

体外 APC/C 活性体系的建立 及其影响因素的研究

高彦飞¹ 李 腾¹ 常 艳¹ 王玉博¹ 穆 蕊¹ 陈 亮¹ 甄 诚¹
韩秋影¹ 于 鸣² 巩伟丽¹ 张维娜¹ 李慧艳^{1*}

(国家生物医学分析中心¹, 北京 100850; 军事医学科学院基础医学研究所细胞免疫学教研室², 北京 100850)

摘 要 为获得具有细胞周期后期促进复合物 (APC/C) 活性的细胞裂解液并建立 APC/C 体外活性检测体系, 以其底物 Cyclin B 及 Securin 的降解为检测指标, 分别从细胞阻滞于有丝分裂期的时间, UBCH10 (APC/C 的 E2 酶) 的浓度以及裂解液浓度等几个方面研究了各种处理因素对 APC/C 活性的影响, 并且用体外翻译底物验证了其活性及相关结论。此项工作为进一步探索 APC/C 相关分子事件奠定了基础。

关键词 后期促进复合物 Cyclin B Securin UBCH10 活性

中图分类号 Q253; **文献标志码** A

随着对细胞周期研究的逐渐深入, 与泛素-蛋白酶体降解相关的一系列分子事件, 得到越来越多的关注。其中对细胞周期后期促进复合物 (APC/C) 的相关研究正在成为一个热点。

细胞周期后期促进复合物 (anaphase promoting complex, cyclosome, APC/C) 是有丝分裂期及 G1 期起主要作用的 E3 泛素连接酶^[1]。为了保证亲子代细胞间基因的稳定性, APC/C 的活性发挥受到许多因素的调控。如与其共激活子 Cdc20 或 Cdh1 的结合, 自身及共激活子的磷酸化修饰, 纺锤体组装检查点 (Spindle Assembly Checkpoint, SAC) 的抑制^[2]等。

其中纺锤体组装检查点对 APC/C 的抑制被认为是维持基因组稳定性的重要环节。该检查点主要负责检查有丝分裂中姐妹染色单体上的动粒是否与两极微管均连接正确, 及动粒间的压力是否正常。当以上两个条件都满足时, 纺锤体组装检查点灭活, 解除其对 APC/C 的抑制, 释放出 APC/C 活

性, 促使 Cyclin B 及 Securin 被降解, 促进细胞周期由中期向后期的转化。纺锤体组装检查点的异常灭活经常与非整倍体 (aneuploidy) 的产生以及肿瘤的发生发展有着密不可分的关系^[3]。然而, 纺锤体组装检查点的灭活及与其相连的 APC/C 的激活的机制至今还不十分清楚。

为了达到研究纺锤体组装检查点灭活及与其相连的 APC/C 激活的分子机制的目的, 现初步建立 APC/C 的体外活性检测系统并验证其可靠性。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及同步化

HeLa 细胞用含 10% 胎牛血清和 100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 DMEM (Invitrogen 公司产品) 在 CO₂ 含量为 5% 的 37℃ 孵箱中培养, 采用胰酶消化法进行细胞传代。当培养瓶中的细胞生长至 40%—60% 密度时加入 2 mM 胸腺嘧啶脱氧核苷 (thymidine) 24 h, 生理盐水洗涤 4 次, 加入含 100 ng/mL Nocodazole 的 DMEM 新鲜培养基, 继续培养 14 h, 用有丝分裂摇落法 (Shake-off) 收集有丝分裂细胞。

1.2 细胞裂解液的制备

收集细胞,1 000 r/min 离心 3 min,去培养基,1 × PBS 洗涤 2 次,加入与细胞等体积的细胞裂解液 [25 mmol/L Hepes pH 7.5,1.5 mmol/L MgCl₂,5 mmol/L KCl,1 mmol/L DTT,15 mmol/L 磷酸肌酸 (Sigma, Inc),2 mmol/L ATP (Sigma, Inc),蛋白酶抑制剂 (Roche, Inc) 1 片/50 mL]。液氮反复冻融 3 次,使裂解液通过 26 G 的针头 8—10 次。5 000 r/min 离心 5 min,收集上清,然后 12 000 r/min 离心 20 min,去沉淀,分装液氮保存。

1.3 体外降解体系的建立

以一个反应为例,取 10 μL 上述裂解液,加入以下各成份 (终浓度)。1.5 mg/mL 泛素 (Boston Biochem, Inc),7.5 mmol/L 磷酸肌酸,1 mmol/L ATP,1 mmol/L MgCl₂,0.1 mmol/L 放线菌酮 (Sigma, Inc) 置于 30 ℃ 水浴开始反应。在指定时间点取出加入 2 × SDS 凝胶上样缓冲液,100 ℃ 煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 分离,转膜后用相应的抗体进行 Western 检测,最后用 ECL 化学发光试剂 (Pekin Elmer) 显影压片。

1.4 体外降解体系的建立 (体外翻译底物)

