

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2005)07-0577-04

人 *akt1* 基因真核表达载体的构建及表达

沈 岚, 李 霞, 张自峰, 苏 金, 刘新平, 药立波

(第四军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710033)

Construction and expression of human *akt1* gene

SHEN Lan, LI Xia, ZHANG Zi-Feng, SU Jin, LIU Xin-Ping, YAO Li-Bo

Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To construct the eukaryotic expressing vectors of human *akt1* and N-terminally myristoylation signal-attached *akt1* (*myr-akt1*) and to test their expression in African green monkey kidney cell line COS-7. **METHODS:** Human *akt1* and *myr-akt1* genes tagged with flag were amplified from human dental pulp mRNA by RT-PCR. The products were cloned into pMD-18T vector, sequenced and then subcloned into eukaryotic expressing vector pcDNA3.1 (+). The recombinant vectors were then transfected into COS-7 cells with lipofectin to detect the expression of *akt1* and *myr-akt1* by Western blot. The cell cycle profiles of COS-7 cells were analyzed by flow cytometry (FCM). **RESULTS:** The eukaryotic expressing vectors containing human *akt1* and *myr-akt1* were successfully constructed and their expression in COS-7 cells could be detected. AKT1 overexpression and activation showed little effect on the cell cycle of COS-7 by cell cycle profiles. **CONCLUSION:** The eukaryotic expressing vectors containing human *akt1* and *myr-akt1* are constructed and they can express *flag-akt1* and *flag-myr-akt1* fused proteins correctly in COS-7 cells. But the regulation of cell cycle by AKT1 has to be further investigated.

【Keywords】 *akt1* gene; myristoylation; RT-PCR; clone; gene expression

【摘要】目的 构建带有 *flag* 标签的人 *akt1* 及豆蔻酰化 *akt1* 真核表达载体,并检测其在真核细胞中的表达及对细胞周期的影响。方法 应用 RT-PCR 的方法从人牙髓组织 mRNA 中

扩增出 *akt1* 和 *myr-akt1* 基因,并在其 C-末端端上含 24 bp 的 *flag* 标签,克隆到 pMD-18T 载体并测序,再亚克隆至真核表达载体 pcDNA3.1(+),酶切鉴定正确后采用脂质体法瞬时转染 COS-7 细胞,Western blot 检测 *flag-akt1* 及 *flag-myr-akt1* 在细胞中的表达,同时流式细胞术观察细胞周期。结果 测序证实从人牙髓组织 mRNA 中扩增出的 *flag-akt1* 及 *flag-myr-akt1* 融合基因的序列以及读框全部正确;脂质体法转染 COS-7 后检测到预期目的蛋白的表达。流式细胞术的结果显示当 AKT1 过度表达以及过度活化时对 COS-7 细胞周期未产生明显影响。结论 成功构建了 C-末端带 *flag* 标签的 *akt1* 及豆蔻酰化 *akt1* 真核表达载体,并使其在真核细胞 COS-7 中表达。但是 AKT1 对细胞周期的调控有待进一步研究。

【关键词】 *akt1* 基因;豆蔻酰化;逆转录聚合酶链反应;克隆;基因表达

【中图分类号】 Q78 **【文献标识码】** A

0 引言

蛋白激酶 B (亦称为 Akt) 是一种蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶,因其与蛋白激酶 A (PKA) 和蛋白激酶 C (PKC) 具有相对高的同源性,而被命名为蛋白激酶 B (PKB)^[1]。蛋白激酶 B 作为磷脂酰肌醇-3 激酶 (PI3-kinase) 的下游分子,它广泛参与细胞各种功能的调节。PKB 对代谢的影响主要表现为促进蛋白质的合成,促进糖原的转运^[2]。同时,PKB 作为细胞抗凋亡途径中的一个关键的调节分子^[3-5],正在成为细胞信号转导领域的一个新的研究热点。在 *akt1* 的氨基末端加入 *src* 家族分子豆蔻酰化信号序列,可以使 *akt1* 向质膜移位,从而持续激活。本实验中我们成功构建了 C-末端融合有 *flag* 标签的 *akt1* 基因的真核表达载体和 N-末端融合有 *src* 家族成员 Lck 氨基末端 12 个氨基酸的 *akt1* 基因的真核表达载体^[6],并采用脂质体法转染培养的 COS-7 细胞,检测其是否正确表达以及对正常上皮细胞细胞周期的影响,为进一步研究 *akt1* 过度表达以及过度活化对肿瘤细胞生长的影响奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌菌株 DH5 α 、真核表达载体 pcDNA3.1(+) 和 COS-7 细胞由本室保存;人牙髓组

