

# 肿瘤坏死因子- $\alpha$ 转换酶基因金属蛋白酶区的克隆及表达

张玉心<sup>1</sup>, 马涛<sup>2</sup>, 陈治文<sup>1</sup>, 夏俊<sup>1</sup>

[摘要]目的: 克隆和构建含有肿瘤坏死因子- $\alpha$  转换酶金属蛋白酶区 (metalproteinase domain of human tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme TACEmp) 基因表达载体, 并在大肠埃希菌中高效表达。方法: 用 RT-PCR 方法, 从 THP-1 细胞中扩增出 TACEmp 基因片段, 插入表达载体 pET-DsbA<sup>mut</sup>, 用限制性酶切和 DNA 测序进行鉴定; 转化到大肠埃希菌 BL21 中进行诱导表达, 通过 SDS-PAGE 电泳分析表达产物。结果: 克隆 TACEmp 基因并构建重组表达载体 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp 转化入 BL21, IPTG 诱导后获得高效表达的 TACEmp 融合表达蛋白。结论: 利用分子伴侣融合蛋白技术使 TACEmp 在原核表达系统中获得了高效可溶性表达。

[关键词] 肿瘤坏死因子- $\alpha$  转换酶; 二硫键异构酶; 基因克隆; 原核表达

[中国图书资料分类号] R 730.3 [文献标识码] A

## Cloning and expression of gene encoding metalloproteinase domain of tumor necrosis factor $\alpha$ converting enzyme

ZHANG Yuxin MA Tao CHEN Zhiwen XIA Jun

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College Bengbu 233030 China)

[Abstract] **Objective** To construct expression vector of the metalloproteinase domain of human tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme (TACEmp) and express its protein in *E. coli*. **Methods** RT-PCR and sequencing were used to clone and confirm the TACEmp gene. The fusion expression vector was constructed with the prokaryotic expression vector including disulfide isomerase dsbA gene and the TACEmp, named pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp and transformed into *E. coli* BL21. After induced by IPTG, expression product was analyzed by SDS-PAGE. **Results** TACEmp was cloned by RT-PCR. The recombinant vector pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp was constructed. The fusion protein was expressed at high level in *E. coli*. **Conclusions** The TACEmp was expressed at high level in prokaryotic expression system by using fusion protein technology. The expression of TACEmp protein may be useful for the study of biological functions of TACEmp and its biotherapy in TACEmp related diseases.

[Key words] tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme; disulfide isomerase; gene cloning; prokaryotic expression

肿瘤坏死因子- $\alpha$  前体转换酶 (tumor necrosis factor  $\alpha$  converting enzyme, TACE) 是一种金属蛋白

水解酶, 参与多种细胞膜蛋白外功能区的脱落过程<sup>[1]</sup>, 其特异地裂解 TNF- $\alpha$  前体后释放可溶性的分泌型 TNF- $\alpha$  (sTNF- $\alpha$ ) 所介导的炎症反应及其在药物发现上的作用日益受到重视。研究表明在关节炎<sup>[2]</sup>、子宫内膜异位<sup>[3]</sup>、老年性痴呆<sup>[4]</sup> 等疾病中均有 TACE 和 sTNF- $\alpha$  的表达增加。用抑制剂抑制 TACE 的活性对关节炎、癌症和糖尿病有潜在治疗作用<sup>[5]</sup>。因此对 TACE 的性质及作用机制的确定,

[收稿日期] 2005-06-22

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金资助项目 (No. 2005kj285); 蚌埠医学院科研项目 (No. BY0408)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 生物化学和分子生物学教研室, 2. 药物分析教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 张玉心 (1976-), 女, 硕士, 讲师。

### [参考文献]

- [1] 张劲松, 张宗梁, 王兴宇, 等. 转录因子 NF- $\kappa$ B 的研究进展 [J]. 科学通报, 2002, 47(5): 323-329
- [2] Matsumoto M, Yanada T, Yoshinaga SK, et al. Essential role of NF- $\kappa$ B inducing kinase in T cell activation through the TCR/CD3 pathway [J]. *J Immunol* 2002, 169(3): 1151-1158.
- [3] Latchman DS. 转录因子实用技术 [M]. 第 2 版. 北京: 清华大学出版社, 2004: 2-4.
- [4] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 138-139.
- [5] Andreone TL, O'Connor M, Denenberg A, et al. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 regulates activation of activator protein 1 in murine fibroblasts [J]. *J Immunol* 2003, 170(4): 2113-2120.

