

(*Institute of Materia Medica, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430074, China*).

Abstract A water-soluble carboxymethylated derivative (CM-HNP) of Hunai polysaccharide (HNP) from the sclerotia of *Pleurotus tuber-regium* (Fr.) Sing. was prepared by the reaction of HNP with monochloroacetic acid. The antioxidative activities of CM-HNP were also studied. The results showed that CM-HNP can protect liver mitochondria from lipid

peroxidation induced by Fe^{2+} -Vit C including the increase of TBARS contents, the swelling of mitochondria and the decrease of membrane fluidity with a dosage-effect manner. In addition, CM-HNP can effectively scavenge O_2^- generated by the self-oxidation of pyrogallol acid.

Key words Hunai polysaccharide, antioxidation, carboxymethylation

IGF 受体 1 分子上 IGF-1 结合位点的探讨

杜清友 刘宝英 薛沿宁 王会信 丁红梅

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 为了探讨胰岛素样生长因子受体 1 (IGF-R1) 分子上的胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 结合位点, 建立了研究 IGF-1 与 IGF-R1 相互作用的酵母双杂交模型; 利用基因体外定点突变的方法, 构建了 7 种 IGF-R1 突变体; 然后通过报告基因活性的定量分析, 在酵母双杂交模型中检测了 IGF-1 与各种 IGF-R1 突变体之间相互作用的大小, 初步确定了 IGF-R1 分子中 IGF-1 的结合位点, 并且 IGF-R1 分子上 N237、T238 在与 IGF-1 结合中起着重要作用。

关键词 胰岛素样生长因子, IGF 受体, 酵母双杂交系统

学科分类号 R373

胰岛素样生长因子 (IGFs) 是一类多功能的细胞增殖因子, 具有广泛的生物学效应, 在胚胎和个体发育过程中起着重要作用^[1]。IGF-1 是由 70 个氨基酸残基组成的单链多肽, 分子质量在 7.5 ku 左右, 含有 3 个链内二硫键。IGF 通过细胞表面两种类型的 IGF 受体 (IGF-R1, IGF-R2) 发挥生物学作用。IGF-1 与 IGF-R1 相互作用的研究, 对于认识 IGF-1 的分子作用机理和相关药物的研制具有重要意义, 因而引起人们的关注。IGF-1 的空间结构已经清楚, 它与 IGF-R1 结合的位点以及关键氨基酸残基的组成也已确定^[2]。最近, IGF-R1 分子的晶体结构得以阐明^[3], 初步确定胞外区 α 链上的 Cys 富含区即 His223 与 Met274 之间为 IGF-1 的结合区域, 但 IGF-1 的结合位点或者结合区中的关键氨基酸组成还不清楚。

酵母双杂交技术 (yeast two-hybrid system) 是一种直接在细胞内检测蛋白质相互作用的分子遗传学方法, 与以往的各种生化手段比较明显的优势在于, 不必经过繁杂的蛋白质纯化过程, 而且其灵敏

度很高, 从而为研究蛋白质的相互作用提供了很大的方便, 特别是用来确定蛋白质之间相互作用的位点^[4]。酵母双杂交技术已成功地用于分析 IGF-1 与 IGF-R1 的相互作用, 并探讨了 IGF-1 分子上与 IGF-R1 相互作用的位点^[5]。我们曾利用噬菌体表面展示技术推断出 IGF-R1 分子上可能的 IGF-1 结合位点^[6], 在此基础上, 对 IGF-R1 分子中 IGF-1 结合位点的氨基酸定点突变, 获得 IGF-R1 突变体, 在酵母双杂交模型中探讨了 IGF-R1 突变体与 IGF-1 的相互作用, 分析了各个氨基酸残基的作用大小。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: *E. coli* JM109 为本室保存; 酵母菌 Y153 由 Joslin Diabetes Center 的 Kohjiro Veki 博士惠赠; 酵母表达载体 pGBT9、pACT2 为

Tel: (010) 66933333

收稿日期: 1999-07-22, 修回日期: 1999-11-16

Clontech 产品, 含有完整的人 IGF-R1 cDNA 基因的质粒 pCVN-IGFR1 由 Thomas Jefferson University 的 Baserga 教授惠赠; 含有人 IGF-1 成熟肽基因的质粒 pALTER-IGF1 为本室构建。

