论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0938-04

# 人源性 MIF cDNA 的克隆及其原核高效表达的研究

刘进军,李 鹏,郭 鹰,潘自铁,胡川闽 (第三军医大学医学检验系临床生物化学教研室,重庆 400038)

**提 要:目的** 克隆人 MIF cDNA 并构建其高效原核表达载体,表达和纯化得到高纯度的可溶性 hMIF 蛋白。**方法** 经 RT-PCR 从人乳腺癌细胞株 MDA-MB453 中扩增到 hMIF cDNA,并克隆到原核表达载体 pET11b 中。测序验证后将其转入大肠杆菌 BL21 中表达,最后经离子交换和疏水层析法纯化 hMIF 蛋白。**结果** 克隆到的 hMIF cDNA 与 Genebank 已发表的序列完全一致,纯化得到的产物经 Western blotting 鉴定证实为 hMIF 蛋白。**结论** 应用基因重组技术成功构建了 pET11b/hMIF 重组质粒,在大肠杆菌中实现了高效表达;纯化到高纯度的可溶性 hMIF 蛋白,为治疗性抗 hMIF 抗体的研究创造了条件。

**关键词:** hMIF;乳腺癌;原核表达;蛋白纯化

**中图法分类号:** R392.11; R394-33; R394.2 **文献标识码:** A

# Cloning and expression of human macrophage migration inhibitory factor

LIU Jin-jun, LI Peng, GUO Ying, PAN Zi-tie, HU Chuan-min (Department of Clinical Biochemistry, College of Medical Laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To clone the cDNA of human macrophage migration inhibitory factor (hMIF), construct its prokaryotic expression vector and purify hMIF protein. **Methods** RT-PCR was used to amplify the cDNA of hMIF from the total RNA of human breast cancer cell line MDA-MB453. The DNA fragment was cloned into vector pET11b. After its sequence was verified, recombinant plasmid was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). The expressed product was purified through cation exchange and hydrophobic interaction chromatography and identified by Western blotting. **Results** A 353 bp-length DNA fragment was obtained by RT-PCR amplification and sequence analysis, indicating that the DNA was identical to the hMIF sequence reported in GenBank. The purified protein was proved to be soluble hMIF protein by Western blotting. **Conclusion** Full length hMIF cDNA was cloned from human breast cancer cell line MDA-MB453, and expressed in prokaryotic cells successfully. Purified soluble hMIF protein provides a good basis to prepare anti-hMIF antibody or humanized antibody.

**Key words:** hMIF; breast cancer; prokaryotic expression; protein purification

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是20世纪60年代 Bloom 和 David 从激活的T淋巴细胞中首先发现和命名的一个可溶性细胞因子,其具体生物学活性一直不清楚,1989年 MIF cDNA 被克隆后,其结构与功能才逐渐被深入研究[1]。人 MIF 基因编码序列全长约 353 bp,定位于人 22q11.2[2]。hMIF 分子为同源三聚体结构,单体是由114个氨基酸残基组成,相对分子量约为 $12.5 \times 10^3$ 的非糖基化蛋白。MIF 广泛表达于垂体前叶细胞、T 淋巴细胞、单核巨噬细胞、上皮细胞等多种细胞中,具有细胞因子和激素的双重作用特点[3],是一种重要的免疫调控相关分子,并与多种炎症性疾病、肿瘤的发生发展关系密切。目前 MIF 已成为国内外学者普遍关注的研究热点之一。

本研究旨在克隆人 MIF(hMIF)cDNA 序列并构建其高效原核表达载体,表达和纯化获得高纯度 hMIF 蛋白,为抗 hMIF 治疗性抗体的制备及其抗炎和抗癌作用研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞株 pET11b 质粒购自 Novagen 公

**基金项目:** 重庆市科委自然科学基金资助重点项目(2004BA5017),创伤烧伤复合伤国家重点实验室开放基金资助项目(200317)
Supported by the Key Program of Natural Science Foundation by Scientific Committee of Chongqing (2004BA5017) and The Open Funds of State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury (200317)

