

血管生成素相互作用蛋白的发现 及其在哺乳动物细胞中的验证

徐东刚^{1)*} 马百坤²⁾ 李 莉³⁾ 邹民吉¹⁾ 彭善云¹⁾ 王嘉玺^{1)*}

(¹⁾军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850; ²⁾南京军区总医院全军医学检验中心, 南京 210002;

³⁾大连医科大学第二附属医院血液科, 大连 116023)

摘要 通过 RT-PCR 从人外周血白细胞中钓取血管生成素 (angiogenin, Ang) cDNA, 构建诱饵蛋白载体 pAS-2-1-Ang, 对其自身转录激活活性进行鉴定后, 通过酵母双杂交系统筛选人肝细胞 cDNA 文库, 获得两个双阳性克隆。序列分析和同源检索表明所获候选蛋白分别为人上皮细胞素和 λ 晶体蛋白。构建 Ang 及候选蛋白标签融合表达载体并共转染 COS-7 细胞, 利用免疫共沉淀和蛋白质印迹方法在哺乳动物细胞中验证了 Ang 与候选蛋白间的相互作用。为阐明 Ang 促血管新生的分子机制创造了条件。

关键词 血管生成素, 酵母双杂交, 相互作用蛋白, 免疫共沉淀

学科分类号 Q71

新的微血管生成与癌症的发生和发展密切相关, 因此各类血管生成相关因子及其抑制物正成为当今肿瘤生物治疗的研究热点。血管生成素 (Ang) 是第一个被确定的, 来源于人肿瘤组织具有促血管生成作用的细胞因子, 其结构为单链多肽, 有一个封闭的 N 端, 由 123 个氨基酸残基组成^[1]。它与胰凝乳蛋白酶有较高的同源性 (35%), 两者间一些重要活性位点的氨基酸残基也非常保守, 如 His12、His119 和 Lys41 等, 因此目前将其归属于 RNA 酶超家族。Ang 参与了新生血管形成的主要过程, 免疫荧光实验证实, 存在一种 Ang 的细胞内通路 (核转位现象), 而且进入到核内的 Ang 最终是结合到 DNA 上^[2]。是否存在核受体以及 Ang 是否具有转录调控因子的作用还有待于深入研究。目前 Ang 的受体还没有确定, 其核转位的具体途径和在细胞内的作用方式也均未知。因此我们利用酵母双杂交系统从人的胎肝 cDNA 文库中筛选 Ang 的相互作用蛋白, 并在哺乳动物细胞中验证这些相互作用的真实可靠性, 为阐明其促进血管新生的分子机制创造条件和提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

酵母菌株 Y190 购自美国 Clontech 公司; *E. coli* DH5 α Genotype: supE44, lacU169 (lacZM15) hsdR17, recA1, endA1, gyr96, thi⁻1, rel. 为本室保存菌种; COS-7 细胞为本室保存; pCL1、

pVA3-1、pTD1-1、pLAM5-1、pACT-2、pAS2-1 以及标签载体 pCMV-HA 和 pCMV-MYC 等为 Clontech 公司产品; T 载体为 Promega 公司产品。

1.2 酶、生化试剂及相关培养基

*Bam*HI、*Eco*RI、*Sfi*I、*Sal*I、*Xho*I、AMV 逆转录酶、Taq DNA 多聚酶和 T4 DNA 连接酶、质粒提取试剂盒及其 RNA 提取试剂盒均购自美国 Promega 公司; YEASTMAKER Yeast Transformation system 试剂盒、human fetal hepatic MATCHMAKER cDNA library、HA 单克隆抗体和 MYC 单克隆抗体购自 Clontech 公司; 3-AT 购自 Sigma 公司 (1 mol/L 3-AT: 8.408 g 溶于 100 ml 去离子水中, 过滤除菌, 4℃ 储存)。YPD、SD 和各类缺陷培养基为 Clontech 公司产品; DMEM、Lipofectamine 转染试剂和胰酶等购自 GIBCO 公司; 免疫共沉淀试剂盒为德国宝灵曼公司产品。相关试剂的配制参照各自的产品说明书及分子克隆手册^[3,4]。

