

生物素化 *FOXM1* 真核表达体系的构建及鉴定

邹红春, 谭桂湘, 谭拥军*

(湖南大学 生物学院, 中国湖南 长沙 410082)

摘要: 建立基于生物素 AP-tag 标签的 *FOXM1* 真核表达载体, 利用生物素与链霉亲和素的高特异性、高亲和力的结合性质对 *FOXM1* 蛋白进行纯化, 为后续鉴定其互作分子的研究奠定基础。分别构建真核表达载体 pcDNA3.1-AP-*FOXM1* 和大肠杆菌生物素连接酶 *BirA* 真核表达载体 pcDNA3.1-*BirA*, 将 pcDNA3.1-AP-*FOXM1* 和 pcDNA3.1-*BirA* 共转染人胚肾 293T(HEK293T)细胞, 用银染及 Western 印迹检测细胞裂解液, 确定相关蛋白表达; 用链霉亲和素琼脂糖珠纯化生物素标记的 *FOXM1*, 并考察 *FOXM1* 的互作蛋白是否可以同时被洗脱下来。研究发现构建的生物素标签真核表达体系能有效表达生物素化的目标蛋白 *FOXM1*; 该蛋白在 Western 印迹、pull-down 等实验中可实现无需抗体的一步法应用; 该体系可用于 *FOXM1* 互作蛋白的鉴定和功能分析。结果表明建立了基于生物素 AP-tag 标签的 *FOXM1* 真核表达体系, 为 *FOXM1* 互作蛋白与功能的深入研究奠定了技术基础。

关键词: 生物素化 *FOXM1*; *BirA* 生物素连接酶; HEK 293T 细胞; 亲和纯化; 蛋白印迹

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2016)01-0016-05

Construction and Identification of Biotinylated *FOXM1* Eukaryotic Expression System

ZOU Hong-chun, TAN Gui-xiang, TAN Yong-jun*

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, Hunan, China)

Abstract: To construct the eukaryotic expression vector for biotin AP-tagged *FOXM1* and purify the biotin-labeled *FOXM1* based on the high specificity, high affinity interaction between biotin and streptavidin will provide a foundation for the follow-up identification of *FOXM1*-interacting proteins. The eukaryotic expression vectors pcDNA3.1-AP-*FOXM1* and pcDNA3.1-*BirA* containing *E. coli* biotin ligase (*BirA*) were constructed respectively and co-transfected into HEK 293T cells. The expression of the biotin-labeled *FOXM1* in the cells was confirmed by silver nitrate staining and Western-blot with HRP-labeled Streptavidin. The biotinylated *FOXM1* was purified with streptavidin agarose beads and the efficiency of the pull-down of *FOXM1*-interacting proteins were also analyzed. The constructed eukaryotic expression system produced biotinylated *FOXM1* in cells. This protein enabled a one-step method for detection and purification of *FOXM1* in Western-blot and pull-down experiments without using antibodies. The establishment of eukaryotic expression system of biotinylated *FOXM1* provided a technical foundation for the identification of *FOXM1*-interacting proteins and the study of *FOXM1* functions.

Key words: biotinylated *FOXM1*; *BirA* biotin ligase; HEK 293T cells; affinity purification; Western-blot

(*Life Science Research*, 2016, 20(1): 016-020)

FOXM1 (Forkhead box protein M1) 是 Fork-head box 转录因子家族的成员之一^[1], 它与细胞增

殖、衰老、DNA 损伤修复、再生和肿瘤等许多生理病理过程都有密切关系^[2,3]。*FOXM1* 转录因子与细

收稿日期: 2015-03-27; 修回日期: 2015-10-15

基金项目: 国家自然科学基金中港合作研究 NSFC-RGC 项目(香港大学)

作者简介: 邹红春(1989-), 女, 湖南株洲人, 硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗; * 通讯作者: 谭拥军(1967-), 男, 湖南长沙人, 湖南大学教授, 药理和分子生物学博士, 博士生导师, 主要从事肿瘤基因治疗和干细胞的多能性与定向分化, Tel: 0731-88823211, E-mail: yj-tan@hnu.edu.cn.