1.1.2 工具酶及试剂: *EcoR* I、*Bam* H I、*Sac* II 及 T4DNA 连接酶购自 Promega 公司; 体外定点突变试剂盒及质粒小量提取试剂盒均为 Promega 公司产品; 酵母提取物和胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 酵母菌培养基购自 Clontech 公司; 邻硝基苯- β -D-半乳糖苷 (ONPG), X-gal, PEG 4000, 二甲基亚砜 (DMSO) 为 Sigma 公司产品; 鲑鱼精 DNA, β -巯基乙醇为 Serva 公司产品; 其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 寡核苷酸引物: IGF-R1 突变引物 1 为 CTGCCCCCGACACCTAC (Asn237 $\rightarrow$ Asp), 引物 2 为 CCGCCCAACGCCTACAGGT (Thr238 $\rightarrow$ Ala), 引物 3 为 AGGTTTGAGGGCGCGCTGTGTGAC (Trp244 $\rightarrow$ Ala), 引物 4 为 AGGTTTGAGGGCTGGGCTGTGTGGACCGTGA (Arg245 $\rightarrow$ Ala), 引物 5 为 CCTACAGGTTTGAGGGCGCGCGCTGTGTGGACCGTGACT (Trp244 $\rightarrow$ Ala, Arg245 $\rightarrow$ Ala)。以上突变寡核苷酸引物均由宝生物工程 (大连) 有限公司合成并纯化 (C18 纯化)。测序引物: T7 启动子测序引物 (20mer) 为 Promega 公司产品; SP6 启动子测序引物 (19mer) 购自华美生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增: 按常规方法进行。52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 共进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 基因操作: 按文献 [7] 进行。

1.2.3 酵母感受态的制备及转化: 采用 LiAc 方法制备和转化, 详细操作见试剂盒说明书。

1.2.4 报告基因的活性分析: 分别以 X-gal、ONPG 为底物定性和定量检测报告基因 β -半乳糖苷酶活性, 按 Clontech 公司的手册进行。

1.2.5 基因定点突变: 按试剂盒说明书进行。

1.2.6 DNA 序列自动测定: 在 ABI 373A 型 DNA 自动测序仪上进行, 由军事医学科学院生物工程研究所完成。

2 结果

2.1 IGF-R1 (1~315) 基因的克隆

根据成熟的 IGF-R1 基因序列以及为了以后便

于克隆并且能够在酵母表达载体 pACT2 中以正确的阅读框架表达杂合体 (AD-IGFR1), 设计 PCR 反应引物, 上游引物为 CGGAATTCGAAATCTGCGGGCCAGGC 含有 *EcoR* I 酶切位点; 下游引物为 CGGGATCCTAAGTAACAGAATCAATGGT 含有 *Bam* H I 酶切位点及终止密码子 TAG。以质粒 pCVN-IGFR1 为模板, 在耐热 DNA 聚合酶的作用下得到一长约 1 000 bp 的扩增产物 (图略), 扩增产物回收后, 用 *EcoR* I / *Bam* H I 进行双酶切, 连接到 pALTER 载体中相应的位点, 提取质粒, 进行 DNA 自动测序。序列分析结果表明 (图略), DNA 序列与文献报道及设计的完全相符。

2.2 酵母双杂交模型的建立

2.2.1 酵母表达质粒 pGBT-IGF1 的构建: 将阅读框架与 GAL4 蛋白一致的 IGF-1 成熟肽基因从克隆载体 pALTER-IGF1, 用 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切回收约 200 bp 的基因片段, 再克隆到 pGBT9 酵母表达载体中, 经酶切鉴定获得重组质粒 pGBT-IGF1 (图 1)。

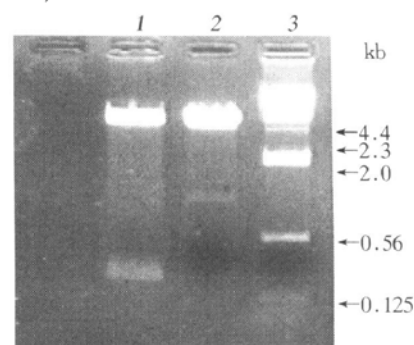


图 1 重组质粒 pGBT-IGF1 的酶切鉴定

1: *EcoR* I + *Bam* H I 双酶切; 2: pACT2 空载体 *EcoR* I + *Bam* H I 双酶切; 3: λ DNA / *Hind* III 分子质量标准。

2.2.2 酵母表达质粒 pACT-IGFR1 的构建: 将获得的 IGF-R1 (1~315) 基因从克隆载体 pALTER-IGFR1, 用 *EcoR* I / *Bam* H I 双酶切回收约 1 000 bp 的基因片段, 再克隆到 pACT2 酵母表达载体中, 经酶切鉴定获得重组质粒 pACT-IGFR1 (图 2)。

2.2.3 IGF-1 与 IGF-R1 相互作用分析: 将重组质粒 pGBT-IGF1、pACT-IGFR1 共转化酵母 Y153, 同时无外源基因的 pGBT9、pACT2 也分别与重组质粒配对转化, 作为阴性对照。结果表明, IGF-1 与 IGF-R1 的共表达在 3.5 h 内使 X-gal 变蓝, 而单独 IGF-1、IGF-R1 杂合体表达均不易使 X-gal 变蓝, 均需要 12 h 以上 (表 1)。至此, 我们采用酵母表达载体 pGBT9 和 pACT2, 建立了研究 IGF-1

