

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001803

Plk1 PBD 蛋白原核表达、分离纯化与活性鉴定

陈云雨¹, 刘 刚¹, 张 晶², 刘晓平¹

(1. 皖南医学院药学院新药筛选与评价中心, 芜湖 241002;

2. 中国医学科学院-北京协和医学院医药生物技术研究所国家新药(微生物)筛选中心, 北京 100050)

【摘要】目的:原核表达保罗样激酶 1 底物结合域(Polo-like kinase 1 Polo-box domain, Plk1 PBD)蛋白, 经分离纯化后进行生物学活性鉴定。**方法:**以 HeLa cDNA 为模板经 PCR 反应扩增 *Plk1 PBD* 基因, 利用 DNA 重组技术与 pET-28a 载体连接构建重组质粒。将重组质粒转化到 *E.coli* Rosetta(DE3), 经诱导培养后进行 Plk1 PBD 蛋白原核表达。采用亲和层析方法分离纯化 Plk1 PBD 蛋白后, 以酶联免疫吸附测定实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)和荧光偏振实验(fluorescence polarization, FP)进行生物学活性鉴定。**结果:**测序与重组质粒酶切结果表明, 成功构建了 pET-28a-Plk1 PBD 原核表达质粒。SDS-PAGE 电泳和 Western blot 实验证实了 Plk1 PBD 蛋白的原核表达。ELISA 实验和 FP 实验表明 Plk1 PBD 蛋白具有良好的生物学活性。**结论:**成功进行了 Plk1 PBD 蛋白的原核表达、分离纯化与活性鉴定, 为其生物学功能研究及以 Plk1 PBD 蛋白为靶标的新型抗肿瘤药物发现奠定了基础。

【关键词】Plk1 PBD 蛋白; 原核表达; 亲和层析; 荧光偏振**【中图分类号】**Q789**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-01-30Bacterial expression, purification and biological activity evaluation
of Plk1 PBD proteinChen Yunyu¹, Liu Gang¹, Zhang Jing², Liu Xiaoping¹

(1. Center for New Drug Screening & Evaluation, School of Pharmacy, Wannan Medical College;

2. National Center for Microbial Drug Screening, Institute of Medicinal Biotechnology,

Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College)

【Abstract】Objective: To develop the bacterial expression, purification and biological activity evaluation methods for Polo-like kinase 1 Polo-box domain(Plk1 PBD) protein. **Methods:** HeLa cDNA was served as a template to amplify *Plk1 PBD* gene fragment by PCR. After inserting into pET-28a vector, *E.coli* Rosetta(DE3) competent cells were transformed with pET-28a-Plk1 PBD plasmid. Plk1 PBD protein was expressed after induction and purified with HisTrap affinity chromatography, and then the biological activity was evaluated by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) and fluorescence polarization(FP) assay. **Results:** The DNA sequencing and double digestion map for recombinant plasmid showed the construction was successful. SDS-PAGE and Western blot assay demonstrated that Plk1 PBD protein was successfully expressed and purified, and ELISA and FP assay showed a perfect biological activity of Plk1 PBD protein. **Conclusion:** Plk1 PBD protein is prepared successfully, which paves the way for further study on its cellular functions *in vitro* and the development for novel Plk1 inhibitors targeting Polo-box domain.

【Key words】Plk1 Polo-box domain protein; bacterial expression; affinity chromatography; fluorescence polarization

作者介绍: 陈云雨, Email: chenyunyu1984@163.com,

研究方向: 新药筛选与分子药理学。

通信作者: 刘晓平, Email: liuxiaoping@wnmc.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81370087, 81703546);

安徽省自然科学基金资助项目(编号: 1808085QH265);

吉林省科技发展计划资助项目(编号: 20160520045JH)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180704.0948.002.html>

(2018-07-05)

