

引用格式:

张丽萌, 李闰婷, 聂晓宁, 李玉华, 刘爱菊, 邢真真, 聂文营, 马润林, 王林青, 陈龙欣. 酵母双杂交技术筛选与绵羊微管解聚蛋白相互作用的蛋白[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(2): 201–207.

ZHANG L M, LI R T, NIE X N, LI Y H, LIU A J, XING Z Z, NIE W Y, MA R L, WANG L Q, CHEN L X. Screening of the proteins interacting with sheep stathmin by the yeast two-hybrid technology[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(2): 201–207.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



酵母双杂交技术筛选与绵羊微管解聚蛋白相互作用的蛋白

张丽萌¹, 李闰婷¹, 聂晓宁¹, 李玉华¹, 刘爱菊², 邢真真¹,

聂文营³, 马润林^{1*}, 王林青^{1*}, 陈龙欣^{1*}

(1.郑州师范学院生命科学学院, 河南 郑州 450044; 2.河北农业大学动物科技学院, 河北 保定 071000; 3.吉林医药学院检验学院, 吉林 吉林 132013)

摘 要: 采用 TRIzol 法提取绵羊卵巢组织总 RNA, 运用 RT-PCR 技术扩增绵羊微管解聚蛋白基因(*STMN1*)的编码区序列; 通过同源重组技术构建重组诱饵表达载体 pGBKT7-STMN1, 鉴定该诱饵蛋白在酵母双杂交系统中的自激活活性、细胞毒性和表达情况; 利用诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 从绵羊卵巢组织细胞的酵母双杂交 cDNA 文库筛选互作的宿主蛋白。结果显示: 成功构建重组诱饵质粒 pGBKT7-STMN1, 并对酵母细胞无自激活活性和细胞毒性作用, 且能在酵母细胞中正常表达; 筛选获得 12 个与 STMN1 相互作用的克隆, 经测序比对分析和点对点验证, 得到 CREB 和 FOXM1 共 2 个互作的宿主蛋白, 这 2 个蛋白可能参与调控细胞的增殖、周期、凋亡等过程。

关 键 词: 绵羊; 微管解聚蛋白(*STMN1*); 诱饵载体; cDNA 文库; 酵母双杂交; 互作蛋白

中图分类号: S826.3

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)02-0201-07

Screening of the proteins interacting with sheep stathmin by the yeast two-hybrid technology

ZHANG Limeng¹, LI Runtong¹, NIE Xiaoning¹, LI Yuhua¹, LIU Aiju², XING Zhenzhen¹,

NIE Wenying³, MA Runlin^{1*}, WANG Linqing^{1*}, CHEN Longxin^{1*}

(1.School of Life Science, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou, Henan 450044, China; 2.College of Animal Science and Technology, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China; 3.Academy of Laboratory, Jilin Medical University, Jilin, Jilin 132013, China)

Abstract: The total RNA was extracted from sheep ovarian tissue by TRIzol method, and the coding region sequence of *STMN1* gene was amplified by RT-PCR. The recombinant bait expression vector pGBKT7-STMN1 was constructed by homologous recombination technology, and the self-activation activity, cytotoxicity and expression of the bait protein in yeast two-hybrid system were determined. Screening of the interacting host proteins was performed from the yeast two-hybrid cDNA library of sheep ovarian tissue cells with the bait plasmid pGBKT7-STMN1. The results showed that the plasmid pGBKT7-STMN1 was successfully constructed in the study, and had no self-activation activity and cytotoxicity to yeast cells, and could be normally expressed in yeast cells. Totally, 12 clones interacting with STMN1

收稿日期: 2020-10-30

修回日期: 2022-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(32071447); 河南省高等学校重点科研项目(21A180027); 河南省自然科学基金项目(202300410509); 河南省科技攻关项目(222102110421); 郑州师范学院大学生科研创新基金项目(2021013)

作者简介: 张丽萌(1988—), 女, 河南郑州人, 博士, 讲师, 主要从事动物胚胎工程及动物繁殖调控的研究, zlmklmyt@163.com; *通信作者, 马润林, 博士, 研究员, 主要从事动物遗传与发育的研究, rlma@ucas.ac.cn; *通信作者, 王林青, 博士, 副教授, 主要从事动物生殖免疫的研究, wanglqtsing@163.com; *通信作者, 陈龙欣, 博士, 副教授, 主要从事动物免疫学的研究, chen_longxin@163.com

were screened out, and the sequencing analysis and point-to-point revealed the two interacting proteins, CREB and FOXM1, which may be involved in the regulation of cell proliferation, cycle and apoptosis.

