

人 DNA 聚合酶 δ 结合蛋白 PDIP38 的克隆、表达和纯化

翁云¹, Rakhee Gupte², Marietta Y. W. T. Lee², 梁念慈³

(1. 中山大学中山医学院生化教研室, 广东 广州 510080; 2. 纽约医学院生物化学与分子生物学系, 美国 纽约 10595; 3. 广东医学院生化教研室, 广东 湛江 524023)

摘要:【目的】克隆表达和纯化野生型及3种缺失突变型人PDIP38谷胱甘肽S转移酶(glutathion S transferase, GST)融合蛋白。【方法】采用常规PCR扩增法得到野生型及3种缺失突变型人PDIP38的cDNA;4种cDNA与GST融合载体pGEX-4T-1重组并转化大肠杆菌DH5 α ;采用BamH I和Xho I双酶切鉴定插入的DNA序列;采用谷胱甘肽-sepharose 4B亲和层析柱纯化重组蛋白。【结果】野生型和3种缺失突变型人PDIP38 GST融合蛋白在DH5 α 中高效表达;经谷胱甘肽-sepharose 4B亲和层析柱一步纯化后,4种蛋白的纯度均达到85%以上。【结论】pGEX-4T-1 GST蛋白融合载体可高效表达人PDIP38蛋白;用谷胱甘肽-sepharose 4B亲和层析柱一步纯化法可简单、快速地得到高纯度的蛋白。

关键词: PDIP38; 谷胱甘肽S转移酶融合蛋白; 克隆; 表达; 纯化

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)01-0029-05

Cloning, Expression and Purification of Human DNA Polymerase δ Interaction Protein PDIP38

WENG Yun¹, Rakhee Gupte², Marietta Y. W. T. Lee², LIANG Nian-ci³

(1. Department of Biochemistry, Zhongshan Medical College of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, New York Medical School, New York 10595, USA; 3. Department of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

Abstract: 【Objective】 Clone, express and purify wild type and 3 deletion mutants of human PDIP38 glutathion S transferase (GST) fusion protein. 【Methods】 Polymerase chain reaction (PCR) amplification was used for cDNAs of wild type and deletion mutants of PDIP38. 4 cDNAs were inserted into the pGEX-4T-1 GST fusion vector and transformed to *E. coli*. DH5 α cell strain. Restriction enzyme BamH I and Xho I were used for double digest to check the inserted DNA. Glutathione-sepharose 4B affinity column was used to purify PDIP38 recombinant proteins. 【Results】 GST fusion wild type and deletion mutants of PDIP38 were highly expressed in *E. coli*. DH5 α . The purities of the recombinant proteins achieve 85% on glutathione-sepharose 4B affinity column. 【Conclusions】 pGEX-4T-1 GST fusion protein vector can highly express human PDIP38 proteins. Using Glutathione-sepharose 4B affinity column can simply and rapidly purify the proteins.

Key words: PDIP38; glutathion S transferase (GST) fusion protein; clone; express; purify

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(1): 29-33]

真核生物 DNA 聚合酶 δ (DNA polymerase δ , pol δ) 在真核生物 DNA 复制和 DNA 损伤修复过程

收稿日期: 2003-08-24

基金项目: 美国 National Institutes of Health Grant NIH grant (No: 41-04-96); 广东省高等学校重点学科(C类)基金资助项目(1999-2002)

作者简介: 翁云(1972-), 女, 讲师, 1998年毕业于广东医学院生物化学教研室, 获医学硕士学位并留校任教; 现在攻读中山大学中山医学院生物化学与分子生物学专业博士学位。梁念慈, 男, 教授, 博士生导师, 通讯作者。E-Mail: ncliang@gdmc.edu.cn

