

重组人淋巴毒素随机点突变组合文库的构建

沈毅珺^{1,2} 潘卫^{1*} 徐容³ 潘欣¹ 王罗春²
王征² 曹峰² 谭靖伟² 吴劲松² 吴芳² 刘彦君^{2*}

¹(第二军医大学基础医学部微生物学教研室, 上海 200433)

²(上海复旦张江生物医药股份有限公司, 上海 201203)

³(安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032)

摘 要 构建重组人淋巴毒素(rhLT)随机点突变组合文库以进行体外分子进化及结构和功能的研究。应用含随机核苷酸序列的引物,通过 Overlap PCR 的方法分别对 rhLT 的 46、106 和 130 位氨基酸进行定点随机突变,获得各单点随机突变文库。通过基因操作将这三个单点随机突变文库拼接并克隆于 pMD-18T 载体建立三点组合突变文库, DNA 测序鉴定突变位点的随机性和多样性,原核表达该变异文库,体外测定生物学活性。成功获得 rhLT 三点随机点突变组合文库,其转化克隆数达到 1.5×10^6 ,是多样性理论值的 4.5 倍。50 个样品的序列分析显示各个位点的核苷酸和氨基酸序列的突变都呈随机性分布。对原核表达的 30 个样品进行生物学活性测定,结果 70%(21 个)的样品无活性、23.3%(7 个)的样品活性低于 rhLT、6.7%(2 个)的样品活性高于 rhLT。成功构建了 rhLT 随机点突变组合文库,该库不仅在一级结构上具有良好的随机性和多样性,而且具有生物学活性的多样性,为应用噬菌体展示等高通量筛选策略对淋巴毒素进行体外分子进化和结构与功能的深入研究打下了基础。

关键词 淋巴毒素, 随机突变, 分子进化

中图分类号 Q785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)01-0043-06

淋巴毒素(Lymphotoxin, 简称 LT)是由淋巴细胞在应激情况下分泌的一种细胞因子。成熟的 LT 蛋白由 171 个氨基酸残基组成^[1],LT N 端的 23 个氨基酸残基被酶解后仍能保持生物活性^[2](图 1)。人 LT 分子以三聚体的方式结合于细胞表面受体 TNFR55 和 TNFR75,激活信号传递^[3]。LT 主要通过结合 TNFR55,由 TNFR55 的死亡结构域(death domain, DD)结合 TNFR 相关蛋白传递细胞毒信号,从而引起细胞的凋亡^[4]。LT 与 TNFR75 结合则不能传递凋亡信号,而激活 NF- κ B,引起其它 LT 生物学活性。LT 与 TNFR55 受体结合复合物的晶体结构显示它们有上下两个主要接触面^[2]:LT A 亚基的 c、f 片层和 C 亚基的 d、e 片层所形成的凹陷参与上接触面的受体结合;LT A 亚基中的 a-a' 环和 C 亚基中的 d-e 环参与下接触面的受体结合。位于 a-a' 环内的 D50 和位于 d-e 环内的 Y108 是最重要的结合位点,对它们进行突变都导致细胞毒活性的完全破坏^[5]。对

```

      24              30              40
1  ATG CAG TCT AGC CTG AAA CGG GCT GCT CAG CTC ATT GGA GAC CGC AGC AAG CAG
I  M H S T L K P A A H L I G D P S K Q
      50
55 AAC TCA CTG CTC TGG AGA GGA AAC AGC GAC GGT GGC TTC CTC CAG GAT GGT TTC
19 N S L L M R A N T O R A F L Q D G F
      60
109 TCG AGG AAG AAT TCT CTC CTG GTC CGC AGC AGT GGC ATC TAC TTC GTC TAG
37 S L S N N S L L V P T S G I Y F V V Y
      70
163 TCG CAG GTG CTC TCT TCT GGG AAA GGC TAC TCT CGC AAG GGC AGC TGC TGC GGA
55 S Q V V F S G K A Y S P K A T S S P
      80
217 CTC TAC CTG GGC CAT GAG GTC CAG CTC TTC TCG CAG TAC CGC TTC CAT GTG
73 I Y L A H E V Q L F S S Q Y P F H V
      90
271 CCT CTC CTC AGC TGC CAG AAG ATG GTG TAT CCA GGG CTG CAG GAA GGC TGG CTG
91 P P L L S S Q K M V Y G L Q E P W L
      100
325 CAC TCG ATG TAC CAG GGG GCT GGG TTC CAG CTC ACG CAG GGA GAC CAG CTA TCG
109 H S M Y H G A A F Q L T Q G D Q L S
      110
379 AGC CAG AGA GAT GGC ATC CGC CAC CTA GTC CTC AGC CGT AGT ACT GTG TTC TTT
117 T H T D G I P H L V L S P S T V F F
      120
433 GGA GGC TTC GCT CTG TAG
136 S A F A L

