PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2009, 36(1): 42~48
www.pibb.ac.cn

截断型线粒体凋亡诱导因子相互作用蛋白质的筛选与鉴定

付玉荣 [1)*,**] 伊正君 [2)*,**] 李 猛 [2)] 邵丽军 [3)] 宋淑亚 [2)]

([1)]山东省潍坊医学院基础医学教学部病原生物学教研室，潍坊 261053；
[2)]山东省潍坊医学院临床学院临床免疫学教研室，潍坊 261042；[3)]山东省潍坊医学院预防医学系，潍坊 261042)

摘要 线粒体凋亡诱导因子(AIF)是一类存在于线粒体内外膜之间保守的黄素蛋白，它从线粒体到细胞核的转位可诱导细胞凋亡．AIF 诱导细胞凋亡的确切机制还不是很清楚．为了筛选可能与截断型 AIF 存在相互作用的蛋白质，探讨截断型 AIF 诱导细胞凋亡的机制，用逆转录 PCR 扩增剪切掉线粒体定位信号的人 AIF 基因片段并克隆入 pcDNA3.1 载体，导入肝癌 HepG2 细胞．成功检测到截断型在转录与翻译水平上的表达．提取转染截断型 AIF 基因的细胞的蛋白质，用免疫沉淀方法分离与截断型可能存在相互作用的蛋白质，用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱对分离得到的蛋白质进行鉴定，其中一蛋白质条带经鉴定为 β-actin．再次用反向免疫共沉淀法与 Western blot 法对筛选出的可能相互作用蛋白质进行验证．结果表明，截断型 AIF 与 β-actin 之间可能存在相互作用．

关键词 凋亡诱导因子，细胞，基质辅助激光解析电离飞行时间质谱，免疫共沉淀
学科分类号 Q7，Q2，Q6 **DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2008.00297

线粒体凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor，AIF)是近年来发现的一种凋亡效应分子，在正常情况下，AIF 是定位于细胞线粒体膜间隙中的黄素蛋白，含有线粒体定位信号序列与核定位序列，不仅具有氧化还原酶活性，还是可直接介导细胞核凋亡的效应分子[1~3]．AIF 首先在细胞质中合成前体分子，然后转移到线粒体中，一旦进入线粒体膜间腔，N 端 102 个氨基酸组成的线粒体定位序列即被水解掉，折叠成为成熟的 AIF 分子．成熟 AIF 蛋白是 57 ku 的单体分子，509～559 位氨基酸片段是 AIF 中所特有的插入片段，可能与 AIF 的促凋亡活性有关[4]．当线粒体受到凋亡刺激时，线粒体膜通透性转变，孔道开放，可引起 AIF 释放，AIF 分子从线粒体释放到胞质，然后再易位到核[5]，与染色体 DNA 结合，使染色体核周边凝集和 DNA 断裂．

大量研究数据表明，AIF 是典型的双功能蛋白，而且 AIF 的氧化还原酶功能不是其凋亡活性所必需的，两种功能可以完全分开，无论是否存在 FAD 或 NAD(P)H，AIF 均能诱导细胞核凋亡．AIF 介导细胞凋亡的机制及其在细胞凋亡中的地位越来越被认识和重视起来．

本实验旨在通过免疫沉淀结合质谱鉴定技术筛选可能与截断型 AIF 存在相互作用的蛋白质分子，其结果或许能进一步阐明 AIF 促细胞凋亡的通路，从而有助于阐明 AIF 介导细胞凋亡的分子机制．

1 材料与方法

1.1 试剂与药品

真核转染试剂 Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司；免疫沉淀试剂盒购自美国 Roche 公司；各种一抗购自美国 Santa Cruz 公司；各种限制性核酸内切酶购自英国 NEB 公司；乙腈(ACN)，三氟醋酸(TFA)购自美国 Fluka 公司；测序级胰蛋白酶购自美国 Promega 公司；质谱外标混合液 Mixture 2, α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸(CHCA)购自美国 Sigma 公司；质粒小量抽提试剂盒，PCR 产物回收

* 共同第一作者.
** 通讯联系人.
Tel: 0536-8068955, E-mail: yifuyurong@163.com
收稿日期：2008-04-24，接受日期：2008-06-03

试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司；逆转录试剂盒(Ver.3.0)购自上海生工生物工程技术服务有限公司；高保真 Probest-Taq 酶购自大连宝生物技术有限公司.

