

CPP32 cDNA 的克隆及其表达和活性检测*

陈亚兵 俞春东 郭本昌 丁梅 郭淑贞 曾定 温龙平

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 厦门 361005)

摘要 CPP32 在细胞编程死亡调控中起重要的作用. 利用 CPP32 专一性引物, 用 RT-PCR 方法从人鼻咽癌 CNE 细胞中扩增出约 830 bp 的片段, 经序列分析证明与已发表的 CPP32 序列完全一致. 将扩增出的编码人全长 CPP32 的 cDNA 片段克隆入 pGEX-2T 中, 转化大肠杆菌 DH5 α . 转化菌经诱导表达出较高含量的 GST-CPP32 融合蛋白. 进一步研究显示, 细菌中表达的 CPP32 蛋白能自我切割, 而且能裂解体外翻译的 PARP, 从而证明其具有生物活性.

关键词 CPP32, 表达, 蛋白裂解活性

学科分类号 Q78

CPP32 是从人的 Jurkat T 淋巴细胞中分离得到的半胱氨酸蛋白酶, 它在免疫系统细胞凋亡的调节中起重要作用^[1]. CPP32 的天然底物有: 多聚二磷酸腺嘌呤核糖聚合酶 (简称 PARP)、U1 小核糖体 (70 ku) 的蛋白及甾醇调节元件结合蛋白 (SREBPs)^[2~6]. 后者与死亡的关系尚不清楚, 但 PARP 及 U1 蛋白的裂解是细胞死亡的标志; 而 PARP 缺失的小鼠能正常发育, 表明 CPP32 有其他死亡相关底物^[7].

多项研究表明 CPP32 半胱氨酸蛋白酶, 在各种因素诱导的编程性细胞死亡中均起重要作用, 因此我们构建了放线菌素 D 诱导的 CNE 细胞死亡模式, 并通过检测不同程度的死亡细胞裂解液中 CPP32 活性, 确定了在这些过程中 CPP32 蛋白酶的活化情况 (待发表). 为了进一步了解 CPP32 及其在细胞凋亡中的作用, 我们用 RT-PCR 法, 从 CNE 细胞中克隆出编码人全长 CPP32 蛋白的 cDNA, 使之在大肠杆菌中以 GST 融合蛋白的形式高效表达, 并对其裂解体外翻译的 CPP32 及 PARP 的生物学活性进行了分析. 这些研究为进一步了解 CPP32 蛋白在细胞凋亡过程中的作用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞株: 测序载体 pCR II 购自美国 Invitrogen 公司, 表达载体 pGEX-2T 购自 Pharmacia 公司; 人鼻咽癌 CNE 细胞购自中国科学院上海细胞研究所.

1.1.2 引物合成: cpr 32、PARP 专一性引物由美国 Cybersyn 公司合成.

1.1.3 抗体: 抗 CPP32 N 端功能区专一性抗体由美国 Michigan 大学 Vishva Dixit 博士惠赠.

1.1.4 化学试剂及酶类: PCR Kits 为美国 Amersham 公司产品. 反转录系统、体外翻译系统、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司, 其他药品及试剂为中国华美公司产品或国产 AR 级试剂.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人鼻咽癌 CNE 细胞采用 RMP1640 培养基, 加 10% 小牛血清于 37℃ 培养.

1.2.2 反转录: 用酸性异硫氰酸胍法提取人鼻咽癌 CNE 细胞的总 RNA, 并由 Promega 公司的反转录系统, 将它们反转录成 cDNA 作为

* 国家自然科学基金资助项目 (39670159).

收稿日期: 1997-03-03, 修回日期: 1997-06-01

模板, 进行 PCR 反应。

1.2.3 PCR 法扩增 DNA 及其产物鉴定: PCR 反应条件: 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共进行 35 个循环。PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4 基因操作技术和方法: 质粒 DNA 提取纯化及从琼脂糖凝胶中分离 DNA 片段, 分别采用厦门 P&N 生物技术公司生产的“质粒 DNA 快速分离纯化试剂盒”及“DNA 片段快速回收试剂盒”, 酶切、电泳、连接、转化等常规分子生物学操作按文献 [8] 的方法进行。

