

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.002.html>

CLIC1 及其点突变体与 Sedlin 蛋白的共定位研究

沙启飞, 潘林鑫, 耿慧武, 王梦媛, 印叶盛, 李子剑, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 构建胞内氯离子通道蛋白 1 (CLIC1) 点突变体的真核表达质粒, 进行 CLIC1 突变体的表达、定位及其与迟发性脊椎骨骺发育不良病蛋白 (Sedlin) 的共定位研究, 为进一步揭示其功能奠定基础。方法 以 CLIC1 全长 cDNA 序列为模板, 构建 3 个真核表达质粒即 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG; Western blot 法检测 CLIC1 及其点突变体在 HEK 293T 细胞中的表达; 免疫荧光技术了解 CLIC1 及其点突变体蛋白在 COS7 细胞中的定位及与 Sedlin 的共定位情况。结果 成功构建了 CLIC1 点突变体的真核表达质粒; Western blot 结果显示 3 个点突变体蛋白在 HEK293T 细胞中均能表达, 突变体的分子量低于野生型的; 免疫荧光实验表明 CLIC1 蛋白在细胞质和细胞核都有表达, 但主要在细胞核。CLIC1 点突变体蛋白定位在胞质中, 细胞核中无分布, 与 Sedlin 蛋白在胞质存在共定位。结论 CLIC1 的 3 种点突变体均能在哺乳动物细胞中有效表达; CLIC1 及其点突变体与 Sedlin 蛋白均存在共定位, 提示两种蛋白之间可能存在相互作用。

关键词 CLIC1; 质粒构建; 免疫荧光; Western blot

中图分类号 Q 28; R 392.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)12-1722-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.002

胞内氯离子通道蛋白 (CLIC) 基因有 7 个同源家族成员 (p64 和 CLIC1~6), 组成了哺乳类通道蛋白家族, 并以可溶性和膜结合性两种状态分布于细胞中^[1]。CLIC1 是第一个被明确的人类细胞和细胞器的离子通道, 蛋白分子量为 27 ku。该蛋白处于氧化状态下结构发生变化, 在 H₂O₂ 孵育环境中可致分子内两个半胱氨酸残基 (Cys-24 和 Cys-59) 形成二硫键, 进而使 CLIC1 从单体形式向二聚体形式转变, 在还原环境中这种转变是可逆的^[2]。CLIC1 二聚体形式暴露出疏水膜, 该膜是形成二聚体接口界面的关键。氧化状态下的 CLIC1 在人工脂双层和囊泡中保持氯离子通道活性, 而在还原状态中通道活性消失。Cys-24 在所有的 CLIC 家族成员中高度保守, 在单体形式中该半胱氨酸在谷胱甘肽结合位点的正中心, 然而 CLIC1 中的 Cys-59 相对于其他成员高度保守的 Ala 是独一无二的。CLIC1 的活性部位半胱氨酸与酶活性直接相关, 进而可能影响氯离子通道活性, 表明 Cys-24 和 Cys-59 对氯离子通道活性发挥着无可替代的作用^[2-3]。该研究将构建下游带有 FLAG 标签的 3 种点突变体, 并比较与野生型

2016-06-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物教研室, 合肥 230032

作者简介: 沙启飞, 男, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn;

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

migration of SGC7901 cells were detected by wound healing assay and transwell assay respectively. Changes of LOX activity were determined by colorimetric method, and changes of LOX expression were determined by Western blot.

Results β -elemene (100, 200, 400, 800 μ mol/L) significantly inhibited the proliferation on SGC7901 cells in a time and dose-dependent manner. After β -elemene treatment for 24 h in SGC7901 cells, the apoptotic ratios were 8.1%, 8.2%, 18.7% and 41.9% with concentrations of β -elemene at 100, 200, 400, 800 μ mol/L. Compared with the control (4.9%), apoptosis rate increased obviously. Effects of migration on SGC7901 cells were significantly inhibited by Wound healing assay and Transwell assay. LOX activity was decreased in a dose-dependent manner. Western blot showed that β -elemene SGC7901 cells could down-regulate expression of LOX. **Conclusion** The proliferation, apoptosis and migration of the gastric cancer SGC7901 cell line can be inhibited after the treatment of β -elemene and the molecular mechanism for those effects may be related to its down-regulated LOX activity and the express of LOX.