Keywords: sheep; stathmin(STMN1); bait plasmid; cDNA library; yeast two-hybrid; interacting protein

中国农业部印发的《全国草食畜牧业规划(2016—2020 年)》^[1]和《全国节粮型畜牧业发展规划(2011—2020 年)》明确提出,提高母羊繁殖力将作为中国养羊业发展模式成功转型和可持续发展的重大战略问题。发掘提高绵羊繁殖力及产羔性能的相关基因并探究其作用机制,对于提高绵羊繁殖力具有重要指导意义。

微管解聚蛋白(STMN1)也称作 Stathmin1、p17、p18、p19 或 op18,是一种普遍存在的胞质磷蛋白,在蛋白的 C 端高度保守且具有 Stathmin 样结构域,含有 4 个外显子区,编码 149 个氨基酸,相对分子质量为 1.9×10^4 ,该蛋白能促进微管的形成和微管解聚活性,是近年来研究较多的蛋白之一^[2-3]。SOBEL 等^[4]发现,STMN1 是调控细胞增殖的主要调节因子,通过与细胞内多种蛋白质相互作用,可调控细胞周期、分化、凋亡和细胞内信号转导等细胞生命过程^[5]。DOU 等^[6]研究发现,在小鼠卵巢颗粒细胞中,STMN1 通过调控 *STAR* 基因的上调表达来促进孕激素的产生。LI 等^[7]研究显示,miRNA-193b 通过靶向 STMN1 调控人卵巢癌细胞生长,还发现 STMN1 是 miRNA-193b 的直接靶点,miRNA-193b 的上调显著降低了卵巢癌细胞中 STMN1 的表达,且在卵巢癌中起到了抑制细胞增殖、诱导细胞凋亡的抑癌作用。CASA DEI 等^[8]研究发现,过表达 STMN1 能够使 C2C12 细胞在分化早期促使细胞分化。STMN1 可与 MAPK3、CDK1、AURKB 等多条细胞内信号通路中的多种蛋白相互作用^[9-11]。近年来,在哺乳动物猪、牛、绵羊的研究中发现,STMN1 均可参与动物的生长发育过程^[12],具有重要调控作用。但截至目前,对 *STMN1* 基因在绵羊繁殖功能中的研究还不完善,在绵羊繁殖调控及卵泡发育中的作用研究尚少见报道。

目前,用于研究蛋白之间的相互作用的方法主要有以下几种:酵母双杂交体系^[13-14]、免疫共沉淀、噬菌体展示技术、Pull-down 技术、荧光共振能量转移法等。酵母双杂交系统主要用于检测已知蛋白之间的互作关系,也可筛选与已知蛋白相互作用的

未知蛋白,对深入研究蛋白的功能和解析其作用机制有重要意义^[15-17]。该技术高通量、高灵敏度,在植物和动物互作蛋白研究中被广泛应用^[18-19]。笔者前期使用 Clontech 公司 Mate & PlateTM 文库构建系统构建了绵羊卵巢组织酵母双杂交 cDNA 文库^[20],为后期筛选与绵羊卵泡发育相关的蛋白提供了试验基础。

本研究中,以绵羊 STMN1 为诱饵,采用酵母双杂交技术,从前期构建的文库中筛选与诱饵质粒互作的宿主靶蛋白,以期明确 STMN1 在绵羊卵泡发育过程中的生物学功能及在蛋白互作中的作用,为后续阐明 STMN1 在绵羊卵泡发育中的调控机制提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试样本和菌株

大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞、酵母表达载体 pGADT7 和 pGBKT7、酵母菌株 Y187 和 Y2HGold 均由郑州师范学院分子生物学实验室保存;绵羊卵巢组织由河北省唐县屠宰场采集后运回河北农业大学胚胎中心实验室保存。

1.2 主要试剂

SD/-Trp 液体/固体培养基、Aureobasidin A、DDO/QDO 补充物、X- α -gal 均购自宝日医生物技术有限公司;DNA Marker、LB 固体/液体培养基、EasyPfu DNA 聚合酶、反转录试剂盒、酵母质粒提取试剂盒和酵母感受态细胞(Y2HGold)均购自北京全式金生物技术有限公司;卡那霉素、Green Taq Mix 聚合酶、同源重组试剂盒(ClonExpress[®] Ultra One Step Cloning)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.3 引物设计

