

人促红细胞生成素基因在家蚕体中的高效表达

张传溪^{1,2} 姜育蕾¹ 胡 萃² 吴祥甫^{1*}

(中国科学院上海生物化学研究所 上海 200031)

(²浙江大学应用昆虫学研究所 杭州 310029)

摘 要 人促红细胞生成素(EPO)是一种调控红系干细胞增殖、分化和成熟的糖蛋白激素。将合成的 EPO cDNA 插入杆状病毒转移载体 pBlueBac III,使其置于 Ph 基因强启动子控制之下,获得了转移载体 pBlueBacEPO。将 pBlueBacEPO DNA 与野生型 BmNPV DNA 共转染 BmN 细胞,经空斑纯化,获插入 EPO cDNA 的重组病毒 rBmNPVEPO。经 Southern 杂交和 PCR 扩增鉴定证明人 EPO 基因已正确组建于 BmNPV 的预定位置。将重组病毒 rBmNPVEPO 穿刺接种 5 龄幼虫和蛹,收集感染第 3~5d 的幼虫血淋巴和 3~6.5d 蛹血淋巴。用 ELISA 检测幼虫血淋巴中 EPO 表达量高达 62800u/mL,蛹血淋巴中表达量达 74000u/mL。Western blot 结果显示幼虫血淋巴和蛹血淋巴均有一条明显的免疫杂交带,分子量均约为 26kD。用 TF-1 细胞对幼虫表达产物进行了生物活性测定,每毫升血淋巴中 EPO 活性约为 63000u。

关键词 人促红细胞生长素基因,家蚕核型多角体病毒,昆虫细胞,蚕体,基因表达

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0046-05

促红细胞生成素(Erythropoietin,简称 EPO)是一种主要产生于肾脏的糖蛋白激素,在红系祖细胞增殖、分化和成熟过程中起着重要调控作用,从而保证人体红细胞处于正常生理范围。目前重组 EPO 已用于临床治疗肾功能衰竭晚期病人引起的贫血、透析性贫血、AIDS 病人使用 AZT 引起的贫血、各种恶性病变引起的贫血及手术前后使用等,均疗效显著。

人 EPO 基因已在不同系统中得到表达。大肠杆菌中表达的 EPO cDNA 产物虽有体外抗原抗体结合活性^[1],但由于不能糖基化,缺乏生物活性。通过哺乳动物表达系统在 CHO、BHK 等细胞中进行重组 EPO 基因表达,由此获得 EPO 产物与天然产物相似^[2~4]。但由于哺乳动物细胞培养成本很高,且表达量不高,因而重组 EPO 产品的成本昂贵。Wojchowski 等(1987)^[5]应用 80 年代发展起来的杆状病毒—昆虫细胞表达系统,在 Sf 细胞中表达人 EPO cDNA,表达产物有天然 EPO 的细胞测定活性,表达量高,展示了杆状病毒-昆虫表达系统的潜力。但昆虫表达系统不存在复杂型的唾液酸糖基化过程,表达的 EPO 产物也存在糖基化较简单,在体

内稳定性较差,降解较快,从而在体内活性较低的问题。这一问题今后可望通过在临床应用时制成缓释剂的方法得以克服。用脂质体包埋的 rhEPO 已证明对小鼠口服有效^[6],这为 rhEPO 的应用开辟了新途径。家蚕是目前唯一可以进行大规模商业化无菌饲养的昆虫,饲养成本低廉,应用 BmNPV-家蚕表达系统表达外源基因具有实用意义。本文报道人工合成的 EPO cDNA 在家蚕体内获得高效表达,且具有良好的体外测定生物活性的结果。

1 材料和方法

1.1 细胞和培养

试验所用家蚕细胞株 BmN 为本实验室传代培养,培养基为 GIBCO-BRL 公司的 TC-100,补加 10% 胎牛血清,27℃ 培养。

1.2 病毒基因组 DNA 制备

野生型家蚕核多角体病毒(*Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, BmNPV)为本室保存的镇江株。野生病毒基因组 DNA 由感染的幼虫体中繁殖的病毒多角体经纯化、抽提而得,具体方法见参考文献 [7]。

