

PC-1 分子转录激活功能研究*

张浩 周建光** 李杰之 于梅 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 *PC-1* 基因是在人前列腺癌细胞中克隆的新基因, 表达水平随前列腺癌恶性程度增加而升高, 其表达产物具有转录因子的一些特征. 为研究 PC-1 分子的转录激活功能, 首先应用酵母双杂交系统将 PC-1 全长以及不同区段的 cDNA 克隆到表达载体 pAS2-1 中, 然后分别转化酵母细胞株 CG-1945. *lacZ* 和 *His3* 报告基因激活的检测结果表明, 该分子具有转录激活活性并将该活性定位于 N 端的 46 个氨基酸区域. 此外, 将 PC-1 分子不同区段的 cDNA 分别克隆至表达载体 pZHO1 中, 将它们与报告基因质粒 pTRE-luc 共转染哺乳动物细胞 COS7 和 C4-2, Firefly 荧光素酶相对活性的检测结果表明, 该分子 N 端的 46 个氨基酸区域具有转录激活活性.

关键词 PC-1, 转录激活活性, 酵母双杂交

学科分类号 Q754

PC-1 基因是由本室周建光等^[1]发现并克隆的新基因, 该基因在人前列腺癌恶性程度较高的细胞中表达明显升高. 通过 GenBank 序列同源性查询, 我们找到了与之高度同源的 5 个基因: *D52/N8*、*N8L*、*R10*、*CSPP28*、*mD52*, 它们所编码的蛋白质除 N 端的部分氨基酸序列存在明显差异之外, C 端 180 个氨基酸高度同源, 这些基因大都与细胞的增殖、恶变相关, 在 Ca^{2+} 介导的信号转导过程中也起到重要作用^[2-5]. 在高度同源的序列中含有一亮氨酸拉链 (leucine zipper) 结构, 这是许多转录因子 (如: c-Jun、C/EBP、GCN/4、c-Myc 等) 进行同源或异源二聚化以便结合 DNA 所必需的. 比较有意思的是, 在 PC-1 分子 N 端 46 个特异的氨基酸序列中富含带负电荷的谷氨酸 (E)、天门冬氨酸 (D), 这是许多转录因子激活靶基因转录所具有的共同序列特征. 同时, 许多转录因子都属于早期应答基因, 其表达水平随外界环境的变化而改变^[6-8], 我们已有的研究表明, *PC-1* 表达明显受到雄激素的调控^[1].

为研究 PC-1 分子的转录激活活性, 我们首先应用酵母双杂交系统将编码 PC-1 全长分子以及不同区段 (N 端第 1~46 位氨基酸区段, 这是 PC-1 与其同源分子比较特异的区域; 第 47~224 位氨基酸区段, 该区域是它们的同源区域; 第 1~125 位氨基酸区段, 该区域为含有亮氨酸拉链结构区段) 的 cDNA 分别克隆到酵母表达载体 pAS2-1 中, 使它们与编码 GAL4 DNA 结合结构域的 cDNA 进行融合表达, 然后将它们分别转化酵母细胞株 CG-1945 中, 通过检测 *lacZ* 和 *His3* 两个报告基因的表达来

确定 PC-1 分子有无转录激活功能并找出具有该功能的区域.

由于酵母细胞和哺乳动物细胞内的信号转导、转录调节的复杂性、蛋白质分子修饰加工等过程相去甚远, 因此, 我们又进一步运用已经建立的, 在哺乳动物细胞中检测蛋白质分子转录激活活性的系统^[9], 在哺乳动物细胞中将酵母细胞中的检测结果进行了验证.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 含 PC-1 全长 cDNA 的质粒 pZHR3, 酵母表达载体 pAS2-1, 用于在哺乳动物细胞中检测蛋白质分子转录激活活性系统的质粒 (pZHO1、pTRE-luc、pRL-TK), 以及大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、猴肾细胞株 COS7 由本室保存. 酵母细胞株 CG-1945 由杨淑静博士赠送, 人前列腺癌细胞株 C4-2 由美国 Virginia 大学 Chung 教授馈赠.

1.1.2 工具酶及化学试剂: 限制核酸内切酶、Taq DNA 聚合酶、Klenow 片段 (大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段)、T4 DNA 连接酶为大连宝生物工程有限公司产品, Vent DNA 聚合酶为 New England Biolabs 公司产品, 质粒提取试剂盒为上海华舜生

* 国家自然科学基金资助项目 (30070296).

