

颗粒溶素的表达纯化及生物学活性分析

钱 琤, 陈孙孝, 周 晔, 王 燕, 谷明莉, 陈 波, 陈 燕, 邓安梅*, 仲人前*

(第二军医大学长征医院实验诊断科, 全军临床免疫中心, 上海 200003)

[摘要] **目的:** 采用原核表达系统对颗粒溶素 (granulysin, GNLY) 进行体外表达, 纯化及活性鉴定。 **方法:** 以体外培养的人外周血单个核细胞 (PBMC) 为模板, RT-PCR 扩增编码 GNLY 的 cDNA 片段, 插入 pMD-18-T 载体, 测序正确后再亚克隆到质粒 pET28a(+) 中, 构建重组表达质粒 pET28a(+)-GNLY, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) plysS, IPTG 诱导表达融合蛋白, 包涵体经变性后用 Ni 亲和层析纯化, CFU 法测定蛋白活性。 **结果:** 成功地将 GNLY cDNA 片段插入载体 pET28a(+) 中, 构建了表达质粒 pET28a(+)-GNLY。经诱导在原核表达系统中以包涵体形式高效表达了相对分子质量为 9 000 的融合蛋白, 变性纯化后的 GNLY 蛋白经 CFU 法检测, 发现其具有细胞毒活性且细胞毒作用具有剂量依赖性。 **结论:** 本实验利用原核表达系统成功地表达了具有生物学活性的 GNLY, 为研究其功能、作用机制及临床应用奠定了基础。

[关键词] 颗粒溶素; 基因表达; 生物学活性

[中图分类号] Q 786 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0829-05

Expression, purification and bioactivity analysis of granulysin

QIAN Cheng, CHEN Sun-xiao, ZHOU Ye, WANG Yan, GU Ming-li, CHEN Bo, CHEN Yan, DENG An-mei*, ZHONG Ren-qian* (Department of Laboratory Diagnosis, Clinical Immunology Center of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To express the granulysin protein in *E. coli* and to detect its bioactivity after purification. **Methods:** Using cultured human peripheral blood mononuclear cells as the template, we selectively amplified the fragment coding granulysin by RT-PCR. The fragment was then inserted into the prokaryotic expression vector pET28a (+) for transforming *E. coli* BL21(DE3) plysS. Fusion protein expression was induced by isopropyl-Beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). After renaturation, the protein was purified by affinity chromatography and its bioactivity was examined by colony-forming unit. **Results:** We successfully inserted granulysin cDNA fragment into vector pET28a (+) and constructed the expression plasmid pET28a (+)-GNLY. The fusion protein, with a molecular weight of 9 000, was obtained through IPTG induction. After renaturation and purification, the recombinant protein was proven to be bioactive by CFU and its cytotoxicity was in a dose-dependent manner. **Conclusion:** The fusion protein obtained in the present study is bioactive and can be used for further study on its function, mechanism of action and clinical application.

[KEY WORDS] granulysin; gene expression; bioactivity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 829-833]

颗粒溶素 (granulysin, GNLY) 是存在于人类细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 和自然杀伤细胞 (NK cells) 胞质颗粒中的溶细胞蛋白, 它是在研究效应 T 淋巴细胞表达时通过负杂交方法而发现的。T 细胞受体 (TCR) 激活 3~5 d 后, 静止 T 淋巴细胞转变为 T 辅助性细胞和细胞毒型 T 细胞, 此时 GNLY 开始表达。GNLY 定位于胞质颗粒中, 具有溶解酶活性, 可以溶解真菌、寄生虫、细菌和哺乳动物细胞^[1~3]。GNLY 在细胞免疫中发挥重要作用, 一方面, 在某些感染性疾病中 GNLY 的表达水平可以反映患者机体的免疫状态, 另一方面, 通过对 GNLY 肽的筛选修饰, 有望开发出一种有效杀伤微生物的免疫制剂, 应用于临床。迄今, 国内未见有重组表达具有生物学活性 GNLY 的报道, 国外也仅有少量文献报道。

本实验首先用基因工程方法构建 GNLY 原核表达质粒, 并用 IPTG 对转入大肠杆菌中的重组质粒 pET28a(+)-GNLY 进行了诱导表达, 重组蛋白经 Ni-NTA 亲和层析纯化后用免疫印迹法进行鉴定, 并用 CFU 法对纯化的重组蛋白进行活性鉴定。

