

# 人类 Foxm1b 基因的原核表达、抗体制备及其对肝癌细胞中 Foxm1b 蛋白的识别

唐保东<sup>1</sup>, 刘思纯<sup>1</sup>, 徐雅<sup>1</sup>, 曾志荣<sup>2</sup>, 胡品津<sup>2</sup>

(中山大学附属第一医院 1. 黄埔院区消化内科; 2. 消化内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】构建人类 Foxm1b 基因的原核表达载体, 表达并纯化蛋白, 制备多克隆抗体, 并用此抗体检测肝癌细胞中 Foxm1b 基因的表达, 为进一步研究 Foxm1b 基因的功能奠定基础。【方法】从 GenBank 中下载人类 Foxm1b 基因全长 cDNA 序列并用 Pcgene 软件分析其可能的抗原表位, 设计引物, 应用 RT-PCR 获得含抗原表位的 Foxm1b 基因片段, 重组入原核表达载体 pET-28a, 在大肠杆菌 BL-21(DE3) 中诱导表达, 应用亲和层析法获得纯度较高的原核表达蛋白并免疫大鼠制备多克隆抗体, 用 ELISA 检测抗体滴度并用免疫细胞化学的方法检测此抗体对肝癌细胞中天然 Foxm1b 蛋白的识别。【结果】成功构建了 Foxm1b 基因重组表达载体 pET-28a-Foxm1b, 表达的蛋白经纯化后免疫大鼠得到了高滴度的多克隆抗体, 该抗体可以识别肝癌细胞中的天然抗原。【结论】人类 Foxm1b 基因的原核表达载体的构建、重组蛋白的表达纯化及有诊断价值的抗体的制备为后续的研究提供了基础。

**关键词:** 人类 Foxm1b 基因; 原核表达; 多克隆抗体; 肝癌细胞

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)06-0658-04

## Prokaryotic Expression of the Human Foxm1b Gene, Preparation of Its Polyclonal Antibody and Application of the Antibody to Recognize the Foxm1b antigen in Liver Tumor Cell

TANG Bao-dong<sup>1</sup>, LIU Si-chun<sup>1</sup>, XU Ya<sup>1</sup>, ZENG Zhi-rong<sup>2</sup>, HU Pin-jin<sup>2</sup>

(Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To construct prokaryotic recombinant plasmid and express Foxm1b protein, prepare its polyclonal antibody and apply it to recognize the nature antigen in liver tumor cell line. 【Methods】 The full cDNA sequence of human Foxm1b gene was obtained from GenBank and analyzed by PCgene bioinformatics software to investigate the antigenic determinants. The sequence containing antigenic determinants of human Foxm1b gene was amplified by RT-PCR and recombined into prokaryotic expression vector pET-28a, then transformed into E.coli BL-21(DE3). After induced by IPTG, the recombinant protein was expressed and purified by affinity purification. The polyclonal antibody was obtained from rats immunized by the recombinant protein and was identified by ELISA. Immunocytochemistry was used to affirm that the polyclonal antibody could recognize the natural Foxm1b protein expressed in liver tumor cell. 【Results】 The recombinant prokaryotic expression vector pET-28a-Foxm1b was constructed and the recombinant protein was purified successfully, and the prepared high titer polyclonal antibody could recognize the natural protein in liver tumor cell very well. 【Conclusions】 The recombinant prokaryotic expression vector, the recombinant protein and the polyclonal antibody obtained successfully in this study would be applied for further investigation of the Foxm1b gene and liver cancer.

**Key words:** Human Foxm1b gene; prokaryotic expression; polyclonal antibody; liver tumor cell

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(6):658-661]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是人类最常见的恶性肿瘤之一。我国每年约 23 万人死

收稿日期: 2007-05-08

基金项目: 广东省自然科学基金(07300909)

作者简介: 唐保东(1969-), 男, 安徽安庆人, 博士生, 主治医师, E-mail: tbd1999ht@163.com

于肝癌,占全球肝癌患者死亡数的53%。许多研究表明,癌细胞的生长、转移同某些基因有关<sup>[1]</sup>。Foxm1b是一种上调细胞增殖的转录因子,属Fox家族,其属于控制包括增殖、成熟、死亡在内的整个细胞生命周期的基因家族之一,与肿瘤生长和转移相关<sup>[2]</sup>。研究人员用基因缺失小鼠研究Foxm1b基因和肝癌的关系,结果显示这个基因的存在对癌细胞增殖至关重要<sup>[1]</sup>。本研究试图通过构建Foxm1b基因原核表达载体,制备多克隆抗体,并用此抗体检测肝癌细胞中的Foxm1b基因的表达,为深入研究肝癌的分子机制奠定基础,为研究进一步Foxm1b基因的功能提供条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

