文章编号:1000-5404(2007)24-2327-03

论著

突变的SOD1 cDNA与人MAP/MARK1片段在人胚肾293细胞中的相互作用

陈桂生[1],史树贵[1],李露斯[1],陈康宁[1],袁顺宗[2],彭 旭[2],吴 军[2],罗高兴[2] (第三军医大学西南医院:[1]神经内科,[2]全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,疾病蛋白质组学重庆市市级重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 用酵母双杂交方法显示突变的SOD1 cDNA与人MAP/MARK1的片段结合,进一步探讨二者能否在哺乳动物表达系统人胚肾293细胞中发生相互作用,以验证酵母双杂交的结果。**方法** 采用PCR方法及双酶切的方法构建含突变SOD1 cDNA片段的真核表达质粒pCMV-Myc和含人MAP/MARK1的片段真核表达质粒pCMV-HA,分别或共同转染人胚肾293细胞,进行免疫共沉淀检测。**结果** 免疫共沉淀结果表明,重组含突变的SOD1 cDNA质粒pCMV-Myc分别与空载体pCMV-Myc、pCMV-HA共转染,免疫沉淀物中均未检测到结合蛋白,只有重组含突变SOD1 cDNA真核表达质粒pCMV-Myc与重组含人MAP/MARK1的片段真核表达质粒pCMV-HA共转染时,在免疫沉淀物中能检测到结合蛋白,表现在蛋白免疫印迹上有特异性目的条带。**结论** 突变的SOD1 cDNA与人MAP/MARK1片段在人胚肾293细胞中存在蛋白水平的相互作用。

关键词: 突变SOD1 cDNA;人MAP/MARK1;免疫共沉淀;相互作用
中图法分类号: R322.61;R394-33;R394.3 **文献标识码:** A

Interaction between mutated SOD1 cDNA and segment of Homo sapiens MAP/MARK1 in human embryonic kidney cell 293

CHEN Gui-sheng[1], SHI Shu-gui[1], LI Lu-si[1], CHEN Kang-ning[1], YUAN Shun-zong[2], PENG Xu[2], WU Jun[2], LUO Gao-xing[2] ([1]Department of Neurology, [2]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective By using yeast two-hybrid system, an interaction is proven existing between mutated SOD1 cDNA and segment of Homo sapiens MAP/MARK1. In the present study the interaction between the two proteins was further determined in human embryonic kidney cell 293 (HEK293) to verify the results of yeast two-hybrid system. **Methods** Mammalian expression vectors pCMV-Myc containing mutated SOD1 cDNA and pCMV-HA containing segments of Homo sapiens MAP/MARK1 were constructed by PCR and double enzyme digestion. They were transfected to HEK293 cells and examined by coimmunoprecipitation. **Results** The coimmunoprecipitation experiments showed when the recombinated plasmid pCMV-Myc with mutated SOD1 cDNA was cotransfected with plasmid pCMV-Myc or plasmid pCMV-HA, there was no binding protein observed in HEK293 cells. However, when the recombinated plasmid pCMV-Myc with mutated SOD1 cDNA and recombinated plasmid pCMV-HA with segment of Homo sapiens MAP/MARK1 were cotransfected into HEK293 cells, the binding protein was detected. **Conclusion** The mutated SOD1 cDNA interacts with segment of Homo sapiens MAP/MARK1 at protein level in HEK293 cells.

Key words: mutated SOD1 cDNA; Homo sapiens MAP/MARK1; coimmunoprecipitation; interaction

肌萎缩侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是运动神经元疾病的一种亚型,主要表现为上、下运动神经元同时受累所致的肢体肌肉萎缩和瘫痪,最终多因延髓麻痹或肺部感染而死亡。10%~20%的ALS病例具有家族遗传背景,提示该病的发生可能与遗传因素有关[1]。1993年,Rosen等研究发现,约

基金项目:国家自然科学基金(30300116)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300116)
作者简介:陈桂生(1967-),男,湖南省祁阳县人,博士研究生,副主任医师,副教授,主要从事神经遗传疾病方面的研究。电话:(023)68773070,E-mail: Chenguisheng1967@163.com
通讯作者:史树贵,电话:(023)68756756
收稿日期:2007-06-05;修回日期:2007-09-28

