

· 论 著 ·

干扰素诱导蛋白 IFIT1 的克隆与原核可溶性表达*

李洪涛¹, 粟永萍^{1△}, 徐建明², 冉新泽¹, 王军平¹, 艾国平¹, 程天民¹

(1. 第三军医大学军事预防医学院全军复合伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038;

2. Dept. of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, 77030 Houston USA)

摘要:目的 研究干扰素诱导蛋白 IFIT1 的原核可溶性表达。方法 通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)获得 IFIT1 编码序列, 克隆入原核表达载体, 电穿孔转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆, 诱导细菌表达, 蛋白凝胶电泳观察。结果 构建的原核表达平台实现了较丰富的麦芽糖结合蛋白融合 IFIT1(MBP-IFIT1)可溶性表达。结论 MBP-IFIT1 的原核可溶性表达为后续 IFIT1 蛋白结合分析及免疫分析提供了材料及方法学基础。

关键词: 创伤和损伤; 细胞应激; 重组; 原核表达

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.19.001

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)19-1873-03

Cloning and soluble prokaryotic expression of IFIT1*

Li Hongtao¹, Su Yongping^{1△}, Xu Jianming², Ran Xinze¹, Wang Junping¹, Ai Guoping¹, Cheng Tianming¹

(1. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury,

College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China;

2. Dept. of Molecular and Cellular Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX 77030, U. S. A.)

Abstract: **Objective** To investigate the soluble prokaryotic expression of interferon induced factor with tetratricopeptide repeats-1. **Methods** By reverse transcription PCR, murine IFIT1 cDNA coding sequence was acquired, and cloned into the prokaryotic expression vector. Then the E. coli was transformed by electroporation with the recombinant. The screened positive cloning was induced to express target recombinant protein which was observed with SDS-PAGE. **Results** The plenty soluble fusion proteins MBP-IFIT1 could be obtained by this prokaryotic expression construction. **Conclusion** Accomplishment of the soluble expression of MBP-IFIT1 provides basements of the IFIT1 follow-up functional studies.

Key words: wounds and injuries; cell-stress; recombinants; prokaryotic expression

IFIT1(interferon induced factor with tetratricopeptide repeats-1, IFIT1)受 I 型干扰素诱导迅速合成, 且含有多个串联排列的 TPR 模体(tetratricopeptide repeats motif), 所以得名^[1]。IFIT1 分子中的 TPR 模体为 34 个简并氨基酸构成的重复结构, 具有介导蛋白分子间结合及蛋白复合物组配的作用^[2]。相关的研究报道 IFIT1 借其 TPR 模体, 通过结合细胞内靶蛋白, 发挥生物效应^[3-6]; 作者前期的酵母双杂交实验, 发现 IFIT1 可能与糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)结合, 参与调节 GR 的转录活性^[7]; 为进一步研究 IFIT1 的功能, 本文进行了鼠源细胞株 IFIT1 cDNA 全长编码序列的克隆、其原核表达载体的构建及重组融合蛋白可溶性原核表达的实验, 报道如下。

1 材料与与方法

1.1 细胞株、菌株与质粒 小鼠腹腔巨噬细胞株 RAW264.7 (ATCC TIB-71)、菌株 E. coli BL21 (DE3)、原核表达质粒 pGEX-4T-1 为作者所保存, 原核表达质粒 pMAL-C2X 为 New England Biolab(NEB)公司产品。

1.2 试剂 细胞固体培养基、标准胎牛血清购自 Hyclone 公司, 细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、IPTG 购自 Sigma 公司, RNA 抽提试剂(Tripure isolation reagent)购自 Roche, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒——RNA LA PCR kit、限制性内切酶 EcoR I、BamH I 及 T4 连接酶购自 Takara 公司, 质粒抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自 O-

