

猪鼻支原体 P37 蛋白相互作用蛋白的筛选与鉴定*

孙玉宁** 靳更林** 张建芝 吴 健 寿成超***

(北京大学临床肿瘤学院, 北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034)

摘要 既往工作表明, 胃癌组织中有较高的猪鼻支原体感染率, 猪鼻支原体的主要膜蛋白 P37 能够诱导外周血单核细胞释放肿瘤坏死因子 (TNF)。为了深入研究 P37 的作用机制, 利用酵母双杂交系统筛选与 P37 蛋白相互作用的蛋白质分子。首先, 将编码 P37 全长的 cDNA 克隆到 pGBKT7 载体中, 构建“诱饵”表达载体 pGBKT7-p37, 以此筛选人胎盘组织 cDNA 表达文库。在 2.6×10^6 个克隆中, 筛选到一株能与 P37 相互作用的阳性克隆, 序列测定表明, 该阳性克隆编码人视网膜色素上皮细胞蛋白 (Norpeg 蛋白)。在此基础上经 GST-Pull Down 实验, 进一步证实 Norpeg 蛋白确能与 P37 相互作用, 为进一步研究 P37 对细胞的作用机制奠定了基础。

关键词 猪鼻支原体, 酵母双杂交, P37, Norpeg

学科分类号 Q71

PD4 是北京市肿瘤防治研究所胃癌细胞系 MGC-803 为免疫原获得的一株鼠源单克隆抗体^[1], PD4 能够诱导 MGC-803 的凋亡及抑制 ras 转染的 Rat3-3 和 GCM 3T3 细胞在裸鼠中的致瘤性^[2]。对 PD4 的相应抗原进行分子鉴定发现, 该抗原为猪鼻支原体的 P37 蛋白^[3]。近来我们利用 PD4 单抗通过免疫组化检测发现, 胃癌、结肠癌、食道癌、肺癌、乳腺癌等组织中均有较高的支原体感染率, 在新鲜胃癌组织中, 通过分离培养进一步证实了这一结果。P37 蛋白是猪鼻支原体的主要抗原物质, 能够促进肿瘤细胞的浸润、转移^[4], 并能够诱导外周血单核细胞释放肿瘤坏死因子^[5], 提示 P37 蛋白与肿瘤细胞的发生、浸润转移存在着某种相关性。为了进一步阐明 P37 蛋白在胃癌发生、发展中的作用机制, 本研究以 P37 为诱饵蛋白, 通过酵母双杂交体系, 筛选人胎盘组织 cDNA 表达文库, 希望得到与 P37 蛋白相互作用的蛋白质, 为进一步研究其相关的分子机制提供了线索。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、原核表达质粒 (pGEX4T-1, pGEX4T-1-p37, pQE40-p37)、P37 蛋白、PD4 单克隆抗体及酶标二抗 (羊抗鼠-HRP) 均由我室保存。酵母 (*S. cerevisiae*) AH109、穿梭质粒 (pGBKT7, pTD1-1, pVA3-1, pCLI 和 pLAM5'-1), 以 pACT2 为载体的人胚胎组织 cDNA 表达文库为 Clontech 公司产品。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 New England Biolabs

公司。三氨基三唑 (3-amino-1,2,4-triazole, 3-AT) 和各种氨基酸购自 Sigma 公司。DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司。GST 抗体及 PD4 抗体由本室制备, GST 珠子购自 Pharmacia 公司。DNA 合成及序列测定由上海生物工程公司完成。

1.2 载体的构建

1.2.1 诱饵表达载体的构建: 将 pGEX4T-1-p37 和酵母质粒 pGBKT7 分别用 *Bam*H I 和 *Xma* I 酶切消化, Klenow 大片段补平末端, 再经 *Sal* I 酶切, 琼脂糖凝胶电泳并回收得到 p37 片段和 pGBKT7 酶切载体, 将二者用 DNA 连接酶连接, 构建诱饵表达载体 pGBKT7-p37。

