

[文章编号 1000-1182(2005)04-0335-03]

# 人可溶性肿瘤坏死因子 受体真核表达 载体 pcDNA3.1(+)/sTNFR 的构建

徐 艳<sup>1</sup>, 章锦才<sup>2</sup>, 张蕴惠<sup>3</sup>

(1. 南京医科大学口腔医院 口腔内科, 江苏 南京 210029; 2. 广东省口腔医院 口腔内科, 广东 广州 510280;  
3. 四川大学华西口腔医院 牙周病科, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 构建人可溶性肿瘤坏死因子 受体(sTNFR)真核表达载体 pcDNA3.1(+)/sTNFR, 为研究人 sTNFR 在哺乳动物细胞中的合成与表达提供条件。方法 采用体外重组技术, 将 sTNFR 的 RT-PCR 纯化产物及质粒 pcDNA3.1(+) DNA 经 *kpn* 和 *xho* 双酶切、胶回收纯化酶切片段后, 体外连接这两个酶切片段进行定向重组, 再将重组 DNA 转化感受态细胞 *E. Coli* Competent Cells JM109。复苏后, 在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基上筛选阳性克隆, 进行酶切及测序鉴定。结果 挑取的 LB 固体培养基上的 6 个单菌落经证实均为阳性克隆, 即 sTNFR 与 pcDNA3.1(+) 体外重组成功。结论 将 sTNFR cDNA 成功地插入了真核表达载体 pcDNA3.1(+) 中, 构建了质粒 pcDNA3.1(+)/sTNFR。

[关键词] 人可溶性肿瘤坏死因子 受体; 真核载体; 质粒

[中图分类号] R 781.4 [文献标识码]

**Construction of the Eukaryote Expression Vector of Human Soluble Tumor Necrosis Factor Receptor** XU Yan<sup>1</sup>, ZHANG Jin-cai<sup>2</sup>, ZHANG Yun-hui<sup>3</sup>. (1. Dept. of Oral Medicine, College of Stomatology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Dept. of Oral Medicine, Stomatology Hospital of Guangdong Province, Guangzhou 510280, China; 3. Dept. of Periodontology, West China College of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract Objective** Human soluble tumor necrosis factor receptor(sTNFR) can interfere with the biological functions of interleukin-1, which may be appropriate to the treatment of periodontitis. The eukaryote expression vector of the human sTNFR gene must be constructed prior to conducting transgene therapy of periodontitis. **Methods** Both sTNFR gene and plasmid pcDNA 3.1(+) DNA were digested with *Kpn* and *Xho*. After purification, the two fragments were ligated by TakaRa DNA Ligation Kit (Ver 2.0). This recombinant DNA was then transformed into *E. Coli* Competent Cells JM109 and positive clones were selected on the LB agarose plate containing ampicillin (80 µg/ul). **Results** Six single clones were indentified by double digestion with *kpn* and *xho* and two fragments with the size of 5.4 kb and 1.0 kb were produced as expected. **Conclusion** The sTNFR gene was successfully inserted into the eukaryote expression vector plasmid pcDNA 3.1(+) by recombination technology *in vitro*.

**Key words** human soluble tumor necrosis factor receptor; eukaryote vector; plasmid

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 是牙周病发生过程中的一个重要炎症因子, 它与白细胞介素 1 (interleukin-1, IL-1) 在介导骨组织破坏中有着相似的生物学活性。诱导 TNF- $\alpha$  产生的最有效的物质是内毒素, 但同时 TNF- $\alpha$  的活性能被可溶性 TNF-受体 (soluble tumor necrosis factor receptor, sTNFR) 拮抗<sup>1,2</sup>。本实验选择真核表达载体 pcDNA3.1(+), 采用体外重组方法, 构建 pcDNA3.1(+)/sTNFR 重组质

粒, 为研究人 sTNFR 在哺乳动物细胞中的合成与表达提供条件, 同时也为转基因技术治疗牙周炎症奠定实验基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒 pcDNA 3.1(+) DNA 的小量抽提

吸取含有 pcDNA 3.1(+) 质粒的大肠杆菌 *E. Coli* JM109 (30% 甘油保种) 菌液 100 µl, 接种于含氨苄青霉素 (80 g/L) 的 5 ml LB 液体培养基中, 37 175 r/min 离心, 振荡培养过夜。取 2 ml 菌液, 离心, 收集细菌沉淀, 用上海华舜生物工程有限公司的小量质粒快速抽提纯化试剂盒抽提得到 pcDNA 3.1(+) 质粒 DNA 50 µl, 取 8 µl 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果, 其余 -20℃ 保存备用。

