

## 第56位酪氨酸与肿瘤坏死因子细胞毒活性的关系\*

张德震 陈苏民 陈南春 智 刚 苏成芝

(第四军医大学生物化学教研室, 西安)

选择肿瘤坏死因子分子中间部分保守区第56位酪氨酸, 用寡核苷酸诱导的体外基因定点突变法, 将其改变为谷氨酰胺。将突变的肿瘤坏死因子基因插入表达载体 pBV220, 所得表达产物的分子大小及表达量均无明显变化, 但其细胞毒活性及比活性均下降数百倍, 表明该区是肿瘤坏死因子细胞因子细胞毒活性的必需区。

**关键词** 肿瘤坏死因子; 基因定位突变; 蛋白质构效关系

肿瘤坏死因子(TNF)具有抗肿瘤, 抗病毒和免疫调节等多种生物学活性<sup>[1-4]</sup>, 尤其是它具有特异性杀伤肿瘤细胞, 而不杀伤正常细胞的作用<sup>[5]</sup>, 使其有着比较广阔的临床应用前景。但肿瘤坏死因子又具有显著的副作用, 限制了它的临床研究和应用。研究肿瘤坏死因子分子结构与功能的关系, 以期用蛋白质工程手段提高其生物活性, 降低其副作用, 在理论和应用上都是有意义的。

本文是对肿瘤坏死因子构效关系研究的一个部分。采用寡核苷酸指导下的定位基因突变方法, 对肿瘤坏死因子保守区域的第56位酪氨酸密码子进行定向突变, 观察突变的肿瘤坏死因子对肿瘤细胞毒性的变化。

### 材料与 方法

#### (一) 实验材料

1. 肿瘤坏死因子表达菌株 pBVT-NF202: 为张德震等<sup>[6]</sup>构建的肿瘤坏死因子高表达株。

2. 大肠杆菌表达载体 pBV220 及宿主菌 DH5 $\alpha$ : 由中国预防医学科学院病毒研究所病毒基因工程国家重点实验室提供。

3. 寡核苷酸指导的基因定位突变用的 M13噬菌体载体: M13mp9, 在该噬菌体的两个必需基因上有两个琥珀突变, 只能在 sup E<sup>+</sup> 的宿主菌内生长, 用作突变模板。M13mp 9rev, 不带琥珀突变, 可以在 sup E<sup>+</sup> 和 sup E<sup>-</sup> 的宿主菌内生长, 用作在突变反应中形成缺口双键, 所形成的突变体可用 sup E<sup>-</sup> 宿主菌进行筛选。

4. 突变用大肠杆菌菌株: BMH71-18株( $\Delta$ (lac pro AB), thi, sup E:F', lac I<sup>a</sup>, ZAM15, pro A<sup>+</sup> B<sup>+</sup>)用来制备突变模板。BMH 71-18 mut S 株(BMH71-18, mut S 15::tn 10)用来扩增突变反应产物。MK30-3 株( $\Delta$ (lac-pro AB), rec A, gal E, str A:F' lac I<sup>a</sup>, ZAM15, pro A<sup>+</sup> b<sup>+</sup>)用来筛选突变体。突变用载体和宿主菌均购自德国 Boehringer Mannheim公司。

5. 限制酶及工具酶类: 分别购自 Boehringer Mannheim 公司, New England BioLabs公司, 中国医学科学院基础医学研究所友谊生物制品公司及华美生物工程公司。

#### (二) 实验方法

本文于1990年12月23日收到。

\* 国家自然科学基金资助项目。

1. 脱氧寡核苷酸的化学合成: 采用亚磷酸胺法在 Applied Biosystem 381A 型 DNA 合成仪上合成, 用聚丙烯酰胺凝胶变性电泳法纯化。

2. DNA 重组及克隆: 参照 Maniatis 等方法<sup>[7]</sup>。

3. 寡核苷酸指导的体外基因定位突变: 按照文献[12], 参考 Boehringer Mannheim 公司基因突变操作程序进行。

4. DNA 序列分析: 采用美国 USB 公司的 Sequenase™ 试剂盒并按其说明操作程序进行。

5. 肿瘤坏死因子活性检测: 肿瘤坏死因子的诱导表达与细菌裂解沿用本室方法<sup>[6]</sup>。以放线菌素 D 存在下, 对 L929 细胞的毒性方法<sup>[9]</sup>检测肿瘤坏死因子的活性。在 96 孔板上每孔加入  $1-3 \times 10^5$  细胞, 培养 24h 后加入  $1\mu\text{g}/\text{ml}$  放线菌素 D 及待检样品 (不同稀释度的 TNF 表达菌裂解上清液或纯化的 TNF), 24h 后观察细胞存活情况, 以杀死 50% 细胞的 TNF 量为 1 个单位。

