

# CENPK 基因过表达载体的构建及鉴定

吴伟刚,刘妙娜,刘利平,刘琢冰,刘威龙,陈心春,周伯平

(广东医学院附属深圳市第三人民医院,深圳市肝病研究所,深圳市感染免疫重点实验室,广东深圳 518112)

**摘要:** [目的] 构建着丝粒蛋白 K (centromere protein K, CENPK) 基因过表达载体, 并对其在肝癌 FOCUS 细胞中的表达进行鉴定。 [方法] ① 从人肝癌组织中扩增出 CENPK 目的基因并将其克隆到 pCMV-3Tag-3 载体上, 构建真核表达载体 pCMV-CENPK; ② 利用脂质体法将构建好的 pCMV-CENPK 真核表达载体转染肝癌 FOCUS 细胞, 并用 G418 筛选出 CENPK 基因稳定过表达的肝癌 FOCUS 细胞株; ③ 通过 Real-time PCR 及 Western Blot 的方法对筛选出来的细胞进行鉴定。 [结果] ① 经双酶切分析及测序验证, 成功构建了真核表达载体 pCMV-CENPK。 ② 通过 Real-time PCR 及 Western blot 的方法鉴定, CENPK 基因在筛选出来的肝癌 FOCUS 细胞株中成功过表达。 [结论] 成功构建真核表达载体 pCMV-CENPK 并使其在肝癌 FOCUS 细胞中稳定过表达, 为进一步研究 CENPK 基因在肝癌发生发展中的作用奠定了基础。

**关键词:** CENPK 基因; 过表达; 真核表达载体; 肝癌 FOCUS 细胞

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2015)06-0505-05

**doi:** 10.11735/j.issn.1004-0242.2015.06.A015

## Construction and Identification of CENPK Gene Overexpressed Vector

WU Wei-gang, LIU Miao-na, LIU Li-ping, et al.

(Key Laboratory of Infection and Immunity, Institute of Hepatology, Shenzhen Third People's Hospital Affiliated to Guangdong Medical College, Shenzhen 518112, China)

**Abstract:** [Purpose] To construct CENPK gene overexpressed vector and to identify its expression in liver cancer FOCUS cells. [Methods] Amplify the CENPK gene from liver cancer tissues of human, and cloned it into pCMV-3Tag-3 vector, to construct eukaryotic expression vector pCMV-CENPK, then to transfect it into FOCUS cells by lipofection method, and to select it by G418. Cells selected by G418 were confirmed by Real-time PCR and Western Blot. [Results] Being verified with double endonuclease digestion and DNA sequencing, the eukaryotic expression vector pCMV-CENPK was successfully constructed. The FOCUS cells selected by G418 were successfully overexpressing CENPK gene, which was confirmed by Real-time PCR and Western blot. [Conclusion] The eukaryotic expression vector pCMV-CENPK is successfully constructed and was stably overexpressed on FOCUS cells, which lay the foundation for further study of CENPK gene on the role of carcinogenesis and progress of liver cancer.

**Key words:** CENPK gene; overexpression; eukaryotic expression vector; hepatoma FOCUS cells

据 2008 年全国肿瘤登记数据分析, 中国肿瘤登记地区的 41 个登记处合计覆盖登记人口 66 138 784 人 (城市 52 158 495 人, 农村 13 980 289 人), 共报告新发病例 197 833 例, 死亡病例 122 136 例, 其中恶性肿瘤发病率为 299.12/10 万<sup>[1]</sup>。从世界范围来

看, 肝癌在男性中是第 5 大常见的恶性肿瘤, 在女性中则位于第 7 位, 全世界每年约有 564 000 例新发肝癌病例, 而这其中有近半数的病例来自中国<sup>[2-4]</sup>。随着大量肝癌流行病学研究和分子生物学研究工作的开展, 已发现了许多生物标志物、基因多态性与肝癌的发生有关<sup>[5]</sup>。因此, 筛选出肝癌相关的基因并深入研究该基因在肝癌发生发展中的作用, 有助于我们对肝癌发生发展过程的认识, 为肝癌的早期诊断

