

网络出版时间: 2021-05-14 14:53 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1448.001.html>

◇基础医学研究◇

RB1-C 磷酸化位点突变体与 Sedlin 的共定位研究

潘林鑫¹, 徐涛², 范礼斌¹, 钱成³

摘要 目的 研究人视网膜母细胞瘤蛋白 1 羧基端(RB1-C)磷酸化位点突变体的蛋白表达和细胞定位情况及其与迟发性脊椎骨骺发育不良病蛋白(Sedlin)共定位的变化情况。方法 设计 RB1-C 磷酸化位点突变体的引物,以质粒 pcDNA3.1-FLAG-RB1-C 为模板,利用 PCR 技术分别扩增出 pcDNA3.1-FLAG-RB1-C-S788A、S795A、S807A、T811A、T821A、T826A 共 6 个突变体,并对各位点进行测序。分别将以上突变体单独转染至 HEK 293T、COS7 细胞中,利用 Western blot 和免疫荧光(IF)技术观察其蛋白表达和细胞定位情况;分别将以上突变体及 Sedlin 共同转染至 COS7 细胞中,利用 IF 技术观察二者在细胞内的共定位情况,并与野生型 RB1-C 的结果进行比较分析。结果 测序结果显示 RB1-C 的 6 个磷酸化位点均突变成功,并能够在真核细胞内正常表达,且与野生型 RB1-C 的细胞定位基本一致,即主要定位在细胞核内。与野生型 RB1-C 相比,RB1-C-S788A、S795A、T821A、T826A 与 Sedlin 的共定位未发生改变,即主要共定位在细胞核内;但 RB1-C-S807A、T811A 与 Sedlin 的共定位发生了显著变化,除了共定位于细胞核外,在细胞质中也存在共定位现象。结论 RB1-C 磷酸化位点突变体成功构建并表达,其中 S807A、T811A 两个磷酸化位点的突变能够显著改变 RB1-C 与 Sedlin 在细胞中共定位区域,表明它们是 RB1-C 和 Sedlin 结合的关键位点之一,为进一步研究 RB1-C 和 Sedlin 的相互作用奠定了基础。

关键词 视网膜母细胞瘤蛋白 1; 磷酸化; 迟发性脊椎骨骺发育不良病蛋白; 共定位

中图分类号 R 341

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)06-0839-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.001

视网膜母细胞瘤蛋白 1(retinoblastoma, RB1)是人类第一个成功克隆的抑癌基因^[1-2],此发现是人类理解细胞周期调控和肿瘤遗传学的里程碑^[3]。

2021-03-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81700522); 安徽医科大学校级科研基金(编号: 2018xkj021、2018xkj024)

作者单位: 安徽医科大学¹ 生命科学学院、² 药学院、³ 科研实验中心, 合肥 230032

作者简介: 潘林鑫,男,助理实验师;

钱成,女,助理实验师,责任作者, E-mail: qiancheng135@126.com

人 RB1 基因定位在染色体 13q14 上,全长约 18 kb,其中 CDS 序列全长 2 787 bp,编码包含 928 个氨基酸残基的核内磷酸化蛋白 pRb,其包含 N-末端(1~379 aa)、A/B 口袋结构域(380~785 aa)和 C-末端(786~928 aa)三个结构域,其中 RB1 羧基端(RB1-C)含有高度保守的亮氨酸链,能促进蛋白与周期蛋白折叠的结合,在蛋白相互作用过程中扮演着重要角色,而 RB1-C 中丝氨酸和苏氨酸的磷酸化是 RB1 发挥生物学功能最重要的机制之一^[4-6]。人 *SED1* 基因定位在染色体 Xp22.12-Xp22.31 上,全长约 20 kb,其中 CDS 序列全长 420 bp,编码包含 140 个氨基酸残基的迟发性脊椎骨骺发育不良病蛋白(spondyloepiphyseal dysplasia tarda associated protein, Sedlin),该蛋白在骨骼正常发育、蛋白运输过程中发挥着重要作用^[7-8]。该研究首先探索了 RB1-C 和 Sedlin 在细胞中的共定位现象,然后通过构建一系列 RB1-C 磷酸化位点突变体,检测其蛋白表达和细胞定位情况,并进一步观察这些突变体与 Sedlin 的共定位情况,确定 RB1-C 中影响其与 Sedlin 共定位的磷酸化位点,为接下来研究二者相互作用的关键结合位点提供依据。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 pcDNA3.1 空载体质粒、pcDNA3.1-FLAG-RB1-C 和 pcDGFP-Sedlin 真核表达载体质粒, DH5 α 大肠埃希菌感受态菌株, HEK 293T 和 COS7 细胞株均由安徽医科大学生命科学学院生物学实验室保存。

