

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2019.06.025

人源雄激素受体 DNA 结合结构域的原核表达与其响应元件的复合物结晶

秦童, 黄震

(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 610065)

摘要: 为获得高分辨率的雄激素受体与其响应元件的复合物晶体结构, 为前列腺癌的治疗提供药物靶点设计的理论基础. 本研究构建了 AR-DBD 的原核表达载体, 在 0.5 mmol/L IPTG, 16 °C 条件下诱导 24 h 表达该蛋白. 通过与 AR 响应元件寡核酸的结合优化蛋白纯化条件, 使 AR-DBD 蛋白易于纯化. 最终, 蛋白核酸复合物晶体呈现出边缘清晰, 短棒状的立体结构, 本研究制备的蛋白核酸复合物晶体可直接用于 X 射线衍射分析.

关键词: 雄激素受体; 前列腺癌; DNA 结合结构域; 蛋白核酸复合物晶体; 原核表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2019)06-1151-06

Prokaryotic expression of homo androgen receptor DNA binding domain and co-crystallization with androgen response element

QIN Tong, HUANG Zhen

(Key Laboratory of Bio-Resource and Eco-Environment of Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: Obtained a high-resolution complex crystal structure of the androgen receptor (AR) and its response element (ARE) could provide a theoretical basis for drug target design for the treatment of prostate cancer. In this study, a prokaryotic expression vector of AR-DBD was constructed, and the protein was inducted to expression at 16 °C with 0.5 mmol/L IPTG for 24 h. In order to purify AR-DBD protein easily, the protein purification conditions were optimized by binding to ARE oligo-nucleic acids. Finally, we obtained the protein-nucleic acid complex crystal that exhibited short rod-like three-dimensional structures with clear crystal edges. The protein-nucleotide complex crystals prepared in this study can be used for X-ray diffraction analysis directly.

Keywords: Androgen receptor; Prostate cancer; DNA binding domain; Protein-DNA complex crystal; Prokaryotic expression

1 引言

雄激素受体 (androgen receptor, AR) 与很多激素类的相关疾病 (包括前列腺癌、乳腺癌、卵巢

癌、胰腺癌等) 以及肌肉萎缩、骨质疏松等合成代谢缺陷密切相关^[1]. 尤其作为前列腺生长的关键调节因子, 是治疗前列腺癌 (prostate cancer, PCa) 的主要药物靶点^[2]. 雄激素剥夺疗法是治疗 PCa 的

收稿日期: 2019-04-08

基金项目: 国家自然科学基金(21572146)

作者简介: 秦童(1991-), 女, 河南驻马店人, 硕士生, 生物化学与分子生物学. E-mail: qintong_7@163.com

通讯作者: 黄震. E-mail: zhen_huang@scu.edu.cn

一线疗法,也就是通过外科手术或者化学去势的疗法降低人体内雄性激素的含量^[3].尽管该方法在癌症发展的初期颇有成效,但是随着癌症的发展,最终会导致雄激素敏感型和去势抵抗型 PCa 的发生^[4-5].AR 对激素敏感型和去势抵抗型前列腺癌的细胞活力、增殖和侵袭都至关重要^[6].

研究表明,AR 信号通路在激素拮抗剂抑制型的晚期 PCa 中仍起着关键作用,目前,该信号通路研究最多的效应靶点主要集中在配体结合结构域(ligand binding domain, AR-LBD)^[7].但是越来越多的研究表明,AR 信号通路还存在一个非常有潜力的药物靶点,即雄激素受体 DNA 结合结构域(DNA binding domain, AR-DBD).

