

# 人 $\alpha$ 型肿瘤坏死因子基因在昆虫细胞中的表达

李晓平 李元 刘菊萍 吴旻\*

(中国医学科学院医药生物技术研究所 北京 100050)

(中国医学科学院肿瘤研究所 北京 100021)\*

**摘要** 将人肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) cDNA 片段克隆到转移载体 pAc610 上, 然后与苜蓿尺蠖核型多角体病毒 (Autographa californica Nuclear Polyhedrin Virus, AcNPV) DNA 共转染草地贪夜蛾细胞 (*Spodoptera frugiperda*) Sf21, 获得含 hTNF- $\alpha$  基因的重组病毒。以 L929 细胞毒方法测得重组病毒感染 Sf21 细胞 72 小时时的表达量最高, 为  $1.0 \times 10^4$  u/10<sup>6</sup> 细胞; 同时, 培养液中小牛血清浓度对 hTNF- $\alpha$  表达量有较大影响, 当浓度为 6% 时 hTNF- $\alpha$  表达量最高, 感染 72 小时表达量可达  $5.2 \times 10^4$  u/10<sup>6</sup> 细胞, ELISA 实验结果证明其产物确为 hTNF- $\alpha$ 。

**关键词** 肿瘤坏死因子  $\alpha$  基因, 杆状病毒, 草地贪夜蛾细胞, 基因表达

肿瘤坏死因子  $\alpha$  是一种多功能的细胞因子<sup>[1]</sup>, 具有抗肿瘤、抗病毒和免疫调节等多种生物活性<sup>[2]</sup>, 对正常组织细胞无明显的毒性作用<sup>[3]</sup>, 有着广阔的临床应用前景。目前, 国内外已成功地在 大肠杆菌、链霉菌、酵母细胞和猴 COS 细胞中表达了 hTNF 基因<sup>[4-7]</sup>。昆虫杆状病毒表达系统有不少优点<sup>[8,9]</sup>, 该系统为生产有实用价值的真核基因产品开创了新的途径。本文利用该系统成功地克隆表达了 hTNF- $\alpha$ 。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒、细胞与质粒

1.1.1 AcNPV、Sf21 细胞和 L929 细胞由本所保存。

1.1.2 质粒 pHT1 (插入有 hTNF- $\alpha$  cDNA 基因片段); 由吴旻教授赠给; 转移载体 pAc610 由本所保存。

### 1.2 工具酶及其它试剂

限制酶、DNA 多聚酶 I (Klenow) 和缺刻翻译试剂盒为 Boehringer 公司产品; T4 DNA 连接酶为 BRL 公司产品; Grace's 培养基、TC Yeastolate, Lactalbumin hydrolysate 为 J. Science 公司产品; 小牛血清为浙江衢县产品; 抗人 TNF 单克隆抗体 E<sub>6</sub> 和 T<sub>5</sub> 为军事医学科学院四环公司产品; 兔抗鼠 IgG (碱性磷酸脂酶) 为 Sigma 公司产品。

### 1.3 方法

1.3.1 质粒 DNA 的制备及 Southern 杂交: 按 Sambrook 实验手册进行, 见文献 [10], 受体菌为 *E. coli* DH-5 $\alpha$ 。

1.3.2 TNF cDNA 片段的制备及与载体的连接: 将含有 TNF cDNA 片段的质粒 pHT1 用 Hind III 酶切, 并用 Klenow 大片段酶修补成平端, 再用 EcoRI 酶切分离得到 hTNF-

cDNA 片段 (一端为 HindIII 位点, 另一端为平端); 将转移质粒 pAc610 用 XbaI 酶切, 并用 Klenow 大片段酶修补成平端, 再用 EcoRI 酶切, 然后与 hTNF- $\alpha$  cDNA 片段进行连接。