1.2 AIF 真核表达载体 pcDNA3.1/ΔAIF 的构建及鉴定

由于实验目的需要，在引物设计中去除了 AIF 的线粒体定位序列(为有别于全长 AIF，截断型 AIF 书写为 ΔAIF).

1.2.1 引物的设计合成. 根据 GenBank 中人 AIF 基因的序列设计引物. 上游引物：5′ TACCTGCT-AGCTCCGGAGAATTCCATATGGAGGAAGTTC-CTCAAGAC 3′，下游引物：5′ CGTCTAGAGGT-ACCTTATGCGGCCGCGTCTTCATGAATGTTG A-ATAG 3′.

1.2.2 目的基因的 PCR 扩增. 按 RNA 抽提与 MMLV 逆转录试剂盒说明从培养的 HepG2 细胞中提取 RNA 并进行逆转录. 逆转录后调适相应的缓冲液，用高保真 Probest-Taq 酶取代试剂盒自带的 HS-Taq 进行 PCR 扩增. 总反应体积为 30 μl，循环参数为：95℃ 4 min；94℃ 30 s，61℃ 30 s，72℃ 90 s，30 个循环；72℃ 延伸 10 min. 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测.

1.2.3 目标基因的克隆与测序. 将 PCR 扩增产物回收并以 *Nhe* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ双酶切后，与 *Xba* Ⅰ单酶切处理(*Nhe* Ⅰ和 *Xba* Ⅰ为同尾酶)的 pcDNA3.1(+)载体大片段在 16℃ 连接 1 h，转化大肠杆菌 Top10，涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素 LB 平板上培养，次日挑取 3 个氨苄青霉素抗性单菌落，振摇增菌后分别进行菌落 PCR 鉴定，阳性克隆增菌后小量抽提质粒，用 *Nhe* Ⅰ/*Xba* Ⅰ双酶切对连接方向进行鉴定，正向连接应切出 1 621 bp 片段，反向则只能切出 96 bp 片段. 鉴定正确后的正向克隆菌株送上海博亚公司测序.

测序结果与 GenBank(登录号：AF100928)中 AIF 的序列进行比对和分析.

1.3 真核表达质粒 pcDNA3.1/ΔAIF 在细胞株 HepG2 中的表达及检测

细胞置 24 孔板中在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基中，37℃，5% CO_2 培养，常规方法制作 HepG2 细胞爬片. 细胞至 80%～90%汇片后按转染试剂盒说明进行转染，以 pcDNA3.1 空质粒转染的 HepG2 细胞及未转染的细胞作为对照. 转染一定时间后，分别收集实验孔及对照孔的细胞，并对目标基因的表达进行检测.

1.3.1 以 RT-PCR 法对 ΔAIF 基因的表达进行转录水平上的检测. 抽提细胞总 RNA 进行逆转录，ΔAIF 的上下游引物分别为：S1(5′ TCACAAAGA-CACTGCGATTC 3′)，S2(5′ TGCCACCCAGATG-TTAGA 3′)，扩增产物为 749 bp. 以 β-actin 为内参照进行校正，β-actin 的上下游引物分别为：P1 (5′ AAGAAAGGGTGTAACGCAAC 3′)，P2 (5′ AGCTCACCATGGATGATGAT 3′)，扩增产物为 1 149 bp. PCR 反应条件为：95℃ 预变性 5 min；94℃ 45 s，54℃ 45 s，72℃ 45 s，循环次数为 30 次；最后 72℃ 延伸 8 min，PCR 产物进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析.

