

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00927

针对核质运输的高通量小分子筛选方法

罗敏¹, 张全仓², 卢智刚²

1. 广东省深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055;
2. 北京大学深圳研究生院, 深圳 518055

摘要: 核质运输是真核细胞的重大基本生命活动。核质运输小分子抑制剂不仅可以广泛应用并促进核质运输相关的基础研究, 同时也为相关疾病、尤其是病毒性疾病的药物开发提供有利线索。然而, 目前针对核质运输的商业化小分子仅有 Leptomycin B 一种。建立一个针对整个核质运输通路的小分子筛选平台, 将有利于筛选与获得多种干扰核质运输的小分子。文章利用 NZGFP 和 CZGFP 可以重组为具有荧光 GFP 的特性, 构建 NZGFP-NES 和 CZGFP-NLS, 将 NZGFP 和 CZGFP 分别定位在细胞质与细胞核中; 当核内运或核外运通路被干扰, NZGFP 和 CZGFP 定位发生改变并聚集重组为具有荧光的 GFP。该方法可以有效检测核外运小分子抑制剂 Leptomycin B 的作用, 为针对整个核质运输通路的高通量小分子筛选提供了一个有效平台。

关键词: 核质运输; 高通量筛选方法; NZGFP/CZGFP; Leptomycin B

An efficient high-throughput screening assay against nuclear transport

LUO Min¹, ZHANG Quan-Cang², LU Zhi-Gang²

1. Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518055, China;
2. Shenzhen Graduate School of Peking University, Shenzhen 518055, China

Abstract: Nuclear transport, an essential cellular process of eukaryotic cells, plays critical roles in differentiation, development, as well as viral disease and oncogenesis, making the small molecules that target this process very intriguing not only in fundamental research but also in disease treatment. However, only one compound, Leptomycin B, is commercially available to inhibit nuclear transport. Therefore, it will be a great advantage to establish an assay that targets the whole nuclear transport pathway for screening and obtaining small molecule that regulates nuclear transport. In this study, we established an efficient nuclear transport assay based on the reconstitution of GFP by NZGFP and CZGFP. We constructed NZGFP-NES and CZGFP-NLS, making them locate in cytoplasm and nucleus separately. Their distribution will be changed when nuclear transport is interfered, resulting in co-localization of NZGFP-NES and CZGFP-NLS and subsequent reconstitution of fluorescent GFP. The inhibiting effect of Leptomycin B on nuclear transport can be sensitively detected by NZGFP-NES/CZGFP-NLS report system, providing an efficient assay for high-throughput screening of small molecule

收稿日期: 2012-05-14; 修回日期: 2012-05-28

基金项目: 深圳市科技计划项目(编号: JC201005260239A)资助

作者简介: 罗敏, 博士, 副教授, 研究方向: 病原生物学。Tel: 0755-86580919; E-mail: luomin4653@163.net

通讯作者: 卢智刚, 博士, 副教授, 研究方向: 细胞生物学。Tel: 0755-26032949; E-mail: zhglu@yahoo.com

网络出版时间: 2012-6-28 10:36:33

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120628.1036.001.html>

against nuclear transport.

Keywords: nuclear transport; high-throughput screening assay; NZGFP/CZGFP; Leptomycin B

核质运输是细胞核与细胞质之间蛋白质等生物分子进行主动运输的过程,是真核细胞的重大基本生命活动,在正常组织发育、病毒感染以及癌症发生等过程中具有重要作用^[1-4]。例如在病毒感染宿主细胞的过程中,病毒蛋白需要进入细胞核或出核,促进病毒DNA复制、整合或诱导特异基因转录,以完成病毒复制或逃避宿主免疫攻击等,故此,相关蛋白的核质运输也被视为抗病毒药物开发的一个重要药物靶点^[2,5-7]。

核质运输分为两种:核内运与核外运。分子量大于 45 kDa的蛋白进入细胞核需要其含有特异的核定位信号序列(Nuclear localization signal, NLS)。核定位信号被内运蛋白(Importin)识别后介导蛋白进入细胞核^[8,9]。介导方式有两种:一种为NLS被Importin α/β 复合体中的Importin α 识别后,在Importin β 的介导下进行转运;另一种不依赖Importin α , 由Importin β 或其他Importin蛋白自身完成识别与介导。无论哪种情况,Importin-NLS复合物进入细胞核后都在RanGTP酶的作用下发生解离,释放出NLS蛋白^[1,8]。核外运的过程与此类似,需要蛋白含有特异的核外运信号(Nuclear export signal, NES),在外运蛋白(Exportin)的介导下转运出细胞核,最为常见的外运蛋白是Crm-1^[1,4]。

