

李夏莹,张秀杰,宋贵文. STAT3 蛋白真核表达载体的构建及其泛素化功能研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):16-18.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.004

STAT3 蛋白真核表达载体的构建及其泛素化功能研究

李夏莹,张秀杰,宋贵文

(农业部科技发展中心,北京 100176)

摘要:为研究信号转导与转录激活因子3(STAT3)的活性调控机制,克隆人源 STAT3 基因,并将其构建在真核表达载体上。之后,通过细胞内共表达 STAT3 和泛素化质粒的方法,验证了 STAT3 蛋白可以发生多种类型的泛素化修饰。结果表明,K63 位非降解功能的泛素化影响 STAT3 蛋白的磷酸化,从而影响 STAT3 的活性及功能的发挥;而 K48 位降解功能的泛素化影响 STAT3 蛋白的降解,使 STAT3 蛋白得以更新,这 2 种类型的泛素化对 STAT3 蛋白及其功能都十分重要。

关键词:STAT3 蛋白;表达载体;泛素化;K63;K48

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0016-03

信号转导是细胞应对外源信号刺激后,各种信号分子活化并将这种信号传递给效应分子以改变细胞功能的过程,是机体应对外界环境的变化所做出的有效反馈。细胞信号转导调控细胞生长、繁殖、分化、衰老和凋亡等重大生命活动,正常的信号转导是发育、生长和维持健康所必需的,反之,信号转导异常可导致疾病和肿瘤^[1-3]。

JAK-STAT 通路是由细胞因子刺激的重要信号传导通路^[4],许多细胞因子(如 IFN、IL-2)、激素(如泌乳素、生长激素)可通过其传递信号,从而影响细胞的增殖、凋亡、分化与转化^[5]。信号转导与转录激活因子家族(STAT)已发现 7 个成员,STAT3 是该家族的研究热点,且敲除该基因可以使胚胎死亡,说明该基因是不可或缺的。磷酸化修饰是调控 STAT3 活性的主要方式,Tyr705、Ser727 是磷酸化的关键氨基酸位点^[6]。此外,STAT3 的 Lys685 可以在组蛋白乙酰转移酶的修饰下发生可逆乙酰化^[7-8]。

在真核细胞中,蛋白质的泛素化和磷酸化是最常见的翻译后修饰。细胞外信号严格调控着蛋白质的泛素化,在很多情况下,这种调控依赖于蛋白质的磷酸化^[9]。磷酸化通过修饰泛素化的底物,或者修饰泛素化机器的某个组分来影响泛素化。此外,泛素化对于磷酸化和信号分子的传递也有一定的作用。本研究通过研究 STAT3 蛋白是否会发生泛素化,发生哪种类型的泛素化,并以此解释泛素化与 STAT3 活性之间的关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

Taq DNA polymerase,购自北京鼎国生物技术有限公司;T4 DNA 连接酶、pMD-19-T simple Vector、DNA 酶 I、Oligo(dT)18、Random promoters、PrimeScript RT reagent Kit 和 SYBR

Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) Kit,购自 TaKaRa 公司;dNTPs,购自北京盛旭百川生物科技有限公司;DNA 分子量标准品,购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司;蛋白质非预染分子量标准 marker 及预染分子量标准 marker,购自 Fermentas 公司;Tween-20,购自 Amresco 公司;质粒少量提取试剂盒、EASYspin plus RNA 提取试剂盒,购自北京艾德莱生物科技有限公司;质粒大量提取试剂盒、Enhanced chemiluminescence(ECL)kit,购自北京康为世纪生物科技有限公司;DNA 凝胶回收纯化试剂盒,购自 Zymo 公司;无内毒素大量质粒提取试剂盒,购自北京艾德莱生物科技有限公司;Anti-c-HA 单克隆抗体、protein A/G plus-agarose(SC-2003),购自 Santa Cruz 生物公司;Anti-FLAG M2(F1804)单克隆抗体、PI 染料,购自 Sigma 公司;HRP-标记山羊抗小鼠和山羊抗兔抗体,购自北京鼎国生物技术有限公司;Lipofectamine 2000 转染试剂,购自 Invitrogen 公司;蛋白酶抑制剂,购自亚太恒信生物科技(北京)有限公司;Sal I 和 Hind III 酶,购自 NEB 公司;HA-ub、HA-KO、HA-K48、HA-K63 等载体质粒均由唐军教授馈赠;所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 Human STAT3 基因的克隆

