

神经元蛋白 3.1 结合蛋白的筛选与鉴定*

周小海 刘 宇 胡乃月 王春燕 赵立青**

(南开大学生命科学学院, 天津 300071)

摘要 哺乳动物肺组织发育的基本模式总体分为上皮分支的形态发生和分隔膜的形成两个部分. 基因 *p311* 是克隆到的一个在分隔膜形成阶段特异表达的基因, 可能在肺泡发育中起重要作用. 为进一步探讨神经元蛋白 3.1(P311)对肺发育过程的影响, 构建了小鼠肺组织 cDNA 文库, 以融合 Gal4 DNA 结合结构域的重组 P311 蛋白为诱饵, 利用酵母双杂交技术从文库中筛选 P311 结合蛋白. 通过免疫共沉淀和双分子荧光互补等技术进一步验证, SPARC(secreted protein, acidic and rich in cysteine)被确定为 P311 相互作用蛋白. 进一步的研究发现, SPARC 在肺组织中具有与 P311 相似的表达时序特征, 双重免疫组织化学染色显示 SPARC 和 P311 在小鼠肺组织中共定位于肺泡上皮细胞和肌成纤维细胞中. 提示 P311 可能通过与 SPARC 的相互作用影响肺泡发育.

关键词 肺发育, P311, SPARC, 酵母双杂交

学科分类号 Q71, Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00283

肺发育的基本模式总体分为上皮分支的形态发生和分隔膜的形成两个部分. 出现于肺发育早期的分支模式决定近端“上皮树”的立体形态, 而后期分隔膜的形成则创建了完善的远端气道(airway), 并最终形成肺泡^[1]. 肺泡是肺组织进行气体交换的基本功能单位. 肺泡发育异常或损伤不仅可导致新生儿呼吸窘迫、围产期死亡, 还可引发成年个体产生慢性阻塞性肺病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)以及肺气肿等严重肺部疾患^[2]. 目前对这些疾病尚无有效的临床治疗方法. 为寻找新的肺泡发育调节基因, 在前期研究中, 根据分隔膜发生的时序性, 我们利用抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术, 通过比较两个肺泡发育相关阶段(原始肺泡期和肺泡期)分别相对于肺泡发育成熟期(出生后 1 个月)小鼠肺组织基因表达的差异, 克隆到了一个在分隔膜发生相关阶段特异表达的基因 *p311*^[3].

P311 即神经元蛋白 3.1, 又称 PTZ17, 由 Studler 等^[4]于 1993 年在小鼠胚胎的脑组织中首先发现. 已有研究显示 P311 蛋白不属于任何已知的蛋白质家族, 无法从结构上预测其功能. 已知的

P311 蛋白最典型的结构特点, 就是具有富含 Pro、Glu、Asp、Ser 和 Thr 的 PEST 结构域^[5]. PEST 结构域是泛素-蛋白酶体降解系统的作用部位, 它使 P311 蛋白具有极短的半衰期. 此外, PEST 结构域还是蛋白质间相互结合的部位, P311 的生物学功能很可能正是通过该结构域介导的蛋白质间相互作用实现的. 因此, 为进一步探讨 P311 的作用机制, 我们构建了 P311 特异表达阶段小鼠肺组织的 cDNA 文库, 以融合 Gal4 DNA 结合结构域的重组 P311 蛋白为诱饵, 利用酵母双杂交技术从文库中筛选 P311 结合蛋白, 并通过免疫共沉淀(coimmunoprecipitation, CoIP)及双分子荧光互补(bimolecular fluorescence complementation, BiFC)等蛋白质组学手段, 最终确认了 SPARC(secreted protein, acidic and rich in cysteine), 即富含半胱氨酸

* 国家自然科学基金资助项目(30770462)和天津市自然科学基金资助项目(07JCYBJC08100).

** 通讯联系人.

Tel: 022-23500767, E-mail: lqzhao@nankai.edu.cn

收稿日期: 2010-08-04, 接受日期: 2010-09-13

的酸性分泌蛋白, 为 P311 蛋白的结合伴侣. 进一步的研究发现, SPARC 在肺组织中具有与 P311 相似的表达时序特征, 且在肺泡期小鼠肺组织中与 P311 共定位于肺泡上皮细胞和肌成纤维细胞.

1 材料与方法

1.1 材料

RNeasy® Mini Kit 购自 Qiagen 公司. Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits (包括诱饵载体 pGBKT7、线性载体 pGADT-Rec、cDNA 文库构建系统、PEG-LiAC 酵母转化系统及 AH109 菌株等)、Matchmaker™ Co-IP Kit、Protein A、C-Myc Monoclonal Antibody 和 HA-Tag Polyclonal Antibody 购自 Clontech 公司. TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems 和 Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection Systems 体外翻译标记系统购自 Promega 公司. TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 及其他分子克隆所用酶购自 Takara 公司. pCMV-HA 与 pCMV-Myc 真核表达载体由南开大学生命科学学院龙加福教授惠赠. 双分子荧光互补实验所需质粒 pcDNA3.0-YN 与 pcDNA3.0-YC 由南开大学生命科学学院曹又佳教授惠赠. Anti-P311 抗体由美国 Duke 大学 Gregory Taylor 教授惠赠, anti-SPARC 抗体购自 ProteinTech Group, Inc. 菌种、细胞株等由本实验室保存. B6/C57 小鼠由本院动物中心饲养. Lipofectamine 2000 Reagent 购自 Invitrogen 公司. Protease inhibitor cocktail 和 Lactacystin 购自 Sigma 公司. 所有测序及引物合成由 Invitrogen 公司完成.

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒 pGBKT7-P311 的构建. 以本实验室前期构建的 pEGFP-N1-P311 为模板, 上游引物 GAGTCTCCATATGGTTTACTACCCAGAACTCT-TGGTC, 下游引物 TCGGGATCCTTAAAAAGGG-TGGAGGTAAGTGGTAG, 扩增 P311 的 ORF 全序列. PCR 产物经切胶回收后, 与 pGBKT7 载体同时进行 *Nde* I / *Bam* H I 双酶切. 之后进行连接并转化至 *E. coli* DH5 α . 阳性克隆经 PCR 鉴定后送交测序.

