

Sedlin 突变体的表达及其与 RB1 在细胞中的共定位

何叶 潘林鑫 张永 范礼斌 刘晓颖

摘要 目的 构建脊椎骨骺发育不良蛋白(Sedlin)的缺失突变和点突变体质粒,检测其在细胞内的表达、定位及其与RB1蛋白的共定位情况,为后续研究蛋白质相互作用提供依据。方法 以Sedlin全长cDNA序列为模板,扩增目的基因序列,连接至表达载体,构建3个原核表达质粒,即pGEX-3X-SedlinN/Y115A/Y115F和相应的真核表达质粒,即pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F。分别转化pGEX-3X-SedlinN/Y115A/Y115F到大肠杆菌BL21感受态细胞中,IPTG诱导表达,谷胱甘肽琼脂糖珠纯化后进行SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色法检测其表达情况;分别转染pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F于HEK 293T细胞,Western blot法检测相关蛋白在真核细胞中的表达情况;分别单转pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F以及将上述质粒与pDNA3.1-FLAG-RB1共转到COS7细胞中,进行免疫荧光制片,观察其在真核细胞内的定位情况。结果 测序结果显示pGEX-3X-SedlinN/Y115A/Y115F和pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F重组质粒构建成功;考马斯亮蓝染色显示融合蛋白GST-SedlinN/Y115A/Y115F在BL21细胞中能够大量表达;Western blot结果显示GFP-SedlinN/Y115A/Y115F在HEK 293T细胞中能够高效表达;免疫荧光结果显示GFP-SedlinN/Y115A/Y115F蛋白在COS7细胞的细胞质和细胞核中均有分布,并与RB1蛋白存在明显的核内共定位。结论 人Sedlin及其突变体在BL21菌株和HEK 293T细胞中均能有效表达;在COS7细胞中,Sedlin主要表达于细胞核,而Sedlin突变体除在细胞核中表达外,在细胞质中也有相当量的表达,Sedlin及其突变体均与RB1蛋白共定位,显示Sedlin羧基端以及NPFY基序中的Y磷酸化与否并不影响与RB1蛋白的共定位。

关键词 突变体;质粒构建;蛋白表达;免疫荧光

中图分类号 Q 28; R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1526-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.006

迟发性脊椎骨骺发育不良基因(spondyloepiphy-

seal dysplasia tarda, SEDL) 编码的 Sedlin 蛋白在内质网-高尔基体中间体(ER-golgi intermediate compartment, ERGIC) 囊泡运输中发挥关键作用^[1-2]。分析 X-连锁迟发性脊椎骨骺发育不良(spondyloepiphyseal dysplasia tarda, SEDT) 病例,结果显示患者 SEDL 发生多种突变,导致 Sedlin 蛋白定位异常,且 Sedlin 蛋白羧基端的完整有利于其在 ERGIC 的定位,突变最终导致软骨发育功能异常^[3-4]。

最普遍的调节蛋白质活力及功能的方式是蛋白质磷酸化,酪氨酸位点的磷酸化除了在变构及激活该蛋白的活力外,更重要的是促进其和结合蛋白相互作用而形成多蛋白复合物^[5]。本实验室前期已证实 Sedlin 与视网膜母细胞瘤蛋白(RB1)在哺乳动物细胞内存在相互作用^[6],该研究旨在探讨 Sedlin 的 C 端缺失及磷酸化位点突变是否影响 Sedlin 的亚细胞定位及其与 RB1 的共定位。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌株 本实验所用的 COS7 细胞、HEK 293T 细胞,载体 pCDGFP、pGEX-3X, Sedlin 相关质粒, TG1、BL21、DH5 α 菌株等均为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 PrimeSTAR 酶(日本 TaKaRa 公司); BamH I、EcoR I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Dpn I 酶; DMEM 高糖培养基(北京赛默飞世尔科技有限公司);质粒提取试剂盒(美国 OMEGA 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司); Lipofectamine 2000、Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司); GFP 抗体(美国 Santa Cruz 公司); FLAG 抗体(美国 Sigma 公司);细胞裂解液(上海碧云天生物技术有限公司); SuperSignal West Pico 显色试剂盒(美国 Pierce 公司); IPTG、PMSF、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 和 TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);谷胱甘肽琼脂糖珠(美国 GE Healthcare 公司);荧光封片胶(丹麦 DAKO 公司);荧光显微镜(德国 Carl Zeiss Jena 公司)。