收稿日期: 2014-09-10; 修回日期: 2015-01-19

基金项目: 国家自然科学基金 (81372227); 深圳市科技计划项目 (CXZZ20130515163643)

通讯作者: 周伯平, E-mail: zhoubp@hotmail.com

和预防奠定基础。

众所周知,有丝分裂是人类生长、发育、繁殖和遗传的重要基础,其中染色体分离是有丝分裂的关键步骤之一,是真核生物正确传递遗传信息的关键。着丝粒蛋白家族(CENPs)成员是着丝粒组装和功能发挥的基本组成单位,由位于着丝粒上的一组蛋白质构成,它们在细胞分裂期募集到着丝粒上,共同参与着丝粒的组装,同源染色体的配对,姐妹染色单体的连接、复制及分离等功能<sup>[6]</sup>。因此,着丝粒蛋白的结构与功能如果出现异常,则可能导致染色体分离异常,从而导致疾病的发生,如21-三体综合征、克氏综合征,尤其是恶性肿瘤细胞,染色体不分离是其典型的细胞遗传学特征<sup>[7]</sup>。

人类着丝粒蛋白K (centromere protein K, CENPK), 又名 AF5alpha, FKSG14, P33, ICEN37 及 Solt, 是 CENPK 基因(该基因位于染色体 5q12.3)编码的蛋白质, 它由 269 个氨基酸组成, 分子量为 31kD<sup>[8]</sup>。CENPK 可以在胎儿的许多器官中检测到, 其在胎儿肝脏组织中高表达的, 而在成人的肺组织和胎盘组织中表达量很少。Taki 等<sup>[8]</sup>在白血病婴儿中发现 CENPK 基因与 MLL 及 AF-6 基因融合, 这种基因融合是由不同染色体之间通过复杂的易位(5号, 6号, 8号及 11号染色体)造成的。因此, 我们推测 CENPK 很可能是一个新的致癌基因, 但是目前尚少见有关于 CENPK 基因与肝癌发生发展关系的文献报道。本研究拟通过构建真核表达载体 pCMV-CENPK 并使其在肝癌 FOCUS 细胞中稳定过表达, 以期为进一步研究 CENPK 基因在肝癌发生发展中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

肝癌 FOCUS 细胞株为本实验室保存;真核表达载体 pCMV-CENPK 为本实验室保存;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、质粒中抽试剂盒及琼脂糖凝胶电泳回收试剂盒均购自 QIAGEN 公司;G418 购自 Sigma 公司;DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、Opti-MEM® I 培养基和胰蛋白酶均购自 Thermo 公司;常用限制性内切酶(*Hind*Ⅲ、*Xba* I)、T4 连接酶、大肠杆菌 DH-5α 及 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒购自

TaKaRa 公司;脂质体 2000 转染试剂盒购自 Invitrogen 公司;抗体均购自 Santa Cruz 公司(CENPK:sc-81831;β-actin:4970L;Anti mouse IgG:sc-358922)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物的设计合成

根据基因库 (GenBank) 提供的人基因 CENPK (NM\_001267038.1) 序列, 应用 Primer Premier 5 和 DNAMAN 软件设计基因引物, 引物及其序列如 Table 1 所示。

Table 1 Primers and its sequence

| Primers | Sequence                                   |
|---------|--------------------------------------------|
| CENPK-F | 5'-atatAAGCTTCCCACCATGAATCAGGAGGATCTAGA-3' |
| CENPK-R | 5'- AtatTCTAGACTGATGGAAGCTTCTAATC-3'       |

#### 1.2.2 目的基因的扩增及真核表达载体 pCMV-CENPK 的构建

从人肝癌组织中提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 然后以此为模板通过 PCR 方法扩增出 CENPK 目的基因。两端引物为 1.2.1 中设计的引物。PCR 条件: 95℃ 2min, 然后以 94℃ 20s、58℃ 30s、65℃ 1min, 进行 30 个循环, 72℃ 8min。空质粒 pCMV-3Tag-3 及扩增出来的 CENPK 目的基因片段同时用 *Hind*Ⅲ、*Xba* I 进行双酶切, 然后将酶切产物通过电泳验证片段大小, 琼脂糖凝胶回收试剂盒将酶切电泳产物回收后, 在 T4 连接酶的作用下 16℃ 孵育 2h, 将连接产物转化 DH5α 感受态细胞, 转化菌液涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37℃ 培养过夜。次日挑取生长的菌落培养, PCR 筛选阳性克隆, 提取质粒进行双酶切鉴定及序列测定。

