

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001960

基于酵母双杂交技术的 PRR11 相互作用蛋白筛选与初步分析

余淋丽, 张 莲, 张春冬, 卜友泉

(重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室、重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心, 重庆 400016)

【摘要】目的:采用酵母双杂交技术, 筛选 PRR11 的相互作用蛋白, 为深入研究其分子行为机制奠定基础。**方法:**构建用于酵母双杂交筛选的 PRR11 诱饵质粒并检测其自激活作用, 根据结果进一步构建突变体获得具有较低自激活作用的突变体。对人胎脑 cDNA 文库进行筛选, 获得初始阳性克隆。通过 LacZ 报告基因检测、回转变验证、阳性克隆测序及 BLAST 序列比对分析, 排除假阳性克隆和重复克隆, 确定 PRR11 的候选相互作用蛋白。**结果:**PRR11 具有自激活作用, 构建了一个较低自激活作用的 PRR11 突变体。通过酵母双杂交筛选, 获得 102 个初始阳性克隆转化子。经 LacZ 报告基因检测, 将阳性克隆锁定至 39 个。通过测序和序列比对分析, 证实这 39 个克隆属于编码 15 种不同蛋白的基因。最终有 RNF41 等 4 个蛋白通过回转变验证。**结论:**RNF41、SCG5、BCYRN1 和 PRR13 是 PRR11 的潜在相互作用蛋白。

【关键词】PRR11; 酵母双杂交; 蛋白相互作用**【中图分类号】**R734.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-12-04

Screening and preliminary analysis of PRR11 interacting proteins based on the yeast two-hybrid technique

Yu Linli, Zhang Lian, Zhang Chundong, Bu Youquan

(Teaching and Research Section of Biochemistry and Molecular Biology, Chongqing Medical University;
Molecular Lung Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To screen PRR11 interacting proteins by the yeast two-hybrid technique, and to provide a basis for further studies of its molecular mechanism of action. **Methods:** PRR11 bait plasmids were made for the yeast two-hybrid system and tested for auto-activation. Mutants were constructed to obtain lower auto-activation. The human fetal brain cDNA library was screened to obtain initial positive clones. The lacZ reporter gene assay, retransformation, positive clone sequencing, and BLAST sequence alignment analysis were used to rule out false positive and repeated clones and identify candidate PRR11 interacting proteins. **Results:** PRR11 showed auto-activation and a PRR11 mutant with lower auto-activation was constructed. The yeast two-hybrid screening resulted in 102 initial positive clones. The lacZ reporter gene assay further validated 39 positive clones. According to gene sequencing and sequence alignment analysis, the 39 clones were from genes encoding 15 different proteins. Finally, four candidate proteins including RNF41 were verified by retransformation. **Conclusion:** RNF41, SCG5, BCYRN1, and PRR13 are potential PRR11 interacting proteins.

【Key words】PRR11; yeast two-hybrid; protein-protein interaction

PRR11 (proline-rich protein11, PRR11) 是本题组自主发现的一个新的肿瘤相关基因^[1]。该基因定位于人类染色体 17q23, 其编码蛋白质由 360 个氨基酸残基组成。本课题组发现, PRR11 基因呈现

细胞周期依赖的规律性表达特征, 在细胞周期的 S 期后期、G2/M 期进程以及染色体凝集等过程中均具有重要调节作用^[1-2]。本课题组还发现, PRR11 在肺癌等多种恶性肿瘤中表达明显上调, 其表达水平也与肺癌的分级、分期呈显著正相关, 与肺癌患者预后呈显著负相关^[3]。PRR11 基因沉默后, 肺癌细胞的生长增殖、软琼脂克隆形成能力、迁移和侵袭能力, 在体裸鼠移植瘤的成瘤率、肿瘤生长速度和肿瘤大小均明显降低^[1,4]。国内外多个实验室的跟进研究也发现, PRR11 在胃癌、肝癌、胆管癌等多种恶性肿瘤中也具有重要作用^[5-7]。这些研究提示, PRR11

作者介绍: 余淋丽, Email: yuli4247@163.com,

研究方向: 分子肿瘤学。

通信作者: 卜友泉, Email: buyuqen@aliyun.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81672301); 重庆市基础科学与前沿技术研究重点资助项目 (编号: cstc2017jcyj BX0069)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190108.1011.006.html>
(2019-01-09)

