

# TRIM25 蛋白表达与纯化

洪凤琪 高紫艳 林羽\* 徐惠龙\* 许文 李华

福建中医药大学药学院 福建福州 350122

**【摘要】目的** TRIM25 蛋白在原核系统内进行表达, 筛选最佳的纯化条件, 并进行大量表达纯化。**方法** 利用大肠杆菌系统表达 TRIM25, 转化至 Rosetta-gami (DE3) pLysS、Rosetta-gami 2 (DE3) 和 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经 IPTG 诱导表达, 通过 GST 填料纯化和分子排阻层析技术进一步纯化蛋白。**结果** 将 TRIM25 质粒成功转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 表达条件为 16 °C、0.4 mM IPTG 诱导 18 h, 并对纯化条件进行了大量的摸索, 通过对纯化条件的多次优化之后, 最后确定了分子筛 buffer 为 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT。**结论** 成功表达出 TRIM25 蛋白, 筛选出最佳纯化条件, 为后续进一步筛选靶向 TRIM25 蛋白的天然产物及结构功能研究奠定基础。

**【关键词】** TRIM25; 蛋白表达; 蛋白纯化**【中图分类号】** R737**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1009-4393 (2026) 06-083-03

TRIM25 作为一种 E3 泛素连接酶, 介导靶蛋白的泛素化修饰, 参与多种疾病的发生和细胞机制<sup>[1]</sup>。经过研究者的不懈努力, 发现 TRIM25 与多种疾病密切相关, 包括病毒感染、癌症和免疫相关疾病, 例如系统性红斑狼疮<sup>[2]</sup>。在癌细胞中, TRIM25 可能通过调控肿瘤抑制基因、调节细胞周期及促进细胞凋亡逃逸等机制, 参与肿瘤的发生和转移<sup>[3]</sup>。TRIM25 的过表达可能促进癌细胞的增殖和迁移, 而 TRIM25 的缺失则可能导致免疫系统对肿瘤的认识和清除减弱。在免疫反应中, TRIM25 与免疫受体如 RIG-I 相互作用, 促进 RIG-I 的泛素化, 从而增强其对病毒 RNA 的识别和信号传导, 起到增强抗病毒免疫反应<sup>[4]</sup>。TRIM25 不仅在病毒感染和癌症中发挥重要作用, 也参与免疫系统的调节。研究发现, TRIM25 在免疫反应中的双向调节作用, 使其成为治疗自身免疫性疾病或免疫抑制性疾病的潜在靶点。其泛素化功能不仅直接促进蛋白降解, 还通过调节信号通路 (如 NF- $\kappa$ B、IRF3 等) 间接参与免疫调控。因此, 靶向 TRIM25 蛋白的药物发现是研究热点。在体外获得高纯度的 TRIM25 蛋白, 可为后续体外酶抑制剂筛选、药物作用于酶的机制验证和结构功能研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 质粒、菌株、试剂

重组质粒 PGEX-4T-1-TRIM25 委托北京擎科生物公司构建, Rosetta-gami (DE3) pLysS、Rosetta-gami 2 (DE3) 和 BL21 (DE3) 感受态细胞为实验室保存菌种, 酵母提取物、胰蛋白酶均购自英国 Oxoid 公司; 谷胱甘肽, IPTG、氨苄青霉素和预染彩虹蛋白 Marker 均购自大连美仑生物技术有限公司; Tris 和 SDS 均购自合肥兰杰柯科技有限公司; NaCl 和 DTT 均购自北京兰博利德商贸有限公司。GST 填料购自德国 Qiagen 公司。

### 1.2 溶液配制

Lysis buffer 的配制: 50 mM Tris pH 7.5、150 mM NaCl, 分子筛 buffer A 配制: 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5mM DTT, 分子筛 buffer B 配制: 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT; 1000 $\times$  异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) 溶液的配制: 用电子天平称取 4.8 g 的

IPTG 置于烧杯中, 加 R0 水定容至 50 mL, 在超净台中用 0.22  $\mu$ m 孔径的无菌滤膜过滤除菌后收集至无菌管中, -80 °C 低温保存; 1000  $\times$  氨苄青霉素溶液的配制: 用电子天平称取 5 g 的氨苄青霉素置于烧杯中, 加纯水定容至 50 mL, 在超净台中用 0.22  $\mu$ m 孔径的无菌滤膜过滤除菌后收集至无菌管中, -80 °C 低温保存。

