

人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子在大肠杆菌中的克隆与表达

王嘉玺 邹民吉 黄碧莲 张明伟 毛宁

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

摘要 利用基因重组技术构建人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 的高效表达菌株 *E. coli* HB101/pZW, GM47, 经酶切电泳、DNA 测序、SDS-PAGE、Western 印迹及生物活性测定等分析鉴定, 证明能特异性表达有生物活性的 14kDaGM-CSF, 表达水平达 40% 以上, 比活性高达 5×10^3 u/mg, 具有良好的开发应用前景。

关键词 hGM-CSF, 基因重组, 高效表达, Western 印迹

人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (hGM-CSF) 是一种 19kDa 的糖蛋白细胞因子, 为造血祖细胞体外生存、增殖与分化所必需。动物模型及临床试验均证明 hGM-CSF 的多数体外作用亦在体内发生^[1]。hGM-CSF 成熟蛋白由 127 个氨基酸组成, 含有 4 个半胱氨酸残基形成两对二硫键。由于糖基化的效应尚未确定, 且显示宿主细胞类型特异性, 因此宜于用 *E. coli* 体系表达^[2]。

为了制备足量的 hGM-CSF 供临床前与临床研究, 我们将编码成熟 hGM-CFS 的 cDNA 组入温敏型高效表达载体 pBV220, 转化 *E. coli* HB101 感受态细胞, 获得高效表达重组 hGM-CSF 的菌株。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

含有 hGM-CFS 全长编码序列 cDNA 的克隆系本室利用 RT-PCR 方法从周血单个核细胞总 mRNA 分离构建。受 P₈P₁ 串联启动子控制的温度可调型高效表达载体 pBV220 质粒菌株系中国预防医学科学院侯云德教授惠赠。*E. coli* HB101 为本室保存菌种。

1.2 工具酶与试剂

限制酶 EcoRI、BamHI、T4 DNA 连接酶为 NEB 公司产品。Taq DNA 多聚酶购自华美公司。DNA 序列测定试剂盒为 USB 公司产品。抗 hGM-CSF 单克隆抗体 G133 由本所沈倍富教授提供。APAAP 酶联检测系统为本院生物制剂发展中心研制。其余化学试剂均为分析纯。

1.3 寡核苷酸引物的设计、合成及 PCR 扩增目的基因片段

依据 hGM-CFS 成熟蛋白编码区设计上游引物 P47, 在第一个氨基酸的 5' 侧导入起始密码子 ATG 和一个 EcoRI 切点。下游引物 P33 导入大肠杆菌偏性终止密码子 TAA 代替天然终止密码子 TGA 以及一个 BamHI 位点。按设计的序列利用亚磷酸三酯法, 在 Cyclone Plus DNA 自动合成仪合成引物^[9], 以 P47、P33 为引物, 本室分离构建的 hGM-CSF 克隆 pJY. GM 为模板, 按厂家推荐的程序 PCR 扩增约 400bp 的 hGM-CSF cDNA 片段。

