

以杆状病毒为载体表达可溶性 55kD 人肿瘤坏死因子受体 *

吴南君 李 元

(中国医学科学院中国协和医科大学 医药生物技术研究所 北京 100050)

摘 要 从培养的 HeLa 细胞中提取总 RNA,通过反转录 PCR 技术,从该总 RNA 中扩增了约 530 bp 的 shTNFR55 基因的 cDNA,将 cDNA 克隆至转移载体 pAcGp67B 的多角体蛋白基因启动子的下游与转移载体构建成重组转移质粒 pAcTNFR。pAcTNFR 与杆状病毒 AcNPV 的 DNA 共转染昆虫细胞 sf9,通过同源重组形成含有 shTNFR55 基因的重组病毒。经空斑分析和 DNA 斑点杂交获得了纯化的重组病毒 AcNPV-TNFR。采用肿瘤坏死因子(TNF)敏感的 L929 细胞检测表达产物的生物学活性。结果表明表达产物可以中和 TNF 对 L929 的细胞毒性。蛋白配基印迹(Ligand blot)分析表明表达产物分子量约在 20~25kD 之间,有三条带。

关键词 杆状病毒 肿瘤坏死因子受体,昆虫细胞 表达

分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(1999)02-0108-13

肿瘤坏死因子(TNF)是由活化的巨噬细胞、单核细胞和 T 细胞等产生的一种多功能细胞因子。除了对肿瘤细胞显示细胞毒性以外,还具有其它广泛的生物学活性,如导致正常细胞增生、炎症和免疫反应调节、抗病毒反应等^[1]。体内过多地产生 TNF,可引起多种病理反应,如败血症休克、恶病质、炎症组织损伤、类风湿关节炎和其它自身免疫性疾病^[2~4]。TNF 的这些生物学功能是通过与细胞表面的二种特异性受体 TNFR55(55kD)和 TNFR75(75kD)结合后介导复杂的信号传递而实现的。其中大部分的生物学功能是由 TNFR55 介导的^[5]。可溶性的 TNFR 是由细胞表面受体经蛋白酶切割而分泌到胞外的片段,天然存在于人的体液中。可以通过和 TNF 结合而中和其活性。因此,可以用于治疗与 TNF 过量相关的疾病,如脓血症、炎症和自身免疫性疾病等^[2]。人体中天然存在的 shTNFR55 是由 171 个氨基酸组成的多肽,有三个潜在的糖基化位点,分子量约为 25~30kD^[6]。从 HeLa 细胞的总 RNA 中通过 RT-PCR 获得了 shTNFR55 基因的 cDNA,并将其插入到杆状病毒多角体基因启动子下游形成重组病毒,在昆虫细胞中得到了表达。

1 材料和方法

1.1 菌株、细胞株和载体

大肠杆菌 HB101[supE44 hsdS20 recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xy1-5 mt1-1] 本实验室保存。

HeLa 细胞由中国医学科学院基础医学研究所惠赠,37℃ 贴壁培养,培养基为 RPMI-1640 加 10% 小牛血清。昆虫细胞 sf9 由北京大学胡美浩教授惠赠,28℃ 贴壁培养,培养

* 国家自然科学基金资助课题(No. 39670841)

收稿日期:1997-08-11,修回日期:1998-06-05

基为 TNM-FH ,加 10% 小牛血清。L929 细胞由本所病毒室提供 ,37℃ 贴壁培养 ,培养基为 Eagle 's MEM ,加 10% 小牛血清。

转移载体 pAcGP67B 为本实验室保存 ,该质粒有杆状病毒多角体蛋白基因启动子。杆状病毒 AcNPV 由本实验室保存。

1.2 工具酶与试剂

限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T₄DNA 连接酶、细胞培养基、RT-PCR 试剂盒、DNA 荧光标记杂交试剂盒、蛋白质生物素标记试剂盒、肿瘤坏死因子(TNF)等为 GIBCO-BRL、Boehringer-Mannheim、医学科学院友谊公司、上海生物工程公司、Amersham、军事医学科学院邦定公司等公司产品。

