

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2006.02.05

研究生专栏

小鼠 Ras 激酶抑制剂(KSR) 基因氨基端 和羧基端真核表达载体的构建 及其在 293T 细胞中的表达

杨雪琴 周清华 朱文 朱大兴 马力 李昌林 王艳萍 陈小禾 马家宝

=摘要> **背景与目的** 已有的实验证据表明, Ras 激酶抑制剂(kinase suppressor of Ras, KSR) 的功能主要是作为一个支架蛋白组装 MAPK 及其上游调控子形成多蛋白的复合体。但 KSR 是否存在激酶活性, 一直是争论的焦点。本研究的目的是构建小鼠 KSR 基因氨基端(N2KSR) 和羧基端(C2KSR) 的真核表达载体, 并观察其在 293T 细胞中的表达。**方法** 通过 PCR 方法扩增 N2KSR 和 C2KSR 目的片段, 利用基因重组技术构建 pCMV2Tag2b2N2KSR 和 pCMV2Tag2b2C2KSR 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, 通过 Western blot 方法检测目的蛋白的表达。**结果** 通过酶切和测序鉴定, pCMV2Tag2b2N2KSR 和 pCMV2Tag2b2C2KSR 真核表达载体序列正确, 编码框正确。转染后的 293T 细胞经 Western blot 检测, 能够表达目的蛋白。**结论** 成功构建了 pCMV2Tag2b2N2KSR 和 pCMV2Tag2b2C2KSR 真核表达载体并可在 293T 细胞中表达, 为以后的研究奠定了基础。

=关键词> KSR 真核表达 基因重组

=中图分类号> Q784

Construction of eukaryotic expression vectors of carboxyl terminus and amino terminus of kinase suppressor of Ras (KSR) and their expression in 293T cell line YANG Xueqin, ZHOU Qinghua, ZHOU Wen, ZHOU Daxing, MA Li, LI Changlin, WANG Yanping, CHEN Xiaohe, MA Jiabao. Key Laboratory of Lung Cancer Molecular Biology of Sichuan Province, Cancer Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, P. R. China

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

=Abstract> **Background and objective** The present experimental data have showed that the function of kinase suppressor of Ras (KSR) is mainly as a scaffold protein that coordinates the assembly of a multiprotein complex containing MAPK and its upstream regulators. But whether KSR has kinase activity is still the point of argument until now. The aim of this study is to construct eukaryotic expression vectors of carboxyl terminus and amino terminus of KSR and to detect their expression in 293T cell line. **Methods** N2KSR and C2KSR were amplified by PCR. The eukaryotic expression vectors of pCMV2Tag2b2N2KSR and pCMV2Tag2b2C2KSR were constructed by gene recombination technique and the recombinant plasmids were verified by restriction enzyme analysis and sequencing. Then positive clones were transfected into 293T cell line. Expression of target proteins was analyzed by Western blot. **Results** The sequences and open read frames of the two vectors were both completely concordant with experiment design. The target proteins could be observed in transfected 293T cells by Western blot. **Conclusion** Eukaryotic expression vectors of pCMV2Tag2b2N2KSR and pCMV2Tag2b2C2KSR are successfully constructed, and they can be expressed in 293T cells. It provides an experimental base for further research work.

=Key words> KSR Eukaryotic expression Gene recombinant

This work was supported by grants from Key Project of National Natural Science Foundation of China (to ZHOU Qinghua) (No. 30430300), National Natural Science Foundation of China (to ZHOU Qinghua) (No. 30070333) and the Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (to ZHOU Qinghua) (No. 20040610060).

