

稳定表达TSC1/TSC2蛋白质复合物的293T细胞系的建立

闫丽君 吴 更*

(上海交通大学生命科学技术学院, 微生物代谢国家重点实验室, 上海 200240)

摘要 我们使用Clonetechn的同源重组酶连接入TSC1、TSC2全长蛋白编码cDNA ORF到pBudCE4.1真核细胞双元表达载体上, 用脂质体Lipofectamine 2000介导重组质粒pBudCE4.1/TSC2/TSC1导入293T细胞, 用含125 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin的培养基筛选稳定表达TSC1/TSC2蛋白的细胞株, 并用Western blot方法鉴定稳转细胞株的稳定性。该实验成功建立了稳定表达TSC1/TSC2蛋白的293T细胞系, 从而为今后研究TSC1/TSC2蛋白的结构与功能提供实验基础。

关键词 TSC1; TSC2; 稳转细胞系; 真核细胞双元表达载体; Zeocin

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)属于丝氨酸/苏氨酸激酶家族, mTOR介导的信号通路受生长因子、营养、能量、压力^[1]等信号的调控, 参与细胞的生长、分化、增殖和代谢^[2]。TSC1和TSC2(Tuberous sclerosis complex 1/2)是mTOR通路的上游信号分子, 对应基因属于肿瘤抑制基因^[3]。tsc1基因编码Hamartin蛋白, tsc2编码Tuberin蛋白, 两者在多种组织中以共表达存在^[4], 形成异二聚体^[5]。TSC1通过N-端结构域与TSC2 N-端结构域相互作用, 维持TSC2的结构稳定^[6-8], 防止TSC2被泛素化介导的蛋白酶体途径降解。TSC2的C-端含有一个GTP酶激活蛋白(GTPase activating protein, GAP)结构域, GAP被磷酸化激活后, 使得下游激活mTOR的小G蛋白Rheb由活性状态的Rheb-GTP转化为失活状态的Rheb-GDP^[5,9-10], 从而负调控mTOR信号通路^[6]。因而一旦tsc1/2基因突变或失活, mTOR高度活跃, 磷酸化并激活mTOR下游信号分子S6K1并释放4E-BP蛋白^[5,7,10-11], 促进蛋白的翻译导致细胞高度增殖从而引发癌症^[3]。

TSC1/TSC2蛋白复合物三维结构的获得能够帮助我们从分子水平上了解TSC1/TSC2的结合机制, 从而为癌症的治疗提供靶点思路。而哺乳动物细胞表达系统因其能够正确折叠真核来源蛋白, 并能够进行翻译后修饰^[12]而被我们优选为表达TSC1/TSC2蛋白的表达系统。但限于脂质体瞬时转染技术只适合小规模蛋白表达, 用于大规模提取蛋白会极大提高成本, 不利于进行结构生物学研究。因此本文

采用脂质体转染试剂将TSC1及TSC2的编码cDNA ORF导入到人胚肾细胞293T中, 并经Zeocin抗生素加压筛选, 使目的基因整合到宿主细胞的基因组中, 建立可以持续稳定高表达TSC1/TSC2蛋白的细胞株, 为今后研究TSC1/TSC2蛋白复合物的结构与功能提供基础。同时, 在众多已报道文献中很难找到针对筛选稳转细胞的详细操作步骤, 不利于初学者的实践操作, 本文详细描述了构建稳转细胞系的操作流程并通过探索找到了一种操作相对简便的实验方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 pRK7-TSC1(#8995)、pRK7-TSC2(#8996)购自Addgene公司。DH5 α 菌株购自天根生化科技有限公司。真核双元表达载体pBudCE4.1购自Invitrogen公司。293T细胞由本实验室保存。