1.3 引物设计与合成

通过检索 GenBank, 以报道的人血管生成素编码序列为参照, 利用 Primer 5.0 软件设计引物, 为方便克隆在引物序列的 5' 和 3' 端分别加入 *Eco*RI 和 *Bam*HI 切点, F: 5'-GGAATTCATG-CAGGACAACTCCAGGTAC-3', R: 5'-CGGGAT-

* 通讯联系人。

Tel: 010-66931087, E-mail: xudg@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2001-09-17, 接受日期: 2001-11-28

CCTTACGGACGACGGAAAATT-3', AD 质粒测序引物: 上游 5'-CTATTCGATGATGAAGATA-CCCCACCAACCC-3', 下游 5'-GTGAACTTGGGGGTTTTTTCAGTATCTACGAT-3', 由上海生物工程技术有限公司合成。

1.4 RNA 提取、Ang cDNA 扩增及其序列分析

用 Progema 公司的总 RNA 提取试剂盒, 从人的粗分外周血白细胞中提取总 RNA, 然后进行 RT-PCR 扩增, 反应条件为: 在加入逆转录酶前首先 95℃ 变性 3 min, 42℃ 反转录 45 min 后再 94℃ 灭活 5 min; 然后进行 PCR 循环: 94℃ 变性 40 s、42℃ 退火 40 s、72℃ 延伸 60 s, 先进行 5 个循环; 再以 94℃ 变性 40 s、58℃ 退火 40 s、72℃ 延伸 60 s, 进行 25 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min. 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 反应结果. 将所获的基因片段克隆至 T 载体中进行核苷酸序列分析。

1.5 诱饵蛋白载体的构建及鉴定

用 *EcoR* I 和 *Bam* H I 双切 pT-Ang 和质粒 pAS2-1, 分别回收酶切后的 Ang 片段和 pAS2-1 载体, 经 T4 DNA 连接酶作用构建诱饵蛋白表达质粒 pAS2-1-Ang, 并转入大肠杆菌 DH5 α , 扩增后提取质粒, 利用双酶切和 PCR 进行筛选和鉴定。

1.6 Ang 自身转录激活活性的鉴定

将构建的 pAS2-1-Ang 质粒转入感受态酵母中, 观察酵母在缺陷培养基上的生长状况, 及能否表达 β -半乳糖苷酶 (β -gal), 以确定其是否具有转录激活活性。

1.7 双杂交系统对双阳性克隆的筛选和鉴定

利用转入了 pAS2-1-Ang 质粒的 Y190 细胞制备感受态细胞, 然后转化胎肝细胞 cDNA 文库质粒, 通过营养缺陷型培养基和 β -半乳糖苷酶活性实验对转化的酵母进行筛选. 用玻璃珠法从酵母菌中提取质粒, 转化 DH5 α , 提取 AD 质粒并进行酶切和 PCR 鉴定。

1.8 阳性克隆的序列分析和同源检索

利用双杂交试剂盒提供的测序引物进行 AD 质粒的核苷酸序列分析. 测序结果通过 INTERNET 进行同源性对比分析, 以美国国立生物信息中心 (NCBI) 的 BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 作为主要的检索工具, 网址为 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. 对比数据库主要有: a. NCBI 的 NR 库包括: GenBank、EMBL (European

Molecular Biological Laboratory)、DDBJ (DNA Database of Japan) 以及 PDB (Protein Database) 所收录的所有非冗余 (Non-Redundant) 序列; b. NCBI 的 EST 库. 检索主要采用的工具是 BLASTN.

