论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0296-04

应用酵母双杂交系统筛选MRP2胞内区相互作用蛋白

刘 涛[1],金超智[2],张翠莉[3],陈 慧[4],储著朗[4],王英杰[1],杨晓明[2] ([1]第三军医大学西南医院全军感染病研究所,重庆 400038;[2]军事医学科学院放射医学研究所,北京 100850;[3]重庆医科大学生殖医学系遗传学教研室,重庆 410016;[4]安徽医科大学病理生理学教研室,合肥 230032)

提 要: 目的 应用酵母双杂交技术研究与多药耐药蛋白MRP2发生相互作用的蛋白。**方法** 应用酵母双杂交系统,以人MRP2胞内区C末端220个氨基酸为诱饵,筛选成人肝cDNA文库,寻找能与之相互作用的蛋白。利用生物信息学分析,一对一酵母回复性杂交等提供的信息,筛除假阳性。**结果** 经过酵母双杂交共获得162个克隆,经过验证分析,最终确定3个无重复阳性克隆。**结论** 获得的3个基因编码的蛋白可能揭示MRP2新的作用机制。

关键词: MRP2;酵母双杂交;蛋白质相互作用;ATP结合盒超家族转运蛋白

中图法分类号: Q503;Q591.2 **文献标识码**: A

Screening the interaction proteins of MRP2 by yeast two-hybrid system

LIU Tao[1], JIN Chao-zhi[2], ZHANG Cui-li[3], CHEN Hui[4], CHU Zhu-lang[4], WANG Ying-jie[1], YANG Xiao-ming[2] ([1]Institute of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 40038; [2]Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850; [3]Department of Procreation Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016; [4]Department of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: Objective To study interaction proteins of MRP2 by yeast two-hybrid system. **Methods** Using the 220 C-terminal amino acids of MRP2 as bait, a human liver cDNA library was screened and the proteins interacting with MRP2 were searched. The false clones were eliminated by bioinformatic methods and one to one yeast two-hybrid system. **Results** Three true positive clones from yeast clones were obtained after verification. **Conclusion** The encoding proteins we obtained may play important roles in finding the new function of MRP2.

Key words: MRP2; yeast two-hybrid; protein-protein interaction; ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily

ATP结合盒超家族转运蛋白[ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily]是一类分布广泛、数目众多的跨膜转运体系。它们可以转运代谢产物、离子、糖、氨基酸、脂类、固醇以及药物等多种底物通过细胞内、外膜。一些特定的ABC转运蛋白在多药耐性的肿瘤细胞系或癌症过表达,与临床耐药密切相关。这些基因的突变可能直接和间接导致多种遗传疾病[1]。而目前关于ATP结合盒超家族转运蛋白具体转运机制以及功能还未完全了解。关于其与细胞内蛋白的相互作用研究甚少。通过蛋白质相互作用研究可能发现其更准确的转运调节机制与揭示新的功能。人多药耐药蛋白MRP2(the human multidrug resistance protein 2)是人ATP结合盒超家族转运蛋白C亚家族成员之一,又称ABCC2,是一种多处表达的多次跨膜糖蛋白,可以转运多种抗肿瘤药物到细胞外,与肿瘤细胞耐药密切相关[2]。

为更清楚了解ABC转运蛋白具体转运机制,揭示MRP2可能存在的新功能,本研究利用酵母双杂交系统,选取了融合Gal4 DNA结合区(DNA binding domain, DBD)的人MRP2胞内区C末端220个氨基酸为诱饵,筛选成人肝cDNA文库,寻找能与之相互作用的蛋白。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

ProQuest™酵母双杂交系统与成人肝cDNA文库购于美国Invitrogen公司。Yeast Nitrogen Base(YNB)、Bacto-yeast extract、

基金项目:"十五"国家科技攻关计划(2004BA711A19)
Supported by the "Tenth Five-Year Plan" for Sci & Tech Research of China (2004BA711A19)

作者简介:刘 涛(1977-),男,湖北省钟祥市人,硕士研究生,医师,主要从事人类肝脏蛋白质组学方面的研究。电话:(023)68754475
通讯作者:杨晓明,E-mail:xmy1998@yahoo.com.cn
王英杰,E-mail:wangyj103@263.com

