

· 基础研究 ·

PCNA 蛋白突变体的真核表达载体构建及鉴定*

刘小会, 淡松松, 秦焕焕, 高学娟[△], 刘朗夏

(暨南大学生命与健康工程研究院, 广州 510632)

摘要:目的 构建带 FLAG 标签的细胞增殖核抗原(PCNA)蛋白 Y211A、Y211D 突变型重组质粒, 真核表达及鉴定。方法 以 FLAG-PCNA 野生型基因为模板, 运用 PCR 定点突变技术扩增出带突变位点的基因序列, 将其插入真核表达载体 pCMV-N-FLAG, 进行双酶切实验和测序验证。然后, 利用脂质体将重组质粒转染至 293T 细胞, Western blotting 鉴定融合蛋白的表达。结果 FLAG-PCNA(Y211A)、FLAG-PCNA(Y211D)重组质粒测序结果正确, 获得 PCNA 蛋白突变体。结论 成功构建了带 FLAG 标签的 PCNA 蛋白 Y211A、Y211D 真核表达载体, 验证了突变型 PCNA 融合蛋白的表达, 为 PCNA 蛋白功能的深入研究奠定了基础。

关键词: PCNA 蛋白; 突变体; 真核表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.019

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)12-1194-03

Construction and identification of eukaryotic expression vector for mutant PCNA*

Liu Xiaohui, Dan Songsong, Qin Huanhuan, Gao Xuejuan[△], Liu Langxia

(Institutes of Life and Health Engineering, Jínan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

Abstract: Objective To construct and express FLAG-PCNA gene mutant in 293T cells. **Methods** Mutant FLAG-PCNA cDNA was amplified by PCR site-directed mutagenesis with FLAG-PCNA gene as template, and inserted into the eukaryotic expression vector pCMV-N-FLAG. The recombinant vector was then transfected into human embryonic kidney (HEK) 293T cells. The cells were harvested after 48h to identify the expression of plasmids by western blot. **Results** Sequences of recombinant plasmid were correct, and the mutants of PCNA were obtained. **Conclusion** Eukaryotic plasmids of mutant PCNA were obtained, and the expression of mutant PCNA protein was identified, which lay a foundation for further research of PCNA protein.

Key words: PCNA; mutant; eukaryotic expression

细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是一种在增殖细胞中合成或表达的核抗原, 相对分子质量约为 36×10^3 , 是真核细胞 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子, 与 DNA 合成和细胞增殖相关, 是近年来认为更能有效评估肿瘤细胞增殖活性的重要标志物, 也是当前研究的热点之一^[1-3]。

许多文献曾报道, 表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)在细胞增殖与肿瘤分化中发挥着重要作用。Shao-Chun Wang 博士报道 EGFR 可以磷酸化 PCNA 上的 Y211 位点, 减少 PCNA 的降解, 从而促进细胞增殖、参与 DNA 损伤修复^[4-6]。本研究运用 PCR 定点突变技术将 211 位酪氨酸碱基 TAC 分别突变成丙氨酸碱基 GCC、天冬氨酸碱基 GAC, 以获得突变型 PCNA 蛋白基因。将构建的 pCMV-N-FLAG-PCNA Y211A 和 Y211D 重组质粒, 分别转染至 293T 真核细胞, 对表达的融合蛋白进行鉴定, 为进一步探讨 PCNA 蛋白在肿瘤细胞中的生物学作用提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要实验设备 凝胶扫描成像系统、垂直电泳槽、梯度 PCR 仪均购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 主要试剂 限制性内切酶 BamHI 和 XhoI, T4 连接酶, DNA marker 及 PCR 扩增试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 质粒小提、凝胶回收试剂盒购自天根生物技术公司。标准低分子量蛋

白购自 Pharmacia 公司。PCR 引物由英俊公司合成。GST 融合蛋白纯化树脂购自 GE Healthcare 公司。转染试剂 Gen-escortTM II 购自 Wisegen 公司。RIPA 裂解液购自碧云天生物技术公司。FLAG 一抗购自 Sigma 公司。鼠源二抗购自 Biorule 公司。