6. 肿瘤坏死因子及其突变体的纯化: 按本室已建立的 TNF 纯化方法<sup>[10]</sup>进行。

7. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳: 按 Laemmli 法<sup>[11]</sup>。

## 结 果

### (一) 肿瘤坏死因子第 56 位酪氨酸密码子的定向突变

从肿瘤坏死因子表达载体 pBVTNF 202 中以 EcoR I -Pst I 双酶切下 0.6kb 肿瘤坏死因子编码基因片段, 插入带琥珀突变的 M13mp9 双链 DNA 的 EcoR I -Pst I 位点中。用大肠杆菌 BMH71-18 菌株扩增重组体, 制备重组体单链 DNA 作为突变反应模板。

人工合成的寡核苷酸突变引物长度为 21 个核苷酸: 5'-GAGGGCCTGCAGC-TCATCTAC-3', 与肿瘤坏死因子的相应区域 --GAGGGCCTGTACCTCA-TCTAC-- 有两个核苷酸的差别, 使肿瘤坏死因子第 56 位酪氨酸密码子 TAC 改变为谷氨酰胺密码子 CAG。将带有肿瘤坏死因子基因和琥珀突变的 M13mp9 单链 DNA 模板与 EcoR I -Pst I 酶切的不带琥珀突变的 M13mp9 rev 热变性 DNA 退火, 形成缺口双链 DNA。再加入人工合成的寡核苷酸突变引物与之退火。向反应体系中加入四种脱氧单核苷酸、DNA 聚合酶 I Klenow 大片段和 T4 DNA 连接酶, 于室温下反应 2h, 加入 EDTA 至终浓度  $12.5\text{mmol}/\text{L}$ ,  $85^\circ\text{C}$  温育 10min 后终止反应。

用上述突变反应混合液转化氯化钙处理的大肠杆菌 BMH71-18mut S 细胞, 液体培养过夜, 取上清液作连续 1000 倍稀释, 加入过夜培养的大肠杆菌 MK30-3 细胞平皿培养。整个基因定向突变过程见图 1。从所获得的噬菌斑中挑选 5 个, 小量培养, 快速提取噬菌体 DNA, 用限制酶酶切鉴定, 结果有 4 个发生了预期的突变, 突变率达 80%。

从 4 个突变体中任选一个, 感染大肠杆菌 JM103, 制备单链 DNA, 进行 DNA 序列分析。结果证实肿瘤坏死因子基因发生了设计所预期的突变, 即第 56 位酪氨酸密码子突变为谷氨酰胺密码子 CAG, 突变部位产生了一个限制酶 Fnu 4 HI 识别位点 GCAGC (见图 2)。

### (二) 肿瘤坏死因子突变体的表达量与活性比较

从突变体 M13mp9 TNF 25 切下 0.6kb 的 EcoR I -Pst I 突变的肿瘤坏死因子基因片段, 插入表达载体 pBV220 的 EcoR I -Pst I 位点, 得到能表达肿瘤坏死因子

