

· 论 著 ·

## HNP-3 相互作用蛋白的酵母双杂交筛选

张伟义<sup>1</sup>, 邓璐霞<sup>2</sup>, 黄 宁<sup>2</sup>, 朱 涛<sup>1△</sup>

(1. 四川大学华西医院麻醉科, 成都 610041; 2. 四川大学华西医学中心感染与免疫教研室, 成都 610041)

**摘要:**目的 筛选胎肾上腺 cDNA 文库中与人中性粒细胞多肽(HNP-3)成熟肽具有相互作用的蛋白分子。方法 通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)成功获得 HNP-3 成熟肽基因,并将其插入酵母表达载体 pGBKT7 中构建诱饵质粒,转染酵母细胞 AH109,而后经缺陷性培养基上培养并观察 pGBKT7-HNP-3 在 AH109 中的表达情况,检测诱饵载体有无毒性作用和自激活功能。同时收集胎肾上腺,提取 RNA,通过自我检测、分析、报告技术(SMART 技术)制备人胎肾上腺 cDNA 文库。并采用 Matchmaker LexA 酵母双杂交系统从胎肾上腺 cDNA 文库中筛选与 HNP-3 成熟肽相互作用的蛋白。最后通过 PCR 筛选获得阳性克隆并测序,通过回转实验,谷胱甘肽巯基转移酶沉降技术(GST pull down)以及免疫共沉淀实验再次验证二者的相互作用关系。**结果** 成功构建诱饵质粒 pGBK-T7-HNP-3 以及胎肾上腺 cDNA 文库并在酵母细胞中正确表达,筛选获得 HNP-3 成熟肽相互作用的蛋白——促肾上腺皮质激素受体(CTHR-R)2、钙粘着蛋白关联蛋白 1(CTNBN1)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5(LRP5)、成对同源域转录因子 2(PITX2)等。最终选定 ACTH-R 作为主要研究对象,且经 GST pull down 以及免疫共沉淀实验获得了证实二者间具有相互作用的相应的条带。**结论** 从胎肾上腺 cDNA 文库中成功筛选得到  $\alpha$  防御素 HNP-3 成熟肽相互作用蛋白——ACTH-R。

**关键词:**  $\alpha$  防御素; 双杂交系统技术; 受体, 促肾上腺皮质激素; 人  $\alpha$  防御素 3; 胎肾上腺 cDNA 文库

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.33.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)33-3335-05

## Interaction proteins of HNP-3 by yeast two hybrid system

Zhang Weiyi<sup>1</sup>, Deng Luxia<sup>2</sup>, Huang Ning<sup>2</sup>, Zhu Tao<sup>1△</sup>

(1. Department of Anesthesia, West China Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China;

2. Research Unit of Infection and Immunity, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**Abstract: Objective** To screen proteins binding with human neutrophil peptide 3(HNP-3) mature peptide from fetal adrenal cDNA library by yeast two hybrid technique. **Methods** The cDNA fragment encoding HNP-3 mature peptide was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR) and constructed into pGBK-T7 vector as the bait plasmid in yeast two hybrid system 3. The plasmid pGBKT7-HNP-3 was then transformed into the yeast cell AH109, and its toxicity and transcriptional activation was tested by both the phenotype assay and the color assay. Subsequently, the RNA from fetal adrenal gland was obtained and then transformed into cDNA library using SMART technology. The fetal adrenal cDNA library was screened with pGBKT7-HNP-3 as bait plasmid by yeast-two hybrid system Matchmaker Lexa. Finally, the positive clone was obtained by PCR and then identified by sequence. Then the interaction between them was determined by GST pull down in vitro and coimmunoprecipitates experiments in vivo. **Results** Bait and cDNA library have been constructed successfully and transformed into yeast. Then the interaction protein was found -- melanocortin 2 receptor(ACTH-R), melanocortin 2 receptor(ACTH-R), catenin(cadherin-associated protein), beta 1(CTNBN1), low density lipoprotein receptor-related protein 5(LRP5), paired-like homeodomain transcription factor 2(PITX2). Therefore, melanocortin 2 receptor(ACTH-R) was determined into the major subjects. And bands which can demonstrate the relationship between HNP-3 and ACTH-R was obtained in GST(Glutathione S-transferase) pull down and coimmunoprecipitates experiments. **Conclusion** ACTH-R can bind to HNP-3 we obtained from fetal adrenal cDNA library and it may play important roles in the function of HNP-3 mature peptide.

