网络出版时间:2023-01-20 16:23:33 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20230119.1741.008.html

雄激素受体基因各功能域片段的原核表达与功能鉴定

张雨琪,丁明珠,吴金凤,郑海香,张 磊,王 星

摘要 **目的** 系统构建雄激素受体(AR)野生型全长和4个功能域截短体的原核表达质粒,Western blot与凝胶迁移(EMSA)实验鉴定各融合蛋白及其功能。**方法** 基于pGEX-4T-1载体,构建AR全长及各功能域的谷胱甘肽巯基转移酶(GST)融合表达重组质粒。应用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)对重组质粒进行诱导表达,确定各重组蛋白的最佳参数。分别用AR内源性抗体和GST标签抗体进行Western blot鉴定,分析诱导前、诱导后细菌裂解液中的目的蛋白,并利用谷胱甘肽琼脂糖树脂进一步纯化。将纯化后蛋白与病毒荧光探针进行孵育,复合物于非变性凝胶中电泳检测纯化蛋白功能。**结果** 成功构建了AR全长和3个功能域截短体的原核表达质粒。PCR和双酶切鉴定均显示在各插入片段大小相符处出现阳性条带,且测序结果与NCBI GenBank标准株比对一致。其中,96 ku GST-AR-NTD+DBD与86 ku GST-AR-NTD两个融合蛋白得以成功表达及后续纯化。纯化蛋白可与病毒基因组DNA直接结合。**结论** 来源同一基因序列的AR截短体重组质粒原核表达条件不同,纯化后的AR蛋白可用于深入了解AR各功能域与其他分子间的直接相互作用机制。

关键词 雄激素受体;原核表达;GST融合蛋白;功能域突变体

中图分类号 Q 786

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)02-0219-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.008

雄激素受体(androgen receptor,AR)属Ⅰ型类固醇类激素受体,主要与雄激素特异性结合后对生殖及非生殖系统行使重要生理功能。AR由4个结构域组成,为N端转录激活区(N-terminal domain,NTD)、高度保守的DNA结合区(DNA-binding domain)、铰链区(hinge)和配体结合区(ligand-binding domain,LBD),分别行使AR转录激活、识别结合DNA、调节AR空间构象与高度特异结合雄激素等功能[1-2]。近年来,越来越多的肿瘤和病毒感染性疾病被发现与雄激素信号轴调控异常密切相关[3-5],并对病毒有直接调控作用[6]。肆虐全球的新型冠状病毒感染同样表现出性别偏倚,男性患者的症状更严重,死亡率更高[7]。AR能以经典的转录因子角色促进肿瘤病毒的基因表达及致瘤,但此作用是否经由AR与病毒基因组的直接结合而发生目前未知,因此系统性构建AR全长及各功能域的GST融合蛋白,将为后续开展GST-pull down等直接相互作用研究及明确最小互作域等提供基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及抗体 大肠埃希菌感受态细胞DH5α、BL21(DE3)菌种(ZEC-0005-20、ZEC-0014-20)购自中国福州载基生物科技有限公司;pGEX-4T-1质粒、AR-FL-pcDNA 3.1/Hygro质粒由福建医科大学基础医学院消化道恶性肿瘤教育部重点实验室保存并提供;α-AR抗体(货号:ab74272)购自美国Abcam公司,GST标签抗体、兔抗小鼠IgG抗体、小鼠抗兔IgG抗体(货号:2622、7074、5127)购自美国Cell Signaling Technology公司。

1.2 主要试剂 PrimeSTAR Max Premix(2×)DNA聚合酶(货号:R045A,Takara Bio Inc.);XhoⅠ、BamHⅠ、T4 DNA连接酶(货号:R0146L、R0136L、M0202L,New England Biolabs Inc.);考马斯亮蓝染色溶液(货号:C462151,Bio Basic Inc.);RIPA裂解液、溶菌酶(货号:ST206、P0013B,上海碧云天生物技术有限公司);谷胱甘肽还原型[货号:A600229,生工生物工程(上海)股份有限公司];IPTG(货号:80909-1.5,北京天恩泽基因科技有限公司);谷胱甘肽琼脂糖珠子(货号:17075601,美国GE Healthcare公司);蛋白酶抑制剂(货号:HY-K0010,MedChemExpress LLC)。通用型DNA纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒[货号:DP214-02、DP118-02,天根生化科技(北京)有限公司];BCA蛋白定量试剂盒(货号:23227,Thermo Fisher Scientific Inc.)。