[基金项目] 国家自然科学基金 (30471616)、上海市重大科技攻关基金 (04DZ19116)、上海市重点科研支撑条件项目 (051409012) 和上海市青年科技启明星计划 (QMX01423)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30471616), Shanghai Major Sci-Tech Foundation for Tackling Key Problems (04DZ19116), Shanghai Key Scientific Research Supporting Program (051409012) and Shanghai Rising-Star Program (QMX01423)。

[作者简介] 钱 琤, 博士生。E-mail: qiancheng824@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: amdeng70@yahoo.com; rqzhong@guomai.sh.cn

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 (1)菌株和质粒:pET-28a(+)-vector, BL21(DE3)plysS, DH5 α 为本科室保存株; pMD-18-T vector(TaKaRa 公司)。(2)工具酶及主要试剂:限制性内切酶 *Nde* I、*Eco*R I、Premix *Taq* (TaKaRa *Taq*TM Version)及 T₄ DNA 连接酶(TaKaRa 公司); DNA 胶回收试剂盒(上海申能博彩公司); RPMI 1640 培养基,胎牛血清(Gibco 公司); 小量质粒抽提试剂盒(上海华舜生物工程有限公司); RNeasy Mini Kit (QIAGEN), *Taqman* Reverse Transcription Regents (Applied Biosystem); 羊抗兔 IgG 抗体(KPL 公司); 兔抗 6-His 多抗(NOVUS 公司); His-Bind Resin(Novagen)。

1.2 人外周血单个核细胞(PBMC)的分离培养 抽取正常人静脉抗凝血 5 ml,用淋巴细胞分离液按常规操作方法分离单个核细胞。用含 5%胎牛血清(FCS),5%人自体血清的 RPMI 1640 培养基培养调整细胞浓度为(1~2) $\times 10^6$ /ml,于 24 孔细胞培养板中每孔加入 1 ml。加入卡介苗 5 μ g/孔和 rIL-2 50 U/孔用于诱导 $\gamma\delta$ T 细胞,根据细胞增殖情况适时扩孔培养,同时每隔 3~4 d 补充 rIL-2 50 U/孔,以维持细胞生长需要。收集细胞(约 10^6 数量级),用冷的无菌的 1 \times PBS(pH 7.4)洗涤后,即可用于抽提总 RNA。

1.3 引物设计及 RT-PCR 扩增 根据检索 NCBI 数据库提供的 GNLY 基因的 cDNA 编码序列进行了 PCR 引物设计。采用 Primer Premier 5.0 程序设计引物,由联合基因技术有限公司合成。其序列为:上游引物:5'-CAT ATG GGC CGT GAC TAC AGG ACC-3',5'引入 *Nde* I 酶切位点;下游引物:5'-GAA TTC TCA CCT GAG GTC CTC ACA G-3',5'引入 *Eco*R I 酶切位点。将培养细胞按试剂盒说明书抽提总 RNA,RT-PCR 扩增出大小为 222 bp 的 DNA 序列。200 ng 总 RNA 加入 10 μ l 的反转录体系中,42 $^{\circ}$ C 45 min \rightarrow 94 $^{\circ}$ C 3 min 终止反应。反转录产物保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。PCR 循环条件:94 $^{\circ}$ C 3 min \rightarrow 35 个循环(94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 50 s) \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.4 人 GNLY 基因的克隆及 pET28a(+)-GNLY 重组质粒的构建 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后切胶回收纯化,与 pMD-18-T 载体连接过夜,进行 TA 克隆,构建 pMD18T-GNLY 重组质粒。将质粒转入宿主菌 DH5 α ,提取质粒,经双酶切后,用 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察酶切产物。经 DNA 测序鉴定证实所获得的目的片段为 GNLY 基因的编码序列。再将该目

的片断插入 pET-28a(+)-载体,构建 pET-28a(+)-GNLY 重组质粒。将其转入宿主菌 BL21(DE3)plysS,在含卡那霉素的 LB 平板上挑取单菌落筛选阳性克隆,小量扩增,提取质粒,双酶切及测序鉴定。

