

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(sTRAIL)在毕赤酵母中的高效表达

张 伟 赵洪亮 薛 冲 刘志敏*

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 :从人胎盘总 RNA 中通过 RT-PCR 方法获得 sTRAIL 基因的 cDNA ,并通过构建高拷贝表达载体在毕赤酵母中获得了高效表达 ,表达量可达 40.1mg/L。并对表达产物进行了分离纯化和生物学活性分析 ,获得了纯度大于 90% 的纯品 ,该样品能明显表现出诱导 L929 肿瘤细胞凋亡的作用 ,半数致死量为 0.18 μ g/mL ,与文献报道的大致相同。

关键词 :TRAIL ,毕赤酵母 ,高效表达

中图分类号 :Q786 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)03-0328-04

肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand , TRAIL)或称凋亡素 2 配体(Apo2 ligand , Apo2L) ,属于肿瘤坏死因子家族 ,可激活肿瘤细胞的快速凋亡^[1] ,由于其独特的凋亡诱导方式和特异性杀伤肿瘤细胞的特点成为研究热点 ,使 TRAIL 有可能成为新的抗肿瘤药物。TRAIL 是一个 40kD 的 II 型跨膜蛋白。人 TRAIL 分子的细胞外区域与 Fas/Apo-1/CD95 配体、TNF- α (Tumor Necrosis Factor- α)、LT- α (Lymphotoxin- α , 淋巴毒素- α)和 LT- β (Lymphotoxin- β , 淋巴毒素- β)的同源性分别为 28%、23%、23% 和 22%^[2]。在人体多种组织中可以检测到 TRAIL mRNA 的转录 ,包括成人的脾脏、前列腺、卵巢、小肠、大肠和胎盘等 ,但大脑、肝脏和睾丸中不转录此因子。TRAIL 受体属于 TNF 受体超家族 ,主要包括 5 种 :1)TRAIL-R1 (DR4/Apo-2A) ;2)TRAIL-R2(DR5/TRICK/killer) ;3) TRAIL-R3(DcR1/TRID/LIT) ;4) TRAIL-R4(DcR2/TRUNDD) ;5)骨保护蛋白(Osteoprotegerin ,OPG) 。前两种是死亡受体 ,最后一种是与骨密度调节有关的可溶性受体 ,中间两种为诱骗受体。这些受体(除 OPG 外)都属于 I 型跨膜蛋白 ,胞外区高度同源。DR4 和 DR5 分布较广 ,有完整的胞内死亡结构域(Deathdomain , DD) ,与配体结合后通过胞内信号传导通路可诱导凋亡 ;DcR1 和 DcR2 胞内死亡结构域或缺失或不完整 ,与配体结合不能诱导凋亡^[3]。

目前国内外利用基因工程技术表达重组人 sTRAIL ,主要是利用大肠杆菌表达系统 ,表达产物主

要以包涵体的形式存在 ,要得到天然活性的 sTRAIL 必须先进行包涵体的制备、变性和复性的研究。因此 ,本课题利用 RT-PCR 从胎盘总 RNA 中得到 TRAIL 胞外可溶部分(soluble TRAIL , sTRAIL)的基因 ,通过高拷贝表达载体的构建 ,使重组 sTRAIL 获得了高表达 ,并对表达产物的理化性质和活性做了初步的鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 、巴斯德毕赤酵母菌(*Pichia pastoris*)GS115 和 X33 均由本室保存 ;质粒 pPIC9 和 pPICZ α 均由本室保存 ;TNF α 、sTRAIL 和 sTRAIL 多克隆抗体购自 PeproTech EC Ltd 公司 ;人血清白蛋白国家标准品购自国家生物制品检定所 ;牛血清白蛋白、碳酸酐酶和溶菌酶购自 Amresco ;L929 细胞(小鼠成纤维细胞瘤细胞)由本室保存 ;限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、RT-PCR 试剂盒、质粒快速提取试剂盒分别购自华美公司、博大公司和上海生工生物工程技术有限公司 ;分离纯化介质 HiTrapTM Chelating HP、SuperdexTM 75 购自 Pharmacia 公司和中国科学院大连化学物理研究所。

1.2 PCR 引物设计和合成

根据 GenBank 报道的基因序列 ,设计了 3 对 PCR 引物分别用于 RT-PCR、克隆至 pPIC9 和 pPICZ α 质粒中。引物由军事医学科学院生物工程研究所技

