

筛选和鉴定抗卵巢癌活性六肽的靶点蛋白

李小勤,唐宜桂,刘琛,雷婷,秦宜德

摘要 目的 采用 pull-down 技术筛选乳源抗癌六肽 (PG-PIP_N) 在人卵巢癌细胞株 (SKOV3) 上的靶点蛋白 (受体) 并进行鉴定。方法 以 PGPIP_N 的序列为参照,设计出 PG-PIP_N 基因,以 BamH I/Xho I 为酶切位点,将 PGPIP_N 基因构建到表达质粒载体 pGEX-4T-1 中,转化到 *E. coli* BL21 中,用诱导剂异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 低温诱导表达的谷胱甘肽 S 转移酶 (GST) 标签融合蛋白作为诱饵蛋白;从 SKOV3 中提取的总蛋白作为捕获蛋白,运用 GST pull-down 技术,筛选出靶点蛋白质,运用 SDS-PAGE 电泳进行初步鉴定,并用异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的 PGPIP_N 孵育鉴定。结果 SDS-PAGE 电泳中有两条条带,一条为诱饵蛋白,一条为目的条带,在免疫荧光显微镜下观察到荧光 PG-PIP_N 结合到该条带上。结论 筛选和鉴定了 PGPIP_N 作用于卵巢癌细胞上的靶蛋白,为研究其抗癌的作用机制及其信号转导通路奠定了基础。

关键词 乳源抗癌六肽; GST pull-down; 诱饵蛋白; 捕获蛋白; 靶点蛋白

中图分类号 R 392.11; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-0879-04

乳源抗癌六肽 (Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn, PG-PIP_N) 是来源于牛酪蛋白酶解的产物, β -酪蛋白的 63~68 段残基。因其具有免疫活性,最早被称为乳源免疫调节肽^[1-3]。研究^[4-6]表明 PGPIP_N 具有抗癌功能,尤其是抗妇科癌症,例如乳腺癌等,且其具有抑制卵巢癌原代细胞和卵巢癌细胞株 (SKOV3) 细胞生长和增殖,诱导卵巢癌细胞发生凋亡,显示了很好的抗癌前景和开发潜能。研究 PGPIP_N 抗卵巢癌的作用机制及其信号途径显得非常的重要和迫切,要研究其作用机制和信号途径,首要的是靶点的筛选和鉴定。该研究通过 pull-down 技术^[7] 筛选 PG-PIP_N 作用于 SKOV3 的靶点蛋白,以期为进一步研究 PGPIP_N 的抗肿瘤功能机制奠定基础,同时为临床新药的开发提供新的方向和途径。

2014-02-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 30872992)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 李小勤,女,硕士研究生;

秦宜德,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: qinyide@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 细胞株和菌株 SKOV3、大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和 *E. coli* BL21、质粒 pGEX-4T-1 均由安徽医科大学生物化学实验室保存。

1.1.2 试剂 胎牛血清购于杭州四季青公司; RPMI 1640 培养粉购于美国 Gibco 公司; 快速银染试剂盒 (BSP029S-N)、细菌活性化蛋白制备裂解液、质粒提取试剂盒、一步法感受态制备溶液 SSCS 均购于上海生工生物工程有限公司; PGPIP_N 基因由上海生工生物工程有限公司合成; 限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 购于加拿大 Fermentas 公司; pull-down 试剂盒购于美国 Thermo 公司; PGPIP_N 和荧光标记的 PGPIP_N 均由上海楚肽生物科技有限公司合成,纯度 >98%; 电喷雾质谱 (ESI-MS) 分析鉴定在中国科学技术大学实验室完成。

1.2 实验方法

1.2.1 pGEX-4T-1-PGPIP_N 载体的构建及鉴定 参照 GenBank 所报道的编码序列,在基因两端分别加上 BamH I 和 Xho I 酶切位点、终止密码子及保护碱基,设计出 PGPIP_N 的基因序列如下: GCGGATC-CCCTGGGCCGATCCCTAACTAGCTCGAGCGG, 其中下划线分别为 BamH I 和 Xho I 酶切位点。将 PG-PIP_N 基因和质粒 pGEX-4T-1 分别双酶切后连接转化到 *E. coli* DH5 α 中,铺于 LB/氨苄青霉素 (Ampr) 板上,挑选阳性克隆,提取质粒并酶切测序鉴定。

