

C11orf17 蛋白的原核表达及功能预测

汪宗桂¹, 左长清², 刘振杰^{3,4}, 刘新光^{1,3}

(1. 广东医学院生物化学与分子生物学教研室, 广东 东莞 523808; 2. 广东医学院药理学教研室;
3. 广东医学院衰老研究所; 4. 广东省中医院检验科)

摘要: **目的** 利用基因工程技术获取原核表达的 C11orf17 蛋白, 结合生物信息学初步预测其功能。 **方法** 以 K562 细胞的 cDNA 为模板, PCR 扩增 C11orf17 的基因序列; 双酶切后将目的基因亚克隆至原核表达载体 pET-32a 上, 将测序正确的重组表达质粒 pET-32a-C11orf17 转化到 E. coli BL21, 经诱导后 SDS-PAGE 及 Western blot 检测融合蛋白表达, 并分析其可溶性。采用 UGET 软件预测 C11orf17 共表达基因, 蛋白质互作数据库挖掘 C11orf17 基因已知互作蛋白, 在线软件 Gather 富集共表达基因生物功能。 **结果** 成功构建重组表达质粒 pET-32a-C11orf17, 此重组体经诱导后能在 E. coli BL21 高效表达 C11orf17 的融合蛋白, UGET 分析 C11orf17 前 300 共表达探针中, 包含 267 个已知基因, 共表达基因主要富集细胞交流、信号传导、细胞周期基因功能本体。蛋白互作数据库表明, C11orf17 与 PRKACA 蛋白互作, 后者为细胞周期调控重要分子。 **结论** 在原核细胞中成功表达出 C11orf17 蛋白, 生物信息预测其可能是细胞周期调控重要新分子, 为后续研究提供了方向和线索。

关键词: C11orf17; 原核表达; 生物信息学

中图分类号: R34 **文献标识码:** A

Prokaryotic Expression and Function Prediction of C11orf17 Protein

WANG Zonggui, ZUO Changqing, LIU Zhenjie, et al

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College, Guangdong 523808, China)

Abstract: **Objective** To obtain C11orf17 by prokaryotic expression system and predict its function by bioinformatics. **Methods** Breast cancer cell cDNA were synthesized as a template and the gene encoding C11orf17 was amplified by PCR, and PCR product was subcloned into expression vector pET-32a. The constructed recombinant plasmid pET-32a-C11orf17 was transformed to E. coli BL21 for expression under induction of IPTG. The expressed product was identified by SDS-PAGE and Western blot. The co-expressed gene of C11orf17 was predicted by UGET software and its interaction protein was excavated through protein interaction database. The enriching biological function of co-expressed genes was predicted by online software Gather. **Results** The recombinant plasmid was constructed successfully and fusion protein was expressed in E. coli BL21 efficiently after induced by IPTG. The gene functional ontology such as cell communication, signal transduction and cell cycle were enriched among 267 co-expressed genes. The protein interaction database indicated that C11orf17 could interact with PRKACA, which was one important molecule for cell cycle regulation. **Conclusion** Protein C11orf17 was successfully expressed and it may be a novel cell cycle regulated protein.

Key words: C11orf17; prokaryotic expression; bioinformatics

收稿日期: 2013-11-02

基金项目: 国家自然科学基金(30871440), 广东省自然科学基金重点项目(9252402301000002), 湛江市科技计划项目(2010C3106003), 广东医学院科研基金面上项目(M2010005)。

作者简介: 汪宗桂, 硕士, 讲师, 研究方向: 衰老与老年性疾病的分子机制研究, E-mail: gdmcwzg@163.com. 通讯作者刘新光, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 衰老与老年性疾病的分子机制与分子诊断研究, E-mail: xgliu64@126.com.

