

# 乳腺癌疫苗中肿瘤抗原的鉴定

刘安军, 方菁菁, 马姗姗

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

**摘要:** 鉴定乳腺癌疫苗中激活小鼠抗肿瘤免疫反应的肿瘤抗原。利用蛋白质组学方法根据免疫小鼠血清中存在的特异性抗体寻找肿瘤疫苗所含的肿瘤抗原。结果表明, 肿瘤疫苗免疫小鼠的抗体效价大于6400, 证明免疫小鼠血清中抗体含量高, 且其抗肿瘤体液免疫得到增强; SDS-PAGE结合免疫印迹结果证明, 软骨多糖作用后的Ca761细胞, 与免疫血清在50 kDa左右出现了特异性结合的蛋白条带; 二维电泳结合免疫印迹确定了激活免疫反应的肿瘤抗原为50 kDa酸性蛋白, 经质谱技术鉴定, 该肿瘤抗原为 $\alpha$ -tubulin。综上所述, Ca761细胞中的肿瘤抗原 $\alpha$ -tubulin经软骨多糖作用后, 其结构及表达量发生了变化, 该变化的抗原即为肿瘤疫苗中激活小鼠抗肿瘤免疫反应的抗原, 因此肿瘤疫苗免疫成功小鼠可以阻止肿瘤细胞的侵袭;  $\alpha$ -tubulin经软骨多糖作用后其免疫原性增强, 因此其可以开发成为以抗原为基础的疫苗。

**关键词:** 猪软骨多糖; 乳腺癌疫苗; 肿瘤抗原; 免疫蛋白质组学

文章编号: 1673-9078(2013)8-1751-1755

## Identification of Tumor Antigen in the Breast Cancer Vaccine

LIU An-jun, FANG Jing-jing, MA Shan-jie

(College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The tumor antigen in the breast cancer vaccine which activated the anti-tumor immunity response was determined according to the antigen-specific antibodies existent in the serum of the immunized mice by immunoproteomics analysis. The results showed that the antibody titer of immunized mice serum was over 6400 and the high antibody titer suggested that the humoral immunity on anticancer was strengthened. SDS-PAGE and western-blot analysis showed that the protein extracted from Ca761 cells treated with cartilage polysaccharide was bonded with the immune serum at an estimated molecular mass of 50 kDa. 2D-PAGE and western-blot analysis showed that the tumor antigens activated anti-tumor immune response were acidic protein at 50 kDa. By MALDI-TOF-MS, the reactive protein was identified as  $\alpha$ -tubulin. In summary, structure and expression of tumor antigen ( $\alpha$ -tubulin) in Ca761 cells was modified with the cartilage polysaccharide treatment, therefore, the anti-tumor immunity of mice was activated by the tumor vaccine so that the mice immunized with the tumor vaccine could prevent from invasion of tumor cells. The immunogenic of  $\alpha$ -tubulin was strengthened after the treatment with cartilage polysaccharide, which could be developed as a new vaccine.

**Key words:** cartilage polysaccharide; breast cancer vaccine; tumor antigen; immunoproteomics

肿瘤抗原的筛选及性质鉴定是目前肿瘤免疫研究的热点, 尤其当免疫治疗在肿瘤治疗中占据重要位置时, 越发引起人们的重视<sup>[1]</sup>。新的肿瘤抗原不断被发现, 将会推动恶性肿瘤特异性免疫治疗的发展<sup>[2]</sup>。因此, 筛选新的肿瘤抗原对癌症的早期诊断、治疗以及制订新的预后标准、阐明肿瘤的发生机理有着重要的意义, 并为癌症的免疫治疗和预防提供新的治疗靶点及新的保护性抗原设计方案。目前肿瘤抗原的筛选有很多种方法。例如噬菌体抗体库技术、血清学筛选重组 cDNA 表达文库 (SEREX) 技术、蛋白质组学技术等

收稿日期: 2013-04-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31271975)

作者简介: 刘安军 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事水产品、畜产 (副产) 品高附加值的开发利用及功能性食品研究等

