

利用串联亲和纯化结合质谱分析分离和鉴定与蛋白激酶 NLK 结合的蛋白复合物组分

梁俊波 缪时英 王琳芳

摘要 **目的** 利用串联亲和纯化结合质谱分析分离和鉴定与蛋白激酶 NLK 结合的蛋白复合物组分。**方法** 将 RFP、NLK 和其突变体 NLK^{K155M} 克隆至本室改造的带有 Flag 和 Strep 双标签的反转录病毒载体 pMSCVpuro 中,通过酶切鉴定并测序验证其构建的正确性。采用反转录病毒感染结合嘌呤霉素筛选的方法,获得稳定表达 RFP、NLK、NLK 突变体 NLK^{K155M} 的 HCT-116 细胞株,Western blot 法检测目的蛋白 RFP、NLK 和 NLK^{K155M} 的表达。采用串联亲和纯化结合质谱分析,分离、鉴定与 NLK 结合的蛋白。**结果** 构建的 pMSCVpuro/N-Flag-Strep-RFP 和 pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK 质粒经酶切鉴定、测序证明质粒构建正确,pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK^{K155M} 质粒经测序证明构建正确。携带上述基因的反转录病毒感染的 HCT-116 细胞,Flag-Strep-RFP、Flag-Strep-NLK 和 Flag-Strep-NLK^{K155M} 均正常表达。经串联亲和纯化和质谱分析,发现多个可能与 NLK 结合的蛋白。**结论** 本研究采用串联亲和纯化结合质谱分析成功鉴定了若干可能与 NLK 及其突变体 NLK^{K155M} 结合的蛋白质。

关键词 NLK 串联亲和纯化 质谱分析

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Exploring the Interactive Proteins with NLK by Tandem Affinity Purification Coupling Mass Spectroscopy. Liang Junbo, Miao Shiyang, Wang Linfang. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS and PUMC, Beijing 100005, China

Abstract Objective To seek the interactive proteins with NLK by tandem affinity purification coupling mass spectroscopy. **Methods** The coding regions of RFP or human NLK or NLK^{K155M} (a kinase-dead mutant of NLK) were cloned into the modified pMSCVpuro vector downstream of the N-terminal Flag-Strep II tag, resulting in the pMSCVpuro-N-Flag-Strep-NLK retroviral vector. The retroviral vector expressing N-Flag-Strep-RFP or N-Flag-Strep-NLK or N-Flag-Strep-NLK^{K155M} was co-transfected with helper plasmids containing gag-pol and env into HEK293T cells. The collected retrovirus was used to infect HCT-116 cells followed by selecting with puromycin. The expression of RFP or NLK or NLK^{K155M} with both Flag and Strep tags was determined by Western blot. Tandem affinity purification coupling mass spectrometry analysis were performed to isolate and identify NLK or NLK^{K155M} interacting proteins. **Results** The results from both restriction enzyme analysis and DNA sequencing assays indicated that the pMSCVpuro-N-Flag-Strep-RFP or -NLK or -NLK^{K155M} was successfully constructed. HCT-116 cells stably expressing RFP or NLK or NLK^{K155M} with both Flag and Strep tags were verified by Western blot. By tandem affinity purification and subsequent mass spectrometry analysis, several proteins which may be interacted with NLK were identified. **Conclusion** By tandem affinity purification and subsequent mass spectrometry analysis, we successfully identified several NLK or NLK^{K155M} interacting proteins.

Key words NLK; Tandem affinity purification; Mass spectrometry

蛋白质功能研究是后基因组时代的一个主要目标,而蛋白质相互作用网络的建立是系统研究各种生命现象的必由之路。近年来,由于超敏感、高通量质谱技术的发展以及蛋白序列数据库的逐步完善,原位

分析蛋白复合物组分的方法得以快速发展。其中串联亲和纯化(tandem affinity purification, TAP)结合质谱鉴定技术是研究蛋白质相互作用的一种强有力的工具。

NLK 是进化过程中极为保守的一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, NLK 能够结合并磷酸化一系列转录因子和转录辅助因子,包括 LEF1/TCF、c-Myb、A-Myb、STAT3、MEF2A、Nurr1、FOXO1、Notch,因而参与很多信号通路的调节^[1]。最近的研究发现, NLK 在

基金项目:国家重大研究计划项目(2011CB944302);国家重点实验室专项基金资助项目(2060204)