**1.3.3 病毒 DNA 的制备、细胞培养和共感染:** 按 Summers 实验手册进行, 见文献 [11]。用于 Sf21 细胞培养的基本培养液为 TNM-FH (g/L: Grace's 46.4, TC Yeastolate 3.3, Lactalbumin hydrolysate 3.3, pH6.1), 并加入 10% 小牛血清和 1% 抗生素溶液 (卡那霉素、青霉素、链霉素各  $10^3$  u/ml)。Sf21 细胞于 28℃ 恒温培养。共转染采用  $2 \times 10^6$  细胞接种于 25cm<sup>2</sup> 培养瓶。1 小时后吸去培养液, 加入含 1 $\mu$ g AcNPV DNA, 2 $\mu$ g 重组质粒 pAc610-hTNF- $\alpha$ , 0.75ml Grace's 培养液和 0.75ml 转染缓冲液 (25mmol/L HEPES pH7.1, 140mmol/L NaCl, 125mmol/L CaCl<sub>2</sub>) 的混和液, 培养 4 小时, 吸去混和液, 换成新的培养液于 28℃ 培养 3 天后收集共转染上清液。

**1.3.4 重组病毒的筛选和纯化:** 共转染上清液采用斑点杂交方法<sup>[12]</sup>筛选重组病毒, 再采用斑点杂交和病毒稀释方法<sup>[11]</sup>纯化重组病毒。

**1.3.5 表达产物的检测:** 用纯化的重组病毒感染 Sf21  $3 \times 10^6$  细胞/瓶 1 小时, 吸去病毒液, 加入 5ml 培养液于 28℃ 培养。取感染后的细胞, 用磷酸缓冲液 PBS (g/L: NaCl 8, KCl 0.2, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24, pH7.4) 洗 2 次, 最后溶于 1ml PBS, 用冻融法破细胞, 经 10 000r/min 离心 5 分钟, 取细胞裂解上清液检测 hTNF- $\alpha$ 。L 929 细胞毒法测定 hTNF- $\alpha$  活性: 采用在放线菌素 D 存在下, TNF 对 L929 细胞的细胞毒方法<sup>[13]</sup>。以杀死 50% L929 细胞的 TNF 量为一个活性单位。ELISA 实验: 以硝酸纤维素膜为支持物, E<sub>0</sub> 和 T<sub>0</sub> 单克隆抗体为一抗, 兔抗鼠为二抗进行 ELISA 实验, 定性检测表达产物 hTNF- $\alpha$ 。

**1.3.6 基因表达产物与感染时间的关系:** 重组病毒感染 Sf21 细胞后, 在不同的感染时间 24、48、72、96 和 120 小时分别取细胞裂解上清液检测 hTNF- $\alpha$  活性。

**1.3.7 小牛血清浓度对基因表达产物的影响:** 重组病毒感染 Sf21 细胞后, 分别加入不同浓度小牛血清 (0%、2%、4%、6%、8% 和 10%) 的培养液, 在感染时间为 72 小时时分别取细胞裂解上清液检测 hTNF- $\alpha$  活性。

## 2 结果和讨论

### 2.1 含 hTNF- $\alpha$ 基因的重组质粒的构建

重组质粒 pAc610 hTNF- $\alpha$  的构建如图 1 所示。将 TNF cDNA 片段与载体连接的重组质粒 (见方法 2) 转化至大肠杆菌, 经菌落原位杂交筛选出重组质粒。因为重组质粒的平端连接后恢复其 XbaI 酶切位点, 所以以 EcoRI-XbaI 双酶切对重组质粒进行鉴定, 证明 hTNF- $\alpha$  基因片段正确地插入到 pAc610 上 (图版 I-A)。

### 2.2 重组病毒的确定

将重组质粒 pAc610-hTNF- $\alpha$  与野生型 AcNPV DNA 共转染 Sf21 细胞, 以斑点杂交方法筛选重组病毒, 并辅以病毒稀释法纯化得到重组病毒 AcV-hTNF- $\alpha$ 。

重组病毒分别以 XbaI 和 BamHI 酶切进行电泳, 转至硝酸纤维素膜上, 以 hTNF cDNA 为探针进行 Southern 分子杂交, 结果见图版 I-B、C。

经与野生型 AcNPV DNA 酶切图谱进行分析，可以确定 hTNF- $\alpha$  基因同源重组取代了多角体病毒 Polyhedrin 基因。

### 2.3 hTNF- $\alpha$ 基因表达的定性分析

**2.3.1 利用 L929 细胞毒方法测定 hTNF- $\alpha$  活性及感染时间对基因表达水平的影响：**按前述方法进行共转染，并筛选获得重组病毒，将转染细胞于 28 $^{\circ}$ C 进行不同时间的培养，制备细胞裂解上清液进行 hTNF- $\alpha$  的活性测定，结果见图 1。由图 1 可以看出，重组病毒感染 Sf21 后在 72 小时 hTNF- $\alpha$  表达量最高，为  $1.0 \times 10^4 \text{ u} / 10^6 \text{ cells}$ ，此后 hTNF- $\alpha$  在细胞中的活性下降，说明细胞开始裂解，hTNF- $\alpha$  开始释放到培养基中，这与野生型 AcNPV 的 Polyhedrin 基因的表达情况一致，说明了 hTNF- $\alpha$  基因表达受多角体病毒 Polyhedrin 的启动子的控制。