1.3.2 以免疫荧光细胞化学法和 Western blot 法对 ΔAIF 基因的表达进行蛋白质水平上的检测.

a. 用免疫荧光细胞化学法对 ΔAIF 蛋白表达的定位进行检测. 取出爬片，PBS 洗，40 g/L 多聚甲醛固定，PBS 洗，滴加血清封闭液，室温 20 min. 滴加 1∶400 用 PBS 稀释的兔抗人 AIF 一抗 4℃ 过夜. PBS 洗，滴加 Cy3 标记的羊抗兔 IgG，室温 2 h. PBS 洗，水溶性封片剂封片，用共聚焦显微镜观察 ΔAIF 的定位.

b. 用 Western blot 法对蛋白质的表达进行定量检测. 收集细胞，收获全细胞组分与细胞核组分，对各组分进行蛋白质定量，取等量蛋白质进行 SDS-PAGE 分离，分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜，膜经 5%脱脂奶粉封闭，加入 1∶500 稀释的兔抗人 AIF 多抗，4℃ 过夜，加 HRP 标记的羊抗兔 IgG(1∶200)，室温孵育 1 h，用 DAB 显色.

以 β-actin 与 Histone 分别作为全细胞与细胞核的内参照进行校正，密度扫描分析吸光度值(*A*). 上述实验重复 3 次.

1.4 免疫共沉淀反应 (co-immunoprecipitation，IP)

1.4.1 蛋白质样品的准备. 在两管中分别收集转染 pcDNA3.1/ΔAIF 48 h 后的细胞 1×10^7 个，PBS 洗涤 2 次，然后各加入 1 ml 细胞裂解液裂解细胞.

1.4.2 去除非特异性结合. 各取 400 μl上述蛋白质样品，蛋白质的质量约为 500 μg，加入约 1 μg和免疫沉淀时使用的 IgG 种属相同的普通 IgG 和 20 μl充分重悬的 Protein A Agarose，4℃ 缓慢摇动 2 h. 2 500 r/min 离心 5 min，取上清用于后续的免疫沉淀.

1.4.3 免疫沉淀. 其中一管加入 0.4 μg 用于免疫

沉淀的一抗(另一管不加一抗，作为对照)，4℃缓慢摇动过夜．两管各再加入 20 μl 充分重悬的 Protein A Agarose，4℃缓慢摇动 3 h．2 500 r/min 离心 5 min，小心吸弃上清，注意宁可留下少量上清也不能吸掉 Protein A Agarose．用准备蛋白质样品时的裂解液或 PBS 洗涤沉淀 5 次，裂解液或 PBS 的用量每次为 0.5 ml．洗涤时离心条件和吸除上清的要求同上面的步骤．最后一次洗涤后，去除上清，加入 20 μl 1×SDS-PAGE 上样缓冲液重悬沉淀，瞬时高速离心把样品离心至管底．沸水浴处理 5 min，样品 −70℃保存．取上述样品用于 12% SDS-PAGE．上述实验重复 5 次．

1.5　质谱分析与数据库搜索

从 SDS-PAGE 胶上切取蛋白质条带，进行胶内酶解与后续的质谱分析．质谱仪分析的参数设置如下：反射模式，正离子谱测定，N2 激光源波长为 337 nm，真空度 8×10^{-8} Torr，离子源加速电压为 20 kV，脉冲宽度为 3 ns，离子延迟时间 100 ns，Grid 75%，Guide Wire 0.003%，基质为 CHCA，激光强度为 850～1 200 内部单位，质谱信号单次扫描累加 150 次．外标采用混合 Mixture 2 标准液进行相邻校正，内标采用胰蛋白酶自切峰进行两点或单点校正. 通过互联网 http://www.matrixscience.com 上的 Mascot 软件搜索数据库并与数据库中蛋白质的理论 PMF 比对．

1.6　Western blot

用免疫共沉淀方法收集沉淀产物进行 12% SDS-PAGE 分离，分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜，膜经 5%脱脂奶粉封闭，加入 1∶300 稀释的小鼠抗人 β-actin 的一抗，4℃孵育过夜，加 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG (1∶200)，室温孵育 1 h，用 DAB 显色．

