

人肿瘤坏死因子受体的配体胞外段的原核表达及分析

焦艳丽¹, 郑芳¹, 李晓霞², 王宝利¹, 郭善一¹

1 天津医科大学 代谢病医院内分泌研究所, 天津 300070

2 天津医科大学基础医学院 微生物学教研室, 天津 300070

摘要: 新近报道糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体的配体(GITRL)具有抑制前体破骨细胞的作用, 故命名为Osteostat, 为深入研究其功能和机制, 本研究原核表达人 GITRL 胞外段并进行活性分析。利用限制性内切酶 *Eco31I* 获得大肠杆菌偏嗜性 GITRL 的胞外段 cDNA 序列, 构建了基于 pQE-30Xa 的原核表达载体, 并在 M15[pREP4]菌株中经 IPTG 诱导表达带有 His 融合标签的 GITRL 重组蛋白, 主要以包涵体形式存在。经体外包涵体变性、复性及纯化后, 采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 进行分析和鉴定。同时建立了报告基因技术检测 GITRL 重组蛋白生物活性的方法, 简单便捷、灵敏而且周期短, 利用此方法分析了重组 GITRL 胞外段表达蛋白的生物活性。

关键词: GITRL, 原核表达, 报道基因, 偏嗜性, 限制性内切酶 *Eco31I*

Expression and analysis of the extracellular domain of human glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand in *Escherichia coli*

Yanli Jiao¹, Fang Zheng¹, Xiaoxia Li², Baoli Wang¹, and Shanyi Guo¹

1 Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2 Department of Microbiology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: GITRL (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand) has been recently identified as a novel inhibitor of osteoclastogenesis and hence called Osteostat. In this study, we expressed recombinant extracellular domain of GITRL protein in *Escherichia coli* and analyzed its bioactivity. Using an *Eco31I* enzyme-based restriction and ligation method, we obtained an *E. coli*-preferred DNA sequence coding for the extracellular domain of human GITRL. The DNA was cloned into expression vector pQE-30Xa that encodes a fusion tag of 6xHis before the insert. The resultant recombinant expression vector pQE/GITRL was subsequently transformed into *E. coli* strain M15[pREP4]. After induction with Isopropyl β-D-Thiogalactoside (IPTG), the cells produced the fusion protein mainly in the form of inclusion bodies as identified by SDS-PAGE. The recombinant protein was purified by affinity chromatography through Ni-NTA column and recognized by anti-His polyclonal antibody using Western blotting analysis. Moreover, we established a simple, efficient and sensitive reporter gene-based method to detect the activity of the recombinant protein. The results showed that the target protein was biologically active.

Keywords: GITRL, prokaryotic expression, reporter gene, codon preference, restriction enzyme *Eco31I*

Received: November 25, 2008; **Accepted:** March 3, 2009

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30300171), Science and Technology Development Foundation of Tianjin Universities (No. 20060207).

Corresponding author: Xiaoxia Li. Tel: +86-22-23542649; E-mail: lixx@tjmu.edu.cn

国家自然科学基金项目(No. 30300171), 天津市高等学校科技发展基金项目(No. 20060207)资助。

糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子受体的配体 (Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor ligand, GITRL) 是肿瘤坏死因子超家族 (Tumor necrosis factor superfamily, TNFSF) 中的第 18 个成员, 属于 II 型跨膜蛋白, 参与细胞的凋亡、淋巴细胞的活化和分化等过程^[1-3]。新近的研究显示, 它抑制由 NK- κ B 受体激活因子 (Receptor activator of NF- κ B, RANK) 介导的外周血单个核细胞向破骨细胞的分化, 故称之为 Osteostat^[4]。这提示 GITRL 对于骨代谢系统有关的疾病, 比如骨质疏松、类风湿性关节炎及肿瘤骨转移等所致的严重骨丢失可能具有潜在的预防价值。迄今为止, 有关人 GITRL 分子对破骨细胞的调节作用机制仍不明了。