依据 NCBI 在线获取绵羊 *STMN1* 基因(GenBank 登录号为 XM_015093679.2)的编码序列,根据多克隆位点选择 *EcoR* I 和 *Bam* H I 为酶切位点,运用 Primer Premier 5.0 设计扩增 *STMN1* 基因

编码区的上、下游扩增引物: pGBKT7-STMN1-PF, 5'-GCCATGGAGGCCGAATTCATGGCTTCTTCTG ATATCC-3'(下划线部分为 *EcoR* I 的酶切位点); pGBKT7-STMN1-PR, 5'-AGGTCGACGGATCCCC GGTAGTCGGCTTCAGTCTCA-3'(下划线部分为 *Bam* H I 的酶切位点)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 总 RNA 提取及反转录

以经 TRIzol 法提取的绵羊卵巢组织细胞总 RNA 为模板,按照反转录试剂盒中的体系设置反应组分(5 μ L RNA, 1 μ L Anchored Oligo(dT)₁₈ Primer(0.5 μ g/ μ L), 1 μ L TransScript RT/RI Enzyme Mix, 1 μ L gDNA Remover, 10 μ L 2 \times TS Reaction Mix, 2 μ L RNase-free Water, 共 20 μ L),进行 PCR 扩增。PCR 程序: 42 $^{\circ}$ C 反应 15 min, 85 $^{\circ}$ C 灭活 5 s, 失活后冰上孵育 2 min。cDNA 产物保存于-20 $^{\circ}$ C, 备用。

1.5 重组诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 的构建及鉴定

以反转录的 cDNA 为模板,扩增 *STMN1* 基因的片段。反应体系(20 μ L): cDNA 模板 1 μ L, pGBKT7-STMN1-PF 和 pGBKT7-STMN1-PR 各 1 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, 5 \times *Pfu* Buffer 4 μ L, *Pfu* 酶 1 μ L, ddH₂O 10 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。吸取 2 μ g 的 pGBKT7 载体,加入 *Bam* H I 和 *Eco* R I 进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 1%琼脂糖凝胶电泳后进行胶回收;按照同源重组试剂盒说明书,将回收片段和线性化载体 pGBKT7 按照一定比例加入到无菌的 PCR 管内, 37 $^{\circ}$ C 连接 30 min, 通过热激法(42 $^{\circ}$ C, 90 s)转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞,涂板后 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单个菌落,用鉴定引物进行 PCR 菌落鉴定并测序,运用 MegAlign 分析比对序列,挑取序列正确的克隆提取质粒。

1.6 pGBKT7-STMN1 诱饵质粒的自激活活性及细胞毒性检测

参考文献[17]的方法将 1.5 中测序正确的酵母质粒转化至 Y2HGold 感受态细胞中,并检测 pGBKT7-STMN1 对 Y2HGold 报告基因的自激活活性。同时,取 100 μ L 重组诱饵 pGBKT7-STMN1

和空载体 pGBKT7 涂布于 SD/-Trp 营养缺陷型固体培养基上, 30 $^{\circ}$ C 培养箱静置培养 3~5 d 后,挑取单菌落接种至 SD/-Trp(50 μ g/mL Kan)液体培养基中,于 30 $^{\circ}$ C 下 230 r/min 振荡培养 16、18、22、24 h 时,用分光光度计测定其 OD_{600 nm} 值,判断重组诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 对 Y2HGold 酵母细胞有无毒性作用。

1.7 STMN1 诱饵蛋白检测

参考文献[17]的方法检测 STMN1 诱饵蛋白。其中,选择 anti-c-Myc 鼠单克隆抗体(1:4000)为一抗进行孵育。

1.8 STMN1 互作蛋白的筛选

挑取单菌落接种至 50 mL SD/-Trp 液体培养基中,于 30 $^{\circ}$ C 下 230 r/min 振荡培养 20 h 后收集菌体,加入 5 mL SD/Trp 液体培养基重悬菌体;取-80 $^{\circ}$ C 保存的已构建的绵羊卵巢组织酵母双杂交 cDNA 文库菌株 1 mL,将两者混合加入灭菌的 2 L 培养瓶,加入 2 \times YPDA 液体培养基 45 mL,于 30 $^{\circ}$ C 下 50 r/min 振荡培养 20 h 进行杂交,镜检是否出现接合子;然后加入 0.5 \times YPDA 液体培养基收集菌体,将培养物涂于 DDO/X/A(二缺)培养基上,于 30 $^{\circ}$ C 下培养 3~5 d 后,挑取培养板上的蓝色克隆划线至 QDO/X/A(四缺)固体培养基上,再于 30 $^{\circ}$ C 下培养 3~5 d。

