

肿瘤及胚胎组织特异表达蛋白 CEP65 相互作用蛋白的筛选与鉴定*

靳更林 孙玉宁 张建芝 马泓 孟麟 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 CEP65 蛋白 (cancer and embryo expression protein 65) 为肿瘤单克隆抗体 3H11 所识别的抗原分子, RT-PCR 及 RNA 印迹检测表明, CEP65 蛋白表达于肿瘤及胚胎组织. 为了研究 CEP65 在肿瘤发生中的作用机制, 以 CEP65 为诱饵蛋白, 通过酵母双杂交体系筛选人胚胎组织 cDNA 表达文库. 从 5.2×10^6 个克隆中筛选得到 14 个阳性克隆, 并在酵母体系中通过不同方法得到验证. 在此基础上, 选取在双杂交中作用明显的 51 号克隆, 与 CEP65 作 GST pull-down 实验, 结果证明, CEP65 与 51 号阳性克隆蛋白确能相互作用. 生物信息学分析发现, CEP65 与 51 号阳性克隆蛋白相互作用, 可能通过 WW 结构域或者蛋白激酶 C 对细胞的增殖与分化起到调节作用.

关键词 CEP65, 单克隆抗体, 酵母双杂交体系, 相互作用

学科分类号 Q71

McAb 3H11 是我所在 20 世纪 80 年代用不同肿瘤细胞经贯序免疫小鼠制备的抗肿瘤单克隆抗体, 它可与肝癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、胃癌等多种肿瘤组织特异反应^[1], 它的同位素标记物已成功试用于临床肿瘤显像及放射免疫导向手术^[2]. 为阐明 3H11 对应抗原在肿瘤发生中的作用机制, 我们用 McAb3H11 作探针, 通过筛选肿瘤细胞 cDNA 表达文库, 并利用 RACE 和巢式 PCR 等一系列技术, 成功地克隆了 McAb 3H11 对应抗原全长 cDNA (2 110 bp), 该 cDNA 阅读框架为 1 767 个核苷酸, 编码 589 个氨基酸, 其表达产物能被 McAb 3H11 特异识别, 并能阻断 McAb 3H11 与肿瘤细胞的结合. RT-PCR 及 RNA 印迹初步检测表明, 该基因仅表达于肿瘤及胚胎组织 (命名为 cancer and embryo expression protein 65 CEP65), 提示 CEP65 的功能可能同细胞增殖或分化有关^[3]. 生物信息学分析表明, 该基因为一全新基因 (注册号: AF317887), 由 17 个外显子组成, 定位在 12q21, 氨基酸序列分析未见明显功能区. 为了进一步研究 CEP65 在肿瘤发生中的作用机制, 我们通过酵母双杂交体系, 分离和鉴定了与 CEP65 蛋白相互作用的蛋白质分子, 为后续工作奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

大肠杆菌 (*E. coli*) JM109、真核表达质粒 (pcDNA3.1, pEBG) 以及抗 GST 单克隆抗体为本

室保存. 酵母 (*S. cerevisiae*) AH109、穿梭质粒 (pGBKT7, pTD1-1, pVA3-1, pCL1 和 pLAM5'-1)、抗 DNA 结合结构域 (DNA binding domain DBD) 单克隆抗体、酵母培养基均购自 Clontech 公司. 以 pACT2 为载体的人胚胎组织 cDNA 表达文库为 Clontech 公司产品, 由北京大学临床肿瘤学院张之谦老师惠赠. 抗 Myc 单克隆抗体由海军总医院王炎教授惠赠. 限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶等购自 New England Biolabs 公司. 三氨基三唑 (3-amino-1,2,4-triazole, 3-AT) 和所需氨基酸购自 Sigma 公司. DNA 合成及测序由上海生物工程公司完成. COS₇ 细胞购自中国医学科学院细胞库.

