

带3蛋白C端和血型糖蛋白A相互作用 及其抗原相关性的研究*

杜洪清¹⁾ 傅国辉^{1)**} 姜晓殊¹⁾ 龙晓宇¹⁾ 张振宇¹⁾ 杨宝峰²⁾ 孔宪刚³⁾

(¹⁾哈尔滨医科大学病理生理教研室, 哈尔滨 150086; (²⁾哈尔滨医科大学药理教研室, 哈尔滨 150086;

(³⁾中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 哈尔滨 150000)

摘要 采用高效液相色谱法分离鉴定了红细胞膜蛋白质跨膜域的亲水性肽链, 结果显示血型糖蛋白A (GPA) Lys101~ Asp130 与带3蛋白有相关性. 为进行深入研究, 采用 RT-PCR 方法从 K562 细胞中扩增了 410 bp 的 GPA 基因, 分别克隆到酵母双杂交 BD 端表达质粒和杆状病毒转移载体上. 同时, 以含有带3蛋白全长基因的质粒为模板扩增了 348 bp 的带3蛋白C端基因, 将其克隆到酵母双杂交 AD 端表达质粒. 经酵母双杂交营养缺陷培养选择和 β 半乳糖苷酶检测证实 GPA 与带3蛋白之间存在相互作用. GPA 表达产物分别经抗带3蛋白和抗 GPA 抗体进行蛋白质印迹分析, 表明二者具有免疫交叉反应. 上述结果表明带3蛋白与 GPA 在结构与功能上存在着密切联系.

关键词 血型糖蛋白A, 带3蛋白, 杆状病毒表达系统, 膜蛋白

学科分类号 Q735

带3蛋白 (band3, anion exchanger1, AE1) 和血型糖蛋白A (glycophorin A, GPA) 是存在于红细胞膜上的两种重要的膜蛋白质, 分别占红细胞膜蛋白质总量的 25% 左右^[1,2]. 二者的相互关系是近几年研究的热点^[3~5].

带3蛋白是存在于红细胞膜上的由 911 个氨基酸残基构成的内在性蛋白质, 目前已知每一单体跨膜 14 次, 在结构上带3蛋白可分为三个结构域: N 端胞质域、跨膜域和功能未知的酸性 C 端域. N 端胞质域伸向胞浆, 由氨基酸残基 1~ 403 组成, 有膜骨架蛋白、糖酵解酶、血红蛋白及其降解物的结合位点以及磷酸化的位点, 参与跨膜信息传递和其他细胞功能如细胞生长、分化、相互间识别等的调节, 跨膜域是 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 离子交换的活性场所, 酸性 C 端域由 32 个氨基酸残基组成, 其中含有大量携带负电荷的酸性氨基酸, 其在红细胞生理状态下的结构与功能尚未完全阐明^[6]. GPA 是由 131 个氨基酸残基组成、一次性跨膜的糖蛋白, 决定人类的 M 和 N 血型, 是最早被测序的膜蛋白质, 尽管近几年对其进行了广泛的研究, 但它在红细胞生理活动中所发挥的作用, 特别是与带3蛋白在结构与功能上的相互关系尚未阐明^[3~5].

本研究以对红细胞血影释放的肽链分析为线索, 推测带3蛋白与 GPA 相互作用的可能性及其作用部位, 构建了用于酵母双杂交系统的 AD 和 BD 端表达载体^[7~10], 研究了带3蛋白C端域与

GPA 的相互作用, 表达了 GPA 全长蛋白, 探讨了两种蛋白质的抗原相关性^[11~13].

1 材料和方法

1.1 材料

酵母双杂交试剂盒购自 CLOTECH 公司; 杆状病毒表达系统购自 Invitrogen 公司; 蛋白质印迹试剂盒购自 Promega 公司. T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 *Bam*HI、*Eco*RI、*Pst*I 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; Grace's 昆虫细胞培养基购自 Gibco BRL 公司; 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷酶 (X-gal) 购自宝生物工程 (大连) 有限公司.

1.2 方法

1.2.1 人类红细胞血影的制备: 全血由哈尔滨市红十字中心血站提供. 首先用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗红细胞 4 次, 重悬红细胞于含有 0.2 g/L 胰蛋白酶的 PBS 中, 在 37℃ 消化血型糖蛋白 1 h, 然后再用含有 2.5 mg/L PMSF 的 PBS 洗三次, 去除胰蛋白酶. 用 20 倍体积的 5 mmol/L NaHCO_3 溶解红细胞, 冰浴 5 min. 在 4℃ 以 24 000 g 离心 30 min, 并用同种溶液洗 4 次, 在含有 0.15 mol/L

* 国家自然科学基金 (39970291) 和教育部青年骨干教师基金资助课题.

