研究简报

DOI号: 10.3724/SP.J.0000.2009.40762

鳜肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体 Trail基因的原核表达

高 原　昌鸣先　聂 品
(中国科学院水生生物研究所,淡水生态与生物技术国家重点实验室,武汉　430072)

PROKARYOTIC EXPRESSION OF MANDARIN FISH TUMOR RELATED APOPTOSIS INDUCING LIGAND GENE

GAO Yuan, CHANG Ming-Xian and NIE Pin
(*State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan* 430072)

关键词:鳜; TRAIL;原核表达;多克隆抗体
Key words: Mandarin fish; TRAIL; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody
中图分类号: Q781　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 1000-3207(2009)04-0762-05

肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(Tumor related apoptosis inducing ligand, TRAIL),亦称 Apo-2L,是由 Wiley, *et al* 在 1995年搜索 EST数据库时首次发现并成功克隆的,是继 TNF和 FasL之后发现的第三个 TNF家族的凋亡分子[1]。哺乳动物的 TRAIL在很多正常的组织中都能表达,尤其是在脾脏、前列腺和肺中。此外,TRAIL蛋白还具有可特异性的诱导肿瘤细胞的凋亡,而对正常细胞无杀伤作用的特点。这种有效选择性为肿瘤的生物治疗开辟了新的前景[1,2]。目前,有关 TRAIL的研究主要集中在人、鼠等高等脊椎动物的凋亡途径以及抗肿瘤功能方面,鱼类中相关研究尚不多见。至今仅见草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、鳜鱼(*Siniperca chuatsi*) *Trail*基因的相关研究[3,4]。鳜是我国一种重要的淡水养殖对象,但是各种疾病的发生严重影响着其产量[5,6]。免疫防治是控制疾病的重要途径。目前对鳜免疫学的研究已经在免疫球蛋白和一些非特异性免疫因子的克隆方面展开[7—9]。本文对鳜 *Trail*基因完整的开放阅读框以及鳜 *Trail*推断的活性部位(第 84—283氨基酸)进行了克隆,并将整个开放阅读框以及推断的活性部位的片断重组在原核表达载体 pET-32a上,于大肠杆菌中进行了高效表达,这些研究为制备鳜 TRAIL的多克隆抗体奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材　料

1.1.1 实验鱼　鳜购自武汉牛山湖渔场,试验进行前在池中暂养两周,每日投喂活泥鳅,水温保持在(23 ±2) ℃。

1.1.2 试剂　TRIzol Reagents试剂、逆转录酶试剂购自 Invitrogen公司; DEPC、DNase Ⅰ、*ExTaq*酶、DNA marker、T4连接酶均购自 TaKaRa公司; PCR引物由上海华诺公司合成;质粒提取试剂盒、PCR胶回收试剂盒购自 Promaga公司;融合表达载体 pET-32a购自 Novagen公司; DH-5α、Rosetta-gami DE3为本室保种;限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Xho*Ⅰ、*Bam*HⅠ和 *Hin*d III购自 TaKaRa公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 组织总 RNA的提取　取活鳜的头肾组织放入液氮中,后取出加入预冷的 TRIzol提取液,按照说明书步骤提取组织总 RNA。所得的 RNA溶解于 DEPC处理水中,迅速进行逆转录,以获得鳜 Smart cDNA,逆转录方法按照说明书进行。

1.2.2 鳜 TRAIL原核表达载体的构建　根据鳜 *Trail*的全长 cDNA序列(登录号: AY839276)[4],利用 primer5.0软件设计引物。用引物 TRAILexpF和 TRAILexpR扩增已获得的 *ScTrail* cDNA序列上的开放阅读框。*ScTrail*基因的上游引物序列 TRAILexpF 为 ATTGTGAATTCGGCGGGTCGGTCGG-

收稿日期: 2007-10-11;**修订日期**: 2008-09-19
基金项目:中国科学院"百人计划"项目([2005]192)资助
作者简介:高原(1979—),女,湖北襄樊人;博士;研究方向为鱼类免疫学
通讯作者:聂品, E-mail: pinnie@ihb.ac.cn

