

FAM3A 相互作用蛋白的检测

陈 说¹, 肖海鹏¹, 李延兵¹, 陈松锦¹, 银 巍², 修玲玲¹, 曹筱佩¹
(中山大学 1. 附属第一医院内分泌科 2. 中山医学院药理教研室, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】FAM3A (family with sequence similarity 3, member A) 为新近发现的细胞因子 FAM3 的家族成员之一, 本研究检测 FAM3A 的相互作用蛋白。【方法】克隆 FAM3A 并连接到 pGB 载体, 转化酵母 Y190 宿主菌, 加入含主要信号传导细胞因子人 cDNA 文库, 按标准程序进行酵母双杂交, 以 X-Gal 显色评估活性。提取扩增阳性克隆, 连接 pACT2 载体, 测序、检索基因库确定阳性克隆基因。克隆阳性基因并与 FAM3A 质粒共转染酵母进一步确定相互作用。【结果】酵母双杂交检测到一个与 FAM3A 相互作用的阳性克隆, 提取扩增后测序分析此相互作用蛋白为一睾丸特异性丝氨酸/苏氨酸激酶 (TSSK4), 一种与精子的发育、成熟、及生育功能有关的蛋白质。共转染 pGB-FAM3A 质粒与 pACT2-TSSK4 质粒入 Y190 酵母证实上述相互作用。【结论】FAM3A 可能通过与 TSSK4 的相互作用参与精子功能与生育能力的调节。

关键词: FAM3A, 睾丸特异性丝氨酸/苏氨酸激酶, 酵母双杂交

中图分类号: K825-15; Q7; Q946-1 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2008)05-0521-05

Identification of Interaction Protein with FAM3A

CHEN Shuo¹, XIAO Hai-peng¹, LI Yan-bing¹, CHEN Song-jin¹, YIN Wei²,
XIU Ling-ling¹, CAO Xiao-pei¹

(1. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital, 2. Department of Pharmacology,
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】FAM3A (family with sequence similarity 3, member A) is a member belong to the newly discovered FAM3 family. We conducted this study to search for interaction proteins with FAM3A. 【Method】FAM3A DNA was PCR-amplified and cloned to plasmid pGB and transferred to Y190 yeast. A yeast two-hybrid screen in Y190 yeast strain of a human cDNA library (contains most of the cytokins and signaling pathways) was performed. A standard transformation procedure was used. Beta-galactosidase activity of clones was estimated using X-Gal. Positive clones were amplified and linked to pACT2 plasmid. The interaction was confirmed by cotransformation of FAM3A and the TSSK4 into Y190 yeast. 【Result】A potential binding protein was identified. Isolation and sequence analysis of the interacting spectrum clone revealed that FAM3A was binding to a testis-specific serine/threonine kinases (TSSK4), a member of the TSSK family that might have a role in sperm differentiation and/or subsequent sperm functions during maturation, capacitation, and fertilization. The re-introduction of the constructs into Y190 yeast has shown that cotransformation of FAM3A and TSSK4 into Y190 yeast activated expression of the lacZ reporter genes in Y190 yeast, confirming the specificity of their interaction with FAM3A. 【Conclusion】FAM3A may be a potential factor involving in the sperm functions and fertilization through interaction with TSSK4.

Key words: FAM3A; testis-specific serine/threonine kinases; yeast two-hybrid

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(5): 521-525]

FAM3 (family with sequence similarity 3) 家族
是通过计算机模型在基因库中搜索含四螺旋束结

构的细胞因子时发现的一组新的细胞因子家族^[1]。
共有 4 个家族成员: FAM3A, FAM3B, FAM3C, and

收稿日期: 2008-04-01

基金项目: 国家自然科学基金(30570887); 教育部回国人员科研启动基金(141008); 中山大学回国人员科研启动基金(132023)