1.2.2 小鼠肺组织 cDNA 文库的构建. 以 P311 表达量相对较高的出生后第 11 天(postnatal day 11, P11)小鼠肺组织为材料, RNeasy® Mini Kit 提取总 RNA, 琼脂糖凝胶电泳及紫外分光光度计检测

RNA 产量及纯度. 按照 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits 产品说明书, 构建小鼠肺组织 cDNA 文库. 主要步骤如下: 在 PCR 管中依次加入 RNA 样品 1 μ l(约 1 μ g)、CDS III 引物 (10 μ mol/L) 1 μ l、无 RNA 酶 H₂O 1 μ l, 72℃ 孵育 2 min, 冰上冷却 2 min. 依次加入 5 $\times$ 第一链缓冲液 2 μ l、DTT(20 mmol/L) 1 μ l、dNTP 混合物 (10 mmol/L) 1 μ l、MMLV 逆转录酶 1 μ l, 42℃ 孵育 10 min. 再加入 1 μ l BD 精敏 II 型寡核苷酸, 42℃ 孵育 1 h 后, 75℃ 终止反应, 完成第一链合成. 双链 cDNA 合成体系为: cDNA 第一链 2 μ l、双蒸水 70 μ l、10 $\times$ BD 优势 2 号 PCR 缓冲液 10 μ l、50 $\times$ dNTP 混合物 (各 2.5 mmol/L) 2 μ l、5' PCR 引物 (10 μ mol/L) 和 3' PCR 引物 (10 μ mol/L) 各 2 μ l、10 $\times$ GC- 溶解液 10 μ l、50 $\times$ BD 优势 2 号聚合酶混合液 2 μ l. 反应条件为 95℃ 30 s 预变性, 95℃ 变性 10 s, 68℃ 退火及延伸 6 min(每个循环延长 5 s) 共 24 个循环, 之后 68℃ 保温 5 min. 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测后, 经纯化柱纯化, 保存于 -20℃.

1.2.3 诱饵质粒 pGBKT7-P311 毒性与自激活检测. 按照 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits 说明书操作, 用 PEG-LiAC 法将诱饵质粒 pGBKT7-P311 与 pGADT7 转化入酵母菌株 AH109, 以 pGBKT7 与 pGADT7 转化菌为对照. 涂布于 SD/-Trp 平板, 30℃ 培养 2~4 天后, 挑取 1 个单菌落, 分别于 SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Ade/-Trp/X- α -Gal、SD/-His/-Trp/X- α -Gal 三种平板上划线接种. 30℃ 培养 2~4 天, 观察各平板上是否有菌落生成, 以检测诱饵质粒是否对 AH109 的报告基因存在自激活作用. 同时挑取 1 个 SD/-Trp 平板上生长的单菌落, 接种于 50 ml SD/-Trp(Kana)液体培养基中, 30℃ 下 270 r/min 培养过夜后, 检测培养物的 A_{600} . 若 $A_{600} < 0.8$, 说明诱饵质粒 pGBKT7-P311 表达产物对宿主菌 AH109 有毒性, 反之则证明其无毒性, 可用于酵母双杂交筛选.

1.2.4 酵母双杂交筛选小鼠肺组织 cDNA 文库. 按照 Matchmaker™ Library Construction & Screening Kits 说明书操作, 将已转入诱饵质粒 pGBKT7-P311 的 AH109 制备成感受态细胞, 并用 PEG-LiAC 法同时转入小鼠肺组织 cDNA 文库与 pGADT-Rec 线性载体. 以 pGADT7-RecT 与 pGBKT7-53 和 pGADT7-RecT 与 pGBKT7-Lam 共转化 AH101 菌

株分别作为阳性和阴性对照. 将全部转化菌液涂布于 50 个 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板, 并取 30 μ l 菌液, 稀释 25 倍后涂布于 SD/-Leu/-Trp 和 SD/-Leu 平板, 用于计算转化效率. 所有平板在 30 $^{\circ}$ C 下培养 3~7 天至菌落生成. 将 4 块平板上正常生长的菌落, 按顺序划线接种至 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal 平板检测 MEL1 报告基因的表达. 30 $^{\circ}$ C 避光培养 3~5 天, 观察菌落的颜色变化. 变为蓝色的菌落即为此次酵母双杂交初步筛选出的阳性克隆.

1.2.5 阳性克隆的菌落 PCR 鉴定与测序. 挑取 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal 平板上的蓝色阳性克隆, 悬浮于 30 μ l Lyticase(0.05 U/ μ l), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 以去除细胞壁. 而后在 95 $^{\circ}$ C 下加热裂解菌体 5 min. 稍离心, 取上清液 2 μ l 作为模板进行菌落 PCR. 采用 AD domain 引物: 5' AD Primer, CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC, 3' AD Primer, GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGT-ATCTACGAT, 反应体系 50 μ l. 反应完毕, 取 2 μ l 进行琼脂糖凝胶电泳检测, 将可得到单一扩增条带的产物送交测序. 有 2 条以上扩增条带的产物则分别切胶纯化后测序.

1.2.6 酵母双杂交的回复性验证. 从测序成功的阳性克隆酵母菌中提取 pGADT7-Rec-cDNA 重组质粒, 与 pGBKT7-P311 共转化 AH109, 用 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal 平板进行筛选, 如能生成蓝色菌落, 则证明回复性验证成功.

1.2.7 体外免疫共沉淀验证 P311 与其结合蛋白的相互作用. 分别以阳性克隆之一的 pGADT7-Rec-SPARC 重组质粒、pGBKT7-P311 为模板, 使用 TNT[®] Quick Coupled Transcription/Translation Systems 和 Transcend[™] Non-Radioactive Translation Detection Systems 翻译并标记各阳性克隆蛋白产物, 用 Matchmaker[™] Co-IP Kit 进行体外免疫共沉淀, 并通过 SDS-PAGE 及 Streptavidin-AP 结合 Western blue 显色试剂进行检测.

1.2.8 细胞免疫共沉淀验证 P311 与其结合蛋白的相互作用. 分别构建 pCMV-Myc-P311 和 pCMV-HA-SPARC 真核表达载体, 用 Lipofectamine 2000 Reagent 共转染生长状态良好的 HEK 293T 细胞, 并另设 pCMV-HA-SPARC 单独转染作对照. 转染 48 h 后, 用 1 ml 含 10% protease inhibitor cocktail 和 1 μ l Lactacystin 的 RIPA 裂解细胞. 加入 10 μ l

C-Myc 单克隆抗体(0.1 g/L), 4 $^{\circ}$ C 旋转混合 1 h, 再加入 50 μ l Protein A 继续混合 2 h. 之后用含 Lactacystin 的 RIPA 洗涤 Protein A, 重复 4 次后加入 20 μ l SDS-PAGE 上样缓冲液, 用 12%SDS-PAGE 对蛋白质样品进行电泳. 以 HA-Tag 多克隆抗体(0.1 g/L)为一抗, 用 Western-blot 检测重组蛋白 HA-SPARC. 反之以 HA-Tag 多克隆抗体进行共沉淀, 用 16%Trince-SDS-PAGE 对蛋白质样品进行电泳, C-Myc 单克隆抗体进行 Myc-P311 的 Western-blot 检测.

