

• 基础研究 •

利用 Gal4/VP16- UAS 和双荧光素酶报告基因
系统检测 γ - 分泌酶活性*

刘忠华 阮 燕 查芹芹 张 岱

(北京大学精神卫生研究所 北京 100083)

摘要目的: 确立基于 Gal4/VP16- UAS 和双荧光素酶报告基因系统检测 γ - 分泌酶切割淀粉样前体蛋白活性的方法。方法: 将插入上游激活序列(UAS)和萤火虫荧光素酶报告基因的质粒 MH100, 嵌合酵母活性转录因子(Gal4)、单纯疱疹病毒蛋白(VP16)和 γ - 分泌酶切割位点的质粒 C99- GVP, 以及海肾荧光素酶质粒 pRL- CMV, 用脂质体转染法转入稳定表达淀粉样前体蛋白 C 末端的人神经母细胞瘤细胞(SH- SY5Y), 用免疫沉淀 Western blot 分析法检测 β - 淀粉样蛋白(A β)的生成, 利用 Gal4/VP16- UAS 和双荧光素酶报告基因系统测定荧光素酶报告基因的表达。结果: 免疫沉淀 Western blot 分析表明 A β 的生成在 γ - 分泌酶激活剂神经节苷脂 GM1 作用下升高并呈剂量依赖性, 同时双荧光素酶法检测 γ - 分泌酶活性也同步升高。在 γ - 分泌酶抑制剂作用下 A β 的产生呈剂量依赖性的减少, 同时 γ - 分泌酶活性也同步降低。结论: 基于 Gal4/VP16- UAS 和双荧光素酶报告基因系统检测 γ - 分泌酶活性的方法有效可靠, 是一种敏感、定量的检测方法。

关键词: Gal4/VP16- UAS; 双荧光素酶; γ - 分泌酶; 阿尔茨海默症

Applying Gal4/VP16- UAS and Dual- Luciferase reporter gene
system to detecting the activity of γ - secretase

LIU Zhong- hua, RUAN Yan, ZHA Qin- qin, ZHANG Dai*

The Institute of Mental Health, Peking University, Beijing 100083, China

ABSTRACT Objective: To establish an assay, based on Gal4/VP16- UAS and Dual- Luciferase reporter gene, for detecting the activity of γ - secretase in the proteolytic processing of precursor protein. **Methods:** Human neuroblastoma cells SH- SY5Y C99, which stably expresses APP C99, were transfected with the plasmids MH100, C99- GVP and pRL- CMV. MH100 encodes the up activated sequence (UAS) and luciferase. C99- GVP encodes the C- terminal fragment of APP and Gal4/VP16. pRL- CMV encodes the Renilla luciferase. Immunoprecipitation Western blot was used to analyze the A β secretion. The expression of the reporter gene in the cell lysates was assayed by the method based on Gal4/VP16- UAS and Dual- Luciferase reporter gene system. **Results:** Luciferase activities detected by the Gal4/VP16- UAS and Dual- Luciferase reporter gene assay system were increased by GM1, in parallel with the increase of A β secretion detected by immunoprecipitation Western blot. γ - Secretase Inhibitor IX inhibited the secretion of A β and it also decreased luciferase activities in a dose dependent manner.

Conclusion: The assay based on Gal4/VP16- UAS and Dual- Luciferase reporter gene is effective and reliable for detecting the activity of γ - secretase with sensitivity and quantitation, which is helpful to the researches of pathomechanism and therapy of Alzheimer's disease.

Key words: Gal4/VP16- UAS; Dual- Luciferase; γ - secretase; Alzheimer's disease

阿尔茨海默症(Alzheimer's disease, AD)是一种病因不明, 以进行性痴呆为主要临床特征的大脑退行性疾病。老年斑(senile plaque)是AD的主要病理特征之一, 其主要成分是 β -淀粉样蛋白(Amyloid β - protein, A β)。既往研究证实 A β 与 AD 的发生发展密切相关^[1-3]。A β 是由淀粉样前体蛋白(amyloid

precursor protein, APP)经过 β -和 γ -分泌酶切割而产生的^[4,5]。其中, β -分泌酶在APP穿膜区外28个氨基酸的位置切割APP,产生一个大的N端片段和含有A β 片段的99个氨基酸的跨膜片段C99,C99再经过 γ -分泌酶在A β 序列第40/42位氨基酸水解,产生39-42个氨基酸的肽段A β 和另一胞内片