保罗样激酶-1 (Polo-like kinase 1, Plk1) 是广泛存在于真核生物中的一类丝/苏氨酸蛋白激酶, 其 N 端具有一个高度同源的激酶结构域 (kinase domain, KD), C 端具有调节激酶催化活性及亚细胞定位的底物结合域 (Polo-box domain, PBD), PBD 是 Plk1 特有的结构域。Plk1 在有丝分裂 G₂/M 期表达, 在有丝分裂启动、中心体成熟、纺锤体组装、染色体整列等过程中发挥重要作用^[1]。由于 Plk1 在有丝分裂高度活跃的恶性肿瘤细胞中呈过度表达, 调控肿瘤的发生与发展, 因此以 Plk1 为靶标的药物较传统微管蛋白活性抑制剂 (紫杉醇、长春碱) 具有更好的选择性和应用前景^[2-3]。Plk1 已成为肿瘤分子靶向治疗中最具潜力的重要靶标之一。

目前, 大部分 Plk1 小分子抑制剂是针对激酶结构域进行设计的, 特别是 BI2536、volasertib、rigosertib 及 HMN214 已经进入临床研究并展现出良好的应用前景^[4-5]。但激酶结构域在众多激酶结构中的高度保守性以及结构变异积累导致的耐药等问题, 使开发高选择性的 Plk1 抑制剂面临极大的挑战。因此, Plk1 特有的底物结合域 PBD 成为新型 Plk1 小分子抑制剂开发的理想靶标^[2,6]。

本研究通过 PCR 反应扩增 *Plk1 PBD* 基因, 构建 pET-28a-Plk1 PBD 原核表达载体, 表达和纯化高活性的 Plk1 PBD 蛋白, 为其生物学功能研究及靶向 Plk1 PBD 新型抗肿瘤药物发现奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株与细胞株 pET-28a 质粒、pGEX4T-1 质粒由本室保存; *E.coli* DH5 α 及 *E.coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞购自 TransGen Biotech; HeLa 细胞由本室保存。

1.1.2 试剂 TransScript[®] 反转录试剂盒、2 $\times$ Easy Taq[®] 酶、DNA 标准分子量、pEASY[®]-T1 试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 TransGen Biotech; 限制性内切酶 *Nde* I、*Xho* I 购自 Takara; 蛋白标准分子量、BCA (bicinchoninic acid) 法蛋白定量试剂盒购自 ThermoFisher; 异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 小鼠抗 His 标签单抗、HRP-羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 可溶型单组份四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB) 溶液购自天根生化科技 (北京) 有限公司; HisTrap 和 GSTrap 亲和层析柱购自

GE Healthcare; FITC-Poloboxitide (FITC-GPMQSpTPLNG-OH; MW:1583.61) 由上海强耀生物科技有限公司合成; 其他生化试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 *Plk1 PBD* 基因的扩增 根据 Plk1 PBD (326-603 aa) 基因序列设计上下游引物, 上游引物 P1: 5'-GACCATTCCA-CCACATATGTCGATTGC-3'; 下游引物 P2: 5'-AGCTCGAG-GGAGGCCTTGAGACG-3'。以 HeLa cDNA 为模板扩增 Plk1 PBD 基因片段 (834 bp)。PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min、94 $^{\circ}$ C 30 s、55 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 60 s、30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 总延伸 10 min。PCR 反应结束后, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增结果。以胶回收试剂盒回收目的基因片段。

1.2.2 *Plk1 PBD* 基因与 T 载体连接 以 pEASY[®]-T1 试剂盒将回收的 *Plk1 PBD* 基因与 T 载体连接。连接产物转化 *E.coli* DH 5 α 感受态细胞, 涂布于含有 100 μ g/mL 氨苄西林抗性的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。以单菌落 PCR 反应和质粒双酶切法鉴定阳性克隆。

1.2.3 序列测定 将上述方法鉴定的阳性克隆质粒进行基因测序和 BLAST 比对分析。

1.2.4 *Plk1 PBD* 蛋白原核表达载体的构建 上述测序正确的克隆质粒和 pET-28a 载体分别进行双酶切反应, 将回收的 *Plk1 PBD* 基因片段与 pET-28a 表达载体进行连接。连接产物转化 *E.coli* DH 5 α 感受态细胞后, 以 1.2.2 法鉴定阳性克隆。