在细胞周期进程和肺癌等恶性肿瘤的发生发展过程中均具有重要作用,是一个潜在的肺癌等恶性肿瘤的分子治疗靶点。

然而,关于 PRR11 在细胞周期进程和肺癌等恶性肿瘤发生发展中的具体分子行为机制,目前仍不清楚。鉴定 PRR11 的相互作用蛋白将有助于阐明上述问题。酵母双杂交技术是一种广泛应用的研究蛋白质与蛋白质相互作用的技术,在真核模式生物酵母中进行,能够敏感地检测蛋白质之间微弱的、瞬间的作用,具有灵敏度高、特点。该技术不仅适于单一的蛋白质与蛋白质之间的互作鉴定,也更适于对特定蛋白质的相互作用蛋白的高通量筛选^[8-9]。鉴于此,本研究采用酵母双杂交技术,对 PRR11 的相互作用蛋白进行了筛选和初步分析。

1 材料与方法

1.1 材料

酵母双杂交系统试剂盒 DUAL membrane starter kits 购自 Dualsystems Biotech 公司。酵母菌株 NMY32、诱饵质粒载体为 pBT3SUC 和 pBT3STE、猎物质粒载体 pPR3N、文库质粒 pPR3N-human fetal brain cDNA library 均购自 Dualsystems Biotech 公司。大肠杆菌 Top10 感受态、pcDNA3.0-PRR11 质粒为本实验室保存。胶回收试剂盒和细菌质粒抽提试剂盒购自 Axygen 公司。DNA 限制性内切酶 *Sfi* I 试剂盒购自 Fermentas 公司。酶连接试剂盒 DNA Ligation Kit 购买自 TOYOBO 公司。酵母小量抽提试剂盒购自索莱宝公司。

大肠杆菌 LB 培养基和酵母 YPDA 完全培养基参照常规分子克隆实验配制。用于酵母繁殖和筛选的合成缺陷型培养基即 SD 培养基包括亮氨酸合成缺陷型培养基 (SD-L)、色氨酸/亮氨酸合成缺陷型培养基 (SD-TL)、色氨酸/亮氨酸/组氨酸合成缺陷型培养基 (SD-TLH)、色氨酸/亮氨酸/组氨酸/腺嘌呤/合成缺陷型培养基 (SD-TLHA) 参照 DUAL membrane starter kit 使用说明配制。

1.2 方法

1.2.1 诱饵载体的构建和鉴定 以 pcDNA3.0-PRR11 质粒为模板利用 PCR 技术扩增 PRR11 全长基因,且在其 cDNA 序列的两端分别添加 *Sfi* I 酶切位点序列设计引物,引物序列如下:PRR11-F:5'-TTGGCCATTACGGCCATGCCCAAG-TTCAAACAAC-3';PRR11-R:5'-GGCCGAGCGGCCCG-TTTTGTTTCATCAAAGCTGC-3' (下划线部分为 *Sfi* I 酶切位点)。PCR 反应体系为 (50 μ L 体系):Template DNA 1 μ L、PRR11-F/R (10 μ mol/L) 各 1 μ L、5 $\times$ buffer 10 μ L、dNTP mixture (10 mmol/L) 1 μ L、FastPfu DNA Polymerase 1 μ L、ddH₂O Up to 50 μ L;PCR 反应条件为:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;98 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s、35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延

伸 5 min。*Sfi* I 酶切回收后的 PCR 产物,接着与诱饵载体 pBT3SUC 和 pBT3STE 酶切连接,转化大肠杆菌 Top10 感受态,转化挑选经过卡那霉素抗性筛选后的阳性克隆,抽提转化子质粒进行 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳鉴定,最后经 DNA 测序确认。同时采用 PCR 方法构建 4 个删除不同氨基酸残基位点的 PRR11 定点突变体 (Δ 145, Δ 149, Δ 150, Δ 145/ Δ 149/ Δ 150),同样克隆至诱饵载体 pBT3SUC 和 pBT3STE 上,方法同上。

1.2.2 PRR11 及其突变体自激活检测 将已构建好的诱饵载体转化感受态菌 NMY32 中,涂布于 SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA 3 种培养基上,酵母转化后培养 4 d,记录每块平板上的克隆数,并计算每个转化反应在缺陷平板上的转化子数量和生长率。

1.2.3 筛选文库用 3-AT 浓度确定 将质粒 pBT3SUC- Δ 145 和 pPR3N、pBT3SUC- Δ 145 和 pOST1-NubI 分别同时涂布于 SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA 和 SD-TLHA+5mM 3-氨基-1,2,4-三唑 (3-Amino 1,2,4-Triazole, 3-AT) 平板,观察共转化子的生长抑制情况。