1.2 真核表达质粒的构建

1.2.1 CEP65 酵母表达质粒的构建: 根据酵母穿梭表达质粒 pGBKT7 序列及 CEP65 cDNA 的阅读框架, 设计合成扩增 CEP65 的 5' 端正义引物 S10 (5' CGCGGATCCCCAAAGATGAAAGCTCAAGAA 3') 和 3' 端反义引物 R12 (5' ATACGTC GACTCAAAGATTCTTCTGCA 3'), 在引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Sal* I 位点. 以 S10 和 R12 为引物, PCR 扩增 CEP65, 产物经 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切后插入到已经

* 国家自然科学基金资助项目 (30270685), 北京市科技计划重大项目 (H02022002310) 和北京大学基因中心项目

** 通讯联系人.

Tel: 010-66160960, Fax: 010-66175832

E-mail: cshou@vip.sina.com

收稿日期: 2003-10-29, 接受日期: 2004-02-28

相应酶切处理的 pGBKT7 中, 构建 CEP65 酵母表达质粒 pGBKT7-P65.

1.2.2 含 Myc 标签的哺乳动物细胞通用表达质粒的构建: 酵母双杂交筛选到的阳性克隆, 通常需要在哺乳动物细胞中通过免疫共沉淀等方法进一步验证, 为此我们首先合成编码 Myc 标签的两条 DNA 互补链 (正义链 5' AATTCGCCACCATGGAGCA-AAAAGTATTTCGGAAGAGGACTTGCTCGTTCCGC-GTGGATCCCGGGC 3', 反义链 5' TCGAGCCCCGG-ATCCACGCCGAACGAGCAAGTCCTCTCCGAAATC-AGT TTTTGCTCCATGGTGGCG 3'), 两条链退火后分别能在 5' 端和 3' 端自动形成 *EcoR* I 和 *Xho* I 的粘性末端, 并在链中引入 *Bam*H I 和 *Sma* I 位点, 两条链在 95℃ 变性 10 min, 缓慢退火后, 克隆到经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切处理的 pcDNA3 中. 从文库获得的阳性克隆用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后, 将相应片段重组到该质粒中, 从而和 Myc 标签融合表达.

1.2.3 GST-CEP65 融合蛋白真核表达质粒的构建: pEBG 为 GST 的真核表达质粒, 将经 *Not* I 酶切的 pEBG 和 *Sal* I 酶切的 pGBKT7-P65 用常规方法补平, 然后用 *Bam*H I 酶切, 凝胶电泳回收 pEBG 质粒 DNA 和 CEP65 片段, DNA 连接酶连接, 构建能在哺乳动物细胞中表达 GST-CEP65 融合蛋白的质粒 pEBG-P65.

1.3 CEP65 相互作用蛋白的筛选

1.3.1 筛选前的准备

复苏 AH109 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 AH109 的表型. 将构建的“诱饵”载体 pGBKT7-P65 按 Clontech 公司产品说明, 小量 LiCl 转染 AH109 酵母细胞, 涂布相应的酵母培养平板, 观察 CEP65 表达对 AH109 生长的影响, 并排除 pGBKT7-P65 的自主激活活性. 同时收集转染了 pGBKT7-P65 的酵母细胞, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 转至硝酸纤维素膜上, 以抗 DNA 结合结构域单克隆抗体为一抗, 通过蛋白质印迹检测 CEP65 是否在 AH109 中表达.

按照说明书, 测定胚胎 cDNA 表达文库的滴度, 根据所测滴度铺相应数目的培养平板 (每个直径为 150 mm 平皿中涂布 3×10^4 个克隆). 30℃ 培养 36~48 h 后, 收集菌落, 碱变性提取质粒并通过 PEG 进行纯化. 以文库质粒为模板, 用 CEP65 特异序列为引物, PCR 扩增, 检测胚胎组织 cDNA 表达文库中是否有 CEP65 的表达.

