

## 新的端粒酶活性抑制蛋白 LPTS-L 的制备

# Preparation of a Novel Telomerase Inhibitory Protein LPTS-L

吴 楚<sup>1,2</sup>, 笞 亮<sup>1</sup>, 陈光明<sup>1</sup>, 张 芳<sup>1</sup>, 赵慕钧<sup>1\*</sup>

WU Chu<sup>1,2</sup>, DA Liang<sup>1</sup>, CHEN Guang-Ming<sup>1</sup>, ZHANG Fang<sup>1</sup> and ZHAO Mu-Jun<sup>1\*</sup>

1 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031

2 温州大学生命与环境科学学院, 温州 325027

1 Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China

2 School of Life & Environmental Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325027, China

**摘 要** LPTS 基因是利用定位候选克隆策略克隆的一个新的肝相关候选肿瘤抑制基因。LPTS 基因编码一个全长为 328 氨基酸的蛋白质(LPTS-L), 该蛋白具有抑制细胞端粒酶活性的功能。为了进一步研究 LPTS-L 蛋白的结构与功能, 利用 DNA 重组技术, 将 LPTS-L 的 cDNA 克隆到表达载体 pET-24a 中构建重组克隆 pET-24-LPTS, 并在大肠杆菌 BL-21 中进行融合表达, 获得可溶形式的 LPTS-L 融合蛋白。采用 Ni Sepharose 4B 柱亲和层析, 可以获得纯度较高的蛋白, 但不适合大量制备。通过设计引物去掉了 pET-24a 载体上的 6 × His tag, 将 LPTS-L 基因进行了非融合表达, 然后采用磷酸纤维素 P11 阳离子交换层析纯化 LPTS-L 蛋白, 纯度可达到 55%。再经 Sephadex G-100 凝胶过滤, LPTS-L 蛋白的纯度可达到 80%。Western blot 实验显示经纯化后的 LPTS-L 蛋白可与兔抗 GST-LPTS-L 的多抗发生特异性结合。采用 TRAP 法测定蛋白质活性, 结果显示纯化得到的 LPTS-L 蛋白可抑制端粒酶的活性, 与采用 Ni Sepharose 4B 纯化获得的 LPTS-L 融合蛋白比较, 其抑制效率基本一致。因此, 所建立的技术可以有效地制备 LPTS-L 蛋白。

**关键词** LPTS-L 蛋白, 磷酸纤维素 P11, 表达纯化

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0852-06

**Abstract** The gene for LPTS is originally cloned as a human liver-related putative tumor suppressor(LPTS) gene that encodes a full length protein of 328 amino acids(LPTS-L). LPTS-L is also identified as a telomerase inhibitor to regulate telomere length in the cells. To facilitate the functional and structural studies of LPTS-L protein, the cDNA for LPTS-L was cloned into the expression vector pET-24 in frame to generate a recombinant plasmid pET-24-LPTS. The LPTS-L protein was expressed in *E. coli* BL21 solubly, and purified by Ni Sepharose affinity chromatography which, however, is not fit for large scale protein purification. The gene of LPTS-L was then PCR amplified to remove the 6 × His tag, and cloned into pET-24a. The non-fusion protein of LPTS-L was expressed in *E. coli* BL21, and purified by phosphocellulose P11 chromatography. The purity of LPTS-L protein was about 55% after that procedure, and arrived at 80% after second purification by Sephadex G-100 chromatography. Western Blotting analysis showed that the band reflects the specific binding of anti-LPTS antiserum against the purified LPTS-L protein. The TRAP assay was performed to detect the telomerase inhibitory activity of LPTS-L protein in vitro. It was observed that the purified LPTS-L inhibited the activity of telomerase greatly, similarly with that of LPTS-L protein purified by Ni Sepharose

Received: December 22 2006; Accepted: January 17 2007.

This work was supported by a grant from the National High Technology R&D Program of China (No. 2006AA02Z190).

\* Corresponding author. Tel: +86-21-54921115; Fax: +86-21-54921011; E-mail: mjzhao@sibs.ac.cn

国家高技术研究发展计划项目(No. 2006AA02Z190)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

4B. Our results suggest that phosphocellulose P11 plus Sephadex G-100 chromatography could substitute for Ni Sepharose 4B affinity chromatography for preparation of purified LPTS-L protein. Through this study, a technique for preparation of LPTS-L protein in a large scale is established.

