论著

文章编号:1000-5404(2005)14-1428-04

以酵母双杂交系统从成人肝cDNA文库中筛选与研究P311相互作用蛋白的基因序列

袁顺宗[1],吴 军[1],易绍萱[1],贺伟峰[1],陈希炜[1],马 兵[1],罗高兴[1],丁华野[2],Peter M. Larsen[3] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组,重庆市市级重点实验室,重庆 400038;[2]北京军区总医院病理科,北京 100700;[3]南丹麦大学蛋白质组分析中心,丹麦)

提 要:目的 应用酵母双杂交技术研究与增生性瘢痕相关新候选蛋白P311发生相互作用的蛋白。**方法** 应用酵母双杂交系统,以人P311为诱饵,筛选成人肝cDNA文库,寻找能与之相互作用的阳性克隆。以回复性杂交试验排除假阳性,并对阳性克隆进行序列测定和生物信息学分析。**结果** 经过酵母双杂交共获得355个克隆,经过测序和验证,最终确认8个克隆基因。**结论** 获得的8个基因编码的蛋白可能与P311的作用过程有关。

关键词: 酵母双杂交;P311;增生性瘢痕;纤维化

中图法分类号: Q503;Q781;Q785 **文献标识码:** A

Screening the gene sequences of the interaction proteins of P311 from human adult cDNA library by yeast two-hybrid system

YUAN Shun-zong[1], WU Jun[1], YI Shao-xuan[1], HE Wei-feng[1], CHEN Xi-wei[1], MA Bing[1], LUO Gao-xing[1], DING Hua-ye[2], Peter M. Larsen[3] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Department of Pathology, General Hospital of Beijing Military Area Command, Beijing 100700, China; [3]Centre for Proteome Analysis, University of Southern Denmark, Denmark)

Abstract: Objective To study interaction proteins of new candidate protein P311 in hypertrophic scar by yeast two-hybrid system. Methods Using P311 as bait, a human liver cDNA library was screened and the proteins interacting with P311 were searched. The false positive clones were discarded by one to one yeast two-hybrid system, and the positive clones were sequenced and analyzed by bioinformatic methods. Results Eight true positive clones from yeast clones were obtained after verification. Conclusion The encoding proteins we obtained may play important roles in the function of P311.

Key words: yeast two-hybrid; P311; hypertrophic scar; fibrosis

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是皮肤创伤异常修复的一种不良结局,其产生决定于炎症范围和持续时间、作用于瘢痕组织的张力以及个体的遗传表型等[1]。研究表明成纤维细胞在纤维化发生和瘢痕形成中起着非常重要的作用[2],但是对参与增生性瘢痕发生发展的基因及其调控机制目前尚未完全清楚。我们利用基因芯片技术对烧伤后早期增生性瘢痕组织与同体正常皮肤组织的差异表达基因研究中筛选出97条相关基因,对其逐一进行生物信息学分析,发现在早期增生性瘢痕中p311(GenBank ID:hsu36189)的表达有着显著差异[3,4]。Fujitani等[5]证实大鼠受损后的面神经轴突延伸修复过程中P311 mRNA呈一过性上调,且重组腺病毒载体AxCAP311-FLAG的异位表达可以促进未分化PC12细胞的神经轴突生成。Pan等[6]的实验也表明P311能促进成纤维细胞向肌纤维母细胞转化,使TGF-β1和参与活化TGF-β1的基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9表达降低,从而抑制胶原蛋白1和3表达,进而发挥其抗纤维化作用。因此,为了进一步探讨P311在创伤修复过程尤其增生性瘢痕发生发展中的的作用机制及可能存在的上下游调控模式,我们利

作者简介: 袁顺宗(1977-),男,四川省武胜县人,硕士研究生,医师,主要从事纤维化相关蛋白与信号传导方面的研究。电话:(023)68752688

通讯作者: 吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:junwupro@public.cta.cq.cn

收稿日期: 2005-03-01;**修回日期:** 2005-04-19

用酵母双杂交系统，以融合 Gal4 DNA 结合区（DNA binding domain，DBD）的 P311 为诱饵蛋白，筛选了人肝 cDNA 文库，得到了与 P311 相互作用的基因编码序列。