1.2.4 酵母双杂交文库筛选 用较低自激活突变体 pBT3SUC-PRR11 Δ 145 诱饵质粒的 NMY32 酵母转化子作为受体菌制备感受态,将文库质粒 pPR3N-human fetal brain cDNA 转入其中,涂布于 SD-TLHA +5mmol/L 3-AT 平板上。30 $^{\circ}$ C 恒温培养 3~4 d,观察转化结果,记录转化效率,根据效率平板的转化子数量,计算筛库效率。为了消除背景生长菌落的干扰,在培养到第 3 天时,用绒布对筛库平板进行影印清除后,继续培养 4~7 d,挑取再次长出的转化子菌落进行下一步检测。

1.2.5 阳性克隆鉴定 从筛库平板中挑取直径大于 1.5 mm 的单菌落,共挑取了 102 个初始阳性克隆转化子转接到 SD-TL 缺陷型平板中继续培养 2~3 d。将 SD-TL 缺陷型平板上长出的 102 个初始阳性克隆转化子分别用无菌水稀释后点种至 SD-TL 和 SD-TLHA+10mM 3AT 缺陷平板,30 $^{\circ}$ C 恒温培养 3~4 d。用阳性克隆 His 和 Ade 报告基因检测对初始阳性克隆转化子进行筛选,然后对通过 His 和 Ade 报告基因检测的初始阳性克隆进一步进行 LacZ 报告基因检测和半定量 β -Galactosidase 检测。

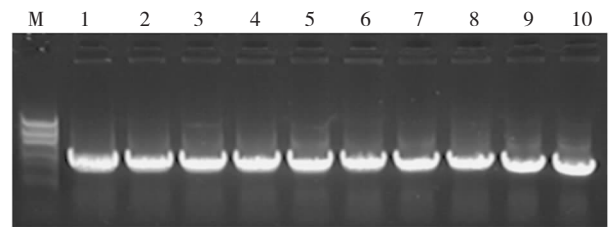
1.2.6 酵母阳性克隆 DNA 提取和测序比对 将以上通过鉴定的阳性克隆菌株分别接入 SD-TL 液体培养基,振荡培养过夜后采用酵母小量抽提试剂盒抽提酵母质粒。然后,将抽提得到的酵母质粒转化大肠杆菌 Top10 新鲜感受态进行扩增。在每个阳性克隆的转化平板上随机挑取 2~3 个 Top10 转化子 (编号依次为 a、b、c) 转接含有 Amp 的 LB 液体培养扩增后抽提质粒,对质粒进行 DNA 测序和 BLAST 比对。

1.2.7 阳性克隆回转验证 用含有正确 pBT3SUC-PRR11 Δ 145 诱饵质粒的 NMY32 酵母转化子作为受体菌制备感受态,将 DNA 测序后的阳性克隆 (除去重复的克隆和测序结构异常克隆) 分别转化其中,达到克隆质粒与诱饵克隆质粒共转于酵母中,通过 His、Ade 和 LacZ 报告基因的检测,对转化的酵母进行筛选。

2 结 果

2.1 诱饵载体的构建

以本实验室保存的 pcDNA3.0-PRR11 质粒为模板,采用 PCR 技术扩增 PRR11 的编码区,经 *Sfi* I 酶切,分别与 pBT3SUC 和 pBT3STE 进行酶切连接。转化大肠杆菌 TOP10 感受态,接种于带卡那抗性的液体 LB 培养基,摇菌抽提质粒,进行 PCR 扩增。结果如图 1 所示,各克隆扩增片段均符合预期大小。对上述阳性克隆分别进行测序验证。测序结果证明 pBT3SUC-PRR11 和 pBT3STE-PRR11 诱饵载体构建成功。



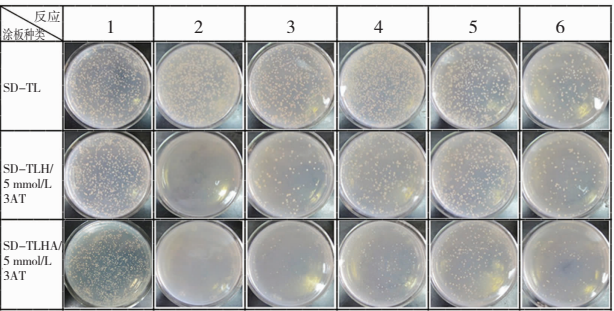
泳道 1~5 为 pBT3SUC- PRR11 转化子 PCR 产物;泳道 6~10 为 pBT3STE-PRR11 转化子 PCR 产物;M 为 DNA Marker; 由上至下依次为 3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp

图 1 诱饵载体 pBT3SUC- PRR11 和 pBT3STE- PRR11 菌落 PCR 结果

2.2 重组诱饵蛋白自激活检测和功能检测

将所构建好的质粒按照表 1 组合转入到膜酵母菌 NMY32 中,通过酵母双杂交系统进行自激活和功能检测。表 1 为酵母转化培养 4 d 后的每块板上的克隆数以及每个转化反应在缺陷平板上的转化子数量和生长率。如表 2、图 2 所示,反应 1 为阳性对照,因为 APP-bait 和 Fe65-prey 具有强相互作用,故可在 SD-TLH 和 SD-TLHA 筛选平板上生长旺

盛。反应 2 为阴性对照,在筛选平板上的生长率为 0。反应 5 和 6 为酵母双杂交系统的功能检测,其生长率为 58%~67%,表明诱饵蛋白在酵母菌中能正确表达并产生功能。反应 3 和 4 为检测诱饵蛋白 pBT3SUC-PRR11 和 pBT3STE-PRR11 的自激活作用,在 SD-TLH 和 SD-TLHA 筛选平板上,转化了 2 种诱饵蛋白的酵母菌分别具有一定的生长率,表明 PRR11 诱饵蛋白有自激活作用。因此,有必要构建突变体以消除 PRR11 的自激活作用。



1~6 分别表示按照表 1 给出的质粒组合进行转化酵母菌;上表示 1~6 质粒组合在 SD-TL 平板中的生长情况;中表示 1~6 质粒组合在 SD-TLH/5 mmol/L 3-AT 平板中的生长情况;下表示 1~6 质粒组合在 SD-TLHA/5 mmol/L 3-AT 平板中的生长情况

图 2 PRR11 诱饵载体的自激活检测

2.3 PRR11 突变体构建及自激活检测

根据 PRR11 氨基酸序列分析,分别构建了 4 个 PRR11 定点突变体 Δ 145、 Δ 149、 Δ 150、 Δ 145/ Δ 149/ Δ 150,PCR 扩增结果如图 3 所示。PCR 产物纯化回收后酶切和连接到诱饵载体 pBT3SUC 和 pBT3STE,转化大肠杆菌,菌落 PCR 鉴定结果如图 4 所示,测序证实序列突变成功。按照表 3 的质粒组合转化酵母菌受体 NMY32,每个转化反应涂板至 SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA 3 种缺陷平板。结果见表 3,pBT3SUC- Δ 145 在 SD-TLH 和 SD-TLHA 的筛选平板上的生长率为 39.78%

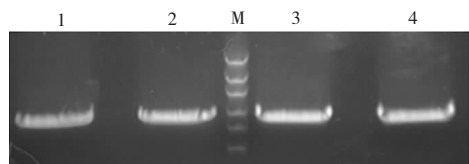
表 1 PRR11 自激活检测转化实验分组

反应	AD 质粒	BD 质粒	涂板种类	备注
1	pNubG-Fe65	pTSU2-APP	SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA	阳性对照
2	pPR3N	pTSU2-APP	SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA	阴性对照
3	pPR3N	pBT3SUC-PRR11	SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA	自激活检测
4	pPR3N	pBT3STE-PRR11	SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA	自激活检测
5	pOST1-NubI	pBT3SUC-PRR11	SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA	功能检测
6	pOST1-NubI	pBT3STE-PRR11	SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA	功能检测
7	----	pBT3SUC-PRR11	SD-L	筛库备用
8	----	pBT3STE-PRR11	SD-L	筛库备用

表 2 PRR11 自激活检测结果

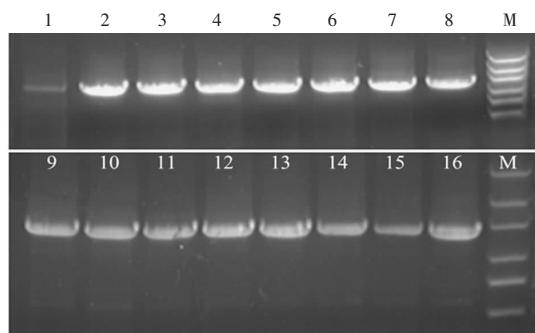
反应	1	2	3	4	5	6
SD-TL	896	760	768	1 600	720	280
SD-TLH	800	0	200	408	488	164
SD-TLH上的生长率(%)	89.29	0.00	26.04	25.50	67.78	58.57
SD-TLHA	712	0	137	360	448	140
SD-TLHA上的生长率(%)	79.46	0.00	17.84	22.50	62.22	50.00
备注	阳性对照	阴性对照	有自激活	有自激活	有功能	有功能