1.2 方法

2019-06-03 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81772908、81201368);安徽高校自然科学基金项目(编号:KJ2017A203)

作者单位:安徽医科大学生命科学院生物学系,合肥 230032

作者简介:何叶,女,硕士研究生;

范礼斌,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:lfan@ahmu.edu.cn;

刘晓颖,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:liuxiaoqing@ahmu.edu.cn

1.2.1 Sedlin 缺失突变体和点突变体的序列扩增^[6] 以 Sedlin 全长 cDNA 序列为模板 25 μl PCR 体系进行扩增: 模板 DNA 10 ng (0.5 μl) ,上下游引物浓度均为 20 pmol/ μl (0.5 μl) ,Prime STAR 酶 12.5 μl ,ddH₂O 11 μl 。

1.2.2 Sedlin 缺失突变体的构建^[6] 对上述扩增产物进行电泳,凝胶试剂盒进行回收,将得到的 PCR 产物用限制性内切酶 BamH I 和 EcoR I 进行双酶切,并同样双酶切 pCDGFP 载体、pGEX-3X 载体,将酶切后的产物用 T4 DNA 连接酶连接(16 $^{\circ}\text{C}$ 连接约 12 h),然后转化 TG1 感受态细胞并平板培养; 10 h 后选取单克隆挑菌,37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养 12 h 进行质粒抽提,最后用 BamH I 和 EcoR I 进行酶切鉴定; 选酶切鉴定正确的质粒送公司测序。

1.2.3 Sedlin 点突变体的构建^[6] 20 μl 扩增产物加入 Dpn I 酶 1.5 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h,转化 DH5 α 感受态细胞,平板培养约 12~16 h 后,挑取单克隆 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡过夜培养; 最后抽提质粒并进行双酶切鉴定,选取酶切鉴定正确的质粒送公司测序。

1.2.4 细胞培养及转染 用含有 100 U/ml 青、链霉素及 5% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 COS7 细胞、HEK 293T 细胞。细胞长满单层时传代,次日将重组质粒(μg): Lipofectamine 2000 按 1:2 的比例转染至 HEK 293T 细胞,用于检测蛋白表达; 将重组质粒(μg): Lipofectamine 2000 按 1:1.5 转染至 COS7 细胞,用于免疫荧光实验。

1.2.5 GST-SedlinN、GST-Sedlin-Y115A、GST-Sedlin-Y115F 融合蛋白的表达及纯化 把 pGEX-3X-SedlinN/Y115A/Y115F 重组质粒转化至 BL21 感受态细胞,挑取单克隆至含有氨苄抗性的 2 ml LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 12 h; 取 50 μl 菌液到含有氨苄抗性 5 ml LB 中扩大培养,当 OD₆₀₀ 值达 0.4~0.6 范围时再按照 GST-Sedlin 融合蛋白的最佳诱导条件摸索制备 GST-SedlinN、GST-Sedlin-Y115A、GST-Sedlin-Y115F 的诱导条件,按照最佳条件诱导(pGEX-3X-SedlinN 为 0.05 mmol/L 的 IPTG,16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 12 h,pGEX-3X-Sedlin-Y115A、pGEX-3X-Sedlin-Y115F 为 0.01 mmol/L 的 IPTG,30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 4 h),诱导结束后收集细菌并用含终浓度 0.1 mmol/L 的 PMSF 和 DTT 的细菌裂解液裂解约 30 min,再适当超声以促进细胞裂解; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 20 min,取上清液,每管 1 ml 分装至 1.5 ml EP 管,保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。取 1 份制备好的融合蛋白用谷胱甘肽

琼脂糖球珠对其进行纯化并制成样品,SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色后凝胶成像仪拍照,检测融合蛋白是否成功诱导表达。

1.2.6 Western blot 法检测蛋白表达 转染 48 h 后收集细胞,加适量细胞裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 25~30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 20 min,取适量蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳; 100 V 电转 1 h; PVDF 膜于 5% 脱脂奶粉中封闭 1.5 h, TBST 洗膜(10 min,3 次),GFP 兔抗(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜(10 min,3 次),二抗(1:5 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜(10 min,3 次),ECL 显影。

