

# 人可溶性增殖诱导配体在大肠杆菌中的表达、纯化及生物活性鉴定

岳园园, 水燕, 管政兵, 张双全

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京, 210097)

**[摘要]** 人增殖诱导配体在促肿瘤细胞增殖以及自身免疫性疾病中具有重要的作用. 从 GenBank 中查出人 APRIL 的序列号(AF046888), 根据其胞外可溶部分序列设计引物, 采用 RT-PCR 技术从健康人新鲜血液单核细胞(PBMCs)总 RNA 中克隆出人 sAPRIL cDNA, 将该 cDNA 克隆入原核表达载体 pET30a, 经 IPTG 诱导后在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得高效表达, 经 SDS-PAGE 后在 17 000 左右有一明显的表达条带, 该蛋白主要以包涵体形式存在, 表达量达 45% 左右, 将包涵体蛋白变性后进行细胞生物活性实验, 为进一步研究其临床应用奠定了基础.

**[关键词]** 增殖诱导配体, 基因克隆, 肿瘤细胞, 增殖

**[中图分类号]** R 392.11 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)04-0086-05

## Cloning, Expression and Characterization of Human Soluble APRIL in Escherichia Coli

Yue Yuanyuan, Shui Yan, Guan Zhengbing, Zhang Shuangquan

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Jiangsu Province Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210097, China)

**Abstract:** A proliferation-inducing ligand plays an important role in promoting the proliferation of tumor cells and its own immunized diseases. We screen the accession of hsAPRIL in GenBank (AF:046888) and design the primers according to part of its extracellular sequence. The total RNA, extracted from human blood, is amplified into the sequence of cDNA encoding sAPRIL by RT-PCR and cloned into the vector pET30a for expression in *Escherichia coli*. After purification and refolding, the protein is used for biological activity assay. After induction by IPTG, the protein is examined by SDS-PAGE and its active form is obtained. After sequencing, the APRIL gene is confirmed to clone into the recombinant expression vector. The rhsAPRIL is about up to 40% in the total protein expressed in the *Escherichia coli*. After purification and refolding, the protein can stimulate tumor cell proliferation.

**Key words:** a proliferation-inducing ligand, gene clone, tumor cell, proliferation

## 0 引言

肿瘤坏死因子家族(TNF)的细胞因子具有不同的生物功能, TNF- $\alpha$  是一种具有促炎症反应的多效能细胞因子, 而 CD95L 与 TRAIL/Apo2L 则诱导表达同系受体细胞的凋亡. 其他 TNF 家族的成员, 如 TRANCE, LIGH 和 TWEAK 都参与免疫过程与组织内态稳定的调控. 增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand 即 APRIL), 又称作 TNF 相关的死亡配体 I (TNF-related death ligand-1 即 TRD-1), 是一种 II 型跨膜蛋白, 它于 1998 年由 Hahne 等发现, 其基因定位于人染色体 17p13.1<sup>[1]</sup>, 与 TNF 家族的另一个成员 TWEAK(TNF 相关的凋亡弱诱导子)临近. 在 TNF 配体家族众多成员中, APRIL 与 BAFF 最为接近, 两者的

收稿日期: 2006-06-15.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30271093).

作者简介: 岳园园, 女, 1981—, 研究生, 主要从事生物化学的学习与研究. E-mail: yuanyuanroom@126.com

通讯联系人: 张双全, 1952—, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学的教学与研究. E-mail: zhangshuangquan@263.net

TNF 同源区域(TNF homology domain)具有 30% 的相似序列. 人的 APRIL 基因有 6 个外显子, 经过转录后形成 3 种可变剪接的 mRNA, 分别为 1.8, 2.1 和 2.4 kb, 编码全长为 250 个氨基酸的蛋白, 其中 29~49 氨基酸为疏水的跨膜区, 50~250 氨基酸为胞外区, 经 furin 转换酶在富含精氨酸的基序 R-K-R-R 处(即 101~104 氨基酸残基处)裂解后, 部分胞外区从膜上脱下, 形成天然 sAPRIL(即 105~250 氨基酸残基区域)<sup>[2]</sup>. 全长 APRIL 和 sAPRIL 的生物学活性基本一致, 表明 105~250 氨基酸是人 APRIL 发挥功能的主要区域<sup>[3]</sup>. 成熟的 sAPRIL 是一个大约 63 000 的非共价三聚体. 据推测, 鼠 APRIL 的晶状结构与人 APRIL 相似, 它是一个紧密的三聚体, 其主链骨架折叠方式与人 BAFF 很相似.

