

重组人隐花色素蛋白 I 的表达纯化及其在制备放疗保护剂中的应用

姚辰^{1,2}, 盛春姐¹, 刘冬¹, 高诗娟¹, 姜威¹, 余虹燕³, 李建东¹, 陈慧明^{1,2}, 武娇祥^{1,2}, 潘长穿⁴, 陈帅¹, 黄文林^{1,3,5}

1 中国科学院微生物研究所 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 安徽大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230601

3 中山大学肿瘤防治中心 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060

4 四川省肿瘤医院·研究所 肿瘤内科, 四川 成都 614000

5 广州达博生物制品有限公司 广东省肿瘤靶向治疗新药研发企业重点实验室, 广东 广州 510663

姚辰, 盛春姐, 刘冬, 等. 重组人隐花色素蛋白 I 的表达纯化及其在制备放疗保护剂中的应用. 生物工程学报, 2015, 31(1): 135-146.

Yao C, Sheng CJ, Liu D, et al. Expression, purification of recombinant human cryptochrome I and its application in preparation of protective agent for radiotherapy. Chin J Biotech, 2015, 31(1): 135-146.

摘要: 放疗是治疗肿瘤的最常用手段之一, 为寻找能够保护肿瘤组织周边正常细胞的放疗保护剂, 通过原核表达质粒的构建, 利用大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导并成功表达出人隐花色素蛋白 I (hCRY1)。采用包涵体溶解、梯度透析复性、镍柱亲和纯化以及超滤浓缩的蛋白纯化工艺, 1 L 菌液可收获 10-15 mg 纯度超过 95% 的 hCRY1。在 HaCaT 细胞中通过细胞 DNA 损伤修复中所产生的 H2A.X foci 荧光强度的定量检测, 验证了纯化所得的 hCRY1 具有射线损伤防护功能; 通过对经过 hCRY1 以及对照蛋白处理后的细胞凋亡情况的检测排除了 hCRY1 的毒副作用对 H2A.X foci 荧光强度的影响。这些为进一步研究 hCRY1 提供了便利条件, 也为将 hCRY1 开发成为新的放疗保护剂提供了理论基础。

关键词: 生物节律, 包涵体, 梯度透析, 镍柱亲和纯化, DNA 损伤, HaCaT, H2A.X foci, 免疫荧光

Received: March 21, 2014; **Accepted:** May 22, 2014

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (Nos. 2012CB518900, 2011CB504706, 2011CB504805), National Natural Science Foundation of China (No. 81171572), National Major Scientific and Technological Special Project for "Major New Drugs Innovation and Development" (No. 2014ZX09101041), Guangdong Innovative Research Team Program (No. 2009010058).

Corresponding author: Wenlin Huang. Tel: +86-10-64807806; E-mail: wl_huang@hotmail.com

Shuai Chen. Tel: +86-20-87342303; E-mail: shuaichen2010@hotmail.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (Nos. 2012CB518900, 2011CB504706, 2011CB504805), 国家自然科学基金 (No. 81171572), "重大新药创制"科技重大专项 (No. 2014ZX09101041), 广东省创新科研团队计划 (No. 2009010058) 资助。

网络出版时间: 2014-06-19

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140169.html>

Expression, purification of recombinant human cryptochrome I and its application in preparation of protective agent for radiotherapy

Chen Yao^{1,2}, Chunjie Sheng¹, Dong Liu¹, Shijuan Gao¹, Wei Jiang¹, Hongyan Yu³, Jiandong Li¹, Huiming Chen^{1,2}, Jiaoxiang Wu^{1,2}, Changchuan Pan⁴, Shuai Chen¹, and Wenlin Huang^{1,3,5}

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

3 State Key Laboratory of Oncology in South China, Cancer Center, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong, China

4 Medical Oncology, Sichuan Cancer Hospital and Institute, Chengdu 614000, Sichuan, China

5 The Key Laboratory of Tumor Targeted Medicine in Guangdong Province, Guangzhou Double Bio-product Inc, Guangzhou 510663, Guangdong, China

Abstract: Radiotherapy is a treatment for cancer with undesired by-effects. In order to develop a new radiation protective agent that could reduce the by-effects, we tried to express and purify human cryptochrome 1 (hCRY1). The coding sequence of hCRY1 was inserted into prokaryotic expression plasmid pET28a(+), and this protein was purified from *Escherichia coli* BL21(DE3) after IPTG induction, ultrasonication, inclusion body dissolution, gradient dialysis, nickel column purification and ultrafiltration. The yield of hCRY1 in 1 L *E. coli* culture (LB medium) was about 10–15 mg. The radiation protective efficiency of hCRY1 was monitored by detecting X-ray-induced H2A.X foci in HaCaT cells. The results of immunofluorescence show that hCRY1 significantly reduces X-ray stimulated DNA damage response. The apoptosis of HaCaT cell was also detected, and the repression of H2A.X foci formation was not due to hCRY1's cytotoxicity. All these data suggest a potential application of recombinant hCRY1 as a protective agent for radiotherapy.

