

Tn 细胞凋亡抑制蛋白 (TnIAP) 在粉纹夜蛾细胞中的表达和活性研究

廖文韬 杨 扬 吴祥甫*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 在粉纹夜蛾 (*Trichoplusia ni*) 细胞 Tn-5B1-4 中, 高效表达了来自粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 能够抑制细胞凋亡的 TnIAP 蛋白。聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫印迹分析表明, 表达的重组 TnIAP 只有少部分是可溶性蛋白, 大部分以不溶的形式存在。这一结果与以往在昆虫细胞中往往表达出可溶性蛋白不同。活性实验表明, 可溶的重组 TnIAP 能够直接抑制 caspase-9 酶解 Ac-LEHD-AFC 的活性, 也能抑制 caspase-9 激活 HEK293 细胞抽提物酶解 Ac-DEVD-AFC 的活性。结果进一步证明, 昆虫和哺乳动物的细胞凋亡分子机制在进化上是极为保守的。

关键词 TnIAP, 表达, 细胞凋亡

学科分类号 Q7

细胞凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis, IAP) 广泛存在于真核细胞中, 并在细胞凋亡过程中起至关重要的作用。对各个 IAP 基因作用机制和相关蛋白的研究是目前细胞凋亡研究的生长点之一。在哺乳动物细胞中, IAP 如 XIAP, cIAP-1, cIAP-2 等是各种 caspase (如 caspase-3, -7, -9) 的抑制蛋白, 在正常情况下 IAP 通过抑制各种 procaspase 的激活和活性来抑制细胞凋亡的发生。当细胞接受了细胞内和细胞外的细胞凋亡触发信号后, 与 IAP 作用的蛋白质如 Smac 就通过结合 IAP 而消除了 IAP 对 caspase 的抑制, 从而引发细胞凋亡的整个过程^[1, 2]。由于第一个 IAP 基因是从杆状病毒中克隆而来, 而且细胞凋亡机制在进化上具有保守性, 因此, 对杆状病毒宿主细胞如粉纹夜蛾细胞、秋粘虫细胞的内源 IAP 基因的功能研究受到人们的密切关注^[3]。

1999 年, 美国 Dixit 博士的实验室从粉纹夜蛾细胞 Tn-368 中克隆了 TnIAP 基因, 并在基因水平研究了 IAP 对昆虫细胞凋亡的抑制效应。TnIAP 基因的编码框有 1 140 个碱基对, 共编码 379 个氨基酸的蛋白质, N 端有两个杆状病毒 IAP 重复序列 (baculovirus IAP repeat, BIR) motif, C 端有一个 RING 指结构 (RING finger)^[4]。然而到目前为止, 对 TnIAP 在蛋白质水平的功能研究尚未见诸报道。这里, 我们对从粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 克隆出的 TnIAP 在粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 进行了表达研究, 这样重组蛋白可能更接近天然蛋白, 并对其直接抑制人的 caspase-9 的蛋白酶活性进行了

探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒: 大肠杆菌 TG1、DH10Bac、粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 和质粒 pSK-TnIAP, pFastBacHTb 为本实验室构建或保存。

1.1.2 试剂: 限制性内切酶、T4DNA 连接酶、5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷 (X-gal)、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG)、氮蓝四唑 (NBT) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸 (BCIP) 为 GibcoBRL 公司产品; His6 肽的小鼠单克隆抗体, Ni²⁺-IDA Sepharose 6B fast flow 为 Sigma 公司产品, 碱性磷酸酶偶联的羊抗小鼠 IgG 为 Promega 公司产品, 四肽荧光底物 Ac-DEVD-AFC 和 Ac-LEHD-AFC 为 Pharmingen 公司产品, 大肠杆菌中表达的 SfIAP 和 caspase-9 为本实验室纯化和保存, 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 重组 DNA 技术: 限制性酶切反应, DNA 的连接、转化。重组克隆的蓝白斑筛选。质粒的抽提等技术均按文献 [5] 略作修改进行。

1.2.2 PCR 检测: PCR 反应体系参照文献 [6] 进行。PCR 进行 40 个循环, 反应条件为 94℃变性 30 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 最后 72℃保温 10 min。引物 1 和 2 分别根据基因 5' 和 3' 末端

* 通讯联系人。

Tel: 021-64374430-5253, E-mail: xfwu@sunm.shnc.ac.cn

收稿日期: 2002-02-08, 接受日期: 2002-03-23

的相应序列设计. 引物 1: GTCATATGTGGT-CGTGTTTATTACC (T/A/G/C) TG, 引物 2: ATCTCGAGTCACGAGAAATATAACCGCAC (T/A/G/C) GC.