收稿日期:2006-03-20;修回日期:2006-11-20

Bacto-Peptone 购于美国 BD 公司。PEG3350、葡萄糖、LiAC、各种氨基酸购于北京百灵克生物科技公司。3-AT、212 ~ 300 μm 玻璃珠购自美国 Sigma 公司。酵母质粒提取试剂盒购于北京天为时代公司。细菌质粒小量提取试剂盒购于美国 Promega 公司。细菌质粒大量提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司。*Taq* 酶、DNA 限制性内切酶购于大连宝生物工程(TaKaRa)有限公司。T_4 DNA 连接酶购于纽英伦生物技术(北京)有限公司。X-gal 购于美国 Gibco 公司。JM109 细菌感受态为实验室保存。

1.2　pDBLeu-MRP2 诱饵载体的构建

利用 PCR 扩增的方法从成人肝 cDNA 文库中获得对应 MRP2 胞内 C 末端 220 个氨基酸的编码序列(GenBank Accession Number: NM_000392)。上游引物 5′-ACGCGTCGACCAGCATGGAGAAGATTGGTGTG-3′,下划线处为 *Sal* Ⅰ酶切位点;下游引物 5′-GGACTAGTCTAGAATTTTGTGCTGTTCAC-3′,下划线处为 *Spe* Ⅰ酶切位点。PCR 条件:94 ℃,预变性 5 min;94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环;72 ℃ 7 min。回收 PCR 产物,*Sal* Ⅰ和 *Spe* Ⅰ双酶切,然后与同样双酶切的 pDBLeu 载体连接。连接产物转化 *E. coli.* JM109 感受态,卡那抗性筛选,挑选阳性克隆提取质粒进行 PCR 和酶切鉴定,送上海博亚(北京)公司测序。

1.3　酵母的转化与自激活检测、3AT 的确定

参考 ProQuest™酵母双杂交系统操作手册执行并做适当改进。接种数个单克隆 MaV203 酵母菌于 YPAD 培养基中,30 ℃ 250 r/min 摇床培养过夜,次日取过夜菌转接入新鲜 YPAD 培养基使其起始 $D(600)$ 值为 0.1,用灭菌水重悬 MaV203,30 ℃ 250 r/min 摇床培养至 $D(600)$ 为 0.4 左右(约 5 h)。离心收集菌体,洗涤后用 1 × TE/LiAC 重悬,收集菌体,分为 2 组,都加入单链鲑精 DNA(ssDNA) 5 μl、PEG/LiAC,1 组加质粒 pDBLeu-MRP2(筛选文库用),另 1 组加质粒 pDBLeu-MRP2 + pPC86(自激活检测用),每种质粒均加入 200 ng,轻轻混匀,30 ℃ 水浴 30 min,42 ℃ 水浴 15 min,离心收集菌体,无菌水重悬,分别涂布于 SC-Leu 和 SC-Leu-Trp 营养缺陷平板上,30 ℃ 培养 48 ~ 72 h,观察酵母细胞的生长状态。然后随机从 SC-Leu-Trp 板上挑取长出的菌落 4 个以及 A ~ E 5 个对照菌各 2 个挑取到 SC-Leu-Trp 营养缺陷平板上,30 ℃ 培养 24 ~ 48 h。随后用绒布影印到一系列 3AT 浓度梯度(10、25、50、75、100 mmol/L)的 SC-Leu-Trp-His 营养缺陷平板上,并同时做影印清除,30 ℃ 继续培养,24 h 后再做 1 次影印清除,30 ℃ 继续培养 24 ~ 48 h 观察结果,抑制转化子细胞生长的最低的 3-AT 浓度就是需要加入的 3AT 浓度。

