

鼠 TNF- α 功能位点及其中和性抗体结合位点研究*

贾俊英^{1, 2)} 周洪哲¹⁾ 唐捷^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (²⁾中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 肿瘤坏死因子 TNF- α 是一个多功能的细胞因子, 许多免疫系统疾病的发生和 TNF- α 的过量释放有关. 对 TNF- α 的功能研究有助于了解这些疾病的发生机制, 而以 TNF- α 为靶点的抗体可用于治疗多种自身免疫性疾病. 通过研究一个抗鼠 TNF- α 中和性单克隆抗体的结合位点, 确定了鼠 TNF- α 行使其生物学功能的关键部位. 首先利用酵母展示技术确定了中和性抗体 9C6 的结合位点是鼠 TNF- α 的第 29~40 氨基酸线性片段. 然后在此区域引入点突变, 找到鼠 TNF- α 与 9C6 抗体结合的关键位点. 最终用大肠杆菌表达鼠 TNF- α 和其突变体蛋白, 通过 L929 细胞杀伤实验, 证实与 9C6 抗体结合的关键位点也是决定鼠 TNF- α 生物学功能的关键位点.

关键词 鼠 TNF- α , 中和性抗体, 结合位点, 酵母展示
学科分类号 Q51, R392

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00505

1975 年 Carswell 等^[1]首先发现, 在接种 BCG 的小鼠体内注射内毒素 LPS 后, 血清中产生一种能杀伤某些肿瘤细胞或使体内肿瘤组织发生血坏死的因子, 称为肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF). TNF 主要由单核细胞和巨噬细胞分泌产生^[2], 与许多免疫系统疾病相关^[3]. TNF- α 通过 55 ku 的 TNF 型受体或 75 ku 的 TNF 型受体作用引发细胞毒性, 参与免疫调控和细胞分裂等活动^[4~7]. 已知 TNF- α 与一些免疫系统疾病如关节炎, 强直性脊柱炎, 败血症等密切相关. 小鼠 TNF- α 前体为 235 氨基酸残基, 其中包含由 79 个氨基酸残基组成的信号肽, 成熟的小鼠 TNF- α 分子质量为 17 ku, 由 156 个氨基酸残基组成. 成熟的人 TNF- α 与鼠 TNF- α 的氨基酸组成有 79% 同源性, 三级结构极其相似, TNF- α 的生物学作用无明显的种属特异性. 人 TNF- α 与其中和性抗体结合位点研究比较多, 但鼠 TNF- α 与其中和性抗体结合位点研究报道比较少. 我们筛选得到了可以中和鼠 TNF- α 的单克隆抗体 9C6, 为了研究鼠 TNF- α 作用机制, 利用酵母展示技术寻找出抗体在抗原上的结合部位, 把抗体结合部位突变后, 确定了鼠 TNF- α 的功能部位, 有助于进一步了解 TNF- α 的作用机制.

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21(DE3), EBY100

酿酒酵母为本实验室保存; L929 细胞购自英国菌种保藏中心; pET-41d 质粒, 由本实验室经 pET-41a 质粒切去 GST 序列改造而来; pYDS 质粒改造自 pYD1 (Invitrogen 公司); 限制性内切酶, pMD19-T 载体购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司; 鼠 TNF- α cDNA 从 Invitrogen 公司购买; 单链 DNA 引物及 DNA 测序由北京三博志远生物技术有限公司完成; TransTaq High Fidelity 高保真 DNA 聚合酶购自北京全金式生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自 Tiangen 公司; Ni 柱购自 GE Healthcare 公司; MTT 购自 Sigma 公司; 放线菌素 D 购自 MERCK 公司; DMEM 培养基, Anti-V5-FITC 抗体购自 Invitrogen 公司, goat-anti-mouse-IgG-FITC 购自 SouthernBiotech 公司; goat-anti-mouse-IgG-HRP 购自 KPL 公司; Biotin-anti-mouse-TNF- α 多抗, Streptavidin-HRP 二抗购自 Ebioscience 公司.

1.2 鼠 TNF- α 分段酵母展示

从 N 端或 C 端分别截短鼠 TNF- α 蛋白的设计

* 国家高技术研究发展计划(863)资助项目(2006AA02090805, 2006AA02090402).