1.1.2 试剂 脂质体(Lipofectamine 2000)、博来霉素(Zeocin)、青霉素/链霉素双抗均购自Invitrogen公司。限制性内切酶购自New England Biolabs公司。同源重组连接酶In-Fusion[®] HD购自Clonetechn公司。化学发光试剂购自天根生化科技有限公司。一抗(Anti-TSC1、anti-TSC2)购自Cell Signaling Technol-

收稿日期: 2012-08-17 接受日期: 2012-09-10

国家自然科学基金(No.30821005)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-34205996, Email: geng.wu@sjtu.edu.cn

ogy公司。HRP标记的二抗羊抗兔购自Proteintech Group公司。DMEM培养基购自Hyclone公司,胎牛血清购自Biological Industries公司。

1.2 方法

1.2.1 TSC1、TSC2的cDNA ORF的克隆 我们分别以pRK7-TSC1、pRK7-TSC2质粒为模板,根据Clontech的In-Fusion® HD Cloning Kit设计引物,Primer-TSC1F: 5'-GCG GCC GCT TCG AAG GTA CCA TGG CCC AAC AAG CAA AT-3', PrimerTSC1R: 5'-CCA GCC GGC CAG ATC TCT GCC CTG AAA ATA CAG GTT TTC GCT GTG TTC ATG ATG AGT-3', PrimerTSC2F: 5'-ATT CCT GCA GGT CGA CAA TGG CCA AAC CAA CAA GC-3', PrimerTSC2R: 5'-GTT CGG ATC CTC TAG AGC CCT GAA AAT ACA GGT TTT CCA CAA ACT CGG TGA AGT C-3',其中TSC1的编码cDNA添加*Kpn* I、*Bgl* II酶切位点(划线部分),TSC2的编码cDNA添加*Sal* I、*Xba* I酶切位点(划线部分);由于基因需要克隆到pBudCE4.1双元载体上(图1),该载体的多克隆位点C端含有Myc、His等标签,因此还在*tsc1*、*tsc2*基因末端添加TEV酶切位点(灰色部分),且不含终止密码子。分别以PrimerTSC1F+PrimerTSC1R及PrimerTSC2F+PrimerTSC2R为引物,扩增出TSC1的cDNA ORF(3 492 bp)和TSC2的cDNA ORF(5 352 bp)。扩增产物通过0.8%琼脂糖凝胶电泳鉴定,并进行胶回收。

1.2.2 重组质粒pBudCE4.1/TSC2/TSC1的构建 *Sal* I、*Xba* I双酶切pBudCE4.1载体,使用Clontech的In-Fusion® HD Cloning Kit连接pBudCE4.1与TSC2片段,50 °C作用15 min,连接产物转化到DH5 α 中,Zeocin抗性平板筛选培养,挑取阳性克隆,菌液PCR鉴定及酶切鉴定正确后测序,测序正确的质粒命名为pBudCE4.1/TSC2。再用*Kpn* I、*Bgl* II双酶切pBudCE4.1/TSC2质粒,同样方法连接TSC1片段,挑取阳性质粒进行测序,测序正确的质粒命名为pBudCE4.1/TSC2/TSC1。

1.2.3 重组质粒瞬时转染293T细胞 293T细胞常规培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中(含青霉素、链霉素),于37 °C、5% CO₂的饱和湿度培养箱中培养。转染24 h前,接种1 \times 10⁶细胞于6孔板中(培养基不含抗生素),第二天,待细胞达到90%以上的汇合度时,以脂质体Lipofectamine 2000介导重组质

粒pBudCE4.1/TSC2/TSC1转染293T细胞,6 h后更换新鲜培养基,48 h后收取细胞,PBS洗涤,加入裂解液[25 mmol/L pH8.0的Tris-HCl,300 mmol/L NaCl,1 μ g/mL抑蛋白酶肽,1 μ g/mL亮抑酶肽,0.5 mmol/L苯甲基磺酰氟(PMSF)]裂解,液氮反复冻融3次,14 000 r/min、4 °C离心15 min,分别取上清和沉淀,5% SDS-PAGE电泳后,转移到PVDF膜上,5%脱脂牛奶室温封闭45 min,一抗(Anti-TSC1或Anti-TSC2,1:5 000)室温作用2 h,二抗羊抗兔(1:5 000)室温作用1 h,显影曝光,检测蛋白是否有表达。