1.2 主要试剂 DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司; BamHI、Xho I 和 Dpn I 限制性内切酶购自上海生工生物公司; 质粒小量抽提试剂盒购自美国 Axygen 公司; 细胞裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、一抗稀释液购自上海碧云天公司; FLAG 抗体购自德国 Sigma 公司; DMEM 高糖培养基购自美国 HyClone 公司; 胎牛血清购自美国 CLARK 公司; 脂质体转染试剂盒、Opti-MEM[®] Medium 购自美国 Invitrogen 公司; AL600RGB 凝胶成像系统购自美国 GE 公司; Axio Observer 3 倒

置荧光显微镜购自德国卡尔蔡司公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建 设计并合成 RB1-C 磷酸化位点突变体引物,见表 1,以质粒 pcDNA3.1-FLAG-RB1-C 为模板,利用高保真 DNA 聚合酶分别扩增出突变体 pcDNA3.1-FLAG-RB1-C-S788A、S795A、S807A、T811A、T821A、T826A,在 PCR 产物中加入 Dpn I 酶消化模板,然后转化于 DH5a 感受态中培养至单克隆生成,挑取单克隆继续扩大培养后进行质粒小量抽提,并对质粒进行双酶切鉴定(BamH I 和 Xho I) 6 h 后进行琼脂糖电泳,选择鉴定正确的质粒对目的片段进行测序,并分析磷酸化位点是否成功突变。

表 1 RB1-C 磷酸化位点突变体引物表

引物名称	序列(5'-3')
RB1-C-S788A	F: TCCTCGAGCCCTTACAAGTTTCCTAGTTCACCCCTACGGA R: TGTAAGGGGCTCGAGGAATGTGAGGTATTGGTGACAAGGT
RB1-C-S795A	F: TCCTAGTGCACCCCTTACGGATTCTCGAGGGAACATCTAT R: TAAGGGTGCACCTAGGAACTGTGAAGGGCTTCGAGGAATGT
RB1-C-S807A	F: TCTATATTGCACCCCTGAAGAGTCCATATAAAATTCAGA R: TCAGGGGTGCAATATAGATGTTCCCTCCAGGAATCCGTAA
RB1-C-S811A	F: TGAAGGCTCCATATAAAATTCAGAAGGTCTGCCAACACCA R: TATATGGAGCCTTCAGGGGTGAAATATAGATGTTCCCTCCA
RB1-C-T821A	F: TCTGCCAGCACCAACAAAAATGACTCCAAGATCAAGAATCT R: TGTGTGCTGCTGCCAGACCTTCTGAAATTTTATATGGACTCT
RB1-C-T826A	F: AAAAATGGCTCCAAGATCAAGAATCTTACTATCAATTGGT R: ATCTTGGAGCCATTTTGTGTGTTGGCAGACCTTCTGA

1.3.2 细胞培养 复苏 HEK 293T 和 COS7 细胞系,并用完全培养基(90% DMEM 高糖 + 10% FBS + 青链霉素)在 5% CO₂ 的恒温培养箱中进行培养,并及时进行细胞换液和传代。

1.3.3 质粒转染 本研究采用的转染方法为脂质体(Lipo8000)转染法,具体步骤以 6 孔板为例:在进行转染前,把培养有细胞的 6 孔板每孔换成 2 ml 新鲜的完全培养液,然后取一个洁净无菌的离心管,加入 125 μ l 不含抗生素和血清的 DMEM 培养液或 Opti-MEM[®] Medium,加入 2.5 μ g 质粒后轻轻混匀,再加入 4 μ l Lipo8000 转染试剂后轻轻混匀,并将混合液滴加至 6 孔板中,继续培养 24~48 h,用于后续的细胞定位和蛋白表达实验。

1.3.4 Western blot 检测 转染各 RB1-C 磷酸化位点突变体至 HEK 293T 细胞中,约 48 h 后收集细胞,加入裂解缓冲液(含蛋白酶抑制剂)进行裂解(4 $^{\circ}$ C、30 min),超声破碎后收集细胞裂解液进行高速离心(4 $^{\circ}$ C、10 min),收集部分上清液,加入适量的

