

[文章编号] 1007-385X(2003)01- 0017- 04

人可溶性 4-1BBL 在毕氏酵母中的表达及其协同刺激效应的研究

沈丽琴¹, 徐 颖¹, 黄伟达², 邓忠彬¹, 古 涛¹, 马泓冰¹, 张学光¹(1. 苏州大学生物技术研究所, 江苏 苏州 215007; 2. 上海复旦大学生化系, 上海 200433)

[摘 要] 目的: 通过甲醇营养型毕氏酵母蛋白质表达系统,表达出具有生物活性的人可溶性 4-1BBL 重组蛋白。方法: PCR 方法从 XG-4-1BBL 转基因细胞中获得 4-1BBL 的胞外段基因;利用酵母表达载体 pPICZαA 构建重组质粒 pPICZαA-s4-1BBL,经线性化后电转化导入毕氏酵母 GS115 中,甲醇诱导表达;SDS-PAGE 蛋白电泳和 Western blot 分析发酵上清中 hs4-1BBL 蛋白表达水平及其特异性;体外 T 细胞增殖试验(³H-TdR 掺入法)观察 rhs4-1BBL 蛋白的生物学活性。结果: (1)成功地扩增到 4-1BBL 的胞外段基因,酶切鉴定及测序结果与已知的基因序列一致;(2)SDS-PAGE 蛋白电泳和 Western blot 结果显示所获重组蛋白的分子量与预期分子量(21 kD)相同,并可被 4-1BBL 特异性抗体识别;(3)重组蛋白在体外具有协同促进 T 细胞增殖的效应。结论: 成功地在毕氏酵母表达系统中表达出具有生物学活性的人可溶性 4-1BBL 重组蛋白,为进一步研究其功能奠定了物质基础。

[关键词] 人可溶性 4-1BBL; 毕氏酵母; 表达; 协同效应

[中图分类号] R392.1 [文献标识码] A

Expression of Recombinant Human Soluble 4-1BBL in Yeast Pichia Pastoris and It's Costimulating Activity on T Cells

SHEN Li-qin¹, XU Ying¹, HUANG Wei-da², DENG Zhong-bing¹, GU Tao¹, MA Hong-bing¹, ZHANG Xue-guang¹(1. Institute of Biotechnology of Suzhou University, Suzhou 215007; 2. Department of Biochemistry, Fudan University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective:** Methyilotropic yeast pichia pastoris system was used to express recombinant human soluble 4-1BBL protein with biological activity. **Methods:** According to the nuclear acid sequence coding human soluble 4-1BBL, we cloned the genes with PCR from XG-4-1BBL transfection cell line,then the gene fragment for extracellular domain was subcloned into the PUCm-T vector and sequence of s4-1BBL cDNA was confirmed by sequencing. The s4-1BBL gene was inserted into the pPICZαA , which was transformed into Pichia pastoris GS115 by linearized electroportion. The recombinant protein was identified by the assay of SDS-PAGE and Western-blot. Costimulating activity of rhs4-1BBL on T cell proliferation *in vitro* was evidenced by ³H-TdR incorporation assay. **Results:** The s4-1BBL cDNA was successfully obtained and insected into pPICZαA. The protein molecular weight of hs4-1BBL in the yeast supernamant was about 21 kD by SDS-PAGE analyses ,and the specificity was identified by western blot. Finally, rhs4-1BBL protein could costimulate the proliferation of T cells *in vitro*. **Conclusion:** The rhs4-1BBL protein was efficiently expressed in Pichia pastoris (GS115)and showed natural biological activities. And it may provide a valuable materials for further study of 4-1BB/4-1BBL.

[Key words] hs4-1BBL; Pichia pastoris; expression; costimulating activity

* 4-1BB 配体(4-1BBL)是目前倍受关注的一种共刺激分子,属肿瘤坏死因子(TNF)超家属成员,其基因定位于人 19p13.3 染色体上,主要表达在抗原递呈细胞(APC),包括 CD40L 活化的 B 细胞,γ-IFN 活化的巨噬

[基金项目] 国家重大基础研究项目(20001CB51003)资助
[作者简介] 沈丽琴(1969-), 女,苏州市人,博士生,主要从事免疫方面的研究。

细胞和树突状细胞,还可在 B 细胞性恶性肿瘤细胞株及单核细胞上表达。4-1BBL 是 II 型跨膜糖蛋白,编码人 4-1BBL 的 cDNA 含有 768 bp 组成的阅读框架,全长 255 个氨基酸,成熟蛋白分子量为 27 kD 左右,由细胞外区、跨膜区和胞浆内区组成。细胞外区 cDNA 约 621 bp,编码可溶性 4-1BBL 蛋白,含有多个糖基化位点^[1],呈现在机体体液中。业已表明,可溶性 4-1BBL 具有膜型 4-1BBL 相同的生物学功能。鉴此,采用基因工程方法,克隆和表达人可溶性 4-1BBL 重组蛋白具有重要的研究和潜在的应用价值。本研究从转染 4-1BBL 基因的人多发性骨髓瘤细胞株(XG-4-1BBL)中克隆出 4-1BBL 的胞外段基因片段(s4-1BBL),然后在毕氏酵母蛋白表达系统中进行表达,并对所获重组蛋白的生物学特性进行初步鉴定和分析。