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888447, E-mail: jtang@sun5.ibp.ac.cn

收稿日期: 2008-07-16, 接受日期: 2008-09-22

参见图 1. 另截取鼠 TNF- α 17~28 氨基酸片段, 23~34 氨基酸片段, 29~40 氨基酸片段以及 17~40 氨基酸片段来确定 9C6 结合位点. 设计相应引物, 分别扩增各片段, 并加上酵母同源重组区, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒纯化回收, 用于转化酵母.

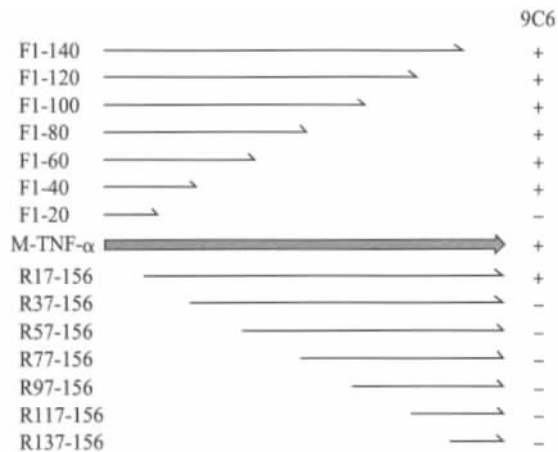


Fig. 1 Mouse TNF- α fragments displayed on yeast cell surface and the result of binding to 9C6 mAb as detected by FACS
+: Binding; -: No binding.

点突变之一(Mutant A)是将鼠 TNF- α 第 30 个氨基酸丝氨酸(Ser), 第 34 个氨基酸天冬酰胺(Asn), 第 37 个氨基酸亮氨酸(Leu)统一突变为丙氨酸(Ala). 另一点突变(Mutant B)将鼠 TNF- α 的第 31 个氨基酸谷氨酰胺(Gln), 第 34 个氨基酸天冬酰胺(Asn), 第 39 个氨基酸天冬酰胺(Asn), 均突变为丙氨酸(Ala), 分别设计引物, 用 PCR 方法引入突变, 产生 2 个鼠 TNF- α 突变体, 并展示在酵母表面, 检测与 9C6 是否结合.

1.3 酵母转化

醋酸锂法转化酵母^[8], 转化后涂在 SD(selective growth dextrose medium)平板上, 30℃培养箱培养 3 天.

1.4 酵母诱导

从 SD 平板上挑单克隆接种到 2 ml SD 培养基(加 2%葡萄糖)中, 30℃摇床培养到 A 值至 2 时, 取 1 ml 菌液, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清. 用 1 ml SG(selective growth galactose medium)培养基(加 2%半乳糖)悬浮菌体, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 然后用 2 ml SG 培养基悬浮菌体, 转入试管, 20℃摇床诱导 48 h.

1.5 流式细胞仪分析

取 SG 诱导的酵母细胞 1×10^6 个, 用 1 ml

FACS 缓冲液(1%BSA-PBS)洗 1 次, 5 000 r/min 离心 5 min, 弃上清. 按 1:1 000 加入 anti-V5-FITC 抗体, 4℃避光孵育 30 min, 用 1 ml FACS 缓冲液洗 2 次, 弃上清, 用 300 μ l FACS 缓冲液悬浮菌体, 流式细胞仪 FACS calibur 检测 V5 信号. 同时用鼠 TNF- α 抗体 9C6 标记酵母, 标记方法同上, 抗体浓度为 200 nmol/L, 4℃避光孵育 30 min, 用 1 ml FACS 缓冲液洗 3 次, 弃上清, 按 1:100 加入 goat anti-mouse-IgG-FITC, 4℃避光孵育 30 min, 用 1 ml FACS 缓冲液洗 3 次, 弃上清, 300 μ l FACS 缓冲液悬浮菌体, 流式细胞仪检测.

1.6 克隆表达鼠 TNF- α 及其突变体蛋白

以鼠 TNF cDNA 为模板, 设计引物分别扩增鼠 TNF- α 及其突变体 Mutant A 的 DNA 序列, 均引入 *Bam*H 和 *Hind* 酶切位点, 连入 pMD19-T 载体测序正确后, 以 *Bam*H 和 *Hind* 连入 pET-41d 质粒, 分别转化 BL21(DE3). 挑单克隆接种到 LB Kana⁺ 液体培养基中, 37℃培养到 A 值 0.6~0.8 时, 加入 0.1 mmol/L 的 IPTG(isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside)16℃诱导 16 h, 收集菌体, 用结合缓冲液(500 mmol/L NaCl, 50 mmol/L Na₂HPO₄, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)悬浮菌体, 冰上超声破碎, Ni 柱亲和纯化蛋白, 12% SDS-PAGE 检测纯化蛋白.

