

网络出版时间: 2016-10-12 13:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161012.1323.009.html>

RACK1 突变体在哺乳动物细胞中的表达及定位研究

朱亮亮 韩 卢 王蓓华 耿慧武 潘林鑫 刘晓颖 范礼斌¹

摘要 目的 根据活化蛋白激酶 C 受体 1 (RACK1) 的蛋白结构 构建其缺失突变体的真核表达质粒 研究 RACK1 缺失突变体在真核细胞内的表达及定位改变。方法 根据 RACK1 蛋白的结构域特点 以 pcDNA3.1-RACK1-FLAG 为模板 构建真核表达质粒 pcDNA3.1-RACK1(51-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(93-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(135-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(180-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG; Western blot 检测上述重组质粒在 HEK 293T 细胞中的表达; 免疫荧光技术检测 RACK1 的各缺失突变体在 COS7 细胞中的定位情况。结果 成功构建了 RACK1 各缺失突变体的真核表达质粒; Western blot 结果表明 除 pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG 外 其余缺失突变体在 HEK 293T 细胞中均有效表达; 免疫荧光实验表明 RACK1 缺失突变体在 COS7 细胞中主要定位在胞质 细胞核中也有少量分布。结论 成功构建了 RACK1 缺失突变体真核表达质粒 并在 HEK 293T 和 COS7 细胞中成功表达; 在 COS7 细胞中不同缺失突变体的表达定位均有差异 与野生型的 RACK1 相比也有所不同 表明缺失不同的结构域后其在细胞中的定位表达也发生了改变。这为研究 RACK1 各结构域的功能提供了重要依据。

关键词 突变体; 质粒构建; 免疫荧光; Western blot; 结构域中图分类号 Q 28; R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)11-1595-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.11.009

2016-07-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学系 合肥 230032

作者简介: 朱亮亮 男 硕士研究生;

刘晓颖 女 副教授 责任作者 E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn;

范礼斌 男 教授 硕士生导师 责任作者 E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

活化蛋白激酶 C 受体 1 (the receptor for activated C kinase 1, RACK1) 是由 7 个 WD40 (Trp-Asp) 重复结构域组成的 36 ku 的细胞内支架蛋白 首先是作为锚定蛋白并激活胞内受体蛋白激酶 C (PKC) 被报道^[1] 且能与 PKC β II 相互作用^[2]。RACK1 也命名为鸟嘌呤核苷酸结合蛋白 β 亚基类似物 1 (GNB2L1) 确定为 WD40 结构域蛋白家族成员 在大分子复合物中广泛存在^[3]。RACK1 可以与不同的信号分子如 PER1、PKC ϵ 、Src 相互作用 并作为多种蛋白质与蛋白质相互作用的平台^[4-7]。对于许多激酶和受体来说 RACK1 作为一种支架蛋白 在许多生物反应中起着至关重要的作用 包括免疫应答、细胞生长、黏附、迁移和分化等^[8-10]。该研究根据 RACK1 的 7 个 WD40 重复结构域 对其进行逐个缺失 并构建重组质粒。了解各缺失突变体的表达及定位情况 比较各缺失突变体与野生型的差异 进一步探索各结构域的不同功能。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系、菌株等 HEK 293T、COS7、感受态 *E. coli* TG1 细胞、真核表达载体 pcDNA3.1 (+)、pcDNA3.1-RACK1-FLAG 均为安徽医科大学生物教研室保存。

