

文章编号:1674-2974(2016)06-0104-05

# 人 FOXA1 蛋白的原核表达、纯化及蛋白互作分析\*

谭拥军<sup>†</sup>, 陈竹林, 陈团辉, 向 勤

(湖南大学 生物学院, 湖南长沙 410082)

**摘要:**构建 FOXA1 的原核表达载体,诱导表达并纯化后获得人 FOXA1 的 C 端和 N 端蛋白片段,为寻找 FOXA1 的互作蛋白提供材料基础.提取人乳腺癌细胞 MCF7 的总 RNA,逆转录成 cDNA,设计引物 PCR 克隆 FOXA1 的 cDNA,再以此为模板扩增 FOXA1 的 C 端、N 端 cDNA 片段,分别并克隆进带有 GST 标签的原核表达载体 pGEX-4T-1,构建重组表达质粒.双酶切及测序鉴定正确后,转化至大肠杆菌 BL21 Rosetta DE3,经 IPTG 诱导,Glutathione Sepharose 4B 亲和纯化,通过 SDS-PAGE 电泳及 Western blot 确定 FOXA1 蛋白的表达.与 MCF7 细胞裂解液孵育,进行 GST-Pull down 试验,检测纯化蛋白与 FOXA1 已知互作蛋白 TLE3 的相互作用.成功构建 pGEX-4T-1-FOXA1-C 和 pGEX-4T-1-FOXA1-N 的原核表达载体;在大肠杆菌中诱导目的蛋白表达;经 Glutathione Sepharose 4B 纯化后,获得了人 FOXA1 的 C 端蛋白片段 GST-FOXA1-C 与 N 端蛋白片段 GST-FOXA1-N;证实 GST-FOXA1-C 能与 FOXA1 已知互作蛋白 TLE3 的相互作用.

**关键词:**转录因子 FOXA1;原核表达;相互作用蛋白

**中图分类号:**Q786

**文献标识码:**A

## Prokaryotic Expression, Purification, and Protein-interaction Analysis of Human FOXA1 Protein

TAN Yong-jun<sup>†</sup>, CHEN Zhu-lin, CHEN Tuan-hui, XIANG Qin

(College of Biology, Hunan Univ, Changsha, Hunan 410082, China)

**Abstract:** To identify proteins interacting with transcription factor FOXA1, different prokaryotic expression vectors for human FOXA1 protein were constructed and the proteins of FOXA1 C-terminus and FOXA1 N-terminus were purified. They provided a material foundation for future studies of FOXA1-interacted proteins. Total RNAs were extracted from human breast cancer MCF7 cells and reverse transcribed into cDNAs. The full length cDNA of FOXA1 was amplified by PCR, and the C-terminal and N terminal segments were also amplified respectively. The different FOXA1 cDNA fragments were cloned into a prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The correct vectors were confirmed by double restriction enzyme digestion and DNA sequencing and transformed into E. coli BL21 Rosetta DE3. The FOXA1 proteins were purified with Glutathione Sepharose 4B and analyzed through SDS-PAGE electrophoresis and Western blot. GST Pull-down experiments were performed with lysates of MCF7 cells and FOXA1 proteins to test

\* 收稿日期:2015-08-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472718), National Natural Science Foundation of China(81472718)

作者简介:谭拥军(1967-),男,湖南长沙人,湖南大学教授,博士生导师

<sup>†</sup> 通讯联系人, E-mail: yjtan@hnu.edu.cn

the interaction between FOXA1 and a known FOXA1-interacted protein TLE3. Prokaryotic expression vectors of pGEX-4T-1-FOXA1-C and pGEX-4T-1-FOXA1-N were constructed successfully. The proteins of FOXA1 C-terminus (GST-FOXA1-C) and FOXA1 N-terminus (GST-FOXA1-N) were purified by Glutathione Sepharose 4B. It was confirmed that the purified GST-FOXA1-C was able to interact with the known FOXA1-interacted protein TLE3 in the Pull-down experiment.