1.3 质粒与菌株、细胞株 质粒 pCMV-N-FLAG-PCNA、真核表达载体 pCMV-N-FLAG 及大肠杆菌 DH5 α 均为本实验室所保存。

1.4 方 法

1.4.1 目的基因的获得以及重组质粒的构建验证 根据 GeneBank 检索到的 PCNA 基因序列, 设计扩增其全长序列的引物; 根据 pCMV-N-FLAG 空载的多克隆位点图谱, 在引物的 5' 端引入限制性内切酶 BamHI, 3' 端引入限制性内切酶 XhoI 识别序列; 结合实验要求, 设计带突变碱基位点的引物, FLAG-PCNA 全长引物、突变体引物序列如表 1 所示。以 pCMV-N-FLAG-PCNA 为模板, 进行 PCR 反应, 先扩增带有突变位点的前、后两端 DNA 序列, 反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 扩增产物大小分别为 633 bp 和 153 bp, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定及胶回收纯化。然后, 将前后两段序列互为引物和模板, 进行拼接, 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,

* 基金项目: 国家 973 重点基础研究发展计划资助项目(2011CB910701); 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31000628); 暨南大学引进优秀人才科研启动基金资助项目(50624001); 广东省高等学校高层次人才资助项目(50524006)。 [△] 通讯作者, E-mail: tgaobj@jnu.edu.cn。

表 1 构建 FLAG-PCNA 突变体重组质粒的上下游引物设计

引物名称	引物序列
pCMV-N-FLAG-PCNA-F	5'-ATAGGATCCATGTTCGAGGCGCGCCTG-3'
pCMV-N-FLAG-PCNA-R	5'-GCACTCGAGCCTAAGATCCTTCTTCATCC-3'
pCMV-N-FLAG-PCNA-Y211A-F	5'-TTTTGCACTGAGGGCCCTGAACTTCTTTAC-3'
pCMV-N-FLAG-PCNA-Y211A-R	5'-TAAAGAAGTTCAGGGCCCTCAGTGCAAAAAG-3'
pCMV-N-FLAG-PCNA-Y211D-F	5'-TTTTGCACTGAGGGACCTGAACTTCTTTAC-3'
pCMV-N-FLAG-PCNA-Y211D-R	5'-TAAAGAAGTTCAGGTCCCTCAGTGCAAAAAG-3'

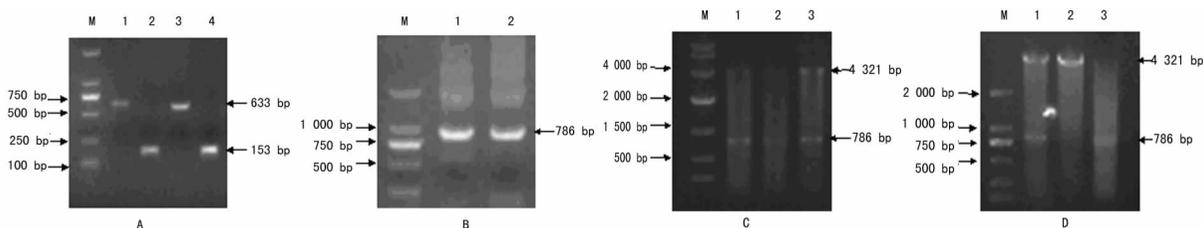
7 个循环。紧接着,全长基因上、下游引物加入到反应体系,反应条件:94 °C 30 s,63.2 °C 30 s,72 °C 延伸 1 min;30 个循环,扩增带突变位点、786 bp 的全长基因,1%琼脂糖凝胶电泳分析鉴定及胶回收纯化。随后,将 BamHI 和 XhoI 双酶切的 PCR 产物,插入到双酶切处理后的 pCMV-N-FLAG 空载体中,进行连接转化,酶切验证后,送至上海英俊生物技术公司进行测序。

1.4.2 细胞转染 人胚肾 T 细胞 293T 细胞用含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养,每 2~3 天传代一次,用 0.25% 胰酶消化传代。六孔板中,每孔接种 5 × 10⁵,待细胞贴壁后进行转染。野生型和突变型重组质粒分别与转染试剂 GenEscortTM II 以 2 μg : 4 μL 比例,用 DMEM 稀释混匀,室温静置孵育 30 min 后,将复合物加之细胞中,4~6 h 后,更换成含 10% 胎牛血清 DMEM 培养基,培养 48 h。