Key words β -elemene; SGC7901 cells; proliferation; apoptosis; migration

蛋白的表达及定位的差别。在前期研究基础上,了解 CLIC1 及其点突变体与迟发性脊椎骨发育不良病蛋白 (Sedlin) 在哺乳动物细胞中的共定位情况,为进一步揭示 CLIC1 的生物学功能提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒和菌株 COS7 细胞、HEK293T 细胞、真核表达载体 pcDNA3.1 (+)、CLIC1 相关质粒、Sedlin 相关质粒,大肠杆菌 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); DMEM 高糖培养基(北京赛默飞世尔科技有限公司);限制性内切酶 BamH I、Xho I,识别甲基化位点的 Dpn I 酶;质粒提取试剂盒(美国 OMEGA 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);LipofectamineTM 2000、Opti-MEM(美国 Invitrogen 公司);FLAG M2 单抗(美国 Sigma 公司);细胞裂解液(上海碧云天公司);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);荧光封片胶(丹麦 DAKO 公司);PVDF 膜(加拿大 BioBasic 公司);SuperSignal West Pico 显色试剂盒(美国 Pierce 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司);引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 点突变体序列扩增 突变体的构建基于真核表达载体 pcDNA3.1(+),见图1。根据目的基因序列和引物设计原则设计特异性 PCR 引物,以 CLIC1 全长 cDNA 序列为模板,25 μ l PCR 体系:模板 DNA 10 ng(0.5 μ l),上下游引物浓度均为 20 pmol/ μ l(0.5 μ l),PrimeSTAR 酶 12.5 μ l,ddH₂O 11 μ l 分别进行扩增。

1.2.2 点突变体的构建 20 μ l 扩增产物加入 Dpn I 酶 1.7 μ l,37 $^{\circ}$ C 水浴锅里温育 1.5 h,然后直接转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,均匀涂布于含氨苄抗性的 LB 培养皿上,37 $^{\circ}$ C 倒置培养约 12~16 h;挑取单克隆在含有氨苄抗性的 LB 培养基 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜;抽取质粒后双酶切鉴定并送公司测序。

1.2.3 细胞培养 COS7 细胞、HEK293T 细胞用含双抗(100 U/ml 青、链霉素)、5% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养。当细胞铺满培养皿传代,选用对数生长期细胞实验。

1.2.4 Western blot 法检测蛋白表达 HEK293T 细胞用含 5% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养,LipofectamineTM 2000 与重组质粒的比例为 2:1。转染 48 h 后收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤 1 次,弃尽 PBS;加细胞裂解液于混悬仪上 10 r/min 混悬 20 min 后冰上超声(pulse on 1 s,pulse off 9 s,持续 3 min);4 $^{\circ}$ C、14 000 r/min 离心 20 min,取上清液 10 μ l 加等量 2 $\times$ SDS 上样缓冲液煮沸 5 min,冰浴 3 min;SDS-PAGE 胶电泳分离;100 V 湿转 70 min;PVDF 膜在 5% 脱脂奶粉封闭液中孵育 2 h,FLAG 鼠抗(1:500) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗 4 次,每次 15 min;二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,TBST 漂洗 4 次,每次 20 min;在暗盒中用显影试剂盒中溶液于 PVDF 膜上反应,按常规方法显影、定影。

1.2.5 荧光定位 COS7 细胞在 5% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中培养,转染前 1 d 在 35 mm 皿中置盖玻片接种一定数量的细胞,使得转染当天细胞汇合度达 50% 以上。分别转染野生型 CLIC1 及其点突变体,LipofectamineTM 2000 与重组质粒的比例为 1:1;转染 4~6 h 后换不含双抗培养基培养;24 h 后固定细胞,FLAG 单抗孵育 2 h,TRITC 标记山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h,DAPI 染核后,荧光封片胶封片;4 $^{\circ}$ C 存储过夜,用激光共聚焦显微镜观察荧光。

