论著

文章编号:1000-5404(2006)22-2266-03

前列腺癌上调表达基因BRP44的蛋白细胞定位及功能预测研究

吴 刚,彭 亮,聂志林,叶 锦,毕 罡,靳文生,靳风烁 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科,重庆 400042)

提 要:目的 了解GFP-BRP44融合蛋白的细胞定位,初步预测BRP44的功能。**方法** 构建BRP44与GFP的融合表达真核载体,脂质体介导法转染高表达该基因的前列腺癌细胞株LNCaP,激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的细胞定位。生物信息学方法对基因BRP44进行序列分析及功能预测。**结果** 成功构建GFP-BRP44融合蛋白的真核表达载体,pEGFP-BRP44融和蛋白在LNCaP细胞核及细胞质均有表达。与单纯GFP相比,融合蛋白在细胞质的表达相比细胞核更强。功能预测提示基因BRP44可能是一个受oct-1等转录因子调控,主要在细胞线粒体发挥基因调节作用的可溶性蛋白。**结论** BRP44蛋白可能主要在细胞质发挥作用。

关键词: BRP44; 真核表达载体;细胞定位;基因功能

中图法分类号: R394-33;R394.3;R737.25 **文献标识码:** A

Cellular localization of BRP44 up-expressed in prostate cancer and prediction of gene function

WU Gang, PENG Liang, NIE Zhi-lin, YE Jin, BI Gang, JIN Wen-sheng, JIN Feng-shuo (Department of Urology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the subcellular localization of GFP-BRP44 in LNCaP cells and predict the gene functions of BRP44. **Methods** The plasmid with fusion gene of BRP44 and green fluorescent protein (GFP) was constructed and transfected into LNCaP cells by liposome. The subcellular localization of GFP-BRP44 and pure GFP was observed by laser scannning confocal microscope. The gene function was predicted by analyzing the sequence and motif of BRP44 with bioinformatics. **Results** Some useful information predicted about gene function of BRP44 was gotten. The fusion protein of GFP-BRP44 expressed in both nuclei and cytoplasm of LNCaP cells. However, compared with pure GFP, the expression of GFP-BRP44 in cytoplasm was stronger than in nuclei. Predicted information hinted that BRP44 may be a regulatory factor regulating some gene expression in cellular mitochondria. **Conclusion** The protein of BRP44 mainly located in cytoplasm of LNCaP cells.

Key words: BRP44; eukaryotic expressing vector; cellular localization; gene function

我们在前期实验中用基因表达系列分析(serial analysis of gene expression, SAGE)数据库挖掘的方法[1]发现基因BRP44在前列腺癌组织的表达数据库中高表达,超过癌周围正常组织的10倍。同时在人体所有肿瘤及正常组织中,BRP44在前列腺癌组织的表达强度最高。用Northern blot初步证实了BRP44为前列腺癌上调表达的相关癌基因。通过基因功能检索,我们没有发现关于BRP44任何功能研究的报道。因此,我们构建BRP44与GFP的融合表达真核质粒,转染高表达该基因的前列腺癌细胞株LNCaP,用激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的细胞定位。用生物信息学方法对基因BRP44进行序列分析及功能预测,为进一步研究BRP44的功能及与前列腺癌发生发展的关系打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、细胞系和质粒 DH5α大肠杆菌菌株为本实验室保存;前列腺癌细胞系LNCaP由西安交通大学附属第一医院贺大林教授馈赠,真核表达载体pEGFP-C1由本校医学检验系

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(30400446)
Supported by the General Program of the National Natural Science Foundation of China (30400446)

作者简介:吴 刚(1973-),男,重庆市人,博士研究生,主治医师,主要从事前列腺癌方面的研究。电话:13708310161,E-mail:wugangdoctor@yahoo.com

通讯作者:靳风烁,电话:(023)68757364,E-mail:fengshuojin@hotmail.com

收稿日期:2006-03-28;修回日期:2006-08-31

临床生物化学教研室胡川闽教授馈赠。

1.1.2　主要试剂　细胞培养用 1640 以及胎牛血清(Hyclone 公司)，细胞转染用阳离子脂质体 Lipofectamine 2000、Trizol 试剂及 SurperScript Ⅱ 反转录试剂盒(Invitrogen 公司)，Wizard purefection plasmid DNA purification system(Promega 公司)，DNA 胶回收试剂盒以及 T_4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司)，PCR 所用试剂及限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Eco*R Ⅰ(TaKaRa 公司)，T_4 多核苷酸激酶试剂盒(Promega 公司)。