1.3.2 互作蛋白的筛选: 以转染 pGBKT7-P65 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 20 个 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+ 3-AT 培养平板 (直径 135 mm), 按照浓度梯度涂布 3 个 SD/-Trp/-Leu 培养平板, 检测转染效率. 同时作相应的阴性与阳性对照. 培养平板 30℃ 培养 6 天后贴膜, 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, 编号后重新划线于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+ 3-AT 培养平板, 30℃ 培养, 记录克隆出现时间. 当克隆菌落长到直径约 2 mm 时, 贴膜, 进行 β -半乳糖苷酶活性分析, 记录显色时间. 挑取克隆出现不晚于 60 h、显色时间不长于 3 h 的菌落, 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' TACCACTA-CAATGGATG 3', 反义链 5' GAACTTGCGGGGT-TTTC 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 JM109, 提取、纯化质粒.

1.3.3 酵母体系对阳性克隆的验证: His⁺、LacZ⁺、Ade⁺ 克隆质粒, 分别转染单纯酵母 AH109 细胞及转染有 pGBKT7 或 pLAM'5-1 或 pGBKT7-P65 的酵母 AH109 细胞, 涂布相应的条件培养平板, 30℃ 培养. 根据培养表型去除相应的假阳性克隆.

1.4 通过共沉淀对 CEP65 互作蛋白的进一步验证
将通过酵母水平验证的阳性克隆进行测序分析, 并将其克隆到前述的含 Myc 标签的哺乳细胞表达质粒中, 将该质粒与 pEBG-P65 用 DEAE 法共转染 COS7 细胞, 48 h 后回收细胞, 裂解液裂解细胞^[4], 提取总蛋白质, 4℃ 与 GST 珠子摇动孵育过夜. 次日回收珠子, 洗涤后行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 分别用 Myc 及 GST 抗体进行蛋白质印迹分析.

2 结 果

2.1 诱饵 pGBKT7-P65 载体的构建

我们利用 CEP65 两端的特异引物扩增 CEP65 的全长 cDNA 编码片段, 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 酶切

消化后将其重组到 pGBKT7 中, 酶切鉴定及测序分析表明, CEP65 的插入方向及阅读框架均无误 (酶切鉴定见图 1a, 测序图谱略)。为了确证构建的 pGBKT7-P65 能在酵母中得到正确表达, 我们将 pGBKT7-P65 转染 AH109, pGBKT7 转染 AH109 作对照, 用 DNA 结合结构域单克隆抗体作蛋白质印迹分析, 结果检测到了约 85 ku 的 CEP65 与 DNA 结合结构域的融合表达带, 证明 CEP65 能在酵母中得到表达 (图 1b)。

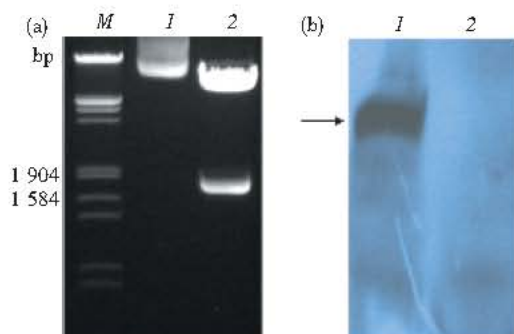


Fig. 1 pGBKT7-P65 construction and its expression in yeast

(a) Endonuclease analysis of pGBKT7-P65. M: marker; I: No enzyme; 2: Cut by *Bam*HI/*Sal*I. (b) Expression of pGBKT7-P65 in yeast cell AH109. I: pGBKT7-P65 in yeast cell AH109; 2: Yeast cell AH109 without transfection.