根据 NCBI STAT3 (ID:47080104) 基因序列设计引物,上游引物为 5'-ATGCCCAATGGAATCAGC-3',下游引物为 5'-TCACATGGGGAGGTAGCGC-3'。建立 50 μL PCR 反应体系:5 μL 10 × PCR Buffer,2 μL 10 mmol/L dNTPs,20 pmol/L 上下游引物各 1 μL,4 μL cDNA,1 μL Taq plus DNA polymerase,用 ddH₂O 补至 50 μL。按以下程序进行 PCR 反应:94 °C 预变性 5 min,进入循环:94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 2.5 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。1% 琼脂糖凝胶电泳检查 PCR 产物,目的基因大小为 2 313 bp。

1.3 宿主细胞蛋白 STAT3 重组质粒的构建

针对 pRK5-flag 质粒多克隆位点设计引物并引入 Sal I 和 Hind III 酶切位点,以测序正确的 pMD-19-T-STAT3 质粒为模板进行 PCR;1.5% 琼脂糖凝胶电泳回收 PCR 产物后,进行 Sal I 和 Hind III 双酶切,同时对 pRK5-flag 质粒进行

收稿日期:2016-11-18

基金项目:国家科技重大专项(编号:2016ZX08012003)。

作者简介:李夏莹(1986—),女,云南玉溪人,博士,农艺师,主要从事转基因检测技术方面的研究。E-mail:esmaclod006@163.com。

通信作者:宋贵文,高级农艺师,主要从事转基因生物安全方面的研究。Tel:(010)59198153;E-mail:songguiwen@agri.gov.cn。

Sal I 和 *Hind* III 双酶切, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳回收酶切产物; 将 PCR 酶切产物和 *pRK5*-*flag* 酶切产物按 6:1 摩尔比混合, 并加入等量的 (5 μ L) Solution I (酶溶液), 过夜连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ; 挑取单克隆, 提取质粒酶切鉴定正确后, 由北京诺赛基因组研究中心有限公司进行测序, 测序正确克隆保存菌种, 并提取质粒待用。

pRK5-*flag*-*STAT3*: 上下游引物分别引入 *Sal* I 和 *Hind* III 酶切位点, 上游引物为 5'-ACGCGTCGACATGGCCCAATG-GAATCAGCTAC-3', 下游引物为 5'-CCCAAGCTTTCACATGGGGGAGGTAGCGCAC-3'。

1.4 STAT3 泛素化的检测

6 孔板分别按下述方式转染 HEK293T 细胞, 其中 *pRK5*-*flag* 空载体组作为阴性对照: (1) *pRK5*-*flag*+HA-ub; (2) *pRK5*-*flag*-*STAT3*+HA-ub; (3) *pRK5*-*flag*+HA-KO; (4) *pRK5*-*flag*-*STAT3*+HA-K48; (5) *pRK5*-*flag*-*STAT3*+HA-K63。

