

大鼠 SR-BI 胞外域与 ApoA-I 蛋白相互作用的确认*

李兰松^{1,2} 李维琪^{1,2} 信学雷¹ 曹旭^{1**}

(中国科学院新疆理化技术研究所 乌鲁木齐 830011)¹ (中国科学院研究生院 北京 100039)²

摘要: 先以含全长 SR-BI cDNA 序列的重组质粒 pMD18-T-rS 为模板进行 PCR 反应扩增 SR-BI 得到胞外域 cDNA 片段, 经测序证明正确后, 定向克隆到酵母双杂交表达载体, 然后与 pGBKT7-ApoA-I 质粒共转化酵母细胞, 通过报告基因及酵母交配试验确认了 SR-BI 的胞外域部分和 ApoA-I 之间的确存, 观察到 ApoA-I 与 SR-BI 胞外域间的相互作用力比与全长的 SR-BI 间的相互作用力提高了 10%。

关键词: 载脂蛋白 AI (ApoA-I), B 族 I 型清道夫受体 (SR-BI), SR-BI 胞外域, 基因克隆, 酵母双杂交

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 02-0068-06

Verification the Interaction of Apolipoprotein AI and the Extracellular Domain of Scavenger Receptors Class B Type I*

LI Lan-Song^{1,2} LI Wei-Qi^{1,2} XIN Xue-Lei¹ CAO Xu^{1**}

(The Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, CAS, Urumqi 830011)¹

(Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)²

Abstract: In this paper, the DNA fragment rSE was amplified by PCR using the recombinant plasmids pMD18-T-rS (containing the hole lines of cDNA of SR-BI) as template. Then the PCR product was directionally cloned into the yeast two hybrid express vector pGADT7 after it was confirmed with sequencing. The recombined vector (named pGADT7-rSE) and pGBKT7-ApoA-I vector was cotransformed in yeast strain AH109. We identified the interaction of ApoA-I and rSE by using report genes and yeast mating. At last, we observed that the interaction of ApoA-I and rSE is about 10% more than that of ApoA-I and SR-BI of rat.

Key words: Apolipoprotein AI (ApoAI), Scavenger receptor class B type I (SR-BI), Extracellular domain of SR-BI, Gene clone, Yeast two hybrid

研究表明, 高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 浓度的降低与心脑血管疾病的发病率呈正相关。大鼠 B 族 I 型清道夫受体是目前已确认的唯一真正介导细胞与高密度脂蛋白作用的膜受体^[1], 该受体介导高密度脂蛋白-胆固醇酯的选择性吸收, 是调节肝脏胆固醇逆转运的唯一靶点^[2]。

载脂蛋白 ApoA-I (ApolipoproteinA- I) 是血清中高密度脂蛋白的主要成分。2000 年 Williams^[3] 利用结合与交联的方法证明了 ApoA-I 与 SR-BI 之间的相互作用在 HDL 与 SR-BI 相互作用中扮演主要角色。在胆固醇逆转运中 HDL 与其受体 SR-BI 的相互作用应该可以做为降脂药初筛的靶点之一。

SR-BI 属于 CD36 超家族, 相对分子量为 57kD, 由 509 个氨基酸残基组成, 包含 13 个外显子。该蛋白由 N 端胞浆域、N 端跨膜域、一个大的胞外域、C 端跨膜域和 C 端

