

鸡去泛素化相关因子 1 基因原核表达载体的构建及表达

赵程程¹, 郑海南¹, 吴山力², 郑梅竹³, 杨德才¹, 张玉静¹, 艾永兴^{1*} (1. 吉林大学 畜牧兽医学院, 吉林 长春 130062; 2. 吉林大学 白求恩医学院, 吉林 长春 130021; 3. 长春师范学院 中心实验室, 吉林 长春 130032)

摘要: 构建鸡去泛素化相关因子 1 (Chicken ubiquitin-related factor 1, chUAF1) 的原核表达载体, 并对表达产物进行鉴定。将提取的鸡法氏囊 cDNA 根据哺乳动物基因组的特性 5'-端 GC 含量高 3'-端 GC 含量低的特点设计 2 对引物, PCR 获取 2 段基因片段。将两者用搭桥部分的酶切位点进行酶切, 胶回收, 连接成 chUAF1 基因全长, 再将基因克隆入 pMD18-T 载体, 酶切鉴定后, 将 chUAF1 基因亚克隆到 pET28a 原核表达载体, 构建重组质粒 pET28a-UAF1。转化 BL21(DE3) 大肠杆菌中, IPTG 诱导表达并鉴定。结果显示, 所构建的 chUAF1 基因表达载体 pET28a-chUAF1 经 PCR 及 DNA 测序结果表明构建正确, SDS-PAGE 鉴定在预期位置出现阳性条带。结果表明, 已成功构建了 pET28a-chUAF1 原核表达载体, 为下一步试验提供了依据。

关键词: 泛素化相关因子 1; 构建; 原核表达

中图分类号: Q78; S852.2 文献标志码: A 文章编号: 1005-4545(2013)01-0085-04

Construction and expression of recombinant plasmids encoding chicken UAF1 gene

ZHAO Cheng-cheng¹, ZHENG Hai-nan¹, WU Shan-li², ZHENG Mei-zhu³, YANG De-cai¹, ZHANG Yu-jing¹, AI Yong-xing^{1*} (1. College of Animal Science and Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. Norman Bethune College of Medicine, Jilin University, Changchun 130021, China; 3. The Central Laboratory, Changchun Normal University, Changchun 130032, China)

Abstract: To construct the prokaryotic expression vector of chicken ubiquitin-related factor 1 (chUAF1), total RNA was isolated from chicken bursa of fabricus and then cDNA was synthesized by RT-PCR. According to the features of the mammalian genome which containing high GC content in 5'-end and low GC content in 3'-end, we designed two pairs of primers to amplified two fragments of chUAF1 by PCR. The full length of chUAF1 gene was reconstituted by linking a same restriction site in the overlap of two fragments and then chUAF1 gene was cloned into pMD18-T vector for sequencing. The correct chUAF1 gene was subcloned into pET28a vector to construct the recombinant plasmids of pET28a-chUAF1. The recombinant plasmids were transformed into BL21(DE3) competent cells. Expression of chUAF1 was induced by IPTG and identified by SDS-PAGE. The results showed chUAF1 was successfully expressed in *E. coli*. expression system.

Key words: UAF1; construction; prokaryotic expression

* Corresponding author

去泛素化相关因子 1 (USP1-associated factor 1, UAF1) 是一个相对分子质量约为 80 000 的蛋白, 其 N-端含有 8 个 WD 重复基序的 WD40 结构域, C-端是螺旋卷曲域 (Coiled-coil)^[1]。Park 等^[2] 人最初

的研究发现其为胞内体 p80 蛋白, 可以与松鼠猴疱疹病毒 (Herpesvirus saimiri, HVS) 的 Tip 相互作用并导致了溶酶体囊泡的形成。目前的研究发现, UAF1 WD40 域结合 3 种去泛素化酶 (USP1、USP12 和 USP46)^[3-4], 并能激活其蛋白酶活性。本试验提取鸡法氏囊的总 RNA, RT-PCR 扩增得到 chUAF1 片段, 并在其两端引入酶切位点 Nco I 和 Xho I, 对 chUAF1 片段和 pET28a 质粒进行双酶

