

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.04.005

## MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的制备及其对肿瘤细胞凋亡的诱导作用

刘新建<sup>1,2,3</sup>, 徐萍<sup>3\*</sup>, 钱其军<sup>4</sup>, 黄倩<sup>5</sup>(1. 上海交通大学 癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200032; 2. 上海交通大学 生命科学技术学院, 上海 200240; 3. 复旦大学 附属眼耳鼻喉科医院 实验中心, 上海 200032; 4. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 基因-病毒治疗实验室, 上海 200438; 5. 上海交通大学 附属第一人民医院 中心实验室, 上海 200080)

[摘要] 目的: 构建 MDA-7/IL-24-HT7 原核及真核表达质粒, 制备 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白, 研究该融合蛋白在肿瘤细胞内的定位及其对肿瘤细胞致凋亡作用。方法: PCR 扩增 MDA-7/IL-24 基因, 插入含有 HaloTag (HT7) 标签的载体中, 构建 MDA-7/IL-24-HT7 原核及真核表达质粒; MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白经 IPTG 诱导表达后纯化。利用带有荧光标记的 HT7 配基观察 MDA-7/IL-24-HT7 在肿瘤细胞内的定位。MTT 法及 AnnexinV-PI 染色法检测 MDA-7/IL-24-HT7 对肿瘤细胞生长和凋亡的影响。结果: 成功构建了表达 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的原核及真核表达质粒, MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白主要存在于 *E. coli* BL21 的包涵体内。MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白定位于肿瘤细胞的内质网上。MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白可抑制肿瘤细胞的生长, 1 mg/ml MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白作用大肠癌 HCT116 细胞、肝癌 SMMC7721 细胞 96 h 后, 细胞凋亡率分别为 (34.7 ± 1.3)% 和 (22.1 ± 0.9)%, 显著高于未处理的肿瘤细胞 ( $P < 0.01$ )。结论: 带有 HaloTag 标签的 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白可抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡。

[关键词] MDA-7/IL-24; HaloTag; 融合蛋白; 肝肿瘤; 大肠肿瘤; 凋亡

[中图分类号] R392-33

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)04-0386-06

## Preparation of MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein and its apoptosis inducing activity on tumor cells

LIU Xin-jian<sup>1,2,3</sup>, XU Ping<sup>3\*</sup>, QIAN Qi-jun<sup>4</sup>, HUANG Qian<sup>5</sup>(1. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200032, China; 2. College of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 3. Experimental Center, EYE & ENT Hospital of Fudan University, Shanghai 200032, China; 4. Laboratory of Gene and Virus Therapy, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 5. Experimental Center, First People's Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University, Shanghai, 200080, China)

[Abstract] **Objective:** To construct MDA-7/IL-24-HT7 prokaryotic and eukaryotic expression vectors, and prepare purified MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein, so as to study its cellular localization and apoptosis-inducing effect on tumor cells. **Methods:** MDA-7/IL-24 gene was amplified by PCR and cloned into vectors containing HaloTag (HT7) to construct MDA-7/IL-24-HT7 prokaryotic and eukaryotic expression vectors. MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein was induced by IPTG and further purified. Cellular localization of MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein in tumor cells was monitored by fluorescence-marked HT7 ligands. The effects of MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein on growth and apoptosis of tumor cells were detected by MTT and Annexin V-PI staining assays. **Results:** MDA-7/IL-24-HT7 prokaryotic and eukaryotic expression vectors were successfully constructed. The MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein was mainly expressed as inclusion bodies in *E. coli* BL21, and localized in the endoplasmic reticulum of tumor cells. MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein inhibited growth of tumor cells. Apoptosis rates of colon cancer HCT116 cells and hepatic carcinoma SMMC7721 cells were

[基金项目] 癌基因及相关基因国家重点实验室开放课题 (No. 80-07-03)。Project supported by the Foundation from State Key Laboratory of Oncogenes and Related Genes (No. 80-07-03)

[作者简介] 刘新建 (1979 - ), 男, 湖南省娄底人, 助理研究员, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究, E-mail: jnuxj2004@yahoo.com.cn; 徐萍 (1972 - ), 女, 上海市人, 主管技师, 主要从事肿瘤基因治疗方面的研究。\* 共同第一作者

[通信作者] 黄倩 (HUANG Qian, corresponding author), E-mail: qhuang@sjtu.edu.cn

( $34.7 \pm 1.3$ )% and ( $22.1 \pm 0.9$ )%, respectively, after treatment with 1mg/ml MDA-7/IL-24-HT7 for 96 h, which were significantly higher than those of untreated tumor cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein containing HaloTag (HT7) can inhibit growth and induce apoptosis of tumor cells.