中起着重要的作用^[1]。Pol δ 由 4 个亚基组成,相对分子质量 (M_r) 分别为 125×10^3 、 50×10^3 、 68×10^3 和 12×10^3 ,其中 p125 催化亚基和 p50 调节亚基构成 pol δ 的酶核心部分。酵母双杂交法研究人胎盘 (human placental matchmaker) cDNA 库中与 pol δ p50 调节亚基结合的蛋白,发现— $M_r = 38 \times 10^3$ 的新蛋白可与 p50 亚基结合,并将其命名为 DNA 聚合酶 δ 结合蛋白 (DNA polymerase δ interaction protein, PDIP38)。PDIP38 的 cDNA 由 1 107 个碱基组成,可编码 368 个氨基酸。Hela 细胞抽提物经过 F78 抗 Pol δ p125 抗体免疫亲和层析柱纯化后,发现 PDIP38 存在于 Pol δ 复制复合物中,表明它和 Pol δ 之间有着功能的联系,而且 PDIP38 还与增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 结合^[2],但是对这个全新蛋白与 p50 调节亚基的结合部位以及它在 DNA 复制过程中的作用目前仍未清楚。本实验构建了 PDIP38 野生型 (PDIP38 WT)、从 1~125 氨基酸残基的 N-末端 (PDIP38 DM1)、从 122-247 氨基酸残基的中间段 (PDIP38 DM2) 和从 243~368 氨基酸残基的 C-末端 (PDIP38 DM3) 3 种缺失突变体的 cDNA,将 4 种 cDNA 与谷胱甘肽 S 转移酶蛋白 (glutathion S transferase, GST) 融合载体 pGEX-4T-1 重组,经表达后,采用谷胱甘肽 -sepharose 4B 亲和层析柱纯化了这 4 种蛋白,以研究 PDIP38 与 Pol δ p50 调节亚基的结合部位及其功能。

1 材料与方 法

1.1 材料和试剂

GST 融合蛋白原核表达载体 pGEX-4T-1 和谷胱甘肽 -sepharose 4B 购自美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司; PCR2.1TA 载体,大肠杆菌菌株 Top 10F' 和 DH5 α 购自美国 Invitrogen 公司; PCR 试剂盒购自美国 Roche 公司; 限制性内切酶 BamH I, Xho I 和蛋白分子标准购自美国 New England Biolabs 公司; 质粒 DNA 提取试剂盒购自美国 QIAGEN 公司; LB 培养基购自美国 Gibco BRL 公司; 小鼠抗人 GST 单克隆抗体、山羊抗小鼠 IgG 和 Western blot 显色试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司; 其它试剂均购自美国 Sigma 公司。

1.2 引物设计和合成

为构建 PDIP38 野生型和 C-末端、N-末端及

两端缺失 3 种突变体,根据已知的 PDIP38 序列,设计了 6 条引物: P1: 5' CGGGATCCATGGCAGCCTGTACAGC 3'; P2: 5' TGCTCGAGCTACTCCTTGGAGCCATGG 3'; P3: 5' GCGGATCCATGGGCTCCAAGGAGGTG3'; P4: 5' CGCTCGAGCTAGGGGATGACAGTGACACG 3'; P5: 5' AAGGATCCATGGTCACTGTCATCCCC 3'; P6: 5' TTCTCGAGCTACCAGTCAA GGCCTGA 3'。

其中引物 1、6 用于构建 PDIP38 全长 cDNA, 1、2 用于构建 PDIP38 N-末端突变体 DM1, 3、4 用于构建 PDIP38 两端缺失突变体 DM2, 5、6 用于构建 PDIP38 C-末端突变体 DM3。引物由美国 QIAGEN 公司合成。

1.3 方 法

1.3.1 PDIP38 野生型及缺失突变体的克隆和 GST 融合蛋白表达载体的构建 以经过测序的 PDIP38 全长 cDNA 为模板,参照 PCR 试剂盒说明书上所列的试剂用量,采用常规 PCR 法扩增出 PDIP38 野生型及突变体的 cDNA。PDIP38WT 和 PDIP38 DM3 的 PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 62 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1 min 共 30 次循环; 第 1 次循环前先经 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 最后 1 次循环完成后,在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PDIP38 DM1 和 DM2 的 PCR 反应参数与前者相似,只是退火温度为 65 $^{\circ}$ C。

