

蛋白质体外磷酸化方法的建立

刘 斌 宋 宜 董 燕 孙志贤*

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 蛋白质的磷酸化与去磷酸化调节方式在细胞信号传递过程中占有极其重要的位置. 建立鉴定蛋白质磷酸化的可靠方法具有重要意义. 毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白 (ataxia telangiectasia mutated, ATM) 是直接感受 DNA 双链断裂损伤, 并起始诸多 DNA 损伤信号反应通路的主开关分子. 电离辐射 (IR) 细胞学反应中, ATM 激酶可通过磷酸化活化 p53 蛋白, 原核表达 p53 融合蛋白, 免疫沉淀 IR 活化的野生型 ATM 蛋白, 进行蛋白质的体外磷酸化反应. 实验验证了 ATM 对 p53 蛋白的磷酸化作用. 这一方法的建立可为研究细胞信号转导途径中蛋白激酶对底物的磷酸化作用及筛查激酶底物提供标准化的技术手段.

关键词 毛细血管扩张性共济失调症突变蛋白 (ATM), p53, 蛋白质体外磷酸化, 电离辐射

学科分类号 Q55

蛋白质的磷酸化修饰与去磷酸化过程是生物体内存在的一种普遍的调节方式, 几乎涉及所有的生理及病理过程, 如糖代谢、光合作用、基因表达等. 对这一过程的研究是目前细胞信号转导研究领域极为重要的课题之一. 因此, 建立鉴定蛋白质磷酸化的可靠方法具有重要意义.

本实验以毛细血管扩张共济失调症突变蛋白激酶 (ataxia telangiectasia mutated, ATM) 对 p53 蛋白的磷酸化反应为例. ATM 是人常染色体单基因隐性遗传病毛细血管扩张共济失调症 (ataxia telangiectasia, AT) 的致病基因, 其编码蛋白 C 端含有磷脂酰肌醇-3-磷酸激酶 (PI3K) 结构域, 其活性可被 PI3K 激酶家族抑制剂 Wortmannin 所抑制, 被认为是 PI3K 激酶家族的重要成员. 在细胞的 DNA 损伤识别监视网络中, ATM 蛋白主要参与 DNA 双链断裂 (DSBs) 损伤的识别与修复, 并通过磷酸化下游多种具有重要细胞学功能的底物分子调控细胞损伤的生物学反应. 而被誉为“分子警察”的 p53 蛋白则是 ATM 激酶催化其磷酸化的效应分子. 电离辐射可引起细胞周期 G1 期和 G2 期的阻滞反应. 辐射引起细胞周期 G1 期阻滞依赖于磷酸化 p53 蛋白的稳定表达. 研究发现 γ 射线诱导的 G1 期阻滞伴有 p53 蛋白的核内积聚. AT 纯合子缺乏辐射诱导 p53 蛋白的聚集. 同时, 辐射诱导 p53 下游分子 p21^{WAF1} 及 Gadd45 的能力也明显下降, 受照后不发生 G1 期阻滞. 由此推测 ATM 为 p53 上游 DNA 损伤感受分子, 它通过磷酸化 p53 蛋白及转录活化 p21 分子调控 G1/S 期进程. 本实

验利用细胞免疫沉淀得到 ATM 蛋白, 原核表达得到 p53 融合蛋白, 建立蛋白质体外磷酸化系统, 实验验证了 ATM 免疫复合物对 p53 融合蛋白的体外磷酸化作用.

1 材料与方法

1.1 材料

原核表达载体 pGEX-6P-1, 菌株 BL21 及蛋白质亲和层析柱 (GSTrapTM FF, Cat NO. 17-5130-02) 购自 Amersham Pharmacia 公司. Trizol 试剂 (Cat NO. 15596-026), 反转录酶 (M-MLV Reverse Transcriptase, Cat NO. 28025-013), 回收试剂盒 (ConcertTM Rapid Gel Extraction System, Cat NO. 11456-019) 均购自 GibcoBRL 公司. PCR 反应试剂盒购自 Sangon 公司. 连接酶 (ligase)、质粒提取试剂盒购自 Promega 公司. ATM 抗体购自 Santa Cruz 公司 (sc-7128). Protein A/G PLUS-Agarose (sc-2003) 购自 Santa Cruz Biotechnology. HeLa 细胞系购自中国医学科学院细胞库. 凝胶成像仪. AlphaImagerTM 1220.

