

人脑中硒蛋白 W 与鞘脂激活蛋白原相互作用的筛选与验证*

陈平 刘晴 马孝杰 王诗捷 刘琼** 倪嘉缙

(深圳大学生命科学学院, 深圳市海洋生物资源与环境重点实验, 深圳市微生物基因工程重点实验室, 深圳 508160)

摘要 硒蛋白 W(SelW)是人脑中一种重要的硒蛋白。在缺硒的条件下, SelW 在脑中具有优先储备的特性, 但其具体机制和在脑中的功能至今尚不清楚。本文以 SelW 突变体 SelW' 为“诱饵”, 采用酵母双杂交系统对人脑文库进行筛选, 获得与 SelW 相互作用的蛋白, 其中一种为鞘脂激活蛋白原(PSAP)。采用荧光共振能量转移技术中的受体漂白和敏化发射两种方法, 验证了 SelW 与 PSAP 的相互作用。构建表达载体在大肠杆菌中成功表达出 SelW', 利用 Pull-down 技术验证了 SelW' 与 PSAP 在细胞外的直接相互作用。采用免疫共沉淀的方法验证了上述两种蛋白在昆明小鼠脑组织中的内源性相互作用。基于 SelW 和 PSAP 的已知生物功能, 推测 SelW 可能在脑部发育和神经退行性疾病形成过程中发挥着重要作用。

关键词 硒蛋白 W, 酵母双杂交, 荧光共振能量转移, Pull-down 技术, 免疫共沉淀, 鞘脂激活蛋白原

学科分类号 Q2, Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00412

硒作为人体必需的微量元素, 参与人体多种生理过程, 具有多种生物学功能^[1-2], 而体内硒的生物功能主要是通过各种硒蛋白来实现^[3]。硒蛋白为一类特殊的蛋白质, 其活性中心氨基酸硒代半胱氨酸(Sec)为通常作为终止码的 TGA 编码, 导致硒蛋白的高表达十分困难, 从而影响了硒蛋白构效关系的研究。因此大部分硒蛋白的生物功能和作用机制至今尚不十分清楚, 这也使其成为目前该领域研究的难点和热点。

SelW 发现于 1972 年, 是一种小分子质量硒蛋白(约为 10 ku)。最初报道其与缺硒动物的白肌病相关, 在细胞内主要分布于细胞质中, 另外有一小部分结合于细胞膜上^[3-4]。对低硒饲养和补硒饲养绵羊的肌肉组织进行活体检测发现^[5], 补硒绵羊在饲喂 3.5 周之后, 肌肉组织 SelW 的表达增加且超过正常水平, 而低硒饲养的绵羊肌肉中 SelW 的含量明显降低; 10.5 周后发现, 低硒饲养其绵羊的骨骼肌、舌头、心脏、肺、肾、脾和肝脏中 SelW 的含量明显低于补硒绵羊, 但脑中 SelW 含量却在两组绵羊中没有明显差异。说明 SelW 的表达受到体

内硒水平的调节, 在缺硒条件下 SelW 在脑中具有优先储备^[6]。SelW 作为一种在人及动物脑中高表达的硒蛋白^[7-8], 目前已知与其相互作用的蛋白仅为 14-3-3^[9]。14-3-3 蛋白在阿尔茨海默症病理特征蛋白 tau 的过度磷酸化过程中扮演着重要角色^[10-11], 但其具体功能及作用机制尚不清楚。因此开展人脑中 SelW 相互作用蛋白的筛选和验证, 探索 SelW 作用途径, 可为进一步了解 SelW 的生物功能奠定基础, 且有助于揭示硒预防脑疾病的分子生物学机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Matchmarker Y2H Gold 酵母双杂交系统及人胎

* 国家自然科学基金(31070731, 21271131, 21301120)和广东省自然科学基金(10151806001000023)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0755-26535432, E-mail: liuqiong@szu.edu.cn

收稿日期: 2013-09-16, 接受日期: 2014-01-03

脑 cDNA 文库、X- α -Gal 和抗真菌抗生素 Aureobasidin A (AbA) 均购自 Clontech 公司; Yeast Nitrogen Base(YNB) 购自 BD 公司; 22 种氨基酸粉末购自 BBI 公司; 葡萄糖、Tris-base、EDTA、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、KCl、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、HCl(分析纯)均购自广州化学试剂厂; LiAc、PEG350 和 β -巯基乙醇购自 Sigma 公司; 鲑鱼精 ssDNA 购自北京博大泰克公司; 试剂盒(E.Z.N.A) Gel Extraction Kit、(E. Z. N. A) Plasmid Mini Kit、(E. Z. N. A) Plasmid Maxip Kit、(E. Z. N. A)Yeast Plasmid Kit 均购自 OMEGA BIO-TACH 公司; Top10、*E. coli* BL21 大肠杆菌菌株和 HEK293T 细胞为本实验室保存; *S-pfu* 高保真酶、DL 2000

DNA 分子质量标准、100 bp DNA 分子质量标准、1 kb DNA 分子质量标准均购自 TAKARA 公司; T4 连接酶购自 Ferments 公司; 氨苄霉素、卡那霉素、琼脂粉均购自北京鼎国生物公司; DNA-MATE 转染试剂购自深圳博纳泰克生物科技有限公司; pDsred1-N1 载体(a novel red fluorescent protein)、pGFP-N2 载体(green fluorescent protein, GFP)、pEYFP-C1 载体(cyan fluorescent protein, YFP)和 pECFP-C1(yellow fluorescent protein, CFP) 本实验室保存; GFP 抗体和兔二抗购自 Abmart 公司; PSAP 抗体购自 Abcam 公司. 实验用引物设计如表 1 所示.

