

PC-1 分子在细胞内定位的深入探讨*

张浩 周建光** 李杰之 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要 为了寻找影响 PC-1 分子进入细胞核的序列, 将该分子不同区段分别与 EGFP 融合表达, 通过观察绿色荧光蛋白在细胞内的分布, 发现 PC-1 分子的第 112 ~ 190 区段是一独立的功能区, 缺失这一区段后, 分子的其余部分能够进入细胞核并在其中积累, 这一区段使 PC-1 分子被排斥于细胞核之外, 并在细胞质中浓缩成许多点状结构. 运用以 SOS 恢复系统为基础的酵母双杂交方法, 发现 PC-1 分子能够定位于细胞膜上, 通过缺失突变发现该分子的第 112 ~ 190 区段是一独立的细胞膜定位信号序列, 这一序列将其定位于细胞的胞膜上.

关键词 PC-1, 亚细胞定位, 细胞膜定位

学科分类号 Q753

PC-1 基因是由本室周建光等^[1]发现并克隆的前列腺癌相关基因, 该基因的蛋白质编码产物含 224 个氨基酸, 分子质量为 25 ku 左右. 理论上可以容易地通过核孔复合体自由扩散至细胞核内, 而我们的实验结果与之相反^[1], 提示 PC-1 分子内部可能存在使其滞留于细胞质中的信号序列, 或者通过与其他分子相互作用而滞留于细胞质中, 也可能是先进入细胞核, 然后又被象 CRM1 一类的分子转运出核. 为了寻找影响 PC-1 分子进入细胞核的序列, 首先将该分子不同区段的 cDNA 分别与 EGFP 融合表达, 通过观察绿色荧光蛋白在细胞内的分布情况, 来寻找这样的滞留信号.

STRATAGENE 公司开发了以 SOS 恢复系统为基础的酵母双杂交系统, 其原理见图 1, 酵母 CDC25 基因与人 hSos 基因同源, 编码产物为鸟苷酸交换因子, CDC25 分子定位于细胞膜上, 能够与锚定于细胞膜上的 Ras 分子结合, 启动 Ras 信号转导通路, 促进细胞分裂. hSos 编码产物则位于细胞质中, 正常情况下无法与 Ras 结合. 在 cdc25H α 宿主酵母细胞中, CDC25 发生温度敏感型突变, 编码产物在 37 $^{\circ}$ C 时失活导致细胞停止分裂. 在实验中, 分别将 hSos 与诱饵蛋白融合表达, 将文库 cDNA 与细胞膜锚定信号——豆蔻酰基化位点融合表达, 这些 cDNA 的编码产物通过细胞膜锚定信号而定位于细胞膜上, 如果诱饵蛋白与文库中的某个 cDNA 编码产物结合, hSos 便可间接地附着于细胞膜上, 在 37 $^{\circ}$ C 时替代 CDC25 分子启动 Ras 信号转导通路, cdc25H α 宿主细胞就能够继续生长. 蛋白质保守性位点分析表明, PC-1 分子有 5 个较为保

守的豆蔻酰基化位点 (分别位于第 21、47、147、158、190 位氨基酸), 该位点可被豆蔻酰基转移酶进行翻译后修饰, 定位至细胞膜^[2], 为了观察这些豆蔻酰基化位点能否将 PC-1 分子锚定于细胞膜上, 运用上述酵母双杂交系统, 将 PC-1 分子全长以及不同区段的 cDNA 分别与 hSos 基因在 cdc25H α 宿主细胞中融合表达, 通过观察它们在 37 $^{\circ}$ C 的生

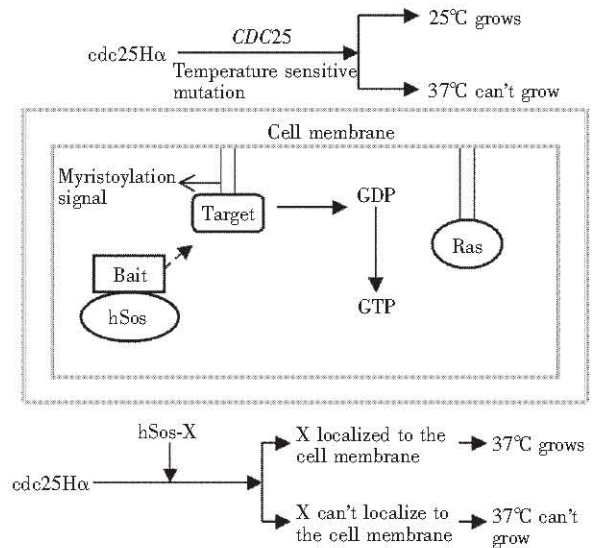


Fig. 1 The principle of a yeast two-hybrid system based on the SOS recovery system