**Key words:** transcription factor FOXA1; prokaryotic expression; interaction protein

转录因子 FOXA1 属于叉头框(Forkhead Box, Fox)转录因子家族的 FOXA 亚家族<sup>[1]</sup>. FOX 基因广泛地分布于从酵母到人的各种真核生物中,构成一个庞大的转录因子家族. 其中在哺乳动物中就拥有 40 个以上成员,分别参与细胞分化、增殖、代谢及细胞凋亡等生理过程的调节<sup>[2]</sup>. FOXA1 是该家族最早被克隆的成员<sup>[3]</sup>.

FOXA1 蛋白介导许多蛋白的相互作用,调节发育、代谢和肿瘤的发生. FOXA1 的功能区域由 DNA 结合区和转录激活区构成. 作为先锋转录因子,FOXA1 的羧基端能与核心组蛋白 H3, H4 相互作用<sup>[4]</sup>加强了 FOXA1 蛋白与核小体的结合能力. 有研究表明转录因子 FOXA1 羧基端的转录激活区可以招募 TLE3/GRG3 结合到染色质上<sup>[5]</sup>. 而 FOXA1 DNA 结合区可以干扰转录因子 NKX2.1 与 DNA 的结合功能从而抑制 NKX2.1 转录复合物的形成,抑制脑肺和甲状腺的发育<sup>[6]</sup>. 此外,FOXA1 的 DNA 结合区还介导 FOXA1 与雄激素受体(AR)的相互作用<sup>[7]</sup>,而在乳腺癌细胞株中,雌激素的应答在一定程度上依赖于 FOXA1 的表达<sup>[8-9]</sup>.

为了进一步研究 FOXA1 在细胞中扮演的角色,本研究通过基因工程技术体外构建表达载体,诱导可溶性融合蛋白 GST-FOXA1-C 和 GST-FOXA1-N 的高效表达并亲和纯化. 利用 GST-Pull down 技术,在乳腺癌细胞 MCF7 中证实 GST-FOXA1-C 可与已知的 FOXA1 结合蛋白 TLE3 发生相互作用,证明纯化蛋白结构正确且能与其互作蛋白发生互作,为进一步寻找 FOXA1 的互作蛋白提供材料基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种、质粒、细胞系

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受(北京鼎国),大肠杆菌 BL21 Rosetta (DE3)感受态(广州百恩维),质粒 pGEX-4T-1 由本实验室保存,乳腺癌细胞 MCF7 为本实验室冻存.

### 1.2 主要试剂

限制性内切酶 BamHI, XhoI, T4 DNA 连接酶均购自 Fermentas 公司, M-MLV 逆转录酶购于 Promega 公司, DNA 高保真聚合酶购于 TOYOBO 公司, PCR 引物由上海生工生物公司合成, Glutathione Sepharose 4B 购于 GE, GST 抗体购于碧云天, V5 抗体购于 Millipore 公司.

### 1.3 重组质粒 pGEX-4T-1-FOXA1-N, pGEX-4T-1-FOXA1-C 的构建及其鉴定

根据 NCBI 检索到的人源 FOXA1 的 cDNA 序列以及空载体 pGEX-4T-1 的多克隆位点确定 FOXA1 的上下游引物如表 1 所示. 上游引物为 CCC GGA TCC ATG TTA GGA ACT GTG AAG, 下划线为 BamH I 酶切位点, 下游引物为 CGC TCT AGA GGA AGT GTT TAG GAC GGG, 下划线为 EcoR I 酶切位点. 以人的乳腺癌细胞 MCF7 提取细胞总 RNA, 逆转录成 cDNA, 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增条件为 94 °C 2 min ; 98 °C 10 s, 68 °C 90 s, 68 °C 10 min, 32 个循环. 将 PCR 产物克隆入 pGEX-4T-1 质粒中, 双酶切鉴定后送上海生工测序. 以测序正确的 pGEX-4T-1-FOXA1 为模板, FOXA1-C 上游引物 GCG CGA ATT CAA CCA CCC GTT CTC CAT CAA, FOXA1-C 下游引物 GCG CCT CGA GTC ATT GGT AGT ACG CCG GCT CCA G; FOXA1-N 上游引物 GCG CGA ATT CAT GTC CTA GGC CAA CCC GG, FOXA1-N 下游引物 GCG CCT CGA GCT AGG CGT GCG GGT AGC TGC GC. 分别克隆 FOXA1 的 C 端(第 397 到第 461 个氨基酸)、N 端(第 66 到第 218 个氨基酸).