mega Bio-tech, 引物委托 Takara 公司合成, 酵母提取物和胰蛋白酶为 Oxiod 公司产品。

1.3 自鼠源性细胞株逆转录扩增 IFIT1 编码序列 DMEM 培养基中加入 10% 胎牛血清, 5% CO₂, 37 °C 培养 RAW264.7 细胞, 至 80% 细胞汇合时, 向培养基中加入 LPS, 至终浓度 0.1 μg/mL, 以诱导 IFIT1 的转录^[10], 刺激 6 h 后收获细胞。提取细胞总 RNA, 即向培养细胞中直接加入 RNA 抽提试剂, 裂解细胞, 加入定量氯仿, 漩涡振荡, 室温静置, 12 000 r/min 离心 15 min, 取上层水相, 加入定量异丙醇, 低温 12 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀的 RNA, 75% 的乙醇洗涤, 50 μL RNase free dH₂O 溶解 RNA, 在紫外分光光度仪测 RNA 浓度。按 Takara RNA PCR kit 的说明, 进行 RT-PCR 操作, 先进行逆转录反应。反应体系: 4 μL MgCl₂, 2 μL 10×RNA buffer, 8.5 μL RNase free dH₂O, 2 μL dNTP Mixture, 0.5 μL RNase Inhibitor, 1 μL AMV reverse transcriptase, 1 μL Oligo dT(15 mers), 0.1 μg total RNA, 20 μL total volume。反应条件: 30 °C 10 min, 50 °C 50 min, 99 °C 5 min。然后, 逆转录产物与 6 μL MgCl₂, 8 μL 10×PCR buffer, 0.5 μL Takara pyrobest Taq, 1.0 μM IFIT1 引物, 61.5 μL dH₂O 混合, 组成 100 μL 反应体系。进行后续 PCR 反应, 扩增 IFIT1 全长编码序列(coding sequence, CDS)。PCR 反应条件: 94 °C 2 min(1 个循环), 94 °C

30 s, 63 °C 50 s, 72 °C 1.5 min (35 个循环)。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳显示实验结果。IFIT1 引物序列: 引物 1: 5' CGG AAT TCA TGG GAG AGA ATG CTG ATG GTG AC3'; 引物 2: 5' CGG GAT CCT CAG AAT GCA GGG TTC ATT TCC CC3' (斜体部分为引入的侧翼碱基, 下划线部分为引入的限制性内切酶 EcoR I、BamH I 位点)。

1.4 小鼠 IFIT1 克隆入原核表达载体 pMAL-C2X 参照 Omega Bio-tech 的操作流程, 纯化 PCR 产物。扩增、抽提 pMAL-C2X 质粒。对两者同时进行 EcoR I、BamH I 的双酶切反应。产物以 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳回收 IFIT1 及载体片断。按 1:3 的摩尔比混合载体片断与插入片断, 以 T4 连接酶进行连接反应。连接产物经乙醇沉淀, 去除溶液中离子。然后电穿孔, 转化大肠杆菌 BL21(DE3)。转化菌株接种于氨苄青霉素抗性的培养板, 次日挑取克隆, 混悬于 10 μL 双蒸水中, 取 1 μL 菌液, 以其煮沸裂解后产生的质粒 DNA 为模板, 掺入引物 1 和引物 2 进行 PCR 反应, 筛选重组子转化克隆。扩增、提取阳性克隆的质粒 DNA, 进行 EcoR I、BamH I 的酶切鉴定, 并进行插入片段的测序。

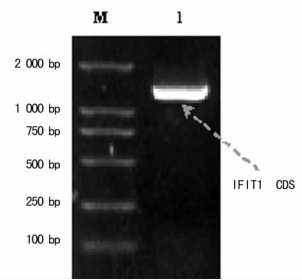
1.5 阳性克隆的诱导表达 配制氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基, 并加入葡萄糖至终浓度 0.2%, 抑制背景表达。挑取 pMAL-C2X-IFIT1 转化的 BL21(DE3) 单菌落, 37 °C 250 r/min 振荡培养过夜。取 1 mL 培养物, 接种于 50 mL 培养基中, 37 °C 250 r/min 振荡培养 8 h, 至 OD₆₀₀ 0.4 时, 向培养物中加入 IPTG 至终浓度 0.3 mM, 30 °C 250 r/min 继续振荡培养 6 h, 诱导融合蛋白的表达。随即 4 °C 5 000 g 离心 10 min 收集菌体, PBS 洗涤, 超声破碎, 进行 SDS-PAGE 分析。

