

人 E2F1 蛋白的表达及与 Sedlin 蛋白共定位研究

汪燕燕, 潘林鑫, 王梦媛, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 研究人 E2F1 蛋白在真核细胞内的表达及其与 Sedlin 蛋白的共定位。方法 构建 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 真核表达质粒, 然后瞬时转染至 HEK 293T 细胞内, Western blot 法检测 E2F1 蛋白的表达; 瞬时单转 E2F1-FLAG 和共转 E2F1-FLAG + Sedlin-绿色荧光蛋白(GFP) 至非洲绿猴肾细胞(COS7) 内, 免疫荧光制片, 荧光显微镜下观察 E2F1-FLAG 在细胞内的定位及其和 Sedlin 的共定位。结果 真核表达质粒 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 构建成功, 且在 HEK 293T 细胞中能够成功表达, 在 COS7 细胞中主要定位在细胞核, 且与 Sedlin 共定位于细胞核。结论 人 E2F1 在 HEK 293T、COS7 细胞中都能够正常表达, 且与 Sedlin 蛋白存在共定位现象, 为进一步了解人 E2F1 的功能及其蛋白质相互作用提供了一定的细胞学基础。

关键词 E2F1; 转染; 基因表达; 细胞定位

中图分类号 R 341; R 394.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)10-1377-04

细胞周期相关转录因子 E2F1, 最早是在研究^[1]腺病毒 E2 启动子的过程中被发现的, 在多种生理和病理过程中发挥重要作用, 具有调控细胞周期进展、诱导细胞凋亡的功能。E2F1 基因全长约为 11 000 bp, 定位于人 20 号染色体的长臂上即 20q11.2, mRNA 全长为 2 486 bp, 由 7 个外显子与 6 个内含子组成, 编码包含 437 个氨基酸残基的约为 60 ku 的蛋白质, 即 E2F1 蛋白。E2F1 蛋白结构包含以下多个结构域: 从 N 端至 C 端分别为 Skp2 结合区、S31、Cyclin A/Cdk2 结合区、核定位信号 NLS 区、DNA 结合区、二聚体化功能区、标记盒、S364 激活区和 pRB 结合区。SEDL 基因定位在人染色体 Xp22.12-Xp22.31 上, 含有 6 个外显子, 全长 20 000 bp, 其编码的蛋白为含有 140 个氨基酸的 Sedlin, 与骨骼的正常发育有着密切关系^[2]。该研究通过构建下游带 FLAG 标签的真核表达质粒 pcDNA3.1-E2F1-FLAG, 过表达于 HEK 293T 和非洲绿猴肾细胞(COS7) 细胞中, 探讨 E2F1 蛋白在真核细胞中的表达及其与 Sedlin 蛋白的共定位情况, 现报道如下。

2015-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(编号: 81201368); 安徽省级大学生创新创业训练计划项目(编号: AH201410366017, AH201410366132)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 汪燕燕, 女, 硕士研究生;

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

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

(MTT), the migration was detected by transwell chamber. The mRNA expressions of serine/threonine kinase(Akt) and FoxO1 were detected by real-time PCR. The protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 and Akt/p-Akt were detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the control group, the rate of cell survival in high glucose group decreased significantly($P < 0.05$), the transitional was decreased significantly($P < 0.05$), the mRNA expression of FoxO1 was increased significantly($P < 0.05$), the protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 and Akt/p-Akt were increased. Compared with high glucose group, the cell survival rate and migration rate in high glucose + IGF1 group were increased significantly, the mRNA expression of FoxO1 was decreased significantly($P < 0.05$), the protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 and Akt/p-Akt were decreased. Compared with high glucose group, the cell survival rate and migration rate in high glucose + IGF1 + AZD5363 group had no significant difference, the mRNA expression of FoxO1 was decreased significantly($P < 0.05$), the protein expressions of FoxO1/p-FoxO1 had no significant difference. The mRNA expression of Akt in five groups had no significant difference. **Conclusion** IGF1 can improve the proliferation and migration of endothelial cell in high glucose. It shows that IGF1 acts through Akt to promote FoxO1 phosphorylation.

