基础研究 文章编号:0253-3626(2009)08-1028-04

IL3-PE38KDEL 融合基因的构建及原核表达

陈 妤[1],娄世锋[1],邓建川[2]

(1.重庆医科大学附属第二医院血液内科,重庆 400010;2.重庆医科大学检验系重点实验室,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建原核表达载体 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL,并诱导和鉴定其蛋白表达。方法:用 PCR 方法扩增所需要的目的片段 IL3 及 PE38KDEL 再通过酶切和连接的方法定向克隆到载体 PQE30-Linker 中得到融合基因 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL。重组载体经酶切,菌落 PCR 鉴定,DNA 序列分析插入片段完全正确,转化感受态大肠杆菌 SG13009,经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 分析分子量大小,Western blot 鉴定。结果:经限制性内切酶酶切鉴定,菌落 PCR 及 DNA 序列分析表明重组表达载体 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL 构建成功,IPTG 诱导后得到了与预计分子量相符的目的蛋白。经 Western blot 鉴定在分子量 57 kD 处有明显特异性条带,说明目的蛋白正确表达。结论:成功构建融合蛋白 IL3-PE38KDEL,为后续的蛋白质纯化及功能研究奠定基础。

【关键词】融合基因;白介素 3; PE38KDEL; 原核表达; PQE30

【中国图书分类法分类号】R551 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-01-14

Construction and prokaryotic expression of fusion gene IL3-PE38KDEL

CHEN Yu, et al

(*Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct a prokaryotic expression plasmid of PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL and identify its recombinant protein expression. *Methods*: The IL3 and PE38KDEL gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the prokaryotic expression plasmid PQE30-Linker constructed after being sequenced. The recombinant vector confirmed by restriction endonucleases digestion, coenobium PCR, and DNA sequence analysis was transformed into E. coli SG13009. The expression of the protein was induced by IPTG. Relative molecular weight of the expression product was detected by SDS-PAGE. Finally, the fusion protein was examined by Western blot. *Results*: The results of restriction endonuclease digestion, coenobium PCR and DNA sequence analysis showed that the prokaryotic expression vector PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL was constructed successfully. With induction of IPTG, the relative molecular weight of the expression product was identical to the expected value. The expressed 6×His-IL3-PE38KDEL fusion protein were identified at relative molecular mass of 57KD by Western blot with anti-His monoclonal antibody, showing the fusion protein expressed correctly. *Conclusion*: The fusion protein IL3-PE38KDEL is successfully constructed, which lays a solid foundation for the further research of protein purification and function.

【Key words】Fusion gene; Interleukin 3(IL3); PE38KDEL; Prokaryotic expression; PQE30

急性髓系白血病(Acute myelogenous leukemia, AML)是我国最常见的恶性血液病。已有研究表明,白血病干细胞(Leukemia stem cells, LSC)是产生白血病细胞和维持白血病状态的祖先细胞[1,2]。LSC 多处在 G_0 期,对常规化疗药物无效,是白血病复发的根源。近年的研究显示,细胞因子白介素 3(Interleukin 3, IL3)受体 α 链(CD123)是 LSC 特异性的表面标志,而正常人类造血干细胞没有此标志[3]。因而 IL3 受体 α 链成为治疗白血病的重要靶点。

本课题拟用基因工程技术构建一种新的免疫毒素 IL3-PE38KDEL, IL-3 为导向分子,铜绿假单胞菌外毒素衍生物 PE38KDEL 为细胞毒性分子,免疫毒素 IL3-PE38KDEL 可以靶向性的针对 LSC 发挥特异性的杀伤作用。该原核表达载体应具有靶向性高,免疫毒素副作用低的特点,为克服白血病多药耐药、减少白血病复发带来福音。

作者介绍:陈 妤(1982-),女,硕士,
研究方向:白血病干细胞。

通讯作者:娄世锋,男,教授, E-mail: loushifeng@hotmail.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 含 PE38KDEL 片段的重组铜绿假单胞菌外毒素表达质粒 pGEX4T-1-PE38KDEL 由四川大学华西医学院微生物教研室李虹教授提供，含有 IL3 片段的基因 GM-CSF-IL3 由北京大学免疫教研室马大龙教授惠赠，表达载体 PQE30，大肠杆菌 *E.coli* DH5α，SG13009 均由重医检验系重点实验室保存。