AR-LBD 作为 PCa 治疗中一个非常重要的靶点^[8],其蛋白晶体结构以及蛋白与一些小分子药物的复合物晶体结构也已经被解析^[9],这为后续的药物设计提供了结构生物学支持.但由于 AR-LBD 极易突变、缺失^[10]以及过度表达可导致 PCa 从激素敏感阶段发展到激素非依赖阶段,极低的激素甚至无需激素即可引发 AR 下游基因的大量表达,造成了药物的抗性,导致前列腺癌的恶变和转移.正是由于 LBD 容易突变甚至缺失^[11-12],导致前列腺癌的治疗困难重重.但是,AR 作为核受体超家族的一员,要引发下游基因的表达需要进入细胞核与 DNA 结合才能引发 PCa 的发展,而 AR-DBD 作为更有潜力的药物靶点近年来也引起很高的关注.研究结果发现,AR-DBD 是一段保守区域,也是一个潜在的药物靶点^[13].鼠源复合物晶体结构显示在 DBD 中存在两个锌指位点,两个 AR 分子以头对头排列方式与启动子结合,四个锌指位点使得 AR 与其响应元件(androgen response element, ARE)的结合较其它甾类受体稳定性与特异性更高.然而,目前只有鼠源 AR-DBD 与其 ARE 的复合结构测定出来^[14]且分辨率不高(仅 4.0 Å),且缺少人源的 AR-DBD 的晶体结构.这给新药物的设计带来不少困难.

本研究通过原核表达和纯化系统获得了高纯度的人源 AR-DBD 蛋白,并鉴定出了 AR-DBD 与雄激素响应元件(androgen response element, ARE)复合物的结晶条件,为高分辨率 AR-DBD 结构的解析以及新型前列腺癌治疗药物的设计提供了新的思路和研究基础.

2 材料和方法

2.1 材料

2.1.1 菌种与质粒雄激素受体 DNA 结合结构域的重组表达质粒 pET21a-AR-DBD 由 pET21a 载体和人源的前列腺癌细胞株 Vcap 总 RNA 反转录得到的 cDNA 构建而成.该重组质粒可通过 His 标签与 Ni²⁺亲和层析柱特异性结合得到纯化的均一性蛋白.人源前列腺癌细胞株 Vcap 由四川大学生物国家重点实验室的陈元伟教授提供.

2.1.2 试剂 酵母提取物、胰蛋白胍、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、Imizadole 和 Tris 碱购于 Sigma-Aldrich 公司;NaCl、浓盐酸等无机试剂购于成都科隆化工有限公司;高糖细胞培养基(DMEM)、胎牛血清购自 Gibco;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒购自天根生物科技有限公司(中国);用于克隆的 DH5a 和 BL21(DE3)、内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I、DNA Marker、DNA 上样缓冲液,蛋白 Marker,蛋白上样缓冲液购于全式金生物技术有限公司(中国);T4 DNA 连接酶购自 New England Biolab(NEB, 英国);Hisrap FF crude Ni²⁺亲和层析柱,Hitrap SPFF 强阳离子交换柱和 Superdex 75 100/300 GL 分子筛层析柱购于 GE Healthcare 公司(美国);晶体筛选试剂盒购于 Hampton Research 公司(美国).

2.2 方法

2.2.1 pET21a-AR-DBD 载体构建 将冻存的细胞在 37 °C 水浴复苏,1500 g 离心 5 min 后去上清,1 mL DMEM 重悬细胞,随后将重悬液转移到细胞培养瓶中加入 6~8 mL 的培养基,10%的胎牛血清培养.待细胞融合度达到 80%左右时,取 10⁷细胞提取总 RNA,反转录得到 cDNA 随后进行 PCR 扩增反应得到目的片段.取 1 μg 的 pET21a 空载体和目的片段进行双酶切,酶切位点为 *Bam* H I 和 *Xho* I,1%的琼脂糖凝胶回收之后按目的片段与载体物质的量比例 5:1 混合,T4 DNA 连接酶 16 °C 过夜连接.连接产物转入 DH5a, SOC 培养基 37 °C, 220 r/min 培养 1 h 后取 200 μL 培养液涂布在含有 50 mg/mL 氨苄霉素的 LB 固体培养基上.37 °C 培养 16 h 后挑取单克隆,菌落 PCR 鉴定阳性克隆后,接种至含有 50 mg/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养 16 h 后,提取重组质粒并测序验证.

