

· 论 著 ·

## 胆管癌相关 FXYP6 基因功能区在大肠埃希菌表达的初步研究

万 涛<sup>1</sup>, 周宁新<sup>2</sup>, 徐东刚<sup>3</sup>, 吴加金<sup>3</sup>, 黄志强<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的 对胆管癌相关基因 FXYP6 基因的功能区进行克隆和表达,以便进一步展开该基因功能研究。方法 借助生物信息学方法分析 FXYP6 基因,设计 FXYP6 基因信号肽剪切后功能区蛋白体外表达序列,并将其克隆到 pBV220 表达载体上,继而以大肠埃希菌为表达系统,使功能区蛋白(不含信号肽)获得体外表达。结果 该基因主要功能位点位于 18 ~ 95 aa。PCR 扩增出剪切掉信号肽序列的功能区序列(即包含 18 ~ 95 aa 的肽链段),并成功构建 pBV220/FXYP6-ex 基因功能区重组表达质粒克隆,其在大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  中表达量最高,表达产物主要以包涵体形式存在。结论 获得胆管癌相关 FXYP6 基因融合蛋白表达产物,为后续研究打下基础。

**[关键词]** 胆管癌;离子通道蛋白;FXYP6 基因;功能区;表达

中图分类号: R575.7;R735.8 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)04-0289-04

### Prokaryotic expression of functional domain of a novel FXYP6 gene related to cholangiocarcinoma

WAN Tao<sup>1</sup>, ZHOU Ning-xin<sup>2</sup>, XU Dong-gang<sup>3</sup>, WU Jia-jin<sup>3</sup>, HUANG Zhi-qiang<sup>1</sup>. 1. Institute of Hepatobiliary Surgery of General Hospital of PLA, Beijing 100853, China; 2. Institute of Hepatobiliary and Gastroenteric Diseases of the Second Artillery General Hospital of PLA, Beijing 100088, China; 3. Institute of Basic Medicine, Academy of Military Medical Science of PLA, Beijing 100850, China

**[Abstract]** **Objective** To obtain the clone and expression of the functional domain of FXYP6 gene, which is a novel cholangiocarcinoma related gene. **Methods** Bioinformatical methods were used to analyze the full-length sequence, and predict the functional domains of its protein. The sequence of functional domain without signal peptide was designed and obtained by polymerase chain reaction, then the recombinant expression plasmid pBV220/FXYP6-ex was constructed to express human FXYP6 functional domain in the host bacteria *E. coli*. **Results** The functional domains were located from 18 aa to 95 aa, and the corresponding objective sequence(FXYP6-ex) was obtained by polymerase chain reaction. The recombinant expression plasmid pBV220/FXYP6-ex was constructed to express human FXYP6 functional domain in the host bacteria. The highest expression level of the target protein was in *E. coli* DH5 $\alpha$ . Most of the target protein was in the inclusion bodies. **Conclusion** This study provides the basis for understanding the relationship between the structure and function of FXYP6. More work should be performed on the novel protein and its influence on the mechanism of cholangiocarcinoma.

**[Key words]** cholangiocarcinoma; ion channel; FXYP6 gene; cloning; functional domains

胆管癌早期诊断困难,恶性程度高,根治机会少,预后很差。因此只有对其发病机制深入认识,才

能达到早期诊断、治疗的目标。本研究组在对胆管癌与正常胆管标本的前期研究中已证实:CCR-L2/FXYP6(以下简称 FXYP6)在不同分化胆管癌组织中呈现差异表达<sup>[1-2]</sup>,并已从人胎肝及脑 cDNA 文库中克隆出 FXYP6 全长基因序列进行分析研究。为进一步研究 FXYP6 基因翻译生成的蛋白是否在胆管癌的发生、发展中起作用,本研究利用大肠埃希菌原核表达系统,将 FXYP6 基因功能区在体外进行表达,分析不同宿主菌对表达效率的影响,验证这一方

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30471699)

