DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.029
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
442 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0442-02

人可溶性TRAIL cDNA的克隆及新型原核表达载体的构建

李蓉芬,何凤田,高会广,陈 姗,江 渝,叶治家,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 克隆人可溶性TRAIL(sTRAIL)cDNA并构建其原核表达载体,为制备新型抗癌分子创造条件。方法 提取HL-60细胞总RNA,经RT-PCR扩增编码人TRAIL 114~281氨基酸残基的cDNA序列,将其克隆至载体pUC19进行序列测定,然后构建于新型原核表达载体pQE-80L中。结果 RT-PCR扩增得到了504bp的DNA片段,序列分析表明与GeneBank中报道的编码人TRAIL 114~281氨基酸残基的cDNA序列完全一致。结论 sTRAIL cDNA的克隆及其原核表达载体的构建,为进一步制备具有抗肿瘤活性的sTRAIL奠定了基础。

关键词:sTRAIL;RT-PCR;克隆;序列分析
中图法分类号:R394-33;R394.3 文献标识码:A

Cloning of human soluble TRAIL cDNA and construction of its prokaryotic expression vector

LI Rong-fen, HE Feng-tian, GAO Hui-guang, CHEN Shan, JIANG Yu, YE Zhi-jia, PENG Jia-he, CHEN Min (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone human soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cDNA and construct its prokaryotic expression vector to prepare a new type antitumor molecule. Methods The total RNA was extracted from HL-60 cell and cDNA was amplified which encoding human TRAIL 114 to 281 amino acid residues with RT-PCR and ligated with vector pUC19 for sequencing. Then the identified cDNA was ligated with the new type prokaryotic expression vector pQE-80L. Results A cDNA sequence of 504 bp was obtained with RT-PCR. Sequence analysis indicated it was completely same as the sequence reported in GenBank. Conclusion This study found a basis for the production of the active soluble TRAIL for antitumor.

Key words: sTRAIL; RT-PCR; clone; sequence analysis

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)也称Apo-2L,是肿瘤坏死因子家族的新成员,1995年由Wiley等[1]首先克隆成功。TRAIL在肝、肾、小肠等组织以及外周血淋巴细胞和转化的T和B淋巴细胞中都有广泛表达[2],其膜结合形式和重组可溶性三聚体形式可以诱导许多淋巴系和非淋巴系肿瘤细胞凋亡,也可引起许多对于FasL和TNFα有抗性的细胞凋亡[3,4]。由于TRAIL具有选择性介导肿瘤细胞凋亡的能力[5],因而有望成为临床上实用的新型广谱抗癌制剂。TRAIL的胞外区(114~281氨基酸残基)可形成可溶性的TRAIL分子(sTRAIL),实验表明[6],sTRAIL在体外能广泛引起各种组织来源的肿瘤细胞株的凋亡,对正常细胞无毒副作用。本实验利用反转录聚合酶链反应(RT-PCR),以人急性早幼粒白血病细胞系HL-60细胞总RNA为模板,扩增出人TRAIL胞外区(114~281氨基酸残基)的cDNA序列,将其克隆于载体pUC19进行序列测定,随后构建于新型表达载体pQE-80L,从而为进一步利用大肠杆菌表达sTRAIL创造了条件。

1 材料与方法

1.1 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pUC19购自华美公司,pQE-80L由美国加州Beckman癌症研究所周度金教授惠赠;RPMI-1640培养基及TriPure RNA抽提试剂为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BamHⅠ购自大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 HL-60细胞的培养 在含10%小牛血清的RPMI-1640培养液中,37 ℃、5% CO_2条件下培养。

1.2.2 细胞总RNA的提取 采用TriPure试剂盒提取细胞总RNA,操作严格按说明书进行。

1.2.3 RT-PCR扩增人sTRAIL cDNA 根据编码人TRAIL 114~281氨基酸残基的cDNA序列设计一对特异引物,上游引物为5′GGGGATCCAGGTCAGTTAGCCAACT 3′,下游引物为5′CGGGATCCAGTGAGAGAAAGAGGTCCTC 3′(黑线标记为*BamH*Ⅰ酶切位点)。RT-PCR按试剂盒说明进行:RNA 1 μg/5 μl,5× 反应buffer 10 μl,上下引物各2 μl,dNTP 1 μl,AMV RTase 5 U/1 μl,Tfl DNA Polymerase 5 U/1 μl,25 mmol/L $MgSO_4$ 2 μl,ddH_2O 26 μl,总体积为50 μl,48 ℃ 45 min;94 ℃预变性2 min,然后94 ℃ 30 s,60 ℃ 1 min,68 ℃ 2 min,40个循环,最后68 ℃延伸7 min。