TATG,下游引物序列 TRAILexpR为 CTGCGCTCGAGGAGTC-CTGCGTCTGATC,分别含有 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点(用下划线表示)以及起始密码子(用黑体表示)。终止密码子已经包含在 PCR扩增的片断中。以鳜的 Smart cDNA为模板,进行 RT-PCR来获得目的片断,反应条件为:94℃预变性 5min;94℃变性 30s,60℃退火 30s,72℃延伸 1min,共 30个循环;72℃再延伸 7min。PCR扩增产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。按照 Omega公司的质粒提取试剂盒的说明书来提取 pET-32a的质粒。同时用 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ两种酶分别酶切上述 PCR得到的 *ScTrail*基因和 pET-32a表达载体质粒,用 1%琼脂糖电泳并纯化回收后,用 T4连接酶连接 8h以上,将连接产物转化于大肠杆菌宿主菌(DE3)中,PCR鉴定阳性菌落后送公司测序(图 1)。

用引物 F12和 R12[4]扩增鳜 TRAIL推断的活性部位。采用与上述同样的方法构建原核表达的重组质粒 pET32a-sScTRAIL(图 2)。

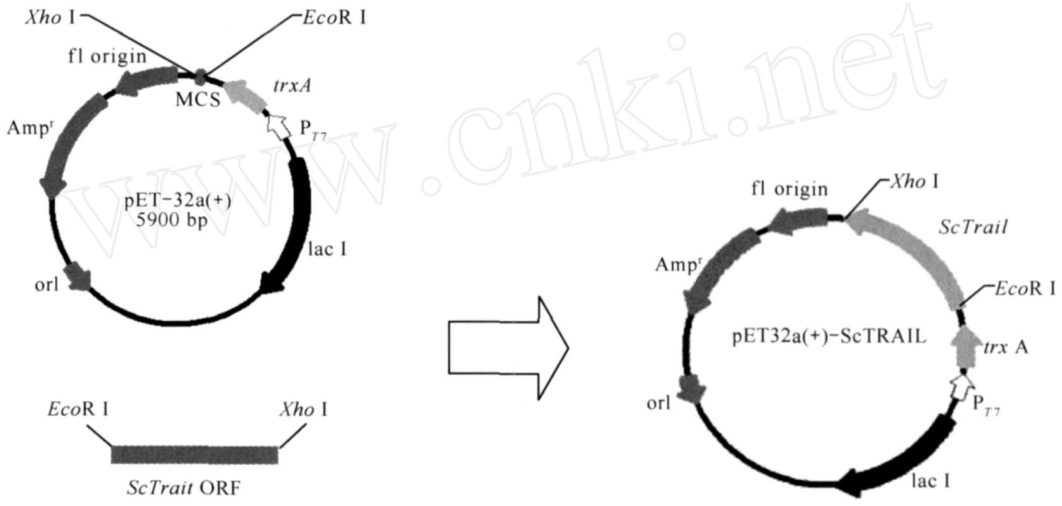


图 1　重组原核表达质粒 pET32a(+)-ScTRAIL 的构建

Fig. 1　The flow chart of recombined plasmid pET32a(+)-ScTRAIL construction

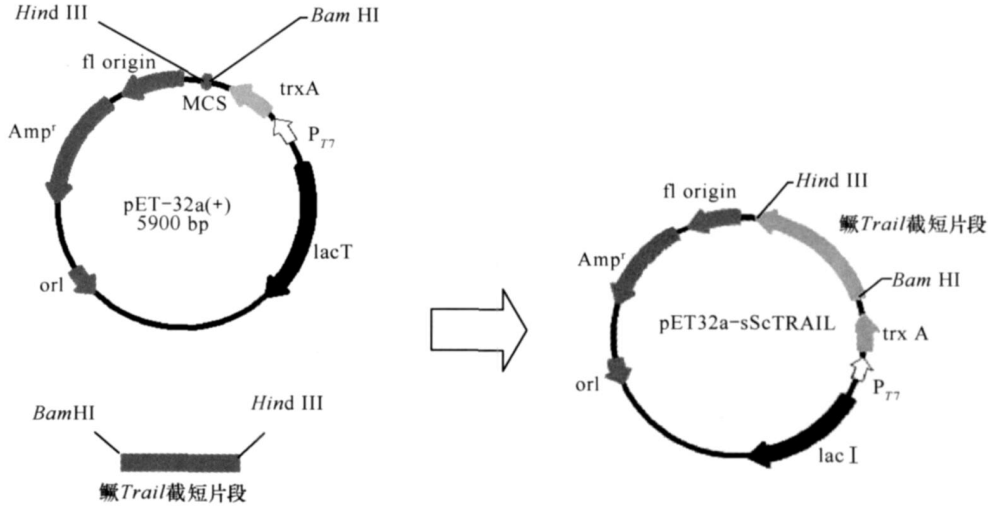


图 2　重组质粒 pET32a-sScTRAIL 的构建

Fig. 2　The flow chart of recombined plasmid pET32a-sScTRAIL construction

1.2.3　重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE鉴定　将测序正确的阳性菌液重新接种于含氨苄青霉素(Ampicillin)100μg/mL、卡那霉素(Kanamycin)15μg/mL、四环素(Tetracycline)12.5μg/mL、氯霉素(Chloramphenicol)34μg/mL的 LB培养液(以含空载体的细胞设立空白对照)。对于表达完全阅读框的重组质粒 pET32a-ScTRAIL,分别在 37℃和 25℃,150r/min条件下培养至 OD_{600}为 0.6左右时,取出 1mL作为阴性对照。诱导组加异丙基硫代 β-半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1mmol/L,然后继续以相同培养条件培养,分别取诱导 2h和 4h收集的诱导组菌液。收集的菌液经离心后进