收稿日期: 2012-08-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31272528)

作者简介: 赵程程 (1988-), 女, 硕士。

* 通讯作者

切处理,连接后得到重组质粒 pET28a-chUAF1 并转化至 *E. coli* BL21(DE3)中,通过 IPTG 诱导可以高效表达,利用 SDS-PAGE 鉴定表达结果,为下一步研究其与去泛素化酶家族相互作用机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞及载体 大肠杆菌菌株 BL21 (DE3)、TOP10 由本室保存。克隆载体:pMD18-T 为 TaKaRa 公司产品;表达载体:pET28a(+)为 Novagen 公司产品。

1.2 试剂 T_4 DNA 连接酶、GC Buffer II、LA Taq DNA 聚合酶及 Nco I、Xho I 和 Hind III 限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司;Pfu DNA 聚合酶购自 Agilent 公司;引物由北京金唯智生物科技有限公司合成;其余试剂均为国产分析纯。

1.3 鸡法氏囊总 RNA 的提取 根据文献报道,鸡法氏囊中 UAF1 基因中的 RNA 表达量较高,所以对其进行总 RNA 的提取。将新鲜的鸡法氏囊切成小块放入研钵中,在研钵中倒入液氮然后迅速研磨组织样(研磨成粉末状为最佳)。在 EP 管中先加入裂解液,然后将磨成粉的组织样加入 EP 管中,室温静置 5 min。 4°C $12\ 000\times g$ 离心 5 min,小心吸取上清液,移入新的离心管中(切勿吸取沉淀)。向上述匀浆裂解液中加入氯仿(RNAiso Plus 的 1/5 体积量),盖紧离心管盖,用手剧烈振荡 15 s,待溶液充分乳化(无分相现象)后,再室温静置 5 min。 4°C $12\ 000\times g$ 离心 15 min。吸取上清液转移至另一新的离心管中(切忌吸出白色中间层)。向上清中加入等体积的异丙醇,上下颠倒离心管充分混匀后,在 $15\sim 30^{\circ}\text{C}$ 下静置 10 min。 4°C $12\ 000\times g$ 离心 10 min。一般在离心后,试管底部会出现沉淀。弃上清,加入 75%乙醇 1 mL(切勿触及沉淀),室温干燥沉淀 2~5 min 加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀,取 $5\ \mu\text{L}$ 利用紫外分光光度计测 D 值后反转录成 cDNA。

1.4 鸡 UAF1 基因的扩增 由于 chUAF1 的 5'-端 GC 含量高而 3'-端 GC 含量比较低,直接扩 chUAF1 基因全长比较困难,所以根据 GenBank 登录的鸡 UAF1 基因序列(序列号为 NM_001030964.1)设计引物。构建方法见图 1。

P1(上游引物): $5'$ -CAGTGTCAACCATGG-GAATGGCGGCGCATCACCGGCAG- $3'$

H1(下游引物): $5'$ -TCTCTGCTGCCCAAG-

GGACC- $3'$

P2(上游引物): $5'$ -GGTGTGGGATC-CAAGAACTTG- $3'$

H2(下游引物): $5'$ -TACGGTCAACTCGAG-GAGTAACCACGTGAGTCCAC- $3'$

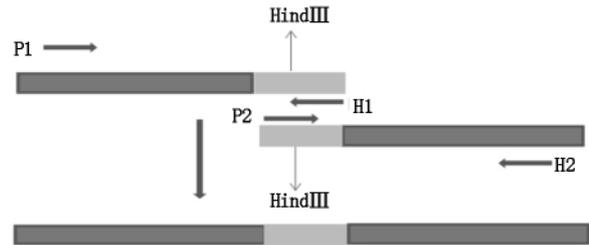


图 1 chUAF1 基因构建方法示意图

1.4.1 chUAF1-S 基因片段的扩增 取 $200\ \mu\text{L}$ PCR 管,依次加入模板 $0.5\ \mu\text{L}$,P1(10 mmol/L) $5\ \mu\text{L}$,H1(10 mmol/L) $5\ \mu\text{L}$,dNTP Mixture(2.5 mmol/L) $8\ \mu\text{L}$, $2\times$ GC Buffer II (Mg^{2+} Plus) $25\ \mu\text{L}$,LA Taq DNA polymerase ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.25\ \mu\text{L}$,Pfu DNA polymerase ($2.5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.25\ \mu\text{L}$,补加适量的去离子水至终体积 $50\ \mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 3 min 预变性, 94°C 1 min, 61°C 1 min, 72°C 2 min,共 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。

