人肿瘤坏死因子可溶性受体Ⅰ与人 IgG:Fc 的融合基因的构建及其在大肠杆菌中的表达

朱 琛* 倪 勇* 修 梅 徐人尔 赵寿元 李昌本
(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 方法引入编码氨基酸残基序列为 GGGGSGGGGS 的接头，将 sTNFR1 cDNA 与人 IgG：Fc cDNA 片段连接，构成融合基因 fusion 1。将 fusion 1 克隆在 pBSⅡ SK′ 载体上。测定序列后，转入 pRSET-B 表达载体，在大肠杆菌中表达，得到分子量为 45kDa 的蛋白，超声破碎后电泳证明表达的蛋白为包涵体，经免疫蛋白印迹证实为我们构建的融合蛋白。

关键词 人肿瘤坏死因子受体 I，sTNFR1-IgG:Fc 融合 cDNA
学科分类号 Q789

肿瘤坏死因子 α（TNFα）主要由激活的巨噬细胞和单核细胞产生。它参与多种机体反应。两类受体参与介导了 TNFα 众多的生物学功能。它们是 TNF-R55（即 TNFR1）和 TNF-R75（即 TNFR2）。分子量分别是 55 kDa 和 75kDa[1]。由于 TNFα 具有多种生物学功能，所以有应用于临床治疗的前景。但由于它是在细胞因子调节过程的上游起作用，所以会引发一系列下游反应，以致产生较大的毒副作用。同时，一些疾病，如败血症休克，脑疟疾，风湿性关节炎，移植器官异体排斥等都直接和 TNFα 的作用有关。因此，寻找一种能有效地与 TNFα 相拮抗的蛋白分子，用于缓解 TNF 引起的毒副作用和疾病将是非常重要和有意义的。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 人可溶性 TNF 受体Ⅰ（sTNFR1）cDNA 和载体 pBSⅡ SK^- 的重组质粒，由本实验室构建[2]。

1.1.2 人 IgG：Fc cDNA（克隆载体 pBSⅡ SK^+），由美国西雅图 Immunex 公司赠送。

1.1.3 限制酶，T4 DNA Ligase，PWO DNA Polymerase 扩增试剂盒，Boehringer 公司产品；T7 DNA Polymerase 测序试剂盒，异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（IPTG），Promega 公司产品；兔抗人 IgG 多克隆抗体，DAKO 公司产品；酶标绵羊抗兔 IgG（HRP），华美公司产品；克隆及表达载体均为 Invitrogen 公司产品。

---

* 作者对本文做出同等贡献。

收稿日期：1997-08-16，修回日期：1998-04-16。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

1.2 方法

1.2.1 用 PCR 方法改建 sTNFR1 cDNA：在 sTNFR1 cDNA 原核表达的基础上[2]，对该 cDNA 序列作进一步改造。在 5′端引物上引入 Xba Ⅰ和 Nde Ⅰ两个酶切位点。以便克隆 PCR 产物。3′端反向引物引入编码 10 个氨基酸残基 GGGGSGGGGS 的接头顺序，并设有 BamH Ⅰ连接位点。

TRZC1：5′-GC TCTAGAG CATATGAGTGTTTGCCCGCAGG-3′（32mer）
Linker1：5′-CTC GGATCCACCGCCACCGCTACCGCCACCGCCTGAGT

CCTCAGTGCCCTTAACATT-3′（57mer）由 Canada 上海 Sangon 公司合成。以 sTNFR1 cDNA 为模板，用以上两引物进行 PCR 扩增。反应体系中含：模板质粒：sTNFR Ⅰ-pBS Ⅱ SK⁻ 1 μl（10 ng），引物：TRZC1（10 mmol/L）1 μl，Linker1（10 mmol/L）1 μl，10×缓冲液 5 μl，dNTP（2 mmol/L）5 μl，PWO 1 μl，加 H_2O 至总体积 50 μl。PCR 反应条件为：92℃ 180 s；92℃ 30 s，55℃ 45 s，72℃ 60 s 为一个循环，PCR 扩增 30 个循环；最后 72℃ 180 s 延伸反应，反应产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 sTNFR1-IgGFc 融合蛋白 cDNA（fusion 1）的构建：回收 PCR 产物，分别用 Xba Ⅰ和 BamH Ⅰ双酶切 PCR 产物和含有人 IgG-Fc 的质粒（Fc-pBSIISK⁺），电泳分离目的片段，然后用 Glass milk 回收改构好的 sTNFR1 cDNA 片段和含 IgG：Fc cDNA 的载体。

