

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.36.006

FANCI 在 HEK293T 细胞中的表达、纯化及活性检测*

袁濮玉¹, 撒 荣^{2#}, 杜佳慧¹, 储小玲², 吴 洁¹, 杨 凡¹,
苏 倩¹, 邱桥成², 薛胜利^{2△}, 刘松柏^{1▲}

(1. 苏州卫生职业技术学院苏州检验医学生物技术重点实验室 215009;

2. 苏州大学附属第一医院血液科, 苏州 215006)

[摘要] **目的** 构建包含 FANCI 野生型(wt)及其突变体 N196S 蛋白的真核表达载体,并对纯化的野生型蛋白及突变体蛋白进行活性检测。**方法** 从 HEK293T 中提取 RNA,并反转录为 cDNA,使用带有 3xFlag 标签序列的特异性引物通过 PCR 方法扩增出人 FANCI 编码区全长,并克隆到 pLVX-EF1-MCS-PGK-Puro 载体上;突变体 N196S 利用 NEBaseChanger™ 引物设计工具,并利用 NEB 公司的点突变构建试剂盒 Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit 技术进行操作。重组的 FANCI 及突变体 N196S 表达质粒通过脂质体 polyJet 转染到 HEK293T 细胞中进行表达。使用免疫沉淀及竞争洗脱的方法纯化 FANCI 及 N196S 突变体蛋白。利用荧光标记 DNA 底物的方法检测 FANCI 及 N196S 突变体蛋白的 DNA 解旋酶活性。**结果** FANCIwt 基因及 N196S 突变体全长编码序列成功构建到 pLVX-EF1-MCS-PGK-Puro 载体上,蛋白质印迹法(Western blot)及 PAGE 胶银染方法成功检测到了 FANCIwt 及 N196S 突变体蛋白的表达、纯化,荧光标记 Oligo DNA 底物方法发现 FANCIwt 与 N196S 突变体蛋白 DNA 解旋酶活性存在差异。**结论** 成功构建了 FANCIwt 及 N196S 突变体真核表达载体,通过生化实验发现 FANCI 及 N196S 突变体蛋白存在差异的 DNA 解旋酶活性。

[关键词] FANCI;突变体;蛋白纯化;活性检测**[中图分类号]** Q814.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)36-4584-04**Expression, purification and activity detection of FANCI in NHEK293T cells***YUAN Puyu¹, HAN Rong^{2#}, DU Jiahui¹, CHU Xiaoling², WU Jie¹,YANG Fan¹, SU Qian², QIU Qiaocheng², XUE Shengli^{2△}, LIU Songbai^{1▲}

(1. Suzhou Key Laboratory of Laboratory Medicine and Biotechnology, Suzhou Vocational Health College, Suzhou, Jiangsu 215009, China; 2. Department of Blood Transfusion, First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215006, China)

[Abstract] **Objective** To construct the eukaryotic expression vector of FANCI wild type and mutant N196S and to purify proteins through immunoprecipitation technology and to conduct the activity detection on the purified wild type protein and mutant protein. **Methods** RNA was extracted from HEK293T and conducted the reverse transcription as cDNA. The total length of human FANCI coding region was amplified by PCR with the specific primers of 3xFlag sequence label and cloned in pLVX-EF1-MCS-PGK-Puro vector; mutant N196S was operated by using NEBaseChanger™ primer design tool and point mutation construction kit Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit from NEB company. Recombinant FANCI and mutant N196S expression plasmids were transfected into HEK293T cells to be expressed by lipidosome Polyjet. FANCI and N196S mutant proteins were purified by using the immunoprecipitation and competing elution methods. The DNA helicase activities of FANCI and N196S mutant proteins were detected by the fluorescent labeling method. **Results** FANCI gene and N196S mutant full length coding sequences were successfully constructed in the pLVX-EF1-MCS-PGK-Puro vector, and the expression and purification of FANCIwt and N196S mutant proteins were successfully detected by Western blot and PAGE gel silver staining methods; the DNA helicase activities of