Keywords: biological rhythm, inclusion bodies, gradient dialysis, Ni-NTA, DNA damage, HaCaT, H2A.X foci, immunofluorescence

癌症是人类健康的最大敌人之一。在癌症的临床治疗中，手术、放疗及化疗是3种最主要的治疗方法，其中放疗的适应症最为广泛，70%以上的恶性肿瘤患者在其治疗的某个阶段都需要接受放疗。放射治疗的目的是最大限度地

将放射剂量集中到病变区，杀灭肿瘤细胞，而周围正常组织或器官则需要尽量少受不必要的照射。然而无论是传统放疗技术还是现代精确放疗技术，都不能做到在治疗肿瘤的同时完全保护正常组织。因此，寻找一些尽可能地保护正常皮肤、组织、器官的方法就成为了放疗

过程中减轻患者痛苦、提高治疗效果的关键所在。为此我们开展了人隐花色素蛋白 I (hCRY1) 的纯化及射线防护功能的研究，旨在寻找新的放疗保护剂材料，希望能为肿瘤患者带来一些福音。

现代时间生物学认为，在自然界中从单细胞动物到高等生物，所有生命活动均存在着按照一定规律运行的、周期性的生命活动现象。经过大量的实验研究证明，这种生命活动现象是明显的节律性活动，称为生物节律。1993年 Ahmad 等^[1]发现的隐花色素 (CRY) 就是目前

人们所发现的生物节律蛋白之一。隐花色素是一种能够感受蓝光和近紫外光 (330–390 nm) 的受体, 在几乎所有种类的植物中都有所发现^[2-3], 同时在昆虫、哺乳动物中都有编码隐花色素的同源基因^[4-5]。不同种类的隐花色素都是由接受光信号的生色团和应答光信号的脱辅基蛋白组成。脱辅基蛋白部分共有两个结构域^[4-6], 其中位于 N 端的 PHR 结构域是高度保守的, 该结构域与光裂解酶十分相似, 是生色团的结合区域, 但其却并不具有光裂解酶活性^[7]; 而 C 端的 DAS 结构域则是一个在不同物种中长度变化较大的非保守区域, 一般负责信号的输出^[8-10]。

迄今为止, 动物体内所发现的隐花色素主要有 CRY1 和 CRY2 两种^[11], 它们与光裂解酶家族共同调节生物体对于紫外线和蓝光小剂量照射的适应性反应, 参与 DNA 光修复的调控, 并与动物的生长、发育、磁感知及生理节律等均有密切的联系^[12-15]。

CRY1 在动物体内参与多种光依赖型转录抑制, 它能够与 BamL1/CLOCK 蛋白二聚体、Per1、Per2 等节律相关蛋白直接作用, 并在节律性生理周期中直接起负调控作用^[16]。一般情况下, 动物胞质内的 CRY1 与 Per2 的稳定性及转运密切相关, 而核内的 CRY1 则通过直接抑制 BamL1/CLOCK 蛋白二聚体和 Per1 的活性来抑制 Per2 的转录^[17-18]。hCRY1 在人体内参与转录调控、DNA 损伤修复等多种生理过程^[19-23]。最近的研究结果表明, CRY1 与动物及人类的多种损伤、疾病以及生物节律失调均密切相关^[24-28]。

由于 hCRY1 的天然状态含量低, 分离获得大量的天然产物十分困难。而多肽合成成本过高, 缺乏作为药物生产的应用前景。迄今为止, 国内外亦无文献报道过 hCRY1 蛋白的原核表达

纯化方法。因此本研究探寻了一套原核表达纯化 hCRY1 的技术路线, 通过构建其原核表达载体 pET28a(+)-hCRY1, 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中表达, 并分离纯化出较高纯度的重组蛋白, 为进一步研究 hCRY1 提供了便利条件。

另外, 我们在人永生化表皮细胞 HaCaT 细胞株中检测了纯化后的 hCRY1 的射线损伤防护功能。紫外、X-ray 等射线照射会导致细胞中的 DNA 双链断裂, 进而诱导细胞产生在 DNA 双链断裂修复过程中起重要作用的 H2A.X foci^[29-31]。因此本研究通过对细胞内 H2A.X foci 的免疫荧光观察和荧光强度量化来检测细胞的损伤程度, 证实了纯化所得的 hCRY1 在放射损伤防护中的功能, 为将 hCRY1 开发成为新的放疗保护剂提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和细胞

大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3)、*Escherichia coli* DH5 α 和质粒 pcDNA3.1-hCRY1 由本实验室保存; 表达载体 pET28a(+) 购自美国 Invitrogen 公司; HaCaT 细胞株由中国疾病预防控制中心白雪涛老师与段招军老师馈赠。

1.1.2 工具酶、抗体和试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* 酶等工具酶和 DNA marker 购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司; 蛋白质 marker 购自美国 Thermo 公司; 兔抗 Phospho-Histone H2A.X 抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 小鼠抗 His 抗体、HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体、山羊抗兔 IgG/FITC 抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司; PCR 产物纯化试剂盒和质粒小提试剂盒购自北京天

根生化科技有限公司; Bradford 蛋白含量检测试剂盒和 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物发展有限公司; 酵母粉和蛋白胨购自英国 OXOID 公司; DMEM 培养基和胎牛血清购自美国 GIBCO 公司; 1 mL Ni-NTA His-Bind Resin 纯化树脂购自上海七海复泰生物科技有限公司; 其他化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 原核表达质粒的构建

