

人 PAK1 重组蛋白质的表达及在人胃癌 BGC-823 细胞内定位

王桂玲 周颖 赵大林¹ 李家滨 刘芙蓉 李丰*

(中国医科大学细胞生物学卫生部重点实验室, 沈阳 110001; ¹ 沈阳体育学院生理学教研室, 沈阳 110001)

摘要 为检测人 PAK1 在原核细胞中的表达情况及在真核细胞中的定位, 利用 RT-PCR 技术获得 PAK1 目的基因, 构建 GST 融合蛋白原核表达载体 pGEX-5X-1/PAK1, IPTG 诱导后进行 SDS-PAGE 及 Western 印迹检测, 并用体外激酶实验测定其生物学活性; 同时, 构建带绿色荧光蛋白 (GFP) 标签的真核表达载体 pEGFP/PAK1, 利用脂质体法转入人胃癌 BGC-823 细胞系中, 在共焦激光扫描显微镜下观察癌细胞中绿色荧光蛋白的表达。结果表明, pGEX-5X-1/PAK1 载体能在大肠杆菌 BL-21 中正确表达 GST-PAK1 融合蛋白, 大小约为 94 kDa, 具有生物活性; PAK1 绿色荧光蛋白定位于细胞浆。上述研究为进一步探索 PAK1 的生物学特性及信号转导通路打下了基础。

关键词 PAK1; 基因克隆; 蛋白表达; 转染; 绿色荧光蛋白

P21-activated kinase1 (PAK1) 是一保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 为 Rho 家族小 G 蛋白三磷酸酶 (Rho-GTPase) Cdc42 和 Rac 下游重要的靶蛋白, 参与许多重要的细胞活动。目前, 越来越多的证据显示 PAK1 在调节生物学活性方面具有重要作用, 包括细胞骨架的动力学调节、细胞移动、凋亡与存活^[1-4]、细胞周期^[5]、基因转录调节^[6,7]、细胞转化^[8]等。近年研究发现, 在肿瘤发生发展过程中存在 PAK1 信号转导途径。因此, 弄清 PAK1 的生物学特性, 干扰 PAK1 信号转导途径, 抑制肿瘤的增殖、浸润及转移, 具有重要的临床应用价值。

我们应用基因重组技术构建 PAK1 原核表达载体, 转化大肠杆菌后并诱导其表达; 同时, 将携带活细胞探针绿色荧光蛋白 (GFP) 的外源性 PAK1 基因通过脂质体法转入人胃癌 BGC-823 细胞中, 观察 PAK1 在细胞内的定位。本研究为进一步探索 PAK1 的生物学特性及信号转导通路打下了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

大肠杆菌 DH5 α 、BL21 感受态菌自备。限制性内切酶、Pyrobest Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、DNA 片段纯化/回收试剂盒均购自 TaKaRa 生物技术公司。RNA 纯化试剂为 Trizol, 购自 Invitrogen 公司。M-MuLV Reverse

Transcriptase 系 NEB 公司产品。原核表达载体 pGEX-5X-1 购自 Pharmacia 生物技术公司。真核表达载体 pEGFP-C1 为美国 Clontech 生物技术公司产品。脂质体转染试剂盒 (Lipofectamine Kit) 为美国 Invitrogen 公司产品。DNA 序列测定及两对引物的合成由 TaKaRa 生物技术公司完成。设计的两对引物序列见表 1。

两对引物的上游引物中分别引入酶切位点 *Bam*HI 和 *Eco*RI, 下游引物中分别引入酶切位点 *Xho*I 和 *Bam*HI, PCR 扩增获得的 PAK1 目的基因经酶切、纯化后分别克隆到原核表达载体 pGEX-5X-1 和真核表达载体 pEGFP-C1 中。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

以 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 对所提取总 RNA 的紫外分光光度值进行测定, 其 A_{260}/A_{280} 为 1.82。各取约 2.0 μ g 总 RNA 在 M-MuLV Reverse Transcriptase 作用下逆转录为 cDNA, 逆转录引物为 Oligo dT。

1.3 PCR 方法获得 PAK1 基因

以 cDNA 为模板, 利用 PCR 技术对 PAK1 进行扩增。反应条件分别为 (1): 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后, 94 $^{\circ}$ C