1.9 标签载体的构建和鉴定

分析诱饵蛋白质粒 pAS2-1-Ang 和 pCMV-HA 上的酶切位点, 发现用 *Sfi* I、*Sal* I 双切后 Ang 片段与标签质粒 pCMV-HA 的相位相符; 根据 pCMV-MYC 的多克隆位点的特性, 结合文库质粒载体的特点, 我们选择 *Sfi* I 和 *Xho* I 分别对标签质粒和文库质粒进行双酶切; 然后用 T4 DNA 连接酶 12℃ 连接 16 h 后转化 DH5 α , 通过 PCR 或双酶切对转化子进行鉴定. 其中酶切反应、DNA 片段的回收、质粒的提取、PCR 及电泳方法参照文献 [3].

1.10 细胞培养、载体的共转染和免疫共沉淀

25 cm² 培养瓶中培养 COS-7 细胞, 条件为: 10% 小牛血清、含双抗的 DMEM 培养基, 37℃, 5% CO₂. 长到 60%~80% 时利用 GIBCO 公司的 Lipofectamine 转染试剂将构建的两种质粒分别共转染到 COS-7 细胞, 相关方法参照有关产品说明书. 将贴壁细胞用胰酶消化, 用培养基吹打下来, 离心弃上清, 并按照德国宝灵曼公司的免疫共沉淀试剂盒说明书进行免疫共沉淀。

1.11 Ang 与候选蛋白间相互作用的验证

免疫共沉淀实验后的上清进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分析. 电泳结束后, 电压 15 V, 半干电转 60 min 将 SDS-PAGE 后的蛋白质转移至 NC 膜, 然后进行蛋白质印迹 (Western blot) 检测。

2 结 果

2.1 Ang cDNA 的获得及序列分析

以提取的白细胞总 RNA 为模板, 用引物 F 和 R 进行 RT-PCR, 获得了 390 bp 左右的 cDNA 片段 (图 1). 将所获 cDNA 片段与 T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 并用酶切的方法筛选阳性重组子 (图 2). 将经双酶切鉴定的重组质粒进行核苷酸全自动测序分析, 所获 DNA 片段大小为 369 bp, 结果与 GenBank 中报道的 Ang 序列完全相同。

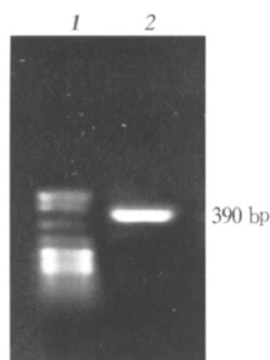


Fig. 1 Electrophoresis analysis of RT-PCR products of ANG gene

1: pBR 322 DNA/ *Msp* I marker; 2: fragments of Ang gene.

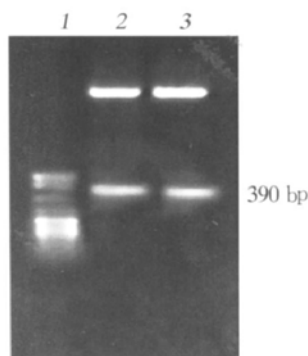


Fig. 2 Restriction analysis of pT Ang

1: pBR 322 DNA/ *Msp* I marker; 2~3: pT-Ang digested with *Eco*RI and *Bam*HI.

2.2 诱饵载体构建、鉴定及转录激活活性分析

酶切后所获 Ang 片段与 pAS2-1 进行连接, 连接产物转化感受态 *E. coli* DH5 α , 随机挑选菌落培养. 提取质粒并进行 PCR 和双酶切鉴定筛选阳性克隆 (图 3).

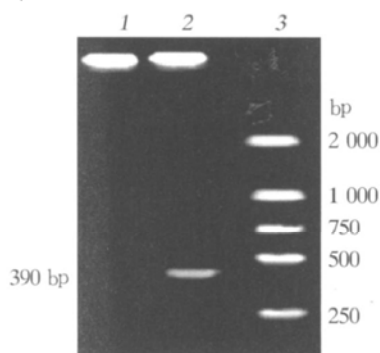


Fig. 3 Restriction analysis of pAS2-1-Ang

1: pAS2-1; 2: pAS2-1-Ang/ *Eco*RI and *Sal*I; 3: DL2000 DNA marker.