胞周期、细胞增殖、细胞的复制和有丝分裂有关^[4,5]。FOXM1 参与小鼠多能性的干性维持,是参与干细胞多能性维持的一个新因子^[6]。FOXM1 是 DNA 损伤后维持基因组稳定性的重要因子,正常细胞中的 FOXM1 能够通过刺激应急基因表达,激活细胞周期检查点^[7]。通过认识以 FOXM1 为核心、依靠蛋白互相作用形成的调节网络,对于全面描述 FOXM1 在细胞中的生物学功能,具有十分重要的价值。

串联亲和纯化的方法是蛋白质组学研究常用方法之一,然而串联亲和纯化法往往造成内源目的蛋白流失,重复多次的洗脱步骤无法获取较弱且短暂互作的生物信号^[8]。因此建立更加高效、灵敏、简便的蛋白纯化检测方法,将为蛋白质相互作用的研究提供一个前期的技术基础。AP-tag 是指将目的蛋白的 N 端或 C 端加上由 15 个氨基酸残基组成的小标签,该小标签可被生物素连接酶 BirA (biotin ligase) 特异性识别并在目的蛋白标签上的赖氨酸残基共价结合生物素^[9],生物素连接酶 BirA 可与链霉亲和素通过非共价键结合,结合力 K_d 值高达 10^{-15} mol/L^[10]。这一特性使得生物素-链霉亲和素系统可广泛应用于生物技术领域^[11-13]。本文关于生物素化标签 FOXM1 的构建,不仅实现了蛋白一步纯化的快速简便方法,而且实现了 Western 印迹检测 FOXM1 蛋白无需一抗的一步法快速检测,为蛋白功能的深入分析及互作蛋白的研究奠定了前期技术基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

大肠杆菌 DH5 α 购自北京百泰克生物技术有限公司,真核表达质粒 pcDNA3.1(-)和 HEK 293T 细胞为本实验室保存,链霉亲和素琼脂糖珠 (streptavidin sepharose high performance) 购自美国 GE 通用电气公司生命科学部,链霉亲和素-HRP 购自 Beyotime, DMEM 培养基 (美国 Invitrogen 公司)、胎牛血清 FBS (美国 Hyclone 公司); DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根生化科技北京有限公司,内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 New England Biolabs 公司, FOXM1 一抗购自美国 Santa 公司 (Santa Cruz SC-502), Rabbit 二抗购自 GE, β -actin 抗体购自中国 Beyotime 公司 (Beyotime aa128), β -catenin 抗体购自美国 Santa 公司 (Santa Cruz SC-7963)。

1.2 方法

1.2.1 pcDNA3.1-BirA 重组表达载体的构建及鉴定

CTAB/NaCl 法提取大肠杆菌基因组,以大肠杆菌基因组为模板扩增 BirA (GenBank: M15820.1) 片段。以上游引物 5'-CGAATTCATGAAGGATA-ACACCGTGCCACTG-3' 和下游引物 5'-CGGATC-CGGTAGAAGAGGTCAGACTACGC-3' 扩增片段长为 960 bp (下划线处分别为 EcoR I、BamH I 酶切位点)。根据 TOYOBO 高保真酶说明书进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,然后以 98 °C 30 s,58 °C 30 s,68 °C 1 min 的条件进行 30 个循环,68 °C 延伸 10 min 回收 1 000 bp 左右的扩增产物。扩增产物与载体 pcDNA3.1(-) 分别经 EcoR I、BamH I 酶切后连接。转化 DH5 α 感受细胞,挑取单克隆振荡过夜培养,按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒后进行酶切鉴定,经测序分析 (上海生工) 证实其正确性,并命名为 pcDNA3.1-BirA。

