

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 21720091152193

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

蛋白酶体亚基 $\beta 1$ 稳转细胞系的构建

Establishment of stably transfected cell lines of $\beta 1$ subunit of
proteasome

杨瑞亮

指导教师姓名: 陶涛 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2012 年 5 月

论文答辩时间: 2012 年 6 月

学位授予日期: 2012 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2012 年 月

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘要

泛素-蛋白酶体途径(UPP)是生物体内蛋白质选择性降解的重要途径之一,其对靶蛋白的降解是一种级联反应过程。真核细胞利用泛素化精细调节能力,使得某些蛋白质的生理功能和含量水平得到调整。其中 26S 蛋白酶体是具有多种催化活性的重要的蛋白质复合体,分布在细胞核和细胞质,正常真核细胞中所含的 26S 蛋白酶体可分为两个亚复合体: 20S 亚复合体为催化核心, 19S 亚复合体为调节复合体,能识别泛素化的底物,并把底物带入 20S 催化亚复合体中进行降解。26S 蛋白酶体对细胞周期的调控、转录活化因子的调控、抗原呈递、细胞增殖和凋亡等生理活动都起着重要作用。

$\beta 1$ 亚基是 20S 催化亚复合体中的一个具有类 Caspase 酶活的亚基,分子量为 23 kDa。发表在 ABB 杂志上的一篇文章报道称当细胞周期运转时 $\beta 1$ 亚基的活性提高,而蛋白酶体的 $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 5$ 亚基细胞内含量水平并没有发生相应的变化。这说明 $\beta 1$ 亚基可能在细胞周期运转、细胞增殖中起作用。

为了深入地研究 $\beta 1$ 亚基的细胞生物学功能,我们首先构建了 pDsRed1-C1- $\beta 1$ 质粒及其突变型质粒,瞬时转染相应质粒进入 HeLa 细胞系,利用 G418 抗生素筛选获得相应稳转细胞系,这些稳转细胞系的制备将为我们今后的研究工作提供实验基础。

关键词: 泛素-蛋白酶体途径; $\beta 1$ 亚基; 稳转细胞系

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

The Ubiquitin-proteasome pathway (UPP) is an important pathway for intracellular protein selective degradation, it executes a cascade reaction for degradation of targeted protein. The function and level of the multitude of proteins are regulated by this pathway in eucaryotic cell. The 26S proteasome is a multicatalytic protease found in both the cytosol and the nucleus. In the normal eucaryotic cell, it is a large multisubunit complex containing two subcomplexes: the 20S proteasome—the proteolytic core and the 19S particle, a regulatory complex required for the recognition of ubiquitinated proteins and their preparation for degradation. The 26S proteasome has great influence on cell cycle, the action of transcription factor, proliferation and apoptosis and other physiological process.

$\beta 1$ is a subunit of 20S subcomplex, which has caspase-like activity, its molecular weight is 23kDa. In the year of 2007, an article from Archives of Biochemistry and Biophysics reports that the activity of the $\beta 1$ subunit is up-regulated as cells enter the cell cycle without concomitant change in the levels of the proteasome $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ subunits. So we estimated that $\beta 1$ involves in the cell growth, proliferation and apoptosis.

To further study the biological function of $\beta 1$ subunit, I constructed pDsRed1-C1- $\beta 1$ plasmid and its mutants at first, and then I transfect corresponding plasmid into HeLa cell line transiently and select stably transfected cells with antibiotic G418. These stable cell lines will become the foundation of the further study in future.

