

## 3'端非翻译区影响 TNF $\alpha$ cDNA 在大肠杆菌中的表达

常金丽 蔡武城 徐立峰 李昌本 赵寿元

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

**摘要** 采用 PCR 方法改变了表达构建物 pRL-rhTNF 中的结构,即去掉 rhTNF $\alpha$  cDNA 3'端非翻译区序列 110bp (命名为 pRL-rhTNF $\alpha$ 2),转入大肠杆菌后,观察数个阳性转化子的表达情况,并与原型 pRL-rhTNF $\alpha$  的表达进行比较。结果表明,去掉 3'端非翻译区的 pRL-rhTNF $\alpha$ 2 能稳定表达 rhTNF $\alpha$ ,其发酵及纯化产品的生物学特征均等同于原型的,且其表达量比原型的有提高,提示 3'端非翻译区序列对表达有影响。3'端非翻译区内存在一个相似于 TA 的重复序列——TTTA TTA 七聚体。这可能是本研究影响 TNF $\alpha$  表达量的原因之一。

**关键词** rhTNF $\alpha$  cDNA, 3'端非翻译区, TA 序列, 表达调控

肿瘤坏死因子  $\alpha$  (Tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 是由激活的巨噬细胞产生的一种多肽,属于细胞因子家族成员,参与免疫、炎症等反应,并被证明有抗肿瘤作用<sup>[1]</sup>。目前,基因工程 TNF $\alpha$  正用于治疗肿瘤的临床试验<sup>[2~4]</sup>。

基因工程 TNF $\alpha$  主要是大肠杆菌中的表达产物,表达量一般在  $10^6 \sim 10^7$  u/ml 发酵液<sup>[5]</sup>。关于 TNF $\alpha$  基因的表达调控研究报道不多。我室构建的 pRL-rhTNF $\alpha$  所用的 TNF $\alpha$  cDNA 包括 3'端非翻译区 110bp<sup>[5]</sup>;本研究用 PCR 定位突变方法,去掉这段序列,命名为 pRL-rhTNF $\alpha$ 2,转入大肠杆菌后,研究比较了 TNF $\alpha$  的表达量。结果表明:长 110bp 的 3'端非翻译序列对 pRL-rhTNF $\alpha$  在大肠杆菌中表达有一定程度的负影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 重组人肿瘤坏死因子工程菌 (pRL-rhTNF $\alpha$ ): 由李昌本等<sup>[5]</sup>构建。

1.1.2 PCR 扩增试剂盒: 复华公司生物技术中心产品。

1.1.3 DNA 序列分析药盒: Pharmacia 公司产品。

1.1.4 细胞株和细胞培养: L929 小鼠成纤维细胞株本室保存。培养条件: 培养基 RPMI1640 中加 10% 小牛血清, 2.0% 碳酸氢钠, 含青霉素 100 u/ml、链霉素 100  $\mu$ g/ml。

1.1.5 抗人 TNF $\alpha$  抗体: 北京生物制品研究所陈晓龙老师馈赠。

### 1.2 方法

1.2.1 PCR 缺失突变引物的人工合成: 用固相亚磷酸胺法合成一对引物。引物 1 序列为 5'GGCCATATGGTTCGTTCTTCTCTCGTA3', 符合 rhTNF $\alpha$  cDNA 相应蛋白质 N 端的序列, 并加上 Nde I 酶切位点; 引物 2 序列为 5'CGGAATTCTCACAGGGCAATG-

ATCCCAAAG3'是天然 hTNF $\alpha$  分子 C 端编码序列的互补序列,并在终止密码子后面加上 EcoR I 酶切位点。

1.2.2 PCR 扩增:模板 pRL-rhTNF $\alpha$ <sup>(5)</sup> 浓度 5ng,引物浓度 25pmol。解链反应 94℃,60s;退火反应 55℃,60s;延伸反应 72℃120s;30 个循环。

1.2.3 PCR 扩增片段的亚克隆:取 50 $\mu$ l PCR 反应物进行琼脂糖凝胶电泳,低熔点胶回收扩增的 cDNA 片段;表达载体 pJLA503<sup>(11)</sup>经 Nde I、EcoR I 双酶切;cDNA 和载体连接,转化大肠杆菌 JM103,酶切鉴定阳性转化子。

