

Num1 和 Pil1 超表达菌株构建及互作关系探究

海力, 肖瑶, 庞文颖, 滕雪, 唐仙英*

(中南民族大学生命科学院, 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, 生物技术国家民委重点实验室, 湖北武汉 430074)

摘要 为了研究 Num1 和 Pil1 之间是否存在互作, 构建了 Pil1 超表达菌株, 并通过酵母四分体解离技术成功构建得到用于免疫共沉淀试验的超表达 Pil1 和 Num1 的菌株。通过免疫共沉淀试验对 Num1 与 Pil1 的互作关系进行初步研究, 并对试验中遇到问题的可能原因进行了分析。这些结果为研究 Pil1 是否参与细胞膜上 Num1 簇的形成奠定了基础。

关键词 酵母; Num1; Pil1; 免疫共沉淀

中图分类号 Q78 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)18-0107-05

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.18.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Construction of Num1 and Pil1 Over-expressing Strains and Exploration of Their Interactions

HAI Li, XIAO Yao, PANG Wen-ying et al. (Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plants in Wuling Area of China, Key Lab for Biotechnology of State Ethnic Affairs Commission, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

Abstract To study whether there is an interaction between Num1 and Pil1, we constructed a Pil1 overexpression strain, and then successfully constructed the strain overexpressing both Pil1 and Num1, which can be used for co-immunoprecipitation experiments, via yeast tetrad dissection technique. We conducted preliminary study on the interaction between Num1 and Pil1 by co-immunoprecipitation, and analyzed possible reasons for problems encountered in the experiment. These results laid the foundation for studying whether Pil1 participates in the formation of Num1 clusters on the cell membrane.

Key words Yeast; Num1; Pil1; Co-immunoprecipitation

细胞器(organelle)一般认为是散布在细胞质内具有一定形态和功能的微结构或微器官。细胞中的细胞器主要有线粒体、内质网、中心体、叶绿体、高尔基体、核糖体等。它们组成了细胞的基本结构,使细胞能正常工作、运转。曾经认为不同的细胞器在细胞中执行不同的功能,各细胞器独立运作,但现在发现,细胞器之间是相互联系的,并且这些联系对于细胞器的功能和整个细胞内环境的稳定至关重要^[1-3]。

线粒体与质膜间的接触对于细胞正常生长也很重要,这些接触会对线粒体形态、分裂、融合、定位和遗传进行调控^[4],线粒体与质膜的连接使得线粒体附着在细胞皮层,使线粒体保持延伸状的形态,更重要的是这种连接会确保在有丝分裂过程中线粒体被准确地分配至子细胞中^[5],同时,这种线粒体-质膜连接也参与线粒体分裂^[6-7]。

细胞器间的接触是通过细胞器间的蛋白互作实现。并且,在不同的生理环境下定位于接触位点的蛋白质会建立、维持或者改变接触,从而影响多种细胞的基本功能^[8]。在酿酒酵母中,线粒体-内质网(ER)-质膜(PM)三者间形成的锚结构(MECA)将线粒体与PM和ER相连,使得3个细胞器膜彼此靠近^[9],MECA的核心蛋白组分是Num1蛋白,Num1是一个313 kD蛋白,由一个N末端卷曲螺旋(CC)结构域(95~303 aa),一个推测的钙结合区EF-hand(303~316 aa),一个FFAT基序(306~330 aa),一个包含13个由64个残基串联重复序列构成的(592~1776 aa)的中间TR结构域,以

及一个C末端的PH(pleckstrin homology)结构域组成^[10-11]。Num1通过C末端的PH结构域与质膜结合,通过N末端的CC结构域与线粒体结合,从而使线粒体和细胞质膜连接起来。有趣的是,线粒体与质膜之间的Num1蛋白簇也作为动力蛋白的皮质锚,在纺锤体的正确定位中起重要作用^[12-14]。动力蛋白沿着星状微管运行,之后被锚定至细胞膜的Num1簇^[15],以帮助有丝分裂过程中纺锤体的正确定位^[12-13]。反过来,Num1簇的形成也受到线粒体的调控,当线粒体遗传受到抑制时,Num1簇的形成受到影响,进而导致动力蛋白介导的纺锤体定位产生错误,导致细胞核的不正常分离^[16]。