C11orf17, 又名 AKIP1、BCA3, 定位于染色体 11p15.3, 含 210 个氨基酸残基, 主要存在于细胞核中。其最先报道为乳腺癌相关蛋白 3, 即 BCA3 (breast cancer associated protein 3), 高表达于前列腺癌和乳腺癌细胞系中^[1], 但其功能研究目前尚未明确。本实验室利用酵母双杂交方法从人骨骼肌细胞 cDNA 文库中筛选了 21 个与衰老相关蛋白 prelamin

A 结合的阳性候选克隆,其中 C11orf17 在其 C 末端 98aa 的区域内与 prelamin A 的 C 末端相结合(数据未发表)。为了进一步研究其功能,本研究对 C11orf17 基因编码区进行克隆、表达,为研究 C11orf17 蛋白的结构和功能奠定基础;同时,我们采用整合蛋白互作与全基因组共表达谱生物信息学方法对其功能进行了预测,为下一步实验提供方向。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 菌种、BL21 (DE3) 菌种、K562 细胞、pET-32a 质粒,均由本室保存;引物、DNA 纯化试剂盒为上海生工生物工程技术有限公司产品;Pyrobest DNA polymer-ase、内切酶 BamH I 及 Xho I 为 TaKaRa 公司产品;Anti-His 抗体,购自 Santa cruz 公司;ECL 试剂盒,购自北京中杉金桥公司;BugBuster 蛋白抽提试剂购自 Novagen 公司等。

1.2 方法

1.2.1 K562 细胞总 RNA 的提取及 cDNA 的制备

按 Trizol 试剂盒操作说明提取 RNA,取 2 μ L 用 DEPC 处理水稀释至 500 μ L,用紫外分光光度法测定 A_{260} 和 A_{280} ,RNA 浓度 (μ g/mL) = $A_{260} \times 40 \times$ 稀释倍数;纯度以 A_{260}/A_{280} 比值表示,达 1.8 ~ 2.0 方能用于实验。用 DEPC 处理的去离子水稀释 RNA 到终浓度为 100 pg/ μ L,进行逆转录实验。RT-PCR 结束后,得到的为 cDNA,样品保存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.2.2 引物的设计与合成 根据已知的 pET32a 载体序列以及 C11orf17 的 cDNA 编码序列,运用 oligo6.0 设计引物上游引物为:5' GA GGA TCC ATG GAC AAC TGT TTG GCG GC 3',含人 C11orf17 cDNA 编码区起始 20 个核苷酸,其 5'端含 BamH I 酶切位点;下游引物为:5' CA CTC GAG CAC AGG GAA GAC CAG GTC CA 3',与人 C11orf17 cDNA 编码区最后 20 个核苷酸互补,其 5'端含 XhoI 酶切位点,引物序列由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.3 pET32a-C11orf17 载体的构建与鉴定 以制备的 cDNA 为模板,利用上述引物进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 30 s,58.2 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min,扩增完毕后 4 $^{\circ}$ C 终止反应。将 PCR 产物与 pET-32a 载体分别进行 BamH I/Xho I 双酶切,经 DNA 纯化试剂

盒纯化后进行连接反应,并转化至 DH5 α 感受态大肠杆菌,经初步的双酶切鉴定后,送上海生工公司测序。

1.2.4 融合蛋白 C11orf17-His6 的原核表达 将经 DNA 测序验证的 pET32a-C11orf17 质粒及空载体 pET-32a 分别转化感受态表达菌 BL21 (DE3),铺入含氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 琼脂平板上倒置培养,当 A_{595} 值达 1 时,加 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol/L 诱导表达,同时设立不加 IPTG 的阴性对照组。继续培养 4 h 后,每管取 1.5 mL 菌液分装,10 000 $\times$ g 离心 1 min,菌体用 100 μ L 灭菌去离子水重悬菌体后,加入等体积的 2 $\times$ 蛋白电泳上样缓冲液混匀,沸水浴 10 min。冷却后吸取 10 μ L 样品上样,进行 SDS-PAGE 分析,Western blotting 分析所用的样品则需要稀释 10 倍。

