

人源 CBX7 功能结构域的重组表达与纯化

胡温温, ALTAF Simair, 吕缜一, 陈 婷, 张云龙, 陆昌瑞*

(东华大学 化学化工与生物工程学院, 中国上海 201620)

摘要: CBX7 (chromobox 7) 在细胞寿命延长和癌症发生中起着重要的调控作用。然而, 获取足量的全长 CBX7 蛋白并用于结构研究极为艰难。实验阐述了 CBX7 功能结构域 CBX7 (aa 145~227) 重组表达载体构建的详细过程。同时, 通过 Ni-NTA 亲和层析对融合目的蛋白进行了纯化, 并利用 SDS-PAGE 及 Western-blot 进行了鉴定分析。纯化后的融合蛋白样品通过离子交换和分子筛层析进一步分离剩余杂质。本实验得到的高浓度 CBX7 蛋白可用于结晶, 为后续 CBX7 的结构和功能研究奠定了基础。

关键词: 人源 CBX7; 功能结构域; 蛋白质表达; 蛋白质纯化; 肿瘤抑制

中图分类号: Q518; Q71

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2019)02-0092-08

Recombinant Expression, Purification of a Human CBX7 Functional Domain

HU Wen-wen, ALTAF Simair, LÜ Zhen-yi, CHEN Ting, ZHANG Yun-long,
LU Chang-ru^{*}

(College of Chemistry, Chemical Engineering and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China)

Abstract: CBX7 regulates the cellular lifespan extension and cancer progression. However, it has proved difficult to obtain the full length CBX7 in sufficient quantities for structural studies. Here the process to recombinantly express the CBX7 functional domain CBX7 (aa 145~227) was described. The target recombinant protein was purified by Ni-NTA affinity chromatography and analyzed by SDS-PAGE and Western-blot. Remaining contaminants were further removed by ion-exchange and size-exclusion chromatography. Through this procedure, milligrams of the CBX7 protein could be available for crystal screen in future studies of CBX7 structure and functions.

Key words: human CBX7 protein; functional domain; protein expression; protein purification; tumor suppressor

(Life Science Research, 2019, 23(2): 092~099)

CBX7 (chromobox 7) 是多梳家族 (polycomb group, PcG) 蛋白的成员, 在细胞增殖和癌症发生中起着重要的调控作用。PcG 蛋白是果蝇同源异型基因 (homeotic gene, HOX) 表达的表观遗传转录因子, 研究发现其在一系列癌症类型中被解除调控^[1-5]。PcG 蛋白形成的多蛋白复合物 (polycomb repressive

complexes, PRCs) 通过表观遗传机制引起染色体结构的改变和基因表达的转录抑制, 从而调节染色体组织并将其维持在转录失活状态^[1, 6-7]。有关研究证明这些典型和非典型的 PRCs (不依赖于转录抑制的方式对细胞和致癌功能进行调节的 PcG 蛋白) 在胚胎发育、细胞增殖和分化、胚胎干细胞

收稿日期: 2018-11-09; 修回日期: 2019-01-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31300603); 中央高校基本科研基金资助项目 (15D110508, 15D110527, 13D110522, 17D210502, 17D310512, 2232014D3-39); 国家大学生创新项目 (14T10501); 上海高校特聘教授 (东方学者) 计划 (2012-28); 东华大学励志计划 (18D210501); 中国博士后科研基金特别资助项目 (2015M571455)

作者简介: 胡温温 (1992-), 女, 河南南阳人, 硕士研究生, 主要从事蛋白质结构与功能的研究, E-mail: 2160503@mail.dhu.edu.cn; * 通讯作者: 陆昌瑞 (1983-), 男, 上海人, 东华大学教授, 博士生导师, 主要从事 RNA 结构与功能、基因的表达与调控等方向的研究, Tel: 021-67792740, E-mail: erlu@dhu.edu.cn.

维持以及多功能干细胞的自我更新与维护过程中发挥重要作用^[3-5, 8]。PRCs 基本上包括 PRC1 和 PRC2, 经典 PRC1 的组成如图 1A 所示。位于染色体 22q13.1 上的 *CBX7* 编码一种 CBX (chromobox) 蛋白, 该蛋白质目前已被鉴定为 PRC1 的核心成分^[9-11]。Pc 蛋白是 PRC1 蛋白复合体的核心组分之一, 哺乳动物中与 Pc 同源的 CBX 蛋白的已知结构域如图 1B 所示: CBX 蛋白主要由 N 端 chromodomain、C 端 Pc box (C-terminal polycomb repressor box) 以及邻近 N 端的 AT HOOK 或 AT HOOK Like (ATHL) 结构域构成, 果蝇 Pc 蛋白不含有 AT HOOK 或 ATHL 结构域^[12]。CBX7 在人类和小鼠中的结构域分布如图 1C 所示, 其中在人类和小鼠中的 CD (chromodomain) 结构域均为 11~60 aa, CBX 家族 C 端结构域在人类 CBX7 中为 209~240 aa (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4mn3/protein/1>), 在小鼠中则是 116~147 aa (<https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/4x3t/protein/1>), 以上分布情况来自 PDB 数据库。

作为 PcG 家族的成员, PRC1 和 PRC2 共同诱导组蛋白共价翻译后修饰(H3K27me3)^[13]。当 PRC1 亚基对组蛋白 H2A (H2AK119Ub1) 进行单泛素化时, PRC2 亚基催化组蛋白 H3lysine27 (H3K27me3) 的三甲基化^[14], 由于这两种组蛋白的