E.coli DH-5、BL-21(DE3)和人肝癌细胞株SMMC-7721由本室保存;SD大鼠(Sprague Dawley,远交群大鼠)由中山大学中山医学院动物中心提供;载体pET-28a(+)购自Novagen公司;T4 DNA连接酶为Promega公司产品;DNA纯化回收试剂盒购自赛百胜公司;His Bind Purification kit购自Novagen公司;弗氏佐剂购自Sigma公司;DMEM购自Gibco公司;RNA提取试剂盒购自Fastagen公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物设计 在GenBank中获得人类Foxm1b基因的全长cDNA序列(基因登录号:BC006529),用PCgene软件分析其可能的抗原表位序列,在主要抗原表位序列区的两侧设计一对引物,并在5'端引入BamH I酶切位点,3'端引入Xho I酶切位点。上游引物为:5'-GAG GGA TCC ATG ACC ATC AAA ACC GAA CTC CC-3';下游引物为:5'-GAG CTC GAG CTG GGA GGC AGG GTC AGA G-3'。

1.2.2 总RNA的提取和目的片段的扩增 用加有10%胎牛血清的DMEM培养基培养人肝癌细胞SMMC-7721,待细胞长满后用0.25%胰酶消化,离心收集细胞,用RNA提取试剂盒提取总mRNA并立即逆转录为cDNA。以cDNA为模板,用上述PCR引物扩增目的片段,PCR反应条件为:94℃预变性5 min,按94℃1 min、63℃50S、72℃1 min的条件进行35个循环后72℃延伸

10 min。

1.2.3 原核表达质粒的构建及鉴定 PCR扩增出的目的片段及pET-28a(+)经BamH I和Xho I双酶切后,分别纯化回收后T4 DNA连接酶16℃水浴连接过夜,转化到E.coli DH5中,涂布到卡那霉素抗性的LB培养板上,37℃培养12~16 h,挑选单克隆进行PCR及质粒双酶切鉴定,挑选2个阳性克隆进行测序,鉴定目的片段的序列及编码框是否正确。

1.2.4 原核表达和纯化 将测序鉴定正确的pET-28a(+)-Foxm1b原核表达质粒转入E.coli BL-21(DE3),挑取单克隆接种到含50 μg/mL卡那霉素的LB培养基中,37℃250 r/min活化过夜,按1:100的比例接种于新鲜的含50 μg/mL卡那霉素的LB培养基中,37℃培养至OD<sub>600</sub> 0.6时,加IPTG至终浓度为1 mmol/L,37℃诱导5 h。离心收集菌体,每克菌体加3 mL裂解液重悬,超声波破碎菌体,12 000 ×g离心力离心,收集上清,纯化表达重组蛋白,经SDS-PAGE鉴定后用pH 7.4的PBS透析,Bradford法测定蛋白浓度。

1.2.5 Foxm1b多克隆抗体的制备及效价检测 纯化后的Foxm1b蛋白与弗氏佐剂等体积混合乳化,腹部皮下多点注射免疫SD大鼠。首次免疫用完全佐剂,每只大鼠200 μg纯化蛋白;之后的免疫用不完全佐剂,每只大鼠每次100 μg纯化蛋白。隔周免疫1次,共免疫3次。第3次免疫2周后心脏采血得血清,用ELISA法测定血清效价,每孔包被有5 μg纯化后的蛋白,血清的稀释度为1:50到1:50 000;二抗为HRP-兔抗大鼠IgG(稀释度为1:20 000)。

1.2.6 免疫细胞化学鉴定重组Foxm1b蛋白抗体对天然抗原的识别 人肝癌细胞SMMC-7721传代并爬片于经多聚赖氨酸处理的防脱玻片上,用4%甲醛-PBS固定细胞15 min, PBS冲洗玻片后用5%BSA-PBS 4℃封闭过夜,再用PBS洗3次,加入含多克隆抗体的血清(1:200)37℃孵育2 h, PBS洗3次后加二抗(HRP-兔抗大鼠IgG, 1:2 000)37℃孵育1 h, PBS洗4次,显色试剂盒显色。

## 2 结果

### 2.1 目的片段的选择和原核表达质粒构建

用PCgene软件分析由cDNA推导的人类

Foxm1b 氨基酸残基序列, 发现三个抗原表位: 氨基酸残基 459-464 位: Arg- Glu- Arg- Arg- Glu- Arg; 361-366: Pro- Gly- Lys- Glu- Glu- Lys; 141-146: Glu- Met- Glu- Glu- Lys- Glu。所选择的目的片段包含了前两个抗原表位, 长度为 705 bp。