Key word: UPP; $\beta 1$ subunit; Stable cell line

目 录

1 前言	1
1.1 泛素-蛋白酶体途径	1
1.1.1 泛素系统.....	1
1.1.2 26S 蛋白酶体.....	3
1.1.2.1 20S 催化颗粒.....	4
1.1.2.2 19S 调节颗粒.....	5
1.2 泛素-蛋白酶体途径的相关生理功能	7
1.2.1 细胞命运的调节.....	7
1.2.2 抗原呈递.....	7
1.2.3 转录的调控.....	7
1.3 泛素-蛋白酶体途径与疾病的关系	7
1.3.1 UPP 在致癌途径中的作用.....	8
1.3.2 神经退行性疾病.....	8
1.3.3 炎症和自我免疫性疾病.....	8
1.4 β1 亚基	9
1.4.1 β 1 亚基的分布与分子结构特征.....	9
1.4.2 β 1 亚基目前的研究进展.....	10
1.4.2.1 β 1 亚基的成熟机制.....	10
1.4.2.2 β 1 亚基与 CP 的装配.....	10
1.4.2.3 β 1 亚基与磷酸化.....	11
1.4.2.4 β 1 亚基的功能研究.....	11
1.5 稳转细胞系简介	12
1.6 本课题研究的目的是和意义	13
2 材料与方 法	14
2.1 实验材料	14
2.1.1 菌株和质粒.....	14
2.1.2 细胞来源.....	14
2.1.3 主要试剂.....	14
2.1.4 抗体.....	15
2.2 仪器设备	15
2.3 分子克隆实验	15
2.3.1 PCR 实验.....	15
2.3.2 DNA 的限制性内切酶消化.....	16
2.3.3 DNA 连接反应.....	17
2.3.4 SDS 碱裂解法小量制备质粒 DNA.....	17
2.3.5 大肠杆菌转化步骤.....	18
2.3.6 感受态细胞的制备.....	19
2.4 Western Blot (免疫印迹实验)	19
2.5 细胞相关实验	22
2.5.1 细胞培养有关试剂的配制.....	22

2.5.1.1 培养基的配制.....	22
2.5.1.2 小牛血清的处理.....	22
2.5.1.3 抗生素的配制.....	23
2.5.1.4 胰酶消化液.....	23
2.5.1.5 1 × PBS (pH7.4)的配制.....	23
2.5.2 细胞培养基本操作流程.....	23
2.5.2.1 换液.....	23
2.5.2.2 传代.....	23
2.5.2.3 细胞计数.....	23
2.5.2.4 接种细胞细胞接种量:	24
2.5.3 Lipofectamine2000 转染法:	24
2.5.4 裂解细胞.....	24
2.6 G418 筛选	25
2.7 基因组的提取	25
3 实验结果.....	27
3.1 β 1 亚基 DNA 片段的扩增.....	27
3.2 pDsRed1-C1- β 1 质粒的构建	27
3.3 pDsRed1-C1- β 1 相关点突变质粒构建	28
3.4 β 1 及其点突变蛋白稳定表达的 HeLa 细胞系的构建.....	30
3.4.1 HeLa 细胞剂量-反应分析	30
3.4.2 细胞转染效率.....	31
3.4.3 稳转细胞系的筛选过程中克隆的形成.....	33
3.4.4 稳转细胞系克隆的挑取及扩增.....	33
3.5 稳转细胞系的鉴定	35
3.5.1 Western blot 鉴定稳转细胞系中相关蛋白质的表达	35
3.5.2 PCR 鉴定稳转细胞系中相关蛋白质基因的整合	35
4 讨论.....	38
参考文献.....	40
致谢.....	44

