

# 蛋白激酶 C $\delta$ 的克隆表达纯化及其在药物先导化合物筛选中的初步应用 Cloning, Expression, Purification of Protein Kinase C $\delta$ and its Preliminary Application in Drug Lead Compounds Screening

陈 樑<sup>1,2\*</sup>, 张红锋<sup>1\*</sup>

CHEN Liang<sup>1,2\*</sup> and ZHANG Hong-Feng<sup>1\*</sup>

1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062

2. 绍兴文理学院医学院, 绍兴 312000

1. The College of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China

2. The Medical School of Shaoxing University, Shaoxing 312000, China

**摘 要** 蛋白激酶 C 家族是一类磷脂酰丝氨酸依赖丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。PKC $\delta$ (蛋白激酶 C $\delta$ )是蛋白激酶 C 家族成员。PKC $\delta$  的异常激活将会导致糖尿病和多种癌症的发生,因此,PKC $\delta$  的特异性抑制剂能成为治疗这些疾病的潜在药物,如能以 PKC $\delta$  为分子靶点来筛选特异性抑制剂,就可以建立癌症及糖尿病的药物先导化合物筛选模型。通过 RT-PCR 的方法,克隆了鼠源的 PKC $\delta$ ,并构建了哺乳动物细胞表达载体,获得了可稳定表达 PKC $\delta$  的 COS1 细胞株。通过亲和吸附的方法获得了较为纯净的 PKC $\delta$ ,并对酶学活性作了进一步的分析,建立了以 PKC $\delta$  为靶点的药物先导化合物筛选模型。

**关键词** 蛋白激酶 C $\delta$ , 表达纯化, 激酶活性分析

**中图分类号** Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)02-0300-05

**Abstract** Protein kinase C $\delta$ (PKC $\delta$ ) is a member of protein kinase C family, which possess phospholipid-dependent serine and threonine kinase activity. PKC $\delta$  is a potential drug target of diabetes and some cancers. The abnormal activation of PKC $\delta$  can arouse diabetes and some cancers. Therefore the specific inhibitors of PKC $\delta$  can be applied in the research and development of the drug candidate of these diseases. The present aim is to obtain active recombinant PKC $\delta$  from COS1 cells. For cloning of mouse PKC $\delta$  a pair of specific primers were designed based on the published sequence of this gene. The cDNA of full coding region was obtained by RT-PCR. The amplified cDNA was subsequently cloned into FLAG-tagged pcDNA3.0 and its sequence was confirmed by DNA sequencing analysis. FLAG-tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$  was transfected into COS1 cells. A cell strain which can stably express PKC $\delta$  was obtained by G418 screening. FLAG-tagged PKC $\delta$  in the supernatant of COS1 cells extracts was absorbed by anti-FLAG resin and eluted by FLAG peptide. The purified protein appeared as a single band on both SDS-PAGE and western blotting, indicating that it was chemical and antigenic pure. By kinase assay, the recombinant PKC $\delta$  was active. Positive inhibitor, staurosporine, was used to prove the enzyme could be greatly inhibited. Several compounds have been found to inhibit the enzyme, which indicates the preliminary application in drug lead compounds screening.

**Key words** protein kinase C $\delta$ , expression and purification, kinase assay

Received: September 17, 2004; Accepted: December 15, 2004.

\* Corresponding author. 陈樑, Tel: 13671651742; E-mail: ys02261040@student.ecnu.edu.cn

