维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)06-0854-03

酵母双杂交系统筛选 Mps1 相互作用蛋白

施 琼[1,2] 翁亚光[1]

(1 重庆医科大学临床检验诊断学实验室,2 基础医学院核医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:对前期筛出的与 Mps1 可能有相互作用的两种蛋白用酵母双杂交回转,验证与 Mps1 有相互作用的蛋白,为染色体分离机制研究提供线索,并为蛋白质相互作用网络提供资料。方法:应用酵母双杂交技术,将前期以 pDBLeu-Mps1 为诱饵质粒筛选成人肝脏 cDNA 文库,得到的 Leu+LacZ+ 阳性克隆进一步回转酵母进行验证,即将文库质粒与诱饵质粒一对一重新转入酵母体内对相互作用进行验证。并对验证后的阳性克隆的外源片段进行测序及同源性分析。结果:用同源性分析,从人胚胎 cDNA 文库筛选到的与 Mps1 有相互作用的两个蛋白在酵母双杂交回转实验中仅有一个为阳性,另一个相互作用为阴性。结论:应用酵母双杂交系统从人胚胎 cDNA 文库中筛选并初步验证了与 Mps1 有相互作用的蛋白,为 Mps1 蛋白的功能研究奠定了基础。

【关键词】酵母双杂交技术;Mps1;蛋白质相互作用

【中国图书分类法分类号】Q819 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-10-18

Screening interactive proteins Mps1 by yeast two hybride system

SHI Qiong, et al

(*Laboratory of Clinical Diagnostics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*objective:*To screen and identify the interactive proteins of Mps1 and provide clues for the studies on Mps1 function on the chromosome segregation.*Methods*:The human embryonic cDNA library was screened with pDBLeu-Mps1 as bait plasmid by yeast two-hybrid system.And two Leu+ and LacZ+ positive yeast clones were obtained, which were contransformed to the MaV203 along with pDBLeu-Mps1 plasmid one to one by yeast simultaneous contransformation so as to identify the protein interactions again. The inserted fragments of identiyied positive clones were sequence and analyzed with BLAST in NCBI. *Results:* Only one positive clone identified one to one yeast simultaneous cotransformation, and the other was negative. The positive clone fragment was MAD1 protein by BLAST analysis in NCBI.*Conclusion*:To screen and initially identify the interactive protein of.Mps1 this research is a foundation for the study on the founctions of Mps1.

【Key word】Yeast two-hybrid system; Mps 1; Protein interaction

染色体不稳定(CIN)导致染色体数目异常(非整倍体)是肿瘤细胞的一个标志,约 50%15 周前的自然流产也都是由非整倍体引起的,但是染色体不稳定的机制与分子基础还不是很清楚。近来研究显示 Spindle checkpoint 是细胞分裂的一个重要调控机制,当这一机制功能发生异常时会导致非整倍体细胞形成。hMps1 在 spindle checkpoint 机制中起重要的作用,它是一个上游调控蛋白,研究它的作用底物及其与其它蛋白的相互作用对于研究整个 spindle checkpoint 蛋白质作用网络具有重要的意义。目前对 Mps1 在染色体分离机制中的作用还很不清楚,本研究通过对 Mps1 编码蛋白相互作用蛋白的筛选不但可为其功能研究奠定基础,还可以为染色体分离机制蛋白质网络图谱研究提供新的依据。

作者介绍:施 琼(1969-),女,教师,博士生,主要研究方向:细胞周期和染色体分离。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母双杂交系统为 ProQuestTM Two-Hybrid System,购自 life technologies 公司。该系统的酵母菌株是 MaV203,诱饵质粒载体是 pDBLeu,猎物质粒载体是 pPC86。X-α-半乳糖苷酶(gal)购自 Clontech 公司。半乳糖、醋酸锂等购自 sigma 公司。

酵母抽提物(yeast extract)和胃蛋白胨(peptone)均购自

维普资讯 http://www.cqvip.com

英国 oxoid 公司。其他试剂购自国内公司。测序公司为华大基因。

1.2 方法

1.2.1 常规分子生物学方法 将诱饵蛋白的读框序列克隆到 pDBLeu 质粒载体上，获得诱饵 pDBLeu-MPS1 质粒，所选用的克隆位点是 Sal I 和 Xho I。用大规模酵母双杂交技术在成人肝脏 cDNA 文库中筛选到两个与之有相互作用的克隆，从该两个克隆中分别提取构建在 pPC86 载体上的文库质粒 DNA。