* 中国科学院“百人计划”项目资助

2001 年“西部之光”项目资助

** 通讯作者 E-mail: lilansong1980@126.com

收稿日期: 2005-06-20, 修回日期: 2005-08-15

胞浆域组成^[4]。

本实验室已经建立了以 ApoA-I 和 SR-BI 完整蛋白相互作用为靶点的酵母双杂交系统, 并已尝试用于降血脂化合物的筛选^[5,6]。我们设想, 如果能够将这种相互作用进行较为细致的定位, 不仅具有重要的理论价值, 还能够提高降脂药物初筛的灵敏度。为此, 我们利用酵母双杂交方法确认了 ApoA-I 及 SR-BI 胞外域间的相互作用, 且观察到它们之间的蛋白相互作用较 ApoA-I 和 SR-BI 完整蛋白相互作用提高了 10% 以上, 为进行 ApoA-I 与 SR-BI 相互作用激动剂的高通量筛选, 快速寻找具有调脂功能的先导化合物并跟踪其有效部位打下了良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细菌菌株、质粒: (1) 大肠杆菌 DH5 α 、JM109 菌株, 本实验室保藏菌株; 酵母宿主菌株 AH109 和 Y187, 均购于美国 CLONETECH 公司; (2) 质粒 pGBKT7-53、pGBKT7-T、pGBKT7-Lam、pCL1、pGADT7、pGBKT7 购于美国 CLONETECH 公司; pMD18-T 质粒购自 TaKaRa 生物公司; pMD18-T-rS (含大鼠 SR-BI 全长 cDNA 的重组质粒)、pGADT7-rS (含 SR-BI 全长 cDNA 的重组质粒)、pGBKT7-apoA-I (含 apoA-I 全长 cDNA 的质粒) 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及仪器: PCR 试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工公司; DNA 分子质量标准、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 MBI 公司; 质粒提取试剂盒由北京天为时代提供; YPD 培养基、SD 培养基、-Ade/-His/-Leu/-Trp Do Supplement、-Leu/-Trp Do Supplement、X- α -Gal 均购于 CLONTECH 公司; 各种氨基酸、ONPG、PNP、3-AT、硫酸腺嘌呤购自于 SIGMA 公司; 其它常规试剂购自北京华美公司和上海生工公司。HZQ-F160 全温震荡培养箱 (上海安亭科学仪器制造厂)、5145C 型高速离心机 (美国 Sigma 公司)、20PR-52D 型高速低温冷冻离心机 (日本 HITACH 公司)、Mettler NK 160 电子天平 (瑞士)、台式 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)、水平电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)、紫外线透射仪 Bio image system (美国 Gene Geniuns 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 SR-BI 基因胞外域克隆及酵母双杂交表达载体的构建: (1) 目的基因的获得: 根据 SR-BI 的蛋白结构和基因序列, 通过计算机辅助分析, 设计引物如下:

E1: 5' - at atc gat atg gtg ccc tgc etc atc aag c -3';

E2: 5' -ac gag etc cta ctg cgc gla gtg aag aac c -3'。

其中 E₁ 5' 端引入 *Clal* 酶切位点, E₂ 5' 引入 *SacI* 酶切位点。PCR 反应条件为: 94℃ 3min; 94℃ 变性 30s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 90s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7min。反应采取 50 μ L 体系。(2) PCR 产物的克隆及序列鉴定: 纯化的 RT-PCR 产物 SR-BI 胞外域定向克隆到 pMD18-T 质粒中后, 转化大肠杆菌 DH5 α , 进行蓝白筛选。酶切鉴定出含有插入片段的阳性克隆, 命名为: pMD18-rSE。DNA 序测定由上海生工公司完成。(3) 大鼠 SR-BI 胞外域表达载体的构建: 按常规方法进行将 rSE 片段与 pGADT7 的连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 挑选阳性菌株, 提取 pGADT7-rSE 质粒 DNA 纯化后备用。

1.2.2 大鼠 SR-BI 胞外域与 ApoA-I 相互作用的确认和酶活测定及分析: (1) 小规模 LiAc 法质粒共转化酵母细胞及相应报告基因的表达确认: 制备酵母感受态细胞^[7], 将

pGADT7-rSE、pGBKT7-apoA-I 共转化酵母菌株 AH109 (实验组); 同时设置 pCL1 为野生型对照, pGADT7-T、pGBKT7-53 为阳性对照, pGADT7-T、pGBKT7-Lam 阴性对照, pGADT7-rS、pGBKT7-apoA-I 为全长对照。将菌液涂布在相应的 SD 省却培养基平板上, 30℃ 保温 3 ~ 7d, 观察转化株生长状况和颜色变化。(2) 质粒单转化酵母细胞与酵母细胞间的交配及相应报告基因的表达确认: 制备酵母感受态细胞, 将 pGADT7-rSE、pGBKT7-apoA-I 分别转化酵母菌株 AH109、Y187, 在相应 SD 省却培养基上筛选单转化子之后, 进而交配得到二倍体实验组。以 pGBKT7-53、pGADT7-T 和 pGBKT7-53、pGADT7-Lam 分别转化酵母菌株 AH109、Y187 后的交配实验为阳、阴性对照, 以 pGADT7-rS、pGBKT7-apoA-I 分别转化酵母菌株 AH109、Y187 后的交配实验为全长对照。交配后取菌液涂布在相应的 SD 省却培养基平板上, 30℃ 保温 3 ~ 7d, 观察生长状况和菌斑颜色变化。(3) α -半乳糖苷酶和 β -半乳糖苷酶的定量测定及分析: 按照文献 [7] 的方法分别进行 α -半乳糖苷酶和 β -半乳糖苷酶的定量测定, 比较实验组和全长对照组中相互作用力的大小。