$5 \times 10^6 \sim 2 \times 10^7$ , 由于增强化学发光法灵敏度很高,  $5 \times 10^6$  个细胞也可取得较为理想的结果。但对于某些“丰度”较低的转录因子检测, 可酌情提高裂解细胞数。(4) 在进行非变性连续电泳时, 由于 SDS 等离子型去垢剂可引起蛋白不可逆的变性, 影响探针与转录因子复合物的稳定性, 因此在电泳前应彻底清洗电泳槽及制胶玻片, 以减小 SDS 对实验的影响。(5) 转膜时必须尽量减少滤纸、聚丙烯酰胺凝胶、尼龙膜之间的气泡。如果三者之间的间隙存在气泡, 将造成“转膜断路”, 阻断探针-转录因子复合物或自由探针向尼龙膜的移动。

可为干预 TNF- $\alpha$  相关疾病提供一种新靶标。TACE 基因的开放阅读框编码 824 个氨基酸, 全长包括信号序列、前导肽(包括一个半胱氨酸开关)、金属蛋白酶活性区、解整合素区、EGF 样区、Crambin 样区、跨膜区及胞浆尾。本文以二硫键异构酶 DsbA 为融合蛋白构建含有 TACE 基因的金属蛋白酶活性区(metalloproteinase domain of human TACE, TACEmp) 编码序列的融合表达载体, 从而获得高表达的、可溶性的目的蛋白, 为进一步研究 TACE 的功能及其在相关疾病生物治疗中的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

1.1 细胞、菌株和质粒 THP-1 细胞(美国 ATCC 引进), 大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3)均为本室保存, 质粒 pET-DsbA<sup>mut</sup>购自深圳源动力生物技术公司。

1.2 主要试剂 Trizol RNA 一步法分离试剂盒(GIBCO BRL 公司), Titan RT-PCR kit(Roche 公司), T4DNA 连接酶、限制性内切酶 BamHI 和 EcoRI 均为华美公司产品, IPTG、X-gal 为 TaKaRa 公司产品。

1.3 引物 从 Genebank 中获得 TACE 的 cDNA 序列, 根据文献<sup>[6]</sup>设计引物(全长包括 EcoRI BamHI 酶切位点在内共 798 bp 其中功能区为 777 bp 编码 259 个氨基酸; 由上海博亚生物技术公司合成)。P1: 5'-CAC GGATCC AGA GCT GAC CCA GAT CCC AT-3' 含 BamHI 酶切位点; P2: 5'-GGT GAATTC TTA GCG TTC TTG AAA ACA CTC CT-3' 含 EcoRI 酶切位点

1.4 基因克隆 以 200 ng/ml 的 LPS 刺激培养 THP-1 细胞 6 h 后, 离心(1 000 r/min), 收集细胞洗涤后用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, RNA 琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性。根据 Titan One Tube RT-PCR 方法, 用引物 P1、P2 扩增出 TACE 金属蛋白酶区 798bp 的片段, 在 50 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 4 min 预变性后, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min 进行 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min 后停止反应。将 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接转化到大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选阳性克隆, 由上海博亚公司测序鉴定。

1.5 重组质粒的构建和表达 提取 pMD18-TACEmp 质粒, 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切后插入到质粒 pET-DsbA<sup>mut</sup>(Ampr) 中构建重组质粒 pET-

DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp 并转化入大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  中筛选重组子。将构建的上述重组质粒和相应空载体转化到大肠埃希菌 BL21(DE3), 加入 IPTG 至终浓度为 1.0 mmol/L 诱导表达 3 h, 用 SDS-PAGE 电泳分析。

## 2 结果

2.1 TACE 膜外功能区的克隆和序列分析 用引物 P1、P2 通过 RT-PCR 从 THP-1 细胞总 RNA 中扩增出 798 bp 的目的基因, 电泳结果见图 1, 在约 800 bp 处可见一清晰条带。由于引物设计时已引入酶切位点, 所以 TACEmp 片段两端分别带有 BamHI 和 EcoRI 酶切位点。克隆到 pMD18-T 载体中测序与 genebank 中的人 TACE 基因序列一致。

