

FKBP25 缺失突变体在细胞中的表达与定位

张姗姗¹, 王蓓华², 龚 芮², 潘林鑫², 耿慧武², 刘晓颖², 邓松华¹, 范礼斌²

摘要 目的 研究 FKBP25 缺失突变体蛋白在细胞内的表达和定位。方法 以人 FKBP25 全长 cDNA 序列的质粒为模板, PCR 方法分别扩增出 FKBP25 缺失突变体序列, 然后插入真核表达载体 pcDNA3.1 中, 通过 Western blot 方法和免疫荧光方法检测其在细胞株中的表达和定位。结果 成功构建了 FKBP25 缺失突变体的真核表达载体, 经 Western blot 检测 FKBP25 缺失突变体在 HEK 293T 细胞中能够有效表达, 免疫荧光显微镜结果显示 FKBP25 缺失突变体在 COS7 细胞中分布于细胞核和细胞质。结论 FKBP25 缺失突变体在 HEK 293T、COS7 细胞中能够表达, 为了解 FKBP25 缺失突变体的功能提供了一定基础。

关键词 FKBP25; 基因表达; 免疫荧光; 细胞定位

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1250-04

FKBP25 是免疫抑制剂 FK506 结合蛋白 (FKBP) 家族成员之一, 编码 224 个氨基酸残基, 其相对分子质量约为 25 ku, 是一个高度保守且含量丰富的蛋白质。FKBP25 具有肽基脯氨酰顺反异构酶 (peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase, PPIase) 活性^[1], 这种酶活性在蛋白质折叠、组装和转运等方面具有重要作用。FKBP25 还能与免疫抑制剂雷帕霉素结合, 发挥免疫调节作用^[2]。该课题组前期研究^[3]结果表明过表达的 FKBP25 在细胞核和细胞质中均有分布。已有文献^[4]报道 FKBP25 不同结构域多个缺失突变体在 H1299 细胞中的表达情况。为了深入研究 FKBP25 蛋白的功能作用, 该研究根据 FKBP25 的已知功能结构域构建了 FKBP25 的两个缺失突变体, 分别对 FKBP25 的两个缺失突变体在细胞内的表达和定位变化进行研究, 为从细胞水平研究 FKBP25 的功能提供了基础。

2014-01-02 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 11040606M170、11040606M164)

作者单位: 安徽医科大学¹ 病理生理学教研室、² 生命科学学院生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 张姗姗, 女, 硕士研究生;

邓松华, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: desoh@126.com;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 FKBP25 全长 cDNA 序列质粒、*E. coli* DH5 α /TG1 菌株、HEK293T 细胞和 COS7 细胞由本实验室保存。

1.2 主要材料和仪器 引物由上海生工公司合成; pfu 酶购自上海生工公司; 小牛肠碱性磷酸酶、T4 连接酶、各种限制性内切酶、Lambda DNA Marker 购自加拿大 Fermentas 公司; DualColor Prestained Protein marker 购自美国 Biorad 公司; DNA 凝胶回收试剂盒和质粒 (小量) 抽提试剂盒购自美国 Axygen 公司; 脂质体转染试剂 2 000、Opti-MEM 购自美国 Invitrogen 公司; DMEM 细胞培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; FLAG M2 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司; TRITC/FITC 标记山羊抗小鼠 IgG 和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; SuperSignal West Pico 显色试剂盒购自美国 Pierce 公司; Leica DMI 6000 荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 以实验室保存的质粒 pGBKT7-FKBP25 为模板, 进行结构域两个缺失突变体的 PCR 扩增, 见图 1。采用 PCR 方法分别扩增基因 FKBP25-FLAG-N(1-110aa) 和 FKBP25-FLAG-C(43-224aa) 序列, 见表 1。回收 PCR 产物, 回收的片段及载体 pcDNA3.1 均用 Xho I、EcoR I 双酶切 4~6 h, 然后进行电泳回收, 用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 下连接 12 h 或过夜, 再将连接产物转化至 TG1 菌株, 培养约 10 h 挑取阳性单克隆, 摇菌过夜, 碱裂解法抽取及纯化质粒, 用 Xho I、EcoR I 双酶切进行鉴定, 将酶切鉴定正确的质粒送上海生工公司测序。测序正确的质粒用试剂盒抽提, 然后 -20 °C 保存。