<sup>[3-4]</sup>。应用蛋白质组学技术直接从蛋白质水平去寻找和筛选肿瘤抗原, 有其特有的优势。蛋白印迹 (Western blot) 技术可以通过与空白血清的对比, 对肿瘤抗原进行初步比较、筛选, 根据免疫印迹的分析结果, 利用双向电泳可以更加精确的确定抗原的性质<sup>[5]</sup>。

肿瘤细胞自身拥有肿瘤抗原, 但是由于抗原性弱, 不能激活足够强的抗肿瘤免疫来抑制癌细胞的增殖。如今大量的研究业已证实肿瘤保护性抗原的应用是可行的、安全的, 并从理论上提出了各种方案, 尝试应用多种细胞疫苗、核酸基因工程疫苗、抗独特型疫苗等来激发宿主的抗肿瘤免疫<sup>[6]</sup>。但不论采取何种方法制备肿瘤保护性抗原, 都是围绕如何提高肿瘤抗原的免疫原性以及如何打破肿瘤免疫耐受这一最关键的核心问题。经前期的研究证实<sup>[7]</sup>, 以本实验室自主研制

的猪软骨多糖作为免疫佐剂的乳腺癌疫苗能够增强机体的免疫能力,并能有效的保护免疫器官和组织癌细胞的浸润和转移,该结果说明我们所制备的肿瘤疫苗中一定存在着肿瘤抗原从而激活了小鼠机体免疫反应。因此在本研究中,我们将从猪软骨多糖诱导 Ca761 细胞发生的变化入手,应用蛋白质组学技术鉴定疫苗中的肿瘤抗原。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 材料

肿瘤细胞株,615 系小鼠自发乳腺癌细胞株 Ca761 购自协和医科大学基础医学细胞中心。

#### 1.1.2 试剂

RPMI-1640、胎牛血清(FBS)购于中国血液研究所;牛血清白蛋白 BSA 购于中国医学科学院血研所科技公司;丙烯酰胺、TEMED、 $\beta$ -巯基乙醇、甲叉双丙烯酰胺为 Amresco 公司产品;SDS、过硫酸铵、TritonX-100 为 SIGMA 公司产品;一维、二维电泳中的其他试剂和耗材均购于 Bio-Rad 公司;其他试剂均为国产分析纯。

#### 1.1.3 主要仪器设备

ESJ205-4 型电子天平,沈阳龙腾电子称量仪器有限公司;2123TC 水套式 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Shellab);B600B 型医用低速离心机,白洋离心机厂;冷冻离心机,美国科峻仪器公司;酶标仪, Bio-Rad 公司;X 射线摄影暗匣,汕头市粤华医疗器械厂有限公司;电泳槽,北京君意东方电泳设备有限公司;电转移装置,北京六一公司;X 光胶片,日本 FUJIFILM 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 抗血清的制备

将前期实验<sup>[7]</sup>得到的免疫成功小鼠摘除眼球,用 1.5 mL 无菌离心管收集全血,室温静置约 2 h 后,低温离心(4 °C, 3000 r/min, 10 min),上层透明液体即为血清,将其分装于 200  $\mu$ L 离心管内,每管 50  $\mu$ L,储存在-20 °C 备用。空白血清来源于正常健康 615 系小鼠

#### 1.2.2 ELISA 法检测免疫小鼠血清抗体效价

参照文献<sup>[8]</sup>的方法检测抗体效价。先将肿瘤抗原进行包被,然后加入一抗(上述制备的小鼠血清,梯度稀释),再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠二抗,生成肿瘤抗原-一抗-酶标二抗的复合物。最后加入可以和辣根过氧化物酶反应的底物溶液,生成有色