1.4.3 细胞裂解及 Western blotting 鉴定表达蛋白 转染收取的细胞用 PBS 清洗 2~3 次之后,用 RIPA 裂解液(含蛋白酶抑制剂)进行裂解和 BCA 法蛋白浓度测定。取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转至 PVDF 膜后,用 1 × TBST 洗膜 3 次,10 分/次,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。然后,用鼠源 FLAG 单克隆抗体(1 : 2 000),4 °C,孵育过夜。次日,1 × TBST 洗膜 3 次后,鼠二抗(1 : 2 000)室温孵育 30 min,经 1 × TBST 洗膜 3 次后,ECL 曝光显影。

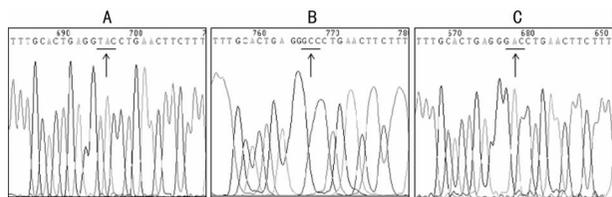
2 结 果

2.1 目的基因片段的扩增 利用 PCR 从模板质粒 pCMV-N-FLAG-PCNA(Wt) 上扩增出带突变位点的 FLAG-PCNA Y211A 和 Y211D 基因前、后两段 DNA 序列,大小分别为 633bp 和 153bp(图 1A)。随后将其拼接,PCR 扩增出带突变位点的全长基因序列,大小为 786 bp(图 1B),均与预期 DNA 片段大小相符。



A: PCNA 突变体拼接片段生成,1: Y211A 拼接前段;2: Y211A 拼接后段;3: Y211D 拼接前段;4: Y211D 拼接后段。B: PCNA 突变体全长片段,1: Y211A 全长片段;2: Y211D 全长片段。C: PCNA 突变体 Y211A 双酶切鉴定,1-3: 重组质粒 1~3 号双酶切。D: PCNA 突变体 Y211D 双酶切鉴定,1-3: 重组质粒 1~3 号双酶切。M: DNA Marker,图左边标出 Marker 分子量。

图 1 FLAG-PCNA Y211A 和 Y211D 基因的 PCR 结果

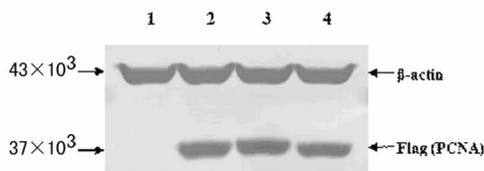


A: PCNA 野生型 Y211 位点测序列 TAC; B: PCNA 突变体 Y211A 位点测序列 TAC → GCC; C: PCNA 突变体 Y211A 位点测序列 TAC → GAC。

图 2 重组质粒的 DNA 测序结果

2.2 重组质粒的鉴定 突变型重组质粒连接转化后,分别挑取 3 个单克隆进行扩大培养,质粒提取后分别用 BamHI 和 XhoI 进行双酶切鉴定。琼脂糖凝胶电泳可见大小 786 bp 的目的条带,表明目的基因已经成功插入 pCMV-N-FLAG 载体

中(图 1C、D)。比较 DNA 测序报告箭头所指位点,表明 211 位的酪氨酸碱基 TAC,已分别突变成丙氨酸(GCC, A)和天冬氨酸碱基(GAC, D)(图 2)。证明突变型 FLAG-PCNA Y211A 和 Y211D 质粒已成功构建。



1: Flag-Vector; 2: Flag-PCNA (Wt); 3: Flag-PCNA (Y211A); 4: Flag-PCNA (Y211D)。

图 3 Western blotting 验证分析融合蛋白的表达

2.3 Western blotting 鉴定融合蛋白 野生型和突变型重组质粒转染过 293T 细胞,经 Western blotting 用 FLAG 抗体孵

育验证后,发现突变型 PCNA 蛋白同野生型 PCNA 蛋白均可以正常表达,蛋白大小与预期相符,结果见图 3。

3 讨 论

PCNA 蛋白的异常与肿瘤的发生发展密切相关,它几乎存在于所有迅速增殖的细胞核中,它的出现明显与细胞增殖有关,其在静止细胞中含量很低,从 G1 末期开始增加,在 S 期达到高峰,是评价细胞增殖状态的重要指标,同时还是鉴别某些良性肿瘤和恶性肿瘤的指标和预后评估指标^[3-7]。蛋白质磷酸化修饰是 PCNA 半衰期调节的主要机制。文献报道 PCNA 蛋白上的 Y211 磷酸化后,可显著增强细胞增殖,降低乳腺癌等恶性肿瘤患者生存率^[4-6]。本研究将 211 位的酪氨酸分别突变成天冬氨酸以模拟该位点的磷酸化,突变成为丙氨酸以阻断该位点的磷酸化^[8-11],构建 pCMV-N-FLAG-PCNA Y211A 和 Y211D 真核表达载体后,转染至 293T 真核细胞并鉴定融合蛋白的表达,为进一步研究 PCNA 的生理功能打下基础。