张红锋, Tel: 86-21-62237646; E-mail: hfzhang@bio.ecnu.edu.cn

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 在跨膜信号传递过程中起着重要作用。PKC 通过催化多种蛋白质上 Ser/Thr 残基的磷酸化, 调节多种细胞的分化、增殖和凋亡。到目前为止, 在哺乳动物组织内已确定多种 PKC 亚类, 分为 A、B、C 三组: A 组称为典型或传统的 PKC (classical or conventional PKC, cPKC), 包括  $\alpha$ 、 $\beta$ I、 $\beta$ II 和  $\gamma$  亚类, 其活性可被  $\text{Ca}^{2+}$ 、二酰基甘油 (DAG)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 激活; B 组为新型 PKC (novel PKC, nPKC), 包括  $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\mu$ 、 $\eta$  和  $\theta$  亚类, 是  $\text{Ca}^{2+}$  非依赖型的, 但其活性可被 DAG、PS 激活; C 组为非典型 PKC (atypical PKC, aPKC), 由  $\zeta$  和  $\lambda$  亚类组成, 可被 PS 激活。但不能被 DAG、 $\text{Ca}^{2+}$  激活<sup>[1,2]</sup>。蛋白激酶 C $\delta$  (PKC $\delta$ ) 和本家族其他成员一样, 主要可分为两个重要的结构域。N 端是调控结构域, 负责 PKC $\delta$  转位到膜上以及与调控蛋白、激活剂的相互作用, C 端是催化结构域<sup>[3,4]</sup>。PKC $\delta$  发生激活转位到质膜上去的时候, 就启动下游一系列信号通路。PKC $\delta$  的异常激活将会导致多种癌症<sup>[5]</sup> 和糖尿病<sup>[6-7]</sup> 的发生, 因此, PKC $\delta$  的特异性抑制剂能成为治疗这些疾病的潜在药物, 如能以 PKC $\delta$  为分子靶点来筛选特异性抑制剂, 就可以建立癌症及糖尿病的药物筛选模型。因此, 表达纯化出具有生物活性的 PKC $\delta$ , 建立以 PKC $\delta$  为靶点的药物筛选模型有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

限制酶、Taq 酶、T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; COS1 细胞由本实验室保存; 带有 FLAG 标签的 pcDNA3.0 由本实验室改造; Trizol 试剂, 磷脂酰丝氨酸 (PS), 二酰基甘油 (DOG) 等购自 Sigma 公司, 所有化学试剂购自上海生工; 质粒扩增所用的大肠杆菌菌株 JM109 购自 Promega 公司; 辣根过氧化酶标记羊抗小鼠 IgG (HRP-IgG) 系 Santa Cruz 公司产品; Western blotting 显色试剂盒系 Pierce 公司产品 (Rockford, IL, USA); [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P] ATP 购自 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 总 RNA 抽提和 cDNA 合成:** 因为鼠脂肪细胞中含有 PKC $\delta$  mRNA<sup>[8]</sup>, 所以取鼠脂肪细胞以 Trizol 试剂提取总 RNA, 直接进行逆转录反应。以 2  $\mu$ g 总 RNA 进行逆转录反应合成第一链 cDNA, 反应体积为 20  $\mu$ L, 其中包含 40u RNase 抑制剂, 1 mmol/L dNTP 混合物, 2.5  $\mu$ mol/L Oligo (dT)<sub>20</sub> 及 15u ThermoScript 逆转录酶, 50 $^{\circ}$ C 反应 45min 后, 于 85 $^{\circ}$ C 温

育, 5min 终止反应, 合成的 cDNA 即可用于 PCR 扩增或存于 -80 $^{\circ}$ C。

**1.2.2 PCR 扩增 PKC $\delta$  基因和真核表达载体的构建:** 根据报道的序列设计引物, 前向引物为: 5' GGA TCC CAT ATG GCA CCG TTC CTG CGC 3', 逆向引物为 5' TCT GGG AAT TCA CTA CTA TTC CAG GAA TTG CTC 3', 引物由上海博亚 (Bioasia) 合成。PCR 反应在 50  $\mu$ L 总体积中进行, 以 2  $\mu$ L cDNA 第一链为模板, 反应条件为在 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后开始循环, 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 150 s, 共 25 个循环后, 于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物和本实验室保存的经过改造的带有 FLAG 标签的 pcDNA3.0 以 *Nde* I + *Eco* R I 双酶切并以 Vitagen 公司胶回收试剂盒从凝胶中回收, 连接后, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 以碱裂解法从转化子中提取质粒, 菌液 PCR 法筛选接入正确外源基因的转化子。用 Vitagen 公司质粒小抽试剂盒小量制备质粒, 上海博亚公司测定基因序列。

**1.2.3 FLAG-tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$  的转染:** 在转染前一天把  $3 \times 10^5$  个 COS1 细胞接种于含有完全培养基的 90 mm 培养皿中, 第 2 天, 取 2  $\mu$ g FLAG-tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$  稀释到 100  $\mu$ L 无血清培养基中, 把 3  $\mu$ L 脂质体稀释到 100  $\mu$ L 无血清培养基中, 将上述两个溶液轻轻混匀, 孵育 20min, 再添加 800  $\mu$ L 无血清培养基, 把这 1 mL 混合液覆盖在细胞表面, 孵育 5h 后, 更换完全培养基。经过一个月的 G418 抗生素筛选, 获得稳定转染的细胞株。

