

## 人 VIGILIN 基因分段克隆及表达\*

俞小琴<sup>1</sup>, 魏玲<sup>1</sup>, 刘秋英<sup>1</sup>, 黄元<sup>1</sup>, 赵荣策<sup>2</sup>, 覃扬<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西基础医学与法医学院 生物化学与分子生物学教研室(成都 610041);

2. 四川大学华西医院 肝血管外科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 探讨人高密度脂蛋白结合蛋白(HDLBP)-VIGILIN 蛋白与其他蛋白质相互作用的机制。方法 根据 VIGILIN 基因全长编码区的结构域,将 VIGILIN 基因全长编码区分为 N 端、KH1-7、KH8-12、KH13-14、C 端 5 段,以 pDsred2-N1/VIGILIN 为模板分别扩增 5 个片段及全长 cDNA 后克隆至 pGEX 5X 3 原核表达载体,测序,然后将鉴定后的重组质粒转化到表达宿主菌 *E. coli* BL21 中进行诱导表达 GST-VIGILIN 融合蛋白,并用 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 检测蛋白表达结果。结果 成功扩增了人 VIGILIN 基因编码区片段,并且构建到原核表达载体中,经酶切、测序鉴定证实序列完全正确,重组载体构建成功,并且在 pGEX 原核表达系统中诱导表达 GST-VIGILIN 融合蛋白,经 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 检测初步证实表达成功。结论 本实验首次根据 VIGILIN 蛋白不同的结构域成功构建了 GST-VIGILIN 分段克隆原核表达载体,并且对融合蛋白表达条件进行了优化,成功表达了 GST 融合蛋白。

**【关键词】** VIGILIN 基因 结构域 分段克隆 原核表达系统

**Segment Cloning and Expression of Human VIGILIN Gene** YU Xiao-qin<sup>1</sup>, WEI Ling<sup>1</sup>, LIU Qiu-ying<sup>1</sup>, HUANG Yuan<sup>1</sup>, ZHAO Rong-ce<sup>2</sup>, QIN Yang<sup>1△</sup>. 1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, West China School of Preclinical and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Liver and Vascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

△ Corresponding author, E-mail: qin\_1@sina.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the mechanisms of interaction between high-density lipoprotein binding protein (HDLBP)-VIGILIN with other proteins, we cloned VIGILIN cDNA N, KH1-7, KH8-12, KH13-14, and C fragments separately into expression vector, and identify the expressed proteins. **Methods** The recombinant plasmid pDsred2-N1/VIGILIN was used as template to amplify VIGILIN full length, VIGILIN N terminal, KH1-7, KH8-12, KH13-14, C terminal and recombined them with pGEX 5X 3. After transformed into *E. coli* BL21 cells, the recombinants were confirmed by enzyme digestion and sequence analysis. After optimizing the IPTG inducing condition, we induced GST-VIGILIN fusion proteins on the appropriate conditions. **Results** The recombinant plasmids of pGEX 5X 3/VIGILIN FL, pGEX 5X 3/VIGILIN N terminal, pGEX 5X 3/VIGILIN KH1-7, pGEX 5X 3/VIGILIN KH8-12, pGEX 5X 3/VIGILIN KH13-14, pGEX 5X 3/VIGILIN C terminal were constructed successfully, and induced the GST-VIGILIN fusion proteins. **Conclusion** pGEX 5X 3/VIGILIN FL, pGEX 5X 3/VIGILIN N terminal, pGEX 5X 3/VIGILIN KH1-7, pGEX 5X 3/VIGILIN KH8-12, pGEX 5X 3/VIGILIN KH13-14, pGEX 5X 3/VIGILIN C terminal recombinant plasmids were constructed successfully, and their corresponding fusion proteins were successfully expressed.

**【Key words】** VIGILIN Domain Segmented cloning Prokaryotic expression

人高密度脂蛋白结合蛋白(HDLBP)-VIGILIN 蛋白是一种含有 14 个相关、但不完全相同的串联的 KH 结构域的多功能蛋白质, VIGILIN 蛋白在细胞核和细胞质中均有分布<sup>[1]</sup>。VIGILIN 蛋白家族广泛存在于真核生物中,如果蝇中的 DDP1、酵母中的

