

利用盘基网柄菌表达可溶性人 Fas 配体

Expression of the Soluble Human Fas Ligand in *Dictyostelium discoideum*

吴小霞¹, 卢英华^{1,2*}, 李清彪^{1,2}, 邓旭¹, 徐志南³

WU Xiao-Xia¹, LU Ying-Hua^{1,2*}, LI Qing-Biao^{1,2}, DENG Xu¹ and XU Zhi-Nan³

1. 厦门大学化学化工学院化学工程与生物工程系, 厦门 361005

2. 厦门大学福建省化学生物学重点实验室, 厦门 361005

3. 浙江大学化学工程与生物工程系生物工程研究所, 杭州 310027

1. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemical and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

2. Key Laboratory for Chemical Biology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China

3. Institute of Biochemical Engineering, Department of Chemical and Biochemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China

摘 要 用 PCR 扩增从激活的人中性粒细胞中得到的编码可溶性 Fas 配体胞外区中第 141 个到第 281 个氨基酸的 cDNA, 将其与 hCG- β 信号肽片段融合到质粒 MB12neo 中, 随后导入到盘基网柄菌 AX3 细胞中, 得到分泌性表达 hFasL 的重组菌 AX3-H3。为提高 shFasL 的表达量, 对质粒 pMB12neo 作了改造, 得到衍生质粒 pMB74。利用质粒 pMB74 克隆表达 shFasL, 得到高通量表达 shFasL 的重组菌 AX3-pLu8。在复杂培养基 HL-5C 中, 重组菌的细胞密度可达 $(1.5 \sim 2) \times 10^7$ /mL, AX3-H3 及 AX3-pLu8 分泌的 shFasL 浓度分别为 23.5 μ g/L 及 206 μ g/L。利用合成培养基 SIH 培养重组菌 AX3-H3 及 AX3-pLu8, 细胞密度均达到 $(4 \sim 5) \times 10^7$ /mL, shFasL 浓度则分别达到 111 μ g/L 和 420 μ g/L。

关键词 可溶性人 Fas 配体, 盘基网柄菌, 重组蛋白, 培养

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0380-05

Abstract An expression system is described for high-yield production of recombinant soluble human FasL (shFasL) in *Dictyostelium discoideum* cells. DNA encoding amino acids 141 ~ 281 of hFasL was PCR amplified from cDNA derived from activated human neutrophils. The resulting product was fused with a DNA fragment encoding hCG- β signal peptide and cloned in the expression vector pMB12neo. *Dictyostelium* strain AX3 was transfected with this plasmid, yielding a recombinant strain called AX3-pCESFL95-H3. In order to improve the shFasL expression level, pMB12neo was optimized by replacing its transcriptional terminator/ polyadenylation segment of the 2H3 gene with an actin8 terminator/polyadenylation segment, yielding derived expression vector pMB74. The recombinant *Dictyostelium* strain called AX3-pLu8 was generated with this new plasmid. When the recombinant cells were cultivated in a complex HL-5C medium, a cell density of $(1.5 \sim 2) \times 10^7$ /mL was reached, and the shFasL level expressed by strains AX3-pCESFL95-H3 and AX3-pLu8 was 23.5 μ g/L and 206 μ g/L, respectively. By using a newly developed synthetic medium called SIH as culture medium, higher cell density of $(4 \sim 5) \times 10^7$ /mL was achieved. Correspondently, 111 μ g/L and 420 μ g/L shFasL were secreted by recombinant strains AX3-pCESFL95-H3 and AX3-pLu8, respectively.

Key words soluble human Fas ligand, *Dictyostelium discoideum*, recombinant protein, cultivation

Received: November 19, 2004; Accepted: March 4, 2005.

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (No. 20306025, 30370039).