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81470296,31701198);江苏省自然科学基金项目(BK20170386);江苏省“科教强卫工程”青年医学人才项目(QNRC2016719, QNRC2016771);江苏省卫生计生委医学科研课题面上项目(H2017074);江苏省六大人才高峰(2016-WSN-123);江苏省教育厅大学生实践创新训练项目(201712688007Y)。作者简介:袁濮玉(1998—),在读本科,主要从事蛋白纯化的研究。# 并列第一作者:撒荣(1993—),在读硕士,主要从事血液病分子机制的研究。△ 通信作者, E-mail: slxue@suda.edu.cn。▲ 并列通信作者, E-mail: liusongbai@126.com。

FANCI and N196S mutant proteins were different by the fluorescent labeling DNA substrate method. **Conclusion** The FANCIwt and N196S mutant eukaryotic expression vectors are successfully constructed, and the biochemical experiment finds that the FANCIwt and N196S mutant proteins have different activities of DNA helicase.

[Key words] FANCI; mutant; protein purification; activity detection

FANCI (Fanconi anemia complementation group J) 基因编码的蛋白是第 1 个被确认的同乳腺癌相关肿瘤抑制因子 BRCA1 (breast cancer 1, early onset) 相结合的蛋白, 因此其最初被命名为 BRCA1 结合的 C 端解旋酶 (BRCA1-associated C-terminal helicase 1, BACH1); 随后又被命名为 BRCA1 相互影响的蛋白 C 端解旋酶 (BRCA1 interacting protein cterminal helicase 1, BRIP1) 以避免同具有类似名称的转录因子相混淆; 而近年来该蛋白被发现是范可尼贫血 (fanconi anemia, FA) 通路的成员之一, 故被称为 FANCI 蛋白^[1-3]。FANCI 是一种 ATP 依赖的 5'-3' DNA 解旋酶, 最初从 FA 和早发性乳腺癌患者中鉴定出来一些错义突变位点 (A349P, R251C, Q255H, P47A, M299I 等), 这暗示 FANCI 蛋白可能作为肿瘤抑制因子维持基因组的稳定性^[4-5]。随后的研究表明, FANCI 蛋白在 DNA 链间交联 (interstrand cross-link, ICL) 修复、复制胁迫响应及 G4-DNA 结构拆解过程中发挥重要功能^[6-8]。FANCI 编码的序列突变与乳腺癌发生紧密相关, 在大量的 FANCI-like 解旋酶结构域中发现 Fe-S 簇结构域, 已经证实了 FANCI 在 motif I、Fe-S 和 BRCA1 互作的结构域发生错义突变, 与乳腺癌及 FA 的发生有关^[9-10]。遗传学研究证实, N 端 Fe-S 簇结构域 (aa276-aa362) 及 MLH1 结合区 (aa128-aa158) 与 FANCI 解旋酶活性相关, 而非 BRCA1 结合区^[2]。体外生化实验发现 A349P、R251C、Q255H 等错义突变失去了 DNA 解旋酶活性, 而 M299I 突变体蛋白的 ATP 水解酶活性及 DNA 解旋酶活性都比野生型高, 从而为阐明疾病发生的机制奠定了基础^[11-14]。

在对急性髓系白血病 (AML) 患者基因图谱的研究过程中发现, FANCI 基因的编码区 c. A587G; p. N196S 位置在 AML 患者中出现了复现性错义突变。但这种突变对活性的影响尚不明确。N196S 突变位于与 ATP 结合的区域, 可能对活性造成一定影响。因此, 本研究构建了 FANCI 及 N196S 突变体表达质粒, 并对在 HEK293T 细胞中表达纯化的蛋白进行了 DNA 解旋酶活性检测, 为进一步研究 FANCI 在白血病发生过程中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料 pLVX-EF1-MCS-PGK-PURO 载体购自广州辉骏生物科技有限公司, FANCIwt 编码区全长基因特异性引物 (FANCI-F: 5'-TCG AGC TCA AGC TTC GAA TTC ATG TCT TCA ATG TGG TCT

