

FLAG Pull-down 技术筛选人乳腺癌细胞中 NGAL 相互作用蛋白

毛山山,程小珍,崔荣花,元建华,王美清

(中南大学湘雅医学院附属海口医院肿瘤化疗科,海南 海口 570208)

【摘要】 目的 构建含有 NGAL 基因的 p3XFLAG-NGAL 真核表达载体并对其进行鉴定,获取人乳腺癌细胞 MCF7 中 NGAL 相互作用蛋白。方法 提取 MCF7 细胞中总 RNA,反转录为 cDNA 后采用聚合酶链反应扩增 NGAL 基因,上下游分别引入 *Not I* 和 *EcoR I* 酶切位点,双酶切后将其插入 p3XFLAG-CMV-14 质粒中,构建 p3XFLAG-NGAL 重组质粒,并进行双酶切和测序鉴定。采用脂质体法转染该质粒至 MCF7 细胞中,经 Western blot 检测 FLAG-NGAL 融合蛋白的表达情况。再使用 FLAG pull-down 技术和蛋白质谱测定获取人乳腺癌细胞 MCF7 中 NGAL 相互作用蛋白。结果 经过 *Not I* 和 *EcoR I* 双酶切及 DNA 测序验证,本研究成功构建 p3XFLAG-NGAL 真核表达载体,免疫印迹证实转染了 p3XFLAG-NGAL 载体的人乳腺癌细胞 MCF7 高表达 FLAG-NGAL 融合蛋白,并利用 FLAG pull-down 技术筛选出人乳腺癌细胞 MCF7 中 NGAL 相互作用蛋白,经蛋白质谱测定为角蛋白-1 (Keratin 1, KRT1)。结论 成功构建 p3XFLAG-NGAL 真核表达载体,并获取人乳腺癌细胞 MCF7 中 NGAL 相互作用蛋白 KRT1,为下一步研究乳腺癌的发生、发展机制提供新的思路和靶点。

【关键词】 NGAL;乳腺癌;p3XFLAG 载体;相互作用蛋白

【中图分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2017)17-2753-04

Screening of NGAL interacting proteins in human breast cancer cells by FLAG Pull-down. MAO Shan-shan, CHENG Xiao-zhen, CUI Rong-hua, YUAN Jiang-hua, WANG Mei-qing. Department of Oncology, Central South University Xiangya School of Medicine Affiliated Haikou Hospital, Haikou 570208, Hainan, CHINA

【Abstract】 Objective To construct a eukaryotic expression vector p3XFLAG-NGAL containing NGAL gene and identify the NGAL interacting protein in human breast cancer cell line MCF7. **Methods** The total RNA was extracted from MCF7 cells, then reverse transcription of cDNA was preformed to amplify NGAL gene by polymerase chain reaction. *Not I* and *EcoR I* restriction enzyme sites were introduced separately in the upstream and downstream. The amplification of NGAL gene ingested by double enzyme digestion was inserted into plasmid p3XFLAG-CMV-14 to construct recombinant plasmid p3XFLAG-NGAL, and then double enzyme digestion and sequencing for identifying. The plasmid was transfected into MCF7 cells by liposome method, and the expression of FLAG-NGAL fusion protein was detected by Western blot. NGAL interaction protein in human breast cancer cell line MCF7 was obtained by FLAG pull-down and protein mass spectrometry. **Results** The eukaryotic expression vector p3XFLAG-NGAL was confirmed by restriction endonuclease *Not I* and *EcoR I* double enzyme digestion and DNA sequencing that the NGAL gene was cloned into the p3XFLAG vector. Western blot results further confirmed that the p3XFLAG-NGAL eukaryotic expression vector was constructed correctly, and KRT1 was identified as the possible interacting protein with NGAL in human breast cancer cells MCF7. **Conclusion** The eukaryotic expression vector of p3XFLAG-NGAL was successfully constructed, and the NGAL interacting protein, KRT1, was obtained in human breast cancer cell line MCF7. These studies provide new ideas and targets for the further study of the pathogenesis and development of breast cancer.

