

人通用转录因子 GTFIIF2 表达与定位

赵 健 耿慧武 乔 正 李春雨 李克娟 刘晓颖 范礼斌

摘要 目的 构建不同标签的人通用转录因子 IIF 多肽 2 (GTFIIF2) 表达载体, 观察其细胞内的表达和定位。方法 设计 GTFIIF2 的引物, 以全长 cDNA 序列为模板, 利用聚合酶链式反应技术扩增 GTFIIF2 全长序列, 构建 pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 和 pCDGFP-GTFIIF2 质粒, 利用 Western blot 法和免疫荧光法检测其在细胞表达与定位; 构建 GST-GTFIIF2 质粒, 转化到 BL21 菌株, 用 IPTG 诱导剂诱导融合蛋白表达, 用 SDS-PAGE 分析诱导表达情况。结果 免疫荧光法检测 GTFIIF2 蛋白集中分布在 COS7 细胞核中, 在细胞质没有分布; pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 和 pCDGFP-GTFIIF2 质粒

能够在 HEK293T 细胞中有效表达; GST-GTFIIF2 在 BL21 菌株中很好的诱导表达。结论 GTFIIF2 在 COS7 细胞、HEK293T 细胞和 BL21 感受态细胞中能有效表达, 为更好地了解 GTFIIF2 蛋白在细胞内的功能提供一定的研究基础。

关键词 GTFIIF2; 基因表达; 蛋白定位; BL21

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)10-1382-05

2014-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201368); 安徽省自然科学基金项目 (编号: 11040606M170、11040606M164); 安徽省教育厅自然科学重点科研项目 (编号: KJ2010A187)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 赵 健, 男, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: xyz2848@sohu.com;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: fan_libin@hotmail.com

通用转录因子 IIF (GTFIIF) 参与基因转录的起始、启动子清除、延伸过程, 是由通用转录因子 IIF 多肽 2 (general transcription factor IIF subunit 2, GTFIIF2 或 RAP30) 和 GTFIIF1 两种亚基组成的四聚体分子^[1-3]。GTFIIF2 定位于人染色体其 13q14, 广泛表达于大部分的组织、器官中, 特别是肝、肾、肺。该基因 cDNA 全长 750 bp, 包含 8 个外显子 7 个内含子, 编码的 GTFIIF2 蛋白由 249 个氨基酸残基组成, 相对分子质量约为 28 380 ku 的蛋白质。其 N-末端与 GTFIIF1 相联系, GTFIIF1 与 GTFIIF2 两者形成的通用转录因子 GTFIIF 四聚体复合物。GTFIIF2 中间部分通过 RPB5 结合到 RNA 聚合酶 II, 对转录延

Effect of mitochondrion mediated apoptosis induced by icotinib in human salivary adenoid cystic carcinoma cell line ACC-M

Yang Cailing¹, Cui Weigang², Zhang Yinghua², et al

(¹Dept of Oral and Maxillofacial Surgery, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453100; ²Dept of Human Anatomy, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003)

Abstract Objective To investigate the role of mitochondrion in the induction of the apoptosis in human salivary adenoid cystic carcinoma cells through icotinib and to observe the effect of different concentrations of icotinib on the apoptosis. **Methods** The ACC-M cells were exposed to icotinib and (or) the P53 inhibitor PFT. The cell viability of ACC-M was measured by MTT assay. Expression of P53 and Cyt C was determined by Western blot analysis. The apoptosis of ACC-M cells was measured by Caspase-3 apoptosis related protein activity. **Results** Icotinib inhibited the viability in ACC-M. Icotinib significantly increased the protein levels of P53 in mitochondrion and Cyt C in cytoplasm and induced apoptosis in ACC-M. However, pretreatment with P53 inhibitor (PFT), the inhibitory effect of icotinib on ACC-M cells was significantly reversed. The level of the Caspase-3 apoptosis related protein activity and the expression of P53 in mitochondrion and Cyt C in cytoplasm were also decreased significantly. **Conclusion** Icotinib may induce apoptosis of ACC-M through the P53 mitochondrial translocation.

