

论著·基础研究

## 人 YPEL5 基因真核表达载体的构建及在食管癌细胞中的表达\*

聂昌君<sup>1,2</sup>, 覃晓慧<sup>1</sup>, 钟青燕<sup>1,2</sup>, 王秋华<sup>1,2</sup>, 唐宁<sup>1,2</sup>, 蔡稔<sup>1,2</sup>, 曾定元<sup>1△</sup>

(1. 柳州市出生缺陷预防与控制重点实验室, 广西柳州 545001;

2. 柳州市妇幼保健院医学遗传科, 广西柳州 545001)

**摘要:**目的 构建人 YPEL5 基因真核表达重组质粒并在食管癌细胞 EC9706 中表达。方法 以人正常组织的 cDNA 为模板, 扩增得到长 366 bp 的 YPEL5 基因编码序列, 将此序列插入到真核表达载体 pCDH-CD513B 的多克隆位点区域中, 得到真核表达载体 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5, 经菌落聚合酶链反应 (PCR) 鉴定后送公司测序。将构建成功的重组质粒转染到人食管癌细胞系 EC9706 中, 利用实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 检测 YPEL5 基因的表达情况。结果 成功扩增出 YPEL5 基因片段, 大小为 366 bp, 经双酶切、连接、转化和筛选得到 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 重组质粒, 通过基因测序鉴定显示重组质粒中插入的基因序列与 GenBank 中的序列一致, 转染 EC9706 细胞 2 d 后, 荧光定量 PCR 和 Western Blot 显示 YPEL5 基因的表达明显上调。结论 成功构建了 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 真核表达载体并在食管癌细胞株 EC9706 中得到表达, 从而为进一步研究其在食管癌进展中的功能奠定了基础。

**关键词:** YPEL5 基因; 分子克隆; 实时荧光定量聚合酶链反应**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.001 **中图法分类号:** R735.1**文章编号:** 1673-4130(2018)02-0129-04**文献标识码:** A

**Construction of human YPEL5 gene eukaryotic expression vector and its expression in esophageal carcinoma cells\***

NIE Changjun<sup>1,2</sup>, QIN Xiaohui<sup>1</sup>, ZHONG Qingyan<sup>1,2</sup>, WANG Qiu Hua<sup>1,2</sup>,TANG Ning<sup>1,2</sup>, CAI Ren<sup>1,2</sup>, ZENG Dingyuan<sup>1△</sup>

(1. Liuzhou Municipal Key Laboratory of Birth Defect Prevention and Control,

Liuzhou, Guangxi 545001, China; 2. Department of Medical Genetics, Liuzhou Municipal Maternity and Child Healthcare Hospital, Liuzhou, Guangxi 545001, China)

**Abstract: Objective** To construct human yippee-like 5 (YPEL5) gene eukaryotic expression recombinant plasmid and to express in esophageal carcinoma EC9706 cells. **Methods** The cDNA from human normal tissue was taken as a template and amplified to YPEL5 gene coding sequence with 366 bp in length. Then this sequence was inserted into the multiple cloning site areas of eukaryotic expression vector pCDH-CD513B for obtaining the eukaryotic expression vector pCDH-CD513B-Flag-YPEL5. After the bacterial colony PCR identification, it was sent to the corporation for testing the sequence. The successfully constructed recombinant plasmid was transfected into human esophageal carcinoma EC9706 cells. The expression of PEL5 gene in EC9706 cells was detected by QRT-PCR and Western Blot. **Results** The YPEL5 gene segment with 366 bp in length was successfully amplified. pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 recombinant plasmid was obtained by double enzyme digestion, connection, conversion and screening. The gene sequencing identification showed that the inserted gene sequence in recombinant plasmid was consistent with that in the GenBank. After 2 d of transfecting into EC9706 cells, the QRT-PCR and Western Blot revealed that YPEL5 gene expression was significantly up-regulated. **Conclusion** The pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 eukaryotic expression vector is successfully constructed and is expressed in esophageal squamous cancer cell line EC9706, thus which lays a foundation for studying its function in the progression of esophageal cancer.