PCR 产物经纯化后,与 PCR2.1TA 载体在 14 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 然后转化感受态大肠杆菌 Top 10F', 通过蓝白斑实验挑选出含正确重组 PDIP38 野生型及突变体质粒的克隆,小量制备质粒,经限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 双酶切后,与经同样酶切的 GST 融合蛋白载体 pGEX-4T-1 在 14 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 得到的 PDIP38 野生型和 3 种突变体重组质粒转化感受态细胞 DH5 α 。小量制备质粒,酶切鉴定后选择含有正确的重组质粒的克隆用于蛋白的表达和纯化。

1.3.2 GST 融合 PDIP38 野生型和缺失突变体蛋白的表达 挑取含有 PDIP38 野生型和 3 种 PDIP38 突变体重组质粒的大肠杆菌 DH5 α 单菌落,加入到 25 mL 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜振荡培养后,再以体积分数为 1:50 的稀释比例将菌株加入到 1 L 含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C, 220 r/min 振荡培养 2~3 h, 当 A_{595} 达到 0.5 左右时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 在 27

℃诱导表达,继续培养5 h后, $3\ 000 \times g$ (J2-HS型, Beckman公司)离心20 min收集细胞,沉淀用PBS缓冲液洗涤2次后,于-70℃冻存备用。

1.3.3 GST融合PDIP38野生型和缺失突变体蛋白的纯化 取250 mL含PDIP38野生型和3种突变体的培养菌,分别加入10 mL细胞裂解缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 体积分数0.1%的润湿剂P40(NP40), 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF), 1 mmol/L DTT, 10 mg/L Leupeptin),于冰浴中超声破碎(强度40,超声15 s,间隔15 s,共5次),然后以 $16\ 000 \times g$, 4℃离心40 min,收集上清,用细胞裂解缓冲液将蛋白质量浓度调到约5 g/L,上到预先用TN缓冲液(25 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 体积分数0.1% NP40, 1 mmol/L PMSF)平衡好的谷胱甘肽-sepharose 4B亲和层析柱(1 mL柱床体积),流速为0.5 mL/min,重复上样两次,经10~20倍柱床体积的TN缓冲液洗涤后,用5 mL含有32 mmol/L谷胱甘肽的TN缓冲液洗脱蛋白,收集洗脱液,每管0.5 mL,用100 g/L和120 g/L SDS-PAGE电泳测定重组蛋白的表达和纯度。

1.3.4 Western blot鉴定纯化的GST融合PDIP38野生型和缺失突变体蛋白 纯化的GST融合PDIP38野生型和突变体蛋白经100 g/L SDS-PAGE电泳后,于4℃转移到硝酸纤维素膜(NC)上。用50 g/L的脱脂牛奶在室温摇床孵育1 h,加入用TBST缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 150 mmol/L NaCl, 体积分数0.1% Tween 20),以1:1 000倍稀释的小鼠抗人GST单克隆抗体(一抗),在4℃摇床孵育过夜后,用TBST缓冲液洗3次(每次15 min)以除去未结合的抗体,加入5 000倍稀释的生物素偶联的山羊抗小鼠IgG(二抗),室温摇床孵育1 h,再用TBST缓冲液洗3次(每次15 min)除去未结合的二抗后,加入Western blot显色试剂A和B混合液孵育5 min,显色并冲洗底片。

2 结果

2.1 PDIP38野生型及缺失突变体GST融合蛋白表达载体的构建和鉴定

以常规PCR法扩增出全长约为1 100 bp的野生型PDIP38 cDNA和3个全长约为400 bp的PDIP38突变体cDNA,PCR产物经蓝白斑实验筛选和BamH I和Xho I双酶切后,与同样双酶切后的

GST融合蛋白载体pGEX-4T-1连接并转化入大肠杆菌DH5 α ,小量制备质粒后,酶切鉴定,10 g/L琼脂糖电泳显示一4 900 bp的载体片段和约1 100 bp及400 bp的目的基因(图1)。

