论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0958-03

重组人 SMAC 及 SMAC-PTD 的制备

胡 颖,何凤田,李蓉芬,高会广,黄 刚,胡大强,龚 薇 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要: 目的 制备重组人 SMAC 及 SMAC-PTD。**方法** 经 RT-PCR 从人 HeLa 细胞中扩增人野生型 SMAC 及 SMAC-PTD cDNA,分别构建于原核表达质粒 pET28a(+),测序正确后,将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达,Ni^{2+}-NTA 层析纯化,SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定目的蛋白。**结果** RT-PCR 扩增分别得到编码人 SMAC 及 SMAC-PTD cDNA 片断,测序结果正确,重组蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达。**结论** 成功制备了高纯度的人野生型 SMAC 及 SMAC-PTD 融合蛋白,为进一步研究奠定了基础。

关键词: SMAC;蛋白转导域;凋亡

中图法分类号: Q503; Q51 **文献标识码**: A

Preparation of recombinant human SMAC and SMAC-PTD

HU Ying, HE Feng-tian, LI Rong-fen, GAO Hui-guang, HUANG Gang, HU Da-qiang, GONG Wei (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To prepare human second mitochondrial derived activator of caspase (hSMAC) and human SMAC-PTD (hSMAC-PTD). **Methods** The cDNA fragments encoding hSMAC and hSMAC-PTD were amplified from HeLa cells by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and PCR. PCR products were cloned into the prokaryotic expression vector pET28a (+) for sequencing. The vectors with correct sequence were transformed into *E coli*. BL21 (DE3) to express the hSMAC and hSMAC-PTD fusion protein with the induction of IPTG. The hSMAC and hSMAC-PTD fusion protein were purified with Ni^{2+}-NTA chromatography, and identified by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The cDNA fragments encoding hSMAC and hSMAC-PTD were amplified by RT-PCR and PCR were accurate. The hSMAC-PTD and hSMAC were highly expressed and purified. **Conclusion** The cDNA fragment encoding human SMAC and SMAC-PTD has been successfully cloned, and the proteins are highly expressed and purified.

Key words: SMAC; TAT PTD; apoptosis

SMAC(即 caspase 的第二个线粒体激活因子),也被称为 DIABLO(direct IAP binding protein with low PI,即低等电点的 IAP 直接结合蛋白)[1,2],它和细胞色素 c 一起在发生凋亡时被线粒体释放入细胞质,参与 caspase 的激活及级联放大效应,从而加速凋亡的发生发展,而凋亡在肿瘤的治疗过程中起着至关重要的作用,因此 SMAC 有可能成为肿瘤治疗的新制剂。因 SMAC 必须在细胞质中才能行使其功能,从而限制了其临床应用,而具有跨膜转导功能的 TAT PTD,则可弥补这一缺陷。

TAT(transactivating protein)蛋白是人类免疫缺陷 1 型病毒(HIV-1)的一个很重要的调控蛋白,具有独特的跨膜转运方式[3,4],而这一方式与其分子中一个富含碱性氨基酸的短序列(YGRKKRRQRRR)[5]所构成的蛋白转导结构域(protein transduction domain, PTD)有关。进一步的研究表明,TAT 的 PTD 具有广谱的蛋白转导能力,可以引导多种多肽和蛋白质进入目标细胞,甚至可以通过血脑屏障。本研究制备较高纯度的人野生型 SMAC 及 SMAC-PTD 融合蛋白,为对 SMAC 的促凋亡作用及 TAT PTD 转导功能进行深入研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂

Tripure RNA 提取试剂为 Roche 公司产品;PCR 引物由上海生工公司合成;RT-PCR 试剂盒为 Promga 公司产品;PCR 产

作者简介:胡 颖(1980-),女,四川省万源市人,硕士研究生,电话:(023)68752947,E-mail:huying19800207@yahoo.com.cn

通讯作者:何凤田,电话:(023)68752262, E-mail:tmmuhft@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-11-21;修回日期:2006-02-20

