

细胞毒性 T 细胞抗原 4 胞外结构域的高效表达与纯化

郭鑫鑫¹, 刘青¹, 丰慧根², 原志庆², 林俊堂^{1,2}, 樊晋宇^{1,2}

(1. 河南省干细胞与生物治疗工程研究中心, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院 生命科学技术学院, 河南 新乡 453003)

摘要:目的:获得细胞毒性 T 淋巴细胞相关分子 4 胞外结构域(exCTLA4)在大肠杆菌中高效表达的条件,并纯化获得高纯度的重组蛋白.方法:构建原核表达质粒 pET28a-exCTLA4 并转入大肠杆菌 Transetta (DE3)中,通过改变诱导物 IPTG 浓度、细菌培养温度和时间,获得了 exCTLA4 的最佳表达条件.收集最佳诱导条件下表达 exCTLA4 的菌体,将菌体超声破碎后,离心分离 exCTLA4 包涵体,用低浓度尿素(2 mol·L⁻¹)洗去大部分背景蛋白后,再用高浓度尿素(8 mol·L⁻¹)溶解包涵体,进一步用镍离子亲和层析方法得到高纯度 exCTLA4.结果:构建了表达载体 pET28a-exCTLA4,获得了 exCTLA4 在 Transetta (DE3)中的最佳诱导条件,即在 1 mmol·L⁻¹ IPTG、25 °C 下,诱导 6 h 能得到最佳表达,但重组蛋白以包涵体形式存在.通过纯化 exCTLA4 包涵体及进一步的镍离子亲和层析获得了高纯度的目的蛋白,Western blot 鉴定为 CTLA4.结论:获得了 exCTLA4 重组蛋白在大肠杆菌中的最佳表达条件和纯化方法及步骤,为该蛋白的应用奠定了基础.

关键词:CTLA4;原核表达;蛋白纯化

中图分类号:Q81

文献标志码:A

CTLA4 是第一个发现的免疫检测点受体^[1],属于 CD28 免疫球蛋白超家族成员,在 T 细胞或 B 细胞中表达^[2-4].人源全长的 CTLA4 又称为亚型 1 或跨膜 CTLA4(transmembrane CTLA4, Tm-CTLA4).Tm-CTLA4 由 4 个外显子拼接而成,其中第一个外显子编码含信号肽序列,第二个外显子编码位于细胞外的免疫球蛋白可变区结构域,即胞外结构域(exCTLA4),第三个外显子编码跨膜结构域,第四个外显子编码胞内结构域^[5].如果 CTLA4 的 mRNA 在剪接成熟中失去外显子 3,则由 1,2 和 4 个外显子拼接成 CTLA4 的亚型 2 又称为可溶性 CTLA4(soluble CTLA4, sCTLA4).sCTLA4 主要表达在静息期的 CD4⁺ 和 CD8⁺ 中,无跨膜结构域,且胞内结构域也因移码提前终止^[6].

Tm-CTLA4 主要表达在活化 T 细胞和调节性 T 细胞表面,形成同源二聚体糖蛋白受体,是 T 细胞的共抑制因子,当与抗原呈递细胞(antigen-presenting cell, APC)表面的 B7-1(CD80)或 B7-2(CD86)配体结合后,CTLA4 可以负向调节 T 细胞的活化,导致 T 细胞应答的下调^[1,7].在肿瘤的免疫治疗中,阻断活化 T 细胞的抑制信号通路,可以重新激活 T 细胞的免疫反应从而激活 T 细胞的抗肿瘤作用^[8],因此,CTLA4 的单克隆抗体已成为具代表性的新型抗肿瘤药物.sCTLA4 与 APC 细胞表面的 B7 结合,一方面能干扰 B7 与 T 细胞共刺激受体 CD28 介导的 T 细胞激活应答;另一方面也能干扰 B7 与 Tm-CTLA4 结合介导的 T 细胞抑制应答^[3,6,9].sCTLA4 的异常表达能打破 T 细胞活化和抑制的平衡,打破 T 细胞的稳态从而导致免疫相关疾病,大量的数据也显示在正常人血清中能检测到低水平的 sCTLA4,而在患有自身免疫疾病的患者血清中显著升高,如格雷夫斯病(Graves' disease)^[10]、桥本甲状腺炎(Hashimoto thyroiditis)^[10]、系统性硬化症(multiple sclerosis)^[11,12]、系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)^[13]、1 型糖尿病(type 1 diabetes)^[14]和类风湿性关节炎^[15]等.因此,sCTLA4 也是自体免疫疾病标志物的开发靶标^[6].

