

嵌合蛋白 sTNFR II-IgG Fc 的克隆、表达与活性分析

徐春晓 姚立红 祖 东 陈爱喆 黄国锦 张智清*

(中国预防医学科学院 病毒学研究所 病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 肿瘤坏死因子是一种重要的炎性细胞因子,目前已知许多免疫疾病与之相关,为了抑制 TNF 的生物学活性,将可溶性 TNFR II(sTNFR II)和人 IgG Fc 分子通过柔性短肽相连,构建成一个嵌合蛋白,在大肠杆菌中进行表达,并获得了纯化蛋白。实验证明该嵌合蛋白能够自发形成聚合体,识别并结合 TNF 蛋白,同单体 sTNFR II 相比,对 TNF 的中和活性得到了较大的提高。

关键词 可溶性肿瘤坏死因子受体,嵌合蛋白,大肠杆菌,生物学活性

中图分类号 Q392.11 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)02-0178-04

肿瘤坏死因子(TNF)是一种多功能细胞因子,目前已知许多病理性反应与之有关,如类风湿性关节炎,脓毒性休克,慢性心衰等^[1]。TNF 的生物学功能是通过结合到细胞表面相应的受体(TNFR)来实现的,TNF 受体胞外区可脱落形成可溶性 TNFR(sTNFR),能与 TNF 分子结合,又不介导信号传递,因此可以用来与膜上受体竞争性结合 TNF,抑制 TNF 介导的生物学活性。研究结果证实,TNF 是以三聚体形式与三个受体分子结合,每个受体结合在 TNF 三聚体相邻的两个受体亚基之间。大量实验表明,只有两个或两个以上受体联合形成聚合体,才能有效介导 TNF 的生物学活性,单个受体对信号传递和 TNF 的中和活性很弱^[2]。本文将可溶性 TNFR II 与 IgG Fc 分子通过一个柔性连接短肽偶联,构建一个 IgG 样的嵌合分子,人为地将 sTNFR II 聚合化,在大肠杆菌中进行了表达,并对纯化后嵌合蛋白的生物学活性进行了研究,与单体 sTNFR II 相比,该嵌合蛋白对 TNF 中和活性明显提高。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 质粒和细胞 :TNFR-p75(TNF 受体胞外区全长基因,由本室从外周血细胞通过 RT-PCR 获得,另文发表),IgG Fc/TA 由梁米芳教授惠赠,T 载体购

自 Promega,质粒 pET32a、pBlue SK,菌种 BL21(DE3),细胞 L929 由本室保存。

1.1.2 工具酶与生化试剂 :核酸内切酶,连接酶购自 Gibco,核酸分子量标准购自 Takara,蛋白质分子量标准购自 Sigma 和 Pharmacia,金属螯合层析柱 Metal Chelate 和分子筛 Superose HR10/30 购自 Pharmacia,TNF 标准品本室保存,sTNFR II 蛋白由本室制备,TNF 单抗由北京生研所张振龙惠赠,抗人 IgG Fc 抗体购自中山公司。

1.2 方 法

1.2.1 重组克隆的构建与鉴定:

根据实验目的设计上下游引物各 4 条:

N1 :5'-GAA TTC CAT ATG CTG CCG GCG CAG GTG GCA TTT AC-3'
N2 :5'-TA GGA TCC GGA GGT GGA GGT AGC GTT GAG CCC AAA TCT-3'
C1 :5'-AC GGA TCC ACC GCC ACC GGG TAA GTG TAC TG-3'
C2 :5'-AT CTC GAG TTA CTA CTG CGT GTA GTG GTT G-3'

引物 N1 和 C1 分别引入 *Eco*R1 和 *Bam*HI 酶切位点,以 TNFR/T 为模板,PCR 扩增出 TNFR II 胞外区 4 个富含 Cys 的功能性结构域,同时去掉信号肽,并在羧基端引入短肽 GlyGlyGlyGlySer;引物 N2 和 C2 分别引入 *Bam*HI 和 *Xho*II 酶切位点,用于扩增 IgG Fc 基因,并在氨基端引入 GlySerGlyGlyGlyGlySer,羧基端引入翻译终止信号 TAG TAA。