```

Note: the mutation amino acids were underlined.

图 1 N 端缺失 23 个氨基酸的重组人淋巴毒素(rhLT)的 cDNA 序列和氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and amino acid sequences of rhLT with 23 amino acid residues deleted from the N-terminus

LT 其它参与受体结合的氨基酸进行突变通常也易

收稿日期:2003-06-30, 修回日期:2003-10-20。

基金项目:国家“863”计划基金项目资助(No. 2001AA215051; 2002AA223309)。

* 通讯作者。刘彦君 Tel: 86-21-58953355; E-mail: yanjunl@yahoo.com.cn; 潘卫 Tel: 86-21-25074371; E-mail: panwei@yahoo.com.cn

形成无活性的分子,但是 Cynthia 等人发现当位于 a-a"环路中的 R46 突变为 H46 或 K46 后,LT 的比活性增加了 2~3 倍^[6],提示对参与受体结合的氨基酸进行适当的改造有可能产生活性更高的蛋白。LT 分子的多个区域、超过 30 个氨基酸残基参与了与 TN-FR55 的结合,我们对位于上接触区 f 片层中的 L130、位于下接触区 a-a"环路中的 R46 和 d-e 环路中的 S106 进行随机突变,成功地构建了重组人淋巴毒素随机点突变组合文库,为实现应用噬菌体展示技术等手段对该组合文库进行体外分子进化研究获得功能活性更优的 LT 分子打下基础。

1 材料和方法

1.1 质粒载体和细胞株

pMD-18T 载体试剂盒购自 TaKaRa 公司。rhLT/pMD-18T 质粒多克隆位点中含 N 端缺失 23 个氨基酸的重组人淋巴毒素衍生物 rhLT 基因,由本室构建。pBV220 质粒、*E. coli* DH5 α 菌株为本室保存。L929 细胞株购自中科院细胞所。

1.2 引物序列

用于 PCR 扩增 LT 随机突变 DNA 的引物序列见表 1。

表 1 rhLT 随机突变引物
Table 1 rhLT primers for random mutagenesis

Name	Description	Sequence(5'→3')
LT-U	Sense terminal primer of rhLT	GAA <i>TTC</i> * ATG CAC TCT ACC CTG AAA CCG
LT-D	Antisense terminal primer of rhLT	GGA <i>TCC</i> CTA CAG AGC GAA GGC TCC AAA
R46m-U	Sense mutation primer of R46	GCA AAC ACG GAC CGT GCC TTC CTC CAG GAT
R46m-D	Antisense mutation primer of R46	GGC ACG GTC CGT GTT TGC <u>SNN</u> * CCA GAG CAG TGA GTT CTG C
S106m-U	Sense mutation primer of S106	GAG GTC CAG CTC TTC TCC <u>NNS</u> CAG TAC CCC TTC CAT GTG
S106m-D	Antisense mutation primer of S106	GGA GAA GAG CTG GAC CTC ATG GGC
L130m-U	Sense mutation primer of L130	GGG CTG CAG GAA CCA TGG <u>NNS</u> CAC TCG ATG TAC CAC GGG
L130m-D	Antisense mutation primer of L130	CCA TGG TTC CTG CAG CCC TGG ATA C

Note: * clone sites are in italic; * * the mutation sites are underlined (N = A/T/C/G, S = G/C).

