

人端粒结合蛋白 TRF1 的克隆、表达和抗体制备

江 红 郑晓飞 罗 瑛 朱 捷 付汉江 孙强玲 陈长浩 孙志贤*

(军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850)

摘 要 利用 RT-PCR 技术,从 HeLa 细胞的 cDNA 文库中扩增到人端粒结合蛋白 1(hTRF1)基因编码区序列,克隆至 pUCm-T 载体,测序正确后,构建带 His₆-tag 原核表达载体 pET-28c-TRF1,经 IPTG 诱导表达的 His₆-TRF1 融合蛋白分子量约为 65kD,Western-blot 证实表达产物可特异地与 TRF1 抗体 sc-6165 结合。用 Ni²⁺-NTA 胶亲和层析纯化可得到电泳均一的融合蛋白,免疫新西兰纯种大白兔,获得特异性好的多克隆抗体,该抗体可用于免疫荧光染色和 Western-blot 方法检测哺乳动物细胞内源性的 TRF1 分子。

关键词 人端粒结合蛋白 1(TRF1),原核表达,抗体

中图分类号 Q513.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0030-04

人端粒结合蛋白 TRF1(Telomere repeat binding factor1)是 Zhong Z 等^[1]1992 年发现的能够直接与端粒 DNA 结合的端粒结合蛋白。近期的研究结果显示 TRF1 可能具有多种功能,它在端粒长度控制、细胞周期调控、DNA 损伤与修复等方面的作用日渐引人注意。为了进一步研究 TRF1 与其它蛋白间的相互作用,探讨它在细胞衰老、死亡和癌变中的作用,我们克隆 TRF1 的全长 cDNA,在大肠杆菌中进行了融合表达,借助亲和层析得到带 His₆-tag 的重组 TRF1,并通过免疫动物,制备了多克隆抗体。

1 材料和方法

1.1 主要试剂、质粒及菌种

限制性核酸内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、DNA marker(DL2000)购自 TaKaRa 公司;pUCm-T 载体、IPTG 购自上海生工;质粒提取试剂盒 Promega Wizard[®] Plus Miniprep DNA Purification System 购自 Promega 公司;DNA 回收试剂盒购自鼎国公司;TRF1 抗体 sc-6165 购自 Santa Cruz 公司;myc 的单克隆抗体购自 Clontech 公司;硝酸纤维素膜为 Amersham 公司产品;HRP 标记的二抗购自北京中山生物技术有限公司;化学发光底物 SuperSignal West Pico Trial Kit 为 Pierce 公司产品;引物由上海生工合成;在上海博亚公司进行序列测定;原核表达质粒 pET-

28c(+)和 HeLa 细胞 cDNA 文库为本室保存;Ni²⁺-NTA 亲和胶为本室制备。

1.2 引物、PCR 及重组质粒 pUCmT-TRF1 的构建

根据 GenBank 登录的 TRF1 序列,设计一对引物用于从 HeLa 细胞的 cDNA 文库中扩增 TRF1 的全长 cDNA,在上、下游引物的两端分别添加 EcoR I 和 Sal I 内切酶位点。引物序列如下:

P1 5' GGAATTCACATGGCGGAGGATGTTTCC 3';
P2: 5' GCGTCGACTTATCAGTCTTCGCTGTCTGA 3'。

PCR 参数为 94℃ 5min,94℃30s,55℃30s,72℃1min,30 个循环;最后 72℃延伸 7min。PCR 产物纯化后,连入 pUCm-T 载体、转化 DH5α 感受态、质粒抽提、双酶切筛选阳性重组子等步骤均按常规分子克隆方法或试剂盒说明书进行,阳性质粒 pUCmT-TRF1 送上海博亚公司测序鉴定。

1.3 重组质粒 pET-28c-TRF1 和 pCMV-myc-TRF1 的构建

用 EcoR I 和 Sal I 内切酶将 TRF1 从 pUCmT-TRF1 质粒中切下,连入同样双酶切的 pET-28c 和 pCMV-myc 中,分别转化 BL21(DE3)和 DH5α 感受态,同前筛选阳性重组子,阳性质粒 pET-28c-TRF1 和 pCMV-myc-TRF1 送上海博亚公司测序鉴定。