将 pAS2-1-Ang 转入酵母宿主 Y190 中, 同时作阳性 (pCL1, pTD1-1/pVA3-1) 和阴性对照

(pTD1-1/pLAM5'-1) 以确保双杂交系统的正确性. 结果表明, 转化了质粒 pAS2-1-Ang 的 Y190 在二缺和三缺平板上不能生长. 从 SD/-Trp 平板上挑选生长良好的菌落作 β -半乳糖苷酶 (β -gal) 分析, 菌落在 8 h 后不变蓝 (图 4), 表明单独的 Ang 蛋白没有转录激活活性, 可用于下一步的文库筛选.

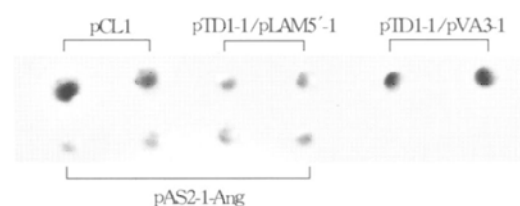


Fig. 4 Analysis of transcription activity of pAS2-1-Ang

2.3 cDNA 文库的筛选及双阳性克隆的获得

大规模转化文库质粒, 涂 SD/-Leu-Trp-His 平板, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养, 约 4~7 d 长出菌落, 挑选生长良好的单菌落, 进行 β -半乳糖苷酶活性实验, 4 h 内变蓝者判为阳性. 从 60 个菌落中筛选得到两个双阳性克隆. 酶切结果显示, 1# 克隆约为 1 000 bp; 2# 克隆约为 1.9 kb. 然后, 将所筛选出的双阳性克隆再次分别单独及与 pAS2-1-Ang 共转化酵母宿主 Y190, β -半乳糖苷酶活性实验结果显示单独的候选蛋白 AD 质粒转化结果为阴性; 而共转化组的鉴定结果为阳性 (图 5). 表明 1# 和 2# 候选蛋白在酵母细胞中确实存在与 Ang 间的相互作用.

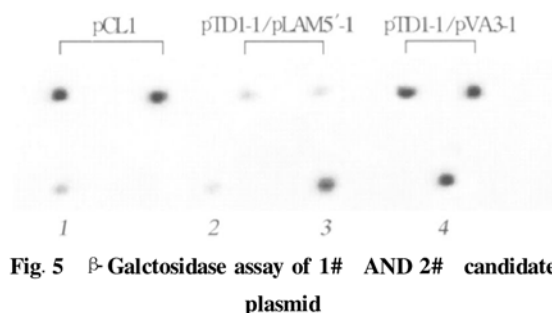


Fig. 5 β -Galactosidase assay of 1# AND 2# candidate plasmid

1: transformation with 1# candidate AD plasmid; 2: transformation with 2# candidate AD plasmid; 3: cotransformation with 1# AD / pAS2-1-Ang; 4: cotransformation with 2# AD / pAS2-1-Ang.

2.4 阳性克隆的序列分析及同源检索

将所获的 AD 质粒进行 DNA 序列分析和对库扫描比较, 同源检索结果为: 1# 候选蛋白与人 λ 晶体蛋白^[3] 的同源性高达 100%; 2# 候选蛋白与

颗粒体蛋白 (上皮细胞素) 的同源性为 99%.