1.3 工具酶

Taq 酶、DNA 连接酶、限制酶均为 TaKaRa 产品。

1.4 R46 位、S106 位、L130 位单点随机突变片段的扩增制备与克隆

以 rhLT/pMD-18T 质粒为模板,分别以 LT-U 和 R46m-D 为一对引物,扩增 R46m-I 片段;以 LT-D 和 R46m-U 为一对引物,扩增 R46m-II 片段;再以 R46m-I 和 R46m-II 为模板,LT-U 和 LT-D 为一对引物,扩增 R46m 片段。用相同方法扩增 S106m 和 L130m 片段(略)。PCR 产物 R46m、S106m、L130m 片段纯化后分别与 pMD-18T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α ,提取克隆于 T 载体的单点随机突变文库重组质粒。

1.5 R46 位 + S106 位 + L130 位三点随机突变片段的酶切拼接与克隆

rhLTR46m/pMD-18T 质粒用限制酶 *EcoR* I 和 *Acc* I 双酶消化,回收 R46m-EA 片段;rhLTS106m/pMD-18T 质粒用限制酶 *Acc* I 和 *Pst* I 双酶消化,回收 S106m-AP 片段;rhLTL130m/pMD-18T 质粒用限制酶 *Pst* I 和 *Bam*H I 双酶消化,回收 L130m-PB 片段。R46m-EA、S106m-AP 和 L130m-PB 片段连接后作为模板,LT-U 和 LT-D 为一对引物,扩增 R46m + S106m

+ L130m 片段。PCR 产物纯化后与 pMD-18T 载体连接,转化 *E. coli* DH5 α ,提取克隆于 T 载体的随机点突变组合文库重组质粒,另取 1/100 的转化液涂布含 Amp 抗性的平板,计算转化数。

1.6 随机突变组合文库重组子序列测定

随机挑取 50 个 rhLT(R46m + S106m + L130m)/pMD-18T 随机点突变组合文库重组子样品,委托上海生工生物技术有限公司进行正、反双向序列测定,测序结果用 DNASTar 软件分析。

1.7 随机点突变组合文库的原核系统表达和体外测活

将 R46m + S106m + L130m 片段从 rhLT(R46m + S106m + L130m)/pMD-18T 质粒上用限制酶 *EcoR* I 和 *Bam*H I 双酶切下,与 pBV220 载体连接后转化 *E. coli* DH5 α 。从转化平板上随机挑取 30 个克隆,分别接种于 1mL LB 培养基中,37℃、250r/min 培养 3h 后,升温至 42℃诱导表达,3h 后收集菌体沉淀,加入 8mol/L 尿素粗提蛋白。同时诱导表达野生型 LT/pBV220/DH5 α 菌作为阳性对照,诱导表达 pBV220/DH5 α 菌作为阴性对照。用含放线菌素 D (1mg/L)的 DMEM 培养基倍比稀释尿素提取液,测

定细胞毒活性。96 孔板每孔接种 2×10^4 细胞数的 L929 细胞,37℃、5% CO₂ 培养 16h 后,每加入 100μL 不同稀释度的样品,继续培养 24h 后用结晶紫染色法检测细胞存活情况,随后对测活的 30 个样品进行序列测定。