Table 1 Primers designed for DNA amplification

Plasmid constructed	Primer name	Sequence
NpGBKT7-SelW	F1	5' TTGGCCATTACGGCCATGGCTCTCGCCGTCCG 3'
	R1	5' TTGGCCGCCTCGGCCCTAGCCCTGAGCCAAGG 3'
NpGBKT7- SelW'(overlap)	F2	5' GGCGCTTGC GGCTACAAGTC 3'
	R2	5' GACTTGTAGCCGCAAGCGCC 3'
pECFP- SelW'	F3	5' CGGAATCCATGGCTCTCGCCGTCCG 3'
	R3	5' CGGGATCCCTTAGCCCTGAGCCAAGG 3'
pEYFP-PSAP425-527	F4	5' CCAAGCTTCG ATGCTGGAGAAAAACAGC 3'
	R4	5' GCTCTAGACTAGTTCCACACATGGCGTTTG 3'
pEGFP- PSAP	F5	5' CCAAGCTTATGTACGCCCTCTCTCTCTGG 3'
	R5	5' ACGCGTCGACTGTTCCACACATGGCGTTTGAATG 3'
pDsRed2-N1-SelW'	F6	5' CCATCGATATGGCTCTCGCCGTCCG 3'
	R6	5' CGGGATCCCGGCCCTGAGCCAAGGCGGCTTTGA 3'
pGBTNH-SelW'	F7	5' CGGGATCCATGGCTCTCGCCGTCCGAGT 3'
	R7	5' CCGCTCGAGGCCCTGAGCCAAGGCGGCTTTGAT 3'

Underlined sequences are digestion sites of DNA restriction endonuclease.

1.2 人 SelW 基因突变体的克隆及质粒构建

根据 SelW 基因(NM_003009.2)编码序列(264 bp) 及 NpGBKT7 载体相关信息设计 SelW 相关引物, 以购自 Clontech 公司的人胎脑 cDNA 文库质粒为模板扩增 SelW 全基因. 以 SelW 全基因为模板, 采用重叠 PCR 技术, 使 SelW 基因中的 TGA 码突变为 TGC 码, 获得 SelW 的突变体 SelW', 再经过 *Sfi* I 酶切后用 T4 连接酶连接到 NpGBKT7 载体上, 经过抗性筛选和基因测序验证获得重组质粒 NpGBKT7-SelW'.

1.3 细胞毒性和自激活作用的检测

挑取单克隆酵母菌(菌落直径 2~3 mm)接种于液体酵母完全培养基(yeast peptone dextrose adenine,

YPDA)中, 30℃、250 r/min, 摇床培养过夜(约 16~18 h)至 $A_{600} \geq 1.5$. 利用 PEG/LiAc 法制备酵母感受态细胞, 具体方法参见 Clontech 公司酵母操作手册. 对于细胞毒性实验, 将已构建好的 NpGBKT7-SelW' 诱饵质粒 0.1 mg 转入酵母感受态细胞中, 加入 200 μl 的灭菌水将酵母细胞重悬起来, 涂布在 SD/-Trp/ X- α -Gal/AbA 缺陷型固体培养基上. 自激活实验分别共转质粒 pADT7-T 和 pGBKT7-p53(阳性对照)、pADT7-T 和 pGBKT7-Lam(阴性对照)、NpGBKT7-SelW' 和 NpADT7 到酵母感受态细胞中, 加入 200 μl 的灭菌水重悬菌体后涂在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α -gal/Aba 平板上, 30℃ 倒置培养, 3~5 天后观察平板生长情况, 通过观察酵母菌的

生长状态和酵母菌落变蓝情况排除实验组 pGBTNH-SelW' 的细胞毒性和自激活情况。

1.4 文库筛选

挑取单克隆酵母菌(菌落直径 2~3 mm)接种于 50 ml 液体酵母完全培养基 YPDA 中, 30℃、250 r/min, 培养过夜(约 18~22 h)至 $A_{600} \geq 1.5$ 。取过夜菌转接入 300 ml 新鲜 YPDA 液体培养基使其起始 A_{600} 为 0.2, 于 30℃、250 r/min 摇床培养至 A_{600} 为 0.4~0.5(约 3~4 h)。利用 PEG/LiAc/TE 法, 转入诱饵质粒 NpGBKT7-SelW' 50 μ g 和文库质粒 25 μ g。将菌液铺在缺陷型固体平板 SD/-Leu/-Trp/-Leu/Aba(三缺板)上, 30℃ 倒置培养一周后将在三缺板长出的酵母菌用划线法划到缺陷型固体平板 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α -gal/Aba(四缺板)上, 30℃ 继续倒置培养一周。

1.5 酵母细胞内回转验证

挑取在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α -gal/Aba 固体平板上变蓝的酵母菌, 接种到 YPDA 液体培养基(5 ml 左右)中, 30℃、250 r/min, 摇床培养过夜, 从酵母菌中提取酵母质粒, 转化至感受态大肠杆菌 Top10 中, 用含有氨苄霉素的 LB 固体培养基筛选, 从筛选到的大肠杆菌中提取猎物质粒(载体为 pACT2), 再与 NpGBKT7-SelW' 质粒共转化 Y2HGold 酵母感受态细胞, 将菌液铺在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA 固体培养基上, 30℃ 倒置培养 3~5 天, 观察菌液变蓝情况, 若变蓝再将酵母菌划到 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α -gal/Aba 固体培养基平板上, 30℃ 倒置培养 3~5 天, 观察菌落是否依然变蓝。对回转验证菌落变蓝的质粒进行测序, 应用 NCBI 数据库中的在线 BLAST 程序进行检索, 分析确定所筛选到基因的名称、归属、同源相似率、编码区、起始码及终止码等一系列基因相关的信息。

1.6 SelW 与猎物基因的共定位验证

分别以 NpGBKT7-SelW' 和人胎脑文库质粒为模板进行 PCR 扩增, 将获得的两段基因分别经相应的限制性内切酶进行双酶切, 酶切产物纯化回收后分别用 T4 连接酶连接到 pGFP-N2 和 pDsRed2-N1 质粒上, 构建重组质粒 pGFP-N2-PSAP 和 pDsRed2-N1-SelW', 测序验证读码框的正确性。将 HEK293T 细胞按 2×10^5 /孔铺在共聚焦专用培养皿上, 待细胞长到 80% 融合, 将 pGFP-N2-PSAP 和 pDsRed2-N1-SelW' 两种质粒各 2 μ g 共转入细胞, 待转染 36 h 后, 运用激光共聚

焦显微镜检测 2 个蛋白质表达及共定位情况。

1.7 FRET 技术验证

1.7.1 重组质粒的构建

如 1.6 中所示, 分别以质粒 NpGBKT7-SelW' 和 pACT2-PSAP 作为模板, 相应引物进行 PCR 扩增结合相应的限制性内切酶, 以 pECFP-C1 和 pEYFP-C1 为载体, 克隆构建重组质粒 pECFP-C1-SelW' 和 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇, 测序验证读码框的正确性。