1.2.9 双分子荧光互补实验验证 P311 与其结合蛋白的相互作用. 分别将 P311 和 SPARC 克隆入带有黄色荧光蛋白(yellow fluorescence protein, YFP) N 端或 C 端的真核表达载体 pcDNA3.0-YN 与 pcDNA3.0-YC, 构建 pcDNA3.0-YN-P311 与 pcDNA3.0-YC-SPARC. 共转染 HeLa 细胞 48 h 后, 在培养液中加入 100 μ l DAPI, 继续培养 2 h 后, 置于 4 $^{\circ}$ C 下 2 h, 以去除非特异性荧光. 之后用 PBS 洗涤细胞 6 次, 并于激光共聚焦扫描显微镜(Leica TCS SP5 confocal microscope)下观察.

1.2.10 Real-time PCR 检测基因表达的时序性. 以 E16.6(Embryonic day 16.5, 阴道栓出现记做 E0.5)、E18.5、P5、P11、P15、P30 小鼠肺组织为材料, 分别提取总 RNA, 并使用 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 合成 cDNA 第一链. 使用 Toyobo 公司的 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 于 iQ[™]5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BIORAD)中进行反应. P311 上游引物, CTGGACTGAAGGAAGGGAGAAT, 下游引物, TTCGGTTCACCTTCCTTAGGCA; SPARC 上游引物, ATGATGAGGACCTGGAT, 下游引物, GGGTTGTCAGCCACCAC. 另设 GAPDH 为内参, 上游引物, AACATCATCCCTGCATCCACTG, 下游引物, CCTGCTTCACCACCTTCTTGAT. PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 循环 40 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 5 min. 每一时期的每个基因重复 3 次. 反应结束后, 以由所测荧光强度半对数曲线中几何级数区决定的循环极限 C_T (cycles threshold)对基因扩增进行定量分析^[9]. 其中靶基因表达的相对量以靶基因相对其对照的 ΔC_T 表示, 即 ΔC_T 等于靶基因 C_T 值与管家基因 GAPDH C_T 值的差. ΔC_T 值越高, 表明靶基因扩增达到荧光可检测水平所需的循环越多, 即

靶基因在组织中的表达水平越低. 不同阶段靶基因表达的差异以 $\Delta\Delta C_T$ 表示, 由最高 ΔC_T 与其他各 ΔC_T 分别相减而得. 靶基因表达的相对倍数以 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 表示. 统计学分析以 Excel 软件系统完成.

1.2.11 免疫组织化学染色. 单独免疫组化: P11 小鼠肺组织石蜡包埋切片, 经脱蜡入水后, 以 0.1% 胰酶 37℃ 处理 10 min 进行抗原修复. 3% H_2O_2 甲醇溶液处理 20 min 消除内源辣根过氧化物酶. 血清封闭 1 h 后分别加入 anti-SPARC(1:400) 或 anti-P311(1:500) 抗体, 于 4℃ 过夜. 以含 0.2% Tween20 的 PBS 洗去多余抗体. 分别通过 ABC-HRP 和 ABC-AP(Vector Lab) 系统结合 DAB 和 BCIP/NBT 显色系统(福州迈新生物技术开发有限公司), 显示 P311 和 SPARC 阳性细胞, 苏木或 Contrast Red 复染后封片. 双重免疫组化: 采用 Dou^{SP} TM 免疫组化双染试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司), 按照产品说明书进行操作. 基本过程与单独染色类似, 切片前处理完成后, 先加入 anti-SPARC 抗体, 并显色. 再次血清封闭后, 加入 anti-P311 抗体, 显色后封片.

2 结 果

2.1 诱饵质粒 pGBKT7-P311 的构建与转录激活检测

以实验室前期构建的基因 *P311* 表达载体 pEGFP-N1-P311 为模板, 扩增 *P311* 全长的开放阅读框(ORF), 总计 207 bp. 通过 *Nde* I 和 *Bam*HI 位点克隆入试剂盒提供的 GAL4 DNA-BD 载体 pGBKT7, 构建出诱饵质粒 pGBKT7-P311. 经 PCR 检测的阳性重组体送测序鉴定, 结果显示 *P311* 基因序列及读码框均正确.

为检测诱饵质粒的转录激活特性, 将 pGBKT7-P311 与 pGADT7 和 pGBKT7 与 pGADT7 分别转化至 AH109, 并各自在 SD/-Trp/X- α -Gal、SD/-Ade/-Trp/X- α -Gal 和 SD/-His/-Trp/X- α -Gal 培养板上培养. pGBKT7-P311 与 pGADT7 转化的 AH109 只在 SD/-Trp/X- α -Gal 培养板上形成白色菌落, 而在 SD/-Ade/-Trp 和 SD/-His/-Trp 平板上均不能生长, 与 pGBKT7 和 pGADT7 转化菌的生长特性完全一致. 即 pGBKT7 携带的抗 Trp 缺陷基因 TRP1 使诱饵质粒 pGBKT7-P311 可在无 Trp 的培养基上生长, 但却不会激活酵母菌 AH109 中的报告基因 *HIS3*、*ADE2* 和 *MEL1*. 故转化菌既不能在

Ade 或 His 缺陷的培养基上生长, 也不能形成蓝色菌落. 表明融合了基因 *P311* 的诱饵质粒, 同 pGBKT7 载体一样无单独激活报告基因的能力, 可用于文库筛选.

2.2 酵母双杂交初步筛选 P311 结合蛋白

采用顺序转化法, 首先获得诱饵质粒 pGBKT7-P311 转化的酵母菌 AH109. 再以自行制备的出生 11 天小鼠肺组织 cDNA 文库和线性化的 pGADT-Rec 同时转化携带诱饵质粒的 AH101, 获得双杂交文库. 以 pGADT7-RecT 与 pGBKT7-53 和 pGADT7-RecT 与 pGBKT7-Lam 共转化 AH101 菌株分别作为阳性和阴性对照, 先后使用 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal 平板对双杂交文库进行两轮筛选, 共获得 401 个阳性克隆(图 1, 蓝色克隆).