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 39970930)。

作者简介: 刘忠华(1972-),女,博士研究生,研究方向:生物精神病学。E-mail: chinalliu@bjmu.edu.cn

责任作者: 张岱(1954-),男,教授,研究方向:临床精神病学与生物精神病学,

先后承担国家973子课题、863子课题、自然科学基金等研究项目

主要从事老年性痴呆和其他精神疾病相关蛋白表达与调控机制方面的研究。

E-mail: daizhang@bjmu.edu.cn Tel: 010-82801937, Fax: 010-62078246

(收稿日期: 2006-03-26 接受日期: 2006-04-10)

段(APP intracellular domain, AICD)^[2]。研究证明较长的A(更易于聚积,并在老年斑形成过程中起到种子作用^[6,7])。γ-分泌酶作为A(生成的最后一个关键酶,决定了A β 片段的长短。开发针对特异性γ-分泌酶的抑制剂,是治疗AD的方向之一^[8]。目前尚缺乏有效的方法检测γ-分泌酶的活性,因此建立一种高效、快速的检测γ-分泌酶活性的方法,为筛选γ-分泌酶抑制剂提供一个有效的工具,将有助于AD的病理机制和临床治疗研究。

研究表明, Gal4-UAS系统广泛应用于蛋白质相互作用, Gal4只有与UAS结合时,方能激活下游基因的转录。在Gal4/VP16-UAS系统中VP16替换了Gal4的激活部位,具有更强的激活功能。双荧光素酶报告基因系统具有机制明确、快速高效等优点。本研究拟整合这两种系统建立一个基于Gal4/VP16-UAS和双荧光素酶报告基因系统的γ-分泌酶活性检测方法,并用γ-分泌酶激活剂GM1和功能性抑制剂IX验证这种方法的可靠性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒 稳定转染人类基因APP的C末端99个氨基酸和信号肽SP的SH-SY5Y细胞(SH-SY5Y C99)由德国海德堡大学分子生物学中心馈赠。质粒C99-GVP/MH100是由瑞典斯德哥尔摩诺贝尔医学学会Nusland教授惠赠。质粒C99-GVP是在pcDNA3.1上克隆人类基因APP的C末端C99和DNA结合/激活结构域Gal4/VP16。质粒MH100编码萤火虫荧光素酶基因和上游激活序列UAS。海肾荧光素酶质粒pRL-CMV购自Promega公司。

1.1.2 试剂和仪器 转染试剂购自Invitrogen公司。转染用的质粒用QIAGEN质粒小提试剂盒提取。MEM/F12培养基购自GibcoBRL公司。鼠抗人A β 1-16单克隆抗体WO2由德国海德堡大学分子生物学中心馈赠。功能性γ-分泌酶抑制剂IX购自Calbiochem公司。双荧光素酶报告基因检测试剂盒购自Promega公司。辣根过氧化物酶偶联抗鼠IgG购于中山生物技术有限公司。ECL试剂购自Amersham公司。CO2培养箱(贺利氏,德国),Veritas™微孔板光度计(Tuner Biosystem,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 SH-SY5Y C99细胞的培养液成分: MEM/F12培养基, 10% (体积百分比) 灭活胎牛血清, 1% (体积百分比) 非必需氨基酸, 200mmol/L 谷氨酰胺, 0.4mg/L 潮霉素B。在37℃、5% CO₂条件下培养。于转染前1d将细胞接种到24孔板培养, 实验当天细胞生长面积达70%, 每个孔加200ng MH100, 100ng C99-GVP, 2ng 海肾荧光素酶质粒pRL-CMV, 以空质粒pcDNA3.1为对照, 按照Lipofectamine转染说明

操作, 转染至SH-SY5Y C99。转染24小时后弃培养液, 用1×PBS (pH 7.4) 洗涤后, 分别加入无血清培养液1.0mL, 其中3个实验组分别加入质量浓度为1、10和50mg/L的GM1, 对照组加入等体积的无菌超纯水, 另一个实验组加入γ-分泌酶抑制剂, 对照组加入等体积的无菌超纯水, 继续培养6h, 收集细胞培养液供免疫沉淀Western blot用, 细胞进行下一步的双荧光素酶报告基因检测。

1.2.2 双荧光素酶报告基因检测 收集培养液后, 用1×PBS (pH 7.4) 清洗细胞, 每孔加入100μl 双荧光素酶检测试剂盒中的细胞裂解液, 进行细胞裂解收集。取20μl 细胞裂解产物, 进行目的报告基因萤火虫荧光素酶及内对照海肾素荧光素酶检测, 计算萤火虫荧光素酶的表达值与内对照海肾素荧光素酶表达值的比值。

