DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.02.021
第26卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 2
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)02-0135-04

论著

人全长 TALL-1 在大肠杆菌中的表达

高会广,何凤田,郑英如,李蓉芬,陈 姗,彭家和,陈 敏 (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 在克隆人TALL-1(TNF- and apoptosis ligand-related leukocyte expressed ligand 1)全长 cDNA 的基础上,用大肠杆菌进行表达并鉴定其生物学活性。方法 采用 RT-PCR 技术,从 HL-60 细胞中扩增编码人 TALL-1 的 cDNA,克隆于高效原核表达载体 pQE-80L 中,以 IPTG 诱导表达,Ni-NTA 层析纯化后,进行生物学活性检测。结果 RT-PCR 扩增得到了 858 bp 的 DNA 片段,测序结果与 GenBank 中报道的编码 TALL-1 的 cDNA 序列一致,并在大肠杆菌中获得了高效表达,活性检测发现它能抑制 U937 细胞的生长。结论 成功克隆了人 TALL-1 全长 cDNA,并获得了高效表达及纯化,纯化产物具有生物学活性,这为进一步的功能研究及临床应用奠定了基础。

关键词:TALL-1;cDNA 克隆;原核表达;蛋白纯化
中图法分类号:R392.13;R378.21;R394-33 文献标识码:A

High expression of human TALL-1 in *Escherichia coli*

GAO Hui-guang, HE Feng-tian, ZHENG Ying-ru, LI Rong-fen, CHEN Shan, PENG Jia-he, CHEN Min (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To clone the cDNA encoding human TNF- and apoptosis ligand-related leukocyte expressed ligand 1 (TALL-1), to express it in *Escherichia coli* (*E. coli*), and to identify its biological activity. **Methods** The total RNA was extracted from HL-60 cells, and the cDNA encoding human TALL-1 amino acids was amplified by RT-PCR. After sequence, the cDNA was ligated into the prokaryotic expression vector pQE-80L and induced by IPTG to express TALL-1. The protein was purified with Ni-NTA chromatography, and its immunological activity was detected. **Results** The cDNA of 858 bp amplified by RT-PCR was consistent with the sequence encoding human TALL-1 amino acids reported in GenBank. The TALL-1 was highly expressed. The protein could strongly suppress the growth of U937 cells. **Conclusion** The cDNA encoding human TALL-1 has been successfully cloned, and the relevant protein is highly expressed and purified. The purified product has biological activity. These results may pave the way for further studies.

Key words: TALL-1; cDNA cloning; prokaryotic expression; protein purification

TALL-1 也称为 THANK(TNF homologue that activates apoptosis, NF-KB and JNK)、BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)、BLyS (B-lymphocyte stimulator)、zTNF4 等[1]。它是 TNF 家族的一个新成员,1999 年首先由 Mukhopadhyay 等[2] 克隆成功。TALL-1 作为新的肿瘤坏死因子超家族成员,它具有 TNF 的活性,能抑制肿瘤细胞系的生长,可激活 caspase-3 而引起细胞凋亡。进一步的研究表明,TALL-1 还可诱导 B 淋巴细胞增殖与分化、促进免疫球蛋白生成、广泛参与 T 细胞的活化与应答[3~5]。鉴于其以上功能,如果以 TALL-1 及其受体为作用靶点来设计和实施治疗方案,则可能达到对某些免疫功能低下疾病及自身免疫性疾病的治疗目的。为此我们克隆了人 TALL-1 的基因,用大肠杆菌进行了表达,并鉴定了其生物学活性,旨在为临床上某些免疫功能低下疾病及自身免疫性疾病的治疗提供新型候选制剂。