根据 hCRY1 的编码区序列 (NCBI Reference Sequence: NM_004075.4) 设计特异性引物, 引物由北京奥科鼎盛公司合成 (表 1)。以实验室保存的 hCRY1 真核表达质粒 pcDNA3.1-hCRY1 为模板, 以 hCRY1-FW 为上游引物, 以 hCRY1-RV 为下游引物进行 PCR, 扩增出编码 hCRY1 的 DNA 片段。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 回收目的条带。用限制性内切酶 *Xho* I 与 *Bam*H I 酶切目的片段与原核表达载体 pET28a(+), 然后用 T4 DNA 连接酶连接带有粘性末端的载体与片段。将连接后的质粒转入 *E. coli* DH5 α , 提取质粒进行酶切检测并将质粒送至北京睿博新科公司进行核苷酸测序, 酶切检测与测序正确的重组质粒命名为 pET28a(+)-hCRY1。

表 1 扩增目的基因 *hCRY1* 的引物

Table 1 PCR primers for amplification of target gene *hCRY1*

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
hCRY1-FW (Forward)	ATA <u>CTCGAGG</u> TCGGCTAT GAGCCGGAG	27
hCRY1-RV (Reverse)	CACGGATCCCTGATTCT CCTGAATGT	27

The base sequences underlined are the restriction sites.

1.3 重组蛋白的诱导表达

取 2 μ L 重组质粒 pET28a(+)-hCRY1 转化感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3) 并涂板。次日挑单菌落接入 20 mL 含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中摇菌过夜, 后以 1:100 的比例转接到 1 L 新鲜的含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中。于 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 摇菌至菌液 OD_{600} 约为 0.6 后, 加入 1 mmol/L 诱导剂异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 24 $^{\circ}$ C、200 r/min 诱导 6 h 后离心收菌。

1.4 重组蛋白的 SDS-PAGE、Western blotting 分析及质谱鉴定

对所收菌体进行超声破碎。从未诱导对照、破碎上清和破碎沉淀中各取 50 μ L 样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并用考马斯亮蓝 G250 进行染色。分别取上述样品进行 Western blotting 分析, 使用一抗为: 小鼠抗 His 抗体; 使用二抗为: HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体。用凝胶成像系统对 Western blotting 显影结果拍照并保存。将考马斯亮蓝 G250 染色后的符合预期大小的目标条带从凝胶中切下, 由中国科学院微生物研究所仪器中心完成质谱鉴定与比对工作。

1.5 重组蛋白的分离纯化

1.5.1 包涵体洗涤和溶解

洗涤液配方: 50 mmol/L Tris-base, 0.5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA), 50 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 2 mol/L 尿素, 用 NaOH 调节 pH 至 8.0。

溶解液配方: 50 mmol/L Tris-base, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (PMSF), 用 NaOH 调节 pH 至 8.0。

用 20 mL 新配置的洗涤液洗涤包涵体后离

心保留沉淀。于洗涤后的沉淀中加入 20 mL 新配置的溶解液进行超声破碎助溶, 破碎时间设置为工作 5 s, 停歇 10 s, 30 个循环, 破碎功率 200 W, 破碎完毕后摇床溶解 2 h。溶解完毕后离心并保留上清, 沉淀则再用适量溶解液重复上述步骤溶解, 直至沉淀体积不再明显减少。

1.5.2 梯度透析复性

复性液配方: 100 mmol/L Tris-base, 400 mmol/L 精氨酸, 2 mol/L 尿素, 5 mmol/L EDTA, 5 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.5 mmol/L 氧化型谷胱甘肽, 用 NaOH 调节 pH 至 8.0。

上样缓冲液配方: 50 mmol/L Tris-base, 50 mmol/L NaCl, 用 NaOH 调节 pH 至 8.0。

将蛋白溶液装入截流分子量为 10 kDa 的透析袋中, 用 2 L 含 6 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris-base, 50 mmol/L NaCl 的透析液透析, 透析需要在 4 °C 环境室中进行并保持磁力搅拌。次日每隔 2 h 向透析液中加入适量上样缓冲液, 直至透析液中尿素终浓度为 3 mol/L (即总体积为 4 L), 并再次于 4 °C 环境室中搅拌透析过夜。将装有蛋白溶液的透析袋从之前的透析液移至 4 L 复性液中, 于环境室中搅拌透析 24 h。此后再将装有蛋白溶液的透析袋移入 2 L 上样缓冲液中并在 4 °C 环境室中搅拌透析, 直到透析袋内有明显的白色絮状析出且数量不再增多 (约 24–48 h)。

1.5.3 Ni-NTA 亲和纯化

将透析后的蛋白液离心并保留上清。用截流分子量为 10 kDa 的超滤管将上清液浓缩至 20 mL。于 4 °C 环境室中上样于预先用上样缓冲液平衡好的 1 mL Ni-NTA His-Bind Resin 纯化树脂中, 分别使用 10 mL 含 50 mmol/L 和 300 mmol/L 咪唑的上样缓冲液洗脱杂蛋白和目标蛋白。

1.5.4 超滤浓缩

将 Ni-NTA 亲和纯化所得的 10 mL 蛋白洗脱缓冲液用上样缓冲液稀释 10 倍, 再用截流分子量为 10 kDa 的超滤管浓缩至原体积, 重复 3 次, 以去除洗脱缓冲液中咪唑, 最后将蛋白溶液浓缩至 5 mL。

