

NOTCH 信号转导通路。由于传统的  $\gamma$ -分泌酶抑制剂也抑制正常肠道细胞内 NOTCH 蛋白的功能,所以在动物和临床实验中呈现了一定的肠道毒性。大量文献报道特异抑制  $\gamma$ -分泌酶底物 APP 裂解而不抑制(或较少抑制)底物 NOTCH 受体裂解的抑制剂,可以有效地避免泛  $\gamma$ -分泌酶抑制剂(非特异的  $\gamma$ -分泌酶抑制剂同时抑制 APP 和 NOTCH)抑制肠道正常细胞的分化和增殖现象<sup>[16]</sup>。本文构建的细胞模型能够通过高通量的筛选的方法发现  $\gamma$ -分泌酶的抑制剂,但是,该模型却无法评价出抑制剂的底物选择性。因此,我们需要构建基于  $\gamma$ -分泌酶的其他底物的模型来评价已经得到的抑制剂的底物选择性,以评价其可能的肠毒性等问题。

#### 4 结论

我们新构建了一个灵敏度高、对 DMSO 承受度高且易于用于高通量筛选  $\gamma$ -分泌酶抑制剂的细胞筛选模型。我们利用该细胞模型对 417 个天然产物进行了筛选,经剂量依赖性验证后发现 1 个具有  $\gamma$ -分泌酶抑制活性的化合物,其  $IC_{50}$  约为  $5\mu\text{mol/L}$ 。根据此天然化合物的新颖的结构,可以促进发现更好的  $\gamma$ -分泌酶抑制剂,为阿尔兹海默症的治疗提供药物先导化合物。

#### 参考文献:

- [1] Jakob - Roetne R, Jacobsen H. Alzheimer's disease: from pathology to therapeutic approaches [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2009, 48(17): 3030 - 3059.
- [2] Ballard C, Gauthier S, Corbett A, et al. Alzheimer's disease [J]. *Lancet*, 2011, 377(9770): 1019 - 1031.
- [3] 朱海升, 刘鞠娟, 蔡光明. 抗老年性痴呆的天然药物研究进展 [J]. *中国药房*, 2007, 18(3): 223 - 225.
- [4] Crouch PJ, Hung LW, Adlard PA, et al. Increasing Cu bioavailability inhibits Abeta oligomers and tau phosphorylation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(2): 381 - 386.
- [5] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta - peptide [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(2): 101 - 112.
- [6] Wang JZ, Liu F. Microtubule - associated protein tau in development, degeneration and protection of neurons [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(2): 148 - 175.
- [7] De Strooper B, Vassar R, Golde T. The secretases: enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease [J]. *Nat Rev Neurol*, 2010, 6(2): 99 - 107.
- [8] Wolfe MS. Intramembrane proteolysis [J]. *Chem Rev*, 2009, 109(4): 1599 - 1612.
- [9] Fraering PC. Structural and Functional Determinants of gamma - Secretase, an Intramembrane Protease Implicated in Alzheimer's Disease [J]. *Curr Genomics*, 2007, 8(8): 531 - 549.
- [10] Osenkowski P, Li H, Ye W, et al. Cryoelectron microscopy structure of purified gamma - secretase at 12 Å resolution [J]. *J Mol Biol*, 2009, 385(2): 642 - 652.
- [11] Wang LF, Zhang R, Xie X. Development of a high - throughput assay for screening of gamma - secretase inhibitor with endogenous human, mouse or Drosophila gamma - secretase [J]. *Molecules*, 2009, 14(9): 3589 - 3599.
- [12] Liao YF, Wang BJ, Cheng HT, et al. Tumor necrosis factor - alpha, interleukin - 1beta, and interferon - gamma stimulate gamma - secretase - mediated cleavage of amyloid precursor protein through a JNK - dependent MAPK pathway [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(47): 49523 - 49532.
- [13] Zettl H, Ness J, Hahnke V, et al. Discovery of gamma - secretase modulators with a novel activity profile by text - based virtual screening [J]. *ACS Chem Biol*, 2012, 7(9): 1488 - 1495.
- [14] Carlson EE. Natural products as chemical probes [J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(7): 639 - 653.
- [15] da Rocha MD, Viegas FP, Campos HC, et al. The role of natural products in the discovery of new drug candidates for the treatment of neurodegenerative disorders II Alzheimer's disease [J]. *NS Neurol Disord Drug Targets*, 2011, 10(2): 251 - 270.
- [16] Wolfe MS, and Selkoe DJ. Giving Alzheimer's the old one - two [J]. *Cell*, 2010, 142(2): 194 - 196.