** 通讯联系人.

Tel: 010-66931323, E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn

收稿日期: 2003-10-20, 接受日期: 2003-11-29

物工程有限公司产品, PCR 回收试剂盒为上海生物工程有限公司产品, LipofectAMINE™ 为 Gibco/BRL 公司产品, YPD、SD/-Leu/-Trp/-His 酵母培养基和 X-gal 为 CLONTECH 公司产品, 3-AT、鲑精 DNA、DMSO、 β -巯基乙醇为 Sigma 公司产品, 其余试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物: PC-1 分子共编码 224 个氨基酸, 其中第 1~46 位氨基酸是其与同源分子比较特异的区段, 第 47~224 位氨基酸是它们的同源序列, 第 81~125 位氨基酸含有亮氨酸拉链结构, 在实验中所用的引物分别用来扩增第 1~46 位、第 47~224 位、第 1~125 位、第 1~224 位氨基酸区段的 cDNA。

1.2 方法

1.2.1 DNA 重组、质粒构建方法及菌落 PCR 鉴定 含重组质粒的阳性细胞克隆参见文献 [10]。

1.2.2 酵母细胞的培养、转化 (LiAC 介导)、His3 以及 lacZ 报告基因的检测 参见 CLONTECH 公司酵母双杂交系统使用操作指南进行。

1.2.3 哺乳动物培养细胞中双荧光素酶报道系统的检测: 分别将 C4-2、COS-7、MCF-7 转染细胞按 10^5 /孔接种于 12 孔板中, 待细胞生长至 90% 铺满时, 按照表 1 进行 8 组 DNA 转染, 其中每组复样 3 次, 细胞转染 48 h 后, 用 $1 \times$ PBS 洗涤细胞一次, 每孔加入 200 μ l 裂解液, 将 12 孔板置于摇床中 220 r/min 室温孵育 20 min 后, 转移至 1.5 ml 离心管中, 振荡 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min。取 20 μ l 细胞裂解液于含有 100 μ l 荧光素酶检测试剂 II 的 1.5 ml 离心管中, 混匀 3 次, 于荧光发光计中读数, 取出离心管, 加入 100 μ l Stop & Glo® Reagent, 混匀 3 次, 读数。前后两组读数的比值即为 firefly 荧光素酶的相对活性。

2 结果

2.1 PC-1 在酵母细胞中的转录激活功能

2.1.1 重组质粒 pAS-PC1、pAS-PC1_{1~46}、pAS-PC1_{1~125}、pAS-PC1_{47~224} 的构建: 以含有 PC-1 全长 cDNA 的质粒 pZHR3 为模板, 经 PCR 反应, 分别扩增出编码 PC-1 全长、1~46 位氨基酸、1~125 位氨基酸、47~224 位氨基酸的 cDNA 片段, 纯化后, 与载体 pAS2-1 分别用相应的限制性核酸内切酶酶切, 连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 鉴定和序列分析正确后分别得到重组质粒 pAS-PC1、pAS-PC1_{1~46}、pAS-PC1_{1~125}、pAS-PC1_{47~224}。

2.1.2 Colony-lift filter assay 方法检测 β 半乳糖苷酶基因的激活情况: 分别将重组质粒 pAS-PC1、pAS-PC1_{1~46}、pAS-PC1_{1~125}、pAS1-PC1_{47~224} 转化酵母细胞 CG-1945, 同时转化 pAS2-1 作为阴性对照, 具体步骤见材料与与方法, 结果见图 1。可以明显看出, pAS-PC1、pAS-PC1_{1~46}、pAS-PC1_{1~125} 转化的细胞变蓝, 而 pAS1-PC1_{47~224}、pAS2-1 转化的细胞不变色。说明 PC-1 分子具有转录激活功能, 第 1~46 位氨基酸在 PC-1 分子转录激活功能中起重要作用。

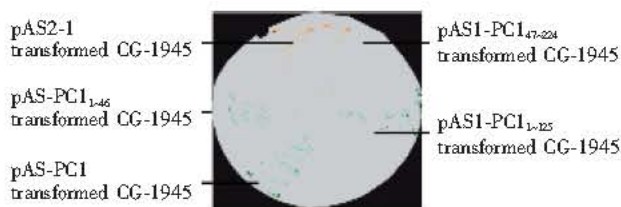


Fig 1 β -Galactosidase colony-lift filter assay for activation of the lacZ reporter gene