1.2.2 诱饵蛋白的诱导表达及其产物的 SDS-PAGE 鉴定 将经测序正确的重组 pGEX-4T-1-PG-PIP_N 质粒转化到用于表达的 BL21 菌株感受态中,铺于 LB/Ampr 板上,37 °C 过夜培养。挑选单克隆接种到 10 ml 含 100 mg/L Ampr 的 LB 培养液中,培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.6 时,在菌液中加入终浓度为 0.5 mmol/L 的异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 在 37 °C、220 r/min 震荡条件下诱导表达 4 h,以 10 000 r/min 4 °C 离心 5 min,弃上清液,沉淀用 TBS 洗 3 次,用细菌活性化蛋白制备裂解液试剂盒裂解细菌,离心后收集上清液。同时进行未诱导重组菌和表达载体 BL-21 的培养,收集裂解液。将

以上述 3 种细菌上清液进行 SDS-PAGE 电泳并用考马斯亮蓝过夜染色。

1.2.3 诱饵蛋白的制备 取 10 ml 培养 5 h 的 pGEX-4T1-PGPIPn 菌液接种于已加过 100 mg/L Ampr 的 250 ml LB 培养基中,培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.6 在菌液中加入诱导剂 IPTG,使其终浓度为 0.5 mmol/L^[8],在 37 °C、220 r/min 震荡条件下诱导表达 4 h,10 000 r/min 4 °C 离心 5 min,弃上清液,用 TBS 洗涤 3 次,称量菌体重量,按 1:10(m/V)重悬于 TBS 中,用细菌活化蛋白制备裂解液试剂盒裂解细菌,离心后收集上清液即诱饵蛋白,保存在 -20 °C 备用。

1.2.4 猎物蛋白制备 培养 SKOV3,培养条件为含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液,培养于 5% CO₂、37 °C、饱和湿度细胞培养箱中。当细胞密度为 80%~90% 时用 0.1% 胰酶(含 0.1 mol/L EDTA)消化,1 000 r/min 离心 5 min,弃去培养液,加 1 ml TBS 混匀,再 1 000 r/min 离心 5 min,丢弃洗涤上清液,以每克湿重细胞加入 2.5 ml 的细胞裂解液,同时按照 1:100 的比例加入 PMSF,混匀后在冰上孵育 30 min,并周期性地摇晃。在 12 000 r/min 离心 5 min,倒出上清液至一新的 EP 管中,-20 °C 保存备用。

1.2.5 捕获目的蛋白及鉴定 谷胱甘肽-琼脂糖树脂处理后,将细菌上清液与适量 50% 谷胱甘肽-琼脂糖树脂匀浆混合,4 °C 轻摇过夜让其充分结合。4 °C、1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清液,沉淀用 TBS 洗 3 次,留取 10 μl 样品作为结合到谷胱甘肽-琼脂糖树脂上的 GST 标签融合蛋白即纯化的 GST 标签融合蛋白,将 SKOV3 细胞裂解液作为猎物蛋白加入到已结合了 GST 标签的融合蛋白的谷胱甘肽-琼脂糖树脂悬液中,在 4 °C 翻转混合孵育 2 h,4 °C、13 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,沉淀用冰冷的 TBS 洗涤,4 °C、13 000 r/min 离心 2 min,重复洗

3 次。再用现配的谷胱甘肽洗脱缓冲液洗脱,离心后上清液加入 30 μl 的 5 × Loading Buffer。轻弹混匀,沸水煮 10 min,离心后收集上清液,进行 SDS-PAGE 电泳。并进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后转 PVDF 膜,4 °C 轻震荡孵育封闭过夜,洗涤后将膜转移到终浓度为 60 μmol/L 的荧光 IPTG 的相互作用缓冲液中,4 °C 轻震荡孵育,用洗涤缓冲液 TBST 洗涤 3 次后,将膜放在免疫荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.6 目的条带的电喷雾质谱分析鉴定 将银染的目的条带切胶酶切进行质谱分析,运用 BioworksTM3.1 软件 Turbo SEQUEST 程序对获得的 MS/MS 自动检索分析,SEQUEST 的结果过滤参数为:当 Charge + 1,XCORR ≥ 1.9;当 Charge + 2,XCORR ≥ 2.5;当 Charge + 3,XCORR ≥ 3.75;其中 DELCN ≥ 0.1。