本研究采用基因重组技术研制了 GITRL 蛋白。首先将 GITRL 的胞外段密码子替换成大肠杆菌偏嗜的密码子, 利用限制性内切酶 *Eco31I* 克隆获得大肠杆菌偏嗜性 GITRL 的胞外段 DNA 序列, 利用原核表达系统对其进行了表达并分析了它的生物活性, 为 GITRL 开发重组基因药物和机制的深入研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒及细胞系

大肠杆菌菌株 JM109 和 M15[pREP4]为本实验室保存, 原核表达质粒 pQE-30Xa 购自 New England Lab。带有 GITR 基因 cDNA 序列的重组表达载体 pcDNA3.1/hGITR、Luc/NF- κ B 报告基因表达载体和带有 GITRL 基因 cDNA 序列的表达载体 pcDNA3.1/GITRL 由本实验室构建。人胚胎肾细胞株(HEK293)为本实验室保存。

1.2 工具酶及试剂

限制性内切酶 *Eco31* I、*Bam*H I、*Hind* III 购自
Fermentas 公司；琼脂糖亲和层析预装柱购自 New

England Biolab。High Affinity Ni-NTA Resin 试剂盒购自 Novagen 公司; 小鼠 Anti-His 单克隆 IgM 抗体购自 Lab Vision 公司, HRP 标记的山羊抗小鼠 IgM 的多克隆抗体购自 Sigma 公司。LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品。luciferase reporter gene assay kit 购自 Promega 公司。

1.3 利用重叠延伸 PCR 和限制性内切酶 *Eco31I* 获得大肠杆菌偏嗜的人 GITRL 胞外段基因

人 GITRL 基因序列胞外段位于 75~199aa 序列, 根据 GenBank(Accession No. NM_005092.3)公布的序列并依据大肠杆菌对密码子的偏嗜性和密码子的简并性原则, 设计并合成 3 对寡核苷酸片段(表 1), 即 ON1 和 ON2、ON3 和 ON4、ON5 和 ON6。每对寡核苷酸片段各有 18 个碱基反向互补, ON1、ON3 与 ON5 为正义链序列, ON2、ON4 与 ON6 为反义链序列。

本研究的策略是首先分别以上述 3 对寡核苷酸片段互为引物和模板, 采用重叠延伸 PCR 方法扩增获得 G1、G2 和 G3 三个片段, 然后利用限制性内切酶 *Eco31I* 实现 3 个片段的拼接获得此编码序列。*Eco31I* 的特点是在识别位点之外切开 DNA, 所得片段为单链突出末端, 如下所示:

5'...GGTCTCN[^]...3'

3'...CCAGAGNNNNN[^]...5' (N 代表任意碱基)。

识别序列

因此本研究将 *Eco31I* 识别和酶切序列引入到 PCR 扩增 3 个 GITRL 基因片段的引物中, 以 GITRL 序列中的碱基代替 N, 经 *Eco31I* 酶切处理后产生 3 个首尾相匹配的粘性末端, 由于 *Eco31I* 酶酶切产生的单链突出末端不含它的识别序列, 可以实现基因片段的正确拼接。下图为 *Eco31I* 进行片段拼接为 GITRL 的示意图(图 1)。

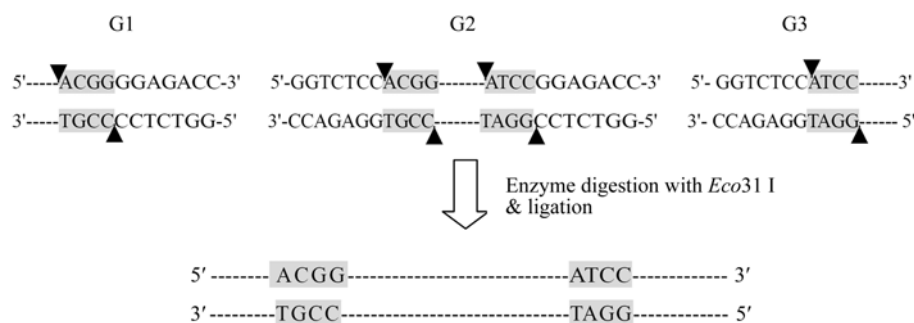


图 1 GITRL 的拼接示意图

Fig. 1. Schematic graph of generation of GITRL.