和 5.847%, 具有最低的自激活效应, 因此对这一诱饵克隆进行 3AT 浓度优化后用于文库筛选。表 3 中的反应 1 和 2 进一步涂板后的生长率如图 5 和表 4 所示, 在浓度 5 mmol/L 的 3AT 基础上, pBT3SUC- $\Delta 145$ 与 pPR3N 共转化子的生长可被完全抑制, 因此采用 5 mmol/L 的 3AT 作为筛库浓度。



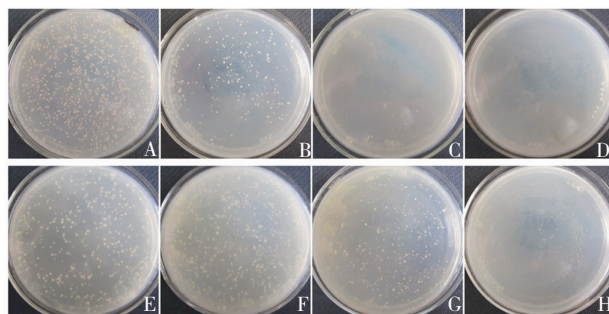
泳道 1~4 为 PRR11 突变体 $\Delta 145$, $\Delta 149$, $\Delta 150$, $\Delta 145/\Delta 149/\Delta 150$ 片段 PCR 产物; M 为 DNA Marker; 由上至下依次为 3 kb、2 kb、1.5 kb、1 kb、750 bp、500 bp

图 3 PRR11 突变体 PCR 扩增结果



泳道 1~2 为 pBT3SUC- $\Delta 145$, 泳道 3~4 为 pBT3SUC- $\Delta 149$, 泳道 5~6 为 pBT3SUC- $\Delta 150$, 泳道 7~8 为 pBT3SUC- $\Delta 145/\Delta 149/\Delta 150$, 泳道 9~10 为 pBT3STE- $\Delta 145$, 泳道 11~12 为 pBT3STE- $\Delta 149$, 泳道 13~14 为 pBT3STE- $\Delta 150$, 泳道 15~16 为 pBT3STE- $\Delta 145/\Delta 149/\Delta 150$ 的菌落 PCR 结果

图 4 PRR11 突变体菌落 PCR 结果



A-D 为 pBT3SUC- $\Delta 145$ 与 pPR3N 共转化子涂板至 SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA 和 SD-TLHA+5 mmol/L 3AT 平板的生长情况; E-H 为 pBT3SUC- $\Delta 145$ 与 pOST1-NubI 共转化子涂板至 SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA 和 SD-TLHA+5 mmol/L 3AT 平板的生长情况

图 5 3-AT 浓度优化

2.4 文库筛选和阳性克隆鉴定

将文库质粒 pPR3N-human fetal brain cDNA 转入到含有 pBT3SUC-PRR11 $\Delta 145$ 诱饵质粒的 NMY32 酵母感受态中, 涂布于 SD-TLHA+5 mmol/L 3-AT 平板。经过影印清除后, 共获取 102 个初始阳性克隆转化子。进一步用无菌水稀释后点种至 SD-TL 和 SD-TLHA+10 mmol/L 3AT 缺陷平板。结果如图 6 所示, 有 42 个初始阳性克隆能通过检测, 能在 SD-TLHA 平板上能生长, 编号为 1、4、7、8、15、16、17、19、20、22、26、33、37、40、41、47、49、56、58、59、61、65、69、70、75、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、89、90、91、92、94、96。

