论著

文章编号:1000-5404(2007)09-0820-04

大肠杆菌双杂交系统筛选与AMPKα2相互作用的蛋白质

符庆瑛[1],高钰琪[1],刘 昕[2] (第三军医大学:[1]高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,[2]基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 利用大肠杆菌双杂交系统筛选脑组织中与大鼠AMP激活的蛋白激酶α2(AMP-activated protein kinase α2,AMPKα2)相互作用的蛋白质,以期进一步探讨AMPKα2在脑内的生物学功能及调节机制。**方法** 以重组质粒pBT-AMPKα2作为诱饵,应用大肠杆菌双杂交系统筛选大鼠胎脑cDNA文库,并对结果进行生物信息学分析。**结果** 筛选出与AMPKα2结合的蛋白7个,包括聚合泛素、热休克蛋白8(heat shock protein 8, HSP8)、磷酸果糖激酶、细胞色素C氧化酶亚基Ⅰ(cytochrome C oxidase subunit Ⅰ, COXⅠ)、人类白细胞抗原B关联性转录物3(HLA-B-associated transcript 3,BAT3)异构体1、蛋白酪氨酸磷酸酶受体型D(protein tyrosine phosphatase receptor type D, Ptprd)、岛-脑蛋白1(islet-brain1,IB1)。**结论** 寻找到了脑内与AMPKα2相互作用的7种蛋白:聚合泛素、HSP8、磷酸果糖激酶、COXⅠ、BAT3异构体1、Ptprd、IB1。

关键词: AMP激活的蛋白激酶;大肠杆菌双杂交;蛋白质相互作用

中图法分类号: Q555.7; Q78; R378.21 **文献标识码:** A

Identification of AMP-activated protein kinase α2 interacting proteins by bacterial two-hybrid screening

FU Qing-ying[1], GAO Yu-qi[1], LIU Xin[2] ([1]Department of Pathophysiology and High Altitude Physiology, College of High Altitude Military Medicine, [2]Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To screen the proteins interacting with AMP-activated protein kinase α2 (AMPKα2) in rat brain cDNA library by bacterial two-hybrid system, and to investigate the biological role and the regulatory mechanism of AMPKα2 in brain. **Methods** The recombinant pBT-AMPKα2 was used as the bait to screen a rat fetal brain cDNA library by bacterial two-hybrid system. The plasmids of positive colonies were extracted and analyzed by DNA sequencing and BLAST search in GenBank. **Results** Seven proteins binding to AMPKα2 were screened out, including polyubiquitin, small heat shock protein 8, phosphofructokinase, cytochrome C oxidase subunit Ⅰ (COXⅠ), HLA-B-associated transcript 3 (BAT3) isoform 1, protein tyrosine phosphatase receptor type D (Ptprd) and islet-brain 1 (IB1). **Conclusion** Polyubiquitin, HSP8, phosphofructokinase, COXⅠ, BAT3 isoform 1, Ptprd and IB1 can interact with AMPKα2 in brain.

Key words: AMP-activated protein kinase; bacterial two hybrid; protein interaction

AMP激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是真核生物中一个重要的蛋白激酶,主要协调代谢和能量的需要,被称为"细胞能量调节器"[1]。脑作为对能量最敏感的组织,AMPK在其中的功能尚未阐明。因此,寻求与AMPK相互作用的蛋白,为进一步研究AMPK在脑组织中的功能和作用机制具有重要意义。鉴于α催化亚基是AMPK的特征性结构,在AMPK催化活性方面发挥重要作用,我们推测与该亚基相互作用的蛋白质在一定程度上代表了特异地与AMPK相互作用的分子。同时,基于脑组织中α2亚基的表达水平高于α1亚基,故我们以AMPKα2的编码序列为诱饵,采用大肠杆菌双杂交系统筛选大鼠脑cDNA文库,寻找与其相互作用的蛋白。

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(30393131)
Supported by the Major Program of the National Natural Science Foundation of China(30393131)

