

人截短型线粒体凋亡诱导因子蛋白的克隆、表达及诱导肝癌细胞凋亡的活性鉴定

付玉荣¹, 伊正君², 颜玉蓉¹, 邱宗荫¹

Cloning and Expression of Recombinant Mitochondrial Δ 1-120 Apoptosis-inducing Factor and Its Enhance Effect on Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cell Line SMMC-7721

FU Yu-Rong¹, YI Zheng-Jun², YAN Yu-Rong¹, QIU Zong-Yin¹

1. 重庆医科大学检验系
临床检验诊断学省部共建教育部
重点实验室,
重庆 400016
2. 山东省潍坊医学院
临床学院检验系,
山东 潍坊 261042

1. Key Laboratory of Laboratory
Medical Diagnostics of Ministry of
Education,
Chongqing University of Medical
Science,
Chongqing, 400016,
P. R. China

2. Laboratory of Medicine,
Weifang Medical University,
Weifang, Shandong, 261042,
P. R. China

通讯作者:邱宗荫

Correspondence to: QIU Zong-Yin

Tel: 86-013708305282

E-mail: zongyin@sohu.com

基金项目:国家自然科学基金
(No. 30470786);教育部博士点
基金项目(No. 2004-165)

Grants: National Natural Science
Foundation of China
(No. 30470786); Doctoral
Program Fund of Ministry of
Education (No. 2004-165)

收稿日期:2006-07-18

修回日期:2006-09-25

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: Mitochondria play a key role in cell apoptosis, and apoptosis-inducing factor (AIF) is a kind of apoptotic protein located in mitochondria. The research on mitochondrial protein can be helpful for elucidating the role of mitochondria in apoptosis. This study was to clone and express recombinant human Δ 1-120 AIF and validate its biological activities of binding DNA and inducing nuclear apoptosis. **METHODS:** A human AIF gene fragment of 1515 bp (mitochondrial localization sequence was deleted) was amplified from SMMC-7721 cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and cloned into pET32a(+) vector to construct recombinant plasmid pET32a-AIF. The recombinant plasmid was transfected into *E.coli* BL21 (DE3). AIF expression was induced by isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG), and detected by SDS-PAGE and Western blot. AIF protein was purified by Ni affinity chromatography and then renatured. The biological activity of renatured AIF protein was detected by electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and Hoechst staining. **RESULTS:** The 1.5 kb AIF gene was successfully isolated, and cloned into pET32a(+) vector. Plasmid pAIF was identified by restrictive enzyme analysis and sequencing. Recombinant *E.coli* strains expressing AIF were obtained. AIF protein amounted to 11% of the total bacterial protein when induced with IPTG at 37°C for 4 h. AIF was specially recognizing by anti-AIF and anti-his antibody. The purity of purified protein reached over 95%. After renaturation, AIF protein binded DNA and induced nuclear apoptosis. **CONCLUSION:** AIF protein with high purity and biological activity was obtained by the method described above.

KEYWORDS: Liver neoplasm; SMMC-7721 cells; Apoptosis-inducing factor; Gene cloning; Expression; Protein purification

【摘要】 背景与目的:线粒体在细胞凋亡中扮演关键的角色,线粒体凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是定位于线粒体中的一种重要的凋亡蛋白,对线粒体蛋白质的研究可深入阐明线粒体在凋亡中的作用。本研究的目的在于克隆、表达重组的人截短型 AIF,并对其诱导肿瘤细胞核凋亡的生物学活性进行鉴定。方法:采用 RT-PCR 技术从人肝癌细胞 SMMC-7721 中扩增出剪切掉线粒体定位信号的人 AIF 基因片段,并按阅读框克隆到原核表达载体 pET32a(+)中。进行酶切与测序鉴定后,以构建的正确重组质粒 pET32a-AIF 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株,在异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导下表达 AIF 蛋白,表达产物用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测;采用镍柱亲和层析法纯化目的蛋白;采用凝胶滞后实验(EMSA)与 Hoechst 33258 染色检测 AIF 蛋白的生物学活性。结果:获得了去掉线粒体定位信号的 AIF 基因,并克隆到 pET32a(+)载体中,经酶切与测序鉴定完全正确。此重组质粒转化入大肠杆菌,经 IPTG 诱导后,在大肠杆菌中可表达相对分子质量约 M_r 70 000 的目的蛋白;表达量约占菌体蛋白总量的 11%,表

