

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.16.007

人 Cuedc2 真核表达载体的构建及其在 HEK293 细胞中的表达 *

刘淑娟¹ 王 涛² 刘朵朵¹ 乔谷媛¹ 韩军涛^{3△}

(1 第四军医大学西京医院妇产科; 2 第四军医大学生物化学与分子生物学教研室;

3 第四军医大学西京医院烧伤科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:构建人 Cuedc2 的真核表达载体,并进行体外验证。**方法:**提取人卵巢癌细胞总 RNA,通过 RT-PCR 的方法其反转录为 cDNA;以之为模板,利用 PCR 获得 Cuedc2 的编码区,纯化后克隆入 pcDNA3.1myc-his(-),利用菌落 PCR 及 DNA 测序进行鉴定。最后,采用瞬时转染的方法,将所构建的重组 CUEDC2 真核表达载体通过脂质体转染 HEK293 细胞,48h 后通过 western blot 检测 Cuedc2 蛋白的表达。**结果:**Cuedc2 编码区 cDNA 正确地插入真核表达载体 pcDNA3.1myc-his(-)中,western blot 检测证实其在 HEK293 细胞中表达,而空载体转染的细胞为阴性,表明所构建的 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 能够在体外有效表达。**结论:**本研究成功地克隆了人 Cuedc2 cDNA,构建了重组真核表达载体,并在 HEK293 细胞中有效表达,为进一步研究人 Cuedc2 的功能及其与肿瘤的关系奠定了实验基础。

关键词: Cuedc2; 真核表达; 克隆; cDNA**中图分类号:** Q75; Q78; R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2014)16-3025-04

Construction of Human Cuedc2 eukaryotic Expression Vector and Expression of Cuedc2 in HEK293 Cells*

LIU Shu-juan¹, WANG Tao², LIU Duo-duo¹, QIAO Gu-yuan¹, HAN Jun-tao^{3△}

(1 Department of Gynecology and Obstetrics; 2 Department of Biochemistry and Molecular Biology;

3 Department of Burns, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To construct the recombinant expression vector of Cuedc2 and detect its expression in HEK293 cells.

Methods: Total RNA was isolated from ovarian cancer cells and RT-PCR was conducted to acquire the cDNA. A 952 bp fragment containing the coding region of Cuedc2 was amplified by PCR and the resulting product was purified. Then this fragment was used as new template and the coding region of Cuedc2 (864 bp) was amplified, purified and inserted into the BamHI and HindIII sites of the pcDNA3.1myc-his (-)A expression vector. The sequence was confirmed by colony PCR and DNA sequencing. In the end, pcDNA3.1 myc-his(-)A-Cuedc2 was transiently transfected into HEK293 cells and the expression of this new construct was detected by western blot.

Results: The full length coding region of Cuedc2 was obtained and confirmed, the expression of Cuedc2 was detected successfully in HEK293 cells. **Conclusion:** The eukaryotic expression vector of Cuedc2 had been successfully constructed, which would provide a useful tool for designing an in-depth investigation of the role of Cuedc2 in tumorigenesis.

Key words: Cuedc2; Eukaryotic expression; Clone; cDNA**Chinese Library Classification(CLC):** Q75; Q78; R737.31 **Document code:** A**Article ID:** 1673-6273(2014)16-3025-04

前言

卵巢癌是妇科恶性肿瘤之一,预后极差,其中尤以上皮性卵巢癌最为多见,约占 75%^[1]。由于症状不典型(常表现为腹部胀气或胃肠道功能紊乱),易导致漏诊或误诊。其起病隐袭的特点往往导致患者在就诊时,肿瘤已发展至晚期阶段,错过了最佳治疗时机,5 年生存率可低于 25%^[2]。化疗耐药是卵巢癌低生存率的主要原因之一^[3]。近年来,肿瘤干细胞在卵巢癌的发生及耐药特性中的作用开始受到关注^[4],研究认为卵巢癌中也存在

肿瘤干细胞^[5,6],其再生与增殖特性是卵巢癌进展、复发及耐药的根源之一^[7]。也有研究认为受体酪氨酸激酶^[8]及多种 microRNA^[9,10]参与的信号转导途径在卵巢癌的发生、发展及预后中起关键作用。

