

大鼠 Notch 1 胞质段的克隆及其表达*

金卫林 廖柏松 鞠 躬**

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 Notch 1 信号途径参与决定细胞命运, 其水解后产生的活性片段——胞质段 (Notch 1 intracellular cytoplasmic domain, NICD) 能被转运进核, 激活下游靶基因的表达. Notch 1 参与细胞的增殖、分化、程序性死亡、发育过程中的形态发生和器官形成等许多重要过程. 为了获得重组的 NICD, 以大鼠脑 cDNA 文库为模板, 用 PCR 方法扩增出编码 NICD 的基因片段, 克隆至谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) 融合表达载体 pGEX-KG 中, 并在大肠杆菌中获得较高水平的表达. 表达的融合蛋白 GST-NICD 分子质量约为 120 ku 左右, 以包涵体和可溶性两种形式存在, 易于亲和层析纯化. 为制备抗体和进一步的功能研究奠定了基础.

关键词 Notch 1, 胞质段, 克隆, 表达

学科分类号 Q78

跨膜大分子 Notch 1 受体主要参与发育过程中的细胞命运的选择^[1,2]. 在复杂的蛋白酶水解作用下, Notch 1 的 G1743 和 V1744 部位发生降解释放它的胞质段 NICD, 而活性的 NICD 被转运进核, 继而激活下游靶基因的表达^[3~6]. 众多实验表明, 在神经系统发育过程中 Notch 1 参与神经发生、髓鞘发育、突触形成和神经干细胞分化等重要的生理过程^[4~9]. 在中枢神经系统中, Notch 1 受体仍然存在于某些特定的脑区, 提示它们在功能上并不是冗长的, 它可能影响神经元或突触的可塑性^[10]. 因此, 探讨 Notch 1 受体在分裂后的神经元的功能及其信号转导途径, 将会有助于更全面地了解 Notch 的功能.

为了进行 Notch 的功能研究和抗体制备, 我们从大鼠脑 cDNA 文库中克隆了编码 NICD 基因片段, 构建了 NICD 融合蛋白表达载体 pGEX-KG-NICD, 在大肠杆菌 JM109 中实现了原核表达, 并且通过谷胱甘肽亲和层析柱获得了纯化的谷胱甘肽-S 转移酶 (GST) -NICD 融合蛋白. NICD 基因克隆的成功有助于在体外培养的海马神经元中模拟 Notch 在分裂后的神经元的功能研究, GST-NICD 重组蛋白的纯化, 为特异的 Notch 抗体制备奠定了基础.

1 材料及方法

1.1 材料与试剂

大鼠脑 cDNA 文库购自美国生命技术公司; T-easy 载体, 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, 蛋白

质分子质量标准, IPTG 等购自美国 Promega 公司; Glutathione-Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司; DNA 分子质量标准来自 NEB 公司; 化学发光试剂盒和长模板 PCR 扩增试剂盒购自 Roche 公司; 凝胶回收试剂盒购自 Clontech 公司; PCR 引物合成和 DNA 测序由北京赛百盛公司完成; 小鼠抗 GST 单克隆抗体由本室制备; 表达载体 pGEX-KG, 菌株 JM109 由本室保存; 其他药品和试剂均为分析纯.

1.2 NICD 基因的扩增及克隆和序列鉴定

NICD 基因编码大鼠 Notch 1 (GenBank 序列号为 X57405) C 端 787 个氨基酸 (V1744 ~ K2530). 实验中, 以大鼠脑 cDNA 文库质粒为模板, 用含 *Eco*RI 位点的 N 端引物 P1 和含 *Sal*I 位点的 C 端引物 P2 扩增 NICD 片段引物序列为: P1, 5'-GCGAATTCTGATGCTGCTGTCCCGCAAG-3' (N 端, 28 bp, 画线部分为 *Eco*RI 识别位点), P2, 5'-CAGTCGACGACTTAAATGCCTCTGGAAT-3' (C 端, 28 bp, 画线部分为 *Sal*I 识别位点) (克隆用的引物设计考虑到所用的表达载体的读框). PCR 反应条件: 94℃ 2 min 对模板进行变性, 在 94℃ 30 s, 55℃ 60 s, 68℃ 3 min, 3 个循环后, 提高退火温度到 64℃, 其他条件不变, 再扩增 25 个循环, 68℃ 延伸 10 min. 将预期大小 2.4 kb 的 PCR 产物经凝胶回收试剂盒回收后, 与

* 国家自然科学基金资助项目 (39870263).

