

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0931-04

• 实验研究 •

## Daxx与雄激素受体结合的功能片段筛选

庾勤慧, 徐桂娜, 郭琰, 朱炳阳, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] Fas死亡结构域相关蛋白; 雄激素受体; GST PullDown

[摘要] 目的 体外筛选出能与雄激素受体具有相互作用的 Daxx 结构域。方法 应用聚合酶链反应扩增 Daxx 四个不同功能结构域, 分别连接到带有 GST 标记的原核表达质粒 pGEX-6p-1 中, 构建 Daxx 四个功能结构域的原核表达载体。经测序鉴定转化 E Coli BL21DE3 菌株, 经氨苄青霉素筛选并扩增阳性克隆, 用 IPTG 诱导蛋白表达后纯化蛋白, 采用 GST pull-down 体外筛选出与雄激素受体具有相互作用的 Daxx 功能结构域。结果 Daxx 不同功能结构域的原核表达载体 pGEX-6p-1/Daxx/DM 1-240、pGEX-6p-1/Daxx/DM 241-501、pGEX-6p-1/Daxx/DM 502-625 和 pGEX-6p-1/Daxx/DM 626-740 经琼脂糖凝胶电泳和 DNA 测序分析, 证实插入质粒的片段大小正确, 无读码框移位和突变。IPTG 诱导后蛋白表达具有明显差异性, 表达蛋白与预期表达蛋白质分子量大小相当。纯化蛋白进行 GST pull-down 实验结果显示 Daxx 与雄激素受体具有相互作用。结论 Daxx 通过第 626-740 位氨基酸序列与雄激素受体相互结合。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Selection of the Daxx Domain Interacting with Androgen Receptor

TUO Qin-Hui, XU Gui-Na, GUO Yan, ZHU Bing-Yang, and LIAO Duan-Fang

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Daxx, Androgen Receptor, GST PullDown

[ABSTRACT] **Aim** To select the functional domain of Daxx which can interact with androgen receptor (AR).

**Methods** Four functional domains of Daxx were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and subcloned to a prokaryotic expression vector (pGEX-6p-1) respectively. The recombinant DNA fragments were identified by DNA sequencing. All recombinant vectors were stably transformed into E Coli BL21DE3 and induced by IPTG. Four recombinant peptides were detected to interact with AR by using GST pull-down in vitro respectively. **Results** The results of pGEX-6p-1/Daxx/DM 1-240, pGEX-6p-1/Daxx/DM 241-501, pGEX-6p-1/Daxx/DM 502-625 and pGEX-6p-1/Daxx/DM 626-740 from DNA sequencing indicates that there is no reading frame shifts and mutations in recombinant. The protein expressed from pGEX-6p-1/Daxx/DM 626-740 can interact with AR by using GST pull-down in vitro. **Conclusion**

The 626th to 740th in amino acid of Daxx can combine AR.

Fas死亡结构域相关蛋白 (Fas death domain-associated protein, Daxx) 是 90 年代末期发现的定位于细胞核 POD 的蛋白质家族中的新成员<sup>[1]</sup>。Daxx 可与雄激素受体 (AR) 蛋白的氨基末端和 DNA 结合域相互作用, 抑制该蛋白的转录活性<sup>[2]</sup>。雄激素 /AR 相互作用能够影响肿瘤细胞和体内正常的雄激素靶组织的脂肪生成基因的表达, 也能促进胆固醇调节元件结合蛋白 (sterol regulatory element binding proteins, SREBP) 活化与胆固醇合成<sup>[3]</sup>。如果寻找能与 AR 特异性结合的 Daxx 功能片段, 调节胆固醇代谢,

利于开发新的调脂药。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验材料

E Coli DH5 $\alpha$ 、E Coli BL21DE3 菌株为本研究所保存; pGEX-6P-1 由本校微生物研究所赠送; 2 $\times$  Taq PCR MasterMix 质粒小量制备试剂盒 (离心柱型)、1 kbp DNA Marker 购自上海天根公司; DNA 回收试剂盒、连接试剂盒购自 Fermentas 公司; GST pull-down 试剂盒购自 PIERCE 公司; BamH I, Sal I, Xho I 限制性内切酶购自美国 MBI 公司; 人雄激素受体蛋白购自 Raybio 公司; 人雄激素受体一抗购自 Santa Cruz 公司; 引物由上海生物工程技术有限公司合成; 其它试剂均为国产分析纯。