2.2.2 AR-DBD 蛋白表达条件优化 将重组质

粒 pET21a-AR-DBD 转入 BL21(DE3) 感受态细胞中得到阳性克隆。挑取单克隆接种于含有 50 mg/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 16 h 后, 以 1 : 100 接种于 1 L LB 液体培养基中继续培养至 OD=0.6~0.8, 分别加入终浓度为 0.2、0.4、0.6~0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 在 25 °C、16 °C 分别培养 20、24 h。分别取 OD=5 的菌液 8 000 g、4 °C 离心 5 min 收集菌体, 加入 500 μ L 的裂解液重悬菌体, 4 °C, 30% PW(1400W), 5 s 开/10 s 关超声 3 min。之后 8 000 g、4 °C 离心 5 min, 分别取上清和沉淀加 10% 体积的 10 \times 蛋白上样缓冲液, 95 °C 热处理 5 min 后, 15% 的 SDS-PAGE 分析。

2.2.3 AR-DBD 蛋白纯化 取 2 L 菌液, 4 °C 离心 30 min (8 000 g), 菌体用 Buffer A (20 mM Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 25 mmol/L Imidazole, 20 mmol/L ZnSO₄, pH 8.0) 重悬, 80 MPa、4 °C 匀浆破碎。将破碎后的菌液 8 000 g、4 °C 离心 30 min, 取上清 0.22 μ m 滤膜过滤后备用。Histrap FF crud 用去离子水和 buffer A 平衡 8 个柱体积后, 将菌体滤液上样。用 buffer A 冲洗 5 个柱体积之后, 再分别用 15% 和 30% 的 buffer B (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, 20 mmol/L ZnSO₄, pH 8.0) 冲洗 2 个柱体积洗脱杂蛋白, 然后用 100% 的 buffer B 洗脱蛋白, 洗脱组分用于 SDS-PAGE 分析。收集的组分混合后用 2 L 的透析液 (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L LiCl, 1 mmol/L DTT, pH 7.4) 透析过夜。

2.2.4 AR-DBD 与 ARE 共纯化 将透析过夜的蛋白溶液浓缩至 5 mL, 加入 10% 的 ARE 用于稳定蛋白构象, 用 Histrap SPFF 强阳离子交换柱, 再次纯化蛋白。首先用 10 个柱体积的过滤除气的 ddH₂O 平衡柱子, 将蛋白上样后用 5 个柱体积的 binding buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L LiCl, 1 mmol/L DTT, 20 mmol/L ZnSO₄, pH 7.4) 洗脱杂蛋白, 随后用 15 个柱体积的 elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 1 mol/L LiCl, 1 mmol/L DTT, 20 mmol/L ZnSO₄, pH 7.4) 线性洗脱目的蛋白, 洗脱组分用 15% 的 SDS-PAGE 分析。收集蛋白组分将 buffer 置换至分子筛 buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L LiCl, 10 mmol/L DTT, 20 mmol/L ZnSO₄, pH 8.0), 体积浓缩至 500 mL 上样, 大约在 18~20 min 蛋白

被逐渐洗脱, 收集组分并走胶分析。随后将蛋白浓缩至 200 mL, 置换 buffer 至 100 mmol/L LiCl, 10 mmol/L DTT, 10% 甘油并分装, 保存于 -80 °C 冰箱保存。