**Key words:** YPEL5 gene; molecular cloning; real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81360365); 广西自然科学基金资助项目(2014GXNSFBA118205、2017GXNSFAA198157); 广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费课题(Z2013600)。

作者简介: 聂昌君, 男, 主管技师, 主要从事肿瘤发生的分子机制研究。△ 通信作者, E-mail: 94195516@qq.com。

本文引用格式: 聂昌君, 覃晓慧, 钟青燕, 等. 人 YPEL5 基因真核表达载体的构建及在食管癌细胞中的表达[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2): 129-132.

Yippee 蛋白最早在研究果蝇中被发现,人 YPEL 基因家族包括 YPEL1、YPEL2、YPEL3、YPEL4 和 YPEL5,该家族成员具有高度的同源性,在物种进化过程中高度保守。所有 YPEL 家族蛋白都定位于中心体和有丝分裂器中,说明该家族与细胞的有丝分裂密切相关。前期研究发现 YPEL5 在食管癌肿瘤组织中的表达水平缺失或者下调。为了进一步探讨 YPEL5 对食管癌细胞生物学功能的作用,YPEL5 基因在食管细胞癌变过程中的作用机制,本研究构建了人 YPEL5 基因的真核表达载体,并在食管癌细胞 EC9706 进行了表达和鉴定。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 菌株 Stbl3 感受态细胞够自赛业生物科技有限公司;真核表达载体 pCDH-CD513B 为本实验室保存;人食管癌细胞系 EC9706 购自中科院上海细胞库。

**1.2 仪器与试剂** CO<sub>2</sub> 培养箱 (Thermos);高速冷冻离心机 (Eppendorf);聚合酶链反应 (PCR) 仪 (ABI);荧光定量 PCR 仪 (BIO-RAD);水平电泳仪 (北京六一);台式恒温培养振荡器 (欧诺)。Primer-STAR HS DNA 聚合酶、DNA 标志物、T4 连接酶、逆转录试剂盒、凝胶回收试剂盒和质粒小提取试剂盒均购自日本 Takara 公司;限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 购自 NEB 公司;Lipofectamine2000 和 RNA 提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司;Sybgreen PCR Mixture 购自 ABI 公司;RPMI-1640 培养基和胎牛血清购自 HyClone 公司;YPEL5 多克隆抗体够自美国 ABGENT 公司;GAPDH 多克隆抗体够自 CST 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 获得目的基因** 依据 GenBank 数据库中人 YPEL5 基因 mRNA 的序列 (NM\_001127401.1)、应用 Primer Premier 5 设计并合成一对特异性引物,5' 端带有 Flag 标签。引物序列两端的分别含有 EcoR I 和 BamH I 限制性内切酶酶切位点和保护碱基。引物序列:正义链为 CCG GAA TTC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG ATG GGC AGA ATT TTC CTT GAT C;反义链为 CGC GGA TCC TCA AGA GTT ATC AGA TGG TAC。PCR 扩增体系为 50  $\mu$ L,包括 10  $\mu$ L 5 $\times$ PCR STAR Buffer,4  $\mu$ L dNTP(2.5 mmol/L),上下游引物各 1  $\mu$ L,1  $\mu$ L 模板 cDNA,0.5  $\mu$ L Taq 聚合酶(5 U/L),用灭菌三蒸水补齐至 50  $\mu$ L。PCR 扩增条件如下:95  $^{\circ}$ C 5 min,95  $^{\circ}$ C 30 s,56  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分离并对其割胶回收。

**1.3.2 重组质粒的构建** 用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对 YPEL5 基因的扩增产物和 pC-

DH-CD513B 载体进行双酶切(37  $^{\circ}$ C 水浴 2 h)。将全部 50  $\mu$ L 酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,并对所需片段分别进行割胶回收。将回收的目的基因与载体按照 5:1 比例混合,加入 T4 连接酶,16  $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物转化至感受态大肠杆菌 Stbl3 中,将菌液涂于含有氨苄青霉素的 LB 固体培养基中 37  $^{\circ}$ C 过夜培养。

**1.3.3 重组质粒的鉴定** 随机挑取单个菌落进行 PCR 鉴定。阳性菌落继续接种于 5 mL LB 液体培养基中(含氨苄青霉素,100  $\mu$ g/mL)扩大培养并提取质粒。将含有重组质粒的大肠杆菌菌液送上海生工生物工程技术有限公司进行测序。测序鉴定正确的菌种大量提取 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 重组质粒。

