

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.02.004

sTACI-Fc-Myc 重组质粒的构建、原核表达及活性鉴定*

白乌仁图雅 赵亚琨 朱燕锋 石宇 孙剑[△]

(天津大学药物科学与技术学院 天津 300072)

摘要 目的: 构建 sTACI-Fc-Myc 重组质粒, 并进行原核表达和纯化具有生物活性的融合蛋白。**方法:** 通过 PCR 法获得 sTACI-Fc-Myc 重组片段, 然后把融合基因片段与原核载体 pET28a 连接在一起, 并构建 pET28a-sTACI-Fc-Myc 重组子, 并转入 BL21(DE3) 中进行表达, 用蛋白 A 凝胶亲和层析柱进行纯化及酶联免疫吸附剂(ELISA)法测定其生物学活性。**结果:** 获得了 sTACI-Fc-Myc 重组质粒, 且该质粒可以在 BL21(DE3) 中表达, 亲和层析柱纯化后纯度可达到 95% 以上, 与 BAFF 的结合活性具有剂量依赖性, 浓度达到 5 ng/μL 时, 两者的吸附达到饱和。**结论:** 成功构建了 sTACI-Fc-Myc 原核表达载体, 并使有生物学活性的融合蛋白在 BL21(DE3) 上获得了稳定表达, 为进一步研究并筛选高活性 BAFF 拮抗肽奠定了基础。

关键词: B 细胞活化因子; TACI-Fc-Myc 融合蛋白; 原核表达

中图分类号: Q78; R392 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2015)02-217-04

Construction, Expression and Activity Analysis of sTACI-Fc-Myc Protein*

BAI Wu-rentuya, ZHAO Ya-cong, ZHU Yan-feng, SHI Yu, SUN Jian[△]

(School of Pharmaceutical Science and Technology of Tianjin University, Tianjin, 300072, China)

ABSTRACT Objective: To construct recombinant plasmid of sTACI-Fc-myc gene and to induce its prokaryotic express and to purify the protein. **Methods:** sTACI-Fc-myc gene was obtained by PCR amplification and then combined with pET28a to construct pET28a-sTACI-Fc-myc recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21 (DE3), and then sTACI-Fc-myc protein was expressed and purified by protein A affinity column chromatography. The purity and activity of sTACI-Fc-myc were identified by ELISA, SDS-PAGE, respectively. **Results:** The sTACI-Fc-myc gene was obtained and the recombinant plasmid can express in BL21 (DE3). The purity can be as high as 95% after affinity chromatography. The biological activity of the purified sTACI-Fc-myc protein was analyzed. sTACI-Fc-myc could bind BAFF specifically in a dose-dependent manner, and the saturated concentration was 5 ng/μL. **Conclusions:** The fusion vector is constructed successfully and a purified recombinated sTACI-Fc-myc protein is obtained, which lays a foundation for further studies of BAFF antagonist peptidobody.

Key words: B-cell activating factor; sTACI-Fc-myc fusion protein; Prokaryotic expression

Chinese Library Classification(CLC): Q78; R392 **Document Code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)02-217-04

前言

肿瘤坏死因子超家族配体 B 淋巴刺激细胞因子 (B lymphocyte stimulator, BAFF), 是 1999 年发现的一种与人体免疫调控密切相关的细胞因子, 是肿瘤坏死因子(TNF)家族的第 13 位成员^[1-4]。BAFF 在体内主要以膜结合型和水溶型存在, BAFF 作为一种 B 淋巴细胞的共刺激细胞因子, 在免疫原的刺激下能特异的刺激 B 淋巴细胞的增殖及分化并诱导其分泌免疫球蛋白^[7-10]。然而 BAFF 作为一种细胞因子, 在体内对靶细胞发挥生物学活性时需要结合特异性的受体, 到目前为止发现的 BAFF 特异的受体有三种, 分别是钙调亲和环素配基相互作用因子 (TACI)、B 细胞成熟抗原 (BCMA)、BAFF 受体 (BAFF-R)^[5-7]。