1.2.2 Norpeg 原核表达载体的构建: 将经筛库获得的阳性克隆 pACT2-Norpeg 和 GST 表达质粒 GEX4T-1 分别用 *Sma* I 和 *Xho* I 双酶切, DNA 试剂盒回收 Norpeg 片段和 pGEX4T-1 载体, 二者用连接酶连接, 获得与 GST 融合的 Norpeg 原核表达载体 pGEX4T-1-Norpeg。

1.3 P37 互作蛋白的筛选

1.3.1 筛选前的准备: 复苏 AH109、Y187 酵母细胞, 涂布到相应的酵母培养平板上, 30℃ 培养 3 ~ 5 天, 验证其表型。将构建的“诱饵”载体 pGEX4T-1-p37 按 Clontech 公司产品说明, 小量

* 国家自然科学基金 (30130190), 北京市自然科学基金 (7012007) 和北京大学肿瘤学重点学科资助项目。

** 对本工作做出同样贡献。

*** 通讯联系人。

Tel: 010-66160960, E-mail: cshou@vip.sina.com

收稿日期: 2004-04-26, 接受日期: 2004-05-30

LiCl 转染 AH109 酵母细胞, 涂布相应的酵母培养平板, 观察 P37 的表达对 AH109 生长的影响, 并排除 pGEX4T-1-p37 的自主激活活性. 同时收集转染了 pGEX4T-1-p37 的酵母细胞, SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 转至硝酸纤维素膜上, 以抗 PD4 单克隆抗体为一抗, 通过蛋白质印迹 (Western blot) 检测 P37 是否在 AH109 中表达.

1.3.2 互作蛋白的筛选: 以转染 pGEX4T-1-p37 的酵母细胞制备感受态, 大剂量 LiCl 转染胚胎 cDNA 表达文库质粒 DNA, 转染产物涂布于 SD/-Trp/-Leu/-Ade/培养平板 (150 mm), 按照浓度梯度涂布 3 个 SD/-Trp/-Leu 培养平板, 检测转染效率. 同时作相应的阴阳性对照. 30℃ 培养 6 天后, 挑取长出的克隆菌落于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/ + 3-AT 培养平板, 30℃ 继续培养 6 天后转膜, 作好标记, 进行 β -半乳糖苷酶活性分析.

根据 β -半乳糖苷酶活性分析结果, 挑取与蓝斑对应的酵母菌落, 编号后重新于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/ + 3-AT 液体培养基中, 30℃ 振荡培养 36 ~ 48 h, 收集酵母细胞, 部分保存于 -70℃, 部分用于酵母质粒的提取.

以提取的酵母质粒为模板, 文库插入片段两侧的特异序列为引物 (正义链 5' TACCACTACAATGGATG 3', 反义链 5' GAACTTGCGGGGTTTTTC 3'), PCR 扩增文库的插入片段, 扩增产物经 *Msp* I 酶切, 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分析, 对 His⁺、LacZ⁺、Ade⁺ 克隆质粒进行分类. 每类质粒选取一株转化大肠杆菌 DH5 α , 提取和纯化质粒.

1.3.3 酵母体系对阳性克隆的验证: 用提取的文库单克隆阳性质粒, 分别转染单纯酵母 AH109 细胞及转染有 pGBKT7 或 pLAMB5-1 或 pGBKT7-p37 的酵母 AH109 细胞, 涂布相应的条件培养平板, 30℃ 培养. 根据培养表型去除假阳性克隆.

