

# 蛋白体外结合实验联合质谱 分析鉴定 Num1 的互作蛋白

唐仙英 肖 瑶 海 力

(中南民族大学 生命科学学院, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074)

**摘 要** 目的: 为了解析芽殖酵母 Num1 蛋白在纺锤体定位和线粒体中的调节机制. 方法: 利用大肠杆菌原核表达并纯化了在 Num1 功能中起核心作用的补丁组装 (PA) 结构域的重组蛋白, 通过蛋白体外结合实验 (Pull-down) 分离了酵母细胞中与 PA 结构域相结合的蛋白复合物, 并对其进行了质谱分析. 结果: 鉴定了一系列新的 Num1 互作蛋白, 包括核糖体蛋白, 参与蛋白折叠、分配及转运的内质网和高尔基复合体蛋白, 参与基因转录和翻译的核酸酶和蛋白酶, 及其他功能的蛋白. 结论: Num1 的互作蛋白的鉴定为进一步研究 Num1 的作用机制奠定了基础.

**关键词** 芽殖酵母; 动力蛋白; PA 结构域; 纺锤体定位

中图分类号 Q26 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)04-0027-04

## Identification of Num1-interacting Proteins by Pull-down Experiments and Mass Spectrometry

Tang Xianying, Xiao Yao, Hai Li

(Key laboratory of Hubei Province for the Protection and Utilization of Special Plant Germplasm in Wuling Mountain Area, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** Objective: To explore the regulatory mechanisms of Num1 during spindle orientation and in mitochondria in budding yeast. Method: Recombinant proteins containing the patch assembly (PA) domain, which played central roles in Num1's functions, were expressed and purified from *E. coli* cells. Protein complexes that bound to the PA domain were isolated from yeast cells through pull-down experiments and analyzed by mass spectrometry. Results: A series of novel Num1-interacting proteins were identified. These included ribosomal proteins, proteins involved in protein folding, sorting and transportation in the ER and Golgi complexes, some nucleases and protein enzymes involved in gene transcription and translation, and other proteins with various functions. Conclusion: Identification of Num1-interacting proteins lays a foundation for further study of Num1's action mechanism.

**Keywords** budding yeast; dynein; PA domain; spindle orientation

为确保细胞的命运决定因子准确地分配到每个子细胞, 所有真核细胞均须正确定位有丝分裂纺锤体<sup>[1]</sup>. 细胞质动力蛋白 Dynein 在各类细胞的纺锤体定位过程中起关键作用<sup>[2-4]</sup>. 在芽殖酵母的不对称分裂过程中, 为了能沿胞质微管产生拉力移动纺锤体, Dynein 在与微管相连的同时, 需被锚定在细胞膜上. Dynein 在细胞膜上的锚定依赖于 Num1 (Nuclear migration 1 核迁移 1)<sup>[5-7]</sup>. Num1 是迄今为止所发现的参与纺锤体定位的唯一位于细胞膜上的因子. Num1 蛋白大约 313 kDa, 由多个结构域组成. 其中,

位于其 C 末端的 PH 结构域通过与细胞膜上的磷酸肌醇 PI(4,5)P<sub>2</sub> 相互作用介导 Num1 与细胞膜结合<sup>[8,9]</sup>; 而另一个位于其 N 末端含有两段预测的 Coiled-coil 序列的结构域则通过自我相互作用介导 Num1 在细胞膜上形成由 14 个分子组成的补丁状复合物, 因此被命名为 Patch Assembly (PA) 结构域<sup>[10]</sup>. 此外, PA 结构域也介导 Num1 与 Dynein 的相互作用<sup>[10]</sup>.

