

研究报告

采用定位基因缺失突变技术 在大肠杆菌中高效表达肿瘤坏死因子

张德震* 吴淑华 张智清 金 奇
赵新华 赵小侠 苏成芝* 侯云德

(病毒基因工程国家重点实验室, 北京)

肿瘤坏死因子 α (TNF)为157个氨基酸组成的细胞因子,在克隆的全长cDNA的5'端有480bp的非编码区包括76个氨基酸信号肽编码区。本文采用寡核苷酸指导下的定位基因缺失突变方法,删除了这一非编码区及信号肽序列,并在成熟TNF分子第一个氨基酸密码前插入一个翻译起始密码(ATG),形成一个限制酶NcoI的识别位点CCATGG。然后取出含有成熟TNF全基因的NcoI-Pst I片段,插入到原核表达载体pBV220中,获得了肿瘤坏死因子的高效表达菌株。活性检测结果表明,肿瘤坏死因子的表达量可达 3.42×10^8 u/L菌液。SDS-PAGE电泳凝胶扫描结果显示,肿瘤坏死因子在大肠杆菌的表达量可占细菌可溶性总蛋白量的22.8%。抗肿瘤坏死因子单克隆抗体可以中和大肠杆菌表达的肿瘤坏死因子对L929细胞的细胞毒性。SD和ATG间插入31个核苷酸可使TNF表达量降低约10倍。

关键词 肿瘤坏死因子; 基因定位突变

肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)是巨噬细胞产生的一种细胞因子^[1],它最明显的活性是可以在体内或体外特异性地杀伤肿瘤细胞^[2],对正常组织细胞则无明显毒性作用^[3]。由于淋巴细胞产生的淋巴毒素在结构上和功能上与肿瘤坏死因子很相似,故有人提出可将巨噬细胞产生的肿瘤坏死因子命名为肿瘤坏死因子 α (TNF α),将淋巴细胞产生的淋巴毒素命名为肿瘤坏死因子 β (TNF β)。从1975年发现TNF^[4]以来,由于自然肿瘤坏死因子的来源有限,产量不高,以致它的理化性质及生物活性的研究受到很大限制。自1984—1985年TNF基因的克隆、表达成功以来^[5,6],获得大量的TNF,大大促进了TNF的各种性质及生物学功能的研究。近年来的研究发现, TNF除了抗肿瘤活性

外,还具有抗病毒感染、抑制病毒复制活性^[7]。TNF还可激活巨噬细胞^[8]及多形核粒细胞、增强其吞噬功能,促进组织相容性抗原的表达^[9],调节机体的免疫功能。TNF与多种细胞因子如IL-1、IL-2及各种干扰素的协同作用,尤其是与 γ 干扰素的协同作用更是引人注目^[10-12]。本文采用寡核苷酸指导下的基因定位突变技术,使TNF cDNA在大肠杆菌中得到了高效表达。

材料与 方法

(一)材料

1. 质粒: pTNF1: 带有肿瘤坏死因

本文于1989年4月13日收到。

* 第四军医大学生物化学教研室。

子 α (简称 TNF)cDNA全长; p γ : 带有 γ 干扰素cDNA全长; pBV220为带有 Amp^r、P_LP_R启动子的高效表达载体^[13], 均由病毒基因工程国家重点实验室提供。

2. 限制酶及修饰酶: 所有限制酶 EcoR I、Pst I、Hind III、Hinc II、Sma I、Nco I、Bgl I 等及 T4DNA 连接酶, S₁核酶、豆芽核酶、T4DNA 聚合酶、DNA 聚合酶 I Kleno 大片段分别购自西德 Boehringer Mannheim 公司, 美国 New England Biolabs 公司, 中国医学科学院基础医学研究所友谊生物制品公司及华美生物技术公司。各种酶反应条件根据文献^[13,14], 并参考各公司提供的酶反应条件进行。

3. 寡核苷酸指导下的基因定位突变方法: 分别采用 JM-103 系统及 Bio-Rad 公司提供的基因突变试剂盒 (MUTAGEN)。其中大肠杆菌菌种 CJ236 基因型为: dut⁻, ung⁻, thi⁻, relA; pCJ105(cm^r)。突变体转化菌种 MV1190 基因型为 Δ (lac-proAB), thi, supE, Δ (srt-rccA)306; Tn10 (tet^r) [F[']: traD[']/36, proAB, lacI ZAM15]。³²P- γ -dATP 及 ³²P- α -dATP 均购自英国 Amersham 公司。

