

盘基网柄菌中 gp150 分子相互作用蛋白质的分离及分析

王大磊 侯连生*

(华东师范大学大学生命科学学院, 上海 200062)

摘要 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达编码盘基网柄菌中 gp150 蛋白 C 末端的基因, 得到含有 gp150 蛋白 C 末端肽段及 6 个组氨酸标签的融合蛋白。通过镍柱亲和层析纯化得到纯度在 90% 以上的目的蛋白, 用于免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。所得抗体经 Western blot 检测有较好的抗 gp150 的特异性, ELISA 法测定效价达 1:128 000 后用于免疫共沉淀, 从发育 16 h 的盘基网柄菌细胞全蛋白中成功分离出两个与 gp150 蛋白相互作用的蛋白质。通过质谱分析鉴定, 分别为 40S ribosomal protein S3 (RPS3) 蛋白和 40S ribosomal protein S24 (RPS24) 蛋白, 两蛋白在细胞周期调控、细胞发育及凋亡过程中有着重要作用。实验结果提示在盘基网柄菌多细胞发育中 gp150 蛋白可能与 RPS3 和 RPS24 发生相互作用, 借此调节了细胞分化和发育。

关键词 盘基网柄菌; gp150 蛋白; 免疫共沉淀; 相互作用蛋白

社会变形虫盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*) 是一种单倍体低等真核生物。实验室内常喂以好氧性克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*), 在营养丰富条件下, 以单细胞形式存在; 在缺乏营养时, 许许多多单个细胞聚集成多细胞体, 进入多细胞发育阶段。其发育过程有着严格的时间和空间的程序, 各阶段的特征也很清楚, 大致分 4 个阶段: 细胞聚集阶段; 细胞丘阶段; 蛞蝓体阶段和子实体阶段。子实体由孢子细胞和柄细胞组成, 在适宜条件下, 孢子细胞萌发开始新的生命周期。由于盘基网柄菌发育周期短, 整个周期约 24 小时, 且涉及到一系列生化过程与高等生物基本相似, 因此适合研究细胞与细胞间的相互作用及细胞粘附分子对发育的影响^[1]。盘基网柄菌的全基因组测序工作已完成, 基因组仅 34 Mb, 约 11 000 个基因, 且基因的突变不会被等位基因所掩盖, 即使是隐性性状也很容易鉴别, 因此拥有非常丰富的突变型细胞。gp150 蛋白是在盘基网柄菌多细胞发育后期表达的膜蛋白分子^[2], 由 *lagC* 基因编码, 能通过调节细胞间异嗜性粘着的相互作用来影响细胞粘着。gp150 突变细胞可以进行早期的发育过程, 但只能停留在疏松细胞丘阶段, 细胞最终不能完成发育。由此推测, gp150 蛋白在盘基网柄菌发育过程中起着重要作用, 它可能参与介导细胞分化和凋亡的信号转导途径, 但具体的信号通路至今仍未完全清楚。

目前对 gp150 分子的下游蛋白因子研究不多, 对

其下游的分子作用机制也不甚了解。本工作表达了 gp150 蛋白胞内 C 末端肽段, 纯化后制备多克隆抗体, 经免疫共沉淀得到两个 gp150 蛋白相关蛋白, 为研究 gp150 分子在盘基网柄菌发育中的信号通路提供了新的研究线索。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 细胞株 盘基网柄菌野生型细胞株 Kax-3

1.1.2 菌株与质粒 所用的大肠杆菌菌株为 *E. coli* BL21(DE3), 表达质粒 pET32a+lagC C-terminal 由多伦多大学医学院生化实验室 Dr. Siu 惠赠。

1.1.3 主要生化试剂 Ni-NTA 琼脂糖柱购自 QIAGEN 公司, 弗氏佐剂为 Sigma 公司产品, AP 标记羊抗兔二抗为 Bio-Rad 公司产品, Protein A-Agarose 为 Roche 公司产品, 蛋白酶抑制剂 cOmplete 购自 Roche 公司, 其它生化试剂均为国产分析纯。