1.6 蛋白功能验证

1.6.1 DNA 损伤诱导

取超滤浓缩后的 hCRY1 蛋白溶液稀释至 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以作备用, 同时用 300 mmol/L 咪唑配制 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 牛血清白蛋白, 经 Ni-NTA 亲和纯化树脂上样流出以及与 hCRY1 样品完全相同的超滤浓缩后作为对照 (cBSA)。用 cBSA 稀释 hCRY1 溶液至不同浓度来设立浓度梯度。

HaCaT 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 5% CO_2 、37 °C、饱和湿度下传代培养。将生长良好的 HaCaT 细胞接种于含玻片的 6 孔板内, 培养至约 80%–90% 细胞密度时换液, 3 h 后分别将不同浓度的 hCRY1 与 cBSA 加入细胞培养液, 使每个孔内的蛋白终浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。之后立刻将每组细胞置于 X-ray 照射机内进行照射, 剂量为 1.132 Gy/min, 照射时间 530 s, 总剂量约为 10 Gy。照射之后立刻将细胞培养液均换回含 10% 胎牛血清的 DMEM, 继续培养 45 min 后收获细胞爬片。

1.6.2 免疫荧光检验

对 HaCaT 细胞爬片进行免疫荧光染色, 使用一抗为: 兔抗 Phospho-Histone H2A.X 抗体; 使用二抗为: 山羊抗兔 IgG/FITC。封片后用激光共聚焦显微镜观察每组细胞内 H2A.X foci 亮度, 在完全相同的拍摄条件下每片分别选取 5 个不同视野统计平均荧光强度。

1.6.3 细胞凋亡检验

将生长良好的 HaCaT 细胞接种于 3 组 12 孔板中, 向每组 12 孔板细胞中分别加入 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hCRY1, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cBSA 以及 20 ng/mL 凋亡诱导剂 $\text{TNF-}\alpha^{[32]}$, 分别于不同时间点与未加任何蛋白的阴性对照组细胞一起检测细胞凋亡情况, 每组细胞、每个时间点检测 3 个复孔。每组复孔细胞用细胞凋亡检测试剂盒对细胞进行双染后用流式细胞仪进行统计分析并根据凋亡细胞百分比绘制曲线图。

2 结果与分析

2.1 pET28a(+)-hCRY1 的构建

我们对目标片段的 PCR 条件进行了探索, 其中最适宜的条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 32 个扩增循环 (94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测, 得到大小约为 1 800 bp 的 hCRY1 条带 (图 1), 证实目的片段已成功扩增。酶切检测连接产物, 可得到大小约为 1 800 bp 的 hCRY1 片段条带和大小约为 5 300 bp 的载体 pET28a(+) 条带 (图 2)。构建质粒的核苷酸测序以及 NCBI 数据库比对结果 (表 2) 均证实原核表达质粒 pET28a(+)-hCRY1 构建成功。

表 2 重组质粒 pET28a(+)-hCRY1 的核苷酸测序比对结果

Table 2 Result of nucleotide BLAST for prokaryotic expression plasmid pET28a(+)-hCRY1

Description	Features	Max score	Total score	Query cover (%)	E value	Identities (%)	Accession No.
Homo sapiens chromosome 12, alternate assembly CHM1_1.1	Cryptochrome-1	346	1 788	86	5e-92	100	NC_018923.2
Homo sapiens chromosome 12, alternate assembly HuRef	Cryptochrome-1	346	1 788	86	5e-92	100	AC_000144.1
Homo sapiens chromosome 12, GRCh38 primary assembly	Cryptochrome-1	346	1 793	86	5e-92	100	NC_000012.12

The sequences were BLAST on <http://blast.st-va.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

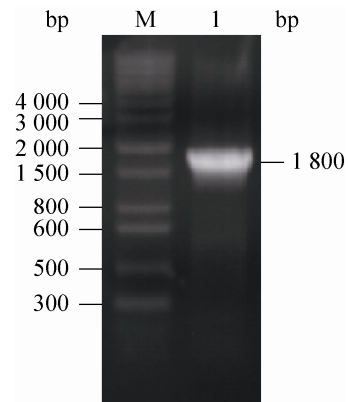


图 1 hCRY1 目的片段 PCR 产物的鉴定

Fig. 1 AGE analysis of the PCR product. M: DNA marker; 1: PCR product.

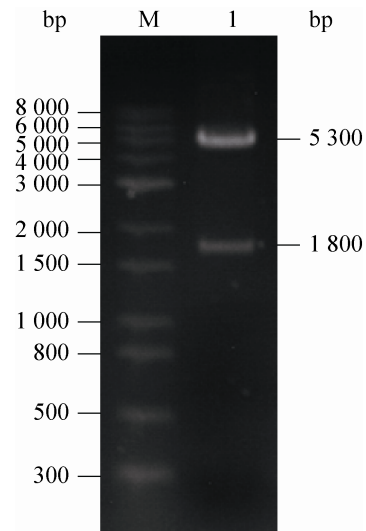


图 2 重组质粒 pET28a(+)-hCRY1 酶切鉴定

Fig. 2 AGE analysis of the digested pET28a(+)-hCRY1 plasmid. M: DNA marker; 1: digested plasmid.