**1.3.4 重组质粒的表达** 将处于对数生长期的人食管癌细胞系 EC9706 以  $2 \times 10^5$ /孔的密度接种于 6 孔板中培养 24 h,使其细胞密度达到 60%~80%。配制转染试剂 A:于 Opti-MEM 培养基中加入 10  $\mu$ L Lipofectamine2000,室温孵育 5 min;配制转染试剂 B:于 Opti-MEM 培养基中加入 5  $\mu$ g pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 质粒。将 A 和 B 试剂混合后室温孵育 20 min,缓慢加入六孔板内混匀后继续培养。将转染空质粒 pCDH-CD513B 的细胞作为阴性对照。

**1.3.5 荧光定量 PCR 鉴定** 转染 24 h 后收获 EC9706 细胞,应用 TRIZOL 法提取细胞中总 RNA,按逆转录试剂盒说明书操作获得 cDNA。以 GAPDH 为内参,对 YPEL5 进行定量。

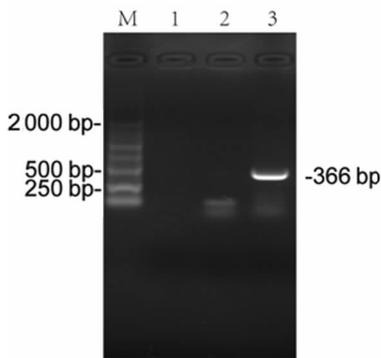
**1.3.6 蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 鉴定** 将 1.3.5 中转染了重组质粒的细胞收集,提取总蛋白。测定蛋白浓度后,各取 30  $\mu$ g 蛋白进行的 SDS-PAGE 电泳分离。将蛋白转到 PVDF 膜上(300 mA,2 h)。转膜结束后,将 PVDF 膜于 5% 的脱脂奶粉中室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入特异性 YPEL5 抗体(1:1 000),4  $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入 HRP 标记的二抗(1:10 000),室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。加入 ECL 发光液显色后,用 Bio-Rad 凝胶成像系统观察并扫描图像,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)作为内参。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 对数据进行统计分析,两组样品均数比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 YPEL5 基因的扩增** 以本实验室已经提取并逆转录的人正常组织 cDNA 为模板,利用设计的引物进行 PCR 扩增后,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离。结果显示扩增产物片段大小约为 366 bp,与目的基因片段大小一致。利用凝胶回收试剂盒回收扩增产物,

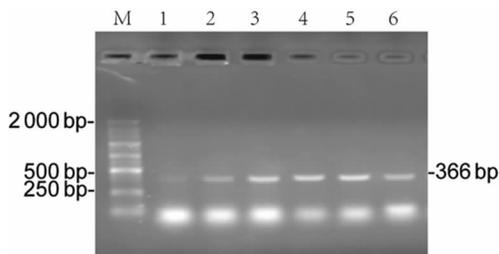
见图 1。



注: M 为 DL2000 DNA 标志物; 1 为空白对照; 2 为阴性对照; 3 为 YPEL5 基因片段

图 1 PCR 扩增人 YPEL5 基因片段

**2.2 重组质粒的获得与菌落 PCR 鉴定** 利用限制性内切酶 EcoR I 和 BamH I 分别对回收扩增产物和 pCDH-CD513B 载体进行双酶切, 利用 DNA 胶回收试剂盒回收酶切产物, 回收后的产物按 3 : 1 的比例使用 T4 DNA 连接酶连接, 转化感受态 Stbl3 菌株, 涂布于含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板后 37 °C 过夜培养, 挑取 6 个克隆进行菌落 PCR。扩增产物利用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。结果显示, 第 2、3、4、5 和 6 号克隆在 366 bp 处出现明亮条带, 初步说明 YPEL5 基因成功插入 pCDH-CD513B 载体上, 见图 2。



