

· 论 著 ·

SIGIRR 胞内区酵母双杂交诱饵质粒的构建及自激活作用检测*

陈旭昕¹,冯华松¹,段蕴铀¹,吴学玲²,钱桂生²

(1. 中国人民解放军海军总医院呼吸内科,北京 100037;2. 第三军医大学新桥医院呼吸内科,重庆 400037)

摘要:目的 构建单免疫球蛋白白介素-1受体相关蛋白(SIGIRR)胞内区酵母双杂交诱饵质粒,并检测其是否存在自激活作用。**方法** 聚合酶链反应(PCR)扩增人 SIGIRR 胞内区基因片段(480~1 230 bp),并将此基因片段重组入 pSos 载体中,构建诱饵质粒 pSos-SIGIRR,经酶切及测序鉴定构建正确后,将重组质粒与对照质粒共转化感受态酵母菌 cdc25H,接种于 25 ℃ SD/Glucose(-UL)和 SD/Galactose(-UL)平板以及 37 ℃ SD/Glucose(-UL)和 SD/Galactose(-UL)平板上,连续观察 6 d 酵母菌生长状况;用 Western blot 法检测目的蛋白表达情况。**结果** 正确构建了人 SIGIRR 胞内区酵母双杂交诱饵质粒 pSos-SIGIRR, pSos-SIGIRR 在酵母双杂交系统中无自激活及毒性作用。Western blot 结果显示,目的蛋白以 170×10³ 的融合蛋白形式表达。**结论** 诱饵质粒 pSos-SIGIRR 可应用于酵母双杂交系统中,为在人肺互补脱氧核糖核酸(cDNA)文库中寻找与 SIGIRR 相互作用蛋白奠定了重要基础。

关键词:免疫球蛋白白介素 1 受体相关蛋白;双杂交系统技术;诱饵质粒;自激活

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.10.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)10-1164-04

Construction of bait plasmid containing SIGIRR cytoplasmic tail and detection of self-activation in yeast two hybrid system*Chen Xuxin¹,Feng Huasong¹,Duan Yunyou¹,Wu Xuelling²,Qian Guisheng²

(1. Department of Respiratory, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100037, China;

2. Department of Respiration, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To construct the bait plasmid of pSos-single immunoglobulin IL-1 receptor related protein(SIGIRR) in CytoTrap yeast two hybrid system, and to test its self-activation. **Methods** The cDNA fragments of SIGIRR(480-1 230 bp) were amplified from pReceiver-LV19-SIGIRR and ligated into the bait plasmid pSos to generate the plasmid pSos-SIGIRR. The pSos-SIGIRR was identified by DNA sequencing and dual-site endonuclease digestion. Then the recombinant plasmid and control plasmid were introduced into the yeast cell cdc25H. The transformants were inoculated on plates of 25 ℃/SD/Glucose(-UL), 25 ℃/SD/Galactose(-UL), 37 ℃/SD/Glucose(-UL) and 37 ℃/SD/Galactose, respectively and the proliferation ability of transformant was observed for 6 d. The Western blot was adopted to detect the expression of target protein. **Results** The pSos-SIGIRR vector was correctly constructed and proved of no self-activation and toxic action. The Western blot showed that the target protein was expressed in a form of fusion protein of 170KD. **Conclusion** The bait plasmid containing SIGIRR cytoplasmic tail can be applied to the yeast two-hybrid system and lays the important foundation for seeking the interacting protein with SIGIRR from the human lung cDNA library in.