**Key words:** alpha-defensins; two-hybrid system techniques; receptors, corticotropin; human neutrophil peptide 3; fetal adrenal cDNA library

抗菌肽是一类小分子多肽,具有抗肿瘤、微生物和病毒作用<sup>[1]</sup>,而人源性防御素(human defensins)则是抗菌肽的重要家族成员之一。又根据其结构、二硫键位置以及抗菌活性,分为以下 3 类: $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  防御素<sup>[2-4]</sup>。人源性防御素是一类具有广泛抗菌谱的阳离子多肽,多表达于吞噬性白细胞以及黏膜表面的上皮细胞中。其强大的抗菌活性、广泛的抗菌谱以及在多种

器官中的高表达,表明其在天然免疫中占有重要的地位<sup>[1-3]</sup>。不同于  $\beta$  防御素主要存在于受感染的皮肤、呼吸道以及泌尿生殖道上皮,人源性  $\alpha$  防御素除主要存在于正常及感染上皮细胞<sup>[5]</sup>。 $\alpha$  防御素除具有广谱杀灭病原微生物功能外,还具有重要的免疫调节功能,如促进吞噬细胞的吞噬,激活肥大细胞脱颗粒,刺激肺上皮细胞释放趋化细胞因子,活化单核细胞分泌

△ 通讯作者, Tel:18980601837; E-mail:1370461@qq.com。

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ), 调节肾上腺皮质激素, 激活或抑制补体经典途径, 促进未成熟树突状细胞以及 T 细胞的活化和趋化<sup>[6-7]</sup>。因此  $\alpha$  防御素被认为是天然免疫反应中关键的多功能效应分子之一。然而  $\alpha$  防御素在调节多种不同类型细胞的生物学功能过程中, 其蛋白相互作用分子及其作用机制目前了解还不十分清楚<sup>[8-9]</sup>。

酵母双杂交系统 (yeast two-hybrid system) 可直接用于检测活细胞内的蛋白-蛋白之间的相互作用, 具有高度敏感性。随着它的广泛应用, 大量重要的蛋白质之间的相互作用及新的配体被发现<sup>[10-11]</sup>。酵母双杂交系统现在不仅已广泛应用于筛选未知蛋白和研究蛋白-蛋白之间的相互作用, 也用于研究蛋白与其他分子间的相互作用、蛋白的功能以及进行药物筛选等<sup>[12-15]</sup>。本实验构建了人中性粒细胞中含有的  $\alpha$  防御素又称人中性粒细胞多肽 3 (human neutrophil peptide 3, HNP-3) 成熟肽 cDNA 片段的酵母双杂交诱饵载体和胎肾上腺 cDNA 文库, 以利用酵母双杂交系统杂交技术, 鉴定 HNP-3 与其反应的相关蛋白分子, 并通过谷胱甘肽转移酶沉降技术 (GST pull down) 以及免疫共沉淀实验再次验证二者的相互作用关系, 为阐明 HNP-3 发挥免疫调节以及抗微生物作用的分子途径提供了有益的线索。

## 1 材料与与方法

**1.1 材料** 表达载体 pGBK-T7 质粒、pGAD-T7 质粒、酵母菌株 AH109 & Y187 购于 Clontech 公司; 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒、T4 连接酶、胶回收试剂盒购于 Takara 公司; 质粒提试剂盒购于赛百盛公司; DNA 重组所用的各种限制性内切酶购于晶美公司; mRNA 提取试剂盒购于上海华舜公司; SMART cDNA 文库构建试剂盒, 酵母 YPD 培养基, SD/Ade<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/His/Trp<sup>-</sup>、SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup> 等培养基, 以及醋酸锂购于美国 Clontech 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 构建** HNP-3 引物: 根据 PubMed 基因库提供的 HNP-3 全长 mRNA 序列 (Genbank 登录号为 NP 0043704), 将序列输入 Primer Premier 5 软件, 设计 HNP-3 引物。正向序列: 5'-GCG GAA TTC GAC TGC TAT TGC AGA ATA CC-3'; 反向序列: 5'-GAT GAC GAC GCA GCA GAA TGC CCA G-3'。HL-60 细胞中总 RNA 的提取按照 TRIzol 说明书进行。RT-PCR 操作按 Takara 的 RT-PCR 试剂盒说明书进行, 反应所得扩增双链 cDNA (ds cDNA) 保存于 -20 °C。获得的 PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。电泳后切下相应位置条带, 按 Takara 的胶回收试剂盒说明书进行。将回收后的 PCR 产物插入 pBluescript-SK-II 质粒中, 然后将重组质粒 pBluescript-SK-II-HNP-3 双酶切后回收小片断 (双酶切和片断回收方法同前), 最后将其与 pGBKT7 空质粒经 EcoRI 和 Sal I 双酶切后回收大片断连接。酶切测序鉴定, 得到诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3。

