

利用膜蛋白酵母双杂交系统构建人尿道上皮细胞 cDNA 文库

李玲玲,余敏君,邓湘赢,戴佩,朱翠明,罗丹,廖雅婷,曾焱华*

(南华大学病原生物学研究所,特殊病原体防控湖南省重点实验室,湖南省子靶标新药研究协同创新中心,湖南衡阳 421001)

摘要: 利用基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交技术,构建人永生尿道上皮细胞(SV-HUC-1) cDNA 文库。Trizol 法提取人尿道上皮细胞总 RNA,并分离纯化其 mRNA;以 mRNA 为模板,合成 cDNA 第一链、第二链;通过 T4 DNA 聚合酶将 DNA 链两端加上 5' 接头;并将其大于 1 kbp 的片段与膜蛋白酵母双杂交载体 pPR3-N 连接,经电转化大肠杆菌感受态细胞,以构建基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交 cDNA 文库,并检测文库的库容量和随机性。本研究成功构建了人尿道上皮细胞的基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交 cDNA 文库,为进一步研究泌尿生殖道感染病原体与宿主尿道上皮细胞的相互作用奠定了实验基础。

关键词: 膜蛋白酵母双杂交; 人尿道上皮细胞; cDNA 文库

中图分类号:R3 文献标识码:A

Construction and Identification of SV-HUC-1 cells cDNA Library Based on Split-ubiquitin Membrane Yeast Two-hybrid System

LI Lingling, YU Minjun, DENG Xiangying, DAI Pei, ZHU Cuiming,

LUO Dan, LIAO Yating, ZENG Yanhua

(*Institute of Pathogenic Biology, University of South China, Hunan Provincial Key Laboratory for Special Pathogens Prevention and Control, Hunan Province Cooperative Innovation Center of Molecular Target New Drug Study, Hengyang 421001, Hunan, China*)

Abstract: The split-ubiquitin membrane-based yeast two-hybrid system was used to construct the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid cDNA library of human urothelium cell (SV-HUC-1). The whole RNA of SV-HUC-1 cells was extracted by using Trizol and the mRNA was isolated and purified by Oligotex mRNA Kits. The first strand of cDNA was synthesized using reverse transcriptase and the double-strand DNA was synthesized using DNA polymerase. After the 5' adaptors were added, the cDNA products were electrophoresised. The DNA fragments that were longer than 1,000 bp were collected and then ligated into the pPR3-N vector. The recombinant vectors were electrotransformed into Escherichia Coli to construct the SV-HUC-1 cells cDNA Library based on split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system. The quality of library was then identified. The capacity of the library was approximately 1.2×10^7 pfu/cm³ and the recombination rate was about 100%, and the average inserts were about 1,200bp. These results demonstrated that the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid cDNA library of SV-HUC-1 cells with high quality was successfully constructed, which lays an experimental basis for the further study on the interaction between urogenital pathogens and SV-HUC-1 cells.

Key words: membrane yeast two-hybrid; SV-HUC-1 cells; cDNA library

1989年由Fields等最早提出来的酵母双杂交系统(Yeast two-hybrid system)是用来检测细胞核内的蛋白之间的相互作用。而瑞士Dual systems

Biotech AG公司开发了一种新的基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交系统(DUAL membrane starter kit),该系统可以简便、快速、特异地用于检测膜蛋白之间的相互作用^[1-3]。

生殖支原体、沙眼衣原体等泌尿生殖道感染病原体主要通过与其宿主细胞膜上相应的受体蛋白相互作用而感染或侵入宿主细胞^[4]。当无限传代的

收稿日期:2018-05-29;修回日期:2018-07-15

基金项目:国家自然科学基金(NO:31370207,81871256)。

*通信作者,E-mail:zengyihua21cn@126.com.