[收稿日期 2005-01-18; 修回日期 2005-03-08]

[基金项目] 国家科技部“九五”攻关资助项目; 江苏省自然科学基金创新人才资助项目 (BK2003422); 南京医科大学科技创新基金资助项目 (CX2002004)

[作者简介] 徐 艳 (1972-), 女, 江苏人, 博士, 讲师

[通讯作者] 徐 艳, Tel: 025-85031860

## 1.2 PCR产物的纯化

取30  $\mu$ l sTNFR的PCR扩增产物<sup>3</sup>行1.5%低熔点琼脂糖凝胶电泳,长波紫外光下迅速切割含657 bp特异性扩增产物的琼脂糖块,使它尽可能小,用小量胶回收试剂盒纯化PCR产物,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

## 1.3 纯化的PCR产物与pcDNA 3.1(+)质粒DNA的酶切、纯化与连接

取15  $\mu$ l PCR胶回收产物和15  $\mu$ l pcDNA 3.1(+)质粒DNA,分别各加入1  $\mu$ l *Kpn*、1  $\mu$ l *Xho*、3  $\mu$ l 10 mol/L Buffer及10  $\mu$ l DDH<sub>2</sub>O,反应体系均为30  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C消化2 h。全部双酶切产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳分离条带,并用小量胶回收试剂盒进行纯化。连接反应由TaKaRa公司生产的DNA Ligation Kit (Ver 2.0)完成,反应体系由2  $\mu$ l质粒载体DNA,8  $\mu$ l目的片段及10  $\mu$ l Solution I组成,反应条件为16 $^{\circ}$ C 2 h。

## 1.4 重组DNA的转化

将-80 $^{\circ}$ C保存的*E. Coli* Competent Cells JM109冰中融解,将60  $\mu$ l移入0.5 ml的EP-PCR管中,加入8  $\mu$ l连接产物pcDNA 3.1(+)/sTNFR重组DNA,混匀,冰中放置30 min,42 $^{\circ}$ C热休克60 s,冰中放置3 min,加入37 $^{\circ}$ C预温好的不含抗生素的LB液体培养基940  $\mu$ l,37 $^{\circ}$ C 175 r/min离心,振荡培养8 h。玻璃推棒铺菌液于LB固体培养基上(含氨苄青霉素80 g/L),37 $^{\circ}$ C静置培养过夜。

## 1.5 重组质粒的筛选及鉴定

1.5.1 重组质粒DNA的提取及初步电泳鉴定 挑取白色菌落若干个,接种于2 ml LB液体培养基中(含氨苄青霉素80 g/L),37 $^{\circ}$ C振荡培养过夜。菌液倒入2 ml离心管中,12 000 r/min离心10 min,集菌,去上清液。用小量质粒快速抽提试剂盒抽提重组质粒DNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳初步鉴定。

1.5.2 重组质粒DNA的酶切分析鉴定 各取适量重组质粒DNA经*Kpn*单酶切和*Kpn*和*Xho*双酶切,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

## 1.6 质粒pcDNA 3.1(+)中插入的sTNFR基因核苷酸序列测定

以质粒上插入基因两侧的固有序列T3和SP6为引物序列,在ABI PRISM<sup>TM</sup> 377XL DNA Sequencer上测序(本工作由TaKaRa Biotech公司协助完成)。