2.5 Ang 及候选蛋白标签载体的构建和鉴定

用 *Sfi* I 和 *Sal* I 分别双切 pAS2-I-Ang 和标签质粒 pCMV-HA, 回收 Ang 片段和 pCMV-HA, T4 DNA 连接酶连接, 转化感受态 *E. coli* DH5 α , 提取质粒后酶切挑选阳性克隆, 构建重组标签质粒 pCMV-HA-Ang (图 6); 用 *Sfi* I 和 *Xho* I 分别对标签质粒 pCMV-MYC 和文库质粒进行双酶切, 然后回收候选蛋白基因和标签质粒, 连接后转化 *E. coli* DH5 α , 提取质粒后通过双酶切筛选阳性克隆, 构建重组标签质粒 pCMV-MYC-1# 和 pCMV-MYC-2# (图 7).

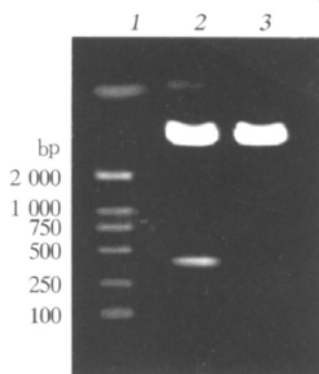


Fig. 6 Restriction analysis of tag plasmid pCMV-HA-Ang

1: DL2000 DNA marker; 2: pCMV-HA-Ang; 3: pCMV-HA.

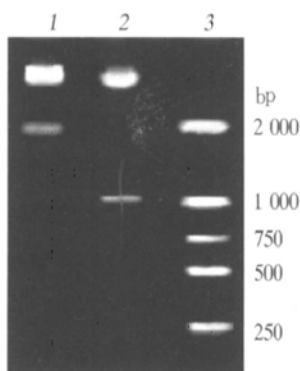


Fig. 7 Restriction analysis of pCMV-MYC candidate gene

1: 2# clone; 2: 1# clone; 3: DL2000 DNA marker.

2.6 细胞共转染、免疫共沉淀及免疫印迹检测

用抗 MYC 单克隆抗体进行免疫共沉淀, 以抗 HA 抗体进行蛋白质印迹, 1# 候选蛋白出现阳性杂交信号, 而 2# 候选蛋白结果为阴性 (图 8). 实验结果表明, 1# 候选蛋白片段不仅在酵母核内, 而且在 COS-7 细胞中均与 Ang 存在相互作用, 提示我们极有可能发现了一个新的与 Ang 存在相互

作用的蛋白质.

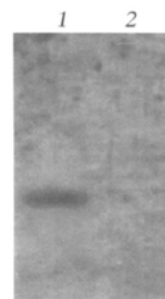


Fig. 8 Western blotting assay of candidate protein with anti-MYC

1: 1# candidate protein; 2: 2# candidate protein.

3 讨 论

Ang 促血管生成是一个非常复杂的生物学过程, 它涉及到多种相关蛋白和辅助因子, 研究这些相互作用和相关蛋白将有助于阐明促血管新生的分子机制. 酵母双杂交系统具有操作简便、灵敏度高、一定程度上反映了细胞内的真实情况、可直接从文库中筛选出与诱饵蛋白相互作用蛋白的基因编码序列等优点^[4]. 我们利用该系统获得了两个与 Ang 有相互作用的候选蛋白. 1# 候选蛋白为人 λ 晶体蛋白, 这类蛋白质最早从兔的晶状体中分离得到, 其亚单位分子质量约为 35 ku. 氨基酸同源性对比分析表明, 它与猪线粒体 L-3 羟酰辅酶 A 脱氢酶的同源性为 30%; 与鼠过氧化酶体中烯酰辅酶 A 水合酶的同源性为 26%. RNA 印迹和蛋白质印迹实验结果证实, λ 晶体蛋白并不是晶状体中所特有, 在心脏、肝脏、肾脏和脾等组织中均有其表达, 但相对量较低. 其在体内的功能尚不清楚, 推测其可能与调控阳离子运输有关, 而且 λ 晶体蛋白本身可能具有酶的活性. 另外, 它还具有特征性的 β - α - β 折叠结构和 DNA 结合域^[5]. 2# 候选蛋白为人颗粒体蛋白, 也称之为上皮细胞素. 它是由炎性白细胞产生的一种细胞因子, 归属于一个富含半胱氨酸的蛋白质家族, 目前该家族共有 4 个成员. 其生物学功能尚不明确, 可能对上皮细胞的增殖有影响, 参与组织创伤愈合的过程. 上皮细胞素在肾脏中有非常高的表达, 提示它具有与炎症反应无关的其他功能^[6,7]. 我们通过免疫共沉淀和蛋白质印迹在哺乳动物细胞中同样检测到了 Ang 与 λ 晶体蛋白片段间的相互作用, 但其与上皮细胞素片段间的相互作用未能检测到, 其原因可能是免疫印迹的灵