### 1.3 感受态的确定

将 TRIM25 质粒分别转化至 Rosetta-gami (DE3) pLysS、Rosetta-gami 2 (DE3) 和 BL21 (DE3) 感受态细胞, 并涂布至含有氨苄青霉素的 LB 固体平板上, 37 °C 培养过夜。分别挑取单克隆菌落, 转入含有 6mL LB 液体培养基的摇菌管中, 200 rpm 37 °C 培养至 OD<sub>600</sub> 值 0.8 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG, 在 18 °C 下诱导 18 h。最后 5000 rpm 离心 10 min 收集菌体。

### 1.4 蛋白大量纯化

#### 1.4.1 细菌破碎

将 TRIM25 质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 次日挑单斑到 250mL 锥形瓶中培养至 OD600 值 0.8 时, 取 5 mL 转入含有 1L LB 液体培养基的摇菌瓶中, 37 °C 200 rpm 培养至 OD600 值 0.8 时, 加入终浓度为 0.4 mmol/L IPTG, 16 °C 诱导 18 h。最后 5000 rpm 离心 12 min 收集菌体。

#### 1.4.2 蛋白纯化

取 3.5 mL 菌体, 加入 50 mL lysis buffer 混合均匀后, 使用低温超高压连续流细胞破碎仪, 压力 1140 bar 左右, 连续破碎 4-5 次, 直至菌液成水滴状不粘稠为止。破碎后的菌液在 4 °C 下 21500 rpm 离心 30 min, 收集上清液。上清液流穿至装有 GST 填料的重力柱中, 使菌液和填料充分结合, 加入 20mL lysis buffer 洗杂, 而后加入 50mL RNA 酶酶切 1.5h, 而后加入 100  $\mu$ L 3C 酶进行酶切 14h, 次日, 将流穿液置于 10 kDa 超滤管中浓缩至 500  $\mu$ L。选择 Superdex 200 Increase 凝胶层析柱, 在 ÄKTA pure 层析系统上进一步纯化。

## 2 结果

### 2.1 TRIM25 蛋白质序列及表达载体

TRIM25 蛋白序列如下: GSGVKAKVLENFLTKSRTELLEYFVKVI FDYNTAHNKVSLSNKYTTASVSDGLQHYRSHPRQRTYCSQVLGLHCYKNGIH YWEVLQKNNFCGVGICYGSMERQGPESRLGRNPNWCVEWFNNKISAWHNNVE KTL PSTKATRVGVLNCDHGFVIFFAVTEKVHLMYKFKVDFTEALYPAFVWFVS