[ **Key words** ] MDA-7/IL-24; HaloTag; fusion protein; liver neoplasmas; colon neoplasmas; apoptosis

[ Chin J Cancer Biother, 2010, 17(4): 386-391 ]

白细胞介素 24 基因( interleukin-24, *IL-24*)又称黑素瘤分化相关基因 7( melanoma differentiation associated gene-7, *MDA-7*), 是 Fisher 等<sup>[1]</sup>用差减杂交技术发现的一种与黑素瘤分化相关的基因, 属于 *IL-10* 家族<sup>[2]</sup>。基因结构和染色体定位分析发现, 人 *MDA-7/IL-24* 基因定位于染色体 1q32 ~ 1q41 的基因簇中, 由 7 个外显子和 6 个内含子组成, 其 cDNA 全长约为 1.7 kb, 编码含 206 个氨基酸的蛋白; 该蛋白的 N 端含有由 49 个氨基酸组成的信号肽序列, 可引导蛋白分泌到细胞外<sup>[3]</sup>。研究表明, *MDA-7/IL-24* 蛋白具有刺激免疫应答和抗肿瘤两方面的功能: 可刺激人外周血单个核细胞分泌细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-12 和 GM-CSF 等<sup>[2]</sup>, 抑制肿瘤细胞生长<sup>[4-5]</sup>, 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[6]</sup>, 抑制新生血管形成<sup>[7-8]</sup>, 其作用不依赖 *P53*、*Rb*、*P16* 等抑癌基因, 对正常细胞没有影响, 是一种具有开发潜力的抗肿瘤因子<sup>[9-11]</sup>。本研究采用 HaloTag 蛋白融合标签技术, 将 *MDA-7/IL-24* 基因克隆入带 HaloTag 标签序列( HT7)的 pFC14A-CMV-Flexi( R)载体中, 得到带有 HaloTag 标签的融合基因( *MDA-7/IL-24-HT7*), 再将此融合基因亚克隆到 pET28( a)原核表达系统, 通过 IPTG 诱导表达及柱纯化得到 *MDA-7/IL-24-HT7* 融合蛋白, 观察此融合蛋白在肿瘤细胞中的定位, 以及对肿瘤细胞增殖和凋亡的作用, 为深入研究 *MDA-7/IL-24* 作为抗肿瘤药物的可能性及分子机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

pET28( a)质粒、大肠杆菌 BL21( DE3)菌株由本实验室保存。含 *MDA-7/IL-24* 基因的 pClon9-INS-*MDA-7/IL-24* 质粒由第二军医大学东方肝胆医院基因-病毒治疗实验室提供。带 HaloTag 标签序列( HT7)的 pFC14A-CMV-Flexi( R)质粒购自 Promega 公司。人肝癌细胞株 SMMC7721、人结直肠癌细胞株 HCT116 由本实验室保存, 采用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶购自 TaKaRa 公司, IPTG、咪唑( imidazole)、Halo-

Tag 配基染料 HaloTag<sup>®</sup> diAcFAM Ligand( 绿色)、HaloTag<sup>®</sup> TAM Ligand( 红色)和内质网标记物( ER-Tracker<sup>™</sup> Blue/white dye, 蓝色)购自 ProGma 公司, MTT 试剂购自 Sigma 公司。质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司, *MDA-7/IL-24* ELISA 检测试剂盒购自 Rapiod 公司, Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒购自 Invitrogen 公司。