Cuedc2 是近年来发现并鉴定的一种包含 Cue 结构域的真核蛋白,是 Cue 家族的新成员^[11]。由于 Cue 结构域是一个由 40 个氨基酸残基构成的中等保守的泛素结合结构域,因此 Cuedc2 的功能与泛素化调节密切相关^[12],如 Cuedc2 可通过泛素-蛋白酶体途径降解 PR 及 ER α ,研究者首先在乳腺癌中对

* 基金项目:陕西省科技攻关基金资助项目(2011K12-10)

作者简介:刘淑娟(1973-),女,博士,副教授,主要研究方向:卵巢癌的诊治研究,电话:029-84771656, E-mail: hanliu@fmmu.edu.cn

△通讯作者:韩军涛, E-mail: hanjt@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2013-11-18 接受日期:2013-12-15)

Cuedc2 进行分析,发现该分子通过与 PR 及 ER α 相互作用参与乳腺癌耐药及内分泌治疗过程^[13]。进一步的研究发现 Cuedc2 在卵巢癌中也呈高表达^[13,14],提示 Cuedc2 在卵巢癌的发生及内分泌治疗中具有重要作用。本研究从人卵巢癌细胞中扩增获得 Cuedc2 的编码区序列,将之克隆入真核表达载体 pcDNA3.1myc-his(-)A 中,成功构建了 Cuedc2 的重组真核表达载体,为进一步研究该分子在卵巢癌的发生、发展及治疗中的作用奠定了实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人卵巢癌细胞系 SKOV-3 为本室保存,胎牛血清及 DMEM 细胞培养基购自杭州四季青公司,脂质体(LipofectamineTM2000)及 TRIzol 购自 Invitrogen;His-Tag 单克隆抗体购自 Abcam 公司、质粒提取试剂盒及琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司;限制性内切酶、RT-PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司;DNA 序列合成及测序由上海生工完成。Western blot 检测设备采用 LI-COR bioscience 的 Odyssey Infrared Imaging System,细胞总蛋白定量采用 Pierce 公司的 BCA Protein Assay Kit。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 RT-PCR 培养人卵巢癌 SKOV-3 细胞至对数生长期,按照说明书提供的方法,使用 TRIzol 裂解细胞并提取细胞总 RNA,并对所提取的总 RNA 进行纯度和浓度测定。根据逆转录试剂盒操作说明提供的反应体系将其反转录为 cDNA。

1.2.2 包含 Cuedc2 编码区的 DNA 片段的初步扩增 以反转录所得的 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增包含 Cuedc2 编码区的目的片段,PCR 引物序列为:Sense P1:5'-ACGGAGCAGAA-GAGAGAGCATG-3',Antisense P2:5'-GGGGTATAGGGCTC-CTGCAT-3',所扩增的目的片段的长度为 952 bp。PCR 反应总体积 50 μ L,其中 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 为 0.5 μ L,模板 cDNA1 μ L。具体反应条件:95 $^{\circ}$ C 5 min,52 $^{\circ}$ C 退火 50s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,扩增反应为 25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应完毕,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行分析鉴定,使用凝胶回收试剂盒,按照相应操作说明对 PCR 产物进行切胶回收纯化。

1.2.3 Cuedc2 编码区的扩增 以 1.2.2 步骤所获得的纯化后的 PCR 产物为模板,设计新的针对 Cuedc2 编码区的特异性引物,在 Cuedc2 编码区上游和下游 5' 端分别加入 BamHI、HindIII 酶切位点,通过 PCR 扩增 Cuedc2 编码区。PCR 引物序列为 Sense P3:5'-CGGGATCCGCCACCATGGAGCTGGAGAGGA-TCGT-3',Antisense P4:5'-CCCAAGCTT TCAATGGAAGCG-GTACTTTC-3'。扩增片段长度为 864bp。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 5 min,50 $^{\circ}$ C 退火 45s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,扩增反应为 25 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行分析鉴定,使用凝胶回收试剂盒,按照相应操作说明对 PCR 产物进行切胶回收纯化。