1.4　成人肝 cDNA 文库的筛选

挑取几个转化了诱饵质粒 pDBLeu-MRP2 的酵母菌单克隆于 SC-Leu 液体培养基中,30 ℃,250 r/min 摇床过夜,次日用以调节 500 ml YPAD 液体培养基 $D(600)$ 为 0.1,30 ℃,250 r/min 摇床至 $D(600)$ 为 0.4 左右,按转化的方法离心、重悬、洗涤后用 1 × TE/LiAC 重悬,收集菌体,加入成人肝 cDNA 文库质粒(25 μg)、鲑精 DNA(125 μl)、PEG/LiAC 混匀,30 ℃ 水浴 30 min,42 ℃ 水浴 30 min,冰上放置 5 min。离心去上清,用无菌水重悬,涂布于 SC-Leu-Trp-His + 3AT 平板上,30 ℃ 培养 60 h。用绒布对所有筛选平板进行影印清除,至完全看不到菌落为止。30 ℃ 培养 48 ~ 60 h,挑取长出的克隆以及对照菌到 SC-Leu-Trp 上,培养 1 ~ 2 d。随后复制到 SC-Leu-Trp-His + 3AT、SC-Leu-Trp-Ura 及覆盖有灭菌 Whatman 滤纸的 YPAD 平板上,进行 His、Ura、LacZ 3 个报告基因的鉴定。

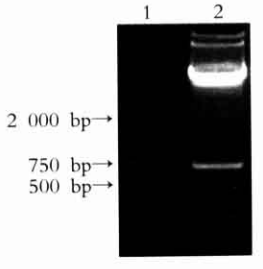
1.5　阳性酵母质粒的提取、回转验证和序列分析

挑取能同时激活 3 个报告基因 His、Ura、LacZ 的阳性克隆于 SC-Leu-Trp 液体培养基中培养过夜,离心去上清,参照天为时代酵母质粒提取试剂盒提取酵母质粒,转化 *E. coli.* JM109 菌株,氨苄抗性筛选,提取 pPC86 猎物质粒。将所得到的猎物质粒分别与 pDBLeu-MRP2 以及 pDBLeu 空载体(作为阳性克隆的自激活对照)共转酵母 MaV203,随后再进行 His、Ura、LacZ 3 个报告基因的回转鉴定。将回转阳性的质粒,送上海博亚(北京)公司测序。测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析。

2　结果

2.1　诱饵蛋白 pDBLeu-MRP2 构建及鉴定

参考 GenBank 中编号为 NM_000392 的 MRP2 基因序列,针对 MRP2 胞内区 C 末端 220 个氨基酸设计引物,成功的利用 PCR 在成人肝 cDNA 文库中扩增出 663 bp 大小的目的 DNA 片段,双酶切和 pDBLeu 连接,随后转化 *E. coli.* JM109。将卡那平板上生长的菌落,摇菌提取质粒,进行 PCR 和酶切鉴定,酶切的结果如图 1 所示,符合目的片段大小。随后送测序验证。测序结果证明插入序列是 MRP2 ORF 序列的 C 末端 663 个碱基序列,编码 MRP2 胞内区 C 末端 220 个氨基酸,且其读框与 pDB-Leu的读框一致。