作者单位:100005 中国医学科学院/北京协和医学院基础医学研究所、医学分子生物学国家重点实验室

通讯作者:王琳芳,电子邮箱:wang.linfang@imicams.ac.cn

多种肿瘤组织中的表达异常,提示 NLK 可能与肿瘤的发生发展过程密切相关,但是 NLK 参与肿瘤发生的分子机制尚不清楚^[2-6]。本研究旨在通过串联亲和纯化结合质谱分析寻找并鉴定与 NLK 相互作用的蛋白质复合物组分,为进一步揭示 NLK 参与肿瘤发生发展的分子机制奠定基础。

材料与方法

1. 材料:HEK293 细胞的 cDNA 由本实验室保存。DNA 聚合酶购自北京全式金生物技术有限公司;限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB;DMEM 高糖培养基和 IMDM 培养基购自 Hyclone;Opti-MEM、胎牛血清、4%~12% Bis-Tris NuPAGE 购自 Life technologies 公司;FuGENE HD 转染试剂和蛋白酶抑制剂购自 Roche 公司;Flag-M2 beads、3×Flag 肽、抗 FLAG 抗体和嘌呤霉素购自 Sigma-Aldrich 公司;Strep-Tactin agarose、D-desthiobiotin 和抗 Strep 抗体购自 IBA 公司;引物合成由 Invitrogen 公司完成。

2. pMSCVpuro/N-Flag-Strep-RFP、pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK 和 pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK^{K155M} 质粒载体构建:以 HEK293 细胞的 cDNA 为模板扩增 NLK 的编码区序列,以 pDsRed-N1 载体为模板扩增 RFP 的编码区序列;将扩增的 DNA 片段和改造的 pMSCVpuro/N-Flag-Strep 载体分别用 Xho I 和 BamH I 双酶切^[7];将双酶切后的产物进行连接;将连接产物转化 DH5 α ;菌液 PCR 鉴定阳性克隆并提取质粒进行测序验证。引物序列为:NLK-上游引物 NLK-下游引物;RFP-上游引物 RFP-上游引物。NLK^{K155M} 突变体的构建采用 Stratagene 公司的 QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kits,突变体上游引物:5'-GAGAG-TAGCGCTCATGAAGATGCCCAACGTC-3',突变体下游引物:5'-GACGTTGGGCATCTTCATGAGCGCTACTCTC-3'。

3. N-Flag-Strep-RFP、N-Flag-Strep-NLK 和 N-Flag-Strep-NLK^{K155M} 反转录病毒的制备:将经过测序验证的重组骨架质粒分别与辅助质粒 gag-pol 和 env 共转染 HEK293T 细胞(骨架质粒:gag-pol:env=2:1:1);分别在转染后 48h 和 72h 收集培养基上清,用 0.22 μ m 的针孔滤器过滤后,4℃,18000r/min 离心 3h 浓缩反转录病毒,用 PBS 重悬反转录病毒,分装后-80℃保存。

4. 稳定过表达 N-Flag-Strep-RFP、N-Flag-Strep-NLK、N-Flag-Strep-NLK^{K155M} 的 HCT-116 细胞株的筛选及鉴定:感染前 1 天,将 HCT-116 细胞接种于 6 孔板中(以感染时细胞密度 30%~40%为宜);待细胞贴壁并充分展开后,分别加入一定量的反转录病毒,同时加入终浓度为 8 μ g/ml 的 polybrene 以增强病毒感染效率;感染后 12h 更换培养基,继续培养 36h;感染后 48h,将细胞传至直径 100mm 的细胞培养皿中,同时加入终浓度为 2 μ g/ml 的嘌呤霉素进行筛选。通过 Western blot 检测细胞中 RFP、NLK、NLK^{K155M} 的表达。