收稿日期:2017-03-03;修回日期:2017-06-10.

基金项目:河南省科技厅项目(122101310100);河南省高等学校重点科研项目计划(16A180012).

作者简介:郭鑫鑫(1992-),女,河南开封人,新乡医学院在读硕士研究生,研究方向为蛋白质的表达与纯化,E-mail:1481276921@qq.com.

通信作者:樊晋宇,E-mail:jyfan1012@163.com.

两种亚型的 CTLA4 所发挥作用的关键步骤就是由第二个外显子编码的免疫球蛋白可变区结构域与 B7 类受体的结合。因此,无论作为开发 CTLA4 的临床治疗性或检测类抗体,还是作为检测试验的阳性对照物,表达并纯化大量 exCTLA4 有重要的应用价值。但是迄今为止,尚无高产量且高纯度的 CTLA4 重组蛋白,限制了其实验研究和商品化应用。本研究构建了 exCTLA4 的原核表达载体,在大肠杆菌 Transetta (DE3)中通过优化诱导时间、表达温度、诱导物用量等,获得了高效的重组蛋白表达条件。高水平表达的胞外结构域主要以包涵体形式存在,从获得的包涵体进一步纯化、复性获得大量可溶的 exCTLA4。exCTLA4 的高效表达与纯化为临床研究或商业化开发提供了保障。

1 材料及方法

1.1 材料

原核表达质粒 pET28a 购自 Novagen 公司,CTLA4 胞外区由上海生工生物工程公司合成,大肠杆菌感受态 DH5 α 、Transetta(DE3)购自全式金公司。限制性内切酶(*Nde* I, *Xho* I), PrimeSTAR Max DNA Polymerase, T4 DNA 连接酶和 DNA Marker(DL2000)购自 TaKaRa 公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒 DNA 小量提取试剂盒购自 OMEGA BIO-TEK 公司,CTLA4 抗体购自北京义翘神州生物技术有限公司,引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 exCTLA4 序列合成与引物设计

根据 GenBank 数据库中人源 CTLA4 基因序列(NM_005214.4)合成了 exCTLA4 序列。通过 Primer 5.0 软件设计引物如下:5'-CTGTCCATATGAAAGCAATGCACGTG-3'(下划线部分为 *Nde* I 酶切位点)和 5'-CCACTCGAGTCAGTCAGAATCTGGGCAC-3'(下划线部分为 *Xho* I 酶切位点),将 exCTLA4 序列扩增并构建到 pET28a 载体的相应酶切位点。

1.2.2 表达载体的构建

以合成的序列为模板,利用 PrimeSTAR Max DNA 聚合酶进行 PCR 反应获得目的片段,反应条件为:94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环后 72 °C 再延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒回收目的片段。

pET28a 经限制性内切酶 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切,后经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收载体片段。在 T4 DNA 连接酶作用下将目的片段与载体相连接,将重组质粒 pET28a-exCTLA4 转化至感受态细胞 DH5 α 中,挑取单克隆,提取质粒进行酶切鉴定,并将阳性样品送至金唯智公司测序。

1.2.3 诱导 exCTLA4 表达的 IPTG 浓度优化

将测序正确的 pET28a-exCTLA4 转化至大肠杆菌 Transetta(DE3)中,挑取单克隆至含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 °C,200 r/min 震荡培养过夜。第二日,按 1:100 比例将上述培养物分别扩大培养至 5 份 10 mL 的 LB 中,培养条件不变,当菌液 OD_{600} 约为 0.6 时,加入 IPTG 使其终浓度分别为:0、0.1、0.5、1、2 mmol·L⁻¹,37 °C 诱导 4 h 后收取菌体。菌体用 1×loading buffer 重悬,并于沸水中煮 5 min,10 000×g 离心 10 min,取上清进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.4 诱导 exCTLA4 表达的温度条件优化

当菌液 OD_{600} 约为 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的 IPTG,分别于 16、25、30、37 °C 诱导 exCTLA4 的表达,4 h 后收取菌体,制备样品进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.5 诱导 exCTLA4 表达的时间条件优化