## 应用酵母双杂交筛选 Rab39A 相互作用的蛋白

范荣, 马琳琳, 张明, 王世聪, 贺威, 孙礼祥, 王团老\*

(厦门大学药学院 福建 厦门 361100)

**摘要:** 目的: 应用酵母双杂交方法, 寻找可能与 Rab39A 相互作用的蛋白。方法: 采用醋酸锂转化法将诱饵蛋白 Rab39A 转入 AH109 酵母菌, Western blotting 检测蛋白表达情况, 检测诱饵载体有无毒性和自激活能力, 筛选出的蛋白通过免疫荧光法进一步验证。结果: 获得 12 个与 Rab39A 相互作用的候选蛋白, 免疫荧光法证明 Rab39A 与 ATRN、TIFA、ITGB1 蛋白确实存在互作关系。结论: 筛选出的蛋白主要与细胞生长、肿瘤细胞形成有关, 为 Rab39A 功能的研究提供了重要线索。

**关键词:** Rab39A; 酵母双杂交; 蛋白质相互作用; 自激活; 共定位

中图分类号: Q786 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1004-311X.2013.04.0088

## Screening Proteins that Interact with Rab39A via Yeast Two - hybrid System

FAN Rong, MA Lin - lin, ZHANG Ming, WANG Shi - cong, HE Wei, SUN Li - xiang, WANG Tuan - lao\*

(Department of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361100, China)

**Abstract: Objective:** Using Yeast - two - hybrid method to inquire proteins interacting with Rab39A. **Method:** The bait plasmid pGBKT7 - Rab39A was transfected into AH109 yeast, checking proteins expression, checking the auto - activity and toxicity of recombinated plasmid, the interactions were further confirmed with immunofluorescence experiment. **Result:** 12 positive proteins possibly interacting with

Rab39A were obtained. The interactions of Rab39A with ATRN, TIFA, ITGB1 were further confirmed by immunofluorescence. **Conclusion:** The screened proteins have relation with cell growth, cancer cell formation, providing important clues for further investigation of biological function of Rab39A.

**Key words:** Rab39A; yeast-two-hybrid system; protein interactions; self-activation; co-localization

## 0 引言

Rab 家族是 Ras 超家族中一类重要的小分子 GTP 酶,作为分子开关调节囊泡运输,在外排和内吞过程中发挥重要功能<sup>[1]</sup>。Rab39 是 Rab 家族中新近发现的蛋白,它包含两个亚型: Rab39A 和 Rab39B,两者分别定位于染色体的 11q22.3 和性染色体的 Xq28 上,蛋白编码序列相似性达 74.2%<sup>[2]</sup>。2010 年,Maila Giannandrea 等人发现 Rab39B 在脑部大量富集,突变的 Rab39B 将导致智力缺陷<sup>[3]</sup>。目前关于 Rab39A 的作用和调控机制研究甚少,现有研究仅揭示了 Rab39A 可以与 caspase-1 结合,调节 caspase-1 依赖的 IL-1 $\beta$  分泌过程<sup>[4]</sup>。为了进一步明确 Rab39A 的作用和功能,本实验利用酵母双杂交方法寻找与 Rab39A 相互作用的蛋白,为深入研究 Rab39A 在调节细胞生命活动中的作用和调控机制提供新的线索。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验材料

大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、HeLa 细胞株购自 ATCC 公司;酵母双杂交所需的菌株 AH109、质粒 pGBKT7 和 pGADT7、人 cDNA 文库菌均购自 Clontech 公司。

