

# 用酵母双杂交系统研究载脂蛋白 AI( apoAI) 和清道夫受体 BI( SR-BI) 间的相互作用\*

信学雷 陈志慧 李维琪\*\* 刘云英 麦迪娜 张云峰

(中国科学院新疆理化技术研究所 乌鲁木齐 830011)

**摘要** 目的:利用酵母双杂交系统验证在胆固醇逆转运过程中起关键作用的大鼠载脂蛋白 AI( apoAI) 和清道夫受体 BI( SR-BI) 间存在着相互作用,为初步筛选具有降脂活性组分提供 1 对新的靶点。方法:首先分别克隆了 Wistar 大鼠的 apoAI 和 SR-BI 基因的 cDNA,并构建了酵母表达载体,利用共转化技术观察到 apoAI 和 SR-BI 间存在着相互作用,并在酵母交配实验中证实了这个结果。结果:经共转化后的实验组与阳性对照组可在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal 平板上生长且菌斑呈蓝色,经测定  $\alpha$ 、 $\beta$ -半乳糖苷酶活力可知酶活分别为 8~12U 和 10~40U。酵母交配后的二倍体实验组、阳性对照组可在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal 平板上生长且菌斑呈蓝色。结论:apoAI 和 SR-BI 间的确存在相互作用。

**关键词** 酵母双杂交 载脂蛋白 AI 清道夫受体 BI 相互作用

流行病学研究表明,血清中的载脂蛋白 apoAI 是高密度脂蛋白的主要成分,具有抗动脉粥样硬化的性质,增加血清中 apoAI 的含量可降低动脉粥样硬化的风险<sup>[1]</sup>。近年研究表明,大鼠 B 族 I 型清道夫受体(scavenger receptors class B type I, SR-BI) 在参与胆固醇逆转运(reverse cholesterol transport, RCT)过程中起着关键性作用<sup>[2~11]</sup>。显然,在胆固醇逆转运中 HDL( apoAI) 与其受体 SR-BI 的相互作用应该是降脂药作用的重要靶点。酵母双杂交技术是近年来发展起来的研究蛋白质之间相互作用的方法,由于双杂交分析是在体内进行的,蛋白质构象与它们在自然状态下很相近,因此,它是一种可灵敏而精确地检测弱相关和瞬时相关蛋白质相互作用的方法。通过报告基因  $\alpha$ 、 $\beta$ -半乳糖苷酶活力的测定可以定量地比较相互作用力的强弱。在 MATCHMAKER 系统 3 中使用了酵母菌株 AH109,它使用 3 个置于 GAL4 上游激活序列和 TATA 盒控制的报告基因 ADE2/HIS3/ MEL1( LacZ) 以完全消除假阳性。由于这些启动子对 GAL4 产生强烈的特异性应答,因此,可消除那些直接与 GAL4 结合位点的侧翼序列相互作用的和那些与特异结合的

TATA 盒上的转录因子相互作用引起的假阳性。另外,MATCHMAKER 系统 3 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,故易于确认蛋白质的相互作用。

文中选用了占 HDL 的载脂蛋白中 65% 的 apoAI 及 SR-BI 基因的全长 cDNA,构建相应的酵母表达载体,利用酵母双杂交系统验证 apoAI 和 SR-BI 间的确存在相互作用,从而为将此系统应用于降血脂药物的筛选打下了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、酵母双杂交系统

MATCHMAKER 双杂交系统 3 试剂盒,包括 pGBKT7 质粒(内含 Trp 营养选择和 AP<sup>R</sup> 抗生素标记)、pGADT7 质粒(内含 Leu 营养选择和 Kan<sup>r</sup> 抗生素标记), pGADT7-SV40、pGBKT7-P53、pGADT7-Lam 质粒,酵母菌株 AH109 和 Y187 购自 Clontech 公司;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

### 1.2 工具酶和主要试剂

总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、PCR 试剂盒和 T4 DNA 连接试剂盒购自 Promega 公司,内切酶购自上海生工生物工程服务中心,YPD 培养基、

收稿日期:2004-07-22 修回日期:2005-02-02

\* 中国科学院“西部之光”资助项目

\*\* 通讯作者,电子信箱:weiqi1@hotmail.com

SD 培养基和 X- $\alpha$ -Gal 购自 Clontech 公司, PNP 和 ONPG 购自 Sigma 公司, 其余均为国产生化试剂。

### 1.3 目的基因的获得

根据 GenBank 中提供的 Wistar 大鼠的 apoAI、SR-BI 序列设计引物如下:

apoAI: P1(上游引物): 5'-atccgggagatgaaagctgcagtggttg-3'