1.2.7 免疫荧光实验 转染后约 24 h 取出 COS7 细胞爬片,用 PBS 清洗细胞(5 min,3 次),-20 $^{\circ}\text{C}$ 的甲醇固定 5 min,再用 70% 乙醇溶液固定细胞 5 min, PBS 清洗(5 min,3 次); 1% 脱脂奶粉封闭 30 min, FLAG 一抗室温孵育 2 h, TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h; DAPI 染核 2 min, PBS 清洗细胞(5 min,3 次), DAKO 封片胶封片; 荧光显微镜下观察、拍摄。

2 结果

2.1 Sedlin 突变体重组质粒的酶切鉴定和测序结果 分别对重组质粒 pGEX-3X-SedlinN/Y115A/Y115F 和 pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F 进行双酶切(BamH I、EcoR I),结果见图 1A、1B。各重组质粒均被切成两条带,一条带与载体大小一致(A 载体为 pGEX-3X 约 4 900 bp; B 载体为 pCDGFP 约 6 100 bp),另一条带与目的片段大小一致(SedlinN 为 330 bp, Sedlin-Y115A/Y115F 为 420 bp)。上述质粒的测序结果经比对,证实各质粒成功构建,见图 1C、1D。

2.2 Sedlin 突变体在原核细胞中的表达 分别转化 pGEX-3X-SedlinN/Y115A/Y115F 质粒至 BL21 菌株,经 IPTG 诱导培养后,收集菌体进行裂解,经谷胱甘肽琼脂糖珠子纯化后进行 SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝染色结果显示,纯化后的样品分别在约 37 ku(图 2A)和 40 ku(图 2B)的位置出现很强的蛋白条带,大小符合 GST-SedlinN、GST-Sedlin-Y115A、GST-Sedlin-Y115F 融合蛋白,表明融合蛋白表达成功。

2.3 Sedlin 突变体在 HEK 293T 细胞中的表达 转染后约 48 h,收集细胞并进行裂解,将细胞总蛋白进行 Western blot 检测,结果显示转染了 pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F 的细胞裂解液均能检测到条带,与预染的蛋白 Marker 对比,过表达的 pCDGFP-SedlinN 分子量为 39 ku,点突变体 pCDGFP-Sedlin-

Y115A、pCDGFP-Sedlin-Y115F 的分子量约为 42 ku , 与野生型 pCDGFP-Sedlin 的分子量一致 ,表明 Sedlin 突变体在 HEK 293T 细胞中正常表达。见图 3。