作者简介: 符庆瑛(1977-),女,河南省新野县人,博士研究生,主要从事缺氧习服适应方面的研究。电话:(023)68772603,E-mail: fqykey@sohu.com

通讯作者: 高钰琪,电话:(023)68752331,E-mail: gyq@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2007-01-05;**修回日期:** 2007-01-23

1　材料与方法

1.1　材料

"诱饵"蛋白质粒 pBT-AMPKα2 由本室自行构建[2]。大肠杆菌表达载体 pBT、大肠杆菌株 XL1-Blue MR 和 XL1-Blue MRF' Kan、大鼠胎脑 cDNA 文库购自 Stratagene 公司。大肠杆菌用培养基 M9 salts、His Dropout Supplement 购自 BD/Clontech 公司，细菌 LB、SOC 培养基为自行配制，adenine HCl、3-amino-1，2,4-triazole (3-AT) 购自 Sigma 公司。*Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司。质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 公司，质粒大量抽提试剂盒购自 Invitrogen 公司。引物合成和测序由上海英骏生物公司承担。其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　cDNA 文库的扩增和质粒纯化　　测定大鼠胎脑 cDNA 文库的滴度，在 252 块直径为 150 mm 四环素抗性的 LB 琼脂平板(LB-Ter$^+$)上，以 2.5×10^4 个菌落/150 mm 平板的密度涂布文库，30 ℃孵育 24 h。从平板上刮取所有菌落至 SOC-Ter$^+$ 培养基中，测定扩增文库的滴度，并大规模纯化质粒。

1.2.2　扩增文库多样性鉴定　　测定扩增文库的滴度时，从不同稀释倍数的扩增文库所涂布的平板上随机挑取 10 个菌落，抽提 DNA 做酶切、电泳检测，并进行测序。

1.2.3　先导文库共转化和阳性对照共转化　　诱饵质粒 pBT-AMPKα2 和 pTRG 文库质粒共转化 100 μl 大肠杆菌 XL1-Blue MR 感受态细胞，转化产物经 100 倍稀释分别涂布于 no 3-AT 非选择性筛选平板和 3-AT 选择性筛选平板。同时，阳性对照组的质粒 pBT-LGF2 和 pTRG-Gal 11^P 也共转化入 100 μl XL1-Blue MR 感受态细胞，转化产物原液分别涂布 no 3-AT 非选择性筛选平板和 3-AT 选择性筛选平板。所有平板均 37 ℃孵育 24 h。

1.2.4　文库筛选　　根据先导文库共转化结果，估算筛选一定数量的文库克隆所需的大规模共转化反应的数量。每个扩大的共转化反应体系中，将诱饵质粒 pBT-AMPKα2 和 pTRG 文库质粒共转化 500 μl 大肠杆菌 XL1-Blue MRF' 感受态细胞，汇集全部转化产物，经 100 倍稀释，取 100 μl 涂布 no 3-AT 非选择性筛选平板，剩余转化产物涂于若干 3-AT 选择性筛选平板，37 ℃ 孵育 24 h。

1.2.5　假定相互作用子的富集　　待孵育 24 h 后，从筛选平板上挑取所有菌落富集于 3-AT 平板，37 ℃孵育 24 h。同时，将原筛选平板置于室温暗处继续孵育 24 h，再富集于 3-AT 平板。

1.2.6　假定相互作用子的第 2 次筛选　　从富集平板上挑取所有菌落分别补缀于双筛选平板(3-AT + 链霉素) 及含四环素和氯霉素抗性的 LB 琼脂平板(LB-Ter$^+$/Cam$^+$)，以进行第 2 次筛选和菌落保存。所有平板 37 ℃孵育 24 h 后，再置于室温暗处继续孵育约 24 h。

