

小鼠 EVL 基因的克隆和真核表达载体的构建 *

邹海¹ 韩骅^{1△} 高方² 曹秀丽² 徐骁²

(1 第四军医大学 基础部医学遗传学与发育生物学教研室 陕西 西安 710032 ;

2 第四军医大学 基础部神经生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 构建小鼠 EVL(Ena/VASP like)基因的真核表达载体,为深入研究 EVL 的功能奠定基础。方法 采用 PCR 方法,从小鼠 cDNA 文库中,扩增出 1245bp 的 EVL 编码区片段,经电泳、胶回收后连接入 pMD-18T 载体中,测序鉴定正确。用 *Bam*HI 和 *Hinc* II 双酶切,定向克隆 EVL 编码区片段到真核表达载体 pcDNA3.1 中,用限制性内切酶酶切鉴定重组质粒正确。将重组质粒转入 HELA 细胞中,以 RT-PCR 检测 EVL 的 mRNA 的表达,以 Western Blot 检测 EVL 蛋白的表达。结果 酶切鉴定结果显示小鼠 EVL 编码区基因被成功克隆入真核表达载体 pcDNA3.1 中,RT-PCR 和 Western Blot 结果以及免疫荧光染色显示 HeLa 细胞中有 EVL 的 mRNA 和蛋白的表达。结论 成功获得 pcDNA3.1-EVL 的真核表达载体,为进一步深入研究 EVL 蛋白的功能奠定了基础。

关键词 EVL 蛋白;基因克隆;真核表达

中图分类号:Q95-3,Q75,Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)24-4606-05

Clone of EVL and Construction of EVL Eukaryotic Expression Plasmid*

ZOU Hai¹, HAN Hua^{1△}, GAO Fang², CAO Xiu-li², XU Xiao²

(1 Department of Medical Genetics and Development Biology, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Institute of Neurosciences, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To generate eukaryotic expression plasmid of EVL (Ena/VASP like) gene, to lay foundation for further investigation of the function of EVL gene. **Methods:** EVL coding region of 1272/1245bp was amplified from mouse cDNA library by PCR, and was then cloned into pMD-18T-vector after being electrophoresed and gel-extracted. After identifying the T-EVL plasmid by sequencing, EVL CDS fragment was cut down by double digestion with *Bam*HI and *Hinc* II, and then was subcloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1. The recombinant plasmid was identified with restriction enzymes and was transfected into HELA cells via liposome mediation. The expression of EVL was detected by RT-PCR for the mRNA transcription and by Western Blot for the protein expression. **Results:** Identification by restriction enzymes showed that EVL coding region fragment had been successfully cloned into eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1. After transfected into HELA cells, the recombinant plasmid could produce EVL mRNA and protein indicated by RT-PCR results and Western Blot results. **Conclusion:** Eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-EVL was successfully cloned, which is helpful for a further investigation of the function of EVL protein.

Key words: EVL protein; Gene cloning; Eukaryotic expression

Chinese Library Classification: Q95-3, Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)24-4606-05

前言

EVL 蛋白属于 Ena/VASP 蛋白家族的成员。该蛋白家族对细胞的骨架蛋白 actin 有重要的调控作用,并通过对骨架蛋白的调控参与多种组织的发育和正常功能的维持,包括神经组织的发育^[1]、神经细胞的存活、神经轴突的生长^[2,3]以及血管内皮正常结构的维持等^[4]。

但是,目前对于 EVL 的功能研究都是作为 Ena/VASP 的成员之一来进行的^[4,26],例如剔除小鼠的研究也大多是该家族成员蛋白的联合剔除^[2,5],对于 EVL 单独的功能目前还了解不多。近两三年,在人的 EVL 蛋白研究方面,发现它除了对 actin

有重要的调控作用外,对于细胞 DNA 的同源重组等也具有十分重要的作用^[6,19]。那么,在小鼠中 EVL 蛋白是否也具有这些功能,还有待于进一步的研究。

为了更加深入地研究小鼠 EVL 蛋白的功能,我们在本研究中构建了小鼠 EVL 基因的真核表达载体 pcDNA3.1-EVL,并在 HeLa 细胞中进行了表达,为下一步研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株与载体

1.1.2 试剂与药品 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有

* 基金项目 国家重点基础研究发展规划(973 项目)资助(001CB509906) 国家自然科学基金资助项目(30200148)