1.5 融合蛋白的诱导表达 挑取上述经鉴定后的重组克隆于 LB/Kana(含卡那霉素 25 μ g/ml)培养液 37 $^{\circ}$ C 振荡过夜,次日 1:100 接种于新的 LB/Kana 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡约 3 h(D_{550} 值约为 0.4~0.6),然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,诱导 4~5 h,离心收集上清及菌体沉淀。分别取上清和沉淀 10 μ l 与标准蛋白,未经诱导的菌体蛋白同时进行 SDS-PAGE 电泳,经考马斯亮蓝染色,分析电泳条带。

1.6 不同诱导温度对表达的影响 取阳性克隆菌落,分别于 25 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 经 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)诱导表达 4 h,观察不同诱导温度对目的蛋白表达的影响,进行 SDS-PAGE 电泳分析结果。

1.7 融合蛋白的变性及亲和层析纯化 每升大肠杆菌培养物沉淀中加入 10 ml Binding Buffer(含 2.5 mmol/L imidazole)缓冲液悬浮菌体,4 $^{\circ}$ C 搅拌过夜,超声碎菌,15 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 60 min 收集上清。取 2 ml His-Bind Resin 装入空柱中。分别用 ddH₂O、Charge Buffer、Binding Buffer 洗柱,加样品过柱,然后分别用含不同浓度咪唑(2.5、60、75 mmol/L imidazole)的 Binding Buffer 洗柱,最后用 Elution Buffer(300 mmol/L imidazole)洗脱,收集洗脱液。

1.8 融合蛋白的复性及鉴定 加二硫代苏糖醇(DTT)至洗脱液中至终浓度为 10 mmol/L,再将上述液体注入注射器中一滴滴流下。用装有复性液的容器接收,低温下进行(洗脱液:复性液=1:5),随后加氧化型 DTT 至终浓度为 10 mol/L。于 4 $^{\circ}$ C 以复性液透析过夜,其间换液 3 次。进行 SDS-PAGE 电泳后考马斯亮蓝染色,灰度扫描分析目的蛋白含量。蛋白浓度检测采用 Bradford 法,以 BSA 为标准样品。

1.9 免疫印迹法验证重组蛋白 将 SDS-PAGE 电泳后凝胶上的条带电转移至硝酸纤维滤膜上,用含 5%脱脂奶粉,0.02% Tween-20 PBS 封闭过夜。兔抗 6-His 多抗为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体为二抗,DAB 显色。

1.10 融合蛋白生物学活性的检测 大肠杆菌和 0、0.1、0.5、1、5、10、20 μ mol/L 不同浓度的 GNLY 共 50 μ l 在 37 $^{\circ}$ C 下共孵育 3 h,样品被稀释并扩散于胰酶解酪蛋白琼脂。24 h 以后,检测 CFU(colony-forming unit) 数。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 GNLY 编码基因 从培养 12 d

的 PBMC 中抽提总 RNA, 以此为模板经 RT-PCR 扩增得到 222 bp 特异性条带, 琼脂糖凝胶电泳证实, 片段大小与理论预期值一致(图 1)

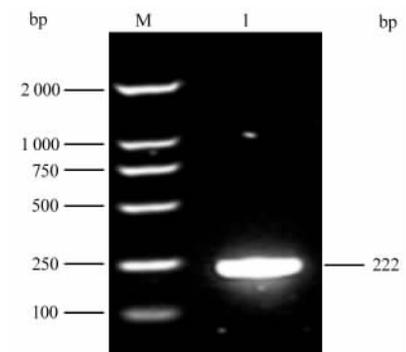


图 1 GNLY 扩增片段的凝胶电泳分析

Fig 1 Gel electrophoresis of PCR products of GNLY

M: DNA marker; 1: PCR products of GNLY

2.2 表达质粒 pET-28a(+)-GNLY 的构建、筛选及鉴定 利用 RT-PCR 技术扩增出 GNLY 编码基因, 成功克隆入 pMD-18-T 载体, 酶切产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在 2 062 bp 和 222 bp 出现单一条带, 大小与理论预期一致。以 pMD-18-T-GNLY 为模板, 扩增目的片段, 产物与 pET28a(+)-连接后, 转化宿主菌 BL21(DE3)plysS, 挑取阳性克隆, 抽取的重组质粒用 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切。酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 在 5.3 kb 和 222 bp 可见 2 条特异性条带, 前者与 pET28a(+)-大小一致, 后者与插入片段大小一致(图 2)。证明表达质粒 pET28a(+)-GNLY 构建成功。并经测序鉴定插入片段与 GenBank 序列完全一致。

