

文章编号 1006-8147(2016)01-0005-04

论 著

## 重组 pCMV-N-Tudor-SN 点突变质粒的构建及表达

杨文栋<sup>1</sup>, 苏超<sup>2</sup>, 张春燕<sup>3</sup>, 赵亚丽<sup>1</sup>, 任媛媛<sup>3</sup>, 高星杰<sup>2</sup>, 杨洁<sup>1,2</sup>, 何津岩<sup>1</sup>

(天津医科大学 1.细胞生物学系;2.基础医学研究中心;3.医学生物化学与分子生物学系,天津 300070)

**摘要** 目的:构建 Tudor-SN 蛋白的 Serine426(S426)、Serine781(S781)、Threonine240(T240)和 Threonine429(T429)的点突变质粒,并使该重组质粒能够在 HeLa 细胞中融合表达。方法:利用定点突变技术,对 Tudor-SN 蛋白进行 S426A、S781A、T240A、T429A 点突变,通过双酶切的方法获得 Tudor-SN.Mutants 片段,最后将其连入到 pCMV-N-Flag 载体中。在 HeLa 细胞中转染该质粒,利用 Western blot 技术检测质粒表达效率。结果:(1)重组质粒经双酶切鉴定,可以观察到载体与 Tudor-SN.Mutants 的条带。(2)转染突变质粒后可看出 HeLa 细胞中有 Flag 蛋白表达。结论:质粒构建成功,可以用于下一步科学研究使用。

**关键词** 人类 Tudor-SN 蛋白;pCMV-N-Flag;重组质粒;融合蛋白

中图分类号 Q7

文献标志码 A

### Construction and expression of recombinant pCMV-N-Tudor-SN.Mutants Flag plasmids

YANG Wen-dong<sup>1</sup>, SU Chao<sup>2</sup>, ZHANG Chun-yan<sup>3</sup>, ZHAO Ya-li<sup>1</sup>, REN Yuan-yuan<sup>3</sup>, GAO Xing-jie<sup>2</sup>, YANG Jie<sup>1,2</sup>, HE Jin-yan<sup>1</sup>

(1. Department of Cell Biology;2. Research Center of Basic Medical Science;3. Department of Medical Biochemistry, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To construct eukaryotic Flag expressing recombinant pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag. **Methods:** The Serine426 (S426), Serine781(S781), Threonine240(T240)and Threonine429(T429) of Tudor-SN were transformed into Alanine by site-directed mutagenesis technique. Then the Tudor-SN.Mutants were obtained by restricting double enzyme digestion, and then inserted into pCMV-N-Flag vector. The recombinant plasmids were transfected into HeLa and observed by Western blot. **Results:** (1) The vector and Tudor-SN.Mutants could be observed by restricting double enzyme digestion. (2) Flag was expressed by HeLa which was transfected with recombinant plasmid. **Conclusion:** The recombinant plasmids of pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag are constructed successfully, and may be useful for further study.

**Key words** human Tudor-SN;pCMV-N-Flag;recombinant plasmid;fusion protein

人类 Tudor-SN 蛋白,又称 SND1(staphylococcal nuclease domain containing 1)或 p100,该蛋白首次以 EB 病毒细胞核抗原 2(epstein-barr virus nuclear protein 2,EBNA2)的转录共激活因子被发现<sup>[1]</sup>。疏水簇结构分析(hydrophobic cluster analysis,HCA)显示,人类 Tudor-SN 蛋白由 N 端 4 个连续的葡萄球菌核酸酶样的(phylococcal nucleases-like,SN)SN(1~4)结构域和 C 端的 Tudor-SN5(TSN)组成<sup>[2]</sup>。近些年,本课题组研究发现 Tudor-SN 蛋白是一种多功能蛋白,可参与多种生物学行为,例如:细胞周期<sup>[3]</sup>、脂代谢<sup>[4]</sup>、细胞应激<sup>[5]</sup>等,并在肿瘤的发生发展中发挥重要作用<sup>[10-13]</sup>。为了进一步揭示其发挥功能的具体机制,笔者通过生物信息学的方法预测了 Tudor-SN 蛋白