* 国家自然科学基金资助项目 (30070296) 和国家高技术“863”计划资助项目 (2002AA223061).

** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2003-08-26, 接受日期: 2003-09-28

长表型, 判断 PC-1 分子是否能够锚定于细胞膜上, 并找出 PC-1 分子内哪些序列负责这样的细胞定位。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 克隆有 PC-1 全长 cDNA 的质粒 pZHR3、表达载体 pEGFP-C1 均由本室保存, 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 由本室保存, 酵母表达质粒 pSos、酵母细胞株 cdc25H α 为 STRATAGENE 公司产品, 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: 限制酶、Taq DNA 聚合酶、Klenow 片段 (大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 大片段)、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, RPMI 1640、胰酶、LipofectAMINETM 转染试剂盒、Adenine Sulfate 为 Gibco/BRL 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 公司产品, YPD、YNB 酵母培养基、X-gal 为 CLONTECH 公司产品, 鲑精 DNA、DMSO、 β -巯基乙醇、Glucose、Galactose、各种氨基酸为 Sigma 公司产品, 其余试剂为国产分析纯试剂。

1.1.3 引物: (1) 用于扩增 PC-1 1~46 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **GGAATTCCCAATGGATTGTAGAGAGATGGAC** 3'; 下游引物 5' **CGCGGATCCTTAAAATTTCTGAAGAGTAGGTGATCC** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFP-C1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1₁₋₄₆). 上游引物 5' **CGGGATCCCCATGGATTGTAGAGAGGAC** 3'; 下游引物 5' **CCGCTCGAGTCAAAAATTTCTGAAGAGTAGGTGATCC** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pSos 中构建重组质粒 pSos-PC1₁₋₄₆). (2) 用于扩增 PC-1 1~125 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **GGAATTCACCAATGGATTGTAGAGAGATGGAC** 3'; 下游引物 5' **CGCGGATCCTTAAAATTTCTGAAGAGTAGGTGATCC** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFPC1 中构建质粒 pEGFPC1-PC1₁₋₁₂₅). 上游引物 5' **CGGGATCCCCATGGATTGTAGAGAGGAC** 3'; 下游引物 5' **CCGCTCGAGTTATTTGGCAATGTTCTGTTT** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pSos 中构建重组质粒 pSos-PC1₁₋₁₂₅). (3) 用于扩增 PC-1 1~160 位氨基酸