**Key words** LPTS-L, phosphocellulose P11, expression and purification

端粒(Telomere)是真核生物染色体末段的特殊结构。正常细胞随分裂次数的增加,端粒逐渐缩短。当端粒缩短到一定程度时,细胞生长受到抑制,既而衰老死亡<sup>[1]</sup>。端粒酶(Telomerase)是一种合成和延伸端粒的核糖核蛋白。正常细胞内检测不到端粒酶活性,因此,正常细胞分裂次数是有限的,不能无限增殖。但是,恶性肿瘤细胞具有无限增殖的能力,这是因为细胞中端粒酶被激活,所以普遍可以检测到较强的端粒酶活性,其染色体端粒可以不断延伸,细胞分裂不受端粒长度的限制<sup>[2,3]</sup>。因此,抑制细胞端粒酶的活性与抑制肿瘤的恶性增殖有关,研究端粒酶的活性调控机制,具有重要的意义。

LPTS 基因是本实验室克隆得到的一个候选肝癌抑制基因,它能抑制肝癌细胞生长和增殖的功能<sup>[4]</sup>。LPTS 基因转录可以产生三个转录本,其中最长的转录本为 LPTS-L,它编码了一个 328 个氨基酸的蛋白,并具有抑制端粒酶活性,是一个端粒酶活性抑制蛋白<sup>[4-6]</sup>。为研究 LPTS-L 蛋白的结构以及功能,需要获得大量的 LPTS-L 蛋白。我们利用 pET-24a 表达载体,构建了 pET-24-LPTS-L 重组表达基因工程菌,并在大肠杆菌 BL-21 中分别进行了融合与非融合表达。我们用 Ni Sepharose 4B 亲和层析柱纯化 LPTS-L 融合蛋白,纯度可达到 50% 左右。但是,用 Ni Sepharose 4B 纯化制备蛋白虽然步骤简单,成本却比较高,且不利于蛋白的放大制备。所以我们尝试用常规的蛋白纯化方法以替代 Ni 柱亲和层析,以便纯化获得 LPTS-L 非融合蛋白。磷酸纤维素是一种阳离子交换介质,在 pH 大于 7.2 时常被用来纯化某些与 DNA、核苷酸或磷酸根有亲合性的蛋白,如转录因子、限制性内切酶、核酸水解酶、蛋白激酶等<sup>[7-11]</sup>。LPTS-L 蛋白含有较多的碱性氨基酸,其等电点约为 10,在中性 pH 时蛋白带正电,能被磷酸纤维素非特异性的结合,所以我们尝试用磷酸纤维素纯化 LPTS-L 非融合蛋白。结果表明,通过磷酸纤维素阳离子交换层析等方法制备的 LPTS-L 非融合蛋白无论在纯度或活性上,与 Ni 柱纯化的 LPTS-L 融合蛋白结果相仿,并且具有成本低,快速简便,可大量制备的优点。这为 LPTS-L 蛋白的进一步应用打下了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒** 大肠杆菌菌株 BL-21, DH-5 $\alpha$ , 含有 LPTS-L 基因的质粒,表达载体 pET-24a( Novagen 公司)均为本实验室保存和构建。

**1.1.2 酶和主要试剂** 各种工具酶购自大连宝生物工程公司, DNA 纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自上海申能博彩生物技术有限公司。兔抗 LPTS-GST 的多克隆抗体由本实验室制备<sup>[12]</sup>, 羊抗兔 IgG/HRP 购自 Sant Cruz Biotechnology 公司, PVDF 膜购自 NEN 公司, 磷酸纤维素 P11 为 Whatman 公司产品, Sephadex G-100 为 Pharmacia 公司产品。其他常用试剂为进口或国产分析纯试剂。引物合成与测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