表 1 用于合成 GITRL 的寡核苷酸片段
Table 1 Oligonucleotides used for generation of GITRL

Oligonucleotides	Sequences for oligonucleotides (5'-3')
ON1	ACTGCTAAAGAACCGTGCATGGCTAAATTTCGGTCCGCTGCCGTCTAAATGGCAGATGGC TTCTTCCGAACCGCCGTGCGTTAACAAAGTTTCTG
ON2	GATCAGGTACAGACCGTTCTGCAGGATTTCCAGTTTCCAGTCAGAACTTTGTTAACGC
ON3	TACGGTCAGGTTGCTCCGAACGCTAACTACAACGACGTTGCTCCGTTCTGAAGTTCGTCT
ON4	ATTTGTTAGTCAGAGTCTGGATCATGTCTTTGTTTTGTACAGACGAACTTCGAACG
ON5	CTAAATCCAGAACGTTGGTGGTACTTACGAACTGCACGTTGGTGACACTATCGACCTG
ON6	AGAGATGAACTGCGGGTTAGCCAGCAGGATGATACCCAGTAAGTGTGTTTTTCAGAA CCTGGTGTTCGGAGTTGAAGATCAGGTCGATAGTGTCAAC

具体步骤如下，首先设计重叠延伸 PCR 扩增的引物如表 2 所示。

表 2 用于合成 GITRL 的引物
Table 2 Primers used for generation of GITRL

Primers	Sequences for primers (5'-3')
F1	GCGGGTCTCGGATC CA TG ACTGCTAAAGAACCGT
R1	ATTGGTCTCCCGT TC TGCAGGATTT
F2	GAA GGTCTCCACGG ICTGTACCTGAT
R2	GCGGGTCTCCGGAT CA TGTCTTTGTTT
F3	AATGGTCTCCATCC AG AACGTTGGTGGTAC
R3	GTTGGTCTCAAGCT TC TAAAGATGAACTGCGGGT

在每一对引物的 5'端均引入 *Eco*31I 内切酶的识别序列(用边框表示)。其中 F1 和 R3 引物中 *Eco*31I 酶识别序列中的 N 分别来自 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶的识别序列(用斜体表示)，该引物设计的目的是将 PCR 产物经过 *Eco*31I 酶切之后直接产生 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶的 5'粘性末端，可与经过 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的克隆载体直接连接并转化。其余引物中 *Eco*31I 酶识别序列的 N 均来自 GITRL 编码序列(用阴影表示)，目的是利用限制性内切酶 *Eco*31 I 实现多个基因片段的拼接。

PCR 扩增反应体系：10×Buffer 2.5 μL，2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL，引物各 0.4 mol/L，寡核苷酸片段各 2.0 μL(终浓度 0.4 μmol/L)，Pfu DNA 聚合酶 1 U，ddH₂O 补齐至 25 μL。PCR 条件为：95℃ 预变性 3 min；94℃ 30 s，62℃ 30 s，72℃ 30 s，进行 25 个循环；然后 72℃ 延伸 5 min。在 PCR 产物中加入 *Eco*31 I 内切酶，37℃ 作用 2 h，回收酶切片段。

1.4 重组 GITRL 胞外段表达质粒的构建与鉴定

*Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pQE-30Xa 载体，与上述 PCR 酶切产物同管连接、转化，提取质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 内切酶酶切鉴定并测序。构建携

带人 GITRL 胞外段基因的 pQE-30Xa 重组质粒，命名为 pQE/GITRL。

1.5 重组 GITRL 蛋白的诱导表达及纯化

将鉴定正确的重组 pQE/GITRL 质粒转化 *E. coli* M15[pREP4]，挑取单一菌落接种于含 100 μg/mL 氨苄青霉素、25 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中，37℃ 振荡培养过夜，通过不同的诱导时间和 IPTG 浓度优化其表达条件。