1.2.4 扩增产物的鉴定 取5 μl RT-PCR产物于1.5%琼脂糖凝胶中电泳,以标准DNA分子量作标准,凝胶扫描仪下观察并记录结果。

1.2.5 sTRAIL-pU19质粒的构建 PCR产物及载体pUC19经*BamH*Ⅰ酶切后分别采用纯化试剂盒进行回收,按常规连接反应条件于16 ℃连接24 h,取5 μl连接产物转化至大肠杆菌DH5α感受态细胞,经蓝白筛选出阳性重组子。经*BamH*Ⅰ进行酶切鉴定,再经酶切鉴定连接方向,最后得到顺式连接sTRAIL-pU19阳性重组子。

1.2.6 sTRAIL-pU19的序列测定 由上海生工公司完成

作者简介:李蓉芬(1963—),女,安徽省宿州市人,硕士,实验师,主要从事抗肿瘤分子方面的研究 电话:(023)68752261
通信作者:何凤田,电话:(023)68752262
收稿日期:2001-10-19;修回日期:2001-12-25

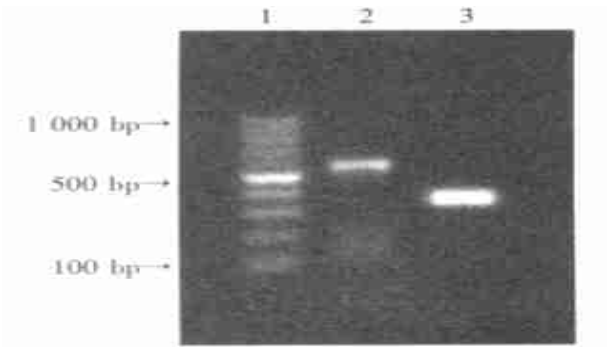
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.7　原核表达载体 sTRAIL-pQE80L 的构建　　将 sTRAIL-pU19 进行 *BamH* Ⅰ 酶切, 回收目的片段并连接于新型表达载体 pQE-80L 中, 经蓝白筛选出阳性重组子, 最后经 *BamH* Ⅰ 酶切鉴定, 得到原核表达载体 sTRAIL-pQE80L。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增 sTRAIL cDNA

可见清晰条带, 片段大小约为 500 bp, 见图 1。



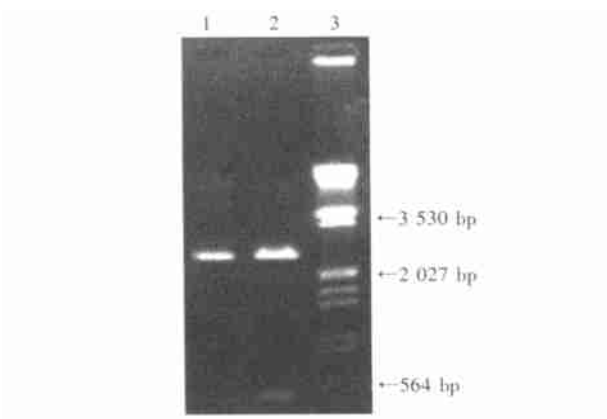
1: Marker (100 bp DNA Ladder); 2: RT-PCR product; 3: Positive control

图 1　RT-PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶的电泳结果

Fig 1　Electrophoresis of RT-PCR product in 1.5% agarose gel

2.2　阳性重组子 sTRAIL-pU19 的筛选

阳性重组子 sTRAIL-pU19 经 *BamH* Ⅰ 酶切后, 可见大小约 500 bp 的目的片段, 见图 2。



1: Recombinant sTRAIL-pU19; 2: Recombinant sTRAIL-pU19 vector digested by *BamH* Ⅰ ; 3: λ/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ marker

图 2　重组质粒 sTRAIL-pU19 的酶切鉴定

Fig 2　Identification of recombinant plasmid sTRAIL－pU19 with enzyme digestion

2.3　sTRAIL-pU19 的序列测定

从 3′端测序, 所测 504bp 与 GenBank 中报道的编码人 TRAIL 114～281 氨基酸残基的 cDNA 序列进行对比, 结果完全一致, 克隆的 sTRAIL cDNA 序列:

GTGA GAGAAAGAGG TCCTCAGAGA GTAGCAGCTC ACATAACTGG
GACCAGAGGA AGAAGCAACA CATTGTCTTC TCCAAACTCC AAGAATGAAA
AGGCTCTGGG CCGCAAAATA AACTCCTGGG AATCATCAAG GAGTGGGCAT
TCATTCCTGA GCAACTTGCA CTTGAGGAAT GGTGAACTGG TCATCCATGA
AAAAGGGTTT TACTACATCT ATTCCCAAAC ATACTTTCGA TTTCAGGAGG
AAATAAAAGA AAACACAAAG AACGACAAAC AAATGGTCCA ATATATTTAC
AAATACACAA GTTATCCTGA CCCTATATTG TTGATGAAAA GTGCTAGAAA
TAGTTGTTGG TCTAAAGATG CAGAATATGG ACTCTATTCC ATCTATCAAG
GGGGAATATT TGAGCTTAAG GAAAATGACA GAATTTTTGT TTCTGTAACA
AATGAGCACT TGATAGACAT GGACCATGAA GCCAGTTTTT TTGGGGCCTT
TTTAGTTGGC

3　讨论

人 TRAIL 分子由 281 个氨基酸组成, N 端无信号肽, C 端为胞外区, 是一种典型的 Ⅱ 型跨膜蛋白, TRAIL 的 114～281 位氨基酸残基区域可形成可溶性的 TRAIL 分子(sTRAIL), 在天然状态下以三聚体的形式发挥作用。TRAIL 通过两个死亡受体(DR4、DR5)介导肿瘤细胞凋亡[7]。与其它 TNF 家族成员相比, TRAIL 的抗肿瘤作用具有如下特点: 更强的诱导肿瘤细胞凋亡的能力、对正常细胞无明显毒副作用、广谱的抗癌作用、仅对细胞核因子 NF-κB 有微弱激活作用、与放化疗药物有明显的协同作用等[8]。本研究中以人急性早幼粒白血病细胞系 HL-60 细胞总 RNA 为材料, 经 RT-PCR 扩增出 TRAIL 胞外区 cDNA 序列, 并构建了其原核表达载体, 为进一步制备 sTRAIL 创造了条件。

我们所采用的原核表达载体 pQE-80L 是一种新型高表达载体, 该载体表达的目的蛋白量可达细胞蛋白总量的 50%, 表达蛋白的 N 端带有 6× His-tag, 便于纯化和检测。此外, 这种载体还可以表达 lac 抑制子, 在 IPTG 诱导前抑制目的蛋白的表达, 因而适用于毒性基因的表达。

参考文献:

[1] Wiley S R, Schooley K, Smolak P J, *et al*. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis[J]. Immunity, 1995, 3(6): 673－682.

[2] Snell V, Clodi K, Zhao S, *et al*. Activity of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in haematolohical maligacies[J]. Br J heamatol, 1997, 99(3): 618－624.

[3] Henning W, Mariapia A D, Richard S J, *et al*. TRAIL-R2: anovel apoptosis-mediating receptor for TRAIL[J]. EMBO J, 1997, 16(17): 5 385－5 391.

[4] Wayne D H, Perter H. TNF-related apoposis-inducing ligand(TRAIL) inducess apoposis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell Killing of target cells[J]. J Immunol, 1998, 161(5): 2 195－2 200.

[5] Pascal S, Jean-Luc B, Margot T, *et al*. Characterization of two receptors for TRAIL[J]. FEBS Letters, 1997(416): 329－334.

[6] Strater J, Moller P. Expression and function of death receptors and their natural ligands in the intestine[J]. Ann N Y Acad Sci, 2000, 915: 162－170.

[7] Pan G, O' Rourke K, Chinnaiyan A M, *et al*. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL[J]. Science, 1997, 276(5 309): 111－113.

[8] acour S, Hammann A, Wotawa A, *et al*. Anticancer agents sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated caspase-8 activation and apoptosis[J]. Cancer Res, 2001, 61(4): 1 645－1 651.

(编辑　冷怀明)

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