**1.2.4 FLAG-tagged PKC $\delta$  的纯化:** 把  $5 \times 10^7$  个稳定转染有 FLAG-tagged PKC $\delta$  基因的 COS1 细胞经 800g, 5min 离心收获, 并重悬于 10 mL bufferA (20 mmol/L MOPS, 4% 甘油, 50 mmol/L NaCl, 5 mmol/L Benzamidine, 1 mmol/L PMSF, 1% NP-40, 0.1%  $\beta$ -巯基乙醇, 1% 去氧胆酸钠 1 mmol/L EDTA), 冰上剧烈振荡半小时, 12 000 g, 离心 30 min, 收获上清。放入 1 mL 抗 FLAG 亲和树脂, 在冰上搅拌过夜, 把树脂装到 1 mL 柱子里, 用 3 mL 含有 FLAG 多肽的 bufferA 洗脱。用可除去分子量小于 10kD 的脱盐管除去洗脱液中的 FLAG 多肽。

**1.2.5 Western 印迹法:** 蛋白样品以 12% SDS-PAGE 进行电泳, 然后以 100V 电压转移 45min, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜, 膜以封闭液 (5% BSA 溶解于 TBS) 于 37 $^{\circ}$ C 振荡封闭过夜, 加入以封闭液稀释 (1:1000) 的小鼠抗 FLAG 抗体, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 2h, 洗膜后加 1:2000 稀释的 HRP 羊抗小鼠 IgG 于 37 $^{\circ}$ C 温育

1h,洗去二抗后,用 Western blotting 显色试剂盒显色。

**1.2.6 PKC $\delta$  酶学活性检测:**由于 PKC $\delta$  是一种蛋白激酶,因此它可以将底物磷酸化,而组蛋白 3 (Histone 3) 就是 PKC $\delta$  的底物之一,当 PKC $\delta$  把 Histone 3 磷酸化后,利用 P30 滤纸特异的吸附磷酸化后的 Histone 3,因为磷酸根带有 [ $\gamma$ - $^{33}$ P],所以可用微板闪烁计数器计数。将纯化后的 PKC $\delta$  蛋白 0.3  $\mu$ g 在 30  $\mu$ L 反应体系中 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 4 mmol/L MgCl $_2$ , 37  $\mu$ mol/L [ $\gamma$ - $^{33}$ P] ATP (1  $\mu$ Ci/assay), 100  $\mu$ g/mL 磷脂酰丝氨酸 (PS), 50 ng/mL 二酰基甘油 (DOG), 300  $\mu$ g/mL Histone 3) 中 30 $^{\circ}$ C 水浴孵育一定时间后,经 1% H $_3$ PO $_4$  终止反应。通过收获器将反应样品吸附于 P30 滤纸上,经 1% H $_3$ PO $_4$  洗 3 次,烘干,加入闪烁液后封膜,置 96 孔微板闪烁计数器计数。改变 PKC $\delta$  蛋白的浓度或改变反应总时间作出酶浓度依赖和时间依赖曲线。

**1.2.7 以 Staurosporine 作为 PKC $\delta$  的特异性抑制剂对 PKC $\delta$  活性的影响:**Staurosporine 是一种较为特异的 PKC $\delta$  的抑制剂<sup>[9]</sup>,又具有显著的抗肿瘤活性<sup>[10]</sup>,可作为比较好的阳性抑制剂来检验其对 PKC $\delta$  的抑制效果。纯化后的 PKC $\delta$  蛋白 0.3  $\mu$ g 在 30  $\mu$ L 反应体系中 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 4 mmol/L MgCl $_2$ , 37  $\mu$ mol/L [ $\gamma$ - $^{33}$ P] ATP (1  $\mu$ Ci/assay), 100  $\mu$ g/mL 磷脂酰丝氨酸 (PS), 50 ng/mL 二酰基甘油 (DOG), 300  $\mu$ g/mL Histone 3),同时添加或者不添加 10  $\mu$ mol/L 的 Staurosporine,看其抑制效果。

