

Limk1 不同突变体 HA 融合表达载体构建及在细胞内定位*

刘亚伟¹, 李 翠², 何敏毅³, 赵 亮², 漆松涛¹, 陈剑荣^{3**}

(1. 南方医科大学南方医院 神经外科, 广东 广州 510515; 2. 南方医科大学基础医学院 重大疾病的转录组及蛋白质组学教育部重点实验室, 广东 广州 510515; 3. 南方医科大学珠江医院 器官移植科, 广东 广州 510282)

[摘要] 目的: 构建 LIM 激酶(Limk)1 不同突变体的 HA 融合表达载体,并在真核细胞中表达,观察这些突变体在细胞内定位。方法: 利用聚合酶链式反应(PCR)扩增 Limk1 全长序列,构建 HA-Limk1 真核表达质粒;利用定点突变策略对 HA-Limk1 进行核定位信号(NLS)缺失突变,命名为 Limk1-NLS(del);用合成两条互补序列退火获得目标片段插入载体的策略构建 Limk1-NLS;将 2 表达质粒转染 HepG2 细胞,细胞免疫荧光方法以及核质分离后用 western-blot 检测其在细胞中定位。结果: 经测序鉴定 Limk1 及其不同突变体序列正确,在 HepG2 细胞中高表达;其中 HA-Limk1 在细胞质、细胞核均有表达, Limk1-NLS(del)主要定位于细胞质, Limk1-NLS 主要定位于细胞核。结论: 成功构建了 Limk1 全长及不同突变体的 HA 融合表达载体,初步明确突变体在细胞内的定位。

[关键词] LIM 激酶 1; 载体构建; 基因表达; 融合蛋白; 细胞内定位; 突变体

[中图分类号] Q78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)04-0475-04

A Study on the Construction, Expression and Intracellular Localization of Different Mutants of Limk1 Fusion Expression Vector

LIU Yawei¹, LI Cui², HE Minyi³, ZHAO Liang², QI Songtao¹, CHEN Jianrong³

(1. Department of Neurosurgery, Nanfang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 2. Key Laboratory of Transcriptome and Proteome of Human Diseases Supported by the Ministry of Education of China, School of Basic Medical Sciences of Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China; 3. Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong, China)

[Abstract] Objective: To construct eukaryotic cell expression vectors of different Limk1 mutants fused with HA and to study the intracellular localizations of the mutant. **Methods:** Using polymerase chain reaction (PCR) for amplification of Limk1 full sequence, constructing HA-Limk1 Eukaryotic Expression Vector; using fixed-mutation to perform NLS deletion mutation, and named it as Limk1-NLS(del); using annealed complementary sequence to gain biotinylated target, to insert it in measurement building of Limk1-NLS; Mutants of Limk1 gene transfected into HepG2 cells,. The intracellular localizations of these mutants were detected with immunofluorescence and western-blot followed to cytoplasm-nucleoplasm separation. **Results:** HA-fused Limk1 mutants highly expressed in HepG2 cells. HA-Limk1 expressed in both cytoplasm and nucleus. The Limk1-NLS(del) mainly localized in cytoplasm. The Limk1-NLS mainly localized in nucleus. **Conclusions:** Limk1 full length and different HA fusion expression vectors are successfully constructed, preliminarily define localization of mutants in nucleus.

[Key words] Limk1; vector construction; gene expression; fusion protein; intracellular localization; mutants

*[基金项目]国家自然科学基金(81372692; 81302229);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20134433120014);广东省自然科学基金(S2012040007081)

**通信作者 E-mail:641745738@qq.com

网络出版时间:2014-08-14 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140814.2243.008.html>