Serine426(S426)、Serine781(S781)、Threonine240(T240)、Threonine429(T429)为其潜在磷酸化位点,并利用定点突变技术将上述位点进行突变,然后将含有突变位点的片段连入到 pCMV-N-Flag 载体中,成功构建了 pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag 的重组质粒,从而为深入研究 Tudor-SN 蛋白的结构和功能提供了便利工具。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 基因定点突变试剂盒(Site-directed Gene Mutagenesis Kit)购于碧云天生物技术有限公司。限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I 及 T4 DNA 连接酶购于 Thermo 公司。Lipofectamine® 2000、opti-MeM 购于 Life technology 公司。去内毒素质粒提取试剂盒购于 Omega 公司。小量 DNA 快速胶回收提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司。T/A 载体(Ptz57R/T)购自上海 Takara 生物工程有限公司。载体质粒 pCMV-N-Flag 重组质粒(图 1)、PGEX-4T-1-Tudor-SN、大肠杆菌 Trans 10 及 HeLa

基金项目 国家杰出青年基金资助项目(31125012);教育部“创新团队发展计划”(IRT13085);国家自然科学基金资助项目(31170830、31370749、31571380);天津市应用基础与前沿技术研究计划(青年基金项目)(15JCQNJC09900)

作者简介 杨文栋(1989-),男,硕士在读,研究方向:肿瘤免疫;通信作者:何津岩,E-mail:hejinyan@tjmu.edu.cn。

细胞均来自本实验室。

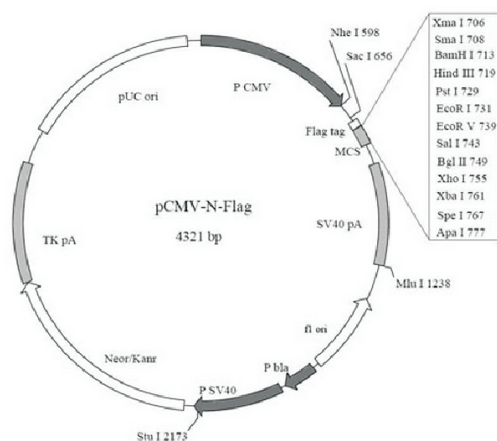


图 1 pCMV-N-Flag 质图谱

Fig 1 Plasmid profile of pCMV-N-Flag

## 1.2 方法

**1.2.1 Tudor-SN 蛋白潜在磷酸化位点的定点突变及目的片段 Tudor-SN.Mutants 的获取** 按照基因定点突变试剂盒提供的实验流程,以 PGEX-4T-1-Tudor-SN 为模板,利用含有突变位点的正、反引物(表 1),进行 PCR 反应,条件为:95 ℃预变性 1 min,以 95 ℃ 40 s,60 ℃ 1 min,68 ℃ 1 min 进行 18 个循环,72 ℃延伸 10 min,4 ℃终止反应。在 PCR 产物中加入 *Dpn* I 酶以切除模板质粒,最终获得 4 种含有突变位点的质粒,即:PGEX-4T-1-Tudor-SN (S426A)、PGEX-4T-1-Tudor-SN (S781A)、PGEX-4T-1-Tudor-SN (T240A)、PGEX-4T-1-Tudor-SN (T429A)。将该 4 种质粒转化进入大肠杆菌 Trans 10 中,37 ℃,200 r/min 条件下摇菌扩增并提取质粒。根据 Tudor-SN 的全长序列设计能够导入 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点的引物(表 2),以获得的 4 种突变质粒为模板进行 PCR 反应,琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物,确定目的片段与实际大小相符后,利用胶回收试剂盒回收目的片段。在 T4 DNA 连接酶催化下,将该目的片段与 T/A 载体在 22 ℃条件下连接过夜。次日将连接产物转化进入大肠杆菌 Trans 10 中,将转化好的菌液涂布于含有氨苄的固体培养板上,37 ℃培养 12 h 后挑取阳性克隆,摇菌扩增并提取质粒。以 *Eco*RI 和 *Bam*HI 对提取的质粒进行双酶切,最后对纯化后的目的片段进行胶回收。