目的片段经 PCR 扩增后克隆到表达载体 pET-28a(+), 经双酶切鉴定(图 1)和测序鉴定, 证实原核表达载体构建成功, 序列与 GenBank 中序列一致。

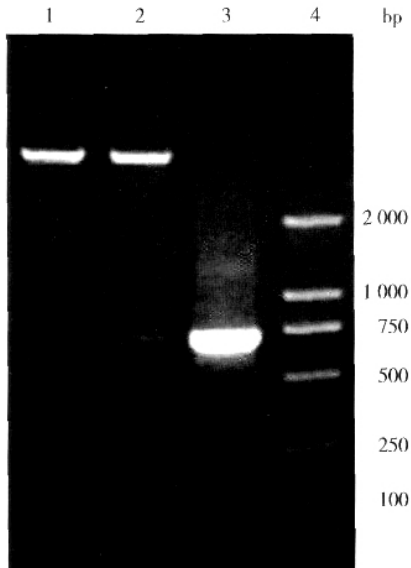


图 1 目的片段与 pET-28a(+)载体构建的重组表达质粒双酶切结果

Fig.1 The result of the recombinant plasmid of objective gene with pET-28a(+) vector digested by double enzyme

Lane1:pET-28a (+) vector digested by *BamH* I and *Xho* I ; Lane2:pET-28a (+)-Foxm1b digested by *BamH* I and *Xho* I ;lane3: PCR production; Lane4:DNA Marker

2.2 Foxm1b 蛋白的原核表达和纯化结果

测序正确的重组克隆经 IPTG 诱导表达和 His 亲和和纯化, 得到纯度较高的 Foxm1b 蛋白, 测定纯化后蛋白浓度为 0.3 mg/mL。经 SDS-PAGE 鉴定(图 2), 在约 27 ku 处出现目的条带, 与理论预测分子量(26.15 ku)相一致。

2.3 抗体的效价和对天然 Foxm1b 蛋白的识别

Western- blotting 结果(图 3)表明纯化所得的重组 Foxm1b 蛋白具有很好的免疫原性。ELISA 测定免疫大鼠所得多克隆抗体的效价为 1:12 800, 且能够很好的识别人肝癌细胞 SMMC-7721 中的

天然 Foxm1b 蛋白(图 4)。

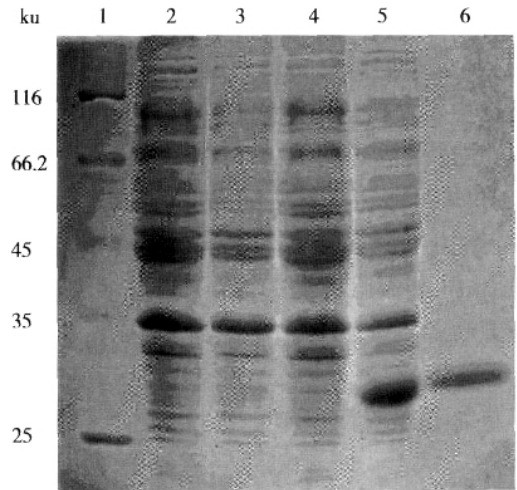


图 2 重组 Foxm1b 蛋白的表达和纯化

Fig.2 Expression and purification of Foxm1b

Lane 1: Protein Marker; Lane 2: BL21 cell contained pET-28a (+) without IPTG induction; lane 3: BL21 cell contained pET-28a (+) with IPTG induction; lane 4: BL21 cell contained the recombinant pET-28a(+)-Foxm1b without IPTG induction; lane 5: BL21 cell contained the recombinant pET-28a (+)-Foxm1b with IPTG induction; lane 6: the recombinant protein purified by the affinity purification

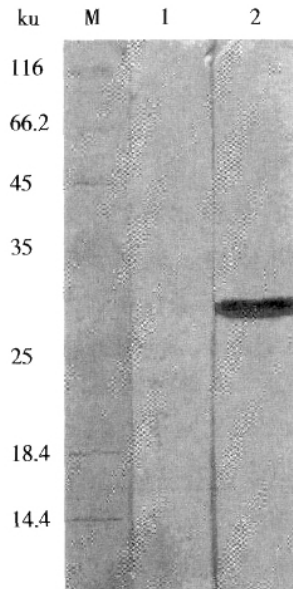


图 3 Western-blotting 分析重组 Foxm1b 蛋白和多克隆抗体

Fig.3 Western blotting analysis of the recombinant Foxm1b protein and the polyclonal antibodies