翻译后修饰与转录沉默有关, 而 CBX7 在此过程中结合 H3K27me3 并促使 H2AK119Ub1 泛素化, 其重要性不言而喻。此外, CBX7 还可以在各种癌症的起始和发展中独立发挥作用^[11, 13-18]。但是, CBX7 在癌症发展中的作用尚存在争议: 对于不同的细胞环境和癌症类型, CBX7 既可以充当致癌因子也可以成为肿瘤抑制因子^[11, 13-18]。值得注意的是, CBX7 也被证明可以正向调节前列腺细胞和造血干细胞的干细胞特性^[19-20]。最近研究表明, CBX7 mRNA 的高表达与癌症患者预后密切相关^[21-22], CBX7 的 CD 结构域通过与 ncRNA (*ANRIL*) 互作^[23]实现对细胞衰老的调控, 成为包括癌症在内的重大疾病诊断的潜在分子标志物及药物治疗的分子靶标^[24-25]。

目前, 关于 CBX7 结构研究的报道仅有两篇^[26-27], 分别解析出的是 N 端 7~62 aa 与 C 端 219~248 aa 区域的结构, 但并未指明具体作用位点及机理。对于 CBX7 的分子生物学机理及其以何种信号通路发挥作用, 我们尚不明确。本实验旨在利用分子生物学方法构建重组克隆并纯化出高纯度 CBX7 部分功能结构域单体, 为后续结构生物学的研究奠定基础, 同时为 CBX7 与 PcG 家族蛋白在癌症发展及肿瘤因子靶向抑制等相关领域中的机制探索提供新的思路和途径。

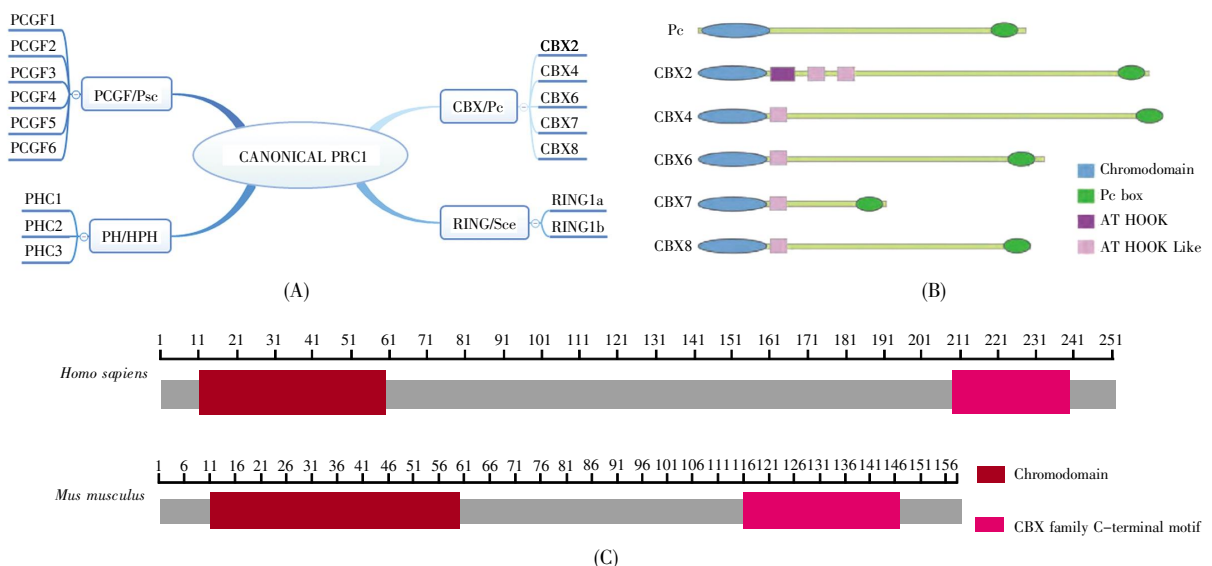


图 1 CBX7 家族蛋白概况

(A) 含有 CBX 蛋白的经典 PRC1 模式图; (B) 果蝇 Pc 蛋白及人源 5 种 CBX 蛋白的结构示意图^[12]; (C) CBX7 在人类和小鼠中的结构域分布图。

Fig.1 General information about CBX7

(A) The CBX in canonical polycomb repressive complex 1 (PRC1); (B) Pc from *Drosophila melanogaster* and CBXs from *Homo sapiens*^[12]; (C) CBX7 structural domains in *Homo sapiens* and *Mus musculus*.