1.4 重组融合蛋白的诱导表达、纯化及鉴定

挑取表达 pET-28c-TRF1 的单个菌落,接种于 LB

(含 Kan 50mg/L)培养液中,调整诱导剂 IPTG 终浓度(0.1、0.5、1mmol/L)诱导时间(1~6h)和诱导温度(25、30、37℃)以期获得重组蛋白的可溶性表达。重组蛋白的纯化及 Western-blot 鉴定参照文献进行^[2]。

1.5 抗 TRF1 多克隆抗体制备

用纯化的融合蛋白 1mg 与等体积的福氏完全佐剂充分混匀,免疫新西兰纯种大白兔 4 周后用同样量的蛋白和等体积福氏不完全佐剂加强免疫 1 次,此后,每隔 2 周加强免疫 1 次,共免疫 4 次。第 3、4 次免疫前耳缘静脉采血,免疫双扩散法测定效价,第 4 次免疫后 2 周,颈动脉插管收集血清。将分离的血清分装存于 -20℃。

1.6 HeLa 细胞的培养及转染

HeLa 细胞用含 10% 热灭活的新鲜胎牛血清的 1640 培养液于 37℃,5% CO₂ 条件下培养,传代后 24h 内,用阳离子脂质体 Lipofectamine 介导 pCMV-myc-TRF1 转染 HeLa 细胞,具体操作按转染试剂盒说明书进行。转染 24h 后提取总蛋白。

1.7 TRF1 多抗的免疫荧光细胞染色及 Western-blot 检测

将细胞铺在 6 孔板内的盖玻片上,贴壁培养 24h,2% 多聚甲醛室温固定 10min,PBQ(含 0.2% Gelatin 和 0.5% BSA 的 PBS)室温封闭 1h;加入用 PBQ 稀释的抗血清,4℃ 反应过夜;加入 PBQ 1:100 稀释的 FITC 标记的二抗,室温黑暗处静置反应 1h;5 μg/mL 的 Hoechst 33258 于室温染核 10min,置荧光显微镜观察。

进行 Western blot 分析时,用裂解液 RIPA (10mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠,蛋白酶抑制剂)将培养 24h 的细胞刮下,用 Bradford 方法蛋白定量后,按每个样本 60μg 总蛋白上样,进行 10% SDS-PAGE;160mA 恒流转膜 60min(0.4μm 硝酸纤维素膜);用封闭液(含 5% 脱脂奶粉的 TBST)室温振荡封闭 2h;用封闭液 1:1000 稀释抗血清于 4℃ 孵育过夜;加入封闭液 1:2000 稀释的 HRP 标记的二抗,室温振荡反应 45min;ECL 显色检测目的蛋白。

2 结 果

2.1 人 TRF1 基因 cDNA 的获得与亚克隆

用 PCR 的方法从 HeLa 细胞的 cDNA 文库中得到约 1.4kb 大小的目的片段,见图 1A。将 PCR 产物亚克隆至 pUCm-T 载体,测序结果显示 EcoR I 和 Sal I 双酶切鉴定阳性的克隆为 TRF1 的 cDNA 序

列与文献报道一致。用 EcoR I 和 Sal I 将 TRF1 的 cDNA 从 pUCmT-TRF1 载体上切下,分别连入同样双酶切的带 His₆-tag 的 pET-28c(+)和带 myc-tag 的 pCMV-myc 载体中,双酶切鉴定阳性克隆,见图 1B。所构建好的 2 种表达载体均经博亚公司测序核实。

