

重组人 TRAIL 胞外片段的 原核表达系统选择及蛋白复性研究

吴冬梅, 金丽娜, 刘顺谊, 司马健, 郇一琳, 吴一凡, 乔波, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院生物制品研究所, 江苏 南京 210097)

[摘要] 采用 PCR 技术从人肝脏 cDNA 文库扩增出编码 114 ~ 281 位氨基酸的 TRAIL 基因片段, 将之克隆至原核表达载体 pET-30a、pQE-30 和 pJLA503 中, 上述重组载体经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 鉴定显示 pET-30a 系统表达效率最高, 目的蛋白占菌体总蛋白含量的 40% 左右; 采用透析法或梯度稀释法对 TRAIL 胞外区片段包涵体进行复性, 非还原 SDS-PAGE 的结果显示梯度稀释法明显好于透析法; 纯化后的 TRAIL 胞外区片段蛋白具有明显的生物学活性, 效果与标准品相似; 通过添加不同的折叠促进剂对复性效率影响的研究, 确立了 TRAIL 胞外区片段适宜的复性方法, 复性效率达 75% ~ 80%。

[关键词] TRAIL, 蛋白表达, 复性, 细胞凋亡

[中图分类号] Q816 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)02-0085-06

Prokarytic Expression and Renaturation of Recombinant Human Extracellular TRAIL Fragment

Wu Dongmei, Jin Lina, Liu Shunyi, Sima Jian, Tai Yilin, Wu Yifan, Qiao Bo, Yin Zhimin

(Institute of Biochemistry and Biological Product, School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: TRAIL truncated gene (amino acids 114 ~ 281) is amplified with PCR technology by using human liver cDNA as a template and cloned into three different expressing vectors including pET30a, pQE30 and pJLA503. SDS-PAGE analysis indicates that pET30a system is the best among the three expression systems after induction by 0.5 mmol/L IPTG and the expressed TRAIL extracellular domain accounts for about 40% of the total bacterial protein. Dilution are also compared with dialysis by which TRAIL extracellular domain inclusion bodies are renatured. Non-reducing SDS-PAGE shows that the renaturation rate by dilution is higher than that by dialysis. Purified protein shows obviously biological activity, which is similar to that of standard. The effect of different additives on TRAIL extracellular domain renaturation is studied and the optimal conditions are obtained. 75% ~ 80% of TRAIL extracellular domain inclusion bodies are renatured.

Key words: TRAIL, Protein expression, renaturation, apoptosis

0 引言

TRAIL/APO-2L (TNF-related apoptosis-inducing ligand/APO-2Ligand), 肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(或称凋亡素 2 配体)是 1995 年发现的一个新的肿瘤坏死因子超基因家族的成员^[1-4]. TRAIL 在人体多种组织器官广泛表达, 如肝脏、肺、胎盘、肾脏、脾脏、外周淋巴细胞等^[1-3]. TRAIL 能明显诱导多种肿瘤细胞凋亡^[5,6], 而对正常细胞几乎没有毒性作用^[7,8]. 体内实验也表现出抗肿瘤效果, 是被十分看好的潜在的抗肿瘤药物之一. 人 TRAIL 分子由 281 个氨基酸残基组成, 为典型的 II 型跨膜蛋白, N 端 15 ~ 40 氨基

收稿日期: 2005-02-20.

基金项目: 国家教育部基金(2002SWXSBJBC22)、江苏省教育厅重点基金资助项目(2005SWXTSBJB113).

作者简介: 吴冬梅, 女, 1979—, 硕士研究生, 主要从事分子生物学和基因工程药物的学习研究. E-mail: wdm8610@163.com

通讯联系人: 殷志敏, 1963—, 教授, 博士生导师, 主要从事细胞信号转导方向的研究工作, E-mail: Zhiminy_2000@yahoo.com

酸为疏水区域并形成跨膜结构, C 末端 114 ~ 281 氨基酸残基形成一个同源的三聚体结构, 为可溶性蛋白, 负责与受体结合^[1-3]. 对人 TRAIL 基因全长 cDNA 及胞外区 114 ~ 281 氨基酸残基(可溶性 TRAIL 分子片段) cDNA 片段的克隆及表达均有报道^[1].

