

人组织型纤溶酶原激活剂 (tPA) 基因的分离与表达

宋后燕 钱民章* 翁致平

(上海医科大学分子遗传学研究室, 上海)

(遵义医学院生化教研室, 贵州遵义) *

组织型纤溶酶原激活剂 (Tissue Type Plasminogen Activator, tPA) 激活纤溶酶原形成纤溶酶, 后者催化水不溶纤维蛋白降解为水溶性肽段, 纤维蛋白能显著增强tPA对纤溶酶原的激活作用, 因此tPA能特异、高效地溶解血栓, 在治疗冠心病等血栓性疾病时效果肯定, 是理想的栓溶剂^[1]。tPA在组织和体液中含量甚微, 同时分子量高达68000, 从天然组织提取或人工合成药用tPA均不切实际, 唯有基因工程是生产药用tPA的合理途径。为此我们首先从人染色体基因文库中分离tPA基因克隆, 以便组装合适的表达载体和高效启动子后引入真核宿主细胞, 组建能够表达tPA基因的工程细胞。

材料与 方法

(一) 材料

1. 人胎盘染色体基因库: 西德Lindcrmaiey, W.教授惠赠。

2. tPA cDNA 克隆: 上海医科大学、分子遗传学研究室构建, 其中tPA cDNA编码tPA分子A、B链交界区域446 bps重组于pUC8 Pst I位点。

3. 各种限制性内切酶、 α -³²P 标记物: 从Boehringer Mannheim和NEN等公司购买。

4. 中国仓鼠卵巢细胞株: 二氢叶酸还原酶基因缺陷突变株 (CHO-dhfr⁻细胞株), 由Chasin教授惠赠。

5. 标准tPA: 由WHO标准局提供。

(二) 方法

1. tPA cDNA 探针的制备: 用改良的Birboim方法^[2]。大量制备含tPA cDNA片段的重组质粒pHS-2, 经Sepharose 2B柱分离, 获得纯化质粒。Pst I 水解pHS-2质粒, 经1%琼脂

糖凝胶电泳分离并回收其中tPA cDNA片段^[3], 按NEN公司切口平移翻译药箱推荐的反应条件, 以 α -³²P CTP标记tPA cDNA片段, 用液体闪烁计数仪测定探针的放射性强度, 计算比放射性, 通常为 1×10^8 cpm/ μ g DNA。

2. 人胎盘染色体基因库的优选: 参考Ny等^[4]及Kafator^[5]等的方法, 用点杂交优选人胎盘染色体基因库中富含tPA编码顺序的组分。

将人胎盘染色体基因库重组DNA随机分为7个组份, 每份取一定量用EcoRI消化2h, 经碱变性后与tPA cDNA探针点杂交, 探针强度为 5×10^5 — 10^6 cpm/ml杂交液, 50℃杂交 (5 × SET; 5 × Denhardt's; 0.1% NapyPO₄; 0.1% SDS; 10% Na-Dextran sulfate; 鱼精DNA 100—200 μ g/ml杂交液) 20h。滤膜用2 × SSC, 0.1% SDS溶液50℃洗涤3次, 室温下洗2次, 然后进行X光胶片放射自显影。

3. 人tPA基因克隆的分离: 取基因库强杂交组份 (PLS) DNA按Mandel方法^[7]转化大肠杆菌HB101细胞, 计算转化率。

参考Grosveld, F.等方法^[6], 用菌落原位杂交分离含tPA基因的阳性克隆。杂交条件与点杂交相同。根据X光胶片上强感光点位置, 挑取阳性菌落。因印片上菌落密度过大, 难以挑到单个克隆, 为此进行了再筛选。选取单个阳性菌落制备cosmid作进一步研究。

4. 人tPA基因的鉴定: 用碱抽提法^[7]制备6个阳性菌落的DNA, DNA分别用Bgl I、EcoR I和Pst I水解。其中t₃ DNA取4份, 分别用EcoR I、Pst I、BamH I和Hind I水解, 水解片段用Southern杂交进行鉴定。