质膜是否也在Num1簇的形成中起作用,为了研究这一问题,从实验室之前通过Num1的Pull-Down试验鉴定出的蛋白中,筛选出定位在细胞膜的蛋白Pil1进一步研究^[17]。Pil1是酵母Eisosome的主要成分,Eisosome是一种大的蛋白复合体,定位于酵母质膜上^[18]。Eisosome通过Pil1直接与细胞膜上的脂质结合并产生内陷^[19]。为了验证Pil1和Num1之间的互作,构建了过表达Pil1和Num1的菌株,通过免疫共沉淀试验检测Pil1和Num1的相互作用,旨在为研究Eisosome是否在Num1簇的形成中起作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株。酿酒酵母YWL37基因型:MAT α *ura3-52 lys2-801 leu2- Δ 1 his3- Δ 200 trp1- Δ 63*^[17];YT52基因型:MAT α *TRP1-GAL1-Num1-YFP-HIS ura3-52 lys2-801 leu2- Δ 1 his3- Δ 200 trp1- Δ 63*;质粒pFA6a-TRP-GAL1-3HA;免疫共沉淀试验所需菌株收集量为YT47:135 mg;YT52:166 mg;YT84:149 mg。

1.1.2 培养基及试剂。YPD培养基和缺乏相应氨基酸的SD

基金项目 国家自然科学基金项目(31401155);中南民族大学基本科研业务费专项(3212018CZY18021)。

作者简介 海力(1995—),男,河南商丘人,硕士研究生,研究方向:细胞生物学。*通信作者,教授,硕士生导师,从事细胞周期研究。

收稿日期 2020-02-29

(synthetic define)培养基;SPM培养基(Yeast extract 1 g/L, CSM 0.2 g/L, Glucose 0.5 g/L, Potassium acetate 10 g/L);Lithium-Sorb溶液(10 mmol/L Tris-base, 100 mmol/L Sorbitol, 10 mmol/L LioAC, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0);PEG(40% PEG, 10 mmol/L LioAC, 10 mmol/L Tris-base, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0);转膜液(10% 甲醇, 0.05% SDS, 25 mmol/L Tris-base, 190 mmol/L Glycine);TBST溶液(50 mmol/L Tris-base, 300 mmol/L NaCl, 0.05% Tween 20, pH 8.0)。

1.2 方法

1.2.1 GAL1-3HA-Pil1 菌株的构建。利用聚合酶链式反应(PCR)对 *PIL1* 进行过表达启动子和蛋白标签的标记。

1.2.1.1 PCR 扩增转化片段。为了后续更好地筛选到 Pil1 高表达量菌株,以 pFA6a-TRP-GAL1-3HA 质粒为模板扩增了标记 *PIL1* 的转化片段 *TRP-GAL1-3HA*。引物序列和 PCR 反应条件见表 1、2。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'—3')
Tang046	CCAAGAAAGAAAATTTGTCTCACATCTGCATCTGCACATTTATTTACCTATACITTTCCAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC
Tang047	TGGGTTCTGTAATTGAGAGCGGTAGGTGCCCTGGAATTTCTTAAAGAGTAAGTTCTGTGGCACTGAGCAGCGTAATCTG

表 2 PCR 反应体系

Table 2 PCR reaction system

序号 No.	组分 Components	用量 Dosage// μ L
1	ddH ₂ O	33.0
2	5 \times PCR buffer	10.0
3	dNTP	1.0
4	Tang046 10 μ mol/L	2.5
5	Tang047 10 μ mol/L	2.5
6	pBJ1172	0.5
7	DNA 聚合酶 DNA polymerase	0.5
	总体系 Total	50

PCR 扩增程序:第一步 98 $^{\circ}$ C 预变性 1 min;第二步 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min(根据 PCR 预计产物片段长度调整), 2 个循环;第三步 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 53 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 33 个循环;第四步 72 $^{\circ}$ C 彻底延伸 8 min, 最后 12 $^{\circ}$ C 保存。