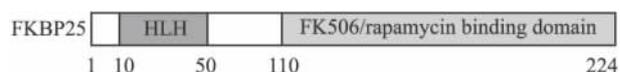


图 1 FKBP25 结构域示意图

1.3.2 细胞培养 在转染前 24 h, 用胰酶消化生长至对数期的 COS7 细胞和 HEK 293T 细胞, 以

表1 FKBP25 缺失突变体引物列表

引物名称	长度 (bp)	引物序列
FKBP25 N-S1m	330	5'-GGAATTCGCCACC ATGGCGCGGCGCT-3'
FKBP25 N-A1m		5'-CCG <u>CTCGAGCGGTCACCTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCTGG</u> TGGACCCATC-3'
FKBP25 C-S1m	543	5'-GGAATTCATGAATTATTAGGAAACA-3'
FKBP25 C-A1m		5'-CCG <u>CTCGAGCGGTCACCTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCTATC</u> AATATCCACTAA-3'

下划线部分为限制性酶切位点 斜体为 FLAG 标签序列

$1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5 / \text{cm}^2$ 的密度重新接种于含 DMEM 培养基加入到 60 mm 培养皿中(在免疫荧光定位实验中,培养皿中先放入用 $1 \times$ 多聚赖氨酸浸泡过的盖玻片)。37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3.3 质粒转染 转染前 24 h, 对 HEK 293T 细胞传代, 待细胞达 70% ~ 85% 密度时, 按试剂盒说明书用脂质体 Lipofectamine 2000 进行转染细胞, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 6 h 后, 弃转染液, 更换新鲜含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中继续培养。转染至 COS7 细胞, 24 h 后待细胞长到 50% ~ 70% 密度时, 按照上述方法进行转染培养。

1.3.4 免疫荧光观察 参照文献^[5]方法进行免疫荧光制片, 细胞转染 24 h 后, 取出培养皿中的盖玻片, 正面朝上, 用预冷的 PBS 溶液洗 3 次。-20 °C 预冷的甲醇溶液固定细胞 3 min, 弃甲醇溶液; 70% 乙醇溶液室温固定细胞 5 min, 弃乙醇溶液; PBS 溶液洗 3 次, 每次 10 min。用含 1% 脱脂奶粉的 TBST 溶液(封闭液)室温封闭 0.5 h, 弃封闭液; 加 FLAG M2 一抗(封闭液配制)室温孵育 2 h, 弃一抗, 封闭液洗 3 次, 每次 10 min。加 TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(TBST 溶液配制)室温孵育 1 h, 弃二抗; PBS 溶液洗 3 次, 每次 10 min。用 100 μl DAPI 溶液染细胞核, 室温 2 min, 弃 DAPI 溶液; PBS 溶液洗 3 次, 每次 10 min。最后吸去盖玻片上的溶液, 用防淬灭封片胶将盖玻片封于干净载玻片上。4 °C 储存, 在荧光显微镜下观察结果并拍照。

1.3.5 Western blot 检测 HEK 293T 细胞转染后培养 48 h, 收集细胞, 加细胞裂解液于冰上裂解, 提取细胞蛋白样品。加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, 冷却保存。标准蛋白 Marker 和蛋白样品一起进行 SDS-PAGE 电泳, 100 V 转膜 1 h, TBST 溶液(含 5% 脱脂奶粉)室温封闭 1 h, 用 FLAG M2 一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜, TBST 溶液洗膜, 用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG

(1:10 000) 室温孵育 1 h, TBST 溶液洗膜, 用 SuperSignal West Pico 显色试剂盒进行显色, 最后用 X 线片曝光、显影和定影。