3 讨 论

成熟的 IGF-R1 是由两个 α 链和两个 β 链通过链间二硫键结合而成的四聚体, 其中两个 α 链组成了胞外配体结合区, 以双聚体的形式与 IGF-1 发生结合. 实验发现, 可溶性 IGF-R1 受体也可以单体的形式与 IGF-1 发生结合^[8]. 在酵母双杂交实验中, IGF-R1 很可能以单体的形式存在, 但 IGF-1 与受体的结合很容易检测到, 并且它们之间的相互作用具有特异性. 有文献报道^[5,9], 用酵母双杂交技术, 可定性或定量研究 IGF-1 与 IGF-R1 之间的相互作用, 并利用随机突变的方法, 探讨了 IGF-1 分子上与 IGF-R1 相互作用的位点. 我们采用启动子更强的酵母表达载体建立的酵母双杂交模型, 比国外文献报道的更灵敏, 并得到实验的证明. 这为更好地分析 IGF-1 与各种 IGF-R1 突变体相互作用奠定了良好的基础.

我们曾用噬菌体表面展示技术, 推测出 IGF-R1 分子上²³⁷NTxxxxxWR²⁴⁵可能是 IGF-1 的结合位点^[6]. 这里我们对推测的氨基酸定点突变, 然后在酵母双杂交模型中检验蛋白质相互作用的大小. 实验发现, IGF-R1 分子的 N237D 突变体和 T238A 突变体与 IGF-1 的结合力分别下降约 5 倍和 3 倍, 而 W244A 突变体和 R245A 突变体则下降约 0.6 倍, 即使 W244A, R245A 双突变体与 IGF-1 的结合力下降也不到 2 倍, 说明 IGF-R1 分子上的 N237、T238 在与 IGF-1 的结合上起到重要作用, 而 W244、R245 的作用相对较弱. 双突变体 N237D, W244A 和 N237D, R245A 的实验结果也证实了这一结论. 另外, 通过对 IGF-R1 和 Insulin-R 同源性分析, 可以发现, 氨基酸 N237、T238 保守性很低; 而氨基酸 W244、R245 完全相同. 因此, 很可能由于氨基酸 N237、T238 的不同, 导致了 IGF-R1 和 Insulin-R 对 IGF-1 亲和力的差异. IGF-R1 突变体 N237D 中, 氨基酸 N 和 D 的侧链长度相同, 不同之处在于氨基酸 N 的侧链有酰胺基团, 为极性氨基酸; 氨基酸 D 侧链有羧基, 为酸性氨基酸, 当 N237D 突变后, 则导致与 IGF-1 的结合力大幅度下降, 说明在与 IGF-1 的结合上, IGF-R1 分子上第 237 位氨基酸侧链的性质而不是长度起到关键作用. 有关 IGF-R1 分子中氨基酸残基的作用大小, 至今未见文献报道.

参 考 文 献

- 1 John I J, David R C. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocrine Rev*, 1995, **16** (1): 3~34
- 2 Cooke R M, Harvey T S, Campbell I D, *et al.* Solution structure of human insulin-like growth factor I: a nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics study. *Biochemistry*, 1991, **30** (22): 5484~5491
- 3 Thomas P J, Mckern G N, Lou M Z, *et al.* Crystal structure of the first three domains of the type I insulin-like growth factor receptor. *Nature*, 1998, **394** (230): 395~401
- 4 Brachmann R K, Boeke J D. Tag games in yeast: the two-hybrid system and beyond. *Curr Opin Biotechnol*, 1997, **8** (5): 561~568
- 5 Zhu J, Kahn C R. Analysis of a peptide hormone-receptor interaction in the yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (24): 13063~13068
- 6 杜清友, 刘宝英, 薛沿宁, 等. 用噬菌体随机肽库探讨 IGF 受体及结合蛋白上的 IGF-1 结合位点. *军事医学科学院院刊*, 1999, **23** (4): 316~317
- 7 Du Q Y, Liu B Y, Xue Y N, *et al.* *Bullet Acad Milit Med Sci*, 1999, **23** (4): 316~317
- 7 Sambrook C, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 35~60
- 8 Laura S L. Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, **47** (3): 235~253
- 9 Wang J, Riedel H. Insulin-like growth factor I receptor and insulin receptor association with a Src homology-2 domain-containing putative adapter. *J Biol Chem*, 1998, **273** (6): 3136~3139

Analysis of the IGF-1 Binding Site on IGF-receptor 1. DU Qing-You, LIU Bao-Ying, XUE Yan-Ning, WANG Hu-Xin, DING Hong-Mei (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China*).

Abstract In order to define insulin-like growth factor 1 (IGF-1) binding sites on IGF-receptor 1 (IGF-R1), the interactions of IGF-1 and IGF-R1 was verified in the yeast two-hybrid system. Seven mutants IGF-R1 were generated by site-directed *in vitro* mutagenesis, then the interactions of IGF-1 and various mutants IGF-R1 were quantified to identify the gain-of-function mutation in the yeast two-hybrid system by assaying the β -galactosidase activity. The results confirmed the binding data of IGF-1 to IGF-R1 and suggested that the residues N237 and T238 on IGF-R1 play a crucial role in binding to IGF-1.

Key words IGF-1, IGF-R, yeast two-hybrid system