2.2.5 AR-DBD 与 ARE 复合物晶体的筛选 于 -80 °C 冰箱取出保存好的蛋白, 冰上融化, 测定蛋白浓度后与 ARE 共同结晶, 使各组分终浓度 AR-DBD (0.05 mmol/L)、ARE (0.1 mmol/L)、ZnSO₄ (10 mmol/L)、LiCl (150 mmol/L)。本实验结晶条件的筛选采用坐滴法, 在 96-3 孔板的池液孔中加入 60 mL 30% 的 MPD, 三个小孔中将蛋白样品与晶体筛选试剂分别按 1 : 1、1 : 2 和 2 : 1 的配比混合坐滴, 用专用封口贴密封之后于 16 °C 培养, 此后隔日观察晶体情况。筛选出适合结晶的条件之后采用悬滴法扩大培养体系。首先在 24 孔培养板中分别加入配好的池液 (与筛选体系一致), 体积均为 1 mL, 然后依次在干净的玻片上滴加一定量的池液和结晶样品, 总体积一般在 2~3 μ L 之间, 池液和样品点在同一位置, 与玻片边缘保持一定的距离, 均匀混合, 将 24 孔板的各个孔边缘均匀涂抹凝胶, 尽快将载有样品和池液的玻片倒扣于孔上 (样品位于孔内), 轻轻按压玻片边缘, 使其与凝胶充分接触, 保证孔内属于密封状态, 16 °C 培养, 隔日观察。

3 结果与分析

3.1 AR-DBD 蛋白表达条件的优化

为了获得大量高纯度的均一蛋白样品, 对原核表达系统进行不同温度和 IPTG 诱导浓度进行尝试。分别用 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L 的 IPTG 分别在 25 °C 条件下培养 20 h 和 16 °C 条件下培养 24 h 进行诱导表达。对 10 个条件下的菌体分别进行破碎取上清和沉淀, 15% 的 SDS-PAGE 分析, 发现蛋白基本上都在上清中, 但是 25 °C 蛋白表达量明显低于 16 °C 条件下的蛋白表达量, 不同 IPTG 的浓度对蛋白表达量似乎没有太大影响。因此, 我们选定 0.5 mmol/L IPTG, 16 °C 诱导 24 h 来表达 AR-DBD。

3.2 AR-DBD 蛋白的纯化

为了获得高纯度的蛋白, 我们通过载体构建时在蛋白的 N 端加入了 His 标签, 以便通过其与 Ni²⁺ 离子亲和层析柱的结合得到纯化, 分析结果显示 AR-DBD 在通过 Histrap FF crude 纯化之后仍然由很多杂蛋白 (图 1), 不利于结晶工作的进

行,分析蛋白的氨基酸序列并通过相关软件的计算得知蛋白的等电位点约为 9.3 左右,在纯化条件下带正电,于是采用 Hitrap SPFF 进行阳离子交换,结果显示离子交换柱纯化之后,还是有很多杂蛋白存在(图 2),其主要以单体形式存在,间或有二聚体形式,并且随着缓冲液中离子浓度的

降低,蛋白变得极易沉淀,为了稳定蛋白的构象并保证蛋白的溶解度与活性,本实验开创性地使用了与其反应元件共存的方法来纯化蛋白.进一步使用分子筛 Superdex 75 100/300 GL 纯化蛋白,收集蛋白组分进行 SDS-PAGE 分析,蛋白纯度较高(图 3),适合下一步蛋白结晶工作.

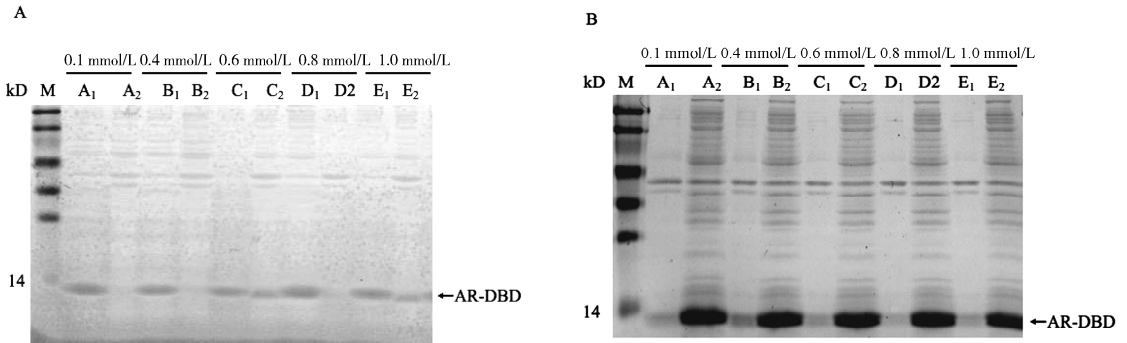


图 1 不同诱导条件下 AR-DBD 的蛋白表达

A: 25 °C 诱导 20 h; B: 16 °C 诱导 24 h; M: 分子量标记.

