

蓖麻毒素 B 链(RTB)酵母双杂交诱饵载体的构建及其自激活作用的检测^X

刘 宁^{1,2}, 刘林娜², 秦贵信¹, 徐 静², 万家余², 高宏伟^{2XX}

1. 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118; 2. 军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

摘 要: 采用 PCR 技术扩增蓖麻毒素 B 链基因, 并克隆入诱饵载体 pSos 中, 成功地构建了酵母双杂交诱饵载体 pSos2RTB。将重组质粒与对照质粒共转化入酵母菌 cdc25H。结果表明: 该段基因表达的蛋白对酵母菌 cdc25H 无毒性和无自激活作用, 且在酵母细胞中定位正确。

关键词: 蓖麻毒素蛋白; 酵母双杂交系统; 诱饵载体; 自激活

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5684(2010)04-0398-04

Construction of Ricin2B(RT2B) Gene Bait Vector and Verification of Self2Activation in Yeast Double2Hybrid System

LIU Ning^{1,2}, LIU Lin2na², QIN Gu2xin¹, XU Jing², WAN Jia2yu², GAO Hong2wei²

1. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China ;
2. Institute of Military Veterinary, Academy of Military Medical Sciences, Changchun 130062, China

Abstract: The ricin2B gene was cloned into the pSos vector. After being verified by restriction enzyme digestion analysis, the recombinant bait vector pSos2RTB of yeast double2hybrid system was obtained. Bait and target plasmids were cotransformed into the cdc25H yeast strain. This result means it was not toxic to cdc25H and had no self2activation.

Key words: ricin; yeast double2hybrid system; bait vector; self2activation.

外源凝集素广泛分布于植物界, 其中多数是无毒的。但是一些外源凝集素结合到核糖体上便形成 δ 型核糖体抑制蛋白, 具有极高的毒性, 其中最具代表性的是蓖麻毒素^[22]。蓖麻毒素是由具有酶活性的 A 链和具有凝集素活性的 B 链通过一个二硫键连接成的异二聚体。有报道指出, 蓖麻毒素 A 链的活性部分由 5 个高度保守的残基组成, 分别为 Y80、Y123、E177、R180、W211, 通过突变分析出该 5 个残基在酶的催化和与核糖体相互作用过程中起着重要作用^[325]。而且 A 链是一种 N2糖苷酶, 可以移去 28S rRNA 腺嘌呤残基, 导致蛋白质的合成终止, 以致细胞死亡。蓖麻毒素 B

链具有凝集素活性, 可与暴露 B1, 4 半乳糖苷键结合, 在少数细胞中还能与甘露糖结合, 然后通过内吞作用进入细胞的包涵体、高尔基体、内质网、胞质溶胶等细胞器, 从而抑制蛋白质的合成, 诱导细胞因子产生, 产生脂质过氧化损伤和细胞凋亡等一些毒性作用^[6]。但到目前为止一些辅助性蛋白在转运过程中的作用仍不是很明确, 所以为了更好地阐明其转运机制, 寻求互作蛋白已经成为首要问题。

由于蛋白质与其他生物大分子间的作用依赖于细胞内环境, 因而对受作用时间及作用力影响较大的传统生化方法的应用受到一定程度的限

X 基金项目: 全军医药卫生科研基金项目(06Q84)

作者简介: 刘 宁, 女, 硕士研究生, 研究方向: 饲料抗营养因子。

收稿日期: 200910212 修回日期: 20100228

XX 通讯作者

制,且蛋白)蛋白及蛋白)核酸间作用的研究进展缓慢。新兴起的双杂交系统应用有效的酵母遗传学方法分析蛋白间相互作用,能快速克隆编码与某一蛋白作用的配体蛋白的基因,因而得到广泛应用^[7]。本试验所采用的 CytoTrap 酵母双杂交系统,所有的蛋白间相互作用都发生在细胞质中,所以这个系统可以称作是酵母细胞质双杂交系统,此方法可以弥补传统酵母双杂交系统的不足^[8]。

