

PRAS40 与 14-3-3 蛋白各亚型相互作用的酵母双杂交系统检测

Study of Interaction Between PRAS40 and 14-3-3 Proteins by Using Yeast Two-hybrid System

刘康武, 黄蓓*, 谭阳, 吴东明

LIU Kang-Wu, HUANG Bei*, TAN Yang and WU Dong-Ming

安徽大学生命科学学院 合肥 230039

School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230039, China

摘 要 PRAS40 是近几年新发现的 Akt 作用底物, 14-3-3 结合蛋白。为确定 PRAS40 与 14-3-3 蛋白 7 种亚基间相互作用关系, 利用 gateway 方法构建用于酵母双杂交系统的诱饵质粒 pEG-PRAS40 及转录激活质粒 pJG-PRAS40, 将 PRAS40 和 14-3-3 各亚型质粒分别作为诱饵蛋白质粒及转录激活质粒共转化酵母细胞 EGY48, 通过氨基酸营养缺陷生长实验及 β -半乳糖苷酶显色反应分析两种蛋白相互作用程度。酶切鉴定证实成功地构建了 pEG-PRAS40 和 pJG-PRAS40 质粒, 酵母双杂交实验结果显示 PRAS40 可以和 14-3-3 亚型 tau, beta, zeta 及 epsilon 相结合, epsilon 较强, beta 和 zeta 次之, tau 较弱。此结果将为深入研究 PRAS40 与 14-3-3 蛋白生物学功能及发现药物靶标奠定基础。

关键词 gateway 技术, PRAS40, 14-3-3, 酵母双杂交

中图分类号 TQ93 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)04-0652-05

Abstract PRAS40, a proline-rich Akt substrate of 40kD, is 14-3-3 binding protein. To study the interaction between PRAS40 and 14-3-3 isoforms, We constructed the expression vector pEG-PRAS40 (DNA-binding plasmid) and pJG-PRAS40 (transcriptional activity plasmid) in yeast using gateway cloning technology, then the plasmid of pEG-PRAS40/pJG-PRAS40 was co-transformed into yeast EGY48 strain with each pJG-14-3-3/pEG-14-3-3 isoform plasmid. The co-transformation were tested by nutrition limitation growth analysis, β -galactosidase color assay was used to study the interaction degree between PRAS40 and 14-3-3 isoforms. We confirmed successfully the construction of pJG-PRAS40 and pEG-PRAS40 with enzyme digestion. four 14-3-3 isoforms were found interacting with PRAS40 using yeast two-hybrid assay, the interaction degree of Epsilon was stronger than beta and zeta, tau was the weakest. Our result will be used to further study the biological function of PRAS40 and 14-3-3 as new drug target.

Key words gateway cloning technology, PRAS40, 14-3-3, yeast two-hybrid

PI3K-Akt pathway 被证实为控制细胞生长、存活、繁殖与凋亡的细胞信号转导通路, 该通路发生障碍将导致细胞病变甚至肿瘤的发生^[1]。因此, 与该

信号通路相关的因子已成为研制抗癌药物的新靶点。

2003 年 Grace Park 等人在利用 14-3-3 蛋白及

Received: December 25, 2006; Accepted: March 13, 2007.

This work was supported by a grant from the Nature Science Fund of Anhui Education Bureau (No. 2006KJ087A).