达的目的蛋白与抗 His 标签抗体与抗人的 AIF 蛋白具有良好的反应性;纯化后,AIF 的纯度达到 95%。经 EMSA 与 Hoechst 33258 染色实验证实:获得的 AIF 蛋白具有良好地与 DNA 结合并可诱导肿瘤细胞核凋亡的能力,凋亡率为 37%。结论:人 AIF 基因在 PET 表达系统中得到有效表达;蛋白复性后能有效地在体外与 DNA 结合,并可诱导细胞凋亡。关键词:肝肿瘤;SMMC-7721 细胞;凋亡诱导因子;基因克隆;表达;蛋白质纯化

中图分类号:R735.7 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2007)05-0494-04

线粒体不仅是真核细胞内的能量工厂^[1],也是细胞凋亡的调控中心^[2],在细胞凋亡中扮演关键角色^[3]。凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor,AIF)是一种具有凋亡诱导活性的黄素蛋白,定位于线粒体的膜间隙。细胞受到凋亡刺激时,AIF 分子从线粒体释放到胞质,然后再易位到核,与染色体 DNA 结合,使染色体核周边凝集和 DNA 断裂^[4,5]。研究细胞核中 AIF 促进染色体凝集和 DNA 大片段形成机制可以对其促进细胞凋亡的功能有更深入的认识,从而可以利用 AIF 作为促进肿瘤细胞凋亡的靶标。为了进一步开展 AIF 基因的功能研究,本研究从人肝癌细胞 SMMC-7721 中扩增出剪切掉线粒体定位信号的 AIF 基因,构建了重组表达质粒 pET32a-AIF,并对其在大肠杆菌中进行了表达,同时对表达产物进行了生物学活性研究。为深入研究 AIF 的基因功能及在线粒体凋亡中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人肝癌细胞 SMMC-7721 由重庆医科大学病理生理教研室提供;RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司;新生小牛血清为杭州四季青公司产品;大肠杆菌 BL21、DH5 α 均由本实验室保存;总 RNA 抽提试剂盒、逆转录试剂盒、高保真 *Taq* 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker、PCR 试剂盒等均购自大连宝生物公司;质粒纯化、DNA 回收试剂盒购自上海华舜公司;pET32a(+)、His 抗体与镍柱亲和层析试剂盒购自 Novagen 公司;异丙基- β -D 硫代半乳糖苷(isopropylthio- β -D-galactoside,IPTG)购自上海生工生物工程有限公司;兔抗人 AIF 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;HRP 标记的羊抗兔二抗为武汉博士德公司产品;预染蛋白质 Marker、浓缩型 DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Hoechst 33258 染色试剂盒购自碧云天生物技术研究所以。

1.2 RT-PCR 与克隆

(1) RNA 提取:按 RNA 抽提与 MMLV 逆转录试剂盒说明,从培养的 SMMC-7721 细胞中提取 RNA 并进行逆转录。(2)引物的设计与合成:根据 GenBank 中人 AIF 基因的序列设计引物。上游引物序列为:5'-TACCTGCTAGCTCCGGAGAATTCCA TATGGAGGAAGTTCCTCAAGAC-3',下游引物序列为:5'-CGTCTAGAGGTACCTTATGCGGCCGCGTCTT CATGAATGTTGAATAG-3'。(3)目的基因的 PCR 扩增:总反应体积为 30 μ l,循环参数为:95 $^{\circ}$ C 4 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 90 s,38 个循环后,再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。(4)目的基因的序列测定:回收 PCR 扩增产物并以 *Nhe* I 和 *Xba* I 双酶切后克隆入真核表达载体 pcDNA3.1 (+) 的 *Xba* I 位点中(*Nhe* I 和 *Xba* I 为同尾酶),构建 pcDNA3.1-AIF, *Nhe* I 和 *Xba* I 双酶切鉴定正确后,交由上海博亚公司进行 DNA 序列测定。

