

视网膜母细胞瘤结合蛋白4基因酵母双杂交诱饵载体的构建

赵梅^{a,b}, 杨俊宝^{b*}

(川北医学院 a.人事处; b.医学遗传学与细胞生物学教研室/医学遗传中心, 四川 南充 637100)

摘要:视网膜母细胞瘤结合蛋白4(*RBBP4*)是WD-40蛋白家族的成员之一,其在组蛋白乙酰化、细胞周期进展及肿瘤干细胞的分化等方面具有重要功能,研究与*RBBP4*互作的新蛋白质和认识*RBBP4*在疾病包括肿瘤的发生发展过程中的分子机制具有重要意义。通过RT-PCR扩增获得了*RBBP4*基因的CDS序列,经双酶切后与pGBKT7酵母诱饵载体连接构建了pGBKT7-*RBBP4*载体,再通过双酶切鉴定和测序验证,结果表明此酵母双杂交诱饵载体被成功构建,为后续利用酵母双杂交技术筛选与*RBBP4*蛋白相互作用的新蛋白提供了参考。

关键词:酵母双杂交;诱饵载体;*RBBP4*基因

中图分类号:R739.7 文献标志码:A 文章编号:1673-1891(2019)02-0017-03

Construction of Yeast Two-Hybrid Bait Vector pGBKT7-RBBP4

ZHAO Mei^{a,b}, YANG Junbao^{b*}

(a. Department of Personnel; b. Department of Medical Genetics & Cell Biology/Center of Medical Genetics, North Sichuan Medical University, Nanchong, Sichuan 637100, China)

Abstract: Being a member of WD-40 protein family, retinoblastoma binding protein 4 (*RBBP4*) plays an important role in histone acetylation, cell cycle progression and differentiation of cancer stem cells. It is important to study new proteins interacting with *RBBP4* and to understand its molecular mechanism in the pathogenesis of diseases, including tumors. In this study, the *RBBP4* gene CDS sequence was successfully amplified by RT-PCR, and pGBKT7-*RBBP4* was constructed by binding with pGBKT7 yeast bait vector. The results of double enzyme digestion and sequencing confirmed that the bait vector of yeast two-hybrid was successfully constructed, which provided a reference for screening new protein interacting with *RBBP4* protein by yeast two-hybrid technology.

Keywords: yeast two hybrid; bait vector; *RBBP4* gene

视网膜母细胞瘤结合蛋白4(Retinoblastoma binding protein 4, *RBBP4*)能在体外和体内和视网膜母细胞瘤蛋白相结合,其分子量为48 KD^[1]。*RBBP4*蛋白全长有425个氨基酸,属于WD-40蛋白家族的成员之一^[2],是核小体重塑与去乙酰化酶(Nucleosome Remodeling and Deacetylation, NuRD)复合物的一个重要的核心亚基,在细胞周期的进程、组蛋白的乙酰化修饰、核小体的修饰、染色体的重塑以及肿瘤干细胞的分化进程中有非常重要的功能^[3,4]。研究发现,*RBBP4*在结肠癌、肝癌^[5]、胃癌^[6]等多种肿瘤的组织中表达量异常升高可能促进了肿瘤的发生和发展,并且能增加宫颈癌细胞的迁移与侵袭能力^[7],*RBBP4*还可

能与雌激素受体相互结合从而影响乳腺癌的预后^[8]。另有研究发现,*RBBP4*还能刺激前列腺癌细胞的侵袭、迁移,促进了前列腺癌细胞的形成及生长^[9]。但是至目前为止,*RBBP4*在肿瘤细胞发生发展过程中的分子作用机制还有待进一步的研究和阐明。

为了进一步阐明*RBBP4*蛋白的活性与调控机制,本研究从HepG2细胞系中提取总RNA,以此为模板进行RT-PCR扩增而获得了*RBBP4*基因的CDS序列,双酶切后与pGBKT7酵母诱饵载体连接构建了pGBKT7-*RBBP4*并进行双酶切和测序鉴定,以为进一步利用酵母双杂交技术筛选与*RBBP4*蛋白互作的新蛋白奠定基础。