收稿日期: 2006-03-30 接受日期: 2006-10-25

国家自然科学基金 (No.30370736, No.30570966) 和教育部博士点基金 (No.20050159023) 资助项目

* 通讯作者。Tel: 024-23261056, Fax: 024-23261056, E-mail: fli@mail.cmu.edu.cn

表 1 构建 PAK1 原核和真核表达质粒所用引物序列

引物	引物序列
PAK1 (原核)	上游 5'-CGGAAGTAGCGGATCCTGGTGGTGACAATGTC-3'
	下游 5'-ATCTCACAGAGCTCGAGACAATGAGGCTGG-3'
PAK1 (真核)	上游 5'-GCTGCTGGTGAATTCCATGTCAAATAACGGCCT-3'
	下游 5'-GGGGTGAGTGGATCCTTAGTGATTGTTCTTTGTG-3'

30 s, 63 °C 1 min, 72 °C 3 min, 循环 30 次, 最后于 72 °C 延伸 10 min; (2): 94 °C 变性 3 min 后, 94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 3 min, 循环 30 次, 最后于 72 °C 延伸 10 min。反应终止后, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 重组质粒 pGEX-5X-1/PAK1 和 pEGFP/PAK1 的构建

1% 琼脂糖凝胶电泳后, 试剂盒分别回收约 1.7 kb 的 PAK1 PCR 产物。用 *Bam*HI 和 *Xho*I 对 PAK1 PCR 纯化产物及 pGEX-5X-1 分别进行酶切; 用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 对 PAK1 PCR 纯化产物和 pEGFP-C1 分别进行酶切。纯化后以 T4 DNA 连接酶于 16 °C 连接 16 h。转化感受态大肠杆菌后, 37 °C 培养过夜扩增、制备质粒 DNA。用碱裂解法提取质粒进行酶切鉴定并测序。

1.5 GST-PAK1 融合蛋白的表达、鉴定及活性检测

将 50 μ l 过夜培养物接入 4 ml 含 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中, 振荡培养 2.5 h, 至对数生长期。加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 进行诱导表达。表达产物行 SDS-PAGE 并将蛋白质转印到 PVDF 膜上进行 Western 印迹, 即经 5% 脱脂奶粉-TBST 溶液 37 °C 封闭 3 h 后, 两张膜分别加入抗 GST 抗体和 PAK1 抗体, TBST 充分洗膜后压片显影, 进一步检测 PAK1-GST 融合蛋白。

用免疫沉淀和放射自显影法检测 PAK1-GST 融合蛋白生物学活性。细菌裂解抽提物与抗 GST 抗体于 4 °C 温育 1 h。然后用蛋白 A Sepharos 磁珠沉淀免疫复合物。收集的免疫复合物洗三次, 再悬浮于激酶缓冲液(含 25 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L DTT, 40 mmol/L ATP, 7.4 $\times$ 10⁴ Bq [γ -³²P]ATP, 2 mmol/L 蛋白激酶抑制剂和 0.5 mmol/L EGTA)。再与 25 mmol/L 髓鞘碱性蛋白(myelin basic protein, MBP) 25 °C 反应 10 min, 加入 Laemmli 缓冲液(0.002% 溴酚蓝, pH 7.0 的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 10% 甘油, 0.4% SDS, 1% 2-巯基乙醇)终止反应。样本煮沸 5 min, 取上清液电泳后, 放射自显影观察 PAK1 激酶活性。

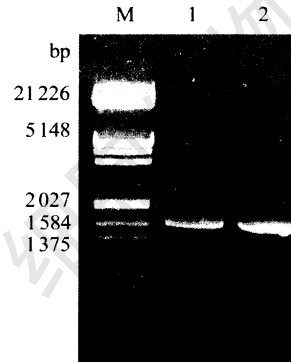


图 1 PAK1 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳图谱

M: DNA 标准(DNA/*Eco*RI+*Hind*III); 1: PAK1 (*Bam*HI、*Xho*I) PCR 产物; 2: PAK1 (*Bam*HI、*Eco*RI)PCR 产物。

