

突变型人 TRBP 基因的构建及表达 *

李俊堂¹ 王立锋² 王芳¹ 杨韬¹ 许彦鸣^{2△} 杨安钢¹

(第四军医大学基础医学院¹ 免疫学教研室² 生物化学与分子生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨 RNAi 过程中 TRBP 传递双链 RNA 的机制,构建 RNA 结合结构域突变的人 TRBP 基因真核表达载体。方法 设计突变引物,通过拼接 PCR 将突变型 TRBP 基因克隆入 pFLAG-CMV4 真核表达载体,经双酶切和测序鉴定正确后,命名为 pFLAG-CMV4-TRBPm。瞬时转染 HEK-293 细胞,western-blot 检测目的蛋白表达。结果:成功扩增了突变序列,构建了突变型 TRBP 基因的真核表达载体,转染 HEK-293 细胞后检测到带标签的目的蛋白表达。结论 突变型 TRBP 基因真核表达载体的成功构建,为进一步研究 TRBP 的生物学效应奠定了基础。

关键词 TRBP 基因 突变 pFLAG-CMV4 真核表达

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2012) 16-3033-04

Construction and Expression of Mutant TRBP Gene*

LI Jun-tang¹, WANG Li-feng², WANG Fang¹, YANG Tao¹, XU Yan-ming^{2△}, YANG An-gang¹

(1 Department of Immunology, 2 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the mechanism that TRBP deliver dsRNA in the process of RNAi, and to construct the eukaryotic expression vector carrying mutant TRBP. **Methods:** Primers for dsRBD domain mutation were designed, and gene splicing by overlapping extension PCR was used to obtain mutant TRBP. Then it was cloned into the Flag-labeled eukaryotic expression vector pFLAG-CMV4, and named pFLAG-CMV4-TRBPm after verified by double-enzyme and sequence detection. After transient transfect into HEK-293 cells, the expression of target gene was detected by Western Blot. **Results:** The mutant TRBP cDNA was amplified and the Flag-labeled eukaryotic expression vector pFLAG-CMV4-TRBPm which encoding mutant TRBP was constructed. Expression of mutant TRBP was successfully detected by western blot using anti-FLAG monoclonal antibody and anti-TRBP polyclonal antibody respectively. **Conclusion:** Flag-labeled pFLAG-CMV4-TRBPm vector was successfully constructed, which is of significance for further research on biological function of TRBP.

Key words: TRBP; Mutation; pFLAG-CMV4; Eukaryotic expression

Chinese Library Classification (CLC): Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3033-04

前言

TRBP 是一种双链 RNA 结合蛋白,它是作为能够促进 HIV-1 表达的反式激活反应 (TAR,trans-activation response) RNA 结合蛋白被发现的^[1]。近年的研究证实其参与了 RNAi^[2]。TRBP、AGO2 和 Dicer 在细胞内存在相互作用^[3],能够在细胞外环境中形成 TRBP-AGO2-Dicer 复合物,加工长片段双链 RNA、识别向导链并且形成成熟的 RISC^[4,5]。

尽管小 RNA 是作为双链被加工的,但最终进入 RISC 的只有一条链,作为双链 RNA 的直接结合分子,TRBP 很可能参与了 RISC 对向导链的选择^[6],其机制目前仍不清楚。TRBP 含有三个双链 RNA 结合结构域 (dsRBD,double strand RNA binding domain)。TRBP 的研究显示,它的第二个 dsRBD 介导了与 TAR RNA 的结合^[7],提示该区域有可能在 RISC 的组装过程中起到传递双链 RNA 的作用。本研究拟基于已经获得的 TRBP

序列,扩增出该 dsRBD 区域突变的 TRBP,克隆入带 Flag 标签的真核表达载体,并在 HEK-293 细胞中表达,为后续研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pFLAG-CMV4、pFLAG-CMV4-TRBP 质粒、大肠杆菌 DH5α 及 HEK-293 细胞均由本室保存。限制性内切酶 BglII, KpnI, DNA 分子量 MARKDL2000, TaqMix 试剂盒 (大连宝泰克生物工程公司);兔抗人 TRBP 多克隆抗体购自 IMGENEX 公司;小鼠抗 FLAG mAb 购自 Sigma 公司;HRP 标记的羊抗小鼠二抗和羊抗兔二抗购自美国 Santa Cruz 生物技术公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司;DMEM 培养基购自 Gibco 公司;小牛血清购自杭州四季青生物制品公司;Lipofectamine™2000 购自 Invitrogen 公司。