2 结果与分析

2.1 大鼠 SR-BI 基因胞外域克隆及酵母双杂交表达载体的构建

2.1.1 SR-BI 胞外域 cDNA 片段的扩增: 采用 PCR 法扩增 SR-BI 的胞外域 cDNA, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 显示有长约 1.2kb 的片段 (图 1), 与预计的目的片段大小位置相符, 表明已成功获得目的 DNA 片段。

2.1.2 重组 pMD18-rSE 质粒载体的克隆鉴定与序列分析: 将 PCR 产物直接克隆到 pMD18-T 载体中, 进行蓝白筛选。随机挑取单菌斑提取质粒, *Cla*I、*Sac*I 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 可见重组克隆外源片段的大小同 PCR 产物一致 (图 2)。测序结果表明插入的基因序列与 GenBank 相应序列完全一致。

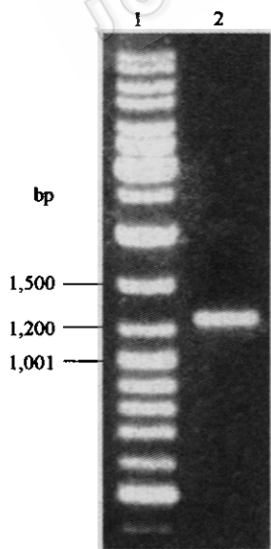


图 1 PCR 扩增结果

1 分子量 Marker, 2 rSE 清道夫受体胞外域

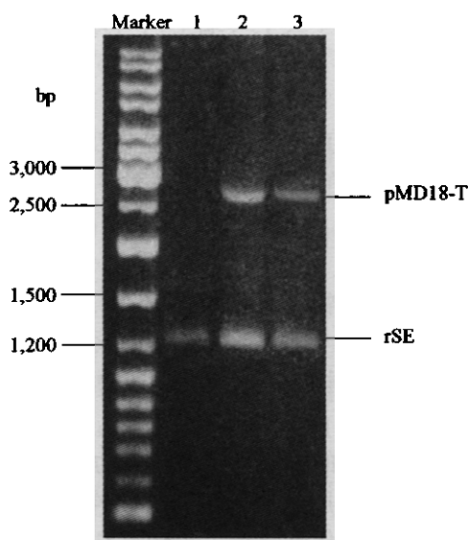


图 2 pMD18-T—rSE 的酶切鉴定结果

M 分子量 Marker, 1 rSE 清道夫受体胞外域, 2、3 用 *Cla*I 和 *Sac*I 酶切 pMD18-T—rSE 重组质粒

2.1.3 酵母表达载体的构建与鉴定: pMD18-T—rSE 重组质粒用 *Cla*I 和 *Sac*I 酶切后回收的 rSE 片段, 然后定向克隆到酵母表达载体 pGADT7 质粒上, 构建重组表达质粒载体 pGADT7—rSE。 *Cla*I 和 *Sac*I 双酶切后, 可见重组表达质粒载体中外源基因片段的大小同相应 pMD18-T—rSE 中外源基因片段的大小以及相应 PCR 产物的大小是一致的 (图 3)。

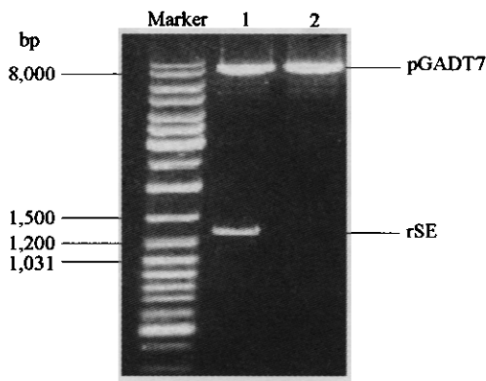


图 3 pGADT7—rSE 的酶切鉴定结果

M 分子量 Marker, 1 *Cla*I 和 *Sac*I 双酶切后的 pGADT7—rSE 质粒, 2 *Cla*I 和 *Sac*I 双酶切后的 pGADT7 质粒