#### 1.2.3 细胞培养及转染

肝癌 FOCUS 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 的环境中培养。收集处于对数生长期的细胞, 使细胞浓度达到 2.0×10<sup>5</sup>/ml, 按 2ml/孔将细胞铺于 6 孔板中, 待次日细胞密度达到 80%~90% 时进行转染。细胞分为 3 组: 未处理组(未进行转染)、对照组(转染空质粒 pCMV-3Tag-3) 和实验组(转染重组质粒 pCMV-CENPK)。最后, 按照脂质体转染试剂盒说明书的操作步骤进行转染。

#### 1.2.4 G418 最佳浓度的确定及稳定株筛选

G418 最佳浓度的确定: 将肝癌 FOCUS 细胞传代接种到 24 孔板, 使每孔细胞的覆盖率达 30% 左

右, 然后分别加入终浓度 0、200、400、600、800、1000 $\mu\text{g/ml}$  的 G418, 连续观察 4~7d 后, 最后选取致使未处理组细胞完全死亡的最低 G418 浓度作为后续筛选细胞克隆的最佳浓度。稳定株的筛选: 转染后, 采用最佳浓度的 G4128 进行筛选, 当对照组和实验组细胞出现明显的克隆而未处理组细胞全部死亡时进行传代直至获得稳定细胞株, 最后采用最佳浓度的 G418 维持培养。

### 1.2.5 转染细胞内 *CENPK* 基因 mRNA 的表达水平分析

分别收集 1.2.4 中筛选出的对照组和实验组细胞, 按照 RNA 提取试剂盒步骤分别提取总 RNA, 并用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录为 cDNA。用 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒进行实时荧光定量 PCR 检测, PCR 条件: 95 $^{\circ}\text{C}$  15s; 95 $^{\circ}\text{C}$  5s; 60 $^{\circ}\text{C}$  30s, 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$  15s; 60 $^{\circ}\text{C}$  1min, 95 $^{\circ}\text{C}$  15s。以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 对 *CENPK* 基因 mRNA 水平进行相对定量。

### 1.2.6 转染细胞内 *CENPK* 蛋白的表达水平分析

分别收集 1.2.4 中筛选出来的对照组和实验组细胞, 用细胞裂解液在冰上作用 10min, 4 $^{\circ}\text{C}$  离心 20min, 收集总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 将凝胶上的蛋白电转移到 NC 膜上, 用含 5% BSA 的 TBST 液 4 $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜。然后, 加入一抗(*CENPK* 和  $\beta$ -actin, 均以 1:2000 的比例进行稀释), 室温震荡孵育 1h。TBST 洗膜 3 次, 每次 10min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(以 1:5000 的比例进行稀释), 室温震荡孵育 1h, 同上述方法洗膜。最后, 于暗室中按常规方法进行显影及定影。

### 1.3 统计学处理

实验数据采用 Image J 软件及 Graphpad Prism 5.0 统计软件包进行统计分析, 计量资料两组间差异采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 *CENPK* 基因扩增及重组质粒的双酶切鉴定

首先, 从人肝癌组织中提取总 RNA, 并将其反转录成 cDNA, 然后通

过 PCR 扩增出 *CENPK* 目的基因。将 PCR 扩增得到的 *CENPK* 基因产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果显示 810bp 的特异基因片段(Figure 1A)。另外, 如 Figure 1B 所示, 空质粒经双酶切后, 只有 4200bp 大小的一个片段, 而重组质粒经双酶切后可以见到约 810 bp 和 4200 bp 的 2 个片段。最后, 通过测序确定重组质粒 pCMV-*CENPK* 中正确插入了 *CENPK* 完整 ORF 基因片段, 表明重组质粒 pCMV-*CENPK* 构建成功(测序结果详见 Figure 2)。