表 1 质粒克隆引物

Tab. 1 Primer of plasmid construction

引物名	正向引物	反向引物
hFOXA1	CCCGGATCCATGTTAG-GAACT GTG AAG	CCCGGATCCCTAG-GAAGTGTTTAGGACGG
hFOXA1-C	GCGCGAATTCAACCAC-CCGTTCTCCATCAA	GCGCCTCGAGTCATTG-GTAGTACGCCGGCTC-CAG
hFOXA1-N	GCGCGAATTCATGTC-CTAGGCCAACCCGG	GCGCCTCGAGCTAG-GCGTGCGGGTAGCT-GCCG

### 1.4 GST-FOXA1-C, GST-FOXA1-N 融合蛋白的纯化及其鉴定

将测序正确的 pGEX-4T-1-FOXA1-N, pGEX-4T-1-FOXA1-C 转化入 BL21 Rosetta DE3 感受态细胞,挑取阳性单克隆,加入含有氨苄青霉素和氯霉素的 LB 培养基中,37 °C,培养至 OD 值在 0.6~1.0 之间,加入终浓度为 0.8 mmol/L IPTG,32 °C 诱导 4 h 后收集菌液,溶菌酶酶解 30 min,超声破碎,取上清加入 GST-beads 室温孵育 30 min 后,加入 Elution Buffer 洗脱,收集洗脱后的蛋白,考染和免疫印迹鉴定。

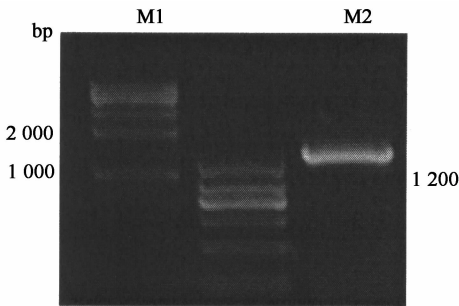
### 1.5 GST pull down

MCF-7 细胞培养至 60%~90% 时,脂质体转染带 V5 标签的 TLE3 真核表达质粒,48 h 后收集转染后的细胞,加入 500 μL IP 裂解液冰上裂解 1 h,13 000 r/min,4 °C,离心 15 min,收集上清,即为总的细胞裂解液.向收集的细胞裂解液中加入 20 μL GST-beads,4 °C,孵育 2 h,离心收集上清,一分为二,分别加入 20 μL GST-beads 和纯化后的 GST-FOXA1-C, GST-FOXA1-N 蛋白,4 °C 旋转结合 2 h,4 000 r/min 离心收集珠子,用预冷的 GST Lysis Buffer 漂洗 3 次,加入 Elution Buffer 洗脱,收集洗脱后的蛋白,进行考染和免疫印迹鉴定。

## 2 结 论

### 2.1 人 FOXA1 基因全长的扩增

MCF7 细胞 RNA 的提取按照 Total RNA KitI 试剂盒(Omega, USA)进行,运用 M-MLV 逆转录酶(Invitrogen, USA)将 RNA 反转录为 cDNA.通过 NCBI 查询人 FOXA1 的 cDNA 序列设计一对引物,再以 cDNA 为模板 PCR 扩增人的 FOXA1 全长(图 1)所示,通过 PCR 扩增出来的 FOXA1 cDNA 大小为 1 400 bp 左右,与 NCBI 查询的大小基本一致。



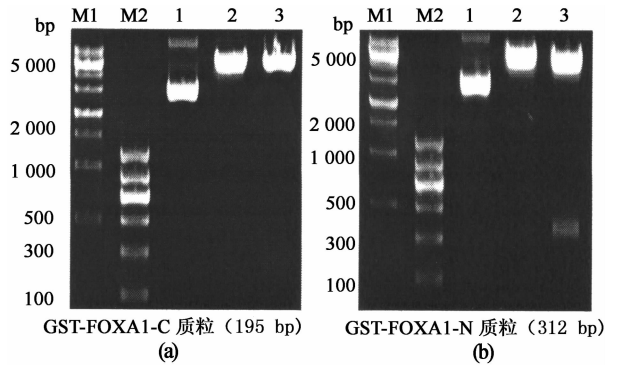
M1: DNA Maker; M2: DNA Maker; 1: 人 FOXA1 全长的 PCR 产物(1 416 bp)