1.2.3 免疫沉淀及Western blot检测培养液中A β 含量 将各组细胞培养液于2700r/min离心15min, 取上清各加入抗A β 单克隆抗体(WO2) 6μL, 蛋白质G-agarose(Sigma) 35μL, 于4℃旋转混合过夜, 2700 r/min离心10min后弃上清, 沉淀物用1×PBS (pH 7.4) 洗涤3次, 加入蛋白电泳上样缓冲液25μL, 于97℃变性10min, 短暂离心, 取上清上样。用10% (质量分数) Tris-Tricine凝胶电泳后, 将蛋白质通过电转移法转移至硝酸纤维素膜(385 mA, 40 min)。将硝酸纤维素膜置于1×PBS (pH 7.4) 中煮沸5min以增加蛋白信号, 用5%脱脂奶粉(PBS溶解) 封闭1h, 1×PBS漂洗3次, 每次5min, 加入单克隆抗体WO2 (用PBS稀释, I:2000), 室温下孵育1h, 1×PBS (pH 7.4) 漂洗3次, 加入辣根过氧化物酶偶联抗鼠IgG (用PBS稀释, I:2000), 室温孵育1h, 用PBS漂洗后以ECL系统检测蛋白条带。目的蛋白条带的光密度分析用Bio-Rad凝胶成像系统的Gel-doc2000分析, 并进行统计学分析。

1.3 统计学方法

所有数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 用SPSS 10.0的单因素方差分析和Bonferroni多重比较检验统计分析。p < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GM1引起γ-分泌酶活性的升高:

SH-SY5Y C99细胞在不同浓度的GM1作用6小时, 用免疫沉淀Western blot检测培养液中A β 的分泌。结果表明, 细胞培养液中的A β 随着GM1浓度的升高而增加(图1)。6次独立实验均得到相同结果, 经单因素方差分析和Bonferroni多重比较检验显示10μM, 50μM GM1处理组细胞分泌A β 的量与对照组均明显升高。与对照组相比, 加入10μM GM1后A(的生成增加了2.98(0.41倍, 加入50μM GM1后A β 的生成增加了4.3±0.79倍, 差异有统计学意义(p < 0.01)。

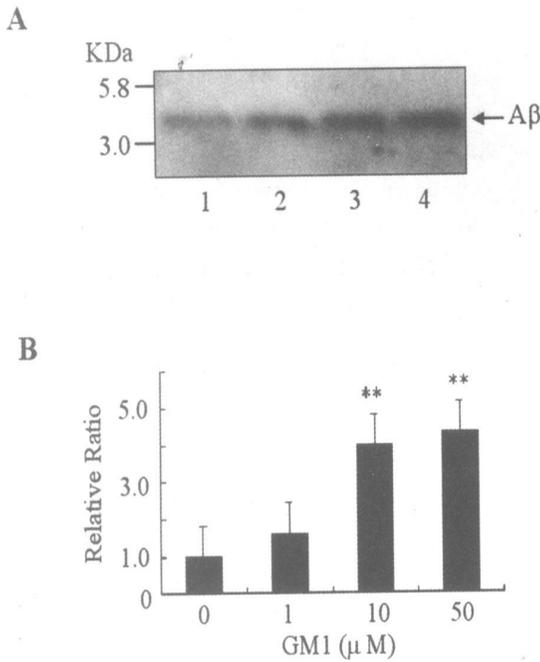


图1 免疫沉淀 Western blot 法检测 GM1 促进 SH- SY5Y C99 细胞分泌 Aβ

Figure 1 Aβ secretion in SH- SY5Y C99 cells was increased by GM1 significantly

A, 1, treated with 0μM GM1; 2, treated with 1μM GM1; 3, treated with 10μM GM1; 4, treated with 50μM GM1

B, n= 3, * * p< 0. 01 versus 0μM GM1

2.2 GM1 对报告基因表达结果的影响:

图 2 显示, GM1 与荧光素酶基因的表达存在明显的剂量-反应关系。经单因素方差分析和 Bonferoni 多重比较检验, 加入 10μM, 50μM GM1 后荧光素酶基因的表达与对照组的差异具有显著性 (p< 0. 01)。

