

GST Pulldown 技术检测 HEK293T 细胞活化的 Rab35

张万秋¹, 朱一超^{2*}

(¹泰州职业技术学院, 江苏 泰州 225300; ²南京医科大学生理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 运用 GST pulldown 技术建立真核细胞中活化的 Rab35 的可靠检测方法。方法: 构建 GST-RUN 的原核表达载体, 并使其在大肠杆菌 BL21 中大量表达。用 GST pulldown 和 Western blot 技术分别检测 HEK293T 细胞中活化的 Rab35 及 Rab35 蛋白的表达。结果: 成功构建了 GST-RUN 的原核表达载体, 并使其在原核细胞中大量表达融合蛋白 GST-RUN, 用 GST Pulldown 和 Western blot 技术证实了 HEK293T 细胞中有活化的 Rab35 和 Rab35 总蛋白的表达。结论: 本工作所建立的 GST Pulldown 技术可以检测 HEK293T 细胞中活化的 Rab35, 从而为进一步深入研究 Rab35 在真核细胞中的功能提供了技术保障。

[关键词] GST pulldown; HEK293T; Rab35; 真核细胞

[中图分类号] R329.25

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)12-1652-04

The activated Rab35 detected by GST pulldown in HEK293T cells

ZHANG Wan-qiu¹, ZHU Yi-chao^{2*}

(¹Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; ²Department of Physiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a GST pulldown assay that can detect the activated Rab35 in eukaryotic cells. **Methods:** We constructed prokaryotic expression vector containing fusion protein GST-RUN. The correct plasmid was transfected into *E. coli* BL21 strain and the expression of the fusion protein was induced by IPTG. SDS-PAGE and Western blotting were utilized for determination of the corresponding recombinant proteins. Then we pulled down the fusion protein with glutathione beads to detect the activated Rab35 in HEK293T cells. **Results:** The prokaryotic expression vector GST-RUN was successfully constructed and expressed fusion protein GST-RUN stably. GST pulldown assay showed high activated Rab35 in HEK293T cells. **Conclusion:** The activated Rab35 was successfully detected by GST pulldown assay. This experimental scheme can be used for further study of active Rab35 targeting in eukaryotic cells.

[Key words] GST pulldown; HEK293T; Rab35; eukaryotic cell

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(12): 1652-1655]

Rab 蛋白是小 G 蛋白 Ras 超家族成员之一, 现已发现人的 Rab 蛋白有近 70 个, 其主要作用与蛋白的运输相关^[1-2]。Rab 蛋白和其他小 G 蛋白类似, 均有 GDP 结合和 GTP 结合两种形式, GTP 结合的 Rab 蛋白是其活性形式, 而 GDP 结合的 Rab 蛋白则是其非活性形式^[3]。本工作所研究的 Rab35 是 Rab 蛋白家族成员之一, 最早在人骨骼肌 cDNA 文库中被克隆^[4]。早期的研究发现, Rab35 参与了细胞膜介导的物质运输^[1-2]。在涉及 Rab35 信号通路调控机制的研究中, Rab35 的活化或失活是其信号通路发挥

调控作用的关键所在, 因此确定 Rab35 是否活化是 Rab35 功能研究首先要考虑的问题。因为目前尚无商品化的试剂盒可用于检测活化的 Rab35, 因此建立检测活化的 Rab35 的实验体系是研究其功能的先决条件。

谷胱甘肽巯基转移酶 (glutathione S-transferase, GST) pulldown 实验是一个行之有效的验证蛋白间相互作用的体外试验技术, 此方法简单易行, 操作方便。小鼠的 RUN and SH3 domain containing 2 (RUSC2) 的 RUN 结构域可与活化的 (Rab35-GTP) 结合^[5]。因此, 将 RUN 和 GST 蛋白融合, 可用于检测真核细胞中活化的 Rab35。为了建立检测活化的 Rab35 的实验体系, 本研究构建了 GST-RUN 原核表

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81101999)

*通讯作者, E-mail: zhuyichao@njmu.edu.cn

达载体, 并采用 GST Pulldown 技术检测 HEK293T 细胞中活化的 Rab35, 从而为进一步研究 Rab35 在真核细胞中的功能提供了技术保障。

