

重组GST-Crosstide蛋白的表达纯化及其在AGC型蛋白激酶活性检测中的应用*

吕逢春 杨一 杜林方** 刘科**

四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室 成都 610064

摘要 AGC型蛋白激酶在信号通路中占据着极为重要的地位, 通过对各种信号通路的调控来影响细胞的生长、增殖和凋亡进程. 为方便检测AGC型蛋白激酶的活性, 设计并构建了新型AGC型蛋白激酶特异底物GST-Crosstide. 通过同位素标记体外磷酸化的方法研究了酵母表达的Pkh1、Ypk1和大肠杆菌表达的Akt1三种AGC型蛋白激酶磷酸化GST-Crosstide的能力. 结果显示, 酵母表达的有活性的Pkh1和Ypk1均可有效磷酸化GST-Crosstide, 并且由于Pkh1对Ypk1的进一步激活, 二者共同作用可显著增加GST-Crosstide磷酸化. 而仅采用大肠杆菌表达的没有被活化的Akt1则无法磷酸化GST-Crosstide, 但Akt1可以被Pkh1或Ypk1激活, 从而获得磷酸化GST-Crosstide的能力. 研究表明, GST-Crosstide可以作为AGC蛋白激酶活性检测的有效工具, 并将有效促进真核生物蛋白激酶调控的细胞信号转导通路的研究. 图7 参14

关键词 GST-Crosstide; AGC型蛋白激酶; 体外磷酸化; Akt1; Ypk1; Pkh1

CLC Q55

Expression and purification of GST-Crosstide and its application in activity analysis of AGC protein kinases*

LYU Fengchun, YANG Yi, DU Linfang** & LIU Ke**

Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract AGC protein kinases play important roles in cellular signal pathways which affect cell growth, proliferation and apoptosis. The purpose of this study was to advance the researches towards elucidating signal pathways regulated by AGC kinases by providing a new protein substrate. We designed and constructed GST-Crosstide, a new specific protein substrate of AGC kinases. Radiolabeled phosphorylation assays were performed *in vitro* using AGC kinases including Pkh1, Ypk1 and Akt1 to phosphorylate GST-Crosstide. The results demonstrated that GST-Crosstide was phosphorylated effectively by active Pkh1 and Ypk1 which were expressed in yeast. The interaction between Pkh1 and Ypk1 enhanced the phosphorylation of GST-Crosstide. The inactive form of Akt1 expressed in *E. coli* was unable to phosphorylate GST-Crosstide until it was activated by Pkh1 or Ypk1. Our study indicated that GST-Crosstide could be used as an efficient tool to analyze AGC protein kinase activity. GST-Crosstide may benefit future studies on cellular signal transduction pathways regulated by AGC protein kinases.

Keywords GST-Crosstide; AGC protein kinase; kinase assay; Akt1; Ypk1; Pkh1

AGC蛋白激酶家族成员之间有着共同的结构域组织方式和很高的序列同源性, 大多数的AGC蛋白激酶成员都有一个或几个脂结合结构域存在其N端, 一个激酶催化结构域和C末端由疏水序列形成的调节结构域. 拥有这些特征的蛋白激酶都属于AGC蛋白激酶家族^[1]. AGC蛋白激酶家族包括蛋白激酶A(PKA)、蛋白激酶G(PKG)和蛋白激酶C(PKC), 同时也包括磷酸肌醇依赖蛋白激酶(PDK)、蛋白激酶B(PKB)和S6K激酶等多种参与细胞信号传导的蛋白激酶. AGC蛋白激酶通过直接或间接的方式调控下游信号途径中

的组分^[1].

Pkh1/2、Sch9、Ypk1/2 和Pkc1等都是酵母中的AGC蛋白激酶. Pkh1是与哺乳动物3-磷酸肌醇依赖蛋白激酶-1(PDK1)同源的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 它调节着下游的AGC蛋白激酶, 包括Ypk1、Pkc1和Sch9, 而YPK1是与哺乳动物蛋白激酶SGK同源的一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶^[2]. 近年来, 人们发现从酵母、线虫、果蝇到人类的细胞凋亡的调节均与AGC型蛋白激酶有着密切的关系. 因此, 对AGC蛋白激酶的活性研究非常重要. 但目前检测AGC型蛋白激酶的活性多使用传统的酶活力测定方法及没有广泛应用的液体闪烁计数仪^[3], 缺乏一种专一、简便、快捷的方法.