【Key words】 NGAL; Breast cancer; p3XFLAG vector; Interaction protein

乳腺癌是严重威胁女性身心健康的恶性肿瘤之一,其发病率位居女性恶性肿瘤的第1位^[1]。乳腺癌的复发和转移是影响其预后的主要因素。中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(neutrophil gelatinase associated lipocalin, NGAL)作为一种新型肿瘤相关蛋白,被越来越多研究证实其在乳腺癌中高表达^[2-3],且能够促进乳腺癌的发生和转移^[4-6],但是其具体的作用机制还不甚明了。本研究期望通过采用 FLAG

Pull-down 技术筛选出人乳腺癌细胞中与 NGAL 相互作用的蛋白,对 NGAL 在乳腺癌发生发展过程中的分子机制进行初步探讨,为进一步深入研究提供新思路和新靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Biowest 公司;Trizol、PCR 试剂盒、Lipo2000、T₄ ligase、质粒提取试剂盒、胶回收

基金项目:海南省自然科学基金(编号:812164)

通讯作者:毛山山。E-mail:coco333333@126.com

试剂盒、限制性内切酶 *Not* I 和 *Eco*R I 均购自 TaKaRa 公司;载体 p3XFLAG-CMV-14 购自 Sigma 公司;小鼠单抗 Flag 抗体和 Flag beads 购自 Sigma 公司,小鼠单抗 Tubulin 抗体、山羊抗小鼠二抗、100 bp DNA marker 和蛋白 marker 购自北京鼎国昌盛生物公司;人乳腺癌细胞 MCF7 购自国家实验细胞资源共享平台。培养箱和超净工作台购自 Thermo Forma 公司;水平式琼脂糖凝胶电泳仪、垂直式电泳仪和湿式电转移购自 Bio-Rad 公司;凝胶成像系统购自 Gene 公司;Qstar 质谱仪购自 ABI 公司。

1.2 相关引物设计 从 NCBI 获得 *NGAL* 基因 mRNA 的全长序列,设计引物序列如下:*NGAL* 5'P *Not*I: ATAAGAATGCGGCCGCATGGTGCCCC TAG-GTCTCCT GTGGC ;*NGAL* 3'P *Eco*RI: CCGGAATTC-GCGCCGTCGATACA CTGGTCGATT GGG。引物委托北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。

1.3 目的基因的扩增 收集培养好的 MCF7 细胞,加入 1 mL Trizol,剧烈震荡混匀,室温下放置 5 min 后加入 200 μ L 氯仿。4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,将上清液(约 600 μ L)转移至新的无 RNase 的 1.5 mL 离心管中。加入等体积氯仿,静置 2 min 后 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液至新的无 RNase 的 1.5 mL 离心管中。再等体积加入异丙醇,上下颠倒充分混匀后于 -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min。离心后弃上清,沉淀用 75% 预冷乙醇洗涤,充分干燥后加入适量 DEPC 水溶解 RNA 并测定浓度。为了防止 DNA 对反转录的影响,要用 DNase 消化提取的 RNA 中的 DNA,其消化程序和反应液的量按说明书操作。随后按照逆转录试剂盒相关操作将 RNA 逆转录为 cDNA,即可作为 PCR 的反应模板。采用 *NGAL* 合成引物进行 PCR 反应,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;60 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30;进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 p3XFLAG-*NGAL* 真核表达载体的构建 (图 1) PCR 产物与 p3XFLAG 质粒分别同时使用 *Not* I 和 *Eco*R I 双酶切,37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。配制 1.0% 琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳,在紫外透射下切胶回收,然后使用 *T*₄ ligase 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态中,使用含终浓度为 50 mg/L 氨苄青霉素的琼脂平板进行筛选,挑选单克隆菌落放入 100 mL 含氨苄青霉素的培养液中摇床过夜,次日按照质粒提取试剂盒步骤提取质粒。