2.2 CEP65 的表达对酵母细胞影响的检测

当 pGBKT7-P65 转染酵母 AH109 后发现, 克隆菌落的大小、颜色正常。可见 CEP65 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-P65 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, 我们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 CEP65 互作蛋白的筛选

用经固相化扩增的文库质粒 DNA 为模板, 我们成功地扩增出 CEP65 的全长 cDNA 片段, 说明 CEP65 在胚胎组织中确有表达。在此基础上, 我们取 35 μ g 胚胎 cDNA 表达文库质粒, 转染含 pGBKT7-P65 的 AH109 酵母细胞, 转染产物涂布于 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+ 3-AT (5 mmol/L) 平板, 30℃ 培养 6 天, 转染效率约为 1.5×10^5 个/ μ g。对在条件培养平板上长出的克隆进行 β -半乳糖苷酶活性分析, 显色 8 h 后, 挑取 107 个菌落较大的 His⁺、LacZ⁺、Ade⁺ 克隆 (图 2), 重新划线在 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+ 3-AT (5 mmol/L) 平板上 30℃ 培养, 当培养 60 h 后, 仍未观察到菌落的克隆, 视为假阳性或作用较弱而被淘汰。当长出的菌落直径约有 2 mm 时再进行 β -半乳糖苷酶活性分析, 以显色时间不超过 3 h 的克隆为阳性克隆。通过选择, 我们共得到 64 株克隆。

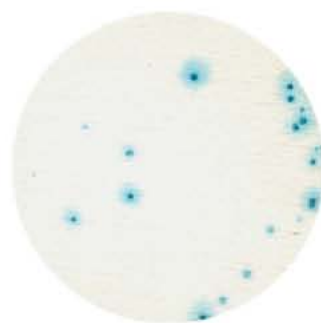


Fig. 2 β -galactosidase activity assay results of library screening

The yeast reporter strain used is AH109, assay is taken after 6 days of growth at 30℃.

2.4 对获得的克隆进行酶切分类

提取上述所选克隆的质粒, 以该质粒为模板, 文库插入片段两侧的特异序列为引物, 通过 PCR 扩增文库的插入片段 (部分克隆的扩增结果见图 3)。扩增产物用 *Msp*I 进行酶切消化, 1.8% 琼脂糖凝胶电泳分析 (图 4)。根据酶切所放出的条带特征, 我们将 64 株 His⁺、LacZ⁺、Ade⁺ 克隆分成了 24 类。每一类中选取一株克隆 DNA, 转化大肠杆菌 JM109, 然后涂布 Amp⁺ LB 培养板。由于 pGBKT7-P65 为 Kana⁺ 抗性, 因不能在 Amp⁺ LB 培养基中生长, 而被去除, 只有转化了文库质粒的菌落才能生长 (文库质粒为 Amp 抗性), 这样我们就

获得了纯化的阳性单克隆质粒。将这些纯化的质粒用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切消化, 释放出来的片段大小与 PCR 扩增的结果一致 (图 5)。

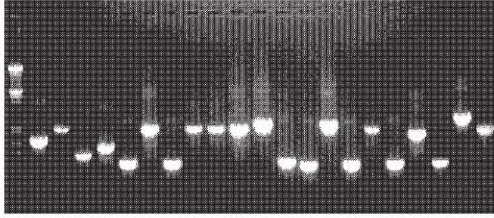


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products from the yeast plasmid inserts