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建: 从 p53 野生型细胞 MCF-7 中提取 RNA, 反转录获得 cDNA. 针对 p53 N 端 1~303 碱基对设计特异性引物, 上游引物为 5'-CG GGATCCATGGAGGAGCCGCACTCAGAT-

* 通讯联系人.

Tel: 010-66931218, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2002-07-15, 接受日期: 2002-09-12

3', 其中包括 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物为 5'-CCG **CTCGAG**TTTCTGGGAAGGGACAGAAGA-3', 其中包括 *Xho*I 酶切位点. 取 cDNA 为模板进行 PCR, 回收扩增得到的片段, 并对引物中含有的限制性酶切位点进行双酶切, 电泳并回收. 将回收的目的片段连接到 pGEX-6P-1 质粒. 测序正确后, 转化 BL21 菌株.

1.2.2 p53 融合蛋白的诱导表达及纯化: 用 IPTG 对转化了 pGEX-p53 质粒的 BL21 进行常规诱导表达. 收集细菌, 超声破碎, 离心, 分别收集上清与沉淀, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 确定 p53 融合蛋白为非包涵体表达形式. 用亲和层析法对细菌裂解液上清进行纯化. SDS-PAGE 验证纯化效果. 把纯化的 p53 融合蛋白透析至激酶缓冲液中.

1.2.3 ATM 蛋白的免疫沉淀: 培养 ATM 野生型的 HeLa 细胞. 实验前一天对细胞进行传代. 对细胞进行照射 (^{60}Co , 10 Gy) 1 h 后, 用 0.2% EDTA/PBS 消化细胞, 收集细胞并用 PBS 洗一次, 得到 2×10^6 个细胞. 用裂解缓冲液 (Lysis 缓冲液, 50 mmol/L Tris, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Tween 20, 0.2% NP-40, 1 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 10% 甘油, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 1 mmol/L DTT) 在冰浴中裂解细胞, 并进行超声破碎, 离心, 12 000 g, 10 min, 4℃. 保存上清. 加入 6 μL ATM 抗体, 4℃ 混悬 4 h. 加入 20 μL Protein A/G PLUS-Agarose, 4℃ 混悬过夜. 离心, 5 000 g, 5 min, 用裂解液洗 3 次, 用 0.5 mol/L LiCl/Lysis 缓冲液洗 1 次, 用激酶缓冲液 (kinase buffer, 50 mmol/L HEPES, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% Tween 20, 0.2% NP-40, 1 mmol/L NaF, 1 mmol/L Na_3VO_4 , 1 mmol/L DTT, 10 mmol/L MnCl_2) 洗 3 次. 弃去上清后保存沉淀. 对此免疫沉淀物进行蛋白质印迹检测.

1.2.4 体外磷酸化反应: 在 ATM 蛋白免疫沉淀复合物中加入 50 μL (22 μg) p53 融合蛋白以及 2.59×10^5 Bq [γ - ^{32}P] ATP (比活度约为 1.85×10^{17} Bq/mol), 混匀, 30℃ 孵育 20 min, 其间需多次振匀.

1.2.5 磷酸化结果检测: 蛋白质体外磷酸化产物中加入 70 μL $2 \times$ 蛋白质电泳上样缓冲液, 取 40 μL 进行 SDS-PAGE. 电泳结束后直接用凝胶进行 X 片的曝光, 显色, 观察目的蛋白的磷酸化结果.

2 结 果

2.1 原核表达载体构建

由图 1 可见, 重组载体 pGEX-p53 经 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切, 得到了与目的片段大小相符的片段. 测序后, 证明序列无误. 由此证明我们正确构建了 pGEX-p53 载体.

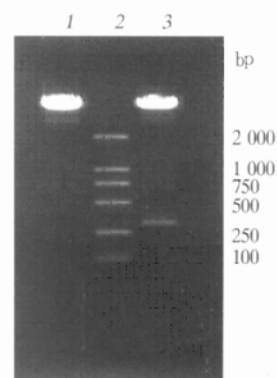


Fig. 1 Restriction analysis of pGEX-p53

1: pGEX-p53; 2: DL2000 DNA marker;
3: pGEX-p53/ (*Bam*H I + *Xho*I).