**1.2.2 诱饵重组质粒转化酵母菌株** 用醋酸锂法将转化有诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 以及空质粒 pGBKT7 的 AH109 酵母菌都分别涂布在 SD/Trp<sup>-</sup>、SD/Ade<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/His/Trp<sup>-</sup>、SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup> 等 4 种营养缺陷性培养基上, 于 30 °C 孵育 3~5 d, 观察酵母菌落生长情况<sup>[4]</sup>。同时将这两种酵母菌在 SD/Trp<sup>-</sup>、SD/Ade<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/His/Trp<sup>-</sup>、SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup> 营养

缺陷培养基中培养 16 h 后测定菌液的 OD600 值。据此推算翻译出的融合蛋白有无单独激活报告基因转录的作用及酵母毒性。

**1.2.3 胎肾上腺 cDNA 文库构建** 提取胎肾上腺组织 RNA, 根据 cDNA 文库构建手册进行胎肾上腺 cDNA 文库构建。然后将得到的 ds cDNA 使用醋酸锂法转化酵母菌株 Y187<sup>[12]</sup>, 转移 1  $\mu$ L 的共转产物至 1 mL 的 YPDA 液体培养基中, 制成 1:1 000 的稀释液, 再从此稀释液中取 1  $\mu$ L 转移至 1 mL 的 YPDA 液体培养基中, 制成 1:1  $\times 10^6$  的稀释液, 取 200  $\mu$ L 的 1  $\times 10^6$  稀释液均匀涂布于直径 150 mm 的 SD/Leu<sup>-</sup> 的平板上, 30 °C 倒置培养至少 20 h, 计数平板菌落。根据参考文献<sup>[14]</sup>中的方法计算转化效率。

**1.2.4 诱饵质粒与文库进行杂交** 使用醋酸锂法将胎肾上腺的 ds cDNA 以及质粒 pGADT-rec 顺序转化到已含有诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 的 AH109 酵母中, 得到 6 mL 转化液, 取每 150 微升均匀涂布于直径 150 mm 的 SD/His<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup> 的平板上 (约 40 块), 30 °C 倒置培养 3~5 d<sup>[14-17]</sup>。转移大于或等于 2 mm 的阳性克隆到 SD/His<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>/Ade<sup>-</sup>/Leu<sup>-</sup>, 30 °C 倒置培养 3~5 d, 然后根据酵母在不同缺陷型培养基上的表型和  $\beta$ -半乳糖苷酶印膜法分析结果鉴定阳性克隆<sup>[15]</sup>。

**1.2.5 回转变验证试验** 将筛选得到的阳性克隆测序后经 Genbank 比对同源性后得到的序列结果 (X), 通过 PCR 扩增后, 与载体 pGADrec 连接后成为载体-pGADrec-X, 与表达 pGBKT7-HNP-3 共转化酵母菌株 AH109 菌株进行回转变验证, 将配合产物按 1:10、1:100、1:1 000、1:10 000 铺于 X- $\alpha$ -gal 的四缺氨基酸营养培养基上 30 °C 培养 7 d。