1.2.5 *Plk1 PBD* 蛋白的表达 将鉴定正确的重组质粒转化 *E.coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞, 涂布于含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。随机挑取 4 个单菌落接种至 5 mL LB 液体培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 中, 诱导目的蛋白表达 (0.5 mmol/L IPTG, 20 $^{\circ}$ C 诱导 10 h)。收集 1/5 的菌体沉淀, 以 12% SDS-PAGE 电泳 (下同) 检测 Plk1 PBD 蛋白表达。另 4/5 菌体沉淀重悬于 1 mL TBS (50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl pH8.0), 以超声波法裂解菌体, 离心收集裂解后的上清液和沉淀。以 SDS-PAGE 电泳进行目的蛋白的可溶性表达分析。同时以转化 pET-28a 质粒的 *E.coli* Rosetta BL21 (DE3) 为阴性对照组。

1.2.6 *Plk1 PBD* 蛋白的分离纯化 收集菌体裂解上清液, 用 10 倍体积的平衡液 (25 mmol/L Tris、0.5 mol/L NaCl、50 mmol/L 咪唑 pH7.8) 稀释后, 制备粗提液。将 HisTrap 亲和层析柱依次用 10 倍柱床体积的蒸馏水和平衡液进行清洗与平衡。上样流速 0.5 mL/min, 待上样完毕后, 再以平衡液洗脱流穿峰至基线。最后以洗脱液 (25 mmol/L Tris、0.5 mol/L NaCl、500 mmol/L 咪唑 pH7.8) 进行梯度洗脱并收集目的蛋白峰。纯化的 Plk1 PBD 蛋白以 SDS-PAGE 电泳进行分析, 透析过夜后, 以 BCA 法进行定量。

1.2.7 Western blot 鉴定纯化的 Plk1 PBD 蛋白 将 1.2.6 的

电泳胶进行转膜,进行 Western blot 检测。一抗为 1:2 000 稀释的小鼠抗 His 单抗,二抗为 1:2 000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG,用增强型辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)底物化学发光液显影成像。

1.2.8 GST-Map205^{PRM} 原核表达与分离纯化 检索 Map205^{PRM} (276–325 aa) 的基因序列,在其两端加入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点后进行人工合成。合成的基因片段直接连接 pGEX-4T-1 载体并进行测序。Map205^{PRM} 基因合成序列如下:

```
ggatcccttgacgatttggtggcgaaagtccgcggaagaattcgccgaatcaac
atggatggtattgcgtgccgcacgagcgggaattgacattgaagcggatatgcaccca
cgagttggagcaggaatcgacacttttggggcaggactcgag。
```

将 pGEX-4T-1-GST-Map205^{PRM} 重组质粒转化 *E.coli* Rosetta (DE3) 感受态细胞,以 1.2.6 方法进行 GST-Map205^{PRM} 表达(0.5 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导 4 h)。菌体以超声波裂解后,收集裂解上清液,用 10 倍体积的平衡液(50 mmol/L Tris、0.15 mol/L NaCl pH8.0)稀释后,制备粗提液。将 GSTrap 亲和层析柱依次用 10 倍柱床体积的蒸馏水和平衡液进行清洗和平衡。上样流速 0.1 mL/min,上样完毕后,再以平衡液洗脱流穿峰至基线。最后以洗脱液(50 mmol/L Tris、0.15 mol/L NaCl、10 mmol/L 还原型谷胱甘肽 pH8.0)直接洗脱 GST-Map205^{PRM} 并收集目的蛋白峰。纯化的 GST-Map205^{PRM} 以 SDS-PAGE 电泳进行分析,透析后定量。

1.2.9 酶联免疫吸附测定实验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 包被 GST-Map205^{PRM} (10 µg/mL; 100 µL/孔) 于 96 孔酶标板中,4 °C 过夜。以含 0.1% Tween-20 的磷酸盐(phosphate buffered solution, PBS)缓冲液(PBST)洗板 3 次。酶标板以含 3%牛血清白蛋白(bull serum albumin, BSA)的 PBS 封闭 2 h 后, PBST 洗板。依次加入 2 倍倍比稀释的 8 组不同浓度的 Plk1 PBD 蛋白(起始浓度 5 µg/mL; 100 µL/孔),每组设置 3 个复孔,室温反应 1 h。以 PBST 洗板后,再依次加入小鼠抗 His 标签单抗(1:2 000; 100 µL/孔)和 HRP-羊抗小鼠 IgG (1:2 000; 100 µL/孔),室温反应 1 h, PBST 洗板。加入

