

长白猪肿瘤坏死因子 α 成熟肽基因克隆、 表达及其表达产物活性检测

杨明凡, 陈红英, 张素梅, 王彦彬, 崔保安

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要: 本研究旨在克隆和表达猪肿瘤坏死因子成熟肽基因及其表达蛋白的生物活性。根据 GenBank 登录的猪肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 成熟肽基因序列设计一对上下游引物。应用 RT-PCR 技术直接从丹系长白猪脾脏组织中扩增猪的 TNF- α 成熟肽基因。将 RT-PCR 扩增到的特异性片段克隆到 pGEM-T Easy 载体中, 构建 pGEM-TNF 重组质粒, 经宝生物(大连)有限公司测序, 该 TNF- α 成熟肽基因的长度为 465 bp, 编码 154 aa。以重组克隆质粒 pGEM-TNF 为模板, PCR 扩增猪 TNF- α 成熟肽基因, 并将其插入原核表达载体 pET-28a(+) 中, 在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21 中诱导表达。SDS-PAGE 电泳结果表明表达的融合蛋白约为 38 ku, 重组蛋白以包涵体形式表达, 表达重组蛋白约占菌体总蛋白的 36.8%。细胞毒 T 细胞试验表明所表达的蛋白经初步纯化、变性复性后, 可明显增强淋巴毒性 T 细胞作用。结果提示长白猪肿瘤坏死因子得到了成功克隆与表达, 表达的蛋白产物具有一定的生物活性。

关键词: 猪肿瘤坏死因子; 基因克隆; 原核表达; 生物学活性

中图分类号: S852.4

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2011)08-1145-05

Cloning, Expression of the Mature TNF- α Gene from Danish Landrace Porcine and Biological Activities Detection of the Expressed Protein

YANG Ming-fan, CHEN Hong-ying, ZHANG Su-mei, WANG Yan-bin, CUI Bao-an

(College of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University,
Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The complete open reading frame (ORF) of TNF- α gene was amplified from Danish Landrace porcine spleen lymphocyte stimulated by ConA, which includes 465 bp and encodes 154 aa. The gene encoding mature TNF- α protein was cloned directionally into prokaryotic expression vector pET-28a(+) and the fusion expression was induced in *E. coli* BL21. SDS-PAGE demonstrated that the fusion protein expressed in form of inclusion body is approximately 38 kDa, the product of expression account 36.8% of the total bacterium proteins. Western-blotting analysis indicated that there is a specific electrophoresis strip at the place where the relative molecular mass is about 38 kDa. A 465 bp specific fragment strip was observed by detection after the recombinant bacteria was transcribed. After the protein was purified roughly and renatured, the killing effect of CTLs Cytotoxicity assay confirmed that it can enhance lymphocyte cytotoxicity obviously.

Key words: porcine TNF- α ; gene cloning; prokaryote expression; biological activities

肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) 由 Carswell 等于 1975 年发现, 是主要由脂多糖

(LPS) 激活的单核-巨噬细胞产生的细胞因子。此外, 激活的 T 细胞、NK 细胞、肥大细胞等也能分泌

收稿日期: 2011-01-07

基金项目: 河南省博士后科研基金项目(10400102); 河南省教育厅科研攻关项目(2011A230011)

