

酵母双杂交系统筛选 CLN8P 相互作用蛋白

何淑雅 肖卫纯 李洁 李斌元 孙春莉 闵凌峰 ZHONG Nanbert

【摘要】 目的 应用酵母双杂交系统筛选 CLN8P 相互作用蛋白质,通过对相互作用蛋白质的筛选及研究,探讨 CLN8 的功能,为 CLN8 和 NCLs 疾病群的发病机制研究提供线索,并为疾病的蛋白质相互作用网络提供资料。方法 应用酵母双杂交技术,以 pLexA-CLN8 为诱饵质粒筛选人胎脑 cDNA 文库,得到 Leu⁺ LacZ⁺ 阳性克隆,进一步进行验证,并对验证后的阳性克隆的外源性片段进行测序及同源性分析。结果 从人胎脑 cDNA 文库中筛选得到 60 个 Leu⁺ LacZ⁺ 阳性克隆,将获得的具有外源性片段的文库质粒与诱饵质粒一对一重新转入酵母体内对相互作用进行验证,共获得阳性克隆 22 个,对验证后阳性克隆测序并进行同源性分析,共获得不同的候选基因序列 5 个。结论 应用酵母双杂交系统,共筛选得到 5 个不同的基因,其编码蛋白与 CLN8P 有相互作用,可能与 NCLs 发病机制相关。

【关键词】 酵母双杂交技术; 神经元蜡样脂褐质沉积症; CLN8; 蛋白质相互作用

Screening Interactive Proteins of CLN8P by Yeast Two Hybrid Techniques HE Shu-ya¹, XIAO Wei-chun¹, LI Jie¹, LI Bin-yuan¹, SUN Chun-li¹, MIN Ling-feng¹, ZHONG Nanbert². (¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology of Nahua University, Hengyang 421001, P. R. China; ² Department of Human Genetics, NYS Institute for Basic Research, Staten Island NY 10314, U S A)

Corresponding author: HE Shu-ya. E-mail: skyhe2000@hotmail.com

【Abstract】 Objective To screen and identify the interactive proteins of CLN8P and provide clues for the studies on CLN8 function and pathogenesis of NCLs. **Methods** The Human Fetal Brain cDNA library was screened with pLexA-CLN8 as bait plasmid by yeast-two hybrid system, and Leu⁺ and LacZ⁺ positive yeast clones were obtained, which were cotransformed to the EGY48 (p8op-LacZ) along with pLexA-CLN8 plasmid one to one by yeast simultaneous cotransformation so as to identify the protein interactions again. The inserted fragments of identified positive clones were sequenced and analyzed with Blast in NCBI. **Results** There are 60 Leu⁺ and LacZ⁺ positive yeast clones which are obtained through screening the fetal brain library with pLexA-CLN8 as bait plasmid. There are 22 positive clones identified one to one by yeast simultaneous co-transformation. 5 different candidate gene sequences are obtained by Blast analysis in NCBI. **Conclusion** 5 gene sequences were obtained, these coding proteins can interact with CLN8P and some of them may be involved with pathogenesis of NCLs.

【Key words】 Yeast two-hybrid system; The neuronal ceroid lipofuscinoses; CLN8; Protein interaction

神经元蜡样脂褐质沉积症(neuronal ceroid lipofuscinoses, NCLs)是一组儿童常见的进行性神经元变性疾病群,多为常染色体隐性遗传。此疾病群的主要临床症状包括快速的视力恶化、癫痫发作、进行性智力障碍、运动失调和行为变化^[1]。从婴儿至成人均可发病,其中,新生儿发病率可高达 1/12 500。NCLs 主要组织细胞病变特征为溶酶体内脂质沉积,最后导致以神经细胞和视网膜细胞为主的细胞凋亡。

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 30370795);湖南省教育厅资助(No. 04c543)

作者单位:421001 衡阳,南华大学生物学与分子生物学教研室(何淑雅、肖卫纯、李洁、李斌元、孙春莉、闵凌峰);NY10314 纽约州立人类发育不全研究所(ZHONG Nanbert)

通讯作者:何淑雅 E-mail: skyhe2000@hotmail.com

目前认为 NCLs 至少可分为 10 种疾病亚型,各亚型由不同基因突变引起,但不同亚型之间却具有相似的临床表现及病理改变^[2]。其致病相关基因包括 CLN1~10。研究者们已经克隆出其中的 6 个基因(CLN1、2、3、5、6、8)^[3~8],但是这些已知基因及其编码蛋白与其发病机制之间的关系并不清楚。有研究者们已经发现了各亚型分子水平上的联系^[2,9~11]。根据这些研究结果,有研究者推测这些疾病相关基因编码蛋白可能直接或间接通过蛋白质相互作用形成蛋白质相互作用网络,最后通过共同的通路导致线粒体 ATP 酶亚基 C 降解受阻^[12],导致疾病亚型相似的病理改变和疾病的发生。CLN8 编码区全长 861bp,其 R24G 突变可引起 NCLs 第Ⅷ型,即