产物,通过酶标仪检测后计算小鼠血清中抗体的效价。P: N $\geq$ 2.0 为阳性。

#### 1.2.3 SDS-PAGE 蛋白样品制备

参照文献<sup>[9]</sup>的方法提取蛋白样品。简述如下:分别收集 24 h、48 h 和 72 h 与 400  $\mu$ g/mL 浓度的软骨多糖共培养的 Ca761 细胞,用生理盐水洗涤 3 次,弃上清后加入蛋白裂解液(2.5 mL 1 mol/L Tris-HCl, 0.438 g NaCl, 0.5 mL Triton X-100, 100  $\mu$ g/mL PMSF, 用三蒸水定容至 50 mL),吹匀后置于冰上裂解 30 min。随后离心(14,000 r/min, 15 min)收集上清液,按照考马斯亮蓝法测蛋白浓度。将样品与等体积的蛋白上样缓冲液混匀,并进行分装,保存在-70 °C 备用。另提未经多糖处理的 Ca761 细胞蛋白作为对照。

#### 1.2.4 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳与免疫印迹(Western blotting)

按照文献<sup>[9]</sup>的成分配制体积分数为 12% 的分离胶,并按其方法取等量蛋白质样品进行 SDS-PAGE。电泳结束后,用切胶板将分离胶取出,用考马斯亮蓝 R-250 溶液染色,摇床上染色 3 h。倒去染色液,加入脱色液,直至凝胶上背景蓝色褪去,显现出清晰的蛋白质条带。

按 Towbin 等<sup>[10]</sup>的方法进行肿瘤抗原分析。将凝胶转移至硝酸纤维素薄膜上,5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜, PBST 洗涤 3 次,每次 15 min,加入上述制备的一抗(免疫成功小鼠或空白小鼠血清, 1:200), 37 °C 孵育 2 h, PBST 洗涤 4 次后,加入山羊抗小鼠 IgG (1:3000) 1 h,用 PBST 溶液冲洗膜 3 次,每次 15 min 后,加入 ECL 化学发光试剂显色。

#### 1.2.5 二维电泳(2D-PAGE)结合免疫印迹分析肿瘤特异性抗原

参照文献<sup>[11]</sup>的方法提取二维电泳蛋白样品。收集与 400  $\mu$ g/mL 浓度的软骨多糖共培养 48 h 的 Ca761 细胞和未经处理的 Ca761 细胞,用生理盐水洗涤 3 次,加入二维蛋白裂解液(6 M 尿素, 2 M 硫脲, 2% Chaps, 50 mM DTT, 0.2% Bio-Lyte)。用 1 mL 枪吹匀,在液氮中反复冻融 3 次,随后置于冰上裂解 30 min。用冷冻离心机 4 °C 离心,收集上清液,按照考马斯亮蓝法测蛋白浓度。

双向凝胶电泳主要参照 Jan Vydra<sup>[11]</sup>的方法进行,简述如下:采用 pH 3~10, 17 cm IPG 胶条,每份以 1 mg 总蛋白量与水化液(8 mol/L 尿素、20 mmol/L DTT、2% CHAPS、0.5% IPG 缓冲液以及 0.001% 溴酚兰)充分混合,总体积 350  $\mu$ L。用 IPGphor 等电聚焦仪进行第一相等电聚焦,在 20 °C 下自动运行。等电聚焦结束后,将经过两步平衡后的 IPG 胶条置于第二

向凝胶的顶端，用低熔点琼脂糖封胶液封胶条。用垂直电泳仪进行电泳，温度控制在 20℃。

电泳结束后，按常规方法进行染色、脱色，未染色的凝胶转移至硝酸纤维薄膜上进行免疫印迹，方法如 1.2.4 所示。

### 1.2.6 质谱鉴定

将二维电泳免疫印迹结果确定的对应凝胶上的蛋白质点切下置于 1.5 mL EP 管中，用 50% 乙腈和 50 mmol/pL 碳酸氢铵脱色 1 h，乙腈脱水冷冻抽干。加 5 μL (15 μg/mL) 胰酶，4℃ 放置 1 h 后，加入 10 μL (50 mmol/L) 碳酸氢铵，37℃ 酶解过夜 50 μL 萃取液 (5% 三氟乙酸: 50% 乙腈) 超声萃取 20 min，重复提取 1 次，将处理好的样品用 MS/MS 质谱得到肽质量指纹图谱，最后在 NCBI (nr) 非冗余数据库中用 GPS 软件进行查询<sup>[12]</sup>。