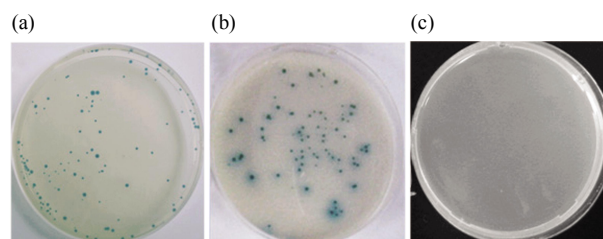


Fig. 1 Screening the library

The yeast cotransformants which could grow on SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp plate were transferred to SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal plates to screen positive clones (blue ones). (a) A positive control, which represents yeast AH101 cells are cotransformed with pGADT7-RecT and pGBKT7-53. (b) Represents positive clones in the library resulting from yeast AH101 cells cotransformed with pGBKT7-P311 and pGADT-Rec-cDNA. (c) A negative control, which represents yeast AH101 cells are cotransformed with pGADT7-RecT and pGBKT7-Lam.

将所有阳性克隆进行菌落 PCR 与电泳鉴定, 共有 264 个克隆扩增出一个或多个条带. 分离各条带进行测序, 以 GenBank 数据库中的 BLAST 工具分析测序结果. 排除多种蛋白酶、核糖体、线粒体蛋白、细胞骨架等公认假阳性蛋白及重复克隆后, 对剩余阳性克隆用 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- α -gal 平板进行回复性验证. 初步确定 SPARC、Peroxioredoxin-1、SP-C、Loxl-1 等是可能与 P311 相互作用的蛋白质(表 1).

Table 1 Gene candidates encoding P311 interacting proteins

Name of gene	Homology	Accession No	Functions
SPARC	100%	NM_009242	Calcium ion binding, extracellular matrix binding
Prdx1	100%	NM_011034	Oxidoreductase,peroxidase, peroxiredoxin activity
SPC	100%	NM_011359	Regulation of liquid surface tension
Lox11	100%	NM_010729	Metal ion binding, protein binding
TnXB	100%	NM_031176	Collagen binding, heparin binding
Galectin-1	100%	NM_008495	Galactose binding, myoblast differentiation
Fibrillin-2	100%	NM_010181	Extracellular matrix structural constituent

我们选择 SPARC 作为进一步研究的靶蛋白. SPARC(secreted protein, acidic and rich in cysteine), 即富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白, 是一个钙离子结合糖蛋白, 表达于不同生物的多种组织细胞, 特别是发育和重建中的组织细胞, 其生理功能涉及组织分化与发育、细胞黏附与迁移及细胞周期的调节等诸多方面^[7].

2.3 SPARC 与 P311 在体外相互作用

为验证 P311 和 SPARC 蛋白在体外的相互作用, 我们以 pGBKT7-Myc-P311 和 pGADT7-Rec-HA-SPARC 为模板, 利用 Promega 公司的蛋白质体外合成与标记系统, 分别合成出掺入 Biotin-Lys 标记的 HA-SPARC 和 Myc-P311 蛋白. 以 anti-Myc 或 anti-HA 抗体结合蛋白 A 珠球, 对单一蛋白或两蛋白的混合物进行体外免疫共沉淀, 并经 Streptavidin-AP 结合 Western blue 显色进行检测. 结果显示(图 2), HA-SPARC 蛋白单独存在时不能

与 anti-Myc 抗体共沉淀(lane 1), 而 Myc-P311 与 HA-SPARC 蛋白的混合物可被 anti-Myc 抗体共沉淀(lane 2), 且蛋白质大小同 anti-HA 沉淀的 HA-SPARC(lane 3)一致. 表明 P311 和 SPARC 蛋白在体外存在相互作用. (注: 由于 P311 蛋白分子质量仅有 8 ku, 且只含 5 个 Lys 残基, 其条带难以显色, 故在此仅显示结合 SPARC 的条带).

2.4 SPARC 与 P311 在哺乳动物细胞中相互作用

为检测 P311 与 SPARC 是否在真核细胞中具有相互作用, 我们分别将 2 个基因的 ORF 全序列克隆至 pCMV-Myc 和 pCMV-HA 真核表达载体, 构建出重组 pCMV-Myc-P311 和 pCMV-HA-SPARC. 重组载体共转染 HEK 293T 细胞后, 用 anti-Myc 抗体和蛋白 A 珠球进行免疫共沉淀, 以 anti-HA 为抗体通过 Western blot 检测共沉淀蛋白质, 反之,用 anti-HA 抗体和蛋白 A 珠球进行免疫共沉淀, 以 anti-Myc 为抗体进行 Western blot 检测. 结果显示(图 3a), pCMV-Myc 与 pCMV-HA-SPARC 共转染的 293 细胞裂解液不能与 anti-Myc 抗体共沉淀(lane 3), 只有 pCMV-Myc-P311 与 pCMV-HA-SPARC 共转染细胞时(lane 1), HA-SPARC 可与 anti-Myc 抗体共同沉淀, 并且显示与单独转染 HA-SPARC 之阳性对照一致的条带, 反之亦然. 表明 P311 和 SPARC 在细胞中存在相互作用.

为了直观地观察蛋白质在细胞内的相互作用, 我们采用双分子荧光互补(BiFC)技术^[8-9], 对活体细胞中 P311 与 SPARC 相互作用进行了检测. 基于蛋白质片段互补与功能重建的双分子荧光互补技术是近年来新兴的, 在细胞内直接检测结合蛋白间生物学相互作用的技术. 分别将 P311 和 SPARC 之 cDNA 克隆到带有黄色荧光蛋白 N 端和 C 端序列的载体 pcDNA3.0-YN 和 pcDNA3.0-YC 中. 重组体共转染 HeLa 细胞 48 h 后用 DAPI 染色细胞核.

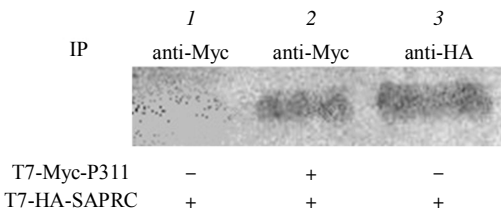


Fig. 2 P311 interacts with SPARC in vitro Myc fused P311 and HA fused SPARC were translated in vitro respectively in the presence of biotin-labeled Lys. HA-SPARC protein alone (lane 1) could not be precipitated by anti-Myc antibody, while the protein mixture (lane 2) of HA-SPARC and Myc-P311 were immunoprecipitated by anti-Myc antibody. Another portion of HA-SPARC protein was pulled down by anti-HA antibody as positive control (lane 3). Immunoprecipitates were analyzed by Streptavidin-AP with Western Blue Stabilized Substrate. The protein bands expressing only in mixture and control lanes demonstrated that P311 interacts with SPARC in cell free system.

