

BPHL 与 PML-C 间相互作用的胞内、外验证^{*}

初晨^{1,2}, 刘北忠^{1,2△}, 钟梁², 吴秀娟², 朱丹², 吴燕²

1. 重庆医科大学附属永川医院 中心实验室(永川 402160); 2. 重庆医科大学检验医学院
临床检验诊断学教育部重点实验室(重庆 400016)

【摘要】 目的 通过酵母双杂交实验及免疫共沉淀技术验证人联苯样水解酶(BPHL)与缺失核定位信号的人急性早幼粒细胞白血病(PML)基因的 coiled-coil 的结构域(PML-C)蛋白之间的相互作用。**方法** 将表达 PML-C 诱饵蛋白及 BPHL 靶蛋白的重组质粒 pGBKT7-PML-C 及 pACT2-BPHL 共转化 AH109 酵母菌,通过酵母双杂交实验验证两者在活细胞内的相互作用。构建能在人胚肾 293 细胞中表达带 HA 标签的 PML-C 融合蛋白的重组载体 pCMV-HA-PML-C,经酶切鉴定正确后,和表达带 myc 标签的 BPHL 融合蛋白的重组真核表达载体 pCMV-myc-BPHL,共转染人胚肾 293 细胞,利用免疫共沉淀技术验证 BPHL 与 PML-C 间的相互作用。**结果** pGBKT7-PML-C 及 pACT2-BPHL 质粒共转化 AH109 酵母菌后,可见蓝色阳性克隆。构建的重组表达载体 pCMV-HA-PML-C 及 pCMV-myc-BPHL 经双酶切鉴定正确后共转染 HEK293 细胞,抗 HA 多克隆抗体沉淀 HA-PML-C 相互作用蛋白复合物后,用抗 c-myc 单克隆抗体进行 Western blot 检测,可以检测到 myc-BPHL 的表达蛋白。**结论** 成功构建了 pCMV-HA-PML-C 及 pCMV-myc-BPHL 融合蛋白真核表达重组载体,利用酵母双杂交实验及免疫共沉淀技术证实 BPHL 与 PML-C 之间存在着相互作用。

【关键词】 人联苯样水解酶 早幼粒细胞白血病螺旋 coiled-coil 结构域 蛋白质相互作用 酵母双杂交 免疫共沉淀 载体构建

Identification of Interaction Between BPHL and PML-C CHU Chen^{1,2}, LIU Bei-zhong^{1,2△}, ZHONG Liang², WU Xiu-juan², ZHU Dan², WU Yan². 1. Central Laboratory of Yongchuan Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 402160, China; 2. Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics, Ministry of Education, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
△ Corresponding author, E-mail: liubeizhong@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the interaction between BPHL and PML-C by co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid system. **Methods** The recombination expression plasmids pGBKT7-PML-C and pACT2-BPHL were cotransformed into yeast AH109, to investigate their interaction *in vivo*. The expression vector of HA-tagged fusion protein (pCMV-HA-PML-C) and the expression vector of myc-tagged fusion protein (pCMV-myc-BPHL) were constructed and identified respectively, and cotransfected into human embryo kidney 293 (HEK293) cells, the interaction between PML-C and BPHL was investigated by co-immunoprecipitation *in vitro*. **Results** Blue clones were found in QDO/5-bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactoside (X- α -gal) plate, eukaryotic expression vectors named as pCMV-HA-PML-C and pCMV-myc-BPHL were constructed and confirmed with double restriction enzyme digestion and co-transfected into HEK 293 cells successfully. After immunoprecipitation of HA-PML-C with anti-HA polyclonal antibody, expressed myc-BPHL protein was identified by Western blot with anti-c-myc monoclonal antibody from immunoprecipitated complex. **Conclusion** The eukaryotic expression vector of pCMV-HA-PML-C and pCMV-myc-BPHL were constructed successfully. The interaction between PML-C and BPHL was identified by co-immunoprecipitation and yeast two-hybrid technique.

