

重组人 sBLyS 表达纯化条件的优化、理化特征及生物功能研究

闫晓梅 张双全* 张大鹏 刘美艳 刘平

(南京师范大学生命科学学院生物化学与分子生物学研究室,南京 210097)

摘 要 构建了原核表达质粒 pET-30a(+)-sBLyS, 转化大肠杆菌 BL21(λ DE3), IPTG 诱导表达的重组蛋白以可溶部分和包涵体两种形式存在, 为了提高可溶部分重组蛋白的比例, 确定 16℃ 为诱导表达的温度, 最佳表达时间为 12h。在此条件下大规模诱导表达, 经 Ni²⁺ 亲和层析获得重组人 sBLyS。重组蛋白的等电点约为 7.1~7.3, 活性状态时是非共价连接的同源三聚体。MTT 法测重组人 sBLyS 对 B 淋巴细胞的增殖作用结果表明, B 细胞经抗 IgM 原血清活化后, 它的增殖程度在一定的重组人 sBLyS 浓度范围内随其浓度的增加而提高, sBLyS 刺激时间对 B 细胞增长也有显著影响, sBLyS 以 2μg/mL 刺激 3d B 淋巴细胞的增殖达最大。

关键词 重组人 sBLyS, 纯化, 同源三聚体, 细胞增殖

中图分类号 R392.2 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0318-05

B 淋巴细胞刺激因子(BLyS)是 1999 年新发现的一种与人体免疫有关的细胞因子, 又称为 BAFF^[1]、TALL-1^[2]、THANK^[3], 属于 TNF 超家族成员。BLyB 的基因定位在染色体 13q32-34 上, 为 II 型膜蛋白, 全长 285 个氨基酸, 分为胞质区、跨膜区和胞外的功能区。它的长片段(aaL83~285)和短片段(aaQ136~L285 或 aaA134~L285)都已在真核系统中克隆表达且均有活性^[1]。

BLyS 能刺激 B 淋巴细胞增殖、分化和分泌抗体^[4], 对 B 细胞功能的发挥起到重要的调控作用, BLyS 的正常表达对维持依赖和不依赖 T 细胞的抗原刺激的 B 细胞的活化和增殖至关重要, 能极大地提高先天和后天免疫缺陷或低下病人的免疫能力。同时, BLyS 的过表达又可能发生自身免疫性疾病。

目前欧美已有 HGSi, Amgen, Genetech 等著名生物技术公司进行 BLyS 的研发, 以期研制出新型的治疗先天免疫缺陷症药物。BLyS 的动物安全性试验已有报道。2000 年 11 月, 美国 FDA 正式批准 HGS 公司开发的重组 hBLyS 进入人体 I 期临床试验, 针对普通变异免疫缺乏症(CVID)患者进行治疗。

我们从人胎盘 cDNA 文库中克隆了 BLyS 的短片段(aaA134~L285)即功能区, 称为可溶性 BLyS(soluble BLyS, sBLyS), 构建了原核生物表达载体 pET-30a(+)-sBLyS, 继而将质粒转化大肠杆菌 BL21

(λ DE3), 它在宿主菌中表达的重组蛋白以可溶性融合蛋白和包涵体两种形式存在。继续探索了宿主菌高效表达和回收可溶部分融合蛋白的条件, 在优化条件下大量表达重组蛋白, 经过 Ni²⁺ 亲和层析分离纯化, 获得了高纯度具有生物学活性的重组人 sBLyS, 并对它的理化性质及其对 B 淋巴细胞的刺激作用做了进一步的研究。首次验证了重组人 sBLyS 以非共价同源三聚体的形式存在, 并找到了它刺激 B 淋巴细胞的最佳条件。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 BL21(λ DE3)为本实验室保存, IPTG 购自 Promega 公司, Ni²⁺ 亲和层析胶为本实验室自行制备, AET、MTT、FITC 标记的鼠抗人 CD19 单抗购自 Sigma 公司, 兔抗人 IgM 原血清(效价 1:32)购自北京邦定公司, 健康人血液购自南京市血液中心。