1.3 EPO cDNA 和转移载体来源

EPO cDNA 由中国科学院上海生物工程中心陈常庆组人工合成,克隆于 pUC19 中^[8]。我们已用该基因 5'端和 3'端的 *Xba*I 和 *Bam*HI 位点将基因切下,两端补平后克隆于 pBacPAK8 的 *Bam*HI(补平)位点中,构成 pBacEPO 载体,并使 5'端和 3'端分别产生 *Bam*HI 位点和 *Cla*I 位点。pBlueBacIII 载体为 Invitrogen 公司产品。

1.4 共转染

接种 Bm-N 细胞于 35 mm dish 中单层培养,贴壁生长过夜,第二天用不含血清培养基漂洗 3 次,加 1 mL 无血清培养基待用。取野生型病毒 DNA 1 μ g,重组转移载体质粒 DNA 2 μ g 混合,加 H₂O 至 50 μ L,另取 Lipofectin 15 μ L,与 35 μ L H₂O 混合。将 DNA 溶液和脂质体液混匀,静置 15min,然后逐滴加入 dish 中,27 $^{\circ}$ C 培养 6h,换 3mL 加 10% 血清的培养基,继续培养 5d,收集上清用于空斑筛选。

1.5 重组病毒的筛选和纯化

接种 Bm-N 细胞于 35mm dish,用共转染上清 0.5mL 感染 1h 后,吸掉培养基,铺上含有 1% 低融点胶和 200 μ g X-gal 的培养基 2mL,待胶凝固后,倒置 dish 27 $^{\circ}$ C 培养 5d,至蓝斑出现,挑取蓝斑感染 24 孔板中细胞,4d 后进行点杂交,取阳性斑病毒,在 35mm dish 进行下一轮筛选。反复筛选纯化直至没有任何多角体。

1.6 重组病毒的 PCR 鉴定

正向引物为 CAGGATCCGAGATGGGGGTGC-ACGAA

反向引物为 GCGATCTAAGACACGCAACA

Taq 酶为永德公司产品,扩增条件为 92 $^{\circ}$ C 1min,55 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 1min,30 次循环。

1.7 重组病毒的 Southern blot 杂交鉴定

重组病毒基因组 DNA 从感染细胞上清的病毒粒子中抽提,酶切后,Southern 转移至硝酸纤维素膜上,以用 α -³²P-dCTP(Amersham 公司产品)标记的 EPO 基因为探针,在严格条件下杂交和洗膜,并压片自显影。

1.8 家蚕的感染和样品处理

家蚕品种为青松 \times 皓月,用人工饲料饲养。5 龄起蚕经表皮消毒,每头蚕穿刺接种 10⁵ pfu 重组病毒。发病后收集血淋巴,必要时经液氮和 37 $^{\circ}$ C 反复冻融 3 次,离心去除细胞碎片和脂质,上清用于检测。

1.9 蛋白质 SDS-PAGE 和免疫杂交

SDS-PAGE 胶浓度为 15%,电转移 0.35A,1h。兔抗人为第一抗体,系用人工合成的 EPO 成熟蛋白 N 端 24 个氨基酸残基组成的多肽注射兔并采取血清所得,羊抗兔碱性磷酸酶为第二抗体,显色用 GIBCO-BRL 公司 NBT/BCIP 为底物。

1.10 表达产物的 ELISA 检测和生物活性测定

EPO ELISA 试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品,根据“多抗-EPO-单抗”夹心酶联免疫测定法测定 EPO,具体按试剂盒介绍的方法进行。单位换算按试剂盒标准,1u=1000mIU=1000 \times 6.6pg。