【Key words】 BPHL PML-C Protein-protein interaction Yeast two-hybrid system Co-immunoprecipitation Vector construction

95%以上急性早幼粒细胞白血病患者具有特征性的非随机染色体易位。该易位使 15 号染色体上的早幼粒细胞白血病(PML)基因与 17 号染色体上的维甲酸受体 α (RAR α)基因发生融合,表达 PML-RAR α 融合蛋白^[1],PML-RAR α 融合基因在急性早幼粒细胞白血病的发生发展中有重要作用。研究表明 PML-RAR α 在早期造血细胞的活性依赖于中性

粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)^[2], NE 可将 PML-RAR α 融合蛋白切割成 NLS-RAR α 和缺失核定位信号的 PML。缺失核定位信号的 PML 中包含了 PML 的螺旋 coiled-coil 结构域,命名为 PML-C,本课题组利用特异性引物扩增 PML-C,并成功构建酵母双杂交诱饵表达载体 pGBKT7-PML-C^[3]。在前期实验中我们利用酵母双杂交系统筛选出 43 个能与 PML-C 结构域相互作用的克隆;经进一步的归类与酵母回转试验得到 9 个阳性克隆^[4],人联苯样水解酶(BPHL)是其中的一个阳性克隆。为了探讨 BPHL 的功能以及 BPHL 与缺

^{*} 国家自然科学基金(No. 81171658)和重庆市自然科学基金计划重点项目(No. 20011BA5037)资助

△ 通讯作者, E-mail: liubeizhong@yahoo.com.cn

失核定位信号的PML全长相互作用机制,以更好的研究BPHL在急性早幼粒细胞白血病发生中的分子机制,我们分别构建了BPHL的融合蛋白Myc-BPHL和PML-C的融合蛋白HA-PML-C的表达载体pCMV-myc-BPHL和pCMV-HA-PML-C,共转染HEK293细胞后,利用免疫共沉淀验证BPHL与PML-C间是否存在相互作用。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种及试剂

诱饵质粒pGBKT7-PML-C及文库质粒pACT2-BPHL(本课题组保存)^[4]。pTD1-1(编码PACT2中AD/SV40大T抗原杂合蛋白)购自Clontech公司。真核表达载体pCMV-HA、pCMV-myc,大肠杆菌DH5 α 。人胚肾293细胞(本室冻存);限制性内切酶XhoI、SfiI、SalI、EcoRI, T4连接酶及DNA marker (TaKaRa公司);兔抗HA多克隆抗体、鼠抗c-myc单克隆抗体及蛋白G/蛋白A琼脂糖珠混悬液(Clontech公司);HRP标记的山羊抗鼠IgG(Millorpc公司);HRP标记山羊抗兔IgG(H+L)(北京鼎国生物科技有限公司);胎牛血清、DMEM培养基(TaKaRa公司);转染试剂LipofectamineTM 2000 (Invitrogen公司);通用蛋白裂解/抽提试剂、PCR产物纯化试剂盒(TaKaRa公司);PVDF膜(Millipore公司);化学发光试剂盒(Millipore公司);预染标准蛋白分子量(Fermentas公司);质粒小抽试剂盒(OMEGAR);胶回收试剂盒(上海华舜)。SD基础培养液、完全极限培养液、5-溴-4-氯-3-吡啶- α -D-半乳糖苷(X- α -gal, Clontech公司)。

1.2 方法

1.2.1 酵母双杂交实验 依据Clontech公司酵母双杂交操作手册,采用TE/LiAC方法制备酵母AH109感受态细胞,用聚乙二醇/醋酸锂(PEG/LiAC)法将pGBKT7-PML-C及pACT2-BPHL共转化至酵母感受态细胞AH109,铺于SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp营养缺陷平板(QDO),平板内加有X- α -gal,30℃培养4d,观察是否有蓝色的阳性克隆。同时,共转化pGBKT7-PML-C与pTD1-1,作为阴性对照。