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、表达载体和基因信息

感受态细胞 DH5 α 、BL21 (DE3)均由本实验室自制。所使用的 pp-SUMO 表达载体是经过改良之后含有 6 个 SUMO 标签的 pET28a 载体,选取的酶切位点是 *Bam*H I/*Xho* I。全长 CBX7 序列由生工生物工程(上海)股份有限公司(以下简称“生工”)合成并插入 pUC57 质粒作为 PCR 扩增反应的模板;CBX7 蛋白的基因序列根据大肠杆菌密码子的偏爱性进行优化和改进,保留原有野生型蛋白质序列,可以进行后续实验。

1.1.2 试剂与仪器

Pfu DNA 聚合酶、质粒小量提取试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自生工;DNA D2000 marker 购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司;限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho* I 购自美国 NEB 公司;上样缓冲液 5 \times SDS loading dye 由本实验室自制;DNA marker B600022、蛋白质 marker BM525、蛋白质预染 marker 及亲和层析介质 Ni-NTA sefinoseTM resin 购自生工;蛋白质 marker 26610、预染 marker 26616 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;HiTrap Q FF 5 mL 预装柱、Superdex200 10/300 GL 预装柱购自美国 GE 公司;其他试剂为国产分析纯。各阶段所用溶液及缓冲体系见表 1。

核酸凝胶成像仪、PCR 仪、蛋白质凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad 公司;离心机、紫外分光光度计购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;AKTA 蛋白质纯化系统购自美国 GE 公司;FPLC 蛋白质

纯化系统购自苏州赛谱仪器有限公司。

1.2 方法与步骤

1.2.1 SUMO-CBX7 融合基因的构建

通过在线软件(<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>)预测出人源 CBX7 蛋白的二级结构以及蛋白质中氨基酸序列的无序分布图,从而判断出其结构域边界并据此设计需要表达片段的引物。*CBX7* 基因经密码子优化后,在大肠杆菌中能够高效表达,以该序列作为 PCR 模板,用引物 5'-aaaaGGATC-CGCTCACAAATAT-3'和 3'-aaaaCTCGAGTAAT-AACGCGGTAATATCG-5'进行常规 PCR,扩增出目的序列。经过改良后的 pp-SUMO 载体可增加蛋白质的可溶性高效表达,将 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的 pp-SUMO 载体和目的序列进行连接和转化,构建成功的重组质粒需要进行测序并鉴定。

1.2.2 SUMO-CBX7 重组基因的表达鉴定

将测序成功的 SUMO-CBX7 质粒转入 BL21 (DE3)感受态细胞,经卡那霉素抗性筛选后,挑取阳性单克隆于 37 $^{\circ}$ C 摇床培养过夜。取过夜培养的工程菌以 1/100 比例加入 5 mL 培养基中,卡那霉素占比 0.1%,37 $^{\circ}$ C、225 r/min 培养至 OD_{600} 0.5~0.6。加入 1 mmol/L 的异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG),于 37 $^{\circ}$ C 进行快速诱导表达,约 4 h 后留样,进行 SDS-PAGE 和 Western-blot 鉴定。

1.2.3 SUMO-CBX7 融合蛋白的亲和纯化

取 1~2 L 诱导表达后的菌液,4 $^{\circ}$ C 条件下 3 500 r/min 离心 30 min。将离心后的菌液去上清,沉淀用冰冷的 binding buffer 重悬,破碎细胞之前加入 100 μ L 的苯甲基磺酰氟(phenylmethane-

表 1 溶液及缓冲体系
Table 1 Buffers used in this study

Buffers	Details
Binding buffer	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 5 mmol/L imidazole
Wash buffer	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 10 mmol/L imidazole
	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 20 mmol/L imidazole
	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 30 mmol/L imidazole
	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 40 mmol/L imidazole
	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 50 mmol/L imidazole
	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 60 mmol/L imidazole
Elution buffer	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 50 mmol/L imidazole
	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 250 mmol/L imidazole
Strip buffer	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 70 mmol/L imidazole
	25 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 5% glycerol, 1 mol/L imidazole
Ion-exchange buffer	50 mmol/L Tris, pH 8.0, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA
	50 mmol/L Tris, pH 8.0, 1 mol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA
Size-exclusion buffer	50 mmol/L Tris, pH 8.0, 200 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA

sulfonyl fluoride, PMSF) (100 mmol/L)混匀, 破碎第一遍后再次加入 100 μ L 的 PMSF 混匀并继续破碎, 破碎之后的细胞悬液需经过高速离心分离上清和沉淀, 其中离心速度为 12 000 r/min, 时间为 1 h。将保存在 20%乙醇的 Ni-NTA 预装柱用 ddH₂O 冲洗干净, 用多于 5 CV (column volume)的 binding buffer 平衡, 上清液过两遍使目的蛋白与 Ni-NTA 柱内介质充分结合。然后分别用多于 5 CV 的 wash buffer 和 elution buffer 洗脱杂蛋白并收集目的蛋白。各步骤分别留样并用 12% SDS-PAGE 和 Western-blot 检测鉴定。

1.2.4 离子交换层析

Relianx 色谱仪的离子交换层析操作系统如下: 选用 HiTrap Q FF 5 mL 预装柱, 起初设置低速流出 20%乙醇, 用多于 5 CV 的 ddH₂O 冲洗柱子, 然后用 2~3 CV 1 mol/L NaOH 冲洗, 接下来继续用多于 5 CV 的 ddH₂O 冲洗柱子, 使用 5 CV 无盐 buffer 平衡, 上样 200~500 μ L 蛋白质浓缩样品, 设置盐浓度梯度(将含 NaCl 浓度为 1 mol/L 的 ion-exchange buffer 按照 1%~100%的体积比与无盐 buffer 混合以改变洗脱液盐浓度, 此处可直接在程序中设置)冲洗, 收集 UV280 以及 UV254 吸收峰处的蛋白质洗脱样品, 留样并用 12% SDS-PAGE 进行检测与分析, 最后将样品浓缩。