** 通讯联系人.

Tel: 029-3246270, E-mail: Jugong@ms.xab.ac.cn

收稿日期: 2000-06-02, 接受日期: 2000-08-23

T-easy 载体连接, 转化感受态 JM109 细菌, 涂布于氨苄 LB 板上, 做蓝白筛选, 挑取白色克隆抽取质粒, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定^[11]. 选取两个酶切鉴定正确的克隆质粒送交赛百盛公司进行序列测定. 序列验证无误的质粒经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切后, 回收, 与同样经双酶切后回收的 pGEX-KG^[12] 质粒片段连接, 转化感受态 JM109 细菌, 涂布于氨苄 LB 板上, 挑取克隆抽取质粒, 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定^[11].

1.3 NICD 的诱导表达

挑取经酶切鉴定的转化菌, 分别置 5 ml 含氨苄 LB 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日稀释 10 倍, 继续培养 2 h ($A_{600} = 0.8$) 时, 将菌液分装入两个试管中, 其中一管作为诱导的阴性对照, 而另一管加入异丙基硫代 β -D-半乳糖苷 (IPTG), 终浓度为 0.5 mmol/L, 继续培养 3 h, 离心 (7 700 g , 10 min), 1 ml 的菌液离心获得的菌体经 50 μ l 的 PBS 悬浮后加等量的 2 $\times$ SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 上样缓冲液, 煮沸 5 min 后取 8 μ l 样品行 8% SDS-PAGE, 鉴定表达的阳性克隆.

取经小样鉴定的阳性克隆菌液少许, 置 100 ml 的含氨苄 LB 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜, 次日稀释成 500 ml, 继续培养 2 h ($A_{600} = 0.8$) 时, 加入 IPTG, 终浓度为 0.5 mmol/L, 继续培养 3 h, 离心 (7 700 g , 10 min), 菌体用 PBS 洗涤后, 加入 4 ml 含溶菌酶和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的 PBS, 冰上放置 20 min, 间歇超声 10 min, 离心 (13 500 g , 30 min) 分别收集上清和沉淀. 上清 20 μ l 和少量沉淀经 50 μ l 的 PBS 悬浮后加等量的 2 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 5 min 后行 8% SDS-PAGE, 确认表达产物为可溶形式, 还是存在于包涵体中.

1.4 大鼠重组 NICD 的纯化及蛋白质免疫印迹鉴定

收集的上清部分用含 1% Triton X-100 的 PBS 稀释至 100 ml, 上样于经 PBS 平衡好的谷胱甘肽 (glutathione)-Sephrose 4B 亲和层析柱, 速度为 30 ml/h. 上样完成后, 用 20 倍柱床体积的 PBS 洗涤至基线, 用 50 mmol/L glutathione, 250 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 的洗脱液洗脱, 收集洗脱峰的组分, 制样电泳检测. 洗脱组分对 4 $\times$ 1L PBS 透析过夜, 紫外吸收定量, 分装成小份-70℃ 保存. 以上过柱纯化和透析过程在 4℃ 下完成.

纯化的重组 GST-NICD 用抗 pGEX-KG 载体 GST 的单抗进行蛋白质印迹分析. 操作按 Roche

公司提供的化学发光方法进行, 样品行 10% SDS-PAGE 后, 电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上, PVDF 膜经 1% 封闭液封闭后, 与抗 GST 单抗 (McAb, 腹水 1: 100 000 稀释) 反应, 经 POD 偶联的二抗和化学发光检测 GST 单抗与融合表达产物 GST-NICD 的反应性.

2 结 果

2.1 NICD 克隆和序列鉴定

用具有高保真性的长模板 PCR 扩增用的 DNA 聚合酶 (Roche 公司, 热稳定的 Taq 酶和 Pwo DNA 聚合酶混合物), 以大鼠脑 cDNA 文库质粒为模板进行 NICD 的扩增, 扩增产物经 0.8% 琼脂糖电泳分析, 可见于约 2 400 bp 处出现一条特异条带, 大小与预期相符 (图 1).

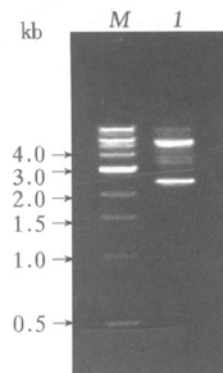


Fig. 1 PCR amplification of the NICD gene

M: 1 kb DNA marker; I: PCR product of the NICD gene, the expected fragment size is 2.4 kb.

PCR 产物克隆到 T-easy 载体 (Promega 公司) 中, 挑取三个白色克隆, 抽取质粒用 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定, 皆为阳性克隆 (图 2).