**作者简介:** 刘进军(1978-),男,湖南省衡阳市人,硕士研究生,主要从事单克隆抗体制备方面的研究。电话:(023)68752313
**通讯作者:** 胡川闽,电话:(023)68753761

**收稿日期:** 2005-03-01;**修回日期:** 2005-04-01

司，大肠杆菌 DH5α、BL21(DE3)为本科室保存，MDA-MB453 细胞株购自中科院细胞所。

1.1.2　主要试剂和器材　　限制性内切酶购于 NEB 公司；Trizol 试剂和 RPMI1640 购于 Gibco 公司；RT-PCR 试剂盒、T4 DNA 连接酶、Pfu DNA 聚合酶为 Promega 公司产品；琼脂糖凝胶回收试剂盒由 Qiagen 公司提供。GST-hMAM 融合蛋白为本科室纯化保存，抗 hMIF 单克隆抗体为美国 Bucala 教授馈赠。ÄKTA prime 蛋白纯化仪、SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱及 Hitrap butyl FF 疏水层析柱均为 Amersham Biosciences 公司产品。高效液相色谱分析仪为美国惠普公司产品。其余试剂为电泳纯或分析纯。

### 1.2　方法

1.2.1　引物设计与合成　　根据 Genebank 中已发表的 hMIF cDNA 序列，参考文献[4]设计了 1 对特异引物。上游引物为 5′-CGCGGATCCTGCGGCTCTTAGGCGAAGG-3′(含 *Bam*H Ⅰ 位点)；下游引物为 5′-CGCCATATGCCGATGTTCATCGTAAACAC-3′(含 *Nde* Ⅰ 位点)，上下游引物 5′端均带有保护碱基。上述引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2.2　总 RNA 的提取　　将 -80 ℃冻存的乳腺癌细胞株 MD-MB453 细胞复苏，在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中，37 ℃、5% $CO_2$ 条件下扩大培养，细胞离心收集后用 Trizol 试剂提取总 RNA，详细方法见 Trizol 试剂操作说明。

1.2.3　RT-PCR　　RT-PCR 按 Promega 公司的试剂盒说明进行。RT 反应以 Oligo(dT)为引物；PCR 反应总体积为 50 μl，反应参数如下：94 ℃预变性 4 min，然后进行 35 个循环：94 ℃变性 60 s，55 ℃复性 60 s，72 ℃延伸 60 s，最后 72 ℃延伸 5 min。反应结束后用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，并按凝胶回收试剂盒说明对 RT-PCR 产物快速纯化回收。

1.2.4　pET11b/hMIF 重组表达质粒的构建和鉴定　　将回收的 PCR 产物与 pET11b 载体一起用 *Bam*H Ⅰ 和 *Nde* Ⅰ 双酶切消化后与之连接，4 ℃过夜，第 2 日用连接产物转化 DH5α 菌，并将其涂在含有羧苄青霉素的 LB 琼脂平板上，次日挑取白色菌落接种于 LB 培养基扩大培养，采用碱裂解法提取质粒，取 10 μl 质粒用 *Bam*H Ⅰ、*Nde* Ⅰ 双酶切后 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.5　DNA 测序分析　　将 pET11b/hMIF 重组质粒送往上海博亚公司测序，并应用 Blast 软件将测序结果与 GenBank 的 hMIF cDNA 进行同源性分析。

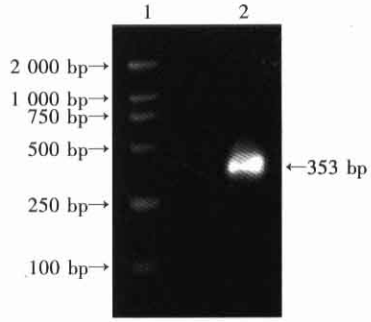
1.2.6　hMIF 可溶性蛋白的诱导表达及鉴定　　将 pET11b/hMIF 重组质粒转化 BL21 (DE3)菌，涂 LB 平板挑单菌落接种，扩大培养，加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 6 h 后取诱导产物做 15% Tricine-SDS PAGE 电泳检测。

1.2.7　重组蛋白的纯化及 Western blotting　　将高表达菌株在发酵罐内扩大培养并诱导，得到的表达菌用 20 mmol/L pH 5.8 的 PBS 混匀后超声破菌，离心取上清，上样于装填 SP Sepharose Fast Flow 的阳离子交换柱，用含 1 mol/L NaCl 的 PBS 洗脱；得到的初纯品上样于平衡好的 Hitrap butyl FF 疏水层析柱，洗脱液为含 0.75 mol/L $(NH_4)_2SO_4$ 的 20 mmol/L PBS 洗脱得到成品蛋白。再用 Lowry 法(Folin 酚法)测定 hMIF 蛋白质含量，并将纯化的蛋白用 Western blotting 鉴定，所用一抗即为 Bucala 教授赠送的抗 hMIF 单克隆抗体；纯化产物用高效液相色谱法(HPLC)进行纯度测定。