* Corresponding author. Tel: 86-592-2183088; E-mail: ylu@xmu.edu.cn

国家自然科学基金资助项目 (No. 20306025, 30370039)。

人 Fas 配体(human Fas ligand, hFasL)是分子量为 37kD 的同源三聚体 II 型跨膜糖蛋白^[1],是一种细胞凋亡因子,属于肿瘤坏死因子家族成员^[2,3]。FasL 通过与细胞表面的 Fas 受体结合可引起 Fas 表达阳性的细胞凋亡,从而杀死病变细胞^[4]。FasL 也可以可溶性形式存在。可溶性 FasL 同样具有生物活性,可与它的膜结合形式竞争性调节细胞的凋亡。FasL 的凋亡作用在治疗肿瘤、AIDS、癌症、关节炎等慢性疾病方面有着极其重要的作用。

FasL 含有一个二硫键以及约 8kD 的 N-连接的寡聚糖链。最近,李宁丽等人在大肠杆菌中以融合蛋白的形式表达 hFasL,该 hFasL 重组蛋白经透析复性后具有诱导 Jurkat 细胞凋亡的活性^[5]。但由于大肠杆菌不具备糖基化等翻译后修饰功能,所表达的 hFasL 不能获得与天然产物相似的正确结构。国外 Zappitelli 等人报道了通过哺乳动物表达系统在 CHO 细胞中克隆表达可溶性 hFasL 基因以大量生产 hFasL 蛋白^[6],但表达量只有 60 $\mu\text{g}/10^6$ cells,而且由于 CHO 细胞生长缓慢,往往需要使用含血清的培养基,培养成本很高,导致最终的重组 hFasL 产品价格昂贵。此外,Mariani 等人通过构建杆状病毒重组质粒,实现了膜结合形式的鼠 FasL 和人 FasL 在被重组病毒感染的昆虫 Sf9 细胞中的表达,表达产物经免疫印迹表明其分子量分别为 40kD、32 ~ 33kD,而且均具有生物活性,可引起敏感靶细胞的凋亡^[7]。膜结合和可溶性形式的 hFasL 还在 COS 细胞^[8]、鼠 T 淋巴瘤细胞^[8]、人体胚胎肾 293 细胞^[9]以及被杆状病毒转染的 Sf9 细胞^[10]中得到表达。但这些工作都只是用基因克隆手段获得少量纯的 hFasL 蛋白以用于研究其凋亡性质或其与 Fas 的作用方式等等,而不是以开发 hFasL 的高效表达系统为重点,因此表达量很低,不超过 20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

本研究首次尝试利用粘霉盘基网柄菌(*Dictyostelium discoideum*, Dd)克隆表达可溶性人 Fas 配体(shFasL)。盘基网柄菌作为一个前景广阔的真核生物表达系统,在表达(糖)蛋白方面具有很多优越性,自 90 年代初已成功用于表达多种需要翻译后修饰的重组药用蛋白^[11]。利用盘基网柄菌克隆和表达 shFasL 重组蛋白,不仅可以更好地了解 hFasL 的生物功能,而且可能大大降低生产成本,开发它在药物治疗方面的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

酵母粉购自德国 Bioferm 公司,胰蛋白胨由 Difco 公司提供。酪蛋白胨、肌蛋白胨和葡萄糖购自 Merck 公司,链霉素硫酸盐由 Sigma 公司提供,而遗

传菌素则来自 Serva 公司。除天冬酰胺酸购自 ICN、组氨酸购自 Senn、甘氨酸购自 Carl Roth 之外,实验所用的氨基酸大多数来自日本 Ajinomoto 公司。维生素中除叶酸购自 Sigma 公司外,生物素、硫辛酸以及维生素 B1、B2、B12 均来自 Fluka 公司。其余化学试剂均为分析纯级别以上的。

1.2 hFasL 基因片段的扩增与克隆

从激活的人中性粒细胞中提取总 RNA,再进行逆转录得到编码可溶性 Fas 配体胞外区第 141 个到第 281 个氨基酸的 cDNA,随后经 PCR 扩增。用于扩增 FasL 基因片段的引物序列分别为:正向引物为 5'-CTCGAGGTACCTGGGCTTCTAAGGAGCTGAGGAA GTGG-3',反向引物为 5'-CTGCAGGATCCTTAGAGCT TATATAAGCCGAA-3'(画线部分分别为 *Kpn* I 和 *Bam* H I 限制酶切位点)。所得 PCR 产物克隆到质粒 pGEM-T Easy (Promega) 中,并由此得到质粒 pFLED。