Key words icotinib; adenoid cystic carcinoma cell; mitochondrion; apoptosis

伸是必要的。GTFIIF2 的 C-末端包含一个非特异性的 DNA 结合结构域。该蛋白具有特有的 ATP-依赖的 DNA 解旋酶活性,很多重要的转录因子以 GTFIIF2 为靶分子,通过与其相互作用影响转录起始复合物的形成或稳定性,实现对转录的影响和调节。因此 GTFIIF2 被认为是转录过程中重要的基本转录因子^[4]。研究分别构建了带 FLAG 标签、带 GFP 标签的 GTFIIF2 质粒,并将分别转染至 HEK293T 细胞、COS7 细胞中;并且构建了 GST-GTFIIF2,转化到 BL21 感受态细胞中,观察 GTFIIF2 在细胞内的表达和定位。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞株 GTFIIF2 全长 cDNA 的大肠杆菌是由厦门大学生命科学院韩家淮实验室提供;载体 pcDNA3.1 (+) 和 pCDGFP、GST(pGEX-5X-3)、BL21 和 TG1 菌株、HEK293T 和 COS7 细胞株都由我实验室保存。

1.2 试剂与仪器 EcoR I、EcoR V、T4 DNA 连接酶、DNA Marker(美国 Fermentas 公司);蛋白 Marker、pfu 酶(中国上海生工生物公司);Trans2k DNA Marker(美国 Thermo 公司);DNA 胶回收试剂盒与质粒小量抽提试剂盒(美国 Axygen 公司);DMEM 培养基与胎牛血清(美国 Hyclone 公司);Lipofectamine 2000 脂质体、Opti-MEM 转染液(美国 Invitrogen 公司);细胞裂解液与一抗稀释液(中国上海碧云天公司);FLAG 一抗(美国 Sigma 公司);辣根酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和山羊抗小鼠 IgG/TRITC(北京中杉金桥生物技术有限公司);荧光显微镜 DMI 6000 型(德国 Leica 公司);引物由中国上海生工生物有限公司制作合成。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 由含有真核细胞 GTFIIF2 全长 cDNA 序列的质粒为模板,引物设计见表 1,用 PCR 方法扩增 GTFIIF2 序列,琼脂糖凝胶电泳、回收,将 PCR 产物和 pcDNA3.1 (+)、pCDGFP、GST(pGEX-5X-3)载体分别用 EcoR I、EcoR V 双酶切和用 EcoR I、NOT I 双酶切 6 h,电泳、胶回收,用 T4 DNA 连接酶在 12~16 °C 连接 12 h,涂盘,转化,约 12 h 挑单克隆菌株,摇菌,按试剂盒方法抽提质粒,用上述的酶酶切鉴定后,正确的样品送到上海生工生物有限公司测序。

1.3.2 细胞培养 在细胞长满需传代时,先 PBS 液洗 3 次,用胰酶消化细胞 2~5 min,观察至细胞变

表 1 引物序列

质粒名称	序列(5'→3')
pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2	上游:GGAATTCGCCACCATGGCCGAGCGCGG
	下游:GATATCTCACTTCTGTCATGCTCTTTGTAG
	TCGTCACCTCTTTTCTTC
pCDGFP-GTFIIF2	上游:GGAATTCGCCACCATGGCCGAGCGCGG
	下游:GATATCTCACTCACTCTTTTCTTC
GST-GTFIIF2	上游:GGAATTCATGGCCGAGCGCGG
	下游:ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATTTA
	GTCACCTCTTT

圆,加 DMEM 培养液终止消化,PBS 液重悬清洗,以 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 的密度接种到培养皿中(荧光定位观察的实验需放入多聚赖氨酸浸泡过的盖玻片)。37 °C 5% CO₂ 培养过夜。

1.3.3 质粒转染 在检测表达实验中,质粒转染到 HEK293T 细胞时,细胞需长到 75%~85% 的汇合度(转染到 COS7 细胞观察蛋白的定位时,细胞需长到 20%~30% 的汇合度),用脂质体转染法转染细胞,置培养皿于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。转染 4~6 h 后,换新鲜的 DMEM 培养液,继续培养。