作者简介: 洪凤琪, 女, 硕士研究生在读, 从事资源与品质评价。

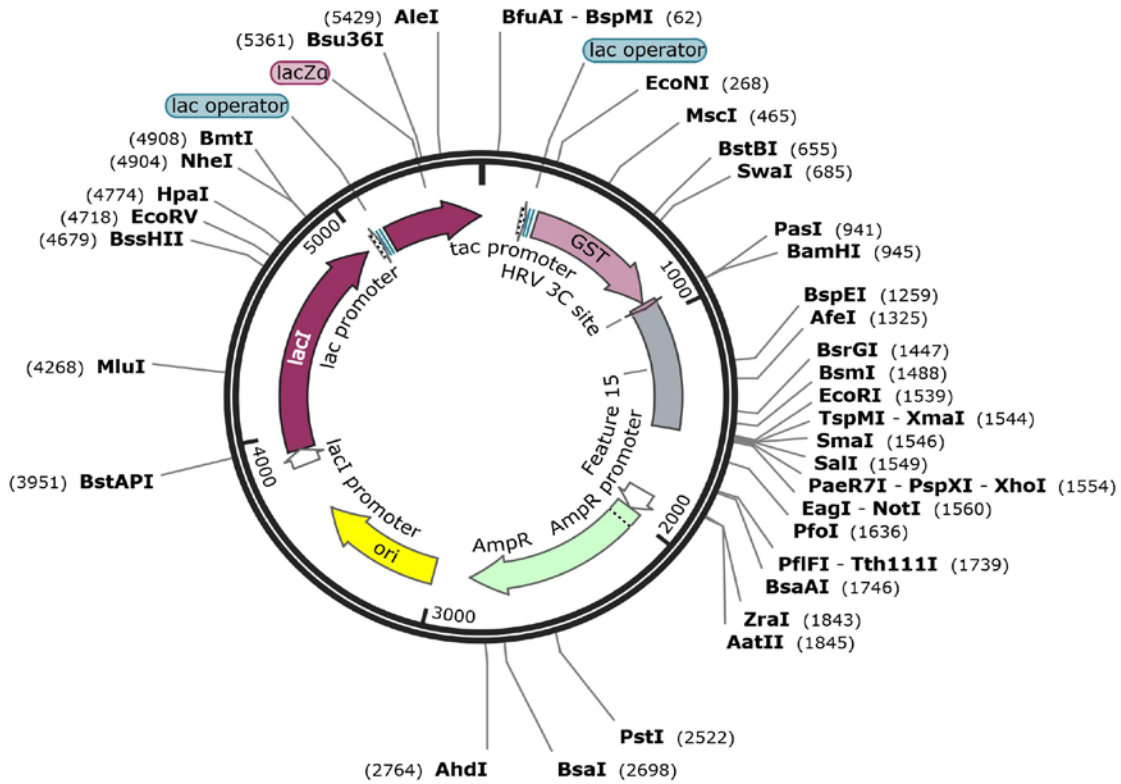
\* 通讯作者: 林羽, 男, 教授。从事药学研究。

\* 通讯作者: 徐惠龙, 男, 正高级实验师, 从事中药资源研究。

AGTTLICSCK

构建载体: TRIM25 蛋白质序列经过密码子优化后委托北京擎科生物公司合成, 构建到 PGEX-4T-1 载体的 PasI 与 EcoRI 位点之间, 该载体带有氨苄青霉素抗性基因 AmpR, 启

动子系统是由 lac 操纵子控制的 tac 强启动子, 同时, 质粒自身携带了高表达型 lac 阻遏蛋白基因, 在抑制启动子泄露表达时, 无需依赖宿主菌的 lacI, 可以对目的基因进行强转录 (图 1)。