作者简介: 杨明凡(1971-), 女, 河南新野人, 在读博士后, 主要从事分子免疫学研究, E-mail: yangmingfan123@163.com

TNF,但量要少得多^[1]。TNF可分为 α 型和 β 型:TNF- α 也即经典的TNF,主要由LPS等激活的单核-巨噬细胞产生;TNF- β 主要由激活的T细胞产生,即淋巴毒素(LT)。TNF- α 的生物学活性相当广泛,除了具有抗肿瘤作用外,还能够激活炎症浸润细胞,杀死病原微生物;同时还能激活T细胞并促进B细胞产生抗体,增强MHC-I类抗原的表达,提高CTL对病毒的杀伤作用。TNF- β 的生物学活性是能杀伤带有相应抗原的肿瘤细胞和移植物的异体组织细胞,抑制靶细胞分裂繁殖的作用^[2]。由此可见TNF- α 在抗病原微生物感染、抗肿瘤及移植免疫等方面有着广泛的临床应用前景,是一种极具开发价值的新型免疫增强剂。1988年Shokhov首次克隆了人TNF- α 基因^[3],目前有关猪TNF- α 成熟肽基因的研究文献报道较少,本试验运用RT-PCR技术扩增到丹系长白猪TNF- α 成熟肽基因完整开放阅读框(ORF),并构建了其成熟肽在大肠杆菌中的高效表达,从而为进一步研究TNF- α 成熟肽基因生物学活性和应用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

丹系长白猪由河南省某种育场提供。

克隆载体pGEM-T Easy载体购自Promega公司;表达载体pET-28a(+),*E. coli* BL21,*E. coli* DH5 α 为本实验室保存。RPMI1640培养基购自GIBCO公司;淋巴细胞分离液、RT-PCR试剂盒、*Bam*H I、*Hind* III等内切酶、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷(X-gal)、琼脂糖等购自宝生物工程(大连)有限公司;T4 DNA连接酶购自Promega公司;DNA凝胶回收试剂、牛血清白蛋白(BSA)等购自北京天根生化科技有限公司;质粒快速提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限公司;氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽均购自Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 参照GenBank(X57321)已发表猪TNF- α 的基因序列,利用引物设计软件Primer 5.0设计上、下游引物。上游引物P1:5'-GCGG-GATCCATGCGTTTGGGAGTGC-3';下游引物P2:5'-ATAAGCTTTTGGTTTCCGTGACAGC-3'。上游引物P1带有*Bam*H I酶切位点,下游引物P2带有*Hind* III酶切位点,上、下游引物之间所扩

增片段长464bp,为猪TNF- α 基因的成熟肽。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.2 猪TNF- α 基因的PCR扩增 无菌操作取丹系长白猪脾脏,提取淋巴细胞总RNA。参照宝生物工程(大连)有限公司RT-PCR试剂盒说明书,进行反转录PCR扩增,反应程序:94℃5min;94℃1min,56℃1min,72℃30s,30个循环;72℃延伸10min。取5 μ L PCR产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测,然后用凝胶回收试剂盒回收纯化RT-PCR产物。

1.2.3 猪TNF- α 基因克隆与序列分析 将回收纯化到的PCR产物克隆到pGEM-T载体上,并转化至DH5 α 宿主菌。经*Bam*H I、*Hind* III酶切和PCR鉴定筛选阳性克隆,送宝生物工程(大连)有限公司进行测序,重组阳性质粒命名为pGEM-TNF。

1.2.4 猪TNF- α 成熟肽基因表达载体构建 以pGEM-TNF质粒为模板,PCR产物用*Bam*H I、*Hind* III酶切,电泳后回收纯化目的片段猪TNF- α 成熟肽基因,同时pET-28a(+)也用*Bam*H I、*Hind* III酶切、回收纯化。按照常规操作进行目的片段与表达载体的连接、转化,重组质粒经*Bam*H I、*Hind* III酶切和PCR初步鉴定后送宝生物(大连)有限公司测序,重组阳性质粒命名为pET-TNF。

1.2.5 猪TNF- α 成熟蛋白的原核表达 鉴定获得的阳性质粒pET-TNF转化大肠杆菌BL21菌株,挑取单个菌落在LB Kan⁺肉汤培养基中37℃振荡培养过夜。然后按1:10比例扩大培养,待OD值达0.6左右时,加入IPTG(终浓度为1.0 mmol·L⁻¹),37℃振荡培养,分别在诱导0、4 h后取菌液样品1 mL,离心,PBS重悬,加入等体积2 \times SDS上样缓冲液,煮沸5 min,参照文献方法进行SDS-PAGE电泳检测^[4]。