1.2.5 分子筛层析

AKTA 蛋白质纯化系统的分子筛层析操作如

下: 选用 Superdex200 10/300 GL 预装柱, 起初设置低速流出 20%乙醇, 用 1.5 CV 的 ddH₂O 冲洗柱子, 然后用 1~1.5 CV size-exclusion buffer 平衡, 接下来上样 250 μ L 蛋白质浓缩样品, 洗脱 1 CV, 收集 UV280 以及 UV254 吸收峰处的蛋白质洗脱样品, 留样并用 12% SDS-PAGE 进行检测与分析。最后将样品浓缩, 加入 5%甘油, 用液氮速冻, 置于-80 $^{\circ}$ C 冷存。

2 结果

2.1 SUMO-CBX7 重组质粒的构建和表达

为使目的基因在大肠杆菌内可溶性高效表达, 我们选择将目的基因导入 pp-SUMO 载体中。双酶切后的 pp-SUMO 质粒长度大约 5 600 bp (图 2A)。插入 pUC57 质粒的全长 CBX7 基因序列作为 PCR 扩增反应的模板, 大小约 2 000 bp (图 2B)。通过 PCR 扩增反应得到的目的片段 CBX7 (aa 145~227)如图 2C 所示, 其经过 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切后的片段大约 249 bp (图 2D)。

将构建好的重组质粒(图 3A)转入 BL21 (DE3)感受态细胞, 并加入 1 mmol/L 的 IPTG, 于 37 $^{\circ}$ C 进行快速诱导表达(图 3B, 3C)。

2.2 SUMO-CBX7 融合蛋白的亲纯化

融合蛋白 N 端带有 6*His 标签, 可以使用 Ni-NTA 亲和层析对其进行纯化。亲和层析的纯化结果如图 4 所示, 过完两遍的上清(binding flow

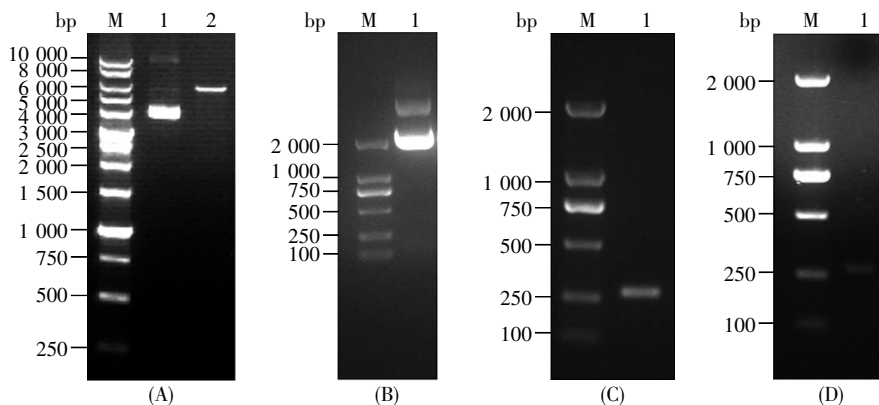


图2 琼脂糖凝胶电泳分析 CBX7 目的片段和 pp-SUMO 质粒载体

(A) pp-SUMO 质粒检测。M: DNA marker B600022, 1: pp-SUMO 质粒, 2: 经 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切后的 pp-SUMO 质粒; (B) CBX7 模板质粒检测。M: DNA marker D2000, 1: CBX7 质粒; (C) CBX7 (145~227 aa) PCR 产物检测。M: DNA marker D2000, 1: CBX7 (145~227 aa) 片段; (D) CBX7 (145~227 aa) PCR 产物酶切检测。M: DNA marker D2000, 1: 经 *Bam*H I/*Xho* I 双酶切后的 CBX7 (145~227 aa) 片段。

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of plasmid pp-SUMO and CBX7 fragment

(A) Analysis of plasmid pp-SUMO. M: DNA marker B600022. 1: Plasmid pp-SUMO. 2: Plasmid pp-SUMO after *Bam*H I/*Xho* I digestion; (B) Analysis of CBX7 plasmid. M: D2000 DNA marker. 1: CBX7 plasmid; (C) Analysis of CBX7 (145~227 aa) fragment. M: D2000 DNA marker. 1: CBX7 (145~227 aa) fragment; (D) Analysis of CBX7 (145~227 aa) fragment after *Bam*H I/*Xho* I digestion.

