DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.022
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
1734 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1734-03

酵母双杂交筛选与分化抑制因子Id1′相互作用的蛋白

贾思远,罗向东,齐 洁,苏踊跃,陈 渝 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 筛选成人肺组织文库中与分化抑制因子Id1′相互作用的蛋白。方法 构建重组诱饵质粒pHybLex/Zeo-Id1′,转化入酵母细胞EGY48/pSH18-34,检测重组质粒有无非特异激活报告基因;通过筛选成人肺组织文库,获取真阳性文库质粒,进行测序和同源性比较,获得真阳性克隆。结果 经测序证实,重组诱饵质粒pHybLex/Zeo-Id1′构建成功;将重组质粒转化入酵母细胞EGY48/pSH18-34,经检测无非特异激活功能。进一步通过对文库进行筛选,获得一个真阳性克隆,通过测序和同源性比较证实该阳性克隆是酪氨酸蛋白激酶Fyn。结论 分化抑制因子Id1′与Fyn在酵母细胞中存在相互作用。

关键词:分化抑制因子1;酵母双杂交;Fyn
中图法分类号:Q51;Q785 文献标识码:A

Screening of the protein interacting with inhibitor of differentiation 1′ using yeast two hybrid method

JIA Si-yuan, LUO Xiang-dong, QI Jie, SU Yong-yue, CHEN Yu (Institute of Burn Research, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain the protein interacting with inhibitor of differentiation1′(Id1′). Methods The recombinant bait plasmid pHybLex/Zeo-Id1′ was constructed and transformed into yeast strain EGY48/pSH18-34 to test pHybLex/Zeo-Id1′ for non-specific activation. Adult human lung cDNA libraries were screened to obtain true positive library plasmid. The true positive library clone was obtained by sequencing and basic local alignment sequence tool (BLAST). Results The recombinant bait vector, named as pHybLex/Zeo-Id1′, was confirmed by sequencing. pHybLex/Zeo-Id1′ was transformed into yeast strain EGY48/pSH18-34 and the transformants had no autonomously activated reporter genes. One true positive clone, obtained by screening of the adult human lung cDNA libraries, was confirmed to be Fyn by sequencing and BLAST. Conclusion Id1′ can interact with Fyn.

Key words: inhibitor of differentiation; yeast two hybrid; Fyn

1990年Robert Benezra首次克隆出Id基因,并用Id蛋白来阻断未成熟的细胞分化。Id蛋白的主要功能是负向调控分化,因而被称为"分化抑制因子"(Inhibitor of differentiation)。Id蛋白还在细胞周期调控、凋亡以及肿瘤生成等方面起重要作用[1]。在哺乳细胞中,Id家族由四个成员Id1-4构成,四种Id分子功能相近,但又不完全一致。本室前期研究表明,人钙调素依赖的丝氨酸蛋白激酶(hCASK)的下游信号分子为Id1[2]。二者相互作用可调节细胞的增殖分化。由于转录及转录后调控,Id1产生两种不同拼接型的蛋白:Id1和Id1′蛋白[3]。而hCASK与Id1′蛋白之间的亲和力远高于与Id1的亲和力(结果待发表)。因此,有必要深入研究Id1′在CASK参与的增殖分化信号调控通路中所起的作用。

在研究蛋白质之间相互作用时,酵母双杂交(Yeast two hybrid)技术是目前常用的技术平台。本实验利用酵母双杂交技术,筛选成人肺组织cDNA文库中与Id1′相互作用的蛋白。

1 材料与方法

1.1 实验材料

酵母双杂交诱饵(Bait)质粒pHybLex/Zeo,阴性对照质粒pHybLex/Zeo-Lamin,阳性对照质粒pYESTrp-Jun,pHybLex/Zeo-Fos2以及酵母株EGY48/PSH18-34、成人肺组织cDNA文库均购自Invitrogen公司。PVp16-Id1′质粒包含的Id1′编码序列,由本室自行构建。DNA重组所用各种限制性内切酶,T4DNA连接酶,pfu DNA聚合酶等均购自TaKaRa公司。酵母培养用试剂购自Clontech公司。