由于表达的重组 GITRL 蛋白 N 端带有 6×His 标签，故纯化方案参照 High Affinity Ni-NTA Resin 试剂盒提供的变性纯化方案(Denature protocol) 进行操作，即在变性条件下溶解包涵体后上柱。

1.6 重组 GITRL 蛋白的 Western blotting 检测

纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后，电转移至 PVDF 膜上，在含 5%脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中室温封闭膜 1~2 h，与抗组氨酸抗体 4 过夜孵育，二抗采用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体。最后用增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒进行检测。

1.7 重组 GITRL 胞外段表达蛋白生物活性分析的测定体系的建立

重组质粒 pcDNA3.1/hGITR 在脂质体 lipofectamine2000 介导下转染 HEK293 细胞株，经 G418 筛选稳定表达 hGITR 的细胞株，简称 hGITR-HEK293。将 hGITR-HEK293 细胞以 8×10⁴/mL 的浓度接种于 24 孔板，每孔 0.5 mL 继续培养 24 h 后转染。空质粒 pcDNA3.1 作为对照组，重组质粒 pcDNA3.1/ GITRL 作为实验组。每孔均同时转染 0.5 μg luc/NF-κB 报告基因质粒，做 6 个复孔。分别于 12 h 和 24 h 后收获细胞，测定细胞荧光素酶活性。同时用 BCA 法检测细胞裂解液中的总蛋白进行校正。结果用 RLU(Relative luciferase unit)表示，即表

示为实验组荧光素酶测定值相对于对照组荧光素酶测定值的倍数。

1.8 重组 GITRL 胞外段蛋白的生物活性分析

将 hGITR-HEK293 细胞以 $8 \times 10^4/\text{mL}$ 浓度接种于 24 孔板, 每孔 0.5 mL 继续培养 24 h 后转染 0.5 μg luc/NF- κB 报告基因质粒。继续培养 12 h 后, 加入重组 GITRL 表达蛋白。

样品分组为: 1) 溶媒组: Tris-NaCl 溶液; 2) 低浓度重组 GITRL 表达蛋白 (25 ng/mL); 3) 中浓度重组 GITRL 表达蛋白 (100 ng/mL); 4) 高浓度重组 GITRL 表达蛋白 (400 ng/mL)。做 6 个复孔, 样品作用 24 h 和 36 h 后测定细胞荧光素酶活性。同时用 BCA 法检测细胞裂解液中的总蛋白进行校正。结果用 RLU(Relative luciferase unit) 表示, 即表示为实验组荧光素酶测定值相对于溶媒组荧光素酶测定值的倍数。

2 结果

2.1 重组表达质粒 pQE/GITRL 的酶切鉴定

pQE/GITRL 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见线性载体片段和大小为 393 bp 的片段, 符合预期大小(图 2a), 且经测序证实序列并未出现移码改变, 其编码氨基酸序列与参考序列吻合(图 2b), 进一步证实利用限制性内切酶 *Eco*31I 的酶切产生的粘性末端首尾相匹配, 从而实现了 GITRL 3 个片段之间的正确拼接。

2.2 重组 GITRL 胞外段在原核细胞中的表达及纯化鉴定

重组质粒 pQE/GITRL 转化菌在 37°C 下诱导表达 4 h 后, 在 16 kD 附近出现深染条带, 大小与预期一致, 且表达蛋白主要存在于包涵体中(图 3)。亲和层析对重组蛋白纯化后测定计算其产量为 13 mg/L。采用 Western blotting 鉴定纯化后的 GITRL 蛋白, DAB 显色可见预期位置蛋白与抗 His 抗体发生特异