1.2 方法

1.2.1 重组人 sBLyS 克隆的诱导表达: 根据已知 BLyS 的 cDNA 序列, 设计特异性 PCR 引物, 引物 1: 5'-CAAACACAGATAACAGGAAATGAT3'; 引物 2: 5'-CTAGGTGTAAGTAGGTCACAGCA3'; Nest-PCR 引物, 引物 1: 5'-GATATCGACGACGACGACAAGGCCGTTTCAGGGTCCAG3', 引物 2: 5'-AAGCTTGGTGTAAAGTAGGTC-

CAGCAGTTT 3'。后两者含有 *EcoRV* 和 *HindIII* 酶切位点。以人胎盘 cDNA 文库为模板,用第一对引物 PCR 扩增得到 BLyS 的 cDNA;再用第二对引物进行 Nest-PCR,扩增得到胞膜外部分(sBLyS)的 DNA,然后克隆到 PCR-Blunt 载体系统中扩增,QINprep plasmid miniprep kit 纯化质粒,*HindIII* 及 *EcoRV* 双酶切,电泳检测,直接克隆到 pET-30a(+)载体中,构建成能表达出带有 6×His 纯化标记的融合蛋白的原核表达质粒,详见参考文献[5]。常规 CaCl_2 法将质粒转化大肠杆菌 BL21(λ DE3)。相同条件下培养含有目的质粒的转化菌,菌液 $OD_{600} = 0.6$ 时加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,分别于 30℃、28℃、25℃、22℃、19℃ 和 16℃ 以相同转速震荡诱导表达,每隔 1~2h 取出 1mL 培养物,检测 OD_{600} ,用 2×SDS-PAGE 样品缓冲液处理后进行 SDS-PAGE。BIO-RAD 凝胶成像系统扫描凝胶,Quantity One 软件分析各温度下不同时间重组蛋白的最大表达量。

1.2.2 温度对重组人 sBLyS 可溶性表达的影响 在以上 6 种温度下以各自最佳表达时间诱导细菌,收集菌体,相同条件下分别超声破菌、离心,取上清进行 SDS-PAGE,凝胶扫描分析重组人 sBLyS 可溶部分占细菌可溶性蛋白的相对含量,确定最佳诱导温度。

1.2.3 重组人 sBLyS 的分离纯化和鉴定 在以上确定的条件下诱导 500mL 转化菌,离心收集菌体,超声,离心取上清,上 Ni^{2+} 亲和层析^[6,7]胶,Elute 缓冲液(4mol/L 咪唑、2mol/L NaCl、80mmol/L Tris-HCl pH7.9)特异性洗脱,BIO-RAD 低压层析仪自动检测、收集。所获重组蛋白经 SDS-PAGE 鉴定分子量和纯度。蛋白含量测定采用改良的考马斯亮蓝显色法。

1.2.4 重组人 sBLyS 的等电点 采用 BIO-RAD 等电聚焦系统参照说明书测定。

1.2.5 重组人 sBLyS 的亚基鉴定 制备 4% 的浓缩胶和 4%~30% 的梯度分离胶^[8],150V 恒压电泳 15~16h,CBB_{G250} 染色。

1.2.6 B 淋巴细胞的提取和纯度鉴定 采用玫瑰花结形成法^[9]从人血液中分离,用 FITC 标记的鼠抗人 CD19 单抗处理 B 细胞,在荧光显微镜下检测 B 细胞的纯度为 95%。

1.2.7 MTT 法^[10]测定重组人 sBLyS 对 B 淋巴细胞的增殖作用 根据抗 IgM 原血清预刺激的时间、浓度和重组人 sBLyS(rhsBLyS)刺激的时间、浓度 4 个因素,分别在 4 个水平上进行正交实验(Table 1),根据