1 材料与方法

1.1 主要材料

HL-60 细胞系由重庆医科大学病理生理学教研室提供;质粒 pUC18 及 pUC19 购自华美公司,菌种 DH5 及质粒 pQE-80L 由本室保存;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 试剂盒及 PCR 纯化试剂盒为 Promega 公司产品;限制性内切酶 *Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ 购自大连宝生物公司。抗-His 单抗和 Ni-NTA 层析系统购自德国 Qiagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 TALL-1 cDNA 的克隆 根据 GenBank 中编码人 TALL-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271228)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30271228)
作者简介:高会广(1973-),男,山东省沂南县人,硕士研究生,医师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。电话:(023)68752261-8056
收稿日期:2003-01-15;修回日期:2003-05-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 氨基酸的 cDNA 序列，设计特异性引物：

引物 1：5′-GCG AAT TCA TGG ATG ACT CCA CAG-3′

引物 2：5′-GCG TCG ACT CAC AGC AGT TTC AAT G-3′

在两个引物中分别引入 *Eco*RⅠ、*Sal*Ⅰ的酶切位点，以 HL-60 细胞总 RNA 为模板进行 RT-PCR（按试剂盒说明进行），电泳检测结果并测序，然后将测序正确的 pUC19/TALL-1 进行 *Eco*RⅠ＋*Sal*Ⅰ酶切，回收目的片段并连接于高效表达载体 pQE-80L 中，最后经酶切鉴定，得到重组原核表达载体 pQE-80L/TALL-1[6]。

1.2.2 蛋白的诱导表达 挑取含重组原核表达载体的单个菌落接种于 LB 培养液中，37 ℃，200 r/min 振荡培养过夜，次日以1%接种到 5 ml LB 培养液中，37 ℃，振荡培养至 D_{600} 为 0.8 时，加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L，继续培养 4 h。

1.2.3 SDS-PAGE 参照《现代分子生物学实验技术》进行，以15%的聚丙烯酰胺为分离胶，浓缩胶浓度为 5%，取上述培养液 1 ml，离心 12 000 r/min，1 min，沉淀加 100 μl 1× 上样缓冲液，100 ℃煮 10 min，取 20 μl 上样，电泳后，行考马斯亮蓝染色。

1.2.4 诱导表达的动力学研究 按 1.2.2 方法诱导表达，分别取加入 1 mmol/L IPTG 后 1～7 h 的培养物各 1 ml；再分别用 0.1、0.5、1.0、2.0 mmol/L 进行诱导，4 h 后各取培养物 1 ml。把上述样本处理后，行 SDS-PAGE（方法同 1.2.3）。

1.2.5 Western blot 分析 按一抗说明书进行。诱导表达的产物经 SDS-PAGE，半干法电转移至硝酸纤维素膜上，丽春红 s 染色后标出 marker 的位置，去离子水洗膜去丽春红 s，5%脱脂奶粉室温封闭，加抗-His 单抗孵育，洗涤后加 HRP 标记的第二抗体室温孵育 1 h，洗膜后加 DAB 闭光显色。

1.2.6 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化表达蛋白 将含重组质粒 pQE-80L/TALL-1 的表达菌株接种于 500 ml LB 中做大量表达（方法同 1.2.2），离心收集诱导表达后的细菌，超声波破碎菌体，离心沉淀包涵体[7]。用缓冲液 A（8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH_2PO_4、0.01 mol/L Tris-HCl pH 8.0）裂解包涵体，裂解上清过 Ni-NTA 树脂层析柱；用缓冲液 A 和缓冲液 B（8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH_2PO_4、0.01 mol/L Tris-HCl pH 6.3）洗柱，直至 A_{280} 小于 0.01，用缓冲液 C（缓冲液 B 中含 250 mmol/L 咪唑）洗脱目的蛋白。行 SDS-PAGE 电泳分析，并采取逐步降低尿素浓度的方法，透析除去纯化蛋白溶液中的尿素，并使变性的蛋白在此过程中自然复性。