Key words: single immunoglobulin interleukin-1 receptor related protein; two-hybrid system techniques; bait plasmid; self-activation

单免疫球蛋白白介素-1受体相关蛋白(single immunoglobulin interleukin-1 receptor related protein, SIGIRR)于 1999 年由 Thomassen 等^[1]首次发现并命名,属于 Toll 样受体/白介素-1受体[Toll like receptor/interleukin-1 receptor, TLR/IL-1R(TIR)]超家族,又被称为 TIR8,是 TLR/IL-1R 信号通路的负调控分子^[2]。有研究表明,过表达 SIGIRR 可抑制核转录因子的转录活性,减轻内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导的炎症反应,提高急性肺损伤小鼠模型的生存率^[3-5],但目前 SIGIRR 的负调控机制尚不明了。有研究发现, SIGIRR 胞内段 TIR 域是其发挥负性调控作用的关键结构^[6]。酵母双杂交技术是常用的研究蛋白质间相互作用的遗传学方法。该技术不仅可用于检测一对功能已知的蛋白质间的相互作用,还可以通过以已知功能的蛋白质基因筛选双杂交互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid, cDNA)文库,用于发现与已知蛋白分子有相互作用的新分子,并推测新

分子可能的功能^[7]。本研究克隆人 SIGIRR(161~410 aa, 480~1230 bp)基因插入酵母双杂交系统 pSos 载体中,构建诱饵质粒 pSos-SIGIRR,转化 cdc25H 酵母感受态细胞后,并对其自身激活特性及融合蛋白表达情况进行检测,为下一步筛选与 SIGIRR 存在相互作用的蛋白质奠定基础。

1 材料与方

1.1 材料 CytoTrap XRpremade libraries kit(包括质粒 pSos、pMyr、pSos-MAFB、pMyr-laminC、pMyr-MAFB 以及 cdc25H 酵母菌株等)购自美国 Stratagene 公司。pReceiver-LV19-SIGIRR 购自广州复能基因公司。BamH I, Kpn I, Xho I, Not I 限制酶、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶等工具酶、DNA Marker 购自大连 TaKaRa 公司。AxyPrep 质粒大提试剂盒及胶回收试剂盒购自杭州爱思进公司。兔抗人 Sos 多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 为江苏碧云天公司进口分装产品。LiSORB、鲑精

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30600272)。 作者简介:陈旭昕(1981-),主治医师,医学博士,主要从事急性肺损伤的发生机制与防治研究。

DNA、聚乙二醇(PEG)、醋酸锂(LiOAc)、酸洗玻璃珠购自美国 Sigma 公司。其他生化试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 诱饵质粒 pSos-SIGIRR 的构建及鉴定 以质粒 pReceiver-LV19-SIGIRR 为模板,用聚合酶链反应(PCR)的方法扩增出 SIGIRR 胞内区(161~410 aa,480~1230 bp)基因片段。引物序列上游引物:5'-ACG GGA TCC GCG ACG GGA AGC TCT ACG ACG CC-3';下游引物:5'-GCA GAC GCG GCC GCC TAC ATA TCA TCC TTG GAC ACC-3',分别在两端引入酶切位点 Not I 和 BamH I。反应条件:94 °C 预变性 5 min、94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 40 s、72 °C 延伸 2 min 共 30 个循环;72 °C 后延伸 10 min。PCR 产物 5 μL 与 6×上样缓冲液 1 μL 混匀上样,进行 1%琼脂糖凝胶电泳,胶回收后,用 Not I、BamH I 双酶切,定向克隆到同样双酶切的 pSos 载体,转化 DH5α 感受态菌株,涂布转化菌于含氨苄西林的平板上,37 °C 培养过夜,挑选单克隆扩大培养,提取质粒进行酶切鉴定,酶切鉴定正确者进一步送 DNA 测序,将含有正确插入目的基因片段诱饵质粒命名为 pSos-SIGIRR。

1.2.2 cdc25H 酵母感受态细胞的制备 从-80 °C 取出甘油冻存的 cdc25H 酵母细胞菌株,无菌接种环刮取少许划线于含腺嘌呤的 YPD 培养基(YPD medium supplemented with adenine,YPAD)平板,于 25 °C 培养 4 d。挑 4~5 个单菌落放入 1 mL YPAD 培养基中,高速振荡打散细胞后,培养于 50 mL YPAD 液体培养基中,25 °C,恒温摇床,240 r/min,过夜,直至 OD600>1,YPAD 液体培养基稀释过夜培养物,调整 OD600=0.2,25 °C,恒温摇床,240 r/min,4 h,直至 OD600=0.8 将菌液于 3 000 r/min 室温离心 5 min,弃上清液;50 mL LiSORB 重悬细胞沉淀,室温孵育 30 min 后室温 3 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 300 μL 的 LiSORB 重悬后再加入 600 μL 鲑精 DNA 混合物,充分混匀;加入 5.4 mL 的 PEG/LiOAc 溶液和 530 μL 的二甲基亚砜(DMSO)到细胞悬液中混匀,按照每份 500 μL,分装到无菌的微量离心管中,备用。此感受态用现制备。