5 $\times$ SDS 上样缓冲液,充分混匀后沸水浴 5 min,冰浴后取适量蛋白样品先后进行 SDS-PAGE 电泳(100 V、2 h)和恒流湿转(200 mA、1 h),取出 PVDF 膜后先后进行封闭(5% 牛血清白蛋白、1 h)、清洗(TBST 缓冲液、30 min)、FLAG 一抗溶液孵育(1:500、4 $^{\circ}$ C、过夜)、HRP-IgG 二抗溶液孵育(1:5000、室温、1 h)、清洗(TBST 缓冲液、30 min)等操作,最后利用 ECL 化学发光试剂盒对 PVDF 膜进行显色,在蛋白成像仪上进行显影和拍摄。

1.3.5 免疫荧光观察 单独转染各 RB1-C 磷酸化位点突变体或与 Sedlin 共同转染至 COS7 细胞中,约 24 h 后取出细胞爬片,用 PBS 缓冲液清洗 3 次后进行细胞固定(-20 $^{\circ}$ C 预冷甲醇 2 min、70% 乙醇 5 min),用 PBS 缓冲液清洗 3 次后进行细胞封闭(1% BSA、30 min),加入 FLAG 一抗溶液进行孵育(1:100、室温、2 h),用封闭液清洗 3 次后加入 TRITC 标记的荧光二抗进行避光孵育(1:200、室温、1 h),用 PBS 缓冲液清洗 3 次后加入 0.15 g/L DAPI 溶液进行细胞核染色(室温、2 min),用 PBS 缓冲液清洗 3 次后用滤纸尽可能吸去盖玻片上的溶液,用荧光封片胶将盖玻片封于洁净的载玻片上,在荧光显微镜下观察并拍摄。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,两个独立样本间采用 χ^2 检验,数据以频数表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RB1-C 与 Sedlin 的细胞内定位及共定位情况

分别将 FLAG-RB1-C 和 GFP-Sedlin 转染至 COS7 细胞中,进行免疫荧光实验观察它们各自的细胞定位情况,结果显示 RB1-C 主要定位在细胞核中,而 Sedlin 在细胞核和细胞质中均有显著定位,见图 1A。将二者共同转染至 COS7 细胞中,并观察它们在细胞内的共定位情况,结果表明 RB1-C 和 Sedlin 在细胞核内明显存在共定位现象,见图 1B。

2.2 RB1-C 磷酸化位点突变体的构建 酶切鉴定结果显示所有质粒均出现两条带,与 DNA Marker 的比较,一条带与目的片段 RB1-C(432 bp)的大小基本一致,另一条带与 pcDNA3.1 载体(5400 bp)的大小基本一致。结果表明 RB1-C 磷酸化位点突变体扩增成功,见图 2A。将各质粒送生物公司进行测序,且将测序结果与 RB1-C 的 CDS 序列进行比对,显示各磷酸化位点均突变成功,即丝氨酸或苏氨酸均成功突变为丙氨酸,见图 2B。