1.1.2 主要试剂与仪器 Prime Star 酶购自日本 TaKaRa 公司; 限制性内切酶 Hind III、EcoR V、T4 DNA 连接酶及 Lambda DNA EcoR I + Hind III Marker 购自加拿大 Fermentas 公司; AxyPrep DNA Gel Extraction Kit 购自美国 Axygen 公司; Plasmid Mini Kit 购自美国 Omega Bio-TEK 公司; DMEM 高

the lack of CD34, CD45 and CD31 expressions. Alizarin red and oil red O staining showed ADSCs could be differentiated to osteoblasts and adipocytes. The red fluorescence of CM-DiI labeling existed in the cell membrane and cytoplasm, which did not exist in the cell nucleus. After passages, the fluorescence was attenuated, and the fluorescence labeling rates of the third, sixth and ninth passage were 97.09%, 66.21% and 37.86%, respectively. **Conclusion** Rat ADSCs can grow and proliferate rapidly, and they have multiple differentiation potential. CM-DiI can label ADSCs simply and effectively. These can provide the basis for the following experiment *in vivo*.

Key words adipose-derived stem cells; cell culture; CM-DiI; cell labeling

糖培养基购自北京赛默飞世尔科技有限公司; 胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; Lipofectamine™ 2000、Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司; FLAG M2 单抗购自美国 Sigma 公司; TRITC/FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 荧光封片胶购自丹麦 DAKO 公司; PVDF 膜购自加拿大 BioBasi 公司; ECL 显色试剂盒购自美国 Pierce 公司; 荧光显微镜(Leica DMI 6000 型)购自德国 Leica 公司。

1.2 方法

1.2.1 运用 NCBI 数据库分析 RACK1 序列,划分 RACK1 的 7 个 WD40 区域。RACK1 是 G 蛋白 β 亚基的高度同源物,根据 G 蛋白 β 亚基的晶体结构使用 PyMOL 软件绘制 RACK1 的三维结构彩图。

1.2.2 缺失突变体的构建 根据目的基因序列和引物设计原则设计特异性引物,引物由通用生物系统(安徽)有限公司合成,具体引物设计见表 1。以 pcDNA3.1-RACK1-FLAG 为模板,使用厂商推荐的 PCR 反应程序用 Prime Star 酶扩增目的序列,产物由琼脂糖凝胶电泳分离,并用凝胶回收试剂盒回收纯化。扩增产物以及真核表达载体 pcDNA3.1(+) 用限制性内切酶 Hind III、EcoR V 进行酶切。酶切产物经 T4 DNA 连接酶 16 °C 连接过夜;连接产物转化到感受态细胞 TG1,均匀涂布于含氨苄抗性的 LB 培养皿上,37 °C 倒置培养 8 ~ 12 h;挑取单克隆于含有氨苄抗性的 LB 培养基中 37 °C 震荡过夜;SDS 碱裂解法抽提质粒并酶切鉴定,选择 1 管鉴定正确的质粒送通用生物系统(安徽)有限公司测序。

1.2.3 细胞培养 COS7 细胞和 HEK 293T 细胞均在含 5% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中培养,培养过程中加入双抗(青霉素、链霉素)并置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中。

1.2.4 瞬时转染 蛋白表达实验中,待转染前 1 d

接种的 HEK 293T 细胞长至 80% ~ 90% 的汇合度时,按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 的说明书将重组质粒瞬时转染于细胞中,培养 48 h。在荧光定位实验中,转染前 1 d 在 35 mm 的培养皿中置盖玻片接种的细胞长至 40% ~ 50% 的汇合度时,将重组质粒瞬时转染于细胞中,培养 24 h。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 转染 48 h 后收集细胞,将细胞悬浮于细胞裂解液中 4 °C 混旋裂解 0.5 ~ 1 h,4 °C、14 000 r/min 离心 20 min,分别收集上清液和沉淀;取 50 μ l 上清液与等量 2 $\times$ SDS 上样缓冲液混合,沉淀中直接加入适量 2 $\times$ SDS,沸水浴煮 5 min,12 000 r/min 离心 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳;电泳结束后 100 V 恒压电转 1 h;室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 PVDF 膜 2 h,FLAG 一抗(1 : 500)4 °C 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次(每次 10 min);二抗(1 : 5 000)室温孵育 1.5 h,TBST 漂洗 3 次(每次 15 min);于暗室中 ECL 显色试剂盒显影。