正交表 $L_{16}(4^5)$ 进行。用 RPMI1640 培养液(含 20% FBS,100u 青霉素,100u 链霉素)将 B 淋巴细胞以 4×10^4 cpm 的浓度加入 24 孔培养板,每孔按表 1 加入已过滤除菌的兔抗人 IgM 原血清,每个浓度 3 个复孔,37℃、5% CO_2 培养 1~4d 后,洗去抗 IgM 原血清,用培养液重悬至细胞原悬液体积,加入一系列浓度的重组人 sBLyS,继续培养 1~4d。设立 3 组对照,分别只加抗 IgM 原血清、重组人 sBLyS 和培养液。最后,加入 MTT 溶液 60 μ L,37℃ 培养,4h 后加入 600 μ L 10% SDS-0.01mol/L HCl 溶液,37℃ 放置过夜。用 BIO-RAD 酶标仪进行光吸收度检测,检测波长 595nm,参比波长 655nm,测定各孔的 $OD_{595} - OD_{655}$ 值。将 2×10^5 cpm 的 B 细胞进行倍比稀释,MTT 法处理后分别测 $OD_{595} - OD_{655}$ 值,以 $OD_{595} - OD_{655}$ 值为横坐标、细胞数量为纵坐标做标准曲线,以上实验结果的 $OD_{595} - OD_{655}$ 值从标准曲线查出相应的细胞数量。

表 1 正交实验的 4 个因素和 4 个水平

Table 1 4 factors and levels in experiment of orthogonal

Factors	Time of Anti-IgM serum	Dose of Anti-IgM serum	Time of rhsBLyS	Concentration of rhsBLyS
Levels	/d	/ μ L	/d	(μ g/mL)
1	1	10	1	0.5
2	2	20	2	1
3	3	40	3	2
4	4	80	4	4

2 结果

2.1 重组人 sBLyS 的诱导表达

不同温度下重组蛋白的表达量均随着时间的延长而增加,在 30℃、28℃、25℃ 和 22℃ 诱导都是第 4 小时的表达量最高,约占全菌总蛋白的 21%,而 19℃、16℃ 诱导则在第 12 小时表达量最高,也约占全菌总蛋白的 21%。不同时间段菌体生长及重组蛋白诱导表达的曲线见图 1。可见不同温度诱导表达的融合蛋白(可溶部分和包涵体)占全菌总蛋白的比例是一致的,只是低温使得最大量表达融合蛋白的时间延长。

2.2 诱导温度对重组人 sBLyS 可溶性表达的影响

30℃、28℃、25℃ 诱导的可溶性重组蛋白均占全菌可溶性蛋白的 7.1%,22℃ 诱导的占 7.8%,19℃ 占 8.9%,而 16℃ 占 12.8%。说明 16℃ 低温诱导提高了重组人 sBLyS 可溶部分所占的比例。16℃ 诱导在不影响重组蛋白产量的情况下增加了重组蛋白可

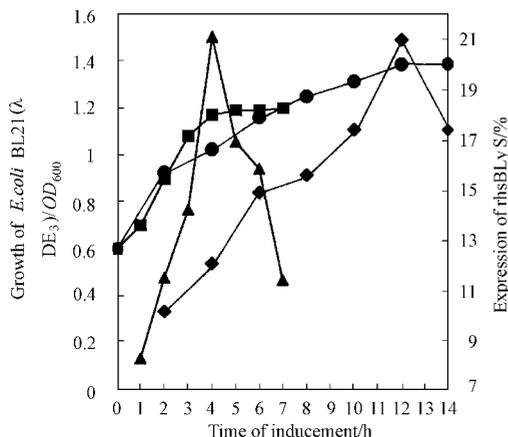


图1 诱导的不同时间段菌体生长和重组蛋白诱导表达的曲线

Fig.1 Curve of growth of cells and expression of rBsLyS at different time after induction