### 2.2 转染细胞内 *CENPK* 基因 mRNA 的相对表达量

如 Figure 3 所示, 对照组(转染空质粒 pCMV-3Tag-3)*CENPK* 基因 mRNA 的相对表达量为  $1.12 \pm 0.16$  ( $n=3$ ), 实验组(转染重组质粒 pCMV-*CENPK*)细胞内 *CENPK* 的 mRNA 相对表达量为  $8.64 \pm 0.43$  ( $n=3$ ), 差异具有统计学意义( $P < 0.001$ ), 提示筛选得到的细胞株为成功转染重组质粒并稳定过表达 *CENPK* 基因的肝癌 FOCUS 细胞株。

### 2.3 转染细胞内 *CENPK* 蛋白的相对表达量

如 Figure 4 所示, 与对照组(转染空质粒 pCMV-3Tag-3)细胞相比, 实验组(转染重组质粒 pCMV-*CENPK*)细胞内 *CENPK* 蛋白的表达水平增高了约  $55.9 \pm 1.2$  倍( $P < 0.001$ ), 也表明筛选得到的细胞株为成功转染重组质粒并稳定过表达 *CENPK* 基因的肝癌 FOCUS 细胞株。

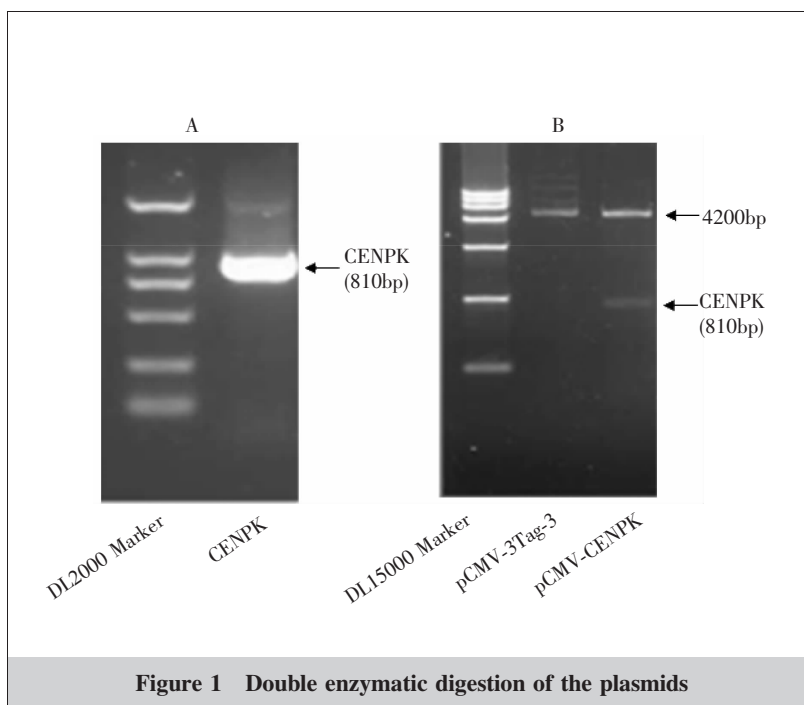


Figure 1 Double enzymatic digestion of the plasmids

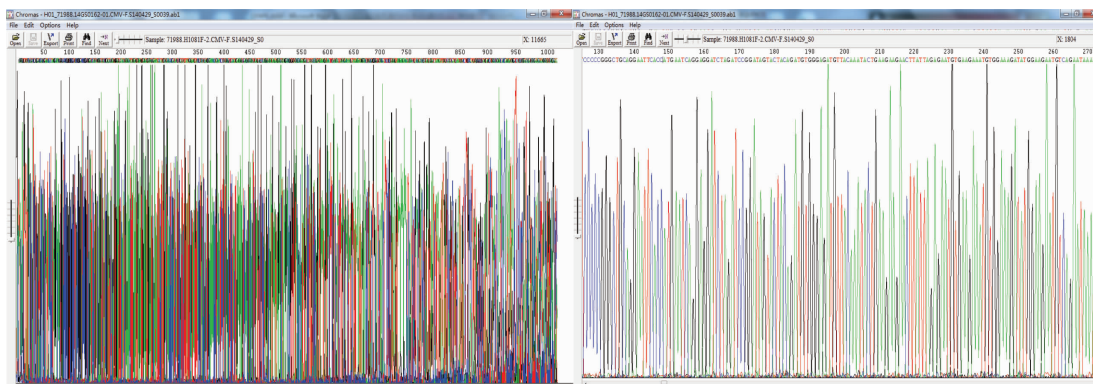


Figure 2 The sequencing result of *CENPK* in pCMV-3tag-3

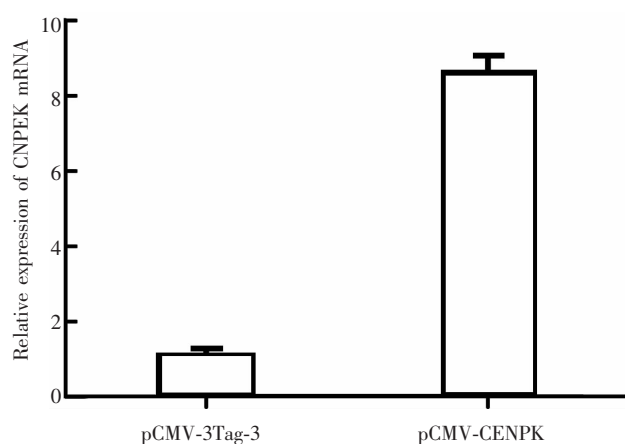


Figure 3 Expression level of *CENPK* by Real-time PCR

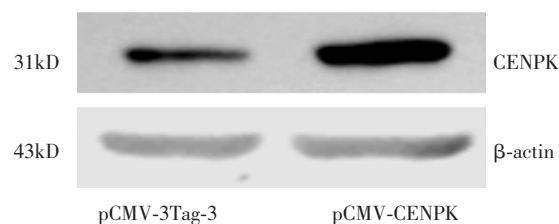