Fig. 1 The expression of AR-DBD under different conditions.

A: 20 h of induction at 25 °C; B: 24 h of induction at 16 °C; M: protein marker.

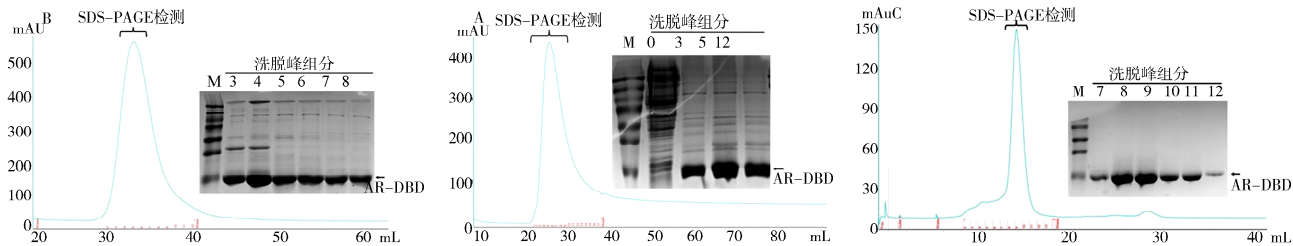


图 2 AR-DBD 纯化过程中组分的 SDS-PAGE 分析

A: Ni^{2+} 离子亲和层析结果分析, O 是流穿, 3、5、12 分别表示收集时的组分编号; B: Hitrap SPFF 强阳离子交换柱结果分析, 3、4、5、6、7、8 分别表示收集时的组分编号; C: super 75 分子筛纯化结果分析, 7、8、9、10、11 分别表示收集时的组分编号.

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of fractions during the purification of AR-DBD protein

A: Purified protein from Ni^{2+} ion affinity chromatography. O stand for proteins flow through. No. 3, 5 and 12 indicated the collected fractions; B: Purified protein eluted from Hitrap SPFF column was subjected to SDS-PAGE analysis. No. 3, 4, 5, 6, 7 and 8 indicated the collected fractions; C: Purified AR-DBD protein from super 75 column. No. 7, 8, 9, 10 and 11 indicated the collected fractions.

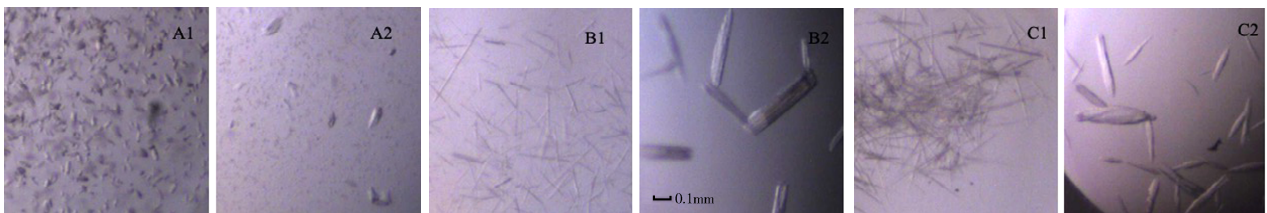


图 3 AR-DBD 与 ARE 的复合物晶体

Fig. 3 Crystal complex of AR-DBD and ARE

3.3 AR-DBD 与 ARE 复合物晶体的筛选

将得到的均一活性蛋白进行复合物晶体的初步筛选, AR-DBD 是高度保守的蛋白区域, 由鼠源结构可知 Zn^{2+} 可稳定蛋白构象, 因此在样品中 10 mmol/L 的 ZnSO_4 来帮助保持蛋白活性. 使用 Index HT 蛋白质、核酸结晶试剂盒筛选各样品结晶所需要的条件, 共筛选了 288 个晶体生长条件, 包