1.4 P37 互作蛋白的进一步验证

将构建的 pGEX4T-1-Norpeg, 转化感受态 DH5 α , 涂布 Amp^RLB 平板, 37℃ 培养过夜, 挑取克隆, Amp^RLB 液态培养基 37℃ 培养过夜, 1:20 稀释后继续培养 2 ~ 4 h, 加 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 继续在 37℃ 诱导培养 3 h, 纯化的融合蛋白 GST-Norpeg 经变性复性处理. GST 珠子与变复性处理的融合蛋白 GST-Norpeg 室温孵 2 h, 4℃, 12 000 g 离心 1 min, 去上清, 再与经 IPTG 诱导的 pQE40-p37 细菌裂解液上清 4℃ 孵育过夜. 次日, 4℃, 12 000 g 离心 1 min, 去上清, PBS 洗涤

5 次后, 沉淀中加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, PD4 单抗为一抗, 蛋白质印迹检测 P37 是否存在. 同时用 GST 蛋白替换 GST-Norpeg 作阴性对照.

2 结 果

2.1 诱饵表达载体 pGBKT7-p37 的构建

P37 蛋白基因是我室以猪鼻支原体 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增, 将扩增产物经过 7 处定点突变 (TGA→TGG, TGA 在猪鼻支原体中编码色氨酸, 而在原核细胞中代表终止密码子, 故将 TGA 突变 TGG, 仍代表色氨酸) 而得到的 1 212 bp 的 DNA 片段^[6]. 将该片段经 pGEX4T-1-p37 重组到 pGBKT7 中, 酶切鉴定及测序分析表明, P37 的插入方向及阅读框架均无误 (酶切鉴定及测序图谱略). 为了确证构建的 pGBKT7-p37 能在酵母中得到正确表达, 我们将 pGBKT7-p37 转染酵母菌 AH109, pGBKT7 转染 AH109 及空 AH109 作对照, 用 PD4 抗体作蛋白质印迹分析, 结果检测到了约 55 ku 的 P37 与 DNA 结合结构域的融合表达带, 证明 P37 能在酵母中得到表达 (图 1).

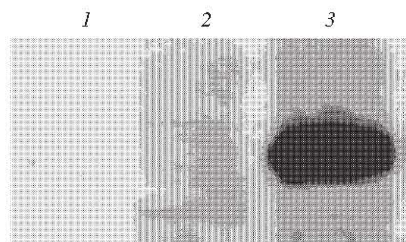


Fig. 1 Western blot analysis of Gal4 DBD-P37 expression in AH109 with antibody PD4

1: AH109; 2: AH109-pGBKT7; 3: AH109-pGBKT7-p37.

2.2 P37 的表达对酵母细胞的毒性及自身转录激活活性的检测

用 pGBKT7-p37 转染酵母 AH109 后, 克隆菌落的大小、颜色均正常, 表明 P37 的表达对酵母细胞没有明显的毒性. 将克隆菌落涂布 SD/-Trp 和 SD/-Trp/-Ade 培养平板, 30℃ 培养 5 天, SD/-Trp/-His/-Ade 平板上未见克隆长出, 并且 SD/-Trp 中长出的菌落经 β -半乳糖苷酶活性分析, 在 8 h 内未见颜色变化. 这些结果表明: pGBKT7-p37 本身不具备自身转录激活活性, 可用于酵母双杂交的筛选. 同时由于酵母细胞 His 的泄露表达, 将转化子分别涂布在 SD/-Trp/ + 3-AT (1 mmol/L)、

SD/-Trp/+ 3-AT (3 mmol/L)、SD/-Trp/+ 3-AT (5 mmol/L)、SD/-Trp/+ 3-AT (7 mmol/L)、SD/-Trp/+ 3-AT (9 mmol/L) 的培养平板上, 30℃ 培养 5 天, 发现当 3-AT 浓度在 5 mmol/L 时就可以有效地抑制 His 的泄露表达, 选取这一浓度作为文库筛选时的使用浓度.