#### 1.2 细胞培养

冻存的肝 HepG2 细胞<sup>[4]</sup>, 复苏后用含有 10% 新

[收稿日期] 2010-10-15 [修回日期] 2010-11-08

[基金项目] 国家自然科学基金 (30971170, 30971267, 30600249) 资助; 湖南省教育厅优秀青年项目 (09B089)

[作者简介] 庾勤慧, 博士, 副教授, 主要研究方向为心血管药理学, Email 为 qhtu@yaho.com.cn 通讯作者廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管药理学, Email 为 dfliao66@yahoo.com.cn

生牛血清的 RPM I 1640 培养基孵育,同时加入 100 U/L 链霉素和 100 U/L 青霉素,在 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

### 1.3 RT-PCR 扩增 D<sub>axx</sub> 不同片段

肝 HepG2 细胞总 RNA 应用 Trizol 提取。取 3 μg 总 mRNA,按逆转录试剂盒说明逆转录合成 cDNA。参照文献 [5] 设计 D<sub>axx</sub> 功能片段: DM 1-240 上游引物为 TAA TGG ATC CAT GGC CAC CGC TAA CAG CAT CAT C, DM 1-240 下游引物为 TAA TGT CGA CCA GCT CAC ATA GTC GCC CAA AGA G, DM 241-501 上游引物为 TAA TGG ATC CAA AGA CTG CTC TTC ACT GAC C, DM 241-501 下游引物为 TAA TGT CGA CTA GTG AGG ACA TGG GGC TCT T, DM 502-625 上游引物为 TAA TGG ATC CGA ACC TGG AAC CTG GCA AAC A, DM 502-625 下游引物为 TAA TGT CGA CAT CTC CCC AGT TGT GAG GA, DM 626-740 上游引物为 CTT GGA TCC GGT CCC CCC TGC AAA AAA T, DM 626-740 下游引物为 TTC GTC GAC CTA ATC AGA GTC TGA GAG CA。DM 1-240、DM 241-501 及 DM 502-625 片段 PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 45 s, 66°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 30 个循环,最后 72°C 终延伸 10 min; DM 626-740 片段 PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 45 s, 68°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 30 个循环,最后 72°C 终延伸 10 min。2.5 μL DNA 样品中加入 1 μL 6× 上样缓冲液,以 5V/cm 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,紫外灯下观察结果并用凝胶成像系统照相保存。

### 1.4 pGEX-6P-1 重组质粒构建与鉴定

在紫外灯下切下含 PCR 产物的琼脂糖凝胶、溶解、回收和纯化。再与 pGEX-6P-1 质粒重组后转化 E Coli BL21 DE3 感受态细胞,涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上,37°C 生化培养箱正置培养 30 min 后,倒置培养 12~16 h 菌落长出即取出并封口于 4°C 保存。挑取经酶切初步证实插入正确的单克隆菌落,将阳性菌液 1.5 mL 寄上海生物工程有限公司和北京诺赛基因公司进行 DNA 序列测定。测序后结果与 GeneBank 登录的序列做 BLAST 同源性分析。

### 1.5 诱导 GST 融合蛋白表达

按 1:100 比例接种 E Coli BL21 DE3 菌株于含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 液体培养基中,过夜培养 12~16 h 取过夜培养菌按 1:100 比例接种 E Coli BL21 DE3 菌株于含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 液体培养基中,培养 4 h 加入终浓度为 100

mg/L IPTG 诱导 4 h。离心收集细菌,加入 1× 蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min,最高速离心 15 min,取上清进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.6 GST pull-down 筛选

取 1~3 μg GST 标签蛋白和 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 1-240、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 241-501、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 502-625、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 626-740 的 GST 融合蛋白分别与 2 μg AR 蛋白混合,各置于 Eppendorf 管中。每管加入 800 μL 结合缓冲液,充分混匀后于 4°C 上下颠倒混匀 2 h。加入用 1× PBS 活化好的 50% 谷胱甘肽琼脂糖 4B 凝胶珠 50 μL,置于 4°C 再上下颠倒混匀 2 h。4°C、500 g 离心 5 min,去上清,沉淀下来的凝胶珠用结合缓冲液重悬,4°C 混匀洗涤 3 min,500 g 离心 5 min,去上清。再重复洗涤 3 次,最后用 20 μL 上样缓冲液重悬。100°C 加热 5 min 后进行 SDS-PAGE 分析。

### 1.7 统计学方法

所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较用单因素方差分析,多重比较用 LSD-t 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 D<sub>axx</sub> 四个不同功能结构域原核表达载体的构建与鉴定