P2(下游引物): 5'-atgtcgaccgggcgcctcdaagcgttc-3'

SR-BI: P3(上游引物): 5'-atatcgatatgggcgtcagctcgc-3'

P4(下游引物): 5'-acgagctctacagcttggttctt-3'

用总 RNA 提取试剂盒提取大鼠肝组织总 RNA, 再利用反转录试剂盒将其反转录为 cDNA。引物 P1、P2 和 P3、P4 中分别导入了 *Sma*I、*Sal*I 和 *Cla*I、*Sac*I 的酶切位点并加上相应的保护碱基, 向反转录产物中加入相应的引物进行 PCR 扩增得到 apoAI、SR-BI 的全长 cDNA, 扩增条件: 94℃ 变性 2min; 94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 90s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7min。产物 4℃ 保存。

大肠杆菌重组质粒的制备: 载体质粒提取、酶切后将 apoAI 及 SR-BI 基因的 cDNA 插入载体质粒, 选择阳性克隆及鉴定等按常规方法<sup>[12]</sup>进行, 得到重组质粒 pMD18-A 和 pMD18-S。

### 1.4 酵母重组质粒的构建

将质粒 pMD18-A、pGBKT7 及 pMD18-S、pGADT7 分别以 *Sma*I/*Sal*I 及 *Cla*I/*Sac*I 双酶切, 回收相应 apoAI、pGBKT7 及 SR-BI、pGADT7 片段, 用 T4 DNA 连接试剂盒连接后再用 *CaCl*<sub>2</sub> 转化法将它们分别转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 质粒的提取、纯化、酶切、克隆及鉴定等按常规方法进行。经限制性内切酶分析其中含有正确插入片段的克隆分别命名为 pGBKT7-apoAI 和 pGBADT7-SR-BI。

### 1.5 制备酵母感受态细胞、双质粒共转化酵母菌株

按文献[13]制备酵母感受态细胞并用 pGBKT7-apoAI 和 pGBADT7-SR-BI 共转化酵母菌株 AH109(实验组), pGBKT7-P53、pGBADT7-SV40 肿瘤病毒大 T 抗原基因和 pGBKT7-P53、pGBADT7-Lam 共转化酵母菌株 AH109 为分别作阳性和阴性对照, 将菌液涂布在相应的 SD(营养缺陷培养基)平板上, 30℃ 保温 3~7d, 观察转化株生长状况。

### 1.6 利用酵母交配证实 apoAI 和 SR-BI 2 种蛋白间存在相互作用

按文献[14]的方法用 pGBKT7-apoAI 和 pGBADT7-SR-BI 分别转化酵母菌株 AH109 和 Y187 进行交配实验得到二倍体实验组。以 pGBKT7-

P53、pGBADT7-SV40 肿瘤病毒大 T 抗原基因和 pGBKT7-P53、pGBADT7-Lam 分别转化酵母菌株 AH109 和 Y187 的交配实验为阳性和阴性对照, 交配后取菌液涂布在 SD/-Leu/-Trp 平板上, 30℃ 保温 3~5d, 待长出克隆后, 用无菌牙签接种在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal 平板上, 30℃ 保温 3~7d, 观察生长状况及颜色变化。

### 1.7 报告基因的检测

1.7.1 His 基因的检测 用无菌牙签随机挑取酵母菌单克隆分别划在 SD/-Leu、SD/-Trp、SD/-His 及 SD/-Ura 平板上, 于 30℃ 保温, 观察生长情况。

1.7.2 MelI 基因的检测 (1) 将实验组、阳、阴性对照组菌斑挑到 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal 的平板上, 检测报告基因 MelI 的表达, 30℃ 保温 3~5d, 观察生长状况及颜色变化。(2) 按文献[15]的方法以 PNP 为底物分别测定  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活力。

1.7.3 laz 基因的检测 按文献[16]的方法以 ONPG 为底物检测  $\beta$ -半乳糖苷酶的活力。

## 2 结果

### 2.1 apoAI、SR-BI 蛋白基因的扩增

采用优化逆转录方法对大鼠肝细胞总 RNA 进行逆转录, 然后在 50 $\mu$ l 反应体系中继续扩增反应。取 RT-PCR 扩增产物 10 $\mu$ l, 在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳。所见到 800bp 的带为 ApoAI 基因的扩增产物, 1.5kb 的带为 SR-BI 基因的扩增产物(图 1)。