1.2.4 DNA 序列分析:取一个阳性转化子,快速小量抽提质粒,并亚克隆进 pUC118 和 pUC119 载体,再制备单链。用作测序模板。按 Pharmacia 公司的序列分析仪和测序盒提供的方法进行操作。

1.2.5 工程菌的发酵试验:取过夜培养的阳性转化子和原型 TNF $\alpha$  工程菌,按 1%接种在含氨苄青霉素 100 $\mu$ g/ml 的 TB 培养基内,30℃培养至菌体 Klette 读数为 90 时(绿色滤光片),迅速升温至 42℃,继续培养 4h;于 4℃ 5000r/min 离心 10min 收获菌体,用超声破碎液(0.2mol/L NaCl,0.1mol/L Tris,50mmol/L EDTA,pH8)离心,洗涤再用适当体积破碎液将菌体悬浮,超声破碎以后,于 4℃ 12000r/min 离心 15min,上清液可于 -20℃ 保存。

1.2.6 工程菌表达产物的鉴定:(1)活性测定——采用 L929 细胞毒测定法,以杀死 50% 细胞数的最高稀释倍数为其效价<sup>(5)</sup>。(2)SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,考马斯亮蓝染色。<sup>(5)</sup>。(3)薄层扫描——将电泳胶置于薄层扫描仪下扫描,波长 590nm,积分计算 TNF $\alpha$  蛋白占菌体总蛋白质的量。

1.2.7 rhTNF $\alpha$  蛋白的纯化:工程菌超声上清液经硫酸铵盐析,G-25 柱层析脱盐,再经 DEAE-52 纤维素柱层析和 S-100 凝胶柱层析分离纯化。纯化产物经电泳鉴定纯度 > 95%。

1.2.8 HPLC 分析:(1)样品预处理:取适量纯化液于 1000r/min,4℃ 离心 8min,吸取上清液用  $\phi$ 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤。(2)上样分析:HPLC 柱(Biosil SEC-400);上样缓冲液(10mmol/L Tris,pH6.4),流速 1ml/min,上样量 20 $\mu$ l。根据标准蛋白质分子量计算样品的分子量同时判断样本的纯度。

1.2.9 rhTNF $\alpha$ 2 细胞毒活性的抗体中和实验:取不同稀释度的抗人 rTNF $\alpha$  抗体加入正在作 TNF $\alpha$ 2 活性测定的 L929 细胞 96 孔板内,继续培养一定时间后,观察抗体对 TNF $\alpha$ 2 细胞杀伤的保护作用。以产生 >75% 的保护作用的抗体稀释度为抗体的效价。

## 2 结 果

### 2.1 pRL-rhTNF $\alpha$ 2 表达载体的构建及鉴定

pRL-rhTNF $\alpha$ 2 表达载体的构建全过程如图 1。以原型肿瘤坏死因子  $\alpha$  表达构建物 pRL-rhTNF 为模板,用 PCR 技术扩增获得 rhTNF $\alpha$ 2 的 cDNA 片段(0.49kb),经 Nde I、EcoR I 双酶切,再与表达载体 pJLA503(同样双酶切)连接,转化大肠杆菌 JM103,转化子经双酶切初步鉴定(图版 I-C)。取其中一个转化子,用碱裂解法抽提质粒,经酶切、填平、低熔点胶回收小片段与 pUC118、pUC119 连接(图 1)连接物转化大肠杆菌

MV1184, 制备单链, 再进行 DNA 序列分析。序列分析结果表明, PCR 扩增中没有发生差错。pRL-rhTNF $\alpha$ 2 表达载体上的 TNF $\alpha$ cDNA 片段不含 3' 端非翻译区。