1.2 实验方法

1.2.1 重组诱饵质粒的构建 以PVp16-Id1′质粒为模板,

基金项目:国家重点基础研究规划资助项目("973"项目)(G1999054201)
作者简介:贾思远(1974-),男,河南省开封县人,博士,医师,主要从事细胞增殖分化调控机制方面的研究。电话:(023)68754149-8082
收稿日期:2003-08-11;修回日期:2003-08-22

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PCR 扩增 Id1′的编码序列。PCR 引物: 5′-GC TATGAATTCAAAGTCGCCAGTGGCAGC-3′和 5′-GATATCTCGAG CTAGTGGTCGGATCTGGA-3′。反应条件: 94 ℃ 1 min, 58 ℃ 1 min, 72 ℃ 3 min, 共 30 个循环。将 Id1′的 PCR 产物克隆进酵母双杂交诱饵质粒 pHybLex/Zeo 中, 得到重组诱饵质粒 pHybLex/Zeo-Id1′, 测序鉴定后, 用 LiAc 转化 EGY48/ PSH18-34 酵母。

1.2.2　重组诱饵质粒非特异激活功能的检测　　方法主要参照 Invitrogene 公司的"Hybrid Hunter"操作手册进行。以 EGY48/ PSH18-34(pYESTrp-Jun + pHybLex/Zeo-Fos2)为阳性对照, EGY48/ PSH18-34(pYESTrp-Jun + pHybLex/Zeo-Lamin)为阴性对照, 检测实验组 EGY48/PSH18-34(pYESTrp-Jun + pHybLex/Zeo-Id1′)在 YC-WULZ200Gal/Raf 培养基上能否激活报告基因 Leu2 和 LacZ。若实验组不能在该培养基上生长, 表明无非特异激活 Leu2 功能; 采用β-半乳糖苷酶滤膜分析检测报告基因 LacZ 被激活情况。若实验组酵母克隆在 8 h 内未变蓝, 表明无非特异激活 LacZ 功能。

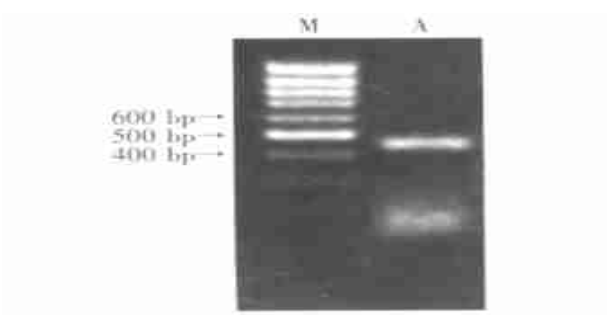
1.2.3　筛选文库质粒及真阳性文库质粒的获得　　扩增成人肺组织文库, 并大量提取文库质粒。电穿孔法转化 EGY48/ PSH18-34(pHybLex/Zeo-Id1′), 转化后的酵母在 YC-WULZ200 Gal/ Raf 培养基上依次筛选 $Leu2^+$ 和 $Leu2^+$ $LacZ^+$ 双阳性克隆。用酸洗玻璃珠法提取双阳性酵母质粒, 转化入大肠杆菌 DH5α, 分离出文库质粒。将这些文库质粒再分别转化 EGY48/PSH18-34(pHybLex/Zeo-Id1′), EGY48/ PSH18-34(pHybLex/Zeo-Lamin)及 EGY48/PSH18-34(pHybLex/Zeo), 重复筛选 $Leu2^+$ $LacZ^+$ 双阳性克隆, 获得真阳性文库质粒。

1.2.4　靶 DNA 片段分析　　将真阳性文库质粒送上海基康公司, 利用 pYESTrp2 的测序引物进行测序, 经 NCBI 进行同源性比较。

2　结果

2.1　重组诱饵质粒的构建

以本室自行构建的 pVp16-Id1′质粒为模板, PCR 法扩增出带有酶切位点的 Id1′的编码序列, 结果见图 1。将 Id1′的 PCR 产物克隆进酵母双杂交诱饵质粒 pHybLex/Zeo 中, 得到重组诱饵质粒 pHybLex/Zeo-Id1′, 经测序鉴定构建成功。