TACI 是 2000 年 Wu^[9]等通过表达克隆方法确定, TACI 与可溶性 BAFF 和跨膜 BAFF 都有高亲和力相互作用, TACI 主要表达在 B 淋巴细胞表面, 在活化的 T 淋巴细胞和树突状细胞表面也有少量表达, TACI 与配体 BAFF 结合后会产生一系列信号传导, 从而调节免疫反应。而且研究发现, 在不同类型的自身免疫性疾病患者的血清中, BAFF 的含量是明显升高的, BAFF 还与部分肿瘤疾病的发生有关。因此, 抗 B 淋巴细胞刺激因子拮抗剂可以用于治疗自身免疫疾病如: 类风湿关节炎, 系统性红斑狼疮, 综合干燥症等^[11-15], 所以用 BAFF 受体融合蛋白可以封闭 BAFF 生物学功能, 到目前为进入临床实验的全人源化重组受体 - 免疫球蛋白融合蛋白 (TACI-Ig) 阿塞西普 (Atacept) 对 SLE 和 RA 有效, 免疫球蛋白和炎症指标水平以及成熟 B

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81273308)

作者简介: 白乌仁图雅(1988-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物与生化药学、B 细胞刺激因子抑制剂,

电话: 022-87401943, E-mail: wutu0065@163.com

△ 通讯作者: 孙剑(1963-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 基因工程制药、免疫学、B 淋巴细胞发育及其相关疾病等,

E-mail: jsunbio2009@yahoo.com

(收稿日期: 2014-07-05 接受日期: 2014-07-29)

细胞数量的减少程度均呈剂量依赖性,患者耐受性好。还有一个受体融合蛋白(BR3-Fc)和肽融合蛋白(A-623)已经进入Ⅱ期临床试验^[16,18,25]。本实验通过基因重组的方法,构建含有人 TACI 受体胞外区片段与 FC 片段和 Myc 标签连接的重组质粒,经原核系统表达及亲和层析柱纯化后得到生物活性高的融合蛋白。同时末端加了 Myc 标签可以利用抗 Myc 的抗体检测肽融合蛋白竞争结合 BAFF 的活性,有利于筛选高活性的 BAFF 拮抗肽。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 大肠杆菌 JM109、BL21 大肠杆菌、pET-28a 质粒、pET-28a-TACI-Fc 质粒均为天津大学药物科学与技术学院实验室所保存实验室储存。

1.1.2 实验试剂 T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、EcoRI 限制性内切酶、HindIII 限制性内切酶(TaKaRa);重叠 PCR 引物的合成和融合基因片段测序(Invitrogen);小量质粒提取试剂盒和琼脂糖凝胶回收试剂盒 (Promega);HRP 辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);卡那霉素抗生素、诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、TMB(Sigma);其他化学试剂(国药化学试剂公司)。

1.2 方法

1.2.1 pET-28a-TACI-Fc-Myc 融合质粒载体的构建 依据 Myc (EQKLISEEDL) 的氨基酸序列设计及合成特异扩增 TACI-Fc-Myc 片段的引物。本实验保存的 pET-28a-TACI-Fc 质粒载体为模板,用重叠 PCR 方法扩增 TACI-Fc-Myc 基因片段。PCR 产物用 1% DNA 琼脂糖凝胶电泳检测,用胶回收试剂盒切胶回收目的条带。利用 T4 DNA 连接酶把 sTACI-Fc-Myc 重组序列、双酶切后的 pET-28a 载体连接片段连接,并转化 JM109 宿主菌,菌液 PCR 筛选阳性克隆,再用 EcoRI 和 HindIII 内切酶双酶切鉴定,阳性重组子测序正确。