5. 串联亲和纯化:流程图见图 1。实验分为 3 组,即 RFP

组、NLK 组和 NLK^{K155M} 组。每组收取大约 5×10^8 个细胞(相当于 5 个直径为 150mm 的细胞培养皿的细胞量),用含有蛋白酶抑制剂的 NETN 裂解液(20mmol/L Tris-HCl, pH 值 8.0; 100mmol/L NaCl; 0.5% Nonidet-P40; 1mmol/L EDTA)裂解细胞,13000r/min 离心 1h,收集上清;细胞裂解液上清与 Strep-Tactin 树脂混合,4℃孵育 1h;经裂解液漂洗 3 次后,用 1ml 洗脱缓冲液(含 2mmol/L D-desthiobiotin 的 NETN 裂解液)洗脱收集蛋白,即完成第 1 次亲和纯化。洗脱的蛋白与 Flag-M2 树脂混合,4℃孵育 1h;经裂解液漂洗 3 次后,用 100 μ l 洗脱缓冲液(含 0.3mg/ml 3×Flag 肽的 NETN 裂解液)洗脱收集蛋白,即完成第 2 次亲和纯化。洗脱后的蛋白用 4%~12% Bis-Tris NuPAGE 预制梯度胶进行电泳分离。将预制胶用增强型考马斯亮蓝染液(0.12% Coomassie G-250, 10% 硫酸铵,10% 磷酸,20% 甲醇)室温染色过夜,并用超纯水脱色。

6. 质谱鉴定:用干净的刀片从考染胶上切下部分差异条带,放入 1.5ml EP 管中进行胶内酶解,运用质谱仪进行分析。采用 GPS Explorer 3.5 软件包和 MASCOT 2.0 数据库搜索软件对一级、二级质谱分析结果联合搜索,得到相应的蛋白信息。

结 果

1. pMSCVpuro/N-Flag-Strep-RFP、pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK 质粒的酶切鉴定:通过 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定,1% 琼脂糖凝胶电泳分离,结果如图 1 所示。

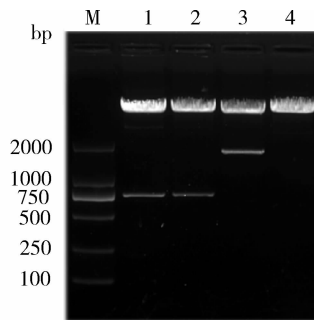


图 1 重组质粒的酶切鉴定

M. DNA 分子质量标准;1、2. pMSCVpuro/N-Flag-Strep-RFP; 3. pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK; 4. pMSCVpuro/N-Flag-Strep

2. 稳定过表达 N-Flag-Strep-RFP、N-Flag-Strep-NLK、N-Flag-Strep-NLK^{K155M} 的 HCT-116 细胞株的鉴定:测序正确的 pMSCVpuro/N-Flag-Strep-RFP、pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK 和 pMSCVpuro/N-Flag-Strep-NLK^{K155M} 通过进一步的反转录病毒包装、感染 HCT-116 细胞以及嘌呤霉素筛选,最终通过 Western blot 法检测表达。结果显示,

HCT-116 细胞中 FLAG-Strep-RFP、FLAG-Strep-NLK 和 FLAG-Strep-NLK^{K155M} 均正常表达 (图 2)。

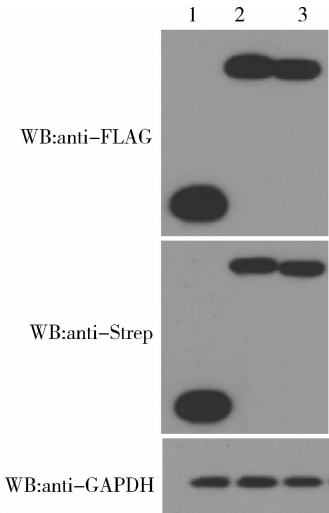


图 2 Western blot 法鉴定 HCT-116 细胞中 FLAG-Strep-RFP、FLAG-Strep-NLK 和 FLAG-Strep-NLK^{K155M} 的表达

1. FLAG-Strep-RFP; 2. FLAG-Strep-NLK; 3. FLAG-Strep-NLK^{K155M}; WB. Western blot

3. 串联亲和纯化分离与 NLK 结合的蛋白组分考马斯亮蓝染色结果显示, NLK 组和 NLK^{K155M} 组与表达 RFP 蛋白的对照组相比, 有多条明显的差异条带 (图 3)。选择差异较为明显的两个条带 (band1 和 band 2) 进行质谱鉴定。