当菌液 OD_{600} 约为 0.6 时,加入终浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导 exCTLA4 的表达,并分别在诱导前、诱导后 2、4、6、8、20 h 时间点取样,收取菌体,制备样品用 SDS-PAGE 电泳检测最佳诱导时间。

1.2.6 exCTLA4 表达的可溶性分析

收集诱导后的菌体,用结合缓冲液(0.1 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄-2H₂O,0.01 mmol·L⁻¹ Tris,pH8.0)重悬,冰浴上超声 6 s,停 8 s,反复此步骤 10 min。在 4 °C,10 000×g 条件下离心 20 min,分别取部分上清和

沉淀进行 SDS-PAGE 检测。

1.2.7 exCTLA4 表达的纯化

按上述优化后的表达条件,在 1 L 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基中扩增,诱导目标蛋白表达。收集菌液,离心,去上清,−20 ℃ 保存备用。将收集的菌体重悬于 100 mL 结合缓冲液中(0.1 mmol · L⁻¹ NaH₂PO₄ · 2H₂O, 0.01 mmol · L⁻¹ Tris, pH8.0)中,冰浴上超声 6 s,停 8 s,反复此步骤 20 min。在 4 ℃, 10 000 × g 条件下离心 20 min,取沉淀。50 mL 含 2 mol · L⁻¹ 尿素的结合缓冲液重悬包涵体沉淀,放置 10 min。4 ℃, 10 000 × g 条件下离心 10 min;重复此洗涤步骤 3 次。用 40 mL 的 8 mol · L⁻¹ 尿素溶解包涵体,4 ℃ 放置过夜。第二日,包涵体溶解液在 4 ℃, 10 000 × g 条件下离心 30 min,取上清。目标蛋白的纯化依照 Novagen 公司 Ni-NTA His · band resins 使用方法进行操作。

1.2.8 纯化蛋白的 Western Blot 分析

按常规对诱导前及纯化的重组蛋白进行 SDS-PAGE 和电转移,电转移后,PVDF 膜用封闭液于 37 ℃ 封闭 1 h,分别加入用 1 × TBST 稀释的抗 His 标签的鼠抗以及抗 CTLA4 的兔抗,4 ℃ 孵育过夜,1 × TBST 洗涤 3 次,每次洗涤 10 min。分别加入用 1 × TBST 稀释的 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 及山羊抗兔 IgG 抗体,室温孵育 40 min,1 × TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,加入显色底物,化学发光显影。

2 结果

2.1 exCTLA4 的表达质粒构建

通过 PCR 扩增出的片段经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在 378 bp 处出现与预期大小相符的片段。重组表达质粒 pET28a-exCTLA4 经 *Nde* I, *Xho* I 双酶切后,琼脂糖凝胶电泳显示在 378 bp 处有一条与 PCR 产物大小一致的条带,在约 5 000 bp 处有一条与载体 pET28a 双酶切后大小一致的条带。DNA 测序结果与已知序列经 BLAST 比对完全一致,且无突变发生。说明 pET28a-exCTLA4 表达质粒构建成功。

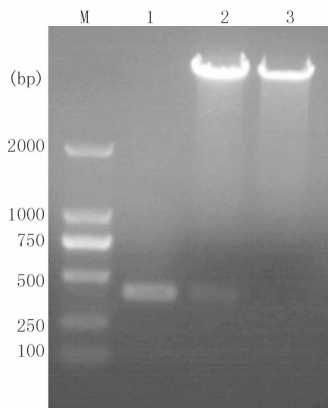
2.2 exCTLA4 表达条件的优化

本研究测试了诱导物浓度 IPTG、诱导温度和诱导时间 3 方面因素对 exCTLA4 高效表达的影响。不同浓度 IPTG 的诱导结果如图 2A 所示,泳道 1 为 IPTG 诱导前,泳道 2~6 分别为 IPTG 浓度为 0、0.1、0.5、2 及 1 mmol · L⁻¹ 下,37 ℃ 诱导 4 h 后菌体蛋白的电泳图谱。与未加 IPTG(泳道 1)组相比,IPTG 浓度为 0.1、0.5、1 及 2 mmol · L⁻¹ 条件下,exCTLA4 重组蛋白(14.5 kD)在转化的表达菌株中均有表达。重复三次后,统计分析最佳的 IPTG 浓度,如图 2B 所示,在 IPTG 浓度为 1 mmol · L⁻¹ 时,exCTLA4 的表达量较高。