1.1.4 实验动物 新西兰大白兔 4 只, 雄性, 体重 2.0~2.5 Kg, 购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 实验方法

1.2.1 目的蛋白的诱导表达 将质粒 pET32a+lagC

收稿日期: 2010-03-25 接受日期: 2010-05-25

国家自然科学基金(No.30970316, No.30670266)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn

C-terminal转化感受态细胞BL21, 少量提取质粒DNA, *Bgl*III 和 *Xho*I 双酶切电泳鉴定及阳性菌株的测序。将鉴定正确的阳性克隆接种到含有氨苄青霉素(100 μ g/ml)的LB培养液中, 37 $^{\circ}$ C振荡过夜。次日以5%的接种量接入100 ml含有氨苄青霉素(100 μ g/ml)的LB培养液中, 培养至OD值到达0.6~0.8。加入IPTG至终浓度为1 mmol/L, 37 $^{\circ}$ C诱导4h。将诱导前后的菌液分别制样, SDS-PAGE (12%分离胶, 5%浓缩胶)电泳, 考马斯亮蓝染色分析。

1.2.2 表达蛋白的可溶性分析 大量诱导菌液, 离心收集菌体, 用无菌水重悬, -20 $^{\circ}$ C冷冻, 室温下溶化, 反复冻溶10次以上。8 000 r/min离心30 min分别收集上清和沉淀。取样进行SDS-PAGE, 分析目的蛋白的表达形式。

1.2.3 目的蛋白的纯化 证实目的蛋白以包涵体形式存在后, 大量诱导菌液, 反复冻溶破碎后收集包涵体, 分别用5 ml含Triton X-100的2 mol/L和4 mol/L的尿素各洗涤一次, 除去杂蛋白。8 mol/L的尿素溶解包涵体。按照QIAGEN公司Ni-NTA Superflow Cartridge使用手册提供的方法纯化目的蛋白。

1.2.4 多克隆抗体的制备、特异性的鉴定及效价的检测 将纯化后的目的蛋白SDS-PAGE电泳, 胶用预冷的0.25 mol/L KCl溶液染色, 切下目的条带后液氮研磨, 溶于PBS至终浓度为1 mg/ml, 背部皮下多点注射法免疫新西兰大白兔。首次免疫时, 按每只1 mg的剂量, 加等体积的弗氏完全佐剂, 充分混匀后皮下多点注射; 10天后加强免疫, 初次免疫1/2的抗原量, 加弗氏不完全佐剂, 加强免疫3次, 第四次免疫后10天耳缘静脉取血测效价, 符合要求后颈动脉取血, 分离血清, -20 $^{\circ}$ C分装保存。

以纯化的gp150蛋白作为抗原, 进行Western blot分析, 以免疫前的兔血清做对照, 用NBT/BCIP显色观察结果。

间接ELISA法检测抗血清效价, 同时设立阴性对照和空白对照。用酶标仪测定 A_{490} 。以阳性血清的平均 A_{490} 值(P)和阴性血清的平均 A_{490} 值(N)之比即 $P/N \geq 2.1$ 判定为阳性。

1.2.5 gp150分子相关蛋白质的筛选 收集发育至16 h的盘基网柄菌野生型Kax-3细胞, 加入抽提缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L DTT, 1% Triton X-100, 10%蛋白酶抑制剂cOmplete)。冰上裂解30 min, 离心除去细胞碎片。吸取上清液, 测定蛋白浓度, 立即用于免疫共沉淀。在含2 mg细胞总蛋白的1 ml

抽提缓冲液中, 加入1 μ l免疫前兔血清和30 μ l ProteinA, 4 $^{\circ}$ C振荡2 h, 离心去除珠子以消除非特异性结合蛋白。同时利用2 mg牛血清白蛋白(BSA)做对照。在上清中加入5 μ l多克隆抗体和30 μ l ProteinA, 4 $^{\circ}$ C振荡过夜, 离心收集珠子, TBST缓冲液洗涤珠子5次, 每次5 min。离心收集珠子, 加入2 \times SDS上样缓冲液, 煮沸5 min, SDS-PAGE电泳检测。考马斯亮蓝染色观察。