1.1.3　PCR 引物的设计合成　根据 Genbank 数据库 BRP44 的 mRNA 序列及载体 pEGFP-C1 的多酶切位点设计 2 对引物，用 Oligo 6.0 软件进行引物设计。在上下游引物的 5′引入相应的 *Hind* Ⅲ、*Eco*R Ⅰ限制性内切酶识别序列及保护碱基。经软件分析目的序列不含有 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ的酶切位点，并保证开放阅读框的正确。引物由上海 Sangon 公司合成。

正义引物：5′-CCA ↓ AGCTTAGTCGTCGTGGCAGGAAAAG，反义引物：5′-CGG ↓ AATTCTTTGTGTGCTTTAGCTTTTAGTTC，产物：498 bp。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养以及总 RNA 的提取　LNCaP 细胞常规复苏，培养液为 1640 + 10% 小牛血清，5% CO_2、37 ℃培养箱中培养。总 RNA 提取按照 Trizol 试剂的操作说明书进行。RNA 逆转录合成 cDNA 按照 SurperScript Ⅱ 反转录试剂盒的操作说明书进行。

1.2.2　PCR 扩增　采用 PE 公司 9600 型扩增仪进行扩增反应：预变性 94 ℃ 5 min；变性 94 ℃ 30 s；退火 60 ℃ 30 s；72℃延伸 30 s 共 30 个循环，最后 1 个循环 72 ℃延伸 5 min，PCR 反应结束后取 5 μl 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳，用 UVPGD 800 凝胶分析仪观察和记录结果。DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.2.3　BRP44 与 GFP 的融合表达真核载体重组体的构建

将 PCR 产物及载体 pEGFP-C1 进行 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ的双酶切，用 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段，T_4 DNA 连接酶 4 ℃将目的片段与载体进行连接。重组体转化感受态细胞后涂于含有卡那霉素的 LB 培养板，挑选阳性菌落扩增，抽提质粒后双酶切及测序鉴定(测序送上海 Sangon 公司)。所得序列与 GenBank 比较，最终确定正确的阳性菌落后扩增，Wizard purefection plasmid DNA purification system 试剂盒提取无内毒素污染的重组质粒 pEGFP-C1-BRP44，双酶切再次鉴定。

1.2.4　LNCaP 细胞的转染　转染前 1 天将 LNCaP 细胞以每孔 8×10^5 的细胞密度铺入 6 孔板，转染时细胞达到 80% 的融合，3 μg 重组质粒 pEGFP-C1-BRP44 与 8 μl Lipofectamin 2000 混合后加入每孔细胞，对照组加入 pEGFP-C1 质粒，阴性对照只加脂质体，转染 6 h 更换为常规培养液。24、48 h 后荧光倒置显微镜观察到 GFP-BRP44 融合蛋白表达后固定细胞制成细胞爬片，激光共聚焦显微镜分层扫描观察。

1.2.5　生物信息学方法预测 BRP44 的可能功能　①组织表达谱分析：SAGE Genie 分析 SAGE 电子表达谱，UniGene's EST ProfileViewer 分析 EST 电子表达谱。②启动子区及调节因子的预测：PromoterInspector 软件。③进化树分析：clustalW 软件排列序列，phylip 软件生成。④蛋白质序列分析及结构预测：predictprotein 软件；蛋白质序列的相似性比较采用 CLUSTAL W 程序，蛋白基序的查询使用 Prosite 数据库，Tmpred 软件分析蛋白可能的跨膜结构。