人 LIM 激酶(LIM kinase, LIMK)1 是 LIMK 蛋白家族两大成员之一,属于双特异性(丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸)激酶,参与细胞迁移、细胞周期、神经元分化等多种细胞功能调节,在肿瘤细胞侵袭、转移以及神经发育紊乱(William's syndrome)等多种病理过程中发挥作用^[1-2]。Limk1 能将 Cofilin 磷酸化使其成为失活的 pCofilin,进而参与细胞肌动蛋白骨架的重新组合^[3]。Limk1 编码的蛋白既有核定位信号(Nuclear localization sequence, NLS),又有核输出信号(nuclear export signals, NES),在不同细胞中亚细胞定位不同^[4]。蛋白质在细胞内定位的不同,导致其行使的功能不同^[5]。虽然目前对 Limk1 在胞质中的作用及其机制研究很多,但是其在细胞核中究竟发挥何种作用及其机制尚不清楚。因此,对 Limk1 不同亚细胞定位进行探讨具有重要意义。本研究构建了 HA 标记的 Limk1 不同突变体的融合表达载体,并在哺乳动物细胞中进行表达,观察这些突变体在细胞内的定位情况。

1 材料和方法

1.1 试剂

Homo sapiens LIM domain kinase 1 (Limk1), transcript variant 1, mRNA (NM_002314 BC152982) 片段购自长沙赢润生物技术有限公司。DNA ladder 和 MutanBEST 定点突变试剂盒购自大连宝生物公司,引物由英骏公司合成。激光共聚焦培养皿和细胞培养皿购自 Corning 公司,4,6-联脒-2-苯基吲哚(4,6-Diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,DMEM 培养基、Opti-MEM 培养基和胎牛血清(FBS)购自美国 Gibco BRL 公司,Lipofectamine2000 转染试剂购自美国 Life 公司,质粒小量制备试剂盒购自 QIAGEN 公司。兔抗 HA、兔抗 β -actin 一抗及羊抗兔二抗购自美国 CST 公司,TRITC(红色荧光)标记的羊抗兔二抗购自美国 Life 公司。

1.2 细菌和细胞

实验用大肠杆菌株 DH5 α 和人 HepG2 细胞系为本室保存,HepG2 细胞用含 5% FBS 的 DMEM 培养基在 CO₂ 培养箱(37 °C、5% CO₂)中培养。

1.3 HA 标记的 Limk1 不同突变体的构建

利用 PCR 扩增 Limk1 序列全长,插入 pcDNA3-HA 真核表达质粒的 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切位点

之间,命名为 HA-Limk1。pcDNA3-HA 是以点突变策略在 pcDNA3 载体的 *Hind* III 和 *Kpn* I 之间插入 HA 序列构建而成。利用 MutanBEST 定点突变试剂盒对 HA-Limk1 进行 NLS 缺失突变,命名为 Limk1-NLS(del)。用合成两条互补序列退火获得目标片段插入载体的策略构建在 Limk1 上游插入串联两个 NLS 序列的质粒,命名为 Limk1-NLS。所有引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequence in this study

质粒名称	引物序列
HA-Limk1	5'-CACGGTACCATGAGGTTGACGCTACTTTG-3' 5'-ATATCTAGAGTCGGGGACCTCAGGCTGG-3'
HA-Limk1	5'-AAGCGCTACACCGTGGTGGCAA-3'
-NLS(del)	5'-CAGGCCCTCAGGCTGAGTCTTCT-3'
HA-Limk1	5'-AGCTTCCAAAGAAGAAGAGAAAAGTGAG -NLS CGGCGGCAGCCCAAAGAAGAAGAGAAAAG TGGGTAC-3' 5'-CCACTTTTCTTCTTCTTTGGGCTGCCGC CGCTCACTTTTCTTCTTCTTTTGA-3'

1.4 Lipofectamine 2000 介导的瞬时转染

在细胞培养皿中按 2×10^4 个/皿加入 HepG2 细胞,24 h 后,利用 Lipofectamine 2000 对 HA 标记的 Limk1 野生型及不同突变体的重组质粒进行瞬时转染,pcDNA3-HA 原质粒作为阴性对照。具体操作步骤按照产品说明书进行,细胞置于 CO₂ 培养箱(37 °C、5% CO₂)中孵育 24 h 后,进行核质分离、western-blot 或细胞免疫荧光检测。

