

## mPem 蛋白相作用分子的筛选与鉴定

# Screening and Detecting of Proteins Interacting with mPem

罗志文, 郭 芬, 李月琴, 李实骞, 张 欣, 李弘剑, 周天鸿\*

LUO Zhi-Wen, GUO Fen, LI Yue-Qin, LI Shi-Qian, ZHANG Xin, LI Hong-Jian and ZHOU Tian-Hong\*

暨南大学生命科学技术学院, 广州 510632

*College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632, China*

**摘 要** mPem 是同源异型框基因, 其 C 末端编码同源异型域。为进一步研究 mPem 蛋白在胚胎发育和生殖组织发育过程中的作用, 利用 GAL4 酵母双杂交系统筛选小鼠 7d 胚胎 cDNA 文库, 共获得 3 个与 mPem 蛋白相作用的分子。其中之一为 Mdfic, 一种新的转录调控因子。进一步的酵母双杂交和体外 GST-Pull down 试验再次确认两者之间的相互作用。Mdfic 与 mPem 蛋白之间的相互作用暗示两者有可能组成转录调控复合体, 共同参与胚胎分化的调控, 为两种蛋白功能的研究提供新的思路。

**关键词** mPem, GAL4 酵母双杂交系统, Mdfic

**中图分类号** Q71 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)01-0125-06

**Abstract** mPem, a homeobox gene, is expressed in a time and stage specific manner during murine ontogeny. Pem transcripts are abundant in 7- and 8-day mouse embryos, but decrease precipitously thereafter. On Day 9 they become abundant in placenta and yolk sac, persisting there until parturition. Although Pem transcripts are not detectable in most of adult tissues, they are present in reproductive system such as testis, epididymis and ovary. This indicates a important role for Pem during embryogenesis and reproductive development.

To study the function of mPem protein, we used a GAL4 based yeast two-hybrid assay to screen a 7-day mouse embryo library with full-length of mPem. 3 proteins were found interacting with mPem protein. One of theses is Mdfic. We confirmed the interaction between mPem and Mdfic in yeast and in vitro.

Mdfic, MyoD family inhibitor domain containing, encodes the myoD family inhibitor domain (I-mfa domain). The interaction between mPem and Mdfic suggested they maybe form the transcriptional regulator complex to regulate embryo differentiation.

**Key words** mPem, yeast two-hybrid, Mdfic

Received: September 12, 2005; Accepted: November 3, 2005.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No.39770411).

\* Corresponding author. Tel: 86-20-85226386; E-mail: tzth@jnu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目(No.39770411)。

*Pem* 基因是美国 Wilkinson 等 1990 年在小鼠 T 淋巴瘤 cDNA 文库中发现的, 因该基因在胎盘 (Placenta) 和胚胎 (Embryo) 中呈时间特异性 (Stage specific) 表达, 故命名为 *Pem*<sup>[1]</sup>。*mPem* 的 cDNA 长 839bp, 编码 210 个氨基酸残基, 其中 116~175 个氨基酸残基与果蝇同源异型框基因家族中的 *prd* 类 (pairedclass) 的同源异型域 (Homeodomain) 极为相似<sup>[2]</sup>。*Pem* 基因虽属 *HOX* 基因, 但是个孤散子 (orphan), 与其他 *HOX* 基因不同, 其定位于 X 染色体近侧端的 *Hprt* 区内<sup>[3,4]</sup>。

*Pem* 基因的表达具有明显的时间和组织特异性: 鼠胚发育的第 6 天, *Pem* 开始在胚胎中表达, 第 7~8 天, 表达量达到最高, 随后迅速减少; 而在胎盘和卵黄囊中, 第 7~8 天时几乎检测不到 *Pem* 的转录, 到了第 9 天大量表达并持续到分娩为止<sup>[1,2]</sup>。*Pem* 基因在大部分成年组织中不表达, 但能够特异性地在生殖器官如睾丸、附睾等中表达, 尤其优先在产生精液的上皮细胞中表达。研究表明, *Pem* 特异性地在附睾近侧尾部和远侧的中部表达, 此处是精子获得运动性和受精能力的地方<sup>[5]</sup>, 暗示 *Pem* 蛋白可能在胚胎发育、生殖组织的发育、精子的生成和成熟中发挥重要作用。为了进一步研究小鼠 *Pem* 蛋白的功能, 本实验以 *mPem* 为诱饵蛋白, 利用 GAL4 酵母双杂交系统筛选小鼠 7d 胚胎 cDNA 文库, 以期获得与 *mPem* 蛋白相作用的分子, 为 *mPem* 蛋白功能的研究提供线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