2.1.3 各组转化的细胞在组氨酸缺陷型琼脂培养基中生长状况: 分别将重组质粒 pAS-PC1、pAS-PC1_{1~46}、pAS-PC1_{1~125}、pAS1-PC1_{47~224} 转化酵母细胞 CG-1945, 同时转化 pAS2-1 作为阴性对照, 将转化的细胞涂布于 SD/-Leu-Trp 营养缺陷型琼脂平板中, 30℃ 培养 72 h (细胞克隆生长至直径为 1 mm 左右), 分别在各组平板中挑取 6 个不同的细胞克隆划线于 SD/-Leu/-Trp/-His 营养缺陷型琼脂培养基 (含 5 mmol/L 3-AT) 培养 72 h 后, 结果见图 2, 可以明显看出, pAS-PC1、pAS-PC1_{1~46}、pAS-PC1_{1~125} 转化的细胞能够在 SD/-Leu/-Trp/-His 缺陷型琼脂培养基中生长, 而 pAS1-PC1_{47~224}、pAS2-1 转化的细胞在此培养基中则不生长。再次验证了 PC-1 分子具有转录激活活性, 而且第 1~46 位氨基酸在 PC-1 分子转录激活功能中起重要作用的实验结果。

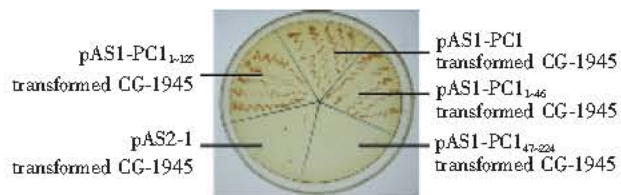


Fig. 2 Activation of the His3 reporter gene

2.2 PC-1 在哺乳动物细胞中的转录激活功能研究

2.2.1 重组质粒 pZHO1-PC1、pZHO1-PC1₁₋₄₆、pZHO1-PC1₁₋₁₂₅、pZHO1-PC1₄₇₋₂₂₄ 的构建: 为了构建包含编码 PC-1 不同 cDNA 片段的重组质粒, 以质粒 pZHR3 为模板, 经 PCR 反应扩增出 PC-1 全长、1~46 位氨基酸、1~125 位氨基酸、47~224 位氨基酸 cDNA 片段后, 与载体分别用相应的限制性核酸内切酶酶切, 连接并转化 DH5 α 感受态细胞, 经 PCR 和序列分析正确后分别得到重组质粒 pZHO1-PC1、pZHO1-PC1₁₋₄₆、pZHO1-PC1₁₋₁₂₅、pZHO1-PC1₄₇₋₂₂₄.

2.2.2 哺乳动物细胞中 PC-1 不同区段对 firefly 荧光素酶表达的影响: 用脂质体介导法分别在 C4-2、COS-7、MCF-7 细胞中转染以下各组质粒 (表 1). 第 1 和第 2 组均转染 pZHO1 + pTRE-luc + pRL-TK 三种质粒, 其中 pZHO1 编码的 TetR (四环素阻遏蛋白) 能够与 pTRE-luc 编码的 firefly 荧光素酶报道基因上游的调控序列——TRE (四环素反应元件) 结合, 但是由于 TetR 不具有转录激活功能, 因而不能激活 firefly 荧光素酶的表达, pRL-TK 编码组成型表达的 Renilla 荧光素酶基因, 其编码产物在实验中作为内参对照^[9], 这两个转染组作为阴性对照组; 第 3 至第 6 组分别转染克隆入 PC-1 不同区段 (PC-1 全长、1~46 位氨基酸、1~125 位氨基酸、47~224 位氨基酸) cDNA 的 pZHO1 系列重组质粒 + pTRE-luc + pRL-TK, 用于检测 PC-1 分子的转录激活活性; 第 7 组转染 pTRE-luc + pRL-TK, 第 8 组只转染 pRL-TK 质粒, 通过比较这两组 firefly 荧光素酶的相对活性来观察细胞内 firefly 荧光素酶的本底表达水平. 48 h 后, 分别检测这 8 组细胞的 firefly 荧光素酶的相对活性. COS-7、C4-2 细胞各转染组荧光素酶活性测定结果见图 3a、3b (MCF-7 细胞各转染组荧光素酶活性测定结果与之近似, 结果略). 结果表明: 阴性对照 (第 1、2 组) 中, firefly 荧光素酶的相对活性 (firefly 和 Renilla 荧光素酶活性比值) 比较接近, 表明该检测系统比较稳定. 第 8 组 firefly 荧光素酶相对活性接近 0, 低于第 7 组的相对活性, 说明在未转染的细胞内 firefly 荧光素酶活性的背景值极低, 不会给实验组造成误差. 在转染编码 PC-1 不同片段的 4 组中, 转染编码 PC-1 N 端 46 个氨基酸组的 firefly 荧光素酶相对活性明显高于转染编码其他片段以及编码 PC-1 全长的细胞组, 也高于阴性对照组, 说明该区段具有明显的转录激活活性. 而缺失编码 N