收稿日期 2004-11-25; 修回日期 2004-12-04

基金项目 国家自然科学基金(30170465)

通讯作者 药立波. Tel.(029)83374513 Email. bioyao@fmmu.edu.cn

作者简介 沈 岚(1977-),女(汉族),湖北省武汉市人,硕士生(导师 药立波,刘新平). Tel.(029)83374516 Email. lans527@hotmail.com

织标本由第四军医大学口腔医学院提供;dNTP, dATP 和 pyrobest 高保真聚合酶、各种限制性内切酶、T4 连接酶和 pMD-18T, DL2000 DNA Marker 购自 Takara 公司;1640 培养基购自 Gibico 公司;Lipofectamine™ 2000 购自 Invitrogen 公司;抗 *flag* M2 mAb, HRP 标记的羊抗鼠第二抗体分别购自 Sigma 公司和博士德公司;Western blot 所用发光底物为 Pierce 公司产品;用于 PCR 反应的引物由上海基康生物技术有限公司合成;质粒提取和 DNA 回收试剂盒由杭州维特洁公司提供。流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 *akt1* 上游引物序列:5'-GCG-GATCCATGACGACGCTGGCTATTGTG-3', *myr-akt1* 上游引物序列 5'-GCGGATCC ATGGGCTGTGGCTGC AGCTCACACCCGGAAGATGAC ATGAGCGACGCTGGC-TATTGTG-3' 其中 GGATCC 为 *Bam*H I 酶切位点,下划线部分为编码 *src* 家族分子豆蔻酰化信号序列的核苷酸序列^[6];下游引物序列:5'-GCGAATTCTCA CTTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTC GCCACAGCCGT-GCTGCTG-3' 其中 GAATTC 为 *Eco*R I 酶切位点,下划线部分为编码 *flag* 标签的核苷酸序列。

1.2.2 总 RNA 的提取和反转录 牙髓组织在 1 mL Trizol 裂解液中充分匀浆后离心,4℃ 12 000 *g*, 10 min, 上清转移入另一离心管后向裂解液中加入 0.2 mL 氯仿,震荡混匀后 4℃ 离心,12 000 *g*, 15 min, 取上清,加入 0.5 mL 异丙醇,放置 10 min 后离心,4℃ 12 000 *g*, 10 min, 沉淀用 750 mL/L 乙醇洗涤,晾干后溶于 10 μL 去离子水中。取 2 μg 进行反转录,反转录采用 Superscript™ II RNaseH-反转录酶系统。20 μL 体系中加入 Oligo dT (500 g/L) 1 μL, 2 μg 总 RNA ddH₂O 至 10 μL, 70℃ 10 min, 冰上冷却,简短离心,加入 5 × 反应缓冲液 4 μL, 0.1 mol/L DTT 2 μL, 10 mmol/L dNTP 4 μL, 混匀,42℃ 温育 50 min, 70℃ 15 min 终止反应,加入 2 U RNase H 1 μL, 37℃ 20 min。

1.2.3 PCR 方法扩增 *flag-akt1* 和 *flag-myr-akt1* 基因及产物修饰 在 25 μL 反应体系中加入 2.5 μL 10 × 反应缓冲液, 2.0 μL dNTP, 模板(cDNA) 1.0 μL, 上下游引物各 1.0 μL, pyrobest 高保真酶 0.25 μL, 补水至 25 μL。扩增条件为 94℃ 5 min, 94℃ 45 s, 62℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 cycles。扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行分离;回收后溶于 35 μL 去离子水中,并进行加“A”反应:50 μL 反应体系中加入 5 μL 10 × 反应缓冲液, 4 μL dATP, 3 μL MgCl₂, 扩增产物