1.2.6 免疫荧光 COS7 细胞转染 24 h 后取出盖玻片,用预冷的 PBS 洗去残留的培养基后,分别用甲醇和 70% 的乙醇溶液固定细胞;1% 脱脂奶粉溶液封闭 30 min;FLAG 一抗(1 : 200,用封闭液稀释)室温孵育 2 h;TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(1 : 200,用 TBST 稀释)室温孵育 1 h;0.15 g/L DAPI 溶液染核;荧光封片胶(Dako)将盖玻片封于载玻片上。4 °C 储存过夜,用共聚焦荧光显微镜观察其定位。

2 结果

2.1 RACK1 三维结构图像和结构域分区

RACK1 是 G 蛋白 β 亚基的同源物,根据其晶体结构用 PyMOL 软件绘制 RACK1 的三维结构图。见图 1A,RACK1 的结构是一个显著不对称的七叶片螺旋

表 1 引物序列

引物名称	序列(5'-3')
pcDNA3-RACK1(51-317)-FLAG	F: CCCAAGCTTGGGGCCACCATGAAGTATGGAATTCCA R: GATATCCTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGCGTGTGCCAATGGTCA
pcDNA3-RACK1(93-317)-FLAG	F: CCCAAGCTTGGGGCCACCATGACAACGGGCACCACCACGA R: GATATCCTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGCGTGTGCCAATGGTCA
pcDNA3-RACK1(135-317)-FLAG	F: CCCAAGCTTGGGGCCACCATGCTGGGTGTGTGCAA R: GATATCCTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGCGTGTGCCAATGGTCA
pcDNA3-RACK1(180-317)-FLAG	F: CCCAAGCTTGGGGCCACCATGGCTAACTGCAAGCTGA R: GATATCCTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGCGTGTGCCAATGGTCA
pcDNA3-RACK1(219-317)-FLAG	F: CCCAAGCTTGGGGCCACCATGTGGGATCTCAACGAA R: GATATCCTCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCGCGTGTGCCAATGGTCA

浆结构,并插入两个显著的回环,一个在叶片Ⅲ和Ⅳ之间另一个在叶片Ⅵ和Ⅶ之间,从晶体结构上看 RACK1 的 N 末端和 C 末端之间有部分交叉。依据 NCBI 数据库分析 RACK1 的序列,将 RACK1 的 317 个氨基酸分成了不等的 7 个 WD40 结构域,并按照逐个缺失的方式构建了 5 个缺失突变体,见图 1B。

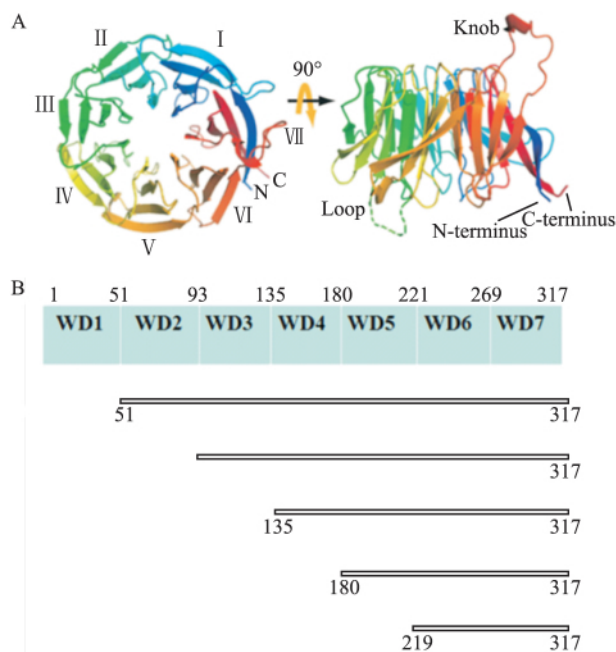


图1 RACK1 晶体结构和结构域图

A: RACK1 晶体结构(左边是俯视图,Ⅰ到Ⅶ每个叶片都贴上标签并使用 CHAINBOWs 设计着色;右边是侧视图);B: RACK1 结构域野生型 RACK1 被分成 7 个不等的结构域,并以此设计 5 个突变体