## 2 结果

### 2.1 质粒pcDNA 3.1(+) DNA抽提结果

提取的pcDNA 3.1(+)质粒DNA经电泳检测,无任何降解及蛋白质、RNA污染(图1)。

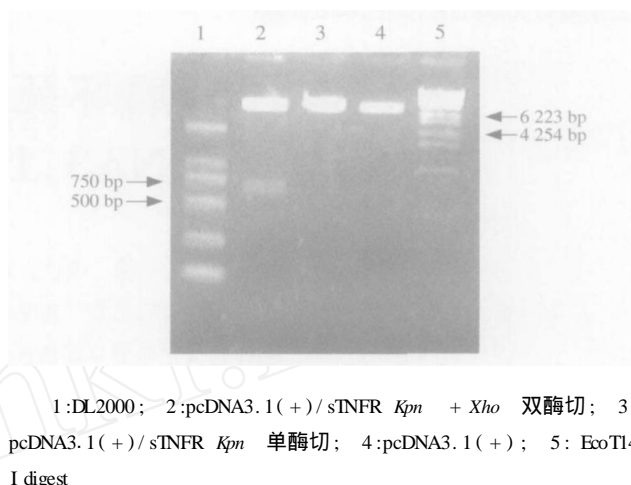


图1 pcDNA3.1(+)酶切鉴定图

Fig 1 Identification of pcDNA3.1(+) by *Kpn* / *Xho*

### 2.2 重组质粒的筛选

sTNFR基因与质粒pcDNA 3.1(+)分别以*Kpn*和*Xho*双酶切后,分别形成两个不同粘端,在连接酶的作用下,sTNFR基因与质粒pcDNA 3.1(+)按预定方向连接,连接液转化宿主菌*E. Coli* Competent Cells JM109后,在含有氨苄青霉素的LB固体培养基上长出若干个乳白色菌落,挑取6个白色菌落在液体LB中增殖后,提取重组质粒DNA,电泳显示比载体质粒pcDNA 3.1(+) DNA相对分子质量大(图1)。进一步酶切鉴定,可见*Kpn*I单酶切为6.0 kb的单带(图1),*Kpn*和*Xho*双酶切为5.4 kb和657 bp的双带(图2)。由于质粒pcDNA 3.1(+)为5.4 kb,sTNFR基因为657 bp,酶切结果基本说明sTNFR基因已与pcDNA 3.1(+)正确重组,将重组质粒命名为pcDNA 3.1(+)/sTNFR。

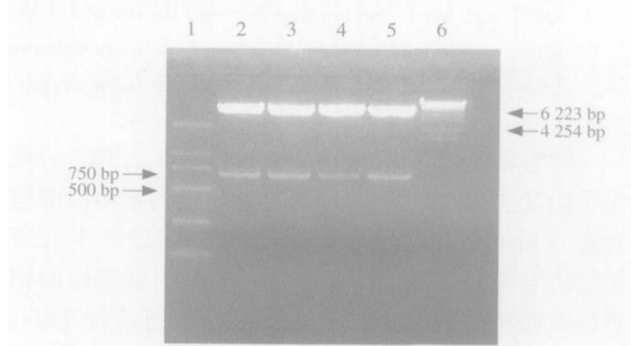


图2 阳性重组子pcDNA3.1(+)/sTNFR双酶切初步鉴定图

Fig 2 Primary identification of positive recombinant plasmid pcDNA3.1(+)/sTNFR by *Kpn* and *Xho*

### 2.3 pcDNA 3.1(+)/sTNFR质粒中sTNFR基因序列的测定

测序结果显示,人sTNFR基因全长657 bp,为一开放阅读框架,与Genbank中公布的人TNFR(p55)mRNA全密码子序列的胞外区域大小完全相符,仅在

222 bp 处发生一个碱基错配,由 G 错配成 A,其余完全相符,这一结果再次证实所获的人 sTNFR 基因是正确的。

### 3 讨论

在牙周炎病变过程中,TNF- $\alpha$  是继 IL-1 的又一较强的骨吸收刺激因子。TNF- $\alpha$  能促进骨细胞生长和合成 DNA,抑制碱性磷酸酶活性,使骨形成受阻,在骨吸收和重建中起重要作用。长期暴露在 TNF- $\alpha$  中的成骨细胞功能受抑,胶原酶降解增加。TNF- $\alpha$  还刺激软骨重吸收和抑制软骨细胞合成蛋白多糖。TNF- $\alpha$  受体的 N 端部分从细胞膜上被酶解下来,成为可溶性的 TNF- $\alpha$  受体(sTNFR)。高剂量的 sTNFR 能阻断 TNF- $\alpha$  的细胞毒作用、免疫调节作用和对组织的毒性作用<sup>4</sup>。在鼠的李斯特菌病模型中,含人 sTNFR(p55)的嵌合蛋白在拮抗内源性 TNF 的细胞毒作用方面比抗 TNF 的单克隆抗体强 10~50 倍。美国的 Immunex 公司、瑞士的 Hoffmann-La Roche 公司已将基因工程获得的 sTNFR 用于类风湿病、HIV 感染、败血性休克及多发硬化的治疗,并已进入临床二期研究中。1998 年,国外学者<sup>5,6</sup> 将商品化的 sTNFR 与 sIL-1R 局部用于牙周病抗炎治疗的动物模型中,都取得了可喜的治疗效果。这为运用炎症因子拮抗剂进行牙周病的抗炎治疗提供了新思路。构建人 sTNFR 的真核表达载体是探索牙周炎治疗新途径的前提条件。