### 1.2 方法

**1.2.1 LPTS-L 融合蛋白与非融合蛋白表达载体的构建** 用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切 pET-24a 载体和本室构建并保存的 LPTS-L 重组质粒 pGEX-LPTS-L<sup>[5]</sup>。用申能博彩公司的 kit 回收 LPTS-L 基因和 pET-24a 载体,用 T4 DNA ligase 对两者进行连接,构建成表达带 6  $\times$  His 的 LPTS 融合蛋白的原核表达载体 pET-24a-LPTS-L1(以下简称为 pEL1)。构建 LPTS-L 非融合蛋白的 pET-24a-LPTS-L2 表达载体,首先根据编码 LPTS-L 的 cDNA 序列设计正向引物为 5'-A CATATG TCT ATG CTG GCT GAA CG-3',反向引物为:5'-T CTCGAG TCA TTT GGA ATC TTT CTT CT-3';其中正向引物引入 *Nde* I 位点,反向引物引入了 *Xho* I 位点和终止密码子以去除 6  $\times$  His tag。以质粒 pGEX-LPTS-L 为模板,加入上述引物,按常规体系用 pfu DNA 聚合酶扩增 LPTS-L 基因,PCR 反应参数为:94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 60s, 重复 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。用 1% 琼脂糖鉴定 PCR 产物,只有一条 1kb 左右的片段,利用 DNA 胶回收试剂盒进行 PCR 产物回收,回收的目的片段连接至 pMD18-T 载体, *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞的制备、转化及转化子的筛选等见参考文献 [13]。提取阳性克隆质粒,用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切制备 LPTS-L 基因片段,并插入 pET-24a 载体的 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点,构建成

表达 LPTS-L 非融合的 pET-24a-LPTS-L2 表达载体 (以下简称为 pEL2)。

**1.2.2 LPTS-L 蛋白的诱导表达:**将表达载体 pEL1 与 pEL2 分别转化 *E. coli* BL-21, 分别挑取阳性克隆进行酶切鉴定, 并经测序无误后, 获得表达 LPTS-L 融合蛋白与 LPTS-L 非融合蛋白的工程菌。将工程菌接种到卡那霉素含量为 100mg/L 的 LB 培养基(每升培养基含 10g Trypton 5g yeast extract, 10g NaCl)中, 37℃ 振荡培养过夜。次日, 以 1% 接种量接入新鲜的 LB 培养基( kan<sup>+</sup>) 中, 37℃ 继续培养约 3h。当  $A_{600}$  约等于 0.6 时, 加入 IPTG 终浓度为 0.5mmol/L, 诱导表达 3~4h。在加入 IPTG 前吸取少量菌液做菌体蛋白阴性对照, 诱导表达后, 4℃, 5000r/min 离心 15min 收集菌体。取适量菌体悬浮在 TE 缓冲液中, 后用超声波破碎, 4℃, 12000r/min 离心 30min, 分别收集上清和沉淀。SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析检测 LPTS-L 蛋白, 具体操作见文献 [5]。SDS-PAGE 浓缩胶的浓度为 5%, 分离胶的浓度为 10%, 电泳缓冲液采用 Tris-甘氨酸系统。具体操作见文献 [14]。

**1.2.3 LPTS-L 蛋白的纯化:**首先用超声波破碎菌体, 将 500mL 诱导表达后的菌液 5000r/min 离心, 收集菌体, 用磷酸盐缓冲液(20mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH, pH7.4, 1mmol/L EDTA, 5% 甘油, 10mmol/L 巯基乙醇)洗涤 1 次, 菌体按 1:20 重悬于磷酸盐缓冲液, 在缓冲液中加入 PMSF 终浓度为 0.2mmol/L, 冰浴超声波破菌, 功率为 200W, 每次超声 10s, 间歇 25s, 反复共 40 次。12000r/min 离心 30min, 收集上清进一步层析。

**磷酸纤维素 P11 阳离子交换层析:**取 2g 磷酸纤维素 P11 干粉, 用 0.5mol/L NaOH, 0.5mol/L HCl 处理后, 将悬浮的树脂装入层析柱(2cm × 15cm)中, 可得到柱床体积为 10mL 的阳离子交换层析柱。用 50mL 磷酸盐缓冲液(含 1mol/L NaCl)洗涤, 再用 50mL 磷酸盐缓冲液平衡柱子, 备用。离心上清液直接上柱, 用 30mL 磷酸盐缓冲液平衡, 再进行分级洗脱, 即先用 50mL 含 600mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液洗去杂蛋白, 然后用 50mL 含 900mmol/L NaCl 的磷酸盐缓冲液洗脱目的蛋白, 收集洗脱峰。

**Sephadex G-100 层析:**收集磷酸纤维素 P11 阳离子交换柱层析的 900mmol/L NaCl 洗脱峰部分的洗脱液, 经 PEG20000 浓缩和透析后, 上样于经 30mmol/L NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 预平衡的 Sephadex G-100 柱(1cm × 80cm, Pharmacia 公司), 再用此平衡液洗脱至无峰出现, 收