各种限制性内切酶，TaqDNA 聚合酶，PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase 酶，DNA 分子量标准 DL2000Marker，500 bp-Marker，蛋白质 Marker，T4 连接酶，质粒小抽试剂盒，胶回收试剂均购合于 Takara 公司，引物的合成由上海英骏公司完成。IPTG，考马斯亮蓝 R250 购于 Sigma 公司。镍离子亲和层析柱(Ni^{2+}-NTA)购于 Novagen 公司。

1.1.2 引物设计 由上海英俊公司完成。

设计寡链单核苷酸 Linker F (正向)：5'-CGGAGGTG-GAGGTTCAGGAGGTGGACTGCA-3'；单核苷酸 Linker R(反向)：5'-GTCCACCTCCTGAACCTCCACCTCCGGTAC-3'。

据 Genbank 人类细胞因子 IL-3 基因全序列(序列号 NM000588)去除信号肽设计引物：IL3-F(正向)：5'-ACAG GCATGCGCTCCCATGACCCAGACAA-3'(含 *Sph* Ⅰ 酶切位点)；IL3-R(反向)：5'-CGGGGTACCAAAGATCGCGAGGCT-CAAAG-3'(含 *Kpn* Ⅰ 酶切位点)。

以重组铜绿假单胞菌外毒素表达质粒 pGEX4T-1-PE38KDEL 序列(含 PE38KDEL 片段)设计引物：PE38KDEL-F(正向)：5'-ATCCTGCAGGAGGGCGGCAGCCTGGCCG-3'(含 *Pst* Ⅰ 酶切位点)；PE38KDEL-R(反向)：5'-ACA AAGCTTTTAGAGCTCGTCTTTCGGCG-3'(含 *Hind* Ⅲ 酶切位点)。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒 PQE30-Linker 的构建 为使融合蛋白有良好的空间结构自由伸展，提高药物学及生物学活性。设计由谷氨酸和丝氨酸构成的疏水柔性肽(G_4SG_3)作为 Linker 连在 IL3 与 PE38KDEL 之间，上下游分别引入 *Kpn* Ⅰ 及 *Pst* Ⅰ 酶切位点。经变性退火后形成 34 bp 大小的双链 DNA。反应条件为：95℃变性 5 min，75℃ 30 s，从 75℃至 30℃缓慢退火至少 1 h，用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测 Linker 合成后的结果。用 *Kpn* Ⅰ 及 *Pst* Ⅰ 双酶切表达质粒 PQE30，将合成的 Linker 与载体 PQE30 以摩尔比为 10:1 的比例混合，在 T4 连接酶的作用下，14℃连接 16 h。

1.2.2 重组载体 PQE30-IL3-Linker 的构建 以重组质粒 GM-CSF-IL3 为模板，用 PrimeSTARTM HS DNA Polymerase 酶扩增出目的片段 IL3，PCR 反应条件为：98℃预变性 5 min，然后 98℃变 10 s，63℃退火 10 s，72℃聚合延伸反应 30 s，共循环 30 次。最后于 72℃聚合延伸反应 5 min。PCR 产物回收提纯后以 *Sph* Ⅰ/*Kpn* Ⅰ 进行双酶切，并克隆至具有相同酶切位点的质粒 PQE30—Linker 中。

1.2.3 PQE30-IL-3-Linker-PE38KDEL 融合基因构建及鉴定 以重组铜绿假单胞菌外毒素表达质粒 pGEX4T-1-PE38KDEL 为模板，用 PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase 酶扩增目的片段 PE38KDEL。反应参数如下：98℃预变性 5 min，98℃变性 10 s，65℃退火 10 s，72℃聚合延伸反应 1 min，共循环 30 次。最后 72℃聚合延伸反应 5 min，PCR 产物回收提纯后以 *Pst* Ⅰ/*Hind* Ⅲ 进行双酶切处理，并克隆至具有相同酶切位点的重组质粒 PQE30—IL3-Linker 中，转化感受态大肠杆菌 *E.coli* DH5α。经氨苄青霉素(100μg/ml)筛选，挑单菌落接种于含 Amp 的 LB 中培养，37℃振摇过夜，同时做重组质粒的酶切鉴定并送大连宝生物公司进行序列测定。