不同温度下对 exCTLA4 诱导表达的结果如图 3A 所示,在 IPTG 浓度为 1 mmol · L⁻¹ 时,分别在 16、25、30 和 37 ℃ 诱导 4 h 后菌体的蛋白表达情况。重复三次后的统计结果如图 3B,诱导温度为 25 ℃ 时蛋白表达量最高。不同诱导时间对 exCTLA4 的表达量影响如图 4A,在 IPTG 为 1 mmol · L⁻¹,温度为 25 ℃ 条件下,将诱导不同时间的菌体收集处理后,SDS-PAGE 电泳检测蛋白质表达量的变化,发现在诱导时间为 6 h 时(泳道 4),exCTLA4 蛋白的表达量要稍高于其他几个泳道(图 4B)。

2.3 exCTLA4 表达的可溶性分析与纯化鉴定

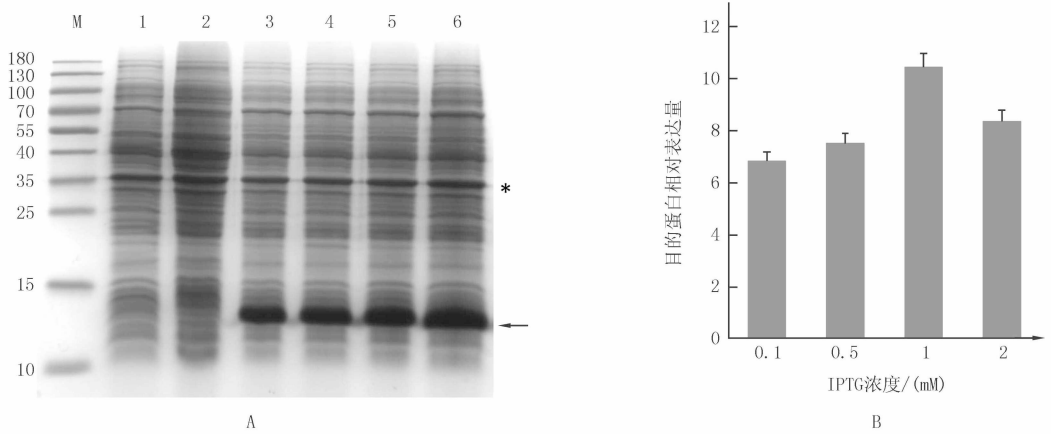
本试验中发现,在上述不同 IPTG、诱导温度和诱导时间下,exCTLA4 大多数以包涵体形式存在。实验选择 1 mmol · L⁻¹ 的 IPTG 浓度,25 ℃ 诱导 6 h 后收集重组蛋白的包涵体(图 5A)。包涵体用低浓度尿素洗涤 3 次,高浓度尿素溶解,经镍离子亲和层析柱纯化,一次纯化就可得到较高纯度的重组蛋白(图 5B)。



M: DL2 000DNA Marker; 1: PCR 产物; 2: 经 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切后的重组质粒 pET28a-exCTLA4; 3: 经 *Nde* I 与 *Xho* I 双酶切后的空质粒 pET28a。