Scp160、脊椎动物中的 VIGILIN 蛋白。不同生物种类中的 VIGILIN 蛋白结构和功能具有高度的保守性<sup>[2,3]</sup>。人 VIGILIN 基因位于 2q37,其包含 29 个外显子,主要编码相对分子质量为  $150 \times 10^3$  的 VIGILIN 蛋白。目前有研究报道 VIGILIN 蛋白有多种生物学功能,包括参与脂代谢<sup>[4]</sup>、有丝分裂时异染色质的分离、维持异染色质结构的稳定性<sup>[5]</sup>,帮助 tRNA 在细胞质和细胞核间的转运、维持 mRNA 的

\* 国家自然科学基金(No. 30870957)资助

△ 通讯作者, E-mail: qin\_1@sina.com

稳定性<sup>[6]</sup>,参与印记基因 *IGF2/H19* 的调控<sup>[7]</sup>,与肝癌、乳腺癌等的发生、发展有关<sup>[8,9]</sup>。

本研究根据人 *VIGILIN* 蛋白不同的结构域将 *VIGILIN* 全长分成 5 个片段,并且将 5 个片段分别亚克隆到 pGEX 5X 3 原核表达载体中,采用 pGEX 原核表达系统在大肠杆菌中诱导表达,产生大量 GST 融合蛋白,为进一步研究 *VIGILIN* 与其他蛋白的相互作用打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2×Taq Plus Master Mix 购自上海近岸科技有限公司,Pyrobest DNA Polymerase 购自大连宝生物公司,质粒小量提取试剂盒购自 Omega 公司,DNA 凝胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,限制性内切酶及 DNA 连接酶购自 Formentas 公司,IPTG、琼脂糖购自 Invitrogen 公司,引物合成及质粒测序鉴定由 Invitrogen 公司完成。含 *VIGILIN* 全

长 cDNA 序列的 pDsred2-N1/*VIGILIN* 重组质粒由我室构建,原核表达载体 pGEX 5X 3 由刘建余博士馈赠,大肠杆菌 BL21、DH5α 为本室保存。

### 1.2 *VIGILIN* 分段及引物设计

根据人 *VIGILIN* 蛋白不同的结构域将 *VIGILIN* 全长 cDNA (GenBankNM\_005336.4) 分成 5 个片段,分别为 N 端、KH1-7、KH8-12、KH13-14、C 端,并用 primer 软件设计包括全长在内的 6 对引物,分别在引物两端加上合适的酶切位点及酶切位点相应的保护碱基,送至 Invitrogen 公司合成。为了纠正与 GST 融合表达后可能出现的读码框移位,设计及合成引物时在 *VIGILIN* 全长 cDNA 起始密码上游引入 2 个碱基,在 N 端、KH13-14、C 端上游引入 2 个碱基,在 KH1-7、KH8-12 上游引入 1 个碱基,以使 GST 和 *VIGILIN* 都能在正确的读码框内融合表达。分段扩增 *VIGILIN* 片段的引物序列、位置、酶切位点等见附表。

### 1.3 *VIGILIN* 全长及分段 cDNA PCR 扩增

附表 扩增 *VIGILIN* 各片段的引物序列、位置、长度、酶切位点、PCR 退火温度

Table Primers used in the amplification of *VIGILIN* cDNA fragments

Primer	Location (bp)	Product size (bp)	Restriction endonuclease	Sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
Full length	232-4 094	3 812	<i>Sma</i> I / <i>Xho</i> I	F: TCCCCCGGGCCATGAGTTCGGTTGCAGTTT R: CCGCTCGAGTGATCATTATCGTTTTGGG	58.0
N terminal	232-686	455	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	F: CGGGATCCCCATGAGTTCGGTTGCAGTTT R: GGAATTCGGCCTGAGTCTGCAGTCTAG	57.1
KH1-7	686-2 165	1 480	<i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I	F: GGAATTCCTCAGCAACTGTTGCCATTC R: CCGCTCGAGCAGAATCCTGCTCCGGGC	60.6
KH8-12	2 165-3 395	1 231	<i>Eco</i> RI / <i>Xho</i> I	F: GGAATTCGTCTATTCAGAAAGACCTGGC R: CCGCTCGAGCTTAAAACCTCTTAAAGCCC	57.1
KH13-14	3 394-3 806	412	<i>Bam</i> HI / <i>Xho</i> I	F: CGGATCCAGCTGAGTGTCAGTGTAGAC R: CCGCTCGAGGAGGATGTGGTTCGATGGCTT	61.6
C terminal	3 805-4 046	242	<i>Bam</i> HI / <i>Eco</i> RI	F: CGGATCCTCAATCTGGAGGAGGAATAC R: GGAATTCGTATCATTATCGTTTTGGG	54.7