2 结 果

2.1 随机点突变组合文库的构建

利用 OverlapPCR 法扩增分别获得 rhLT 单点随机突变 DNA 片段 R46m、S106m 和 L130m,电泳检测 PCR 产物结果,R46m-I、R46m-II 和 R46m 片段的大小分别为 96bp、384bp 和 462bp,与理论值一致,而用相同的方法扩增获得的 S106m 和 L130m 片段大小也与设计相符,电泳图见图 2。利用限制酶 *Eco*R I、*Acc*I、*Pst*I 和 *Bam*H I 将第 46 位、106 位和 130 位的单点随机突变拼接获得 rhLT 三点随机突变 DNA 片段 R46m + S106m + L130m,将该 DNA 片段克隆于 pMD-18T 载体,构建过程见图 3。获得的随机点突变组合文库转化数为 1.5×10^5 。

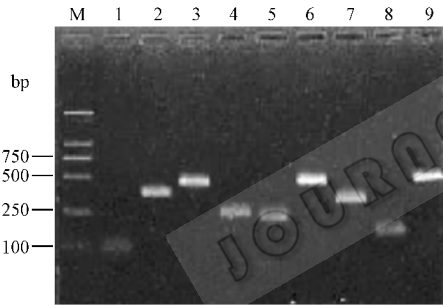


图 2 Overlap PCR 制备 rhLT 单点随机突变片段 R46m、S106m 和 L130m

Fig.2 Overlap PCR amplification of rhLT R46m , S106m and L130m site-directed random mutation fragments

1 ~ 3 : PCR product of R46m-I , R46m-II , R46m fragment ;

4 ~ 6 : PCR product of S106m-I , S106m-II , S106m fragment ;

7 ~ 9 : PCR product of L130m-I , L130m-II , L130m fragment ;

M :DL2000 DNA Marker

2.2 随机点突变组合文库重组子测序结果

对 50 个 rhLT 随机点突变组合文库重组子质粒进行序列测定,证实插入的序列为 rhLT 突变体基因,被突变的氨基酸位点分别是 R46、S106 和 L130,且核苷酸序列均不相同,突变频率的比较结果见表 2。单点核苷酸的突变频率范围为理论值的 32% ~ 208%(实际出现次数与理论出现次数之比);各点平均后的核苷酸的突变频率范围为理论值的 84% ~ 121%。所对应的各氨基酸平均三点随机突变频率