1 材料和方法

1.1 材料

HEK293T 人胚肾细胞系(ATCC 公司, 美国)。TRIzol(Invitrogen 公司, 美国), 无内毒素质粒抽提试剂盒(Qiagen 公司, 德国), *Bam*H I 和 *Eco*R I 限制性内切酶(NEB 公司, 美国), T4 连接酶、*Taq* 酶、*pfu* 高保真酶、pMD18-T 克隆载体(大连宝生物公司), Quant cDNA 第一链合成试剂盒、感受态大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3)(北京天根公司), pGEX-4T-2 原核表达载体(GE 医疗集团, 瑞典), 细菌裂解液(Sigma 公司, 美国), 谷胱甘肽琼脂糖珠(Promega 公司, 美国)。兔抗人 Rab35 单克隆抗体(ProteinTech Group 公司, 美国)、羊抗兔 IgG-HRP(Santa Cruz 公司, 美国), ECL 发光试剂盒(Pierce 公司, 美国)。

细胞培养箱(Thermo 公司, 美国), PCR 仪、电泳仪、转膜仪和成像系统(Bio-Rad 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

HEK293T 细胞使用添加 10%(v/v)胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 5% CO₂、饱和湿度的 37°C 细胞培养箱中培养。

1.2.2 RUN 结构域 cDNA 序列的克隆

用 TRIzol 裂解 HEK293T 细胞, 提取总 RNA, 利用 Quant cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA。以 HEK293T 细胞 cDNA 为模板, 以 5'-TCTCCCGATG-GCAACTCG-3' 和 5'-CACACGCAGCAGTTCCTT-3' 为引物, PCR 克隆 RUN and SH3 domain containing 2 (RUSC2) 基因 (NM_001135999.1) RUN 结构域的 cDNA 序列, PCR 程序如下: 95°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s, 56°C 退火 20 s, 72°C 延伸 1 min, 运行 30 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 产物连接入 pMD18-T 克隆载体, 测序检验阳性克隆。

1.2.3 原核表达载体的构建和质粒的获得

以连接 RUN 的 pMD18-T 克隆载体为模板, 用 5'-CGCGGATCCGCGTCTCCCGATGGCAACTCG-3' (下划线表示 *Bam*H I 的酶切位点) 和 5'-GGAATTC-CACACGCAGCAGTTCCTT-3' (下划线表示 *Eco*R I 的酶切位点) 作引物, PCR 克隆 RUN 的 cDNA 序列并在两边加入酶切位点, 经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切后, 连接至原核表达载体 pGEX-4T-2 中。按 DH5 α

感受态细胞转化说明书, 将连接 RUN 的 pGEX-4T-2 载体转化入感受态大肠杆菌 DH5 α , 并将转化后的大肠杆菌涂布在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37°C 倒置培养。12 h 后, 挑取单克隆菌落, PCR 鉴定阳性克隆。将经 PCR 鉴定的阳性单克隆置于 LB 液体培养基中 37°C 培养过夜, 按质粒提取试剂盒说明书提取质粒, 并测定基因序列。获得的质粒命名为 GST-RUN, 并于 -20°C 保存备用。

1.2.4 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

按 BL21 大肠杆菌感受态细胞转化说明书, 将重组质粒 GST-RUN 转化入感受态大肠杆菌 BL21, 并将转化后的大肠杆菌涂布在含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37°C 倒置培养, 12~16 h 后出现菌落。挑取阳性单克隆, 接种到含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 剧烈振荡至菌液 *D*(600 nm) 值在 0.3~0.4 时, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导后继续培养 3~4 h, 离心并收集菌体。用细菌裂解液重新悬浮菌体, 细菌裂解液裂菌后, 加入 5 \times SDS 上样缓冲液混匀, 蛋白充分变性后行 10% SDS-PAGE, 电泳条件为 80 V 电泳 20~30 min, 待溴酚蓝迁移出积层胶位置再换用 100 V 电泳 90 min, 电泳结束后, 胶作考马斯亮蓝染色 4 h, 脱色后观察结果。