2 结果

2.1 重组质粒 pGEX-4T1-PGPIPn 的构建及鉴定

重组质粒 pGEX-4T1-PGPIPn 经酶切测序结果与 PGPIPn 基因序列相同,见图 1,表明原核表达载体 pGEX-4T1-PGPIPn 构建成功。

2.2 诱饵蛋白的诱导表达及其产物的 SDS-PAGE 鉴定

重组质粒 pGEX-4T1-PGPIPn 被转化到 E. coli BL21 中,经终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 4 h 后,细菌裂解液经 SDS-PAGE 电泳,可观察到表达产物带有 GST 标签的融合蛋白约为 26 ku,见图 2。

2.3 pull-down 实验

以 GST-PGPIPn 融合蛋白为诱饵蛋白,SKOV3 的细胞总蛋白为捕获蛋白,进行 pull-down 实验,最后收集到的样品加入 30 μl 的 5 × Loading Buffer,轻弹混匀,沸水煮 10 min,离心后收集上清液,进行 SDS-PAGE 电泳,银染染色后可见两条电泳条带,一条是约为 26 ku 的诱饵蛋白和一条是大小约为 37 ku 的目的蛋白,见图 3。

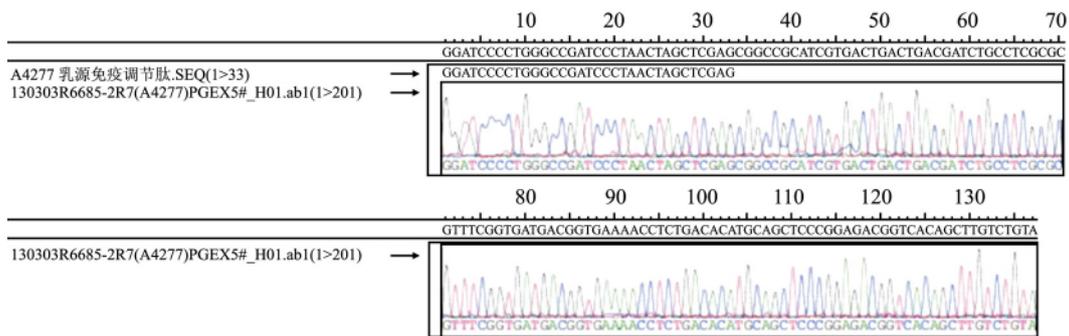


图 1 pGEX-4T1-PGPIPn 酶切测序结果

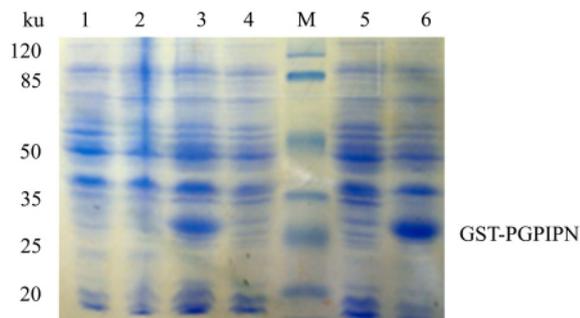


图2 pGEX-4T1-PGPIPIN 诱导表达 GST 融合蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

M: 低分子量 Marker 蛋白; 1, 2: BL21; 3, 6: 0.5 mmol/L IPTG 诱导的 pGEX-4T1-PGPIPIN; 4, 5: 未诱导的 pGEX-4T1-PGPIPIN

