

一种检测蛋白质相互作用的双荧光共定位系统

周军^{1,2}, 周翠红^{1,2}, 邓小燕¹, 陶凤杰³

1. 北京航空航天大学生物与医学工程学院; 生物力学与力生物学教育部重点实验室, 北京 100191
2. 北京大学化学与分子工程学院, 北京核磁共振中心, 北京 100871
3. 北京市第五十六中生物教研组, 北京 100044

摘要 自发荧光蛋白以快捷灵敏、即时检测和无需破坏活细胞的特点在蛋白质相互作用的研究中得到广泛应用。从发光水母 *Aequoria victoria* 中分离的绿色荧光蛋白 (GFP) 和从珊瑚 *Discosoma* sp. 中分离的 DsRed 红色荧光蛋白是自发荧光蛋白的典型代表。本研究开发一种基于 GFP 和红色荧光蛋白 (RFP), 并可通过待检测蛋白在细胞内表达的空间位移变化产生共定位的双荧光共定位检测系统。该系统为克服两种荧光蛋白光谱渗漏带来的非特异性结果的干扰, 将核仁定位信号 (NoLS) 和出核信号 (ABL) 分别连接到 RFP 和 GFP。具有定位信号的 GFP 和 RFP 的待检测蛋白可对分别在细胞核内和 (或) 细胞核外表达, 伴随它们的相互作用, 荧光共定位的现象会产生在细胞内特定的区域。利用抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bak-BH3 短肽作为蛋白对测试该系统, 荧光共定位现象明显, 系统灵敏可靠。

关键词 GFP; DsRed; 蛋白质相互作用

中图分类号 Q291

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.08.001

A Translocation Fluorescence Cross-correlation Tool for the Analysis of Protein-protein Interactions

ZHOU Jun^{1,2}, ZHOU Cuihong^{1,2}, DENG Xiaoyan¹, TAO Fengjie³

1. Key Laboratory for Biomechanics and Mechanobiology, Ministry of Education; School of Biological Science and Biomedical Engineering, Beihang University, Beijing 100191, China
2. Beijing NMR Center, College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China
3. Biology Group, Beijing No.56 Middle School, Beijing 100044, China

Abstract Fluorescence proteins have become widely used molecular probes in the analysis of protein-protein interactions. There are many notable advantages, such as celerity, direct visualization, and noninvasive. Green Fluorescence Protein (GFP) from jelly fish and Red Fluorescence Protein (RFP) from coral are most important auto-fluorescent proteins in this field. A translocation fluorescence cross-correlation tool is developed base on the GFP and RFP for testing protein-protein interaction. To overcome the distract caused by non-specific spectrum permeation of two fluorescent proteins, the nucleolus localization signal sequence (NoLS) and nuclear export signal sequence (ABL signal sequences) are attached to both pairs of the system accordingly. Therefore, the proteins can express in and/or out of the nuclear which endues locomotion of protein pairs and their fluorescence tags. The dynamic protein-protein interaction of anti-apoptotic protein Bcl-2 and Bak-BH3 peptide is straightly and rapidly laid out in the translocation fluorescence cross-correlation tool.

Keywords GFP; DsRed; protein-protein interaction

收稿日期: 2010-12-28; 修回日期: 2011-02-17

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2009CB521703); 国家自然科学基金项目 (30800172, 11072023, 10632010)

作者简介: 周军, 博士研究生, 研究方向为细胞分子生物学, 电子邮箱: zhoujun81@yahoo.cn; 邓小燕 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S030001000M), 教授, 研究方向为生物力学血流动力学, 电子邮箱: dengxy1953@buaa.edu.cn

0 引言

从水母 *Aequorea victoria* 中分离得到的绿色荧光蛋白 (GFP)^[1]和从珊瑚 *Discosoma sp.* 分离得到的 DsRed 红色荧光蛋白^[2]在荧光标记领域是最重要的两种自发荧光蛋白。它们是同源蛋白,单体都是由 11 个 β 折叠围成的桶状结构,荧光发光团嵌入位于桶状结构中心的 α 螺旋上^[3-4]。GFP 和红色荧光蛋白 (RFP) 的波长范围分别是 359~509nm 和 558~702nm。目前,已广泛用于细菌、酵母、果蝇、斑马鱼、植物细胞和多种动物细胞标记^[5-9]。荧光蛋白具有对活细胞无侵害和破坏的优点,在不同细胞系标记,报告基因表达的探针,以及蛋白质相互作用的检测方面都具有广泛应用^[10]。

