

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00468

带核定位信号的 RAR α 与谷氨酸氨连接酶蛋白相互作用的胞内外验证

吴 燕, 刘北忠*, 王 翀, 钟 梁, 朱 丹, 王春光, 金丹婷

重庆医科大学医学检验系临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016

[摘要] **目的** 通过胞内外实验验证谷氨酸氨连接酶(GLUL)与带有核定位信号的维甲酸受体 α (NLS-RAR α)之间的相互作用。**方法** 将表达 GLUL 靶蛋白和 NLS-RAR α 诱饵蛋白的两种重组表达质粒共同转化入 AH109 酵母菌,采用一对一的酵母双杂交技术验证它们在活细胞内的相互作用;通过构建 GLUL 及 NLS-RAR α 蛋白标签融合表达载体,共转染至人胚肾 HEK 293 细胞,利用免疫共沉淀技术在细胞外验证它们之间的相互作用。**结果** GLUL 靶蛋白和 NLS-RAR α 诱饵蛋白质粒共转化 AH109 酵母菌后,可见蓝色的阳性克隆;GLUL 蛋白及 NLS-RAR α 标签融合表达载体构建成功,共同转染至 HEK 293 细胞,采用抗 HA 多克隆抗体免疫沉淀 HA-NLS-RAR α 相互作用蛋白复合物后,抗 c-Myc 单克隆抗体免疫印迹检测,检测到 GLUL-cMyc 蛋白。**结论** 采用酵母双杂交和免疫共沉淀技术成功地在胞内外验证了 GLUL 与 NLS-RAR α 之间存在特异性的相互作用。

[关键词] 维甲酸受体 α ; 核定位信号; 谷氨酸氨连接酶; 蛋白质相互作用; 双杂交系统技术; 免疫共沉淀

[中图分类号] R 733.71 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0468-04

Verification of interaction between glutamate-ammonia ligase and nuclear localization signal-retinoic acid receptor α protein inside and outside cells

WU Yan, LIU Bei-zhong*, WANG Chong, ZHONG Liang, ZHU Dan, WANG Chun-guang, JIN Dan-ting

Key Laboratory of Clinical Medical Diagnostics, Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

[Abstract] **Objective** To verify the interaction between glutamate-ammonia ligase (GLUL) and nuclear localization signal-retinoic acid receptor α (NLS-RAR α) protein by yeast two-hybrid and co-immunoprecipitation method. **Methods** The two plasmids expressing NLS-RAR α bait-protein and GLUL protein were co-transformed into yeast AH109 to investigate the interaction *in vivo*. Tagged fusion protein eukaryotic expression vectors were constructed and co-transfected into HEK 293 cells. Co-immunoprecipitation was used to investigate the interaction between NLS-RAR α and GLUL *in vitro*. **Results** Positive blue clones were found in the QDO/X- α -gal plate. Eukaryotic expression vectors were co-transfected into HEK 293 cells, then HA-NLS-RAR α protein was immunoprecipitated by anti-HA polyclonal antibody, and GLUL-cMyc protein expression was confirmed by Western blotting analysis using anti c-Myc monoclonal antibody. **Conclusion** The interaction between NLS-RAR α and GLUL has been verified by both yeast two-hybrid and co-immunoprecipitation.

[Key words] retinoic acid receptor α ; nuclear localization signals; glutamate-ammonia ligase; protein interaction; two-hybrid system techniques; co-immunoprecipitation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):468-471]

早幼粒细胞白血病基因(PML)与维甲酸受体 α (RAR α)融合而成的 PML-RAR α 融合基因在急性早幼粒细胞白血病(APL)的发生发展中起着重要的作用,但其作用并非始终通过整体的形式来发挥。在早期白血病细胞中,PML-RAR α 融合蛋白被中性

粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)切割后生成带有核定位信号的维甲酸受体 α (NLS-RAR α),进而参与 APL 的发生与发展^[1-2],NLS-RAR α 带有 PML 蛋白的核定位信号,能够干扰正常 RAR α 的信号转导,而其中的具体作用机制尚不明确。从蛋白

[收稿日期] 2009-11-30 **[接受日期]** 2010-01-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30300449),国家中医药管理局面上项目(02-03ZP52),重庆医科大学课题(XBYB2007104)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30300449), State Administration of Traditional Chinese Medicine (02-03ZP52) and Chongqing Medical University (XBYB2007104).

