

凋亡抑制蛋白 Livin 两种异构体原核表达载体的构建及融合表达

邹爱民,沈建军,高萍,林芳,张惠中

Construction of Prokaryotic Expression Vectors for Livin Alpha and Livin Beta

ZOU Ai-min, SHEN Jian-jun, GAO Ping, LIN Fang, ZHANG Hui-zhong

Central Laboratory, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

Corresponding Author: ZHANG Hui-zhong, E-mail: hongyu2001@163.com

Abstract: **Objective** To construct prokaryotic expression vectors for Livin α and Livin β and to obtain the fusion protein of pET32a(+)-livin α and pET32a(+)-livin β . **Methods** Total RNA of HeLa cell was extracted. The full-length cDNA of Livin isoforms was gained by RT-PCR. Then inserted into pET32a(+) vector and constructed the recombinant plasmids pET32a(+)-livin α /DH5 and pET32a(+)-livin β /DH5, sequencing was performed to guarantee correct sequence insertion for the isoforms Livin α and Livin β . Reconstructed the recombinant plasmids pET32a(+)-livin α /BL21 and pET32a(+)-livin β /BL21, the pET32a(+)-livin α /BL21 and pET32a(+)-livin β /BL21 plasmids was induced after 4.5 hours by IPTG, and the value of A_{600nm} was 0.6 in LB medium. Expression of the pET32a(+)-livin α /BL21 and pET32a(+)-livin β /BL21 were analyzed by SDS-PAGE. **Results** Full-length cDNA of Livin α and Livin β was cloned respectively and subcloned into pET32a(+) successfully. Fusion protein of positive recombinants were gained by pET32a(+) prokaryotic expression system. **Conclusion** The construction of prokaryotic expression vector for Livin α and Livin β and validation of expression in cells provide basis for further research on functions of Livin α and Livin β and their anti-apoptosis effect in cancer cell.

Key words: Inhibitor of apoptosis protein family; Livin; Apoptosis; Prokaryotic expression vector

摘要:目的 构建凋亡抑制蛋白 Livin 两种异构体(Livin α 和 Livin β)的原核细胞表达载体 pET32a(+)-livin α 和 pET32a(+)-livin β 。方法 设计合成扩增 Livin 基因异构体全长 cDNA 序列的特异性 PCR 引物,以 HeLa 细胞总 RNA 为模板,RT-PCR 获得 Livin 基因异构体全长 cDNA 序列,用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切取所需目的片段,并插入原核表达载体 pET32a(+)的多克隆位点,经酶切、PCR 鉴定,并经过测序证实后,构建成为 Livin 基因异构体表达载体(pET32a(+)-livin α 、pET32a(+)-livin β)。将重组质粒转入表达菌株 BL21,诱导表达收集菌液,超声碎菌,取其上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳。结果 成功获得 Livin α 和 Livin β 全长 cDNA 序列,并克隆到原核表达载体 pET32a(+)上;成功获得大小为 55kd 左右的融合蛋白。结论 Livin 基因两种异构体原核表达载体的构建及其融合蛋白的制备,为进一步研究 Livin 异构体功能及在肿瘤细胞中的抗凋亡效应奠定了基础。此蛋白也可用于进一步抗体制备、免疫鉴定和诊断等研究。

关键词: 凋亡抑制蛋白; Livin; 凋亡; 原核表达

中图分类号: Q781 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2007)06-0409-03

0 引言

Livin 是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis protein family, IAP)家族的新成员,存在 Livin α 、Livin β 两种异构体(isoform),前者 cDNA 全长 897 bp,后者 cDNA 全长 843 bp。两种异构体差异微小,仅后者的外显子 6 缺失了 54 bp 的片段;然而二

者不仅抗凋亡功能有差异,而且具有不同的组织表达谱^[1,2],研究表明,Livin 在多数肿瘤^[1-3],而在正常组织中含量甚微。Livin 基因表达与肿瘤发生有密切关系,并可能作为诱导肿瘤凋亡治疗的新靶点。我们从 HeLa 细胞 cDNA 中克隆出 livin 变体的全序列基因,并在原核表达系统中表达了此蛋白,探讨了该蛋白在大肠杆菌中的表达特性。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株、质粒和试剂 HeLa 细胞株,大肠杆菌