2 结 果

2.1 IFIT1 的扩增、载体构建及阳性克隆的鉴定 小鼠 IFIT1 全长编码序列自起始密码子 ATG 至终止密码子 UGA, 共 1 392 bp。提取经 LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞株 RAW264.7 的总 RNA, 采用具有 3'→5' 外切酶活性的耐热 DNA 聚合酶, 进行高保真的 RT-PCR 反应, 得到了全长编码序列产物 (图 1)。通过限制性酶切→连接反应, IFIT1 CDS 定向克隆于原核融合表达质粒 pMAL-C2X 中, 形成原核融合表达载体 pMAL-C2X-IFIT1 (图 2), 其中担体——麦芽糖结合蛋白 (maltose binding protein, MBP) 融合于 IFIT1 分子的 N 端。连接产物直接转化至 E. coli BL21(DE3), 挑取 7 个单菌落, 以引物 1、引物 2 进行 PCR 反应, 筛选出 2 个重组质粒转化阳性克隆 (图 3)。将其扩增, 抽提质粒, 进一步以限制性酶切反应鉴定 (图 4), 单酶切反应产物较 pMAL-C2X 空载体 (6.64 kb) 增加了约 1 kb, 双酶切反应产物出现 2 个条带, 分别对应线性化 pMAL-C2X 空载体及插入片段 IFIT1 CDS, 初步证实成功构建了 IFIT1 融合表达质粒 pMAL-C2X-IFIT1。进一步对重组质粒进行碱基测序, 结果与 Genbank 数据库中小鼠 IFIT1 cDNA 的序列信息 100% 吻合。

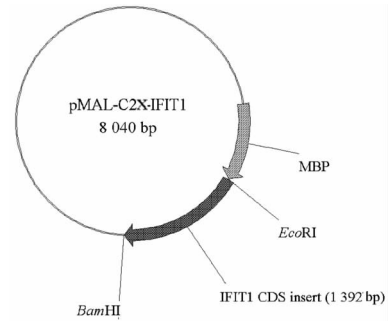
2.2 重组蛋白的原核可溶性表达 通过观察诱导时间 (2~6 h), 诱导温度 (25 °C~37 °C), IPTG 浓度 (0.05~1 mM); 等不同的诱导条件下融合蛋白 MBP-IFIT1 的表达情况, 发现 0.3 mM 的 IPTG, 30 °C 诱导 6 h 可获得较好的可溶性表达 (图 5), 此时可溶性表达与细菌包涵体内折叠蛋白 (图 5) 比例接近 1:1。继续降低温度及 IPTG 浓度并不增加可溶性蛋白的比例, 反而降低目的蛋白 MBP-IFIT1 总的表达量, 进而降低可溶性

蛋白的产量。



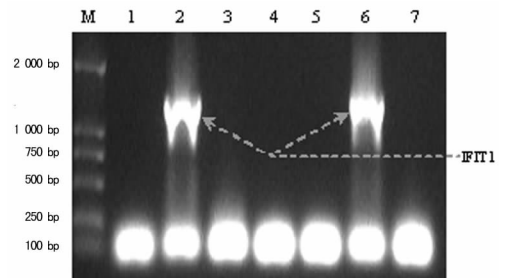
箭头示 PCR 产物, 大小约 1 400 bp。M: DNA 分子量标记, 1: RT-PCR 产物。