作者简介:万 涛(1972-),男,河北秦皇岛人,博士,主治医师,从事肝胆胰外科基础与临床研究

作者单位:1. 100853 北京,解放军总医院肝胆外科研究所;2. 100088 北京,第二炮兵总医院肝胆胃肠病研究所;3. 100850 北京,解放军军事医学科学院基础医学研究所

法对 FXYP6 功能蛋白表达的可行性,为证实 FXYP6 基因表达的蛋白在胆管癌发生机制中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** FXYP6 基因功能区序列片段:由前期研究获得其阳性克隆;基因序列分析、引物设计、氨基酸序列分析和功能区位点预测:应用 Goldkey 核酸与蛋白质分析软件,为军事医学科学院三所吴加金教授提供;表达质粒载体 pBV220 vector:军事医学科学院三所王嘉玺教授惠赠;大肠埃希菌原核表达系统 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、JM109、HB101、BL21;均为军事医学科学院三所三室提供;T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准 DL2000 及限制性内切酶 *Pst* I、*Eco*R I:均为日本 TaKaRa 公司产品;DNA 片段回收试剂盒:上海申能博彩生物科技有限公司产品;质粒提取试剂盒:美国 Sigma 公司产品。

### 1.2 重组 FXYP6 基因功能区原核表达质粒的构建

将鉴定正确的 FXYP6 基因功能区质粒和 pBV220 表达载体质粒,以限制性内切酶 *Pst* I、*Eco*R I 分别进行消化,酶切产物经 10 g/L 低熔点琼脂糖凝胶纯化与回收,按照插入片段与空载体 3:1 的比例进行连接反应。

**1.3 重组质粒的转化与鉴定** 取连接产物 5  $\mu$ l,阳性和阴性对照连接产物各 2  $\mu$ l 转化入 200  $\mu$ l DH5 $\alpha$  感受态细胞中,在含氨苄青霉素平板上培养。以无菌牙签挑取半个阳性转化菌落放入含 5 ml LB(即溶菌肉汤,AMP<sup>+</sup>)的试管中,以 120 r/min 在 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床过夜。依试剂盒提供步骤完成质粒 DNA 的提取。取 2  $\mu$ l 质粒 DNA,在 10 g/L 琼脂糖凝胶中进行电泳,以确定质粒提取效果。

**1.4 阳性质粒的鉴定** 以限制性内切酶 *Pst* I、*Eco*R I 进行双酶切反应。以 FXYP6 基因编码区序列为模板,应用 Goldkey 软件设计并合成引物(P5/P6),扩增产物大小 234 bp。在 5'侧 FXYP6 功能区肽链的第一个氨基酸编码序列前方添加起始密码子 ATG,将 FXYP6 功能区肽链 3'侧的终止密码子 TGA 改为强终止密码子 TAA。引物序列为:

```

P5 27bp Tm 62.64 GC 51.85%
5'-----> 3'
GGAATTTCATA TGTGCCAGT GCAGCTG
P6 28bp Tm 61.08 GC 46.43%
5'-----> 3'
AA CTGCAG TT AGTTCTCTGC TTTCTGGG

```

以引物(P5/P6)进行 PCR 扩增,以 FXYP6 基因 cDNA 克隆质粒模板为阳性对照,并设立阴性对照。采用 25  $\mu$ l PCR 反应体系,反应产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。选取经酶切、PCR 鉴定后确认的阳性重组克隆测序。

### 1.5 重组原核表达质粒在不同宿主菌中的表达与检测

**1.5.1 重组 pBV220/FXYP6-ex 表达质粒转化不同宿主菌** 将鉴定正确的表达质粒 pBV220/FXYP6-ex 分别转化入已制备好的大肠埃希菌原核表达系统 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、JM109、HB101 和 BL21 感受态细胞。感受态细胞制备和转化方法如前所述。

**1.5.2 重组蛋白的热诱导表达** 将阳性转化菌落放入 5 ml 液体 LB(AMP<sup>+</sup>)中,以 180 r/min 在 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床过夜。次日取 30  $\mu$ l 过夜培养物转接至 3 ml LB/Amp<sup>+</sup> 活化,测定吸光度(A)=0.4~0.6,即达到对数中期时终止活化。迅速将培养物转入 42 $^{\circ}$ C 水浴摇床中,200 r/min,诱导目的蛋白在大肠埃希菌中表达,4~6 h 后收获。取诱导后的菌液 1.5 ml,重悬细胞,以超声波细胞粉碎机破碎细菌(冰浴中),离心分别收取上清和沉淀。

