

新基因 FAM92A1 - 289 与增殖细胞核抗原 PCNA 相互作用的验证

桂 卉 郭兴荣 方 娟 沈君豪 阮绪芝

摘 要 **目的** 利用免疫共沉淀技术验证未知蛋白 FAM92A1 - 289 和 PCNA (增殖细胞核抗原) 之间的相互作用。方法构建带有嘌呤霉素抗性的载体 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 和真核表达载体 PCDNA3.1 - PCNA, 先将 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 载体转染入 HeLa 细胞, 通过最合适浓度的嘌呤霉素筛选, 得到稳定表达 FAM92A1 - 289 的 HeLa/FAM92A1 - 289 细胞, 再将载体 PCDNA3.1 - PCNA 转染入 HeLa/FAM92A1 - 289 细胞, 利用免疫共沉淀来验证 FAM92A1 - 289 和 PCNA 之间的相互作用。**结果** 构建的重组表达载体经双酶切、测序鉴定正确, 稳定表达株 HeLa/FAM92A1 - 289 细胞构建成功, PCNA 单克隆抗体沉淀蛋白复合物后, 用 GFP 抗体进行 Western blot 法检测, 检测出了 GFP - FAM92A1 - 289 蛋白。**结论** 免疫共沉淀证明了 FAM92A1 - 289 和 PCNA 之间存在相互作用。

关键词 FAM92A1 - 289 PCNA 免疫共沉淀 相互作用

中图分类号 R737.33; Q2 - 33

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.03.014

Identification of Interaction Between New Gene FAM92A1 - 289 and Proliferating Cell Nuclear Antigen PCNA. Gui Hui, Guo Xingrong, Fang Juan, et al. Department of Pathophysiology, Basic Medical College, Wuhan University, Hubei 430072, China

Abstract **Objective** To explore the interactions between the unknown protein FAM92A1 - 289 and PCNA by co - immunoprecipitation methods. **Methods** We recombinant vector CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 and eukaryotic expression vector PCDNA3.1 - PCNA. First of all, the vector CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 was transfected into HeLa cells. By puromycin screening, the stably - transfected HeLa/FAM92A1 - 289 cells showed that overexpression of FAM92A1 - 289 were obtained. Then the vector PCDNA3.1 - PCNA was transfected into HeLa/FAM92A1 - 289 cells. Explore the interactions between FAM92A1 - 289 and PCNA was explored. **Results** Double restriction enzyme and gene sequencing showed that the recombinant vector was constructed correctly when PCNA was immunoprecipitated by anti - PCNA antibody. GFP - FAM92A1 - 289 was identified by western blotting with anti - GFP antibody from immunoprecipitated complex. **Conclusion** The interactions between FAM92A1 - 289 and PCNA could be identified by co - immunoprecipitation.

Key words FAM92A1 - 289; PCNA; Co - immunoprecipitation; Interaction

FAM92A1 基因是由 Strausberg 等^[1]于 2001 年首次从人睾丸中克隆。已发现其有 10 个转录变体, 编码一组低分子的核蛋白^[2]。FAM92A1 - 289 是 Ruan 等^[3]2007 年从肿瘤中发现并克隆的 FAM92A1 新转录变体基因, 同时也是最大的一个变体, 编码 289 个氨基酸的核蛋白^[4]。笔者通过之前的研究发现 FAM92A1 - 289 作为一种新的肿瘤相关基因, 具有促进肿瘤生长的能力^[5]。半定量 RT - PCR 分析发现, 它在癌细胞和胚胎组织等增殖旺盛的细胞中表达较高, 在其他细胞中表达相对较低。提示

FAM92A1 - 289 是一个增殖相关新基因。前期, 笔者以 FAM92A1 - 289 为诱饵构建并检测真核表达载体 PGBKT7 - FAM92A1 - 289, 在无自激活作用的前提下, 本实验小组通过酵母双杂交实验得到了与 FAM92A1 - 289 相互作用的蛋白 PCNA^[6]。已知增殖细胞核抗原 PCNA 在增殖细胞中广泛表达, 在 DNA 复制、修复、细胞周期调控等机制中发挥重要功能^[7]。那么 FAM92A1 - 289 是否是通过与 PCNA 相互作用来影响细胞增殖、调控细胞周期呢? 本实验中使用的细胞系 HeLa 细胞含有内源性的 PCNA, 构建和转染真核表达载体 PCDNA3.1 - PCNA 是为了提高 PCNA 的表达量, 使实验结果更加明显, 同时稳定表达株 HeLa/FAM92A1 - 289 的构建使 FAM92A1 - 289 得到了超表达, 再通过免疫共沉淀实验来验证二者之