以 TNFR-p75/T 和 IgG Fc/TA 为模板,PCR 分别扩增去掉信号肽的 TNFR 胞外区全长基因和人 IgG

收稿日期 2001-08-31,修回日期 2001-12-20。

基金项目 国家 863 高科技生物领域基金资助(No. 102-08-01-03)。

* 联系作者 :Tel :86-10-63519655 ; Fax :86-10-63532053 ; E-mail : zhang_zq@public3.bta.net.cn

Fc 基因,两个基因经连接肽基因连接后插入 pBlue SK 载体,然后将该嵌合蛋白基因插入 pET32a 中,构建重组表达载体 pET32a/sTNFR II-IgG Fc。在嵌合蛋白中间引入一个连接短肽:-GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer-。以 pBlue SK/sTNFR II-IgG Fc 为模板测序。

1.2.2 嵌合蛋白在大肠杆菌中的表达:将 pET32a/sTNFR II-IgG Fc 转化 *E. coli* 菌株 BL21(DE3),挑取阳性克隆,接种含 Amp 的 LB 培养基,37℃ 培养过夜,1:100 转接 2L 三角瓶放大培养, $A_{600} = 0.6$ 时,加入 IPTG 诱导培养,12% 的 SDS-PAGE 电泳检测表达水平。

1.2.3 嵌合蛋白的纯化:发酵菌体用破碎液悬浮,冰浴超声破碎菌体,离心回收包涵体,2mol/L 尿素漂洗,然后 6mol/L 尿素溶解包涵体,变性后的包涵体对含 2mol/L 尿素 PBS 透析过夜,直接上经金属螯合层析柱,300mmol 咪唑洗脱活性蛋白峰,Lowry 法测定蛋白浓度。

1.2.4 纯化蛋白的鉴定:

Dot-blot:将纯化后的蛋白样品,直接点在 NC 膜上,2% BSA 封闭过夜,然后与 TNF 蛋白 37℃ 保温 2h,以鼠抗 hTNF 单抗为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,DAB 显色。

Western-blot:纯化蛋白经还原和非还原 SDS-PAGE 后转膜,脱脂奶封闭过夜,以抗人 IgG Fc 抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗稀释,DAB 显色。

FPLC Superose 分子筛分析:纯化样品直接上 Superose HR 层析柱,洗脱缓冲液为 0.2mol PB + 0.9% NaCl, pH = 7.4。

1.2.5 抗 hTNF 活性检测:纯化后的嵌合蛋白用 PBS 稀释,与 0.2ng 的 hTNF 37℃ 保温 2h,用鼠 L929 细胞检测 hTNF 生物学活性,测活方法按文献 [3] 进行,MTT 显色,测量 A_{570} 。

2 结果

2.1 重组克隆的构建与鉴定

重组表达载体 pET32a/sTNFR II-IgG Fc (见图 1) 酶切与测序结果表明,sTNFR II 和 IgG Fc 的基因完全正确,插入位点和中间连接区也与设计相符。

2.2 Trx-sTNFR II-IgG Fc 在 *E. coli* 中的表达

阳性克隆经 IPTG 诱导表达后,进行 SDS-PAGE,结果与阴性对照相比有明显的目的蛋白表达带(见图 2),表达量约 40%,分子量约 60kD,与理论值相

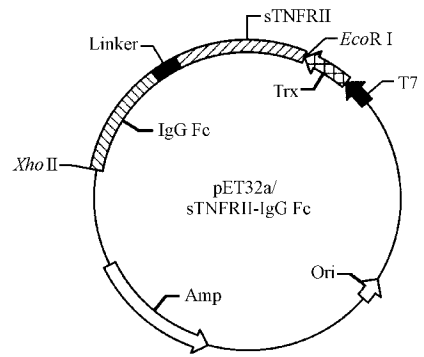


图 1 重组表达载体 pET32a/sTNFR II-IgG Fc 结构图

Fig.1 Structure of recombinant expression vector pET32a/sTNFR II-IgG Fc

符。嵌合蛋白的 N 端融合有 Trx 蛋白,Trx 蛋白是 pET32a 载体上所携带的,通过 6 × His 与融合蛋白相连,因此完整的分子构型应为 Trx-sTNFR II-IgG Fc,6 × His 的存在使重组蛋白能够方便地利用金属螯合层析纯化。诱导表达后的菌体经超声破碎后,分别取上清和沉淀电泳,结果表明嵌合蛋白是以包涵体形式表达的(见图 2)。