#### 1.1.2 试剂

醋酸锂、PEG4000、ONPG 购自 Biotech 公司;限制性内切酶 *Nde* I、*Bam*HI、*Sal* I 购自 New England Biolabs 公司;T<sub>4</sub> DNA 连接酶、DNA 聚合酶、dNTP 购自 TOYOBO 公司;兔抗 Rab39A 多克隆抗体由本实验室制备。Saponin 购自 Sigma 公司、FITC 偶联的 FITC 山羊抗兔的二抗购自 Jackson ImmunoResearch 公司、ECL 化学显影试剂盒购自 Pierce 公司、质粒小提试剂盒购自 Omega 公司。

#### 1.1.3 培养基

蛋白胨、酵母提取物、琼脂购自 Oxoid 公司;酵母培养试剂及各类营养缺陷型购自 Clontech 公司。细胞培养基 RPMI1640 购自 GIBCO 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 诱饵质粒 pGBKT7-Rab39A 的构建

本实验去掉了人源 Rab39A 羧基端的三个氨基酸残基 CFC。序列为:

上游引物: 5' - TTCCATATGGAGACCATCTGGATCTAC -

3'

下游引物: 5' - CGCGGATCCTCATTTCTTTCCTGGGCTT-TACTGC - 3'

引入 *Nde* I 和 *Bam*HI 为酶切位点,以 pEGFP-Rab39A 为模板进行 PCR 扩增,双酶切后连接到 pGBKT7 载体,构建好的重组质粒经双酶切和测序验证。

#### 1.2.2 酵母菌感受态制备及质粒转化

酵母菌感受态制备方法采用醋酸锂转化法,将复苏的 AH109 接种至 50ml YPD 培养基,30 $^{\circ}$ C 摇过夜。离心 1 000r/min  $\times$  5min,加 30ml 水洗涂沉淀。离心 1 000r/min  $\times$  5min,加 1.5ml 1 $\times$  TE/LiAc 轻轻重悬,分装后冰上备用。加入 1 $\mu$ l 质粒 DNA(100ng/ $\mu$ l)、10 $\mu$ l carrier DNA(10 $\mu$ g/ $\mu$ l)、0.6ml PEG/LiAc 30 $^{\circ}$ C 摇床 200r/min  $\times$  30min。加入 70 $\mu$ l DMSO 颠倒混匀,42 $^{\circ}$ C 水浴 15min,冰置 2min。离心弃上清,加入 500 $\mu$ l 1 $\times$  TE 重悬。将转化后的菌涂在 SD/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 板上,检测质粒 pGBKT7-Rab39A 有无自激活能力。将转化菌接种于 SD/-Trp 液体培养基,以空载为对照质粒,检测诱饵质粒有无毒性。

#### 1.2.3 Western-blot 检测 rab39A 蛋白的表达

将筛选的阳性转化菌扩大培养,采用玻璃珠破细胞法提取酵母全蛋白。取 30 $\mu$ l 作 SDS-PAGE 将蛋白转移至 PVDF 膜上,一抗为兔源性 Rab39A 多克隆抗体,二抗为羊抗兔 IgG-HRP 酶标抗体,用 DAB 显色检测蛋白表达。

#### 1.2.4 酵母双杂交

将过夜活化的 pGBKT7-Rab39A 转化菌离心 1 000r/min  $\times$  5min,留 5ml 液体重悬沉淀。加 1ml Y187 文库菌于含诱饵菌的瓶中,加 40ml 2 $\times$  YPD,轻轻涡旋混匀。28 $^{\circ}$ C 振荡(30r/min)培养 24h。20h 后,在 400 倍显微镜下观察二倍体细胞。继续培养 4h,将菌液离心 1 000g  $\times$  5min,去上清。依次加入 2 $\times$  YPD、0.5 $\times$  YPD、水各 50ml,离心 1 000g  $\times$  5min,洗涤沉淀 3 次。最后加水至 10ml 后混匀。取 10 $\mu$ l 以 1/100、1/1 000、1/10 000 梯度稀释,各取 100 $\mu$ l 涂于 SD/-Trp、SD/-Leu、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 板。30 $^{\circ}$ C 倒置培养 7~14d,计算杂交效率。