核质运输小分子抑制剂不仅可以广泛应用于核质运输相关的基础研究,同时也为相关疾病、尤其是病毒性疾病的药物开发提供有利线索。然而,目前针对核质运输的商业化小分子仅有Leptomycin B一种,该小分子是外运蛋白Crm-1的特异性抑制剂。另外报道的几种小分子,如ratjadone、短肽抑制剂以及其他几种天然产物小分子等,其作用靶点均为Crm-1,并且作用效果低于Leptomycin B^[5-7,10,11]。最近,Wagstaff等^[12,13]发现几种小分子可以特异性抑制HIV整合酶与Importin α/β 的结合,并抑制HIV整合酶进入细胞核,但其作用机制以及其是否抑制Importin α/β 介导的核内运通路并不清楚。之前研究所利用的平台作用靶点过于单一,只针对Crm-1或

Importin α/β 与其感兴趣的蛋白的结合。鉴于目前核质运输相关小分子的稀缺,建立一个针对整个核质运输通路的小分子筛选平台,将有利于筛选与获得多种干扰核质运输的小分子。

本研究利用NZGFP和CZGFP可以重组为具有荧光GFP的特性^[14],构建NZGFP-NES和CZGFP-NLS,将NZGFP和CZGFP分别定位在细胞质与细胞核中;当核内运或核外运通路被干扰,NZGFP和CZGFP定位发生改变并聚集重组为具有荧光的高通量小分子筛选提供了一个有效平台。

1 材料和方法

1.1 质粒构建

利用表1所列的引物(利用Primer5软件设计,上海生工生物工程技术有限公司合成),以pEGFP-C2(Clontech公司)为模板扩增NGFP与CGFP片段,其中NGFP通过Hind III/BamHI、CGFP通过Hind III/XhoI酶切后分别连入pcDNA3.1-puro(Addgene)和pcDNA3.1(Invitrogen公司)载体,测序正确,获得pcDNA3.1-puro-NGFP和pcDNA3.1-CGFP。

为将亮氨酸拉链(Leucinezipper)引入NGFP与CGFP中,我们合成拉链结构的正反链oligo(表1);分别取100 $\mu\text{mol/L}$ 的oligo 22.5 μL ,加入5 μL 10 \times Annealing Buffer(1 mol/L NaCl, 100 mmol/L Tris, pH7.4),利用PCR仪梯度降温进行复性(95 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$, 2 min/);将复性产物用0.5 \times Annealing Buffer稀释100倍后,取3 μL 与50 ng酶切回收后的载体进行连接(其中pcDNA3.1-puro-NGFP利用BamHI/XhoI酶切,pcDNA3.1-CGFP利用Hind III/BamHI酶切),测序正确,获得pcDNA3.1-puro-NZGFP和pcDNA3.1-CZGFP。

利用同样的复性方法,将NES和NLS序列(表1)通过EcoRI/XhoI位点分别连入NZGFP和CZGFP载体中,测序正确,获得pcDNA3.1-puro-NZGFP-NES和pcDNA3.1-CZGFP-NLS。

表 1 引物及 oligo 序列

名称	序列(5'→3')	备注
NGFP-For	CTTAAGCTTGCCACCATGGCCAGCAAGGGCGAGG	扩增 NGFP
NGFP-Rev	GCCGGATCCACCCTGCTTGTCGGCCATGATATAG	
NES-oligo-For	ATCGGAGGATCTGGATCTGGAATGAACAGCAATGAATTAGCCTTAAAAAC TAGCAGGCCTTGATATCAACAAGACAGAATGAC	PKI 基因的 NES 序列合成
NES-oligo-Rev	TCGAGTCATTCTGTCTTGTGATATCAAGGCCTGCTAGTTTTAAGGCTAA TTCATTGCTGTTTCATCCAGATCCAGATCCTCCGAT	
NLZ-oligo-For	GATCCGGCAGCGGCGCACTCAAGAAGGAGCTGCAAGCCAACAAAAAG GAACTGGCCCAGCTGAAATGGGAAGTGCAGGCTCTGAAAAAAGAGCTC GCCAGGATATCTGAC	NZGFP 中亮氨酸拉链的序列合成
NLZ-oligo-Rev	TCGAGTCAGATATCCTGGGCGAGCTCTTTTTTTCAGAGCCTGCAGTTCCC ATTTTCAGCTGGGCCAGTTCTTTTTTGTGGCTTGCAGCTCCTTCTTGAGT GCGCCGCTGCCG	
CGFP-For1	GCCAGCGCGGATCCGGCAAGAACGGCATCAAGGTG	扩增 CGFP
CGFP-For2	CTTAAGCTTGCCACCATGGCCAGCGGCGGATCCGGC	
CGFP-Rev	AGACTCGAGTCAGATATCGTTGTACAGCTCGTCCAT	
NLS-oligo-For	ATCGGTGGATCTGGCAGCGGCCCTAAGAAGAAAAGGAAGGTGTGAC	SV40 基因的 NLS 序列合成
NLS-oligo-Rev	TCGAGTCACACCTTCTTTTCTTCTTAGGGCCGCTGCCAGATCCACCGAT	
CLZ-oligo-For	AGCTTGCCACCATGGCCAGCGAGCAACTGGAAAAAAGTGCAGGCC TGGAGAAGAAGCTGGCGCAGCTGGAGTGGAAAGAACCAAGCCCTCGAA AAGAAACTGGCCCAGGGCG	CZGFP 中亮氨酸拉链的序列合成
CLZ-oligo-Rev	GATCCGCCCTGGGCGAGTTCTTTTTCGAGGGCTTGGTTCTTCCACTCCA GCTGCGCCAGCTTCTTCTCCAGGGCTGCAGCTTTTTTTCCAGTTGCTC GCTGGCCATGGTGGCA	
NES-Red-oligo-For	TCGACGATGAACAGCAATGAATTAGCCTTAAAACTAGCAGGCCTTGATA TCAACAAGACAGAACGG	PKI 的 NES 序列, 构建 NES-DsRed
NES-Red-oligo Rev	GATCCCCTTCTGTCTTGTGATATCAAGGCCTGCTAGTTTTAAGGCTAAT TCATTGCTGTTTCATCG	