基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2012FFB02001)

作者单位:442000 十堰, 湖北医药学院附属太和医院生命科学研究

通讯作者:阮绪芝, 教授, 电子信箱: ruanxuzhi@163.com

间的相互作用,为进一步研究 FAM92A1 - 289 在细胞周期中的作用机制奠定基础。

材料与方法

1. 材料:Hela 细胞、GFP - FAM92A1 - 289 质粒、E. coli DH5 α 感受态、PCDNA3.1(-)his.myc 真核表达载体、CMV - SP6 - TALEN vector set - left arm 载体为湖北医药学院附属太和医院生命科学研究所存。TRIzol 总 RNA 提取试剂盒、2 $\times$ Taq PCR master - mix、T4 DNA Ligase、TIAN prep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒、通用型 DNA 纯化回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司,胎牛血清 FBS、opti - MEM medium、DMEM 高糖培养基均购自 Gibco 公司、转染试剂 LipofectamineTM2000 购自 Invitrogen 公司。限制性核酸内切酶 Xho I 和 BamH I 购自 TakaRa 宝生物公司。第 1 链 cDNA 合成试剂盒购自 Fementas 公司。彩色预染蛋白质分子质量标准、RIPA 细胞裂解液、Protein A + G Agarose、1 $\times$ SDS PAGE 上样缓冲液、SDS - PAGE 凝胶快速配制试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。PCNA 抗小鼠单克隆抗体、GFP 抗小鼠单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。引物合成与测序由上海生工生物工程有限公司完成。

2. 主要设备:PCR 仪购自德国 Appendorf 公司,Bio - Rad 凝胶成像与分析系统购自美国 Alpha Innotech 公司,电子恒温摇床、水浴振荡器购自哈尔滨东联电子技术公司,细菌电热恒温培养箱购自北京恒宇公司,电热恒温水浴箱购自德国 Memmert 公司,酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司,荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

3. 方法:(1)Hela 细胞中总 RNA 的提取:Hela 细胞常规培养于 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养,常规换液、传代,待细胞达到对数生长期时离心收集细胞,用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA。保存于 - 20 $^{\circ}$ C 备用。(2)引物的设计与合成,见表 1。(3)RT - PCR 扩增 GFP - 289 和 PCNA 编码区片段:用第 1 链 cDNA 合成试剂盒将 2 μ g 总 RNA 反转录成 cDNA。分别以 GFP - FAM92A1 - 289 质粒和 PCNA 的 cDNA 为模板用对应的引物分别对 GFP - FAM92A1 - 289 和 PCNA 进行 PCR 的扩增。反应体系为 GFP - FAM92A1 - 289:质粒 1 μ l,上下游引物各 1.5 μ l,2 $\times$ Taq PCR master - mix 15 μ l,ddH₂O 11 μ l。PCNA:cDNA 2 μ l,上下游引物各 1.5 μ l,2 $\times$ Taq PCR master - mix 15 μ l,ddH₂O 10 μ l。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 5min, 95 $^{\circ}$ C

