

# C7orf69基因的克隆表达及生物信息学分析

顾红岩<sup>1</sup>, 孟雪<sup>1</sup>, 李辉<sup>2</sup>, 郝晓花<sup>1,3,4</sup>, 李兴旺<sup>1</sup>, 魏红山<sup>1,3,4</sup> (1.北京大学地坛医院教学医院, 北京 100015; 2.首都医科大学附属北京地坛医院 感染中心, 北京 100015; 3.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 4.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015)

**摘要:** 目的 体外克隆表达并纯化C7orf69重组蛋白, 对C7orf69蛋白进行生物信息学分析。方法 PCR扩增C7orf69目的基因片段, 构建原核表达载体, 转化BL21, IPTG诱导目的蛋白表达, SDS-PAGE和Western blot鉴定, Ni-NTA纯化目的蛋白。结果 扩增获得序列完全正确的C7orf69基因片段(自然变异体), 重组蛋白以包涵体的形式高效表达, 在非变性条件下获得较高纯度的重组蛋白。生物信息学软件预测C7orf69蛋白(含信号肽)含有PKC、CK2磷酸化位点和N-十四烷基化位点。结论 成功的对分泌蛋白C7orf69进行了基因克隆、表达与初步纯化, 为其进一步的功能研究奠定了坚实的基础。

**关键词:** C7orf69; 基因; 分泌蛋白

## Cloning, expression and bioinformatics analysis of gene C7orf69

GU Hong-yan<sup>1</sup>, MENG Xue<sup>1</sup>, LI Hui<sup>2</sup>, HAO Xiao-hua<sup>1,3,4</sup>, LI Xing-wang<sup>1</sup>, WEI Hong-shan<sup>1,3,4</sup> (1.Beijing Ditan Hospital, Peking University Teaching Hospital, Beijing 100015, China; 2.Infectious Diseases Center, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 4.Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To clone, express and purify recombinant protein C7orf69 in vitro, and to analyze its bioinformatics by prediction software. **Methods** Gene C7orf69 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and inserted into prokaryotic expression plasmid. Then the plasmid was transformed into *E. coli* BL21, induced by IPTG, identified by SDS-PAGE and Western blot, and purified under native or denaturing conditions by Ni-NTA resin. **Results** The right sequenced gene C7orf69 containing a natural variation was obtained, and the recombinant protein was highly expressed in the form of inclusion body. Purified recombinant protein was obtained under native conditions by Ni-NTA resin. The bioinformatics analysis by prediction software indicates that there are PKC and CK2 phosphorylation sites and a myristylation site in the protein C7orf69 including the signal peptide. **Conclusions** C7orf69 was successfully cloned, expressed and purified. These jobs lay solid foundation for the further study of its functions.

**Key words:** C7orf69; Gene; Secretory protein

分泌蛋白(secreted protein)是指在细胞内合成后, 分泌到细胞外发挥重要作用的生物活性分子, 包括各种不同功能的分子如细胞因子、趋化因子、补体、肽类激素、消化酶、蛋白水解酶、毒素和免疫球蛋白等<sup>[1]</sup>。人体中的分泌蛋白占全部人类

蛋白质组的30%<sup>[2]</sup>, 参与了信号转导、细胞黏附、迁移、增殖分化、血液凝固、免疫预防和癌症发生等多种过程<sup>[3,4]</sup>。许多分泌蛋白具有潜在的临床应用价值, 并已得到了广泛的应用, 如干扰素用于抗病毒治疗、粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)用

于放化疗所致的白细胞减少和再生障碍性贫血等、胰岛素有效控制血糖、肿瘤坏死因子抑制剂(英夫利西单抗)用于治疗类风湿关节炎、强直性脊柱炎以及甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)用于诊断和预测肝癌等。因此寻找、发现和研究新的分泌蛋白对人类具有重要意义。

