

◇ 基础医学研究 ◇

人 RACK1 蛋白在 HEK-293T 和 BL21 细胞中的表达及 COS7 细胞的定位

乔正, 赵健, 潘林鑫, 李春雨, 徐雪琴, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 构建可以表达有活性的蛋白激酶 C 受体 (RACK1) 的重组质粒, 检测其在细胞内的表达与定位情况。方法 设计上下游引物, 以 RACK1 全长 cDNA 序列为模板, PCR 扩增出 RACK1 序列, 分别构建到载体 pcDNA3.1 和 pGEX-5X-3。转染 pcDNA3.1-FLAG-RACK1 到人胚胎肾细胞 (HEK-293T) 和非洲绿猴肾成纤维细胞 (COS7 细胞), 转化 pGEX-5X-3-RACK1 到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中表达, Western blot 法和考马斯亮蓝染色法检测 RACK1 表达情况, 免疫荧光法研究其细胞内定位。结果 成功构建了 pcDNA3.1-FLAG-RACK1 和 GEX-5X-3-RACK1 重组质粒。Western blot 证明了其在 HEK-293T 细胞中的表达, 考马斯亮蓝染色显示其在 BL21 菌株也能大量表达, 免疫荧光显示 RACK1 在 COS7 的细胞核与细胞质中均有分布。结论 人 RACK1 在 HEK-293T 细胞和 BL21 菌株中均能有效表达, 在 COS7 细胞的胞质、胞核均有分布, 为进一步研究人 RACK1 基因的功能奠定了基础。

关键词 RACK1; 基因表达; 细胞定位; BL21

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1189-04

有活性的蛋白激酶 C 受体 (receptor for activated C kinase, RACK1) 是一种分子量为 36 ku 的 G 蛋白 β 亚单位的同源物, 是 WD-40 蛋白家族中的一个成员。编码基因定位于 5q35.3, 是 RACKS 家族中第一个被识别的成员^[1], 并且 RACK1 蛋白从衣藻到人类都是保守的。后来因为其结构与哺乳动物 G 蛋白异源三聚体 β 亚基有同源性, 故又被称为 GNB2L1, 即鸟苷酸结合蛋白 $\beta 2$ 样因子 1。近来的有

研究^[2]表明, RACK1 可结合多种胞质蛋白或亚细胞结构, 参与多条代谢通路, 发挥不同的生理作用。该研究构建了真核表达载体 pcDNA3.1-FLAG-RACK1, 将其转染至 HEK-293T、COS7 细胞中, 并且构建了 pGEX-5X-3-RACK1, 转化到 BL21 感受态细胞中, 观察 RACK1 在细胞中的表达及其分布情况。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 含人 RACK1 全长 cDNA 序列的模板由韩家淮院士实验室提供, 载体 pcDNA3.1、pGEX-5X-3, BL21、TG1 菌株, HEK-293T、COS7 细胞株由本实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 PrimeSTAR 酶 (日本 TaKaRa 公司); Hind III、EcoR V、Not I、Sma I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶; Trans2k DNA Marker (北京全式金公司); 蛋白 Marker (美国 Thermo 公司); 胶回收试剂盒与质粒小抽试剂盒 (美国 Axygen 公司); DMEM 培养基与胎牛血清 (美国 Hyclone 公司); 脂质体 2000、Opti-MEM (美国 Invitrogen 公司); 细胞裂解液 (上海碧云天公司); FLAG 抗体 (美国 Sigma 公司); IPTG、PMSF、辣根过氧化物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); 谷胱甘肽琼脂糖球珠 (美国 GE Healthcare); ECL 显色试剂盒 (美国 Pierce 公司); 荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 凝胶成像分析系统 (上海鸥翔科学仪器有限公司); 引物由上海生工合成。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 通过 NCBI 检索人 RACK1 全长序列, 设计引物, 见表 1。PCR 法扩增出 RACK1 序列, 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物与 pcDNA3.1 或 pGEX-5X-3 载体通过 EcoR V、Hind III 或者 Sma I、Not I 酶切 (酶切条件参照说明书), 琼脂糖凝胶电泳, 试剂盒胶回收, 在 12~16 °C 连接过夜。涂盘, 转化, 培养 12 h 挑单克隆, 摇菌, 试剂盒抽提质粒, 酶切鉴定后, 将菌液 (加甘油) 送生工生物公司测序。

