

人可溶性 APRIL (sAPRIL) 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

戴双双 何凤田* 张 艳 李蓉芬 杨朝辉 彭家和

(第三军医大学生物化学与分子生物学教研室, 重庆 400038)

摘 要 从 GenBank 中查找出人 APRIL 蛋白(编号:075888)序列,取其部分胞外(sAPRIL)序列设计引物,用 RT-PCR 从扁桃体总 RNA 中扩增出人 sAPRIL 基因,经克隆测序后进行同源比较,证实所克隆的基因即为 sAPRIL。克隆载体经酶切后构建了表达载体,并在大肠杆菌中表达,纯化蛋白后进行细胞学实验表明 sAPRIL 有明显刺激肿瘤细胞增殖的作用,为深入研究 sAPRIL 的功能奠定了基础。

关键词 增殖诱导配体, 基因克隆, 大肠杆菌表达

中图分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0875-04

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的疾患,寻找有效治疗药物和有效治疗手段一直是人们致力解决的热点和难点。增殖诱导配体(a proliferation-inducing ligand, APRIL)分子的发现及其作用的研究为上述热点和难点问题的解决带来了新的希望。APRIL 分子是 TNF 超家族的一个新成员,属 II 型跨膜蛋白,全长为 250 个氨基酸^[1,2]。其中 29~49 氨基酸为疏水的跨膜区,50~250 氨基酸为胞外区,经 furin 转换酶在富含精氨酸的基序 R-K-R-R 处(101-104 氨基酸残基处)裂解后,部分胞外区从膜上脱下,形成天然可溶性 APRIL(sAPRIL, 即 105-250 氨基酸区域),全长(即膜结合型)APRIL 和 sAPRIL 的生物学活性基本一致^[3]。

近年诸多研究表明,APRIL 在多种肿瘤细胞的增殖和存活以及促肿瘤形成的过程中都起着独特的作用^[4,5]。该基因在正常组织中的表达很弱,并且只见于前列腺、外周血淋巴细胞、单核/巨噬细胞、结肠、脾、胰腺等几个组织,但在多种肿瘤细胞系和肿瘤组织中(特别是胃肠道肿瘤如直肠癌细胞系 SW480)有高水平表达。因此人 APRIL 分子可能是作为一种自分泌或旁分泌生长因子而促进肿瘤的形成及肿瘤细胞的增殖与存活^[6,7,8]。体外及动物体内实验发现,APRIL 受体的可溶形式可通过竞争性抑制 APRIL 与其膜受体的结合而明显抑制某些肿瘤细胞的增殖^[9,10]。因此深入研究 APRIL 分子的作用机制及其抑制剂的筛选,可为与 APRIL 高表达相关的多种肿瘤的治疗提供新型候选制剂,并可为

APRIL 高表达相关的多种肿瘤的治疗提供药物设计的新靶标,具有重大的理论和实际意义。

1 材料与方 法

1.1 主要材料和试剂

人新鲜扁桃体组织取自临床手术切除的扁桃体;RPMI-1640 培养基及 Tripure RNA 提取试剂为 Roche 公司产品;PCR 引物由上海生工公司合成;RT-PCR 试剂盒及 PCR 纯化试剂盒为 Promega 公司产品;限制酶购自大连宝生物公司;质粒 pUC19 购自华美公司;原核表达载体 pQE-80L 由本室保存。

1.2 方 法

1.2.1 细胞总 RNA 的提取: 取人新鲜扁桃体组织,按照 Tripure 试剂盒说明提取细胞总 RNA,用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,紫外分光光度计测定其浓度。