PCR 扩增完成之后每 50 μ L PCR 反应产物加 5 μ L 5 \times loading buffer 混匀后进行琼脂糖凝胶电泳检测,电泳检测后用凝胶提取试剂盒回收,将回收产物放至 4 $^{\circ}$ C 暂存。

1.2.1.2 酵母感受态细胞制备。从 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中取所需菌株在 YPD 固体培养基上划线,放置 30 $^{\circ}$ C 恒温培养箱培养 1~2 d,挑菌落到 3 mL YPD 液体培养基,30 $^{\circ}$ C, 220 r/min 摇床培养 24 h 左右;次日吸取 6 μ L 菌液(视酵母菌长势而定)到新的 30 mL YPD 液体培养基,30 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床培养至对数期(OD₆₀₀约为 0.5);3 000 r/min 离心 3 min 弃上清,收集 30 mL 对数期生长的 YWL37 细胞,取 10 mL 灭菌水重悬清洗细胞,之后 3 000 r/min 离心 1 min 去上清,加 3 mL Lithium-Sorb 溶液吹打重悬细胞,3 000 r/min 离心 2 min 去上清;用 360 μ L Lithium-Sorb 和 40 μ L 鲑鱼精子 DNA(作为载体 DNA,使用之前应先在沸水中煮 10 min 后放冰上冷却)重悬浮细胞,分装到新的 1.5 mL 离心管中,每管 100 μ L,于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.1.3 目的片段转化。取 100 μ L YWL37 感受态细胞置于冰上;取 10 μ L PCR 回收产物 *TRP-GAL1-3HA* 至 100 μ L YWL37 感受态细胞中,加入 6 倍体积 PEG 混匀,室温静置

30 min;然后加入 38 μ L 二甲基亚砜(DMSO),42 $^{\circ}$ C 水浴热激 5 min,之后 3 000 r/min 离心 2 min,弃上清;加 50 μ L 灭菌水重悬细胞,之后将细胞涂布缺乏色氨酸的固体培养基 SD-TRP。

1.2.1.4 阳性克隆的筛选。在对应的 SD-TRP 培养基上挑选单克隆,在新的 SD-TRP 培养基上划线筛选单克隆,重复 1 次;将从第二次划线的培养基上挑选的单克隆进行扩大培养,待提酵母总蛋白进行鉴定。

1.2.2 重组转化子的过表达鉴定。

1.2.2.1 GAL1 启动子超表达菌株细胞培养。将转化筛选得到的克隆在 YPD 固体培养基划线,30 $^{\circ}$ C 恒温 24 h,之后接种细胞至 3 mL YPD 液体培养基,30 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床中培养至饱和(约 24 h)。取 6 μ L 生长饱和的细胞液,转移至 3 mL 含有 2% 棉子糖(Raffinose)的 YPA 液体培养基中,30 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床中培养 16 h。将培养 16 h 的细胞液,3 000 r/min 离心 2 min,弃上清,向沉淀中加入含 2% 半乳糖(Galactose)的 YPA 液体培养基,30 $^{\circ}$ C、220 r/min 摇床中继续培养 4 h,之后收集细胞。

1.2.2.2 TCA 法制备酵母总蛋白。3 000 r/min 离心 5 min 收集上述培养的细胞至收集管,向沉淀中加入 100 μ L 20% 三氯乙酸(TCA),之后加直径 1 mmol/L 玻璃珠至液面以下,室温使用珠式细胞破碎仪(Mini-beadbeater16, Biosepc)破碎细胞 1 min,冰上冷却 2 min,重复 3 次。用针头在收集管底部扎一小孔,将收集管放入 1.5 mL 离心管中,4 $^{\circ}$ C 1 000 r/min 离心 3 min,弃收集管,3 000 r/min 继续离心 5 min,弃上清。向沉淀中加 40 μ L 2 \times 蛋白上样缓冲液(protein loading buffer)和 40 μ L Tris-HCl(pH 8.0)混匀,之后沸水中煮 5 min,12 000 r/min 离心 1 min,-20 $^{\circ}$ C 保存,上清用于蛋白质免疫印迹。