1　材料与方法

1.1　菌种、质粒、cDNA 文库和试剂

大肠杆菌 DH5α 为本室保存菌种；P311 的基因编码序列由其发现者 Levi-Strauss Matthieu 教授惠赠。各种与酵母双杂交系统有关的试剂及各种缺陷型培养基均购自 Clontech 公司。常用分子生物学工具酶购自 TaKaRa 公司。质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自 Omega 公司。T 载体（pTZ57R/T）购自 Fermentas 公司。胰蛋白胨、酵母提取物为 Oxford 公司产品。琼脂粉、琼脂糖、Peptone 等购自上海生工。实验中除试剂盒提供以外的引物由上海博亚公司合成，合成的 P311 引物序列为：

p311 上游引物：pGBKT7-p311-*Nde* Ⅰ 5′-GCACATATGGTTTATTACCCAG-3′（插入 *Nde* Ⅰ 酶切位点）；下游引物：pGBKT7-p311-*Bam*H Ⅰ 5′-CAGGATCCTTAAAAAAACTCCAGG-3′（插入 *Bam*H Ⅰ 酶切位点）。

1.2　方法

1.2.1　诱饵重组质粒构建与转化　　P311 基因经 PCR 扩增，0.8% 琼脂糖电泳证实为 220 bp 大小后，用 PCR 产物纯化试剂盒回收，连接至 pTZ57R/T，转化至 DH5α 进行蓝白斑筛选阳性菌落并进行质粒扩增、抽提。同时以 *Nde* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ 双酶切 pTZ57R/T-p311 和 pGBKT7 质粒，回收并连接，再次转化 DH5α，提取质粒并通过 PCR、酶切和测序鉴定 pGBKT7 - p311 构建成功后醋酸锂法转化酵母菌株 AH109，通过 SD/-Trp 筛选阳性克隆，并经 PCR 再次鉴定正确后保存菌种备用。

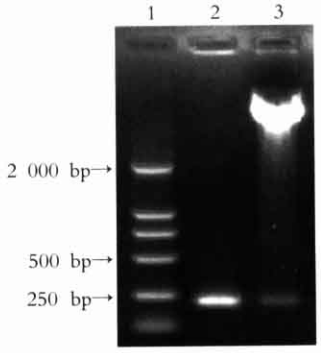
1.2.2　文库筛选　　按照 Clontech 公司的说明书进行文库的酵母接合筛选阳性克隆。验证诱饵蛋白重组质粒 pGBKT7 - p311 对 AH109 宿主菌无毒性与自激活功能后，将 AH109[pGBKT7 - 53]与 Y187[文库重组质粒]进行接合，依次通过 SD/ - Leu/ - Trp/ - His/ - Ade，SD/ - Leu/ - Trp/X - α - Gal，SD/ - Leu/ - Trp/X - α - Gal，SD/ - Leu/ - Trp/ - His/ - Ade/X - α - Gal 四轮筛选后，对所获得的阳性克隆进行酵母菌落 PCR，反应体系中同时加入 p311 和 pACT2 两对引物，0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其产物，重复 3 次，从中确定出同时含有诱饵和文库序列的阳性克隆。对阳性克隆中的重组质粒经扩增、抽提并一一测序、分类整理后，交换宿主菌株，再次进行接合实验验证阳性相互作用。

1.2.3　阳性克隆的生物信息学分析　　对上一步筛选出的阳性克隆在质粒提取并测序后，利用 BLAST（basic local alignment search tool）对结果进行同源性分析、比对（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/），对比数据库主要为 GenBank、EMBL、DDBJ 中的所有非冗余序列。并利用 Bioinformatic Harvester（http://harvester.embl.de/）在线工具分析阳性克隆所代表基因的来源与蛋白功能等相关信息。

2　结果

2.1　诱饵重组质粒的构建

经酶切、PCR 鉴定及 DNA 测序（图 1），表明 P311 基因正确插入到 pGBKT7 载体中（与 Gal4 DNA 结合区具有相同的阅读框架）。



1：DL2000 marker；2：PCR product of pGBKT7-p311；3：The vector and target fragment of pGBKT7-p311 digested with *Nde* Ⅰ，*Bam*H Ⅰ

图 1　阳性质粒的 PCR 与酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1　Electrophogram of positive clones after PCR and enzymatic digestion

测序序列为：ATGGTTTATTACCCAGAACTCTTTGTCTGGGTCAGTCAAGAACCATTTCCAAACAAGGACATGGAGGGAAGGCTTCCTAAGGGAAGACTTCCTGTCCCAAAGGAAGTGAACCGCAAGAAGAACGATGAGACAAACGCTGCCTCCCTGACTCCACTGGGCAGCAGTGAACTCCGCTCCCCAAGAATCAGTTACCTCCACTTTTTTTAA