1.3 总 RNA 的提取

用酸性异硫氰酸胍-酚-氯仿抽提法^[7]。

1.4 反转录和 PCR 扩增

1.4.1 引物设计 :根据已知的 55kD 人肿瘤坏死因子受体(TNFR55)基因的胞外核苷酸序列和转移载体 pACGP67B 的多克隆位点 ,合成了如下二条引物 :

5'端引物 5' - ATGGATCCGATAGTGTGTGTGCCCA - 3' 引入 BamHI 酶切位点

3'端引物 5' - ATGAATTC TTATGTGGTGCCTGAGTCC - 3' 引入 EcoRI 酶切位点及终止密码子 TAA。

1.4.2 cDNA 第一链的合成 :以提取的 HeLa 细胞总 RNA 为模板 ,参照 GIBCO-BRL 公司试剂盒说明书 ,合成 cDNA 第一链。

1.4.3 PCR 扩增 :在 50 μ L 反应体系中 ,采用 1.5mmol/L 的 MgCl₂、0.1mmol/L 的 NTP ,在 94℃ 变性 4min 后 ,开始进行循环。共进行 30 个循环 94℃ 变性 1min ,58℃ 复性 1min ,72℃ 延长 1min。30 个循环后 72℃ 再延长 10min。

1.5 重组转移质粒的构建和 cDNA 序列测定

转移载体 pAcGP67B 和 RT-PCR 产物用 BamHI 和 EcoRI 双酶切以后 ,连接 转化 *E. coli* HB101。转化子经筛选、鉴定后得到含重组转移质粒 pAcTNFR 的重组子。重组转移质粒 pAcTNFR 用 BamHI 和 EcoRI 双酶切以后 ,用低熔点胶回收 cDNA 片段 ,亚克隆至 pUC19 上。用 ABI 自动测序仪测序。

1.6 共转染及重组病毒纯化

将构建的重组转移质粒 pAcTNFR 与野生的杆状病毒 AcNPV DNA 混合 ,用改进的磷酸钙沉淀转染技术^[8]共转染昆虫细胞 Sf9。27℃ 培养 5d 以后 ,上清用终点稀释法稀释 ,感染 96 孔板上的 Sf9 细胞 ,培养 5d 后 ,96 孔板上的细胞用荧光标记的 shTNFR55 基因的 cDNA 片段作探针进行 DNA 斑点杂交。杂交阳性孔的上清液再用空斑分析法^[8]进行纯化 ,重复三次。可以得到纯化的重组病毒。

1.7 DNA 斑点杂交

重组病毒用荧光标记的 shTNFR55 基因的 cDNA 片段作探针进行检测。方法见 Amersham 公司产品手册。

1.8 表达产物生物学活性测定

用 MEN 培养基透析过的重组病毒感染的昆虫细胞培养液上清或细胞裂解液在室温

中和 TNF(10u/mL)、放线菌素 D(2μg/mL)混合 1h, 加入到已在 96 孔板上培养 24h 的 TNF 敏感细胞 L929 中。培养 20~24h, 结晶紫染色、SDS 裂解活细胞、570nm 测定光密度^[9]。表达产物的活性用 TNF 的细胞毒性抑制百分率表示。

$$\text{TNF 的细胞毒性抑制百分率} = \frac{OD(\text{TNF} + \text{表达产物}) - OD(\text{TNF})}{OD(\text{正常细胞}) - OD(\text{TNF})} \times 100$$

1.9 SDS-PAGE 及配基印迹(ligand blot)分析^[10]

分离胶浓度为 12%。上样缓冲液不加 DTT, 样品不煮沸。蛋白电泳结束以后, 将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶上转移至硝酸纤维素膜上。用 5% 脱脂牛奶 4℃ 封闭过夜, 漂洗后装入杂交袋中, 加入生物素标记的重组人 TNF, 10℃ 杂交 4h。PBS 漂洗, 硝酸纤维素膜装入新杂交袋中, 加入 1:5000 稀释的 Streptavidin-HRP, 10℃ 保温 1h。TBS 漂洗, 二氨基联苯胺显色。