- Growth of *E. coli* BL21 (λ DE3) induced at 25°C ;
- Growth of *E. coli* BL21 (λ DE3) induced at 16°C ;
- ▲ Expression of rBsLyS induced at 25°C ;
- ◆ Expression of rBsLyS induced at 16°C

溶部分的比例,提高了重组蛋白的回收率。

2.3 重组人 sBLyS 的分离纯化和 SDS-PAGE 鉴定

重组人 sBLyS 在 Ni²⁺ 亲和胶上被 Elute 缓冲液特异性洗脱,然后透析、冻干。经过表达纯化条件的优化,从 500mL 培养物获得的融合蛋白的绝对量由 1.07mg 提高到 3.88mg,可溶性融合蛋白的回收率约为 72%。重组人 sBLyS 经 SDS-PAGE 鉴定为单一条带,纯度为 95%(Fig. 2),分子量为 33kD,与理论分子量基本一致。

2.4 重组人 sBLyS 的等电点

重组蛋白上 BIO-RAD 等电聚焦仪,输出功率 12W,聚焦结束后收集每格中的溶液,分别测 pH 和 OD₂₈₀ 值(Fig. 3)。图中显示重组蛋白峰集中在 pH 7.1 ~ 7.3 之间,说明重组人 sBLyS 的等电点约为 7.1 ~ 7.3。

2.5 重组人 sBLyS 的亚基鉴定

高分子量蛋白标准和重组人 sBLyS 经梯度凝胶电泳后染色,发现重组人 sBLyS 在活性条件下分子量约为 100kD(33kD × 3)(Fig. 4),而重组人 sBLyS 在 SDS 和 β-巯基乙醇处理及仅用 SDS 处理后的分子量均为 33kD(结果略)。Schneider 等^[1]在研究重组 BLyS 时用 SDS-PAGE 和凝胶过滤法测定变性和活性状态下的分子量,得出重组 BLyS 是同源三聚体的结论。同时,TNF 家族其它大部分成员均具有 3 个相同亚基的结构。我们通过实验进一步验证了重组 sBLyS 于活性状态时是非共价连接的同源三聚体。

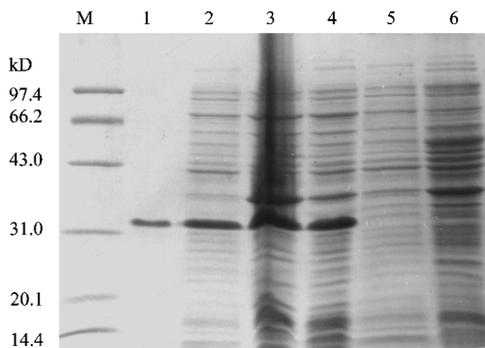


图2 纯化的 rBsLyS 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig.2 Identification of rBsLyS by SDS-PAGE

- M. Protein marker 1. Purified rBsLyS ;
- 2. Supernatant protein 3. Deposition ;
- 4. Total protein after induction ;
- 5. Before induction 6. Untransformed bacteria