本课题组通过生物信息学检测及大规模的信号肽分析筛选,已得到一批功能未知的分泌蛋白编码基因,并已对相关基因进行了克隆表达及初步的功能研究<sup>[5-7]</sup>。C7orf69是分泌蛋白编码基因之一。本研究旨在克隆表达功能未知基因C7orf69并对其进行生物信息学预测分析,为其功能研究奠定工作基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与试剂** 淋巴组织、pET-32a(+)载体为本室保存;Taq酶、T4 DNA连接酶、pGEM-T vector、限制性核酸内切酶购自Promega公司;DNA提取试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;Ni-NTA购自Qiagen公司;其余化学试剂均为国产分析纯和生物化学试剂。PCR引物合成由上海生工技术有限公司完成。

## 1.2 方法

**1.2.1 C7orf69基因扩增** 根据GenBank公布的C7orf69基因序列(除信号肽编码区)和原核表达空载体pET32a(+)序列,设计合成一对寡聚核苷酸引物(Forward primer: GGATCCCTTTCACCTCCCACC ATGAAC; Reverse primer: CTCGAGTTTGTGAA ACCAGCAGTTATTTCCA),引入Bam H I、Xho I酶切位点。Trizol法提取淋巴组织总RNA,并逆转录为cDNA,以其为模板扩增C7orf69基因片段,反应条件:94℃ 5分钟;94℃ 30秒,60~50℃ 30秒,72℃ 40秒,20个循环,每个循环下降0.5℃;94℃ 30秒,55℃ 30秒,72℃ 40秒,20个循环;72℃ 7分钟;4℃放置。

**1.2.2 pET32a(+)-C7orf69原核表达载体的构建** T4连接酶连接C7orf69和pGEM-T vector,过夜连接体系转化DH5 $\alpha$ ,行蓝白斑筛选。挑取5个白色菌落于LB中,振摇过夜。碱裂解法提取质粒,取酶切鉴定正确的质粒,送至北京奥科鼎盛生物科技有限

公司测序。测序正确的质粒和本室保存的pET-32a(+)载体,同时双酶切,鉴定并回收,连接过夜,转化DH-5 $\alpha$ ,取菌落于LB中振摇过夜培养,再次提取质粒并酶切鉴定,同前测序比对。

**1.2.3 重组蛋白的小量诱导表达** 取测序正确的原核表达质粒转化BL21,同上摇菌提质粒(提取质粒前留取部分菌液-80℃保菌备用)并酶切鉴定。取鉴定正确的质粒所保存的菌液150  $\mu$ l,加入5 ml LB培养液中培养过夜。次日,各取100  $\mu$ l菌液加入至8管含5 ml LB的试管内,振摇培养至A值为0.6~0.8时,向4管菌液内加入终浓度为1.0 mmol/L的诱导剂IPTG,分别于28、30、32、37℃下振摇培养,每个诱导温度下含加与不加诱导剂两管菌液。分别于诱导2、4、6、8小时各留取1 ml菌液制样,取20  $\mu$ l上清行SDS-PAGE电泳分析。

**1.2.4 重组蛋白的Western blot鉴定** 取20  $\mu$ l诱导2、4、6、8小时的蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,220 mA转膜40分钟,封闭2小时;抗-His单克隆抗体1:2000稀释作为一抗,4℃孵育过夜;羊抗鼠HRP-IgG 1:2000稀释作为二抗,室温孵育2小时;ECL显影鉴定。

**1.2.5 重组蛋白的大量诱导** 振摇培养过夜步骤同小量诱导。次日将菌液1:50(V/V)转摇至TB培养基中扩大培养,37℃摇菌至菌体密度A值为0.6~0.8时,加入终浓度为1.0 mmol/L诱导剂IPTG,37℃继续培养2小时。诱导的菌液离心集菌后反复冻融3次及超声破碎<sup>[6]</sup>,离心收集上清A液,包涵体洗涤上清B、C液,及包涵体溶解上清D液。4℃缓慢振摇透析D液,逐渐除去高浓度的尿素,使蛋白复性。