作者简介: 陈 说 (1984-), 男, 广东湛江人, 硕士研究生; 曹筱佩, 通信作者, 副教授, 硕士生导师, Email: caoxp100@hotmail.com

FAM3D, 各编码一含 224-235 氨基酸的多肽。研究显示 FAM 家族不同于目前发现的任何已知因子, 其中 FAM3A 广泛分布于机体的各个组织, 但主要在血管内皮尤其是毛细血管内皮分布, FAM3B 主要在胰腺表达, FAM3C 亦广泛分布于机体的各个组织, FAM3D 主要在卵巢表达^[1]。其功能尚在初步的研究中^[2-5], 可能介导细胞信号传递, 参与细胞的增殖分化、成熟与凋亡, 但目前尚缺乏深入详细的研究。我们从检测与 FAM3A 相互作用的蛋白质着手, 探讨其可能的作用途径, 为进一步研究其生理功能提供基础。

1 材料和方法

1.1 FAM3A 基因克隆与鉴定

从 SMARTcDNA 文库中扩增, PCR30 转, 产物电泳, 回收胶, 纯化, 室温过夜连接到 pGEM-T 载体, 转化感受态细菌 DH10B, 使用 x-gal 做蓝白斑筛查。从板上挑取 12 个克隆接菌, 培养 8 h 后煮菌, 用高保真 Pfu 酶 PCR 扩增 FAM3A 基因并克隆到 pGB 载体。提取克隆质粒, 送测序。

1.2 酵母双杂交

1.2.1 主要材料 pGEM-T 载体, pGB 载体, pACT2 载体, YPD 培养基, 人细胞因子 cDNA 文库(包含大部分的细胞因子及信号转导途径), Y190 酵母宿主菌(上海睿星基因技术有限公司), SD/-Trp 液体培养基。

1.2.2 诱饵 FAM3A 基因转化宿主菌 Y190 将克隆接种于 3 mL YPD 液体培养基 30 °C 振荡培养过夜, 接入大体积 50 mL YPD 中培养。加入 100 ng FAM3A 基因质粒、5 μL 预变性的 Carrier DNA、500 μL 1X TE/LiAc/PEG, 于 30 °C 水浴中孵育, 再 42 °C 水浴热激、冰浴, 离心收集菌体。液体重悬菌体, 涂布于 SD/-Trp 平板上培养, 观察克隆生长情况。采用膜检的方法检测诱饵基因的自激活情况。

1.2.3 筛选组织库 含诱饵 FAM3A 质粒的酵母菌接种于 SD/-Trp 液体培养基中, 再转入 500 mL YPDA(YPD+Adenine)液体培养。加入文库 DNA A、B、C 各 2 μg, 100 μL 预变性的 Carrier DNA, 50 mL 1XTE/LiAc/PEG, 剧烈涡旋混匀, 30 °C 孵育, 再 42 °C 热激、冰浴。悬浮菌体, 做滴度测定, 其余菌液涂布于 15 cm SD/-Trp/-Leu/-His/+30 mmol/L 3-AT(3-amino-1,2,4-triazole)平板上。第 3 天起观

察平板酵母克隆生长状态。

计算转库效率: 对生长在 SD/-Trp/-Leu 平板上的克隆计数, 挑选克隆数在 30 ~ 300 之间稀释度计算转库效率

$$\frac{\text{克隆数(cfu)} \times \text{总悬浮体积}}{\text{涂板体积} \times \text{稀释度} \times \text{文库用量}(\mu\text{g})} = \text{cfu}/\mu\text{g DNA}$$

1.2.4 抽提、扩增阳性克隆 膜检变蓝的阳性克隆用牙签涂布在 SD/-Trp-Leu-His+30 mmol/L 3-AT 平板上, 约 2 cm², 然后放置于 30 °C 培养箱中培养 3 ~ 4 d。提取酵母质粒。将质粒悬于 10 μL ddH₂O 中, 取 2 ~ 3 μL 转化感受态细菌 DH10B 中, 菌株涂布于 LB/+Amp 平板中生长。生长出的克隆在 LB/Amp 液体培养基中扩增, 提取质粒送测序。