2.1.1 pGEX-6P-1/D<sub>axx</sub> 的构建图示 pGEX-6P-1 为原核表达载体,由 tac 启动子启动,受 lac 阻抑物调控,在 lac 阻抑物高水平表达的 lacIq 大肠杆菌菌株中,其转录可被抑制,加入 IPTG 可诱导其表达。pGEX-6P-1 下游无终止密码子,其表达的蛋白为带有 GST 标签的融合蛋白。D<sub>axx</sub> 的四个功能结构域的 PCR 产物经 BamH I 和 Sal I 双酶切后,连接至原核表达载体 pGEX-6p-1 中 (图 1)。

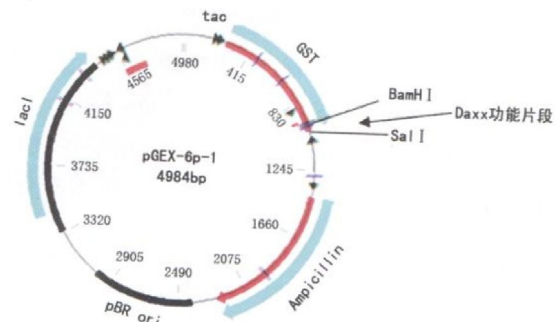


图 1 原核表达载体的构建示意图

### 2.1.2 DNA 测序鉴定 随机各挑取一个单克隆

经 PCR 和双酶切的初步鉴定后进行 DNA 测序, 进一步确定插入片段是否存在突变及插入片段的阅读框是否正确。结果显示, 插入片段的阅读框正确 (没有读码框移位)、没有移码突变 (图 2)。全部测

序结果经与 GeneBank 上登录序列进行 BLAST 同源性比较, 因 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 241-501 存在同义突变, 其同源性为 99%, 其余片段同源性为 100%, 与来源片段一致。