目前国内对 TRAIL 的研究尚处于初步阶段, 而对 TRAIL 的基因工程产业化以及药理毒理研究更少. 原核基因工程产品有生产成本低、表达量高、包涵体蛋白易于纯化等优点, 但包涵体的复性工作是难点和关键环节, 对于规模化生产至关重要. 本文报道了 TRAIL 胞外区片段多种原核表达载体的构建. 通过对 TRAIL 胞外区片段包涵体洗涤条件的研究, 使 TRAIL 胞外区片段蛋白纯度提高到 90% 以上, 并确定了重组人 TRAIL 胞外区片段简单适宜的复性方法, 复性率达 75% ~ 80%, 纯度达 98%. 为 TRAIL 蛋白胞外区片段进一步中试放大研究打下了基础.

1 材料和方法

1.1 试剂和器材

人肝 cDNA 文库由南京大学生物化学系张敏跃教授提供, PfuTurbo DNA Polymerase(购自 Strategene 公司), 限制性内切酶和 T4DNA 连接酶(购自 Takara 公司), TRAIL 胞外区片段标准品(购自 Peppo Tech EC 公司), CM-Sepharose, Sephadex-100(购自 Amersham 公司), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 培养基和小牛血清(购自 Gibco 公司), 噻唑兰 (MTT/Thiazoyl blue tetrazolium bromide)(购自 Sigma 公司), IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside) 及其它试剂均购自上海生工生物工程公司进口分装.

1.2 质粒与菌株

pET-30a(购自 Novagene 公司); 质粒 pJLA503 和 pQE-30a、大肠杆菌 DH5 α 和 BL-21(DE3) 均为本室保存.

1.3 载体构建

以人肝 cDNA 文库为模板, 用 PCR 的方法扩增出全长 TRAIL 的基因(用于 TA 克隆, 数据未示), 再以 TRAIL 全长基因为模板, PCR 扩增出 TRAIL 胞外区(114 ~ 281 位氨基酸)基因片段, PCR 的条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 4 min 后, 94 $^{\circ}$ C 变性 50 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 在上下游引物中分别引入 NdeI 和 BamHI 的酶切位点, 插入 pET-30a 载体的 NdeI/BamHI 位点, 获得重组载体 pET30-114; 而将该基因片段插入 pJLA503 载体的 NdeI/BamHI 位点, 获得重组载体 pJLA503-114; 在上下游引物中分别引入 SacI 和 HindIII 的酶切位点, 插入 pQE30a 载体的 SacI/HindIII 位点, 获得重组载体 pQE30-114. 引物设计如下:

P1: 5'-ATGGCTATGATGGAGGTC-3'

P2: 5'-TTAGCCAACTAAAAAACTG-3'

P3: 5'-TATCCATATGGTGAGAGAAAGAGGT-3'

P4: 5'-ATTAGGATCCCTTAGCCAACTAAAAA-3'

P5: 5'-AGTAGAGCTCATGGTGAGAGAAAGAG-3'

P6: 5'-GCTGAAGCTTTTAGCCAACTAAAAA-3'

其中 P1 和 P2 用于扩增全长 TRAIL 的 cDNA, P3 和 P4 用于构建 pET30-114(胞外片断) 和 pJLA503-114(胞外片断), P5 和 P6 用于构建 pQE30-114(胞外片断). 上述载体中插入的基因经 DNA 序列测定与文献报道完全一致.

1.4 蛋白诱导表达

pET30-114, pJLA503-114 及 pQE30-114 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3). pET30-114 及 pQE30-114 重组载体诱导表达方法按 Novagene 公司 pET System Manual 操作, 含 pJLA503-114 重组载体的大肠杆菌于 30 $^{\circ}$ C 培养, 42 $^{\circ}$ C 诱导. 三种重组载体分别诱导表达 6 h 后进行 SDS-PAGE 分析鉴定目的蛋白表达量.

1.5 包涵体的提取与洗涤

工程菌在含有 Amp 的 LB 培养基中培养并诱导表达, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 5 min 离心收集菌体, 超声破菌提取包涵体, 然后分别用 4 mol/L 尿素、2 mol/L 尿素、0.5% TritonX-100 漂洗, 最后 4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min, 5 min 离心收集沉淀.