G-3'; FANCI-R: 5'-TTA TCT AGA GTC GCG GGA TCC TTA CTT AAA ACC AGG AAA CAT G-3'), N196S 点突变构建特异性引物 (FANCI-N196S/F: 5'-GTA AAA CTC AGC TCT CCA CTG-3'; FANCI-N196S/R: 5'-AGT CTT TCC TGA ATC AAC-3'), 以及荧光标记 DNA 底物均在华大基因科技公司合成; HEK293T 细胞购自上海拜力生物科技有限公司, 大肠杆菌感受态 DH5 α 购自北京全式金生物技术公司, Polyjet 购自美国 SignaGen 公司, 限制性内切酶 ECOR I、BamH I、Xba I、Dpn I 及 T4 DNA 连接酶均购自美国 NEB 公司, ClonExpress II One Step Cloning Kit 连接酶购自诺唯赞生物公司, PCR、质粒提取试剂盒购自天根生物公司, Flag 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的二抗、3xFlag 肽段购自英国 Abcam 公司, M2 Beads 购自美国 Sigma 公司, 银染试剂盒购自碧云天生物公司。细胞培养基及血清的细胞培养相关试剂均购自四季青公司。

1.2 方法

1.2.1 FANCIwt 及 N196S 突变体真核表达载体的构建 选取 HEK293T 细胞来源的 cDNA 片段, 采用聚合酶链反应 (PCR) 扩增出相应的 FANCIwt 编码区全长片段, 琼脂糖电泳鉴定 DNA 条带并胶回收。ECOR I、BamH I 双酶切 pLVX-EF1-MCS-PGK-PURO 载体, 并纯化回收酶切产物。将酶切后的表达载体及 PCR 酶切片段利用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 在 37 °C 条件下反应 30 min, 连接产物转化到 DH5 α 感受态中, 并涂到带有氨苄抗性的 LB 平板上, 在 37 °C 培养箱中过夜, 挑选单个菌落进行质粒酶切, 测序验证成功的质粒用于后续 N196S 突变体质粒的构建及接下来的转染。N196S 突变体质粒以 FANCIwt 质粒为模板, 利用点突变引物进行 PCR 扩增, 扩增后的产物进行 Dpn I 酶解, 然后转化到 DH5 α 感受态中进行与以上相同的后续检测操作。

1.2.2 细胞培养及脂质体转染 HEK293T 细胞常规培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 前 1 d 细胞铺于 15 cm 培养板中, 等细胞密度至 70%~80% 时, 瞬时转染 FANCIwt 及 N196S 表达质粒 (按照美国 SignaGen 公司的 Polyjet 转染说明书进行转染)。

1.2.3 提取总蛋白及蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 转染 36~48 h 后, 弃掉上清液培养基, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞 3 次。刮刀收集细胞并加入适量 RI-

PA 裂解液,振荡 15 s 后置于冰上 30 min。12 000×g 于 4 ℃ 离心 30 min,将裂解液上清液转移到另外一个新的 EP 管中,利用二辛可宁酸(BCA)方法进行蛋白定量。取 50 μg 总蛋白经 10% SDS-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶分离,100 V 情况下利用湿转方法将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗膜 3 次,每次 10 min。加入一抗 anti-Flag 抗体(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠(1:2 000)二抗室温孵育 1.5 h,PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。增强化学发光法(ECL)显色和发光(Odyssey Fc 成像仪,Gene 公司,美国)。