生物活性测定由中国科学院上海生物工程中心协助进行,应用依赖于 EPO 或 GM-CSF 或 IL-3 的 TF-1 细胞株,并用氡掺入法、液闪计数定量。

2 结果与分析

2.1 转移载体的构建

昆虫病毒转移载体 pBlueBacIII 含有苜蓿丫纹夜蛾(*Autographa californica*)核型多角体病毒(AcNPV)的多角体蛋白基因强启动子,多角体蛋白基因的起始密码 ATG 已通过定点突变去除,但保留了原 ATG 上游和下游所有已知与翻译调控有关的序列部分。该载体还含有一个由 AcNPV ETL 启动子控制下的 β -galactosidase 基因,可与外源基因一起重组和表达,这可使重组斑呈蓝色以便于肉眼筛选。 β -galactosidase 基因上游和多克隆位点下游各有 2098bp 和 1925bp 的 AcMNPV 序列,可供与病毒 DNA 同源重组。由于 AcMNPV 与 BmNPV 同源性很高,因此该载体亦可用于与 BmNPV 同源重组。

将 pBacEPO 中带有翻译起始密码子 ATG 和终止密码子 TGA 的完整 EPO 基因克隆在 pBlueBacIII 的 *Bam*HI 和 *Hind*III(补平)位点上,使其处在多角体蛋白基因启动子控制之下,获得的转移载体称为 pBlueBacEPO(图 1)。经酶切鉴定,证明所插入基因的位置、大小和方向均正确(图 2)。

2.2 携带人 EPO 基因的转移载体在家蚕细胞中的重组和鉴定

将转移载体 pBlueBacEPO DNA 与野生型 Bm-NPV DNA 共转染 Bm-N 单层细胞,5d 后将感染上清在 X-gal 存在下进行重组病毒斑纯化,挑选蓝色、多角体缺失斑,结合点杂交,经几轮纯化后获得没有任何野生病毒的重组病毒,称为 rBmNPVEOP。将重组病毒基因组 DNA 用限制酶酶切后,Southern 转移至硝酸纤维素膜,用 α -³²P 标记的 EPO 基因探针杂交,结果如图 3 所示。由图 3 可见明显的阳性

杂交区带,且杂交带分子数与预期的相符, *Bam*HI + *Eco*RI 双酶切可裁出 0.6kb 与探针杂交的 EPO 基因。用含 EPO 基因 5'端部分序列为正向引物,病毒多角体蛋白基因编码区下游部分序列为反向引物,对重组病毒基因组 DNA 进行 PCR 扩增,结果如图 4 所示。以重组病毒基因组 DNA 为模板扩增出的片段大小与以转移载体为模板扩增出的片段大小一致,均约为 1.1kb,与预期结果相符。这说明人 EPO 基因确已组建于 BmNPV 的预定位置,且无明显改构或缺失。

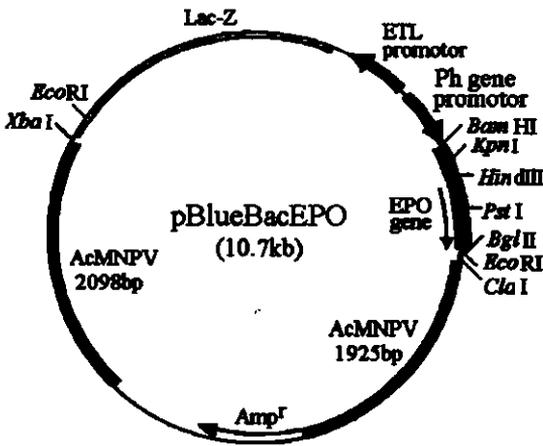


图 1 转移载体 pBlueBacEPO 的结构

Fig.1 Structure of the transfer vector pBlueBacEPO

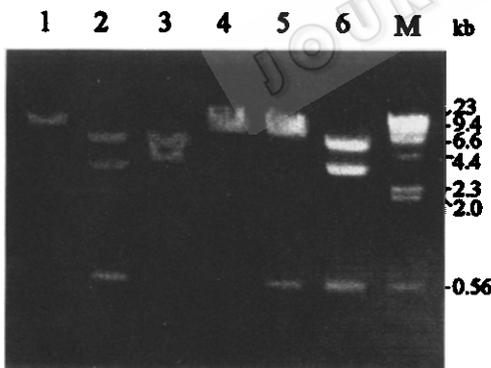


图 2 转移载体 pBlueBacEPO 的酶切图谱

Fig.2 Restriction pattern of the transfer vector pBlueBacEPO

- 1. *Bam*HI; 2. *Bam*HI + *Eco*RI; 3. *Eco*RI; 4. *Hind*III;
- 5. *Bam*HI + *Bgl*II; 6. *Bam*HI + *Xba*I; M. *Hind*III/ λ DNA