* 基金项目 国家自然科学基金(30870497) 国家自然科学基金(30901359) 国家自然科学基金(81001015)

作者简介 李俊堂(1981-),男,博士研究生,研究方向 RNA 干扰机制及其在肿瘤生物治疗中的应用,

电话 1029)84774516, E-mail juntangli@163.com

△通讯作者 许彦鸣, E-mail amyymxu@gmail.com

(收稿日期 2011-10-08 接受日期 2011-11-30)

1.2 方法

1.2.1 人突变型 TRBP cDNA 的扩增 根据文献提示的 RNA 结合位点设计突变引物对记为 TRBPmf 和 TRBPmr (突变位点用小写字母表示), 结合野生型 TRBP 两端引物 (表 1), 以 pFLAG-CMV4-TRBP 质粒为模板, 进行分段和拼接 PCR, 扩增出突变的 TRBP 序列。分段扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 然后

95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 扩增 25 个循环, 最后 72 °C 终延伸 5 min。分段扩增产物拼接条件: 95 °C 变性 5 min, 64 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 5 min; 拼接产物扩增条件: 95 °C 预变性 5 min, 然后 95 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 扩增 25 个循环, 最后 72 °C 终延伸 5 min。

表 1 PCR 引物设计
Table 1 PCR Primer Design

Primer sequences	
TRBPf	5'-TTTAGATCTGATGAGTGAAGAGGAGCAAGGCTCCGGC-3'
TRBPmr	5'-TGTGCACagcAAGCAGCATTTTGGCCGCCGATTacCTTTGCCAAgcTTTGGAAGT-3'
TRBPmf	5'-ACTTCCAAAgcaTTGGCAAAGctAATGCGGCGGCCAAAATGCTGCTTgctGTGCACA-3'
TRBPPr	5'-TTTGGTACCTCACTTGCTGCCTGCCATGATCTTGAGG-3'

1.2.2 人突变型 TRBP 基因真核表达载体的构建 拼接 PCR 扩增产物经琼脂糖电泳纯化、凝胶回收后, 分别用 *Bgl*III 和 *Kpn*I 对目的片段及真核载体 pFLAG-CMV4 进行双酶切, 按照一定体系连接。取一定量连接产物按标准程序转化 100 μl DH5α 感受态细胞, 转化菌铺板至含 Amp 的 LB 固体培养基, 37 °C 培养 12 h。随机挑取单克隆, 扩增后提取质粒, 酶切鉴定并测序证实, 质粒命名为 pFLAG-CMV4-TRBPm。

1.2.3 突变型 TRBP 蛋白的免疫印迹分析 pFLAG-CMV4-TRBPm 和 pFLAG-CMV4 空载体瞬时转染 HEK-293 细胞 (参照 Invitrogen 公司 Lipofectamine™2000 试剂转染说明), 48 h 后收取细胞、提取总蛋白、定量。常规方法电泳并用 Bio-Rad 系统将蛋白从胶上转移至 NC 膜, 5 % 脱脂奶粉封闭 1 h, 加入抗

Flag 单克隆抗体或抗 TRBP 多克隆抗体 (1:1000), 室温摇床温育 1 h 后 4 °C 冰箱过夜; 次日用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 二抗分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠或羊抗兔 IgG 抗体 (1:4000), 室温摇床温育 1 h 后用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, ECL 化学发光, 暗室显影。

2 结果

2.1 拼接 PCR 获取人突变型 TRBP cDNA

以 pFLAG-CMV4-TRBP 质粒为模板, 使用引物 TRBPf、TRBPmr、TRBPmf、TRBPPr (图 1a), 分别进行分段和拼接 PCR, 扩增出突变的 TRBP 序列, PCR 产物与设计序列的大小一致 (图 1b)。