1.5 细胞核质分离

将转染质粒培养 24 h 后的细胞用预冷的 PBS 洗 2 遍,尽量吸尽 PBS,加入预冷的匀浆缓冲液 120 μ L,冰上匀浆 15 min,3 000 r/min 离心 20 min,上清即为胞浆蛋白。胞核沉淀中加入 60 μ L 匀浆缓冲液,洗涤 2 次,4 °C,3 000 r/min 离心 10 min,沉淀中加入 10 μ L 核提取缓冲液,冰上 150 r/min 摇动 1 h,4 °C,14 000 r/min 离心 20 min,上清液即为核提取物。

1.6 Limk1 蛋白在细胞核及细胞质中的含量

将各组细胞核、细胞质蛋白定量后,各取 40 μ g 进行 12 % 的 SDS-PAGE 电泳,电泳完成后,将蛋白转移至 PVDF 膜,经过封闭、抗 HA 一抗孵育、辣根过氧化物酶偶联的二抗孵育后,用增强型化学发光试剂(Enhanced Chemiluminescence, ECL)显色,应用柯达 2000MM 图像工作站分析蛋白质水平。

1.7 Limk1 在细胞内定位

将转染后细胞接种到激光共聚焦皿,多聚甲醛固定,Triton X-100 对细胞膜通透处理,一抗使用兔源性抗 HA 抗体,二抗使用 TRITC (红色荧光) 标记的羊抗兔二抗;DNA 用 DAPI 复染,封片后用激光共聚焦显微镜观察荧光分布情况。