利用同样的复性方法, 将 NES 序列(表 1)通过 *Sal* /*Bam*H 位点连入 DsRed-N1(Clontech 公司)载体中, 测序正确, 获得 NES-DsRed-N1。

1.2 细胞培养、转染、稳定细胞系的构建及 Leptomycin B 药物处理

HeLa 细胞在 DMEM 培养基(DMEM 高糖, 10% 胎牛血清, 1%双抗, 1%谷氨酰胺)中培养。

DNA 转染及稳定细胞系筛选: 质粒 DNA 利用 Qiagen 质粒提取试剂盒纯化; HeLa 细胞培养在 3.5 cm 平皿中至 80%~90%密度, 转染前 1 h 换液, 取 2 μ g DNA 利用 Lipofectamine(Invitrogen 公司)进行转染, 6 h 后换液, 24~48 h 时利用荧光显微镜(Zeiss)进行荧光观察; 为筛选稳定表达 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 的细胞系, 质粒 DNA 经 *Mlu* 酶切线性化后, 利用 lipofectamine 转染 HeLa 细胞, 转染 24 h 后, 换液为药物筛选培养基(G418: 终浓度 300 ng/mL; Puromycin: 终浓度 1 μ g/mL)筛选 7~10 d。

Leptomycin B 药物处理: 在细胞培养基中加入终浓度 6 ng/mL 的 Leptomycin B 处理 3 h, 立即进行荧光观察或流式细胞分析。

1.3 细胞质与细胞核的分离及 Western blotting

细胞用 PBS 洗一遍后, 置于低渗溶液 (10 mmol/LHepes, pH 7.4, 10 mmol/L MgCl₂, 42 mmol/L KCl, 10 mmol/L lactacystin)进行细胞裂解 10 min, 利用匀浆器在冰上破碎细胞; 600 r/min、4 离心 10 min, 上清和沉淀分别为细胞质和细胞核的粗提物; 将细胞质粗提物继续 100 000 r/min、4 离心 90 min, 取上清即为纯化的细胞质组分; 将细胞核粗提物继续利用低渗溶液处理 10 min, 然后置于 2 mol/L蔗糖垫上, 150 000 r/min离心 60 min, 沉淀即为纯化的细胞核组分。

Western blotting: 蛋白样品利用 6%~15%梯度 SDS-PAGE 胶进行电泳后, 半干转印至硝酸纤维素膜上; 取转印膜利用 5%脱脂奶粉-TTBS 室温封闭 1

h后, 与一抗(抗 GFP 多克隆抗体, 抗 Lamin B1 抗体, 均购自 Santa Cruz 公司)孵育 1 h, TTBS 换洗 3 次, 10 min/次, 继而与 HRP 偶联的二抗(Santa Cruz 公司)孵育 1 h, TTBS 换洗 3 次, 10 min/次, 利用 HRP 底物(Pierce 公司)和 X 光片进行曝光和显影。

1.4 多功能酶标仪检测及流式细胞检测

细胞培养在 96 孔白板中, 药物处理后利用多功能酶标仪(TECAN infinite 200)读取 GFP 荧光值, 继而利用 MTT 试剂盒(Promega 公司)检测孔板中的细胞数量, 将 GFP 荧光值除以细胞数量, 获得标准 GFP 荧光值。

细胞经胰酶(Invitrogen 公司)消化后, PBS 洗涤一次, 重悬于含 2%胎牛血清的 PBS 中; 上样前加入终浓度 $1\mu\text{mol/L}$ 的 PI(Sigma 公司), 利用流式细胞仪进行流式分析(FACS Calibur, BD)。