人工合成的多肽Crosstide, 氨基酸序列为GRPRTSFAEG. Crosstide经常被用来作激酶分析的底物, 比如在Akt蛋白激酶活性分析中应用^[4-5]. 但该多肽价格较昂

收稿日期 Received: 2012-04-20 接受日期 Accepted: 2014-05-14

*国家自然科学基金项目(30671181)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (30671181)

**通讯作者 Corresponding authors (E-mail: dulinfang@yahoo.com; kliu98@scu.edu.cn)

贵,且Crosstide分子量较小,其磷酸化变化难于进行SDS-PAGE分析,需要使用国内实验室装备较少的液体闪烁计数器进行检测.为了便于进行SDS-PAGE和对电泳凝胶进行放射自显影检测Crosstide的磷酸化,需要给Crosstide加上一个减缓其电泳迁移率的标签蛋白. GST标签是构建重组蛋白广泛采用的标签蛋白,且没有研究表明GST会被AGC激酶磷酸化,因此它不会干扰Crosstide的磷酸化检测.因此,在本研究中,我们构建了带GST标签的重组蛋白GST-Crosstide.为了验证GST-Crosstide作为底物的活性,选取3种广泛研究的AGC蛋白激酶——Pkh1、Ypk1、Akt1进行磷酸化.首先利用大肠杆菌实现重组蛋白GST-Crosstide和GST-Akt1的原核表达;然后以纯化的重组蛋白GST-Crosstide为底物,纯化的His-Pkh1、His-Ypk1和GST-Akt1为激酶,通过体外磷酸化反应,使GST-Crosstide分别与Pkh1、Ypk1和Akt1相互作用,检测GST-Crosstide是否可被磷酸化.本研究旨在寻找有效用于AGC型蛋白激酶活性检测,成为AGC激酶相关信号通路研究及药物开发的新工具.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 大肠杆菌DH5 α 和BL21由本实验室冻存,克隆表达载体pGEX-2TK和pGEX-5X-3购自上海英骏生物技术有限公司.

1.1.2 试剂 Pkh1和Ypk1由本实验室提供^[6];Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、BamHI和EcoRI限制性内切酶购自TaKaRa公司;Lambda蛋白磷酸酶(λ -ppase)购自NEB公司;PCR产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒和核酸分子Marker、蛋白分子Marker购自TIANGEN公司;腺苷5'-[γ -³²P]三磷酸盐([γ -³²P]ATP)购自北京市福瑞生物工程公司核算研究室;ECL化学发光溶液、PVDF膜购自Millipore公司;其余试剂均为进口或者国产分析纯.

1.1.3 仪器 高速冷冻离心机购自德国Beckman公司,凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司,超声波破碎仪购自美国Cole-Parmer公司,电泳槽Mini-PROTEAN购自美国Bio-Rad公司,恒温水浴锅购自美国PolyScience公司,高压灭菌锅购自中国上海申安医疗有限责任公司,恒温摇床购自中国哈尔滨东明医疗有限责任公司,SW-CJ-1C超净工作台购自中国苏州安泰有限责任公司.

1.2 方法

1.2.1 基因合成 根据Crosstide氨基酸序列合成Crosstide核苷酸全序列,5'端序列为5'-GATCCGGACG-TCCACGTACGAGCAGCTTCGCTGAGGGATGAG-3',3'端序列为5'-AATTCTCATCCCTCAGCGAAG CTGCTCGTACGTGGACGTCCG-3',并在5'和3'序列中分别引入BamHI和EcoRI限制酶切位点,由上海英骏生物技术有限公司合成.

