

融合蛋白的生产技术

杨和平 黄宗之

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

对融合蛋白的研究侧重两个方面,一是利用其生物学功能,构建双功能蛋白;另一个是利用其与受体结合的特异性,构建导向药物。在动脉粥样硬化的防治研究中已初步运用了这两种融合蛋白。

绿脓杆菌外毒素(PE)分为三个功能区,1区系氨基末端区,由1~252号氨基酸组成,与易感细胞识别有关。Ⅱ区是中央区,包括253~364号氨基酸,

(下转第148页)

(上接 136 页)

与 PE 的“跨膜移位”有关, III 区是羧基末端区,由 405~613 号氨基酸组成,具有 ADPR 转移酶活性,在辅酶 I (NAD) 的存在下抑制多肽链的延长。其机理是:PE 的 ADPR 转移酶,可催化 NAD 上的 ADPR 转移到延伸因子-2(EF2),而使 EF-失活。

$$\text{NAD} + \text{EF-2} \xrightarrow{\text{PE}} \text{ADPR} - \text{EF-2} + \text{H}^+ + \text{菸酰胺}$$

近年来,应用基因融合技术,以编码肽类激素、生长因子或其它识别蛋白基因替换 PE 中识别受体的功能区,制备出多种与 PE 有关的嵌合毒素(Chimeric toxin),这种嵌合毒素可与不同的细胞受体结合,有利于研究毒素受体的关系和其细胞毒性,从而达到靶向性治疗的作用。例如 TGF α -PE₁₀是用转化生长因子 α (TGF α)替换 PE 的 Ia 区产生的嵌合毒素,它可与转化生长因子(TGF)受体结合。

Sporin-6(SAP)催化灭活核糖体蛋白(ribosome-inactivating protein),它来源于一种称 Saponaria officinalis 的植物,有人将 Saporin 与碱性成纤维细胞(bFGF)交联导向培养的动脉平滑肌细胞和大鼠内皮剥脱的冠状动脉,SAP-bFGF 具有靶向性抑制动脉平滑肌细胞增殖的作用。

免疫毒素(immunotoxin)是指特异性抗体与毒素以共价键接成的杂交分子。目前常用的毒素分二类:①植物毒素:包括蓖麻籽毒素(RT)、相思子毒素(abrin)、商陆抗病毒蛋白(poreweed anti-viral pro-

tein,PAP),gelonin 等;②细菌毒素:包括白喉类毒素(DT)、绿脓杆菌外毒素(PE)等。其中 RT、abrin 和 DT 是由 A 链和 B 链组成,称为全毒素,PAP, gelonin 及 PE 是一条类似 A 链的单链组成,称为半毒素(hemitoxin)。将上述毒素或其 A 链与抗体分子连接,则可赋予毒素以特异性杀伤各种靶细胞。

上述介绍的是导向药物的构建概况,近年来双功能蛋白发展十分迅速。如 IL-2/免疫球蛋白嵌合分子,IL-2 与干扰素 r 的融合蛋白,IL-2 与细胞毒素的融合蛋白以及 IL-6 与白喉毒素的融合蛋白等,这些融合分子在肿瘤和心血管研究和防治中得到广泛的应用。

下面以 IL-6 与白喉毒素组为例,介绍融合蛋白的生产技术。首先要对人 IL-6 基因进行序列分析,通过 PCR 技术扩增出改造后的 IL-6 基因,其信号肽编码序列被删除,经 DNA 重组获得表达人 IL-6 的工程菌,再构建白喉毒素的表达载体。其方法是经培养白喉杆菌,通过 PCR 技术克隆基因编码序列,构建表达载体后,经 IPTG 诱导表达。然后采用 DNA 重组技术、PCR 和蛋白工程 IL-6 DNA 取代白喉毒素基因的受体结合区,从而构成出白喉毒素/IL-6 重组基因,经过表达载体构建,转染细菌,得到白喉毒素/IL-6 的工程菌,生产出白喉毒素与 IL-6 的融合蛋白,通过融合蛋白的特性细胞毒作用的分析,可为对肿瘤等的导向治疗提供基因工程产品。