

肿瘤坏死因子相关凋亡受体 (TRAIL) cDNA 的克隆及高效表达

陈宜顶¹ 闫长伟¹ 王联结¹ 刘丽²

(陕西科技大学生命科学与工程学院 咸阳 712081)¹ (空军总医院分子生物学中心实验室 北京 100036)²

摘要: 为了得到人 TRAIL cDNA 并克隆到 pGEM-T Vector。利用 PCR 技术获得目的基因片段, 通过原核表达载体 pBV220 构建人 TRAIL 表达质粒。将所得表达质粒转化宿主菌 DH5 α , 培养至 OD₆₀₀ 值到达 0.6 时 42 $^{\circ}$ C 诱导表达, 并通过 SDS-PAGE 分析表达结果。经凝胶薄层扫描, 对 pBV-TRAIL/DH5 α 工程菌热诱导 5h, TRAIL 衍生物蛋白的表达量最高约占菌体可溶性总蛋白的 31%。人 TRAIL 基因, 通过 pBV220 原核表达载体可在大肠杆菌中获得高效表达。

关键词: TRAIL, RT-PCR, 基因克隆, 原核表达

中图分类号: Q7-71 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0064-05

CLONING OF HUMAN TRAIL cDNA AND EXPRESSION

CHEN Yi-Ding¹ YAN Chang-Wei¹ WANG Lian-Jie¹ LIU Li²

(College of Life Science & Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an 712081)

(Key Laboratory of Molecular Biology, Airforce General Hospital, Beijing 100036)

Abstract: To obtain human TRAIL cDNA and expression products, we obtain target gene cDNA from human lymphocyte

收稿日期: 2002-11-18, 修回日期: 2003-01-15

through RT-PCR, and clone it to pGEM-T vector. We construct human TRAIL expression plasmid with pBV220 expression vector and target gene fragment obtained by PCR. Then we transform the plasmid to host cells, DH5 α , till OD₆₀₀ value reaching 0.6, induce expression of TRAIL at 42°C. The TRAIL products were obtained with about 31% yield of total bacterial soluble proteins after 5h inducing pBV-TRAIL/DH5 α engineering bacteria strain by gel thin layer scan analysis. Human TRAIL gene can highly express in *E. coli* through prokaryon expression vector, pBV220.

Key words: Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), RT-PCR, Gene clone, Prokaryon expression

肿瘤坏死因子相关的凋亡配体 (tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 的英文缩写即 TRAIL, 亦称凋亡素-2 配体 (Apo-2L), 属肿瘤坏死因子 (TNF) 家族成员, 于 1996 年报道由 Ptti 等人克隆得到^[1]。由于 TRAIL 选择性杀伤肿瘤细胞而不能诱导正常细胞凋亡^[2-4], 有望成为新一代抗肿瘤药物。

编码 TRAIL 的基因位于人 3q26 染色体上, 其 cDNA 长约 2kb, 编码 281 个氨基酸组成分子量为 32.5×10^3 的跨膜蛋白, 该蛋白定位于细胞表面, C 末端留在胞外。TRAIL 分子结构与 CD95L 及 TNF 类似, 呈典型的 II 型跨膜蛋白特征^[1,5], 其 N 末端 (15~40) 有一疏水区, C 末端 (115~281) 氨基酸残基形成一个同源三聚体结构, 被激活的三聚体可以从膜上游离出来, 诱导附近细胞的凋亡。据此, 我们在大肠杆菌中表达了人 TRAIL C 末端第 95~281 位 187 个氨基酸的蛋白, 分子量约 21kD。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: pGEM-T 克隆载体, 购自 Promega 公司; 原核表达载体 pBV220 带有 Amp 和 P_RP_L 启动子, 是一种温度诱导的大肠杆菌高效表达载体; 大肠杆菌 DH5 α , 以上质粒和菌种由空军总医院分子生物学中心实验室保存。