APRIL 主要在恶性肿瘤中表达, 作为 TNF 家族的一个成员, APRIL 在各种自身免疫性疾病及恶性肿瘤中的作用日益为人们关注<sup>[4,5]</sup>, 它在体内和体外都能促进一些肿瘤细胞系的增殖. 本文报道了用大肠杆菌高效表达人的可溶性增殖诱导配体, 纯化复性后对其生物活性进行鉴定.

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料和试剂

人血液购自江苏省血液中心, 引物由 invitrogen 公司合成, Trizol 试剂购自 invitrogen 公司, RPMI-1640 培养基为 Roche 公司产品. 质粒小提试剂盒购自 Promega 公司, 割胶回收试剂盒及限制酶购自大连宝生物公司. 原核表达载体 pET-30a, 表达菌株 BL21(DE3)均由本实验室保存.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞总 RNA 的提取

取新鲜人外周血液, 利用 Trizol 试剂按一般步骤提取其总 RNA, 将提取的总 RNA 用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性.

#### 1.2.2 RT-PCR 扩增人 sAPRIL cDNA

上游引物为: 5' TCAGGACATATGTCATCATCATCATCATGCAGTGCTCACCCA 3' (斜体部分为 NdeI 酶切位点, 加入 6 个 His 标签肽, 便于纯化)、下游引物为 5' ACTGAGGGATCCTCACAGTTTCACAAACCCCAG 3' (斜体部分为 BamHI 酶切位点).

RT-PCR 的过程如下:

(1) 逆转录: 在总体积为 20  $\mu$ L 的反应液中含有总 RNA 5  $\mu$ L (约 1  $\mu$ g)、5 $\times$  反应缓冲液 4  $\mu$ L, AMV 反转录酶 1  $\mu$ L (10 U), RNase inhibitor 0.5  $\mu$ L (20 U), Oligo(dT)<sub>18</sub> 1  $\mu$ L (50 pmol), DEPC 水 6.5  $\mu$ L, 轻轻吹打混匀, 室温 10 min 后放入 42  $^{\circ}$ C 恒温水浴中保温 1 h, 在冰水上冷却 2 min, 即得到 cDNA.

(2) PCR: 利用逆转录所得模板进行 PCR, 体系为 50  $\mu$ L, 上、下游引物各 1  $\mu$ L (各 2  $\mu$ mol/L), dNTP 4  $\mu$ L (每种为 2.5 mmol/L), MgCl<sub>2</sub> 3  $\mu$ L (25 mmol/L), 10 $\times$  缓冲液 5  $\mu$ L, rTaq 酶 0.5  $\mu$ L, 模板 cDNA 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 34.5  $\mu$ L; 反应程序为: 94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 然后 94  $^{\circ}$ C 30 s, 51  $^{\circ}$ C 40 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s 共 30 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 10 min. 反应完成后, 取 3  $\mu$ L 产物于 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳, 凝胶扫描仪下观察并记录结果.

#### 1.2.3 DNA 的克隆及序列测定

将 RT-PCR 产物与载体 pET-30a 经 NdeI 与 BamHI 酶切后分别用割胶回收试剂盒回收, 16  $^{\circ}$ C 过夜连接于原核表达载体 pET-30a 中, 用连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 利用具有 Kan 抗性的固体 LB 板筛选后得到阳性重组子, 提质粒经 NdeI 与 BamHI 双酶切鉴定, 获得重组质粒(命名为 pET-30a/APRIL), 序列测定由上海 invitrogen 公司完成, 并将测序结果在 NCBI 服务器上进行同源性比较(结果未显示).

#### 1.2.4 重组人 APRIL(rhAPRIL)的表达及鉴定

将测序后的重组质粒 pET-30a/APRIL 转化表达菌株 BL21(DE3)的感受态细胞后再次利用 Kan 抗性的固体 LB 板进行抗性筛选, 将筛选所得阳性重组子进行扩大培养, 在 37  $^{\circ}$ C 生长至 A<sub>600</sub> 为 0.6~0.8 后, 在 IPTG 终浓度为 1 mmol 的条件下培养 5 h, 以诱导目的蛋白的表达, 超声碎菌后进行 SDS-PAGE(分离胶 15%, 浓缩胶 4%)分析目的蛋白的表达部位及表达水平. 以 His 标签肽为标志, 经 western blot 进一步鉴定目的蛋白, 其简要步骤是: 将诱导表达的产物先进行 SDS-PAGE, 然后以湿法转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 将膜用 TBST 摇洗 5 min 后置于封闭液中封闭 1 h, 再用 TBST 洗 4 次, 之后用抗 His 单抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 摇洗 3 次, 再与 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 室温孵育 1 h, 最后用 TMB 显色.

