

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738 (2006) 02 - 0151 - 03

诱骗受体 DcR3 的基因构建、表达及特异性鉴定

李文珠¹, 陶惠然², 颜江华², 张长弓², 苏金华², 王阶平¹, 杨桂旺¹, 庄国洪^{1*}(厦门大学: ¹生命科学学院, ²医学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005)

[摘要] 目的: 构建适于原核表达的人诱骗受体 DcR3 基因, 并进行重组蛋白的表达纯化及特异性鉴定。方法: 查得人 DcR3 cDNA 全序列, 将其分段设计引物, 通过重叠 PCR 获得 DcR3 基因。构建 pET-22b (+) /DcR3 表达载体, 转化大肠杆菌 Rosetta-gami, IPTG 诱导表达, Ni 柱纯化。采用 ELISA 进行特异性鉴定。结果: 通过重叠 PCR 获得了编码正确氨基酸序列的目的基因。目的蛋白以包涵体的形式表达, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。纯化后, 蛋白纯度达 95% 以上。ELISA 结果表明所纯化的蛋白可与抗 DcR3 抗体发生特异结合。结论: 诱骗受体 DcR3 基因的成功构建、表达及纯化, 为进一步的功能研究奠定了基础。

[关键词] DcR3; 基因构建; 基因表达**[中图分类号]** Q786 **[文献标识码]** A

诱骗受体 3 (decoy receptor 3, DcR3) 是 1998 年 Pitti 等^[1]发现的肿瘤坏死因子受体 (TNFR) 超家族的一新成员。DcR3 能竞争性地与 LIGHT (lymphotoxin-like, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D (gD) for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes; TNFSF14) 及 FasL 结合并抑制其介导的细胞凋亡^[2]。现有的研究表明, DcR3 在肺癌、胃肠道肿瘤、脑恶性胶质瘤、胰腺癌和肝癌等恶性肿瘤组织中都有不同程度的表达^[3], 同时, DcR3 在肿瘤患者血清及组织中浓度的高低与其恶性程度呈正相关^[4]。由于 DcR3 是癌组织分泌产生的, 因此术后患者血清中 DcR3 水平可作为肿瘤切除彻底与否的重要指标。

由于 DcR3 与多种恶性肿瘤的生物学特性和疾病分期等方面密切相关^[5], 因此 DcR3 在肿瘤早期排查、手术切除效果评估等方面具有重要的临床意义。降低 DcR3 的基因表达可能使肿瘤细胞趋向凋亡, 因

此 DcR3 在肿瘤基因治疗中有巨大的潜在价值。同时, DcR3 在自身免疫性疾病方面也有一些研究报道^[6]。本实验中通过重叠 PCR 技术获得适合在原核细胞中表达的人 DcR3 基因序列, 并在大肠杆菌中获得的高效表达、纯化后的人 DcR3 蛋白具有与抗 DcR3-IgG 结合的特异性。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 Rosetta-gami 菌株、质粒 pET-22b (+) 均购自 Novagen 公司。引物由上海生工公司合成。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶及 Pfu DNA 聚合酶为 NEB 公司产品。质粒提取及胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。Ni²⁺-HiTrap Chelating HP 树脂为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。兔抗 DcR3-IgG 抗体和 HRP 标记的鼠抗兔 IgG 抗体购自 Signa 公司。抗 DR4、DR5 单克隆抗体 (mAb) FUM1.4、FUM1.5 由第四军医大学金伯泉教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 DcR3 的基因构建 从 GenBank 上查得 DcR3 cDNA 全序列, 去除 N 端 29 个信号肽序列。根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则, 在不影响氨基酸序列的前提下, 将 DcR3 的核苷酸序列进行部分修改。将其分成 12 个引物片段, 经重叠 PCR 得到 DcR3 基因。利用引物 F1 和 R12 引入 Nco I 和 Xho I 酶切位点 (表 1)。