1.7.2 细胞转染

将 HEK293T 细胞按 2×10^5 /孔铺在共聚焦专用培养皿上, 待细胞长到 80% 融合, 按照实验操作要求, 质粒转染 HEK293 细胞(单转: 4 μ g 质粒, 共转: 两种质粒各 2 μ g)。目的基因组: 单转 pECFP-C1-SelW', 单转 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇, 共转染 pECFP-C1-SelW' 和 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇。对照组: 单转 pECFP-C1、单转 pEYFP-C1 及共转 pECFP-C1 和 pEYFP-C1。具体方法: 提前 1 h 将培养皿中的培养基换成 2 ml 无血清无双抗的 DMEM 细胞培养基, 将转染试剂及 DNA 混合, 室温孵育 30 min, 加入培养皿中轻柔混匀, 置于 CO₂ 培养箱中孵育; 3~4 h 后弃去培养基, 换成含 10% 的血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基继续培养 36 h 后, 运用 OLYMPUS FV1000 激光共聚焦显微镜对转染细胞进行 FRET 检测。

1.7.3 受体漂白法检测

参照文献[12]采用受体漂白法对共转染 pECFP-C1-SelW' 和 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 的细胞进行检测。使用 FRET CFP/YFP 激发光对转染后的细胞进行激发, 功率 95% 的 515 nm 激光进行漂白(60 s), 设置扫描图像时间为 5 帧(其中漂白前 2 帧, 漂白后 3 帧), 选择感兴趣的区域, 对 YFP 通道进行漂白。漂白结束后, 查看软件所做的漂白曲线是否呈现 CFP 荧光强度的增加和 YFP 荧光强度的降低。用 FV10-ASW 2.1 Viewer 软件计算出 2 个蛋白之间的距离和 FRET 效率。同时按照上述相同的方法和参数对共转 pECFP-C1 和 pEYFP-C1 的细胞进行检测作为阴性对照组。

1.7.4 敏化发射法检测

参照文献[13]采用敏化发射法分别以单转 pECFP-C1-SelW'、单转 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇、共转 pECFP-C1-SelW' 和 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 的细胞进行检测。根据单转样品的荧光图像来调节 CFP 和 YFP 通道至图像呈最佳状态后使用固定的成像

参数: CFP 通道, 10%激光功率, HV 为 450; YFP 通道, 7%激光功率, HV 为 490, 依次采集表 2 所列的 7 张图片. 用 FV10-ASW 2.1 Viewer 软件计算出 FRET 转移效率和受体与供体之间的距离, 与此同时, 利用相同方法, 同样参数对阴性对照组(单转 pECFP-C1、单转 pEYFP-C1 及共转 pECFP-C1 和 pEYFP-C1)的细胞进行检测.

Table 2 Image information acquired through the sensitized-emission method

Entry	Plasmid for cell transfection	Excitation wavelength (nm)	Channel
(A1), (A2)	pECFP-C1-SelW'	405	CFP
(B1), (B2)		405	YFP
(C1), (C2)	pEYFP-C1-PSAP ₄₂₅₋₅₂₇	405	YFP
(D1), (D2)		515	YFP
(E1), (E2)	pECFP-C1-SelW'+ pEYFP-C1-PSAP ₄₂₅₋₅₂₇	405	CFP
(F1), (F1)		405	YFP
(G1), (G1)		515	YFP

1.8 Pull-down 验证 SelW 与 PSAP 之间的相互作用

1.8.1 SelW 的表达纯化

用测序正确的 pGBTNH-SelW' 质粒转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 从转化成功的平板上挑选合适的单克隆菌接种于含有氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中, 37℃、220 r/min 摇床培养至 A_{600} 达 0.6~0.8 后, 25℃ 下加入 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 6 h, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 将菌体溶解于裂解缓冲液(balance buffer), 超声裂解后离心提取蛋白上清. 获得的蛋白上清, 用 0.45 μ m 的滤膜过滤, 除去其中的颗粒型物质后参考文献[14], 采用镍柱亲和层析进行 SelW' 重组蛋白的分离纯化. 主要过程如下: 蛋白上清先与经裂解缓冲液平衡过的 Ni-EDTA 柱子结合, 再经洗涤缓冲液(含 60 mmol/L 咪唑溶液)淋洗除去杂蛋白, 最后通过洗脱缓冲液(含 300 mmol/L 咪唑溶液)洗脱, 收集目的蛋白洗脱峰, -80℃ 保存备用.

1.8.2 细胞转染及蛋白质样品制备

同 1.7.2 法将 24 μ g pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 和 24 μ g pEYFP-C1 质粒分别转染 HEK293T 细胞, 5% CO₂、37℃ 培养 36 h 后收获细胞. 向收获的细胞中加入 500 μ l 细胞裂解液(含终浓度 1 mmol/L 的 PMSF), 裂解超声破碎细胞, 4℃、13 000 r/min,

离心 30 min, 收集上清, 获得蛋白质. 吸取 20 μ l 所得蛋白质上清用 Western blot 检测目的蛋白的表达情况. 如表达情况良好, 方可进行后续的 Pull-down 验证实验.

1.8.3 Pull-down 法验证

将 400 μ l 转染收获的 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 蛋白和 pEYFP-C1 蛋白分别加到 10 μ l 经细胞裂解液预处理过的 Protein A/G beads 中, 4℃ 旋转混匀 1 h 后, 4℃、2 000 r/min, 离心 3 min, 将上清转移至另一新的 EP 管中, 分别加入 4 μ l GFP 抗体, 4℃ 旋转混匀 2~3 h, 使抗体与蛋白质充分结合. 随后 4℃、2 000 r/min, 离心 3 min, 取上清加至含有 20 μ l 经细胞裂解液处理过的 Protein A/G beads 的 EP 管中, 4℃ 旋转混匀过夜, 4℃、2 000 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 获得抗体珠子和蛋白质相结合的混合物, 该混合物经细胞裂解液洗涤后加入 50 μ l 纯化的 SelW', 4℃ 旋转混匀 3 h, 4℃、2 000 r/min, 离心 3 min, 弃上清, 沉淀经 PBS 3 次洗涤后加入 15 μ l 的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水浴 5 min, 4℃、12 000 r/min 离心 5 min 后取上清经 SDS-PAGE 后转至 PVDF 膜上, 以鼠 SelW 抗体为一抗, 辣根过氧化物酶偶联的驴抗羊的二抗进行 Western blot 检测 Protein A/G 上是否结合有 SelW'.

