

GST-hDaxx 蛋白的构建及其原核表达产物的鉴定

唐旭红¹,朱翠明²,万艳平²

Identification of GST-hDaxx Protein Construction and Its Prokaryotic Expression Products

TANG Xu-hong¹, ZHU Cui-ming², WANYan-ping²

1. Department of Diagnosis of Western Medicine, Hunan Chinese Medical College, Changsha 410007, China; 2. Institute of Pathogenic biology, Nanhua University

Abstract: Objective To construct recombinant protein of GST-hDaxx and to induce the expression of its fusion protein. **Methods** By constructing pGEX-4T/hDaxx recombinant, GST-hDaxx fusion protein was induced to express by IPTG in E.coli BL21, and purified by glutathione resin. hDaxx fusion protein was analyzed by Western blot. The direct binding of hDaxx and p53 was studied by co-immunoprecipitation reaction.

Results hDaxx fusion protein was induced to express by IPTG in E.coli successfully. Soluble GST-hDaxx fusion protein was purified and identified by Western blot. The binding reaction of hDaxx and p53 was observed by co-immunoprecipitation reaction and Western blot. **Conclusion** GST-hDaxx fusion protein was expressed and purified. The binding of hDaxx and p53 suggested that they may play an important role in tumor genesis.

Keywords: GST; hDaxx; fusion protein; p53

摘要:目的 构建 GST-hDaxx 蛋白并在原核细胞中诱导表达 GST-hDaxx 融合蛋白,并研究其与 p53 的结合能力。方法 构建 GST-hDaxx 融合蛋白原核细胞表达载体 pGEX-4T/hDaxx,在大肠杆菌(E.coli)中用异丙基-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达。表达产物用亲和层析柱加以纯化后,Western blot 鉴定表达产物与纯化物。通过共免疫沉淀反应与 Western blot 观察 hDaxx 与 p53 的结合反应。结果 在原核细胞中成功表达了 GST-hDaxx 融合蛋白,hDaxx 与 p53 可发生共免疫沉淀反应。结论 1.GST-hDaxx 融合蛋白成功表达;2.hDaxx 和 p53 的相互结合提示它们可能与肿瘤的发生有关。

关键词: GST; hDaxx; 融合蛋白; p53

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2004)03-0133-03

0 引言

hDaxx 是细胞核内的一种新型转录调控蛋白,它与 Fas 死亡结构域(death domain, DD)相互作用诱导细胞凋亡^[1]。hDaxx 蛋白定位 6p21.3,即位于主要组织相容性复合体(thema jor histocompatibility complex, MHC),可能与自身免疫性疾病和癌症的发病机理存在着一定的关系^[2]。p53 是细胞 DNA 损伤应答过程中的主要成分,它在细胞周期控制、DNA 修复、细胞凋亡、细胞分化及血管生成中起关键调控作用^[3]。hDaxx 可能与 p53 在病毒感染及细胞凋亡和细胞转化中有重要生物学作用。本文用谷胱甘肽 S 转移酶(GST)与 hDaxx 融合蛋白表达载体,在 E.coli BL21 中成功地用 IPTG 诱导表达了 GST-hDaxx 融合蛋白,并用亲和层析柱加以纯化,利用 Western blot 分析纯化产物及其与 p53 发生共

免疫沉淀反应后的反应产物,以便为在体内外研究 hDaxx 与 p53 相互作用及作用效果提供前期实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 电穿孔机及低温超速离心机分别系 BIO-RAD 公司与 Beckman 公司产品,操作按说明书进行。限制性核酸内切酶、T4DNA 连接酶购于 Bechringer Mannheim 公司。IPTG 购于 Fisher Scientific 公司,还原型谷胱甘肽、DEAE-sephacel、glutathione S-transferase 4B 购于 Pharmacia 公司,ECL 试剂购于 MENTM公司。兔抗 Daxx 抗体(Daxx)、兔抗 GST 抗体(GST)、鼠抗 p53 抗体(p53 DO-1)及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-GAR)购于 Santa Cruz 公司。

1.2 GST-hDaxx 融合蛋白表达载体 pGEX-4T/hDaxx 的构建 将 pcDNA3.1/hDaxx^[4]用 EcoRI 酶切,收获约 2.2kb 片段,插入 pGEX-4T-1 相同位点。hDaxx cDNA 下游约 1.7kb 及载体 EcoRI 后各有一

收稿日期:2003-09-28;修回日期:2003-12-02

基金项目:湖南省教育厅资助项目(No.02C391)