1.5 p3XFLAG-*NGAL* 真核表达载体的酶切及测序鉴定 将提取好的 p3XFLAG-*NGAL* 质粒同时进行 *Not* I 和 *Eco*R I 双酶切,37 $^{\circ}$ C 酶切过夜。配制 1.0% 琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳,使用 PCR 产物作对照,放入含 EB 的溶液中浸泡 20 min,观察条带并放入凝胶

成像仪器中拍照。将酶切正确的 p3XFLAG-*NGAL* 质粒送上海美吉生物医药科技有限公司测序。应用 Chromas 软件读取测序结果,使用 NCBI BLAST 验证测序结果。

1.6 免疫印迹法检测 FLAG-*NGAL* 融合蛋白在 MCF7 中的表达 人乳腺癌细胞 MCF7 使用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清,1% 抗生素) 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中培养。当细胞密度达到 80% 以上时使用 Lipo2000 转染试剂进行转染,每 6 cm 盘细胞使用质粒量 4 μ g。分别转染对照质粒 p3XFLAG 与重组质粒 p3XFLAG-*NGAL*。在转染 48 h 后检测 Flag 蛋白表达水平。将细胞样品中加入预冷的裂解液,超声破碎后 13 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min;轻轻吸取上清,转移至新的离心管中置于冰上待用。使用 BCA 蛋白定量试剂盒通过标准曲线计算出样品的蛋白浓度。取等量蛋白样品,加入上样缓冲液,97 $^{\circ}$ C 加热 6 min 变性,室温冷却离心后上样。SDS-PAGE 凝胶电泳结束后,采用电转仪将蛋白从分离胶转移至 PVDF 膜上。转膜完成后,将 PVDF 膜封闭后加入抗 Flag 一抗(浓度 1:1 000),4 $^{\circ}$ C 杂交过夜。洗去一抗后加入辣根酶标记的山羊抗小鼠二抗(浓度 1:3 000),室温孵育 1 h,将 ECL 的 A 液和 B 液等体积混合后均匀滴在 PVDF 膜上,放入暗盒中显影。

1.7 FLAG pull-down 技术获取 MCF7 中 *NGAL* 相互作用蛋白 收集 1×10^8 转染 p3XFLAG 或质粒 p3XFLAG-*NGAL* 的 MCF7 细胞,加入预冷的裂解液,超声破碎后 13 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10 min;轻轻吸取上清,转移至新的离心管中置于冰上待用。使用 BCA 法蛋白定量为 1 mg/mL。取总蛋白量为 1 mg 的蛋白液加入 20 μ L Flag beads,置于 4 $^{\circ}$ C 轻柔旋转震荡,拉取与 *NGAL* 相互作用蛋白。2 h 后离心,弃上清。裂解 Buffer 洗涤 4 次,弃上清。加入 40 μ L 裂解液和 10 μ L SDS 上样 Buffer,100 $^{\circ}$ C 煮 7 min,行 SDS-PAGE。考马斯亮蓝染色 4 h,脱色后观测是否有差异蛋白。用刀片小心切下含有差异蛋白的胶块,4 $^{\circ}$ C 保存,进行蛋白质谱的测定。

1.8 蛋白质谱测定 用 50% ACN/25 mmol/L NH₄HCO₃ (pH 8.0) 300 μ L 脱色 30 min,分别脱色 3 次,或者脱色到胶体无色。加入 50 μ L 100% ACN (ACN 中不能有酸性物)浸泡胶体约 5 min,胶干燥变白后吸出 ACN,EP 管中的剩余 ACN 采用自然蒸发。随后加 10 μ L Trypsin (Trypsin 10~15 μ g/mL,溶于 25 mmol/L NH₄HCO₃, pH 8.0) 浸没胶体,吸胀。4 $^{\circ}$ C 浸没 30 min 后,移除多余酶液,并加入 10 μ L 25 mmol/L NH₄HCO₃ 浸没,37 $^{\circ}$ C 过夜(约 15 h)。吸出蛋白酶解液,转入新的离心管中,原来的离心管中加入 100 μ L 60% ACN/0.1% TFA 超声裂解 15 min,吸出溶液,加入到有蛋白酶解液的离心管

