

· 基础研究 ·

Raf全长及氨基端、羧基端真核表达载体的构建和表达

王卓敏 陈军 万海粟 刘红雨 朱文 肖文 范羽 李永文 孙丽亚 周清华

【摘要】 背景与目的 Raf是Ras-Raf-MEK-ERK信号转导通路中的关键分子,在多种人类肿瘤中存在高度活化,然而其生物学功能和详细调节机理目前尚未完全明了。本研究旨在构建人Raf基因全长(Raf-1),氨基端(N-Raf)及羧基端(C-Raf)真核表达载体,并观察其在293T细胞中的表达情况。方法 通过PCR方法扩增Raf-1, N-Raf和C-Raf目的片段,利用基因重组技术构建pCMV-Tag2b-Raf-1, pCMV-Tag2b-N-Raf和pCMV-Tag2b-C-Raf真核表达载体,并进行酶切和测序鉴定。鉴定正确的克隆瞬时转染293T细胞,Western blot检测目的蛋白的表达。结果 酶切和测序结果均证实pCMV-Tag2b-Raf-1, pCMV-Tag2b-N-Raf和pCMV-Tag2b-C-Raf真核表达载体的序列和编码框均正确无误,转染后的293T细胞经Western Blot检测可正确表达目的蛋白。结论 本研究成功构建了pCMV-Tag2b-Raf-1, pCMV-Tag2b-N-Raf和pCMV-Tag2b-C-Raf真核表达载体并可在293T细胞中表达,为今后进一步研究Raf基因的生物学机理奠定了基础。

【关键词】 Raf 基因重组 真核表达

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2008.03.001

Construction and expression of eukaryotic expression vectors of full-length, amino-terminus and carboxyl-terminus Raf gene

WANG Zhuomin^{*△}, CHEN Jun[△], WAN Haisu[△], LIU Hongyu[△], ZHU Wen[△], XIAO Wen[△],
FAN Yu^{*△}, LI Yongwen[△], SUN Liya[△], ZHOU Qinghua^{*△}

^{*}The Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology in Sichuan Province, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; [△]Tianjin Key Laboratory of Lung Cancer Metastasis and Tumor Microenvironment, Tianjin Lung Cancer Institute, Tianjin Medical University General Hospital, Anshan Road No.154, Heping District, Tianjin 300052, China

Corresponding author: ZHOU Qinghua, E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn

【Abstract】 Background and objective Raf is a key molecule in the Ras-Raf-MEK-ERK signal transduction pathway and is highly activated in different human carcinomas. However, its biological functions and regulation mechanisms are still unclear. The aims of this study were to construct eukaryotic expression vectors with Raf full encoding region, truncated amino-terminus and carboxyl-terminus, respectively. **Methods** Eukaryotic expression vectors of pCMV-Tag2b-Raf-1, pCMV-Tag2b-N-Raf and pCMV-Tag2b-C-Raf were constructed by gene recombination technique and confirmed by restriction enzyme analysis and DNA sequencing. Furthermore, the expression of these fusion proteins was detected by western blot in transiently transfected 293T cells. **Results** The sequences and open reading frames of these three vectors were completely consistent with experimental design. All target proteins can be detected in 293T cells. **Conclusion** Eukaryotic expression vectors of pCMV-Tag2b-Raf-1, pCMV-Tag2b-N-Raf and pCMV-Tag2b-C-Raf were successfully constructed and can be expressed in 293T cells.

【Key words】 Raf Gene recombination Eukaryotic expression

This work was supported by grants from Key Project of National Natural Science Foundation of China (No.30430300 to ZHOU Qinghua), Major Project of Tianjin Sci-Tech Support Programme (No. 06YFSZSF 05300 to ZHOU Qinghua) and National Natural Science Foundation of China (No.30500221 to CHEN Jun; No.30500496 to LIU Hongyu)

本研究受国家自然科学基金重点项目(No.30430300),天津市科技职称计划重点项目(No. 06YFSZSF 05300)和国家自然科学基金(No.30500221; No.30500496)资助