1.1.2 工具酶和主要试剂: 各种工具酶及试剂盒分别购自 Promega 公司、华美生物工程公司和北京友谊生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 人外周血淋巴细胞总 RNA 的提取: 用大连宝生物工程公司 TRIZOL RNA 提取试剂盒按说明书提供的操作程序提取淋巴细胞总 RNA。

1.2.2 寡核苷酸引物的合成: 根据文献报道^[1] 的人 TRAIL cDNA 序列, 我们设计了用以扩增人 TRAIL 基因的上、下游 TR-PCR 引物序列, 两条引物链长度均为 23bp, 上游引物: 5'-GAATAGAGAAGGAAGGCTTCACT-3', 下游引物: 5'-CATCTTCATAGTG-TATCATCCTG-3'; 根据 TRAIL cDNA 序列合成 PCR 引物, 上游引物: 5'-CGGAATTCAT-GACCTCTGAGGAAACC-3', 带有起始密码子 ATC 和 *EcoR* I 位点, 及下游引物: 5'-CGG-GATCCTTAGCCAACTAAAAAGGC-3', 带有终止密码子和 *Bam*H I 位点。所有引物均由大连宝生物工程公司合成。

1.2.3 RT-PCR 获得目的基因 cDNA: 在 10 μ L 用 DEPC 处理过的去离子水中加入总 RNA 1 μ g, 下游引物 1 μ L (50 μ mol/L), 70°C 变性 10min 后迅速冷却至 4°C 退火 5min, 然后依次加入 10 \times 逆转录缓冲液 2 μ L、AMV 逆转录酶 1 μ L (10U/ μ L), dNTP 10 μ L (2.5mmol/L), Rnasin 1 μ L (40U/ μ L), 用去离子水补平至 20 μ L, 于 42°C 反应 1h。逆转录结束后 100°C 5min 灭活 AMV 逆转录酶。短暂离心后吸出 10 μ L 的水相用作 PCR 模板扩增反转

录产物。采用 Promega 公司的 PCR 产物纯化试剂盒 (Wizard PCR Preps DNA Purification System) 直接纯化 PCR 产物。

1.2.4 目的基因 cDNA 克隆及鉴定: 将所获得的目的基因片段克隆入 pGEM-T 克隆载体转化 DH5 感受态, 然后进行 α 互补蓝、白斑阳性克隆的筛选。

1.2.5 DNA 序列分析: 用 Promega 公司质粒小量提取试剂盒 (Wizard Plus Minipreps DNA Purification System) 提取质粒 DNA 模板。参照说明书提供的操作程序提取和纯化质粒。随后送交北京鼎国生物工程公司测序。

1.2.6 外援基因在大肠杆菌中的表达: 将含 TRAIL 表达质粒的 DH5α 菌在含 Amp100μg/mL 的 LB 中 30℃ 活化过夜后, 按 1:100 的比例接种到 LB 中 30℃ 振荡培养, 至 OD₆₀₀ 达到 0.6 时, 转至 42℃ 继续培养 4~5h, 收集菌体; 洗 3 次, -20℃ 过夜。

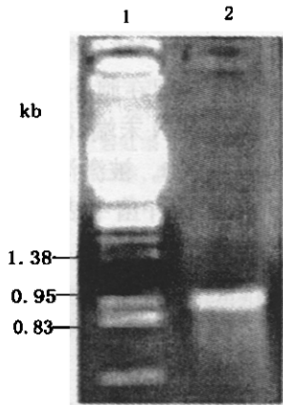


图 1 RT-PCR 获得的人 TRAIL cDNA 鉴定
1 λDNA-HindIII,
2 RT-PCR 产物 (989bp)

1.2.7 目的蛋白定量: 收集 10mL 细菌培养液后, 取沉淀用缓冲液 (20mmol/L Tris·HCl, 100mmol/L NaCl, pH8.0) 以 1:10 (W/V) 的比例重新悬浮超声破碎细胞 20min, 然后再 10,000 r/min 离心 2min 取上清 SDS-PAGE, 经考马斯亮蓝染色后所得胶用 Molecular Analyst 软件薄层扫描分析。同时取上清液 20μL 用蒸馏水稀释至 1mL, 用美国 Pharmacia 公司出品的 UV3000 分光光度仪测量 260nm 和 280nm 处的吸光度, 利用 Warburg-Christian 公式: 蛋白质 mg·mL⁻¹ = 1.45A₂₆₀ - 0.74A₂₈₀ 估算出蛋白浓度, 再根据表达量计算目的蛋白浓度。