1.2.6 质谱分析 根据凝胶染色的结果, 小心地切下较为清晰的两条蛋白条带, 送上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所蛋白组学技术平台进行质谱分析, 确定条带内蛋白质的氨基酸序列。

2 结果

2.1 重组融合蛋白的诱导表达及可溶性分析

将诱导表达后的菌体反复冻融破碎, 离心后分别收集沉淀和上清, 12%的SDS-PAGE电泳分析, 与诱导前相比, 在25 kDa处可见一条明显增粗的新生蛋白条带(图1中泳道2), 与预期的分子量相符, 说明gp150融合蛋白的表达成功; 目的蛋白主要存在于沉淀中(图1中泳道3), 而上清中25 kDa处没有出现目的条带(图1中泳道4), 说明融合表达的gp150蛋白C末端主要以包涵体形式存在。

2.2 融合蛋白的纯化

诱导后菌液反复冻融破碎后, 经Ni-NTA柱纯化后SDS电泳分析, 纯化后的gp150蛋白胞内C末端为单一的蛋白条带(图2中泳道5), 且与诱导表达的蛋白大小一致, 通过凝胶成像系统图象分析, 纯化后的

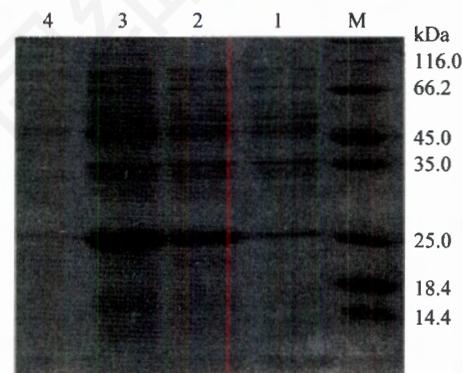


Fig.1 PAGE-SDS analysis of the expression of pET32a+lagC C-terminal

M: protein molecular marker; Lane 1: pET32a+lagC C-terminal(not induced); Lane 2: pET32a+lagC C-terminal (induced for 4h); Lane 3: deposit after freezing and thawing; Lane 4: supernatant fluid after freezing and thawing .

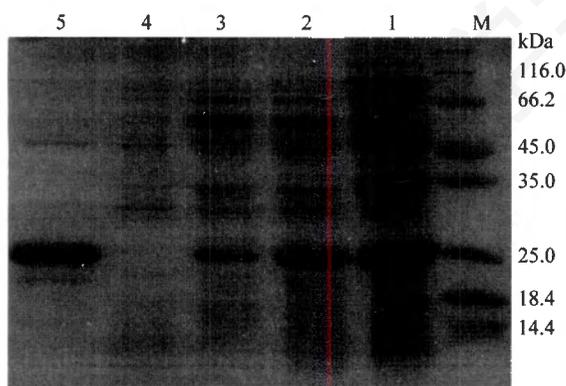


Fig.2 PAGE-SDS analysis of purification of the recombinant protein

M: protein molecular marker; Lane 1: inclusion bodies before purification; Lane 2: dissolved inclusion bodies; Lane 3: proteins unbound with Ni-NTA; Lane 4: impurity proteins eluted form Ni-NTA; Lane 5: purified gp150 protein.

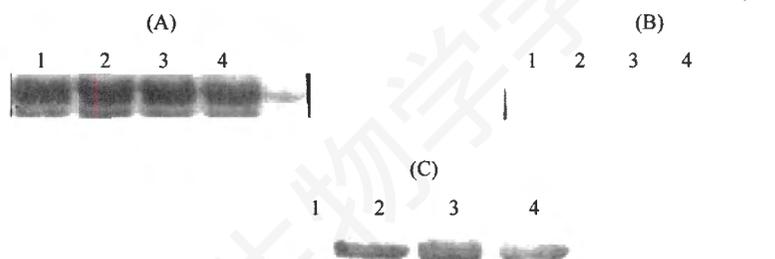


Fig.3 Western blot analysis of the specificity of antiserum

A: 1-4: antiserum of rabbit after immunization; B: 1-4: serum control before immunization; C: Lane 1: pET32a+lagC C-terminal (not induced); Lane 2: pET32a+ lagC C-terminal (IPTG induced for 4h); Lane 3: inclusion bodies before purification; Lane 4: purified gp150 protein on Ni-NTA cartridge.