1.2.3 连接、转化与筛选：取改构好的 sTNFR1 cDNA 片段和含 IgG：Fc cDNA 的载体各约 50 ng，用 T4 Ligase 于 16℃ 连接过夜，次日转入 JM109 感受态细胞。挑取菌落若干，取少许菌体悬于 40μl ddH_2O 中，100℃ 煮沸 5 min，离心取 10 μl 上清，分别加入引物：TRZC1（10 mmol/L）0.3 μl，Linker 1（10 mmol/L）0.3 μl，10×缓冲液 2.5 μl，dNTP（2 mmol/L）1.5 μl，Taq 酶 0.2μl，加 H_2O 至总体积 25 μl，循环数为 20。电泳 PCR 产物，能扩增出与 **1.2.1** 中同样大小片段的菌落为阳性克隆。进一步用 EcoR Ⅰ和 Nde Ⅰ双酶切鉴定，能扩增出长约 1.2 kb DNA 片段的为阳性克隆。融合基因命名为 fusion 1，重组质粒为 *tdz*，工程菌株为 TDZ。

1.2.4 融合基因 fusion 1 的全序列测定：A. 亚克隆的构建：用 Xba Ⅰ，BamH Ⅰ双酶切 *tdz*，得到 sTNFR1 部分，克隆进 pBS Ⅱ SK⁻ 中，得到 1 号亚克隆；再用 BamH Ⅰ，EcoR Ⅰ双酶切 *tdz*，得到 IgG：Fc 部分，克隆进 pBS Ⅱ SK⁻ 中，得到 2 号亚克隆；然后用 Sac Ⅱ双酶切 *tdz*，将余下的载体自连得到 3 号亚克隆。B. 测定：参照 Promega 公司的产品说明书进行。

1.2.5 TDZ 发酵产物的初步纯化：将重组质粒 *tdz* 用 Nde Ⅰ和 EcoR Ⅰ双酶切，得到的融合 cDNA fusion 1 克隆在表达载体 pRSET-B 中，转化大肠杆菌 DE3 菌株，构成 TDZ 工程菌株。

pRSET 为 IPTG 诱导型的表达载体。诱导条件参照 Invitrogen 公司的说明书，并稍作改进；诱导 3 h 后，取 1 ml 菌液，离心收集菌体，加入 100 μl 水重新悬浮并加入等体积的 2×上样缓冲液，沸水浴中放置 5 min，15% SDS-PAGE 检测。剩余的菌体离心收集，按 1g 菌体∶10 ml 超声破碎液 TBS 的比例悬浮菌体，超声破碎，离心后分别取上

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

清和沉淀进行 SDS-PAGE 检测。超声沉淀用 2 mol/L 尿素洗 2 次，沉淀以 8 mol/L 尿素加 8 mol/L DTT 溶解，取样作 SDS-PAGE。

1.2.6 免疫蛋白印迹分析：参照《分子克隆实验指南》（第二版）的方法进行。第一抗体和第二抗体的稀释度按产品说明书进行。封闭液采 10% 小牛血清-PBS（pH 7.4）-0.05% Tween-20。

2 结 果

2.1 PCR 获取目的片段，融合基因 fusion 1 的构建

以含有 sTNFR1 的重组质粒为模板，用引物 TRZC1 和 Linker 1 进行 PCR 扩增。电泳显示产物有很强的专一性。

将 PCR 产物用 Xba Ⅰ和 BamH Ⅰ双酶切处理，回收 DNA 片段后，克隆进含 IgG：Fc cDNA 的 pBSⅡ SK$^+$ 载体（Xba Ⅰ和 BamH Ⅰ双酶切处理），构建的融合基因为 fusion 1。经酶切图谱分析（图 1）证明拼接正确。

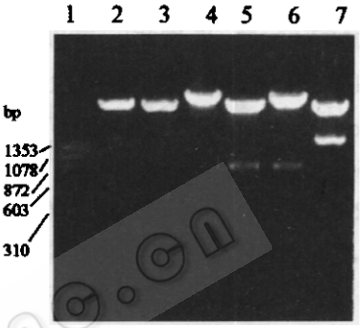

图 1 fusion 1 的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction map of fusionl gene

1. Φ×174/Hae Ⅲ marker
2. pBSⅡ SK$^+$ -/Xba Ⅰ + BamH Ⅰ
3. pBSⅡ SK$^+$ - IgG：Fc/BamH Ⅰ + EcoR Ⅰ
4. pBSⅡ SK$^+$ - fusion 1/BamH Ⅰ + EcoR Ⅰ
5. pBSⅡ SK$^+$ - sTNFR1/Xba Ⅰ BamH Ⅰ
6. pBSⅡ SK$^+$ - fusion 1/Xba Ⅰ + BamH Ⅰ
7. pBSⅡ SK$^+$ - fusion 1/Xba Ⅰ + EcoR Ⅰ