1.2.2 质粒回转

1.2.2.1 制备小量 MaV203 酵母感受态 将活化的 YPAD 板上的 MaV203 全部刮下，重悬于 5ml 无菌超滤水中，再将重悬液加入到 YPAD 液体培养基中，使 OD600 达 0.1；后 30℃ 250r/min 摇动培养，分光光度计监测，直到 OD600 达到 0.4。收集酵母细胞，按说明书，用醋酸锂法制备感受态酵母细胞。

1.2.2.2 质里粒转化组的设计及鲑精 DNA 的制备 A 组无 DNA 质粒；B 组 100ng pDBLeu+400ng pPC86；C 组 100ng pDBLeu+100ng pPC86-Y；D 组 100ng pDBLeu-Pin1+100ng pPC86-Y。其中 A 组和 B 组分别为阴性和阳性转化对照组；C 组为猎物自激活检测组；D 组为相互作用检测组。因诱饵的自激活检测已经在前期的大规模酵母双杂交筛选中完成，故省去。将以上各组质粒按说明书操作制备成鲑精 DNA。

1.2.2.3 转 化 在每组质粒 EP 管中加入 50μl 感受态酵母细胞，混匀后铺在含 25mmol/L 3AT 浓度的 SC-/Leu-/Try 二缺平板上(该 3AT 浓度在前期实验中已经证明能抑制 His 基础表达水平)。30℃ 培养 48~72h 后在复制到 SC/-Leu/-Try/-His/-Ura 四缺板和 YPAD 平板上，以后操作严格按 ProQuestTM Two-Hybrid System 说明书。

1.2.3 鉴定报告基因的表达 本酵母双杂交系统设计了二个报告基因：His、Ura 和 LacZ 报告基因。将在 SC/-Leu/-Try 二缺平板上长出的酵母菌落复制到 SC/-Leu/-Try/-His/-Ura 四缺板上，经过清除复制过程，检测 His 和 Ura 报告基因的表达。将复制到 YPAD 平板的滤纸上的菌落作 X-gal 分析，以检测 LacZ 报告基因的表达。X-gal 滤膜分析克隆变为蓝色者为阳性。在报告基因表达的鉴定中均要设置该系统提供的 A、B、C、D、E 对照，A 为强阳性；B、C 为阳性；D 为可疑阳性；E 为阴性。

2 结 果

2.1 猎物自激活检测

100ng pDBLeu+100ng pPC86-Y 质粒组的酵母转化子在 SC/-Leu/-Try/-His/-Ura 四缺平板上，30℃培养 72h 后无菌落长出；且 X-gal 分析，48h 后仍为白色，而对照转化子 A、B、C 均变蓝，说明猎物质粒 pPC86-Y 无自激活性。

2.2 回转验证结果

将前期实验获得的两个候选质粒一对一与诱饵质粒 pDBLeu-Pin1 重新转化 MaV203 酵母菌后，其中一个转化子在 SC/-Leu/-Try/-His/-Ura 四缺平板上经过复制清除后，30℃培养 72h 长出菌落；且在 X-gal 滤膜分析时，该菌落几乎与对照 A 转化子同时变蓝，呈强阳性，说明 Mps1 与该猎物可能有很强的相互作用。而另一个转化子在 SC/-Leu/-Try/-His/-Ura 四缺平板上经过复制清除后，30℃培养 72h 未长出菌落；且 X-gal 滤膜分析为阴性。

2.3 测序及 BLAST 分析

将回转阳性克隆送测序，在 NCBI 中用 BLAST 进行同源性分析，得到与 Mps1 有相互作用蛋白的基因是 MAD1。

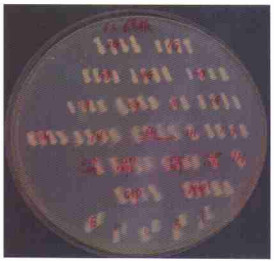


图 1 候选质粒与诱饵质粒(一对一)重转酵母 48h 后 SC/-Leu/-Try 平板上菌落



图 2 候选质粒与诱饵质粒(一对一)重转酵母 48h 后 SC/-Leu/-Try/-His/-Ura 平板上菌落

维普资讯 http://www.cqvip.com

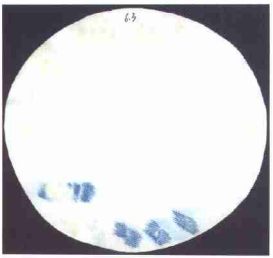


图 3 候选质粒与诱饵质粒(一对一)重转酵母 48h 后 X-gal 滤膜分析

3 讨 论

蛋白质间相互作用及蛋白质的磷酸化研究是当前研究的一个热点。在所有生命活动中,蛋白质之间的相互作用是必不可少的,它是细胞进行一切代谢活动的基础。蛋白质的相互作用能产生许多效应,了解蛋白质相互作用的方式、作用程度、作用结果,将有助于蛋白质功能的分析、生命发育的探索、疑难病理的研究、有效药物的开发等众多问题的解决,因此提示蛋白质间相互作用的关系,建立相互作用关系的网络图已成为蛋白质组学中研究的热点。