羊抗兔抗体为二抗, 间接 ELISA 法测定抗体效价。结果表明免疫后的抗血清效价达到 1 : 128 000 以上 [(标本 A 值 - 空白对照 A 值)/(阴性对照 A 值 - 空白对照 A 值) \geq 2.1 为阳性]。

2.4 免疫共沉淀和 SDS 电泳分析

多克隆抗体与发育至 16 h 的盘基网柄菌野生型 Kax-3 细胞的总蛋白进行免疫共沉淀, 同时使用等量的 BSA 做空白对照。收集的免疫共沉淀蛋白复合物进行 SDS 电泳分离, 结果如图 4 所示。泳道 3 为免疫共沉淀蛋白复合物, 其中 25 kDa (图 4A) 与 14 kDa (图 4B) 处的条带较为清晰。实验共重复 5 次, 所获得结果一致。

2.5 蛋白条带的质谱鉴定

将质谱检出的肽段氨基酸序列在盘基网柄菌蛋白质序列数据库中进行检索, 从而确定出每个条带内所含有的蛋白质种类(表 1)。图 4 中条带 A 为 40S

gp150 分子 C 末端蛋白纯度达到 90% 以上。

2.3 gp150 蛋白多克隆抗体的 Western blot 分析及效价检测

以纯化的 gp150 蛋白作为抗原, 用制备的多克隆抗体为一抗, AP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 常规方法进行 Western blot 印迹分析, 与免疫前血清对照, 呈现特异性条带(图 3A), 结果表明抗 gp150 蛋白多克隆抗体可以与表达的 gp150 融合蛋白特异性结合, 与免疫前血清则没有发生反应(图 3B), 说明成功制备出 gp150 蛋白的多克隆抗体。诱导的 BL21 菌体蛋白与抗血清有明显的杂交条带, 而未诱导的 BL21 全菌蛋白与抗血清没有杂交条带(图 3C), 抗体仅特异地识别目的蛋白, 说明我们制备的多克隆抗体特异性较高。

用免疫前的兔血清为对照, 纯化的 gp150 蛋白 C 末端为抗原, 制备的多克隆抗体为一抗, HRP 标记的

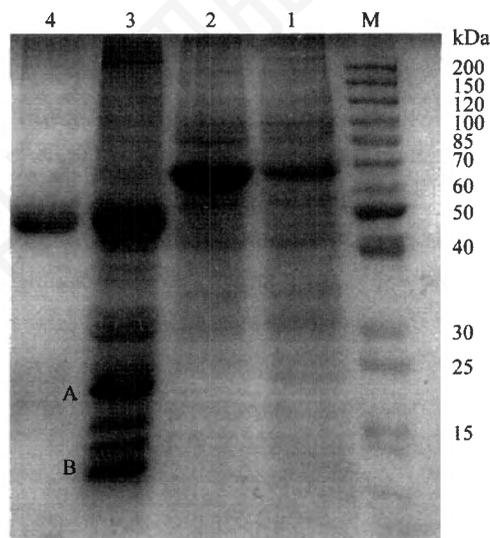


Fig.4 Result of co-immunoprecipitation

M: protein molecular marker; Lane 1: total proteins of dictyostelium (16h); Lane 2: proteins unbound with protein A-agarose; Lane 3: proteins immunoprecipitated; Lane 4: BSA served as control.