本文于1988年9月13日收到。

各样品酶反应物和 ^{32}P 末端标记的 $\lambda\text{DNA}/\text{Hind III}$ 片段经0.5%琼脂糖凝胶电泳分离和碱变性后,将凝胶中的DNA片段转移到硝酸纤维素滤膜上,与tPA cDNA探针 50°C 杂交20h,滤膜按常规洗涤后,进行放射自显影。以标准分子量各片段的碱基对为纵坐标,泳动迁移率为横坐标,在半对数表上作出标准曲线,取杂交片段的泳动迁移率从标准曲线算出杂交片段的长度(bps)算其分子量。

5. DNA转染细胞: 阳性克隆 t₃ cosmid

DNA(图1)与质粒pSV2-dhfr共转化CHO-dhfr-DG44细胞^[8], cosmid DNA取15 μg ,与5 μg pSV2-dhfr质粒混合后加入CaCl₂溶液,然后缓慢地同Hepes-磷酸缓冲液混合,放置室温下30min,待生成很细的沉淀物后加到含 5×10^5 受体细胞的培养瓶中,16h后除去含DNA沉淀物的培养液,换入新鲜的含0.01m mol/L次黄嘌呤核苷和0.003m mol/L胸腺嘧啶核苷的DMEM培养液,培养28h后换入DMEM培养液,其中不含次黄嘌呤核苷和胸腺嘧啶核苷,以选择转化细胞克隆。以后每

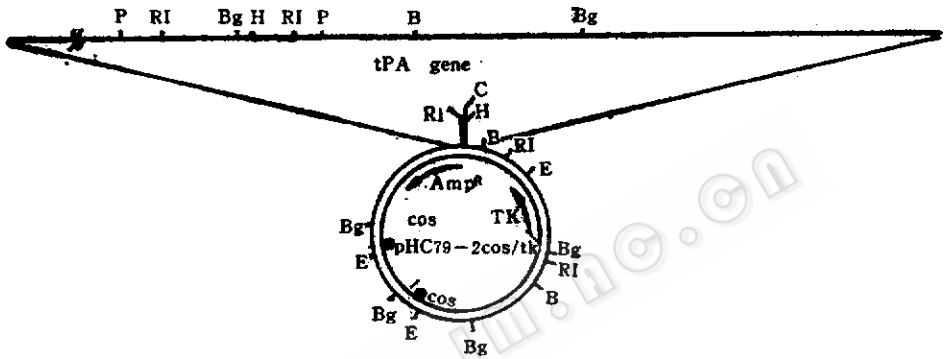


图1 t₃重组cosmid DNA的结构和部分限制性内切酶位点

Fig.1 The structure of t₃ recombinant cosmid DNA and its restriction endonucleases sites

B, BamH I; Bg, Bgl I; C, Cla I; E, EcoR I; H, Hind III; P, Pst I; RI, EcoR I

隔三天换一次DMEM培养液,12天以后看到转化细胞克隆。

6. tPA活力检测:用纤维蛋白-琼脂糖凝胶板检测培养液中tPA的活性^[9]。

结果与讨论

(一) 人tPA基因克隆的筛选和分离

人胎盘染色体基因库重组DNA与tPA cDNA探针点杂交时,第5组份DNA显示强杂交感光点(图版I-A)。说明该组份DNA中所含PA基因或基因片段比其它组份丰富,因此优选第5组份DNA转化大肠杆菌HB101,转化率为 1×10^6 转化子/ μg DNA。用tPA cDNA探针与这些转化菌落进行原位杂交,约 5×10^5 个转化菌落中得到19个阳性菌落(图版I-B),再次筛选,至少有10个菌落再次显示强感光点。

(二) 人tPA基因的鉴定

阳性菌落t₁—t₆ DNA用EcoR I酶切后,经凝胶电泳和Southern转移与tPA cDNA探针杂

交均出现2.8kb杂交带,若用Bgl I水解,6个样品均出现7.2kb杂交带(图版I-c)。阳性菌落t₁—t₄用Pst I酶解,4个样品均出现4.2kb杂交带。这些结果与Ny等报道的数据几乎相同,而阴性对照及单纯载体不出现这些杂交带,表明我们所分离到的阳性克隆中,cosmid载体内插入了含tPA基因的DNA片段。