[作者简介] 吴 燕,硕士生。E-mail: wuyan911123@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 023-66645783, E-mail: liubeizhong@yahoo.com.cn

质的相互作用出发,可以为探明其分子作用机制提供线索与实验依据。为此,我们采用酵母双杂交系统从人白血病细胞 cDNA 文库中进行筛选,初步得到了谷氨酸氨连接酶(glutamate-ammonia ligase, GLUL)、AGBL5 与 JTV1 等 8 种与 NLS-RAR α 具有相互作用的蛋白^[3-4]。其中,GLUL 或谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)是细胞增殖与凋亡信号通路中能量的主要来源。为深入探索 GLUL 与 NLS-RAR α 的相互联系在人类 APL 发生发展中的机制,则需要进一步明确两者是否存在相互作用。因此,本实验拟通过一对一的酵母双杂交实验与基于人体细胞内表达的免疫共沉淀实验,在胞内外共同验证 GLUL 与 NLS-RAR α 的特异性相互作用。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种及试剂 pcDNA3.1-PML-RAR α 质粒由美国华盛顿大学 Andrew A. Lane 教授赠予; pGBKT7-NLS-RAR α 载体、pACT2-GLUL 载体、pTD-1 载体及人胚肾 293 细胞,大肠杆菌 DH5 α 为本课题组保存;酵母菌株 AH109、完全极限培养基、SD 基础培养基、X- α -gal,真核表达载体 pCMV-Myc、pCMV-HA,蛋白 G/蛋白 A 琼脂糖珠混悬液、鼠抗 c-Myc 单克隆抗体及兔抗 HA 多克隆抗体为 Clontech 公司产品;PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小抽试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司;限制性内切酶 *Sfi* I、*Sal* I、*Xho* I、*Eco*R I、T₄ 连接酶、DNA marker、T₄ 载体及 pMD18-T 载体为 TaKaRa 公司产品;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为 Santa Cruz 公司产品;DMEM 培养液、小牛血清和通用蛋白裂解/抽提试剂分别购自杭州四季青生物工程材料有限公司和盖宁生物科技(北京)有限公司;转染试剂 LipofectamineTM2000 为 Invitrogen 公司产品;预染标准蛋白相对分子质量购自北京赛百盛生物工程公司;PVDF 膜和化学发光试剂盒分别为 Millipore 公司和 Viagene 公司产品。

1.2 酵母双杂交实验 根据 Clontech 公司的酵母双杂交操作手册,采用 TE/LiAC 方法,制备酵母 AH109 感受态细胞,并采用 PEG/LiAC 法将 pACT2-GLUL 及 pGBKT7-NLS-RAR α 共同转化至 AH109 酵母感受态细胞,铺于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 营养缺陷平板(QDO),此平板内加有 X- α -gal,于 30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d,观察是否有阳性克隆即蓝色克隆。同时,共同转化 pTD1-1 与 pGBKT7-NLS-RAR α 作为阴性对照。阴性对照不能在 QDO 平板上生长。

1.3 免疫共沉淀实验

1.3.1 重组质粒 pCMV-HA-NLS-RAR α 和 pCMV-Myc-GLUL 的构建 pCMV-HA-NLS-RAR α 重组质粒的构建:以 pcDNA3.1-PML-RAR α 为模板,克隆 NLS-RAR α 基因片段,经 TA 克隆装入 pMD18-T,得到含 NLS-RAR α 基因片段的 pMD18-T-NLS-RAR α 载体,测序分析验证。再用 *Sal* I/*Eco*R I 双酶切,亚克隆入 pCMV-HA 载体,经酶切鉴定正确后再测序分析。pCMV-Myc-GLUL 重组质粒的构建:用 *Xho* I/*Sfi* I 双酶切,从文库质粒 pACT2-GLUL 中得到 GLUL 基因片段,亚克隆入 pCMV-Myc 载体,酶切鉴定及测序分析。

1.3.2 细胞转染 人胚肾 293 细胞以 DMEM 培养液培养,待长至 90% 融合时共转染 pCMV-HA-NLS-RAR α 和 pCMV-Myc-GLUL 重组质粒,并以单独转染 pCMV-HA-NLS-RAR α 质粒和 pCMV-Myc-GLUL 质粒作为对照。转染步骤:(1)无抗生素无血清 DMEM 培养液 200 μ l 分别稀释 pCMV-Myc-GLUL 质粒和 pCMV-HA-NLS-RAR α 质粒各 5 μ g,混匀,室温孵育 10 min。(2)再用 225 μ l 无抗生素无血清 DMEM 培养液稀释 25 μ l LipofetamineTM2000 混匀后,室温下孵育 10 min。(3)将(1)液和(2)液混匀成转染混合液,室温下孵育 30 min,加入已改用 1.5 ml 无抗生素无血清 DMEM 培养液培养的培养瓶,轻拍混匀,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养 4 h,弃用原培养液,换用浓度为 5% 小牛血清的 DMEM 培养液继续培养。