1.3 亚克隆

以 *Eco*R I 和 *Not* I 分别双酶切测序正确的 pcDNA3.1-AIF 和原核表达载体 pET32a(+),分别回收 1 515 bp 的目的基因片段和 pET32a 载体大片段,用连接酶连接目的基因和载体片段,构建重组原核表达载体 pET32a-AIF,以其转化 *E.coli*. DH5 α 感受态菌株,接种于含羧苄青霉素 100 μ g/ml 的 LB 平板上培养后,挑取阳性菌落。小量提取质粒以 *Eco*R I 和 *Not* I 进行双酶切鉴定,正确后交由上海博亚公司进行测序。

1.4 SDS-PAGE、Western blot 与亲和层析纯化

以 pET32a-AIF 转化 BL21 感受态菌株,在含羧苄青霉素的 LB 平板上培养后,挑取阳性菌落接种于含羧苄青霉素的液体培养基中。于 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜后,按 1:10 比例转种于 LA 培养基中。37 $^{\circ}$ C 振荡约 2 h,在吸光度值(*A* 值)约为 0.6(0.4~1)时,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h。4 $^{\circ}$ C 条件下 10 000 r/min 离心 5 min,收集菌体并用 1 \times SDS 上样 buffer 煮沸裂解,离心取上清,按照文献[5]进行 12% SDS-PAGE 和 Western blot 检测。

用裂解缓冲液悬浮表达菌,超声波破碎后,4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 20 min,取上清和沉淀进行蛋白电泳,证明表达的目的蛋白主要存在于上清。常规方法^[7]进行镍柱亲和层析纯化透析。

1.5 凝胶滞后实验(EMSA)检测目的蛋白的生物学活性

参照文献[6]的方法进行:将 1 μ l(0.5 μ g/ μ l)

DNA ladder(50~1 000 bp) 与 10 μ l AIF(1 μ g / μ l) 混匀,室温孵育 1 h,同时设无关蛋白对照。3%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并拍照。实验重复 3 次。

1.6 Hoechst 33258 染色

参照文献 [7] 从 SMMC-7721 细胞中提取细胞核,加入 5 μ l AIF(1 μ g/ μ l),同时设生理盐水对照,37℃孵育 2.5 h,按 Hoechst 33258 染色试剂盒说明书进行染色,荧光显微镜下观察细胞核形态并照相。计数 100 个细胞,计算细胞凋亡率,实验重复 3 次。

2 结 果

2.1 AIF 的 RT-PCR 扩增产物的鉴定与 AIF 基因原核表达载体 pET32a-AIF 的构建

使用 AIF 基因的特异引物,以提取的 RNA 为模板进行 RT-PCR 反应,产物经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,可见与预期产物 1 515 bp 相符的特异条带。回收目的片段后,插入 pCDNA3.1 载体中,经酶切鉴定得到正确的克隆(图 1)。测序结果与 GenBank 中人 AIF 基因的序列比较未发现突变。用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切 pCDNA3.1-AIF 与 pET32a(+),回收目的片段与 pET32a 载体大片段进行连接,转化 *E.coli*. DH5 α 感受态菌株,挑取单个菌落扩增并小量提取质粒,*EcoR* I 和 *Not* I 双酶切所得片段同预期的 1 515 bp 大小一致(图 1)。经上海博亚技术公司测序表明,目标序列完全按预期目的亚克隆入 pET32a 质粒的相应位点中。

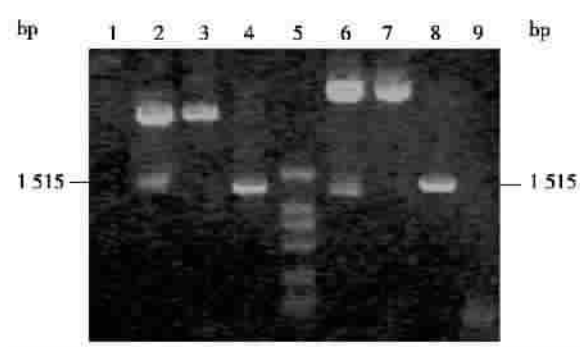


图 1 AIF mRNA 的 RT-PCR 扩增与酶切分析

Figure 1 Apoptosis-inducing factor (AIF) mRNA amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with restrictive enzyme digestion

Lane 1: PCR negative control from pcDNA3.1; lane 2: pcDNA3.1-AIF digested by *Nhe* I and *Xba* I; lane 3: pcDNA3.1; lane 4: PCR product of AIF gene from pcDNA3.1-AIF; lane 5: DL2000 marker; lane 6: pET32a-AIF digested by *EcoR* I and *Not* I; lane 7: pET32a; lane 8: PCR product of AIF gene from pET32a-AIF; lane 9: PCR negative control from pET32a.

