

# 胃癌相关基因GCRG123的克隆及其在大肠杆菌中的表达

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔

## ■背景资料

GCRG123是本实验室筛选出的1条在进展期胃癌、癌旁和正常胃黏膜组织间差异表达的新基因序列, 其与人类lamin样蛋白80%同源, 而A型lamin与肿瘤相关。最近的研究又发现GCRG123为LINE-1家族成员。为了进一步研究GCRG123在胃癌发生发展中的作用, 本课题组构建融合基因表达载体, 并在大肠杆菌中高效表达了Thioredoxin/GCRG123融合蛋白, 为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料。

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔, 中国人民解放军总医院南楼消化科 北京市 100853

军队“十五”重点科研基金资助项目, No. 01Z035

作者贡献分布: 此课题由王孟薇、吴本俨、王刚石及伍银桥共同设计; 研究过程由伍银桥、王刚石及尤纬缔操作完成; 本论文写作由伍银桥完成。

通讯作者: 伍银桥, 100853, 北京市复兴路28号, 中国人民解放军总医院南楼消化内科. wuyq56@hotmail.com

电话: 010-66876246

收稿日期: 2008-11-05 修回日期: 2008-11-19

接受日期: 2008-11-24 在线出版日期: 2008-12-18

## Cloning and expression of gastric cancer related gene GCRG123 in *E.coli*

Yin-Qiao Wu, Gang-Shi Wang, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You

Yin-Qiao Wu, Gang-Shi Wang, Meng-Wei Wang, Ben-Yan Wu, Wei-Di You, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China

Supported by: Key Project Grant in Medical Sciences

from the Tenth Five-year Plan of Chinese PLA, No. 01Z035

Correspondence to: Yin-Qiao Wu, Department of Gastroenterology, South Building, General Hospital of Chinese PLA, Beijing 100853, China. wuyq56@hotmail.com

Received: 2008-11-05 Revised: 2008-11-19

Accepted: 2008-11-24 Published online: 2008-12-18

## Abstract

**AIM:** To express gastric cancer related gene GCRG123 by using thioredoxin fusion expression system.

**METHODS:** GCRG123 cDNA with complete open reading frame was amplified by PCR from plasmid pGEM-T, and then cloned into thioredoxin fusion expression vector pET102/D-TOPO. The recombinant plasmid was further transformed into *E.coli* BL21 strain. After induction with IPTG, thioredoxin-GCRG123 fusion protein was expressed in *E.coli*.

**RESULTS:** SDS-PAGE analysis showed the thioredoxin-GCRG123 fusion protein with relative molecule mass of 18 700 was highly expressed. The thin layer gel scanning analysis showed that the yield of GCRG123 fusion protein was 23.6% of the total bacterial protein.

**CONCLUSION:** The GCRG123 recombinant fusion protein is successfully expressed in *E.coli*.

**Key Words:** Gastric cancer; Gene; GCRG123; Prokaryotic expression

Wu YQ, Wang GS, Wang MW, Wu BY, You WD. Cloning and expression of gastric cancer related gene GCRG123 in *E.coli*. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(35): 3984-3987

## 摘要

**目的:** 利用硫氧还蛋白融合表达系统表达胃癌相关基因GCRG123。

**方法:** 采用PCR技术从pGEM-T质粒上扩增出含完整ORF的GCRG123 cDNA序列, 将其克隆至硫氧还蛋白融合表达载体pET102/D-TOPO中, 转化大肠杆菌BL21, 经IPTG诱导表达重组融合蛋白, SDS-PAGE分析表达产物。

**结果:** 工程菌经IPTG诱导后, 高效表达出相对分子质量约18 700的重组融合蛋白。薄层凝胶扫描显示, 其表达量占菌体总蛋白质的23.6%。

**结论:** 在大肠杆菌中成功表达了GCRG123重组融合蛋白。

**关键词:** 胃癌; 基因; GCRG123; 原核表达

伍银桥, 王刚石, 王孟薇, 吴本俨, 尤纬缔. 胃癌相关基因GCRG123的克隆及其在大肠杆菌中的表达. *世界华人消化杂志* 2008; 16(35): 3984-3987