本试验克隆了蓖麻毒素 B 链基因 (RTB),将其插入酵母双杂交系统诱饵载体 pSos 中,构建成为 pSos2RTB,为下一步利用酵母双杂交筛选与蓖麻毒素 B 链存在相互作用的蛋白质奠定了基础,以便于进一步研究蓖麻毒素的转运机制及解毒药物。

1 材料与方法

1.1 材料

cdc25H 酵母菌株及质粒 pSos、pSos MAFB、pMyr laminc、pMyr MAFB 均购自 Stratagene 公司,大肠杆菌 DH5A 感受态细胞为军事兽医研究所实验室保存, pMD218T 载体、DL2000 Marker、DL15000 Marker、Not I 和 Sal I 酶等分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 诱饵质粒 pSos2RTB 的构建

1.1.2.1 蓖麻毒素 B 链基因的克隆 设计 B 链上游含有 Sal I 酶切位点的引物 5c2GTTGTCGACC2GCTGATGTTGIATGGATCCTG23c,下游含有 Not I 酶切位点的引物 5c2ATTGCGGCCGCTTATCAAAT AATGGTAAACCATATT23c,提取蓖麻种子中基因组作为模板进行 PCR。反应体系为模板 1 LL,上下引物各 1 LL, dNTP 5 LL, EXTAq 0.15 LL, dH₂O 36.15 LL, EXTAq Buffer 5 LL。反应条件为 94 e 2 min; 94 e 30 s, 55 e 30 s, 72 e 40 s, 30 个循环; 72 e 5 min。PCR 产物即为两端含有相应酶切位点的 RTB 片段。

1.1.2.2 重组质粒 pMD18T2simple2RTB (即 pMD18T2B)的构建及鉴定 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,使用凝胶回收试剂盒回收目的基因,按 T 载体试剂盒操作说明与 pMD18T2simple 载体连接 (Solu2 tio I 5 LL, 回收产物 4 LL, T 载体 1 LL, 混匀后 4 e 连接过夜),用 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 DH5A,使用氨苄抗性筛选阳性菌落并抽提质粒,进行双酶

切鉴定。酶切体系为重组质粒 10 LL, Sal I 215 LL, Not I 215 LL, H2Buffer 215 LL, BSA 5 LL, dH₂O 2215 LL, 37 e 水浴 3 h。经双酶切分析证明连接成功后,将保留菌种送上海捷瑞生物技术有限公司进行序列测定。

1.1.2.3 诱饵重组质粒 pSos2RTB 的构建及鉴定

将重组成功的质粒 pMD18T2B 及酵母表达载体 pSos 分别经 Not I 和 Sal I 双酶切后,琼脂糖电泳回收纯化。按照 Solution I 5 LL,载体 0.15 LL,目的片断 415 LL, 16 e 连接 4 h,然后 4 e 连接过夜。将连接产物用 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 DH5A,使用氨苄抗性筛选阳性菌落并扩增、抽提质粒,双酶切鉴定阳性质粒,条件同本文/112120。将重组质粒命名为 pSos2RTB,经酶切分析证明连接成功后,送上海捷瑞生物技术有限公司进行序列测定。

1.1.3 cdc25H 酵母感受态的制备

1° 从 -80 e 取用甘油储存的酵母菌种划线于 YPAD 平板上,22~25 e 培养 4 d 直至长出单菌落。用封口膜封好放于 4 e 储存 7 d。

2° 挑取 cdc25H 酵母平板上的一个较大的新鲜菌落于装有 1 mL YPAD 培养基的小离心管中,振荡涡旋使细胞团彻底分散。

3° 将悬液转移到装有 50 mL YPAD 的 250 mL 锥形瓶中,室温 220~250 r/min 摇床培养 14~16 h,直至其 OD₆₀₀>1100。