Ras 激酶抑制剂(kinase suppressor of Ras, KSR) 是 90 年代中期发现的一个新基因, 由于其与 Raf 的结构和基因特征相似而被命名。该基因最先发现于果蝇及线虫中, 其后在人和小鼠中亦发现了其同源序列。目前许多生物化学和基因结构的研究都认为 KSR 以支架蛋白和可能的激酶方式加速了 Ras 依赖性的 Ras 通路激酶 Raf、MEK 以及 MAPK 信号传导通路的信号传导。为了深入研究 KSR 的生物学活性, 本研究应用基因重组技术构建小鼠 KSR 的氨基端(N2KSR)和羧基端(C2KSR)的真核表达载体, 应用基因转染技术构建转基因细胞株, 应用 Western blot 检测 KSR 的表达, 为进一步研究 KSR 的功能提供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 XL12blue 菌由本实验室保存, pCMV2Tag2b 载体购自 Stratagene 公司, 含有 KSR 基因的重组 pCMV2Tag2b2KSR 质粒由美国范德堡大学 D. Brent. Polk 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 Not I、EcoR I、Bgl I、BamH I、Pyrobest 高保真 DNA 聚合酶, DNA 连接试剂盒均购自 TAKARA 公司。PCR 产物纯化试剂盒及质粒提取试剂盒购自北京赛百盛公司。PolyFect Transfection Reagent 购自 Qiagen 公司。Flag 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 根据 pCMV2Tag2b2KSR 质粒测序结果及 pCMV2Tag2b 载体序列设计引物, 由于 KSR cDNA 本身在 955 bp 处存在 BamH I 酶切位点, 而 BamH I 与 Bgl I 为同尾酶, 故在 N2KSR 引物设计时一端引入 Bgl I 酶切位点, 另一端为 EcoR I 酶切位点, 扩增产物经 Bgl I 和 EcoR I 酶切后插入载体的 BamH I 和 EcoR I 酶切位点, 而 C2KSR 的扩增则直接在引物两边加入 BamH I 和 EcoR I 酶切位点, 经酶切后插入载体 BamH I 和 EcoR I 酶切位点。具体构建过程见图 1, 设计引物如下: N2KSR 上游: 5c2GGAAGATCTATGGATAGAGCGGCGTTGCC23c, 下游: 5c2CGGAATTCTTACCAGGGCCGCGGGA2GCT23c; C2KSR 上游: 5c2CGGGATCCTCTCGAA2GGCCAGCCAG23c, 下游: 5c2CGGAATTCGACGGCTGGCTACATC23c。

1.2.2 PCR 反应条件 反应体系采取试剂盒说明书

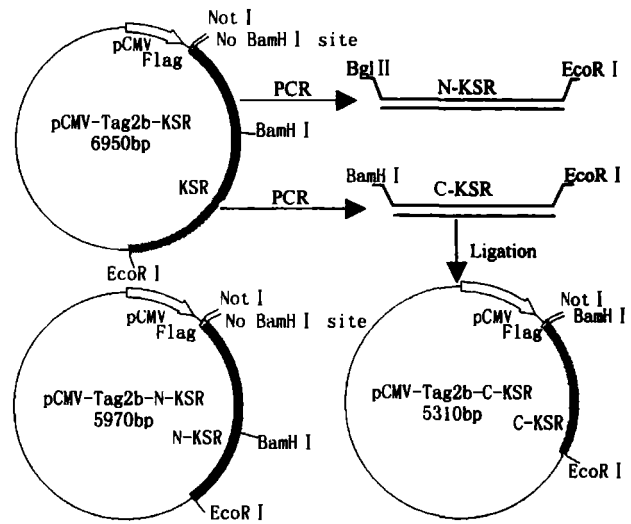


图 1 pCMV2Tag2bN2KSR 和 pCMV2Tag2bC2KSR 真核表达载体构建示意图

Fig 1 Construction of eukaryotic expression vectors of pCMV2Tag2bN2KSR and pCMV2Tag2bC2KSR

建议用量, 由于 N2KSR 本身以及下游引物的 GC 含量偏高(分别为 61.8% 和 66.7%), 故在 N2KSR 的 PCR 扩增反应体系中加入 5% 的甘油和 DMSO。PCR 扩增条件分别为: N2KSR: 95 e 预变性 3 min; 94 e 变性 30 s, 62 e 退火 40 s, 72 e 延伸 90 s, 共 30 个循环; 最后 72 e 延伸 8 min。C2KSR: 95 e 预变性 3 min; 94 e 变性 30 s, 60 e 退火 35 s, 72 e 延伸 90 s, 共 30 个循环; 最后 72 e 延伸 8 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 最后回收、纯化目的片段。