### 1.2 *MDA-7/IL-24-HT7* 融合基因及 pFC14A-*MDA-7/IL-24-HT7* 真核表达质粒的构建

遵循 PCR 引物设计原则, 根据 Gene bank 上 *MDA-7/IL-24* 的 mRNA 序列( BC009681)设计含有酶切位点 *Nhe* I 的上游引物( 5'-AATAGGGC TAGCGCCACCATGAATTTTCAACAGAGGCT-3') 和 *Xho* I 的下游引物( 5'-GAATTCGGTCTCCTCGAGGAGCTTGTAGAATTTCTGCA-3'), 以 pClon9-INS-*MDA-7/IL-24* 质粒 DNA 为模板, PCR 扩增 *MDA-7/IL-24* 编码基因片段( 94  $^{\circ}$ C、30 s, 58  $^{\circ}$ C、30 s, 72  $^{\circ}$ C、2 min; 30 个循环)。PCR 产物以 *Nhe* I、*Xho* I 双酶切后, 插入 pFC14A-CMV-Flexi 载体的 *Nhe* I、*Xho* I 位点上, 得到 pFC14A-*MDA-7/IL-24-HT7* 重组质粒。重组质粒经 *Hind* III、*Sal* I 双酶切鉴定, 并对其进行测序验证。

### 1.3 pET28( a)-*MDA-7/IL-24-HT7* 原核表达质粒的构建

将 *Nhe* I、*Sal* I 酶切 pFC14A-*MDA-7/IL-24-HT7* 质粒得到的 *MDA-7/IL-24-HT7* 融合基因片段亚克隆入 pET28( a)原核表达载体的 *Nhe* I、*Sal* I 位点, 得到 pET28( a)-*MDA-7/IL-24-HT7* 原核表达重组质粒, 重组质粒经 *Hind* III、*Bgl* II 双酶切鉴定。

### 1.4 *MDA-7/IL-24-HT7* 融合蛋白的表达

经鉴定正确的 pET28( a)-*MDA-7/IL-24-HT7* 原核表达质粒转化 BL21 感受态细胞, 挑单菌落在 LB 液体培养基( Kan<sup>+</sup>)中培养过夜后, 按 1% 的体积接种到 2 ml LB 液体培养基( Kan<sup>+</sup>)中, 37  $^{\circ}$ C、180 rpm/min 振荡培养至光密度( *D*)值为 0.5 ~ 0.6 时加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 继续培养 4 h 后收集菌液, 抽提蛋白。以不含目的基因的空载体转化菌作为对照, 经 SDS-PAGE, 筛选高水平表达 *MDA-7/IL-24-HT7* 蛋白的重组工程菌。将筛选出的

单克隆菌落接种于 LB 液体培养基( Kan<sup>+</sup> )中, 培养过夜后, 按 1% 的体积接种 2 ml 菌液于 LB 液体培养基( Kan<sup>+</sup> )中, 37℃、180 rpm/min 振荡培养至 *D* 值为 0.5~0.6 时, 加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导, 4 h 后 13 400 × *g* 离心 5 min 收获沉淀, 用 500 μl 溶菌缓冲液溶解沉淀, 超声破碎后 13 400 × *g* 离心取上清, 再用等量溶菌缓冲液重悬沉淀, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

1.5 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的复性

按上述方法发酵出 1.5 L 菌液后, 离心收集菌体, 沉淀称重为 3.0 g。按照每克菌体加入 3 ml 超声裂解缓冲液重悬沉淀, 反复冻融 3 次后, 按 100 μg/ml 加入溶菌酶, 冰浴超声破碎后, 13 400 × *g* 离心 5 min, 分别收获上清和沉淀。沉淀再加入含 2% 去氧胆酸的超声裂解液充分重悬, 50℃ 水浴 10 min, 4℃、13 400 × *g* 离心 5 min 分别收获上清和沉淀, 再重复 1 次。沉淀再依次用含 1、3 mol/L 盐酸胍的超声裂解液洗涤(室温, 10 min), 4℃、13 400 × *g* 离心 5 min。沉淀用含 6 mol/L 盐酸胍的变性液重悬, 4℃ 溶解过夜。待沉淀完全溶解后, 用滤过 10 万相对分子质量蛋白超滤管( Millipore, Amicon Ultra 4 )过滤, 4℃、7 500 × *g* 离心 10 min, 流穿液再用 5 万相对分子质量蛋白超滤管过滤, 4℃、7 500 × *g* 离心 10 min。分别收集上述超滤管内浓缩液以及滤过 5 万相对分子质量蛋白的超滤管的流穿液, 进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后进行鉴定。此后将收集到的两种浓缩液, 用不同浓度盐酸胍复性液( 6、5、4、3、2、1 mol/L、PBS )复性, 4℃ 各 4 h, 最后用透析液透析, 收集透析袋内液体, 4℃、13 400 × *g* 离心 10 min, 取含有 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白上清, ELISA 检测 MDA-7/IL-24 蛋白含量。