性反应, 证明 16 kD 位置的表达蛋白确系融合蛋白 His-GITRL(图 4)。

2.3 用于重组 GITRL 胞外段表达蛋白生物活性分析的测定体系的建立

将 luc/NF- κB 转染 hGITR- HEK293 细胞, 同时分别转染质粒 pcDNA3.1/GITRL 和 pcDNA3.1, 在不同时间点检测荧光素酶的活性。从图 5 中可看出, 转染 pcDNA3.1/GITRL 后 12 h 和 24 h 荧光素酶活性较对照组分别增高 1.56 倍和 2.25 倍, 说明在 HEK293 细胞中 GITRL 可以通过与其受体 GITR 结合激活 NF- κB 信号转导通路, 从而建立了通过转染 luc/NF- κB 的 hGITR- HEK293 细胞测定 GITRL 重组表达蛋白活性的体系。

2.4 重组 GITRL 胞外段蛋白的生物活性分析

在上述建立的测定体系中, 加入不同剂量的重组蛋白 GITRL, 检测荧光素酶的活性, 结果如图 6 所示, 可见在 24 h 和 36 h 时间点, 各剂量组荧光素酶的活性均较溶媒组增高, 说明重组 GITRL 胞外段表达蛋白具有生物活性。其中 24 h 的中、高剂量组荧光素酶活性较高, 分别为溶媒组的 3.15 和 3.18 倍。

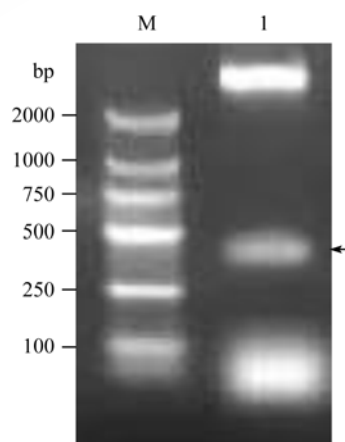


图 2a 重组 pQE/GITRL 的酶切鉴定

Fig. 2a Identification of constructs with digestion by *Bam*H I and *Hind* III endonuclease. M: DNA marker; I: digested pQE/GITRL by *Bam*H I and *Hind* III.



图 2b 目的蛋白 N 端部分的 DNA 测序结果

Fig. 1b Sequence analysis showed that the clones generated using our protocol did not exhibit frameshift mutation, arrows indicate sequences of 6X-his tag and start codon respectively.

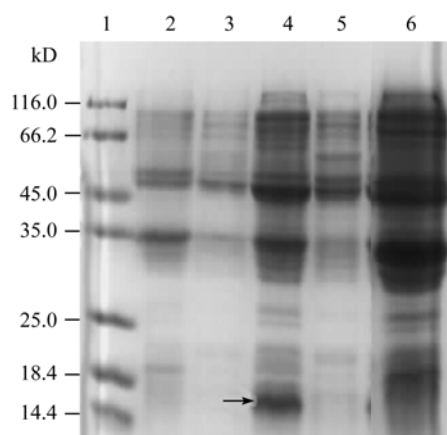


图3 重组表达载体 pQE/GITRL 在 *E. coli* M15 中的表达

Fig. 3 Expression of recombinant vector pQE/GITRL in *E. coli* M15. 1: protein marker; 2: insoluble cell lysates of pQE30-Xa transformants induced with IPTG; 3: soluble cell lysates of pQE30-Xa transformants induced with IPTG; 4: insoluble cell lysates of pQE/GITRL transformants induced with IPTG; 5: soluble cell lysates of pQE/GITRL transformants induced with IPTG; 6: insoluble cell lysates of *E. coli* M15 induced by IPTG.

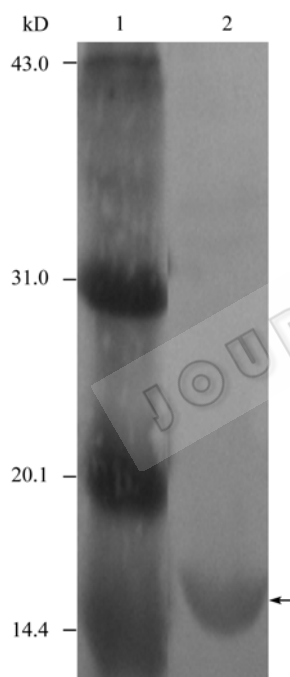


图4 Western blotting 鉴定融合蛋白

Fig. 4 Analysis of purified GITRL protein by Western blotting. 1: protein marker; 2: Western blotting analysis of His-GITRL.