1.2.5 蛋白提取和 GST pulldown 实验

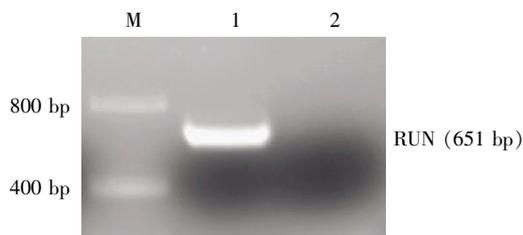
将谷胱甘肽琼脂糖珠加入含 GST-RUN 蛋白的细菌裂解上清液中, 4°C 旋转混合 30 min, 离心, 弃上清, 沉淀用细菌裂解液洗涤 3 次。按本实验室建立的方法^[6], RIPA 蛋白裂解液裂解血清饥饿 24 h 后的 HEK293T 人胚肾细胞, 提取总蛋白, BCA 比色法测定蛋白浓度。取 200 μ g 蛋白, 与已结合 GST-RUN 融合蛋白的谷胱甘肽琼脂糖珠 100 μ l 置于同一个 EP 管中, 用于沉淀活化的 Rab35。4°C 旋转孵育 1 h, 离心后分离沉淀和上清, 取 10% 上清液用以检测非活化的 Rab35, 即 Rab35-GDP 组; 用冲洗液洗涤琼脂糖珠沉淀 3 次, 以去除未结合的蛋白, 洗涤后的沉淀结合有活化的 Rab35, 即 Rab35-GTP 组; 另取 20 μ g 总蛋白, 作为上样对照组。向上述 3 组样本加入 SDS 上样缓冲液, 100°C 煮沸 5 min, 离心 3 min, 取上清行 12% SDS-PAGE。电泳条件为 80 V 电泳 20~30 min, 待溴酚蓝迁移出积层胶位置再换用 100 V 电泳 90 min, 电泳完毕后将蛋白经湿转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。抗 Rab35 抗体(1:800) 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜, 羊抗兔 IgG-HRP(1:1 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 暗室中加入 ECL 液孵育

5 min 后,利用凝胶电泳成像系统进行读片分析。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建

以 PCR 产物酶切后连接的方法,将目的基因 RUN cDNA 序列连接入原核表达载体 pGEX-4T-2。将连接后的原核表达载体转化入感受态大肠杆菌 DH5 α ,经过菌液 PCR 鉴定,重组质粒中含有目的基因的插入片段,其大小为 651 bp(图 1)。进一步对上述获得的阳性克隆进行基因测序,测序结果表明,新构建的原核表达载体含有目的基因片段 RUN,且无基因突变。这些实验结果清楚说明 GST-RUN 原核表达载体构建成功。



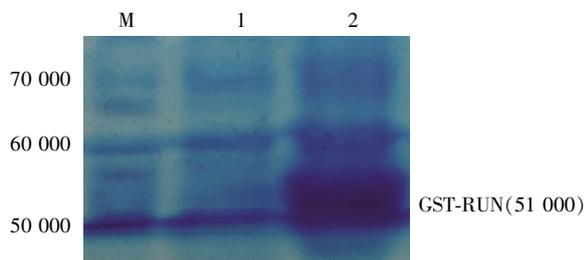
M: DNA Marker; 1: 阳性克隆; 2: 假阳性克隆。

图 1 重组原核表达载体阳性克隆的 PCR 鉴定

Figure 1 The PCR results of positive clone of recombinant prokaryotic expression vector

2.2 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

将 GST-RUN 原核表达载体转化入感受态大肠杆菌 BL21,经 IPTG 诱导表达,考马斯亮蓝染色、脱色后可见蓝色的蛋白条带。与未经 IPTG 诱导组比较,IPTG 诱导组大量表达约 51 000 的融合蛋白(图 2)。实验结果表明构建的 GST-RUN 原核表达载体,可以使目的蛋白大量表达,达到实验要求。



M: 蛋白 Marker; 1: 未经 IPTG 诱导组; 2: IPTG 诱导组。

图 2 GST-RUN 重组蛋白在 BL21 中的表达

Figure 2 The expression of GST-RUN recombinant protein in BL21 cells

2.3 Pulldown 检测活化的 Rab35

为了检测真核细胞中活化的 Rab35,用 RIPA 蛋白裂解液裂解 HEK293T 人胚肾细胞后提取总蛋白,用 GST Pulldown 技术检测活化的 Rab35。Pull-

down 组的结果表明,GST-RUN 可与 Rab35 结合,在约 23 000 处显现目的蛋白条带,而 GST 空白对照组没有检测到蛋白条带(图 3)。此外,上清液中有非活化的 Rab35 (Rab35-GDP),且 Rab35-GTP 约为 Rab35-GDP 量的 11.7%,约为 Rab35 总量的 10.5% (图 3)。这些结果说明,本研究建立的实验体系可以检测真核细胞中活化的 Rab35,同时说明 HEK293T 细胞在静息条件便有少量活化的 Rab35 存在。