4. 标准 TNF 及抗 TNF 单克隆抗体: 均购自西德 Boehringer Mannheim 公司。

(二) 方法

1. 寡核苷酸突变引物的人工合成: 采用亚磷酸法, 用 ABI 公司 DNA 合成仪 381A 型合成。引物的纯化采用瑞典 Pharmacia 公司快速液相层析仪 (FPLC) Mono Q 离子交换柱进行。

2. DNA 序列分析: 采用 Boehringer Mannheim 公司 M13 DNA 序列分析试剂盒所提供的全部试剂, 用 Sanger 双脱氧法, 按照 Boehringer Mannheim 公司所提供的操作程序进行。

3. 质粒重组、细菌转化及杂交筛选: 均参照文献^[14,15]。

4. 肿瘤坏死因子活性检测: 含人重组 TNF 基因表达载体的转化细菌在含氨基青霉素 100 μ g/ml 的 LB 中 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 6—10h, 再按 1:100 的比例稀释到含氨基青霉素的 LB 或 M₉ 培养基中, 继续 30 $^{\circ}$ C 培养 4—6h, 至 A₆₀₀ 达 0.3—0.6, 提高温度至 42 $^{\circ}$ C 继续培养 4—5h。收集菌液, 5000r/min 离心 5min。向细菌沉淀物中按 1:3 重量: 体积加入 7mol/L 盐酸胍, 50mmol/L 硼酸缓冲液, 冰浴中搅拌 1h。17000r/min 离心 19min, 收集上清备用。

TNF 活性检测: 采用在放线菌素 D 存在下, TNF 对 L929 细胞的细胞毒性方法^[16]。在 96 孔板上每孔加入 1—3 \times 10⁴ 细胞, 24h 后加入 1 μ g/ml 放线菌素 D 及不同稀释度的 TNF 表达菌裂解上清液, 24h 后观察细胞存活情况, 以杀死 50% 细胞的 TNF 量为一个单位。

5. TNF 中和试验: 在 96 孔板上进行, 不同稀释度的 TNF 与 5 单位的 TNF 单克隆抗体在室温作用 1h 后加入 929 细胞, 24h 后观察对 929 细胞毒的保护作用。

6. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照文献^[17]。聚丙烯酰胺凝胶胶厚 1mm, 分离胶长 100mm, 浓缩胶长 20mm。上样后以 20mA 恒流电泳至溴酚蓝达凝胶下缘。取下凝胶放入染色液中染色 1—2h, 再以脱色液脱色至本底透明。

结 果

(一) TNF cDNA 5' 端非编码区及信号多肽序列的定位缺失突变

从 TNF cDNA 克隆载体 pTNF1 中以 Hind III-Apa I 切下约 0.8kb TNF cDNA 片段, 同时将带有 γ 干扰素 cDNA 的 pr 质

粒用 HindIII -Pst I 切开，两个片段于 HindIII 粘端连接，而 Apa I 及 Pst I 粘端用豆芽核酸酶削平，组装成 pUCIT202 质粒(图 1)。在 TNF 的 5' 端先与 γ 干扰素 cDNA 连接的目的是为以后组建 IFN- γ -

TNF 融合蛋白之用。

从 pUCIT202 切下含 γ 干扰素和肿瘤坏死因子串联基因的 EcoR I -Hind III 片段，插入 M13mp19RFDNA 的 EcoR I -Hind III 位点中，得到 M13mpIT19。