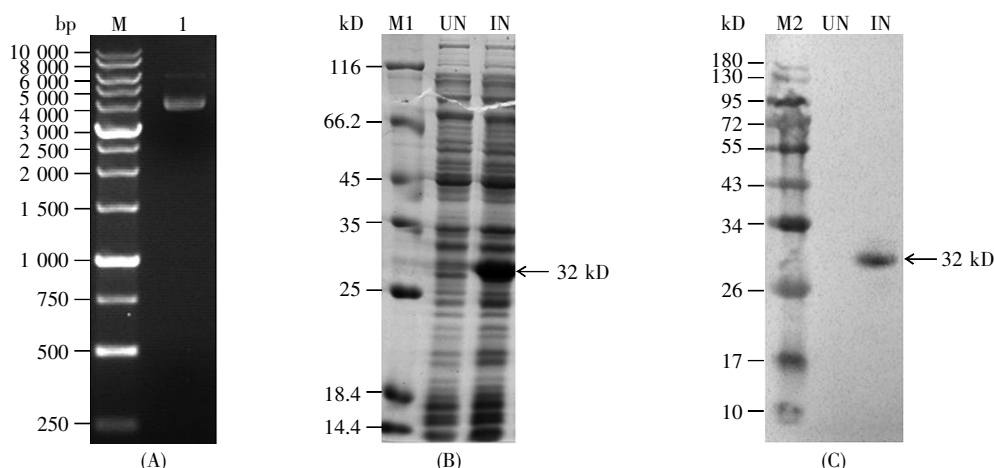


图3 重组质粒的鉴定与表达

(A) 重组质粒检测。M: DNA marker B600022, 1: SUMO-CBX7 (aa 145~227)质粒; (B) 12% SDS-PAGE 电泳图; (C) 用于检测 His 标签的 Western-blot 图, 6*His-tag 单克隆抗体来自 ProteinTech。M1: 蛋白质 marker 26610; M2: 蛋白质预染 marker 26616; UN: 诱导前的样品; IN: 1 mmol/L IPTG 诱导后的样品。

Fig.3 Analyses and expression of recombinant plasmid

(A) Analysis of recombinant plasmid. M: DNA marker B600022. 1: Plasmid SUMO-CBX7 (aa 145~227); (B) SDS-PAGE analysis in a 12% polyacrylamide gel; (C) Western-blot using 6*His-tag monoclonal antibody (ProteinTech). M1: Protein marker 26610; M2: Protein marker 26616; UN: Uninduced sample; IN: 1 mmol/L IPTG induced sample.

through)中不含目标蛋白,说明融合蛋白能够充分与亲和介质结合。根据融合蛋白的性质和等电点,各阶段选用缓冲液 pH 8.0,由于咪唑(imidazole)对分离杂质极为重要,选用不同咪唑浓度梯度的 wash buffer 对杂蛋白进行洗脱,找到合适的洗脱条件(10 mmol/L 咪唑 wash buffer 10 CV, 20 mmol/L 咪唑 wash buffer 5 CV, 50 mmol/L 咪唑 elution buffer 10 CV 收集,多于 5 CV 70 mmol/L strip buffer 冲洗 Ni-NTA 柱),最终获得较为纯净的目的蛋白。

2.3 SUMO-CBX7 的性质及结构鉴定

由图 4 可知 Ni-NTA 亲和层析可以去除 90% 杂蛋白,但仍有部分杂蛋白和降解条带无法分离干净,因此我们依据物质的带电性质选用 HiTrap Q FF (强阴离子交换层析)来继续去除杂质,并利用分子筛层析进一步纯化。相关结果如图 5、图 6 所示,目的蛋白以对称、尖锐的单峰形态被洗脱下来, SUMO-CBX7 融合蛋白的纯度达到 97% 及以上,已达到结晶条件。

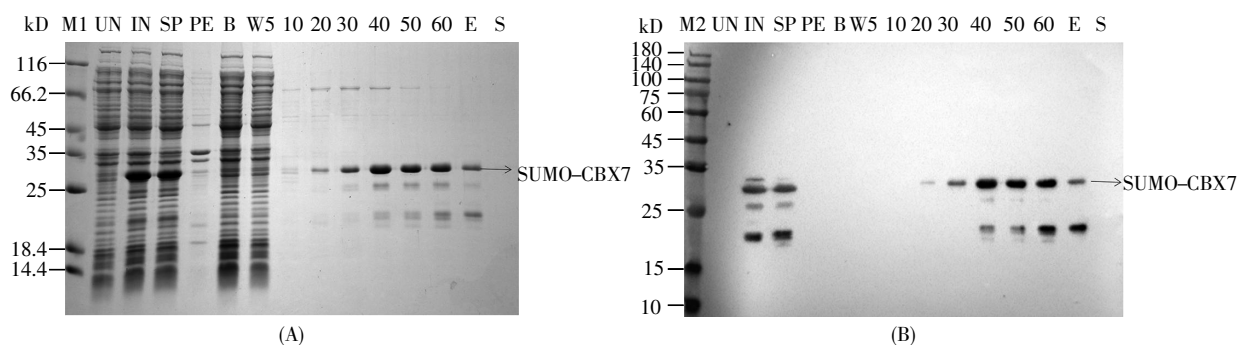


图4 经 Ni-NTA 亲和层析纯化后的 SUMO-CBX7 融合蛋白的 SDS-PAGE 与 Western-blot 分析

(A) 12% SDS-PAGE 电泳图; (B) Western-blot 图。M1: 蛋白质 marker BM525; M2: 蛋白质预染 marker; UN: 诱导前的样品; IN: 1 mmol/L IPTG 诱导后的样品; SP: 上清; PE: 沉淀; B: 过完两遍的上清; W5: 含 5 mmol/L 咪唑的洗脱穿液; 10-60: 分别为 10-60 mmol/L 咪唑浓度梯度的洗脱穿液; E: 250 mmol/L 咪唑的蛋白质收集液; S: 含 1 mol/L 咪唑的洗脱穿液。

Fig.4 SDS-PAGE and Western-blot analyses of SUMO-CBX7 protein purified by Ni-NTA affinity chromatography

(A) SDS-PAGE analysis in a 12% polyacrylamide gel; (B) Western-blot using 6*His-tag monoclonal antibody (ProteinTech). M1: Protein marker BM525; M2: Regular range protein marker; UN: Uninduced sample; IN: 1 mmol/L IPTG induced sample; SP: Supernatant of cell lysate; PE: Pellet of cell lysate; B: Binding flow through; W5: Washing flow through (5 mmol/L imidazole); 10-60: Washing flow through (10-60 mmol/L imidazole); E: Elution fraction (250 mmol/L imidazole); S: Strip flow through (1 mol/L imidazole).