## 2　结果

### 2.1　RT-PCR 扩增产物的鉴定

用 Trizol 提取人乳腺癌细胞株 MD-MB453 细胞的总 RNA，并作 RT-PCR 扩增 hMIF cDNA，PCR 产物作 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示，RT-PCR 扩增产物大小与预期相同，约为 353 bp 左右(图 1)。



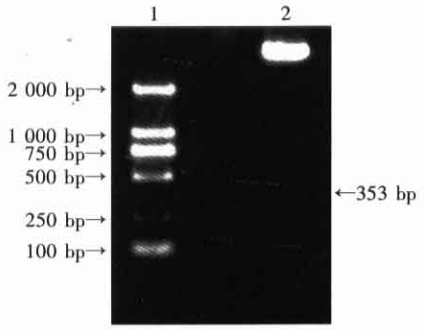

1：DNA marker；2：PCR product

**图 1　人 MIF RT-PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果分析**

**Fig 1　Electrophoretic profile of human MIF gene amplified by PCR**

### 2.2　重组质粒 pET11b/hMIF 的双酶切鉴定

将重组质粒转化入 DH5α 宿主菌中，在含有羧苄青霉素的 LB 平板上培养，并挑取阳性克隆抽提质粒，用 *Bam*H Ⅰ 和 *Nde* Ⅰ 双酶切后行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，可见切下的 1 个大小约为 353 bp 的特异片段，表明 pET11b 质粒中已插入大小约为 353 bp 的片段(图 2)。




1：DNA marker；2：pET11b/hMIF/*Bam*H Ⅰ + *Nde* Ⅰ

**图 2　重组质粒 pET11b/hMIF 的双酶切鉴定**

**Fig 2　Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmid pET11b/hMIF**

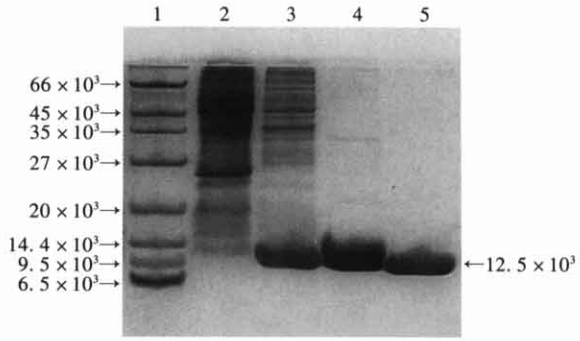
### 2.3　重组质粒测序

挑取单克隆 DH5α 转化菌送上海博亚生物技术有限公司测序，结果表明插入序列与 GenBank 中报道的 hMIF cDNA 序列完

全一致，表明 hMIF 基因较为保守。

## 2.4 hMIF 可溶性蛋白的诱导表达和分离纯化

用重组质粒 pET11b/MIF 转化蛋白表达菌 BL21(DE3)，并将 IPTG 诱导的重组菌裂解，再通过阳离子交换和疏水层析法对表达产物进行纯化，并分别取样行 Tricine SDS-PAGE 电泳，IPTG 未诱导的重组菌作阴性对照。经考马斯亮蓝染色后，可见诱导菌比未诱导菌明显多出 1 条清晰的区带，其 Mr 约12 500 (图 3)，与预期 hMIF 的 Mr 值相符；重组蛋白的表达量高，约占细菌总蛋白的 30%；纯化效果较好，杂蛋白条带极少，hMIF 的纯度很高。




1: Protein relative molecular weight marker; 2: Expressed protein without induction; 3: Expressed protein induced with IPTG; 4: Primary purified hMIF protein through SP Sepharose Fast Flow column; 5: Final purified hMIF protein through Hitrap butyl FF column

**图 3 重组 hMIF 蛋白的诱导表达与纯化**

**Fig 3 Identification of recombinant hMIF with tricine SDS-PAGE**

## 2.5 纯化产物的纯度测定

将纯化的蛋白用高效液相色谱法(HPLC)分析其纯度，测定结果如图 4 所示。可知经 SP Sepharose Fast Flow 阳离子交换柱初纯化后 hMIF 蛋白的纯度达 92.62% 以上(图 4)，再次 Hitrap butyl FF 疏水层析纯化后 hMIF 纯度可达 95.40%(图 5)。这表明最后的纯化产物已可用于单克隆抗体制备和动物实验。