在 Leica TCS SP5 激光共聚焦显微镜下观察, 结果显示(图 3b), pcDNA3.0-YN-P311 与 pcDNA3.0-YC-SPARC 共转染后, 细胞内有明显黄色荧光产

生, 且产生荧光部位主要位于细胞质, 符合 P311 及 SPARC 蛋白的表达特点. 表明 P311 与 SPARC 在活细胞中的相互作用.

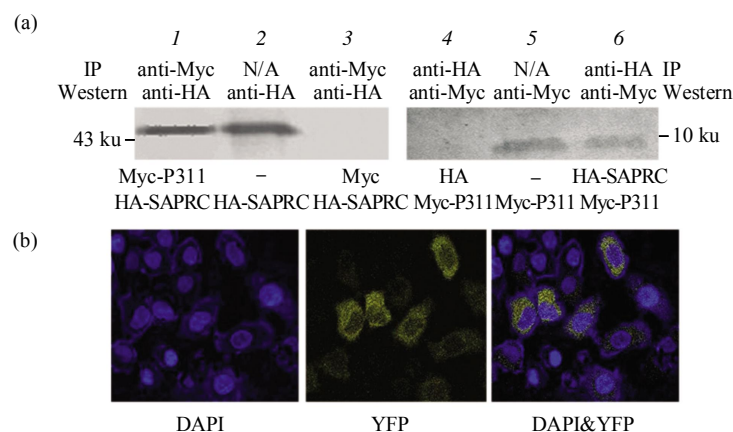


Fig. 3 P311 interacts with SPARC in mammalian cells

(a) HEK293T cells were cotransfected with plasmids encoding Myc-P311 and HA-SPARC (lane 1, 6), Myc vector and HA-SPARC (lane 3), HA vector and Myc-P311 (lane 4). Immunoprecipitations were performed in the presence of protease inhibitor cocktail and the ubiquitin/proteasome inhibitor lactacystin using anti-Myc antibody (lane 1, 3) or anti-HA antibody (lane 4, 6), and another portion of HA-SPARC or Myc-P311 transfected cell lysate were not treated with any antibodies as positive controls (lane 2, 5). The blots were probed with HA epitope specific antibody (lane 1, 2, 3) or Myc epitope specific antibody (lane 4, 5, 6). Both pull down products and positive controls exhibited bands at *M* around 45 ku representing SPARC or 9.5 ku representing P311. (b) HeLa cells were cotransfected with plasmids encoding YFP fragments fused proteins, YN-P311 and YC-SPARC. 48 h later of transfection, cells were stained with DAPI and subjected to confocal fluorescence microscopy.

2.5 SPARC 与 P311 在肺组织中的表达具有相似的时序性

根据气道形成的形态学特征, 肺的发育通常被描述为 4 个时期^[10]: 假腺期(pseudoglandular stage, 小鼠 E9.5~E16.5)、小管期(canalicular stage, 小鼠 E16.5~E17.5)、原始肺泡期(saccular stage, 小鼠 E17.5~P5)和肺泡期(alveolar stage, 小鼠 P5~P14). 为进一步探讨 P311 与 SPARC 在肺组织的相互作用关系及其在肺泡发育过程中的相互作用, 我们以

E16.5、E18.5、P5、P11、P15、P30 等不同发育阶段的小鼠肺组织为材料, 通过 Real-time PCR 方法, 检测了 SPARC 和 P311 表达的时序特性. 结果显示(图 4), SPARC 与 P311 有相似的表达时序性, 即在原始肺泡期表达量开始明显上升, 至出生后第 11 天左右达到最高峰, 而后又有不同程度的下降, 直至肺泡发育成熟期(P30)降至较低水平. 提示 P311 与 SPARC 可能参与肺泡发育的相关过程.

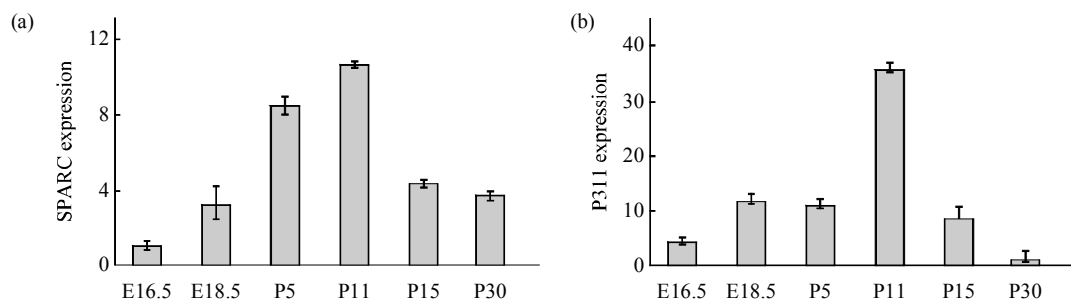


Fig. 4 P311 and SPARC have similar temporal expression patterns during lung development

SPARC (a) had similar temporal expression pattern to P311 (b). The expression of these two genes started to increase at the beginning of the saccular stage of lung development (E18.5), and this trend remained at the beginning of alveolar development (P5) and until the expression levels of these genes became highest around postnatal day 11 (P11). Then, the relative amounts of the mRNAs of these proteins decreased to low levels as the lung grew into maturity. This kind of developmental expression pattern implied that P311 and SPARC may be relevant to saccular and alveolar development.

2.6 SPARC 与 P311 在小鼠肺组织中的表达定位

为进一步确认 SPARC 与 P311 在动物体内存在相互作用, 我们根据 Real time PCR 结果, 选择出生后 11 天(P11)的小鼠肺组织切片, 对 SPARC 和 P311 进行了单独免疫组化和双重免疫组化检测. 结果显示, P311 蛋白高表达于 P11 小鼠肺组织中(图 5a, 棕色为阳性细胞, 蓝色显示苏木复染的细胞核), 主要分布在围界肺泡的上皮细胞(实线箭头)、肺泡隔膜生长点的肌成纤维细胞(虚线箭头)及部分间质细胞(带尾箭头)中. SPARC 的表达量明显低于 P311(图 5b, 蓝色表示阳性细胞, 红色为复染背景), 亦主要表达于上皮及肌成纤维细胞中. 双重组化染色可见 SPARC 和 P311 共同表达与某些肺泡上皮及肌成纤维细胞中(图 5c, d, d 为 c 图的局部放大, 箭头所示黑褐色处为双阳性细胞), 表明 SPARC 和 P311 在小鼠肺组织细胞中确实存在共定位.