2 结果

2.1 cDNA 合成

以 HeLa 细胞的总 RNA 为模板, 经反转录和 PCR 扩增, 得到一条长约 530bp 的片段。与设计一致。如图 1。

2.2 重组转移质粒的构建和 cDNA 序列测定

转移载体 pAcGP67B 和 RT-PCR 产物用 BamHI 和 EcoRI 双酶切后, 连接, 转化 *E. coli* HB101。经筛选、鉴定后得到含重组转移质粒 pAcTNFR 的重组子。重组转移质粒的构建过程见图 2, 琼脂糖凝胶电泳见图 3。从重组转移质粒 pAcTNFR 上切下的 cDNA 片段亚克隆至 pUC19 上, 经 ABI 自动测序仪测序证明, 扩增的可溶性 55kD 人肿瘤坏死因子受体基因与文献报道相符。

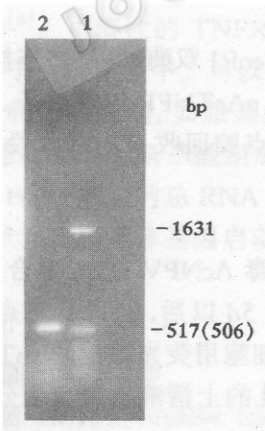


图 1 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 The agarose gel electrophoresis of RT-PCR product
1. Marker: pBR322 DNA/HinfI; 2. RT-PCR product.

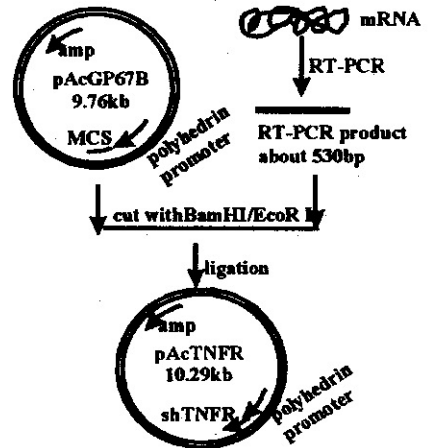


图 2 重组转移质粒 pAcTNFR 的构建过程

Fig. 2 Construction of recombinant transfer plasmid pAcTNFR

2.3 重组病毒 DNA 斑点杂交

重组转移质粒含杆状病毒多角体蛋白基因启动子,重组转移质粒 pAcTNFR 和杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞 Sf9 后,可以发生同源重组。

共转染以后的细胞上清液通过终点稀释、斑点杂交,再用空斑分析纯化三次以后得到了 70 株纯化病毒。纯化病毒再用荧光标记的 shTNFR55 基因的 cDNA 片段作探针,进行斑点杂交以进一步确证。结果显示,纯化病毒杂交结果全为阳性,证明都含有 shTNFR55 基因,都是重组病毒,命名为 AcNPV-TNFR。斑点杂交结果见图 4。

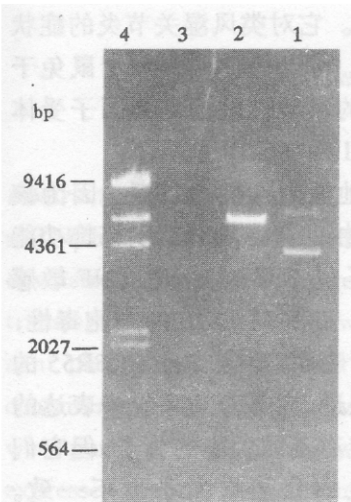


图 3 重组转移质粒 pAcTNFR 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.3 The agarose gel electrophoresis of recombinant transfer plasmid pAcTNFR

1. pAcTNFR; 2. pAcTNFR/EcoRI + BamHI;