图 1 人 FOXA1 全长的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of full-length human FOXA1

### 2.2 重组质粒 pGEX-4T-1-FOXA1-N, pGEX-4T-1-FOXA1-C 的构建

再以此为模板扩增 FOXA1-C/FOXA1-N,大小分别为 196 kb, 459 kb,与预期大小一致.将 PCR 克隆获得的片段克隆至表达载体 PGEX-4T-1,进行双酶切鉴定如图 2 所示.我们已经讨论了 FOXA1 的结构域蛋白在生物体内发挥了重要作用,为了进一步研究其在生物体内的功能,所以克隆出人 FOXA1 的羧基端和氨基端蛋白,为后续试验奠定材料基础。



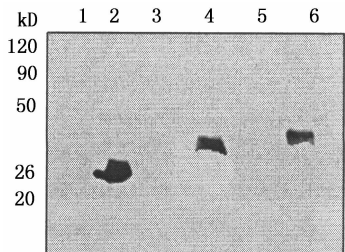
(a): M1: DNA Maker; M2: DNA Maker; 1: GST-FOXA1-C; 2: GST-FOXA1-C 单酶切; 3: GST-FOXA1-C 双酶切. (b): M1: DNA Maker; M2: DNA Maker; 1: GST-FOXA1-N; 2: GST-FOXA1-N 单酶切; 3: GST-FOXA1-N 双酶切

图 2 重组表达质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion by PCR GST-FOXA1-C/GST-FOXA1-N

### 2.3 GST-FOXA-C 及 GST-FOXA1-N 融合蛋白的表达及鉴定

将 pGEX-4T-1, pGEX-4T-1-FOXA1-N, pGEX-4T-1-FOXA1-C 3 个质粒分别转化进 BL21 Rosetta DE3 感受态细胞,挑取阳性克隆大规模培养,经 IPTG 诱导后,收集菌液,Western blot 法检测显示, GST-FOXA-C 及 GST-FOXA1-N 融合蛋白均能有效表达(图 3)。



1: Maker; 2: GST 蛋白; 3: GST-FOXA1-C 诱导前; 4: GST-FOXA1-C 诱导后; 5: GST-FOXA1-N 诱导前; 6: GST-FOXA1-N 诱导后

图 3 融合蛋白的免疫印迹分析

Fig. 3 Fusion protein immunoblot analysis

## 2.4 GST-FOXA-C 与 GST-FOXA1-N 融合蛋白的纯化

将 pGEX-4T-1, pGEX-4T-1-FOXA1-N, pGEX-4T-1-FOXA1-C 3 个质粒分别转化进 BL21 Rosetta DE3 感受态细胞, 挑取阳性克隆大规模培养, 经 IPTG 诱导后, 收集菌液, 酶解, 超声破碎. 上清用 GST-Sepharose4B 亲和珠纯化后, 经考马斯亮蓝染色结果显示, 虽出现不同程度的降解, 但均能有效地获得较高浓度的目的 GST-FOXA-C 及 GST-FOXA1-N 融合蛋白(图 4).

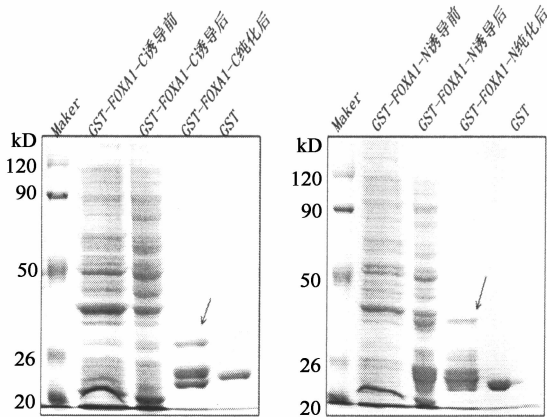
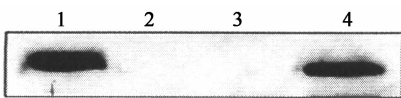