Spindle checkpoint 由一个蛋白质网络构成,研究较早的,比较透彻一点的是 Mad1,Mad2,Mad3(BubR1),HBub1,Bub3,and Mps1 (Yu,2002; Cleveland et al.,2003) 另外还有 CENP-E,Aurora B复合物(Aurora B,INCENP,surviving),APC/C (anaphase promoting complex/ cyclosome),cdc20,Nde80/Hec1 等蛋白也参与这一机制并起重要的作用。Suzanne Vigneron.Et.al 通过对蟾蜍的研究发现用免疫耗竭(immunodeleption)方法耗竭某一个蛋白,其它蛋白不能与着丝点结合,并以此来确定各种蛋白在这条通路里所处的位置,他们的研究表明,Aurora B 复合物处于最上游的位置,用免疫耗竭的方法去掉 Aurora B 复合物后(主要是 Aurora B 和 INCENP)Mps1,Bub1 和 CENP-E 不能与着丝点结合,XMps1,XBub1 和 CENP-E 之间存在相互依赖的关系,在哺乳动物细胞中研究发现 hMps1 与着丝点的结合并依赖于其它蛋白,只与着丝点蛋 Hec1/Nde80-Nuf2 复合物有关(Volker M.),这说明虽然 spindle checkpoint 在生物进化过程中具有一定的保守性,但所参与的蛋白在结构与功能上还是存在一定差异,在蛋白质相互作用方面没有研究还很少,各种蛋白质间的相互作用还不是很清楚,因此有必要对蛋白相互作用进行一个系统的研究。当前的研究主要是以着丝点作为这个蛋白质作用的平台,所有参与作用的蛋白结合于着丝点上,这种空间距离上的拉近有利于各个蛋白相互作用,共同完成 spindle checkpoint 的监控功能。

目前对 Mps1 的功能研究表明,过度表达的能引起细胞周期停滞,即使在没有纺锤体损坏的条件下也能激活 spindle checkpoint;对蟾蜍进行研究发现,在 checkpoint 机制中,相互作用的蛋白质网络里 XMPS1 处于较上游的调控位置;另外,MPS1 能够与着丝点和微管连接,这暗示 MPS1 在 checkpoint 机制中可能是一个感受器,当没有微管与着丝点连接的时候,由 MPS1 激活下游的蛋白产生抑制后期开始的信号。Mps1 的氨基端(1~305)能与着丝点 Hec1/Nde80-Nuf2 结合,其羧基端(518~786)的催化结构域能与微管结合,且微管能调节 Mps1 的激酶活性,当 Mps1 与微管结合后其激酶活性能增加 4 倍左右(Volker M.)因此它是一个潜在的“分子感受器”,通过它感受着丝点与微管的连接状态而把物理信号转化为生化信号。上面说过 Suzanne Vigneron.Et.al 的实验表明 Mps1 在这条信号传递通路里处于较上游的位置,故 Mps1 在 spindle checkpoint 信号传递通路中的作用是相当重要的。

自 Fields 和 Song 创立了酵母双杂交系统以来,该技术便在诸多领域得到了广泛的应用。实践证明,酵母双杂交技术是筛选、鉴定相互作用蛋白的一个非常有效的手段。本研究以 Mps1 为诱饵,应用大规模酵母双杂交技术在人胚胎 cDNA 文库中获得的两个阳性克隆回转酵母细胞验证,用 His、Ura 和 LacZ 三个报告基因检测,最后证实仅其中一个为阳性,另一个为假阳性,并将阳性质粒送测序后用 BLAST 分析为 MAD1 基因,初步证明 Mad1 与 Mps1 存在相互作用,但该结果还需要在下一步的免疫共沉淀和 GST 实验中加以确证。本实验结果为研究 Mps1 在染色体分离机制中的作用奠定了基础,为研究非整倍体肿瘤的发生和治疗打好实验和理论基础。

(通讯作者:翁亚光,教授,博士生导师。) (下转第 888 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