1.9 阳性克隆的筛选

按照酵母质粒提取试剂盒说明书提取 1.8 中 QDO/X/A(四缺)固体培养基上显蓝色的酵母菌质粒,测定浓度后进行标记。以 1 μ L 质粒为模板,进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系与程序同 1.4,其中上、下游引物用 pGADT7 通用引物。1%琼脂糖凝胶 DNA 电泳检测 PCR 扩增产物后送测序;根据测序结果,利用 NCBI 在线网站与绵羊基因组数据库比对分析。

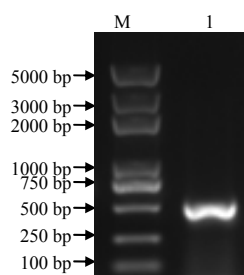
1.10 STMN1 与筛选宿主蛋白的一对一互作验证

挑选含正确开放阅读框的编码序列,采用分子克隆技术构建至 pGADT7 载体,将 1.9 中提取的酵母质粒与 pGBKT7-STMN1 诱饵质粒共转化至 Y2HGold 感受态细胞,同时以 pGBKT7 空质粒作为对照,转化、稀释后涂布于 QDO/X/A(四缺)固体培养基上,于 30 $^{\circ}$ C 下培养 3~5 d,观察酵母菌生长情况。

2 结果与分析

2.1 诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 的构建及鉴定结果

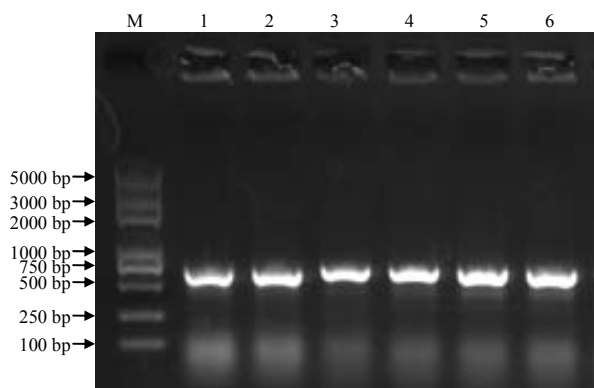
以 cDNA 为模板, PCR 扩增后采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 在预期片段大小(487 bp)处有一特异性条带(图 1)。连接转化后挑取的 6 个单菌落进行 PCR 鉴定后显示, 6 个克隆 PCR 扩增条带一致(图 2)。测序比对分析显示, 扩增的 *STMN1*



M Trans2K Plus DNA Marker; 1 *STMN1* 片段。

图1 绵羊 *STMN1* 基因的PCR扩增产物

Fig.1 PCR amplification products of sheep *STMN1* gene



M Trans2K Plus DNA Marker; 1~6 pGBKT7-STMN1 单克隆。

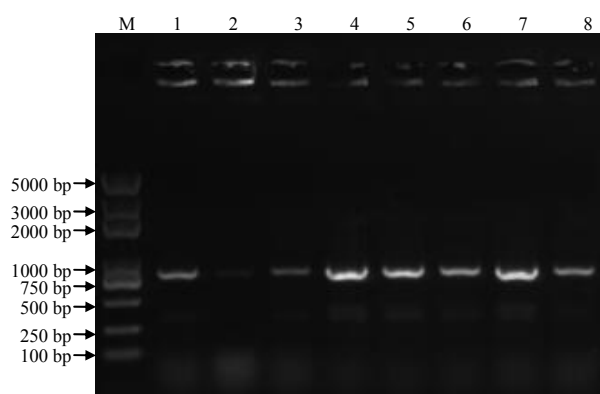
图2 pGBKT7-STMN1克隆转化DH5α的菌落PCR扩增条带

Fig.2 PCR amplification band of pGBKT7-STMN1 clones from *Escherichia coli* DH5α

基因编码序列与 GeneBank 中下载序列同源性一致, 表明重组诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 构建成功。