**1.2.6 重组蛋白的纯化** 按照Qiagen公司的Ni-NTA蛋白纯化技术说明,分别在变性和非变性条件下纯化C7orf69重组蛋白。

**1.2.7 C7orf69的生物信息学分析** 用ProtParam tool(网址: <http://web.expasy.org/protparam/>)对C7orf69蛋白(含信号肽)的氨基酸序列进行理化性质的预测;SOPMA(网址: [http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_sopma.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html))和phyre2(网址: <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/>)

phyre2/html/page.cgi?id=index) 预测分析其二、三级结构; PSORT (网址: <http://psort.hgc.jp/form2.html>) 进行亚细胞定位; PredictProtein (网址: <http://www.predictprotein.org/#>) 分析其蛋白质功能位点; ArchaeaFun 1.0 Server (网址: [Server:http://www.cbs.dtu.dk/services/ArchaeaFun/](http://www.cbs.dtu.dk/services/ArchaeaFun/)) 对蛋白质性质进行预测。

## 2 结果

**2.1 pET32a (+)-C7orf69原核表达载体构建成功** PCR扩增得到了C7orf69基因片段(不含信号肽编码区)约300 bp, 与理论片段306 bp大小相符; C7orf69基因片段成功插入pGEM-T vector, 测序结果显示为C7orf69的自然变异体基因片段(其蛋白序列中第32位氨基酸由K突变为E), 与GenBank结果一致; 基因片段成功插入pET-32a (+) 载体, 原核表达载体C7orf69-pET-32a (+) 构建成功, 见图1。

**2.2 小量诱导可见C7orf69重组蛋白表达** 目的蛋白在振荡培养2、4、6、8小时后, 均有不同程度的表达, 与理论蛋白大小相符(约32~33 kD), 与28、30、32 °C下的蛋白诱导量相比, 37 °C下的蛋白诱导量最高(28、30、32 °C下的小量诱导图未给出); 重组蛋白His标签鉴定, 证实为目的蛋白即C7orf69重组蛋白, 见图2。

**2.3 Ni-NTA在非变性条件下获得较高纯度的C7orf69重组蛋白** 大量诱导后得到了浓度较高的目的蛋白, 与理论蛋白大小相符(约32~33 kD), 目的蛋白主要以包涵体的形式出现在D液中; 使用Ni-

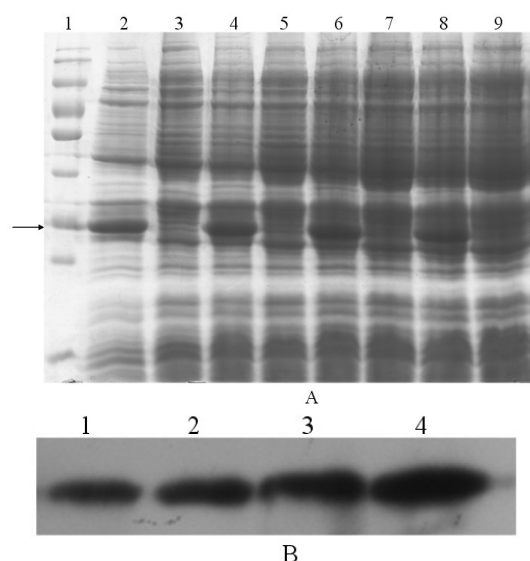


图2 C7orf69重组蛋白小量诱导表达结果及Western blot验证

注: A: 以37 °C, 1.0 mmol/L IPTG, 小量诱导, 1为蛋白Marker, 2~9为C7orf69重组蛋白分别于2、4、6、8小时小量诱导和非诱导条件下的表达情况。B: C7orf69重组蛋白Western blot验证, 1~4为小量诱导2、4、6、8小时的重组蛋白His标签验证

NTA蛋白纯化技术, 在非变性条件下纯化C7orf69重组蛋白, 可获得纯度较高的目的蛋白; 而在变性条件下纯化蛋白, 蛋白洗脱液(Elution Buffer E)中未见到重组蛋白, 见图3。

**2.4 C7orf69的生物信息学分析** ProtParam tool分析显示, C7orf69蛋白(含信号肽)由122个氨基酸组成, 相对分子质量为14 424.9 Da, 消光系数(Extinction coefficient)为37 970, 理论等电点为9.47; 蛋白的不稳定系数(Instability index)是54.54, 表明该蛋白性质不稳定; 亲水指数(Grand average of hydropathicity GRAVY)为-0.738, 说明其为亲水性蛋白。SOPMA预测C7orf69蛋白二级结构包括 $\alpha$ -螺旋(39 aa, 31.97%)、 $\beta$ 折叠(29 aa,