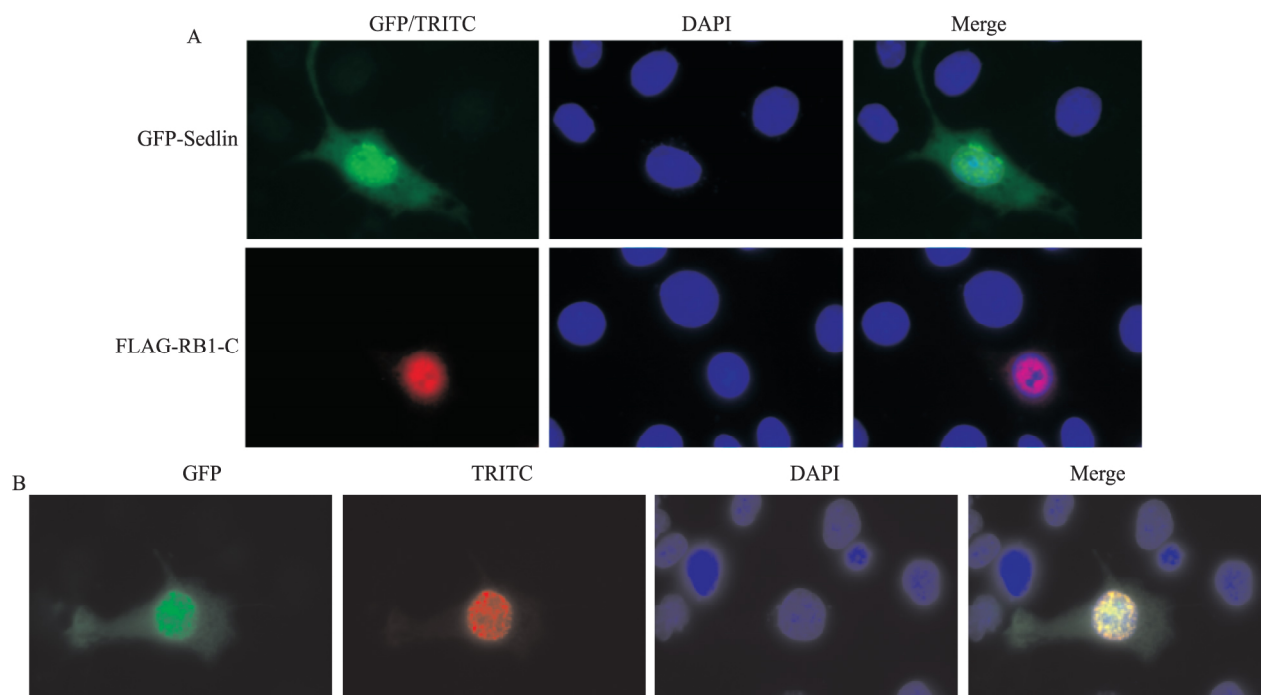


图1 RB1-C与Sedlin的细胞内定位及共定位

A: FLAG-RB1-C与GFP-Sedlin各自的荧光定位图; B: FLAG-RB1-C与GFP-Sedlin荧光共定位图; GFP: GFP-Sedlin绿色荧光表达; TRITC: FLAG-RB1-C红色荧光; DAPI: 细胞核染色; Merge: 荧光和细胞核叠加图

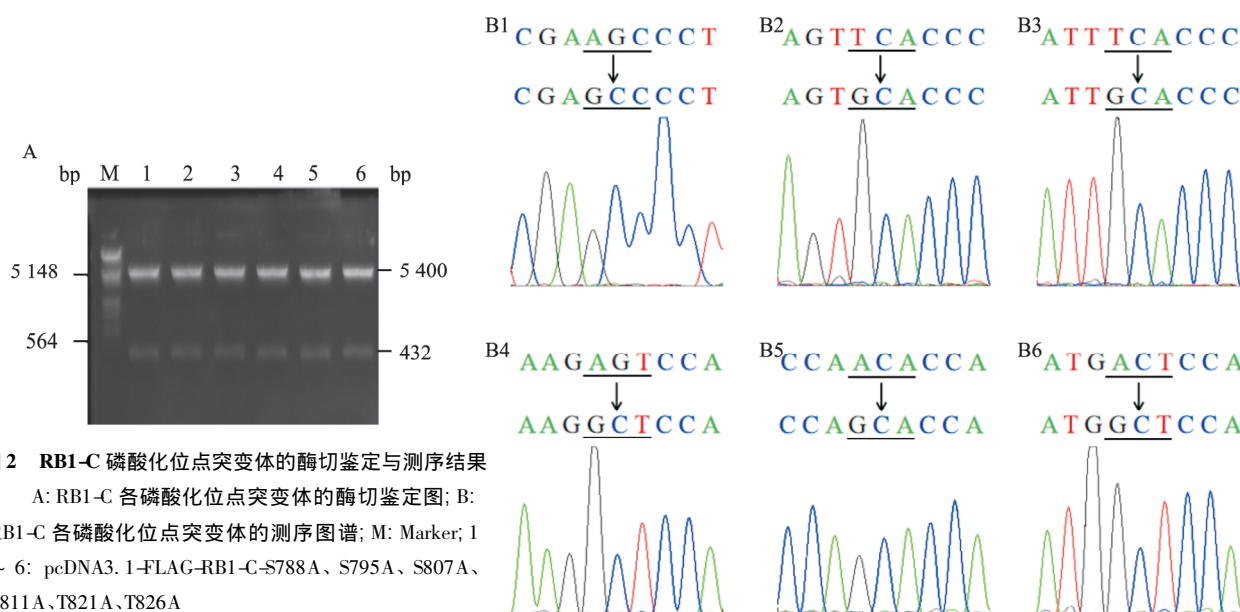


图2 RB1-C磷酸化位点突变体的酶切鉴定与测序结果

A: RB1-C各磷酸化位点突变体的酶切鉴定图; B: RB1-C各磷酸化位点突变体的测序图谱; M: Marker; 1~6: pcDNA3.1-FLAG-RB1-C-S788A、S795A、S807A、T811A、T821A、T826A