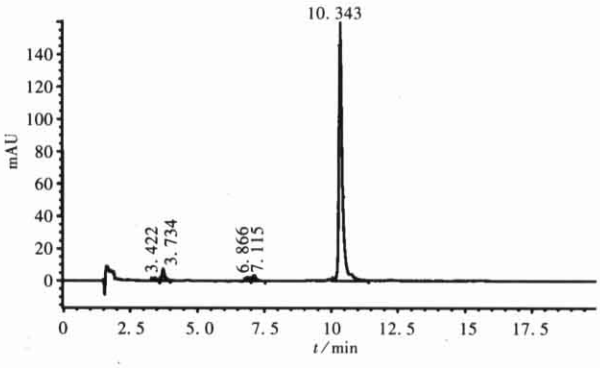



**图 4 初次纯化产物的 HPLC 法纯度测定**

**Fig 4 Purity assay of primary purified hMIF protein through HPLC**

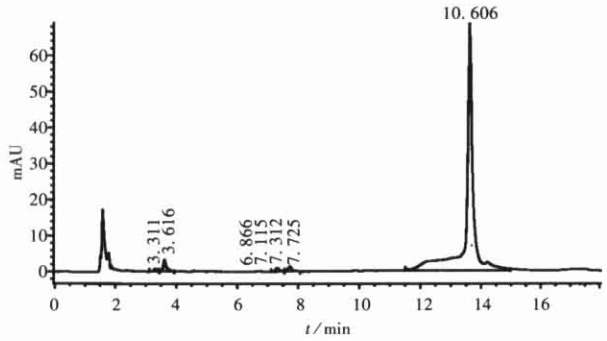
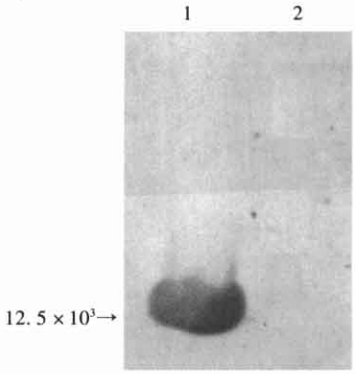



**图 5 最终纯化产物的 HPLC 法纯度测定**

**Fig 5 Purity assay of final purified hMIF protein through HPLC**

## 2.6 纯化产物的免疫印迹

将纯化的 hMIF 蛋白行 Western blotting 鉴定，结果显示，BL21 转化菌表达纯化的蛋白能与抗 hMIF 抗体发生反应，而阴性对照 GST-hMAM 融合蛋白则与上述抗体无反应(图 6)。




1: Purified hMIF protein; 2: GST-hMAM

**图 6 纯化产物的 Western blotting**

**Fig 6 Western blotting of recombinant hMIF reacted with rabbit anti-hMIF IgG**

## 3 讨论

MIF 是体内先天性免疫和获得性免疫的重要调节因子，也是重要的应激反应蛋白，具有重要的免疫防御和调节作用，此外，它还是糖皮质激素天然的拮抗物，其引起的过度炎症反应与感染性休克、风湿性关节炎、慢性肾炎等多种感染性、自体免疫性疾病关系密切[5]。MIF 已被实验证实可促进感染性休克[6]、风湿性关节炎[7]、ARDS[8]等多种疾病的发生，而抗 MIF 中和性抗体则对上述疾病具有显著的保护作用。此外，MIF 与肿瘤的相关性也是目前研究的热点之一。一方面 MIF

通过抑制 P53 基因表达对抗凋亡[9]、促进细胞生长和血管生成等作用诱导了肿瘤的产生及其免疫逃避作用，并增强肿瘤的侵袭力；另一方面 MIF 可调节单核/巨噬细胞的 ADCC 作用，杀伤肿瘤细胞。但目前的研究结果提示 MIF 以促进肿瘤正性生长作用为主，而抗 MIF 抗体可显著减慢肿瘤的生长速度。故以 MIF 为作用靶标可以作为临床研制抗炎、抗肿瘤等新药的突破点。

据文献[10,11]报道，MIF 在鼻咽癌、恶性黑色素瘤、转移性前列腺癌、肺癌、结肠癌等恶性肿瘤细胞中高表达，其表达情况往往与患者预后情况密切相关，且抗 MIF 中和性抗体可抑制肿瘤的生长和新生血管的生成。但目前尚少有文献报道 MIF 与乳腺癌的相关性，且少见有人从肿瘤细胞中克隆到 MIF 基因。本研究则从人乳腺癌细胞株 MD-MB453 中克隆到了 hMIF cDNA，进一步证实了 MIF 与肿瘤的密切关系，并为乳腺癌的诊治提供了新的线索。而研究中采用凝胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物后直接连接 PET11b 载体，不但减少了 PCR 产物中非特异性片段与目的载体的连接，也省略了 TA 克隆筛选的步骤，操作简单有效，可为其他实验者的基因克隆操作提供参考。

