

研究报告

一种新型人 TNF 表达质粒的构建
及在大肠杆菌中的高表达*

何晓龙** 常金丽 蔡武城 喻 红

吕 群 赵寿元 王成海** 林葆城** 朱鹤年**

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

摘要 在详细分析 TNF 结构及前人有关 TNF 结构与功能关系研究的基础上, 应用 PCR 技术构建了一种新型人肿瘤坏死因子 (TNF) 分子的编码基因, 并将该编码基因插入表达质粒, 转化大肠杆菌, 通过温度诱导获得了高表达。活性测定的结果表明, 新型人 TNF 对 L929 细胞的细胞毒活性较原型人 TNF 升高了 10^3 数量级。

关键词 肿瘤坏死因子, 多聚酶链反应, 基因突变

肿瘤坏死因子 (TNF) 是具有多种生物学活性的细胞因子, 它对肿瘤组织和肿瘤细胞的特异杀伤作用, 使其有望成为临床上理想的抗癌药物^[1]。但是, 初步的临床试验表明, TNF 有很严重的毒副作用^[2], 克服这些毒副作用是使 TNF 广泛用于临床的前提。应用基因工程的手段对 TNF 分子进行某些改造, 增加其抗肿瘤活性, 降低毒副作用, 是解决这个问题一个办法。我们在详细分析了 TNF 分子的结构及前人有关 TNF 结构与功能关系的研究结果的基础上, 采用 PCR 技术, 构建了一个新型人 TNF 分子的编码基因, 并在大肠杆菌中得到了高表达。

1 材料与方法

1.1 菌种及试剂

原型人 TNF 表达质粒 pRL-hTNF 由李昌本等人构建^[3], JM103, MV1184 大肠杆菌菌株为本所冻存; 各种工具酶分别购自 Biolabs, pharmacia 及华美生物工程公司。L929 细胞为本所传代保存。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 引物的合成 采用亚磷酰胺法在 ABI Applied Biosystem 公司的 DNA 合成仪上合成。此工作委托中国科学院上海细胞生物学研究所完成。共合成两个引物: 引物 1 为 5' GCCATATGCGCAAACGTAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCCTCA 3', 该引物有一个 Nde I 酶切位点, 在起始密码子后紧接 Arg Lys Arg 的密码子, 其后是天然人 TNF 分子 11 位以后的氨基酸编码序列; 引物 2 为 5' CCGGAATTCTCAGAAGGCAATGATCCCAAAGTA 3', 该引物将天然人 TNF157 位的 Leu 密码子改为 Phe 密码子, 其余为天然人 TNF C 端编码序列的互补序列, 含有终止密码子及 EcoR I 酶切位点。

1.2.2 PCR 用复旦大学提供的 FDDK-I DNA 扩增试剂盒 I 进行。以原型人 TNF 的表达质粒 pRL-hTNF 作为扩增的模板。

*国家自然科学基金和“863”计划资助项目。

**第二军医大学神经生物学教研室。

收稿日期: 1993-04-05, 修回日期: 1993-11-02

1.2.3 扩增片段的克隆及表达 将PCR扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,低熔点琼脂糖回收扩增的DNA片段,然后用Nde I和EcoR I进行双酶切,并与用同样两种酶酶切过的表达载体pJLA503进行连接,转化JM103宿主菌,筛选含有所需插入片段的转化子,按文献所述进行诱导表达^[3].

1.2.4 表达产物的分离纯化及活性检测 分离纯化参照文献[3]进行.表达产物的活性检测采用在放线菌素D存在情况下,对L929细胞的细胞毒性方法^[4].96孔板每孔加L929细胞 2×10^4 ,培养24h后加入 $1 \mu\text{g/ml}$ 放线菌素D及不同稀释度的菌体超声上清或纯化的TNF,24h后观察细胞的杀伤情况,以杀伤50%细胞时的TNF的量作为一个活性单位.蛋白质的定量采用Lowry's法^[5].

1.2.5 扩增片段的序列测定 将已插入表达载体的扩增片段亚克隆进pUC118和pUC119质粒的Sma I和EcoR I位点之间,按文献所述制备这两种质粒的单链^[6],用Pharmacia T7测序盒进行DNA的序列测定.

1.2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 按Laemmli的方法进行^[7].浓缩胶浓度为5%,分离胶为15%—17%,电压150V.考马斯亮蓝R250染色.

2 结 果

2.1 PCR扩增片段

用引物1和2扩增出了一长470碱基对的DNA片段.图1为PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳.



图1 PCR扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

左: 扩增产物;
右: Hind III DNA.