人永生尿道上皮细胞系(SV40 Immortalized human urothelium cell line, SV-HUC-1)传到第 20 代的时候,依然可以检测到其标志性的蛋白,因此,该细胞是研究泌尿道组织细胞的理想细胞^[5]。鉴于目前国内外尚未见关于泌尿生殖道感染病原体是与人尿道上皮细胞哪些受体蛋白相互作用,因而介导其黏附或侵入细胞的报道,因此,本研究拟通过合成人尿道上皮细胞的 cDNA,利用膜蛋白酵母双杂交系统构建 SV-HUC-1 细胞的 cDNA 文库,为下一步研究泌尿生殖道感染病原体的受体及其与宿主细胞的相互作用奠定实验基础。

1 材料与方 法

1.1 主要材料 Trizol 试剂购自 Initrogen 公司, Oligotex mRNA Kits 购自于 Qiagen 公司, 1 kb Plus DNA Ladder 和 UltraPure Agarose 为上海海科生物公司产品, Supscript double stand cDNA Kit 购自 Invitrogen 公司;台式高速冷冻离心机(Centrifuge 5417R)为 Eppendorf 公司产品, PCR 仪和 MicroPulser 电转化仪(1652100)为 Biorad 公司产品。

1.2 Trizol 法提取细胞总 RNA 提取细胞总 RNA, 步骤简述如下:收集培养好的细胞样本,加入 2.0 mL Trizol,室温静置 5 min;加入 4 mL 酚-氯仿, 12 000 g, 4 ℃离心 10 min,再加入 4 mL 异丙醇, 12 000 g, 4 ℃离心 15 min,弃上清后用 5 mL 75%乙醇洗沉淀 2 次,并用 500 μL DEPC 水溶解,取 1 μL 用于 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析,其余-80 ℃保持备用。

1.3 mRNA 的分离 细胞 mRNA 的分离按 Oligotex mRNA Kits 的说明书进行,其步骤简述如下:将总 RNA 转移到无 RNA 酶的 EP 管中,向其中加入经 70 ℃预热的 OBB 缓冲液,混匀后立即置于 70 ℃水浴 3 min,然后在 20~30 ℃中放置 10 min,室温离心 2 min 后弃上清,用 400 μL 的 OW2 Buffer 重悬沉淀,混匀后转移到 1.5 mL 离心柱上经 14 000 g 离心 1 min,转移到一新的离心管后加入 100 μL 的 DEPC 水(70 ℃预热),混匀后 14 000 g 离心 1 min,转移离心柱(Millpore 公司)至新的 1.5 mL 离心管中加入 400 μL 的 OW2 缓冲液,离心 1 min 后重复上一步骤,再用水洗脱一次,合并两次的洗脱液,加入 60 μL 2 mol/L 的乙酸钠和 600 μL 无水乙醇,混匀后于-80 ℃中放置 15 min,离心 15 min,用 75%乙醇洗一遍,再次离心后溶于 8 μL 的 DEPC 水,取 1 μL 电泳检测并测其 OD 值。

1.4 cDNA 的合成 将 4.5 μg 分离纯化的 mRNA 补

体积至 22.5 μL,加入 DEPC 水 3 μL 和 2 μL 3' RT 引物,置于 PCR 仪上 70 ℃处理 7 min 后置于冰上;同时在另一个无 RNA 酶的 EP 管中加入 10 μL 5×RT Buffer、5 μL 水和 2.5 μL 10 mmol/L 的 dNTPs 和 5 μL 逆转录酶。待引物反应管降至 45 ℃时孵育 2 min,将其加入上述 PCR 反应体系中,混匀,置于 50 ℃孵育 1 h,即生成第一链 cDNA。加入 Glycogen (20 μg/μL)、NH₄OAc(7.5 mol/L)和无水酒精于-80 ℃沉淀, 16 000 g, 4 ℃离心 30 min,弃上清后加入 70%酒精,离心后室温干燥并用 66 μL DEPC 水溶解 cDNA。再通过 DNA 聚合酶合成 cDNA 相应的第二条链,然后加入 160 μL 酚-异戊醇-氯仿混合物,离心 5 min,用乙醇沉淀上清,再用 34 μL DEPC 水溶解。

1.5 cDNA 与载体的连接 将 cDNA 产物与 T4 DNA 连接酶于 16 ℃孵育 24 h,以将 cDNA 末端连接上 5' A 接头,经 T4 DNA 聚合酶将其补平,将产物进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收大于 1 kbp 片段后用 DEPC 水溶解。将 7 μL cDNA 与 3 μL 经酶切处理线性化的 pPR3-N 载体混合,加入 5 μL Infusion 重组酶和 5 μL DEPC 水,混匀后于 50 ℃反应 1 h,加入 2 μL 蛋白酶 K 和 78 μL 无菌水,混匀并于-80 ℃放置 1 h,加入 Glycogen (20 μg/μL)、NH₄OAc(7.5 mol/L)和无水酒精于-80 ℃沉淀,离心后用乙醇洗涤,最后用 10 μL DEPC 水重悬 cDNA 沉淀。