Key words insulin-like growth factor 1; forkhead transcription factors; high glucose; endothelial cells; proliferation; migration

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和细胞 包含人 E2F1 的 cDNA 序列由厦门大学韩家淮院士友情惠赠; TG1 和 DH5a 大肠杆菌菌株、pcDNA3.1(+) 表达载体、pCD 绿色荧光蛋白 (green fluorescence protein, GFP)-Sedlin 表达质粒、以及 COS7、HEK 293T 细胞株皆由安徽医科大学生命科学院生物学实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器 扩增引物由上海生工生物公司合成; DNA 聚合酶购自大连宝生物工程有限公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒购自美国 Axygen 公司; 限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I、Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker 以及 T4 DNA 连接酶均购自美国 Fermentas 公司; 蛋白预染 Marker 购自美国 Bio-rad 公司; 特级胎牛血清购自美国 Clark 公司; DMEM 高糖培养基购自美国 Hyclone 公司; Opti-MEM 减血清培养基和脂质体 2000 转染试剂均购自美国 Invitrogen 公司; FLAG M2 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司; Western blot 及 IP 细胞裂解液和一抗、二抗稀释液均购自上海碧云天研究所; HRP 和四甲基异硫氰酸罗丹明标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体均购自北京中杉金桥公司; ECL 显色试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司; 荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 质粒构建^[3] 设计、合成下游带有 FLAG 标签的 E2F1 引物, 上游引物: 5'-CGGGATCCCGC-CACCATGGCCTTGGCCGGGGC-3'; 下游引物: 5'-GGAATTCCTCACTTGTCTCATCGTCTTTGTAGTCGA AATCCAGGGGGGTGA-3' (斜体为 FLAG 标签), 以含人 E2F1 全长 cDNA 序列的质粒为模板, PCR 扩增出目的片段; 琼脂糖电泳, 胶回收试剂盒回收 PCR 产物; 限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对 E2F1 的 PCR 产物和 pcDNA3.1(+) 载体进行双酶切; 16 °C 条件下, 用 T4 连接酶连接过夜; 次日用 TG1 或 DH5a 对连接产物进行转化, 37 °C 倒置培养; 待长出单克隆, 挑取数个单克隆进行摇菌, 碱裂解法抽提质粒; EcoR I 和 BamH I 进行酶切鉴定, 选择 1 管鉴定正确的质粒送生工有限公司测序。

1.3.2 细胞准备 在蛋白表达的实验中, 对 HEK 293T 细胞进行常规传代, 以适当的密度接种至直径为 60 mm 的培养皿中, 培养过夜后待转染。在免疫荧光实验中, 对 COS7 细胞进行常规传代, 在传代的同时, 取 1 张无菌的盖玻片放入直径为 35 mm 的培

养皿中, 用适当浓度的多聚赖氨酸对盖玻片进行包被, 充分晾干后种入适当密度的细胞, 培养过夜后待转染。

1.3.3 质粒转染 在蛋白表达的实验中, 待接种的 HEK 293T 细胞生长至密度约 90% 时, 根据脂质体 2000 转染试剂盒操作说明对细胞进行转染, 转入质粒的量约为 5 μg, 转染后在 Opti-MEM 无血清培养基中继续培养约 6 h, 换含有 5% 胎牛血清的培养基继续培养, 约 48 h 后收集细胞; 在免疫荧光实验中, 转染前 COS7 细胞密度约为 50%, 转染方法同蛋白表达实验。

1.3.4 Western blot 法检测^[4] 转染 24 ~ 48 h 后, 胰酶消化细胞, 离心后收集细胞, PBS 清洗 2 次; 适量细胞裂解液悬浮细胞, 4 °C 混悬 30 ~ 60 min 后, 超声破碎 3 s; 14 000 r/min、4 °C 离心 10 min 收集上清液, 即蛋白样品; 取适量加入等量的 SDS 上样缓冲液 (2 ×), 沸水浴 5 min 后置冰水中冷却; 取适量样品上样, SDS-PAGE 电泳 (100 V、2 h), 恒压湿转 (100 V、1 h); 5% 的脱脂奶粉或 BSA 溶液封闭 1 ~ 2 h; 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜或室温孵育 2 h, TBST 溶液洗膜 3 次; HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1 : 10 000) 室温孵育 1 h, TBST 溶液洗膜; 暗室中进行显影。