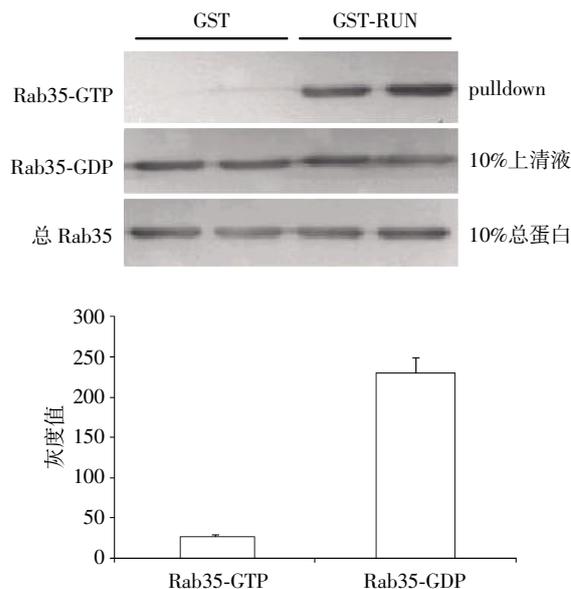


图 3 GST Pulldown 技术检测 HEK293T 细胞中活化的 Rab35

Figure 3 The activated Rab35 detected by GST pulldown in HEK293T cells

3 讨论

Rab 蛋白组成了最大的小 G 蛋白家族,在真核细胞中 Rab 蛋白参与了几乎所有的膜内运输过程^[1-2]。Rab 功能的异常会导致很多疾病,例如免疫缺陷、癌症以及神经紊乱^[2]。Rab35 是 Rab 蛋白家族成员之一,以往报道 Rab35 主要参与 T 细胞调节受体^[7],线虫的卵母细胞卵黄蛋白受体的细胞内吞、质膜循环^[8]以及参与果蝇 S2 细胞和 HeLa 细胞胞质分裂过程中的内含体循环^[9]等。近来一些研究结果暗示 Rab35 可能也参与对细胞极化形态改变的调控^[10-12],如在幼地鼠肾细胞(BHK 细胞)中,过表达野生型和组成型活性的 Rab35 可诱导细胞突触的形成;在 PC12 和 N1E-115 神经细胞中 Rab35 可调节轴突的生长^[13]; Rab35 过表达诱导 T 细胞向细胞四周伸出突触状结构^[14]。由此可见,在多种真核细胞中 Rab35 参与众多的细胞生理和病理活动。因为目前尚无商品化的