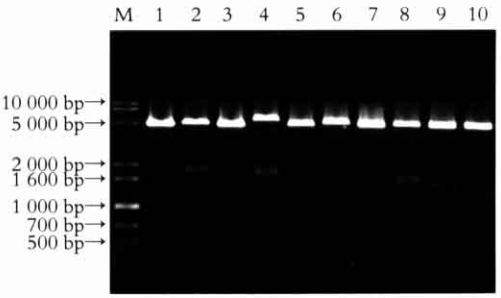
1.2.7　蛋白质相互作用子的证实　　将经过第 2 次筛选得到的菌落接种于 LB-Ter$^+$ 培养基中，30 ℃振荡培养过夜，抽提质粒并转化大肠杆菌 XL1-Blue MRF' Kan 感受态细胞，转化产物铺于 LB-Ter$^+$ 琼脂平板，37 ℃孵育 24 h。从平板上挑菌落分别补缀于 LB-Ter$^+$ 和 LB-Cam$^+$ 琼脂平板，将具有 Ter^{r}Cam^{s}特性的菌落接种于 LB-Ter$^+$ 培养基中，30 ℃振荡培养过夜，抽提质粒。再将诱饵质粒 pBT-AMPKα2 与抽提的 pTRG 靶质粒，以及 pBT 空载体与 pTRG 靶质粒分别共转化大肠杆菌 XL1-Blue MR 感受态细胞，转化产物铺于 no 3-AT 平板和 3-AT 平板，37 ℃孵育约 24 h。

1.2.8　阳性克隆的测序和同源性比对　　阳性质粒送上海英骏公司测序，将测序结果与 GenBank 数据库进行同源性比较分析。

2　结果

2.1　扩增文库多样性检测

扩增文库经梯度稀释后涂板，挑取 10 个菌落，扩增细菌，抽提质粒做 *Eco*R Ⅰ / *Xho* Ⅰ 双酶切，电泳检测(图 1)所示条带与测序结果做电子酶切所得到的片段大小相一致，并且 10 个菌落测序的碱基序列均不相同，说明扩增文库的多样性仍保持，未发生偏移。



M: 1 kb 标准; 1 - 10: *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ 双酶切扩增文库质粒

图 1　扩增文库质粒的双酶切电泳图

2.2　大肠杆菌双杂交筛选结果

将 pBT-AMPKα2 和 pTRG 文库质粒的共转化产物在 3-AT 平板上孵育培养，筛选出能在此平板上生长且菌落直径大于 2 mm的克隆 592 个，这是利用 His3 报告基因的表达初步筛选出的可能的 AMPKα2 相互作用蛋白。

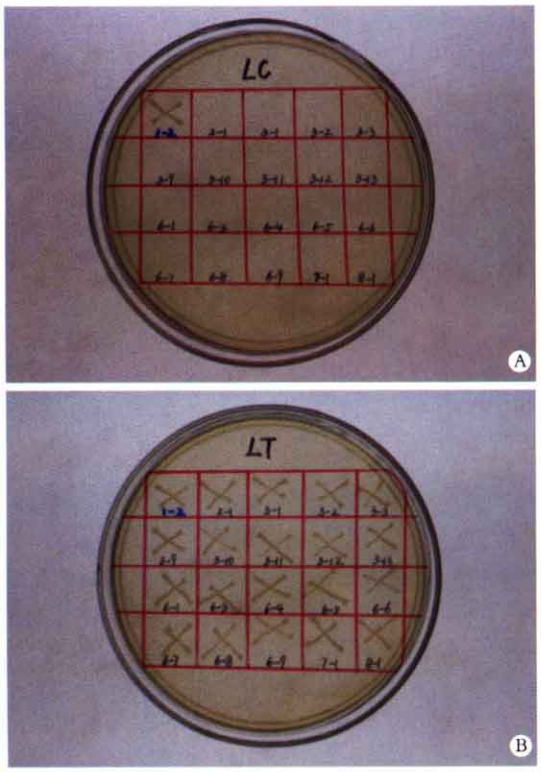
将初筛得到的克隆全部补缀于含有 3-AT 和链霉素的双筛选平板(简称 Dual 平板)进行第 2 次筛选，结果显示有 20 个克隆不能生长，其余克隆生长良好，这是利用 aadA 报告基因的表达排除假阳性克隆。