2 结果

2.1 人 TRAIL cDNA 的获得与鉴定

利用 TR-PCR 从正常人淋巴细胞总 RNA 中获得人 TRAIL 基因 (图 1), 并将其克隆入 pGEM-T Vector 中。

```

5'-CCTCAC TGACTATAAAAGAAATAGAGAAAGGAAAGGCTTTCAGTGCACCGGCTGCGCTGCCTGAC
TTACAGCAGTCAGAC TCTGACAGGATCTATGCTATGATGGAGGTCCAGGGGGGAOCCAGC
CTGGGACAGACCTGGCTGCTGATCGTGATCTTTCACAGTCCCTCTGCACTCTCTGTGTG
GC TGTAACTTACGTGTACTTTTACC AACGAGCTGAGCCAGATCCAGGAC AAGTACTCCAAA
A(G)GTGGCAATGCTTCTTTCTTAAAGAAAGATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAG
AGTATGAAACAGCCCTGCTGCGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCACTCTGTTAGAAAGATG
ATTITGAGA ↓ ACCTCTGAGGAAACCATTCTACTAGTTCAGAAAGCAACAAAATATTTCT
CCCTAGTGAGAGAAAGAGGCTCTCAGAGACTAGCA (G)GCTCACATACTGGACCCAGAGGA
AGAAGCAACACATTTGCTTCTTCCAAACTCC AAGAATGAAAAGGC TCTGGCCOC AAAATA
AACTCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCATTCTGAGCAACTTGCACCTTGAGGAAT
GGTGAACTGGTATCCATGAAAAGGGTTTACTACTCTATTTC AAAACATACATTTTCGA
TTCTAGGAGGAAATAAAGAAAACACAAAGAACAGCAAAATGGTCCAAATATTTTAC
AAATACAC AAGTTATCTGACCCCTATATTTGTTGA TGAAAAGTGC TAGAAAATAGTTGTCG
TCTAAAGA TGCAGAAATATGACATCTATTCCATCTATCAAGGGGCAATATTTGAGCTTAAG
GAAAATGACAGAAATTTTGTCTTCTGTAACAAA TCGACACTTGTATAGACATGGACCATGAA
GCCAGTTTTTTCGGGCGCTTTTATGTTGGCTTTCAGGATGATACACTATGAGATGTTTCAAAAAAATCTGAC-3'

```

图 2 RT-PCR 获得的人 TRAIL cDNA 序列

□ 起始和终止密码子, — RT-PCR 引物,

() 文献报道序列

用 T7 和 SP6 引物 PCR 扩增目的基因并进行测序 (图 2)。测序结果显示, 文献报道^[5] 的人 TRAIL cDNA 序列与 TR-PCR 获得的人 TRAIL cDNA 序列相比, 编码区第 151 位和第 369 位碱基均从 A→G。前一个位点碱基的改变 (AGT→GGT) 使氨基酸 Ser→Gly, 后一个改变位点 (GCA→GCG) 位于密码子的第三位, 故仍编码 Ala。

2.2 pBV-TRAILD 表达质粒的构建

以质粒 pGEM-hTRAIL DNA

为模板, PCR 扩增编码 TRAIL C-末端 95~281 位 187 个氨基酸 583bp 的 cDNA (包括引物序列), 琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 扩增产物均为一条带, 分子量与预计的相同。将此 PCR 产物和原核热诱导型表达载体 pBV220 分别用 *EcoR* I 和 *Bam*HI 消化, 然后进行重组, 连接物转化 *E. coli*DH5 α 受体菌, 获得 pBV-TRAILD 重组质粒 (图 3)。