物纯化试剂盒为 Omega 公司产品；限制性内切酶购自大连宝生生物公司；抗-His 单抗和 Ni^{2+}-NTA 亲和层析系统购自德国 Qiagen 公司；人 HeLa 细胞，质粒 pET28a(+)及大肠杆菌 DH5α 和 BL21(DE3)由本室保存；扩增 SMAC cDNA 引物序列如下：上游引物为：5′-TTA CCA TGG GCG CGG TTC CTA TTG CAC AG-3′(划线部分为 *Nco* Ⅰ酶切位点)，下游引物为：5′-ATT CTC GAG ATC CTC ACG CAG GTA GGC CTC-3′(划线部分为 *Xho* Ⅰ酶切位点)；扩增 SMAC-PTD cDNA 引物序列如下：上游引物为：5′-TTA CCA TGG GCG CGG TTC CTA TTG CAC AG-3′(划线部分为 *Nco* Ⅰ酶切位点)；下游引物 1 为：5′-TTC TTC CTG CCA TAA TCC TCA CGC AGC TAG-3′；下游引物 2 为：5′-GTC GCT GTC TCC GCT TCT TCC TGC CAT AAT-3′；下游引物 3 为：5′-ATT CTC GAG TCT TCG TCG CTG TCT CCG CTT CTT -3′(划线部分为 *Xho* Ⅰ酶切位点)。

1.2　方法

1.2.1　人野生型 SMAC cDNA 的制备　　取人 HeLa 细胞约 6×10^6 用 Tripure 提取细胞总 RNA，按照 RT 试剂盒说明操作将 RNA 反转录为 cDNA。为得到实验所需人野生型 SMAC cDNA，本实验设计了 PCR 引物，上游引物和下游引物分别选用 *Nco* Ⅰ和 *Xho* Ⅰ两个酶切位点，PCR 的反应程序如下：94℃ 5 min；然后(94 ℃ 30 s，60 ℃ 1 min，72 ℃ 1 min)×30 个循环；最后 72 ℃ 10 min。反应完成后，取 5 μl 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定结果。

1.2.2　人 SMAC-PTD cDNA 的制备　　以 SMAC 为模板采用上游引物固定，下游引物逐步延伸的方法，将 PTD 的编码序列(33 bp)引入到 SMAC cDNA 的 3′端。PCR 的简要过程如下：应用上游引物及下游引物 1 进行第 1 次 PCR，反应程序为 94℃ 5 min；然后(94 ℃ 30 s；60 ℃ 30 s；72 ℃ 1 min)×30 个循环；最后 72 ℃ 10 min。反应完成后，将纯化回收后的 PCR 产物作为模板进行第 2 次 PCR，除下游引物换为引物 2 其他条件不变。再将此次的 PCR 纯化回收产物作为模板进行第 3 次 PCR，下游引物换为引物 3。取 PCR 产物 5 μl 于 1% 琼脂糖凝胶中电泳以鉴定结果。

1.2.3　重组人 SMAC(rhSMAC)及 SMAC-PTD(rhSMAC-PTD)的表达及鉴定　　将 PCR 产物及载体 pET28a(+)分别经 *Nco* Ⅰ + *Xho* Ⅰ酶切后构建重组质粒(命名为 pET28a-SMAC 和 pET28a-SMAC-PTD)。将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，挑选阳性重组子，提取质粒，经 *Nco* Ⅰ + *Xho* Ⅰ进行酶切鉴定证实为所构建的重组质粒。取含重组质粒的细菌扩增培养，在 37 ℃及终浓度为 1 mmol/LIPTG 的条件下诱导 4 h，超声碎菌，行 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达部位及表达水平。

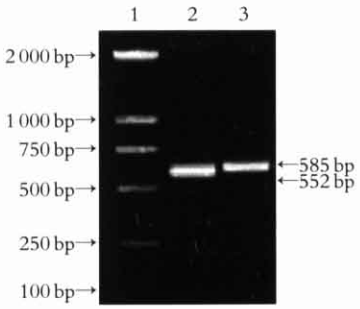
1.2.4　Western blot 鉴定目的蛋白　　以所表达目的蛋白上的 His 标签肽为标志，经 Western blot 进一步鉴定，其简要步骤是：将诱导表达的产物先行 SDS-PAGE，然后以半干法电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜)上，取下 NC 膜短暂漂洗后用丽春红染膜，待蛋白 marker 条带显色后用滤纸将膜轻轻吸干，用记号笔标记蛋白 marker 各条带，继而经漂洗去除丽春红，然后依次经 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h，与抗-His 单抗孵育 1 h，与 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 孵育 1 h，每步完成后均严格洗膜，最后加 DAB 避光显色。