2.2 重组蛋白的鉴定

菌体破碎后上清与沉淀分别用 SDS-PAGE 分析并用考马斯亮蓝 G250 染色, 沉淀中出现明显的 hCRY1 条带 (图 3A), 证明大部分目的蛋白以包涵体的形式表达。Western blotting 结果与考马斯亮蓝染色结果一致 (图 3B)。质谱鉴定以及与 NCBI 数据库比对结果证实该蛋白确实为 hCRY1 (NCBI Reference Sequence: NP_004066.1) (图 4)。

2.3 重组蛋白的纯化结果

将镍柱纯化前蛋白溶液样品与镍柱纯化过程中收集的流穿液、洗杂缓冲液、洗脱缓冲液共同进行 SDS-PAGE 电泳, 经考马斯亮蓝染色后可见杂蛋白已被显著去除 (图 5); 分别将超滤浓缩前后样品进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色, 可见蛋白样品浓度进一步提高 (图 6)。

用 Bradford 蛋白含量检测试剂盒测量每个步骤中的总蛋白含量, 测量目标蛋白条带与总

条带的灰度值之比以计算目标蛋白纯度, 总结蛋白纯化表 (表 3)。最终可从 1 L 菌液中提取 12.5 mg 纯度约为 95.1% 的 hCRY1。

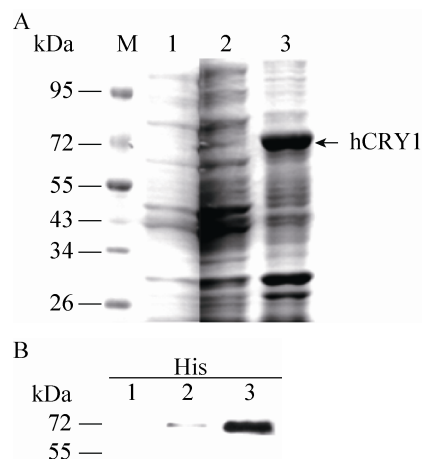


图 3 破碎样品的 SDS-PAGE 电泳 (A) 和 Western blotting 检测 (B)

Fig. 3 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) analysis of the *E. coli* lysates. M: protein marker; 1: uninduced lysates; 2: supernatant of the induced lysates after ultrasonication; 3: precipitant of the induced lysates after ultrasonication.

```

1  MGVNAVHWFR KGLRLHDNPA LKECIQGADT ITCVYILDPW FAGSSNVGIN RWRFLQCLE
61  DLDANLRKLN SRLFVIRGQP ADVFPRLFKE WNITKLSIEY DSEPFGKERD AAIKKLATEA
121 GVEVIVRISH TLYDLDKIIE LGGQPPLTY KRFQTLISKM EPLEIPVETI TSEVIEKCTT
181 PLSDDHDEKY GVPSLEELGF DTDGLSSAVW PGGETEALTR LERHLERKAW VANFERPRMN
241 ANSLLASPTG LSPYLRFGCL SCRLFYFKLT DLYKKVKKNS SPPLSLYGQL LWREFFYTAA
301 TNNPRFDKME GNPICVQIPW DKNPEALAKW AEGRTGFPWI DAIMTQLRQE GWIHHLARHA
361 VACFLTRGDL WISWEEGMKV FEELLLDADW SINAGSWMWL SCSSFFQQFF HCYCPVGFGR
421 RTDPNGDYIR RYLPVLRGFP AKYIYDPWNA PEGIQKVAKC LIGVNYKPM VNHAESRLN
481 IERMKQIYQQ LSRYRGLGLL ASVPSNPNGN GGFMGYSAEN IPGCSSSGSC SQGSGILHYA
541 HGDSQQTHLL KQGRSSMG TG LSGGKRPSQE EDTQSIGPKV QRQSTN

```

图 4 重组蛋白的质谱鉴定结果

Fig. 4 The result of mass spectrometer analysis. The amino acid sequences matched with hCRY1 were shown in red.

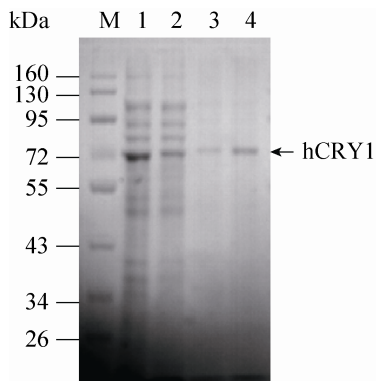


图5 Ni-NTA亲和纯化前后样品的SDS-PAGE电泳检测

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of hCRY1 purified using the Ni-NTA His-Bind Resin. M: protein marker; 1: column load; 2: load flowthrough; 3: 50 mmol/L imidazole wash; 4: 300 mmol/L imidazole wash.

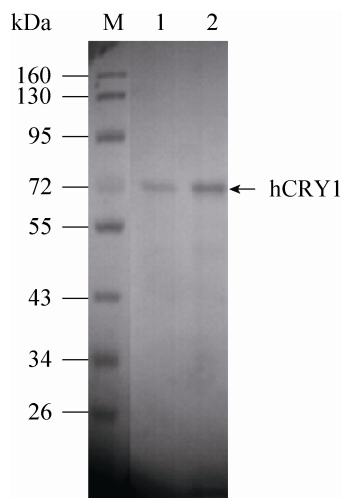


图6 超滤浓缩前后样品的SDS-PAGE电泳检测

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of the proteins before and after ultrafiltration. M: protein marker; 1: hCRY1 before ultrafiltration; 2: hCRY1 after ultrafiltration.