细胞内泛素化: (1) 质粒转染后 20 h (即收获细胞蛋白前 4 h), 加入 20 μ mol/L MG132 抑制蛋白酶体的降解作用。 (2) 收获细胞蛋白。用冰预冷的 1 \times PBS 轻轻漂洗细胞 2 次。 (3) 配制裂解工作液。1 mL Lysis buffer 中加入 10 μ mol/L 二硫苏糖醇溶液, 1 \times cocktail C 蛋白酶抑制, 10 mmol/L *N*-乙基胍丁烯二酰亚胺和终浓度为 1% 的十二烷基硫酸钠溶液 (SDS)。 (4) 6 孔板每个孔中加入 80 μ L 用现配的裂解工作液, 将细胞刮下转移至 1.5 mL 的离心管中。 (5) 将离心管放入 95 $^{\circ}$ C 金属浴中, 灭活 10 min。 (6) 超声波 (功率 10%) 破碎细胞沉淀 1 min。 (7) 每管加入 720 μ L 不含 (SDS) 的裂解工作液, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 20 min。 (8) 取出 50 μ L 离心上清液作为 Input, 其余上清液加入到含有偶联 Flag 抗体的 beads 离心管中, 4 $^{\circ}$ C 旋转孵育过夜。 (9) 过夜孵育之后, 用 1 \times Lysis buffer 洗涤 beads 3 次 (4 $^{\circ}$ C、3 000 r/min、3 min)。 (10) 加入 20 μ L 2 \times SDS 蛋白上样缓冲液, 于 100 $^{\circ}$ C 煮 10 min, 立即进行 Western Blot 检测。

2 结果与分析

2.1 人源 STAT3 基因的克隆

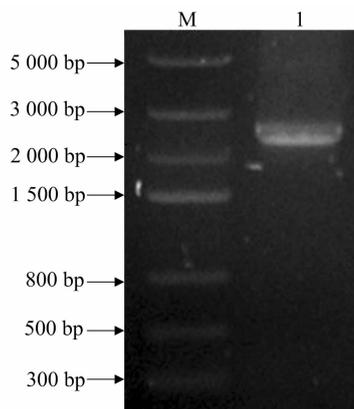
为获取人源基因 *STAT3*, 使用 Trizol 法提取 HEK293T 细胞的总 RNA, 以其为模板利用 RT-PCR 扩增 *STAT3* 基因。扩增得到片段大小约为 2 310 bp, 如图 1 所示。随后将 2 种 PCR 产物分别与 *pMD*-19-T 载体连接, 并将转化后长出的阳性克隆进行测序。测序结果表明, 构建并保存在 *pMD*-19-T 载体中的 *STAT3* 基因与 NCBI 上登陆的参考序列在氨基酸水平上完全相同, 可用于后续试验中。

2.2 STAT3 基因重组载体的构建

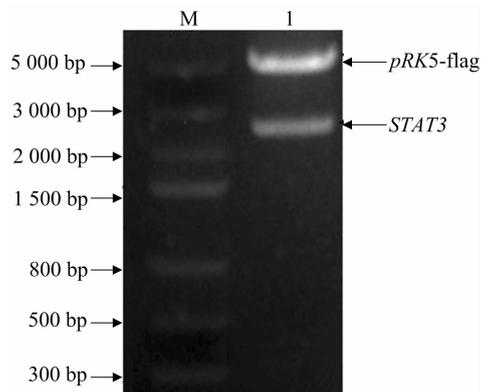
根据试验需要, 将 *STAT3* 基因分别插入相应的表达载体内, 经双酶切鉴定及测序比对正确后作质粒大量提取, 用于后续的试验。依据试验需求构建重组载体 *pRK5*-*flag*-*STAT3*, 重组载体的酶切鉴定结果如图 2 所示。

2.3 pRK5-flag-STAT3 质粒的验证表达

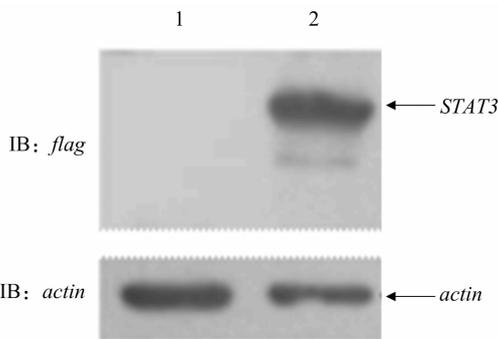
将 *pRK5*-*flag*-*STAT3* 质粒转染入 HEK293T 细胞, 转染 24 h 后收获细胞蛋白, 进行 Western Blot 验证。如图 3 所示, *pRK5*-*flag*-*STAT3* 在细胞中表达良好, 可以用于后续试验。