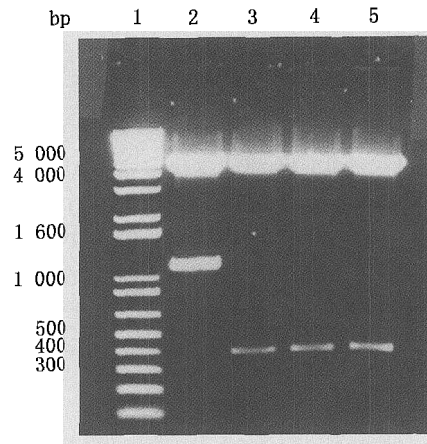


图1 PDIP38野生型和突变体重组质粒双酶切鉴定图谱

Fig. 1 Restriction analysis of PDIP38 wild type and deletion mutants

1: DNA M_r standard marker; 2~5: digestion of pGEX-4T-1/PDIP38 WT, pGEX-4T-1/PDIP38 DM1, pGEX-4T-1/PDIP38 DM2 and pGEX-4T-1/PDIP38 DM3 with BamH I and Xho I

2.2 GST融合PDIP38野生型及缺失突变体蛋白的表达

谷胱甘肽S转移酶蛋白的 M_r 理论值为 26×10^3 , GST融合野生型PDIP38蛋白 M_r 理论值为 68×10^3 , GST融合PDIP38 N-末端、两端缺失和C-末端3种突变体蛋白 M_r 理论值分别为 39×10^3 、 41×10^3 和 40×10^3 。含有PDIP38野生型和缺失突变体基因的大肠杆菌DH5 α 经IPTG诱导表达后用100 g/L SDS-PAGE鉴定表达产物,可见到与理论值近似的高表达条带(图2)。结果表明GST融合的PDIP38野生型和3种缺失突变体蛋白在DH5 α 中高效表达。

2.3 GST融合PDIP38野生型及缺失突变体蛋白的纯化和鉴定

经谷胱甘肽-sepharose 4B亲和层析柱纯化后的蛋白,走120 g/L SDS-PAGE并用考马斯亮蓝染色,经凝胶图像分析仪分析,蛋白质纯度均达85%以上,纯化后的蛋白在 26×10^3 附近出现一微弱的蛋白带,与纯化的GST蛋白分子量相近,应是降解的GST蛋白(图3)。用抗人GST蛋白抗体进行免疫印迹实验,Western Blot结果显示所纯化的蛋白为GST融合蛋白(图4)。

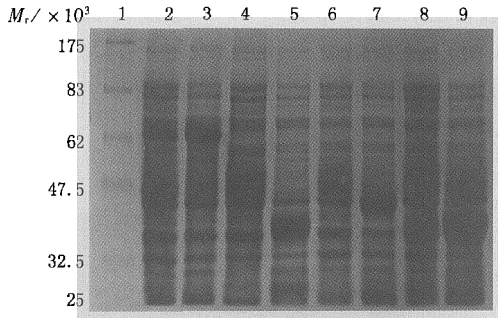


图 2 SDS-PAGE 测定 GST 融合 PDIP38 野生型及缺失突变体蛋白的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of GST fusion PDIP38 wild type and deletion mutants

1: protein standard; 2, 4, 6, 8: the cell lysates of PDIP38 WT, DM1, DM2 and DM3 before induced; 3, 5, 7, 9: the cell lysates of PDIP38 WT, DM1, DM2 and DM3 after induced by 0.1 mmol/L IPTG

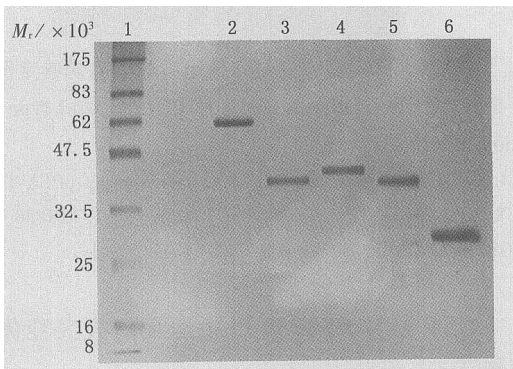


图 3 SDS-PAGE 测定纯化的 GST 融合 PDIP38 野生型及缺失突变体蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified protein of GST fusion PDIP38 wild type and deletion mutants

1: protein standard; 2: PDIP38 WT; 3: PDIP38 DM1; 4: PDIP38 DM2; 5: PDIP38 DM3; 6: GST protein