** 通讯联系人.

Tel: 0451-6669470, E-mail: fuguhu@263.net

收稿日期: 2001-06-12, 接受日期: 2001-06-28

NaCl 的 5 mmol/L NaHCO₃ 溶液中加入 15 mg/L 胰蛋白酶, 在 4℃ 振荡消化血影 1 h (即红细胞血影在高盐溶液中进行胰蛋白酶消化), 胞浆侧带 3 蛋白 40 ku 结构域被消化. 加入 antipain (10 mg/L) 后, 在 4℃ 45 600 g 离心 20 min, 而后用相同的溶液洗血影膜. 在 4℃ 用 5 倍体积的 100 mmol/L NaOH 洗去周边蛋白. 碱处理后的血影膜用 5 mmol/L NaHCO₃ 洗 3 次, 然后在 5 mmol/L NaHCO₃ 溶液中重悬, 使蛋白质浓度为 1.5 g/L. 向其中加入 15 mg/L 的胰蛋白酶, 在 37℃ 消化过夜 (即红细胞血影在低盐溶液中进行胰蛋白酶消化), 然后在 4℃, 27 200 g 离心 30 min, 收集上清, 用逆相高效液相色谱 (HPLC) 进行多肽分析^[7,9,14].

1.2.2 高效液相色谱分析: 用含有 0.1% 三氟乙酸的 0% ~ 100% 乙腈溶液, 在装有逆相色谱柱 (cosmosil C-18, 4.6 mm × 250 mm) 的 HPLC 上进行上清中多肽的分析, 流速为 0.8 ml/min, 收集样品进行二次色谱分离纯化后用气相氨基酸测序仪 (gas-phase amino acid sequencer) 进行氨基酸测序.

1.2.3 GPA 的克隆: 参照 GenBank 数据库中检索到的序列设计引物, 从 K562 细胞中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 得到完整的长度为 410 bp 的 GPA 编码区. PCR 产物测序后, 进行纯化、补平, 并在 5' 端加入磷酸基团, 用于连接经过限制酶 *Sma* I 水解并去磷酸化的 pUC19 质粒上. 将经过阳性选择的重组质粒纯化、测序.

1.2.4 质粒构建: 根据已发表的血型糖蛋白 A 与带 3 蛋白 C 端 (AE1ct) 基因序列, 分别设计两对引物构建酵母双杂交表达质粒. 含带 3 基因的重组质粒 pRGB4 由加拿大阿尔伯塔大学生物化学研究室 Casey 教授惠赠. 参照 GenBank 数据库中检索到的序列设计 AE1 C 端引物并合成, 预计产物长度为 350 bp. 具体序列为: AE1ctP3: 5' ggggcggccgcctcagcgccatc 3'; AE1ctP4: 5' gtgtgagggcgaggagatctcc 3'. 以 AE1 全长 cDNA 为模板, 作 50 μl 的 PCR. PCR 产物经电泳后在紫外灯下观察片段大小. 上述 PCR 产物纯化后, 直接连接至 pMD18-T 载体上. 用 *Eco*R I 酶切 pMD18-T-AE1-C 端, 获得约 350 bp 产物, 经电泳纯化后, 加入经相同酶切的 pGADT₇, 14℃ 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5α. 在含氨苄青霉素平板上筛选阳性重组子 pGADT₇-AE1cdb3, 然后小量提取质粒, *Eco*R I 酶切、*Bal* II 酶切鉴定. 将经过阳性选择的

重组质粒纯化、测序^[5]. 分别用 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切 pUC19-GPA, 得 410 bp 产物电泳纯化后, 加入经相同双酶切的 pGBKT₇, 14℃ 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5α. 在含氨苄青霉素平板上筛选阳性重组子 pGBKT₇-GPA, 然后小量提取质粒, 酶切、PCR 鉴定.