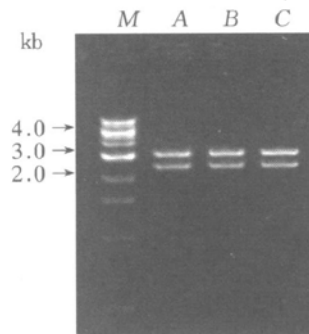


Fig. 2 Restriction enzyme digested of the recombinant plasmids T-easy NICD

M: 1 kb DNA marker; A, B, C: three individual colonies of T-easy-NICD digested with *EcoR* I / *Sal* I. The digested fragments are 3.0 kb and 2.4 kb.

选取两个克隆进行双向序列测定, 部分序列结果表明, 克隆的大鼠 NICD 的 cDNA 序列与 GenBank 中已公布的 NICD 序列完全一致 (测序资料略). 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切下的 2.4 kb 的片段连接到与同样经双酶切后回收的 pGEX-KG 质粒中, 构建了 pGEX-KG-NICD 的表达质粒.

2.2 GST-NICD 融合蛋白的表达与纯化

经酶切鉴定的三个阳性 pGEX-KG-NICD/JM109 菌, 在 IPTG 诱导下, 出现一条明显的特异表达蛋白带, 表达的蛋白质分子质量约为 120 ku, 与 GST-NICD 融合蛋白分子质量预期值基本相符 (图 3, 泳道 A, B, C, D). 大量诱导阳性表达菌, 经分级分离鉴定, 此特异表达产物主要以可溶与包涵体两种形式存在 (图 3, 泳道 E, F, G).

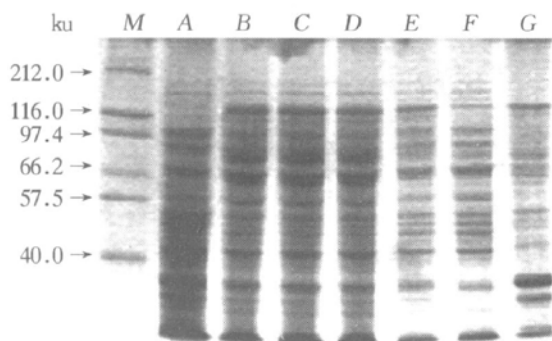


Fig. 3 SDS PAGE analysis of the expression products of pGEX-KG-NICD in JM109

M: protein marker; A: the uninduced expression products of pGEX-KG-NICD; B (E), C, D: the expression products of three individual plasmids of pGEX-KG-NICD 1, 2, 3 induced with IPTG; F: the soluble expression products of pGEX-KG-NICD1; G: the insoluble expression products of pGEX-KG-NICD1. The expected size is 120 ku.

由于表达产物少量存在于上清可溶组分, 易于通过谷胱甘肽亲和层析获得纯化的 GST-NICD 蛋白. 亲和层析纯化的 GST-NICD 经 10% SDS-PAGE 检测, 观察到纯化后的 GST-NICD 蛋白为多种组分, 电泳结果主要表现为 82 ku, 75 ku, 28 ku 和 20 ku 四条带, 而 120 ku 的蛋白质带用考马斯亮蓝染色观察不到 (图 4a). 从 2L 细菌培养物中我们获得了 5 mg 的融合蛋白, 足以用于抗体的制备与筛选.

2.3 蛋白质免疫印迹鉴定 GST-NICD 融合蛋白

纯化的 GST-NICD 蛋白经 10% SDS-PAGE 并电转移至 PVDF 膜上, 用 GST McAb 检测其反应特异性. 结果表明: 纯化的 GST-NICD 中 120 ku 及 28 ku 的蛋白质带能与抗 GST 的 McAb 发生特

异反应, 而 82 ku, 75 ku 与更小的 20 ku 带不与 GST 抗体发生特异反应. 同时, 未经 IPTG 诱导的 pGEX-KG-NICD 转化的细菌蛋白不与 GST 抗体发生反应 (图 4b).

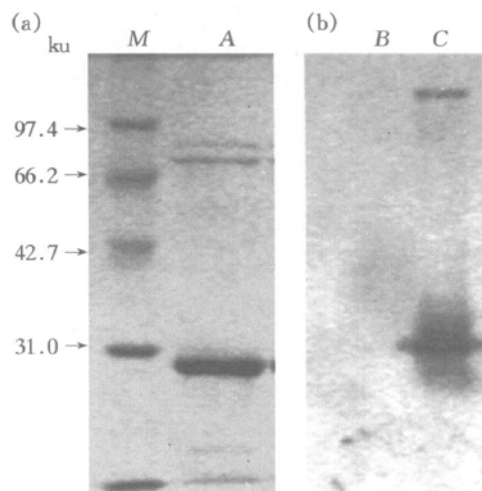


Fig. 4 10% SDS PAGE and Western blot analysis of the purified recombinant protein GST-NICD

(a) M: protein marker; A: the purified recombinant protein GST-NICD. (b) B: uninduced expression products of pGEX-KG-NICD1; C: the purified recombinant protein GST-NICD.