### 1.2.5 $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析柱纯化 rhAPRIL

将含重组质粒 pET-30a/APRIL 的表达菌 BL21(DE3) 在 100 mL LB 中扩大培养并按上述条件进行 IPTG 诱导后, 12 000 r/min、5 min 离心收集细菌, 超声碎菌后, 离心沉淀包涵体。用缓冲液 A (20 mmol Tris-HCl, pH 7.9) 洗涤包涵体, 12 000 r/min、15 min 离心弃上清, 此过程重复 2 次。缓冲液 B (6 mol/L Urea, 5 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol Tris-HCl, pH 7.9) 溶解包涵体后, 将上清过  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 树脂层析柱; 用缓冲液 B 和缓冲液 C (6 mol/L Urea, 60 mmol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol Tris-HCl, pH 7.9) 洗柱后, 用洗脱缓冲液 D (1 mol/L 咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol Tris-HCl, pH 7.9) 洗脱目的蛋白。对收集的蛋白进行 SDS-PAGE 分析, 并采取逐步降低尿素浓度的方法, 透析除去尿素, 使变性的目的蛋白在此过程中自然复性, 从而得到纯化的重组人可溶性 APRIL。

### 1.2.6 rhAPRIL 生物学活性检测:

用 RPMI-1640 培养液将对数生长期的 Jurkat 细胞配成  $5 \times 10^4/\text{mL}$  悬液, 按每孔 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液加入 96 孔培养板, 然后分别加入不同浓度的 rhAPRIL (终浓度分别为 0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 每孔总体积均为 200  $\mu\text{L}$ , 以 200  $\mu\text{L}$  未加复性 rhAPRIL 蛋白的细胞作为空白对照。将细胞于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 36 h 后用 MTT 法检测细胞的存活状态。实验设三复孔, 取其平均值。对只含 pET-30a 载体的细菌, 同样进行 IPTG 诱导和  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 柱层析纯化步骤, 以所获得的透析产物作阴性对照, 以鼠 APRIL 标准品作为阳性对照。

## 2 结果

### 2.1 RT-PCR 扩增结果

扩增产物进行电泳后, 可见经 RT-PCR 扩增后得到的片段大小约为 450 bp 左右, 与预计的可溶性人 APRIL 基因大小一致。(图 1)

### 2.2 rhAPRIL cDNA 的克隆及序列测定

将目的片段克隆于载体 pET-30a, 经菌落 PCR 鉴定正确后进行 DNA 序列测定, 结果表明该序列与 GenBank 中报道的编码人 APRIL105-250 的 cDNA 序列完全一致。

### 2.3 rhAPRIL 的表达及鉴定

将插入正确序列的重组表达载体 (菌落 PCR 鉴定图谱如图 2) 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 后, 以 IPTG 诱导表达, 经 SDS-PAGE 分析表明所表达的目的蛋白主要位于包涵体内, 而在其它组分未见明显表达 (如图 3)。全菌裂解液进行 SDS-PAGE, 结果显示重组目的蛋白相对分子质量约为 17 000, 灰度扫描显示目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 45% 左右, 这表明 rhAPRIL 在大肠杆菌中获得了高效表达。以 His 标签肽为标志的 Western blot 分析显示, 经 IPTG 诱导的含重组表达载体 pET-30a/APRIL 的菌体裂解物能与抗 His 单抗特异反应, 在 Mr 约 17 000 处呈现单一条带 (图 3)。