1.7 鼠 TNF- α 及其突变体蛋白的 ELISA 检测

以不同浓度的鼠 TNF- α 及其突变体蛋白 Mutant A 包板, 起始浓度均为 2 mg/L, 2 倍倍比稀释, 共稀释 10 个浓度梯度, 以包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐, pH 9.6)为空白对照, 每浓度平行 3 个复孔, 37℃结合 1 h, PBS-T(0.1% Tween 20)洗 3 次, 每孔加入 1:1 000 稀释的 Biotin-anti-mouse-TNF- α 多抗 100 μ l, 37℃结合 1 h, PBS-T 洗 3 次, 然后加入 1:1 000 稀释的 Streptavidin-HRP, 37℃结合 1 h, PBS-T 洗 3 次, 最后 OPD 显色, 490 nm 波长测 A 值.

将纯化的鼠 TNF- α 及其突变体蛋白用包被液分别稀释到 2 mg/L, 每孔加 100 μ l, 37℃结合 1 h, PBS-T 洗 3 次, 用 2%BSA-PBS 封闭, 每孔加 200 μ l, 37℃结合 1 h, PBS-T 洗 3 次, 加入 9C6 单克隆抗体, 起始浓度为 10 mg/L, 逐孔 3 倍稀释, 共稀释 10 个浓度, 每个浓度梯度设 3 个复孔, 每孔加 100 μ l, 对照组加入 100 μ l PBS, 37℃ 1 h, PBS-T 洗 3 次, 加入 goat-anti-mouse-IgG-HRP,

37°C结合 1 h, PBS-T 洗 3 次, 用 OPD 显色 5 min, 加入 2 mol/L 等体积硫酸终止反应, 在 490 nm 波长测 A 值.

1.8 细胞培养和 9C6 对鼠 TNF-α 的中和作用

L929 细胞在 37°C, 5% CO₂ 条件下用 DMEM 培养液加 10%胎牛血清培养. L929 细胞浓度为 3.0×10⁵/ml, 加入放线菌素 D 终浓度为 1 mg/L, 96 孔板每孔加 90 μl 细胞悬液. 鼠 TNF-α 的作用浓度为 10 μg/L, 9C6 的起始浓度为 20 mg/L, 逐次 2 倍稀释后与鼠 TNF-α 混合, 37°C 作用 30 min 后, 取 10 μl 加入 96 孔板, 使每孔终体积为 100 μl, 每抗体浓度设 3 个复孔, 同时以单独加鼠 TNF-α 和 9C6 的孔为对照组. 37°C, 5%CO₂ 培养 20 h 后, 每孔加入 20 μl MTT (5 g/L), 细胞培养箱继续培养 3 h, 弃上清, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砷(DMSO), 轻微震荡均匀, 在 570 nm 波长测 A 值.

1.9 鼠 TNF-α 及其突变体蛋白对小鼠成纤维细胞株 L929 细胞杀伤实验

调整 L929 细胞浓度为 3.0×10⁵/ml, 加入放线菌素 D 终浓度为 1 mg/L, 96 孔板每孔加 95 μl 细胞悬液, 再分别加入 5 μl 鼠 TNF-α 和鼠 TNF-α Mutant A, 每孔总体积为 100 μl, 鼠 TNF-α 和鼠 TNF-α Mutant A 起始浓度为 1 mg/L, 逐孔 3 倍稀释, 以不加鼠 TNF-α 和鼠 TNF-α Mutant A 蛋白的孔为空白对照, 每一浓度 3 个复孔. 37°C, 5% CO₂ 培养 20 h 后, 每孔加入 20 μl MTT(5 g/L), 37°C, 5% CO₂ 继续培养 3 h, 弃上清, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砷(DMSO), 轻微震荡均匀, 在 570 nm 波长测 A 值.