2.3 目的基因的诱导表达

2.3.1 GNLY 融合蛋白表达最佳诱导温度的筛选

重组原核表达质粒 pET28a(+)-GNLY 在大肠杆菌 BL21(DE3)plysS 中分别在 25°C、30°C 和 37°C 经 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)诱导表达 4 h, 在相对分子质量 9 000 处有一明显深染蛋白条带, 与预计的 GNLY 融合蛋白相对分子质量大小一致。超声裂解细菌, 离心后分别取上清和沉淀电泳分析, 发现表达产物基本在沉淀中, 灰度扫描分析, 30°C 培养的细菌上清中融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 5%, 37°C 时包涵体内融合蛋白的表达量占菌体总蛋白的 35%。说明 GNLY 主要是以包涵体形式存在于细菌细胞内。同时可以看出融合蛋白的表达量在细菌上清中以 30°C 时表达量最大, 在包涵体中以 37°C 时表达量最大(图 3)。

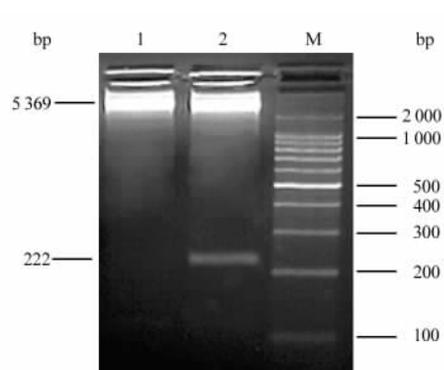


图 2 pET-28a(+)-GNLY 重组质粒的双酶切鉴定

Fig 2 Identification of pET28a(+)-GNLY by digestion

M: DNA marker; 1: pET28a(+)-GNLY without digestion; 2: pET28a(+)-GNLY digested by *Nde* I / *Eco*R I

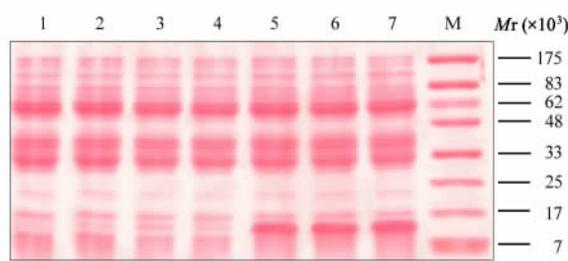


图 3 GNLY 融合蛋白表达最佳诱导温度的筛选

Fig 3 Screening of optimal induction temperature for GNLY fusion protein

M: Protein molecular mass marker; 1: Bacterial extracts of GNLY-BL21(DE3)plysS un-induced; 2-4: Supernatant of bacterial extracts of GNLY-BL21(DE3)plysS at 25°C, 30°C, and 37°C, respectively; 5-7: Inclusion bodies of bacterial extracts of GNLY-BL21(DE3)plysS at 25°C, 30°C, and 37°C, respectively

2.3.2 包涵体中表达蛋白的变复性与纯化 包涵体经变、复性、Ni 柱纯化后进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析, 得到相对分子质量约 9 000 的单一条带, 与 GNLY 的理论计算值相符, 纯度为 95%(图 4)。

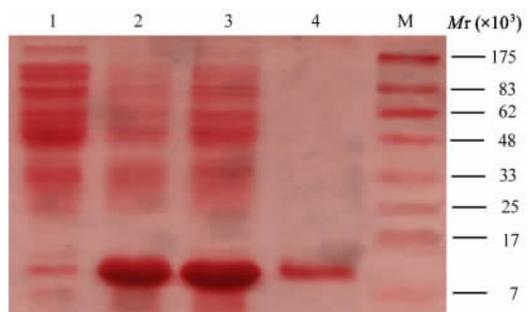


图 4 SDS-PAGE 分析 GNLY 的表达

Fig 4 Expression of GNLY by SDS-PAGE

M: Protein molecular mass marker; 1: Supernatant of bacterial extracts of GNLY-BL21(DE3)plysS; 2, 3: Inclusion bodies of bacterial extracts of GNLY-BL21(DE3)plysS after renaturation; 4: Purified protein of GNLY