3. PCR product; 4. λ DNA/HindIII marker.

2.4 表达产物的生物学活性测定

用重组病毒感染昆虫细胞 Sf9 三天以后的上清液和细胞裂解液进行生物学活性测定。试验结果表明,重组病毒感染昆虫细胞后的表达产物可以中和 TNF 对 TNF 敏感细胞 L929 的细胞毒性,且胞内和胞外都表达了 shTNFR55。当加入 50 μ L/孔的细胞裂解液时, TNF 的细胞毒性抑制率为 69.23%,当加入 50 μ L/孔的细胞上清液时, TNF 的细胞毒性抑制率为 31.34%。结果见图 5。

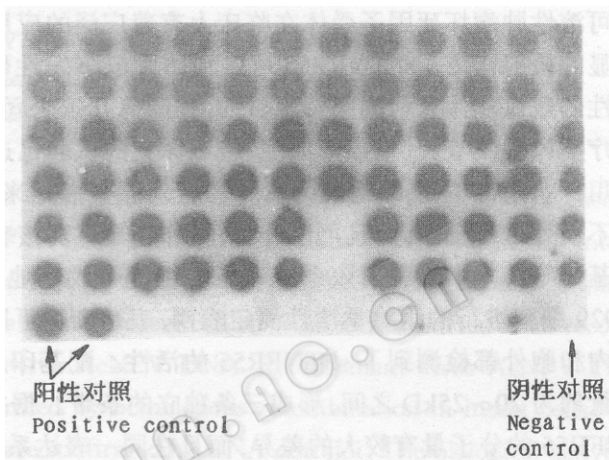


图 4 纯化后的重组病毒的 DNA 斑点杂交

Fig.4 DNA dot blot of purified recombinant virus

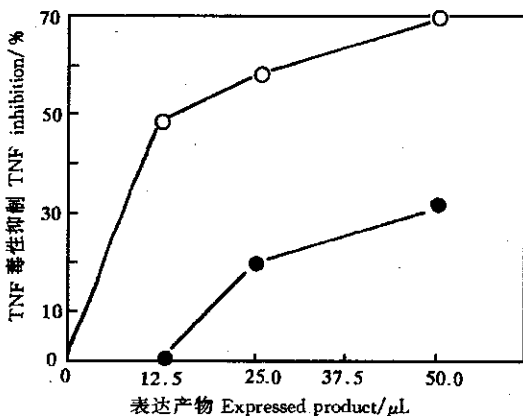


图 5 表达产物中和 TNF 对 L929 的细胞毒性

Fig.5 Neutralization of TNF cytotoxicity on L929 by expressed product

--- 细胞上清液 Supernatant of culture

— 细胞裂解液 Lysate of cells

2.5 表达产物的配基印迹 (ligand blot) 分析

经重组病毒 AcNPV-TNFR 感染三天的昆虫细胞裂解液进行非还原 SDS-PAGE, 然后将蛋白转移至硝酸纤维素滤膜上, 以生物素标记的重组人 TNF 为探针, 进行受体配基结合反应。大约在 20~25kD 间有三条带。表明可溶性的 55kD 人肿瘤坏死因子受体 shTNFR55 在昆虫细胞中得到了表达。

3 讨论

可溶性肿瘤坏死因子受体在临床上有着广泛的应用前景。它对类风湿关节炎的症状有明显的缓解作用。shTNRF55 可以预防大鼠多发性硬化症, 可以保护狒狒和老鼠免于致死性的败血症休克和脑膜炎。目前, 美国有几家公司开发的可溶性肿瘤坏死因子受体在治疗类风湿关节炎、重症败血症、脓毒休克的试验已进入 III 期临床^[11]。