* Corresponding author. Tel: +86-551-5107341; E-mail: bei Huang@163.com

安徽省教育厅重点资助 (No. 2006KJ087A), 安徽省生态工程与生物技术重点实验室开放课题经费资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

Akt 抗体筛选 Akt 作用底物时发现了一种新的由胰岛素诱导出来的 Akt 作用底物 PRAS40: Proline-rich-Akt Substrate, 40kD 的 14-3-3 结合蛋白^[2], 该蛋白在人体内各组织均有表达, 尤其在心脏及肝脏内的表达量最高。2004 年 Atsushi 等人首次利用小鼠脑中风模型对 PRAS40 的功能进行了研究, 他们发现加入 NGF 后引起的 PRAS40 磷酸化及其与 Akt、14-3-3 的相互作用在由 tICI (transient focal cerebral ischemia) 引起的凋亡性神经细胞死亡恢复中起着重要作用。2005 年黄蓓等发现 PRAS40 在乳腺癌及肺癌早期发生中的表达量增加^[4]; 2007 年 E. V. Haar 等人证实 PRAS40 为 mTOR 结合蛋白, 在 PI3K-Akt-mTOR pathway 中, PRAS40 与 14-3-3 间的相互作用可能对细胞增殖起重要的调控作用^[5]。

14-3-3 蛋白是 1967 年首次在牛脑细胞中发现的一种酸性的、可溶性的二聚体蛋白, 根据它们在凝胶中的迁移率命名为 14-3-3, 其大小约为 23~28kD。该分子伴侣可以和 60 多种蛋白相互作用并在所有真核细胞内均有表达, 它们参与了真核细胞中的蛋白激酶介导的信号传导通路, 在基因转录、细胞周期调控、前体蛋白运输中起着十分重要的作用^[6]。

14-3-3 蛋白在哺乳动物中有七个亚型: beta、gamma、epsilon、zeta、sigma、eta ($\beta \gamma \epsilon \zeta \eta \sigma \tau$), 该蛋白以稳定的同源/异源二聚体形式聚集在一起, 能同时结合两个配体。所有 14-3-3 的三级结构都极其相似, 哺乳动物 14-3-3 蛋白是由两个单体连接形成的杯状二聚体结构, 每个单体由 9 个 α 螺旋 ($\alpha A \sim \alpha I$) 组成, 反向平行排列成 L 型结构, 彼此间被一短环间隔^[7]。eta, tau, sigma 的晶体结构分析^[8,9]表明 14-3-3 的亚型间虽具有高度的相似性, 但各个亚型的磷酸化肽段结合凹槽边缘的氨基酸存在差异^[10], 14-3-3 不同亚型之间存在着相似重叠的结合专一性, 因此其结合蛋白质的能力存在着差异^[11]。

作为 14-3-3 结合蛋白的 PRAS40, 它与 14-3-3 蛋白的 7 种亚型的作用规律还不清楚。本实验拟选用 pJG4-5 和 pEG202 作为 PRAS40 与 14-3-3 基因载体, 通过 gateway 方法构建用于酵母双杂交系统的 PRAS40 及 14-3-3 各亚型质粒, 检测二者相互作用关系, 为深入研究 PRAS40 与 14-3-3 的生物学功能及发现药物靶标奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种: 用于酵母双杂交的常用菌种

和质粒: 酵母细胞 *S. cerevisiae* EGY48 (MAT α , Trp1, His3, Ura3, LexAop-LEU2) 质粒 pSH18-34 (LexAop, GALpro, Ura, Ap^r) pDonr201、pJG4-5 (Galpro, Trp1, ADHter, Ap^r) pEG202 (LexA, ADHpro, His3, Ap^r) 均购自 Invitrogen 公司, Puv I 及 Sma I 为 Promega 公司产品。

人黑色素细胞瘤 (Homo sapiens, melanoma cell line) PRAS40 全长 cDNA 序列订购于 ATCC 公司 (MGC2865, 序号 2988648)。

pEG-14-3-3 七种亚型质粒组: pEG-zeta, pEG-beta, pEG-gamma, pEG-sigma, pEG-tau, pEG-eta, pEG-epsilon; pJG-14-3-3 七种亚型质粒组: pJG-zeta, pJG-beta, pJG-gamma, pJG-sigma, pJG-tau, pJG-eta, pJG-epsilon; 与 14-3-3 相互作用的阳性对照质粒 pEG-ASKI^[12]; 阴性对照质粒 pEG202, pJG4-5, pJG-zeta-K49E (点突变), 均由美国 Emory 大学药理学系傅海安教授惠赠^[13]。