1.3 阳性克隆鉴定

为了去除假阳性结果的干扰, 阳性克隆质粒与诱饵基因质粒共转酵母菌 Y190, 并同时空白质粒与阳性基因质粒共转酵母菌 Y190 作对照, 长出 Y190 菌于液氮冷冻 2 min 后, 于 X-gal Z buffer 显色, 验证其相互作用真实性。

2 结 果

2.1 FAM3A 克隆质粒结果

FAM3A 克隆质粒 PCR 结果得到一长度约为 650 bp 的条带(图 1), 得到 5 个正确克隆质粒, 采用引物: FAM3A5 5'-ATgAggTTggCAggCCCTCTCCgCATTg-3', FAM3A3: 5'-CTAgCTggCCgTgCTTCTCCgCgggATAC-3' 扩增 FAM3A ORF, 送测序。得到正确的 FAM3A 克隆, 在 FAM3A 的第 639 bp 存在一个 SNP (C/G), 我们得到的克隆在此位置为 G。

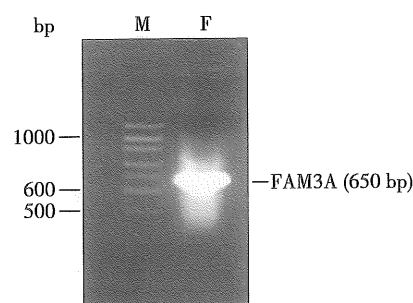


图 1 从 SMARTcDNA 文库中扩增的 FAM3A 基因片段
Fig.1 PCR result of FAM3A DNA fragment from SMARTcDNA bank

A 650 bp band was observed on the PAG gel of the PCR product. M: Marker, F: FAM3A

2.2 酵母双杂交结果

诱饵基因转化 Y190 酵母菌后,膜检显示其无自激活。小文库筛查可见菌株生长, 10^{-4} 滴度平板中有 5 个克隆生长。 10^{-3} 滴度平板中有 46 个克隆生长。转化效率为 2.5×10^5 cfu/ μ g DNA。重新转划于

SD/-leu-trp 平板中生长出 15 个克隆, X-Gal 显色确定其中只有 1 个阳性克隆,其余 14 个均为阴性克隆。转化细菌感受肽后提取阳性克隆酵母质粒,测序结果显示阳性基因为 TSSK4(NM-174944.2) (图 2)。