1.6 电转化大肠杆菌感受态细胞 将 2.5 μL 重组产物和 50 μL 感受态细胞加入-80 ℃预冷的电转杯,于电转化仪上电击后迅速加入 1 mL LB 培养基,将 4 份转化后菌液合并后补足培养基到 5 mL, 37 ℃震荡培养 1 h,将培养物稀释 10¹、10²、10³、10⁴ 倍,分别取 10 μL 涂板。

1.7 膜蛋白酵母双杂交文库的质量鉴定 将 10 μL 转化后细菌原液稀释 1 000 倍后,取 10 μL 涂布在含氨苄抗性的 LB 平板上,24 h 后计数,以鉴定文库的库容量。为了鉴定插入片段的大小,随机在平板上挑取 24 个单克隆进行 PCR 扩增,再进行琼脂糖凝胶电泳分析。PCR 产物经 DNA 测序后进行 BLAST 比对以分析其是否为人源性。

2 结 果

2.1 成功提取 SV-HUC-1 细胞的总 RNA 提取了 SV-HUC-1 细胞的总 RNA,并进行琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图 1 所示:所提取的 RNA 出现两条清晰的条带,无降解,18sRNA 条带亮度大约为 28sRNA 条带的亮度的 1/2,这说明提取的 SV-HUC-1 细胞 RNA 质

量较好,完全满足后续构建文库的需要。

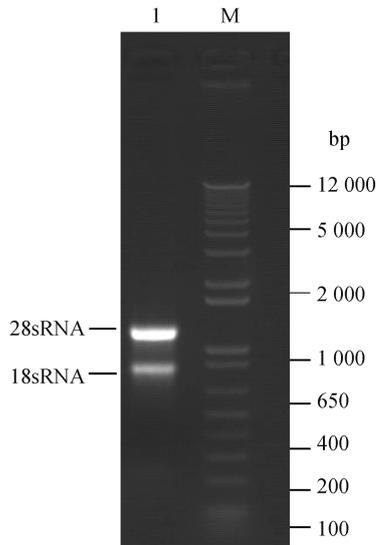


图1 SV-HUC-1细胞总RNA的琼脂糖凝胶电泳
1: Total RNA; M: DNA Marker

2.2 成功分离SV-HUC-1细胞的mRNA 用1.0%琼脂糖凝胶电泳分析经Oligotex mRNA Kits分离纯化的mRNA,如图2所示:mRNA呈弥散灶分布,条带清晰且分布均匀,说明分离的mRNA质量合格。根据测定的OD值计算,mRNA的总量约为5.1 μg,说明成功分离到SV-HUC-1细胞的mRNA,且分离的量可以满足后续建库需要。

2.3 构建的膜蛋白酵母双杂交文库具有较高的库容 为了检测文库的库容,将10 μL原始电转化菌

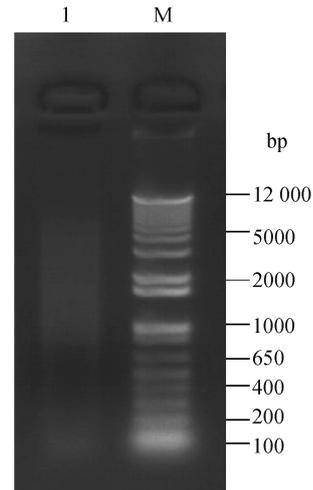


图2 人永生化尿道上皮细胞mRNA的分离与纯化
1: mRNA; M: DNA分子质量标准

液稀释100倍后,取10 μL涂板,平板上共长出240个克隆,共有5 mL原始电转化菌液,因此,总库容量为: $240/10 \times 100 \times 1000 \times 5 = 1.2 \times 10^7$ CFU,说明构建的文库具有较高的库容。

2.4 构建的膜蛋白酵母双杂交文库具有高的重组率和随机性 为进一步鉴定文库的重组率和随机性,对随机挑取的24个单克隆进行PCR后经琼脂糖凝胶电泳分析,结果如图3所示:24个克隆均扩增成功,其重组率达到了100%;且由图可知,插入的片段长度处于400~2 000 bp之间,其平均长度约为1.2 kbp左右,说明文库具有较好的随机性^[7]。BLAST分析表明这些外源插入片段均为人性。