1:标准(DL2000);2: *Sal* Ⅰ和 *Spe* Ⅰ双酶切

图 1　pDBLeu-MRP2 的 *Sal* Ⅰ和 *Spe* Ⅰ酶切电泳图

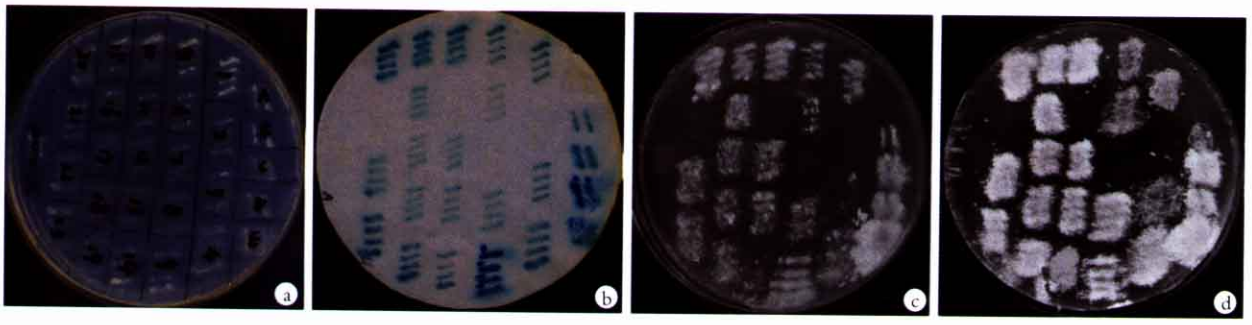
2.2　诱饵蛋白自激活的检测和 3AT 的确定

将 pDBLeu-MRP2 转入酵母菌生长后,长出的克隆菌落的大小、颜色正常,表明目的蛋白的表达对酵母细胞没有毒性。根据加入了不同浓度的 3-AT 的 SC-Leu-Trp-His 营养缺陷平板上的菌落生长情况,可以观察到抑制转化子细胞生长的最低的 3-AT 浓度为 25 mmol/L,25、50、75、100 mmol/L 浓度的平板不能生长,表明 pDBLeu-MRP2 无自激活作用,我们采用 25 mmol/L 的 3AT 浓度作为筛库浓度。

2.3　成人肝 cDNA 文库的筛选和阳性克隆的鉴定

大量提取成人肝 cDNA 文库后,将其转入已经含有 pDBLeu-MRP2 质粒的酵母 MaV203 感受态中,涂布于 SC-Leu-Trp-His + 25 mmol/L 3AT 平板上生长,共得到 1.8×10^6 个转化子。经过复制清除后,挑取生长的克隆 162 个进行 His、Ura、LacZ 表型分析。结果共有 23 个阳性克隆通过了 His、Ura 和 LacZ 这 3

个报告基因的验证。按照天为时代酵母质粒提取试剂盒说明书，提取阳性酵母质粒，通过氨苄抗性筛选得到 pPC86 猎物质粒，随后与 pDBLeu-MRP2 共转酵母 MaV203，再次进行 3 个报告基因的分析。将这 23 个阳性克隆回转后 3 个报告基因仍然阳性的克隆为 19 个，见图 2。随后将这 19 个 pPC86 猎物质粒送测序。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对，进一步分析这些测序结果，注意删除不符合读框和公认的假阳性蛋白，最终确定 3 个无重复阳性克隆。结果见表 1。



a：母板（b，c，d 和母板相应位置对应）；b：LacZ 表型鉴定图，显蓝的菌落是阳性菌落；c，d：分别是 His、Ura 表型鉴定图，白色部分为阳性菌落

图 2 阳性克隆回转验证 LacZ、His、Ura 表型

表 1 利用酵母双杂交系统筛选到的与 MRP2 发生相互作用的 3 种蛋白

猎物	GenBank 接受号	出现次数
NFKB1	NM_003998	16
MCPH1	NM_024596	2
SHANK3	XM_037493.5	1

3 讨论

蛋白质－蛋白质相互作用是一切生命活动的基础，揭示相互作用规律是认识生命奥秘的必经之路。酵母双杂交技术是研究蛋白质相互作用最重要的技术平台之一，近年来在各种模式生物以及人类大规模相互作用组的研究中已经得到成功利用[3,4]，但这些数据中并没有包含人 ATP 结合盒超家族转运蛋白。人 ATP 结合盒超家族转运蛋白是一群广泛分布的跨膜转运蛋白，它们如何转运各种底物的精密调节机制仍然不明。越来越多的研究提示，人 ATP 结合盒超家族转运蛋白的功能不仅仅在于物质转运功能，还可能存在许多其他目前未知的功能[5]。MRP2 是一种重要的人 ATP 结合盒超家族转运蛋白成员，调节许多药物的药物（代谢）动力学[6]，它的表达和活性也在特定的药物和疾病状态下发生相应的改变，与肿瘤耐药密切相关，它在药物性肝损伤中扮演重要角色。但目前对于 MRP2 是如何转运药物，以及 MRP2 除了转运功能外是否存在其他的功能知之甚少。由于 MRP2 是多次跨膜蛋白，全面的了解该蛋白的相互作用蛋白，必须截取 MRP2 多个胞内部分，同时在所得相互作用结果中，必须充分考虑到两种蛋白的定位关系，提示了应用传统酵母双杂交技术有一定的局限性。但近年来少数学者对单个重要 ABC 蛋白应用传统的酵母双杂交方法对其相互作用蛋白进行了研究[5,7-9]，提示 ABC 蛋白与细胞内产生相互作用的区域主要位于其胞质区的 C 端或者 N 端，也为利用传统酵母双杂交技术研究 ABC 蛋白相互作用蛋白提供了成功范例。