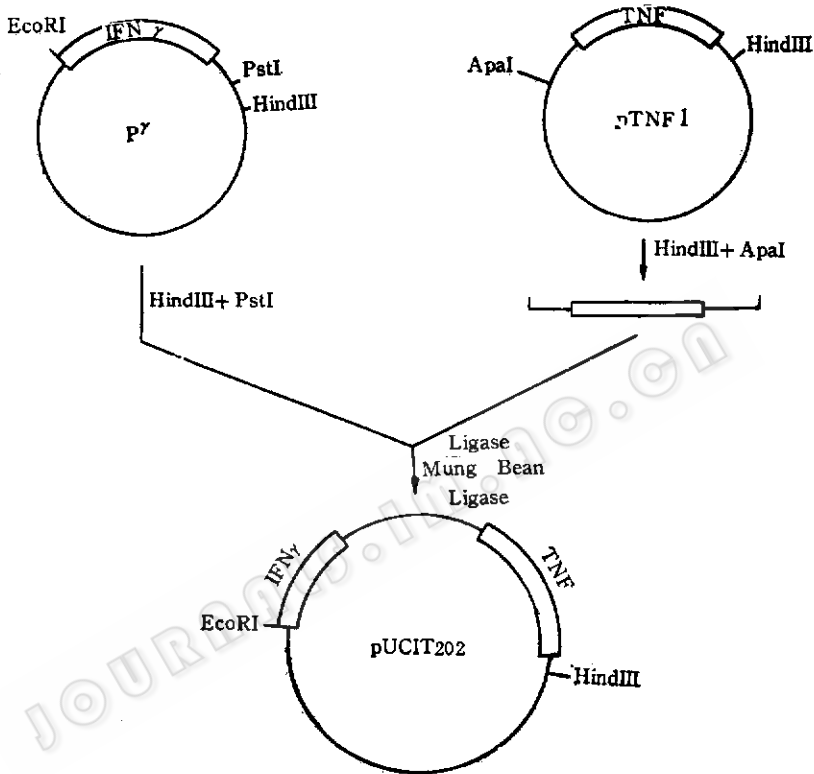


图 1 TNF-IFN- γ 串联基因的构建

Fig.1 Construction of tandem TNF-IFN- γ gene

采用两种基因定位突变方法：BioRad 提供的 MUTA-GENE 药盒，即 CJ236-T4DNA 聚合酶系统以及经典的 JM-103-Kleno 突变系统，以 M13 mp IT19 分别感染 JM103 及 CJ236，获得 M13mpIT19 的正常单链及含 U 单链。以这两种单链为模板分别与人工合成的寡核苷酸引物退火。引物为人工合成的 27 个核苷酸：5' CGAAG-A G CATCCATGGTCAGATCATCT 3'，其中 5' 端 12 个核苷酸与 IFN- γ cDNA 的 3' 端互补，3' 端的 12 个核苷酸与 TNF cDNA 的 5' 端互补，中间为 ATG。引物两端跨

越 IFN- γ 和 TNF 之间 480 个核苷酸。JM103-Klenow 突变系统采用 M13mpIT19 正常单链与 M13mp19 EcoR I -Hind III 酶切大片段以及突变引物同时退火形成缺口双链。在各种底物存在下，以大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段延伸补平缺口(图 2B) Bio-Rad 试剂盒突变系统用含 U 单链的与 M13mpIT19 突变引物退火形成部分杂交双链，在各种底物存在下，用 T4DNA 聚合酶延伸(图 2A)。合成反应在室温中进行 3—4h。分别用含突变体的合成反应液转化 JM103 及 MV1190 宿主菌。