定位于细胞膜上的 Num1 复合物不具有运动性<sup>[8,11]</sup>. 除了在纺锤体定位中的作用, 它还通过与

收稿日期 2018-03-22

作者简介 唐仙英(1974-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 细胞周期. E-mail: xytangscuec@163.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31371366); 上海市教委科研创新项目(14ZZ075)

线粒体膜上特定种类的脂类物质结合而介导线粒体与细胞膜的连接,并由此调节线粒体的分裂<sup>[12,13]</sup>. Lackner 等<sup>[10,12]</sup>发现线粒体与细胞膜的连接是由 Num1 的 PA 结构域尤其是其中预测的 Coiled-coil 序列所介导,但 Num1 在纺锤体定位与线粒体中的活性如何调节目前尚不清楚.本研究利用在 BL21 大肠杆菌细胞中表达纯化的 PA 结构域,通过 Pull-down 实验分离酵母细胞中与 PA 结构域相互作用的蛋白质,并进一步通过质谱分析完成鉴定,旨在通过鉴定 Num1 的互作蛋白,为揭示 Num1 的作用途径及机制奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

DH5 $\alpha$  和 BL21 大肠杆菌细胞(北京鼎国昌盛);蛋白酶抑制剂混合物(Protease Inhibitor Cocktail, Roche),S 蛋白琼脂糖(S protein agarose slurry)、Bugbuster 蛋白提取反应液(Novagen);氨苄青霉素、氯霉素、异丙基硫代半乳糖苷 IPTG、苯甲基磺酰氟 PMSF(BioSharp).

高速冷冻离心机(CR22G 型, HITACHI);微量冷冻离心机(FC5515R 型, OHAUS);高压细胞破碎仪(BT40/TS2/AA 型, Constant System Cell Disruptor);凝胶成像分析仪(Universal Hood II 型, BIO-RAD).

### 1.2 质粒与酵母菌株

编码 Num1<sub>PA(1-303)</sub>-PCN-S-TEV-Z 的质粒 pXT65 (PCN: PreScission 蛋白酶酶切位点, S: S-tag, TEV: TEV 蛋白酶酶切位点, Z: IgG binding motif)用于表达 PA 结构域与 S-tag 的融合蛋白,其构建方法如下:编码 Num1 1-303 aa 且在 5'端含有一个 Nco I 限制性内切酶位点,3'端含有一个 Not I 限制性内切酶位点的 DNA 片段分别用正向引物 5'-CCAGCCATGGCCTCCCAACAACAGGCATAAA AAG-3'和反向引物 5'-CCAGGCGGCCGCCAGATGTT ACTGTAGTATCG-3'从酵母基因组 DNA 通过 PCR 扩增,扩增的片段经 Nco I 和 Not I 酶切后与同样经 Nco I 和 Not I 酶切的载体 pBSG01<sup>[10]</sup>连接并测序确认,产生 pXT65、pXT66(PCN-S-TEV-Z)为空载体对照.酵母菌株 YWL555<sup>[10]</sup>.

基因型为 *MAT $\alpha$  num1 $\Delta$  :: HIS3 ura3-52 lys2-801 leu2- $\Delta$ 1 his3- $\Delta$ 200 trp1- $\Delta$ 63*.

### 1.3 大肠杆菌细胞培养

质粒制备或转化用 DH5 $\alpha$  细胞,重组蛋白表达和制备用 BL21 细胞<sup>[14]</sup>.DH5 $\alpha$  细胞用含氨苄青霉素

的 LB 培养基于 37 °C 培养.用于制备重组蛋白的 BL21 细胞按下述方式培养:保存于-80 °C 的 BL21 大肠杆菌细胞在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上 37 °C 过夜培养.次日从 LB 平板上挑取细胞接种到含氨苄青霉素和氯霉素的 LB 液体培养基,37 °C 过夜培养.第 3 d 将液体培养基中的细胞稀释至 OD<sub>600</sub> = 0.1,25 °C 培养 3 h,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L,20 °C 培养 16 h 诱导融合蛋白表达,离心收集细胞.

### 1.4 蛋白可溶性检测

按 1.2 培养的 BL21 细胞经离心收集后,按每 0.01 g 细胞加入 50  $\mu$ L Bugbuster 蛋白提取反应液,混匀,室温下轻摇 15 min,4 °C 16000 g 离心 20 min;分别取上清和沉淀加入蛋白上样缓冲液,沸水煮 5 min.将上清和沉淀制备的蛋白样品分别经变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离后用考马斯亮兰染色,比较目的蛋白在上清和沉淀中的分配比例.