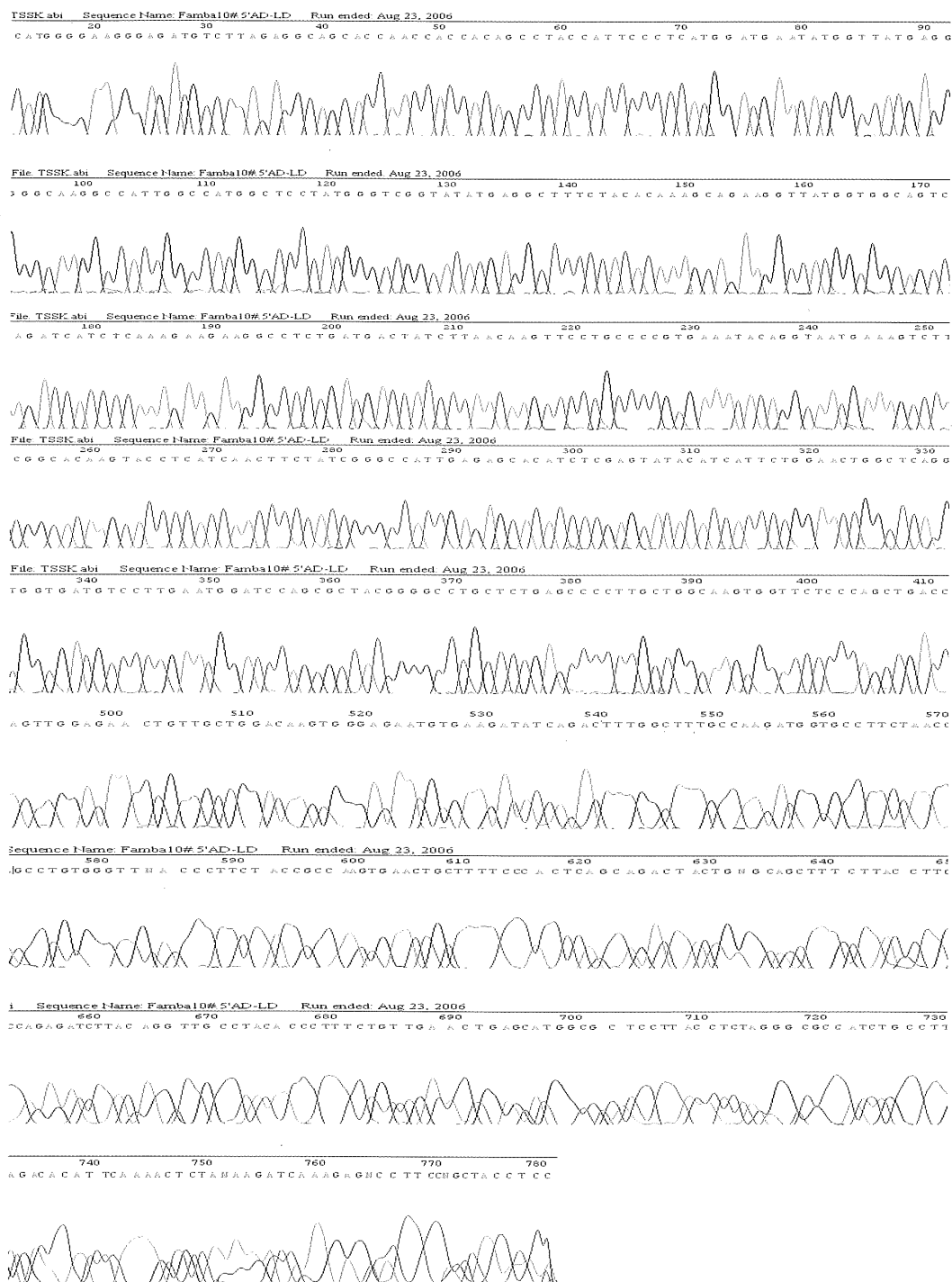


图 2 酵母双杂交检测到的阳性克隆

Fig.2 Result of the yeast two-hybrid

One positive clone was obtained. Sequencing and Genebank search have shown that the protein that interact with FAM3A in yeast was TSSK4 (NM-174944.2), a protein involving in sperm differentiation and/or sperm functions during maturation, capacitation and fertilization

2.3 共转染鉴定杂交结果

共转染杂交 pGB-FAM3A 质粒与 pACT2-TSSK4 质粒入 Y190 酵母可激活报告基因 LacZ 的表达,而空白质粒与 pGB-FAM3A 质粒共转染入 Y190 酵母不能激活报告基因 LacZ 的表达,证实 FAM3A 与 TSSK4 之间的相互作用。

3 讨 论

FAM3 家族是一组具有四螺旋束结构的细胞因子,通常四螺旋束结构的细胞因子为炎症细胞因子,但 FAM3 不同于任何现有的因子。其成员 FAM3B 主要在胰腺表达,具有与炎症因子 IL-6 类似的致细胞凋亡的作用,对培养的胰岛 B 细胞、啮齿动物以及人类的胰岛均有致凋亡作用^[2,6]。FAM3A 是 FAM 家族成员之一,广泛在各种组织的血管内皮表达,其蛋白在睾丸组织有丰富表达,有研究显示它是人类先天性耳聋的候选基因之一^[5],但没有后续研究证实。其具体的生理功能不明。我们通过研究其相互作用蛋白,寻找其作用途径的线索,为进一步研究其功能打下基础。