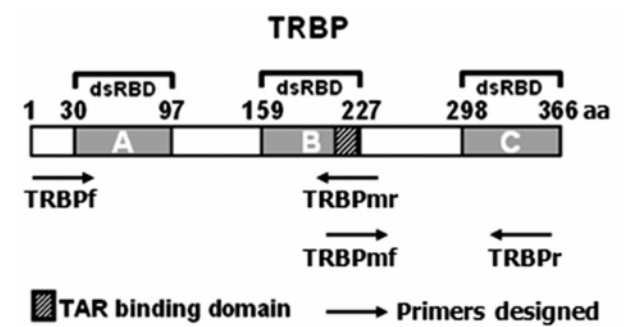


图 1a TRBP 基因结构与突变引物设计示意图
Fig.1a Structure of TRBP and mutation Primer design

2.2 pFLAG-CMV4-TRBPm 真核表达载体的构建

用 *Bgl*III 和 *Kpn*I 双酶切经过胶回收的 PCR 产物, 克隆入 pFLAG-CMV4 表达载体, 获得含有 pFLAG-CMV4-TRBPm 基因的真核表达载体, *Bgl*III 和 *Kpn*I 双酶切鉴定出目的片段与设计大小符合 (图 2a), 用 pFLAG-CMV4 表达载体的通用引物对阳性克隆进行测序鉴定, 结果与设计序列完全一致 (图 2b)。pFLAG-CMV4-TRBPm 真核表达载体构建成功。

2.3 突变型 TRBP 蛋白在 HEK-293 细胞中的表达

将质粒 pFLAG-CMV4-TRBPm 和 pFLAG-CMV4 空载体

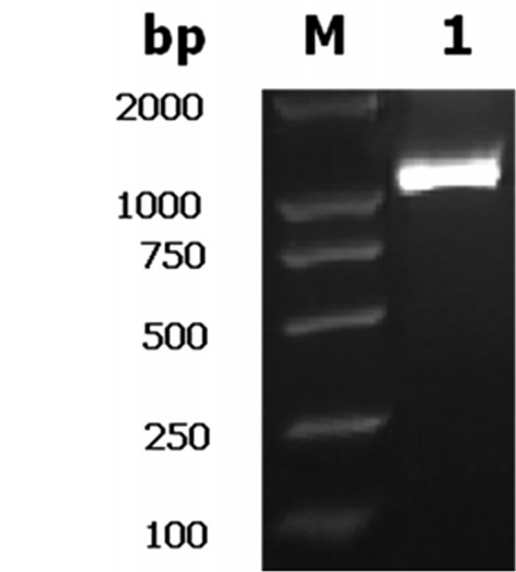


图 1b PCR 获得人突变型 TRBP 序列 M PCR marker; 1 人突变型 TRBP PCR 产物

Fig.1b PCR products of TRBP mutant M PCR marker; 1 mutant human TRBP PCR products

瞬时转染 HEK-293 细胞, 48 h 后同未转染组一同收取细胞, 提

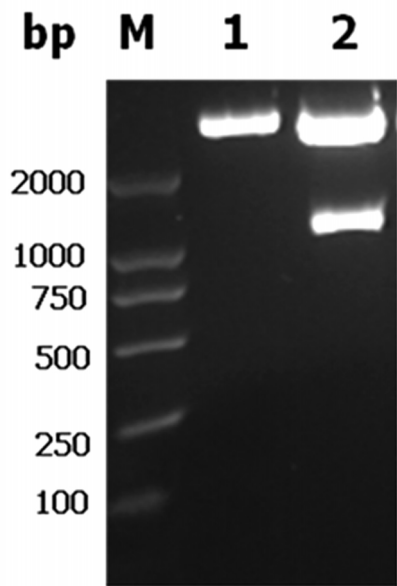


图 2a pFLAG-CMV4-TRBPm 真核表达载体的双酶切鉴定 M PCR marker 1 pFLAG-CMV4 空载体的双酶切产物；
2 pFLAG-CMV4-TRBPm 真核表达载体的双酶切产物
Fig. 2a Identification of pFLAG-CMV4 and pFLAG-CMV4-TRBPm by restriction enzyme digestion M PCR marker 1 pFLAG-CMV4 vector digestion 2 pFLAG-CMV4-TRBPm digestion