1.6 MDA-7/IL-24-HT7 蛋白在肿瘤细胞内的定位

按 1 × 10<sup>5</sup>/孔将肝癌 SMMC7721 细胞接种于置于 24 孔板的玻片上, 培养过夜后, 采用脂质体 Lipofectamine 2 000( Invitrogen )介导 pFC14A-MDA-7/IL-24-HT7 转染肿瘤细胞, 或加入纯化的 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白, 培养 24 h 后, 加入含 HaloTag 配基的染料 HaloTag<sup>®</sup> diAcFAM Ligand( 5 μmol/L; 绿色 )和 HaloTag<sup>®</sup> TAM Ligand( 5 μmol/L, 红色 )以及内质网标记物( ER-Tracker<sup>™</sup> Blue/white dye, 100 nmol/L, 蓝色 ), 染色 15~30 min 后用 PBS 洗去游离染料, 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min。漂洗后荧光显微镜下观察、拍照。

1.7 MTT 法检测 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白对肿瘤细胞生长的作用

按 1 × 10<sup>4</sup>/孔分别将 HCT116 细胞及 SMMC7721 细胞接种于 96 孔板中, 培养过夜后加入不同浓度纯化后的 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白, 继续培养 96 h 后, 采用 MTT 法检测存活细胞。每一个浓度设 4 个复孔, 实验重复 3 次。

1.8 流式细胞术检测 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白对肿瘤细胞凋亡的影响

按 1 × 10<sup>5</sup>/孔将 HCT116、SMMC7721 细胞接种于 24 孔板中, 培养过夜后加入不同浓度纯化后的 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白, 继续培养 96 h 后, 用含 0.02% EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化、收集细胞, 经预冷的 PBS 洗涤 2 次后, 加入 Annexin V-PI 染色液, 避光孵育 15 min 后用流式细胞仪检测凋亡细胞。

1.9 统计分析

实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 SPSS13.0 统计软件对数据进行 *t* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 融合基因及重组质粒的鉴定

PCR 扩增的 MDA-7/IL-24 目的基因大小为 630 bp, 通过 PCR 反应成功实现了 MDA-7/IL-24 基因序列和 pFC14A-CMV-Flexi( R )载体上 HT7 序列融合。测序结果与 NCBI 基因库中 MDA-7/IL-24 的 cDNA 序列完全一致。pFC14A-MDA-7/IL-24-HT7 重组质粒经 *Hind* III、*Sal* I 双酶切鉴定, 切出约 1 890 bp 的小片段, 与理论值相符; 而对照质粒 pFC14A-CMV-Flexi( R )载体切出的片段长度约 1 660 bp( 图 2 )。pFC14A-MDA-7/IL-24-HT7 质粒经 *Nhe* I、*Sal* I 酶切, 得到 MDA-7/IL-24-HT7 融合基因片段, 亚克隆入 pET28( a )原核表达载体, 得到 pET28( a )-MDA-7/IL-24-HT7 重组质粒( 图 1 ), 经 *Hind* III、*Bgl* II 双酶切鉴定, 也能切除约 1 800 bp 的片段, 与理论值相符( 图 2 )。

2.2 工程菌的筛选

与对照比较, 所挑选的全部单菌落经 IPTG 诱导后在相对分子质量 52 000 处都有明显的蛋白条带, 各菌落之间该蛋白的表达量比较接近( 图 3 )。

2.3 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的包涵体表达及复性结果

经过 IPTG 诱导的菌体超声波破碎后, 离心分离上清和沉淀进行电泳, 结果表明, MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白在 BL21 中以包涵体形式存在, 在上清中基本检测不到目的蛋白( 图 4 )。