作者简介 邹海(1984-) 男,硕士研究生,电话:18893690088 E-mail: 260609477@qq.com

△通讯作者 韩骅,男,博士生导师,教授

(收稿日期:2012-04-23 接受日期:2012-05-18)

限公司 ,RNA 提取试剂 TRIzol、转染试剂 Lipofectamine2000 购自 Invitrogen Gibco 公司 ,PCR 引物由 Takara 公司合成 ,Taq DNA 聚合酶、反转录试剂盒、限制性内切酶、修饰酶及 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司 ;质粒抽提以及胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司 ,抗 EVL 抗体购自 Santa cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 EVL 编码区的 PCR 扩增 P1 5'-GGCAGCCAC-GATGAGTGAACAG-3' ,P2 5'-CCAGGACTGGTGCCATCTT-ACG-3'。以小鼠 cDNA 文库为模板 扩增 EVL 基因片段。扩增后 经 10g/L 琼脂糖凝胶电泳 ,回收 PCR 产物 ,克隆入真核表达载体中。用 *Hinc* II 和 *Xba* I 以及 *Eco*RI 进行酶切鉴定 ,得到了 T-EVL 阳性克隆载体 ,交由公司进行测序。

1.2.2 重组表达载体的构建 回收目的片段 ,用 *Bam*HI 和 *Hinc* II 从 T-EVL 载体中切下 EVL 编码区基因片段 ,连接入上一步酶切回收的 pcDNA3.1 片段 ,连接、转化、扩增后得到 pcDNA3.1-EVL 载体 ,再用 *Eco*RI 和 *Hind* III 进行进一步的酶切鉴定。

1.2.3 细胞培养和转染 细胞转染用脂质体(Lipofectamine2000 , Invitrogen)介导进行。取对数生长期的 Hela 细胞培养于 6 孔板中 ,当细胞生长至 80%融合时进行转染。每孔分别取 5 μ L 脂质体和 2 μ g 质粒 ,各自加入 100 μ L 无血清的 DMEM 培养基中 ,共孵育 30min ,以制备脂质体 -DNA 混合液。弃掉细胞中原有的培养液 ,缓慢滴加上述脂质体 -DNA 混合液。培养 6 h 后再次更换为含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养液 培养 72h。

1.2.4 RT-PCR 检测 EVL 的 mRNA 的表达 采用反转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链 ,具体操作参考该试剂说明书。PCR 所用上游引物为 P3 5'-AGCCTGCTGGGAGTGTGAATG-3' ,下游引

物为 P4 5'-ACCTTGTGCAGCTCCCGAAC-3' ,循环参数为 98 $^{\circ}$ C 20 秒 ,60 $^{\circ}$ C 30 秒 ,72 $^{\circ}$ C 30 秒 ,共循环 35 次。

1.2.5 Western Blot 检测转染细胞的蛋白表达 1 mM MgCl₂ ,1 mM PMSF ,1mg/mL OVA ,0.5% NP-40)冰上孵育 5 分钟 ,4 $^{\circ}$ C 旋转 30 分钟 ,4 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟(12000 转 / 分钟) ,收集蛋白样品 ,用 BCA 法测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白后电转移至 PVDF 膜 ,5%脱脂奶粉封闭 1 小时 ,PBS 洗涤后 ,分别加入抗 EVL 抗体和抗 actin 抗体 ,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜 ,PBS 洗涤后 ,加入相应的辣根过氧化物酶 HRP 标记的兔抗山羊 IgG、HRP 标记的羊抗鼠 IgG 孵育 1 小时 ,PBS 洗涤后化学发光法检测。

1.2.6 免疫荧光染色检测蛋白的表达 依次加入 10%正常兔血清进行封闭 ,再用 1% BSA 稀释的山羊抗小鼠 EVL 抗体于 4 $^{\circ}$ C 染色过夜 ,0.01M 的 PBS 洗涤 3 次 ,再加入抗山羊 IgG 的 CY3 标记的荧光二抗 ,0.01M 的 PBS 洗涤 3 次 ,制片后于荧光显微镜下观察。