基金项目 :国家重大科技专项平台性课题(2002AA2Z345B)

* 通讯作者。Tel 86-10-66948823 ;Fax 86-10-63833524 ;E-mail :zwx176@yahoo.com.cn

作者简介 :张 伟(1976-) ,男 ,山东章丘人 ,博士生 ,主要从事微生物学及分子生物学等方面的研究。

其他作者 :黎 明 ,张士猛

收稿日期 :2003-08-04 ,修回日期 :2003-12-22

术保障室合成。序列如下:(1)用于 RT-PCR:5'-AACTCGAGAAAAGAATGGCTATGATGGAGGTC-3'(上游);5'-AAGAATTCCTATTAGCCAATAAAAAGGCC-CC-3'(下游)。(2)用于克隆至 pPIC9 质粒中:5'-AACTCGAGAAAAGAGTGAGAGAAAGAGGTCCT-3'(上游);5'-AAGAATTCCTATTAGCCAATAAAAAGGCC-CCGAA-3'(下游)。(3)用于克隆至 pPICZ α 质粒中:5'-AACTCGAGAAAAGAGTGAGAGAAAGAGGTCCT-3'(上游);5'-AATCTAGACTATTAGCCAATAAAAAGGCC-CCGAAA-3'(下游)。

1.3 重组 sTRAIL 基因的克隆

按照 RT-PCR 试剂盒的方法进行反转录反应,获得的反转录产物即 cDNA 可以作为 PCR 反应的模板。PCR 反应条件为:94℃ 3min;94℃ 30s,50℃ 30s,72℃ 40s,25~30 个循环,72℃ 10min。

1.4 重组 sTRAIL 表达载体的构建和表达

1.4.1 单拷贝表达载体的构建:用 *Eco*R I 和 *Xho*I (或 *Xho*I 和 *Xba*I) 双酶切 PCR 产物和 pPIC9 (pPICZ α) 载体,电泳纯化,回收酶切的基因片段和载体,然后用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,37℃ 培养 16h 后进行鉴定,并挑选阳性克隆测序。

1.4.2 多拷贝表达载体的构建:将上一步构建的 pPICZ α 单拷贝表达载体进行 *Bam*H I、*Bgl* II 双酶切和 *Bam*H I 单酶切,电泳纯化、回收、去磷酸化和连接,酶切鉴定,这样就构建完成双拷贝表达载体,挑取阳性克隆重复前面的步骤构建四拷贝表达载体。

1.4.3 诱导表达:将构建好的表达载体线性化后转化毕赤酵母宿主菌,用选择性培养基筛选表达菌株。将工程菌接种到 5mL YPD 液体培养基中,30℃ 培养过夜后,再转接到 BMGY 液体培养基中,待甘油消耗尽后加入 0.5% 的甲醇进行诱导,诱导大约 72h 后离心收集上清,进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 表达产物的分离纯化

1.5.1 发酵液上清的粗纯化:首先取 40% 饱和度的硫酸铵,缓慢且均匀的加到发酵液上清中(避免硫酸铵局部浓度过高),搅拌至硫酸铵完全溶解,然后将浑浊液在 4℃ 静置 4~6h,最后用 8000~10000r/min 离心 30min,去上清保留沉淀。

1.5.2 Ni 柱的亲和层析:将沉淀用含 0.5mol/L NaCl 的 0.1mol/L pH8.0 醋酸钠缓冲液悬起。用含 0.5mol/L NaCl 的 0.1mol/L pH8.0 醋酸钠缓冲液平衡 Ni 离子亲和层析柱,上样后再用 0.5mol/L NaCl 的 0.1mol/L pH8.0 醋酸钠缓冲液平衡,最后用含

0.5mol/L 咪唑和 0.5mol/L NaCl 的 0.1mol/L pH8.0 醋酸钠缓冲液平衡洗脱。收集各蛋白峰进行 SDS-PAGE 分析。

1.5.3 Zn²⁺ 离子柱的亲和层析:Ni 柱亲和层析后样品经稀释或透析到含 50mmol/L NaAC 和 0.5mol/L NaCl pH6.95 的液体中,然后用 Zn²⁺ 离子亲和层析的预装柱做进一步的纯化,上样后用含 50mmol/L NaAC 和 0.5mol/L NaCl pH4.0 的缓冲液进行洗脱。收集各蛋白峰进行 SDS-PAGE 分析。