细胞内蛋白质相互作用的复杂网络是细胞信号通路和信号转导的基础。细胞相对静止稳态,剧烈变化和多种生理功能的实现基础在很大程度上是蛋白质相互作用的结果^[11]。探索和发现这些蛋白质之间的相互作用和甄别这种相互作用对应的生理功能的关系是当前生命科学和基础医学的热门领域之一。通过分子生物学的方法调节特定蛋白对之间的相互作用,为临床中的疑难杂症提出了新型治疗方法。因此,调节和控制引起相应生物学功能对应的蛋白对之间相互作用正在逐渐开创新兴治疗方法,且引起了学术研究和制药工业等领域的浓厚兴趣和关注^[12]。

传统上用于体外检测蛋白质相互作用的方法并不少,但对于生物体而言,只有在自然生理条件下,即细胞的正常生理环境下得到的蛋白质的空间和即时信息才能反映出它们之间真实的相互作用^[13]。目前基于荧光蛋白的检测方法包括荧光素酶检测系统 (luciferase system)、荧光共振能量转移系统 (FRET)、双荧光互补系统 (BiFC)^[14] 和荧光共定位系统 (fluorescence cross-correlation spectroscopy) 等^[15-17]。在上述方法中,荧光共定位系统以其灵活简便和多色荧光联合使用特点,已经在不同物种的多种细胞型的蛋白质相互作用研究中得到推广。

荧光共定位系统的基本原则是将待检测蛋白对用分子生物学的方法分别带上不同的颜色的荧光蛋白标签,如果待检测蛋白对之间具有相互作用,它们各自的荧光标签的光谱就会相互干扰和叠加,产生重叠荧光的共定位^[18]。已用于该系统的荧光蛋白有蓝色荧光蛋白、绿色荧光蛋白和黄色荧光蛋白等^[19]。不同的荧光蛋白光谱都有特定的范围,很多荧光蛋白的光谱范围都具有重叠的区域,因此共定位系统会产生假阳性的结果。此外,许多被检测蛋白在细胞内的定位相同,当它们带着各自的标签在细胞内表达时,即使没有特异的相互作用,也会表现出荧光共定位的现象。为了克服这个不足,亚细胞定位信号也被应用到荧光共定位系统中,以达到优化系统,提高检测特异性的目的。

本文拟开发一种基于 GFP 和 RFP 的双荧光共定位系统,以期对蛋白质相互作用的研究提供高效快捷的方法。研究以抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bak-BH3 短肽作为检测该系统的蛋白对^[20]。核仁定位信号 (NoLS) 和出核信号 (ABL) 分别被连接到 RFP 和 GFP,被检测蛋白分别在细胞核内和细胞核外两个区

域表达。当蛋白对之间具有相互作用时,蛋白质因其所带的特定的定位信号,会在细胞内产生空间位置变化,从而使其荧光共定位在一起。该系统快捷简便,只需一台荧光显微镜即可将蛋白对在细胞内的动态变化呈现出来。