M: Marker; A: Id1′

图 1　PCR 扩增 Id1′的编码序列结果

Fig 1　Result of amplified Idf　coding sequence by PCR

2.2　重组诱饵质粒非特异激活功能的检测

对生长在 YC-WULZ200/Gal 培养基上的克隆进行分析发现, 转化阳性对照质粒的酵母在该缺陷培养基上生长良好, 转化有阴性对照质粒的酵母不能生长, 而实验组亦不能在该培养基上生长; 表明重组诱饵表达质粒无非特异激活报告基因 Leu2 功能。β-半乳糖苷酶滤膜分析实验发现, 转化有阳性对照质粒的酵母克隆在 30 min 内变成深蓝色; 而阴性对照以及实验组酵母克隆 8 h 内不显蓝色, 表明构建的重组诱饵表达质粒对报告基因 LacZ 无自激活作用。

2.3　文库质粒的筛选及真阳性文库质粒的获得

将文库质粒转化 EGY48/ PSH18-34(pHybLex/Zeo-Id1′), 转化效率为 2.01×10^5 cfu/μg。将转化后的酵母克隆接种在 YC-WULZ200 Gal/Raf 培养基上, 经初步筛选, 获得 198 个 $Leu2^+$ 克隆, 见图 2。采用β-半乳糖苷酶克隆滤膜影印法进一步分析报告基因 LacZ 表达情况, 获得 19 个 $Leu2^+$ $LacZ^+$ 克隆, 见图 3。提取上述阳性克隆的质粒, 设置阳性对照及阴性对照, 将 19 个双阳性克隆质粒分别与 pHybLex/Zeo-Id1′、pHybLex/Zeo-Lamin、pHybLex/Zeo 转化入酵母株 EGY48/ pSH18-34 中, 并检测这些转化株 LacZ 报告基因表达情况, 最终获得 1 个真阳性克隆。



图 2　酵母双杂交筛选 Leu^+ 克隆

Fig 2　Screening of Leu^+ clone using yeast two hybrid method



Blue: Positive clone;

图 3　酵母双杂交筛选 $Leu2^+$ $LacZ^+$ 克隆

Fig 3　Screening of $Leu2^+$ $LacZ^+$ clone using yeast two hybrid method

2.4　靶 DNA 片段测序比对

抽提获得真阳性克隆质粒, 应用 pYESTrp2 测序引物进行测序(结果略), 将测序结果经 Genetool 软件比对分析, 并与 NCBI 核酸数据库进行同源性比较, 结果发现其中一个克隆与酪氨酸蛋白激酶 Fyn 高度同源(360/360)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

本实验应用酵母双杂交方法，通过对成人肺组织cDNA文库进行筛选，发现Id1′可与酪氨酸蛋白激酶Fyn在酵母细胞中发生相互作用。Id1′属Id家族成员之一，该家族在细胞增殖分化过程中起重要作用，因此被誉为调节细胞增殖分化的刹车[4]。Id1′可以与多种蛋白发生相互作用而调控增殖分化[5]，而对于Id1′与Fyn之间相互作用，尚未见报道。

Fyn在1986年被发现，是酪氨酸蛋白激酶(Protein-tyrosine kinase, PTK)Src家族成员之一，分子量为59×10^3。Fyn含有一个SH2(Src-homologue 2)结构域及一个SH3(Src-homologue 3)结构域。这两种结构域都与细胞的信号转导过程相关。研究表明，Fyn是一种具有多种生物学功能的蛋白。其功能与细胞增殖密切相关，此外Fyn还参与T细胞信号通路，与脑功能有关，参与细胞黏附介导的信号通路。Fyn对细胞增殖影响方面，Courtneidge等[6]研究证实：包括Fyn在内的Src激酶家族通过PDGF受体参与细胞内的信号转导。若在成纤维细胞内微注射入灭活形式的Fyn、Src、Yes或特异性抑制Fyn、Src、Yes活性的抗体cst. 1，PDGF刺激后细胞不能进入S期。成纤维细胞的增殖过程需要这些激酶的SH2结构域的参与。SH2结构域的靶蛋白之一是Sam68，它是一种RNA结合蛋白，在细胞周期的M期与Src家族的某些成员发生相互作用[7]。研究者认为Fyn等激酶可能通过使Sam68的酪氨酸位点发生磷酸化，进而与之结合而参与细胞的分裂过程。

Fyn具有调控细胞增殖的功能，并且主要作用于细胞周期的S/M期。而目前对于Id1′对G_1期调控的研究较为清楚[8]，对于Id1′蛋白如何调控S/G_2/M期的进程，目前研究得较少。我们实验表明，Fyn与Id1′在酵母体系中存在相互作用，在哺乳动物细胞中是否存在相互作用尚待证实，Fyn与Id1′相互作用是不是调控S/M期进程的一种机制？这些都需进一步的实验予以证实。

参考文献：

[1] Lasorella A, Uo T, Iavarone A. Id proteins at the cross-road of development and cancer[J]. Oncogene, 2001, 20(58): 8326-8333.