图 4 GST-FOXA1-C 和 GST-FOXA1-N 融合蛋白的纯化及考马斯亮蓝染色

Fig. 4 GST-FOXA1-C and GST-FOXA1-N fusion protein purification and Coomassie blue staining

## 2.5 GST-pull down 结果分析

将带有 GST-FOXA1-C 与 GST-FOXA1-N 融合蛋白的珠子与过表达的 V5-TLE3 蛋白的 MCF7 细胞裂解液孵育后, 用 V5 抗体进行 Western blot 法检测(图 5)结果显示, GST-FOXA1-C 融合蛋白可以与 TLE3 蛋白发生结合, 而 GST 蛋白和 GST-FOXA1-N 融合蛋白在同一位置无此条带, 说明 FOXA1-C 端蛋白结构域能够有效的与 TLE3 蛋白特异地相互作用, 具有与 FOXA1 全长蛋白部分相似的生物学功能.

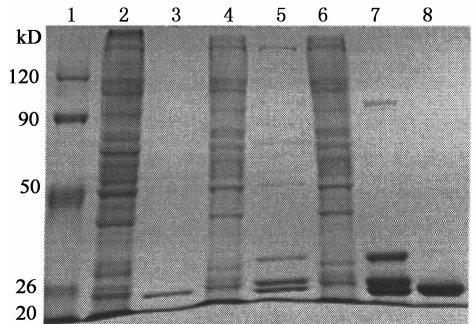


1: 过表达 V5-TLE3 蛋白的 MCF7 细胞裂解物(Input); 2: GST 蛋白与 Input 孵育后的 Pull down 产物; 3: GST-FOXA1-N 融合蛋白与 Input 孵育后的 Pull down 产物; 4: GST-FOXA1-C 融合蛋白与 Input 孵育后的 Pull down 产物

图 5 Pull down 产物 Western blot 分析  
Fig. 5 Pull down analysis of SDS-PAGE and Western blot analysis of the product

## 2.6 Pull down 结果的考马斯亮蓝分析

将带有 GST-FOXA1-C 融合蛋白的珠子与 MCF7 细胞裂解液孵育后, 同时用 GST 蛋白与 MCF7 细胞裂解液孵育的结果作为对照, 再用洗脱液将 Pull down 产物洗脱下来, 经考马斯亮蓝染色发现, GST-FOXA1-C 融合蛋白能够拖下许多与 FOXA1-C 端相结合的互作蛋白, 从而为后面的实验奠定材料基础(图 6).



1: Protein Maker; 2: Input; MCF7 cell lysis; 3: 对照组 GST Pull down 洗脱产物; 4: 对照组 GST Pull down 上清; 5: 实验组 GST-FOXA1-C Pull down 洗脱产物; 6: 实验组 GST-FOXA1-C 洗脱上清; 7: GST-FOXA1-C 蛋白; 8: GST 蛋白

图 6 GST-FOXA1-C 融合蛋白 Pull down 结果的考马斯亮蓝分析

Fig. 6 GST-FOXA1-C fusion protein Pull down analysis of SDS-PAGE of the product

## 3 讨论

GST Pull down 技术是体外确定两个已知蛋白是否相互作用以及筛选与已知融合蛋白相互作用的未知蛋白的有效方法. 本实验成功构建 GST-FOXA1 结构域蛋白的表达载体, 这种构建基因的某一段的结构域蛋白研究其生物学功能并不少见, 有文章报道过构建转录因子 FOXO 基因的结构域蛋白研究它与目的蛋白的甲基化作用<sup>[10]</sup>. 再摸索诱导条件后以比较优化的条件诱导出 GST-FOXA1-C 和 GST-FOXA1-N 融合蛋白, 作为后续试验的诱饵蛋白. 将高表达 V5-TLE3 的 MCF7 细胞裂解液与 GST-FOXA1-C 诱饵蛋白以最佳时间孵育后, 成功捕捉与其已知的结合蛋白 TLE3, 证实实验制备的融合蛋白具有生物活性. 随后再次在 MCF7 裂解液中以 GST-FOXA1-C 为诱饵蛋白进行 GST Pull down, 将产物进行 SDS-PAGE 后考马斯亮蓝染色发现成功捕捉到相互作用的蛋白.