Table 1 Identification of proteins in the bands by mass spectroscopic analysis

Protein band	Protein name	Accession No.	Protein MW	Protein Score	Protein Score C.I.%	PI
A	40S ribosomal protein S3	gil74834663	24546.1	100	100	9.83
B	40S ribosomal protein S24	gil66819948	14283.1	80	99.963	10.56

ribosomal protein S3 蛋白; 条带 B 为 40S ribosomal protein S24 蛋白。

3 讨论

gp150 蛋白是一种嗜性细胞表面粘附分子, 可以通过细胞间嗜性粘着的相互作用来调节细胞的粘着, 以此来调节细胞的分化。大量研究显示, gp150 蛋白在盘基网柄菌多细胞发育过程中起着重要作用, 可能参与了介导细胞分化和凋亡的信号转导途径, 但具体的信号通路至今仍未完全清楚。研究发现 gp150 蛋白与多细胞的外膜最近, 并且它们表达的时间与这层外膜出现的时间相差不多, 外膜的形成不但能使多细胞体在一个相对独立的微环境内完成发育, 而且使多细胞体真正进入细胞分化阶段^[3]。相关研究显示 gp150 除了为细胞丘内的形态发生行为建立一个黏附微环境外, 还参与调节细胞类型专一化和分化的信号途径^[4]。但是目前为止只知道 gp150 蛋白与 G 盒结合因子(GBF)有关系。有研究表明, 超表达 GBF 能弥补缺失 *lagC* 引起的表型缺陷。GBF 是一种转录因子, 调节聚集后阶段基因的转录^[5]。GBF 可以调控 *lagC* 基因的表达, 而 *lagC* 基因也能正反馈增强 GBF 的表达^[6]。gp150 蛋白或 GBF 缺失的细胞表现出相似的发育缺陷^[7], 都不能激活诱导前孢子和前柄细胞发育的基因, 导致疏松聚集的细胞最终解聚成单个细胞。

我们以往的研究发现 gp150 蛋白缺失的盘基网柄菌细胞不能完成多细胞发育, 只能停留在细胞发育的某个阶段, 证明 gp150 蛋白是调节细胞分化与发育过程的重要蛋白。但其下游的蛋白是什么, 我们一直很感兴趣。为了弄清楚这些问题, 本文采用了免疫共沉淀的方法。免疫共沉淀技术是研究蛋白质之间相互作用的经典技术, 能够在避免人为影响的条件下分离得到天然状态下相互作用的蛋白复合体。但其也存在着多种不足, 例如需要多克隆抗体等^[8]。

为此笔者采用镍柱纯化含 His 标签的融合蛋白, 简化纯化的步骤, 实验结果证明蛋白纯化程度很高, 达到 90% 以上。利用纯化的 gp150 蛋白免疫家兔, 获得的多克隆抗体效价达到 1 : 128 000 以上; 经 Western blot 检测, 证明得到的多克隆抗体特异性较高。

这为后续深入研究 gp150 蛋白在盘基网柄菌发育过程中的相互作用蛋白及其在盘基网柄菌细胞发育中的作用提供了必要前提和有力工具。

因为盘基网柄菌细胞发育到 16h, 为细胞分化的重要阶段, gp150 蛋白的表达量也较高; 所以我们提取该发育时段细胞的总蛋白, 利用制备的抗体通过免疫共沉淀的方法从盘基网柄菌细胞中分离了 2 个与 gp150 相互作用的蛋白, 经质谱鉴定分别为 40S ribosomal protein S3(RPS3)和 40S ribosomal protein S24 (RPS24)。gp150 蛋白是直接和 RPS3 及 RPS24 相结合, 还是通过其他中间的分子影响它们的功能, 笔者还不十分清楚, 不过至少能推测 gp150 蛋白与 RPS3 和 RPS24 存在某种相互作用, 从而影响着盘基网柄菌细胞的多细胞发育过程。