1.2.2 RT-PCR 扩增人 APRIL₁₀₅₋₂₅₀ cDNA: 上游引物为:5'-gcg ggt acc gca gtc ctc acc caa aaa ca-3'(划线部分为 Kpn I 酶切位点),下游引物为:5'-gcg aag ctt tca cag tit cac aaa ccc ca-3'(划线部分为 Hind III 酶切位点)。RT-PCR 的简要过程如下:在总体积为 50 μ L 的反应液中含有总 RNA 5 μ L(约 1 μ g)、5 \times 反应缓冲液 10 μ L,上、下游引物各 2 μ L(各 1 μ mol/L),dNTP 1 μ L(每种为 10mmol/L),AMV 反转录酶 1 μ L(5u),Tth DNA 聚合酶 1 μ L(5u),25mmol/L MgSO₄ 2 μ L,双蒸水 26 μ L;反应程序为 48 $^{\circ}$ C 45min;94 $^{\circ}$ C 预变性 2min;然后(94 $^{\circ}$ C 30s,60 $^{\circ}$ C 1min,68 $^{\circ}$ C 2min) \times 40 个循环;最后 68 $^{\circ}$ C

收稿日期:2004-04-06, 修回日期:2004-07-06。

* 通讯作者。 Tel: 86-23-68752262; E-mail: xiaobao@mail.tmmu.com.cn

7min。反应完成后,取 5 μ L 产物于 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,凝胶扫描仪下观察并记录结果。

1.2.3 DNA 的克隆及序列测定: 将 RT-PCR 产物及载体 pUC19 经 *Hind* III + *Kpn* I 酶切后,分别用纯化试剂盒进行回收,按常规连接条件于 16 $^{\circ}$ C 连接 12 h,将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经蓝白斑筛选获得阳性重组子,提取质粒,经 *Hind* III + *Kpn* I 进行酶切鉴定获得重组质粒(命名为 pUC19/APRIL₁₀₅₋₂₅₀)。序列测定由上海生工公司完成,并将测序结果在 NCBI 服务器上进行同源比较(网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

1.2.4 重组人 APRIL₁₀₅₋₂₅₀ (rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀) 的表达及鉴定: DNA 测序后,以 *Hind* III + *Kpn* I 酶切 pUC19/APRIL₁₀₅₋₂₅₀ 质粒,回收目的片段并连接于原核表达载体 pQE-80L(该载体可使外源目的蛋白在 N 端带有 6 \times His-tag,而可证明 APRIL C 端的主要功能部位,从而便于用 Ni²⁺-NTA 层析系统进行纯化。并转化于大肠杆菌 DH5 α ,经质粒提取和酶切鉴定得到重组原核表达载体 pQE-80L/APRIL₁₀₅₋₂₅₀。挑取含重组原核表达载体的单个菌落扩增培养,在 37 $^{\circ}$ C 及终浓度为 1mmol/L IPTG 的条件下培养 4 h,以诱导目的蛋白的表达。超声碎菌,行 SDS-PAGE(分离胶 15%,积层胶 5%)分析目的蛋白的表达部位及表达水平。以所表达目的蛋白上的 His 标签肽为标志,经 Western blot 进一步鉴定,其简要步骤是:将诱导表达的产物先行 SDS-PAGE,然后以半干法电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上,取下 NC 膜短暂漂洗后用丽春红染膜,待蛋白 marker 条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干,用记号笔标记蛋白 marker 各条带,继而经漂洗去除丽春红,然后依次经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h、与抗-His 单抗孵育 1 h、与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h,每步完成后均严格洗膜,最后加 DAB 避光显色。

1.2.5 Ni²⁺ 亲和层析柱纯化 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀: 将含重组质粒 pQE-80L/APRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的表达菌在 100mL LB 中扩大培养并按上述条件进行 IPTG 诱导后,离心收集细菌,超声碎菌后,离心沉淀包涵体。用缓冲液 A (8mol/L 尿素、0.1mol/L Na₂HPO₄、0.01mol/L Tris-HCl pH8.0)溶解包涵体,溶解上清过 Ni²⁺-NTA 树脂层析柱;用缓冲液 A 和缓冲液 B (8mol/L 尿素、0.1mol/L Na₂HPO₄、0.01mol/L Tris-HCl pH6.3)洗柱,直至 A₂₈₀ 小于 0.01;用缓冲液 C(缓冲液 B 中含 250mmol/L 咪唑)洗脱目的蛋白。对收集的蛋白行 SDS-PAGE