2.4 Western免疫印迹分析 纯化的GNLY蛋白可与抗His多抗发生良好的抗原抗体反应。亲和层析后含GNLY融合蛋白的洗脱组分进行SDS-PAGE后免疫印迹检测,结果显示:9 000处有明显抗原抗体反应(图5)。

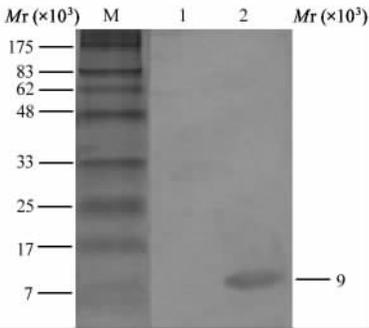


图5 Western印迹检测GNLY融合蛋白

Fig 5 Western blotting of GNLY

M:Protein molecular mass marker; 1: Total protein of BL21 (DE3) pLysS without expression of GNLY; 2: Purified protein of GNLY

2.5 CFU法检测GNLY细胞毒活性 融合蛋白生物活性的检测:大肠杆菌和不同浓度的GNLY(0、0.1、0.5、1.5、10、20 μmol/L)共50 μl在37℃下共孵育3 h,样品被稀释并扩散于胰酶解酪蛋白琼脂。24 h以后,检测CFU。结果表明GNLY对大肠杆菌具有杀伤作用,且随着剂量的增加,杀伤作用增强,说明重组获得的GNLY不仅对细菌具有细胞毒作用且细胞毒活性具有剂量依赖性(图6)。

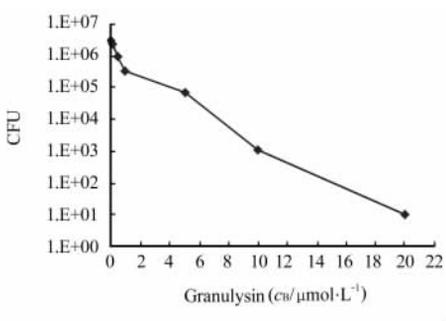


图6 不同剂量GNLY对大肠杆菌的细胞毒活性检测

Fig 6 Cytotoxicity of granulysin against *E. coli* at different doses

3 讨论

GNLY是在人类CTL和NK细胞中发现的一种新的细胞毒性分子,具有广泛的杀菌、杀大肠杆菌功能。对尿沉渣中GNLY、穿孔素和颗粒酶同时检

测可以预测肾移植急性排斥反应的发生^[4]。Morizane等^[5]用共聚焦激光显微镜检查发现病毒感染细胞反应性CD4⁺和/或CD8⁺T细胞均表达颗粒酶B和GNLY,说明GNLY在病毒囊泡的形成中起作用,尤其是在以脐形凹陷小泡为特征的疱疹和牛痘样水疱病组织损伤中起作用。Takemoto等^[6]发现与对照组相比,亚急性硬化性全脑炎患者PBMC中GNLY表达明显降低,定量RT-PCR检测GNLY mRNA的表达,与23个对照相比,30个亚急性硬化性全脑炎患者表达降低,7个麻疹患者中增高,表明GNLY在针对麻疹病毒的宿主免疫防御中起重要作用。有学者^[7]检测了26个干细胞移植患者血清中GNLY的表达。在同种异体的干细胞移植中,GNLY在前3周短暂增加,在急性移植抗宿主疾病(GVHD)中,血清GNLY显著增加且与GVHD的严重程度相关。血清GNLY是干细胞移植中GVHD一个有用的指标。

GNLY以非溶解活性的15 000前体蛋白形式产生于效应细胞内,然后被转入细胞酸性囊泡内加工为有活性的9 000蛋白行使其功能。本研究克隆的cDNA全长222 bp,为编码活性GNLY 9 000氨基酸对应的基因序列。因为宿主菌BL21(DE3)pLysS对带毒性基因载体的耐受性较高,所以本研究用其克隆目的基因,避免了GNLY对宿主细胞的可能毒性造成的质粒不稳定。目的基因被克隆到pET质粒载体上,受噬菌体T7强转录及翻译信号控制,表达由宿主细胞提供的T7 RNA聚合酶诱导。