1.6 包涵体的溶解与复性

1.6.1 稀释复性

包涵体溶于 8 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris 盐酸缓冲液 (pH 8.0) 中, 将蛋白浓度调整至 0.4 mg/mL, 于室温用 50 mmol/L Tris 盐酸缓冲液, 100 μ mol/L ZnCl_2 (pH 8.0) 缓冲液中逐步梯度稀释, 缓慢搅拌, 至尿素浓度达 0.1 mol/L 时, 于 4℃ 在 10 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 8.0) 中透析。

1.6.2 透析复性

包涵体溶于 8 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris 盐酸 (pH 8.0) 中, 将蛋白调整浓度至 0.1 mg/ml, 随后装入透析袋中, 分别用 1 mol/L 尿素复性液 (1 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris 盐酸, 100 μ mol/L ZnCl_2 , pH 8.0), 0.5 mol/L 尿素复性液 (0.5 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris 盐酸, 100 μ mol/L ZnCl_2 , pH 8.0), 0.1 mol/L 尿素复性液 (0.1 mol/L 尿素, 50 mmol/L Tris 盐酸, 100 μ mol/L ZnCl_2 , pH 8.0) 以及 10 mmol/L PBS (pH 8.0) 溶液于 4℃ 分 4 次经 48 h 逐步透析复性。

1.7 非还原 SDS-PAGE

制备浓度为 13% 的凝胶, 上样缓冲液中除了不含 DTT 和巯基乙醇外, 其它成分与还原 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳相同^[9]。

1.8 测蛋白质浓度:

用 BSA (牛血清白蛋白) 作标准曲线, 采用考马斯蓝染料结合法^[6], 测定蛋白质浓度。

1.9 复性产物的纯化

采用 Sephadex G100 分子筛凝胶过滤, 以 10 mmol/L PBS (pH 8.0) 洗脱, 流速 0.5 ml/min。

1.10 TRAIL 胞外区片段生物学活性测定及复性率的计算

Hela 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养液的 96 孔板中, 以标准品 TRAIL 胞外区片段蛋白为参比, 加入不同浓度的复性 TRAIL 胞外区片段蛋白, 于 37℃, 5% CO_2 中继续孵育 24 h 后, 通过 MTT 法^[10]测定细胞 $OD_{570\text{nm}}$ 值。重组人 TRAIL 胞外区片段的复性效率按以下公式计算:

$$x = \text{复性 TRAIL 胞外区片段蛋白浓度} / \text{变性 TRAIL 胞外区片段蛋白浓度}$$

$$y = \text{复性 TRAIL 胞外区片段蛋白比活性} / \text{标准品 TRAIL 胞外区片段蛋白比活性}$$

$$\text{复性率} = x \times y \times 100\%$$

2 结果

2.1 三种重组人 TRAIL 表达载体的酶切鉴定

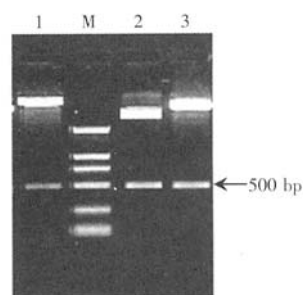
pET30-114 和 pJLA503-114 用 NdeI 和 BamHI 进行双酶切, pQE30-114 用 SacI 和 HindIII 进行双酶切, 1% Agarose 电泳鉴定 (图 1.)

2.2 三种重组人 TRAIL 表达载体蛋白表达量的比较

将含 pET-114, pQE-114 和 pJLA503-114 的转化子分别诱导表达, SDS-PAGE 鉴定发现 pET-114 载体表达效率最高, 凝胶成像系统 (江苏捷达科技发展有限公司捷达 801 系列) 扫描分析显示, 目的蛋白占总菌蛋白的 40% 左右 (图 2.)