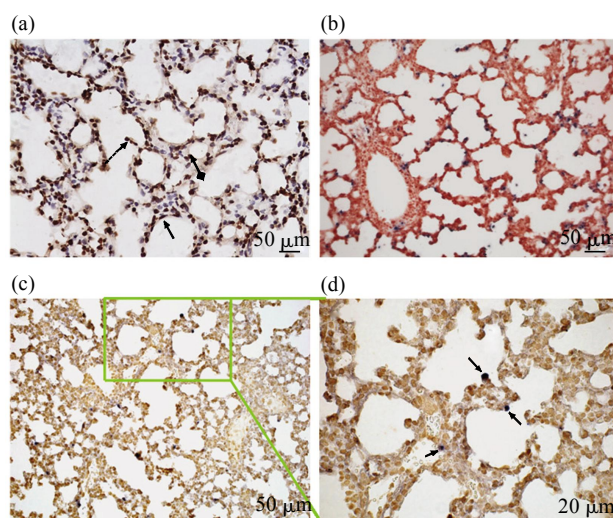


Fig. 5 Cellular expression of SPARC and P311 in mouse lungs

(a) Immunostaining of P11 mouse lung sections with an antibody to P311. P311 (brown) were found in epithelium (solid arrow), myofibroblast (dotted arrow), and mesenchymal cells (tailed arrow). (b) Immunostaining showed SPARC positive cells (blue) in P11 mouse lungs. (c, d) Double immunostaining with both anti-P311 and anti-SPARC antibodies on one P11 mouse lung section. Some alveolar epithelium and myofibroblast exhibited double positive. (d) A zoom of (c).

3 讨 论

肺器官发育过程中, 假腺期和小管期侧重于上皮分支的形态发生, 而随后的原始肺泡期和肺泡期则通过两次的分隔膜发生及重建形成巨大的气体交

换面积, 是肺泡形成的重要阶段. 近年来, 通过基因打靶等方法, 学者们已发现了一些影响肺泡形成的基因, 如对于原始肺泡形成具有重要作用的 TGF- β 3 家族和 Wnt 信号通路, 及与成熟肺泡形成密切相关的血小板衍生生长因子(PDGF-A)^[11]、成纤维细胞生长因子(FGF)^[12]等. 这些重要调节基因的表达状况, 直接影响肺泡的形成乃至整个肺组织的发育. 其表达异常亦可导致与肺发育不良相关的各种肺部疾患, 如 FGF 及其受体异常可导致新生儿致死性肺发育异常, 而 Smad-TGF- β 系统异常可导致幼儿肺泡损伤与成年后肺气肿的发生^[13].

由于肺泡的发生出现在肺组织形成的特定时期, 我们推测调节肺泡发育的各种激活或抑制因子将特异性地高水平表达于这些时期. *p311* 即是我们利用抑制性差减杂交技术克隆的, 在肺泡发生相关阶段特异表达的基因^[3].

p311 基因全长 2 025 bp, 编码一个分子质量 8 ku、由 68 个氨基酸组成的多肽, 在人和小鼠等物种间高度保守^[14]. 近年研究发现, P311 蛋白广泛表达于多种组织细胞中, 且是一种胞内蛋白, 主要存在于胞浆, 在核内亦有少量定位. 其表型功能主要包括: 参与受损神经系统的再生^[15-16]、促进成纤维细胞表型转化^[14, 17-18], 并且与肿瘤细胞的迁移、浸润等密切相关^[19-20]. 在我们前期的关于 P311 对肺泡发育调控作用的研究中发现, 相对于成熟肺组织 P311 在原始肺泡期到肺泡形成初期的表达明显升高, 而后在肺泡期达到最高峰, 并在整个肺泡形成阶段保持高水平表达. 而在肺泡损伤相关的肺气肿患者肺组织中其表达量显著下降. 此外, 地塞米松导致的肺发育不良小鼠肺组织中, P311 表达亦显著下降^[3]. 这些结果提示 P311 可能与肺泡形成有关, 抑或在防止肺损伤或对受损肺组织的修复中发挥作用.

然而, P311 蛋白调控肺泡发育的分子机制, 目前尚不清楚. 基于 P311 分子结构上的特点, 在本文中利用酵母双杂交技术, 从小鼠胎肺组织中筛选 P311 的相互作用蛋白, 希望通过对结合蛋白的了解, 进一步认识 P311 的功能. SPARC 是我们筛选出来的一个 P311 结合蛋白.

SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine), 即富含半胱氨酸的酸性分泌蛋白. 由于在骨基质和基底膜肿瘤中均有该蛋白质的高水平表达, 因此, 该蛋白质也被称为骨结合素(osteonectin)或 BM-40(base membrane-40)^[21-22]. 成熟 SPARC 的

分子质量为 32 ku, 但由于其包含的糖基链及自身酸性 *pI* 值的影响, 其在 SDS-PAGE 时将表现出 43 ku 的表观分子质量^[23]. SPARC 具有高度的种间保守性^[7], 这其中还包括一段含 17 个氨基酸残基的信号肽, 能够介导 SPARC 蛋白向胞外分泌. 目前对于该蛋白质功能及相关机制的报道, 主要集中于 SPARC 作为胞外蛋白触动胞内信号转导, 进而影响细胞功能的方面.

然而, 我们利用重组诱饵质粒 pGBKT7-P311 进行的酵母双杂交筛选中, SPARC 却被作为胞内蛋白 P311 的一种胞内结合伴侣筛选出来. 对 SPARC 的这种胞内定位, 使得我们对该蛋白质的关注点, 由其胞外功能转向了胞内功能.

实际上, 目前已经有相当数量公认的胞外因子, 被发现能够通过胞外、胞内两条途径发挥生理功能. 除了与细胞膜表面受体作用, 通过信号转导间接影响细胞活性的经典途径外, 还能通过直接与靶细胞内的细胞核相互作用来调控细胞生命活动. 这些双功能的生长因子和肽类激素, 包括表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGFs)、胰岛素(insulin)、血管生成素(angiogenin)、甲状旁腺激素相关肽(PTHrP)等. 关于这些分泌蛋白在胞内定位的机制, 目前尚无定论, 这些蛋白质因子在胞内的定位, 对于其已知的作为胞外分子的功能, 可能起到补充或者增强的作用^[24].