2.2 pET32a-rAIF 的原核表达及纯化

以 pET32a-AIF 转化 *E.coli*. BL21 感受态菌株,经 IPTG 诱导后,可表达 M_r 约为 70 000 的融合蛋白(含 His 标签)。以抗-His 抗体和抗 AIF 抗体作一抗,皆可检测到 AIF 融合蛋白(图 2)。

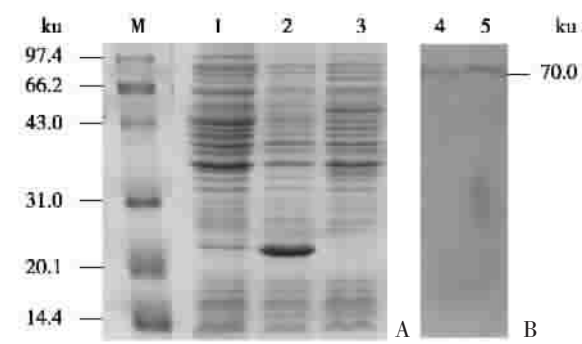


图 2 重组蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blot 分析

Figure 2 Recombinant AIF protein detected by SDS-PAGE (A) and Western blot (B)

Lane M: marker; lane 1: BL21; lane 2: BL21 transfected with pET32a; lane 3: BL21 transfected with pET32a-AIF; lane 4: anti-AIF; lane 5: anti-His.

2.3 目的蛋白的纯化

取大量诱导后的细菌,于 4℃ 以 5 000 r/min 离心 20 min,收集细菌悬浮于裂解缓冲液中经超声波破碎,收集上清。经凝胶扫描分析表明,表达的目的蛋白约占总蛋白的 11%。纯化与复性后,以 SDS-PAGE 分析目的蛋白的纯度,目的蛋白纯度大于 95%(图 3)。

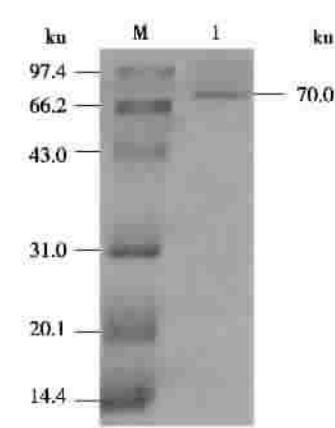


图 3 AIF 蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 分析

Figure 3 Purified AIF protein detected by SDS-PAGE

Lane M: marker; lane 1: purified AIF protein.

2.4 凝胶滞后实验与细胞核凋亡检测

凝胶滞后实验显示,AIF 能很好地与 DNA 结合,有效地使 DNA 滞留于加样孔内,而无关蛋白

BSA则没有此作用(图4)。体外实验证明,AIF 能有效地诱导 SMMC-7721 细胞核发生染色质凝集等凋亡作用,致凋亡率约为 37%(图5)。



图4 EMSA 实验检测 AIF 与 DNA 相互作用

Figure 4 Interaction between AIF and DNA assessed by EMSA

Lane M: DNA marker; lane 1: interaction between AIF and marker; lane 2: interaction between BSA and marker.

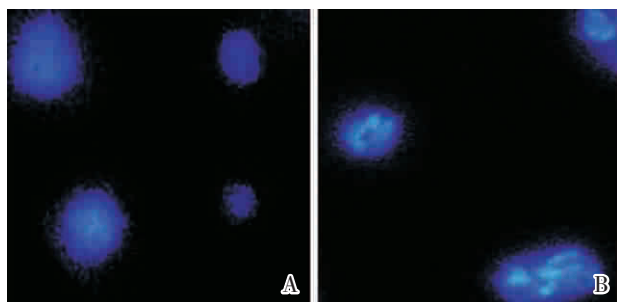


图5 AIF 蛋白对细胞核的影响(Hoechst 33258 ×400)

Figure 5 The effect of AIF on cell nucleus (Hoechst 33258 ×400)

A: control; B: nuclei treated with AIF.