1.7　反向免疫共沉淀与 Western blot

反向免疫共沉淀操作同上面的免疫共沉淀，只是用抗人 β-actin 的一抗代替上面的抗人 AIF 一抗，其余操作相同．沉淀下来的蛋白质进行 12% SDS-PAGE 分离，分离后的蛋白质转移至 PVDF 膜，加入稀释的兔抗人 AIF 一抗，4℃孵育过夜，加 HRP 标记的羊抗兔 IgG (1∶200)，室温孵育 1 h，用 DAB 显色．

1.8　统计学分析

实验结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示．样本均数的两两比较采用 t 检验(方差齐同)及 t'检验(方差不齐)．检验水准取 α=0.05．

2　结　　果

2.1　真核表达载体 pcDNA3.1/ΔAIF 构建成功

获得的重组 pcDNA3.1/ΔAIF 质粒经菌落 PCR 鉴定后，琼脂糖凝胶电泳可见到与目的片段大小一致的 PCR 产物条带．抽提质粒用 *Nhe* Ⅰ/*Xba* Ⅰ进行双酶切鉴定的结果表明：酶切后产生一线性空载体条带及一条约 1 600 bp 的目的片段，与理论预测值一致(图 1)．pcDNA3.1/ΔAIF 重组质粒测序结果表明，ΔAIF 目标片段已插入相应载体开放读码框的正确位点，测序结果完全正确．

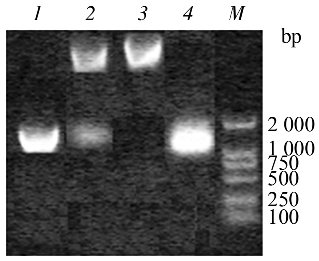

Fig. 1　The RT-PCR result and restriction enzyme analysis of pcDNA3.1/ΔAIF

1: RT-PCR product of ΔAIF; *2*: pcDNA3.1/ΔAIF was digested by *Nhe* Ⅰ/*Xba* Ⅰ; *3*: pcDNA3.1; *4*: PCR product of pcDNA3.1/ΔAIF; *M*: DNA marker: DL2000.

2.2　ΔAIF 基因在细胞株 HepG2 中表达

2.2.1　在转录水平上检测的结果．在转染 pcDNA3.1/ΔAIF 48 h 后，与对照组相比，ΔAIF 的转录明显增加(P = 0.001)(图 2)．

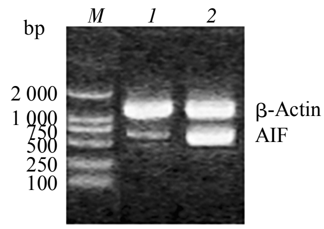

Fig. 2　RT-PCR result of ΔAIF

M: DNA marker: DL2000; *1*: Control group; *2*: Group transfected with pcDNA3.1/ΔAIF.

2.2.2　在蛋白质水平上检测的结果．

a．免疫荧光细胞化学法检测结果表明：在对照细胞中，内源 AIF 基因的表达主要定位于细胞浆中；ΔAIF 基因可在人肝癌 HepG2 细胞内表达，随着时间增加，表达量也增多；由于缺少线粒体定位信号，外源 ΔAIF 基因的表达主要定位在细胞核

中，并且伴随 ΔAIF 的核迁移，转染的细胞发生了凋亡样变(图 3).

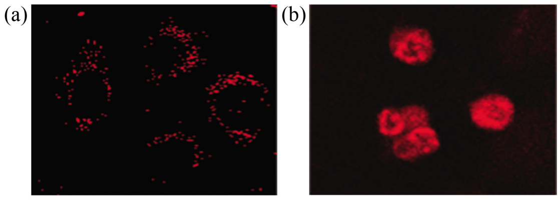

Fig. 3　Protein expression of ΔAIF in HepG2 cells transfected with pcDNA3.1/ΔAIF

(a)Control cells. (b)Cells transfected with pcDNA3.1/ΔAIF for 48 h.

b．Western blot 法检测结果也表明：外源 ΔAIF 基因可在人肝癌 HepG2 细胞内表达，在转染 48 h 后 ΔAIF 的全细胞表达量与对照组相比有显著的统计学差异($P < 0.05$)，同时在转染 48 h 后 ΔAIF 细胞核内的表达量也显著增多($P < 0.05$)(图 4).