对于我们筛选出的 SPARC 蛋白, 也同上述各种分泌蛋白一样, 亦有其在胞内定位并发挥作用的报道. 如 SPARC 能够在胞质中通过与整联蛋白交联激酶(integrin-linked kinase, ILK)相互作用, 对纤连蛋白诱导的应力纤维形成起到促进作用, 而这一过程又对胞外纤连蛋白基质的装配至关重要, 因此, SPARC 在这里通过其胞内作用, 调控了胞外基质的装配^[25-26]. 而在体外培养的胚胎期鸡细胞和牛主动脉内皮细胞(bovine aortic endothelial cells, BAE cells)中, 细胞核内均有内源 SPARC 的定位, 并可能会作为一种核骨架结合蛋白发挥作用^[27-28].

p311 与 *sparc* 都曾作为促进神经胶质瘤迁移的基因被筛选出来^[19, 29]. 当在神经胶质瘤细胞中分别异位表达两种蛋白质时, 所引发的表型变化更具有相似性. 向 U87MG 恶性胶质瘤细胞中稳定转入 SPARC 后, 胞质部分将变得伸展, 使细胞由原来的圆形转变为扁平形, 细胞穿透对抗凝集块所需的时间较对照细胞明显缩短, 表现出增强的浸润性. 而经过免疫荧光染色标记后, 发现异位表达的

SPARC 蛋白存在于恶性胶质瘤细胞的胞内, 集中于细胞核的近外周侧. 结果提示, 这种对细胞浸润能力的促进作用, 可能是 SPARC 蛋白在胞内发挥功能的结果^[30]. 另一方面, 当向 U118 神经胶质瘤细胞中稳定转入 P311 后, 该细胞内的纤维状肌动蛋白骨架将发生重排, 原先的肌动蛋白应力纤维明显减少, 而相应的, 细胞运动前缘的表层肌动蛋白明显增加, 迁移速率大幅提高. 而同样经过间接免疫荧光方法对 P311 进行胞内定位后, 发现有大量 P311 存在于细胞运动前缘, 能够与该部位的表层肌动蛋白网络实现共定位^[31]. 虽然肺泡发生的机制尚有许多疑问, 但隔膜的发生和重建都涉及到特定细胞的趋化运动. P311 和 SPARC 很可能通过协同促进细胞运动, 来调控肺组织的形态发生.

已经有报道指出, 在成纤维细胞系 NIH 3T3 中过量表达 P311 可导致该细胞分化为肌成纤维细胞^[32]. 肌成纤维细胞在肺泡隔膜的形成的起着重要的作用, 如次级隔膜发生及重建所必需的弹性蛋白即由肌成纤维细胞产生^[32]. 另外, 由 P311 诱导产生的这种肌成纤维细胞, 其迁移方式表现为阿米巴样运动, 而不是常见的间充质型运动. 采用阿米巴样运动方式细胞的特点在于, 缺少黏着斑和应力纤维, 也没有整联蛋白和基质金属蛋白酶的簇集^[33]. SPARC 亦有相似功能, 胞外的 SPARC 分子能够通过其自身的卵泡抑素样区域(follistatin-like region)和 Ca^{2+} 结合 EF 手性结构(Ca^{2+} -binding EF-hand)与内皮细胞表面的受体分子结合, 进而触动该细胞黏着斑的解装配, 同时, 胞内的纤维状肌动蛋白也会发生重新分布, 集中于细胞外周侧^[33]. 尽管这一功能是在将 SPARC 作为胞外分子研究时所报道的, 但是, 胞内定位的 SPARC 也有可能对这种胞外效应起到补充或增强的作用. 因此, 胞内 SPARC 和 P311 在细胞抗黏附和调控细胞骨架排布方面, 也具有相似的作用.

更直接揭示 P311 和 SPARC 在体内作用相关性的研究, 是分别对这两种蛋白质进行的体内组化定位分析. 当利用抗 P311 抗体对人体血管和肠组织切片进行免疫染色后, 发现正常的血管和内脏组织平滑肌细胞, 均能表达 P311 蛋白^[32]. 而另一方面, 在大鼠正常真皮和肉芽组织切片中对 SPARC 蛋白进行组化定位发现, 毛细血管和主动脉的平滑肌细胞胞内具有对抗 SPARC 抗体的免疫反应性^[34]. 提示 P311 和 SPARC 两种蛋白质, 很可能在体内正常的血管平滑肌细胞中, 实现共定位. 此外, 当

大鼠肺发育进入小管期和原始肺泡期时, 免疫组化和原位杂交实验显示 SPARC 主要定位于气道周围的血管和平滑肌细胞处^[35]。而在这里, 我们的研究结果显示 P311 和 SPARC 在肺泡期于肌成纤维细胞中存在共定位。肺泡发育过程中, 无论是平滑肌细胞, 还是肌成纤维细胞在弹性蛋白的分泌及隔膜的生长中都具有重要的作用。P311 与 SPARC 有可能在体内通过这两种细胞发挥调控肺泡发育的功能。

此外, 值得一提的是, 在前述的通过酵母双杂交筛选出的 7 个 P311 结合蛋白中, 除了 Prdx1 是典型的胞内蛋白, Galectin-1 是一种不依赖于经典膜泡分泌途径的部分分泌蛋白外, 包括 SPARC 在内的其他 5 种蛋白质, 即 SPARC、SPC、Loxl1、TnXB 和 Fibrillin-2, 均是目前公认的经典分泌蛋白, 虽然关于这几种蛋白质也具有胞内胞外双重定位的报道并不多见, 但是, 其与 P311 这种胞内蛋白相互结合的能力, 提示它们可能会作为胞内蛋白发挥一定作用。另一方面, P311 能够与如此多的分泌蛋白在胞内结合, 也提示我们其在引导分泌蛋白向胞内定位方面, 可能具有一定功能。这些都是值得后面进行深入研究的问题。