1.2.2 引物设计 根据AKT1基因序列,设计扩增AKT1的引物,上游引物(P1):5'端序列为5'-CGGGATCCTTATGAACGACGTAGCC-3',3'端序列为5'-CGGAATTCTCAGGCTGTGCCACT-3',并在5'和3'序列中分别引入BamHI和EcoRI限制酶切位点,由上海英骏生物技术有限公司合成.

1.2.3 GST-Crosstide和GST-Akt1重组蛋白的诱导表达和纯化

构建重组质粒pGEX-2TK-Crosstide和pGEX-2TK-AKT1,将其分别转化大肠杆菌BL21,在30℃下,用1 mmol/L异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)诱导3-5 h,进行原核表达.收集细胞,超声破壁提取细胞全蛋白,再利用Glutathione Sepharose 4 Fast Flow亲和层析进一步纯化后得到电泳条带均一的重组蛋白GST-Crosstide和GST-Akt1.

1.2.4 检测纯化后的GST-Crosstide蛋白是否自磷酸化 取20 μ g GST-Crosstide重组蛋白,加入800 U的 λ -ppase 30℃温育;对照组20 μ g GST-Crosstide重组蛋白不加入 λ -ppase 30℃温育,通过SDS-PAGE检测GST-Crosstide有无自磷酸化.再将其转膜,室温封闭12 h后,分别使用丝氨酸磷酸化抗体(Anti-pSer)和苏氨酸磷酸化抗体(Anti-pThr)为一抗进行孵育,二抗孵育后进行蛋白检测.用于免疫印迹检测的正对照的磷酸化蛋白来源于光照前后的拟南芥类囊体蛋白^[6].

1.2.5 以GST-Crosstide为底物检测各种蛋白激酶活性 将GST-Crosstide分别与His-Pkh1、His-Ypk1、GST-Akt1三种待检测蛋白混合,向反应体系中加入Kinase buffer(15 mmol/L醋酸镁,50 mmol/L MOPS,0.2 mmol/L 硼酸钠,1 mmol/L EGTA,1 mmol/L DTT,20%甘油,500 μ mol/L [γ -³²P]ATP)和H₂O,使反应体系为30 μ L,在30℃条件下,反应1 h,SDS-PAGE后用胶片曝光4 d后将胶片显影定影^[7-8].

2 结果与分析

2.1 GST-Crosstide重组蛋白表达纯化及磷酸化分析

由于人工合成的多肽Crosstide价格较昂贵,且需要液体闪烁计数器进行检测.因此本研究中,为了便于通过放射自显影检测蛋白激酶对Crosstide的磷酸化作用,构建了重组蛋白GST-Crosstide.结果显示与未经IPTG诱导的细胞(Lane 1)相比,诱导后细胞(Lane 2)在约相对分子质量(M_r)26 $\times$ 10³处产生了明显条带(图1).该条带迁移率较不含Crosstide的GST略微偏小,与其 M_r 略高于GST一致.结果表明GST-Crosstide被成功诱导表达.

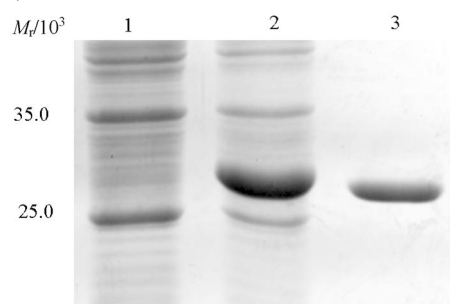


图1 GST-Crosstide在大肠杆菌中表达的SDS-PAGE电泳图谱. 1: 未诱导的阳性质粒转化子; 2: IPTG诱导的阳性质粒转化子; 3: GST.

Fig. 1 SDS-PAGE image of GST-Crosstide expressed in *E. coli*. 1: uninduced positive transformant with pGEX-2TK-Crosstide; 2: IPTG induced positive transformant with pGEX-2TK-Crosstide; 3: GST.