收稿日期:2019-4-19

基金项目:四川省教育厅重点项目(18ZA0198);四川省卫计委重点项目(18ZD038);川北医学院博士科研启动基金(CBY17-QD10);南充市科知局市校合作项目(18SXHZ0232)。

作者简介:赵梅(1978—),女,四川南充人,助教,本科,研究方向:医学遗传学。*为通信作者。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

限制性内切酶 *NdeI*、*EcoRI* 购自 ThermoFisher 科技公司, T4 DNA Ligase 购自大连 Takara 公司, 质粒抽提试剂盒购自美国 Promega 公司。pGBKT7 为本实验室保存, 大肠杆菌 DH5 α 、一步法 RT-PCR 试剂盒购自北京天根生化科技公司。

1.2 引物设计与合成

根据 RBBP4cDNA 的序列, 在上游引物和下游引物分别添加限制性内切酶 *NdeI*(-CAT ATG-) 和 *EcoRI*(-GAA TTC-) 位点来设计特异性的 PCR 引物。PCR 反应的引物序列如下: 上游引物: 5'-CATATGGCCGACAAGGAAGCAGCCTT-3'; 下游引物: 5'-GAATTCCTAGGACCCTTGTCTTCTGGA-3'。引物由擎科(成都)生物科技有限公司合成。

1.3 RT-PCR 扩增

以 HepG2 细胞系的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增出目的条带, PCR 反应体系 50 μ L。反应条件为: 42 $^{\circ}$ C、30 min, 95 $^{\circ}$ C、3 min, 94 $^{\circ}$ C、30 s, 60 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C、5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并进行胶回收和纯化。

1.4 酵母双杂交表达载体 pGBKT7-RBBP4 的构建与鉴定

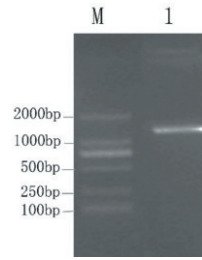
将胶回收的 PCR 产物片段与载体 pGBKT7 用 *NdeI* 和 *EcoRI* 双酶切, 37 $^{\circ}$ C 中 1 h, 将双酶切的目的片段与线性载体进行胶回收、纯化并连接, 于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。取适量连接产物用热激法转化 DH5 α 感受态细胞, 涂平板(含卡那霉素 50 μ g/mL), 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 16~18 h, 观察平板菌落生长情况。挑取单个菌落接种于 2 mL 的 LB 液体培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL)中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。第二日进行离心, 弃上清, 用质粒提取试剂盒提取 pGBKT7-RBBP4 质粒, 将上述得到 pGBKT7-RBBP4 质粒进行 *NdeI* 和 *EcoRI* 双酶切鉴定, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将经过酶切鉴定正确的重组质粒送往苏州金唯智科技公司进行测序, 并通过 NCBI 网站的 BLAST 功能对测序结果进行比对, 将测序结果完全正确的重组质粒扩大培养并保存备用。

2 结果

2.1 RBBP4 cDNA 片段的扩增

以 HepG2 细胞系的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增出长 1 290 bp (含两个酶切位点) 的

RBBP4 基因, 如图 1 所示。经切胶回收后效果好, 条带单一。

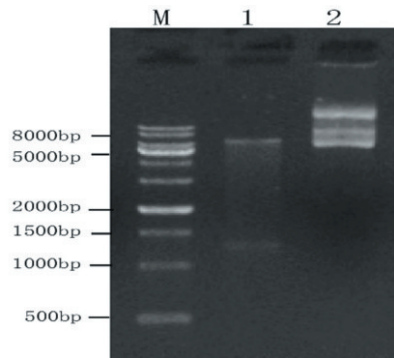


M: DL2000 DNA marker

图1 PCR 扩增产物电泳结果

2.2 酵母双杂交诱饵载体的亚克隆与双酶切鉴定

将经 *NdeI*/*EcoRI* 双酶切的 *RBBP4* cDNA 片段和 pGBKT7 载体电泳、切胶回收纯化后连接, 转化、筛选阳性克隆扩大培养、提质粒, 对阳性克隆的质粒进行 *NdeI*/*EcoRI* 双酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 鉴定结果如图 2 所示。