Matchmaker GAL4 酵母双杂交系统 3 包括酵母菌株 AH109, 载体 pGBKT7、pGADT7 以及阴阳性对照质粒 pGBKT7-Lam、pGBKT7-53、pGADT7-T 购自 Clontech 公司。含有 *mPem* 通读框的 pEGFP-*mPem* 质粒由美国 Wilkinson MF 教授惠赠。*E. coli* DH5 $\alpha$  菌株由实验室保存。小鼠 7d 胚胎 cDNA 文库购自 Clontech 公司。培养基以及各种氨基酸购自 Amersco 公司。分子生物学试剂 (包括酶、Marker、X-gal 等) 分别购自 TaKaRa 生物科技有限公司和 Sigma 公司。<sup>35</sup>S-Met 和 Glutathione-Sepharose 4B 颗粒购自 Amersham 公司。TNT T7 体外转录翻译系统试剂盒购自 Promega 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 诱饵质粒 pGBKT7-*mPem* 的构建及其自激活活性的检测:** 以 pEGFP-*mPem* 为模板, 上游引物为 5'

T TCC GTT CAT ATG GAA GCT GAG GGT TCC AGC 3', 下游引物为 3'CGC TGT GGC TCT AAA ATT CAG CTG GGA CAC 5', 采用 PCR 方法扩增 *mPem* 基因的 CDS 序列, 并分别在 5'端加入 *Nde* I 酶切位点 (下划线区域), 在 3'端加入 *Sal* I 酶切位点 (下划线区域)。PCR 扩增产物胶回收后经 *Nde* I 和 *Sal* I 双酶切, 并克隆至 pGBKT7 载体中, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。pGBKT7-*mPem* 转化子经 PCR 鉴定、双酶切鉴定后递交上海博亚生物工程有限公司进行序列测定。融合区域的通读框经序列分析正确后, 采用 PEG-LiAC 方法将该诱饵质粒 pGBKT7-*mPem* 转染酵母菌株 AH109, 并检测其自激活活性。

**1.2.2 酵母双杂交筛选:** 采用 PEG-LiAC 方法将诱饵质粒 pGBKT7-*mPem* 和构建在 pACT2 载体上的小鼠 7d 胚胎 cDNA 文库质粒共转染酵母菌株 AH109。新鲜制备的 AH109 感受态细胞 (8mL) 与 pGBKT7-*mPem* 诱饵质粒 (1.0mg)、构建在 pGADT7 载体上的小鼠 7d 胚胎 cDNA 文库质粒 (0.5mg)、鲑鱼精 DNA (20mg) 混合后加入 1  $\times$  PEG3350/LiAC 溶液 (60mL), 彻底混匀后 30 $^{\circ}$ C 孵育 30min。之后, 加入 7mL DMSO, 混匀后 42 $^{\circ}$ C 孵育 15min。离心后的菌体重新悬浮在 10mL TE (pH7.0), 并涂布在 SD/-Trp-Leu 平板上 30 $^{\circ}$ C 倒置培养 48h。阳性克隆先后影印到 SD/-Trp-Leu-His 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上。

**1.2.3  $\beta$ -半乳糖苷酶活性检测:** 将酵母克隆点于 Whatman # 5 滤纸上, 液氮中反复冻融 3 次, 每次 10s, 恢复至室温后将滤纸放于浸有 2mL Z buffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  16.1mg/mL,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  5.50mg/mL, KCl 0.75mg/mL,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.25mg/mL), 5.4 $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇和 33.4 $\mu$ L X-gal (20mg/mL) 的滤纸上, 置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱内, 直至蓝色出现。8h 之内变蓝为阳性克隆。