大肠杆菌 DH5 α 由安徽农业大学生命科学学院朱苏文副教授惠赠。

1.1.2 培养基和添加剂: 细菌培养基酵母抽提物, 胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品, 无氨基酵母氮源购自北京经科宏达生物有限公司, X-gal 购自 Research Products International Corp. USA, 聚乙二醇 4000 购自中国医药 (集团) 上海化学试剂公司, N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 上海振兴化工一厂产品, LiAc (醋酸锂) 购自上海国药集团化学试剂有限公司, 各种氨基酸及糖类均购自中科院上海生化研究所, 质粒抽提试剂盒 E. Z. N. A. plasmid Mini Kit I 购于 Omega 公司 (U.S.A)

1.2 方法

1.2.1 PRAS40 质粒的构建: 以人黑色素细胞瘤细胞全长 cDNA 为模板, 上游序列的 attB 引物为 5'-gggg aca agt ttg tac aaa aaa gca ggc tta atg gcg tcg ggg cgc cg -3', 下游序列的 attB 引物为 5'-ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gtc tca ata ttt ccg ctt cag -3'。采用 PCR 方法扩增 PRAS40 基因的 CDS 序列, 获得 attB-PRAS40 基因片段, 将其与 pDonr201 通过 BP 反应构建含有 PRAS40 的穿梭载体质粒 pDonr201-PRAS40 (pBG4) 转化 *E. coli* DH5 α , 阳性克隆进行酶切和测序鉴定, 然后通过 LR 反应再将 PRAS40 克隆到表达载体, 构建了诱饵蛋白质粒 pEG-PRAS40 (pBH32, His3) 和转录活性质粒 pJG-PRAS40 (pBH31, Trp1) (按照 Invitrogen 公司的操作手册), 这两种表达质粒分别用 Sma I 及 Puv I 酶切鉴定。

1.2.2 酵母双杂交质粒转化:先将含有 LacZ 的报告基因质粒 pSH18-34 转入酵母细胞 EGY48, 阳性克隆可在 Glu/-Ura 培养基上生长, 待菌液生长至 $OD_{600} = 0.6$ 时, 离心收集菌体于 EP 管中, 加入 $50\mu\text{L}$ LiAc 溶液制成感受态细胞。

采用 PEG-LiAc 方法, 将鲑鱼精 DNA ($2\mu\text{g}$) 诱饵质粒 ($0.5\mu\text{g}$) 转录激活质粒 ($0.5\mu\text{g}$) 混合后加入 PEG4000/LiAc 溶液, 30°C 孵育 30min, 再加入 $20\mu\text{L}$ 1mol/L DTT, 42°C 热休克 10 min, 室温静置 2h, 无菌水洗涤 3 次, 离心后的菌体重悬于 $50\mu\text{L}$ 的无菌水中, 涂布于 Glu/-Ura-Trp-His 平板上, 30°C 培养 3 ~ 5d, 检查菌落的生长情况。

Glu/-Ura-Trp-His 平板 100mL 配方: [-Ura-Trp-His 氨基酸混合物 0.2g, YNB 0.144g, 硫酸铵 0.5g, 琼脂粉 1.8g, 双蒸水 95mL, 40% 葡萄糖溶液 5mL。

1.2.3 酵母转化显色反应:取酵母转化子菌落划线于 X-gal 板上, 30°C 培养 15h 后间隔时间观察菌落是否显蓝色, 并记下开始显色的时间, 时间的长短与作用强弱成正相关。