2.2 p53 融合蛋白的诱导表达及纯化

转化了 pGEX-p53 质粒的 BL21, 用 1 mmol 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导表达, 37℃, 3 h. 对全菌体及细菌裂解液的上清进行 SDS-PAGE 的结果显示 (图 2), p53 融合蛋白的表

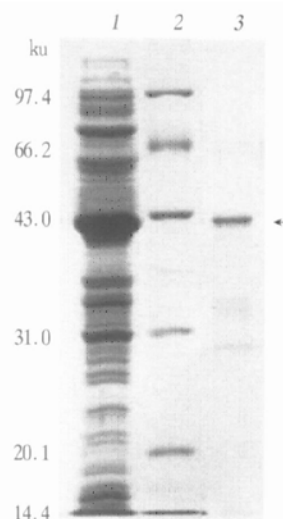


Fig. 2 SDS PAGE analysis of fusion protein of GST-p53

1: the induced total bacterial proteins with induced expression of GST-p53; 2: low-range protein molecular standard; 3: purified fusion protein of GST-p53 marked by the arrow.

达形式为非包涵体形式, 其理论分子质量为 39 ku. 采用亲和层析对诱导后的细菌裂解液上清进行纯化, 每 100 ml 菌液可得 2.4 mg 蛋白质.

2.3 ATM 蛋白免疫沉淀复合物的蛋白质印迹分析

从 HeLa 细胞中得到 ATM 抗体免疫沉淀复合物, 对其进行蛋白质免疫印迹, 检测到 350 ku 的特异性 ATM 蛋白 (图 3).

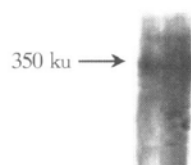


Fig. 3 Western blotting assay of ATM protein immunoprecipitated from HeLa cell

2.4 ATM 对 p53 融合蛋白体外磷酸化结果

由图 4 中 1 及图 5 中 1 可以看到, ATM 免疫沉淀复合物对 p53 融合蛋白磷酸化的结果为阳性, 此结果与理论相符. 如图 5 所示, 经 PI3K 特异性抑制剂 Wortmannin 处理的 HeLa 细胞, 其 ATM 免疫沉淀复合物对 p53 融合蛋白体外磷酸化作用减弱. 在 Wortmannin 浓度达到 10^{-5} mol/L 时, 对激酶的抑制效果明显, 这一浓度与报道相符. 由此我们可以判定, 对 p53 融合蛋白进行体外磷酸化的激酶是 Wortmannin 敏感的. 用与 ATM 抗体相同种属的无关抗体得到的免疫沉淀复合物对 p53 融合蛋白进行

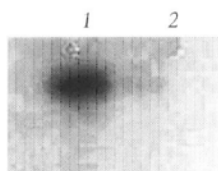


Fig. 4 Phosphorylation of GST-p53 by irradiation activated ATM in HeLa cell

1: GST-p53 phosphorylated by immunoprecipitates with ATM (sc-7128) antibody; 2: GST-p53 phosphorylated by immunoprecipitates with rabbit purified IgG.

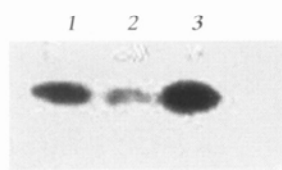


Fig. 5 Phosphorylation of GST-p53 by ATM in HeLa cell was inhibited by Wortmannin

1: Control, no Wortmannin added; 2: 10^{-5} mol/L Wortmannin treated 1 h before 10Gy IR; 3: 10^{-6} mol/L Wortmannin treated 1 h before 10Gy irradiation.

的体外磷酸化结果为阴性, 这进一步有理由使我们相信 p53 融合蛋白体外磷酸化作用是 ATM 蛋白相关的.

3 讨 论

现代分子生物学倾向于认为生物大分子间的相互作用在很大程度上是基于结构上的分子识别. 蛋白质体外磷酸化这一方法正是模拟体内的溶液环境, 再现体内的反应过程. 蛋白质的体外磷酸化方法相对于细胞体系的磷酸化过程, 具有激酶与底物更明确、相互关系更确定的特点.