1.3.2 细胞培养 待细胞长满单层, PBS 洗 2 次, 胰酶消化细胞至细胞变圆, DMEM 培养基终止消

2014-05-04 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 (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: 乔正, 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: lfan@ahmu.edu.cn

化 ,PBS 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(加 10% 小牛血清的 DMEM 培养基) 用于免疫荧光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。

表 1 引物序列

引物名称	序列
FLAG-RACK1-S1m	5'-CCCAAGCTTGGGGCCACCATGACTGAGCA GATGA-3'
FLAG-RACK1-A1m	5'-GATATCCTACTTGTGTCATCGTCTTTGTA GTCGCGTGTGCCAATGCTCA-3'
GST-RACK1-S2m	5'-TCCCCCGGGGAATGACTGAGCAGAT-3'
GST-RACK1-A2m	5'-ATAAGAATGCGGCCGCTAAACTATCTAGC GTGTGCCAATGCT-3'

1.3.3 质粒转染 在检测表达实验中 ,HEK-293T 细胞长到 85% ~ 95% 汇合度(荧光定位实验中 COS7 细胞长到 30% ~ 40% 的汇合度) 脂质体转染法转染细胞 ,37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 4 ~ 6 h ,更换培养液 ,继续培养。

1.3.4 Western blot 法检测 转染细胞 48 h 后 ,取出置冰上 ,加细胞裂解液(含 PMSF) 裂解 15 min ,收集并破碎细胞;4 °C、14 000 r/min 离心 ,取 10 μl 上清 ,加等体积 2 × SDS 上样缓冲液 ,沸水浴 5 min ,进行 SDS-PAGE 电泳 ,转膜;5% 脱脂奶粉封闭 1 h ,FLAG 鼠抗(1 : 500)4 °C 孵育过夜 ,TBST 清洗;室温下孵育二抗(山羊抗小鼠 IgG ,1 : 8 000)1 h ,TBST 清洗;X 线片显影 ,晾干扫描。

1.3.5 免疫荧光观察 转染细胞 24 h 后 ,预冷的 PBS 清洗细胞 2 次 ,20 °C 预冷甲醇和 70% 乙醇分别固定 5 min ;PBS 清洗 3 次 ,每次 5 min ,弃 PBS ;1% 脱脂奶粉封闭 30 min ;加 FLAG 鼠抗(1 : 100) 室温孵育 2 ~ 3 h ,PBS 清洗;二抗(TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG ,1 : 500) 室温孵育 1 h ,PBS 清洗;染核(0.15 g/L DAPI 溶液)2 ~ 3 min ,PBS 清洗 3 次;吸干多余水分 ,封片;4 °C 储存过夜 ,荧光显微镜观察、拍照。

1.3.6 GST-RACK1 融合蛋白的表达及纯化 把 pGEX-5X-3-RACK1 重组质粒转化到 BL21 感受态细胞中 ,挑单克隆至 2 ml LB 培养基(含氨苄)中 37 °C 摇菌过夜。次日取 50 μl 菌液到含 5 ml LB(含氨苄) 继续摇菌 ,至 OD₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8 ;30 °C 下 ,分别加入终浓度为 0.1、0.5、1 mmol/L 的 IPTG 诱导 2、4、6 h。SDS-PAGE 电泳 ,确定最佳 IPTG 浓度、最佳诱导时间和温度;挑取单克隆 ,按照上述最佳条件摇菌扩大培养 ,收集细菌;细菌裂解液(含终浓度 0.1

mmol/L 的 PMSF 和 DTT) 裂解 ,超声破碎;4 °C、14 000 r/min 离心 10 min ,取上清液 ,加灭菌甘油至 15% 体积 ,分装 , - 80 °C 冻存。SDS-PAGE 电泳 ,考马斯亮蓝染色 ,凝胶成像仪下拍照。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-FLAG-RACK1 及 pGEX-5X-3-RACK1 重组质粒鉴定 pcDNA3.1-FLAG-RACK1 鉴定结果如图 1A 所示 ,重组质粒经过 EcoR V、Hind III 酶切后出现的 2 条带与酶切空载体及 PCR 产物的条带位置一致 ,经过 Marker 比对 ,与 pcDNA3.1(5 428 bp)、目的片段 RACK1(954 bp) 大小一致 ,证明连接是成功的。图 1B 是 pGEX-5X-3-RACK1 重组质粒的鉴定结果 ,与 pGEX-5X-3 载体和 PCR 产物比对 ,同样证明连接成功。