试剂盒可用于检测活化的 Rab35,因此,要深入阐明 Rab35 在真核细胞中作用机制,建立检测活化的 Rab35 的可靠实验体系至关重要。

小 G 蛋白具有两种分子构象:GTP 结合的活性状态和 GDP 结合的非活性状态。小 G 蛋白在两种状态间交替,从而以分子开关的形式行使功能。检测小 G 蛋白 GTP 结合的活性状态,常常运用 GST Pulldown 技术。Pulldown 技术是用固相化的、已标记的诱饵蛋白或标签蛋白(如生物素-、FLAG-、Poly-His-或 GST-),从细胞裂解液中钓出与之相互作用的蛋白,进而确定其活性^[15]。GST 基因融合系统是以可诱导的、高表达的 GST 融合基因或基因片段为基础,通过此技术在大肠杆菌中表达出的融合蛋白的氨基末端为 GST 部分,羧基端为目的蛋白,因此融合蛋白具有完整的 GST 氨基酸序列,且具有与天然蛋白相似的酶活性与晶体结构。因为它将靶蛋白-GST 融合蛋白亲和固化在谷胱甘肽亲和树脂上,因此当目的蛋白溶液过柱时,可从中捕获与之相互作用的目的蛋白,洗脱结合物后通过 SDS-PAGE 电泳分析,从而可以研究两种蛋白间的相互作用或筛选相应的目的蛋白。pGEX 系列质粒是目前比较常用的 GST 融合系统载体,本文选用 pGEX-4T-2 作为实验载体。本研究采用 IPTG 作为诱导剂,诱导 GST-RUN 融合蛋白在大肠杆菌 BL21 菌株中表达,SDS-PAGE 后考马斯亮蓝染色结果显示 GST-RUN 融合蛋白大量表达。基因测序和 SDS-PAGE 结果均说明 GST-RUN 原核表达载体构建成功,并能成功表达融合蛋白。本实验用 GST-RUN 融合蛋白钓出了 HEK293T 细胞中活化的 Rab35,说明运用 GST Pulldown 技术可以检测活化的 Rab35,同时暗示在人的细胞或组织中 Rab35 和 RUSC2 的 RUN 结构域的相互作用方式和其他哺乳动物的作用形式类似^[5],Rab35 和 RUSC2 相互结合的确切分子机制需进一步研究。

综上所述,本研究通过构建 GST-RUN 原核表达载体,并使其在大肠杆菌中大量表达,同时采用 GST Pulldown 技术成功检测了 HEK293T 中活化的 Rab35,从而建立了真核细胞中检测活化的 Rab35 的实验手段,这为进一步研究 Rab35 在真核细胞中的功能提供了技术保障。

[参考文献]

- [1] Hutagalung AH,Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology [J]. *Physiol Rev*, 2011,91(1):119-149
- [2] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2009,10(8):513-525
- [3] Pfeffer SR. Structural clues to Rab GTPase functional diversity[J]. *J Biol Chem*,2005,280(16):15485-15488
- [4] Zhu AX,Zhao Y,Flier JS. Molecular cloning of two small GTP binding proteins from human skeletal muscle [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,1994,205(3):1875-1882
- [5] Fukuda M,Kobayashi H,Ishibashi K,et al. Genome-wide investigation of the Rab binding activity of RUN domains:development of a novel tool that specifically traps GTP-Rab35[J]. *Cell Struct Funct*,2011,36(2):155-170
- [6] Zhu Y,Tian Y,Du J,et al. Dvl2-dependent activation of Daam1 and RhoA regulates Wnt5a-induced breast cancer cell migration[J]. *PLoS ONE*,2012,7(5):e37823
- [7] Patino-Lopez G,Dong X,Ben-Aissa K,et al. Rab35 and its gap epi64c in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation[J]. *J Biol Chem*,2008,283(26):18323-18330
- [8] Sato M,Sato K,Liou W,et al. Regulation of endocytic recycling by *C. elegans* Rab35 and its regulator rme-4,a coated-pit protein[J]. *EMBO J*,2008,27(8):1183-1196
- [9] Kouranti I,Sachse M,Arouche N,et al. Rab35 regulates an endocytic recycling pathway essential for the terminal steps of cytokinesis[J]. *Curr Biol*,2006,16(17):1719-1725
- [10] Chua CE,Lim YS,Tang BL. Rab35-a vesicular traffic-regulating small GTPase with actin modulating roles [J]. *FEBS Lett*,2010,584(1):1-6
- [11] Schiefermeier N,Teis D,Huber LA. Endosomal signaling and cell migration [J]. *Curr Opin Cell Biol*,2011,23(5):615-620
- [12] Marat AL,Ioannou MS,McPherson PS. Connecdenn 3/Dennd1c binds actin linking Rab35 activation to the actin cytoskeleton[J]. *Mol Biol Cell*,2012,23(1):163-175
- [13] Chevallier J,Koop C,Srivastava A,et al. Rab35 regulates neurite outgrowth and cell shape [J]. *FEBS Lett*,2009,583(7):1096-1101
- [14] Shim J, Lee SM, Lee MS, et al. Rab35 mediates transport of Cdc42 and Rac1 to the plasma membrane during phagocytosis[J]. *Mol Cell Biol*,2010,30(6):1421-1433
- [15] 李卫星, 杜军, 朱一超. GST pulldown 技术检测 HEK293T 细胞 Daam1 的活性 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2011,31(10):1412-1416