1.2.4 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 重组真核表达载体的构建与鉴定 将步骤 1.2.3 所获得的纯化 PCR 产物用限制性内切酶 BamHI 及 HindIII 做双酶切,反应条件为 37 $^{\circ}$ C,2h;再将其与经相同双酶切的 pcDNA3.1myc-his(-)载体通过 T4DNA 连接酶相连,4 $^{\circ}$ C 过夜后转化 DH5 α 感受态细胞,37 $^{\circ}$ C 培养 16h 后挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定,将菌落 PCR 结果为阳性的克隆进行双酶切鉴定并送公司测序,将鉴定正确的质粒命名为 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2。

1.2.5 Cuedc2 重组质粒的体外表达验证 将所构建的重组质粒 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 进行体外瞬时表达,所使用的工具细胞为 HEK293。具体转染过程参照 LipofectamineTM2000 的说明书进行,待细胞融合约 60%且生长状态良好时进行操作,以转染空载体 pcDNA3.1myc-his(-)的 HEK293 细胞作为对照,转染 6h 后换液,培养 48h 后,胰酶消化并离心细胞,使用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗涤 3 次,再加入裂解液(RIPA+PMSF,比例为 100:1),吹打数次,于冰上裂解 10 min 后,超声 3 次,每次 10 秒。于 4 $^{\circ}$ C、12000 rpm 离心 10 min,收集上清液,加入适量 5 $\times$ loading buffer,并于 100 $^{\circ}$ C 煮沸变性 7 min。将所处理之样品行 SDS-PAGE 后,转于 NC 膜(具体条件为:恒压 100V,2 h)。5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入 Anti-His 单克隆抗体(1:1000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入荧光标记的羊抗小鼠 IgG(1:12000),室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 6min。使用 Odyssey Infrared Imaging System 对膜上的荧光信号进行检测。

2 结果

2.1 包含 Cuedc2 编码区的片段的初步扩增及 Cuedc2 编码区的克隆

提取 SKOV-3 细胞总 RNA,通过 RT-PCR 反应将其反转录为 cDNA。首先以该 cDNA 为模板,使用引物 P1、P2 进行扩增,该扩增产物大小为 952 bp,包含但大于 Cuedc2 的编码区,目的是方便选择合适的 PCR 引物,提高 PCR 的成功率。将该反应产物行琼脂糖凝胶电泳,结果显示在近 1000 bp 处有一特异性扩增条带,符合预期目的片段的大小(图 1A)。对该片段进行切胶纯化,随后以该纯化片段为模板,使用添加了 BamHI、HindIII 酶切位点的引物 P3P4 进行 PCR 反应,将该反应产物行琼脂糖凝胶电泳,结果显示在 864 bp 处有一特异性扩增条带,符合预期目的片段的大小(图 1B),对该片段进行纯化,此片段即为携带酶切位点的 Cuedc2 编码区片段,方便后续克隆操作。

2.2 Cuedc2 真核表达载体的构建与鉴定

将真核表达载体 pcDNA3.1myc-his(-)用 BamHI、HindIII 进行双酶切,行琼脂糖凝胶电泳并切胶回收,与经同样酶切的 Cuedc2 编码区片段进行连接。连接产物转化大肠杆菌后,挑取克隆进行菌落 PCR 鉴定。琼脂糖凝胶电泳结果显示,在 864 bp 处出现特异性扩增条带(图 2A),该长度与 Cuedc2 编码区大小一致;再将该克隆摇菌提取质粒做 BamHI、HindIII 双酶切验证,可见 864bp 大小的目的条带从载体上切下(图 2B),表明重组真核表达载体 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 构建成功。所有

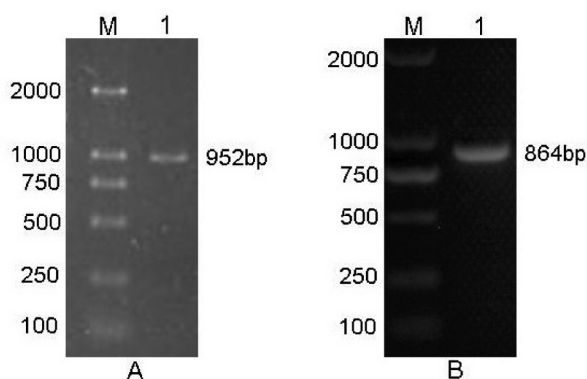


图1 包含 Cuedc2 编码区的长片段及 Cuedc2 编码区的扩增
A:1: 包含 Cuedc2 编码区的长片段扩增产物;B:1:Cuedc2 编码区的扩增产物