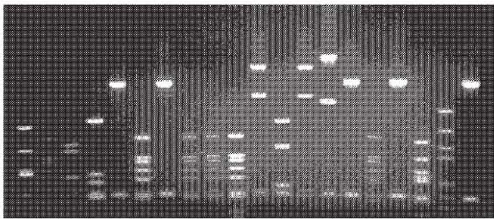


Fig. 4 Analysis of yeast plasmid inserts PCR products with *Msp* I

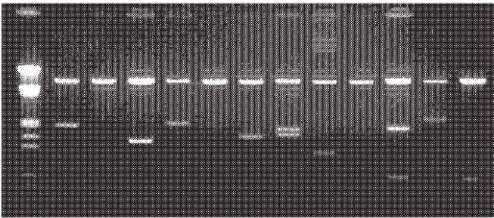


Fig. 5 Identification of yeast plasmid with *Bam*H I / *Xho* I digestion

2.5 酵母水平对获得的克隆进行假阳性排除

将获得的克隆质粒转染 AH109, 并且将这些质粒分别和 pGBKT7、pLAMB5'-1 以及 pGBKT7-P65 共转染 AH109 酵母细胞, 将转染产物分别涂布于 SD/-Leu、SD/-Trp/-Leu 培养平板上。当克隆长出后, 再挑取克隆分别涂布于 SD/-Leu/-His/-Ade/+3-AT (5 mmol/L)、SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/+3-AT (5 mmol/L) 平板上。这时, 只有克隆质粒与 pGBKT7-P65 共转染的实验组在这种培养平板上能长出克隆菌落, 而其他处理组不能长出克隆菌落的为阳性克隆, 否则为假阳性。通过检验发现, 9、57 号两类文库质粒转染 AH109 酵母细胞, 不需诱饵载体的存在即可激活报告基因的转录; 36、55、

67、90、100 号 5 类克隆与 pGBKT7 空载体共转染 AH109 酵母细胞, 即可激活报告基因的转录; 14、19、26 号 3 类克隆与 pLAMB5'-1 共转染 AH109 酵母细胞, 也可激活报告基因的转录。上述克隆均被视为假阳性而被淘汰。最后我们获得了 14 株在酵母系统中验证为阳性的克隆。

2.6 CEP65 互作蛋白在哺乳动物细胞中进一步验证

在酵母双杂交中获得的阳性克隆, 必须通过其他体系进行进一步的验证。我们将 CEP65 重组到 pEBG 中与 GST 融合表达, 将酵母双杂交筛选中反应明显的 51 号阳性克隆的插入片段重组到 Myc 标签表达质粒中。将上述两种质粒共转染 COS₇ 细胞, 然后用 GST 珠子做 GST pull-down, 分别用抗 GST 和抗 Myc 抗体做蛋白质印迹分析 (图 6), 结果发现, 通过 GST 的珠子能将 51 号插入片段与 Myc 的融合蛋白沉淀下来, 这说明 CEP65 与 51 号克隆蛋白在哺乳细胞中确实存在着相互作用。

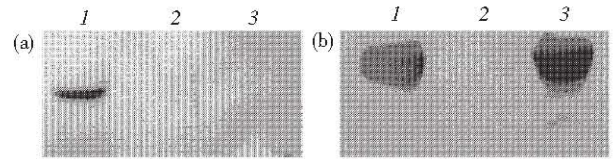


Fig. 6 The results of GST pull-down assay analyzing the interaction between CEP65 and the 51st clone

(a) Anti-Myc MAb as the 1st antibody. 1: pEBG-P65/pcDNA3-51; 2: pEBG/pcDNA3-51; 3: pEBG-P65/pcDNA3. (b) Anti-GST MAb as the 1st antibody. 1: pEBG-P65/pcDNA3-51; 2: pEBG/pcDNA3-51; 3: pEBG-P65/pcDNA3.

3 讨 论

酵母双杂交技术作为发现和研究蛋白质与蛋白质之间相互作用的重要技术平台, 在近几年来得到了广泛运用。通过酵母双杂交筛选到的相互作用蛋白, 往往与诱饵蛋白功能密切相关, 彼此相互调节, 共同参与某些生理或病理的过程, 这样可以加深对各种生物分子机理的理解, 特别是对疾病相关基因作用机制的理解^[5]。酵母双杂交体系虽有很多优势^[6], 但是在实际应用中也存在着不少问题, 尤其是假阳性的问题。在本研究中, 我们设置了多组实验排除了那些直接和报告基因启动子结合, 以及那些直接与 DNA 结合结构域结合, 而使报告基因得以转录等的假阳性克隆, 但对其他原因引起的假阳性就难以确定了。例如, 报告基因的不同评判体系, 对同一蛋白质相互作用能力的评判也不尽相同^[7], 这就可能造成假阳性。又如诱饵与 DNA 结