2 结 果

2.1 9C6 与鼠 TNF-α 各片段结合情况

诱导展示鼠 TNF-α 正反向各不同长度片段的酵母, 9C6 单克隆抗体标记后, 流式细胞仪检测结果显示, 从 N 端起始各片段只有 F1-20 片段与 9C6 不结合, 其余各片段(包括全长片段)均与 9C6 结合; 从 C 端开始各片段只有 R17-156 片段与 9C6 结合, 其余各片段均不结合 9C6 单克隆抗体, 所以我们预计 9C6 与成熟鼠 TNF-α 蛋白结合位置在第 17~40 氨基酸范围内(图 1). 接着把鼠 TNF-α 第 17~40 氨基酸片段分为 3 段, 即 17~28, 23~34, 29~40 氨基酸片段, 分别展示在酵母表面, 用 9C6 标记后, 流式细胞仪检测, 结果只有 29~40 氨基酸片段与 9C6 结合, 说明 9C6 与成熟鼠 TNF-α 蛋白的结合位点在第 29~40 氨基酸片段上, 即 LSQRANALLANG 这一氨基酸片段(图 2). 进一步在 29~40 氨基酸序列中引入点突变, 把第 30 个氨基酸丝氨酸(Ser), 第 34 个氨基酸天冬酰胺(Asn), 第 37 个氨基酸亮氨酸(Leu)统一突变为丙氨酸(Ala), 这一突变记作 Mutant A, 把第 31 个氨基酸谷氨酰胺(Gln), 第 34 个氨基酸天冬酰胺(Asn), 第 39 个氨基酸天冬酰胺(Asn), 均突变为丙氨酸(Ala), 这一突变记作 Mutant B. 酵母分别展示突变及野生型鼠 TNF-α, 诱导表达后, 流式细胞仪检测, anti-V5-FITC 标记后均为阳性信号, 说明目的蛋白正确表达. 9C6 标记后, Mutant A 不与 9C6 结合, 而 Mutant B 与 9C6 仍结合(图 3), 进一步证明 9C6 的结合位点即在鼠 TNF-α 第 29~40 氨基酸片段上.

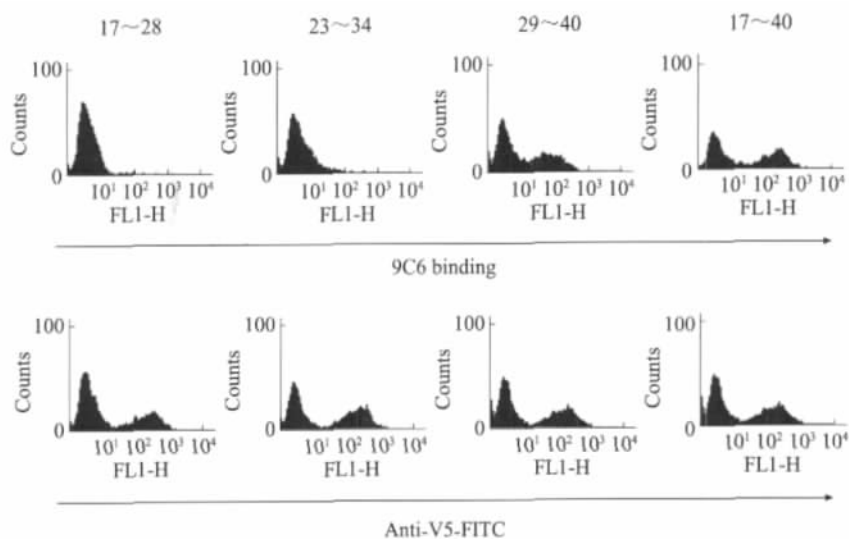


Fig. 2 FACS histogram of mouse TNF-α fragments displayed on yeast surface, labeled with anti-V5-FITC and 9C6 respectively

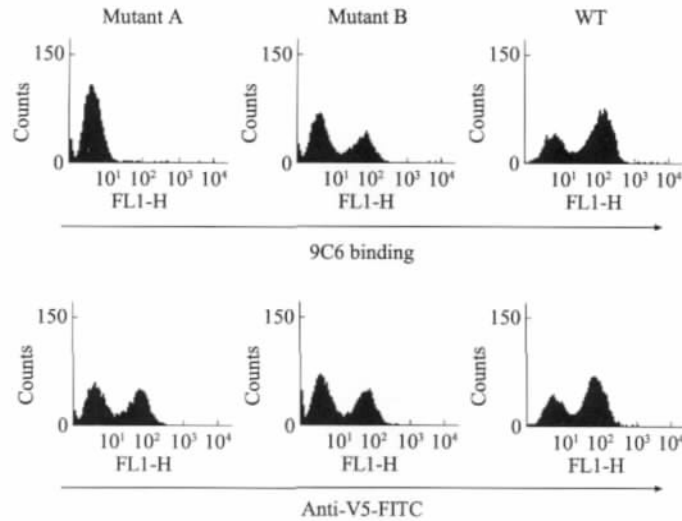


Fig. 3 Flow cytometric analysis of mouse TNF- α (WT) and mouse TNF- α mutants(Mutant A and Mutant B) displayed on yeast cell surface labeled with anti-V5-FITC and 9C6 respectively
WT: wild-type.