1.2.6 猪TNF- α 成熟蛋白原核表达条件的优化

诱导表达方法同上,另外分梯度设定IPTG终浓度为0~1.6 mmol·L⁻¹对重组菌液诱导3.5~4 h,进行SDS-PAGE检测,以确定最佳诱导浓度;利用终浓度为1.0 mmol·L⁻¹ IPTG对重组菌液进行诱导,分别在0~9 h和过夜诱导取菌样,进行SDS-PAGE检测,以确定最佳诱导时间。采用25、30、42℃不同温度进行诱导以确定最佳诱导温度。

1.2.7 猪TNF- α 成熟蛋白原核表达产物的Western blot分析 经SDS-PAGE电泳后,将凝胶上的蛋白转印至硝酸纤维素膜(NC)上,用鼠抗猪

TNF- α 单克隆抗体作一抗,用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 作二抗,参照文献[5]的方法进行 Western-blotting 分析。

1.2.8 猪 TNF- α 成熟蛋白表达产物的纯化与复性

表达产物的纯化与复性参照文献[6]的方法进行,收集上述表达蛋白产物的菌液,离心,用约 4 倍于沉淀重量的 PBS 重悬菌体,并用超声波将细菌破碎,破碎的细菌 $12\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集包涵体沉淀,每克沉淀加入 9 mL 变性液溶解沉淀,室温放置 1 h 以上;向变性蛋白溶液中加入 9 倍的稀释液,然后加入 GSH 和 GSSG,使其终浓度分别为 1 和 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 20 h 以上,对重组蛋白进行复性,然后用透析缓冲液进行透析,透析完全后溶液中不应含尿素,再用 PEG 8000 浓缩,将复性蛋白过滤除菌后 $-20\ ^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.9 细胞毒性 T 细胞试验 检测猪 TNF- α 成熟蛋白表达产物活性^[7]

1.2.9.1 靶细胞的制备:将猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)接种于长满单层的 MACK 145 细胞,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后收集细胞,吹散制成细胞悬液,用 RPMI 1640 营养液稀释成 10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液。

1.2.9.2 效应细胞制备:经血清学诊断确诊为 PRRSV 感染的小猪采血 5 mL,加入 300 μL 肝素抗凝,然后加入 4 倍体积的生理盐水,混匀后缓慢加入等体积的淋巴细胞分离液,2000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,吸取白细胞层转入 1.5 mL EP 管,用 RPMI 1640 营养液洗涤 3 次后,再用含 10% 犊牛血清的 RPMI 1640 培养液配制成 10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 细胞悬液。

1.2.9.3 混合培养:按靶细胞与效应细胞 1:20 的比例,在已培养有靶细胞的培养孔中加入淋巴细胞,同时按 1:10、1:10²、1:10³、1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶ 加入猪 TNF- α 的表达蛋白质,补加含 20% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 0.1 mL,继续培养 40 h,同时设靶细胞与效应细胞对照组和效应细胞作对照。

1.2.9.4 杀伤率计算:按公式

杀伤率 =

$$\frac{\text{对照组平均细胞数} - \text{试验组平均细胞数}}{\text{对照组平均细胞数}} \times 100\%$$

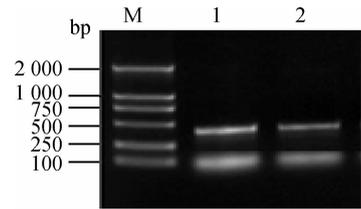
计算。

2 结果

2.1 猪 TNF- α 基因的 PCR 扩增

RT-PCR 扩增猪 TNF- α 基因产物电泳结果显

示,扩增出的特异性目的片段与理论预期的大小一致,长度约 465 bp(图 1)。



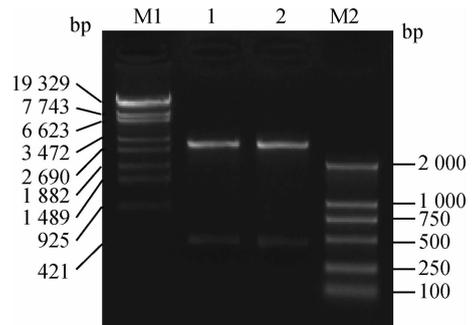
M. DNA 相对分子质量标准 DL2000;1,2. PCR 产物
M. Marker DL2000; 1, 2. Pig TNF- α PCR products