2 结果

2.1 CLIC1 点突变体的构建 对质粒 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG 分别进行双酶切(BamH I、Xho I),见图1。CLIC1 点突变体均被切成 2 条强带,与 Marker 对比,一条带大约在 5 148 bp 位置上,另一条位置不超过 831 bp,相应的质粒送往生工进行测序,反馈的结果指示质粒构建成功。

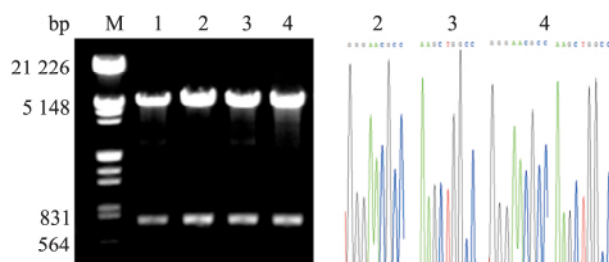


图1 重组质粒酶切鉴定图及测序图

M: Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker; 1: pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 的酶切鉴定结果; 2: pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG 的酶切鉴定结果及测序图; 3: pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG 的酶切鉴定结果及测序图; 4: pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG 的酶切鉴定结果及测序图

2.2 CLIC1 及其点突变体蛋白在 HEK293T 细胞中的表达 结果显示裂解液都能检测相应的目的条带,与预染的蛋白 Marker 对比,CLIC1 及其点突变体的条带与预期一致,即 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 的分子量为 27 ku,pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG 的分子量约为 20 ku。表明 CLIC1 及其点突变体在 HEK 293T 细胞中正常表达。见图 2。

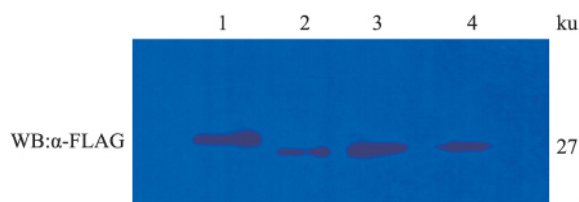


图2 Western blot 法检测 CLIC1 及其点突变体蛋白在哺乳动物细胞中的表达

1: 转染 pcDNA3.1-CLIC1-FLAG 的细胞裂解液的免疫印迹; 2: 转染 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG 的细胞裂解液的免疫印迹; 3: 转染 pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG 的细胞裂解液的免疫印迹; 4: 转染 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG 的细胞裂解液的免疫印迹

2.3 CLIC1 及其点突变体在 COS7 细胞中的定位 转染 24 h 后,经激光共聚焦显微镜观察,结果见图 3。野生型 CLIC1 在胞质与细胞核中均有表达;点突变体 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG 和 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG 主要分布于胞质中,在细胞核中无分布,野生型与突变体蛋白在 COS7 细胞中的定位发生明显变化,见图 3A。CLIC1 及其点突变体质粒分别与 Sedlin 质粒共转入 COS7 细胞中,野生型 CLIC1 与 Sedlin 在胞质、胞核及核膜处均有共定位,而点突变体与 Sedlin 的共定位仅见于胞质中,见图 3B。

3 讨论

本研究将 CLIC1 点突变体构建于真核表达载体 pcDNA3.1(+),分别转染至 HEK293T 和 COS7 细胞中,初步了解其在真核细胞中的表达和定位。野生型 CLIC1 在胞质与细胞核中都有分布,而点突变体 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG 和 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG 仅表达于胞质中,细胞核中无分布;野

生型 CLIC1 与 Sedlin 蛋白在胞质、胞核及核膜处均有共定位,而点突变体与 Sedlin 只在胞质有共定位,说明点突变体不存在类似野生型活性位点半胱氨酸残基,导致其蛋白结构及活性位点的构象发生改变以及该位点与周围氨基酸化学键的改变,蛋白功能也发生相应的变化。