分析,并采取逐步降低尿素浓度的方法,透析除去尿素,使变性的目的蛋白在此过程中自然复性,从而得到纯化的重组人可溶性 APRIL₁₀₅₋₂₅₀ (rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀)。分别经 SDS-PAGE 和毛细管电泳分析纯化蛋白纯度,经紫外分光光度计检测蛋白浓度,最后冻干保存。

1.2.6 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 生物学活性检测: 用 1640 培养液将 Jurkat 细胞配成 1.5 \times 10⁶/mL 悬液,按每孔 100 μ L 细胞悬液加入 96 孔培养板,然后分别加入不同浓度的 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ (终浓度分别为 0.125 μ g/mL、0.25 μ g/mL、0.50 μ g/mL、1.0 μ g/mL、2.0 μ g/mL、4.0 μ g/mL),每孔总体积均为 200 μ L,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 12 h,然后按 1 μ Ci/孔加入 ³H-TdR,继续培养 16 h,然后将细胞收集于 49 型玻纤滤纸上,烘干后利用液闪仪测定 ³H-TdR 掺入量(以 cpm 值表示)。以同样制备的 HeLa 细胞为对照(该细胞不具备 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 受体)。实验设三复孔,取其平均值。对只含 pQE-80L 载体的细菌,同样进行 IPTG 诱导和 Ni²⁺-NTA 柱层析纯化步骤,以所获得的透析产物作阴性对照。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增结果

扩增产物行电泳后,可见 APRIL 基因经 RT-PCR 缺失扩增得到的片段大小约为 450bp(图 1)。

2.2 人 APRIL₁₀₅₋₂₅₀ cDNA 的克隆及序列测定

将目的片段克隆于载体 pUC19 进行 DNA 序列测定,该序列与 GenBank 中报道的编码人 APRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的 cDNA 序列完全一致,且除小鼠外,与其他生物均无同源性。

2.3 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的表达及鉴定

将序列正确的 APRIL₁₀₅₋₂₅₀ cDNA 克隆于原核表达载体 pQE-80L 得到重组表达载体 pQE-80L/APRIL₁₀₅₋₂₅₀(酶切鉴定图谱如图 2)。将重组表达载体转化大肠杆菌 DH5 α 后,以 IPTG 诱导表达,经 SDS-PAGE 分析表明所表达的目的蛋白主要位于包涵体内,而在其它组分未见明显表达。对全菌裂解液进行 SDS-PAGE,结果显示重组目的蛋白相对分子质量约为 18000,灰度扫描显示目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 43.6%,这表明 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 在大肠杆菌中获得了高效表达。以 His 标签肽为标志的 Western blot 分析显示,经 IPTG 诱导的含重组表达载体 pQE-80L/APRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的菌体裂解物能与抗-His 单

抗特异性反应,在约 Mr17500 处呈现单一条带,而经同样诱导的只含载体 pQE-80L 的菌体裂解物则无此反应,说明所表达的融合蛋白的确是目的蛋白(见图 3)。

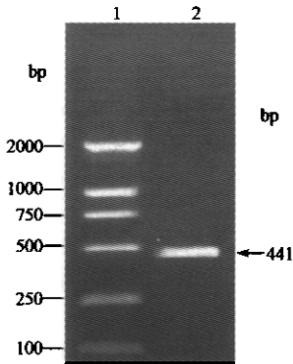


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Gel electrophoresis of the RT-PCR products

1: DNA marker DL2000;
2: hAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ cDNA amplified from
the mRNA derived from human tonsil

