

基因重组 $\text{TNF}\alpha$ 衍生物 TRSP10 的高效制备及其对 DU145 细胞抑制作用研究*

方世雄 马义** 沈淑桃 赵绍军 洪岸

(暨南大学细胞生物学系 暨南大学生物医药研究院 广东省生物工程药物重点实验室 基因工程药物国家工程研究中心 广州 510632)

摘要 利用基因工程技术表达能够促使肿瘤细胞 DU145 凋亡的肿瘤坏死因子 α ($\text{TNF}\alpha$) 的衍生物 TRSP10, 并在体外研究其对 DU145 细胞的抑制效应。以重叠延伸 PCR 方法合成 TRSP10 基因序列, 并插入高效表达的质粒载体 pKYB-MCS 的 *Nde* I 和 *Sap* I 酶切位点之间, 优化融合蛋白诱导表达的条件, 建立了从载体构建到重组菌表达、制备的工艺技术条件。MTT 法检测 TRSP10 对前列腺癌细胞 DU145 增殖的抑制作用。实验结果表明: 重组菌 ER2566 诱导表达可溶性融合蛋白的最佳条件是诱导剂 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L、诱导表达温度 37℃、诱导表达时间 8h。利用 IMPACT 系统及 HPLC 技术纯化制备 TRSP10, 得到产物纯度达到 96%, 质谱鉴定确定其分子质量为 3.59kDa, 与理论值相符; 体外细胞学研究结果表明, TRSP10 对前列腺癌细胞 DU145 有明显的抑制作用, 在 5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$ TRSP10 及 10 $\mu\text{mol/L}$ $\text{TNF}\alpha$ 阳性对照处理后 48h 抑制率分别达到 11.40%, 22.97%, 33.26%, 48.35% 及 42.50%。

关键词 基因工程 肿瘤坏死因子 α 衍生物 表达纯化 抑制增殖

中图分类号 Q789

$\text{TNF}\alpha$ 是一种具有多重功能的细胞因子^[1], 发展至今, 在促肿瘤细胞凋亡以及炎症的发生上有较多的研究。参考文献[2]报道: 1968 年, Granger 和 Williams 发现一种由 T 淋巴细胞分泌的可溶性的淋巴毒素。1975 年, Carswell 等^[3]在由内毒素产生的肿瘤的出血性坏死的研究过程中, 发现了存在某种物质的血清能导致肿瘤发生出血性坏死的现象, 并将这种物质命名为肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF), 由此拉开了对 TNF 研究的序幕。TNF 的概念于 1984 年被分离, 是 $\text{TNF}\alpha$ 和 $\text{TNF}\beta$ 两种细胞因子的统称, 分别由巨噬细胞

和 T 淋巴细胞分泌^[4]。

在 1985 至 1988 年间, 重组 $\text{TNF}\alpha$ 在肿瘤医学上有了广泛的研究, 不过因其毒副作用大, 在体内半衰期短, 癌症病人均表现出非常低的最大耐受剂量, 虽然在其后的研究中采用局部多次灌注的方法取得了一定的疗效^[5], 但仍然暴露出其毒副作用大^[6], 在体内半衰期短的缺陷。因此在 $\text{TNF}\alpha$ 抗肿瘤治疗的研究过程中, 降低或消除其毒副作用、延长其在体内的半衰期, 是解决问题的重点和难点。因此, 寻找新型高效、低毒的抗肿瘤药物一直是国内外医药研发的热点。抗肿瘤小分子多肽较之蛋白类大分子药物具有分子量小、低毒性、易被吸收等优点^[7], 且采用基因工程手段合成成本较低, 在生产应用上有得天独厚的优势。本研究立足于 $\text{TNF}\alpha$ 结构与功能, 查阅大量相关资料, 借助于生物信息学模拟, 设计得到 $\text{TNF}\alpha$ 的衍生多肽 TRSP10, 采用基因工程技术, 通过构建基因工程菌, 摸索表达纯化的条件, 高效稳定制备 TRSP10, 并重点研究了其在体外对前列腺癌细胞的生物学效应, 为后续机制的研究、药物的研发奠