收稿日期:2006-07-18;修回日期:2006-11-23

作者单位:710038 西安,第四军医大学唐都医院中心实验室

通讯作者:张惠中, E-mail: hongyu2001@163.com

作者简介:邹爱民(1969-),女,硕士,主要从事生物治疗方面的研究

DH5、BL21 及质粒 pET-32a(+) 为本科室保存; PCR 引物由上海英骏生物有限公司合成; RT-PCR、RNA 提取试剂 Trizol 试剂盒购自 invitrogen 公司、细胞培养试剂购自华美公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 BamHI 和 HindIII、核酸分子质量标准购自大连 TaKaRa 生物有限公司; 质粒抽提试剂盒、凝胶 DNA 回收试剂盒、PCR 产物回收试剂盒购自安徽优晶生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计合成 根据 GenBank 提供的 Livin (NM139317)、Livin (NM022161) 的 cDNA 序列, 分别设计两对 Livin 特异性 PCR 扩增引物。第 1 对引物 Livin-1、用于扩增 Livin、Livin 的全长 cDNA 序列, 在 5' 端分别添加 BamHI 和 HindIII 酶切位点及相应保护碱基序列。第 2 对引物 Livin-2 用于对 PCR 产物及重组体进行 PCR 初步鉴定, 克隆产物片段为 (298 ~ 800)。序列如下: Livin-1 sense primer (P1) 5'-gggggatccatggacctaagacagtgc-3', antisense primer (P2) 5'-gggaagcttggacaggaaggtgctgc-3'; Livin-2 sense primer (P1) 5'-tgaggagttgctctgg-3', antisense primer (P2) 5'-gcacggcacaagacgat-3'。

1.2.2 Livin 异构体基因的克隆 用 Trizol 试剂提取 Hela 细胞总 RNA。按说明书方法反转录后采用 Livin-1 引物按以下条件进行 PCR 扩增: 94 预变性 5min, 94 变性 30s, 64 退火 35s, 72 延伸 1min, 30 个循环, 72 延伸 5min。采用 Livin-2 对 PCR 产物进行异构体鉴定, 反应条件: 94 预变性 5min, 94 变性 30s, 58 退火 30s, 72 延伸 1min, 30 个循环, 72 延伸 5min。

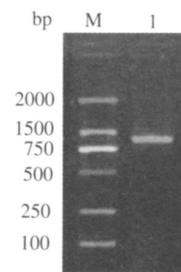
1.2.3 重组质粒 pET 32a(+)-Livin 的构建和鉴定 将 PCR 产物回收纯化, 酶切后的 PCR 回收产物与 pET32a(+) 质粒用 T4 连接酶 16 连接过夜。将 20 μl 连接产物转化 100 μl 的 E coli DH5 感受菌, 37 250r/min 培养 1 h, 收集菌体涂于 Amp⁺ LB 固体培养基平板, 37 倒置培养过夜。挑取克隆提取质粒, 用 BamHI 和 HindIII 限制性内切酶进行双酶切鉴定, 采用 Livin-2 引物对重组质粒进行 PCR 鉴定筛选 Livin 和 Livin 的重组质粒。分析正确的克隆送交公司测序, 测序引物为 T7 Promoter。所获阳性克隆命名为 pET 32a(+)-Livin 和 pET 32a(+)-Livin。

1.2.4 融合蛋白的制备 将重组质粒 pET32a(+)-livin 和 pET32a(+)-livin 重新转化 BL21, 构建重组工程菌 pET32a(+)-livin /BL21 和 pET32a(+)-livin /BL21, 进行目的蛋白的诱导表达。取 100 μl 重

组工程菌 pET32a(+)-livin /BL21 和 pET32a(+)-livin /BL21 过夜菌液, 分别转接至含 5 ml 培养基的摇菌管, 37 250r/min, 培养至 A₆₀₀ 0.6, 37 IPTG 诱导 4h, 离心收集菌体。菌液 (0.5 ml) 经离心洗涤后, 进行 SDS-PAGE 分析。采用 FR-200 紫外可见分析装置, 复日 smart view 2001 生物电泳图象分析系统对电泳图谱进行分析。