M—DNA 分子量标准品; 1—*STAT3* PCR 产物
图1 通过 RT-PCR 从 HEK293T 总 RNA 中扩增的 *STAT3* 基因



M—DNA 分子量标准品; 1—*pRK5*-*flag*-*STAT3* 重组载体双酶切鉴定
图2 *STAT3* 重组质粒的双酶切鉴定



1—*pRK5*-*flag* 重组质粒; 2—*pRK5*-*flag*-*STAT3* 重组质粒
图3 *pRK5*-*flag*-*STAT3* 重组质粒的表达鉴定

2.4 STAT3 蛋白可以发生泛素化

为验证 *STAT3* 蛋白能否发生泛素化修饰, 将构建的 *pRK5*-*flag*-*STAT3* 真核表达载体以及 *pRK5*-*flag* 与 HA-ub 一起转染 HEK293T 细胞, 为保证能有效捕捉蛋白泛素化修饰, 在转染 20 h 后收集细胞裂解液, 并进行免疫共沉淀, 孵育 2 h 后, 进行 Western Blot 检测, 如图 4 所示, *STAT3* 可以发生泛素化修饰。

2.5 STAT3 蛋白泛素化类型确定

泛素分子全长包含 7 个赖氨酸位点 (K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63) 和 1 个位于 C 端的甘氨酸位点以及位于 N 端的甲硫氨酸位点。泛素自身的每个赖氨酸位点以及 N 端的

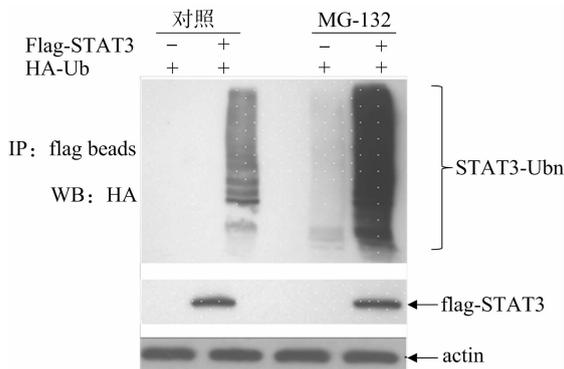


图4 STAT3 蛋白发生泛素化修饰

甲硫氨酸位点都可以发生泛素化从而延伸泛素链^[10-11],其中对 K48、K63 位多聚泛素化的研究最广泛。按照试验方法中所述,将构建的 pRK5 - flag - STAT3 真核表达载体以及 pRK5 - flag 分别与 HA - ub、HA - KO、HA - K48、HA - K48 一起转染 HEK293T 细胞,在转染 20 h 后收集细胞裂解液,并进行免疫共沉淀,孵育 2 h 后,进行 Western Blot 检测,如图 5 所示,STAT3 可以发生多种类型的泛素化修饰。