1.3.3 免疫共沉淀 转染 48 h 后,收集细胞,用预冷的 PBS 清洗细胞 3 次,离心并弃去上清;加入 500 μ l 通用蛋白裂解液(已加入蛋白酶抑制剂),冰上吹打裂解 20 min,于 4 $^{\circ}$ C 下 1 400 \times g 离心 30 min,随后收集裂解液并加入 2 μ g 兔抗 HA 多克隆抗体,于 4 $^{\circ}$ C 下振荡混合过夜;次日加入 40 μ l 蛋白 G/蛋白 A 琼脂糖珠混悬液,于 4 $^{\circ}$ C 下振荡混合 8 h,250 \times g 离心 5 min,弃上清,再用通用蛋白裂解液洗 3 次;最后加入 20 μ l 的 2 \times 蛋白电泳缓冲液煮沸 5 min,瞬时离心后进行 SDS-PAGE。

1.3.4 免疫印迹分析 样品以浓度为 12% 的 SDS-PAGE 分离胶电泳(80 U 30 min,100 U 2 h),半干电转转至 PVDF 膜 15 U,15 min 后,5% 的脱脂奶粉中封闭过夜。次日加入鼠抗 c-Myc 单抗,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,再用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,按操作手册加入化学发光试剂,成像仪中显影、摄像。

2 结果

2.1 酵母双杂交的结果 将 pACT2-GLUL 及 pG-

BKT7-NLS-RAR α 共同转化入酵母感受态细胞 AH109 之后,在相应的培养液中以 30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d,出现了蓝色的阳性克隆,而阴性对照则未见克隆生长,该结果证明 GLUL 与 NLS-RAR α 在酵母细胞内确实存在相互作用(图 1)。

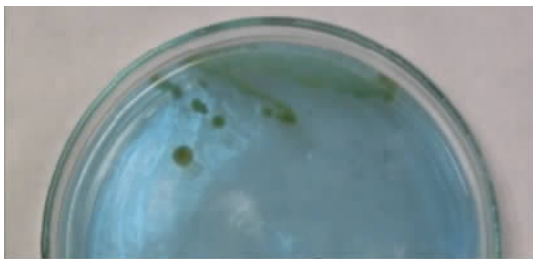


图 1 生长在 QDO 培养板上的阳性克隆

Fig 1 Positive clones in QDO plate

2.2 重组质粒 pCMV-HA-NLS-RAR α 的酶切分析及测序鉴定 用 *Sal* I /*Eco*R I 酶对重组的质粒双酶切,在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳,酶切产物中在 1 578 bp 处可见预期大小相对分子质量的片段(图 2)。测序的结果亦证明扩增的基因片段与预期完全相符合(图 3),说明重组质粒 pCMV-HA-NLS-RAR α 构建成功。

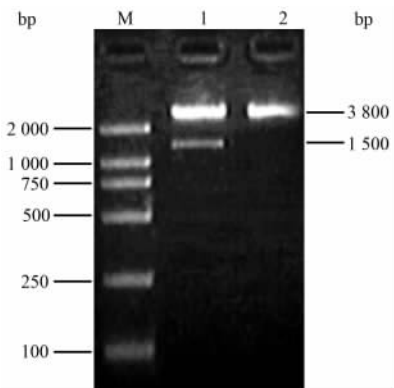


图 2 重组质粒 pCMV-HA-NLS-RAR α 的双酶切分析图

Fig 2 Restriction enzyme analysis of

pCMV-HA-NLS-RAR α using *Sal* I & *Eco*R I

M: Marker; 1: pCMV-HA-NLS-RAR α ; 2: pCMV-HA

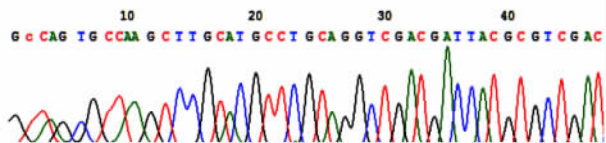


图 3 重组质粒 pCMV-HA-NLS-RAR α 的测序图(部分)