2 结果

2.1 EVL 基因的扩增和克隆

为了获得 EVL 基因片段 ,cDNA 文库为模板 ,以引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增 ,得到 1245bp 的片段 ,符合小鼠 EVL 基因编码区大小(图 1A)。进而从凝胶中回收了扩增的条带 ,插入 pMD-18T 克隆载体。继而用 *Hinc* II 和 *Xba* I 以及 *Eco*RI 进行酶切鉴定 ,获得阳性克隆后(图 1 B, C) ,交由公司进行了 DNA 测序分析。结果表明所获得的扩增产物与 Genebank 中的小鼠 EVL 基因编码区完全吻合。

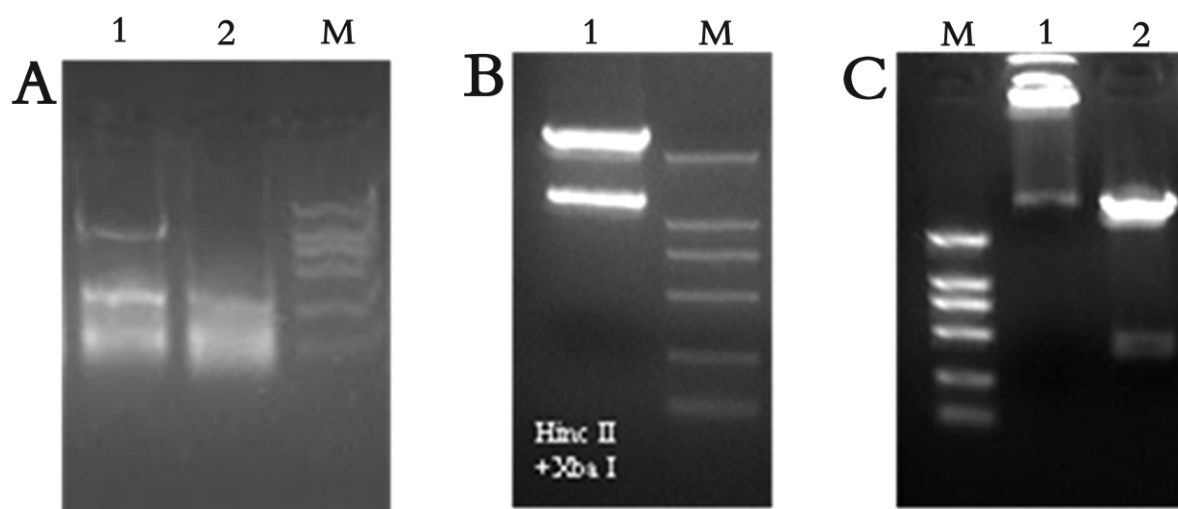


图 1 (A)以小鼠胚胎 cDNA 文库为模板 ,以引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增 ,得到 1272/1245bp 的片段(A 图 1 泳道) ,符合小鼠 EVL 基因编码区大小。2 泳道为阴性对照。(B)用 *Hinc* II 和 *Xba* I 进行酶切 ,可以得到大小为 1200bp 左右的阳性片段。(C)用 EVL 的 CDS 区内含有的 *Eco*RI 进行酶切鉴定 ,得到 3600bp 和 350bp 左右的片段 ,同时判断 EVL-CDS 插入的方向。1 为阴性克隆 2 为阳性克隆。M marker ,自上而下为 2000,1000,750,500,200,100bp

Fig.1 (A)Use mouse embryo cDNA library as template for PCR amplification with primers P1 and P2. Fragment with size of 1272/1245bp was obtained (Lane 1) which was correspond with the ORF of the mice EVL. Lane 2 was the negative control. (B) The correct fragment of about 1200bp can be obtained when digested with *Hinc*II and *Xba*I. (C)The fragment of about 3600bp and 350bp can be obtained when the plasmid was digested with *Eco*RI which was contained in the CDS region of ELV

2.2 pcDNA3.1-EVL 真核表达载体的构建

用 *Bam*HI 和 *Hinc* II 将 EVL 基因编码区片段从 pMD-18T 载体中切下,定向插入到用 *Xho*I 酶切、Klenow I 补平、然后再用 *Bam*HI 酶切的真核表达载体 pcDNA3.1 中,经过连接、转化得到重组表达载体 pcDNA3.1-EVL。酶切后,经 10g/L 的琼脂糖凝胶电泳(图 2)分析显示,构建的重组体经 *Eco*RI 和 *Hind* I-*II* 酶切可产生预期的 6271kb 和 336kb 的条带,证明得到了正确的重组真核表达载体 pcDNA3.1-EVL。