含了不同的添加剂, 沉淀剂, pH 值和缓冲体系, 以求获得最好的结晶条件. 经过 2~3 w 16 °C 的培养, 在几个条件下观察到晶体的形成. 根据筛选出的条件, 进行调整, 获得了比较好的晶体图片. 晶体从最开始无规则的小石子形状(图 3 A1)或者针状(图 3 B1、C1), 优化至边缘清晰的立体结构状

(图 3 A2)和短棒状(图 3 B2、C2). 我们知道, 晶体的形成和生长是由于分子有序排列的结果, 形状规则的晶体意味着内部分子的紧密排列, 优化后的晶体显示出更高的质量, 意味着更好的 X 射线衍射和更高的分辨率.

4 讨 论

本研究首次纯化了人源的 AR-DBD 蛋白并成功制备了供 X 射线衍射分析的晶体. 本研究目的是为了探究 AR-DBD 与基因的相互作用提供反应机理, 通过解析 AR-DBD 与其响应元件 ARE 复合物的晶体结构, 最终为治疗前列腺癌新的药物靶点设计提供理论依据. 我们表达并纯化了均一活性的 AR-DBD 蛋白, 由于该蛋白只是一个结构域, 分子量很小, 非常容易受到体系的影响. 本实验最初拟使用 pET28a-SUMO 表达体系, 其优点在于, pET28a-SUMO 在蛋白的 N 端带有一个 SUMO 标签, 该标签可由商品化的蛋白酶 Recombinant Sam II Ubiquitin-Like Modifier Protease 1 (SUMO Protease 1, ULP1)切割, 且该酶自带 His 标签, 可经 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化后与目标蛋白分离, 得到没有标签的蛋白. 但由于该标签过大 (16.6 kD)影响了目标蛋白的表达和折叠, 切割不易进行, 进而才采用 pET21a 的表达载体进行表达. 同时在纯化缓冲体系中加入 Zn^{2+} 和 ARE 来稳定蛋白构象, 10%甘油来增加蛋白溶解度.

前列腺癌的发病率逐年升高, 早在 2014 年就成为西方国家男性的第一杀手, 且随着年龄的增长, 该病发病率和致死率都不断攀升, 当 PCa 发展到去势抵抗型前列腺癌时期 (castration-resistant prostate cancer, CRPC), AR 信号通路就成为最主要的治疗靶点^[15]. LBD 和 DBD 作为该信号通路中药物设计靶点得到了最多的研究, 其中, 针对 LBD 的晶体结构小分子药物的设计及联用得到了良好的发展^[16]. 而针对 DBD 设计的药物却是少之又少, 究其原因, 恐怕主要是缺少高精度的人源 AR-DBD-ARE 蛋白核酸复合物. 目前鼠源 AR-DBD 与 ARE 的复合物晶体分辨率为 4.0 \AA ^[14], 尽管当 552 位的半胱氨酸突变为丙氨酸时, 其复合物晶体的分辨率可提高至 3.1 \AA , 但仍然不能满足药物设计的精度要求 (2 \AA 左右). 尽管鼠源和人源 AR-DBD 只相差一个氨基酸残基, 目前为止人源 AR-DBD 或其与 ARE 的复合物结构尚未测定出来. 这恐怕是由于在纯化过程中 AR-DBD 蛋白非

常容易聚集成多聚体, 而发生沉淀, 不易纯化. 这给人源 AR-DBD 或其与 ARE 的复合物晶体的准备和结构测定带来了很大困难. 在这个方面, 我们的研究工作实现了突破: 我们通过添加 ARE 和金属离子稳定蛋白构象, 添加助溶剂提高蛋白的可溶性以及浓度, 将蛋白最终浓缩至 10 mg/mL , 可满足晶体生长的需要, 进而筛选出了 AR-DBD-ARE 蛋白核酸复合物的结晶条件. 接下来, 我们还将通过硒代寡聚核酸取代的方法来帮助蛋白晶体的生长, 以期获得高质量的晶体和分辨率高的衍射数据, 对人源 AR-DBD 及其 ARE 复合物进行结构测定, 为该靶点的药物设计提供高精度结构学信息.