2.2 RACK1 缺失突变体 PCR 扩增产物及重组质粒的鉴定 对提取的重组质粒 pcDNA3.1-RACK1 (51-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (93-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (135-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (180-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (219-317)-FLAG; 进行 HindⅢ、EcoRⅤ 酶切鉴定,经与 Marker 的比对表明连接成功,见图 2。测序结果进一步证实目的片段正确插入到 pcDNA3.1(+) 载体中。

2.3 RACK1 突变体在哺乳动物细胞中的表达 对转染了 pcDNA3.1-RACK1 (51-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (93-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (135-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (180-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1 (219-317)-FLAG 的 HEK293T 细胞 48 h 后收集细胞并进行 Western blot 检测。如图 3A 所示,除 pcDNA3.1-RACK1 (219-

317)-FLAG 外,其它突变体裂解液均检测到相应的目的条带。而在沉淀中所有的突变体均有表达,如图 3B 所示。与蛋白 Marker 比较,条带与预期的一致,即分别为 30、25、20、15 和 10 ku。表明 RACK1 的 5 个缺失突变体均能在 HEK 293T 细胞中表达。

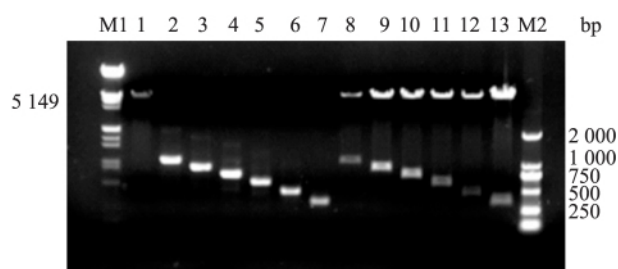


图2 重组质粒酶切鉴定图

M1: Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker; M2: TaKaRa DL2000 Marker; 1: pcDNA3.1(+) 载体酶切鉴定结果; 2、8: pcDNA3.1-RACK1-FLAG 的 PCR 产物和酶切鉴定结果; 3、9: pcDNA3.1-RACK1(51-317)-FLAG 的 PCR 产物和酶切鉴定结果; 4、10: pcDNA3.1-RACK1(93-317)-FLAG 的 PCR 产物和酶切鉴定结果; 5、11: pcDNA3.1-RACK1(135-317)-FLAG 的 PCR 产物和酶切鉴定结果; 6、12: pcDNA3.1-RACK1(180-317)-FLAG 的 PCR 产物和酶切鉴定结果; 7、13: pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG 的 PCR 产物和酶切鉴定结果

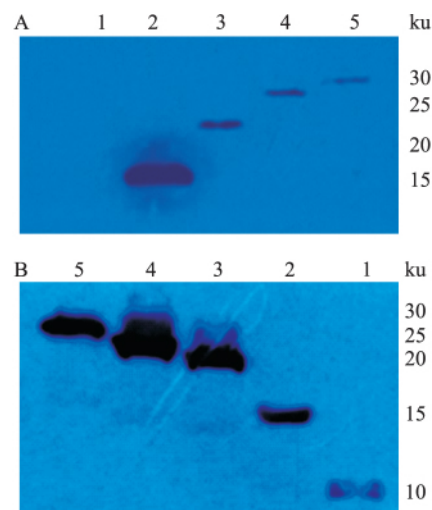


图3 Western blot 检测 RACK1 突变体在哺乳动物细胞中的表达

A: 转染了相应缺失突变体的 HEK 293T 细胞裂解液; B: 转染了相应缺失突变体的 HEK 293T 细胞沉淀; 1: pcDNA3.1-RACK1 (219-317)-FLAG; 2: pcDNA3.1-RACK1 (180-317)-FLAG; 3: pcDNA3.1-RACK1 (135-317)-FLAG; 4: pcDNA3.1-RACK1 (93-317)-FLAG; 5: pcDNA3.1-RACK1 (51-317)-FLAG