敏度不够, 加上这些蛋白质的分子质量较大, 免疫共沉淀的效率相对较低等。另外, 由于酵母细胞与哺乳动物细胞存在的差异, 所以有可能在哺乳动物细胞水平检测不到二者的相互作用, 或他们之间在哺乳动物细胞中没有相互作用。但从另一个方面看, 也更进一步说明了我们发现的 λ 晶体蛋白与Ang间存在相互作用的真实可靠性。目前Ang的受体还没有确定, 对于其在体内作用机制的探讨也很少, 这些相互作用蛋白质的发现, 对进一步了解Ang的生物学功能, 阐明其促血管生成的分子机制创造了条件, 这些相互作用蛋白质的结构基础以及生物学意义等有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- 1 Weiner H L, Weiner L H, Swain J L, *et al.* Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science*, 1987, **237** (4812): 280~ 282
- 2 Hu G F, Xu C J, Riordan J F, *et al.* Human angiogenin is rapidly translocated to the nucleus of human umbilical vein endothelial cells and binds to DNA. *J Cell Biochem*, 2000, **76** (3): 452~ 462
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989. 19~ 55
- 4 Fields S, Sternglanz R. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interaction. *Trends Genetics*, 1994, **10** (8): 286~ 292
- 5 Mulders J M, Hendriks W, Blankestijn W M, *et al.* λ Crystallin, a major rabbit lens protein, is related to hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenases. *J Biol Chem*, 1988, **30** (25): 15462~ 15466
- 6 Bhandari V, Palfree R G, Bateman A. Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (5): 1715~ 1719
- 7 Plowman G D, Green J M, Neubauer M G, *et al.* The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J Biol Chem*, 1992, **267** (18): 13073~ 13078

The Novel Interactive Protein with Angiogenin and It's Identification in Mammal Cell Line

XU Dong-Gang^{1)*}, MA Bai-Kun²⁾, LI Li³⁾, ZOU Min-Ji¹⁾, PENG Shan-Yun¹⁾, WANG Jia-Xi^{1)*}

(¹⁾Institute of Basic Medical Science, Beijing 100850, China; (²⁾The Central Laboratory, The General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, China; (³⁾The Hematological Division, The Second Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116023, China)

Abstract The cDNA encoding angiogenin was isolated by RT-PCR from human peripheral white blood cell. The bait protein plasmid of pAS-2-1-Ang was constructed, and it's transcription activity was analyzed. Two positive clones were obtained from human fetal liver cDNA library screened by yeast two-hybrid system. The result of sequence analysis and homology comparison showed the candidate protein was lambda-crystallin and human granulin, respectively. The tag plasmid of angiogenin and candidate protein were constructed and cotransfected into COS-7 cell line. The interaction between angiogenin and candidate protein was identified by the assay of co-immunoprecipitation and Western blotting.

Key words angiogenin, yeast two-hybrid system, interacting protein, co-immunoprecipitation

* Corresponding author. Tel: 86-10-66931087, E-mail: xudg@nic.bmi.ac.cn

Received: September 17, 2001 Accepted: November 28, 2001