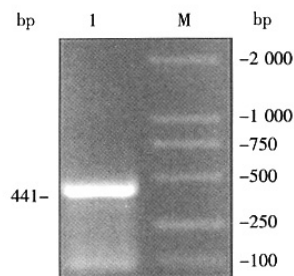


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

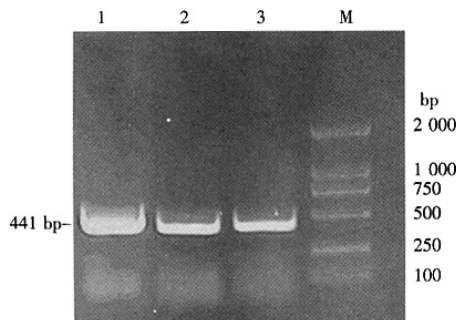


图 2 菌落 PCR 鉴定重组子

M: DNA marker DL2000; 1, 2, 3 均为所挑的阳性克隆

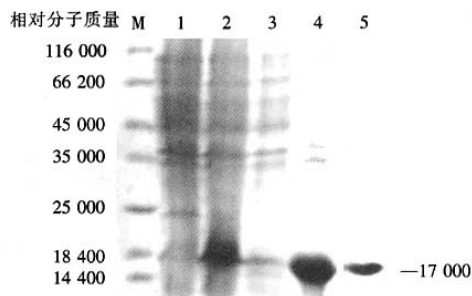


图 3 SDS-PAGE 与 western blot 分析 rhAPRIL 的表达

M: 蛋白 maker; 1: 未诱导的全菌蛋白; 2: 诱导 5 h 后的全菌蛋白; 3: 超声后上清中的蛋白; 4: 包涵体中的蛋白; 5: western 鉴定后的特异性条带

## 2.4 rhsAPRIL 的纯化及生物活性分析

200 mL 菌液表达的总蛋白经  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA 纯化后,可得到 4.5 mg 目的蛋白,其纯化率达 85% 左右(图 4).将纯化蛋白分步透析复性后进行 SDS-PAGE,结果仅在约 Mr 17 000 处见单一条带(图 4),这说明复性后目的蛋白 rhsAPRIL 的纯度是较高的. MTT 法得到不同浓度及作用时间下 APRIL 对人 Jurkat 肿瘤细胞促增殖的生物学活性(见图 5),由图可知,在本实验条件下,随着 rhsAPRIL 浓度的增加,其促增殖作用增强,表明 rhsAPRIL 的上述生物学活性具有剂量依赖效应,而且在低血清培养条件下,这种作用更加明显(结果未显示).

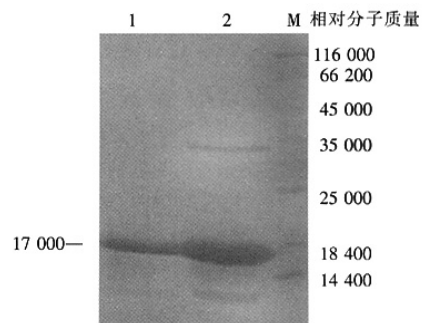
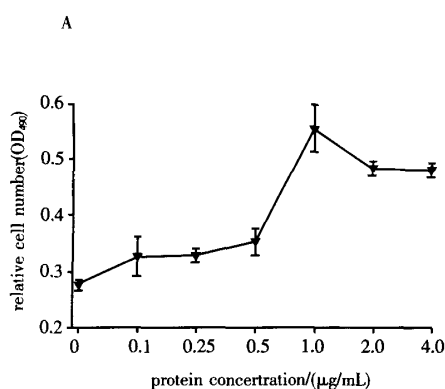
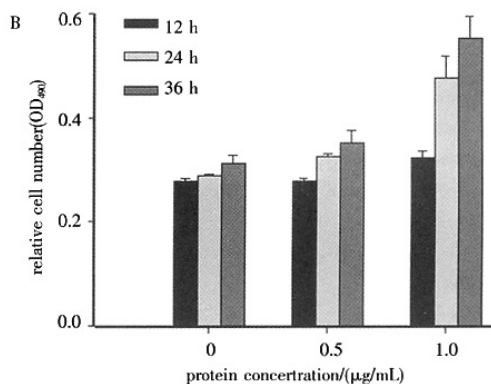


图 4 SDS-PAGE 分析纯化及复性 rhsAPRIL  
M: 蛋白 Marker; 1: 复性 rhsAPRIL; 2: 纯化 rhsAPRIL



A: rhsAPRIL 对 Jurkat 细胞的剂量依赖性促增长作用



B: 不同作用时间及浓度下 rhsAPRIL 对 Jurkat 细胞的促增长作用

图 5 rhsAPRIL 对 Jurkat 细胞的促增殖作用

## 3 讨论

作为 TNF 家族的一个成员, APRIL 在各种自身免疫性疾病及恶性肿瘤中的作用日益为人们关注<sup>[4,5]</sup>. 许多研究表明, APRIL 在多种肿瘤细胞的增殖和存活以及促肿瘤形成的过程中都起着独特的作用<sup>[6,7]</sup>. APRIL 在正常组织的表达很弱,但在多种肿瘤细胞系和肿瘤组织中(特别是胃肠道肿瘤)有高水平表达. 因此,设法有效抑制 APRIL 的功能活性,有可能为相关肿瘤的治疗提供崭新途径<sup>[8]</sup>. 有研究表明 APRIL 和 BAFF 一样,在自身免疫性疾病如系统性红斑狼疮(SLE),类风湿性关节炎(RA), Sjögren's 并发症和多发性硬化症(MS)中具有重要的作用. APRIL 在这几种自身免疫性疾病患者中的血清水平显著高于正常人<sup>[9]</sup>. 那么以 APRIL 为靶向来治疗这些自身免疫性疾病是将来研究的一个热点方向.