端 46 个氨基酸的 PC-1 分子以及 PC-1 全长分子细胞组中 firefly 荧光素酶的相对活性与阴性对照相比则没有明显差异.

Table 1 Different panels of plasmids used in transfection mammalian cells

Order	Different PC-1 cDNA fragment (0.5 μ g)	pZHO1 Negative control (0.5 μ g)	pTRE-luc (0.2 μ g)	pRL-TK (0.1 μ g)
1	-	+	+	+
2	-	+	+	+
3	pAS-PC1 ₁₋₄₆	-	+	+
4	pAS-PC1 ₁₋₁₂₅	-	+	+
5	pAS-PC1	-	+	+
6	pAS-PC1 ₄₇₋₂₂₄	-	+	+
7	-	-	+	+
8	-	-	-	+

“+” means adding plasmid in the corresponding column, “-” means not adding.

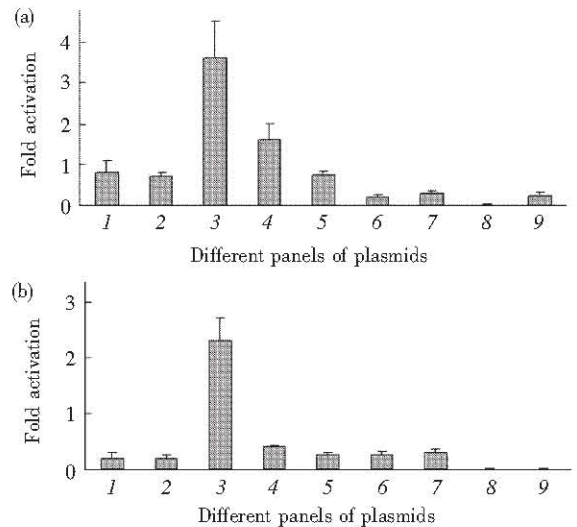


Fig. 3 The transcriptional activation activity of different regions within PC-1

Result are expressed as $(\bar{x} + s)$ for three independent experiments.

(a) COS7 cell, (b) C4-2 cell.

3 讨 论

为了检测 PC-1 分子的转录激活功能, 我们首先应用 CLONTECH 开发的酵母双杂交系统, 通过对 lacZ 和 His3 两种报告基因表达的检测, 我们得到了结果比较一致的结果: 全长分子、1~46 位氨

氨酸、1~125位氨基酸能够激活报告基因表达,而缺少N端46个氨基酸的区段(47~224位氨基酸)则没有这一活性,说明PC-1分子具有转录激活功能,而且负责这一功能的区域位于N端46个氨基酸,这与我们的预测相一致,说明PC-1这一特异的区域(和同源分子相比较)具有重要的功能。

为了在哺乳动物细胞中研究PC-1分子的转录激活活性,我们运用已经建立的在哺乳动物细胞中检测蛋白质分子转录激活活性的系统^[9],分别将PC-1全长、1~46位氨基酸、1~125位氨基酸、47~224位氨基酸区段的cDNA克隆至表达载体pZHO1中,然后将它们分别和报告基因共转染至MCF-7、COS7、C4-2哺乳动物细胞中,各转染组firefly荧光素酶相对活性的检测结果表明,1~46位氨基酸转染组和阴性对照组差别显著,为其5倍左右。而PC-1全长、47~224位氨基酸转染组活性的比值则接近于阴性对照组,没有检测到明显的转录激活活性。考虑到许多转录因子转录激活活性受到严格调控,比如磷酸化水平的增加能够提高转录激活功能,还有许多转录因子在正常情况下滞留于细胞质中或者锚定于细胞膜上,在一定外界因素诱导下,它们才进入细胞核中发挥应有的转录激活功能^[11,12]。以前的研究表明,在正常的培养条件下,PC-1分子不能进入细胞核而滞留于细胞质中^[13]。我们推测PC-1分子的转录激活功能区位于1~46位氨基酸,在正常条件下,由于PC-1分子不能进入细胞核而不能表现出转录激活活性,也许某些生理病理条件下,PC-1分子在细胞内的定位会发生改变,从而通过其转录激活功能区发挥转录激活功能,寻找出影响PC-1分子在细胞内转录激活活性的条件将是我们要进一步探索、解决的问题。