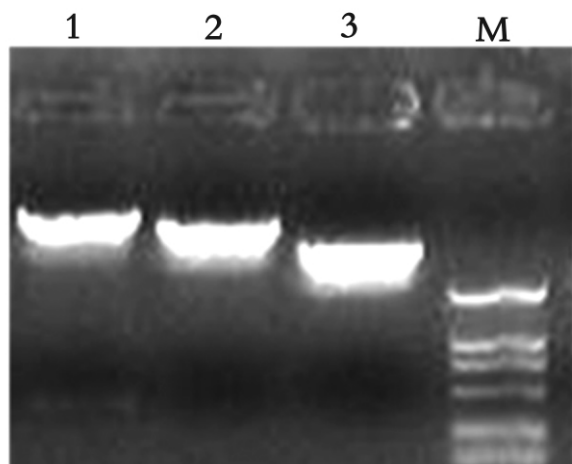


图 2 将 pcDNA3.1-EVL 用 *Eco*RI 和 *Hind* III 进行酶切,可产生预期的 6271kb 和 336kb 的条带,如 1 泳道所示,2、3 泳道为阴性克隆。M: marker,自上而下为 2000,1000,750,500,200,100bp

Fig. 2 The pcDNA3.1-EVL was digested with *Eco*RI and *Hind*III, and we can get the predicted fragments of 6271bp and 336bp as shown in Lane 1.

Lane 2 and Lane 3 were the negative control. M: marker, from top to bottom was 2000,1000,750,500,200,100 bp

2.3 EVL 蛋白的瞬时表达和检测

为了检测构建的 pcDNA3.1-EVL 是否能够在真核细胞中表达出 EVL 蛋白,我们将 pcDNA3.1-EVL 转染至 HELA 细胞,用 RT-PCR 检测 EVL 的 mRNA 表达、用 Western Blot 方法和免疫荧光染色的方法检测 EVL 蛋白的表达。

HELA 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板内,培养约 16 小时后细胞生长达 60~80%左右的融合,此时,将质粒 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-EVL 分别转染 HELA 细胞。转染后 72h,提取各组细胞的总 RNA 并反转录为 cDNA。以此 cDNA 为模板,使用 P3 和 P4 引物进行 PCR,产物经琼脂糖凝胶电泳后进行鉴定。结果显示(图 3)转染 pcDNA3.1-EVL 的细胞组可以检测出一条长度约为 100bp 的特异性条带,与预期大小相同,转染空载体 pcDNA3.1 的细胞组中则检测很弱的阳性性条带,推测为 HELA 细胞内源性的 EVL 表达。这一结果表明转染 pcDNA3.1-EVL 的 HELA 细胞中,会大量进行 EVL 的 mRNA 合成。其次,转染后 72h 收取蛋白,用 EVL 抗体检测各组细胞中 EVL 蛋白的表达。结果显示(图 4)转染 pcDNA3.1-EVL 的细胞组可以检测出一条与预期大小相同的特异性条带,而对照组呈现出很弱的条带,推测为 HELA 细胞内源性的 EVL 蛋白表达。这一结果证实转染 pcDNA3.1-EVL 的 HELA 细胞中有增强的 EVL

蛋白的表达。最后,对转染后 72h 的细胞进行免疫荧光染色。结果显示(图 5),EVL 的阳性荧光染色在转染 pcDNA3.1 的对照组细胞中只呈现很弱的表达,而在转染 pcDNA3.1-EVL 的细胞中则有很强的表达。这一结果更进一步证实了所构建的 pcDNA3.1-EVL 载体在转染入 HELA 细胞后能够进行有效的 EVL 蛋白的表达。