2.3 人胎盘 cDNA 文库的筛选和阳性克隆的初步鉴定

以含 pGBKT7-p37 的酵母 AH109 制备感受态, 按照 Clontech 公司酵母双杂交 (Yeast two-hybrid) 系统说明书进行文库规模转化, 转化物涂布于 SD/-Trp/-Leu/-Ade 选择平板. 30℃ 培养 6 天后, 在 2.6×10^6 转化子中共得到 42 个克隆. 将这些克隆进一步划线于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+ 3-AT

(5 mmol/L) 平皿, 当克隆菌落直径约为 2 mm 时进行 β-半乳糖苷酶滤膜分析, 最终得到 8 个能在上述四缺平板上生长, 且 β-半乳糖苷酶滤膜分析为阳性的克隆. 提取阳性克隆的文库质粒 DNA, PCR 扩增插入片段, 扩增产物用 *Msp* I 酶切分类. 结果 7 个克隆为同一种克隆 (扩增片段 820 bp); 另一克隆为不同克隆 (扩增片段 2 800 bp) (图 2). 将 2 个文库质粒转染相应的酵母细胞在酵母水平进行假阳性排除, 结果扩增片段为 2 800 bp 的片段自身具有 β-半乳糖苷酶活性, 为假阳性克隆, 予以排除. 而扩增片段为 820 bp 的克隆为阳性克隆 (表 1), DNA 序列测定及 BLAST 分析发现, 该克隆编码 Norpeg 蛋白.

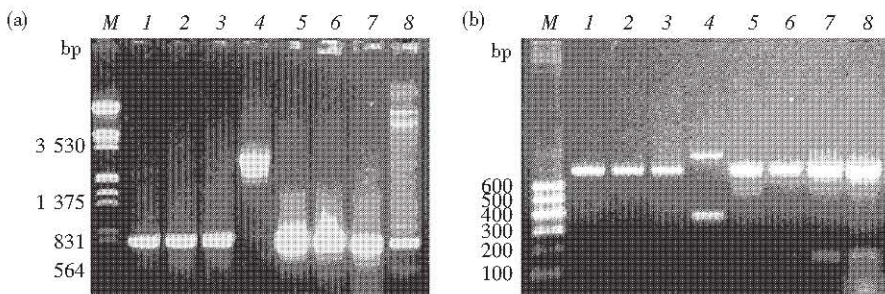


Fig. 2 PCR amplification of oposite clone inserts (a) and restriction map of the amplified inserts digested with *Msp* I (b)
M: DNA marker; 1~8: Different clones.

Table 1 Candidates indentification in AH109

	AH109	AH109 (pGBKT7)	AH109 (pLAM5'-1)	AH109 (pGBKT7-p37)
pACT2-Norpeg	-	-	-	+
pACT2-cDNA (2 800 bp)	+			

2.4 Norpeg 与 P37 相互作用的进一步验证

将构建的 pGEX4T-1-Norpeg 转化大肠杆菌, 经 0.5 mmol/L IPTG 诱导, 我们获得了大量表达的 GST-Norpeg 融合蛋白 (图 3), 融合蛋白以包涵体形式存在, 经变性复性处理后与 GST 珠子室温孵育 2 h, 离心, 洗涤后与 P37 蛋白孵育过夜, 次日, 4℃, 12 000 g 离心 1 min, 去上清, PBS 洗涤 5 次后, 沉淀中加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液, 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, PD4 单抗为一抗, 免疫印迹检测 P37 是否与 Norpeg 相互作用. 实验结果表明: GST 珠子通过 GST-Norpeg 蛋白可将 P37 蛋白沉淀下来, 而通过 GST 蛋白却不能将

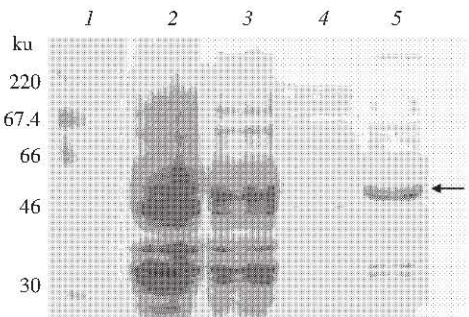


Fig. 3 SDS-PAGE analysis of GST-Norpeg expression in DH5α
1: Protein marker; 2: Total of bacterial protein IPTG without induction; 3: Total of bacterial protein induced by IPTG; 4: Proteins from supernatant after sonication; 5: Protein from inclusion body.