1.2.3 pCMV2Tag2bN2KSR 和 pCMV2Tag2bC2KSR 重组质粒的鉴定与测序 由于 pCMV2Tag2bN2KSR 重组质粒在其氨基端构建时引入了 BamH I 和 Bgl I 这一对同尾酶, 因此构建后该位点不再为 BamH I 和 Bgl I 所酶切, 故 pCMV2Tag2bN2KSR 重组质粒鉴定选用了 Not I 与 EcoR I 双酶切鉴定。pCMV2Tag2bC2KSR 则仍采用 BamH I 和 EcoR I 酶切鉴定。酶切鉴定正确的克隆送大连宝生物公司测序。

1.2.4 细胞培养及瞬时转染 293T 细胞用含有 10% 小牛血清的 DMEM 培养基在 37 e、5% CO₂ 的孵箱中培养。瞬时转染采用 Qiagen 公司的 PolyFect Transfection Reagent 试剂, 具体过程如下: 转染前一天按 1.2 @10⁶ 细胞数接种于 25 cm² 培养瓶中, 当细胞密度达到 60%~80% 时即可进行转染, 将 4 Lg 质粒稀释于 150 LL 无血清、无抗生素的 DMEM 培养基中, 加入 40 LL 转染试剂, 反应 10 min 后加入 1 mL 完全培养基并立即转入已更换培养基的培养瓶中, 继续培

养, 24 h 后换液一次, 48 h 后收集细胞, 裂解取上清以进行下一步鉴定。

1.2.5 Western blot 检测 分别收集 pCMV2Tag2b2N2KSR、pCMV2Tag2b2C2KSR、pCMV2Tag2b 以及未转染组细胞的上清, 取 20 Lg 总蛋白进行电泳(5%的浓缩胶以及 8% 的分离胶), 并转至 PVDF 膜(100 V, 70 min), 封闭液封闭 1 h(含 15% 脱脂奶粉的 TBS 液), Flag 抗体按 1 B 1000 稀释(稀释液为含 0.05% Tween 的 TBS 液), 4e 孵育过夜, 二抗山羊抗兔 IgG 按 1 B 4000 稀释, 生物素化二抗按 1 B 500 稀释(稀释液同前), 室温孵育 1 h, 最后用 ECL 化学发光法显色。

2 结果

2.1 N2KSR 和 C2KSR PCR 扩增结果(图 2) PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳显示 N2KSR 约 1633 bp 大小, C2KSR 约 1023 bp 大小, 片段大小同预期结果相符。

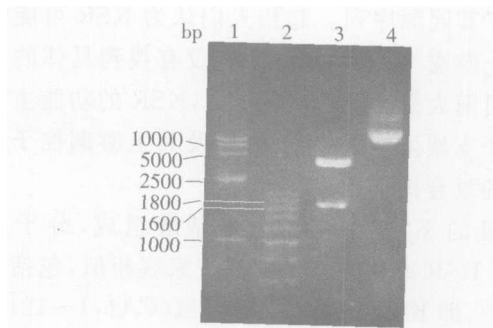


图 3 pCMV2Tag2b2N2KSR 双酶切鉴定结果

Fig 3 Restriction enzyme digestion analysis of pCMV2Tag2b2N2KSR 1, 2: Marker; 3: Recombinant plasmid digested with NotI and EcoRI; 4: Plasmid control

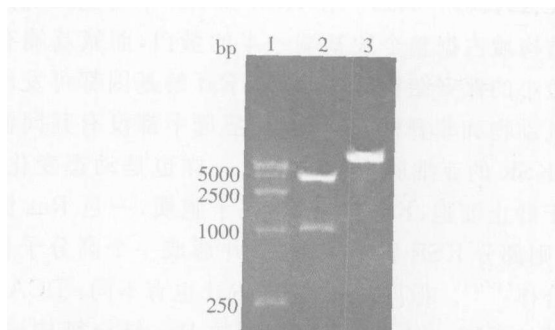


图 4 pCMV2Tag2b2C2KSR 双酶切鉴定结果

Fig 4 Restriction enzyme digestion analysis of pCMV2Tag2b2C2KSR 1: Marker; 2: Recombinant plasmid digested with BamHI and EcoRI; 3: Plasmid control