Figure 4 Expression level of *CENPK* by Western blot

### 3 讨论

1980年,Moroi和Fritzler等<sup>[9,10]</sup>首次在系统性硬化病患者的血浆中发现了着丝粒蛋白,并观察到它们紧密地结合在染色体的着丝粒DNA上。目前为止,人类已经发现80多种着丝粒蛋白家族成员<sup>[5,7]</sup>,它们之间相互构成复杂的蛋白网络,例如CENP-C、-H、-I和-K~-U等14种着丝粒蛋白可以CCAN网络(常驻性着丝粒相关网络,constitutive centromere-associated network)<sup>[11,12]</sup>。有研究者在CENPI、CENPJ、CENPK、CENPL和CENPX等着丝粒蛋白中发现大量与癌症相关的基因突变,其中前4种着丝粒蛋白在肿瘤组织样品中也发现了这种基因突变<sup>[13]</sup>。同时,大量研究表明着丝粒蛋白家族成员与许多恶性肿瘤的发生发展密切,如Tomonaga等<sup>[14,15]</sup>在11例人直

肠癌组织中发现CENPA的mRNA和蛋白水平较相应的癌旁组织高,与之结合构成活性着丝粒复合物的CENPH也是如此。另外,CENPK在三阴性乳腺癌的组织及细胞系中表达量是上调的,通过siRNA介导使之表达量下调后,可以使癌细胞由于失去正常的微管结构而停留在G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期,从而抑制癌细胞的增殖<sup>[16]</sup>。以上研究表明,包括CENPK在内的许多着丝粒蛋白家族成员与肿瘤的发生发展密切相关。但是,目前国内外尚少见关于*CENPK*基因与肝癌发生发展关系的研究报道。

众所周知,癌基因一直都是肿瘤学研究的热点问题。为了研究癌基因对肿瘤细胞行为学的影响及其分子机制,首先必须寻找一种能携带目的基因进入肿瘤细胞的载体,且保证该目的基因进入细胞后仍能正常复制及表达,其中质粒是理想的运载体,因