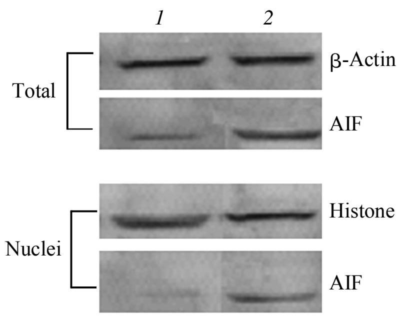

Fig. 4　Western blot analysis expression of ΔAIF in HepG2 cells transfected with pcDNA3.1/ΔAIF

1: Control group; *2*: Group transfected with pcDNA3.1/ΔAIF for 48 h.

2.3　免疫共沉淀结果

免疫共沉淀产物的 SDS-PAGE 结果显示，在未加 AIF 抗体组没有沉淀出蛋白质条带，转染外源 ΔAIF 基因组共沉淀出 7 条蛋白质带，分子质量分别约在 200 ku、70 ku、55 ku、50 ku、45 ku、27 ku 与 20 ku 左右(图 5).

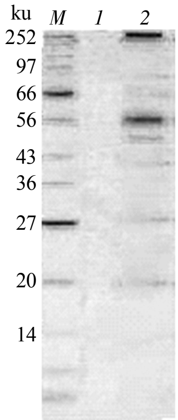

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of protein of IP

M: Protein marker; *1*: Control group; *2*: Group transfected with pcDNA3.1/ΔAIF.

2.4　质谱分析与数据库搜索结果

从 SDS-PAGE 胶上切取的电泳蛋白质条带进行酶解与质谱分析后，用 Mascot 软件搜索数据库得到了两个可能的相互作用蛋白 β-actin 与 TopoⅡ(图 6，7)，其余的点未能成功鉴定出相应蛋白质.