## 2 结果

### 2.1 PKC $\delta$ 基因的克隆和表达载体的构建

根据报道的序列设计引物,通过 RT-PCR 扩增出一条大约 2 kb 的 DNA 片段,如图 1,该片段经酶切与经相同酶切的带有 FLAG 标签的 pcDNA3.0 连接,转化 JM109,挑取 3 个单克隆菌落,抽提质粒,经酶切验证(图 1),交上海博亚公司测序,与文献报道一致。

### 2.2 PKC $\delta$ 的表达纯化

将  $5 \times 10^7$  个稳定转染有 FLAG-tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$  的 COS1 细胞收获,破碎细胞,取上清,经抗 FLAG 亲和树脂的吸附,用 FLAG 多肽洗脱后,在 SDS-PAGE 胶上就可以看到分子量大约为 80 kD 的条带(图 2),这与预测一致。

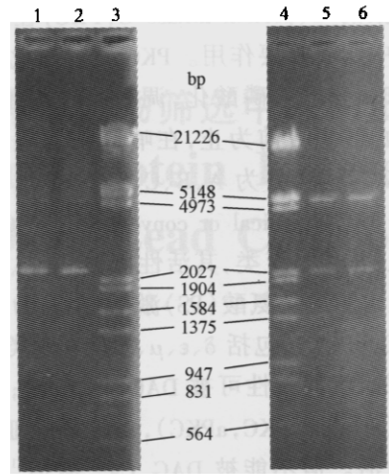


图 1 以 RT-PCR 的方法克隆 PKC $\delta$  基因及哺乳动物细胞表达载体的构建

Fig.1 Cloning of PKC $\delta$  and construction of FLAG-tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$

1,2: RT-PCR product; 3,4: DNA marker; 5,6: recombinant plasmid containing PKC $\delta$  gene; 7: standard DNA marker range.

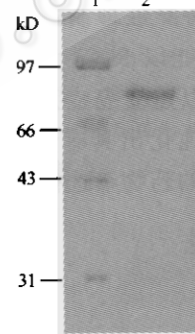


图 2 纯化得到 PKC $\delta$  SDS-PAGE 鉴定

Fig.2 The identification of purified PKC $\delta$  by SDS-PAGE

1: standard protein marker 2: purified PKC $\delta$  protein.

### 2.3 FLAG-tagged PKC $\delta$ 的 Western 印迹法检测

分别取转染有 FLAG-tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$  的 COS1 细胞和转染有空载体 FLAG-tagged pcDNA3.0 的 COS1 细胞,取破胞上清,用小鼠抗 FLAG 抗体 Western 检测(图 3),可见转染有 FLAG-tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$  的 COS1 细胞破胞上清中 80 kD 处有条带。将纯化得到的 FLAG-tagged PKC $\delta$ ,用 Western 印迹检测后可得到 80 kD 处有条带。

### 2.4 PKC $\delta$ 的酶学性质分析

利用 P30 滤纸可以特异的吸附磷酸化后的底物,当 PKC $\delta$  把底物 Histone 3 磷酸化,由于 P30 滤纸特异吸附了磷酸化后的 Histone 3,把未被磷酸化的底物洗去,使用液体闪烁计数的方法,就可对 PKC $\delta$  的活性进行检测。在加激活剂磷脂酰丝氨酸(PS)、

二酰基甘油(DOG)后 PKC $\delta$  的活性可提高 3 倍。有  
没有加 CaCl<sub>2</sub> 对 PKC $\delta$  的活性没有影响(图 4)。这与  
文献报道<sup>[3]</sup> 的也一致。

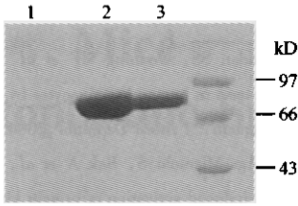


图 3 Western 印迹法验证 PKC $\delta$  的表达和纯化  
Fig.3 Western blotting analyses of the expression  
and purification of PKC $\delta$

1: the supernatant of COS1 cells transfected with FLAG-tagged  
pcDNA3.0; 2: the supernatant of COS1 cells transfected with FLAG-  
tagged pcDNA3.0-PKC $\delta$ ; 3: purified PKC $\delta$  protein.