TMB 底物显色液(100 µL/孔),室温避光 5 min,以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应,多功能酶标仪检测 450 nm 处吸光度(absorbance, A)值,即 A_{450 nm}。

1.2.10 荧光偏振实验 参考文献[7–8],将 60 nmol/L FITC-Poloboxide 溶液(30 µL/孔)依次加入 384 孔板中,同时将 Plk1 PBD 蛋白以荧光偏振反应液(50 mmol/L Tris、10 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA pH8.0)稀释至 1 000、800、600、400、200、100、50、0 nmol/L。将不同浓度的 Plk1 PBD 蛋白稀释液以 30 µL/孔依次加入到含有 FITC-Poloboxide 的 384 孔板中,每个浓度设置 3 个复孔。室温缓慢振摇,避光孵育 15 min,多功能酶标仪检测 mP 值(millipolarization unit)。

2 结果

2.1 Plk1 PBD 蛋白原核表达质粒的构建

以 HeLa cDNA 为模板,利用 PCR 反应扩增出约 840 bp 的特异片段,与 *Plk1 PBD* 基因理论大小一致(图 1A)。将测序正确的 *Plk1 PBD* 基因与 pET-28a 载体连接构建原核表达质粒,随机选取经卡那霉素抗性筛选的重组菌落进行 PCR 鉴定。电泳结果表明,所有菌落均可扩增出约 840 bp 的特异片段(图 1B)。重组质粒经 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切反应后,得到了约 840 bp 的 DNA 片段,与预期大小一致(图 1C)。上述结果表明,成功构建了 Plk1 PBD 蛋白原核表达质粒。

2.2 Plk1 PBD 蛋白的原核表达

4 株工程菌经诱导培养后,离心收集菌体,以 SDS-PAGE 电泳分析,与阴性对照组相比,在相对分子量 30 kD 左右可见明显的蛋白表达条带,与 Plk1 PBD 蛋白理论分子量基本一致(图 2)。取裂解菌体的沉淀和上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析,发现 Plk1 PBD 蛋白绝大部分存在于裂解上清液中,表明 Plk1 PBD 蛋白以可溶形式表达(图 3A)。综上所述,成功进行了 Plk1 PBD 蛋白的原核表达。

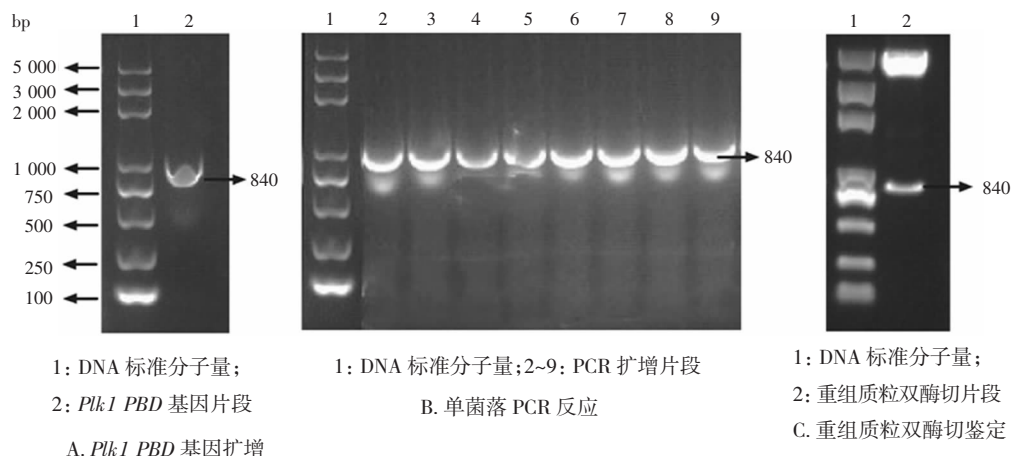
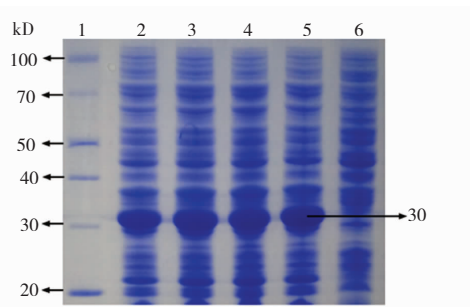
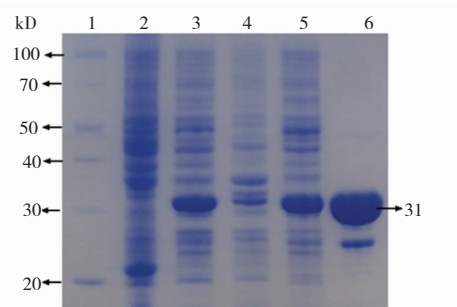