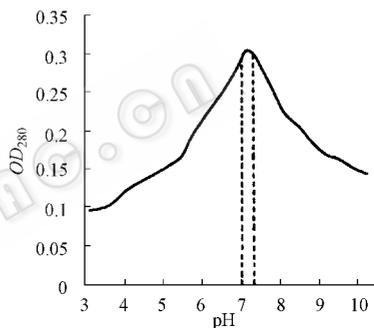


图3 重组人 sBLyS 的等电聚焦蛋白峰

Fig.3 Protein peak of rBsLyS by IEF

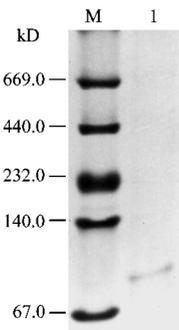


图4 rBsLyS 的梯度凝胶电泳

Fig.4 Gel concentration gradient electrophoresis of rBsLyS

- M. Protein marker 1. rBsLyS

2.6 重组人 sBLyS 促 B 淋巴细胞增殖的活性

按表 1 各个因素及其相应的水平进行了 16 组实验,以各因素的相应水平为横坐标,以各水平下的各实验组细胞平均数量之和为纵坐标作图(Fig. 5)。

结果用 SPSS 软件进行方差分析,4 种因素 A、B、C、D 均对 B 淋巴细胞的增殖有极其显著的影响(α = 0.01)。从图 5 可看出 (a) 抗 IgM 原血清加入细胞悬液后,随着刺激时间的延长,细胞数量不断增

加, 72h 达到最大。(b) B 细胞增殖程度随着抗 IgM 原血清剂量的增加而增加, 至 40 μ L 时达到最高。(c) 在抗 IgM 抗体的最佳刺激下, 激活的 B 细胞在 24h 后即对重组人 sBLyS 产生微弱应答, 到 72h 应答程度最高。(d) 重组人 sBLyS 的浓度在 0.5 ~ 2 μ g/mL 之间时, 细胞增殖随蛋白浓度的增加而增强, 呈明显的剂量依

赖关系, 在重组人 sBLyS 浓度为 2 μ g/mL 时细胞增殖达到高峰, 至 4 μ g/mL 时, 细胞增殖略有下降, 其机制还不十分明确。综合以上结果可确定 MTT 法测重组人 sBLyS 引起 B 淋巴细胞最大程度增殖的条件为 A₃B₃C₃D₃, 即抗 IgM 原血清 40 μ L, 预刺激 3d, 重组 sBLyS 浓度 2 μ g/mL, 刺激 3d 后 MTT 检测。

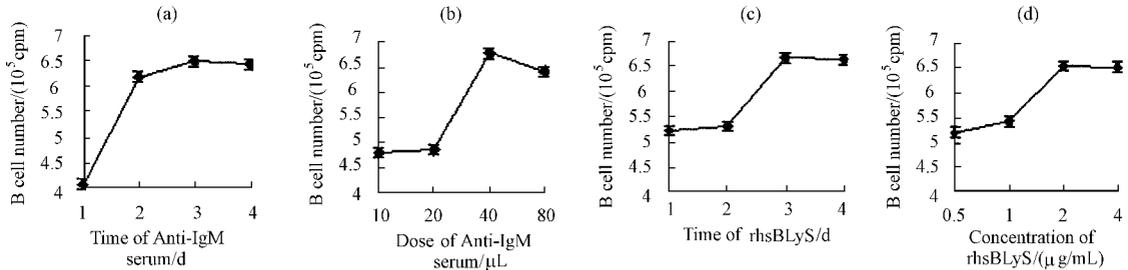


图 5 4 种因素各个水平对 B 淋巴细胞增殖的影响

Fig. 5 Effect of 4 factors and levels on proliferation of B lymphocytes

与 3 组对照相比, 重组人 sBLyS 和抗 IgM 原血清协同作用使 B 淋巴细胞从 4×10^4 cpm 增加至最高 1.85×10^5 cpm, 静止的 B 细胞和只加重组人 sBLyS 的 B 细胞在第 3 天约死亡 25%, 第 6 天已检测不到活细胞, 而仅加抗 IgM 原血清 40 μ L 刺激了 3d 的 B 细胞也有一定的增殖, 从 4×10^4 cpm 增加至 1.3×10^5 cpm (Fig. 6)。说明表达纯化的重组人 sBLyS 对 B 细胞具有增殖活性, 但若没有抗 IgM 抗体的预先激活, B 细胞则不能接受 sBLyS 的增殖信号。

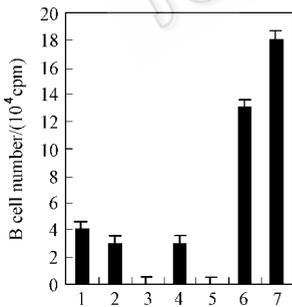


图 6 rBsBLyS 和 anti-IgM 刺激 B 细胞增殖

Fig. 6 RhsBLyS and anti-IgM serum stimulate B cell proliferation

1. 0 day with culture medium
2. 3 days with culture medium ;
3. 6 days with culture medium
4. 3 days with rBsBLyS ;
5. 6 days with rBsBLyS
6. 3 days with 40 μ L Anti-IgM serum ;
7. 6 days with 2 μ g/mL rBsBLyS and 40 μ L Anti-IgM serum

3 讨论

人 BLyS 是免疫学领域中新发现的细胞因子, 它属于 TNF 超家族成员, 由单核细胞或树突细胞分泌^[1,4], 实验证实 B 淋巴细胞和 U-937、IM-9 等肿瘤细胞表面均有 BLyS 的受体^[4], BLyS 在体外和

体内均引起 B 淋巴细胞的增殖, 接受 BLyS 注射的小鼠血清中 IgM 和 IgA 增加了 2 ~ 5 倍^[4]。BLyS 转基因小鼠能显著地增加成熟 B 淋巴细胞和效应 T 淋巴细胞的数量, 诱导 B 淋巴细胞增殖并分泌免疫球蛋白, 同时 BLyS 的过表达可引起多种自体免疫表现形式^[11]。可见 BLyS 在体内究竟担任什么角色, 具有哪些重要的作用有待于尽快研究。

本室成功构建了原核表达质粒载体 pET-30a (+)sBLyS, 在其宿主菌中诱导表达的融合蛋白以包涵体和胞质中可溶性形式存在, 我们曾经用变性复性法从包涵体中回收重组蛋白, 但其生物活性很低。因此主要从重组蛋白的可溶部分中回收蛋白。尽管有报道低温诱导表达可以提高重组蛋白可溶部分的比例, 但前人所用的低温仅在 28 $^{\circ}$ C 左右, 本文用 28 $^{\circ}$ C 诱导并没有提高融合蛋白的回收率。经过实验发现在 16 $^{\circ}$ C 下诱导 12h 可以较多地获得可溶性重组蛋白。在此基础上扩大培养, 诱导表达, 经 Ni²⁺ 亲和层析分离纯化获得了组分单一 (纯度达 95%) 的重组人 sBLyS。

BLyS 对 B 淋巴细胞的刺激需要抗 IgM 抗体、LPS、SAC 等的预活化, 若 B 淋巴细胞没有预活化则不会对 BLyS 产生反应。抗 IgM 抗体预活化的时间和浓度以及重组蛋白刺激的时间和浓度均会影响 B 淋巴细胞的增殖程度, 为了寻找 B 淋巴细胞发生最大程度增殖的条件, 为以后的实验打下基础, 我们设计了正交实验。结果表明抗 IgM 原血清预活化 3d 后再加入重组人 sBLyS (终浓度 2 μ g/mL) 作用 3d, B 淋巴细胞增殖程度达到最高。这与 Boyd^[12] 和

Moore^[4]等人的结果是一致的:抗 IgM 抗体刺激 B 淋巴细胞 72h, B 淋巴细胞对细胞因子的反应程度最高,加入重组细胞因子 72h 后,细胞增殖达到最大。抗 IgM 抗体刺激所有休止期小 B 淋巴细胞从 G₀ 期进入 G₁ 期,并可能诱导休止期小 B 淋巴细胞表达功能上活跃的各种细胞因子受体^[13],如 IL-4 受体、IL-5 受体、BLyS 受体等,因此,没有活化的 B 淋巴细胞表面可能不存在细胞因子受体,因而仅有 BLyS 作用 B 淋巴细胞时则观察不到增殖现象。我们首次证实重组人 sBLyS 以非共价的同源三聚体形式发挥活性,当它与 B 淋巴细胞上的相应受体结合后引起一系列的信号传导, RNA、DNA 合成明显增加,从而引起细胞增殖和分化。