2 结果与分析

绿色荧光蛋白 GFP 可以拆分成两段, N-GFP 和 C-GFP; 分别在 N-GFP 和 C-GFP 的 C 端接上亮氨酸拉链(Leucine Zipper)形成 NZGFP 和 CZGFP; 在细胞中单独表达 NZGFP 或 CZGFP 均没有荧光, 然而两者共

表达后, NZGFP 和 CZGFP 可以在细胞内重组成具有荧光的 GFP^[14](图 1A)。

故此, 我们拟利用该特性, 构建 NZGFP-NES 和 CZGFP-NLS, 使 NZGFP 和 CZGFP 分别定位在细胞质与细胞核中; 当核内运或核外运通路被干扰, NZGFP 和 CZGFP 定位发生改变并聚集重组为具有荧光的 GFP(图 1B)。

2.1 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系的建立

为建立和验证以上模型, 首先构建 NZGFP 和 CZGFP。即首先构建 C-GFP 和 N-GFP, 再将亮氨酸拉链(Leucine zipper)利用正反链 DNA 复性方法分别连入 C-GFP 和 N-GFP, 构建成 CZGFP 和 NZGFP(图 2A)。将 NZGFP 和 CZGFP 共转入 HeLa 细胞, 结果与报道一致, 细胞可以观察到绿色荧光(图 2B), 表明所构建的 NZGFP 与 CZGFP 可以有效重组为完整的 GFP。

继而, 我们在 NZGFP 和 CZGFP 的基础上构建 CZGFP-NLS 和 NZGFP-NES, 其中 NLS 为 SV40T 的核定位信号序列, 而 NES 为 PKI 的核外运信号序列。利用同样的正反链 DNA 复性后连接的方法, 分别将核定位信号(NLS)和核外运信号(NES)连接在

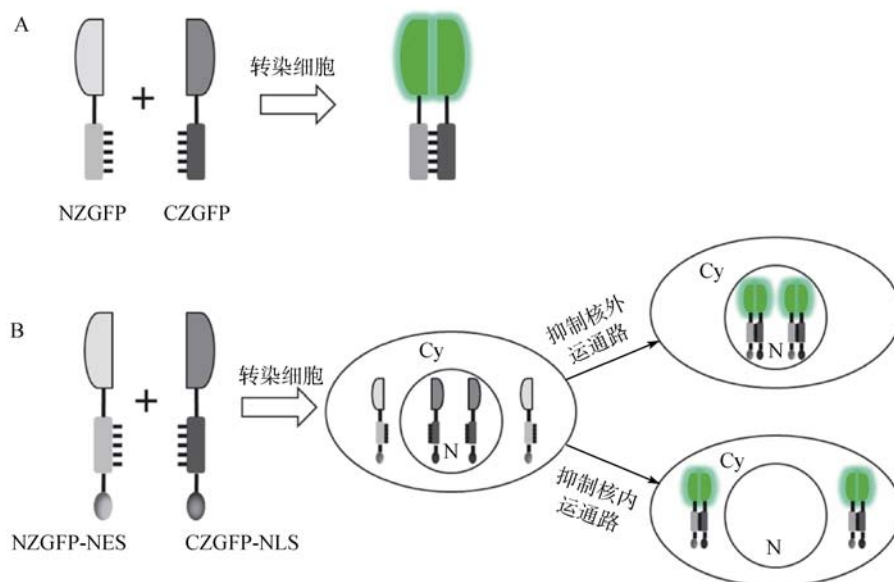


图 1 核质运输检测体系的策略示意图

A: GFP 的两个片段在分别连接上亮氨酸拉链后, 形成 NZGFP 和 CZGFP, 二者在亮氨酸拉链的作用下结合并重组成具有荧光的完整 GFP^[14]; B: 在 CZGFP 和 NZGFP 的末端分别连接核内运信号(NLS)和核外运信号(NES), 形成 CZGFP-NLS 和 NZGFP-NES, 二者由于 NLS 和 NES 的作用分别定位在细胞核与细胞质中, 故此不能发生重组; 当核质运输途径被抑制后, 将导致 CZGFP-NLS 出核或 NZGFP-NES 入核, 进而二者发生结合并重组为有荧光的完整 GFP。