[2] 齐 洁，罗向东，罗 勤. 人CASK/LIN-2下游信号分子的初步研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2000, 17(6): 404-408.

[3] Tamura Y, Sugimto M, Ohnishi K, *et al*. Differential activity of a variant form of the human Id-1 protein generated by alternative splicing[J]. FEBS, 1998, 436(1): 169-173.

[4] Carmeliet P. Developmental biology. Controlling the cellular brakes[J]. Nature, 1999, 401(6754): 657-658.

[5] Jogi A, Persson P, Grynfeld A, *et al*. Modulation of basic helix-loop-helix transcription complex formation by Id proteins during neuronal differentiation[J]. J Biol Chem, 2002, 277(11): 9118-9126.

[6] Broome M A, Courtneidge S A. No requirement for src family kinases for PDGF signaling in fibroblasts expressing SV40 large T antigen[J]. Oncogene, 2000, 19(24): 2867-2869.

[7] Hartmann A M, Nayler O, Schwaiger F W, *et al*. The interaction and colocalization of Sam68 with the splicing-associated factor YT521-B in nuclear dots is regulated by the Src family kinase p59 (fyn)[J]. Mol Biol Cell, 1999, 10(11): 3909-3926.

[8] Yokota Y, Mori S. Role of Id family proteins in growth control[J]. J Cell Physiol, 2002, 190(1): 21-28.

(编辑 张 宁)

(上接1733页)

员要进行技术培训和操作规程的学习，以免人为造成机器损坏，影响医疗工作，每台机器定专人负责保养。加强医技人员的英语和工程技术方面的培训和学习从而使自己在熟练掌握所用设备操作技术以外，再掌握一些简单故障的排除与应急处理方法，避免在急救过程中设备出现简单故障，一时又找不到维修人员而影响急救工作的进行[1]。

2 维护和保养

医疗设备的电子电路中集成电路较多，且机械结构紧密，对环境温度、湿度有一定要求，安装空调机和去湿机是必需的，同时还要经常注意观察温度湿度的变化。

稳定的供电电源：放射科所有的医疗设备对供电电源的电压波动范围及频率有明确的要求，务必严格遵守，尤其是交流电源。电网电压有时会不稳定，因此大型设备应另外专门配备稳压装置。停电后应当切断电源，待电源稳定后再通电开机。

本科工程师应经常定期检查机器的状况，对设备进行包括操作情况、测试与调整、电气安全测试、清洁、润滑及更换易损耗元件，并检查设备保养登记情况，对于出现的问题及时给予处理。

加强维修人员的培训工作，提高维修人员的业务水平，对维修人员进行定期培训，利用请进来(即请有关公司到院里来举行技术讲座或培训班)，或走出去(即出去参加相应的学术会议或学习班)，使维修人员能及时地了解医疗设备技术发展的最新动态，拓宽其知识面[2]。

合理利用保修合同，保证设备的完好率。近几年来，由于进口设备不断增多，国外厂家在我国建立了不少的维修服务站，以进行他们的售后服务工作，我们应充分利用他们的技术服务，搞好本单位的维修工作[3]。

医疗设备和其他设备相比具有其特殊性，但也广泛存在着一般性。只要我们认真总结经验不断学习，维护和保养工作是能够做得很好的。

关键词：医疗设备；维护；保养

中图法分类号：R197.39 文献标识码：B

参考文献：

[1] 孟祥湖，张之才. 加强医疗设备的维修保养工作创造良好的经济效益[J]. 医疗设备信息, 2000, (5): 44

[2] 张良才，朱 辉，朱雅轩. 医疗设备使用工作中亟待解决的若干问题探讨[J]. 医疗装备, 2000, 11: 41-42

[3] 陈 骏. 谈医疗设备的日常维护与保养[J]. 医疗设备信息, 2000, (6): 38

(编辑 冷怀明)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net