集洗脱峰。实验在 4℃ 条件下进行。用 SDS-PAGE 检测收集的样品。用 Bradford 法测定纯化蛋白的浓度。

**Ni Sepharose 4B 亲和层析:**将 500mL 诱导表达后的菌液 5000r/min 离心, 收集菌体, 用 NTA-0 缓冲液(20mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 1mmol/L EDTA, and 0.5mmol/L NaCl)洗涤 1 次, 菌体按 1:20 重悬于 NTA-0 缓冲液, 在缓冲液中加入 PMSF, 终浓度为 0.2mmol/L, 然后在冰浴中进行超声波破菌, 功率为 200W, 每次超声 10s, 间歇 25s, 反复共 40 次。12000r/min, 离心 30min, 收集上清进一步层析。Ni 亲和层析柱(3S NTA Resin)为上海申能博彩生物科技有限公司产品, 具体的纯化方法参照产品说明书。简单的流程为: 超声后上清流经 NTA-0 缓冲液预平衡过的 3S NTA Resin 亲和层析柱, 吸附后分别用 NTA-0 和 NTA-2Q(20mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 1mmol/L EDTA, and 0.5mmol/L NaCl, 20mmol/L 咪唑)缓冲液洗涤, 各 5 倍柱体积, 至无蛋白质流出, 然后用 NTA-20Q(20mmol/L Tris-HCl, pH7.9, 1mmol/L EDTA, and 0.5mmol/L NaCl, 200mmol/L 咪唑)洗脱, 收集各流出液, 补加 PMSF 终浓度为 0.2mmol/L。实验在 4℃ 条件下进行。SDS-PAGE 检测流出液的蛋白纯度和含量。

**1.2.4 LPTS-L 蛋白的 Western blotting 检测:**将未诱导表达的大肠杆菌 BL-21, 诱导表达后的工程菌总蛋白及纯化所得样品经 SDS-PAGE 后, 用 Bio-Rad 公司的电转仪将蛋白转至 PVDF 膜上, 进行 Western blot 实验检测。一抗为抗 LPTS-L 蛋白的抗体, 二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG。用 ECL 试剂盒进行检测。具体的实验操作参考文献 [12, 14]。

**1.2.5 LPTS-L 蛋白的端粒酶抑制活性的测定:**端粒酶活性测定采用 TRAP 法。端粒酶来自 SMMC-7721 肝癌细胞裂解液, 将 SMMC-7721 肝癌细胞接种在 10mL 培养瓶中, 培养基为 RPMI 1640, 温度为 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下贴壁培养, 满瓶后收取培养细胞。即将培养基吸干, 用 PBS 洗一遍细胞, 然后用胰酶将细胞消化, PBS 冲洗细胞, 吸入离心管, 4000r/min 离心收集细胞。再用 washing buffer (10mmol/L Hepes-KOH (pH7.5), 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10mmol/L KCl, 1mmol/L DTT)洗一遍细胞, 离心。用冰预冷的 lysis buffer(10mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 1mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1mmol/L EDTA, 0.1mmol/L PMSF, 5mmol/L 巯基乙醇, 0.5% CHAPS, 10% 甘油)500μL 重悬细胞

置冰上 30min 4℃, 12000r/min 高速离心 30min, 离心获得上清可用来测定端粒酶活性。上清液可在 -70℃ 保存。

TRAP 反应在 Eppendorf 管中进行, 反应体积为 50 $\mu$ L, 在管中加入 42 $\mu$ L 反应缓冲液( 20mmol/L Tris-HCl ( pH8.3 ), 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 63mmol/L KCl, 0.005% Tween-20, 1mmol/L EDTA, 0.1mg/mL BSA ), 1 $\mu$ L SMMC-7721 肝癌细胞裂解液上清, 0.25 $\mu$ L 10mmol/L dNTP, 1 $\mu$ L 倍比稀释的 LPTS-L 蛋白, 混匀后在冰上放置 10min, 管内再加入 1 $\mu$ L Ts 引物 ( 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L ), 25℃ 延伸 30min, 85℃ 灭活 5min, 再加 Taq 酶 ( 0.5 $\mu$ L ) Cx 引物 1 $\mu$ L ( 0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L ) 进行 PCR 反应 ( 94℃ 30s, 50℃ 40s, 72℃ 40s, 33 个循环, 72℃ 2min ) 具体操作见文献 [ 15 ] 引物的序列为: Ts 引物: 5'-AATCCGTGCGAGCAGAGTT-3'; Cx 引物: 5'-(CCCTTA)3CCCTAA-3'。然后电泳鉴定上述 PCR 反应产物。电泳采用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶, 0.5 $\times$  TBE 缓冲液, 电压 100V, 6~8h。最后银染显色, 拍照。