从生长良好的克隆中挑取最早长出的 20 个克隆进行质粒抽提，转化大肠杆菌 XL1-Blue MRF' Kan 感受态细胞，转化产物铺于 LB-Ter$^+$ 琼脂平板，并将菌落分别补缀于 LB-Ter$^+$ 和 LB-Cam$^+$ 琼脂平板以进行纯化。结果显示，19 个克隆具有 Ter^r Cam^{s}特性，有 1 个克隆是 Ter^r Cam^{r}特性(图 2)。

将 19 个具有 Ter^{r}Cams 特性的克隆一一回复至大肠杆菌 XL1-Blue MR 菌株中进行验证。19 个克隆对应的 pTRG 靶质粒与 pBT-AMPKα2 诱饵质粒的共转化产物都能在 3-AT 平板上生长，其中有 9 个克隆在缺乏诱饵蛋白 AMPKα2 的情况下，靶蛋白不能激活报告基因，表现为 pBT 空载体与 pTRG 靶质粒的共转化产物不能在 3-AT 平板上生长，故最终获得 9 个真阳性克隆(图 3 为其中 1 个候选阳性克隆的验证平板)。而其余 10 个克隆在缺乏诱饵蛋白 AMPKα2 的情况下，靶蛋白仍能激活报告基因，也就是说这 10 个克隆既能与 pBT-AMPKα2 相互作用，又能与 pBT 相互作用(图 4 为其中 1 个候选阳性克隆的验证平板)。

2.3 阳性克隆的序列分析

将筛选出的9个阳性克隆质粒进行测序，并将结果与GenBank数据库进行同源性比较分析，得到7种已知蛋白（表1）。一个对应磷酸果糖激酶，它是已经阐明的AMPK的下游底物，调节糖酵解途径；有3个分别对应细胞色素C氧化酶亚基Ⅰ（cytochrome C oxidase subunit Ⅰ，COXⅠ）、蛋白酪氨酸磷酸酶受体型D（protein tyrosine phosphatase receptor type D，Ptprd）、岛-脑蛋白1（islet-brain1，IB1），目前有AMPK与它们的关联性报道，但尚未明确指出二者有直接的相互作用关系；其余分别是聚合泛素、热休克蛋白8（heat shock protein 8，HSP8）、人类白细胞抗原B关联性转录物3（HLA-B-associated transcript 3，BAT3）异构体1，迄今还无任何关于AMPK与它们的相关性报道。