作者单位: 610041 成都, 四川大学华西医院肺癌分子生物学重点实验室(王卓敏, 范羽, 周清华); 300052 天津, 天津市肺癌转移与肿瘤微环境重点实验室, 天津市肺癌研究所, 天津医科大学总医院(陈军 万海粟 刘红雨 朱文 肖文 范羽 李永文 孙丽亚 周清华)(通讯作者: 周清华, E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn)

Ras-Raf-MEK-ERK通路是调节细胞增生、分化和凋亡等生物过程的一条重要信号转导通路,其在多种人类肿瘤中被高度活化,与肿瘤的发生密切相关。Raf作为这一信号转导通路中的关键分子,对于该通路的信号转导具有决定性作用。然而,Raf激酶的生物学功能和调节机制极其复杂,其详细调节机制目前尚未完全阐明。究其原因可能与Raf蛋白的特殊生物学结构有关,因此本研究应用基因重组技术构建了人Raf激酶的全长(Raf-1),氨基端(N-Raf)及羧基端(C-Raf)真核表达载体,应用基因转染技术构建转基因的293T细胞株,并应用Western Blot技术检测转染基因的表达状态,为深入研究Raf激酶的功能和调节提供了理论基础和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 pCMV-Tag2b载体、XL1-blue菌株均购自美国stratagene公司并由本实验室保存;含有Raf-1基因的重组pcDNA3-Raf-1-Flag质粒由美国密歇根大学Kun-Liang Guan教授馈赠;293T细胞购自北京协和医科大学基础医学院细胞库。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶BamH I、EcoR I, T4 DNA连接酶,重组Taq DNA聚合酶,pMD18-T Simple Vector均购自宝生物工程(大连)有限公司;pfu高保真DNA聚合酶、DNA纯化回收试剂盒购自北京天根生化科技有限公司;硅胶膜型TM质粒DNA小量提取试剂盒购自北京赛百盛基因技术有限公司;LipofectamineTM2000转染试剂购自美国Invitrogen公司;兔抗Flag抗体、ECL发光试剂盒购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 pCMV-Tag2b-Raf-1, pCMV-Tag2b-N-Raf和pCMV-Tag2b-C-Raf重组质粒通过PCR方法产生。根据pcDNA3-Raf-1-Flag载体测序结果及pCMV-Tag2b载体序列设计引物扩增目的基因,由于Raf-1 cDNA本身不存在BamH I及EcoR I酶切位点,故在三对引物设计时均在上游引入BamH I酶切位点,而在下游引入EcoR I酶切位点,扩增产物经末尾加“A”处理后进行TA克隆,经鉴定正确的克隆进行BamH I和EcoR I酶切,然后再插入pCMV-Tag2b载体的BamH I和EcoR I酶切位点。引物设计如下:Raf-1上游:5'-CGGGA TCCATGGAGCACATACAGGGAGCTTGG-3',下游:5'-CGGAATTCTCAGTCCTTGTAGTCGAAGACAGGCA

GC-3';N-Raf上游:5'-CGGGATCCATGGAGCAC ATACAGGGAGCTTGG-3',下游:5'-CGGAATTCTC ACCAGCCTGTTGGGCTCAGATTG-3';C-Raf上游:5'-CGGGATCCTCACAGCCGAAAACCCCGT-3',下游:5'-CGGAATTCTCAGTCCTTGTAGTCGAAGACAG GCAGC-3'。

1.2.2 PCR反应条件 反应体系采取试剂盒说明书建议用量。PCR扩增条件如下:Raf-1:95℃预变性3min;94℃变性30s,62℃退火40s,72℃延伸120s,共34个循环;72℃最后延伸5min。N-Raf与C-Raf:95℃预变性3min;94℃变性30s,62℃退火45s,72℃延伸60s,共34个循环;72℃最后延伸5min。4℃终止反应,1%琼脂糖凝胶电泳检测,然后纯化、回收目的片段。

1.2.3 TA克隆及定向克隆 PCR产物纯化、回收并经末尾加A处理后定向克隆至pMD18-T Simple Vector中,阳性克隆采用BamH I及EcoR I双酶切鉴定,酶切鉴定正确的克隆送上海生物工程技术有限公司测序;酶切及测序均正确无误后再亚克隆至真核表达载体pCMV-Tag2b中。