中,反复操作3次,合并所有溶液,进行冻干。采用ESI-MALDI-TOF-MS分析肽段。

医药科技有限公司测序,测序结果经NCBI BLAST验证正确。这说明p3XFLAG-NGAL真核表达载体的构建是正确的。

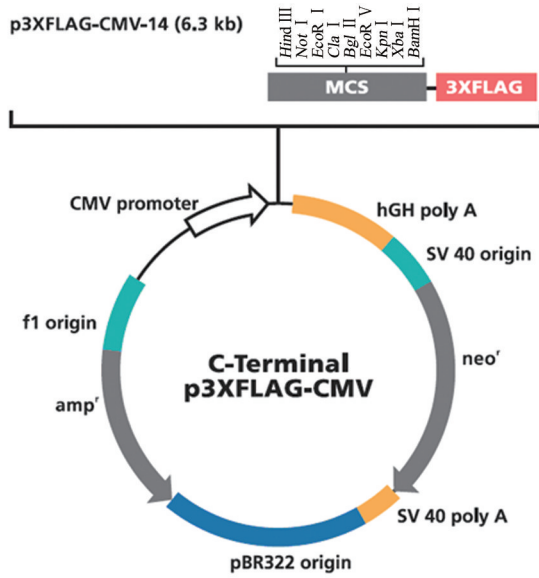


图1 p3XFLAG-CMV-14载体序列图

注:图片来自Sigma公司官方网站(<http://www.sigmaaldrich.com/>)

2 结果

2.1 NGAL基因扩增结果 NGAL基因扩增产物经1.0%琼脂糖电泳鉴定,在500~750 bp处可见一清晰条带,基本与NGAL mRNA约600 bp的长度大小一致,见图2。

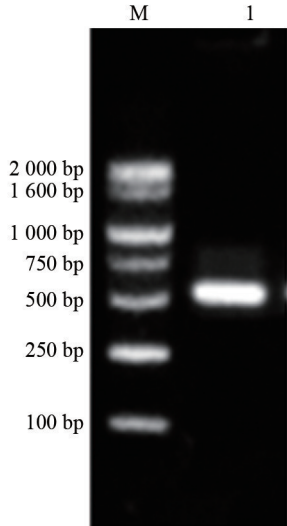


图2 NGAL基因扩增结果

注:M:100 bp DNA marker (NMW002);1:PCR产物。

2.2 p3XFLAG-NGAL真核表达载体的鉴定 采用NotI和EcoRI双酶切连接好的p3XFLAG-NGAL重组质粒,将NGAL基因扩增产物做为对照,经1%琼脂糖电泳后,紫外线下可见对照组和双酶切组在靠近500~750 bp处各有一条带,位置相同,与NGAL基因的长度600 bp相符,酶切结果见图3。将双酶切鉴定正确的p3XFLAG-NGAL真核表达载体送上海美吉生物

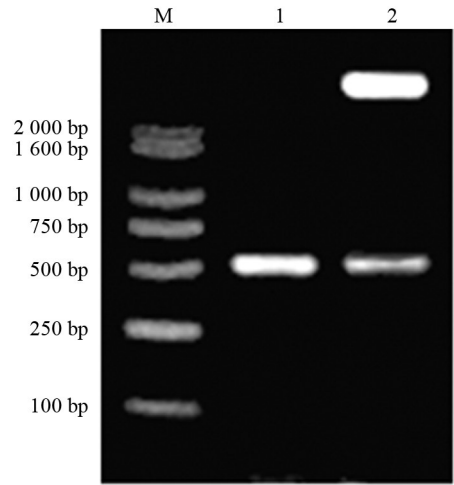


图3 p3XFLAG-NGAL真核表达载体双酶切鉴定结果

注:M:100 bp DNA marker (NMW002); 1:p3XFLAG对照质粒; 2:p3XFLAG-NGAL重组质粒。

2.3 鉴定FLAG-NGAL融合蛋白在MCF7中的表达 取对数生长期的人乳腺癌细胞MCF7分别转染p3XFLAG、p3XFLAG-NGAL质粒48 h后,经Western blot检测FLAG-NGAL融合蛋白表达情况。转染p3XFLAG-NGAL质粒的FLAG-NGAL融合蛋白约在25 KD处有明显的条带,而转染p3XFLAG质粒组没有蛋白的表达,见图4。