在本实验中我们利用特异性引物从人外周血中扩增获得了 APRIL 的可溶性片段,它是全长 APRIL 即膜结合型 APRIL 的第 105 到 250 个氨基酸部分,但与全长 APRIL 一样,都具有生物学活性,也更便于对该分子进行功能研究. 此外,我们选用原核表达载体 pET-30a,在构建重组载体时不存在读码框移位等问题,可方便基因的克隆与表达;而且选用了 NdeI 和 BamHI 这两个酶切位点,切去了 pET-30a 载体上两个自带的 His-tag,在设计引物时在上游引物 NdeI 酶切位点后加入 6 个 His 氨基酸作为标签肽,这样既有利于目的蛋白的纯化又不致在利用载体的 His-tag 时,因载体自带基因过长而影响 APRIL 蛋白的性质. 该系统表达的目的蛋白达到细胞总量的 45%,表达效率高,且带有 lac 抑制子,在未加入诱导剂 IPTG 以前,转录不启动,具有“毒性”的目的蛋白不表达,故并不影响宿主菌的生长. 在宿主菌生长到一定数目后,再加入 IPTG 诱导生长,就可获得大量表达的目的蛋白.

我们将全菌蛋白经 SDS-PAGE 后发现,在上清中几乎没有目的蛋白的存在,蛋白主要以包涵体的形式存在,这就涉及到蛋白变复性的问题. 在本实验中,我们曾经尝试以稀释复性的方法来获取活性蛋白,但是

复性后溶液体积过大,且活性蛋白量较少;后来我们采取逐步降低蛋白中尿素浓度的方法来透析除去尿素,使目的蛋白缓慢恢复其自然构像.此种复性方法简单易行,操作起来也很方便,复性周期较短,对目的蛋白来说是一种可行的复性方法.

APRIL 通过与其受体结合激活信号通路从而发挥其生物学活性<sup>[10]</sup>,在自身免疫性疾病和肿瘤中发挥作用.本实验室制备的 rhsAPRIL 对 Jurkat 细胞具有一定的促增殖作用,如果利用该活性蛋白筛选出一种具有高特异性的 APRIL 的抗体,那么这种抗体有可能在治疗自身免疫疾病中发挥一定作用,为与 APRIL 高表达相关的多种肿瘤的治疗提供新型候选制剂,有望开发一种新型的用于肿瘤治疗的生物制剂.

### [参考文献]

- [1] Hahne M, Kataoka T, Schroter M, et al. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth [J]. J Exp Med, 1998, 188: 1 185 - 1 190.
- [2] Kelly K, Manos E, Jensen G, et al. APRIL/TRDL-1, a tumor necrosis factor-like ligand, stimulates cell death [J]. Cancer Res, 2000, 60: 1 021 - 1 027.
- [3] Rennert P, Schneider P, Cachero T, et al. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth [J]. J Exp Med, 2000, 192: 1 677 - 1 684.
- [4] Pradet-Balade B, Medema J P, M LoÃ Pez-Fraga, et al. An endogenous hybrid mRNA encodes TWE-PRIL, a functional cell surface TWEAK-APRIL fusion protein [J]. The EMBO Journal 2002, 21: 5 711 - 5 720.
- [5] Yu G, Boone J, Delaney J, et al. APRIL stimulates B and T cell function by binding BCMA and TACI [J]. Nat Immunol, 2000, 1: 252 - 256.
- [6] Mackay F, Schneider P, Rennert P, et al. BAFF and APRIL: A tutorial on B cell survival [J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21: 231 - 264.
- [7] Roschke V, Sosnovtseva S, Ward C, et al. Blys and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases [J]. J Immunol, 2002, 168: 4 314 - 4 321.
- [8] Jens V, Marta L, Fernando A, et al. APRIL modulates B and T cell immunity [J]. J Clin Invest, 2002, 109: 1 587 - 1 598.
- [9] Gross J A, Johnston J, Mudri S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease [J]. Nature, 2000, 404: 995 - 999.
- [10] Stacey R. Dillon, Jane A. et al. An APRIL to remember: novel TNF ligands as therapeutic targets [J]. Nature, 2006: 235 - 246.

[责任编辑:孙德泉]