1.2.5 核苷酸序列测定: 采用 Sanger 末端终止法, 在 ABI 373A DNA 测序仪上进行。

1.2.6 蛋白质的诱导表达: 工程菌在含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养基中, 37℃ 振荡培养过夜, 按 10% 接种扩大培养, 37℃ 培养至 A_{600} 为 1.2, 加入 IPTG 至终浓度 1 mol/L, 继续培养 2 h。

1.2.7 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 4℃ 离心收集菌体, 用上样缓冲液处理, 100℃ 煮沸 5 min。12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 考马斯亮蓝 G-250 染色。

1.2.8 PARP 的体外翻译及裂解: 采用 Promega 公司生产的 T7 polymerase 启动的体外翻译试剂盒 (*in vitro* transcription-translation kit), 在 ^{35}S -甲硫氨酸存在下进行体外翻译。体外翻译的 ^{35}S -甲硫氨酸标记的人 PARP (N 端 310 个氨基酸的片段) 与表达 CPP32 的大肠杆菌的裂解液, 于 37℃ 共培育 2 h, 进行 20% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 然后进行放射自显影。

1.2.9 蛋白质印迹: 未标记的体外翻译的 CPP32 与表达 CPP32 的大肠杆菌的裂解液于 37℃ 共培育 2 h, 进行 20% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 然后用抗 CPP32 N 端功能区专一性抗体进行蛋白质印迹检测。

2 结 果

2.1 PCR 扩增

利用 CPP32 专一性引物, 在人的鼻咽癌

CNE 细胞中, 扩增出一条与预期相符的 0.8 kb 的片段; PARP 专一性引物, 则在人的鼻咽癌 CNE 细胞中, 扩增出一条与预期相符的 0.95 kb 的片段, 编码 PARP N 端 34 ku 肽段 (图 1)。

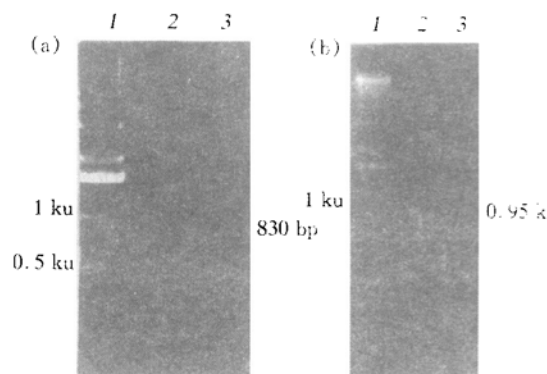


图 1 PCR 产物的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图谱
(a) cyp32; (b) PARP. 1: 1 kb DNA 分子质量标记; 2: 无模板对照; 3: CNE 细胞扩增产物。

2.2 PCR 产物的克隆及序列分析

从琼脂糖凝胶上将约 0.8 kb 的 CPP32 cDNA 片段及 0.95 kb 的 PARP cDNA 片段回收, 与 pCR II 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 通过蓝/白筛选及酶切鉴定, 获得含插入片段的质粒, 进行序列分析。结果表明插入片段序列与文献报道的 CPP32 cDNA 及 PARP cDNA 序列相同。

2.3 表达质粒的构建及转化大肠杆菌 DH5 α

用 *EcoR* I / *Bam* H I 将 CPP32 cDNA 从 pCR-CPP32 质粒上切下, 克隆入表达载体 pGEX-2T, 转化大肠杆菌 DH5 α , 通过酶切分析 (图 2), 获得转化重组质粒的菌株。

2.4 CPP-32 cDNA 在大肠杆菌 DH5 α 的表达

含有 pGEX-CPP32 的大肠杆菌 DH5 α 菌株经 IPTG 诱导表达后, 用 1× SDS 上样缓冲液煮沸裂解菌体细胞, 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 结果如图 3a 所示。可见 58 ku 处有一条高表达的蛋白带, 为 GST-CPP32; 而在约 40 ku 处亦有一条较亮的带, 推测为 GST-CPP32 自我裂解后剩余体与 GST 的连接