自 1989 年 Weiser 等从活化的人外周血 T 淋巴细胞中扩增到 hMIF cDNA 后，国内外研究者对 hMIF 表达载体的选择产生了浓厚的兴趣，而原核表达载体系统具有方便、代价低廉的优点，为首选的载体系统。然而很多载体表达的融合蛋白均以不溶的包涵体形式存在，复性相当困难，难以得到可溶性的高纯度蛋白，如 1996 年李建远等[12]利用人 T 细胞 cDNA 文库构建的人 PCT-MIF 和 PMT-MIF 重组质粒，表达出的包涵体蛋白即难以复性。而 pET 载体系统是目前在大肠杆菌中表达重组蛋白的一个有效系统，目的基因导入后受 T7 启动子调控，该系统表达产物含量高而稳定，免疫原性强，便于回收和纯化[13]。本研究选择 pET11b 载体，并构建了 pET11b/hMIF 重组质粒，诱导表达的 hMIF 蛋白表达量很高，且为可溶性蛋白，不存在包涵体的复性问题，方便了 hMIF 的纯化。实验中根据该蛋白的理化特点设计的纯化方法简单可靠，蛋白只需要两个步骤就能得到高纯度的 hMIF 蛋白，随后的几次蛋白纯化结果均令人满意。因 hMIF 预测的等电点在 7.9 左右，故我们用 20 mmol/L pH 5.8 的 PBS 破菌，SP Sepharose Fast Flow 强阳离子交换柱初纯化后蛋白纯度即达到了 92.62% 以上，再用 Hitrap butyl FF 中等强度疏水柱处理后即得到了纯度高达 95.40% 以上的终产品 hMIF 蛋白，为抗 hMIF 治疗性抗体的研究奠定了基础。

## 参考文献：


[1] Bucala R. Signal transduction. A most interesting factor [J]. Nature, 2000, 408(6809): 146 - 147.

[2] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(10): 791 - 800.

[3] Petrovsky N, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a critical neurohumoral mediator[J]. Front Horm Res, 2002, 29: 83 - 90.

[4] Bernhagen J, Mitchell R A, Calandra T, *et al*. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF)[J]. Biochemistry, 1994, 33 (47): 14144 - 14155.

[5] Lue H, Kleemann R, Calandra T, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease[J]. Microbes Infect, 2000, 4(4): 449 - 460.

[6] Calandra T, Echtenacher B, Roy D L, *et al*. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor [J]. Nat Med, 2000, 6(2): 164 - 170.

[7] Ichiyama H, Onodera S, Nishihira J, *et al*. Inhibition of joint. inflammation and destruction induced by anti-type II collagen antibody/lipopolysaccharide (LPS)-induced arthritis in mice due to deletion of macrophage migration inhibitory factor (MIF) [J]. Cytokine, 2004, 26(5): 187 - 194.

[8] Lai K N, Leung J C, Metz C N, *et al*. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome [J]. J Pathol, 2003, 199(4): 496 - 508.

[9] Mitchell R A, Liao H, Chesney J, *et al*. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(1): 345 - 350.

[10] Ogawa H, Nishihira J, Sato Y, *et al*. An antibody for macrophage migration inhibitory factor suppresses tumour growth and inhibits tumour-associated angiogenesis [J]. Cytokine, 2000, 12(4): 309 - 314.

[11] Shimizu T, Abe R, Nakamura H, *et al*. High expression of macrophage migration inhibitoryfactor in human melanoma cells and its role in tumor cell growth and angiogenesis[J]. Biochem Biophy Res Commun, 1999, 264(3): 751 - 758.

[12] 李建远，马大龙，宋泉生，等. 人重组巨噬细胞移动抑制因子在大肠杆菌的高效表达与鉴定[J]. 中国免疫学杂志，1996，12(6)：339 - 342.

[13] 张一折，刘照惠，吴　隼，等. 应用 pET 系统表达 rhIFN-α2b 基因的研究[J]. 中国生物制品学杂志，2003，16(3)：147 - 150.


（编辑　刘洪城）