#### 1.2.5 阳性克隆的筛选

接种候选克隆于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 培养基中扩大培养,离心 10 000r/min  $\times$  10s 收集酵母细胞,加入 200 $\mu$ l 酵母裂解液、300 $\mu$ l 苯酚/氯仿/异丙醇(25:24:1)和 0.3g 玻璃珠,涡旋 3min。室温离心 14 000r/min  $\times$  8min,取上清至 1.5ml 管中,加 200 $\mu$ l 异丙醇颠倒混匀,室温放置 5min。离心 14 000r/min  $\times$  10min,去上清,加 500 $\mu$ l 70% 乙醇。离心 14 000r/min  $\times$  5min,去上清,室温晾干,加 20 $\mu$ l 65 $^{\circ}$ C 无菌水重悬。用热激法将质粒转入 DH5 $\alpha$  感受态,涂于含氨基青霉素的平板,37 $^{\circ}$ C 培养过夜后小提质粒。

#### 1.2.6 回复性杂交、免疫荧光法验证相互作用

文库质粒和 pGBKT7-Rab39A 各取 0.1 $\mu$ g,共转化进酵母

收稿日期:2013-03-05;修回日期:2013-05-07

基金项目:国家自然科学基金面上项目“新 Rab 蛋白对甘露糖-6-磷酸受体及其介导的溶酶体蛋白质运输路径的调控作用及机制研究”,No. 30971442、31071176;福建省自然科学基金项目“小 GTP 酶 Rab 蛋白在人类乳腺癌发生过程中的调控作用”2010J01234)资助  
作者简介:范荣(1987-),女,硕士,专业方向:化学生物学,从事细胞膜泡运输机制研究,Email: lelepipidoudou@sina.com。马琳琳为共同第一作者。\* 通讯作者:王团老(1969-),男,教授,博士生导师,从事细胞生物学、生物医学领域的研究,特别是对动物细胞中蛋白质分子的跨膜运输调控机制的研究,成果发表于 EMBO J, Molecular Biology of Cell 等杂志,Email: xmuibrwtl@xmu.edu.cn。

AH109 感受态,设文库质粒和 pGBKT7 空载共转化酵母细胞为对照。涂于 SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp 板,30℃ 培养 3d。

以酵母克隆提取的质粒为模板,PCR 扩增目的片段,经 BamH I 和 Sal I 双酶切后插入带 Flag 标签的 pCMV - tag2B 载体,与 GFP - Rab39A 共转染 Hela 细胞。20h 后固定,用 mouse - anti - Flag 抗体孵育,封片、观察。

### 2 结果与分析

#### 2.1 重组诱饵质粒的构建

以 pEGFP - Rab39A 为模板扩增 Rab39A 的 C 末端 645bp 片段,扩增产物大小与预期相符(图 1)。将 PCR 扩增出的重组质粒经双酶切鉴定,样品在 600bp 之上有一条带(图 2),大小与 Rab39A 的目的片段相一致。经华大基因公司测序,结果表明目的片段与去掉 Rab39A 的羧基端 3 个氨基酸后的核苷酸序列相符,且阅读框正确,证明目的基因已经成功克隆入酵母诱饵载体中。

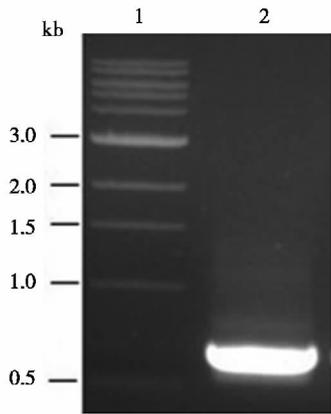


图 1 目的片段 Rab39A cDNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification of Rab39A by PCR

Lane 1: DNA marker; Lane 2: Rab39A.

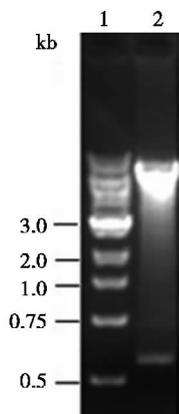


图 2 双酶切鉴定 pGBKT7 - Rab39A

Fig. 2 pGBKT7 - Rab39A confirmation by digestion

Lane 1: DNA marker; Lane 2: pGBKT7 - Rab39A/Nde I, BamH I.