进行性癫痫伴智力障碍。编码蛋白 CLN8P 是跨膜蛋白,长 286 个氨基酸,位于内质网中^[13],目前没有发现有关 CLN8P 功能研究的报道。本研究通过对 CLN8 编码蛋白相互作用蛋白的筛选及其功能研究,不但可以初步了解 CLN8 的功能,还可以为 NCLs 发病机制蛋白质网络图谱研究提供新的依据。

1 材料

酵母双杂交系统 酵母 SD 培养基,SD/-Trp 培养基,SD/-Ura,SD/-Ura/-His,SD/-Ura/-His/-Trp,SD/-Ura/-His/-Trp/-Leu 培养基,X-α-半乳糖苷酶(gal)等购自 Clontech 公司;半乳糖(Gal)棉子糖(Raf)醋酸锂等购自 Sigma 公司;QIAGEN Plasmid Mega Kit 购自 QIAGEN 公司;kc8 大肠杆菌,EGY48(p8op-LacZ),CLN8 编码序列由美国纽约州立发育不全研究所 Zhong 博士惠赠,其他化学试剂均购自国内。测序公司为华大基因。

2 方法

2.1 常规分子生物学方法:人胎脑文库扩增及质粒 DNA 的提取,醋酸锂法转化酵母细胞,酵母 DNA 的提取均按照 CLONTECH 公司酵母双杂交系统说明书进行。鲑精 DNA 的制备(carrier DNA),电转化细胞的制备及酵母质粒的电转化按照分子克隆(第 3 版)。

2.2 诱饵质粒的构建及毒性和自激活性检测:CLN8 酵母表达载体 pLexA-CLN8 构建后,将 pLexA-CLN8 重组体转化 EGY48(p8op-LacZ),将转化子 EGY48-pLexA-CLN8 铺皿于 SD/-His/-Ura,SD/-His/-Ura/X-gal 培养基上检测 CLN8 是否有毒性及自激活性。用空载体 pLexA 以及 EGY48-pLexA-Pos(阳性)作为阴性及阳性对照。

2.3 文库扩增,质粒抽提:根据滴度和独立克隆数计算所需文库原始菌液体积和铺皿个数。液体培养液(Amp⁺)稀释文库原始菌液,铺于 150 mm 的 LB 皿(Amp⁺),共铺皿 80 个(文库独立克隆数为 2 × 10⁶,而滴度为 6 × 10⁶)。37℃ 过夜培养,每皿加 LB 培养液 5mL,刮下菌落,收集于锥形瓶中。用 QIAGEN Plasmid Mega Kit 抽提质粒,置 -20℃ 保存待用。

2.4 文库转化与筛选:制备酵母菌(已经转化 pLexA-CLN8 表达质粒)感受态,醋酸锂法转入文库质粒,铺于 SD/-Ura/-His/-Trp 培养 4~6 d,刮取菌液铺于 SD/-Ura/-His/-Trp/-Leu/Raf/Gal 培养 4~6 d,X-gal 滤膜分析克隆变为蓝色者为候选阳性克隆。

2.5 阳性克隆质粒的分离:抽提变蓝色酵母克隆质粒,转化至大肠杆菌 kc8 中,在 M9/Amp⁺/-Trp 培

养基上筛选分离得到靶质粒。

2.6 阳性克隆的鉴定 测序分析:按以上方法将获得的候选阳性质粒一对一与诱饵质粒 pLexA-CLN8 重新共转化 EGY48 酵母菌,X-gal 滤膜分析。初步验证其相互作用,去除假阳性。将再次变蓝色者送测序,在 GenBank 中作同源序列分析。

3 结果

3.1 毒性检测:与转化有空载体 pLexA 的 EGY48 酵母比较,转化有 pLexA-CLN8 的 EGY48 酵母生长速度没有发生变化,证明 CLN8 对 EGY48 酵母细胞无毒性作用。

3.2 自激活性检测:EGY48-pLexA-CLN8 酵母转化子在 SD/-His/-Ura/X-gal 培养基上生长为白色,而对照转化子 EGY48-pLexA-Pos 变蓝色,说明 pLexA-CLN8 无自激活性。

3.3 筛选结果:得到在 SD/-Ura/-His-Trp/-Leu/Raf/Gal 培养基上能生长,用 X-gal 滤膜分析能变成蓝色的候选阳性克隆 60 个(见图 1)。

3.4 重新验证:将获得的候选阳性质粒一对一与诱饵质粒 pLexA-CLN8 重新共转化 EGY48 酵母菌后,X-gal 滤膜分析,再次变蓝色认为是阳性克隆,共得到表达 LacZ⁺,Leu⁺ 阳性克隆 20 个(见图 2)。



图 1 X-gal 滤膜分析得到蓝色阳性克隆(部分)

Fig.1 Blue positive clones by X-gal filter membrane analysis(part)



图 2 蓝色阳性克隆与诱饵质粒(一对一)重转酵母后 X-gal 滤膜分析

Fig.2 X-gal filter membrane analysis after blue positive clones cotransformed with bait plasmids