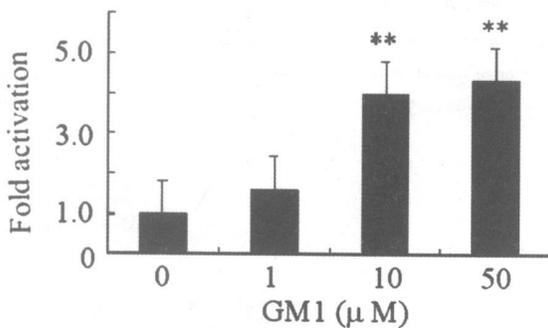


图2 GM1 对报告基因表达的影响

Figure 2 Effects of GM1 on the luciferase activity

n= 6, p< 0. 01 versus 0μM GM1

2.3 功能性 γ- 分泌酶抑制剂 IX 对 Aβ 分泌的影响:

加入功能性 γ- 分泌酶抑制剂 IX 后, Aβ 的生成显著减少 (图 3)。在 0. 1μM 处理组, Aβ 的生成明显减少 (p< 0. 001), 在 0. 3μM 处理组, Aβ 的生成几乎检测不到。

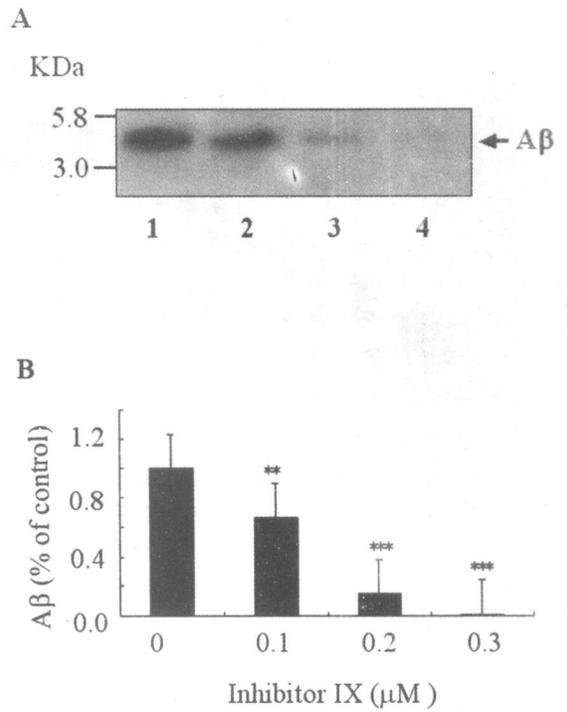


图 3 免疫沉淀 Western blot 法检测功能性 γ- 分泌酶抑制剂 IX 抑制 SH- SY5Y C99 细胞分泌 Aβ

Figure 3 Aβ secretion in SH- SY5Y C99 cells was decreased by Inhibitor IX

A, 1, treated with 0μM Inhibitor IX; 2, treated with 0. 1μM Inhibitor IX; 3, treated with 0. 2μM Inhibitor IX; 4, treated with 0. 3μM Inhibitor IX

B, n= 3, * * p< 0. 01, * * * p< 0. 001 versus 1μM Inhibitor IX

2.4 功能性 γ- 分泌酶抑制剂 IX 对报告基因表达结果的影响:

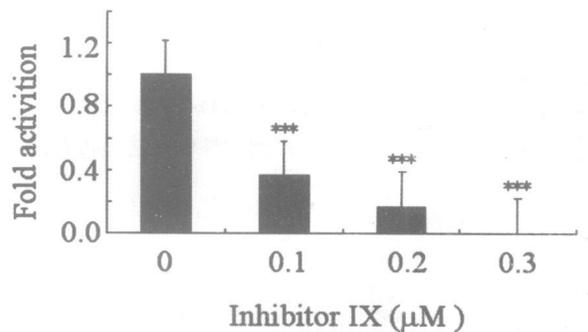


图 4 功能性 γ- 分泌酶抑制剂 IX 对报告基因表达的影响

Figure 4 Effects of Inhibitor IX on the luciferase activity

n= 6, * * * p< 0. 001 versus 0μM Inhibitor IX

从图 4 可见, 荧光素酶基因的表达随着功能性 γ- 分泌酶抑制剂 IX 浓度的升高而降低, 在 0. 1 (M 处理组, 荧光素酶基因的表达明显降低 (p< 0. 001), 而在 0. 3μM 处理组, 荧光素酶基因的表达的降低具有非常显著性, 与抑制剂对 A(的生成影响一致。