2.2 鼠 TNF- α 及其突变体蛋白表达纯化

以鼠 TNF- α cDNA 为模板, PCR 扩增鼠 TNF- α 及其突变体序列, 连入 pMD19-T 载体, 测序得到正确序列后, 用 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切目的片段, 胶回收纯化后, 用 T4 DNA 连接酶连入 pET-41d 表达质粒, 得到重组质粒 pET-41d-M-TNF 和 pET-41d-M-TNF-Mutant A. 将重组质粒导入大肠杆菌 BL21(DE3), 然后用 IPTG 进行诱导, 有大量的鼠 TNF- α 及其突变体蛋白的表达. 诱导后的菌液经由超声破碎、Ni 柱亲和纯化, 得到了约 18 ku 较纯的可溶性的重组鼠 TNF- α 以及它的突变体 Mutant A 蛋白(图 4).

2.3 ELISA 检测鼠 TNF- α 及其突变体蛋白

以浓度梯度稀释的鼠 TNF- α 及其突变体蛋白包板, 加入 1 : 1000 稀释的 9C6 单抗, 然后加入 goat-anti-mouse-IgG-HRP (1 : 5000) 标记, 最后 OPD 显色, 490nm 波长测 A 值. 结果表明, 与重

组鼠 TNF- α 相比, 鼠 TNF- α 突变体 Mutant A 与 9C6 的结合能力显著降低(图 5a). 然而作为对照,

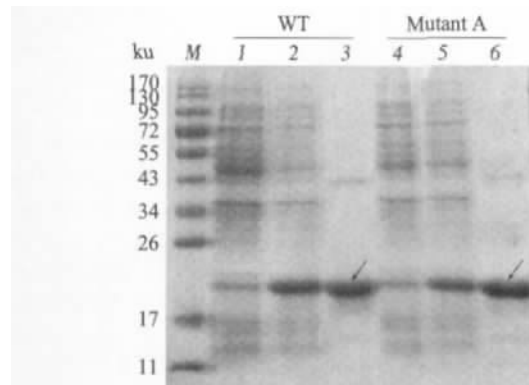


Fig. 4 Expression and purification of mouse TNF- α and its mutant protein analyzed on 12% SDS-PAGE

M: Protein marker; 1: Uninduced mouse TNF- α BL21; 2: Induced mouse TNF- α BL21; 3: Purified mouse TNF- α protein; 4: Uninduced mouse TNF- α Mutant A BL21; 5: Induced mouse TNF- α Mutant A BL21; 6: Purified mouse TNF- α Mutant A protein.

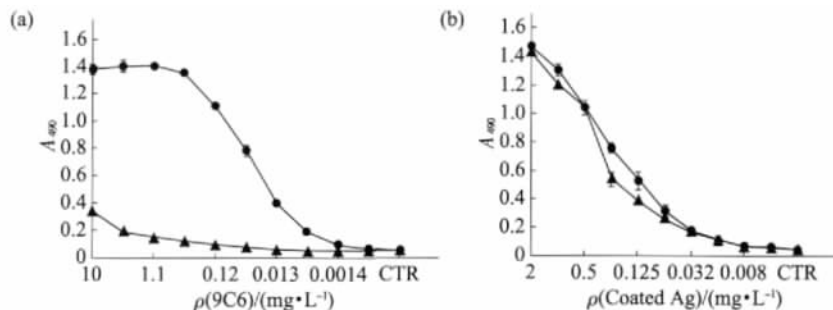


Fig. 5 ELISA for mouse TNF- α and mouse TNF- α Mutant A protein

(a) 2 mg/L antigens were coated onto a plate and serially diluted 9C6 mAb were added, then detected using HRP-conjugated goat anti-mouse IgG. (b) Serially diluted antigens were coated onto a 96-well flat-bottom plate and biotin-anti-mouse-TNF- α polyclonal antibody was added as described in Materials and methods. The binding was detected with HRP-conjugated Streptavidin. ●-●: Mouse TNF- α ;▲-▲: Mouse TNF- α Mutant A protein; CTR: Control.