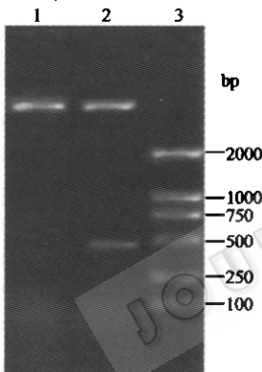


图 2 重组原核表达载体的酶切鉴定图谱

Fig.2 Identification of recombinant plasmid

pQE-80L/APRIL105-250
1: pQE-80L/ *Hind* III + *Kpn* I ;
2: pQE-80L/APRIL₁₀₅₋₂₅₀/ *Hind* III + *Kpn* I ;
3: DNA marker DL2000

2.4 目的蛋白的纯化及功能活性分析

表达蛋白经 Ni²⁺-NTA 纯化及分步透析复性后进行 SDS-PAGE,结果仅在约 M_r18000 处见单一条带(见图 4),进一步经毛细管电泳分析,证实纯度达 98.2%,这说明目的蛋白 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的纯度是较高的。³H-TdR 掺入实验所得各 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 浓度下的 cpm 值如表 1 所示,表明所制备的 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 具有明显促进人 Jurkat 肿瘤细胞增殖的生物学活性。而且由表 1 可知,在本实验条件下,随着 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 浓度的增加,cpm 值增大,表明

rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的上述生物学活性具有剂量依赖效应;当 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 浓度 ≥ 1.0μg/mL 时,cpm 值则不再明显增大,表明此时 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 与靶细胞上相应受体的结合已达饱和。

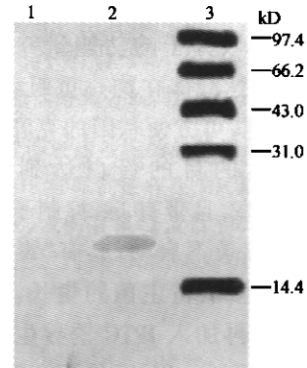


图 3 Western blot 分析 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的表达

Fig.3 Western blot analysis of rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀

1: *E. coli* DH5a transformed by empty plasmid pQE80L;
2: expression of rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ in
E. coli DH5a incubated by IPTG for 4 h;
3: low molecular weight protein marker

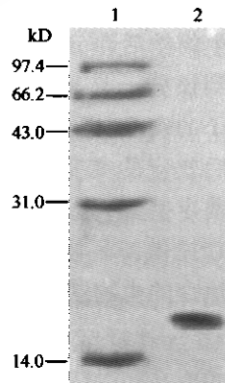


图 4 SDS-PAGE 分析 rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 纯化产物

Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified rhAPRIL₁₀₅₋₂₅₀

1: low molecular weight protein marker;
2: rhAPRIL105-250

表 1 ³H-TdR 掺入法检测 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 的生物学活性(以 cpm 值表示)

Table 1 Identification of the activity of rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ by ³H-TdR

Concentration of rhsAPRIL ₁₀₅₋₂₅₀ / (μg/mL)	Activity of rhsAPRIL ₁₀₅₋₂₅₀ (Jurkat cell) (cpm)	Control (HeLa cell) (cpm)
0 (negative control)	4425 ± 697	3898 ± 598
0.125	8357 ± 786	4253 ± 625
0.25	13809 ± 792	4362 ± 687
0.50	18636 ± 837	3906 ± 632
1.0	19884 ± 891	4405 ± 683
2.0	19683 ± 825	4289 ± 615
4.0	19702 ± 850	4450 ± 690

3 讨论

在 PCR 扩增同时,我们对 APRIL 的部分胞外区进行了缺失,直接得到了可溶性的 APRIL(sAPRIL) 基因片段,使该基因的编码产物具有更高的生物学活性,也更便于对该分子的功能研究。此外,采用 pQE-80L 的原核表达载体在构建重组载体时不存在读码框移位等问题,可方便基因的克隆与表达;同时该系统可使表达的目的蛋白达到细胞总量的 43.6%,表达效率高,且带有 lac 抑制子,在未加入诱导剂 IPTG 以前,转录不启动,具有“毒性”的目的蛋白不表达,故并不影响宿主菌的生长。在宿主菌生长到一定数目后,再加入 IPTG 诱导生长,就可获得大量表达的目的蛋白。此外,使用 pQE80-L 载体表达的外源蛋白 N 端带有 His-tag,易于通过镍柱纯化。