1.2.4 细胞培养及瞬时转染 293T细胞用含10%小牛血清的DMEM培养基在37℃、5%CO₂、饱和湿度的孵箱中培养。瞬时转染采用Invitrogen公司的LipofectamineTM2000转染试剂,具体过程如下:转染前一天分别接种2×10⁶细胞于25cm²培养瓶中,细胞密度达80%时即可进行转染;对于每瓶细胞,使用500μL无血清、无抗生素的DMEM培养基稀释6.0μg质粒DNA,使用500μL无血清DMEM培养基稀释20μL Lipofectamine 2000试剂;混合稀释的DNA和稀释的Lipofectamine 2000,在室温孵育20min以形成混合物,加入培养瓶中轻轻混匀,37℃培养(4-6)h;更换新鲜完全培养基继续培养,转染后(24-48)h收集细胞进行裂解提取细胞总蛋白。

1.2.5 Western blot检测 分别收集pCMV-Tag2b-Raf-1、pCMV-Tag2b-N-Raf、pCMV-Tag2b-C-Raf、pCMV-Tag2b及未转染组细胞裂解产物的上清,各取10μg总蛋白进行SDS-PAGE电泳(浓缩胶5%,分离胶10%)。电泳结束后湿转法电转至硝酸纤维素膜(100V,60min),含5%脱脂奶粉的TBST封闭液室温封闭1h;Flag抗体以1:1000稀释于一抗稀释液(1×TBST,5%BSA)中,室温孵育(1-2)h;偶联HRP的山羊抗兔二抗以1:4000的比例,偶联HRP的抗生物素二抗以1:1000

的比例稀释，室温孵育1 h，最后采用化学发光法进行检测。

2 结果

2.1 Raf-1, N- Raf和C- Raf的PCR扩增结果 (图1) PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳显示Raf-1约1975 bp大小, N- Raf约934 bp, C- Raf约1063 bp大小, 均同预期结果相符。

2.2 pCMV-Tag2b-Raf-1, pCMV-Tag2b-N-Raf和pCMV-Tag2b-C-Raf重组质粒的双酶切鉴定及测序 采用BamH I和EcoR I 进行双酶切, 预计pCMV-Tag2b-Raf-1质粒可产生4306 bp和1965 bp两个片段, pCMV-Tag2b-N-Raf质

粒可产生4306 bp和924 bp两个片段, pCMV-Tag2b-C-Raf可产生4306 bp和1053 bp两个片段; 电泳结果显示, 三个质粒的酶切片断均与预期结果相符 (图2)。测序结果也证实插入序列完全正确, 编码框亦准确无误。

2.3 Raf表达产物的Western blot检测结果 (图3) 转染了pCMV-Tag2b-Raf-1、pCMV-Tag2b-N-Raf及pCMV-Tag2b-C-Raf质粒的293T细胞表达出了带有Flag标签的融合蛋白, 即Flag-Raf-1, Flag-N-Raf和Flag-C-Raf, 大小分别为75 KDa, 35.5 KDa及41 KDa, 空载体组则未见目的条带表达。

3 讨论

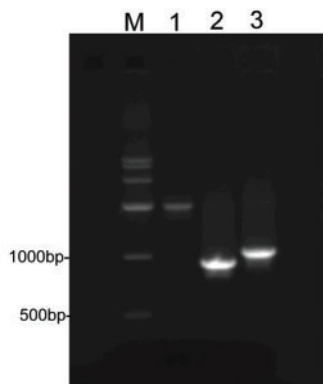


图1 Raf-1, N-Raf和C-Raf的PCR扩增结果

Fig 1 PCR amplification of Raf-1, N- Raf and C- Raf
M: Marker; 1: PCR product of Raf-1; 2: PCR product of N-Raf;
3: PCR product of C-Raf