1.2.3 cdc25H 酵母菌表型及温度回复突变的鉴定 (1)cdc25H 酵母细胞表型鉴定:取-80 °C 冻存的 cdc25H 突变型酵母细胞,分别划线于 YPDA 平板及 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-His、SD/-Ura 平板,25 °C 下培养至第 6 d,每天观察酵母细胞生长状况。直至第 6 天,若在 YPDA 平板上生长而在其余 SD 平板中不生长,则说明该酵母细胞的表型正确。(2)cdc25H 酵母细胞回复突变鉴定:将 pSos 和 pMyr 各 2 μg 加入到 500 μL 的酵母感受态细胞中混匀,取出 100 μL 加入 2 μL 1.4 mol/L β 巯基乙醇,混匀室温孵育 30 min,再进行热休克处理(42 °C 孵育 20 min),随后冰浴 3 min;室温 14 000 r/min 离心 30 s,弃上清液;加入 0.5 mL 1 mol/L 的山梨糖醇重悬,转化混合物均匀涂布于 150 mm SD/Glucose(-UL)平板上,37 °C,培养 6 d,观察克隆形成状况。

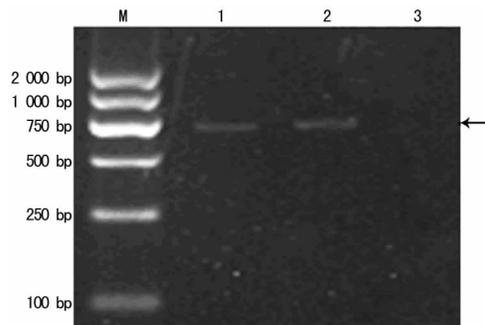
1.2.4 诱饵质粒 pSos-SIGIRR 自激活活性检测 设置阳性对照组(pSos-MAFB+pMyr-MAFB)、阴性对照组(pSos-MAFB+pMyr-Lamin C)、自激活检测组(pSos-SIGIRR+pMyr)及定位检测组(pSos-SIGIRR+pMyr-SB),每组均 n=5;按照上述相同操作方法,将上述各组别共转化入酵母感受态中,然后分别接种于 25 °C SD/Glucose(-UL)和 SD/Galactose(-UL)平板以及 37 °C SD/Glucose(-UL)和 SD/Galactose(-UL)平板上,连续观察 6 d 酵母菌生长状况,实验重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测表达产物 分别设置 pSos-SIGIRR

重组载体组及 pSos 空载体组,同上操作,分别将诱饵质粒 pSos-SIGIRR 及空载体 pSos 的 cdc25H 转化菌接种于 5 mL SD/Glucose(-UL)培养基中,彻底涡旋,25 °C,250 r/min,培养过夜,转接至 50 mL YPDA 中,再培养 4 h 左右,直到 OD600=0.5,离心收集菌体,沉淀在裂解缓冲液和玻璃珠共同作用下,抽提酵母菌蛋白,取少量按常规进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western blot 检测,依次结合一抗及二抗后,ECL 发光液中显色,放入 GBox-HR 凝胶成像分析系统中摄像分析。一抗为兔抗人 Sos 多克隆抗体(1:500),二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(1:1 000)。