1.2.2.3 蛋白免疫印迹。该试验共检测 2 种蛋白: Pil1 和 Num1。分别采用 10% 变性聚丙烯酰胺凝胶及 6.25% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,SDS-PAGE 胶配方见表 3、4。电泳结束后,针对 Pil1 使用半干转仪在含 10% 甲醇的转膜液中将蛋白转移至 PVDF 膜,针对 Num1 则使用湿转的办法在相同的转

膜液中将蛋白转至 PVDF 膜。将 PVDF 膜浸泡至含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液轻摇 1 h。封闭之后,使用 HA 抗体 (THET-Mc-HA Tag Antibody, mAb, Mouse, GenScript) 或 GFP 抗体 (Mouse Anti GFP Monoclonal-Antibody, 兴华基因) 室温轻摇孵育 2 h, TBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min, 之后使用二抗室温轻摇孵育 1 h, TBST 溶液洗 3 次, 每次 10 min, 然后使用含 3 μL H_2O_2 的 10 mL 显色液对 PVDF 膜上的蛋白进行显色, 凝胶成像仪曝光检测。

Western Blot 检测显示 Pil1 成功超表达, 命名为 YT47 (*GAL1-TRP-3HA-PIL1*)。

表 3 分离胶 (15 mL)

Table 3 Separating glue (15 mL)

成分 Components	6.25% 分离胶 6.25% gel	10% 分离胶 10% gel
ddH ₂ O	8.02 mL	6.1 mL
4×lower buffer pH8.8	3.75 mL	3.75 mL
30% 丙烯酰胺 30% acrylamide	3.13 mL	5 mL
10% APS	100 μL	100 μL
TEMED	10 μL	10 μL

表 4 浓缩胶 (10 mL)

Table 4 Concentrated glue (10 mL)

序号 No.	组分 Components	用量 Dosage
1	ddH ₂ O	6.4 mL
2	4×upper buffer pH6.8	2.5 mL
3	30% 丙烯酰胺	1.0 mL
4	10% APS	100 μL
5	TEMED	10 μL

1.2.3 酵母四分体解离法构建免疫共沉淀 (CoIP) 菌株及表达鉴定。

1.2.3.1 亲代酵母菌株杂交。取 YT47、YT52 在 YPD 固体培养基上划线, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 1~2 d, 长出细胞后, 挑取适量的亲代菌株在新的 YPD 固体培养基上混合, 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h, 用牙签挑混合菌落顶部少量菌在相应双缺培养基 SD-TRP-HIS 上划线培养 1~2 d, 之后挑取菌落转移至 3 mL SPM 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 3~4 d (不能超过 4 d), 普通光学显微镜下观察是否有四分体存在。

1.2.3.2 酵母细胞壁去除。取 70 μL SPM 中细胞液至 1.5 mL 离心管, 3 000 r/min 离心 1 min, 弃上清。加 100 μL Lithium-Sorb 溶液和 8 μL Zymolase 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 静置 8 min, 之后进行四分体解离或存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 直至使用。

1.2.3.3 酵母四分体解离及菌株筛选。取细胞沉淀 20 μL 滴至 YPD 固体培养基, 竖立培养皿, 使沉淀在培养基表面成一条直线, 利用酵母四分体解离操作仪 (MSM400, Singer) 按照使用说明书, 进行四分体分离, 解离完成后将培养基放置 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱培养至细胞长出, 之后根据需要得到相应的菌株, 将培养皿复制至 SD-HIS, SD-TRP 培养基和交配型选择培养基培养, 筛选结果如表 5。

1.2.3.4 Western Blot 鉴定。将筛选得到的菌落转移至 3 mL YPD 液体培养基中培养, 收集对数期细胞提取总蛋白并进行

Western Blot 鉴定。

表 5 孢子复制缺陷培养基筛选结果

Table 5 Spore screen on selective media

亲代酵母 Parental yeast	四分体 Tetrad	单孢子 Monospore	SD-TRP	SD-HIS	交配型 Mating type
YT47×YT52	A	A1	-	-	α
		A2	+	+	a
		A3	+	+	a
		A4	+	-	α
	B	B1	+	+	a
		B2	+	+	α
		B3	+	-	a
		B4	-	-	α

