

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0065 - 03

TNF 家族的新成员 TRAIL cDNA 的克隆及其在 E. coli 中的表达

胡以平,姚玉成

(第二军医大学基础部细胞生物学教研室 上海 200433)

摘要:目的:克隆 Trail 基因 cDNA 全长,构建 Trail 的原核表达载体,从而建立其原核表达体系。方法:通过抽提外周血淋巴细胞总 RNA 进行 RT-PCR 克隆 Trail cDNA,构建 Trail 的原核表达载体,用限制性酶切和 DNA 测序进行鉴定,以温度进行诱导表达,通过 SDS-page 分析表达产物。结果:(1)克隆了 Trail 基因 cDNA 全长,DNA 测序结果与报道的完全一致;(2)构建了 Trail 基因原核表达载体;(3)将构建好的载体转化相应的宿主菌,诱导后得到了 Trail 蛋白表达产物。结论:Trail 基因 cDNA 的克隆将对于其抗肿瘤作用研究有重要意义,同时此基因原核表达系统的建立为其在肿瘤生物治疗中的应用奠定了基础。

关键词: Trail;基因克隆;原核表达

中图分类号:Q78

文献标识码:A

THE CLONING OF TRAIL cDNA AND ITS EXPRESSION IN E. COLI

HU Yi-ping, YAO Yur-cheng

(Department of Cell Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Purpose: To develop a inducible system for expression of Trail in *E. coli*. **Methods:** RT-PCR and sequencing were used to clone and conform Trail gene. The production of expression was analyzed by SDS-page.

Results: Trail cDNA was cloned by RT-PCR. After sequencing, we constructed the inducible vector for expression of Trail in *E. coli*. The vector was transformed with TG1. Trail was expressed by induced of changing temperature from 30 to 42. The production was conformed by SDS-page. **Conclusion:** This study will provide new insight into physiological and pathological roles of Trail-mediated cytotoxicity and its potential application to tumor immunotherapy.

Key words: Trail; gene cloning; gene expression

Trail (Tumor related apoptosis inducing ligand) 分子属于 TNF 家族,在肝、肾、小肠等组织以及外周血淋巴细胞和转化的 T 和 B 淋巴细胞中都有广泛表达¹,其膜结合形式和重组可溶性三聚体形式可以诱导许多淋巴系和非淋巴系肿瘤细胞凋亡,也可引起许多对于 FasL 和 TNF 有抗性的细胞凋亡¹⁻⁵。Trail 诱导细胞凋亡机制目前认为是与其受体 DR₄ 和 DR₅ 结合,诱导肿瘤细胞凋亡,由于正常细胞表面有

与 DR₄ 和 DR₅ 竞争的诱骗受体 DCR₁ 和 DCR₂,而许多肿瘤细胞并不表达这两种诱骗受体,所以 Trail 对于一些肿瘤细胞如淋巴系肿瘤有一定的特异性,诱导凋亡有一定的选择性,这为肿瘤的生物治疗又提供了一个新策略⁶⁻⁹。

人 Trail 由 281 个氨基酸组成,是型膜糖蛋白,羟基端位于胞外,是发挥功能的主要部位,胞内段很短只有 17 个氨基酸。Trail 分子的胞外区可被半胱

收稿日期:1999 - 12 - 25; 修订日期:2000 - 02 - 20

作者简介:胡以平(1954 -),男,四川省人,教授,博士,主要从事转基因动物的研究。

氨酸蛋白酶剪切到体液中,形成 19kD 的单位。象大多数 TNF 家族成员一样,单体形成的 Trail 分子具有高度的寡聚化倾向,形成分子量分别为 48kD,66kD 的二聚体和三聚体。膜结合形式和具有亮氨酸拉链的三聚体形式活性最高¹⁰。这些性质的认识对于克隆此基因和重组表达 Trail 蛋白提供了前题。本文通过对外周血淋巴细胞的总 RNA 进行 RT-PCR 克隆了 Trail 基因,并通过原核表达系统得到了重组蛋白产物。

材料与amp;方法

1 材料:pJLA503 质粒和 TG1 菌种由第二军医大学中西药研究室郭宝玉教授赠送。DH5a 菌种由本室保存。

2 试剂:限制性内切酶 Nde^I,Pst^I,BamH^I,T₄ DNA 连接酶等购自 Promega 公司,丙烯酰胺和双叉丙烯酰胺,pfu,MMLV,dNTP 及 DTT 均购自加拿大 Sangon 公司。

3 方法:

3.1 人外周淋巴细胞总 RNA 的提取:取正常成人外周血,用淋巴细胞分离液进行分离;RNA 抽取参照 Chomozoyki 等的方法,一步提取。

3.2 Trail cDNA 的获得:根据 Trail cDNA 基因序列,首先设计 PCR 引物,上游引物:5'GGATCCG-CATATGGCTATGATGGAGG3',下游引物 5'CTC-GAGGGATCCTTAGCCAACTAAAAAGGCC3'。以外周血的淋巴细胞总 RNA 为模板,用 MMLV 进行反转录后,再以其为模板加入 pfu 和相应引物进行变性、复性、链延伸,温度和时间分别为 94^o,30s,37^o,30s,72^o,300s,反应 8 个循环后,再以 94^o,30s,58^o,30s,72^o,300s,反应 22 个循环。PCR 产物经过琼脂糖凝胶电泳鉴定,回收,溶于无菌去离子水中,-20^o 保存。

3.3 原核表达载体的构建:Trail 分别用限制性内切酶消化 RT-PCR 产物和原核表达载体框架 pJLA503,经琼脂糖凝胶电泳的,回收相应片段,以 T₄ DNA 连接酶,16^h 连接 12-16h,转化 DH5⁺,经碱法少量抽取质粒,并用限制性酶切和 DNA 序列测定进行了鉴定。

3.4 Trail 蛋白的表达:将构建好的 pJLA503-Trail 转化的 TG1,30^o 培养过夜,挑取单菌落于 5ml LB 液体培养基(50mg/ml 氨卞青霉素)中,300 转/分培养至 OD=0.5~0.6 时,升温至 42^o 继续培养 2-

3h,取 1ml 以 4000r/min 离心进行鉴定。

3.5 Trail 蛋白表达产物 SDS-page 分析:取 1ml 菌液离心沉淀加入 1 \times SDS-page 电泳缓冲液,沸水中 3min,加样于 15%的丙烯酰胺凝胶进行电泳,约 6h 后用考马斯亮蓝进行染色。

结 果

1 Trail cDNA 全长的克隆:

为了获得 Trail cDNA,我们抽取了外周血淋巴细胞的总 RNA,并以此为模板进行反转录,再以相应引物进行 PCR,在约 0.85kb 长度处得到相关片段(见图 1),回收此片段,进一步进行了分析和鉴定。

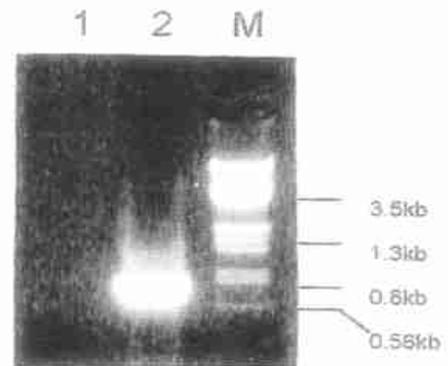


Figure 1 The result of RT-PCR

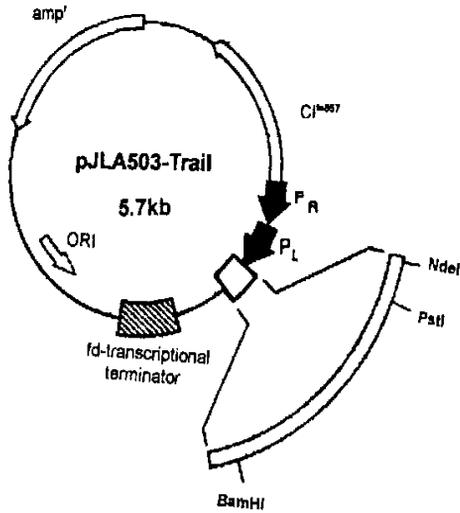
M. / EcoRI + HindIII Marker; 1. Production of RT-PCR; 2. Control

2 Trail cDNA 的序列测定及其原核表达载体(pJLA503-Trail)的构建

分别用限制性内切酶 Nde^I 和 BamH^I 消化 pJLA503 和 PCR 产物,以 T₄ DNA 连接酶进行连接,以 DH5a 进行了转化,在转化子中筛选出限制性酶切鉴定正确的,以相应引物进行了 DNA 序列测定,得到的结果与报道的完全一致。DNA 序列、构建过程和限制性酶切分析见图 2 和图 3。

3 Trail 蛋白的表达

进一步用已构建好的 Trail 原核表达载体转化 TG1,30^o 培养过夜,挑取其中单克隆在 LB 液体培养基中,300 转/分,当菌液培养至 OD=0.5-0.6 时将温度升至 42^o 进行诱导,pJLA503 中表达的 CI857 蛋白失活,使处于抑制状态的 PR、PL 启动子开放,Trail 基因得到表达。