3 讨论

A β (是阿尔茨海默病(AD)的主要病理特征老年斑的主要组成成份,抑制A β 生成是AD治疗中处于核心地位的上游治疗措施,而 γ -分泌酶是A β 的生成过程中的关键酶,因此,对于 γ -分泌酶的研究成为AD的研究热点和重点之一。文献报导的检测方法,主要是根据终产物A β 的产量和抑制剂的作用来判断 γ -分泌酶活性^[9,10]。但这些方法操作繁杂,影响因素多并且不能定量,不易进行高通量的筛选。

本文所建立的基于Gal4/VP16-UAS和双荧光素酶报告基因系统的检测方法,是将Gal4/VP16与APP的C末端C99合成质粒C99-GVP,在细胞内经过 γ -分泌酶水解后,包括Gal4/VP16的胞内片段转入核中,与上游激活序列UAS结合,从而促进了下游荧光素酶基因的表达。与传统方法相比,本研究方法具有以下几方面的优点:首先,活性酵母转录因子Gal4只能在识别UAS时才能激活目标基因,使启动子下游基因转录,故该方法有较强的特异性;其次,VP16具有很强的激活功能,易于激活下游荧光素酶基因的表达,因此该方法灵敏性较高;第三,双荧光素酶报告基因系统本身具有方便、灵敏和高通量的特点。Karlstrom等采用Gal4/VP16-UAS和单荧光素酶基因报告系统有效检测出缺失PS1的胚胎干细胞中 γ -分泌酶的活性^[11],本研究应用Gal4/VP16-UAS和双荧光素酶基因报告系统检测神经瘤细胞 γ -分泌酶的活性,并应用免疫沉淀Western Blot方法进一步验证了该检测方法的可行性。

本文采用 γ -分泌酶的激活剂和功能性抑制剂对该检测方法进行验证。GM1是 γ -分泌酶的激活剂,在APP产生A β 的过程中只作用于 γ -分泌酶而对 α -和 β -分泌酶不产生影响^[12]。本研究用不同浓度的GM1作用于SH-SY5Y C99细胞,用免疫沉淀Western blot法检测GM1促进了 γ -分泌酶活性,同时用本文建立的方法检测到荧光素酶报告基因表达相应升高。另外,用功能性 γ -分泌酶抑制剂IX作用于SH-SY5Y C99细胞,用本方法检测到 γ -分泌酶活性相应降低,与免疫沉淀Western blot法的结果一致,进一步验证了这种方法的可靠性。

综上所述,本研究建立的基于Gal4/VP16-UAS和双荧光素酶报告基因系统的检测 γ -分泌酶活性的方法是可行的,具有

特异性强、灵敏度高、高通量等特点,为进行 γ -分泌酶抑制剂的筛选提供了一个较好的方法。

参考文献

- [1] Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, et al. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids [J]. *Nature*, 1992, 359(6393): 325-7
- [2] Hanu M, Denis P, Young Y, et al. Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21099-106
- [3] Kawabata S, Higgins GA, Gordon JW. Amyloid plaques, neurofibrillary tangles and neuronal loss in brains of transgenic mice overexpressing a C-terminal fragment of human amyloid precursor protein [J]. *Nature*, 1992, 356(6366): 265
- [4] Podlisny MB, Lee G, Selkoe DJ. Gene dosage of the amyloid beta precursor protein in Alzheimer's disease [J]. *Science* 1987; 238 (4827): 669-71
- [5] Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor [J]. *Nature*, 1987, 325(6106): 733-6
- [6] Jarrett JT, Berger, E. P., and Lansbury. The carboxy terminus of the amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: Implication for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 4693-7
- [7] Hayashi H, Kimura N, Yamaguchi H, et al. A seed for Alzheimer amyloid in the brain [J]. *J Neurosci*, 2004; 24(20): 4894-902
- [8] Wolfe MS. Secretase as a target for Alzheimer's disease [J]. *Curr Top Med Chem*, 2002; 2(4): 371-83
- [9] Desire L, Bourdin J, Loiseau N, et al. RAC1 inhibition targets APP processing by gamma-secretase and decreases A β production in vitro and in vivo [J]. *J Biol Chem*, 2005
- [10] Kim SH, Yin YL, Li YM, et al. Evidence that assembly of an active gamma-secretase complex occurs in the early compartments of the secretory pathway [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 48615-9
- [11] Karlstrom H, Bergman A, Lendahl U, et al. A sensitive and quantitative assay for measuring cleavage of presenilin substrates [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(9): 6763-6
- [12] Zha Q, Ruan Y, Hartmann T, et al. GM1 ganglioside regulates the proteolysis of amyloid precursor protein [J]. *Mol Psychiatry*, 2004, 9(10): 946-52