1 材料与方法

1.1 质粒构建

两端带有限制性酶切位点 EcoR I 和 BamH I 的 NoLS 和 ABL 的核酸序列,由引物 Primer01n-Primer04C 和 Primer05n-20c 退火连接合成 (附表 1)。GFP 和 RFP 分别取自载体 Wasabi-C 和 DsRedN1。Wasabi-C 和 DsRedN1 载体分别购自 Allelebiotech 和 Clontech 公司。NoLS 被连接到 DsRedN1 的 N 端,ABL 被连接到 Wasabi-C 的 C 端。NoLS-DsRed 的序列通过 PCR 方法,用引物 Nov071n 和 Nov071c 扩增得到 (PCR 反应条件:94°C 下预变性 5min,94°C 30s,60°C 1min,72°C 1min 40s,4°C 10min,30 个循环)。扩增得到的 NoLS-RFP 替换质粒 Venus[1]-Zipper 中的 Venus[1] 片段。Venus[1]-Zipper 质粒载体由加拿大蒙特利尔大学的 Stephen W. Michnick 博士惠赠。两端带有 BspEI 和 XbaI 酶切位点的 Bak-BH3 短肽 (72GQV-GRQLAIIGDDINR87) 通过引物 Venus01n 和 Venus02c 用退火连接合成 (附表 2),并连接到 NoLS-RFP-Zipper 的 C 端,从而得到 NoLS-RFP-Bak。Bcl-2 基因来自北京大学核磁共振中心。Bcl-2 的 cDNA 全长由带有酶切位点 Xho I 和 EcoR I 的引物 Bcl2n 和 Bcl2c 通过 PCR 扩增得到 (PCR 反应条件:94°C 下预变性 5min,94°C 30s,60°C 1min,72°C 1min 10s,4°C 10min,30 个循环),并插入到质粒 Wasabi-ABL 上,得到 GFP-Bcl-2-ABL。

1.2 细胞培养和转染

HeLa 细胞培养于 37°C,5%CO₂ 细胞培养箱。培养基为含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基 (Dulbecco Modified Eagle's Medium, Hyclone, USA)。细胞培养于 24 孔板中。当细胞密度达到 70%左右时,将质粒瞬时转染细胞。转染试剂使用 Vigorous 公司生产的 PEI。两种质粒共转染时,质粒转染量分别为 300ng。24 孔板每个孔转染所用的质粒总量为 600ng。

1.3 荧光共定位检测和计数

瞬时转染后的细胞转染效率达 25%左右。鉴定的荧光以转染 24h 后产生可见的绿色荧光和红色荧光为准。细胞计数所选的样本需同时含有绿色荧光和红色荧光的细胞。转染前的细胞量和质粒浓度完全平行。每组实验重复 3 次。荧光照片由德国莱卡公司生产的倒置荧光显微镜拍摄获得。细胞计数时的曝光时间和细胞所处条件完全平行。每组细胞计数分别选取 300 个细胞统计分析。

2 结果与讨论

2.1 双荧光共定位系统的原理

基于 GFP 和 RFP 的活细胞内的蛋白质相互作用的检测技术发展迅速,双荧光互补系统、荧光共振能量转移系统和

荧光共定位系统的检测方法不断推陈出新^[20]。然而,细胞的内部环境错综复杂,其中涉及的细胞信号转导^[21]、细胞骨架^[22]和细胞内蛋白的动力学变化纷乱难辨^[23]。

红色和绿色荧光蛋白是目前使用最广泛的自发荧光蛋白,它们的光谱范围具有部分重叠的区间。在荧光显微镜下明亮的红色荧光很容易透过绿色荧光的通道被观察到,影响绿色荧光通道下的样品观测。为此,在荧光共定位系统中加入特定的亚细胞定位信号十分必要。

出核信号的 ABL 序列和核定位信号的 NoLS 序列从 NES 数据库中获得。ABL(氨基酸序列为 AINKLENNLRELQICPAT)原本来源于原癌基因 *ABL1* 的 nt809~nt826。原癌基因 *ABL1* 编码一个胞浆蛋白和一个酪氨酸激酶的核蛋白,与细胞分化、细胞分裂、细胞黏连和细胞对应力的应激反应有关^[24]。当 GFP 连上 ABL 序列后,在荧光显微镜下,95%以上的融合 GFP 蛋白完全表达在细胞核之外。核定位信号 NoLS 来源于 *sirtuin-1* 的移码突变。位于 nt262~nt265 的 4 个核苷酸缺失的移码突变得到 1 个含有 93 个氨基酸的人造片段(附图 1)。NoLS 的 DNA 序列对应于 *sirtuin-1* DNA 序列核酸的 nt266~nt544。有报道显示,NoLS 可以定位在细胞核中的机制是因为 NoLS 可以与核蛋白 B23 相互作用而产生核定位的功能^[25]。当 RFP 与 NoLS 融合表达时,NoLS-RFP 表达在细胞核内。NoLS 在已发现的核定位信号中,被认为是核定位能力最强的定位信号。NoLS 无论位于被标记蛋白的 N 端还是 C 端,都能将标记的蛋白带到细胞核内,在多种细胞中都具有强核定位能力^[27]。