2.2　诱饵重组质粒的毒性、自激活与接合率

与 pGBKT7 空载体对照相比较，实验结果证实诱饵重组质粒无自激活活性、对 AH109 无毒性，并且 AH109[pGBKT7-p311] 与 Y187[pTD1-1] 的接合率略高于其以对照 Y187[pTD1-1] 与 AH109[pGBKT7-53] 的接合率。表明 AH109[pGBKT7-p311] 可以用于酵母双杂交系统筛选相互作用蛋白。

2.3　成人肝 cDNA 文库的筛选和阳性克隆的鉴定

30 ℃培养 22 d，SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 培养基上初步挑选出阳性菌落为 355 个，经过 3 轮系统控制下的筛选得到阳性菌落 98 个，连续重复 3 次酵母菌落 PCR 后，鉴定出同时含有诱饵和文库序列的阳性克隆 55 个。并最终成功提取出 40 个阳性文库质粒。对测序结果进行生物信息学分析后发现 40 个阳性克隆分属 18 种目的基因（表 1）。一对一的回复性杂交实验（将 AD 阳性质粒分别与诱饵蛋白 pGBKT7-p311 质粒分别交换宿主菌进行接合）表明，阳性克隆均能生长且 α-半乳糖苷酶显色反应阳性。

2.4　阳性克隆的生物信息学分析

进一步分析 18 种基因对应的编码蛋白，并删除公认的假

阳性蛋白如线粒体蛋白(haplotype As8D mitochondrion)、转铁蛋白(ferritin)和细胞骨架(actin)等之后,最终确定8个阳性克隆,其代号为:7,8,15,16,19,47,49,88,与P311都能同时表达于成纤维细胞中。

表1 酵母双杂交系统筛选出与P311发生相互作用的18种蛋白

Tab 1 18 positive interacting proteins obtained by yeast two-hybrid system

Proteins	Clones(n)	Number of some plasmids
Metallothionein 2A	17	49
Ferritin light polypeptide	3	4
Hypothetical protein HT036	3	19
Peptide deformylase-like protein	2	15
Aspartoacylase-3	2	16
BAC clone RP11-291L15 from 4	1	25
Chromosome clone RP11-47L3	1	40
Clone FLB1413 PRO0309	1	88
Haplotype As8D mitochondrion	1	54
Hepsin (transmembrane protease, serine 1) (HPN)	1	9
Histidine-rich glycoprotein (HRG)	1	8
Signal recognition particle receptor	1	7
Transthyretin (prealbumin, amyloidosis type I)	1	33
Actin, beta (ACTB)	1	83
Aldehyde oxidase 1 (AOX1)	1	63
Clone RP11-320C15 on chromosome 6	1	53
cDNA FLJ11094 fis, clone PLACE1005373	1	75
Integrin beta 4 binding protein (ITGB4BP)	1	47

3 讨论

P311(又名PTZ17,pentylenetetrazol 17)的编码基因由Studler等[7]于1993年通过差异展示方法首先在胚胎大鼠的脑组织中发现。P311基因定位于5号染色体ORF13,其完整的基因全长约为2 025 bp,包含3个开放阅读框,但仅第一个阅读框编码含68个氨基酸的蛋白P311,分子量为8×10^3,该阅读框阅读框在人和小鼠之间高度保守[6,7]。此外,在人、小鼠和鸡P311的N末端还存在一高度保守的PEST结构域(富含Pro,Glu,Ser和Thr的区域)[6]。该结构主要发现存在于短时表达的蛋白如转录因子、细胞因子和信号分子的结构中[8]。并且P311的表达受HGF/SF通路调控[9],说明P311在细胞分化过程中扮演着转录因子或促转录因子转录活性的角色[5]。我们虽然在前期利用基因芯片对增生性瘢痕的研究中发现p311表达具有显著差异,并且Pan等的实验也证实P311可能具有抗纤维化的潜在作用,并促使成纤维细胞向肌成纤维细胞转化,但作用机制目前尚未完全清楚[6]。因此我们选用酵母双杂交系统对P311的相互作用蛋白进行筛选,希望能够从中发现与其功能相关的相互作用蛋白,为进一步研究P311在纤维化中的作用机制奠定基础。