1.2.2 融合目的蛋白的诱导表达和纯化 已测序正确的重组质粒载体 pET28a-TACI-Fc-Myc 转到感受态表达宿主菌 BL21 (DE3)。为了筛选高表达量单克隆隔天从长好菌的固体培养基上挑取六个单菌落,分别接种于 3 mL LB 加 Kana 培养基中,37℃ 恒温培养箱振荡培养 12 h。一部分菌液用 30%甘油保存菌种,剩余的菌液加入诱导剂 IPTG,37℃ 恒温培养箱诱导 16 h,菌液用 SDS-PAGE 蛋白电泳检测蛋白的表达情况,挑选高表达量的克隆。然后从保存的高表达克隆菌液中取 20 μL 接种于 2 mL LB 加 Kana 培养基中,37℃ 恒温培养箱培养 12 h,隔天转接于 500 mL LB 加 Kana 培养基中,37℃ 恒温培养箱振荡培养至菌液 OD=0.5,加 500 μL 诱导剂 IPTG,37℃ 恒温诱导培养 18 h。诱导表达后的菌液 8000 rpm 4℃ 离心 10 min,沉淀用 1× PBS 洗涤一次,最后用 1× PBS 重悬冻存,-80℃ 和 4℃ 之间反复冻融三次后超声破碎菌液后 12000 rpm 4℃ 离心 8 min,把上清液用 0.22 μm 滤器过滤除杂,然后上清通过蛋白 A 凝胶亲和柱纯化,并用 SDS-PAGE 蛋白电泳检测目的蛋白。

1.2.3 酶联免疫吸附测定(ELISA) 采用 pH9.6 的碳酸缓冲液包被 BAFF 于 96 孔酶标条中终浓度为 10 μg/mL,4℃ 反应 18 h。PBST 洗涤 3 次,5%脱脂奶粉封闭,置于 37℃ 培养箱中

孵育 2 h。洗涤 3 次之后,加入用 1%脱脂奶粉稀释的不同浓度(0.5 ng/μL,1 ng/μL,5 ng/μL,10 ng/μL)的 sTACI-Fc-Myc 融合蛋白、设置 PBS 为空白对照、FC 蛋白为阴性对照,37℃ 反应 1 h。PBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的山羊抗人的单抗,37℃ 培养箱孵育 1 h。PBST 洗涤 3 次,加入 TMB 显色液,37℃ 恒温箱反应 10 min,随后立即每孔加 50 μL 2 mol/L 硫酸终止反应液终止显色反应,即用酶标仪在 450 nm 处测定 OD 吸光值,根据数据绘制吸光度-浓度标准曲线,分析 BAFF 与融合蛋白的结合能力。

2 结果

2.1 目的基因的扩增与重组子的构建

利用重叠 PCR 方法扩增 sTACI-Fc-Myc 基因,用 1%琼脂糖凝胶 DNA 电泳检测,如图 1 所示,在 1000 bp 左右有目的条带。从转化固体培养板上挑 6 个单克隆,用 LB 加 kana 的培养基培养^[19],完成菌液 PCR 后用 1%琼脂糖凝胶电泳检测,1000 bp 左右有目的条带(图 2)。从重组克隆中提取质粒,用 EcoRI 和 HindIII 内切酶进行双酶切鉴定,从电泳结果可见在 1000 bp 左右的目的片段(图 3)。最后阳性重组质粒目的基因序列测序结果显示,sTACI-Fc-Myc 基因正确。