20%的家族性 ALS 是由于位于染色体 21q 的 SOD1 基因突变所引起。目前已发现的与家族性 ALS 相关的 SOD1 基因突变类型多达 100 种以上[2]。本课题组在对一个 ALS 家系的研究中,发现该家系成员的 SOD1 突变[3]。并且该家系成员的 SOD1 突变是一个新的突变(GenBank ID: EF143990),本课题组已对该突变 SOD1 的功能作了初步研究[4,5]。为了进一步研究突变 SOD1 的生物学功能,本课题组采用酵母双杂交的方法,研究与之相互作用蛋白。其中发现了突变的 SOD1 cDNA 片段能与人 MAP/MARK1 片段结合,但这一现象尚需在哺乳动物表达系统进行验证。本实验采用免疫共沉淀(coimmunoprecipitaion)方法在人胚肾 293 细胞(human embryonic kidney cell 293, HEK293)内验证突变的 SOD1 cDNA 片段能与人 MAP/MARK1 蛋白之间的相互作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人胚肾细胞(HEK293)由本院全军烧伤研究所细胞培养室提供,pEGFP-mSOD1 cDNA 和人 MAP/MARK1 片段由本课题组提供,载体 pCMV-Myc(带有 Myc 标签)、载体 pCMV-HA(带有 HA 标签)由全军烧伤研究所袁顺宗博士提供,脂质体转染试剂盒、质粒提取试剂盒、抗-Myc 抗体和抗-HA 抗体(小鼠单克隆抗体)均购自天根公司,二抗(鼠抗)、protein A/G agrose beads 购自 SantaCruz 公司,其余均为市售分析纯试剂。

1.2 人 MAP/MARK1 片段获得

采用酵母双杂交的方法,得到的第 20 号阳性克隆。与 GenBank 中的序列进行比对,第 20 号阳性克隆的序列与人类微管相关蛋白/微管相关调节激酶[Homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1)]的部分基因和蛋白质序列完全相符。

1.3 突变 SOD1 cDNA 片段获得

根据 mSOD1 的序列设计引物:mSOD1-*Eco*R Ⅰ正义链:5′-GACGAATTCATGGCGACGAAG-3′,mSOD1-*Sal* Ⅰ反义链:5′-GACGTCGACATGCTTCCCCACACCTTCATCT-3′,引物由上海生工生物科技有限公司合成,以 pEGFP-mSOD1 cDNA 为模板 PCR 扩增。

1.4 细胞培养与转染

分 4 组:①阴性对照组,只加入转染剂,不加入任何质粒;②含 mSOD1 cDNA 质粒 pCMV-Myc 与空载体 pCMV-Myc 组,加入转染剂、含 mSOD1 cDNA 质粒 pCMV-Myc 和空载体 pCMV-Myc;③含 mSOD1 cDNA 质粒 pCMV-Myc 与空载体 pCMV-HA 组,加入转染剂、含 mSOD1 cDNA 质粒 pCMV-Myc 和空载体 pCMV-HA;④共转染组,加入转染剂、含 mSOD1 cDNA 质粒 pCMV-Myc 和含人 MAP/MARK1 片段质粒 pCMV-HA。把培养的 HEK293 细胞转入 6 孔板中,细胞贴壁和生长 5×10^8 时开始转染。

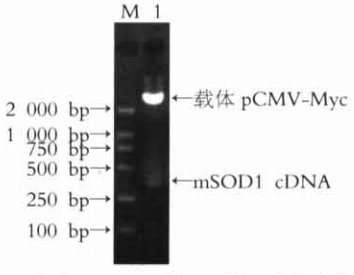
1.5 细胞裂解、SDS-PAGE 与蛋白免疫印迹

细胞转染 48 h 后,冷 PBS 洗涤 2 遍,RIPE 加蛋白酶抑制剂 200 μl,冰浴 30 min,12 000 r/min 低温(4 ℃)离心 30 min,取上清液,加入 1 μg 抗-Myc 抗体(1:400)单抗 4 ℃旋转(30~50 r/min)过夜。次日加入 protein A/G agrose beads, 4 ℃旋转孵育 4 h, 12 000 r/min 低温离心 30 min,弃上清后加入 RIPE 洗涤,重复洗涤 3 次后加入 20 μl 2 × 加样缓冲液,100 ℃,5 min。12 000 r/min 离心 1 min,取上清行 SDS-PAGE 电泳(10%分离胶,3%浓缩胶),转膜,5%脱脂奶粉封闭 4 h 后加入抗-HA 抗体(1:400)4 ℃孵育过夜,二抗抗鼠-HRP 抗体(1:1 000)室温杂交1 h,化学发光法显色。