4° 使用新鲜配制 YPAD 培养液,稀释菌液至 OD₆₀₀=0.12,室温继续振荡培养 3 h。

5° 将 YPAD 培养液室温下 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,再用 50 mL 灭菌四馏水重悬沉淀,在室温下 1 000 r/min 离心 10 min。

6° 弃去上清液,用 1 mL TE/LiAc 悬浮沉淀,室温下 1 000 r/min 离心 10 min,吸去上清,用 250 LL TE/LiAc 悬浮沉淀,分装即为酵母感受态。

7° 制备感受态的同时,当步骤 4° 中菌液 OD₆₀₀>0.17 时,将 75 LL 菌液划线到 YPAD 板上,37 e 孵育,4~6 d 后观察该瓶菌液是否存在温度突变菌株,如存在突变现象,则该感受态不可使用。

1.1.4 酵母细胞的转化

利用 LioAc 转化法^[9]向 2 h 之内制备好的酵母感受态中加入诱饵重组质粒 pSos2RTB,再向该离心管中加入终浓度 50 Lg/mL 的变性鲑鱼精 DNA,再依次加入 30 LL 10 倍 LiAc、30 LL 10 倍

TE, 240 μ L 50% PEG3350, 剧烈振荡混匀 10 s, 使其充分混合。将离心管置于 23 e 下 250 r/min 摇动培养 45 min。每管中再加入 50 μ L DMSO, 轻轻混匀。42 e 热激 15 min, 然后 8 000 r/min 离心 5 min。弃掉上清, 用 1 mL TE 重悬沉淀, 再次离心, 重悬。从中吸取 200 μ L 涂到 SD/ glucose(- L) 平板上, 置于 23 e 培养 4 d 至菌落长出。再挑取其中生长较大的菌落, 利用载体引物进行菌落 PCR, 看其转化是否成功。

1.5 重组诱饵质粒 (pSos2RTB) 的自激活作用和定位检验

为了减少隔代相传而产生假阳性结果, 采用共转化法和 LioAc 转化法进行 5 组试验。第 1 组 (自激活阳性对照组) pSosMAFB 质粒 (400 ng) 和 pMyrMAFB (400 ng), 第 2 组 (定位阳性对照组) pSosMAFB 质粒 (400 ng) 和 pMyrSB (400 ng), 第 3 组 (阴性对照组) pSosMAFB 质粒 (400 ng) 和 pMyr laminC (400 ng), 第 4 组 (自激活检验组) pSos2RTB (400 ng) 和 pMyr (400 ng), 第 5 组 (定位检验组) pSos2RTB (400 ng) 和 pMyrSB (400 ng)。利用 LioAc 转化法^[9], 方法同本文 1140, 将转化菌液铺于 SD/ glucose(- UL) 筛选平板上, 于 23 e 培养约 4 d, 直至出现菌落。每组各挑取较大的 5 个菌落, 分别重悬于 25 μ L 灭菌水中, 每份重悬菌液各吸取 1 滴 (215 μ L 为 1 滴) 分别滴于一个 SD/ glu2cose(- UL) 和一个 SD/ galactose(- UL) 平板, 同时置于 37 e 培养 6 d, 直至菌落有继续生长状态。

2 结果与分析

2.1 重组质粒 pMD182RTB 的构建及其鉴定结果

重组质粒 pMD182RTB 经 Not I 和 Sal I 双酶切后电泳鉴定, 目的片段大小约 786 bp, 与预期大小相符。测序结果与标准序列 X52908 (Gen2 Bank) 中 RTB 基因相符合, 表明 pMD182RTB 构建成功 (图 1)。

2.2 诱饵重组质粒 pSos2RTB 的构建及其鉴定结果

重组质粒 pSos2RTB 经 Sal I 和 Not I 双酶切后电泳鉴定, 插入片段大小正确 (图 2)。用酵母表达载体 pSos 引物进行测序, 结果证实片断为蓖麻毒素 B 链序列, 表明诱饵重组质粒 pSos2RTB 构建成功。