1.3.5 免疫荧光实验检测^[5] 转染后 24 h 左右, 轻轻取出细胞爬片, 细胞面朝上放置; 滴加 PBS 清洗 2 ~ 3 遍; 甲醇溶液 (-20 °C 冷藏) 固定 2 min, 70% 的乙醇溶液继续固定 5 min, 弃去乙醇; PBS 清洗 3 次, 用脱脂奶粉溶液 (1%, TBST 配制) 封闭 0.5 h, 弃去封闭液; 适量的一抗溶液 (1 : 200) 室温孵育 1.5 ~ 2 h, 弃一抗; 封闭液清洗 3 次后, 用适量的四甲基异硫氰酸罗丹明标记的二抗溶液 (1 : 200) 室温避光孵育 1 h, 弃二抗; PBS 清洗 3 ~ 4 次, 适量的 DAPI (150 mg/L) 溶液染色, 室温 2 ~ 3 min, 弃 DAPI 溶液; PBS 溶液清洗 3 次, 用滤纸尽量吸去细胞爬片上残留的液体, 用封片胶将爬片的细胞面轻轻封于干净的载玻片上; 待爬片固定后在荧光显微镜下进行观察和拍摄。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 质粒的酶切鉴定 对重组质粒 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 进行 BamH I、EcoR I 双酶切, 酶切鉴定的结果见图 1, 第 2 泳道的重组质粒 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 酶切后得到 2 条亮带, 通过与 pcDNA3.1 空载体酶切产物、E2F1 PCR

产物以及 Marker 的横向对比表明,一条亮带是载体 pcDNA3.1(5 400 bp),另一条亮带是目的片段 E2F1(1 314 bp),表明该质粒成功连接。后续的测序结果也表明连接正确。

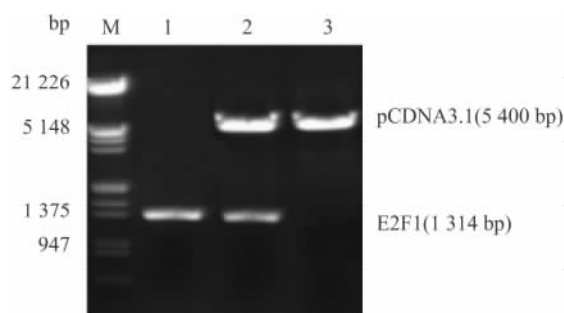


图1 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 质粒的双酶切鉴定

M: Lambda DNA/EcoR I + Hind III Marker; 1: E2F1 的 PCR 产物;
2: pcDNA3.1-E2F1-FLAG 的酶切产物; 3: pcDNA3.1 的酶切产物

2.2 E2F1 蛋白在 HEK 293T 细胞中的表达 过表达 E2F1 的 HEK 293T 细胞裂解液, Western blot 法分析后结果见图 2, 转染了 pcDNA3.1-E2F1-FLAG 的 HEK 293T 细胞裂解液能够检测到条带, 通过与预染蛋白 Marker 的横向比较, 显示条带大小约为 60 ku, 与 E2F1 蛋白的分子量基本一致, 且未转染质粒的 HEK 293T 细胞裂解液未检测到任何条带, 表明 E2F1 蛋白能够在 HEK 293T 细胞中成功表达。

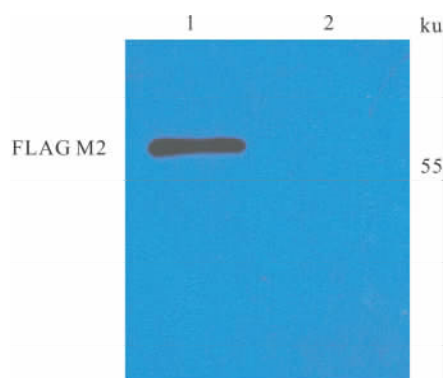


图2 Western blot 法检测 E2F1 在 HEK 293T 细胞中的蛋白表达
1: 转染 pcDNA3.1-E2F1-FLAG; 2: 转染 pcDNA3.1 载体

2.3 E2F1 蛋白在 COS7 细胞中的定位 利用荧光显微镜观察 E2F1-FLAG 在 COS7 细胞中的定位, E2F1 蛋白主要定位在细胞核内。见图 3。

2.4 E2F1 蛋白与 Sedlin 蛋白在 COS7 细胞中的共定位 利用荧光显微镜观察 E2F1-FLAG 与 Sedlin-GFP 在 COS7 细胞中的共定位, E2F1 蛋白与 Sedlin 蛋白存在共定位现象, 主要共定位在细胞核内。见图 4。