1.2.3 Tr-5B1-4 细胞培养技术: 细胞培养技术、重组病毒的获得、外源基因在 Tr-5B1-4 细胞中的表达按文献 [7] 进行, 共转染实验按 Lipofectin 产品说明书进行.

1.2.4 表达产物的分析和纯化: 表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 及蛋白质印迹分析按《分子克隆》实验手册略作修改进行. 收集重组病毒感染细胞, 用 PBS 洗涤 1~2 次后悬浮于裂解缓冲液 (220 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1% NP40, 200 mmol/L 蔗糖) 中, 超声波裂解细胞. 裂解后的表达蛋白液 15 000 r/min 离心 30 min, 取上清液和沉淀. 上清液直接用 Ni²⁺-IDA Sepharose 6B 亲和层析柱纯化后, 用截留 10 ku 分子的微量浓缩滤器 (Amicon 公司) 置换成缓冲液 A (220 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 200 mmol/L 蔗糖) 后待用. 方法按 pET 系统操作指南略加修改进行.

1.2.5 细胞抽提物制备: 细胞抽提物按文献 [2] 略加修改从人胚肾 293 细胞 (HEK293) 中提取. 用冰冷的 PBS 洗涤收获的 HEK293 细胞 2 次, 用缓冲液 A (20 mmol/L HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 200 mmol/L 蔗糖) 溶解细胞, 匀浆裂解细胞, 15 000 r/min 离心 30 min, 取上清.

1.2.6 caspase-9 酶活测定实验和 IAP 蛋白对 caspase-9 的抑制实验: caspase-9 酶活测定方法是用细胞抽提物 (10 g/L) 加入 0.5 μmol/L 纯化后的 caspase-9 在 37℃ 下保温 10 min 后, 酶解 50 μmol/L Ac-DEVD-AFC, 释放出 7-氨基-4-三氟甲基-香豆素 (AFC); 或者用 caspase-9 直接酶解 50 μmol/L Ac-LEHD-AFC 释放出 AFC, 然后用 Hitachi 分光荧光计测定激发波长为 400 nm, 发射波长为 505 nm 的荧光强度, 30 min 的时间曲线^[8, 9]. IAP 蛋白对 caspase-9 的抑制实验: 5 μmol/L IAP 蛋白和 0.5 μmol/L caspase-9 的混合液冰浴 30 min, 然后进行上述 caspase-9 酶活测定.

2 结果和讨论

2.1 重组病毒的获得

将 *TnIAP* 基因用 *EcoR* I 和 *Hind* III 从质粒 pSK-*TnIAP* 中切除后, 克隆至昆虫表达供体质粒 pFastBacHtb 的 *EcoR* I-*Hind* III 位点, 使基因置于在病毒多角体基因的启动子控制之下, 得到重组供体质粒 pFastBacHtb-*TnIAP*, 整个阅读框架完全正确. 重组供体质粒图谱见图 1. 然后, 我们将质粒 pFastBacHtb-*TnIAP* 转化到大肠杆菌 DH10αBac 中, 经过 2 轮蓝白斑筛选, 扩增出一个在 X-gal 和 IPTG 作用下仍然为白色的重组 DH10αBac 菌株. 从这个菌株中提取重组病毒 DNA 后, 将重组病毒 DNA 转染到 Tr-5B1-4 细胞, 3 d 后收集子代病毒粒子并扩增子代病毒一轮. 将收集的子代病毒提取 DNA, 用引物 1 和 2 进行 PCR 检测, 结果扩增出一条约 1.1 kb 的 DNA 片段, 证明在重组病毒基因组中的确整合了基因 *TnIAP* (图 2).

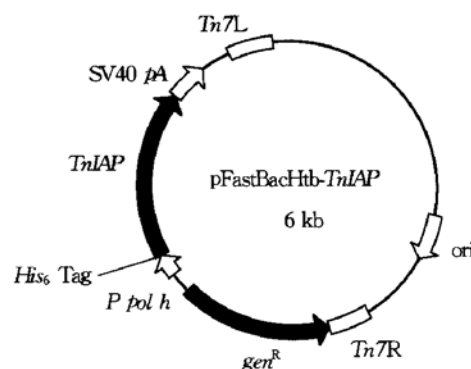


Fig. 1 Schematic representation of recombinant donor plasmid pFastBacHtb-*TnIAP*

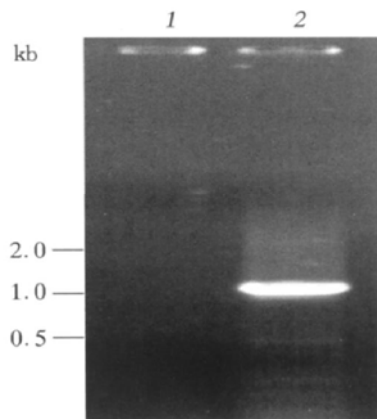


Fig. 2 PCR amplification of *TnIAP* gene from recombinant viral DNA

1: bacmid DNA; 2: recombinant viral DNA.