1.2.4 重组 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL 融合蛋白的诱导表达 将重组表达载体 pQE30-IL3-Linker-PE38KDEL 转化感受态大肠杆菌 SG13009，挑单个菌落接种入 LB 培养液(含 100 mg/L 氨苄青霉素，50 mg/L 卡那霉素)中，37℃恒温水平振摇过夜，次日将饱和培养物按 1:50 接种于 20 ml 新鲜 LB(含 100 mg/L 氨苄青霉素，50 mg/L 卡那霉素)培养液中，分 5 管，以相同条件 37℃振摇培养大约 2 h，待 OD_{600}=0.6 时，对照管不加 IPTG，其余 4 管加 IPTG 至浓度依次为 0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 继续培养，分别于 2.5、4、6 和 8 h 取 1 ml 菌液，离心收集沉淀，加入 1×SDS-PAGE 上样缓冲液，煮沸 10 min，12 000 r/min 离心 5 min，取上清进行 SDS-PAGE 分析。以确定最佳诱导表达条件。最后大量表达。

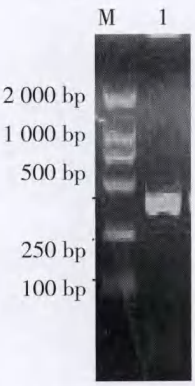
1.2.5 融合蛋白表达形式分析 大量诱导表达的工程菌 4℃，12 000 r/min 离心 10 min，每 100 ml 菌液加 5 ml 1×Binding Buffer(NaCl 500 mmol/L，Tris-cl 20 mmol/L，pH7.9)重悬，超声碎菌 20 min，功率 400 W，超声 5 s，停 5 s。4℃下 12 000 r/min 离心 10 min，分别取上清和沉淀 SDS-PAGE 分析蛋白质表达形式。

1.2.6 融合蛋白 IL3-PE38KDEL 的免疫印记分析 收集诱导工程菌 1 ml，12 000 r/min 离心 10 min，加入 1×SDS 上样 Buffer 充分混悬，100℃煮沸 10 min，1000 r/min 离心 1min 备用。配 15%分离胶，1mm 厚 10 孔梳，每孔上样 10μl。电泳 90 min 后切胶，将目的片段切下置于负极缓冲液中浸泡 30 min。测胶长及胶宽，剪取与胶等面积大小滤纸 8 张，剪下与胶等大的 PVDF 膜放甲醇中浸泡 15 s，再放于正极缓冲液中浸泡。按正确顺序放于电转仪中以 5 V 电压转 15 min。电转毕取出膜在 TBS 中略清洗，置于丽春红染液中染色约 2 min，明显条带即可取出在双蒸水中清洗干净。膜以闭液(PBS，pH7.4，含 5%的脱脂奶粉和 0.5%的 Tween-20)封闭 1 h，加入以封闭液稀释(1:200)的鼠抗 6×His 单克隆抗体 4℃孵育过夜，TBST 洗膜 4 次，每次 10 min，羊抗鼠的二抗(1:3 000)37℃温育 1 h，TBST 洗膜 4 次后，洗去二抗后以 ECL 发光试剂盒进行显色，X 光片曝光后进行显影定影。

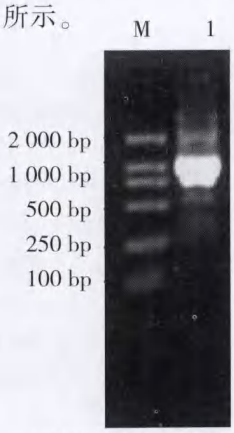
2 结 果

2.1 人类细胞因子 IL3 及假单胞菌外毒素 PE38KDEL 的 PCR 扩增

PCR 扩增得到了相应的目的片段，大小分别为 399 bp、1 038 bp，如图 1 所示。



M.DNA MarkerDL2000；
1.均为目的片段 IL3 的 PCR 扩增产物（399 bp）



M.DNA MarkerDL2000；
1.目的片段 PE38KDEL 的扩增产物（1 038 bp）

图 1　IL3 PCR 产物电泳图　图 2　PE38KDEL PCR 产物电泳图

2.2 重组融合质粒 IL3-PE38KDEL 的酶切鉴定

将已构建构的重组质粒 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL 分别经 *Pst* Ⅰ、*Hind* Ⅲ；*Sph* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ；*Sph* Ⅰ、*Hind* Ⅲ行双酶切鉴定，其酶切后的小片段分别为 1 038 bp、399 bp、1 475 bp 与预期相符。大连宝生物公司 DNA 序列报告显示，所构建的融合基因核苷酸序列及表达框无误，该质粒 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL 构建成功。其酶切结果如图 2 所示。