2.4 重组蛋白的射线防护功能检测

将hCRY1分别以0、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度加入细胞培养基中，10 Gy总剂量X-ray照射后孵育兔抗Phospho-Histone H2A.X抗体并制片观察，在完全相同的观察条

件下，可见未经X-ray照射的对照组细胞中的H2A.X foci荧光强度明显弱于经过X-ray照射的实验组细胞；当细胞培养基中的hCRY1浓度达到50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时，实验组细胞内H2A.X foci的荧光强度明显降低(图7)。在每个细胞爬片中随机选取5个视野，将荧光强度量化并进行统计学分析(图8)，分析结论表明该结果具有统计学意义。

用细胞凋亡检测试剂盒分别检测hCRY1、cBSA以及阳性对照TNF- α 在0、8、16、24 h等不同时间点对HaCaT细胞凋亡及坏死的影响，结果表明处理24 h之后，无论是hCRY1还是cBSA都不会引起细胞凋亡，而阳性对照诱导剂TNF- α 则可以明显诱导细胞凋亡(图9)。cBSA的阴性结果可以排除蛋白内小分子杂质的毒性作用对免疫荧光实验结果的影响；hCRY1的阴性结果则可以排除蛋白本身毒性以及6 \times His tag的毒性对免疫荧光实验结果的影响。

表3 从1 L菌液中分离纯化hCRY1的蛋白纯化表
Table 3 Summary of hCRY1 purification from 1 L LB culture

Step	Total protein ^a (mg)	hCRY1 (mg)	Yield ^b (%)	Purity ^c (%)
Gradient dialysis	123.2	57.2	—	46.4
Ni-NTA purification	13.7	12.7	22.2	92.7
Ultrafiltration replacement	12.5	11.9	93.8	95.1

^a Total amount of proteins was determined by Bradford protein assay kit. ^b Yield was calculated by dividing the amount of hCRY1 obtained after every step by the amount in previous step. ^c Purity was estimated from the scanned gel by measuring the band of hCRY1 as a fraction of all bands.

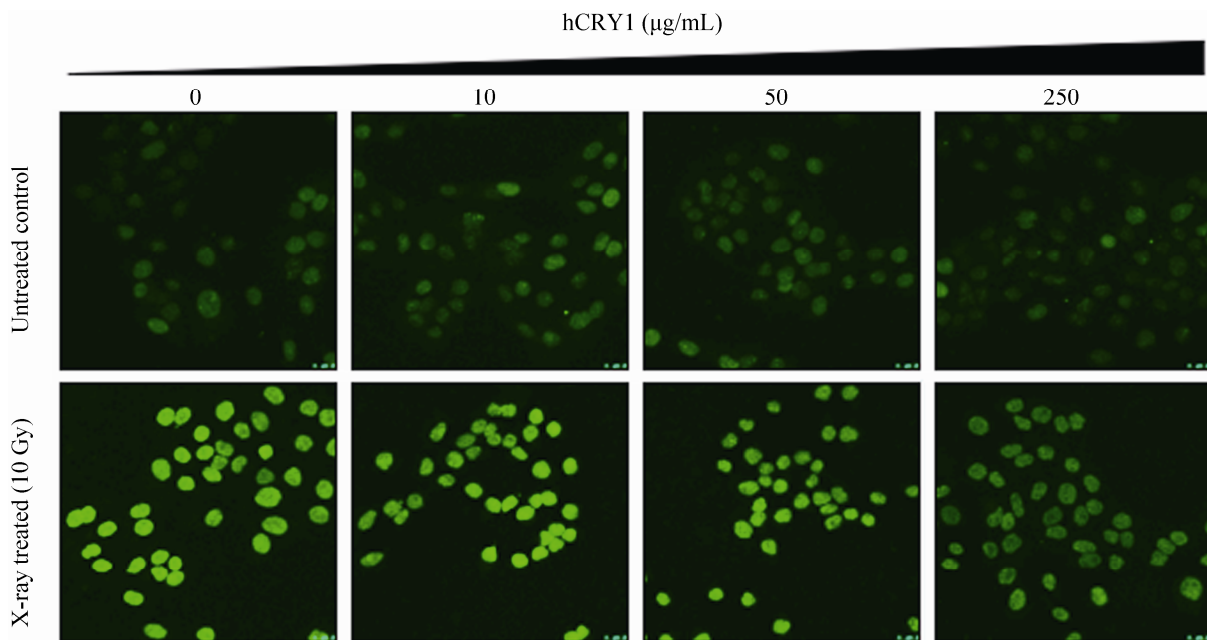


图 7 HaCaT 细胞中的 hCRY1 射线损伤防护功能检测

Fig. 7 The radiation protective efficiency of hCRY1 was monitored in HaCaT cells. Upper panel was X-ray untreated control correspond to indicated concentration; lower panel was 10 Gy X-ray treated sample.