2.2 为测定 fusion 1 的全序列构建亚克隆

我们在 fusion 1 中，选择了几个酶切位点，酶切连接后建成 3 个亚克隆（No. 1，2，3）（图 2）。经双链测序，证明与预期序列相符，图 3 示融合位点的 DNA 序列。

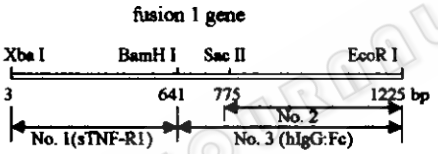

图 2 fusion 1 的 3 个亚克隆的构建

Fig. 2 Construction of three fusion 1 subclones

2.3 融合基因 fusion1 在 *E. coli* 中的表达

挑取 TDZ 单克隆进行发酵。从 SDS-PAGE 结果（图 4）可以看到，IPTG 诱导后有明显的表达条带，其分子量稍大于标准蛋白质分子量标记 43 kDa，与理论推算的融合蛋白分子量 46 kDa 相符。另外，发酵菌体经超声破碎后，分别收集上清及沉淀，SDS-PAGE 证明表达的蛋白产物以包涵体形式存在。初步纯化包涵体，经 SDS-PAGE 电泳胶薄层扫描测定，纯度达 70%。

2.4 免疫蛋白印迹分析

由于融合蛋白的羧基端为人 IgG:Fc 片段。在免疫蛋白印迹分析时，用兔抗人 IgG 多克隆抗体，与转移到硝酸纤维膜上的蛋白作免疫显色反应，用辣根过氧化物酶显色系统显色。发酵菌体总蛋白样品在稍大于标准蛋白质分子量标记43kDa的位置上含呈阳

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

性显色反应的条带。空载体阴性对照在相应位置上则无显色条带可见（图 5）。

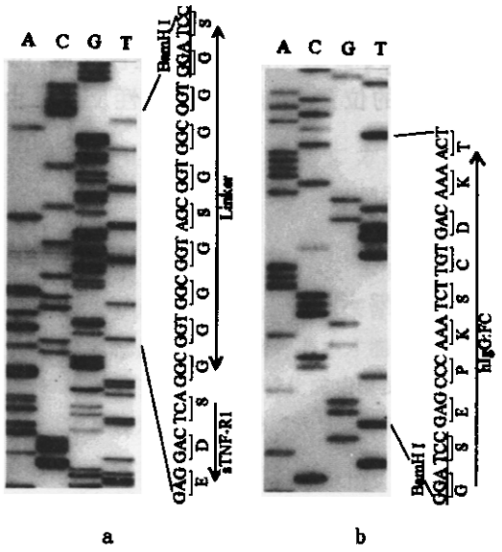

图 3　fusion 1 连接处的 DNA 序列

Fig. 3　Fusing site sequence of fusion 1

a. sTNF-R1 3′terminal (From subclone No. 1)

b. hIgG: Fc 5′terminal (From subclone No. 2)

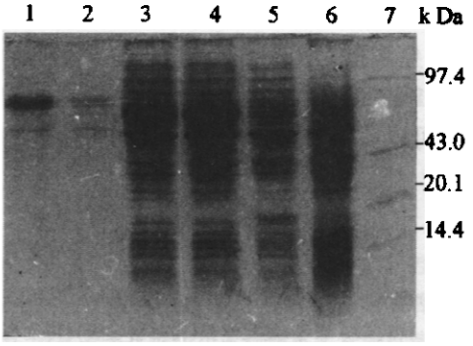

图 4　Fusion1 表达产物的 SDS-PAGE 图

Fig. 4　SDS-PAGE of Fusion 1

1～2. Fusion 1 protein as an inclusion body

3～4. pRSET-B-fusion 1 (DE3) after 3 h induction

5. pRSET-B (DE3) control

6. Ultrasonic supernant of pRSET-B-fusion 1 (DE3)

7. MW standard markers

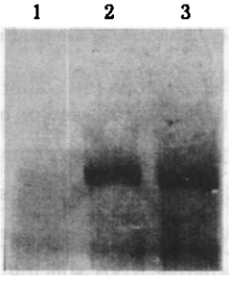

图 5　Fusion 1 免疫蛋白印迹图

Fig. 5　Western blot analysis of Fusion 1

1. pRSET-B (DE3) control

2～3. pRSET-B-fusion 1 (DE3)