注: “+”表示生长, “-”表示不生长

Note: “+” indicated growth, “-” indicated no growth

1.2.4 CoIP 检测 Pil1 与 Num1 的互作。

收集细胞: 每个 CoIP 需要用不少于 90 mg 的细胞。

细胞培养: 第 1 天, 从 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出 CoIP 所需菌株, 用 YPD 培养基活化; 第 3 天早上从平板上取细胞接种到 3 mL YPD 液体培养基中; 第 4 天, 等细胞长至饱和, 下午吸取 108 μL 菌液至 54 mL 液体培养基中 (48.6 mL YPA-D+5.4 mL 20% Raffinose) 过夜培养 16 h; 第 5 天, 3 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 54 mL YPA+半乳糖培养 4 h, 收集细胞。

免疫共沉淀试验方法:

(1) 细胞长好以后, 3 000 r/min 离心 2 min 弃上清, 再加入 1 mL 灭菌水重悬, 3 000 r/min 离心 1 min 弃上清, 加入 1 mL 1× 细胞裂解液 (lysis buffer) [配方见表 6、7, 不含蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor cocktail), 购自 Roche] 重悬后转入 1.5 mL 收集管中, 3 000 r/min 离心 1 min 弃上清后可在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

(2) 吸取 30 μL Protein G 磁珠 (GE Healthcare) 到 1.5 mL 离心管 (EP 管) 中 (剪枪头), 加入 1 mL 1× lysis buffer (不含 PI) 清洗, 之后将 EP 管放入磁力架 MagRack 6, 收集磁珠到离心管一侧, 吸弃上清, 再加入 1 mL 1× lysis buffer (不含 PI) 重复洗一次弃上清, 加入 200 μL 1× lysis buffer (含 PI) 洗一次弃上清后, 向 EP 管中加入 200 μL 1× lysis buffer 和 3 μL GFP 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。

(3) 细胞破碎: 向已收集好的细胞中 (保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的细胞取出后需置于冰上融化) 先加入 300 μL 1× lysis buffer (含 PI), 重悬后加入 1× lysis buffer (含 PI) 至 600 μL , 然后向收集管中加入珠子至液面以下。细胞破碎 45 s, 拿出放置在冰上静置 2 min, 重复 3 个循环。

(4) 在收集管底部戳一个洞, 插到 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min 离心 2 min 后, 向收集管中加入 200 μL 1× lysis buffer (含 PI), 继续 3 000 r/min 离心 2 min, 弃收集管, 再 12 000 r/min 离心 15 min, 取 50 μL 上清作为 Input。

(5) 吸取剩余上清 (大约有 600 μL) 到孵育抗体的 1.5 mL EP 管中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育 1.5 h。

(6) 孵育完后, 用磁力架收集磁珠, 取 50 μL 上清作为未结合蛋白 (unbound) 后弃上清。

(7) 用 1× 洗脱液 (wash buffer) (不含 PI) 洗磁珠 3 次, 每

次加1 mL 1× wash buffer。

(8)用磁力架收集磁珠到离心管一侧,弃上清后加入40 μ L ddH₂O 和 40 μ L 2× protein loading buffer,沸水煮5 min,-20 $^{\circ}$ C保存。向Input和unbound中加入50 μ L 2× protein loading buffer沸水煮5 min,-20 $^{\circ}$ C保存。

(9)点样前拿出样品沸水煮5 min,短暂离心,取上清点样,进行Western Blot检测。

表6 2×细胞裂解液
Table 6 2×lysis buffer

组分 Component	终浓度 Final concentration	存储浓度 Stock	体积 Amount
Na-HEPES,pH7.5	100 mmol/L	1 mol/L	10 mL
醋酸钠 NaOAc,pH7.5	400 mmol/L	3 mol/L	13.3 mL
EDTA	2 mmol/L	0.5 mol/L	40 μ L
EGTA	2 mmol/L	0.5 mol/L	40 μ L
醋酸镁 MgOAc	10 mmol/L	1 mol/L	1 mL
甘油 Glycerol	10%	50%	20 mL