1.2.5　Ni^{2+} 亲和层析柱纯化 rhSMAC 及 rhSMAC-TAT　　将含重组质粒 pET28a-SMAC 和 pET28a-SMAC-PTD 的表达菌在 1 000 ml LB 中扩大培养并按上述条件进行 IPTG 诱导后，离心收集细菌，按 1 g 菌/4 ml 的比例加入 Lysis Buffer(50 mmol/L $NaH_2PO_4\cdot2H_2O$，300 mmol/L NaCl，10 mmol/L 咪唑，pH 8.0)，1 mg/ml 加入溶菌酶混匀并置冰上 30 min 后超声碎菌(碎菌前加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 PMSF)，离心收集上清。将上清过 Ni^{2+}-NTA 树脂层析柱；用 Lysis Buffer 及 Wash Buffer(50 mmol/L $NaH_2PO_4\cdot2H_2O$，300 mmol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑，pH8.0)洗柱，直至 $D(280)<0.01$；用 Elution Buffer(50 mmol/L $NaH_2PO_4\cdot2H_2O$，300 mmol/L NaCl，250 mmol/L 咪唑，pH8.0)洗脱目的蛋白。对收集的目的蛋白行 SDS-PAGE 分析，并采取 PBS 进行透析以除去多余盐分，从而得到纯化的重组人 SMAC 及 SMAC-PTD。经 SDS-PAGE 及灰度扫描分析纯化蛋白纯度。

2　结果

2.1　SMAC cDNA 及 SMAC-PTD cDNA 的克隆

如图 1 所示，RT-PCR 扩增的 SMAC cDNA 为 552 bp，而 PCR 扩增的 SMAC-PTD cDNA 为 585 bp (图 1)。

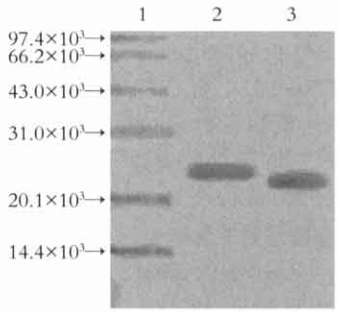


1：DL2000 标准；2：经 RT-PCR 扩展得 hSMAC cDNA；3：经 RT-PCR 扩展得 hSMAC-TAT PTD cDNA

图 1　RT-PCR 及 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

2.2　rhSMAC 及 hSMAC-PTD 的原核表达及鉴定

将目的 cDNA 分别克隆于载体 pET28a(+)进行 DNA 序列测定，结果两序列均与 GenBank 中报道的相应 cDNA 序列完全一致。将序列正确的 pET28a-SMAC 及 pET28a-SMAC-PTD 质粒载体转化于大肠杆菌 BL21(DE3)后，以 IPTG 诱导表达，经 SDS-PAGE 分析表明两目的蛋白在包涵体及上清内均有表达。对全菌裂解液进行 SDS-PAGE，结果显示重组目的蛋白相对分子质量分别约为 23 000 及 24 000，灰度扫描显示目的蛋白表达量占菌体总蛋白的 20.16% 及 22.03%，这表明 rhSMAC 及 rhSMAC-PTD 在大肠杆菌中获得了高效表达。以 His 标签肽为标志的 Western blot 分析显示，经 IPTG 诱导的含重组表达载体 pET28a-SMAC 及 pET28a-SMAC-PTD 的菌体裂解物能与抗-His 单抗特异性反应，，在分子质量约为 23 000 及 24 000 处都分别呈现单一条带，而经同样诱导的只含载体 pET28a(+)的菌体裂解物则无此反应，说明所表达的融合蛋白的确是目的蛋白(图 2)。

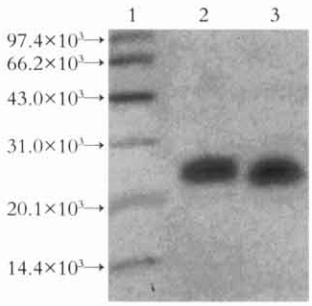


1:标准; 2:rhSMAC- PTD; 3:rhSMAC;

图2 Western blot 分析 rhSMAC- PTD 及 rhSMAC 的表达

2.3 目的蛋白的纯化

表达蛋白经 Ni^{2+}-NTA 纯化及分步透析后进行 SDS-PAGE,结果分别在分子质量约为 23 000 和 24 000 处见单一条带(图3),经凝胶扫描仪灰度扫描证实蛋白纯度可达 90%。