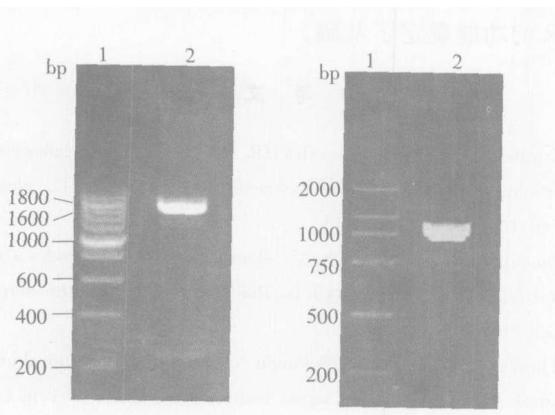


图 2 N2KSR 和 C2KSR 的 PCR 产物电泳图

Fig 2 PCR amplification of N2KSR (left) and C2KSR (right) 1: Marker; 2: PCR product

2.2 pCMV2Tag2b2N2KSR 和 pCMV2Tag2b2C2KSR 重组质粒双酶切鉴定及测序 pCMV2Tag2b2N2KSR 质粒预计大小为 1656 bp。pCMV2Tag2b2C2KSR 质粒预计大小为 1023 bp。电泳结果与预期片段大小相符(图 3,4)。双酶切鉴定阳性克隆送大连宝生物公司测序, 结果插入序列完全正确, 编码框亦正确无误。

2.3 KSR 表达产物的 Western blot 检测结果(图 5)

转染了 pCMV2Tag2b2N2KSR 和 pCMV2Tag2b2C2KSR 质粒的 293T 细胞表达出融合了 Flag 标签的融合蛋白, 即 Flag2N2KSR 和 Flag2C2KSR, 分别为 75 ku 和 50 ku 大小, 空载体组和未转染组则未见目的条带表达。

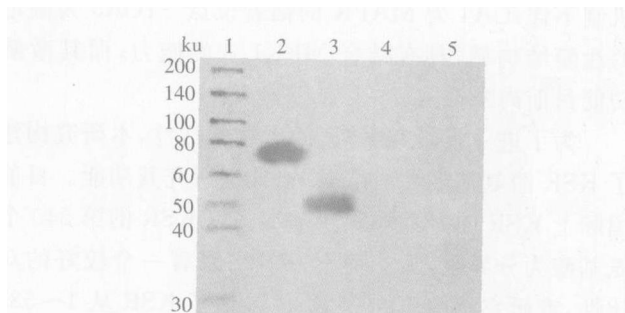


图 5 Flag2N2KSR 和 Flag2C2KSR 的 Western blot 检测

Fig 5 Analysis of Flag2N2KSR and Flag2C2KSR by Western blot 1: Marker; 2: pCMV2Tag2b2N2KSR group; 3: pCMV2Tag2b2C2KSR group; 4: pCMV2Tag2b group; 5: Untransfected group

3 讨论

Ras 信号级联在细胞生长和发育的信号传导中具有重要作用。Ras 通路的一个主要途径就是 MAPK 通路, 包括胞质激酶 Raf、MEK 和 MAPK 等。上世纪 90 年代中期 Kornfeld、Sundaram 以及 Therrien 等^[1-3]于三个不同实验室在果蝇及线虫中发现了一个新的基因, 由于其与 Raf 的结构和基因特征相似而被命名为 Ras 激酶抑制剂, 即 KSR, 并先后在人和小鼠

中发现了其同源序列。起初人们认为 KSR 可能作用于 Raf 上游或与其平行,但一直没有找到具体的分子机制。目前大量的实验证据表明,KSR 的功能主要是作为一个支架蛋白组装 MAPK 及其上游调控子形成多蛋白的复合体。