杆状病毒转移载体的构建: 血型糖蛋白 A 基因上游引物为 P5: 5'-tagagattagatgtcagcatcaagtac-3', 下游引物为 P6: 5'-gttgaatagaaaatctgcagacaagtgtc-3'. 以血型糖蛋白 A 反转录产物为模板进行 PCR. PCR 产物经电泳后在紫外灯下观察片段大小. 上述 PCR 产物纯化后, 直接连接至 pMD18-T 载体上. 将经过阳性选择的重组质粒纯化、鉴定、测序. 纯化的杆状病毒转移载体 pBlueBacHisB 用 *Bam*H I 酶切, 纯化, 去磷酸化后的载体溶于 Tris-EDTA 溶液中, 20℃ 保存备用. 将已测序的阳性质粒用 *Bam*H I 酶切后, 血型糖蛋白 A 与转移载体在 T4 DNA 连接酶催化的条件下进行连接反应, 得阳性重组子并命名为 pFASTBac-GPA, 提取质粒后进行酶切、PCR 鉴定和测序. 序列分析由宝生物工程 (大连) 有限公司完成.

1.2.5 酵母表达质粒的转化和 β 半乳糖苷酶活性的检测: 按 Clontech 手册进行. 挑取 AH109 单菌落接种于 1 ml 培养液中, 将过夜培养基转移至 300 ml 锥形瓶中, 230 r/min 振荡 3 h. 离心后弃上清, 用无菌 TE 重悬细胞. 离心后弃上清, 再加入 1.5 ml 的无菌 1 × TE-1 × LiAc、0.1 μg pGADT₇-AE1ct、0.1 μg pGBKT₇-GPA 和 0.1 ml Herring Testes Carrier DNA 混匀. 将 0.1 ml 酵母感受态细胞 AH109 加至管内, 振荡. 再加入 0.6 ml 无菌 PEG/LiAc 溶液, 振荡 30 min 后加 70 μl 二甲基亚砜 (DMSO), 42℃ 水浴 15 min, 冰浴 1~2 min. 室温 14 000 g 离心 5 s, 弃上清. 用 0.5 ml 无菌水重悬细胞. 每 100 μl 铺 *leu*+/trp+/his-SD 营养缺陷性平板, 然后测 β 半乳糖苷酶活性. 在另一个实验中, 每 100 μl 铺 *leu*+/trp+/his-SD 营养缺陷性平板和 *leu*+/trp+/his-/ade-SD 营养缺陷性平板, 再测 β 半乳糖苷酶活性. 30℃ 培养 2~4 d 直至出现克隆. β 半乳糖苷酶活性检测: 在三缺或四缺平板上长出的菌落, 印记在滤纸上, 浸于液氮中 10~30 s, 取出, 放置至恢复室温, 放与浸泡有 2 ml Z 缓冲液/X-gal 溶液的滤纸上, 30℃ 温育, 至菌斑出现蓝色, 既为阳性, 无颜色变化为阴性.

1.2.6 Sf9 细胞的培养和重组病毒 pFASTBac

GPA 转染 Sf9: Sf9 细胞在 Grace's 昆虫细胞培养液中培养, 含有 3.3 g/L 酵母提取物、3.3 g/L 水解乳白蛋白、0.35 g/L 碳酸氢钠、5%~10% 胎牛血清的 TNM-FH, 在 28℃ 培养. 按照 Bac-to-BacTM expressing system 试剂盒使用说明书进行重组病毒 pFASTBac-AE1 的纯化后, 在脂质体介导下, 转染 Sf9 昆虫细胞, 数天后收取病毒上清后, 具体步骤按试剂盒使用手册进行.

1.2.7 重组蛋白的蛋白质印迹检测: 重组病毒按 10 倍感染复数 (m. o. i. $\approx$ 10) 感染 Sf9 细胞, 在培养 3 d 出现病变并收获细胞. 表达的蛋白用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和蛋白质印迹进行检测. 弃去培养基, PBS 洗 1 次. 将细胞悬浮于 PBS 液中, 冰浴超声裂菌, 加入 SDS 上样缓冲液后用于 SDS-PAGE. 电泳条件为: 恒压 200 V, 时间 2~2.5 h. 菌体超声后上清经 12% SDS-PAGE 后, 转移到硝酸纤维素膜上, 用含 10% BSA 的 TBST 封闭 30 min 后, 用 TBST (含 0.02% Tween-20) 洗膜 3 次, 每次 10 min. 一抗为抗人类带 3 蛋白的抗体, 二抗为辣根过氧化物酶标记抗鼠的 IgG-AP. 分别加入一抗和二抗反应, 然后用底物溶液显色 15 min, 待蛋白质颜色变紫, 用去离子水终止显色.

2 结 果

2.1 高效液相色谱分析

红细胞膜血影经胰蛋白酶过夜消化, 离心后上清进行逆相高效液相色谱 (HPLC) 分析. 分析图谱如图 1 所示, 回收 8 个主要波峰样品, 再次分别进行 HPLC 纯化, 然后测序, 结果表明, 除 GPALys101~Asp130 一条肽链外, 其他均为带 3 蛋白跨膜域的亲水部分 (loop 和 C 端尾部), 结合本研究室及国外的其他研究结果, 我们推测在 GPA 和带 3 蛋白 C 端之间存在相互作用的可能性. 氨基酸测序结果如图 1 所示.