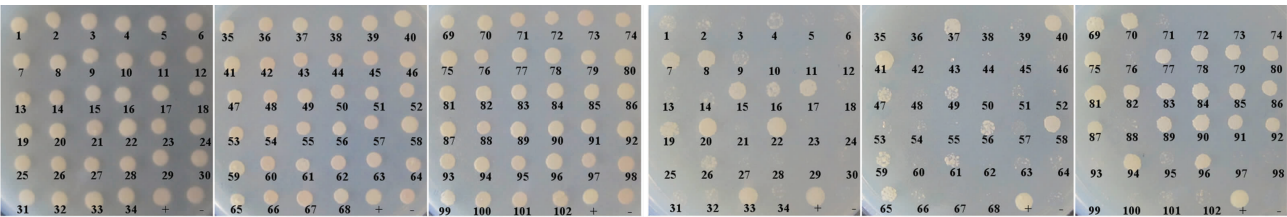
进一步对上述 42 个初始阳性克隆进行 LacZ 报告基因检测。通过 β -半乳糖苷酶活性分析, 仅有 3 个初始阳性克隆 (编号为: 1、20、49) 未能通过检测 (图 7)。由此, 共计筛选到阳性克隆 39 个。

表 3 各突变体在筛选平板上的生长数目及比率

反应编号	质粒 1	质粒 2	SD-TL 生长数目	SD-TLH 生长数目 / 比例 (n/%)	SD-TLHA 生长数目 / 比例 (n/%)
1	pBT3SUC- $\Delta 145$	pPR3N	1 488	592/39.78	87/5.85
2	pBT3SUC- $\Delta 145$	pOST1-NubI	320	194/60.63	344/107.5
3	pBT3STE- $\Delta 145$	pPR3N	1 184	232/19.59	126/10.64
4	pBT3STE- $\Delta 145$	pOST1-NubI	896	544/60.71	348/38.84
5	pBT3SUC- $\Delta 149$	pPR3N	616	228/37.01	112/18.18
6	pBT3SUC- $\Delta 149$	pOST1-NubI	384	428/111.50	344/89.58
7	pBT3STE- $\Delta 149$	pPR3N	400	102/25.50	83/20.75
8	pBT3STE- $\Delta 149$	pOST1-NubI	664	420/63.25	480/72.29
9	pBT3SUC- $\Delta 150$	pPR3N	272	108/39.71	82/30.14
10	pBT3SUC- $\Delta 150$	pOST1-NubI	284	230/80.99	388/136.6
11	pBT3STE- $\Delta 150$	pPR3N	984	169/17.17	220/22.36
12	pBT3STE- $\Delta 150$	pOST1-NubI	446	270/60.54	208/46.64
13	pBT3SUC- $\Delta 145/\Delta 149/\Delta 150$	pPR3N	968	162/16.74	148/15.29
14	pBT3SUC- $\Delta 145/\Delta 149/\Delta 150$	pOST1-NubI	528	370/70.08	448/84.85
15	pBT3STE- $\Delta 145/\Delta 149/\Delta 150$	pPR3N	1 336	448/33.53	165/12.35
16	pBT3STE- $\Delta 145/\Delta 149/\Delta 150$	pOST1-NubI	374	378/101.10	215/57.49
17	pTSU2-APP	pNubG-Fe65	608	648/106.6	469/77.14
18	pTSU2-APP	pPR3N	424	0/0.00	0/0.00

表 4 pBT3SUC-Δ145 突变体在筛选平板上的生长数目及比率

质粒 1	质粒 2	SD-TL 生长数目	SD-TLH 生长数目 / 比例 (n/%)	SD-TLHA 生长数目 / 比例 (n/%)	SD-TLHA+5 mmol/L 3AT 生长数目 / 比例 (n/%)
pBT3SUC-Δ145	pPR3N	1 120	288/25.71	52/4.64	0/0.00
pBT3SUC-Δ145	pOST1-NubI	456	560/122.80	464/101.80	121/26.54

