

文章编号:1673-1689(2010)01-0145-05

蓖麻毒素 A 链基因的克隆表达、纯化及其活性

王洪斌^{1,2}, 董丹¹, 许冰¹, 周向红¹, 阎斌伦²

(1. 淮海工学院 海洋学院, 江苏 连云港 222005; 2. 江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏 连云港 222005)

摘要: 为了实现蓖麻毒素 A 链基因(*rtA*)的克隆表达,制备有高生物活性的重组蓖麻毒素 A 链蛋白(RTA),借助重组腺病毒介导表达的 RTB 进入细胞,发挥 RTA 的细胞毒作用,检测其活性。重组质粒 pET32a-His-RTA 能正确表达 RTA 融合蛋白,相对分子质量约 47 000,每升细菌培养物回收约 50 mg 的纯化蛋白质,在有 RTB 表达的系列中,细胞死亡率明显上升,最高可达 50%~60%。说明利用 pET32a 表达系统可以快速获得大量有高生物活性的可溶性 RTA 融合蛋白质。以腺病毒为载体表达 RTB 可以帮助 RTA 进入细胞,对细胞发挥毒性作用。

关键词: 蓖麻毒素;RTA;RTB;融合表达;细胞杀伤

中图分类号: Q 786

文献标识码: A

Expression, Purification and Characterization of Ricin A from *E. coli*

WANG Hong-bin^{1,2}, DONG Dan¹, XU Bing¹, ZHOU Xiang-hong¹, YAN Bin-lun²

(1. Marine College, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Lianyungang 222005, China)

Abstract: The target of this study is to achieve the cloning and expression of ricin A chain gene and produce the recombined ricin A chain protein (RTA) with high activity and then assay its activity by RTB mediated by recombined adenovirus. The RTA could enter cells and exert cytotoxicity. For this, the ricin A chain gene was amplified by PCR and cloned it into the fusion expression vector pET32a to construct plasmid (pET32a-His-RTA), the plasmid was transferred into *E. coli* BL21 and induced with low concentration of IPTG (1 mmol/L) at low temperature (20 °C). Purified RTA by Ni-NTA column and the purified protein was identified by SDS-PAGE electrophoresis and Western-blot. It was found that the constructed recombinant plasmid (pET32a-His-RTA) was efficiently expressed RTA fusion protein and about 50 mg purified protein (Mr 47 000) was obtained from 1 liter culture broth. The cell death rate significantly increased and the highest being about 50-60 percentage point in the system containing RTB.

Key words: ricin, RTA, RTB, fusion expression, cell killing

收稿日期:2009-02-12

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划重大项目(2006BAD09A01)、淮海工学院重点学科建设项目(HYK200605)。

作者简介:王洪斌(1966-),男,江苏连云港人,副教授,理学硕士,主要从事微生物学及基因工程的教学与科研工作。E-mail:whbvirus@126.com

蓖麻毒蛋白(ricin)是从植物蓖麻籽中分离得到的一种核糖体失活蛋白(ribosome inactivating proteins, RIPs),是一种高毒性糖蛋白,由通过一个二硫键相连的A链(RTA)与B链(RTB)组成,RTA是毒性链,RTB是运载体,为凝集素。由RTB与细胞膜表面结合位点结合介导RTA经逆分泌途径进入细胞质到达内质网,发生二硫键断裂使两条链分离,并使RTA重新折叠为活性状态。A链由263个氨基酸组成,相对分子质量为32 000,具有N-糖苷酶活性,能催化28S rRNA在4234位脱去一个腺嘌呤,使核糖体60S大亚基失活,抑制细胞内蛋白质合成,最终导致细胞死亡^[1-2]。RTA因其高细胞毒性,与抗体、激素或者相关的细胞因子等偶联成免疫毒素(ITs),在体内特异性杀伤具有相应配体的靶细胞,如表达肿瘤特异抗原的癌细胞、自身免疫性T细胞等^[3-4]。