P37 蛋白沉淀下来, 这进一步证明了 Norpeg 的确可以和 P37 相互作用 (图 4)。

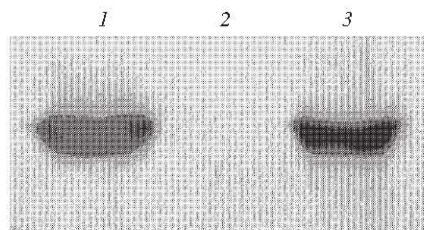


Fig. 4 Identification of the interaction between P37 and Norpeg with GST-pulldown assay

1: P37; 2: GST/P37; 3: GST-Norpeg/P37.

3 讨 论

支原体是一类能独立繁殖的最小微生物, 属于柔膜体纲, 缺乏细胞壁。多数支原体有严格的宿主和组织特异性, 支原体有一套复杂的机制使其能在宿主中长期存在, 多种支原体可引起宿主产生疾病。猪鼻支原体最初是从猪的呼吸道内分离出来的, 可引起小猪多发性浆膜炎和关节炎。我们研究结果表明, 人胃癌组织中存在较高的猪鼻支原体感染率, 那么支原体的感染和肿瘤的发生是否相关呢? P37 蛋白是猪鼻支原体的一种主要膜蛋白, 是猪鼻支原体的主要免疫原, 具备诱导肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的潜能。本研究利用酵母双杂交技术, 筛选到与 P37 蛋白相互作用的 Norpeg 蛋白, 并通过 GST Pull down 实验得到进一步验证。Norpeg 基因是 Krishnan 等^[6]通过视黄酸诱导从人类 RPE 细胞系 ARPE-19 中发现并克隆的新基因, 其 cDNA 全长 4 925 bp, 定位于 5p^{13.2-13.3}, 人类 Norpeg 蛋白的分子质量为 110 ku。Norpeg 蛋白结构上有两个特征: 一是在蛋白质的 C 端有一个很大的螺旋-螺旋结构域, 占整个蛋白质的 60%, 此种结构参与蛋白质自身或与其他蛋白质的相互作用; 另一个特征是 N 端含有 6 个重复锚蛋白序列, 参与蛋白质间的相互结合^[7,8]。因此, Norpeg 蛋白结构上的螺旋-螺旋结构域和重复锚蛋白序列特征, 提示了此蛋白质具有潜在的结合细胞内其他蛋白质的功能。此外, 通过免疫荧光显微镜及激光扫描共聚焦显微镜观察, Norpeg-FLAG 融合蛋白位于细胞胞浆中, 提示此蛋白质是一种胞浆蛋白。通过 RNA 印迹检