**1.2.2 重组真核质粒 pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag 的构建** 对 pCMV-N-Flag 质粒进行 *Eco*RI 和 *Bam*HI 的双酶切,使其线性化,切下含有目的条带的凝胶块,并回收目的片段。在 T4 DNA 连接酶催化下,将回收的线性化载体与纯化后的 Tudor-SN.

Mutants 片段在 16 ℃条件下连接过夜,次日将连接产物转化进入大肠杆菌 Trans 10 中,以卡那霉素筛选单克隆菌落,挑取单克隆后,37 ℃摇菌过夜,次日提取质粒,并将质粒进行 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切鉴定。

表 1 突变引物对

Tab 1 Mutation primers

引物名称	引物序列(5'→3')
S426A	5'-CTACATTAGACCAGCCGCC(AGC)CCAGCCACAGACAGTGC-3'
Antisense S426A	5'-GGCAGTCTCTCTGTGGCTGGGCG(GCT)GGCTGCTAATGTAG-3'
S781A	5'-GCCTGGGTACCCTAGCC(TCA)CTGCCTTCAGCACTCGGG-3'
Antisense S781A	5'-CCCAGTGTCTGAAGGCAGGGCG(TGA)TAGGTTACCCAGGC-3'
T240A	5'-GCAGATGGCAGTGAAGCC(ACT)CCAGAGCCTTTTGTGCAG-3'
Antisense T240A	5'-CTGCAGCAAAAGGCTCTGGGCG(AGT)TTCAGTCCATCTGC-3'
T429A	5'-CATTAGACCAGCCAGCCAGCCGCC(ACA)GAGACAGTGCCTG-3'
Antisense T429A	5'-CAGGCACTGTCTCGGC(TGT)GGCTGGGCTGGCTGCTAATG-3'

下划线部分代表突变后的序列,括号内为原始序列

上、下游引物中,下划线部分代表能够分别引入的 *Eco*RI 和 *Bam*HI 的酶切位点的序列

表 2 Tudor-SN 全长引物序列

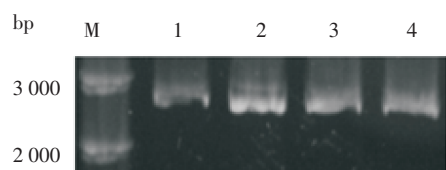
Tab 2 Primer sequences of Tudor-SN

引物名称	引物序列(5'→3')
Forward primer	5'-CGGATCCATGGCGTCTCCGCGCAGA-3'
Reverse primer	5'-CGAATCTCTTAGCGGCTGTAGCCAAATT-3'

**1.2.3 重组真核质粒 pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag 的表达鉴定** HeLa 接种于 6 孔板中,并在 37 ℃,5%的二氧化碳培养箱中培养,待细胞密度到达 60%~70%时进行转染。转染前 2 h,将原有的含有 10%胎牛血清的 DMEM 换成无血清的 DMEM。取 6 个高压无菌的 1.5 mL 离心管,并在每管中加入 200 μL 的 opti-MeM,随后各加入 pCMV-N-Flag、pCMV-N-Tudor-SN、pCMV-N-Tudor-SN (S426A)-Flag、pCMV-N-Tudor-SN(S781A)-Flag、pCMV-N-Tudor-SN (T240A)-Flag、pCMV-N-Tudor-SN (T429A)-Flag 质粒 2.5 μg (每个离心管只加入一种质粒),最后加入 Lipofectamine® 2000 (转染试剂)8 μL,轻轻弹匀后静置 15 min。取出细胞,将混好的液体均匀滴加入孔板中,水平摇匀。7 h 后将细胞培养液换成含有 10%胎牛血清的完全培养基。48 h 后收取细胞,以 RIPA 裂解液提取蛋白后,利用 Western blot 技术检测质粒表达效率。