图 1 Plk1 PBD 蛋白原核表达质粒的构建



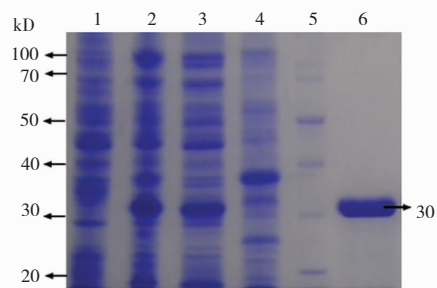
1: 标准分子量; 2~5: 诱导的单克隆菌落; 6: 阴性对照

图 2 Plk1 PBD 蛋白的原核表达

1: 标准分子量; 2: 阴性对照; 3: 菌体蛋白; 4: 裂解沉淀; 5: 裂解上清液; 6: 纯化的 GST-Map205^{PBM} 蛋白 (31 kD)图 4 GST-Map205^{PBM} 原核表达与分离纯化

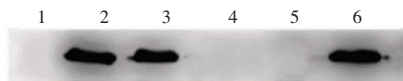
2.3 Plk1 PBD 蛋白的分离纯化与鉴定

将裂解上清液经 HisTrap 亲和层析柱分离纯化, 将收集的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝染色后呈单一蛋白条带, 表明纯化的 Plk1 PBD 蛋白具有较高的纯度 (图 3A)。以 Western blot 实验鉴定纯化的 Plk1 PBD 蛋白, 结果可见在相对分子量 30 kD 左右出现特异性条带, 证实了 Plk1 PBD 蛋白的正确表达 (图 3B)。目的蛋白经透析和 BCA 法定量后, 其浓度为 0.85 mg/mL。



1: 阴性对照; 2: 菌体蛋白; 3: 裂解上清液; 4: 裂解沉淀; 5: 标准分子量; 6: 纯化的 Plk1 PBD 蛋白 (30 kD)

A. Plk1 PBD 蛋白的分离纯化



1: 阴性对照; 2: 菌体蛋白; 3: 裂解上清液; 4: 裂解沉淀; 5: 标准分子量; 6: 纯化的 Plk1 PBD 蛋白

B. Plk1 PBD 蛋白的 Western blot 鉴定

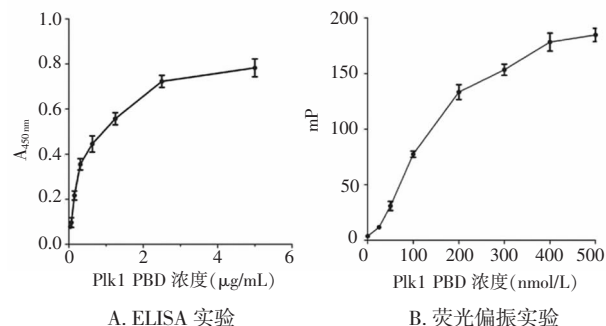
图 3 Plk1 PBD 蛋白的分离纯化与鉴定

2.4 GST-Map205^{PBM} 原核表达与分离纯化

GST-Map205^{PBM} 工程菌经诱导培养后收集菌体, 以 SDS-PAGE 电泳分析, 在相对分子量 31 kD 左右可见明显的蛋白表达条带, 与 GST-Map205^{PBM} 理论分子量基本一致。取裂解菌体的沉淀和上清液进行上述电泳, 结果表明 GST-Map205^{PBM} 存在裂解上清中, 以可溶形式表达。裂解上清液经 GSTrap 亲和层析柱分离纯化后, 将收集的样品进行电泳, 得到了条带单一的 GST-Map205^{PBM}, 与预期大小一致 (图 4)。纯化的蛋白经透析和 BCA 法定量后, 其浓度为 3.94 mg/mL。