2 结果

2.1 重组质粒 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-N 和 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-C 酶切鉴定 酶切鉴定结果见图 2, 抽提的质粒经 Xho I、EcoR I 双酶切鉴定, 鉴定正确后与 DNA Marker 比对, 一条是载体 pcDNA3.1 大小约 5 400 bp, 其余分别是 FKBP25 目的片段大小约 672 bp、FKBP25-FLAG-N 目的片段大小约 330 bp、FKBP25-FLAG-C 目的片段大小约 543 bp, 酶切鉴定结果证明连接是成功的。

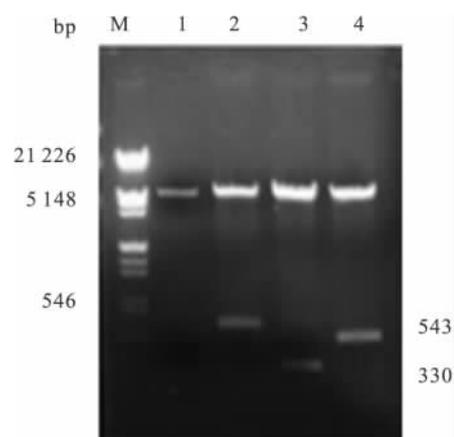


图2 重组质粒 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-N 和 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-C 的酶切鉴定

M: λDNA/EcoR I + Hind III Marker; 1: 酶切载体 pcDNA3.1; 2: 酶切 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG 质粒; 3: 酶切 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-N 质粒; 4: 酶切 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-C 质粒

2.2 FKBP25 缺失突变体在 COS7 细胞中的定位

在荧光显微镜下观察 FKBP25 缺失突变体在 COS7 细胞中的定位, 红色荧光代表 FKBP25 蛋白在 COS7 细胞中的定位。pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-N 主要定位于 COS7 细胞的细胞核中, 在细胞质中也有表达; pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-C 主要定位于 COS7 细胞的细胞质, 在细胞核中有少量表达, 呈不均一的细小颗粒状。见图 3。

2.3 FKBP25 缺失突变体蛋白的 Western blot 分析 用 FLAG M2 抗体来检测, 分别转染 pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-N、pcDNA3.1-FKBP25-FLAG-C 的细胞裂解液中检测到条带, 大小约 12 ku 和 20 ku, 符合 FKBP25 缺失突变体蛋白分子量大小, 结果表明 FKBP25 缺失突变体蛋白在 HEK 293T 细胞中能有效表达, 见图 4。

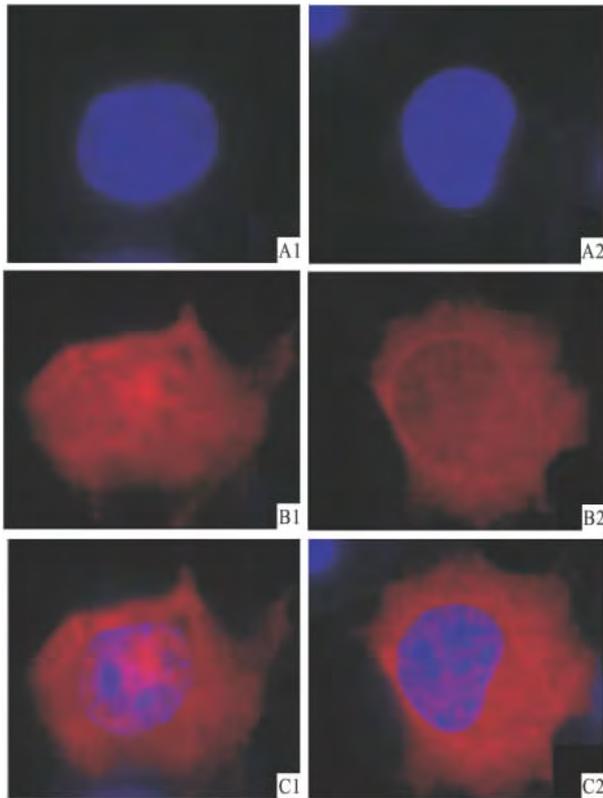


图3 FKBP25 缺失突变体蛋白在 COS7 细胞中的定位 ×1 000
A1、A2: DAPI 染色示细胞核; B1: FKBP25-FLAG-N 在 COS7 细胞中的定位; B2: FKBP25-FLAG-C 在 COS7 细胞中的定位; C1、C2: 两个图像(A1 与 B1、A2 与 B2)的叠加图像