**2.3.2 小牛血清浓度对基因表达水平的影响：**以上述方法进行重组病毒 AcV-hTNF- $\alpha$  对 Sf21 的感染，培养液加入不同浓度小牛血清，结果如图 2 所示，小牛血清浓度对重组病毒的 hTNF- $\alpha$  基因表达影响较大，在小牛血清浓度为 6% 时，hTNF- $\alpha$  基因的表达量最高，达到  $5.2 \times 10^4 \text{ u} / 10^6 \text{ cells}$ ，是 10% 小牛血清浓度的 5 倍。

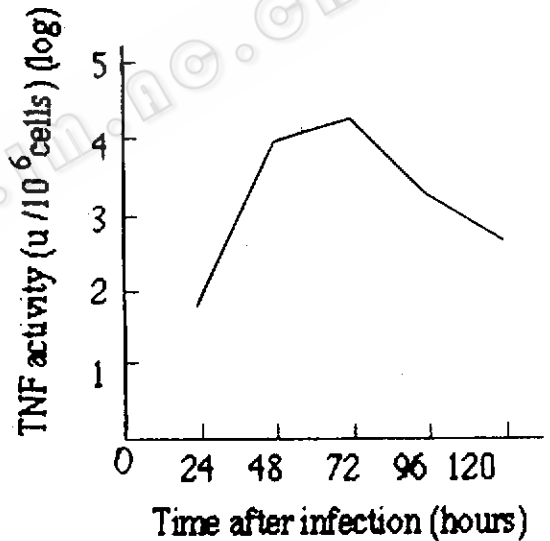
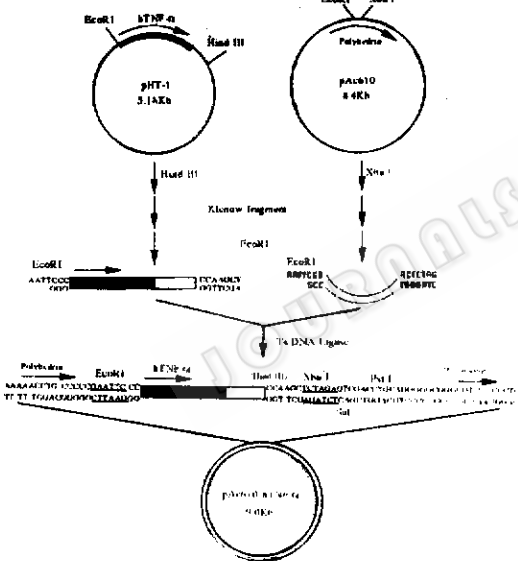


图 1 重组病毒 AcV-hTNF- $\alpha$  感染的 Sf21 细胞经不同时间测定的 hTNF- $\alpha$  活性

图 2 小牛血清浓度对 hTNF- $\alpha$  表达量的影响

Fig. 1 hTNF- $\alpha$  activity in Sf21 cells infected with the recombinant virus AcV-hTNF- $\alpha$  at various times

Fig. 2 Effect of FBS concentration on hTNF- $\alpha$  gene expression in AcV-hTNF- $\alpha$ -infected Sf21 cells

**2.3.3 ELISA 实验：**以硝酸纤维素膜为支持物，取重组病毒 AcV-hTNF- $\alpha$  感染 Sf21 后 72 小时时的细胞裂解上清液进行 ELISA 实验，结果见图版 I-D、E。结果表明，表达产物与标准 hTNF- $\alpha$  有同样的抗原抗体的免疫反应，证明其表达产物与标准 hTNF- $\alpha$  在免疫学性质上是一致的。此外对表达产物也进行 Western 杂交，与 ELISA 实验结果相同(图略)。因此可以确认表达产物为 hTNF- $\alpha$ 。