2.3 RB1-C磷酸化位点突变体的表达与细胞定位情况 Western blot结果显示用FLAG抗体免疫印迹时,转染了RB1-C磷酸化位点突变体的各组样品在约15 ku左右的位置均出现蛋白条带,且分子量大小与RB1-C野生型基本一致,见图3A,这一结果表明RB1-C磷酸化位点突变体能够在真核细胞内正常表达。分别将上述质粒转染至COS7细胞中,并进行免疫荧光实验观察它们各自的细胞定位情况,结果显示这些RB1-C磷酸化位点突变体主要定

位在细胞核中,与野生型RB1-C的定位情况基本一致,见图3B,这一结果表明RB1-C磷酸化位点的突变并不会影响其表达和定位。

2.4 RB1-C磷酸化位点突变体与Sedlin的共定位情况 与野生型RB1-C相比,RB1-C-S788A、S795A、T821A、T826A与Sedlin的共定位未发生明显改变,主要还是共定位于细胞核内,但RB1-C-S807A、T811A与Sedlin的共定位结果发生了很大变化。在各拍摄的30余组结果中,RB1-C-T811A与

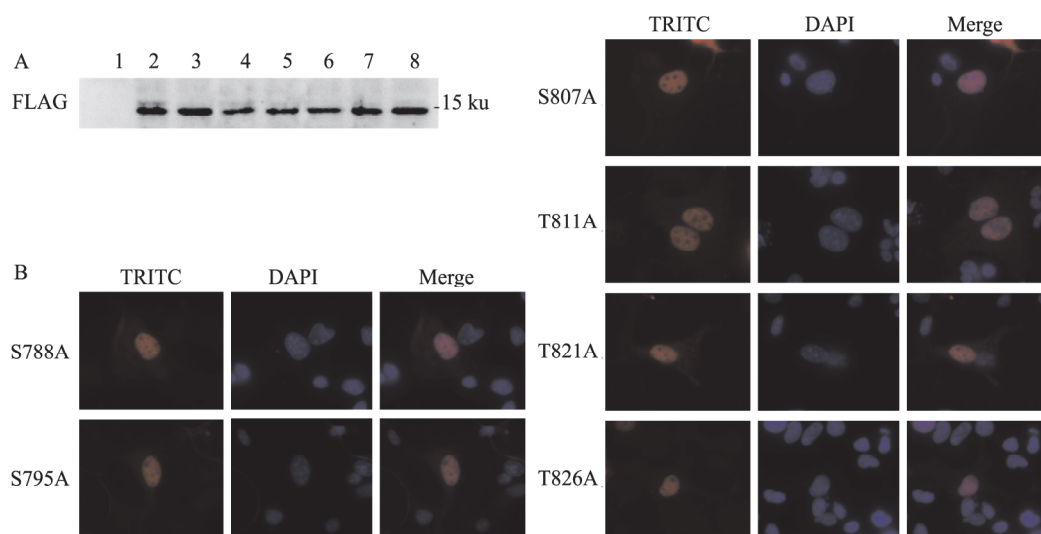


图3 RB1-C磷酸化位点突变体的表达与细胞定位图

A: RB1-C磷酸化位点突变体的蛋白表达图: 1: 未转染的细胞裂解液; 2: 转染了 FLAG-RB1-C 的细胞裂解液; 3~8: 转染了 FLAG-RB1-C-S788A、S795A、S807A、T811A、T821A、T826A 的细胞裂解液; B: RB1-C磷酸化位点突变体的荧光定位图; TRITC: 红色荧光; DAPI: 细胞核染色; Merge: 荧光和细胞核叠加图

Sedlin 有 19 组共定位于细胞核内, 另有 13 组共定位于细胞质中; 而 RB1-C-S807A 与 Sedlin 变化则更大, 有 29 组共定位于细胞质中, 仅有 4 组定位在细胞核中, 见图 4 和表 2; 这一结果表明 807、811 位点的突变对 RB1-C 与 Sedlin 的共定位产生了影响。

表2 RB1-C磷酸化位点突变体与 Sedlin 的细胞共定位情况(组数)

组别	细胞核共定位	细胞质共定位	χ^2 值	P 值
野生型	30	30		
S807A	4	4	42.66	6.513×10^{-11}
T811A	19	13	10.67	0.001 1