### 1.2.7 统计分析

实验结果都以均数±标准偏差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示；组间差异采用双侧 t 检验及方差分析进行统计分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 抗体效价的测定

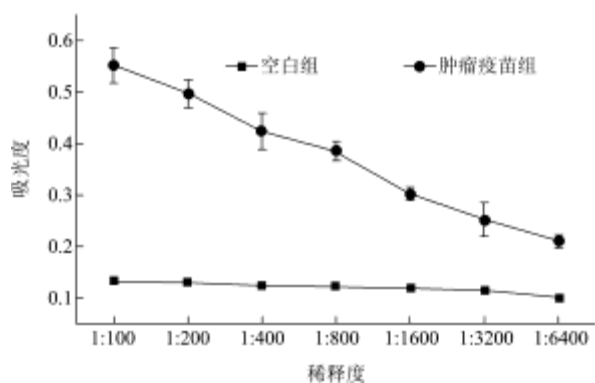


图 1 ELISA 法检测血清抗体效价

Fig.1 Antibody levels examined by ELISA assay

通过图 1 可以看出，免疫小鼠血清具有较高的抗体效价 (>6400)，说明以软骨多糖为免疫佐剂的 Ca761 细胞疫苗可以刺激小鼠产生特异性抗体，增强小鼠的体液免疫能力，从而抑制肿瘤细胞的增殖。

### 2.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结合免疫印迹

#### 法检测肿瘤抗原

图 2 中左边是蛋白 Marker，中间是聚丙烯酰胺凝胶电泳结果，右边的是免疫印迹的结果。对比蛋白 Marker 可以发现：在 50 kDa 附近蛋白量发生显著变

化，0 h 蛋白在此分子量上并无明显条带，而 24 h、48 h 和 72 h 均有明显条带。用免疫成功小鼠血清作为一抗，对电泳结果进行免疫印迹试验，结果显现出一条明显的特异性条带，和电泳结果对比后，确定即为 50 kDa 分子量上的蛋白条带。而用正常小鼠血清作为一抗的对照试验中，并没有出现任何条带。因此可以认定此特异性结合与免疫相关，并且此特异性抗体只存在于免疫成功小鼠血清中。由于经软骨多糖培养 48 h 后的蛋白免疫印迹结果较为明显，因此我们将与 400 μg/mL 浓度的软骨多糖共培养 48 h 的 Ca761 细胞作为接下来实验研究对象。

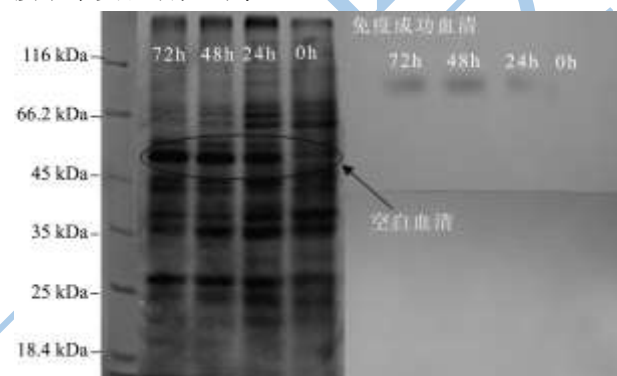


图 2 SDS-PAGE 及免疫印迹结果

Fig.2 Results of SDS-PAGE and western blotting

### 2.3 二维电泳分析肿瘤抗原

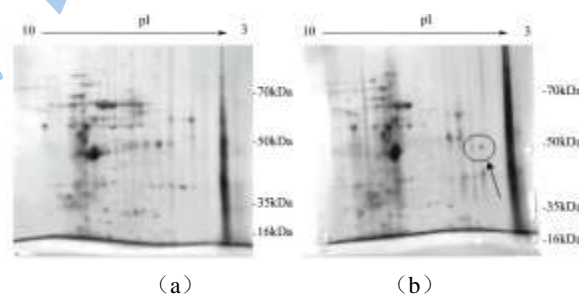


图 3 软骨多糖作用的 Ca761 细胞蛋白质二维电泳图谱

Fig.3 Two-dimensional electrophoresis patterns of total proteins from Ca761 cells treated with cartilage polysaccharide