双荧光共定位系统原理如图 1 所示。ABL 的序列被连接到 GFP 的 C 末端。待检测蛋白 A 被插入到 GFP-ABL。NoLS 被插入到 RFP 的 N 末端,待检测蛋白 B 被插入到 RFP 的 C 端(图 1(a))。红色荧光蛋白 RFP 比 GFP 耐酸性环境,因而更适合作为进入细胞核内的探针。当蛋白 A 和蛋白 B 具有明确的相互作用时,绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白会共定位在细胞核内。相反,当蛋白 A 和蛋白 B 之间没有相互作用时,蛋白 A 和蛋白 B 会分别在细胞核内和核外各自表达(图 1(b))。

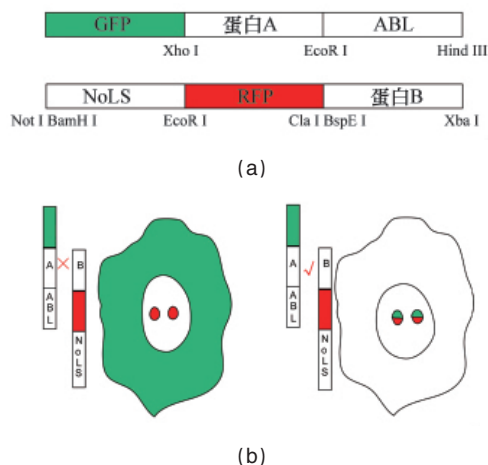


图 1 绿色和红色荧光共定位系统设计原理

Fig. 1 Illustration of design principle of translocation fluorescence cross-correlation tool based on GFP and RFP

2.2 双荧光共定位系统细胞转染

为了进一步量化荧光共定位系统的检测效果, Bak-BH3 短肽和抗凋亡蛋白 Bcl-2 被作为蛋白对测试该系统。Bak-BH3 短肽作为蛋白 B 被连接到 NoLS-RFP 的 C 端, Bcl-2 作为蛋白 A 被连接到 GFP-ABL。从研究结果可以明显发现,当对照质粒 GFP-ABL 和 RFP-NoLS 共转染的时候,绿色荧光和红色荧光分别在细胞的核内和核外各自表达(图 2(a))。当质粒 GFP-ABL 和 NoLS-RFP-Bak, GFP-Bcl-2-ABL 和 NoLS-RFP 共转染 HeLa 细胞时,绿色荧光和红色荧光也是在核内外各自表达(图 2(b)和 2(c)),没有共定位的荧光信号。当 GFP-Bcl-2-ABL 和 NoLS-RFP-Bak 共转染的时候,带有绿色荧光标签的 Bcl-2 被带有红色荧光标签的 Bak-BH3 短肽带进了细胞核,呈现出明显的两种荧光的共定位(图 2(d))。

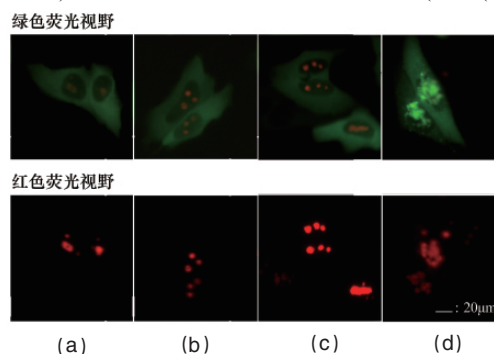


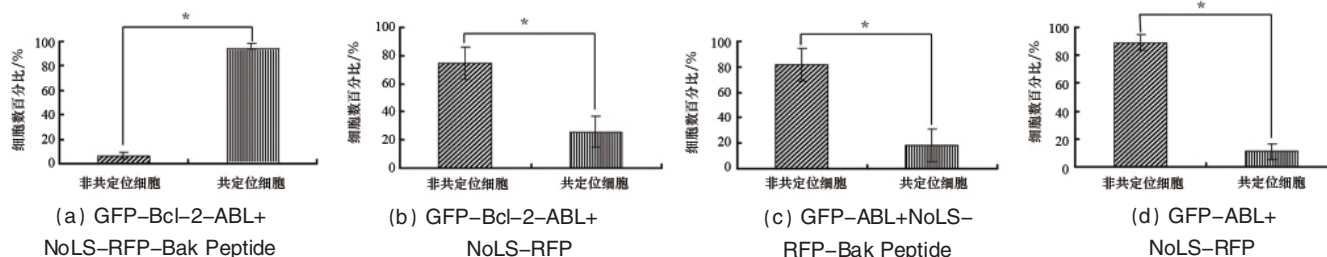
图 2 荧光共定位系统检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bak-BH3 短肽荧光图