用杆状病毒-昆虫细胞表达系统表达外源蛋白越来越多地受到人们的重视。因为该系统不仅表达产量高, 而且可以分泌, 另外还具有真核表达系统的蛋白翻译后的修饰功能如糖基化等。本实验利用该系统在昆虫细胞中成功地表达了 shTNFR55。用 TNF 敏感的 L929 细胞进行的生物学活性测定表明, 表达产物可以抑制 TNF 对 L929 的细胞毒性, 且胞内和胞外都检测到了 shTNFR55 的活性。配基印迹分析表明, 表达的 shTNFR55 的分子量约为 20~25kD 之间, 形成三条独立的条带。据文献报道, 在各表达系统中表达的 shTNFR55 的分子量有较大的差异, 而且在同一表达系统中也有不同大小的分子, 但它们都具有生物学功能。另外, 还原和非还原 SDS-PAGE 产生的分子量大小也不一致。Loetscher^[12]报道在 CHO 细胞中表达的 shTNFR55 非还原电泳产生 28 和 32kD 的二条带, 还原电泳产生 30~35kD 的几条带。Pinnical^[13]报道在人肾细胞 293S 中表达的形成 24.2、28.2、32.8kD 三条带。认为产生不同大小分子量的表达产物是由于糖基化程度不同造成的。本实验中产生的分子量不一的三条带认为也是由于表达产物的糖基化程度不同造成的, 它们都可以和配基 TNF 进行受体配基结合反应, 具有完整的生物学功能。shTNFR55 在昆虫细胞中的成功表达为将来利用其治疗与 TNF 相关的疾病及建立筛选 TNF 受体拮抗剂模型奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Vassalli P. *Annu Rev Immunol*, 1992, **10**: 411~52.
- [2] Aderka D. *Cytokine Growth Factor Reviews* 1996, **7**(3): 231~240.
- [3] Corti A, Bagnasco L, Cassani G. *Lymphokine and Cytokine Research*, 1994, **13**(3): 183~190.
- [4] Gray P W, Barrett K, Chantry D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 7380~7384.
- [5] Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R *et al.* *Trends in Cell Biology*, 1995, **5**(10): 392~399.
- [6] Engelmann H, Novick D, Wallach D. *J Biol Chem*, 1990, **265**(3): 1531~1536.
- [7] Chomezyuski P, Sacchi N. *Analytical Biochemistry*, 1987, **162**: 156~160.
- [8] Summers M D, Smith G E. *A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555. 1987, **1**~37.
- [9] Seckinger P, Isaacs S, Dayer J M. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 11966~11972.

- [10] Saccardo M B ,Grazioli L ,Cozzi E *et al.* . *J Biotechnol* ,1993 ,**30**:367~378.
- [11] 田玲.国外医学情报 ,1997 ,**9** :1~11.
- [12] Loetscher H ,Gentz R ,Zulauf M *et al.* . *J Biol Chem* ,1991 ,**266**(27):18324~18329.
- [13] Pennica D ,Kohr W J ,Fendly B M *et al.* . *Biochemistry* 1992 ,**31** :1134~1141.

EXPRESSION OF SOLUBLE 55 kD RECEPTOR FOR HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR USING BACULOVIRUS VECTOR

Wu Nanjun Li Yuan

(*Institute of Medicinal Biotechnology ,Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College ,Beijing 100050*)

Abstract Total RNA was isolated from HeLa cells and about 530 bp cDNA encoding shTNFR55 was amplified with RT-PCR from the total RNA. The cDNA was cloned into the downstream of polyhedrin gene promoter in transfer vector pAcGP67B ,and a recombinant transfer plasmid pAcTNFR was constructed. Insect cell sf9 was co-transferred with recombinant plasmid pAcTNFR and baculovirus AcNPV DNA. Recombinant virus AcNPV-TNFR containing shTNFR55 gene were formed by homologous recombination in insect cells. They were purified by plaque assay and were confirmed by DNA dot blot. The biological activity of expressed product was determined with culturing TNF-susceptible L929 cell line ,and the result showed that the expressed product could neutralize the cytotoxicity of TNF on L929 cell line. Ligand blot analysis revealed the expressed protein three discrete bands between 20~25kD.

Key words Baculovirus , Receptor for tumor necrosis factor , Insect cell , Expression

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund(No. 39670841)