1.2.5 融合蛋白 C11orf17-His6 的可溶性分析 取上述诱导表达的 1.5 mL 细菌培养液离心收集的菌体,用 300 μ L BugBuster 试剂重悬沉淀,加入溶菌酶使终浓度为 1 KU/mL [溶菌酶可用溶菌酶稀释液进行稀释:50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5),100 mmol/L NaCl,0.1 mmol/L EDTA,1 mmol/L DTT,0.1% Triton X-100] 和 0.3 μ L Benzonase 核酸酶以降解核酸,降低抽提物粘度。细菌重悬后,在水平摇床低速摇动,室温孵育 10 ~ 20 min。使用 Benzonase 核酸酶孵育后,细菌抽提物不应为粘稠状态。12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,将离心后的上清转移到新的 EP 管中,沉淀部分加 80 ~ 100 μ L 蒸馏水重悬。分别取 10 μ L 上述处理的上清液和沉淀重悬液,加等体积的 2 $\times$ 蛋白电泳上样缓冲液,混匀后沸水浴 10 min,再进行 SDS-PAGE 和 Western blotting 分析。

1.2.6 生物信息学功能预测 C11orf17 的全基因组共表达分析采用全基因组共表达资源库分析 web 工具 UGET (<http://genome.ucla.edu/~jldong/GenCorr.html>) 进行^[2];分析采用芯片平台为 affymetrix 公司的 HG-U133 Plus 2,选择与 C11orf17 基因共表达强度最高的 300 个探针进行分析。C11orf17 基因的蛋白互作分析:整合人类蛋白相互作用数据库 BioGRID (<http://thebiogrid.org/>)^[3] 和 HPRD (www.hprd.org/)^[4] 相关资源,搜索与 C11orf17 蛋白相互作用的已知蛋白。最后采用在线生物信息软件 Gather (<http://gather.genome.duke.edu/>) 分析共表达基因和相互作用蛋白所富集的生物功能。

2 结 果

2.1 目的基因的获得及 pET32a-C11orf17 载体的构建

以 K562 细胞总 RNA 制备的 cDNA 为模板,经 PCR 扩增,取 1 μ L 的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果(见图 1 的 A 和 B 泳道)显示在 500 ~ 750 bp 之间有很亮的条带,与理论值 630 bp 相符,表明 PCR 扩增获得大量的 C11orf17 目的片段。将 PCR 产物连接 pET-32a 载体后,扩增阳性菌落,提取质粒分别进行 BamH I 和 Xho I 双酶切鉴定,结果显示(见图 1 的 C 泳道),在约 630 bp 处及 6 000 bp 处出现两条带,其大小与理论值(目的片段约 630 bp,空载体约 5 900 bp)相一致,表明 C11orf17 的 PCR 产物经双酶切后已经连接到载体 pET32a 上。将重组子送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,结果发现其序列与 GenBank 完全一致,证明原核表达重组质粒 pET32a-C11orf17 构建成功。

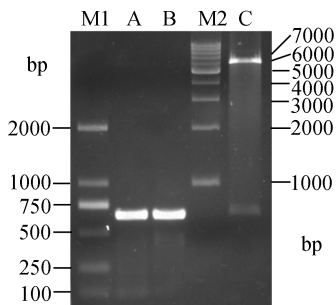


图 1 C11orf17 的 PCR 扩增及 pET32a-C11orf17 载体的双酶切鉴定

2.2 重组 C11orf17-His6 融合蛋白的表达情况及检测

将重组质粒 pET32a-C11orf17 和空载体 pET-32a 分别转化大肠杆菌 BL21 (DE3),经 IPTG 诱导在分子量 43.5kD(见图 2 的 D 泳道)和 20.4kD(见图 2 的 B 泳道)处分别出现明显条带。这与 His 标签蛋白分子量为 20.4kD 和 C11orf17 为 23.1kD 的理论值相符,即 C11orf17-His6 融合蛋白分子量为 43.5 kD。而未经 IPTG 诱导的 BL21(含 pET32a-C11orf17)和 BL21(含 pET-32a)则未见高表达量目的条带,分别见图 2 的 C 泳道和 A 泳道。为进一步确认融合蛋白 C11orf17-His6 得到表达,本文用 anti-

His 标签抗体对细菌总裂解液进行 Western blotting 检测,结果见图 3 的 E。以上表明重组质粒 pET32a-C11orf17 在大肠杆菌 BL21 中得到表达。