图 1 RT-PCR 扩增猪 TNF- α 基因

Fig. 1 Electrophoretic analysis of pig TNF- α PCR products

2.2 猪 TNF- α 基因重组克隆载体的鉴定

猪 TNF- α 基因 PCR 回收纯化产物与 pGEM-T Easy 连接转化,小量提取重组质粒经 *Bam*H I、*Hind* III 酶切得到预期大小的目的片段(图 2)。将得到的阳性克隆质粒送大连宝生物公司测序,证明重组克隆质粒 pGEM-TNF 构建成功。



M1、M2. DNA 相对分子质量标准;1,2. 重组质粒 pGEM-TNF

M1, M2. DNA Marker; 1, 2. Recombinant pGEM-TNF

图 2 重组质粒 pGEM-TNF 酶切鉴定

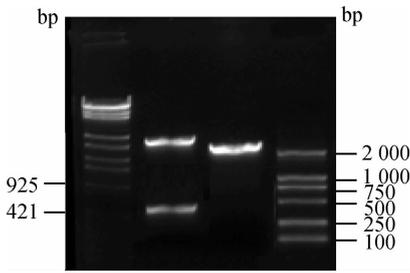
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pGEM-T with *Bam*H I and *Hind* III

2.3 猪 TNF- α 基因重组表达载体的鉴定

小量提取重组质粒用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切后电泳,得到预期大小的目的片段(图 3)。将得到的阳性克隆质粒送大连宝生物公司测序,结果与预期序列符合,证明重组质粒 pET-TNF 构建成功。

2.4 猪 TNF- α 基因原核表达产物检测

重组质粒转化到受体菌 BL21,经 IPTG 诱导后用 SDS-PAGE 分析,目的基因得到高效表达,表达蛋白的相对分子质量约为 38 ku,表达重组蛋白约占菌体总蛋白的 36.8%(图 4)。

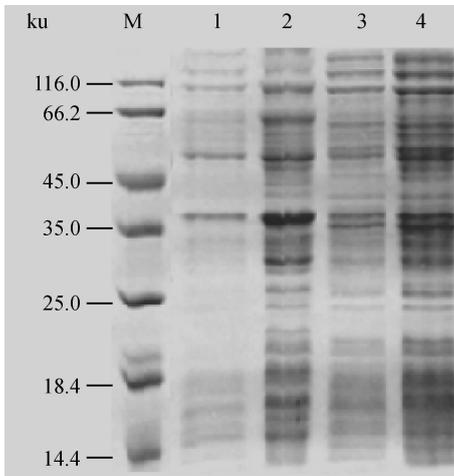


M1、M2. DNA 相对分子质量标准;1. 重组质粒 pET-TNF;2. pET-28a(+)

M1, M2. DNA Marker; 1, 2. Rrecombinant pET-TNF; 2. Negative plasmid

图3 重组质粒 pET-TNF 酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-TNF with *Bam*H I and *Hind* III



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. pET-TNF IPTG 诱导 1 h;2. pET-TNF IPTG 诱导 2 h;3. pET-28a(+)IPTG 诱导 1 h;4. pET-28a(+)IPTG 诱导 2 h

M. Middle MW protein marker;1. pET-TNF induced by IPTG for 1 h;2. pET-TNF induced by IPTG for 2 h;3. pET-28 a(+) induced by IPTG for 1 h;4. pET-28 a(+) induced by IPTG for 2 h

图4 表达产物 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 Expression of the pET-TNF in *E. coli* analyzed by SDS-PAGE

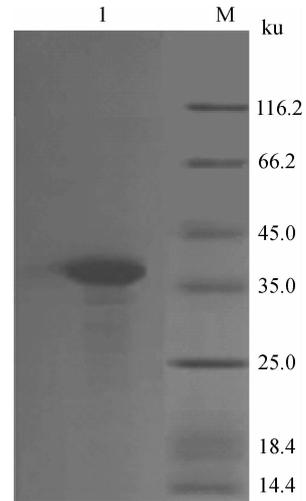
2.5 猪 TNF- α 基因表达产物的 Western blotting 分析