2.2 大鼠 SR-BI 胞外域与 ApoA-I 相互作用的确认和酶活测定及分析

2.2.1 共转化酵母细胞证实 SR-BI 胞外域与 ApoA-I 之间存在相互作用: 实验组、全长对照组、阳性对照组和野生型对照组可在 SD/-Leu/-Trp、SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal 平板上生长, 且呈蓝色; 阴性对照可在 SD/-Leu/-Trp 生长, 但不能在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板上生长。

2.2.2 单转化酵母细胞与酵母细胞间的交配证实 SR-BI 胞外域与 ApoA-I 之间存在相互作用: 交配实验所得菌株均可在 SD/-Leu/-Trp 平板上生长, 实验组、全长对照组、阳性对照组和野生型对照组可在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- α -Gal 平板上生长, 且呈蓝色; 阴性对照可在 SD/-Leu/-Trp 生长, 但不能在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade。

2.2.3 α -半乳糖苷酶和 β -半乳糖苷酶的定量测定及分析: 根据文献 [7] 的方法对野生型对照菌株、阳性对照、阴性对照和全长对照组菌株进行 α -半乳糖苷酶的定量测定, 按文献 [7] 对上述菌株的 β -半乳糖苷酶活力进行分别测定, 所得结果如图 4~7 所示。

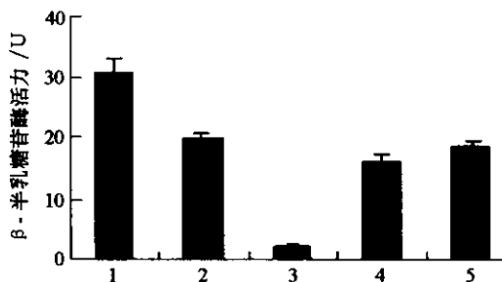


图 4 共转化的酵母细胞 β -半乳糖苷酶活力比较

1 野生型对照, 2 阳性对照, 3 阴性对照, 4 全长对照, 5 实验组

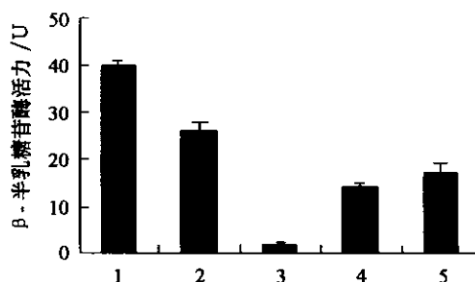


图 5 共转化的酵母细胞 α -半乳糖苷酶活力比较

1 野生型对照, 2 阳性对照, 3 阴性对照, 4 全长对照, 5 实验组

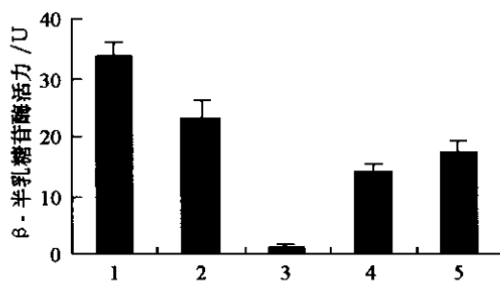


图 6 交配的二倍体酵母细胞中 β -半乳糖苷酶活力比较

1 野生型对照, 2 阳性对照, 3 阴性对照,
4 全长对照, 5 实验组

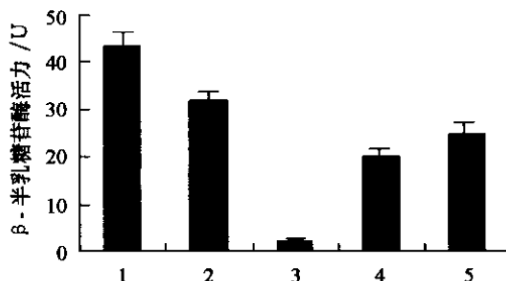


图 7 交配的二倍体酵母细胞中 α -半乳糖苷酶活力比较

1 野生型对照, 2 阳性对照, 3 阴性对照,
4 全长对照, 5 实验组

从实验结果可以看出, 即实验组比全长对照组的半乳糖苷酶的活力强, 即 ApoA-I 蛋白和 SR-BI 胞外域 cDNA 序列所编码的蛋白之间的相互作用强于 ApoA-I 蛋白和全长的 SR-BI 之间的相互作用。

3 讨论

2004 年 8 月, Out^[2]等公布“SR-BI 是介导肝脏和肾上腺选择性吸收胆固醇酯的唯一分子, 是调节胆固醇逆转运的唯一靶点”这一研究结果, SR-BI 在心脑血管疾病中所具备的巨大的药物设计和针对性治疗的实用潜力便更为突出。