3 讨论

RB1 在哺乳动物的组织细胞中广泛表达, 预示着其功能上的多样性, 而磷酸化是 RB1 最基本、最普遍和最重要的功能机制, 其磷酸化水平的变化能够对细胞周期产生调控作用, 进而影响细胞增殖、分化、衰老、凋亡等生物学功能, 而其抑癌作用与这些功能的正常发挥密切相关^[9-11]。RB1 功能的发挥依赖于其口袋结构域, 能够通过该结构域与许多重要蛋白相互作用, 如 E2F 转录因子; RB1-C 磷酸化位点的研究对进一步探索其生物学功能有重要意义^[12]。另外, Sedlin 是一个高度保守的蛋白, 广泛分布于心脏、肝脏、肾脏、骨骼肌等组织, 且在酵母、果蝇和脊椎动物中都存在着同源物^[13], 它是转运蛋白颗粒复合物中的一员, 也可能是 ERGIC/VTC 复

合物的一部分, 在蛋白运输过程即内质网-高尔基复合体之间的膜泡运输中发挥着重要作用^[8, 14]。

本研究首先对 RB1-C 与 Sedlin 的共定位进行了探索, 结果表明二者在细胞核内明显存在共定位现象, 但二者结合的具体位点尚不明确, 需进行进一步的点突变研究。RB1 的磷酸化对其功能的发挥有重要作用, 其磷酸化位点的突变可能引起蛋白结构变化进而影响相互作用功能, 磷酸化位点一般有丝氨酸 (serine, S)、苏氨酸 (threonine, T)、酪氨酸 (tyrosine, Y), 其中 S 和 T 最常见, 因为其结构末端含有活泼的羟基, 更容易与磷酸基团结合促进磷酸化发生。另外, 丙氨酸 (alanine, A) 是氨基酸中侧链最短的手性氨基酸, 通过将某氨基酸残基突变为 A, 可以通过考察该突变蛋白的功能是否因此突变而失去或改变, 从而可以定位对该蛋白功能有关键影响的氨基酸残基, 这种方法被称作“丙氨酸扫描”, 是丝氨酸/苏氨酸的磷酸化功能研究的一种手段。本研究即通过将 S/T 突变为 A 来构建 RB1-C 中 6 个重要的磷酸化位点突变体。

虽然点突变构建已经是成熟的基因修饰技术, 但与普通质粒构建相比, 其在实际操作过程中还存在着一些难点。本研究点突变构建采用了一步法^[15], 即以 pcDNA3.1-FLAG-RB1-C 为模板将整个环状质粒扩增出来。该目的片段较长, 将近 6 000 bp, 所以扩增的成功率和保真率有所下降, 即便扩增成功, 后期的模板消化操作也很关键。如果模