收稿日期: 2015-01-04 修回日期: 2015-01-20

* 国家自然科学基金面上项目 (81373314)、广东省自然科学基金 (S2012010008756)、高等学校博士学科点专项科研基金项目 (20124401120012)、中央高校基本科研业务费专项资金 (21612408)、科技部科技型中小企业技术创新基金 (11C26214413218)、广东省高等学校科技创新项目 (2012KJCX0015)、广东省教育部产学研结合项目 (2010B090400544, 2013B090500105)、广州市科技计划项目 (2011J4300112) 资助项目

** 通讯作者, 电子信箱: tmayi@jnu.edu.cn

定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、载体、细胞与试剂

大肠杆菌 ER2566 为暨南大学生物医药研究院分子生物学实验室保存;质粒载体 pKYB-MCS 购自美国 New England Biolabs 公司;前列腺癌细胞 DU145、PCR purification Kit、Gel Extraction Kit 和 Plasmid Miniprep Kit 购自德国 Qiagen 公司;T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司;限制性核酸内切酶 *Nde*I 和 *Sap*I、Chitin-Beads 购自美国 New England Biolabs 公司;乙腈(HPLC 级)和甲酸购自美国 Tedia 公司;三氟乙酸(TFA) 购自美国 Merck 公司;MTT 粉末购自美国 SIGMA 公司;其他均为国产分析纯试剂。引物合成及 DNA 测序由华大基因有限公司完成。

1.2 仪器设备

高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技公司);核酸蛋白分析仪(日本日立公司);微量移液器(日本立洋公司);带 C18 反相柱的 HPLC 系统(美国 Agilent 公司);PCR 仪(美国 BIO-RED 公司)JN-MultiT2.0 温控超高压连续流细胞破碎仪(中国广州聚能生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒 pKYB-TRSP10 的构建与鉴定 选用大肠杆菌偏爱密码子分段设计引物,以重叠延伸 PCR 方法合成 TRSP10 基因序列,并插入高效表达的质粒载体 pKYB-MCS 的 *Nde*I 和 *Sap*I 酶切位点之间,从而构建出重组质粒 pKYB-TRSP10(图 1),通过 CaCl_2 法制备 ER2566 感受态细胞,将构建好的重组质粒转入大肠杆菌 ER2566,转化菌涂在含有 0.1% 的氨苄霉素的平板上,挑取单菌落培养 12 ~ 18h,进而抽提质粒,经双酶切鉴定(图 2),及 T7 启动子的通用引物加以测序验证(图 3)。

1.3.2 融合蛋白 TRSP10-intein-CBD 诱导表达鉴定及条件优化 构建成功的重组质粒 pKYB-TRSP10 转化大肠杆菌表达菌 ER2566,在含有 50mg/ml 氨苄霉素的 LB 培养基中,37℃,150r/min 摇菌培养至 OD_{600} 为 0.6 ~ 0.8,取 1 ml 作为阴性对照,向剩余培养液加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37℃ 180 r/min 诱导表达 6 h,10 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,用 PBS 洗涤一次,50 μ l 上样缓冲液重悬,取 10 μ l 进行 15% SDS-PAGE 电泳鉴定。在目的蛋白的诱导表达过程中,设置不同的诱导温度(12,17,22,27,32,37℃)、不同的诱导时间

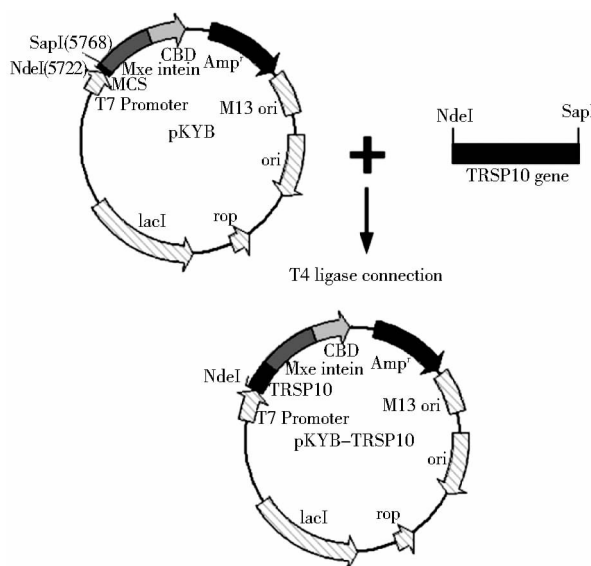


图 1 重组质粒载体 pKYB-TRSP10 的构建

Fig. 1 Construction of the recombinant plasmid pKYB-TRSP10

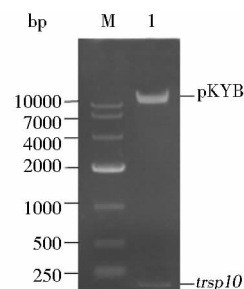


图 2 重组质粒 pKYB-trsp10 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by pKYB-trsp10 enzyme digestion