1.2.2 DcR3 表达载体的构建、表达及纯化 PCR 产物及质粒分别用限制性内切酶 Nco I 和 Xho I 消化, 胶回收。用 T4 DNA 连接酶将 DcR3 基因克隆至质粒 pET-22b (+) 中, 构建重组质粒 pET-22b (+) /DcR3, 转化 *E. coli* Rosetta-gami, 重组子提取质粒进行酶切鉴定, 阳性克隆送上海英俊生物技术有限公司测序。参照文献^[7]挑选测序正确的重组质粒 pET-22b (+) /DcR3 的 *E. coli* Rosetta-gami 单菌落, 37 振荡培养过夜, 按 1:100 稀释到 LB 培养液中, 37 振荡培养至 A₆₀₀ 值 0.6~0.8 时, 加入终浓度为 0.7 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 7 h, 目的蛋白的纯化参照 Amersham Pharmacia Biotech 公司提供的 Ni 柱蛋白纯化操作手册进行。采用透析法复性。

1.2.3 ELISA 鉴定特异性 用表达产物 (100 μg/L) 包被酶标板 100 μL/孔, 3 孔, 分别记为 A、B、C, 4 过夜, 以 BSA (10 mg/L) 作为阴性对照, 同时设空白对照。每孔加 200 μL 含 10 g/L BSA 的 PBS, 37 温育 1 h, A、B、C 分别加 1:1000

收稿日期: 2005 - 12 - 09; 修回日期: 2006 - 01 - 10

基金项目: 厦门大学科研启动基金资助 (No. Z03103)

作者简介: 李文珠 (1983 -), 女, 浙江温州人, 硕士生。

Tel: (0592) 2186980; Email: zz_xx@126.com

* Corresponding author, Email: zhuanguohong@yahoo.com.cn

共同第 1 作者

稀释的兔抗 DcR3-IgG 抗体、FUM1. 4、FUM1. 5, 37 温育 1 h, 加 1 100 稀释的 HRP 标记的鼠抗兔 IgG 抗体, 37 温育 0.5 h, 然后加入 TMB 底物液, 避光显色 15 min, 以 2 mol/L H₂SO₄ 终止反应。酶标检测仪测定 A₄₀₅ 值。本实验重复 3 次。

表 1 DcR3 引物详表

序号	引物	产物 (bp)
D1	F1 GGCCA TGGATGTGGCA GAAACACCGA CCTACCCGTGGCGTGACGCA GAGACA GGGGAACGTC TGGTGTGCGCCCA GTGTCCGCCA GG	166
	R2 TGGGTGTAA TGGCGCGGA GGACA TGGGCCGCA CGTCGTCGGGCTGTCA CGCGGCA TGGAC GCTGCA CAAA GGTGCCTGGCGGACAC	
D2	F3 TACACCA GTTCTGGAAC TACCTGGA GCCTGTCGCTACTGCAAC GTCTGTGCGGTGA GCTGTA GGA GGA GGCAC GTGCTTGCCA T	166
	R4 A GA TGA TGC TCCAA GCA GAAACCA GCA TGC GC GAA GAA GCCGTGTGCGGCA GC GGCA GCG CGGTTA TGGGTGCA TGGCAA GCACG	
D3	F5 ATGCA TCTGTGCCA CCGGGTGC CGCGTGA TTGCCCGGGCA CCCC GA GCA GAA CACGCA GTGCCAACCGTGCCGCCGGGTACCT	166
	R6 ACA TTGA GGGCCA GGCCCA GGCCCGTGA GTTGC GA TCGGGCTGGCA TTGCTCTGA GCTGGA GCTGCTGGCTGA GAA GGTA CCCGGCG	
D4	F7 CCTCAA TGTGCCGGGCTCTA GTTCCCA TGA CACCTGTGCA CCA GCTGCACTGGCTTCCCGCTCA GACCCCGTGTACCGGGA GCTGA	166
	R8 TTGCAACA GCCCGTGA GACGCTTGA TGG GA TGTCTGGAAA GCCA CAAA GTCGA TGA CGGCA CGTTCACACTCTCTCA GCTCCCGGT	
D5	F9 GCTGTGCAA GCCTTA GA GGCCCGGA GGGCTGGGGTCCGACCCG GTGCGGGCCGCG GGCCTTGA GCTGAA GCTGCGTCTGCTGT	166
	R10 GCA TACGGGCCACGCGCA GCCTGTAA GA CGCA CCA GCA GTGCCCGTCTGCGCCCA GGA GCTCCGTGA GACGACGACGCA G	
D6	F11 GCCCGTA TGCCCGGCTGGAACGTA GC GTTCGTGA GCG	66
	R12 GA GCTCGA GA TGCA CCGGTAA GAA GCGCTCACGAACG	