胶电泳的结果.该片段编码的氨基酸序列与原型人TNF分子相比,在N端缺失了7个氨基酸,且将原型人TNF8,9,10位的Pro Ser Asp改为Arg Lys Arg,157位的Leu改为Phe.这种新型人TNF(命名为hTNFD3)不算起始氨基酸Met,全长150个氨基酸.扩增的DNA片段不含原型人TNF的3'非翻译区.

2.2 hTNFD3表达质粒的构建

上述PCR扩增产物经Nde I和EcoR I双酶切后,插入表达载体pJLA503的多克隆位点区的Nde I和EcoR I之间,新的质粒命名为phTNFD3.构建好的质粒再经Nde I和EcoR I双酶切鉴定,表明含有所需的插入片段.该插入片段比pRL-hTNF中TNF的cDNA短了130个碱基(见图2).



图2 phTNFD3的鉴定

1: phTNFD3;
2: pRL-hTNF;
3: Hind III DNA.

2.3 hTNFD3在大肠杆菌内的高效表达

将上述构建好的质粒转化进JM103宿主菌,经温度诱导表达后,超声破碎菌体,离心取上清进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳.结果表明,phTNFD3的表达量较pRL-hTNF高一倍以上.薄层扫描显示前者hTNFD3的表达量占菌体总蛋白的30%,后者TNF只占总蛋白量的13%.电泳结果见图3.

2.4 TNF的纯化及比活性比较

发酵菌体经超声破碎后,通过对超声上清进行盐析、层析等一系列分离纯化步骤,可获得纯度达95%以上的重组人TNF及hTNFD3.测定纯化产物对L929细胞的细胞

毒活性及蛋白质含量, 算出原型人 TNF 及 hTNFD3 的比活性, 结果见表 1. 结果表明, hTNFD3 的比活性较原型人 TNF 要高 10^3 数量级.

型人 TNF 作了三处改变, 所得的 hTNFD3 的编码序列与预期的完全一致.

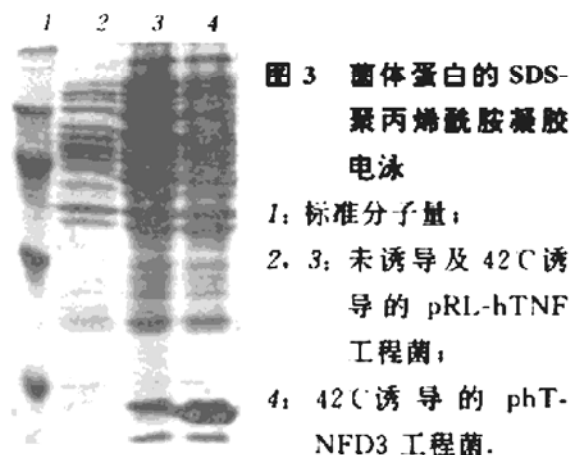


图 3 菌体蛋白的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1: 标准分子量;
2, 3: 未诱导及 42°C 诱导的 pRL-hTNF 工程菌;
4: 42°C 诱导的 pH-TNFD3 工程菌.

表 1 原型人 TNF 与 hTNFD3 的比活性比较

蛋白质	特异活性/ (U/mg)
原型人 TNF	1.563×10^7
hTNFD3	5.010×10^{10}

2.5 hTNFD3 编码序列的测定

采用双脱氧末端终止法测定的 hTNFD3 的编码序列见图 4. 测定结果表明, hTNFD3 的编码序列在原型人 TNF cDNA 的基础上发生了预期的改变, 引物的合成及 PCR 扩增均未出现差错.

3 讨 论

3.1 PCR 技术用于基因改造

PCR 的出现被誉为是分子生物学领域的一次技术革命, 它使得一些以往比较难进行的工作变得很容易. 对基因进行改造即是一个例子. 以往这方面的工作主要应用寡核苷酸定位诱变、酶切拼接等技术, 不仅费时、费力, 有特殊的实验条件要求, 而且成功率也不高^[8]. 应用 PCR 技术则简便易行, 而且一次 PCR 反应可以同时多个部位的诱变. 国内外这方面已有不少报道^[9]. 我们实验的结果也充分显示了 PCR 技术的这些优点, 一次 PCR 同时对原