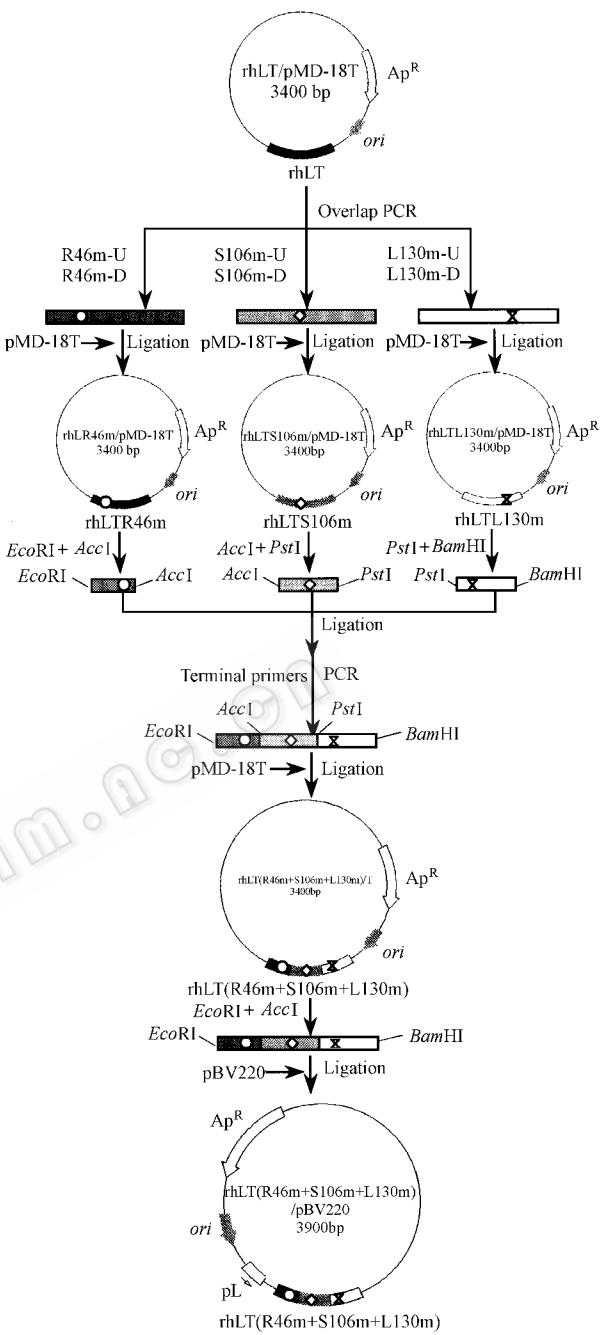


图 3 rhLT 随机点突变组合文库重组质粒的构建

Fig.3 Construction of the recombinant plasmid of rhLT combined site-directed random mutation library

范围为理论值的 21% ~ 229%,见表 3。

2.3 随机点突变组合文库的原核表达和活性分析

将克隆于 pMD-18T 载体上的随机点突变组合文库用限制酶 *Eco*R I 和 *Bam*H I 克隆至 pBV220 载体,构建了 rhLT 原核表达随机点突变组合文库,上述文库的酶切鉴定结果见图 4。从原核表达文库中挑取 30 个样品进行体外测活和序列测定,结果见表 4。其中 21 个样品未测出活性,占 70%,活性低于等

于 rhLT 的样品有 7 个 ,占 23.3% ,活性高于 rhLT 的 样品有 2 个 ,占 6.7%。

表 2 rhLT 随机点突变组合文库核苷酸突变频率

	46			106			130			Average
	N	N	S	N	N	S	N	N	S	
A	12/12.5	6/12.5	0/0	26/12.5	16/12.5	0/0	18/12.5	13/12.5	0/0	15.1/12.5
T	19/12.5	22/12.5	0/0	4/12.5	4/12.5	0/0	7/12.5	7/12.5	0/0	10.5/12.5
C	8/12.5	9/12.5	28/25	5/12.5	11/12.5	35/25	8/12.5	12/12.5	18/25	11.1/12.5
G	11/12.5	13/12.5	20/25	15/12.5	19/12.5	15/25	17/12.5	18/12.5	32/25	13.3/12.5

表 3 rhLT 随机点突变组合文库氨基酸突变频率

	46	106	130	Average	Theory
Ala-A	1	2	5	2.67	3.1
Cys-C	2	0	0	0.67	1.6
Asp-D	2	3	2	2.33	1.6
Glu-E	0	1	4	1.67	1.6
Phe-F	4	0	1	1.67	1.6
Gly-G	1	8	6	5.00	3.1
His-H	0	1	0	0.33	1.6
Ile-I	3	0	1	1.33	1.6
Lys-K	0	7	4	3.67	1.6
Leu-L	6	1	3	3.33	4.7
Met-M	2	2	2	2.00	1.6
Asn-N	1	3	0	1.33	1.6
Pro-P	2	1	2	1.67	3.1
Gln-Q	0	0	1	0.33	1.6
Arg-R	7	6	6	6.33	4.7
Ser-S	4	6	2	4.00	4.7
Thr-T	2	6	5	4.33	3.1
Val-V	7	1	1	3.00	3.1
Trp-W	3	1	3	2.33	1.6
Tyr-Y	2	1	1	1.67	1.6
Ter-.	1	0	1	0.67	1.6
Total	50	50	50	50	50