## 2 结果

**2.1 Tudor-SN 蛋白潜在磷酸化位点的定点突变及目的片段 Tudor-SN.Mutants 的获取** 以 PGEX-4T-1-Tudor-SN 为模板,利用能够引入突变位点的正、反引物进行 PCR 反应,并获得 4 种突变质粒:PGEX-4T-1-Tudor-SN(S426A)、PGEX-4T-1-Tudor-SN(S781A)、PGEX-4T-1-Tudor-SN(T240A)和 PGEX-4T-1-Tudor-SN(T429A),以这 4 种点突变质粒为模板,利用能够导入 *EcoR* I 和 *Bam* H I 酶切位点的引物对目的片段进行扩增(图 2),结果显示条带位于 2 700 bp 左右,与预期相符。凝胶回收该片段用以下一步反应。

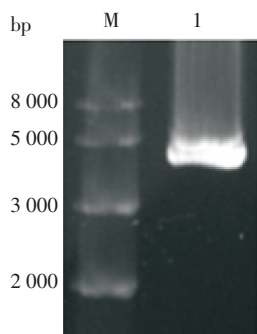


M:Marker;1:S426A;2:S781A;3:T240A;4:T429A

图 2 目的片段 Tudor-SN.Mutants 的获取

Fig 2 Acquisition of target fragment Tudor-SN.Mutants

**2.2 线性质粒载体的获取** 利用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切 pCMV-N-Flag 质粒,使其线性化。琼脂糖凝胶电泳结果显示该条带在 4 000 bp 左右(图 3),与质粒的实际大小相符,凝胶回收该片段,用以后续连接反应。

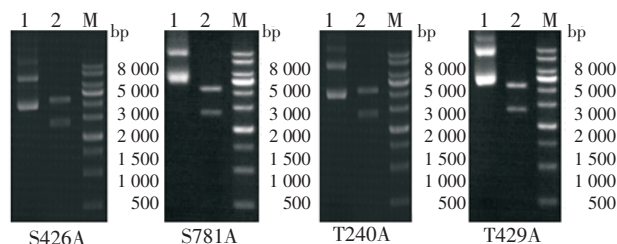


M:Marker;1:线性 pCMV-N-Flag 质粒

图 3 线性 pCMV-N-Flag 质粒的获取

Fig 3 Acquisition of linear plasmid pCMV-N-Flag

**2.3 重组真核质粒 pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag 的构建** 在 T4 DNA 连接酶的作用下,将线性 pCMV-N-Flag 质粒与纯化后的 Tudor-SN.Mutants 进行连接,将连接好的质粒转入大肠杆菌 Trans 10 中,筛选扩增后提取质粒,将该 4 种质粒进行 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切鉴定(图 4),从结果可以看出产物大小与实际大小相符,证明质粒构建成功。



M:Marker;1:未双酶切;2:以 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双酶切

图 4 重组质粒 pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag 的双酶切鉴定

Fig 4 Identification by restricting double enzyme digestion of recombinant plasmids pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag

**2.4 重组真核质粒转染细胞的表达鉴定** 在六孔板中转染该种质粒,48 h 后收取细胞,利用 Western blot 技术检测质粒表达效率(图 5),从结果可以看出 pCMV-N-Tudor-SN.Mutants-Flag 在 HeLa 细胞可以正常的融合表达。