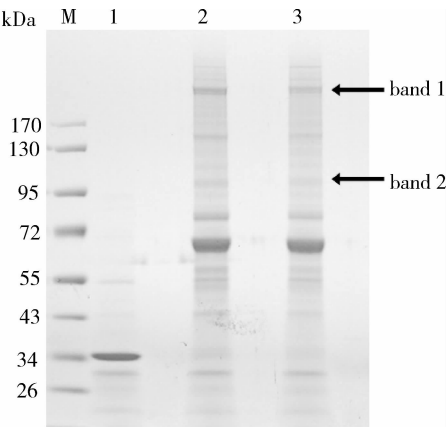


图 3 SDS-PAGE 结合考马斯亮蓝染色分离和分析 TAP 纯化蛋白

M. DNA 分子质量标准; 1. FLAG-Strep-RFP; 2. FLAG-Strep-NLK; 3. FLAG-Strep-NLK^{K155M}

4. 质谱鉴定结果: 通过质谱分析得到 band1 和 band2 中的蛋白组分, 其中 band1 中得分最高的蛋白

为 CAD (carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamoylase, dihydroorotase, CAD), band2 中得分最高的蛋白为 TLE3 (transducin-like enhancer protein 3, TLE3)。CAD 蛋白和 TLE3 可能与 NLK 存在相互作用。

讨 论

TAP 是一种常用的纯化蛋白复合物的方法, 由 Rigaut 等^[8] 在 1999 年首次报道并在酵母中成功应用。传统的 TAP 标签蛋白由 Protein A、TEV 蛋白酶可剪接序列和钙调蛋白结合肽 (calmodulin-binding peptide, CBP) 组成。随着 TAP 技术在其他物种的广泛应用, 研究人员开发了不同于传统 TAP 标签的其他标签, 如 HA、Flag、Strep-tag II、His 等。通过将不同的标签进行串联组合实验发现, Flag 和 Strep-tag II 两个标签的串联组合效果最好, 主要表现在以下 3 个方面: ① 标签分子质量小 (<4.6kDa), 对诱饵蛋白的功能几乎没有影响或影响极小; ② 去除了 TEV 蛋白酶的酶解步骤, 缩短了纯化时间, 提高了纯化效率; ③ 避免了传统标签中的 CBP 与细胞内源的钙调蛋白结合, 可能引起的细胞内钙调蛋白依赖的信号通路异常^[9]。

本研究利用 Flag 和 Strep-tag II 双标签进行串联亲和纯化, 成功分离得到了与蛋白激酶 NLK 结合的蛋白复合物组分, 并通过质谱鉴定得到 TLE3 和 CAD 等可能与 NLK 结合的蛋白质。TLE 是果蝇 Groucho 蛋白在脊椎动物中的同源蛋白, 包括 TLE1、TLE2、TLE3 和 TLE4。作为一类进化上保守的核内转录抑制因子, Groucho/TLE 主要通过转录激活因子竞争结合转录因子的方式参与细胞内信号通路的调节, 包括 Notch、Wnt、TGF- β 等信号通路^[10]。而 NLK 也被证实参与 Notch、Wnt 等信号通路的调节^[1]。进一步的研究需要通过免疫沉淀等实验验证 NLK 与 Groucho/TLE 之间的相互作用以及两者结合的位点。同时, 明确两者在肿瘤发生中的相关性以及 NLK 是否通过 Groucho/TLE 发挥作用。

CAD 是一个分子质量大约为 243kDa, 由单一多肽链组成的多功能蛋白, 主要包括 3 个功能相关的结构域, 即氨甲酰磷酸合成酶 (carbamoyl phosphate synthetase II, CPSase)、天冬氨酸转氨甲酰酶 (aspartate transcarbamoylase, ATCase) 和二氢乳清酸酶 (dihydroorotase, DHOase), 三者分别催化嘧啶核苷酸从头合成的前三步酶促反应^[11, 12]。其中, CPSase II 负责嘧啶核苷酸从头合成的第一步反应, 也是限速反应。CPSase II 的激活和抑制分别受到磷酸核糖焦磷酸

(phosphoribosyl pyrophosphate, PRPP) 和尿嘧啶核苷酸(uridine monophosphate, UMP) 的变构调控。除了变构调节, CAD 的活性也受到 MAPK、PKA、PKC 等激酶的磷酸化调节^[13-15]。

最近的研究结果显示, 蛋白激酶 mTORC1 活化的激酶 S6K1 能够直接磷酸化 CAD 蛋白 1859 位的丝氨酸, 而磷酸化的 CAD-S1859 能够促进嘧啶核苷酸的从头合成, 进而促进细胞周期 S 期的进程^[16, 17]。尽管大量的研究证实, NLK 在多种肿瘤组织中表达异常, 但是 NLK 参与肿瘤发生的分子机制尚不清楚。作为一种保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, NLK 是否也通过磷酸化 CAD 蛋白参与调控细胞内嘧啶核苷酸的从头合成, 进而调控肿瘤细胞的生长, 将是一个值得深入研究的课题。