3 讨论

GITRL 抑制前体破骨细胞的作用首次在 2006 年被报道^[4], 其作为一个在血管内皮细胞(Vascular endothelial cells, EC)中适应性表达的细胞因子可以抑制外周血单个核细胞向早期破骨细胞的发育, 故

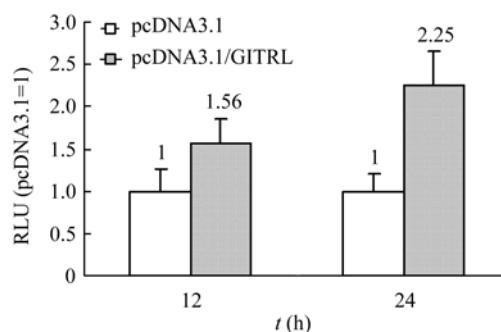


图5 pcDNA3.1/GITRL 转染导致 hGITR-HEK293 细胞中的 luc/NF-κB 报告基因的激活($n=6$)

Fig. 5 Transfection with pcDNA3.1/GITRL led to the activation of luc/NF-κB reporter gene in hGITR-HEK293 cells.

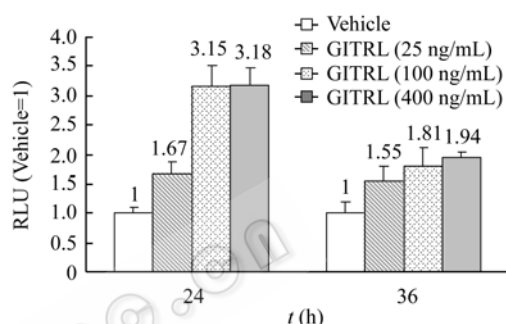


图6 重组 GITRL 胞外段蛋白促进 hGITR-HEK293 细胞中 luc/NF-κB 报告基因的表达($n=6$)

Fig. 6 Recombinant GITRL protein elevated the luc/NF-κB reporter gene expression level in hGITR-HEK293 cell.

称之为 Osteostat。目前关于 GITRL 抑制破骨细胞形成的机制尚不明确, 有研究表明 GITRL 通过影响 RANKL/OPG/RANK 系统抑制破骨细胞的生成, 还可能参与 I 型 IFN 抑制破骨细胞的分化过程^[5], 因此 GITRL 的功能及机制需要进一步探讨。本研究采用基因重组技术研制了 GITRL 蛋白, 并对其生物活性进行分析。

首先, 本研究在蛋白重组的过程中进行了如下改进: 1) 大肠杆菌嗜性的人 GITRL 胞外段编码序列需要人工合成, 本研究选择合成 60~90 个寡核苷酸长度的片段, 采用重叠延伸 PCR 法^[6]进行 GITRL 胞外段 3 个基因片段的扩增; 2) 利用限制性内切酶^[7]*Eco*31 I 实现 3 个片段的拼接获得完整的基因。*Eco*31 I 的特点是在识别位点之外切开 DNA, 所得片段为单链突出末端, 而且该末端的碱基可以是任意碱基 N。因此本研究将 N 设计为 GITRL 序列中的碱基, 同时将 *Eco*31 I 酶切位点引入到 PCR 扩增的 3 个 GITRL 基因片段中, 经 *Eco*31 I 酶切处理后产生 3

个首尾相匹配的粘性末端, 从而实现基因片段的正确拼接。较重叠延伸 PCR 的拼接方法而言, 该方法省略了一步 PCR 的扩增过程, 降低了错配率, 过程简单、快速而高效。