**1.2.6 GST pull down 以及免疫共沉淀实验共同验证 ACTH-R 与 HNP-3 相互作用** 首先提取 pGBKT7-HNP-3 质粒 DNA, 并将 HNP-3 的开放阅读框亚克隆于 pGEX4T-1 载体中, 得到 pGEX4T-1-HNP-3。然后以正向序列: 5'-GCG GAA TTC GAC TGC TAT TGC AGA ATA CC-3'; 反向序列: 5'-GAT GAC GAC GCA GCA GAA TGC CCA G-3' 为引物构建载体 pACT2-ACTH-R<sub>261-458</sub>。并将 pGEX4T-1-HNP-3 重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 使用终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达, 细菌收集后使用磷酸二氢盐缓冲液 (PBS) 重悬, 超声破碎细胞, 14 000 r/min 离心 15 min 收集上清液, 上清液与谷胱甘肽-琼脂糖共孵育 1 h 后, 经 PBS 洗涤 3 次, 用 20 mmol/L 的还原性谷胱甘肽洗脱, 洗脱的 GST-HNP-3 融合蛋白经 SDS-PAGE 确认相对分子质量。pACT2-ACTH-R<sub>261-458</sub> 经酶切后线性化, 然后使用 TNT<sup>®</sup> Quick Master Mix 进行体外转录和翻译。将体外转录、翻译反应液与琼脂糖-谷胱甘肽、GST-HNP-3 混合, 4 °C 孵育 60 min 后, PBS 洗涤 3 次, 然后进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜后使用 anti-ACTH-R 抗体检测。同时将 pGBKT7-HNP-3 经双酶切后亚克隆至 pCMV-HA 载体中——pCMV-HA-HNP-3, 将 pACT2-ACTH-R<sub>261-458</sub> 经双酶切后亚克隆至 pCMV-Myc 载体——pCMV-Myc-ACTH-R<sub>261-458</sub>。采用磷酸钙法分别将二者各 1  $\mu$ g 共转染人胚肾 293 细胞中。收集裂解后的上清液, 一部分用于蛋白质印迹检测, 其余用于免疫共沉淀实验。将 HA 多抗加入裂解液中, 4 °C 孵育 1 h, 然后将 A/G plus 琼脂糖加入裂解液中, 4 °C 摇动过夜。免疫沉淀物用 1 mL RIPA 缓冲液冲洗 4 次, 然后经 SDS-PAGE 电泳,

转膜后 ECL 发光试剂盒检测。

**2 结 果**

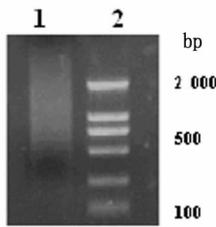
**2.1 诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 转化 AH109**

**2.1.1 重组诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 序列测定与分析** 构建的重组诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 经测序分析,插入片段其碱基序列与 HNP-3 成熟肽基因编码序列一致,且插入方向正确,见插 I 图 1。

**2.1.2 诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 自激活检测** 将重组诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 转化 AH109 分别在 SD/Trp<sup>-</sup>、SD/Ade<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/His<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup> 4 种营养缺陷培养基上划线,30 °C 培养,观察在各种培养基上的生长情况。转化重组诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 的 AH109 在 SD/Trp<sup>-</sup>、SD/Ade<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/His<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup> 4 种二缺陷培养基的生长情况见插 I 图 2。可见已转入诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 的 AH109 酵母菌可在 SD/Trp<sup>-</sup> 单缺氨基酸营养培养基上正常生长,而在二缺氨基酸营养培养基 SD/Ade<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/His<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup> 未见生长,结果与预期一致,说明转化后的 AH109 酵母菌无自激活发生。

**2.2 胎肾上腺 cDNA 文库的构建**

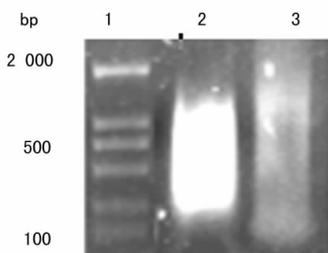
**2.2.1 胎肾上腺 mRNA 提取** 胎肾上腺用 TRIzol 提取后行 1% 琼脂糖凝胶电泳,总 RNA 富含的 2 条特异带:28S rRNA 和 18S rRNA 以及小片段 5S tRNA 带,分光光度测定总 RNA 的 A<sub>260</sub> 和 A<sub>280</sub> 可得 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> > 1.8,说明所提取 RNA 纯度较高且未降解。使用 mRNA 抽提试剂盒从胎肾上腺总 RNA 中磁珠吸附 mRNA,结果见图 3,分布范围在 300~3 000 bp 之间,符合 mRAN 分布的正常范围。



1. mRNA; 2. Marker 2000.

**图 3 胎肾上腺 mRNA 提取**

**2.2.2 胎肾上腺 ds cDNA 的合成及纯化** 提取的胎肾上腺 mRNA 得到 ds cDNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,扩增产物大小约为 0.2~8.0 kb,与预期相同。用 SPIN-TE400 柱子纯化,可见纯化后 ds cDNA 与未纯化双链 cDNA 相比长度分布均匀,可以满足 cDNA 文库构建的要求,见图 4。