**1.5.3 检测目的蛋白的表达** 使用凝胶电泳法检测目的蛋白的表达,将聚丙烯酰胺凝胶小心固定在电泳槽上,依预定顺序上样 5~10  $\mu$ l(以空质粒 pBV220 转入宿主菌作空白对照),以 30 V 恒压进行电泳。取出凝胶,放入考马斯亮蓝染液中浸泡,在脱色摇床缓慢摇动染色 10 min 以上,再以脱色液浸泡凝胶,隔夜后观察。

## 2 结果

### 2.1 重组 FXYP6 基因功能区原核表达质粒的构建

应用 Goldkey 软件对 FXYP6 基因正 1 相位编码区序列进行分析,获得该基因产物作为膜蛋白的可能功能区分布:其中信号肽位于第 1~17 氨基酸(aa),主要功能位点位于 18~34 aa,35~57 aa 为跨膜区肽链结构,58~95 aa 是胞内区,为潜在的功能位点。设计剪切掉信号肽序列的功能区片段(即包含 18~95 aa 的肽链段)对应核酸序列大小为 234 bp。以限制性内切酶 *Pst* I、*Eco*R I 对鉴定正确的 FXYP6 基因功能区质粒和 pBV220 表达载体质粒进行酶切反应,电泳显示可成功切取约 250 bp 大小的目的插入片段和空载体。选取阳性克隆,分别采用双酶切反应和 PCR 反应扩增,结果确有约 250 bp 大小与目的片段大小相似的清晰条带出现(图 1)。将阳性重组转化子的菌液进行测序,测序成功,为正向

插入克隆,序列比较分析结果与原始序列资料吻合。表明产物经纯化回收后,与 pBV220 载体重组成功,得到 pBV220/FXYD6 基因功能区重组质粒克隆。

**2.2 重组原核表达质粒在不同宿主菌中的表达与检测** 应用 Goldkey 软件对 FXYD6 基因进行翻译,获得目的蛋白的氨基酸长度为 78 aa,按照氨基酸平均分子量 126.7 Da(dalton,道尔顿)计算,目的蛋白的分子量约 9800 Da。从电泳结果看,外源蛋白以 DH5 $\alpha$  表达量最高,而在 HB101、BL21 和 JM109 仅有微弱表达(图 2)。在 37℃、42℃ 条件下生长和诱导的蛋白表达无显著差异。在对蛋白表达产物的分析时发现,产物主要以包涵体形式存在,菌体裂解物上清在相应位置上没有明显的条带(图 3)。

3 讨论

FXYD6 基因属于 FXYD 基因家族,全称为包含 FXYD 氨基酸链的离子转运调节因子成员 6(FXYD

domain-containing ion transport regulator 6)。该基因家族由 Sweadner 于 2000 年底命名,目前认为该家族共包含 7 个成员,均为小分子蛋白(66 ~ 178 aa),其功能多与离子转运有关<sup>[3]</sup>。胆汁酸盐的摄取、转运和分泌主要受胆管细胞膜表面离子通道的功能调控。胆管上皮细胞膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性改变,直接影响胆汁分泌,进一步出现胆汁浓缩、胆汁淤滞和胆栓形成<sup>[4]</sup>。

前期工作已证实 FXYD6 基因在胆管癌,尤其在低分化胆管癌中呈现高表达,而高分化胆管癌中呈现低表达<sup>[5]</sup>。hFXYD6 反义核酸抑制人胆管癌 QBC939 细胞体外增殖能力,但对其侵袭能力无明显作用;抑制胰腺癌细胞 sw1990 中 FXYD6 的表达可以抑制细胞的增殖,提示 FXYD6 可能是一个对胆管癌和胰腺癌具有潜在临床应用价值的基因治疗靶点<sup>[6-7]</sup>。此外有结果显示,FXYD3 基因在胰腺癌中过表达,并且影响胰腺癌细胞的生长<sup>[8]</sup>。