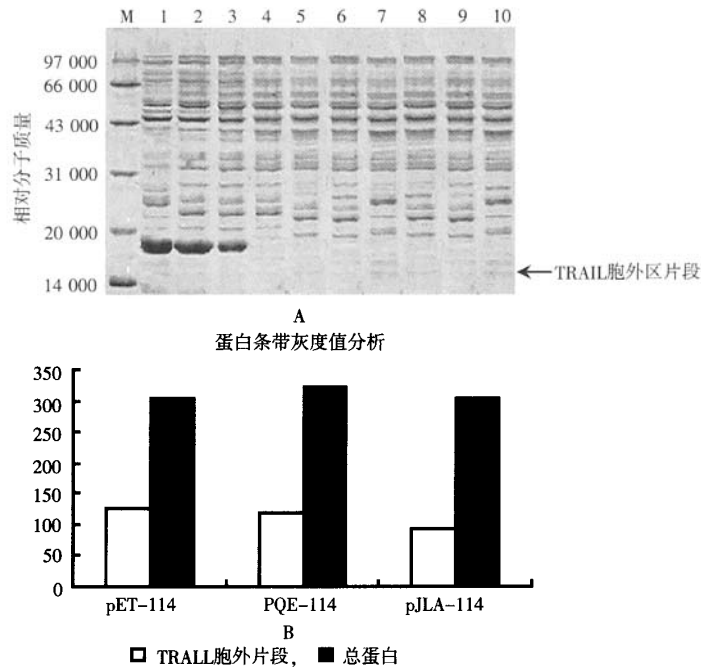
2.3 包涵体的洗涤纯化

pET-114 转化子诱导表达后经超声破菌和 4 mol/L 尿素、2 mol/L 尿素以及 0.5% TritonX-100 逐步漂洗后, 包涵体纯度经凝胶扫描分析达 90% 左右 (见图 3.)



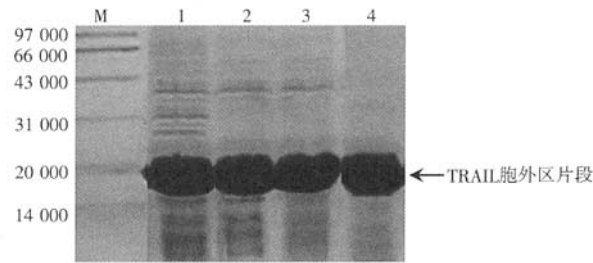
1: pET-114 (NdeI, BamHI 酶切); 2: pQE-114 (SacI, HindIII 酶切); 3: pJLA503-114 (NdeI, BamHI 酶切); M: DNA Marker (DL-2000)

图 1 重组载体的酶切鉴定



A. 1:pET-114 诱导; 2:pQE-114 诱导; 3:pJLA503-114 诱导; 4:pET-30a 空载体转化子诱导; 5:pQE-30a 空载体转化子诱导; 6:pJLA503 空载体转化子诱导; 7:pET-114 未诱导; 8:pQE-114 未诱导; 9:pJLA503-114 未诱导; 10:BL21 空菌总蛋白; M:Low MW Marker
B. SDS-PAGE 的蛋白条带灰度值分析 pET-114、pQE-114 和 pJLA503-114 分别诱导的 TRAIL 蛋白占总菌蛋白的百分比分别为:40.61%、36.82%、30.38%

图 2 三种表达载体表达 TRAIL 蛋白的 13%SDS-PAGE 图



1: 未漂洗样品; 2:4mol/L 尿素漂洗; 3:4mol/L 尿素+2mol/L 尿素漂洗; 4:4mol/L 尿素+2mol/L 尿素+0.5%TritonX-100 漂洗; M:Low MW Marker

图 3 包涵体经漂洗纯化后 15%SDS-PAGE 图

2. 4 稀释复性与透析复性的结果

取 20 mg 包涵体溶于 50 mL 变性液中,取 25 mL 变性液 (8 mol/L 尿素) 调整蛋白浓度至 0.1 mg/mL 进行透析复性 (方法),透析后体积为 105 mL, 经 4℃, 12 000 r/min, 10 min 离心后去沉淀测得上清中蛋白浓度为 30.81 mg/L,得到总复性蛋白 3.34 mg;另取 25 mL 变性液进行稀释复性 (方法),透析后体积为 2 L,经 4℃, 12 000 r/min, 10 min 离心后超滤浓缩至 112 mL, 测得此时蛋白浓度为 57.86 mg/L,得到总复性蛋白 6.48 mg;经非还原 SDS-PAGE 鉴定透析复性液中单体的含量约 20%,而稀释后复性液中未检测到单体蛋白,后者复性