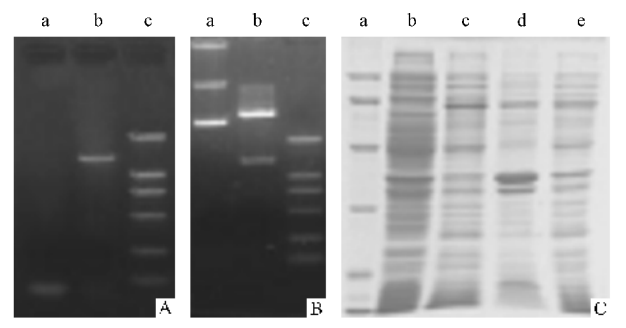


图 1 重组子 pET-28c-TRF1 的鉴定和表达

Fig.1 Identification and expression of the recombinant plasmid pET-28c-TRF1

A PCR result of TRF1 a)negative control ;b)TRF1 ;c)DNA Marker (DL2000 2000、1000、750、500、250、100bp).
B :Identification of pET-28c-TRF1 a)pET-28c-TRF1 ;b)pET-28c-TRF1/EcoR I + Sal I ;c)DNA marker (DL2000 ,2000、1000、750、500、250、100bp).
C :Expression of pET-28c-TRF1 a)Standard protein molecular Marker (94.7、67.2、43、31、20.1、14.4kD);b)Bacterial total protein before induction ;c)Supernatant of the induced protein ;d)Precipitation of the induced protein ;e)Bacterial total protein after IPTG induction .

2.2 融合蛋白的诱导、表达、纯化及鉴定

按照前述方法进行人 TRF1 蛋白的诱导表达,经过不同的 IPTG 诱导浓度、诱导时间和诱导温度的筛选,经 0.5mmol/L IPTG 终浓度、37℃ 诱导 3h 后,在诱导菌全菌中有约 65kD 大小的 His₆-TRF1 蛋白表达,见图 1C-b 和 e,其中目的蛋白约占全菌总蛋白的 8.7%。通过对目的蛋白可溶性分析可知,在诱导菌超声处理后的上清和沉淀中均有诱导物生成,分别占总蛋白的 12.3% 和 9.2%,见图 1C-c 和 d,提示:重组的 His₆-TRF1 表达后,一部分能够以可溶的形式存在于 E. coli 中,一部分则以包涵体的形式存在。用 Ni²⁺-NTA 胶在非变性状态下进行亲和层析纯化,可得到电泳均一的目的蛋白,Western-blot 证实表达产物可特异地与 TRF1 抗体 sc-6165 结合^[2]。

2.3 人 TRF1 蛋白在 HeLa 细胞中的表达

将构建好的氨基端带 myc-tag 的真核表达载体 pCMV-myc-TRF1 瞬时转染 HeLa 细胞,收集转染 24h 后的细胞总蛋白。用 myc 单克隆抗体进行 Western-blot 分析,结果显示 24h 后 TRF1 与标签蛋白 myc 所表达的融合蛋白可与抗 myc 单克隆抗体发生特异性的结合反应,在 70kD 附近可见一特异性反应条带,见图 2A。

2.4 TRF1 抗血清的制备及检测

在琼脂双扩散试验中,抗血清在 1:4 稀释后与纯化的重组蛋白发生反应,可见清晰的沉淀线。Western-blot 实验证明,未经任何纯化的 1:5000 稀释的抗体与诱导表达的 His₆-TRF1 蛋白有特异的抗原抗体反应(结果未显示)。同时,TRF1 抗血清 1:1000 稀释后可以检测哺乳动物细胞裂解液中的内源性 TRF1,见图 2B-a。Pin 家族的 Pin2 除了在 C 端缺失一个由 20 个氨基酸组成的片段外,与 TRF1 完全同源,TRF1 和 Pin2 可能是来自于同一基因 *Pin2/TRF1* 的不同剪切形式,在分布和功能上很难区分二者^[3],因而可见到两条目的带,其中分子量略大的条带为 TRF1。

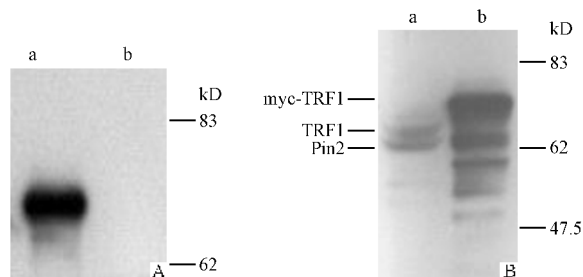


图 2 Western-blot 对 TRF1 的检测

Fig.2 Western-blot analysis of TRF1

A: Western-blot analysis of myc-TRF1 fusion protein expressed in HeLa cell line using myc monoclonal antibody

a. Sample from HeLa transfected with pCMV-myc-TRF1; b. Negative control: sample from HeLa transfected with pCMV-myc.