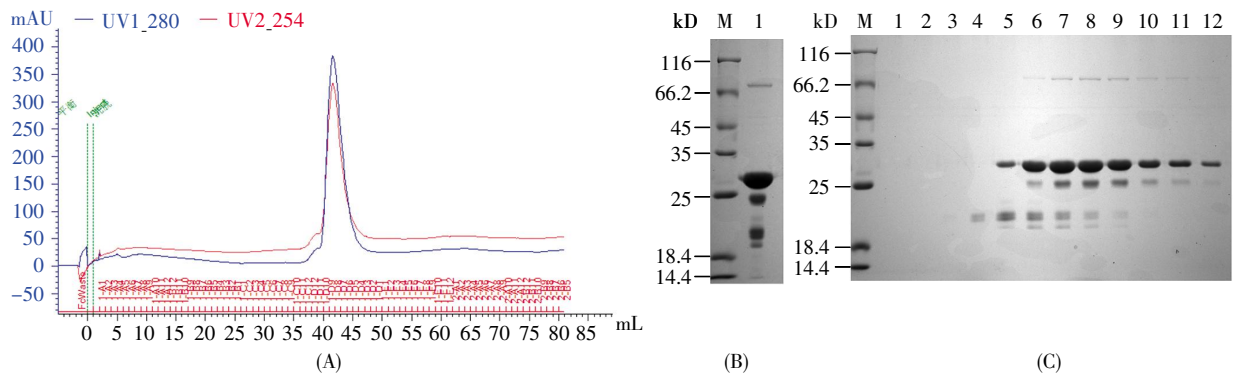


图 5 SUMO-CBX7 的离子交换层析纯化及鉴定分析

(A) SUMO-CBX7 离子交换层析纯化后的图谱。红线: UV254, 蓝线: UV280; (B) 上样留样的 12% SDS-PAGE 电泳图。M: 蛋白质 marker BM525, 1: 上样留样; (C) 出峰收集液 12% SDS-PAGE 电泳图。Lanes 1~12: 第 38~49 mL 收集液留样, M: 蛋白质 marker BM525。

Fig.5 Identification and purification of SUMO-CBX7 by ion exchange chromatography

(A) The anion exchange chromatogram of SUMO-CBX7. Red curve: UV254. Blue curve: UV280; (B) 12% SDS-PAGE analyses of the injection sample. M: Protein marker BM525. 1: Injection sample; (C) 12% SDS-PAGE analyses of the collected fraction corresponding to the peak. Lanes 1~12: The corresponding samples of the fractions 38~49. M: Protein marker BM525.

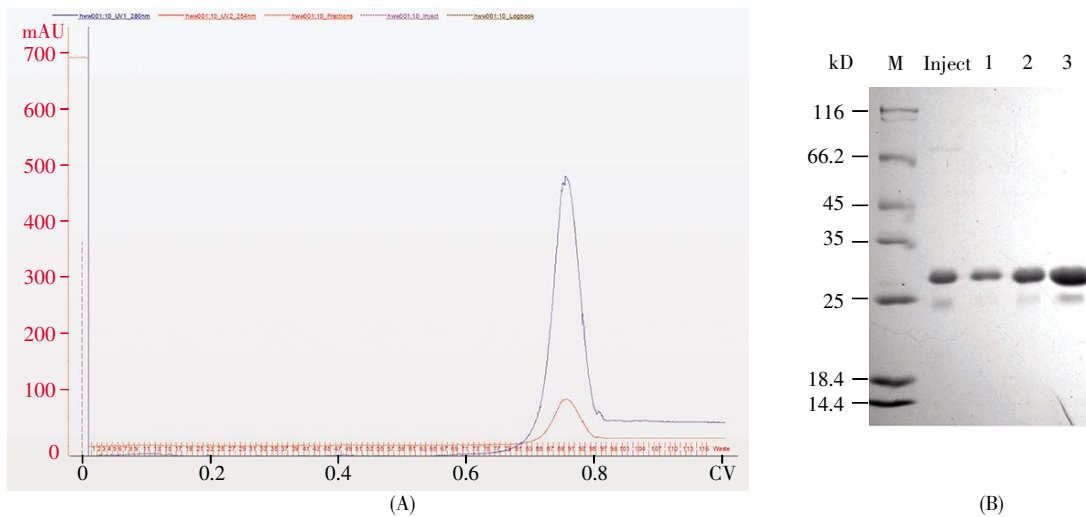


图 6 SUMO-CBX7 的分子筛层析纯化及鉴定分析

(A) SUMO-CBX7 的分子筛层析图谱。红线: UV254, 蓝线: UV280; (B) 上样留样的 12% SDS-PAGE 电泳图。M: 蛋白质 marker BM525; Inject: 上样留样; 1~3: 第 88~90 mL 收集液留样。

Fig.6 Identification and purification analyses of SUMO-CBX7 by size-exclusion chromatography

(A) The size-exclusion chromatography of SUMO-CBX7. Red curve: UV254. Blue curve: UV280; (B) 12% SDS-PAGE analyses of the injection sample. M: Protein marker BM525; Inject: Injection sample; Lanes 1~3: The corresponding samples of the fractions 88~90.