M: High molecular DNA marker; 1: Recombinant plasmid pKYB-trsp10 enzyme digestion

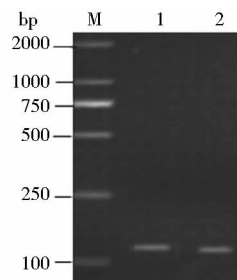


图 3 目的基因 TRSP10 的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of TRSP10 gene

M: Low molecular DNA marker; 1, 2: *trsp10* gene amplified by PCR

(2,4,6,8h) 和不同诱导剂 IPTG 浓度(0.2,0.4,0.6,0.8,1.0mmol/L),进行诱导表达,各取菌液 1L,7 000 r/min 离心 30min,用含有 20 mmol/L Tris-HCl,500 mmol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.1% Triton-X100 的缓冲液中溶解 JN-MultiT2.0 温控超高压连续流细胞破碎仪进行破碎,破碎产物 4℃,15 000 r/min 离心 30min,取上清进行 15% SDS-PAGE 电泳分析。

1.3.3 目的肽 TRSP10 的纯化、制备与鉴定 按优化的表达体系进行诱导表达,收集菌体,按 $m/V = 1/10$ 用 Buffer 1 进行溶解,用 JN-MultiT2.0 温控超高压连续流细胞破碎仪进行破碎,破碎产物 4℃,15 000r/min 离心 30min,取上清液过 Chitin-Beads 柱纯化,整个纯化过程在 4℃ 层析冷柜中进行。用含有 20mmol/L Tris-HCl,500mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,40mmol/L DTT 的切割缓冲液快速过柱,剩留适量的切割缓冲液与结合融合蛋白的 Chitin-Beads 4℃ 共孵育 24h,然后收集切割缓冲液,用截留相对分子质量 1 k 的透析袋纯水透析。利用 HPLC 制备的重组肽 TRSP10 并分析其纯度,分析及制备条件为:流动相 A(5% CNCH₃: 95% H₂O,0.1% TFA),流动相 B(100% CNCH₃,0.1% TFA),体积流量 1.5ml/min,20min 线性梯度洗脱,B 相至 65%,光吸收检测波长为 280nm。制备的 TRSP10 用电泳和 ESI-MASS 鉴定其分子质量,目的肽样品 -20℃ 保存备用。

1.3.4 MTT 法检测 TRSP10 对前列腺癌细胞 DU145 增殖的抑制作用 前列腺癌细胞 DU145 复苏后,于体积分数为 10% 胎牛血清的 TRSP10-1640 培养基中,放置于 37℃、饱和湿度及体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱中培养,每隔 2~3 天换液,待细胞长满后及时传代。实验过程中,取对数生长状态下的 DU145 细胞,在 96 孔细胞培养板上,以 100 μ l/孔的体积接种 5000~8000 个细胞,过夜放置于培养箱内培养,待其贴壁。在已摸清大致作用浓度的条件下,分别设空白对照组、5 μ mol/L、10 μ mol/L、20 μ mol/L、40 μ mol/L TRSP10 处理组,对照及每个处理均设 6 个复孔,放置于培养箱中继续培养 48h,处理时间结束后,吸去孔内的培养基,缓慢加入 40 μ l 已配置好的 1 \times MTT 溶液,于培养箱中孵育 4~6h 后吸去 MTT 溶液,加入 100 μ l DMSO,待其溶解,酶标仪测 OD 值(波长 570nm,参考波长 630nm),测得吸光度 A 值。

药物对细胞生长抑制率的计算公式:生长抑制率 $IR(\%) = [1 - (\text{实验组 A 值} - \text{空白组 A 值}) / (\text{对照组 A 值} - \text{空白组 A 值})] \times 100\%$ 。