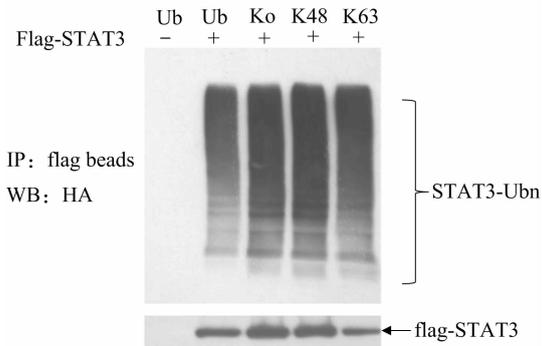


图5 STAT3 泛素化类型的确定

3 结果与讨论

STAT3 蛋白作为信号通路中一个关键的分子,在受到外界信号刺激时,会发生磷酸化和二聚体化,转化为活性形式的 pSTAT3,进入细胞核发挥转录激活的作用。

本研究通过克隆的方法获得了人源 STAT3 基因,并将其构建在 pRK5 - flag 表达载体上。之后将 pRK5 - flag - STAT3 和泛素质粒共转染细胞,确认 STAT3 可以发生泛素化修饰,并可以发生 Ko、K48、K63 等多种类型的泛素化。已有研究报道 K63 位的泛素化中在信号激活和蛋白质运输中起了关键作用;蛋白激酶 Akt 的 K63 链泛素化,对于 Akt 的膜定位和磷酸化很重要^[12-14]。此外,K48 位的泛素化被证实与蛋白质降解有关^[15]。而其他赖氨酸连接的多聚泛素链具有非泛素降解和泛素降解功能,其中 K63 连接多聚泛素化具有非泛素降解功能。已发现泛素化介导的非蛋白降解功能包括 DNA 损伤修复、信号传导、转录调节、胞吞作用和蛋白激酶活化。

结合本研究结果以及已有文献报道,可推测 K63 位非降解功能的泛素化影响 STAT3 蛋白的磷酸化,从而影响 STAT3 的活性及功能的发挥;而 K48 位降解功能的泛素化影响 STAT3 蛋白的降解,使 STAT3 蛋白得以更新,这 2 种类型的

泛素化对于 STAT3 蛋白及其功能都十分重要。

参考文献:

- [1] Levy D E, Kessler D S, Pine R, et al. Interferon - induced nuclear factors that bind a shared promoter element correlate with positive and negative transcriptional control [J]. *Genes & Development*, 1988, 2 (4): 383 - 393.
- [2] Dale T C, Imam A M, Kerr I M, et al. Rapid activation by interferon alpha of a latent DNA - binding protein present in the cytoplasm of untreated cells [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, 86 (4): 1203 - 1207.
- [3] Fu X Y. A transcription factor with SH2 and SH3 domains is directly activated by an interferon alpha - induced cytoplasmic protein tyrosine kinase(s) [J]. *Cell*, 1992, 70 (2): 323 - 335.
- [4] Nakanoh S, Fuse N, Tadokoro R, et al. Jak1/Stat3 signaling acts as a positive regulator of pluripotency in chicken pre - gastrula embryos [J]. *Developmental Biology*, 2017, 421 (1): 43 - 51.
- [5] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3 [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009, 9 (11): 798 - 809.
- [6] Larner A C, David M, Feldman G M, et al. Tyrosine phosphorylation of DNA binding proteins by multiple cytokines [J]. *Science*, 1993, 261 (5129): 1730 - 1733.
- [7] Lee H, Zhang P, Herrmann A, et al. Acetylated STAT3 is crucial for methylation of tumor - suppressor gene promoters and inhibition by resveratrol results in demethylation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109 (20): 7765 - 7769.
- [8] Pan J, Lee Y, Zhang Q, et al. Honokiol decreases lung cancer metastasis through inhibition of the STAT3 signaling pathway [J]. *Cancer Prevention Research*, 2017, 10 (2): 133 - 141.
- [9] Park S, Kim D, Kaneko S, et al. Molecular cloning and characterization of the human AKT1 promoter uncovers its up - regulation by the Src/Stat3 pathway [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (47): 38932 - 38941.
- [10] Xu P, Duong D M, Seyfried N T, et al. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation [J]. *Cell*, 2009, 137 (1): 133 - 145.
- [11] Rieser E, Cordier S M, Walczak H. Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38 (2): 94 - 102.
- [12] Yang W L, Jin G, Li C F, et al. Cycles of ubiquitination and deubiquitination critically regulate growth factor - mediated activation of Akt signaling [J]. *Science Signaling*, 2013, 6 (257): ra3.
- [13] Lin K. The Akt DUBbed InAktive [J]. *Science Signaling*, 2013, 6 (257): Pe1.
- [14] Yang W L. The role of K63 - linked ubiquitination cycles in Akt kinase activation [D]. Houston: The University of Texas at Houston, 2013.
- [15] Li P, Liu H, Zhang Y, et al. Endotoxin tolerance inhibits degradation of tumor necrosis factor receptor - associated factor 3 by suppressing pellino 1 expression and the K48 ubiquitin ligase activity of cellular inhibitor of apoptosis protein 2 [J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2016, 214 (6): 906 - 915.