小鼠的 KSR 由 873 个氨基酸组成,分子量为 115 ku。KSR 家族的结构与 Raf 家族相似,包括五个结构域^[3]:即 KSR 独特的保守区域(CA1, 1~ 121),由 40 个氨基酸组成;富含脯氨酸区域(CA2, 173~ 312);富含半胱氨酸的锌指结构域(CA3, 334~ 363);富含丝/苏氨酸区域(CA4, 419~ 508);以及假定的激酶结构域(CA5, 509~ 847)。在 KSR 和 Raf 中均能发现其激酶结构域占据整个羧基端一半的蛋白,而氨基端有一个较小的保守结构域;KSR 和 Raf 的基因都可发现于哺乳动物和非脊椎动物,但在酵母中都没有其同源序列;KSR 的亚细胞定位同 Raf 一样也是动态变化的,对于静止细胞,KSR 主要存在于胞质,一旦 Ras 激活后,则部分 KSR 转位到胞膜,并形成一个大分子量的复合体^[4-6]。但同时 KSR 与 Raf 也有不同:① CA1 结构域的不同;② KSR 没有所谓的 Ras 结合结构域;③ KSR 假定的激酶结构域中的赖氨酸残基为精氨酸所代替(Arg589)。目前 CA1 和 CA2 结构域的功能还知之甚少;CA3 参与调控 KSR 的亚细胞定位^[5],但具体机制不详;CA4 为 MAPK 的锚着位点^[7];CA5 为假定的激酶结构域,具有结合 MEK1/2 的能力,而其激酶功能目前尚未证实。

为了进一步研究 KSR 的生物学活性,本研究构建了 KSR 的氨基端和羧基端,拟分别研究其功能。目前国际上 KSR 的氨基端和羧基端多以 KSR 的第 540 个氨基酸为分界线,为了使下一步结果有一个较好的对比性,本研究所构建的 N2KSR 包括了 KSR 从 1~ 538 段的氨基酸,即包含了 CA1~ CA4 的结构域,C2KSR 包括了 KSR 从 540~ 873 段的氨基酸,即包含了 CA5 结构域。

由于 KSR cDNA 本身含有 2622 个碱基,可能存在潜在的酶切位点,因此在构建重组载体之前,进行了软件分析。通过 DNASTAR 软件发现 pCMV2Tag2b 载体的多克隆位点(除 EcoRI 外)包括 BamHI、HindIII、XhoI 以及 ApaI 等均存在于 KSR cDNA 上,而 BamHI 位点仅存在于 KSR 的第 955 bp 处。因此利用 BglII 与 BamHI 为同尾酶,酶切后可产生相同的

粘性末端,在构建 pCMV2Tag2bN2KSR 时,引物设计加上了 BglII 酶切位点。通过 BglII + EcoRI 酶切 PCR 产物, BamHI + EcoRI 酶切载体,再进行粘端连接。连接后的重组质粒不能再通过 BamHI 或 BglII 进行酶切鉴定,故选用了 Flag 密码子起始序列前存在的 NotI 酶切位点,该位点亦是 DNASTAR 软件发现的。因此本研究结果充分说明了使用软件协助构建载体的必要性和重要性。

pCMV2Tag2b 载体在其氨基端存在 Flag 抗原标签,所构建的 pCMV2Tag2bN2KSR 和 pCMV2Tag2bC2KSR 重组质粒,表达出的目的蛋白为融合了 Flag 的融合蛋白,鉴定表达时既可以选择针对目的蛋白的抗体,亦可以选择针对 Flag 的抗体。由于本实验室同时构建了两个载体,且存在于 KSR 的不同结构域,因此选用 Flag 抗体进行鉴定。

酶切、测序以及 Western blot 鉴定结果表明本研究所构建的真核表达载体完全正确,为进一步研究 KSR 的功能奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Kornfeld K, Hom DB, Horvitz HR. The *ksr21* gene encodes a novel protein kinase involved in Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell*, 1995, 83(6): B903-913.
- 2 Sundaram M, Han M. The *C. elegans ksr21* gene encodes a novel Ras-related kinase involved in Ras-mediated signal transduction. *Cell*, 1995, 83(6): B889-901.
- 3 Therrien M, Chang HC, Solomon NM, et al. KSR, a novel protein kinase required for RAS signal transduction. *Cell*, 1995, 83(6): B872-888.
- 4 Xing H, Kornfeld K, Muslin AJ. The protein kinase KSR interacts with 14-3-3 protein and Raf. *Curr Biol*, 1997, 7(5): B294-300.
- 5 Michaud NR, Therrien M, Cacace A, et al. KSR stimulates Ras activity in a kinase-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(24): B12792-12796. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, 95(5): B2714-2715.
- 6 Stewart S, Sundaram M, Zhang Y, et al. Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): B5523-5534.
- 7 Jacobs D, Glossip D, Xing H, et al. Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev*, 1999, 13(2): B163-175.

(收稿:2006-02-22 修回:2006-03-10)

(本文编辑 李蓓兰)