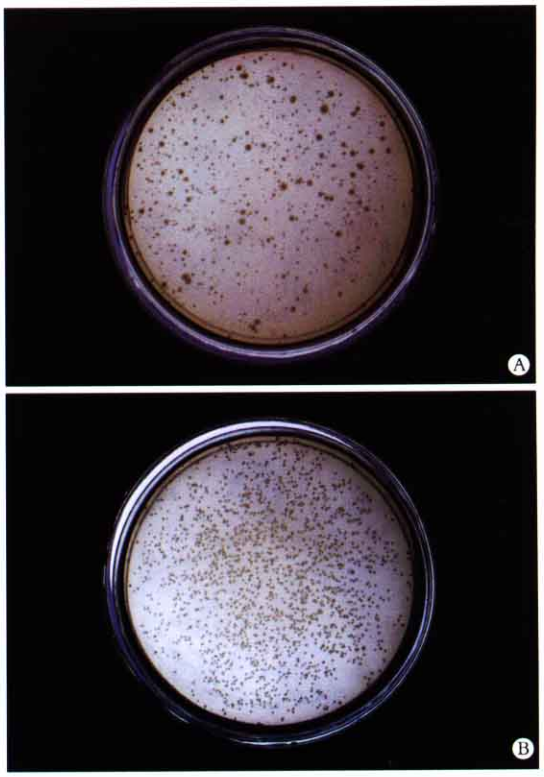


A：LC（LB-Cam$^+$琼脂平板）；B：LT（LB-Ter$^+$琼脂平板）
栅格中的数字代表克隆编号

图2 Terr Cams特性克隆的筛选



图3 候选阳性克隆只与pBT-AMPKα2相互作用，不与pBT相互作用



A：与pBT-AMPKα2作用；B：与pBT作用

图4 候选阳性克隆分别与pBT-AMPKα2、pBT相互作用

表1 筛选的阳性克隆与GenBank同源序列比较

序号	已知的同源序列编码蛋白	相同克隆数	相似性（%）
1	聚合泛素	1	100
2	HSP8	1	99
3	磷酸果糖激酶	2	99
4	COXⅠ	2	100
5	BAT3异构体1	1	99
6	Ptprd	1	100
7	IB1	1	99

3 讨论

AMPK是真核生物中广泛存在的一种具有高度保守性的蛋白激酶，它促使产生ATP的分解代谢途径增强，而消耗ATP的合成代谢途径受抑制。由此可见，AMPK通路是能量稳态调节中的重要途径。正常的能量供给是维持脑功能的绝对必要条件，因此研究AMPK在脑内能量稳态调节中的作用，具有潜在应用价值。但目前关于脑内AMPK生物学功能及其机制的认识尤显匮乏，探究脑内与AMPK相互作用的蛋白将有助于脑内AMPK生物学效应的阐明。

本实验采用大肠杆菌双杂交系统筛选大鼠胎脑cDNA文库中AMPK结合蛋白的基因。在此之前，我

们已成功构建重组质粒 pBT-AMPKα2[2]，并且通过自激活检测实验证实无自主活化作用的前提下，将其作为大肠杆菌双杂交系统的诱饵，为本实验的文库筛选工作提供了实验基础。

本实验结果显示，此次筛选共获得 9 个阳性克隆，经大肠杆菌回复实验和测序分析证实了 7 种与 AMPKα2 相互作用的蛋白，它们分别是：聚合泛素、HSP8、磷酸果糖激酶、COX Ⅰ、BAT3 异构体 1、Ptprd、IB1。①磷酸果糖激酶是糖酵解的限速酶，AMPK 的激活使其磷酸化，活性增强，促进糖酵解产生更多 ATP。当机体缺氧时，能量主要通过糖酵解获得。②聚合泛素是由数个泛素分子形成的聚泛素链，它与蛋白酶体组成的泛素-蛋白酶体系统负责细胞内蛋白质的降解，该过程需要消耗 ATP。但在低氧条件下泛素-蛋白酶体途径下调，这与低氧时机体的节能反应相协调一致。因此，从维持能量稳态的角度来讲，推测 AMPK 与泛素之间存在联系，但需进一步研究证实。此外，研究表明 AMPK 和泛素还与神经退化性疾病有关。泛素-蛋白酶体通路的功能缺失诱导多巴胺能细胞死亡，造成细胞内泛素化蛋白质积聚，可能在帕金森黑质多巴胺能神经元变性死亡中发挥重要作用[3]。另有证据表明，在帕金森病基因敲除小鼠和野生型小鼠之间有 87 种蛋白质不同，其中与能量代谢有关的蛋白质占较高比例[4]。由此可见，帕金森病不仅与泛素有关，还与能量代谢有关。除帕金森病外，由于特定蛋白质在脑内不当聚集所造成的神经退化性疾病还有阿兹海默症、汉丁顿舞蹈症，其中汉丁顿舞蹈症的大脑纹状体内 AMPK 过度活化，造成了能量代谢缺陷[5]。综上，AMPK、泛素及细胞能量状态三者在神经退化性疾病的发病机制中存在一定联系，但究竟 AMPK 与泛素之间存在怎样的调控作用，有待研究。③小分子量热休克蛋白能抵御不良刺激的侵袭，在细胞中最常见的刺激是氧化应激，研究已证实小分子量热休克蛋白能保护细胞免受氧化应激损伤，促进细胞存活。Culmsee 等[6]研究指出，AMPK 的激活能促进神经元抵抗 Aβ 肽所致的氧化损伤，促进神经元的存活。在脑内小分子量热休克蛋白是否具有与 AMPK 相互作用的辅助调节功能目前还未知。④细胞色素 C 氧化酶是细胞电子传递链的主要成员，其活性下降，导致线粒体氧化磷酸化功能障碍，ATP 合成减少，最终造成神经元损伤。虽然对细胞色素 C 氧化酶在能量方面所起的作用已较清楚，然而 AMPK 与其之间的关系问题尚未明确提出。⑤BAT3、蛋白酪氨酸磷酸酶及 IB1 均与细胞凋亡密切相关。小鼠体内 BAT3 失活导致肺、肾、脑发育缺陷，甚至致命。BAT3 可能是通过介导细胞的凋亡和增殖途径来调控哺乳动物的生存、发育[7]。研究表明，酪氨酸磷酸酶和 IB1 能对抗神经细胞中的凋亡信号，促进神经元的存活[8,9]。近年研究表明，AMPK 的激活能诱导细胞发生凋亡，但该效应在生物机体内究竟起何作用不清楚。筛选出的 BAT3、蛋白酪氨酸磷酸酶及 IB1 都是调控凋亡的信号分子，它们与 AMPK 存在怎样的相互作用关系尚无从查证，对其进一步研究可能有助于认识 AMPK 所介导的凋亡通路。

