

p21 蛋白在小鼠受精卵不同期的表达及定位

武迪迪¹, 张盼盼², 李雪松¹, 张杰¹, 宗志宏¹, 于秉治^{1△}

(1. 中国医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳市第五医院外科)

[摘要] 目的: 研究小鼠受精卵不同时期中 p21 蛋白的细胞表达及定位。方法: 根据时间点收集不同时期小鼠卵细胞, 应用免疫荧光法检测其 p21 蛋白的细胞定位。同时用 Western blot 法检测 p21 蛋白的表达。结果: 在小鼠受精卵 G1 期 p21 蛋白分布在胞浆中, S 期向胞核聚集, 而 G2 期则集中分布于细胞核中; 不同时期小鼠受精卵中 p21 蛋白的表达无明显差异。结论: p21 蛋白在小鼠受精卵发育中的作用与其细胞定位密切相关。

[关键词] 小鼠受精卵; p21 蛋白; 细胞周期; 定位

[中图分类号] Q132.7 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)01-0007-02

Expression and localization of p21 protein in different phases of mouse fertilized eggs

WU Di-di¹, ZHANG Pan-pan², LI Xue-song¹, ZHANG Jie¹, ZONG Zhi-hong¹, YU Bing-zhi^{1△}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang 110001, China; 2. Department of Surgery, The Fifth Hospital of Shenyang)

[Abstract] Objective: To investigate expression and location of p21 protein in G1, S, and G2 phases of mice fertilized eggs. Methods: The fertilized eggs in G1, S, G2 phases were collected. The expression and location of p21 protein were determined by Western blot and immunofluorescence method, respectively. Results: p21 protein in G1, S, and G2 phases of fertilized eggs was located in the cytoplasm, near the nucleus, and in the nucleus, respectively. No significant difference in p21 expression was found among fertilized eggs in different phases. Conclusion: The location of p21 protein changes in different phases of mouse fertilized eggs.

[Key words] fertilized eggs; p21 protein; cell cycle; localization

小鼠受精卵早期的发育与其细胞周期的调控密切相关。参与调控的因子不仅包含正调控作用的细胞周期素 (cyclins)、细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK)、还有负调控作用的 CDK 抑制因子 (cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)。p21 蛋白是细胞周期抑制蛋白的一种, 可通过与 CDK 结合, 抑制其活性而影响细胞周期的进程。本研究旨在明确小鼠受精卵不同时期中 p21 蛋白定位情况, 为进一步研究 p21 蛋白对小鼠受精卵早期发育提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 小鼠超数排卵和受精卵的收集

参照参考文献[1]的方法, 根据不同时间点收集不同期细胞: 受精后 4~8 h 为 G1 期; 9~15 h 为 S 期; 15~18 h 为 G2 期。

1.2 间接免疫荧光法检测 p21 蛋白的细胞定位^[2]

将不同期受精卵各 20 个移入新鲜配制的 4% 多聚甲醛液中, 固定 30 min (37℃), 然后在清洗液 (含 0.1% BSA 的 PBS) 清洗 3 次后, 用含 0.2% Triton-X100 的 PBS 处理 15 min (37℃) 以增加细胞膜透性, 用清洗液充分清洗后把卵移入封闭液 (含 1% BSA 的 PBS) 中, 37℃ 1 h。鼠单克隆 p21 抗体室温孵育 1 h 或 4℃ 过夜。用清洗液洗卵 3 次以充分去除未结合的抗体, 然后移入二抗 (FITC 标记) 中, 室温避光孵育 30 min, 用清洗液洗 3 次, 去除未结合的二抗。

1.3 Western blot 法检测小鼠受精卵不同期 p21 蛋白的表达

取小鼠一细胞 G1、S、G2 期受精卵各 200 个, 经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转印到硝酸纤维素膜上, 与 p21 一抗 4℃ 孵育过夜, 经 TBS 洗涤后, 再与第二抗体室温孵育 2 h, TTBS 充分冲洗后, 显色观察。

2 结果

2.1 免疫荧光检测小鼠受精卵不同期 p21 细胞的表达定位

[基金项目] 国家“973”重点基础研究发展规划资助项目

(G1999055900-2); 国家自然科学基金重点资助项目 (39730460)