X-gal 固体培养基 100mL 的配方: YNB 0.17g, 硫酸铵 0.5g, 琼脂粉 2.0g [-Ura-Trp-His] 缺陷型氨基酸混合物 0.2g; 3.66g 磷酸二氢钾, 7.5g 磷酸氢二钾, 100mL 双蒸水, 40% 半乳糖 5mL, 20% 棉子糖 5mL, X-gal 0.2mL (20mg/mL 溶于 N,N-二甲基甲酰胺)。

2 结果与分析

诱饵 PRAS40 基因及转录激活 14-3-3 各亚型基因已分别构建于 LexA fusion plasmid pEG202 及 Library plasmid pJG4-5 载体, 当它们共转化酵母细胞 EGY48/pSH18-34 时, 可以在 Glu/-Ura-Trp-His 平板上生长。如果诱饵蛋白 PRAS40 及猎物蛋白 14-3-3 相互作用便可启动 pSH18-34 质粒中 LacZ 报告基因的表达, 从而使其底物 Galactose (包含在 X-gal 培养基中) 显蓝色。

用于酵母双杂交的 pEG-PRAS40 及 pJG-PRAS40 表达质粒通过 gateway technology 构建而成, PRAS40 质粒构建流程图如图 1 所示。

2.1 attB-PRAS40 基因的 PCR 扩增

从含有 PRAS40 全序列的质粒 MGC-2865 中利用 attB 引物扩增出了 attB-PRAS40-PCR 基因产物, 如图 2 所示。PRAS40-ORF 为 771bp, attB1 加 attB2 约 60bp, 共计 831bp。电泳图上的条带与预期值大小一致。

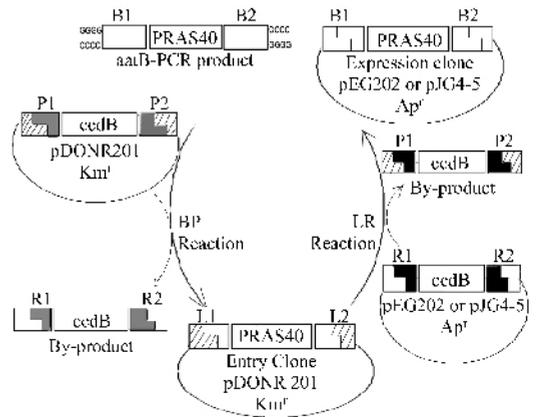


图 1 PRAS40 质粒构建流程图

Fig. 1 Flowchart of construction of recombinant PRAS40 expression vector

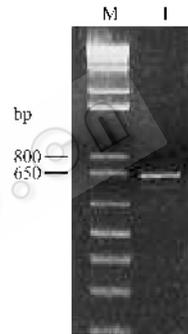


图 2 attB-PRAS40 PCR 扩增

Fig. 2 Electrophoresis of attB-PRAS40 PCR product
M: DNA marker; I: PCR product.

2.2 PRAS40 质粒的构建及鉴定

将 attB-PRAS40 的 PCR 产物和 pDonr201 载体通过 BP 反应构建含有 PRAS40 基因的穿梭载体 pDonr201-PRAS40 质粒, 阳性克隆进行酶切和测序鉴定, 然后通过 LR 反应再将 PRAS40 转移到表达载体, 构建了在酵母中表达的质粒 pJG-PRAS40 和 pEG-PRAS40, 如图 3 所示。

挑选阳性克隆进行酶切鉴定(图 4 所示): pJG-PRAS40 用 *Pvu*I 单酶切, 鉴定时应出现 5850bp 及 1435bp 二条带; pEG-PRAS40 用 *Sma*I 单酶切, 鉴定时应出现 5453bp、4863bp 及 686bp 三条带。电泳结果显示: d1、d2、d5 为 pJG-PRAS40 的正确克隆, e3、e4、e5 为 pEG-PRAS40 的正确克隆。