1.6 PAK1 在细胞内的定位

将重组质粒 pEGFP/PAK1 通过脂质体法导入人胃癌 BGC-823 细胞系中, 用共焦激光扫描显微镜方法观察 PAK1 在细胞内的定位。

2 结果

2.1 PCR 法获得 PAK1 目的基因

PCR 反应终止后, 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约 1.7 kb 大小的特异性片段(图 1), 片段大小与已报道的 PAK1 基因大小相同。

2.2 重组质粒的酶切鉴定及测序

质粒提取后, 将 pGEX-5X-1/PAK1 质粒用 *Bam*HI 进行单酶切及 *Bam*HI 与 *Xho*I 双酶切质粒鉴定, 见图 2。pGEX-5X-1 载体片段约 4.9 kb, PAK1 片段长约 1.7 kb, *Bam*HI 单酶切使质粒线性化后于 6.7 kb 处出现单一条带, 与目的质粒大小吻合; 双酶切后于 5.0 kb 和 1.5 kb 附近分别释放出两个条带, 长度与载体和 PAK1 分别对应。单、双酶切均提示重组质粒构建成功。重组质粒经序列测定证明, PAK1 编码区序列完全正确。

将 pEGFP/PAK1 质粒用 *Bam*HI 联合 *Eco*RI 进行消化, 经 1% 琼脂糖凝胶检测可见分别约为 4.7 kb 和 1.7 kb 的两个片段, 长度与 pEGFP 载体和 PAK1 分别对应(图 3), 说明质粒构建成功。重组质粒经序列测

定证明, PAK1 编码区序列完全正确。

2.3 GST-PAK1 融合蛋白的表达、鉴定及活性检测

重组表达载体 pGEX-5X-1/PAK1 在大肠杆菌

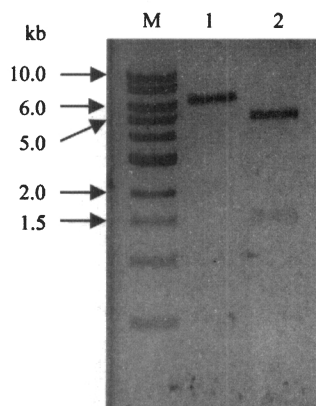


图2 重组质粒pGEX-5X-1/PAK1酶切鉴定结果

M: 1kb DNA 标准; 1: pGEX-5X-1/PAK1 经 *Bam*HI 消化; 2: pGEX-5X-1/PAK1 经 *Bam*HI/*Xho*I 消化。

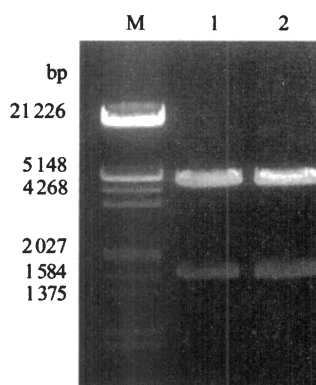


图3 重组质粒pEGFP/PAK1酶切鉴定结果

M: DNA 标准(DNA/*Eco*RI+*Hind*III); 1, 2: pEGFP/PAK1 经 *Bam*HI/*Eco*RI 消化。

BL21 菌株中经 IPTG 诱导表达。表达产物经 SDS-PAGE 显示, 与空载体对照, 在分子量约 94 kDa 处出现新生蛋白质带(GST 为 26 kDa, PAK1 为 68 kDa)与预期的融合蛋白大小相一致(图 4)。证实 PAK1 可以在原核细胞中表达, 为后续研究工作中 PAK1 纯化蛋白的获得提供了必要条件。

Western 印迹检测结果表明, 重组表达载体 pGEX-5X-1/PAK1 表达的蛋白质可与抗 GST 单克隆抗体和 PAK1 抗体出现特异性结合反应, 说明成功的