合结构域融合蛋白和文库与激活结构域融合蛋白,有时也能形成特异的空间构象而相互结合,但是,在生理状态下,诱饵蛋白与文库蛋白的这种构象并不存在,这种由于与 DNA 结合结构域或激活结构域融合表达后而造成的假阳性也不易去除。另外,无论是诱饵与 DNA 结合结构域在酵母中的融合表达,还是文库蛋白与激活结构域在酵母中的融合表达,都会打破原有酵母细胞内的平衡状态,从而引起一些基因表达水平的改变。这样,即使诱饵与文库蛋白并不直接相互作用,但是由于它们引起的酵母体内基因表达水平的改变,使得报告基因得以转录,进而造成难以辨别诱饵蛋白依赖的假阳性。因此,从酵母双杂体系中获得阳性克隆必需通过其他体系进行进一步的验证,以确认它们间的相互作用。目前比较认同的方法有免疫共沉淀以及 GST Pull-down 等方法。值得注意的是:这些方法有时会产生假阴性结果。这是因为,无论何种方法,往往会在表达诱饵蛋白和筛选文库蛋白时给它们加上一个标签,以便后面的检测,而有时正是这些标签影响了诱饵蛋白或文库蛋白的构象,而导致二者之间不能相互作用。对于这种情况,通过更换标签通常就能解决问题。

CEP65 是我们克隆的新基因, RNA 印迹和 RT-PCR 实验初步发现该基因主要表达于恶性组织细胞中,在胎盘组织中亦有表达。将其原核表达产物作为抗原免疫哺乳动物(小鼠、兔子)制备抗体的过程中发现:CEP65 的免疫原性很低。因此我们推测,该抗原可能是哺乳动物胚胎生长的表达调控蛋白在肿瘤中恢复表达,可能与细胞快速增殖和低分化相关,近年来的研究也证明了的确存在这样的分子^[8]。我们以 CEP65 为诱饵,筛选胚胎组织 cDNA 表达文库,并通过哺乳细胞中的 GST Pull-down 实验证实,CEP65 与 51 号阳性克隆相互作用。通过 NCBI 中 BLAST 软件分析发现,51 号克隆与未知功能的蛋白(编号为 KIBRA)高度同源。最近,又有研究者从鼠的肿瘤组织中筛选到一个 cDNA 克隆(AAH06733),同 51 号克隆也有很高的同源性,它可能是 51 号克隆的鼠源同源基因。生物信息学方法对 KIBRA 蛋白进行分析发现,KIBRA 定位在 5q34 ~ 5q35,含有两个 WW 结构域、蛋白激酶 C (PKC) 保守序列 2 类似结构域以及一个谷氨酸富集区。WW 结构域是已知最小的球型结构域,它通过与脯氨酸富集区域结合而对相应蛋白质的功能进行调节,Kremerskothen 等^[9]通过

筛选小肽库发现,KIBRA 的第一个 WW 结构域可以和 RxPPxY (x 代表任意氨基酸) 特异结合。在许多调控蛋白降解、基因转录、RNA 剪接的蛋白质中都有 WW 结构域的存在,它可能在一些特殊的信号通路上起着重要作用。蛋白激酶 C (PKC) 保守序列 2 结构域是依赖钙离子的磷脂/蛋白质的结合位点,它经常存在于信号转导的蛋白质分子中。PKC 能增强特异基因的转录,其主要通过两种途径发挥作用:一是 PKC 激活某些蛋白激酶级联系统,使转录调节因子磷酸化并活化;二是 PKC 诱导某些抑制蛋白质磷酸化,释放出有活性的转录调节蛋白,进入核结合于特异基因的调控区从而发挥作用。研究表明,从巴豆油中提取的多环醇衍生物佛波脂(phorbol esters)可以使 PKC 产生持久活性,而佛波脂是一种致癌剂,由此可提示,PKC 可能对于细胞分裂和增殖具有重要意义^[10]。以上分析表明,CEP65 很可能与 51 号阳性克隆蛋白相互作用,通过 WW 结构域或者蛋白激酶 C 对细胞增殖与分化起到调节作用,而 CEP65 到底参与了哪些信号通路而发挥作用的研究工作正在进行之中。