用 Biotin-anti-mouse-TNF- α 多抗和 Streptavidin-HRP 标记时, TNF- α 突变体 Mutant A 具有和重组鼠 TNF- α 同等水平的与 TNF- α 多抗结合的能力(图 5b). 这是由于多抗本身具有多个结合位点, 突变并不影响与多抗的结合水平. 这表明突变的位点正是与鼠单克隆抗体 9C6 特异的结合部位.

2.4 9C6 对鼠 TNF- α 的中和活性和鼠 TNF- α 及其突变体蛋白对小鼠成纤维细胞株 L929 细胞杀伤作用

在 10 $\mu\text{g/L}$ 鼠 TNF- α 作用下, L929 细胞分别加入 0~20 mg/L 的 9C6 抗体, 细胞培养箱培养 20 h 后, 每孔加入 20 μl MTT(5 g/L), 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 继续培养 3 h 后, 弃上清, 二甲基亚砜(DMSO)溶

解紫色结晶, 在 570 nm 波长测 A 值. 结果表明, 9C6 对鼠 TNF- α 有中和活性, 单独加 10 $\mu\text{g/L}$ 鼠 TNF- α 时, L929 细胞几乎全部死亡, 而加 20 mg/L 9C6 时, 细胞具有很高的存活率(图 6a).

在 L929 杀伤实验中, L929 细胞中加入不同浓度的鼠 TNF- α 及其突变体蛋白 Mutant A, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 条件下细胞培养箱中培养 20 h 后, 每孔加入 20 μl MTT(5 g/L), 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 继续培养 3 h 后, 弃上清, DMSO 溶解后在 570 nm 波长测 A 值. 结果显示, 鼠 TNF- α 突变体 Mutant A 完全丧失了对 L929 细胞的杀伤作用, 这提示与鼠 TNF- α 单克隆抗体 9C6 的结合部位正是鼠 TNF- α 的活性功能区域(图 6b).

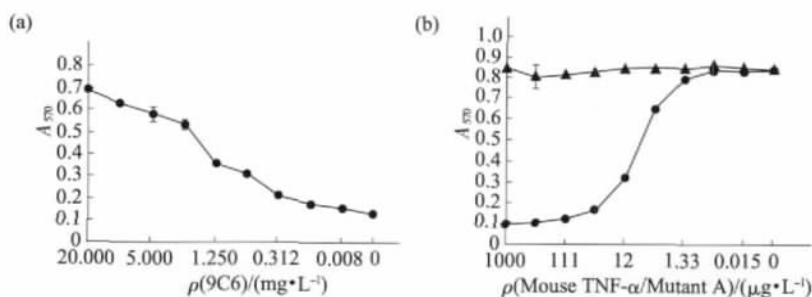


Fig. 6 Assays for neutralization of TNF- α -mediated cytotoxicity by 9C6 and mouse TNF- α and mouse TNF- α Mutant A killing L929 cells

(a) L929 cells were treated with 0~20 mg/L of 9C6 in the presence of mouse TNF- α (10 $\mu\text{g/L}$) for 20 h and cell survival was measured by MTT assay. The result showed that the cytotoxic effect of mouse TNF- α can be neutralized by 9C6. (b) L929 was plated onto a 96-well plate and serially diluted mouse TNF- α and mouse TNF- α Mutant A protein were added. The cells were incubated for 20 h at 37 $^{\circ}\text{C}$ and cell viability was analyzed using a colorimetric MTT assay. ●-●: Mouse TNF- α ; ▲-▲: Mouse TNF- α Mutant A protein.