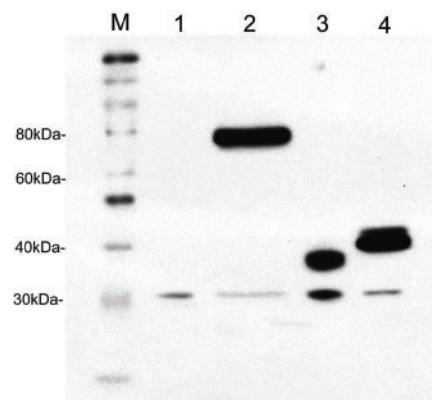


图3 Flag- Raf-1, Flag-N-Raf和Flag-C-Raf的Western blot检测

Fig 3 Analysis of Flag-Raf-1, Flag-N-Raf and Flag-C-Raf by Western blot

M: Marker; 1: pCMV-Tag2b; 2: pCMV-Tag2b-Raf-1; 3: pCMV-Tag2b-N-Raf; 4: pCMV-Tag2b-C-Raf

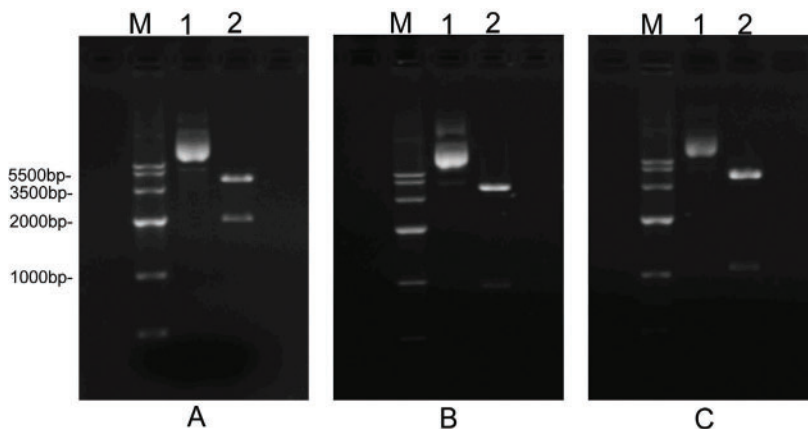


图2 重组质粒的双酶切鉴定

Fig 2 Restriction enzyme digestion analysis of the recombinant vectors

A: pCMV-Tag2b- Raf-1; B: pCMV-Tag2b-N-Raf; C: pCMV-Tag2b-C-Raf M: Marker; 1: Control vector; 2: Vector digested with BamH I and EcoR I

Raf为Ras-Raf-MEK-ERK信号转导通路中的关键分子。v-raf转化基因最早在鼠肉瘤病毒3611-MSV中发现^[1], Raf-1原癌基因即是v-raf的细胞内同源物,具有丝/苏氨酸激酶活性。在高等生物中Raf激酶家族由三个成员组成,分别为A-Raf, B-Raf和C-Raf(或Raf-1)^[2],三者结构类似,均由三个保守结构域(CR)组成。CR1包含两个Ras结合位点-Ras结合结构域(RBD)和半胱氨酸富集结构域(CRD); CR2富含丝/苏氨酸残基; CR3为激酶结构域,是行使功能的主要部分,在三种异构体间存在显著差异,但在不同物种之间却存在进化上的高度保守性。

人类Raf-1基因定位于染色体3p25,广泛表达于各种组织^[3],其表达产物Raf-1激酶由648个氨基酸组成^[4],分子量约74 kD,是到目前为止研究最广泛、最深入的异构体,大部分有关Raf在信号转导过程中作用的突破性研究也是围绕Raf-1进行的。Raf激酶的调节是一个及其复杂的过程,涉及到与其他信号转导通路的整合,分子间相互作用、多位点的磷酸化和脱磷酸化、蛋白-蛋白相互作用以及与脂类的直接作用等多个方面^[5-8]。目前的研究已经发现活化的Ras与CR1保守区结合使Raf从胞浆转位至胞膜,并在活化位点的磷酸化和抑制性位点的去磷酸化共同作用下完全活化。一旦被激活,Raf即可通过磷酸化活化下游一系列的蛋白,从而调节细胞生长和分裂,并为多种细胞的增殖和恶性转化所需^[9]。然而目前有研究表明Raf-1具有MEK和ERK非依赖性功能,可能在细胞凋亡的调节方面发挥重要作用^[10,11]。另有研究显示Raf-1的MEK激酶活性并非其调节细胞存活及运动所必需^[12]。总之,Raf的功能及其调节尚未完全明了,究其原因可能与Raf蛋白的特殊生物学结构有关。