最初认为 RPS3 是核糖体小亚基的一个组分^[9]。随着研究的深入, 发现 RPS3 能增强 BER 蛋白的催化活性^[10], 还是 NF- κ B 复合体的亚单位^[11], 并且能在 ERK1/2 调节的磷酸化刺激下, 转位到细胞核内^[12]。这些结果表明 RPS3 蛋白是具备多功能调节作用的蛋白, 在细胞分化发育过程中起着重要作用。有趣的是有研究发现 RPS3 能够通过它的 KH 结构域与 p53 以及 MDM2 蛋白相互作用^[13]。p53 基因是目前研究得较为清楚的一种抑癌基因, 其结构与功能都已较为明确^[14], 在机体组织细胞的生长、发育与分化等过程中起重要作用。MDM2 是一种癌基因, 该基因编码一种锌指蛋白, 可与 p53 组成自动调节反馈环^[15], 抑制 p53 介导的转录活性和阻止 p53 诱导凋亡的作用, 引起肿瘤发生。这表明 RPS3 能够通过其 KH 结构域与 p53 以及 MDM2 蛋白相互作用来影响细胞的生长、发育与分化。而 gp150 分子正是盘基网柄菌细胞发育及分化过程中的重要蛋白, 因此我们推测很有可能 gp150 蛋白通过与 RPS3 蛋白相互作用, 然后通过 RPS3 调节细胞的发育与分化, 从而影响盘基网柄菌的多细胞发育过程。

RPS24 在细胞周期调控、细胞发育及凋亡过程中也有着重要作用。RPS24 突变细胞的增殖能力与野生型细胞相比明显降低, 且细胞周期出现异常^[16]。RPS24 蛋白的缺失导致 G₁ 期检验点蛋白 p21 显著增

加, 尽管 RPS24 突变细胞中 G₁ 期的细胞数量与正常细胞一样, 但进入 S 期后细胞数量逐渐减少, 使 G₂/M 期的细胞数量显著降低。所以 RPS24 突变细胞的细胞周期受阻, 不能进入 G₂/M 期。有研究表明进入 G₂ 期的盘基网柄菌细胞更倾向于最终分化成孢子^[17], 这说明盘基网柄菌细胞处在细胞周期什么阶段与其在多细胞发育过程中最终分化成为孢子细胞还是柄细胞有着密切联系。本实验室之前的研究发现 gp150 蛋白与盘基网柄菌发育中柄细胞的分化形成有关系, 随着发育的进行, 在最终发育成柄细胞的前柄细胞区, gp150 蛋白的分布逐渐增加; 而最终发育成孢子的前孢子细胞区中则几乎没有 gp150 蛋白的分布。这暗示着 gp150 蛋白可能通过与 RPS24 蛋白的相互作用, 抑制 RPS24 蛋白的表达, 使部分盘基网柄菌细胞不能进入 G₂ 期, 最终分化成柄细胞, 而没有 gp150 蛋白分布的细胞, 其 RPS24 蛋白能够正常表达, 进入 G₂ 期, 最终分化成孢子细胞。

本文首次在盘基网柄菌中鉴定了 2 个 gp150 结合蛋白, 推测它们与 gp150 蛋白的相互作用能影响盘基网柄菌细胞的发育与分化过程, 为进一步研究 gp150 蛋白参与的信号通路提供了新的线索。但 RPS3 和 RPS24 两个蛋白在盘基网柄菌多细胞发育中的作用及与 gp150 蛋白相互作用的分子机制仍需要进一步研究。

参考文献(References)

- 1 侯连生. Gp150 蛋白在盘基网柄菌发育中的作用及粘附分子间关系的分析. 动物学 2004; 50(1): 75-82.
- 2 Wang J, Awrey D, Loomis WF, Firtel RA, Siu CH, Hou LS. The membrane glycoprotein gp150 is encoded by the lagC gene and mediates cell-cell adhesion by heterophilic binding during *Dictyostelium* development. *Dev Biol* 2000; 227(2): 734-45.
- 3 Mehdy MC, Ratner D, Firtel RA. Induction and modulation of cell-type-specific gene expression in *Dictyostelium*. *Cell* 1983; 32(3): 763-71.
- 4 Mann SK, Firtel RA. cAMP-dependent protein kinase differentially regulates prestalk and prespore differentiation during