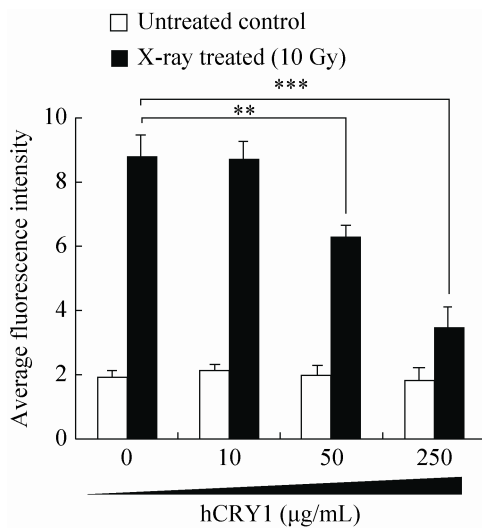


图 8 HaCaT 细胞中 H2A.X foci 的相对荧光强度

Fig. 8 The relative fluorescence intensity of H2A.X foci in HaCaT cells after treatment with different dose of hCRY1 (** $P < 0.05$ and *** $P < 0.001$).

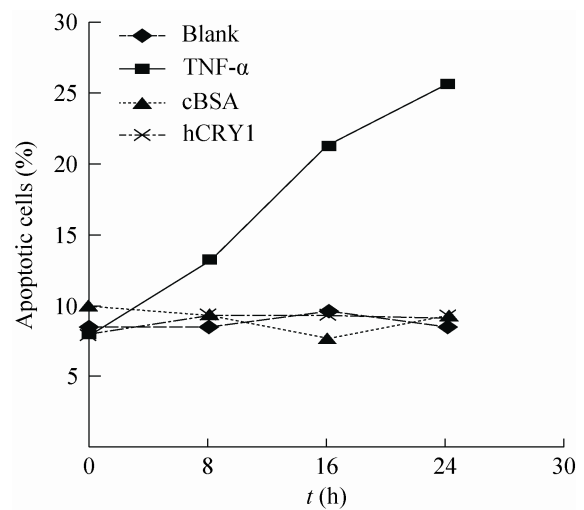


图 9 HaCaT 细胞凋亡检测

Fig. 9 Detection of apoptosis in HaCaT cells at different time points following treatment with the proteins as indicated.

3 讨论

目前,大肠杆菌表达系统广泛用于重组蛋白的生产,其优点是表达水平较高、操作简单。因此本研究选用 pET28a(+) 作为表达载体,通过上述原核表达纯化方法,1 L 菌液可收获 hCRY1 10–15 mg,产率远高于目前已知的其他方法,而由于该原核表达纯化方法所需要的培养基及后续纯化原料相对廉价,成本经计算远低于真核表达纯化方法和化学合成多肽方法。在大规模生产应用中,该方法提供了复性原料进行重复利用的可能性,这也将极大地降低成本。另外此方法操作过程简单,容错率高,操作人员不需要大量的专业知识即可进行生产工作。

我们在研究中曾尝试通过降低诱导温度和转速使蛋白可溶性表达,但效果均不理想。我们也探索了诱导时间和 IPTG 浓度对诱导效果的影响,发现当诱导时间超过 4 h, IPTG 浓度达到 0.5 mmol/L 时,诱导效果相差甚微。因此我们最终选择了效果相对较好且较为常用的 6 h 的诱导时间和 1 mmol/L 的 IPTG 浓度。从工业生产的角度说,这提供了一个节约成本的可能性。

在没有超声助溶的情况下, hCRY1 包涵体的溶解过程是非常缓慢的,因此我们使用较小功率的超声破碎来辅助包涵体的溶解。我们曾使用传统的包涵体复性方法(将蛋白液加入 500 mL 复性液中,再用浓缩杯及超滤管浓缩至 5 mL 左右的较小体积),但是目标蛋白的损失非常严重,1 L 菌液最终收获的目标蛋白不足 2 mg,因此我们使用梯度透析复性法来完成包涵体的复性。梯度透析复性中所使用的蛋白复性液可回收使用 3–5 次,这又是一个潜在的工

业生产上节约成本的空间。在使用上样缓冲液进行透析的过程中,会有大量絮状蛋白析出, SDS-PAGE 分析表明这些蛋白 90% 都是大小约为 35 kDa 的杂蛋白,因此这种析出对于 hCRY1 的纯化是极其有利的。超过 60% 的杂蛋白会在梯度透析的过程中被去除。

由于目标蛋白携带有 6×His tag,因此我们选择 Ni-NTA His-Bind Resin 纯化树脂来实现杂蛋白的去除。在多次纯化的过程中我们发现,再生后首次使用的镍柱往往吸附蛋白的特异性较差,而第 2–3 次使用时能够达到最理想的目标蛋白特异性吸附效果。当纯化树脂重复使用 5–7 次之后,载量则会明显下降,此时需要按照说明书对纯化树脂进行再生。

目前市场上常见的放疗保护剂主要以口服类和注射类药物为主,药物成分往往是亲质子含硫化物类物质,其中最常见的是氮磷汀和还原型谷胱甘肽^[33-34]。而 hCRY1 作为色素类放疗保护剂,有可能成为一种新型的药物。考虑到通过皮肤涂抹进行给药的可能性,我们使用人永生化角质形成细胞 HaCaT 进行蛋白的体外功能验证。细胞的 DNA 损伤实验表明了 hCRY1 确实能够使细胞受到的射线损伤明显减少,由于对照蛋白 cBSA 中添加了 300 mmol 咪唑并进行了与 hCRY1 完全相同的处理,基本可以排除蛋白中其他小分子杂质对实验结果的影响;而细胞凋亡的检测结果则排除了蛋白本身以及 6×His tag 的毒副作用对实验结果的影响。由于我们的 X-ray 照射实验是在加入蛋白溶液后立刻进行的,也可以排除 hCRY1 胞内作用的影响。因此我们认为 hCRY1 具有吸收射线并减少细胞损伤的功能,具备开发成为放疗保护剂的潜力。

