论著

文章编号:1000-5404(2005)10-0948-03

# 人可溶性增殖诱导配体 cDNA 突变体的设计与构建

高全胜[1],黄复生[1],何凤田[2] (第三军医大学基础医学部:[1]病原生物学教研室,[2]生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

**提 要:目的** 构建6种人可溶性增殖诱导配体(soluble a proliferation-inducing ligand, sAPRIL)cDNA突变体。**方法** 采用PCR将可溶性增殖诱导配体(sAPRIL)cDNA进行突变,并分别在其N端和C端连接TEL Th表位序列,插入到pQE80表达载体上,最后转化至DH5α感受态细胞。重组质粒经酶切鉴定后进行测序。**结果** 经PCR扩增分别得到了对应于6种突变体的sAPRIL序列,酶切和测序证实成功构建了含HEL Th表位的sAPRIL cDNA突变体表达质粒。**结论** 成功构建了6种sAPRIL cDNA突变体的表达质粒,为进一步进行sAPRIL突变体cDNA的表达和活性鉴定奠定了基础。

**关键词**:sAPRIL;突变体

**中图法分类号**:R392.13;R394-33 **文献标识码**:A

# Design and construction of cDNA mutant of human sAPRIL

GAO Quan-sheng[1], HUANG Fu-sheng[1], HE Feng-tian[2] ([1]Department of Pathogenic Biology, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To construct 6 kinds of human soluble proliferation-inducing ligand (sAPRIL) cDNA mutants. **Methods** Six pair primers according to the cDNA sequence of human sAPRIL for different mutants were designed as follows: HEL Th epitope was added at C or N end, the last or first 45 bp DNA was deleted and HEL Th epitope was added, the last or first 90 bp DNA was deleted and HEL Th epitope was added. Different enzyme site was designed at 5′ end of 12 primers, *Bam*H Ⅰ or *Sal* Ⅰ or *Hand* Ⅲ. At the same time, 2 pairs of HEL Th epitope sequence were designed and synthesized, and different incision enzyme sticky end sequence was added at the 5′ or 3′ end of each epitope DNA. Mutant sequences were amplified by 6 pairs primers with sAPRIL cloning plasmid as template. The PCR fragment was digested and then ligated with the HEL Th epitope DNA that had been reannealed. The ligation fragments of the head were ligated with digested pQE80 vector fragment again, and were transformed into DH5α competent cell. Recombinant plasmids were identified by digestion and sequencing. **Results** Six sAPRIL cDNA mutant DNA sequences were obtained by PCR, and the expression plasmids of sAPRIL cDNA mutants including HEL Th epitope sequence were constructed successfully. The result of sequencing proved that mutations generated as designed fully. **Conclusion** Six sAPRIL cDNA mutant expression plasmids were constructed successfully.

**Key words**: sAPRIL; mutant

APRIL分子是TNF家族的一个新成员,1998年首先由Hehne等[1]发现并克隆,属Ⅱ型跨膜蛋白,N端在胞内,C端在胞外。人APRIL全长为250个氨基酸,其中29~49氨基酸为疏水的跨膜区,50~250氨基酸为胞外区,经furin转换酶在富含精氨酸的基序R-K-R-R处(即101~104氨基酸残基处)裂解后,部分胞外区从膜上脱下,形成天然sAPRIL(即105~250氨基酸残基区域)[2]。全长APRIL和sAPRIL的生物学活性基本一致,表明105~250氨基酸为人APRIL发挥功能的主要区域。APRIL在正常组织的表达很弱,但在多种肿瘤细胞系和肿瘤组织中(特别是胃肠道肿瘤)有高水平表达。因此,设法有效抑制APRIL的功能活性,有可能为相关肿瘤的治疗提供崭新途径。