以 pDsred2-N1/*VIGILIN* 重组质粒为模板扩增 *VIGILIN* 全长 cDNA 及分段 cDNA。*VIGILIN* 全长 PCR 扩增的反应体系为: 10×Pyrobest buffer 5 μL, dNTP Mix (各 2.5 mmol/L) 4 μL, 上游引物(10 pmol/L) 1 μL, 下游引物(10 pmol/L) 1 μL, 模板 0.5 μL (约 50 ng), Pyrobest 酶(5 U/μL) 0.5 μL 混匀, 水 36.5 μL, 反应总体积为 48.5 μL<sup>[10]</sup>。*VIGILIN* 全长扩增条件为: 预变性 94 °C, 5 min, 变性 94 °C, 45 s, 退火 58 °C, 30 s, 延伸 72 °C, 3 min, 30 个循环后 4 °C 保存。*VIGILIN* N 端、KH1-7、KH8-12、KH13-14、C 端 PCR 扩增体系为: 2×Taq Plus Master Mix

25 μL, 上游引物(10 pmol/L) 1 μL, 下游引物(10 pmol/L) 1 μL, 模板 0.5 μL (约 50 ng), 水 22.5 μL, 反应总体积为 50 μL。*VIGILIN* 分段扩增条件为: 预变性 94 °C, 1 min 30 s, 变性 94 °C, 30 s, 退火温度见附表, 30 s, 延伸 72 °C, 1 min, 30 个循环后 72 °C 延伸 5 min 后 4 °C 保存。各段均以相应体系和相应条件分别扩增 4 管, 共 200 μL。分别取各段扩增产物 5 μL, 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。鉴定后各段剩余 PCR 产物均用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的片段。

### 1.4 *VIGILIN* 全长及分段 cDNA 原核表达载体构建

分别双酶切 VIGILIN 各片段及 pGEX 5X 3 质粒。各片段所用限制性内切酶分别为 *Sma* I / *Xho* I (VIGILIN 全长), *Bam*H I / *Eco*R I (N 端), *Eco*R I / *Xho* I (KH1-7), *Eco*R I / *Xho* I (KH8-12), *Bam*H I / *Xho* I (KH13-14), *Bam*H I / *Eco*R I (C 端)。pGEX 5X 3 质粒用相同的限制性内切酶双酶切。将酶切后的各片段用 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳后回收。分别将纯化的目的片段与纯化的相应的 pGEX 5X 3 载体连接, VIGILIN 分段的连接体系为: 10 × T4 DNA ligase buffer 2 μL, T4 DNA ligase (5 U/μL) 0.2 μL, pGEX5X3 载体 20 ng, 目的片断 60~200 ng, 总体积 20 μL。22 °C 连接 1 h。VIGILIN 全长因引入了 *Sma* I, 所以按平末端的方法连接, 体系为: 10 × T4 DNA ligase buffer 2 μL, 50% PEG 4000 Solution 2 μL, T4 DNA ligase (5 U/μL) 1 μL, 总体积 20 μL。22 °C 连接 2 h。其中载体 DNA 与插入片段 DNA 的摩尔比为 1 : (3~10)。取各连接产物 5 μL, 转化 DH5α 感受态细胞, 然后铺于 LB (100 μg/mL 氨苄青霉素) 平板上, 待菌液干后翻板, 37 °C 过夜, 次日挑单菌落接种至 LB 液体培养基中过夜培养, 扩增后按质粒小量提取试剂盒说明书提取重组质粒, 分别按附表中各片段的限制性内切酶双酶切各重组质粒筛选出阳性克隆。将阳性克隆菌各取 300 μL 送至公司测序, 测序均用 pGEX 通用引物。测序后将测得的序列与 VIGILIN cDNA 全长序列用 DNAMAN 软件比对。将鉴定好的重组质粒转化到 *E. coli* BL21 大肠杆菌中鉴定: 经酶切 VIGILIN 6 个 PCR 产物及 pGEX 5X 3 载体、连接相应的 PCR 产物及载体、转化连接产物到大肠杆菌中后, 各随机挑取单个菌落进行扩增培养, 然后提取质粒进行双酶切后, 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳。