2.4 RACK1 突变体在 COS7 细胞中的定位 转染了 RACK1 突变体质粒的 COS7 细胞 24 h 后取出进行免疫荧光制片并在荧光显微镜下观察其定位。

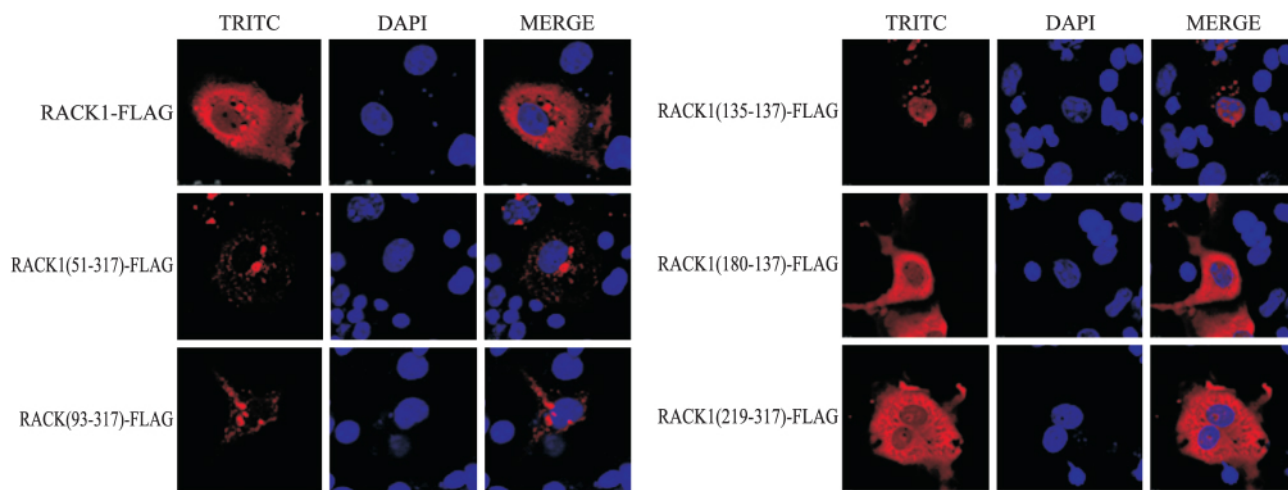


图4 RACK1 突变体在 COS7 细胞中的定位 ×600

红色: 带 FLAG 标签的 RACK1 突变体蛋白; 蓝色: DAPI 染色的细胞核; TRITC: FLAG 荧光二抗; DAPI: 细胞核染料; MERGE: 组合图

如图 4 所示, pcDNA3.1-RACK1(51-317)-FLAG 主要定位在细胞质并成点状分布, 细胞核中有极少表达; pcDNA3.1-RACK1(93-317)-FLAG 与 pcDNA3.1-RACK1(51-317)-FLAG 在 COS7 细胞中的定位相同; pcDNA3.1-RACK1(135-317)-FLAG 主要定位在细胞核中, 但细胞质中也有部分点状分布; pcDNA3.1-RACK1(180-317)-FLAG 与 pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG 主要定位在细胞质中且成弥散式的分布, 与其他突变体一样在细胞核中也有部分表达, 但相对量较多; 在定位发生变化的同时, 各突变体的表达量也发生了变化。随着 WD40 区域的减少, RACK1 突变体在 COS7 中的定位发生了一定的变化, 可能是由于在减少 WD40 结构域的同时其酸碱氨基酸发生了变化, 导致其在细胞中的定位发生了变化。