表 1 同源性分析结果统计
Table 1 Statistics of results by homology analysis

基因名称	同源性	编码蛋白名称	编号
ND1	100%	NADH dehydrogenase subunit 1	3 9 22 23 26 42
MT3	100%	metallothionein 3	6 7 18 20
<i>Homo sapiens</i> Brk1-like protein mRNA	100%	hHBrk1	38
BYSL	100%	Bystin	37
ND5	97%	NADH dehydrogenase subunit 5	13 28 29 30 31 32 33 40

3.5 测序结果:将阳性克隆质粒送测序,进行同源性分析,得到 5 个编码 CLN8P 相互作用蛋白的基因。

4 讨论

自 Fields 和 Song 创立了酵母双杂交系统以来,该技术便在诸多领域得到了广泛的应用,韩亮等^[14]利用 GAL4 酵母双杂交系统,以 Wnt 受体 LRP6 的胞内区为诱饵蛋白,筛选小鼠 115d 胚胎 cDNA 文库,发现了 1 个新的 LRP6 相互作用蛋白:黑色素瘤相关抗原 MAAT1p15;张怡等用酵母双杂交系统筛选得到 hSNF5 的作用蛋白 hS^[15]。实践证明,酵母双杂交技术是筛选、鉴定相互作用蛋白的一个非常有效的手段。

本实验通过酵母双杂交系统得到 5 个不同的相互作用蛋白的编码基因。ND1 和 ND5 编码蛋白为还原型辅酶 I 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶辅酶(NADH)亚基 1 和 5,人体内的主要作用是作为呼吸链的脱氢酶辅酶。线粒体内的 NADH 参与 NADH 氧化呼吸链,体内多种代谢物(如苹果酸、乳酸、丙酮酸、异柠檬酸等)在相应脱氢酶的催化下,脱下的氢都通过此条呼吸链传递给氧生成水,伴随产生大量的 ATP,供应机体需要。体内的 ATP 生成减少或缺失,细胞可能因缺乏供能而凋亡。MT3 编码蛋白 MT3 为 MT 基因家族的一个脑特异性(brain-specific)成员,为一种神经元生长抑制因子,能抑制小鼠大脑萃取物中神经元细胞的存活。MT3 还是一种金属结合蛋白,能与 Zn²⁺、Cu²⁺ 等结合,主要是维持锌在神经元内的平衡,锌是许多大脑功能的调节因子,当细胞锌缺乏时,MT3 的基本表达抑制其生长。

CLN8P 突变导致 NCL8 发病过程中,CLN8P 与 ND1 和 ND5 不能相互作用,进而导致 NADH 功能障碍,细胞不能产生足够的能量,最后可能引起需要能

量较多的神经细胞及其视网膜细胞的能量供应不足而致凋亡。这就可以解释脂质沉积发生在体内多种细胞,为什么仅导致大脑皮层及视网膜为主的神经细胞脱失。CLN8P 与 MT3 相互作用,能抑制 NT3 神经元生长抑制因子的功能而表现出金属结合蛋白的功能。当 CLN8 突变时,CLN8P 与 MT3 不能相互作用,导致 MT3 表现神经元生长抑制因子的功能,神经元细胞的生长抑制,神经细胞脱失,而金属结合蛋白的功能下降或消失,与 Zn²⁺ 的结合障碍,最后引起大脑功能受抑制,引起智力障碍。

而其他亚型可能通过蛋白质相互作用网络,最后引起 CLN8P 功能障碍,最后导致相似的症状。因此,在不同的 NCLs 发病中,不同的致病基因产生相似的表现和病理特征。

参 考 文 献

- 1 Wisniewski KE, Kida E, Connell F, et al. Neuronal ceroid lipofuscinoses: research update. *Neurol Sci*, 2000 21: 49-56.
- 2 Weimer M, Kriscenski-Perry E, Elshatory Y, et al. The neuronal ceroid lipofuscinoses: mutations in different proteins result in similar disease. *Neuromolecular Med*, 2002 4: 111-124.
- 3 Jarvela I, Schleutker J, Haataja L, et al. Infantile form of neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN1) maps to the short arm of chromosome 1. *Genomics*, 1991 9: 170-173.
- 4 Sharp JD, Wheeler RB, Lake BD, et al. Loci for classical and a variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis map to chromosomes 11p15 and 15q21-q23. *Hum Mol Genet*, 1997 6: 591-595.
- 5 Gardiner M, Sandford A, Deadman M, et al. Batten disease (Spielmeier-Vogt disease, juvenile onset neuronal ceroid-lipofuscinosis) gene (CLN3) maps to human chromosome 16. *Genomics*, 1990 8: 387-390.
- 6 Savukoski M, Klockars T, Holmberg V, et al. CLN5, a novel gene encoding a putative transmembrane protein mutated in Finnish variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nat Genet*, 1998 19: 286-288.
- 7 Wheeler RB, Sharp JD, Mitchell WA, et al. A new locus for variant late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis-CLN7. *Mol Genet Metab*, 1999 66: 337-338.