1.2.2 pcDNA3.1-AP-FOXM1 重组表达载体的构建及鉴定

以 pCMV-hFOXM1 (NCBI: NM_202003.1) 为模板,以上游引物 5'-GGAATTCATGTCCGGCCT-GAACGACATCTTCGAGGCTCAGAAAATCGAAT-GGCACGAACTAGTATGAAAAGTACCCCCCGT-CG-3' 和下游引物 5'-CCCAAGCTTCTACTG-TAGCTCAGGAAT-3' 扩增全长人的 FOXM1 的 cDNA 序列 (下划线处分别为 EcoR I、Hind III 酶切位点)。根据 TOYOBO 高保真酶说明书进行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,然后以 98 °C 30 s,58 °C 30 s,68 °C 3 min 的条件进行 30 个循环,68 °C 延伸 10 min 回收 2 400 bp 左右的扩增产物。扩增产物与载体 pcDNA3.1(-) 分别经 EcoR I、Hind III 酶切后连接。转化 DH5 α 感受细胞,挑取单克隆振荡过夜培养,按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒后进行酶切鉴定,经测序分析 (上海生工) 证实其正确性,并命名为 pcDNA3.1-AP-FOXM1。

1.2.3 AP-tag 标记的 FOXM1 在 HEK 293T 细胞内的生物素化

将 HEK 293T 细胞置于 6 cm 培养皿的完全培养基中生长,即 DMEM、10% 的胎牛血清、1% 青霉素,细胞密度长至 60%~80% 时,混合 65 μ L 2 mol/L CaCl₂, pcDNA3.1-BirA 和 pcDNA3.1-AP-FOXM1 按照 1:1 的比例混合进行转染 (各 5 μ g),补充灭菌水到 500 μ L,充分混匀,加入 2 \times HBS 500 μ L,吹

打至微乳白色(50次左右),加入到 HEK293T 细胞中。同时分别转染 pcDNA3.1-AP-FOXM1 和 pcDNA3.1-BirA,设置阴性对照。转染 6~8 h 后换新鲜的完全培养基,细胞转染 36~44 h 后收集细胞。

1.2.4 生物素化 FOXM1 的一步纯化法

细胞转染 36~44 h 后弃培养基上清,用预冷的 1×PBS 溶液清洗 1~2 次,再加入 1 mL PBS,用细胞刮刀迅速把铁壁细胞刮下并转移到 1.5 mL 离心管,短暂离心 20~30 s 后去上清,加入 300 μL IP 裂解液(Tris-HCl 50 mmol/L、NaCl 100 mmol/L、EDTA 2.5 mmol/L、EGTA 2.5 mmol/L、NP40 0.5%、Glycerol 5%、Sodium Vanadate 0.1 mmol/L、NaF 1 mmol/L、β-glycerophosphate 10 mmol/L、Cocktail 1%、PMSF 1 mmol/L),在冰上充分裂解 30 min,4 °C、13 000 r/min 离心 10 min,将上清液转移到新的离心管中,取 200 μL 裂解液与 100 μL 链霉亲和素琼脂糖珠在 4 °C 层析框中用旋转混合仪旋转共孵育 1 h,1 000 r/min 离心 2 min,弃上清,加入 1 mL 预冷的 1×PBS 溶液,洗涤 4 次,以除去非特异性结合,最后弃上清,向链霉亲和素珠子中加入 100 μL IP 裂解液加入适量的 1×上样缓冲液,100 °C 20 min 蛋白变性,13 000 r/min 离心 1 min,留上清液,将上清液分成等量两份,一份经 12% SDS-PAGE 并用 AgNO₃ 染色,另一份做 Western-blot 分析。