Table of contents

1 Introduction	1
1.1 Ubiquitin-Proteasome Pathway	1
1.1.1 Ubiquitin system	1
1.1.2 26S proteasome	3
1.1.2.1 20S core particle	4
1.1.2.2 19S regulatory particle	5
1.2 Biological functions of UPP	7
1.2.1 The regulation of cell fate	7
1.2.2 Antigen presentation	7
1.2.3 Regulation of transcription	7
1.3 UPP and diseases	7
1.3.1 The role of UPP in oncogenic signaling	8
1.3.2 Neurodegenerative disorders	8
1.3.3 Inflammatory and autoimmune diseases	8
1.4 β1 subunit	9
1.4.1 The localization and molecular characterization of β 1 subunit	9
1.4.2 Current research of β 1 subunit	10
1.4.2.1 Maturation of β 1 subunit	10
1.4.2.2 The relationship between β 1 subunit and CP	10
1.4.2.3 The relationship between β 1 subunit and phosphorylation	11
1.4.2.4 Research of the function of β 1 subunit	11
1.5 Brief introduction of stable cell line	12
1.6 Purpose and significance	13
2 Materials and Methods	14
2.1 Materials	14
2.1.1 Strain and plasmid	14
2.1.2 Cell line	14
2.1.3 Reagents	14
2.1.4 Antibodies	15
2.2 Apparatus	15
2.3 Molecular clone experiment	15
2.3.1 PCR	15
2.3.2 DNA digestion	16
2.3.3 Construction of plasmids	17
2.3.4 Plasmid extraction	17
2.3.5 Transformation	18
2.3.6 Competent cell preparation	19
2.4 Western Blot	19
2.5 Cell Biology experiments	22
2.5.1 Cell culture reagents	22

2.5.1.1 Culture medium	22
2.5.1.2 Treatment of Calf serum	22
2.5.1.3 Antibiotic.....	23
2.5.1.4 Trypsin	23
2.5.1.5 1 × PBS (pH7.4).....	23
2.5.2 The protocol of cell culturing.....	23
2.5.2.1 Culture medium change	23
2.5.2.2 subculturing.....	23
2.5.2.3 Cell counting.....	23
2.5.2.4 Cell seeding.....	24
2.5.3 Transient transfection with Lipofectamine2000	24
2.5.4 Cell lysate.....	24
2.6 G418 screening	25
2.7 Extraction of genomic DNA	25
3 Results	27
3.1 Amplification of β 1 DNA	27
3.2 Construction of pDsRed1-C1- β 1.....	27
3.3 Construction of pDsRed1-C1- β 1 mutants.....	28
3.4 The establishment of stable cell lines.....	30
3.4.1 Suitable dosage of G418 for screening	30
3.4.2 Transfection efficiency.....	31
3.4.3 Cell clone	33
3.4.4 Picking and amplification of stable cell lines	33
3.5 The identification of stable cell lines	35
3.5.1 The identification by Western blot.....	35
3.5.2 The identification by PCR.....	35
4 Discussion.....	38
Reference.....	40
Acknowledgement.....	44

1 前言

1.1 泛素-蛋白酶体途径

泛素-蛋白酶体途径是细胞内最重要的非溶酶体蛋白质降解途径，2004 年的诺贝尔化学奖授予了以色列科学家 Aaron Ciechanover, Avram Hershko 和美国科学家 Irwin Rose，就是以表彰他们在泛素调节的蛋白酶体降解途径中的研究。通过不同的多肽共价修饰蛋白质以改变其功能是个普遍的现象，这种生理现象的发现在细胞生物学领域是个巨大的进步，随着一系列起修饰功能的多肽发现[1]，至今最为普遍的就是泛素 [2-5]。在真核细胞中绝大多数存在于细胞质和细胞核内的蛋白质的降解都是通过泛素-蛋白酶体途径。

通过泛素-蛋白酶体系统介导的蛋白水解在一系列细胞生理活动过程中起着举足轻重的作用。调节着包括细胞周期、分裂、免疫和炎症反应、发育和分化等重要的生命活动[6]。在真核细胞内泛素-蛋白酶体途径承担着细胞内很多重要蛋白质的降解，包括信号分子、肿瘤抑制因子、细胞周期调节因子、转录因子、抑制分子（它的降解可激活其他蛋白）、抗凋亡蛋白（eg.Bcl-2）以及其他蛋白。因此，该途径的异常与肿瘤发生、神经退化、囊泡性纤维症、威尔森氏病、利德尔综合征、糖尿病等疾病有着密切关系[7]。泛素-蛋白酶体途径降解蛋白质包括两个步骤：（1）通过泛素系统将多聚泛素链连接到需要降解的底物上；（2）将带有泛素链标签的蛋白质传送至 26S 蛋白酶体进行降解[5, 6]。经蛋白酶体降解后的产物为 8—12 个氨基酸的多肽[8]。