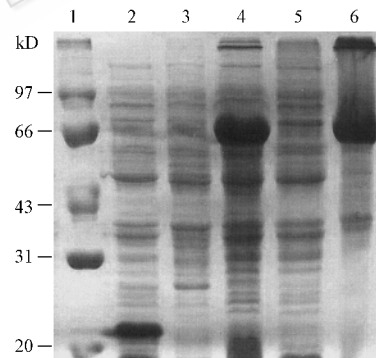


图 2 Trx-sTNFR II-IgG Fc 在 *E. coli* 中的表达

Fig.2 Expression of Trx-sTNFR II-IgG Fc in *E. coli*

1. Protein marker; 2. BL21 (DE3)/pET32a control; 3. Uninduced control; 4. Total cell lysate; 5. Supernatant; 6. Supernatant precipitate

2.3 Trx-sTNFR II-IgG Fc 嵌合蛋白的纯化

采取透析复性与柱上复性相结合的方法,逐步去除变性剂,靶蛋白含有 6 × His 标签,吸附在镍离子金属螯合层析柱上,经漂洗去除杂蛋白后,300mmol 咪唑洗脱活性蛋白峰,SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色分析表明,纯化后样品的纯度大于 95%(见图 3)。

2.4 纯化蛋白的鉴定

2.4.1 Dot-blot: Dot-blot 结果表明(图 4)嵌合蛋白 Trx-sTNFR II-IgG Fc 能够识别并结合 TNF 蛋白,而阴性对照不能与 TNF 蛋白结合,表明我们构建的嵌合

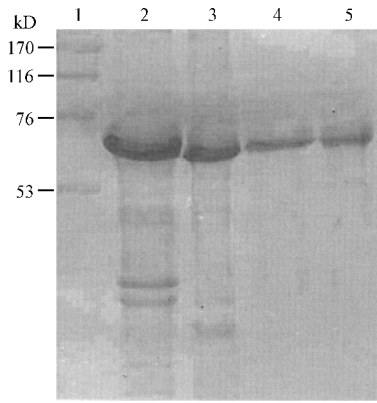


图 3 Trx-sTNFRII-IgG Fc 嵌合蛋白的纯化(还原 SDS-PAGE)

Fig.3 Purification of Trx-sTNFRII-IgG Fc protein(reduced SDS-PAGE)

1. Protein marker ;2. Inclusion body ;3. Washed Inclusion body ;
4&5. Purified protein

蛋白具有正确的分子构象。

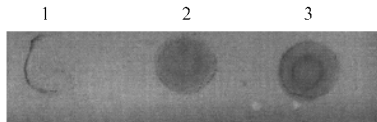


图 4 Dot-blot 鉴定 Trx-sTNFRII-IgG Fc 嵌合蛋白

Fig.4 Dot-blot of Trx-sTNFRII-IgG Fc protein

1. Negative control(Trx protein) ;2. Trx-sTNFRII-IgG Fc protein ;
3. Trx-sTNFRII protein

2.4.2 Western-blot : Western-blot 分析表明纯化的蛋白与抗人 IgG Fc 抗体在 60kD 处有特异性结合 ;同时非还原电泳在 120kD 和 180kD 处也有特异性结合 ,而还原电泳则没有(图 5) ,提示纯化的靶蛋白以单聚体、二聚体和三聚体三种形式存在。

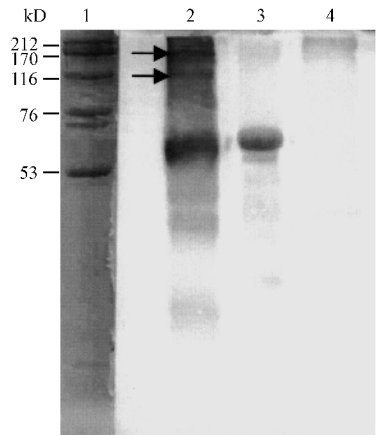


图 5 Western-blot 鉴定 Trx-sTNFRII-IgG Fc 嵌合蛋白

Fig.5 Western-blot of Trx-sTNFRII-IgG Fc protein

1. Protein marker ;2. Unreduced sample ;3. Reduced sample ;
4. BL21 (DE3)pET32a supersonic supernatant (negative control)