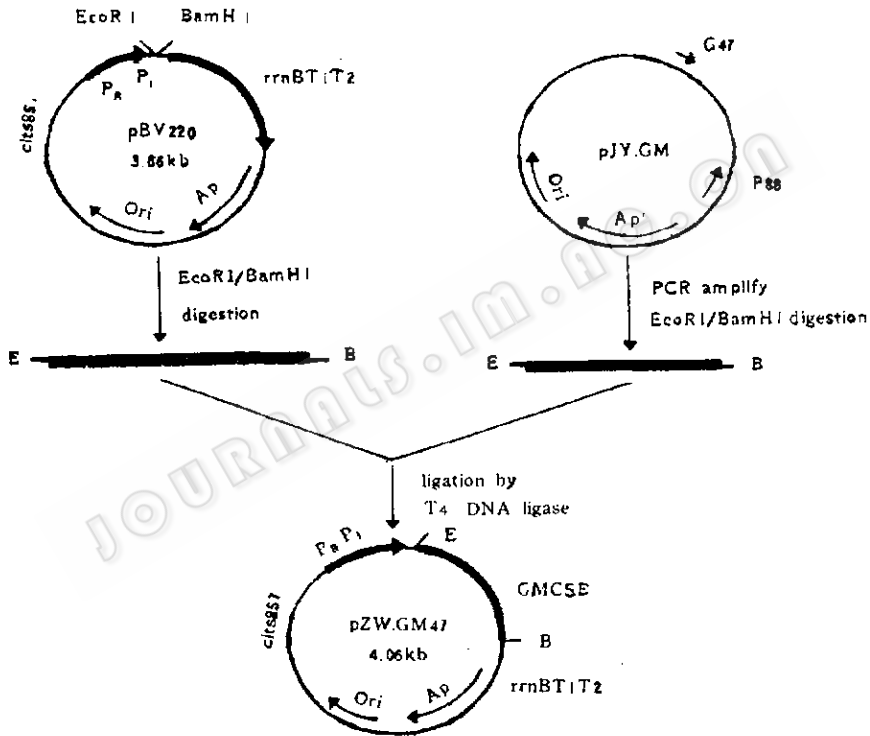


图 1 重组质粒 pZW.GM47 的构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pZW.GM47

1.4 重组 hGM-CSF 表达载体的构建

构建方案见图 1。PCR 方法扩增的 hGM-CSF cDNA 片段及纯化的 pBV220 质粒 DNA 均用 EcoRI/BamHI 双酶切, 尔后用 LMT 琼脂糖凝胶电泳分别分离纯化所需 DNA 片段, 二者等克分子比混合并用 T4 DNA 连接酶连接过夜, 取 100-200ng 的连接物转化 *E. coli* HB101 感受态细胞。用 EcoRI/BamHI 双酶切从重组质粒 DNA 中切下并回收约 400bp 的插入片段, 定向插入 M13mp18 载体的相应位点之中, 筛选阳性重组子, 提取单链, 利用 Sanger 双脱氧终止法测定 DNA 序列。以上操作均参照“分子克隆实验手册”第

二版进行⁽⁴⁾。

1.5 表达产物的鉴定

重组克隆过夜培养物 1:50 接种于 M9CA 培养基内, 30℃ 振荡培养至 OD 值为 0.4—0.6, 立即转移至 42℃ 水浴摇床诱导培养 4 小时。离心收菌, 超声破碎, SDS-PAGE (15%) 电泳, 考马斯亮蓝 R250 染色薄层扫描测定表达产物占菌体总蛋白的百分比。复份未染色的 SDS-PAGE 分离的表达产物在 ABI 电转移装置 (0.65mA/cm, 1 小时 15 分钟) 中半干法转印至硝酸纤维素膜 NCF 上, 再按下述流程进行 Western 印迹免疫检测: 转印的 NCF, 于含 20% BSA 的 10ml PBS 中, 37℃ 作用 1 小时→5ml 含 2% BSA 和抗 hGM-CSF 单抗 G133 (1:500) 的 PBS, 室温保温过夜→PBS 洗 3 次→3.5ml 含 2% BSA 和羊抗鼠 IgG (1:1) 的 PBS, 室温 30 分钟→PBS 洗 3 次→显色底物 (A:B=1:1) 3ml + 坚固红 3mg, 室温 30 分钟→水洗显色, NCF 半干, 观察有无特异染色条带并照相记录。

1.6 表达产物生物活性的测定

200ml M9CA 培养物离心收菌, 悬浮于 10ml 缓冲液 (50mmol/L Na₂HPO₄, pH8.5, 10mmol/L EDTA, 1% Triton X-100) 洗 2 次, 同样离心取沉淀溶于 2mol/L GnHCl, 离心收集上清保留沉淀。沉淀、上清均用 SDS-PAGE (15%) 检测, 上清用 10mmol/L Na₂HPO₄, pH5.0 稀释 2 倍, 4℃ 静置 2 天, 转移至 -20℃ 保存。此即为包含体提取物, 在 96 孔板上以 MTT 法测定其刺激 hGM-CSF 依赖的细胞 TF1 的增殖活性⁽⁵⁾。