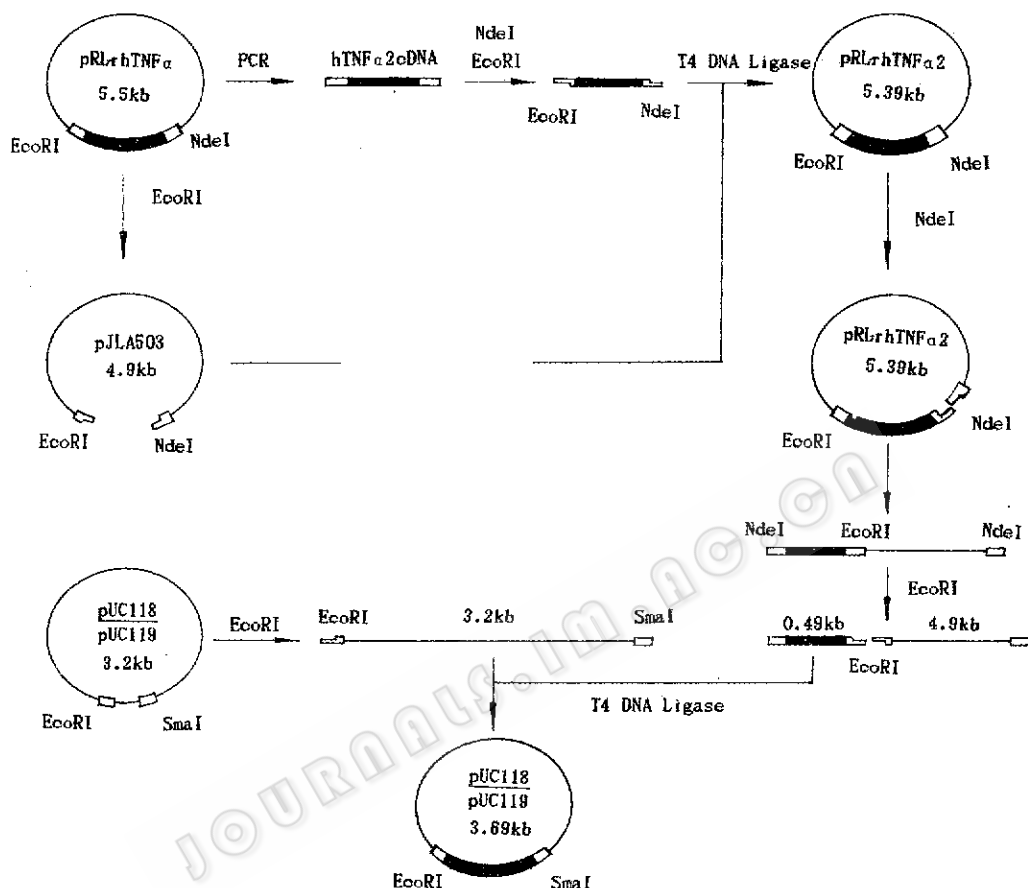


图 1 用于表达和测序的 TNF $\alpha$ 2 质粒的构建

Fig. 1 Construction of the pRL-rhTNF $\alpha$ 2

## 2.2 rhTNF $\alpha$ 2 cDNA 在大肠杆菌中的表达及表达产物的鉴定

选取经双酶切鉴定的阳性转化子 5 个, 分别命名为 pRL-rhTNF $\alpha$ 2-1 至 pRL-rhTNF $\alpha$ 2-5; 与 pRL-rhTNF $\alpha$  原型的菌体并行培养, 诱导。发酵产物经超声破碎, 分别取其超声上清液作 SDS-PAGE 鉴定 TNF $\alpha$ 2 的表达情况, 并同时检测超声上清液对 L929 的细胞毒性。结果表明: (1) SDS-PAGE 电泳可见明显的蛋白质表达条带 (图版 I-A)。从分子量迁移率看, hTNF $\alpha$ 2 具有和原型 hTNF $\alpha$  同样的分子量。从条带着色深浅来看, hTNF $\alpha$ 2 的表达量高于原型 hTNF $\alpha$ 。薄层扫描结果表明: 原型 (pRL-rhTNF $\alpha$ ) 的表达产物占总蛋白质含量的 10%, 而转化子 1pRL-rhTNF $\alpha$ 2 则占 18% 左右 (图 2)。(2) 超声上清液对 L929 细胞毒测定结果显示: 5 个重组子 (pRL-rhTNF $\alpha$ 2-1 至 pRL-rhTNF $\alpha$ 2-5) 的细胞毒活性 (u/ml 发酵液) 分别是  $2 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$  和  $2 \times 10^8$ , 而原型 (pRL-rhTNF $\alpha$ ) 为  $2 \times 10^7$ 。也就是说, 从细胞毒活性来比较表达量, 转化子比原型提高一个数量级。