#### 2.2 自激活效应和毒性检测

将构建好的 pGBKT7 - Rab39A 转化 AH109 感受态细胞,涂 SD/ - Trp 和 SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp 板,3d 后只有

SD/ - Trp 板上有克隆长出,SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp 板上没有克隆,说明诱饵质粒 pGBKT7 - Rab39A 无自激活能力。分别挑取转化入 pGBKT7 - Rab39A 和 pGBKT7 的酵母菌,培养于 SD/ - Trp 培养基中,24h 后测得 pGBKT7 - Rab39A 转化菌的 OD<sub>600</sub> 值为 1.278, pGBKT7 空载转化菌的 OD<sub>600</sub> 值为 1.246,两者并无显著差异。

#### 2.3 诱饵蛋白的表达

挑选 4 个转化有 pGBKT7 - Rab39A 的 AH109 酵母菌,经 Western Blot 检测,4 个样品在 44kD 处均有特异性蛋白反应条带(图 3),与预期结果一致。因此可以将 pGBKT7 - Rab39A 作为诱饵蛋白,用于酵母双杂交实验。

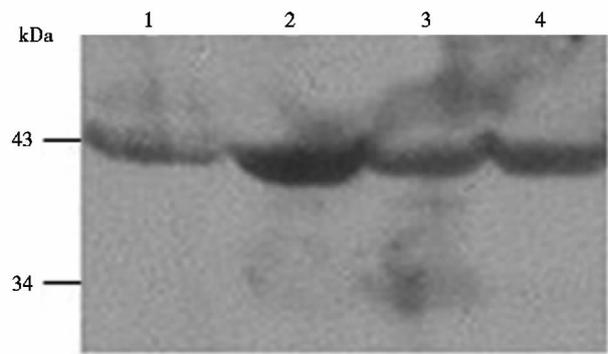


图 3 检测 pGBKT7 - Rab39A 的表达情况

Fig. 3 Analysis of the expression of pGBKT7 - Rab39A

Lane 1, 2, 3, 4: protein extracted from transformed yeasts.

#### 2.4 酵母双杂交结果

酵母双杂交后,在 SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp 四缺板上共长出 39 个克隆,杂交效率为 5.5%,大于 2%,符合实验要求。将阳性克隆所对应的文库质粒,与 pGBKT7 - Rab39A 共转化到 AH109 酵母感受态中,培养在 SD/ - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp 板。以各文库质粒与 pGBKT7 共转 AH109 作为对照,排除假阳性文库质粒,最终得到 12 个阳性克隆(图 4)。对文库质粒经测序、BLAST 比对,得到 12 个可能相互作用的蛋白(表 1)。其中 ATRN、CNTN4、AP4S1 与神经系统相关,IG-BP1、HLA - DQA1、PMSB8、TIFA、SH2D4A 与免疫相关,ITGB、SH2D4A、LRRC6、RNF2 与细胞的生长或迁移相关。

表 1 筛选出的阳性克隆

Tab. 1 Screened clones interacted with Rab39A

GenBank accession No	Gene name	Positive clone number	Interated sequence
NM_148919	Proteasome subunit beta type 8 (PSMB8)	4	196 - 831
NM_139321	Homo sapiens arattectin ( ATRN)	6	2868 - 3819
NM_001551	Immunoglobulin binding protein 1 ( IGBP1)	2	1 - 747
NM_175607	Contactin 4 ( CNTN4)	2	2616 - 3081
NM_022071	SH2 domain containing 4A ( SH2D4A)	3	1271 - 1365

NM_052864	TRAF - interacting protein with forkhead - associated domain ( TIFA)	4	13 - 555
NM_033667	Integrin beta 1( ITGB1)	3	1012 - 1930
NM_001128126	Adaptor - related protein complex 4 sigma 1 subunit ( AP4S1)	3	1 - 435
NM_012472	Leucine rich repeat containing 6 ( LRRC6)	4	490 - 1275
NM_002122	Major histocompatibility complex classII DQ alpha 1( HLA - DQA1)	1	1 - 758
NM_007212	Ring finger protein 2 ( RNF2)	1	1 - 910
NM_003096	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G ( SNRPG)	1	1 - 231