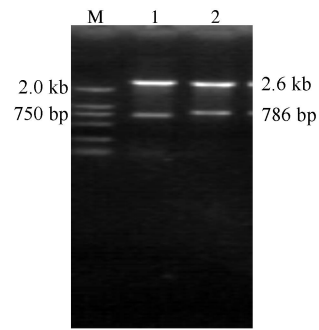


图 1 pMD182RTB 质粒双酶切鉴定结果
M. DL Marker 2000; 1~2. pMD182RTB 经 Sal I 和 Not I 双酶切 pMD182RTB digest by Sal I / Not I

图 1 pMD182RTB 质粒双酶切鉴定结果

Fig. 1. Identification of pMD182RTB by restriction enzyme digestion and analysis by electrophoresis

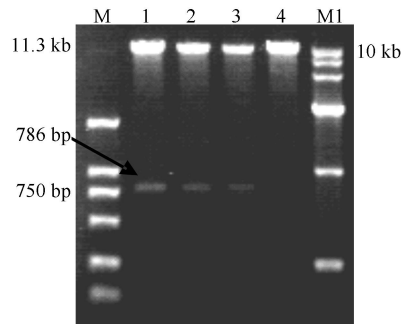


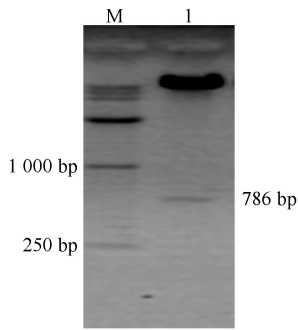
图 2 pSos2RTB 质粒双酶切鉴定结果
M. DL Marker 2000; 1~4. pSos2RTB 经 Sal I 和 Not I 双酶切 pSos2RTB digest by Sal I / Not I; M1. DL Marker 10000

图 2 pSos2RTB 质粒双酶切鉴定结果

Fig. 2. Identification of pSos2RTB by restriction enzyme digestion and analysis by electrophoresis

2.3 重组诱饵质粒 (pSos2RTB) 的表达与鉴定结果

采用 LioAc 法将构建成功的诱饵蛋白编码质粒 (pSos2RTB) 转化于酵母感受态中, 在 23 e 培养约 4 d 的 SD/ glucose (- L) 平板中筛选出假定阳性克隆。利用酵母表达载体 pSos 引物对选出的疑似阳性克隆进行酵母菌落 PCR, 快速筛选酵母转化子, 试验重复 3 次。在 786 bp 处均可见到目的条带 (图 3), 证明转化成功。



M. DL Marker 10000; 1. 诱饵质粒菌落 PCR 产物 PCR products of pSo2RTB plasmid

图3 酵母菌 cdc25H 重组诱饵质粒 pSo2 RTB 的阳性克隆 PCR 扩增产物电泳鉴定

Fig. 3. Electrophoresis analysis of PCR amplification products of pSo2 RTB plasmid in the cdc25H yeast

2.4 诱饵质粒的自激活检验和定位检验结果

挑选各转化组于 23 e 培养, 4 d 后在 SD/ glu2 cose(- UL) 营养缺陷板上长出白色湿润菌落。分别用灭菌水重悬所选择的较大菌落, 然后滴到 2 对 SD/ glucose (- UL) 和 SD/ galactose (- UL) 营养缺陷板上。将每组中的 1 对 SD/ glucose (- UL) 和 SD/ galactose (- UL) 于 37 e 培养, 另 1 对于 23 e 培养。约 5 d, 在 37 e 培养组中, 可见到第 1, 2, 5 组在 SD/ galactose (- UL) 营养缺陷板上长出菌落, 而第 3, 4 组在 SD/ galactose (- UL) 营养缺陷板上无菌落长出 (表 1)。表明诱饵质粒无自激活宿主菌 cdc25H 的作用, 且该诱饵质粒表达的融合蛋白在宿主细胞质中定位正确。