M:DL2000 DNA marker

Fig. 1 The PCR amplification for Cuedc2 CDS

A: PCR product for the longer fragment containing Cuedc2 CDS; B: PCR product Cuedc2 CDS; M: DL2000 DNA marker

阳性克隆均送测序进一步验证。

2.3 真核表达载体 pcDNA3.1myc-his (-)-Cuedc2 的体外表达及鉴定

将 pcDNA3.1myc-his (-)-Cuedc2 转染工具细胞 HEK293 后,以转染空载体 pcDNA3.1myc-his(-)的细胞做为对照,使用 anti-his 单抗进行 Western blot 检测,可在 33 kD 处检测到预期大小的条带,而对照细胞无 Cuedc2 表达,表明 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 转染 HEK293 后 Cuedc2 有效表达(图 3)。

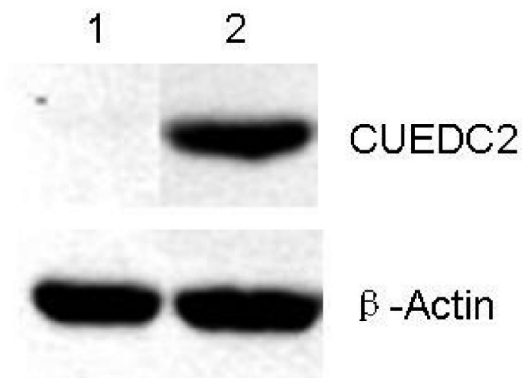


图3 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 在 HEK293 细胞中的表达

1:为转染空载体 pcDNA3.1myc-his(-)的 HEK293 细胞;2:为转染重组质粒 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 的 HEK293 细胞

Fig. 3 The expression of new construct pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 in HEK293 cells

1: HEK293 cells transfected with pcDNA3.1myc-his(-); 2: HEK293 cells transfected with pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2

3 讨论

卵巢癌是女性生殖系统预后最差的恶性肿瘤,这与其发病机制复杂、症状多样而缺乏特异性以及早期诊断困难有关。目前,卵巢癌的发病及耐药机制研究主要集中于卵巢癌肿瘤干细

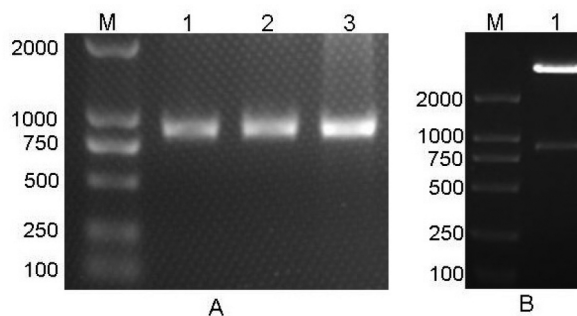


图2 真核表达载体 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 菌落 PCR 及双酶切鉴定

A:1-3 为菌落 PCR 扩增出的大小约 864bp 的目的条带;

M:DL2000 DNA marker;

B:重组质粒用 BamHI、HindIII 进行双酶切鉴定的结果

Fig. 2 The identification of pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2

A: Colony PCR to identificate the pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2;

B: The result for BamHI and HindIII digestion of pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2; M: DL2000 DNA marker

胞的存在^[15]、癌基因 / 抑癌基因的相互作用^[16]以及卵巢癌细胞内信号转导途径等方面,然而其具体的分子机制十分复杂,新的突破有赖于新的信号分子的发现与鉴定。