**1.2.4 阳性酵母克隆的鉴定与分析:** 利用溶细胞酶法抽提阳性酵母克隆的质粒, 并将其转化入宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  中扩增, 碱裂解法小量抽提质粒。阳性克隆质粒中的 AD 插入片段采用 PCR 方法扩增, 上游引物: 5' AAG TGA ACT TGC GGG GTT TTT CAG TAT CTA 3', 下游引物: 3' CCA AAC CAC CCC ATA GAA GTA GTA GCT TAT 5'。PCR 扩增产物用 *Hae* III 酶切鉴定, 琼脂糖初步分析其组成。不同酶谱的库质粒递交上海博亚生物工程有限公司进行序列测定, 所测得的序列在 GenBank 上进行同源性搜索和序列比对分析。

**1.2.5 GST-pull down 试验:** 将 pGEX4T3 质粒、

pGEX4T3-mPem 融合质粒分别转化入常规表达菌株 *E. coli* BL21 中,37℃培养过夜,次日按 1/10 体积转接,继续培养 3h 后,加入终浓度 1mmol/L IPTG,37℃培养 6h。收集到的菌体使用溶菌酶裂解,4℃离心取上清,加入 20μL 平衡过的 Glutathione-Sepharose 4B 颗粒,20℃振荡孵育 30min 后,使用 Binding/Wash 缓冲液 (4.2mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140mmol/L NaCl, 10mmol/L KCl) 冲洗 3 次。Mdfic 纯蛋白在体外以 pGBKT7-Mdfic 为模板,利用 TNT 体外转录翻译试剂盒制备并用<sup>35</sup>S-Met 标记。<sup>35</sup>S-Met 标记的 Mdfic 各 10μL 分别加入到处理后的 Glutathione-Sepharose 4B 颗粒中,4℃过夜孵育后,颗粒使用 Binding/Wash 缓冲液冲洗 3 次,SDS-PAGE 电泳后,利用 Typhoon 进行同位素扫描分析。

2 结果

2.1 酵母双杂交诱饵表达载体的构建、鉴定及其自激活作用检测

利用 PCR 方法以 pEGFP-mPem 为模板,扩增增长的 mPem 通读框序列,并将其克隆至 pGBKT7 载体中。pGBKT7-mPem 转化子经 PCR、双酶切鉴定后递交上海博亚生物有限公司测序(结果未显示),测序结果表明插入序列和通读框均正确。将 pGBKT7-mPem 诱饵质粒转化入酵母菌株 AH109 中,并涂布在 SD/-Trp 平板上。挑选 6 个在 SD/-Trp 平板上生长的克隆分别划线于 SD/-Leu、SD/-Ura、SD/-Trp、SD/-His 四种平板上,可见其在 SD/-Ura、SD/-Trp 上生长,而在 SD/-Leu、SD/-His 上不生长。β-半乳糖苷酶活性检测表明所有的克隆均为白色。这些结果表明 mPem 在酵母宿主菌 AH109 中无自激活作用。结果如图 1 所示。

2.2 与 mPem 蛋白相互作用分子的筛选

利用 PEG-LiAC 的方法,将 pGBKT7-mPem 诱饵质粒和构建在 pACT2 载体上的小鼠 7d 胚胎 cDNA 文库质粒共转染至酵母宿主菌 AH109 中,转化液涂布在 50 块 SD/-Trp-Leu 平板上,共获得  $5.2 \times 10^7$  个转化子。从平板上收集酵母转化菌并滴定。取  $1.57 \times 10^8$  个转化子平铺在 SD/-Trp-Leu-His 平板上,其上的克隆随即影印到 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上,共得到 298 个可以在 SD/-Trp-Leu-His-Ade 平板上生长的克隆。检测该 298 个克隆的 β-半乳糖苷酶活性,结果显示其中 53 个克隆 β-半乳糖苷酶活性为阳性(图 2),确定为阳性克隆。