cDNA. 上游引物 5' **CGGGATCCCCATGGATTGTAGAGAGGAC** 3'; 下游引物 5' **CCGCTCGAGTTAGACTGAGCCAACAGACG** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pSos 中构建重组质粒 pSos-PC1₁₋₁₆₀). (4) 用于扩增 PC-1 1~180 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **CGGGATCCCCATGGATTGTAGAGAGGAC** 3'; 下游引物 5' **CCGCTCGAGTTACTTTTCTTCAAATGATTTAAAAGTTG** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pSos 中构建重组质粒 pSos-PC1₁₁₀₋₁₈₀). (5) 用于扩增 PC-1 1~190 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **CGGGATCCCCATGGATTGTAGAGAGGAC** 3'; 下游引物 5' **CCGCTCGAGTTATCCCCCTACTTTAGACTTTA** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pSos 中构建重组质粒 pSos-PC1₁₋₁₉₀). (6) 用于扩增 PC-1 47~224 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **CGCGAATTTCTGCTGCTGAGAACAGACC** 3'; 下游引物 5' **CCGCTCGAGTTACAGGCTCTCCTGTGTCTT**-3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFP-C1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1₄₇₋₂₂₄). 上游引物 5' **CGCGGATCCGCTGGTCTGCTGAGAACAGACC** 3'; 下游引物 5' **CCGCTCGAGTTACAGGCTCTCCTGTGTCTT** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pSos 中构建重组质粒 pSos-PC1₄₇₋₂₂₄). (7) 用于扩增 PC-1 112~180 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **CGGGATCCCGGAATCAATTCTCTACAGGA** 3'; 下游引物 5' **CGCGGATCCTTACTTTTCTTCAAATGATTTAAAAG** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFP-C1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1₁₁₂₋₁₈₀). (8) 用于扩增 PC-1 112~190 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **CGGGATCCCGGAATCAATTCTCTACAGGA** 3'; 下游引物 5' **CGCGGATCCTTACTTTTCTTCAAATGATTTAAAAG** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFPC1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1₁₁₂₋₁₉₀). 上游引物 5' **CGGGATCCCGGAATCAATTCTCTACAGGA** 3'; 下游引物 5' **CGCGGATCCTTACTTTTCTTCAAATGATTTAAAAG** 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFPC1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1₁₁₂₋₁₉₀). (9) 用于扩增 PC-1 112~224 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' **CCGCTCGAGCTGGAATCAATTCTCTACAGGA** 3'; 下游引物 5' **CGCGGATCCAGATGTGCTTGAACCTCGC**-3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFPC1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1₁₁₂₋₂₂₄).

(10) 用于扩增 PC-1 138 ~ 224 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' CCGCTCGAGCTAAGACATCTGAAACCTTATC 3'; 下游引物 5' CGCGGATCCAGATGTGCTTGAACCTCGC 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFPC1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1₁₃₈₋₂₂₄). (11) 用于扩增 PC-1 1 ~ 224 位氨基酸 cDNA. 上游引物 5' GGAATTCACCATGGATTGTAGAGAGATGGAC 3'; 下游引物 5' CGGGATCCCCGAGGCTCTCCTGTGTCTTTTC 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pEGFP-C1 中构建重组质粒 pEGFPC1-PC1). 上游引物 5' CGGGATCCCCATGGATTGTAGAGAGGAC 3'; 下游引物 5' CCGCTCGAGTTACAGGCTCTCCTGTGTCTT 3' (该组引物扩增的片段用于克隆入载体 pSos 中构建重组质粒 pSos-PC1). (12) 用于重组 PCR 的引物. 上游引物 5' CCGCTCGAGCTATGGATGTAGAGTGGAC 3' (引物命名为 PCNXho). 下游引物 5' AAGTTTCCGCTTGATCTCT 3' (引物命名为 PCC₁₁₁). 上游引物 5' AGAGATCAAGCGGAACTTACCAAGCCTGCTGCT 3' (引物命名为 PCN_{Δ111-190}). 下游引物 5' CGCGGATCCAGATGTGCTTGAACCTCGC 3' (引物命名为 pAS-PCCBam).

它们分别与 PC-1 cDNA 编码区部分序列互补, 扩增出不同片段的 PC-1 cDNA 序列, 在这些引物序列的 5' 和 3' 分别引入了限制性内切酶识别位点 (用斜体字母表示), 以便于下一步的克隆. 以上引物由上海博雅生物技术有限公司合成.

1.2 方法

1.2.1 重组 PCR 反应: 分别以 pZHR3 为模板, 以 PCNXho + PCC₁₁₁ 和 PCN_{Δ111-190} + pAS-PCCBam 为引物, 建立 PCR 反应体系, 反应条件为: 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s (30 个循环), 72℃ 8 min. 反应结束后, 将这两组反应产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 切下目的片段, 用琼脂糖回收试剂盒纯化; 再从纯化产物中各取 1 μl, 作为模板, 建立 PCR 反应体系, 按以下的条件进行 PCR 反应: 94℃ 4 min, 94℃ 30 s, 40℃ 30 s, 72℃ 30 s (5 个循环), 94℃ 30 s, 40℃ 30 s, 72℃ 30 s (25 个循环), 72℃ 8 min.