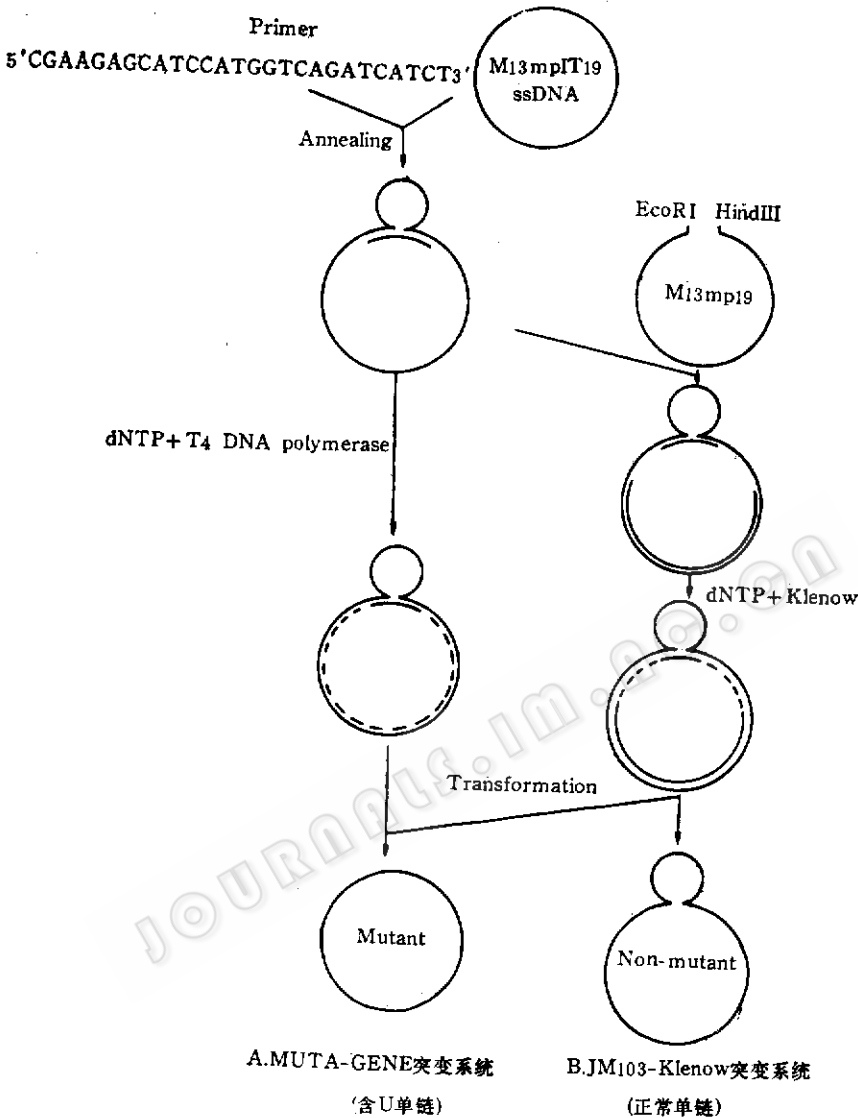


图2 寡核苷酸指导下的定位基因缺失突变

Fig.2 Site-specific gene deletion using oligonucleotide-directed mutagenesis

突变体的筛选用寡核苷酸引物杂交筛选、Nco I 酶切、EcoR I -Hind III 片段凝胶电泳, 最后用 DNA 序列分析确定突变结果。结果表明, U-DNA 单链模板突变系统的突变产率比 JM103-Kleno 系统突变产率高约 6 倍。DNA 序列分析结果证明, 采用此方法可以准确地删除了 TNF 基因上游非编码区及信号多肽序列, 获得了以 Nco I 酶切位点开始的去信号肽的 TNF

cDNA(图版 I - 2), 即 M13mpIT892。

(二) 人重组 TNF 高效表达载体的组建

从突变体 M13mpIT892 切下 0.6kb 的 Nco I -Hind III TNF cDNA 片段, 用 kleno 补平后插入 pUC19Hinc II 位点, 得到 pUCTNF8, 恢复了 TNF 基因 5' 端的 Nco I 位点。分别以 Nco I -Pst I 与 EcoR I -Pst I 切下其中 TNF 基因片段, 插入表达