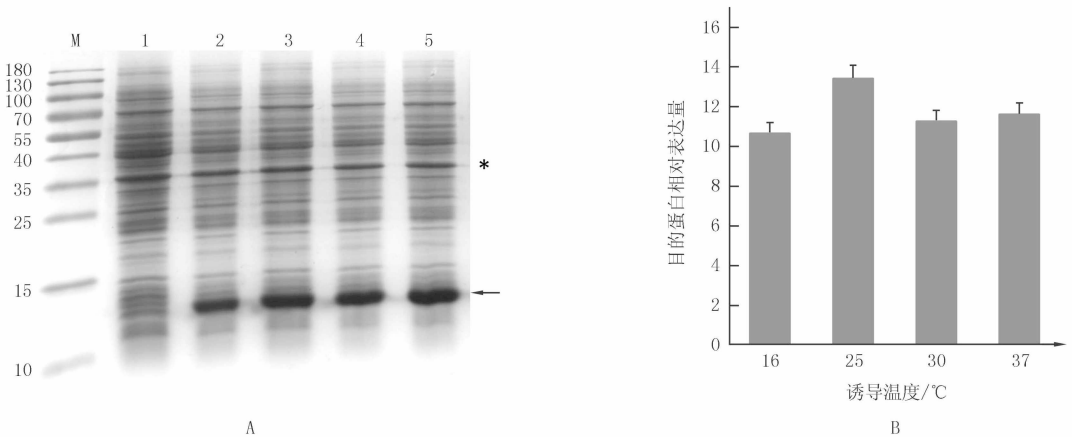
图1 重组质粒 pET28a-exCTLA4 的酶切鉴定

将得到的高纯度蛋白进行 Western Blot 鉴定,结果显示(图 5C),未诱导的菌体(对照组)没有出现特异性条带,而实验组在约 14.5 kD 处出现一条特异性条带,与 SDS-PAGE 电泳出现目的蛋白带的位置相符,符合预期.



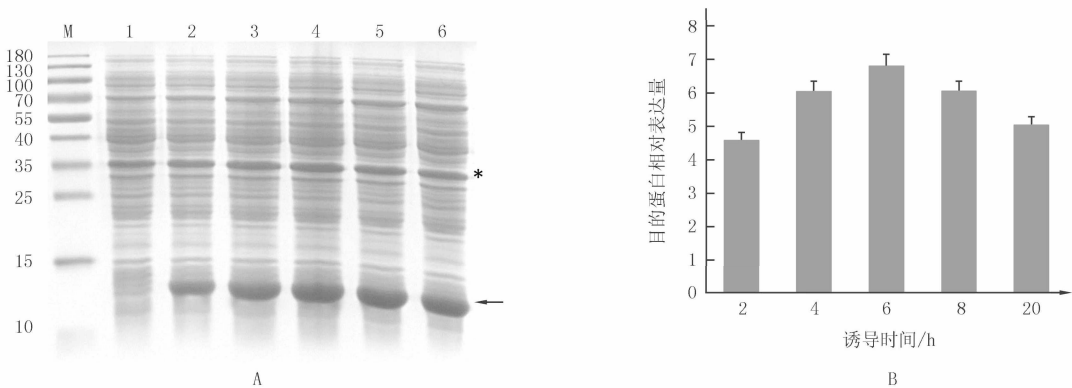
图A:M: 蛋白marker (kD); 1: 诱导前pET28a-exCLA4全菌蛋白; 2-6分别为: IPTG浓度为0、0.1、0.5、2、1 mmol·L⁻¹条件诱导的全菌蛋白. 图B:A中对应泳道的重组蛋白与菌体的内参蛋白的相对表达量. 注:*作为菌体的内参蛋白, 箭头所指位置为重组蛋白.

图2 不同IPTG浓度对exCLA4表达的影响



图A:M: 蛋白marker (kD); 1: 诱导前pET28a-exCLA4全菌蛋白; 2-5分别为: 16、25、30、37 °C条件诱导的全菌蛋白. 图B:A中对应泳道的重组蛋白与菌体的内参蛋白的相对表达量. 注:*作为菌体的内参蛋白. 箭头所指位置为重组蛋白.

图3 不同诱导温度对exCLA4表达的影响



图A:M: 蛋白marker (kD); 1: 诱导前pET28a-exCLA4全菌蛋白; 2-6分别为: 诱导2、4、6、8、20 h全菌蛋白. 图B:A中对应泳道的重组蛋白与菌体的内参蛋白的相对表达量. 注:*作为菌体的内参蛋白. 箭头所指位置为重组蛋白.