Fig. 2 Fluorescent images of Bak-BH3 peptide and anti-apoptotic protein Bcl-2 in the system

2.3 共定位细胞计数

荧光共定位系统中, NoLS 由 93 个氨基酸组成, ABL 由 18 个氨基酸组成。理想状态下, 如果待检测蛋白对的分子量相等, 根据检测系统两个片段分子量大小, NoLS-RFP-B 会将 GFP-A-ABL 带入细胞核内。值得一提的是, 在本研究中, 荧光共定位的信号出现后, 随着时间继续延长, 一部分 NoLS-RFP-B 也同样会从细胞核中弥散出核。这可能由于蛋白 A 和蛋白 B 结合之后, 蛋白 A 的 ABL 信号仍然具有出核的功能, 可以使蛋白 A 和 B 的复合体出核; 另外一种解释, NoLS-RFP-B 可能结合 GFP-A-ABL 的 RNA 后出核翻译, 然后随着蛋白质相互作用的原因再转运到细胞核内也会产生这样的现象。这种现象的机制仍然需要进一步研究。但该现象并不会影响本系统检测蛋白质相互作用的共定位信号。

为了量化两种荧光共定位细胞的比例, 针对同时包含两种荧光探针标记的细胞进行统计分析。结果显示, 当质粒 GFP-Bcl-2-ABL 和 NoLS-RFP-Bak 共转染 HeLa 细胞时, 95% 的细胞显示双荧光明显共定位, 非共定位和无法识别的细胞约占 5% (图 3 (a))。在质粒 GFP-ABL 和 NoLS-RFP, GFP-ABL 和 NoLS-RFP-Bak 以及 ABL-Bcl-2-ABL 和 NoLS-RFP 的转染组合中, 80% 以上的细胞是没有共定位的现象, 非特异共定位的细胞和无法识别共定位的细胞低于 20% (图 3(b), 3(c), 3(d))。

图3 共定位细胞计数 (* 为 $P < 0.01$)Fig. 3 Enumeration of co-localization and non-co-localization cells (* as $P < 0.01$)

3 结论

本研究开发出一种用于检测蛋白质相互作用的双荧光共定位系统。该系统基于 GFP 和 RFP 并加入定位信号 NoLS 和 ABL。在蛋白质相互作用的检测中,检测信号灵敏,共定位现象显著。

参考文献 (References)

- [1] Chudakov D M, Lukyanov S, Lukyanov K A. Fluorescent proteins as a tool kit for in vivo imaging trends [J]. *Trends Biotechnol*, 2005, 23(12): 605-613.
- [2] Jakobs S, Subramaniam V, Schonle A, et al. EFGP and DsRed expressing cultures of Escherichia coli imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy[J]. *FEBS Lett*, 2000, 479(3): 131-135.
- [3] Wall M A, Socolich M, Ranganathan R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed[J]. *Nat Struct Biol*, 2000, 7(12): 1133-1138.
- [4] Leiderman P, Genosar L, Huppert D, et al. Ultrafast excited-state dynamics in the green fluorescent protein variant S65T/H148D. 3. Short- and long-time dynamics of the excited-state proton transfer[J]. *Biochemistry*, 2007, 30, 46(43): 12026-12036.
- [5] Vintersten K, Monetti C, Gertsenstein M, et al. Mouse in red: Red fluorescent protein expression in mouse ES cells, embryos, and adult animals [J]. *Genesis*, 2004, 40(4): 241-246.
- [6] Gubin A N, Koduru S, Njorge J M, et al. Stable expression of green fluorescent protein after liposomal transfection of K562 cells without selective growth conditions [J]. *Biotechniques*, 1999, 27 (6): 1162-1164, 1166-1170.
- [7] Kawakami N, Sakane N, Nishizawa F, et al. Green fluorescent protein-transgenic mice: Immune functions and their application to studies of lymphocyte development[J]. *Immunol Lett*, 1999, 70(3): 165-171.
- [8] Hadjantonakis A K, Macmaster S, Nagy A. Embryonic stem cells and mice expressing different GFP variants for multiple non-invasive reporter usage within a single animal[J]. *BMC Biotechnol*, 2002, 2(1): 1-9.
- [9] Luker K E, Smith M C, Luker G D, et al. Kinetics of regulated protein-protein interactions revealed with firefly luciferase complementation imaging in cells and living animals [J]. *PNAS*, 2004, 101 (33): 12288-12293.
- [10] Fernandez-Suarez M, Chen T S, Ting A Y. Protein-protein interaction detection in vitro and in cells by proximity biotinylation [J]. *J Am Chem Soc*, 2008, 130(29): 9251-9253.
- [11] Mendelsohn A R, Brent R. Protein interaction methods—toward an

endgame[J]. *Science*, 1999, 284(5422): 1948-1950.

- [12] Wehrman T, Kleaveland B, Her J H, et al. Protein-protein interactions monitored in mammalian cells via complementation of beta -lactamase enzyme fragments[J]. *PNAS*, 2002, 99(6): 3469-3474.
- [13] Anderie I, Schmid A. In vivo visualization of actin dynamics and actin interactions by BiFC[J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(10): 1131-1135.
- [14] Hu C D, Chinenov Y, Kerppola T K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. *Mol Cell*, 2002, 9(4): 789-798.
- [15] Hu C D, Kerppola T K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(5): 539-545.
- [16] Luker K E, Piwnica-Worms D. Optimizing luciferase protein fragment complementation for bioluminescent imaging of protein-protein interactions in live cells and animals[J]. *Methods Enzymol*, 2004, 385: 349-360.
- [17] Shyu Y J, Liu H, Deng X, et al. Identification of new fluorescent protein fragments for bimolecular fluorescence complementation analysis under physiological conditions[J]. *Biotechniques*, 2006, 40(1): 61-66.
- [18] Kerppola T K. Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(6): 449-456.
- [19] Lin J, Wang N, Li Y, et al. LEC-BiFC: A new method for rapid assay of protein interaction[J]. *Biotech Histochem*, 2010, 14(1): 1-8.
- [20] Knauer S K, Stauber R H. Development of an autofluorescent translocation biosensor system to investigate protein-protein interactions in living cells[J]. *Anal Chem*, 2005, 77(15): 4815-4820.
- [21] Emery A C, Pshenichkin S, Takoudjou G R, et al. The protective signaling of metabotropic glutamate receptor 1 is mediated by sustained, {beta}-arrestin-1-dependent ERK phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285 (34): 26041-26048.
- [22] Kopecka M, Ilkovic L, Ramikova V, et al. Effect of cytoskeleton inhibitors on conidiogenesis and capsule in the long neck yeast *fellomyces* examined by scanning electron microscopy [J]. *Chemotherapy* 2010, 56(3):197-202.
- [23] Esposito F, Tornincasa M, Chieffi P, et al. High-mobility group A1 proteins regulate p53-mediated transcription of *Bcl-2* gene [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(13): 5379-5388.
- [24] Yoshida K, Komatsu K, Wang H G, et al. c-Abl tyrosine kinase regulates the human Rad9 checkpoint protein in response to DNA damage[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(10): 3292-3300.
- [25] Lechertier T, Sirri V, Hernandez-Verdun D, et al. A B23-interacting sequences as a tool to visualize protein interactions in a cellular context [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt2): 265-275.