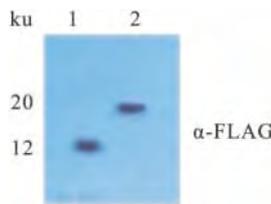


图4 FKBP25 缺失突变体在 HEK 293T 细胞中表达
1: 转染 pcDNA3.1 的 HEK 293T 细胞裂解液; 2: 转染重组质粒 FKBP25-FLAG-N 的 HEK 293T 细胞裂解液; 3: 转染重组质粒 FKBP25-FLAG-C 的 HEK 293T 细胞裂解液

3 讨论

基因序列分析表明,人 FKBP 家族中各成员之间的同源性很好,人 FKBP25 与人 FKBP12 氨基酸序列有 62% 的同源性,而 FKBP25 的 C 末端氨基酸序列与 FKBP12 有 43% 相似性^[6]。FKBP25 和 FKBP12 这两种蛋白的主体结构均由一个 β 折叠、一段短的 α 螺旋、40s、50s、80s 三段柔性连接环组成,主体结构非常相似,这些结果提示了 FKBP25 可能具

有 FKBP12 的一些功能作用,如细胞凋亡、信号转导、蛋白质折叠以及基因转录等多种细胞生命活动。

本研究成功构建了 FKBP25-FLAG-N 和 FKBP25-FLAG-C 的结构域缺失突变体,将其分别转染至 COS7 细胞和 HEK 293T 细胞中进行定位以及表达情况的研究。本研究结果提示,FKBP25-FLAG-N 蛋白在 COS7 细胞中的定位主要集中在细胞核,而 FKBP25-FLAG-C 蛋白在 COS7 细胞中的定位主要集中在细胞质中,造成这一差别的原因推测有以下几点:第一,蛋白含量的差别可能会影响蛋白的表达;第二,标签引入的位置不同可能会影响蛋白的定位;第三,两者入核的主要功能区的差别,但确切原因在以后的研究中进一步证实。之前的研究^[7]表明,FKBP25 主要定位于细胞核,这也许与实验方法和所用的细胞株不同有一定关系。本实验研究的结果与本实验组前期研究的结果是一致的,FKBP25 缺失突变体蛋白在 HEK 293T 细胞和 COS7 细胞中均能有效表达。本研究对 FKBP25 缺失突变体在细胞内定位和表达分别进行了初步的研究,这为进一步探讨 FKBP25 蛋白的作用机制和功能提供了一定基础依据。

参考文献

- [1] Gudavicius G, Soufari H, Upadhyay S, et al. Resolving the functions of peptidylprolyl isomerases: insights from the mutagenesis of the nuclear FKBP25 enzyme [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41 (3): 761-8.
- [2] Patterson C E, Schaub T, Coleman E J. Developmental regulation of FKBP65. An ER-localized extracellular matrix binding-protein [J]. *Mol Biol Cell* 2000, 11(11): 3925-35.
- [3] 龚 芮, 潘林鑫, 张姍婧, 等. 人 FKBP3 在哺乳动物细胞系中的转染表达与定位[J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(5): 558-61.
- [4] Anna M O, Petros K, Samantha N, et al. FKBP25, a novel regulator of the p53 pathway, induces the degradation of MDM2 and activation of p53 [J]. *FEBS Letters* 2009, 583(4): 621-6.
- [5] 潘林鑫, 李新颖, 徐南, 等. 人 RB1 及其突变体的表达与定位 [J]. *安徽医科大学学报* 2013, 48(8): 853-7.
- [6] Jun L, Deborah T H, Stuart L S, et al. Structure of the human 25 kDa FK506 binding protein complexed with rapamycin [J]. *Am Chem Soc*, 1996, 118(5): 1231-2.
- [7] Johnson K L, Lawen A. Rapamycin inhibits didemnin B-induced apoptosis in human HL-60 cells: evidence for the possible involvement of FK506-binding protein 25 [J]. *Immunol Cell Biol*, 1999, 77(3): 242-8.