30s, 55 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 1min,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 10min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用通用型 DNA 纯化回收试剂盒纯化目的片段,并检测浓度。(4)真核表达载体 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 和 PCDNA3.1 - PCNA 载体的构建与鉴定:用对应的限制性内切酶 EcoR I 和 Xho I 双酶切 GFP - FAM92A1 - 289 的 PCR 产物和 CMV - SP6 - TALEN vector set - left arm 载体,用对应的 Xho I 和 BamH I 双酶切 PCNA 的 PCR 产物和 PCDNA3.1(-)his.myc 载体。1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用通用型 DNA 纯化回收试剂盒切胶回收以上鉴定正确的目的片段和目的载体,T4 DNA 连接酶连接对应的目的片段和目的载体,连接产物各取 10 μ l 转化入大肠杆菌感受态 E. coli DH5 α 中,42 $^{\circ}$ C 转化后 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 涂在带有卡那的 LB 平板上,PCDNA3.1 - PCNA 涂在带有氨苄抗性的 LB 平板上,倒置 37 $^{\circ}$ C 细菌培养箱中培养。次日挑选出阳性菌落,过夜摇菌。用质粒小提试剂盒分别提取两种重组真核表达载体。用对应的限制性核酸内切酶双酶切后 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,酶切鉴定正确后送上海生工生物工程有限公司测序,同时 - 80 $^{\circ}$ C 保留菌种。(5)嘌呤霉素筛选 Hela 细胞最近浓度的确定:将处于对数生长期的 Hela 细胞计数后接种于 24 孔板,计数每孔种入相同数目的细胞。用含有不同浓度嘌呤霉素的培养基筛选 Hela 细胞,设筛选嘌呤霉素的浓度梯度为 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、3 μ g/ml,每种浓度设 3 个复孔,3 天换 1 次培养基,筛选 9 天后 3 个孔的 Hela 细胞全部死亡为宜,得到嘌呤霉素筛选 Hela 细胞最佳浓度为 1.5 μ g/ml。(6)稳定表达 FAM92A1 - 289 的细胞株 Hela/ FAM92A1 - 289 的构建:将测序正确的带有嘌呤霉素抗性的质粒 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 按照 Invitrogen LipofectamineTM2000 转染试剂盒说明书转染 Hela 细胞。次日用含有 1.5 μ g/ml 嘌呤霉素的培养基开始筛选转染后的 Hela 细胞,共计 9 天,3 天换 1 次液,筛选完成后置于倒置显微镜下观察稳转效果。将绿色荧光载体 PEGFP - N1 通过化学转染的方法转入 Hela 细胞得到 Hela/ PEGFP - N1 细胞,分别提取 Hela 细胞、Hela/ PEGFP - N1、Hela/ FAM92A1 - 289 的蛋白。各取 20 μ l 通过 Western blot 法检测蛋白分子质量的大小以确定稳定表达株是否构建成功。(7)免疫共沉淀实验检测 FAM92A1 - 289 和 PCNA 的相互作用:分别培养 Hela/ FAM92A1 - 289 细胞和 Hela 细胞于 10cm

的培养皿中,待其融合度达到 80% 时,按照 Invitrogen Lipofectamine™2000 转染试剂盒说明书将构建正确的 PCDNA3.1 - PCNA 载体转入这两种细胞株,培养 48h 后提取蛋白。方法如下:预冷的 PBS 洗涤细胞两遍后用细胞刮将此两种细胞分别刮至 1.5ml 的 EP 管中,离心去除 PBS。每支 EP 管中加入 500μl 的细胞裂解液(RIPA 裂解液和 PMSF 按 100:1 的比例配好)。置于冰上裂解 30min 后,加入免疫沉淀的一抗 PCNA,4℃ 摇晃过夜后,加入 20μl Protein A + G 4℃ 摇晃 3h,离心,去上清后,用 RIPA 裂解液清洗 Protein

A + G 5 次。弃上清,加入 20μl 1 × SDS PAGE 上样缓冲液重悬沉淀。沸水中煮 5min。(8) Western blot 法检测:配制 12% SDS - PAGE 凝胶,每孔加入 20μl 样品。半干转转膜 15V 30min,加入 5% 脱脂奶粉室温条件下摇荡封闭 1h。按 1:100 稀释鼠抗单克隆一抗 GFP,4℃ 过夜孵育;次日 TBST 洗膜 5min × 3 次后,按 1:150 稀释鼠抗单克隆一抗 PCNA,室温摇床孵育 1h。洗膜 3 次后,按 1:500 稀释山羊抗小鼠二抗,室温摇床孵育 1h。洗膜 3 次后加入化学发光液于 Bio - Rad 凝胶成像仪中进行显影。

表 1 引物序列与酶切位点 ($\bar{x} \pm s$)

名称		序列(5'→3')	酶切位点
GFP - 289	上游	CCG GAATTCATGATGAGGCGCACC	EcoR I
	下游	CCG CTCGAGTCTACTGTACAGCTCGT	Xho I
PCNA	上游	CCG CTCGAGCGATGTTTCGAGGCGCGCCTGGTC	Xho I
	下游	CA GGATCCCTAAGATCCTTCTTCATCCT	BamH I

结 果

1. 重组载体 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 和 PCDNA3.1 - PCNA 的构建与鉴定: GFP - FAM92A1 - 289 和 PCNA 的 PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测出了和目的片段大小相同的条带, GFP - FAM92A1 - 289 为 1590bp, PCNA 为 786bp(图 1)。再将重组的载体用对应的核酸内切酶双酶切后电泳检测,检测出了和目的片段大小相同的条带,送测序,测序结果正确,未出现碱基突变和缺失,载体构建成功。