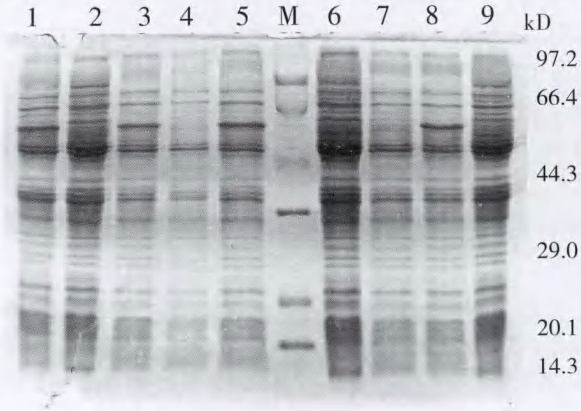


M_1. DNA Marker DL2000；M_2. 1kbp DNA Ladder Marker；
1. 融合基因经 *Pst* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切得到长约 1 038 bp 的小片段即 PE38KDEL；
2. 融合基因经 *Sph* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ双酶切得到长约 400 bp 的小片段即 IL3；
3. 融合基因经 *Sph* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切得到长约 1 500 bp 的小片段即 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL

图 3　重组质粒 IL3-PE38KDEL 酶切鉴定电泳图

2.3 融合蛋白的表达及 SDS-PAGE 分析

将重组质粒 PQE30-IL3-PE38KDEL 从克隆菌 DH5α 中提出，转入表达宿主菌 SG13009，经 IPTG 诱导后，与空载体转化的相同菌株的表达产物比较，都出现了新的蛋白条带，分子量为 57 kD 与预期的分子量大小相符。诱导时间在 2.5~8 h 内，在 IPTG 浓度为 0.1~2.0 mmol/L 之间表达无明显差异，表达量占菌体总蛋白量的 17.65%。见图 4。蛋白质的可溶性分析显示：目的蛋白仅存在于包涵体沉淀中，上清液未见明显表达。

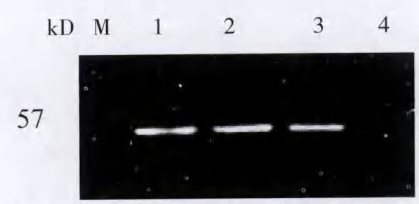


M.蛋白质分子量 Marker；1.诱导 8 h 后的工程菌；2.诱导 8 h 后的空载；3.诱导 6 h 后的工程菌；4.诱导 6 h 后的空载；5.诱导 4 h 后的工程菌；6.未诱导的空载；7.诱导 2.5 h 后的空载；8.诱导 2.5 h 厚的工程菌；9.未诱导的工程菌

图 4　SDS-PAGE 分析重组质粒 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL 在宿主菌 SG13009 的蛋白表达

2.4 融合蛋白 IL3-PE38KDEL 的免疫印记分析及序列测定

利用特异抗组氨酸标签的抗体对目的蛋白行免疫印记分析表明，在分子量约 57kD 的地方出现明显的目的条带，与预期相符。证实了表达产物能够被抗组氨酸标签的单克隆抗体特异性结合。说明构建的免疫毒素 PQE30-IL-Linker-PE38KDEL 在宿主菌中得到表达。