根据 TNT 体外翻译试剂盒 (Promga, Inc) 操作方法,翻译³⁵S 标记的底物蛋白。除加入 1.3 所述成分外,每 10 μL 还需加入 1 μL³⁵S 标记的底物,置于 30 ℃ 水浴开始反应。在指定时间点取出加入 2 × SDS 凝胶上样缓冲液,100 ℃ 煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 分离,干胶及放射自显影。

2 结果

2.1 细胞阻滞于有丝分裂期时间长短对 APC/C 底物的影响

细胞长期处于有丝分裂期会引起凋亡、逃离等事件^[4],为避免其对后续实验的影响,首先试验不同阻滞时间的 Hela 细胞对底物降解的影响。Hela 细胞经 Thymidine 同步化 24 h 后,释放入含有 100 ng/mL Nocodazole 的培养基,分别于 14,18,22 h Shake-off 收集有丝分裂期细胞。收集细胞再释放入

新鲜培养基,分别于 0,1,1.5,2,2.5 h 收集样品。检测有丝分裂期中后期转化过程中 APC/C 的主要底物 Cyclin B 和 Securin 的降解速率。如图 1 所示,阻滞于 Nocodazole,14,18,22 h (自 Thymidine 释放开始计时),各组间 Cyclin B 和 Securin 降解的速率无显著变化。

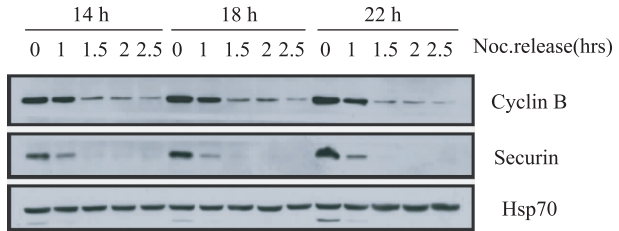


图 1 Nocodazole 阻滞不同时间对底物降解速率的影响
Hela 细胞经 Thymidine 同步化 24 h 后,释放入含有 100 ng/mL Nocodazole 的培养基,各组根据图中所示时间点收集细胞,释放入新鲜培养基。用相应抗体进行 immuno blotting (IB) 检测。

2.2 裂解液中 APC/C 活性的检测

Braunstein 等报道,有丝分裂前中期细胞裂解液能够用于检测纺锤体检查点的灭活及 APC/C 激活的一系列分子事件^[5]。为了验证这一理论的可靠性,以及在本实验室建立这一体系,利用节 2.1 得到的细胞裂解液检测其对 Cyclin B, Securin 降解的活性。同时因为文献报道^[6—8],APC/C 的 E2 酶,UBCH10,能够促进纺锤体检查点的灭活及 APC/C 激活,但是 Walker 等^[9]通过其它方法证明其在纺锤体检查点的灭活及 APC/C 激活过程中不发挥作用。为验证 UBCH10 在此过程中是否有作用,完成了图 2 所示实验。通过检测内源的 Cyclin B, Securin,细胞裂解液在加入泛素及能量系统后 Cyclin B, Securin 可以被降解,但是降解速率明显比细胞释放要慢。在加入 UBCH10 后,与对照组相比,底物降解速率明显加快。说明 UBCH10 检测纺锤体检查点的灭活及 APC/C 激活过程中确实发挥着重要作用。

2.3 裂解液浓度对 APC/C 活性的影响

因为 Cyclin B 及 Securin 降解速率均与细胞释放降解速率差别较大,为了解释这种现象,我们通过改变不同条件进行探索,发现当将裂解液原始浓

度 25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 稀释为 8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 时,裂解液中 APC/C 对底物的降解活性明显升高,如图 3 所示。通过比较不同时间点底物的变化,发现 Cyclin B 较 Securin 变化更明显。此种情况下,加入 UBCH10 对底物的降解促进作用更明显。

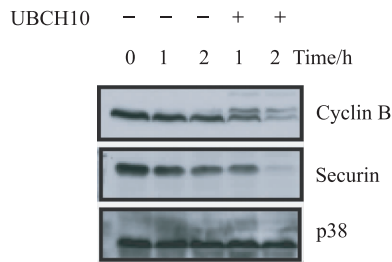


图 2 细胞裂解液(25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)中 APC/C 对底物降解速率的评价及 UBCH10 的影响

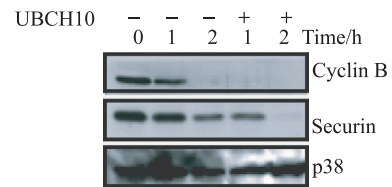


图 3 细胞裂解液(8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)中 APC/C 对底物降解速率的评价及 UBCH10 的影响

2.4 体外翻译底物验证

图 2 和图 3 所示实验均为检测裂解液内内源 Cyclin B,Securin 的降解速率,为验证外源加入的体外翻译底物能否重复以上现象,向细胞裂解液中加入体外翻译的底物 Securin 并检测其降解。如图 4 所示,与内源结果一致,裂解液浓度高时底物降解慢,裂解液浓度低时底物降解快。且无论浓度高低,加入 UBCH10 都可明显促进底物的降解。