2 结果

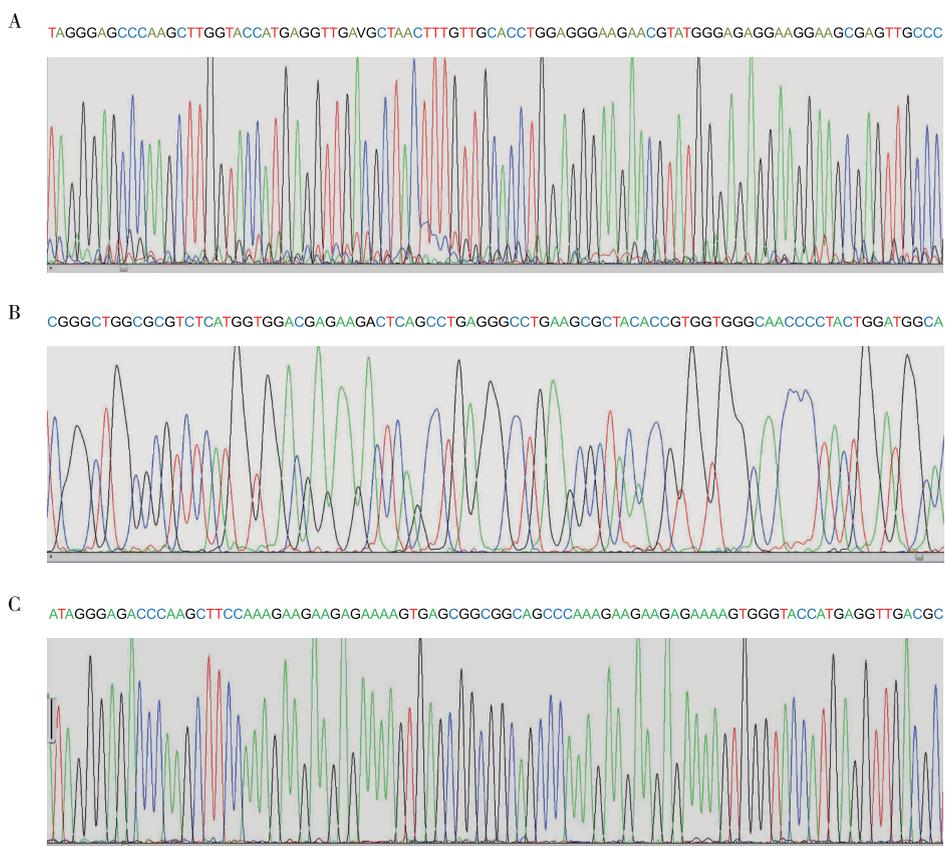
2.1 Limk1 不同突变体的测序

为了鉴定各突变体是否突变成功,将少量提取的重组质粒进行序列分析。测序结果证实,各突

变反应都成功得到了相应的突变体(图 1)。

2.2 Limk1 不同突变体在 HepG2 细胞中的表达和定位

western-blot 检测结果表明转染 pcDNA3-HA 的细胞,无论细胞质还是细胞核中均检测不到相应的条带;转染 Limk1-NLS(del)的细胞,在细胞质中可检测到明显的条带,而细胞核中该蛋白条带非常微弱;转染 Limk1-NLS 的细胞,在细胞核中可检测到明显的条带,而细胞质中该蛋白条带非常微弱(图 2)。该实验重复 3 次。



A. Limk1 ;B. Limk1-NLS(del) ;C. Limk1-NLS

图 1 Limk1 不同突变体测序结果

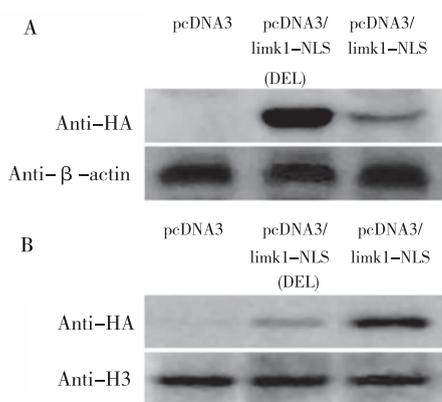
Fig. 1 Sequencing results of different mutants of Limk1

细胞免疫荧光实验结果发现转染 24 h 后,从荧光分布可以看出,HA-Limk1 在胞质胞核中均有分布,大部分定位于胞质中,Limk1-NLS(del) 主要分布于胞质内,而 Limk1-NLS 主要分布于细胞核内(图 3)。该实验重复 3 次。

3 讨论

近年来,LIMK 在肿瘤中的作用引起了广泛关注^[6]。Limk1 的主要功能包括:(1) Limk1 磷酸化

Cofilin,从而抑制纤维状肌动蛋白的聚合,影响肌动蛋白的稳定,参与肌动蛋白细胞骨架的重组,因此调控各种细胞运动分裂、各种膜结构和其他的微观结构形成,对于肿瘤细胞的迁移、黏附、侵袭起着相当重要的作用^[7-8];(2) Limk1 可被 ROCK 激活,继而导致细胞内的肌动蛋白的聚合及微管重排^[9, 10]。目前,对 Limk1 功能及其分子机制的研究主要集中于胞质中的 Limk1 蛋白,但是该蛋白也可定位于胞核,而这方面的研究甚少。



A. HepG2 细胞质蛋白; B. HepG2 细胞核蛋白
图 2 Limk1 不同突变体在 HepG2 细胞核和细胞质中表达 (western-blot)

Fig. 2 The expression of different Limk1 mutants in cytoplasm or nuclear of HepG2 cells(western-blot)

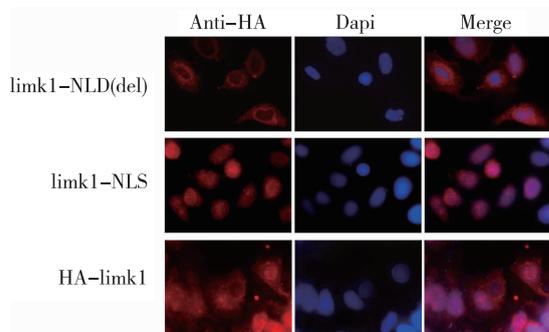


图 3 Limk1 不同突变体在 HepG2 细胞核和细胞质含量 (免疫荧光法)