总的来说，本实验通过大肠杆菌双杂交系统筛选到多种与 AMPK 发生相互作用的蛋白质，涉及能量调节、蛋白质降解以及凋亡调控等多条信号途径，并且与神经退行性疾病密切相关。多数相互作用关系从现有文献中找不到直接证据，但这恰恰为我们进一步发掘其中潜藏的机制提供了新视点。

参考文献：

[1] Kemp B E, Mitchelhill K I, Stapleton D, *et al*. Dealing with energy demand: the AMP-activated protein kinase[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24(1): 22 - 25.

[2] 符庆瑛，高钰琪. AMP 激活的蛋白激酶 α2 大肠杆菌双杂交诱饵重组质粒的构建及鉴定[J]. 第三军医大学学报，2006，28(19)：1923 - 1926.

[3] 杨　卉，陈生弟，李　彪，等. 阻断泛素-蛋白酶体通路诱导 PC12 细胞死亡和泛素阳性包涵体生成[J]. 中华神经科杂志，2005，38(7)：430 - 433.

[4] Periquet M, Corti O, Jacquier S, *et al*. Proteomic analysis of parkin knockout mice: alterations in energy metabolism, protein handling and synaptic function[J]. J Neurochem, 2005, 95(5): 1259 - 1276.

[5] Chou S Y, Lee Y C, Chen H M, *et al*. CGS21680 attenuates symptoms of Huntington's disease in a transgenic mouse model[J]. J Neurochem, 2005, 93(2): 310 - 320.

[6] Culmsee C, Monnig J, Kemp B E, *et al*. AMP-activated protein kinase is highly expressed in neurons in the developing rat brain and promotes neuronal survival following glucose deprivation[J]. J Mol Neurosci, 2001, 17(1): 45 - 58.

[7] Desmots F, Russell H R, Lee Y, *et al*. The reaper-binding protein scythe modulates apoptosis and proliferation during mammalian development[J]. Mol Cell Biol, 2005, 25 (23): 10329 - 10337.

[8] Lopez C J, Qayyum I, Mishra O P, *et al*. Effect of nitration on protein tyrosine phosphatase and protein phosphatase activity in neuronal cell membranes of newborn piglets[J]. Neurosci Lett, 2005, 386(2): 78 - 81.

[9] Dong Z, Zhou L, Del-Villar K, *et al*. JIP1 regulates neuronal apoptosis in response to stress[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2005, 134(2): 282 - 293.

（编辑　龙　亮）