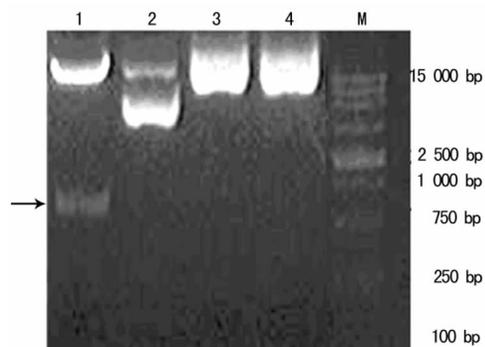
2 结果

2.1 诱饵质粒 pSos-SIGIRR 的构建及鉴定结果 以 pReceiver-LV19-SIGIRR 质粒为模板,经 PCR 扩增、凝胶电泳分析,可以得到约 750 bp 大小的扩增产物,与 SIGIRR 胞内区(480~1 230 bp)基因片段相符,见图 1。pSos-SIGIRR 经 Not I 和 BamH I 双酶切后电泳鉴定,预期能切出约 750 bp 和 12 000 bp 两条片段,可见 1 号克隆酶切结果与预期相符,见图 2。将 1 号克隆进一步测序,结果也证实插入片段与 SIGIRR 胞内区(480~1 230 bp)基因序列一致。说明此重组质粒 pSos-SIGIRR 构建成功。



M:DNA 标记物;1,2:以 pReceiver-LV19-SIGIRR 为模板;3:阴性对照。

图 1 SIGIRR 胞内区基因片段的 PCR 扩增



1:重组质粒 pSos-SIGIRR;2:平行对照;3,4:空载体 pSos;M:DNA 标记物。

图 2 重组质粒 pSos-SIGIRR 的酶切鉴定

2.2 cdc25H 酵母菌表型及回复突变鉴定结果 表型鉴定结果显示,25 °C 培养 6 d 后,cdc25H 酵母菌只在 YPDA 平板形成菌落,而其余 SD 平板均无克隆出现,与预期相符,说明此 cdc25H 酵母菌表型正确;接种于 37 °C YPDA 平板上的 cdc25H 突变型酵母菌,培养 6 d,只有 6 个克隆形成,远小于 30 个克隆,见图 3;而共转化为 pSos 和 pMyr 的酵母感受态细胞,于 37 °C SD/Glucose(-UL)平板上,培养 6 d,无克隆形成,说明

该酵母菌和酵母感受态细菌均未发生温度敏感性回复突变。

2.3 诱饵质粒转化 *cdc25H* 感受态及自激活检测 结果显示在 25 °C 条件下,所有平板上均有克隆形成;37 °C 条件下,SD/Glucose(-UL)平板上均无克隆形成,阳性对照组及 pSos-SIGIRR+pMyr-SB 共转化子在 37 °C,SD/Galactose(-UL)平板上能形成菌落,而阴性对照组及 pSos-SIGIRR+pMyr 共转化子却不能在 37 °C,SD/Galactose(-UL)平板上生长,此结果与预期结果相符。表明诱饵质粒无自激活宿主菌 *cdc25H* 作用,且所表达融合的蛋白定位正确,以下为代表性图片,见图 4。

2.4 Sos-SIGIRR 融合蛋白的表达 将酵母细胞蛋白提取液,以抗人 Sos 的多克隆抗体行 Western blot 分析,结果显示,空载体 pSos 组在 150×10^3 左右位置,可检测到 Sos 蛋白的表达,而 pSos-SIGIRR 重组质粒组在 170×10^3 左右位置,可检测到 Sos-SIGIRR 融合蛋白的表达,与该融合蛋白相对分子质量的