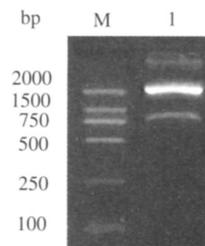
2 结果

2.1 livin 基因的分离扩增与重组质粒的酶切鉴定 以 Hela 细胞 cDNA 为模板, 用 livin-1 引物进行 RT-PCR 得到大小为 900 左右的特异性条带, 见图 1, 对其用 livin-2 引物进行 PCR 扩增后的电泳鉴定得到大小为 500bp 的两条特异性条带, 结果表明, 此 PCR 产物为 livin 和 livin DNA 的混合物, 见图 3。回收并插入表达载体 pET32a(+), 构建重组子, 重组子经 BamHI、HindIII 双酶切后, 在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图上呈现两条特异性条带, 分别为载体片段及大小为 900bp 左右的目的片段, 见图 2, 回收酶切产物并用 livin-2 引物进行 PCR 扩增后, 得到大小为 500bp 左右的两条特异性条带, 经序列测定, 此为 Livin、Livin 两个变体形式, 见图 3。同样用 livin-2 引物鉴定两株重组工程菌分别为 pET32a(+)-livin /BL21 和 pET32a(+)-livin /BL21。



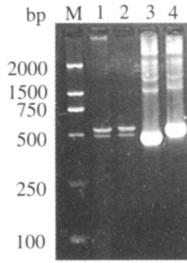
M: DNA marker; lane 1: PCR products of recombinant pET32a(+)-livin & (about 900kb)

图 1 Livin & PCR 扩增产物琼脂糖电泳结果



M: DNA marker; lane 1: pET32a(+)-livin & digested with BamHI、HindIII (fragment of plasmid and production of about 900kb)

图 2 重组质粒 pET32a(+)-livin & 酶切电泳鉴定结果



M: DNA marker; lane 1, 2: Identify the PCR amplification production of livin isoforms by livin - 2 primer; lane 3, 4: Identify the recombinant plasmid livin₁ / livin₂ by livin-2 primer

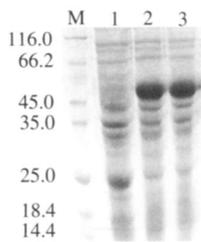
图 3 PCR 扩增产物及重组质粒的 livin 变构体的鉴定结果

2.2 重组载体的测序验证

2.2.1 PET32a(+)-livin 的测序结果 测序结果显示:碱基序列正确,只在 528 位发生同义突变, TCC-TCT(丝氨酸)。

2.2.2 PET32a(+)-livin 的测序结果 测序结果显示:碱基序列正确,同样只在 528 位发生同义突变, TCC-TCT(丝氨酸),这与孙建国等^[12]研究结果一致。

2.3 重组质粒 PET32a(+)-livin 和 PET32a(+)-livin 在大肠杆菌中的表达 含有重组质粒 PET32a(+)-livin 和 PET32a(+)-livin 的大肠杆菌 BL21 在 37℃ 经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 电泳显示在分子量 55kd 处可见新的融合蛋白表达带,见图 4。



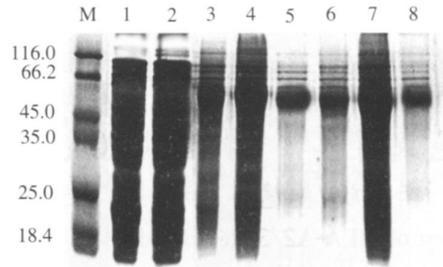
M: Low-molecular-weight marker; lane1: BL21; lane2: pET32a(+)-livin / BL21; lane 3: pET32a(+)-livin / BL21

图 4 pET32a(+)-livin 和 pET32a(+)-livin 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

2.4 表达产物的可溶性分析 收集菌液,进行超声碎菌,取其上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳,发现其主要为可溶性蛋白,有少量包涵体,见图 5。

3 讨论

Livin 基因是一种新发现的 IAP 成员,其基因转录产物有两种 mRNA 亚型 livin₁、livin₂,分别编码 298 个氨基酸蛋白质和 280 个氨基酸蛋白质。IAP 家族在其蛋白质的氨基端至少有 1~3 个高度



M: Low-molecular-weight marker; lane1: BL21; lane2: pET32a(+)-BL21 after induction; lane3: pET32a(+)-livin / BL21 sediment; lane4: pET32a(+)-livin / BL21 total bacterium; lane5: pET32a(+)-livin / BL21 supernatant; lane6: pET32a(+)-livin / BL21 sediment; lane7: pET32a(+)-livin / BL21 total bacterium; lane 8: pET32a(+)-livin / BL21 supernatant