2.2 酵母双杂交系统分析 AE1 C 端与 GPA 的相互作用

从目前的研究结果及结构上分析, 带 3 蛋白 C 端域尾部 Ala893~Val911 19 个氨基酸残基与 GPALys101~Asp130 存在着相互作用的可能性, 我们试比较一下二者的一级结构: Band3 Ala893~

Val911: ATFD EEEGRDEYDEVAMPV; GPA Lys101~Asp130: (YGIRRLTK) KSPDV KPLPSPD TDVPL \ SSVEIENPETS DQ. 带 3 蛋白 C 端含有大量的带负电荷的酸性氨基酸, 而 GPA 的 C 端有比较多的碱性氨基酸, 在结构上有相互作用的条件, 为验证这一推测, 我们构建了用于研究蛋白质相互作用的酵母双杂交 AD 和 BD 端表达载体, 全长 131 个氨基酸的 GPA 编码链被整合到 GAL4 的结合域 BD 端中, 而编码带 3 蛋白 C 端的 116 个氨基酸结构域的编码链被整合到 GAL4 的激活域 AD 端中, 然后共转染酵母菌, 观察相互作用的结果, 考虑到双杂交系统要求的条件, 本实验以可能相互作用的位点为基础适当延长了表达载体的长度, 即 GPA 全长基因 (见表达序列) 和带 3 蛋白 C 端 348 bp 基因.

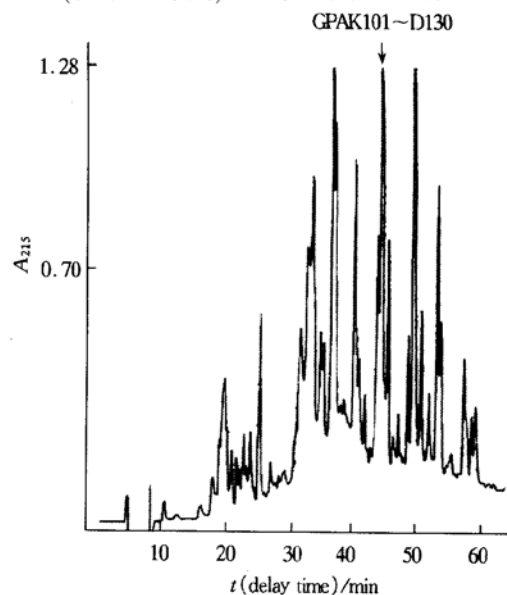


Fig. 1 HPLC analysis of membrane peptides released into the supernatant following trypsin treatment

First, white ghosts were treated by trypsin from which the cytoplasmic domain of band3 had removed. Following alkali-treatment, the membranes were redigested with trypsin (1.5 g/L). Peptides released into the supernatant were collected and analyzed with a reversed-phase column (Cosmosil C-18, 4.6 mm $\times$ 250 mm) using a linear gradient of 0%~100% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid. GPA Lys101~Asp130 is shown. The amino acid sequences of GPA and band3 C-terminus were showed as the following. GPA: 101KSPSDVKPLPSPD TDVPLSSVEIENPETS D130; Band3 C-terminus: 879NVELQCLDADD-AKATFDEEEGRDEYDEVAMPV 911.

AD 端 pGADT7-AE1cdb3 基因及其编码的氨基酸序列:

```

ctc agc ggc atc cag ctc ttt gac cgc atc ttg ctt ctg ttc aag cca ccc aag tat cac
L S G I Q L F D R I L L L F K P P K Y H
cca gat gtg ccc tac gtc aag cgg gtg aag acc tgg cgc atg cac tta ttc acg ggc
P D V P Y V K R V K T W R M H L F T G
Atc cag atc atc tgc ctg gca gtg ctg tgg gtg gtg aag tcc acg ccg gcc tcc ctg
I Q I I C L A V L W V V K S T P A S L
gcc ctg ccc ttc gtc ctc atc ctc act gtg ccg ctg cgg cgc gtc ctg ctg ccg ctc atc
A L P F V L I L T V P L R R V L L P L I
ttc agg aac gtg gag ctt cag tgt ctg gat gct gat gat gcc aag gca acc ttt gat
F R N V E L Q C L D A D D A K A T F D
gag gag gaa ggt cgg gat gaa tac gac gaa gtg gcc atg cct gtg tga ggg gcg
E E E G R D E Y D E V A M P V S G A