将GST-Crosstide重组蛋白的粗提液通过亲和层析柱进行纯化,纯化后的蛋白溶液按照洗脱顺序分装于20个Epp管中.纯化结果显示:洗脱液从洗脱第1管开始有蛋白条带,并基本无杂带.第2、3、4、5管蛋白量基本一致,且蛋白条带的位置略高于GST蛋白,说明得到纯化的GST-Crosstide重组蛋白(图2).

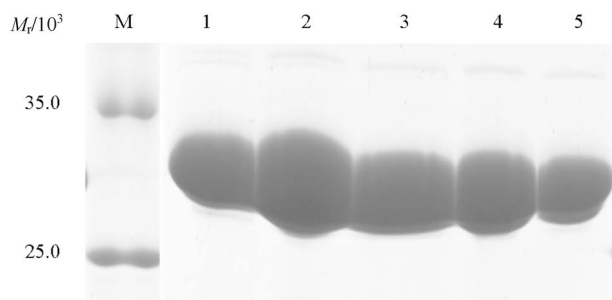


图2 GST亲和层析后样品的SDS-PAGE分析. M: 蛋白分子量标准; 1-5: 纯化后的GST-Crosstide重组蛋白.

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of fractions through GST-Sepharose column. M: Protein marker; 1-5: GST-Crosstide fractions of purification.

为了检测纯化后的GST-Crosstide的磷酸化状态, 将未经 λ -ppase处理的蛋白(图3, Lane 1)与 λ -ppase处理后的蛋白(图3, Lane 2)相比较, 发现电泳迁移率无区别; 再分别使用Ser和Thr磷酸化抗体进行检测, 均检测不到磷酸化条带. 而采用同样免疫印迹方法可清晰检测拟南芥类囊体膜蛋白光照前后磷酸化变化, 表明磷酸化抗体的有效性(图3, Lane 3, 4). 上述免疫印迹实验表明纯化后的GST-Crosstide没有被磷酸化(图3). 因此, 我们成功表达并得到电泳纯且未被磷酸化的GST-Crosstide重组蛋白, 可以用来作下一步蛋白激酶活性实验的底物.

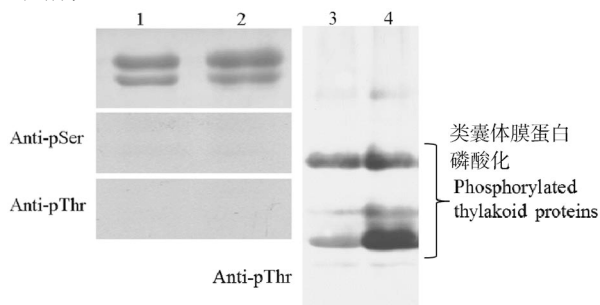


图3 GST-Crosstide的磷酸化检测. 1: 未经 λ -ppase处理的GST-Crosstide; 2: λ -ppase处理后的GST-Crosstide; 3: 拟南芥类囊体蛋白光照前; 4: 拟南芥类囊体蛋白光照后.

Fig. 3 Phosphorylation detection of GST-Crosstide. 1: GST-Crosstide not treated by λ -ppase; 2: GST-Crosstide treated by λ -ppase; 3: Thylakoid proteins from *Arabidopsis thaliana* before illumination; 4: Thylakoid proteins from *A. thaliana* after illumination.

2.2 以GST-Crosstide为底物检测Pkh1激酶活性

为了验证GST-Crosstide作为底物的活性, 选取了3种广泛研究的AGC蛋白激酶——Pkh1、Ypk1和Akt1对其进行磷酸化. 首先以纯化的重组蛋白GST-Crosstide为底物, 纯化的His-Pkh1为激酶, 通过体外磷酸化反应, 检测GST-Crosstide是否可被磷酸化. 结果显示, 只有同时加入激酶Pkh1和底物GST-Crosstide时, 才能检测到磷酸化信号; 同时, GST-Crosstide不能发生自磷酸化, Pkh1也不能磷酸化GST(图4), 说明Pkh1可以将GST-Crosstide磷酸化, 证明GST-Crosstide是检测Pkh1蛋白激酶活性的有效底物.