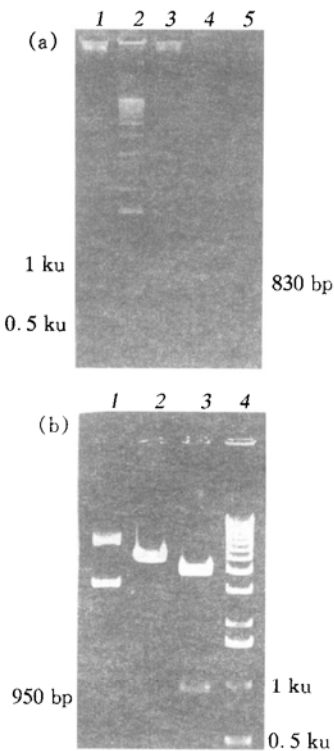


图 2 重组质粒的酶切分析

(a) pGEX-CPP32. 1: pGEX-CPP32; 2: 1 kb DNA 分子质量标记; 3: pGEX-CPP32+ *EcoR* I + *Bam* H I; 4: pGEX-2T+ *EcoR* I; 5: pGEX-2T. (b) pCRII-PARP. 1: pCRII-PARP; 2: pCRII-PARP + *Bam* H I; 3: pCRII-PARP + *EcoR* I; 4: 1 kb DNA 分子质量标准.

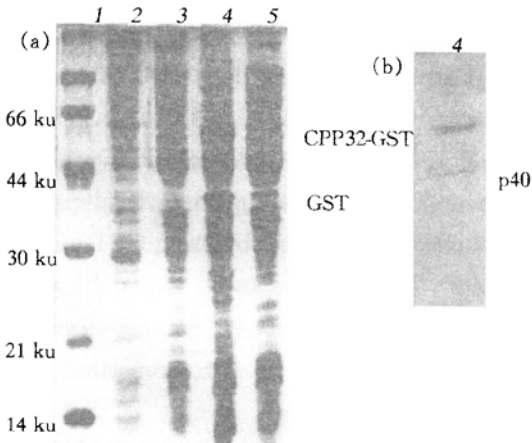


图 3 GST-CPP32 的 12% SDS-PAGE (a) 及蛋白质印迹 (b) 图谱

1: 蛋白质分子质量标记; 2, 3: pGEX-2T; 4, 5: pGEX-CPP32; 3, 5: 未诱导; 2, 4: IPTG 诱导.

物. 随后我们用蛋白质印迹分析进行检测, 发现 GST 抗体可检测到 58 ku 及 40 ku 两条带, 与我们的推测相符. 图 3b 示菌体裂解液的蛋白质印迹分析.

2.5 CPP32 的蛋白裂解活性检测

2.5.1 5 μ l 体外翻译的 PARP 与 5 μ g 大肠杆菌裂解液于 37 $^{\circ}$ C 共培育 2 h, 进行 20% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 然后进行放射自显影, 结果如图 4 所示, 表明在大肠杆菌中表达的 cpp32 蛋白, 对体外翻译的 PARP 有裂解活性.

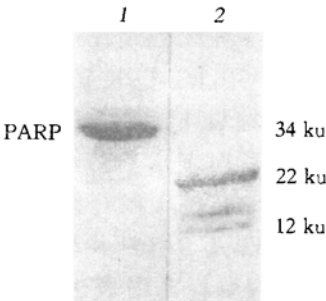


图 4 CPP32 裂解体外翻译的 PARP 的放射自显影图谱

1: 体外翻译的 PARP 与 pGEX-2T 转化的大肠杆菌裂解液共培育; 2: 体外翻译的 PARP 与表达 CPP32 蛋白的大肠杆菌裂解液共培育.

2.5.2 5 μ l 体外翻译的 CPP32 与 5 μ g 大肠杆菌

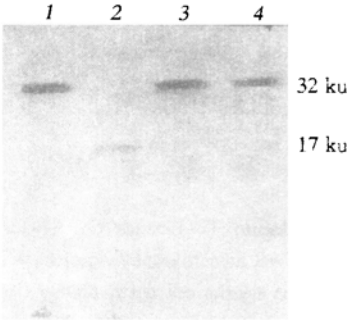


图 5 菌体中表达的 CPP32 裂解体外翻译的 CPP32

1: 体外翻译的 CPP32; 2: CPP32 + pGEX-CPP32 转化的大肠杆菌; 3: CPP32+ pGEX-2T 转化的大肠杆菌; 4: CPP32+ pGEX-CPP32 转化的大肠杆菌加 2 mmol/L N-ethylmaleimide.