理论预算值相符,说明重组子 pSos-SIGIRR 在 *cdc25H* 酵母细胞中,目的基因 SIGIRR 以融合蛋白形式被成功表达,见图 5。

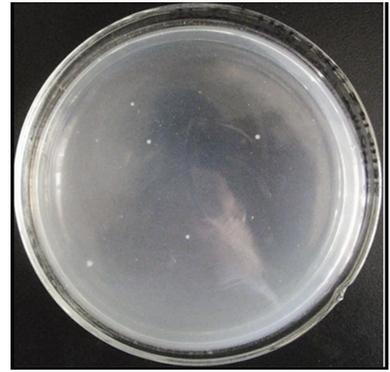


图 3 *cdc25H* 突变型酵母菌回复突变检测

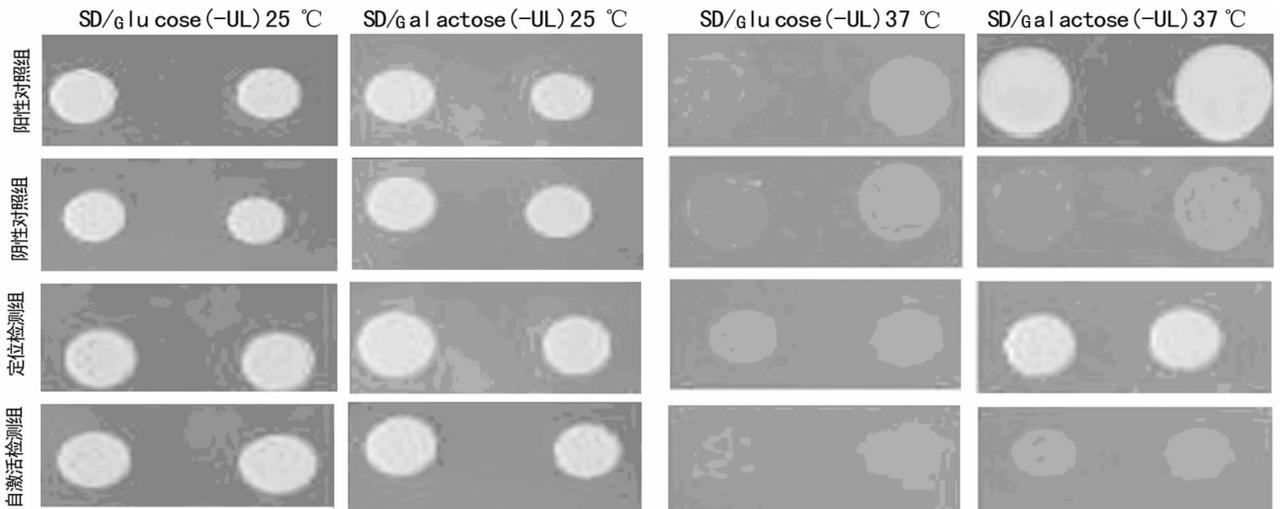
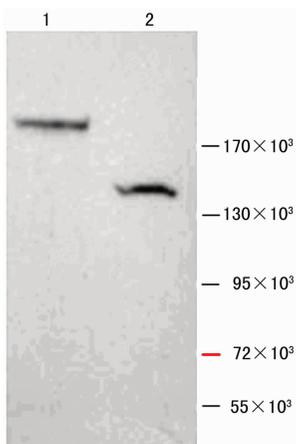


图 4 诱饵质粒 pSos-SIGIRR 自激活作用的检测结果



1:重组质粒 pSos-SIGIRR 组;2:空载体 pSos 组。

图 5 Western blot 检测酵母细胞中融合蛋白的表达

3 讨 论

酵母双杂交系统由 Fields 等^[8]于 1989 年首次建立。其基本原理是基于对真核生物转录调控起始过程的认识。一般而言,真核细胞生物的特异转录激活因子是由两个或多个相互独立的结构域构成的,其中 DNA 结合域(DNA-binding domain, BD)和转录激活域(transcriptional activation domain, AD)是转录因子发挥功能所必需的。单独的 BD 虽能与启动子结合,但不能激活转录;单独的 AD 由于不能接近启动子,因此亦不能

激活转录。基于这一原理,可将两个待测蛋白分别与这两个结构域构建成融合蛋白,并共同表达于同一个酵母菌中。与 BD 融合的蛋白称之为“诱饵蛋白”,而与 AD 融合的蛋白称之为“靶蛋白”。若两个待测蛋白存在相互作用,就会通过待测蛋白的桥联作用使 AD 与 BD 重新形成具有活性的转录激活因子,从而激活相应基因的转录与表达。被激活转录的基因通常称为报告基因,反之,通过对报告基因表型的测定,可以反过来判断“诱饵蛋白”与“靶蛋白”之间是否存在相互作用^[9]。传统的酵母双杂交系统,并非对所有蛋白适用,某些发生在核外的蛋白间相互作用则可能检测不到。即便目前表达质粒中核定位信号序列的应用,仍然不完全排除某些必须经过内质网等细胞器进行修饰的蛋白不能进入细胞核内的可能性^[10-11]。