1.3.4 GST 融合蛋白诱导表达 把 GST 空载体和 GST 重组质粒分别转化 BL21 感受态细胞,12 h 后分别挑一单克隆至 2 ml 氨苄抗性的 LB 培养基中 37 °C 培养过夜;次日分别取培养物 1 ml 加入到 100 ml 氨苄抗性的 LB 培养基中进行扩大培养至 OD₆₀₀ = 0.6~0.8 (约 2 h);分别以预实验中确定的最佳 IPTG 浓度(0.1 mmol/L)、最佳时间(6 h)、最佳温度(30 °C)诱导表达融合蛋白;以 4 °C、14 000 r/min 离心 15 min,收集细菌,重悬细菌于 5 ml 裂解缓冲液(用前加 PMSF 至终浓度 0.1 mmol/L)中,冰上超声 6 次,每次 5 s;4 °C、14 000 r/min 离心 10 min,收集上清液,测蛋白含量;各加 25 μl PMSF 至 GST 和 GST 融合蛋白的上清液中,分别加灭菌甘油至 15% 体积,以每管 500 μl 分装,-80 °C 冻存。分别取出 20 μl glutathione 珠子放置两 EP 管中,用预冷的 PBS 液清洗珠子 4 °C、3 000 r/min 离心 3 min,收集珠子,重复 3 次;在室温下溶解 GST 和 GST 融合蛋白,分别取出 10 μl,加等体积的 2×SDS 上样缓冲液,沸水浴 5 min,冰上冷却,放置 4 °C 待电泳;分别将剩余的上清液与预处理的珠子混合,4 °C 混旋作用 1 h,1 h 后用分别用结合缓冲液清洗珠子,每次 500 μl,4 °C、3 000 r/min 离心 3 min,重复 3 次,最后收集两份珠子(一份结合了 GST、另一份结合了 GST 融合蛋白);两份珠子,加等体积的 2×SDS 上样缓冲液混合,沸水浴 5 min,冰上冷却,4 °C、3 000 r/min

min 离心 3 min, 取上清液待电泳。

1.3.5 Western blot 检测 转染 48 h 后, 取出培养皿, 放置冰块板上, 弃去培养液, 用滤纸洗干; 用预冷的 PBS 液清洗 2 次, 弃去 PBS 液; 用滤纸尽量吸干 PBS 液, 加入细胞裂解液, 冰上裂解 10 min; 冰水中用内切式高速分散器破碎转染的细胞, 4 ℃、14 000 r/min 离心 5 min, 弃去沉淀; 得到蛋白样品, 取部分样品。加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液, 100 ℃煮沸 5 min 后, 和标准蛋白 Marker 一起进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭液(含 5 % 脱脂奶粉的 TBST 溶液)室温封闭 1.5 h, FLAG 鼠抗(1 : 300)4 ℃孵育过夜, TBST 液清洗, 室温下附二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG, 1 : 8 000)1 h, TBST 液清洗, X 线片显影和定影, 晾干扫描。

1.3.6 免疫荧光制片及观察 转染细胞 24 h 后, 预冷的 PBS 液清洗细胞 2 次, 经过 -20 ℃预冷甲醇和 70% 乙醇溶液分别固定 5 min; 再用 PBS 液清洗 3 次, 每次 5 min, 弃 PBS 液。然后封闭(含 1% 脱脂奶粉的 TBST 溶液)30 min, 弃去; 加 FLAG 鼠抗(1 : 100)室温孵育 2 ~ 3 h, 弃去, 用封闭液清洗。二抗(TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG, 1 : 500)室温孵育 1 h, 弃二抗; PBS 液清洗, 染核(0.15 g/L DAPI 溶液)2 ~ 3 min, PBS 液清洗 3 次, 用滤纸吸干多余水分, 封片, 4 ℃储存过夜, 荧光显微镜观察、拍照。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 和 pCDGFP-GTFIIF2 重组质粒鉴定 质粒用 EcoR I、EcoR V 双酶切均得到 2 条带, 通过与 Marker 对比, 其中一条带是载体 pcDNA3.1 (5 400 bp) 或 pCDGFP (6 100 bp), 另一条是目的片段 GTFIIF2 (249 bp)。测序结果与 GTFIIF2 的全长序列一致, 见图 1、2。

2.2 GTFIIF2 蛋白在 BL21 感受态细胞中的表达

构建好的 GST-GTFIIF2 融合蛋白经过 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色, 洗脱液漂洗, 凝胶成像仪

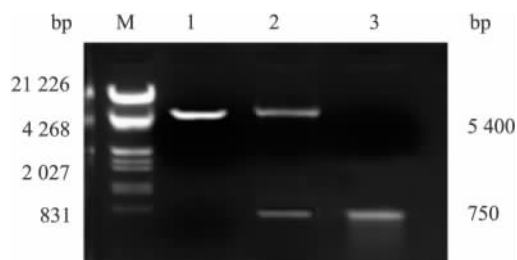


图1 重组质粒 pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 的酶切鉴定

M: λDNA/EcoR I + Hind III Marker; 1: 酶切载体 pcDNA3.1; 2: 酶切鉴定连接成功的重组质粒; 3: GTFIIF2 PCR 产物