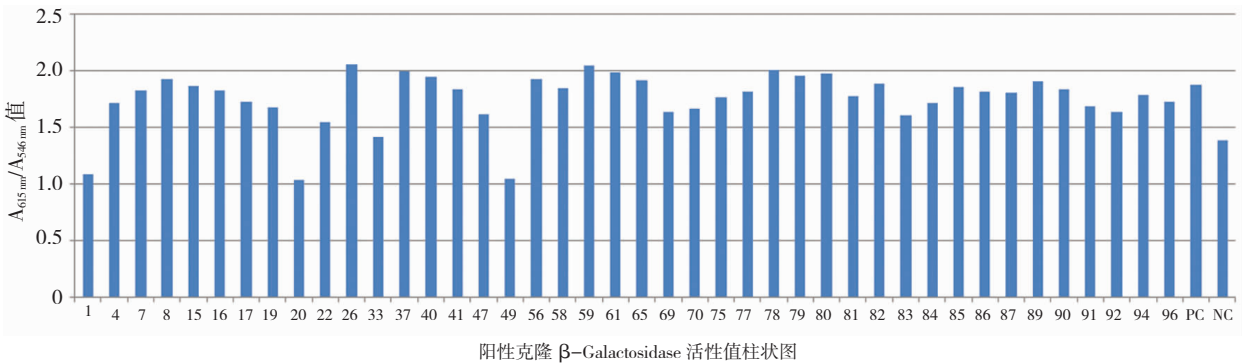


A. 102 个初始阳性克隆在 SD-TL 缺陷平板的生长情况

B. SD-TLHA+10 mmol/L 3AT 缺陷平板的生长情况

标注“+”为阳性对照,标注“-”为阴性对照

图 6 102 个初始阳性克隆在缺陷平板上的生长情况



注:前 42 个柱状图表示 42 个阳性克隆的 β-半乳糖苷酶活性;PC:阳性对照的 β-半乳糖苷酶活性;NC:阴性对照的 β-半乳糖苷酶活性

图 7 阳性克隆 β-半乳糖苷酶活性值柱状图

抽提阳性克隆质粒并转化大肠杆菌 TOP10 感受态,在含卡那抗性的 LB 培养基中扩增后提质粒并进 DNA 测序 BLAST 比对。根据测序和比对结果,除去重复的克隆和测序结构异常克隆,获得阳性克隆 15 个,也就是说前述的 39 个克隆实际上属于编码 15 种不同蛋白的基因。

最后把这 15 种蛋白的编码克隆质粒与诱饵克隆质粒共转化酵母进行回转验证(表 5),最终确定有 4 种蛋白的编码克隆能通过回转验证,这 4 个蛋白分别为 RNF41、SCG5、BCYRN1 和 PRR13。

3 讨论

众所周知,作为一种生物大分子,特定蛋白质可以通过与其他蛋白质或 DNA/RNA 等分子之间相互作用而行使其功能,参与各种生物学过程。PRR11 是本课题组前期鉴定发现的一个新的肿瘤相关基因^[1]。本课题组及其他实验室的多项研究业已证实,PRR11 在细胞周期进程和肺癌等恶性肿瘤的发生发展过程中均具有重要作用^[1-3]。通过对 PRR11 蛋

表 5 回转实验验证阳性克隆通过报告基因的检测的情况

阳性克隆编号	编码蛋白	是否通过 ADE2、HIS3 检测	是否通过 LacZ 检测
4-a	RNF41	√	√ (1.641)
26-a	SCG5	√	√ (1.362)
41-a	PTPRZ	×	√ (1.559)
75-a	RNU2	×	√ (1.331)
78-a	BCYRN1	√	√ (1.547)
79-a	PRR13	√	√ (1.700)
84-a	RPS21	×	√ (1.528)
85-a	SF3B5	×	√ (1.446)
86-a	CDKL5	×	√ (1.400)
86-b	FAM218A	×	√ (1.522)
87-a	CLPTM1	×	√ (1.481)
89-a	ERP44	×	√ (1.473)
90-a	RND3	×	√ (1.445)
94-a	WHSC1	×	√ (1.458)
96-a	WXD691	×	√ (1.462)
阳性对照		√	√ (1.558)
阴性对照		×	×

白的结构域进行深度分析发现,PRR11 含有 2 个典型的介导蛋白质相互作用的富含脯氨酸区,且该蛋白又主要定位于细胞质,这就强烈提示 PRR11 可在

细胞质内通过其富含脯氨酸区与其他蛋白质发生相互作用进而调节相应信号转导通路而发挥其功能^[1,10-11]。因此,在本研究中通过酵母双杂交技术对 PRR11 的潜在相互作用蛋白进行筛选和初步分析。

通过酵母双杂交技术,以 PRR11 为诱饵蛋白,对人胎脑 cDNA 文库进行筛选,初步筛选获得 102 个初始阳性克隆转化子。通过一系列的 LacZ 报告基因检测、回转变证、阳性克隆测序及 BLAST 序列比对分析,排除假阳性克隆和重复克隆,最终初步确定 RNF41、SCG5、BCYRN1 和 PRR13 是 PRR11 的潜在相互作用蛋白。