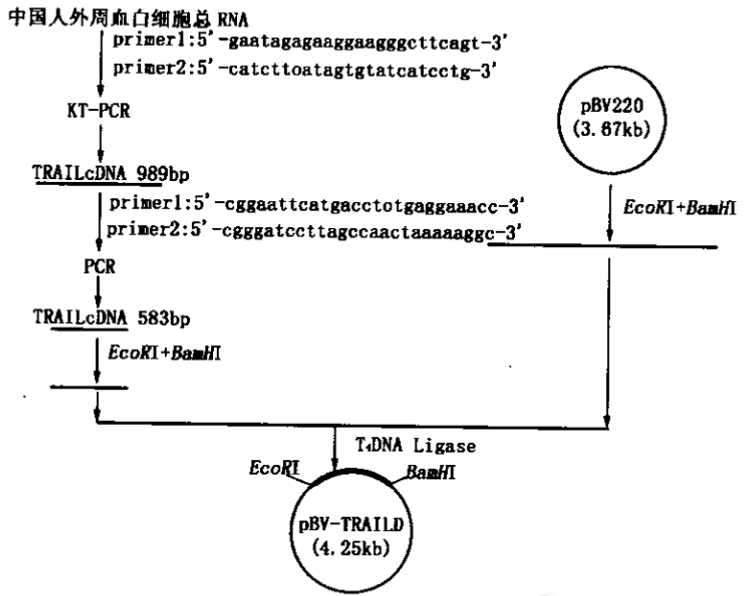


图 3 pBV-TRAILD 表达质粒构建示意图

正确的重组质粒用 *EcoR* I 和 *Bam*HI 双酶消化应得约 3.7kb 和 0.57kb 两条带 (图 4)。提取酶切鉴定正确的 pBV-TRAILD 重组质粒, 以合成的与 pBV220 载体克隆位点两边序列相应的两条引物对目的基因进行序列分析, 结果与设计的一致 (图 5), 该基因编码人 TRAIL C 末端第 95~281 位 187 个氨基酸。

2.3 pBV-TRAILD/DH5 α 工程菌对 TRAILD 蛋白的表达

将 pBV-TRAILD/DH5 α 工程菌和 pBV220/DH5 α 菌 (空载体转化 DH5 α) 分别接种于 LB 培养基中, 30 $^{\circ}$ C 培养至 $OD_{600} = 0.6$ 时, 立即升温至 42 $^{\circ}$ C 进行诱导 5h。诱导时, 1 λ DNA-*Hind* III/*EcoR*I, 2 *EcoR*I 和 *Bam*HI 消化 pBV-TRAILD/DH5 α 工程菌每 h 取 1mL 培养液, 4 $^{\circ}$ C 6,000 r/min 离心 5min, 弃上清, 加入 100 μ L 菌体裂解液裂菌, 100 $^{\circ}$ C 煮 5min, 10,000 r/min 离心 5min, 分别取上清 20 μ L 加样, 用 15% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 电泳胶用考马斯亮兰染色观察目的蛋白表达量的变化。当蛋白表达量不再明显增加后, 即收集 10mL 细菌培养液, 超声处理, 取上清进行电泳, 结果表明 (图 6), 经 42 $^{\circ}$ C 诱导的 pBV-TRAILD/DH5 α 工程菌蛋白与 pBV220/DH5 α 菌蛋白 SDS-PAGE 电泳比较, 除前者多一条约 21kD (与 TRAIL 衍生物预计的分子量一致) 染色较深的蛋白条带外, 其它区带均相同。经凝胶薄层扫描 Molecular Analyst 软件分析, pBV-TRAILD/DH5 α 工程菌 42 $^{\circ}$ C 诱导 5h, TRAIL 衍生物蛋白的表达量达到最高, 约占菌体可溶性总蛋白的 31%。初步估计, 用 LB 培养基培养, 可溶性目的蛋白的表达产量可达到约 520mg/L。