1. Marker 2000; 2. 胎肾上腺 ds cDNA ; 3. 纯化后 ds cDNA

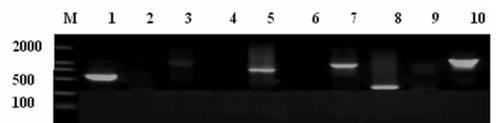
**图 4 胎肾上腺 ds cDNA 的合成与纯化**

**2.2.3 胎肾上腺 cDNA 文库转化效率鉴定** 胎肾上腺 ds cDNA 和 pGADT7-Rec<sup>-</sup> 转化 Y187 酵母感受态细胞,单菌落计数,计算转化效率约为 1.7 × 10<sup>6</sup> 转化子/3 μg pGADT7/Rec<sup>-</sup>,达到了文库构建要求的转化效率(1.0 × 10<sup>6</sup> 转化子/3 μg pGADT7/Rec<sup>-</sup>)。按照 150 μL 重悬菌液/120 mm 平板将转化的(胎肾上腺 ds cDNA 和 pGADT7/Rec<sup>-</sup>)的 Y187 酵母菌涂布于 SD/Leu<sup>-</sup> (约 40 个平板),30 °C 培养,用 Freezing medium 溶解保种,分装后 -80 °C 保存,血球计数板计数保种浓度为 1.4 × 10<sup>8</sup> /mL (标准为 2 × 10<sup>7</sup> /mL)。

**2.4 重组诱饵质粒毒性检测** 挑取重组诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 转化菌 AH109 单克隆(2~3 mm)接种于 SD/Trp<sup>-</sup> + KaNa 液体培养基中,培养 16 h,检测菌液的 OD<sub>600</sub> = 0.9,符合进一步进行双杂交的要求(OD<sub>600</sub> ≥ 0.8)。离心重悬于 5 mL SD/Trp<sup>-</sup> 液体培养基中,细胞计数板计数细胞密度 = 1.3 × 10<sup>9</sup> /mL,也符合进一步进行双杂交的要求(细胞密度应大于或等于 1 × 10<sup>9</sup> /mL)。说明重组诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 无酵母毒性,转化重组诱饵质粒的 AH109 可用于下一步的酵母双杂交。

**2.5 阳性酵母菌 lacZ 报告基因表达的 β-半乳糖苷酶活性检测** 将阳性克隆点样于硝酸纤维滤膜上,液氮冷冻后室温裂菌,Z buffer/X-gal 溶液浸泡显色。如插 I 图 5 所示,其中有近 200 个克隆双杂交 AH109 显色(图中选取阳性克隆集中拍摄),说明在这些双杂交 AH109 酵母菌内同源重组人胎肾上腺 cDNA 文库质粒表达蛋白与诱饵蛋白 pGBKT7-HNP-3 有相互作用。

**2.6 酵母杂交菌落 PCR 及测序鉴定** 将蓝色对应的阳性克隆再次涂布四缺氨基酸营养培养基平板培养(重复 3~4 次),挑取新鲜菌落作菌落 PCR,如图 6 所示,PCR 产物凝胶电泳显示产生 100~1 500 bp 片段,大片段分子测序结果经 BLAST 比对显示为无关蛋白。其余小分子 PCR 产物测序并经 BLAST 比对明确能与 HNP-3 相互作用的蛋白的种类,然后进行回转试验验证最终的真阳性相互作用克隆。为进一步排除假阳性,将筛选得到的每个 cDNA 融合质粒分别与 pGBKT7-HNP-3 共转化 AH109 进行回转验证,经营养缺陷选择及诱导筛选最终得到 9 种真阳性相互作用克隆。对这 9 种克隆的插入片段测序后在 GenBank 数据库中进行序列比对,发现有 5 个片段没有同源蛋白匹配。另外 4 个片段分别与促肾上腺皮质激素受体(CTHR-R)2、钙粘着蛋白关联蛋白 1(CTNNB1)、低密度脂蛋白受体相关蛋白 5(LRP5)、成对同源域转录因子 2(paired-like homeodomain transcription factor 2,PITX2)的片段同源,见表 1。其中由于 ACTH-R 片段的同源性最高,且克隆数重复最多选取了 ACTH-R 作为最终的研究对象。



M; Maker; 1~10; PCR 产物

**图 6 部分酵母杂交菌落 PCR 鉴定**

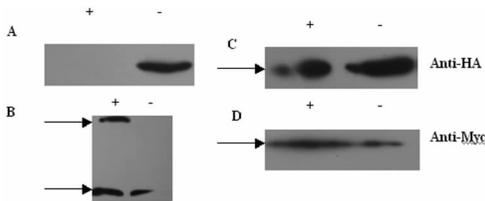
**2.7 GST pull down 及免疫共沉淀验证 ACTH-R 与 HNP-1 相互作用** 经 IPTG 诱导后收集菌液,超声破碎后与谷胱甘肽-琼脂糖共孵育后经 SDS-PAGE 电泳分离,采用考马斯亮蓝