图 1 小鼠腹腔巨噬细胞 RT-PCR 的琼脂糖凝胶电泳结果



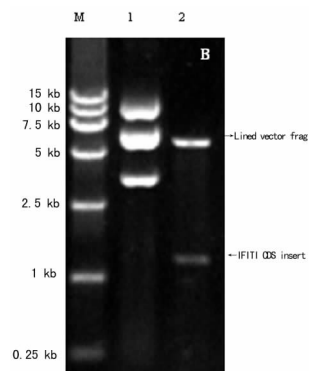
担体——麦芽糖结合蛋白 (MBP) 融合于插入子 IFIT1 的 N 末端。

图 2 原核表达载体 pMAL-C2X-IFIT1 的质粒结构图



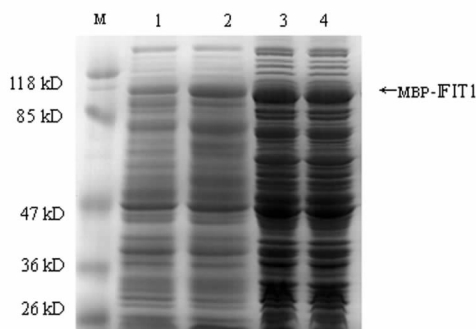
箭头显示 PCR 产物为 IFIT1 CDS 序列。M: DNA 分子量标记 DL2 000 (2 kb, 1 kb, 0.75 kb, 0.5 kb, 0.25 kb, 0.1 kb)。1~7 泳道: 筛选克隆的 PCR 产物, 其中 2nd 与 6th 泳道对应的菌落为阳性转化克隆。

图 3 琼脂糖凝胶电泳显示菌落 PCR 方法筛选阳性转化克隆的结果



显示转化阳性克隆携带重组质粒中含有 IFIT1 CDS。M: DNA 分子量标记 DL15 000 (15 kb, 10 kb, 7.5 kb, 5 kb, 2.5 kb, 1 kb, 0.25 kb)。1 泳道: 提取的质粒 DNA; 2 泳道: 限制性内切酶 EcoR I 及 BamH I 共酶切质粒 DNA 的产物。

图 4 转化阳性克隆的限制性酶切产物的琼脂糖凝胶电泳结果



箭头指示为重组蛋白分子 MBP-IFIT1 所对应的条带。M: 蛋白分子量标记物; 1: 未经 IPTG 诱导的转化菌总蛋白的电泳条带; 2: 诱导的转化菌总蛋白的电泳条带(有明显的目标蛋白条带); 3: 诱导转化菌的可溶性蛋白的电泳条带; 4: 诱导的转化菌的非可溶性蛋白的电泳条带。

图 5 蛋白凝胶电泳分析转化大肠杆菌中 MBP-IFIT1 的表达情况

3 讨论

相关的研究报道 IFIT1 因病毒感染及旁分泌的干扰素的诱导而表达, 进而结合并干扰了真核细胞翻译起始因子的活性, 因而抑制病毒颗粒的组装, 是真核细胞一种内在的抵御病毒感染的途径^[3-4]。但 IFIT1 并非只因病毒而激活, Wathélet 等^[5]以细菌 LPS 刺激 3T3 细胞, 也获得了 IFIT1 的迅速高表达。白细胞介素-1、视黄酸同样可诱导细胞高表达 IFIT1^[6]。而本文观察到实验性严重创伤早期 IFIT1 的表达也迅速升高^[8]。在烧伤早期小鼠中, IFIT1 在肝、脾、肺脏等的转录迅速激活, mRNA 及蛋白分子水平在正常对照小鼠很低或不能检出, 伤后则明显提高, 并持续数天至 1 周; 颅脑冲击伤小鼠伤后早期的多脏器观察中, 也发现 IFIT1 mRNA 水平的类似变化。严重创伤继发炎症反应, 细胞暴露于高炎性介质刺激下, IFIT1 此时的迅速表达, 表明高炎性介质应激, 也可诱导 IFIT1 表达^[9-14]。预示 IFIT1 不仅是病毒感染应激分子; 除抵御病毒感染机制外, 该分子可能具有其他的功能。