1.2.2 常规 PCR 反应和重组质粒构建: 参见文献 [3], PCR 产物回收后, 与质粒 pEGFP-C1 和 pSos 分别用合适的限制酶消化, 经连接、转化、阳性重组子筛选、测序正确后分别得到重组质粒

pEGFPC1-PC1₁₋₄₆、 pEGFPC1-PC1₁₋₁₂₅、 pEGFPC1-PC1₄₇₋₂₂₄、 pEGFPC1-PC1₁₁₂₋₁₈₀、 pEGFPC1-PC1₁₁₂₋₁₉₀、 pEGFPC1-PC1₁₁₂₋₂₂₄、 pEGFPC1-PC1₁₃₈₋₂₂₄、 pEGFPC1-PC1、 pEGFPC1-PC1_{Δ111-190}、 pSos-PC1₁₋₄₆、 pSos-PC1₁₋₁₂₅、 pSos-PC1₁₋₁₆₀、 pSos-PC1₁₋₁₈₀、 pSos-PC1₁₋₁₉₀、 pSos-PC1₄₇₋₂₂₄、 pSos-PC1₁₁₂₋₁₉₀、 pSos-PC1.

1.2.3 转染之前 DNA 的处理、用脂质体介导 DNA 转染细胞: 按 Gibco/BRL 公司提供的试剂盒说明书进行.

1.2.4 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白在细胞内的分布: 将转染后的人前列腺癌 C4-2 细胞先用冰冷的 1 × PBS 洗 3 次, 再用 3% 的福尔马林固定 20 min, 1 × PBS 洗 3 次, 荧光显微镜下观察并照相.

1.2.5 酵母细胞的培养、转化 (LiAC 介导): 参见 STRATAGENE 公司酵母双杂交系统使用操作指南进行.

1.2.6 酵母细胞的表型鉴定: a. 营养表型鉴定. 在 YPDA 平板上划线培养 cdc25Hα 细胞, 从平板上挑取菌落, 分别划线于 SD/glucose (-Ura)、SD/glucose (-Leu)、YPDA 营养琼脂平板, 室温或 37℃ 培养, 连续 4 天观察细胞的生长状况. b. 温度表型鉴定. 同时在两块 YPDA 平板上划线培养 cdc25Hα 细胞, 分别于室温和 37℃ 培养, 连续 4 天观察细胞的生长状况.

2 结 果

2.1 PC-1 分子不同区段在细胞内的定位

2.1.1 重组质粒 pEGFP-PC1₁₋₂₂₄、 pEGFP-PC1_{Δ112-190}、 pEGFP-PC1₁₁₂₋₁₈₀、 pEGFP-PC1₁₁₂₋₁₉₀、 pEGFP-PC1₁₃₈₋₂₂₄、 pEGFP-PC1₁₁₂₋₂₂₄、 pEGFP-PC1₁₋₁₂₅、

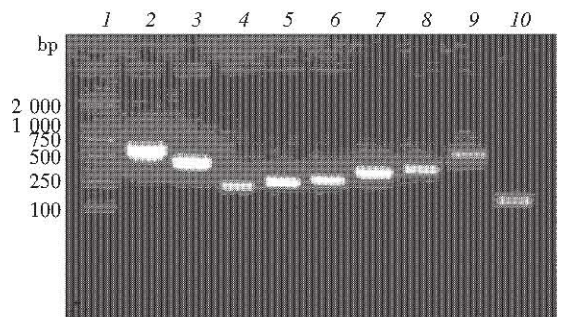


Fig. 2 PCR identification of recombinant plasmids

1: DNA marker; 2: pEGFP-PC1; 3: pEGFP-PC1_{Δ112-190}; 4: pEGFP-PC1₁₁₂₋₁₈₀; 5: pEGFP-PC1₁₁₂₋₁₉₀; 6: pEGFP-PC1₁₃₈₋₂₂₄; 7: pEGFP-PC1₁₁₂₋₂₂₄; 8: pEGFP-PC1₁₋₁₂₅; 9: pEGFP-PC1₄₇₋₂₂₄; 10: pEGFP-PC1₁₋₄₆.

pEGFP-PC1_{47~224}、pEGFP-PC1_{1~46} 的构建: 经 PCR 鉴定 (图 2) 和序列测定, 结果表明 PC-1 第 1 ~ 224、 Δ 112 ~ 190、112 ~ 180、112 ~ 190、138 ~ 224、112 ~ 224、1 ~ 125、47 ~ 224、1 ~ 46 各氨基酸区段的 cDNA 分别正确克隆入 pEGFP-C1 表达载

体中, 而且和 EGFP cDNA 正确融合.