表 1 诱饵自激活情况及定位检验结果

Table 1. Verification of bait plasmid self activation for Cyto Trap interaction assays

组别 Group	共转化质粒组合 Cotransformed plasmids	SD/ (- UL)/ 23e		SD/ (- UL)/ 37e	
		Glucose		Glucose	Galactose
1	pSosMAFB 和 pMyrMAFB	+		-	+
2	pSosMAFB 和 pMyrSB	+		-	+
3	pSosMAFB 和 pMyr	+		-	-
4	pSo2RTB 和 pMyr	+		-	-
5	pSo2RTB 和 pMyrSB	+		-	+

注: / + 0 代表生长良好, / - 0 代表不生长

Note: / + 0 represents cells grow well; / - 0 represents cells fail to grow

3 讨论

研究蓖麻毒素的互作蛋白, 将其毒素转运路径的确定和药物的研发提供一定的科学依据。本试验通过酶切和测序鉴定已经成功构建诱饵重组质粒 pSo2RTB。利用 LioAc 转化法将重组质粒转化入 cdc25H 酵母菌中, 可见其能够在 SD/ glucose (- L) 平板上长出菌落, 而未转化诱饵质粒的 cdc25H 酵母菌在 SD/ glucose (- L) 平板上则未见菌落生长。通过 2 种载体不同的筛选标志 (pSos 质粒的筛选标志为 - Leu, pMyr 质粒的筛选标志为 - Ura) 和 cdc25H 酵母菌自身不能在 Leu (亮氨酸) 和 Ura (尿嘧啶) 营养缺陷培养基上生长的特性可以证明诱饵质粒 pSo2RTB 编码的诱饵融合蛋白能够在宿主酵母菌成功表达。为排除使用该方法所产生假阳性结果, 同时对诱饵质粒的自激活和定位情况做了重复性验证, 结果证明该重组质粒无自激活和无毒性作用。本试验结果为下一步从

文库筛选蓖麻毒素 B 链互作蛋白奠定了基础。

参考文献:

- [1] 曾佑炜, 宋光泉, 彭永宏, 等. 蓖麻毒蛋白研究及应用进展 [J]. 亚热带植物科学, 2004, 33(1): 60-63.
- [2] Olsnes S, Kozlovb J V. Ricin [J]. Toxicol, 2001(39): 172-178.
- [3] Marsden C J, Fulop V, Day P J, et al. The effect of mutations su2 rounding and within the active site on the catalytic activity of ricin A chain [J]. Eur J Biochem, 2004, 271(1): 15-16.
- [4] Ready M P, Kim Y, Robertus J D. Site-directed mutagenesis of ricin A2 chain and implications for the mechanism of action [J]. Protein, 1991, 10 (3): 27-28.
- [5] Schlossman D, Withers D, Welsh P, et al. Role of glutamic acid 177 of the ricin toxin A chain in enzymatic inactivation of ribosomes [J]. Mol Cell Biol, 1989, 9 (11): 5012-5021.
- [6] 葛利萍, 詹金彪. 蓖麻毒素在细胞内的运输和转运途径研究进展 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2003, 32 (6): 538-543.
- [7] Suter B, Kittanakom S, Stagljar I. Two-hybrid technologies in proteomics research. [J]. Biotechnology, 2008, 19(4): 316-323.
- [8] Graner E, Mercadante A F, Zanata SM, et al. Cellular prion protein binds laminin and mediates neurite outgrowth [J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000, 76 (1): 8-12.
- [9] Gietz R D, Schiestl R H, Williams A R, et al. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/ S2DNA/ PEG procedure [J]. Yeast, 1995, 11 (4): 352-360.