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3984.asp>

## 0 引言

研究表明, 胃癌的发生发展过程中涉及到多种癌基因、抑癌基因的变化<sup>[1]</sup>, 但迄今仍未从基因角度完全阐明胃癌发生、浸润或转移等方面的机制, 胃癌的早期诊断、预后判断和治疗等各方面尚无突破, 其年死亡率在我国仍高居不下。我们应用荧光标记的mRNA差异显示技术分析了我中国人胃窦部进展期腺癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织之间表达基因的差异, 从

## ■同行评议者

樊晓明, 主任医师, 复旦大学附属金山医院消化科

中筛选并克隆出1条基因序列, 命名为GCRG123, 其在正常和癌旁组织中的表达高于癌组织, 生物信息学分析显示其与人类lamin样蛋白80%同源, 其编码产物为一个新的lamin样蛋白<sup>[2-3]</sup>; 最近发现GCRG123为LINE-1家族成员<sup>[4]</sup>. 为了获得GCRG123蛋白并进一步研究其在胃癌发生发展中的作用, 我们扩增了含完整ORF的GCRG123 cDNA序列, 采用基因重组技术, 构建了融合基因表达载体, 并在大肠杆菌中高效表达了Thioredoxin/GCRG123融合蛋白.

## 1 材料和方法

1.1 材料 含目的片段的pGEM-T质粒由本室王刚石博士构建保存. *E. coli* TOP10, BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3)菌株, platinum<sup>®</sup> Pfx DNA polymerase和pET102/D-TOPO载体均为Invitrogen公司产品. IPTG, 质粒提取试剂盒购自Promega公司. DNA分子质量标准DL2000购自宝生物工程有限公司(TaKaRa). 蛋白质分子质量标准购自北京原平皓生物有限公司. SDS, Tris碱为Gibco公司产品. 丙烯酰胺, 甘氨酸为Sigma公司产品.

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成: 按照GCRG123的cDNA序列设计了一对引物, 并根据表达载体要求在上游引物5'端加入CACC序列, 以便于后续的定向克隆. 引物由中国科学院微生物所合成. 引物序列如下: P1: 5'-C ACC AAT AAT GAA ATG AAG GCA GA-3', P2: 5'-GTA TCT CCT TCA GTT CTG CTC T-3'.

1.2.2 PCR扩增: 以pGEM-T质粒为模板, 以P1、P2为引物, 用Pfx DNA polymerase扩增出含完整ORF的GCRG123 cDNA序列. PCR扩增的条件是: 94℃变性30 s, 51℃退火30 s, 68℃延伸1 min, 25次循环反应后, 于68℃继续延伸10 min.

1.2.3 表达载体的构建及鉴定: 按产品说明将PCR产物与pET102/D-TOPO载体连接, 转化TOP10感受态菌, 随机挑取10个菌落, 进行PCR鉴定. 选取经过PCR初步鉴定的阳性菌落, 送上海博亚生物工程公司测序.

1.2.4 融合蛋白的表达: 将质粒DNA转化BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3)感受态菌, 接种于10 mL含氨苄青霉素(100 mg/L)的LB液体培养基中, 37℃过夜培养后按1:50放大培养至 $A_{600}$ 达0.5-0.6, 加入IPTG至浓度为1 mmol/L, 诱导培养3-4 h. 收集菌体进行SDS-PAGE凝胶电泳检测.

1.2.5 SDS-PAGE分析表达产物: 离心收集诱导培

养的工程菌菌体, 悬浮于裂解缓冲液中, 经反复冷融或超声破碎后离心, 沉淀不溶解蛋白, 上清即为可溶组分, 再进行SDS-PAGE凝胶电泳. 根据上清组分与沉淀组分中的蛋白的含量, 判断其表达形式.

## 2 结果

2.1 目的基因片段的扩增及序列分析 PCR扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 可见1条清晰、单一、大小约266 bp的特异性扩增条带(图1), 其大小与预计的相吻合. 序列测定结果与理论预期一致.