B: Western-blot analysis of TRF1 from HeLa cells lysate using antiserum

a. Cell lysate of HeLa cell line; b. Cell lysate of HeLa cells transiently transfected with myc-TRF1

为了对细胞内源性的 TRF1 进行亚细胞定位,我们用免疫荧光细胞染色的方法对肝癌细胞系 HepG2、胃癌细胞系 803、乳腺癌细胞系 MCF7 和宫颈癌细胞系 HeLa 中的靶蛋白进行检测。细胞在与 1:400 稀释的抗血清和 FITC 标记的羊抗兔二抗反应后,在荧光显微镜下,细胞内源性 TRF1 呈现绿色,同时 DNA 经过 Hoechst 33258 染色后使细胞核显紫色。将两种激发光下所看到的图像叠加后,可见不同细胞系的内源性 TRF1 主要分布于细胞核,原因在于它的羧基端含有核定位信号,见图 3。

3 讨 论

本文报道利用人 TRF1 蛋白的原核表达产物经纯化后免疫家兔,成功地制备了该蛋白的多克隆抗体。用 TRF1 蛋白的真核表达产物对其进行鉴定后确认,该抗体能够成功地用于 TRF1 蛋白的识别。同时,免疫荧光细胞染色技术显示,不同细胞系内源性的 TRF1 均主要集中分布于细胞核中。

图 3 细胞内源性 TRF1 的免疫荧光染色

Fig.3 Immunofluorescence cell staining of endogenous

TRF1 from four cell lines using antiserum

Green: TRF1; blue: DNA; Merge: TRF1 + DNA. a) HepG2; b) 803; c) MCF7; d) HeLa

TRF1 蛋白最初是以双链的端粒重复序列 (TTAGGG)_n 为配基,用亲和层析的方法从 HeLa 细胞核提取物中得到的。TRF1 分子由 439 个氨基酸残基组成,结构上包括 N 端的酸性结构域、中间的二聚体区和 C 端的核定位信号区及 Myb 区域。它具有多种重要的生物学功能,首先,它是端粒长度的负调节因子^[4]。它能够以二聚体的形式通过其 C 端的 myb 结构域与端粒 DNA 结合,强化端粒的有序结构,使其处于一种“关闭”状态,导致端粒酶无法接近端粒末端发挥作用,缩短端粒长度,而端锚聚合酶 (Tankyrase) 对它进行聚 ADP-核糖基化修饰,可使其从端粒 DNA 上脱落,解除它对端粒长度的调节作用^[5]。其次, Kishi S^[6] 等的研究结果提示:它的过表达能介导具有短端粒的细胞(如 HeLa 和 A431)进入有丝分裂并诱导其凋亡,并且 TRF1 在肿瘤组织中的表达水平明显低于相邻的正常组织,这与肿瘤组织必须维持稳定的端粒长度相一致。另外,它的 Ser²¹⁹ 可被 DNA 双链损伤的感受分子 ATM (Ataxia-telangiectasia mutated) 磷酸化,从而参与 DNA 双链损伤引起的细胞学反应^[7]。最后,TRF1 的蛋白表达水平不仅与细胞周期密切相关,而且从端粒上解离下来的 TRF1 分子可

被蛋白酶体系通过泛素化修饰所降解^[8]。

我们的兴趣在于,有哪些分子能与 TRF1 形成复合物,从而调控 TRF1 的功能的发挥? TRF1 能否直接与端粒酶的蛋白组份 hTERT(Human telomere catalytic subunit)结合,通过调控端粒酶的活性以影响端粒的长度?要回答这些问题,必须具备的一个前提就是获得能够有效检测 TRF1 的抗体。由于从 Santa Cruz 公司购得的抗体 sc-1977 和 sc-6165 均只能识别亲和纯化的重组 His₆-TRF1,在蛋白上样量 100 μ g、一抗 1:100 稀释 4 $^{\circ}$ C 反应过夜、二抗 1:2000 室温摇 4h 的 Western-blot 条件下仍不能检测哺乳动物细胞裂解液中内源性的靶蛋白,这就使得这两种抗体的应用大打折扣,更不利于进一步探讨 TRF1 的生物学功能。我们所制备的抗血清在 Western blot 检测和免疫荧光细胞染色分析中能够有效地识别哺乳动物细胞中内源性的 TRF1,为开展 TRF1 分子后续功能的研究提供了条件。