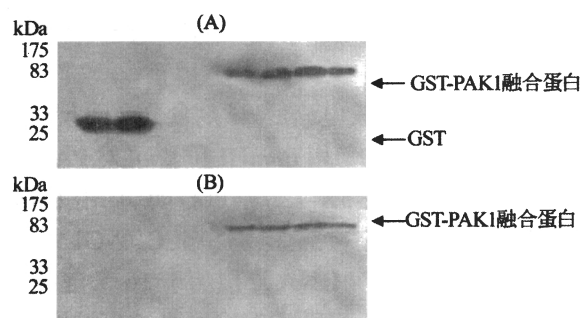


图5 GST-PAK1 融合蛋白的 Western 印迹鉴定

A: 抗 GST 抗体; B: 抗 PAK1 抗体。

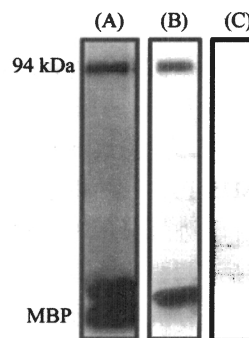


图6 体外激酶实验检测 PAK1 活性

A: 阳性对照; B: GST-PAK1 融合蛋白; C: GST 阴性对照。

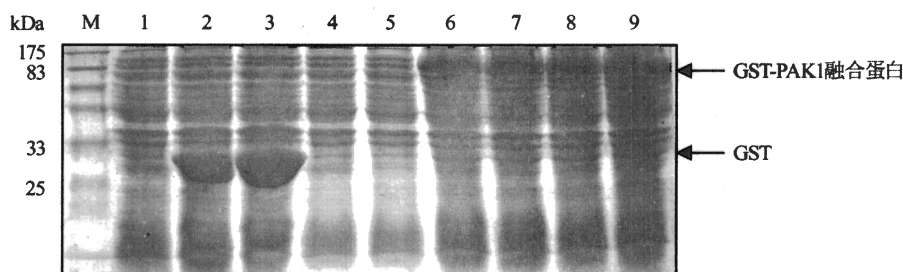


图4 融合蛋白 GST-PAK1 的 SDS-PAGE

M: 预染蛋白标准; 1: pGEX-5X-1 空白质粒未经诱导对照; 2, 3: pGEX-5X-1 空白质粒于 37 °C 诱导 2 h; 4, 5: pGEX-5X-1/PAK1 质粒未经诱导对照; 6, 7, 8, 9: pGEX-5X-1/PAK1 质粒于 37 °C 依次诱导 2 h。

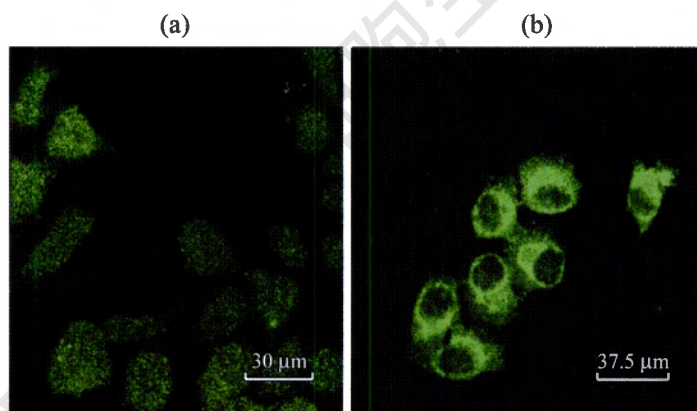


图7 PAK1在真核细胞内的定位

a: pEGFP空白质粒转染后的BGC-823细胞; b: pEGFP/PAK1重组质粒转染后的BGC-823细胞。

表达了GST-PAK1融合蛋白(图5)。根据体外激酶实验放射性自显影出现的磷酸化条带,进一步证实表达出来的PAK1具有生物学活性(图6)。

2.4 PAK1在细胞内的定位

pEGFP/PAK1真核表达载体通过脂质体法转入人胃癌BGC-823细胞系中。用共焦激光扫描显微镜方法观察PAK1在真核细胞内的定位(图7)。镜下可观察到,在pEGFP-C1空白质粒转染对照组中,绿色荧光遍布整个癌细胞,且分布比较均匀(图7a);而在pEGFP/PAK1重组质粒转染组中,如图7b所示,绿色荧光布满细胞胞浆,但核内无绿色荧光。提示转入的质粒已在细胞中表达出PAK1/GFP融合蛋白,PAK1定位于胞浆。