为进行 IFIT1 的功能研究, 作者首先希望得到 IFIT1 的可溶性分子, 籍此进行亲和分子的筛选, 借 IFIT1 结合靶蛋白功能的指向, 寻找进一步功能研究的线索。对于细菌而言, 重组质粒编码蛋白为外源性蛋白, 虽然在细菌内能正确编码, 但能否正确折叠而形成可溶性功能蛋白, 常不能事先预料, 一旦不能正确形成二、三级结构, 疏水基团外露即会凝聚沉淀, 而形成细菌包涵体。作者前期构建了以 GST 作为担体的原核融合表达质粒 pGEX-4T-IFIT1, 尽管实现了重组融合蛋白 GST-IFIT1 的原核表达, 但几乎均为包涵体蛋白(结果未列出), 没有可溶性蛋白出现, 无法进行后续实验的研究。随后改用 MBP 作为担体, 构建原核融合表达质粒 pMAL-C2X-IFIT1, 结果表明原核表达的重组蛋白 MBP-IFIT1, 不仅有可溶性表达, 而且表达量丰富, 接近总量的 50%, 因此, 利于亲和纯化, 用作抗原, 制备针对天然蛋白的高特异性抗体^[15], 进行 IFIT1 的免疫分析等。进一步以其为诱饵, 体外筛选结合靶分子, 根据结合靶分子探明 IFIT1 的功能。

重组分子——麦芽糖结合蛋白融合 IFIT1 (MBP-IFIT1) 在适当诱导条件下可实现较丰富的原核可溶性表达, 为进一步的蛋白结合分析及免疫分析提供了材料及方法学基础。

参考文献:

[1] Wathélet M, Moutschen S, Defilippi P, et al. Molecular

cloning, full-length sequence and preliminary characterization of a 56-kDa protein induced by human interferons [J]. *Eur J Biochem*, 1986, 155(1): 11-17.

- [2] Sikorski RS, Boguski MS, Goebel M, et al. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis [J]. *Cell*, 1990, 60: 307-317.
- [3] Sen GC. Novel functions of interferon-induced proteins [J]. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10(2): 93-101.
- [4] Smith JB, Herschman HR. The glucocorticoid attenuated response genes GARG-16, GARG-39, and GARG-49/IRG2 encode inducible proteins containing multiple tetratricopeptide repeat domains [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 330(2): 290-300.
- [5] Wathélet MG, Clauss IM, Nols CB, et al. New inducers revealed by the promoter sequence analysis of two interferon-activated human genes [J]. *Eur J Biochem*, 1987, 169(2): 313-321.
- [6] Ye S, Pang H, Gu YY, et al. Protein interaction for an interferon-inducible systemic lupus associated gene, IFIT1 [J]. *Rheumatology*, 2003, 42(10): 1155-1163.
- [7] Li SR, Su YP, Liu XH, et al. The interferon induced protein P56 interact with glucocorticoid receptor and regulate GR transcriptional activity [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2004, 31(9): 791-795.
- [8] 李洪涛, 栗永萍, 徐建明, 等. 烧伤小鼠 IFIT1 表达的初步观察 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(22): 2250-2252.
- [9] 李淑蓉, 栗永萍, 邓正阳, 等. 烧伤小鼠早期 P56 与 IFN mRNA 表达变化及麻醉或 KPVP 对其表达的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2008, 30(5): 367-369.
- [10] 邓正阳, 李淑蓉, 王蒙, 等. 人 P56 蛋白及其各种缺失突变体酵母表达质粒的构建及鉴定 [J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(7): 561-564.
- [11] 任澍, 栗永萍, 李洪涛, 等. JAB1 表达下调对 LPS 诱导炎症因子 TNF- α 和 IL-26 的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(16): 1552-1554.
- [12] 陆建华, 陶军, 叶建宁, 等. 颈交感神经阻滞对放烧复合伤小鼠 HPA 轴的调节及相关机制研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28(21): 2111-2113.
- [13] 王明海, 栗永萍, 程天民, 等. 糖皮质激素受体基因 RNA 干扰的生物学效应研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26(20): 1795-1798.
- [14] Li HT, Su YP, Cheng TM, et al. The interaction between interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats-1 and eukaryotic elongation factor-1A [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 337: 101-110.
- [15] 郭晓妹, 李洪涛, 方海立, 等. 小鼠 IFIT1 多克隆抗体的制备 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(15): 1462-1464.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-03-15)