素性诸多的不良反应，和 PYM 的有发热、厌食恶心等不适症状。将 TAA 和 PYM 联合使用，不仅可使两种药物发生协同增效作用，而且可以通过减少各药物的用药量，而使其副作用减少。本组随访数据没有出现发热、厌食、恶心等不适症状。由于 TAA 是混悬液，其药物颗粒不能通过毛细血管，不能进入血液循环，以免发生微血管痉挛、栓塞，造成过敏性休克或组织缺血坏死。本组病例中 1 例过敏性休克估计与此有关，经过积极的抗休克治疗，患儿完全恢复。

国内郑勤田应用 PYM 局部注射治疗小儿血管瘤首获成功后[5]，很多报道是注射一次未能消退者每隔 7 天重复 1 次，间隔时间太短，我们在此基础上加用 TAA，并延长了注射间隔时间，可以使药物总量至少减半，副作用亦随之减少。

Chiller 观察到血管瘤出生时出现，好发于头面部，在开始 6 个月中，增长非常迅速，此后，增长速度逐渐减慢，到 1 岁左右，开始进入消退期[6]。本组病例中，6 月以下患儿占 82%，此时是血管瘤病变发展迅速的增值期，对患儿的容貌美观及家长心理影响大，就诊率较高，同时也是血管瘤治疗的最佳时机。由于血管瘤的病理演变包括几个不同时期，每一时期在组织学上和临床上都表现不同。我们采用联合用药方式的目的，旨在最大限度地充分发挥皮质类固醇可能竞争性结合血管瘤内皮细胞膜受体，抑制血管瘤细胞的快速增值及 PYM 抑制血管瘤细胞的 DNA 的合成，影响细胞代谢的相互协同作用，克服彼此间单独用药时的局限性，降低皮质类固醇及 PYM 的副作用，减少药物用量，提高治疗效率，对婴幼儿应该是一种更安全的治疗方法，较单一用药亦更可靠，取得了良好的治疗效果。

参 考 文 献

[1] Mulliken JB, Glowacki J. Hemangiomas and vascular malformations in infants and children: A classification based on endotheliad characteristics[J].Plast Reconstr Surg, 1982;69(3):412-422.

[2] Kushner BJ.Intralesional corticosteroids injection for infantile adnexal hemangioma[J]. Am J Ophthmol ,1982 ;93(4):496-506.

[3] Ahmed Assaf.Corticosteroids in the management of adnexal hemangioma in infancy and childhood[J]. Ann Ophthmol, 1992;24(1):12-18.

[4] 陈新谦，金有豫，汤 光，等.新编药物学 [M].北京：人民卫生出版社，2003.677-678.

[5] 郑勤田，伍连康，容文星，等.平阳霉素局部注射治疗小儿血管瘤[J].中华外科杂志，1991;29(5):290-291.

[6] Chiller KG, Passaro D, Frieden IJ. Hemangiomas of infancy: clinical characteristics, morphologic subtypes, and their relationship to race, ethnicity, and sex[J]. Arch Dermatol, 2002;38:1567-1576.

(上接第 856 页)

参 考 文 献

[1] Biggins S, Murray A. W.2001, The budding yeast protein kinase ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint [J]. Genes Dev, 2001;15(23):3118-3129.

[2] Fang G.Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex[J].Mol.Biol Cell, 2002;13:755-766.

[3] Hardwick KG, Weiss E, Luca FC, et al.Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption [J].Science, 1996;273:953-956.

[4] Jablonski S.A., Chan.The hBUB1 and hBUBR1kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis[J].Chromosoma, 1998;107:386-396.

[5] Rieder C. L., Schultz A., Cole R, et al.Anaphase onset invertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle[J]. J Cell Biol, 1994;127(5):1301-1310.

[6] Sudakin V., Chan G.K., Yen T.J.Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2[J]. Cell Biol, 2001; 154:925-936.

[7] Tang Z., Bharadwaj R., Li B., et al.Mad2-independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1[J].Dev.Cell, 2001;1:227-237.

[8] Todd W. Seeley, 1 Ling Wang, and Julia Y. Zhen. Phosphorylation of Human MAD1 by the BUB1Kinase in Vitro[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1999;257:589-595.

[9] Volker M. Stucke. Christoph Baumann. Erich A. Nigg.Kinetochore localization and microtubule interaction of the human spindle checkpoint kinase Mps1[J].Chromosoma, 2004;113:1-15.

[10] Yu H.Regulation of APC Cdc20 by the spindle checkpoint.Curr.Opin [J].Cell Biol, 2002;14:706-714.

[11] 张 洁，符传孩，缪 勇，等.蛋白激酶 TTK 与 CENP-E 相互作用并共定位于人细胞的动粒[J].科学通报，2002;47(19):