3　讨　　论

我们在已构建的 sTNFR1 的工作基础上，研究 sTNFR1-IgG：Fc 融合蛋白。为此，重新设计了 PCR 引物，5′端引入了 Xba Ⅰ酶切位点，3′端引物上加上了一个编码 10 个氨基酸残基的 DNA linker，该 linker 的设计参考 Benson 等人在构建 GM-CSF/IL-3 融合蛋白时所用的氨基酸 linker 顺序[6]。在 IgG：Fc 和 sTNF-R1 之间加上了编码氨基酸 GGGGSGGGGS 的接头，构建好的融合的 cDNA 克隆在 pBSⅡ SK$^+$载体上。序列测定后再转入 pRSET-B 表达载体，进行原核表达，得到分子量约为 45 kDa 的蛋白，超声破碎后电泳证明表达蛋白为包涵体，经免疫蛋白印迹分析确认为我们构建的融合蛋白。

我们沿用与原核表达 sTNFR1 相同的发酵条件获得了融合蛋白。虽然为了构建融合基因的需要，在融合基因中间区段引入了一个在 *E. coli* 中极少用到的甘氨酸密码子 GGA(BamH Ⅰ酶切位点处)。但这并未影响外源蛋白的翻译。说明真核基因在 *E. coli* 细胞中表达时，基因的翻译起始区域密码子改为 *E. coli* 细胞的偏好密码子对于整个蛋白的翻译完成起关键作用。至于基因的中间区段密码子的属性似乎对整个蛋白的翻译无太

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

大的影响。因此,真核基因在 *E. coli* 细胞的表达时,往往只需改变基因上游密码子为 *E. coli* 细胞的偏好密码子。

免疫蛋白印迹分析结果(图5)显示,含空载体 pRSET-B 的克隆样品无显色反应,fusion 1 cDNA 诱导后表达的蛋白样品在略大于 43 kDa 的位置上有明显的阳性反应。由此,可以认为该蛋白产物为我们所构建的融合蛋白。

参 考 文 献

1 Vandenabeele P, Declercq W *et al*. Trends in Cell Biology, 1995, **5**(10): 392~399

2 修 梅,朱 琛等.复旦学报(自然科学版)(待发表)

3 Mohler K M, Torrance D S *et al*. J Immunol, 1993, **151**: 1548~1561

4 Lukacs N W, Chensue S W *et al*. J Immunol, 1994, **152**: 5883~5889

5 Baker D, Butler D *et al*. Eur. J Immunol, 1994, **24**: 2040~2048

6 Curtis B M, Williams D E *et al*. P N A S USA, 1991, **88**: 5809

7 陈亚华,周 铭等.生物化学与生物物理学报, 1996, **28**(3): 257~263

Construction of sTNFR1-IgG: Fc Fusion Gene and Its Expression in *Escherichia coli*

Zhu Chen* Ni Yong* Xiu Mei Xu Rener Zhao Shouyuan Li Changben

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

Abstract Tumor necrosis factor α(TNFα) exerts many biological functions such as anti-infection, anti-tumor, cytotoxity and systemic inflammatory response. Two kinds of receptor of TNF, TNF-R1 and TNF-R2, mediate these effects. Each of them has two forms respectively: the mumbrane binding form and soluble form. The soluble form(i. e. sTNF-Rs) is generated by the gene encoding TNF-Rs throught alternative RNA splicing, or by protein processing from TNF-Rs. It can inhibit the specific binding between TNFα and its membrane receptors. Through this way sTNFRs exhibit the clinical significance by reducing the side effect of TNFα or treating TNFα related diseases. However, the monomeric form of sTNFRs combine with TNFα with much low affinity, which is not ideal in the clinical practise. In order to improve the affinity of the protein to TNFα, a fusion cDNA of sTNF-R1-IgG: Fc was constructed by adding an oligonuleotide linker between sTNFR1 and IgG: Fc. The protein product with biological function is expected as an IgG like divalent protein with two subunits linked by the disulfide bond contributed by the disulfide bond contributed by IgG: Fc fraction. The dimeric sTNFR1-IgG: Fc molecule is supposed to be a more potent inhibitor compared with the monomeric sTNFR(50: 1000×). The product of this fusion gene has been expressed in *E. coli* DE3 cells. It takes a form of inclusion body and has been identified by protein immunoblotting.

Key words Soluble tumor necrosis factor α receptor 1(sTNFR1), sTNFR1-IgG: Fc fusion cDNA

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn