

【基础研究】

限公司),氨苄西林(河南新乡华星药厂,国药准字 H41020511),PCR 扩增引物合成、基因序列测定均由北京奥科鼎盛生物技术公司完成。Thermal Cycler 型 PCR 仪(美国 ABI 公司),凝胶图像分析仪(美国 Alpha Innotech 公司),5424 型离心机(德国 Eppendorf 公司),超净工作台(苏州净化设备仪器厂)。

1.4 引物设计 编码 Stathmin 16 位 Ser 的碱基为-TCA,25 位 Ser 的碱基为-AGC,38 位 Ser 的碱基为-TCC,63 位 Ser 的碱基为-TCC。将丝氨酸突变为丙氨酸,丙氨酸的碱基序列为 GCN,为分别获得突变序列,设计上下游引物如下:Ser16 上游引物 Ser16/A-F:5'-CGTGCCGACAGCCA-3',下游引物 Ser16/A-R:5'-TGGCCTGCGGCACG-3';Ser25 上游引物 Ser25/A-F:5'-TTCTCGCCCCCTCGGT-3',下游引物 Ser25/A-R:5'-ACCGAGGGGCGAGAA-3';Ser38 下游引物 Ser38/A-F:5'-CCTTGCCC-CTCCAAA-3',下游引物 Ser38/A-R:5'-TTTGAGAGGGCAAGG-3';Ser63 上游引物 Ser63/A-F:5'-AAGGCCCATGAAGCT-3',下游引物 Ser63/A-R:5'-AGCTTCATGGGACTT-3';Stathmin 上游引物 Stathmin-F:5'-CCGGAATTCATGGCTTCTTGATATCC-3',下游引物 Stathmin-R:5'-CCGCTCG-AGTAGTCAGCTTCAGTCTCG-3'。下滑线部分为酶切位点,上游为 *EcoR* I,下游为 *Xho* I。

1.5 点突变扩增 以 Stathmin 全长片段为模板,分别利用下述 3 个 PCR 反应体系进行 Ser 位点突变扩增。

1.5.1 Ser16 位点突变扩增 反应(1):分别以 Ser16/A-F 和 Stathmin-R 为引物,Stathmin 全长基因片段为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为 94 ℃ 3 min,94 ℃ 40 s 变性,53 ℃ 40 s 退火,72 ℃ 40 s 延伸,30 个循环,72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存;反应(2):再以 Stathmin-F 和 Ser16/A-R 为引物,Stathmin 全长基因片段为模板,进行 PCR 扩增,反应条件同反应(1);反应(3):以 Stathmin-F 和 Stathmin-R 为引物,反应(1)和反应(2)扩增产物为模板,进行 PCR 扩增,反应条件同反应(1),即可获得 Ser16/A 的突变序列。

1.5.2 Ser25 位点突变扩增 反应(1):以 Ser25/A-F 和 Stathmin-R 为引物进行扩增;反应(2):再以 Stathmin-F 和 Ser25/A-R 为引物进行扩增;其余步骤同 Ser16/A 的突变序列的实验方法。

1.5.3 Ser38 位点突变扩增 反应(1):以 Ser38/A-F 和 Stathmin-R 为引物进行扩增;反应(2):再以 Stathmin-F 和 Ser38/A-R 为引物进行扩增;其余步骤同 Ser16/A 的突变序列的实验方法。

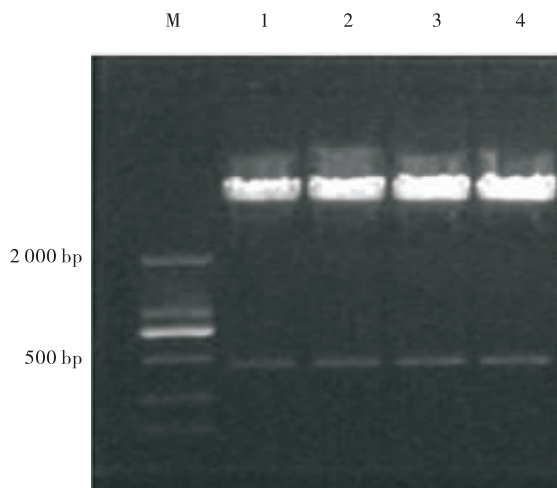
1.5.4 Ser63 位点突变扩增 反应(1):以 Ser63/A-F 和 Stathmin-R 为引物进行扩增;反应(2):再以 Stathmin-F 和 Ser25/A-R 为引物进行扩增;其余步骤

同 Ser16/A 的突变序列的实验方法。

1.6 连接载体 将获得的点突变扩增序列 Ser16/A、Ser25/A、Ser38/A、Ser63/A 分别采用质量分数 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,取 450 bp 左右的目标条带按照胶回收试剂盒说明书分别进行回收。再将 Stathmin 点突变的胶回收产物和真核表达载体 pcDNA3.1 分别用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切。将酶切产物分别加入质量分数 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳后,并将目标条带进行胶回收。然后分别将突变后的 Ser16/A、Ser25/A、Ser38/A、Ser63/A 胶回收产物与 pcDNA3.1 载体回收产物用 T4 连接酶在 0 ℃ 连接 16 h,将连接产物 10 μL 加入到 100 μL *E. coli* JM109 的感受态细胞中进行转化,涂布在含有氨苄西林的平板上 37 ℃ 孵育过夜。将平板上生长的阳性克隆转到 5 mL 含有氨苄西林的培养液中,37 ℃ 220 r · min⁻¹ 摇床培养 12 ~ 16 h,收菌,并按照说明书提取质粒。将提取的重组质粒 DNA 用限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 双酶切,酶切产物进行琼脂糖电泳,将大小正确的序列送北京奥科鼎盛生物技术公司进行序列分析。

2 结果

2.1 重组载体双酶切鉴定 点突变重组质粒双酶切产物进行琼脂糖电泳,条带大小均为 450 bp,符合预期(图 1)。点突变序列成功转化到真核表达质粒 pcDNA3.1 中。



M: Marker DL2000; 1: pcDNA3.1/Stathmin Ser16/A; 2: pcDNA3.1/Stathmin Ser25/A; 3: pcDNA3.1/Stathmin Ser38/A; 4: pcDNA3.1/Stathmin Ser63/A。

图 1 点突变重组载体酶切鉴定

Fig. 1 Identification of enzyme digestion products of recombinant vector with point mutation

2.2 重组载体基因序列分析 重组质粒进行 DNA 序列分析, Ser16、Ser25、Ser38、Ser63 成功突变为丙氨酸。编码 Stathmin16 位 Ser 的碱基 TCA 突变为丙

氨酸 GCA(图 2),25 位 Ser 的碱基 AGC 突变为丙氨酸 GCC(图 3),38 位 Ser 的碱基 TCC 突变为丙氨酸 GCC(图 5)。

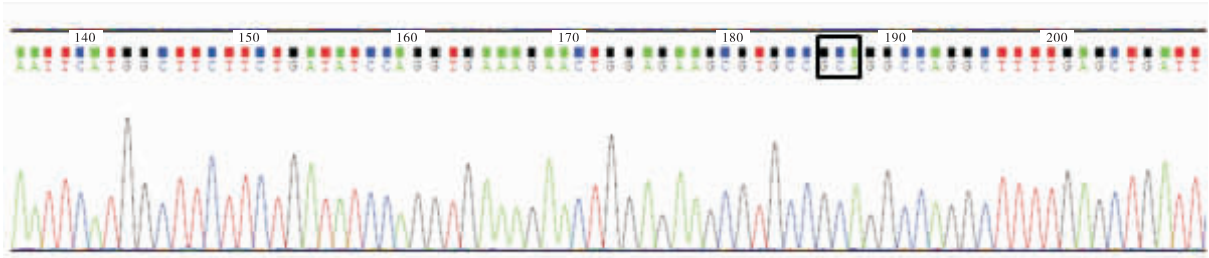


图 2 pcDNA3.1/Stathmin Ser16/A 基因测序结果
Fig.2 Results of pcDNA3.1/Stathmin Ser16/A gene sequencing

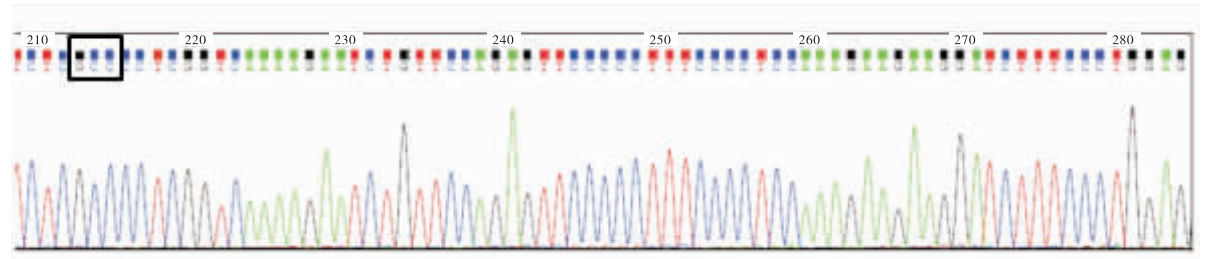


图 3 pcDNA3.1/Stathmin Ser25/A 基因测序结果
Fig.3 Results of pcDNA3.1/Stathmin Ser25/A gene sequencing

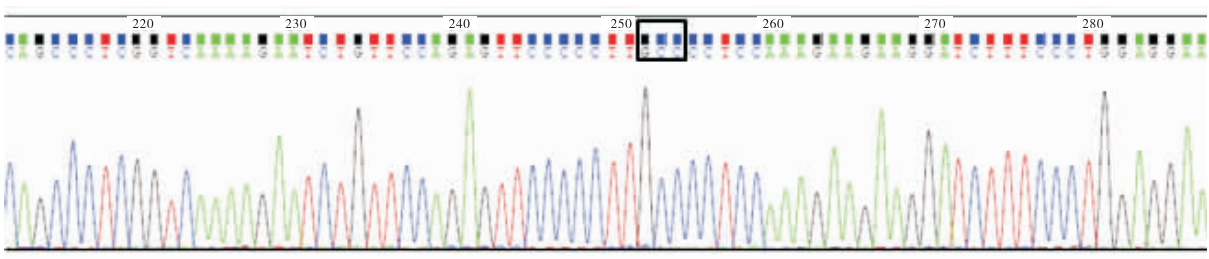


图 4 pcDNA3.1/Stathmin Ser38/A 基因测序结果
Fig.4 Results of pcDNA3.1/Stathmin Ser38/A gene sequencing

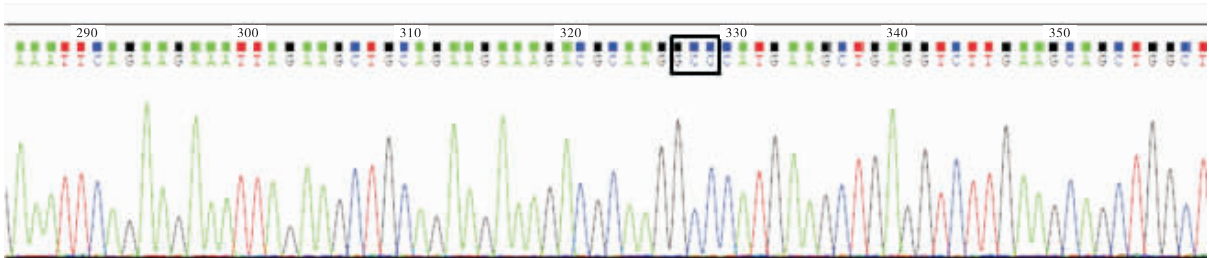


图 5 pcDNA3.1/Stathmin/Ser63/A 基因测序结果
Fig.5 Results of pcDNA3.1/Stathmin Ser63/A gene sequencing

3 讨论

Stathmin 蛋白是一种广泛存在于细胞质的磷酸化蛋白,具有高度保守性,有 α 、 β 2 个不同的亚型^[4]。Stathmin 蛋白可以通过 N 端的 Ser16、Ser25、Ser38 和 Ser63 等 4 个丝氨酸残基磷酸化和去磷酸化作用来调控微管的聚合与解聚,从而影响细胞周

期^[5]。在细胞有丝分裂初期,Stathmin 在蛋白激酶作用下磷酸化水平明显升高,4 个丝氨酸残基能够被不同的蛋白激酶进行磷酸化,Stathmin 经过磷酸化后就会失去与微管蛋白异二聚体结合的能力,从而释放微管蛋白异二聚体,有利于微管的聚合,促进纺锤体的形成;而当细胞进入有丝分裂的晚期,经过磷酸化修饰的 Stathmin 会被相应的磷酸酶去磷酸

化,Stathmin 去磷酸化后获得了再次与微管蛋白结合的能力,从而促进微管的解聚以及纺锤体的解体,这时细胞就会顺利进入新的细胞周期^[6]。总的来说,在细胞周期中 Stathmin 蛋白可以通过不同的磷酸化状态来改变微管蛋白的结合与分离,从而完成它对细胞有丝分裂的调控作用。