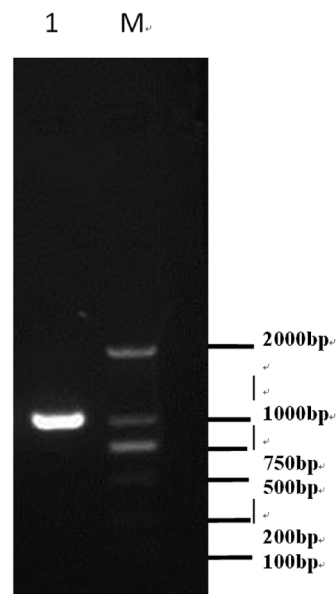


图 1 PCR 扩增 sTACI-Fc-Myc 基因 M: DNA 标准品 孔 1: sTACI-Fc-Myc

Fig.1 PCR product of sTACI-Fc-Myc M: Marker lane1: sTACI-Fc-Myc

2.2 融合蛋白的大量表达和纯化

重组质粒转入表达宿主菌 BL21 之后小量诱导表达筛选表达量高的菌种,通过扩大培养和用诱导剂 IPTG 诱导表达目的蛋白,离心后收集已表达目的蛋白的大肠杆菌菌液然后超声破碎(功率 300W 超声 3s、停 5s,一次 5 min 总共三次)之后,离心后得到的上清液用蛋白 A 亲和层析柱进行纯化,纯化结果用 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定,从胶上看到在 40 kDa 左右位置显示目的蛋白(图 4)。

2.3 融合蛋白生物学活性鉴定

通过用抗 Myc 二抗做 ELISA 实验分析 sTACI-Fc-Myc 蛋

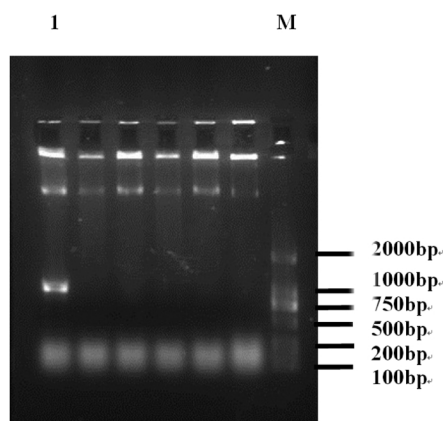


图2 sTACI-Fc-Myc 重组菌株菌液 PCR M:蛋白标准品 孔1:阳性克隆

Fig.2 Bacterial liquid PCR M: Proteins Marker Lane1:Positive clone

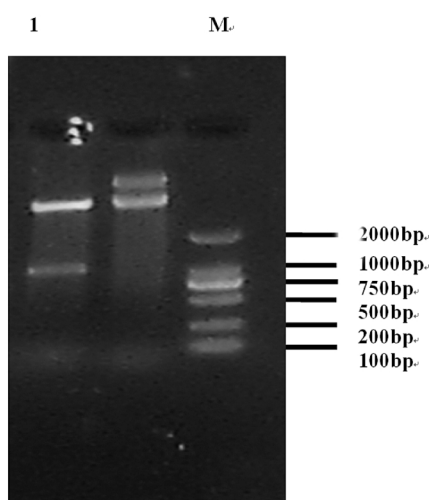


图3 sTACI-Fc-Myc 融合质粒双酶切 M: DNA 标准品 孔1:重组质粒酶切片段

Fig.3 sTACI-Fc-Myc restriction digestion analysis M:Marker

lane1: Enzyme fragment of Recombinant plasmid

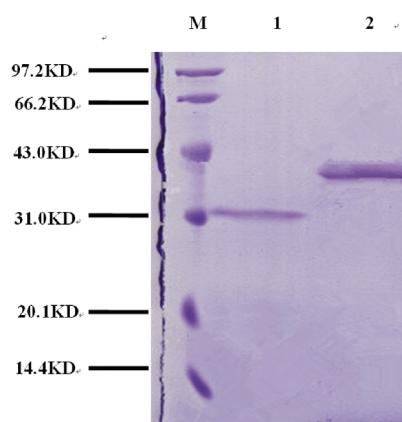


图4 SDS-PAGE 鉴定 sTACI-Fc-Myc 融合蛋白

M: 蛋白标准品 孔1:BAFF 蛋白 孔2:sTACI-Fc-Myc 融合蛋白

Fig.4 Identification of sTACI-Fc-Myc fusion protein by SDS-PAGE

M: Marker Lane1: BAFF Lane2: sTACI-Fc-Myc fusion protein

白与 BAFF 的结合。对 OD450 nm 处吸光度 - 蛋白浓度作图, 结果表明用抗 Myc 抗体检测到 sTACI-Fc-Myc 蛋白与 BAFF 的高结合活性。sTACI-Fc-Myc 融合蛋白浓度达到 $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}$ 时, sTACI-Fc-Myc 目的蛋白和 BAFF 的亲合力达到饱和值, 阴性对照 Fc 组与 BAFF 没有结合活性(如图 5)。