蛋白质间的相互作用、相互协调是细胞进行一切代谢活动的基础。酵母双杂交技术为 Fields 等^[7]提出,并在近年发展起来的研究蛋白——蛋白相互作用的方法。它利用酵母生长速度快,且容易操作的特点,在其体系中研究哺乳动物细胞的蛋白——蛋白间的相互作用,通过筛选 cDNA 文库,找到与感兴趣蛋白相互作用的蛋白。酵母乳糖代谢的调节因子 GAL4 在结构上是组件式往往由两个或两个以上的结构上可以分开、功能上相互独立的结构域构成,至少包含有 DNA 结合功能域和转录激活功能域。这两个结构域在分开时不能激活转录。只有当被分开的两者通过适当的途径在空间上较为接近时,才能重新呈现完整的 GAL4 转录因子活性。根据这个特性,将编码 cDNA 文库的基因与诱饵蛋白的基因构建在表达载体上,转化改造后的酵母,当上述两种载体所表达的融合蛋白能够相互作用时,可激活酵母基因组中的报告基因,从而筛选到阳性菌落。对载体中插入的文库基因进行测序和分析就可以知道与诱饵蛋白相互作用的蛋白基因。

TSSK 是一组睾丸特异性的丝氨酸-苏氨酸激酶,目前发现五个家族成员 TSSK1-TSSK5^[8-10]。结

构与生物信息学研究显示它们属于人类 AMPK 分支,高度特异性地在睾丸组织中丰富表达^[10,11]。TSSK 通过使其下游物质 TSKS 磷酸化,对精原细胞、精母细胞以及精子起保护^[8],TSSK5 可使 CREB 第 133 位的苏氨酸磷酸化,激活 CREB/CRE 途径,参与精子的生成^[9]。TSKS 在睾丸肿瘤组织中表达明显下降,而在肿瘤周围的肿瘤前组织中丰富表达^[12]。这些研究提示 TSSK 家族可能与精子的发生、形成、获能以及生育过程精子的分化及功能有关。认为其功能异常与男性不育有关,并被作为可能的组织特异性靶分子应用于新的避孕药开发中^[8,13]。

尽管通过酵母双杂交系统可以证明两个蛋白之间具有相互作用,但由于蛋白相互作用的时空效应,一些可以在酵母中的蛋白相互作用,在真核的细胞中依然需要更深入的研究。我们初步的研究在酵母中检测到 FAM3A 与 TSSK4 的相互作用,并在进一步的共转染中得到证实,特别是 FAM3A 蛋白亦在睾丸中高度表达,提示 FAM3A 也可能是一个与精子的发育以及男性生育能力有关的因子。为进一步的研究提供了线索。

参考文献:

- [1] Zhu Y, Xu G, Patel A, et al. Cloning, expression, and initial characterization of a novel cytokine-like gene family[J]. *Genomics*, 2002, 80(2):144-150.
- [2] Cao X, Yang J, Burkhardt BR, et al. Effects of overexpression of pancreatic derived factor (FAM3B) in isolated mouse islets and insulin-secreting betaTC3 cells[J]. *AJP Endocrinol Metab*, 2005, 289(4):E543-E550.
- [3] Yang J, Gao Z, Robert CE, et al. Structure-function studies of PANDER, an islet specific cytokine inducing cell death of insulin-secreting beta cells[J]. *Biochemistry*, 2005, 44(34):11342-11352.
- [4] Xu W, Gao Z, Wu J, et al. Interferon-gamma-induced regulation of the pancreatic derived cytokine FAM3B in islets and insulin-secreting betaTC3 cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2005, 240(1-2):74-81.
- [5] Guo J, Cheng H, Zhao S, et al. GG: a domain involved in phage LTF apparatus and implicated in human MEB and non-syndromic hearing loss diseases[J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(2):581-584.
- [6] Cao X, Gao Z, Robert CE, et al. Pancreatic-derived factor (FAM3B), a novel islet cytokine, induces apoptosis