作者单位:1.410007 长沙,湖南中医学院西医诊断学教研室;2. 湖南衡阳南华大学病原生物学研究所

Hind 位点, Hind 酶切鉴定插入方向正确后, 得到 GST-hDaxx 融合蛋白原核细胞表达载体 pGEX-4T/hDaxx。

1.3 GST-hDaxx 融合蛋白在 E.coli 中的诱导表达与纯化 用电穿孔法将质粒 pGEX-4T/hDaxx 转化 E.coliBL21。用 LA 液体培养基(LA 液)将细菌经 37 水浴振荡过夜后, 取 200 μ l 培养物移入 2ml LA 液中培养 2~4h, 待 OD₆₀₀ 值为 0.8~1.0 时, 加 IPTG 并使其终浓度为 0.4 mmol/L。30 水浴振荡培养 3h 后, 取 200 μ l 培养物离心去上清, 沉淀物加 30 μ l 1 倍 SDS 样本缓冲液, 煮沸 3min-20 保存备用。取诱导表达好的 300ml 细菌培养物离心收集菌体, PBS 洗涤 1 次, 菌体重新悬浮于 10ml PBST (加 DTT 至终浓度 1mmol/L) 中, -80 冰冻 1h 后于 37 水浴冻融, 冰浴超声波破碎细胞, 离心收集上清。上清中加入 30ml 0.3 mol/L NaCl+PBST+1mmol/L DTT, 稀释后用 0.45 μ m 滤膜过滤, 在滤液中加入 4ml DEAE-Sephacel (用 PBST+1mmol/L DTT 饱和)。于 4 旋转混合 1h, 离心收集上清, 上清 0.45 μ m 滤膜过滤, 在滤液中加入 0.25 ml glutathione S-transferase 4B (用 PBS+1mmol/L DTT 饱和) 于 4 旋转混合 2h 后装柱, 用 PBS 洗柱 1 次, 适量洗脱液 [20mmol/L GSH, 0.5 mol/L NaCl, 50mmol/L Tris (pH 8.0), 0.1% Triton X-100, 1mmol/L DTT] 分次洗脱。蛋白洗脱液经透析后, 加入甘油保存于 -80 备用。取适量纯化产物加 SDS 样本缓冲液, 煮沸 3min, 经 SDS-PAGE 后, 一组用考马斯亮蓝染色、醋酸脱色液脱色及干胶; 另一组作 Western blot, 即样本经 SDS-PAGE 后转硝酸纤维素膜, 将膜用 5% 的脱脂牛奶封闭过夜。Daxx 按滴度稀释在 5% 的脱脂牛奶中, 置室温轻摇 2h 后, 用 TB-T 缓冲液洗膜 3 次。HRP-GAR 按滴度稀释在 5% 的脱脂牛奶中, 置室温轻摇 1h 后, 洗膜 3 次, 加 ECL 试剂后, 感光底片。

1.4 共免疫沉淀反应测定 GST-Daxx 与 p53 在体外的结合反应 GST 与 p53 纯化物由刘跃博士惠赠^[5]。将 0.5 μ g GST-Daxx 纯化物与 0.5 μ g p53 纯化物混合, 加 p53DO-1, 每管另加 500 μ l 缓冲液 B 及 20 μ l 蛋白质 G 琼脂糖, 阴性对照为 GST-Daxx 或 GST 与 p53DO-1。将其置 4 缓慢旋转 1h, 用缓冲液 B 洗沉淀物 4 次。沉淀物加 20 μ l SDS 缓冲液, 50ng GST-Daxx 纯化物作阳性对照, 同上作 Western blot, 但一抗为 GST。

2 结果

2.1 图 1 示载体 pGEX-4T/hDaxx 及其限制性酶

切后琼脂糖电泳图。EcoRI 酶切后有约 2.2 kb 片段 (lane5), HindIII 酶切出约 0.5 kb 片段 (lane6), 即 hDaxx cDNA 片段连接方向正确。

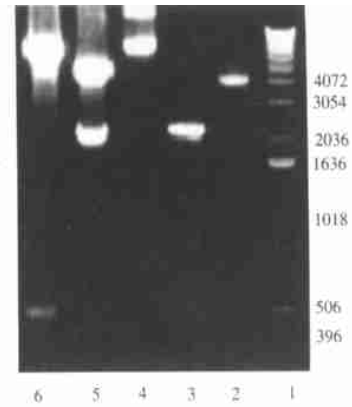


图 1 pGEX-4T/hDaxx 及酶切产物琼脂糖电泳图
1. DNA 标准化分子量 2. pGEX-4T-1EcoRI 酶切回收片段
3. hDaxx EcoRI 酶切回收片段 4. pGEX-4T/hDaxx 质粒
5. pGEX-4T/hDaxx 用 EcoRI 酶切 6. pGEX-4T/hDaxx 用 HindIII 酶切

2.2 pGEX-4T/hDaxx 转化 E.coliBL21 后, 用 IPTG 诱导表达产物并用亲和层析柱纯化。图 2 是诱导前后及纯化产物经 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色结果, IPTG 能诱导 GST-hDaxx 融合蛋白的表达 (lane3)。