30 μL *rTaq* 酶 0.5 μL, 补水至 50 μL, 72℃ 40 min。

1.2.4 PCR 产物克隆及序列测定 上述加“A”后的 PCR 产物回收,回收片段克隆到 pMD-18T 载体,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,挑选阳性克隆进行酶切鉴定及测序。

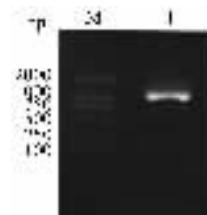
1.2.5 pcDNA3.1(+)-*flag-akt1* 和 pcDNA3.1(+)-*flag-myr-akt1* 真核表达载体的构建 大量提取重组 pMD18-T-*flag-akt1* 和 pMD18-T-*flag-myr-akt1* 载体质粒,用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切出目的片段后,插入 pcDNA3.1(+)-真核表达载体中,构建出重组表达载体 pcDNA3.1(+)-*flag-akt1* 和 pcDNA3.1(+)-*flag-myr-akt1*。

1.2.6 基因转染 COS-7 细胞在含 100 mL/L 新生小牛血清的 1640 培养基中,于 37℃ 50 mL/L CO₂ 饱和湿度下培养,80% 汇合时按照 Lipofectamine™ 2000 说明书进行对照质粒和重组表达载体的转染。

1.2.7 Western blot 检测转染后细胞中转入基因的表达 于转染后 48 h 收细胞并裂解细胞,取 20 μg 处理后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳并电转移至 NC 膜,5 g/L 脱脂奶封闭 1 h,分别与 1:1000 稀释后的一抗孵育 1 h, PBST 洗膜,然后与 1:3000 稀释后的二抗孵育 1 h, PBST 洗膜后加入发光底物孵育 1 min, 暗室中用 X 光片曝光,显影,定影。

2 结果

2.1 人 *akt1* 以及 *myr-akt1* 基因的 PCR 扩增、克隆和序列分析 琼脂糖电泳显示,PCR 产物分别为 1486 和 1552 bp 的特异性片段,分别将此两条带回收,即与 pMD18-T 载体连接。酶切鉴定后,对其中 1 个阳性克隆进行测序,并将序列在 GenBank 中进行分析。结果显示,序列完全正确。Fig 1 和 Fig 2 显示,PCR 技术扩增 *akt1* 以及豆蔻酰化 *akt1* 基因全长。Fig 3 显示重组 pMD18-T 载体酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果。



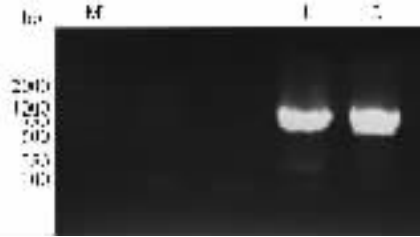
M: Marker; 1: PCR product of *flag-akt1*。

Fig 1 PCR product of *flag-human akt1*

图 1 人 *akt1* 基因 PCR 扩增产物的鉴定

2.2 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-*flag-akt1* 和

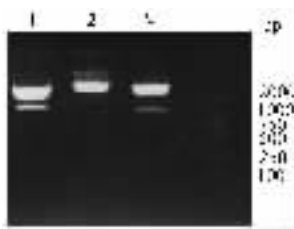
pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1 的构建 利用酶切后产生的载体和片段之间互补的黏性末端进行亚克隆。构建成功的 pMD-18T-flag-akt1 以及 pMD-18T-flag-myr-akt1 用 BamH I 和 EcoR I 酶切出目的片段后,插入 pcDNA3.1(+)真核表达载体中。Fig 4 用 BamH I 和 EcoR I 酶切鉴定成功构建出重组表达载体 pcDNA3.1(+)-flag-akt1 和 pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1。



M : Marker ; 1 , 2 : PCR product of flag-myr-akt1.

Fig 2 PCR product of flag-myr-human akt1

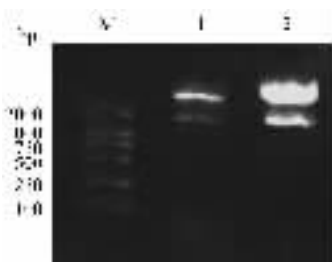
图2 人豆蔻酰化 akt1 基因 PCR 扩增产物的鉴定



1 : pMD-18T-flag-myr-akt1 digested by EcoR I and BamH I ; 2 : pMD-18T-flag-akt1 digested by EcoR I and BamH I ; M : Marker.