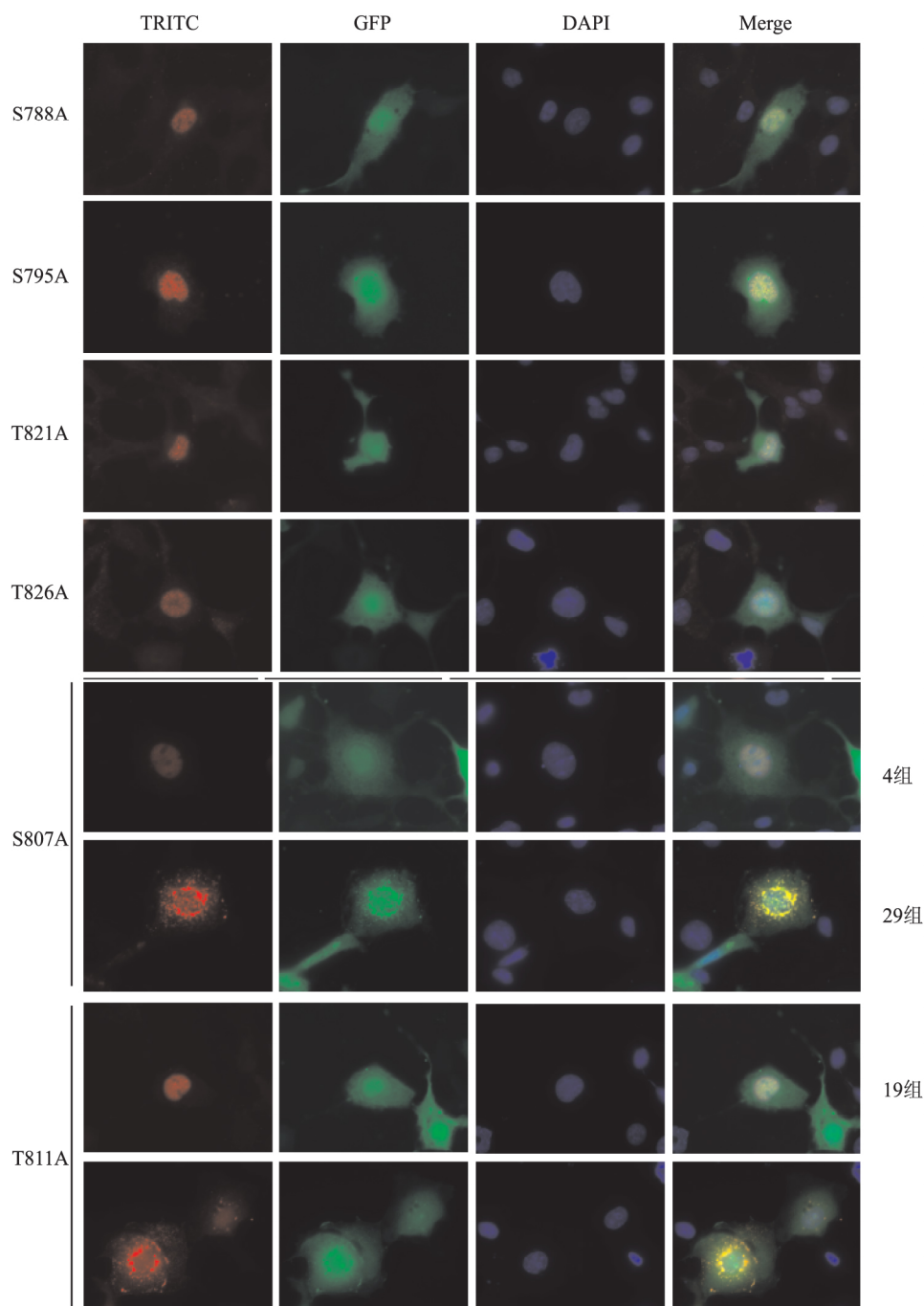


图4 RB1-C 磷酸化位点突变体与 Sedlin 的细胞共定位图

TRITC: FLAG-RB1-C 的红色荧光; GFP: GFP-Sedlin 的绿色荧光; DAPI: 细胞核染色; Merge: 荧光和细胞核叠加图

板消化不完全,将会在质粒转化过程混入野生型 RB1-C 导致假阳性。克隆中存在大量野生型 RB1-C 增加了测序成本,影响实验进程。本研究首先成功构建了 6 个 RB1-C 磷酸化位点突变体,即 pcDNA3.1-FLAG-RB1-C-S788A、S795A、S807A、T811A、T821A、T826A,并对其定位和表达情况进行了研究,结果表明它们的细胞亚定位和野生型 RB1-C 基本一致,即主要定位在细胞核内,且蛋白表达的分子量也与野生型 RB1-C 的基本一致。与野生型

RB1-C 相比,RB1-C-S788A、S795A、T821A、T826A 和 Sedlin 的共定位未发生改变,依旧主要集中在细胞核内,但 RB1-C-S807A、T811A 和 Sedlin 共定位的位置发生了很大变化,除了有共定位于细胞核,在细胞质中也存在共定位,而且根据位置推测可能存在于内质网和(或)高尔基体上,表明它们可能是 RB1-C 和 Sedlin 相互作用的关键位点,且这两个位点的突变很可能会降低 Sedlin 与 RB1 的结合效率,进而影响 Sedlin 对 RB1 蛋白入核的运输功能。该研究