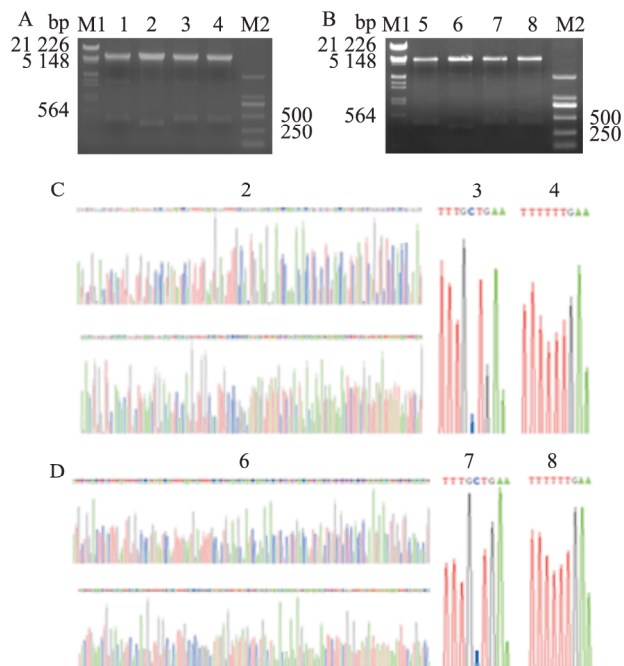


图 1 重组质粒的酶切鉴定及测序结果图

A、B: 重组质粒的酶切鉴定图; C、D: 重组质粒的测序结果图; M1: Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker; M2: TaKaKa DL2000 Marker; 1: pGEX-Sedlin 的酶切鉴定结果; 2: pGEX-SedlinN 的酶切鉴定结果及测序图; 3: pGEX-Sedlin-Y115A 的酶切鉴定结果及测序图; 4: pGEX-Sedlin-Y115F 的酶切鉴定结果及测序图; 5: pCDGFP-Sedlin 的酶切鉴定结果; 6: pCDGFP-SedlinN 的酶切鉴定结果及测序图; 7: pCDGFP-Sedlin-Y115A 的酶切鉴定结果及测序图; 8: pCDGFP-Sedlin-Y115F 的酶切鉴定结果及测序图

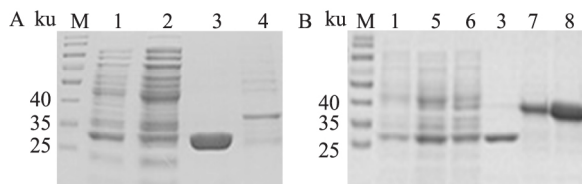


图 2 考马斯亮蓝染色检测谷胱甘肽琼脂糖珠纯化后的融合蛋白 M: 标准蛋白 Marker 梯度; 1: GST 的细菌裂解液; 2: GST-SedlinN 的细菌裂解液; 3: GST 的纯化蛋白; 4: GST-SedlinN 的纯化蛋白; 5: GST-Sedlin-Y115A 的细菌裂解液; 6: GST-Sedlin-Y115F 的细菌裂解液; 7: GST-Sedlin-Y115A 的纯化蛋白; 8: GST-Sedlin-Y115F 的纯化蛋白

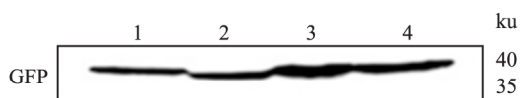


图 3 Sedlin 突变体蛋白在哺乳动物细胞中的表达

1: 转染 pCDGFP-Sedlin 的 HEK 293T 细胞裂解液; 2: 转染 pCDGFP-SedlinN 的 HEK 293T 细胞裂解液; 3: 转染 pCDGFP-Sedlin-Y115A 的 HEK 293T 细胞裂解液; 4: 转染 pCDGFP-Sedlin-Y115F 的 HEK 293T 细胞裂解液

2.4 Sedlin 突变体蛋白在 COS7 细胞中的定位 分别单转 Sedlin 突变体 pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F 至 COS7 细胞中 ,然后进行免疫荧光制片、显微拍摄 ,结果显示它们在细胞核与细胞质中均有表达 ,且细胞核表达量较高 ,见图 4A ,这一结果与野生型 Sedlin 的定位基本一致 ,见图 4B。表明 Sedlin 的 C 端缺失后 ,以及 C 端磷酸化位点突变后并未影响其亚细胞定位。

2.5 Sedlin 突变体蛋白与 RB1 蛋白的共定位 分别共转 Sedlin 突变体质粒 pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F 与 pcDNA3.1-FLAG-RB1 至 COS7 细胞中 ,进行免疫荧光制片、显微拍摄 ,结果显示它们与 RB1 蛋白在核内均存在明显的共定位 ,表明 Sedlin 的 C 端缺失后 ,以及 C 端磷酸化位点突变后并未影响其与 RB1 的共定位(图 5A、5B) 提示 Sedlin 的 N 端可能是与 RB1 相互作用的重要结构域。

3 讨论

SEDT 是一种软骨发育功能障碍疾病 ,病变主要累及身体承重大关节 ,以退行性大关节炎和短躯干性侏儒为主要临床表现^[1]。SEDT 为 X-连锁隐性遗传 ,具有高度遗传性^[7]。高度保守的 Sedlin 蛋白 ,在心脏、肾脏、骨骼肌等组织中均有分布。相关定位研究^[8]表明 Sedlin 蛋白在哺乳动物细胞 COS7 中与 ERGIC 在细胞核周围有部分共定位现象。现阶段研究普遍认为 SEDT 的发病原因可能是 SEDL 基因突变导致 Sedlin 功能异常 ,软骨细胞不能正常分泌细胞外基质 ,进而引起骨骼发育异常。SEDT 相关的 Sedlin 突变不会导致亚细胞定位的异常 ,但涉及疏水核心内残基的突变会导致其与转录因子 MBP1、PITX1 和 SF1 相互作用的丧失^[9]。Sedlin 的二聚化及其核定位表明哺乳动物 Sedlin 的其他作用;据报道其与酵母中的 Sedlin 同源物 Trs20p 已经作为 TRAPP 复合物中的单体存在^[10] ,其中 Sedlin 在内质网-高尔基体的膜泡转运中发挥重要作用。人 Rb1 基因全长 178 143 bp ,定位于染色体 13q14 ,编码约 104 ~ 110 ku 的核内磷酸化蛋白 pRb^[11]。RB1 蛋白几乎在所有正常细胞中表达 ,但表达量存在组织和发育阶段的差异 ,在视网膜、心脏和肌肉中较高 ,肝脏、胸腺和脑中较低 ,且随年龄的增长 ,表达量在各组织中均有显著下降。RB1 蛋白具有包括参与细胞周期、细胞分化、细胞凋亡的调控等功能 ,RB1 的抑癌作用与这些功能的正常发挥密不可分^[12]。

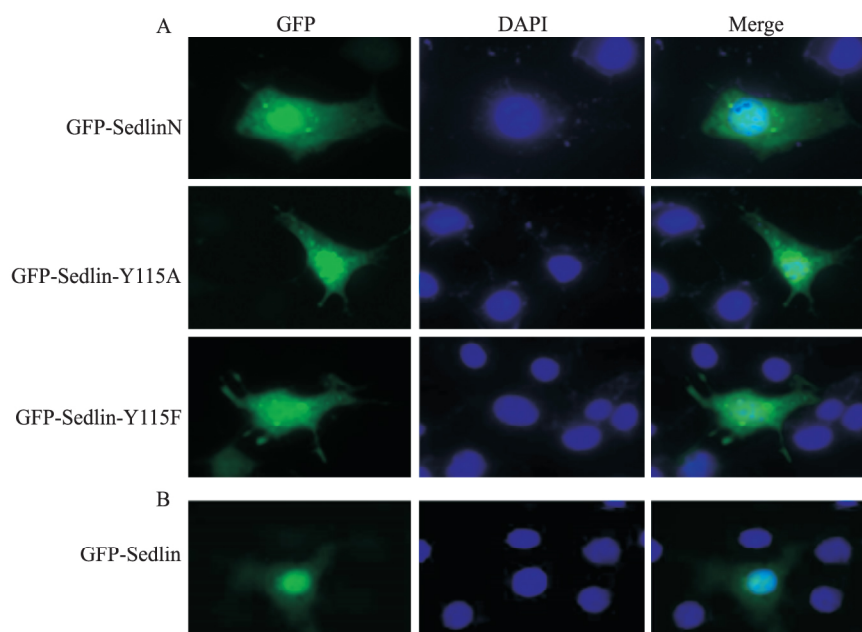


图4 Sedlin 及其突变体蛋白在 COS7 细胞中的定位

A: Sedlin 突变体蛋白 (SedlinN/Y115A/Y115F) 在 COS7 细胞中的定位; B: Sedlin 蛋白在 COS7 细胞中的定位; GFP: 显示含 GFP 标签的蛋白; DAPI: 显示染色的细胞核; Merge: 叠加效果