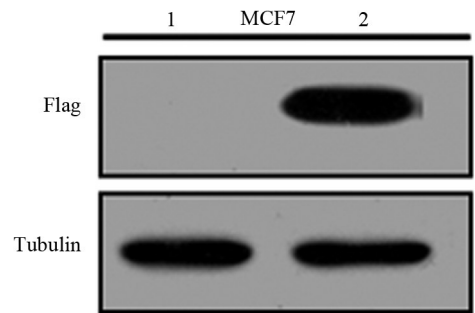


图4 FLAG-NGAL融合蛋白的免疫印迹结果

注:1:p3XFLAG对照质粒;2:p3XFLAG-NGAL重组质粒。

2.4 采用FLAG Pull-down技术获取MCF7中NGAL相互作用蛋白 将过表达的FLAG-NGAL融合蛋白用Flag beads进行免疫沉淀,蛋白液行SDS-PAGE。结果发现在FLAG-NGAL过表达的样品中分子量在55~72 kD间多出一条蛋白带,而在转染空白质粒对照样品中未见存在,见图5。将该条带送北大医学部蛋白组学实验中心进行质谱测定。质谱结果显示该差异条带最可能是分子量为66 kD的KRT1蛋白。为此我们推断NGAL蛋白可能与KRT1蛋白之间存在相互作用。

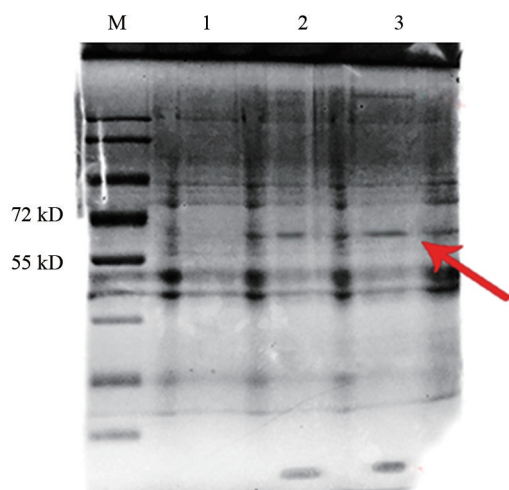


图5 免疫沉淀 FLAG-NGAL SDS凝胶电泳结果

注:箭头示KRT1蛋白带,M:蛋白marker (PM0021);1:p3XFLAG对照质粒;2,3:p3XFLAG-NGAL重组质粒。

3 讨论

随着发病率和死亡率的逐年升高,乳腺癌已成为严重威胁女性身心健康的首要恶性肿瘤。虽然近年来诊疗技术和化疗药物不断更新,乳腺癌患者的治疗有了极大地改善,但患者的生存率并没有得到显著提高。复发和转移是仍影响乳腺癌预后的主要因素。

NGAL又名lipocalin 2,是lipocalin家族的新成员,于1993年在人中性粒细胞中被发现^[7],是一种只有25 kD的小分子分泌蛋白。最初NGAL是作为黏膜的先天性免疫因子进入大家视野^[8-9]。现今它在周围循环中表达水平的改变常应用在临床对肾功能早期损伤的检测中^[10-11]。近年来NGAL与人类肿瘤的关系受到了人们的重视,它在多种肿瘤中表达上调^[12-14],并被认为是一种新的癌基因^[15]。有越来越多研究证实NGAL和乳腺癌侵袭和转移密切相关。Shi等^[16]的研究表明NGAL可能通过对PI3K/Akt通路的抑制作用,促进乳腺癌细胞的肺转移。Yang等^[17]的研究证明NGAL能够在体内和体外促进血管生成,进而促进肿瘤的进展。Wang等^[18]的研究揭示C/EBP ζ 能够直接作用于NGAL启动子区域,抑制NGAL基因的转录,从而抑制乳腺癌细胞的侵袭转移。