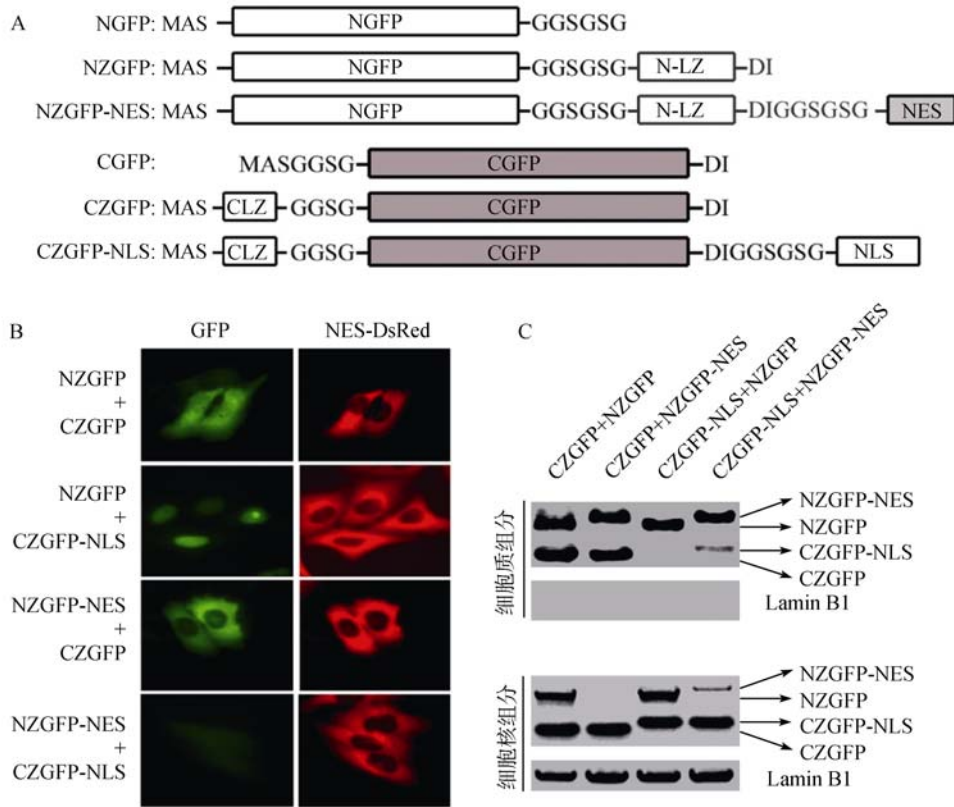


图 2 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系的建立

A : NGFP 及 CGFP 系列衍生物的结构示意图, 相关氨基酸序列见表 2; B : 将 NZGFP、NZGFP-NES 分别与 CZGFP 和 CZGFP-NLS 转染 HeLa 细胞, 24~36 h 在荧光显微镜下观察; 转染时同时共转 NES-DsRed, 作为细胞质参照; C : 将 B 中共转的细胞分别提取细胞质与细胞核组分, 电泳后利用 GFP 抗体进行 Western blotting 检测; Lamin B1 只存在于细胞核中, 在实验中作为对照, 检测是否存在核质污染。

表 2 CZGFP-NLS 及 NZGFP-NES 中相关元件的氨基酸序列

名称	氨基酸序列	备注
CGFP	MASGGSGKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQNTPIGDGPVLLPDNHLYS TQSALSKDPNEKRDMVLLFVTAAGITLGMDELYN	CGFP 的氨基酸序列
C-LZ	EQLEKKLQALEKKLAQLEWKNQALEKKLAQ	CZGFP 的亮氨酸拉链的氨基酸序列
NLS	PKKKRKV	CZGFP-NLS 中的 NLS 氨基酸序列, 来源于 SV40 基因
NGFP	KGEELFTGVVPIVLELDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPV PWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFKSAWPEGYVQERTIFFKDDGNY KTRAEVKFEQDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNVSHNVYIMADKQ	NGFP 的氨基酸序列
N-LZ	ALKKELQANKKELAQLEWKNQALEKKLAQ	NZGFP 中的亮氨酸拉链的氨基酸序列
NES	NSNELALKLAGLDINKTE	NZGFP-NES 中的 NES 氨基酸序列, 来源于 PKI 基因

CZGFP 和 NZGFP 的 C 端, 构建出 CZGFP-NLS 和 NZGFP-NES(图 2A)。

将 CZGFP-NLS、NZGFP-NES、NZGFP 和 CZGFP 按不同排列组合转染 HeLa 细胞, 结果显示共表达 CZGFP-NLS 和 NZGFP 的细胞中, 绿色荧光仅出现在细胞核中; 共表达 CZGFP 和 NZGFP-NES 的细胞中, 绿色荧光出现在细胞质中; 共表达 CZGFP-NLS

和 NZGFP-NES 细胞中, 含绿色荧光的细胞比例明显减少, 绿色荧光在细胞质与细胞核中均有分布, 但荧光强度明显偏弱(图 2B)。为进一步证明观察到的荧光与重组 GFP 定位的一致性, 分离这些细胞的细胞核与细胞质进行 Western blotting 检测, 结果显示共表达 CZGFP-NLS/NZGFP-NES 的细胞中, 大部分 CZGFP-NLS 和 NZGFP-NES 蛋白仍然分别定位在