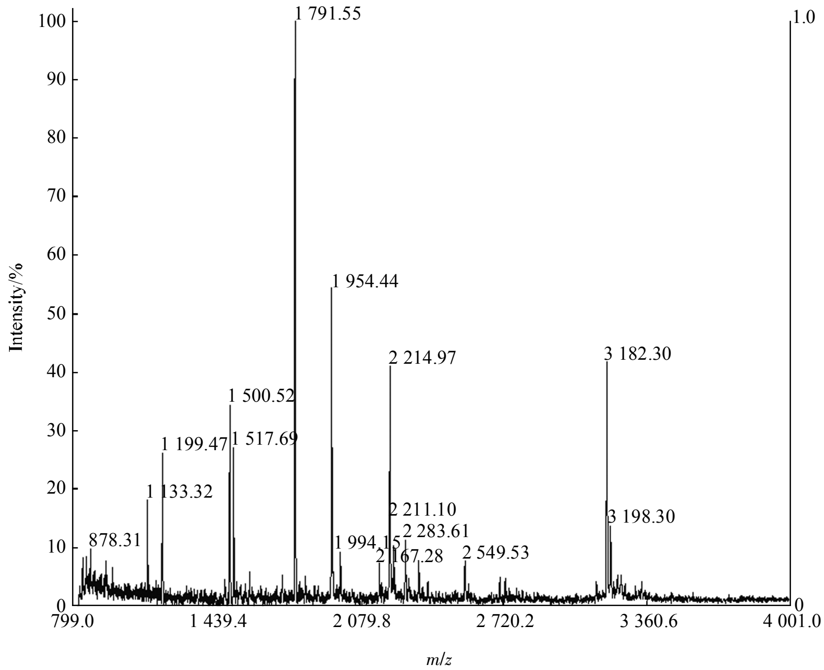

Fig. 6　The PMF result of β-actin

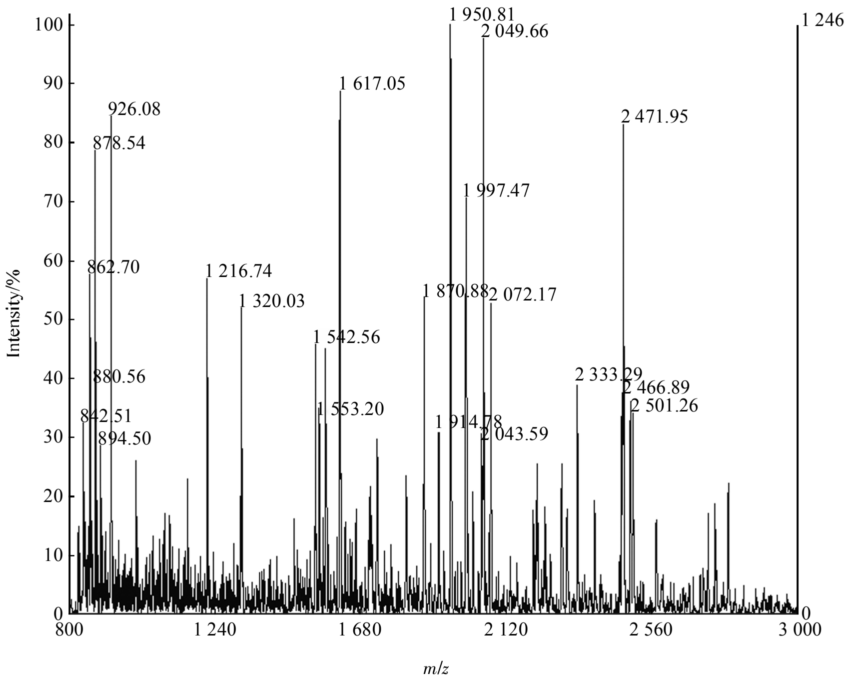

Fig. 7 The PMF result of Topo Ⅱ

2.5 免疫共沉淀结果的验证

为了验证免疫沉淀的结果，我们用免疫共沉淀的沉淀产物进行了 Western blot 实验，结果显示：用抗人 AIF 一抗沉淀出的蛋白质与 β-actin 抗体作用，呈现阳性反应(图 8).

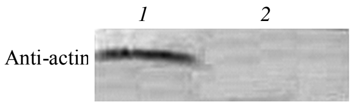

Fig. 8 Western blot analysis of protein of IP

1: Group precipitated by anti-AIF antibody; 2: Control group.

进一步用反向免疫共沉淀对筛选出的蛋白质进行了验证，结果显示：β-actin 抗体沉淀出的蛋白质与 AIF 抗体作用，呈现阳性反应(图 9).

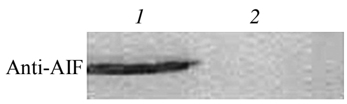

Fig. 9 Western blot analysis of protein of IP

1: Group precipitated by anti-β-actin antibody; *2*: Control group.

3 讨 论

AIF 在细胞正常状态下是位于线粒体中，当凋亡信号刺激时才从线粒体移位到细胞核并引起细胞凋亡．本研究是要探讨在凋亡时截断型 AIF 的相互作用蛋白质，因此，本研究在设计 AIF 的引物时，删去了 AIF 的线粒体定位序列，这样转染的 AIF(含有核定位序列)不需其他凋亡信号的刺激就可直接定位到细胞核中并引起细胞凋亡[6].

为探究生物进程的分子机制，需要确定介导这个过程的蛋白质 - 蛋白质间的相互作用．免疫共沉淀是用来研究蛋白质与蛋白质间相互作用的技术之一，这种方法最常用于确定一种特定蛋白质的新的作用搭档或用于测定两种目标蛋白质是否在体内结合．其基本原理是：当细胞在非变性条件下被裂解时，完整细胞内存在的蛋白质 - 蛋白质之间的结合被保持下来．这一事实可被用于检测和确定生理条件下相关的蛋白质 - 蛋白质间的相互作用．在细胞裂解液中加入抗兴趣蛋白的抗体，孵育后再加入与抗体特异结合的于 Agarose 珠上的金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)．若细胞中有与兴趣蛋白结合的目的蛋白，就可以形成这样一种复合物：“目的蛋白 - 兴趣蛋白 - 抗兴趣蛋白抗体 -SPA/Agarose”．因为 SPA/ Agarose 比较大，这样复合物在离心时就被分离出来，经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，复合物四组分又被分开．然后经质谱法或 Western blot 法来鉴定与检测目的蛋白是什么，是否为预测蛋白．这种方法得到的目的蛋白是在细胞内天然与兴趣蛋白结合的，符合体内实际情况，得到的蛋白质可信度高[7, 8].