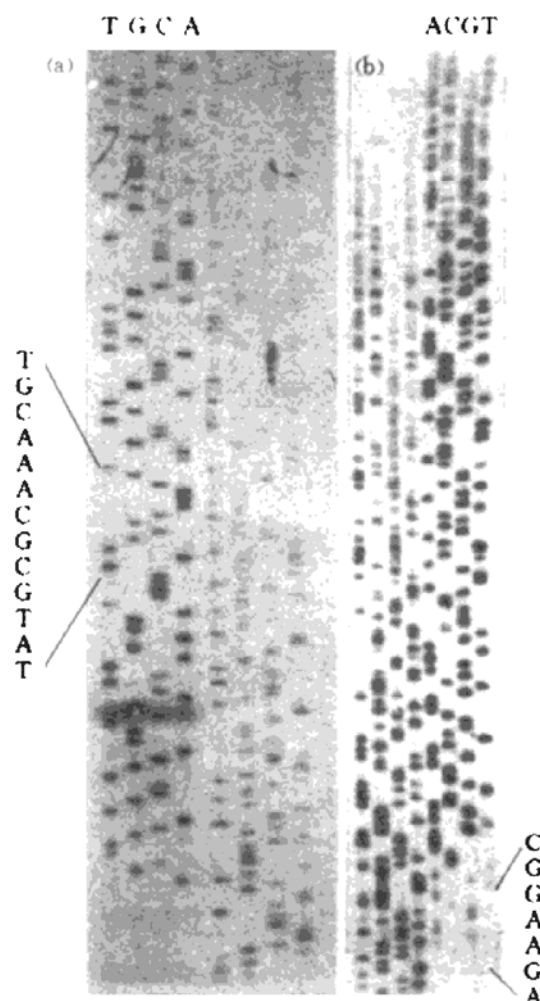


图 4 TNF 衍生物编码序列的测定

(a) 改变 N 末端的编码序列; (b) 改变 C 末端的编码序列.

3.2 hTNFD3 的表达量较原型人 TNF 高一倍以上, 其原因可能与起始码后的 DNA 序列有关. hTNFD3 的编码序列与 pRL-hTNF 中原型人 TNF cDNA 相比, 缺失了 21 个碱基对, 另有三个氨基酸的密码子不同. 起始码后的序列如何影响外源基因在大肠杆菌中的表达, 详细机制目前尚不完全明了. 有人认为, 翻译的效率与起始码周围核酸序列形成的二级结构是否有利于核糖体进入起始码部位有很大关系^[10]. 虽然 hTNFD3 的编码序列还缺失了原型人 TNF cDNA 中的 3' 非翻译区, 但这似乎对表达量的提高没有作用, 因同样缺失了 3' 非翻译区的原型人 TNF 表达量并无改变 (结

果未显示)。

3.3 hTNFD3 与原型人 TNF 相比, 比活性升高达 10^3 数量级, 这比单独缺失 N 端的氨基酸或单独将 157 位 Leu 改为 Phe 引起的活性升高都要大^[11,12], 其原因可能是 hTNFD3 形成的三聚体更稳定, 更有利于与 TNF 受体的结合。上述结果也提示, 多种增强 TNF 活性的突变有叠加效果。hTNFD3 是否达到了 TNF 作用的极限, 是否还有活性更强的 TNF 衍生物, 尚需进一步的研究。Soma 等曾报道, TNF 氨基端碱性增强可使 TNF 抗肿瘤谱扩大^[13], 因此我们将原型人 TNF8, 9, 10 位的 Pro Ser Asp 改为 hTNFD3 中 1, 2, 3 位的 Arg Lys Arg, 但目前尚未发现 hTNFD3 有更大的抗肿瘤谱 (结果未显示)。

参 考 文 献

1 Thomas H, Balkwill F R. *Pharmac Ther*, 1991; **52**: 307

- 2 Porter A G. *Trends in Biotechnology*, 1991; **9**: 158
- 3 李昌本, 柴常星, 谢毅等. *中国科学 B 辑*, 1991; (5): 497
- 4 Aggawal B B, Kohr W J, Hass P E *et al.* *J Biol Chem*, 1985; **260**: 2345
- 5 Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* *J Biol Chem*, 1951; **193**: 265
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 302
- 7 Laemmli U K. *Nature*, 1970; **227**: 680
- 8 Kramer W, Fritz H J. *Methods Enzymol*, 1987; **154**: 367
- 9 Jones D H, Howard B H. *Biotechniques*, 1991; **10**: 62
- 10 Gheysen D, Iserentant D, Derom C *et al.* *Gene*, 1982; **17**: 55
- 11 Creasey A A, Doyle L V, Reynolds M T *et al.* *Cancer Res*, 1987; **47**: 145
- 12 Kamijo R, Takeda R, Nagumo M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; **160**: 820
- 13 Soma G I, Kitahara N, Tsuji Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; **148**: 629