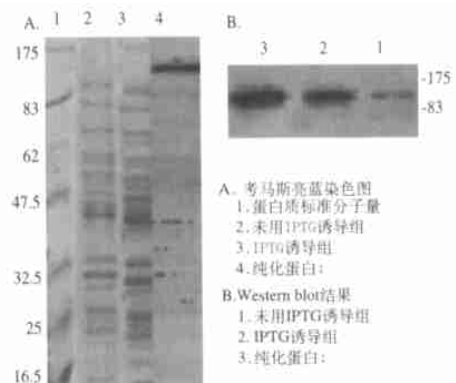


图 2 hDaxx 在 E.coli 中的表达与纯化

2.3 GST-hDaxx 融合蛋白诱导前后产物及纯化物经 SDS-PAGE 后, Western blot 结果见图 3。

2.4 Daxx 与 p53 直接结合 适量纯化的 GST-hDaxx 与 p53 混合后用抗 p53 抗体作体外共免疫沉淀反应, Western blot 结果显示: 抗 p53 抗体能将 Daxx 一起沉淀下来, 即 p53 可与 hDaxx 发生共免疫沉淀反应, 见图 3 lane5。

3 讨论

hDaxx 作为一种转录抑制子, 能抑制 Pax3、Pax5 等转录因子的转录^[6]。hDaxx 与急性早幼粒

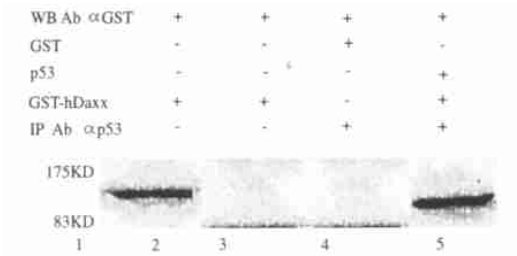


图 3 p53 与 hDaxx 在细胞外的直接结合反应

纯化的 p53 (500ng), GST-hDaxx (500ng) 混合后用抗 p53 等抗体作免疫沉淀反映与 Westernblot, 每组成份与所用抗体见图上说明, Lane2 为 50ng 纯化 GST-hDaxx 作为阳性对照

细胞性白血病 (PML) 蛋白在体内相互作用共定位细胞核 PML 癌基因结构域 (PODs), 维持 PODs 的平衡与稳定。来自急性早幼粒细胞性白血病 (APL) 病人的 NB4 细胞, PML 与 RAR 形成的复合物 PML-RAR 是一种癌蛋白, 能打破 hDaxx 与 PML 的共定位, 使 hDaxx 不能定位 PODs, 而定位到密集的染色质。一旦用反式维甲酸或三氧化二砷处理 NB4 细胞, hDaxx 脱离密集的染色质, 重新定位到 PODs^[7]。为了进一步研究 hDaxx 在体外的某些生物学活性, 本文构建了 GST-hDaxx 融合蛋白原核细胞表达载体 pGEX-4T/hDaxx, 并在 E.coli 中诱导表达, 经亲和层析柱后得到 GST-hDaxx 融合蛋白纯化物。

p53 能诱导癌细胞周期的终止, 介导癌细胞凋亡^[8]。hDaxx 可能抑制某些与凋亡相关蛋白的转录, 但 hDaxx 和 p53 之间有何关系至今还不太清楚。我们利用纯化的 GST-hDaxx, 通过共免疫沉淀

反应与 Westernblot 研究 Daxx 与 p53 的结合反应, 发现两种蛋白质可在体外发生直接结合, 为研究他们在体内的生物学活性提供了实验依据。我们将进一步探讨 hDaxx 对 p53 的转录活性的影响, 并将对 hDaxx 与 p53 两种蛋白质在癌细胞凋亡中的作用作进一步研究。

参考文献:

[1] Yang XL, Khosravi F, FarR, Chan gHY, et al. Daxx, a novel Fas binding protein that activates JNK and promotes apoptosis [J]. Cell, 1997, 89 (7) :1067-1076.

[2] Kiriakidou M, Driscoll DA, Lopez Guisa JM, et al. Cloning and expression of primate Daxx cDNAs and mapping of the human gene to chromosome 6p21.3 in the MHC region [J]. DNA and Cell Biol, 1997, 16 (11) :1289-1298.

[3] Ma yP, Ma ye E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein [J]. Oncogene, 1999, 18 (53) :7621-7636.

[4] 万艳平, 吴移谋, 谭立志, 等. 腺病毒 12 型 E1B55kD 癌蛋白与人 Daxx 相互作用 [J]. 肿瘤, 2003, 23 (1) :22-24.

[5] Liu y, Colosimo AL, Yang XJ, et al. Adenovirus E1B55 kDa oncoprotein inhibits p53 acetylation by PCAF [J]. Mol & Cell Biol, 2000, 20 (15) :5540-5553.

[6] Emelianov AV, Kovac CR, Sepulveda MA, et al. The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells [J]. J Biol Chem, 2002, 277 (13) :11156-11164.

[7] Li H, Leo C, Zhu J, et al. Sequestration and inhibition of Daxx-mediated transcriptional repression by PML [J]. Molecular and cellular biology, 2000, 20 (5) :1784-1796.

[8] Kaelin W. G. The emerging p53 gene family [J]. Natl Cancer Inst, 1999, 91 (7) :594-598.

[编辑: 周永红; 校对: 刘红武]