1 材料与方法

1.1 材料

TriZOL, PUCm-T, pPICZαA 和大肠杆菌株 TOP10 分别购自 GIBCO, 美国 Stratagene 公司。瑞典 Pharmacia 公司。T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Xho I、Xba I、pfuDNA 多聚酶、逆转录酶均购自大连 Takara 公司。含 Amp 抗性质粒的菌株液体培养于 LB 培养基中加入氨苄青,终浓度为 60 μg/ml。X-gal, IPTG 购自 Sigma 公司。Tryptone 和 Yeast Extract 购自 Oxoid 公司。化学发光(Western-Blot)药盒由 Boehringer Mannheim (Germany)提供。CD3, CD28 激发型单抗、羊抗鼠磁珠二抗、鼠抗人 4-1BBL 单抗均购自法国 Immunotech 公司。³H-TdR 购自中国北京原子能研究所。XG-4-1BBL 转基因细胞由法国 INSERM 432U Klein 教授赠送。Uno-Q 柱购自美国 Pharmacia 公司。

1.2 PCR

从 XG-4-1BBL 转基因细胞中抽取总 DNA,然后根据 s4-1BBL 分子碱基序列在其两端设计上下游引物,上游引物: 5'-GAGGCTGAAGCATTCAGGATCCTTG-TAGTAAC-3'; 下游引物: 5'-AAGCTTCTAGATCAGATGATCTGCGGAGAGTG-3', 由上海博亚公司合成,引物 5'端及 3'端分别携带 Xho I, Xba I 限制性内切酶酶切位点。PCR 参数为: 95℃ 预变性 5 min 后加入 Taq 酶, 95℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min 为一个循环,扩增 35 个循环,最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10 min,取 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.3 序列分析

从低熔点琼脂糖凝胶中回收特异性扩增片段,再与 PUCm-T 质粒连接并转化感受态大肠杆菌 TOP10,以含 AMP 的 LB 平板培养转化菌,同时进行蓝、白斑筛

选,挑取阳性克隆经 LB 培养后,在博亚生物技术公司的 ALF 型 DNA 自动测序仪上以末端终止法进行核苷酸序列测定。

1.4 pPICZαA-s4-1BBL 质粒的构建

可溶性 4-1BB(s4-1BB)基因片段,继用 Xho I, Xba I 双酶切后转入相应酶切的 pPICZαA 酵母表达载体,构建重组质粒 pPICZαA-s4-1BBL,经酶切和 PCR 等方法鉴定正确后再用 SACI 酶切线性化后电转化导入感受态的 GS115 酵母菌株,涂布于含 50 μg/ml zeocin 的 YPDS 板上,30℃ 培养箱中放置 3~4 d,挑选 zeocin 抗性的阳性克隆,甲醇进行诱导表达。

1.5 s4-1BBL 在酵母 GS115 中的表达

从 YPDS 板挑取多个克隆,分别放入 BMGY 培养基中,30℃, 250 r/min 震荡 18~24 h,当 OD₆₀₀ 值达 2.0~6.0,离心,弃上清,沉淀用 BMMY 培养基重悬,调整 OD₆₀₀ 值至 0.6~1.0,30℃, 250 r/min 震荡,每 24 小时加终浓度为 1% 甲醇进行诱导表达,分别于第 24, 48, 72 小时吸出培养液离心,取上清 60 μl,加上 30 μl SDS 电泳上样缓冲液,12% SDS-PAGE 电泳,考马斯兰 R-250 染色,根据标准分子量确定表达产物的分子量。

1.6 免疫印迹试验(Western blot)

实验参照德国宝灵曼公司试剂盒(Western blot Kit)说明书进行,即表达产物经 12% SDS-PAGE 电泳后,电转移法将蛋白转印至硝酸纤维素膜上,以鼠抗人 4-1BBL 单抗(1 μg/ml)为第一抗体,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为第二抗体,化学发光检测系统对表达产物进行鉴定。

1.7 rhs4-1BBL 的分离纯化

100 ml 酵母上清用 20 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)于 4℃ 进行透析 24 h,期间换液 6 次,透析液高速离心(12 000 r/min),10 min 后上样于 1 ml 的 Uno-Q 阴离子柱,20 mmol/L Tris-HCl NaCl 进行梯度洗脱,收集流出峰,经 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定后留取目的管,过滤除菌和分光光度仪定量。