Trim 25 (22.4kDa)  
5569 bp

图 1: 原核表达载体 PGEX-4T-1 图谱

2.2 TRIM25 蛋白小量表达检测

本次实验选择了三种感受态细胞, 其中蛋白只有在

BL21 (DE3) 感受态细胞中有表达, 因此, 选择 BL21 (DE3) 感受态细胞作为表达菌株。

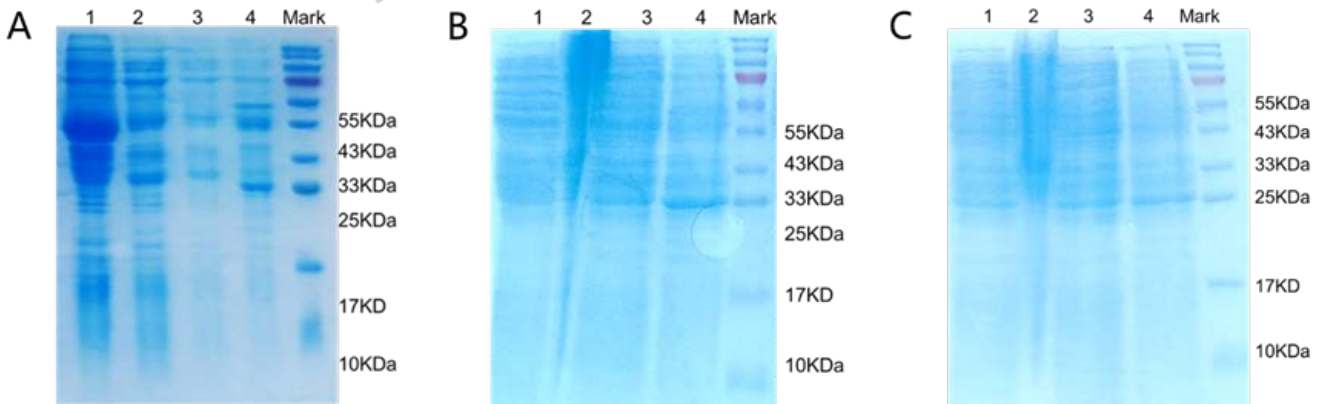


图 2: TRIM25 在不同感受态细胞中的表达情况

(A: 泳道 1 为 BL21 (DE3) 感受态细胞表达破碎后的上清样品; 泳道 2 为 BL21 (DE3) 感受态细胞表达破碎后的沉淀样品; 泳道 3 为 BL21 (DE3) 感受态细胞表达与 GST 填料孵育后的上清样品; 泳道 4 为 BL21 (DE3) 感受态细胞表达的 GST 填料洗脱样品; B: 泳道 1 为 Rosetta 2 (DE3) pLysS 感受态细胞表达破碎后的上清样品; 泳道 2 为 Rosetta 2 (DE3) pLysS 感受态细胞表达破碎后的沉淀样品; 泳道 3 为 Rosetta 2 (DE3)

pLysS 感受态细胞表达与 GST 填料孵育后的上清样品; 泳道 4 为 Rosetta 2 (DE3) pLysS 感受态细胞表达的 GST 填料洗脱样品; C: 泳道 1 为 Rosetta-gami 2 (DE3) 感受态细胞表达破碎后的上清样品; 泳道 2 为 Rosetta-gami 2 (DE3) 感受态细胞表达破碎后的沉淀样品; 泳道 3 为 Rosetta-gami 2 (DE3) 感受态细胞表达与 GST 填料孵育后的上清样品; 泳道 4 为 Rosetta-gami 2 (DE3) 感受态细胞表达的 GST 填料洗脱样

品; M 为 Marker.)

### 2.2.1 TRIM25 大量表达与纯化

我们对纯化条件进行了大量的摸索, 通过对纯化条件的

多次优化之后, 最后确定了分子筛 buffer 为 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, 1 mM DTT, 见图 3、图 4。