参 考 文 献

1 Zhou J G, Zhou H E, Lin B Y, *et al.* DNA microarray identified

a novel *pc-1* gene differentially expressed by human prostate tissues and tumor cell lines. The Fifth Asian Congress on Urology, Beijing, 2000

- 2 Byrne J A, Tomasetto C, Garnier J M, *et al.* A screening method to identify genes commonly overexpressed in carcinomas and the identification of a novel complementary DNA sequence. *Cancer Res*, 1995, **55** (13): 2896~2903
- 3 Chen S L, Zhang X K, Halverson D O, *et al.* Characterization of human N8 protein. *Oncogene*, 1997, **15** (21): 2577~2588
- 4 Proux V, Provot S, Felder-Schmittbuhl M P, *et al.* Characterization of a leucine zipper-containing protein identified by retroviral insertion in avian neuroretina cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (48): 30790~30797
- 5 Parente J A, Goldearing J R, Petropoulos A C, *et al.* Purification, cloning, and expression of a novel, endogenous, calcium-sensitive, 28-kDa phosphoprotein. *J Biol Chem*, 1996, **271** (33): 20096~20101
- 6 Struhl K. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends Biochem Sci*, 1989, **14** (4): 137~140
- 7 Ma J, Ptashne M. A new class of yeast transcriptional activators. *Cell*, 1987, **51** (1): 113~119
- 8 Morgan J I, Curran T. Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu Rev Neurosci*, 1991, **14**: 421~451
- 9 张浩,周建光,李杰之,等.一种在哺乳动物细胞中研究蛋白分子转录激活活性系统的建立. *遗传学报*, 2002, **29** (11): 983~989
Zhang H, Zhou J G, Li J Z, *et al.* *Acta Genetica Sinica*, 2002, **29** (11): 983~989
- 10 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 34~40
- 11 Huang T T, Kudo N, Yoshida M, *et al.* A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I κ B α controls cytoplasmic localization of inactive NF- κ B/I κ B α complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (3): 1014~1019
- 12 Yoshida H, Okada T, Haze K, *et al.* ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the *cis*-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (18): 6755~6767
- 13 张浩,周建光,黄翠芬,等.人前列腺癌相关基因PC-1表达产物在细胞内的定位研究. *军事医学科学院院刊*, 2001, **25** (4): 255~259
Zhang H, Zhou J G, Huang C F, *et al.* *Bull Acad Mil Med Sci*, 2001, **25** (4): 255~259

The Study of The Transcriptional Activation Activity of PC-1 *

ZHANG Hao, ZHOU Jian-Guang **, LI Jie-Zhi, YU Mei, HUANG Cui-Fen

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract The gene *PC-1* was identified as a novel gene that expressed higher in the much more malignant human prostate cancer cell lines and its translation product meets some points of transcription factors. In order to study the transcriptional activation activity of PC-1, firstly, the yeast two-hybrid system was used and the whole length as well as various regions of PC-1 cDNA were cloned into the expression vector pAS2-1 and transfected into the yeast cell line CG-1945 respectively, the result of the reporter genes *lacZ* and *His3* activation assay showed that PC-1 had transcriptional activation activity and this activity was mapped within its N terminal 46 amino acids. Then, the various regions of PC-1 cDNA were cloned into the expression vector pZHO1 and cotransfected with the pTRE-*luc* plasmid of the reporter gene into COS7 and C4-2 mammalian cells, the 46 amino acids in the N terminal of PC-1 were found to have transcriptional activation activity by the firefly relative luciferase activity assay.

Key words PC-1, transcriptional activation, yeast two-hybrid system

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30070296).

** Corresponding author. Tel: 86-10-66931323, E-mail: zhoujgx@public.bta.net.cn

Received: October 20, 2003 Accepted: November 29, 2003