2 结果

2.1 真核表达质粒重组和鉴定

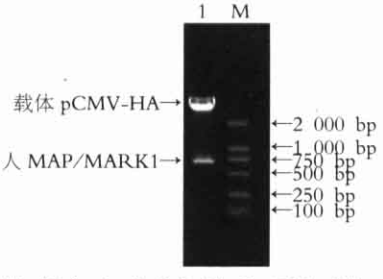
2.1.1 含 mSOD1 cDNA 质粒 pCMV-Myc 重组和鉴定 用 PCR 的方法将 mSOD1 cDNA 片段扩增后,通过 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切位点接入质粒 pCMV-Myc,构建重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA。如图 1 所示,用 *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切可从重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 切出载体 pCMV-Myc 和插入片段 mSOD1 cDNA,质粒测序结果显示重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 的插入片段与 mSOD1 cDNA 的序列一致。



M: 标准; 1: *Eco*R Ⅰ/*Sal* Ⅰ双酶切产物

图 1 重组质粒 pCMV- Myc-mSOD1 cDNA 双酶切结果

2.1.2 含人 MAP/MARK1 片段质粒 pCMV-HA 重组和鉴定 用于酵母杂交的人脑文库的载体 pACT2 载入片段的双酶切位点为 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ,根据这个特点,直接双酶切,胶回收得到人 MAP/MARK1 片段,按照 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切位点接入质粒 pCMV-HA,构建重组 pCMV-HA-MAP/MARK1。如图 2 所示,用 *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切可从重组质粒 pCMV-HA-MAP/MARK1 切出载体 pCMV-HA 和插入片段 MAP/MARK1。



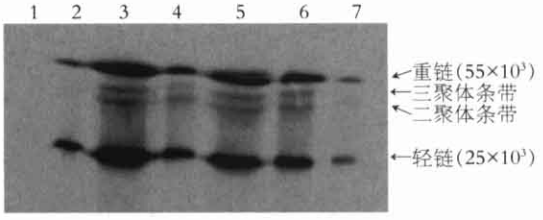
M: 标准; 1: *Eco*R Ⅰ/*Xho* Ⅰ双酶切产物

图 2 重组 pCMV-HA-MAP/MARK1 双酶切结果

2.2 免疫共沉淀结果

按照分组进行免疫沉淀产物行 SDS-PAGE 电泳及免疫印迹检测。如图 3 所示,阴性对照(没有加任何质粒和任何抗体)显色后无任何条带;重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 和空载体 pCMV-Myc 共转染后,显色后出现 2 条非特异性条带,为抗体 IgG 的轻链(25×10^3),重链(55×10^3);重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 和另外 1 个重组质粒共转染后,出现 2 条非

特异性条带和 2 条特异性条带；重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 和重组质粒 pCMV-HA-MAP/MARK1 共转染后，出现 2 条非特异性条带，另外，在轻链和重链之间可见 2 条可能是结合蛋白的二聚体和三聚体的条带，说明重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 和重组质粒 pCMV-HA-MAP/MARK1 已发生了结合而被免疫共沉淀。重组质粒 pCMV-HA-MAP/MARK1 与空载体 pCMV-Myc 共转染后，出现 2 条非特异性条带，但在轻链和重链之间未见条带，说明它们没有发生共沉淀。



1：阴性对照；2：重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 与空载体 pCMV-Myc 共转染；3、4：重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 和另外一个重组质粒共转；5、6：重组质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA 和重组质粒 pCMV-HA-MAP/MARK1 共转染；7：重组质粒 pCMV-HA-MAP/MARK1 与空载体 pCMV-Myc 共转染

图 3　SDS-PAGE 电泳及免疫印迹检测免疫共沉淀结果

3　讨论

酵母双杂交技术已成为研究蛋白质分子间相互作用的重要工具。它具有快速、高通量的特点，但是由于以酵母为表达载体，因而不可避免地会出现缺乏蛋白翻译后修饰、磷酸化以及假阳性等问题。本课题组用酵母双杂交的方法，获得 14 个相互作用蛋白的阳性克隆，为进一步明确突变 SOD1 相互作用蛋白是否在真核细胞中与突变的 SOD1 也存在这种相互作用。在研究真核细胞 2 种蛋白之间的相互作用时，目前通常是将 2 种蛋白同时表达在同一种细胞上[6]，然后用免疫共沉淀的方法对 2 种蛋白质的融合蛋白进行免疫印迹检测。本研究选用其中的第 20 号阳性克隆作为研究对象。首先构建含 mSOD1 cDNA 并带有 Myc 标签的真核表达质粒 pCMV-Myc-mSOD1 cDNA，将此质粒与表达人 MAP/MARK1 并带有 HA 标签的真核表达质粒 pCMV-HA-MAP/MARK1 共转染 HEK293 细胞。从本实验结果可以看出，2 种重组质粒在 HEK293 细胞中有目的蛋白表达，免疫印迹检测条带在 40×10^3 左右，其相对分子质量较用氨基酸序列计算得到的（35×10^3）要大，推测可能与蛋白质在翻译后有糖基化等修饰有关[7,8]，免疫沉淀下来的蛋白质如果被糖基化，则计算出来的相对分子质量就比预计的大 30% ~ 50%[9]。并且本实验结果显示，发现 2 条特异性条带，这可能是结合蛋白的二聚体和三聚体，这 2 种形式是 2 个蛋白质单体结合时最常见的空间结构。