为进一步了解 RB1-C 的生物学功能及其与 Sedlin 相互作用的具体位点奠定了细胞学基础。

参考文献

- [1] Friend S H , Bernards R , Weinberg R A , et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma[J]. *Nature* ,1986 ,323(6089) :643 – 6.
- [2] Lee W H , Bookstein R , Hong F , et al. Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning ,identification and sequence[J]. *Science* ,1987 ,235(4794) :1394 – 9.
- [3] Wang J Y , Knudsen E S , Welch P J. The retinoblastoma tumor suppressor protein [J]. *Adv Cancer Res* ,1994 ,64: 25 – 85.
- [4] Liban T J , Medina E M ,Tripathi S ,et al. Conservation and divergence of C-terminal domain structure in the retinoblastoma protein family[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017 ,114(19) :4942 – 7.
- [5] Topacio B R , Zatulovskiy E , Cristea S , et al. Cyclin D-Cdk4 δ drives cell-cycle progression *via* the retinoblastoma protein's C-terminal helix[J]. *Mol Cell* 2019 ,74(4) :758 – 70.
- [6] Burke J R , Liban T J , Restrepo T ,et al. Multiple mechanisms for E2F binding inhibition by phosphorylation of the retinoblastoma protein C-terminal domain[J]. *J Mol Biol* ,2014 ,426(1) :245 – 55.
- [7] 夏欣一 ,周 鑫 ,崔英霞. SEDL 基因突变与 X 连锁迟发性脊柱骨骼发育不良研究进展[J]. *中国优生与遗传杂志* ,2010 ,18(4) :8 – 10.
- [8] Venditti R , Scanu T , Santoro M , et al. Sedlin controls the ER export of procollagen by regulating the Sar1 cycle [J]. *Science* , 2012 ,337: 1668 – 72.
- [9] 刘双虎 ,王守志 ,张 慧 ,等. 视网膜母细胞瘤基因 I(RB1) 研究进展[J]. *遗传* ,2010 ,32(11) :1097 – 104.
- [10] Marshall A E , Roes M V , Passos D T , et al. RB1 deletion in retinoblastoma protein pathway-disrupted cells results in DNA damage and cancer progression [J]. *Mol Cell Biol* , 2019 , 39 (16) : e00105 – 19.
- [11] Chakraborty G , Armenia J , Mazzu Y Z , et al. Significance of BRCA2 and RB1 co-loss in aggressive prostate cancer progression [J]. *Clin Cancer Res* 2020 ,26(8) :2047 – 64.
- [12] Sengupta S , Lingnurkar R , Carey T S , et al. The evolutionarily conserved C-terminal domains in the mammalian retinoblastoma tumor suppressor family serve as dual regulators of protein stability and transcriptional potency [J]. *J Biol Chem* , 2015 , 290(23) : 14462 – 75.
- [13] Géczi J , Shaw M A , Bellon J R , et al. Human wild-type SEDL protein functionally complements yeast trs20p but some naturally occurring SEDL mutants do not[J]. *Gene* ,2003 ,320: 137 – 44.
- [14] Kim J J , Lipatova Z , Segev N. TRAPP complexes in secretion and autophagy[J]. *Front Cell Dev Biol* ,2016 ,4: 20.
- [15] 何 叶 ,潘林鑫 ,张 永 ,等. Sedlin 突变体的表达及其与 RB1 在细胞中的共定位[J]. *安徽医科大学学报* ,2019 ,54(10) : 1526 – 30.

Co-localization of RB1-C-terminal phosphorylation site mutants and Sedlin

Pan Linxin¹ , Xu Tao² , Fan Libin¹ , et al

(¹*School of Life Sciences* ,²*School of Pharmacy , Anhui Medical University Hefei 230032*)

Abstract Objective To study the protein expression and cell localization of RB1-C-terminal phosphorylation site mutants , and to investigate the change of co-localization with Sedlin. **Methods** The primers of RB1-C-terminal phosphorylation site mutants were designed , and pcDNA3.1-FLAG-RB1-C was used as the template to amplify pcDNA3.1-FLAG-RB1-C-S788A ,S795A ,S807A ,T811A ,T821A ,T826A. The above mutants were separately transfected into HEK 293T and COS7 cells , and their protein expression and cell localization were observed by Western blot and immunofluorescence technology; the co-localization of the above mutants and Sedlin were observed by IF technology , and compared with the results of wild type RB1-C. **Results** The sequencing results showed that the six phosphorylation sites of RB1-C were mutated successfully and expressed normally in eukaryotic cells , which was basically consistent with the cell localization of wild type RB1-C , and they were mainly located in the nucleus. In addition , compared with the wild-type RB1-C , the co-localization of RB1-C-S788A ,S795A ,T821A ,T826A and Sedlin did not change , that is , they were mainly co-located in the nucleus , but the co-localization of RB1-C-S807A ,T811A and Sedlin changed significantly , in addition to co-localization and nucleus , there was also significant co-localization in the cytoplasm. **Conclusion** RB1-C phosphorylation site mutants were successfully constructed and expressed. The mutations of two phosphorylation sites S807A or T811A can significantly change the co-localization region of RB1-C and Sedlin in cells , indicating that they are one of the key binding sites of RB1-C and Sedlin , which lays a foundation for further study of the interaction between RB1-C and Sedlin.

Key words RB1-C; phosphorylation; Sedlin; co-localization