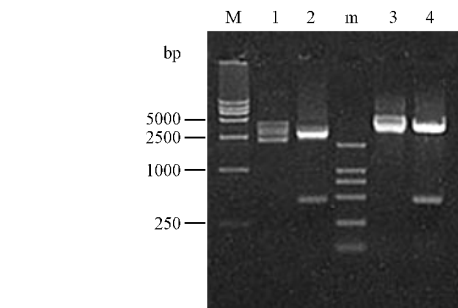


图 4 pMD-18T 和 pBV220 rhLT 随机点突变组合文库的酶切鉴定

Fig.4 Restriction enzyme digestion of the libraries in pMD-18T and pBV220
1 :rhLT(R46m + S106m + L130m)pMD-18T plasmid ; 2 :rhLT(R46m + S106m + L130m)pMD-18T plasmid digested with *Eco*R I and *Bam*H I ; 3 :rhLT(R46m + S106m + L130m)pBV220 plasmid ; 4 :rhLT (R46m + S106m + L130m)pBV220 plasmid digested with *Eco*R I and *Bam*H I

表 4 rhLT 随机点突变组合文库样品测活和测序结果

	Mutation			50% cytotoxicity (Dilution)
	46	106	130	
wild type	R	S	L	2 ¹³
rhLTm-1	R	D	E	2 ¹¹
rhLTm-2	G	T	L	2 ⁷
rhLTm-3	S	E	K	ND*
rhLTm-4	V	N	D	ND
rhLTm-5	R	Q	T	2 ¹⁵
rhLTm-6	F	T	T	ND
rhLTm-7	I	S	R	ND
rhLTm-8	T	N	S	2 ¹⁰
rhLTm-9	P	K	Y	ND
rhLTm-10	R	* *	R	ND
rhLTm-11	N	A	Y	ND
rhLTm-12	R	R	G	2 ¹²
rhLTm-13	M	G	S	ND
rhLTm-14	W	R	M	ND
rhLTm-15	F	T	E	ND
rhLTm-16	I	P	Q	ND
rhLTm-17	S	C	R	ND
rhLTm-18	S	G	S	ND
rhLTm-19	V	R	M	2 ⁶
rhLTm-20	V	S	F	ND
rhLTm-21	D	H	T	ND
rhLTm-22	M	N	S	2 ⁶
rhLTm-23	C	A	W	ND
rhLTm-24	Y	K	P	ND
rhLTm-25	R	T	S	2 ¹⁴
rhLTm-26	L	F	M	ND
rhLTm-27	P	G	.	ND
rhLTm-28	V	A	D	ND
rhLTm-29	L	I	G	ND
rhLTm-30	V	H	T	2 ¹³

Note : * ND :not detected (dilution < 2⁶). * * . :terminal codon.

3 讨论

传统的药物筛选费用昂贵、周期长、风险大 ,而在分子水平上利用达尔文的进化论思想发展起来的分子进化工程已成为药物设计与筛选的新手段 [7 8]

利用分子进化工程已筛选出大量的受体拮抗剂、酶抑制剂等用于治疗癌症、艾滋病、心血管病、神经性疾病等^[9,10]。分子进化工程技术上包括三个方面:

(1) 构建大容量的组合文库 (2) 特定生物活性的高通量筛选方法 (3) 活性成分的分析鉴定。构建适合的大容量生物大分子变异体组合文库是进行分子进化研究的关键, 我们根据淋巴毒素与 TNFR55 受体结合复合物的晶体衍射结构, 结合其它 LT 突变研究资料选择了参与受体 2 个接触面的三个氨基酸位点进行组合随机突变, 希望构建出具有较大库容、良好随机性和多样性、能对 LT 的生物活性产生各种影响的突变体, 以便实施有效的分子进化研究。