1.3 hCG- β 信号肽基因的扩增与克隆

Fas 配体一般是插入到细胞质膜中成为不具信号肽的 II 型跨膜蛋白。为分泌性表达 Fas 配体,有必要将 Fas 配体胞外区的基因片段和一段信号肽序列相连接。为此,将一段来自 pEBVA100^[12]并编码了人绒毛膜促性腺激素(hCG)- β 信号肽基因的 DNA 片段经 PCR 扩增。引物序列分别为:正向引物为 5'-TCAGATCTAAAAAATGGAGATGTCCAAGG-3',反向引物为 5'-GCCCA GGTACCACCCATGCT-3'(划线部分分别为 *Bgl* II 和 *Kpn* I 限制酶切位点)。所得 PCR 产物同样克隆到质粒 pGEM-T Easy 中,并由此得到质粒 pHgbSP。为提高 Fas 配体在盘基网柄菌中的表达量,在 pHgbSP 中设置一段盘基网柄菌 'Kozak' 序列即 AAAAA,以及在该段序列的下游加上 hCG- β 链中第 1 个直到第 20 个的密码子,其中第 5 个到第 13 个、第 16 个和第 17 个密码子均根据盘基网柄菌对密码子的偏爱性作了相应的调整^[12]。

1.4 重组体 pCESFL95 的构建及盘基网柄菌转化

以上两个质粒 pFLED 和 pHgbSP 均经 DNA 测序检验无误。接着,将 pFLED 中带有限制酶切位点 *Kpn* I - *Pst* I 的编码 hFasL 的片段插入到 pHgbSP 中编码 hCG- β 信号肽序列的下游位置,得到质粒 pSFL, pSFL 即融合了编码可溶性 FasL 中第 141 个到第 281 个氨基酸的基因以及编码 hCG- β 信号肽的基因。随后,将带有 *Bgl* II - *Bam* H I 限制酶切位点的 pSFL 经 *Bgl* II 酶切,得到 496 bp 的 *Bgl* II - *Bam* H I 片段,将之插入到质粒 pMB12neo^[13] 的 *Bgl* II 位点,从而得到重组体 pCESFL95。再将 pCESFL95 通过电穿孔方法^[14] 导入到盘基网柄菌 AX3 细胞中,得到重组菌株 AX3-pCESFL95-H3,简称 AX3-H3。可溶性人

质粒含有一段编码可溶性 FasL 中第 141 个到第 281 个氨基酸的基因,此外为使表达产物分泌到培养基中,还包含了一段编码 hCG- β 信号肽的基因。利用复合培养基摇瓶培养重组盘基网柄菌 AX3-H3,4~5d 后取培养基上清液作 ELISA 分析,为阳性结果,表明重组盘基网柄菌能够分泌表达 shFasL,该蛋白具有天然蛋白的抗原性,可与 FasL 的特异性单克隆抗体结合。由 FasL 标准曲线计算可知 shFasL 的表达量为 16~30 $\mu\text{g/L}$ 。

将表达载体 pMB12neo 中的转录终止子 2H3 替换为强终止子 actin8,并进行基因测序、调整 actin8 终止子,得到一个新的表达载体 pMB74。将 pSFL 中 496 bp *Bgl* I - *Bam* H I DNA 片段插入到质粒 MB74 的 *Bgl* II 位点,得到重组菌株 AX3-pLu8。