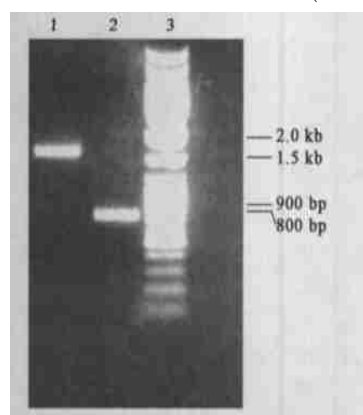


图1 apoAI、SR-BI 基因扩增图

1: SR-BI 基因 cDNA; 2: apoAI 基因 cDNA; 3: 100bp~10kb maker

Fig.1 Product of apoAI、SR-BI gene amplification by PCR

1: SR-BI gene cDNA; 2: apoAI gene cDNA; 3: 100bp~10kb maker

2.2 重组质粒 pMD18-A 和 pMD18-S 的酶切及序列分析

RT-PCR 扩增产物定向克隆到 pMD18-T 中, 得到重组质粒 pMD18-A 和 pMD18-S。再利用 *Sma*I/*Sal*I 和 *Cla*I/*Sac*I 双酶酶切质粒 pMD18-A 和 pMD18-S 进行酶切鉴定(图2), 鉴定后对 pMD18-A、pMD18-S 进行测序分析, 其结果与 GenBank 中提供的大鼠的 apoA1、SR-BI 序列相比较。序列分析表明, 扩增得到的 apoA1 基因与查到的基因完全一致, SR-BI 基因中有 1 个同义突变。



图2 pMD18-A 和 pMD18-S 的酶切鉴定  
1~ 3: *Cla*I/*Sac*I 双酶切 pMD18-S 重组质粒;  
4~ 5, 7~ 8: *Sma*I/*Sal*I 双酶切 pMD18-A 重组质粒;  
6: 100~ 3 000bp maker

Fig.2 Identification of recombinant pMD18-A and pMD18-S by enzyme digestion

1~ 3: Recombinant pMD18-S digested by *Cla*I/*Sac*I;  
4~ 5, 7~ 8: Recombinant pMD18-A digested by *Sma*I/*Sal*I;  
6: 100~ 3000bp maker

2.3 重组质粒 pGBADT7-SR-BI 和 pGBKBT7-apoA1 的酶切分析

重组质粒 pGBKBT7-apoA1 和 pGBADT7-SR-BI 的酶切鉴定结果如图3所示。

2.4 确认 ApoA1 和 SR-BI 2种蛋白间存在相互作用  
用共转化法证实, 实验组和阳性对照可在 SD/

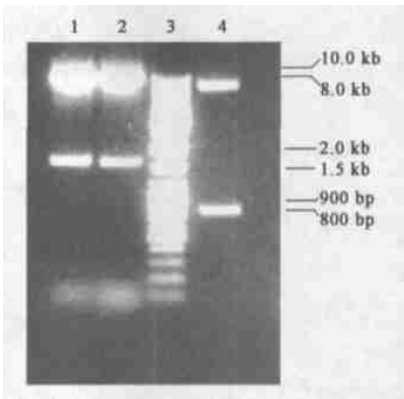


图3 重组质粒 pGBKBT7-apoA1、pGBADT7-SR-BI 的酶切鉴定图

1, 2: *Cla*I/*Sac*I 双酶切 pGBADT7-SR-BI; 3: 100bp~ 10kb maker;  
4: *Sma*I/*Sal*I 双酶切 pGBKBT7-apoA1

Fig.3 Recombinant pGBKBT7-apoA1、pGBADT7-SR-BI digested by different enzymes

1~ 2: Recombinant pGBADT7-SR-BI digested by *Cla*I/*Sac*I;  
3: 100bp~ 10kb maker; 4: Recombinant pGBKBT7-apoA1 digested by *Sma*I/*Sal*I

-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal 平板上生长; 阴性对照可在 SD/-Leu/-Trp 生长, 但不能在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal 平板上生长。

用交配法证实, 所有菌株先在 SD/-Leu/-Trp 平板上生长后, 转接到 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal 上, 二倍体实验组及阳性对照菌株可以生长。