国内外对 LT 的结构与功能研究主要通过对其的氨基酸序列缺失或定点突变改造^[2,11,12]实现, 国外有对 LT 及其它生物活性大分子单个氨基酸位点及连续的多个氨基酸位点进行随机突变的研究, 但未见对不连续的多个氨基酸进行随机突变组合文库构建的报道。构建多个不连续的氨基酸突变组合文库的优势首先在于能迅速扩大突变体的数量(构建 n 个氨基酸突变产生的多样性为 20^n), 达到高通量的生物进化筛选获得高性能的新一代候选药物的要求; 其次, 多个位置的相互影响能产生更多结构和活性差异更大的突变体; 此外, 在 LT 与 TNFR55 受体复合物的晶体衍射结构研究基础上, 选择参与受体结合的特定氨基酸进行定点的随机突变, 能较完整地保留 LT 的基本结构, 增加了获得定向进化分子的有效性, 避免了连续多个氨基酸位点突变对分子结构产生过大的影响。由于构建不连续的多个氨基酸突变组合文库在基因操作技术上存在较大的难度, 我们通过 PCR 反应条件的控制和组合突变体库连接策略的精密设计, 经过多次改进和反复实验, 在国内外首次将 LT 分子参与受体 2 个接触面的三个氨基酸进行随机突变组合获得成功。

我们所构建的 rhLT 随机点突变组合文库转化数为 1.5×10^5 , 而随机核苷酸 NNS (N = A/T/C/G, S = G/C) 所形成的 32 种密码子构成的三个氨基酸随机突变可产生 3.3×10^4 种可能的核苷酸序列, 该变异体库的容量达到了理论值的 4.5 倍, 完全能包含所有的三点随机突变组合。测序分析随机点突变组合文库的随机性显示 (1) 在核苷酸水平上 (表 2) 3 个突变氨基酸的 9 个核苷酸点中, 有 6 个 N 突变均包含了 A、T、C、G 4 种核苷酸, 突变频率范围为理论值的 32% ~ 208%; 另 3 个 S 突变包含了 C、G 两种核苷酸, 突变频率范围为理论值的 60% ~ 140%。

虽然每种核苷酸在不同点上的突变频率与理论值存在一定偏差, 但这种偏差主要是由于测序样品数不足所引起的, 将各点进行平均后的核苷酸的突变频率范围则为理论值的 84% ~ 121%, 显示出良好的随机突变模式。(2) 在氨基酸水平上 (表 3): 每个氨基酸位置上都可突变产生 20 种氨基酸, 每种氨基酸在这三个位置上的突变频率范围为理论值的 0% ~ 438%, 变化范围较大是由测序样品不足以及氨基酸密码子的兼并性所致。虽然每个突变位置中未能出现所有 20 种氨基酸, 但是每种氨基酸至少在三个突变位置中出现一次以上, 且以三个突变位置综合计算, 各氨基酸平均突变频率范围为理论值的 21% ~ 229%。由于使用 NNS 密码子进行突变, 理论上仅有三种氨基酸出现频率, 分别为 4.7 次、3.1 次和 1.6 次, 若将 50 个样品所有三个突变位置合并统计, 应出现 4.7 次的氨基酸实际出现频率为 4.55; 应出现 3.1 次的氨基酸实际出现频率为 3.33; 应出现 1.6 次的氨基酸实际出现频率为 1.54, 可见氨基酸的变化是随机的。对上述结果的分析表明该组合文库在核苷酸和氨基酸的一级结构上都具备了良好的随机性和多样性。另对文库中 30 个随机样品的生物学活性测定结果显示, 无活性 (其中包括活性极低的样品)、低活性和高活性样品分别占 70%、23.3% 和 6.7%, 其中 15[#] 和 25[#] 样品的活性分别为野生型 rhLT 的 2 ~ 4 倍, 证实在该文库中包含生物学活性有巨大差异的各种突变体, 显示出生物学活性的多样性。

本实验室已将该文库展示于丝状噬菌体表面, 正通过体外受体亲和筛选的手段, 研究 LT 的结构与功能, 并已初步获得多个活性大幅度提高的样品, 相应结果将后续报道。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Nina LP, Nancy HR. Lymphotoxin. *Ann Rev Immunol*, 1988 **6**: 407 ~ 438
- [2] David WB, Allan D, Wolfgang J *et al.* Crystal structure of the soluble human 55kD TNF receptor-human TNF-beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell*, 1993, **73** (7): 431 ~ 445
- [3] Marcus S, Sigrun H, Philip B *et al.* Functional discrepancies between tumor necrosis factor and lymphotoxin alpha explained by trimer stability and distinct receptor interactions. *Eur J Immunol*, 1995, **25**: 2183 ~ 2189
- [4] Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*, 2003, **88** (2): 212 ~ 218
- [5] Eck MJ, Ultsch M, Rinderknecht E *et al.* The structure of human