染色可见相应条带。将该融合蛋白用于后续 GST pull down 结果,然后将得到的翻译表达蛋白 Myc-ACTH-R<sub>261-458</sub> 与其共育后,经 SDS-PAGE 电泳分离条带,然后使用蛋白质印迹检测可见相应条带,见图 7 A。

胞内免疫共沉淀实验结果显示,当用转染的全细胞裂解液作 Myc 的蛋白质印迹检测时,可见转染 pHA-HNP-3 的细胞有一个内源性的 Myc 条带,而转染两个载体的细胞有两个条带检出,包括内源性的 Myc 和外源性 Myc-ACTH-R<sub>261-458</sub>,见图 7 B,证明 Myc-ACTH-R<sub>261-458</sub> 已有产物表达;当用抗 Myc 抗体做免疫沉淀,行抗 HA 抗体蛋白质印迹检测,可检测到相应 HA-HNP-3 表达条带,见图 7 C;当用抗 HA 抗体免疫沉淀时,行抗 Myc 抗体蛋白质印迹检测,可检测清晰的目的条带,见图 7 D。

表 1 阳性克隆与 GenBank 同源性比对结果

编号	已知的同源序列编码蛋白	位置	克隆数	同源性(%)
1	ACTH-R2	aa 261-458	4	96
2	CTNNB1	aa 118-290	1	93
3	LRP5	aa 348-468	1	90
4	PITX2	aa 115-180	1	85



ACTH-R<sub>261-458</sub> 的分析,“—”表明仅有 TnT 参与反应。A:对照;B:48 h 后,整体细胞沉淀物被用于检测内源性和外源性的 Myc-融合蛋白;C:HA 抗体的免疫共沉淀检测条带;D:Myc 抗体的免疫共沉淀检测条带。

图 7 HNP-3 与 ACTH-R<sub>261-458</sub> 免疫共沉淀实验结果

### 3 讨论

人源性  $\alpha$  防御素包括了中性粒细胞多肽的 4 个家族成员分子,即 HNP1~4,以及肠道上皮细胞的 2 个家族成员分子。 $\alpha$  防御素被视为机体黏膜炎症屏障抵抗病原微生物入侵早期最主要的分子之一,同时对机体的免疫和炎症反应也具有许多重要和复杂的调控作用<sup>[16-18]</sup>。近年来研究发现  $\alpha$  防御素能够增强某些呼吸道致病菌对上皮细胞的黏附,诱导呼吸道上皮细胞表达趋化细胞因子,促进呼吸道黏膜的损伤修复<sup>[19]</sup>。但是对于其研究多着重于肽分子与细胞相互作用后其效应的观察,而对于分子与分子之间,比如 HNP-3 与细胞何种蛋白分子起反应,以及反应后分子间的级联效应还有许多需要进一步深入研究的地方<sup>[20-22]</sup>。本研究采用的 pGBKT7 为 Gal4 酵母双杂交系统特异的酵母表达质粒,该质粒预置了转录因子的 DNA 结合结构域的序列,通过基因克隆的方法,接入 HNP-3 的阅读框,可得到诱饵重组表达质粒 pGBKT7-HNP-3。HNP-3 的基因位于 8 号染色体,有 3 个外显子,其编码的蛋白分子为防御素前体(prepro-defensin),约 94 个氨基酸残基组成,经过细胞内氨肽酶多次剪切后形成 34 个氨基酸残基的成熟肽,以发挥其生物学功能,所以本实验选择成熟肽编码基因作为插