注:加水至100 mL

Note: Add water to 100 mL

表7 1×细胞裂解液
Table 7 1×lysis buffer

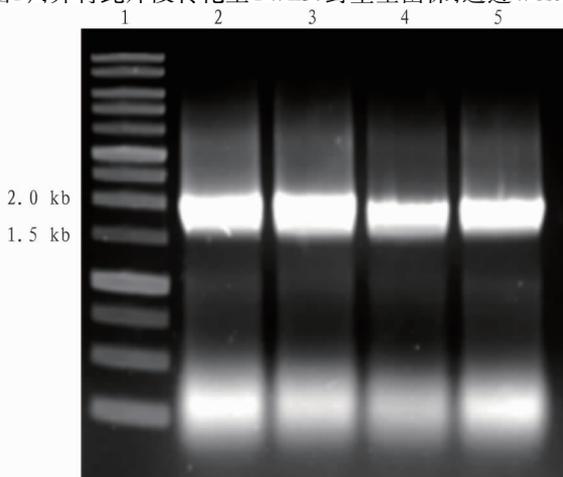
组分 Component	终浓度 Final concentration	存储浓度 Stock	体积 Amount
2×细胞裂解液 2×lysis buffer	1×	2×	15 mL
NP-40	0.25%	10%	750 μ L
DTT	3 mmol/L	1 mol/L	100 μ L
PMSF	1 mmol/L	100 mmol/L	300 μ L

注:加水至30 mL,加蛋白酶抑制剂50 μ L至1 mL 1×细胞裂解液

Note: Add water to 30 mL, add protease inhibitor 50 μ L to 1 mL 1× lysis buffer

2 结果与分析

2.1 GAL-3HA-Pil1 重组菌株的构建和表达鉴定 为了检测Pil1与Num1在细胞内是否发生互作,以质粒pFA6a-TRP-GAL1-3HA为模板扩增TRP1-GAL1-3HA片段(1798 bp)(图1),并将此片段转化至YWL37野生型菌株,通过Western-



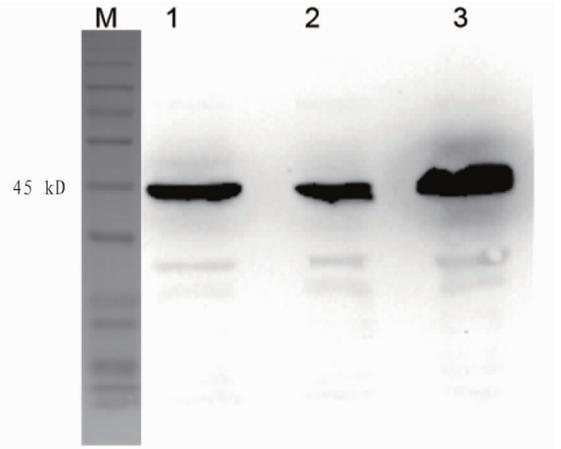
注:1.DNA Ladder;2~5.TRP1-GAL1-3HA片段

图1 目的片段TRP1-GAL1-3HA扩增

Fig.1 Amplification of the target fragment TRP1-GAL1-3HA

Blot检测到Pil1的表达(图2),构建得到了TRP1-GAL1-3HA-Pil1超表达菌株,命名为YT47。

2.2 酵母四分体解离法构建重组菌株 由于用于酵母杂交的亲代酵母中均带有TPR标记,所以根据酵母四分体筛选分离后再用Western Blot进一步鉴定(图3),筛选得到A2(MATa TRP-GAL-3HA-Pil1 TRP-GAL1-NUM1-YFP-HIS命名为YT84),B1(MATa TRP-GAL-3HA-Pil1 TRP-GAL1-NUM1-YFP-HIS命名为YT85)。