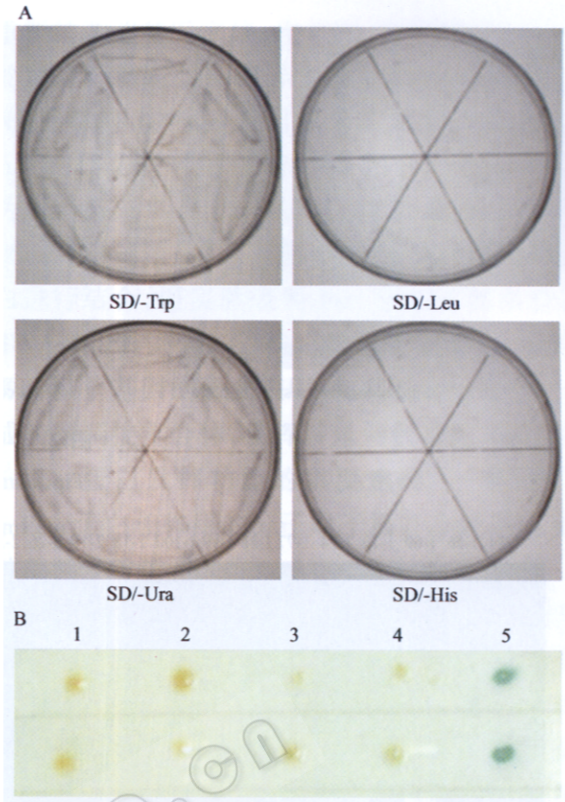


图 1 mPem 蛋白在酵母 AH109 中自激活活性检测

Fig. 1 Detection of autonomous activation of mPem  
A: the pGBKT7-mPem transformants were streaked on SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Ura, and SD/-His plate and cultured.  
B: β-Galactosidase assays. 1 ~ 3: pGBKT7-mPem transformants; 4: negative control (pGBKT7-53/pGADT7-T cotransformants); 5: positive control (pGBKT7-Lam/pGADT7-T cotransformants).

2.3 阳性酵母克隆的鉴定与分析

从 53 个阳性克隆中抽提酵母质粒并转入 *E. coli* DH5α, 抽提质粒。PCR 扩增质粒中的 pACT2/library 插入片段,获得 26 个 PCR 产物,使用 Hae III 单酶切,酶切后的样品走琼脂糖凝胶电泳(图 3),以去除重复序列,最后获得 7 个非重复克隆。将此 7 个非重复克隆递交上海博亚生物科技有限公司测序,测序结果在 GenBank 上进行同源性搜索和序列比对分析,获得 3 个与 mPem 相作用的蛋白,其中之一为 Mdfic (MyoD family inhibitor domain containing)。

2.4 Mdfic 蛋白与 mPem 蛋白在酵母中的相互作用

为进一步在酵母中确认 Mdfic 蛋白与 mPem 蛋白之间的相互作用,PCR 方法扩增 pACT2-Mdfic 中的 Mdfic 插入片段,并克隆至 pGBKT7 载体中;同时将 mPem 克隆至 pGADT7 载体中。将构建好的 pGBKT7-Mdfic 和 pGADT7 空载体, pGBKT7 空载体和 pGADT7-mPem, pGBKT7-Mdfic 和 pGADT7-mPem 分