作者用原核表达系统融合表达RTA,分离制备了有高生物活性的可溶性RTA蛋白,借助重组腺病毒介导表达的RTB进入细胞,发挥RTA的细胞毒作用,研究其对细胞产生的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌DH5a、BL21、pET32a(+)质粒、携带蓖麻毒素B链基因重组腺病毒(B-Track-Ad)、HEK293、HeLa细胞等:由作者所在实验室保存;各种限制性内切酶、DNA连接酶、pMD18-T Vector购自大连宝生物有限公司(TaKaRa)和New England Biolab(NEB);DNA凝胶回收试剂盒以及PCR产物回收试剂盒、Pfu DNA polymerase、Taq DNA polymerase:购自申能博彩生物科技有限公司;PCR的引物合成与测序:由上海申能博彩生物科技有限公司完成;1640细胞培养液:购自Sigma公司的粉剂配制,加10%的小牛血清使用;转染试剂Lipofectin:购自Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 蓖麻毒素A链基因(rta)的PCR扩增 蓖麻的蓖麻毒蛋白基因中并不含有内含子,可以用直接PCR方法获得其基因,而不需要利用RT-PCR,从蓖麻叶细胞中用植物基因组抽提试剂盒提取蓖麻基因组DNA。蓖麻叶采自浙江宁波山区。根据Genbank登录的RT序列(登录号S40336),设计一对上下游引物:

上游:5' GCG GAATTC ATG ATATT CCCC AACA TACCC 3' 下游:5' GCG

AA GCTT TCAAA ACTGT GACGA TGGTG GAG 3'。为了与pET32a质粒融合表达,同时也便于定向克隆,在引物的两端分别引入EcoR I和Hind III限制性酶切位点。以蓖麻毒素基因组为模板,按常规方法进行PCR扩增。扩增条件:预变性(94 °C,5 min),变性(95 °C,30 s),复性(56 °C,30 s),延伸(72 °C,1 min),终止延伸(72 °C,10 min)。PCR产物割胶、回收、纯化,直接克隆至pMD18-T Vector上,构建测序质粒(pMD18-T-RTA),经酶切鉴定后,将其转化至DH5a, LB(Amp 抗性)、37 °C培养后送上海博亚生物科技有限公司测序。

1.2.2 RTA原核表达及纯化

1) 表达载体质粒的构建(pET32a-His-RTA):将质粒pMD18-T-RTA用EcoR I与Hind III双酶切,割胶回收rta条带。同时,对pET32a质粒进行EcoR I与Hind III双酶切,二者连接过夜,转化至LB(Amp 抗性)平板,挑取单克隆菌落,37 °C、200 r/min摇菌培养后,碱法抽提质粒,用Sca I、EcoR I/Hind III、BamH I/Xho I 3组酶分别进行酶切鉴定。

2) RTA的融合表达及SDS-PAGE电泳检测、Western blot鉴定:将鉴定准确的pET32a-His-RTA质粒转化至大肠杆菌BL21(表达工程菌)感受态细胞中,用LB(Amp 抗性)平板筛选。从转化平板上挑取转化子单克隆菌落摇床培养过夜,次日按1:50比例转接至100 mL LB(Amp 抗性)中,于37 °C、200 r/min摇菌培养,培养至OD₆₀₀为0.5~0.7时,加IPTG至终浓度为1 mmol/L,并改为20 °C诱导培养10 h。吸取1 mL菌液于5 000 r/min离心5 min,收集菌体,弃去上清液,50 μL纯水悬浮沉淀,再加50 μL 2×SDS凝胶上样缓冲液,进行SDS-PAGE分析。同时,将分离蛋白电转移至硝酸纤维素膜上,进行Western blot鉴定。以没有克隆rta的pET32a空质粒及未经诱导的质粒作为阴性对照。