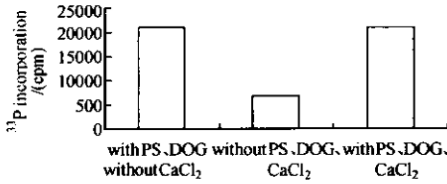


图 4 PKC $\delta$  的酶学性质分析

Fig.4 The properties of PKC $\delta$  enzymology

### 2.5 PKC $\delta$ 酶活性蛋白浓度依赖曲线和时间依赖曲线

改变 PKC $\delta$  蛋白的浓度或改变反应总时间作出  
酶学的浓度依赖和时间依赖曲线。进一步研究其酶  
学活性。由下图可知,该酶是具有浓度依赖性和时  
间依赖性的。

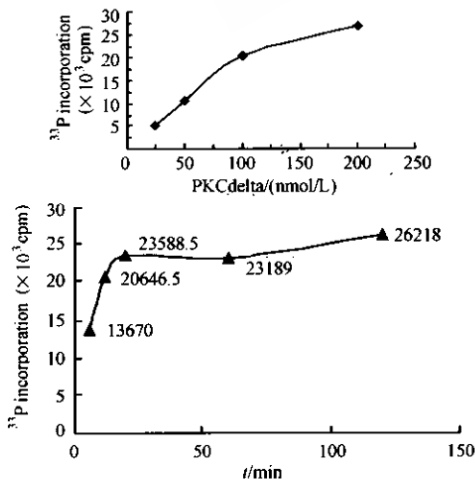


图 5 PKC $\delta$  酶活性的蛋白浓度依赖曲线和时间依赖曲线

Fig.5 Concentration and time dependence curve of PKC $\delta$  activity

### 2.6 以 Staurosporine 作为阳性抑制剂试验模型的可信性

Staurosporine 是一种较为特异的 PKC $\delta$  的抑制

剂<sup>[9]</sup>,又具有显著的抗肿瘤活性,可作为比较好的阳  
性抑制剂来检验其对 PKC $\delta$  的抑制效果。实验结果  
显示,Staurosporine 作为阳性抑制剂可大大的抑制  
PKC $\delta$  的活性,这提示我们以 PKC $\delta$  为分子靶点的抑  
制剂筛选模型是基本可行的。如果其他的化合物有  
类似的抑制效果,就可能有 Staurosporine 类似的功  
用。目前,本实验室已经利用该模型在进行抑制剂的  
筛选,即药物的先导化合物的筛选,已初步发现某些  
化合物或中药多糖成分具有一定的抑制效果(未  
发表)。

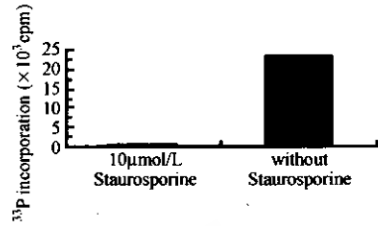


图 6 PKC $\delta$  的特异性抑制剂对 PKC $\delta$  活性的影响

Fig.6 The influence of the PKC $\delta$  specific inhibitor  
upon PKC $\delta$  activity

### 3 讨论

PKC $\delta$  异常激活与多种疾病如糖尿病<sup>[6-8, 11-12]</sup>、  
恶性肿瘤<sup>[5]</sup> 都有密切关系,是治疗这些疾病的潜在  
靶点,如能发现其特异性的抑制剂,就有可能成为治  
疗这些疾病的药物。由于 PKC $\delta$  的功能在大多数组  
织中都是冗余的,而对病灶功能可能是必不可少的。  
因此 PKC $\delta$  的特异性抑制剂将比较针对于病灶细  
胞,而对于正常细胞毒副作用较小。把 PKC $\delta$  作为  
分子靶点筛选药物,可以为评价样品的生物活性和  
药理作用提供分子或基因水平的活性结果,直接揭  
示了化合物与靶点之间的作用机制。这对于评价活  
性化合物的药用价值,以及深入认识药物作用的机  
制都是十分重要的实验依据。而且如果能发现其特  
异性的抑制剂或激活剂都将为研究 PKC $\delta$  的生物功  
能提供新的方法和手段。