Cuedc2 是 Cue 家族的新成员,对 PR(孕酮受体)具有调节作用,可通过泛素 - 蛋白酶体途径降解 PR;通过与 PR 相互作用,Cuedc2 可以抑制 PR 的转录激活作用从而阻断孕酮信号途径。此外,Cuedc2 对 ER α 也具有明确的作用。研究证实,在人乳腺癌细胞系 MCF-7 及 ZR-75-1 中,Cuedc2 的过表达可导致 ER α 数量的显著下降;而利用针对 Cuedc2 的 siRNA 在乳腺癌细胞系中下调 Cuedc2 的表达,可使 ER α 的蛋白表达显著增加^[13,14,17]。值得注意的是,近年来研究发现 Cuedc2 在卵巢癌组织中呈高表达,可能与卵巢癌的发生发展密切相关。但目前关于 Cuedc2 在卵巢癌发生、进展及预后方面的作用尚无报道。本研究利用人卵巢癌细胞系 SKOV-3,通过 PCR 扩增获得 Cuedc2 的编码序列,并将之插入真核表达载体 pcDNA3.1myc-his(-)中,利用工具细胞 HEK293 进行体外瞬时转染,确定 Cuedc2 在体外得到有效表达,表明重组真核表达质粒 pcDNA3.1myc-his(-)-Cuedc2 构建成功,为深入研究 Cuedc2 在卵巢癌中的作用机制打下了良好基础。

参考文献(References)

- [1] D.L. Chan, D.L. Morris, A. Rao, et al. Intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer: a review of tolerance and efficacy [J]. Cancer Manag Res, 2012,4:413-422
- [2] O.W. Foley, J.A. Rauh-Hain, M.G. del Carmen. Recurrent epithelial ovarian cancer: an update on treatment[J]. Oncology (Williston Park), 2013,27(4):288-294
- [3] K.M. Kuusisto, O. Akinrinade, M. Vihinen, et al. Copy Number Variation Analysis in Familial BRCA1/2-Negative Finnish Breast and Ovarian Cancer[J]. PLoS One, 2013,8(8):e71802
- [4] K. Yasuda, T. Torigoe, R. Morita, et al. Ovarian cancer stem cells are

- enriched in side population and aldehyde dehydrogenase bright overlapping population[J]. PLoS One, 2013,8(8):e68187
- [5] J. Di, T. Duiveman-de Boer, P.L. Zusterzeel, et al. The stem cell markers Oct4A, Nanog and c-Myc are expressed in ascites cells and tumor tissue of ovarian cancer patients [J]. Cell Oncol (Dordr), 2013,36(5):363-374
- [6] Z. Zhang, Y. Zhu, Y. Lai, et al. Follicle-stimulating hormone inhibits apoptosis in ovarian cancer cells by regulating the OCT4 stem cell signaling pathway[J]. Int J Oncol, 2013,43(4):1194-1204
- [7] L. Yang, D. Lai. Ovarian cancer stem cells enrichment [J]. Methods Mol Biol, 2013,1049:337-345
- [8] M. Morotti, C.M. Becker, M.V. Menada, et al. Targeting tyrosine-kinases in ovarian cancer [J]. Expert Opin Investig Drugs, 2013,22(10):1265-1279
- [9] Y.F. Chen, Z. Dong, Y. Xia, et al. A nucleoside analog inhibits microRNA-214 through targeting heat-shock factor 1 in human epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Sci, 2013,doi: 10.1111
- [10] M. Nishimura, E.J. Jung, M.Y. Shah, et al. Therapeutic synergy between microRNA and siRNA in ovarian cancer treatment [J]. Cancer Discov, 2013,[Epub ahead of print]
- [11] P.J. Zhang, J. Zhao, H.Y. Li, et al. CUE domain containing 2 regulates degradation of progesterone receptor by ubiquitin-proteasome[J]. EMBO J, 2007,26(7):1831-1842
- [12] H.Y. Li, H. Liu, C.H. Wang, et al. Deactivation of the kinase IKK by CUEDC2 through recruitment of the phosphatase PP1 [J]. Nat Immunol, 2008,9(5):533-541
- [13] X. Pan, T. Zhou, Y.H. Tai, et al. Elevated expression of CUEDC2 protein confers endocrine resistance in breast cancer [J]. Nat Med, 2011,17(6):708-714
- [14] Y.F. Gao, T. Li, Y. Chang, et al. Cdk1-phosphorylated CUEDC2 promotes spindle checkpoint inactivation and chromosomal instability[J]. Nat Cell Biol, 2011,13(8):924-933
- [15] P.M. Bareiss, A. Paczulla, H. Wang, et al. Quintanilla-Martinez, K. Schulze-Osthoff, F. Essmann, and C. Lengerke, SOX2 Expression Associates with Stem Cell State in Human Ovarian Carcinoma[J]. Cancer Res, 2013,73(17):5544-5555
- [16] L. Farrand, S. Byun, J.Y. Kim, et al. Piceatannol Enhances Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer via Modulation of p53, X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP), and Mitochondrial Fission[J]. J Biol Chem, 2013,288(33):23740-23750
- [17] J. Man, X. Zhang. CUEDC2: an emerging key player in inflammation and tumorigenesis[J]. Protein Cell, 2011,2(9):699-703