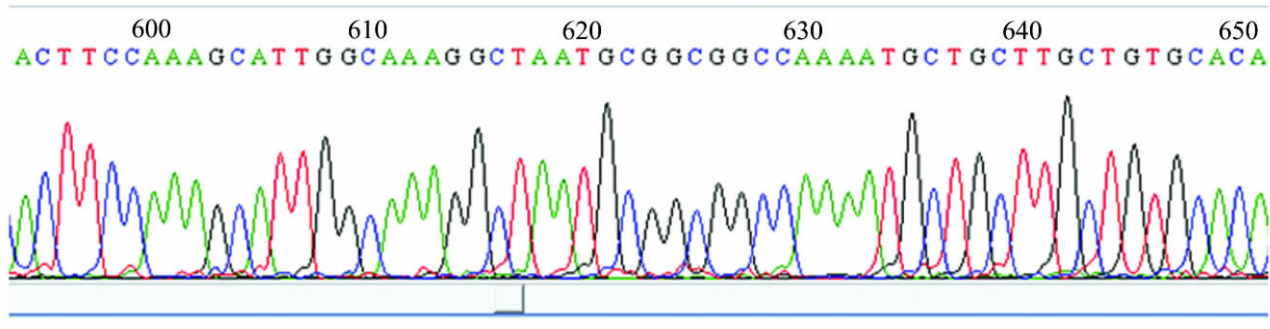


图 2b pFLAG-CMV4-TRBPm 真核表达载体的部分 DNA 测序图 (突变段序列)
Fig. 2b Sequencing map of partial pFLAG-CMV4-TRBPm plasmid (mutant sites)

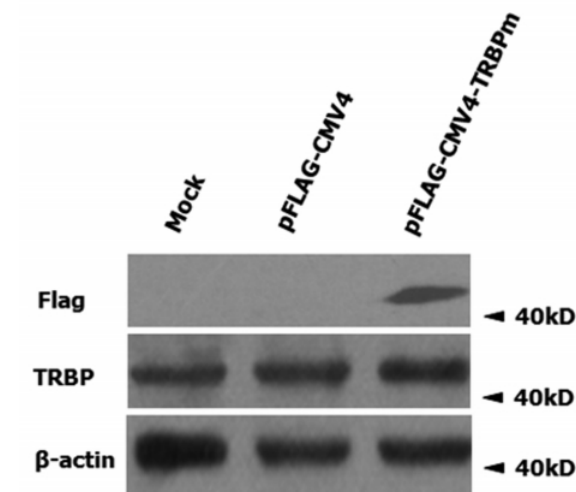


图 3 突变型 TRBP 蛋白在 HEK-293 细胞中的表达
Fig. 3 Flag labeled TRBP mutant expression in transfected HEK-293 cell line

取总蛋白进行 Western Blot 检测 (图 3)，结果显示突变型 TRBP 蛋白在转染质粒 pFLAG-CMV4-TRBPm 的 HEK-293 细胞中得到表达。

3 讨论

TRBP 在哺乳动物的 RNAi 过程中，直接参与了 Dicer 对前体 microRNA 的加工。作为双链 RNA 结合蛋白，它含有 3 个 dsRBD。对 RISC 复合体的研究发现这些 RNA 结合结构域还负责与其它 RISC 组分相结合。其中，从 N 端开始的第三个 dsRBD 可以与 Dicer 结合^[8]，而前两个 dsRBD 分别能够与另一种双链 RNA 结合蛋白 PACT 发生相互作用^[9,10]。在未涉及 RNAi 的研究中显示，位于 TRBP 第二个 dsRBD 内部的 KR-螺旋模序负责了与 RNA 相结合。而这部分结构域是否在 RISC 复合体的形成过程中发挥结合 RNA 并传递向导链的作用仍不清楚。

双链 siRNA 经过 RISC 加工后，只有一条链被装载到有活性 RISC 中，这种对 RNA 链的选择具有一定的偏好性^[11,12]。在果蝇中，Dicer 酶家族成员 Dcr-2 和 R2D2 (此命名源于该蛋白含两个双链 RNA 结合结构域，而且能与 Dcr-2 结合) 形成的异二聚体对双链 siRNA 的定向结合能力可能导致了 RNAi 的链偏好^[13]。而果蝇的细胞外实验证实，分别延伸特定 siRNA 的两