阳性菌落t₃用EcoR I、BamH I、Pst I和Hind III 4种内切酶水解,经凝胶电泳和Southern转移后与tPA cDNA探针杂交,阳性杂交带长度分别为2.8、11.5、4.2和14.6kb(图版I-D)。EcoR I、Pst I杂交带大小与前面的结果相同,而BamH I和Hind III杂交带大小与Ny等报道一致,证明了t₃克隆中含有tPA基因,t₃克隆的重组cosmid的结构及其限制性内切酶位点如图(图1)。

(三) 人tPA基因在CHO-dhfr⁻细胞中的表达

t₃重组cosmid DNA与pSV2-dhfr质粒共转化CHO-dhfr⁻DG44细胞,在选择培养基中生长12—14天后,出现1—2mm直径转化细胞克隆,转化效率为 1×10^{-5} 转化细胞数/受体细胞数。挑取单个克隆细胞,分别进行扩增,并测定培养液中tPA活性。

转化细胞克隆中约有半数克隆细胞的培养中能检测到显著的tPA活性。把其中一个克隆细胞定名为克隆SW-1,扩增后培养中能检测到tPA活性,经适当诱导后,培养液中tPA活性为30—50 IU/ml,比诱导前提高10—20倍。

pHC79 2cos/TK DNA(重组cosmid的载体)与pSV2-dhfr质粒共转化CHO-dhfr⁻DG44细胞,在阳性克隆细胞的培养液中,检测不到显著的tPA活性(图版I-E)。这说明我们所分离到的t₃重组cosmid DNA中含有完整的人tPA基因以及基因表达所需的其它重要顺序,如启动子,修剪、加工顺序和poly A加尾信号等。

讨 论

tPA基因以单拷贝存在于人染色体中^[10],要从信息量浩大的人染色体基因库中分离tPA基因犹如大海捞针。我们将基因库DNA分成几个组份与tPA cDNA探针进行点杂交。其中第5组份DNA显示强阳性,说明第5组份DNA中含有较丰富的tPA基因或基因片段。因此,我们优选第5组份DNA移化HB101细菌,从这些转化的细

胞中,我们分离到含tPA基因的克隆。这个优选法显著地减少了筛选工作的盲目性和工作量。

6个阳性菌落DNA用EcoR I、Bgl II和Pst I水解,经凝胶电泳和Southern转移与tPA cDNA探针杂交,每个克隆的DNA分别得到2.8 kb、7.2 kb和4.2 kb的杂交带,其长度与Ny等报道一致,表明我们所分离到的阳性克隆中,其重组cosmid载体内插入了含tPA基因的DNA片段,阳性菌落t₃用限制性酶EcoR I、Pst I、Hind III和BamHI水解,EcoR I、Pst I杂交带大小得到重复性结果,而BamHI和Hind III水解后杂交带长度与Ny报道一致。不同的6个阳性菌落的DNA样品,用同一内切酶消化,作核酸分子杂交得到同一大小的杂交片段,表明这些阳性菌落的DNA中,插入的外源DNA里都含有tPA基因或tPA基因片段,因为tPA基因中限制性内切酶位点是一定的。阳性克隆中cosmid质粒所组装的重组片段的总长度不可能是完全相同的,因为在插入片段中,除了tPA基因外,在两端还可能带有人染色体DNA其它顺序,而这些顺序的长短,很难完全一致。ccosmid质粒组装外源DNA的最大容量是45 kb,我们所分离到的t₃阳性克隆中,外源DNA约38 kb。

我们正在用MTX等扩增转化细胞中整合基因的拷贝数,以便进一步提高表达水平。

参 考 文 献

- [1] Weimar, W. et al.: *Lancet*, 2:1018, 1981.
- [2] Birnboim, H. C.: *Nucl. Acid. Res.*, 7:1513, 1979.
- [3] 顾银良: 生命的化学, 8:21, 1988.
- [4] Ny, T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 8:5355, 1984.
- [5] Kafator, F. C. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, 7:1541, 1979.
- [6] Mandel, M. et al.: *J. Mol. Biol.*, 53:159, 1970.
- [7] Grosveld, F. et al.: *Gene*, 13:227, 1981.
- [8] Wigler, M. et al.: *Cell*, 14:725, 1979.
- [9] 王结义等: 上海医科大学学报, 14:179, 1987.
- [10] Sandra, J. et al.: *J. Mol. Chem.*, 261:2972, 1986.