γ 射线诱发大鼠胚胎细胞转化与 N-ras 的激活

陈昌虎 姚开泰*

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

C. C. LING

(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, N. Y. USA)

摘要 以 γ 射线诱发转化的大鼠胚胎细胞 (REC: myc: Y33) 的 DNA 构建粘粒基因库, 用总基因库 DNA 转染 NIH/3T3 细胞, 产生转化灶的 DNA 作二轮转染, 二轮转化的 NIH/3T3 细胞内有大鼠 REC: myc: Y33 DNA 中具转化活性的 N-ras 基因, 用不对称 PCR 和 DNA 序列分析法证明, REC: myc: Y33 细胞中鼠 N-ras 的活化是由于第 61 位密码子的 A→G 点突变。NIH/3T3 转化灶中鼠 N-ras 也有同样点突变, 但 NIH/3T3 细胞的内源性 N-ras 基因则无此突变。

关键词 γ 射线, 鼠胚胎细胞转化, N-ras 基因活化

流行病学调查及动物实验证实, 放射线能够引发人及动物肿瘤。但其引发肿瘤的分子机理至今未明。自从发现了瘤基因和抑瘤基因, 人们推测放射线致瘤可能涉及某些瘤基因的激活及抑瘤基因的失活^[1], 且有人在放射线引发

的动物肿瘤中发现了活化的瘤基因^[2]。

在体外实验中放射线能诱发某些细胞的恶性转化, 但仍无证据说明细胞转化与特定的瘤

* 通讯联系人。

收稿日期: 1993-05-11, 修回日期: 1993-08-02

8-hydroxyguanine. fluorescence products. lipid. DNA

Apoptosis and Oncogenes. Yan Shuizhong, Zhao Xiaohang, Wu Min. (*National Lab of Molecular Oncology, Cancer Institute Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 222

Apoptosis, programmed cell death, is a natural form of cell death characterized by active participated of a cell in the process leading to its own decrepit and death. Recently studies suggested that apoptosis is a result from a set of discrete cellular events that are regulated by a cascade gene expression. Oncogenes and tumor suppressor genes are involved in this regulation. Apoptosis is closely related to cancer. Failure and bolckage of apoptosis in tumor cells could therefore be the fundamental importance in contributing not only to the evasion of physiological countrols on cell numbers, but also to the resistance both to natural defenses and to clinical therapy.

Key words apoptosis, bcl-2 gene, c-myc gene, p53 gene

Construction of a Novel Human TNF Expression Plasmid and its High Expression in *E. Coli*. He Xiaolong, Chang Jinli, Cai Wucheng, Yu Hong, Lu Qun, Zhao Shouyuan, Wang Chenghai, Lin Baocheng, Zhu Henian. (*Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 225

On the basis of analysis of TNF structure and the relationship between structure and function, a novel TNF coding sequence was synthesized by PCR technique and inserted into an

expression plasmid. By temperature induction the transformed *E. Coli* with the novel TNF expression plasmid produced high yield of novel TNF, whose cytotoxic activity to L929 cell was 10^3 higher than recombinant human TNF.

Key words tumor necrosis factor, polymerase chain reaction, gene mutagenesis

Activation of N-ras Gene is Associated With γ -Radiation-Induced Transformation of Rat Embryo Cells. Chen Changhu, Yao Kaitai, C. C. LING. (*Cancer Research Institute of Hunan Medical University, Changsha 410078*). *Prog. Biochem. Biophys.* (China). 1994; **21** (3): 228

A cosmid library, constructed from DNA of the γ -radiation-transformed REC: myc cell line, designated REC: myc: Y33, was transfected into NIH/3T3 cells, yielding foci. Another round transfection of DNA from the first round focus into fresh NIH/3T3 cells produced second round foci. An active N-ras gene which originated from rat REC: myc: Y33 cells was detected in the NIH/3T3 secondary transformants. With PCR and direct DNA sequencing techniques, rat N-ras gene was found activated in the REC: myc: Y33 cells by CAA $\rightarrow$ CGA point mutation at codon 61, but not in the REC: myc cells. Also rat N-ras gene was identified as a point mutated gene in the NIH/3T3 transformants, and the endogenous N-ras gene in the NIH/3T3 recipient cells remains normal. What was found to be more interesting is that five out of six γ -radiation transformed REC: myc cell lines bear the same point mutation (CAA $\rightarrow$ CGA) indicating association of γ -radiation-induced transformation with point mutation in the N-ras gene.

Key words γ -radiation, transformation of rat embryo cells, activation of N-ras gene