2.1 HL-5C 培养基培养重组盘基网柄菌 AX3-H3 和 AX3-pLu8 表达 shFasL

利用复合培养基 HL-5C 在 500 mL 摇瓶上培养重组盘基网柄菌 AX3-H3 的结果如图 2 所示。在 HL-5C 培养基中重组菌株 AX3-H3 以世代时间 8~10 h 生长到 $(1.5 \sim 1.6) \times 10^7/\text{mL}$,培养 122 h 后(稳定期后期),培养基中 AX3-H3 表达的 shFasL 最高浓度为 23.5 $\mu\text{g/L}$ 。葡萄糖在对数生长期后期开始被消耗,稳定期中葡萄糖浓度继续下降,总共约有 1/3 的葡萄糖(即 3.7~4.0 g/L)被消耗。

通过优化表达载体 pMB12neo 得到的重组菌株 AX3-pLu8 在 HL-5C 培养基中所能达到的最大细胞密度和葡萄糖消耗量与重组菌株 AX3-H3 相当,但 AX3-pLu8 的 shFasL 表达量大大提高,培养基中 shFasL 的最高浓度达到 206 $\mu\text{g/L}$ (图 2),比表达载体未优化前得到的重组菌株 AX3-H3 在 HL-5C 培养基中的表达量提高了 8 倍。

2.2 SIH 合成培养基培养重组盘基网柄菌 AX3-H3 和 AX3-pLu8 表达 shFasL

经长时间适应后,重组菌株 AX3-H3 在合成培养基 SIH 中的典型培养过程如图 3 所示。虽然在 SIH 细胞生长较为缓慢(世代时间为 14~16 h),但 AX3-H3 的细胞密度却最终达到了 $4.8 \times 10^7/\text{mL}$,即与 HL-5C 培养基相比,细胞密度提高了 3 倍。培养 186 h 后,AX3-H3 表达的 shFasL 浓度在稳定期后期达到最高,为 111 $\mu\text{g/L}$,约为 HL-5C 培养基中 shFasL 表达量的 5 倍。从图 3 可以看出,在利用 SIH 合成培养基培养过程中,3/4 以上的葡萄糖被细胞消耗,从而导致了比 HL-5C 培养基更高的细胞密度和 shFasL 表达量。

而表达载体优化之后得到的重组菌株 AX3-pLu8,在 SIH 培养基中其细胞密度达到了 $(4.2 \sim 4.3) \times 10^7/\text{mL}$,相应地,其 shFasL 表达量达到 420

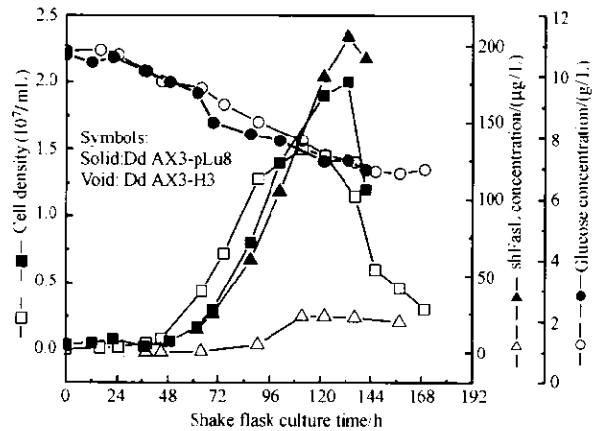


图 2 在复合培养基 HL-5C 中摇瓶培养重组盘基网柄菌 AX3-H3 和 AX3-pLu8 表达 shFasL

Fig.2 Shake-flask cultivation of recombinant *D. discoideum* strain AX3-H3 and AX3-pLu8 in the presence of complex medium HL-5C for shFasL expression