M. 预染 Marker；1、2、3.均为诱导 4 h 后的目的蛋白；4. 诱导 4 h 后的空载

图 5　融合蛋白 IL3-Linker-PE38KDEL Western blot 鉴定

3 讨 论

在白血病细胞群中,并非所有的细胞都有相同的增殖能力,而是存在一个等级系统。其中只有小部分有极强的增殖潜能,它们构成和维持了白血病状态。近几年来在这一领域的研究有所进展,发现并证实了白血病干细胞的存在[1]。随着白血病干细胞相对特异性抗原 CD123(IL-3 受体 α 链)的发现,将 CD123 作为靶点特异性清除 LSC 的研究越来越受到人们的关注[3,4]。铜绿假单胞菌外毒素(Pseudomonas aeruginosa exotoxin,PE)是由铜绿假单胞菌分泌,约为 66 000 的 1 条单链多肽,由 163 个氨基酸构成,毒性强烈,将它与靶向分子融合可以获得相应的免疫毒素。PE38KDEL 是将 PE 分子的受体结合区Ⅰa 区、部分Ⅰb 区去掉从而降低其免疫原性及非特异性毒性,同时将羧基端 REDLK 置换为内质网保守序列 KDEL,大大提高毒素分子的跨膜效应,使其活性增大 6~10 倍,从而增强所构免疫毒素的杀伤力[5,6]。去掉结合区(Ia 区)的 PE 其细胞毒特异性就完全取决于载体的特异性。因此非特异性毒副作用很低,临床治疗空间较大。

本课题尝试将靶向分子 CD123(IL3Rα 链)的选择性配体即人类细胞因子 IL3 与经修饰的多肽毒素 PE38KDEL 引入疏水柔性肽共价连接起来构建重组原核表达载体 IL3-Linker-PE38KDEL。IL3R 与 IL3 结合后能迅速内化到细胞浆,接着 PE 裂解为大小 M_t 37 000 及 M_t 27 000 2 个片段, 大片段最后进入高尔基体与延长因子 2(EF_2)结合使其糖基化失活,抑制蛋白合成从而导致细胞凋亡[5,7]。故利用 IL3 携带生物毒素杀伤白血病干细胞就成为很有希望的治疗办法。

目前国内外尚无 IL3-PE38KDEL 重组免疫毒素的构建报道。本课题将融合基因 IL3-PE38KDEL 成功构建到 PQE30 原核表达载体中。选用这一载体是考虑到 PQE30 是属于 PDS 质粒家族,带有大肠杆菌 T5 启动子和转录终止信号,能够编码 6 个组氨酸残基,外源基因经多克隆位点插入后,表达的蛋白带有六聚组氨酸接头。六聚组氨酸接头对蛋白质的空间构象及生物学活性影响非常小,但是对表达蛋白的纯化有重要意义[8]。由于组氨酸的咪唑环能够与金属 Ni^{2+}形成螯合物,利用Ni^{2+}-NTA 树脂可以达到纯化蛋白甚至柱上复性的目的。因此 PQE30-IL3-Linker-PE38KDEL 融合基因构建成功,序列正确无误,顺利诱导表达目的蛋白,分子量与预计相符,Western blot 条带单一清晰,融合蛋白的成功构建,为下一步蛋白质纯化、复性及生物学活性鉴定打下基础。

参 考 文 献

[1] Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice[J]. Nature, 1994, 367 (6464): 645-648.

[2] Hope K J, Jin L, Dick J E. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity [J]. Nat Immunol, 2004, 5(7): 738-743.

[3] Jordan C T, Upchurch D, Szilvassy S J, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells[J]. Leukemia, 2000, 14(10): 1777-1784.

[4] Guzman M L, Jordan C T. Considerations for targeting malignant stem cells in leukemia[J]. Cancer Control, 2004, 11(2): 97-104.

[5] Pastan I.Targeted therapy of cancer with recombinant immunotoxins [J]. Biochim Biophys Acta, 1997, 1333(2): C1-C6.

[6] Seetharam S, Chaudhary V K, FitzGerald D J, et al. Increased cytotoxic activity of PE and two chimeric toxins ending in KDEL[J]. Biol Chem, 1991, 266(26): 17376-17381.

[7] Kreitmam R J. Immunotoxins in cancer therapy[J]. Curropin Immunol, 1999, 11(5): 570-578.

[8] Dabrowski S, Kur J. Cloning and expression in Escherichia coli of the recombination His-tagged DNA polymerases from pyrococcus furiosus and pyrococcus woesei[J]. Protein Expression and Purification, 1998, 14 (6): 131-138.

(责任编辑:冉明会)