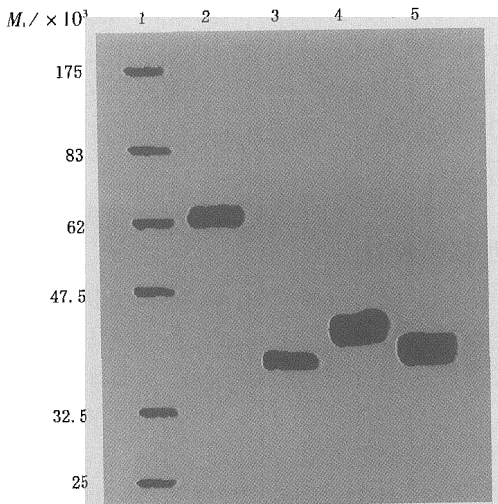


图 4 Western Blot 测定纯化的 GST 融合 PDIP38 野生型及缺失突变体蛋白

Fig. 4 Western blot analysis of the purified protein of

GST fusion PDIP38 wild type and deletion mutants

1: protein standard; 2: PDIP38 WT; 3: PDIP38 DM1; 4: PDIP38 DM2; 5: PDIP38 DM3

3 讨论

DNA 聚合酶 pol δ 最早由 Byrnes 等^[3] 人于 1976 年从牛骨髓中分离出来, 它最重要的功能是在真核生物 DNA 复制过程中催化 DNA 领头链和冈崎片段的延伸^[4]。pol δ 本身不能直接和 DNA 结合, 需要增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 和复制因子 C (replication factor C, RFC) 以及其它复制相关蛋白的参与来完成其催化 DNA 复制的功能^[5]。PCNA 是 pol δ 有效发挥聚合酶功能所不可缺少的, 在复制过程中作为分子移动夹子^[2] 而发挥作用。它可以稳定 pol δ 与引物-模板的连接, 并增加 pol δ 的 DNA 聚合酶活性。在体外利用 polydA · oligodT 为底物研究从牛胸腺纯化的 pol δ 时, 发现 PCNA 可激活 pol δ 的活性高达 100 倍以上^[6]。

早期从哺乳动物组织中分离纯化的 pol δ 主要由两个亚基组成, 分别为 125×10^3 的催化亚基和 50×10^3 (或 48×10^3) 的功能尚未清楚的小亚基, 目前认为哺乳动物的 pol δ 至少由 4 个亚基组成, 可是各亚基的功能所知不多。p125 亚基本身具有 DNA 聚合酶和 DNA 3'-5' 外切酶活性, N 末端有 PCNA 结合位点, 但是单个重组的 p125 亚基在体外不被 PCNA 激活^[7], 而重组 p125/p50 复合物可以被 PCNA 激活, 并催化 DNA 链的延伸^[8]。研究单个重组人 p125 亚基或 p50 亚基与 PCNA 的结合, 及 p125/p50 两亚基复合物与 PCNA 的结合时, 发现单个 p125 催化亚基与 PCNA 无直接作用, 单独的 p50 小亚基可与 PCNA 共同沉淀, 且其 N-末端是与 PCNA 结合的区域, 因此认为 pol δ 必须通过 p50 亚基才能与 PCNA 连接^[9], 这也说明 p50 亚基是 pol δ 与 PCNA 结合并使 p125 亚基行使催化功能所不可缺少的。

以 pol δ p50 亚基为饵, 采用酵母双杂交法研究与 p50 亚基结合的蛋白时, 发现参与细胞周期调控的 p21 蛋白及两种新的未知功能的蛋白 PDIP38 和 PDIP46 可与 pol δ p50 亚基结合。分析 PDIP38 的氨基酸顺序, 发现它的 C-末端氨基酸残基与细菌的 APAG 蛋白有 28% ~ 37% 的相似性, 与人的 F box A 蛋白有 32% 的相似性, 但关于这两种蛋白的功能