Fig 3 Sequencing result of pCMV-HA-NLS-RAR α (fragment)

2.3 重组质粒 pCMV-Myc-GLUL 的酶切分析及测序鉴定 采用 *Xho* I /*Sfi* I 进行双酶切,在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,酶切产物中在 3 500 bp 处可见预

期大小相对分子质量的片段(图 4)。测序的结果亦证明扩增的基因片段与预期完全相符合(图 5),说明重组质粒 pCMV-Myc-GLUL 构建成功。

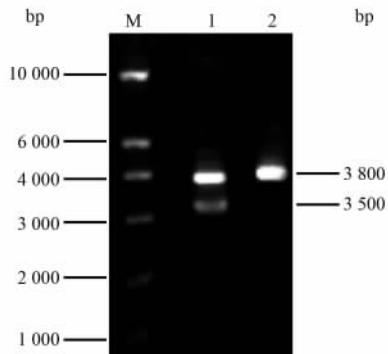


图 4 重组质粒 pCMV-Myc-GLUL 的双酶切分析图

Fig 4 Restriction enzyme analysis of

pCMV-Myc-GLUL using *Xho* I & *Sfi* I

M: Marker; 1: pCMV-Myc-GLUL; 2: pCMV-Myc

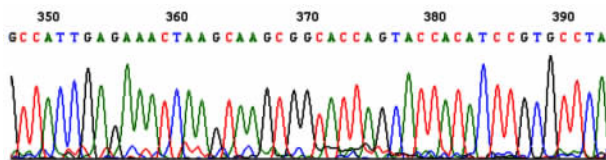


图 5 重组质粒 pCMV-Myc-GLUL 的测序图(部分)

Fig 5 Sequencing result of pCMV-Myc-GLUL (fragment)

2.4 免疫共沉淀结果 在共同转染了 pCMV-Myc-GLUL 和 pCMV-HA-NLS-RAR α 的全细胞裂解液中,先用 HA 抗体免疫沉淀后,再用 c-Myc 单克隆抗体做蛋白印迹分析,结果检测到相对分子质量大约为 42 000 的蛋白(GLUL-cMyc 融合蛋白的相对分子质量为 42 000),而在单独转染了 pCMV-Myc-GLUL 或 pCMV-HA-NLS-RAR α 的全细胞裂解液中,免疫沉淀则未检测到 GLUL-cMyc 融合蛋白表达(图 6)。该实验重复操作 3 次,结果均一致。结合前期的酵母双杂交结果,证明 GLUL 与 NLS-RAR α 之间有相互作用。

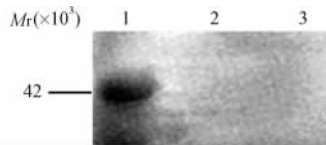


图 6 免疫共沉淀检测 GLUL 和

NLS-RAR α 间的相互作用

Fig 6 Interaction between GLUL and NLS-RAR α

was detected by co-immunoprecipitation

1: pCMV-HA-NLS-RAR α and pCMV-Myc-GLUL co-transfected; 2: pCMV-HA-NLS-RAR α transfected; 3: pCMV-Myc-GLUL transfected

3 讨论

PML-RAR α 融合基因是急性早幼粒细胞白血病(APL)特异的细胞遗传学改变,它是由15q的PML和17q的RAR α 基因融合形成。PML-RAR α 基因表达PML-RAR α 融合蛋白,能够影响野生型的RAR α 和PML的结构和功能,从而在APL的发病机制中起着重要作用。有研究表明,单独将PML-RAR α 导入动物体内,虽然能够在体内检测到高水平表达的PML-RAR α mRNA和PML-RAR α 蛋白,但是仅有2%~3%的动物会发展成为白血病。如果将PML-RAR α 转染入早期的髓细胞,很容易发展成为APL白血病细胞;若将其转染入晚期的髓细胞,结果却不能发展为APL白血病细胞^[5-7]。在对PML-RAR α 的进一步研究中,Lane和Ley^[1]发现,PML-RAR α 融合蛋白在含有NE的U937细胞中被切割成相对分子质量为52 000和61 000的2个片段,即带有NLS的NLS-RAR α 和NLS缺失突变的PML(NLS deletion mutation, Mut-PML)。在不包含NE的早期髓细胞中导入PML-RAR α 发生APL的概率只有2%~3%,远远低于富含NE的早期髓细胞,从而证实了NE在APL发生中的重要性。裂解形成的这两段蛋白对白血病的发生极可能有重要影响,但是仍未见国内外对其作用机制的研究报道。我们在前期实验中利用酵母双杂交系统从白血病细胞cDNA文库中筛选出了能够与NLS-RAR α 蛋白发生相互作用的蛋白^[3-4],首次发现了GLUL在酵母细胞内与NLS-RAR α 蛋白可能存在相互作用。因此,本实验采用酵母体内共转化和免疫共沉淀进一步验证两者的作用。