3 讨 论

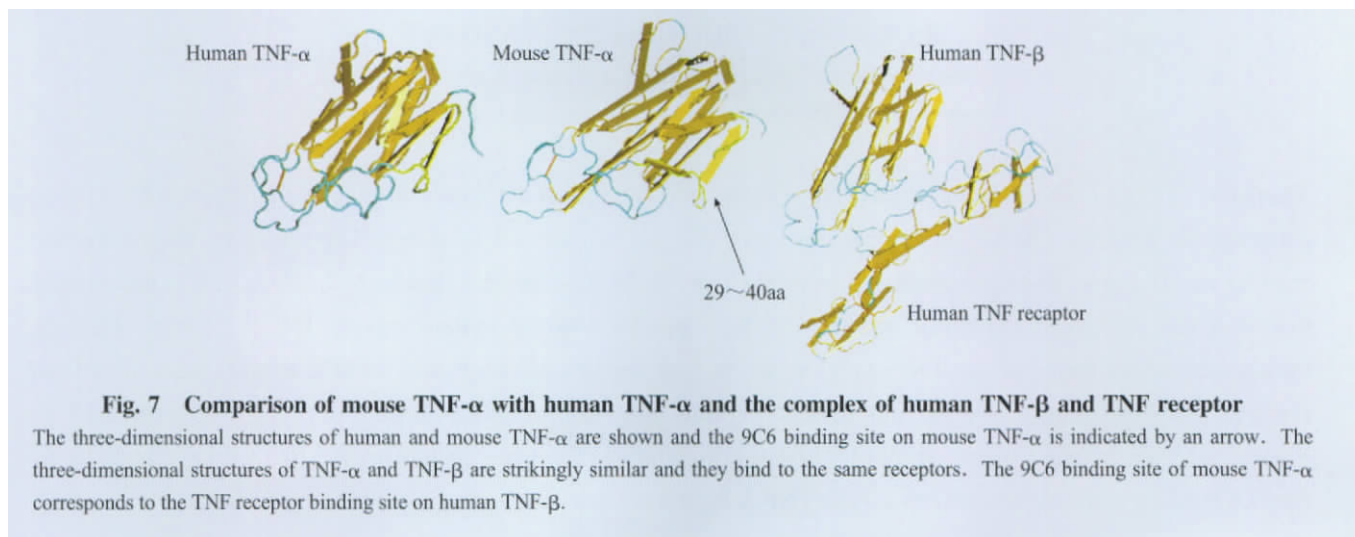
自从 1975 年首次报道 TNF- α 以来, 科学家对这一细胞因子进行了大量的研究. 目前认为, TNF- α 是引起慢性炎症疾病的主要细胞因子, TNF- α 的中和性抗体已经上市用于治疗多种疾病. 关于人 TNF- α 与其中和性抗体的结合位点的研究报道比较多, 通过合成肽段^[9, 10], 表达突变蛋白^[11, 12]等方法已经鉴定出抗体的结合位点. 9C6 是可以中和鼠 TNF- α 的单克隆抗体(图 6a), 通过 Western-blot 检测, 9C6 可以识别鼠 TNF- α (未显示数据), 说明 9C6 识别的是鼠 TNF- α 的某一段线性片段, 进而我们通过酵母展示技术, 把鼠 TNF- α 不同长度的氨基酸片段展示在酵母表面, 最后确定 9C6 与鼠 TNF- α 成熟蛋白的 29~40 氨基酸肽段结合(图 2). 为了进一步研究鼠 TNF- α 的功能区域, 对 29~40 氨基酸肽段进行点突变, 发现 Mutant A

(Ser30/Asn34/Leu37 均突变为 Ala)与 9C6 不结合, 而另一突变体 Mutant B(Gln31/Asn34/Asn39 均突变为 Ala)仍然与 9C6 结合(图 3). 同时把鼠 TNF- α 与其突变体 Mutant A 分别用大肠杆菌表达, 纯化后通过 ELISA 检测其与 9C6 的结合, 验证了酵母展示的结果, 即突变体蛋白不与 9C6 结合(图 5a). 在功能方面, 通过 TNF- α 对 L929 的杀伤实验, 证实突变体 Mutant A 对 L929 细胞没有杀伤作用(图 6b), 说明突变的 3 个氨基酸位点是影响鼠 TNF- α 功能的关键位点.

成熟的鼠 TNF- α 和人 TNF- α 蛋白有 79% 同源性, 其三级结构和功能相似(图 7), 都可以杀伤 L929 细胞. 对人 TNF- α 的前期研究表明, 29~36, 84~91 和 143~149 肽段是与受体结合位点^[13]. 中和性抗体通过封闭 TNF- α 与其受体结合位点来阻断 TNF- α 与其受体的结合, 从而抑制 TNF- α 的生物学功能^[14]. 通过化学合成人 TNF- α 重叠肽段

确定抗人 TNF- α 多抗的结合位点时也发现，中和人 TNF- α 多抗识别 7~11, 17~23, 30~39, 42~49, 106~122 和 135~142 氨基酸肽段^[9]。我们研究证明，鼠 TNF- α 的中和性抗体 9C6 结合鼠 TNF- α 的 29~40 肽段，与前期工作中对人 TNF- α 及其中和性抗体的研究结果基本一致。人 TNF- α

与 TNF- β 的三级结构也极其相似，都与 TNF 受体结合。人 TNF- β 与其受体复合物的晶体结构直观地显示了，配体 - 受体相互作用的位点，9C6 与鼠 TNF- α 的结合部位(箭头所示)，正好对应于 TNF- β 与其受体结合部位(图 7)。