仍在研究中。目前令人感兴趣的是PDIP38上还有多个PCNA结合位点,分别位于81~88,151~158和193~120位氨基酸,它们的氨基酸组成特点是:QXXZXXF,这种结构特点在其它一些与PCNA结合的蛋白氨基酸序列中也可以找到。以PDIP38进行配对(pairwise)酵母双杂交分析、体外共免疫沉淀和PCNA覆盖(overlay)实验也证明PDIP38可与PCNA结合^[2]。由于PDIP38可以同时结合pol δ p50亚基和PCNA,那么它在pol δ 与PCNA结合时所起的作用很值得研究。此外在PDIP38的氨基酸序列中还发现一些蛋白激酶PKC和蛋白激酶CK2的磷酸化位点,而且我们利用pairwise酵母双杂交分析发现PDIP38还与甲状腺激素受体连接蛋白6(thyroid hormone receptor interactor 6, Trip 6)结合,这表明PDIP38可能与细胞信号传导途径有关(待发表)。

pGEX-4T-1是一种GST融合蛋白载体,经该载体表达的目的蛋白含有谷胱甘肽S转移酶,可以用谷胱甘肽-sepharose 4B亲和层析柱纯化。GST在多数情况下不影响所要表达的目的蛋白的功能和结构,还有助于一些小分子重组蛋白结构的稳定,不易被水解。由于GST融合蛋白性质稳定且易于纯化,因此越来越多的体外蛋白功能和蛋白与蛋白之间的连接作用研究实验使用GST融合蛋白^[10]。为此,我们根据PDIP38氨基酸结构特点和功能区域分布情况,将它分为从1~125氨基酸残基的N-末端(PDIP38 DM1)、从122~247氨基酸残基的中间段(PDIP38 DM2)和从243~368氨基酸残基的C-末端(PDIP38 DM3)3段多肽,其中DM1和DM2含有PCNA结合区域,而DM3主要为APAG蛋白区域,然后用pGEX-4T-1载体来表达PDIP38野生型和3种缺失突变体蛋白,只需经过一步纯化就可以得到高纯度的蛋白,为进一步确定PDIP38与p50亚基及PCNA的结合部位及研究PDIP38的功能提供材料。

参考文献:

- [1] Porter M E. Positive and negative effects of deletions and mutations within the 5' flanking sequences of plasmodium falciparum DNA polymerase δ [J]. Molec Biochem Parasitol, 2002,122(1): 9-19.
- [2] Liu Li, Esther M, Rodriguez Belmonte, *et al.* Identification of a novel protein, PDIP38, that interacts with the p50 subunit of DNA polymerase δ and proliferation cell nuclear antigen[J]. J Biol Chem, 2003, 278(12): 10041-47.
- [3] Byrnes J J, Downey K M, Black V L, *et al.* A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta[J]. Biochemistry, 1976, 15(13):2817-23.
- [4] Tsurimoto T, Melendy T, Stillman B. Sequential initiation of lagging and leading strand synthesis by two different polymerase complexes at the SV40 DNA replication origin[J]. Nature, 1990, 346(6284): 534-9.
- [5] Waga S, Stillman B. The DNA replication fork in eukaryotic cells[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 721-51.
- [6] Prelich G, Tan C-K, Kostura M, *et al.* Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase auxiliary protein[J]. Nature, 1987, 326(61120): 517-20.
- [7] Hindges R, Hübcher U. Production of active mouse DNA polymerase in bacteria[J]. Gene, 1997, 158(2): 241-6.
- [8] Lu X, Tan C K, Zhou J Q, *et al.* Direct interaction of proliferating cell nuclear antigen with the small subunit of DNA polymerase δ [J]. J Biol Chem, 2002, 277(27): 24340-5.
- [9] Zuo S, Gibbs E, Kelman Z, *et al.* Can polymerase δ isolate from Schizosaccharomyces pombe contains five subunits[J]. Proc Natl Acad Sci, 1997, 94(21): 11244-9.
- [10] Ahmad S, Ali M M, Mustafa A S. Construction of a modified vector for efficient purification of recombinant mycobacterium tuberculosis proteins expressed in *Escherichia coli*[J]. Protein Expr Purif, 2003, 29(2): 167-75.

[1] Porter M E. Positive and negative effects of deletions and

(编辑 张敏瑞)