1.5.4 超滤浓缩:Zn²⁺ 柱亲和层析后的样品经截留分子量为 10kD 的超滤管浓缩,有利于以后的理化性质的分析及生物活性的鉴定。

1.6 重组 sTRAIL 的生物学活性测定^[4]

将对数生长期的 L929 细胞稀释浓度到 2×10^5 个/mL,取 96 孔细胞培养板,每孔中加 100 μ L 细胞悬液,在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养;用含 2 μ g/mL 放线菌素 D 的细胞培养液倍比稀释 sTRAIL 纯品和 TNF 标准品,TNF 标准品 10ng/mL 上板做倍比稀释,共 10 个稀释度;将纯化后的 sTRAIL 稀释至 2 μ g/mL 上板,同样做 10 个稀释度;在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中继续培养 24h,培养时间以阳性对照孔中的细胞全部死亡为准。每孔加入 20 μ L MTT 溶液后继续培养 5h,然后加入 80 μ L 10% SDS 溶解液,待结晶物完全溶解后测定 570nm 的吸收值。

1.7 重组 sTRAIL 样品的 Western blot 分析

纯化的重组 sTRAIL 进行完 SDS-APGE 电泳后通过电转移的方法将 sTRAIL 转移到硝酸纤维素膜上。将硝酸纤维素膜放在一平皿中,加入封闭液,37℃ 下轻轻振荡 2~3h。封闭结束后用 PBS 洗 3 次,将硝酸纤维素膜浸泡在一抗溶液中,室温下轻轻振荡 2h。将硝酸纤维素膜用 PBS 洗 3 次,每次 5min。将膜浸泡在二抗溶液中,在室温下轻轻振荡 1h。取出硝酸纤维素膜,用 PBS 洗 3~5 次,每次 5min。将膜放入显色液中,室温下轻轻摇动。观察显色反应,当条带达到所需深度时,立刻用水终止显色,然后将膜转入 PBS 中保存。

2 结果和讨论

2.1 表达载体的构建

以胎盘总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 方法扩增目的基因片段。扩增产物经琼脂糖电泳在约 0.5kb 处有一明显扩增片段。按 1.4 节中的步骤构建单拷贝和多拷贝表达载体,并用酶切进行鉴定。

2.2 重组 TRAIL 的高效表达和表达量的确定

选取单拷贝和四拷贝的 pPICZ α -sTRAIL/X-33 表

达菌株以及 pPIC9-sTRAIL/GS115 表达株在摇瓶里分别进行诱导表达,待诱导到 72h 后对每个表达菌株分别取上清进行 SDS-PAGE 分析^[5],观察各转化子在表达条带上有无差异(图 1)。从电泳结果可见,第 3 泳道的 pPIC α -sTRAIL/X33 四拷贝表达菌株的表达量明显高于另两株。

根据图 1 中 5~7 泳道外标蛋白的扫描积分面积值与蛋白浓度的关系,计算得到 pPIC9-sTRAIL 表达菌株、pPIC α -sTRAIL 单拷贝表达菌株和 pPIC α -sTRAIL 四拷贝表达菌株的表达量分别为 6.9mg/L、10.6mg/L、40.1mg/L。因此,增加受体菌的基因剂量的方法,能明显提高目的蛋白 sTRAIL 的表达量,所以我们选用 pPIC α -sTRAIL 四拷贝表达株为 sTRAIL 的工程菌。

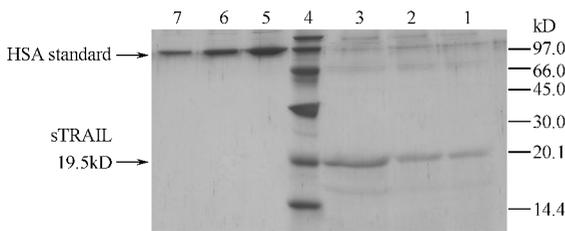


图 1 外标法测定培养上清中 sTRAIL 表达水平的 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE analysis for expression of sTRAIL in culture supernatant
1. pPIC9-sTRAIL; 2. pPIC α -sTRAIL(1 copy); 3. pPIC α -sTRAIL(4 copies); 4. Molecular weight marker; 5~7. HSA 2 μ g, 1 μ g, 0.5 μ g.