入诱饵质粒的目的片段<sup>[23-26]</sup>。

因为重组诱饵质粒表达的诱饵蛋白可能会激活报告基因 Trp 以及转入酵母菌后可能影响其生长,所以需要进行自激活以及毒性鉴定。在单缺氨基酸营养培养基平板 SD/Trp<sup>-</sup> 中,转化的 pGBKT7-HNP-3 酵母菌均出现白色菌落,而在二缺氨基酸营养培养基平板 SD/Ade<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/His<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup>、SD/Leu<sup>-</sup>/Trp<sup>-</sup> 中均没有菌落生长,说明重组诱饵质粒 pGBKT7-HNP-3 表达产物没有自激活效应,而单缺 SD/Trp<sup>-</sup> 液体培养基培养,细胞密度可达  $1.3 \times 10^9$  /mL,说明转化酵母菌在单缺氨基酸营养培养基生长良好,同时也表明表达的诱饵蛋白也无酵母菌毒性<sup>[27]</sup>。本研究的目的是为了探索防御素分子与胎肾上腺组织中蛋白相互作用的分子基础,所以采用 SMART 技术构建了胎肾上腺 cDNA 文库,该技术所需 RNA 较少,步骤简单,易于得到较为富集的全长 ds cDNA。本研究结果显示,其库容量达  $1.7 \times 10^6$  转化子/ $3 \mu\text{g}$  pGADT7/Rec<sup>-</sup>,片段长度达 300~3 000 bp,符合文库构建要求。将 pGBKT7-HNP-3、人胎肾上腺细胞 ds cDNA 及文库质粒 pGART7/Rec<sup>-</sup> 顺序转化酵母菌 AH109 进行杂交,若有相互作用蛋白将产生阳性克隆,但表达产物杂交过程中,存在非特异结合容易产生假阳性克隆。为减少假阳性所带来的鉴定目的分子的困难,需要多次对所得到的“阳性克隆”进行筛选鉴定。本实验用  $\beta$ -半乳糖苷酶活性实验以及四缺氨基酸营养缺陷培养基进行了双重筛选,杂交后获得近 900 个克隆,经双重筛选后得到 200 个候选阳性菌落,明显减少了假阳性克隆数<sup>[28]</sup>。筛选出的阳性克隆株能在四缺氨基酸营养培养基上反复传代培养。并经回转验证  $\beta$ -半乳糖苷酶印膜法检测以及免疫共沉淀鉴定相互作用确实存在。可见酵母双杂交系统构建成功,从而为实验室的后续工作打下坚实的基础。

本实验对部分候选阳性克隆进行菌落 PCR 分析,其中较大的片段可能含有人胎肾上腺 cDNA 文库中与 HNP-3 成熟肽相互作用的蛋白分子,对这些候选克隆进一步分析鉴定,筛选出 4 个与 HNP-3 成熟肽相互作用的特异蛋白分子。本实验所得阳性克隆通过 PCR 测序,并将测序结果在 GenBank 中比对以寻找并明确未知的胎肾上腺组织中能与 HNP-3 相互作用的蛋白。在阳性克隆中通过测序比对发现 ACTH-R2 能与 HNP-3 蛋白相互作用,进一步体外免疫共沉淀实验亦证实二者能相互作用。目前,已有报道表明防御素具有封闭 ACTH-R2 的功能,并且在急性感染时能够阻断具有免疫抑制作用的肾上腺类固醇激素的产生<sup>[29]</sup>。所以研究 HNP-3 与 ACTH-R2 的作用很可能是 HNP 在细胞内外转运信号通路中的关键所在。通过对 HNP-3 与 ACTH-R2 相互作用的进一步研究不仅有利于阐明防御素发挥免疫调节作用的信号转导通路,还可能揭示与防御素相关疾病的发病机制,进而寻找治疗这些疾病的有效方法。

### 参考文献:

- [1] Gans T, Weiss J. Antimicrobial peptides of phagocytes and epithelia[J]. Semin Hematol, 1997, 34(11):343-344.
- [2] Augustin DK, Heimer SR, Tam C, et al. Role of defensins in corneal epithelial barrier function against pseudomonas aeruginosa traversal [J]. Infect Immun, 2010, 29 (13): 33-37.