可见,在 B 淋巴细胞激活、增殖和分化的过程中有多种抗原和细胞因子的参与,具有多种途径,它们的作用机制错综复杂,深入研究 BLyS 的功能对从分子水平研究 B 淋巴细胞的激活、增殖和分化机制具有十分重要的意义。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Scheider P, Mackay F, Steiner V *et al.*. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med*, 1999, **189**(11): 1747 ~ 1756
- [2] Shu H B, Hu W H, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leu Bio*, 1999, **65**(5): 680 ~ 683
- [3] Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y F. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apopto-

sis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH₂-terminal kinase. *J Bio Chem*, 1999, **274**(23): 15978 ~ 15981

- [4] Moore P A, Belvedere O, Orr A *et al.*. LByS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*, 1999, **285**(5425): 260 ~ 263
- [5] LIU P (刘平), ZHANG S Q (张双全), YAN X M (闫晓梅) *et al.*. Cloning, expression, purification and activity of the hsBLyS. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (生物化学与生物物理学报), 2001, **33**(2): 210 ~ 214
- [6] Porath J, Olin B. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum protein affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. *Biochemistry*, 1983, **22**: 1621 ~ 1630
- [7] Eugene S. Purification of proteins by IMAC. *Trends in Biotechnology*, 1985, **3**(25): 1 ~ 7
- [8] ZHANG L X (张龙翔), ZHANG T K (张庭芳), LI L Y (李令媛). *Experimental Methods and Techniques in Biochemistry*. Beijing: Higher Education Press (生化实验方法和技术), 1997, pp. 106 ~ 111
- [9] ZHU L P (朱立平), CHEN X Q (陈学清). *Common Experimental Methods in Immunology*. Beijing: People's Martial Medicine Press (免疫学常用实验方法), 2000, pp. 151 ~ 158
- [10] ZHANG L J (张丽君), WU W J (吴文俊), WANG Y T (王友同). Bio-Activity Determination of HSS with MIT method. *Pharmaceutical Biotechnology* (药物生物技术), 1999, **1**(1): 49 ~ 51
- [11] Mackay F P, Woodcock S A, Lawton P *et al.*. Mice transgenic for BAFF develop lymphocyte disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med*, 1999, **190**(11): 1697 ~ 1710
- [12] Andrew W, Boyd D C, Fisher D A *et al.*. Structural and functional characterization of IL2 receptors on activated human B cells. *J Immunol*, 1985, **134**(4): 2387 ~ 2392
- [13] ZHU L P (朱立平). *Differentiation and Modulation of human B Lymphocyte*. Beijing: Science Press (人 B 淋巴细胞的分化和调节), 1988, pp. 34 ~ 37

Study on Optimization of Expression, Purification, Properties and Biological Function of Recombinant Human sBLyS

YAN Xiao-Mei ZHANG Shuang-Quan* ZHANG Da-Peng LIU Mei-Yan LIU Ping

(Biochemistry and Molecular Biology Laboratory, Life Science College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract The prokaryotic expression plasmid pET-30a(+)-sBLyS was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (λDE3). The recombinant protein was found to be highly expressed by the plight of soluble part and inclusion body. For the sake of enhancing the proportion of the soluble part, inducement at 16°C for 12h was ascertained. The expressing product was then purified by Ni²⁺ affinity chromatography gel. PI of the recombinant human sBLyS (rhsBLyS) is about 7.1 ~ 7.3 and it assembles into a homotrimer. The effect of rhsBLyS on B lymphocytes by MIT method told us the B lymphocytes' proliferating capacity dose depended on concentration and also stimulating time of the rhsBLyS. With rhsBLyS (2 μg/mL) stimulating 3 days, B lymphocytes can proliferate the most.

Key words recombination human sBLyS, purification, homotrimer, cell proliferation