DNA 水平条带大小应该无明显变化,3 种点突变体相对野生型而言只是 DNA 序列中对应位置碱基种类发生变化而总的碱基数不变,Western blot 显示点突变体的蛋白分子量均略低于野生型,由于点突变体中半胱氨酸突变成丙氨酸,可能引发泛素化导致蛋白降解,相应的分子量同步下降。泛素化是可逆的,依赖 ATP 并且通过泛素激活酶 E1、泛素结合酶 E2、泛素连接酶 E3 一系列催化反应所致。如图 4 所示首先在 ATP(红色所示) 供能的情况下酶 E1 黏附在泛素分子尾部(淡黄色所示)的半胱氨酸残基上(绿色所示,注意在这个结构中半胱氨酸突变成丙氨酸) 激活泛素,接着 E1 将激活的泛素分子转移到 E2 酶上,随后 E2 酶和一些种类不同的 E3 酶共同识别靶蛋白,对其进行泛素化修饰。E3 酶的外形就像一个夹子,靶蛋白连接在中间的空隙内(星号所示)。蛋白质泛素化的结果是使得被标记的蛋白质被蛋白酶分解为较小的多肽、氨基酸以及可以重复使用的泛素,由此可以猜测 3 种点突变体蛋白受到泛素化特异性修饰。野生型 CLIC1 蛋白与 Sedlin 蛋白存在相互作用^[4]; 3 种点突变体与 Sedlin 在胞质有共定位,提示可能存在相互作用。将进一步通过 GST-pull down、co-IP 实验了解 CLIC1 点突变体蛋白与 Sedlin 蛋白是否存在相互作用。

CLIC1 蛋白含有 240 个氨基酸残基,其结构属于谷胱甘肽 S-转移酶(GST) 超家族。经典的 GSTs 属于细胞质蛋白,在内源性或异生素分子催化三肽谷胱甘肽(GSH) 结合在亲电中心^[5]。GSTs 第一个成员在异生物质新陈代谢中被发现,然而基因组时代找到了很多该家族成员。CLIC1 不同于经典的酶促 GSTs,因为其有一个活性位点半胱氨酸残基(人源 CLIC1 中的 Cys24),其由蛋白质本身来激活。相比之下,经典 GSTs 激活谷胱甘肽的硫醇基,其与有高亲和力的活性位点非共价结合。经典的 GSTs 硫醇基的位置大约相当于在 CLIC 蛋白活性位点半胱氨酸的位置。所有的 CLICs 成员都有 2 个保守的半胱氨酸(CLIC1 中 Cys178 和 Cys223)^[6]。

