

[文章编号] 1007-385X(2004)01-0053-04

TRAIL 基因原核表达载体的构建、表达与抗体制备

方琴¹, 孙等军², 张旭³, 任志娟³, 肖芸³, 刘丰丰¹, 吴正宇¹, 文小平², 王季石³(1. 贵阳医学院附属医院药剂科, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附属医院肿瘤科, 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院附属医院血液科, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 获取抗肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TRAIL)抗体。方法: 利用 PCR 技术和基因重组技术将 TRAIL 基因构建于原核表达载体 pPreTMH-Tb 中, 经酶切、测序鉴定证实构建完全正确后, 通过 IPTG 诱导在大肠杆菌 DH-5 α 中获得表达, 并将 TRAIL 蛋白免疫家兔, 通过 Dot blot 及 Western blot 检测抗 TRAIL 抗体的产生。结果: 成功构建 TRAIL 基因原核表达载体, 并在大肠杆菌 DH-5 α 中获得表达, TRAIL 蛋白表达量占菌体蛋白质总量的 11.8%, Dot blot 及 Western blot 检测证实获得了抗 TRAIL 抗体。结论: 成功制备抗 TRAIL 抗体, 这为 TRAIL 在真核细胞水平研究奠定了实验基础。

[关键词] 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体; 基因表达; 大肠杆菌

[中图分类号] R73-36+2 **[文献标识码]** A

Construction of Prokaryotic Expression Vector of TRAIL Gene and Preparation of Anti-TRAIL Antibody

FANG Qin¹, SUN Deng-jun², ZHANG Xu³, REN Zhi-juan³, XIAO Yun³, LIU Feng-feng¹, WU Zheng-yu¹, WEN Xiao-ping², WANG Ji-shi³(1. Department of Pharmaceutics, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 3. Department of Hematology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the anti-TRAIL antibody. **Methods:** A prokaryotic expression vector pPre-TMHTb was constructed by PCR and recombinant DNA techniques and was confirmed by enzymatic digestion and sequence analysis. TRAIL protein induced to express by IPTG in *E. coli* DH-5 α . After TRAIL protein immunised rabbits, anti-TRAIL antibody was tested by Dot blot and Western blot. **Results:** A prokaryotic expression vector pPre-TMHTb was constructed and expressed in *E. coli* DH-5 α . TRAIL protein was detected up to 11.8% of the total bacterial protein expressed and anti-TRAIL antibody was tested by Dot blot and Western blot. **Conclusions:** The anti-TRAIL antibody was obtained that provides an experimental basis for the studies of TRAIL in eukaryotic level.

[Key words] TNF-related apoptosis-inducing ligand; gene expression; *escherichia coli*

* 正常凋亡机制失控是肿瘤细胞无限增殖的重要原因, 涉及到死亡受体通路下调, p53 基因突变及异常 bcl-2 途径激活等, 其中死亡分子受体与其配体结合诱导凋亡起着关键性作用。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)基因定位于染色体 3q26, 是新发现的存在细胞表面具有选择性介导肿瘤细胞凋亡的细胞因子配体, 在多种组织和细胞中广泛表达^[1]。为了研究 TRAIL 的生物学

活性, TRAIL 基因构建于原核表达载体中, 通过 IPTG 诱导在大肠杆菌 DH-5 α 中得到高效表达, 经过初次及加强免疫大白兔, 获得了抗 TRAIL 特异性抗体, 这为以后进行更深入的研究奠定了实验基础。

[基金项目] 贵州省省长专项(No. S2001-14)资助

[作者简介] 方琴(1960-), 女, 贵州贵阳人, 副主任药师, 主要从事肿瘤临床药理研究

1 材料与方 法

1.1 菌株与质粒

E. coli DH-5 α 为本实验室保存;质粒载体 pPreTMH-Tb 与 TRAILcDNA 由中科院上海细胞所提供。

1.2 酶与主要试剂

限制性酶 BamH I, Xba I, T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;IPTG 华美生物工程公司产品;硝酸纤维素膜与弗氏完全佐剂购自上海生物工程公司;HRP 标记的抗兔 IgG 羊 mAb 为 S_{ABC} 公司产品;3,3-二氨基联苯胺购自上海五联化工厂;柱离心胶回收试剂盒为华舜生物工程公司产品;DNA 和蛋白 Marker 购自 TaKaRa 公司。