2.3 PRAS40 与 14-3-3 各亚型酵母双杂交分析

2.3.1 pEG-PRAS40 与 pJG-14-3-3 各亚型相互作用分析:设诱饵质粒 pEG-PRAS40 与转录激活质粒 pJG-14-3-3 各亚型为实验组, pEG-Ask1 与 pJG-zeta 为阳性对照, pEG-Ask1 与 pJG-zeta-K49E (点突变型) 为阴性对照, pEG-PRAS40 与 pJG4-5 为空白对照, 将成对的质粒共 10 组分别共转染 EGY48/pSH18-34

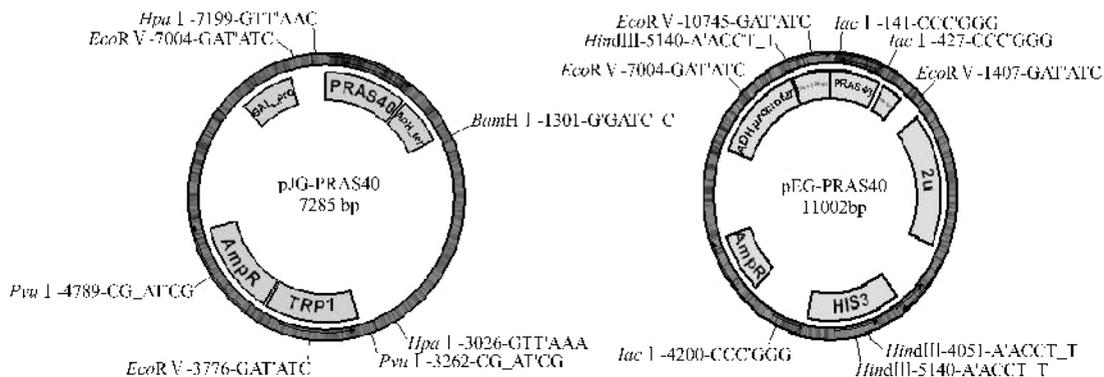


图 3 表达载体 pJG-PRAS40 和 pEG-PRAS40 质粒的构建

Fig. 3 Construction of recombinant expression vector pEG-PRAS40 and pJG-PRAS40

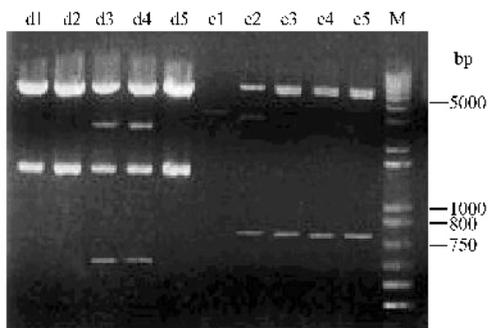


图 4 pJG-PRAS40 和 pEG-PRAS40 质粒的酶切电泳鉴定图

Fig. 4 Restriction pattern of recombinant vector pJG-PRAS40 and pEG-PRAS40

d1-d5 : pJG-PRAS40 digested with *Pvu* I ;
e1-e5 : pEG-PRAS40 digested with *Sma* I .

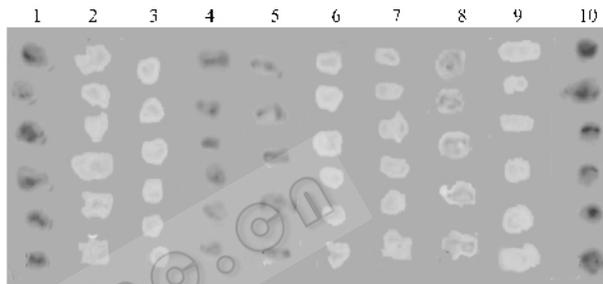


图 5 PRAS40 和 14-3-3 亚型相互作用在 x-gal 板上显色反应

Fig. 5 X-gal color assay of interaction between PRAS40 and 14-3-3 isoforms

1 : pEG-Ask1 + pJG-zeta ; 2 : pEG-Ask1 + pJG-zeta-K49E ;
3 : pEG- PRAS40 + pJG-4-5 ; 4 : pEG-PRAS40 + pJG-beta ;
5 : pEG-PRAS40 + pJG-zeta ; 6 : pEG- PRAS40 + pJG-gamma ;
7 : pEG-PRAS40 + p JG-sigma ; 8 : pEG-PRAS40 + pJG-tau ;
9 : pEG-PRAS40 + pJG-eta ; 10 : pEG-PRAS40 + pJG-epsilon .