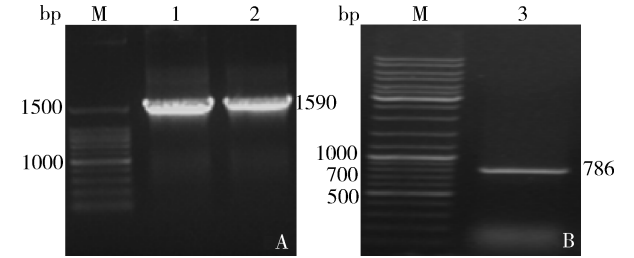


图 1 PCR 扩增目的片段
GFP - FAM92A1 - 289 和 PCNA

A. PCR 扩增 GFP - FAM92A1 - 289 1% 琼脂糖凝胶电泳结果;B. PCR 扩增 PCNA 的结果;M. DNA 标志物;1、2. GFP - FAM92A1 - 289 的 PCR 扩增产物(1590bp);3. PCNA 的 PCR 扩增产物(786bp)

5. 稳定表达 FAM92A1 - 289 的 HeLa/ FAM92A1 - 289 细胞的检测:将构建好的稳定表达株扩大培养后置于荧光显微镜下观察,整个视野里的细胞被标记上

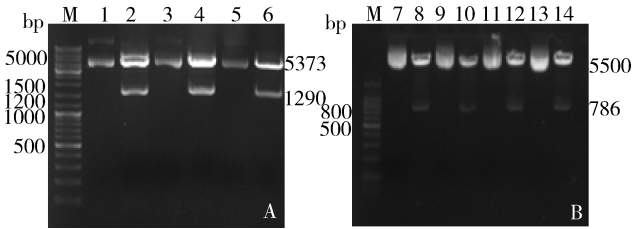


图 2 双酶切鉴定 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 和 PCDNA3.1 - PCNA 载体

A. 载体 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289 的酶切鉴定结果;B. PCDNA3.1 - PCNA 的酶切鉴定结果;M. DNA 标志物;1、3、5. CMV - SP6 - TALEN - GFP - FAM92A1 - 289 质粒;2、4、6. EcoR I 和 Xho I 双酶切检测 CMV - SP6 - TALEN - GFP - FAM92A1 - 289 结果;7、9、11、13. PCDNA3.1 - PCNA 质粒;8、10、12、14. Xho I 和 BamH I 双酶切检测 PCDNA3.1 - PCNA 结果

了绿色荧光,且细胞形态及生长状况都良好。用 GFP 特异性抗体进行 Western blot 法检测, HeLa/ FAM92A1 - 289 蛋白提取物检测出了 GFP - FAM92A1 - 289 的特异性条带(61kDa), HeLa/ PEG-FP - N1 的蛋白提取物检测到了 GFP - N1 的特异性条带(27kDa),野生型 HeLa 细胞的蛋白未检测到特异性条带,表明稳定表达 FAM92A1 - 289 的 HeLa/ FAM92A1 - 289 细胞构建成功(图 3)。

6. 免疫共沉淀实验结果:PCDNA3.1 - PCNA 载体转入 HeLa/ FAM92A1 - 289 细胞和 HeLa 细胞后, 48h 后收集细胞并提取蛋白,用抗小鼠单克隆抗体 PCNA 沉淀蛋白复合物后进行 Western blot 法检测,



图3 超表达 FAM92A1 - 289 的稳定表达株

HeLa/ FAM92A1 - 289 细胞的检测

A. M 为彩色预染蛋白质分子质量标准,野生型的 HeLa 细胞蛋白(对照)、HeLa/PEGFP - N1、HeLa/FAM92A1 - 289 的蛋白经过 GFP 单克隆抗体检测的特异性条带;B. 荧光显微镜下观察 HeLa/289 细胞($\times 200$)

从图4中可以看出 PCNA 的单克隆抗体将 HeLa/ FAM92A1 - 289 蛋白提取物中的 PCNA 沉淀了下来,同时在 PCNA 相互作用的蛋白复合物中检测到了 GFP - FAM92A1 - 289。由于 HeLa 细胞本身含有内源性的 PCNA 对于野生型的 HeLa 细胞和单转染 PCDNA3.1 - PCNA 的 HeLa 细胞都只检测出了 PCNA 蛋白,没有检测出 GFP - FAM92A1 - 289。表明增殖蛋白 FAM92A1 - 289 与 PCNA 之间存在相互作用。重复检测3次,结果一致。用293细胞重复上述实验,结果无异议。