1.3 动物

大白兔由贵阳医学院动物房提供。

1.4 TRAIL 原核表达载体的构建

质粒载体 pPreTMH-Tb 与 TRAILcDNA 经限制性酶 BamH I, Xba I 双酶切后,行琼脂糖凝胶电泳分离,根据试剂盒进行胶回收。取纯化的 TRAILcDNA 片段 9 μ l, pPre-TMHTb 空载体 3 μ l, T₄ DNA 连接酶 2 μ l, Buffer 1 μ l, ddH₂O 补至总体积 20 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。次日将连接产物转化感受态大肠杆菌 DH-5 α , 涂布于含 100 μ g/ml 的氨苄青霉素(AP) LB 板, 37 $^{\circ}$ C 倒置过夜后, 挑选菌落进行鉴定。重组表达质粒命名为 pPTb/TL。

1.5 pPTb/TL 重组体的酶切鉴定

常规小规模抽提质粒 pPTb/TL 后, 根据下列体系进行酶切鉴定: pPTb/TL 5 μ l, 10 \times Buffer 1 μ l, BamH I 与 Xba I 各 1 μ l, 用 ddH₂O 补至总体积 20 μ l, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 90 min。取 20 μ l 酶切产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 于紫外灯下观察结果。鉴定正确后质粒扩增, 并行 ABI377 全自动测序仪测定 DNA 序列。

1.6 TRAIL 基因在大肠杆菌中表达

挑取已鉴定正确的 pPTb/TL 克隆接种于含 AP 的 LB 烧瓶中, 37 $^{\circ}$ C 摇振至菌液 A590 达 0.5 ~ 1.0 加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L, 继续培养 6 h, 同时诱导空载体 pPreTMH-Tb。取 1 ml 菌液, 5 000 r/min 离心 5 min, 100 μ l PBS 重悬菌体。取上述样本 10 μ l 加入等体积的上样缓冲液 100 $^{\circ}$ C 变性 3 min, 上样行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分析 TRAIL 基因在大肠杆菌 DH-5 α 的表达情况, 并用薄层扫描仪计算 TRAIL 蛋白在菌体总蛋白质中的百分含量。

1.7 TRAIL 抗体的制备

将 TRAIL 蛋白条带从 PAGE 凝胶中切下, 用等量弗氏完全佐剂乳化后于家兔背部皮下多点注射, 这是初次免疫。5 周后用 1/3 初次免疫量的蛋白-佐剂混合

物于兔子大腿肌肉加强免疫, 7 ~ 10 d 后耳缘静脉取血, 检测抗体产生。

1.8 Dot blot 检测抗体产生

取 1 μ l 含 TRAIL 蛋白的细菌裂解液点于一甲醇(39 mmol/L 甘氨酸, 48 mmol/L Tris 碱, 0.037% SDS, 20% 甲醇) 处理过的硝酸纤维素膜上, 室温干燥 30 min, 加封闭液(5% 脱脂奶粉, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5) 室温孵育 2 h。分别用免疫前、后抗血清作为一抗与点样蛋白起反应。血清用样品稀释液(5% 脱脂奶粉, 150 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5) 作 1:100 稀释, 将滤膜与稀释血清室温孵育 2 h。抗 TRAIL 抗体用 HRP 标记的抗兔 IgG 羊 mAb 与显色底物(50 mmol/L Tris-HCl, pH7.5, 0.6 mg/ml, 3,3-二氨基联苯胺, 0.3% NiCl 1 ml, 30% H₂O₂ 10 μ l) 检测, 待显色后照相保存。

1.9 Western blot 分析

浇制 PAGE 电泳胶, 上样重组体 pPTb/TL 表达菌体, 以空载体 pPreTMH-Tb 诱导菌体作对照, 经电泳分离后, 用湿转移法转印到硝酸纤维素滤膜上, 后操作同 Dot blot。

2 结 果

2.1 酶切鉴定重组质粒 pPTb/TL

重组体 pPTb/TL 抽提质粒经限制性酶 BamH I, Xba I 双酶切后可见 710 bp 的 DNA 条带, 结果(图 1)。将酶切鉴定正确的 pPreTMH-Tb 质粒行 DNA 序列测定, 结果读框完全正确。

图 1 pPTb/TL 原核表达载体酶切鉴定

Fig. 1 Digestive identification for prokaryotic expression vector pPTb/TL

1: DNA marker; 2: TRAIL gene; 3: pPreTMH-Tb; 4: pPTb/TL

2.2 TRAIL 基因的表达

与空载体 pPre-TMHTb 对照组相比,以 IPTG 诱导的 pPTb/TL 在 Mr. 约为 26 kD 处有一明显高表达带,此结果与预测分子量是一致的,表明 TRAIL 基因在大肠杆菌中得到高效表达(图 2)。经薄层扫描仪计算分析 TRAIL 蛋白占菌体总蛋白质的 11.8%。