细胞核与细胞质中，只有少部分蛋白发生异位，与荧光结果一致(图 2C)。以上结果表明，核定位信号

NLS 与核外运信号 NES 可以将 GFP 的两个片段有效地定位在不同的细胞区域中。

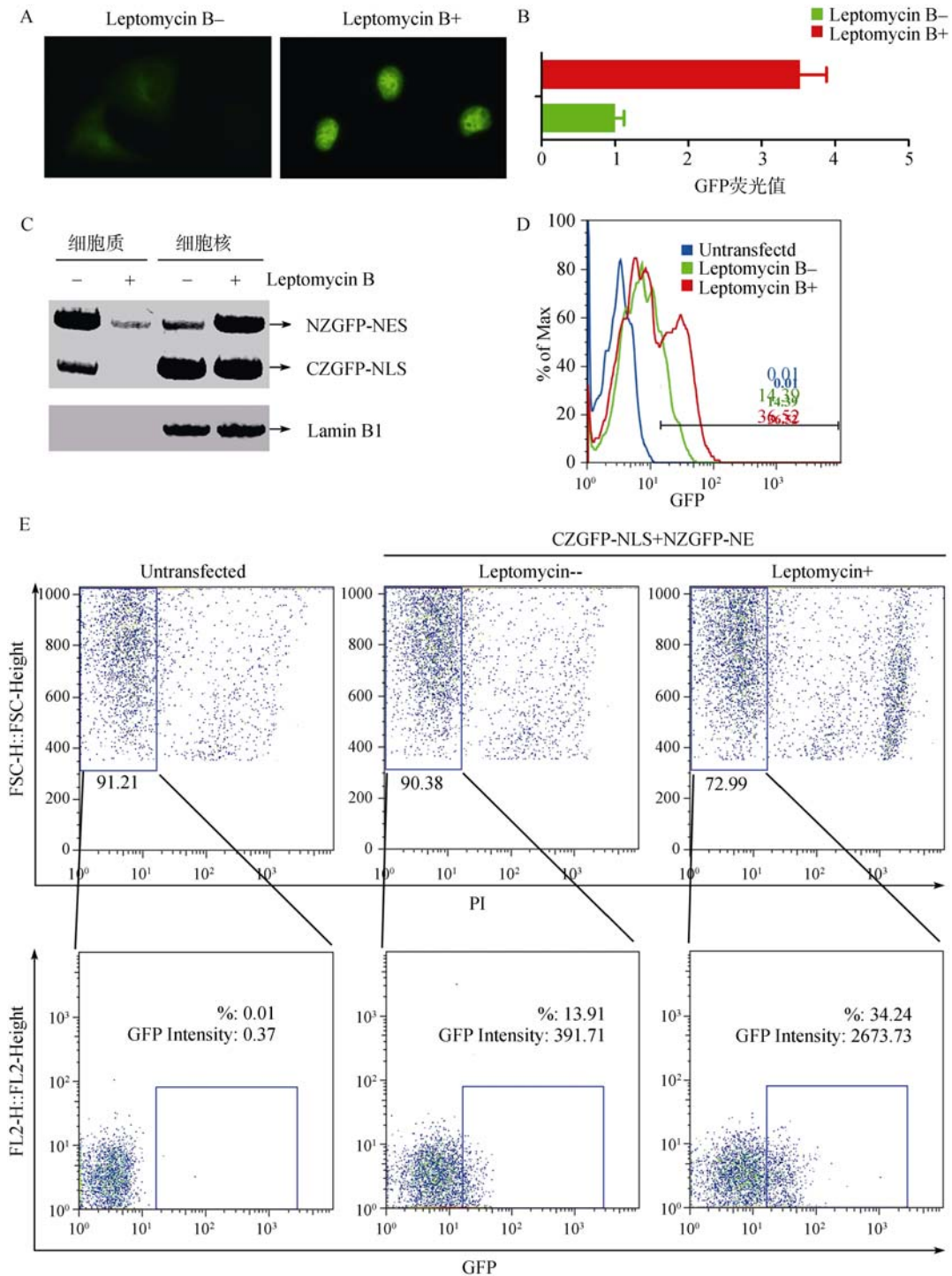


图 3 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系可以有效检测 Leptomycin B 针对核外运的抑制效果

A : Leptomycin B 处理前与处理 3h 后，同一视野下的细胞荧光观察结果；B : 利用多功能酶标仪检测 Leptomycin B 处理前与处理 3h 后的 GFP 荧光值变化；C : 收集 Leptomycin B 处理前与处理 3h 后的细胞，分离其细胞质与细胞核组分，并利用抗 GFP 抗体进行 Western blotting 检测，Lamin B1 作为检测是否存在核质污染的对照；D、E : 收集 Leptomycin B 处理前与处理 3h 后的细胞进行流式细胞检测，选取 PI 阴性细胞进行 GFP 分析，其中 D 为点状图，E 为峰形图。