2.3 EPO 基因在培养细胞中的表达

将重组 rBmNPVEPO 感染 Bm-N 细胞,感染后 96h 收获培养上清,用于 ELISA 检测。ELISA 测定的细胞培养上清中 EPO 含量达 1360u/mL。将感染后 4d 离心沉淀下的 10^6 个细胞悬于 1 mL PBS 中,反复冻融离心后,上清亦可检测到 146u/mL。由于

感染第 4 天时细胞原生质膜仍完好未裂解,以此推测 EPO 可以正确地被 BmN 细胞分泌至胞外,属分泌型蛋白。

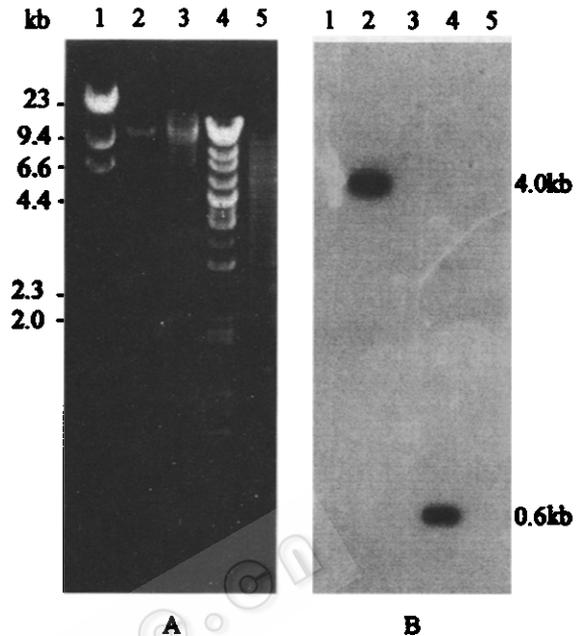


图 3 重组病毒 rBmNPVEPO DNA 的 Southern 杂交结果

Fig.3 Southern hybridization of recombinant virus rBmNPVEPO DNA

- A. Restriction pattern of virus DNA: 1. *Hind*III/ λ DNA; 2. *Eco*RI/recombinant virus rBmNPVEPO; 3. *Eco*RI/wild BmNPV; 4. *Eco*RI + *Bam*HI/recombinant virus rBmNPVEPO; 5. *Eco*RI + *Bam*HI/wild BmNPV
- B. Southern hybridization result of A, Using EPO cDNA as a 32 P labeled probe.

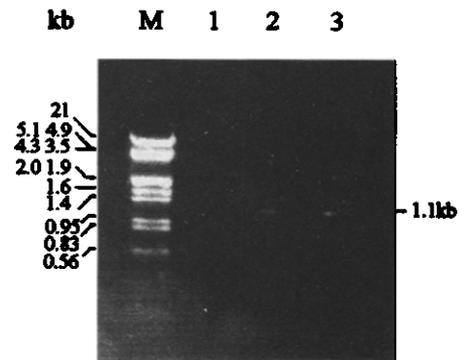


图 4 重组病毒 rBmNPVEPO DNA 的 PCR 鉴定

Fig.4 PCR assay of the recombinant virus rBmNPVEPO DNA

- M. *Hind*III + *Eco*RI/ λ DNA; 1. Wild BmNPV DNA; 2. rBmNPVEPO DNA; 3. The transfer vector pBlueBacEPO DNA

2.4 EPO 基因在家蚕幼虫和蛹体中的表达

将刚脱皮不久的 5 龄蚕幼虫和结茧后第 4 天蛹

经表皮消毒后,穿刺接种 1×10^5 pfu rBmNPVEPO, 幼虫至第 4 天出现病毒感染发病症状;第 5 天出现死亡,蛹至第 4 天症状亦明显,第 5~7 天陆续死亡,将感染第 3~5 天的幼虫和 3~6.5 天的蛹的血淋巴分别收集,经离心除去组织、细胞碎片后,用 ELISA 检测,结果如表 1 所示。幼虫血淋巴中 EPO 表达量在第 4 天时达最高峰,每毫升血淋巴达 628000u,蛹血淋巴中表达量在第 5 天时达最高峰,高达每毫升血淋巴 74000u。