2 结果

2.1 重组质粒 pKYB-TRSP10 的鉴定

将重组表达菌接种于 LB 培养基中,培养 3h,培养基明显变浑浊时,抽提质粒,双酶切鉴定(图 2),以 T7 启动子通用引物作为测序引物扩增目的基因(图 3),得到目的片段后由华大基因测序有限公司测序,得到序列结果后,经过 Blast 后,序列并无碱基错配,确定重组表达质粒 pKYB-TRSP10 构建成功。

2.2 融合蛋白 TRSP10-intein-CBD 诱导表达条件的优化

2.2.1 可溶性融合蛋白 IPTG 诱导表达浓度的确定 以 1.0mmol/L 为 IPTG 最高诱导表达浓度,0.2mmol/L 为间隔浓度,向下设置 6 个诱导浓度梯度,分别是 1.0,0.8,0.6,0.4,0.2,0mmol/L,诱导表达过夜,收集菌体破碎后 15 000r/min 离心取上清制得样品后经过 15% SDS-PAGE 分析,结果如图 4 所示,经 BandScan5.0 软件分析,在菌体质量相同的情况下,0.8mmol/L 的 IPTG 诱导菌体表达可溶性融合蛋白的量要明显高于其他各组的的结果,因此可以得出 0.8mmol/L 的 IPTG 为最佳的诱导剂浓度。

2.2.2 可溶性融合蛋白诱导表达温度的优化 以 37℃ 为最高表达温度,5℃ 为间隔温度,向下设置 6 个温度梯度,分别是 12℃、17℃、22℃、27℃、32℃、37℃,诱导表达过夜,收集菌体破碎后 15 000r/min 离心取上清制得样品后经过 15% SDS-PAGE 分析,结果如图 5 所示,经 BandScan5.0 软件分析,在菌体质量相同的情况下,37℃ 条件下诱导菌体表达可溶性融合蛋白的量要明显高于其他各组的的结果,因此可以得出 37℃ 为最佳的诱导温度。

2.2.3 可溶性融合蛋白诱导表达时间的优化 以 8h 为最长表达时间,2h 为间隔时间,向下设置 4 个温度梯度,分别是 2h、4h、6h、8h,收集菌体破碎后 15 000r/min 离心取上清制得样品后经过 15% SDS-PAGE 分析,结果如图 6 所示,经 BandScan5.0 软件分析,在菌体质量相同的情况下,8h 条件下诱导菌体表达可溶性融合蛋白的量要明显高于其他各组的的结果,因此可以得出 8h 为最佳的诱导温度。

从以上实验结果我们可以得出结论:可溶性融合蛋白 TRSP10-intein-CBD 最佳诱导表达条件为:诱导剂 IPTG 浓度为 0.8 mmol/L、诱导表达温度 37℃、诱导表达时间 8h。

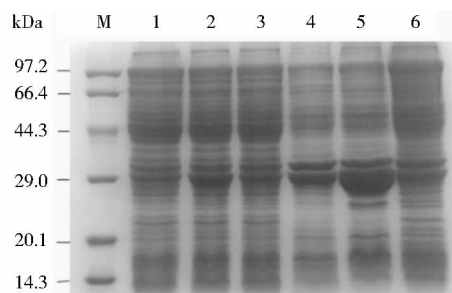


图4 IPTG 浓度对可溶性融合蛋白诱导表达的影响

Fig. 4 Impact of IPTG concentration on the dissoluble fusion protein expression

M: Protein marker; 1 ~ 6: The supernatant of transformed *E. coli* induced by IPTG with 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mmol/L IPTG

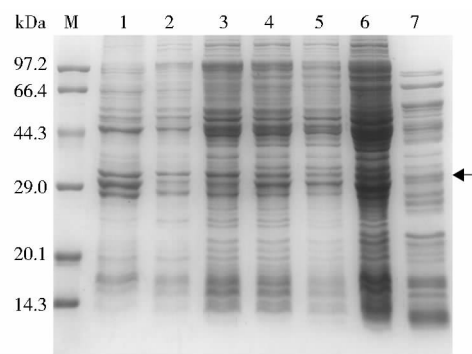


图5 温度对可溶性融合蛋白诱导表达的影响

Fig. 5 Impact of temperature on the dissoluble fusion protein expression

M: Protein marker; 1 ~ 6: The supernatant of *E. coli* induced by IPTG at 37, 32, 27, 22, 17, 12°C; 7: The supernatant of transformed *E. coli* without IPTG