**基金项目**:国家自然科学基金资助项目(30300314)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300314)

**作者简介**:高全胜(1970-),男,河北省衡水市人,博士研究生,主要从事病原微生物免疫分子机制方面的研究。电话:(023)68772377

**通讯作者**:黄复生,电话:(023)68752244,E-mail: fshengh@mail.tmmu.com.cn。何凤田,电话:(023)68752262

**收稿日期**:2005-01-26;**修回日期**:2005-04-15

Dalum 等[3]在 1999 年提出，经异源性 Th 表位修饰的细胞因子突变体可构成一种新抗原，由这种新抗原所诱导出的抗体可与天然细胞因子发生交叉结合反应，从而抑制天然细胞因子的功能（这种交叉抗体称为内源性抗天然细胞因子抗体）。基于此设想，他们创立了一种可诱导内源性抗天然 TNF-α 抗体的新方法，该方法用鸡卵清蛋白表位（HEL Th）81 ~ 95 氨基酸序列或 325 ~ 333 氨基酸序列替换小鼠 TNF-α 基因的某些结构，构建出几个 Th 表位修饰的 TNF-α 突变体，这些突变体均失去了天然 TNF-α 的活性，但具有了免疫原性。用相应突变体免疫小鼠，获得了可在体外抑制天然 TNF-α 功能的抗体，从而为 TNF-α 相关疾病的治疗了提供了一种崭新策略。

基于 Dalum 等的理论假设和研究结果，本研究拟将人 sAPRIL cDNA 进行突变并引入 HEL Th 表位序列，构建人 sAPRIL cDNA 的多种突变体，以期得到可表达丧失天然活性但具有抗原性的 sAPRIL 载体，为相关疾病的治疗提供新的方法和途径。

## 1　材料与方法

### 1.1　材料

1.1.1　菌株与质粒　　DH5α 菌株为本室保存，pQE-80L 质粒购自 Qiagen 公司，sAPRIL 克隆质粒 pUC18-sAPRIL 为本室构建。

1.1.2　分子生物学试剂　　限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Sal* Ⅰ、*Hand* Ⅲ、T4 DNA 连接酶及 Pfu *Taq* 酶为 NEB 公司产品，质粒纯化试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为 Omiga 公司产品。

1.1.3　引物　　根据 GenBank 中人 APRIL cDNA 全序列并应用 Primer 5.0 软件设计合成了 8 条引物，引物序列如下：

P1：5′-GTGGATCCGCAGTGCTCACCCAAAAACAG-3′

P2：5′-GCGTCGACTCACAGTTTCACAAACCCCAG-3′

P3：5′-GTGTCGACGCAGTGCTCACCCAAAAACAG-3′

P4：5′-GCAAGCTTTCACAGTTTCACAAACCCCAG-3′

P5：5′-GTGTCGACCTGGTTCCCATTAACGCCACC-3′

P6：5′-GTGTCGACAAGTTTCGCCCTTGCCCG-3′

P7：5′-GTGTCGACGAGGTGATGTGGCAACC-3′

P8：5′-GCGTCGACTTGGTGTAAATGGAAGACACC-3′

引物 5′端加 2 个保护碱基和酶切位点（图中下划线部分：GGATCC 为 *Bam*H Ⅰ 位点，GTCGAC 为 *Sal* Ⅰ 位点，AAGCTT 为 *Hand* Ⅲ 位点）。引物由上海生工公司合成。

1.1.4　HEL Th 表位　　设计并合成 HEL Th 表位序列如下：

C1：5′-TCGACAGCGCCCTGCTGTCTTCTGATATCACCGCCAGCGTGAACTGCGCCA-3′

C2：5′-AGCTTGGCGCAGTTCACGCTGGCGGTGATATCAGAAGACAGCAGGGCGCTG-3′

N1：5′-GATCCAGCGCCCTGCTGTCTTCTGATATCACCGCCAGCGTGAACTGCGCCG-3′

N2：5′-TCGACGGCGCAGTTCACGCTGGCGGTGATATCAGAAGACAGCAGGGCGCTG-3′

表位的 5′和 3′端加入不同酶的粘性末端（下划线部分：其中 C1 和 C2 退火后在 5′端形成 *Sal* Ⅰ 粘端，3′端形成 *Hand* Ⅲ 粘端；N1 和 N2 退火后在 5′端形成 *Bam*H Ⅰ 粘端，3′端形成 *Sal* Ⅰ 粘端）。表位序列由上海生工公司合成。