为了进一步研究Raf的生物学活性及其调节,本实验室构建了Raf-1全长以及Raf-1氨基端和羧基端,拟分别研究其功能。全长Raf-1由648个氨基酸组成;Raf-1氨基端(N末端)调节结构域由CR1和CR2两个保守序列组成^[13,14],其中CR1由62-194位氨基酸组成,包含一个Ras结合结构域(RBD,51-131位氨基酸)^[15,16]和一个半胱氨酸富集结构域(CRD,139-184位氨基酸)^[17]。CR2是一段由14个氨基酸(255-268)组成的序列,富含丝/苏氨酸残基^[18]。而CR3(330-627位氨基酸)保守区则构成了Raf-1羧基端(C末端)的激酶结构域^[19],包含四个磷酸化活化位点(Serines338,339和Tyrosines340,341)。本实验室构建的氨基端Raf(N-Raf)包括了Raf的1-305位氨基酸,即包含了CR1和CR2结构域,羧基端

Raf(C-Raf)包括了Raf的306-648位氨基酸,即包含了CR3结构域,与国际上Raf-1氨基端和羧基端的分界基本一致^[20]。

在构建重组载体之前,对Raf的限制性酶切位点进行了软件分析。通过Primer Premier5.0软件发现pCMV-Tag2b载体的多克隆位点EcoR I及BamH I在Raf的cDNA上并不存在,因此在构建pCMV-Tag2b-Raf-1;pCMV-Tag2b-N-Raf及pCMV-Tag2b-C-Raf时,引物设计均在上游添加BamH I限制性酶切位点,在下游添加终止密码子及EcoR I限制性酶切位点,经TA克隆后再亚克隆至真核表达载体中,最终成功构建了pCMV-Tag2b-Raf-1,pCMV-Tag2b-N-Raf和pCMV-Tag2b-C-Raf重组载体。

Flag蛋白表达系统是被公认的用于表达、纯化以及检测融合蛋白的表达系统。pCMV-Tag2b载体全长4324 bp,在其氨基端含有Flag标签,是一个与重组蛋白相融合的由8个亲水氨基酸(Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys)组成的多肽片段,定位在融合蛋白的表面,因此不会干扰目标蛋白的功能,反而有利于一些未知蛋白和未商品化抗体蛋白的检测。因此本实验室构建的三个重组蛋白均采用Flag抗体进行检测。

综上所述,本研究通过应用Flag蛋白表达系统构建了人Raf基因全长(Raf-1),氨基端(N-Raf)及羧基端(C-Raf)真核表达载体,为今后进一步研究Raf的生物学功能及其调节奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Rapp UR, Goldsborough MD, Mark GE, et al. Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. Proc Natl Acad Sci USA, 1983, 80(14): 4218-4222.
- 2 Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, et al. The ins and outs of Raf kinases. Trends Biochem Sci, 1994, 19(11): 474-480.
- 3 Storm SM, Cleveland JL, Rapp UR. Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissue. Oncogene, 1990, 5(3): 345-351.
- 4 Morrison DK. The Raf-1 kinase as a transducer of mitogenic signals. Cancer Cells, 1990, 2(12): 377-382.
- 5 Morrison DK, Cutler RE. The complexity of Raf-1 regulation. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(2): 174-179.
- 6 Chong H, Lee J, Guan KL. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. EMBO J, 2001, 20(14): 3716-3727.
- 7 Cutler RE Jr, Stephens RM, Saracino MR, et al. Autoregulation of the