GLUL基因编码的蛋白质属于谷氨酰胺合成酶家族,能够催化谷氨酸和氨合成谷氨酰胺,是主要的能量来源,与细胞增殖、细胞凋亡抑制等的信号通路密切相关^[8]。GLUL基因可在胎儿的早期阶段表达,能将氨从循环中清除,从而对氨进行解毒,并通过平衡循环中酸/碱比来控制机体的pH值起重要作用^[9]。目前陆续发现了GLUL基因的几种拼接转录变体,已有研究报道GLUL基因突变可引起先天的谷氨酰胺缺乏,从而可以导致多器官功能衰竭和新生儿死亡^[10]。另有研究表明,GLUL基因的表达受到严格的控制,尤其是在肝小叶中,因为这种酶与氮的内环境稳定相关。在人类原发性肝癌中,发现有GLUL基因的高表达,可能与其促进肿瘤发生/发展环境的形成有关^[11]。因此,GLUL基因突变或表达异常,均可通过某些机制诱导病变或促进癌症发生。

野生型RAR α 在胞质内发挥其生物学效应,而带有NLS的NLS-RAR α 却在胞核内起作用,其定位的不同必然导致作用效应的差异。在前期实验中,我们采用核内酵母双杂交系统进行筛选,初步发现GLUL与NLS-RAR α 之间可能存在相互作用。通过本研究,进一步在细胞内外证实了GLUL与NLS-RAR α 存在相互作用。我们推测通过NLS-RAR α 与GLUL的相互作用,GLUL的正常功能受到干扰,这可能与APL的发生、发展有关。目前还未见国内外有关GLUL蛋白与PML-RAR α 或RAR α 蛋白相互作用的报道。因此,本研究结果为了解这些基因的功能和作用机制提供了新的线索,同时也为深入探讨其相互作用在APL发生中的分子作用机制奠定了实验基础。

[参考文献]

- [1] Lane A A, Ley T J. Neutrophil elastase is important for PML-retinoic acid receptor alpha activities in early myeloid cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25: 23-33.
- [2] Lane A A, Chabner B A. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy[J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27: 5459-5468.
- [3] 王东生,王翀,刘北忠,夏乾峰,郝坡,刘畅,等.酵母双杂交系统筛选和验证与RAR α -V相互作用的蛋白[J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29: 388-392.
- [4] 王翀,钟梁,王东生,刘北忠,廖飞,郝坡,等. NLS-RAR α 蛋白相互作用蛋白的筛选与验证[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2009, 36: 500-505.
- [5] Early E, Moore M A, Kakizuka A, Nason-Burchenal K, Martin P, Evans R M, et al. Transgenic expression of PML/RARalpha impairs myelopoiesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 7900-7904.
- [6] Westervelt P, Ley T J. Seed versus soil: the importance of the target cell for transgenic models of human leukemias[J]. *Blood*, 1999, 93: 2143-2148.
- [7] Laurenzana A, Petruccioli L A, Pettersson F, Figueroa M E, Melnick A, Baldwin A S, et al. Inhibition of DNA methyltransferase activates tumor necrosis factor alpha-induced monocytic differentiation in acute myeloid leukemia cells[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 55-64.
- [8] Evans M E, Jones D P, Ziegler T R. Glutamine inhibits cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells *via* the pyrimidine pathway[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289: G388-G396.
- [9] Clancy K P, Berger R, Cox M, Bleskan J, Walton K A, Hart I, et al. Localization of the *L*-glutamine synthetase gene to chromosome 1q23[J]. *Genomics*, 1996, 38: 418-420.
- [10] Häberle J, Görg B, Rutsch F, Schmidt E, Toutain A, Benoist J F, et al. Congenital glutamine deficiency with glutamine synthetase mutations[J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1926-1933.
- [11] Christa L, Simon M T, Flinois J P, Gebhardt R, Brechot C, Lasserre C. Overexpression of glutamine synthetase in human primary liver cancer[J]. *Gastroenterology*, 1994, 106: 1312-1320.