此,载体的构建是肿瘤学研究最基本的技术。本实验通过将 CENPK 目的基因与质粒进行连接,构建真核表达载体 pCMV-CENPK,然后将其导入肝癌 FOCUS 细胞中。最后,本实验通过 Real-time PCR 及 Western blot 的方法对转染后的细胞进行鉴定,结果表明 CENPK 目的基因在肝癌 FOCUS 细胞中成功过表达,也为进一步研究 CENPK 基因过表达对肝癌细胞增殖、侵袭及转移等行为学的影响奠定重要基础。

## 参考文献:

- [1] Zheng RS,Zhang SW,Wu LY,et al.Report of incidence and mortality from China cancer registries in 2008 [J]. China Cancer,2012,21(1):1-12.[郑荣寿,张思维,吴良有,等.中国肿瘤登记地区 2008 年恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2012,21(1):1-12.]
- [2] Llovet JM,Burroughs A,Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet,2003,362(9399):1907-1917.
- [3] Bosch FX,Ribes J,Diaz M,et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. Gastroenterology, 2004,127(5 Suppl 1):S5-S16.
- [4] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [5] Gao S,Yang WS,Gao J,et al. Progress in molecular epidemiology of primary hepatocellular carcinoma [J]. China Cancer,2012,(2):136-144.[高姗,杨万水,高静,等.原发性肝癌的分子流行病学研究进展[J].中国肿瘤,2012,21(2):136-144.]
- [6] Huang L,Xia JH. Research progress of structure and function of human centromere[J]. Foreign Medical Sciences,2000, 23(1):1-4.[黄蕾,夏家辉.人类着丝粒结构及功能研究进展[J].国外医学(遗传学分册),2000,23(1):1-4.]
- [7] Qiu SL,Wang JM,Yu C,et al.The kinetochore proteins CENP-K and CENP-H can form a heterologous supercoiled complex [J]. Science in China (C:Life Sciences), 2009,39(2):202-210.[邱淑兰,王佳宁,于闯,等.动粒蛋白 CENP-K 和 CENP-H 可形成异源超螺旋复合体[J].中国科学(C 辑:生命科学),2009,39(2):202-210.]
- [8] Taki T,Hayashi Y,Taniwaki M,et al. Fusion of the MLL gene with two different genes,AF-6 and AF-5alpha,by a complex translocation involving chromosomes 5,6,8 and 11 in infant leukemia[J]. Oncogene,1996,13(10):2121-2130.
- [9] Moroi Y,Peebles C,Fritzler M J,et al. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1980,77(3):1627-1631.
- [10] Tan EM,Rodnan GP,Garcia I,et al. Diversity of antinuclear antibodies in progressive systemic sclerosis. Anti-centromere antibody and its relationship to CREST syndrome[J]. Arthritis Rheum,1980,23(6):617-625.
- [11] Perpelescu M,Fukagawa T. The ABCs of CENPs[J]. Chromosoma,2011,120(5):425-446.
- [12] McClelland SE,Borusu S,Amaro AC,et al. The CENP-A NAC/CAD kinetochore complex controls chromosome congression and spindle bipolarity[J]. EMBO J,2007,26(24):5033-5047.
- [13] Kumar A,Rajendran V,Sethumadhavan R,et al. Identifying novel oncogenes:a machine learning approach [J]. Interdiscip Sci,2013,5(4):241-246.
- [14] Tomonaga T,Matsushita K,Yamaguchi S,et al. Overexpression and mistargeting of centromere protein-A in human primary colorectal cancer [J]. Cancer Res,2003,63(13):3511-3516.
- [15] Tomonaga T,Matsushita K,Ishibashi M,et al. Centromere protein H is up-regulated in primary human colorectal cancer and its overexpression induces aneuploidy[J]. Cancer Res,2005,65(11):4683-4689.
- [16] Komatsu M,Yoshimaru T,Matsuo T,et al. Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis[J]. Int J Oncol,2013,42(2):478-506.