2022-12-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81873966);福建医科大学高层次人才启动经费计划(编号:XRCZX2019016);病毒学国家重点实验室开放研究基金(编号:2020KF007);福建省自然科学基金项目(编号:2021J01663)

作者单位:福建医科大学基础医学院,福州 350122

作者简介:张雨琪,女,本科生;

王 星,女,研究员,责任作者,E-mail:xwang623@fjmu.edu.cn

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3 基于 pGEX-4T-1 质粒构建 AR 全长及功能域截短体的重组质粒

1.3.1 AR 全长及截短目的基因的扩增和回收 根据 pGEX-4T-1 质粒骨架和 AR 基因序列选择 BamH I 与 Xho I 酶切位点，以本实验室保存的 ARFL-pcDNA 3.1/Hygro 质粒为模板，聚合酶链式(polymerase chain reaction，PCR)反应扩增并纯化回收 AR 全长及截短目的基因片段，上下游引物序列见表 1。扩增参数为 98 ℃预变性 5 min；98 ℃变性 10 s，62 ℃退火 5 s，72 ℃延伸 30 s，总共 30 个循环；最后 72 ℃延伸 10 min。

表 1 AR 全长及截短目的基因引物的名称和序列

引物名称	序列(5′-3′)
AR-FL-pGEX-4T-1-F	CGGGATCCAGGAGGTTTTTCATGGAAGTGCAGTTA
AR-FL-pGEX-4T-1-R	CCCTCGAGTCACTGGGTGTGGAAATAGATG
AR△LBD-pGEX-4T-1-R	CCCTCGAGTCAACATTCATAGCCTTCAATG
AR-NTD + DBD-pGEX-4T-1-R	CCCTCGAGTCAAGTCATCCCTGCTTCATAAC
AR-NTD-pGEX-4T-1-R	CCCTCGAG TCACATGTCCCCGTAAGGTCCG
AR-LBD-pGEX-4T-1-F	CGGGATCCAGGAGGTTTTTCATGCAGCCCATCTT TCTGAATGT
AR-LBD-pGEX-4T-1-R	CCCTCGAGTCACTGGGTGTGGAAATAGATG

1.3.2 重组质粒的构建与鉴定 用限制性内切酶 BamH I 与 Xho I 对质粒与目的基因片段在 37 ℃中进行酶切 5 h，酶切后两者以 1∶5 比例用 T4 连接酶 16 ℃连接 2 h 以上。连接产物转化入 BL21(DE3)感受态菌株中，以 100 μg/ml 氨苄青霉素(ampicillin，Amp)筛选抗性单克隆。以菌液为模板，上下游引物与扩增参数同 1.3.1 项，进行 PCR 扩增鉴定。进一步对 PCR 结果阳性的菌液进行质粒抽提，同上对质粒行 BamH I 与 Xho I 的双酶切鉴定，并将鉴定结果阳性的质粒送铂尚生物技术(上海)有限公司测序。

1.4 AR 全长及功能域截短体融合蛋白的诱导表达及条件优化 取测序正确的菌液以 4% 接种于 Amp LB 培养液中，振荡培养菌体处于对数生长期(OD 值为 0.6 ~ 0.8)，留取 1.5 ml 菌液诱导前对照。设置不同 IPTG 浓度(0.1、0.5、1 mmol/L)，不同诱导温度(30、37 ℃)，并在不同时间点(6、12 h)收集 1.5 ml 诱导后菌液，离心得到细菌沉淀。用 100 μl RIPA 裂解液重悬细菌沉淀并冰上裂解 10 min，冰浴超声破碎菌体，于十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝中电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegel electrophoresis，SDS-PAGE)，考马斯亮蓝染色胶块，分析各组间目的蛋白表达效率，选择最佳的诱导表达条件进行大量重组菌的诱导表达，并用谷胱甘肽琼脂糖树脂进一步纯化。

