论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2400-03

利用免疫共沉淀验证 HT036 与 P311 间的相互作用

袁顺宗[1,2*],彭 旭[1,2*],马 兵[1,2],王庆红[1,2],易绍萱[1,2],贺伟峰[1,2],陈希炜[1,2],胡晓红[1,2],张小容[1,2],周丽娜[1,2],罗高兴[1,2],吴 军[1,2] (第三军医大学西南医院:[1]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,[2]疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 利用免疫共沉淀技术验证未知蛋白 HT036(hypothetical protein, HT036)和 P311 间的相互作用。**方法** 构建能在哺乳动物细胞中表达带 HA 标签的 HT036 融合蛋白(HA-HT036)的重组载体 pCMV-HA-HT036,经酶切鉴定正确后,和表达带 Myc 标签的 P311 融合蛋白(Myc-P311)的重组真核表达载体 pCMV-Myc-p311,单独或者共转染人 293 细胞,利用免疫共沉淀技术验证 HT036 与 P311 间的相互作用。**结果** 构建的重组表达载体 pCMV-HA-HT036 经双酶切鉴定正确,转染 293 细胞,抗 Myc 单克隆抗体沉淀 Myc-P311 相互作用蛋白复合物后,用抗 HA 单克隆抗体进行 Western blot 检测,可以检测到 HA-HT036 的表达。**结论** 成功构建了 HA-HT036 融合蛋白真核表达重组载体,在哺乳动物细胞中表达后利用免疫共沉淀技术证实 HT036 与 P311 之间存在着相互作用。

关键词:HT036;P311;载体构建;免疫共沉淀;相互作用

中图法分类号:Q503;Q51;TQ93 **文献标识码**:A

Identification of interaction between HT036 and P311 by co-immunoprecipitation

YUAN Shun-zong[1,2], PENG Xu[1,2], MA Bing[1,2], WANG Qing-hong[1,2], YI Shao-xuan[1,2], HE Wei-feng[1,2], CHEN Xi-wei[1,2], HU Xiao-hong[1,2], ZHANG Xiao-rong[1,2], ZHOU Li-na[1,2], LUO Gao-xing[1,2], WU Jun[1,2] (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, [2]Chongqing Key Lab for Medical Proteomics, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the interaction between HT036 (hypothetical protein HT036) and P311 by co-immunoprecipitation. **Methods** HA-tagged fusion protein (HA-HT036) expression vector was constructed, identified and transfected into human embryo kidney 293 (HEK293) cells alone or with Myc-tagged fusion protein (Myc-P311) expression vector pCMV-Myc-p311. The interaction between P311 and HT036 was detected by co-immunoprecipitation. **Results** Double restriction enzyme digestion showed that pCMV-HA-HT036 was constructed correctly. When Myc-P311 was immunoprecipitated by anti-Myc antibody, HA-HT036 was identified by Western blotting with anti-HA antibody from immunoprecipitated complex. **Conclusion** The recombinant vector pCMV-HA-HT036 was constructed successfully. The interaction between HT036 and P311 could be identified by co-immunoprecipitation after co-expression of pCMV-HA-HT036 and pCMV-Myc-p311. The result provides an important basis for further study of the intracellular signal transduction of P311.

Key words: HT036; P311; expression vector construction; co-immunoprecipitation; protein-protein interaction

P311 基因是本研究小组利用基因芯片技术从早期增生性瘢痕组织中筛选出的显著高表达的差异基因[1],同时 Pan 等[2]的研究证实 P311 蛋白在创伤愈合早期表达于肌成纤维细胞内,并且 P311 基因转染成纤维细胞后能够促进成纤维细胞转分化为肌成纤维细胞,提示 P311 可能在创伤纤维化修复以及增生性瘢痕发生发展过程中起着重要作用,故我们将其列为增生性瘢痕相关的新候选蛋白。然而 P311 促成纤维细胞-

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(30571922)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30571922)

作者简介:袁顺宗(1977-),男,四川省武胜县人,博士研究生,医师,主要从事纤维化相关调节机制方面的研究。电话:(023)68752688, E-mail: yuanshunzong@mail.tmmu.com.cn
*:同等贡献者
通讯作者:罗高兴,电话:(023)68754006
吴 军, E-mail: junwupro@public.cta.cq

收稿日期:2006-07-10;**修回日期**:2006-09-08

肌成纤维细胞转分化的分子机制尚不清楚，因此我们又利用酵母双杂交技术对 P311 的相互作用蛋白进行了初步筛选，获得了一个能与 P311 发生相互作用的新蛋白——未知蛋白 HT036[3]。在此基础上，为了在活体细胞内进一步证实 HT036 与 P311 间的相互作用，我们分别构建了 P311 的融合蛋白 Myc-P311 和 HT036 的融合蛋白 HA-HT036 的表达载体 pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036，共转染 HEK293 细胞后，利用免疫共沉淀验证 P311 与 HT036 间是否存在着相互作用。