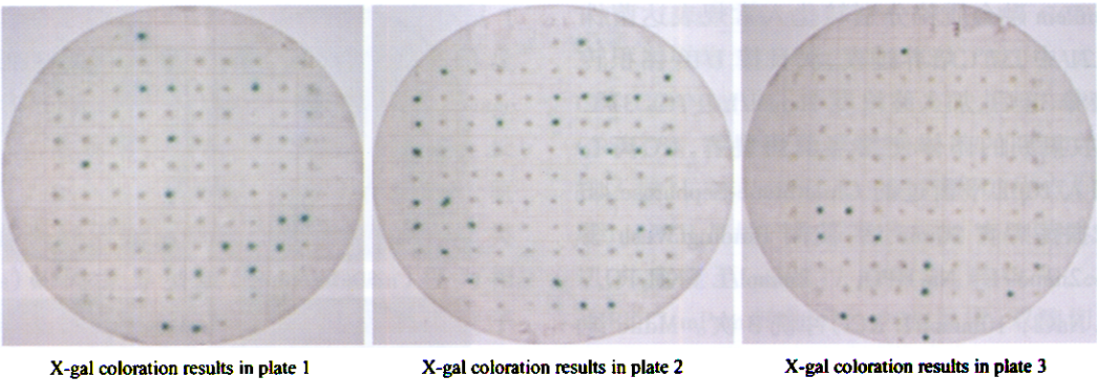


图 2 β-半乳糖苷酶活性检测  
Fig. 2 β-Galactosidase assays

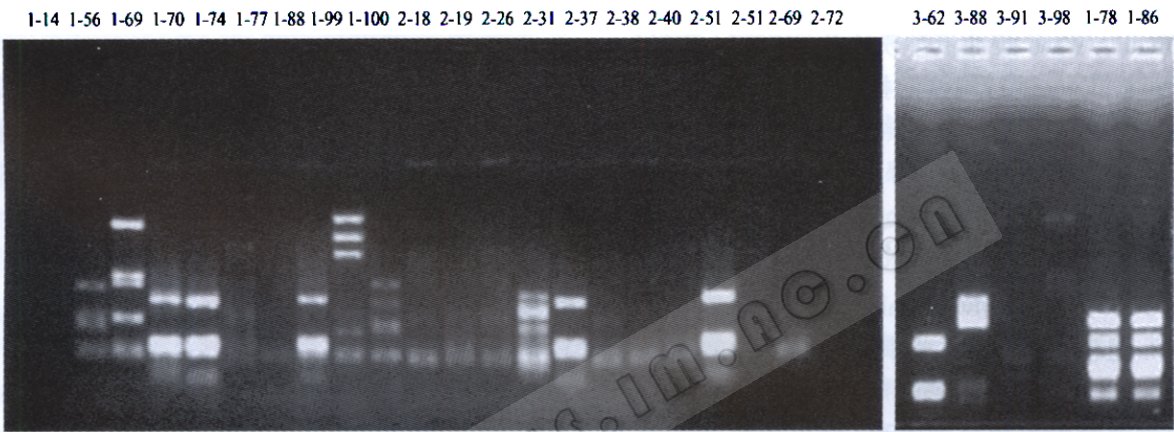


图 3 阳性酵母克隆中 pACT2/ library 插入片段的 Hae III 酶切结果  
Fig. 3 Using Hae III digesting the pACT2/ library insert fragment in candidate yeast colony

别共转染酵母菌株 AH109, 并将其分别划线在 SD/-Trp-Leu-Ade-His 选择培养基上。结果显示 pGBKT7-Mdfic 和 pGADT7 空载体共转化子、pGBKT7 空载体和 pGADT7-mPem 共转化子均不能够在 SD/-Trp-Leu-Ade-His 选择培养基上生长(图 4 a, b), 且 β-半乳糖

苷酶活性为阴性, 表明单独的 Mdfic 蛋白和 mPem 蛋白本身都不能激活下游报告基因。pGBKT7-Mdfic 和 pGADT7-mPem 共转子不仅能够在 SD/-Trp-Leu-Ade-His 选择培养基上生长, 而且 β-半乳糖苷酶活性为阳性(图 4 c, d)。这些均表明 mPem 蛋白和 Mdfic 蛋

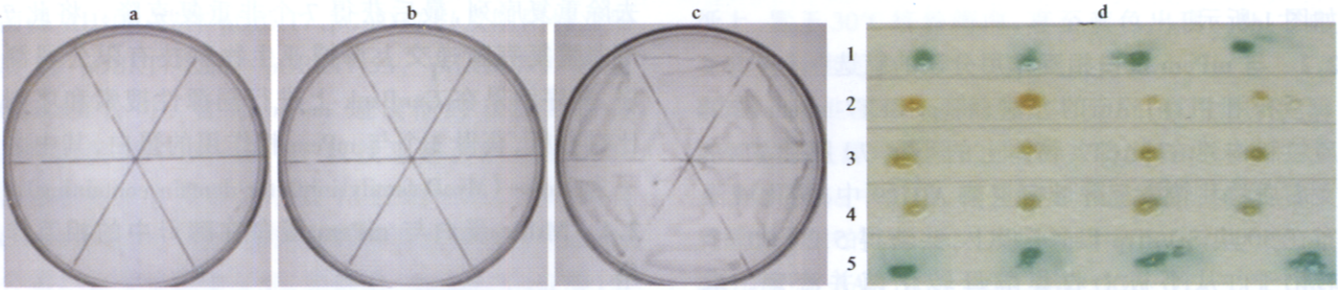


图 4 Mdfic 与 mPem 蛋白在酵母中的相互作用  
Fig. 4 Interaction between mPem and Mdfic in yeast