2.2 TACE 蛋白酶区重组质粒的构建与鉴定 将质粒 pET-DsbA<sup>mut</sup>和 pMD18-TACEmp 分别用 BamHI 和 EcoRI 双酶切回收后, 连接转化到 DH5 $\alpha$  中, 在培养中发现含重组质粒的菌落明显比含 pET-DsbA<sup>mut</sup>空载体的菌落生长迟缓, 20 h 后才能长出针眼大小的菌落, 在液体 LB 培养基中过夜培养后的菌液浓度比正常情况要小得多。提取的重组质粒的浓度比正常情况低, 但是经 BamHI 和 EcoRI 双酶切后仍然得到了 3.6 kbp 和 800 bp 两个片段, 用 P1、P2 引物进行菌落 PCR 扩增得到了约 800 bp 大小的片段, 均与预期结果一致(见图 2)。这些都显示重组质粒 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp 的构建是成功的。

2.3 重组质粒的诱导表达 将 pET-DsbA<sup>mut</sup>空载体和重组质粒 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp 分别转化到大肠埃希菌 BL21(DE3)中表达的过程中, 发现含重组质粒的菌株表现出非常明显的生长迟滞现象。在固体 LB 平板上培养的含重组质粒的菌株, 在培养 24 h 后, 才长出针眼大小的菌落。而且挑选单个菌落到 LB 液体中进行过夜培养的过程中, 先后挑选了数十个单菌落到 LB 液体培养基中过夜培养, 结果只有一个菌株能生长, 而且菌液浓度较小, 从研究过程得出结论, 必须从新鲜培养出来的平板上挑选的菌落才能生长, 即使培养好的平板在冰箱中存放一夜, 再挑单个菌落培养时都不会生长。将上述过夜培养的菌液按 1:100 转种到新的 LB 培养基中, 培养 8 h 后 OD 值才能达到 0.6 左右, 但加 IPTG 诱导后的表达较为正常。经诱导后, 进行 12% 的 SDS-PAGE 分

析,重组质粒 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp在 BL21(DE3)中诱导表达出一条浓密的分子量约 55kDa的蛋白条带,含空载体 pET-DsbA<sup>mut</sup>的细菌经诱导后可见很浓密的 25 kDa的蛋白条带(见图 3)。经密度扫描分析,诱导 3h后的表达量可达 40.8%,表达产物

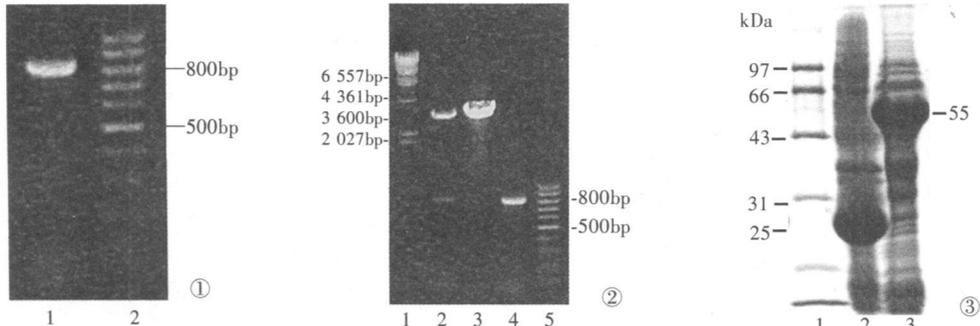


图 1 RT-PCR 结果 (1. PCR 扩增 TACEmp 片段; 2. 100bp DNA Ladder) 图 2 重组质粒 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp 酶切鉴定 (1. ADNA/Hind III Marker; 2. BamHI + EcoRI 双酶切 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp; 3. BamHI 酶切 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp; 4. TACEmp 片段; 5. 100bp DNA Ladder) 图 3 诱导表达 pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp 的结果 [1. Protein MW Marker; 2. pET-DsbA<sup>mut</sup>/BL21 (DE3) 诱导 3h; 3. pET-DsbA<sup>mut</sup>-TACEmp/BL21 (DE3) 诱导 3h]