1.2.4 免疫沉淀纯化蛋白与 PAGE 银染 FANCIwt 及突变体 N196S 表达质粒在 HEK293T 细胞中转染 36~48 h 后收集细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞,4 ℃ 离心获得总蛋白上清液,在上清液中加入 20 μL M2 Beads,4 ℃ 旋转过夜,利用预冷 PBS 漂洗 M2 Beads 3 次,然后加入 30 μL 3xFlag 肽段竞争洗脱 Flag-FANCIwt 及 Flag-N196S 蛋白,获得的纯化蛋白用于活性检测及 PAGE 胶银染(按照碧云天生物公司的快速银染说明书进行银染)。

1.2.5 DNA 解旋酶活性检测 DNA 解旋酶活性检测采用荧光标记 Oligo DNA 底物的方法,上下游 oligo 序列为:DC26(上游),5'-TAMRA TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TCC CAG TAA AAC GAC GAC GGC CAG TGC-3';Tstem25(下游),5'-GCA CTG GCC GTC GTT TTA CGG TCG TGA CTG GGA AAA CCC TGG CG3-3'。反应前将退火后的 DNA 底物及反应缓冲液混合在一起,30 ℃ 情况下水浴反应 1 h,然后用加入乙二胺四乙酸(EDTA)及蛋白酶 K 的 6×DNA 上样缓冲液进行终止反应。反应产物通过非变性 PAGE 胶进行分离,分离后的结果通过荧光成像仪进行观察(Odyssey Fc 成像仪,Gene 公司)。

2 结 果

2.1 通过 PCR 扩增获得 FANCIwt 基因 cDNA 编码区全长 以 HEK293T 细胞来源的 cDNA 片段为模板,应用设计的引物进行人源 FANCIwt 基因 PCR 扩增,可见 3.7×10³ 大小的特异性片段,见图 1。

2.2 FANCIwt 真核表达载体及 N196S 突变体构建鉴定 利用 FANCIwt 表达质粒为模板,通过点突变引物进行 PCR 扩增,获得的质粒进行测序,鉴定 FANCI 基因 cDNA 第 587 位由 A 突变为 G,相应氨基酸由 N(天冬氨酸)突变为 S(丝氨酸),突变成功。FANCIwt 及 N196S 真核表达载体 pIvx-EF1-MCS-PGK-PURO,经 Xba I 酶切后得到约 2.5×10³(片段)

及 9.9×10³(载体)的两条条带。见图 2。

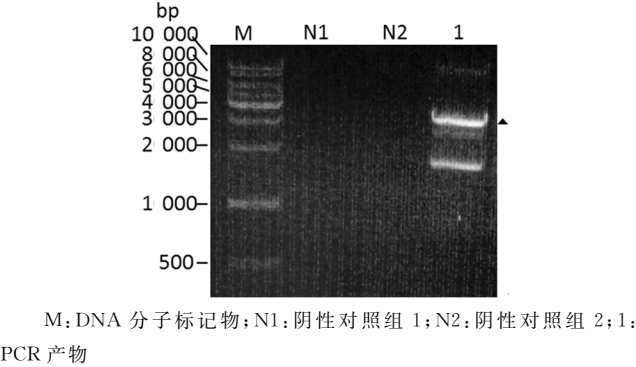


图 1 目的基因 PCR 扩增

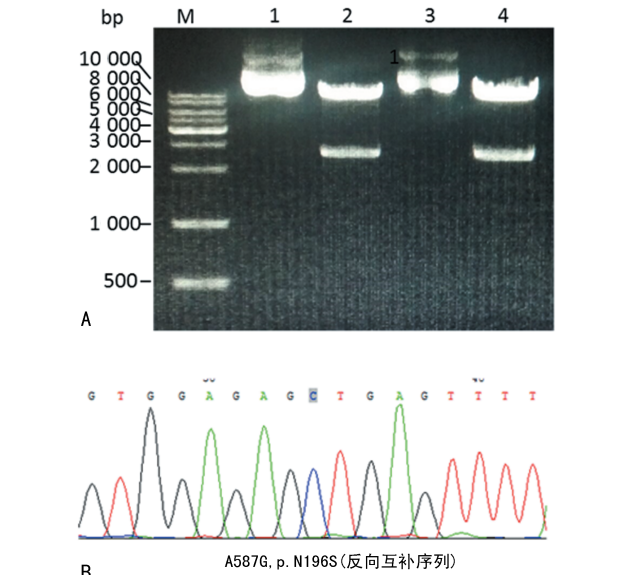


图 2 酶切验证(A)及突变测序验证(B)