M: Protein Marker; Lane 1: the recombinant Foxm1b protein with the serum from normal rat; Lane 2: the recombinant Foxm1b protein with the serum from rat immunized by the recombinant protein

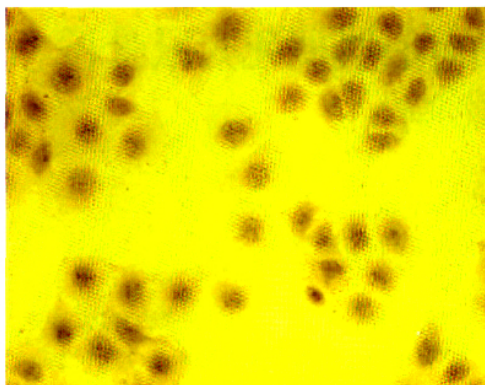


图4 多克隆抗体对人肝癌细胞 SMMC-7721 中天然 Foxm1b 蛋白的识别

Fig.4 The polyclonal antibody recognized Foxm1b protein in human liver tumor cell line SMMC-7721 ( $\times 200$ )

### 3 讨论

Foxm1b 基因在组织器官的发育中起着关键性作用<sup>[3,4]</sup>, 也在人类的多种肿瘤中呈现转录和表达量的明显增加, 是近年来备受关注的研究热点<sup>[5-7]</sup>。在肝癌组织中同样出现 Foxm1b 蛋白的高表达, 而且表达量的大小可用于判断肝癌的分化程度和患者的预后<sup>[8]</sup>。最新的资料显示, 以 Foxm1b 基因为靶标的治疗肝癌的实验研究已经初步开展<sup>[9]</sup>。因此, 对 Foxm1b 基因在肝癌发生、发展、诊断和治疗中的重要作用值得进一步深入研究。本研究利用生物信息学方法分析 Foxm1b 基因, 发现三个抗原表位, 针对其 C- 端的两个抗原表位序列 (Arg-Glu-Arg-Arg-Glu-Arg; Pro-Gly-Lys-Glu-Glu-Lys) 设计引物, 采用原核表达系统, 成功地表达出目的肽段。针对抗原表位设计引物扩增目的片段而不是扩增 Foxm1b 全长 cDNA 是因为: Foxm1b 全长 cDNA 编码区有 2244 个 bp, 过长的序列不利于蛋白表达; 针对抗原表位的抗体将具有更好的敏感性和特异性。SDS-PAGE 检测发现在超声破碎菌体的上清和沉淀中均存在重组蛋白, 说明此重组蛋白可以以可溶形式表达, 这使得重组蛋白的纯化变的相对容易。取上清液进行亲和纯化, 用纯化产物免疫大鼠制备的多克隆抗体经 ELISA 检测具有较高的抗体滴度, 并能很好地识别人肝

癌细胞 SMMC-7721 中的天然 Foxm1b 蛋白, 表明表达的重组蛋白具有很好的免疫原性和免疫反应性。此多克隆抗体的制得为进一步研究 Foxm1b 基因在肝癌发生、发展、诊断和治疗中的重要作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张昌卿, 肖锡宾, 冯凯涛, 等. 肝癌组织中 P73 蛋白表达的意义 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2002, 23(5s): 8-10.
- [2] 曹冬梅, 卢建. 叉头框(Fox)转录因子家族的结构与功能 [J]. 生命科学, 2006, 18(5): 491-496.
- [3] WANG X, KIYOKAWA H, DENNEWITZ M B, et al. The Forkhead Box m1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99(26): 16881-16886.
- [4] KIM I M, RAMAKRISHNA S, GUSAROVA G A, et al. The forkhead box m1 transcription factor is essential for embryonic development of pulmonary vasculature [J]. J Biol Chem, 2005, 280(23): 22278-22286.
- [5] KIM I M, ACKERSON T, RAMAKRISHNA S, et al. The Forkhead Box m1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer [J]. Cancer Res, 2006, 66(4): 2153-2161.
- [6] TEH M T, WONG S T, NEILL G W, et al. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas [J]. Cancer Res, 2002, 62(16): 4773-4780.
- [7] WONSEY D R, FOLLETTIE M T. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe [J]. Cancer Res, 2005, 65(12): 5181-5189.
- [8] LEE J S, CHU I S, HEO J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling [J]. Hepatology, 2004, 40(3): 667-676.
- [9] GUSAROVA G A, WANG I C, MAJOR M L, et al. A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment [J]. J Clin Invest, 2007, 117(1): 99-111.

(编辑 孙慧兰)