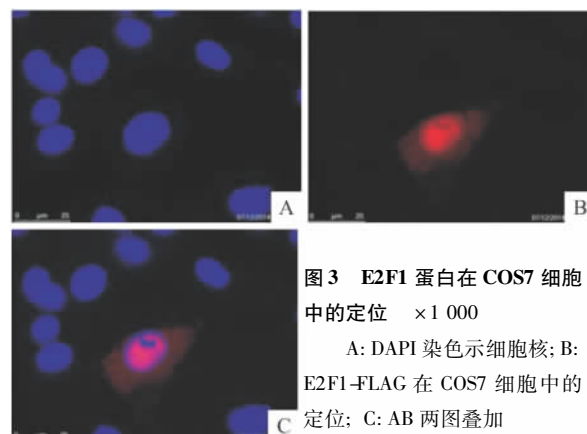


图3 E2F1 蛋白在 COS7 细胞中的定位 ×1 000

A: DAPI 染色示细胞核; B: E2F1-FLAG 在 COS7 细胞中的定位; C: AB 两图叠加

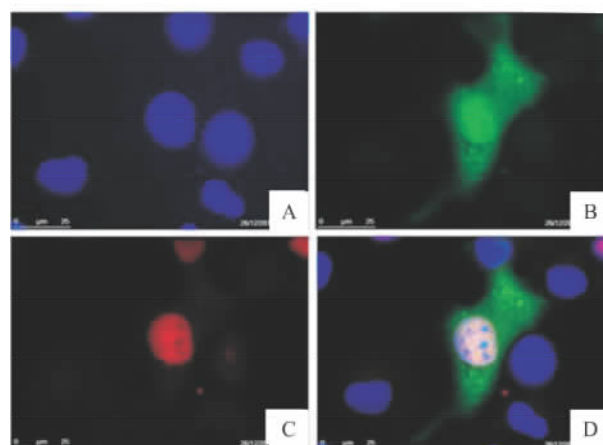


图4 E2F1 与 Sedlin 在 COS7 细胞中的共定位 ×1 000

A: DAPI 染色示细胞核; B: Sedlin-GFP 在 COS7 细胞中的定位;
C: E2F1-FLAG 在 COS7 细胞中的定位; D: ABC 三图的叠加

3 讨论

本研究通过质粒构建、Western blot 法、免疫荧光等技术研究了 E2F1 在真核细胞内的表达和定位以及和 Sedlin 蛋白的共定位情况, 结果表明, E2F1 在 HEK 293T 细胞内能够成功表达, 且在 COS7 细胞中的分布主要集中在细胞核, 并与 Sedlin 蛋白共定位于细胞核, 这将为继续研究 E2F1 和 Sedlin 之间的相互作用的精细机制提供基础。蛋白表达实验之所以选择 HEK 293T 是由于该细胞有较快的生长速度, 而且转染效率很高, 蛋白表达量多, 是瞬时转染获得胞内外蛋白常用的细胞株。荧光定位的实验之所以选择 COS7 细胞是由于该细胞有较强的贴壁能力, 适合后期的免疫制片, 而且其形态较大, 铺展较开, 适合观察蛋白的定位情况。

E2F 家族目前有 8 个成员, 命名依次为 E2F1 ~ 8, 家族成员之间存在着高度同源性, 大部分成员都包含以下几个保守区域: DNA 结合区域、转录活化结合区域、DP 二聚体结合区域。不同的 E2F 成员有特异性的结合区, 根据启动子的转录调节特性可