```

构建的两个酵母质粒 pGBKT₇GPA 和 pGADT₇AE1ct 共同转化酿酒酵母 AH109, AH109 在 GAL4 激活域的上游包含有 His、Ade 和 lacZ 三个报告基因, 分别在不同的启动子之下, 激活三个报告基因能够大大减少了假阳性的出现. 本实验利用该系统表达了 lacZ、His3 和 Ade 三个报告基因, 结果可靠. 只有 AE1 C 端与 GPA 有相互作用, GAL4 蛋白的 DNA 结合域和 DNA 激活域才能相互靠近, 激活报告基因的转录. 在 *leu*/*trp*/*his*-SD 营养缺陷培养基生长后测 β 半乳糖苷酶活性, 实验结果见图2: 空质粒载体 pGBKT₇-GPA 转化酵母

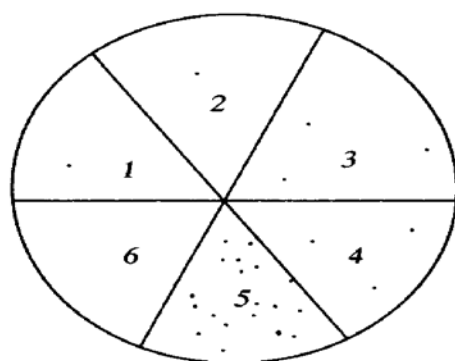


Fig 2 Yeast two hybrid assay of the GPA and AE1 C terminal domain

AH109 cells were transformed with pGBKT₇GPA and pGADT₇AE1ct, and the β -galactosidase activity was measured. The dots indicated the blue colonies after the β -galactosidase activity was measured. Cells were transformed with the following plasmids: 1: pGBKT₇GPA only; 2: pGADT₇AE1ct only; 3: pGBKT₇GPA + pGADT₇; 4: pGADT₇AE1ct + pGBKT₇; 5: pGADT₇AE1ct + pGBKT₇GPA; 6: pLAM5' (hybrid of the GAL4 DNA-binding domain and unrelated protein, laminin).

菌 (1 区); 空质粒载体 pGADT₇-AE1ct 转化酵母菌 (2 区); 一个空质粒载体和一个重组质粒载体 (3 区和 4 区); 两个质粒均为重组质粒载体 (5 区); 阴性对照 (6 区). 只有 AE1 C 端与 GPA 两种蛋白均得到表达, β 半乳糖苷酶报告基因才能激

活 (图2, 5 区). 在另一个实验中, 转化后在不同条件下生长的菌落数也有所不同, 在四缺板上, 菌落生长缓慢且菌落数略少于三缺平板. 经 β 半乳糖苷酶检测, 部分菌落变成蓝色 (图3). 这些结果表明: AE1ct 与 GPA 在酵母体内激活了 GAL4 上游的三个报告基因, 证实 AE1ct 与 GPA 有直接的相互作用.

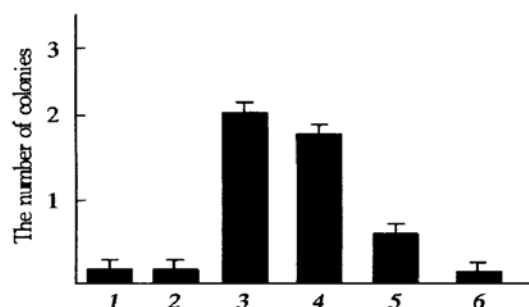


Fig 3 Yeast two hybrid assay of the GPA and AE1 C terminal domain with the different reporters activated

The columns showed the number of positive colonies of the five average colonies. 1: GPA and pGADT₇ plasmid transformed AH109 on the *leu*/*trp* plates; 2: AE1 C-terminal domain and pGBKT₇ transformed AH109 on *leu*/*trp* plates; 3: GPA and AE1 C-terminal domain transformed AH109 on *leu*/*trp*/*his* plates; 4: GPA and AE1 C-terminal domain transformed AH109 on *leu*/*trp*/*his*/*ade* plates; 5: GPA and AE1 C-terminal domain transformed AH109 on *leu*/*trp*/*his*/*ade*/*LacZ* plates; 6: pLAM5' (negative control).