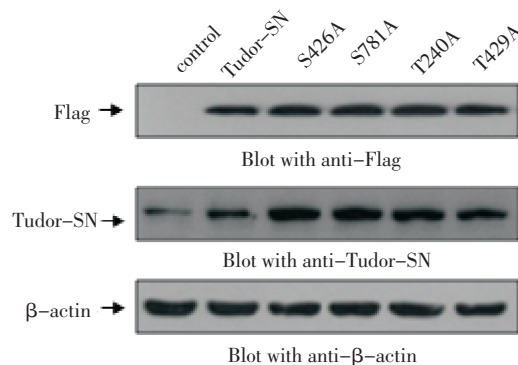


图 5 重组质粒的表达鉴定

Fig 5 Identification of recombinant plasmids

## 3 讨论

Tudor-SN 蛋白是一种高度保守、广谱存在的多功能蛋白,可以通过特有的功能结构域参与多个细胞生物学过程。例如,在白介素 4 介导的特异性基因的转录过程中,Tudor-SN 蛋白可以作为 STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6)的转录共激活因子与 STAT-TAD (transcription activation domain)相结合,同时 Tudor-SN 蛋白还可以与 RNA pol II (RNA polymerase II)结合,为 STAT6 和 RNA pol II 的相互作用提供桥梁,共同调控下游基因的转录活性<sup>[6]</sup>。此外,Tudor-SN 蛋白能够与转录因子 c-Myb 结合,参与造血细胞和淋巴细胞的增殖和分化<sup>[7]</sup>。在周期调控中,Tudor-SN 蛋白通过增强 E2F1 (E2F transcription factor 1)与启动子的结合,促使 E2F1 的靶基因的转录,促进细胞由 G1 期向 S 期转化<sup>[8]</sup>。同样,在细胞应激中,Tudor-SN 蛋白也发挥着重要作用。HeLa 细胞在亚硝酸盐条件下可形成应激颗粒,Tudor-SN 蛋白通过 SN 结构域可以与应激颗粒



组分 G3BP 蛋白及 AGTR1 (angiotensin II type 1 receptor 1) 的 3'UTR (3' untranslated region) 相结合, 参与应激颗粒的形成<sup>[8]</sup>。此外, Tudor-SN 蛋白与多种疾病的发病机制密切相关<sup>[9-13]</sup>, 诸如肺腺癌、肾癌、结肠癌、前列腺癌、常染色体显性遗传多囊肾病等。

本课题组多年来致力于对 Tudor-SN 蛋白的多功能性研究, 其中特异性位点的磷酸化是笔者很关注的点。蛋白质的磷酸化是蛋白质行使生物学功能的最直接、最重要的方式, 例如, 在细胞 G2/M 期转化的过程中, CDK1 (cyclin-dependent kinase 1) 的磷酸化扮演了关键性的“分子开关”的作用<sup>[14]</sup>, 首先与周期蛋白结合的 CDK1 在 wee1/mik1 激酶、CDK 活化激酶 (CDK1-activating kinase) 和蛋白磷酸水解酶 cdc25C 的作用下被磷酸化激活, 激活的 CDK1 可以进一步磷酸化多种底物蛋白, 包括核仁蛋白<sup>[15]</sup>、组蛋白<sup>[16]</sup>、p53<sup>[17]</sup>等, 被磷酸化后的底物蛋白可以行使不同的生物学功能, 促进细胞由 G2 期向 M 期转化。在糖原的代谢中, 蛋白质磷酸化的联级反应也发挥重要作用<sup>[18]</sup>, 当细胞内的 cAMP (cyclic adenosine monophosphate) 升高时, PKA (protein kinase A) 被激活, 随后它可以磷酸化糖原磷酸化酶激酶, 激活的糖原磷酸化酶激酶又可以磷酸化糖原磷酸化酶, 此时糖原磷酸化酶可降解糖原, 生成葡萄糖-1-磷酸, 可见, 蛋白质的磷酸化在各种生理生化反应中发挥着极其重要的作用。