报告基因表达的检测。(1) His 基因的检测: 将单纯 AH109、Y187 菌株和含有 pGBKBT7-apoA1 的 AH109 菌株 (03042801)、含 pGBADT7-SR-BI 的 Y187 菌株 (03042831)、共转化后的 AH109 菌株 (030613) 分别涂布在 SD/-Leu、SD/-Trp、SD/-Ura、SD/-His 平板上, 30℃ 培养 36h 后可见单纯的 AH109、Y187 菌株仅在 SD/-Ura 上生长, 而 03042801 可在 SD/-Ura、SD/-Trp 上生长, 03042831 菌株可在 SD/-Ura、SD/-Leu 上生长; 030613 菌株



图4 携带不同质粒的酵母菌在不同培养基上的生长状况

Fig.4 Growth of yeast strains with different plasmids on different mediums

在所有省缺培养基上生长,除 030613 菌株外所有菌株都不能在 SD/-His 上生长(图 4)。(2) MEL1 基因的检测:030613 菌株,阳性对照可以生长且菌斑呈现蓝色,阴性对照仅能在 SD/-Leu/-Trp 培养基上生长。以 PNP 为底物的液体分析法检测  $\alpha$ -半乳糖苷酶的活力可测得 030613 菌株酶活在 8~12U 之间。阳性对照为 15U 左右,阴性对照几乎测不到。(3) Laz 基因的检测:以 ONPG 为底物的液体分析法检测  $\beta$ -半乳糖苷酶的活力可测得 030613 菌株酶活在 10~40U 之间。阳性对照在 20~60U 之间,阴性对照在 1~2U。

### 3 讨论

实验首先通过 RT-PCR 获得了 Wistar 大鼠的 apoAI 和 SR-BI 基因,虽然清道夫受体 BI(SR-BI) 的测序结果中出现 1 个碱基与公布序列不同,但这是同义突变,不影响氨基酸组成。共转化实验时,将经过共转化的菌株涂布在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -Gal 上,如果 apoAI 和 SR-BI 2 种蛋白相互作用,则转化后的菌株可以生长,且菌斑变蓝,否则,菌斑将不会生长。在用营养缺陷型筛选确认后采用酵母交配实验进一步证实了这种相互作用的存在。

在实验中,之所以采用了 SR-BI 的完整蛋白来检测相互作用,是因为目前关于 SR-BI 与 HDL 相互作用的位点仍不明确,一般认为 SR-BI 是在细胞外与 HDL 产生相互作用的,但近来有报道, HDL 是通过内吞作用进入细胞后才与 SR-BI 产生相互作用<sup>[17]</sup>,所以采用完整蛋白应该可以确保相互作用的发生。

我们已经用这一系统对 5 种天然产物或药物进行了测试,其结果与动物试验或临床试验结果是一致的。

### 参考文献

- [1] Koji M, Yoshinaru W, Takaaki N. Effects of glucose and insulin on rat apolipoprotein A I gene expression. J Bio Chem, 1998, 273 (30): 18959~18965
- [2] Porsini G T, Pulcini J T, Sparrow A M, et al. High density lipoprotein interconversions in rat and man as assessed with a novel nontransferable apolipoprotein. J Biol Chem, 1993, 268: 3114~3119
- [3] Gao G, Garcia C K, Wyne K L, et al. Structure and localization of the human gene encoding SR-BI/CLA-1: evidence for transcriptional control by steroidogenic factor 1. J Biol Chem,