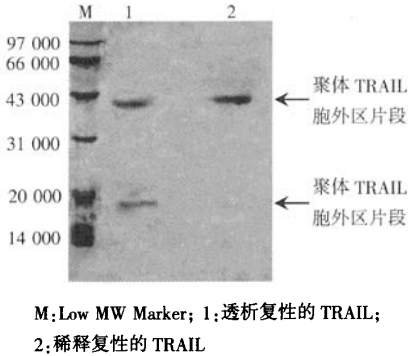


图 4 复性后 TRAIL 的非还原 SDS-PAGE 电泳图

效果明显好于前者(图4)。

2.5 复性 TRAIL 蛋白的凝胶过滤纯化

由于包涵体经洗涤后纯度很高,由稀释复性得到 TRAIL 胞外区片段蛋白几乎均为三聚体,因此我们采用一步凝胶过滤对 TRAIL 胞外区片段蛋白进行分离纯化。稀释复性获得的 TRAIL 胞外区片段蛋白经浓缩后上样 Sephadex G-100 凝胶柱,以 10 mmol/L PBS(pH 8.0)进行洗脱,洗脱峰见图 5),收集到的蛋白经 14% SDS-PAGE 电泳鉴定为单一条带,扫描分析纯度 98% 以上(图 6)。

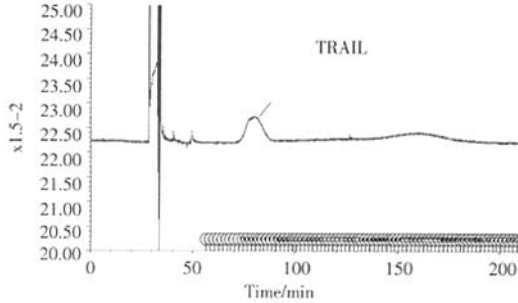
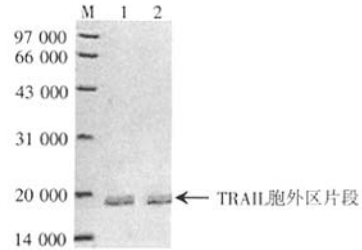


图5 复性 TRAIL 胞外区片段经 Sephadex G-100 的紫外检测图



1:标准品 TRAIL; 2:稀释复性蛋白峰; M:Low MW Marker

图6 纯化的 TRAIL 蛋白峰 14%SDS-PAGE

2.6 纯化蛋白的生物学活性测定

结果显示,复性 TRAIL 胞外区片段蛋白的促死亡曲线与标准品的促死亡曲线相吻合(图7),表明 TRAIL 胞外区片段蛋白复性后具有明显的生物活性。由死亡曲线的近似斜率推算出 425 ng/mL 的标准品 TRAIL 胞外区片段即能杀死 50% HeLa 细胞,而复性 TRAIL 胞外区片段蛋白的半致死浓度为 500 ng/mL,活性为标准品的 85% 左右。定义 5 ng 复性 TRAIL 胞外区片段蛋白为一个活性单位,那么通过梯度稀释复性的产品比活性为 2.0×10^5 U/mg,标准品的比活性为 2.35×10^5 U/mg。复性率按公式(方法 1.10)计算。结果:用梯度稀释方法,复性率可达 55.1%。

2.7 折叠促进剂对蛋白复性的影响

我们在 TRAIL 胞外区片段稀释复性过程中发现蛋白仍有一定程度的凝聚沉淀现象,据报道,蛋白质在复性过程中,蛋白质分子的疏水核心暴露于溶液中,肽链间疏水区域的非特异相互作用会导致蛋白无规凝聚的形成^[11],而复性过程中添加折叠促进剂如甘油^[12],PEG^[13],L-精氨酸^[14],Triton X-100^[15]等可以有效地抑制无规则凝聚。我们比较了在向复性液中添加各种折叠促进剂对 TRAIL 胞外区片段复性的影响,发现 0.03 g/L 的 PEG 6000 可明显提高蛋白复性效率(数据未显示)。图 8 显示 5% 甘油或 0.5 mol/L 的 L-精氨酸也可以增加复性效率,还显示 0.03 g/L 的 PEG 6000 加上 5% 甘油能进一步提高复性效率,但 Triton X-100 对复性没有效果。

3 讨论

目前国内 TRAIL 的克隆表达研究已有报道^[16]。本文构建了三种原核表达系统并进行比较,表达效率最高的系统中目的蛋白高达 40% 左右。对一种特定蛋白包涵体进行复性的具体方法需要根据反复实验进行筛选比较来确定,透析法的好处是不增加体积,通过降低外透液浓度来控制变性剂去除速度,但由于作