行超声破碎,分别收集上清和沉淀,通过 SDS-PAGE电泳对表达产物进行分析。对于表达鳜 TRAIL推断活性部位的重组质粒 pET32a-sScTRAIL,经 IPTG在 25℃诱导 8h后,分别收集上清和沉淀,通过 SDS-PAGE电泳对表达产物进行分析。

1.2.4 鳜 TRAIL融合蛋白 Western blot检测 在确定最佳诱导条件后,诱导表达鳜 TRAIL蛋白,分别将超声破碎后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE。然后将其转移至硝酸纤维素膜上,用鼠抗 6组氨酸的单抗为一抗,二抗为碱性磷酸酶耦联的山羊抗鼠 IgG与之反应,各步骤之间用含 0.05% Tween的 TBS清洗膜 3次,每次 5min,最后用 nitroblue tetrazolium chloride and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (NBT/BCIP)显色。

1.2.5 鳜 TRAIL活性蛋白的过柱纯化 根据 Novagen pET系统操作手册,利用多聚组氨酸 (His)标签融合蛋白纯化树脂 (His-Bind Resin, Novagen)对鳜重组质粒 pET32a-sScTRAIL表达的可溶蛋白进行纯化。在诱导表达大量目的蛋白后,4℃下 10000 r/min离心 5min弃上清,向细菌沉淀中加入 4℃用冰预冷的 1 ×Ni-NTA 结合缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L咪唑, pH8.0),每 100 mL培养液加入 4 mL结合缓冲液,重悬菌体。 -40℃冷冻,室温溶解,反复冻融三次。再在冰水浴中超声 10min (10w,超声 10s, 间隔 10s),破碎菌体。4℃下 10000 r/min离心 20min,保留上清液。

将树脂充分重悬,取 4 mL悬液加到 10 mL沉降柱 (Gravity column)中,树脂自然沉降后,加 1 ×Ni-NTA结合缓冲液洗两次。将菌体上清液加到处理好的树脂中,4℃轻柔混匀,结合 2h。树脂自然沉降后,打开沉降柱下端的管帽,让缓冲液缓慢流出。液体流完后,加 1 ×Ni-NTA漂洗缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L咪唑, pH8.0) 5 mL,轻柔混匀,漂洗两遍。然后加 1 ×Ni-NTA洗脱缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4, 300 mmol/L NaCl, pH8.0, 咪唑浓度分别为 160、200、250 mmol/L),按照咪唑浓度由低向高洗脱并收集目的蛋白。