a, b, c: pGBKT7-Mdfic /pGADT7 cotransformants (a), pGBKT7/ pGADT7-mPem cotransformants (b), pGADT7-mPem/pGBKT7- Mdfic cotransformants (c) was streaked on SD/-Trp - Leu-His-Ade and cultured;  
d: β-Galactosidase assays. Row 1: positive control (pGBKT7-53/pGADT7-T cotransformants); Row 2: negative control (pGBKT7-Lam/pGADT7-T cotransformants); Row 3: pGBKT7-Mdfic/ pGADT7 cotransformants; Row 4: pGBKT7/ pGADT7-mPem cotransformants; Row 5: pGADT7-mPem and pGBKT7- Mdfic cotransformants.

白在酵母体内存在相互作用。

2.5 GST-pull down 试验证实 mPem 蛋白与 Mdfic 蛋白之间的相互作用

为进一步证实 mPem 蛋白与 Mdfic 蛋白之间的相互作用,我们进行了 GST-pull down 试验。以 pGBKT7-Mdfic 为模板,使用 TNT 体外转录翻译系统体外转录翻译 Mdfic 蛋白,并用<sup>35</sup>S-Met 标记。分别在 *E. coli* BL21 中表达 GST 和 GST-mPem 融合蛋白,将其固着在 Glutathione-Sepharose 4B 颗粒上,并和<sup>35</sup>S-Met 标记的 Mdfic 蛋白混合。4℃过夜孵育后,颗粒使用 Binding/Wash 缓冲液冲洗 3 次后走 SDS-PAGE 电泳,结果利用 Typhoon 进行同位素扫描。结果显示 Mdfic 蛋白和 GST-mPem 融合蛋白结合而不能和 GST 单独结合(图 5)。这表明 Mdfic 蛋白确实能够在体外与 mPem 蛋白相互作用。



图 5 GST-pull down 实验

Fig. 5 GST-pull down assay

*In-vitro* translated Mdfic was incubated with immobilized beads and washed for three times by Binding/wash buffer. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and scanned by TYPHOON.

1: *In-vitro* translated products of <sup>35</sup>S-Met-labeled Mdfic; 2: GST beads; 3: GST-mPem beads.

3 讨论

蛋白质在细胞的生命活动中扮演着重要的角色,其功能的发挥不是孤立的,是在纵横交错的网络中通过与其他分子的相互作用完成的。*mPem* 发现至今已有 10 多年,但目前对 *Pem* 基因的研究主要集中于基因本身表达的调控和特异性表达,以及配子形成过程中的时间和空间一致性方面,从而提出 *Pem* 蛋白可能在胚胎发育、生殖组织发育、精子的生成和成熟中发挥重要作用,但对于 *Pem* 蛋白究竟如何发挥作用却知之甚少。同源异型框基因家族是一

个重要的调节基因家族,作为转录因子调控动物胚胎的发育。*Pem* 是同源异型框(homeobox)基因,其 cDNA 序列中编码一个同源异型域<sup>[2,3]</sup>,因此推测 *Pem* 蛋白作为转录因子与 DNA 结合。然而直到目前为止,仍未找到 *Pem* 蛋白的核酸结合位点。Wilkinson 尝试用 *prd* 类基因的 DNA 结合序列与 *Pem* 蛋白进行结合,但实验表明 *Pem* 蛋白不能结合 *prd* 的 DNA 结合序列(Wilkinson 的私人通信)。对果蝇同源异型框基因的研究表明,与其他转录因子一起,组成转录调控复合体,发挥转录调控功能,也是许多 Homeobox 蛋白发挥功能的重要途径<sup>[6]</sup>。因此寻找与 *mPem* 蛋白相作用的分子对于揭开小鼠 *Pem* 蛋白的功能具有重要意义。