RNF41 即环指蛋白 41 (ring finger protein 41, RNF41),也称 NRDP1 (neuregulin receptor degradation protein 1),是一个非常重要的蛋白,具有抑制细胞增殖、促进细胞凋亡和抑制炎症反应等多种功能,参与乳腺癌、胶质瘤等恶性肿瘤以及其他多种神经系统和造血系统等疾病的发生发展^[12-16]。SCG5 (secretogranin V) 蛋白属于一种分泌型的分子伴侣类蛋白,目前已有研究发现其在神经退行性疾病、代谢性疾病及胶质瘤等恶性肿瘤中具有重要作用^[17]。PRR13 (proline-rich 13) 也称 TXR,与 PRR11 一样,也有富含脯氨酸区,目前关于该基因的报道较少,初步提示其参与调节多种癌细胞对化疗药物的敏感性^[18]。有趣的是,BCYRN1 (brain cytoplasmic RNA 1) 属于长链非编码 RNA (lncRNAs),已有初步报道显示其在神经退行性疾病和多种恶性肿瘤中具有重要作用^[19]。

需要指出的是,本研究的结果是一个初步的高通量筛选和初步鉴定,PRR11 与 RNF41 等 4 个蛋白之间的潜在相互作用及其生物学意义仍需进一步的系统研究和细致分析,本课题组实验室目前正在进行该工作。

参 考 文 献

- [1] Ji Y, Xie M, Lan H, et al. PRR11 is a novel gene implicated in cell cycle progression and lung cancer[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(3):645-656.
- [2] Zhang C, Zhang Y, Li Y, et al. PRR11 regulates late-S to G2/M phase progression and induces premature chromatin condensation (PCC)[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 458(3):501-508.
- [3] Wang Y, Zhang Y, Zhang C, et al. The gene pair PRR11 and SKA2 shares a NF-Y-regulated bidirectional promoter and contributes to lung cancer development[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(9):1133-1144.
- [4] Zhang L, Lei Y, Zhang Y, et al. Silencing of PRR11 suppresses cell proliferation and induces autophagy in NSCLC cells[J]. *Genes & Diseases*, 2017, 5(2):158-166.
- [5] Qiao W, Wang HY, Zhang XZ, et al. Proline-rich protein 11 silencing inhibits hepatocellular carcinoma growth and epithelial-mesenchymal transition through β -catenin signaling[J]. *Gene*, 2019, 681(10):7-14.
- [6] Ying C, Zhanshan C, Wenzheng F, et al. The prognostic potential and oncogenic effects of PRR11 expression in hilar cholangiocarcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(24):20419-20433.
- [7] Song Z, Liu W, Xiao Y, et al. PRR11 is a prognostic marker and potential oncogene in patients with gastric cancer[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0128943.
- [8] Valkonen J. Protein-protein interactions: the yeast two-hybrid system[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2008, 451(451):421.
- [9] Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, et al. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1991, 88(21):9578-9582.
- [10] Ball LJ, Kuehne R, Schneider-Mergener J, et al. Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, 44(19):2852-2869.
- [11] Kay BK, Williamson MP, Sudol M. The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains[J]. *Faseb*, 2000, 14(2):231-241.
- [12] Yen L, Cao Z, Wu X, et al. Loss of Nrdp1 Enhances ErbB2/ErbB3-dependent breast tumor cell growth[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(23):11279-11286.
- [13] Zhang Y, Zeng Y, Wang M, et al. Cardiac-specific overexpression of E3 ligase Nrdp1 increases ischemia and reperfusion-induced cardiac injury[J]. *Basic Research in Cardiology*, 2011, 106(3):371-383.
- [14] Wang C, Chen T, Zhang J, et al. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(7):744-752.
- [15] Wauman J, De Ceuninck L, Vanderroost N, et al. RNF41 (Nrdp1) controls type I cytokine receptor degradation and ectodomain shedding[J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 6):921-932.
- [16] Shi H, Du J, Wang L, et al. Lower expression of Nrdp1 in human glioma contributes tumor progression by reducing apoptosis[J]. *IUBMB Life*, 2014, 66(10):704-710.
- [17] Waha A, Felsberg J, Hartmann W, et al. Frequent epigenetic inactivation of the chaperone SCNE1/7B2 in human gliomas[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(3):612-622.
- [18] Lih CJ, Wei W, Cohen SN. Txl1: a transcriptional regulator of thrombospondin-1 that modulates cellular sensitivity to taxanes[J]. *Genes Dev*, 2006, 20(15):2082-2095.
- [19] Samson J, Cronin S, Dean K. BC200 (BCYRN1) — the shortest, long, non-coding RNA associated with cancer[J]. *Noncoding RNA Res*, 2018, 22(3):131-143.

(责任编辑:唐秋姗)