注:M.蛋白Marker;1~2.GAL1-Msp1-3HA(对照);3.GAL1-3HA-Pil1

图2 GAL1-3HA-Pil1 Western Blot 检测

Fig.2 Western Blot detection for GAL1-3HA-Pil1

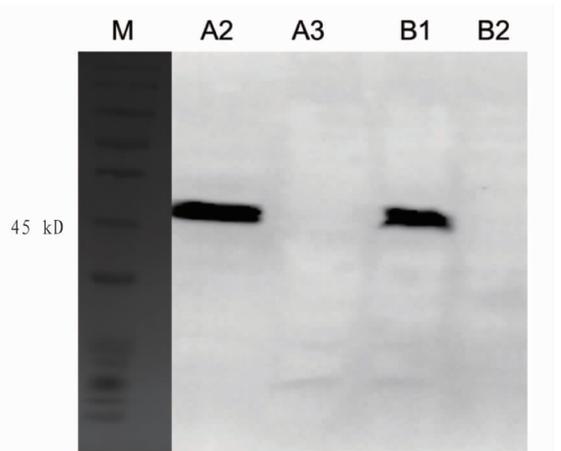
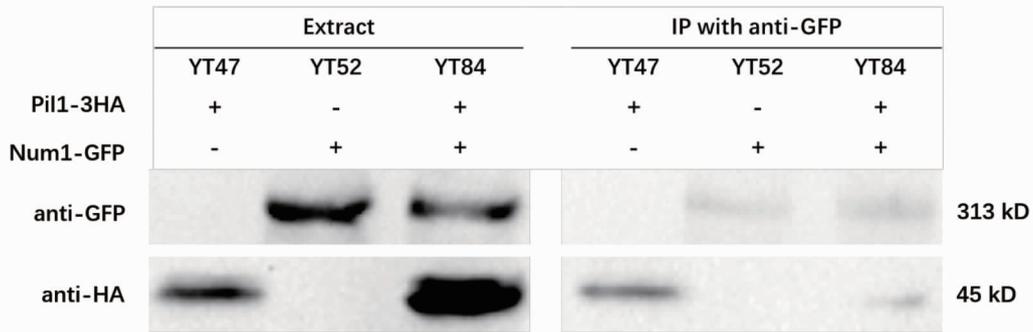


图3 A2,B1 Western Blot 检测

Fig.3 Western Blot detection for A2,B1

HA抗体检测A2、B1菌株中Pil1是否超表达。结果显示A2、B1菌株构建成功,将用于免疫共沉淀(CoIP)试验。

2.3 CoIP检测Num1与Pil1的互作 CoIP试验使用GFP抗体(兔抗)(Genescript)孵育Protein G,经GFP抗体沉淀下来的蛋白分别用GFP抗体和HA抗体检测,试验结果如图4所示。Num1-GFP蛋白被成功地沉淀下来(图4上右,第2道和第3道)。而且,3HA-Pil1蛋白也随着Num1-GFP蛋白共同沉淀下来(图4下右,第3道)。但是,在不表达Num1-GFP而只表达3HA-Pil1的CoIP样品中也检测到3HA-Pil1蛋白(图4下右,第1道),说明3HA-Pil1蛋白与免疫沉淀用的GFP抗体或Protein磁珠发生了非特异性结合。



注:YT47.*TRP-GAL-3HA-PIL1*;YT52.*TRP-GAL1-NUM1-YFP-HIS*;YT84.*TRP-GAL-3HA-PIL1 TRP-GAL1-NUM1-YFP-HIS*

图 4 Gal1-3HA-Pil1 和 GAL1-NUM1-YFP 免疫共沉淀

Fig.4 Gal1-3HA-Pil1 co-immunoprecipitated with GAL1-NUM1-YFP

3 结论与讨论

该研究通过基因同源重组及酵母四分体解离等方法成功构建了 *TRP-GAL-3HA-PIL1 TRP-GAL1-NUM1-YFP-HIS* 菌株,旨在通过免疫共沉淀试验探究 Num1 与 Pil1 的互作关系,以期为后续研究 Pil1 所在的 Eisosome 膜结构是否影响细胞膜上 Num1 簇(Num1 多聚体)的形成奠定基础。在用 Protein G 磁珠和 GFP 抗体进行的 CoIP 试验中,虽然 3HA-Pil1 能和 Num1-GFP 共同沉淀下来,但是在只表达 3HA-Pil1 而不表达 Num1-GFP 的细胞沉淀下来的样品中也检测到了 3HA-Pil1。分析这种非特异性条带的出现可能与以下几方面有关:①Protein G 磁珠能非特异性结合 3HA-Pil1 蛋白;②用于免疫沉淀试验的 GFP 抗体能非特异性结合 HA 标记的 Pil1 蛋白,使其沉淀下来;③免疫共沉淀试验中的清洗步骤不彻底,使得 Pil1 与 Protein G 间产生非特异性粘黏。