上述实验结果表明，我们已经获得了含有 hTNF- $\alpha$  基因的重组病毒，在昆虫细胞中

的表达产物经 ELISA, Western 杂交实验确证为 hTNF- $\alpha$ , 表达水平与感染细胞的培养时间及培养液中小牛血清浓度有关。结果表明, 以 72 小时、小牛血清浓度为 6% 时最好, 表达水平达到  $5.2 \times 10^4 / 10^6$  细胞。

近年来, 国内外采用昆虫为表达体系已经进行了不少外源基因的成功克隆和表达<sup>[9]</sup>, 但是目前只有 TNF- $\beta$  克隆表达的报道<sup>[14]</sup>, 未见有 TNF- $\alpha$  的报道, 因此本工作首次报道了 TNF- $\alpha$  基因在昆虫体系的成功克隆和表达。目前我们正在进行分泌性表达和进一步提高表达水平的研究。表达产物的纯化正在进行中。

### 参 考 文 献

- [1] Mannel D N *et al.* Infect Immun. 1981, 33: 156.
- [2] Old L J *et al.* Science, 1985, 230: 630.
- [3] Sugeran B J *et al.* Science, 1985, 230: 943.
- [4] Chang S Y *et al.* In: Biology of Actinomycetes'88, Okami Y ed., Japan Scientific Societies Press, Tokyo, 1988, p. 103.
- [5] Marmenout A *et al.* Eur J Biochem, 1985, 152: 515.
- [6] Pennica D *et al.* Nature, 1984, 312: 724.
- [7] Sreekrishna K *et al.* Biochem, 1989, 28: 4117.
- [8] Luckow VA. *et al.* Bio-Technology, 1988, 6: 47.
- [9] Luckow VA. In: Recombinant DNA Technology and Applications, Prokop A *et al.* ed., McGraw-Hill Inc., New York, 1990, p. 97.
- [10] Sambrook J *et al.* Molecular Cloning, A Lab Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Lab, New York, 1989.
- [11] Summer M D *et al.* A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A & M University, Texas, 1987.
- [12] Pen J. Nucleic Acids Research, 1989, 17: 451.
- [13] Stone-Walff D S *et al.* J Exp Med, 1984, 159: 828.
- [14] Chai H *et al.* Fourth International Symposium & Workshop, SCBA, Singapore, 1992, p. 160.

## Expression of Human TNF- $\alpha$ Gene in Insect Cells Sf21

Li Xiaoping Li Yuan Liu Juping Wu Min\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050)

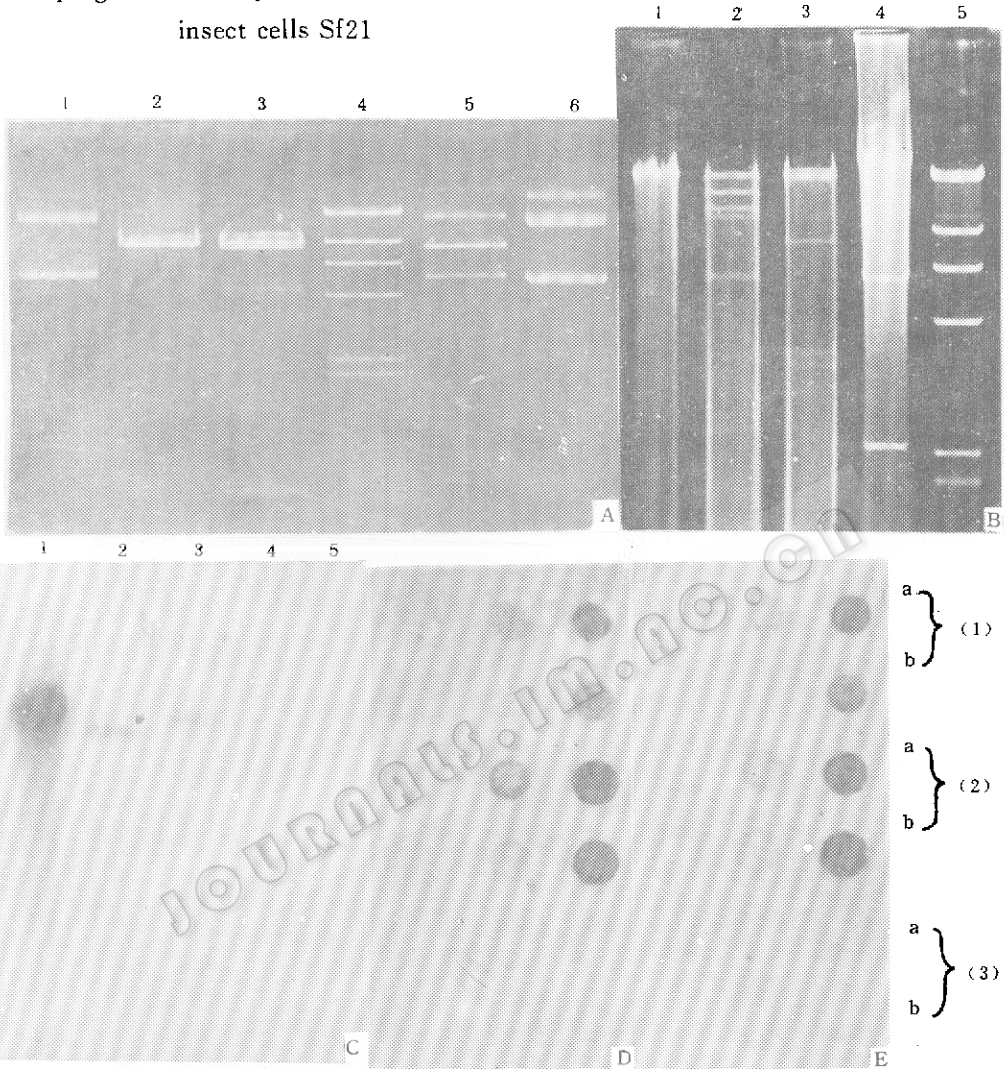
(Institute of Oncology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