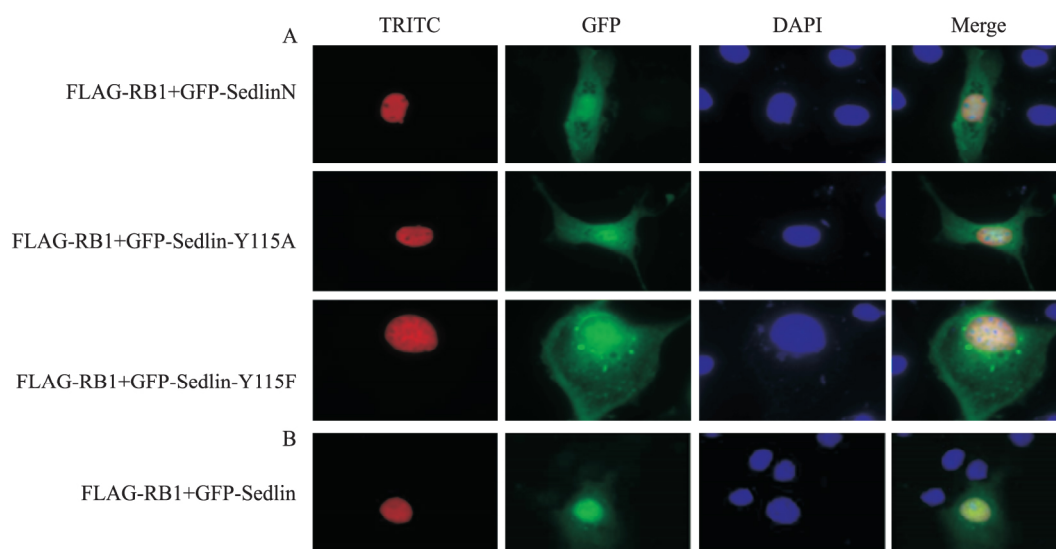


图5 Sedlin 突变体蛋白与 RB1 蛋白在 COS7 细胞中的共定位

A: Sedlin 突变体蛋白 (SedlinN/Y115A/Y115F) 与 RB1 蛋白在 COS7 细胞中的共定位; B: Sedlin 蛋白与 RB1 蛋白在 COS7 细胞中的共定位; TRITC: 含 FLAG 标签的 RB1 蛋白; GFP: 显示含 GFP 标签的蛋白; DAPI: 显示染色的细胞核; Merge: 叠加效果

本研究通过构建 pCDGFP-SedlinN、pCDGFP-Sedlin-Y115A、pCDGFP-Sedlin-Y115F 真核表达质粒,并将其分别转染至 COS7、HEK 293T 细胞,比较 Sedlin 突变体相对于野生型在真核细胞内的表达和定位改变。鉴于本课题组前期已证实野生型 Sedlin 蛋白与 RB1 蛋白存在共定位,所以又分别将上述几个质粒与 FLAG-RB1 质粒共转至 COS7 细胞中,了

解 Sedlin 突变体蛋白与 RB1 蛋白的共定位情况。将 Sedlin 的三个突变体构建到原核表达载体 pGEX-3X 中,诱导表达 GST 融合蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白表达情况。

构建的两个点突变体在 DNA 水平条带大小相对于野生型而言无明显变化,只是 DNA 序列中对应位置碱基种类发生变化,而总的碱基数不变,除了

Tyr115Phe、Tyr115Ala 突变体以外,常见的 Sedlin 突变体还有 Asp47Tyr、Ser73Leu、Phe83Ser 和 Val130Asp 根据相关文献^[9]中对 Sedlin 三维结构分析得知,Sedlin 突变体 (Ser73Leu、Phe83Ser、Val130Asp) 位于 Sedlin 的疏水核心结构域内,因此可能会影响 Sedlin 的结构完整性以及与其他蛋白的相互作用。例如,极性 Ser73 到 Leu73 的突变将导致疏水性沟槽的破坏从而导致氢键的损失。类似地,Phe83 和 Val130 残基处于疏水区域内蛋白质的内部,这些非极性残基突变为极性残基(分别为丝氨酸和天冬氨酸)可能会破坏疏水核心内的相互作用,导致 Sedlin 的错误折叠,这将破坏蛋白质-蛋白质相互作用^[9]。

pCDGFP-SedlinN、pCDGFP-Sedlin-Y115A、pCDGFP-Sedlin-Y115F 几个突变体在 HEK 293T 细胞里均有表达,且缺失突变体的蛋白分子量低于野生型及其点突变体,但是分子量变化不大,这是因为 SEDL 基因的编码区 423 bp,而编码 Sedlin 的缺失突变体(N 端)的基因有 339 bp,结果证明缺失了 Sedlin 的 C 端以后 Sedlin 的缺失突变体(N 端)依然能正常表达。免疫荧光结果显示突变体 pCDGFP-SedlinN/Y115A/Y115F 在细胞质与细胞核中均有表达,与野生型 Sedlin 的定位情况基本一致,表明上述突变均不会改变 Sedlin 蛋白的亚细胞定位,结合本文中上述免疫荧光实验结果证明的 RB1 蛋白与 SedlinN/Y115A/Y115F 突变体蛋白在 COS7 中均存在共定位,说明 Sedlin 的第 115 位氨基酸(磷酸化位点)突变后(Tyr115Phe、Tyr115Ala)并不会导致其与 RB1 蛋白共定位的改变;同时由于 RB1 蛋白与 SedlinN 蛋白存在共定位情况,可以得出初步结论: Sedlin 蛋白与 RB1 蛋白相互作用的部位可能是 Sedlin 蛋白的 N 端。