涂布于 [Glu⁻Ura⁻Trp⁻His⁻] 固体培养基上, 挑出阳性克隆接种于 X-gal 板上显色, 结果如图 5 及表 1 所示。pEG-PRAS40 与 pJG-14-3-3 亚型 tau、beta、epsilon、zeta 可以结合且在 X-gal 板上显色, epsilon 作用较强, beta 及 zeta 次之, tau 较弱。

2.3.2 pJG-PRAS40 与 pEG-14-3-3 各亚型相互作用分析: 为进一步验证表 1 的结果, 设转录激活质粒

pJG-PRAS40 与诱饵质粒 pEG-14-3-3 各亚型为实验组, pEG-202 与 pJG-PRAS40 为空白对照, 阳性与阴性对照不变, 也得到了类似的结果(表 2), 且在 x-gal 板上显色反应结果与图 5 相似。

表 1 用酵母双杂交系统检测 pEG-PRAS40 与 pJG-14-3-3 各亚型的相互作用

Table 1 The interaction between pEG-PRAS40 and pJG-14-3-3's isoforms detected by yeast two-hybrid system

Type of groups	No.	pEG	pJG	Clones (-Trp-His-Ura)	X-gal activity	Start time of blue color/h
Positive	1	pEG-Ask1	pJG-zeta	123	+	17.20
Negative	2	pEG-Ask1	pJG-zetaK49E	117	-	
Empty	3	pEG-PRAS40	pJG-4-5	74	-	
Experiment	4	pEG-PRAS40	pJG-beta	81	++	19.25
Experiment	5	pEG-PRAS40	pJG-zeta	75	++	20.20
Experiment	6	pEG-PRAS40	pJG-gamma	83	-	
Experiment	7	pEG-PRAS40	pJG-sigma	95	-	
Experiment	8	pEG-PRAS40	pJG-tau	69	+	21.20
Experiment	9	pEG-PRAS40	pJG-eta	67	-	
Experiment	10	pEG-PRAS40	pJG-epsilon	73	+++	18.00

表 2 用酵母双杂交系统检测 pJG-PRAS40 与 pEG-14-3-3 各亚型的相互作用

Table 2 The interaction between pJG-PRAS40 and pEG-14-3-3's isoforms detected by yeast two-hybrid system

Type of groups	No.	pEG	pJG	Clones (-Trp-His-Ura)	β -gal activity	Start time of Blue color/h
Positive	1	pEG-Ask1	pJG-zeta	109	+	16.20
Negative	2	pEG-Ask1	pJG-zeta-K49E	97	-	
Empty	3	pJG-PRAS40	pEG202	116	-	
Experiment	4	pJG-PRAS40	pEG-beta	107	++	19.30
Experiment	5	pJG-PRAS40	pEG-zeta	94	++	18.20
Experiment	6	pJG-PRAS40	pEG-gamma	68	-	
Experiment	7	pJG-PRAS40	pEG-sigma	84	-	
Experiment	8	pJG-PRAS40	pEG-tau	95	+	21.40
Experiment	9	pJG-PRAS40	pEG-eta	78	-	
Experiment	10	pJG-PRAS40	pEG-epsilon	103	+++	17.00