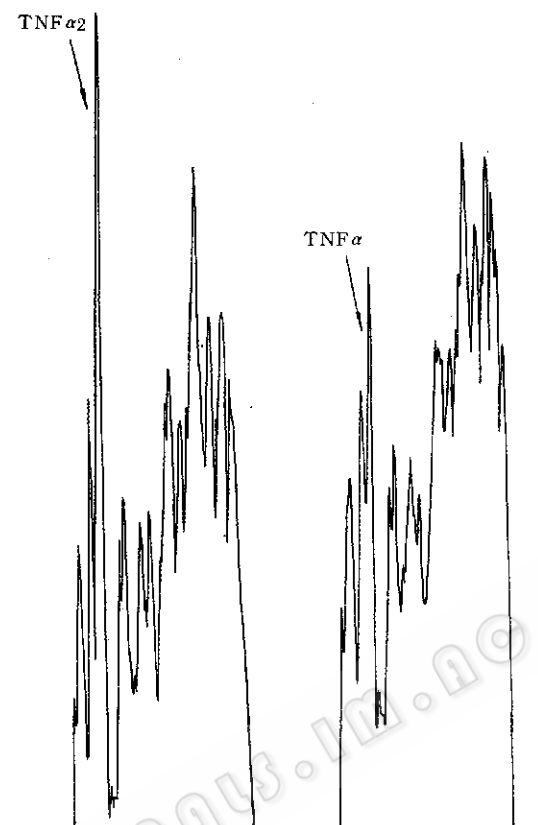


图 2 TNF $\alpha$  和 TNF $\alpha$ 2 电泳的薄层扫描

Fig. 2 Analysis of fermentation products in *E. coli* by thin layer scanning

a. pRL-rhTNF $\alpha$ 2, b. pRL-rhTNF $\alpha$

### 2.3 TNF $\alpha$ 2 表达产物的纯化和 HPLC 分析

选择一个转化子 (pRL-rhTNF $\alpha$ 2-1) 进行批量发酵, 取上清液经盐析和柱层析纯化后, 用还原型 SDS-PAGE 电泳鉴定, 在电泳图谱上显示为一条区带, 分子量 17kDa (图版 I-B)。纯度 >95%。

以 HPLC 检测纯化后的 TNF $\alpha$ 2-1 样本, 并与标准蛋白参数比较表明、纯化后的 TNF $\alpha$ 2-1 由单体、二聚体和三聚体共同组成, 三聚体活性形式占主要成分 (图 3)。

### 2.4 纯化后的 TNF $\alpha$ 2-1 的细胞毒活性鉴定

用紫外吸收法测定纯化后 TNF $\alpha$ 2-1 的蛋白质含量, 同时测定其细胞毒活性, 求得比活达  $2 \times 10^6$  u/mg 蛋白质, 表明表达量的提高有利于纯化。

hTNF $\alpha$ 2 纯化产物的 L929 细胞毒活性能被抗 TNF $\alpha$  抗体中和, 结果表明, 当 hTNF $\alpha$  浓度为  $10^5$  u/0.3mg/孔时, 1:2<sup>12</sup> 稀释的 TNF $\alpha$  抗体可将其细胞杀伤毒性完全中和。

## 3 讨 论

TNF $\alpha$  由单拷贝基因编码, 基因全长 2.5kb, 由 4 个外显子组成, 其中外显子 4 编码

TNF $\alpha$ 成熟蛋白的大部分和部分 3'端非翻译区。TNF $\alpha$  的 mRNA 全长 1672bp, 其中 3'端编码区长 729bp。我室构建的 pRL-rhTNF $\alpha$  的 TNF cDNA 其 3'端带有 110bp 的非翻译区序列(表 1)。为了研究这段序列对 TNF $\alpha$  表达的影响, 我们用 PCR 方法构建了不含 3'端非翻译区序列的 pRLrhTNF $\alpha$ 2, 转化大肠杆菌 JM103, 发酵结果显示其 TNF $\alpha$  表达量有提高。纯化后的 TNF $\alpha$ 2 生物学特征鉴定表明它等同于原型 TNF $\alpha$ , 即表现为杀伤 L929 细胞、TNF $\alpha$  抗体能中和其细胞毒活性、活性形式主要为三聚体<sup>(5)</sup>、还原条件下分子量为 17kDa 等。