图 2 TRAIL 在 DH-5 α 受体菌中诱导 6 h 表达情况

Fig. 2 The expression of TRAIL induced with IPTG for 6 h in DH-5 α

1-4, 7-10: pPTb/TL; 5: Marker; 6: pPreTMH-Tb

2.3 Dot blot 检测抗体产生

加强免疫 8 d 后,兔耳缘静脉取血,用其抗血清作为一抗进行杂交,同时用未免疫前的兔血清作对照。结果可见实验组有明显的深色斑点,而免疫前对照组未见明显杂交斑点,这说明抗体已产生(图 3)。同时采用加热变性与不变性的表达菌体作为抗原杂交,结果均见深色杂交斑点,此说明蛋白加热变性并不影响其抗原性(图 4)。

图 3 Dot blot 检测抗体产生的分析

Fig. 3 The analysis by Dot blot with anti-serum that immuned with TRAIL protein

2.4 表达产物的 Western blot 分析

通过 Western 分析看出含 TRAIL 蛋白的泳道在 26 kD 分子量处有一明显的特异性杂交带,而空载体 pPreTMH-Tb 对照组无此带,此结果说明 Dot blot 证实

所产生的抗体是 TRAIL 特异性抗体,结果见(图 5)。

图 4 变性与不变性抗原的 Dot blot 分析

Fig. 4 The analysis by Dot blot with different antigen

A: Dot blot with undenaturated antigen;
B: Dot blot with denaturated antigen

图 5 Western blot 的特异性分析

Fig. 5 Identification of the characteristic of anti-TRAIL antibodies by Western blot

1: Marker; 2-6: TRAIL protein; 7-8: Control

3 讨 论

自从 Wiley 和 Robert 于 1995 年发现和克隆人 TRAIL 基因以来,TRAIL 的研究已成为当今的热点。与以往细胞因子配体相比,如 TNF- α 和 FasL 等,TRAIL 不仅同样对多种肿瘤细胞有很强的凋亡诱导作用,而且还具有以往细胞因子所不可比拟的优点。(1)靶向性强:TNF- α 和 FasL 对某些肿瘤细胞有较强的杀伤作用,但同时正常组织有明显的损伤,甚至引起严重副作用,因而限制了其在治疗肿瘤中的应用。TRAIL 能选择性介导肿瘤细胞凋亡而对正常组织和细胞无损伤,这是因为 TRAIL 有 4 种受体 DR4, DR5, DcR1, DcR2^[2],均定位于染色体 8p22-21,具有较高的同源性。DR5 在结构上与 DR4 很相似,膜内区有一段死亡结构域(death domain, DD)能传递死亡信号。而 DcR1, DcR2 则称为假性受体(Decoy receptors),是一种糖磷脂膜锚定蛋白,与 DR4, DR5 结构同源,在胞外有

T 结合区,但胞内的 DD 缺失或突变,因而二者都不能传递死亡信号。二者均在正常组织中广泛表达,而在肿瘤组织中不表达^[3]。因此,正常细胞由于有 DcR1, DcR2 和 DR4, DR5 竞争结合 TRAIL 而免受其攻击,肿瘤组织则由于缺乏 DcR1 和 DcR2 的保护而易被 TRAIL 诱导细胞凋亡^[4]。(2)分布广: FasL 仅局限的表达于激活的 T 细胞、NK 细胞和免疫赦免区,而 TRAIL 广泛表达于脾、前列腺、肺、肝、肾和外周淋巴细胞等人体组织,但在脑组织中未见表达^[5]。国外最新研究表明, TRAIL 对结肠癌、肺癌、乳腺癌、肾癌、皮肤癌、脑肿瘤、白血病细胞等都有明显的细胞毒性。因此 TRAIL 具有广泛的应用前景,有望成为一种新的抗肿瘤药物^[6]。

本实验中,我们将 TRAIL 基因通过限制性酶切构建于原核表达载体 pPre-TMHTb 中,酶切、测序鉴定正确后通过 IPTG 诱导在大肠杆菌获得高效表达,将获得的高表达 TRAIL 蛋白免疫家兔,经过初次及加强免疫后,行 Dot blot 及 Western blot 检测,结果显示抗 TRAIL 特异性抗体产生。抗 TRAIL 抗体的成功制备为 TRAIL 在真核细胞的表达检测等更深入的研究方面奠定了实验基础^[7]。