1.4.2 chUAF1-L 基因片段的扩增 取 $200\ \mu\text{L}$ PCR 管,依次加入模板 $0.5\ \mu\text{L}$,P2(10 mmol/L) $5\ \mu\text{L}$,H2(10 mmol/L) $5\ \mu\text{L}$,dNTP Mixture(2.5 mmol/L) $8\ \mu\text{L}$, $10\times$ PCR buffer (Mg^{2+} Plus) $5\ \mu\text{L}$,LA Taq DNA polymerase ($5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.25\ \mu\text{L}$,Pfu DNA polymerase ($2.5\ \text{U}/\mu\text{L}$) $0.25\ \mu\text{L}$,补加适量的去离子水至终体积达 $50\ \mu\text{L}$ 。混匀,离心。反应条件: 95°C 3 min 预变性, 94°C 1 min, 48°C 1 min, 72°C 2 min,共 30 个循环,最后 72°C 延伸 10 min。

1.5 重组质粒 pET28a-chUAF1 的构建 将最终 PCR 搭桥连接 chUAF1 的 2 个片段产物切胶回收,回收产物与 pMD18-T 载体相连,获得 pMD18T-chUAF1-S 载体和 pMD18T-chUAF1-L 载体,转化大肠杆菌感受态 TOP10 中,提取重组质粒,酶切鉴定正确后,将重组载体送北京金唯智生物科技有限公司测序,测序正确后将 pMD18T-chUAF1-S 以 Nco I 和 Hind III 酶切以及 pMD18T-chUAF1-L 以 Hind III 和 Xho I 酶切,将酶切产物切胶回收。2 段胶回收产物与 pET28a 载体进行连接,获得重组质粒 pET28a-chUAF1。

1.6 pET28a-chUAF1 蛋白的表达及鉴定 挑取含重组质粒 pET28a-chUAF1 的单菌落,接种于 5 mL 含卡那霉素(50 g/L)的 LB 培养基中,37℃ 摇床振荡培养 12 h。取 50 μL 过夜培养物接入 5 mL 含卡那霉素(50 g/L)的 LB 培养基振荡培养 3 h($D_{600} = 0.6$),用 0.1 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 5 h,离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 鉴定。

2 结果

2.1 chUAF1 基因 RT-PCR 结果 通过 RT-PCR 从鸡法氏囊组织中扩增 chUAF1 基因,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见 746 bp 和 1 504 bp 左右的片段,与预期大小相符(图 2)。

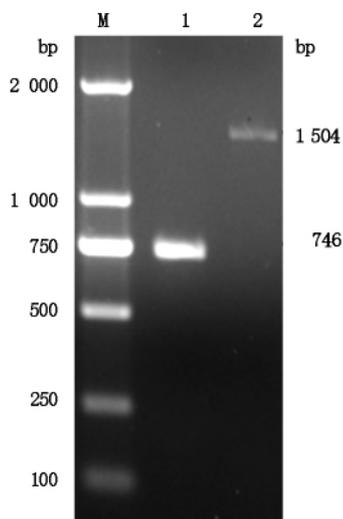


图 2 chUAF1 基因 PCR 电泳结果 M. DL2000 DNA Marker; 1. chUAF1-S 基因 PCR 产物; 2. chUAF1-L 基因 PCR 产物