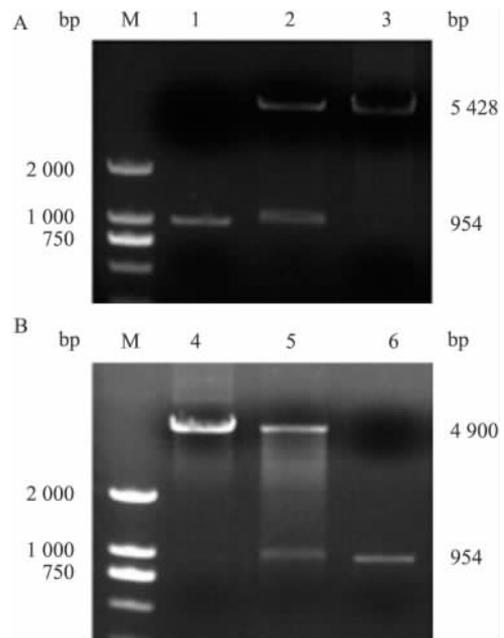


图 1 重组质粒的酶切电泳图

A: 质粒 pcDNA3.1-FLAG-RACK1 的酶切电泳图;B: 质粒 GST-RACK1 的酶切电泳图;M: λDNA/EcoR I + Hind III Marker;1、6: RACK1 的 PCR 产物;2、5: 重组质粒的酶切;3: pcDNA3.1(+) 载体酶切;4: GST 载体酶切

2.2 RACK1 蛋白在 HEK-293T 细胞中的表达 收集 HEK-293T 细胞 ,SDS-PAGE 电泳转膜后 ,暗室显影 ,显示的条带与蛋白 Marker 比对后约为 36 ku ,见图 2 ,与 FLAG-RACK1 表达的蛋白分子量大小一致 ,结果表明 RACK1 蛋白在 HEK-293T 细胞中的表达成功。

2.3 GST-RACK1 融合蛋白在 BL21 感受态细胞

中的表达 转化了 pGEX-5X-3-RACK1 质粒的菌液经过不同浓度 IPTG 诱导 2、4、6 h 后, SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 拍照, 发现在 0.1 mmol/L IPTG 浓度诱导 4 h 时, GST-RACK1 融合蛋白表达量较高, 见图 3。GST 和 GST 融合蛋白同时经过谷胱甘肽琼脂糖珠子纯化后得到约为 27ku 和 63ku 的条带, 见图 4, 分别与 GST 和 GST-RACK1 融合蛋白大小一致, 表明融合蛋白表达成功。

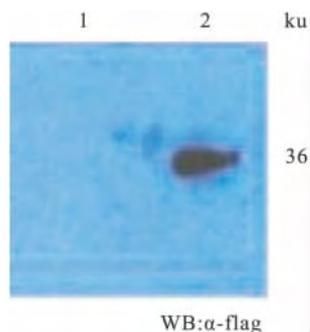


图 2 Western blot 检测 FLAG-RACK1 蛋白的表达

1: 未转染 FLAG-RACK1 的细胞裂解液; 2: 转染了 FLAG-RACK1 的细胞裂解液

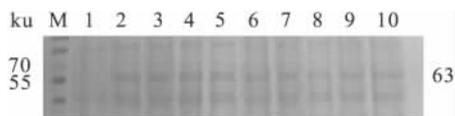


图 3 IPTG 诱导 GST-RACK1 融合蛋白的表达

M: 标准蛋白 Marker 梯度; 1: 未加 IPTG 诱导的细菌裂解液; 2、3、4: 0.1 mmol/L IPTG 分别诱导 2、4、6 h 的细菌裂解液; 5、6、7: 0.5 mmol/L IPTG 分别诱导 2、4、6 h 的细菌裂解液; 8、9、10: 1.0 mmol/L IPTG 分别诱导 2、4、6 h 细菌裂解液