1.2.5 Western-blot 分析

将处理好的样品以每孔 80 μg 的上样量进行 SDS-PAGE 电泳,然后电转移蛋白至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h。使用 FOXM1 和 β-catenin 一抗和二抗进行相应的免疫反应,使用 SA-HRP 进行生物素化蛋白检测。用 TBST 洗后,化学发光试剂显影 1~2 min,定影,用 β-actin 作内参验证蛋白的含量。

1.2.6 银染分析

将处理好的样品以每孔 80 μg 的上样量进行 10% SDS-PAGE 电泳。固定:电泳完将胶置于固定液中固定 20 min,然后用 ddH₂O 洗 4 次,每次 2 min。染色:加入 0.2% AgNO₃,染色 30 min,然后用 ddH₂O 洗 4 次,每次 1 min,染色时要避光。显色:加入显色液,来回摇 15 min。

2 结果

2.1 pcDNA-BirA 重组表达载体的构建及鉴定

以大肠杆菌 DH5a 全基因组 DNA 为模板,经 TOYOBO 高保真酶 PCR 扩增获得全长 *BirA* 基

因。产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,目的条带单一,长度约为 1 000 bp,与标准序列大小相近,且没有引物二聚体(图 1A)。将该 PCR 产物克隆到 pcDNA3.1(-)载体,进行转化挑选单克隆菌落,提取质粒后进行酶切,初步鉴定 *BirA* 基因插入成功(图 1B),选取其中酶切鉴定成功的两个进行测序,测序结果与已报道的 *BirA* 基因序列一致。

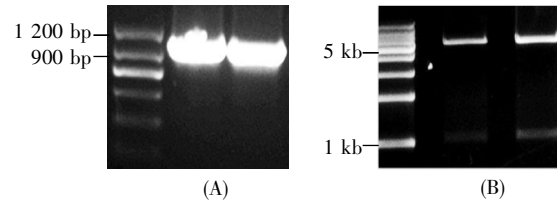


图 1 pcDNA-BirA 的构建及鉴定

(A) PCR 扩增 *BirA*; (B) 酶切鉴定重组 *BirA* 质粒

Fig.1 Construction and identification of pcDNA-BirA

(A) *BirA* amplified by PCR; (B) Identification of pcDNA-BirA by restriction enzyme digestion

2.2 pcDNA-AP-FOXM1 重组表达载体的构建及鉴定

以 pCMV-hFOXM1 质粒为模板,经 TOYOBO 高保真酶扩增 *FOXM1* 片段,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳(图 2A),与预计长度 2 400 bp 基本相符。将该 PCR 产物克隆到 pcDNA3.1(-)载体,进行转化挑选单克隆菌落,提取质粒后进行酶切,初步鉴定 *FOXM1* 基因插入成功(图 2B),选取其中两个进行测序,测序结果与已报道的人的 *FOXM1* 基因序列一致。

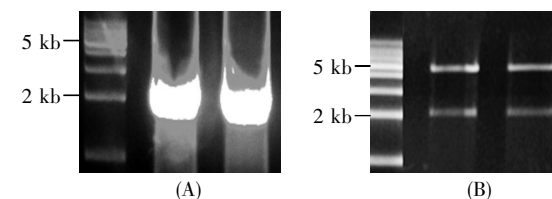


图 2 pcDNA-AP-FOXM1 的构建及鉴定

(A) PCR 扩增 hFOXM1 cDNA; (B) 酶切鉴定重组 AP-FOXM1 质粒

Fig.2 Construction and identification of pcDNA-AP-FOXM1

(A) Homo FOXM1 cDNA amplified by PCR; (B) Identification of pcDNA-AP-FOXM1 by restriction enzyme digestion

2.3 重组质粒在真核细胞中的表达及生物素化 Western-blot 分析

将所构建的重组质粒 pcDNA-BirA 和 pcDNA3.1-AP-FOXM1 通过磷酸钙共转染 HEK 293T 细胞,同时提取细胞蛋白,进行 Western-blot 印记分析 AP-FOXM1 蛋白的表达水平以及生物素化。