### 1.5 GST 融合蛋白表达条件的优化 (以 GST-VIGILIN N 为例)

以不同条件分别对 GST-VIGILIN N 融合蛋白进行诱导表达后, 用 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的表达情况。GST-VIGILIN N 融合蛋白按培养温度 (16 °C、25 °C), IPTG 浓度 (0.1、0.5、1.0 mmol/L), 诱导时间 (3 h、6 h) 的不同条件分别进行诱导表达。诱导 3 h、6 h 后各分别取出 3 mL 培养物, 10 000 r/min, 离心 1 min 后弃上清, 沉淀在 -20 °C 冰箱中反复冻融 2 次后分别向沉淀中加入 300 μL 细菌裂解液, 冰上以 150 W, 超声 4 s, 停 12 s 的条件超声 10 次后, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min。分

离上清和沉淀, 向沉淀中加入 300 μL 1 × SDS 上样缓冲液, 上清各取 80 μL 加入 20 μL 5 × SDS 上样缓冲液混匀, 100 °C 煮 5 min, 各取 20 μL 用 100 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 确定最适表达条件。GST-VIGILIN 全长融合蛋白按培养温度 (16 °C、25 °C), IPTG 浓度 (0.1、0.5、1.0 mmol/L), 诱导时间 (3 h、6 h、12 h) 诱导, 其余方法同前, 进行优化<sup>[11]</sup>。

### 1.6 GST-VIGILIN 全长及分段重组克隆融合蛋白表达

按上述优化条件诱导表达 GST-VIGILIN 融合蛋白, 诱导后行 SDS-PAGE 电泳并用抗 GST 的抗体做 Western blot 检测融合蛋白的表达。取保种的经鉴定后构建成功的各 pGEX 5X 3-VIGILIN 重组菌划线, 次日挑单克隆于 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C 振摇过夜, 取 100 μL 菌液加入 10 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C、220 r/min, 快摇 2 h, 至对数期 (吸光度<sub>600</sub> 约为 0.6)。VIGILIN 分段加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 25 °C, 150 r/min 诱导表达 3 h<sup>[11]</sup>。VIGILIN 全长加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 16 °C, 150 r/min 诱导表达 12 h。取各段诱导后菌液 1 mL, 4 °C, 10 000 r/min 离心 1 min 弃上清, 收集菌体, 各加入 100 μL 1 × SDS 上样缓冲液, 沸水煮 10 min 后瞬时离心, 上清用于 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 检测融合蛋白的表达。

## 2 结果

### 2.1 VIGILIN 各片段的 PCR 扩增

以 pDsred2-N1/VIGILIN 重组质粒为模板扩增 VIGILIN cDNA 全长及分段片段, 其中各片段的理论大小分别为: N 端, 455 bp; KH1-7, 1 480 bp; KH8-12, 1 231 bp; KH13-14, 412 bp; C 端, 242 bp。如图 1 所示, 各片段经电泳后呈现为清晰的单一条带, 大小与理论值大致一致。

### 2.2 pGEX 5X 3-VIGILIN 各段重组质粒的鉴定

各酶切后的重组质粒分别可见约 5 000 bp 的质粒, 3 800 bp 左右的 VIGILIN 全长, 450 bp 左右的 N 端, 1 500 bp 左右的 KH1-7, 1 200 bp 左右的 KH8-12, 400 bp 左右的 KH13-14, 250 bp 左右的 C 端。见图 2。大小与理论值大致一致, 测序结果比对后证实与目的片段完全一致。

### 2.3 GST-VIGILIN 融合蛋白表达条件的优化

如图 3 所示: GST-VIGILIN N 分段融合蛋白

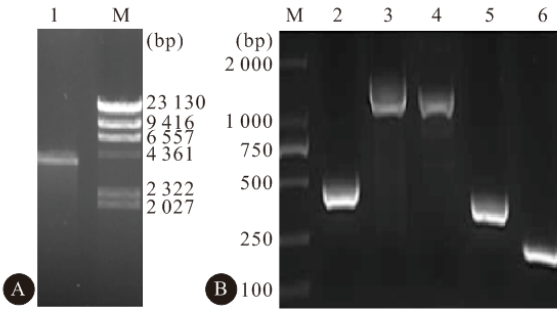


图 1 *VIGILIN* 全长 cDNA (A) 及分段 cDNA 片段 (B) PCR 扩增产物电泳

Fig 1 Agarose gel electrophoresis of *VIGILIN* fragments PCR amplification products