酵母双杂交技术最初是由Fields等[10]创建,是在真核细胞内从基因水平分析蛋白与蛋白之间相互作用的一种灵敏方法。其主要优势在于研究细胞内蛋白质间相互作用时,蛋白质可保持天然构象,从而能够真实反应体内蛋白质间相互作用,而且该方法是对编码蛋白质的基因进行操作而非直接研究蛋白质间的相互作用,因此绕开了分离目的蛋白的技术问题。Clontech公司的Matchmaker GAL4 two-hybrid system 3与传统的双杂交系统相比其主要优势在于利用酵母a型(菌株AH109)与α型单倍体细胞(菌株Y187)相互接合的生长方式,使得诱饵蛋白与文库中的目的蛋白在二倍体细胞内直接相互作用,避免了共转染诱饵质粒和文库质粒所带来的低效率问题,同时由于宿主菌(AH109)使用了3个报告基因(HIS3、ADE2、LacZ/MEL1)也使得由于系统本身所致的假阳性率也大为降低。本实验通过对成人肝文库的筛选,一对一回复性实验验证及生物信息学分析后确定了8种阳性相互作用蛋白。此8种蛋白能与P311同时表达于成纤维细胞中,并能在酵母双杂交系统中与P311发生相互作用。其中,阳性相互作用蛋白之一的金属硫蛋白2A(metallothionein 2A,MT2A)已经为Miura等[11]证实能够调控P311的表达。此外,张宝林等[12]在对内皮抑制素相互作用蛋白的研究中也筛选到编码未知蛋白HT036的阳性克隆,通过对各蛋白数据库的查询,表明此序列编码一功能不明的基因。将模建的HT036结构与PDB库中的蛋白三维结构进行对比,发现除1K77外没有其他蛋白与之结构相似;由于1K77是来自于大肠杆菌的蛋白,虽然最近有晶体结构析出,但未见其功能报道。这表明HT036蛋白很可能是目前存在于哺乳动物细胞内的结构、功能未知的一种新蛋白,有可能与P311和内皮抑制素的作用机制有关。

总之,结合P311相互作用蛋白筛选结果和我们前期增生性瘢痕基因芯片中p311的显著差异表达现象,以及Pan等发现P311的表达能够引起TGF-β1和参与活化TGF-β1的基质金属蛋白酶MMP-2、MMP-9表达降低[6],从而通过抑制胶原蛋白1和3表达抑制纤维化,我们推测纤维化的形成和瘢痕的发生发展可能和P311与其相互作用蛋白之间的相互作用存在着一定的联系,这也有待于进一步实验证实。

参考文献:

[1] Roseborough I E, Grevious M A, Lee R C. Prevention and treatment of excessive dermal scarring[J]. J Natl Med Assoc, 2004, 96(1): 108-116.

[2] 李　才. 器官纤维化基础与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，2003. 1－34.

[3] Wu J, Ma B, Yi S, *et al*. Gene expression of early hypertrophic scar tissue screened by means of cDNA microarrays[J]. J Trauma, 2004, 57(6): 1276－1286.

[4] 马　兵，吴　军，易绍萱，等. 表达谱基因芯片筛选烧伤后增生性瘢痕相关基因的研究[J]. 中华创伤杂志，2001，17(6)：334－337.

[5] Fujitani M, Yamagishi S, Che Y H, *et al*. P311 accelerates nerve regeneration of the axotomized facial nerve[J]. J Neurochem, 2004, 91(3): 737－744.

[6] Pan D, Zhe X, Jakkaraju S, *et al*. P311 induces a TGF-beta1-independent, nonfibrogenic myofibroblast phenotype[J]. J Clin Invest, 2002, 110(9): 1349－1358.

[7] Studler J M, Glowinski J, Levi Strauss M. An abundant mRNA of the embryonic brain persists at a high level in cerebellum, hippocampus and olfactory bulb during adulthood[J]. Eur J Neurosci, 1993, 5(6): 614－623.

[8] Varshavsky A. The ubiquitin system[J]. Trends Biochem Sci, 1997, 22(10): 383－387.

[9] Taylor G A, Hudson E, Resau J H, *et al*. Regulation of P311 expression by Met-hepatocyte growth factor/scatter factor and the ubiquitin/proteasome system[J]. J Biol Chem, 2000, 275(6): 4215－4219.

[10] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. Nature, 1989, 340(6230): 245－246.

[11] Miura N, Naganuma A. Metallothionein mediates gene expression of 3.1 mRNA (PTZ17) related to epileptic seizure[J]. FEBS Lett, 2000, 479(3): 146－148.

[12] 张宝林，贾向旭，苑晓玲，等. 酵母双杂交技术研究与内皮抑制素相互作用的蛋白质[J]. 军事医学科学院院刊，2003，27(3)：180－182.