1.2.2 重组质粒pCMV-HA-PML-C和pCMV-myc-BPHL的构建 构建pCMV-HA-PML-C重组质粒:根据诱饵质粒pGBKT7-PML-C和空载体pCMV-HA酶切位点,利用SalI和EcoRI进行双酶切,37℃,5h水浴后,对酶切产物进行8g/L琼

脂糖凝胶电泳,紫外灯下分别切割含目的片段PML-C和空载体PCMV-HA的凝胶,用胶回收试剂盒进行回收。T4DNA连接酶连接胶回收产物(14℃,16h),转化至DH5 α ,接种至含有氨苄青霉素的LB固体培养基37℃,过夜,挑取平板上的单菌落,扩增细菌,用质粒小抽试剂盒提取质粒,SalI和EcoRI进行双酶切,并用10g/L琼脂糖凝胶电泳酶切产物,酶切鉴定正确后进行测序分析。

构建pCMV-myc-BPHL重组质粒:用XhoI和SfiI对文库质粒pACT2-BPHL和空载体pCMV-myc进行双酶切,酶切产物BPHL亚克隆入pCMV-myc空载体,酶切鉴定正确后进行测序分析。

1.2.3 人胚肾293细胞转染 DMEM培养基常规培养人胚肾293细胞,将细胞传至6孔板,待细胞长至90%时,共转染pCMV-HA-PML-C和pCMV-myc-BPHL,以pCMV-HA-PML-C和pCMV-myc-BPHL分别转染为对照。转染步骤:①将6孔板培养基换成1mL无血清无双抗的DMEM培养基。②将24 μ g PCMV-HA-PML-C质粒和24 μ g PCMV-myc-BPHL质粒用50 μ L无抗生素无血清DMEM稀释并混匀后,室温孵育5min。③将48 μ L LipofetamineTM 2000用50 μ L无抗生素无血清DMEM稀释并混匀后,室温孵育5min。④将②液与③液混合成转染混合液,室温孵育20min,加入已经换用1mL无血清无抗生素DMEM培养的6孔板中,轻拍混匀,常规培养(37℃,CO₂)6h后,弃原培养基,换用1.5mL含10%小牛血清的无抗生素的DMEM培养基继续培养。同时另取两瓶长至90%的HEK293细胞,分别转染pCMV-HA-PML-C和pCMV-myc-BPHL重组质粒作为对照。

1.2.4 免疫共沉淀 细胞转染52h后,先用胰酶将细胞悬浮,收集细胞于1.5mL EP管中,离心,去除上清液,用预冷的PBS清洗细胞3次,离心,弃上清;冰上加入400 μ L通用蛋白裂解抽提试剂和4 μ L蛋白酶抑制剂,每间隔5min吹打几次,30min后,4℃12000 $\times$ g离心40min,收集上清液,加入2 μ g兔抗HA多克隆抗体,4℃振荡混合过夜;加入20 μ L蛋白G/蛋白A琼脂糖珠混悬液,4℃振荡混合6h,4℃12000 $\times$ g离心5min,弃上清,用通用蛋白裂解液洗涤2次;4℃12000 $\times$ g离心,取上清,加入20 μ L1 $\times$ 蛋白电泳缓冲液,100℃煮沸5min,待用。

1.2.5 免疫印记分析 120g/L SDS-PAGE分离胶7.5mL,50g/L浓缩胶3mL对样品进行电泳(80U,

30 min;100 U,2 h),半干转膜仪(15 V, 12 min)转至 PVDF 膜后,5%脱脂奶粉室温封闭 6 h,加入鼠抗 c-myc 单克隆抗体(1 : 1000 比例稀释),37 ℃ 孵育 2 h 后,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 检测一抗,37 ℃ 孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,加化学发光试剂(A 液 200 μL 与 B 液 200 μL 混匀),于成像仪中显影,摄像。