Stathmin 蛋白的功能与恶性肿瘤的发生、发展密切相关。首先,Stathmin 在乳腺癌、黑色素瘤、食管癌、膀胱癌、急性白血病等多种恶性肿瘤中均呈现过表达状态^[7-10]。其次,Stathmin 是许多细胞内蛋白激酶如丝裂活化蛋白激酶、钙调蛋白依赖蛋白激酶、细胞周期蛋白依赖激酶等的底物^[11],这些蛋白激酶能够在不同的细胞周期通过修饰 Stathmin 蛋白的不同磷酸化位点而改变微管蛋白的聚合,从而调控细胞的增殖和分化^[12]。最后,因为 Stathmin 蛋白下游作用的靶点是微管,而微管对肿瘤细胞分裂、增殖及侵袭发挥着关键的调控作用,所以 Stathmin 能影响以微管系统为靶点的化学治疗药物对肿瘤的敏感性。

点突变技术是研究磷酸化的一种重要技术策略。将磷酸化的位点运用 PCR 点突变的方式突变为不能进行磷酸化的氨基酸残基,从而准确地单位点抑制 Stathmin 磷酸化。本实验中,利用 PCR 点突变分别将 Stathmin 蛋白的 4 个磷酸化位点的丝氨酸突变为丙氨酸,并通过基因序列测定进行了验证,进一步将点突变序列转入真核表达载体中构建了 Stathmin 磷酸化位点突变载体,有助于在进一步的研究中构建点突变细胞模型,探讨 Stathmin 磷酸化在肿瘤细胞生长、侵袭、转移等多方面生物表现的影响,为发现新的肿瘤生物治疗靶点奠定基础;同时为进一步研究 Stathmin 不同磷酸化位点的具体作用提供实验基础。

参考文献:

[1] NEMUNAITIS J. Stathmin 1: a protein with many tasks. New bio-marker and potential target in cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*,2012,16(7):631-634.

[2] HARADA K, FERDOUS T, HARADA T, *et al.* High expression of Stathmin 1 is a strong prognostic marker in oral squamous cell carcinoma patients treated by docetaxel-containing regimens[J]. *Clin Exp Med*,2015, Epub ahead of print.

[3] MICELI C, TEJADA A, CASTANEDA A, *et al.* Cell cycle inhibition therapy that targets Stathmin *in vitro* and *in vivo* models of breast cancer[J]. *Cancer Gene Ther*,2013,20(5):298-307.

[4] UCHIDA S, MARTEL G, PAVLOWSKY A, *et al.* Learning-induced and Stathmin-dependent changes in microtubule stability are critical for memory and disrupted in ageing[J]. *Nat Commun*,2014,5:4389.

[5] LU Y, LIU C, CHENG H, *et al.* Stathmin, interacting with NF- κ B, promotes tumor growth and predicts poor prognosis of pancreatic cancer[J]. *Curr Mol Med*,2014,14(3):328-339.

[6] LIN X, LIAO Y, CHEN X, *et al.* Regulation of oncoprotein 18/Stathmin signaling by ERK concerns the resistance to taxol in non small cell lung cancer cells[J]. *Cancer Biother Radiopharm*,2016,31(2):37-43.

[7] MACHADO-NETO J A, LAZARINI M, FAVARO P, *et al.* ANKHD1 silencing inhibits Stathmin 1 activity, cell proliferation and migration of leukemia cells[J]. *Biochim Biophys Acta*,2015,1853(3):583-593.

[8] DU J, TAO Z H, LI J, *et al.* Construction of a hepatocellular carcinoma cell line that stably expresses Stathmin with a Ser25 phosphorylation site mutation[J]. *Genet Mol Res*,2015,14(4):12111-12117.

[9] BAQUERO M T, HANNA J A, NEUMEISTER V, *et al.* Stathmin expression and its relationship to microtubule-associated protein tau and outcome in breast cancer[J]. *Cancer*,2012,118(19):4660-4669.

[10] ZHU H W, JIANG D, XIE Z Y, *et al.* Effects of Stathmin 1 silencing by siRNA on sensitivity of esophageal cancer cells Eca-109 to paclitaxel[J]. *Genet Mol Res*,2015,14(4):18695-18702.

[11] ZHENG P, LIU Y X, CHEN L, *et al.* Stathmin, a new target of PRL-3 identified by proteomic methods, plays a key role in progression and metastasis of colorectal cancer[J]. *J Proteome Res*,2010,9(10):4897-4905.

[12] HU J Y, CHU Z G, HAN J, *et al.* The p38/MAPK pathway regulates microtubule polymerization through phosphorylation of MAP4 and Op18 in hypoxic cells[J]. *Cell Mol Life Sci*,2010,67(2):321-333.

(本文编辑:李胜利 英文编辑:徐自超)