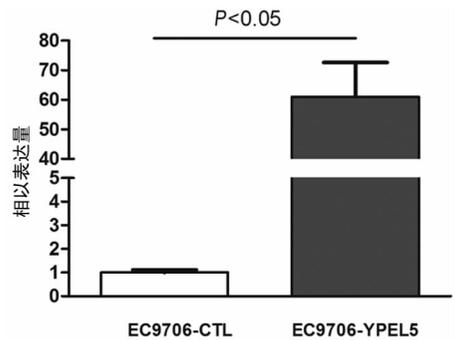
注: M 为 DL2000 DNA 标志物; 1~6: 菌落 PCR 扩增产物

图 2 重组质粒的电泳鉴定

**2.3 重组质粒的测序鉴定** 阳性菌落扩增后提取质粒, 送测序后分析序列结果表明, 插入到重组质粒中的 YPEL5 基因与 GenBank 中的序列完全一致。因此成功获得了 YPEL5 基因真核表达载体。

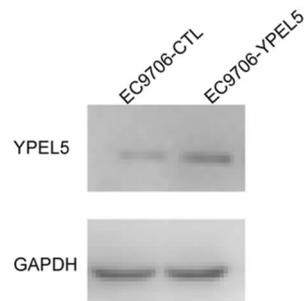
**2.4 荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测 YPEL5 在 EC9706 细胞中的表达** 分别将 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 和其对照空载体通过 Lipofectamine2000 转染 EC9706 细胞, 提取 RNA 并逆转录为 cDNA 后, 利用荧光定量 PCR 检测 YPEL5 基因的表达。结果显示, 转染了 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 的 EC9706 细胞中 YPEL5 的 mRNA 表达水平比转染空载体组明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3; Western Blot 检测结果显示转染了 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 的 EC9706 细胞中 YPEL5 的蛋白表达水平比对照空载体转染组明显升高, 说明外源 YPEL5 已经

在食管癌细胞 EC9706 中表达, 见图 4。



注: EC9706-CTL 为转染空载体组; EC9706-YPEL5 为转染 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 组

图 3 实时荧光定量 PCR 检测 YPEL5 的表达



注: EC9706-CTL 为转染空载体组; EC9706-YPEL5 为转染 pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 组

图 4 Western Blot 检测 YPEL5 的表达

### 3 讨论

食管癌是一种严重危害人类健康的消化道恶性肿瘤, 在全球最常见的癌症中排名第 6 位, 在中国的病死率排名第 4 位<sup>[1-4]</sup>。食管癌包括食管鳞癌和食管腺癌, 它们的流行病学特征具有明显的不同。西方国家主要以腺癌为主, 中国的食管癌主要是鳞状细胞癌。食管癌的发病率具有明显的种族性, 食管鳞癌在黑色人种和黄色人种中发病率高, 食管腺癌在白色人种中发病率高。在我国食管鳞癌占 90% 以上<sup>[5]</sup>。食管癌的发生和发展过程中也涉及多种癌基因和抑癌基因的变异<sup>[6-7]</sup>。对食管癌相关基因的研究对于食管癌的早期诊断、判断预后、治疗及预防等方面都有重要的意义。

2001 年研究发现惜古比天蚕抑血细胞聚集素时, 应用酵母双杂交系统筛选出一种新的抑血细胞聚集素相互作用蛋白, 命名为果蝇 Yippee 蛋白。该基因定位于果蝇 X 染色体的 12A 区域, 序列分析发现 Yippee 是一个真核生物中高度保守的蛋白, 包含 2 个由半胱氨酸组成的锌指结构口袋 (Cys-x2-Cys-x52-Cys-x2-Cys)<sup>[8]</sup>。2004 年有研究者对人类 22 号染色体全面测序时, 发现了包括 5 个成员的新基因家族, 由于该基因家族和果蝇 Yippee 基因具有高度的同源性, 因此被命名为 Yippee-Like 家族<sup>[9]</sup>。人 YPEL 基因家族包括 YPEL1、YPEL2、YPEL3、YPEL4 和 YPEL5, 5 个成员间在蛋白水平上同样也具有高度同

源性(43.8%~96.6%)。通过对公共数据库比对发现,从 68 个物种(真菌、植物和动物)中发现了 100 个 Ypel 基因,这 100 个 Ypel 的氨基酸序列同样也具有高度同源性,并且具有保守序列 C-X(2)-C-X(19)-G-X(3)-L-X(5)-N-X(13)-G-X(8)-C-X(2)-C-X(4)-GWXY-X(10)-K-X(6)-E<sup>[9]</sup>。该家族的前 4 个成员在有丝分裂期定位于有丝分裂器附近,而在细胞间期定位于中心体和核仁。YPEL5 蛋白在细胞间期同样定位于中心体和核仁,而在有丝分裂期定位于纺锤体。所有 YPEL 家族蛋白都定位于中心体和有丝分裂器中,说明家族与细胞有丝分裂密切相关。