3) RTA的融合表达产物的Ni-NTA亲和层析柱纯化与鉴定:将含pET32a-His-RTA重组质粒的BL21菌进行大量诱导表达,离心收集沉淀,超声波破壁,按非变性条件抽提纯化蛋白质过程进行层析纯化。最后用PBS缓冲液透析,用聚乙二醇8000浓缩后,定量保存。

1.2.3 RTA对细胞的特异性杀伤效果检测 以相同的高moi(100以上)的B-Track-Ad感染HEK293细胞、Hela细胞,使其在细胞中表达RTB,24 h后在培养液的上清液中加入纯化的

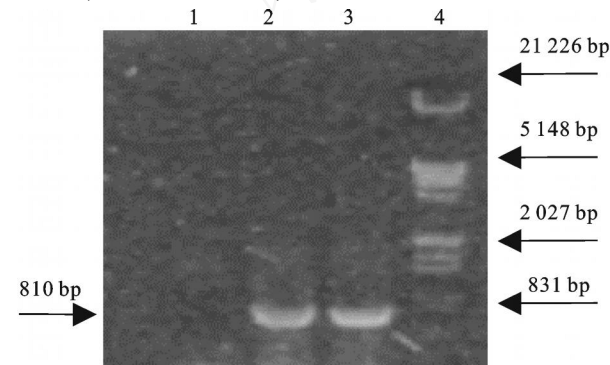
RTA(质量浓度为 122 μg/ mL) ,按 0、10、20、40 μL 4 个批量分别添加。继续培养 24 h 后, Trypan blue 染色法检测细胞的活性。以不携带 B 链基因的腺病毒 Track-Ad 作为对照。

由于病毒的复制通常伴随着对细胞生长的抑制和细胞骨架的破坏,故在 HEK293 细胞中的杀伤效果可能伴随着病毒对细胞的杀死作用,所以,又挑选了 Hela 细胞,实验方法同上。

2 实验结果

2.1 rta 的 PCR 扩增

成功扩增到 rta 基因,将其克隆至 pMD18-T Vector 上,测序结果与 NCBI Genbank (登录号 S40336)数据核对无误,见图 1。



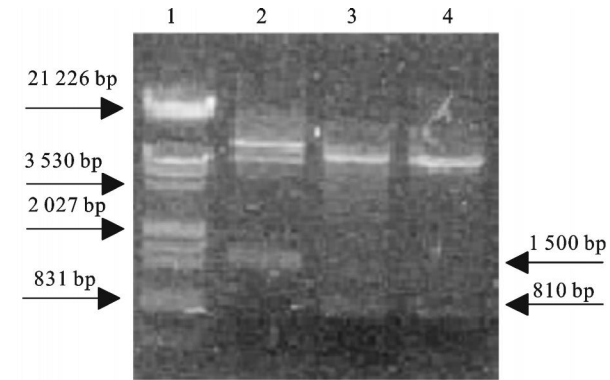
1. 阴性对照:无菌水为模板; 2. 阳性结果:蓖麻叶基因组为模板(条带为 810 bp) ;4. DNAMarker (Hind III EcoR I)

图 1 rta 基因 PCR 结果

Fig. 1 PCR of rta gene

2.2 RTA 原核表达及纯化

用 Hind III EcoR I 将 rta 克隆至 pET32a 质粒上,构建表达载体质粒(pET32a- His- RTA) ,酶切鉴定正确,见图 2。

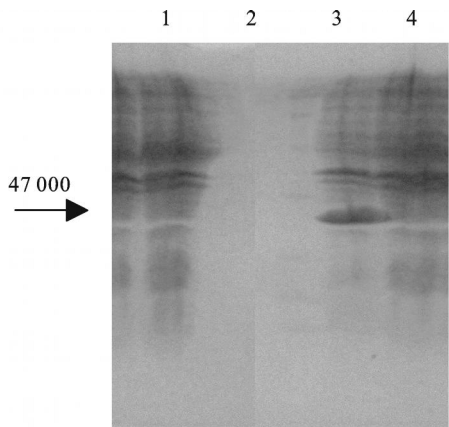


1. DNA Marker (HindIII/ EcoRI) ; 2. ScaI; 3. EcoRI/ HindIII; 4. BamHI/ XhoI

图 2 表达载体质粒(PET32a- His- RTA) 酶切鉴定结果

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of expression plasmid(PET32a- His- RTA)