2.5 Plk1 PBD 蛋白的生物学活性鉴定

由于 Plk1 通过 PBD 结构域与 Map205^{PBM} 相互作用^[9-10], Map205^{PBM} 介导的 ELISA 实验表明, 随着 Plk1 PBD 蛋白浓度的逐渐升高, $A_{450\text{nm}}$ 值也随之升高, 结合反应具有良好的浓度依赖性 (图 5A)。将 FITC-Poloboxitide 作为 Plk1 PBD 模拟磷酸化底物^[7,11], 在荧光偏振实验中, 随着 Plk1 PBD 蛋白浓度的升高, mP 值也逐渐升高并趋于平台期, 其结合反应具有典型的量效关系 (图 5B)。上述结果表明, 纯化的 Plk1 PBD 蛋白具有良好的生物学活性。



A. ELISA 实验

B. 荧光偏振实验

图 5 Plk1 PBD 蛋白的生物学活性鉴定

3 讨论

大肠杆菌原核表达体系具有遗传背景清楚、操作简单、成本低廉、易于发酵等优点, 成为重组蛋白表达的首选方式^[12]。本研究利用 DNA 重组技术, 成功进行了 Plk1 PBD 蛋白原核表达和分离纯化。在 Plk1 PBD 蛋白表达载体选择方面, 本研究曾首选 pET-30a 作为表达载体, 但在后续的实验中发现, 以此构建的原核表达质粒在 *E. coli* Rosetta (DE3) 中基本没有明显的目的蛋白表达。探究上述原因, 本研究认为可能是由于外源序列携带的起始密码子不能被大肠杆菌有效利用, 进而导致蛋白翻译效率的极大降低。故此, 在利用原有酶切位点基础上, 更换

pET-28a 作为表达载体,在重组蛋白两端进行 $6 \times \text{His}$ 标签的融合表达后,经 20°C 低温诱导,Plk1 PBD 蛋白在 *E.coli* Rosetta(DE3)中呈可溶表达,表达量约 50 mg/L 。另外,不同表达宿主菌的选择对外源蛋白表达的影响也是极其重要的。由于 *E.coli* Rosetta (DE3)含有 6 种稀有密码子对应的 tRNA,故此首选其作为 Plk1 PBD 蛋白的表达宿主菌。

Drosophila Map205(microtubule-associated protein 205, Map205)是一类分布于微管上参与有丝分裂调控的功能蛋白。Plk1 通过 PBD 结构域与 Map205^{PBM} 相互作用,进而“锚定”在微管上调控有丝分裂过程。但 Map205 是迄今为止发现的唯一一个以非磷酸化形式与 Plk1 PBD 蛋白相互作用的底物蛋白^[9-10]。鉴于 Map205^{PBM} 和其他磷酸化底物蛋白(如 Wee1A、Cdc25C)相比的原核表达优势,采用操作简便的原核表达体系进行 GST-Map205^{PBM} 的制备。

PBD 结构域是 Plks 家族特有的结构域,是调控激酶催化活性和结合磷酸化底物的重要功能性结构域。正常情况下,Plk1 激酶区域(kinase domain, KD)与 PBD 结构域结合,以一种自抑制的调控形式存在;当 Thr210 被上游的其他激酶磷酸化后,KD 结构域开始解离,PBD 结构域开始与磷酸化底物结合,开启 Plk1 催化活性,从而开始一系列的激酶催化反应^[10,13]。另外,Plk1 通过 PBD 结构域与其磷酸化底物蛋白结合,在有丝分裂的不同时期使 Plk1 “锚定”于中心体、动粒、赤道板以精准调控 Plk1 的亚细胞空间分布而发挥相应的有丝分裂调控功能^[14],但 Plk1 PBD 与其底物蛋白结合具有磷酸化依赖性和空间结构依赖性特征^[7,11]。故此,稳定的空间构象对于 Plk1 PBD 生物学功能的发挥至关重要。