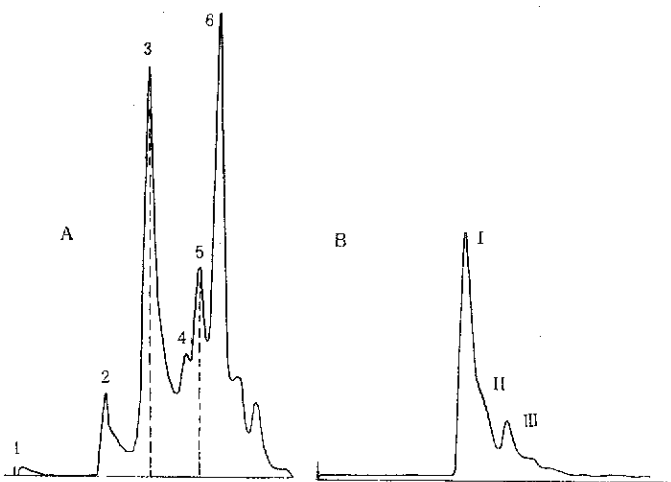


图 3 纯化的 TNF $\alpha$ 2-蛋白质的 HPLC 分析  
Fig. 3 Identification of purified rhTNF $\alpha$ 2 by HPLC

- a. Molecular weight marker
2. Thyroglobulin 165kDa
3. Immunoglobulin 55kDa
4. Ovalbumin 43~44kDa
5. Myohemoglobin 17. 2kDa
6. Vitamin B<sub>12</sub> 1. 35~1. 43kDa
- b. rhTNF $\alpha$ 2-1
1. Trimer, I. Dimer, II Monomer

表 1 TNF $\alpha$  cDNA3'非翻译区的 DNA 序列

Table 1 3'-untranslated region sequence of rhTNF $\alpha$  cDNA

|   |
|---|
| TGA GGA GGA CGA ACA TCC AAC CTT CCC AAA CGC CTC CCC |
| TGC CCC AAT CCC TTT ATT ACC CCC TCC TTC AGA CAC CCT |
| *****   |
| CAA CCT CTT CTG GCT CAA AAA GAG AAT TGG GGG CTT AGG |

\* : TA-rich sequence

影响外源基因表达调控的因素主要有两个方面:(1)载体的影响,包括启动子、SD 序列、终止子等;(2)目的基因序列的影响,包括 5'和 3'端非翻译区、某些编码序列、特别是起始密码子周围的编码序列。本文主要研究 3'端非翻译区的 110bp 对目的基因表达的影响。Krug 等曾报道,许多细胞因子的 3'端非翻译区内有一段 TA 富集序列,可明显抑制外源基因在真核细胞内的表达,并系统研究了 TA 序列的长度、位置等因素的影响<sup>(7~9)</sup>。我们所用的是大肠杆菌表达系统,观察到在去掉 3'端非翻译区 110bp 后表达量提高的现象。经计算机序列分析发现,在 TNF $\alpha$  的 3'端非翻译区 48bp 处存在一个相似于 TA 重复序列的七聚体(表 1) TTTATTA,提示该序列对 TNF $\alpha$  在大肠杆菌中的表达可能有一定的抑制作用。

Sato 等报道,外源基因在大肠杆菌中的表达效率还与载体上外源基因和转录终止子之间的距离有关,只有当两者处于最适的距离时才能使目的基因获得最好的表达<sup>(10)</sup>。本

文研究用的表达载体 pJLA503, 在 polylinker 下游有转录终止子, 因而还有一种可能性, 即去掉 TNF $\alpha$  cDNA 3'端非翻译区 110bp 后, TNF $\alpha$ 2 cDNA 和载体上的转录终止子之间处于较适距离, 从而使表达量有所提高。

### 参 考 文 献

- [1] Carewell E A, Old L J, Kassel R L *et al.* Proc Natl Acad Sci. USA, 1975, 72: 3666.
- [2] Pfreunolschuh M G. Eur. J Cancer Clin Oncol, 1989, 25: 397.
- [3] 渡道直树. 他. 癌上化学疗法 15: 780, 1988.
- [4] 新津洋司郎, 渡道直树. 医学のあゆみ, 152: 579, 1990.
- [5] Li CB, Chai CX, Xie Y, *et al.* Science in China (series B) 1992, 35: 319.
- [6] Sambrook J, Fritsch, EF, Maniatis T. Molecular Cloning 1989, p1847.
- [7] Kruys V, Marinx O, Shaw G, *et al.*, Science 1989, 245: 852.
- [8] Kruys V, Wathelet MG, Poupart P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1987, 84: 6030.
- [9] Shaw G, Kamen R. Cell, 1986, 46: 659.
- [10] Sato T, Matsui H, Shibakara S, *et al.* J. Biochem. 1987, 101: 525.
- [11] Schauder B, Blocker H, Frank R. *et al.* Gene 1987, 52: 279.