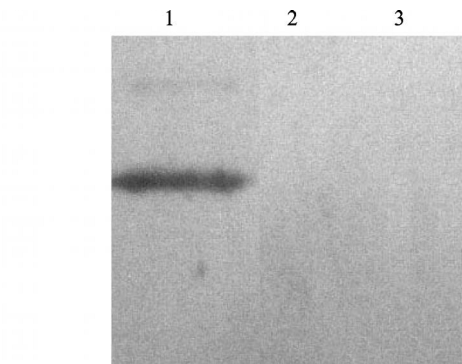
以 IPTG 诱导 RTA 的融合表达并 SDS- PAGE 电泳检测和 Western blot 鉴定。SDS- PAGE 电泳检测表明,菌液在 47 000 位置出现明显增强的表达条带,见图 3。Western blot 鉴定结果证实该条带即 RTA- His 融合蛋白,见图 4。继而对表达产物进行非变性条件下的 Ni-NTA 亲和层析柱纯化与鉴定。纯化后 SDS- PAGE 电泳检测表明,平衡缓冲液已洗去了绝大多数的杂蛋白,而 20, 40 mmol/L 咪唑溶液洗脱液中含有大量目的蛋白质,见图 5。即使到了 100、200 mmol/L 也出现了较淡的目的条带(未显示),表明诱导上清液的表达量非常可观。据透析后 SDS- PAGE 条带清晰度来看,纯度非常高,见图 6。



1. Protein Marker(从上向下依次为200 000、116 000、97 000、66 000、44 000、29 000、14 000) ; 2. 经 IPTG 诱导表达;3. 未经 IPTG 诱导表达;4. 空质粒样品

图 3 RTA 融合表达产物 SDS- PAGE 电泳结果

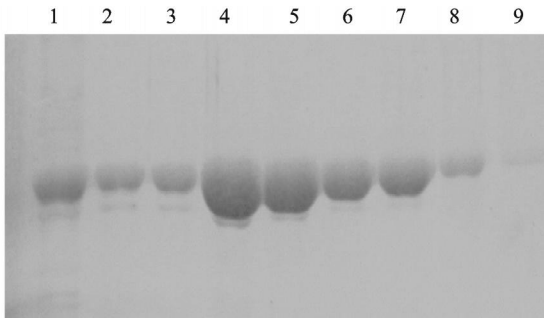
Fig. 3 SDS PAGE electrophoresis of RTA fusion expression



1. 经 IPTG 诱导表达; 2. 未经 IPTG 诱导表达; 3. 空质粒样品 pET32a

图 4 RTA 融合表达产物 Western blot 鉴定结果

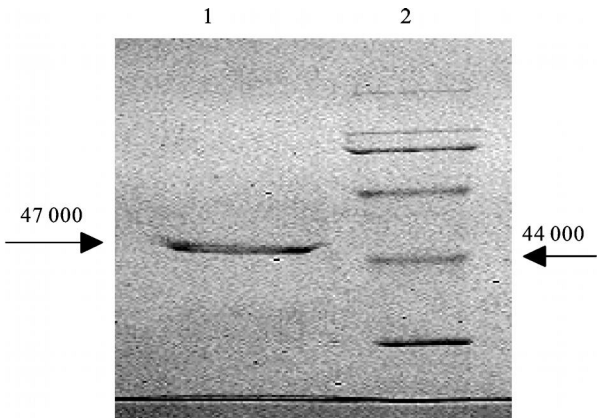
Fig. 4 The Western blot identification of RTA fusion expression product