1997, 272:33068~33076

- [4] Trigatti K B, Rayburn H, Vinals M, et al. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 9322~9327
- [5] 刘晓辉,洪斌. 抗动脉粥样硬化的新靶位—高密度脂蛋白受体 SR-BI 国外医药(抗生素分册), 2003, 24(2): 70~73, 92  
Liu X H, Hong B. Foreign Medical Sciences (Antibiotics), 2003, 24(2): 70~73, 92
- [6] Temel R E, Walzen R L, Banka C L, et al. Apolipoprotein A-I is necessary for the *in vivo* formation of high density lipoprotein competent for scavenger receptor BF mediated cholesteryl ester selective uptake. J Biol Chem, 2002, 277(29): 26565~26572
- [7] Liu T, Krieger M, Kan H Y, et al. The effects of mutations in helices 4 and 6 of ApoA-I on scavenger receptor class B type I (SR-BI)-mediated cholesterol efflux suggest that formation of a productive complex between reconstituted high density lipoprotein and SR-BI is required for efficient lipid transport. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21576~21584
- [8] Greene D J, Skeggs J W, Morton R E. Elevated triglyceride content diminishes the capacity of high density lipoprotein to deliver cholesteryl esters via the scavenger receptor class B type I (SR-BI). J Biol Chem, 2001, 276(7): 4804~4811
- [9] Vials M, Xu S, Vasile E, et al. Identification of the N-linked glycosylation sites on the high density lipoprotein (HDL) receptor SR-BI and assessment of their effects on HDL binding and selective lipid uptake. J Biol Chem, 2003, 278(7): 5325~5332
- [10] Connelly M A, de la Llera-Moya M, Peng Y, et al. Separation of lipid transport functions by mutations in the extracellular domain of scavenger receptor class B type I. J Biol Chem, 2003, 278(28): 25773~25782
- [11] de Beer M C, Durbin D M, Cai L, et al. Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. Journal of Lipid Research, 2001, 42: 309~313
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002  
Sambrook J, Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [13] Gietz D, St Jean A, Woods R A, et al. Improved methods for high efficiency transformation of intact yeast cell. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 1425
- [14] Finley R L Jr, Brent R. Interaction mating reveals binary and ternary connections between *Drosophila* cell cycle regulators. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 12980~12984
- [15] Aho S, Arffman A, Pummi T, et al. A novel report gene MEL1 for yeast two-hybrid system. Anal Biochem, 1997, 25(3): 270~272
- [16] Estojak J, Brent R, Golemis E A. Correlation of two hybrid affinity data with *in vitro* measurement. Mol Cell Biol, 1995, (15): 5820~5829
- [17] Silver D L, Tall A R. The cellular biology of scavenger receptor class B type I. Curr Opin Lipidol, 2001, 12(5): 497~504

## Study on Interaction Between Apolipoprotein AI and Scavenger Receptors Class B Type I by Yeast Two Hybrid

XIN Xue-lei CHEN Zhi-hui LI Wei-qi LIU Yur-ying Maidina ZHANG Yur-feng

(The Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, The Chinese Academy of Sciences Urumqi 830011, China)

**Abstract** Objective: To verify the interaction between apolipoprotein AI and scavenger receptors class B type I (SR-BI), a key process of reverse cholesterol transport, by yeast two hybrid method and to provide a new target for selecting active substance for reducing lipid in plasma. Method: Apolipoprotein AI and SR-BI gene cDNA from Wistar rat were cloned, and DNA/ apoAI and AD/ SR-BI were constructed, then co-transformed into yeast strain AH109. Transformants were selected on medium of SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal and the putative positive clones were identified by yeast mating. Result: Transformants can grow on medium of SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal and the colonies are blue.  $\alpha$ ,  $\beta$  galactosidase assays show that the activity of  $\alpha$ ,  $\beta$  galactosidase are 8~12U and 10~40U respectively. After yeast mating, blue colonies can still be seen on medium of SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X- $\alpha$ -Gal. Conclusion: It is true that there is interaction between apolipoprotein AI and SR-BI.

**Key words** Yeast two-hybrid Apolipoprotein AI SR-BI Interaction

(上接第 74 页)

## Fusion of Alpha toxin Gene and Beta toxin Gene from *Clostridium perfringens* Type C

XU Chong-bo<sup>1</sup> XU Chong-li<sup>2</sup> LIU Qing-ping<sup>1</sup> ZHU Yong-ning<sup>1</sup> ZENG Jin<sup>2</sup> WANG Yur-jiong<sup>2</sup>

(1 College of Bioengineering, Dalian University Dalian 116622, China)

(2 College of Life Science, Ningxia University Yinchuan 750021, China)

**Abstract** Alpha toxin gene and beta toxin gene from chromosomal DNA of *Clostridium perfringens* type C were amplified by PCR, and PCR products were cleaved with restriction endonucleases and recovered. The recombinant plasmid pETXAB1 containing  $\alpha\beta_1$  fusion gene was constructed by recombinant technique and then transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). The  $\alpha\beta_1$  fusion protein was expressed in recombinant strain BL21(DE3) (pETXAB1), and the expression level of the  $\alpha\beta_1$  fusion protein was about 12.68% of total cellular protein by SDS-PAGE and three layer gel scanning analysis. More importantly, immunization in a mouse model with crude preparation containing the fusion protein inclusion bodies or inactivated recombinant strain induced protection against at least 1MLD of the toxin from *Clostridium perfringens* type C. Hence, the fusion protein has a good immunogenicity. The constructed recombinant strain BL21(DE3) (pETXAB1) could be used as a candidate of vaccine strain.

**Key words** *Clostridium perfringens* type C Alpha toxin gene Beta toxin gene Gene fusion