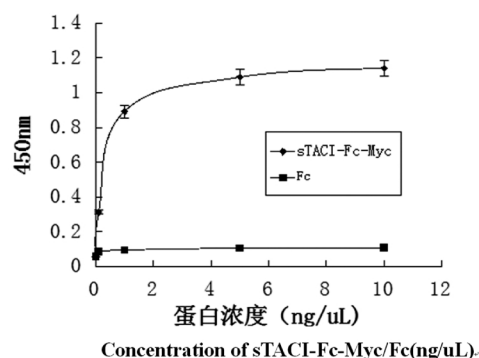


图5 ELISA 鉴定 sTACI-Fc-Myc 与 BAFF 的结合亲和力

Fig.5 Analysis of sTACI -Fc-Myc and BAFF binding activity

3 讨论

自 1999 年 BAFF 被发现以来,BAFF 调节免疫反应及在自身免疫疾病等方面的作用逐渐被认识。所以以 BAFF 为靶点治疗这些疾病成为研究热点,主要有抗 BAFF 单克隆抗体、BAFF 受体融合蛋白、BAFF 拮抗短肽。Atacicept(TACI-Ig)是一种全人源化的 TACI 胞外区和人免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)G1 的 Fc 段融合蛋白,可以作为一种诱饵受体竞争性结合 BAFF 和 APRIL,但在临床试验中还出现一些问题有待解决,如不稳定及感染等^[16,19]。对比 TACI-Ig 片段,本实验室设计含有一个 CRD 片段的 TACI 胞外区与 Fc 连接,构建了正确的重组质粒,通过原核表达可溶性融合蛋白及亲和层析柱纯化后得到较高纯度的融合蛋白,经 ELISA 鉴定本实验构建的融合蛋白具有与 BAFF 有较高的亲和力,为筛选高活性的拮抗肽体提供实验依据。

本实验室构建的 TACI-Fc 融合基因尾端加上 Myc 标签基因片段,构建融合质粒并转化表达菌 BL21 最后纯化 sTACI-Fc-Myc 融合蛋白。为竞争性 ELISA 分析肽体与 TACI-Fc-myc 竞争性结合 BAFF 的能力提供实验数据。

参考文献(References)

- [1] H B Shu, W H Hu, H Johnson. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens [J]. Leukoc Biol, 1999, 65 (5): 680-683
- [2] Moore PA, Belvedere O, OrrA, et al. BLys :member of the tumor necrosis factor and B lymphocyte stimulator [J]. Science, 1999, 285 (5425): 260-263
- [3] Schneider P, Mackay F, Steiner V, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth [J]. J ExpMed, 1999, 189(11): 1747-1756
- [4] Asok Mukhopadhyay, Jian Ni, Yifan Zhai. Identification and Characterization of a Novel Cytokine, THANK, a TNF Homologue That Activates Apoptosis, NF-kB, and c-Jun NH2-Terminal Kinase [J]. The Journal Of Biological Chemistry, 1999, 274 (23): 15978-15981