2.3 FANCIwt 及 N196S 突变体蛋白在 HEK293T 细胞中的表达 将构建成功的 FANCIwt 及 N196S 突变体表达质粒转染到 HEK293T 细胞中,Western blot 检测到蛋白的成功表达,见图 3A。

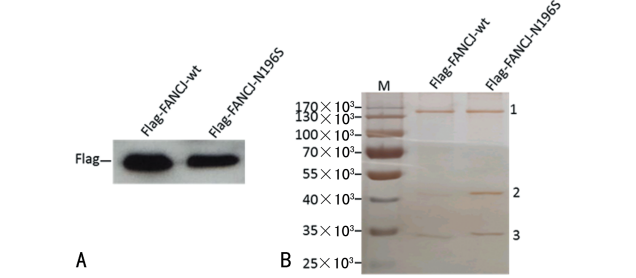


图 3 Western blot 检测(A)及蛋白纯化银染成像(B)

2.4 免疫沉淀方法纯化 FANCIwt、N196S 突变体蛋白及 PAGE 胶银染 FANCIwt 及突变体 N196S 表达质粒在 HEK293T 细胞中转染表达后收集细胞,裂解细胞并提前总蛋白,使用 M2 Beads 沉淀带 Flag 标签的 FANCIwt 及突变体 N196S 蛋白,然后通过 3xFlag 肽段将蛋白竞争洗脱下来,洗脱下来的蛋白经

银染染色,检测到明显的 FANCIwt 及突变体 N196S 蛋白条带,见图 3B。

2.5 DNA 解旋酶活性检测 采用荧光标记 Oligo DNA 底物的方法(图 4A),对 FANCIwt 及突变体 N196S 蛋白进行了 DNA 解旋酶活性检测,发现与 FANCIwt 野生型相比,N196S 突变体活性明显增强,并疑似具有额外核酸酶活性(产物 2),见图 4B。

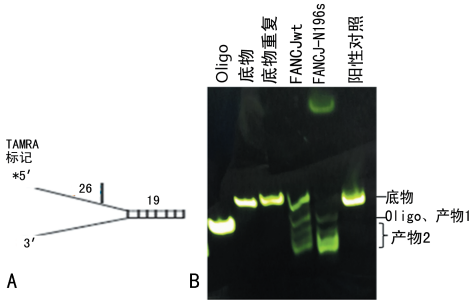


图 4 DNA 底物(A)及解旋酶活性检测(B)

3 讨论

FANCI 在 FA、乳腺癌及急性髓系白血病中都在复现性的错义突变。因此,在不同类型的癌症中,FANCI 都被认为参与了疾病的发生、发展进程,受到了广泛关注。FANCI 具有 DNA 解旋酶活性,参与包括 FA 通路在内的多个 DNA 修复通路,在多种癌症患者中检测到的错义突变体也显示与 DNA 解旋酶活性的改变相关^[5,10]。本课题组前期研究中在急性髓系白血病患者中检测到了一种复现性的 N196S 错义突变,位于与 ATP 结合的区域,靠近 Fe-S 结构域及与 MLH1 结合的区域,之前少见报道,对 FANCI 功能的具体影响目前尚不清楚。因此构建 FANCIWT 及其突变体的表达载体,纯化蛋白并检测蛋白的解旋酶活性,将为后续 FANCI 在白血病发生过程的研究中奠定基础^[12]。本研究中,采用 HEK293T 细胞来源的 cDNA 片段作为模板扩增出相应的 FANCIwt 基因序列,将其与 pIvx-EF1-MCS-PGK-PURO 真核表达载体相连,并以此 FANCIWT 野生型表达质粒为模板,构建了 N196S 表达载体,转入 HEK293T 细胞。通过 Western blot 及银染检测证明成功表达纯化了两种蛋白。后续通过荧光标记 DNA 底物的方法成功检测到 FANCIwt 及 N196S 突变体蛋白解旋酶活性存在差异性,这为后续研究 FANCI 突变导致白血病发生的机制奠定基础。总之,本研究结果将为进一步研究 FANCIWT 及 N196S 突变体在急性髓系白血病发生、发展过程中的作用机制奠定基础,也为研究 FANCI 生物学功能提供了新的思路。