1.5 Western blot 鉴定融合蛋白表达 将诱导前菌液、诱导后菌液与纯化后蛋白上样于 SDS-PAGE 凝胶电泳，将蛋白 300 mA、1.5 h 转至 PVDF 膜上，于 5% 牛血清白蛋白中室温封闭 1 h。将膜与 AR 和 GST 的特异性抗体(1∶1 000)于 4 ℃过夜孵育结合，次日，用洗膜液(含 0.1% Tween 20 的 1 × TBST)快速转动洗膜 3 次，分别加入 HRP 标记的兔抗小鼠 IgG 抗体、小鼠抗兔 IgG 抗体(1∶10 000)，室温孵育 1 h。洗膜后均匀滴加 ECL 化学发光底物，置于 ImageQuant LAS 4000 凝胶成像仪中进行曝光。

1.6 凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay，EMSA)鉴定纯化蛋白功能 将纯化后融合蛋白、GST(150 pmol)与一种能和 AR 结合的病毒荧光探针(荧光探针的设计及扩增同先前研究[6]，30 pmol)在 EMSA 结合缓冲液中混匀，25 ℃孵育 30 min。配置 20 ml 6.5% 非变性 PAGE 胶：将 1 ml 10 × TBE、4.4 ml 30% 丙烯酰胺/甲叉双丙烯酰胺溶液、1 ml 50% 甘油、20 μl TEMED、13.6 ml ddH_2O 均匀混合，室温静置 10 min 脱气，再加入 120 μl 10% 过硫酸胺吹打混匀，灌胶后室温放置 2 h 以上。在 0.5 × TBE 电泳缓冲液中 120 V 冰上预电泳至电流稳定在 15 mA 左右。将孵育后的蛋白-DNA 探针复合物小心上样于胶孔内，120 V 冰上电泳 2 h 以上。用 ODYSSEY CLx 双色红外激光成像仪分析结果。

2 结果

2.1 设计与扩增 AR 全长及各功能域截短体基因片段 本文共设计了 4 个截短体 AR，使其缺失或仅存在一个功能域(图 1A)。依次为全长 AR(AR-FL，1 - 919 aa)及缺失 LBD(AR△LBD，1 - 669 aa)、缺失 LBD 与铰链区(仅余 N 端转录激活域与 DNA 结合域)(AR-NTD + DBD，1 - 625 aa)、缺失 LBD、铰链区(Hinge)和 DBD 的 N 端转录激活域(AR-NTD，1 - 537 aa)、配体结合域(AR-LBD，669 - 919 aa)的截短体 AR。PCR 扩增产物上样于 2% 琼脂糖凝胶电泳分析，结果显示在标准分子量 Marker 相对应长度 2 763、2 004、1 872、1 608、753 bp 处，分别出现单一清晰的扩增条带，成功获得 AR-FL、AR△LBD、AR-NTD + DBD、AR-NTD、AR-LBD 目的基因片段(图 1B)。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