表 1 以 BmNPV 为载体在家蚕体中表达人 EPO 基因

Table 1 Expression of human EPO gene in silkworms using a BmNPV vector. Amount of rhEPO expressed in the hemolymph at different times post infection of recombinant virus* (u/mL)**

Days p. i.	0	3	4	5	6.5
Larvae	0	34000	62800	46000	/
Pupae	0	20500	47000	74000	33400

*Boehringer Mannheim EPO ELISA Kit was used in the test. 1u = 6.6×10^3 pg

** 10 larvae or pupae were tested for each treat. Numbers in the table are the average amount.

将上述感染的幼虫和蛹血淋巴裂解后进行 15% SDS-PAGE 电泳,然后电转移至硝酸纤维素滤膜上。用兔抗人(IgG)多克隆抗体免疫杂交,随后与碱性磷酸酶偶联的羊抗兔第二抗体保温,加底物后显色。结果显示幼虫血淋巴和蛹血淋巴均有一条明显的免疫杂交带,且两者分子量大小相似。由标准分子量曲线计算出杂交阳性带分子量约为 26kD。这一分子量与 Quelle^[10]在其它昆虫细胞中表达的 EPO 分子量(26kD)相近(图 5)。用 TF-1 细胞进行的生物活性测定,结果与 ELISA 检测相近,每毫升幼虫血淋巴约有 EPO 活性 63000u。

3 讨论

人的 EPO 基因位于第 7 号染色体即 7pter—q22,由外显子 II、III、IV 的全部和 I、V 的一部分构成它的结构基因。结构基因总长 579 核苷酸,其中 5'端编码一个由 27 个疏水性氨基酸组成的信号肽,余下的 166 个氨基酸组成一个成熟蛋白。本实验所用人工合成的 EPO 基因,全长 593 个核苷酸,使用密码子虽然与天然基因的密码子不尽相同,但编码的氨基酸与 EPO 前体蛋白完全相同。EPO 基因在家蚕细胞中表达产物主要存在于培养基上清中,而且家蚕细胞和蚕体中表达的 EPO 均具有免疫活性

和体外生物活性,这暗示 EPO 前体蛋白信号肽能被蚕体和蚕细胞识别和切割,并被分泌出蚕细胞。

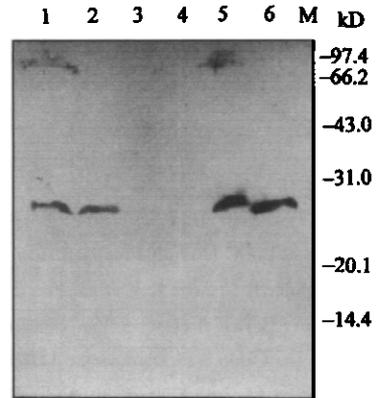


图 5 家蚕幼虫和蛹体表达的 EPO 基因产物的免疫杂交分析

Fig. 5 Immunoblotting analysis for human EPO gene products expressed in the larvae and pupae of the silkworm

1, 2. Pupa/rBmNPVEPO; 3. Pupa/wild BmNPV; 4. Wild BmNPV; 5, 6. Larvae/rBmNPVEPO; M. Protein molecular weight standards