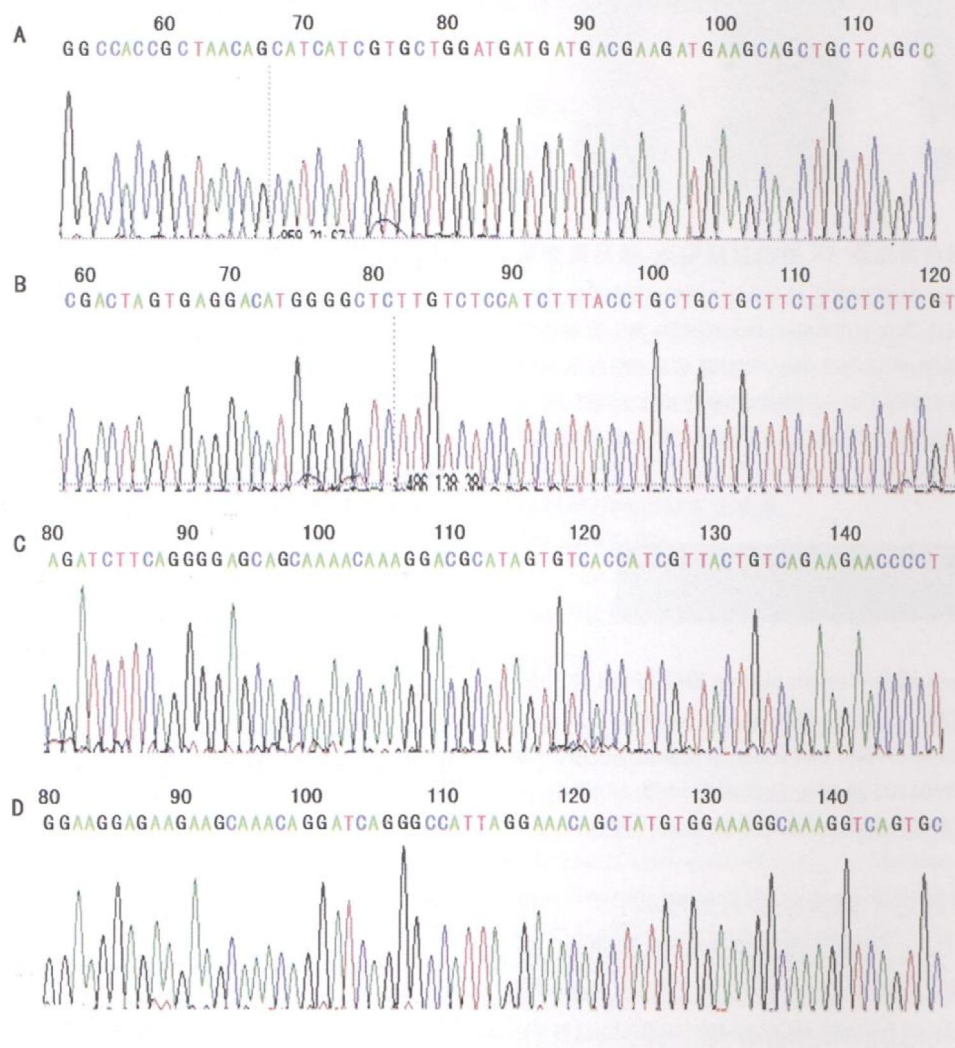


图 2 D<sub>axx</sub>四个不同功能结构域突变体重组子测序结果 (只显示部分) A 为 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 1-240, B 为 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 241-501, C 为 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 502-625, D 为 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 626-740。

## 2.2 诱导后 D<sub>axx</sub>功能蛋白的表达

四个原核表达载体分别转化表达菌株 E Coli BL21DE3, 经浓度为 100 mg/L IPTG 诱导 4 h 后表达各自 GST 融合蛋白。GST 标签蛋白、各 GST 融合蛋白及 AR 蛋白未经 GST pull-down 筛选直接进行 SDS-PAGE 分析、考马斯亮蓝染色, 显示均有表达 (图 3)。

## 2.3 D<sub>axx</sub>功能蛋白在体外与 AR 结合

取 GST 标签蛋白和 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 1-240、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 241-501、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 502-625、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 626-740 表达的 GST 融合蛋白分别与 AR 蛋白混合, 并用 50% 的谷胱甘肽-琼脂糖 4B 凝胶珠结合, 经洗脱缓冲液

洗涤后, 用洗脱液洗脱。各洗脱液为样本进行 SDS-PAGE 分析, 用 antiAR 抗体进行 Western blotting 检测。在图 4 的第 4 泳道出现 AR 条带, 在第 1、2、3 及 5 泳道中均未出现 AR 条带, 说明 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 626-740 表达的 GST 融合蛋白与 AR 具有相互作用, 而 pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 1-240、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 241-501、pGEX-6p-1/D<sub>axx</sub>/DM 502-625 表达的 GST 融合蛋白和 GST 标签蛋白与 AR 均无相互作用。

## 3 讨论

D<sub>axx</sub> 是 90 年代末期发现的蛋白质家族中的新成员。最初发现它是一种 Fas 受体胞浆死亡结构域

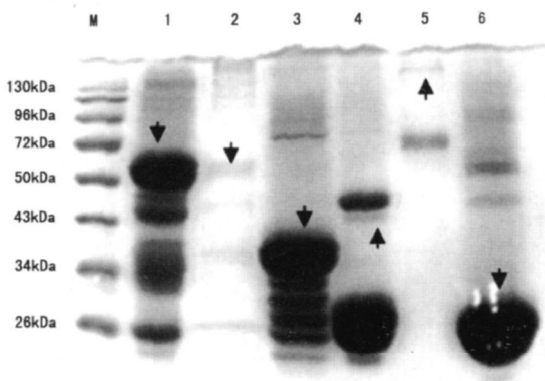


图3. GST、GST融合蛋白及AR蛋白直接电泳、考马斯亮蓝染色 M为Marker, Lane 1为含pGEX-6p-1/Daxx/DM1-240重组体的菌体蛋白; Lane 2为含pGEX-6p-1/Daxx/DM241-501重组体的菌体蛋白; Lane 3为含pGEX-6p-1/Daxx/DM502-625重组体的菌体蛋白; Lane 4为含pGEX-6p-1/Daxx/DM626-740重组体的菌体蛋白; Lane 5为AR蛋白,分子量130 kDa; Lane 6为含GST标签蛋白的菌体蛋白。

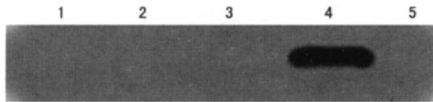


图4. GST-pull down结合Western blotting检测与AR体外结合的Daxx功能区域 1为pGEX-6p-1/Daxx/DM1-240重组蛋白洗脱液, 2为pGEX-6p-1/Daxx/DM241-501重组蛋白洗脱液, 3为pGEX-6p-1/Daxx/DM502-625重组蛋白洗脱液, 4为pGEX-6p-1/Daxx/DM626-740重组蛋白洗脱液, 5为GST标签蛋白洗脱液。