3 讨论

PAK1是一保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,为Cdc42和Rac下游重要的靶蛋白,参与许多重要的细胞活动。PAK1包含N末端调节区和C末端激酶区,N末端调节区含GTP酶结合域(GTPase binding domain, GBD),可介导PAK1与Rac和Cdc42的结合^[9]。许多证据显示,在肿瘤生长过程中存在PAK1信号转导途径。因此,获得PAK1纯化蛋白并了解其细胞内定位情况,对于深入了解PAK1的生物学特性及功能,从而阻断PAK1信号转导通路,提供临床肿瘤防治的新靶点。

为研究PAK1在原核细胞中的表达情况,获得PAK1纯化蛋白,根据PAK1序列,我们设计合成引物,

应用RT-PCR技术获得PAK1目的基因,将该基因克隆到GST融合蛋白原核表达载体pGEX-5X-1的BamHI/XhoI位点,将该重组表达载体转化大肠杆菌BL21, IPTG诱导其表达后进行SDS-PAGE及Western印迹检测。结果表明,我们成功地构建了含有PAK1基因的原核表达载体pGEX-5X-1/PAK1,该载体能在大肠杆菌中正确表达GST-PAK1融合蛋白,大小约为94 kDa,经检测具有生物学活性。同时,为研究PAK1在真核细胞中的定位,我们将PAK1基因克隆到GFP融合蛋白真核表达载体pEGFP的BamHI/EcoRI位点,构建了PAK1的真核表达载体,实验所选的pEGFP-C1载体中带有GFP序列,GFP在蓝光照射下会发出明亮的绿色荧光。通过脂质体法转入人胃癌BGC-823细胞系中,在共焦激光扫描显微镜下观察PAK1在癌细胞中的定位。GFP代表PAK1在细胞浆内的分布,可见PAK1主要定位于胞浆。上述研究工作,为下一步探索PAK1的生物学特性及信号转导通路打下了基础。

参考文献 (References)

- [1] Edwards DC *et al.* *Nat Cell Biol*, 1999, 1: 253
- [2] Vadlamudi RK *et al.* *Nat Cell Biol*, 2002, 4: 681
- [3] Vadlamudi RK *et al.* *EMBO Rep*, 2004, 5: 154
- [4] Schurmann A *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 453
- [5] Balasenthil S *et al.* *J Biol Chem*, 2004, 279: 1422
- [6] Vadlamudi RK *et al.* *Cancer Metastasis Rev*, 2003, 22: 385
- [7] Gururaj AE *et al.* *Breast Cancer Res*, 2005, 7: 5
- [8] Barnes CJ *et al.* *Mol Cancer Ther*, 2003, 2: 345
- [9] Sells MA *et al.* *Curr Biol*, 1997, 7: 202

Expression of Recombinant Protein of Human PAK1 and Its Location in Cytoplasm of BGC-823 Cells

Gui-Ling Wang, Ying Zhou, Da-Lin Zhao¹, Jia-Bin Li, Fu-Rong Liu, Feng Li*

(Key Laboratory of Cell Biology, Ministry of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China;

¹Department of Physiology, Shenyang Institute of Athletics, Shenyang 110001, China)

Abstract To detect p21-activated kinase1 (PAK1) expression in prokaryocyte and its location in transfected eukaryotic cells, we obtained PAK1 gene by RT-PCR and cloned the coding sequences of PAK1 into the prokaryotic expression vector pGEX-5X-1. The expressed proteins were induced by IPTG and identified by SDS-PAGE, Western blot and kinase assay *in vitro*. At the same time, GFP-tagged eukaryotic expression vector pEGFP/PAK1 was constructed and then transfected into human gastric cancer cell line BGC-823 with liposome, and the expression of GFP was observed by confocal laser scanning microscopy. pGEX-5X-1/PAK1 could express GST-PAK1 fusion protein with 94kDa. Under microscopy, the expression of GFP-tagged PAK1 was observed in cytoplasm of BGC-823 cells transfected with pEGFP/PAK1. This study provides the basis for research on biological features of PAK1.

Key words p21-activated kinase1; gene clone; protein expression; transfection; GFP

Received: March 30, 2006 Accepted: October 25, 2006

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30370736, No.30570966) and the Doctoral Fund of Ministry of Education of China (No.20050159023)

*Corresponding author. Tel: 86-24-23261056, Fax: 86-24-23261056, E-mail: fli@mail.cmu.edu.cn