2.2 融合蛋白表达的鉴定 SDS-PAGE分析表明, 工程菌经IPTG诱导后, 在相对分子质量约18 700处出现了1条明显的新蛋白带, 其大小与理论推算的融合蛋白相对分子质量相符合, 未诱导的工程菌中未见此带. 在诱导后1 h该蛋白即开始表达, 3-4 h达高峰. 凝胶薄层扫描分析显示其表达量约占菌体总蛋白的23.6%. 将菌体进行冻融裂解或超声破碎、离心后分别取其上清和沉淀进行SDS-PAGE凝胶电泳检测, 发现无论诱导时间长短, Thioredoxin/GCRG123融合蛋白均主要以包涵体形式存在于沉淀中, 菌体裂解物上清在相应位置没有明确条带出现(图2).

## 3 讨论

癌基因和抑癌基因以及与肿瘤发生相关的其他因素的研究一直是近年来肿瘤研究的焦点<sup>[5]</sup>. 在胃癌的发生发展过程中涉及到HER2/neu, met, k-sam, ras, c-myc, bcl-2, APC, E-Cadherin, p53, Rb, cyclin等多种基因. 但这些基因在胃癌组织中变异的特异性不强, 仍很难用作胃癌的监测指标. GCRG123是本实验室应用荧光标记的mRNA差异显示技术(DDRT-PCR)从我国人胃窦部进展期腺癌组织、癌旁组织和正常胃黏膜组织中筛选并克隆出的1条差异表达基因序列. GCRG123由445 bp组成, 具有完整的开放阅读框架, 编码含有49个氨基酸的产物. 该核苷酸序列登录GenBank, 登录号AF454554. 生物信息学分析显示其与人类lamin样蛋白80%同源<sup>[3]</sup>, lamin即核纤层蛋白, 是核纤层的主要组成成分, 而核纤层是真核细胞中紧贴内核膜内层的纤维状网状结构, 对稳定细胞核的形状和染色质高度有序性, 以及调节染色质的螺旋化和解螺旋等均有重要作用. 文献已报道多个lamin样蛋白<sup>[6]</sup>, 但对各种lamin样蛋白的功能尚缺乏了解.

根据lamin的序列、在有丝分裂中的行为

### ■应用要点

对GCRG123的深入研究, 有助于阐明胃癌的发病机制, 也将为胃癌的诊断、治疗和预后判断提供新的思路 and 手段.

### ■名词解释

lamin: 核纤层蛋白, 是核纤层的主要组成成分, 而核纤层是真核细胞中紧贴内核膜内层的纤维状网状结构, 对稳定细胞核的形状和染色质高度有序性, 以及调节染色质的螺旋化和解螺旋等均有重要作用。

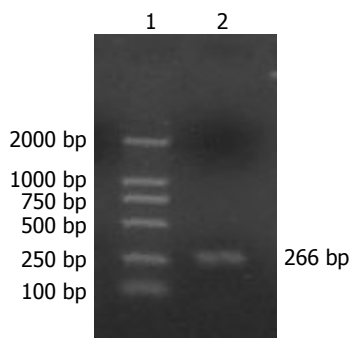


图 1 GCRG123 PCR扩增片段. 1: DNA marker; 2: PCR product.