本研究选取 MRP2 胞内区 C 末端 220 个氨基酸为诱饵，利用酵母双杂交系统在成人肝 cDNA 文库筛选与之相互作用的蛋白。在筛选到的 23 个阳性克隆中，经回转验证、测序和生物信息学分析，初步确定了 3 个与 MRP2 有相互作用的蛋白，均是以前没有报道过的。NF-κB1 和 MRP2 的相互作用在酵母双杂交结果中出现高达 16 次。NF-κB1 是一类关键性的核转录因子，是 NF-κB 重要成员之一，存在于几乎所有类型的组织和细胞，通常以同源或异源二聚体非活性形式存在于几乎所有类型细胞的胞质中，具有十分重要的功能，只有受到各种活化因素的作用，其才能被激活[10]。研究表明许多化疗药物可以明显激活 NF-κB，从而阻止癌细胞的坏死，影响化疗药物的治疗效果，是产生癌细胞耐药性的另一大原因。但是关于这些化疗药物是如何激活 NF-κB 的，有着许多不同的解释，而一些药物目前仍然没有一个令人信服的解释[11]。本实验显示 MRP2 与 NF-κB1 的相互作用，可能为解释该问题提供一丝线索。MRP2 是一种跨膜蛋白，很多化疗药物是它的底物，这些药物中阿霉素及其类似物、CPT-11 等多种化疗药物均可以激活 NF-κB。这些化疗药物可能与 MRP2 结合后，通过其 C 末端部分与 NF-κB1 某一区域相结合，导致 NF-κB1 降解为 P50，发生下续的激活反应，同时可能通过调节与 MRP2 表达相关的基因，导致 MRP2 表达增加，形成正反馈。另一方面，因为 NF-κB1 全长形式本身也是阻止 P50 等复合体入核的物质，NF-κB1 的降解进一步加强 NF-κB 的激活，引起下续的瀑布效应。该发现可能揭示 NF-κB 新的激活路径，为依赖于 MRP2 的 NF-κB 激活路径。为 NF-κB -pathway 注入新的成员，同时也将众多抗肿瘤药物与

NF-κB-pathway 相联系。也可能提出另一种肿瘤耐药机制，也为解决临床化疗耐药提供新的靶点和线索。

本研究以酵母双杂交技术，首次以 MRP2 胞内 C 末端 220 个氨基酸为诱饵蛋白从成人肝 cDNA 文库筛选到了 3 个相互作用的蛋白。关于这 3 个蛋白在体内与 MRP2 相互作用的真实性，以及它们的相互作用可能潜在的意义有待进一步的功能研究与证实。

参考文献：

[1] Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily[J]. Genome Res, 2001, 11(7): 1156-1166.
[2] Gerk P M, Vore M. Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 302(2): 407-415.
[3] Stelzl U, Worm U, Lalowski M, *et al*. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome[J]. Cell, 2005, 122(6): 957-968.
[4] Rual J F, Venkatesan K, Hao T, *et al*. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network[J]. Nature, 2005, 437(7062): 1173-1178.
[5] Nofer J R, Remaley A T, Feuerborn R, *et al*. Apolipoprotein A-I activates CDC42 signaling through ABCA1 transporter[J]. J Lipid Res, 2006, 47(4): 794-803.
[6] Szakacs G, Paterson J K, Ludwig J A, *et al*. Targeting multidrug resistance in cancer[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(3): 219-234.
[7] Geisler M, Girin M, Brandt S, *et al*. Arabidopsis immunophilin-like TWD1 functionally interacts with vacuolar ABC transporters[J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(7): 3393-3405.
[8] Ortiz D F, Moseley J, Calderon G, *et al*. Identification of HAX-1 as a protein that binds bile salt export protein and regulates its abundance in the apical membrane of Madin-Darby canine kidney cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(31): 32761-32770.
[9] Curry J M, Whalan R, Hunt D M, *et al*. An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts with a serine-threonine protein kinase and is required for growth of Mycobacterium tuberculosis in mice[J]. Infect Immun, 2005, 73(8): 4471-4477.
[10] Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 297-309.
[11] HAYDEN M S, GHOSH S. Signaling to NF-kappaB[J]. Genes Dev, 2004, 18(18): 2195-2224.