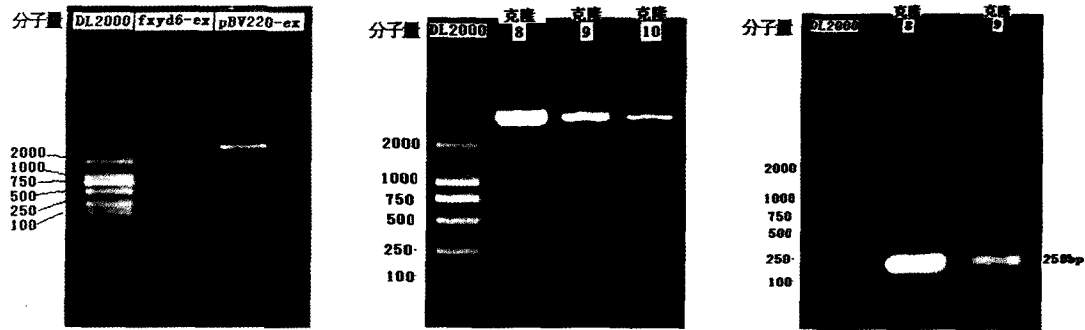


图 1 左图为 FXYD6 功能区质粒和 pBV220 质粒双酶切反应电泳图,中图为 pBV220/FXYD6 功能区重组质粒双酶切电泳图,右图为重组质粒巢式 PCR 鉴定电泳图(标号 8、9、10 为不同克隆编号)

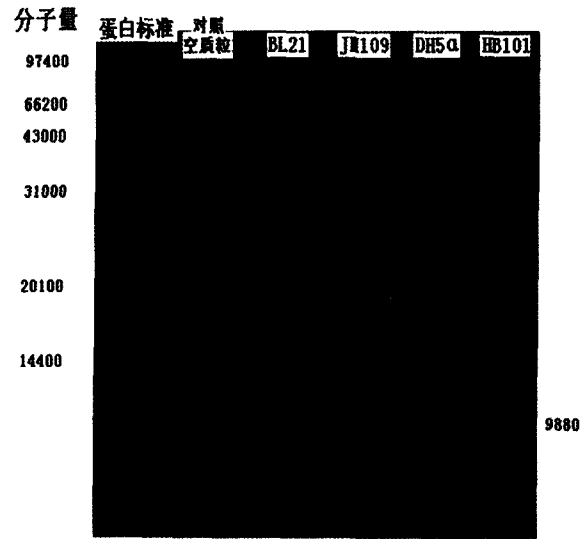


图 2 外源 FXYD6 功能区蛋白在不同宿主菌中表达情况

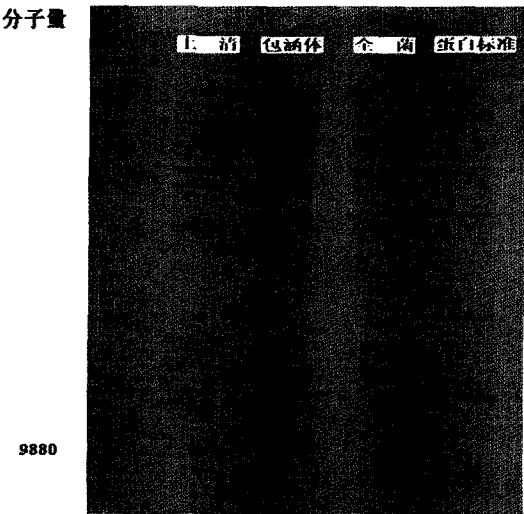


图 3 外源 FXYD6 功能区蛋白在 DH5 $\alpha$  中表达分布情况

目前对 FXYP6 基因表达的研究尚局限在对该基因的检查,本实验试图利用大肠埃希菌原核表达系统,将 FXYP6 基因功能区在体外进行表达,分析不同宿主菌对表达效率的影响,经实验证实这一方法对 FXYP6 功能蛋白表达是可行的。