A: *VIGILIN* cDNA full length (1),  $\lambda$ -*Hind* III digest DNA marker (M); B: DL2000 DNA marker (M), *VIGILIN* N terminal (2), *VIGILIN* KH1-7 (3), *VIGILIN* KH8-12 (4), *VIGILIN* KH13-14(5), *VIGILIN* C terminal (6)

在 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 温度为 25 °C, 诱导时间为 3 h 和 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 温度为 16 °C, 诱导时间为 6 h 时分布在裂解液上清较多, 两者上清中蛋白量相差不大, 为了节约时间, 最终选择以 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 温度为 25 °C, 诱导时间为 3 h 作为分段融合蛋白的表达条件。GST-*VIGILIN* 全长融合蛋白在 IPTG 浓度为 0.1 mmol/L, 温度为 16 °C, 诱导时间为 12 h 时分布在裂解液上清较多 (结果未显示), 由此确定 GST-*VIGILIN* 分段融合蛋白在 IPTG 终浓度为

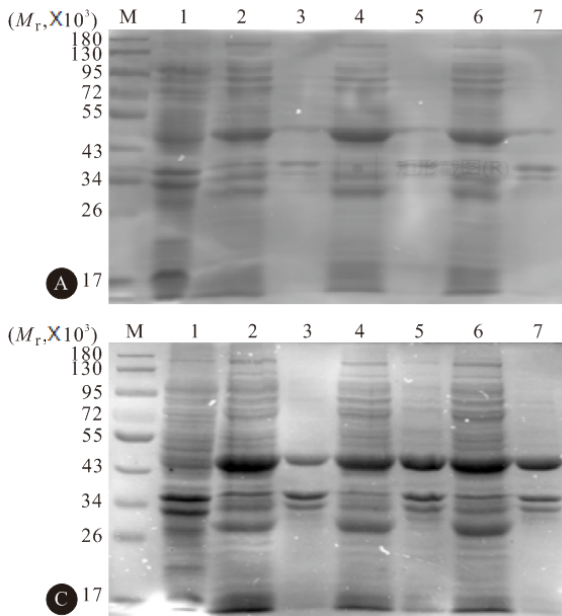


图 3 GST-*VIGILIN* N 分段融合蛋白诱导表达条件优化

Fig 3 Optimizing of GST-*VIGILIN* N terminal fusion proteins expression induced conditions by SDS-PAGE electrophoresis

The fusion proteins were expressed with different inducing conditions. The host bacteria were induced at 16 °C for 3 h (A), 6 h (B), at 25 °C for 3 h (C), 6 h (D). M: Marker; 1, BL21; 2, 4, 6: Supernatant with 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L and 1 mmol/L IPTG, respectively; 3, 5, 7: Precipitate 0.1 mmol/L, 0.5 mmol/L and 1 mmol/L IPTG, respectively

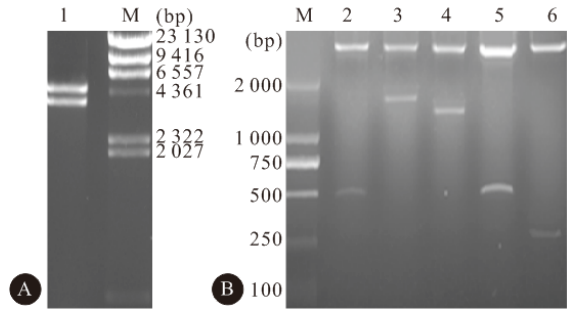


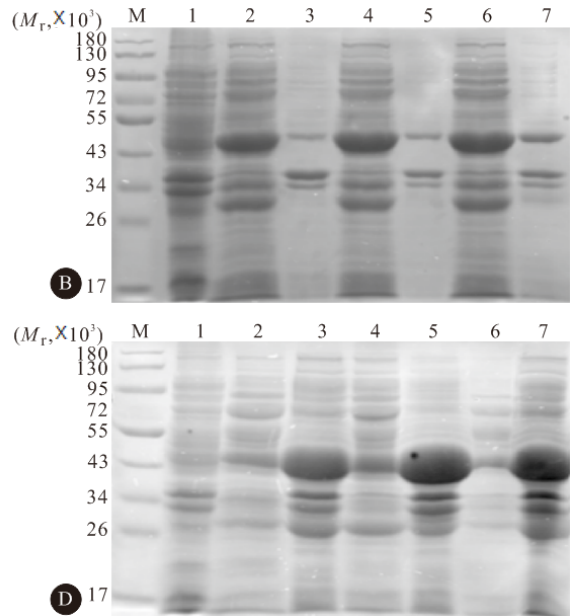
图 2 *VIGILIN* 全长 cDNA 及其片段重组质粒的鉴定

Fig 2 Identification of *VIGILIN* full-length cDNA and its fragments recombinant plasmids by agarose gel electrophoresis