结合蛋白, 可以通过不同途径参与细胞凋亡<sup>[6]</sup>。我们实验室发现Daxx介导巨噬细胞和肝细胞凋亡, 都与调节细胞内胆固醇含量有关<sup>[4, 7, 8]</sup>。并且Daxx能与调节胆固醇代谢的AR相互作用<sup>[3]</sup>, 但与AR作用的Daxx功能片段未曾有研究。

文献[1, 5]报道hDaxx有四个功能结构域, 本研究对Daxx的四个功能结构域分别设计引物, 采用PCR扩增这四个区域, 再用BamHiv和Saliv双酶切, 然后连接至原核表达载体pGEX-6p-1中。四个原核表达载体pGEX-6p-1/Daxx/DM1-240、pGEX-6p-1/Daxx/DM241-501、pGEX-6p-1/Daxx/DM502-625、pGEX-6p-1/Daxx/DM626-740进行DNA测序验证正确并与GeneBank上登录序列进行BLAST同源性分析, 结果发现pGEX-6p-1/Daxx/DM1-240、pGEX-6p-1/Daxx/DM502-625、pGEX-6p-1/Daxx/DM626-740同源性均为100%, pGEX-6p-1/Daxx/DM241-501因存在一个同义突变, 其同源性为99%, 说明Daxx四个功能结构域的原核表达载体构

建成功。

四个原核表达载体分别转化表达菌株E Coli BL21DE3并经诱导表达各自GST融合蛋白。GST标签蛋白的分子量约为26 kDa根据我们的估测, GST融合蛋白分子量以氨基酸数乘以110再加上GST标签蛋白的分子量来估算, 则最终的蛋白表达结果pGEX-6p-1/Daxx/DM1-240应该在52 kDa, pGEX-6p-1/Daxx/DM241-501应该在54 kDa, pGEX-6p-1/Daxx/DM502-625应该在40 kDa, pGEX-6p-1/Daxx/DM626-740应该在39 kDa处有最终蛋白表达条带出现。提取蛋白经SDS-PAGE鉴定, 分别在52 kDa, 54 kDa, 40 kDa, 39 kDa处均观察到有蛋白的差异表达, 与预测表达的蛋白分子量相当。通过亲和层析可获得高纯度的融合蛋白, 并进一步进行GST pull-down实验, 结果发现pGEX-6p-1/Daxx/DM626-740表达的GST融合蛋白与AR具有相互作用, 说明在细胞外Daxx第626~740位氨基酸区域与AR能相互结合。

Daxx第626~740位氨基酸序列与AR相互作用后是否降低HepG2细胞内胆固醇, 是我们下一步工作计划。本研究创新之处在于首次证实Daxx的羧基末端第626~740位氨基酸区域能够与AR相互作用, 为下一步Daxx功能片段的研究以及药物开发提供了实验依据。

#### [参考文献]

- [1] Yang X, KhosraviFar R, Chang HY, et al. Daxx: a novel Fas binding protein that activates NK and apoptosis[J]. *Cell* 1997; **89** (7): 10 672-761.
- [2] Mizuta H, Kuroda Y. Cloning and functional characterization of a rat Daxx that functions as a corepressor for the androgen receptor[J]. *Cell Biol Int* 2004; **28** (8-9): 609-614.
- [3] Heemers H, Vanderhoydonc F, Roskams T, et al. Androgens stimulate coordinated lipogenic gene expression in normal target tissues in vivo[J]. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **205** (1-2): 21-31.
- [4] Tuo QH, Xiong GZ, Zhu PY, et al. The effect of overexpressed Daxx in liver tumor cells on the apoptosis induced by oxidative stress[J]. *Progress in Biochem Biophys* 2008; **35** (11): 1 270-275.
- [5] Emelyanov AV, Kovac CR, Sepulveda MA, et al. The interaction of Pax5 (BSAP) with Daxx can result in transcriptional activation in B cells[J]. *J Biol Chem*, 2002; **277** (13): 11 156-164.
- [6] 苏波, 万艳平, 廖端芳. 细胞凋亡通路及转录调控中的Daxx[J]. *中国病理生理杂志*, 2005; **21** (3): 617-620.
- [7] Su B, Yang YR, Tuo QH, et al. Antiapoptotic effects of probucol are associated with downregulation of Daxx expression in THP-1 macrophage[J]. *Cardiovasc Drugs Ther* 2007; **21** (1): 37-45.
- [8] 贺庆芝, 庾勤慧, 曾怀才, 等. Daxx通过上调Caveolin-1的表达介导ox-LDL诱导巨噬细胞胆固醇蓄积和凋亡[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010; **37** (8): 881-890.

(此文编辑 文玉珊)