为得到无干扰的试验结果,为后期试验奠定基础,可以从以下 3 个方面进行改善:①更换不同品牌的 Protein G;②检测 GFP 抗体的特异性;③调整免疫共沉淀试验中 lysis buffer 的盐离子浓度,提高清洗的严谨性。

参考文献

- [1] BRAUN R J, WESTERMANN B. With the help of MOM: Mitochondrial contributions to cellular quality control[J]. Trends in cell biology, 2017, 27(6): 441-452.
- [2] DENIC V, DÖTSCH V, SINNING I. Endoplasmic reticulum targeting and insertion of tail-anchored membrane proteins by the GET pathway[J]. Cold spring harbor perspectives in biology, 2013, 5(8): 1-11.
- [3] DYALL S D, BROWN M T, JOHNSON P J. Ancient invasions: From endosymbionts to organelles[J]. Science, 2004, 304(5668): 253-257.
- [4] KLECKER T, WEMMER M, HAAG M, et al. Interaction of MDM33 with mitochondrial inner membrane homeostasis pathways in yeast[J]. Scientific reports, 2016, 5(1): 1-14.
- [5] YU J W, MENDROLA J M, AUDHYA A, et al. Genome-wide analysis of

- membrane targeting by *S.cerevisiae* pleckstrin homology domains[J]. Molecular cell, 2004, 13(5): 677-688.
- [6] 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]. The journal of cell biology, 2000, 151(6): 1337-1343.
- [7] FARKASOVSKY M, KÜNTZEL H. Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac1p and cytoplasmic microtubules in budding yeast[J]. The journal of cell biology, 2001, 152(2): 251-262.
- [8] LABROUSSE A M, ZAPPATERRA M D, RUBE D A, et al. *C.elegans* dynein-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane[J]. Molecular cell, 1999, 4(5): 815-826.
- [9] LACKNER L L, PING H, GRAEF M, et al. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria[J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2013, 110(6): E458-E467.
- [10] INGERMAN E, PERKINS E M, MARINO M, et al. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria[J]. The journal of cell biology, 2005, 170(7): 1021-1027.
- [11] GREENBERG S R, TAN W M, LEE W L. Num1 versus NuMA: Insights from two functionally homologous proteins[J]. Biophysical reviews, 2018, 10(6): 1631-1636.
- [12] KNOBLACH B, RACHUBINSKI R A. Sharing the cell's bounty-organelle inheritance in yeast[J]. Journal of cell science, 2015, 128(4): 621-630.
- [13] 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]. The journal of cell biology, 2012, 196(6): 743-756.
- [14] LAWRENCE E J, MANDATO C A. Mitochondria localize to the cleavage furrow in mammalian cytokinesis[J]. PLoS One, 2013, 8(8): 1-12.
- [15] FRIEDEN M, ARNAUDEAU S, CASTELBOU C, et al. Subplasmalemmal mitochondria modulate the activity of plasma membrane Ca^{2+} -ATPases[J]. Journal of biological chemistry, 2005, 280(52): 43198-43208.
- [16] LACKNER L L. The expanding and unexpected functions of mitochondria contact sites[J]. Trends in cell biology, 2019, 29(7): 580-590.
- [17] 唐仙英, 肖瑶, 海力. 蛋白体外结合实验联合质谱分析鉴定 Num1 的互作蛋白[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2018, 37(4): 27-30.
- [18] MOREIRA K E, WALTHER T C, AGUILAR P S, et al. Pil1 controls eisosome biogenesis[J]. Molecular biology of the cell, 2008, 20(3): 809-818.
- [19] KABECHR R, BALDISSARD S, HAMMOND J, et al. The filament-forming protein Pil1 assembles linear eisosomes in fission yeast[J]. Molecular biology of the cell, 2011, 22(21): 4059-4067.