我们通过 RT-PCR 的方法,构建了 PKC $\delta$  的哺乳  
动物细胞表达载体,并获得了可稳定表达 PKC $\delta$  的  
COS1 细胞株,获得了较纯净的重组 PKC $\delta$ 。通过在  
PKC $\delta$  的 N 端添加了一段表达 FLAG 多肽的序列,形  
成了 FLAG 融合蛋白,利用这段序列只需通过一步  
就可以纯化到较为纯净的 PKC $\delta$ ;由于 FLAG 是一个  
短肽,因而对活性没有影响。添加了 FLAG 多肽还  
有助于我们利用小鼠抗 FLAG 抗体,通过 Western 印  
迹检测表达的蛋白,通过 Western 印迹法显示,在转

化空载体的 COS1 细胞中无任何阳性条带,只有转入带有基因 PKC $\delta$  载体的 COS1 细胞才出现预计分子量大小的反应条带,并且,纯化后的蛋白 Western 检测也有这条带。从而基本确定 PKC $\delta$  的正确表达和纯化。而通过酶学性质的分析,包括激活剂对其活性的激活,和活性并不依赖于 Ca<sup>2+</sup> 这两点更可确定 PKC $\delta$  的成功表达纯化,并从另一方面表明利用 FLAG 多肽进行纯化这一策略的正确性。

最后,我们利用 Staurosporine 作为阳性药物来试验模型的可行性<sup>9-10</sup>,实验结果显示,Staurosporine 可大大抑制 PKC $\delta$  的活性,这提示我们以 PKC $\delta$  为分子靶点的抑制剂筛选模型是基本可行的。如果其他的化合物有类似的抑制效果,就可能有 Staurosporine 类似的功用。在以酶特异性抑制剂作为药物先导化合物筛选目标进行筛选时,可以根据酶活性作为检测指标筛选抑制酶活性的化合物。目前,本实验室已经利用该模型在进行药物筛选,已初步发现某些化合物或中药多糖成分具有一定的抑制效果。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D *et al.* Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279**: L429-L438
- [ 2 ] Newton AC. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chem Rev*, 2001, **101**: 2353 - 2364
- [ 3 ] Luise S, Andress G, Hans-Joachim M *et al.* Phosphorylation of protein kinase C $\delta$  (PKC $\delta$ ) at Threonine 505 is not a prerequisite for enzymatic activity. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 6805 - 6811
- [ 4 ] Luise S, Martina S, Susanne R *et al.* Requirements of protein kinase C $\delta$  for catalytic function. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 8886 - 8892
- [ 5 ] Sitailo LA, Tibudan SS, Denning MF *et al.* Bax activation and induction of apoptosis in human keratinocytes by the protein kinase C delta catalytic domain. *J Invest Dermatol*, 2004, **123**: 434 - 443
- [ 6 ] Rosenzweig T, Aga-Mizrachi S, Bak A *et al.* Src tyrosine kinase regulates insulin-induced activation of protein kinase C (PKC) delta in skeletal muscle. *Cell Signal*, 2004, **16**: 1299 - 1308
- [ 7 ] Braiman L, Alt A, Kuroki T *et al.* Insulin induces specific interaction between insulin receptor and protein kinase C $\delta$  in primary cultured skeletal muscle. *Mol Endocrinol*, 2001, **15**: 565 - 574
- [ 8 ] Ayse G, Darrell A, Nicholas JGW. Rotlerin inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes by uncoupling mitochondrial oxidative phosphorylation. *Endocrinology*, 2002, **143**: 3884 - 3896
- [ 9 ] Seynaeve CM, Kazanietz MG, Blumberg PM *et al.* Differential inhibition of protein kinase C isozymes by UCN-01, a staurosporine analogue. *Mol Pharmacol*, 1994, **45**(6): 1207 - 1214
- [ 10 ] Wang YF, Hsieh YF, Lin CL *et al.* Staurosporine-induced G(2)/M arrest in primary effusion lymphoma BCBL-1 cells. *Ann Hematol*, 2004, **83**(12): 739 - 44.
- [ 11 ] Braiman L, Alt A, Kuroki T *et al.* Protein kinase C $\delta$  mediates insulin-induced glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle. *Mol Endocrinol*, 1999, **13**: 2002 - 2012
- [ 12 ] Caruso M, Maitan MA, Bifulco G *et al.* Activation and mitochondrial translocation of protein kinase C $\delta$  are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 45088 - 45097