3 讨论

本研究设计并构建了 5 个带 FLAG 标签的 RACK1 缺失突变体, 并分别将其转染至 HEK 293T 和 COS7 细胞中, 结果显示, 所有缺失突变体均能在 HEK 293T 细胞中表达, 但 pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG 在上清液中不表达而在沉淀中表达, 这可能是 pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG 在 HEK 293T 细胞中的细胞膜上表达, 不能被溶解到裂解液中而留在沉淀中。在 COS7 细胞中, 缺失突变体 pcDNA3.1-RACK1(51-317)-FLAG 和 pcDNA3.1-RACK1(93-317)-FLAG 主要成点状分布在细胞质中, 这可能是因为 WD2 和 WD3 区域含较多的酸性氨基酸, 缺失突变体 pcDNA3.1-RACK1(135-317)-

FLAG 主要分布在细胞核中, 但细胞质中也有少量点状分布, 这可能是因为 WD4 区域含较多的双碱性氨基酸, 这些缺失突变体与野生型 RACK1 的细胞定位相比有明显的变化^[11-12]; 缺失突变体 pcDNA3.1-RACK1(180-317)-FLAG、pcDNA3.1-RACK1(219-317)-FLAG 主要在胞质与核膜处成弥散型分布, 细胞核中有少量分布, 与野生型 RACK1 的细胞定位未发生明显变化。随着 WD40 结构域的缺失其细胞定位随之也发生了变化, 表明不同的 WD40 结构域对细胞定位可能有不同的影响。在定位发生变化的同时, 各突变体的表达量也发生了变化, 可能存在的原因有待进一步研究。

WD40 蛋白广泛存在于真核细胞中^[11], 特别是在人源基因中^[12], 其特征在于由 40 到 60 个不等的重复氨基酸组成, 其内部含有两个保守的肽序列, 甘氨酸-组氨酸(GH)和色氨酸-天冬氨酸(WD)^[13-14]。含 WD40 的蛋白会参与诸如信号转导、染色质修饰和转录调控的基本机制。RACK1 含有 7 个重复的 WD40 区域, 可能具备所有 WD40 蛋白家族的特征。与其相互作用的蛋白都特异性结合在特定的 WD 区域, 如 Src、PDE4D5、PKC β 、干扰素受体等的结合区域都在 WD5-7 范围^[15]。RACK1 的 WD6 与 WD7 结构域能够与 pkd2L1 的 Ala19-Pro45 片段相互作用。表明 RACK1 的不同 WD40 区域可能具备不同的功能。研究显示野生型 RACK1 可与 CLIC1 蛋白相互作用, 本研究表明在缺失不同的 WD40 区域后其仍可在哺乳动物细胞中表达, 故可进一步研究 RACK1 的不同缺失突变体是否与 CLIC1 蛋白存在相互作用, 以及相互作用的具体区