1.8 纯化的 T 淋巴细胞制备

外周血单个核细胞(PBMC)经 2~3 h 贴壁去除贴壁细胞后加入鼠抗人 CD19 和 CD56 单抗共孵育 0.5 h 后再加入磁珠二抗过柱,经阴性选择获得纯化的 T 细胞群体。

1.9 T 细胞体外激发培养和³H-TdR 掺入试验

人 CD3 激发型单抗按 10 μg/ml 包板(96 孔),4℃ 过夜,第 2 天加入纯化的人外周血 T 淋巴细胞(每孔 10⁴/100 μl),分成 6 个实验组① CD3(10 μg/ml);② s4-1BBL(1 μg/ml);③ CD28 激发型单抗(10 μg/ml);④ CD3 + s4-1BBL(1 μg/ml);⑤ CD3 + CD28;⑥ CD3

+ s4-1BBL + CD28;和 T 细胞共培养,每组置 4 个复孔,第 5 天加入³H-TdR 3.7 × 10⁴ Bq/well,37℃ 共培养 12 h,收集细胞测放射性核数每分钟闪烁计数(CPM)。

2 结 果

2.1 hs4-1BBLcDNA 的克隆及序列分析

通过所设计的 hs4-1BBL 基因的上下游引物和 PCR 方法,以转基因细胞的 DNA 为模板,获得 s4-1BBL 的特异性片段,为 621 bp(图 1),同时将 PCR 产物亚克隆于 PUCm-T 质粒,阳性重组子经核苷酸序列测定表明其编码区序列与文献报道一致。

图 1 PCR 产物的凝胶电泳(4-1BBL 胞外段基因)
Fig.1 Identification of amplified PCR products
M: DNA marker; 1: PCR product

2.2 pPICZαA-s4-1BBL 表达质粒的鉴定

将测序正确的 s4-1BBL 基因片段与酵母细胞表达载体 pPICZαA 连接,构建成重组质粒 pPICZαA-s4-1BBL,经 Xho I ,Xba I 双酶切鉴定正确(见图 2)。将其电转化酵母菌株 GS115 后筛选到高拷贝 zeocin 抗性酵母细胞菌株 GS115-s4-1BBL。

图 2 重组表达质粒的鉴定
Fig.2 Analysis of recombinant plasmid pPICZαA-s4-1BBL
1: PCR product; 2,3: pPICZαA; 4: pPICZαA-s4-1BBL; Plasmid 5: pPICZαA-s4-1BBL digested with Xho I and Xba I

2.3 rhs4-1BBL 的表达及鉴定

GS115-s4-1BBL 经甲醇诱导不同时间的酵母上清经 SDS 电泳分析显示,在 21 kD 处有一特异条带,并发现经甲醇诱导 72 h s4-1BBL 表达量最高(见图 3),经 Western blot 结果证实该蛋白条带能与 4-1BBL 单抗特异结合。

图 3 GS115 在摇瓶内培养不同时间发酵液的 SDS-PAGE 电泳分析
Fig.3 SDS-PAGE analysis of GS115 supernatant produced in the flask.
M: Protein molecular weight markers; 1, 2: 12 h after methanol induction; 3: 24 h after methanol induction; 4: 48 h after methanol induction; 5: 72 h after methanol induction; 6: 96 h after methanol induction

2.4 rhs 4-1BBL 的分离纯化

透析上清加样速度为 0.5 ml/min,Tris-HCl /1N NaCl 梯度洗脱,速度为 0.5 ml/min,全自动收集仪收集流出液,出现的较高洗脱峰经 SDS-PAGE 电泳证实为含目的蛋白的主峰(图 4),并经紫外分光光度仪初步定量约 30 μg/ml。

图 4 纯化后的 s4-1BBL 电泳分析
Fig.4 Analysis of purified rhs4-1BBL by SDS-PAGE
M: Protein molecular weight markers; 1: Culture supernatant of transformed of pichia pastoris with pPICZαA; 2: Crude protein; 3: Purified s4-1BBL protein

2.5 重组蛋白(rhs4-1BBL)具有协同刺激 T 细胞增殖

效应,³H-TdR 实验结果表明(图5),加入 s4-1BBL 重组蛋白组对 T 细胞增殖的刺激指数(CPM)值明显高于单独 CD3 刺激组,和 CD28 激发型单抗作用相似,而且两者具协同效应,由此表明所获得 rhs4-1BBL 具有良好的协同激发 T 细胞增殖的生物学功能。