FoxA1 是 Fox 转录因子家族中的一员, 该转录因子属于“螺旋-转角-螺旋”类蛋白的一个亚群. Fox

家族蛋白功能涉及胚胎发育、细胞周期调控、糖类和脂类代谢、生物老化、免疫调节等多种生物学过程,其突变和表达异常与发育畸形、代谢性疾病以及肿瘤发生有关<sup>[11-12]</sup>。已有文章得出结论 FOXA1 与 TLE3 在乳腺癌中相互作用,本文通过进行 GST Pull down 成功验证这一结论并证实制备的蛋白具有生物活性。

TLE 基因最早在 1968 年被发现,现已知的家族成员共有 19 个<sup>[13]</sup>,是典型的转录辅助抑制因子家族蛋白。在哺乳动物中,它包括 TLE(transducin-like enhancer of split)1~4(人类)。Gro / TLE 蛋白家族不能直接与 DNA 结合,而是被各种不同类型的转录因子所招募<sup>[14]</sup>。有研究证实转录因子 FOXA1 羧基端的转录激活区可以招 TLE3/GRG3 结合到染色质上。本实验通过利用 GST-FOXA1-C 与 TLE3 的体外相互作用验证两者相互作用。

乳腺癌现已成为人类的一大杀手,越来越多的研究证明 FOXA1 在乳腺癌中发挥了重要的作用,使其有望成为肿瘤治疗的新靶点<sup>[15-16]</sup>。本文成功克隆了人的 FOXA1,FOXA1-C,FOXA1-N 基因并获得有活性的人 FOXA1-C 和 FOXA1-N 蛋白,为后续进一步寻找 FOXA1 的互作蛋白和制备抗体奠定了良好的基础。

## 参考文献

- [1] KAESTNER K H, KNOCHEL W, MARTINEZ D E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors[J]. *Genes Dev*, 2000, 14(2): 142-146.
- [2] HANNENHALLI S, KAESTNER K H. The evolution of fox genes and their role in development and disease[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(4): 233-240.
- [3] LAI E. HNF-3A, a hepatocyte-enriched transcription factor of novel structure is regulated transcriptionally[J]. *Genes Dev*, 1990, 4(8): 1427-1436.
- [4] CIRILLO L A. Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4[J]. *Mol Cell*, 2002, 9(2): 279-289.
- [5] SEKIYA T, ZARET K S. Repression by Groucho/TLE/Grg proteins; genomic site recruitment generates compacted chromatin in vitro and impairs activator binding in vivo[J]. *Mol Cell*, 2007, 28(2): 291-303.
- [6] MINOO P. Physical and functional interactions between homeodomain NKX2.1 and winged helix/forkhead FOXA1 in lung epithelial cells[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(6): 2155-2165.
- [7] GAO N. The role of hepatocyte nuclear factor-3 alpha (Forkhead Box A1) and androgen receptor in transcriptional regulation of prostatic genes[J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(8): 1484-1507.
- [8] CARROLL J S. Chromosome-wide mapping of estrogen receptor binding reveals long-range regulation requiring the forkhead protein FOXA1[J]. *Cell*, 2005, 122(1): 33-43.
- [9] LUPIEN M. FOXA1 translates epigenetic signatures into enhancer-driven lineage-specific transcription[J]. *Cell*, 2008, 132(6): 958-70.
- [10] YAMAGATA K. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2): 221-231.
- [11] TAN Y, RAYCHAUDHURI P, COSTA R H. Chk2 mediates stabilization of the FoxM1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27(3): 1007-1016.
- [12] LEHMANN O J. Foxs in development and disease[J]. *Trends Genet*, 2003, 19(6): 339-344.
- [13] CHEN G, COUREY A J. Groucho/TLE family proteins and transcriptional repression[J]. *Gene*, 2000, 249(1/2): 1-16.
- [14] FISHER A L, CAUDY M. Groucho proteins: transcriptional corepressors for specific subsets of DNA-binding transcription factors in vertebrates and invertebrates[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(13): 1931-1940.
- [15] CANCER Genome Atlas N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours[J]. *Nature*, 2012, 490(7418): 61-70.
- [16] LEHMANN B D. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(7): 2750-2767.