图4 不同诱导时间对exCLA4表达的影响

3 讨论

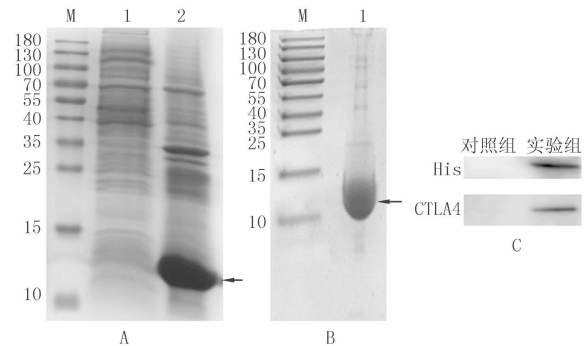
本研究选用 pET28a 作为表达载体,筛选了 exCTLA4 在大肠杆菌中的高水平表达条件,并成功分离纯化了目的蛋白.影响目的基因在大肠杆菌中表达的影响因素较多,本研究中对影响蛋白表达产量的 IPTG 浓度、诱导温度和诱导时间 3 个因素进行了优化.诱导浓度及诱导时间对蛋白表达影响稍大,在 IPTG 的诱导浓度达到 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蛋白表达量最高,若继续增加诱导剂的浓度,蛋白表达量反而下降;在诱导时间的优化中,发现蛋白表达量在诱导 6 h 后达到最高,随着诱导时间的延长,蛋白表达量反而呈现下降的趋势.诱导温度除 $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 蛋白表达量较低外,其余温度对表达量影响不大,在 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 时表达量稍高,因此选择此温度作为诱导温度.

虽然优化了多种表达条件,重组蛋白仍以包涵体形式存在,包涵体是外源基因在细胞中表达时形成的一种膜包裹的高密度、不溶性蛋白颗粒^[16],形成的主要机制为蛋白合成速度较快,导致蛋白不能进行正确的折叠^[17].但是这种表达形式可避免宿主细胞蛋白酶对目的蛋白的降解,有利于保持重组蛋白的完整,也有利于后续的纯化.通过收集诱导后的菌体,离心去除培养液,超声破碎法来获取包涵体.因为盐酸胍作为一种强变性剂,在蛋白复性过程中可能会导致蛋白形成多聚体,且对 SDS-PAGE 造成影响,不利于检测^[18],本研究选用尿素作为变性剂洗涤,先用低浓度的尿素($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)去除大部分包涵体上黏附的杂质,如一些膜碎片和膜蛋白等,再用高浓度的尿素($8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)破坏蛋白间的氢键溶解包涵体蛋白^[19],在此基础上,进一步的用亲和层析纯化蛋白.本研究用尿素作变性剂的另一个原因是在镍离子亲和层析纯化蛋白过程中,易于通过改变缓冲液的 pH 值来洗脱重组蛋白,一次纯化即可获得较高纯度的目的蛋白,因此有利于表达蛋白的纯化工艺.此外,尿素毒性低于盐酸胍,也方便重组蛋白的后期应用.

本研究成功地在大肠杆菌中表达了 exCTLA4,并优化得到了最佳表达条件,获得了高纯度的重组蛋白,建立了一条简单、高效制备 exCTLA4 的路线,为进一步开展其相关功能性研究提供了样品保障.

参 考 文 献

- [1] Pardoll D M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2012, 12(4): 252-264.
- [2] Vesely M D, Kershaw M H, Schreiber R D, et al. Natural innate and adaptive immunity to cancer [J]. *Annual Review of Immunology*, 2011, 29: 235-271.
- [3] Walker L S, Sansom D M. The emerging role of CTLA4 as a cell-extrinsic regulator of T cell responses [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2011, 11(12): 852-863.
- [4] Oaks M K, Hallett M, Penwell R T, et al. A native soluble form of CTLA-4 [J]. *Cell Immunology*, 2000, 201(2): 144-153.
- [5] Esposito L, Hunter K M, Clark J, et al. Investigation of soluble and transmembrane CTLA-4 isoforms in serum and microvesicles [J]. *J Immunol*, 2014, 193(2): 889-900.
- [6] Pawlak E, Kochanowska I E, Frydecka I, et al. The soluble CTLA-4 receptor: a new marker in autoimmune diseases [J]. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 2005, 53(4): 336-341.
- [7] Qureshi O S, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4 [J]. *Science*, 2011, 332(6029): 600-603.
- [8] 许标波, 贺毅憬, 王伟力, 等. 肿瘤免疫检查点抑制剂临床治疗的研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(2): 218-224.
- [9] Zhang Q, Vignali D A. Co-stimulatory and Co-inhibitory Pathways in Autoimmunity [J]. *Immunity*, 2016, 44(5): 1034-1051.
- [10] Chistiakov D A, Turakulov R I. CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2003,



A: 重组蛋白 exCTLA4 的可溶性. M: 蛋白 marker; 1: 超声后上清; 2: 超声后沉淀. B: 重组蛋白 exCTLA4 的纯化. M: 蛋白 marker; 1: 蛋白纯化结果. C: 重组蛋白 exCTLA4 的 Western Blot 鉴定结果. 对照组: 诱导前菌体蛋白; 实验组: 纯化后的 exCTLA4 蛋白.