菌裂解液于 37 ℃ 共培育 2 h, 进行 20% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 然后用抗 CPP32 N 端功能区专一性抗体进行蛋白质印迹检测, 结果如图 5 所示, 可见大肠杆菌裂解液中的 CPP32 能裂解体外翻译的 CPP32.

3 讨 论

CPP32 是 ICE/CED-3 半胱氨酸蛋白酶家族成员, 自 1994 年 Fernandes-Alnemri^[1] 首次报道 CPP32 的发现以来, 已有大量的研究证明了其在细胞死亡途径中的关键性作用^[2~6]. 为了研究 CPP32 在死亡途径中的作用, 我们从 CNE 细胞中用 RT-PCR 法克隆出 CPP32 cDNA, 并使之在 pGEX 系统中功能性的表达. 经过筛选获得了高表达 GST-CPP32 的菌株; 而且, 表达 CPP32 的大肠杆菌裂解液, 与体外翻译的 CPP32 及 PARP 共培育, 能使它们裂解. 说明了大肠杆菌中表达的 CPP32 具有生物活性. 有趣的是, 我们发现体外翻译的 CPP32 不能自我裂解, 而大肠杆菌中表达的 CPP32 能自我裂解. 据日本大阪大学医学部 Nagata 博士的解释是: 存在两种不同的 CPP32, 其中一种是能自我裂解的; 可能是体外翻译的量太少, 无法自我裂解 (个人通信). 已知 ICE 及 GrB 能裂解 CPP32 使之成为活性形式, 是否大肠杆菌中存在有某些蛋白酶可裂解 CPP32 尚有待探讨. 对 CPP32 激活剂及其作用底物的进一步了解, 将有助于认识 CPP32 在死亡机制中的作用.

参 考 文 献

- 1 Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri E S *et al.* CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian ICE. *J Biol Chem*, 1994, **269** (49): 30761~30764
- 2 Nicholson D W, Ali A, Thornberry N A *et al.* Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 1995, **376** (6535): 37~43
- 3 Lazebnik Y A, Kaufmann S H, Desnoyers S *et al.* Cleavage of poly (ACP-ribose) polymerase by a protease with properties like ICE. *Nature*, 1994, **371** (6495): 346~347
- 4 Wang X D, Pai J, Wiedenfeld E A *et al.* Purification of an interleukin 1 β converting enzyme related cysteine protease that cleaves sterol regulatory element binding proteins between the leucine zipper and transmembrane domains. *J Biol Chem*, 1995, **270** (30): 18044~18050
- 5 Casciola-Rosen L A, Miller D K, Anhalt G T *et al.* Specific cleavage of the 70 kd protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death. *J Biol Chem*, 1994, **269** (49): 30757~30760
- 6 Tewari M, Dixit V M *et al.* Fas and TNF-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J Biol Chem*, 1995, **270** (7): 3255~3260
- 7 Wang Z Q, Auer B, Stingl L *et al.* Mice lacking ADPRT and (ADP-ribosyl) action develop normally but are susceptible to skin disease. *Genes Dev*, 1995, **9** (5): 509~520
- 8 Martin S J, Green D R, Cotter T G. Dicing with death: dissecting the components of the apoptosis machinery. *Trans in Biochem Sci*, 1994, **19** (1): 26~30

Cloning and Functional Expression of CPP32 cDNA in *E. coli*. CHEN Ya-bing, YU Chundong, GUO Ben-chang, DING Mei, GUO Shuzhen, Zeng Ding, WEN Long-ping (*State Laboratory for Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China*).

Abstract CPP32 has been recently reported to be involved in the early process of programmed cell death. To further study CPP32 and its regulation in the cell, a 830 bp cDNA was cloned by RT-PCR from CNE cells encoding the full length human CPP32 protein and high level expression was achieved in *E. coli* by using GST expression system. The results showed that the bacterially expressed CPP32 protein is auto-cleaved and capable of cleaving *in vitro*-translated PARP, thus is fully functional.

Key words CPP32, expression, proteolytically active