- [5] Gross J A, Johnson J, Mudri S. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B-cell autoimmune disease[J]. *Nature*, 2000, 404(6781): 995-998
- [6] Thompson J S, Bixler S A, Qian F. BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF [J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2108-2111
- [7] G S Cheema, V Roschke, D M Hilbert, et al. Elevated serum B lymphocyte stimulator levels in patients with systemic immune-based rheumatic diseases[J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(6): 1313-1319
- [8] Groom J, Kalled S, Cutler A H. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjogren's syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(1): 59-68
- [9] Wu YM, Bressette D, Carrell JA, et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily member TACI is a high affinity receptor for TNF family members APRIL and BLyS [J]. *Biological Chemistry*, 2000, 275(45): 35478-35485
- [10] Freiburger T, Ravcuková B, Grodecká L, et al. Sequence variants of the TNFR SF13B gene in Czech CVID and IgAD patients in the context of other populations [J]. *Hum Immunol*, 2012, 73 (11): 1147-1154
- [11] Baker KP, Edwards BM, Main SH, et al. Generation and characterization of LymphoStat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(11): 3253-3265
- [12] Karpusas M, Cachero TG, Qian F. Crystal structure of extracellular human BAFF, a TNF family member that stimulates B lymphocytes [J]. *J Mol Biol*, 2002, 315(5): 1145-1149
- [13] Jian Sun, Jiannan Feng, Yan Li, et al. A novel BAFF antagonist peptide designed based on the 3-D Complex structure of BCMA and BAFF [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2006, 346(4): 1158-1162
- [14] Tian Yu, Zhu Yan-feng, Wu Zhen, et al. An optimized B lymphocyte stimulator (BAFF) antagonist peptide inhibits the interaction of BAFF with BCMA[J]. *Biotechnol Lett*, 2013, 35(4): 523-528
- [15] 冀丽军, 白乌仁图雅, 柴琳. TACI-Fc 融合蛋白的基因构建、原核表达及生物活性鉴定[J]. *生物技术杂志*, 2013, 23(3): 25-27
Ji Li-jun, Bai Wu-rentuya, Chai Lin. Construction and Prokaryotic Expression of TACI-Fc Fusion Protein [J]. *Biotechnology*, 2013, 23(3): 25-27
- [16] H Hsu, S D Khare, F Lee, et al. A novel modality of BAFF-specific inhibitor AMG623 peptibody reduces B-cell number and improves outcomes in murine models of autoimmune disease [J]. *Clinical and Experimental Rheumatology*, 2012, 30(2): 197-201
- [17] Annika Deiß, Isabel Brecht, Axel Haarmann, et al. Treating multiple sclerosis with monoclonal antibodies[J]. *Tnemed Article*, 2013, 13(3): 313-335
- [18] Genovese MC, Kinnman N, de La Bourdonnaye G, et al. Atacicept in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to tumor necrosis factor antagonist therapy: Results of a phase II, randomized, placebo-controlled dose finding trial[J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(7): 1793-1803
- [19] Cheng Y, Yan S, Zhao W, et al. The effect of BLyS on the activity of peripheral B lymphocytes mediated by BLyS receptors in patients with systemic lupus erythematosus[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2013, 72 (2): 141-147
- [20] Martinez Gallo M, Radigan L, Almejún MB, et al. TACI mutations and impaired B cell function in subjects with CVID and healthy heterozygotes[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2013, 131(2): 468-476
- [21] Lougaris V, Gallizzi R, Vitali M, et al. A novel compound heterozygous TACI mutation in an autosomal recessive common variable immunodeficiency (CVID) family[J]. *Hum Immunol*, 2012, 73(8): 836-839
- [22] Koopmans W, Woon ST, Browett P, et al. Clinical Variability of Family Members with the C104R Mutation in Transmembrane Activator and Calcium Modulator and Cyclophilin Ligand Interactor (TACI)[J]. *J Clin Immunol*, 2013, 33(1): 68-73
- [23] EM, Wax S, Rajeswaran A, et al. Atacicept in combination with MMF and corticosteroids in lupus nephritis results of a prematurely terminated trial[J]. *Arthritis Res Ther*, 2012, 14(1): 33-38
- [24] He B, Santamaria R, Xu W, et al. The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(9): 836-845
- [25] A M Jacobi, W Huang, T Wang, et al. Effect of long-term belimumab treatment on B cells in systemic lupus erythematosus: extension of a phase II, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(1): 201-210
- [26] Stohl W, Mettas S, Tan SM, et al. B lymphocyte stimulator overexpression in patients with systemic lupus erythematosus: longitudinal observations[J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(12): 3475-3486