测发现, 该基因除了在视网膜上皮细胞有表达外 (受视黄酸的诱导、调控), 在胎盘、生精小管、以及各种肿瘤细胞系如: 腺性结肠癌 SW480、肺癌细胞 AF549、淋巴瘤 K-562、HeLa cell S3 中均有 Norpeg 基因的高表达。同时, 研究者通过原位杂交技术观察 9.5 ~ 15.5 天的小鼠胚胎, 在神经组织、胚胎肾、肺也有该基因的高表达。上述研究结果表明, Norpeg 基因在增殖细胞及肿瘤细胞系中均有较高表达, 提示可能与细胞增殖有关, 同时也提示, 此基因可能在胚胎早期的发育、成长过程中起到很重要的作用。至于猪鼻支原体感染组织后, 如何通过 P37 蛋白与细胞内的 Norpeg 蛋白相互作用, 在某种机制上激活或活化细胞内的某种信号转导通路, 进而导致细胞代谢或行为的改变, 甚至肿瘤的发生、浸润或转移, 尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 董志伟, 万文徽, 李振甫, 等. 抗人胃癌细胞株 MGC-803 单克隆抗体 PD4 制备. 生物化学杂志, 1985, **2** (4): 52 ~ 58
Dong Z W, Wan W H, Li Z P, *et al.* Chin Biochem J, 1985, **2** (4): 52 ~ 58
- 2 殷卫宁, 董志伟, 邓国仁, 等. 单克隆抗体 PD4 对 Ha-ras 转化细胞 Rat3-3 抑制效应的研究. 中华肿瘤杂志, 1991, **13** (2): 82 ~ 86
Yin W N, Dong Z W, Deng G R, *et al.* Chin J Oncology, 1991, **13** (2): 82 ~ 86
- 3 孙国勋, 寿成超, 吴 健, 等. 单克隆抗体 PD4 相关抗原的鉴定. 中华医学杂志, 2001, **81** (7): 437 ~ 438
Song G X, Shou C C, Wu J, *et al.* Nation Medical J China, 2001, **81** (7): 437 ~ 438
- 4 Reutzel R, Boehlein S K, Govindasamy L, *et al.* Crystallization and preliminary X-ray analysis of the tumor metastasis factor p37. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2002, **58** (12): 2141 ~ 2144
- 5 宁金鹰, 黄 苏, 吴 健, 等. 猪鼻支原体蛋白 P37 诱导外周血单核细胞释放肿瘤坏死因子. 科学通报, 2003, **48** (4): 353 ~ 357
Ning J Y, Huang S, Wu J, *et al.* Chin Sci Bull, 2003, **48** (4): 353 ~ 357
- 6 Krishnan R, Kutty G, Samuel W, *et al.* Molecular characterization and developmental expression of NORPEG, a novel gene induced by retinoic acid. J Biol Chem, 2001, **276** (4): 2831 ~ 2840
- 7 Fritzler M J, Lung C C, Hamel J C, *et al.* Molecular characterization of golgin-245, a novel golgi complex protein containing a granin signature. J Biol Chem, 1995, **270**: 31262 ~ 31268
- 8 Yamauchi-Takahara K, Sole M J, Liew J, *et al.* Characterization of human cardiac myosin heavy chain genes. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, **86** (10): 3504 ~ 3508

Isolation and Identification of a Protein Interacting With P37 Protein of *Mycoplasma hyorhinitis**

SUN Yu-Ning**, JIN Geng-Lin**, ZHANG Jian-Zhi, WU Jian, SHOU Cheng-Chao***

(Peking University School of Oncology, Beijing Institute for Cancer Research, Beijing 100034, China)

Abstract High ratio infection of *Mycoplasma hyorhinitis* in gastric tumor tissues suggests a possible association between mycoplasma infection and cancer. P37, an outer-membrane bacterial protein from *Mycoplasma hyorhinitis*, increases neoplastic invasivity and metastasis and induces TNF- α secretion from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). To investigate the functional mechanism of P37, yeast two-hybrid system was used to isolate proteins interacted with P37 from a human placenta cDNA library. Among the 2.6×10^6 transformant clones, one positive clone was obtained. Sequence analysis revealed that the clone is a cDNA fragment from *Norpeg* and encode a carboxy terminal protein. The interaction between P37 and *Norpeg* was further confirmed by ELISA and GST-Pull down assay. This result would be useful to study the function of P37 further.

Key words *M. hyorhinitis*, yeast two-hybrid, P37, *Norpeg*

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30130190), Natural Science Foundation of Beijing (7012007) and Oncology Key Program of Peking University.

** The two authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author. Tel: 86-10-66160960, E-mail: cshou@vip.sina.com

Received: April 26, 2004 Accepted: May 30, 2004