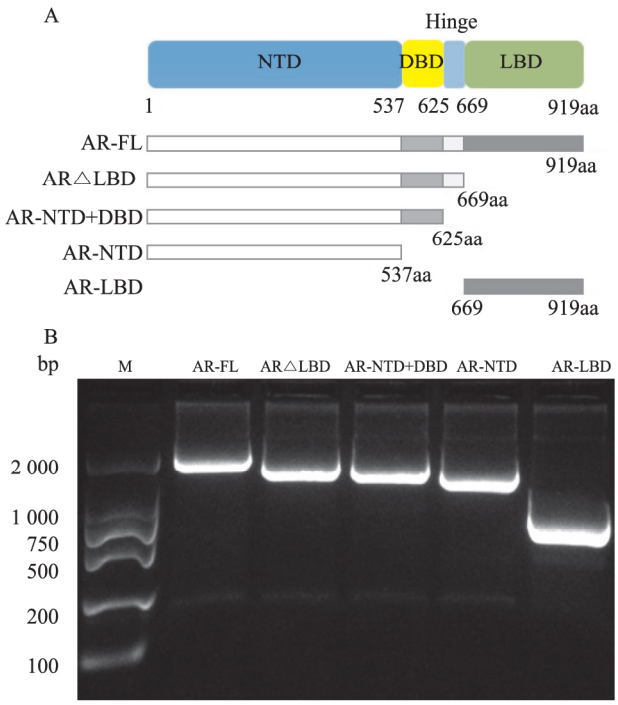

图 1 设计和扩增 AR 全长和各功能域截短体基因片段

A: AR 结构图及全长、各截短体信息; B: AR 全长及各功能域截短体基因片段的 2% 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 构建并鉴定 AR 全长及各功能域的原核表达质粒 以菌液为模板进行 PCR 扩增检测，如图 2A 所示，在相应分子量大小处出现单一清晰的扩增条带。阳性质粒双酶切后出现两条泳带，靠近胶孔的条带为酶切后的 pGEX-4T-1 质粒，远离胶孔的则是酶切出的插入片段(图 2B)。对双重鉴定中均显示阳性的克隆进行测序，将插入片段测序结果与 NCBI GenBank 标准株氨基酸序列(NG-009014.2)进行比对(图 2C)，AR 全长、AR-NTD+DBD、AR-LBD 序列与标准株一致，AR-NTD 的第 460 个氨基酸由甘氨酸突变为天冬氨酸。最终成功构建 4 个重组质粒，分别为 AR-FL-pGEX-4T-1、AR-NTD+DBD-pGEX-4T-1、AR-NTD-pGEX-4T-1、AR-LBD-pGEX-4T-1。

2.3 诱导表达各 GST 融合蛋白 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色分析重组菌在诱导后产生的可溶性蛋白，结果显示，与未加 IPTG 的阴性对照组相比，加入 IPTG 后可诱导空载、AR-FL-pGEX-4T-1、AR-NTD+DBD-pGEX-4T-1、AR-NTD-pGEX-4T-1、AR-LBD-pGEX-4T-1 重组菌分别在26、129、96、86、