共转染 pcDNA-BirA 和 pcDNA3.1-AP-FOXM1 的 HEK 293T 细胞和单转染 AP-FOXM1 的 HEK 293T 细胞中 FOXM1 的表达量上升(图 3A),而在生物素的检测中发现只有共转染 pcDNA-BirA 和 pcDNA3.1-AP-FOXM1 的 HEK 293T 细胞中才能检测到生物素(图 3B)。实验结果表明重组质粒 pcDNA3.1-AP-FOXM1 能在真核细胞中表达,并且只有同时表达 pcDNA-BirA 和 pcDNA3.1-AP-FOXM1, AP-FOXM1 才能被生物素化。

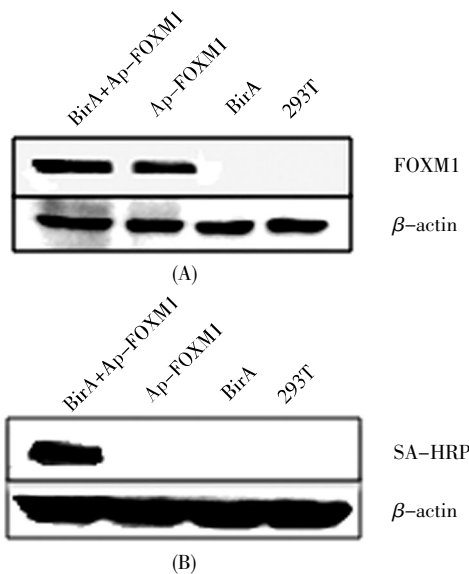


图 3 洗脱纯化前的蛋白检测
(A) 重组质粒转染 HEK 293T 细胞后 FOXM1 的表达检测;
(B) 重组质粒转染 HEK 293T 细胞后生物素的表达检测

Fig.3 Detection of protein before pull-down
(A) Detection of FOXM1 expression in recombinant plasmid transfected HEK 293T cells; (B) Detection of biotin expression in recombinant plasmid transfected HEK 293T cells

2.4 生物素化的 AP-FOXM1 一步纯化 Western-blot 分析

由于生物素化蛋白可以与链霉亲和素特异性结合,所以使用链霉亲和素珠子将生物素化蛋白

亲和纯化。亲和纯化后进行 Western-blot 分析,发现只有共转染 pcDNA-BirA 和 pcDNA3.1-AP-FOXM1 的 HEK 293T 细胞中的蛋白样本能检测到生物素(图 4A)和 FOXM1(图 4B)。

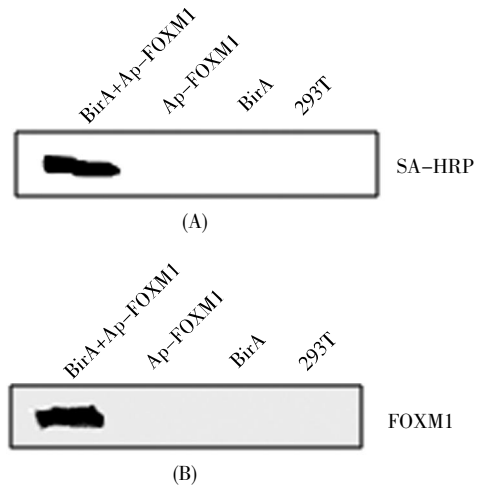


图 4 洗脱纯化后的蛋白检测
(A) 亲和纯化后生物素的表达检测; (B) 亲和纯化后 FOXM1 的表达检测

Fig.4 Detection of protein after pull-down
(A) Detection of biotin after pull-down; (B) Detection of biotin after pull-down