A: pGEX 5X 3-*VIGILIN* full length digested with *Sma* I / *Xho* I (1),  $\lambda$ -*Hind* III digest DNA marker (M); B: DL2000 DNA marker (M); pGEX 5X 3-*VIGILIN* N terminal digested with *Bam*H I / *Eco*R I (2); pGEX 5X 3-*VIGILIN* KH1-7 digested with *Eco*R I / *Xho* I (3); pGEX 5X 3-*VIGILIN* KH8-12 digested with *Eco*R I / *Xho* I (4); pGEX 5X 3-*VIGILIN* KH13-14 digested with *Bam*H I / *Xho* I (5); pGEX 5X 3-*VIGILIN* C terminal digested with *Bam*H I / *Eco*R I (6)

0.1 mmol/L, 温度为 25 °C 诱导 3 h, GST-*VIGILIN* 全长融合蛋白在 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L, 温度为 16 °C 诱导 12 h 为较理想的蛋白质诱导表达条件。在此条件下进行 GST-*VIGILIN* 融合蛋白表达。

### 2.4 *VIGILIN* 全长 cDNA 及其分段片段的 GST 融合蛋白诱导表达



SDS-PAGE 电泳结果见图 4A, 可见 GST-VIGILIN 各段融合的蛋白均有表达, GST-VIGILIN 全长相对分子质量约为  $170 \times 10^3$ , GST-VIGILIN N 端相对分子质量约为  $40 \times 10^3$ , GST-VIGILIN KH1-7 相对分子质量约  $70 \times 10^3$ , GST-

VIGILIN KH8-12 相对分子质量约为  $60 \times 10^3$ , KH13-14 相对分子质量约为  $40 \times 10^3$ , C 端相对分子质量约为  $30 \times 10^3$ 。所有片段大小与估计值大致相符。Western blot 结果见图 4B, GST-VIGILIN KH1-7 在略小于  $70 \times 10^3$  处有条带, GST-VIGILIN

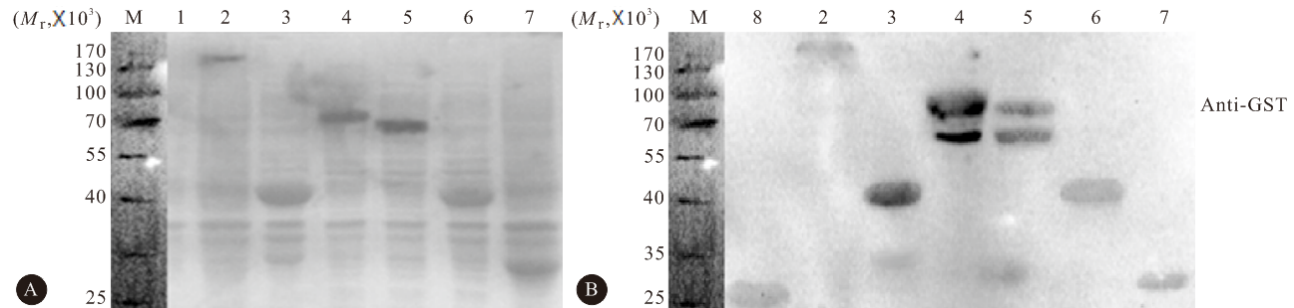


图 4 GST-VIGILIN 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 电泳结果(A)和 Western blot 结果(B)

Fig 4 SDS-PAGE electrophoresis analysis (A) and Western blot analysis (B) of the GST-VIGILIN fusion proteins

M: Marker; 1: BL21; 2: GST-VIGILIN full length induced at  $16^\circ\text{C}$ , 12 h; 3-7: GST-VIGILIN N terminal, GST-VIGILIN KH1-7, GST-VIGILIN KH8-12, GST-VIGILIN KH13-14, GST-VIGILIN C terminal induced at  $25^\circ\text{C}$ , 3 h, respectively; 8: GST