1~3 用 NTA-0 Buffer 洗脱;4~6 用 NTA-20 Buffer 洗脱;7~9 用 NTA-40 Buffer 洗脱

图 5 RTA 融合表达产物层析纯化洗脱液 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 5 Purified eluate SDS PAGE electrophoresis of RTA fusion expression product



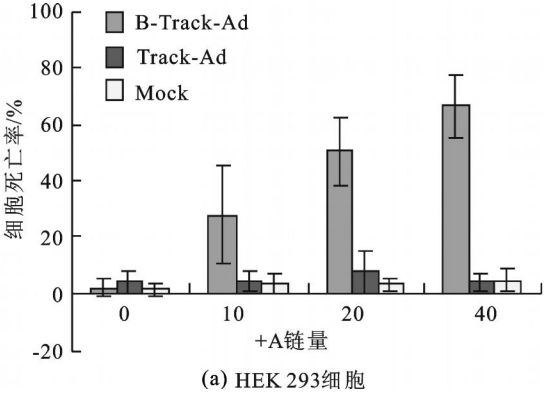
1. 洗脱液透析后样品 2. Protein Marker

图 6 纯化的 RTA 融合蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

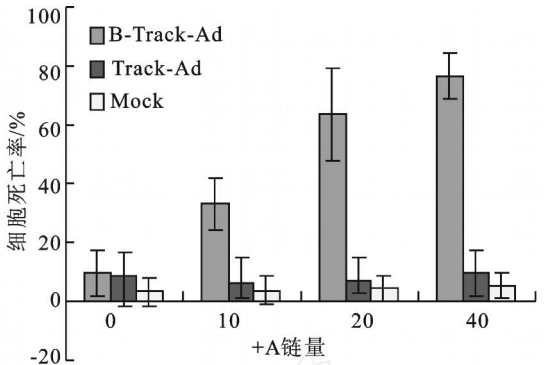
Fig. 6 SDS PAGE electrophoresis of purified RTA fusion protein

2.3 RTA 对细胞的特异性杀伤效果检测

Trypan blue 染色法检测结果表明,RTB 的表达,对 RTA 杀伤细胞确有帮助,在有 RTB 表达的系列中,细胞死亡率有明显的上升。从 10μl-20μl-40μl 的批次中,死亡率上升约 40 个百分点,并呈梯度上升趋势,而对照系基本维持在一定范围,没有增长,见图 7。



(a) HEK 293 细胞



(b) HeLa 细胞

B-Track-Ad 为携带 rtb 重组腺病毒,Track-Ad 不带有 rtb 的重组腺病毒,Mock 为空细胞对照

图 7 Trypan Blue 染色法检测 RTA 与 B-Track-Ad 联合作用对 HEK293 和 HeLa 细胞的杀伤作用

Fig. 7 Trypan Blue staining detection for RTA and the B-Track-Ad combined effects on HEK293 and HeLa cells' Cytotoxicity

3 结 语

Ricin 是免疫毒素中最常用的毒素之一,但在细胞中的转运机制还不甚明了。目前并没有直接在内质网观察到 Ricin,故不排除在细胞中还有其他的运输方式^[5]。所以,Ricin 如何发挥细胞毒性机制仍然是目前研究的热点。天然的 RTA 因为与高度糖基化的 RTB 相连,容易被体内的肝脏网状系统清除,因此非糖基化的 RTA 更适合应用于免疫毒素及其细胞毒性机制的研究^[6]。作者采用融合有 His-tag 系列载体 pET32a 进行 RTA 融合蛋白表达及制备,并通过降低诱导温度(20 °C 与 IPTG (1 mmol/L)用量来控制细菌生长条件,可能有利于促进蛋白质的折叠而减少包涵体的形成^[7],由于融合了 His-tag 标签,在融合基因序列后加上终止密码子,故载体上的下游序列将不会表达。利用镍柱层析技术将 RTA-His 融合蛋白纯化。该法方便、快速,纯度高。获得每毫升培养物表达纯化约 123 μg 的具有生物活性的 RTA 融合蛋白。为利用常规的基因工程技术进一步研究蓖麻毒素在细胞内的转运机制、制备蓖麻毒素的特异性抗体以及建立蓖麻毒素的检测方法等奠定了基础。