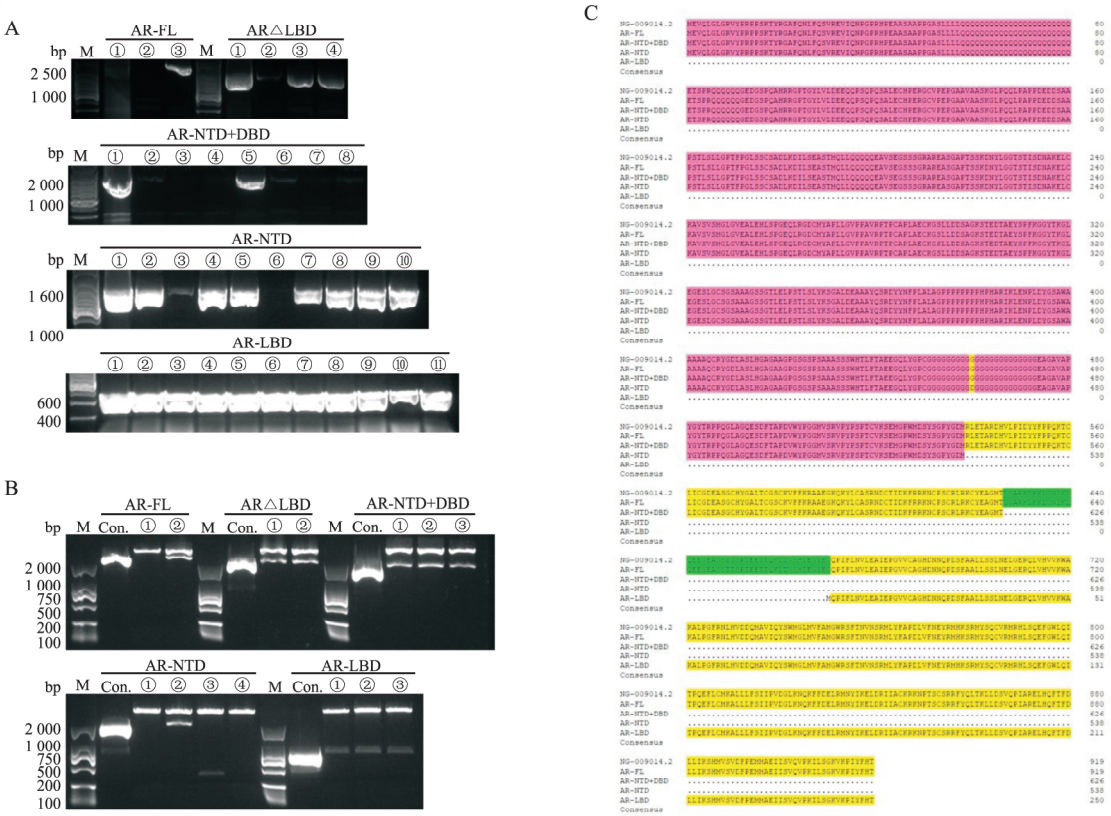

图 2 重组质粒的菌液 PCR、双酶切鉴定及同源比对结果

A: 菌液 PCR 扩增结果显示阳性菌液在相应分子大小处出现单一清晰条带; ①-⑪: 表示各类重组质粒所挑取的克隆数; B: 抽提阳性菌液中质粒进行双酶切鉴定; 各重组质粒的第一条泳道以相应基因片段作为阳性对照，注明为 Con.; ①-④: 表示所鉴定的重组质粒数目; C: 重组质粒测序结果与标准株氨基酸序列的同源比对结果; 粉色、黄色、绿色色块分别代表序列一致性为 70%、50%、30% 及以上

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

54 ku 处出现了非菌体蛋白的大量表达条带(图 3,红色箭头指示处)。对比两个诱导时间,诱导 12 h 比 6 h 的蛋白条带总体染色更浓,但相应分子量处目的蛋白的表达条带差异不明显。对比两个诱导温度,细菌在 30 ℃诱导时蛋白表达量略优于 37 ℃,特别是 GST 蛋白明显在 30 ℃条件下表达量更大。并且当 IPTG 终浓度为 1 mmol/L 时细菌蛋白总量有所下降,表现出一定的试剂毒性。因此,IPTG 终浓度 0.1 mmol/L、30 ℃、200 r/min 诱导 6 h 为最佳诱导条件,在此条件下小量诱导的目的蛋白条带最明显。

2.4 Western blot 与 EMSA 鉴定各融合蛋白表达及其功能 Western blot 检测了重组质粒诱导表达蛋白,结果显示(图 4A),AR-NTD + DBD-pGEX-4T-1、AR-NTD-pGEX-4T-1 重组质粒诱导表达后的粗提总蛋白与纯化蛋白中均能检测出特异性 AR 蛋白表达,分别位于 96、86 ku 处。用 GST 标签抗体作为一抗时,3 种质粒的诱导后细菌裂解液与纯化蛋白均能被 GST 标签抗体检测出,且 GST 空载组蛋白经过纯化后杂带消失,仅在 26 ku 处出现一单一条带。重组质粒表达的截短体 AR 融合蛋白在目的位置大小处存在目的条带(图 4,红色箭头指示处)。EMSA 结果显示荧光游离探针与 AR-NTD + DBD、AR-NTD 融合蛋白复合物泳带较 GST 组显著滞后(图 4B),证明两个融合蛋白经纯化后在体外具有与 DNA 直接结合的功能。