1.9 免疫共沉淀法验证

1.9.1 Western blot 检测两蛋白在小鼠脑组织中的表达

取 10 月龄的雌性昆明小白鼠一只, 解剖取脑部嗅球、小脑、额叶、胼胝体和下丘脑、海马、皮层共 6 个部分, 称取各自重量, 按照质量体积比 1:9 加入细胞裂解液(含 PMSF), 超声裂解提取蛋白, BCA 法进行蛋白质定量后用 Western blot 法检测各个脑组织中 SelW 和 PSAP 的表达情况, 根据两蛋白的表达情况选取其中一个组织样品进行免疫共沉淀实验, 验证其内源性相互作用.

1.9.2 免疫共沉淀和 Western blot 验证

以下实验全部在 4℃ 操作. 取 400 μ l 小鼠脑组织匀浆上清液, 加至经蛋白质裂解液预处理过的 Protein A/G beads 中, 旋转混匀 1 h 用于预处理蛋白. 2 000 r/min 离心 3 min, 收集上清液, 加入 20 μ l SelW 抗体, 旋转混匀 2~3 h, 使抗体与蛋白质充分结合. 2 000 r/min 离心 3 min, 将充分结合的蛋白质和抗体加入到含 20 μ l 预处理过的 Protein A/G beads 的 EP 管中, 4℃ 旋转混匀过夜, 形成珠子-抗体蛋白相结合的复合物, 2 000 r/min 离心

3 min, 弃上清, 用细胞裂解液洗涤沉淀. 加入 15 μ l 的 2 $\times$ SDS 上样缓冲液, 置沸水浴 5 min, 于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min 后取上清, 经 SDS-PAGE 电泳后转到 PVDF 膜上, 加入兔 PSAP 一抗、辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗进行 Western blot 检测 Protein A/G 上是否结合有 PSAP 蛋白.

2 结 果

2.1 SelW 基因的克隆、突变、质粒构建和酵母转化

硒蛋白基因中的 Sec 由传统意义上的终止码编码, 因此通常情况下在翻译的过程中与终止密码子存在竞争, 为保证 SelW 全长基因表达成完整的蛋白质, 本文从人胎脑 cDNA 文库中成功扩增出 SelW 基因, 并采用定点突变技术获得了将 Sec 突变为 Cys 的 SelW 的突变体即 SelW' (均为 264 bp). 将 SelW' 的 PCR 产物和 NpGBKT7 载体连接, 构建出重组质粒 NpGBKT7-SelW' (诱饵质粒), 通过酶切鉴定和测序分析确定与载体连接的基因片段序列与 NCBI 中读码框正确性及序列相似性达到 100%.

诱饵质粒构建成功后, 为使酵母双杂交筛选工作顺利开展, 首先对 SelW 基因的毒性及自激活情况进行检测. 采用 PEG/LiAc 法分别将 NpGBKT7-SelW' 质粒转化 Y2HGold 酵母感受态细胞涂布在 SD/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板, 转化 3 天后菌落生长饱满说明 NpGBKT7-SelW' 无细胞毒性. 自激活实验将 NpGBKT7-SelW' 与 NpADT7 共转化酵母菌后涂布在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α -gal/AbA 平板上, 根据与阳性对照和阴性对照平板的比较结果: 实验组和阴性对照组在四缺板上菌不能生长, 而阳性对照组菌落颜色为蓝色, 可知 SelW' 基因的表达对 Y2HGold 酵母菌无自激活现象, 可用于下一步相互作用蛋白的筛选实验.

2.2 共转法筛选人胎脑 cDNA 文库及回转验证

将 NpGBKT7-SelW' 质粒 (100 μ g) 和 Clontech 公司人胎脑 cDNA 文库质粒 (50 μ g) 用 PEG/LiAc 法共转入 Y2HGold 酵母感受态细胞中, 铺于 SD/-Leu/-Trp/-Leu/AbA 平板上, 培养 5 天后看到有白色酵母菌落长出, 用划线法将长出来的单克隆酵母菌划到 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α -gal/AbA (SD-4) 固体平板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 1 周, 结果发现有些划线的酵母菌可正常生长且菌落呈现明显的蓝色, 初步

认为这些克隆即为阳性克隆.

将四缺板上变蓝的酵母菌提取质粒, 再转化到 Top10 大肠杆菌中, 提取大肠杆菌质粒送去测序, 通过 NCBI 进行比对, 结果表明编号为 9 的猎物基因为鞘脂激活蛋白原 (prosaposin, PSAP), 基因登陆号 NM_001042466.1.

将 NpGBKT7-SelW' 质粒和分离出来的 pACT2-PSAP 质粒共转化 Y2HGold 酵母感受态细胞, 同时以 NpGBKT7-p53 和 NpADT7-T 共转酵母作为阳性对照, NpGBKT7-Lam 和 NpADT7-T 共转组作为阴性对照. 铺板 3~5 天后, 共转化 NpGBKT7-SelW' 和 pACT2-PSAP 质粒组及阳性对照组在 SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal/AbA 平板上有较大的蓝色菌落长出, 而阴性对照组菌落较小且未变蓝. 挑选单克隆划线到 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/x- α -gal/AbA 平板上, 阳性对照组与 NpGBKT7-SelW' 和 pACT2-PSAP 共转组变蓝, 而阴性对照组则不能生长, 说明了 SelW' 和 PSAP 之间存在相互作用.

2.3 SelW' 与 PSAP 共定位验证

共定位是两个蛋白质之间发生相互作用的首要条件, 因此在进行后续两蛋白质之间相互作用的验证实验之前首先要确定 SelW' 能否与 PSAP 发生共定位. 将构建好的 pEGFP-N2-PSAP 和 pDsRed2-N1-SelW' 质粒共转染 HEK293T 细胞, 转染 36 h 后在荧光共聚焦显微镜下观察荧光蛋白的表达情况. 结果如图 1 所示, 从图上可以看出两种质粒所编码的荧光蛋白都有表达, 且绿色荧光蛋白融合表达的 PSAP 蛋白及红色荧光蛋白融合的 SelW' 蛋白均表达于细胞质中, 由此可知 PSAP 蛋白和 SelW' 在细胞体内能够共定位、且都定位于细胞质中.