$\mu\text{g/L}$, 比重组菌株 AX3-H3 在相同培养条件下的 shFasL 表达量提高了近 3 倍。

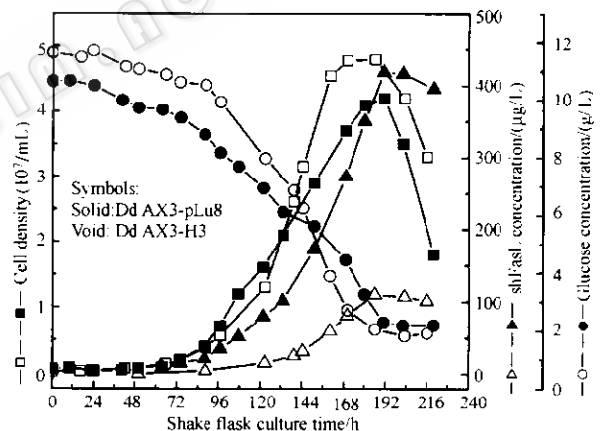


图 3 在合成培养基 SIH 中摇瓶培养重组盘基网柄菌 AX3-H3 和 AX3-pLu8 表达 shFasL

Fig.3 Typical time course of shake-flask cultivation of recombinant *D. discoideum* strain AX3-H3 and AX3-pLu8 on SIH medium for shFasL expression

3 结论

对于外源基因的高效与活性表达,选择一个好的表达系统非常重要。盘基网柄菌的主要优点在于它可对重组蛋白进行各种翻译后修饰,如磷酸化、酰基化、形成糖基磷脂酰肌醇锚点(GPI),特别是氮连接或氧连接的简单和复杂的糖基化,而且其糖基化机制与高等生物非常相似^[17]。此外,可在盘基网柄菌中应用随机突变方法产生成千上万个克隆子,从而避免了在昂贵而难处理的哺乳动物细胞系进行分

析^[18]。重组蛋白在盘基网柄菌中是由染色体外质粒表达复制,而不是由整合到染色体上的 DNA 表达复制,这样可一步得到重组蛋白以用于后续分析,并且质粒的高拷贝数可使蛋白质在可调节的启动子的严格控制下以胞内、膜结合或以胞外分泌的形式大量表达。单细胞的阿米巴变形虫能够在简单、廉价培养基上较快速生长并能在发酵罐中以较高的密度 $[(1 \sim 2) \times 10^7/\text{mL}]$ 悬浮培养,利于重组蛋白的大量生产。由于在表达糖蛋白方面具有以上这些优越性,盘基网柄菌已被成功用于表达多种重组药用蛋白,诸如恶性疟疾环孢子病毒蛋白抗原、血吸虫 S-谷胱甘肽转移酶、轮状病毒 SA11 毒株 VP7 蛋白、人抗凝血酶 III、hCG 等等,这些重组蛋白均具有相应的体内外生物活性,表达水平与在动物细胞系(如 CHO)中表达相当或更高,有的已达到 1 mg/L ^[11]。

通过将编码 shFasL 中第 141 个到第 281 个氨基酸的基因与 hCG- β 信号肽基因融合,利用表达载体 pMB12neo 在盘基网柄菌表达系统中成功实现了 shFasL 的分泌表达,得到重组菌 AX3-H3。在此工作的基础上,从上游的载体优化与下游的重组菌高密度培养这两方面着手,开展了两部分工作。以提高 shFasL 的表达效率和质粒稳定性为目标,对原载体 pMB12neo 进行了优化,将原终止子 2H3 替换为强终止子 actin8,并着重研究了终止子 actin8 的基因序列,继而进行相应的调整。发现优化后的表达载体 pMB74 在强终止子 actin 8 的作用下,可使目的基因得到较高的表达。利用该表达载体 pMB74 经同样的克隆程序后得到重组菌 AX3-pLu8,其 shFasL 表达量比 AX3-H3 提高数倍,由此成功构建了一个高效表达 shFasL 的盘基网柄菌表达系统。

相比于复合培养基,盘基网柄菌在合成培养基上往往能达到更高的细胞密度。因此进一步采用文献报道的合成培养基 SIH 培养重组菌 AX3-H3 和 AX3-pLu8,以实现盘基网柄菌的高密度生长,从而实现在盘基网柄菌中目标蛋白 shFasL 的高通量合成。在合成培养基 SIH 中,重组菌 AX3-pLu8 的最大细胞密度达到 $4 \times 10^7/\text{mL}$ 以上,shFasL 表达量则高达 $420 \mu\text{g/L}$,从而为利用这一新型真核表达系统大规模生产 shFasL 奠定了基础。