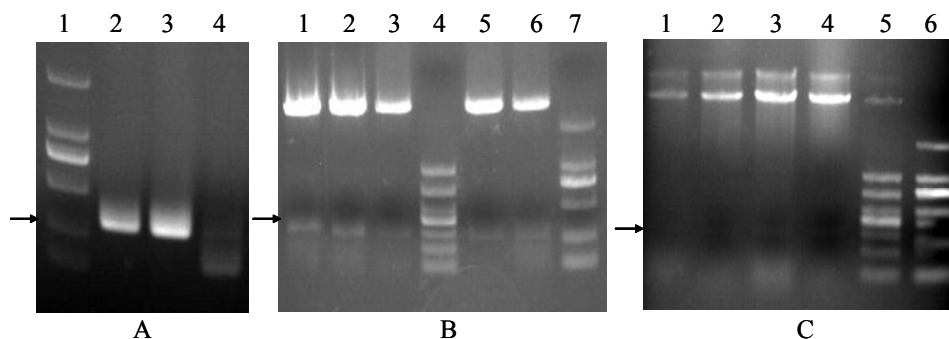


图1 C7orf69-pET 32a (+) 原核表达载体的构建

注: A: 以淋巴组织cDNA为模板扩增C7orf69, 1为DNA Marker: DL2000; 2、3为淋巴组织, 4为阴性对照。B: C7orf69-pGEM-T vector双酶切鉴定电泳图, 1~3、5、6为不同单克隆菌落; 4为DNA Marker: DL1000; 7为DNA Marker: DL2000。C: C7orf69-pET 32a (+) 双酶切鉴定电泳图: 1~4为不同单克隆菌落; 5为DNA Marker: DL1000; 6为DNA Marker: DL2000 (箭头: C7orf69, 306 bp)



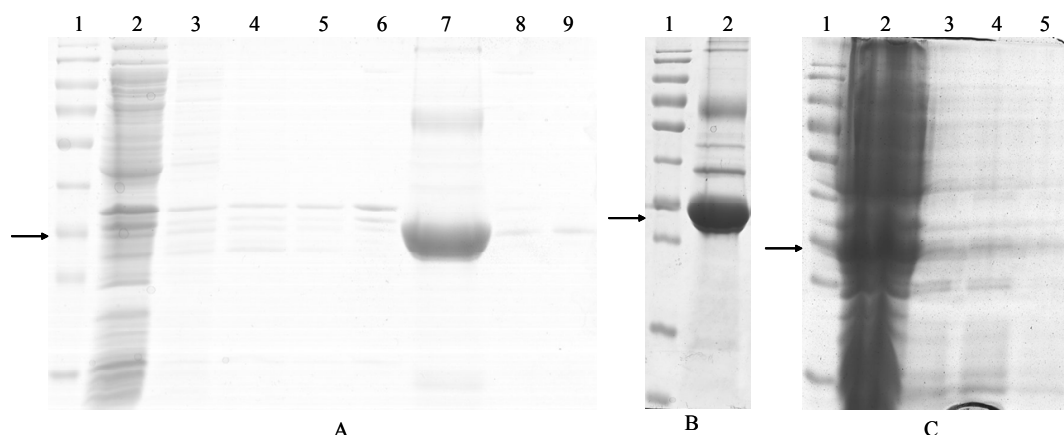


图3 C7orf69重组蛋白大量诱导表达及纯化结果

注: A: C7orf69重组蛋白大量诱导表达, 1为蛋白Marker; 2为超声碎菌离心上清A液; 3~5为洗涤液洗涤上清B1、B2、B3; 6、8、9为去离子水洗涤上清C1、C2、C3; 7为包涵体溶解上清(见目的蛋白C7orf69)。B: C7orf69重组蛋白在非变性条件下纯化, 1为蛋白Marker; 2为含250 mM咪唑的Elution Buffer(见较高纯度的目的蛋白)。C: 变性条件下纯化, 1为蛋白Marker; 2为蛋白穿透液; 3~5为Elution Buffer E(未见目的蛋白)