图5 重组蛋白(rhs 4-1BBL)对 T 细胞促增殖作用的分析

Fig. 5 Promotion of proliferation of T cells by rhs4-1BBL protein

3 讨论

T 细胞活化依赖于双信号作用^[1],即除 Ag-MHC 复合物提供的特异性抗原刺激信号外,还需要共刺激信号,T 细胞只有获得这双重信号后,才能发生有效的活化、增殖进而发挥其功能,如分泌细胞因子或细胞毒性 T 细胞(CTL)的溶细胞效应。若失去第一信号,可导致 T 细胞失活。同样,若缺乏共刺激信号,T 细胞将进入无反应状态,甚至发生凋亡^[2]。

虽然 CD28 分子是最早被公认的共刺激分子,它提供了 T 细胞早期活化信号。但活化后 T 细胞通过耗竭自分泌的生长因子 IL-2 会降低或中止其继续增殖,此时必须加入外源性 T 细胞生长因子,例如 IL-2。近年发现,4-1BB/4-1BBL 相互作用介导的生物学功能主要是促进 T 细胞活化、增殖和分泌细胞因子,如可使 CD8⁺ T 细胞产生 IL-2 和 IFN- γ ,还能使 CD4⁺ T 细胞产生 IL-2 及 IL-4,和增强 CTL 的功能^[3],可维持 CD4⁺, CD8⁺ T 细胞较长时间的存活,延长其免疫应答效应。其可能机制为^[4-5]:4-1BB 与 4-1BBL 结合后发生的信号传导通过 TRAF2-NIK 通路活化了 NF- κ B(NF-induced kinase),从而抑制了活化诱导的细胞凋亡(AICD),并能促进 T 细胞生长因子的分泌。也有研究表明,4-1BB/4-1BBL 的信号传递可能与 P38-MAPK(有丝分裂原活化的蛋白激酶)通路有关^[6]。若 TRAF2 缺

陷的小鼠,可对 4-1BB 的激发不产生反应,也不能介导 IL-2 的产生。所以,4-1BB 分子的配基化为 T 细胞活化后增殖提供了独立于 CD28 外的共刺激信号。另外,4-1BB 和 CD28 相互作用,上调了 T 细胞内 Bcl-2, Bax-XL 等抗凋亡基因的表达,发挥协同抗凋亡作用,因此,二者对 T 细胞增殖具显著的协同刺激效应。

4-1BBL 有膜结合型和 21 kD 的可溶性两种形式,尽管体内 4-1BBL 主要以膜型蛋白存在,但其胞外段可被特定蛋白酶所溶解,以可溶性形式释放于血中,体内外实验表明,可溶性 4-1BBL(s4-1BBL)蛋白具有与膜型蛋白一样的生物学活性。

采用基因工程方法克隆和表达具有生物学活性的人可溶性 4-1BBL 重组蛋白,具有重要的理论研究和应用价值。目前国内尚未开展相关工作。毕氏酵母表达系统也是近年来逐渐为人们所重视,其有明显的优势^[7]:体外较易诱导表达,并可进行高密度培养,从而提高表达量;表达的蛋白直接分泌于培养上清中,且自身仅分泌少量内源性蛋白,故易于纯化;对表达的蛋白可进行适当的糖基化,保持产品的生物活性;有此可见,毕氏酵母是当前较为理想的外源基因表达系统,适合基因工程产品的研制和开发。

[参考文献]

- [1] Goofwin RG, Din WS, Davis-Smith T, *et al.* Molecular cloning of a ligand for the inducible T cell gene 4-1BB: A member of an emerging family of cytokine with homology to tumor necrosis factor [J]. *Eur J Immunol*, 1993, 23: 2631-2641.
- [2] Tan JT, Whitmire JK, Ahmed R. 4-1BB ligand, a member of TNF family, is important for generation of antiviral CD8 T cell responses [J]. *J Immunol*, 1999, (9): 4859-4868.
- [3] Cohn M, At Cannons JL, Lau P, *et al.* 4-1BB ligand induces cell indivision, sustains survial, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cell with similar efficacy[J]. *J Immunity*, 2001, 167 (3): 1313-1324.
- [4] Inn K, Jang Z, Lee H, *et al.* Human 4-1BB signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor NF- κ B[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 242: 613-620.
- [5] Hurtado JC, Kwon BS, Yong J, *et al.* Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cell and inhibit activation-induced cell death[J]. *J Immunol*, 1997, 158: 2600-2609.
- [6] Cannons JL, Choi Y, Watts TH, *et al.* Role of TNF receptor-association factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB dependent immune response[J]. *J Immunol*, 2000, 165(11): 6193-6204.
- [7] Paifer E, Margolles E, Cremata J, *et al.* Efficient expression and secretion of recombinant alpha amylas in pichia pastoris using two different signal sequences[J]. *Yeast*, 1994, 10: 1415-1419.

[收稿日期] 2002-10-21

[修回日期] 2003-01-10