- Dictyostelium* development. *Development* 1993; 119(1): 135-46.
- 5 Sukumaran S, Brown JM, Firtel RA, McNally JG. lagC-null and gbf-null cells define key steps in the morphogenesis of *Dictyostelium* mounds. *Dev Biol* 1998; 200(1): 16-26.
- 6 Coates JC, Harwood AJ. Cell-cell adhesion and signal transduction during *Dictyostelium* development. *J. Cell Sci* 2001; 114(24): 4349-58.
- 7 Faix J, Gerisch G, Noegel AA. Overexpression of the csA cell adhesion molecule under its own cAMP-regulated promoter impairs morphogenesis in *Dictyostelium*. *J. Cell Sci* 1992; 102(2): 203-14.
- 8 黄翠芬, 叶棋浓. 蛋白质间相互作用技术的研究近况. 中国生物化学与分子生物学报 1998; 14(1): 1-7
- 9 Schäfer T, Maco B, Petfalski E, Tooltervey D, Böttche B, Aebi U, et al. Hrr-25-dependent phosphorylation state regulates organization of the pre-40S subunit. *Nature* 2006; 441: 651-5.
- 10 Hegde V, Wang M, Deutsch WA. Human ribosome protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1. *Biochemistry* 2004; 43: 14211-7.
- 11 Wan F, Anderson D, Barnitz R, Snow A, Bidere N, Zheng L, et al. Ribosomal protein S3:a KH domain subunit in NF-kB complexes that mediates selective gene regulation. *Cell* 2007; 131: 927-39.
- 12 Yadavilli S, Hegde V, Deutscher WA. Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependant on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress. *DNA Repair* 2007; 6: 1453-62.
- 13 Yadavilli S, D.Mayo L, Higgins M, Lain S, Hegde V, Deutsch WA. Ribosomal protein S3: A multi-functional protein that interacts with both p53 and MDM2 through its KH domain. *DNA Repair* 2009; 8(10): 1215-24.
- 14 张珊文. 中国 P53 基因治疗的现状和前景. 医学研究杂志 2008; 37(6): 3-5.
- 15 Harris SL, Levine A J. The p53 pathway: positive and negative feedback loop. *Oncogene* 2005; 24(17): 2899-908.
- 16 Badhai J, Fröjmark AS, J Davey E, Schuster J, Dahl N. Ribosomal protein S19 and S24 insufficiency cause distinct cell cycle defects in Diamond-Blackfan anemia. *Biochem Biophys Acta* 2009; 1792(10): 1036-42.
- 17 Tetsuya M, Jonathan R. Live imaging of the *Dictyostelium* cell cycle reveals widespread S phase during development, a G2 bias in spore differentiation and a premitotic checkpoint. *Development* 2008; 135(9): 1647-57.

Screening and Analyzing of gp150-interacting Proteins of *Dictyostelium discoideum*

Da-Lei Wang, Lian-Sheng Hou*

(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract In order to screen the interacting proteins of gp150, protein gp150 (lagC) C-terminal was expressed and polyclonal antibody of gp150 C-terminal was prepared and identified. The recombinant plasmid pET-32a(+) with lagC C-terminal and 6-His tag was expressed in *E. coli* BL21 (DE3) host cells. The fusion protein with 6×His was purified by Ni²⁺ affinity chromatography column and then was used to immune the New Zealand rabbits for preparing polyclonal antibody. The titer and specificity of the rabbit's antiserum were measured by ELISA and Western blot, respectively. The results showed that the fusion protein was successfully expressed and polyclonal antibody was also successfully obtained. The specificity of antibody was proved by Western blot analysis of expression product of gp150. The potency of the polyclonal antibody was as high as 1:128 000. The polyclonal antibody was used in co-immunoprecipitation and two gp150-interacting proteins were captured and identified as 40S ribosomal protein S3 and 40S ribosomal protein S24 by mass spectrometer, which play important roles in regulating of cell cycle, cell development and apoptosis. The data suggest that gp150 can interact with RPS3 and RPS24 for regulating cell differentiation and development during multicellular development of *Dictyostelium discoideum*.

Key words *Dictyostelium discoideum*; gp150; co-immunoprecipitation; interacting protein

Received: March 25, 2010 Accepted: May 25, 2010

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30970316, No.30670266)

*Corresponding author. Tel: 86-21-62233767, E-mail: lshou@bio.ecnu.edu.cn