结果如图 3 所示，图 a 是 0 h Ca761 乳腺癌细胞的二维电泳结果，图 b 是与软骨多糖共培养 48 h 的 Ca761 二维电泳结果。从上往下蛋白的分子量在减小，从左往右表示蛋白的等电点在降低，从图中可以看出，图 b 在椭圆区域内相比于图 a 出现了明显的差异蛋白点，说明经软骨多糖共培养 48 h 后，分子量在 50 kDa 的该种蛋白质表达量明显上调，结合之前 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹的结果，我们可以推测图中椭圆区域中的 50 kDa 左右的酸性蛋白质可能为肿瘤疫苗中激活小鼠抗肿瘤免疫反应的肿瘤抗原，下面用免



疫印迹进一步确定肿瘤抗原的位置和性质。

### 2.4 Western blotting 确定肿瘤抗原

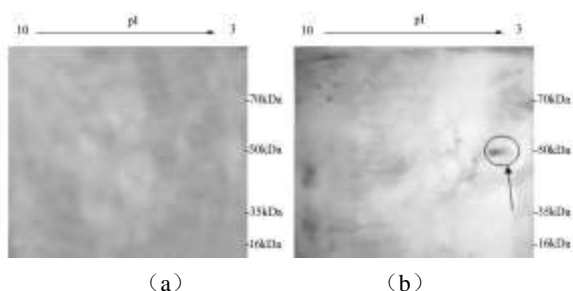


图4 Western blotting 检测肿瘤抗原

Fig.4 Detection of tumor antigen by western blotting

图4是二维电泳免疫印迹结果，其中图a为一抗处理空白小鼠血清的免疫印迹结果，b为一抗处理免疫成功小鼠血清的免疫印迹结果。从图上可以明显看出，空白血清和48h蛋白并未发生特异性结合，而免疫成功血清和48h蛋白发生了显著的特异性结合，并且结合位点是在50kDa左右，结合二维电泳结果，我们可以确定与免疫血清有特异性结合反应的这个蛋白点即为我们制备的肿瘤疫苗中在激活小鼠抗肿瘤免疫反应中起主要作用的肿瘤抗原。从结果我们可以推断，这种肿瘤抗原可能是猪软骨多糖对肿瘤细胞的作用位点，软骨多糖通过作用该肿瘤抗原而其表达量发生变化，或是软骨多糖对抗原进行了直接修饰或者调控了蛋白翻译表达后的修饰，使其结构产生了变化，增强了该肿瘤抗原的免疫原性，从而产生了相对应的特异性抗体，所以当肿瘤疫苗免疫小鼠后，机体的抗肿瘤免疫反应被激活，产生的特异性抗体保护机体免受肿瘤细胞的侵袭。

### 2.5 质谱鉴定结果

结合二维电泳结果，我们可以确定与免疫血清有特异性结合反应的这个蛋白点即为我们制备的肿瘤疫苗中在激活小鼠免疫反应中起主要作用的肿瘤抗原。将图4(b)抗原与抗体结合的特异性蛋白点与图3(b)