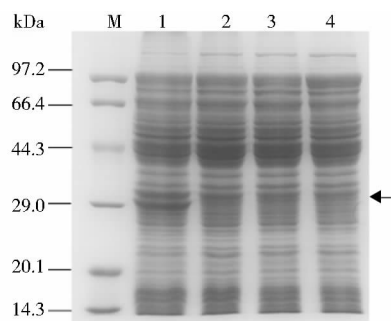


图6 时间对可溶性融合蛋白诱导表达的影响

Fig. 6 Impact of time on the dissoluble fusion protein expression

M: Protein marker; 1 ~ 4: The supernatant of transformed *E. coli* induced by IPTG for 8, 6, 4, 2 h

2.3 小分子目的多肽 TRSP10 的制备及鉴定

依据 IMPACT 纯化系统,收集可溶性融合蛋白,通过 DTT 诱导 intein,使其发生自剪切行为将目的多肽从亲和标签上洗脱出来。利用 HPLC 技术对目的多肽进行再纯化,接出相应的峰,冻干后纯度可高达 96%,经 15% SDS-PAGE 分析(图 7)和质谱鉴定(图 8),确定其相对分子质量为 3.59kDa,与理论值一致。

2.4 TRSP10 对前列腺癌细胞 DU145 的增殖抑制作用

通过 40μmol/L TRSP10 对 DU145 细胞做不同时间的处理,检测其细胞抑制率,其中各个时间点处理与阴性对照相比,其 *P* 值均小于 0.05,实验结果表明,于 48h 细胞抑制率最高(图 9)。接下来用 40μmol/L, 20μmol/L, 10μmol/L, 5μmol/L 的 4 个处理组及阴性,阳性两个对照组作用于 DU145 前列腺癌细胞 48h,其中阴性对照组为未加药组,阳性对照组为 10μmol/L TNFα。通过 MTT 法检测,在以上浓度处理下均对细胞有增殖抑制作用,且各个药物浓度处理与阴性对照处理相比,其 *P* 值均小于 0.05,差异显著,如表 1 所示,说明 TRSP10 对前列腺癌细胞 DU145 的增殖有一定的抑制作用。

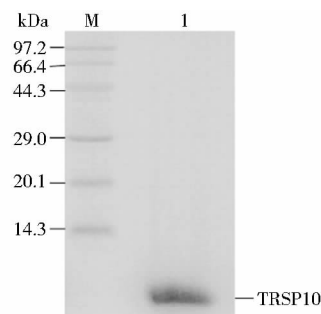


图7 重组多肽 TRSP10 的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 7 SDS-PAGE identification of recombinant peptide TRSP10

M: Protein marker; 1: TRSP10 Recombinant peptide after purification

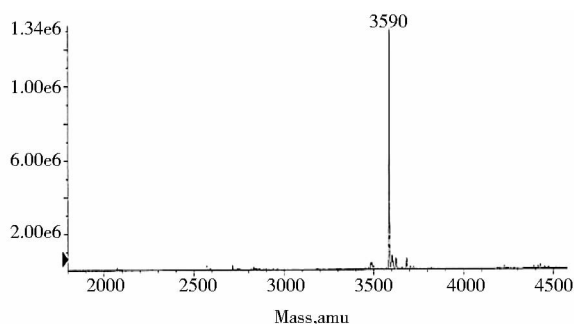


图8 重组多肽 TRSP10 的质谱鉴定

Fig. 8 MS identification of recombinant peptide TRSP10

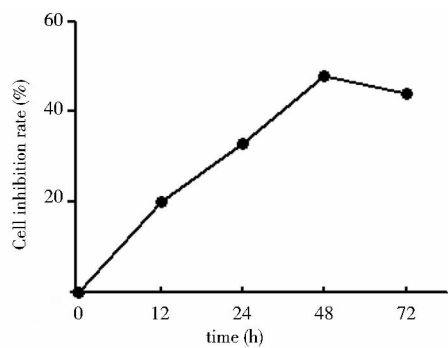


图9 40 μ mol/L TRSP10 处理 DU145 细胞不同时间的抑制率

Fig.9 Inhibition rate of DU145 cell treated with 40 μ mol/L TRSP10 in different time

表1 不同浓度 TRSP10 对前列腺癌细胞 DU145 的抑制作用

Table 1 The inhibitory effect on prostate cancer DU145 by different concentrations of TRSP10