参 考 文 献

- 1 Shou C, Li C, Meng L, *et al.* Construction, expression and activity of a single chain antibody to gastric cancer cells. *Natl Med J China*, 1997, **77** (6): 434 ~ 438
- 2 Xu G W, Zhang M Y, Liu B G. Radioimmunoguided surgery in gastric cancer using ¹³¹I labeled monoclonal antibody 3H11. *Semin Surg Oncol*, 1994, **10** (2): 88 ~ 94
- 3 Chen D, Shou C. Molecular cloning of a tumor-associated antigen recognized by monoclonal antibody 3H11. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **280** (1): 99 ~ 103
- 4 Zheng L, Schickling O, Peter M E, *et al.* The death effector domain-associated factor plays distinct regulatory roles in the nucleus and cytoplasm. *J Biol Chem*, 2001, **276** (34): 31945 ~ 31952
- 5 余 鹰,朱诗国,张必成,等. 应用酵母双杂交系统筛选 BRD7 相互作用的蛋白. *中国科学 (C 辑)*, 2002, **32** (2): 151 ~ 158
- 6 Yu Y, Zhu S G, Zhang BC *et al.* *Sci Chin (C)*, 2002, **32** (2): 151 ~ 158
- 6 Serebriiskii H G, Khazak V, Golemis E A. Redefinition of yeast two-hybrid system in dialogue with changing priorities in biological research. *BioTechniques*, 2001, **30** (3): 634 ~ 655
- 7 Serebriiskii H, Estojak J, Berman M, *et al.* Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. 2000, **28** (2): 3228 ~ 3236
- 8 Tsai R, McKay R. A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes Dev*, 2002, **16** (23): 2991 ~ 3003
- 9 Kremerskothen J, Plaas C, Buther K, *et al.* Characterization of KIBRA, a novel WW domain-containing protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **300** (4): 862 ~ 867
- 10 王林芳,杨克恭. 蛋白质与核酸. 北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社,1998. 152 ~ 153

Wang L F, Yang K G. *Protein and Nucleic Acid*. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical University Press, 1998. 152 ~ 153

Searching for Interaction Partners of Cancer and Embryo Expression Protein CEP65 by Yeast Two-hybrid Screening*

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

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

Abstract Cancer and embryo expression protein 65 (CEP65) specifically reacted with Mab3H11, which can bind specifically to different cancer cells from different tissues. Northern blot and RT-PCR showed that the mRNA of CEP65 was extensively distributed in embryonic tissue and different cancerous tissues, but not in corresponding normal tissues. In order to study the function of CEP65 in tumor development, using the yeast two-hybrid system, with CEP65 as a bait, a placenta cDNA expression library was screened, and fourteen positive clones was isolated in yeast from 5.2×10^6 clones. To ascertain the interaction, the 51st clone which interacted more intensive with CEP65 in yea was selected to do GST pull-down assay with CEP65. The result indicated that CEP65 also interacted with the 51st clone *in vitro*. Bioinformatics analysis showed the interaction between CEP65 and the 51st clone maybe regulate the cell differentiation and proliferation by WW domain or protein kinase C.

Key words CEP65, molecular antibody, yeast two-hybrid system, interaction

* This work was supported by grants from The Natural Sciences Foundation of China (30270685), The Funds for Major Science and Technology Research of Beijing (H02022002310) and The Funds from Peking University Gene Center.

** Corresponding author. Tel: 86-10-66160960, Fax: 86-10-66175832, E-mail: cshou@vip.sina.com

Received: October 29, 2003 Accepted: February 28, 2004