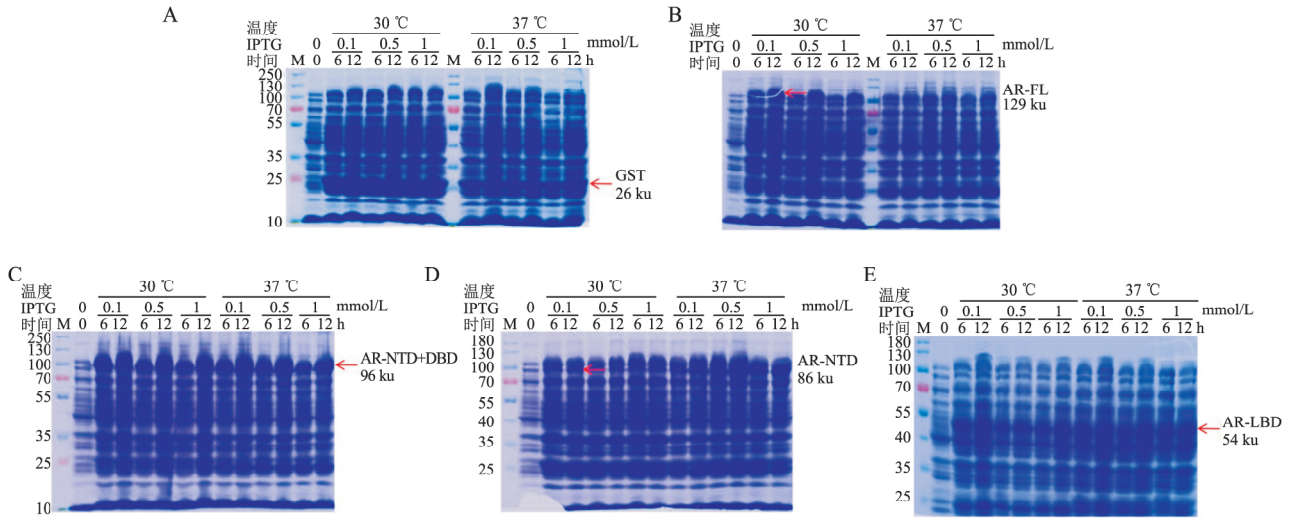

图 3 考马斯亮蓝染色分析 pGEX-4T-1 空载和 AR 各重组质粒的诱导表达

A: pGEX-4T-1 空载; B: AR-FL-pGEX-4T-1; C: AR-NTD + DBD-pGEX-4T-1; D: AR-NTD-pGEX-4T-1; E: AR-LBD-pGEX-4T-1; 红色箭头指示蛋白名称与分子量

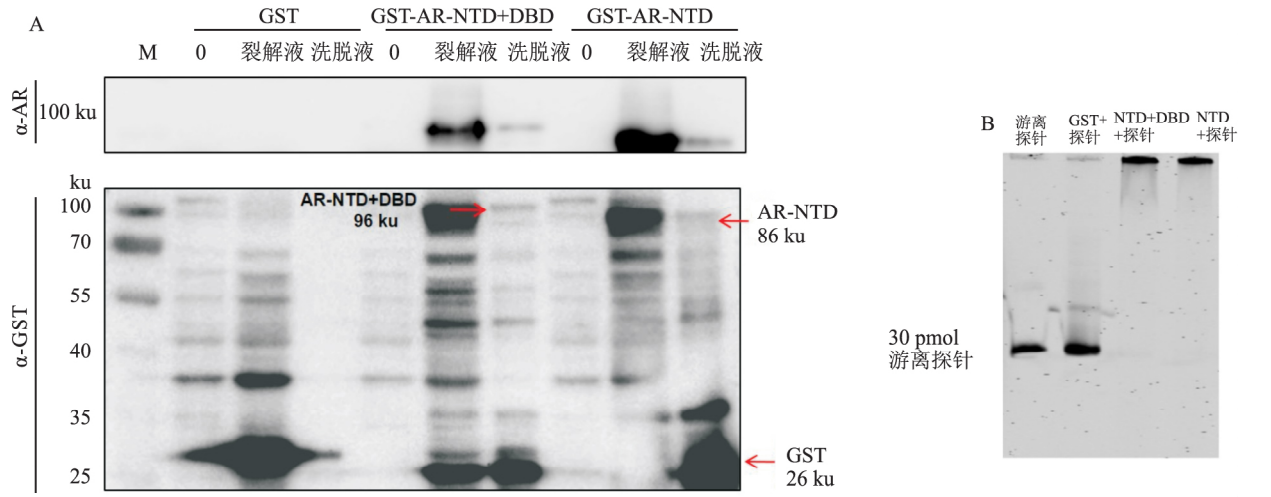

图 4 Western blot 与 EMSA 鉴定各融合蛋白表达及其功能

A: AR 内源性抗体和 GST 标签抗体对 GST 融合的 AR-NTD + DBD 与 AR-NTD 进行 Western blot 鉴定; B: EMSA 验证 AR-NTD + DBD 与 AR-NTD 与 DNA 荧光探针的直接结合