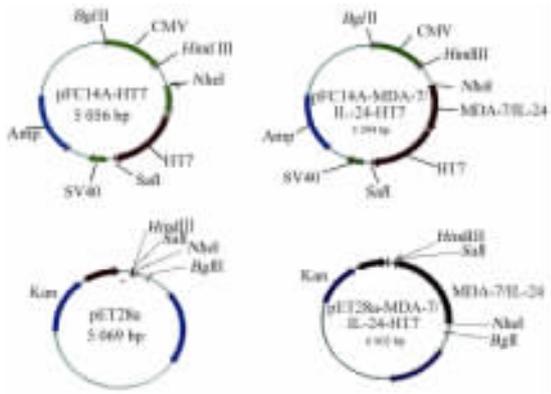


图1 质粒构建示意图

Fig.1 Construction of plasmids

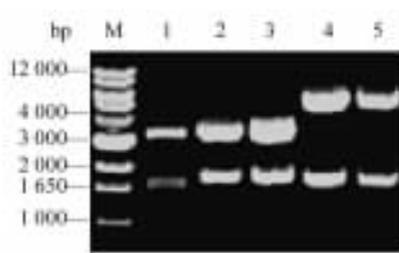


图2 重组质粒酶切鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmids by restriction enzyme digestion

M: Marker; 1: pFC14A-CMV-Flexi( R ); 2: pFC14A-MDA-7/IL-24-HT7; 3: pFC14A-MDA-7/IL-24-HT7; 4: pET28( a )-MDA-7/IL-24-HT7; 5: pET28( a )-MDA-7/IL-24-HT7

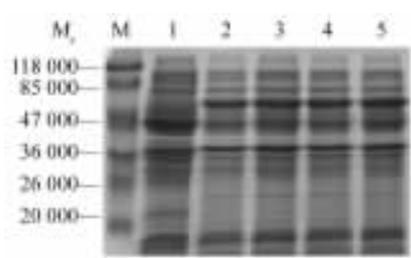


图3 SDS-PAGE 鉴定 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的表达

Fig.3 SDS-PAGE analysis MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein expression

M: Marker; 1: pET28( a ); 2,3,4,5: Four individual pET28( a )-MDA-7/IL-24-HT7/BL21 clones after induction of IPTG

包涵体变性后溶于 6 mol/L 盐酸胍变性液中,超滤管依次过滤,收集纯化过程中各组分进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色。结果(图 4)显示,10 万和

5 万相对分子质量蛋白超滤管浓缩液中都存在目的蛋白,经凝胶电泳仪分析其纯度分别为 80.3% ,92.7%。超滤浓缩液再进行复性、透析,所得上清液经 ELISA 检测,MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的质量浓度分别为 575.67 μg/ml。结果说明,包涵体经过变性、超滤、复性后能纯化得到 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白。

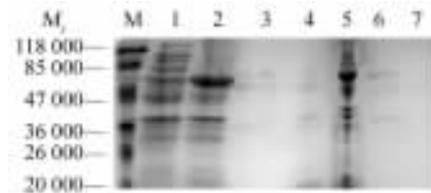


图4 SDS-PAGE 鉴定纯化后 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白

Fig.4 Identification of purified MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein by SDS-PAGE

M: Marker; 1: Supernatant from pET28( a )-MDA-7/IL-24-HT7/BL21 transformed cell lysate; 2: Pellet from pET28( a )-MDA-7/IL-24-HT7/BL21 transformed cells; 3: Supernatant from 1 mol/L guanidine hydrochloride washing; 4: Supernatant from 3 mol/L guanidine hydrochloride washing; 5: Concentrated by Ultra-15 centrifugal filter (  $M_r$  100 000 ); 6: Concentrated by Ultra-15 centrifugal filter (  $M_r$  50 000 ); 7: Flow-through of Ultra-15 Centrifugal Filter (  $M_r$  50 000 )

#### 2.4 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白在 SMMC7721 细胞内的定位

通过与 HaloTag 配基结合的荧光标记可示踪 HaloTag 融合蛋白,免疫荧光染色结果(图 5)表明,SMMC7721 细胞转染 pFC14A-MDA-7/IL-24-HT7 质粒后或直接加入原核表达的 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白后,MDA-7/IL-24 蛋白主要定位于内质网。