致谢:用于制备编码 shFasL cDNA 的人中性粒细胞由荷兰 Groningen 大学医学院肿瘤所 Tineke Timmer 和 Steven de Jong 教授惠赠,特此致谢。

REFERENCES(参考文献)

[1] Tanaka M, Suda T, Takahashi T *et al.* Expression of the functional soluble form of human Fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J*,

1995, **14**: 1129–1135

- [2] Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, **88**: 355–365
- [3] Seino K, Iwabuchi K, Kayagaki N *et al.* Cutting edge: chemotactic activity of soluble Fas ligand against phagocytes. *J Immunol*, 1998, **161**: 4484–4488
- [4] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science*, 1995, **267**: 1449–1456
- [5] Li NL(李宇丽), Nie H(聂红), Yu QW(余奇文) *et al.* The expression and application of humar. Fas ligand in *E. coli*. *Journal of Cell and Molecule Immunology* (细胞与分子免疫学杂志), 2003, **19**(1): 20–22
- [6] Zappitelli S, D'Alatri L, Ciucci A *et al.* Expression and characterization of biologically active human Fas ligand produced in CHO cells. *Mol Biotechnol*, 2003, **23**(3):189–202
- [7] Mariani S M, Matiba B, Sparna T *et al.* Expression of biologically active mouse and human CD95/APO-1/Fas ligand in the baculovirus system. *Journal of Immunological Methods*, 1996, **193**:63–70
- [8] Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T *et al.* Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*, 1995, **182**: 1777–1783
- [9] Schneider P, Bodmer J L, Holler N *et al.* Characterization of Fas (APO-1, CD95)-Fas ligand interaction. *J Biol Chem*, 1997, **272**(30): 18827–18833
- [10] Oyaizu N, Kayagaki N, Yagita H *et al.* Requirement of cell-cell contact in the induction of Jurkat cell apoptosis: the membrane-anchored but not soluble form of FasL can trigger anti-CD3-induced apoptosis in Jurkat T cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **238**: 670–675
- [11] Lu Yinghua, Wu Xiaoxia, Xu Zhinan *et al.* Advances in *Dictyostelium discoideum* as an expression system. *Chemical Journal on Internet*, 2004, **6**(9): 58
- [12] Vervoort EB, van Ravestein A, van Peij NNME *et al.* Optimizing heterologous expression in *Dictyostelium*: importance of 5 codon adaptation. *Nucl Acids Res*, 2000, **28**(10): 2069–2074
- [13] Heikoop JC, Grootenhuis PD, Blaauw M *et al.* Expression of a bioactive, single-chain choriogonadotropin in *Dictyostelium discoideum*. *Eur J Biochem*, 1998, **256**:359–363
- [14] Mann SKO, Devreotes PN, Elliott S *et al.* Cell biological, molecular genetic, and bio-chemical methods to examine *Dictyostelium*. In: Celis, J E., (Ed.), *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, New York: Academic Press, 1994, pp. 412–452
- [15] Han SI, Flaschel E, Friehs K. Improvement of a synthetic medium for *Dictyostelium discoideum*. *Proc Biochem*, 2004, **39**: 925–930
- [16] Franke J, Kessin R. A defined medium for axenic strains of *Dictyostelium discoideum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, **74**(5): 2157–2161
- [17] Jung E, Williams KL. Review: The production of the recombinant glycoproteins with special reference to the simple eukaryotes including *Dictyostelium discoideum*. *Biotechnol Appl Biochem*, 1997, **25**: 3–8
- [18] Linskens MHK, Grootenhuis PDJ, Blaauw M *et al.* Random mutagenesis and screening of complex glycoproteins: expression of human gonadotropins in *Dictyostelium discoideum*. *FASEB J*, 1999, **13**: 639–645