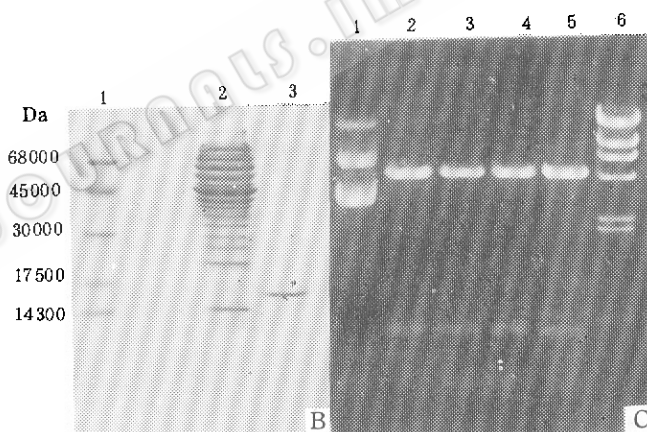
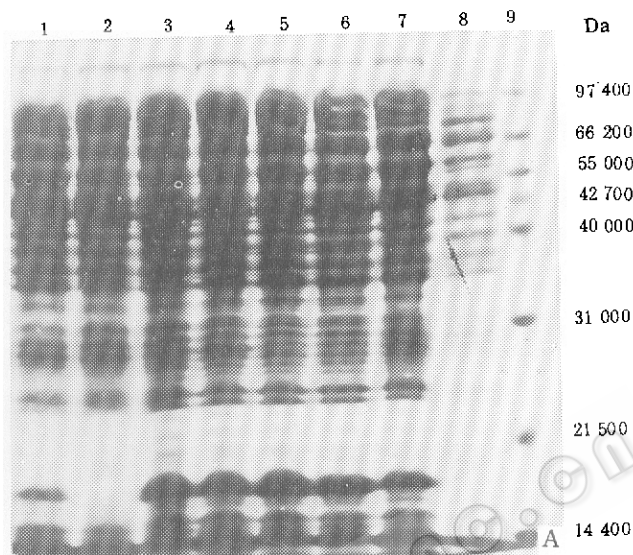
## Effect of 3'-untranslated Region on Expression of TNF $\alpha$ cDNA in *Escherichia coli*

Chang Jinli Cai Wucheng Xu Lifeng Li Changben Zhao Shouyuan

(Institute of Genetics, State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433)

**Abstract** A construct pRL-rhTNF $\alpha$ 2, in which the 110bp 3'-untranslated region of rhTNF $\alpha$  cDNA was deleted, was transformed in *E. coli*. The expression level of several positive transformants was determined. The results showed that the expression of pRL-TNF $\alpha$ 2 was stable and the biological characteristics of the protein product were as same as that of pRL-rhTNF $\alpha$ . Furthermore, the expression level of pRL-rhTNF $\alpha$ 2 was increased. It suggested that 3'-untranslated region may have some negative effects on gene expression. A TA-rich sequence, TTTATTA, contained in 3'-untranslated region of pRL-rhTNF $\alpha$  may be involved in the inhibitory effect on gene expression.

**Key words** pRL-rhTNF $\alpha$  cDNA, 3'-untranslated region, regulation of expression



A. Analysis of fermentation products in *E. coli* by SDS-PAGE

1. pRL-rhTNF $\alpha$ /JM103.
2. 8. JM103
- 3~7. pRL-rhTNF $\alpha$  2-1 to 2-5/JM103
9. Molecular weight marker

B. Identification of purified rhTNF $\alpha$  2 by SDS-PAGE

1. Molecular weight marker
2. Crude product
3. Purified product

C. Identification of pRL-rhTNF $\alpha$ 2 transformants by electrophoresis

1. pRL-rhTNF $\alpha$ 2
- 2~5. pRL-rhTNF $\alpha$ 2 (1-4) + Nde, Hind III
6. Molecular weight marker ( $\lambda$  DNA/Hind III)