2.1.2 荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白分布确定 PC-1 不同区段在细胞内的定位: 将上述不同的重组质粒分别转染人前列腺癌 C4-2 细胞, 36 h 后于荧光显微镜下观察并照相, 结果见表 1 和图 3.

Table 1 The subcellular localization of various PC-1 regions fused with EGFP

Order	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Various PC-1 region	1 ~ 46	47 ~ 224	1 ~ 125	112 ~ 224	138 ~ 224	112 ~ 180	112 ~ 190	Δ 112 ~ 138	Δ 112 ~ 190
Subcellular localization	Cytoplasm and nucleus	Nucleus	Cytoplasm and nucleus	Cytoplasm	Cytoplasm and nucleus	Cytoplasm and nucleus	Cytoplasm, dotted distribution	Cytoplasm and nucleus	Nucleus

含 PC-1 1 ~ 46、1 ~ 125、138 ~ 224、112 ~ 180 区段的融合蛋白在 C4-2 细胞的胞质、胞核发出均一的绿色荧光, 分辨不出核质的界限 (图 3a, c,

h, i); 而 47 ~ 224、112 ~ 224、1 ~ 224 (图 3b, d, k) 和 112 ~ 190 区段 (图 e, f, g) 胞质中可见到明显绿色荧光, 胞核则呈空泡状, 没有绿色荧

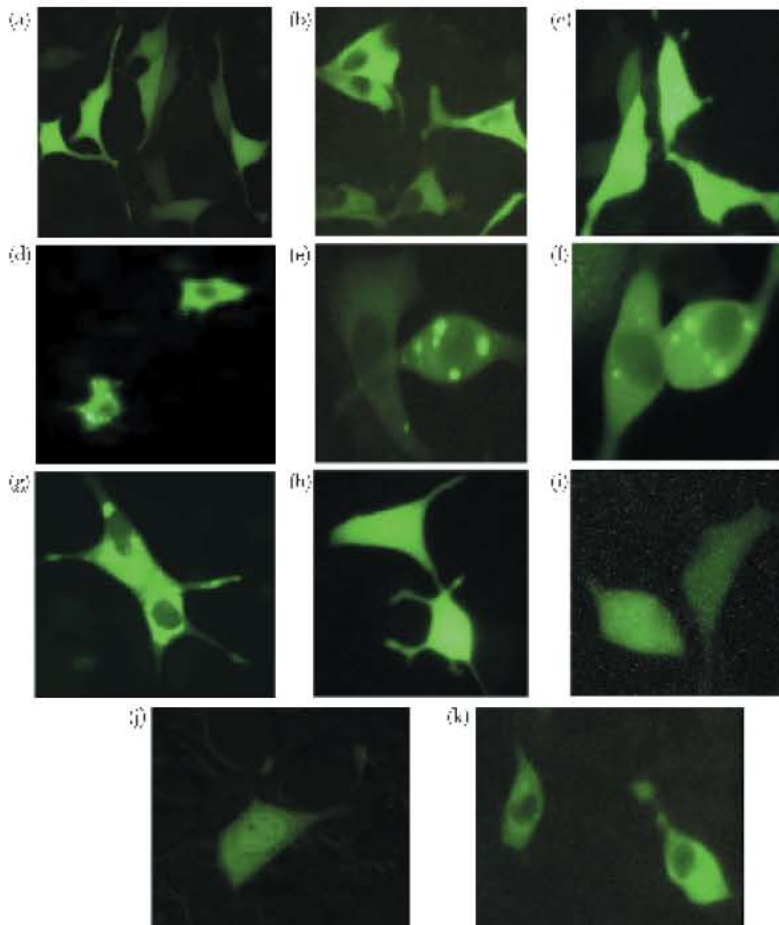


Fig. 3 Subcellular localization of different PC-1 regions fused with EGFP

(a) pEGFP-PC1₁₋₄₆; (b) pEGFP-PC1₄₇₋₂₂₄; (c) pEGFP-PC1₁₋₁₂₅; (d) pEGFP-PC1₁₁₂₋₂₂₄; (e, f, g) pEGFP-PC1₁₁₂₋₁₉₀; (h) pEGFP-PC1₁₃₈₋₂₂₄; (i) pEGFP-PC1₁₁₂₋₁₈₀; (j) pEGFP-PC _{Δ 112-190}; (k) pEGFP-PC1.