Fig 3 Identification of recombinant pMD-18T-flag-akt1 and pMD-18T-flag-myr-akt1

图3 pMD-18T-flag-akt1 与 pMD-18T-flag-myr-akt1 重组质粒的酶切鉴定



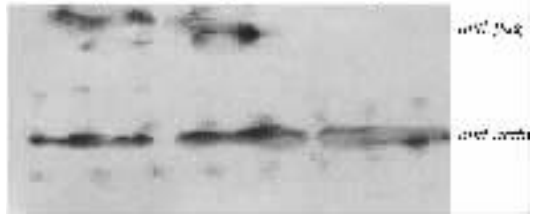
M : Marker ; 1 : pcDNA3.1(+)-flag-akt1 digested by EcoR I and BamH I ; 2 : pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1 digested by EcoR I and BamH I.

Fig 4 Identification of recombinant pcDNA3.1(+)-flag-akt1 and pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1

图4 pcDNA3.1(+)-flag-akt1 与 pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1 重组质粒的酶切鉴定

2.3 真核表达载体 pcDNA3.1(+)-flag-akt1 和 pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1 在 COS-7 细胞中的表达 构建成功的 pcDNA3.1(+)-flag-akt1 , pcDNA

3.1(+)-flag-myr-akt1 和对照载体 pcDNA3.1(+) 分别瞬时转染 COS-7 细胞 转染后 48 h anti-flag 抗体检测到 flag-akt1 在蛋白水平的表达,而对照的空质粒转染后则没有相应的条带(Fig 5)。表明所构建的真核表达载体 pcDNA3.1(+)-flag-akt1 以及 pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1 可以在真核细胞内正确表达。



1 : Expression of flag-myr-akt1 in COS-7 cells transfected with pcDNA3.1(+)-flag-myr-akt1 at 48 h (anti-flag) ; 2 : Expression of flag-akt1 in COS-7 cells transfected with pcDNA3.1(+)-flag-akt1 at 48 h (anti-flag) ; 3 : pcDNA3.1 (Control) .

Fig 5 Expression of flag-akt1 and flag-myr-akt1 in COS-7 cells
图5 flag-akt1 以及 flag-myr-akt1 在 COS-7 细胞中的表达

2.4 akt1 和 myr-akt1 表达产物对 COS-7 细胞的细胞周期的影响 流式细胞仪检测 AKT1 过表达以及过度活化后对 COS-7 细胞周期的影响。结果发现 : AKT1 过表达以及过度活化后对 COS-7 细胞周期的影响较小 ; 与对照组 pcDNA3.1 相比较,两者均出现 G2 期轻度阻滞。其中当 AKT1 过度表达时 S 期出现轻度延长,当 AKT1 持续激活时 G1 期出现轻度延长 (Fig 6)。

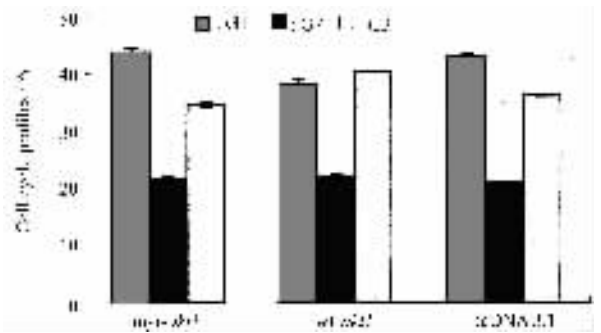


Fig 6 Cell cycle of AKT1 and myr-AKT1 on COS7 cells analyzed by cell cycle profiles

图6 akt1 和 myr-akt1 表达产物对 COS-7 细胞的细胞周期的影响

3 讨论

哺乳动物的基因组中含有 3 种 Akt 的编码基因,其编码蛋白分别称为 Akt α , Akt β , Akt γ 。Akt β 和 Akt γ 与 Akt α 间有 82% 的同源性,不过 Akt γ 的 C 端缺少 23 个氨基酸。它们具有相似的一级结构 :N 端

有一个 PH 结构域, 激酶区位于中部, C 端含有一个调节区. Akt 是 PI-3K (磷脂酰肌醇-3 激酶) 的靶分子^[7], Akt N 端的 PH 结构域是 PI-3K 产物作用的位点, PIP2 和 PIP3 均可以高亲和力结合于 PH 结构域. Akt 的 PH 结构域与 PIP2 或 PIP3 结合的最主要作用是使其向质膜移位, 靠近上游活化它的激酶类分子, 同时 Akt 的调节区也可以与其 PH 结构域结合, 对其功能进行调控^[8].