## 2 结果

### 2.1 表达载体 pEL1 与 pEL2 的构建

本实验室构建的 pGEX-LPTS 质粒, 含有编码

LPTS-L 蛋白的全长 cDNA, 表达产物为 GST-LPTS 融合蛋白。因为 GST 可能干扰或影响目的蛋白的生理功能与活性, 我们用 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切, 构建不带 GST 的全长 LPTS-L 基因表达质粒 ( pEL1 ) 表达产物为带 6 $\times$  His 的 LPTS-L 融合蛋白。为了使获得的 LPTS-L 蛋白尽可能少带其它多肽, 我们又通过设计引物去除了 pET-24a 载体上的 T7 tag 和 His tag, 得到重组的 pEL2 表达质粒, 表达产物为不带 T7 tag 和 6 $\times$  His 的 LPTS-L 非融合蛋白。

### 2.2 pEL1 和 pEL2 重组质粒在 *E. coli* BL-21 中的表达

将 pEL1 与 pEL2 重组质粒分别转化 *E. coli* BL-21 宿主菌, 经 IPTG 诱导表达后, 收集菌体, 菌体经超声波破碎后, 取少量进行 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达。结果表明诱导后有明显的 LPTS-L-His 融合蛋白与 LPTS-L 非融合蛋白表达带 ( 见图 1A 中泳道 3 和 2B 中泳道 2 )。LPTS-L 非融合蛋白表观分子量约为 40kD, 与 LPTS 蛋白理论分子量 37kD 相符, 而 LPTS-L-His 融合蛋白带有 His tag 等, 所以分子量约为 44kD。经凝胶扫描, 显示表达的 LPTS-L 蛋白约占菌体总蛋白的 18%。经发酵诱导条件的不断优化, LPTS-L 蛋白主要以可溶的形式存在于上清中。

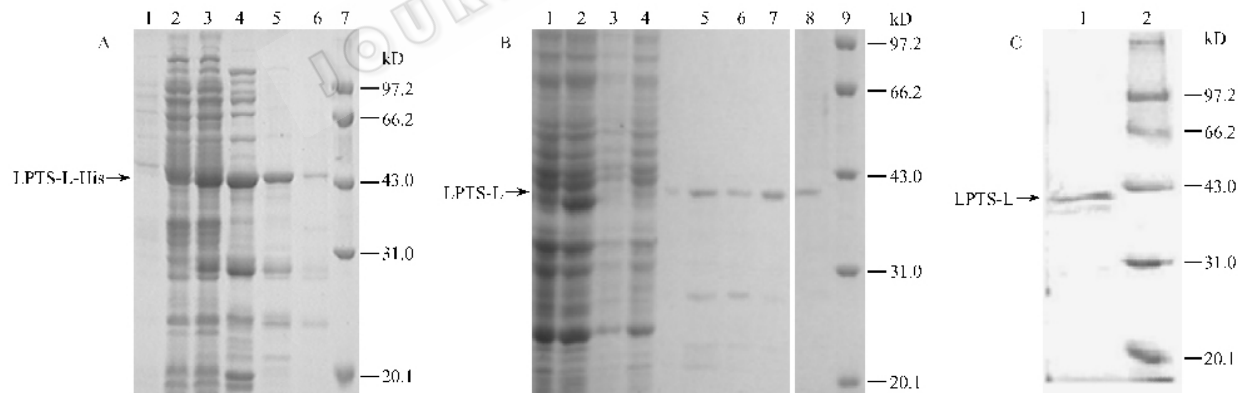


图 1 SDS-PAGE 分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis

A. LPTS-L-His fusion protein expressed in *E. coli* BL-21. 1: supernatant of ultrasonic fragmentation; 2: total protein before IPTG induction; 3: total protein after IPTG induction for 3 hours; 4: precipitation of ultrasonic fragmentation; 5: purified fusion protein by Ni Sepharose 4B; 7: protein marker. B. LPTS-L protein purified by phosphocellulose P11. 1: total protein before IPTG induction; 2: total protein after IPTG induction for 3 hours; 3: flow through from 600mmol/L NaCl elution of undesired protein; 4: flow through from 900mmol/L NaCl elution of LPTS-L protein; 5: LPTS-L protein purified by phosphocellulose P11 and Sephadex G-100 gel filtration chromatography; 9: protein marker. C. LPTS-L protein purified by phosphocellulose P11 and Sephadex G-100. 1: purified LPTS-L protein after phosphocellulose P11 and Sephadex G-100 gel filtration chromatography; 2: protein marker.