TNF- α 作为一个多功能的细胞因子，在感染、炎症和自身免疫疾病中具有重要的调节作用，许多免疫系统疾病与 TNF- α 的过量释放有关，目前已有中和 TNF- α 的抗体用于临床治疗风湿性关节炎、强制性脊柱炎和败血症等免疫系统疾病^[15]。TNF- α 通过与其型或型受体结合发挥作用，因此确定鼠 TNF- α 与受体结合位点对于了解鼠 TNF- α 的作用机制，设计阻断 TNF- α 与其受体结合作用的治疗性药物具有重要的指导意义。

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 tumours. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**(9): 3666~3670
- 2 Old L J. Tumor necrosis factor. *Sci Am*, 1988, **258**(5): 59~75
- 3 Clark I A. How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2007, **18**(3~4): 335~343
- 4 Beutler B, Cerami A. The biology of cachectin/TNF- α primary mediator of the host response. *Annu Rev Immunol*, 1989, **7**: 625~655
- 5 Tracey K J, Wei H, Manogue K R, *et al.* Cachectin/tumour necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J Exp Med*, 1988, **167**(3): 1211~1227
- 6 Loetscher H, Pan Y C, Lahm H W, *et al.* Molecular cloning and expression of the human 55 ku tumour necrosis factor receptor. *Cell*, 1990, **61**(2): 351~359
- 7 Schall T J, Lewis M, Koller K J, *et al.* Molecular cloning and

expression of a receptor for human tumour necrosis factor. *Cell*, 1990, **61**(2): 361~370

- 8 Gietz R D, Woods R A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, 2002, **350**: 87~96
- 9 Yone K, Bajard S, Tsunekawa N, *et al.* Epitopic regions for antibodies against tumor necrosis factor α . *J Biol Chem*, 1995, **270**(33): 19509~19519
- 10 Nagahira K, Fukuda Y, Terakawa M, *et al.* Epitope mapping of monoclonal antibodies to tumor necrosis factor- α by synthetic peptide approach. *Immunology Letters*, 1995, **46**(1~2): 135~141
- 11 Shingarova L N, Sagaidak L N, Berkova N, *et al.* Determination of binding site of anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody using hybrid and mutant proteins. *FEBS Letters*, 1996, **386**(1): 72~74
- 12 Zhu C S, Liu X S, Feng J N, *et al.* Characterization of the neutralizing activity of three anti-human TNF monoclonal antibodies and prediction of their TNF epitopes by molecular modeling and mutant protein approach. *Immunology Letters*, 2006, **102**(2): 177~183
- 13 Van Ostade X, Tavernier J, Fiers W. Structure-activity studies of human tumor necrosis factors. *Protein Eng*, 1994, **7**(1): 5~22
- 14 Tracey D, Klareskog L, Sasso E H, *et al.* Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther*, 2008, **117**(2): 244~279
- 15 Feldmann M, Maini R N. Anti-TNF- α therapy of rheumatoid arthritis: What have we learned?. *Annu Rev Immunol*, 2001, **19**: 163~196

The Study of Mouse TNF- α Functional Domain and Its Neutralizing Antibody Binding Site

JIA Jun-Ying^{1,2)}, ZHOU Hong-Zhe¹⁾, TANG Jie^{1)**}

¹⁾Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾Graduate School of The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Tumor necrosis factor alpha(TNF- α) is a multi-functional cytokine that plays a significant role in many autoimmune diseases. The key biological functional domain of mouse TNF- α was determined by identifying the binding site of mouse TNF- α neutralizing antibody 9C6. Using yeast surface display technology, it was determined that 9C6 can recognize the linear amino acid fragment 29 ~40 of mature mouse TNF- α protein. Through mutagenesis experiments of this TNF- α region, the critical amino acids necessary for 9C6 binding were identified. Finally, wild-type mouse TNF- α and mutant variants that loses binding ability to 9C6 were expressed in *Escherichia coli*, purified, and used in a L929 cell killing assay. The assay results proved that the key amino acids for 9C6 binding were consistent with mouse TNF- α functional domain.

Key words mouse TNF- α , neutralizing antibody, binding site, yeast display

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00505

*This work was supported by a grant from The Hi-Tech Research and Development Program of China(2006AA02090805, 2006AA02090402).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888447, E-mail: jtang@sun5.ibp.ac.cn

Received: July 16, 2008 Accepted: September 22, 2008