2.2 诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 转化至 Y2HGold 感受态细胞的结果

将质粒转化至酵母感受态细胞后, 挑取的 8 个克隆的 PCR 产物条带均约 780 bp(图 3), 表明 pGBKT7-STMN1 诱饵质粒已成功转化至 Y2HGold 菌。



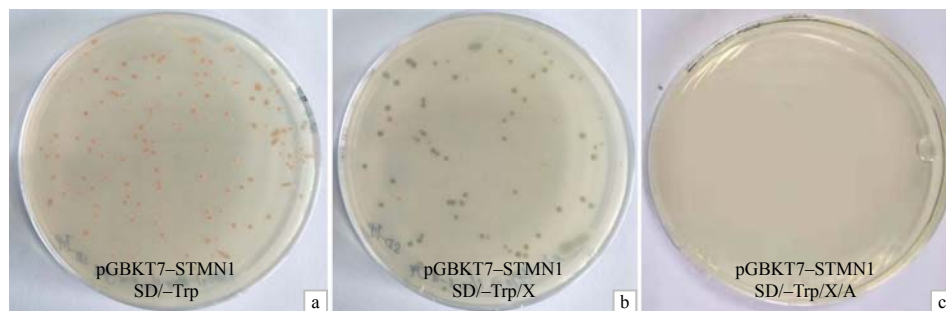
M Trans2K Plus DNA Marker; 1~8 pGBKT7-STMN1 单克隆。

图3 pGBKT7-STMN1转化至Y2HGold酵母菌中的PCR鉴定结果

Fig.3 PCR identification result of pGBKT7-STMN1 transformed into Y2HGold yeast strain

2.3 诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 自激活的活性及细胞毒性

转化诱饵质粒后, 在 SD/-Trp 营养缺陷型固体培养基上长出酵母单菌落(图 4-a), 在 SD/-Trp/X-α-Gal 营养缺陷型固体培养基上长出蓝色酵母单菌落(图 4-b), 而在 SD/-Trp/X-α-Gal/AbA 营养缺陷型固体培养基上没有菌落生长(图 4-c), 说明诱饵重组质粒 pGBKT7-STMN1 对 Y2HGold 酵母宿主菌无自激活活性。

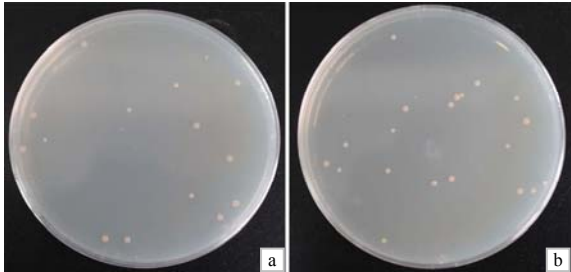


a SD/-Trp 固体培养基; b SD/-Trp/X-α-Gal 固体培养基; c SD/-Trp/X-α-Gal/AbA 固体培养基。

图4 pGBKT7-STMN1对Y2HGold酵母菌自激活活性的检测结果

Fig.4 Detection of self-activity of pGBKT7-STMN1 in Y2HGold yeast strain

在 SD/-Trp 营养缺陷型固体培养基上培养 3~5 d 后,重组 pGBKT7-STMN1(图 5-a)与空载体 pGBKT7 的酵母菌落(图 5-b)大小和形态相近。从图 6 可知,随培养时间的增加,酵母菌的生长状态呈上升趋势,表明 pGBKT7-STMN1 诱饵质粒对 Y2HGold 酵母没有细胞毒性作用。



a 诱饵质粒 pGBKT7-STMN1; b 空载体 pGBKT7。
图5 诱饵质粒pGBKT7-STMN1和空载体pGBKT7质粒转化后在SD/-Trp培养基上的生长情况

Fig.5 The growth of bait plasmid PGBKT7-STMN1 and pGBKT7 after transformation on SD/-Trp medium