2.3 载体 pFASTBac-GPA 的构建和重组病毒转染 Sf9 细胞

扩增出的 PCR 产物和 pMD18T 相连接, *Bam*HI 鉴定重组质粒 pMD18T-GPA 后, 限制性内切酶酶切鉴定方向, 正向者可以切下 400 bp 的片段. 重组质粒 pMD18T-GPA 用限制性内切酶 *Bam*HI 切下 GPA 基因片段与相同酶切的杆状病毒载体 pFASTBac 进行连接, 转化. 在含有 X-gal 的平板上筛选到蓝色的阳性重组菌落, 随机挑取蓝色菌落培养, 获取重组质粒 pFASTBac-GPA 并由 PCR 扩增鉴定. 以合成引物及根据 GPA 序列合成

引物对重组子 pFASTBac-GPA 进行测序, 结果如图 4 所示, 除第 91 位异亮氨酸被丙氨酸取代外, 其余氨基酸与公布的 GPA 的氨基酸序列一致. 重组病毒阅读框正确, 可用于下一步转染实验. 杆状病毒转移载体 pFASTBac-AE1 在脂质体介导下转

染昆虫细胞 Sf9 细胞单层. 转染后 3 d 在普通光学显微镜下可观察到转染细胞由于重组病毒感染所引起的生长停止, 细胞体积增大. 细胞中出现颗粒样物质, 细胞轮廓粗糙.

```

5' taaaaaaacctataaatattccggattattcataccgtccaccatcgggcgcgatcctctagagattagatgtcagca tca
S
agt acc act ggt gtg gca atg cac act tca acc tct tct tca gtc aca aag agt tac atc tca tca
S T T G V A M H T S T S S S V T K S Y I S S
cag aca aat gat acg cac aaa cgg gac aca tat gca gcc act cct aga gct cat gaa gtt tca gaa att
Q T N D T H K R D T Y A A T P R A H E V S E I
tct gtt aga act gtt tac cct cca gaa gag gaa acc gga gaa agg gta caa ctt gcc cat cat ttc tca gaa cca
S V R T V Y P P E E E T G E R V Q L A H H F S E P
gag ata aca ctc att att ttt ggg gtg atg gct ggt gtt att gga acg atc ctc tta gtt tct tac ggt att cgc
E I T L I I F G V M A G V I G T I L L V S Y G I R
cga ctg ata aag aaa agc cca tct gat gta aaa cct ctc ccc tca cct gac aca gac gtg cct tta agt tct gtt
R L I K K S P S D V R P L P S P D T D V P L S S V
gaa ata gaa aat ctgcagacaagtgtcaatcgctcgacctgcaggcatgcaagcttgtcgagaagtactagaggatca
E I E N
taatcagccataccacattgtagagggtttacttcttataaaaaacctccacacctccccctgaacctgaacataa3'

```

Fig. 4 DNA and inferred protein sequence of pFASTBac-GPA

2.4 重组蛋白的 SDS PAGE 和蛋白质印迹鉴定结果

重组杆状病毒感染 Sf9 细胞 3 d 后, 收获细胞. 超声波破碎后, SDS-PAGE 和蛋白质印迹鉴定其生物活性. SDS-PAGE 分析表明重组杆状病毒表达的 GPA 蛋白质分子质量约为 18 ku 左右

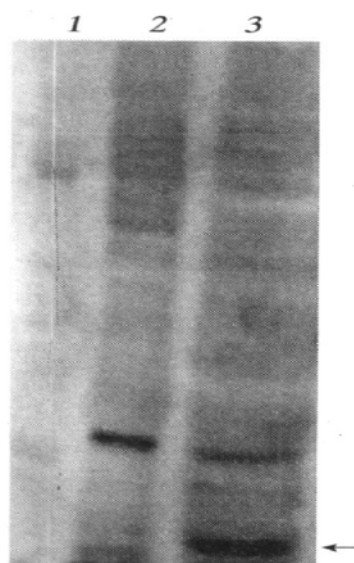


Fig. 5 Western blot of GPA after 12% SDS PAGE with the monoclonal anti-AE1 antibody

1: marker; 2: the normal Sf9 cell (negative control); 3: GPA (about 18 ku).

(图 5), Sf9 细胞作为阴性对照. 因为 AE1 和 GPA 共同参与了 W_r^b 的形成, AE1 和 GPA 可能存在交叉反应. 为了检测是否存在交叉反应, 用 AE1 单克隆抗体进行 GPA 的蛋白质印迹的检测, 结果表明在 18 ku 左右有一条明显的条带 (图 5), 证明 GPA 与 AE1 有相同的抗原决定簇, 可能在红细胞的膜蛋白生发过程中二者有某种密切联系.