1.2.7 生物学活性检测 培养 U937 细胞，用 1640 培养液将其配成 5× 10^6/ml 的悬液，在 96 孔培养板上分别加入不同量的重组 TALL-1（0.002、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10 μg）和淋巴细胞悬液 100 μl，以 PBS 作对照，每组 3 孔，37 ℃，5% CO_2 条件下培养 56 h，然后加入 ^{3}H-TdR，继续培养 16 h，液体闪烁计数仪测 cpm 值。

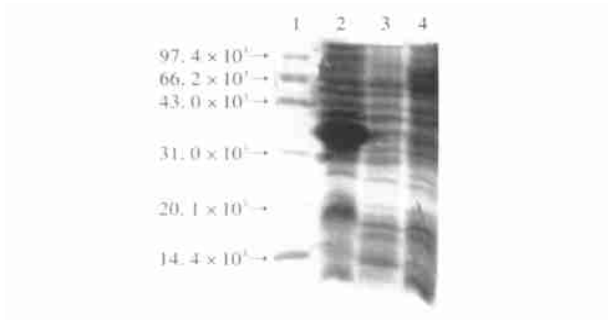
2 结果

2.1 重组原核表达载体的构建

pQE-80L/TALL-1 经酶切后，可见大小约为 860 bp 的目的片段，表明重组原核表达载体构建成功。

2.2 重组蛋白的诱导表达

携带 pQE-80L/TALL-1 质粒的 DH5α 菌株，经 IPTG 诱导后表达了重组目的蛋白，其分子量约为 36× 10^3，在菌体内以包涵体的形式存在。SDS-PAGE 结果见图 1。



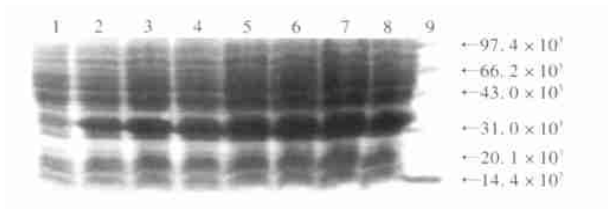
1：Protein marker；2：pQE-80L/TALL-1/DH5α after 4 h induction with IPTG；3：pQE-80L/TALL-1/DH5α before induction；4：pQE-80L/DH5α after 4 h induction with IPTG

图 1 重组蛋白的 SDS-PAGE

Fig 1 SDS-PAGE analysis of recombinant protein

2.3 诱导表达的动力学研究

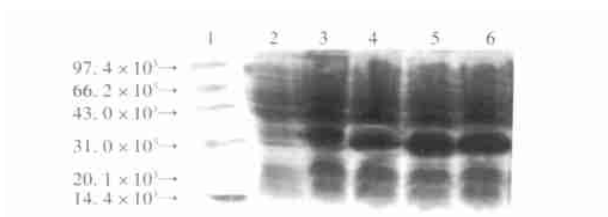
将各表达时间点和不同诱导剂量时所取样本处理后行 SDS-PAGE，考马斯亮蓝 R250 染色，结果分别见图 2、3。用 Bio-Rad 凝胶成像系统测定靶蛋白量占总蛋白质的比例，结果发现诱导 4 h 和 1 mmol/L 时表达效果最好。



1：pQE-80L/TALL-1/DH5α before induction；2－8：pQE-80L/TALL-1/DH5α after 1－7 h induction with IPTG；9：Protein marker

图 2 不同诱导时间的 SDS-PAGE

Fig 2 SDS-PAGE analysis of recombinant protein at different time



1：Protein marker；2：pQE-80L/TALL-1/DH5α before induction；3－6：pQE-80L/TALL-1/DH5α after induction with IPTG at 0.1，0.5，1.0，2.0 mmol/L

图 3 不同诱导浓度的 SDS-PAGE

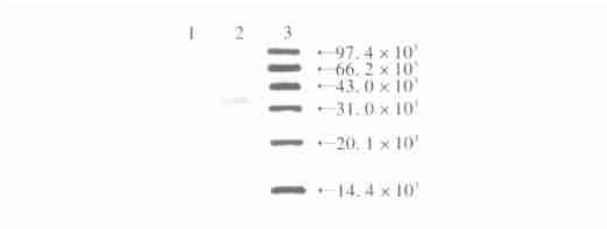
Fig 3 SDS-PAGE analysis of TALL-1 in IPTG of different concentrations

2.4 融合蛋白的鉴定

Western blot 分析显示，经诱导的菌体裂解物与抗-His 单抗反应，在分子量约 36× 10^3 处出现单一条带，而未经诱导的菌体

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

则无此反应, 说明所表达的融合有 6× his 的蛋白的确是目的蛋白。结果见图 4。



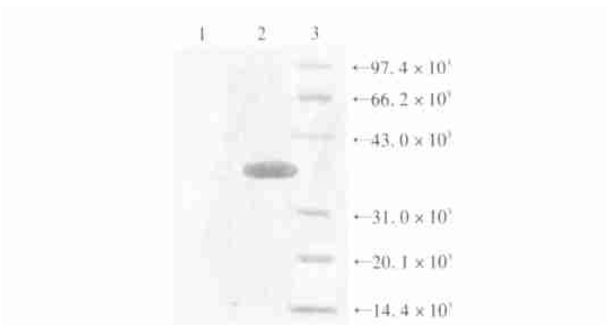
1: Negative control; 2: Recombinant protein TALL-1; 3: Protein marker

图 4　重组蛋白的免疫印迹分析

Fig 4　Western blot analysis of recombinant proteins

2.5　表达蛋白的纯化

表达蛋白经 Ni-NTA 纯化后行 SDS-PAGE, 结果电泳谱中呈单一条带(图 5), 说明目的蛋白得到了较高程度的纯化。



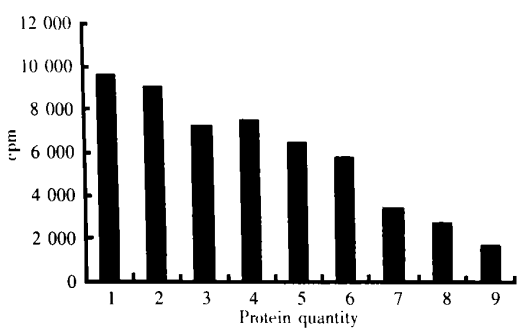
1: Negative control; 2: Purified recombinant protein TALL-1; 3: Protein marker

图 5　纯化产物的 SDS-PAGE

Fig 5　SDS-PAGE analysis of purified proteins

2.6　生物学活性检测

培养 72 h 后, 与对照组比较, 加入重组 TALL-1 的实验组, 其 cpm 值降低, 说明我们所获重组蛋白对 U937 肿瘤细胞具有杀伤作用, 结果见图 6。



1: Control (PBS); 2— 9: Protein quantity of 0.002, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, and 10 μg

图 6　TALL-1 对 U937 细胞的细胞毒作用

Fig 6　Cytotoxicity of TALL-1 to U937

3　讨论

TALL-1 是近年来新发现的 TNF 超家族成员, 它是由 285 个氨基酸组成的II型跨膜蛋白, 其中 47 ~ 73 氨基酸为跨膜区, 74 ~ 285 氨基酸为胞外区, 133 ~ 285 氨基酸为其发挥功能的主要区域[8]。该分子有膜结合型和可溶性两种形式, 二者的生物学活性基本一致[9]。TALL-1 作用的发挥, 需要通过与其受体结合来实现。目前已发现 TALL-1 受体至少有 3 个, 它们是 TACI (transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor)、BCMA (B cell maturation antigen)及 BAFF-R[10]。TALL-1 作为肿瘤坏死因子超家族成员, 它具有 TNF 所有的活性, 能抑制肿瘤细胞系的生长, 可激活 caspase-3 而引起细胞凋亡。另外, TALL-1 还是一种重要的免疫调节分子, 其在生理条件下一方面广泛参与调节 B 细胞发育和分化以及抗体的产生[1, 11]; 另一方面也广泛参与 T 细胞的活化与应答过程[4]。在病理情况下, TALL-1 过表达则密切参与了同时涉及 B、T 淋巴细胞功能亢进的系统性红斑狼疮和类风湿关节炎等多种自身免疫性疾病的发生和发展[3, 12]; 而 TALL-1 缺陷则会出现成熟 B 细胞数目减少[13]。鉴于 TALL-1 的上述特点, 人们已开始针对某些疾病设计和尝试以 TALL-1 及其受体为作用靶点的治疗新措施。在人类, 重组可溶性 TALL-1 已于 2001 年进入临床实验, 用以刺激免疫功能低下患者的免疫系统; 而抗-TALL-1 抗体也于 2001 年进入临床前试验, 用以治疗自身免疫性疾病[14]。

本研究在克隆 TALL-1 cDNA 并构建了其原核表达载体的基础上, 经 IPTG 诱导表达和层析纯化后得到高纯度的重组蛋白, 并初步检测了其生物学活性, 证实了 TALL-1 对肿瘤细胞具有杀伤功能, 同时, 我们还探索了其最佳表达条件, 从而为 TALL-1 的大量生产奠定了基础。总之, 所取得的这些结果为进一步研究 TALL-1 的作用机制及研制新型的 TALL-1 抑制分子创造了条件, 同时也为相关疾病的治疗性研究奠定了物质基础。

参考文献:

[1] Wu Y, Bressette D, Carrell J A, *et al*. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 35478— 35485.

[2] Mukhopadhyay A, Ni J, Zhai Y, *et al*. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-kappaB, and c-Jun NH2-terminal kinase[J]. J Biol Chem, 1999, 274(23): 15978— 15981.

[3] Zhang J, Roschke V, Baker K P, *et al*. Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus[J]. J Immunol, 2001, 166(1): 6— 10.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[4] Huard B, Schneider P, Mauri D, *et al*. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF[J]. J Immunol, 2001, 167(11): 6225—6231.
[5] Mackay F, Browning J L. BAFF: a fundamental survival factor for B cell [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2(7): 465—475.
[6] 高会广, 何凤田, 李蓉芬, 等. 人BAFF cDNA的克隆及原核表达载体的构建[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(6): 498—500.
[7] 王 燕, 毛琼国, 万 瑛, 等. 人IL-3突变体在大肠杆菌中的表达及纯化[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 33—35.
[8] Moore P A, Belvedere O, Orr A, *et al*. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator[J]. Science, 1999, 285(5425): 260—263.
[9] Schneider P, MacKay F, Steiner V, *et al*. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth[J]. J Exp Med, 1999, 189(11): 1747—1756.
[10] Oren D A, Li Y, Volovik Y, *et al*. Structural basis of BLyS receptor recognition[J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(4): 288—292.
[11] Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, *et al*. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells[J]. Blood, 2001, 97(1): 198—204.
[12] Stohl W. Systemic lupus erythematosus: a blissless disease of too much BLyS(B lymphocyte stimulator) protein[J]. Curr Opin Rheumatol, 2002, 14(5): 522—528.
[13] Batten M, Groom J, Cachero T G, *et al*. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes[J]. J Exp Med, 2000, 192(10): 1453—1466.
[14] Haseltine W A. Genomics and drug discovery[J]. J Am Acad Dermatol, 2001, 45(3): 473—475.

(编辑 陈聪连)

(上接134页)

表1 室内外照射空气吸收剂量率($\times 10^{-8}$ Gy·h^{-1})($\bar{x}\pm s$, %)

分类	实验组	对照组	实验组/对照组
一般实验室	12.11±4.05	12.34±4.03	0.98
机能实验室	11.74±3.38	—	—
办公室	14.53±4.19	13.54±4.17	1.07
杂物室	10.14±2.40	11.37±3.64	0.89
平均值	12.13	12.14	0.98

结果表明, 实验组室内空气吸收剂量率算术平均值为12.13$\times 10^{-8}$ Gy·h^{-1}, 对照组为12.41$\times 10^{-8}$ Gy·h^{-1}, 两组间(实验组/对照组为0.98)及各类房间之间空气吸收剂量率相差不大。

2.2 β表面沾染

表2是实验室组与对照组室内β表面沾染水平。

表2 室内设备、地面、墙壁β表面沾染水平(Bq/cm^2)($\bar{x}\pm s$)

分类	实验组	对照组
一般实验室	0.76±0.14	1.33±0.37
机能实验室	0.77±0.14	
办公室	1.24±0.12	1.67±0.28
杂物室	0.80±0.20	1.20±0.17

结果表明, 实验组室内β表面沾染算术平均值为0.89 Bq/cm^2, 对照组为1.40 Bq/cm^2。

3 讨论

我们生活的环境中存在一定剂量的天然辐射, 即天然本底辐射, 它是由宇宙射线、地球γ辐射的外照射、体内放射性核素引起的内照射、氡及其短寿命子体四种组分组成的。天然辐射是正常情况下人类所受辐射的最大来源。天然外照射是指地球γ辐射和宇宙射线之和。人类所受来自天然辐射的年有效剂量平均为2 400 μSv[2]。在同一地区, 室内γ辐射水平的差异主要与建筑材料中天然放射性核素含量有关。

某教研室是我校基础科室, 近几十年来, 因历史原因曾在该室放置过封闭源, 以及工作需要曾使用过同位素试剂, 且近年又使用计算机等, 这些导致了有人怀疑工作人员所受辐射增高, 为此, 我们对该室所属房间进行了测量。

测量结果表明, 某教研室室内天然外照射空气吸收剂量率为12.13$\times 10^{-8}$ Gy·h^{-1}, 对照组为12.41$\times 10^{-8}$ Gy·h^{-1}, 两组间(实验组/对照组为0.98)及各类房间之间空气吸收剂量率相差不大。这与文献所报道的室内外照射空气吸收剂量率主要与建筑材料的种类有关是一致的。实验组与对照组均稍高于四川省室内天然外照射空气吸收剂量率8.97$\times 10^{-8}$ Gy·h^{-1}[3], 尽管这种数值稍高, 但仍在我国室内外照射的范围内。另外, 有较多VDTs的机能实验室空气吸收剂量率与一般实验室相差不大, 可能由于测量时仪器都已关闭有关; 这与文献[4]报道瞬时法测得使用VDTs用房比未使用房间稍高, 但累积法测量却未见升高的结论相近。

室内β表面沾染水平为0.89 Bq/cm^2, 对照组为1.40 Bq/cm^2, 两组β表面沾染水平均未超出一般工作场所β粒子污染表面导出限值37 Bq/cm^2[5]。

总之, 尽管几十年来, 某教研室长期使用同位素试剂, 及近年来使用计算机等仪器较多, 但总体说来, 其室内天然外照射及β表面沾染水平仍在正常范围内。

关键词: 天然外照射; 空气吸收剂量率; β表面沾染
中图法分类号: R134 文献标识码: B

参考文献:

[1] 潘自强, 郭明强, 崔广志, 等. 中国天然辐射本底水平和居民剂量估算[J]. 辐射防护, 1992, 12(1): 251—259.
[2] United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and effects of ionizing radiation[M]. New York: United Nations, 1993. 14—16.
[3] 邓新华. 四川省环境天然贯穿辐射水平调查研究[J]. 辐射防护, 1991, 11(1): 35—39.
[4] 李 蓉, 郭 勇. 解放军医学图书馆天然外照射的测量与比较[J]. 中国辐射卫生, 1999, 8(3): 147—150.
[5] 程绍钧, 余裕民. 检验核医学[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1999. 15—19.

(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net