3 讨论

AIF 基因定位于 Xq25-26, 编码 613 个氨基酸。AIF 首先在细胞质中合成前体分子,然后转移到线粒体中,一旦进入线粒体膜间腔,N 端 102 个氨基酸组成的线粒体定位序列即被水解掉,折叠成为成熟的 AIF 分子。当线粒体受到凋亡刺激时,线粒体膜通透性转变孔道开放,引起 AIF 释放^[8]。AIF 依赖的细胞凋亡是非 Caspases 依赖的,在真核细胞中广泛存在并发挥重要作用的一条凋亡途径^[9]。AIF 介导细胞凋亡的机制及其在细胞凋亡中的地位逐渐被认识和重视起来。因此,若能获得大量重组、且有良好生物学活性的 AIF,将有助于深入研究其促凋亡活性,扩展我们对细胞凋亡的进一步认识,并为肿瘤生物治疗提供新的思路。

AIF 的凋亡诱导活性与其氧化还原酶活性无关,无论是否存在 FAD 或 NADH,AIF 均能诱导核凋亡。成熟 AIF 蛋白是 57 ku 的单体分子,AIF 晶体结构研究揭示,成熟 AIF 由 3 部分构成:一个 FAD 结合结构域(122~262 和 400~477 位氨基酸),一个 NADH 结合结构域(263~399 位氨基酸)和一个 C 末端结构域(478~610 位氨基酸),其 509~559 位氨基酸片段是 AIF 中所特有的插入片段,可能与 AIF 的促凋亡活性有关。

本实验成功克隆了人截短 AIF 基因,并利用基因重组技术将 AIF 克隆于原核表达载体 pET32a(+)中,并在宿主菌 *E.coli*. BL21 (DE3) 中获得有效表达。表达的目的蛋白占菌体总蛋白的 11%,经镍柱亲和层析纯化后的蛋白纯度大于 95%。纯化后的蛋白能与抗 AIF 的抗体和抗 His 的抗体具有良好的免疫反应性。

AIF 表面带正电荷,可以与 DNA 结合,这种结合对 AIF 的凋亡活性是必需的。凝胶滞后实验显示,纯化后的 AIF 蛋白能很好地与 DNA 结合,使 DNA 迁移滞后;而在同样条件下,无关蛋白 BSA 则不能与 DNA 结合;凋亡诱导实验显示,AIF 蛋白可有效诱导 SMMC-7721 细胞核发生凋亡,凋亡率约为 37%。以上实验证明 AIF 具有良好的生物学活性,可用于促凋亡活性的功能研究。这为进一步研究 AIF 基因的功能奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 刘 峰, 蒋宇扬, 刘世英, 等. 二异丙基磷酰化二肽甲酯通过线粒体途径诱导 K562 细胞凋亡 [J]. 癌症, 2005, 24(4):448-453.
- [2] 王昌正, 曹 诚, 马清钧. 凋亡诱导因子(AIF)对细胞凋亡的调控 [J]. 生命的化学, 2005, 25(6):454-456.
- [3] 李 兴, 潘 卫, 邱 峰, 等. 双向电泳分析肝癌细胞线粒体的差异表达蛋白 [J]. 癌症, 2005, 24(11):1327-1331.
- [4] Mohamad N, Gutierrez A, Nunez M, et al. Mitochondrial apoptotic pathways [J]. Biocell, 2005, 29(2):149-161.
- [5] Seth R, Yang C, Kaushal V, et al. p53-dependent caspase-2 activation in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and its role in renal tubular epithelial cell injury [J]. J Biol Chem, 2005, 280(35):31230-31239.
- [6] Ye H, Cande C, Stephanou N C, et al. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor [J]. Nat Struct Biol, 2002, 9(9):680-684.
- [7] Susin SA, Lorenzo H K, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. Nature, 1999, 397(6718):441-446.
- [8] 马晓冬, 乔东访, 田雪梅, 等. 三氧化二砷诱导线粒体通透性转变孔道开放的机制研究 [J]. 癌症, 2006, 25(1):17-21.
- [9] Pardo J, Perez-Galan P, Gamen S, et al. A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis [J]. J Immunol, 2001, 167(3):1222-1229.

[编辑及校对:张 菊]