23.77%)、 $\beta$ -转角(7 aa, 5.74%)和无规卷曲(47 aa, 38.52%)。phyre2对C7orf69及自然变异体蛋白的二、三级结构预测显示, 两者的二、三级结构存在较大差异, 见图4、5。PSORT亚细胞定位显示, C7orf69蛋白位于胞浆的可能性为34.8%, 位于细胞核的可能性为21.7%。PredictProtein预测显示该蛋白有3个蛋白激酶C磷酸化位点(PKC)(55、75、104)、两个酪蛋白激酶2磷酸化位点(CK2)(83、102)和1个N-十四烷基化位点(90)。ArchaeaFun 1.0 Server对蛋白的性质预测显示该蛋白可能是一种蛋白水解酶(1.985)。

### 3 讨论

C7orf69是一种功能未知的蛋白编码基因, 生物信息学显示: C7orf69基因位于人类第7号染色体p12.3位置, 开放读码框全长366 bp, 编码蛋白全长122 aa, 其中1~20 aa为信号肽, 存在自然突变体(第32位氨基酸由K突变为E)。本研究中, 成功克隆了人类功能未知基因C7orf69的自然变异体基因, 并构建了原核表达载体, 表达纯化了C7orf69重组蛋白, 对其相关生物信息学进行了预测分析, 为该基因的功能研究奠定了良好的基础。

磷酸化调节是细胞内信号转导的重要方式。PKC磷酸化位点是信号转导调控中非常常见的分子结构, 在细胞增殖及细胞周期等中具有广泛的调节作用<sup>[8]</sup>。磷酸化位点还与病毒基因组的复制、重装、衣壳的定位和病毒颗粒的成熟有关<sup>[9,10]</sup>。酪蛋

白激酶是广泛存在于真核生物的丝/苏氨酸蛋白激酶, 包括CK1和CK2两大类。酪蛋白激酶2(CK2)可横向介导多条信号途径, 以级联和垂直方式发挥作用, 调节细胞的增殖、分化和凋亡, 广泛参与一系列复杂的细胞功能<sup>[11]</sup>。CK2的磷酸化作用也有助于病毒的复制和表达<sup>[12]</sup>。此外, 十四烷基化也可参与病毒的复制和释放等<sup>[13]</sup>。生物信息学分析表明, C7orf69蛋白可能具有PKC、CK2磷酸化位点和十四烷基化位点, 提示该蛋白的生物学功能可能受以上蛋白激酶的磷酸化调节和肉豆蔻酰基转移酶的十四烷基化调节, 从而参与对细胞增殖、分化和凋亡的调控以及抗病毒或参与病毒的复制、成熟和释放等过程。

生物信息学分析显示, C7orf69蛋白位于胞浆和细胞核的可能性较大, 而且该蛋白很可能是一种水解酶, 但GeneCards显示C7orf69蛋白是一种分泌蛋白, 提示该蛋白的细胞组织学分布还有待进一步的体外和体内研究确认。目前, 已成功表达纯化了C7orf69的重组蛋白, 为研究并验证上述相关信息打下了坚实的基础。二、三级结构预测显示, C7orf69的自然变异体蛋白, 虽然仅有一个氨基酸与原序列不同, 但二者的二、三级结构却明显不同, 提示该自然变异点对该蛋白的功能可能具有重要作用, 这两种形式的蛋白在人体内可能各自发挥着不同的生物学功能, 后期本课题组将通过点突变的方法, 获得无自然变异点的C7orf69基因, 同时