◇ 预防医学研究 ◇

三氯乙烯致敏小鼠 Tc1/Tc2 细胞失衡研究

张澄¹, 王峰¹, 冷静², 查晚生¹, 张家祥¹, 李树龙¹, 王慧¹, 沈彤³, 朱启星^{1,3}

摘要 目的 检测小鼠经三氯乙烯(TCE)致敏后 Tc1、Tc2 细胞的变化,探讨 Tc1/Tc2 细胞失衡在三氯乙烯药疹样皮炎(DMLT)中的可能作用。方法 BALB/c 雌性小鼠随机分为空白对照、溶剂对照和 TCE 处理组,在末次激发后 24、48、72 h 和 7 d 根据皮肤肿胀程度和病理表现分为致敏组和未致敏组。无菌取出脾脏,用流式细胞术检测 Tc1、Tc2 细胞数量,实时荧光定量 PCR 检测 T-bet、GATA-3 mRNA 转录水平。结果 与未致敏组相比,致敏组 Tc1 细胞数量在 24、48、72 h 和 7 d 显著上升($P < 0.01$),72 h 水平最高;致敏组 Tc2 细胞数量在 24、48、72 h 显著上升($P < 0.01$),72 h 水平达到峰值,7 d 较未致敏组差异无统计学意义($P > 0.05$);致敏组

Tc1/Tc2 比例于 48、72 h 和 7 d 较未致敏组显著上升($P < 0.01$)。致敏组 T-bet、GATA-3 mRNA 转录水平在 48、72 h 和 7 d 较相应时点未致敏组显著上升($P < 0.05$, $P < 0.01$),72 h 达到峰值。结论 Tc1/Tc2 细胞失衡可能参与了 TCE 致敏小鼠的免疫损伤过程并发挥重要的作用。

关键词 三氯乙烯;细胞毒性 T 细胞;BALB/c 小鼠

中图分类号 R 114

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1253-05

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是重要的工业和环境毒物,职业暴露 TCE 可诱发工人罹患职业性三氯乙烯药疹样皮炎(occupational medicamentosa-like dermatitis induced by trichloroethylene, DMLT),该病病情凶险,病死率高,已列入职业病范畴^[1]。DMLT 的临床表现符合 IV 型变态反应特征^[1],其详细发病机制尚未阐明,T 细胞介导的免疫调节失衡可能参与发病^[2]。CD8⁺ T 细胞又称细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, Tc),可在一定条件下极化为 Tc1 或 Tc2 细胞,通过生成 I 类或 II 类细胞因子参与调节免疫细胞分化和炎症反应,Tc1/Tc2 极化失衡与多种免疫性疾病的发病与进展相关^[3-4]。该研

2014-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371730);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20133420110001)

作者单位:¹安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学,合肥 230032

²安徽省医学科学研究所,合肥 230061

³安徽医科大学第一附属医院皮肤病研究所,合肥 230022

作者简介:张澄,男,硕士研究生;

朱启星,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zqxing@yeah.net

Localization and expression of human FKBP25 deletion mutants in mammalian cell lines

Zhang Shanjing¹, Wang Beihua², Gong Rui², et al^{(1)Dept of Pathophysiology, ^(2)Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)}

Abstract Objective To investigate the expression and localization of the product of FKBP25 deleted mutants in cells. **Methods** The full length cDNA fragment of FKBP25 was used for PCR amplification, to construct FKBP25 deletion mutant gene sequence respectively, and inserted them into pcDNA3.1 vector. All expressions were detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** The expression of FKBP25 deletion mutants was constructed successfully. Western blot assay showed that FKBP25 deletion mutants could express efficiently in HEK293T cell line, and the results of immunofluorescence microscopy showed that the FKBP25 deletion mutants protein was found to be localized in the nucleus and cytoplasm in COS7 cells lines. **Conclusion** The FKBP25 deletion mutants can express in HEK 293T and COS7 cell lines. The results provide the basis for further understanding of the function of FKBP25 deletion mutants.

Key words FKBP25; gene expression; immunofluorescence; cellular localization