纯化后的表达产物经 Western blotting 分析, 结果与鼠抗猪 TNF- α 单克隆抗体呈现阳性反应(图 5), 且无非特异性条带出现, 证明表达产物为目的蛋白。

2.6 细胞毒性 T 细胞试验检测

靶细胞与效应细胞作用的同时, 按 1 : 10、1 : 10²、1 : 10³、1 : 10⁴、1 : 10⁵、1 : 10⁶ 加入猪 TNF- α 表达蛋白质对靶细胞的杀伤率分别如下: 42.2% \pm

3.4%、38.4% \pm 2.7%、33.3% \pm 2.1%、27.6% \pm 2.4%、21.2% \pm 2.3%、16.2% \pm 1.8%, 靶细胞与效应细胞对照组的杀伤率为 15.3% \pm 1.6%。统计学检验结果显示当猪 TNF- α 表达蛋白产物按 1 : 10⁵ 以上浓度(50 μ g \cdot mL⁻¹) 稀释时, 对靶细胞的杀伤率和靶细胞与效应细胞对照组的杀伤率差异显著 ($P < 0.05$), 表明猪 TNF- α 表达蛋白质具有增强 CTL 对病毒的杀伤作用活性。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 表达的目的蛋白

M. Middle MW protein marker;1. Expressed protein of the pET-TNF

图5 表达产物的 Western blotting 分析

Fig. 5 Western blot analysis of the expressed product of the pET-TNF in *E. coli*

3 讨论

猪 TNF- α 成熟肽基因与人 TNF- α 成熟肽基因相比, 核苷酸的同源性为 84.9%, 氨基酸的同源性为 87.1%, 说明人 TNF- α 和猪 TNF- α 成熟肽的同源性较高, 但又存在着一定差异, 这可能同为哺乳动物, 猪 TNF- α 和人 TNF- α 来源于共同的祖先, 这个共同的基因祖先在进化过程中, 在环境、疾病和免疫系统选择性的压力支配下演化为各自的 TNF- α , 为适应不同物种的免疫系统而发挥其生物学功能。

随着现代分子生物学技术的飞速发展, 在工程菌 *E. coli* 中高水平表达外源基因, 从而获得所需的大量目的蛋白, 已经在生物学技术领域中得到了广泛应用。pET-28 a(+)是一种融合表达载体, 含有较强的 T7 启动子, 并且能够编码 N 端 6 个连续的 His-Tag 前导肽作为亲和臂, 从而使所表达的重组蛋白通过金属离子(Ni²⁺) 配体亲和层析而快速纯化, 故该载

体具有表达效率高,表达产物易于纯化等优点^[8-11]。

研究发现,人 TNF- α 有 2 种形式:17 ku(157 个氨基酸)的分泌状态可溶性的 TNF- α (sTNF- α)和 26 ku(233 个氨基酸)膜相关的 TNF- α (mTNF- α),一般认为 mTNF- α 是 sTNF- α 的前体,在膜金属蛋白酶的作用下,从细胞膜上裂解,脱落成为 sTNF- α ^[17-20]。人的 TNF- α 是以分泌状态可溶性的 TNF- α (sTNF- α)发挥生物学作用,由 157 个氨基酸构成,以同源三聚体的形式发挥活性。rh-TNF- α 是迄今为止所有细胞因子中唯一具有直接杀伤靶细胞的因子,因此引起了国内外的广泛重视^[12-16]。据国内外文献资料报道关于人 TNF- α 成熟肽基因的克隆表达及生物活性研究相对较多^[17-21],但目前有关猪 TNF- α 成熟肽基因的研究文献报道较少,为此,本研究应用基因工程技术,成功克隆了丹系长白猪 TNF- α 成熟肽基因完整开放阅读框(ORF),并构建其成熟肽在大肠杆菌中的高效表达,从而为进一步研究猪 TNF- α 成熟肽基因的生物学活性和应用奠定了基础。

参考文献:

[1] CARSWELL E A, OLD L J, KASSEL R L, et al. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors [J]. *PNAS*, 1975, 72(9):3666-3670.