和组织特异性表达特征的不同, 将其分为A型和B型lamin, A型lamin包含lamin A和lamin C. B型lamin在所有的胚胎和体细胞中均表达, 而A型lamin则在不同分化的细胞和组织中呈现不同的表达特征. 研究表明, 人类lamin A基因的突变与一些疾病有关, 包括Emery-Dreifuss肌营养不良、扩张性心肌病、先天性脂肪代谢障碍等. 许多类型的肿瘤均出现A型lamin的表达下调, 包括小细胞肺癌、睾丸生殖细胞肿瘤和皮肤基底细胞癌等<sup>[3,7-8]</sup>. 核lamin表达在消化系统肿瘤中也很常见, 结直肠癌中A型lamin高表达者预后差<sup>[9]</sup>. 在胃癌的各种癌前损害中, 不典型增生可见到lamin表达下调, 而肠化和萎缩性胃炎却无此现象<sup>[10]</sup>. 本实验室通过原位杂交检测显示, GCRG123在正常的胃粘膜上皮细胞和幽门腺高表达, 而在胃腺癌组织、不典型增生组织及部分肠化生组织低表达<sup>[3]</sup>, 与lamin样蛋白表达特征基本一致, GCRG123基因产物可能为一个新的lamin样蛋白. 而最近的研究发现GCRG123为LINE-1家族成员, 且在胃印戒细胞癌中高表达<sup>[4]</sup>.

为了进一步弄清楚GCRG123在胃癌发生发展中的作用及在胃癌诊断中的意义. 我们以获得的含完整开放阅读框架的GCRG123 cDNA片段为切入点, 利用大肠杆菌高密度生长的优势和易于表达蛋白、纯化简单, 尤其是以融合蛋白表达的形式等特点, 进行了GCRG123 cDNA片段在原核系统中的表达, 为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料. 可以预期, 对GCRG123的深入研究, 不仅有助于阐明胃癌的发病机制, 也将为胃癌的诊断、治疗和预后判断提供新的思路 and 手段. 通常PCR产物与载体的直接连接效率不高, 并且有非特异性背景菌落产生, 造成后续的筛选困难. 而拓朴异构酶 I 却能高效且快速地将PCR产物与载体相连, 同时我们使用的TOPO平端克隆方法主要是载体进行了改良设计, 含有ccdB(control of cell death)基因<sup>[11-12]</sup>, 可降低非特

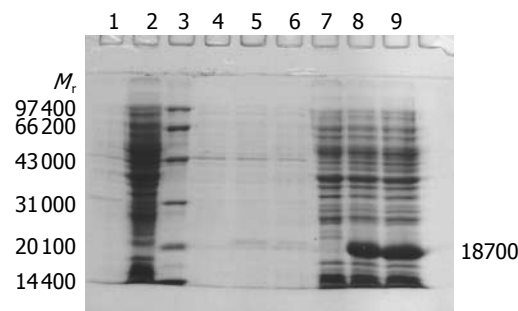


图 2 GCRG123蛋白表达形式的确定. 1-2: 未诱导4 h上清和沉淀; 3: Marker; 4, 7: IPTG诱导前上清和沉淀; 5, 8: IPTG诱导3 h上清和沉淀; 6, 9: IPTG诱导4 h上清和沉淀.

异性背景菌落, 也易于筛选. 在原核细胞表达时, 为获得产量高、利于基因工程下游纯化的工作, 目前多主张选用以融合蛋白表达形式的载体, 这样既能解决表达蛋白的纯化, 又可防止宿主菌蛋白酶对融合蛋白的降解, 有利于保护目的蛋白的生物活性. 我们选用pET102/D-TOPO表达载体, 是近年构建的新型载体, 带有强大的T7表达启动子, 给实验操作带来极为有利的方便.

我们以pET102/D-TOPO载体高水平地表达了人thioredoxin/GCRG123融合蛋白, 产物表达量占菌体总蛋白的23.6%. 选用pET102/D-TOPO载体除了希望得到高水平表达的重组融合蛋白, 同时还希望获得可溶性蛋白, 但其表达仍主要以包涵体的形式存在. 究其形成包涵体的原因, 可能有以下几个方面: (1)重组蛋白的高水平表达. 一般而言, 包涵体的形成是外源蛋白在大肠杆菌中高效表达时的普遍现象. (2)大肠杆菌胞质与真核细胞胞质环境的差异使重组的外源蛋白不能在大肠杆菌中进行正常的折叠<sup>[13-14]</sup>. (3)包涵体的形成虽与所表达蛋白的分子无关, 但却受肽链氨基酸组成的影响, 大量疏水氨基酸的存在易促进蛋白的聚集. (4)细菌培养温度、pH等也可能影响包涵体的形成<sup>[15]</sup>. 包涵体蛋白虽然往往无生物活性, 需要重新溶解和复性, 但也为重组蛋白纯化带来了极大的方便, 此外, 包涵体的形成有利于防止蛋白酶对表达蛋白的降解, 增加了产物的稳定性.