1　材料与方法

1.1　菌种、质粒和试剂

大肠杆菌 DH5α、含 P311 基因序列的重组载体 pCMV-Myc-p311 和含 HT036 编码序列的重组载体 pACT2-HT036 均为本研究小组保存试剂。pCMV-HA 载体、Myc 单抗和 HA 多抗均购自 Clontech 公司，HRP 标记的羊抗兔 IgG 及化学发光液购自博士德公司，细胞裂解液 RIPA 购自 Santa Cruz 公司，PVDF 膜购自 Millipore 公司，蛋白标准品（Biotinylated Protein Ladder）及其检测抗体（Anti-biotin HRP-linked antibody）购自康成公司，分子生物学操作所用工具酶购自 TaKaRa 公司，质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司，胰蛋白胨、酵母提取物购自 Oxford 公司，琼脂粉、琼脂糖等购自上海生工，DMEM 购自 Gibco 公司，转染剂 Lipofetamine 2000 购自 Invitrogen 公司。

1.2　方法

1.2.1　重组载体 pCMV-HA-HT036 的构建　　分别根据 pACT2-HT036 和空载体 pCMV-HA 的特点，进行 *Sfi* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切；0.6% 琼脂糖凝胶电泳酶切产物后，紫外灯下分别切割含目的片段和载体的凝胶，用胶回收试剂盒进行回收；T_4 DNA 连接酶分别连接胶回收产物（16 ℃，1 h）并转化连接产物至 DH5α，挑取单菌落进行质粒扩增，用 *Sfi* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定连接产物，并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳酶切产物。

1.2.2　细胞转染　　按 2×10^5/孔接种 HEK293 细胞至六孔板中，待细胞长至 90% 融合时共转染 pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036，以 pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036 的分别转染为对照组。具体方法：①将 10 μg DNA 用 250 μl 不含抗生素的无菌无血清 DMEM 稀释并混匀后，室温孵育 5 min。②用 240 μl 不含抗生素的无菌无血清 DMEM 稀释 10 μl Lipofectamine 2000 并混匀后，室温孵育 5 min。③将①和②中混合液进行混和即成转染混合液，室温孵育 15 min。④将六孔板中培养基换用 1 ml 不含抗生素的无菌无血清 DMEM，加入转染混合液，并轻柔混匀，置于 CO_2 培养箱中（37 ℃，5% CO_2）孵育。⑤4 h 后，弃去培养基，换用含 10% 小牛血清之 DMEM 继续培养。

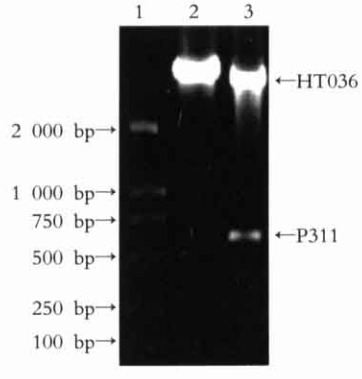
1.2.3　免疫沉淀反应　　转染 48 h 后，弃去培养基，在冰上进行后续操作。刮下细胞，用冷 PBS 液冲洗 2 遍，离心，弃上清，加入 100 μl RIPA，冰浴 30 min，加入 1 μg 小鼠抗 Myc 单克隆抗体，4 ℃旋转混合 2 h，加入 20 μl 蛋白 A，继续混合 12 h，离心，去上清后，用 RIPA 洗沉淀 3 遍，加入 20 μl 2 × Tricine SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 5 min，稍离心后，立即进行电泳。

1.2.4　Western blot 检测　　用 10% Tricine SDS-PAGE 胶对样品进行电泳，每孔上样量为 20 μl，蛋白标准品上样量为 10 μl，用半干电转仪转膜后，5% 脱脂奶粉封闭 1 h，然后加入 1∶2 000 稀释的兔抗 HA 多克隆抗体，4 ℃过夜孵育后，0.1% TBST 洗膜，3 次，5 min/次，加入 1∶10 000稀释的羊抗兔 IgG 和 1∶10 000 稀释的蛋白标准品检测抗体，室温孵育 30 min，洗膜，方法同前，根据操作说明，加入化学发光液，于 Bio-Rad 凝胶成像仪中进行显影。

2　结果

2.1　重组载体 pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036 的鉴定

经酶切、电泳后获得的图谱显示（图 1），近 250 bp 处的条带为酶切后的目的片段 P311 编码基因（图 1，条带 2），近 700 bp处的条带为酶切后的目的基因 HT036（图 2，条带 3），表明 pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036 分别构建成功。实验重复 3 次，结果均一致。