3 讨 论

近年来, 许多研究结果表明带 3 蛋白和 GPA 之间在功能上存在密切联系: a. GPA 的突变体和 GPA 的缺陷型能够影响带 3 蛋白的糖苷化, 此结果表明, GPA 直接或间接地调节体内带 3 蛋白的翻译后修饰; b. 抗-GPA 的抗体可以减少带 3 蛋白自由流动性; c. 在爪蛙属卵母细胞上, GPA 可以使带 3 蛋白易于表达, 并能加强其阴离子交换功能; d. 免疫学研究也证实 GPA 与带 3 蛋白有紧密的相互作用, 带 3 蛋白的单克隆抗体可以从红细胞膜上沉淀出 GPA. 而且, 代表带 3 蛋白选择多态性的相关抗原 W_r^a 和 W_r^b 的需要带 3 蛋白与 GPA 的共表达^[12, 13]. 上述研究结果都表明带 3 蛋白和 GPA 在红细胞膜上的密切关系.

但是, 目前所有关于二者相互关系的报道均未发现结构上的直接证据, 而仅停留于现象的观察. 本研究在对红细胞血影释放肽链进行分析后发现带3蛋白 Asp893~ Val911 与 GPALsy101~ Asp130 有关, 同时发现二者分别是一种新活性蛋白酶的特异激活物和特异底物 (关于新活性蛋白酶已做报道), 从而找到了研究二者相互作用位点的突破口. 根据

现有的直接实验证据, 带3蛋白C端的116个氨基酸残基与GPA存在着相互作用, 这是国内外首次报告两种蛋白质相互作用的直接证据, 结合其他结果, 这种相互作用应该在C端的16个氨基酸范围内, 并设想在带3蛋白C端可能存在下面的结构形式:

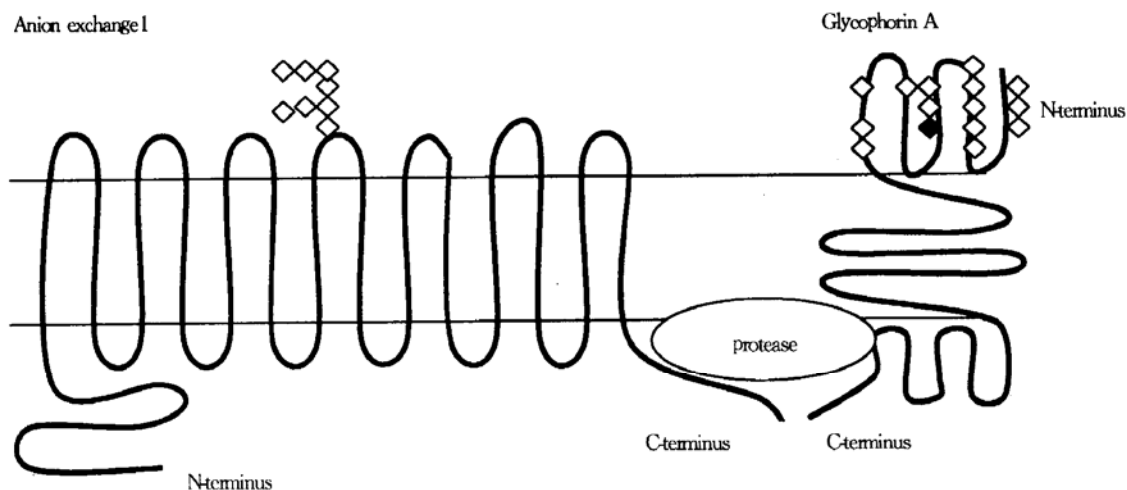


Fig. 6 The structural relation between the anion exchanger1, glycoporin A and the novel protease

The right part is the anion exchanger1; The middle is novel protease; The left is glycoporin A; ◇: O-linked glycosidic bond; ◆: N-linked glycosidic bond.