#### 2.5 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白抑制肿瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞凋亡

将不同浓度的纯化后 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白加到铺有 HCT116、SMMC7721 细胞的 96 孔细胞培养板中,96 h 后 MTT 法检测存活细胞。结果(图 6)显示,随着 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白浓度增加,存活细胞明显减少。MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白对 HCT116 和 SMMC7721 细胞的半数致死剂量分别为 1 600、1 000 ng/ml。进一步用 Annexin V-PI 法检测细胞凋亡,1 000 ng/ml MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白作用 HCT116、SMMC7721 细胞 96 h 后,凋亡细胞率分别为( 34.7 ± 1.3)% 和( 22.1 ± 0.9)% ,而未加 MDA-7/IL-24-HT7 融

合蛋白的肿瘤细胞凋亡率很低(图7)。

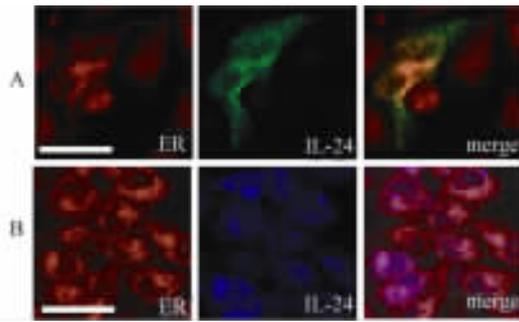


图5 MDA-7/IL-24 融合蛋白在 SMMC7721 细胞内质网中定位

Fig. 5 Localization of MDA-7/IL-24 fusion protein in ER of SMMC7721 cells( Bar = 50 μm )

A: pFC14-MDA-7/IL-24 plasmid;  
B: Purified MDA-7/IL-24 protein

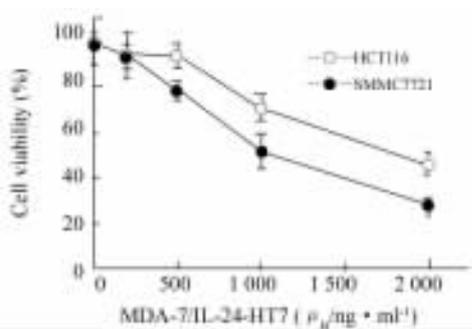


图6 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白抑制肿瘤细胞生长

Fig. 6 MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein inhibited growth of tumor cells

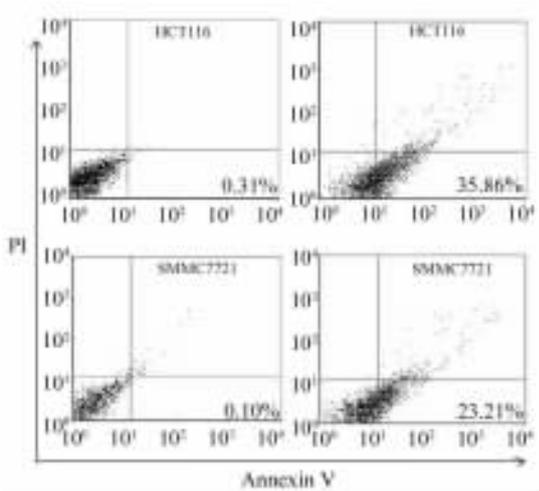


图7 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白诱导肿瘤细胞凋亡

Fig. 7 MDA-7/IL-24-HT7 fusion protein induced apoptosis of tumor cells

### 3 讨论

MDA-7/IL-24 具有选择性抑制肿瘤细胞生长、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制新生血管形成等能力,对正常细胞没有影响,是一种具有开发潜力的抗肿瘤因子<sup>[12]</sup>。然而,MDA-7/IL-24 抗肿瘤作用机制尚不明确。本研究利用 HaloTag 标签技术标记 MDA-7/IL-24,为 MDA-7/IL-24 抗肿瘤研究提供了新的手段。