2.2 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系可以有效检测核外运通路抑制剂 Leptomycin B 的抑制效果

为检测该体系是否可以用于筛选核质运输的小分子, 将 CZGFP-NLS 和 NZGFP-NES 共转至 HeLa 细胞中, 利用 G418 和嘌呤霉素(Puromycin)筛选获得稳定表达这两个基因的细胞系。其中约有 15% 的细胞可以观察到微弱 GFP 荧光, 并主要呈全细胞分布(图 3A)。利用核外运通路抑制剂 Leptomycin B 对细胞进行处理, 可以观察到细胞 GFP 荧光强度增强, 并聚集在细胞核中; 另外, 处理前检测不到 GFP 荧光的细胞在 Leptomycin B 处理后可以观察到明显的 GFP 荧光(图 3A), 利用多功能酶标仪, 发现 LeptomycinB 处理后 GFP 荧光值上升至约 3.5 倍(图 3B), 表明有新的 GFP 被重组产生。同时, 分离这些细胞的细胞核与细胞质组分进行 Western blotting 检测, 结果显示 Leptomycin B 处理后, 定位在细胞质中的 NZGFP-NES 大量聚集到细胞核中(图 3C)。以上结果表明, Leptomycin B 抑制 NZGFP-NES 的出核, 使其聚集在细胞核中与 CZGFP-NLS 重组产生新的 GFP。

为进一步对 Leptomycin B 的抑制效果进行量化, 我们对 Leptomycin B 处理前后的细胞进行流式细胞分析。由于 Leptomycin B 可以诱导一定程度的细胞死亡, 为排除死细胞的干扰, 对细胞进行 PI 染色, 并选取 PI 阴性细胞进行 GFP 重组分析。结果发现 Leptomycin B 处理后, GFP 阳性细胞由~14%增加至~34%, 而 GFP 阳性细胞的 GFP 荧光强度则增加至 6 倍多(图 3 : D, E)。以上结果显示 Leptomycin B 抑制 NZGFP-NES 的出核, 导致 NZGFP-NES 聚集在细胞核中并与 CZGFP-NLS 进行有效重组形成完整的 GFP, 表明 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系能有效检测 Leptomycin B 的抑制核外运的作用。

3 讨论

核质运输是真核细胞的重大基本生命活动, 在正常组织发育、病毒感染以及癌症发生等过程中具有重要作用^[1-4]。利用小分子化合物抑制核内运或核外运不仅对研究核质运输相关机制具有重要意义, 同时也为相关疾病的治疗提供理论基础^[2, 5, 7]。然而目前针对核质运输的商业化小分子抑制剂仅有 LeptomycinB 一种, 且只针对核外运通路。其中一个

重要原因是缺乏有效检测核质运输平台的平台。以往的检测平台利用体外蛋白结合实验, 如 Importin α/β 与 NLS 蛋白的结合, 对小分子进行筛选, 靶点单一, 而在体内的效果也需要进一步的测试, 所获得的小分子往往只抑制特异检测蛋白的核质运输^[12, 13]。本研究所建立的 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系直接在细胞体内进行测试, 并且其靶点针对整个核质运输通路, 包括核内运和核外运。另外, 当发现阳性小分子后, 可以直接通过荧光观察 GFP 出现在核内还是核外以鉴定小分子是作用在核外运通路还是核内运通路。

我们利用 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系对 Leptomycin B 进行检测, 发现 Leptomycin B 处理后, GFP 阳性细胞由~14%增加至~34%, 而 GFP 阳性细胞的 GFP 荧光强度则增加至 6 倍; 表明干扰核质运输途径后, NZGFP-NES 或 CZGFP-NLS 的定位发生变化, 导致二者聚集在一起重组产生新的 GFP 荧光; 这同时也证明, 利用 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 检测核质运输的策略是有效地。在核质运输途径未被干扰的情况下, 表达 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 的细胞中约有 15% 可以观察到微弱的 GFP 荧光, 这很有可能是因为在细胞分裂过程中, 核膜崩解导致 NZGFP-NES 和 CZGFP-NLS 聚集在一起发生 GFP 的重组, 而分裂完成之后, 重组 GFP 在 NLS 与 NES 的作用下发生解离, 但仍有部分未发生解离, 导致背景荧光的出现。由于未解离的重组 GFP 同时含有 NLS 与 NES, 这些 GFP 荧光呈全细胞分布, 这与 Western blotting 的结果也一致。