3 讨 论

采用 GST 融合蛋白作为免疫原是制备抗体最常用的成熟方法, 与合成肽相比较, 它可能获得识别更多个表位的抗体, 对于功能研究有时候更全面, 尤其对于不稳定或具有多种功能形式的分子, 可能更适合. 研究表明, Notch 1 受体的功能主要通过 NICD 进核实现的^[3,4,13]. 带有核进入信号的 NICD 作为 Notch 1 的活性形式被转运进核, 进而激活下游的转录因子和靶基因^[5], 参与发育阶段的许多重要的生理过程的调控^[4,6-9], 在中枢神经系统中 Notch 1 受体可能也有重要的功能^[10]. 但奇怪的是很少有人报告运用免疫组化方法和其他技术在体内检测到转核的 NICD, 尽管转核的 NICD 可以通过用融合有绿色荧光蛋白 (GFP), c-Myc 表位等标签的 NICD 真核表达载体转染真核细胞过表达能够观察或检测到, 对于这种情况, 许多作者把它解释为在体时极少量的 NICD 进核就能发挥功能作用^[13,14]. 当然, 这是一种比较聪明的解释, 可是并不能排除别的机制. 比如说, 使用不同表位的抗体造成结果的不全面和不可靠; 或许, NICD 在体时并不进核或者 Notch 1 降

解的活性形式 NICD 传递进核的信息主要通过别的中间信号分子; 还有一种可能就是 NICD 在胞浆中发挥别的作用, 否则, 胞浆中存在较高水平的 NICD, 而核中却检测不到, 对于生物体来说, 岂不是浪费 (Kopan 和 Jan 私人通讯). 目前, 用于 Notch 1 检测用的抗体都是用羧基端或 Notch 的胞外段的合成短肽制备的, 当然, 对于这种来源的抗体特异性比较好, 但是由于 Notch 1 蛋白质的结构特殊性, 很多抗体可能不能全面地反映 Notch 1 活性片段 NICD 进核的实际情况. 所以, 运用整个的 NICD 作为免疫原, 制备多抗, 筛选特异于 Notch 1 的单抗, 对于研究 Notch 1 的信号转导途径将是一个有力的工具.

本实验使用高保真性的 Taq DNA 聚合酶和长模板 PCR 技术从大鼠脑 cDNA 文库中获得了编码 NICD 的 2.4 kb 基因片段, 测序表明克隆的基因序列没有发生突变, 构建的绿色荧光蛋白 EGFP-NICD 质粒转染 COS-7L, 观察到绿色荧光蛋白为核定位, 提示克隆的 NICD 符合进一步研究 NICD 在分裂后神经元的功能. 使用 GST 融合表达载体, IPTG 诱导重组表达 GST-NICD. 经谷胱甘肽亲和层析纯化的 GST-NICD, SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色观察主要为四条蛋白质带, 分子质量分别为 82 ku、75 ku、28 ku 以及更小的 20ku, 而纯化前的 120 ku 的蛋白质带观察不到 (图 4a), 推测在亲和层析纯化的过程中 GST-NICD 发生了降解. 用抗 GST 抗体检测纯化的 GST-NICD, 抗 GST 抗体主要识别 120 ku 和 28 ku, 而另外的主要条带 82 ku、75ku 和 20ku 却不为抗 GST 抗体所识别. 据此判断, 120 ku 的蛋白质降解成多条片段 (图 4b). 试图通过改变宿主细菌和优化诱导条件等改善这种降解, 但收效甚微. 实验表明, 在真核细胞中, Notch 1 不仅在 G1743 和 V1744 处降解产生 NICD 活性片段, NICD 进核发挥功能, 而且 NICD 部分 (预期大小约 85 ku) 在羧基端易被降解成多条片段, 其中 75 ku、63 ku 最常见, 氨基酸序列测定表明造成这种降解片段大小的不同主要发生在羧基端^[13], 推测 NICD 存在 PEST 基序, 对胞内蛋白酶 calpain 敏感有关^[13, 15]. SDS-PAGE 电泳发现原核表达产物 GST-NICD 降解也非常严重, 从产生的片段大小来看, 发生的降解位置可能在 NICD 的氨基端与羧基端都有. 28 ku 的片段对

GST 反应阳性提示 GST-NICD 的发生降解在 NICD 的近氨基端, 但位置是否在 V 处不好判断, 而羧基端的降解是否与在真核细胞中一样与 PEST 位点有关还有待于探讨.