EPO 是一个酸性糖基化的蛋白,天然 EPO 分子量约为 34kD,其中 40% 分子量来源于蛋白上的糖基。Wojchowski(1987)^[5]用杆状病毒表达系统在昆虫 Sf 细胞中表达了人的 EPO cDNA,表达纯化的产物分子量为 23kD,其中约 4.6kD 分子量来源于糖基化,整个分子量比天然 EPO 分子量小,主要原因在于昆虫表达系统中糖基化较简单,不存在复杂型的唾液酸糖基化过程,因而使得 EPO 分子中糖链末端缺少唾液酸而造成分子偏小,但表达的产物具有天然 EPO 的全部体外测定生物活性,纯化产物活性单位为 2×10^5 u/mg。而用 N-Glycanase 处理获得的去糖多肽,分子量约为 18kD,生物活性丧失 80% 以上。Quelle 等人报道在 Sf 悬浮细胞中表达 EPO 基因,表达量高达 500u/mL 培养基,纯化的表达产物经准确确定分子量为 26kD,其中糖基占分子量的 30%,昆虫表达 EPO 产物分子量很均一,这与哺乳动物表达系统糖基化复杂,表达的 EPO 基因产物分子量从 30~38kD,即糖基分子量占 40% 至 50% 情况很不相同^[9]。因此 Sf 细胞表达的产物为 EPO 作用机制、细胞受体研究提供了高活性和很高纯度的激素源,同时由于其糖基化的均一性,也为直接的结构分析提供很好的材料。近年的研究表明用脂质体包埋的 rhEPO 口服对小鼠有效^[6],这为 rhEPO 的应用开辟了新途径。本试验结果表明,用 BmNPV 蚕幼虫系统表达 EPO 基因,表达量高达

62800u/mL 幼虫血淋巴或 74000u/mL 蛹血淋巴, 是迄今为止所有报道中最高的。蚕体表达的 EPO 基因产物分子量约为 26kD, 接近 Sf 细胞表达的 EPO 分子量, 生物活性测定表明表达产物具有良好

的体外活性。家蚕是目前唯一可进行无菌人工饲料大规模饲养的昆虫, EPO 在人工饲料饲养的家蚕体中高效表达成功, 为大批量低成本生产基因工程 EPO 产品提供了一条可能的新途径。

参 考 文 献

- [1] Lee Huang S. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1984 **81** :2708~2712
- [2] Lin F K, Suggs S, Lin C H *et al.* *Prac Natl Acad Sci USA* ,1985 **82** :7580~7584
- [3] Powell J S, Berkner K L, Lebo R V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1986 **83** :6465~6469
- [4] Sasaki H, Bothner B, Dell A *et al.* *J Virol Biochem* ,1987 **262** :12059~12076
- [5] Wojchowski D M, Orkin S H, Sytkowski A. *J Biochem Bioph Acta* ,1987 **910** :214~232
- [6] Maitani Y, Hazama M, Tojo Y *et al.* *J Pharm Sci* ,1996 **85** :440~445
- [7] Summers M D, Smith G E. *A Manual of Methods for Baculovirus Vectoc and Insect Cell Culture Procedures* Texas : Texas A&M University , 1986
- [8] 毛积芳, 戴金凤, 冯春婴等. *生物工程学报* ,1995 **11** :85~89
- [9] Quelle F W, Caslake L F, Burkert R I *et al.* *Blood* ,1987 **74** :652~657

High Expression of Human EPO Gene in the Larvae and Pupae of the Silkworm *Bombyx mori*

ZHANG Chuan-xi^{1, 2} JIANG Yu-lei HU Cui² WU Xiang-fu¹

¹ Shanghai Institute of Biochemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031

² Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029

Abstract Erythropoietin (EPO) is a glycoprotein hormone produced primarily by the kidney, and is principal factor regulating red blood cell production. The synthesized EPO cDNA was inserted into the transfer vector pBlueBacIII to generate the recombinant transfer plasmid pBlueBacEPO. Cotransfection of BmN cells with pBlueBacEPO DNA and Wild BmNPV DNA generated the recombinant virus rBmNPVEPO carrying EPO gene driven by the strong promoter of AcNPV polyhedrin gene. The results of Southern blot and PCR reaction confirmed that EPO gene had been correctly inserted in the target position in the BmNPV genome. ELISA assay showed that the EPO gene was expressed with high level in the larvae and pupae of the silkworm. The larvae and pupae produced as high as 62 800u and 74 000u in 1mL hemolymph on the 4th day (larvae) and the 5th day (pupae) after infection with the recombinant virus rBmNPVEPO, respectively. Western blot analysis showed the molecular weight of rhEPO produced in the larvae or pupae was about 26kD. Biologic assay showed the rhEPO had high activity (about 63 000u in per milliliter of hemolymph) *in vitro*.

Key words *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus, human erythropoietin gene, expression, Insect cells, silkworm larvae and pupae