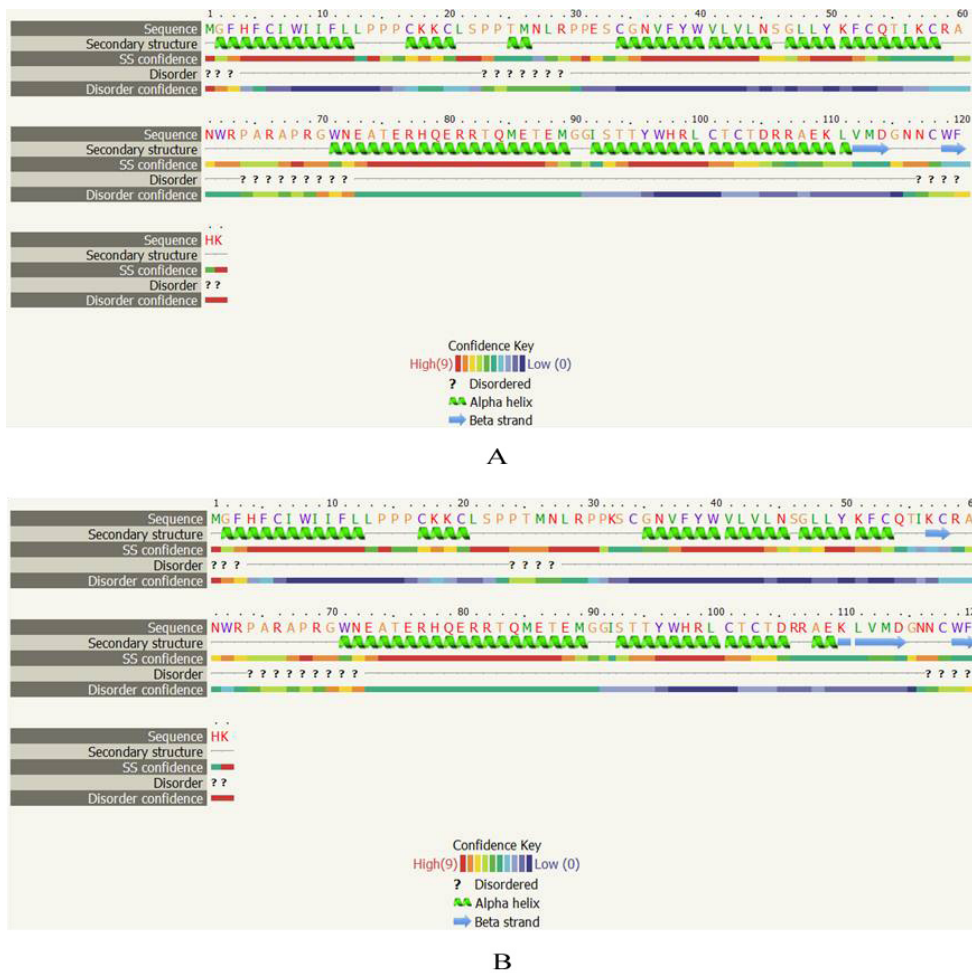


图 4 phyre2对C7orf69和自然变异体蛋白的二级结构预测结果

注：A：C7orf69自然变异体蛋白二级结构预测。B：C7orf69蛋白二级结构预测

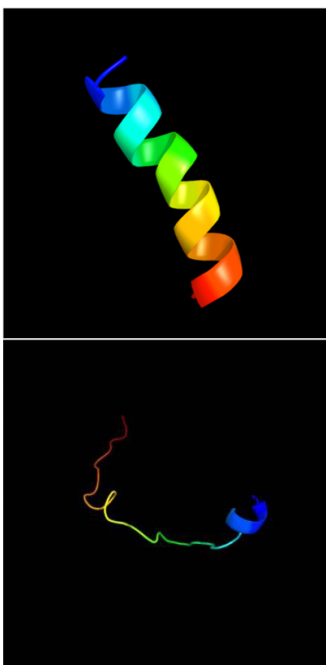


图 5 phyre2对C7orf69和自然突变体蛋白的三级结构预测结果

注：A：C7orf69自然变异体蛋白三级结构预测。B：C7orf69蛋白三级结构预测

对二者体内外的功能做进一步研究。

本研究初步克隆表达了C7orf69重组蛋白，有关该基因编码蛋白的细胞定位及相应的功能，本课题组仍在研究中。

#### 参考文献

- [1] 李淑娟, 徐丹. 病原体分泌蛋白质组的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2011, 38: 18-21.
- [2] 李鑫. 功能未知基因C6orf120克隆表达及初步功能研究[D]. 首都医科大学内科学(传染病), 2011.
- [3] 朱弘, 周宇波, 曾令春, 等. 一个富含谷氨酸的人类分泌蛋白基因hMGRAP的克隆与表达分析[J]. 遗传, 2005, 27: 7-13.
- [4] Klein RD, Gu Q, Goddard A, et al. Selection for genes encoding secreted proteins and receptors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 7108-7113.
- [5] Li X, Qiao Y, Chang LS, et al. Role of C6ORF120, an N-glycosylated protein, is implicated in apoptosis of CD4 (+) T lymphocytes[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124: 3560-3567.
- [6] 乔雍, 常路丝, 魏红莲, 等. 功能未知基因C16orf68在不同肝细胞系内的表达特征[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2011, 20: 327-330.