### 4 参考文献

- 1 Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 192-198
- 2 Wang G, Wang M, You W, Li H. [Cloning and primary expression analyses of down-regulated cDNA fragment in human gastric cancer] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2001; 18: 43-47
- 3 Wang G, Wang M, Wu B, You W. [A lamin-like protein

- gene is down-regulated in human gastric cancer] *Zhonghua Yixue Yichuanxue Zazhi* 2003; 20: 119-122
- 4 Wang GS, Wang MW, Wu BY, Yang XY, Wang WH, You WD. LINE-1 family member GCRG123 gene is up-regulated in human gastric signet-ring cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 758-763
- 5 Fujiwara Y, Doki Y, Taniguchi H, Sohma I, Takiguchi S, Miyata H, Yamasaki M, Monden M. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives. *Gastric Cancer* 2007; 10: 197-204
- 6 Foisy S, Joly EC, Bibor-Hardy V. Purification of intact nuclear lamina and identification of novel laminlike proteins in Raji, a cell line devoid of lamins A and C. *Biochem Cell Biol* 1997; 75: 721-732
- 7 Venables RS, McLean S, Luny D, Moteleb E, Morley S, Quinlan RA, Lane EB, Hutchison CJ. Expression of individual lamins in basal cell carcinomas of the skin. *Br J Cancer* 2001; 84: 512-519
- 8 Tilli CM, Ramaekers FC, Broers JL, Hutchison CJ, Neumann HA. Lamin expression in normal human skin, actinic keratosis, squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2003; 148: 102-109
- 9 Willis ND, Cox TR, Rahman-Casañs SF, Smits K, Przyborski SA, van den Brandt P, van Engeland M, Weijenberg M, Wilson RG, de Bruijne A, Hutchison CJ. Lamin A/C is a risk biomarker in colorectal cancer. *PLoS ONE* 2008; 3: e2988
- 10 Moss SF, Krivosheyev V, de Souza A, Chin K, Gaetz HP, Chaudhary N, Worman HJ, Holt PR. Decreased and aberrant nuclear lamin expression in gastrointestinal tract neoplasms. *Gut* 1999; 45: 723-729
- 11 Van Melderden L. Molecular interactions of the CcdB poison with its bacterial target, the DNA gyrase. *Int J Med Microbiol* 2002; 291: 537-544
- 12 Dao-Thi MH, Charlier D, Loris R, Maes D, Messens J, Wyns L, Backmann J. Intricate interactions within the ccd plasmid addiction system. *J Biol Chem* 2002; 277: 3733-3742
- 13 Carrio MM, Villaverde A. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Lett* 2003; 537: 215-221
- 14 Middelberg AP. Preparative protein refolding. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 437-443
- 15 Yang Q, Xu J, Li M, Lei X, An L. High-level expression of a soluble snake venom enzyme, glosheobin, in *E. coli* in the presence of metal ions. *Biotechnol Lett* 2003; 25: 607-610

#### ■同行评价

本文利用硫氧还蛋白融合表达系统在大肠杆菌中成功表达了GCRG123重组融合蛋白,为后续的功能研究、蛋白制备及其抗体研制提供了良好的实验材料。也有助于利用GCRG123重组融合蛋白,进一步研究阐明GCRG123在胃癌发生中的生物学作用,学术价值较好。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2008年版权归世界华人消化杂志

#### • 消息 •

### 世界华人消化杂志参考文献要求

**本刊讯** 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码。如马连生<sup>[1]</sup>报告……,潘伯荣 *et al*<sup>[2-5]</sup>认为……;PCR方法敏感性高<sup>[6-7]</sup>。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology* (<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。(常务副总编辑: 张海宁 2008-12-18)