参考文献

- Ishitani T, Ishitani S. Nemo-like kinase, a multifaceted cell signaling regulator[J]. Cell Signa, 2013, 25 (1): 190-197
- Emami KH, Brown LG, Pitts TE, *et al.* Nemo-like kinase induces apoptosis and inhibits androgen receptor signaling in prostate cancer cells [J]. Prostate, 2009, 69 (14): 1481-1492
- Jung KH, Kim JK, Noh JH, *et al.* Targeted disruption of Nemo-like kinase inhibits tumor cell growth by simultaneous suppression of cyclin D1 and CDK2 in human hepatocellular carcinoma[J]. J Cell Biochem, 2010, 110 (3): 687-696
- Cui G, Li Z, Shao B, *et al.* Clinical and biological significance of nemo-like kinase expression in glioma[J]. J Clin Neurosci, 2011, 18 (2): 271-275
- Huang Y, Jiang Y, Lu W, *et al.* Nemo-like kinase associated with proliferation and apoptosis by c-Myb degradation in breast cancer [J]. PLoS One, 2013, 8 (7): e69148
- Lv L, Wan C, Chen B, *et al.* Nemo-like kinase (NLK) inhibits the progression of NSCLC via negatively modulating WNT signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2014, 115 (1): 81-92
- Cheng X, Liang J, Teng Y, *et al.* Nemo-like kinase promotes etoposide-induced apoptosis of male germ cell-derived GC-1 cells in vitro[J]. FEBS Lett, 2012, 586 (10): 1497-1503
- Rigaut G, Shenchenko A, Rutz B, *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17 (10): 1030-1032
- Gloeckner CJ, Boldt K, Schumacher A, *et al.* A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterisation of native protein complexes[J]. Proteomics, 2007, 7 (23): 4228-4234
- Turki-Judeh W, Courey AJ. Groucho: a corepressor with instructive roles in development[J]. Curr Top Dev Biol, 2012, 98 (1): 65-96
- Huang M, Graves LM. De novo synthesis of pyrimidine nucleotides; emerging interfaces with signal transduction pathways [J]. Cell Mol Life Sci, 2003, 60 (2): 321-336
- Evans DR, Guy HI. Mammalian pyrimidine biosynthesis: fresh insights into an ancient pathway[J]. J Biol Chem, 2004, 279 (32): 33035-33038
- Graves LM, Guy HI, Kozlowski P, *et al.* Regulation of carbamoyl phosphate synthetase by MAP kinase[J]. Nature, 2000, 403 (6767): 328-332
- Sigoillot FD, Evans DR, Guy HI. Growth-dependent regulation of mammalian pyrimidine biosynthesis by the protein kinase A and MAPK signaling cascades[J]. J Biol Chem, 2002, 277 (18): 15745-15751
- Sigoillot FD, Kotisis DH, Masko EM, *et al.* Protein kinase C modulates the up-regulation of the pyrimidine biosynthetic complex, CAD, by MAP kinase[J]. Front Biosci, 2007, 12 (1): 3892-3898
- Robitaille AM, Christen S, Shimobayashi M, *et al.* Quantitative phosphoproteomics reveal mTORC1 activates de novo pyrimidine synthesis [J]. Science, 2013, 339 (6125): 1320-1323
- Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, *et al.* Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1 [J]. Science, 2013, 339 (6125): 1323-1328

(收稿日期: 2014-03-05)

(修回日期: 2014-03-13)

首发未用药精神分裂症患者的白质纤维及皮质结构的 MRI 研究

郝传奎 王 煦 赖云耀 刘晓怡 于 欣 陈 雷 洪 楠 张维涛

摘 要 目的 研究首发未用药精神分裂症患者白质纤维及皮质结构的异常改变。**方法** 对 36 例首发未用药精神分裂症患者和 41 名健康对照进行全脑弥散张量成像(DTI)及脑结构成像。通过基于纤维束的空间体积分析(TBSS)比较两组间白质纤

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAI17B04)

作者单位:100044 北京大学人民医院

通讯作者:洪楠, 电子信箱: hongnan@pkuaph.edu.cn