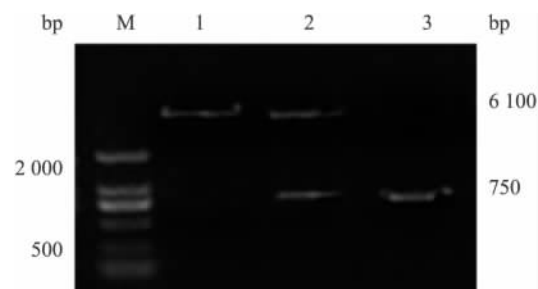


图2 重组质粒 pCDGFP-GTFIIF2 的酶切鉴定

M: λDNA/EcoR I + Hind III Marker; 1: 酶切载体 pCDGFP; 2: 酶切鉴定连接成功的重组质粒; 3: GTFIIF2 PCR 产物

拍照。得到约为 27 ku 和 56 ku 的条带, 第 2 泳道在约 27 ku 的位置出现了条带, 即 GST 蛋白(27 ku), 第 2 泳道在 55 ku 和 70 ku 之间的位置出现了条带, 即为 GST-GTFIIF2 融合蛋白(56 ku), 表明 GST-GTFIIF2 融合蛋白的制备成功。见图 3。

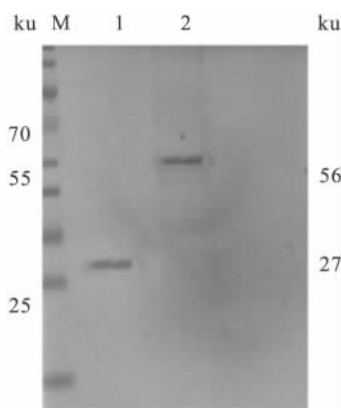


图3 GST-GTFIIF2 融合蛋白图

M: Marker; 1: GST 珠子沉淀的 pGEX-5X 的细菌裂解液; 2: GST 珠子沉淀的 pGEX-5X-GTFIIF2 的细菌裂解液

2.3 GTFIIF2 蛋白在体内的表达 蛋白经过 SDS-PAGE 电泳转膜, X 线片曝光并显影和定影后观察到转染了 pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2, pCDGFP-GTFIIF2 都检测到了条带, FLAG-GTFIIF2 融合蛋白分子量大小约为 29 ku, 而 GFP-GTFIIF2 融合蛋白分子量大小约为 56 ku (GFP 蛋白分子量为 27 ku), 二者结果一致表明 GTFIIF2 蛋白在 HEK293T 细胞中的表达成功, 见图 4。

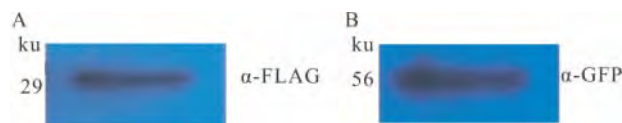


图4 Western blot 法检测 GTFIIF2 蛋白表达

A: 转染 pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 的 HEK293T 细胞裂解液; B: 转染 pCDGFP-GTFIIF2 的 HEK293T 细胞裂解液