图 5 融合蛋白表达纯化(pET32a(+)-livin / BL21 和 pET32a(+)-livin / BL21)的 SDS-PAGE 电泳分析

保守的约 70 个氨基酸的 BIR 结构域;在羧基端还有一个锌指状结构的保守氨基酸序列称为 RING 结构域(NIAP 和 survivin 除外)。而 Livin 只有一个 BIR 和 RING 结构域,其结构非常类似 survivin^[1,21]。

报道表明 Livin 基因只在黑色素瘤、结肠癌、前列腺腺癌和膀胱癌等肿瘤细胞中及在胎盘、胚胎组织中表达,在多数正常成人组织中不表达^[1-3],这一表达的特异性使得 Livin 基因成为目前研究的热点。越来越多的研究表明,Livin 基因在肿瘤的发生、发展中起重要的作用。已有实验表明,Livin 基因能够抑制肿瘤细胞的凋亡,并与肿瘤细胞的耐药性有关^[4-7]。Yagihashi 等^[8,9]还在某些肿瘤患者(肺癌、乳腺癌及胃癌)血清中检测到了抗 Livin 抗体,表明抗 Livin 抗体可作为肿瘤标志物用于肿瘤的临床诊断。

Livin 基因抗凋亡作用的主要机制是: 通过其 BIR 结构域直接抑制 Caspase 或前体 Caspase; 以及下游 Caspase-3 和 Caspase-7 的活性,也可以抑制 Caspase-9 蛋白的水解过程^[1-3]。 Livin 通过选择性激活由 TAB1/ TAK1 介导的 MAP 激酶 JNK1,明显抑制由 TNF-α 和 ICE 诱导的凋亡^[7]。

Livin 在其碳末端拥有 RING 指结构,该结构具有 E3 泛素连接酶活性,Livin 同样具有该酶活性,并且可靶向降解 Smac/ DIABLO 复合物,Smac/ DIABLO 复合物可通过抑制 IAP-caspases 的交互作用,来发挥促凋亡功能,Livin 对 Smac/ DIABLO 复合物的降解被认为是 Livin 抗细胞凋亡的机制之一^[10]。

为了深入研究 Livin 的结构、功能及其在肿瘤转移中的分子机制,并在此基础上开发其抑制剂为

(下转第 448 页)

3.2 HCC 的 CT 血供分型与 VEGF 表达

VEGF 诱导肿瘤血管生成“开关”开启。肿瘤新生血管的形成决定 HCC 血供类型,血供类型又决定了 CT 的强化表现。HCC 血供类型与 VEGF 表达和 CT 表现之间存在着必然的联系。本研究 CT 显示,动脉血供型在动脉早期可以看见异常血管显影,而肿瘤的强化在动脉晚期和毛细血管期最明显,CT 值较平扫增高 40 HU 以上;动、门脉双重血供型的肿瘤强化时间较动脉血供型稍晚,最佳强化时间在毛细血管期和平衡期,强化程度与动脉血供型无显著差异;部分小肝癌或肝癌大面积坏死时肿瘤表现为少血供,少血供型仅表现平衡期病灶内或边缘轻微强化,CT 值较平扫仅增高 20HU 左右。肿瘤强化程度与 VEGF 的表达水平呈正相关;动脉血供型与动、门脉双重血供型的血清 VEGF 表达水平都高,二者无明显差异 ($P > 0.05$);动脉血供型与动、门脉双重血供型的血清 VEGF 表达水平明显高于少血供型血清 VEGF 表达水平 ($P < 0.01$);少血供型血清 VEGF 表达水平与正常组血清 VEGF 表达水平无明显差异 ($P > 0.05$)。从肿瘤的最佳强化时间来看,说明肿瘤微血管越丰富,强化越明显,

VEGF 表达水平也越高。同时也说明 VEGF 表达与肿瘤的微血管密度有关^[5]。

通过 CT 增强扫描既可以了解肿瘤的血供类型,又可以预测肿瘤的 VEGF 表达水平,帮助我们选择治疗方法。TACE 治疗血供丰富的肿瘤短期效果较好,被广泛采用。但是血供丰富的肿瘤 VEGF 表达水平都高。采用 TACE 灌注化疗与抗血管生成抑制剂相结合可提高疗效。

参考文献:

[1] 赵建军,胡敬群,蔡建强,等. 血管内皮生长因子在肝细胞癌血清中的表达意义[J]. 中华肿瘤杂志,2001,23(5):389-392.
 [2] 黄娟,周祥平,刘荣波,等. 原发性肝癌血供特点的类型螺旋 CT 表现及其与病理学特点的相关性研究[J]. 中华放射学杂志,2000,34(11):753-756.
 [3] 姚登福,祝勇,吴信华,等. 人肝癌组织血管内皮生长因子及微血管密度分析的临床价值[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(2):92-94.
 [4] Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenesis switch during tumorigenesis[J]. Cell,1996,86(3):353-364.
 [5] Mise M, Arii S, Higashitani H, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor gene expression in liver tumor[J]. Hepatology,1996,23:455-464.

[编辑:贺文;校对:马福元]

(上接第 411 页)

肿瘤的治疗提供新方法,我们克隆出了 Livin 两种异构体形式,并发现其在第 528 位碱基(第 176 位密码子)发生突变,由于是同义突变(TCC~TCT 丝氨酸),不影响蛋白表达氨基酸序列,这一点同孙建国等^[11]的研究结果一致,并认为这是人种误差造成的结果。

由于 Livin 的分子结构、生物学功能、活性调节等多方面尚待进一步阐明,得到足够数量和纯度的蛋白是进一步研究的关键。因此,我们利用基因重组技术构建工程菌,采用 his 基因融合表达系统 pET32a(+) 构建了 pET32a(+)/livin 融合表达重组体,成功表达了 Livin 和 Livin 融合蛋白。实验证明,pET32a(+)-livin/BL21 和 pET32a(+)-livin/BL21 表达条件基本一致,这两种工程菌生长营养要求简单,易于表达,稳定性好。本研究确定了工程菌的最适诱导条件,即选定了 LB 作为最佳培养基,pH 6.5~7.0,对数中期开始诱导 4.5h,表达量高,为进一步扩大生产打下了良好的基础,此融合蛋白也可进一步用于抗体制备、免疫鉴定和诊断等研究,其应用价值非常广泛。

参考文献:

[1] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member[J]. J Biol Chem,2001,276(5):3238-

3246.
 [2] Vucic D, Stennicke HR, Pisabarro MT, et al. ML-IAP, a novel inhibitor of apoptosis that is preferentially expressed in human melanomas[J]. Curr Biol,2000,10(21):1359-1366.
 [3] Gazzaniga P, Gradilone A, Guliani L, et al. Expression and prognostic significance of LIVIN, SURVLIVIN and other apoptosis-related genes in the progression of superficial bladder cancer[J]. Ann Oncol,2003,14(1):85-90.
 [4] Crnkovic M I, Hoppe S F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/MLIAP/KIAP gene[J]. Oncogene,2003,22(51):8330-8336.
 [5] Cmkovic-Mertens, Semzow J, Hoppe-Seyler F, et al. Isoform-specific silencing of the Livin gene by RNA interference defines Livin. as key mediator of apoptosis inhibition in HeLa cells[J]. J Mol Med,2006,84(3):232-240.
 [6] Wright CW, duckett CS. Reawakening the cellular death program in neoplasia through the therapeutic blockade of IAP function[J]. J Clin Investigation,2005,115(10):2673-2678.
 [7] Sanna MG, da Silva Correia J, Ducrey O, et al. IAP suppression of apoptosis involves distinct mechanisms: The TAK1/JNK1 signaling cascade and caspase inhibition[J]. Mol Cell Biol,2002,22(6):1754-1766.
 [8] Yagihashi A, Asanumaa K, Kobayashia D, et al. Detection of autoantibodies to livin and survivin in sera from lung cancer patients[J]. Lung Cancer,2005,48(2):217-221.
 [9] Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, et al. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer[J]. Clin Chim Acta,2005,362(1-2):125-130.
 [10] Ma L, Y Huang, Z Song, et al. Livin promotes Sac/DIABLO degradation by ubiquitin-proteasome pathway[J]. Cell Death Differ,2006,13(12):2079-2088.
 [11] 孙建国,陈正堂,王志新,等. 凋亡抑制蛋白 Livin 两种异构体真核表达载体的构建及表达鉴定[J]. 第三军医大学学报,2005,27(19):1935-1938.

[编辑:周永红;校对:安凤]