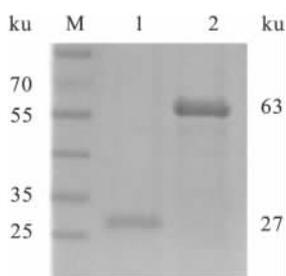


图 4 考马斯亮蓝染色检测谷胱甘肽琼脂糖珠子纯化后的蛋白

M: 标准蛋白 Marker 梯度; 1: GST 空载体转化的细菌裂解液; 2: GST-RACK1 质粒转化的细菌裂解液

2.4 RACK1 蛋白在 COS7 细胞中的定位 用荧光显微镜观察 pcDNA3.1-FLAG-RACK1 在 COS7 细胞中的定位情况, 明显观察到 RACK1 蛋白在细胞核内外都有分布, 见图 5。

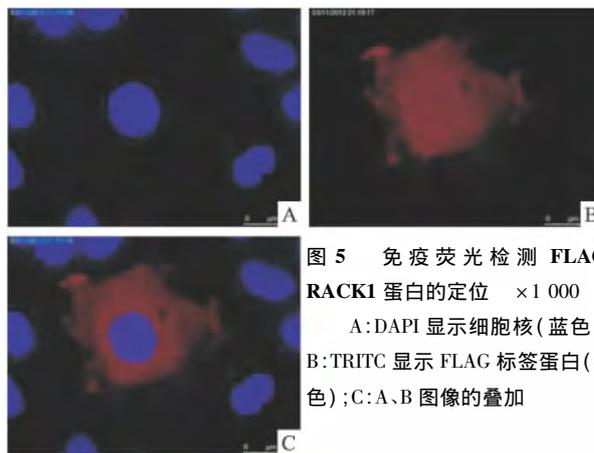


图 5 免疫荧光检测 FLAG-RACK1 蛋白的定位 ×1 000

A: DAPI 显示细胞核 (蓝色);
B: TRITC 显示 FLAG 标签蛋白 (红色);
C: A、B 图像的叠加

3 讨论

RACK1 作为脚手架蛋白主要是由 7 个 WD 结构域介导发挥作用, 存在与多种蛋白结合的位点^[3], 例如与 SH2 结构域蛋白 (Src 和 Fyn) 结合, RACK1 可以抑制其活性, 与含 PH 结构域蛋白 (dynamin 和 p120GAP) 和 C2 结构域蛋白 (如 PKCs) 都有结合。并且 RACK1 还能够调节与其结合的蛋白的酶活性, 例如 RACK1 能够稳定蛋白磷酸酶 2A 的活性, 维持 PKCβ II 的活性结构。

近年来有关 RACK1 与肿瘤关系的研究越来越多, 例如其在结肠癌、卵巢癌、肝细胞性肿瘤和黑色素瘤中表达量都有增高趋势^[4-6]。RACK1 表达的上调与口腔鳞癌细胞的增殖密切相关, 是口腔鳞癌重要的凋亡调控因子之一^[7]; 在乳腺癌中, RACK1 的表达被评估为预后指标^[8]。RACK1 的表达还与肺癌患者的病理期、肿瘤大小有关, 表明其也许是一种新的肺癌诊断标志物^[9]。但在某些肿瘤细胞中表达量降低, 例如在胃癌的发生过程中, RACK1 可通过稳定 β-catenin 破坏复合体来负性调节 Wnt 通路, 在胃癌中作为肿瘤抑制剂^[10], RACK1 还可通过调节 E-钙黏素的内吞来促进上皮细胞间的黏附, 抑制侵袭性^[11]。其在不同肿瘤组织中的具体表达机制还有待进一步深入研究。

人体内多种疾病的发病机制都是由于某些蛋白质的表达被抑制或促进, 现在普遍研究蛋白质相互作用的实验基础是免疫荧光、免疫共沉淀和 GST pull-down 技术, 通过免疫荧光技术可观察蛋白质在体内外的定位, 初步分析蛋白质在细胞内空间位置是否有相互联系的可能性, 免疫共沉淀是对蛋白质在细胞内部是否有相互作用的有力补充, 但是两种蛋白质是否有直接相互作用, 需要通过 GST pull-down