### 3 讨论

二硫键异构酶 DsbA 是一个定位在周质的催化二硫键形成的蛋白,是精确的删除了信号序列的突变体,使其能定位于胞质内<sup>[7]</sup>。而本文使用的 DsbA<sup>mut</sup>是在信号肽缺失的 DsbA 中再进行位点突变,使两个活性半胱氨酸位点转变为丝氨酸。这些修饰,消除了该蛋白的氧化还原酶活力,但并不影响突变蛋白的细胞定位和可溶性。这样就能实现具有活性蛋白的高效表达。Zhang 等将多种真核蛋白包括 TGFβ-2、IGF-1、IGFBP-3、3C 蛋白酶、sIGFβ-R II、BDNF、瘦素、GDNF、mEGFBP、GFP 等与 DsbA<sup>mut</sup>融合,在细胞内都能形成可溶性的高水平表达,而且对表达的 TGFβ-2、IGF-1、IGFBP-3、3C 蛋白酶、sIGFβ-R II、GFP 的活力测试中,只有 TGFβ-2 无活力。

从本实验过程来看,在含重组质粒的菌株的培养过程中,TACE 蛋白的表达对菌株生长存在明显的抑制作用。说明与 DsbA<sup>mut</sup>的融合表达,可能使一部分 TACE 金属蛋白酶区蛋白形成了有活力的形式,但由于 TACE 是一个蛋白水解酶,它的表达可能会对菌株本身造成伤害,所以存在这种生长抑制状态。在本室同时利用 TACE 膜外功能区 (1300 bp) 构建的 pET-DsbA<sup>mut</sup>-T1300 的表达结果来看,也印证了这一点。在将 pET-DsbA<sup>mut</sup>-T1300 重组质粒转化到宿主菌后,20 h 才能长出针眼大小的菌落,在液体培养基中过夜培养后的菌液浓度同样比正常情况要小

的可溶性分析结果显示,约有 50% 的重组蛋白是可溶的。重组蛋白中 DsbA<sup>mut</sup>和 His 标签的总分子量为 24.7 kDa TACE 蛋白酶区分子量为 30.3 kDa 因此重组蛋白总分子量约为 55 kDa 与理论预期结果完全一致。

得多。而在本室构建的 pET-28c-T1300 和 pGEX-T1300 重组质粒的表达过程中则没有出现这种生长抑制现象,说明 DsbA<sup>mut</sup>确实有可能帮助蛋白形成正确的构象形式实现有活性的表达。本实验构建表达 TACE 金属蛋白酶区,为下一步纯化 TACE、制备 TACE 抗血清和利用噬菌体肽库筛选 TACE 抑制剂奠定工作基础。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Peschon JJ, Slack JL, Reddy P *et al* An essential role for ectodomain shedding in mammalian development [ J ]. *Science* 1998; 282(5392): 1281-1284.
- [2] Moss ML, Jin SL, Becherer JD *et al* Structural features and biochemical properties of TNF-α converting enzyme (TACE) [ J ]. *J Neuroimmunol* 1997; 72(2): 127-129.
- [3] Gottschalk G, Malberg K, Amlt M, *et al* Matrix metalloproteinases and TACE play a role in the pathogenesis of endometriosis [ J ]. *Adv Exp Med Biol*, 2000; 477: 483-486.
- [4] Skovronsky DM, Fah S, Lee VM *et al* Neuronal localization of the TNF-α converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques [ J ]. *J Neurobiol* 2001; 49(1): 40-46.
- [5] Moss ML, White JM, Lambert MH *et al* TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery [ J ]. *Drug Discovery Today* 2001; 6(8): 417-426.
- [6] Hansen HB, Dietrich S, Kisseleva T *et al* CD30 shedding from Karpas 299 lymphoma cells is mediated by TNF-α converting enzyme [ J ]. *J Immunol* 2000; 165(12): 6703-6709.
- [7] Yang Z, David RO, Kinzyen BN, *et al* Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli* [ J ]. *Protein Expr Puri* 1998; 12: 159-165.