REFERENCES(参考文献)

[1] Zhong Z, Lily S, Shawn K *et al.* A mammalian factor that binds te-

lomic TTAGGG repeats *in vitro*. *Molecular and Cellular Biology*. 1992, **12** (11): 4834 - 4843

- [2] Jiang H(江红)Zheng XR(郑晓飞),Luo Y(罗瑛)*et al.* Preparation of Ni²⁺ affinity gel and purification of His₆-tag recombinant proteins. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences(军事医学科学院院刊)* 2003 **27** (1): 47
- [3] Shen M, Hagglom C, Vogt M *et al.* Characterization and cell cycle regulation of the related human telomeric proteins Pin2 and TRF1 suggest a role in mitosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997 **94** :13618 - 13623
- [4] Bas VS, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, 1997 **385** :740 - 743
- [5] Smith S, Giriat I, Schmitt A *et al.* Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomere. *Science*, 1998 **282** (5393):1484 - 1487
- [6] Kishi S, Wulf G, Nakamura M *et al.* Telomeric protein Pin2/TRF1 induces mitotic entry and apoptosis in cells with short telomeres and is down-regulated in human breast tumors. *Oncogene*, 2001 **20** :1497 - 1508
- [7] Kishi S, Zhou XZ, Ziv Y *et al.* Telomeric protein Pin2/TRF1 as an important ATM target in response to double strand DNA breaks. *J Biol Chem*, 2001 **276** (31):29282 - 29291
- [8] Chang W, Dynek JN and Smith S. TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres. *Genes and Development*, 2003 **17** :1328 - 1333

Cloning and Expression of hTRF1 in *Escherichia coli* and Preparation of Polyclonal Antibody

JIANG Hong ZHENG Xiao-Fei LUO Ying ZHU Jie FU Han-Jiang

SUN Qiang-Ling CHEN Chang-Hao SUN Zhi-Xian*

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

Abstract Human telomeric repeat binding factor 1(TRF1) contains one Myb-type DNA-binding repeat and an amino-terminal acidic domain. It can bind to the duplex array of TTAGGG repeats at chromosome ends and is shown to be important in preserving genomic stability, maintaining cell proliferative capacity, and blocking the activation of DNA-damage cell cycle checkpoints. Interestingly, the double strand DNA breaks sensor ATM interacts with and phosphorylates Pin2/TRF1 and inhibits its function after DNA damage. Are there some proteins else that can interact with TRF1 and influence its function? In order to analysis the interaction between TRF1 and other proteins, we must prepare the antiserum that can recognize the endogenous TRF1 of cell lysates. TRF1 cDNA was amplified using cDNA Library of HeLa cell by PCR and cloned into pUCm-T vector. Sequence analysis reveals identity to the GenBank report. The TRF1 cDNA was subcloned into expression vector pET-28(+) and expressed in *E. coli* as a fusion protein of 65 kD. The recombinant TRF1 can express in the supernatant (about 12.3% in total protein) on the induction of 0.5mmol/L IPTG at 37 $^{\circ}$ C for 3 hours. Western-blot analysis showed the recombinant protein can react with TRF1 polyclonal antibody sc-6165 (from Santa Cruz Company). His₆-TRF1 was purified by Ni²⁺-NTA resin affinity chromatography made by ourselves and showed to be homogeneity in SDS-PAGE. Rabbits were immunized for four times to prepare polyclonal antibody. The unpurified antiserum can recognize the overexpressed TRF1 with myc-tag and the endogenous Pin2/TRF1 of cell lysate by Western-blot at 1:1000 dilution. At 1:400 dilution, the antiserum can interact with endogenous TRF1 by Immunofluorescence cell staining analysis. The endogenous TRF1 in different cell lines, such as HepG2, 803, MCF7 and HeLa, locates in the nucleus. The soluble expression TRF1 and preparation of its antibody lay the foundation to study it further.

Key words telomeric repeat binding factor1 (TRF1), expression, polyclonal antibody

Received : 06-18-2003

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No.30000086 and 30000195).

* Corresponding author. Tel 86-10-66932212 ;Fax 86-10-68214653 ;E-mail :sunzx@nic.bmi.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>