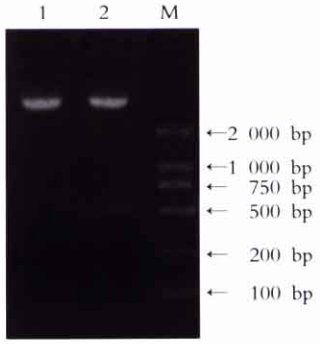
2　结果

2.1　Alu 亚家族 Sx 基因目的片段的扩增

PCR 扩增产生的特异性条带约 500 bp，与预计的片段大小相同。

2.2　GFP-BRP44 融合蛋白真核表达载体 pEGFP-C1-BRP44 的双酶切鉴定结果

将重组子经 *Hind* Ⅲ及 *Eco*R Ⅰ双酶切后，在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳，结果重组体产生约 500 bp 及 5 kb 的 2 个特异性条带(图 1)，500 bp 带与 PCR 扩增片段结果一致，5 kb 与 pEGFP-C1 空载体一致。



M：DNA 标准；1：pEGFP-C1 空载体；2：pEGFP-C1-BRP44

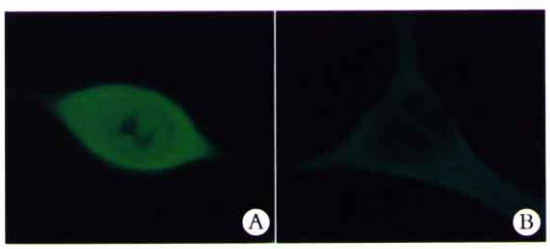
图 1　真核表达载体 pEGFP-C1-BRP44 的双酶切鉴定电泳图

2.3　序列分析

重组子送上海 Sangon 公司进行测序，序列分析证明插入片段位置正确，序列与已经公布的 BRP44 的 mRNA 序列完全一致。表明 GFP-BRP44 融合蛋白真核表达载体构建成功。

2.4　前列腺癌细胞 LNCaP 的转染

pEGFP-C1-BRP44 转染 LNCaP 细胞获得融合蛋白的表达。通过激光共聚焦显微镜扫描观察：pEGFP-BRP44 融和蛋白在 LNCaP 细胞核及细胞质均存在。通过图像分析软件与对照相比，融合蛋白的荧光强度在细胞质中比细胞核更强(图 2)。



A：pEGFP-C1；B：pEGFP-C1-BRP44

图 2　pEGFP-C1 及 pEGFP-C1-BRP44 质粒转染 48 h 后的 LNCaP 细胞　(激光共聚焦显微镜 ×1 200)

2.5 生物信息学方法预测 BRP44 可能的功能

SAGE 电子表达谱显示 BRP44 在人体多种组织中均有不同程度的表达,在前列腺癌组织中表达最高,在前列腺癌组织的表达数据库的表达超过癌周围正常组织的 10 倍。EST 数据表达谱显示 BRP44 在人体多种正常组织中均有不同程度的表达,在肾脏、胰腺、大脑及前列腺表达较高。启动子区及调节因子的预测该基因最大可能被 oct-1 等转录因子调控。进化树分析与人类基因最近的物种是:C_familiaris(家犬),其次为小鼠。蛋白功能预测该基因表达 127 个氨基酸、分子量 14279 的蛋白,在 93 氨基酸位点可能存在糖基化修饰,8、51、104 等氨基酸位点可能存在烷基化修饰。二级结构以 α 螺旋和 β 折叠为主,由于该蛋白序列较短,没有同源的结构已知蛋白结构域,因此预测其三级结构很困难。该蛋白包含一段未知功能的保守性结构域,见 http://www.ncbi.nlm.nih.qov/Structure/cdd/cddsrv.cgi?uid=17369,BLAST 检测没有发现任何已知功能蛋白与其同源。细胞定位预测提示该蛋白有可能位于线粒体,并属于可溶性蛋白,作为膜蛋白的可能性不大。

