

人类肿瘤坏死因子相关凋亡配体活性部位 基因在毕赤酵母中的表达

徐 红¹ 赖心田² 叶 凯¹ 马辉文^{1*} 洪 葵³

¹(武汉大学药学院 武汉 430072)

²(海南华康生物制品研究所 海口 570310)

³(华南热带农业大学热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘 要 探讨了人类肿瘤坏死因子相关凋亡配体(TRAIL)生物活性部分在巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的分泌表达。由于 TRAIL 活性部位区第 149-150 氨基酸含有一个 *Kex2* 位点 根据 *Pichia pastoris* 分泌表达的特点 对 149 位氨基酸进行了改造 使其编码的氨基酸由 Arg 突变为 Lys。这样使 TRAIL 在分泌的过程中不被 *Kex2* 切割 保证了片段的完整。序列分析正确后 将编码 TRAIL 的可溶区的基因片段插入到酵母表达载体 pPIC9K 中 使之位于 α -因子信号肽下游 且与之同框 构建分泌型表达载体 pPIC9K-TRAIL。采用原生质体法将重组质粒转化 *Pichia pastoris* 菌株 GS115 获基因工程菌株 *Pichia pastoris*(pPIC9K-TRAIL)。将工程菌用甲醇诱导培养 3 ~ 4d 对摇瓶发酵的培养上清进行 SDS-PAGE、Western blot 分析和体外生物活性检测 结果发现发酵液中分子量约为 19kD 和 38kD 的蛋白质能被 TRAIL 多克隆抗体特异性识别 且具有在体外诱导肿瘤细胞凋亡的活性。通过薄层扫描分析显示目的蛋白最高可占可溶性总蛋白的 36%。上述实验结果表明 在 *Pichia pastoris* 中表达的 TRAIL 能以寡聚体的形式存在并且具有生物学活性。

关键词 表达 TRAIL, 寡核苷酸介导的突变作用, 巴斯德毕赤酵母

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0163-05

肿瘤坏死因子相关凋亡配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)或称凋亡素 2 配体(APO 2 ligand, Apo2)是属于 TNF 家族的细胞因子。编码 TRAIL 的基因于 1995 年从人的表达标签(EST)文库中发现 在人体的多种组织器官 如肝脏、肺、胎盘、肾脏及外周血淋巴细胞中广泛表达^[1,2]。TRAIL 由 281 个氨基酸残基组成 是一种典型的 II 型跨膜蛋白。它包含有 N-端胞质结构域(氨基酸 1 - 18)、跨膜区(氨基酸 19 - 38)和胞外区(氨基酸 39 - 281)。胞外区为可溶部分 也是生物活性存在部位 能迅速诱导多种肿瘤细胞和病毒感染细胞凋亡 并且对正常细胞组织无毒害作用^[1,2]。TRAIL 的这些特征使 TRAIL 逐渐成为肿瘤治疗药物开发的热点。据 Reutershealth 最新报道 TRAIL 能在体外彻底清除艾滋病病毒 这一发现也为艾滋病患者带来了希望。

目前 TRAIL 研究的一个重要方面是研究 TRAIL 寡聚体 如二聚体、三聚体、或者更高形式的寡聚体

的生物学功能。寡聚体可以通过 TRAIL 蛋白分子间的二硫键的结合或 TRAIL 分子链的非共价键的相互作用而形成^[1]。目前报道的寡聚体有 Fc 融合的二聚体和四聚体、亮氨酸拉链结构的三聚体。TNF 家族成员有高度的寡聚化趋向 一般是以三聚体的形式表现出生物活性^[3,4] 三聚体形式的 TRAIL 在增强生物学活性方面被认为占有优势^[1]。由于 TRAIL 活性部位区第 149 ~ 150 氨基酸含有一个 *Kex2* 位点 根据 *Pichia pastoris* 分泌表达的特点 本项研究利用 PCR 定点突变技术对第 149 位氨基酸即 TRAIL DNA 序列第 531 - 534bp 进行改造 使其编码的氨基酸由 Arg 突变为 Lys。这样使 TRAIL 在分泌的过程中不被 *Kex2* 切割 保证了片段的完整。并转入 *Pichia pastoris* 细胞中分泌表达 以获得可溶性人类 TRAIL 蛋白 为深入研究 TRAIL 的作用机理和开发新的抗肿瘤药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pPIC9K 质粒及 *P. pastoris* 表达系统购自 Invitrogen 公司 ;pGEM-T/TRAIL 质粒由海南华康生物制品所提供 ;TRAIL 多克隆抗体购自 Imgenex 公司 ;地高辛标记试剂盒购自 Roche 公司 ;限制性酶、T4-DNA 连接酶、从琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段的试剂盒均购于 Promega 公司 ;PCR 引物委托上海生工公司合成。L929、Hela、Jurkat 和 B16 细胞购自设在武汉大学的中国典型培养物保藏中心。1640 培养基购于 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 :根据 *P. pastoris* 表达载体 pPIC9K 的特点 ,根据 TRAIL 基因活性部位的 DNA 序列 ,设计合成两对引物 :

a 5'GCGAATTCGTGAGAGAAAGAGGTC3'

b 5'GTTTATTTTCTTGCCACG3'

c 5'CTGGCAAGAAAATAAAC3'

d 5'GCTCTAGAAACTAAAAAGGCC3'

其中 ,引物 a 引入 *EcoR* I 酶切位点 ,引物 d 引入 *Xba* I 位点 ,引物 b、c 的 DNA 序列互补。

1.2.2 PCR 扩增 :第一步 ,以质粒 pGEM-T/TRAIL 为模板 ,分别用引物 a、b 扩增得到 ab 片段 ;引物 c、d 扩增得到 cd 片段。第二步 ,将 ab、cd 回收片段混合作为模板 ,用引物 a、d 扩增得到 ad 片段。回收 ad 片段 ,经 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切纯化后 ,插入到 pGEM-T 载体中构建 pGEM-TRAIL 载体 ,并作序列测定。

1.2.3 表达载体构建 :将经测序鉴定正确后的 pGEM-TRAIL 用 *EcoR* I、*Xba* I 双酶切 ,回收 TRAIL 基因片段 ,与用 *EcoR* I、*Avr* II 两种酶处理的 pPIC9K 载体连接得 pPIC9K-TRAIL 重组体 ,转化 *E. coli* TOP10F' ,提取质粒 ,并作酶切图谱鉴定。

1.2.4 酵母转化及多拷贝整合子的筛选 :重组质粒 pPIC9K-TRAIL 经 *Sac* I 酶切完全线性化后 ,按 Invitrogen 公司提供的毕赤氏酵母转化试剂盒说明书提供的操作方法转化 *P. pastoris* GS115 原生质体 ,转化子在 30℃ 下培养 2~4d。用 G418 抗生素筛选高拷贝 TRAIL 基因片段转化子。挑取对 G418 有高抗性的酵母单菌落接种于 5 mL 的 MD 培养基中 ,在 30℃ 250r/min 摇床中振荡培养过夜 ,离心收集菌体 ,抽提酵母基因组 DNA。按照地高辛标记试剂盒说明书进行探针标记和杂交检测。

1.2.5 重组 *P. pastoris* 菌株的诱导表达 :将筛选的多拷贝转化子菌株按 Invitrogen 公司毕赤氏酵母转

化试剂盒说明书提供的操作方法进行摇瓶发酵 ,用甲醇作诱导物诱导 TRAIL 表达。挑取在 YPD 平板上新鲜培养的单菌落 ,接种至 100 mL BMGY 培养基中 ,在 30℃ ,转速为 250r/min 的回转式摇床中培养至 $OD_{600} = 2$ 。离心、收集菌体并将菌体重悬于 20mL BMMY 培养基中。每 24h 取样 1 mL 并补加甲醇于培养基中至终浓度为 0.5% ,诱导表达 4d。离心发酵液 ,并将上清和细胞沉淀分别冻存于 -20℃。

1.2.6 表达产物的 SDS-PAGE 和免疫学鉴定 :取经甲醇诱导 3~4d 的发酵液上清作 SDS-PAGE 和免疫印迹分析。SDS-PAGE 染色方法为银染法。按标准方法进行^[5]。

1.2.7 TRAIL 的生物活性检测 :按文献 [6] 方法将 L929、Hela、Jurkat 和 B16 细胞分别以 5×10^4 个/mL 的浓度接种于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基的 96 孔培养板中 ,在 37℃ 下培养至细胞完全贴壁后 ,添加 50 ng/mL 的放线菌素 D ,继续培养 2h ,加入经梯度稀释的 TRAIL 样品后继续培养 20h ,观察细胞形态并采用 MTT 法检测 TRAIL 的细胞毒活力。

2 结 果

2.1 重组质粒 pPIC9K-TRAIL 的构建及鉴定

两步 PCR 扩增得到的 ab、cd、ad 片段大小分别为 131bp、391bp、532bp ,与预计大小相符。将 ad 片段插入 pGEM-T 载体 ,DNA 序列分析结果表明诱变后的 TRAIL 基因片段符合要求。重组质粒 pPIC9K-TRAIL 经 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切后 ,得到长度分别为 7320bp 和 2488bp 的两条 DNA 片段 ,不含插入片段的质粒 pPIC9K 经 *EcoR* I + *Sal* I 双酶切后的 DNA 片段大小分别为 7320bp 和 1956bp ,显示 TRAIL 基因已正确地插入到 pPIC9K 质粒中。

2.2 重组质粒的转化及酵母转化子的筛选

pPIC9K 质粒含有抗卡那霉素的抗性基因和组氨酸合成酶基因 ,转化宿主菌 (*his*⁻) 获得的转化子除了能够在不含组氨酸的培养基中生长外还能耐受一定浓度的 G418。转入的外源基因的拷贝数越多 ,宿主菌耐受 G418 的浓度就越高 ,其蛋白表达量可能也会增加。因此 ,用逐渐升高的 G418 浓度的方法可以筛选到外源基因拷贝数逐级增加的转化子。将转化子的菌落从组氨酸选择培养基上刮下来 ,涂布在 G418 浓度分别为 0.5、0.75、1.0、1.5、2.0、2.5mg/mL 的 YPD 平板上 ,在 30℃ 下培养 2~5d。选出能耐受 1.0 或 1.5mg/mL G418 的酵母菌落进行点杂交检测。以含有 pPIC9K 的酵母转化子菌株作阴性对照 ,重组

表达载体 pPIC9K-TRAIL 质粒作阳性对照,地高辛标记的 TRAIL 基因活性部位为探针,筛选杂交信号强的转化子。实验结果表明,从高浓度 G418 平板上获得的菌落杂交信号较强。

2.3 重组酵母菌株表型分析

对经 G418 筛选和杂交检测得到的转化子进行甲醇利用型表型分析,结果表明,99%的转化子为甲醇缓慢利用型(Mut^s)。

2.4 产物 SDS-PAGE 及免疫学检测

取发酵上清液进行 SDS-PAGE 和免疫印迹分析。SDS-PAGE 图谱显示重组菌株发酵上清液中存在有表观分子量约为 19kD 和 38kD 两条染色较深的蛋白带,免疫印迹分析发现这两处的蛋白带均能特异性地识别兔抗人 TRAIL 多克隆抗体,说明 TRAIL 蛋白在发酵液中以单体和二聚体的形式存在(图 1、2)。薄层扫描分析可知所得蛋白占总蛋白的 36%(图 3)给产物的分离纯化带来很大便利。

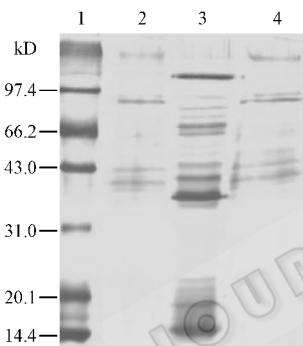


图 1 整合 TRAIL 基因的重组 *P. pastoris* 培养上清的 SDS-PAGE 蛋白分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of the proteins in the culture supernatant of the recombinant *P. pastoris* harboring gene fragment of TRAIL

1. Standard protein molecular weight marker; 2. Culture supernatant of methanol induced recombinant *P. pastoris* transformed by pPIC9K; 3. Culture supernatant of methanol induced recombinant *P. pastoris* transformed by pPIC9K-TRAIL; 4. Culture supernatant of recombinant *P. pastoris* transformed with pPIC9K-TRAIL

2.5 重组人可溶性 TRAIL 的细胞毒性分析

将发酵上清液稀释至蛋白含量约为 $2\mu\text{g}/\text{mL}$ (紫外检测),然后进行二倍稀释如图 4,TRAIL 对肿瘤细胞毒活力曲线结果表明,TRAIL 浓度约为 $150\text{ng}/\text{mL}$ 的可使 50% 的细胞死亡。说明表达蛋白具有较好生物活性。如图 5 所示,我们可以看出随着 TRAIL 浓度的增加细胞形态明显发生改变,细胞逐渐变圆变小,胞质浓缩,染色质发生凝聚并边集在细胞内侧;且细胞的 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈梯状条带,这

些现象与细胞凋亡时所表现出的形态学特征相似,因此认为 TRAIL 诱发肿瘤细胞的凋亡。

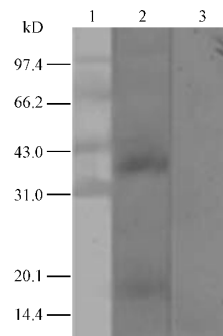


图 2 rhTRAIL 的免疫印迹分析

Fig.2 Western blot analysis of the rhTRAIL

1. Standard protein molecular weight marker stained amino-black; 2. Culture supernatant of methanol induced recombinant *P. pastoris* transformed by pPIC9K; 3. Culture supernatant of methanol induced recombinant *P. pastoris* transformed by pPIC9K-TRAIL

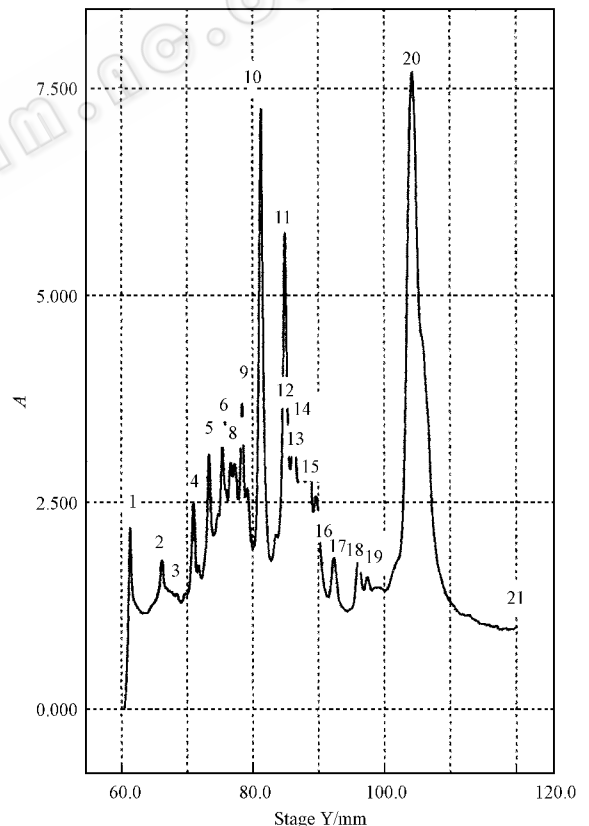


图 3 蛋白含量分析

Fig.3 Analysis of protein content in the culture supernatant
Peak 10.38kD, Peak 20.19kD

3 讨论

目前用于研究的重组 TRAIL 有原核表达和真核表达二种。原核表达的 TRAIL 以包涵体的形式

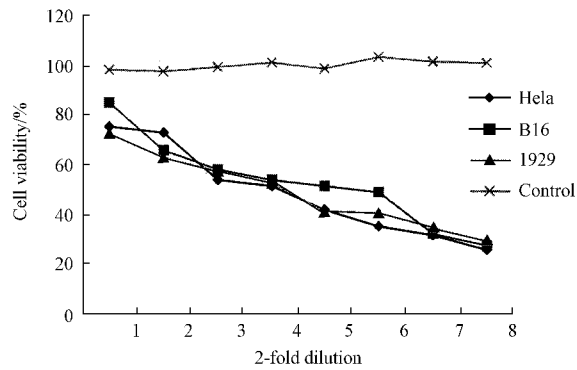


图 4 人类重组 TRAIL 诱导的细胞毒性

Fig.4 Cytotoxicity induced by rhTRAIL

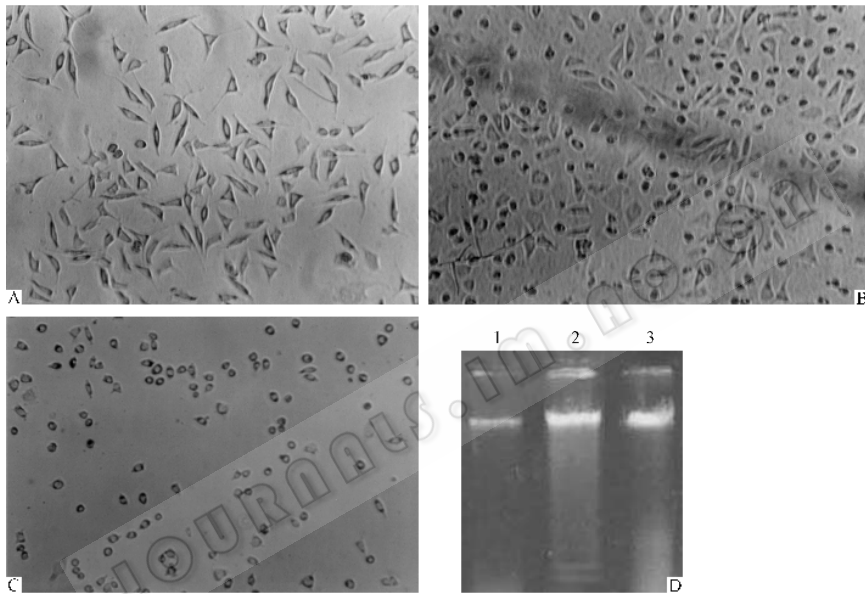


图 5 人重组 TRAIL 诱导 L929 细胞凋亡

Fig.5 Apoptosis of L929 cell induced by rhTRAIL

A ~ C. Morphology of cell. A. Control ;B. L929 Cells cultured in the medium containing about 100ng/mL of rhTRAIL produced in this work ;C. L929 Cells cultured in the medium containing about 200ng/mL of TRAIL produced in this work ;D. DNA fragmentation analysis. 1. DNA of normal cells 2. 12h 3. 24h

存在,在复性的过程中,TRAIL 蛋白质分子与分子之间的二硫键很难正确配对形成有活性的寡聚体。真核表达一般采用动物细胞培养物作为表达宿主,用动物细胞表达的重组 TRAIL 表达量低,且操作繁琐,消耗大,不适合大规模应用。采用酵母表达系统以分泌形式表达出来的产物具有类似于人体内天然蛋白质的结构,因此,产物具有较低的免疫原性,便于临床应用^[7]。目前国内外还没有有关酵母分泌表达 TRAIL 的研究报道。本研究将编码 TRAIL 的胞外可溶区,即第 114 - 281 个氨基酸残基之间多肽链的 DNA 序列第 531 - 534bp 进行改造,使其能在 *P. pastoris* 中进行分泌表达。免疫印迹实验显示,表观分子量为 19kD 和 38kD 的蛋白能被免抗人 TRAIL 多克隆抗体特异性地识别。*P. pastoris* 的糖基化位点

为 Asn-X-Ser/Thr,分析改造后的 114 - 281 位氨基酸结果显示没有糖基化位点,我们在提高还原剂剂量、延长煮沸时间的情况下发现 38kD 的蛋白带明显的解聚(结果未展示)。随着煮沸时间和还原剂剂量的提高,19kD 的带明显加深,而 38kD 带明显减弱,与文献 8 报道一致。说明表达产物能以二聚体的形式存在,即 *P. pastoris* 在分泌过程中使 TRAIL 正确折叠形成寡聚体。

以往的研究工作认为,改造后的 TRAIL 活性部位的氨基酸序列或者 DNA 序列与天然序列至少要有 80% 的同源,最好是大于 90%,才不会影响 TRAIL 的生物学活性^[1]。本研究改造的 TRAIL 氨基酸序列与天然氨基酸序列有 99.4% 同源。实验结果也显示改造后的 TRAIL 基因片段编码表达的重

组 TRAIL 对多种肿瘤细胞都有凋亡诱导效应,因此有较好的生物学活性。实验中发现基因的拷贝数是影响 TRAIL 蛋白表达量的一个重要因素。一般来讲,基因拷贝数越多,表达量越高^[7]。就本实验中采用 G418 逐级筛选出来的重组 *P. pastoris* 菌株而论, TRAIL 表达量随基因拷贝数增加而增加。

本实验首次在 *P. pastoris* 表达系统中以分泌形式表达出重组人可溶性 TRAIL 蛋白。且能直接形成有活性的二聚体形式,能够在体外诱导多种肿瘤细胞如 L929、B16、Jurkat、Hela 发生凋亡。TRAIL 蛋白在该系统中的正确表达,对于下一步进行临床前研究打下了良好的基础。

REFERENCES (参考文献)

[1] Wiely S R, Schooley K, Smola K P J *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family. *Immunity*, 1995, **3**: 673 - 682

- [2] Pitti R M, Marsters S A, Ruppert S *et al.* Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, **271**(22): 12687 - 12690
- [3] Tanaka M, Suda T, Takahashi T *et al.* Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*, 1995, **14**: 1129 - 1135
- [4] Peitsch M, Tschopp J. Comparative molecular modeling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol Immunol*, 1995, **32**: 761 - 768
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed.*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] Thomas S, Griffith A, Chin A, Glenn C, Jackson *et al.* Intracellular Regulation of TRAIL-Induced Apoptosis in Human Melanoma Cells. *J Immunol*, 1998, **10**: 559 - 563
- [7] David R, Higgins J, James M, Cregg. *Pichia* protocols. Humana Press Inc, 1998
- [8] Sara M, Mariani P, Peter H, Kramer. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol*, 1998, **28**: 973 - 982

Expression of a DNA Fragment Encoding the Active Domain of Human TNF Related Apoptosis Inducing Ligand in *Pichia pastoris*

XU Hong¹ LAI Xin-Tian² YE Kai¹ MA Hui-Wen^{1*} HONG Kui³

¹(College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

²(Huakang Bioproduct Institute Hainan, Haikou 570310, China)

³(National Key Biotechnology Lab for Tropical Crops South China University of Tropical Agriculture, Haikou 571101, China)

Abstract Human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a member of the tumor necrosis factor (TNF) family of ligands which has been reported in 1995. The TRAIL protein induces apoptosis of certain types of target cells, such as transformed cells that include but are not limited to cancer cells and virus-infected cells but the normal cells. It is a type II transmembrane protein and the extracellular domain of TRAIL is the functional domain in induction of cell apoptosis. A gene fragment encoding for the active domain of TRAIL was modified with oligo-nucleotide directed mutagenesis according to the characters of *Pichia pastoris* expressing vector. Arginine at the position of 149 corresponding to the amino acid residue 531 which might be a potential Kex2 protease processing sites was substituted with Lysine to prevent the expressed protein from the digestion by the protease. After proved with DNA sequencing, the modified gene fragment coding soluble TRAIL domain was inserted into the *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K in the same reading frame with α -factor secreting signal peptide. The recombinant plasmid pPIC9K - TRAIL was transferred into *P. pastoris* cell by spheroplast transformation. The recombinant yeasts were identified by antibiotic G418 and Southern dot blot. The transformants (His⁺ Mut^s) containing multi-copy gene fragment of TRAIL were selected with increasing concentration of G418 and induced with 0.5% methanol in shaking flask to expression the active domain of TRAIL. After inducing for 3 ~ 4 days, the proteins in the culture supernatant was assayed with SDS-PAGE and Western blot. Two expressed protein bands whose apparent molecular weight were 19kD and 38kD, respectively, could be specifically recognized by polyclonal antibodies against human TRAIL. The 38kD protein might be a dimers of TRAIL in the culture supernatant. The amount of expressed foreign protein made up to 36% of the total proteins in the culture supernatant. Biological activity assay, in vitro indicated that the expressed protein could induce tumor cells apoptosis.

Key words TRAIL expression, oligonucleotide directed mutagenesis clone, *Pichia pastoris*