**Abstract** A cDNA fragment coding human tumor necrosis factor  $\alpha$  (hTNF- $\alpha$ ) was inserted into the vector pAC610. The Sf21 cells (*Spodoptera frugiperda* 21) were co-transfected with pAC610-hTNF- $\alpha$  and AcNPV DNA (Autographa californica Nuclear Polyhedrin Virus DNA). The resultant recombinant virus was screened by dot hybridization and purified by plaque formation technique. TNF- $\alpha$  activity was measured by L929 cytotoxic assay. The highest expression level,  $5.2 \times 10^4 / 10^6$  cells, was given at 72 hours after infection and with 6% FBS in medium. ELISA tests showed that the product expressed in hTNF- $\alpha$ .

**Key words** Tumor necrosis factor  $\alpha$ , baculovirus, *Spodoptera frugiperda* 21 cells, gene expression

季晓平等：人 $\alpha$ 型肿瘤坏死因子基因在昆虫细胞中的表达  
 Li Xiaoping *et al.* : Expression of human TNF- $\alpha$  gene in  
 insect cells Sf21

图版 I  
 Plate I



A. Agarose gel electrophoresis of digested pAc610-hTNF- $\alpha$  with EcoRI/XbaI  
 1. pAc610-hTNF- $\alpha$ , 2. pAc610-hTNF- $\alpha$ +EcoRI,  
 3. pAc610-hTNF- $\alpha$ +EcoRI+XbaI,  
 4.  $\lambda$ DNA+Hind III, 5. pAc610+EcoRI, 6. pAc610

B and C Southern hybridization

B. Agarose gel electrophoresis before hybridization

C. Autoradiography of hybridization patterns

1. AcV-hTNF- $\alpha$  total DNA, 2. AcV-hTNF- $\alpha$ +XhoI  
 3. AcV-hTNF- $\alpha$ +BamHI, 4. AcV-hTNF- $\alpha$ +KpnI  
 5.  $\lambda$ DNA+HindII

D, E. ELISA experiment

D. First Antibody is monoclonal antibody E<sub>6</sub>

E. First Antibody is monoclonal antibody T<sub>5</sub>

a. Sample not treated (from left to right, samples volume increase consecutively in proportion of 1 : 5)

b. Sample treated at 100 C for 3 minutes (from left to right, samples volume increase consecutively in proportion of 1 : 5)

(1) The supernatant of Sf21 cells lysis infected by AcV-hTNF- $\alpha$

(2) TNF

(3) The supernatant of Sf21 cells lysis no infected by AcV-hTNF- $\alpha$