本研究采用的 CytoTrap yeast two-hybrid 体系属于改进的酵母双杂交系统-核外双杂交技术,可以弥补传统系统的不足^[12-13]。其基本原理是:将诱饵蛋白与 Sos 蛋白融合,靶蛋白与酵母细胞膜上 Myr 蛋白融合,二者共转化 *cdc25H* 温度敏感突变型酵母细胞(此突变体因 *cdc25* 基因的突变,37 °C 时无法激活 Ras 途径,丧失了 37 °C 条件下生长的能力)。但当诱饵蛋白与靶蛋白发生相互作用,则把 Sos 蛋白带到细胞膜上并激活 Ras 蛋白,恢复 37 °C 时细胞的生长能力^[14-15]。SIGIRR 是 TLR/IL-1R 信号通路中重要的负性调控分子^[16-17],能够通过“俘获”TIR 信号通路中的关键组分而阻断信号的转导^[18],SIGIRR 胞内区的 TIR 域是其发挥负性调控作用的关键功能结

构域^[2,6]。研究 SIGIRR 的相互作用蛋白,对阐明 SIGIRR 负调控分子机制具有重要意义。本研究将包含 TIR 结构域的 SIGIRR 胞内区(480~1 230 bp)编码序列克隆至 CytoTrap 系统中的诱饵载体 pSos 中。经酶切、序列分析鉴定,证实正确构建了诱饵质粒 pSos-SIGIRR。将其与空载体 pMyr 共转化感受态酵母菌后,结果证明当 pMyr 质粒不表达诱饵相互作用蛋白时,cdc25H 温度敏感突变型酵母细胞不能获得在 37 ℃ 下 SD/Galactose(-UL)平板上生长的能力,Ras 途径未被激活,证明所构建的诱饵质粒不具有自激活作用;而定位检测组(pSos-SIGIRR + pMyr-SB)共转化入感受态酵母菌后,可在 37 ℃,SD/Galactose(-UL)平板上能形成菌落,提示当融合诱饵蛋白中的 Sos 与定位于细胞膜上的 SB(SoS binding protein)蛋白结合后激活了 Ras 途径,使温度突变型酵母菌 cdc25H 恢复了 37 ℃ 条件下生长的能力,提示融合诱饵蛋白 Sos-SIGIRR 表达后位于酵母菌细胞质中;且从酵母生长状态看,此诱饵质粒对酵母菌无毒性作用;Western blot 检测转化酵母菌蛋白表达情况,证明 Sos-SIGIRR 融合蛋白可稳定表达。诱饵质粒 pSos-SIGIRR 的成功构建及其自激活作用检测,为进一步利用 pSos-SIGIRR 从人肺 cDNA 文库中需找出新的与 SIGIRR 相互作用蛋白、研究 SIGIRR 的调控机制及避免实验中出现假阳性结果奠定了实验基础。

参考文献:

- [1] Thomassen E, Renshaw BR, Sims JE. Identification and characterization of SIGIRR, a molecule representing a novel subtype of the il-1r superfamily[J]. *Cytokine*, 1999, 11(6):389-399.
- [2] Wald D, Qin J, Zhao Z, et al. SIGIRR, a negative regulator of toll-like receptor-interleukin 1 receptor signaling[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(9):920-927.
- [3] Zhang C, Wu X, Zhao Y, et al. SIGIRR inhibits toll-like receptor 4, 5, 9-mediated immune responses in human airway epithelial cells[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(1): 601-609.
- [4] 陈旭昕, 吴学玲, 陈华萍, 等. SIGIRR 过表达对 LPS 诱导的 H292 细胞 NF- κ B 活性的影响[J]. *重庆医学*, 2011, 40(8):732-734.
- [5] Chen X, Zhao Y, Wu X, et al. Enhanced expression of single immunoglobulin IL-1 receptor-related molecule ameliorates Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. *Shock*, 2011, 35(2):198-204.
- [6] Qin J, Qian Y, Yao J, et al. SIGIRR inhibits interleukin-1 receptor and toll-like receptor 4-mediated signaling

through different mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(26):25233-25241.