2.3 以GST-Crosstide为底物检测Ypk1激酶活性

接下来以纯化的GST-Crosstide为底物, 纯化的His-Ypk1为激酶, 通过体外磷酸化反应, 检测GST-Crosstide是否可

被Ypk1所磷酸化. 结果发现, 与Pkh1的效果类似, 蛋白激酶Ypk1可以有效磷酸化GST-Crosstide(图5), 证明GST-Crosstide同样是检测Ypk1蛋白激酶活性的有效底物.

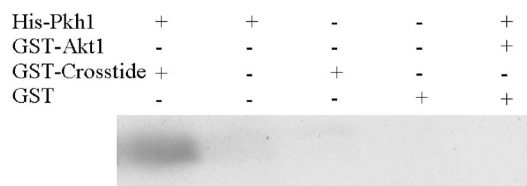


图4 以GST-Crosstide为底物检测Pkh1激酶活性.

Fig. 4 Kinase activity assay of Pkh1 using GST-Crosstide.

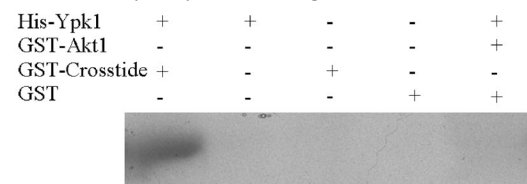


图5 以GST-Crosstide为底物检测Ypk1激酶活性.

Fig. 5 Kinase activity assay of Ypk1 using GST-Crosstide.

2.4 以GST-Crosstide为底物检测Akt1激酶活性

2.4.1 Pkh1增强Akt1对GST-Crosstide的磷酸化活性 最后以纯化的GST-Crosstide为底物, 纯化的His-Akt1为激酶, 通过体外磷酸化反应, 检测GST-Crosstide是否可以被Akt1磷酸化. 结果发现, 当同时加入激酶Akt1和底物GST-Crosstide时, GST-Crosstide不能被磷酸化(图6), 显示Akt1不能单独作为GST-Crosstide的上游激酶. 但当两种激酶Pkh1和Akt1同时与底物GST-Crosstide反应时, 可以检测到明显的磷酸化信号, 且与单独的蛋白激酶Pkh1对GST-Crosstide的磷酸化程度相比, 信号明显增强(图6). 显示Akt1虽然不能单独磷酸化GST-Crosstide, 但Akt1可以增强Pkh1对GST-Crosstide的磷酸化活性, 显示GST-Crosstide也可以作为间接检测Akt1蛋白激酶活性的底物.

2.4.2 Ypk1增强Akt1对GST-Crosstide的磷酸化活性 接下来验证Akt1能否增强Ypk1的激酶活性. 结果显示, 两种激酶Ypk1和Akt1同时与底物GST-Crosstide反应后, 可以检测到明显的磷酸化信号, 且与激酶Pkh1单独作用相比, 信号明显增强(图7). 说明Akt1也可以增强Pkh1对GST-Crosstide的磷酸化活性.

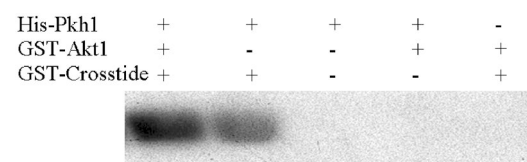


图6 Pkh1增强Akt1对GST-Crosstide激酶的磷酸化活性.

Fig. 6 Pkh1 enhanced the kinase activity of Akt1 towards GST-Crosstide.

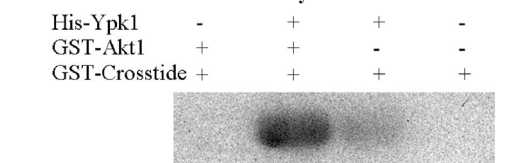


图7 Ypk1增强Akt1对GST-Crosstide激酶的磷酸化活性.

Fig. 7 Ypk1 enhanced the kinase activity of Akt1 towards GST-Crosstide.