### 1.5 Pull-down 实验

#### 1.5.1 重组蛋白的制备

携带 pXT65 和 pXT66 的 BL21 大肠杆菌按 1.3 各收集 5 g 细胞.按照每克细胞 1 mL 的比例加入 Bind/Wash buffer [150 mmol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5), 0.05% TritonX-100, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, Protease Inhibitor Cocktail],用高压细胞破碎仪(压力 207 MPa, 4 °C)破碎细胞.破碎的细胞 4 °C 下 12000 g 离心 10 min,收集上清,此为大肠杆菌细胞裂解液.取 100  $\mu$ L S protein agarose 悬液,1000 g 离心 1 min,除去上清,用 Bind/Wash buffer 洗 3 次,每次 1 mL.加入大肠杆菌细胞裂解液,4 °C 旋转混合 45 min,离心,除去上清.再用 Bind/Wash buffer 洗珠子 3 次,每次 5 mL,洗过的珠子置于冰上.

#### 1.5.2 酵母细胞裂解液的制备

离心收集 YPD 液体培养基中旺盛生长的对数期 YWL555 细胞,每个 pull-down 实验需要 5 g 湿细胞.按 1 mL/g 的比例加入酵母裂解缓冲液 [30 mmol/L HEPES (pH 7.4), 50 mmol/L 乙酸钾, 2 mmol/L 醋酸镁, 0.2 mmol/L EGTA, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, Protease Inhibitor Cocktail (Roche)],用高压细胞破碎仪破碎细胞.破碎的细胞液 10000 g 离心 5 min,上清即为酵母细胞裂解液.

#### 1.5.3 Pull-down 反应

将 1.5.2 中制备的酵母细胞裂解液加入到 1.5.1 中已结合了重组蛋白的 S 蛋白琼脂糖中,4 °C 旋转 2

h, 1000 g 离心 1 min, 移去上清。用 Wash buffer [10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 150 mmol/L KCl, 10% Glycerol, 0.05% Triton X-100, 1 mmol/L DTT, Protease Inhibitor Cocktail (Roche)] 洗 3 次, 每次 8 mL。除去 Wash buffer, 加入 100  $\mu$ L 蛋白上样缓冲液, 沸水煮 5 min, 收集上清保存于  $-20^{\circ}\text{C}$ 。

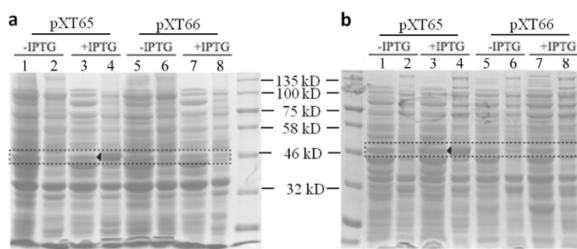
### 1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白鉴定

所有的蛋白质样品均用 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测<sup>[15]</sup>。其中 Pull-down 沉淀下来的酵母蛋白样品 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 再用考马斯亮蓝染色液染色, 切下被 PA 结构域融合蛋白沉淀下来的特异性蛋白条带进行鸟枪法 (shotgun) LC-MS 质谱分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 PA 结构域重组蛋白的表达

PA 结构域是预测的 Coiled-coil 结构, 高度不可溶。比较了不同培养条件下 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 融合蛋白在 BL21 大肠杆菌中的表达 (见图 1), 最后确定适宜的诱导条件为 IPTG 浓度 0.5 mmol/L, 20  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养, 此时 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 存在于细胞裂解液上清的比例相对较高, 图 1 中虚线框对应预期蛋白带, 箭头指示为该蛋白在 20  $^{\circ}\text{C}$  条件下表达 (图 1b) 较 37  $^{\circ}\text{C}$  下表达 (图 1a) 时存在于裂解液上清中的比例高。



1, 3, 5, 7) 上清; 2, 4, 6, 8) 沉淀

a) 37  $^{\circ}\text{C}$ , IPTG 0.5 mmol/L; b) 20  $^{\circ}\text{C}$ , IPTG 0.5 mmol/L