浓度 (μ mol/L)	样品数	光吸收值	抑制率
阴性对照	6	0.777 \pm 0.020	0
5.0	6	0.652 \pm 0.021 *	11.40%
10.0	6	0.600 \pm 0.023 *	22.97%
20.0	6	0.509 \pm 0.016 *	33.26%
40.0	6	0.403 \pm 0.015 *	48.35%
TNF α	6	0.446 \pm 0.017 *	42.50%

* $P < 0.05$; TRSP10 处理组 vs 阴性对照组

3 讨论

TNF α 是一种被广泛研究的,能发生多种生物学效应的细胞因子^[8]。TNF α 可以引发炎症反应、免疫反应^[9]、肿瘤细胞凋亡等广泛的细胞反应,可以激活多条信号通路起始凋亡。TNF α 的受体包括有 TNFR1、TNFR2,TNF α 的功能主要由 TNFR1 介导^[10],虽然 TNFR2 与 TNF α 的亲合力高于 TNFR1 约 5 倍,但因为 TNFR2 主要在免疫细胞表达,且其不含有起始凋亡通路的死亡结构域^[11],其凋亡功能主要依赖于 TNFR1 起作用^[12],且有研究表明一些炎性疾病和癌症的发生与其表达量上调有关^[13]。在 TNFR1 上有 3 个功能域,通过与不同的蛋白相互作用,可以转换不同的细胞内信号,从而起始不同的信号通路^[14]。凋亡通路主要依赖于包括 TRADD、FADD、JNK、RIP、cPLA2、caspase 等凋亡相关的蛋白分子发挥作用^[15]。

综上所述,TNF α 可通过以上通路使肿瘤细胞发生凋亡,不过由于该细胞因子半衰期短,有较强的毒副作

用,有研究表明,在缺血性心脏病及外围血管病变等疾病的发病过程中,TNFR2 的表达量明显上调,而 TNFR1 的表达量没有变化^[16]。因此本研究就其半衰期短及毒副作用强的缺陷对其结构进行优化,并通过生物信息学加以验证,得到 TNF α 衍生物 TRSP10。TRSP10 是 TNF α 的一段衍生多肽,能与 TNFR1 结合,从而保证其能够起始由 TNFR1 介导的凋亡信号通路;和 TNFR2 的结合变弱,在一定程度上能够降低 TNF α 起始的 TNFR2 通路,从而降低其毒副作用。本研究采用基因工程手段发酵生产 TRSP10 重组多肽,通过构建 TRSP10-pKYB-ER2566 重组菌,经过长时间的实验,主要对可溶性融合蛋白 IPTG 诱导表达浓度、温度、时间等条件进行了摸索,建立一个能够高效稳定表达可溶性蛋白的较为理想的条件,即 37 $^{\circ}$ C,0.8 mmol/L IPTG 诱导表达 8 h,在后续的纯化过程中,通过对 IMPACT 系统条件的摸索,确定了 DTT 诱导蛋白内含肽自切割的条件,形成了一套从载体构建到重组菌表达纯化的工艺技术条件,通过重组表达保证了多肽的活性,而且能够有效地提高多肽制备的效率,更加节约了实验过程中的经济投入,为后续的实验研究奠定了坚实的基础。

本研究在体外主要对前列腺癌细胞 DU145 进行研究,通过重组表达纯化的多肽 TRSP10 作用培养的 DU145 细胞 48h,MTT 检测发现,重组多肽 TRSP10 对 DU145 细胞有明显的增殖抑制作用,这表明重组多肽 TRSP10 能够抑制 DU145 细胞的增殖。可通过后续的毒理实验及相关的动物实验,深入探究重组多肽 TRSP10 对 DU145 的抑制作用,使其成为治疗前列腺癌的小分子多肽类药物。

参考文献

[1] 李卫,刘佳,白家媛,等. α 肿瘤坏死因子的研究进展. 动物医学进展, 2010(12): 108-111.
Li W, Liu J, Bai J Y, et al. The research progress of tumor necrosis factor alpha. Animal Medical Progress, 2010(12):108-111.
[2] Idriss H T, Naismith J H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: Structure-function relationship (s). Microscopy Research and Technique, 2000,50(3):184-195.
[3] Carswell E A, Old L J, Kassel R L,et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1975,72(9): 3666-3670.
[4] Shalaby M R, Aggarwal B B,Rinderknecht E, et al. Activation of