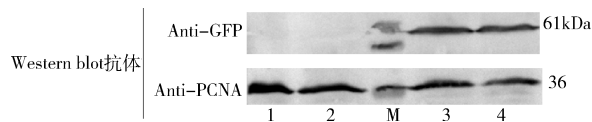


图4 免疫共沉淀检测 FAM92A1 - 289 与 PCNA 的相互作用

M. 彩色预染蛋白质分子质量标准;1. PCDNA3.1 - PCNA 单转染 HeLa 细胞;2. 未做转染的 HeLa 细胞蛋白对照组;3. PCDNA3.1 - PCNA 单转染 HeLa/ FAM92A1 - 289 细胞总蛋白提取物;4. FAM92A1 - 289 和 PCNA 的免疫沉淀蛋白复合物

讨 论

FAM92A1 - 289 是一种未知新基因,其功能尚不明确。前期生物信息学分析发现其蛋白结构中 α 螺旋占 70% 多且含有 1 个卷曲螺旋结构,5 个 CK2 位点、7 个 PKC 磷酸化位点和 1 个肉豆蔻酰化位点^[2]。已知卷曲螺旋结构是蛋白质和蛋白质相互作用的基础^[8]。而 PKC、CK2 磷酸化位点是信号转导分子等发育调控分子中常见的结构,在细胞增殖及细胞周期中有着广泛的调节作用^[9,10]。所以笔者试图通过验证 FAM92A1 - 289 和 PCNA 的相互关系来寻找 FAM92A1 - 289 基因在细胞周期中作用机制的突破

口。为进一步确定结果的可靠性,排除试剂干扰,笔者通过构建人 FAM92A1 - 289 基因的真核表达载体 CMV - SP6 - GFP - FAM92A1 - 289,建立了稳定表达株 HeLa/ FAM92A1 - 289。稳定表达株的构建有利于进行反复的实验得到一个相对准确的结果。

从细胞提取物中利用免疫共沉淀技术来检测蛋白之间的相互作用是一种极为有效的检测方法。免疫共沉淀技术既可以单独使用也可以和其他方法如酵母双杂交技术联合来验证蛋白间的相互作用^[11]。本实验就是在酵母双杂交结果的基础上加以验证的。但由于新基因 FAM92A1 - 289 目前没有抗体,笔者通过带 GFP 标签的真核表达载体稳定表达 FAM92A1 - 289 基因,将其与 PCNA 进行免疫共沉淀,结果证明二者是存在相互作用的。

今后笔者将研究 FAM92A1 - 289 在细胞周期中的作用机制。这些对于全面认识新基因 FAM92A1 - 289 的功能及研究其在肿瘤发生中的作用具有极为重要的意义。

参考文献

- 1 Strausberg RL, Feingold EA, Grouse LH, *et al.* Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26):16899 - 16903
- 2 余高明, 裴德, 阮绪芝, 等. 新基因 FAM92A1 的生物信息学分析及功能预测[J]. 邵阳医学院学报, 2008, 27(4): 289 - 294
- 3 Ruan XZ, Yan F, Zhao XY, *et al.* Identification and characterization of two novel variants of the DUF1208 protein FAM92A1 [J]. *Mol Cells*, 2007, 23(3): 391 - 397
- 4 赵琪, 陈洁, 胡莹, 等. FAM92A1 - 289 基因的真核表达载体构建和亚细胞定位[J]. 生物学杂志, 2012, 29(1): 13 - 15
- 5 Liang SF, Gong FM, Wei Y Q, *et al.* Prokaryotic expression, purification of a new tumor - relative protein FAM92A1 - 289 and its characterization in renal cell carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2009, 276: 81 - 87
- 6 方娟, 李瑞明, 卢志勇, 等. 人 FAM92A1 基因诱饵表达质粒的构建与鉴定[J]. 医学分子生物学杂志, 2011, 8(3): 240 - 244
- 7 宋楠萌, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展[J]. 自然科学进展, 2006, 16(10): 1201 - 1209
- 8 Burkhard P, Stetefeld J, Strelkov SV. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif[J]. *Trends Cell Biol*, 2001, 11: 82 - 88
- 9 季少平, 药立波. 蛋白激酶 C 与细胞周期[J]. 生命科学, 2001, 13(1): 37 - 40, 27
- 10 刘振杰, 刘新光, 梁念慈. 蛋白激酶 CK2 在细胞周期调控中的作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(11): 1281 - 1285
- 11 Masters SC. Co - immunoprecipitation from transfected cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2004, 261: 337 - 350

(收稿日期: 2015 - 03 - 03)

(修回日期: 2015 - 03 - 13)