参 考 文 献

- [1] Burri P H. Fetal and postnatal development of the lung. *Annu Rev Physiol*, 1984, **46**: 617-628
- [2] Barnes P J. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 2000, **343**: 269-280
- [3] Zhao L Q, Leung J K, Yamamoto H, *et al*. Identification of P311 as a potential gene regulating alveolar generation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2006, **35**(1): 48-54
- [4] Studler J M, Glowinski J, Levi-Strauss M. An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood. *Eur J Neurosci*, 1993, **5**(6): 614-623
- [5] Taylor G A, Hudson E, Resau J H, *et al*. Regulation of P311 by met-hepatocyte growth factor/scatter factor and the ubiquitin/proteasome system. *J Biol Chem*, 2000, **275**(6): 4215-4219
- [6] Ross J W, Ashworth M D, Hurst A G, *et al*. Analysis and characterization of differential gene expression during rapid trophoblastic elongation in the pig using suppression subtractive hybridization. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003, **14**(1): 23-26
- [7] Motamed K. SPARC (osteonectin/BM-40). *Int J Biochem Cell Biol*, 1999, **31**(12): 1363-1366
- [8] Ghosh I, Hamilton A D, Regan L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, 2000, **122**(23): 5658-5659
- [9] Hu C D, Chinenov Y, Kerppola T K. Visualization of interactions among bZip and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002, **9**(4): 789-798
- [10] Boyden E A. Development and growth of the airways//Hodson W A. *Development of The Lung*. New York: Marcel Decker, 1977: 3-35
- [11] Bostrom H, Willetts K, Pekny M, *et al*. PDGF-A signaling is a critical event in lung alveolar myofibroblast development and alveogenesis. *Celf*, 1996, **85**(6): 63-73
- [12] Weinstein M, Xu X, Ohyama K, *et al*. FGFR-3 and FGFR-4 function cooperatively to direct alveogenesis in the murine lung. *Development*, 1998, **125**: 3615-3623
- [13] Kaartinen V, Voncken J W, Shuler C, *et al*. Abnormal lung development and cleft palate in mice lacking TGF-beta 3 indicates defects of epithelial-mesenchymal interaction. *Nat Genet*, 1995, **11**(4): 415-421
- [14] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, *et al*. P311 induces a TGF-beta1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype. *J Clin Invest*, 2002, **110**(9): 1349-1358
- [15] Fujitani M, Yamagishi S, Che Y H, *et al*. P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve. *J Neurochem*, 2004, **91**(3): 737-744
- [16] Erhardt J A, Pittman R N. Ectopic p21WAF1 expression induces differentiation-specific cell cycle changes in PC12 cells characteristic of nerve growth factor treatment. *J Biol Chem*, 1998, **273**(36): 23517-23523
- [17] Paliwal S, Shi J, Dhru U, *et al*. P311 bindings to the latency associate protein and downregulates the expression of TGF - beta1 and TGF - beta2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315**(4): 1104-1109
- [18] Shi J, Badri K R, Choudhury R, *et al*. P311-induced myofibroblasts exhibit ameoid-like migration through RalA activation. *Exper Cell Res*, 2006, **312**(17): 3432-3442
- [19] Mariani L W, McDonough S, Hoelzinger D B, *et al*. Identification and validation of P311 as a glioblastoma invasion gene using laser capture micro-dissection. *Cancer Res*, 2001, **61**(10): 4190-4196
- [20] Fang M Z, Liu C, Song Y, *et al*. Overexpression of gastrin-releasing peptide in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*, 2004, **25**(6): 865-871
- [21] Termine J D, Kleinman H K, Whitson S W, *et al*. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell*, 1981, **26**(1): 99-105
- [22] Mann K, Deutzman R, Paulsson M, *et al*. Solubilization of protein BM-40 from a basement membrane tumor with chelating agents and evidence for its identity with osteonectin and SPARC. *FEBS Letters*, 1987, **218**: 167-172
- [23] Mason I J, Murphy D, Munke M, *et al*. Developmental and transformation-sensitive expression of the Sparc gene on mouse chromosome 11. *EMBO J*, 1986, **5**: 1831-1837
- [24] Henderson J E. Nuclear targeting of secrete proteins. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, **129**: 1-5

- [25] Barker T H, Baneyx G, Cardo-Vila M, *et al.* SPARC regulates extracellular matrix organization through its modulation of integrin-linked kinase activity. *J Biol Chem*, 2005, **280**: 36483–36493
- [26] Gooden M D, Vernon R B, Bassuk J A, *et al.* Cell cycle-dependent nuclear location of the matricellular protein SPARC: association with the nuclear matrix. *J Cell Biochem*, 1999, **74**: 152–167
- [27] Yan Q, Weaver M, Perdue N, *et al.* Matricellular protein SPARC is translocated to the nuclei of immortalized murine lens epithelial cells. *J Cell Physiol*, 2005, **203**: 286–294
- [28] Kzhyshkowska J, Workman G, Cardo-Vila M, *et al.* Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC. *J Immunol*, 2006, **176**: 5825–5832
- [29] Rempel S A, Golembieski W A, Ge S, *et al.* SPARC: a signal of astrocytic neoplastic transformation and reactive response in human primary and xenograft gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1998, **57**: 1112–1121
- [30] Golembieski W A, Ge S, Nelson K, *et al.* Increased SPARC expression promotes U87 glioblastoma invasion *in vitro*. *Int J Devl Neurosci*, 1999, **17**: 463–472
- [31] McDonough W S, Tran N L, Berens M E. Regulation of glioma cell migration by serine-phosphorylated P311. *Neoplasia*, 2005, **7**(9): 862–872
- [32] Wendel D P, Taylor D G, Albertine K H, *et al.* Impaired distal airway development in mice lacking elastin. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, **23**(3): 320–326
- [33] Murphy-Ullrich J E, Lane T F, Pallero M A, *et al.* SPARC mediates focal adhesion disassembly in endothelial cells through a follistatin-like region and the Ca²⁺-binding EF-hand. *J Cell Biochem*, 1995, **57**(2): 341–350
- [34] Reed M J, Puolakkainen P, Lane T F, *et al.* Differential expression of SPARC and Thrombospondin-1 in wound repair: immunolocalization and *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem*, 1993, **41**: 1467–1477
- [35] Strandjord T P, Sage E H, Clark J G. SPARC participates in the branching morphogenesis of developing fetal rat lung. *Am J Cell Mol Biol*, 1995, **13**(3): 279–287

Screening and Identification of P311 Binding Proteins*

ZHOU Xiao-Hai, LIU Yu, HU Nai-Yue, WANG Chun-Yan, ZHAO Li-Qing**

(Life Science College, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract Alveoli are the key functional units of the lungs where gas exchange take place. But the regulation of alveolar morphogenesis is not completely understood. The basic strategies of mammalian lung development can be generally divided into two stages: epithelial branching morphogenesis, and septal formation. P311 was identified previously as a gene that specifically expressed during lung septal formation. In order to further explore the potential effects of P311 during lung development, a yeast two-hybrid screen was performed to identify P311 interacting partners. A recombinant P311 fused with the Gal4 DNA binding domain was used as the bait protein to screen a cDNA library constructed from developing mouse lungs. After confirmed by coimmunoprecipitation (CoIP) and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments, SPARC (secreted protein, acidic and rich in cysteine) was identified as a P311 binding protein. In further studies, it was found that SPARC showed similar temporal expression pattern with P311 during lung development. Double immunostaining indicated SPARC and P311 colocalized in alveolar epithelium and myofibroblast in P11 mouse lung sections. Taken together, the data suggested that P311 might have a close connection with SPARC on its influences on lung development.

Key words lung development, P311, SPARC, yeast two-hybrid screen

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00283

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30770462) and The Natural Science Foundation of Tianjin (07JCYBJC08100).

**Corresponding author.

Tel: 86-22-23500767, E-mail: lqzhao@nankai.edu.cn

Received: August 4, 2010 Accepted: September 13, 2010