2.3 重组蛋白的分离纯化

发酵液离心留上清,通过 40% 饱和硫酸铵沉淀,大部分目的蛋白被沉淀下来。按照材料与方法中的两步亲和层析,去掉了大部分杂蛋白。将各步骤的洗脱液进行 SDS-PAGE 分析,在 20.1kD 下方明显可见目的蛋白条带(图 2)。经薄层凝胶扫描分析第二步亲和层析后目的蛋白的纯度大于 90%。

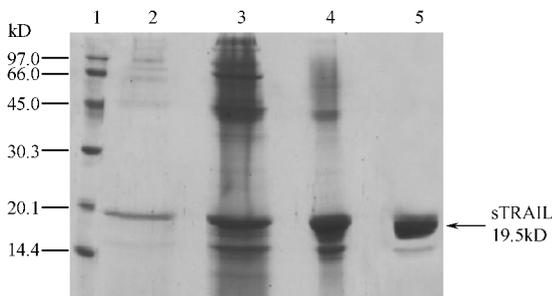


图 2 sTRAIL 的纯化结果

Fig. 2 SDS-PAGE analysis for purification of sTRAIL

1. Molecular weight marker; 2. Culture supernatant; 3. Sulfate precipitation; 4. Ni²⁺ chelating chromatography; 5. Zn²⁺ chelating chromatography.

2.4 重组蛋白理化性质的鉴定

2.4.1 重组蛋白 N 端氨基酸序列的测定:重组 sTRAIL 经 SDS-PAGE 分析,电转移至 PVDF 膜上,染色脱色后剪下目的条带做 N 末端氨基酸残基进行了测定分析。测定结果显示样品 N 末端的氨基酸序列为 V-R-E-R-G-P-Q,与 GenBank 报道的 sTRAIL 序列相一致。

2.4.2 重组蛋白分子量的测定:分子量是表征一个蛋白的特性的重要参数之一。将重组 sTRAIL 纯品进行反相处理并冻干后,送交军事医学科学院仪器中心用质谱进行分子量的测定。测得 sTRAIL 的精确分子量为 19491Da 与根据其氨基酸序列计算的理论分子量 19491.85 仅差 $4.4 \times 10^{-3} \%$,在仪器的误差范围以内,可认为重组 sTRAIL 样品的分子量是正确的,并证明没有发生氨基酸的降解缺失。

2.4.3 重组蛋白表观分子量的测定:由于在 SuperdexTM 75 分析时,流动相可用接近于生理条件的磷酸盐缓冲液,因而可测定蛋白在生理条件下的表观分子量。我们采用牛血清白蛋白、碳酸酐酶、溶菌酶和 sTRAIL 分别通过凝胶层析(SuperdexTM 75),根据它们的出峰时间与分子量的关系来推断 sTRAIL 的表观分子量。结果显示(表 1),sTRAIL 的表观分子量为 56.9kD,约为 SDS-PAGE 和质谱测得分子量的 3 倍,说明 sTRAIL 在生理条件下可能是以三聚体形式存在的,还应考虑到分子形状这一因素。

表 1 表观分子量的测定

Table 1 Mensuration of apparent molecular weight of sTRAIL

Sample	Molecular weight/kD	Retention time/min
Albumin	66.0	14.0
Carbonic anhydrase	30.0	19.5
Lysozyme	14.4	28.5
sTRAIL	about 56.9	14.5

2.4.4 免疫印迹:SDS-PAGE 结果显示酵母分泌表达的 sTRAIL 分子量大约为 20kD,与理论值基本一致。使用 sTRAIL 多克隆抗体进行 Western blot 鉴定,结果显示所表达的蛋白能与其相应的抗体发生特异性免疫反应(图 3)。进一步证实了重组 sTRAIL 蛋白具有免疫原性。