图 1 不同条件下蛋白诱导表达结果

Fig.1 Protein expression induced under different conditions

### 2.2 PA 结构域重组蛋白的纯化

携带 pXT65 [Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z] 或 pXT66 (PCN-S-TEV-Z) 的 BL21 大肠杆菌细胞在含 0.5 mmol/L IPTG 浓度的培养基中 20  $^{\circ}\text{C}$  过夜培养诱导蛋白表达。由于诱导表达的 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 蛋白含有一个 S-tag, 因此可在裂解大肠杆菌细胞后, 使其与 S 蛋白琼脂糖珠子结合而得到纯化, 结果见图 2。如图 2 所示: S 蛋白琼脂糖能从表达 pXT65 的大肠杆菌细胞裂解液中沉淀下来

Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 蛋白 (箭头所示), 而未从表达空载体 pXT66 的大肠杆菌细胞裂解液中沉淀下来蛋白。

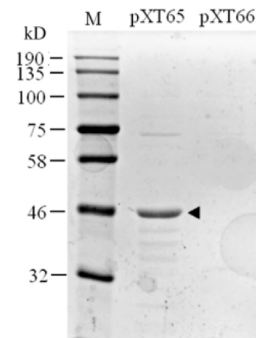


图 2 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 蛋白的纯化

Fig.2 Purification of Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z protein

### 2.3 PA 结构域重组蛋白与酵母蛋白的离体结合

为分离与 PA 结构域相互作用的酵母蛋白, 用结合在 S 蛋白琼脂糖珠子上的 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 蛋白与酵母细胞裂解液进行了离体结合实验, 即 Pull-down 实验。由于 PA 结构域具有自我相互结合的特性<sup>[10]</sup>, 为防止 PA 结构域与酵母内源的 Num1 蛋白相结合, 酵母细胞裂解液已从敲除了野生型 NUM1 基因的酵母菌株 (num1 $\Delta$ , 即 YWL555) 中制备。洗去非特异性结合的蛋白质, 即获得了结合在 S 蛋白琼脂糖珠子上的 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 及其结合的其他蛋白质的复合物。此蛋白复合物样品经 SDS-PAGE 分离后用考马斯亮蓝染色, 结果见图 3。如图 3 所示: 上箭头为 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 蛋白, 下箭头是被 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 特异性沉淀下来的蛋白复合物 (即 pXT66 的 Pull-down 样品中缺乏的蛋白), 将其切割下来进行质谱分析, 用于鉴定与 PA 结构域互作的蛋白。

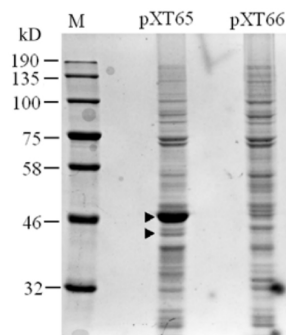


图 3 Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z 的 Pull-down 蛋白检测

Fig.3 Detection of proteins pulled down by Num1<sub>PA(1-303)}</sub>-PCN-S-TEV-Z

### 2.4 互作蛋白的鉴定

通过对 Pull-down 沉淀下来的蛋白复合物进行鸟枪法 (shotgun) LC-MS 质谱分析, 鉴定出一系列新

的与 Num1 相互作用的蛋白,按照参与的细胞功能分组如表 1.

### 3 结语

位于 Num1 N 末端的 PA 结构域(1-303 aa)在 Num1 的功能中起核心作用,缺失了 PA 结构域的 Num1 将同时失去其在纺锤体定位和线粒体中的功能<sup>[10,12,13]</sup>.为分离 Num1 的互作蛋白,在大肠杆菌细胞中表达了 PA 结构域和纯化标签的融合蛋白 Num1<sub>PA(1-303)</sub>-PCN-S-TEV-Z,并用 S protein agarose 对

其进行了纯化.结合在 S protein agarose 珠子上的重组蛋白用于从不表达内源 Num1 蛋白的酵母细胞裂解液中沉淀 PA 结构域的互作蛋白.通过对沉淀下来的蛋白进行鸟枪法 LC-MS 质谱分析,鉴定了一系列新的 Num1 的互作蛋白,包括大量的核糖体蛋白和参与蛋白折叠转运的蛋白,参与基因转录和翻译的核酸酶和蛋白酶,及其他功能各异的蛋白质.这些结果为进一步揭示 Num1 在纺锤体定位及线粒体中的作用机制奠定了基础,也为此过程的调控机制提供了更多思路.