作者采取的是基因工程技术表达的具有高生物活性的 RTA 融合蛋白^[5],与细胞中表达、出膜的 RTB 蛋白结合,RTB 介导 RTA 进入细胞,对细胞发挥毒性作用。根据通行的毒性作用机制推测,只要有 RTB 存在,与细胞表面末端含有半乳糖基结构的受体结合,形成细胞内吞作用,就可以帮助

RTA 蛋白进入细胞,发挥毒性作用。关于 Ricin 应用于临床肿瘤治疗的研究和应用由来已久,在本研究中,借助重组腺病毒载体表达的 RTB 实现外加的 RTA 进入细胞,经 Trypan Blue 染色法检测,表达 RTB 的组都比的未表达 RTB 以及空细胞对照组的细胞死亡率要高,以 0、10、20、40 μL 的 A 链量梯度升高,最高差距可达 50%~60%。由于我们

Trypan Blue 染色法选用的是 HEK293、Hela 细胞,而重组腺病毒在 HEK293 细胞中可以扩增,故不能排除病毒杀伤细胞的影响,在实验中,我们控制在病毒感染 48 h 以内进行检测以消除病毒杀伤细胞的影响。同时选用了 Hela 细胞,在细胞培养系统中初步证实本研究的可行性。

参考文献(References):

- [1] Jon D Robertus, Arthur F Monzingo. The structure of ribosome inactivating proteins[J]. **Medicinal Chemistry**, 2004, (4):477 - 486.
- [2] Jon R. The structure and action of ricin, a cytotoxic N-glycosidase[J]. **Cell biology**, 1991, 2:23 - 30.
- [3] Olsnes S, Kozlov J V. Ricin[J]. **Toxicon**, 2001, 39:1723 - 1728.
- [4] Fodstad O, Kvalheim G, Godal A, et al. Phase I study of the plant protein ricin[J]. **Cancer Res**, 1984, 44:862 - 865.
- [5] Chen A, Ramzey J A, Rockford K D. Evidence that the transport of ricin to the cytoplasm is independent of both Rab 6A and COP1[J]. **Cell Science**, 2003, 116(17):3503 - 3510.
- [6] Lord J M, Roberts L M, Robertus J D. Ricin: structure, mode of action and some current applications[J]. **FASEB J**, 1994, 8:201 - 208.
- [7] Lavallie E R, Diblasio E A, Kovacic S. A thioredoxingene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. **Biotechnology**, 1993, 11(2):187 - 193.

(责任编辑:李春丽)

《江南大学学报(自然科学版)》 征稿、征订启事

《江南大学学报(自然科学版)》(双月刊)是由教育部主管、江南大学(国家“211工程”重点建设高校)主办的自然科学类学术期刊。本刊主要刊载通信与控制工程、信息工程、机械工程、产品系统设计理论、纺织工程、应用化学、材料工程、土木工程、数理科学等学科的学术论文、研究报告,以及反映学科前沿研究动态的高质量综述。

本刊优先刊登国家自然科学基金和省部级及其以上科研项目析出论文,同时发表与企业及生产实际密切相关的应用性研究成果。热忱欢迎广大高校教学、科研人员及相关领域的专家、学者,在读硕士、博士研究生赐稿。

本刊为 A4 开本,128 页,每册订价 8.00 元;全年共 6 期,48.00 元;本刊邮发代号:28-189,全国各地邮局均可订阅,亦可向本刊编辑部直接订购。本刊可破季订阅。热忱欢迎广大读者订阅本刊。

邮编:214122

电子邮箱:xbzrkx@jiangnan.edu.cn

地址:江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

电话:0510-85913519

《江南大学学报(自然科学版)》编辑部