本实验用免疫共沉淀方法初步证实了在哺乳动物细胞 HEK293 中 mSOD1 cDNA 和人 MAP/MARK1 片段在蛋白质水平存在相互作用，但这两种蛋白质在体内相互作用的生理意义尚待研究。微管相关蛋白（MAP）是 tau 蛋白过度磷酸化形成的，tau 蛋白是一种能与微管蛋白结合并对微管的形成起促进和稳定作用的蛋白。最近的研究表明，在人类发现有 4 个亚型，有 1 个亚型浓缩在脑部[10]。许多中枢神经系统疾病的病变与细胞骨架成分的异常有关，微管相关的运输障碍可以解释很多的痴呆疾病中出现的功能变化，如 Parkinson 病、Lewy 小体病和 Alzheimer 病[11]。文献[12]报道，有一种微管相关蛋白 DCX 可能是通过调节微管的结构和稳定性来指导神经元的迁移，它的突变可能影响皮层的发育，影响神经元前体细胞的迁移。这可能在运动神经元疾病的发生和发展中起到一定作用。总之，突变的 SOD1 和人 MAP/MARK1 在运动神经元疾病的发生作用还要进一步研究，以探明其机制。

参考文献：

[1] Bradley M, Bradley L, de-Belleroche J, *et al*. Patterns of inheritance in familial ALS [J]. Neurology, 2005, 64(9): 1628 - 1631.

[2] Jacobsson J, Jonsson P A, Andersen P M, *et al*. Superoxide dismutase in CSF from amyotrophic lateral sclerosis patients with and without CuZn-superoxide dismutase mutations[J]. Brain, 2001, 124(Pt 7): 1461 - 1466.

[3] 史树贵，李露斯，陈康宁，等. 一个肌萎缩侧索硬化家系的 SOD1 基因突变[J]. 中华医学遗传学杂志，2004，21(2)：149 - 152.

[4] 胡　俊，李露斯，吴玉章，等. 构建具有突变铜-锌超氧化物歧化酶绿色荧光真核表达载体[J]. 中国临床康复，2005，9(29)：58 - 59.

[5] 史树贵，李露斯，刘　昕，等. 一个肌萎缩侧索硬化家系 D21S223 微卫星位点遗传连锁分析[J]. 第三军医大学学报，2006，28(4)：363 - 365.

[6] Bolduc N, Ouellet M, Pitre F, *et al*. Molecular characterization of two plant BI-1 homologues which suppress Bax-induced apoptosis in human 293 cells[J]. Planta, 2003, 216(3): 377 - 386.

[7] Vicentic A, Robeva A, Rogge G, *et al*. Biochemistry and pharmacology of epitope-tagged alpha(1)-adrenergic receptor subtypes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2002, 302(1): 58 - 65.

[8] Garrigue-Antar L, Hartigan N, Kadler K E. Post-translational modification of bone morphogenetic protein-1 is required for secretion and stability of the protein[J]. J Biol Chem, 2002, 277(45): 43327 - 43334.

[9] Panneerselvam S, Marx A, Mandelkow E M, *et al*. Structure of the catalytic and ubiquitin-associated domains of the protein kinase MARK/Par-1[J]. Structure, 2006, 14(2): 173 - 183.

[10] Ferrer I. Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease[J]. Cerebellum, 2002, 1(3): 213 - 222.

[11] Santarelli L, Saxe M, Gross C, *et al*. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants[J]. Science, 2003, 301(5634): 805 - 809.

[12] Moores C A, Perderiset M, Francis F, *et al*. Mechanism of microtubule stabilization by doublecortin[J]. Mol Cell, 2004, 14(6): 833 - 839.

（编辑　龙　亮）