2 结果

2.1 酵母双杂交结果

pGBKT7-*PML-C* 及 pACT2-*BPHL* 共转化至酵母感受态细胞 AH109 后,在相应培养基上 30 ℃ 培养 4 d,可见蓝色的阳性克隆出现,而阴性对照未见克隆生长,表明 *BPHL* 与 *PML-C* 在酵母细胞内确实存在相互作用(图 1)。

2.2 重组质粒 pCMV-HA-*PML-C* 的酶切分析及测序鉴定

用 *Sal* I /*Eco*R I 对重组质粒进行双酶切,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳酶切产物可见 700 bp 处预期

大小片段(图 2)。测序结果显示扩增的基因片段与预期完全相符(图 3),说明载体构建成功。

2.3 重组质粒 pCMV-myc-*BPHL* 的酶切分析及测序鉴定

用 *Sfi* I /*Xho* I 进行双酶切,电泳酶切产物可见 950 bp 左右预计大小片段(图 4)。测序结果正确(图 5),表明载体构建成功。

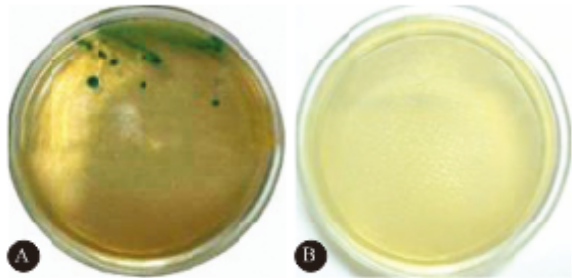


图 1 生长在 QDO 上的阳性克隆(A)与阴性对照(B)
Fig 1 Positive clone (A) and negative control (B) on SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-gal (QDO)

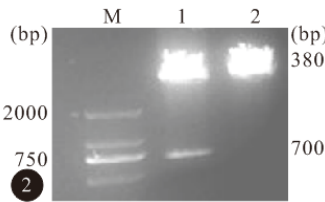


图 2 重组质粒 pCMV-HA-*PML-C* 的双酶切酶切产物琼脂糖电泳图
Fig 2 The agarose gel electropherogram of pCMV-HA-*PML-C* digested with *Sal* I + *Eco*R I

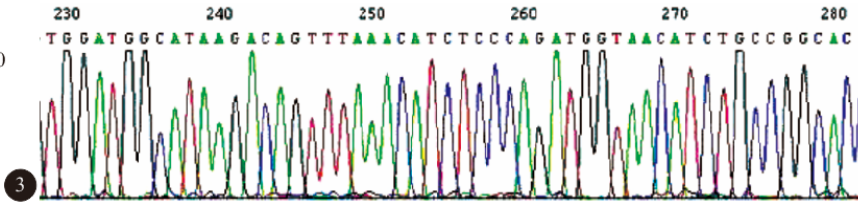


图 3 重组质粒 pCMV-HA-*PML-C* 的部分 DNA 测序图
Fig 3 Sequencing result of pCMV-HA-*PML-C* (part)

M: Marker; 1: Restriction enzyme analysis of pCMV-HA-*PML-C* (*Sal* I + *Eco*R I); 2: Restriction enzyme analysis of pCMV-HA (*Sal* I + *Eco*R I)

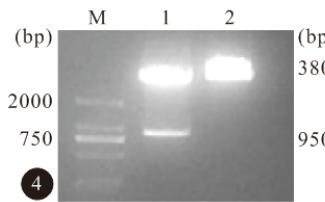


图 4 重组质粒 pCMV-myc-*BPHL* 的酶切产物琼脂糖电泳图
Fig 4 The agarose gel electropherogram of restriction enzyme analysis of recombination plasmids pCMV-myc-*BPHL*

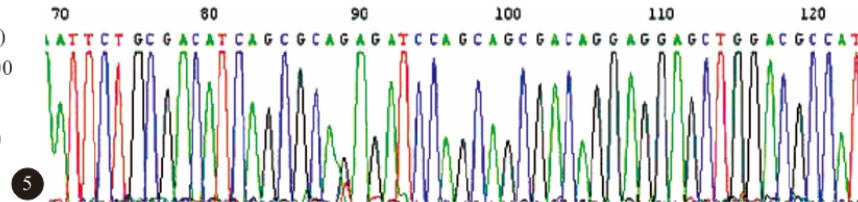


图 5 重组质粒 pCMV-myc-*BPHL* 的部分 DNA 测序图
Fig 5 Sequencing result of pCMV-myc-*BPHL* (part)