近年来, 多种实验技术被应用到蛋白质的磷酸化研究中, 其中定点突变是最常用、最重要的技术之一。它是将已有的 DNA 序列中, 定向改变碱基的实验技术, 包括碱基对的改变、缺失或插入。现今, 定点突变技术已被广泛应用于科学研究中。例如, 研究蛋白质的结构与功能, 优化 DNA 作用元件, 增强酶的作用活性以及提高抗体的稳定性等。虽然本课题组前期的利用生物信息学手段预测的 Tudor-SN 蛋白的 Serine426 (S426)、Serine781 (S781)、Threonine240 (T240)、Threonine429 (T429) 为潜在的磷酸化位点, 但是对其磷酸化所行使的生物学功能则不是很清楚, 因此笔者引入了定点突变技术将上述磷酸化位点都突变为 Alanine, 并成功构建了 pCMV-N-Tudor-SN (S426A)-Flag、pCMV-N-Tudor-SN (S781A)-Flag、pCMV-N-Tudor-SN (T240A)-Flag、pCMV-N-Tudor-SN (T429A)-Flag 的突变质粒, 为进一步研究 Tudor-SN 蛋白的多功能性奠定了基础。

#### 参考文献:

[1] Tong X, Drapkin R, Yalamanchili R, et al. The Epstein-Barr virus nuclear protein 2 acidic domain forms a complex with a novel cellular coactivator that can interact with TFIIIE[J]. *Mol Cell Biol*, 1995, 15(9):4735

- [2] Callebaut I, Mornon J P. The human EBNA-2 coactivator p100: multidomain organization and relationship to the staphylococcal nuclease fold and to the Tudor protein involved in *Drosophila melanogaster* development[J]. *Biochem J*, 1997, 321(Pt 1):125
- [3] Su C, Zhang C, Teclé A, et al. Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN), a novel regulator facilitating G1/S phase transition, acting as a co-activator of E2F-1 in cell cycle regulation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(11):7208
- [4] Duan Z, Zhao X, Fu X, et al. Tudor-SN, a novel coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  protein, is essential for adipogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(12):8364
- [5] Gao X, Ge L, Shao J, et al. Tudor-SN interacts with and co-localizes with G3BP in stress granules under stress conditions[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(16):3525
- [6] Välineva T, Yang J, Palovuori R, et al. The transcriptional co-activator protein p100 recruits histone acetyltransferase activity to STAT6 and mediates interaction between the CREB-binding protein and STAT6[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(15):14989
- [7] Levenson J D, Koskinen P J, Orrico F C, et al. Pim-1 kinase and p100 cooperate to enhance c-Myb activity[J]. *Mol Cell*, 1998, 2(4):417
- [8] Gao X, Shi X, Fu X, et al. Human Tudor staphylococcal nuclease (Tudor-SN) protein modulates the kinetics of AGTR1-3'UTR granule formation[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(13):2154
- [9] Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, et al. Overexpression of dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(5):2345
- [10] Brito C C, Fachel A A, Vettore A L, et al. Identification of protein-coding and intronic noncoding RNAs down-regulated in clear cell renal carcinoma[J]. *Mol Carcin*, 2008, 47(10):757
- [11] Tsuchiya N, Ochiai M, Nakashima K, et al. SND1, a component of RNA-induced silencing complex, is up-regulated in human colon cancers and implicated in early stage colon carcinogenesis[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(19):9568
- [12] Kuruma H, Kamata Y, Takahashi H, et al. Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 as a potential tissue marker for prostate cancer[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(6):2044
- [13] Low S H, Vasanth S, Larson C H, et al. Polycystin-1, STAT6, and P100 function in a pathway that transduces ciliary mechanosensation and is activated in polycystic kidney disease[J]. *Dev Cell*, 2006, 10(1):57
- [14] Sánchez-Martínez C, Gelbert L M, Lallena M J, et al. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(17):3420
- [15] Lam Y W, Trinkle-Mulcahy L. New insights into nucleolar structure and function[J]. *F1000Prime Rep*, 2015, 7:48
- [16] Tamura K. Development of cell-cycle checkpoint therapy for solid tumors[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45(12):1097
- [17] Wang X, Simpson E R, Brown K A. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2015, [Epub ahead of print]
- [18] Jackson M A, Caputo N, Castle J R, et al. Stable liquid glucagon formulations for rescue treatment and bi-hormonal closed-loop pancreas[J]. *Curr Diab Rep*, 2012, 12(6):705

(2015-10-19 收稿)