本研究重点关注 Sedlin 的 3 个突变体蛋白的表达及其与 RB1 蛋白在细胞内的共定位情况,将为本

课题组后续研究 Sedlin 与 RB1 相互作用的详细机制提供依据,为进一步揭示人类 Sedlin 蛋白在细胞中的作用机制、与相关疾病的关系等奠定一定的基础。

参考文献

- [1] Xiaoying L, Yunfei W, Libin F, et al. Interaction of sedlin with PAM14[J]. *J Cell Biochem* 2010, 109: 1129-33.
- [2] Jang S B, Kim Y G, Cho Y S, et al. Crystal structure of SEDL and its implications for a genetic disease spondyloepiphyseal dysplasia tarda[J]. *J Biol Chem* 2002 277: 49863-9.
- [3] Kim Y G, Raunser S, Munger C, et al. The architecture of the multisubunit TRAPP I complex suggests a model for vesicle tethering[J]. *Cell* 2006, 127: 817-30.
- [4] Choi M Y, Chan C C, Cheah K S, et al. Biochemical consequences of sedlin mutations that cause spondyloepiphyseal dysplasia tarda[J]. *Biochem J* 2009 423(2): 233-42.
- [5] 姜铮,王芳,何湘,等.蛋白质磷酸化修饰的研究进展[J]. *生物技术通讯* 2009 20(2): 233-7.
- [6] 潘林鑫,李新颖,徐南,等.人 RB1 及其突变体的表达与定位[J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(8): 853-8.
- [7] Mumm S, Zhang X, Vacca M, et al. The sedlin gene for spondyloepiphyseal dysplasia tarda escapes X-inactivation and contains a non-canonical splice site[J]. *Gene* 2001 273(2): 285-93.
- [8] Moon R T, Bowerman B, Boutros M, et al. The promise and perils of Wnt-signaling through beta-catenin[J]. *Science* 2002 296(5573): 1644-6.
- [9] Jeyabalan J, Nesbit M A, Galvanovskis J, et al. SEDLIN forms homodimers: characterisation of SEDLIN mutations and their interactions with transcription factors MBP1, PITX1 and SF1[J]. *PLoS One* 2010 5(5): e1064.
- [10] Taussig D, Lipatova Z, Kim J J, et al. Trs20 is required for TRAPP II assembly[J]. *Traffic* 2013, 14(6): 678-90.
- [11] Seth M R, Anne L G, Ning Z, et al. Structure of the RbC-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release[J]. *Cell* 2005 123: 1093-106.
- [12] Di F R, Tesoriere G, Vento R, et al. RB1 in cancer: different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis[J]. *J Cell Physiol* 2013 228(8): 1676-87.

Expression of Sedlin mutants and its colocalization with RB1 in cells

He Ye, Pan Linxin, Zhang Yong, et al

(Dept of Biology, School of Life Science, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the plasmids of the Sedlin mutants and detect their expression and co-localization with RB1 in cells. **Methods** Sedlin mutants were amplified by PCR with the template including the full length cDNA fragment of Sedlin. Eukaryotic plasmids pcDNA3.1-GFP-SedlinN/Sedlin-Y115A/Sedlin-Y115F and prokaryotic plasmids pGEX-3X-SedlinN/Sedlin-Y115A/Sedlin-Y115F were constructed respectively. pcDNA3.1-GFP-SedlinN/Sedlin-Y115A/Sedlin-Y115F were transfected into HEK 293T cells, and pGEX-3X-SedlinN/Sedlin-Y115A