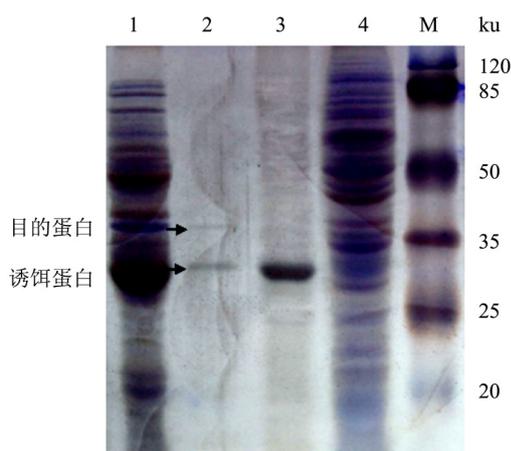


图3 pull-down SDS-PAGE 电泳结果

1: 诱饵蛋白总样品; 2: pull-down 结果; 3: 纯化的诱饵蛋白; 4: 猎物蛋白样品; M: 低分子量蛋白

2.4 目的蛋白条带的鉴定 pull-down 样品通过非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,恒流转 PVDF 膜,用荧光标记 PGPIPIN 孵育,在免疫荧光显微镜下观察到一条带,其位置和目的蛋白相吻合,说明此条带能够和免疫调节肽结合,证明其是 PGPIPIN 的靶蛋白,且在其他条件一致的情况下,因 4 °C 轻震荡孵育的时间不同,见图 4 条带的荧光强度也随之而改变,1 h 时结合不够充分,荧光不够强,2 h 的条带最亮,3、4 h 荧光逐渐减弱,说明 2 h 的孵育震荡时间相比较最佳。

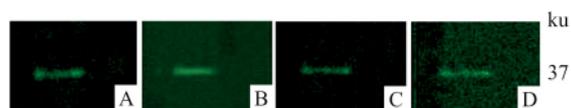


图4 免疫荧光肽不同时间孵育目的蛋白条带

A: 1 h; B: 2 h; C: 3 h; D: 4 h

2.5 目的条带的电喷雾质谱分析鉴定 经酶解后

所得肽段与 NCBI 蛋白-蛋白 BLAST 进行对比,得到 5 个功能相关的靶点蛋白,分别是: aldolase A、aldolase C、eukaryotic translation elongation factor 1 delta isoform 2、60S ribosomal protein L5、similar to F-box only protein 2。

3 讨论

最近在临床药物的研究和开发中,对小分子量多肽进行了深入探讨,特别是免疫活性肽这类肽,因其具有改善、调节机体的免疫力和抗肿瘤等功能,并因其活性高、来源广泛、稳定性强等优势而受到国内外的广泛关注^[9]。本课题组研究^[10]显示,PGPIPIN 对卵巢癌和乳腺癌等妇科癌细胞具有抑制作用,可以诱导肿瘤细胞发生凋亡,同时可以明显抑制肿瘤细胞的生长,提高动物机体的免疫力。PGPIPIN 是通过何种途径作用于卵巢癌细胞,其靶点蛋白的纯化和鉴定对进一步研究其作用机制和信号通路有着非常重要的意义。

现今的标签蛋白中,GST 标签蛋白由于其具有高效性、高选择性等优点,在蛋白质的相互作用研究领域里得到了广泛应用。GST pull-down 是将诱饵蛋白质和 GST 标签融合表达后,利用一步法纯化后与含有目的蛋白质的溶液进行孵育结合,再利用谷胱甘肽溶液洗脱 GST 融合蛋白-目的蛋白的复合物,然后进行 SDS-PAGE 电泳鉴定与诱饵蛋白质相互作用的蛋白质的类型^[11]。本研究中以 GST 为标签和 PGPIPIN 为目的基因进行了融合表达作为诱饵蛋白,从 SKOV3 细胞总提取蛋白中钓出与目的蛋白相互作用的蛋白质。蛋白质复合物的分离纯化是利用固定在琼脂糖树脂上的 GST-谷胱甘肽亲和标签和配位体反标签的系统来完成。此方法操作简单,同时避免使用同位素等有害人体物质。本研究成功的关键是具有足够量且保持蛋白质活性的 GST 融合蛋白和捕获蛋白,所以提取 SKOV3 总蛋白时要使用低强度的细胞裂解液,高强度的细胞裂解液会使蛋白质大量降解,无法获得实验所需的目的蛋白,可能导致实验失败。另外,谷胱甘肽洗脱缓冲液必须现配现用,因为缓冲液的离子强度和酸碱度对诱饵蛋白和目的蛋白的结合度影响非常大。

本研究通过 GST pull-down 方法筛选到的 PGPIPIN 的靶点蛋白是离体的蛋白,与其在卵巢癌细胞中的形态结构可能存在差异,但是否发生了空间结构及甲基化修饰等理化性质的改变,有待进一步研究,因此这增加继续研究 PGPIPIN 对卵巢癌细胞作