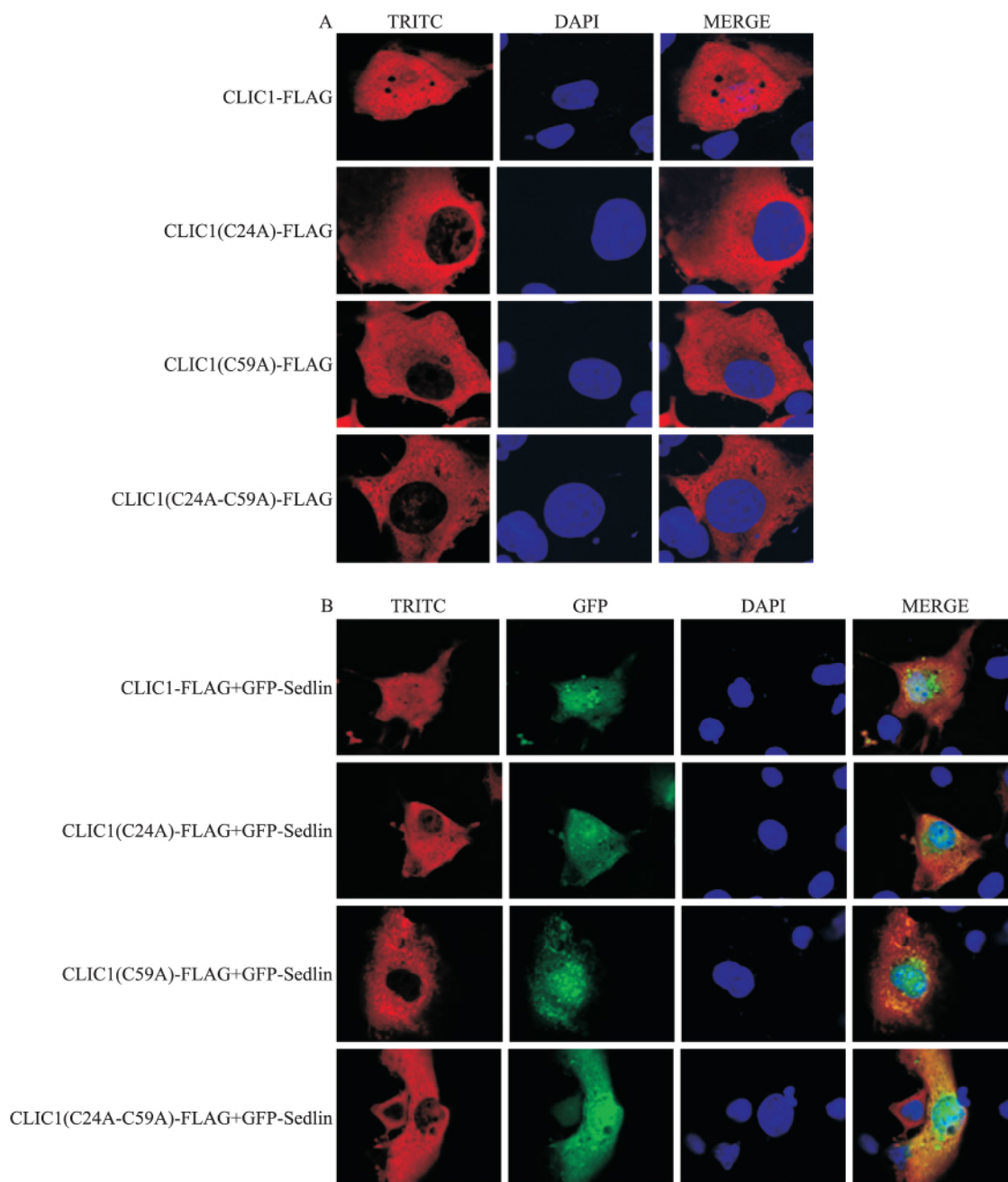


图3 免疫荧光结果图 ×600

A: CLIC1 及其点突变体蛋白在 COS7 细胞中的定位; B: CLIC1 及其点突变体蛋白与 Sedlin 蛋白在 COS7 细胞中的共定位; TRITC: 含 FLAG 标签的蛋白; DAPI: DAPI 染色的细胞核; GFP: 含 GFP 标签的蛋白; MERGE: 叠加效果

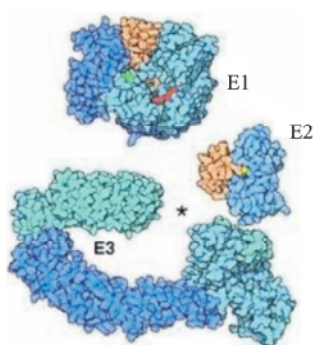


图4 泛素化过程

本研究定点突变方法的基本原理是利用完全互补的并带有突变位点的引物来扩增整个模板质粒 DNA。由于从细菌细胞提取的模板质粒 DNA 有甲基化位点,而 PCR 扩增产物没有甲基化位点,因此采用能特异识别甲基化位点的 Dpn I 酶。最后将 PCR 扩增的线型突变质粒转化入大肠杆菌,利用大肠杆菌自身的修饰酶系统使线型质粒环化^[7]。构建点突变体的实验中,需用 Dpn I 酶 1.7 μl 在 37℃ 水浴锅里温育 1.5 h 来消化扩增产物中的模板,