· 科技动态 ·

LPS 或全菌体阻断体内炎性单核细胞向树突状细胞(DC)的转化

DC 是位于体内淋巴和一些非淋巴组织的专职性抗原提呈细胞(APC),它在机体免疫系统防御外来病原微生物的过程中起到很重要的作用。体内的迁移 DC 可以来源于驻留在外周组织中的 DC,也可以来源于血液中的单核细胞。研究表明一些细胞因子和内环境的因素会影响单核细胞向巨噬细胞或向 DC 的分化。由于 DC 所起的重要抗原提呈作用,当机体受感染后产生迁移 DC 的能力就直接决定着获得性免疫能力的强弱。通过皮下注射活的或已灭活的细菌或者 LPS,诱导了强烈的局部先天免疫应答从而阻断了单核细胞分化生成 DC 以及向引流淋巴结(DLN)的迁移。表明强烈的先天免疫应答能抑制机体对颗粒性抗原的获得性免疫反应。

将实验用小鼠腹腔麻醉后在其背部割伤 4 处,来诱导炎症反应,它们分别由腹股沟和臂部的淋巴结(LN)引流。通过向割伤处注射 FITC latex 小珠标记的革兰阴性菌,发现 DC 向 DLN 的迁移受到抑制,并且与注射处细菌呈浓度依赖性关系。以同样方法向对侧割伤处注射,发现近侧的 DC 迁移并未受到影响,说明 DC 迁移的抑制是由局部因素引起的。另外实验发现用灭活的细菌或单纯的 LPS 注射同样能抑制 DC 的迁移。当皮下注射细菌而将 FITC 涂抹于小鼠的表皮上时,观察朗格汉斯细胞(LC)的迁移没有受到细菌的抑制,表明这种抑制仅局限于注射处的 DC。进一步实验表明细菌对 DC 迁移的抑制在根本上是对单核细胞向 DC 分化的抑制。若将炎症反应处搜集的 latex + cell 在没有细菌存在的情况下再次腹腔注射,没有产生迁移 DC,这就说明细菌对 DC 分化的抑制是不可逆的。当用 LPS 诱导 TLR4 发生突变的 C3H/HeJ 小鼠时,发现单核细胞的迁移并未受影响,所以这种抑制也并非只是由于 TLR4 的作用。与此同时,又发现这种由于细菌导致的抑制还同炎性细胞的存在有关,对它的发生起到一定的协助作用。进一步分析了细胞因子在其中的作用,结果显示 IL-10、IL-6 或 INF- γ 等细胞因子不足以引起 DC 的分化受阻,但是 IL-12-p40 在这个作用中起到一定的作用。

上述研究表明细菌或 LPS 能有效抑制体内炎性部位 DC 的分化以及其向 DLN 的迁移,由于体内其它 DC 提呈颗粒性抗原的能力不强,而迁移 DC 提呈抗原受抑制,最终导致机体对外来细菌类型的颗粒性抗原的获得性免疫降低,也就是细菌关联的信号在获得性免疫中起到负向调节的作用。

[参考文献]

- [1] Wiley SR, Schooley K. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3: 673-682.
- [2] Bonavida B, Ng CP, Jazirehi A, et al. Selectivity of TRAIL-mediated apoptosis of cancer cells and synergy with drugs: The TRAIL TO nontoxic cancer therapeutics[J]. Int J Oncol, 1999, 15: 793-802.
- [3] El-Deiry WS. The TRAIL to an anti-cancer agent[J]. Drug Resist, 1999, 2: 79-80.
- [4] Keane MM, Etenberg SA, Nau MM, et al. Chemotherapy augments TRAIL-induced apoptosis in breast cell line[J]. Cancer Res, 1999, 59: 734-741.
- [5] Griffith TS, Broghammer EL, et al. Suppression of tumor growth following intralesional therapy with TRAIL recombinant adenovirus [J]. Mol Ther, 2001, 4: 257-266.
- [6] Yamashita Y, Shimada M, Tanaka S, et al. Electroporation-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L gene therapy for hepatocellular carcinoma[J]. Hum Gene Ther, 2002, 13: 275-286.
- [7] 薛胜利,冯作化,张桂梅,等. TRAIL 真核表达治疗肝细胞癌作用的研究[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2002, 9(3): 158-162.

[收稿日期] 2003 - 05 - 26

[修回日期] 2003 - 09 - 15