1.2.4 Zeocin对293T细胞的最小致死浓度的确定 接种5 \times 10⁴细胞于24孔板中,使第二天的汇合度小于25%。接种第二天开始更换含有不同浓度梯度的Zeocin筛选培养基,浓度分别为0,50,125,250,500,750,1 000 μ g/mL,每个浓度6个复孔。每隔1天更换一次培养基,以去除死细胞,挑选能在10~14天内杀死所有细胞的最低浓度作为Zeocin对293T细胞的最小致死浓度。

1.2.5 稳定细胞株的筛选 根据1.2.4方法瞬时转染293T细胞,48 h后胰酶消化细胞,以5 \times 10⁵/板的量传代到10 cm培养皿中(使第二天的汇合度小于25%),24 h后待细胞贴壁后,更换含125 μ g/mL Zeocin的筛选培养基培养细胞,每隔1天换液,持续10~14天。待克隆长到一定大小后,吸取2 μ L胰酶,对准克隆反复吹吸,转移至预先铺有培养基的24孔板中培养,待长满后再传代到6孔板、6 cm板、10 cm板依次扩大培养,每个细胞株取等量细胞做Western blot检测蛋白表达情况。

1.2.6 Western blot检测稳转细胞稳定性 Western blot检测55个单克隆细胞表达TSC1/TSC2蛋白能力,挑取部分高表达细胞株,连续传12代,每代取样,Western blot检测对比稳转细胞蛋白表达的稳定性。

2 结果

2.1 TSC1/TSC2的cDNA ORF的克隆及真核细胞表达载体的构建

重组质粒的构建流程见图1。pBudCE4.1载体有两个多克隆位点,TSC2的cDNA ORF连接到CMV启动子下,TSC1的cDNA ORF连接到EF-1 α 启动子下。以pRK7-TSC1、pRK7-TSC2质粒为模板,以表1中的引物PCR,得到结果(图2A),分别在2 500~4 000 bp,4 000~8 000 bp检测到两条

带, 与预期结果相同(TSC1, 3 492 bp; TSC2, 5 352 bp)。pBudCE4.1经*Sal* I、*Xba* I双酶切后, 通过In-Fusion® HD酶和TSC2的cDNA ORF连接, 得到了阳性克隆, 进行菌液PCR鉴定, 得到了与阳性条带(模板为pRK7-TSC2)同等大小的条带, 抽质粒进行酶切鉴定。由于pBudCE4.1载体4 595 bp, TSC2的cDNA ORF全长5 352 bp, 所以在4 000~8 000 bp区间只得到了1条条带(图2B), 证明TSC2片段已连接上, 同时送交质粒到上海迈浦生物科技公司测序, 经过比对, 表明TSC2已连接到了pBudCE4.1上。命名该质粒为pBudCE4.1/TSC2。再用*Kpn* I、*Bgl* II双酶切pBudCE4.1/TSC2质粒, 同样方法连接TSC1片段, 将得到的重组质粒进行酶切鉴定, 在2 500~4 000 bp区

间得到了1条条带(图2C), 证明TSC1片段已连接上, 同时送交质粒到上海迈浦生物科技公司测序, 经过比对, 表明TSC1已连接到了pBudCE4.1, 测序正确的质粒命名为pBudCE4.1/TSC2/TSC1。