CYLD 干扰对实验性视网膜脱离中光感受器细胞 坏死性凋亡伴发自噬的影响

杨南¹, 丁婕², 闫原野², 鲁理³, 董凯³

摘要 目的 探讨圆柱瘤基因(CYLD)干扰对实验性视网膜脱离中光感受器细胞坏死性凋亡伴发自噬的影响。方法 大鼠视网膜下注射慢病毒载体3周后,在各实验组建立视网膜脱离的模型,分为正常对照组、未干预组、CYLD干预组、阴性干预组。建模3d后,使用电镜观察光感受器细胞的形态学特点并判断其死亡方式。采用Western blot法检测视网膜裂解的LC3蛋白、beclin-1蛋白表达。结果 电镜检测结果显示CYLD干预组光感受器细胞坏死数明显低于未干预组和阴性干预组($P < 0.05$)。Western blot结果表明CYLD干预组LC3蛋白、beclin-1蛋白表达水平显著低于未干预组和阴性干预组($P < 0.01$)。结论 电镜检测和Western blot检测结果共同显示CYLD干扰可以通过抑制LC3和beclin-1的活化,从而抑制光感受器细胞的坏死性凋亡伴发的自噬。

关键词 视网膜脱离; 光感受器细胞; 坏死性凋亡; 自噬

中图分类号 R 774.1+2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1531-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.007

2019-06-19 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81400407); 安徽省自然科学基金(编号: 1408085QH159)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属省立医院, 合肥 230001

² 皖南医学院眼科, 芜湖 241000

³ 安徽医科大学附属省立医院眼科, 合肥 230001

作者简介: 杨南, 男, 硕士研究生;

董凯, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: happysubmission@163.com

视网膜脱离后光感受器细胞死亡的方式有多种, 本课题组在国际上首次发现光感受器细胞的坏死性凋亡的形态学改变^[1]。同时还发现, 半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶抑制剂(carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-fluoromethylketone, z-VAD-FMK)不仅诱导光感受器细胞的坏死性凋亡, 同时还参与了自噬的激活^[2]。另外, 圆柱瘤基因(cylindromatosis, CYLD)干扰可以抑制视网膜脱离后光感受器细胞中的坏死性凋亡和凋亡^[3], 但是对坏死性凋亡中的自噬有无影响尚不清楚。另一方面, 活性氧、Beclin1、雷帕霉素靶蛋白、磷酸肌醇三磷酸激酶、LC3-II等多种蛋白质和信号通路参与了自噬的发生^[4]。Beclin1是早期自噬体形成的必需组分, 与自噬体膜的形成有关, 并引导募集其他自噬相关蛋白定位于自噬体膜^[5]。LC3-I向LC3-II的转换是自噬体形成的标志^[6]。该研究探讨CYLD干扰对实验性视网膜脱离中光感受器细胞坏死性凋亡伴发自噬有无影响, 为视网膜脱离后的视功能恢复提供一定理论基础和干预思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 普通级健康雄性SD大鼠48只, 体质量260~280g, 由安徽医科大学附属省立医院和上海交通大学附属第一人民医院提供, 大鼠在室温18~25℃、湿度<60%环境下饲养。

/Sedlin-Y115F were transformed into BL21 cells. Western blot and Coomassie brilliant blue staining were used to detect its expression. Immunofluorescence experiment in COS7 cells was performed to detect the co-localization of Sedlin mutants with RB1. **Results** The recombinant plasmids pcDNA3.1-GFP-SedlinN/Sedlin-Y115A/-Sedlin-Y115F and pGEX-3X-SedlinN/Sedlin-Y115A/Sedlin-Y115F were constructed successfully, which could be highly expressed in HEK 293T cells and BL21 competent cells, and the expression of Sedlin mutants were found both in nucleus and in cytoplasm, and they colocalized with RB1 in nucleus. **Conclusion** Sedlin and its mutants are effectively expressed in BL21 and HEK 293T cells. In COS7 cells, Sedlin is mainly expressed in the nucleus, however, its mutants are expressed in both nucleus and cytoplasm, with a considerable amount in cytoplasm. The mutants were colocalized with RB1 protein, indicating that the carboxyl terminus of Sedlin and the phosphorylation of Y in NPFY motif did not affect its co-localization with RB1 protein.

Key words sedlin mutants; plasmids construction; protein expression; immunofluorescence