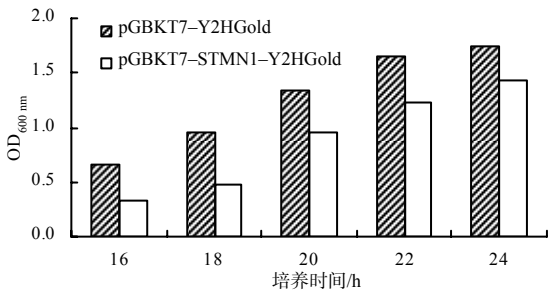
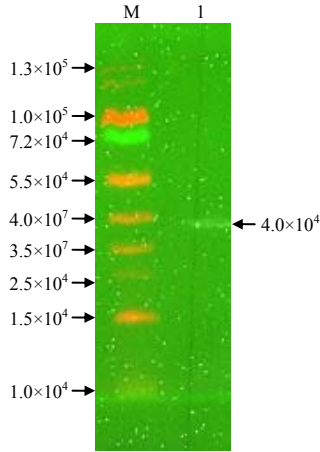


图6 pGBKT7-Y2HGold和pGBKT7-STMN1-Y2HGold酵母菌的生长趋势

Fig.6 Growth rate of pGBKT7-Y2HGold and pGBKT7-STMN1-Y2HGold

2.4 STMN1 诱饵蛋白表达的检测结果

转化重组诱饵载体 pGBKT7-STMN1 后,经蛋白质印记法检测,显示在 NC 膜上有 1 条 4.0×10^4 的特异性条带,与预期一致(图 7),说明 STMN1 诱饵蛋白在酵母细胞中成功表达。



M PageRuler™ Prestained Protein Ladder; 1 pGBKT7-STMN1 诱饵蛋白。

图7 STMN1诱饵蛋白的蛋白质印记法表达检测结果
Fig.7 Western-blot detection result of STMN1 bait protein

2.5 STMN1 互作蛋白的筛选结果

培养后共得到 12 个单菌落,分别提取 12 个酵母克隆的质粒后转化大肠杆菌 DH5α,测序分析后,通过 Blast 分析淘汰重复和未知序列,最终获得 4 个蛋白(表 1)。

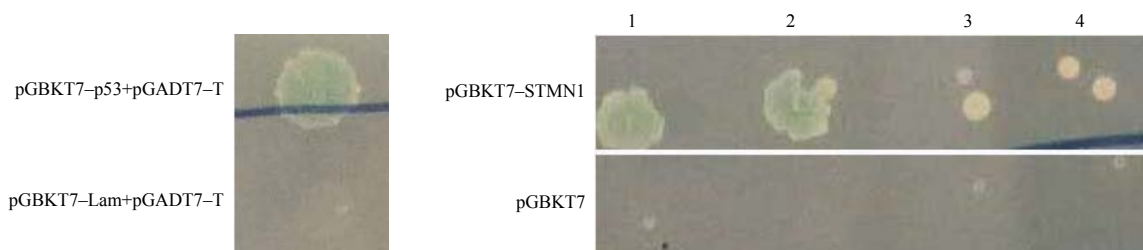
表1 酵母双杂交筛选出的与STMN1互作的蛋白及其功能注释

Table 1 Proteins interacting with STMN1 screened by the yeast two-hybrid and their functional annotation				
序号	蛋白	基因序列号	蛋白描述	蛋白功能
1	CREB	XM_027961580.1	环磷酸腺苷效应元件结合蛋白	作为调节基因转录的蛋白,在多条细胞信号转导通路中参与细胞的增殖、分化、凋亡等过程
2	CDK1	XM_004010698.4	周期蛋白依赖性激酶	作为细胞周期调控中的重要因子之一,与周期蛋白 cyclin 协同作用,发挥生物学功能作用
3	STAT3	XM_015098787.2	信号转导因子及转录活化因子 3	参与细胞信号转导作用,主要起调控基因转录的作用。
4	FOXM1	XM_015094994.2	叉头框转录因子 M1	可调控细胞周期蛋白的表达,激活与靶细胞转移的相关基因表达,是细胞中重要的转录调控因子

2.6 STMN1 与筛选宿主蛋白互作的验证结果

在 QDO/X/A 固体培养中有 2 种蛋白(CREB 和

FOXM1)显蓝色,2 种(CDK1 和 STAT3)显白色,表明蛋白 CREB 和 FOXM1 可与诱饵质粒 pGBKT7-STMN1 进行互作(图 8)。



pGBKT7-p53+pGADT7-T 为阳性对照; pGBKT7-Lam+pGADT7-T 为阴性对照; 1~4 分别为 CREB、FOXMI、CDK1、STAT3。