YPEL5 是 Yippee-Like 家族的第 5 个成员, YPEL5 基因位于人类 2 号染色体 2q23.1, HOSONO 等<sup>[10]</sup>研究了 YPEL5 在系统发育方面的功能, YPEL5 在细胞周期的不同阶段具有不同的亚细胞定位。在细胞间期 YPEL5 定位在细胞核和中心体上, 敲降 YPEL5 基因能够抑制 COS-7 细胞的生长和青鳞鱼胚胎早期的发育,表明其参与了细胞周期的进程。酵母双杂交发现 YPEL5 蛋白与 RanPM 蛋白和 RanBP10 蛋白相互作用共同参与动物细胞周期的调节。这些结果说明, YPEL5 基因在调控细胞分裂和细胞周期进程中发挥重要作用。VELUSAMY 等<sup>[11]</sup>对慢性淋巴细胞白血病(CLL)通过转录组测序发现 YPEL5-PPP1CB 存在嵌合现象。把 YPEL5/PPP1CB 嵌合体导入哺乳动物细胞,表达了截断型的 PPP1CB 蛋白的磷酸酶活性减弱。PPP1CB 的沉默导致细胞增殖能力和克隆形成能力的增强<sup>[12]</sup>。

本研究为了进一步研究 YPEL5 的生物学功能,通过逆转录 PCR 扩增 YPEL5 基因片段,双酶切真核表达载体 pCDH-CD513B 和扩增的目的片段后,利用 DNA 连接酶连接扩增产物和质粒,通过菌落 PCR、双酶切和测序验证了扩增片段的正确性,成功构建了人 YPEL5 基因真核表达载体,进一步转染食管癌细胞系 EC9706,通过实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 检测到 YPEL5 基因表达成功。pCDH-CD513B-Flag-YPEL5 真核表达载体的构建为今后能够建立稳定表达的细胞模型,进一步研究 YPEL5 的生物学特性和功能,研究 YPEL5 对食管癌细胞的生长增殖能力、迁移和侵袭能力及对细胞周期和细胞凋亡的影响提供了有力的工具,为阐明其在肿瘤发生发展中的作用奠定了基础。

## 参考文献

[1] MCGUIRE S. Geneva, Switzerland; World Health Organi-

- zation, international agency for research on cancer, WHO press, 2015[J]. Adv Nutr, 2016, 7(2): 418-419.
- [2] PISANI P, PARKIN D M, BRAY F, et al. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990[J]. Inter J Cancer, 1999, 83(1): 18-29.
- [3] DONG Z, TANG P, LI L, et al. The strategy for esophageal cancer control in high-risk areas of China[J]. Jpn J Clin Oncol, 2002, 32(1): 10-12.
- [4] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [5] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [6] MA J J, YU X Y, GUO L P, et al. DUSP6, a tumor suppressor, is involved in differentiation and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncol Lett, 2013, 6(6): 1624-1630.
- [7] SHEN Z Y, XU L Y, LI E M, et al. The multistage process of carcinogenesis in human esophageal epithelial cells induced by human papillomavirus[J]. Oncol Rep, 2004, 11(3): 647-654.
- [8] ROXSTROM K, FAYE I. The drosophila gene yippee reveals a novel family of putative Zinc binding proteins highly conserved among eukaryotes[J]. Insect Mol Biol, 2001, 10(1): 77-86.
- [9] HOSONO K, SASAKI T, MINOSHIMA S, et al. Identification and characterization of a novel gene family YPEL in a wide spectrum of eukaryotic species[J]. Gene, 2004, 340(1): 31-43.
- [10] HOSONO K, NODA S, SHIMIZU A, et al. YPEL5 protein of the YPEL gene family is involved in the cell cycle progression by interacting with two distinct proteins RanBPM and RanBP10[J]. Genomics, 2010, 96(2): 102-111.
- [11] VELUSAMY T, PALANISAMY N, KALYANA S, et al. Recurrent reciprocal RNA chimera involving YPEL5 and PPP1CB in chronic lymphocytic leukemia[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(8): 3035-3040.
- [12] VANDEPOELE K, PHILIPPE J, DENYS B. The YPEL5-PPP1CB fusion transcript is detected in different hematological malignancies and in normal samples[J]. Leuk Res Rep, 2015, 4(2): 51-54.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-28)