从实验的结果来看, 蛋白核酸复合物晶体由开始小而杂乱的小石子形状经优化后得到边缘清晰的立体方砖型结构, 或者由细针状优化至短粗棒状结构. 我们知道, 晶体的生长是单个分子在三维空间有序堆积的结果, 一般来说, 用于蛋白核酸复合物晶体生长的样品除了对纯度有很高的要求之外, 还要求分子内部之间有较强的作用力, 例如盐晶是较强的离子键, 核酸晶体是作用更强的碱基堆积力. 通过调整缓冲液的成分, 可以增强或者改变分子间的相互作用, 从而得到优化的复合物晶体. 而本研究通过不断优化条件得到了质量较好的复合物晶体, 可用于晶体的 X 射线衍射, 以期得到复合物的晶体结构, 为前列腺癌的治疗提供创新靶点.

参考文献:

- [1] Li D, Zhou W, Pang J, *et al.* A magic drug target: Androgen receptor [J]. *Med Res Rev*, 2018, 39: 1485.
- [2] Massie C E, Lyn Ch A, Ramos-Montoya A, *et al.* The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism [J]. *EMBO J*, 2011, 30: 2719.
- [3] Debes J D, Tindall D J. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer [J]. *Cancer Lett*, 2002, 187: 1.
- [4] Hara T, Miyazaki H, Lee A, *et al.* Androgen receptor and invasion in prostate cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68: 1128.
- [5] Dehm S M, Tindall D J. Alternatively spliced androgen receptor variants [J]. *Endocr Relat Cancer*,

- 2011, 18: 183.
- [6] Snoek R, Cheng H, Margiotti K, *et al.* In vivo knockdown of the androgen receptor results in growth inhibition and regression of well-established, castration-resistant prostate tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15: 39.
- [7] Culig Z, Santer F R. Androgen receptor signaling in prostate cancer [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2014, 33: 413.
- [8] Hu B, Hu H, Yin M, *et al.* Sertad1 promotes prostate cancer progression through binding androgen receptor ligand binding domain [J]. *Int J Cancer*, 2019, 144: 558.
- [9] Estebanez-Perpina E, Arnold L A, Nguyen P, *et al.* A surface on the androgen receptor that allosterically regulates coactivator binding [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 16074.
- [10] Bohl C E, Miller D D, Chen J, *et al.* Structural basis for accommodation of nonsteroidal ligands in the androgen receptor [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 37747.
- [11] Matias P M, Donner P, Coelho R, *et al.* Structural evidence for ligand specificity in the binding domain of the human androgen receptor. Implications for pathogenic gene mutations [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 26164.
- [12] Wang B, Lou G, Wu K, *et al.* Developing new targeting strategy for androgen receptor variants in castration resistant prostate cancer [J]. *Int J Cancer*, 2017, 141: 2121.
- [13] Dalal K, Roshan-Moniri M, Sharma A, *et al.* Selectively targeting the DNA-binding domain of the androgen receptor as a prospective therapy for prostate cancer [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 26417.
- [14] Shaffer P L, Jivan A, Dollins D E, *et al.* Structural basis of androgen receptor binding to selective androgen response elements [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 4758.
- [15] Parray A, Siddique H R, Nanda S, *et al.* Castration-resistant prostate cancer: potential targets and therapies [J]. *Biologics*, 2012, 6: 267.
- [16] Li H, Ban F, Dalal K, *et al.* Discovery of small-molecule inhibitors selectively targeting the DNA-binding domain of the human androgen receptor [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 6458.

引用本文格式:

中文: 秦童, 黄震. 人源雄激素受体 DNA 结合结构域的原核表达与其响应元件的复合物结晶[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2019, 56: 1151.

英文: Qin T, Huang Z. Prokaryotic expression of homo androgen receptor DNA binding domain and co-crystallization with androgen response element [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2019, 56: 1151.