M: Marker; 1: Restriction enzyme analysis of pCMV-myc-*BPHL* (*Xho* I + *Sfi* I); 2: Restriction enzyme analysis of pCMV-myc (*Xho* I + *Sfi* I)

2.4 免疫共沉淀结果

共转染 pCMV-HA-*PML-C* 和 pCMV-myc-*BPHL* 及分别转染 pCMV-HA-*PML-C*、pCMV-myc-*BPHL* 的细胞培养 52 h 后提取蛋白,用抗 HA 标签抗体免疫沉淀后,用鼠抗 c-myc 单克隆抗体和

羊抗鼠抗体孵育,经蛋白免疫印记技术检测相对分子质量大约为 30×10^3 的 pCMV-myc-*BPHL* 表达融合蛋白,与预期大小一致;而单独转染 pCMV-HA-*PML-C* 或 pCMV-myc-*BPHL* 未检测到融合蛋白表达(图 6)。实验重复 3 次,结果一致,说明

PML-C 与 BPHL 间存在相互作用。

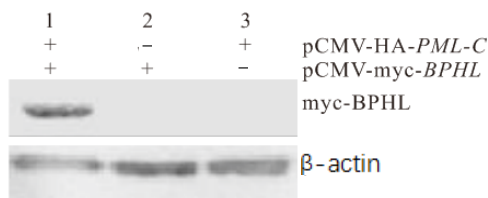


图 6 免疫共沉淀结果

Fig 6 Interaction between PML-C and BPHL via co-immunoprecipitation

3 讨论

PML-RAR α 融合基因对急性早幼粒细胞白血病的发病发展具有重要的作用,其产物 PML-RAR α 融合蛋白影响野生型 RAR α 和 PML 的结构和功能^[5,6],另外,它也能通过降低生长因子对正常血细胞生成的有效性,从而促进慢性髓细胞性白血病的克隆优势^[2]。在前期实验中我们利用酵母双杂交系统筛选出 43 个能与 PML-C 结构域相互作用的克隆;经进一步的归类与酵母回转试验得到 9 个阳性克隆^[4],本实验挑取其中的一个阳性克隆 BPHL,利用酵母双杂交实验及免疫共沉淀技术验证其与 PML-C 间存在相互作用。

BPHL 是人类的一种新的丝氨酸水解酶,相对分子质量大约为 30×10^3 ,与能够分解多氯联苯化合物的原核生物酶有一系列的相似性。其 mRNA 含有 8 个外显子和 7 个内含子,能编码人类联苯水解酶相关的蛋白,催化抗病毒药物伐昔洛韦和缬更昔洛韦的水解活化^[7,8]。Kim 等^[9]实验证明 BPHL 对氨基酸酯类前体药物的设计具有重要作用。BPHL 具有丝氨酸水解酶的特点,即具有特有的氨基酸酯结合方式,可以水解很多底物,其活性中心含有丝氨酸残基,属于丝氨酸依赖水解酶,是一种重要的 α 氨基酸酯水解酶^[10,11],可以断裂大分子蛋白质中大的肽键,使之成为小分子,在哺乳动物中扮演重要的角色,特别是在消化、凝血及补体系统方面。

另外,有研究发现 PML 基因能够编码生长和转化抑制因子,其过表达可以抑制肿瘤生长^[12,13]。急性早幼粒细胞白血病中的 PML 及 PML 核小体 (PML-NBs) 已经被破坏。PML-NBs 是一种多蛋白复合体,当受到病毒感染时,该核体的大小、形态和数量发生改变,而肿瘤抑制因子 p53 是细胞先天性免疫防御系统中的重要调节因子,其被募集到 PML-NBs 发挥特定功能^[14,15]。BPHL 作为一种新