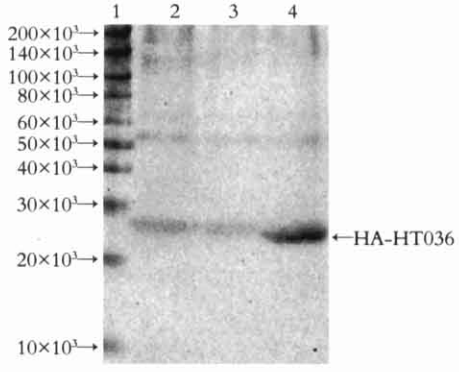


1：DNA 标准（DL2000）；2：pCMV-Myc-p311 酶切；3：pCMV-HA-HT036 酶切

图 1　pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036 重组载体酶切后的琼脂糖凝胶电泳图

2.2　免疫共沉淀结果

pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036 共转染 HEK293 细胞 48 h 后，提取蛋白，沉淀 P311 及与其相互作用的蛋白复合物，并进行 Western blot 检测（图 2）。从图 2 可以看出，在单独转染 pCMV-Myc-p311 或 pCMV-HA-HT036 的情况下，利用 Myc 抗体进行免疫沉淀后没有检测到 HA-HT036 的表达（阴性对照），只有当 pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036 共转染后，在经 Myc 抗体沉淀下来的 Myc-P311 相互作用蛋白复合物中，才可以检测到 HA-HT036 的表达，结合我们前期酵母双杂交的筛选结果，表明 P311 与 HT036 之间具有相互作用。实验重复 3 次，结果均一致。



1:蛋白标准; 2: pCMV-Myc-p311 单转染 HEK293;3: pCMV-HA-HT036 单转染 HEK293; 4: pCMV-Myc-p311 和 pCMV-HA-HT036 共转染 HEK293

图2 免疫共沉淀检测 P311 与 HT036 之间的相互作用

3 讨论

从全细胞提取物中利用免疫共沉淀技术来检测蛋白间的相互作用是一种极为有效的检测方法,该技术可以用来验证已知蛋白间的相互作用,还可以用来验证已知蛋白与未知蛋白间的相互作用。免疫共沉淀技术既可以单独使用也可以和其他方法如酵母双杂交技术联合应用来验证蛋白间的相互作用[4]。本实验就是在前期的酵母双杂交初步筛选结果的基础上进行的进一步验证 P311 与 HT036 之间的相互作用。

P311,亦称 PTZ17,编码分子量为 8×10^3 的胞内蛋白,最初被发现于神经元和肌肉组织中[5]。随后本研究小组发现在早期的增生性瘢痕组织中,P311 基因呈显著差异表达,但机制与作用不明。同时,Pan 等[2]也研究发现创伤愈合过程中,P311 蛋白高表达于肌成纤维细胞(以细胞质为主)中,且能够促进成纤维细胞-肌成纤维细胞转分化,表明 P311 可能影响纤维化乃至增生性瘢痕的发生发展过程。增生性瘢痕通常由于皮肤创伤不完全修复过程中的过度纤维化所致,其产生决定于炎症范围与持续时间、作用于瘢痕组织的张力以及个体遗传表型等因素[6]。既往研究表明成纤维细胞/肌成纤维细胞在纤维化发生和瘢痕形成过程中起着关键作用[7],虽然目前的研究表明 TGF-β1、PTEN 和 PPARγ 拮抗剂等因子在成纤维细胞-肌成纤维细胞转分化中发挥着重要功能[8-11],然而对参与其中的调控基因及其信号传导机制还未完全清楚。因此,P311 的发现及初步研究结果对于揭示增生性瘢痕的发生发展以及防治,可能会是一个新的突破口。尽管如此,对于 P311 在与增生性瘢痕密切相关的成纤维细胞-肌成纤维细胞转分化过程中的细胞信号研究,文献报道却较少。虽然我们在前期的研究中获得了一个新的 P311 相互作用候选蛋白——未知蛋白 HT036,但由于 P311 与 HT036 均没有现成的抗体可以获得,因此我们采用了真核细胞内表达带标签的融合蛋白 Myc-P311 和 HA-HT036,并通过免疫共沉淀的方法证实 P311 与 HT036 在活体细胞内存在着相互作用。不过,对于 P311 与 HT036 间的相互作用对肌成纤维细胞转分化的影响尚需进一步实验研究来进行探讨。

参考文献:

[1] 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.

[2] 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.

[3] 袁顺宗, 吴 军, 易绍萱, 等. 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[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(14): 1428-1431.

[4] MASTERS S C. Co-immunoprecipitation from transfected cells[J]. Methods Mol Biol, 2004, 261: 337-350.

[5] 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.

[6] 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.

[7] DESMOULIERE A, CHAPONNIER C, GABBIANI G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast[J]. Wound Repair Regen, 2005, 13(1): 7-12.

[8] WHITE E S, ATRASZ R G, HU B, *et al*. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog Deleted on chromosome 10)[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173(1): 112-121.

[9] BURGESS H A, DAUGHERTY L E, THATCHER T H, *et al*. PPARgamma agonists inhibit TGF-beta induced pulmonary myofibroblast differentiation and collagen production: implications for therapy of lung fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(6): L1146-L1153.

[10] VALLANCE B A, GUNAWAN M I, HEWLETT B, *et al*. TGF-beta1 gene transfer to the mouse colon leads to intestinal fibrosis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(1): G116-G128.

[11] EVANS R A, TIAN Y C, STEADMAN R, *et al*. TGF-beta1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation-the role of Smad proteins[J]. Exp Cell Res, 2003, 282(2): 90-100.

(编辑 张大春)