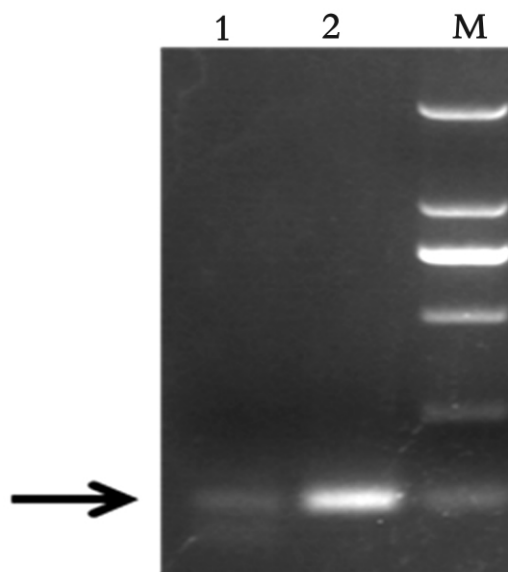


图 3 HELA 细胞转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-EVL 后 72h,提取各组细胞的总 RNA,反转录后用 P3 和 P4 引物进行 RT-PCR。可见转染 pcDNA3.1 的细胞中(1 泳道)有少量阳性片段的表达,推测为 HELA 细胞中内源性 EVL 的 mRNA 的转录。而转染 pcDNA3.1-EVL 的细胞中(2 泳道)则有很强的阳性条带,表明载体 pcDNA3.1-EVL 转染 HELA 细胞后,细胞中 EVL 的 mRNA 的转录增加。M: marker,自上而下为 2000,1000,750,500,200,100bp

Fig. 3 HELA cells were transfected with pcDNA3.1 and pcDNA3.1-EVL. Total RNA of each group was extracted after 72h. RT-PCR was carried out with P3 and P4 as primers after reverse transcription. A very weak band of the positive fragment was detected in pcDNA3.1 transfection group(Lane 1) which was considered as endogenous EVL expression in HELA cells.

The positive band in pcDNA3.1-EVL transfection group(Lane 2) was obviously stronger which indicated the mRNA of EVL in HELA was increased after transfected pcDNA3.1-EVL. M: marker, from top to bottom was 2000,1000,750,500,200,100 bp

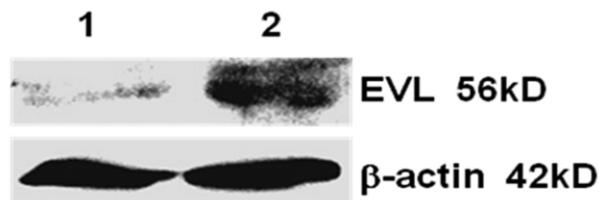


图 4 HELA 细胞转染 pcDNA3.1 和 pcDNA3.1-EVL 72h 后,提取各组细胞的总蛋白。相比对照组(1 泳道,转染 pcDNA3.1 空载体)而言,转染 pcDNA3.1-EVL 的细胞(2 泳道)中有更多的 EVL 蛋白的表达

Fig. 4 HELA cells were transfected with pcDNA3.1 and pcDNA3.1-EVL. Total protein of each group was extracted after 72h and western blot was carried out. Compared with control group(Lane 1), protein expression of EVL in the pcDNA3.1-EVL transfection group was obviously increased