用机制的难度。电喷雾质谱筛选出来的 5 种靶点蛋白之间的相互作用关系,是否全部是有效的受体也有待进一步的分析研究。而且 PGPIP_N 究竟是在细胞膜上发挥作用还是通过细胞膜介导胞内信号转导作用,这也是后续研究的一大难关。今后本课题组可能会通过双向电泳、基因沉默和基因干扰等方法来深入了解 PGPIP_N 的抗癌机制,为将来 PGPIP_N 应用于临床实践提供实验依据。

参考文献

- [1] Meisel H. Biochemical properties of regulatory peptides derived from milk proteins [J]. *Biopolymers* ,1997 43(2) : 119 -28.
- [2] Kayser H , Meisel H. Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins [J]. *FEBS Lett* ,1996 383(1 -2) : 18 -20.
- [3] Migliore-Samour D , Floch F ,Jolles P. Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation [J]. *J Dairy Res* ,1989 , 56(3) : 357 -62.
- [4] Wei W , Fang G , Cai W , et al. PGPIP_N , a therapeutic hexapeptide , suppressed human ovarian cancer growth by targeting BCL2 [J]. *PLoS One* ,2013 , 8 (4) : e60701.
- [5] 魏彩,秦宜德,郑欣,等. 乳源免疫调节肽体外抑制人卵巢癌细胞侵袭和转移 [J]. *中国药理学通报* ,2013 29(1) : 42 -8.
- [6] 郑欣,何晓光,张文晓,等. 免疫调节肽对卵巢癌 skov3 细胞凋亡及相关基因表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报* ,2013 , 48(7) : 758 -62.
- [7] Ramirez C A , Dea-Ayuela M A , Gutiérrez-Blázquez MD , et al. Identification of proteins interacting with HSP70 mRNAs in *Leishmania braziliensis* [J]. *Proteomics* ,2013 7(1) : 43 -82.
- [8] Saluta M , Bell P A. Troubleshooting GST fusion protein expression in *E. coli* [J]. *Life Sci News* ,1998 1(1) : 1 -3.
- [9] 吕学泽,王雪敏,梁玉荣,等. 免疫活性肽的研究进展 [J]. *中国畜牧兽医* ,2011 38(4) : 170 -2.
- [10] 张文晓,秦宜德,何晓光,等. 乳铁蛋白抗菌-免疫调节融合肽的载体构建及在大肠杆菌中的表达和纯化 [J]. *安徽医科大学学报* ,2012 47(6) : 641 -4.
- [11] 陈谋通,刘建军. 蛋白质相互作用的研究方法 [J]. *生物技术通报* ,2009 1(1) : 52 -68.

Screening the receptor of anticancer hexapeptide in human ovarian carcinoma cells

Li Xiaoqin ,Tang Yigui ,Liu Chen ,et al

(Dept of Biochemistry and Molecular Biology Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To screen and identify the receptor of anticancer hexapeptide derived in bata casein in human ovarian cancer cell lines (SKOV3) by pull-down. **Methods** According to its sequence , PGPIP_N gene was designed and synthesized with the restriction sites of BamH I /Xho I , then was linked with the expression plasmid vector , pGEX-4T-1. This expression plasmid vector was transformed into *E. coli* , BL21. The GST-tagged fusion protein as the bait protein was expressed in BL21 by IPTG induced at low temperature. The total proteins were extracted from SKOV3 as the capture protein. By GST pull-down , the target protein was captured and screened from the above extracted proteins. By SDS-PAGE , the target protein was identified with PGPIP_N labelled fluorescein isothiocyanate (FITC) . **Results** The two protein bands were seen on SDS-PAGE gel , one being the bait protein and another being the target protein which was identified by immunofluorescence microscopy with the fluorescence labelled peptides. **Conclusion** The receptor of anticancer hexapeptide derived in bata casein is screened in human ovarian cancer cell lines (SKOV3) by pull-down. This study will lay the foundation for understanding the anticancer mechanism and transduction pathways of PGPIP_N.

Key words milk-derived anticancer hexapeptide; GST pull-down; bait protein; capture protein; target proteins