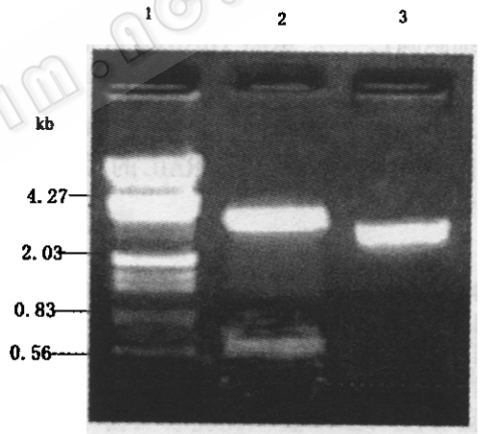


图 4 pBV-TRAILD 表达质粒的酶切鉴定

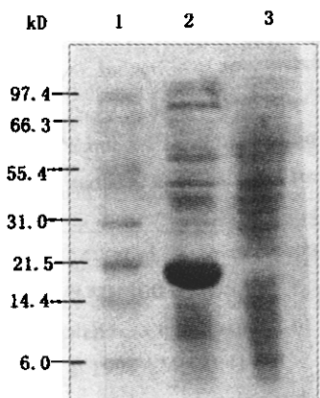


图5 TRAILD表达产物的 SDS-PAGE
1 Marker, 2 42℃诱导 5h 后 pBV-TRAILD/DH5α 工程菌, 3 42℃诱导 5h 含质粒 pBV220 的 DH5α

3 讨论

RT-PCR 技术是从生物体内获得基因的基本手段之一。对于真核生物, 染色体 DNA 基因是不连续的, 除了具有有编码功能的外显子外, 还夹杂有不参与编码的内含子, 只有从 DNA 转录生成的成熟 mRNA, 其开放阅读框才是编码序列。由于原核生物不具备转录产物的加工功能, 不能剪除内含子, 故而在使用大肠杆菌表达真核基因编码的蛋白质时, 目的基因必须是只含编码序列的 cDNA。逆转录过程可以实现以 RNA 为模板生成 DNA, RT-PCR 就是以 RNA 为模板, 以特异性引物为引导序列, 在逆转录酶的作用下合成 cDNA 的过程。通过这一步骤, 可以得到所需的仅含编码序列的基因片断。我们就利用了这一技术获得了 TRAIL 基因序列。

目前所发现的 TRAIL 生物学作用主要是能诱导突变细胞凋亡, 包括诱导转化系细胞、血液系统恶性肿瘤细胞、HIV 感染患者的 T 细胞以及由肺、肾、结肠、乳腺、前列腺、卵巢以及中枢神经系统在内的多种组织细胞来源肿瘤细胞凋亡^[6,7]。虽然 TRAIL 在肿瘤发生发展过程的作用机制目前还不是很清楚, 但可以肯定 TRAIL 对多种组织来源的肿瘤细胞具有确实有效的杀伤作用, 同时却不至于伤及正常细胞。TRAIL 的这种特异的肿瘤细胞选择性杀伤作用, 显示出其在肿瘤治疗方面的巨大潜力。本课题为 TRAIL 的后续研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Piti R M, Masters S A, Ruppert S, *et al.* J Bio Chem 1996, 271 (22): 12687~12690.
- [2] Degli-Esposti M A, Dougall W C, Smolak P J, *et al.* Curr Biol 1997, 7 (12): 1003~1006.
- [3] Masters S A, Sheridan J P, Pitti R M, *et al.* Curr Biol 1997, 7 (12): 1003~1006.
- [4] Pan G, Ni J, Yu G, *et al.* FEBS Lett 1998, 424 (12) 41~45.
- [5] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, *et al.* Immunity 1995, 3 (6): 673~682.
- [6] Snell V, Clodi K, Zhao S, *et al.* Br J Haematol. 1997, 99 (3): 618~624.
- [7] Ashkenazi A, Pai R C, Fong S, *et al.* J Clin Invest. 1999, 104 (2): 155~162.