2.4.3 FPLC Superose 分析 : 纯品蛋白经分子筛分离后 ,有 3 个洗脱峰 ,相应的分子量约 60kD ,120kD

和 200kD ,而相应的 SDS-PAGE 还原电泳该样品仅一条带 ,表明这 3 个峰是同一种蛋白 ,在天然状态下该蛋白以单聚体、二聚体和三聚体的多种形式存在。

2.5 抗 TNF 活性检测

L929 细胞检测 TNF 的活性结果表明 ,纯化的嵌合蛋白对 TNF 具有中和活性 ,能抑制 TNF 对 L929 的杀伤 ,0.02 ~ 0.05 μ g 的嵌合蛋白能够完全中和 0.2ng 的 TNF 蛋白生物学活性 ,而单体的 sTNFR 中和 0.2ng 的 TNF 蛋白需 0.2 ~ 0.5 μ g ,表明嵌合蛋白对 TNF 的中和活性比单体的 sTNFR 提高了一个数量级(图 6)。

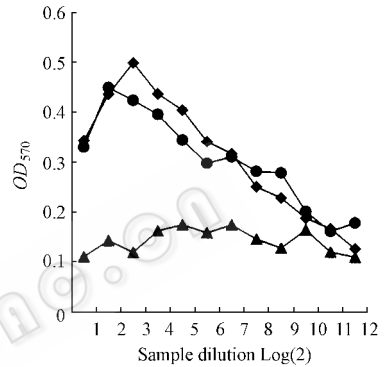


图 6 Trx-sTNFRII-IgG Fc 嵌合蛋白中和 TNF 活性检测

Fig.6 Anti-TNF activity assay of Trx-sTNFRII-IgG Fc protein

◆ . Trx-sTNFR II protein (698 μ g/mL)
● . Trx-sTNFR II-IgG Fc protein (72 μ g/mL)
▲ . BL21 (DE3)pET32a supersonic supernatant
(negative control ,1500 μ g/mL)

3 讨 论

TNF 是一种多功能细胞因子 ,在炎症反应、免疫调节、抗肿瘤、微生物与寄生虫感染等方面起重要作用 ,许多病理性反应如内毒素休克、类风湿性关节炎、慢性心衰等都与之密切相关 ,因此抑制 TNF 的生物学活性在临床上具有重要的意义。TNF 的生物学功能是通过细胞表面相应的受体来实现的 ,利用可溶性 TNF 受体与膜上受体竞争结合 ,是阻断 TNF 信号传递的一条有效途径。大量研究表明 TNF 与 TNFR 是以三聚体-三聚体的形式结合的 ,膜上受体的聚合化是介导 TNF 活性的基础^[4]。

sTNFRII 胞外区有 4 个 30 ~ 42 个氨基酸组成的保守的、富含 Cys 的结构域 ,在 TNF 的识别与信号传递中起重要作用 ,两个可能的糖基化位点 ,但对生物学活性无影响 ,据此本文克隆了 sTNFRII 的基因 ,并与 IgG Fc 基因通过一个柔性短肽偶联 ,在大肠杆菌中进行了表达。在 pET32a 系统 ,该嵌合蛋白 N 末端

融合有硫氧还蛋白(Trx A),整个蛋白全长 539 个氨基酸,分子量为 59.87kD。Trx 有利于嵌合蛋白的高效表达,可促进蛋白质的正确折叠。我们已经证明,在 sTNFR 的 N 末端融合 Trx A 蛋白,对 sTNFR 的生物学活性无影响^[5],为了进一步的临床应用研究,需将 Trx A 切除,目前该工作正在进行之中。