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

本文详述了构建重组质粒与诱导原核蛋白表达的实验过程，针对其中的重难点以及所遇到的问题，总结得出以下结论：① 设计高特异性的引物是 PCR 实验成功的关键。② 在重组质粒的构建过程中，连接效率与 DNA 和载体比例密切相关，适当提高 DNA 比例或能得到更高的连接效率。过长的目的基因也是连接效率低下的重要原因，结果显示在同一连接体系条件下，短片段 DNA 更易与载体重组成功。③ 为避免影响后续实验进度，应严格验证重组质粒。以菌液为模板扩增目的片段可能出现假阳性，需行双酶切鉴定。在菌液 PCR 与双酶切鉴定双阳性的情况下，有一定概率出现碱基缺失或增补造成突变。所以为确保载体正常表达，测序结果才是验证重组质粒是否构建成功的金标准。分析测序结果需同时对核苷酸和氨基酸序列进行比对，分析有无移码、无义或点突变。本研究对 ARΔLBD-pGEX-4T-1 重组质粒测序结果进行核苷酸的同源比对时，显示其发生了移码突变，但鉴于与 AR-NTD + DBD-pGEX-4T-1 相比较前者在结构上仅缺少铰链区，而非 AR 的重要功能域，故在两次测序错误后未重新构建。④ 诱导表达实验中，诱导温度、时间、转速及诱导剂浓度都会影响菌株表达目的蛋白的能力，预实验中可以在不同时间点留取菌液以摸索出最佳的目的蛋白表达条件。通过降低温度与诱导剂浓度，能在一定程度上减小诱导剂对菌体生长的毒性作用，且摇培过程需保障足够的菌通气量。也有部分蛋白即使在插入片段无误的情况下，仍无法诱导表达出蛋白。实验结果显示，不同表达载体与不同长度的基因插入片段都会影响细菌蛋白的表达。分子量越大的 GST 融合蛋白越难表达，例如在诱导 129 ku 的 GST 融合 AR 全长蛋白表达时，出现了仅表达 GST，不表达目的蛋白的情况。此外，细菌沉淀的充分裂解超声是纯化蛋白纯度和浓度的基本保证。⑤ 蛋白纯化实验需严格在冰上操作，并补加蛋白酶抑制剂防止蛋白降解。本研究通过 Western blot 分析明确了 AR 蛋白的特异性，但泳道中同时也出现了一些小于目的蛋白分子量的蛋白杂带，在实验操作规范的前提下，综合分析认为此蛋白杂带是由于载体本身性质所致的无法避免的蛋白降解条带，载体起始密码子的上游在 RNA 编码区有类似于核糖体结合位点的间隔序列，导致其在第二点起始翻译。后续通过对目的基因进行密码子优化或更换载体等措施或能得到表达量更大、更稳定的融合蛋白。

参考文献

[1] Fujita K, Nonomura N. Role of androgen receptor in prostate cancer: A review [J]. World J Mens Health, 2019, 37(3): 288-95.

[2] 梁栋国，王雅婷，罗睿宇，等. HOTAIR 与前列腺癌的研究进展[J]. 安徽医科大学学报，2019，54(1)：163-7.

[3] Zhou H C, Liu C X, Pan W D, et al. Dual and opposing roles of the androgen receptor in VETC-dependent and invasion-dependent metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2021, 75(4): 900-11.

[4] Li C L, Li C Y, Lin Y Y, et al. Androgen receptor enhances hepatic telomerase reverse transcriptase gene transcription after hepatitis B virus integration or point mutation in promoter region [J]. Hepatology, 2019, 69(2): 498-512.

[5] Wang X, Zou Z, Deng Z, et al. Male hormones activate EphA2 to facilitate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection: Implications for gender disparity in Kaposi's sarcoma [J]. PLoS Path, 2017, 13(9): e1006580.

[6] Ding M, Wu J, Sun R, et al. Androgen receptor transactivates KSHV noncoding RNA PAN to promote lytic replication-mediated oncogenesis: A mechanism of sex disparity in KS [J]. PLoS Pathog, 2021, 17(9): e1009947.

[7] Takahashi T, Ellingson M K, Wong P, et al. Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes [J]. Nature, 2020, 588(7837): 315-20.

Prokaryotic expression and functional identification of androgen receptor functional domains

Zhang Yuqi, Ding Mingzhu, Wu Jinfeng, Zheng Haixiang, Zhang Lei, Wang Xing

(*School of Basic Medical Sciences, Fujian Medical University, Fuzhou* 350122)

Abstract ***Objective*** To construct the full-length prokaryotic expression plasmid of the wild type of androgen receptor (AR) and the truncated body of four functional domains, and to identify the fusion protein by Western blot and electrophoretic mobility shift assay (EMSA). ***Methods*** Based on the pGEX-4T-1 vector, the recombinant plasmids were constructed to express the full-length and functional domains of AR. IPTG was used to induce the

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

网络出版时间: 2023 - 01 - 20 16:07:50 **网络出版地址:** https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20230119.1741.009.html

人皮肤表皮干细胞外泌体的分离培养与鉴定

李碧优[1,2],马 洁[2],张启宇[3],章华兵[1],朱云平[1,2]