2.2 pMD18T-chUAF1-S 载体和 pMD18T-chUAF1-L 载体的酶切鉴定 pMD18T-chUAF1-S 载体用 Nco I 和 Hind III 酶切以及 pMD18T-chUAF1-L 载体用 Hind III 和 Xho I 酶切,得到 2 条 600 bp 和 1 500 bp 左右的片段,与预期的结果相符(图 3、4)。测序结果与 chUAF1 在 GenBank 中登录的碱基序列完全一致。

2.3 pET28a-chUAF1 载体的酶切鉴定 pET28a-chUAF1 载体经 Nco I 和 Xho I 酶切后,得到 1 条约 2 000 bp 的片段,为正向连接片段,与预期的结果相符(图 5)。测序结果与 chUAF1 在 GenBank 中登录的碱基序列完全一致。

2.4 chUAF1 蛋白在大肠杆菌中的表达 37℃ 过夜培养 12 h,经 IPTG 诱导 5 h 表达后,取菌悬液进行 SDS-PAGE 鉴定,在相对分子质量约 76 000 处

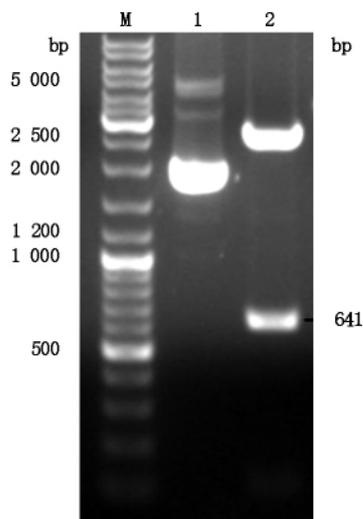


图 3 pMD18T-chUAF1-S 载体酶切鉴定 M. DNA Marker 10000; 1. pMD18T-chUAF1-S 质粒; 2. pMD18T-chUAF1-S Nco I 和 Hind III 双酶切产物

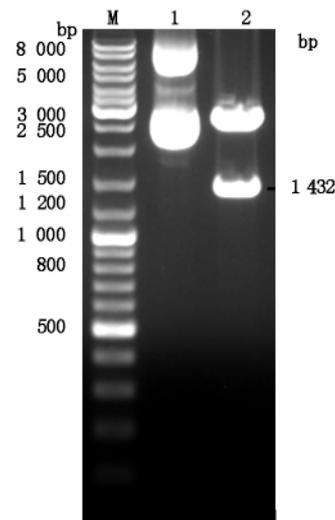


图 4 pMD18T-chUAF1-L 载体酶切鉴定 M. DNA Marker 10000; 1. pMD18T-chUAF1-L 质粒; 2. pMD18T-chUAF1-L Hind III 和 Xho I 双酶切产物

可见有目的蛋白条带,而空载体对照菌液则无目的条带出现(图 6)。

3 讨论

chUAF1 序列表现为 5'-端 GC 含量高 3'-端 GC 含量很低,我们通过分段基因扩增的方法,并根据重叠部分包含的相同的酶切位点进行酶切,然后连接成目的基因的全长。

UAF1 是一个相对分子质量为 80 000 的蛋白。Park 等^[2]人最初的研究发现,其为胞内体 p80 蛋白,可以与松鼠猴疱疹病毒(Herpesvirus saimiri, HVS)的 Tip 相互作用并导致了溶酶体囊泡的形

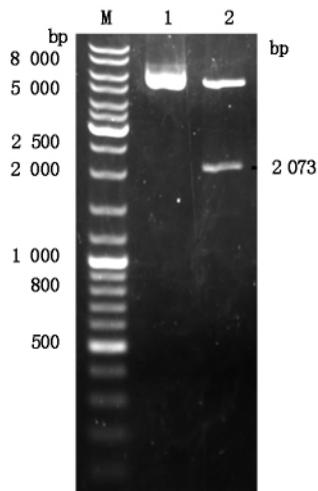


图5 pET28a-chUAF1 载体酶切鉴定 M. DNA marker 10000; 1. pET28a-chUAF1 质粒; 2. pET28a-chUAF1 Nco I 和 Xho I 双酶切产物