在构建 Y211A、Y211D 重组质粒过程中,本研究采用了突变位点周围序列重叠拼接的策略,分别构建了突变位点前段和后段的 DNA 序列,随后利用 PCR、两端 DNA 序列互为模板引物进行拼接。为了保证突变目的基因产物能够有效扩增,实验前作者利用全长基因的引物,设置了梯度 PCR 反应,找到了 63.2℃ 反应效率相对较高的退火温度。

293T 细胞因具备理想的细胞转染效率,所以是蛋白表达和功能研究中常用到的细胞株。同一张膜上,经 DAB 底物显色后,相对于内参 β -actin,作者发现目的蛋白有较高的表达量。文献中报道,作者利用蛋白合成抑制剂处理、结合 Y211F 突变体发现,Y211 位点的磷酸化有助于 PCNA 蛋白的降解,在初步的蛋白表达中尚未看到明显的变化;再者,由于 PCNA 在细胞中存在 DNA 结合和游离两种形式,而 DNA 结合形式不易被分离,同内源 PCNA 蛋白的影响调节有可能是造成这种变化不明显的原因^[12-15]。

参考文献:

- [1] Stenner M, Demgensky A, Molls C, et al. Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in parotid gland cancer [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269 (4): 1225-1232.
- [2] Acharya N, Klassen R, Johnson RE, et al. PCNA binding domains in all three subunits of yeast DNA polymerase δ modulate its function in DNA replication [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 8(44): 17927-17932.
- [3] Strzalka W, Ziemienowicz A. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation [J]. *Ann Bot*, 2011, 107(7): 1127-1140.
- [4] Wang SC, Nakajimal Y, Yu YL, et al. Tyrosine phosphorylation controls PCNA function through protein stability [J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(12): 1359-1368.
- [5] Zhao H, Lo YH, Ma L, et al. Targeting tyrosine phosphorylation of PCNA inhibits prostate cancer growth [J]. *Mol Cancer Ther*, 2011, 10(1): 29-36.
- [6] Wang SC, Hung MC. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15 (21): 6484-6489.
- [7] Naryzhny SN. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65 (23): 3789-3808.
- [8] Chen L, Feany MB. Alpha-synuclein phosphorylation controls neurotoxicity and inclusion formation in a Drosophila model of Parkinson disease [J]. *Nat Neurosci*, 2005, 8(5): 657-663.
- [9] 田平芳, 曲凯, 谭天伟. 链球菌生物合成透明质酸的分子机理与基因工程菌构建进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2008, 28(4): 98-102.
- [10] 邵圣文, 于建国, 武文斌, 等. 丙型肝炎病毒 F 蛋白磷酸化位点突变与细胞内分布 [J]. *微生物与感染*, 2007, 2(2): 87-89.
- [11] 徐熠熠, 蓝建平, 朱园园, 等. TRF1219 位磷酸化在细胞周期调控中的作用研究 [J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2007, 36(4): 5-8.
- [12] Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork [J]. *Cell*, 2007, 129(4): 665-679.
- [13] Chen J, Ai Y, Wang J, et al. Chemically ubiquitylated PCNA as a probe for eukaryotic translesion DNA synthesis [J]. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(4): 270-272.
- [14] Achary N, Yoon JH, Gal H. Roles of PCNA-binding and ubiquitin-binding domains in human DNA polymerase η in translesion DNA synthesis [J]. *PNAS*, 2008, 105 (46): 17724-17729.
- [15] Mayanagia K, Kiyonari S, Saitod M, et al. Mechanism of replication machinery assembly as revealed by the DNA ligase-PCNA-DNA complex architecture [J]. *PNAS*, 2009, 106(12): 4647-4652.

(收稿日期: 2011-12-12 修回日期: 2012-01-09)

启事: 本刊对院士及 863、973 项目文章开通绿色通道, 欢迎投稿。