[作者简介] 武迪迪 (1976-), 女, 讲师, 硕士。

△ Corresponding Author's E-mail: yzbio@yahoo.com.cn

结果显示 G1 期 p21 蛋白分布在胞浆中;S 期 p21 蛋白向胞核聚集;G2 期 p21 蛋白则集中分布在细胞核中(图 1)。

3 讨论

对小鼠受精卵早期发育调控的研究集中在对其细胞周期的调控,细胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理状态。细胞周期的调控包括正性调控及负性调控,CKI 是近年来刚分离得到的一类很重要的细胞周期调控负性蛋白,这些蛋白在体外通过与 CDK、cyclin 或 cyclin-CDK 复合物的结合,抑制 CDK 的活性,进而抑制细胞周期的进程。p21 蛋白作为其中重要的一员,在细胞周期调控中所起的作用引起广泛的关注。其第 21-26 及 49-72 氨基酸处分别与 cyclin,CDK 结合,从而使 cyclin-CDK 复合物的激酶活性丧失^[3,4]。另外体外研究表明 p21 通过抑制 cyclinE-cdk2 和 cyclinD1-cdk4 的活性,使 Rb 蛋白不能发生磷酸化,从而使细胞生长停滞,细胞周期停滞在 G1 期^[5]。

p21 蛋白对细胞周期的调控多集中在对其表达的研究,近期研究表明 p21 调控细胞周期的能力还依赖于其细胞定位。蛋白是否在正确的位置表达又能决定其功能能否发挥^[6]。江虹等对 p21 蛋白结构研究表明,p21 蛋白在 N 端存在核定位信号,是核定位蛋白^[7],发挥功能多位于细胞核内。本实验结果显示 p21 蛋白在小鼠受精卵不同期存在定位的改变,这种定位的改变影响了 p21 蛋白正常功能的发挥,因而影响了小鼠受精卵的早期发育。但其蛋白入核机制有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] HOGAN B,COSTANTINI F,LACYO E. Manipulating the mouse embryo [M]. New York :Cold Spring Laboratory,1986:89-108.
- [2] 范衡宇,佟超,李满玉,等.用激光共聚焦显微术在小鼠卵母细胞中检测蛋白激酶 C [J]. 生物化学与生物物理进展,2001,28(6):900-903.
- [3] LIN J,REICHNER C,WU X,et al. Analysis of wild-type and mutant p21WAF-1 gene activities [J]. Mol Cell Biol,1996,16(4):1786-1793.
- [4] NAKANISHI M,ROBETORVE RS,ADAMI GR,et al. Identification of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21Sdi1/CIP1/WAF1 [J]. EMBO J,1995,14(3):555-563.
- [5] NICULESCU AB,CHEN X,SMEETS M,et al. Effects of p21 Cip1/Waf1 regulates both the G1/S and G2/M cell cycle phase transitions:pRb as a critical determinant of p21 function [J]. Mol Cell Biol,1998,18(1):629-643.
- [6] DULIC V,STEIN GH,FAR DF,et al. Nuclear accumulation of p21cip1 at the onset of mitosis;a role at the G2/M-phase transition [J]. Mol Cell Biol,1998,18(1):546-557.
- [7] 江虹,王永潮.哺乳类细胞中周期蛋白依赖激酶抑制因子 [J]. 生理科学进展,1996,27(2):107-112.

[收稿日期] 2006-06-08

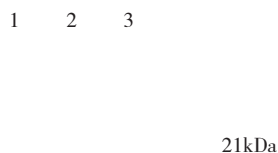
A:G1 期;B:S 期;C:G2 期

图 1 小鼠受精卵不同期 p21 蛋白的表达定位

Fig.1 Localization of p21 protein in different phases of mouse fertilized eggs

2.2 Western blotting 检测小鼠受精卵不同期 p21 蛋白表达

p21 蛋白的表达在 G1,S,G2 期均无明显差异(图 2)。



1:G1 期;2:S 期;3:G2 期

图 2 小鼠受精卵不同期 p21 蛋白的表达

Fig.2 Expression of p21 protein in different phases of mouse fertilized eggs