（编辑 张大春）

文章编号：1000-5404(2007)04-0299-01

个案与短篇

胃肠道神经内分泌肿瘤1例

阴 绯[1]，陈东凤[2]，史洪涛[2]（[1]四川省西昌市凉山州第二人民医院消化内科，凉山 615000；[2]第三军医大学大坪医院野战外科研究所消化内科，重庆 400042）

1 临床资料

患者，男性，37岁，因反复上腹胀痛4年，反酸3个月于2005-11-20收入我院普通外科。患者4年前因上述症状在当地某医院行胃镜检查诊断为"胃炎"，仅给予对症处理，3个月前再次出现上腹部烧灼感、反酸，在某医院行胃镜检查提示"胃炎、十二指肠球炎"，治疗（不详）无缓解；于2005-11-08来我院胃镜检查，见胃底贲门下2个大小约0.4 cm×0.2 cm×0.2 cm息肉样隆起，表面粗糙，活检结果为腺癌；4 d后复查胃镜，活检结果为神经内分泌癌。

既往史：患者从幼年起即有反复发作性舌炎及口腔溃疡。2003年因记忆力下降、行为异常入我院，诊断为急性播散性脑炎，治疗10 d缓解出院。2005-11-01因反复左下肢无力12年，加重1个月入脑二科；入院后查有轻度巨细胞性贫血（HB 123 g/L），血浆维生素B_{12}为98 pg/ml（正常223～1 132 pg/ml）明显低下，铁和叶酸正常；给予补充血浆维生素B_{12}、叶酸、营养周围神经、改善血循环等对症处理后，症状明显缓解；于11月11日出院，出院诊断为多发性神经病，巨细胞性贫血。

家族史：父母无症状，兄妹6人，除患者外反复发作性口腔溃疡3人，其中贫血1人，3人均无消化道症状；其中2人在患者确诊后行常规胃镜检查，均无异常发现。3人在服用B族维生素及叶酸后，口腔溃疡的发作次数及范围均有减轻。

入院后查体：浅表淋巴结无肿大，心肺未见异常，中上腹压痛，未扪及包块，余无异常。辅助检查：三大常规、肝肾功、腹部B超及CT均正常。

11月23日行胃癌根治术。术后病理报告：胃早期神经内分泌癌，癌组织在全胃黏膜层广泛浸润性生长，但不超过黏膜下层。免疫组化：CK(cytokerations)(+/-) Syn突触素(++) CgA嗜铬蛋白A(++) NSE神经细胞特异性烯醇酶(+/-)。

2 讨论

神经内分泌肿瘤是一类可以发生于很多器官的肿瘤，因有某种特定的生物学特征，而被划为一类。它们均起源于神经内分泌细胞，有特有的内分泌功能，常常以某种分泌综合征表现出来。最近美国研究显示，年检出率为3/100 000，1/3发生于消化道，20%发展为癌[1,2]。大多数神经内分泌肿瘤是散发的，也有少许的家族倾向，可能是一些复杂的家族性内分泌肿瘤中的一部分，如多发性内分泌肿瘤（multiple endocrine neoplasia, MEN）1型、2型。

（下转303页）

作者简介：阴 绯（1973-），女，四川省西昌市人，主治医师，主要从事消化内科方面的研究。电话：13981523076

收稿日期：2006-10-17；修回日期：2006-11-15