美国 Immunex 的 Etanercept 已被批准用于类风湿性关节炎(RA)治疗^[6]。我们设计了与 Etanercept 完全不同的连接肽,同时利用 RT-PCR 自行扩增出了 TNFR II 胞外区全长基因。Swiss Model 软件三维结构分析表明,我们设计的连接肽能确保嵌合蛋白的两个功能性亚基保持各自独立的三维空间结构,从而确保表达后的嵌合蛋白能够形成正确的空间构象,保持 sTNFR II 的生物学活性。非还原电泳和 Western-blot 证明 sTNFR II-IgG Fc 嵌合蛋白存在单聚体、二聚体和三聚体多种形式。在 FPLC 上 Superose HR 分子筛的分析结果与此相同,但聚合体的比例比非还原电泳高得多。我们曾尝试将纯化分离出的单聚体和聚合体再分别进行还原电泳和 Western-blot,结果均又出现单聚体和多聚体,表明在溶液中,sTNFR II-IgG Fc 嵌合蛋白是以单聚体、二聚体和多聚体多种形式动态共存。

L929 细胞测活结果表明,中和 0.2ng 的 TNF, sTNFR II 单体蛋白需 0.2 ~ 0.5 μ g,嵌合蛋白 sTNFR II-

IgGFc 需 0.02 ~ 0.05 μ g,若按摩尔数计算,中和 1.18 $\times 10^{-14}$ mol TNF,需 sTNFR II 单体蛋白 5 $\times 10^{-12}$ ~ 1.25 $\times 10^{-11}$ mol,而嵌合蛋白 sTNFR II-IgG Fc 仅需 3 $\times 10^{-13}$ ~ 7.5 $\times 10^{-13}$ mol。这一结果表明,我们获得的嵌合蛋白比单体的 sTNFR II 对 TNF 的中和活性至少提高一个数量级,显示了良好的应用前景。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Gravstein L A, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Immunology*, 1998, **10** :423 ~ 434
- [2] Brocks B, Rode H J, Klein M *et al.* A TNF receptor antagonistic scFv, which is not secreted in mammalian cells, is expressed as a soluble mono- and bivalent scFv derivative in insect cells. *Immunotechnology*, 1997, **3** :173 ~ 184
- [3] XU C X (徐春晓), NI D M (倪道明), ZHANG Z I (张振龙) *et al.* Expression and activity assay of three kinds of novel human tumor necrosis factor- α derivatives. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology* (中华微生物学和免疫学杂志), 2000, **20** (3) :132 ~ 135
- [4] Jacobs CA, M. P. Beckmann, K. Mohler *et al.* Pharmacokinetic parameters and biodistribution of soluble cytokine receptors. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1992, **34B** :123 ~ 128
- [5] XU C X (徐春晓), YAO L H (姚立红), CHEN A J (陈爱麟) *et al.* Expression and neutralization activity assay of soluble tumor necrosis factor receptor II (sTNFR II) in *E. coli*. *Chinese Journal of Virology* (病毒学报), 2001, **17** (2) :132 ~ 135
- [6] Allred A. Etanercept in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Pharmacother* 2001, **2** (7) :1137 ~ 1148

Cloning, Expression and Bio-activity Assay of Chimeric Fusion Protein sTNFR II-IgG Fc

XU Chun-Xiao YAO Li-Hong ZU Dong CHEN Ai-Jun HUANG Guo-Jin ZHANG Zhi-Qing*

(State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology, Beijing 100052, China)

Abstract Tumor necrosis factor (TNF) is a key cytokine in immunology system and is related to many human diseases. In order to inhibit the activity of TNF, cDNA coding for soluble TNF receptor II (sTNFR II) and human IgG Fc were linked using a flexible hinge. This gene was expressed in *E. coli* as a chimeric protein and purified by metal chelate chromatography. The results show that the fusion protein exists in the physiological form as a dimer, has the ability to bind with TNF and inhibits the cytotoxicity of TNF on L929 cells. Contrasting to monomer sTNFR II, the chimeric protein has an improved bioactivity, and displays potential prospects for research and application.

Key words soluble tumor necrosis factor receptor (sTNFR), chimeric fusion protein, *E. coli*, bioactivity

Received : 08-31-2001

This work was supported by grant from State "863" High-Tech Project (No. 102-08-01-03).

* Corresponding author. Tel : 86-10-63519655 ; Fax : 86-10-63532053 ; E-mail : zhang_zq@public3.bta.net.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>