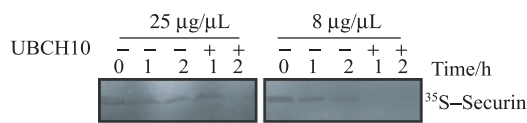


图 4 不同浓度裂解液及 UBCH10 对体外翻译 Securin 降解速率的影响

3 讨论

纺锤体检查点灭活及相继的 APC/C 激活成为

科研热点,尽管现在研究手段很多,但是涉及到分子机制的探索时,很多活细胞内实验都会面临同一个问题,即很难判断观察到的结果是导致细胞阻滞的原因还是细胞阻滞的结果。例如一个基因干涉后观察 Cyclin B 降解延迟及细胞中期向后转化变慢,会有两种可能性:1) 这是因为 Cyclin B 降解延迟导致 Cdk1 活性降低变慢,从而导致细胞中期向后转化变慢;2) 这是因为,干涉这个基因导致细胞整体水平的某些变化,使其周期变慢,周期变慢,Cyclin B 的降解必然会被延迟。本文所建立的体外系统,可以在一定程度上避免上述第二种情况的出现,因为细胞裂解液缺少了活细胞的整体环境及染色体等影响成分。这就为更好的研究纺锤体检查点灭活及相继的 APC/C 激活奠定了很好的基础。

参 考 文 献

- 1 Peters J M. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2006;7(9):644—656
- 2 Musacchio A,Salmon E D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2007;8(5):379—393
- 3 Schwartzman J M,Sotillo R,Benezra R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. *Nat Rev Cancer*,2010;10(2):102—115
- 4 Brito D A,Rieder C L. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol*,2006;16(12):1194—1200
- 5 Braunstein I,Miniowitz S,Moshe Y,*et al.* Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2007;104(12):4870—4875
- 6 Reddy S K,Rape M,Margansky W A,*et al.* Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature*,2007;446(7138):921—925
- 7 Stegmeier F,Rape M,Draviam V M,*et al.* Anaphase initiation is regulated by antagonistic ubiquitination and deubiquitination activities. *Nature*,2007;446(7138):876—881
- 8 Summers M K,Pan B,Mukhyala K,*et al.* The unique N terminus of the UbcH10 E2 enzyme controls the threshold for APC activation and enhances checkpoint regulation of the APC. *Mol Cell*,2008;31(4):544—556
- 9 Walker A,Acquaviva C,Matsusaka T,*et al.* UbcH10 has a rate-limiting role in G1 phase but might not act in the spindle checkpoint or as part of an autonomous oscillator. *J Cell Sci*,2008;121(Pt 14):2319—2326

Preparation of Extracts with APC/C Activity and Analysis of Its Influencing Factors

GAO Yan-fei¹, LI Teng¹, CHANG Yan¹, WANG Yu-bo¹, MU Rui¹, CHEN Liang¹, ZHEN Cheng¹, HAN Qiu-ying¹,
YU Ming², GONG Wei-li¹, ZHANG Wei-na¹, LI Hui-yan^{1□}

(National Center of Biomedical Analasis, Beijing 100850, P. R. China;

Department of Molecular Immunology¹, Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, P. R. China)

[Abstract] To prepare the cell extracts with the APC/C activity and analysis of its influencing factors, the degradation of APC/C's substrates Cyclin B and Securin was used as a marker. Several assays were done to analysis its influencing factors, including the duration of cells arrest in mitosis, the activity of extracts, the presence of its E2 enzyme, UBCH10, and the concentration of extracts. The similar result was obtained using the *in vitro* translated substrates. Taken together, these assays were the basement to further study the related molecular mechanism.

[Key words] APC/C Cyclin B Securin UBCH10 activity

(上接第 5153 页)

- 7 Reddy S K, Rape M, Margansky W A, *et al.* Ubch10-Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature*, 2007; 466 (7138) : 921—925
- 8 Garnett M J, Mansfeld J, Godwin C. UBE2S elongates ubiquitin chains on APC/C substrates to promote mitotic exit. *Nat Cell Biol*, 2009; 11

(11) : 1363—1369

- 9 Lippincott-Schwartz J, Patterson G H. Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 2003; 300 (5616) : 87—91

Construction and Mitosis Observation of HeLa/GFP—H2B Cell

LI Teng¹, GAO Yan-fei¹, CHANG Yan¹, WANG Yu-bo¹, MU Rui¹, CHEN Liang¹,
ZHEN Cheng¹, HAN Qiu-ying¹, YU Ming², GONG Wei-li¹, ZHANG Wei-na¹, LI Hui-yan^{1□}

(National Center of Biomedical Analysis¹, Beijing 100850, P. R. China;

Department of Molecular Immunology², Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, P. R. China)

[Abstract] Accurate chromosome segregation depends on the precise regulation of mitotic progression, including the timing of mitosis and proper regulation of spindle assembly checkpoint are gotten. Though live-cell observation movement of chromosome, we could accurately quantify the procedure above. Here, though retroviral infection system we get stable expressed GFP-H2B HeLa cell line. Together with synchronizing cells to mitosis, a technique is established that observing mitosis though time-lapse confocal scanning laser microscopy.

[Key words] mitosis cell synchronization live-cell imaging