NICD 的克隆成功和纯化的重组 GST-NICD, 为 Notch 抗体制备与进一步研究 Notch 1 在中枢神经系统的功能奠定了基础. 目前, 抗 NICD 的多抗正在鉴定, 单抗正在筛选中.

参 考 文 献

- 1 Artavanis-Tsaakonas S, Matsuno K, Fortini M E. Notch signaling. *Science*, 1995, **268** (5208): 225~ 232
- 2 Kopan R, Turner D L. The Notch pathway: democracy and aristocracy during the selection of cell fate. *Curr Opin Neurobiol*, 1996, **6** (5): 594~ 601
- 3 de Strooper B, Annaert W, Cupers P, *et al.* A presenilin 1-dependent gamma secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 1999, **398** (6727): 518~ 522
- 4 Rav W J, Yao M, Mumm J, *et al.* Cell surface presenilin 1 participates in the gamma secretase-like proteolysis of Notch. *J Biol Chem*, 1999, **274** (51): 36801~ 36807
- 5 Jarriault S, Brou C, Logeat F, *et al.* Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature*, 1995, **377** (6547): 355~ 358
- 6 Milner L A, Kopan R, Martin D I, *et al.* A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors. *Blood*, 1994, **83** (8): 2057~ 2062
- 7 Nye J S, Kopan R, Axel R. An activated Notch suppresses neurogenesis and myogenesis but not gliogenesis in mammalian cells. *Development*, 1994, **120** (9): 2421~ 2430
- 8 Wakamatsu Y, Maynard T M, Jones S U, *et al.* Numb localizes in the basal cortex of mitotic avian neuroepithelial cells and modulates neuronal differentiation by binding to NOTCH-1. *Neuron*, 1999, **23** (1): 71~ 81
- 9 Chenn A, Walsh C A. Perspectives: neurobiology. Cranking it up a notch. *Science*, 1999, **286** (5440): 689~ 690
- 10 Higuchi M, Kiyama H, Hayakawa T, *et al.* Differential expression of Notch1 and Notch2 in developing and adult mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 1995, **29** (2): 263~ 272
- 11 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2 nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 6~ 30
- 12 Guan K L, Dixon J E. Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal Biochem*, 1991, **192** (2): 262~ 267
- 13 Schroeter E H, Kisslinger J A, Kopan R. Notch1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain. *Nature*, 1998, **393** (6683): 382~ 386
- 14 Berezovska O, Frosch M, McLean P, *et al.* The Alzheimer-related gene presenilin 1 facilitates notch 1 in primary mammalian neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999, **69** (2): 273~ 280
- 15 Song W, Nadeau P, Yuan M, *et al.* Proteolytic release and nuclear translocation of Notch1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, **96** (12): 6959~ 6963

Cloning and Expression of the Intracellular Cytoplasmic Domain of Rat Notch 1 Receptor*

JIN Wei Lin, LIAO Bai Song, JÜ Gong**

(Institute of Neurosciences, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract Notch proteins are involved in cell-fate selection throughout development. Signalling through the transmembrane receptor Notch is triggered by ligand binding, which induces the proteolytic cleavage of the Notch protein. This cleavage generates an intracellular fragment of the Notch protein (Notch-ICD), which translocates into the nucleus and modifies transcription of target genes through its association with the CSL family of DNA binding protein (where CSL stands for CBF1, Su (H), Lag-1). Notch activity affects the implementation of differentiation, proliferation, and apoptotic programs, providing a general developmental tool to influence organ formation and morphogenesis. To obtain recombinant rat NICD, a long template and high fidelity PCR was used to clone NICD (1744V-2530K) DNA fragment from rat brain cDNA library. The cloned NICD fragment was confirmed by sequencing and then subcloned into glutathione-S-transferase (GST) fusion protein expression vector pGEX-KG. The GST-NICD fusion proteins were expressed in *E. coli* JM109 after inducing by IPTG. The fusion proteins were purified by affinity chromatography on glutathione Sepharose 4B.

Key words Notch 1, intracellular cytoplasmic domain, cloning, expression

* This work was supported by a grant from National Natural Sciences Foundation of China (39870263).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3246270, E-mail: Jugong@ms.xab.ac.cn

Received: June 2, 2000 Accepted: August 23, 2000