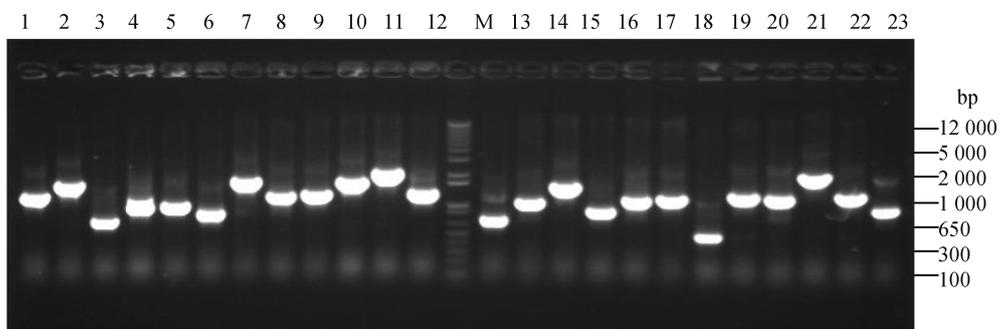


图3 SV-HUC-1细胞cDNA文库随机克隆的PCR产物琼脂糖凝胶电泳
1~23: PCR产物; M: DNA分子质量标准

3 讨 论

泌尿系感染通常可导致不孕不育、急性非淋菌性尿道炎^[6]、子宫内膜炎等疾病。且有相关资料表明生殖支原体、穿透支原体等泌尿生殖道支原体与人类免疫缺陷病毒(HIV)的感染密切相关^[7-8]。

因此,近年来,泌尿生殖道病原体感染越来越引起人们的广泛关注。

病原体感染或侵入宿主细胞依赖于病原体和宿主细胞膜上相应受体蛋白的作用,因此,病原体的组织亲嗜性是由病原体的黏附蛋白和宿主细胞的受体蛋白的特异结合决定的。通过深入研究能与

病原体特异结合的宿主细胞膜表面的受体,有助于了解病原体的致病机制,并可利用受体模拟分子或者拮抗分子来阻挡病原体黏附或侵入宿主细胞,从而开发出新型药物或者疫苗防治病原体感染。

免疫共沉淀技术、亲和蛋白组学技术和酵母双杂交技术等都可用于研究病原体与宿主细胞相应受体蛋白之间的相互作用。其中由 Fields 等在 1989 年提出的酵母双杂交技术是现在研究蛋白质相互作用的最有效的手段之一^[4],该方法利用诱饵和猎物蛋白相互作用的报告基因,判断特定蛋白之间有无相互作用^[9]。由于是在细胞核内融合蛋白通过相互作用而激活转录,因此经典的酵母双杂交系统并不可以用于膜蛋白之间的研究,而瑞士 Dual systems Biotech AG 公司开发的基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交系统(DUAL membrane starter kit)无需核定位信号、且泛素蛋白对具有相互作用的蛋白的影响很小,可检测膜蛋白与其它蛋白之间的相互作用^[10-12]。因此,基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交技术目前已广泛用于寻找病原菌与宿主细胞受体蛋白的相互作用。如 Grefen C 等利用该方法证实肺炎衣原体 CPj0783 蛋白能够识别人 Huntingtin-protein14 蛋白^[13]痢疾杆菌的 IpaC 蛋白可以与人胶原酶蛋白发生相互作用,提示胶原酶蛋白可能是痢疾杆菌的受体作用靶点^[14]。

为了阐明泌尿生殖道感染病原体与宿主细胞受体蛋白相互作用的关系及其可能的致病机制,本研究利用基于分离的泛素介导的膜蛋白酵母双杂交系统构建了 SV-HUC-1 的 cDNA 文库。在研究中,我们使用同源重组的方式将合成的 cDNA 与经酶切处理线性化的 pPR3-N 载体进行连接,由于线性化的 DNA 两端与基因组 DNA 的多处序列具有同源性,因而后续的重组连接更准确,该重组方法整合了其它公司所用连接方法的优点步骤相对简单,克服了其连接效率低的缺点,从而大大提高了文库质量^[15],且方便今后将该文库样本构建到任何其它载体上。本研究中构建的 cDNA 文库的库容达到了 1.2×10^7 ,一般而言,如果文库的平均滴度在 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 之间,则表明文库的质量较好,且本研究中构建的文库具有很高的重组率和随机性,因此,本研究成功构建了基于分离泛素介导的膜蛋白酵母双杂交系统的 SV-HUC-1 cDNA 文库,为进一步研究泌尿生殖道感染病原体与宿主细胞的相互作用,阐明泌尿生殖道感染病原体感染宿主细胞的致病机制奠定了实验基础。我们在下一步的研究将利用此文库筛选生殖支原体、沙眼衣原体和淋病奈瑟菌等