实验结果显示，免疫共沉淀的产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离得到了 7 条蛋白质带．经过质谱鉴定，只成功鉴定出了两种蛋白质，β-actin 与 TopoⅡ.

我们又用 Western blot 法与反向免疫共沉淀对筛选出的蛋白质 β-actin 进行了验证，结果显示：用 AIF 抗体沉淀出的蛋白质与 β-actin 抗体呈现阳性反应，用 β-actin 抗体沉淀出的蛋白质与 AIF 抗体呈现阳性反应，截断型 AIF 与 β-actin 之间可能存在相互作用.

已有研究表明，细胞骨架结构变化和程序性细胞死亡以及衰老过程相关[9, 10]．在细胞质基质中，细胞骨架赋予细胞一定形态的构造因素，细胞骨架与各种细胞运动，如原生质流动、细胞分裂、胞饮作用以及细胞器移动等功能有关.

β-actin 为肌动蛋白，与微管蛋白(微管)、肌球蛋白及原肌球蛋白(微纤维)等构成细胞骨架．由 374 个氨基酸残基组成，分子质量为 41.785 ku，一般结合有 1 分子的 ATP 和 1 原子的 Ca(分子质量 42.3 ku)．兔骨骼肌肌动蛋白整个氨基酸的排列已经确定．直径为 5.5 μm 的球状单体(G 肌动蛋白)在中性盐条件下(0.1 mol/L KCl，5 mmol/L $MgCl_2$ 等)聚合成为 F 肌动蛋白．近年来的研究揭示，actin 本身的聚合、解聚及 actin-myosin 分子间的相互调节参与了细胞凋亡的过程，在细胞凋亡过程中，细胞骨架肌动蛋白 actin 是凋亡的关键调节者[11]．但 β-actin 与 AIF 之间是否确实存在相互作用以及两者在促凋亡之间是否确实存在联系，如果存在相互作用与联系，相互作用的分子机制又是什么，是一系列需要进一步探讨的问题.

筛选到的另一个蛋白质是 TopoⅡ，Topo 是一种基本核酶，为催化 DNA 拓扑学异构体相互转变的酶之总称，催化 DNA 链断开和结合的偶联反应．在许多与 DNA 有关的遗传功能中起重要作用，如细胞的复制、转录、转运及同源染色体的分离等．在闭环状双链 DNA 的拓扑学转变中，要暂时将 DNA 的一个链或两个链切断，根据异构体化的方式而分为 2 个型．切断 1 个链而改变拓扑结构的称为Ⅰ型拓扑异构酶(topoisomeraseⅠ)；通过切断 2 个链来进行的称为Ⅱ型拓扑异构酶(topoisomeraseⅡ)．在Ⅱ型拓扑异构酶中，DNA 促旋酶可单独催化闭环状 DNA 产生超螺旋，这是独特的．细胞凋亡(又称细胞程序性死亡)的调控由多种基因、核内外酶、信号蛋白等成分协同完成，其中 DNA 拓扑异构酶认为是细胞凋亡过程中核内相关的调控因素[12].

在细胞核内，AIF 可通过其 DNA 结合区直接作用于核 DNA，突变分析表明，AIF 与 DNA 的结合是其发挥凋亡作用所必需的，且无序列特异性．但是，单纯的 AIF 与 DNA 结合并不能引起 DNA 的断裂，体内 AIF 与 DNA 结合后引起后续 DNA 损伤的机制可能是：AIF 与 DNA 结合后可能激活的另一种分子在起作用．那么，TopoⅡ/DNA 的结合与 ΔAIF/DNA 的结合之间是否真正地存在相互联系，如果有联系，又是怎样地联系，这是需要进一步探索的问题.