3 讨论

癌症被世界卫生组织(World Health Organization, WHO)列为世界五大疑难杂症之一。近日,世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)发布最新报告称近几年癌症发病率呈上升趋势,人口老龄化已成为细胞癌变的重要因素之一(https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf, 2018 年

10 月获取该信息)。PcG 蛋白是转录抑制因子,其调节着细胞增殖、细胞衰老、细胞凋亡、细胞癌变等关键发育和生理过程^[28],在人类癌症发生和发展中发挥重要作用。CBX7 作为 PcG 家族成员 PRC1 复合物的的重要组成部分之一,参与多种肿瘤抑制因子转录沉默机制,与不同类型恶性肿瘤的发生密切相关。最近研究表明,miR-19 通过抑制 CBX7 的表达而影响肺癌细胞的增殖、迁移和细胞周期^[29]。CBX7 在维持胚胎干细胞自我更新和全能性中发

挥重要作用,其表达随着小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的分化而减少:CBX7在ESCs中的过表达会增强ESCs的多能性,反之,CBX7的活性丧失,ESCs发生分化^[30]。CBX7是多梳谱系蛋白质中研究最为广泛的代表^[31],在细胞衰老和多种癌症类型中发挥着关键的调控作用,可作为癌症诊断和预后中的分子标志物。

然而, CBX7参与细胞增殖、衰老、干细胞分化和多种癌症类型的分子机制尚未明确。而且,除了已报道的CBX7蛋白C端Pc-box结构域和N端CD结合结构域的精细三维结构^[26-27]之外, CBX7其余部分的功能和结构仍是未解之谜。这对于CBX7相关的靶向药物研究极其不利。

本实验通过在线软件PSIPRED对人源CBX7蛋白的二级结构以及氨基酸序列无序分布进行预测(结果未给出),根据预测结果判断CBX7功能结构域边界。同时,结合在线软件PredictProtein预测显示的蛋白质结合区段170~198 aa,设计出包含该功能结构域的145~227 aa区段的引物。在此基础上,利用大肠杆菌SUMO体外表达系统高效可溶的特点,构建出CBX7功能结构域CBX7(aa 145~227)的重组表达载体。随后,通过Ni-NTA亲和层析对融合蛋白进行纯化,在Ni-NTA亲和层析分离杂质时,根据蛋白质性质选择合适的缓冲液pH以及盐浓度,可提高纯化效率。由于蛋白质样品的复杂性,需要结合离子交换和分子筛层析对其进行进一步的纯化。通过选择强阴离子预装柱HiTrap Q FF和分子筛层析柱Superdex200对目的融合蛋白和剩余杂质进行分离,最终获得高纯度可结晶的融合蛋白,可为后续结构生物学相关研究奠定基础。

虽然CBX7与癌症发生发展和干细胞全能性相关,并已成为CBX蛋白家族的研究热点,但是我们对CBX7(aa 145~227)片段知之甚少。目前,有关CBX7结构和功能的研究仍处于探索阶段。由于CBX7蛋白本身性质极不稳定,容易降解,且中段结构域可溶性差,所以利用pp-SUMO表达系统提高蛋白质可溶性表达并拿到结构域单体非常不易。我们通过纯化多达20个不同结构域片段,仅得到文中所述145~227 aa结构域单体。在所纯化的20个结构域片段中,有14个片段形成包涵体存在于沉淀中,即使对其进行变性、复性处理也不能够得到有活性的蛋白质;剩下可溶性较好部分全部出现不同程度降解或部分片段从目的

片段上断裂的现象,致使CBX7蛋白的纯化工作仍存在巨大挑战性。本实验通过对人类CBX7(aa 145~227)功能结构域的原核表达,不断改善纯化体系,首次成功获得稳定且高纯度的融合蛋白,可用于结晶。我们希望通过晶体学实验解析出该功能域的精细三维结构,并以此为突破点对该区段的分子学功能进行探索,分析其分子作用机理和结合位点,为后续人类CBX7全长结构研究和PRC1复合物精细三维结构及功能研究提供科学依据,同时为PcG家族蛋白在癌症治疗和肿瘤抑制靶向药物等领域中的研究提供新思路。

参考文献(References):

- [1] DI CROCE L, HELIN K. Transcriptional regulation by polycomb group proteins[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2013, 20(10): 1147-1155.
- [2] FORZATI F, FEDERICO A, PALLANTE P, *et al.* CBX7 is a tumor suppressor in mice and humans[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2012, 122(2): 612-623.
- [3] SCALFO A, PIUNTI A, PASINI D. The controversial role of the polycomb group proteins in transcription and cancer: how much do we not understand polycomb proteins[J]. *FEBS Journal*, 2015, 282(9): 1703-1722.
- [4] VAN VLERKEN L E, KIEFER C M, MOREHOUSE C, *et al.* EZH2 is required for breast and pancreatic cancer stem cell maintenance and can be used as a functional cancer stem cell reporter[J]. *Stem Cells Translational Medicine*, 2013, 2(1): 43-52.
- [5] RADULOVIC V, DE HAAN G, KLAUKE K. Polycomb-group proteins in hematopoietic stem cell regulation and hematopoietic neoplasms[J]. *Leukemia*, 2013, 27(3): 523-533.
- [6] RINGROSE L, PARO R. Epigenetic regulation of cellular memory by the polycomb and trithorax group proteins[J]. *Annual Review of Genetics*, 2004, 38: 413-443.
- [7] SURFACE L E, THORNTON S R, BOYER L A. Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment[J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 7(3): 288-298.
- [8] LIU S, DONTU G, MANTLE I D, *et al.* Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells[J]. *Cancer Research*, 2006, 66(12): 6063-6071.
- [9] NI S J, ZHAO L Q, WANG X F, *et al.* CBX7 regulates stem cell-like properties of gastric cancer cells via p16 and AKT-NF- κ B-miR-21 pathways[J]. *Journal of Hematology & Oncology*, 2018, 11: 2-14.
- [10] GUNSTER M J, RAAPHORST F M, HAMER K M, *et al.* Differential expression of human polycomb group proteins in various tissues and cell types[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2001, suppl. 36: 129-143.