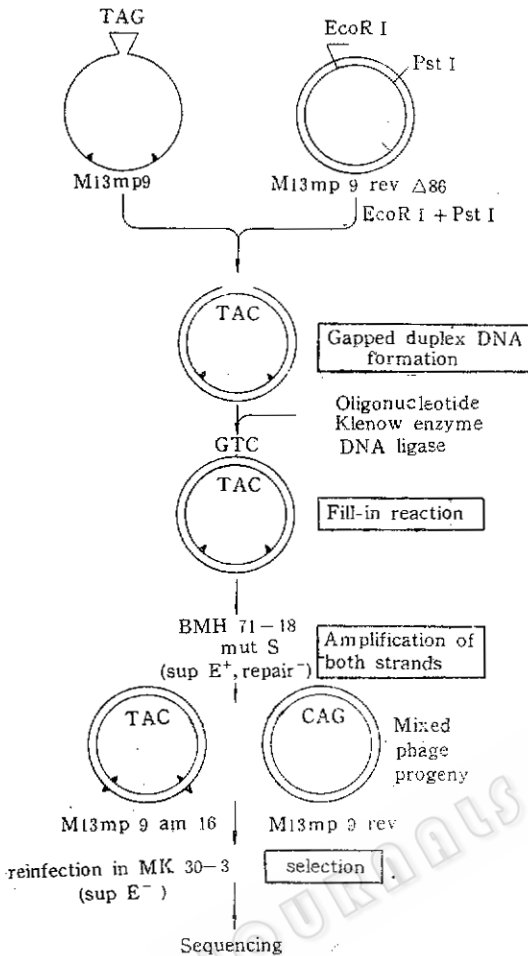


图 1 体外定位基因突变

Fig.1 Site-specific gene mutagenesis

突变体的质粒 pBV TNF25, 转化宿主菌 DH5 $\alpha$ 。将 DH5 $\alpha$ /pBV TNF202 与 DH5 $\alpha$ /pBV TNF25 (与 pBV TNF202 的差别仅 TNF 基因第56位密码子两个核苷酸不同) 同时在 30 $^{\circ}$ C 培养、42 $^{\circ}$ C 诱导表达, 离心收集细菌、盐酸胍裂菌、17000r/min 离心 10min, 取少量上清液作 SDS-PAGE 检查肿瘤坏死因子表达情况, 并检测上清液对 L929 细胞的细胞毒性。结果表明: 突变后的肿瘤坏死因子的分子大小和表达量均无显著变化 (图 3a), 然而其细菌裂解上清液对 L929 细胞的细胞毒活性急剧下降, 表达菌 DH5 $\alpha$ /pBV TNF25 细菌裂解

液上清肿瘤坏死因子滴度比 pBV TNF202 低的 2—3 个数量级。对照株 DH5 $\alpha$ /pBV 220 细菌裂解液对 L929 细胞无细胞毒性, 见表 1。

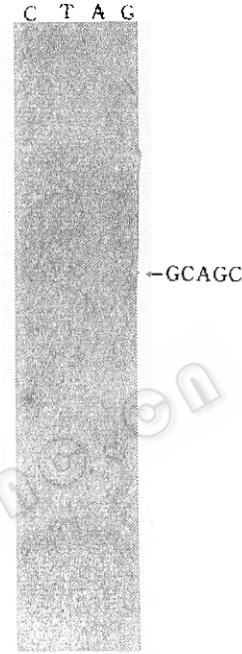


图 2 突变体 DNA 序列分析 (箭头处为突变点)  
Fig.2 DNA sequencing of the mutant (the arrow shows the mutated point)

表 1 TNF Gln56 与 TNF 的活性比较  
Table 1 Comparison of activities of TNF Gln56 and TNF

表达质粒 Expression plasmid	TNF 活 性 TNF Activity ( $\times 10^3$ u/ml)
pBVTNF202	189.0
pBVTNF25	0.271
pBV220	0.0

### (三) 肿瘤坏死因子及其突变体的纯化和活性比较

采用本室建立的肿瘤坏死因子纯化方法分别对肿瘤坏死因子及其突变体的基因表达产物进行纯化, 获得了电泳纯的肿瘤坏死因子和突变体肿瘤坏死因子 (图 3b)。用 Lowry's 法或紫外吸收法测定纯化产物

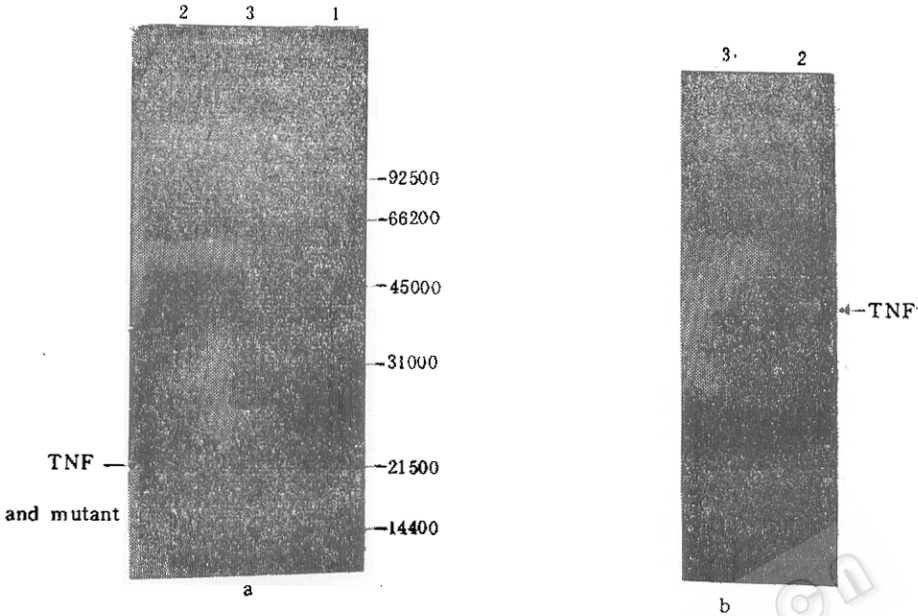


图 3 肿瘤坏死因子及其突变体SDS-PAGE电泳  
Fig.3 SDS-PAGE of TNF and the mutant  
a. SDS-PAGE of bacterial lysate, b. SDS-PAGE of purified mutant protein  
1. Standard MW marker, 2. Mutant protein, 3. Tumor necrosis factor