### 2.3 LPTS-L 蛋白的纯化

我们采用 Ni Sepharose 4B 亲和层析的纯化方法, 分离 LPTS-L-His 融合蛋白, 纯度可达到 50% 左

右。但用 Ni Sepharose 4B 成本较高且不易大量制备目的蛋白, 所以研究采用其他蛋白质纯化方法以替代 Ni 柱。此外为了更好地研究 LPTS 天然蛋白的结

构和功能,克隆表达不带  $6 \times \text{His}$  的 LPTS-L 非融合蛋白。在预实验时试用 CM-Sepharose FF 柱层析,结果发现弱阳离子交换树脂 CM-Sepharose FF 对 LPTS-L 蛋白吸附较弱,在  $200\text{mmol/L}$  NaCl 的磷酸盐缓冲液时就能洗脱下来,这样 LPTS-L 蛋白就不容易与其他杂蛋白分开。而磷酸纤维素是一种中强阳离子交换树脂,在 pH 大于 7.2 时常被用来纯化某些与 DNA、核苷酸或磷酸根有亲合性的蛋白,如转录因子、限制性内切酶、核酸水解酶、蛋白激酶等<sup>[7,8]</sup>。且 LPTS-L 蛋白经分析具有与 RNA 结合的结构域,且含有较多的碱性氨基酸,在中性 pH 时蛋白带正电,所以尝试通过磷酸纤维素 P11 阳离子交换层析,纯化 LPTS-L 蛋白。

经实验研究,发现磷酸纤维素 P11 阳离子交换层析制备的 LPTS-L 非融合蛋白可以达到 Ni 柱纯化 LPTS-L-His 融合蛋白的效果。将经磷酸纤维素 P11 阳离子交换层析阶段洗脱获得的蛋白样品作 SDS-PAGE,电泳结果见图 1B,由图可知由磷酸盐缓冲液与含  $600\text{mmol/L}$  NaCl 的磷酸盐缓冲液洗脱下来的蛋白样品中含有多条杂蛋白,而由含  $900\text{mmol/L}$  NaCl 的磷酸盐缓冲液洗脱下来的蛋白样品中含目的蛋白较多,经凝胶分析,纯度约为 55%(见图 1B 泳道 7 和 8)。再经 Sephadex G-100 层析后,目的蛋白纯度进一步得到提高,约为 80%(见图 1C)。纯化的具体操作见方法部分。结果表明,我们研制的这种纯化 LPTS-L 蛋白的方法操作简单,只用磷酸纤维素 P11 和 Sephadex G100 二步层析就可获得电泳纯的 LPTS-L 蛋白。蛋白 Bradford 定量实验表明 LPTS-L 蛋白的得率约为  $4.7\text{mg/L}$  发酵液。

#### 2.4 LPTS-L 纯化蛋白的免疫检测

为了鉴定我们制备的 LPTS-L 蛋白是否具有免疫原性,我们将纯化的 LPTS-L 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,电转至硝酸纤维素膜上,用兔抗 LPTS-GST 的多抗进行 Western blot 杂交分析。结果显示:抗体与纯化的 LPTS-L 蛋白在约  $40\text{kD}$  处形成了特异的抗原-抗体反应条带(见图 2)。表明用本方法纯化的 LPTS-L 蛋白具有良好的免疫反应原性。

#### 2.5 LPTS-L 纯化蛋白的端粒酶抑制活性测定

我们采用现在比较通用的检测端粒酶活性的方法即 TRAP 法,检测纯化后的 LPTS 蛋白是否具有抑制端粒酶的活性。实验结果表明,磷酸纤维素 P11 加 Sephadex G-100 二步层析法纯化后的 LPTS 蛋白具有明显的端粒酶抑制剂活性。其抑制活力随着加入 LPTS-L 蛋白量的增加而递增(见图 3,3~6)。