二维电泳考染参考胶结果相匹配，将匹配的蛋白点进行质谱分析，图5为对应点的质谱分析结果。将测得的肽片段质量数据输入NCBI(nr)非冗余蛋白质数据库进行同源蛋白质查询，该蛋白点得到了10个备选蛋白，结果如表1所示。将分析报告中备选蛋白的分子量、蛋白等电点及得分等数据，与二维凝胶电泳对应蛋白点的相关信息相匹配，鉴定出与免疫血清发生特异性结合的这种蛋白为α微管蛋白(Tubulin alpha chain)(登陆号gi|549052)，该蛋白等电点pI为4.94，分子量为50.82kDa。α-tubulin为微管的组成成分，微管参与维持细胞形态，有丝分裂，染色体分离等过程<sup>[13]</sup>，当微管延伸和缩短的动力学发生改变后，有丝分裂终止，细胞进入凋亡程序。微管蛋白结合药物与微管蛋白结合后，主要通过抑制有丝分裂来促进细胞凋亡。许多研究表明，α-tubulin在肿瘤中的异常表达与肿瘤的发生、发展、浸润、转移及预后密切相关<sup>[14]</sup>，因此α-tubulin有望成为判断肿瘤浸润转移能力、肿瘤病人预后的标志物以及作为肿瘤基因治疗靶分子、肿瘤抗原的可能性。从结果我们推测α-tubulin为软骨多糖对Ca761细胞的作用位点，软骨多糖通过与他们的结合使其表达量或结构变化，使其免疫原性增强，从而激活了机体的抗肿瘤免疫反应，避免了肿瘤细胞的免疫逃逸。

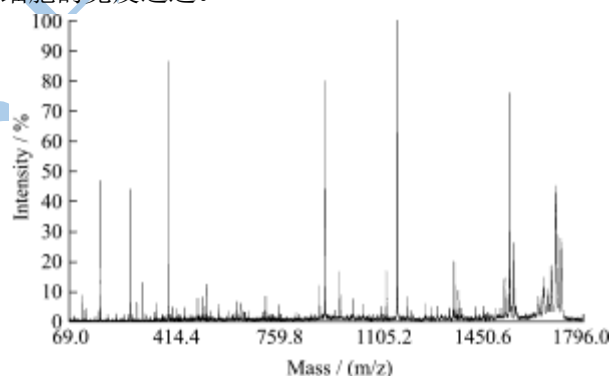


图5 MS/MS 质谱结果

Fig.5 The result of MS/MS

表1 差异表达蛋白的备选蛋白

Table 1 Optional proteins of the differential expression protein

序号	备选蛋白名称	登录号	蛋白分子量	蛋白等电点	得分 C.I.%
1	RecName: Full=Tubulin alpha chain; AltName: Full=Alpha T6	gi 549052	50819.86	4.94	100.00
2	alpha-tubulin [Sycon sp. AR-2003]	gi 32967400	43144.27	6.02	100.00
3	RecName: Full=Tubulin alpha chain	gi 3024695	50745.64	4.94	99.99

转下页

接上页

4	Hypothetical protein BRAFLDRAFT_58397 [Branchiostoma floridae]	gi 260804101	50977.87	4.90	99.96
5	Tubulin alpha-1C chain [Lepeophtheirus salmonis]	gi 225712468	50549.81	4.98	99.96
6	predicted protein [Physocomitrella patens subsp. patens]	gi 168061630	50109.68	4.99	98.61
7	hypothetical protein MGL_4211 [Malassezia globosa CBS 7966]	gi 164655037	50516.70	4.99	60.73
8	alpha-tubulin [Miscanthus transmorrisonensis]	gi 37936222	50176.69	4.92	60.73
9	tubulin alpha-2 chain [Gallus gallus]	gi 45382095	50450.43	4.86	28.05
10	hypothetical protein LOAG_10553 [Loa loa]	gi 307758711	38647.11	5.82	0.00

### 3 结论

3.1 通过以往的免疫荧光检测结果<sup>[9]</sup>结合本次研究中的抗体效价检测结果,我们发现以猪软骨多糖作为免疫佐剂所制得的肿瘤疫苗免疫小鼠的抗血清能够与经软骨多糖作用48 h后的Ca761细胞发生抗原-抗体特异性结合,而空白血清则无抗原-抗体特异性结合,且免疫小鼠血清抗体效价可达到6400以上,这说明我们所制备的乳腺癌肿瘤疫苗中存在能够激活小鼠发生体液免疫反应的相关抗原。