的蛋白质含量，同时测定纯化产物的肿瘤坏死因子活性，计算肿瘤坏死因子及其突变体的比活性。结果表明：肿瘤坏死因子Tyr56突变为Gln56后，比活性下降了583倍，见表2。

表 2 TNF Gln56与TNF的比活性比较  
Table 2 Comparison of specific activities of TNF gln56 and TNF

蛋白质	比 活 性
Proteins	Specific activity(×10 <sup>4</sup> u/mg)
TNF	842.0
TNFGln56	1.458

讨 论

本文对人肿瘤坏死因子cDNA的定位突变，采用琥珀密码筛选的突变系统。由于突变体筛选菌株MK30-3对带有琥珀密码子的非突变体（突变反应模板）具有严格的筛选作用，因此具有较高的突变效率

（理论上突变效率可达100%）；且筛选突变体时不必用突变引物进行杂交，可直接用限制酶酶切鉴定，又能直接进行DNA序列分析。与我们以前所用的突变方法<sup>[6]</sup>相比，具有操作简单，实验周期短，成功率高等优点，从而使本实验顺利完成。

目前肿瘤坏死因子结构与功能的研究资料还不多，仅有少数对其N端几个氨基酸与生物活性关系的探讨。近年Jones等用X线衍射等技术研究了肿瘤坏死因子的蛋白质空间结构<sup>[13]</sup>，但空间结构与功能的关系还未阐明。我们通过对人、鼠、兔肿瘤坏死因子α和β一级结构及其生物活性的比较，发现这些不同种类的肿瘤坏死因子分子中有一些位于疏水区的保守氨基酸，推测它们位于分子内核，可能是不同的肿瘤坏死因子具有相同生物学活性的结构基础。对这些区域进行研究，可能会找到担负不同生物活性（抗肿瘤、抗病毒、免疫调节及毒副作用）的结构区域，最终阐

明其结构与功能的关系。我们首先选择的第56位酪氨酸, 位于肿瘤坏死因子三明治样结构的下层反向 $\beta$ 片层中<sup>[13]</sup>, 无论在肿瘤坏死因子的单体还是在活性形式的三聚体中, 都位于分子内部。将此酪氨酸改变为谷氨酰胺使该部位亲水性增加, 使分子内失去一个 -OH 基团而加多一个 -NH<sub>2</sub> (或-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)。实验证明, 突变后的肿瘤

坏死因子对 L929 肿瘤细胞的细胞毒性下降数百倍。表明 Tyr56 可能是肿瘤坏死因子抗肿瘤活性的必需基团, 或者 Tyr56 所在区域是肿瘤坏死因子抗肿瘤活性的必需区。该区域涉及多大范围, 第56位酪氨酸改变后如何影响肿瘤坏死因子的肿瘤细胞毒作用, 是影响受体结合, 还是影响受体结合后的过程等问题, 尚待进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Mannel, D.N. et al., *Infect. Immun.*, 33:156, 1981.
- [2] Old, L.J. et al., *Science*, 230:830, 1985.
- [3] Mestan, J. et al., *Nature*, 322:816, 1986.
- [4] Heidenreich, S. et al., *Immunol.*, 140:1511, 1988.
- [5] Sugerman, B.J. et al., *Science*, 230:843, 1985.
- [6] 张德震等: 生物工程学报, 6 (3): 181, 1990.
- [7] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
- [8] Kramer, W. et al., *Nucl. Acids Res.*, 12:9441, 1984.
- [9] Aggarwal, B.B. et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2345, 1985.
- [10] 陈南春等: 第四军医大学学报 (待发表)
- [11] Laemmli, U.K., *Nature*, 227:680, 1970.
- [12] 张德震等: 国外医学分子生物学分册, 11 (4): 159, 1989.
- [13] Jones, F.V. et al., *Nature*, 338:325, 1989.

## Significance of the 56th Tyrosine of Tumor Necrosis Factor for Its Cytotoxic Activity

Zhang Dezhen Chen Sumin Chen Nanchun Zhi Gang Su Chenzhi  
(The Fourth Military Medical University, Xian)

A conserved amino acid residue, the 56th tyrosine was substituted by glutamine using site-specific mutagenesis. The expression level of this mutant protein in *E. coli* did not changed significantly, however, its specific activity of the cytotoxicity on L929 cultural cells decreased 583 times as comparing to the unmutant tumor necrosis factor. The results show that the tyrosine 56 residue or the region where tyrosine 56 located is important for the cytotoxicity of tumor necrosis factor.

### Key words

Tumor necrosis factor; oligonucleotide-directed mutagenesis; structure-function relationship in protein