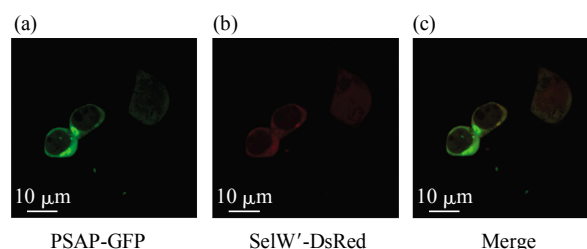


Fig. 1 Co-localization of PSAP (fused with green fluorescent protein, PSAP-GFP) and SelW' (fused with red fluorescent protein, SelW'-DsRed) in HEK293T cells detected by confocal microscopy 36 h later after transfection

(a) PSAP-GFP. (b) SelW' -DsRed. (c) Merge of (a) and (b). The bar represents 10 μ m.

2.4 能量共振转移(FRET)验证蛋白质相互作用

2.4.1 受体漂白法

依据受体漂白法检测原理,漂白曲线中如果受体荧光强度降低的同时供体荧光强度升高,表明两蛋白质之间可能具有相互作用.结果如图 2A2 所示,共转染 pECFP-C1-SelW' 和 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 的细胞,经 515 nm、95% 的激光漂白后,在 CFP-SelW' 荧光强度降低的同时, YFP-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 荧光强度升高,而对照组(共转 pECFP-C1 和 pEYFP-C1 的细胞)中 CFP 荧光强度降低的过程中并未伴随 YFP 荧光强度的升高(图 2A1).采用

FV10-ASW 2.1 Viewer 软件,结合实验所得的原始数据计算出两种蛋白质之间的 FRET 效率及距离.选取 20 个不同的 ROI 分别测定其 E 和 D ,结果显示:实验组(共转 pECFP-C1-SelW' 和 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇)的相互作用平均效率为 $(23.2 \pm 3.4)\%$,平均距离为 (6.67 ± 0.25) nm,而对照组荧光蛋白之间 FRET 平均效率为 $(7.9 \pm 1.3)\%$,平均距离为 (8.65 ± 0.20) nm.表明 SelW' 与 PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 在细胞内能发生能量转移,证明 SelW' 与 PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 两者之间存在相互作用.

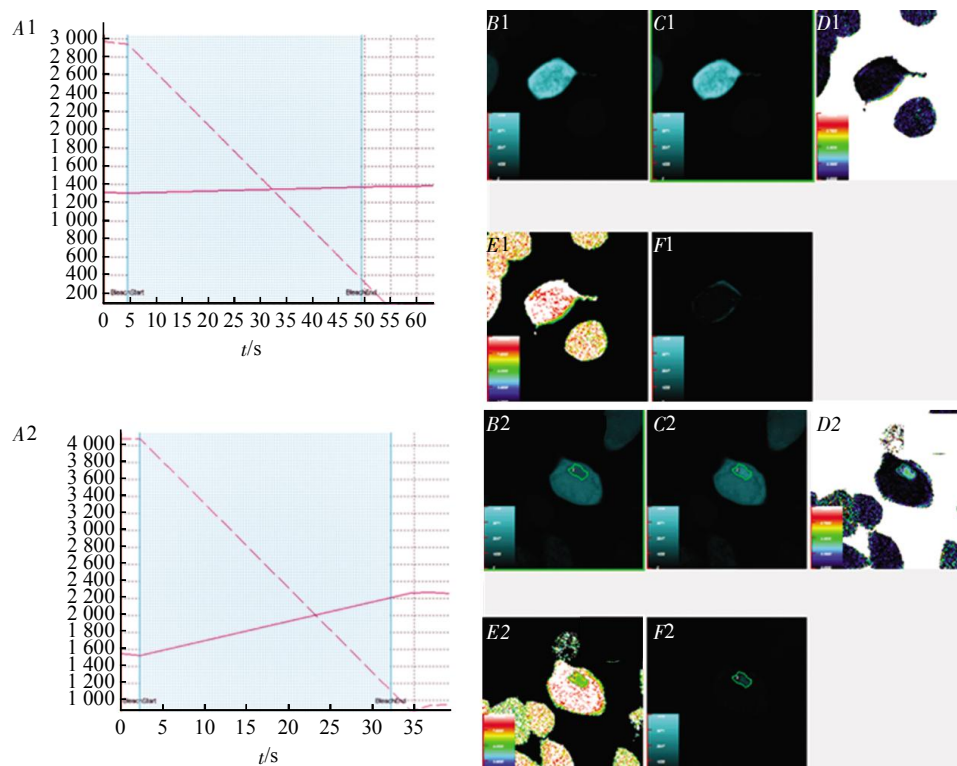


Fig. 2 Interaction between SelW' and PSAP verified by the receptor photobleaching method of FRET

(A1 ~ F1) HEK293T cells cotransfected with the vacant plasmid pEYFP-C1 and pECFP-C1 as negative control; (A2 ~ F2) Cells cotransfected with pECFP-C1-SelW' and pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇. (A1, A2) Photobleaching curves (solid curve for donor fluorescence, dashed for receptor); (B1, B2) the fluorescence images of donors before bleaching; (C1, C2) the fluorescence images of donors after bleaching; (D1, D2) FRET efficiency images between donor and receptor; (E1, E2) FRET distance between donor and receptor; (F1, F2) the fluorescence increments of donors before and after bleaching.

2.4.2 敏化发射法

根据敏化发射法,分别对相互作用蛋白组和对照组各 3 个样本,在不同激发波长和成像条件下采集 7 张图像,选取其中一套示于图 3A ~ G,对各图像扣除背景后输入软件相应的位置,计算 FRET 效率和距离(图 3H, I),每组样品选择 20 个细胞进行实验,计算出平均效率和平均距离.经统计计算

得对照组转染 pEYFP-C1 和 pECFP-C1 的 FRET 平均效率为 $(1.4 \pm 0.7)\%$,平均距离为 (9.73 ± 0.22) nm;而转染了 pECFP-C1-SelW' 和 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 的细胞中 FRET 的平均效率为 $(31.7 \pm 5.3)\%$,平均距离为 (56.07 ± 0.28) nm.该结果进一步验证了 SelW' 和 PSAP 之间的相互作用.