3 讨论与结论

蛋白激酶功能的缺陷会导致多种疾病,这也使得蛋白激酶成为药物设计的主要靶标。AGC蛋白激酶在各种信号通路中占据着重要的地位,通过对信号通路的调节影响细胞生长、增殖和凋亡,进一步调控生命体的活动。因此,对AGC型蛋白激酶的活性研究非常重要^[10]。

本研究设计并构建了新型AGC激酶特异底物GST-Crosstide,并选取了3种在真核细胞生理功能具有重要调控作用的AGC蛋白激酶——Pkh1、Ypk1和Akt1,采用体外磷酸化的方法,通过以GST-Crosstide为底物检测激酶活性,验证了GST-Crosstide作为Ser/Thr蛋白激酶活性研究的底物的可行性。本研究结果显示,Pkh1、Ypk1均可将GST-Crosstide磷酸化,证明了它们的蛋白激酶活性都可以通过对GST-Crosstide的磷酸化作用来检测。同时,Akt1虽然不能单独磷酸化GST-Crosstide,但Akt1可以增强Pkh1和Ypk1对GST-Crosstide的磷酸化活性,显示GST-Crosstide也可以作为间接检测Akt1蛋白激酶活性的底物。本研究表明GST-Crosstide有可能也可以作为其他AGC蛋白激酶的底物,进行激酶活性分析。这对进一步深入研究AGC蛋白激酶参与的信号通路的研究有着重要的意义^[11-12]。AGC蛋白激酶参与的信号通路还与肿瘤、病毒性感染及多种退行性病变有关^[13-14],因此如果GST-Crosstide可作为特异的AGC蛋白激酶底物,将有可能为药物设计提供一个有价值的工具。

参考文献 [References]

- Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: Navigating downstream [J]. *Cell*, 2007, **129** (7): 1261-1274
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann I, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. *Science*, 1997, **275**: 1943-1947
- Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Alfred Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T, Frye C, Hu R, Swedlund B, Teng DHR, Tavtigian SV. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers [J]. *Nat Genet*, 1997, **15**: 356-362
- Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta [J]. *Cancer Res*, 1997, **57**: 2124-2129
- Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 4240-4245
- Hansson M, Vener AV. Identification of three previously unknown in vivo protein phosphorylation sites in thylakoid membranes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, **2** (8): 550-559
- 刘军, 闫磊, 朱德燕, 苗敏, 曹红平, 钟彦, 刘科. 酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)蛋白激酶SCH9激活环磷酸化调控胁迫应答[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2010, **47** (1): 185-191 [Liu J, Lü L, Zhu DY, Miao M, Cao HP, Zhong Y, Liu K. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) protein kinase SCH9 activation loop phosphorylation regulate stress response [J]. *J Sichuan University Nat Sci Ed*, 2010, **47** (1): 185-191]
- Cristofano AD, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression [J]. *Nat Genet*, 1998, **19**: 348-355
- Comer FI, Parent CA. PI 3-kinases and PTEN: how opposites attract [J]. *Cell*, 2002, **109**: 541-544
- Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN. Protein Kinase Inhibitors: Insights into Drug Design from Structure [J]. *Science*, 2004, **303**: 1800-1805
- Leevers SJ, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signalling through phosphoinositide 3-kinases: the lipid stake centre stage [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, **11**: 219-225
- Liu QR, Sasaki T, Kozieradzki I, Wakeham A, Itie A, Dumont DJ, Penninger JM. SHIP is a negative regulator of growth factor receptor-mediated PKB/Akt activation and myeloid cell survival [J]. *Genes Dev*, 1999, **13**: 786-791
- Sattler M, Verma S, Pride YB, Salgia R, Rohrschneider LR, Griffin JD. SHIP1, an SH2 domain containing polyinositol-5-phosphatase, regulates migration through two critical tyrosine residues and forms a novel signaling complex with DOK1 and CRKL [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 2451-2458
- Backers K, Blero D, Paternotte N, Zhang J, Erneux C. The termination of PI3K signalling by SHIP1 and SHIP2 inositol 5-phosphatases [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2003, **43**: 15-28