表 1 Num1 的互作蛋白

Tab.1 Proteins interacting with Num1

细胞功能	蛋白名称
核糖体蛋白	Rpl16b, Rbg1, Rps13, Rrp7, Mrp7, Rpl16, Rps11a, L11A, Rpl30, Rpl2a, Rps2, Rpl5, Rps14b, Asc1, Rpl7b, Ribosomal protein L6, L9B, L13, L15, L18A, L19, L25, L27, S9A
参与蛋白折叠与转运的分子伴侣等蛋白	Aha1, Cpr6, Ssa2, Hsp70, Hsp60, Ist1, Cog5, Ydj1, Sgt2
参与基因转录和翻译的核酸酶和蛋白酶	Rpc53, Sbp1, Gcd7, Tif1, Ski1
其他功能	Pdc1, Adh1, Pep4, Hom2, Nop1, Air2, Kap95

#### 参 考 文 献

- 1003-1014.
- [1] Torres E M, Williams B R, Amon A. Aneuploidy: cells losing their balance [J]. *Genetics*, 2008, 179 ( 2 ): 737-746.
- [2] Nguyen-Ngoc T, Afshar K, Gönczy P. Coupling of cortical dynein and G alpha proteins mediates spindle positioning in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nat Cell Bio*, 2007, 9( 11 ): 1294-1302.
- [3] Siller K H, Cabernard C, Doe C Q. The NuMA-related Mud protein binds Pins and regulates spindle orientation in *Drosophila* neuroblasts [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8 ( 6 ): 594-600.
- [4] Du Q, Macara I G. Mammalian Pins is a conformational switch that links NuMA to heterotrimeric G proteins [J]. *Cell*, 2004, 119( 4 ): 503-516.
- [5] Bloom K. Nuclear migration: cortical anchors for cytoplasmic dynein [J]. *Curr Biol*, 2001, 11( 8 ): 326-329.
- [6] Farkasovsky M, Kuntzel H. Cortical Num1 interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast [J]. *J Cell Biol*, 2001, 152( 2 ): 251-262.
- [7] Markus S M, Punch J J, Lee W L. Motor- and tail-dependent targeting of dynein to microtubule plus ends and the cell cortex [J]. *Curr Biol*, 2009, 19 ( 3 ): 196-205.
- [8] Farkasovsky M, Kuntzel H. Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions [J]. *J Cell Biol*, 1995, 131( 4 ): 1003-1014.
- [9] Tang X, Punch J J, Lee W L. A CAAX motif can compensate for the PH domain of Num1 for cortical dynein attachment [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8 ( 19 ): 3182-3190.
- [10] Tang X, Germain B S, Lee W L. A novel patch assembly domain in Num1 mediates dynein anchoring at the cortex during spindle positioning [J]. *J Cell Biol*, 2012, 196( 6 ): 743-756.
- [11] Heil-Chapdelaine R A, Oberle J R, Cooper J A. The cortical protein Num1p is essential for dynein-dependent interactions of microtubules with the cortex [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151( 6 ): 1337-1344.
- [12] Lackner L L, Ping H, Graef M, et al. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110 ( 6 ): E458-E467.
- [13] Ping H A, Kraft L M, Chen W, et al. Num1 anchors mitochondria to the plasma membrane via two domains with different lipid binding specificities [J]. *J Cell Bio*, 2016, 213( 5 ): 513-524.
- [14] 阳小飞, 余 意, 刘孟雪, 等. 稳定表达绿色荧光蛋白的 HEK293T 细胞的构建 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2017, 36( 2 ): 38-41.
- [15] 王红莹, 杜 嫵. 斑马鱼母源凝集素基因 *zfol* 的克隆和表达分析 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2016, 35( 3 ): 26-29.

(责任编辑 刘 钊)