本实验选择的质粒 pcDNA3.1(+)是目前真核细胞表达外源蛋白的常用质粒,能在哺乳动物细胞系中高效连续表达,具有一系列表达调控所需的功能元件:真核表达 CMV 增强启动子、多克隆位点、BGH polyA 转录终止信号、SV40 来源的新霉素抗性选择标记以及能在大肠杆菌选择和维持的 ColEI 和氨苄青霉素抗性基因。本实验所构建的真核表达载体 pcD-

NA3.1(+)/sTNFR 不仅为牙周炎抗炎基因治疗提供基础,还适用于生产基因工程活性多肽 sTNFR。

外源基因编码的蛋白在真核细胞中正确表达和分泌是转基因治疗成功的关键步骤之一<sup>7</sup>。本实验构建的 pcDNA3.1(+)/sTNFR 包含了完整的成熟肽编码区,具有正确的阅读框架,为外源基因在真核细胞的分泌与表达奠定了实验基础。

### [参考文献]

- 1 ] Thompson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  induce osteoblastic cell to stimulate osteoclastic bone resorption J. J Immunol, 1987, 138(3): 775-779.
- 2 ] Olsson I, Lantz M, Nilsson E, et al. Isolation and characterization of a tumor necrosis factor binding protein from urine J. Eur J Haematol, 1989, 42(3): 270-275.
- 3 ] 徐 艳, 张蕴惠, 章锦才. RT-PCR 法扩增可溶性肿瘤坏死因子受体编码区基因 J. 华西口腔医学杂志, 2000, 18(增刊): 17-19.  
(Xu Y, Zhang WH, Zhang JC. Amplifying soluble tumor necrosis factor receptor gene by RT-PCR J. West China J Stomatology, 2000, 18(supple): 17-19.)
- 4 ] 孙卫民, 王惠琴主编. 细胞因子研究方法学 M. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 16-18.  
(Sun WM, Wang HD. Methods of researching cytokine M. Beijing: People's Medical Publishing Press, 1999: 16-18.)
- 5 ] Assuma R, Oates T, Cochran D, et al. TNF and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis J. J Immunol, 1998, 160(1): 403-409.
- 6 ] Graves DT, Delima AJ, Assuma R, et al. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis J. J Periodontol, 1998, 69(12): 1419-1425.
- 7 ] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术 M. 北京: 高等教育出版社, 1993: 542-558.  
(Lu SD. Modern molecular biology experimental technique M. Beijing: Advance Education Press, 1993: 542-558.)

(本文编辑 汤亚玲)

## 《中国口腔医学实用信息》出版发行

由卫生部统计信息中心饶克勤主任、中华口腔医学会张震康会长联合主编《中国口腔医学实用信息》于 2005 年 6 月由人民军医出版社出版发行。该书是中国首部口腔医学领域的实用信息图书,分为中国口腔医学论坛、口腔医学人力资源信息、口腔医疗机构信息、口腔器材生产经销厂商信息、口腔医学社团组织信息及附录六大部分,囊括了我国近 17 000 名主治医师以上的口腔医师、近 200 个口腔专科医院及数千个口腔医疗机构的信息,是口腔医学界、口腔医疗行业及产业界重要的参考资料。书号: ISBN 7-80194-777-0/R. 777, 每册定价 130 元。读者可直接向中华口腔医学会订购,也可通过中华口腔医学网网上书城(网址: <http://book.cndent.com> 或 <http://www.cndent.com>) 订购(享受 9 折优惠)。书款可通过邮局汇款或银行转帐方式支付,款到或汇款凭证到即寄书。邮局汇款至北京海淀中关村南大街 22 号中华口腔医学会中华口腔医学网编辑部 赵建江收,邮编 100081(留言栏内请注明书名和册数)。银行汇款:收款人名称:北京集强口腔医学网络科技有限公司;收款人账号:110-0605-7601-8001-453812;开户银行:交通银行北京海淀支行。咨询电话:010-58995149-11(马小姐);传真:010-58995149-13;E-mail: [sales@cndent.com](mailto:sales@cndent.com)。

中华口腔医学会 中华口腔医学网