通过在目的蛋白的 N 端或 C 端连接某种标签,可以简便、快速分离纯化目的蛋白。目前常用的小分子多肽标签有 6 × His<sup>[13]</sup>, Flag<sup>[14]</sup>, HA, c-myc, StrepII<sup>[15]</sup>等,主要用于快速纯化重组蛋白,也可以作为简便检测重组蛋白的手段,如 Western blotting、免疫组化技术。另一类标签为大分子蛋白<sup>[16-17]</sup>,如 GFP, RFP 等荧光蛋白,通过与目的蛋白融合,借助荧光蛋白可以跟踪或显示目的蛋白,特别适合观察活细胞内目的蛋白的表达、分布、代谢以及与其他蛋白的相互作用等。因此,蛋白类分子标签已经广泛地应用于生命科学与医学的各个领域<sup>[18-20]</sup>。然而,上述两种标签各具特色,尚没有将各自的功能完美地结合在一起。

HaloTag 是 Promega 公司发明的一种新标签,可以用于蛋白质成像和蛋白质功能研究。HaloTag 标签能高度特异、快速捕获外界环境中的 HaloTag 配基,实现两者间不可逆共价结合,借助 HaloTag 配基所结合的荧光标记可跟踪显示活细胞内的 HaloTag 融合蛋白<sup>[21-23]</sup>。本研究中,MDA-7/IL-24 为一种可溶性蛋白,无已知的核定位信号,主要分布在细胞核膜周围和胞质内,作为自分泌或旁分泌因子与靶细胞膜上受体结合,发挥其生物学功能<sup>[10]</sup>。本研究通过原核和真核质粒系统分别表达 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白,利用 HaloTag 标签和带有荧光标记的 HaloTag 配基结合的特点,清楚地显示了 MDA-7/IL-24 在肿瘤细胞内的表达和定位。定位于内质网的 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白可能在高尔基体中聚集,糖基化修饰后,在信号肽的作用下分泌到胞外;也有可能通过内质网应激启动细胞凋亡。在基因功能研究中,通常在目的基因的上游或下游构建带有标签的重组表达质粒,而标签蛋白可能对目的基因表达产物的空间结构和功能产生影响。本研究表达、纯化的 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白可抑制肿瘤细胞的生长,并诱导肿瘤细胞凋亡,说明 HaloTag 标签并不影响 MDA-7/IL-24 蛋白的功能。因此本研究纯化得到的 MDA-7/IL-24-HT7 仍然具有抑制肿

瘤细胞生长和诱导肿瘤细胞凋亡的活性。

总之,本研究通过基因工程技术构建了表达 MDA-7/IL-24-HT7 融合蛋白的原核表达质粒,并通过 HaloTag 标签,建立了可以快速跟踪显示目标蛋白 MDA-7/IL-24 的新方法。本研究证实 HaloTag 标签不影响 MDA-7/IL-24 融合蛋白的活性,为 MDA-7/IL-24 蛋白抗肿瘤研究提供了新的手段。