2.5 免疫荧光验证相互作用

将 ATRN、TIFA、ITGB1 的目的片段 构建到带 Flag 标签的 pCMV - tag2B 载体上 与 GFP - Rab39A 共转染 Hela 细胞。使

用共聚焦显微镜观察 ,可见 Rab39A 主要以囊泡状分布于细胞膜上( 图 5) ,ATRN、TIFA、ITGB1 和 Rab39A 均有很好的共定位 进一步验证 ATRN、TIFA、ITGB1 与 Rab39A 存在相互作用。

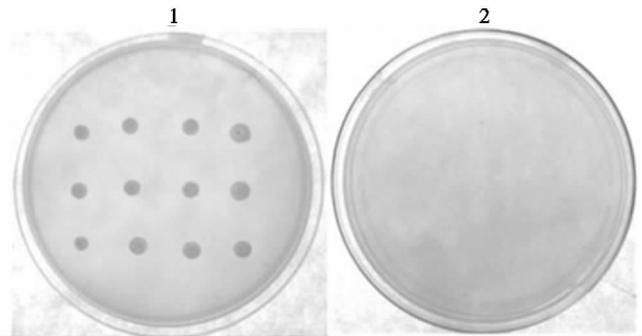


图4 筛选 Rab39A 互作蛋白

Fig. 4 Screening out proteins interacting with Rab39A  
Plate 1: pGBKT7 - Rab39A + pGADT7 - cDNA library;  
Plate 2: pGBKT7 + pGADT7 - cDNA library.