为了寻找抗肿瘤转移新的靶点,进一步阐明乳腺癌复发和转移的机制,我们构建了p3XFLAG-NGAL真核表达载体,并经Western blot检测证实FLAG-NGAL融合蛋白在人乳腺癌细胞MCF7中高效表达。然后我们采用FLAG Pull-down技术筛选并经蛋白质谱分析鉴定出人乳腺癌细胞MCF7中可能与NGAL存在相互作用的蛋白KRT1。接下来我们将对KRT1蛋白进一步研究和验证,明确NGAL在乳腺癌发生、转移中的作用及其相关的信号通路,从而为深入研究乳腺癌的发生、发展机制提供新的思路,并在此基础上寻找治疗乳腺癌的靶点和筛选能够预测乳腺癌转移及预后的分子标志物。

参考文献

[1] Cancer Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of hu-

man breast tumours [J]. Nature, 2012, 490(7418): 61-70.

- [2] Leng X, Ding T, Lin H, et al. Inhibition of lipocalin 2 impairs breast tumorigenesis and metastasis [J]. Cancer Res, 2009, 69(22): 8579-8584.
- [3] Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 108(3): 389-397.
- [4] Yang J, McNeish B, Butterfield C, Moses MA. Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer [J]. FASEB J, 2013, 27(1): 45-50.
- [5] Berger T, Cheung CC, Elia AJ, et al. Disruption of the *Len2* gene in mice suppresses primary mammary tumor formation but does not decrease lung metastasis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(7): 2995-3000.
- [6] Leng X, Wu Y, Arlinghaus RB. Relationships of lipocalin 2 with breast tumorigenesis and metastasis [J]. J Cell Physiol, 2011, 226(2): 309-314.
- [7] Kjeldsen L, Johnsen AH, Sengelov H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase [J]. J Biol Chem, 1993, 268(14): 10425-10432.
- [8] Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, et al. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition [J]. Mol Cell, 2002, 10(5): 1033-1043.
- [9] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron [J]. Nature, 2004, 432(7019): 917-921.
- [10] Haase M, Haase-Fielitz A, Bellomo R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease [J]. Curr Opin Hematol, 2010, 18(1):11-18.
- [11] Viau A, El Karoui K, Laouari D, et al. Lipocalin 2 is essential for chronic kidney disease progression in mice and humans [J]. J Clin Invest, 2010, 120(11): 4065-4076.
- [12] Bousserouel S, Kauntz H, Gosse F, et al. Identification of gene expression profiles correlated to tumor progression in a preclinical model of colon carcinogenesis [J]. Int J Oncol, 2010, 36(6): 1485-1490.
- [13] Miyamoto T, Kashima H, Suzuki A, et al. Laser-captured microdissection-microarray analysis of the genes involved in endometrial carcinogenesis: stepwise up-regulation of lipocalin2 expression in normal and neoplastic endometria and its functional relevance [J]. Hum Pathol, 2011, 42(9): 1265-1274.
- [14] Wang HJ, He XJ, Ma YY, et al. Expressions of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in gastric cancer: a potential biomarker for prognosis and an ancillary diagnostic test [J]. Anat Rec (Hoboken), 2010, 293(11): 1855-1863.
- [15] Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene [J]. Cancer Lett, 2010, 288(1): 10-16.
- [16] Shi H, Gu Y, Yang J, et al. Lipocalin 2 promotes lung metastasis of murine breast cancer cells [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2008, 27(1): 83.
- [17] Yang J, McNeish B, Butterfield C, et al. Lipocalin 2 is a novel regulator of angiogenesis in human breast cancer [J]. FASEB J, 2013, 27(1): 45-50.
- [18] Wang L, Li H, Wang J, et al. C/EBP ζ targets to neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a repressor for metastasis of MDA-MB-231 cells [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(10): 1803-1813.

(收稿日期:2017-03-25)