Ni 柱亲和层析纯化的 LPTS 融合蛋白的端粒酶抑制活性见图 3(7~10)。用我们建立的纯化方法获得的蛋白其活性与 Ni 柱纯化的 LPTS-L 融合蛋白基本上相仿,获得的重组蛋白很好地保留了 LPTS-L 蛋白的生物学活性。

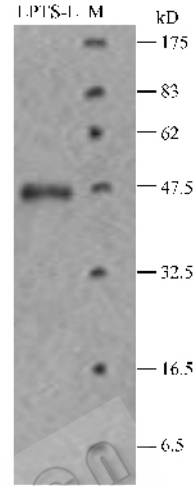


图 2 LPTS-L 蛋白的 Western blot 免疫检测结果

Fig.2 Western blotting analysis of purified LPTS-L protein

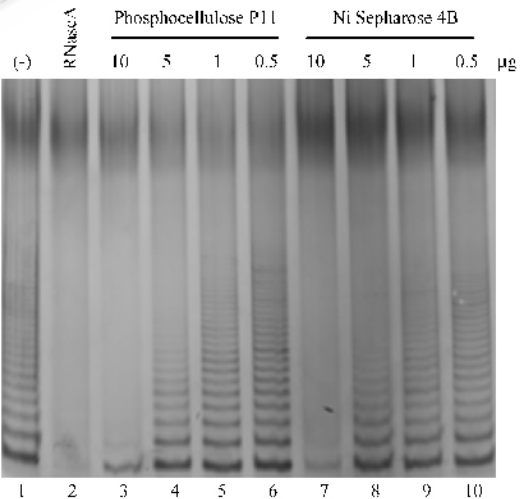


图 3 TRAP 实验分析 LPTS-L 纯化蛋白的端粒酶抑制活性

Fig.3 TRAP assay analysis of the telomerase activity inhibited by purified LPTS-L proteins *in vitro*

1: telomerase activity positive contrast; 2: telomerase activity negative contrast; 3~6: telomerase activity were inhibited by phosphocellulose P11 purified LPTS-L protein with dose dependent manner; 7~10: telomerase activity were inhibited by Ni Sepharose 4B purified LPTS-L protein.

### 3 讨论

LPTS 是由本实验室克隆的一个候选抑癌基因,实验表明 LPTS 基因在肝癌组织及肝癌细胞系中表

过量降低或检测不到,如果将 *LPTS* 基因导入肝癌细胞,能抑制肝癌细胞的生长和增殖。已有的研究还表明 *LPTS-L* 蛋白具有抑制细胞端粒酶的活性。因此,*LPTS* 基因是一个具有重要生理功能,并与肿瘤有关的重要基因。由于目前对 *LPTS* 基因的了解甚少,对 *LPTS-L* 蛋白的结构也未见有报道。研制 *LPTS-L* 蛋白的制备方法,对进一步研究 *LPTS-L* 的结构和功能有一定意义。

本文主要报道了一种制备 *LPTS-L* 蛋白的新方法。通常我们将 *LPTS-L* 基因插入 pET-24a 表达载体,然后在大肠杆菌 BL-21 中进行表达,获得 *LPTS-L*-His 融合蛋白。再经 Ni Sepharose 4B 柱亲和层析,获得 *LPTS-L* 纯化蛋白。在我们的实验中,我们通过优化发酵和诱导条件使 *LPTS-L* 融合蛋白以可溶形式表达,表达产物可占菌体总蛋白的 18%。经 Ni Sepharose 4B 柱纯化,*LPTS-L*-His 融合蛋白纯度可达到 50% 左右。但是,用 Ni Sepharose 4B 纯化蛋白成本较高且不易大量制备,获得带有 His tag 的 *LPTS-L*-His 融合蛋白对后续的结构或功能研究有一定局限,所以我们构建了非融合的 *LPTS-L* 表达载体。在获得高表达 *LPTS-L* 非融合蛋白的基因工程菌后,我们又研制了分离纯化方法,我们成功地采用磷酸纤维素 P11 阳离子交换层析替代 Ni 柱。经磷酸纤维素 P11 阳离子交换层析纯化 *LPTS-L* 蛋白后,*LPTS-L* 蛋白纯度可达到 55%。再经 Sephadex G-100 凝胶过滤层析,*LPTS-L* 蛋白的纯度可达到 80% 以上。Western blotting 实验显示,纯化后的 *LPTS-L* 蛋白与兔抗 GST-*LPTS-L* 的多抗能特异性结合。TRAP 实验显示磷酸纤维素 P11 纯化得到的 *LPTS-L* 蛋白具有明显的端粒酶抑制活性,与 Ni Sepharose 4B 纯化得到的 *LPTS-L* 融合蛋白活性基本一致。但与 Ni Sepharose 4B 相比,用磷酸纤维素来纯化 *LPTS-L* 则具有以下优点:方法简便快速,纯化程度较高,价格低廉,稳定性较好,而且载量高适用于大量的制备纯化,得到的蛋白更接近天然的 *LPTS-L* 蛋白,因此是一种比较理想的 *LPTS-L* 蛋白质纯化方法。这为今后进行 *LPTS-L* 蛋白的研究和应用奠定了良好的基础。