1:标准; 2:纯化后 rhSMAC-PTD; 3:纯化后 rhSMAC

图3 SDS-PAGE 分析纯化产物

3 讨论

SMAC mRNA 在正常人体组织睾丸,心,肝,肾,脾和前列腺中均有较高表达,同时在 Jurkat, HeLa,及 MCF-7 等多种肿瘤细胞株中也有广泛表达。人类的 SMAC 蛋白有 SMAC-L、SMAC-S 和野生型的 SMAC 三种存在形式。SMAC-L 蛋白含 239 个氨基酸,当其转运到线粒体中即被裂解掉含有 55 个氨基酸的 MTS (mitochondrial targeting sequence),生成含有 184 个氨基酸的野生型 SMAC 蛋白。野生型 SMAC 蛋白则以纯二聚体的形式存在于线粒体膜间腔内。高度保守的凋亡作用机制,包括一连串的始动 caspases 和效应 caspases 的相继激活[6]。一旦被激活,效应 caspases 就引起一系列的水解反应,最终导致细胞死亡。凋亡阻滞剂(the inhibitor of apoptosis, IAP) 蛋白家族,通过阻止前 caspases 的激活和成熟 caspases 的催化活性而阻抑凋亡[6],当机体受到 DNA 损伤和细胞表面死亡受体的活化等刺激时,SMAC 也从线粒体内释放到细胞质中以消除多种 IAPs 的抗凋亡作用[3,4]。因此,SMAC 就成为哺乳动物细胞凋亡的主要调节子,同时野生型 SMAC 蛋白只在凋亡受到异常阻滞的肿瘤细胞内行使其促凋亡作用而并不引起健康细胞的凋亡,这就为用于肿瘤的治疗提供了理论依据。

因 SMAC 于细胞质内行使功能,而外源型蛋白这种大分子物质很难穿过细胞膜,因此本实验将其与 PTD 融合表达。PTD 为 HIV-1 的反式激活蛋白 TAT 序列中的一个富含碱性氨基酸残基的蛋白结构域,称之为蛋白转导域(PTD),能将不同大小的蛋白质跨膜转导入细胞质内。其蛋白转导活性具有如下特点:① 所引导的蛋白质可以具有很大的分子质量且不增加其免疫原性。② PTD 介导的蛋白转导过程速度快,不需要能量。③操作简便,只需将与 PTD 融合的分子加入组织培养介质中,15 min 内胞内即可达最大浓度。推测其蛋白转导活性与蛋白转导域中带有强正电荷的碱性氨基酸有关,可能通过直接与带负电荷的细胞膜脂类相互作用而介导穿膜过程。因为 PTD 的高效跨膜作用可以携带 SMAC 进入任何细胞甚至细胞核,所以下一步的工作是在鉴定了 SMAC-PTD 的跨膜转运及体外杀伤肿瘤细胞活性后在 SMAC-PTD 上连上靶向分子,将该融合蛋白靶向于肿瘤细胞。

因为 SMAC 的 N 端残基 AVPI 对于 SMAC 的促凋亡功能来说是必须的,所以引物设计时,在 SMAC 基因的 C 端引入 PTD 编码序列,使 PTD 不会影响 SMAC 的功能。在本研究中构建的融合表达质粒 pET28a-SMAC-PTD,在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得高效表达,获得了重组人 SMAC 及 SMAC-PTD,为 SMAC 在基础和临床应用等方面的进一步研究都奠定了良好的物质基础。

参考文献:

[1] DU C, FANG M, LI Y, *et al*. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1): 33 - 42.

[2] VERHAGEN A M, EKERT P G, PAKUSCH M, *et al*. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins[J]. Cell, 2000, 102(1): 43 - 53.

[3] ADRAIN C, CREAGH E M, MARTIN S J. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2[J]. EMBO J, 2001, 20(23): 6627 - 6636.

[4] HASENJAGER A, GILLISSEN B, MULLER A, *et al*. Smac induces cytochrome c release and apoptosis independently from Bax/Bcl-xl in a strictly caspase-3-dependent manner in human carcinoma cells[J]. Oncogene, 2004, 23(26): 4523 - 4535.

[5] GUELEN L, PATERSON H, GAKEN J, *et al*. TAT-apoptin is efficiently delivered and induces apoptosis in cancer cells[J]. Oncogene, 2004, 23(5): 1153 - 1165.

[6] LEMASTERS J J. Dying a thousand deaths: redundant pathways from different organelles to apoptosis and necrosis[J]. Gastroenterology, 2005, 129(1): 351 - 360.

(编辑 张大春)