- [11] PALLANTE P, FEDERICO A, BERLINGIERI M T, *et al.* Loss of the CBX7 gene expression correlates with a highly malignant phenotype in thyroid cancer[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(16): 6770–6778.
- [12] 关珊丽, 王健, 谢忆, 等. 多梳蛋白 CBX 家族在哺乳动物中结构与功能多样性的研究进展[J]. *中国科学: 生命科学(GUAN Shan-li, WANG Jian, XIE Yi, et al. Structural and functional diversity of mammalian CBX proteins[J]. Science Sinica Vitae)*, 2017, 47(8): 847–862.
- [13] LEVINE S S, KING I F, KINGSTON R E. Division of labor in polycomb group repression[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2004, 29(9): 478–485.
- [14] CAO R, WANG L, WANG H, *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb–group silencing[J]. *Science*, 2002, 298(5595): 1039–1043.
- [15] PALLANTE P, TERRACCIANO L, CARAFA V, *et al.* The loss of the CBX7 gene expression represents an adverse prognostic marker for survival of colon carcinoma patients[J]. *European Journal of Cancer*, 2010, 46(12): 2304–2313.
- [16] KARAMITOPOULOU E, PALLANTE P, ZLOBEC I, *et al.* Loss of the CBX7 protein expression correlates with a more aggressive phenotype in pancreatic cancer[J]. *European Journal of Cancer*, 2010, 46(8): 1438–1444.
- [17] FORZATI F, FEDERICO A, PALLANTE P, *et al.* Tumor suppressor activity of CBX7 in lung carcinogenesis[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(10): 1888–1891.
- [18] ZHANG X W, ZHANG L, QIN W, *et al.* Oncogenic role of the chromobox protein CBX7 in gastric cancer[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2010, 29: 114.
- [19] BERNARD D, MARTINEZ–LEAL J F, RIZZO S, *et al.* CBX7 controls the growth of normal and tumor–derived prostate cells by repressing the *Ink4a/Arf* locus[J]. *Oncogene*, 2005, 24(36): 5543–5551.
- [20] KLAUKE K, RADULOVIC V, BROEKHUIS M, *et al.* Polycomb Cbx family members mediate the balance between haematopoietic stem cell self–renewal and differentiation[J]. *Nature Cell Biology*, 2013, 15(4): 353–362.
- [21] NING G, HUANG Y L, ZHEN L M, *et al.* Transcriptional expressions of chromobox 1/2/3/6/8 as independent indicators for survivals in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Aging*, 2018, 10(11): 3450–3473.
- [22] HU Q, WU W, ZENG A, *et al.* Polycomb group expression signatures in the malignant progression of gliomas[J]. *Oncology Letters*, 2017, 13(4): 2583–2590.
- [23] YAP K L, LI S, MUNOZ–CABELLO A M, *et al.* Molecular interplay of the noncoding RNA *ANRIL* and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of *INK4a*[J]. *Molecular Cell*, 2010, 38(5): 662–674.
- [24] BILGIÇ F, GERÇEKER E, ÖRENAY BOYACI OĞLU S, *et al.* Potential role of chromatin remodeling factor genes in atrophic gastritis/gastric cancer risk[J]. *Turkish Journal of Gastroenterology*, 2018, 29: 427–435.
- [25] LIU H, LI Z, LI L. The molecular selectivity of UNC3866 inhibitor for Polycomb CBX7 protein from molecular dynamics simulation[J]. *Computational Biology and Chemistry*, 2018, 74: 339–346.
- [26] WANG R, TAYLOR A B, LEAL B Z, *et al.* Polycomb group targeting through different binding partners of RING1B C–terminal domain[J]. *Structure*, 2010, 18(8): 966–975.
- [27] KAUSTOV L, OUYANG H, AMAYA M, *et al.* Recognition and specificity determinants of the human Cbx chromodomains[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(1): 521–529.
- [28] WANG W, QIN J J, VORUGANTI S, *et al.* Polycomb group (PcG) proteins and human cancers: multifaceted functions and therapeutic implications[J]. *Medicinal Research Reviews*, 2015, 35(6): 1220–1267.
- [29] PENG X, GUAN L, GAO B. miRNA–19 promotes non–small–cell lung cancer cell proliferation via inhibiting CBX7 expression[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2018, 11: 8865–8874.
- [30] MOREY L, PASCUAL G, COZZUTO L, *et al.* Nonoverlapping functions of the polycomb group Cbx family of proteins in embryonic stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(1): 47–62.
- [31] SIMHADRIC C, DAZE K D, DOUGLAS S F, *et al.* Chromodomain antagonists that target the polycomb–group methyllysine reader protein chromobox homolog 7 (CBX7)[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 57(7): 2874–2883.