A

ATGGCTATGATGGAGGTCACAGGGGACCCAGCCTGGGACAGACCTGCCTGCTG
 ATCGTATCTTCACAGTGCCTCCTGAGTCTCTCTGTGTGGCTGTAACCTACGTTGATC
 TTTACCAACGAGCTGAAGCAGATGCAGGACAAGTACCCAAAAGTTGGCATTGCTTGT
 TTCTTAAAAGAAGATGACAGTTATTGGGACCCCAATGACGAAGAGAGATGAACAGC
 CCCTGCTGGCAAGTCAAGTGGCAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAAAGATGATTTTGG
 AACCTCTGAGGAAACCAATTCACAGTTCAAGAAAAGCAACAATAATTTCTCCCTA
 GTGAGAAAAGAGGTCCTCAGAGAGTAGCAGCTCACATAACTGGGACCAGAGAA
 GAAGCAACACATTGTCTTCTCCAACTCCAAGAATGAAAAGGCTCTGGGCCGCAAAA
 TAACTCCTGGGAATCATCAAGGAGTGGGCATTCTTCTGAGCAACTTGCACTTGA
 GGAATGGTGAACCTGGTATCCATGAAAAAGGGTTTTACTACATCTATTCCAAACAT
 ACTTTTCGATTTTCAGGAGGAAATAAAAGAAAAACAAAGAACGACAAACAAATGGTCC
 AATATATTTACAAATACACAAGTTATCCTGACCCATATTTGTTGATGAAAAGTGCTAG
 AAATAGTTGTTGGTCTAAAGATGCAGAAATGGAAGTCTATCCATCTATCAAGGGG
 AATATTTGAGCTTAAGGAAAATGACAGAAATTTTGTCTGTAAACAAATGAGCACTTG
 ATAGACATGGACATGAAGCCAGTTTTTTCGGGGCTTTTTAGTTGGCTAA

B

Figure 2 The structure of pJLA503 - Trail and sequence of Trail
 A: Structure of pJLA503 - Trail; B: Sequence of Trail

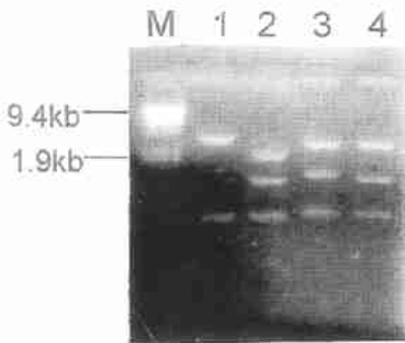


Figure 3 Analysis of pJLA503 and pJLA503 - Trail
 M. / HindIII Marker; 1. NdeI + BamHI; 2. PstI (pJLA503); 3. PstI; 4. PstI + NdeI

4 Trail cDNA 表达产物的 SDS - page 分析

经 42 诱导后的培养物,我们分别对菌体和上清进行 SDS - page 分析,发现上清无特殊条带产生,而菌体蛋白在 19kd 处有一条带单明显的区别于对

照组,这与国外报道的重组表达产物的分子量基本一致,而且表达量占菌体总蛋白的 15 % 以上(见图 4)。

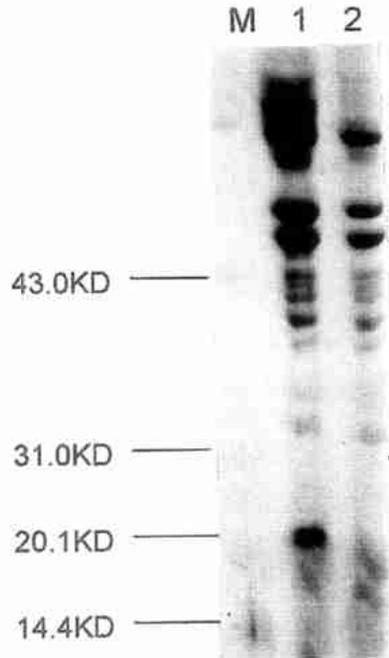


Figure 4 SDS-page analysis of the Trail expression
 M:protein molecular weight marker;1.42 :2.30

讨论

本文通过 RT - PCR 的方法以外周血淋巴细胞为材料克隆了 Trail cDNA,并构建了相应的原核表达载体 pJLA503 - Trail,通过温度诱导表达了 Trail 蛋白。在此过程中值得讨论的有以下几点:

首先,Trail 被认为是继 TNF 之后的又一候选的治疗肿瘤的基因工程药物,与 TNF 相比其作用更具特异性,尤其是对于血液和淋巴系统肿瘤更明显。与 FasL 比较起来作用更早,在有些肿瘤细胞中作用更有效。我们克隆得到了 Trail cDNA,在此基础上就可以进行多方面的工作,对于 Trail 的抗肿瘤机制进行进一步的研究。

其次,我们建立的 Trail 原核表达体系,对于 Trail 的工程化生产是至关重要的。在所建立的表达体系中,Trail 的表达量可以达到占菌体总蛋白的 15 % 以上,对于下一步的纯化和活性分析鉴定是非常重要的。

再有,在我们所建立的表达体系中,由于引入了 CI857、PR 和 PL 调控体系,使诱导不再使用传统的 TPTG 或其它的药品,而直接通过升温来达到要求,既节约又便于操作,这给下一步的生产提供了良好的条件。

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0068 - 4

3 个 HDAC1 的保守氨基酸定点突变的获得

陈 坚¹, 张晓琴², 傅继梁³(¹ 第二军医大学海军卫生教研室, ² 第二军医大学长海医院感染科, ³ 第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

摘要:目的:为了研究 HDAC1 保守氨基酸的定点突变对其功能的影响,需要建立 HDAC1 保守氨基酸定点突变的突变子。方法:在克隆 HDAC1 cDNA 的基础上,利用 Altered Site 体外突变系统对 HDAC1 保守氨基酸中的三个氨基酸位点进行突变,经 DNA 测序鉴定。结果与结论:结果分别获得了 HDAC1 的 C151A, Y188F, S197A 的定点突变子,为进一步研究 HDAC1 保守氨基酸的定点突变对其功能的影响打下了基础。

关键词:组蛋白脱乙酰化酶 1;组蛋白脱乙酰化;定点突变

中图分类号:Q784

文献标识码:A

CONSTRUCTION OF THREE CONSERVED AMINO ACID RESIDUE MUTATIONS OF HDAC1

CHEN jian¹ Xiao-qin ZHANG² Ji-liang FU³

(1. Department of navy hygiene, 2. Infection department Changhai hospital, 3. Institute of

Trail 的原核表达在国内外还不曾有报道,我们克隆了该基因并建立了原核的表达系统,正在进行产物的纯化和活性测定,这将为肿瘤生物治疗研究和临床应用奠定基础。

参考文献

- 1 Robert MP, Scot AM, Siehfried R, et al. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematological malignancies J. *Br J heamatol*, 1997, 99:618 - 624.
- 2 Henning W, Mariapia AD, Richard SJ, et al. TRAIL-R2:anovel apoptosismediating receptor for TRAIL J. *EMBO J*, 1997, 16 (17):5385 - 5391.
- 3 Pascal S, Jean-Luc B, Margot T, et al. Characterization of two receptors for TRAIL J. *FEBS Letters*, 1997 (416):329 - 334.
- 4 Wayne DH, Perter H. TNF-related apoptosis-inducing liand (TRAIL) inducess apoptosis in Fas liang-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell Killing of target cells J. *J Immunol*, 1998, 161:2195 - 2200.
- 5 Sara MM, Berd M, Elena AA, et al. Interleukin 1 -converting enzyme related proteases/ caspases are involved in TRAIL-induced apoptosis of myeloma and leukemia cells J. *J Cell Biol*, 1997, 137(1):221 - 229.
- 6 klaus S, Davide F, Marck L, et al. Apoptosis signaling by death receptors J. *Europe J Biochem*. 1998, 254:439 - 459.
- 7 Arjun S, Jian N, Bharat BA, et al. Death domain receptors and their role in cell demise J. *J Interferon Cytokine Res*, 1998, 427:124 - 128.
- 8 Preet MC, Michael E, Alan J, et al. Death receptor 5, a new member at the TNFR family, and DR4 inducing FADD-dependent apoptosis and active the NF- κ B pathway J. *Immunity*, 1997, 7:831 - 836.
- 9 Pierre G. Cell death: TRAIL and its receptors J. *Current Biol*, 1997, 7:R750 - R753.
- 10 Sara MM, Peter HK. Differential regulation of TRAIL and CD95 liand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage J. *Europe J Immunol*, 1998, 28:973 - 982.

收稿日期:1999 - 11 - 14; 修订日期:2000 - 01 - 13

作者简介:陈坚(1966 -)男,浙江绍兴人,讲师,博士,从事基因表达调控研究。

基金项目:国家自然科学基金资助(39800082)