在细胞中单独表达 NLS-GFP 或 NES-GFP 也可以检测核质运输途径的小分子作用效果, 但只能通过荧光显微镜观察 GFP 的定位变化。而 NZGFP-NES/CZGFP-NLS 体系所检测的不仅仅是荧光定位所发生的变化, 同时也包含了 GFP 荧光的增加, 使其可以利用流式细胞仪或多功能酶标仪进行高通量检测。由于许多小分子引起细胞死亡, 导致核膜破裂致使 NZGFP 和 CZGFP 发生接触和 GFP 重组, 而多功能酶标仪方法难以区分 GFP 荧光的来源, 流式细胞分析则可以通过 PI 染色去除死细胞的干扰, 故此更为准确和灵敏。

综上所述, 本研究依据 NZGFP 和 CZGFP 可以重组为具有荧光 GFP 的特性, 构建基于 NZGFP-

NES/CZGFP-NLS 的核质运输检测体系, 正常状态下 NZGFP 和 CZGFP 分别定位在细胞质与细胞核中, 不具有荧光; 当核内运或核外运通路被干扰, NZGFP 和 CZGFP 定位发生改变并聚集重组, 发出荧光。通过对已知核外运小分子抑制剂 LeptomycinB 的检测, 此广谱性核质运输小分子的筛选平台准确有效, 对该系统的改进和小分子的高通量筛选还有待进一步的研究和探索。

参考文献(References):

- [1] Dasso M. Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell*, 2001, 104(3): 321–324. [DOI](#)
- [2] Gademann K. Controlling protein transport by small molecules. *Curr Drug Targets*, 2011, 12(11): 1574–1580. [DOI](#)
- [3] Hogarth CA, Calanni S, Jans DA, Loveland KL. Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev Dyn*, 2006, 235(1): 253–262. [DOI](#)
- [4] Terry LJ, Shows EB, Wentz SR. Crossing the nuclear envelope: hierarchical regulation of nucleocytoplasmic transport. *Science*, 2007, 318(5855): 1412–1416. [DOI](#)
- [5] Flint SJ, Huang W, Goodhouse J, Kyin S. A peptide inhibitor of exportin1 blocks shuttling of the adenoviral E1B 55 kDa protein but not export of viral late mRNAs. *Virology*, 2005, 337(1): 7–17. [DOI](#)
- [6] Kau TR, Schroeder F, Ramaswamy S, Wojciechowski CL, Zhao JJ, Roberts TM, Clardy J, Sellers WR, Silver PA. A chemical genetic screen identifies inhibitors of regulated nuclear export of a Forkhead transcription factor in PTEN-deficient tumor cells. *Cancer Cell*, 2003, 4(6): 463–47. [DOI](#)
- [7] Kau TR, Way JC, Silver PA. Nuclear transport and cancer: from mechanism to intervention. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(2): 106–117. [DOI](#)
- [8] de Strambio-Castilla C, Niepel M, Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(7): 490–501. [DOI](#)
- [9] Goldfarb DS, Corbett AH, Mason DA, Harreman MT, Adam SA. Importin α : a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol*, 2004, 14(9): 505–514. [DOI](#)
- [10] Meissner T, Krause E, Vinkemeier U. Ratjadone and leptomycin B block CRM1-dependent nuclear export by identical mechanisms. *FEBS Lett*, 2004, 576(1–2): 27–30. [DOI](#)
- [11] Mutka SC, Yang WQ, Dong SD, Ward SL, Craig DA, Timmermans PB, Murli S. Identification of nuclear export inhibitors with potent anticancer activity *in vivo*. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 510–517. [DOI](#)
- [12] Wagstaff KM, Sivakumaran H, Heaton SM, Harrich D, Jans DA. Ivermectin is a specific inhibitor of importin α/β -mediated nuclear import able to inhibit replication of HIV-1 and dengue virus. *Biochem J*, 2012, 443(3): 851–856. [DOI](#)
- [13] Wagstaff KM, Rawlinson SM, Hearps AC, Jans DA. An AlphaScreen(R)-based assay for high-throughput screening for specific inhibitors of nuclear import. *J Biomol Screen*, 2012, 16(2): 192–200. [DOI](#)
- [14] Ghosh I, Hamilton AD, Regan L. Antiparallel leucine zipper-directed protein reassembly: Application to the green fluorescent protein. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 5658–5659. [DOI](#)

•综合信息•

《遗传学报》(JGG)2011年 JCR 影响因子达到 1.883

2012年6月 Thomson Reuters 发布的 2011 年度 JCR 数据显示,《遗传学报》(Journal of Genetics and Genomics, JGG) 最新影响因子达到了 1.883, 比 2010 年的 1.494 提升了 26%, 在 157 种遗传学期刊中的排名由 2010 年的 120 位上升到 104 位。在中国大陆 SCI 期刊中的排名已上升到第 13 位。

近年来,在主办单位的大力支持下,在全体编委和编辑部的共同努力下, JGG 在内容和形式上不断改革,学术质量和国际影响力显著提升,办刊工作取得了长足的进步。值此,谨向一直关心、支持 JGG 发展的有关领导、编委、审者、作者及读者表示衷心的感谢!