AKT 是 AKR 小鼠自发胸腺瘤转化癌基因 *v-akt* 的产物, 原癌基因 *c-akt* 也能表达这种蛋白质 c-AKT, 且能使 Ser/Thr 磷酸化, 故称之为丝氨酸/苏氨酸激酶 Akt. *v-akt* 和 *c-akt* 基因都能编码 AKT 蛋白, 但在翻译后修饰以及亚细胞定位等方面均有明显不同. *c-akt* 编码的蛋白由于翻译后修饰过程中不能被豆蔻酰化, 因而不能转位于细胞膜上, 90% 位于细胞质中, 且不具有致癌性. *v-akt* 则相反, 它编码的一种融合蛋白, 翻译后修饰能被豆蔻酰化, 40% 转位于细胞膜, 只有 30% 位于胞质, 另有 30% 位于胞核, 且具有强致癌性^[9].

我们通过 RT-PCR 的方法获得 C-末端融合有 *flag* 标签的人 *akt1* 基因以及 N-末端融合有豆蔻酰化序列的人 *akt1* 基因, 并构建了它们的真核表达载体. 这些表达载体在真核细胞 COS-7 中能够正确表达, 但对 COS-7 细胞的细胞周期影响较小, 出现 G2 期轻度阻滞. 这为我们进一步研究 *akt1* 对肿瘤细胞生长的调节以及肿瘤治疗的新思路奠定了基础.

【参考文献】

[1] Konishi H, Kuroda S, Tanaka M, et al. Molecular cloning and char-

acterization of a new member of the RAC protein kinase family: Association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995; 216(2): 526-534.

- [2] Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): A multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation [J]. *Biochem J*, 1998; 335 (Pt 1): 1-13.
- [3] Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor [J]. *Cell*, 1999; 96(6): 857-868.
- [4] Danilkovitch A, Donley S, Skeel A, et al. Two independent signaling pathways mediate the antiapoptotic action of macrophage-stimulating protein on epithelial cells [J]. *Mol Cell Biol*, 2000; 20(6): 2218-2227.
- [5] Eves EM, Xiong W, Bellacosa A, et al. Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line [J]. *Mol Cell Biol*, 1998; 18(4): 2143-2152.
- [6] Andjelkovi M, Alessi DR, Meier R, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B [J]. *J Biol Chem*, 1997; 272(50): 31515-31524.
- [7] Burhering BM, Coffey PJ. Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction [J]. *Nature*, 1995; 376(6541): 599-602.
- [8] 季少平, 沈 岚, 王吉村, 等. Akt 的 PH 结构域与其调节区的结合 [J]. 第四军医大学学报 2002; 23(22): 2027-2031.
Ji SP, Shen L, Wang JC, et al. Binding of Akt PH domain to its regulatory domain [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2002; 23(22): 2027-2031.
- [9] Bellacosa A, Chan TO, Ahmed NN, et al. Akt activation by growth factors is a multiple-step process: The role of the PH domain [J]. *Oncogene*, 1998; 17(3): 313-325.

编辑 许昌泰

欢迎订阅 欢迎投稿

第四军医大学学报是唯一获得首届国家期刊奖的医科大学学报, 其影响因子和被引频次均位于该领域学报之前列, 首批列入我国“论文统计源期刊”和“核心期刊”, 并被我国各大检索系统和国际著名数据库《CA》、《BA》、《AJ》及《UPD》收录, 是广大医务工作者施展才华的理想园地.

通讯地址: 西安市长乐西路 169 号 邮编: 710033

联系电话: (029) 83374674 83373456; 83373804

http://journal.fmmu.edu.cn

Email: edjfmumu@fmmu.edu.cn