荧光偏振技术主要基于荧光分子的偏振性与其受激发时的旋转速度密切相关的原理,被广泛应用于血药浓度监测、药物筛选、大分子活性分析及疾病诊断^[7-8,15]。荧光偏振检测在溶液中进行,是均相检测形式的最佳解决方案。本研究利用已报道的 FITC-Poloboxide 作为 Plk1 PBD 蛋白模拟磷酸化底物^[7,11],相比固相包被 GST-Map205^{PBM} 的 ELISA 实验,荧光偏振技术可在液相环境中检测其与 Plk1 PBD 蛋白的特异结合反应。ELISA 实验和 FP 结果表明,Plk1 PBD 蛋白能够与 GST-Map205^{PBM} 和 FITC-Poloboxide 发生特异性结合,其具有良好的生物学活性。

重组蛋白的高效制备和活性鉴定具有重要的

实践意义。PBD 结构域作为 Plk1 特有的底物结合域和重要的功能调节域,是未来高选择性 Plk1 抑制剂开发的一个理想靶标。本研究成功进行了 Plk1 PBD 蛋白原核表达、分离纯化与活性鉴定,为其生物学功能研究和以 Plk1 PBD 为靶标的新型抗肿瘤药物高通量筛选模型的建立奠定了坚实基础。

致谢

感谢皖南医学院博士科研启动基金(RC-QD201617)对本研究项目的资助!

参考文献

- [1] Archambault V, Glover DM. Polo-like kinases; conservation and divergence in their functions and regulation[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(4): 265-275.
- [2] 张亮,曹燕华,卢帅,等. 靶向 Polo 样激酶 1 底物结合区: PBD1 抑制剂的研究进展[J]. 药理学, 2013, 48(3): 315-324.
- [3] Lens SM, Voest EE, Medema RH. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2010, 10(12): 825-841.
- [4] Liu X. Targeting Polo-like kinases; a promising therapeutic approach for cancer treatment[J]. Transl Oncol, 2015, 8(3): 185-195.
- [5] McInnes C, Wyatt MD. PLK1 as an oncology target; current status and future potential[J]. Drug Discov Today, 2011, 16(13): 619-625.
- [6] Lee KS, Idle JR. Pinning down the polo-box domain[J]. Chem Biol, 2008, 15(5): 415-416.
- [7] Chen Y, Zhang J, Li D, et al. Identification of a novel Polo-like kinase 1 inhibitor that specifically blocks the functions of Polo-Box domain[J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 1234-1246.
- [8] 陈云雨, 缪冬冬, 张叶明, 等. 靶向 PLK1 PBD 小分子抑制剂荧光偏振高通量筛选模型的建立[J]. 中国医药生物技术, 2017, 12(5): 385-390.
- [9] Archambault V, D'Avino PP, Deery MJ, et al. Sequestration of Polo kinase to microtubules by phosphopriming-independent binding to Map205 is relieved by phosphorylation at a CDK site in mitosis[J]. Genes Dev, 2008, 22(19): 2707-2720.
- [10] Xu J, Shen C, Wang T, et al. Structural basis for the inhibition of Polo-like kinase 1[J]. Nat Struct Mol Biol, 2013, 20(9): 1047-1053.
- [11] Elia AE, Relloso P, Haire LF, et al. The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain[J]. Cell, 2003, 115(1): 83-95.
- [12] 张鹤铭, 蔡楚凡, 刘杨, 等. 人白血病抑制因子在原核细胞中的表达与纯化[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(9): 7-14.
- [13] Park JE, Soung NK, Johmura Y, et al. Polo-box domain; a versatile mediator of polo-like kinase function[J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(12): 1957-1970.
- [14] Dai W, Wang X. Grabbing Plk1 by the PBD[J]. Mol Cell, 2006, 24(4): 489-490.
- [15] Lea WA, Simeonov A. Fluorescence polarization assays in small molecule screening[J]. Expert Opin Drug Discov, 2011, 6(1): 17-32.

(责任编辑: 冉明会)