摘要 **目的** 通过优化技术流程,探究人皮肤表皮干细胞(EPSCs)体外分离培养及表皮干细胞外泌体(EPSCs-Exo)分离纯化的方法。**方法** 首先通过优化人源 EPSCs 的分离酶,运用改良的无血清培养液,添加 10 种因子刺激 EPSCs 生长,促进其分泌 EPSCs-Exo,同时维持 EPSCs 干性和增殖性,延缓 EPSCs 的分化和成熟。进一步优化差速离心的条件,高效高纯度提取人源的 EPSCs-Exo。对人皮肤组织进行免疫荧光染色溯源 EPSCs;对分离的 EPSCs 进行 Western blot 和免疫荧光染色检测其表面多个标志物;对 EPSCs-Exo 从形态、粒径大小、多个胞内和膜上标志物进行鉴定。**结果** 人皮肤组织分层表达表皮细胞的标志物,EPSCs 高表达整合素 α6(integrin-α6)、整合素 β1(integrin-β1)、P63 蛋白(P63)、细胞角蛋白 19(CK19)等标志物,EPSCs 上清液超速离心后的透射电镜显示茶托状结构,粒径大小检测直径介于 30 ~ 150 nm,蛋白印迹显示 Tsg101、CD9、CD63(溶酶体相关膜蛋白 3)呈阳性,Calnexin、GAPDH 呈阴性。**结论** 该研究成功在体外分离培养了人源 EPSCs 并获得人源 EPSCs-Exo。

关键词 外泌体;人表皮干细胞;超速离心;再生医学
中图分类号 R 459.9; Q 2-33
文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2023)02 - 0224 - 06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2023.02.009

表皮干细胞(epidermal stem cells,EPSCs)主要位于表皮细胞的基底层。在皮肤创伤时,可从基底层迁移到创伤部位,促进伤口的修复和愈合[1]。EPSCs 随年龄增长逐渐减少,因此分离培养 EPSCs 变得尤为重要,而人源 EPSCs 的分离和培养一直存在易污染、易分化的难点[2]。外泌体(exosomes,EVs)直径在 30 ~ 150 nm 的细胞外囊泡[3],干细胞是最常见的外泌体分泌细胞[4],相比干细胞,外泌体免疫原性低,内容物稳定易保存,以及易于量产等优点。外泌体的分离和提取一直是外泌体研究的难点[5]。

目前干细胞外泌体研究主要聚焦于间充质干细胞和脂肪干细胞,大都来源于大小鼠或细胞系[6],人源表皮干细胞外泌体(epidermal stem cells-exo-

2022 - 12 - 21 接收
基金项目:国家重点研发计划重点专项项目(编号:2021YFA1301603);蛋白质组学国家重点实验室开放课题(编号:SKLP-O2020005)

作者单位:[1] 安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032
[2] 军事医学研究院生命组学研究所蛋白质组学国家重点实验室,北京 102206
[3] 北京协和医院皮肤科,北京 100730
作者简介:李碧优,女,硕士研究生;
朱云平,男,研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhuyunping@ncpsb.org.cn;
章华兵,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:slzhang1977@163.com

expression of the recombinant proteins, which were isolated and purified by glutathione sepharose 4B beads under the optimized condition. The specific protein expression in the bacterial lysate and the purified protein isolated with glutathione sepharose 4B beads was identified by Western blot with AR antibody and GST labeled antibody. The purified protein was incubated with a fluorescent probe of the virus, and the complex was detected by electrophoresis in a non-denaturing gel. ***Results*** The prokaryotic recombinant plasmids of full length and three functional domain truncated AR were successfully constructed. The recombinant clones were identified by using bacterial culture as a template, and further verified by double enzyme digestion. It showed that there were identical bands in the same sizes as the inserted fragments. The nucleotide and the amino acid sequences were aligned to the reference sequence in NCBI GenBank. The GST fusion protein, GST-AR-NTD + DBD (96 ku) and GST-AR-NTD (86 ku) were successfully induced and verified. The purified protein could be directly combined with the viral genome DNA. ***Conclusion*** The prokaryotic expression conditions of truncated AR plasmid from the same gene sequence are different. The purified AR protein can be used to understand the direct interaction mechanism between functional domains of AR and other molecules.

Key words androgen receptor; prokaryotic expression; GST fusion protein; functional domain mutants

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net