该酶的量减少不能彻底发挥消化作用,进而会导致培养皿中模板与所需质粒共存(长得过密),通过几次重复试验得出 $1.7 \mu\text{l}$ 是最佳体积。最近几年对 CLIC1 与肿瘤关系的报道很多,例如其在乳腺癌、胃癌、大肠癌、肝癌中的表达量显著增多^[8-10]。CLIC1 参与肿瘤细胞增殖、分化以及凋亡,通过参与内质网到高尔基体的蛋白运输进而可能影响其他调节蛋白的表达^[11]。

参考文献

- [1] Valenzuela S M, Mazzanti M, Tonini R, et al. The nuclear chloride ion channel NCC27 is involved in regulation of the cell cycle [J]. *Physiol*, 2000, 529(Pt 3): 541–52.
- [2] Harrop S J, De Maere M Z, Fairlie W D, et al. Crystal structure of a soluble form of the intracellular chloride ion channel CLIC1 (NCC27) at 1.4-Å resolution [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48): 44993–5000.
- [3] Little D R, Harrop S J, Fairlie W D, et al. The intracellular chloride ion channel protein CLIC1 undergoes a redox-controlled structural transition [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 9298–305.
- [4] Fan L, Yu W, Zhu X. Interaction of Sedlin with chloride intracellular channel proteins [J]. *FEBS Lett*, 2003, 540(1–3): 77–80.
- [5] Wilce M C, Parker M W. S-structure and function of glutathione S-transferases [J]. *J Biol Chem*, 1994, 12(5): 1–18.
- [6] Littler D R, Harrop S J, Goodchild S C, et al. The enigma of the CLIC proteins: Ion channels, redox proteins, enzymes, scaffolding proteins? [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(10): 2093–101.
- [7] 冯莹颖, 张强, 周青春, 等. 一步法定点突变技术快速构建 bsh 基因突变启动子 [J]. *生物技术*, 2009, 19(5): 29–32.
- [8] Edwards J C, Kapadia S. Regulation of the bovine kidney microsomal chloride channel p64 by p59fyn, a Src family tyrosine kinase [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(41): 31826–32.
- [9] 宋波, 唐建斌, 王波, 等. 基因芯片筛选小鼠肝癌淋巴道转移相关基因 [J]. *癌症*, 2005, 24(7): 774–80.
- [10] Chen C D, Wang C S, Huang Y H, et al. Overexpression of CLIC1 in human gastric carcinoma and its clinicopathological significance [J]. *Proteomics*, 2007, 7(1): 155–67.
- [11] Leanza L, Biasutto L, Managò A, et al. Intracellular ion channels and cancer [J]. *Front Physiol*, 2013, 4: 227.

Co-localization of CLIC1 and its Site-directed mutants with Sedlin

Sha Qifei, Pan Linxin, Geng Huiwu, et al

(Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct the eukaryotic expression plasmids of the chloride intracellular channel protein 1 (CLIC1) mutants using molecular cloning techniques and observe the expression of CLIC1 mutants and their co-localization with Sedlin related to spondyloepiphyseal dysplasia tarda for further study on the cellular functions of CLIC1 protein. **Methods** CLIC1 mutants were amplified by PCR with the template including the full length cDNA fragment of CLIC1. Eukaryotic plasmids pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG, pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG, pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG were constructed respectively. The expression and localization of CLIC1 and its mutants in mammalian cells were detected by Western blot and confocal fluorescence microscopy respectively. **Results** All the plasmids of CLIC1 mutants were successfully constructed, which could be effectively expressed in HEK293T. The molecular weight of mutants was lower than the wild type. Western blot and confocal fluorescence microscopy results indicated that CLIC1 localized both in cytoplasm and nucleus, mainly in nucleus. At the same time, CLIC1 mutants localized in cytoplasm only. The mutants of CLIC1 had co-localization with CLIC1 in cytoplasm. **Conclusion** Recombinant plasmids of CLIC1 mutants express effectively in eukaryotic cells. CLIC1 protein and its mutants appear to co-localize with Sedlin respectively, which implies that CLIC1 and its mutants may interact with Sedlin respectively.

Key words CLIC1; recombinant plasmids; immunofluorescence; Western blot