光出现, 有意思的是转染 112 ~ 190 区段细胞的细胞质中有许多荧光浓集的点状结构; 而 112 ~ 190 缺失区段 (Δ112 ~ 190) 则在细胞核中有浓集现象 (图 3j)。

图 3a, b 结果说明除去 N 端 46 个氨基酸以外的 C 端序列可能是导致 PC-1 分子不能入核的原因, 这也可能是 PC-1 全长分子和第 1 ~ 46 区与转录激活活性差别的原因。图 3c 和 d 说明 PC-1 分子不能入核的原因是亮氨酸拉链结构以外的 C 端序列引起的; 图 e, f, g 进一步将决定 PC-1 分子不能入核的序列集中至第 112 ~ 190 位氨基酸区域。在图 3h 中, 运用重组 PCR 方法将第 112 ~ 190 位

氨基酸区域删除, 余下部分则在细胞核中有浓集现象, 进一步验证了这一结论。

2.2 PC-1 分子在细胞膜上的定位

2.2.1 酵母细胞株 cdc25Hα 生长表型的鉴定: 酵母细胞株 cdc25Hα 的表型鉴定结果见表 2, 在 25℃ 情况下, 该细胞在完全培养基 YPDA 中正常生长, 在尿嘧啶和亮氨酸缺陷型的培养基中不生长, 说明在该细胞中参与合成尿嘧啶和亮氨酸的相关基因发生了突变。该细胞在完全培养基中, 25℃ 情况下生长, 在 37℃ 条件下不生长, 这是由于酵母细胞中 CDC25H 基因发生温度敏感型突变所致, 表明该细胞适合用于 PC-1 分子在细胞内的定位研究。

Table 2 Identification of the phenotype of yeast cell line

Culture condition	25℃		37℃	
	SD/glucose (-Ura)	SD/glucose (-Leu)	YPDA	YPDA
Growth phenotype	-	-	+	-

“+”: means growth; “-”: means no growth.

2.2.2 重组质粒 pSos-PC1、pSos-PC1₁₋₄₆、pSos-PC1₄₇₋₂₂₄、pSos-PC1₁₋₁₂₅、pSos-PC1₁₋₁₆₀、pSos-PC1₁₋₁₈₀、pSos-PC1₁₁₂₋₁₉₀、pSos-PC1₁₋₁₉₀ 的构建: 经 PCR 鉴定 (图 4) 和序列测定, 结果表明 PC-1 第 1 ~ 46、47 ~ 224、1 ~ 125、1 ~ 160、1 ~ 180、1 ~ 190、112 ~ 190 各氨基酸区段的 cDNA 分别正确克隆入 pSos 表达载体中。

件下, 转化 1 ~ 46、1 ~ 125、1 ~ 160、1 ~ 180 PC-1 区段的 cdc25Hα 细胞在 37℃ 不能生长, 转化 47 ~ 224、1 ~ 190、112 ~ 190、1 ~ 224 区段的细胞则能够生长。第 1 组结果表明 PC-1 分子能够定位于细胞膜上; 第 1 组和第 2 组表明第 46 个氨基酸 C 端的序列将该分子定位于细胞膜上; 第 4、5、6、7 组进一步将决定 PC-1 细胞膜定位的序列集中至第 112 ~ 190 氨基酸区域, 这一结果和该区域将 PC-1 分子滞留于细胞质中结果类似。

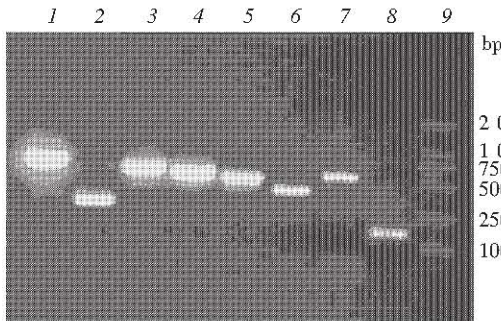


Fig. 4 PCR identification of recombinant plasmids

1: pSos-PC1; 2: pSos-PC1₁₁₂₋₁₉₀; 3: pSos-PC1₁₋₁₉₀; 4: pSos-PC1₁₋₁₈₀; 5: pSos-PC1₁₋₁₆₀; 6: pSos-PC1₁₋₁₂₅; 7: pSos-PC1₄₇₋₂₂₄; 8: pSos-PC1₁₋₄₆; 9: DNA marker.