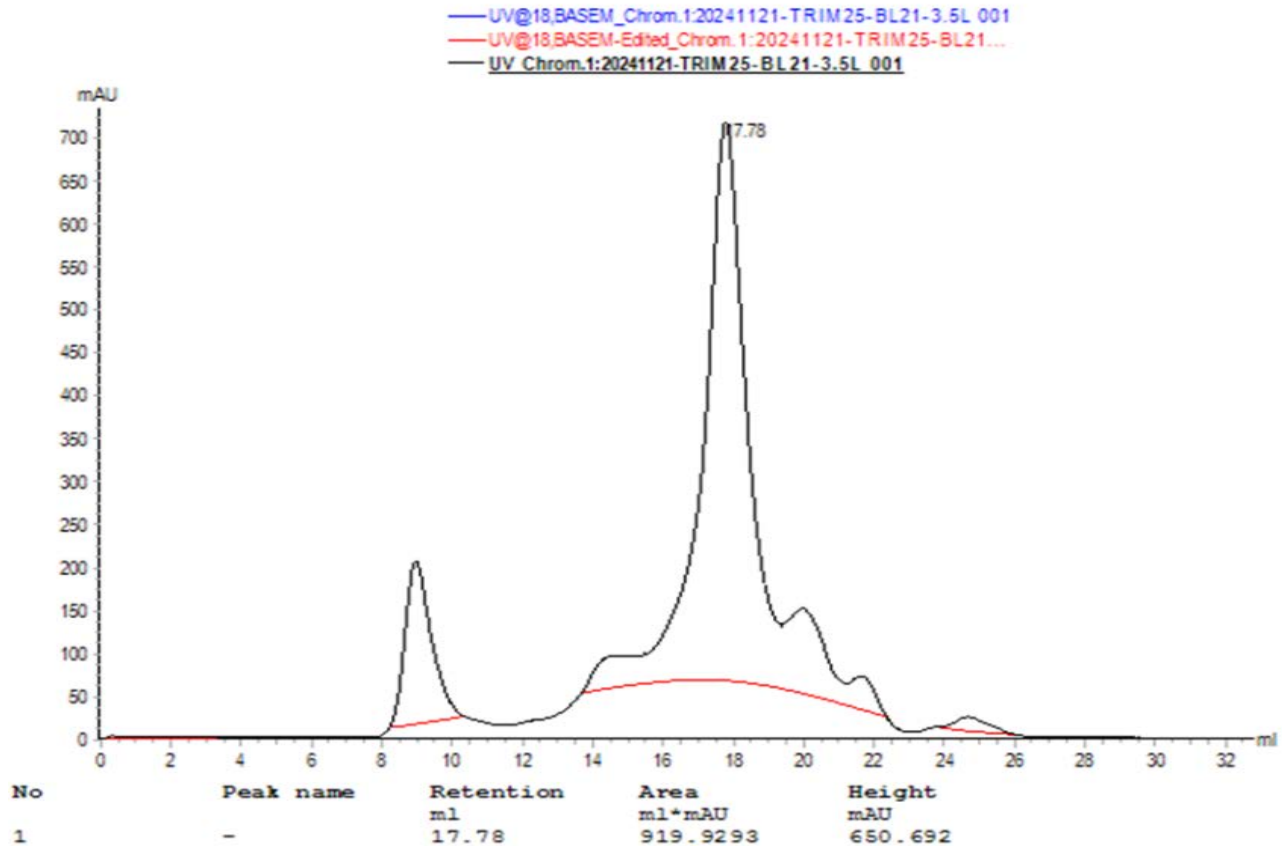


图 3: TRIM25 蛋白分子筛纯化图

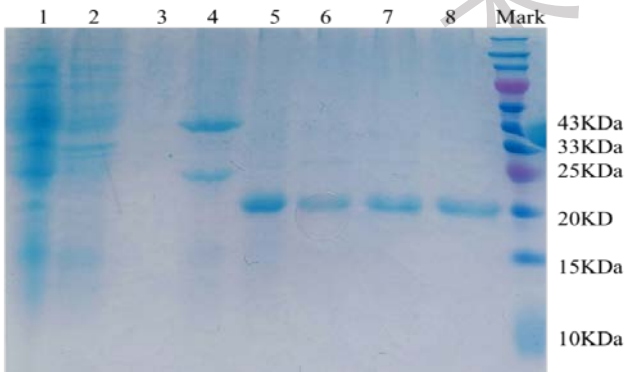


图 4: TRIM25 蛋白 SDS-PAGE 凝胶图

1. 总样 2. 流穿 3. 洗杂 4. 酶切前 5. 酶切后 6-8: 分子筛 16 ~ 18ml

### 3 讨论

TRIM25 作为一种 E3 泛素连接酶, 介导靶蛋白的泛素化修饰, 参与多种疾病的发生和细胞机制, 尤其在乳腺癌、结直肠癌、肺癌等中通过抑制 p53 通路、激活促癌信号促进肿瘤, 是肿瘤靶向治疗研究的重要候选分子<sup>[5]</sup>, 也是天然产物研究的热点蛋白<sup>[6]</sup>。本研究我们通过借助 GST 标签, 采用 PGEX-4T-1 载体构建出 TRIM25 蛋白质粒, 使蛋白成功在原核系统表达, 优化了感受态细胞和分子筛 buffer 的摸索, 最终得到纯度和均一性较好的 TRIM25 蛋白, 为后续在体外对 TRIM25 蛋白结构和功能性的研究奠定基础, 也为从天然产物中获得 TRIM25 亲和力配体活性成分奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Chiang C, Yap BK. TRIM25, TRIM28 and TRIM59 and Their Protein Partners in Cancer Signaling Crosstalk: Potential Novel Therapeutic Targets for Cancer [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2024, 25;46(10):10745-10761.
- [2] Yan Y, Zhou S, Chen X, et al. Suppression of ITPKB degradation by Trim25 confers TMZ resistance in glioblastoma through ROS homeostasis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024,9(1):58.
- [3] Rahimi-Tesiye M, Zaersabet M, Salehiyeh S, et al. The role of TRIM25 in the occurrence and development of cancers and inflammatory diseases [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(5):188954.
- [4] Wu SF, Xia L, Shi XD, et al. RIG-I regulates myeloid differentiation by promoting TRIM25-mediated ISGylation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(25):14395-14404.
- [5] Li J, Liu J, Zhou Z, et al. Tumor-specific GPX4 degradation enhances ferroptosis-initiated antitumor immune response in mouse models of pancreatic cancer [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(720):3049.
- [6] Liu Z, Wang K, Jiang C, Chen Y, Liu F, Xie M, Yim WY, Yao D, Qian X, Chen S, Shi J, Xu K, Wang Y, Dong N. Morusin Alleviates Aortic Valve Calcification by Inhibiting Valve Interstitial Cell Senescence Through Cnd1/Trim25/Nrf2 Axis [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024,11(20):2307319