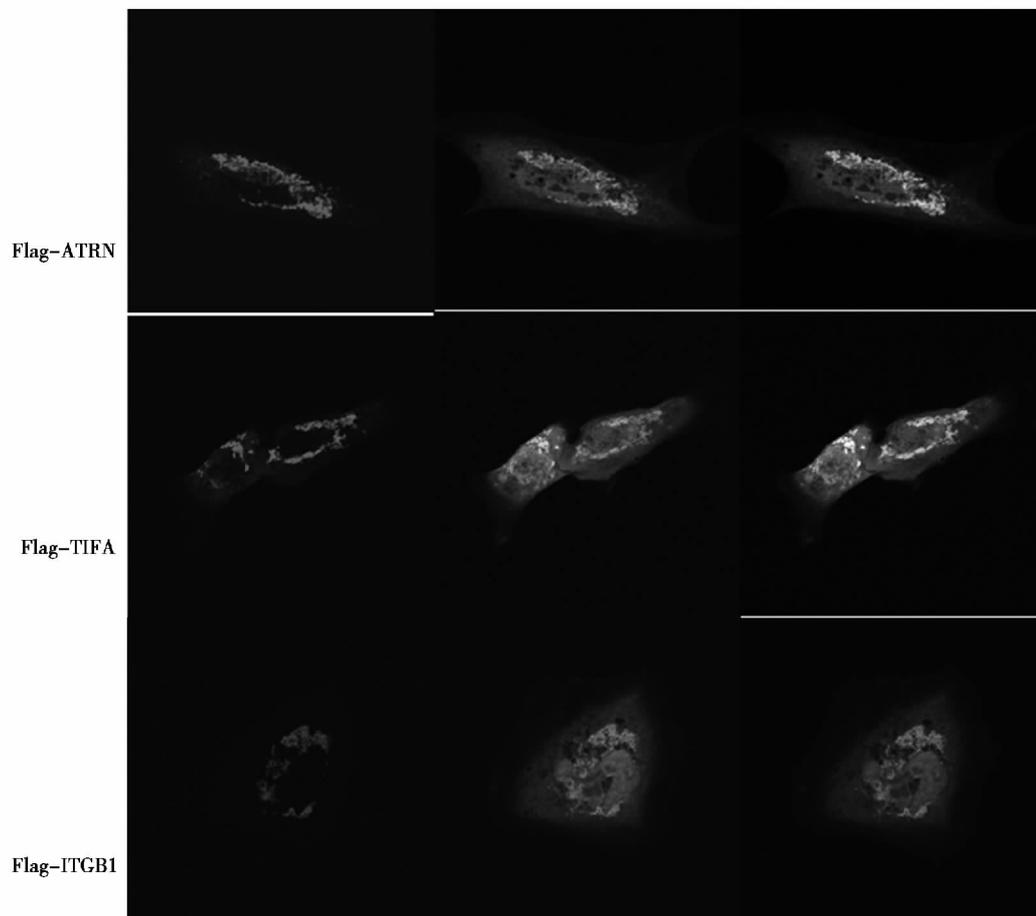


图5 验证筛选的蛋白与 Rab39A 共定位

Fig. 5 The colocalization of screened proteins with Rab39A

GFP - tagged Rab39A and Flag - tagged ATRN ,TIFA ,ITGB1 were expressed in HeLa cells. Cells were stained by mouse - anti - Flag antibody.

3 讨论

Rab 蛋白是囊泡运输中普遍存在的组分 ,调控外排和内吞的膜运输过程。许多 Rab 家族蛋白与某些疾病发生相关 ,例如 Rab27A 的错义突变导致免疫缺陷 ,引起格里塞利综合

症<sup>[5]</sup>。Rab3B 在前列腺癌细胞中表达上调 ,促进癌细胞生长<sup>[6]</sup>。Rab25 过表达与卵巢癌、乳腺癌等有关<sup>[7,8]</sup>。

Rab39 作为 Rab 蛋白家族的新成员 ,广泛分布在人的各组织 ,定位于高尔基体参与细胞内吞途径的调节<sup>[9]</sup>。Shin - ichi-

ro Yoshimura 等发现 Rab39 通过与 DENND5 相互作用,调节其分子开关活性<sup>[10]</sup>。最近有报道表明 Rab39 能够与 rasf-1 结合,以增强细胞对氧化应激反应的敏感性,通过修饰蛋白等结构组分调节细胞的膜泡运输<sup>[11]</sup>。目前,对 Rab39 的功能机制研究较少,寻找与 Rab39 相互作用的蛋白,成为进一步探究 Rab39 的作用机制和功能的需要。

实验应用酵母双杂交技术,以 Rab39 其中的一个亚型 Rab39A 作为诱饵蛋白,在人源 cDNA 文库中筛选,共钓出 12 种与 Rab39A 相互作用的蛋白。其中 TIFA 蛋白在 IL-1 受体信号途径中可以作为衔接蛋白连接 TRAF6 与 IRAK-1<sup>[12]</sup>。同时有报道显示 Rab39A 蛋白参与 IL-1 分泌过程<sup>[13]</sup>,而 Rab39A 很可能通过与 TIFA 蛋白相互作用,从而影响着 IL-1 的分泌过程,这一结果为 IL-1 信号机制的进一步探索奠定了基础。ITGB1 蛋白是磷酸酶 PP2A 的催化亚基的调控组分,在细胞生长和周期调控中起重要作用<sup>[14]</sup>。实验发现 Rab39A 能够与 ITGB1 相互作用,说明 Rab39A 可能参与调节细胞生长,而 Rab39A 是否通过作用于 ITGB1 或是 Rab39A 突变等形式对细胞的生长产生影响,还需进一步实验证明。已有研究发现 ITGB1 的过表达与肺腺癌的形成有关,同时本实验筛选出的另一蛋白 ATRN,可以作用于神经胶质细胞转变成肿瘤细胞的过程,且 ATRN 普遍分布在高尔基体的胞质膜上<sup>[15]</sup>,可以猜想 Rab39A 可能与 Rab 家族的许多蛋白一样,对癌细胞的形成有影响,对于 Rab39A 如何影响癌细胞的形成以及改变 Rab39A 的表达或者突变 Rab39A 是否对癌细胞的形成产生影响都需要我们通过进一步实验进行探索。

参考文献:

- [1] Chia WJ, Tang BL. Emerging roles for Rab family GTPases in human cancer [J]. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1795: 110-116.
- [2] Cheng H, Ma Y, Ni X, et al. Isolation and characterization of a human novel RAB (RAB39B) gen [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2002, 97: 72-75.
- [3] Giannandrea M, Bianchi V, Mignogna ML, et al. Mutations in the small GTPase gene RAB39B are responsible for X-linked mental retardation associated with autism, epilepsy and macrocephaly [J]. *Am J Hum Genet*, 2010, 86(2): 185-195.
- [4] Christine EB, Emma MC, Luke AJ, et al. Rab39a binds caspase-1 and

is required for caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion [J]. *J Biol Chem* 2009, 284(50): 34531-34537.