2.2 TnIAP 基因在 Tn 细胞中的表达分析和纯化

重组病毒感染 Tn-5B1-4 细胞 72 h 之后, 收集表达细胞进行 SDS-PAGE 分析 (图3). 结果表明, 在 45 ku 的相应位置有非常明显的表达条带. 然而令

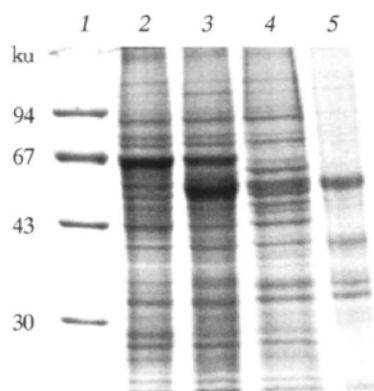


Fig. 3 Expression and solubility analysis of recombinant TnIAP

1: protein molecular mass marker; 2: Tn cells infected with wild type viruses; 3: Tn cells infected with recombinant viruses; 4: lysate supernatant of Tn cells infected with recombinant viruses; 5: lysate precipitate of Tn cells infected with recombinant viruses.

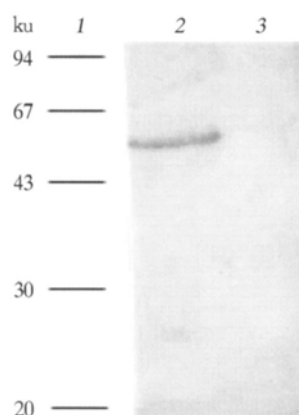


Fig. 4 Western blot analysis of recombinant TnIAP

1: protein molecular mass marker; 2: lysates supernatant of Tn cells infected with recombinant viruses; 3: lysates supernatant of Tn cells infected with wild type viruses.

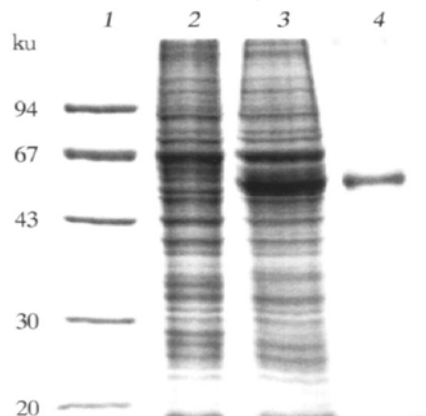


Fig. 5 Purification of recombinant TnIAP

1: protein molecular mass marker; 2: Tn cells infected with wild type viruses; 3: Tn cells infected with recombinant viruses; 4: purified TnIAP.

人惊讶的是, 表达产物有相当部分是不可溶的. 蛋白质印迹分析表明, 超声波裂解细胞后的上清液在相应位置显示出明显条带, 证明表达的正确性 (图4). 超声波裂解细胞后的上清液用 Ni^{2+} -IDA sepharose 6B 亲和层析柱纯化后, 得到纯度为 90% 以上的蛋白质 (图5).

2.3 TnIAP 对 caspase-9 的蛋白酶活性抑制

我们以大肠杆菌中表达的 SfIAP 重组蛋白为对照, 鉴定了 Tn-5B1-4 细胞中表达的 TnIAP 对 caspase-9 的抑制效应. 抑制实验表明, Tn-5B1-4 细胞中表达的 TnIAP 能直接抑制 caspase-9 酶解 Ac-LEHD-AFC, 也能抑制 caspase-9 激活 HEK293 细胞抽提物, 抑制效应与大肠杆菌中表达的 SfIAP 重组蛋白并无明显不同 (图6).