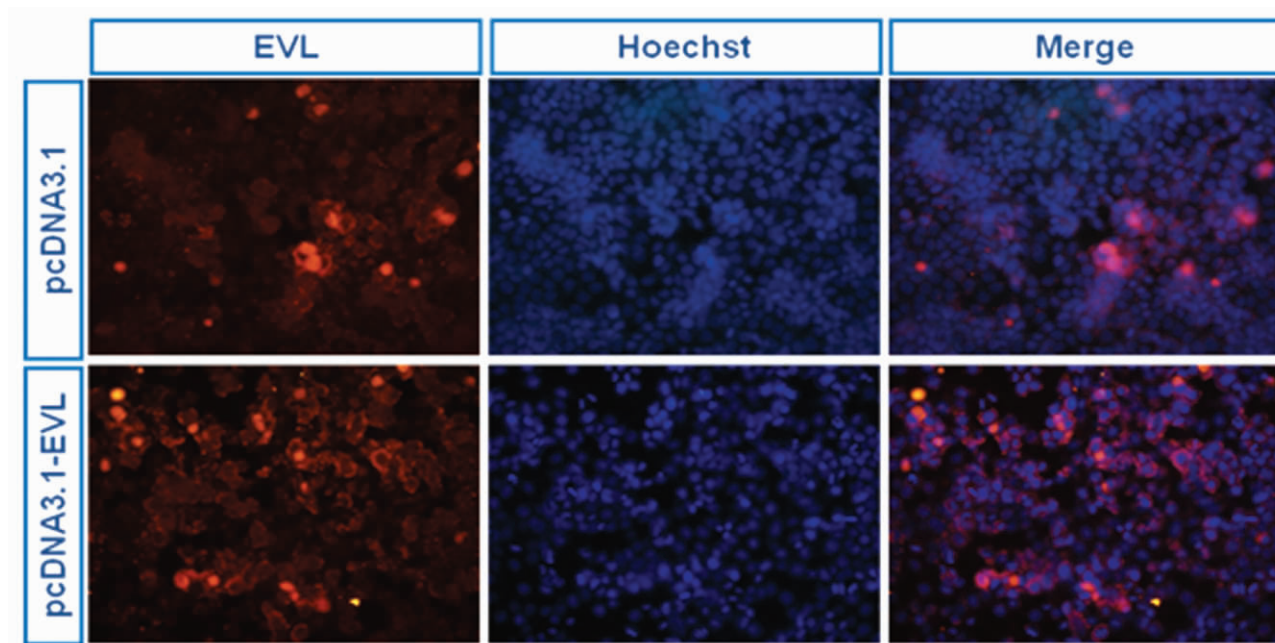


图5 对 EVL 蛋白进行免疫荧光染色 ,转染 pcDNA3.1 空载体的对照组细胞中只有少量的内源性 EVL 的表达 ,而转染 pcDNA3.1-EVL 后 ,细胞中 EVL 蛋白的表达比对照组增强很多

Fig.5 The fig.5 was immunofluorescence staining of EVL protein.The pcDNA3.1 transfection group showed only a small amount of endogenous EVL expression, while the fluorescence intensity of pcDNA3.1-EVL transfection group cells was enhanced a lot than the control group

3 讨论

EVL 蛋白属于 Ena/VASP 蛋白家族的成员 ,对于 actin 蛋白具有十分重要的调控作用^[7,27]。在脊椎动物中 ,Ena/VASP 家族包括 Mena、VASP、EVL ,果蝇中则只有 Ena(enabled)一个蛋白^[7]。所有成员之间拥有共同的保守结构域 ,包括 N 末端的 EVH1(Ena/VASP homology)结构域、C 末端的 EVH2 结构域和中间富含脯氨酸的区域^[15,22]。EVL 蛋白即属于 Ena / VASP 蛋白家族成员^[11,23]而且它对与 actin 蛋白也具有十分重要的调控作用。

研究表明 Ena/VASP 蛋白还能够通过阻断 capping 蛋白的功能 ,来调节 F-actin 的聚合 ,从而促进 F-actin 纤维的延长^[9,10]。以此为基础 ,Ena/VASP 蛋白家族在多种细胞行为中发挥着重要的作用^[9,24]。果蝇、线虫和小鼠中进行的实验研究都证实 ,Ena/VASP 参与到神经元的轴突生长、树突形态发育和神经突触的形成^[14,25] ,并且在外源诱导因子和排斥因子调节轴突生长方向的通路中 ,担任下游调节分子^[11,12,10,13]。在 Ena/VASP 家族的三种蛋白都敲除的小鼠中 ,神经元不能正确发育 ,无法启动神经突(neurite)的形成 ,由此导致该小鼠不能正确形成皮层的轴突纤维束^[2,14,15,8,19]。Ena/VASP 蛋白还会影响神经元轴突的维持和神经元的存活 ,在其表达降低后 ,神经元轴突缩短 ,并进一步诱发细胞的凋亡^[3,16,13,21]。近年来 ,对人的 EVL 蛋白的研究结果还提示 ,EVL 蛋白在单链 DNA 的串联和 DNA 重组过程中也发挥着重要的作用^[17,6,18,31]。

关于 Ena/VASP 蛋白家族的研究还有许多未知领域^[14,28,32] 例如 ,哺乳动物中三种蛋白之间在功能上是否各有侧重 ,对于生物体的发育又会有怎样的意义^[19,29] ,尤其是关于 EVL 蛋白的

研究 ,除了其作为 Ena/VASP 蛋白家族的一员来参与骨架蛋白的调控外 ,它还具有什么样的功能 ,小鼠的 EVL 蛋白是否也像人的 EVL 蛋白一样具有同源重组的功能 ,这些问题都有待于进一步的实验证实。

参考文献(References)