域。

参考文献

- [1] Ron D , Mochly-Rosen D. Agonists and antagonists of protein kinase C function , derived from its binding proteins [J]. *J Biol Chem* ,1994 ,269(34) : 21395 – 8.
- [2] Ron D ,Chen C H ,Caldwell J ,et al. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1994 ,91(3) : 839 – 43.
- [3] Adams D R ,Ron D ,Kiely P A. RACK1 , A multifaceted scaffolding protein: structure and function [J]. *Cell Commun Signal* ,2011 ,9: 22.
- [4] Hu L ,Lu F , Wang Y , et al. RACK1 , a novel hPER1-interacting protein [J]. *J Mol Neurosci* ,2006 ,29(1) : 55 – 63.
- [5] Besson A ,Wilson T L ,Yong V W. The anchoring protein RACK1 links protein kinase C epsilon to integrin beta chains. Requirements for adhesion and motility [J]. *J Biol Chem* ,2002 ,277(24) : 22073 – 84.
- [6] Chang B Y ,Chiang M ,Cartwright C A. The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1 [J]. *J Biol Chem* ,2001 ,276(23) : 20346 – 56.
- [7] Sklan E H , Podoly E , Soreq H. RACK1 has the nerve to act: structure meets function in the nervous system [J]. *Prog Neurobiol* ,2006 ,78(2) : 117 – 34.
- [8] McCahill A ,Warwicker J ,Bolger G B ,et al. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms [J]. *Mol Pharmacol* ,2002 ,62(6) : 1261 – 73.
- [9] Mamidipudi V , Dhillon N K , Parman T , et al. RACK1 inhibits colonic cell growth by regulating Src activity at cell cycle checkpoints [J]. *Oncogene* ,2007 ,26(20) : 2914 – 24.
- [10] Berns H , Humar R , Hengeler B , et al. RACK1 is up-regulated in angiogenesis and human carcinomas [J]. *FASEB J* ,2000 ,14: 2549 – 58.
- [11] Janda L ,Tichy P , Spízek J , et al. A deduced *Thermomonospora curvata* protein containing serine/threonine protein kinase and WD-repeat domains [J]. *J Bacteriol* ,1996 ,178(15) : 1487 – 9.
- [12] Letunic I ,Doerks T ,Bork P. SMART: recent updates , new developments and status in 2015 [J]. *Nucleic Acids Res* ,2014 ,43: 257 – 60.
- [13] Yu L ,Gaitatzes C ,Neer E ,et al. Thirty-plus functional families from a single motif [J]. *Protein Sci* ,2000 ,9(12) : 2470 – 6.
- [14] Van Nocker S , Ludwig P. The WD-repeat protein super family in Arabidopsis: conservation and divergence in structure and function [J]. *BMC Genomics* ,2003 ,4(1) : 50.
- [15] McCahill A ,Warwicker J ,Bolger G B , et al. The RACK1 scaffold protein: a dynamic cog in cell response mechanisms [J]. *Mol Pharmacol* ,2002 ,62(6) : 1261 – 73.

Expression and localization of RACK1 mutants in mammalian cell

Zhu Liangliang , Han Lu , Wang Beihua , et al

(*Dept of Biology , Anhui Medical University , Hefei 230032*)

Abstract *Objective* To construct the eukaryotic expression plasmids of the receptor for activated C kinase 1 (RACK1) deletion mutants according to the protein structure of RACK1 and observe the expression and cellular localization of RACK1 mutants in the eukaryotic cells. *Methods* According to the characteristics of RACK1 domains , the eukaryotic expression plasmids pcDNA3.1-RACK1 (51-317) -FLAG , pcDNA3.1-RACK1 (93-317) -FLAG , pcDNA3.1-RACK1 (135-317) -FLAG , pcDNA3.1-RACK1 (180-317) -FLAG , and pcDNA3.1-RACK1 (219-317) -FLAG were constructed. The expressions of RACK1 mutants plasmids in HEK 293T cells were detected by Western blot and the localizations in COS7 cells were detected by immunofluorescence technique. *Results* All the plasmids of RACK1 mutants were successfully constructed. Western blot results indicated that all the mutants in HEK 293T cells expressed effectively except pcDNA3.1-RACK1 (219-317) -FLAG. Immunofluorescence experiments indicated that RACK1 mutants localized both in cytoplasm and nucleus , mainly in cytoplasm. *Conclusion* Recombinant plasmids of RACK1 mutants are constructed successfully and express effectively in HEK 293T cells and COS7 cells. However there are differences in the expression and localization of the different mutants in COS7 cells , and to contrast with the wild-type RACK1 are also similar. This situation indicates that the expression and cellular localization have some changes happened when there are some domains deficient in the RACK1 protein. The study is very important for exploring the function of the different domains of RACK1.

Key words mutant; recombinant plasmids; fluorescence; Western blot; domain