- human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon-gamma and tumor necrosis factors. *Journal of Immunology*, 1985, 135(3): 2069-2073.
- [5] Lejeune F J, Ruegg C, Lienard D. Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Current Opinion in Immunology*, 1998, 10(5): 573-580.
- [6] Lienard D, Ewalenko P, Delmotte J J, et al. High-dose recombinant tumor necrosis factor alpha in combination with interferon gamma and melphalan in isolation perfusion of the limbs for melanoma and sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, 1992, 10(1): 52-60.
- [7] 张冉, 劳兴珍, 郑珩. 抗肿瘤小分子多肽的研究进展. 氨基酸和生物资源, 2012, 4: 42-46.
- Zhang R, Rao X Z, Zheng Y. The research progress of antitumor of small molecular peptides. *Aminoacids, and Biological Resources*, 2012, 4: 42-46.
- [8] 张钧. 肿瘤坏死因子参与心血管疾病的发生及在治疗中的潜在作用. 心血管病学进展, 2004, 1: 32-35.
- Zhang J. Tumor necrosis factor involved in the occurrence of cardiovascular disease and potential role in treatment. *Progress in Cardiovascular Epidemiology*, 2004, 1: 32-35.
- [9] Biton J, Boissier M C, Bessis N. TNFalpha: activator or inhibitor of regulatory T cells. *Joint Bone Spine*, 2012, 79(2): 119-23.
- [10] Chen G, Goeddel D V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science*, 2002, 296(5573): 1634-1635.
- [11] van Horssen R, Hagen T L M, Eggermont A M M. TNF-alpha in cancer treatment: Molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist*, 2006, 11(4): 397-408.
- [12] Gupta S. A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling. *Journal of Clinical Immunology*, 2002, 22(4): 185-194.
- [13] Carpentier I, Coornaert B, Beyaert R. Function and regulation of tumor necrosis factor receptor type 2. *Current Medicinal Chemistry*, 2004, 11(16): 2205-2212.
- [14] Ding W X, Yin X M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2004, 8(4): 445-454.
- [15] Sethu S, Melendez A J. New developments on the TNFalpha-mediated signalling pathways. *Biosci Rep*, 2011, 31(1): 63-76.
- [16] Benjafield A V, Wang X L, Morris B J. Tumor necrosis factor receptor 2 gene (TNFRSF1B) in genetic basis of coronary artery disease. *Journal of Molecular Medicine*, 2000, 79(2-3): 109-115.

Efficient Preparation of TNF α Derivatives TRSP10 and Preliminary Study of Its Inhibitory Effect on Prostate Cancer DU145 Cells

FANG Shi-xiong MA Yi SHEN Shu-tao ZHAO Shao-jun HONG An

(Department of Cell Biology of Jinan University, Institute of Biological Medicine of Jinan University, Guangdong Provincial Key

Laboratory of Bioengineering Medicine, National Engineering Research Center of Genetic Medicine, Guangzhou 510632, China)

Abstract It is intending to prepare tumor necrosis factor α (TNF α) derivative TRSP10 which can lead prostate cancer DU145 cells apoptosis by genetic engineering and to study the inhibitory effect on DU145 cells *in vitro*. *Trsp10* gene sequences were synthesized by overlap extension PCR and then inserted into the site between *SapI* and *NdeI* in the highly-efficient expression vector, pKYB-MCS and conduct the optimal conditions to induce the expression of the fusion protein and set up the technology from vector construction to the expression and purification of the recombinant bacteria. MTT detect the inhibit proliferation effect of the TRSP10 on prostate cancer DU145 cells. The results showed that the optimal expression condition was as follows: at 0.8 mmol/L IPTG, 37 °C and 8 hours. Purified by the IMPACT system and HPLC technology, the purity of the TRSP10 is 96%. The molecular mass is 3.59 kDa that is determined by the mass spectrometry, which is consistent with the theoretical data. *In vitro*, studies showed that, TRSP10 could significantly inhibit the proliferation of prostate cancer DU145 cells. The rates of inhibition among the concentrations of 5, 10, 20, 40 μ mol/L, are 11.40%, 22.97%, 33.26%, 48.35% respectively.

Key words Genetic engineering Tumor necrosis factor alpha derivative Expression and purification Inhibit proliferation