（编辑　王　红）

（上接 1427 页）

表 1　阑尾炎超声分型诊断符合率

	超声确诊例数	手术及病理确诊例数	诊断符合率(%)
单纯性阑尾炎	35	39	89.7
化脓性阑尾炎	66	68	97.1
坏疽性阑尾炎	44	46	95.7
阑尾周围脓肿	31	31	100.0

2.1　各型阑尾炎典型声像图表现

单纯性阑尾炎：阑尾轻度增大，轮廓清晰，管壁层次清楚，粘膜毛糙，回声中断，管腔轻度积液。化脓性阑尾炎：阑尾明显肿胀，张力高，轮廓清晰，浆膜回声增强，阑尾层次较模糊（但尚能分辨），粘膜毛糙，回声中断更为明显，阑尾腔内见较多量液暗区，且透声差。与周围组织界限亦较清晰。坏疽性阑尾炎：穿孔前，阑尾大小及腔内回声与化脓性阑尾炎相似；穿孔后，早期阑尾直径较穿孔前缩小，张力减低，阑尾壁层次结构更加模糊不清，阑尾局部可见全层中断现象，中断处浆膜外可见不规则液暗区。穿孔时间较久，阑尾形态部分或全部不能显示。阑尾周围脓肿：回盲部周围回声杂乱，可见强弱不均混合回声团。

2.2　阑尾炎的间接征象

盲肠壁及阑尾根部管壁水肿增厚呈低回声，阑尾根部与盲肠交汇处呈“喇叭口”改变。大网膜向炎症部位聚集包裹：本组 146 例出现回盲部周围大网膜聚集包裹，占 83.0%。声像图表现为阑尾周围明显增厚的絮团状高回声。腹腔积液：本组 93 例存在不同程度的腹腔积液，占 52.8%。超声显示最小液暗区，深约 5 mm，最大者 50 mm。液暗区透声良好 26 例，透声差 67 例。肠系膜淋巴结肿大：本组 91 例发现肠系膜淋巴结肿大，占 51.7%。肿大淋巴结往往发生于阑尾周围，淋巴结有孤立，也有彼此聚集的。呈椭圆形，长宽比 >2:1，内部呈低回声。上述声像改变在小儿及部分腹壁较薄的瘦弱体型成人中易于检出。阑尾周围肠管扩张：本组 68 例有此现象，占 38.6%；出现肠管扩张病例中几乎所有病例都有升结肠扩张现象。出现此现象是因为炎症刺激临近肠管导致麻痹性肠管扩张所致。

3　讨论

急性阑尾炎是临床常见的急腹症，其病因主要是由于阑尾管腔阻塞和细菌侵入[1]。具有典型转移性腹痛症状和体征的患者诊断并不困难。但临床有部分患者尤其是小儿、老年人、孕妇，通常不能提供腹痛的详细病史，缺乏典型体征，需要长时间观察才能作出明确诊断。由于上述特殊类型阑尾炎易误诊，并发症多，常危及生命，外科医师主张早期行阑尾切除术[1]，其结果造成 10% ~15% 的假阳性[2]。近年来，随着高分辨率超声仪的不断出现，使超声在诊断阑尾炎方面越来越普及。超声检查对临床拟诊阑尾炎者意义更大，使假阳性率明显下降。超声检查特异性高。一般情况下，当超声明确显示阑尾炎征象时诊断便可成立。本组病例统计显示：超声诊断单纯性阑尾炎其符合率为 89.7%，化脓性阑尾炎为 97.1%，坏疽性阑尾炎为 95.7%，阑尾周围脓肿为 100%。可见超声对小儿及成人阑尾炎的临床病理分型有很高的价值。

本组病例超声检出阑尾炎直接征象最早时间约发病后 5 h，共计 3 例，阑尾内均见粪石嵌顿；本组阑尾炎最早穿孔为发病后 25 h，为 1 例粪石嵌顿患儿，本组阑尾炎穿孔病例平均发病时间约 41 h；本组阑尾炎最佳检查时段在发病后 8 ~20 h，该时段多处于单纯性阑尾炎或化脓性阑尾炎阶段，超声对阑尾显示效果好，阑尾尚未穿孔，该时段检查对外科手术时机选择意义大。

关键词：超声检查；阑尾炎

中图法分类号：R445.1　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 戴显伟. 阑尾疾病[A]. 见：吴在德，吴肇汉 主编. 外科学[M]. 第 6 版. 北京：人民卫生出版社，2004. 491，496－497.

[2] 潘　尹，金慧佩，王　海，等. 超声检查对小儿阑尾炎的诊断和临床分型的价值探讨[J]. 中国超声医学杂志，2003，19(11)：842－845.

（编辑　栾　嘉）