- [1] Goh KL, Cai L, Cepko CL, et al. Ena/VASP proteins regulate cortical neuronal positioning[J]. Curr Biol, 2002, 12(7): 565-569
- [2] Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. Neuron, 2007,56(3): 441-455
- [3] Franco DL, Rezaval C, Caceres A, et al. ENA/VASP downregulation triggers cell death by impairing axonal maintenance in hippocampal neurons[J]. Mol Cell Neurosci, 2010,44(2): 154-164
- [4] Furman C, Sieminski AL, Kwiatkowski AV, et al. Ena/VASP is required for endothelial barrier function in vivo [J]. J Cell Biol, 2007,179(4): 761-775
- [5] Kwiatkowski AV, Rubinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. Neuron, 2007,56(3): 441-455
- [6] Takaku M, Machida S, Nakayama S, et al. Biochemical analysis of the human EVL domains in homologous recombination [J]. FEBS J, 2009,276(20): 5841-5848
- [7] Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, et al. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics[J]. Cell, 1996, 87(2): 227-239
- [8] Reinhard M, Jarchau T, Walter U. Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins [J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26 (4): 243-249
- [9] Applewhite DA, Barzik M, Kojima S, et al. Ena/VASP proteins have

- an anti-capping independent function in filopodia formation [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(7): 2579-2591
- [10] Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, et al. Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1[J]. *Neuron*, 2004, 42(1): 37-49
- [11] Lanier LM, Gates MA, Witke W, et al. Mena is required for neurulation and commissure formation[J]. *Neuron*, 1999, 22(2): 313-325
- [12] Lin YL, Lei YT, Hong CJ, et al. Syndecan-2 induces filopodia and dendritic spine formation via the neurofibromin-PKA-Ena/VASP pathway[J]. *J Cell Biol*, 2007, 177(5): 829-841
- [13] Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, et al. Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1[J]. *Neuron*, 2004, 42(1): 37-49
- [14] Kwiatkowski AV, Robinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007,56(3): 441-455
- [15] Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, et al. Filopodia are required for cortical neurite initiation [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(12): 1347-1359
- [16] Franco DL, Rezaval C, Caceres A, et al. ENA/VASP downregulation triggers cell death by impairing axonal maintenance in hippocampal neurons[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2010, 44(2): 154-164
- [17] Takaku M, Takahashi D, Machida S, et al. Single-stranded DNA catenation mediated by human EVL and a type I topoisomerase[J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(21): 7579-7586
- [18] Takaku M, Machida S, Nakayama S, et al. Biochemical analysis of the human EVL domains in homologous recombination [J]. *FEBS J*, 2009, 276(20): 5841-5848
- [19] Reinhard M, Jarchau T, Walter U. Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins [J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26 (4): 243-249
- [20] Kwiatkowski AV, Robinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007,56(3): 441-455
- [21] Lebrand C, Dent EW, Strasser GA, et al. Critical role of Ena/VASP proteins for filopodia formation in neurons and in function downstream of netrin-1[J]. *Neuron*, 2004, 42(1): 37-49
- [22] Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM, et al. Filopodia are required for cortical neurite initiation [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(12): 1347-1359
- [23] Lanier LM, Gates MA, Witke W, et al. Mena is required for neurulation and commissure formation[J]. *Neuron*, 1999, 22(2): 313-325
- [24] Applewhite DA, Barzik M, Kojima S, et al. Ena/VASP proteins have an anti-capping independent function in filopodia formation [J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18(7): 2579-2591
- [25] Kwiatkowski AV, Robinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007,56(3): 441-455
- [26] Furman C, Sieminski AL, Kwiatkowski AV, et al. Ena/VASP is required for endothelial barrier function in vivo [J]. *J Cell Biol*, 2007, 179(4): 761-775
- [27] Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M, et al. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics[J]. *Cell*, 1996, 87(2): 227-239
- [28] Kwiatkowski AV, Robinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007,56(3): 441-455
- [29] Reinhard M, Jarchau T, Walter U. Actin-based motility: stop and go with Ena/VASP proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(4): 243-249
- [30] Kwiatkowski AV, Robinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007,56(3): 441-455
- [31] Takaku M, Machida S, Nakayama S, et al. Biochemical analysis of the human EVL domains in homologous recombination [J]. *FEBS J*. 2009, 276(20): 5841-588
- [32] Kwiatkowski AV, Robinson DA, Dent EW, et al. Ena/VASP Is Required for neuritogenesis in the developing cortex [J]. *Neuron*, 2007,56(3):441-455