2.5 重组蛋白生物活性测定

依据 sTRAIL 能够诱导 L929 肿瘤细胞的凋亡,并且在一定的浓度范围内,加入 TRAIL 的量与肿瘤

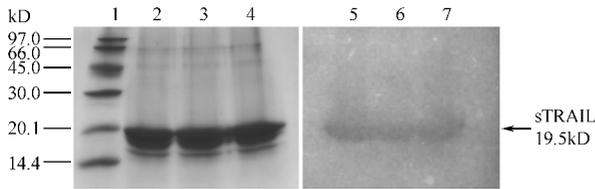


图3 sTRAIL 的免疫印迹

Fig.3 Western blot of sTRAIL

1. Molecular weight marker 2~4. SDS-PAGE of sTRAIL sample ; 5~7. Responding result of western blot.

细胞死亡的数量之间存在一定的量效关系,因此我们按照材料与方法中的细胞测活方法对 sTRAIL 纯品的生物学活性进行了分析^[6](图4)。结果显示 sTRAIL 和 TNF α 的活性曲线近似为标准的“S”型,说明二者对 L929 细胞有诱导其凋亡的作用。对照组 OD_{570} 吸收值的平均值约为 0.6 (设为 100%) ,因此半数细胞死亡的吸收值应为 0.3 ,所以 sTRAIL 和 TNF α 的半数致死量(引起 50% 细胞死亡)应为吸收值 OD_{570} 0.3 所对应的蛋白浓度。TNF α 的初始浓度为 10ng/mL ,sTRAIL 的初始浓度为 2 μ g/mL。因此 ,TNF α 的半数致死量约为 0.16ng/mL ,而 sTRAIL 的半数致死量约为 0.18 μ g/mL。与国内外相关报道的结果比较说明酵母分泌表达的 sTRAIL 蛋白具有很好的抗肿瘤活性 ,该项工作为今后对 TRAIL 进行结构与功能的研究打下了扎实的基础。

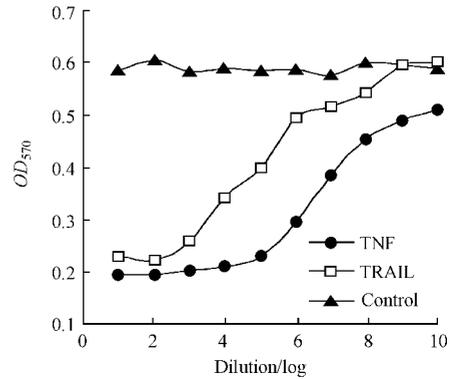


图4 TNF α 和 sTRAIL 对 L929 细胞的杀伤作用

Fig.4 Cytotoxicity of TNF α and sTRAIL on L929 cells

参 考 文 献

- [1] Evan G L. A matter of life and cell death. *Science* ,1998 , **281** (5381) : 1317 - 1312.
- [2] 王梁华,焦炳华. 肿瘤坏死因子家族新成员——TRAIL. 生物化学与生物物理进展 ,1998 , **25** : 392 - 395.
- [3] 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 Biol Chem* , 1996 , **271** (22) : 12687 - 12690.
- [4] 孙卫民,王惠琴. 细胞因子的研究方法. 北京: 人民卫生出版社 ,1997 602 - 604.
- [5] 聂东宋,梁宋平,李 敏. 外源蛋白在毕赤酵母中高效表达的策略. 吉首大学学报 2001 **22** (3) : 40 - 44.
- [6] Tudor M , Baetu John Hiscott. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine & Growth Factor Review* .2002 , **13** : 199 - 207.

Expression of TNF-related Apoptosis-inducing Ligand (sTRAIL) in *Pichia pastoris*

ZHANG Wei ZHAO Hong-Liang XUE Chong LIU Zhi-Min*

(Institute of Biotechnology of Academy of Military Medical Sciences , Beijing 100071 , China)

Abstract : The gene of sTRAIL was obtained from placenta total RNA by RT-PCR. Multicopies plasmid-pPICZ α was constructed and transformed into *Pichia pastoris* X33. The expression level of recombinant sTRAIL can reach 40.1mg/L. Separation , purification and bioactivity analysis of the expressed products was performed. The purity of the final products reached more than 90% . The product could induce L929 cell apoptosis , and the ED_{50} of sTRAIL is about 0.18 μ g/mL.

Key words : TRAIL , *Pichia pastoris* , Expression

Foundation item : Grants from National High Technolgy Program (2002AA2Z345B)

* Corresponding author. Tel 86-10-66948823 ; Fax 86-10-63833524 ;E-mail :zwxl76@yahoo.com.cn

Received date : 08-04-2003