参考文献

[1] BLOUIN J L,DURIAUX SAÏL G,GUIPPONI M,et al. Isolation of the human BACH1 transcription regulator

gene,which maps to chromosome 21q22.1[J]. Hum Genet,1998,102(3):282-288.

[2] BRIDGE W L,VANDENBERG C J,FRANKLIN R J,et al. The BRIP1 helicase functions independently of BRCA1 in the Fanconi anemia pathway for DNA crosslink repair[J]. Nat Genet,2005,37(9):953-957.

[3] LEVITUS M,WAISFISZ Q,GODTHELP B C,et al. The DNA helicase BRIP1 is defective in Fanconi anemia complementation group J[J]. Nat Genet,2005,37(9):934-935.

[4] FRANK B,HEMMINKI K,MEINDL A,et al. BRIP1 (BACH1) variants and familial breast cancer risk;a case-control study[J]. BMC Cancer,2007,7:83.

[5] BROSH R M,CANTOR S B. Molecular and cellular functions of the FANCI DNA helicase defective in cancer and in Fanconi anemia[J]. Frontiers in genetics,2014,5:372.

[6] CANTOR SB,NAYAK S. FANCI at the FORK[J]. Mutat Res,2016,788:7-11.

[7] MATSUZAKI K,BOREL V,ADELMAN C A,et al. FANCI suppresses microsatellite instability and lymphomagenesis independent of the Fanconi anemia pathway[J]. Genes Dev,2015,29(24):2532-2546.

[8] SUHASINI A N,SOMMERS J A,MUNIANDY P A,et al. Fanconi anemia group J helicase and MRE11 nuclease interact to facilitate the DNA damage response[J]. Mol Cell Biol,2013,33(11):2212-2227.

[9] WU Y,BROSH RM,J R. Helicase-inactivating mutations as a basis for dominant negative phenotypes[J]. Cell Cycle,2010,9(20):4080-4090.

[10] BALMANA J,DOMSHEK S M. BRIP1 as an ovarian cancer susceptibility gene;ready for the clinic? [J]. J Natl Cancer Inst,2015,107(11):djv262.

[11] BARTHELEMY J,HANENBERG H,LEFFAK M. FANCI is essential to maintain microsatellite structure genome-wide during replication stress[J]. Nucleic Acids Res,2017,45(1):509-511.

[12] GUO M,VIDHYASAGAR V,TALWAR T,et al. Mutational analysis of FANCI helicase[J]. Methods,2016,108:118-129.

[13] GUO M,VIDHYASAGAR V,DING H,et al. Insight into the roles of helicase motif Ia by characterizing Fanconi Anemia Group J Protein (FANCI) Patient Mutations[J]. J Biol Chem,2014,289(15):10551-10565.

[14] GUPTA R,SHARMA S,DOHERTY K M,et al. Inhibition of BACH1 (FANCI) helicase by backbone discontinuity is overcome by increased motor ATPase or length of loading strand[J]. Nucleic Acids Res,2006,34(22):6673-6683.