KH8-12 在略小于主带的地方同样有一条带。

### 3 讨论

研究显示 VIGILIN 蛋白参与了不同基因、mRNA、tRNA、蛋白多层次的调控。目前已发现的有 VIGILIN 与脂蛋白脂肪酶(LPL)复合体结合参与脂蛋白脂肪酶在血管内皮细胞的转运, 调控血浆甘油三酯的代谢<sup>[13]</sup>; VIGILIN 与信号肽酶 signal peptide peptidase(SPP)形成复合体参与膜蛋白的翻译和错误折叠的消除<sup>[14]</sup>; VIGILIN 与 mRNA 结合维持 mRNA 的稳定性, 与 tRNA 及翻译延长因子结合保证翻译的效率<sup>[15]</sup>; VIGILIN 与组蛋白甲基转移酶 SUV39H1 结合, 维持异染色质的稳定性<sup>[16]</sup>; 我室前期研究发现 VIGILIN 与转录因子 CTCF 相互作用参与 CTCF 依赖的 *IGF2/H19* 印记基因的调控<sup>[7]</sup>; CTCF 介导 VIGILIN 在卫星序列 2 结合的减少从而引起 HP1a 的结合减少等<sup>[17]</sup>。但 VIGILIN 与这些蛋白质、RNA 以及基因相互作用的机制尚不完全清楚。

为了进一步研究 VIGILIN 蛋白与其他因子相互作用的机制, 本研究根据 VIGILIN 蛋白不同的结构域首次成功分段克隆了 GST-VIGILIN 融合蛋白原核表达载体, 并且利用原核表达系统首次成功诱导出 GST-VIGILIN 融合蛋白。值得注意的是, 在 Western blot 结果中融合蛋白 GST-VIGILIN KH1-7 及 GST-VIGILIN KH8-12 分别在略小于主带的地方有一条带, 说明融合蛋白 GST-VIGILIN

KH1-7 及 GST-VIGILIN KH8-12 在原核表达系统中可翻译出两种分子大小不同的蛋白质, 据报道 VIGILIN 基因可以翻译出相对分子质量约  $140 \times 10^3$ 、 $110 \times 10^3$ 、 $90 \times 10^3$ 、 $70 \times 10^3$  等多种大小不等的蛋白质, 在真核细胞中行使不同的功能。但在单纯的 SDS-PAGE 电泳中并未观察到以上现象, 这可能与 Western blot 在检测蛋白质表达方面灵敏度远远高于单纯的 SDS-PAGE 电泳有关。这两种融合蛋白的两种不同蛋白质的区别有待进一步确认。

本研究采用的原核表达系统大大增加了蛋白表达量, 但由于真核生物基因组的复杂性, 原核表达系统相比之下缺乏转录后的剪接和加工系统; 缺乏翻译后的加工修饰如糖基化、磷酸化、甲基化从而会影响蛋白质的功能; 在原核系统中表达的真核蛋白缺乏稳定性, 容易被细菌蛋白酶污染、常常形成包涵体等。此外, 原核表达系统中并无与该蛋白相互作用的其他因子, 原核表达系统并不能完全模拟真核表达系统, 所以在原核表达系统中通常只能模拟真核细胞蛋白质的直接简单的相互作用。但由于真核细胞中蛋白表达产量低, 真核表达系统价格昂贵, 目前原核表达系统运用仍然较广泛。

综上, 本研究成功构建了 VIGILIN 分段原核表达载体, 成功诱导出 GST-VIGILIN 融合蛋白并进行了鉴定, 为进一步研究 VIGILIN 蛋白的功能打下基础。同时本研究也存在不足之处: 由于没有针对 VIGILIN 分段蛋白的特异性抗体所以无法用 VIGILIN 抗体检测 VIGILIN 分段蛋白。