## [ 参 考 文 献 ]

- [ 1 ] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, Goldstein NI, Fisher PB. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, MDA-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression [ J ]. *Oncogene*, 1995, 11( 12 ): 2477-2486.
- [ 2 ] Caudell EG, Mumm JB, Poindexter N, Ekmekcioglu S, Mhashilkar AM, Yang XH, et al. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24 [ J ]. *J Immunol*, 2002, 168( 12 ): 6041-6046.
- [ 3 ] Huang EY, Madireddi MT, Gopalkrishnan RV, Leszczyniecka M, Su Z, Lebedeva IV, et al. Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated ( MDA-7 ) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties [ J ]. *Oncogene*, 2001, 20( 48 ): 7051-7063.
- [ 4 ] Sarkar D, Lebedeva IV, Gupta P, Emdad L, Sauane M, Dent P, et al. Melanoma differentiation associated gene-7 ( MDA-7 ) / IL-24: A ' magic bullet ' for cancer therapy [ J ]. *Expert Opin Biol Ther*, 2007, 7( 5 ): 577-586.
- [ 5 ] Tong AW, Nemunaitis J, Su D, Zhang Y, Cunningham C, Senzer N, et al. Intratumoral injection of INGN 241, a nonreplicating adenovector expressing the melanoma-differentiation associated gene-7 ( MDA-7/IL-24 ): Biologic outcome in advanced cancer patients [ J ]. *Mol Ther*, 2005, 11( 1 ): 160-172.
- [ 6 ] Sauane M, Su ZZ, Dash R, Liu X, Norris JS, Sarkar D, et al. Ceramide plays a prominent role in MDA-7/IL-24-induced cancer-specific apoptosis [ J ]. *J Cell Physiol*, 2010, 222( 3 ): 546-555.
- [ 7 ] Chen J, Chada S, Mhashilar A, Miano JM. Tumor suppressor MDA-7/IL-24 selectively inhibits vascular smooth muscle cell growth and migration [ J ]. *Mol Ther*, 2003, 8( 2 ): 220-229.
- [ 8 ] Lebedeva IV, EMDAd L, Su ZZ, Gupta P, Sauane M, Sarkar D, et al. MDA-7/IL-24, novel anticancer cytokine: Focus on bystander antitumor, radiosensitization and antiangiogenic properties and overview of the phase I clinical experience [ J ]. *Int J Oncol*, 2007, 31( 5 ): 985-1007.
- [ 9 ] Eager R, Harle L, Nemunatis J. Ad-MDA-7; INGN241: A review of preclinical and clinical experience [ J ]. *Expert Opin Biol Ther*, 2008, 8( 10 ): 1633-1643.
- [ 10 ] Gupta P, Su ZZ, Lebedeva IV, Sarkar D, Sauane M, EMDAd L, et al. MDA-7/IL-24: Multifunctional cancer-specific apoptosis-inducing cytokine [ J ]. *Pharmacol Ther*, 2006, 111( 3 ): 596-628.
- [ 11 ] Sauane M, Gopalkrishnan RV, Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Dent P, et al. MDA-7/IL-24: Novel cancer growth suppressing and apoptosis inducing cytokine [ J ]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14( 1 ): 35-51.
- [ 12 ] 王长松,陈燕平. 抑癌基因 MDA-7/IL-24 研究进展 [ J ]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32( 4 ): 248-250.
- [ 13 ] Janknecht R, de Martynoff G, Lou J, Hipskind RA, Nordheim A, Srunnenberg HG. Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus [ J ]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88( 20 ): 8972-8976.
- [ 14 ] Einhauer A, Jungbauer A. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins [ J ]. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, 49( 1/2/3 ): 455-465.
- [ 15 ] Skerra A, Schmidt TG. Use of the Strep-Tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins [ J ]. *Methods Enzymol*, 2000, 326: 271-304.
- [ 16 ] Kobayashi T, Morone N, Kashiyaama T, Oyamada H, Kurebayashi N, Murayama T. Engineering a novel multifunctional green fluorescent protein tag for wide variety of protein research [ J ]. *PLoS One*, 2008, 3( 12 ): e3822.
- [ 17 ] Tsien RY. The green fluorescent protein [ J ]. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67: 509-544.
- [ 18 ] 李永进,陈媛媛,毕利军. 融合标签技术及其应用 [ J ]. *生物工程学报*, 2006, 22( 4 ): 523-527.
- [ 19 ] Terpe K. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems [ J ]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60( 5 ): 523-533.
- [ 20 ] Brecht A, Gibbs T. Self-labeling protein tags [ J ]. *Bioforum Europe*, 2005, 6( 1 ): 50-51.
- [ 21 ] Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, et al. HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis [ J ]. *ACS Chem Bio*, 2008, 3( 6 ): 373-382.
- [ 22 ] Uhr M, Hartzell D, Mendez J, Klaubert DH, Wood K. Method for detection of protein-protein and protein-DNA interactions using HaloTag [ J ]. *Methods Mol Biol*, 2008, 421: 191-209.
- [ 23 ] Hartzell D, Trinklein ND, Mendez J, Murphy N, Aldred SF, Wood K, et al. A function analysis of the CREB signaling pathway using Halo-chip and high throughput reporter assays [ J ]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 497-512.

[ 收稿日期 ] 2010 - 04 - 15

[ 修回日期 ] 2010 - 05 - 18

[ 本文编辑 ] 徐红梅