载体pBV220的EcoR I -Pst I位点，得到两种表达质粒pBVTNF202及pBVTNF1，其中前者SD序列与ATG之间的序列为

TAAGGAGGAATTCA TG，而后者为TAAGAAGGAATTCGAGCTCGGTACC CGGGGATCCTCTAGAGTCCATG比前

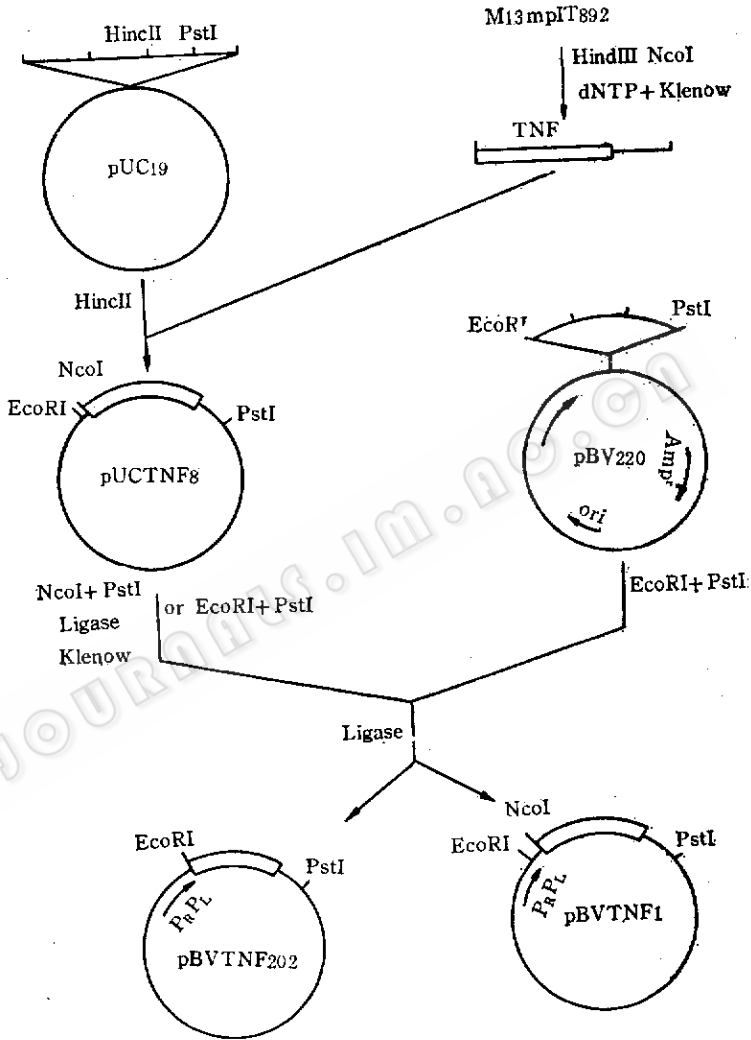


图3 肿瘤坏死因子表达质粒的构建

Fig.3 Construction of the expression plasmid for TNF

者多31个核苷酸(图3)。

(三) 人重组TNF在大肠杆菌中的表达及SD-ATG间的距离对表达的影响

用上述两种表达质粒转化宿主菌DH5α，得到的表达菌株分别经30℃培养，42℃诱导后：盐酸胍裂解细菌，

17000r/min，离心10min，检测上清液对L929细胞的细胞毒性。结果表明，DH5α/pBVTNF202的细菌裂解上清对L929细胞有很明显的细胞毒性，其活性可达 3.42×10^8 u/L菌液，而表达菌DH5α/pBVTNF1细菌裂解液上清TNF滴度比pBVTNF202

参 考 文 献

- [1] Mannel, D. N. et al.: *Infect. Immun.*, 33:156, 1981.
 [2] Old, L. J. et al.: *Science*, 230:630, 1985.
 [3] Sugerman, B. J. et al.: *Science*, 230:943, 1985.
 [4] Carswell, E. A. et al.: *PNAS*, 72: 3666, 1975.
 [5] Pennica, D. et al.: *Nature*, 312:724, 1984.
 [6] Wang, A. M. et al.: *Science*, 228:149, 1985.
 [7] Wong, G. H. W. et al.: *Nature*, 323:819, 1986.
 [8] Trinchieri, G. et al.: *J. Exp. Med.*, 164:1206, 1986.
 [9] Wedgwood, J. F. et al.: *Cell Immunol.*, 111:1, 1988.
 [10] Chen, L. et al.: *J. Immunol.*, 139:4096, 1987.
 [11] Marquet, R. L. et al.: *Int. J. Cancer*, 40:550, 1987.
 [12] Lewis, G. et al.: *Cancer Res.*, 47:5382, 1987.
 [13] 张智清等: 病毒学报, 4(3):97, 1988.
 [14] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. 1982.
 [15] 侯云德: 病毒基因工程原理及方法, 人民卫生出版社, 北京, 1985.
 [16] Aggarwal, B. B. et al.: *J. Biol. Chem.*, 260:2345, 1985.
 [17] Laemmli, U. K.: *Nature*, 227:680, 1970.
 [18] Jacob, C. O. et al.: *Nature*, 331:356, 1988.
 [19] Wong, G. H. W. et al.: *J. Immunol.*, 140:120, 1988.
 [20] Whitehorn, E. A. et al.: *Gene*, 36:375, 1986.
 [21] Cerami, A. et al.: *Immunol. Today*, 9:28, 1988.