2.2 Western blot检测重组质粒表达TSC1/TSC2蛋白的情况

TSC1蛋白分子量128 kDa, TSC2分子量198 kDa。脂质体介导重组质粒pBudCE4.1/TSC2/TSC1转染293T细胞48 h后, 收集细胞, 加裂解液裂解, 获得的上清和沉淀分别上样, 进行Western blot检测, 检测结果如图3, 使用Anti-TSC2、Anti-TSC1抗体孵育PVDF膜, 分别在上清样品处, 130~250 kDa之间检测到了标签融合蛋白TSC2(201 kDa)、TSC1(132 kDa),

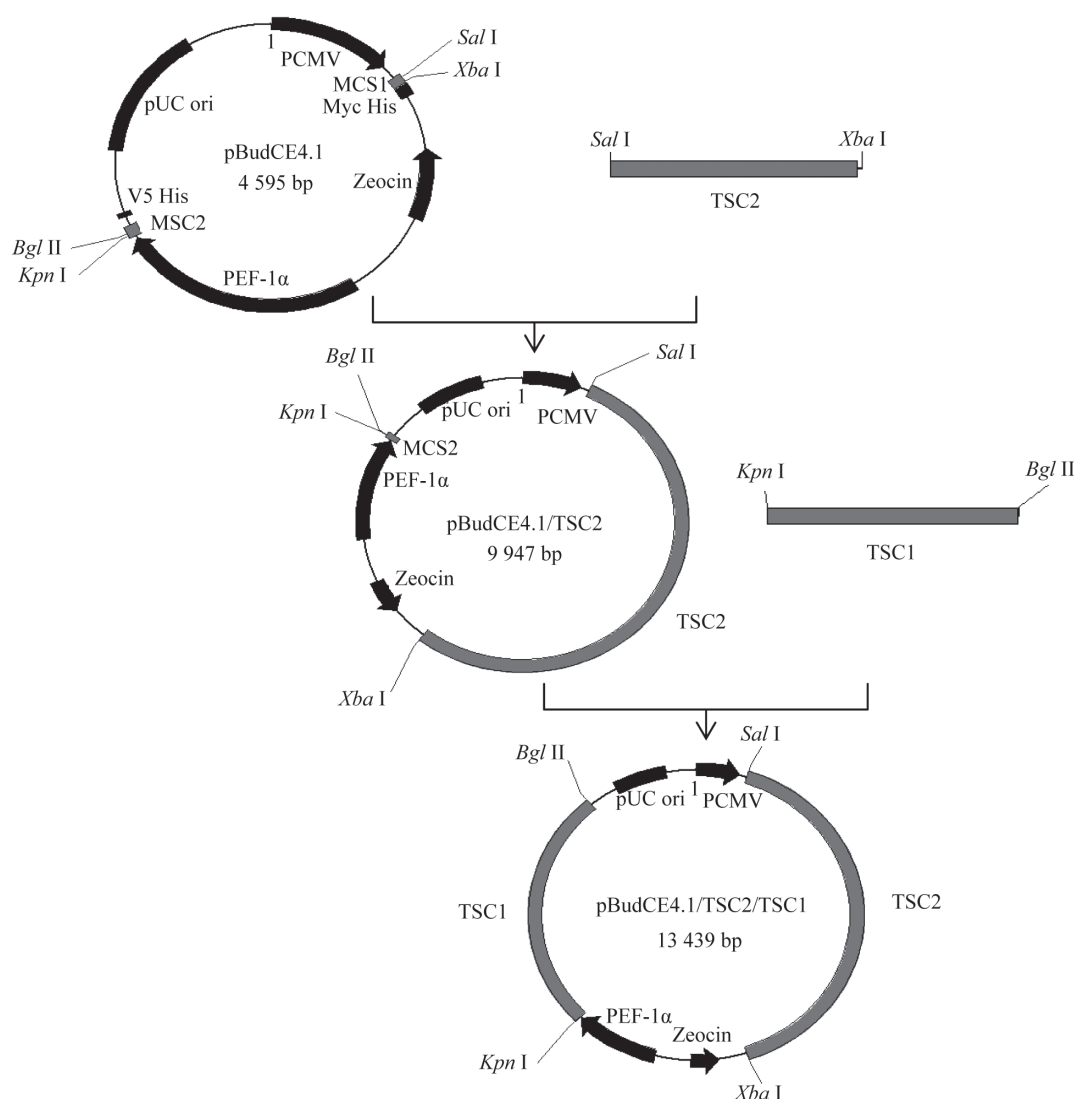


图1 重组质粒pBudCE4.1/TSC2/TSC1构建图谱

Fig.1 Map of reconstruction plasmid of pBudCE4.1/TSC2/TSC1

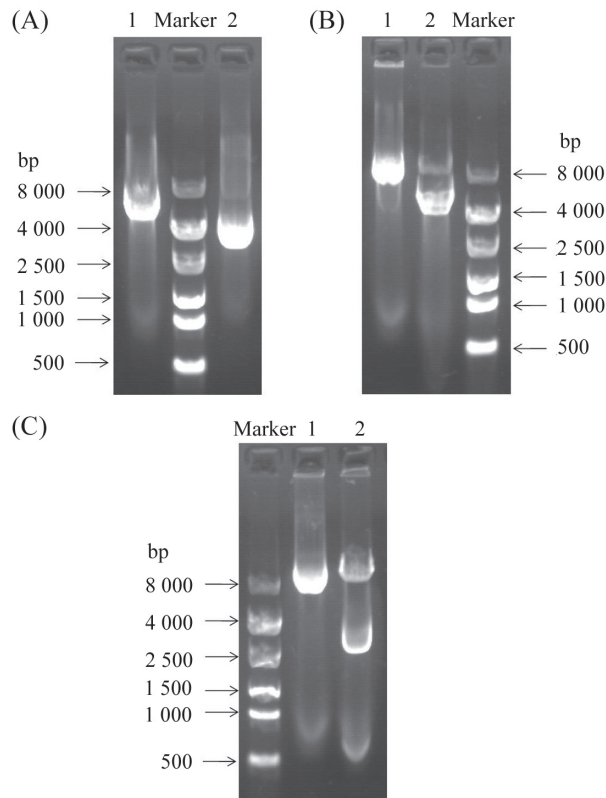
沉淀样品未检测到条带,说明该蛋白复合物在哺乳动物细胞293T中是可溶表达的。

2.3 稳定细胞株的建立

用含不同浓度的Zeocin培养基(Zeocin浓度为50, 125, 250, 500, 750, 1 000 $\mu\text{g/mL}$)培养293T细胞,与对照组(不含Zeocin)相比,细胞增殖减慢,且细胞外形膨大,稍有变圆,但仍为不规则三角形。由于Zeocin能直接杀伤细胞DNA,培养基上清中开始出现死细胞,第10天左右可见125 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin浓度以上的细胞基本被全部杀死,因此将该浓度作为Zeocin对293T细胞的最小致死浓度。

Lipofectamine 2000介导重组质粒pBudCE4.1/TSC2/TSC1转染293T细胞48 h后,将细胞传代。使

用含125 $\mu\text{g/mL}$ Zeocin培养基培养,在第10~14天可见有单克隆出现,挑取单克隆细胞扩大培养并Western blot检测TSC1、TSC2蛋白表达情况。