2.5 生物素化 FOXM1 互作蛋白检测

已有研究发现 β -catenin(88 kD)与 FOXM1 蛋白 C 端存在相互作用。通过构建 pcDNA3.1-BAP-FOXM1(1-224aa)、pcDNA3.1-BAP-FOXM1(1-353aa)和 pcDNA3.1-BAP-FOXM1(1-748aa)质粒与 pcDNA3.1-BirA 共转染 HEK 293T 细胞,提取总蛋白,加入链霉亲和素琼脂糖珠做 pull-down,将得到的产物做 Western-blot,检测已知 FOXM1 互作蛋白 β -catenin。结果如图 5 所示,链霉亲和素琼脂糖珠 pull-down 得到了不同长度的被生物素标记的蛋白片段,用 FOXM1 C-20 抗体检测显示被生物素标记的蛋白为 FOXM1, β -

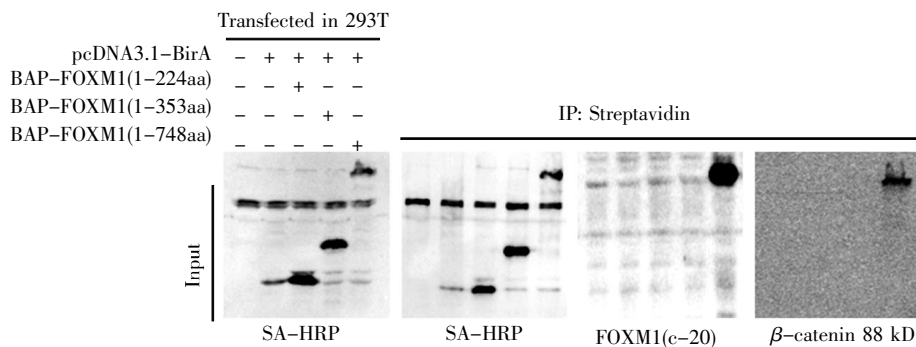


图 5 亲和纯化后 β -catenin 的表达检测
Fig.5 Detection of β -catenin after pull-down

catenin 抗体检测显示其与 FOXM1 的 C 端有互作,与已发表文献结果一致,证实该生物素标记系统有效而可靠。

2.6 生物素化的 FOXM1 硝酸银染色分析

生物素标记相对抗体在研究蛋白相互作用时具有亲和力高、技术方法简单经济的特点。用 pCDNA3.1-AP-FOXM1 质粒与 pCDNA3.1-BirA 共转染 HEK 293T 细胞,提取总蛋白,加入链霉亲和素琼脂糖珠做 pull-down, 纯化后的产物经 SDS-PAGE 后用硝酸银染色。结果显示在生物素化 FOXM1 蛋白 pull-down 产物泳道中,有许多特异性蛋白条带,暗示在 FOXM1 蛋白 pull-down 产物中有多种 FOXM1 潜在互作蛋白。硝酸银染色结果表明我们通过构建 FOXM1 蛋白的生物素标签系统可以有效地用于 FOXM1 互作蛋白研究,该结果为我们后续对 FOXM1 互作蛋白的质谱分析提供了良好的基础(图 6)。

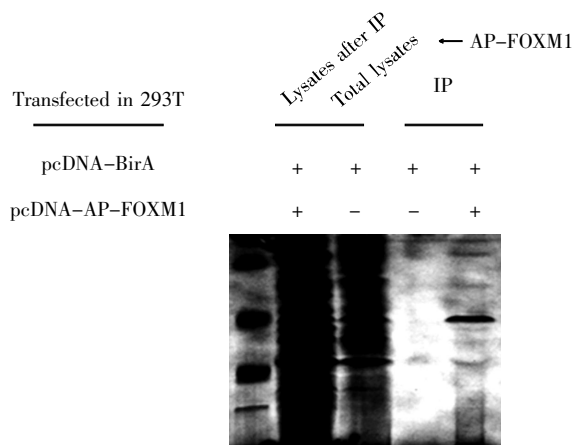


图 6 硝酸银染色检测 AP-FOXM1

Fig. 6 Detection of AP-FOXM1 by silver nitrate staining

3 结束语

本文成功构建了可生物素化的 *hFOXM1* 重组质粒,并实现了一步纯化法和一步 Western-blot 印记法。采用瞬时共转染法,实现了 AP-FOXM1 在哺乳动物细胞内的生物素化,避免了建立稳定高表达细胞系冗长复杂的步骤,只需 3 d 就可获得生物素化的 AP-FOXM1 蛋白复合物。利用生物