图5 exCTLA4 表达的可溶性分析与纯化鉴定

31(1):21-36.

- [11] Kulakova O G, Bashinskaya V V, Tsareva E Y, et al. Association analysis of cytokine receptors' genes polymorphisms with clinical features of multiple sclerosis [J]. Zhurnal Nevrologii i Psikiatrii imeni SS Korsakova, 2016, 116(10/2): 10-15.
- [12] Gerdes L A, Ild K, Beltran E, et al. CTLA4 as Immunological Checkpoint in the Development of Multiple Sclerosis [J]. Annals of Neurology, 2016, 80(2): 294-300.
- [13] Simone R, Pesce G, Antola P, et al. The soluble form of CTLA-4 from serum of patients with autoimmune diseases regulates T-cell responses [J]. BioMed Research International, 2014: 215763-215763.
- [14] Ahmadi S, Rostamzadeh J, Khosravi D, et al. Association of CTLA-4 gene 49A/G polymorphism with the incidence of type 1 diabetes mellitus in the Iranian Kurdish population [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBBS, 2013, 16(24): 1929-1935.
- [15] Fattah S A, Ghattas M H, Saleh S M, et al. Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 gene polymorphism is related to rheumatoid arthritis in Egyptian population [J]. Archives of Physiology and Biochemistry, 2017, 123(1): 50-53.
- [16] Frankel S, Sohn R, Leinwand L. The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88(4): 1192-1196.
- [17] 白羊, 章永垒, 邹有土, 等. 重组人 β NGF 在大肠杆菌中的可溶表达、纯化及活性鉴定 [J]. 生物技术通报, 2016, 32(11): 202-209.
- [18] Cho W K, Sohn U, Kwak J W. Production and in vitro refolding of a single-chain antibody specific for human plasma apolipoprotein A-I [J]. Journal of Biotechnology, 2000, 77(2/3): 169-178.
- [19] 刘慧, 张守涛, 郭亚楠. 人 P53 的原核表达及包涵体复性研究 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2016, 44(4): 112-117.

High Level Expression and Purification of Extracellular Domain of CTLA4

Guo Xinxin¹, Liu Qing¹, Feng Huigen², Yuan Zhiqing², Lin Juntang^{1,2}, Fan Jinyu^{1,2}

(1. Stem Cell and Biological Treatment Engineering Research Center of Henan Province, Xinxiang 453003, China;
2. College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

Abstract: Objective: The work aims to obtain the conditions for efficient expression of extracellular domain of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (exCTLA4) in *Escherichia coli* and to acquire high purity recombinant protein. Methods: The sequence of exCTLA4 was constructed into prokaryotic expression vector of pET28a, namely pET28a-exCTLA4, which was then transferred into *Escherichia coli* Transetta (DE3). The optimal expression conditions of exCTLA4 were obtained by changing the inducer concentration of IPTG, the temperature of bacterial growth and the time of recombinant protein induction. The bacteria were harvested under the best induction conditions. The inclusion body of exCTLA4 collected and purified from bacteria was dissolved in $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea, and then purified by nickel ion affinity chromatography. Results: The expression vector of pET28a-exCTLA4 was constructed and the optimal conditions for exCTLA4 expression in Transetta (DE3) were obtained, which was best expressed at $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ for 6 h, but the recombinant protein was expressed in inclusion body forms. High purity protein was obtained by purification of exCTLA4 inclusion bodies and further by nickel ion affinity chromatography. The recombinant protein of exCTLA4 was identified by Western blot. Conclusion: The conditions of optimal expression for recombinant protein of exCTLA4 in *Escherichia coli* are obtained, and high purity recombinant protein is acquired by inclusion body purification and nickel ion affinity chromatography.

Keywords: CTLA4; prokaryotic expression; protein purification

[责任编辑 王凤产]