由于 *LPTS-L* 蛋白比较容易降解,采用本方法最后获得的 *LPTS-L* 蛋白的纯度为 80% 还有待提高。因此,*LPTS-L* 蛋白的制备和纯化方法还要改进,比如选择不同的载体系统,不同的发酵条件等等。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Stewart SA ,Weinberg RA. Telomeres : cancer to human aging. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006 **22** :531 – 557.
- [ 2 ] Kim NW ,Piatyszek MA ,Prowse KR ,et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* , 1994 **266**( 5193 ) :2011 – 2015.
- [ 3 ] Blasco MA. Telomeres and human disease : ageing , cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005 **6**( 8 ) :611 – 622.
- [ 4 ] Liao C ,Zhao MJ ,Song H ,et al. Identification of the gene for a novel liver-related putative tumor suppressor at a high-frequency loss of heterozygosity region of chromosome 8p23 in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2000 **33**( 4 ) :1 – 727.
- [ 5 ] Liao C ,Zhao MJ ,Zhao J ,et al. Over-expression of *LPTS-L* in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 induces crisis. *World J Gastroenterol* 2002 **8**( 6 ) :1050 – 1052.
- [ 6 ] Zhou XZ ,Lu KP. The Pin2/TRF1- inter-acting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 2001 **107** :347 – 359.
- [ 7 ] Garg LC ,Reeck GR. Isolation and separation of HMG proteins and histones H1 and H5 and core histones by column chromatography on phosphocellulose. *Protein Expression & Purification* ,1998 **14** :155 – 159.
- [ 8 ] Tamantha K ,Osamu T ,Daniel S ,et al. Expression and purification of recombinant human indoleamine 2 , 3-dioxygenase. *Protein Expression & Purification* 2000 **19** :22 – 29.
- [ 9 ] Rebecca P ,John MG ,Keith SW. Cloning , expression , purification , and characterisation of the dUTPase encoded by the integrated *Bacillus subtilis* temperate bacteriophage SP $\beta$ . *Protein Expression & Purification* 2005 **42** :92 – 99.
- [ 10 ] Sollner S ,Berkner S ,Lipps G. Characterisation of the novel restriction endonuclease *Sui* I from *Sulfolobus islandicus*. *Extremophiles* 2006 **10**( 6 ) :629 – 634.
- [ 11 ] Piergiorgio P ,Nathalie F ,Erica C ,et al. The chromatin remodelling complex WSTF-SNF2h interacts with nuclear myosin I and has a role in RNA polymerase I transcription. *EMBO Reports* ,2006 **7**( 5 ) :525 – 530.
- [ 12 ] Li YL( 李义良 ) ,Song H( 宋海 ) ,Zhao MJ( 赵慕钧 ) ,et al. Preparation and identification of polyclonal antibodies against *LPTS*. *China Biotechnology*( 中国生物工程杂志 ) ,2004 **24**( 3 ) :44 – 47.
- [ 13 ] Sambrook J ,Fritsch EF ,Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> eds ,New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989.
- [ 14 ] Wang JZ( 汪家政 ) ,Fan M( 范明 ) . *The Protein Protocols Handbook*. Beijing Science Press 2001 pp.77.
- [ 15 ] Zhang RG ,Wang XW ,Yuan JH ,et al. Using a non-radioisotopic , quantitative TRAP-based method detecting telomerase activities in human hepatoma cells. *Cell Research* 2000 **10** :71 – 77.