- [3] Hazlett L, Wu M. Defensins in innate immunity[J]. *Cell Tissue Res*, 2010, 21(15): 53-58.
- [4] Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, et al. Beta defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6[J]. *Science*, 1999, 286(5439): 525-528.
- [5] Biragyn A, Surenhu M, Yang D, et al. Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens [J]. *J Immunol*, 2005, 167(11): 6644-6653.
- [6] Morel E, Alvarez L, Cabañas R, et al. Expression of  $\alpha$ -defensin 1-3 in T cells from severe cutaneous drug-induced hypersensitivity reactions[J]. *Allergy*, 2010, 29(8): 1398-9995.
- [7] Ma JM, Yang HX. Role of Toll-like receptor 4 and human defensin 5 in primary endocervical epithelial cell[J]. *Chin Med J*, 2010, 123(13): 1762-1767.
- [8] Ouellette AJ. Paneth cells and innate mucosal immunity [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2010, 26(6): 547-553.
- [9] Maekewicz CE, Yuan J, Tran P, et al. Alpha defensins can have anti-HIV activity but are not CD8 cell anti-HIV factors[J]. *AIDS*, 2003, 17(14): F23-32.
- [10] Ye X, Lu H, Huo K, et al. Finding a novel interacting protein of the hepatic carcinoma related gene MIP;NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) [J]. *Oncol Rep*, 2011, 25(1): 231-235.
- [11] Kodama Y, Suetsugu N, Kong SG, et al. Two interacting coiled-coil proteins, WEB1 and PMI2, maintain the chloroplast photorelocation movement velocity in Arabidopsis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(45): 19591-19596.
- [12] Mochizuki S, Tanaka R, Shimoda M, et al. Connective tissue growth factor is a substrate of ADAM28[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 402(4): 651-657.
- [13] Dsher KA, Lehrer RI, Ganz T, et al. Isolation and characterization of human defensin cDNA clones[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 85(19): 7327-7331.
- [14] Parent A, Roy SJ, Iorio-Morin C, et al. ANKRD13C acts as a molecular chaperone for G protein-coupled receptors [J]. *J Biol Chem*, 2010, 11(2): 12-14.
- [15] Tripathi LP, Kataoka C, Taguwa S, et al. Network based analysis of hepatitis C virus Core and NS4B protein interactions[J]. *Mol Biosyst*, 2010, 6(12): 2539-2553.
- [16] Chen Q, Hakimi M, Wu S, et al. Increased genomic copy number of DEFA1/DEFA3 is associated with susceptibility to severe sepsis in Chinese Han population[J]. *Anesthesiology*, 2010, 112(6): 1428-1434.
- [17] Anderson RL, Hiemstra PS, Ward C, et al. Antimicrobial peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome[J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(3): 670-677.
- [18] Konishi K, Gibson KF, Lindell KO, et al. Gene expression profiles of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 180(2): 167-175.
- [19] Khakshoor O, Lin AJ, Korman TP, et al. X-ray crystallographic structure of an artificial beta-sheet dimer[J]. *J Am Chem Soc*, 2010, 132(33): 11622-11628.
- [20] Lehrer RI, Jung G, Ruchala P, et al. Human alpha-defensins inhibit hemolysis mediated by cholesterol-dependent cytolysins[J]. *Infect Immun*, 2009, 77(9): 4028-4040.
- [21] Cole AM, Ganz T. Human antimicrobial peptides analysis and application E [J]. *Biotechniques*, 2005, 29(4): 822-831.
- [22] Tsutsumi-Ishii Y, Hasebe T, Nagaoka I. Role of CCAAT/enhancer-binding protein site in transcription of human neutrophil peptide-1 and -3 defensin genes[J]. *J Immunol*, 2000, 164(6): 3264-3273.
- [23] Puklo M, Guentsch A, Hiemstra PS, et al. Analysis of neutrophil-derived antimicrobial peptides in gingival crevicular fluid suggests importance of cathelicidin LL-37 in the innate immune response against periodontogenic bacteria[J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2008, 23(4): 328-335.
- [24] Anderson RL, Hiemstra PS, Ward C, et al. Antimicrobial peptides in lung transplant recipients with bronchiolitis obliterans syndrome[J]. *Eur Respir J*, 2008, 32(3): 670-677.
- [25] Das S, Vince GS, Lewis-Jones I, et al. The expression of human alpha and beta defensin in the endometrium and their effect on implantation[J]. *J Assist Reprod Genet*, 2007, 24(11): 533-539.
- [26] Ballana E, González JR, Bosch N, et al. Inter-population variability of DEFA3 gene absence; correlation with haplotype structure and population variability[J]. *BMC Genomics*, 2007, 10(8): 14-16.
- [27] Bartkowiak B, Liu P, Phatnani HP, et al. CDK12 is a transcription elongation-associated CTD kinase, the metazoan ortholog of yeast Ctk1 [J]. *Genes Dev*, 2010, 24(20): 2303-2316.
- [28] Hazrati E, Galen B, Lu W, et al. Human alpha- and beta-defensins block multiple steps in herpes simplex virus infection[J]. *J Immunol*, 2006, 177(12): 8658-8666.
- [29] Folkvord JM, McCarter MD, Ryder J, et al. alpha-Defensins 1, 2, and 3 are expressed by granulocytes in lymphoid tissues of HIV-1-seropositive and -seronegative individuals[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006, 42(5): 529-536.