2 结果

2.1 PCR 反应扩增基因片段

于 0.5ml 特制 PCR 反应管内装配反应混合物: 灭菌去离子水 59.7μl, 10× 反应缓冲液 10μl, MgCl₂ (2.5mmol/L) 6.0μl, P47 (5.0μmol/L) 10.0μl, P33 (5.0μmol/L) 10.0μl, pJY. GM (1μg/μl) 0.3μl, dNTPs (5mol/L) 4.0μl, 总体积 100.0μl, 95℃ 变性 10 分钟, Taq DNA Polymeras (5u/μl) 0.5μl, 混匀, 在 PE9 600 循环仪中进行 PCR 扩增, 循环数据为:

94℃ 变性 40 秒→56℃ 退火 30 秒→72℃ 延伸 1 分钟。扩增 30 个循环, 最后一个循环 72℃ 延长 7 分钟, 反应终止后, 取 5μl 反应混合物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 可见一大约 400bp 的特异性扩增带, 未见非特异性扩增 (图版 I-A), 其余 95μl 扩增产物加 5μl 蛋白酶 K (20μg/μl) 50℃ 消化 1 小时, 尔后常规酚萃取纯化扩增片段⁽⁶⁾。

2.2 重组表达载体的构建

构建过程见方法部分, 连接物转化 *E. coli* HB101 感受态细胞得到数百个 Ap 转化菌落, 随机选取 48 个菌落, 碱变性法快速抽提质粒 DNA, 电泳检测发现 6 个大于载体 pBV220 的重组质粒。进一步用 EcoRI/BamHI 双酶切, 结果 pBV220 产生一条 3.6kb 的带, 6 个重组质粒均产生两条带: 一条 3.6kb 的载体, 一条 400bp 的插入片段 (图版 I-B)。电泳结果表明这 6 个重组子完全一致。制备足量 400bp 插入片段, 组入测序载体 M13mpl8 的 EcoRI 与 BamHI 位点之间, 筛选阳性重组子提取单链, 利用 Sanger 双脱氧终止法测定 DNA 序列。结果测出 3' 侧 222 个碱基:

5' GAGGATCCTTAT TCCTGGACTG GCTCCAGCA

GTCAAAGGGG ATGACCAGCA GAAAGTCCTT
 CAGGTTCTCT TTGAAACTTT CAAAGGTGAT
 AATCTGGGTT GCACAGGAAG TTTCCGGGGT
 TGGAGGGCAG TGCTGCTTGT AGTGGCTGGC
 CATCATGGTC AAGGGGCCCT TGAGCTTGGT
 GAGGCTGCCC CGCAGGCCCT GCTTGTACAG
 CTCCAGGCGG 3' (见图版 I-F)

从中可看出下游引物 P33 的序列与设计完全一致,天然终止密码子 TGA 已变成大肠杆菌偏性密码子 TAA, 还有导入的 BamHI 位点。终止密码子前 211 个碱基, 除终止密码子前第 37 位由 T 变为 C 外, 与文献报道完全一致^[7], 由此证明我们构建的克隆确为 rhGM-CSF 克隆, 定名为 pZW. GM47。

2.3 Western 印迹鉴定表达产物

利用鼠抗 hGM-CSF 单克隆抗体 G133, 羊抗鼠 IgG 二抗, 牛碱性磷酸酶复合物系统 (APAAP), 检测 SDS-PAGE 分离并转印至 NCF 上的 *E. coli* HB101/pZW. M47, 以及阴性对照 *E. coli* HB101/pBV220 的表达产物。结果阴性对照泳道未见特异性染色蛋白带, 即未表达 hGM-CSF, 而 *E. coli* HB101/pZW. GM47 泳道则显示一条分子量为 14kDa 的特异性染色蛋白带, 由此证明 *E. coli* HB101/pZW. GM47 表达产物为能与鼠抗 hGM-CSF 单抗 G133 特异性结合的 rhGM-CSF。