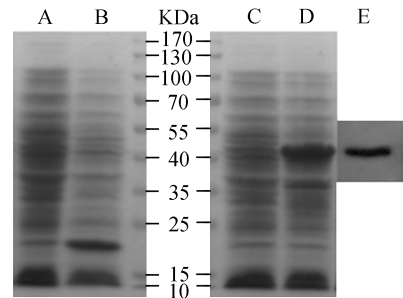


图 2 转化菌中 C11orf17-His6 融合蛋白的表达和 Western blotting 检测

2.3 重组 C11orf17-His6 融合蛋白的可溶性分析及检测

BugBuster 裂解液裂解经 IPTG 诱导的 BL21(含 pET32a-C11orf17)菌体,将上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE,结果发现上清中未出现大量明显的重组融合蛋白(见图 3 的 B 泳道),而在沉淀中 43.5kD 处发现大量重组蛋白(见图 3 的 C 泳道),表明 C11orf17-His6 主要以不可溶的包涵体形式存在。图 3 的 A 泳道是 pET32a-C11orf17 重组菌的全蛋白。为进一步确认 C11orf17-His6 在沉淀中是否确实存在,用 His 标签抗体 Western blotting 进一步检测融合蛋白的表达情况(图 3 的 D 泳道)。结果显示 C11orf17-His6 融合蛋白在 DE3 的包涵体中成功表达。

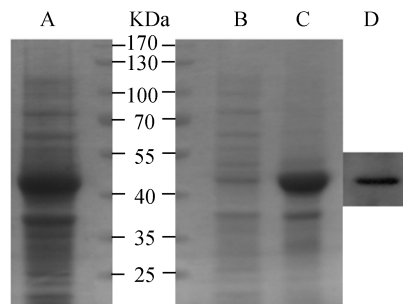


图 3 C11orf17-His6 融合蛋白的可溶性分析和 Western blotting 检测

2.4 生物信息学功能预测

UGET 分析得到前 300 个共表达基因探针中,

包含 267 个已知基因 (gene symbol)。在线 Gather 软件对 267 个共表达基因进行分析发现:共表达基因主要富集基因分子功能本体 GO:0007154 (cell communication), GO:0007165 (signal transduction), GO:0007049 (cell cycle) ($P < 0.0001$)。整合人类蛋白相互作用数据库 BioGRID 和 HPRD 资源分析发现,目前已经研究证明的 C11orf17 相互作用蛋白只有 PRKACA (protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha) 蛋白,后者是细胞周期数据库 (Cell Cycle Database: <http://www.itb.cnr.it/cellcycle/index.html>) 的重要成员。

3 讨 论

中国社会正面临严重的人口老龄化问题,有关衰老和老龄化的研究显得十分紧迫而必须。由于人类的生命周期较长,正常的衰老过程不易研究,因此衰老的研究通常利用人类早衰的病人来完成,进而揭示正常衰老过程的分子机理。儿童早老症 (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome, HGPS) 是一种非常罕见的遗传疾病,患者出生时正常,但会以每年衰老 10 岁的速度老化,平均寿命为 13 岁,90% 以上因为进行性冠状动脉和脑血管硬化死亡^[5]。HGPS 是由于 LMNA 基因在其外显子 11 的 1824 位发生核苷酸替代 (C→T),尽管未造成氨基酸残基的改变 (G608G),但产生了一个潜在的剪切位点,导致外显子 11 的 150nt 被剪切,使得 A 型核纤层蛋白前体 (prelamin A, PLA) 的 C 末端 50 个氨基酸残基被切除^[6],阻止了后续的水解使之加工为成熟的 lamin A 的过程。这表明 prelamin A 的加工和成熟过程与细胞衰老紧密相关。而 prelamin A 可能通过与其他蛋白相互作用最终引起细胞的早衰,寻找新的与细胞衰老相关的 prelamin A 结合蛋白并对其生物学功能进行研究,对于探索细胞衰老发生的机制具有重要意义。