### 1.2　方法

1.2.1　sAPRIL 突变体的设计　　基于 Dalum 等的理论对 sAPRIL 进行突变，突变体设计如下：突变体 A：在 sAPRIL C 端加入 HEL Th 表位序列；突变体 B：在 sAPRIL N 端加入 HEL Th 表位序列；突变体 C：在 sAPRIL C 端缺失 15 个氨基酸残基并加入 HEL Th 表位序列；突变体 D：在 sAPRIL N 端缺失 15 个氨基酸残基并加入 HEL Th 表位序列；突变体 E：在 sAPRIL C 端缺失 30 个氨基酸残基并加入 HEL Th 表位序列；突变体 F：在 sAPRIL N 端缺失 30 个氨基酸残基并加入 HEL Th 表位序列。

1.2.2　sAPRIL 突变序列的扩增　　以 pUC18-sAPRIL 克隆质粒为模板进行 PCR 扩增。P1、P2 引物扩增突变体 A；P3、P4 引物扩增突变体 B；P1、P6 引物扩增突变体 C；P5、P2 引物扩增突变体 D；P8、P3 引物扩增突变体 E；P4、P7 引物扩增突变体 F。扩增条件均为 94 ℃变性 2 min，94 ℃ 30 s、55 ℃ 45 s、72 ℃ 1 min，共 35 个循环；最后 72 ℃延伸 10 mim。1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行鉴定。

1.2.3　HEL Th 表位的退火　　将合成的表位序列用 $ddH_2O$ 稀释至终浓度 200 μmol/L，将 C1、C2（C）与 N1、N2（N）分别混匀，70 ℃ 保温 10 min，然后迅速放冰上 10 min，－20 ℃保存备用。

1.2.4　sAPRIL cDNA 突变表达载体的构建　　将 1.2.1 所扩增的 PCR 产物回收后进行双酶，回收酶切产物并分别与 HEL Th 表位进行连接，酶切及连接成份见表 1，回收连接产物。同时将表达质粒 pQE80 用 *Bam*H Ⅰ 和 *Hand* Ⅲ 进行双酶切，回收酶切产物。将连有 HEL Th 表位序列的 sAPRIL cDNA 突变体与质粒 pQE80 载体片段进行连接，连接产物转化入 DH5α 感受态细胞。挑取重组克隆，提取质粒进行酶切鉴定并测序。

**表 1　sAPRIL cDNA 突变表达载体的构建**

**Tab 1　Construction of sAPRIL cDNA mutants**

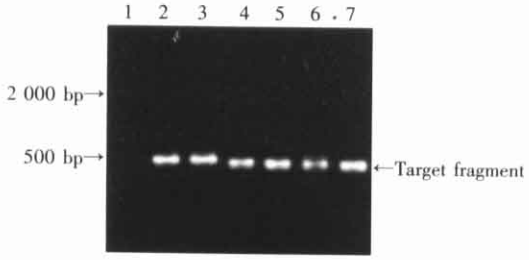
| | Mutant A | Mutant B | Mutant C | Mutant D | Mutant E | Mutant F |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Primers | P1 + P2 | P3 + P4 | P1 + P6 | P5 + P2 | P3 + P8 | P4 + P7 |
| Endonuclease | B + S | S + H | B + S | S + H | B + S | S + H |
| TEL Th epitope | C | N | C | N | C | N |
| Vector | pQE80 | pQE80 | pQE80 | pQE80 | pQE80 | pQE80 |

B：*Bam*H Ⅰ；S：*Sal* Ⅰ；H：*Hand* Ⅲ

## 2　结果

### 2.1　PCR 扩增结果

以 pUC18-sAPRIL 克隆质粒为模板进行 PCR 扩增，1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 1，各扩增片段大小与预期一致。



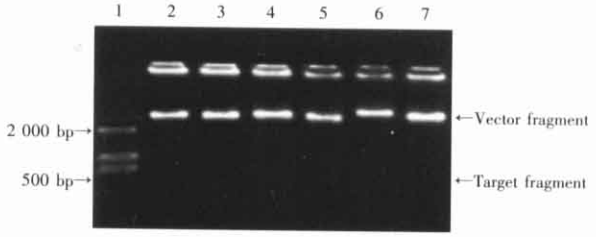

1: DL2000 marker; 2 – 7: mutant A (519 bp), B (519 bp), C (474 bp), D(474 bp), E (429 bp), F (429 bp)