发现的丝氨酸水解酶,催化抗病毒前体药物的水解活化,由此我们推断 BPHL 可能与 PML 相互作用,影响 PML 蛋白及 PML 核小体的功能,另一方面也可能影响肿瘤抑制因子 p53 的功能,抑制急性早幼粒细胞白血病细胞的凋亡。本实验经过进一步验证证明 BPHL 与 PML 的卷曲螺旋结构域 PML-C 间存在相互作用,为我们下一步研究 BPHL 与 PML 全长是否具有相互作用及 BPHL 在急性早幼粒细胞白血病的作用机制提供依据,为进一步研究急性早幼粒细胞白血病发病机制奠定基础。

参 考 文 献

- 1 De The H, Chomienne C, Lanotte M, *et al.* The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukemia fuses the retinoic acid receptor a gene to a novel transcriptional focus. *Nature*, 1990;347(6293):558-561.
- 2 Lane AA, Ley TJ. Neutrophil elastase is important for PML-retinoic acid receptor activities in early myeloid cells. *Mol Cell Biol*, 2005;25(1):23-33.
- 3 王 翀, 刘北忠, 金丹婷等. 早幼粒细胞白血病基因结构诱饵载体的构建及鉴定. *医学分子生物学杂志*, 2009;6(2):101-105.
- 4 朱 丹, 王 翀, 刘北忠等. 酵母双杂交技术筛选并回转变证在胞内与 PML-C 结构域相互作用的蛋白. *医学分子生物学杂志*, 2010;7(3):1672-8009.
- 5 Melnick A, Lich JD. Deconstructing a disease: RAR α its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 1999;93(10):3167-3215.
- 6 Pollock JL, Westervelt P, Walter MJ, *et al.* Mouse model of acute promyelocytic leukemia. *Curr Opin Hematol*, 2001;8(4):206-211.
- 7 Kim I, Sonq X, Viq BS, *et al.* A novel nucleoside prodrug-activating enzyme; subst- rate specificity of biphenyl hydrolase-like protein. *Mol Pharm*, 2004;1(2):117-122.
- 8 Puente XS, Pendás AM, López-otin C. Structural characterization and chromosomal localization of the gene encoding human biphenyl hydrolase-related protein (BPHL). *Genomics*, 1998;51(3):459-462.
- 9 Kim I, Chu XY, Kim S, *et al.* Identification of a human valacyclovi- rase biphenyl hydrolase-like protein as valacyclovir hydrolase. *J Biol Chem*, 2003;278(8):25348-25356.
- 10 Puente XS, Lopez-otin C. Cloning and expression analysis of a novel human serine hydrolase with sequence similarity to prokaryotic enzymes involved in the degradation of aromatic compounds. *J Biol Chem*, 1995;270(21):12926-12932.
- 11 Lai LS, Xu ZH, Zhou JH, *et al.* Molecular basis of prodrug activation by human valacyclovirase, an α -Amino acid ester hydrolase. *J Biol Chem*, 2008;283(3):9318-9327.
- 12 Salomoni P, Bellodi C. New insights into the cytoplasmic function of PML. *Histol Histopathol*, 2007;22(8):937-946.
- 13 He D, Mu ZM, Le X, *et al.* Adenovirus-mediate expression of PML suppresses growth and tumorigenicity of prostate cancer cells. *Cancer Res*, 1997;57(17):1868-1852.
- 14 Sarkari F, Wang X, Nguyen T, *et al.* The herpesvirus associated ubiquitin specific protease, USP7, is an egative regulator of PML proteins and PML nuclear bodies. *PLoS One*, 2011;6(1):16598-16603.
- 15 李向东, 沈 阳, 邱亚峰等. PML-NBs 参与干扰素介导的细胞先天性免疫抗病毒反应. *中国预防兽医学报*, 2009;31(6):107-122.