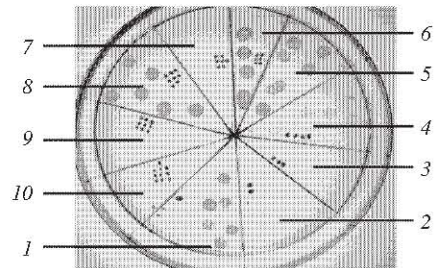


Fig. 5 The growth of cdc25Hα cell line transferred with different plasmids at 37℃

1: pSos -PC1; 2: pSos-PC1₁₋₄₆; 3: pSos-PC1₁₋₁₂₅; 4: pSos-MAFB; 5: pSos-PC1₄₇₋₂₂₄; 6: pSos-PC1₁₁₂₋₁₉₀; 7: pSos-PC1₁₋₁₆₀; 8: pSos-PC1₁₋₁₉₀; 9: pSos-PC1₁₋₁₈₀; 10: PSos.

2.2.3 PC-1 不同区段对 cdc25Hα 生长表型的影响: 将编码 PC-1 不同区段的系列重组质粒转化 cdc25Hα 细胞。从图 5 和表 3 可以看出, 在 37℃ 条

Table 3 The influence of various PC-1 regions on the growth of cdc25H α cell

Order	1	2	3	4	5	6	7	8
Various PC-1 region	1 ~ 224	1 ~ 46	1 ~ 125	47 ~ 224	112 ~ 190	1 ~ 160	1 ~ 190	1 ~ 180
Growth at 37°C	+	-	+	+	+	-	+	-

“+” means growth, “-” means no growth.

3 讨 论

为了找出决定 PC-1 细胞定位的序列, 我们将 PC-1 不同区段. 1 ~ 46、47 ~ 224、1 ~ 125、112 ~ 224、138 ~ 224、112 ~ 190、112 ~ 180 分别与 EGFP 融合表达, 观察它们在细胞内的定位情况, 以寻找决定其细胞定位的结构区域. 研究结果将决定 PC-1 分子不能入核的序列集中至第 112 ~ 190 氨基酸区域. 该区域无论是 N 端或是 C 端减少一定数量的氨基酸, 都会使其不能入核的现象消失, 这说明该区段是一完整的功能区段, 是它将 PC-1 分子滞留于细胞质中. 另外, 有意思的是, 该区段在细胞质中聚集成点状, 这些点状分布和细胞质中什么结构有联系值得进一步研究.

通过蛋白质分子保守性位点分析, 发现在 PC-1 分子内部具有与细胞定位相关的两类序列: 第 105 ~ 111 位氨基酸具有一段与蛋白质出核序列非常相似的序列 LAEIKRKLGI^[4], 另外, 还存在 5 个豆蔻酰基化位点 (分别位于第 21、47、147、158、190 位氨基酸).

出核分子 CRM1 通过和许多分子中的出核序列结合, 将它们转运出细胞核, Leptomycin 为 CRM1 分子的抑制剂, 能够抑制其介导的出核过程^[4]. 我们曾在转染 pEGFP-PC1 C4-2 细胞的培养液中, 加入了 CRM1 分子的抑制剂 Leptomycin, 但没有改变 PC-1 分子在细胞内的分布情况, 说明这段出核序列并非是 PC-1 分子不能入核的原因 (结果未示).