技术进一步在体外证实。所以本实验室将 RACK1 分别构建到 pcDNA3.1 载体上,转染至 HEK-293T、COS7 细胞中,初步了解其在真核细胞中的表达和定位。结果显示 RACK1 在细胞核内外都有表达,这为 RACK1 对细胞核内外的某些蛋白进行调节提供了可能。将 pGEX-5X-3-RACK1 转化到 BL21 感受态细胞中表达融合蛋白 GST-RACK1,因为 BL21 对生长条件的敏感性低,能降低目的基因的背景表达水平,但不干扰目的蛋白的表达,适合表达毒性蛋白和非毒性蛋白。本研究为进一步研究人类 RACK1 蛋白在细胞中的作用机制、与肿瘤等多种疾病的关系奠定了一定的基础。

参考文献

- [1] White C D, Brown M D, Sacks D B. IQGAPs in cancer: a family of scaffold proteins underlying tumorigenesis [J]. *FEBS Lett* 2009, 583(12): 1817-24.
- [2] 刘慧婷, 胡金龙. 活化的蛋白激酶 C 受体 1 (RACK1 Receptor for Activated C Kinase1) 在肿瘤相关方面的研究进展 [J]. *中国医学工程* 2012, 20(5): 179-81.
- [3] 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.
- [4] Zhang W, Zong C S, Hermanto U, et al. RACK1 recruits STAT3 specifically to insulin and insulin-like growth factor 1 receptors for activation, which is important for regulating anchorage-independent growth [J]. *Mol Cell Biol* 2006, 26(2): 413-24.
- [5] Bourd-Boittin K, Le Pabic H, Bonnier D, et al. RACK1, a new ADAM12 interacting protein. Contribution to liver fibrogenesis [J]. *J Biol Chem* 2008, 283(38): 26000-9.
- [6] Egidy G, Jule S, Bosse P, et al. Transcription analysis in the MeLiM swine model identifies RACK1 as a potential marker of malignancy for human melanocytic proliferation [J]. *Mol Cancer*, 2008, 7: 34.
- [7] Wang Z, Zhang B, Jiang L, et al. RACK1, an excellent predictor for poor clinical outcome in oral squamous carcinoma, similar to Ki67 [J]. *Eur J Cancer* 2009, 45(3): 490-6.
- [8] Al-Reefy S, Osman H, Jiang W, et al. Evidence for a pro-apoptotic function of RACK1 in human breast cancer [J]. *Oncogene*, 2010, 29(41): 5651.
- [9] Nagashio R, Sato Y, Matsumoto T, et al. Expression of RACK1 is a novel biomarker in pulmonary adenocarcinomas [J]. *Lung Cancer*, 2010, 69(1): 54-9.
- [10] Deng Y Z, Yao F, Li J J, et al. RACK1 suppresses gastric tumorigenesis by stabilizing the β -catenin destruction complex [J]. *Gastroenterology* 2012, 142(4): 812-23.
- [11] Swaminathan G, Cartwright C A. Rack1 promotes epithelial cell-cell adhesion by regulating E-cadherin endocytosis [J]. *Oncogene*, 2012, 31(3): 376-89.

The expression of human RACK1 in HEK-293T and BL21 and localization in COS7

Qiao Zheng, Zhao Jian, Pan Linxin, et al

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

Abstract Objective To construct an available recombinant plasmids of RACK1 and detect its expression and localization in cells. **Methods** The upstream and downstream primers of RACK1 were designed, RACK1 was amplified by PCR with the template containing its full length cDNA fragment, and then the eukaryotic plasmid pcDNA3.1-FLAG-RACK1 and the prokaryotic plasmid pGEX-5X-3-RACK1 were constructed. pcDNA3.1-FLAG-RACK1 was transfected into HEK-293T and COS7 cells, and pGEX-5X-3-RACK1 was transformed into BL21 cells. Western blot and Coomassie brilliant blue staining were used for the expression and immunofluorescence used for the localization. **Results** The recombinant plasmids pcDNA3.1-FLAG-RACK1 and pGEX-5X-3-RACK1 were constructed successfully. RACK1 can be expressed in HEK-293T cells and BL21 competent cells, and the expression of RACK1 was found both in nucleus and in cytoplasm. **Conclusion** The protein RACK1 can be expressed effectively in HEK-293T cells and BL21 cells and locates both in nucleus and in cytoplasm in COS7 cells, which is basic for further study of human RACK1.

Key words RACK1; gene expression; localization; BL21