3 讨论

PRAS40 因富含脯氨酸的结构可以与许多含 SH3 或 WW 结构域的蛋白相互作用,这些被修饰后的蛋白分子具有多种不同的功能^[2]。Akt 和 14-3-3 蛋白参与了细胞存活、细胞生长、细胞分化、细胞新陈代谢及转录翻译等过程的调节活动,并在细胞凋亡及转化抗肿瘤等方面起着重要的作用^[1]。作为 Akt 的作用底物和 14-3-3 结合蛋白的 PRAS40 有可能成为多种疾病的靶标蛋白。

酵母双杂交系统自建立以来已经成为分析蛋白质相互作用的强有力的方法之一。由于该方法的不断完善,如今它不但可用来在体内检验蛋白质间的相互作用,而且还能用来发现新的作用蛋白质,对蛋白质之间微弱的、瞬间的作用也能够通过报告基因的表达产物敏感地检测到,它是一种具有很高灵敏度的研究蛋白质之间关系的技术^[4]。

本实验成功地通过 gateway 方法构建了在酵母细胞中表达的 PRAS40 质粒,并通过双杂交系统对 PRAS40 及 14-3-3 的作用关系进行了检测。检测的结果表明 PRAS40 和 14-3-3 的亚型 tau、beta、epsilon、zeta 可以结合,且与 epsilon 作用较强, beta 及 zeta 次之, tau 较弱。PRAS40 和 14-3-3 相互作用关系及作用位点的研究将会为进一步研究 PRAS40 在细胞生命活动中的功能奠定基础。

致谢 感谢美国 Emory 大学医学院药理学系傅海安教授提供 14-3-3 各亚型质粒及 Gavin Porter 博士在技术上的指导!

REFERENCES (参考文献)

[1] Fu H, Subramanian RR, Masters SC. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu Rev Pharmacol*. 2000 **40**: 617 - 647.

[2] Kristina KS, Park GY, Bea SK, et al. Identification of a proline-rich akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *J B C*, 2003, **12**: 10189 - 10194.

[3] Saito A, Narasimhan P, Hayashi T, et al. Neuroprotective role of a proline-rich akt substrate in apoptotic neuronal cell death after stroke: relationships with nerve growth factor. *Journal of Neuroscience*. 2004 **24**(7): 1584 - 1593.

[4] Huang B, Porter G. Expression of proline-rich Akt substrate PRAS40 in cell survival pathway and carcinogenesis. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2005, **26**(10): 1253 - 1258.

[5] Haar EV, Lee S, Brandhakavi S, et al. Insulin signaling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature Cell Biology Letters*, 2007, **9**(3): 316 - 323.

[6] Kjarland E, Keen TJ, Kleppe R. Does isoform diversity explain functional differences in the 14-3-3 protein family? Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2006 **7**(3): 217 - 223.

[7] Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work? - Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Letters*, 2002, **513**: 53 - 57.

[8] Liu B, Bienkowska J, Petosa C, et al. Crystal structure of the ζ isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, 1995 **376**: 191 - 194.

[9] Aitken A, Gamblin SJ. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signaling pathways. *Nature*, 1995 **376**: 188 - 191.

[10] Benzinger A, Popowicz GM, Joy JK, et al. The crystal structure of the non-liganded 14-3-3 σ protein: insights into determinants of isoform specific ligand binding and dimerization. *Cell Research*, 2005, **15**(4): 219 - 227.

[11] Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, et al. The structural basis for 14-3-3: phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 1997 **91**: 961 - 971.

[12] Zhang LX, Chen J, Fu H. Suppression of apoptosis signal-regulation Kinase1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(7): 8511 - 8515.

[13] Subramanian RR, Masters SC, Zhang H, et al. Functional conservation of 14-3-3 isoforms in inhibiting bad-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 2001 **271**(1): 142 - 151.

[14] Hui L (惠铃), Ji ZN (季朝能), Cai WQ (蔡文琴), et al. Identification of DAT1/LIM2-interacting proteins by yeast two-hybrid screening. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae (第三军医大学学报)*, 2005 **27**(5): 410 - 414.