以将 E2F 家族蛋白分为两类: E2F1、E2F2 和 E2F3a 称为转录激活因子,受 pRb 的调节,促进细胞由 G₁ 往 S 期的转换^[6]。E2F3b、E2F4、E2F5、E2F6、E2F7 和 E2F8 称为转录抑制因子,主要抑制细胞周期的转化。在 E2F 家族中,活性最有特点的就是 E2F1。E2F1 是细胞周期重要的调控因子,当细胞周期处于 G₀/G₁ 早期时,E2F1 与 DP、RB1 结合形成一个复合物,其中 E2F1 的转录活性被未磷酸化的 pRb 所抑制^[7],同时也抑制了 E2F1 下游靶基因的表达。当细胞周期至 G₁ 晚期时,随着 Cyclin D/CDK4/6、Cyclin E/CDK2 复合物的表达,引起 pRb 的高度磷酸化,导致大量 E2F1 被释放,进而转录激活下游靶基因,促进细胞进入 S 期。当细胞周期处于 S 期时,E2F1 在 Cyclin A/CDK2 复合物的催化下磷酸化失活,导致细胞进入 G₂/M 期^[8]。当细胞进入到新的细胞周期时,pRb 将去磷酸化,与 E2F1 再次结合。E2F1 的转录调节功能除了与 RB1/E2F1 信号通路有关外,还与依赖 p53 负反馈环^[9]、miR-17/miR-20a miRNAs 信号通路^[10]的调控密切相关。除了对细胞周期的调控,E2F1 还参与了细胞凋亡的诱导。另外,E2F1 与肿瘤的发生发展有着密切的关系,在许多癌症中都存在 E2F1 高表达的现象,如子宫内膜癌^[11]、乳腺癌^[12]等,但在某些癌症中 E2F1 的表达量却有所降低,如肝癌^[13],由此可见,E2F1 存在癌基因和抑癌基因的双重特性,因此,对其进行深入研究意义重大。在接下来的研究中,将用蛋白下拉技术、免疫共沉淀等技术,对 E2F1 和 Sedlin 的相互作用做进一步研究。

参考文献

- [1] Kovcsdi I, Reichel R, Nevins J R. Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation [J]. *Cell*, 1986, 45(2): 219–28.
- [2] Choi M Y, Chan C C, Chan D, et al. Biochemical consequences of sedlin mutations that cause spondyloepiphyseal dysplasia tarda [J]. *Biochem J*, 2009, 423(2): 233–42.
- [3] 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.
- [4] 乔 正,赵 健,潘林鑫,等. 人 RACK1 蛋白在 HEK-293T 和 BL21 细胞中的表达及 COS7 细胞的定位 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9): 1189–92.
- [5] 李春雨,潘林鑫,刘晓颖,等. 人类胞内氯离子通道蛋白 3 在原核细胞及真核细胞内的表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9): 1202–5.
- [6] Johnson D G, Schwarz J K, Cress W D, et al. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase [J]. *Nature*, 1993, 365(6444): 349–52.
- [7] Ferreira R, Nagueibeva I, Mathieu M, et al. Cell cycle-dependent recruitment of HDAC-1 correlates with deacetylation of histone H4 on an Rb-E2F target promoter [J]. *EMBO Rep*, 2001, 2(9): 794–9.
- [8] Mundle S D, Sabarwal G. Evolving intricacies and implications of E2F1 regulation [J]. *FASEB J*, 2003, 17(6): 569–74.
- [9] Sharma N, Timmers C, Trikha P, et al. Control of the p53-p21/CIP1 Axis by E2f1, E2f2, and E2f3 is essential for G1/S progression and cellular transformation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(47): 36124–31.
- [10] Pickering M T, Stadler B M, Kowalik T F. miR-17 and miR-20a temper an E2F1-induced G1 checkpoint to regulate cell cycle progression [J]. *Oncogene*, 2009, 28(1): 140–5.
- [11] 刘向真,王如美. 乳腺癌组织中 E2F-1 和 Skp2 的表达及意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(11): 2286–8.
- [12] 庞志澜,马丽辉,孔卫平,等. 子宫内膜癌中 E2F-1、Survivin 和 ki-67 的表达及相关性 [J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(7): 1581–5.
- [13] 王长青,吴 江,周 娟. E2F-1 基因对 HepG2 肝癌细胞增殖影响的研究 [J]. *医学综述*, 2013, 19(4): 722–4.

The expression of human E2F1 and the co-localization with Sedlin

Wang Yanyan, Pan Linxin, Wang Mengyuan, et al

(Dept of Biology, College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression and localization of E2F1 in eukaryotic cells and the co-localization with Sedlin. **Methods** To construct eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-E2F1-FLAG. The plasmid was transfected into HEK 293T cells and the expression was checked by Western blot. Its expression in COS7 cells was detected by fluorescence microscopy. **Results** The eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-E2F1-FLAG was constructed successfully, which could be effectively expressed in HEK 293T and COS7 cells. E2F1 was predominantly distributed in the nucleus, and it co-localized in the nucleus with Sedlin. **Conclusion** E2F1 can over-express efficiently in HEK 293T and COS7 cells, and it can colocalize with Sedlin, which provides important bases for further study on E2F1 including its functions and associated proteins.

Key words E2F1; transfection; gene expression; cellular localization