真核基因在原核细胞如大肠埃希菌中表达常常受很多因素的影响,如:表达的外源蛋白结构含二硫键等,可以使基因在大肠埃希菌中的表达水平有着显著差别;SD 序列距起始密码子之间的距离对于 mRNA 翻译效率的影响;表达载体与宿主菌的匹配;mRNA 的二级结构等。本研究结果显示,插入外源基因片段的 pBV220 载体在不同宿主菌表达结果不同。

非融合的表达载体 pBV220 长约 3.66 kb,含有  $P_L P_R$  串联启动子的高效表达载体,有很强的终止序列 *rnn*,在其 SD 序列后面紧跟多克隆位点,便于插入带起始 ATG 的外源基因<sup>[9]</sup>。由于质粒上携带有温度敏感的 CI 抑制子基因,所以先将质粒 pBV220/FXYP6-ex 转化入大肠埃希菌,在 30℃ 摇床培养至  $A = 0.4$  后,转到 42℃ 水浴摇床上继续培养,此时  $P_L$  启动子开始活化。本研究采用非融合的表达载体 pBV220,在大肠埃希菌中表达,蛋白产物主要是包涵体形式存在。包涵体是由于蛋白质分子间通过共价键或非共价键缔合而形成的致密、具有一定疏水性和无生物活性的颗粒物。

包涵体的形成有利于蛋白质纯化,通过差速离心即可回收;可防止大肠埃希菌中蛋白水解酶的降解,使表达产物稳定,增加表达量。但包涵体属错误折叠的中间态,往往无活性,必须使其重新溶解,经过初步的分离纯化并在适当的条件下再折叠成有生物活性的蛋白质分子。

为使外源蛋白质在大肠埃希菌中达到最为有效的表达,我们对一些表达条件进行优化,结果表明,

重组质粒在所选择的宿主菌 DH5 $\alpha$  中表达外源蛋白量高。细菌的生长状态对目的蛋白表达水平有一定的影响,在  $A = 0.4 \sim 0.5$  时表达较好;而诱导温度对表达的影响并不明显。

本研究利用大肠埃希菌原核表达系统及不同宿主菌将 FXYP6 基因功能区在体外进行表达,获得了胆管癌相关 FXYP6 基因融合蛋白表达产物,为后续研究打下基础。

## 【参考文献】

- [1] 万涛,倪彬,刘建伟,等. 人胆管癌相关基因 CCR-12/FXYP6 大片段克隆与鉴定[J]. 中华实验外科杂志,2003,20(5): 393-395.
- [2] 肖梅,周宁新,高丽杰,等. 半定量检测胆管癌组织中 FXYP6 基因的表达[J]. 中国普外基础与临床杂志,2008,15(2):83-87.
- [3] Sweadner KJ, Rael E. The FXYP gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression[J]. Genomics, 2000,68(1):41-56.
- [4] Strazzabosco M. New insights into cholangiocyte physiology [J]. J Hepatology, 1997,27(5):945-952.
- [5] 肖梅,周宁新,万涛,等. RT-PCR 法检测人 FXYP6 基因在胆道恶性肿瘤中的表达[J]. 肝胆外科杂志,2007,15(3):223-225.
- [6] 窦春青,岳鑫,周宁新. hFXYP6 反义核酸对胆管癌细胞体外增殖和侵袭能力的影响[J]. 世界华人消化杂志,2007,15(9):929-935.
- [7] 刘军桂,周宁新,张效东. FXYP6 shRNA 表达载体的构建及其在体外对胰腺癌细胞增殖的影响[J]. 生物技术通讯,2009,20(4):458-461.
- [8] Kayed H, Kleeff J, Kolb A, et al. FXYP3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth [J]. In J Cancer, 2006,118(1):43-54.
- [9] 张志清,姚立红,侯云德,等. 含 PLPR 启动子的原核高效表达载体的构建及其应用[J]. 病毒学报,1990,6(2):111.

(收稿日期:2010-03-20;修回日期:2010-05-20)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)