2 结果

2.1 DcR3 的基因构建 经 4 轮重叠 PCR 将 12 个长引物片段拼接成完整的 DcR3 基因序列。第 1 轮 PCR 反应, 分别生成 166 bp 长的产物 D1、D2、D3、D4、D5; D6 长度为 66 bp; 第 2 轮 PCR 反应将 D1 与 D2、D3 与 D4 连接成 320 bp 的产物 D7、D8; D5 与 D6 连接成 D9 长度为 220 bp; 第 3 轮 PCR 反应将 D8 与 D9 连接成 528 bp 产物 D11; 第 4 轮 PCR 反应将 D7 与 D11 连接成产物 D12, 即 835 bp 的 DcR3 基因, 各轮 PCR 产物大小均与理论值相符 (图 1)。反应条件均为: 95 预变性 4 min; 95 变性 40 s, 53 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 10 次; 95 变性 4 min; 95 变性 40 s, 58 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 延伸 10 min。

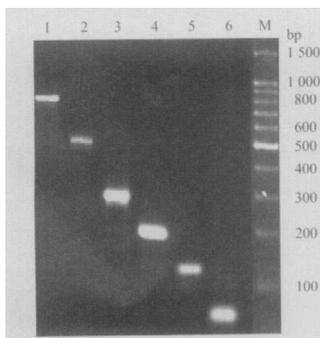


图 1 PCR 产物电泳图

1: D12 (835 bp); 2: D11 (528 bp); 3: D7 (320 bp); 4: D9 (220 bp); 5: D1 (166 bp); 6: D6 (66 bp); M: DNA marker

2.2 重组质粒的酶切鉴定 重组子质粒经 *Nco* I 及 *Xho* I 酶切后, 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到目的条带分别为 DcR3 条带 (813 bp)、pET-22b (+) 条带 (5 482 bp) (图 2)。测序结果表明载体构建正确。

2.3 DcR3 在大肠杆菌中的表达及纯化 含重组质粒 pET-22b (+) /DcR3 的 *E. coli* Rosseta-gam 经 IPTG 诱导表达后, 通

用所测得的 A 值按下述公式计算 P/N 值:

$$P/N \text{ 值} = (\text{被检样品 } A \text{ 值} - \text{空白对照 } A \text{ 值}) / (\text{阴性样品 } A \text{ 值} - \text{空白对照 } A \text{ 值})。$$

P/N 值 > 2.1 判为阳性。

过不同的诱导时间和诱导剂浓度对重组菌进行诱导表达, 确定其最适表达条件为 IPTG 终浓度为 0.7 mmol/L、37 诱导 7 h。目的蛋白主要以包涵体形式存在, 表达量占菌体总蛋白的 30% 以上。洗涤并溶解包涵体, 离心取上清过 Ni 柱纯化。经 SDS-PAGE 分析在相对分子质量 (M_r) 为 33 000 附近有一特异条带, 符合目的蛋白理论推算值 (M_r 约 32 700), 扫描分析显示其纯度达 95% 以上 (图 3)。

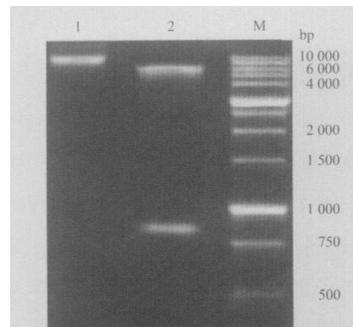


图 2 重组 pET22b (+) /DcR3 质粒的双酶切鉴定

1: 重组 pET22b (+) /DcR3 质粒; 2: *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切 pET22b (+) /DcR3 质粒; M: DNA marker

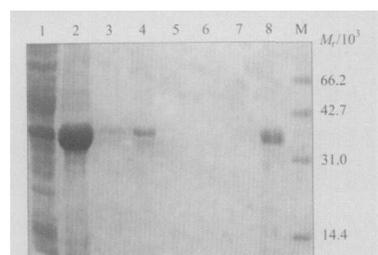


图 3 DcR3 表达及纯化的 SDS-PAGE 分析

1: 破碎上清; 2: 破碎沉淀; 3: 过柱液; 4: Binding buffer 洗脱液; 5: 7: Wash buffer 洗脱液; 8: Elute buffer 洗脱液; M: 蛋白 marker