- [7] 常路丝, 乔雍, 魏洪莲, 等. HBV相关分泌蛋白C18orf54的克隆表达及初步功能研究[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32: 318-323.
- [8] Tang X, Zhang C. Activation of protein kinases A and C promoted proliferation of chicken primordial germ cells[J]. Anim Reprod Sci, 2007, 101: 295-303.
- [9] Lan YT, Li J, Liao W, et al. Roles of the three major phosphorylation sites of hepatitis B virus core protein in viral replication[J]. Virology, 1999, 259: 342-348.
- [10] Liao W, Ou JH. Phosphorylation and nuclear localization of the hepatitis B virus core protein: significance of serine in the three repeated SPRRR motifs[J]. J Virol, 1995, 69: 1025-1029.
- [11] Pinna LA, Meggio F. Protein kinase CK2 ( "casein kinase-2" ) and its implication in cell division and proliferation[J]. Prog Cell Cycle Res, 1997, 3: 77-97.
- [12] Tang J, Zhang ZH, Huang M, et al. Phosphorylation of human La protein at Ser 366 by casein kinase II contributes to hepatitis B virus replication and expression in vitro[J]. J Viral Hepat, 2013, 20(1): 24-33.
- [13] Seaton KE, Smith CD. N-Myristoyltransferase isozymes exhibit differential specificity for human immunodeficiency virus type 1 Gag and Nef[J]. J Gen Virol, 2008, 89: 288-296.

收稿日期: 2013-03-02

## · 消息 ·

## “胆汁淤积性肝病高峰论坛”暨喜美欣上市会

2013年12月14日, 由《中国肝脏病杂志（电子版）》编辑部主办、海正药业创新与生物药事业部、上海百盈医药科技有限公司独家赞助的“胆汁淤积性肝病高峰论坛”在杭州美丽的西溪湿地顺利召开。此次论坛由上海复旦大学附属华山医院翁心华教授担任主持, 上海复旦大学附属华山医院胡锡琪教授、张文宏教授以及首都医科大学附属北京地坛医院谢雯教授分别针对胆汁淤积性肝病的病理特点、发病机制及生化诊断指标和治疗策略与来自全国各地160位肝病领域著名专家及临床医生进行现场互动, 就如何更规范地进行胆汁淤积性肝病的诊断和治疗进行学术交流。

论坛由上海华山医院的翁心华教授做开场介绍, 阐述国内胆汁淤积性肝病发病原因远远广泛于国外, 而且目前已经是临床比较常见的多发病, 但是临床对其诊断与治疗却存在很多误区, 因此, 如何规范地对胆汁淤积性肝病进行诊断和治疗成为亟需解决的问题。

会议主体部分是围绕胆汁淤积性肝病的发病机制、病理特点、临床诊断以及治疗策略展开的学术论题。同时邀请上海华山医院病理科胡锡琪教授结合几十年的临床工作经验, 通过一个个真实的病理图片讲解各种类型和病因的胆汁淤积性肝病的病理特点, 提高临床医生的诊断率, 提示广大临床医生应早期及时关注此类疾病。由来自首都医科大学附属北京地坛医院的谢雯教授和来自上海华山医院的张文宏教授, 分别展开介绍了《胆汁淤积性肝病诊断治疗专家共识（2013版）》与未来临床研究方向以及胆汁淤积的发病机制和治疗策略, 两位讲者的精彩报告过程中不时穿插与参会的160余位专家的答题互动。

通过在各位专家的精彩演讲和讨论, 对胆汁淤积性肝病的诊断和治疗取得了更加明确的认识, 并对胆汁淤积性肝病的发病机制、病理特点、临床诊断以及治疗策略有了新的见解, 胆汁淤积性肝病高峰论坛取得圆满成功。