素和链霉亲和素高达 10^{-15} mol/L 的 K_d 值,使得生物素化的 AP-FOXM1 及其相互结合的蛋白能在更加严格的洗脱条件和洗脱过程中纯化出来,同时将弱的、短暂的互作蛋白洗脱去除,使得其特异性更强,背景更低。

总之,建立了基于生物素 AP-tag 标签的 FOXM1 真核表达体系,实现了蛋白一步纯化的快速简便方法,并实现了 Western 印迹检测 FOXM1 蛋白无需一抗的一步法快速检测,为蛋白功能的深入分析及互作蛋白的研究奠定了前期技术基础。

参考文献(References):

- [1] KORVER W, ROOSE J, HEINEN K, *et al.* The human *TRIDENT/HEH-11/FKHL16* gene: structure, localization, and promoter characterization[J]. *Genomics*, 1997, 46(3): 435-442.
- [2] LAOUKILI J, STAHL M, MEDEMA R H. *FoxM1*: at the crossroads of ageing and cancer [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Review on Cancer*, 2007, 1775(1): 92-102.
- [3] ALVAREZ-FERNANDEZ M, MEDEMA R H. Novel functions of FoxM1: from molecular mechanisms to cancer therapy[J]. *Frontiers in Oncology*, 2013, (3): 30.
- [4] KORVER W, ROOSE J, CLEVERS H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(9): 1715-1719.
- [5] KORVER W, ROOSE J, WILSON A, *et al.* The winged-helix transcription factor Trident is expressed in actively dividing lymphocytes[J]. *Immunobiology*, 1997, 198(1-3): 157-161.
- [6] XIE Z, TAN G, DING M, *et al.* Foxm1 transcription factor is required for maintenance of pluripotency of P19 embryonal carcinoma cells[J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(22): 8027-8038.
- [7] MONTEIRO L J, KHONGKOW P, KONGSEMA M, *et al.* The Forkhead Box M1 protein regulates *BRIPI* expression and DNA damage repair in epirubicin treatment[J]. *Oncogene*, 2013, 32(39): 4634-4645.
- [8] HE Yu-fei, BAO Hui-min, XIAO Xiao-feng, *et al.* Biotin tagging coupled with amino acid-coded mass tagging for efficient and precise screening of interaction proteome in mammalian cells[J]. *RESEARCH ARTICLE, Proteomics*, 2009, 9(24): 5414-5424.
- [9] FERNANDEZ-SUREZ M, CHEN T S. Protein-protein interaction detection *in vitro* and in cells by proximity biotinylation[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(29): 9251-9253.
- [10] KAY B K, THAI S, VOLGINA W. High-throughput biotinylation of proteins[J]. *Humana Press*, 2009, 498: 185-198.
- [11] COGNET I, GUILHOT F, GABRIAC M, *et al.* Cardiotrophin-like cytokine labelling using BirA biotin ligase: a sensitive tool to study receptor expression by immune and non-immune cells[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2005, 301(1-2): 53-65.
- [12] MORIZONO K, XIE Y, HELGUERA G, *et al.* A versatile targeting system with lentiviral vectors bearing the biotin-adaptor peptide[J]. *Journal of Gene Medicine*, 2009, 11(8): 655-663.
- [13] LESCH H P, KAIKKONEN M U, PIKKARAINEN J T, *et al.* Avidin-biotin technology in targeted therapy[J]. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2010, 7(5): 551-564.