重组蛋白在原核表达系统中以天然形式的可溶性蛋白和非天然形式的包涵体两种形式存在。虽然可溶性蛋白纯化程序较包涵体简单,不需变性、复性等过程,但重组蛋白高表达时,在可溶性蛋白中的含量较低,并且在细胞内容易受到蛋白酶的攻击,而导致目的蛋白含量降低;而以包涵体形式表达重组蛋白通常含量较高,易于与其他细胞成分分离,避免蛋白酶对外源蛋白的降解,杂蛋白含量较低。所以本实验对包涵体进行分离、变复性、纯化,并最终获得纯度高达95%的重组蛋白。为了获得具有生物活性的GNLY,我们在复性过程中采用了氧化型/还原型二硫代苏糖醇(DTT)作为氧化/还原系统,通过促使不正确形成的二硫键的交换反应,提高了正确配对的二硫键的产率。此外,本实验在起始密

码子的上游设计了6个组氨酸的编码序列,载体表达蛋白在N端带6个组氨酸尾巴,可用Ni-NTA琼脂柱亲和层析来纯化。且6个组氨酸融合表达产物的相对分子质量较小,因而免疫原性很低,对目的蛋白的构象及活力影响不大。由于GNLY本身对大肠杆菌具有毒性,所以对其进行原核表达具有一定的难度。本研究中选用的毒性蛋白表达系统及对该蛋白包涵体变复性条件的摸索为今后进行GNLY的大量发酵奠定了基础。

本实验成功地从培养的PBMC中扩增得到编码GNLY的基因片段,插入原核表达载体pET-28a(+)中,构建了重组原核表达质粒pET28a(+)-GNLY。将质粒pET28a(+)-GNLY转入大肠杆菌,诱导表达出9000的GNLY融合蛋白;对包涵体进行变复性后用Ni-NTA树脂以亲和层析法纯化,获得纯化的GNLY融合蛋白并经Western印迹证实蛋白的正确性;通过CFU方法鉴定该融合蛋白具有杀伤大肠杆菌的生物学活性。本实验获得的具有生物学活性的GNLY蛋白,为下一步免疫动物获得抗人GNLY抗体、建立ELISA法检测血清中GNLY的含量以及研究其在疾病诊断中的价值创造了条件。

[参考文献]

- [1] Pena SV, Krensky AM. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity[J]. *Semin Immunol*, 1997, 9:117-125.
- [2] Deng A, Chen S, Li Q, et al. Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator[J]. *J Immunol*, 2005, 174:5243-5248.
- [3] Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin[J]. *Science*, 1998, 282:121-125.
- [4] Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection[J]. *Transplantation*, 2004, 77: 1866-1875.
- [5] Morizane S, Suzuki D, Tsuji K, et al. The role of CD4 and CD8 cytotoxic T lymphocytes in the formation of viral vesicles[J]. *Br J Dermatol*, 2005, 153:981-986.
- [6] Takemoto M, Kira R, Kusuhara K, et al. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells from patients with subacute sclerosing panencephalitis using oligonucleotide microarrays[J]. *J Neurovirol*, 2005, 11:299-305.
- [7] Nagasawa M, Isoda T, Itoh S, et al. Analysis of serum granulysin in patients with hematopoietic stem-cell transplantation; its usefulness as a marker of graft-versus-host reaction[J]. *Am J Hematol*, 2006, 81:340-348.

[收稿日期] 2005-12-12

[修回日期] 2006-06-28

[本文编辑] 贾泽军

我校7项课题获2005年度“上海医学科技奖”

一等奖

免疫应答负相调控的细胞机制研究(第二军医大学基础医学部 曹雪涛)

二等奖

细胞因子神经调节作用的分子机制(第二军医大学海医系 蒋春雷)

退变性颈脊髓压迫症的基础与临床研究(长征医院 贾连顺)

三等奖

银屑病患者朗格汉斯细胞异常机制及其在治疗中的意义(长海医院 唐玲)

阴阳虚证与糖皮质激素受体关系研究(第二军医大学中医系 凌昌全)

微创技术在创伤骨科的基础及临床应用研究(长海医院 王秋根)

胆道系统恶性肿瘤外科治疗的临床与基础研究(东方肝胆外科医院 张柏和)