**图 1 缺失突变体 PCR 扩增产物电泳分析**

**Fig 1 Electrophoretic analysis of deleted sAPRIL cDNA mutants**

### 2.2 sAPRIL cDNA 突变体的酶切鉴定

将重组的 sAPRIL cDNA 突变表达载体 A、B、C、D、E、F 用 *Bam*HⅠ和 *Hand*Ⅲ进行双酶切鉴定,电泳结果见图 2。酶切结果均与设计相符,表明突变体基本构建成功。




1: DL2000 marker; 2 – 7: pQE80-A – F/*Bam*HⅠ + *Hand*Ⅲ

**图 2 sAPRIL cDNA 突变体的酶切鉴定**

**Fig 2 Identification of sAPRIL cDNA mutants by digestion**

### 2.3 sAPRIL cDNA 突变体的序列测定

将构建的各突变体进行序列测定,结果表明得到的各突变体序列完全与实验设计相一致,已成功构建了 sAPRIL cDNA 的 6 个突变表达载体。

## 3 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类健康,寻找抗恶性肿瘤的有效制剂及有效手段一直是人们致力解决的热点和难点问题。近年来的诸多研究表明,APRIL 过表达在多种肿瘤细胞的增殖、存活及促肿瘤形成等多个过程中都起着独特的作用。APRIL 不但高表达于多种肿瘤细胞和组织,特别是消化道肿瘤,如 Hehne 等[1]检测发现 SW480、Raji、G36 等多种肿瘤细胞系均有高水平的 APRIL 表达;Rennert 等[4]比较了 48 种肿瘤及其邻近的正常组织,也发现在肿瘤组织中 APRIL 的表达水平显著升高。APRIL 还可作为一种自分泌或旁分泌生长因子而促进肿瘤的形成及肿瘤细胞的增殖与存活,如 sAPRIL 可在体外以剂量依赖方式促进多种肿瘤细胞系(如 Jurkat、Raji、Hela 等)的增殖。因此,设法阻断 APRIL 的生物学活性,有望抑制肿瘤细胞增殖、缩短肿瘤细胞寿命,减缓肿瘤形成,从而可能为 APRIL 相关的多种肿瘤的治疗提供新方法和新药物。

体外及动物体内实验表明,APRIL 受体的可溶形式可通过竞争性抑制 APRIL 与其膜受体的结合而明显抑制某些肿瘤细胞的增殖[5]。如与抗体 Fc 段融合的可溶性 APRIL 受体可明显抑制多种肿瘤细胞系的生长及在裸鼠体内的成瘤速度,甚至可完全阻断在裸鼠体内形成肿瘤。但这些制剂如用于治疗一方面需要反复给药,不便临床操作,另一方面由于融合有 Fc 段,有可能引起不必要的生物学效应,从而使制剂的作用效率降低。因此,如能研制出可诱导内源性抗天然 APRIL 抗体的新型 APRIL 抑制分子,则可避免这些弊端。Dalum 等的研究策略为这一问题的解决提供了一条可行途径。本研究正是基于这一理论,采用 PCR 及基因克隆方法对具有天然生物活性的 sAPRIL cDNA 进行突变,并引入 HEL Th 表位序列,成功构建了 6 个 sAPRIL cDNA 的突变表达载体,为进一步表达和筛选缺失 sAPRIL 活性,但具有其天然抗原性的突变体蛋白打下了基础。

## 参考文献:

[1] Hehne M, Kataoka T, Schroter M, *et al*. APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth[J]. J Exp Med, 1998, 188(6): 1185 – 1190.

[2] Lopez-Fraga M, Fernandez R, Albar J P, *et al*. Biologically active APRIL is secreted following intracellular processing in the Golgi apparatus by furin convertase[J]. EMBO Rep, 2001, 2(10): 945 – 951.

[3] Dalum I, Butler D M, Jensen M R, *et al*. Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-α[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(7): 666 – 669.

[4] Rennert P, Schneider P, Cachero T, *et al*. A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth[J]. J Exp Med, 2000, 192(11): 1677 – 1684.

[5] Marsters S A, Yan M, Pitti R M, *et al*. Interaction of the TNF homologues BLyS and APRIL with the TNF receptor homologues BCMA and TACI[J]. Curr Biol, 2002, 10(13): 785 – 788.

(编辑 王 红)