本研究首先成功地构建了 pGBKT7-mPem 诱饵质粒,自激活活性检测表明其本身不能够激活报告基因的转录。以 *mPem* 为诱饵蛋白,利用酵母双杂交系统筛选小鼠 7d 胚胎 cDNA 文库,共获得 3 个与 *mPem* 蛋白相作用的分子。其中之一为 *Mdfic*。再次的酵母双杂交和 GST-pull down 试验进一步确认了 *Mdfic* 和 *mPem* 蛋白之间的相互作用。

*Mdfic*(MyoD family inhibitor domain containing)基因,是一个近年来新发现的基因,因其编码 MyoD 抑制素结构域(I-mfa domain),故命名为 *Mdfic*<sup>[7]</sup>。MyoD 抑制素(Inhibitor of MyoD family, I-mfa)属于转录调节因子,其主要特征是通过抑制 MyoD 家族成员的转录活性从而负向调控肌细胞的生长发育,参与胚胎发育中肌细胞的分化和生长<sup>[8]</sup>。MyoD 抑制素也可以抑制 Mash2 的转录激活,在滋养层和软骨形成分化中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。I-mfa 特异性的富含半胱氨酸残基的结构域是 MyoD 抑制素功能发挥的关键结构,它可以与许多 bHLH 类转录因子(螺旋-环-螺旋, helix-loop-helix)结合。当 I-mfa 结构域与转录因子结合后,隐藏与其结合的转录因子的核定位信号,使 bHLH 因子滞留在细胞质,从而调控胚胎发育过程中的分化<sup>[8,10]</sup>。

*mPem* 是同源异型框基因,该基因家族是一个重要的调节基因家族,作为转录因子调节动物胚胎的发育。而 *Mdfic* 是 *MyoD* 抑制素基因,该基因家族亦属于转录调节因子,同样在调控胚胎发育中发挥重要作用。*mPem* 蛋白与 *Mdfic* 蛋白之间相互作用的证实暗示 *mPem* 蛋白有可能是与 *Mdfic* 蛋白组成转录调控复合体,共同参与胚胎发育过程中的分化调控,这对两个蛋白功能的研究均提供了线索。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Wilkinson MF, Kleeman J, Richards J *et al.* A novel oncofetal gene is expressed in a stage-specific manner in murine embryonic development. *Dev Biol.* 1990, **141**(2): 451 - 455
- [ 2 ] Maiti S, Doskow J, Li S *et al.* The *Pem* homeobox gene: Androgen-dependent and independent promoters and tissue-specific alternative RNA splicing. *J Biol Chem.* 1996, **271**(29): 17536 - 17546
- [ 3 ] Lin TP, Labosky PA, Grabel LB *et al.* The *Pem* homeobox gene is X-linked and exclusively expressed in extraembryonic tissues during early murine development. *Dev Biol.* 1994, **166**(1): 170 - 179
- [ 4 ] Rayle RE. The oncofetal gene *Pem* specifies a divergent paired class homeodomain. *Dev Biol.* 1991, **146**(1): 255 - 257
- [ 5 ] Lindsey S, Wilkinson MF. *Pem*: a testosterone- and LH-regulated homeobox gene expressed in mouse Sertoli cells and epididymis. *Dev Biol.* 1996, **179**(2): 471 - 484
- [ 6 ] Fan Y, Melhem MF, Chaillet JR. Forced expression of the homeobox-containing gene *Pem* blocks differentiation of embryonic stem cells. *Dev Biol.* 1999, **210**(2): 481 - 496
- [ 7 ] The RIKEN Genome Exploration Research Group Phase II Team and the FANTOM Consortium. Functional annotation of a full-length mouse cDNA collection. *Nature.* 2001, **409** (6821): 685 - 690
- [ 8 ] Chen CM, Kraut N, Groudine M *et al.* I-mf, a novel myogenic repressor, interacts with members of the MyoD family. *Cell.* 1996, **86**(5): 731 - 741
- [ 9 ] Kaut N, Snider L, Chen CM *et al.* Requirement of the mouse I-mfa gene for placental development and skeletal patterning. *The EMBO Journal.* 1998, **17**: 6276 - 6288
- [ 10 ] Jan YN, Jan LY. HLH protein, fly neurogenesis, and vertebrate myogenesis. *Cell.* 1993, **75**(5): 827 - 830