2 结 果

将构建好的基因重组表达质粒 pET32a(+)-ScTRAIL和 pET32a(+)-sScTRAIL送北京奥科测序公司测序,测序引物是表达质粒 pET32a(+)的通用引物。测序结果表明,这两个重组表达质粒插入的序列与 *ScTrail*序列完全一致。酶切位点也是准确的。

鳜 *Trail*基因重组质粒 pET32a(+)-ScTRAIL经 *Eco*R I和 *Xol* I双酶切反应后,电泳结果 (图 3)。泳道 2中存在 pET32a(4.9kb)和 *ScTrail*(898bp)开放阅读框的插入片段。鳜 *Trail*基因重组质粒 pET32a(+)-sScTRAIL的酶切电泳结果未显示。

将基因重组质粒 pET32a(+)-ScTRAIL转化 Rosetta-gami(DE3)感受态细胞。经 IPTG诱导后,含 pET32a(+)-ScTRAIL的大肠杆菌在大约 51kD处出现一条明显的蛋白特

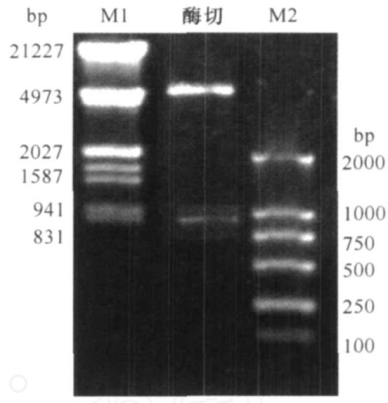


图 3 重组质粒 pET32a(+)-ScTRAIL的双酶切后的电泳图

Fig. 3 The combined plasmid of pET32a(+)-ScTRAIL enzymed by *Eco*R I and *Xol* I

M1: Lambda DNA /*Hind* III + *Eco*R I Marker; M2: DL2000

征带,这与理论估计的相对分子量 51.1kD相符 (图 4)。以未经 IPTG诱导的重组表达克隆总蛋白作为阴性对照。阴性对照中重组蛋白仅有微弱表达;而经 IPTG诱导后,重组蛋白大量表达,并且表达量在诱导后 2—4h内逐渐上升。细菌经超声波破碎后,在上清中可以看出少量重组蛋白的存在,大部分的重组蛋白存在于沉淀中,这说明原核表达整个开放阅读框的重组蛋白主要以不溶的包涵体形式存在于大肠杆菌中。

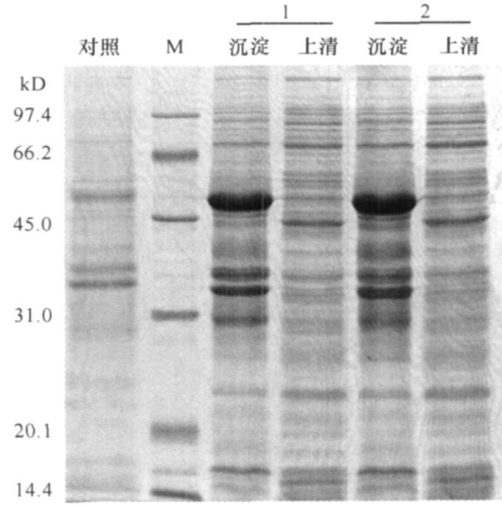


图 4 pET-32a(+)-ScTRAIL表达产物的 SDS-PAGE分析

Fig. 4 SDS-PAGE of the recombination protein pET-32a(+)-ScTRAIL

M,分子质量标准;对照,未经 IPTG诱导的含重组质粒的 Rosetta-gami (DE3)菌体总蛋白;1, IPTG诱导 2h的样品;2, IPTG诱导 4h的样品

M, protein marker; 1, the sample induced 2h by IPTG; 2, the sample induced 4h by IPTG

用了截短的 *ScTrail*基因片断进行原核表达,在原核表达载体 pET-32a(+)中插入了 603 bp的片断,编码 201 aa。将基因重组质粒 pET32a-sScTRAIL转化 Rosetta-gami(DE3)