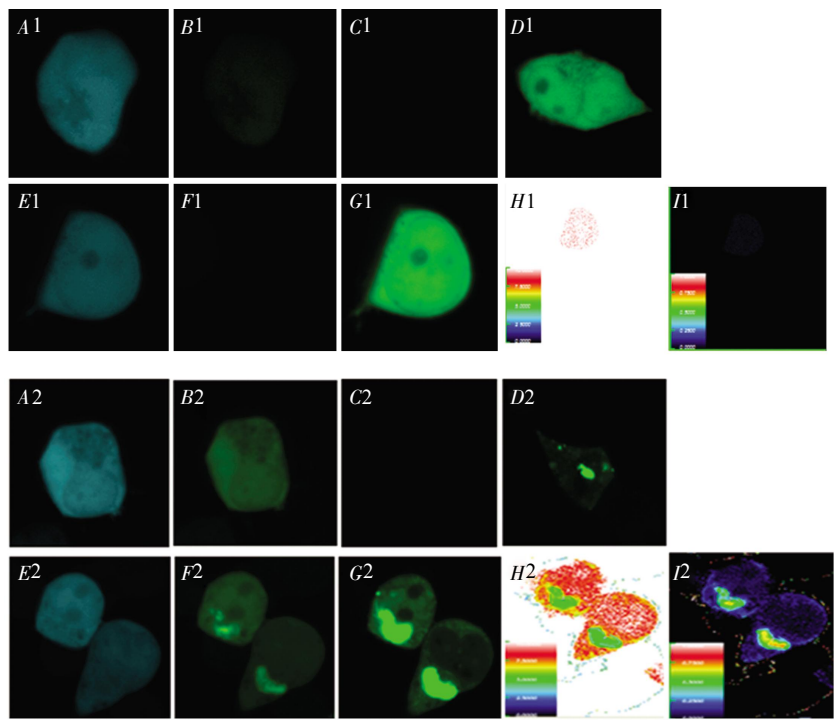


Fig. 3 Interaction between SelW' and PSAP verified by the sensitized emission method of FRET
(A1~I1) FRET of HEK293T cells cotransfected with the plasmids pEYFP-C1 and pECFP-C1; (A2~I2) FRET of cells cotransfected with the plasmids pECFP-C1-SelW' and pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇. (A1~I1, A2~I2) Images collected according to the order in Table 2; (H1, H2) distance images between donor and receptor; (I1, I2) FRET efficiency images between donor and receptor.

2.5 Pull-down 技术验证蛋白质相互作用

2.5.1 SelW 的表达纯化

为在体外表达 SelW'，构建 pGBTNH-SelW' 重组质粒，测序验证成功后将重组质粒转化表达菌株 *E. coli* BL21 感受态细胞，挑选出合适菌株进行大量培养后，收菌，超声裂解提取蛋白质后在 TAKA FPLC System 下通过 Ni-亲和层析的方法实现目的蛋白纯化。图 4a 为纯化过程中各流出成分的 SDS-PAGE 鉴定图。SDS-PAGE 表明已成功地纯化得到较高纯度的目的蛋白 SelW'(图 4a，泳道 4)，可以用于后续 Pull-down 验证实验。

2.5.2 Pull-down 技术验证两蛋白质之间的相互作用

将构建好的 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 质粒和 pEYFP-C1 空载质粒分别转染 HEK293T 细胞，36 h 后收集细胞提取蛋白质，先取适量蛋白质用 Western blot 检测其表达情况，结果如图 4b 所示，YFP-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 和 YFP 蛋白均有表达。取 400 μl 上述分别转染 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 和 pEYFP-C1 质

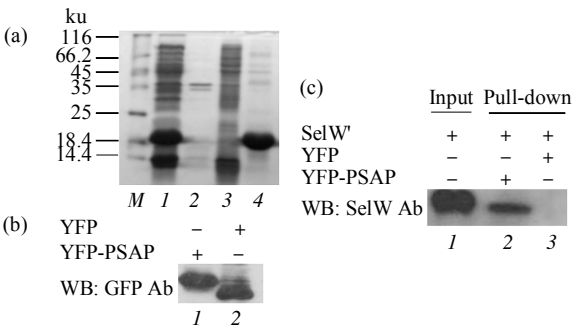


Fig. 4 Interaction between SelW' and PSAP verified by the pull-down assay
(a) Electrophoresis analysis of the products eluted from the Ni²⁺-based immobilized metal ion affinity chromatography. 1: Pre-purified protein solution; 2: Product eluted by balance buffer (i.e., unbound protein); 3: Products eluted by 60 mmol/L imidazole; 4: Product eluted by 500 mmol/L imidazole; M: SM0431 protein marker. (b) Western blot analysis of PSAP₄₂₅₋₅₂₇-YFP (1) or YFP (2) expression in HEK293T cells. (c) Pull-down analysis of the interaction between SelW' and PSAP. 1: Purified His-tagged SelW' was used as a positive control; 2: YFP-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ was immobilized on GFP antibody conjugated protein A/G agarose beads and its binding protein His-tagged SelW' was analyzed by WB with SelW antibody; 3: YFP was used as a negative control.

粒后提取的蛋白质, 分别加入 GFP 抗体, 结合 2~3 h 后, 加入 Protein A/G 珠子结合过夜, 用裂解液洗去弱结合的相互作用蛋白质, 再加入等量纯化的 SelW' 蛋白混匀结合 3 h 左右, 最后用 Western blot 检测珠子上是否结合了纯化的 SelW'. 如图 4c 所示, 转染 pEYFP-C1-PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 组检测到了 SelW', 且分子质量与阳性对照组分子质量大小相同, 而转染 pEYFP-C1 组没有检测到 SelW', 此结果进一步说明 PSAP 与 SelW' 之间存在相互作用, 且两者之间的相互作用是直接的, 无需其他蛋白质的参与.

2.6 免疫共沉淀验证两蛋白质之间的相互作用

上述用到的 FRET 及 Pull-down 验证蛋白质之间相互作用的方法都需首先实现两相互作用蛋白质的大量表达, 其实质为外源蛋白之间的相互作用. 至于体内内源性的 SelW 与 PSAP 之间是否存在相互作用, 则需免疫共沉淀实验来进一步验证. 为保证免疫共沉淀实验的顺利开展, 首先需对 SelW 及各 PSAP 蛋白在小鼠脑内的表达情况进行分析, 取 4 月龄的昆明小鼠脑部, 解剖分离其嗅球、小脑、额叶、胼胝体及下丘脑、海马和皮层 6 个区域, 并超声裂解提取蛋白质, 利用相应的单克隆抗体免疫印迹检测各脑区中 SelW 和 PSAP 蛋白的表达情况. 结果如图 5a 中 I 和 II 所示, 除在嗅球中未检测到 SelW 的表达外, 其他部分脑区均能检测到, 而 PSAP 在所选取的 6 个脑部区域中均有不同程度的表达, 同时还发现这两个蛋白质在小脑中均有相

对较高的表达量, 于是选择小脑进行 co-IP 实验, 验证两者之间的相互作用.