其次, 本研究建立了基于报告基因技术检测重组 GITRL 胞外段表达蛋白生物活性的测定体系。测定 GITRL 蛋白生物活性的方法可以采用 ELISA 法或 MTT 法, 但缺点是成本高或灵敏度低, 尚可采用破骨细胞样细胞(Osteoclast like cell, OLC)诱导分化实验检测重组蛋白的生物活性, 但破骨细胞诱导分化的过程本身繁琐又耗时。国外一项研究报道 GITRL 和其受体 GTR 的结合在巨噬细胞内可以激发 NF- κ B 信号转导^[8]。基于这样的发现, 本研究利用报道基因技术, 在应用极为广泛的 HEK293 细胞中建立了 GITRL 重组表达蛋白活性测定的体系。首先建立了稳定表达 hGTR 的细胞株 hGTR-HEK293, 将构建的 luc/NF- κ B 荧光素酶报告基因载体和质粒 pcDNA3.1/GITRL 共转染 hGTR-HEK293 稳定株, 证实了 NF- κ B 信号的转导通路, 即 GTR 和 GITRL 配受体结合引发 NF- κ B 的激活, NF- κ B 转录因子进入细胞核内, 可以与 luc/NF- κ B 载体上的 NF- κ B 增强子结合, 加强胞内 RNA 聚合酶与启动子的结合, 以此促进 luciferase 的转录表达, 从而建立了通过转染 luc/NF- κ B 的 hGTR- HEK293 细胞测定 GITRL 重组表达蛋白活性的体系。luciferase 具有检测快、灵敏度高、半衰期短、线性好等优点^[9], 因此该测定体系为重组 GITRL 胞外段表达蛋白的生物活性分析提供了一个简单、便捷且灵敏的研究方法。进一步分析重组 GITRL 胞外段表达蛋白的生物活性, 结果显示重组 GITRL 胞外段蛋白各剂量组荧光素酶报告基因的活性较溶媒组均有增高, 说明本研究原核表达的重组 GITRL 胞外段蛋白具有生物活性。

综上, 本研究成功获得 GITRL 胞外段重组蛋白的原核表达, 同时建立了用于该蛋白生物活性分析的测定体系, 通过报告基因技术证实了重组 GITRL 胞外段蛋白的生物活性, 为基因工程重组药物的研发和抑制破骨机制的深入研究奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Igarashi H, Cao Y, Iwai H, *et al.* GTR ligand-costimulation activates effector and regulatory functions of CD4⁺ T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **369** (4): 1134–1138.
 - [2] Nocentini G, Riccardi C. GTR: A multifaceted regulator of immunity belonging to the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Eur J Immunol*, 2005, **35** (4): 1016–1022.
 - [3] Hanabuchi S, Watanabe N, Wang YH, *et al.* Human plasmacytoid dendritic cells activate NK cells through glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-ligand (GITRL). *Blood*, 2006, **107** (9): 3617–3623.
 - [4] Nardelli B, Zaritskaya L, McAuliffe W, *et al.* Osteostat/tumor necrosis factor superfamily 18 inhibits osteoclastogenesis and is selectively expressed by vascular endothelial cells. *Endocrinology*, 2006, **147**(1): 70–78.
 - [5] Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, *et al.* RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos dependent induction of interferon- β . *Nature*, 2002, **416** (6882): 744–749.
 - [6] Young L, Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res*, 2004, **32** (7): e59.
 - [7] Szybalski W, Kim SC, Hasan N, *et al.* Class-II restriction enzymes. *Gene*, 1991, **100** (1): 13–26.
 - [8] Bae EM, Kim WJ, Suk K, *et al.* Reverse signaling initiated from GITRL induces NF- κ B activation through ERK in the inflammatory activation of macrophages. *Mol Immunol*, 2008, **45** (2): 523–533.
 - [9] Liu JW, Sun CH, Liu N. The application of luciferase. *Bull Biol*, 2004, **39** (2): 15–17.
- 刘建武, 孙成华, 刘宁. 荧光素酶及其应用. 生物学通报, 2004, **39** (2): 15–17.