3.2 通过SDS-PAGE结合免疫印迹初步确定肿瘤抗原的位置,以空白小鼠血清和肿瘤疫苗免疫成功小鼠血清做一抗,猪软骨多糖作用后的Ca761细胞中含有的肿瘤抗原与抗血清中的特异性抗体结合,在50 kDa附近出现特异性结合的条带,证明肿瘤疫苗中含有的肿瘤抗原激活了小鼠的抗肿瘤免疫反应。

3.3 为了更确定肿瘤疫苗中激活免疫反应的肿瘤抗原的性质,我们进行了二维电泳结合免疫印迹和质谱分析,结果说明肿瘤疫苗中含有的肿瘤抗原为 $\alpha$ -tubulin,它可能是软骨多糖对在Ca761细胞上的作用位点,多糖通过作用该抗原使其表达量或结构发生变化,从而增强了Ca761细胞的免疫原性,所以我们制备的肿瘤疫苗能够很好的激活小鼠的抗肿瘤免疫反应。

### 参考文献

- [1] Hayashi E, Matsuzaki Y, Hasegawa G, et al. Identification of a novel cancer-testis antigen CRT2 frequently expressed in various cancers using representational differential analysis [J]. *Clinical Cancer Research*, 2007, 13 (21): 6267-6274
- [2] Pereira-Faca SR, Kuick R, Puravs E, et al. Identification of

14-3-3 theta as an antigen that induces a humoral response in lung cancer [J]. *Cancer Research*, 2007, 67 (24): 12000-12006

- [3] Castronovo V, Waltregny D, Kischel P, et al. A chemical proteomics approach for the identification of accessible antigens expressed in human kidney cancer [J]. *Molecular & Cell Proteomics*, 2006, 5 (11): 2083-2091
- [4] Mizukami M, Hanagiri T, Yasuda M, et al. Antitumor effect of antibody against a SEREX-defined antigen (UOEH-LC-1) on lung cancer xenotransplanted into severe combined immunodeficiency mice [J]. *Cancer Research*, 2007, 67 (17): 8351-8357
- [5] Sun W, Xing BC, Sun Y, et al. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma by two-dimensional difference gel electrophoresis [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6 (10): 1798-1808
- [6] Nagorsen D, Thiel E. Clinical and immunologic responses to active specific cancer vaccines in human colorectal cancer [J]. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12 (10): 3064-3069
- [7] 刘安军,马姗姗,郑国强,等.乳腺癌疫苗对荷瘤小鼠的免疫保护作用[J].*免疫学杂志*,2010,26(11):938-941
- Liu A J, Ma S J, Zheng G Q, et al. Immune protective effects of breast cancer vaccine on tumor-bearing mice [J]. *Immunological Journal*, 2010, 26 (11): 938-941
- [8] Salucci V, Lena AM, Ciliberto G, et al. Adenovirus transduction and culture conditions affect the immunogenicity of murine dendritic cells [J]. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2005, 62 (3): 206-217
- [9] Dhuna V, Bains JS, Kamboj SS, et al. Purification and

- characterization of a lectin from *Arisaema tortuosum* Schott having in-vitro anticancer activity against human cancer cell lines [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 38 (5): 526-532
- [10] Towbin H, Staehli T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some application [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76 (9): 4350-4354
- [11] Vydra J, Selicharová I, Smutná K, et al. Two-dimensional electrophoretic comparison of metastatic and non-metastatic human breast tumors using in vitro cultured epithelial cells derived from the cancer tissues [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 107
- [12] He YZ, Mou ZR, Li WL, et al. Identification of IMPDH2 as a tumor-associated antigen in colorectal cancer using immunoproteomics analysis [J]. *International Journal of Colorectal Disease*, 2009, 24 (11): 1271-1279
- [13] Margolis RL, Wilson L. Opposite end assembly and disassembly of microtubules at steady state in vitro [J]. *Cell*, 1978, 13(1): 1-8
- [14] Hammond JW, Cai DW, Verhey KJ. Tubulin modifications and their cellular functions [J]. *Current Opinion Cell Biology*, 2008, 20(1): 71-76