取从小鼠小脑组织提取的蛋白质 400 μ l, 加入到预处理好的 ProteinA/G 中, 加入适量的 SelW 的单克隆抗体进行免疫沉淀, 用蛋白质裂解液洗涤后, 免疫印迹法检测 ProteinA/G 上是否结合有 PSAP 蛋白, 结果如图 5b 所示, 在实验组可清晰地检测到目的蛋白 PSAP(图 5b, 泳道 2), 由此可知 SelW 与 PSAP 之间的相互作用是内源性的.

3 讨 论

本研究采用酵母双杂交技术从人脑文库中筛选到 SelW' 与 PSAP 的相互作用, 用 FRET 技术初步验证了 SelW' 突变体与 PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 的相互作用, 并通过 Pull-down 技术, 证明 PSAP₄₂₅₋₅₂₇ 与纯化的 SelW' 存在外源性相互作用, 更进一步在小鼠脑组织中验证了 SelW 与 PSAP 的内源性相互作用.

PSAP(prosaposin)是一种十分保守、多功能的糖蛋白^[15]. 遗传学上 PSAP 的缺陷会导致几种不同类型的溶酶体贮积症, 如戈谢病、克拉贝病等^[16]. PSAP 的表达及加工对脑内环境的稳定、神经再生、神经退化的延迟都有着重要作用. PSAP 是一种神经营养因子, 其鞘脂激活蛋白 C 区的 N 端 14 个氨基酸残基具有营养活化功能, 含有鞘脂激活蛋白 C 营养序列的肽段(prosapptide)同样具有神经营养功能^[16-17]. 另外, PSAP 还是一种髓鞘营养因子, 在施万细胞和少突胶质细胞中, 通过参与 MAPK 或 PI3K/Akt 信号通路, 刺激硫酸脑苷脂(鞘磷脂的主要成分)的生物合成^[18]. PSAP 基因具有组织特异性及表达的时间与空间特异性^[19]. 其基因在成体和胚胎的神经和生殖系统中高表达, 在 12.5 天的小鼠胚胎中表达水平偏低, 且相比于产前小鼠, 产后小鼠体内的 PSAP 表达量要高得多, 这提示 PSAP 在胚胎发育过程中也担当着重要角色^[17, 20]. 实验也证明, 敲除 PSAP 基因的小鼠由于 PSAP 缺乏, 不仅导致神经系统障碍, 而且生殖系统也出现异常^[21-23]. 这些结果都充分表明 PSAP 不仅在神经系统, 也在生殖系统起着重要作用, 它可能涉及雄性生殖器官的发生、维持及其内的细胞分化^[23].

SelW 作为一种在脑组织中高表达的硒蛋白, 在生物体中发挥着重要作用. 主要功能有维持细胞内的氧化还原平衡^[24]、作为二甲基汞的分子靶标^[25]、调节细胞周期进程^[26-28]等. 目前已发现的与 SelW 相互作用的蛋白 14-3-3 在 tau 蛋白过度磷酸

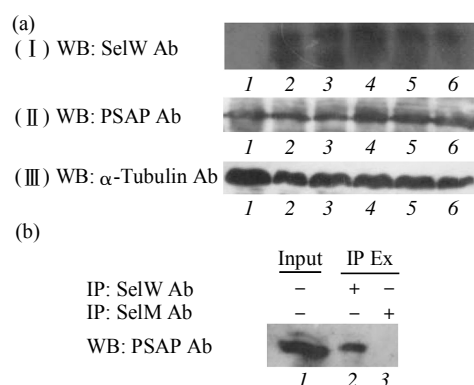


Fig. 5 Endogenous SelW-PSAP interaction verified by co-immunoprecipitation assay

(a) Western blot analyses of the expression of SelW (I) and PSAP (II) in mouse brain tissues. 1~6 represent olfactory bulb, cerebellum, frontal lobe, corpus callosum and hypothalamus, hippocampus, cortex, respectively. (b) Co-IP analyses of endogenous protein interaction. 1: Mouse cerebral lyase was used as a positive control; 2: Mouse cerebral lyase was immunoprecipitated with SelW Ab followed by WB with PSAP Ab; 3: SelM Ab with the same type and source of SelW Ab was used as a negative control. Ab: Antibody; IP Ex: IP extract.