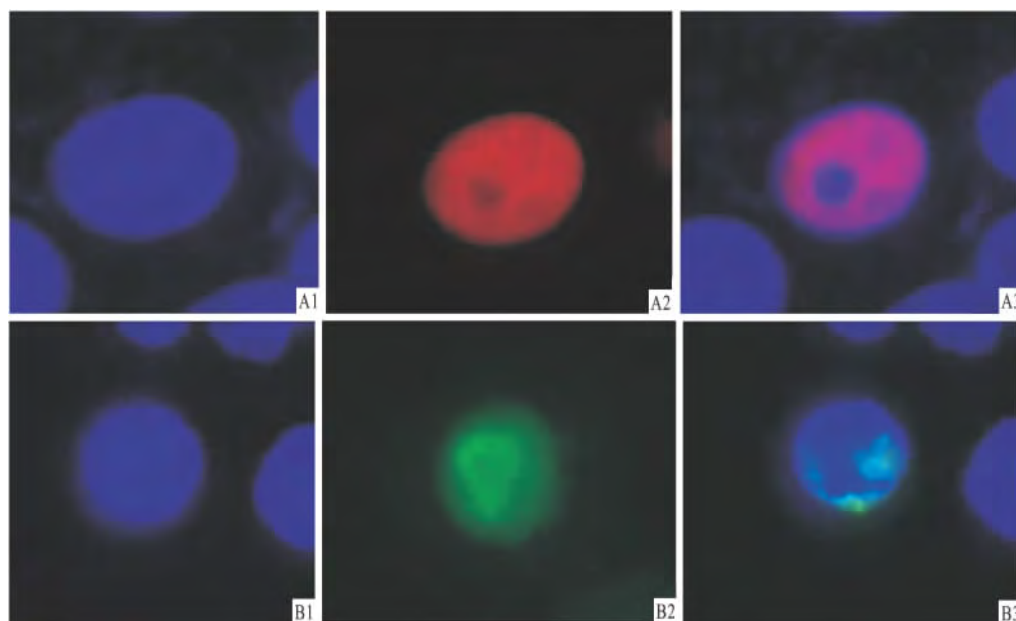


图5 GTFIIF2 蛋白在 COS7 细胞中的定位 $\times 1\,000$

A1、B1: DAPI 染色示细胞核; A2: pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 在 COS7 细胞中的定位; B2: pCDGFP-GTFIIF2 在 COS7 细胞中的定位; A3、B3: 两个图像的叠加

2.4 GTFIIF2 蛋白在 COS7 细胞中的定位 用荧光显微镜观察用 FLAG 和 GFP 标签的 GTFIIF2 在 COS7 细胞中的定位情况,两者在 COS7 细胞中主要分布在细胞核中,而细胞质中未见到明显的表达。二者一致表明 GTFIIF2 蛋白是一种核内蛋白,主要定位在细胞核内,见图 5。

3 讨论

真核生物转录起始过程复杂、繁琐, RNA 聚合酶不能独立聚合在启动子上,需要依赖很多转录的蛋白质引导下发挥协助,转录因子与 RNA 聚合酶 II 形成转录起始复合物,共同参与转录起始的过程。转录因子分为两种:一种是通用转录因子,将 RNA 聚合酶 II 指导到启动子上,支持基础水平的转录,转录才能在正确的位置开始。TFII B 以外,还发现 TFIIA、TFIIF、TFIIE 等,在转录起始复合物组装的不同阶段起作用;另一种是基因特异性转录激活因子,通用转录因子与激活因子的结合,刺激前起始复合物在启动子的装配,在组织、细胞或是受到一些生长因子、激素或者其他刺激开始表达某些特异蛋白质时,才需要的这类转录因子。

GTFIIF2 是 Sopta et al^[5] 从 HeLa 细胞中提取并用抗体抚育蛋白,然后该蛋白从早幼粒白血病细胞株 HL60cDNA 文库筛选表达。Horikoshi et al^[6]

发现 GTFIIF2 实际上是 249 个氨基酸的 cDNA 序列。

GTFIIF1 与 GTFIIF2 两者形成的通用转录因子 GTFIIF 四聚体复合物。GTFIIF1 的 N 端可以激活基因转录起始和延伸,主要在某些单个转录过程发挥作用;GTFIIF1 的其他区域对单个转录过程无明显作用,但可以激活转录的循环过程^[7]。GTFIIF2 与 GTFIIF1 的直接相互结合,通过 GTFIIF1 发挥基因转录激活作用。

GTFIIF2 蛋白通过与 RNA 聚合酶 II 亚基 RPB5 直接结合,使其 RNA 聚合酶 II 被转移到 GTFIIF 上,进而使 RNA 聚合酶 II 结合到转录起始前复合物或转录复合物,使其催化合成 mRNA。许多致病因子如乙型肝炎病毒 X 蛋白就是通过与 RPB5 的结合使肝细胞发生转化,导致肝硬化、肝癌的发生。因而 GTFIIF2 对于转录起始前复合物的形成以及基因的转录过程都是必须的。其功能发生变化将导致严重的疾病,如难治性复发性多发性骨髓瘤^[8]、类风湿关节炎^[9]、亨廷顿疾病^[10]、艾滋病^[7]。

本研究主要针对 GTFIIF2 蛋白在某些特定细胞内的表达及其定位情况。构建带有 FLAG 和 GFP 标签的 GTFIIF2 的真核表达载体,将其转染至 COS7 细胞、HEK293T 细胞株中进行研究,结果显示在 COS7 细胞中主要在细胞核中明显的表达,这与以前

GTFIIF2 的细胞定位结果是一致的^[11]。本研究成功构建了 GTFIIF2 的稳定表达细胞株,并利用此细胞株为下一步进行功能研究做准备;对 GTFIIF2 在原核细胞(BL21 细胞)中能有效表达,为下一步做体外实验进行初步的研究;对 GTFIIF2 的定位和真核表达进行初步的研究,为了解 GTFIIF2 蛋白的作用和功能提供一定技术依据,以及为今后临床相应疾病诊断治疗提供了方法途径之一。

参考文献

- [1] Ren D ,Lei L ,Burton Z F. A region within the RAP74 subunit of human transcription factor IIF is critical for initiation but dispensable for complex assembly [J]. *Mol Cell Biol* ,1999 ,19(11) :7377 - 87.
- [2] Tan S ,Garrett K P ,Conaway R C ,et al. Cryptic DNA-binding domain in the C terminus of RNA polymerase II general transcription factor RAP30 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* ,1994 ,91(21) :9808 - 12.
- [3] Chang C ,Kostrub C F ,Burton Z F. RAP30/74 (transcription factor IIF) is required for promoter escape by RNA polymerase II [J]. *J Biol Chem* ,1993 ,268(27) :20482 - 9.
- [4] McCracken S ,Greenblatt J. Related RNA polymerase-binding regions in human RAP30/74 and *Escherichia coli* sigma 70 [J]. *Science* ,1991 ,253(5022) :900 - 2.
- [5] Sopta M ,Burton Z F ,Greenblatt J. Structure and associated DNA-helicase activity of a general transcription initiation factor that binds to RNA polymerase II [J]. *Nature* ,1989 ,341(6241) :410 - 4.
- [6] Horikoshi M ,Fujita H ,Wang J ,et al. Nucleotide and amino acid sequence of RAP30 [J]. *Nucleic Acids Res* ,1991 ,19(19) :5436.
- [7] Kim J B ,Yamaguchi Y ,Wada T ,et al. Tat-SF1 protein associates with RAP30 and human SPT5 proteins [J]. *Mol Cell Biol* ,1999 ,19(9) :5960 - 8.
- [8] 潘 铭 楚文瑛. 难治性复发性多发性骨髓瘤相关危险因素分析及治疗进展 [J]. *中国社区医师* 2010 ,12(5) :12 - 3.
- [9] Bansard C ,Lequerre T ,Derambure C ,et al. Gene profiling predicts rheumatoid arthritis responsiveness to IL-1Ra (anakinra) [J]. *Rheumatology (Oxford)* 2011 ,50(2) :283 - 92.
- [10] Kaplan A ,Stockwell B R. Therapeutic approaches to preventing cell death in Huntington disease [J]. *Prog Neurobiol* ,2012 ,99(3) :262 - 80.
- [11] Lei L ,Ren O ,Finkelstein A ,et al. Functions of the N-and C-terminal domains of human RAP74 in transcription initiation elongation and recycling of RNA polymerase II [J]. *Mol Cell Biol* ,1998 ,18(4) :2130 - 42.

Human induced the expression of GTFIIF2 in BL21 and the localization in cells

Zhao Jian ,Geng Huiwu ,Qiao Zheng ,et al

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

Abstract Objective To construct recombinant plasmids of GTFIIF2 to detect the expression and the expression and localization of GTFIIF2 in cell. **Methods** The primers of GTFIIF2 were designed ,GTFIIF2 was amplified by PCR with the template including the full length cDNA fragment of GTFIIF2 ,to construct pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 and pCDGFP-GTFIIF2 vectors ,the expression and localization of GTFIIF2 were investigated by the method of Western blot and immunofluorescent assay. Vector GST-GTFIIF2 was transformed into *E. coli* BL21 to observe the expression of fusion protein in the induction of IPTG. **Results** The protein of GTFIIF2 was expressed efficiently in the nucleus of COS7 cells not in the cytoplasm; pcDNA3.1-FLAG-GTFIIF2 and pCDGFP-GTFIIF2 plasmid could be effectively expressed in HEK293T cells; GST-GTFIIF2 could also be induced in the BL21 strains. **Conclusion** GTFIIF2 can effectively express in COS7 cells ,HEK293T cells and BL21 competent cells. The results provide a better understanding of the basic research of GTFIIF2 functions in cells.

Key words GTFIIF2; gene expression; protein localization; BL21