(上接第 3020 页)

- [5] Christine Radtke, Peter M. Vogt. Peripheral Nerve Regeneration: A Current Perspective[J]. Eplasty, 2009, 9:e47
- [6] Meyer M, Matsuoka I, Wetmore C, et al. Enhanced synthesis of brain-derived neurotrophic factor in the lesioned peripheral nerve different mechanisms are responsible for the regulation of BDNF and NGF mRNA[J]. J Cell Biol, 1992,119:45-54
- [7] Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, et al. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo [J]. Neuron, 1992, 9:295-305
- [8] Laquerriere A, Peulve P, Jin O, et al. Effect of basic fibroblast growth factor and alpha-melanocytic stimulating hormone on nerve regeneration through a collagen channel [J]. Microsurgery, 1994, 15: 203-210
- [9] Christine Webber, Douglas Zochodne. The nerve regenerative microenvironment: Early behavior and partnership of axons and Schwann cells [J]. Experimental Neurology, 2010,223:51-59
- [10] Mosahebi A, Woodward B, Wiberg M et al. Retroviral labeling of Schwann cells: in vitro characterization and in vivo transplantation to improve peripheral nerve regeneration [J]. Glia, 2001, 1:8-17
- [11] Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration [J]. Annu Rev Neurosci, 2007, 30:209-233
- [12] Brockes JP, Fields KL, Raff MC. Studies on cultured rat Schwann cells.I. Establishment of purified populations from cultures of peripheral nerve[J]. Brain Res, 1979,1:105-118
- [13] 胡棠,熊良俭,劳杰,等.从成年大白鼠坐骨神经分离培养雪旺细胞的方法学[J].中华显微外科杂志,2002,25:197-200
- Hu Tang, Xiong Liang-jian, Lao Jie, et al. A methodology of cultivation Schwann cells from adult rat sciatic nerve [J]. Chinese Journal of Microsurgery, 2002,25:197-200
- [14] 沈尊理,Berger Alfred,Hierner Robea 等.无血清法培养新生和成年鼠雪旺细胞[J].中华手外科杂志,2001,17:54-55
- Shen Zun-li, Berger Alfred, Hierner Robea, et al. Serum free method to cultivate new and adult rat schwann cells [J]. Chinese Journal of Hand Surgery, 2001,17:54-55
- [15] Lisa N. Pettingill, Ricki L. Minter, Robert K. Shepherd. Schwann cells genetically modified to express neurotrophins promote spiral ganglion neuron survival in vitro [J]. Neuroscience, 2008,152 (3): 821-828
- [16] Peter Arthur-farraj, Katharina wanek, Janina hantke, et al. Mouse Schwann Cells Need Both NRG1 and Cyclic AMP to Myelinate [J]. Glia, 2011,59:720-733
- [17] Rosenstein JM, Krum JM, Ruhrberg C. VEGF in the nervous system [J]. Organogenesis, 2010, 6:107-114
- [18] Seigo Suganuma, Kaoru Tada, Katsuhiko Hayashi, et al. Uncultured adipose-derived regenerative cells promote peripheral nerve regeneration [J]. The Japanese Orthopaedic Association, 2013,18(1): 145-151
- [19] Hakan Orbay, Ahmet Cagri Uysal, Hiko Hyakusoku. Differentiated and undifferentiated adipose- derived stem cells improve function in rats with peripheral nerve gaps [J]. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, 2012, 65:657-664
- [20] Yu-Qing Jin, Wei Liu, Tan-Hui Hong, et al. Efficient Schwann cell purification by differential cell detachment using multiplex collagenase treatment [J]. Journal of Neuroscience Methods, 2008, 170(1):140-148