M: 1 kb ladder DNA marker; 1: pGBKT7-RBBP4 载体 *NdeI* 与 *EcoRI* 双酶切; 2: pGBKT7-RBBP4 质粒

图2 载体 pGBKT 7-RBBP4 双酶切分析

2.3 载体测序与比对结果

将经双酶切鉴定结果正确的 pGBKT7-RBBP4 质粒送公司测序, 并将测序结果经 BLAST 比对, 结果如图 3 所示。结果显示: 质粒中包括 *RBBP4* V1 CDS 全长共 1 278 bp, 在 CDS 序列第 453 位由 T 突变为 C, 但编码的氨基酸不变, 即 GTT 与 GTC 均编码 Val, *RBBP4*cDNA 与 pGBKT7 完全相连, 表明酵母双杂交诱饵载体 pGBKT7-RBBP4 构建成功。

3 讨论

酵母双杂交技术是上世纪 90 年代兴起的一种研究蛋白质间相互作用的分子生物学技术^[10], 是将目的基因克隆至表达载体并在酵母(Y2HGold)中进行真核表达, 翻译后修饰的目的蛋白更接近于体内蛋白的天然构象状态, 用该方法筛选到的蛋白质也

1261 tgatctcaga ggaggacctg catatgatgg ccgacaagga agcagccttc gacgacgag
 1321 tggagaagc agtgatcaac gaggaatca aaatatggaa aaagaacacc cctttcttt
 1381 atgatttggat gatgaccat gctctggagt ggcccagcct aactgcccag tggtctccag
 1441 atgtaaccag accagaaggg aaagatttca gcattcatcg acttgtcctg gggacacaca
 1501 catcggatga acaaaaacct ctgttatag ccagtgtgca gctccctaat gatgatgctc
 1561 agtttgatgc gtcacactac gacagtgaga aaggagaatt tggaggtttt ggttcagtta
 1621 gtggaaaat tgaatataga atcaagatca accatgaagg agaagtaaac agggcccgtt
 1681 atatgccca gaaccttgt atcatcgcaa caaagactec ttccagtgat gttcttGT
 1741 ttgactatac aaaacatcct tctaaaccag atccttctgg agagtgcac ccagacttgc
 1801 gtcctcgttg acatcagaag gaagcgtatg gcttctctg gaaccctaat ctcagtgggc
 1861 acttacttag tgcttcagat gaccatacca tctgctctg ggacatcagt gcegtccaa
 1921 aggagggaaa agtggtagat gcgaagacca tctttacagg gcatacggca gtagtagaag
 1981 atgtttcctg gcactactac catgagctct tgtttgggtc agttgctgat gatcagaaac
 2041 ttatgattg ggatactcgt tcaacaataa ctccaacac aagcactca gttgatgctc
 2101 acactgctga agtgaactgc ctttcttca atccttatag tgaattcatt cttgccacag
 2161 gatcagctga caagactgtt gccttctggg atctgagaaa tctgaaactt aagttgcatt
 2221 cctttgagtc acataaggat gaaatattcc aggttcagtg gtcacctcac aatgagacta
 2281 ttttagcttc cagtggtagt gatcgcagac tgaatgtctg gtagttaagt aaaattggag
 2341 aggaacaatc ccagaagat gcagaagacg ggcccaccaga gttgttgttt atcatggtg
 2401 gtcactactg caagatactc gatttctcct ggaatcccaa tgaaccttgg gtgatttgtt
 2461 ctgtatcaga agacaatc atgcaagtgt ggcaaatggc agagaacatt tataatgatg
 2521 aagaccctga aggaagcgtg gatccagaag gacaagggtc cttaggaattc cggggatcc