- [7] 药立波, 常智杰. 医学分子生物学实验技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003:278-293.
- [8] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions [J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.
- [9] 张树民, 陈英碕. 酵母双杂交体系的新发展[J]. *国外医学遗传学分册*, 1999, 22(5):225-227.
- [10] 张迪, 霍兢, 顾科隆, 等. 酵母双杂交技术进展[J]. *高技术通讯*, 2000, 10(3):98-101.
- [11] 徐静, 万家余, 高宏伟, 等. 阮蛋白(prp23-231)酵母双杂交诱饵载体的构建及其自激活作用的检测[J]. *江西农业学报*, 2008, 20(4):83-85.
- [12] Immink RG, Angenent GC. Transcription factors do it together; the hows and whys of studying protein-protein interactions[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(12):531-534.
- [13] Moerdyk-Schauwecker M, DeStephanis D, Hastie E, et al. Detecting protein-protein interactions in vesicular stomatitis virus using a cytoplasmic yeast two hybrid system [J]. *J Virol Methods*, 2011, 173(2):203-212.
- [14] Wu T, Yuan F, Chang H, et al. Identification of a novel angiogenesis inhibitor 1 and its association with hyaluronidase of streptococcus suis serotype 2[J]. *Microb Pathog*, 2010, 49(1/2):32-37.
- [15] 吴涛, 常海涛, 谭臣, 等. 利用酵母双杂交系统筛选与猪 2 型链球菌透明质酸酶(HYL)相互作用的蛋白质[J]. *中国兽医学报*, 2009, 29(9):1149-1154.
- [16] Garlanda C, Di Liberto D, Vecchi A, et al. Damping excessive inflammation and tissue damage in Mycobacterium tuberculosis infection by Toll IL-1 receptor 8/single Ig IL-1-related receptor, a negative regulator of IL-1/TLR signaling[J]. *J Immunol*, 2007, 179(5):3119-3125.
- [17] Xiao H, Gulen MF, Qin J, et al. The Toll-interleukin-1 receptor member SIGIRR regulates colonic epithelial homeostasis, inflammation, and tumorigenesis [J]. *Immunity*, 2007, 26(4):461-475.
- [18] Garlanda C, Riva F, Veliz T, et al. Increased susceptibility to colitis-associated cancer of mice lacking TIR8, an inhibitory member of the interleukin-1 receptor family[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(13):6017-6021.

(收稿日期:2013-09-08 修回日期:2013-12-15)

(上接第 1163 页)

- 2011, 49(7):557-561.
- [11] 石庆秋, 张学荣, 宋慧, 等. 广西眼镜蛇蛇毒神经生长因子基因在 NIH3T3 细胞中的表达[J]. *广西医科大学学报*, 2010, 27(6):846-849.
- [12] Seidman MD, Ahmad N, Bai U. Molecular mechanisms of age-related hearing loss[J]. *Ageing Res Rev*, 2002, 1(3): 331-343.
- [13] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗螺旋神经元的增龄性变化[J]. *山东大学耳鼻喉眼学*

报, 2008, 22(3):215-217, 221.

- [14] 刘强和, 罗香林, 耿宛平, 等. 快速老化小鼠的听功能和耳蜗毛细胞的增龄性变化[J]. *华夏医学*, 2008, 21(2):213-215.
- [15] Varghese HJ, Davidson MT, MacDonald IC, et al. Activated ras regulates the proliferation apoptosis balance and early survival of developing micromeres[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(3):887-891.

(收稿日期:2013-10-10 修回日期:2013-12-19)