- Raf-1 serine/threonine kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(16): 9214-9219.
- 8 Chong H, Vikis HG, Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. Cell Signal, 2003, 15(5): 469.
- 9 Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signaling cascades. Nature, 2001, 410(6824): 37-40.
- 10 Hindley A, Kolch W. Extracellular signal regulated kinase(ERK)/mitogen activated protein kinase (MAPK)-independent functions of Raf kinase. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 8): 1575-1581.
- 11 Huser M, Luckett J, Chiloeches A, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. EMBO J, 2001, 20(8): 1940-1951.
- 12 Baccarini M. Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". FEBS Lett, 2005, 579(15): 3271-3277.
- 13 Daum G, Eisenmann-Tappe I, Fries HW, et al. The ins and outs of Raf kinases. Trends Biochem Sci, 1994, 19(11): 474-480.
- 14 Morrison DK. The Raf-1 kinase as a transducer of mitogenic signals. Cancer Cells, 1990, 2(12): 377-382.
- 15 Scheffler JE, Waugh DS, Bekesi E, et al. Characterization of a 78-residue fragment of c-Raf-1 that comprises a minimal binding domain for the interaction with Ras-GTP. J Biol Chem, 1994, 269(35): 22340-22346.
- 16 Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. Cell, 1993, 74(1): 205-214.
- 17 Mott HR, Carpenter JW, Zhong S, et al. The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipids binding site. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(16): 8312-8317.
- 18 Cutler RE Jr, Stephens RM, Saracino MR, et al. Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(16): 9214-9219.
- 19 Tran NH, Frost JA. Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. J Biol Chem, 2003, 278(13): 11221-11226.
- 20 Chong H, Guan KL. Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction. J Biol Chem, 2003, 278(38): 36269-36276.

(收稿: 2008-03-26 修回: 2007-04-09)

(本文编辑 南娟)

· 启事 ·

天津市肺癌研究所博士后招收启事

天津市肺癌研究所成立于2006年10月, 其天津市肺癌转移与肿瘤微环境实验室现为天津市重点实验室。此外还包括: 肺癌分子研究室, 肺癌蛋白质组学研究室, 肺癌生物芯片研究室, 肺癌转移分子机理与逆转研究室, 肺癌生物治疗研究室, 肺癌细胞信号研究室, 肺癌遗传学与遗传资源研究室; 面积1150余平米, 拥有精诺真体内可见光成像系统, 激光显微切割, 细胞遗传工作站, 实时荧光定量PCR仪。多功能PCR仪, 多维液相色谱, 流式细胞仪FACS Aria, 高通量细胞因子检测系统, SNP筛查及基因芯片系统, 全自动核酸蛋白提取纯化工作站, 中高压蛋白质分离系统, 2D荧光差异凝胶电泳系统, 全自动斑点切取系统, 培养细胞存活率/浓度分析系统, 细胞活力分析仪, 三气水套培养箱, CO₂水套式培养箱, 真空冷冻干燥系统, 全波长荧光酶标仪, 凝胶成像系统等多种先进实验设备。

研究所人才梯队合理, 以周清华教授为学术带头人共有研究人员23人, 其中正高级职称5人, 均从国外引进, 副高级职称3人; 其余人员均有硕士研究生以上学历。作为天津医科大学重点科研教学基地, 担任研究生、留学生、本科生等各项科研教学工作。目前在读博士生23人, 硕士生16人。

主要研究方向

1. 肺癌侵袭转移的分子机理与信号调节
2. 肺癌侵袭转移与肿瘤微环境
3. 肺癌侵袭转移与分子标志物筛选
4. 肺癌“药物基因组学”
5. 抗肿瘤分子靶向药物的筛选和鉴定
6. 肺癌筛查和早诊分子标记物筛选鉴定
7. 局部晚期肺癌的多学科综合治疗

目前, 主持“十一五”国家攻关课题两项, “863”和国际合作重大项目各1项, 国家自然科学基金重点项目1项, 国家自然科学基金5项, 天津市重点和重大项目各1项, 共计科研经费3000余万元。

博士后招收对象

凡是新近取得博士学位、品学兼优、身体健康者, 均可申请入站从事博士后的研究工作。

招聘要求:

- 1、具有独立开展科研工作的能力和指导学生的能力, 分子生物学、细胞生物学专业博士或有相关工作背景的医学专业博士。
- 2、具有良好团队合作精神和较强的人际沟通能力。

联系人: 周清华 教授

地址: 天津市和平区鞍山道154号门诊楼7楼

邮编: 300052

电话: 022-60363013

E-mail: zhouqh1016@yahoo.com.cn

网站: <http://tjlungcancer.blog.sohu.com> <http://www.tjmugh.com.cn/>