REFERENCES

- [1] Ahmad M, Cashmore AR. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 1993, 366(6451): 162–166.
- [2] Gyula P, Schafer E, Nagy F. Light perception and signalling in higher plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6(5): 446–452.
- [3] Vieira J, Jones AR, Danon A, et al. Human cryptochrome-1 confers light independent biological activity in transgenic *Drosophila* correlated with flavin radical stability. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e31867.
- [4] Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, et al. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 1999, 284(5415): 760–765.
- [5] Cashmore AR. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time. *Cell*, 2003, 114(5): 537–543.
- [6] Lin C, Robertson DE, Ahmad M, et al. Association of flavin adenine dinucleotide with the Arabidopsis blue light receptor CRY1. *Science*, 1995, 269(5226): 968–970.
- [7] Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev*, 2003, 103(6): 2203–2237.
- [8] Yang HQ, Wu YJ, Tang RH, et al. The C termini of Arabidopsis cryptochromes mediate a constitutive light response. *Cell*, 2000, 103(5): 815–827.
- [9] Huala E, Oeller PW, Liscum E, et al. Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, 1997, 278(5346): 2120–2123.
- [10] Yu X, Liu H, Klejnot J, et al. The cryptochrome blue light receptors. *Arabidopsis Book*, 2010, 8: e0135.
- [11] Khan SK, Xu H, Ukai-Tadenuma M, et al. Identification of a novel cryptochrome differentiating domain required for feedback repression in circadian clock function. *J Biol Chem*, 2012, 287(31): 25917–25926.
- [12] Zaporozhan V, Ponomarenko A. Mechanisms of geomagnetic field influence on gene expression using influenza as a model system: basics of physical epidemiology. *Int J Environ Res Public Health*, 2010, 7(3): 938–965.
- [13] Ritz T, Adem S, Schulten K. A model for photoreceptor-based magnetoreception in birds. *Biophys J*, 2000, 78(2): 707–718.
- [14] Zhu H, Sauman I, Yuan Q, et al. Cryptochromes define a novel circadian clock mechanism in monarch butterflies that may underlie sun compass navigation. *PLoS Biol*, 2008, 6(1): e4.
- [15] Yoshii T, Ahmad M, Helfrich-Forster C. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity of *Drosophila*'s circadian clock. *PLoS Biol*, 2009, 7(4): e1000086.
- [16] Langmesser S, Tallone T, Bordon A, et al. Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Mol Biol*, 2008, 9: 41.
- [17] Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*, 2001, 63: 647–676.
- [18] Young MW, Kay SA. Time zones: a comparative genetics of circadian clocks. *Nat Rev Genet*, 2001, 2(9): 702–715.
- [19] Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, et al. Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 59–67.
- [20] Daiyasu H, Ishikawa T, Kuma K, et al. Identification of cryptochrome DASH from vertebrates. *Genes Cells*, 2004, 9(5): 479–495.
- [21] Selby CP, Sancar A. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 17696–17700.
- [22] Facella P, Lopez L, Chiappetta A, et al. CRY-DASH gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS Lett*, 2006, 580(19): 4618–4624.

- [23] Brunelle SA, Hazard ES, Sotka EE, et al. Characterization of a dinoflagellate cryptochrome blue-light receptor with a possible role in circadian control of the cell cycle. *J Phycol*, 2007, 43(3): 509–518.
- [24] Ono D, Honma S, Honma K. Postnatal constant light compensates cryptochrome1 and 2 double deficiency for disruption of circadian behavioral rhythms in mice under constant dark. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e80615.
- [25] Hanoun M, Eisele L, Suzuki M, et al. Epigenetic silencing of the circadian clock gene *CRY1* is associated with an indolent clinical course in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE*, 2012, 7(3): e34347.
- [26] Yu H, Meng X, Wu J, et al. Cryptochrome 1 overexpression correlates with tumor progression and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e61679.
- [27] Tosini G, Kasamatsu M, Sakamoto K. Clock gene expression in the rat retina: effects of lighting conditions and photoreceptor degeneration. *Brain Res*, 2007, 1159: 134–140.
- [28] Boone DR, Sell SL, Micci MA, et al. Traumatic brain injury-induced dysregulation of the circadian clock. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e46204.
- [29] Bassing CH, Alt FW. H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle*, 2004, 3(2): 149–153.
- [30] Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, et al. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998, 273(10): 5858–5868.
- [31] Burma S, Chen BP, Murphy M, et al. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 2001, 276(45): 42462–42467.
- [32] Higuchi M, Aggarwal BB. Differential roles of two types of the TNF receptor in TNF-induced cytotoxicity, DNA fragmentation, and differentiation. *J Immunol*, 1994, 152(8): 4017–4025.
- [33] Inoue T, Masai N, Oh RJ, et al. Adaptive replanning intensity-modulated radiotherapy for choroidal metastasis of breast cancer using optical coherence tomography. *J Radiat Res*, 2014, 55(3): 502–508.
- [34] Nakazawa H, Komori M, Mori Y, et al. Effect of skull contours on dose calculations in Gamma Knife Perfexion stereotactic radiosurgery. *J Appl Clin Med Phys*, 2014, 15(2): 4603.

(本文责编 陈宏宇)