图8 诱饵质粒STMN1与宿主蛋白酵母点对点验证结果

Fig.8 Point-to-point yeast-two-hybrid confirmation between bait plasmid STMN1 and host protein

3 结论与讨论

STMN1 作为 1 种在胞浆中广泛表达的微管蛋白, 具有高度保守的基因, 编码 1 个能够发挥调节功能的蛋白分子, 既可促进微管的形成, 也可促进微管的解离, 通过参与到各种细胞信号通路中, 进而调控细胞增殖、分化及周期等^[21]。有研究^[6]报道, 在啮齿类动物的脑垂体及胰岛素瘤的激素分泌调节中, STMN1 发挥着重要作用, 通过 TGF- α 参与神经生长因子诱导的颗粒细胞凋亡过程, 促进类固醇合成酶的表达, 进而促进激素分泌细胞合成孕酮、睾酮及雌二醇的能力。为深入分析研究 STMN1 的生物学功能以及在绵羊繁殖调控信号通路中的具体分子机制, 本研究, 选择酵母双杂交技术来筛选与 STMN1 蛋白产生相互作用的宿主蛋白。

本研究中, 先构建符合酵母双杂交筛选特性的 pGBKT7-STMN1 诱饵质粒, 转化至酵母感受态细胞后, 检测质粒在细胞中的表达情况及是否对酵母细胞的报告基因有自激活活性和细胞毒性, 结果证明该试验方案可行。利用已构建的绵羊卵巢酵母双杂交 cDNA 文库筛选与 STMN1 相互作用的蛋白, 该文库含有 3×10^8 个重组子的绵羊卵巢组织 cDNA 文库, 插入片段长度多数为 500 ~ 2000 bp, 重组率达 96%, 能有效利用此文库筛选出与诱饵蛋白相互作用的所有克隆^[20]。为了降低假阳性克隆, 将经过缺陷性培养基筛选后的克隆, 采用酵母一对一互作的方法再次验证 STMN1 与已筛选互作蛋白之间在酵母内的关系, 结果显示 CREB 和 FOXMI 这 2 个蛋白可能与 STMN1 蛋白存在互作关系。

CREB 是碱性亮氨酸拉链(bZIP)超家族中磷酸化激活转录因子之一, 作为真核生物细胞核内重要的调控因子, 该家族蛋白能够与 HCF1、树突细胞特异性跨膜蛋白相互作用, 调控细胞的增殖和分化

过程;也可参与调控 cAMP/PKA 细胞信号通路的重要结合蛋白, 在调控基因转录、细胞生长发育等方面具有重要作用^[22]。

FOXMI 是 1 种典型的增殖相关转录因子, 拥有超过 55 个成员的大型 FOX 家族, 为 1 种可参与调控细胞周期、细胞增殖及细胞凋亡等多种重要的生物学过程的蛋白质。通过参与调控细胞周期相关的多个基因的转录, 从而控制细胞中的 DNA 复制和有丝分裂, 继而调控细胞相关功能蛋白的表达, FOXMI 被证明可调节胚胎发生、器官损伤再生和致癌作用^[23]。CHEN 等^[24]研究显示, FOXMI 对人类胚胎干细胞的增殖至关重要, 并通过转录调节细胞周期蛋白 B1(CCNB1)和细胞周期蛋白依赖性激酶 1(CDK1)来保护它们免受氧化应激。除了对靶基因的转录调节外, FOXMI 还与蛋白(如 Npm1、Rnfl68、Melk 和 $\beta(\beta)$ -连环蛋白)直接相互作用。

鉴于此, 在后续研究中可将筛选的 2 个靶蛋白利用 CO-IP、免疫共沉淀等方法从细胞层面验证其与 STMN1 的互作关系, 也可将其作为不同信号转导通路中对细胞功能产生影响的上、下游信号分子, 从多方面阐明 STMN1 参与卵泡发育过程中的具体功能及作用机制。

参考文献:

- [1] 王之保. 我国农业地区发展肉牛产业的思考[J]. 中国牛业科学, 2016, 42(5): 1-10.
- [2] LI J, HU G H, KONG F J, et al. Reduced STMN1 expression induced by RNA interference inhibits the bioactivity of pancreatic cancer cell line Panc-1[J]. Neoplasma, 2014, 61(2): 144-152.
- [3] ATWEH G F, IANCU-RUBIN C. p27^{Kip1} and STMN1: partners again?[J]. Cell Cycle, 2014, 13(20): 3163.
- [4] SOBEL A, BOUTTERIN M C, BERETTA L, et al. Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein

- (stathmin)[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(7): 3765–3772.
- [5] 窦云德. STMN1、DENND1A 在卵巢颗粒细胞中的作用研究[D]. 济南: 山东大学, 2018.
- [6] DOU Y D, ZHAO H, HUANG T, et al. STMN1 promotes progesterone production via StAR up-regulation in mouse granulosa cells[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26691.
- [7] LI H Y, XU Y P, ZHAO D N. MicroRNA-193b regulates human ovarian cancer cell growth via targeting STMN1[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2020, 20(4): 3310–3315.
- [8] CASADEI L, VALLORANI L, GIOACCHINI A M, et al. Proteomics-based investigation in C2C12 myoblast differentiation[J]. European Journal of Histochemistry, 2009, 53(4): e31.
- [9] 王波, 王彬, 张连斌, 等. *TUBB3/STMN1* 基因表达与非小细胞肺癌 EGFR 通路的相关性[J]. 中国肺癌杂志, 2013, 16(10): 547–552.
- [10] XIA X J, WANG L, ZHANG X J, et al. Halofuginone-induced autophagy suppresses the migration and invasion of MCF-7 cells via regulation of STMN1 and p53[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2018, 119(5): 4009–4020.
- [11] SAN-MARINA S, HAN Y Q, LIU J, et al. Suspected leukemia oncoproteins CREB1 and LYL1 regulate Op18/STMN1 expression[J]. Biochimica et Biophysica Acta (Gene Regulatory Mechanisms), 2012, 1819(11/12): 1164–1172.
- [12] 宋志鹏. 猪 *STMN1* 基因在肌肉生长发育中功能的初步研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [13] 李慧春, 陈鹏, 李先斌, 等. 猪小肠上皮细胞酵母双杂交 cDNA 文库的构建[J]. 中国动物传染病学报, 2019, 27(2): 19–24.
- [14] 苏玲, 李彬, 王青, 等. 金柑花蕾酵母双杂交 cDNA 文库构建及评价[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(7): 3169–3173.
- [15] 朱佳慧, 徐秋芳, 袁平平, 等. 水稻幼苗酵母双杂交 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 47–50.
- [16] 高兴红, 贾仁勇. 鸭肠炎病毒 *UL24/C* 基因酵母双杂交诱饵载体构建及鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2018, 40(6): 481–485.
- [17] 张丽萌, 聂晓宁, 李闰婷, 等. 绵羊 *FHL2* 基因酵母双杂交诱饵载体的构建及鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(21): 25–29.
- [18] 雷海英, 白凤麟, 段永红, 等. 玉米酵母双杂交 cDNA 文库的构建及 ZmCEN 互作蛋白的筛选[J]. 西北植物学报, 2018, 38(4): 598–606.
- [19] 王洋, 张政, 王莹莹, 等. 利用番茄 cDNA 酵母双杂交文库筛选 Pti4 互作蛋白[J]. 安徽农业科学, 2019, 47(18): 111–114.
- [20] 张丽萌, 李闰婷, 聂晓宁, 等. 绵羊卵巢组织细胞酵母双杂交 cDNA 文库的构建及鉴定[J]. 畜牧与兽医, 2020, 52(8): 45–49.
- [21] LI X Y, WANG L L, LI T J, et al. STMN1 overexpression correlates with biological behavior in human cutaneous squamous cell carcinoma[J]. Pathology-Research and Practice, 2015, 211(11): 816–823.
- [22] WANG X H, NI L, CHANG D H, et al. Cyclic AMP-responsive element-binding protein(CREB) is critical in autoimmunity by promoting Th17 but inhibiting treg cell differentiation[J]. EBioMedicine, 2017, 25: 165–174.
- [23] SHENG Y, YU C, LIU Y, et al. FOXM1 regulates leukemia stem cell quiescence and survival in MLL-rearranged AML[J]. Nature Communications, 2020, 11: 928.
- [24] CHEN Z, LI L, XU S, et al. A Cdh1-FoxM1-Apc axis controls muscle development and regeneration[J]. Cell Death & Disease, 2020, 11: 180.

责任编辑: 邹慧玲

英文编辑: 柳 正