端，产生的两类 dsRNA 尽管会以方向相反的方式分别定向进入 RISC 后再被 Dcr-2 加工，但这种人为的定向作用并不影响 RISC 对上下链的偏好，RISC 仍会通过热力学因素来加工 RNA^[14]。这说明，果蝇中 siRNA 的链选择尽管依赖于与 Dcr-2 的结合，却完全不受 Dcr-2 加工 dsRNA 方式的影响，同时也预示，由 RNaseIII 样的核酸酶加工后产生的小双链 siRNA 在 RISC 中并没有固定下来，链偏好可能发生在双链 RNA 通过 R2D2 从 Dcr-2 传递到 Argonaute 2 形成活性 RISC 的过程中。在哺乳动物中，TRBP 是负责 RISC 装载 siRNA 的重要双链 RNA 结合蛋白，有可能与 R2D2 相类似地参与了 RISC 对向导链的选择。明确 TRBP 与 siRNA 的结合位点将有助于我们探究这一机制。

与既往通过构建含有单个或两个 dsRBD 的重组表达蛋白研究蛋白质相互作用策略不同^[3,10]，本研究通过分析 TRBP 第二个 dsRBD 内部的 KR-螺旋模序，设计了与 RNA 结合相关碱

性氨基酸的突变, 并通过拼接 PCR, 扩增出该区域突变的 TRBPm, 构建了 pFLAG-CMV4-TRBPm 真核表达载体。转染 HEK293 细胞, 并用抗体 Flag 检测显示该突变体能够正确表达, 而且不影响 TRBP 抗体的识别。本研究为探讨 TRBP 在 RNAi 过程中传递 RNA 链的机制提供了条件, 为进一步明确 TRBP 蛋白的生物学特性奠定了基础。

参考文献 (References)

- [1] Sanghvi V R, Steel L F. The cellular TAR RNA binding protein, TRBP, promotes HIV-1 replication primarily by inhibiting the activation of PKR[J]. J Virol, 2011, Sep 21[Epub ahead of print]
- [2] Rossi J J. Mammalian Dicer finds a partner [J]. EMBO Rep, 2005, 6(10): 927-929
- [3] Chendrimada T P, Gregory R I, Kumaraswamy E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing[J]. Nature, 2005, 436(7051): 740-744
- [4] De N, Macrae I J. Purification and assembly of human Argonaute, Dicer, and TRBP complexes[J]. Methods Mol Biol, 2011, 725: 107-119
- [5] Lau P W, Potter C S, Carragher B, et al. Structure of the human Dicer-TRBP complex by electron microscopy [J]. Structure, 2009, 17(10): 1326-1332
- [6] Kini H K, Walton S P. Effect of siRNA terminal mismatches on TRBP and Dicer binding and silencing efficacy [J]. FEBS J, 2009, 276(22): 6576-6585
- [7] Daviet L, Erard M, Dorin D, et al. Analysis of a binding difference between the two dsRNA-binding domains in TRBP reveals the modular function of a KR-helix motif [J]. Eur J Biochem, 2000, 267(8): 2419-2431
- [8] Haase A D, Jaskiewicz L, Zhang H, et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing[J]. EMBO Rep, 2005, 6(10): 961-967
- [9] Laraki G, Clercius G, Daher A, et al. Interactions between the double-stranded RNA-binding proteins TRBP and PACT define the Medipal domain that mediates protein-protein interactions [J]. RNA Biol, 2008, 5(2): 92-103
- [10] Kok K H, Ng M H, Ching Y P, et al. Human TRBP and PACT directly interact with each other and associate with dicer to facilitate the production of small interfering RNA [J]. J Biol Chem, 2007, 282(24): 17649-17657
- [11] Khvorova A, Reynolds A, Jayasena S D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias[J]. Cell, 2003, 115(2): 209-216
- [12] Schwarz D S, Hutvagner G, Du T, et al. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex[J]. Cell, 2003, 115(2): 199-208
- [13] Tomari Y, Matranga C, Haley B, et al. A protein sensor for siRNA asymmetry[J]. Science, 2004, 306(5700): 1377-1380
- [14] Preall J B, He Z, Gorra J M, et al. Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in Drosophila[J]. Curr Biol, 2006, 16(5): 530-535