化过程中扮演着重要角色^[11, 29], 提示其可能在脑部发育抑或相关神经退行性疾病中发挥着重要的作用。然而, SelW 相关作用通路及具体机制尚不清楚。而本文筛选出 SelW 的相互作用蛋白 PSAP 也与神经退行性疾病密切相关, 这为进一步研究 SelW 的生物功能及硒与神经退行性疾病的关系奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Rayman M P. The importance of selenium to human health. *The Lancet*, 2000, **356**(9225): 233-241
- [2] Papp L V, Holmgren A, Khanna K K. Selenium and selenoproteins in health and disease. *Antioxid Redox Sign*, 2010, **12**(7): 793-795
- [3] 阮红峰, 李金龙, 瞿高平, 等. 硒蛋白 W 的组织分布, 结构与功能. *中国地方病学杂志*, 2010, **29**(4): 468-470
Ruan H F, Li J L, Ju G P, *et al.* *Chin J Endemiol*, 2010, **29**(4): 468-470
- [4] Whanger P. Selenoprotein expression and function—Selenoprotein W. *Biochim Biophys Acta (BBA)-General Subjects*, 2009, **1790**(11): 1448-1452
- [5] Yen J Y, GU Q P, Bellstein M A, *et al.* Selenium influences tissue levels of selenoprotein W in sheep. *J Nutrition*, 1997, **127**(3): 394-402
- [6] Chung Y W, Jeong D, Noh O J, *et al.* Antioxidative role of selenoprotein W in oxidant-induced mouse embryonic neuronal cell death. *Mol Cell*, 2009, **27**(5): 609-613
- [7] Panee J, Bellinger F P, Berry M J. Selenoproteins and Brain Diseases. *Selenoproteins and Mimics*. Springer, 2012: 161-172
- [8] Zhang S, Rocourt C, Cheng W H. Selenoproteins and the aging brain. *Mechan Age Develop*, 2010, **131**(4): 253-260
- [9] Musiani F, Ciurli S, Dikiy A. Interaction of selenoprotein W with 14-3-3 proteins: a computational approach. *J Prote Res*, 2011, **10**(3): 968-976
- [10] Aitken A. Post-translational modification of 14-3-3 isoforms and regulation of cellular function. *Proceedings of Semin Cell Dev Biol*, 2011: 673-680
- [11] 卜碧涛, 张 旻, 王 伟, 等. 14-3-3 蛋白与阿尔茨海默病 tau 蛋白异常磷酸化的关系. *中华神经科杂志*, 2005, **38**(10): 620-623
Bu B T, Zhang M, Wang W, *et al.* *Chin J Neurol*, 2005, **38**(10): 620-623
- [12] 张毅哲, 刘 琼, 田 静, 等. 人脑中脱碘酶相互作用蛋白的筛选与验证. *深圳大学学报 (理工版)*, 2011, **28**(5): 423-429
Zhang Y Z, Liu Q, Tian J, *et al.* *J Shenzhen University Science and Engineering*, 2011, **28**(5): 423-429
- [13] 梁雪莹, 刘 琼, 陈 平, 等. 人肝中硒蛋白 K 相互作用蛋白的筛选与验证. *高等学校化学学报*, 2012, **33**(2): 313-320
Liang X Y, Liu Q, Chen P, *et al.* *Chem J Chin Univ*, 2012, **33**(2): 313-320
- [14] Liu Q, Liang X, Hu D, *et al.* Purification and characterization of two major selenium-containing proteins in selenium-rich silkworm pupas. *Front Chem Chin*, 2010, **5**(1): 88-98
- [15] Balamurugan B, Roshan M, Shaahul L, *et al.* PSAP: protein structure analysis package. *J Appl Cryst*, 2007, **40**(4): 773-777
- [16] 杨长伟, 周剑峰, 陈哲宇. 鞘脂激活蛋白原: 一种新型神经营养因子. *生命的化学*, 2000, **20**(4): 167-169
Yang C W, Zhou J F, Chen Z Y. *Chem Life*, 2000, **20**(4): 167-169
- [17] O'brien J S, Carson G S, Seo H C, *et al.* Identification of prosaposin as a neurotrophic factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(20): 9593-9596
- [18] 郭 芬, 罗志文, 刘兆宇, 等. Prosaposin 对细胞增殖和凋亡的调控及其分子机制. *遗传*, 2009, **31**(12): 1226-1232
Guo F, Luo Zh W, Liu Z Y, *et al.* *Hereditas*, 2009, **31**(12): 1226-1232
- [19] Sun Y, Witte D P, Grabowski G A. Developmental and tissue-specific expression of prosaposin mRNA in murine tissues. *Amer J Pathol*, 1994, **145**(6): 1390
- [20] Matsuki T, Hori G, Furuichi T. Gene expression profiling during the embryonic development of mouse brain using an oligonucleotide-based microarray system. *Mol Brain Res*, 2005, **136**(1): 231-254
- [21] Guo F, Huang X, Li S, *et al.* Identification of prosaposin as a novel interaction partner for Rhox5. *J Gen Genom*, 2007, **34**(5): 392-399
- [22] Morales C, Zhao Q, Lefrancois S, *et al.* Role of prosaposin in the male reproductive system: effect of prosaposin inactivation on the testis, epididymis, prostate, and seminal vesicles. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 2000, **44**(3): 173-186
- [23] Wu Y, Sun L, Zou W, *et al.* Prosaposin, a regulator of estrogen receptor alpha, promotes breast cancer growth. *Cancer Science*, 2012, **103**(10): 1820-1825
- [24] Yao H D, Wu Q, Zhang Z W, *et al.* Selenoprotein W serves as an antioxidant in chicken myoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, **1830**(4): 3112-3120
- [25] Ralsyonn V, Raymond L J. Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity. *Toxicology*, 2010, **278**(1): 112-123
- [26] Hawkes W C, Printsev I, Alkan Z. Selenoprotein W depletion induces a p53-and p21-dependent delay in cell cycle progression in RWPE-1 prostate epithelial cells. *J Cell Biochem*, 2012, **113**(1): 61-69
- [27] Hawkes W C, Wang T T, Alkan Z, *et al.* Selenoprotein W modulates control of cell cycle entry. *Biol Trace Elem Res*, 2009, **131**(3): 229-244
- [28] Hawkes W C, Alkan Z. Delayed cell cycle progression in selenoprotein W-depleted cells is regulated by a mitogen-activated protein kinase kinase 4-p38/c-Jun NH₂-terminal kinase-p53 pathway. *J Biol Chem*, 2012, **287**(33): 27371-27379
- [29] Hamlin C, Puoti G, Berri S, *et al.* A comparison of tau and 14-3-3 protein in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 2012, **79**(6): 547-552

Screening and Verifying The Interactive Protein of Selenoprotein W in Human Brain*

CHEN Ping, LIU Qing, MA Xiao-Jie, WANG Shi-Jie, LIU Qiong**, NI Jia-Zuan

(College of Life science, Shenzhen Key Laboratory of Marine Biotechnology and Ecology, Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, Shenzhen University, Shenzhen 518060, China)

Abstract Selenoprotein W (SelW) is an important selenoprotein that has the priority to be stored in brain when selenium is deficiency. However, the biological function and mechanisms of SelW in brain remain unclear. In this study, human SelW gene was cloned, site-directedly mutated and inserted into the "bait" plasmid. An interactive protein of SelW, prosaposin (PSAP), was discovered by screening the human fetal brain cDNA library using the yeast two-hybrid system. To verify the protein-protein interaction, two FRET methods, sensitized emission and acceptor bleaching, were performed respectively in HEK293T cells. Both assays confirmed the interaction between SelW' and PSAP. Then the expression vector of SelW' was constructed and SelW was overexpressed in *E. coli*. Pull-down assay was carried out by using the purified SelW', and exogenously direct interaction between SelW' and PSAP was also verified. Finally, co-IP method was applied to successfully verify the endogenous interaction between the two proteins in the brain tissues of Kunming mice. All these results show that SelW interacts with PSAP directly both *in vivo* and *in vitro*. SelW may play a key role in the brain development and neurodegenerative disease formation by interacting with PSAP.

Key words selenoprotein W (SelW), yeast two-hybridization, fluorescence resonance energy transfer (FRET), pull-down, co-immunoprecipitation (co-IP), prosaposin (PSAP)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00412

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31070731, 21271131, 21301120) and The Natural Science Foundation of Guangdong Province (10151806001000023).

**Corresponding author.

Tel: 86-755-26535432, E-mail: liuqiong@szu.edu.cn

Received: September 16, 2013 Accepted: January 3, 2014