Fig. 3 The expression of different Limk1 mutants in cytoplasm or nuclear of HepG2 cells detected by immunofluorescence

Limk1 基因位于人类染色体的 7q11.23, 全长 39 499 bp, 含 16 个外显子。选择性剪切该基因可产生两种 mRNA, 一种编码全长 Limk1 蛋白, 另一种因缺失 61 个碱基而使编码蛋白缺乏羧基末端激酶域。该蛋白 N-末端含两个 LIM 结构域及一个 PDZ 结构域, C-末端含一个激酶结构域。其中, LIM 结构域由一对锌指结构构成, 可作用于 C 末端的激酶结构域而负性调节激酶活性, 同时介导蛋白与蛋白间的相互作用, 参与决定细胞命运、生长调节、癌症发生及细胞骨架重组。PDZ 包括两个富含亮氨酸的功能性核转运信号, 使 Limk1 优先定位于细胞质^[11-12]。

为了进一步阐明 Limk1 的细胞内定位与功能

之间的关系, 本实验构建了 HA 标记的 Limk1 不同突变体融合表达载体, 并在真核细胞中进行了表达, 观察这些突变体在细胞内的定位情况。结果表明: 即使 Limk1 含有 NLS, 但是过表达后主要定位于细胞质中, 与删除 NLS 的 Limk1 定位一致。因此, 为了使 Limk1 定位于细胞核中, 本实验将两个串联的 NLS 序列插入 Limk1 序列的 5' 端, 经检测, 使 Limk1 成功定位于细胞核中。

本次研究成功构建了 Limk1 全长及不同突变体的 HA 融合表达载体, 初步明确突变体在细胞内的定位。为进一步研究 Limk1 的移位机制奠定了实验学基础, 同时也为阐明 Limk1 在细胞内的确切生理功能提供了工具。

4 参考文献

- [1] Manetti F. LIM kinases are attractive targets with many macromolecular partners and only a few small molecule regulators[J]. *Med Res Rev*, 2012 (5):968-998.
- [2] 王龙, 于燕妮, 贺晓燕. p57 ~ (kip2) LIMK-1 在胃癌组织中的表达及与肿瘤血管和淋巴管的关系[J]. *贵阳医学院学报*, 2011(1):19-22.
- [3] Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013(2):457-469.
- [4] Mcconnell BV, Koto K, Gutierrez-Hartmann A. Nuclear and cytoplasmic LIMK1 enhances human breast cancer progression[J]. *Mol Cancer*, 2011(10):75.
- [5] 邓鹏, 陈腾祥, 龚小卫. 串联重复核定位信号的绿色荧光蛋白融合载体的构建与原核表达[J]. *贵阳医学院学报*, 2008 (4):340-343.
- [6] 王红, 王岩. LIMK1 与恶性肿瘤的研究现状[J]. *吉林医学*, 2012 (7):1466-1468.
- [7] Slee JB, Lowe-Krentz LJ. Actin realignment and cofilin regulation are essential for barrier integrity during shear stress[J]. *J Cell Biochem*, 2013 (4):782-795.
- [8] Scott RW, Hooper S, Crighton D, et al. LIM kinases are required for invasive path generation by tumor and tumor-associated stromal cells[J]. *J Cell Biol*, 2010 (1):169-185.
- [9] Acevedo K, Li R, Soo P, et al. The phosphorylation of p25/TPPP by LIM kinase 1 inhibits its ability to assemble microtubules[J]. *Exp Cell Res*, 2007 (20):4091-4106.
- [10] Ritchey L, Ottman R, Roumanos M, et al. A functional cooperativity between Aurora A kinase and LIM kinase1: implication in the mitotic process[J]. *Cell Cycle*, 2012 (2):296-309.
- [11] 马艳华, 史玲, 苏琦. LIM 激酶与肿瘤[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2009 (6):490-494.
- [12] Scott RW, Olson MF. LIM kinases: function, regulation and association with human disease [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2007 (6):555-568.

(2014-05-28 收稿, 2014-06-20 修回)
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 赵毅