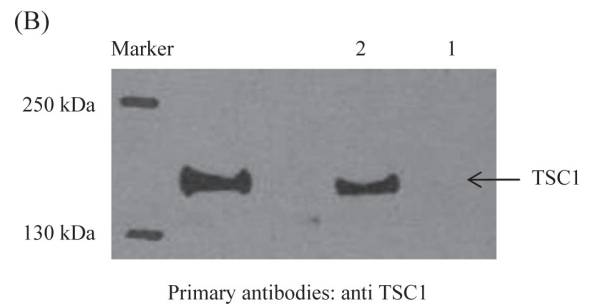
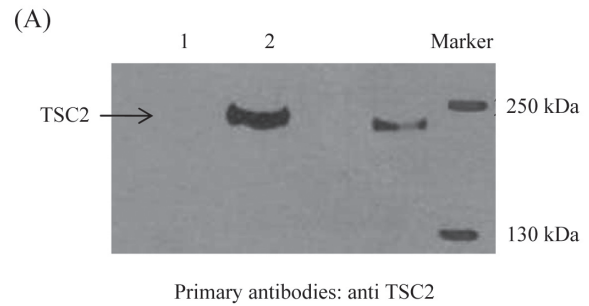


A: 1: *tsc2* 基因; 2: *tsc1* 基因; B: 1: pBudCE4.1/TSC2; 2: pBudCE4.1/TSC2 *Sal* I、*Xba* I酶切; C: 1: pBudCE4.1/TSC2/TSC1; 2: pBudCE4.1/TSC2/TSC1 *Kpn* I、*Bgl* II酶切。

A: 1: TSC2 cDNA ORF; 2: TSC1 cDNA ORF; B: 1: pBudCE4.1/TSC2; 2: pBudCE4.1/TSC2 digested with *Sal* I and *Xba* I; C: 1: pBudCE4.1/TSC2/TSC1; 2: pBudCE4.1/TSC2/TSC1 digested with *Kpn* I and *Bgl* II。

图2 *tsc2*和*tsc1*基因的扩增及pBudCE4.1/TSC2、pBudCE4.1/TSC2/TSC1质粒的酶切鉴定

Fig.2 Amplification of TSC1 and TSC2 genes and identification of enzyme digestion of reconstruction plasmid pBudCE4.1/TSC2 and pBudCE4.1/TSC2/TSC1



1: 细胞裂解液沉淀样品; 2: 细胞裂解液上清。

1: cell debris sample; 2: supernatant of cell lysate.

图3 Western blot检测重组质粒pBudCE4.1/TSC2/TSC1蛋白表达

Fig.3 Protein expression of recombinant plasmid pBudCE4.1/TSC2/TSC1 analyzed by Western blot

2.4 稳转细胞株稳定性的检测

挑选高表达TSC1、TSC2蛋白的稳转细胞株,Western blot检测细胞12代以内蛋白表达的稳定性。结果(图4)发现细胞蛋白表达稳定性较好,不同传代代数细胞表达量几乎一致。说明已成功构建出稳定表达TSC1/TSC2蛋白复合物的293T细胞系。

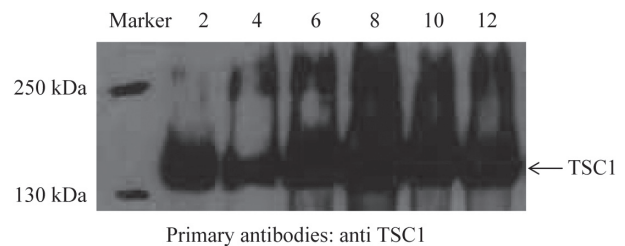


图4 Western blot检测重组质粒表达蛋白稳定性(细胞代数: 2~12代)

Fig.4 Protein expression within Passage 12 of recombination plasmid analyzed by Western blot(passage: 2~12)

3 讨论

TSC1与TSC2因其作为mTOR信号通路上游的负调控因子,对细胞的生长、分化及增殖有着很大的影响。人们研究了TSC1/TSC2在大脑、视网膜、心脏、肾脏等组织器官中的作用^[6],但目前还没有关于该复合物的晶体结构的报道,可能与多种因素有关,研究者首要面临的困难是哺乳动物细胞较低的表达效率及较困难的纯化过程。本实验采用一种较为简便快速的获取稳定细胞株的方法,将TSC1及TSC2同时克隆到同一个载体中,经过Zeocin抗性筛选,得到了能够表达TSC1/TSC2复合物的293T细胞株。另外,与传统方法筛选阳性克隆——有限稀释法不同,本文在细胞被转染48 h后,直接将细胞传代到10 cm板中,并控制平皿中的细胞数量,保证后期阳性细胞克隆之间不相互接触,干扰单克隆的纯度,这样在简便操作流程的同时节约了细胞生长时间,缩短了筛选时间。