## 参 考 文 献

- 1 Wen WL, Stevenson AL, Wang CY, *et al.* Vgl1, a multi-KH domain protein, is a novel component of the fission yeast stress granules required for cell survival under thermal stress. *Nucleic Acids Res*,2010;38(19):6555-6566.
- 2 Battle M, Marsellach FX, Huertas D, *et al.* Drosophila vigilin, DDP1, localises to the cytoplasm and associates to the rough endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta*,2011;1809(1):46-55.
- 3 Rohwedel J, Kügler S, Engebrecht T, *et al.* Evidence for posttranscriptional regulation of the multi K homology domain protein VIGILIN by a small peptide encoded in the 5' leader sequence. *Cell Mol Life Sci*,2003;60(8):1705-1715.
- 4 Young SG, Davies BS, Fong LG, *et al.* GPIHBP1: an endothelial cell molecule important for the lipolytic processing of chylomicrons. *Curr Opin Lipidol*,2007;18(4):389-396.
- 5 Huertas D, Cortes A, Casanova J, *et al.* Drosophila DDP1, a multi KH domain protein contributes to centromeric silencing and chromosome segregation. *Curr Biol*,2004;14(18):1611-1620.
- 6 Li AM, Watson A, Fridovich-Keil JL. Scp160p associates with specific mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res*,2003;31(7):1830-1837.
- 7 Liu QY, Yang B, Xie XY, *et al.* Vigilin interacts with CTCF and involves in CTCF-dependent regulation of imprinted genes Igf2/H19. *FEBS J*,2014;281(12):2713-2725.
- 8 Yang WL, Wei L, Huang WQ, *et al.* Vigilin is overexpressed in hepatocellular carcinoma and is required for HCC cell proliferation and tumor growth. *Oncol Rep*,2014;31(5):2328-2334.
- 9 Woo HH, Yi X, Lamb T, *et al.* Posttranscriptional suppression of proto-oncogene c-fms expression by vigilin in breast cancer. *Mol Cell Biol*,2011;31(1):215-225.
- 10 杨文理, 武 静, 谢晓颀等. 人 *vigilin* 基因全长编码区的分段克隆及鉴定. *四川大学学报(医学版)*,2008;39(6):877-881.
- 11 蒋 磊, 覃 扬, 孙 芝等. 多功能转录因子 CTCF 重组质粒构建及其表达鉴定. *四川大学学报(医学版)*,2009;40(1):1-5.
- 12 魏 玲, 张朝良, 蒋 磊等. 人 VIGILIN N 端融合蛋白的表达及亚细胞定位. *四川大学学报(医学版)*,2009;40(2):185-189.
- 13 Young SG, Davies BS, Voss CV, *et al.* GPIHBP1, an endothelial cell transporter for lipoprotein lipase. *J Lipid Res*,2011;52(11):1869-1884.
- 14 Lu SH, Jeon AH, Schmitt-Ulms G, *et al.* Vigilin interacts with signal peptide peptidase. *Proteome Sci*,2012;10(1):10-33.
- 15 Hirschmann WD, Westendorf H, Mayer A, *et al.* Scp160p is required for translational efficiency of codon-optimized mRNAs in yeast. *Nucleic Acids Res*,2014;42(6):4043-4055.
- 16 Zhou J, Wang QQ, Chen LL, *et al.* On the mechanism of induction of heterochromatin by the RNA-binding protein vigilin. *RNA*,2008;14(9):1773-1781.
- 17 Shen WY, Liu QY, Wei L, *et al.* CTCF-mediated reduction of vigilin binding affects the binding of HP1a to the satellite 2 locus. *FEBS Lett*,2014;588(9):1549-1555.

(2014-12-05 收稿, 2015-05-07 修回)

编辑 吕 熙

## 本 刊 征 稿 启 事

《四川大学学报(医学版)》(原《华西医科大学学报》)是中文核心期刊,曾荣获全国优秀科技期刊一等奖、首届国家期刊奖提名奖、第二、三届全国期刊奖百种重点期刊、四川省十佳科技期刊称号和第一、二、三、四、五届中国高校精品科技期刊奖,2014 中国国际影响力优秀学术期刊。本刊被美国《医学索引》(INDEX MEDICUS, IM/MEDLINE),《生物学文摘》(BIOLOGICAL ABSTRACTS, BA),《化学文摘》(CHEMICAL ABSTRACTS, CA),荷兰《医学文摘》(EXCERPTA MEDICA, EM),中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),中国生物医学文献光盘数据库(CBMdisc),中文生物医学期刊文献数据库(CMCC),中国学术期刊网全文数据库(CNKI),中国学术期刊(光盘版),万方数据-数字化期刊群等数据库收录。

为了更好地开展国内外学术交流,促进医药卫生事业的发展,凡符合编辑部稿件要求(见每卷末期稿约),均可向本刊投稿。凡属于国家自然科学基金及其他部省级以上科研基金资助的来稿,编辑部将适当地给予优先。用英文撰写的稿件投稿时应附上中文稿。英文稿一经采用,刊出时间可提前。

本刊在线投稿网址: <http://scdx.cnjournals.com>

地址:四川省成都市人民南路三段 17 号四川大学学报(医学版)编辑部

邮政编码:610041

电话/传真:(028)85501320

E-mail: [scuxbyxb@scu.edu.cn](mailto:scuxbyxb@scu.edu.cn)