参 考 文 献

1 Cande C, Cohen I, Daugas E, *et al*. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel Caspases-independent death effector released from mitochondria. Biochimie, 2002, **84**(2～3): 215～222

2 Ikai T, Akao Y, Nakagawa Y, *et al*. Magnolol-induced apoptosis is mediated via the intrinsic pathway with release of AIF from mitochondria in U937 cells. Biol Pharm Bull, 2006, **29** (12): 2498～2501

3 于翠娟, 孟艳玲, 王成济, 等. 凋亡诱导因子是线粒体内介导核凋亡的最主要蛋白质之一. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (2): 177～179
Yu C J, Meng Y L, Wang C J, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2002, **29**(2): 177～179

4 Miramar M D, Costantini P, Ravagnan L, *et al*. NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. J Biol Chem, 2001, **276**(19): 16391～16398

5 Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, *et al*. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. EMBO J, 2005, **24**(7): 1375～1386

6 于翠娟, 孟艳玲, 桂俊豪, 等. 重组人凋亡诱导因子基因的构建、表达及其对 HeLa 细胞的促凋亡作用. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29**(6): 305～308
Yu C J, Meng Y L, Gui J H, *et al*. Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (6): 305～308

7 Denson D D, Li J, Eaton D C. Co-localization of the alpha-subunit of BK-channels and c-PLA2 in GH3 cells. Biochem Biophys Res Commun, 2006, **350**(1): 39～49

8 Muntasir H A, Rashid M, Komiyama T, *et al*. Identification of amino acid residues important for sarpogrelate binding to the human 5-hydroxytryptamine2A serotonin receptor. J Pharmacol Sci, 2006, **102**(1): 55～63

9 Gourlay C W, Ayscough K R. Actin-induced hyperactivation of the Ras signaling pathway leads to apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 2006, **26**(17): 6487～6501

10 Montell D J. A kinase gets caspases into shape. Cell, 2006, **126**(3): 450～452

11 Gourlay C W, Ayscough K R. The actin cytoskeleton: a key regulator

of apoptosis and ageing?. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, **6**(7): 583～589

12 Chikamori K, Hill J E, Grabowski D R, *et al*. Downregulation of topoisomerase Ⅱ beta in myeloid leukemia cell lines leads to activation of apoptosis following all-trans retinoic acid-induced differentiation/growth arrest. Leukemia, 2006, **20**(10): 1809～1818

Identification of Proteins Interacting With Interceptive AIF

FU Yu-Rong[1)*, **], YI Zheng-Jun[2)*, **], LI Meng[2)], SHAO Li-Jun[3)], SONG Shu-Ya[2)]

([1)]*Department of Microbiology, Weifang Medical University, Weifang* 261053, China;

[2)]*Department of Clinical Immunology of Clinical Faculty, Weifang Medical University, Weifang* 261042, China;

[3)]*Department of Preventive Medicine, Weifang Medical University, Weifang* 261042, China)

Abstract Apoptosis-inducing factor (AIF), normally confined to mitochondria, can move from mitochondria to nuclei, participate in the execution of cell death. The mechanism by which AIF induces cell apoptosis is unclear. In order to analyze proteins which may interact with AIF, interceptive AIF gene (mitochondrial localization sequence, MLS, was deleted) which was amplified from the total mRNA extracted from hepatoma HepG2 cells by reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR), was inserted into pcDNA3.1 plasmid.The recombinant plasmids constructed successfully were then transfected into HepG2 cells and expressions of interceptive AIF were detected by RT-PCR and Western blot. Immunoprecipitation (IP) and matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were used to isolate and identify proteins which can interact with interceptive AIF respectively. Screened out proteins which may interact with AIF were then confirmed by CO-IP and Western blot. The result showed that AIF may interact with β-actin.

Key words AIF, cell, MALDI-TOF-MS, IP

* FU Yu-Rong and YI Zheng-Jun contributed equally to this work.

**Corresponding author.

Tel: 86-536-8068955, E-mail: yifuyurong@163.com

Received: April 24, 2008 Accepted: June 3, 2008