- of insulin-secreting beta-cells[J]. *Diabetes*, 2003, 52(9): 2296-2303.
- [7] Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.
- [8] Xu B, Hao Z, Jha KN, et al. Validation of a testis specific serine/threonine kinase [TSSK] family and the substrate of TSSK1 & 2, TSKS, as contraceptive targets [J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 2007, 63: 87-101.
- [9] Chen X, Lin G, Wei Y, et al. TSSK5, a novel member of the testis-specific serine/threonine kinase family, phosphorylates CREB at Ser-133, and stimulates the CRE/CREB responsive pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(3): 742-749.
- [10] Hao Z, Jha KN, Vemuganti S, et al. Expression analysis of the human testis-specific serine/threonine kinase (TSSK) homologues. A TSSK member is present in the equatorial segment of human sperm [J]. *Molecular Human Reproduction*, 2004, 10(6): 433-444.
- [11] Visconti PE, Hao Z, Purdon MA, et al. Cloning and chromosomal localization of a gene encoding a novel serine/threonine kinase belonging to the subfamily of testis-specific kinases[J]. *Genomics*, 2001, 77(3): 163-170.
- [12] Scorilas A, Yousef GM, Jung K, et al. Identification and characterization of a novel human testis-specific kinase substrate gene which is downregulated in testicular tumors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 285(2): 400-408.
- [13] Nikolay A, Spiridonov V, Wong L, et al. Identification and Characterization of SSTK, a Serine/Threonine Protein Kinase Essential for Male Fertility[J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(10): 4250-4261.
- (编辑 徐 杰)

(上接第 515 页 from page 515)

MSCs定植?这一现象值得关注。

参考文献:

- [1] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells [J]. *Science*, 1999, 284(5411): 143-147.
- [2] Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues[J]. *Science*, 1997, 276(5309): 71-74.
- [3] Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, et al. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 61(4): 364 - 370.
- [4] 朱美玲, 陈汝光, 刘 华, 等. 人中期胚胎、新生儿脐血及成人骨髓间质干细胞基本生物学特性的比较[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(6): 504-507.
- [5] Bjorklund A. Neurobiology. Better cells for brain repair [J]. *Nature*, 1993, 362(6419): 414-415.
- [6] Olson L. Regeneration in the adult central nervous system: experimental repair strategies[J]. *Nat Med*, 1997, 3(12): 1329-1335.
- [7] Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain[J]. *Neuroscience*, 1992, 48(2): 405-415.
- [8] 周敦华, 张绪超, 黄绍良, 等. 含脐血 MSCs 体系扩增后的脐血重建 NOD/SCID 小鼠造血的研究[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2005, 26(6): 639-643.
- [9] Rezvani M, Birds DA, Hodges H, et al. Modification of radiation myelopathy by the transplantation of neural stem cells in the rat[J]. *Radiat Res*, 2001, 156(4): 408-412.
- [10] Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(8): 4080-4085.
- [11] Son BR, Marquez-Curtis LA, Kucia M, et al. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases [J]. *Stem Cells*, 2006, 24(5): 1254-1264.
- [12] Wynn Rf, Hart CA, Corradi-Perini C, et al. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow[J]. *Blood*, 2004, 104(9): 2643-2645.
- [13] Saito T, Kuang JQ, Bittira B, et al. Xenotransplant cardiac chimera: immune tolerance of adult stem cells [J]. *Ann Thorac Surg*, 2002, 74(1): 19-24.
- [14] Fandrich F, Lin X, Chai GX, et al. Preimplantation stage stem cells induce long term allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning[J]. *Nat Med*, 2002, 8(2): 171-178.
- (编辑 张恩健)