3 讨论

我们在前期实验中用基因表达系列分析 SAGE 数据库挖掘的方法发现基因 BRP44 在前列腺癌组织的表达数据库中高表达,超过癌周围正常组织的 10 倍。同时在人体所有肿瘤及正常组织中,BRP44 在前列腺癌组织的表达强度最高。随后我们用 Northern blot 初步证实了 BRP44 为前列腺癌上调表达的相关癌基因(另文发表)。通过基因功能检索,我们却没有发现关于 BRP44 任何功能研究的报道。对一条功能完全未知的基因,用生物信息学方法预测其功能可带来很多重要的研究提示,减少实验的盲目性[2]。在 BRP44 的功能预测中,由于蛋白只有一段未知功能的保守性结构域,没有发现任何已知功能蛋白与其同源,因此对其可能的功能预测非常困难。亚细胞定位预测提示该蛋白有可能位于线粒体,蛋白结构分析属于可溶性蛋白可能性大。而很多位于线粒体的蛋白与肿瘤相关[3]。因此根据我们进行其他蛋白的功能预测的经验来推断,BRP44 在生物信息学功能预测上给我们的印象是一个功能尚待进一步研究的调节因子,主要在转录或者翻译水平调控肿瘤细胞线粒体内某些基因的表达。

本实验选择 pEGFP-C1 载体构建 pEGFP-C1-BRP44 重组子,pEGFP-C1 载体是一种高效的真核表达载体,其多克隆位点上游是人巨细胞病毒的强启动子及绿色荧光蛋白(GFP)序列,通过 *Hind* Ⅲ及*Eco*R Ⅰ限制性内切酶识别序列插入的 BRP44 序列,在载体上下游调控信号的作用下有望得到目的基因与 GFP 融合蛋白的高水平转录表达。由于测序已经证实重组子在 GFP 序列后直接融合 BRP44 基因的编码序列,而且开放阅读框正确,因此转染细胞后直接可用荧光显微镜观察到 GFP-BRP44 融合蛋白的表达。但是如果要进一步观察融合蛋白的细胞准确定位,即初步观察融合蛋白主要位于细胞膜、细胞质还是细胞核内,则需要用激光共聚焦显微镜逐层对细胞进行扫描观察。本研究用激光共聚焦显微镜观察证实 pEGFP-BRP44 融和蛋白在 BRP44 核及细胞质均有表达,通过图象分析证实与对照相比,融和蛋白在细胞质的表达相比细胞核更强。提示 BRP44 蛋白主要在 LNCaP 细胞质发挥其功能作用,这与与生物信息学预测该蛋白可能位于线粒体是基本相吻合的。

但是,GFP-BRP44 融合蛋白的细胞定位是否就可以认为是 BRP44 蛋白的细胞定位呢?目前研究认为 GFP 一般不会影响与之融和蛋白的功能定位[4],但是 BRP44 蛋白只有 127 个氨基酸,比它更大的在其 N 端 GFP 很难说对其功能定位没有影响。因此,我们计划下一步采用例如 pcDNA3.1/myc-His A 真核表达载体构建 BRP44 表达载体,让该载体上的多聚组氨酸标签在 BRP44 的 C 端表达,再通过检测分子量很小的多聚组氨酸标签来进一步证实 BRP44 的细胞定位。

本研究成功构建了 BRP44 与 GFP 的融合表达真核载体,转染前列腺癌细胞株 LNCaP 并观察了融合蛋白的细胞定位;同时用生物信息学方法对基因 BRP44 进行序列分析及功能预测,初步判断 BRP44 可能是一个功能尚待进一步研究的调节因子,主要在转录或者翻译水平控制肿瘤细胞线粒体某个基因的的表达。为进一步研究 BRP44 的功能及该基因与前列腺癌发生发展的关系打下了基础。

参考文献:

[1] 吴 刚,彭 亮,靳风烁,等. 数据库挖掘方法高通量筛选分析前列腺癌相关基因[J]. 癌症, 2006, 25(5): 645-650.

[2] KATOH M, KATOH M. Bioinformatics for cancer management in the post-genome era [J]. Technol Cancer Res Treat, 2006, 5(2): 169-175.

[3] SCHIMMER A D, THOMAS M P, HURREN R, *et al*. Identification of small molecules that sensitize resistant tumor cells to tumor necrosis factor-family death receptors [J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2367-2375.

[4] LAUGHTON J M, DEVILLARD E, HEINRICHS D E, *et al*. Inhibition of expression of a staphylococcal superantige-like protein by a soluble factor from Lactobacillus reuteri[J]. Microbiology, 2006, 152(Pt 4): 1155-1167.

(编辑 王 红)