感受态细胞。经 IPTG诱导后,含 pET32a-sScTRAIL的大肠杆菌在大约 42 kD处出现一条明显的蛋白特征带,这与理论估计的相对分子量 42 kD相符[4]。阴性对照中重组蛋白仅有微弱表达;而经 IPTG在 25℃诱导 8h后,重组蛋白大量表达,诱导后的细菌经超声波破碎后,在上清和沉淀中都可以检测到鳜 TRAIL重组蛋白的大量表达[4]。这说明获得可溶性重组蛋白的原核表达载体的构建是成功的。

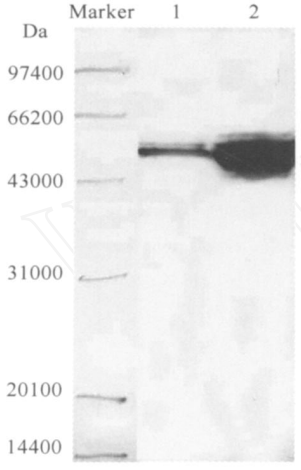


图 5　pET32a(+)-ScTRAIL 表达产物的免疫印迹

Fig. 5　The product of pET32a(+)-ScTRAIL detected with western bolt

Marker 为低分子量蛋白 marker;1,2 分别是 pET32a(+)-ScTRAIL 菌体总蛋白的上清和沉淀经抗六个组氨酸单抗所标记

Marker is the low weight protein marker;1 and 2 is the supernatant and pellet of *E. coli*, respectively, after ultrasonic treatment conjugated by anti-histidine monoantibody

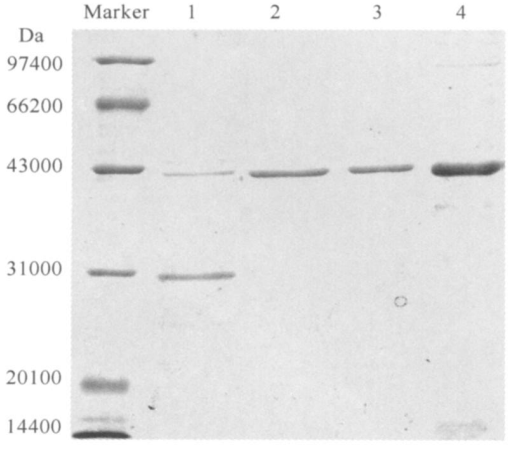


图 6　重组质粒 pET32a-sScTRAIL 可溶性蛋白的纯化

Fig. 6　The purification combined protein

Marker 是 SDS 丙烯酰氨凝胶电泳低分子量标准蛋白质;1 是咪唑浓度为 160mmol/L 时洗脱的重组蛋白;2、3 是咪唑浓度为 200mmol/L 时洗脱的重组蛋白;4 是咪唑浓度为 250mmol/L 洗脱的重组蛋白

1,2,3,4 show the different concentrations of imidazole when purifying the combined protein

用抗六个组氨酸的单抗检测 pET32a(+)-ScTRAIL重组蛋白的表达情况。Westem blot结果显示(图 5),在细菌经超声波破碎后的沉淀中,带有标签的重组蛋白有大量的表达,而在上清中仅有微量的表达。该结果再次证明表达载体构建的准确性,同时由于存在六个组氨酸的标签,可以进行重组蛋白的亲和纯化。

将基因重组质粒 pET32a-sScTRAIL可溶性蛋白经 His.Bind Resin (Novagen)在天然条件下纯化。图 6显示了重组蛋白在不同咪唑浓度下洗脱的结果。SDS-PAGE结果显示在咪唑浓度为 200 mmol/L时,重组蛋白洗脱的最纯,而在咪唑浓度为 250 mmol/L时,重组蛋白的洗脱量最大,但是有很弱的杂蛋白存在。