粗体 atg: 起始密码子; 粗体 tag: 终止密码子; 横线: t 突变为 c

图3 载体 pGBKT7-RBBP4 中 RBBP4cDNA 结果

就具有较高的可信度;该杂交技术不仅可以用于验证已知蛋白之间的相互作用,也可以从酵母双杂交的文库中寻找与诱饵蛋白相互作用的新的蛋白质,从而发现新的基因^[11]。

已有研究证实视网膜母细胞瘤结合蛋白4

(RBBP4)可以影响染色质代谢的所有阶段,还可以调节多能性、细胞周期与细胞分化的相关基因,在甲状腺癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤组织中普遍表达升高^[5-9],说明 RBBP4 在疾病包括肿瘤的发生发展中起着重要的作用。RBBP4 也可能是肝癌肝移植术后肿瘤复发的潜在分子标志物^[12]。但是 RBBP4 对肿瘤发生发展的分子作用机制还不甚明确,对 RBBP4 的研究将会给肿瘤的早期诊断、治疗提供一些新的思路和参考。

为了进一步研究 RBBP4 对肿瘤发生发展所起作用的分子机制,本文利用 PCR 技术和分子克隆方法,把 RBBP4cDNA 的序列亚克隆到酵母双杂交的表达载体 pGBKT7 中,成功构建了酵母双杂交的诱饵载体 Y2HGold (pGBKT7-RBBP4),目的是为下一步酵母双杂交研究打下基础,也是深入研究 RBBP4 编码蛋白的蛋白质-蛋白质相互作用的关键步骤之一,为筛选与 RBBP4 蛋白相互作用的新蛋白质、探索 RBBP4 蛋白的功能及其分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] QIAN Y W, LEE E Y. Dual retinoblastoma-binding proteins with properties related to a negative regulator of ras in Yeast[J]. J Biol Chem, 1995, 270(43):25507-25513.
- [2] XU C, MIN J R. Structure and function of WD40 domain proteins[J]. Protein & Cell, 2011, 2(3):202-214.
- [3] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.
- [4] KR Ü GER A V, JELIER R, DZYUBACHYK O, et al. Comprehensive single cell-resolution analysis of the role of chromatin regulators in early C.elegans embryogenesis[J]. Developmental Biology, 2015, 398 (2):153-162.
- [5] SONG H, XIA S L, LIAO C, et al. Genes encoding Pir51, Beclin 1, RbAp48 and Aldolase b are up or down-regulated in human primary hepatocellular carcinoma[J]. World J Gastroenterol, 2004(4): 509-513.
- [6] 曹熾, 范松龙, 张智弘. 胃癌中 RBBP4 和 BCL-2 的表达及意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2017(10):1070-1073.
- [7] 钟晶晶, 杨旭锐, 麦梅清, 等. 下调 RbAp48 表达可抑制人宫颈癌 MS751 细胞株的迁移侵袭能力[J]. 南方医科大学学报, 2015(11):1564-1569.
- [8] CREEKMORE A L, WALT K A, SCHULTZ-NORTON J R, et al. The role of retinoblastoma-associated Proteins 46 and 48 in estrogen receptor α mediated gene expression[J]. Mol & Cell Endocrinol, 2008(1-2):79-86.
- [9] 黄亚强, 黄红星, 丘少鹏, 等. RBBP4 对前列腺癌细胞生长和侵袭能力的影响[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2016(3):162-166.
- [10] NAKAMURA T, HAMADA F, ISHIDATE T, et al. Axin, an inhibitor of the wnt signalling pathway, interacts with β -catenin, GSK-3 β and APC and reduces the β -catenin level[J]. Genes to Cells, 1998, 3(6):395-403.
- [11] 刘超, 刘乙蒙, 梁治东, 等. 酵母双杂交技术筛选与蛋白激酶 Wee1 相互作用的蛋白[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(3): 23-26.
- [12] 吕震. RBBP4 在肝细胞肝癌中的表达与作用机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.

(责任编辑: 曲继鹏)