为了改善贴壁细胞难以扩大培养及较低的蛋白表达效率的困境,在后续实验中,我们期望通过驯化改变该稳定细胞株生长特性,得到悬浮细胞,便于扩大培养,简化操作流程并节约成本,以便能够得到足够多的蛋白进行结晶实验进行结构研究,为治疗结节性硬化症等癌症提够靶点思路。

参考文献 (References)

1 Mi RF, Ma JH, Zhang DC, Li LM, Zhang HB. Efficacy of com-

- 2 Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 2006; 124(3): 471-84.
- 3 Galanopoulou AS, Gorter JA, Cepeda C. Finding a better drug for epilepsy: the mTOR pathway as an antiepileptogenic target. *Epilepsia* 2012; 53(7): 1119-1130.
- 4 Johnson MW, Kerfoot C, Bushnell T, Li M, Vinters HV. Hamartin and tuberlin expression in human tissues. *Mod Pathol* 2001; 14(3): 202-10.
- 5 Vries PJ. Targeted treatments for cognitive and neurodevelopmental disorders in tuberous sclerosis complex. *Neurotherapeutics* 2010; 7(3): 275-82
- 6 Ehninger D. From genes to 77 cognition in tuberous sclerosis: Implications for mTOR inhibitor-based treatment approaches. *Neuropharmacology* 2012; doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.05.015.
- 7 Han JM, Sahin M. TSC1/TSC2 signaling in the CNS. *FEBS Lett* 2011; 585(7): 973-80.
- 8 Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu TQ, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, *et al.* TSC1 stabilizes TSC2 by inhibiting the interaction between TSC2 and the HERC1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 2006; 281(13): 8313-6.
- 9 Napolioni V, Moavero R, Curatolo P. Recent advances in neurobiology of tuberous sclerosis complex. *Brain Dev* 2009; 31(2): 104-13.
- 10 Curatolo P, Bombardieri R, Jozwiak S. Tuberous sclerosis. *Lancet* 2008; 372(9639): 657-68.
- 11 Dobashi Y, Watanabe Y, Miwa C, Suzuki S, Koyama S. Mammalian target of rapamycin: A central node of complex signaling cascades. *Int J Clin Exp Pathol* 2011; 4(5): 476-95.
- 12 Ohana RF, Hurst R, Vidugiriene J, Slater MR, Wood KV, Urh M. HaloTag-based purification of functional human kinases from mammalian cells. *Protein Expr Purif* 2011; 76(2): 154-64.

Generation of Stable Production of TSC1/TSC2 Protein Complex from 293T Cell Line

Yan Lijun, Wu Geng*

(School of Life Sciences & Biotechnology, State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

Abstract The cDNA ORFs of human TSC1 and TSC2 were cloned into the two multi-cloning sites of the eukaryotic expression plasmid pBudCE4.1 vector by In-Fusion® HD Cloning Kit. The recombinant vector was transfected into 293T cells by Lipofectamine 2000, under the pressure of Zeocin. Stable clones were picked and analyzed by Western blot. In this study, stable production of TSC1/TSC2 protein complex from the 293T cell line was established, which would be a great help for further structural and functional research of the TSC1/TSC2 complex.

Key words TSC1; TSC2; stable cell line; eukaryotic expression plasmid; Zeocin

Received: August 17, 2012 Accepted: September 10, 2012

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30821005)

*Corresponding author. Tel: 86-21-34205996, E-mail: geng.wu@sjtu.edu.cn