3　讨　论

ScTRAIL是典型的 II型跨膜蛋白,没有前导肽,具有跨膜区。利用 pET表达系统对 *ScTrail*基因完全的开放阅读框以及去掉跨膜区的活性区段进行重组表达质粒 pET32a(+)-ScTRAIL和 pET32a(+)-sScTRAIL的构建,得到预期的分子量条带,并经测序证实表达载体构建的准确性。

pET表达系统与重组蛋白在大肠杆菌中表达的其他系统相比,具有很高的表达效率。该表达系统是依据 T7启动子来进行工作的,目前该表达系统已经完成了数千种重组蛋白的表达[10]。为获得最佳表达量,我们研究了 IPTG诱导的时间以及温度对鳜 TRAIL融合蛋白表达的影响。含有整个开放阅读框的重组质粒 pET32a(+)-ScTRAIL无论是在 37℃还是在 25℃,都主要是以包涵体形式存在。而采用去掉跨膜区构建的重组质粒 pET32a(+)-sScTRAIL经 IPTG在 25℃诱导 8h后,在上清中可以看到大量重组蛋白的存在[4]。该结果表明插入序列中跨膜区的存在影响可溶性重组蛋白的表达。

根据不同实验目的的要求,通常制备带有以下标签的融合蛋白:S·Tag、T7·Tag、GST·Tag、His·Tag、HSV·Tag、Trx·Tag、Nus·Tag等。本研究中使用的 pET-32a(+)载体 C、N端带有 His·Tag,它是常用的纯化蛋白的融合标签。利用 His·Tag的融合蛋白标签,我们在天然条件下得到了鳜 TRAIL蛋白。在不同咪唑浓度洗脱条件下,可溶蛋白的纯度和产率有很大的差异。这表明咪唑浓度的优化可以确保纯度和产率之间的最佳平衡。

我们已有的研究结果显示鳜 TRAIL在结构和表达方式上都类似于其他脊椎动物的 *Trail*基因[4],那么它是否也具有类似于哺乳动物 TRAIL诱导肿瘤细胞凋亡的功能呢?鳜 TRAIL可溶蛋白的纯化为研究 ScTRAIL的功能提供了可能。尽管研究结果显示用原核表达获得的 TRAIL可溶性蛋白经纯化后,直接加到人 Hela细胞和 Jurkat细胞中,没有发现凋亡现象的发生,但利用此原核表达系统纯化的可溶蛋白免疫小鼠所制备的鼠抗 ScTRAIL多克隆抗体能够很好的识别组织中的 TRAIL蛋白[4]。因此该研究为鳜 TRAIL多克隆抗体的制备以及 ScTRAIL的功能研究提供了良好的基础。

参考文献:

[1] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, *et al*. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis [J]. *Immunity*, 1996, **3**: 673—682

[2] Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S, *et al*. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**: 12687—12690

[3] Chang M X, Nie P, Xie H X, *et al*. Characterization and expression analysis of TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in grass carp *Ctenopharyngodon idella* [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2006, **110**: 51—60

[4] Gao Y, Chang M X, Sun B J, *et al*. TRAIL in the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: gene and its apoptotic effect in Hela cells [J]. *Fish Shellfish Immun*, 2008, **24**: 55—66

[5] Liu J, Cui Y, Liu J. Food consumption and growth of two piscivorous fishes, the mandarin fish and the Chinese snakehead [J]. *J Fish Biol*, 1998, **53**: 1071—1083

[6] He J G, Zeng K, Weng S P, *et al*. Experimental transmission, pathogenicity and physical-chemical properties of infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) [J]. *Aquaculture*, 2002, **204**: 11—24

[7] Sun B J, Nie P. Molecular cloning of the *viperin* gene and its promoter region from the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, **101**: 161—170

[8] Zhang Y A, Nie P, Luo H Y, *et al*. Characterization of cDNA encoding immunoglobulin light chain of the mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) [J]. *Vet Immunol Immunopathol* 2003, **95**: 81—90

[9] Zhang Y A, Nie P, Wang Y P, *et al*. cDNA sequence encoding immunoglobulin M heavy chain of the mandarin fish *Siniperca chuatsi* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, **14**: 477—480

[10] Wang M, Scott W A, Rao K R, *et al*. Recombinant bovine alpha-lactalbumin obtained by limited proteolysis of a fusion protein expressed at high levels in *Escherichia coli* [J]. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 21116—21121