2000 年 Williams DL 等发表了 SR-BI 与 apoA-I 存在相互作用的观点, 他们认为 SR-BI 与 apoA-I 的 α -螺旋发生多点结合, HDL-CE 沿浓度梯度流动, 其中 SR-BI 的胞外域起主要作用^[8]; 2001 年 Connolly^[9]等证明, SR-BI 介导胆固醇酯吸收、游离胆固醇双向流动以及改变膜脂胆固醇分布等功能的活性部位均为其胞外域部分, 两端的跨膜域和胞浆域近与蛋白锚定在细胞膜上有关; 而 Silver 则认为 HDL 通过内吞作用进入细胞后才与 SR-BI 产生相互作用的^[10]。

酵母双杂交技术是一种快速灵敏的研究蛋白质之间相互用的方法, 本文引用了 Clontech 公司的 MATCHMAKER 系统 3, 可通过报告基因 α 、 β -半乳糖苷酶活力的测定定量地比较相互作用力的强弱; 它含有 3 个报告基因 ADE2/HIS3/MEL1 (LacZ) 以完全消除假阳性。系统中 DNA-BD 和 AD 融合载体 pGBKT7 和 pGADT7 是为高水平蛋白表达而设计的, 故易于蛋白质的相互作用的确认。

本实验采用 PCR 的方法扩增对相互作用起关键作用的 SR-BI 的胞外域 cDNA 片段, 并定向克隆入酵母表达载体中, 构成重组质粒 pGADT7-rSE, 然后与含 ApoA-I cDNA 序列的重组质粒 pGBKT7-ApoA-I 共转化感受态酵母细胞 AH109, 或分别单独转化 AH109 和 Y187 感受态酵母细胞, 然后利用单转化子进行交配验证了 SR-BI 的胞外域与 ApoA-I 蛋白相互作用, 为了保证实验的科学性和实验结果的可靠性, 我们同时设置了野生型对照、阳性对照和阴性对照, 为了通过半乳糖苷酶活力的大小而比较相应蛋白相互作用力的大小, 我们同时还设置了包括全长 SR-BI 和 ApoA-I 蛋白的全长对照组。通过对全长对照组和实验组半乳糖苷酶活力的大小比较, 可以看出, ApoA-I 蛋白和 SR-BI 胞外域 cDNA 序列所编码的蛋白之间的相互作用强于 ApoA-I 蛋白和全长的 SR-BI 之间的相互作用。

本文证明了在酵母双杂交系统中 SR-BI 胞外域与 ApoA-I 之间的确存在相互作用,一方面为进一步寻找二者进行相互作用的具体作用位点甚至起关键作用的氨基酸残基提供了可行性方法,从而为进一步研究二者在胆固醇逆转运和调节血脂水平的分子机理奠定了一定的基础;另一方面确实提高了原系统检测数据的可信范围和检测灵敏度,为进行 ApoA-I 与 SR-BI 相互作用激动剂的高通量筛选和快速寻找具有调脂功能的先导化合物并跟踪其有效部位打下良好的基础。

参 考 文 献

- [1] Acton S, Rigotti A, Landschulz K T, *et al.* Science, 1996, **271**: 518 ~ 520.
- [2] Out R, Hoekstra M. J Lipid Res, 2004, **45**: 2088 ~ 2095.
- [3] Williams D L, de La Llera-Moya M, Thuahnai S T, *et al.* J Biol Chem, 2000, **275** (25): 18897 ~ 18904.
- [4] Cao G, Garcia C K, Wyne K L, *et al.* J Biol Chem, 1997, **272** (52): 33068 ~ 33076.
- [5] 信学雷, 李维琪, 陈志慧, 等. 中国生物工程杂志, 2005, **25** (5): 80 ~ 84.
- [6] 信学雷, 李松兰, 阿吉·艾克拜尔·艾萨. 中国中药, 2005, **7** (13): 1041 ~ 1043.
- [7] Clontech MATCHMAKER GAL4 two-hybrid system3. 1999. 6.
- [8] Williams D L, Temel R E, Connelly M A. Endocr Res, 2000, **26** (4): 639 ~ 651.
- [9] Connelly M A, de la Llera-Moya M, Monzo P, *et al.* Biochemistry, 2001, **40** (17): 5249 ~ 5259.
- [10] Silver D L, Tall A R. Curr Opin Lipidol. 2001, **12** (5): 497 ~ 504.