1.1.1 泛素系统

泛素是一种高度保守的含有 76 个氨基酸的多肽，并普遍表达于所有真核细胞中。把泛素连接到靶蛋白上的这个过程称为泛素化，泛素化是真核细胞内一类极为重要的转录后修饰，这一修饰强有力的改变了被修饰蛋白的命运和功能。泛素化系统将泛素（ubiquitin, Ub）共价地结合到靶蛋白上，随后靶蛋白被 26S 蛋白酶体选择性地降解成短肽[9]。主要过程：Ub 首先被 Ub 活化酶（ubiquitin activating enzymes, E1）活化，Ub 上的 Gly 与 E1 上的半胱氨酸 Cys 残基形成高能硫酯键而连接在一起，然后通过转酯作用，Ub 从 E1 转移到 Ub 结合酶（ubiquitin conjugating enzymes, E2）上的半胱氨酸 Cys，活化的 Ub 再从 E2 转移到底物特异性的 Ub 连接酶（ubiquitin ligase enzymes, E3）半胱氨酸 Cys 残基上，接着通

过形成底物-E3 复合物 (substrate-E3 complex), 使底物发生泛素化, 即多个 Ub 分子通过异肽键 (isopeptide bond) 结合在靶蛋白的赖氨酸 lys 上, 形成多聚 Ub 链, 并以此作为水解信号被 26S 蛋白酶体识别, 进入从而被降解[2, 10] (图 1.1)。

通常一种 E1 对应多种 E2 和多家族 E3 或者 E3 多蛋白复合体, 特异性的 E3 酶主要负责泛素蛋白连接的选择性, 此过程由特异性蛋白所包含的特异性识别信号来决定。在某些情况下 E3 和底物蛋白连接是通过一种受体蛋白来实现, 不同的 E3 采取不同的方式转移泛素至底物蛋白[2]。

现在发现的泛素连接酶 (E3) 主要有三大类: HECT(homologous to E6-AP carboxyl terminus)结构域家族和RING(the really interesting new gene)结构域家族和 U-box 结构域家族。HECT 结构域家族成员直接催化泛素连接到底物蛋白质上, 其代表性成员包括 E6-AP 和 Nedd4 等。RING 结构域家族分为两种类型: (1) 单独一种成分起作用, 该类主要为 N-识别蛋白连接酶, 此类连接酶选择蛋白进行降解基于这些蛋白的 N 末端残基, 成员包括 CBL and IAPs 等 (2) 多成分复合体: 该类型成员最多的为 SCF 家族。以上连接酶中 RING 结构域家族和 U-box 结构域家族并不直接催化蛋白泛素化, 而是在 E2 和目标蛋白之间起辅助作用[11]。