- Chem*, 1992, **267**(4): 2119 – 2122
- [6] Cynthia RG, Chong SL, Alan GP. Aspartic acid 50 and tyrosine 108 are essential for receptor binding and cytotoxic activity of tumor necrosis factor beta (lymphotoxin). *Prot Engin*, 1991, **4**(7): 785 – 791
- [7] Joyce GF. Evolutionary chemistry: getting there from here. *Science*, 1997, **276**(5319): 1658 – 1659
- [8] Brookfield JF. Making selection work. *Nature*, 1995, **375**(6531): 449
- [9] Stemmer WP. Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling. *Nature*, 1994, **370**(6488): 389 – 391
- [10] Pedersen H, Holder S, Sutherlin DP *et al.* A method for directed evolution and functional cloning of enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(18): 10523 – 10528
- [11] Wakabayashi T, Asada M, Nagasu T *et al.* Deletion of lysine 84 to lysine 89 enhances the cytotoxicity and the receptor binding affinity of human lymphotoxin. *J Biol Chem*, 1990, **265**(13): 7604 – 7909
- [12] Nishikawa S, Matsuo N, Isaka Y *et al.* 27 amino acid residues can be deleted from the N-terminus of human lymphotoxin without impairment of its cytotoxic activity. *J Mol Recognit*, 1990, **3**(2): 94 – 99

Construction of Combined Site-directed Random Mutation Libraries of Recombinant Human Lymphotoxin

SHEN Yi-Jun^{1,2} PAN Wei^{1*} XU Rong³ PAN Xin¹ WANG Luo-Chun² WANG Zheng² CAO Feng²
TAN Jing-Wei² WU Jin-Song² WU Fang² LIU Yan-Jun^{2*}

¹(Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

²(Shanghai Fudan-Zhangjiang Biopharmaceutical Co. Ltd, Shanghai 201203, China)

³(Department of Pathology and Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract To construct the combined site-directed random mutation library of recombinant human Lymphotoxin (rhLT) for *in vitro* molecular evolution study, and to study the structure and function relationship. The random point mutations at the sites of 46, 106 and 130 were individually generated by overlap PCR amplification with the random nucleotide primers. The three point mutations were combined and cloned into pMD-18T vector to construct the combined mutation library. DNA sequencing was used to evaluate the diversity and randomness of the mutation sites. The combined mutation library was re-engineered, inserted in prokaryotic expression vector pBV220, transformed and expressed in *Escherichia coli* strain DH5 α . The biological activity of some of the mutants was tested in L929 mouse fibroblast cells. As much as 1.5×10^5 clones were obtained, which represents 4.5 times of the complete mutation libraries at 99% confidence. Sequencing 50 clones revealed no obvious bias in the nucleotide and amino acid mutations at the sites. Among the 30 expressed samples underwent for the bioassay, 70% (21 samples) were inactive, 23.3% (7 samples) had lower activity than rhLT, the remaining 6.7% (2 samples) had higher activity than rhLT. The combined site-directed random mutation library of rhLT has been constructed successfully. In combination with phase display, the library is ready for *in vitro* molecular evolution study.

Key words Lymphotoxin, random mutation, molecular evolution

Received: 06-30-2003

This work was supported by Grant from the National “863” Foundation (No. 2001AA215051, 2002AAZZ3309).

* Corresponding author. LIU Yan-Jun: Tel: 86-21-58953355; E-mail: yanjunl@yahoo.com;

PAN Wei: Tel: 86-21-25074371; E-mail: wpwanwei@yahoo.com.cn