本实验中表达的 p53 融合蛋白包括了 p53 N 端的 Ser9、Ser15、Ser46 磷酸化位点, 实验结果验证了 ATM 对 p53 蛋白的磷酸化作用. 而用 PI3K 特异性抑制剂 Wortmannin 处理后的细胞, 免疫沉淀得到的 ATM 蛋白对 p53 的磷酸化作用明显减弱, 则更进一步证明此种磷酸化作用是 PI3K 类激酶所特异的.

体外磷酸化反应中, 激酶与底物及同位素之间量的对比对于不同的情况有所差异, 因为这与激酶的活性、底物的纯度等因素有关. 本实验正是摸索了各种因素, 确定了各成分的最佳量. 各成分尤其不能过量. 底物也需要达到一定的纯度, 以免在磷酸化的结果中出现与底物分子质量接近的条带, 影响结果的判定.

本实验验证了 ATM 免疫沉淀复合物对 p53 融合蛋白的体外磷酸化作用, 建立了蛋白质体外磷酸化的实验方法, 为研究细胞信号转导网络中其他蛋白质之间的相互作用提供了有力的工具.

参 考 文 献

- 1 Lavin M F. ATM: the product of the gene mutated in ataxia-telangiectasia. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1999, **31** (7): 735~ 740
- 2 Lavin M F, Khanna K K. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *International Journal of Radiation Biology*, 1999, **75** (10): 1201~ 1214
- 3 Pandita T K, Lieberman H B, Lim D S, *et al.* Ionizing radiation activates the ATM kinase throughout the cell cycle. *Oncogene*, 2000, **19** (11): 1386~ 1391
- 4 宋 宜, 孟祥兵, 孙志贤, 等. DNA 损伤生物学反应中 ATM 对 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的直接磷酸化. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, **18** (3): 277~ 281
- 5 Song Y, Meng X B, Sun Z X, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2002, **18** (3): 277~ 281
- 6 Saito S, Goodarzi A A, Higashimoto Y, *et al.* ATM mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including Ser46, in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, 2002, **277** (15): 12491~

- 12494
- 6 Miyakoda M, Suzuki K, Kodama S, *et al.* Activation of ATM and phosphorylation of p53 by heat shock. *Oncogene*, 2002, **21** (7): 1090~ 1096
- 7 孟祥兵, 董燕, 孙志贤. ATM 介导的蛋白磷酸化在辐射损伤信号传递过程中的作用. *科学通报*, 1999, **44** (18): 1963 ~ 1967
- Meng X B, Dong Y, Sun Z X. *Chin Sci Bull*, 1999, **44** (19): 1790~ 1794
- 8 成军. 肿瘤相关基因. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 154~ 168
- Cheng J. *Genes Related to Tumor*. Beijing: Beijing Medical University Press, 2000. 154~ 168
- 9 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导. 第二版. 北京: 科学出版社, 1999. 143~ 158
- Sun D Y, Guo Y L, Ma L G. *Cell Signal Transduction*. 2nd. Beijing: Science Press, 1999. 143~ 158

The Standardization of p53 Protein Phosphorylation *In vitro*

LIU Bin, SONG Yi, DONG Yan, SUN Zhixian*

(*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*)

Abstract Protein phosphorylation and dephosphorylation were key regulatory mechanisms in signal transduction as well as in catabolism of carbohydrates, photosynthesis, the growth of the cell and expression of the gene, etc. Therefore, to establish a sound method of protein phosphorylation assay is of much importance. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) was the product of the gene mutated in the human genetic disorder ataxia-telangiectasia (AT), which regulated the cell's biology response of DNA damage by phosphorylating a series of proteins involved in cell cycle checkpoints, DNA repair and apoptosis. It seemed that ATM played a central role in radiation-induced activation of the tumour suppressor gene product p53. The recombinant protein GST-p53 was expressed in *E. coli* and purified by affinity chromatography. Then, ATM was immunoprecipitated from HeLa cells exposed to 10 Gy γ -ray; and the purified GST-p53 was incubated with immunoprecipitated ATM and [γ - 32 P] ATP. It turned out that the immunoprecipitated complex of ATM could phosphorylate GST-p53 *in vitro*. Moreover, the standardization of this method facilitated delineating protein phosphorylation by protein kinase and screening substitutes of other protein kinases.

Key words ataxia telangiectasia mutated (ATM), protein phosphorylation *in vitro*, p53, ionizing radiation

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931218, E-mail: sunzx@nic.bmi.ac.cn

Received: July 15, 2002 Accepted: September 12, 2002