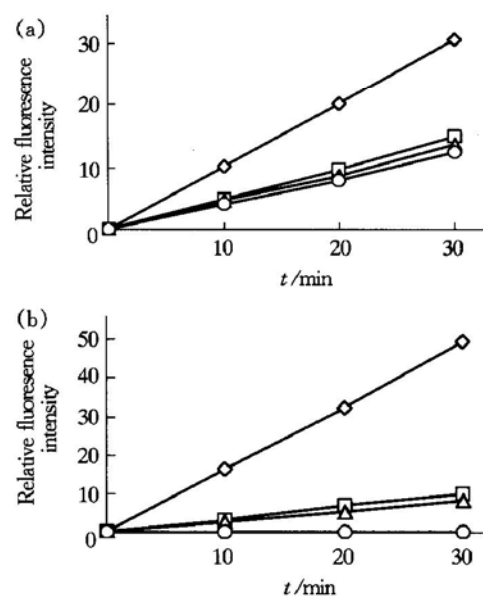


Fig. 6 Inhibition of caspases by TnIAP

◇—◇: caspase 9; □—□: caspase 9 + TnIAP; △—△: caspase 9 + SfIAP; ○—○: mock (without caspase 9 or IAP). (a) TnIAP can inhibit HEK293 cytosolic extracts from activation by caspase-9, measured by the hydrolysis of Ac-DEVD-AFC. (b) TnIAP can inhibit caspase-9 directly from the hydrolysis of Ac-LEHD-AFC.

3 讨 论

与其他系统相比, 昆虫杆状病毒表达系统是一种高效的真核表达系统, 其特点是表达量高、重组蛋白多为可溶性蛋白, 而且对表达出的外源蛋白能够进行正确的蛋白质翻译后加工和糖基化修饰因而常常具有活性^[7]. 我们在粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 中表达出的来自粉纹夜蛾细胞 Tn-5B1-4 能够抑制细胞凋亡的 TnIAP 蛋白, 其表达产物却只有小部

分是可溶性蛋白。以往在昆虫细胞中表达的重组蛋白大部分为可溶性的蛋白。而 TnIAP 在 Tn 细胞中表达出大部分为不溶性蛋白的结果与以往的记录不致, 此原因尚不清楚。

由于来自昆虫细胞的 TnIAP 和 SfIAP 在氨基酸序列上有 90% 的同源性^[9], 而 SfIAP 能够像人源的 IAP 一样直接抑制人源的 caspase-9, 因此, 我们也用 caspase-9 对重组 TnIAP 的活性作出探讨, 证明了对 caspase-9 的抑制效应。值得注意的是, caspase-9 正是目前揭示的哺乳动物细胞凋亡主要途径之一的启动因子。这一结果进一步表明, 昆虫细胞和哺乳动物细胞的细胞凋亡机制在进化上是极为保守的^[10]。

参 考 文 献

- 1 Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, *et al.* Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1999, **15**: 269~290
- 2 Du C Y, Fang M, Li Y, *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 2000, **102** (1): 33~42
- 3 Crook N E, Clem R J, Miller L K. An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, 1993, **67** (4): 2168~2174
- 4 Seshagiri S, Vucic D, Lee J. Baculovirus-based genetic screen for antiapoptotic genes identify a novel IAP. *J Biol Chem*, 1999, **274** (51): 36769~36773
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 880~898
- 6 Griffin H, Griffin A M. *PCR Technology Current Innovation*. Boca Raton: CRC Press, 1994. 5~12
- 7 Summers M D, Smith G E. *A Manual of Methods for Baculovirus Vector and Insect Cell Culture Procedures*, Texas: Texas Agricultural Experimental Station and Texas A&M University College Station, 1987. 1~56
- 8 Zhou Q, Snipas S, Orth K, *et al.* Target protease specificity of the viral serpin CrmA. *J Biol Chem*, 1997, **272** (2): 7797~7800
- 9 Huang Q H, Deveraux Q L, Maeda S, *et al.* Evolutionary conservation of apoptosis mechanisms: lepidopteran and baculoviral inhibitor of apoptosis proteins are inhibitors of mammalian caspase-9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (4): 1427~1432
- 10 Liao W T, Yang Y, Wu X F. Expression and functional analysis of an inhibitor of apoptosis protein from *Trichoplusia ni*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293** (2): 675~679

Expression of TnIAP in *Trichoplusia ni* Cells and Its Biological Activity

LIAO Wen-Tao, YANG Yang, WU Xiang-Fu*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract TnIAP, which can inhibit apoptosis and was cloned from Tr-5B1-4 cells, was highly expressed in Tr-5B1-4 cells. However, SDS-PAGE and Western blot analysis indicated that only small part of recombinant protein was soluble, which was different from the record that most recombinant protein expressed in insect cells were soluble. Activity assays demonstrated that recombinant soluble TnIAP could inhibit the cleavage of Ac-LEHD-AFC by caspase-9 and the activation of HEK293 cytosolic extracts by caspase-9 from cleaving Ac-DEVD-AFC. This result gave the further evidence that the molecular mechanism of apoptosis is evolutionarily conserved through insects to mammals.

Key words TnIAP, expression, apoptosis

* Corresponding author. Tel: 86-21-64374430-5253, E-mail: xfwu@sunm.shnc.ac.cn

Received: February 8, 2002 Accepted: March 23, 2002