- [5] Wendy W, Maya T, Bradford TM, et al. A novel missense mutation (G43S) in the switch I region of Rab27A causing Griscelli Syndrome [J]. *Nature Genetic* 2000, 25: 173-176.
- [6] Tan PY, Chang CW, Chng KR, et al. Integration of regulatory networks by NKX3-1 promotes androgen-dependent prostate cancer survival [J]. *Mol Cell Biol* 2012, 32: 399-414.
- [7] Roshan A, Igor J, Gordon B, et al. The emerging role of the RAB25 small GTPase in cancer [J]. *Traffic* 2009, 10(11): 1561-1568.
- [8] Kwai WC, John PL, Joseph WG, et al. Emerging role of RAB GTPases in cancer and human disease [J]. *Cancer Research*, 2005, 65(7): 1916-1930.
- [9] Taoyong Chen, Yanmei Han, Ming jin Yang, et al. Rab39, a novel Golgi-associated Rab GTPase from human dendritic cells involved in cellular endocytosis [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2003, 303: 1114-1120.
- [10] Yoshimura S, Gerondopoulos A, Linford A, et al. Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors [J]. *J Cell Biol* 2010, 191(2): 367-381.
- [11] Takenaka M, Inoue H, Takeshima AC, et al. C. elegans Rassf homolog, rasf-1, is functionally associated with rab-39 Rab GTPase in oxidative stress response [J]. *Genes to Cells* 2013, 18: 203-210.
- [12] Takatsuna H, Kato H, Gohda J, et al. Identification of TIFA as an adapter protein that links tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) to interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-1 (IRAK-1) in IL-1 receptor signaling [J]. *J Biol Chem* 2003, 278(14): 12144-12150.
- [13] Becker CE, Creagh EM. Rab39a binds caspase-1 and is required for caspase-1-dependent interleukin-1beta secretion [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(50): 34531-34537.
- [14] Sakashita S, Li D, Nashima N, et al. Overexpression of immunoglobulin (CD79a) binding protein 1 (IGBP-1) in small lung adenocarcinomas and its clinicopathological significance [J]. *Pathology International* 2011, 61(3): 130-137.
- [15] Nakadate K, Sakakibara S, Ueda S. Attractin/mahogany protein expression in the rodent central nervous system [J]. *Comparative Neurology* 2008, 508: 94-111.

## Alpha 芋螺毒素 - LtIA 线性肽串联质谱分析

吴勇, 吴潇洒, 长孙东亭, 罗素兰\*

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室, 海口市海洋药物重点实验室, 海南 海口 570228)

摘要: 目的: 利用诱导碰撞解离串联质谱技术, 获得富含半胱氨酸毒素多肽  $\alpha$ -芋螺毒素 ( $\alpha$ -CTx) LtIA 的裂解规律, 为分析未知天然  $\alpha$ -芋螺毒素肽的氨基酸序列结构提供参比和方法借鉴。方法: 通过 Fmoc 固相合成, 色谱分离获得高纯度  $\alpha$ -CTx LtIA 还原型线性肽, 然后利用离子阱-飞行时间质谱进行 MS 和 MS/MS 分析, 同时优化碰撞条件, 分析产生的碎片离子峰特点。结果: 利用 Fmoc 固相合成法成功合成了  $\alpha$ -CTx LtIA 线性肽, 通过串联质谱分析母离子峰, 当碰撞能量和气体设置为 50% 时, 气体毒素肽 b 离子碎片离子较多, 且丰度最高。结论: 利用 IT-TOF-MSMS, 设置好串联质谱分析条件, 可以最大限度获得多肽序列结构信息, 为新的芋螺毒素序列分析提供支持。

关键词: 芋螺毒素; 串联质谱; 多肽测序

中图分类号: Q711.3<sup>+</sup> 文献标识码: A doi:10.3969/j.issn.1004-311X.2013.04.0089

## Analysis of Linear alpha - Conotoxin LtIA by Tandem Mass Spectrometry