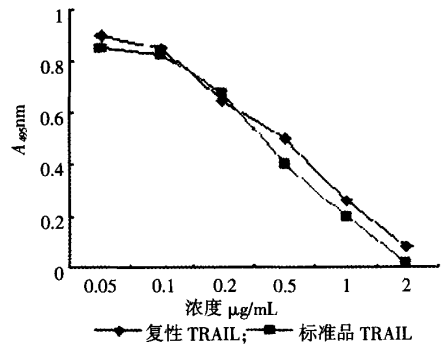
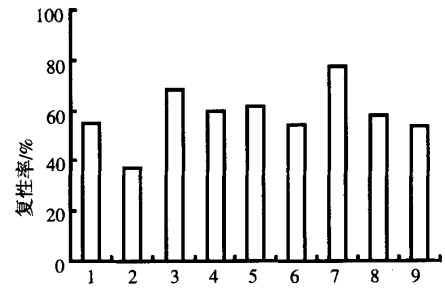


图7 复性 TRAIL 胞外区片段蛋白刺激 HeLa 细胞的死亡曲线



1: 无添加剂; 2: 无添加剂 (透析法); 3: PEG6000 (0.03 g/L); 4: L-精氨酸 (0.5 mol/L); 5: 5% 甘油; 6: 0.01% Triton X-100; 7: PEG6000 (0.03 g/L) + 5% 甘油; 8: PEG6000 (0.03 g/L) + L-精氨酸 (0.5 mol/L); 9: PEG6000 (0.03 g/L) + 0.01% Triton X-100

图8 折叠促进剂对 TRAIL 胞外区片段复性的影响

用时间较长,易形成蛋白质聚集.而稀释法操作的样品量较大,稀释速度要控制好,但它将蛋白质直接加入复性缓冲液中,因而是一种更简单快速的方法.我们首次对 TRAIL 胞外区片段包涵体的两种复性方法进行了比较,并探讨了折叠促进剂对 TRAIL 胞外区片段复性的影响,最终确定了稀释复性法是较好的方法,其复性率达 75%~80%.有效地解决了 TRAIL 胞外区片段包涵体复性的问题,为 TRAIL 胞外区片段基因工程的产业化研究奠定了基础.

[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*, 1995, 3(6): 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(22): 12687-12690.
- [3] Gura T. How TRAIL kills cancer cells, but not normal cells[J]. *Science*, 1997, 277(5327): 768.
- [4] Griffith T S, Lynch D H. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms [J]. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(5): 559-563.
- [5] Wajant H, Haas E, Schwenzer R, et al. Inhibition of death receptor-mediated gene induction by a cycloheximide-sensitive factor occurs at the level of or upstream of fas-associated death domain protein (FADD) [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(32): 24357-24366.
- [6] Bernard D, Quatannens B, Vandenbunder B, et al. Rel/NF-kappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(3): 27322-27328.
- [7] Clarke P, Meintzer S M, Moffitt L A, et al. Two distinct phases of virus-induced nuclear factor kappaB regulation enhance tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in virus-infected cells [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(20): 18092-18100.
- [8] Burns T F, El-Deiry W S. Identification of inhibitors of TRAIL-induced death (ITIDs) in the TRAIL-sensitive colon carcinoma cell line SW480 using a genetic approach [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(41): 37879-37886.
- [9] Daniel M B, Stuart J E. *Protein Methods* [M]. New York: Wiley-Liss Press, 1991: 50-160.
- [10] Lee M W, Park S C, Kim J H. The involvement of oxidative stress in tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in HeLa cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 182(1): 75-82.
- [11] Goldberg M E, Rudolph R, Jaenicke R. A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme [J]. *Biochemistry*, 1991, 30(11): 2790-2797.
- [12] Maeda Y, Yamada H, Ueda T, et al. Effect of additives on the renaturation of reduced lysozyme in the presence of 4M urea [J]. *Protein Engineering*, 1996, 9(5): 461-465.
- [13] Cleland J L, Wang D I. Cosolvent assisted protein refolding [J]. *Bio/Technology*, 1990, 8(12): 1274-1278.
- [14] Kohno T, Carmichael D F, Sommer A, et al. Refolding of recombinant proteins [J]. *Meth Enzymol*, 1990, 185: 187-195.
- [15] Sarkar S N, Ghosh N. Reversible unfolding of Escherichia coli alkaline phosphatase. active site can be reconstituted by a number of pathways [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 330(1): 174-180.
- [16] 朱迅,刘彦信,马正宇,等. sTRAIL 在大肠杆菌中的表达及其诱导细胞凋亡活性的研究 [J]. *科学通报*, 1999, 44(9): 972-975.

[责任编辑:孙德泉]