HIGH EXPRESSION OF α -TUMOR NECROSIS FACTOR IN *ESCHERICHIA COLI* USING SITE-SPECIFIC DELETION MUTAGENESIS

Zhang Dezhen* Wu Shuhua Zhang Zhiqing Jin Qi Zhao Xinhua
 Zhao Xiaoxia Su Chengzhi* Hou Yunde
 (National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Beijing)

Using the oligonucleotide-directed site specific mutagenesis technique, a TNF-cDNA coding 157 amino acids without signal sequence and initiated with ATG was obtained. Sequencing data showed the precise deletion and insertion of the DNA fragment as designed. The obtained TNF cDNA without signal coding sequence was expressed in *E. coli* with a expression vector pBV220. The expression level reached 10^8 units per liter culture. The scanning of the SDS-PAGE gel showed that the amount of the expressed TNF is about 22.8% of total bacterial proteins. The TNF activity can be neutralized with TNF monoclonal antibody.

Key words

Tumor necrosis factor; oligonucleotide-directed deletion-insertion mutagenesis

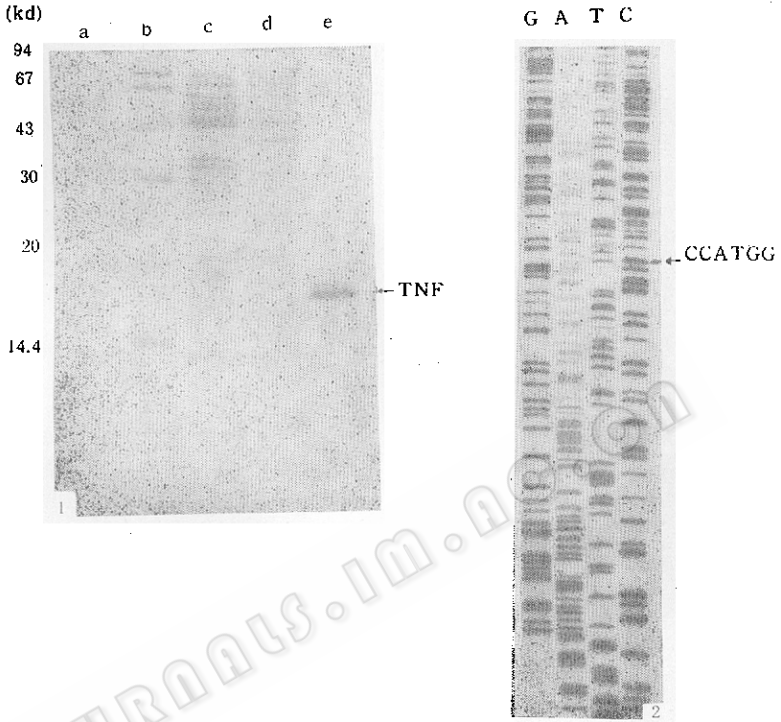
* Department of Biochemistry, Fourth Military Medical College, Xian,

张德震等：采用定位基因缺失突变技术在大肠杆菌中高效表达肿瘤坏死因子

图版 I

Plate I

Zhang Dezhen et al.: High expression of α -tumor necrosis factor in *Escherichia coli* using site-specific deletion mutagenesis



1. 肿瘤坏死因子cDNA表达产物的SDS-PAGE电泳

The SDS-PAGE of the tumor necrosis factor expressed in *E. coli*. a. DH5 α /pTNF1

b. Standard MW proteins c. DH5 α d. DH5 α /pBV220 e. DH5 α /pBVTNF202

2. TNF cDNA突变体的DNA序列分析

DNA sequencing of the TNF cDNA mutant

史瀛仙等：转基因小鼠的研究

图版 I

Plate I

Shi Yingxian et al.: The genetic analysis of transgenic mice