运用 Stratagene 公司开发的以 SOS 恢复系统为基础的酵母双杂交系统, 我们分别将编码 PC-1 分子不同区段的 cDNA 分别克隆至载体 pSos 中, 观察这些不同区段在 37°C 对 cdc25H 表型的影响. 结果进一步将决定 PC-1 细胞膜定位的序列集中至第 112 ~ 190 氨基酸区域, 这一结果和该区域将 PC-1 分子滞留于细胞质中的结果符合, 该区域细胞膜的锚定作用可能也是 PC-1 分子不能入核的一个重要原因. 该区段在细胞质中呈现点状分布, 是否是因为 PC-1 分子附着于其他细胞内的膜结构有待于进

一步研究. 还要指出的是, 通过蛋白质保守性序列查询, PC-1 分子共有 5 个豆蔻酰基化位点, 在 112 ~ 190 氨基酸区域仅有两个位点, 第 1 ~ 125 区域也有两个, 但不能发挥膜定位作用. 第 180 ~ 190 区域没有这一位点, 但 1 ~ 180 区域不能定位于细胞膜上, 而 1 ~ 190 区域则可以定位于细胞膜上, 这说明豆蔻酰基化位点周围的序列会影响其功能的发挥, 这也许是通过影响蛋白质分子的空间构型引起的.

在细胞定位方面的研究是出于以下考虑: a. 蛋白质在细胞内的定位不是固定不变的, 而是受到蛋白质间的相互作用、翻译后修饰等外部因素的影响和调节, 在生长发育的不同阶段, 在细胞周期的各个期相, 蛋白质分子在细胞内的定位都可能发生改变. 越来越多的研究表明, 许多蛋白质分子在合成之后, 先是被动潜伏于发挥活性之外的区域, 在外界条件的诱导下, 它在细胞内的定位发生改变, 转位至其效应部位并发挥特定的生物功能. 一旦信号消失, 又会离开效应部位, 处于无活性状态^[5,6]. PC-1 分子具有转录激活作用, 但却不能够进入细胞核, 推测也许在一定的生理、病理条件下, 该分子可以像其他膜结合的转录因子一样^[7], 通过一定的途径转位进入细胞核进而激活特定的基因转录. 但目前我们还没有发现这一途径, 这也是我们以后关注的一个方面. b. 某些决定蛋白质定位的序列, 可以作为基础研究和药物设计的靶点. c. 从分子进化方面讲, 许多新的保守性功能结构域的发现, 都是由研究某个序列的功能, 再推广到其他分子中相似序列的功能而确定的, 比如核定位序列、磷酸化位点等, 考虑到 PC-1 分子有 5 个同源性很高的蛋白质分子, 我们可以通过研究这些分子以及其他具有相似序列分子的细胞定位, 确定 PC-1 分子 112 ~ 190 氨基酸区域在分子进化中的意义.

参 考 文 献

- 1 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
- 2 Resh M D. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. Biochim Biophys Acta, 1999, **1451** (1): 1 ~ 16
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 34 ~ 48
- 4 Fukuda M, Asano S, Nakamura T, *et al.* CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by nuclear export signal. Nature, 1997, **390** (6657): 308 ~ 311
- 5 Imada K, Leonard W J. The Jak-STAT pathway. Mol Immunol, 2000, **37** (1 ~ 2): 1 ~ 11
- 6 Reich N C. Nuclear/cytoplasmic localization of IRFs in response to viral infection or interferon stimulation. J Interferon and Cytokine Research, 2002, **22** (1): 103 ~ 109
- 7 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

Further Study on The Localization of PC-1 *

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

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

Abstract In order to search for the sequence that affects the entering of PC-1 into cell nucleus, different part of PC-1 cDNA were fused to that of EGFP. Through the observation of the distribution of green fluorescence in the cell, the region between 112 ~ 190 amino acids was identified as independent functional domain which excluded PC-1 from cell nucleus and there appeared many dotted structure in the cell cytoplasm. The other part of PC-1 could accumulated in the nucleus when this region was deleted. Simultaneously, PC-1 was also found to attach to the cell membrane by the yeast two-hybrid system based on the SOS recovery system, what is more, the region between 112 ~ 190 amino acids was identified as independent domain responsible for its cell membrane anchoring.

Key words PC-1, subcellular localization, cell membrane localization

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30070296) and State 863 High Technology R&D Project of China (2002AA223061).

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

Received: August 26, 2003 Accepted: September 28, 2003