本实验室研究发现 C11orf17 在其 C 末端 98aa 的区域内与 prelamin A 的 C 末端相结合。此区域包含了 SH2 结合序列、PKC 磷酸化模体及 CK2 磷酸化位点,并且 C11orf17 的羧基端即 -F-P-V 序列高度保守,对应于共同的结合序列为 -F/Y-x-(A/F/V),此序列来源于 II 型 PDZ 结构域包含蛋白,PDZ 功能域蛋白主要定位在细胞膜的细胞质侧,它们能结合底

物的羧基端,包含有另外的激酶功能域^[1]。这暗示着 C11orf17 的 C 末端区域具有许多未知的重要功能需要我们去探讨。

本文以 K562 细胞的 cDNA 为模板,经 RT-PCR 扩增,成功构建 C11orf17 的原核表达载体,测序验证其序列于 GenBank 中序列完全一致,并且,经大肠杆菌诱导表达,获得了高表达量的融合蛋白,用 His 标签抗体 Western blotting 检测显示,C11orf17-His6 融合蛋白在大肠杆菌 DE3 的包涵体中成功表达。这为抗体制备提供了足够的抗原,对进一步研究 C11orf17 蛋白的结构和功能具有十分重要的意义。

关于新基因、蛋白功能预测,目前广泛使用的方法为利用高通量的基因表达^[7]和蛋白质相互作用数据^[8-9]进行分析。通过整合两种方法有利于预测结果的可靠性。本研究对 C11orf17 进行了全基因组共表达基因分析,结果表明:共表达基因富集细胞交流,信号传导,细胞周期等功能,提示 C11orf17 可能具有以上相关功能。进一步分析已知的相互作用蛋白发现:C11orf17 能与 PRKACA 蛋白相互作用。PRKACA 是 cAMP 依赖性蛋白激酶催化亚基,研究证明其与细胞增殖,细胞周期功能密切相关^[10],是细胞周期数据库的重要成员。通过整合共表达基因和蛋白相互作用预测结果,我们认为:C11orf17 可能是细胞周期调控的重要新分子。衰老相关 prelamin A 蛋白对细胞衰老过程中的细胞周期调控是否与其新的相互作用蛋白 C11orf17 相关,还需进一步研究。

参考文献:

- [1] Kitching R, Li H, Wong MJ, et al. Characterization of a novel human breast cancer associated gene (BCA3) encoding an alternatively spliced proline-rich protein [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1625 (1): 116-121.
- [2] Day A, Dong J, Funari VA, et al. Disease Gene Characterization through large-scale Co-expression analysis [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4 (12): e8491.
- [3] Breitkreutz BJ, Stark C, Reguly T, The bioGRID interaction database: 2008 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36 (Database issue): D637-640.
- [4] Peri S, Navarro JD, Amanchy R, et al. Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans [J]. *Genome Res*, 2003, 13 (10): 2363-2371. (下转第 553 页)

(上接第 544 页)

- [5] Pollex RL, Hegele RA. Hutchinson-Gilford progeria syndrome[J]. Clin Genet, 2004, 66(5): 375-381.
- [6] Eriksson M, Brown WT, Gordon LB, et al. Recurrent de novo point mutations in lamin A cause Hutchinson-Gilford progeria syndrome[J]. Nature, 2003, 423(6937): 293-298.
- [7] Hvidsten TR, Komorowski J, Sandvik AK, et al. Predicting gene function from gene expressions and ontologies[J]. Pac Symp Biocomput, 2001, 6: 299-310.
- [8] Vazquez A, Flammini A, Maritan A, et al. Global protein function prediction from protein-protein interaction networks[J]. Nat Biotechnol, 2003, 21(6): 697-700.
- [9] Deng M, Zhang K, Mehta S, et al. Prediction of protein function using protein-protein interaction data[J]. J Comput Biol, 2003, 10(6): 947-960.
- [10] Cui C, Zhao H, Zhang Z, et al. CDC25B acts as a potential target of PRKACA in fertilized mouse eggs[J]. Biol Reprod, 2008, 79(5): 991-998.

(此文编辑:秦旭平)