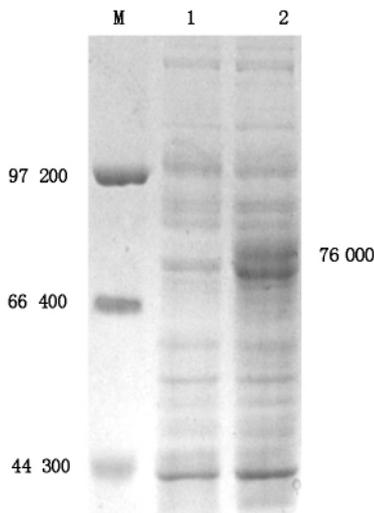


图6 pET28a-chUAF1 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达 M. 蛋白标准分子量; 1. 诱导前菌体蛋白; 2. pET28a-chUAF1 诱导 5 h 后菌体蛋白

成。WD 结构蛋白是一种具有不同的细胞功能的蛋白家族。G 蛋白的 $G\beta$ 亚基是具有 WD 结构域的典型蛋白, $G\beta$ 的 WD 结构的三维结构显示出 β 折叠-WD 重复部分是一种高度对称结构, 每个部分都包括 4 股反向平行的 β 折叠。另外, 一些微管上被转运的蛋白中也常见到有 WD 重复结构域, 这种结构域与这些被转运蛋白的靶向识别及分类有关^[4]。研究发现, p80 蛋白 N-端的 WD 重复结构域可以与 Tip 蛋白相互作用, 而 C-端的复合螺旋区域与溶酶体的定位有关。

UAF1 能调节 USP 亚家族复合物酶活性, 通过它的 WD40 结构域与 USP1 形成一个稳定的 USP1/UAF1 复合体激活 FANCD2, 从而调节

DNA 损伤修复^[1]。Cohn 等^[5]人鉴定了一种新的人 UAF1 复合物 USP12/UAF1, 发现 USP12 自身的酶活性很低但与 UAF1 形成 USP12/UAF1 复合物后, 提高了其酶活性, 但提高程度低于 UAF1 对 USP1 的刺激。

据报道, 在被发现的 95 种人去泛素化酶中有 USP1、USP12 和 USP46 等 3 种酶已被证实其活性可被 UAF1 调节^[6], 其所在的泛素调节系统参与了 DNA 损伤修复^[1]、细胞衰老与凋亡^[7]、免疫调节、病毒感染^[8]等细胞内的生命过程, 而 UAF1 参与免疫系统的调节等细胞生命过程, 因此可以推断这 2 种调节系统之间可能通过 UAF1 与 USP 酶的相互作用而存在一定的关联。开展 UAF1 蛋白的相关研究对于细胞内调节系统之间的联系具有重要意义, 本试验成功地表达了 chUAF1, 为下一步深入研究 UAF1 及 USP 酶类的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Murai J, Yang K, Dejsuphong D, et al. The USP1/UAF1 complex promotes double-strand break repair through homologous recombination[J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(12):2462-2469.
- [2] Park J, Lee B S, Choi J K D, et al. Herpesviral protein targets a cellular WD repeat endosomal protein to downregulate T lymphocyte receptor expression [J]. *Cell Press*, 2002, 17(8):221-233.
- [3] Cohn M A, Kee Y, Haas W, et al. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(8):5343-5351.
- [4] Kowalski J R, Dahlberg C L, Juo P. The deubiquitinating enzyme USP-46 negatively regulates the degradation of glutamate receptors to control their abundance in the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans* [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(4):1341-1354.
- [5] Kee Y, Yang K, Cohn M A, et al. WDR20 regulates activity of the USP12/UAF1 deubiquitinating enzyme complex [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(15):11252-11257.
- [6] Cohn M A, Kowal P, Yang K, et al. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway[J]. *Mol Cell*, 2007, 28(5):786-797.
- [7] 吴慧娟, 张志刚. 泛素-蛋白酶体途径及意义[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26(1):7-10.
- [8] Maertens G N. Ubiquitin-specific proteases 7 and 11 modulate polycomb regulation of the INK4a tumour suppressor[J]. *EMBO*, 2010, 29(15):2553-2564.