[2] BRACZKOWSKI R L, CIESLIK Z B, MUCWIERZGON M W, et al. The combine therapy with TFN α + HREC TNF α and 5-FU in patients with pancreatic cancer after total resection [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1995, 121: 52-61.

[3] SHAKHOV A N, TURETSKAIA R L, UDALOVA I A, et al. Cloning and structural analysis of complementary DNA of the human tumor necrosis factor [J]. *Dokl Akad Nauk SSSR*, 1988, 303(5):1273-1276.

[4] 卢占军,秦爱建,陈欣虹,等. 雏鸡法氏囊蛋白质组学双向电泳技术的建立及其初步分析[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(6): 944-951.

[5] 张文娟,裴宗飞,牛钟相. 禽网状内皮组织增生症病毒 env 蛋白的表达及其在 ELISA 方法中的应用[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(10):1521-1525.

[6] 龚永强,程安春,汪铭书,等. 鸭 IFN- α 成熟肽基因的原核表达、复性及其抗病毒活性研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2008, 39(12):1753-1758.

[7] 孙建海,马燕凌,彭明娥,等. hAFP(137-145)肽段修饰树突细胞诱导细胞毒性 T 淋巴细胞对肝癌细胞的杀伤效应[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2010, 31(1):

6-11.

[8] 宋文学,谢光洪,王 哲. 分子生物学技术在临床兽医学上的应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(6):93-95.

[9] 郑世民,高雪丽,刘超男,等. H5N1 禽流感病毒感染雏鸡免疫器官细胞因子的变化[J]. *畜牧兽医学报*, 2010, 41(6):755-760.

[10] 郑雪莉,李玉成,鞠大鹏,等. TNF- α 对猪脂肪细胞脂肪分解及其相关基因转录表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2009, 40(9):1290-1296.

[11] 王晓艳,王笑梅,高玉龙,等. 鸡传染性贫血病毒 VP2 基因的表达及其免疫活性分析[J]. *微生物学报*, 2006, 46(5):841-843.

[12] 胡艳欣,余锐萍,张洪玉,等. 热应激后猪血清中 IL-2、IFN- γ 及 TNF- α 水平的动态变化[J]. *畜牧兽医学报*, 2006, 37(5):496-499.

[13] CZARNIKI C W. The role of tumor necrosis factor in viral disease [J]. *Antiviral Res*, 1993, 22(4): 223-258.

[14] MOCELLIN S, ROSSI CR, PILATI P, et al. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16(1):35-53.

[15] RUDDLE N H. Tumor necrosis factor (TNF- α) and lymphotoxin (TNF- β) [J]. *Curr Opin Immunol*, 1992, 4(3):327-332.

[16] YOSEF M, FROLKIS P. Effect of tumor necrosis factor alpha on endothelial and inducible nitric oxide synthesis messenger ribonucleic acid expression and nitric oxide synthesis in ischemic and no ischemic isolated rat heart [J]. *J Am College Cardiology*, 2003, 42(7):1299-1305.

[17] RUSSELL A S, ROSENBAUM J T. Anti-tumor necrosis factor therapies in immune-mediated rheumatic diseases [J]. *J Rheumatology Suppl*, 2010, 85:53-62.

[18] KEYSTONE EC, WARE CF. Tumor necrosis factor and anti-tumor necrosis factor therapies [J]. *J Rheumatol Suppl*, 2010, 85:27-39.

[19] LEBWOHL M. Tumor necrosis factor- α blockers in the treatment of psoriasis [J]. *Br J Dermatol*, 2010, 162(6):1169-1171.

[20] FRAN B. Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2002, 13: 135-141.

[21] PARAMESWARAN N, PATIAL S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages [J]. *Critical Rev Eukaryotic Gen Express*, 2010, 20(2):87-103.