2.4 特异性鉴定 通过 ELISA 鉴定, 纯化后得到的蛋白可以

同抗 DcR3-IgG 抗体特异结合, 与 Anti-DR4 mAb FUM1. 4、Anti-DR5 mAb FUM1. 5 没有特异结合, 3 次所测得的结果均相同, 其 P/N 值分别为 3.43、3.39、3.28, 均大于 2.1, 说明复性后的融合蛋白是纯化的 DcR3 蛋白。

3 讨论

本实验中以 GenBank 公布的人 DcR3 cDNA 序列为依据, 去除 N 端 29 个信号肽序列。根据密码子的简并性和大肠杆菌的密码子喜好性原则, 在不影响氨基酸序列的前提下, 将原序列中出现的稀有密码子核苷酸序列进行修改。以修改后的基因序列为模板, 设计 12 条引物, 并分别在引物 F1 和 R12 中引入 *Nco* 和 *Xho* 酶切位点, 每条引物之间有 12 个碱基互补。经过 4 轮 PCR 将 12 个引物片段拼接成 DcR3 基因序列 (835 bp, 包含酶切位点和保护碱基)。经测序证实与 GenBank 中的人 DcR3 (NM003823, AF134240, NM032945) 所编码的 271 个氨基酸序列一致, 阅读框完全正确。因互补数较少对连接反应的最适条件进行了较长时间的摸索, 建议采用此方法时设计引物互补数要大于 15 bp。将 PCR 产物与大肠杆菌表达质粒 pET-22b (+) 连接构建成为 DcR3 的原核表达载体, 转化大肠杆菌 Rosetta-gami 后, 发现基因产物以包涵体形式存在。这能有效地防止细胞内蛋白酶对目的蛋白的水解作用, 使目的蛋白大量聚集, 经变性处理后便于分离纯化。DcR3-6 ×His 蛋白在细菌中的表达量占菌体总蛋白的 30%, 经 SDS-PAGE 分析显示在 M_r 为 33 000 附近有明显表达条带, 与基因编码的理论推算值相符。经 Ni^{2+} 树脂亲和层析纯化后, 表达蛋白的纯度达 95%。ELISA

检测结果显示表达纯化产物可与抗 DcR3 抗体发生特异结合反应, 说明 DcR3 具有一定的抗原活性。我们首次采用重叠 PCR 方法成功获得适于原核表达的人 DcR3 基因, 并成功表达、纯化到 DcR3 蛋白, 为进一步分析其功能和调节机制及研制新型的肿瘤和自身免疫病靶向药物奠定了基础。

致谢: 在此诚挚感谢第四军医大学金伯泉教授提供 Anti-DR5 mAb FUM1. 5 和 Anti-DR4 mAb FUM1. 4, 使得实验能顺利完成。

参考文献:

- [1] Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, *et al*. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer[J]. *Nature*, 1998, 396(6712): 699 - 703.
- [2] Chang YH, Hsieh SL, Chao Y, *et al*. Proinflammatory effects of LIGHT through HVEM and LT R interactions in cultured human umbilical vein endothelial cells[J]. *J Biomed Sci*, 2005, 12(2): 363 - 375.
- [3] Shi G, Mao J, Zhang J, *et al*. Tumor vaccine based on cell surface expression of DcR3/TR6[J]. *J Immunol*, 2005, 174(8): 4727 - 4735.
- [4] Arakawa Y, Tachibana O, Hasegawa M, *et al*. Frequent gene amplification and overexpression of decoy receptor 3 in glioblastoma[J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2005, 109(3): 294 - 298.
- [5] Chang YC, Hsu TL, Lin HH, *et al*. Modulation of macrophage differentiation and activation by decoy receptor 3[J]. *J Leukoc Biol*, 2004, 75(3): 486 - 494.
- [6] Wan X, Shi G, Semenuk M, *et al*. DcR3/TR6 modulates immune cell interactions[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(3): 603 - 612.
- [7] 许鹏, 龚科峰, 陈志南, 等. 肝癌相关抗原 HAbl8G 的高效原核表达及其体外功能的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(6): 734 - 737.