附表 1 合成 NoLS 和 ABL 的引物列表
Supplemental table 1 Oligonucleotides for annealing NoLS and ABL sequences

引物编号	Oligonucleotides(5'-3')	注释
Primer01n	5'-AATTCGGCAATCAACAAGCT-3'	
Primer02c	5'-TGGAGTTCTCGGAGATFGTTTTCCAGCTTGTGATTGCCG-3'	退火合成 AINKLENNLRELQICPAT
Primer03n	5'-GGAAAACAATCTCCGAGA ACTCCAAATCTGCCAGCTACCTA-3'	
Primer04c	5'-AGCTTAGGTAGCTGGGCAGATT-3'	
Primer05n	5'-AGCAAACGACCACGACGTCT-3'	
Primer06c	5'-TTTCTTTGCCAGTCGGCGCAGACGTCGTGGTCTTTGCT-3'	
Primer07n	5'-GCGCCGACTGGGCAAAGAAACCATGGGCGCGCATGCCGC-3'	
Primer08c	5'-CGATGGCTGCCAGATGCGCGGCATGCCGCGCCATGG-3'	
Primer09n	5'-GCGCATCTGGGCAGCCATCGCTGGCCGACCACATGCACCA-3'	
Primer10c	5'-GCGAGTGGTCTGCTTTTGGTGTGCATGTGGTCCGCCAG-3'	
Primer11n	5'-CCAAAACCACGACCACTCGCGCGCGCCCGAAAACGCCG-3'	
Primer12c	5'-TGCCCAGCCGGCGGCACGTCGGCGTTTTCGGCGCGCGC-3'	
Primer13n	5'-ACGTCGCCCGCGCTGGGCACCGAAATTACCTTTTGCAGC-3'	退火合成 NoLS
Primer14c	5'-ATCAGGCTCAGTTTCATCACGTCGAAAAGGTAATTCGG-3'	
Primer15n	5'-GTGATGAAACTGAGCCTGATGGTGTATTCCGGTGAAAAG-3'	
Primer16c	5'-CGGTCAATCCGGCGCATCACTTTCACCGGAATAAACACC-3'	
Primer17n	5'-TGATGCGCCGATTGAAACCGCATATGCAGGCGCTGGTGAC-3'	
Primer18c	5'-TCCATGTCCCTGCAGTCCGGTCACCAGCGCCTGCATATG-3'	
Primer19n	5'-CGGACTGCAGGACATGGA-3'	
Primer20c	5'-CAGAATTCTG AGCAAACGACCACGACGTCTG-3'	
Primer21n	5'-AGGATCCCCTCCATGTCCCTGCAGTCCGG-3'	
Primer20c'	5'-CAGAATTCTGCCCACCATGAGCAAACGACCACGACGTCTG-3'	

附表 2 PCR 反应引物
Supplemental table 2 The primers for PCR

引物编号	Oligonucleotides(5'-3')
Venus01n	5'-CCGGAGGGCAGGTGGGACGGCAGCTCGCCATCATCGGGGACGACATCAACCGAT-3'
Venus02c	5'-CTAGATCGGTGATGTCGTCCCGATGATGGCGAGCTGCCGTCCACCTGCC-3'
Bcl2n	5'-CAATCTCGAGATGGCGCACGCTGGGAGA-3'
Bcl2c	5'-CGACGAATTCTCACTTGTGGCTCAGATAGG-3'
Nov071n	5'-CAATGCGGCCG GCCACCATGAGCAAACGACC -3'
Nov071c	5'-ATGGTA ATCGATGAT CAGGAACAGGTGGTGGCGG -3'

```

S K R P R R L R R L G K E T M G R A C R
1  agcaaacgcccgcgctgtgcccactgggcaaagaaacctgggcccgcacatgccc 60
A H L G S H R W P T T C T T K T T T R
61  ggcacatggggcagccatcgtggccgaccacatgcaccacaaaaccagcactcgc 120
A R R R K R R R R R R L G T E I T F C S
121  gcgcgcgcgaaaaagccgacgtcgccgcccgtggcaccgaaattacctttgcagc 180
V M K L S L M V F I P V K V M R R I E P
181  gtgatgaaactgagcctgatggtgittatccggtgaaagtgatgcgcccgaattgaccg 240
H M Q A L V T G L Q G H G
241  catatgcaggcctggtgaccggcctgcaggccatggc 279
    
```

附图 1 NoLS 的 DNA 和氨基酸序列图
Supplemental Fig. 1 DNA and protein sequences of NoLS

(责任编辑 吴晓丽)