参 考 文 献

- Casey J R, Ding Y, Kopito R R, *et al.* The role of cysteine residues in the erythrocyte plasma membrane anion exchange protein, AE1. *J Biol Chem*, 1995, **270** (15): 8521~ 8527
- Chasis J A, Mohandas N. Erythrocyte glycoporins. *Blood*, 1992, **80** (8): 1869~ 1879
- Hassoun H, Hanada T, Lutchman M, *et al.* Complete deficiency of glycoporin A in red blood cells from mice with targeted inactivation of the band 3 (AE1) gene. *Blood*, 1998, **91** (6): 2146~ 2156
- McPherson R A, Sawyer W H, Tilley L. Rotation diffusion of the erythrocyte integral membrane protein band3. Effect of hemichrom binding. *Biochemistry*, 1992, **31**: 512~ 521
- Groves J D, Michael J A. Glycophorin A facilitates the expression of human band3-mediated anion transport in *Xenopus* oocytes. *J Bio Chem*, 1992, **267**: 22163~ 22170
- Okubo K, Kang D, Hamasaki N, *et al.* Red blood cell band3. *J Bio Chem*, 1994, **269**: 1918~ 1926
- 傅国辉, 姜晓姝, 王孝铭, 等. 红细胞带3蛋白C1肽链的纯化及其功能的初步研究. *中国病理生理杂志*, 1999, **15** (3): 271~ 274
- Fu G H, Jiang X S, Wang X M, *et al.* *Chinese Journal of Pathophysiology*, 1999, **15** (3): 271~ 274
- 傅国辉, 姜晓姝, 王孝铭, 等. 人类红细胞膜阴离子交换蛋白C-末端特性的研究. *哈尔滨医科大学学报*, 1998, **32**: 8~ 11
- Fu G H, Jiang X S, Wang X M, *et al.* *Journal of Harbin Medical University*, 1998, **32**: 8~ 11
- 傅国辉, 姜晓姝, 滨崎直孝, 等. 氢氧化钠对红细胞带3蛋白的研究. *生物医学工程杂志*, 1999, **16** (4): 435~ 437
- Fu G H, Jiang X S, Hamasaki N, *et al.* *J Biomedical Engineering*, 1999, **16** (4): 435~ 437
- 李宏涛, 傅国辉, 秦 勇, 等. 酵母双杂交系统BD端血型糖蛋白A表达质粒的构建. *中国病理生理杂志*, 2002, **1** (18): 64~ 67
- Li H T, Fu G H, Qin Y, *et al.* *Chinese Journal of pathophysiology*, 2002, **1** (18): 64~ 67
- 李宏涛, 傅国辉, 杜洪清, 等. 表达血型糖蛋白A和带3蛋白膜段基因的杆状病毒转移载体的构建. *中国病理生理杂志*, 2001, **11** (8): 364~ 368
- Li H T, Fu G H, Du H Q, *et al.* *Chinese Journal of pathophysiology*, 2001, **11** (8): 364~ 368
- Wainwright S D, Tanner M J, Martin G E, *et al.* Monoclonal antibodies of the membrane domain of the human erythrocyte anion transport protein. Localization of the C-terminus of the protein to the cytoplasmic side of the red membrane and distribution of the protein in some tissues. *Biochem J*, 1989, **258**: 211~ 220
- Telen M J, Chasis J A. Relationship of the human erythrocyte W^b_r antigen to an interaction between glycoporin A and band3. *Blood*, 1990, **76**: 842~ 848
- Kang D, Okubo K, Hamasaki N, *et al.* A structure study of the membrane domain of band3 by tryptic digestion. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 19211~ 19217

The Study on The Interaction Between Band3 C-Terminus and Glycophorin A and Their Immunologic Cross-link Relation^{*}

DU Hong-Qing¹⁾, FU Guo-Hui^{1)**}, JIANG Xiao-Shu¹⁾, LONG Xiao-Yu¹⁾,
ZHANG Zhen-Yu¹⁾, YANG Bao-Feng²⁾, KONG Xian-Gang³⁾

(¹⁾ *Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;*

(²⁾ *Department of Pharmacology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China;*

(³⁾ *Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Harbin 150000, China)*

Abstract The correlation of glycophorin A and band3 was confirmed by purification and identification of hydrophilic peptides of red blood cell transmembrane domain with high performance liquid chromatography (HPLC). Glycophorin A gene (410 bp) was amplified from K562 with RT-PCR and subcloned into the yeast BD hybrid vector pGBKT7 and baculovirus transfer vector pFASTBac. Glycophorin A and band3 C-terminus were co-transformed into the yeast strain AH109 and the interaction was identified by nutritional selection and β -glucosidase activity detection. The GPA expression product in Sf9 cells was analyzed on Western blot with anti-GPA and anti-human band3 antibodies, and the result showed that they have immunologic cross-link reaction. All the results above confirmed the interaction between band3 and glycophorin A.

Key words glycophorin A, band3, baculovirus expression system, membrane protein

^{*} Projects supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant 39970291), Young Teacher Financial Project of Education Ministry.

^{**} Corresponding author. Tel: 86-451-6669470, E-mail: fuguhu@263.net

Received: June 12, 2001 Accepted: June 28, 2001