APRIL 作为一种配体蛋白,通过与其受体结合而发挥其生物学作用。目前,国内外研究中尚无明确该分子的关键功能位点。我们在生物学活性检测表明所制备的 rhsAPRIL₁₀₅₋₂₅₀ 具有明显促进人 Jurkat 肿瘤细胞增殖的生物学活性,且具有剂量依赖效应,因此如果能筛选到该分子与其受体结合的抑制剂,或通过构建该分子的突变体,筛选出只能与受体结合而不引发受体后效应的突变体,则可进一步探索其关键功能位点奠定基础,为与 APRIL 高表达相关的多种肿瘤的治疗提供新型候选制剂,有望开发出新型的用于肿瘤治疗的生物制剂。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Hahne M, Kataoka T, Schroter M *et al.* APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med*, 1998, **188**(6):1185 - 1190
- [2] Mackay F, Schneider P, Rennert P *et al.* BAFF and APRIL: A tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol*, 2003, **21**:231 - 264
- [3] Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar JP *et al.* Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase. *EMBO Rep*, 2001, **2**(10):945 - 951
- [4] Yu G, Boone T, Delaney J *et al.* APRIL and TALL-1 and receptors BCMA and TACI: system for regulating humoral immunity. *Nat Immunol*. 2000, **1**(3):252 - 256
- [5] Rennert P, Schneider P, Cachero TG *et al.* A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth. *J Exp Med*, 2000, **192**(11):1677 - 1684
- [6] Roth W, Wagenknecht B, Klumpp A *et al.* APRIL, a new member of the tumor necrosis factor family, modulates death ligand-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 2001, **8**(4):403 - 410
- [7] Ware CF. APRIL and BAFF connect autoimmunity and cancer. *J Exp Med*, 2000, **192**(11):F35 - F37
- [8] Roschke V, Sosnovtseva S, Christopher D *et al.* BLyS and APRIL form biologically active heterotrimers that are expressed in patients with systemic immune-based rheumatic diseases. *J Immunol*, 2002, **169**(8):4314 - 4321
- [9] Stein JV, Lopez-Fraga M, Elustondo FA *et al.* APRIL modulates B and T cell immunity. *J Clin Invest*, 2002, **109**(12):1587 - 1598
- [10] Marsters SA, Minhong Yan, Pitti RM *et al.* Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI. *Curr Biol*, 2000, **10**(13):785 - 788

Cloning and Expression of Human Soluble APRIL Gene in *Escherichia coli*

DAI Shuang-Shuang HE Feng-Tian* ZHANG Yan LI Rong-Fen YANG Zhao-Hui PENG Jia-He

(Department of Biochemistry, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract To obtain human soluble APRIL cDNA and stable expression in *E. coli* DH5 α , the human APRIL protein sequence was squeezed from GenBank(No:075888), and the primer was designed according to part of its extracellular protein sequence. The sequence of cDNA encoding sAPRIL was amplified from the total RNA, which extracted from human tonsil by RT-PCR and cloned into vector pUC19 for sequencing. Next, the identified cDNA was cloned into the new type of prokaryotic expression vector pQE-80L. Transformed the combined plasmids into *E. coli* DH5 α and identified the activity of this protein by ³H-TdR. The sAPRIL molecule was successfully expressed in *E. coli* DH5 α . and the protein stimulated tumor cell growth.

Key words a proliferation-inducing ligand, gene clone, *Escherichia coli* DH5 α

Received: 04-28-2004

* Corresponding author. Tel: 86-23-68752262; E-mail: xiaobao@mail.tmmu.com.cn