常见泌尿生殖道感染病原体的受体蛋白,以明确这些病原体与宿主受体蛋白的相互作用、阐明其可能的致病机制。

参考文献:

- [1] COX C, MCKENNA JP, WATT AP, et al. Urea plasma parvum and mycoplasma genitalium are found to be significantly associated with microscopy-confirmed urethritis in a routine genitourinary medicine setting[J]. Int J STD AIDS, 2016, 27(10): 861-7.
- [2] MARTIN DH, MANHART LE, WORKOWSKI KA et al. Mycoplasma genitalium from basic science to public health: summary of the results from a national institute of allergy and infectious diseases technical consultation and consensus recommendations for future research priorities[J]. J Infect Dis, 2017, 216(suppl_2): S427-30.
- [3] MEMISEVIC V, ZAVALJEVSKI N. Mining host-pathogen protein interactions to characterize burkholderia mallei infectivity mechanisms[J]. P LoS Comput Biol, 2015, 11(3): e1004088.
- [4] LIU M, DU G, LI B, et al. Cholesterol exacerbates Mycoplasma hyopneumoniae-induced apoptosis via stimulating proliferation and adhesion to porcine alveolar macrophages[J]. Vet Microbiol, 2017, 211: 112-8.
- [5] 江绍锋,黄金清,于晓宇,等. 产酸克雷伯氏菌基因组文库的构建及鉴定[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2016, 34(2): 151-7.
- [6] KASPRZYKOWSKA U, ELIAS J, ELIAS M, et al. Colonization of the lower urogenital tract with Urea plasma parvum can cause asymptomatic infection of the upper reproductive system in women: a preliminary study [J]. Arch Gynecol Obstet, 2014, 289(5): 1129-34.
- [7] SETHI S, ZAMAN K, JAI N, et al. Mycoplasma genitalium infections: current treatment options and resistance issues [J]. Infect Drug Resist, 2017, 10: 283-92.
- [8] SHIMIZU T. Pathogenic factors of mycoplasma [J]. Nihon Saikingu Zasshi, 2015, 70(4): 369-74.
- [9] YANATORI I, YASUI Y, OUCHI K, et al. Chlamydia pneumoniae CPj0783 interaction with Huntingtin-protein14 [J]. Int Microbiol, 2015, 18(4): 225-33.
- [10] INDRIOLO E, GORING DR. Yeast two-hybrid interactions between Arabidopsis lyrata S Receptor Kinase and the ARC1 E3 ligase [J]. Plant Signal Behave, 2016, 11(6): e1188233.
- [11] BASHLINE L, GU Y. Using the split-ubiquitin yeast two-hybrid system to test protein-protein interactions of transmembrane proteins [J]. Methods Mol Biol, 2015, 1242: 143-58.
- [12] LI J, GAO J, HAN L, et al. Development of a membrane-anchored ligand and receptor yeast two-hybrid system for ligand-receptor interaction identification [J]. Sci Rep, 2016, 6: 35631.
- [13] SNIDER J, STAGLIGAR I. Membrane yeast two-hybrid (MYTH) mapping of full-length membrane protein interactions [J]. Cold Spring HarbProtoc, 2016, 2016(1): pdb.top077560.
- [14] PETSCHNIGG J, WONG V, SNIDER J, et al. Investigation of membrane protein interactions using the split-ubiquitin membrane yeast two-hybrid system [J]. Methods Mol Biol, 2012, 812: 225-244.
- [15] DU W, XIA J, ZHANG Y, et al. Expression of recombinant myostatin pro peptide pPIC9K-Msp plasmid in Pichia pastoris [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4): 18414-20.

(本文编辑:蒋湘莲)