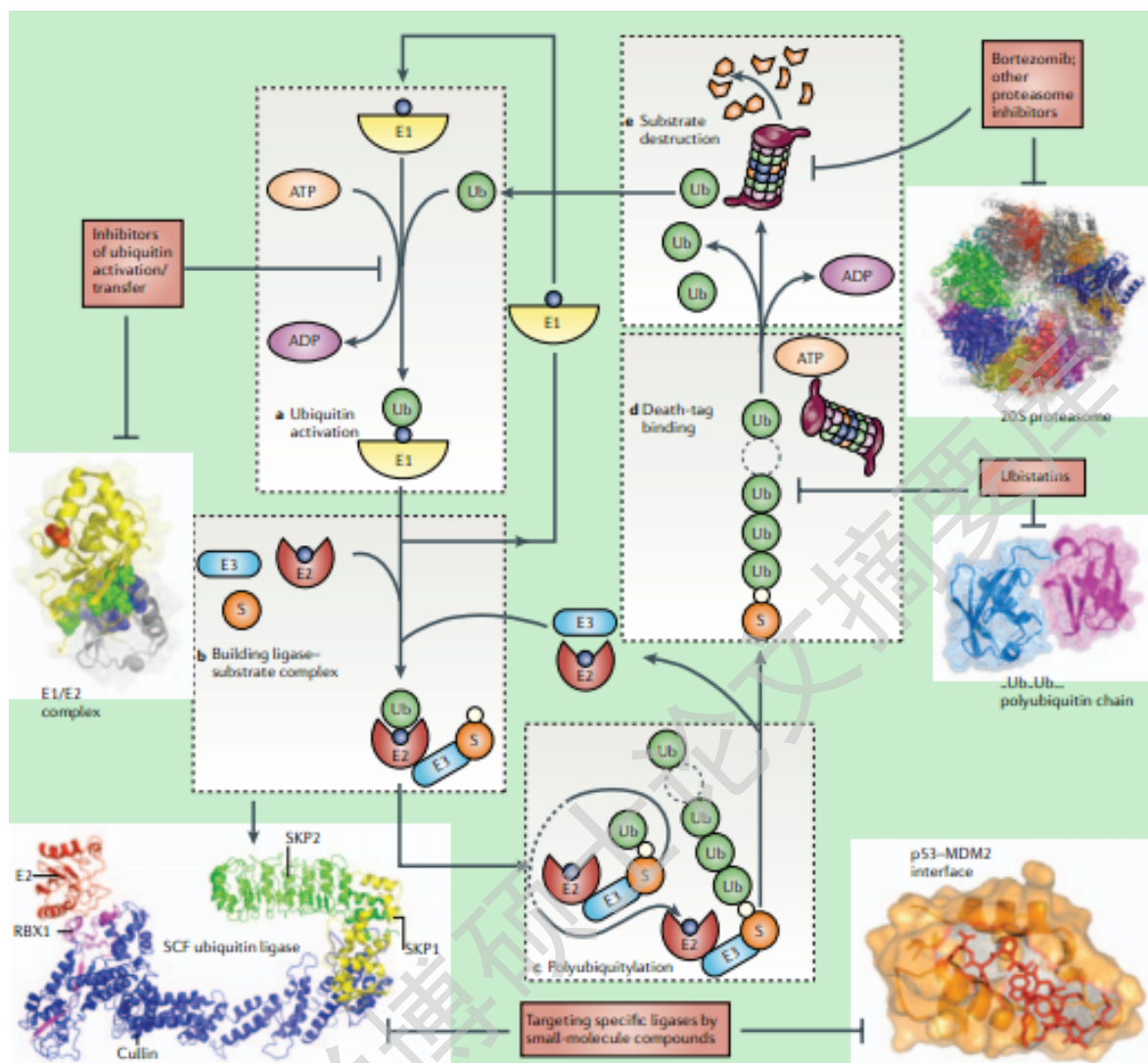


图 1.1 泛素-蛋白酶体降解途径简图[12]

Fig 1.1 Overview of the ubiquitin-proteasome pathway (UPP)

1.1.2 26S 蛋白酶体

26S 蛋白酶体是将泛素途径和蛋白质降解联系起来的重要复合体，涉及到细胞内许多生理过程。26S 蛋白酶体将经过泛素标记的蛋白质降解成短肽，但由于缺少可靠地结构模型、以及 26S 蛋白酶体的复杂性、脆弱性和可塑性，至今对其功能机制的研究尚未十分清晰[13]。

26S 蛋白酶体是一个巨大的多聚蛋白复合体，由两种亚复合体组成：一个 20S 核心颗粒 (CP)，分子量为 700kDa 和 19S 调节颗粒 (RP) 组成，分子量 900kDa，识别泛素化的蛋白并为降解做准备[13] (图 1.2)。26S 蛋白酶体在错误折叠或异常装配蛋白的清除、细胞周期蛋白的降解、转录因子的加工和降解，细胞介导的

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库