2.4 SDS-PAGE 检测表达水平

E. coli HB101/pZW. GM47 菌超声裂解物在 SDS-PAGE (浓缩胶 4%, 分离胶 15%) 分离, 考马斯亮蓝 R250 染色后, 在分子量 14kDa 处见一很强的新增蛋白带 (图版 I-D), 经薄层扫描测定此带占菌体总蛋白的 49% (图版 I-E)。经 TritonX-100 及 GnHCl 洗涤溶解提取包涵体之后, 表达产物纯度分别提高到 75% 和 82% (图版 I-C)。

2.5 表达产物生物活性的测定

结果见图 2, 从图上可看出, 包涵体提取物 (5mol/L GnHCl 溶解, 离心取上清) 不同稀释度均显较强反应而呈深染, 沉淀部分着色较淡表明含残留的 rhGM-CSF, 计算结果表达产物包涵体提取 hGM-CSF 比活为 5×10^7 u/mg。

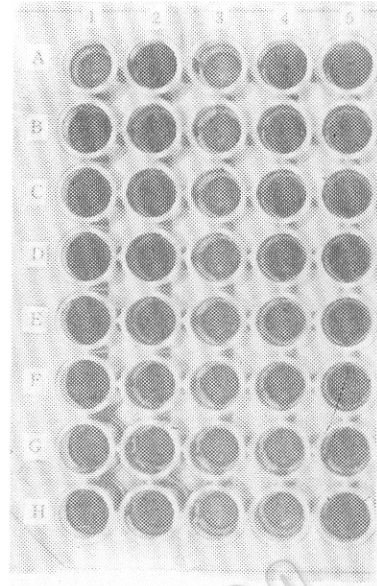
3 讨 论

本研究构建的 rhGM-CSF 表达菌株 *E. coli* HB101/pZW. GM47 能特异性表达有生物活性的 rhGM-CSF, 表达水平高达 49%, 比活性达 5×10^7 u/mg, 均高于文献报道的水平 (8-10%)^[8]。我们之所以能实现 hGM-CSF 在 *E. coli* 中的高效表达, 是由于: (1) 天然 hGM-CSF 基因 5' 侧含有较多的 GC 碱基对, 易形成二级结构影响表达; (2) 通过上游引物的设计, 使 SD 与 ATG 起始密码子之间保持最适距离, 且不形成二级结构; (3) 通过下游引物的设计用大肠杆菌偏性终止密码子 TAA 代替天然的 TGA 终止密码子, 促进翻译的有效终止, 提高表达水平; (4) 本文所用温控型 $P_{\text{R}}P_{\text{L}}$ 串联启动子控制的 pBV220 载体是一高效表达载体。

图2 表达产物 rhGM-CSF 对 TF1 细胞增殖的影响 (MTT 法测定)

Fig. 2 Effect of expressed rhGM-CSF on TF1 cell proliferation determined by MTT method

1A: TF1 cell control; 1B-1H, 2A-2H: Serial dilutions of hGM-CSF standard; 3A-3H: Serial dilutions of *E. coli* HB101/pBV220 product; 4A-4H: Serial dilutions of precipitate of GnHCl-solubilized *E. coli* HB101/pZW. GM47 I. B; 5A-5H: Serial dilutions of supernatant of GnHCl-solubilized *E. coli* HB101/pZW. GM47



参 考 文 献

- [1] Gasson J C. *Blood*, 1991, 77 (6): 1131-1145.
- [2] Greenberg R *et al.* *Curr Microbiol* 1988, 178: 321-332.
- [3] 邹民吉等. *生物化学与生物物理进展* 1992, 19 (4): 319-321.
- [4] Sambrook, J Fritsch, E F Maniatis, T: *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, CSH. N. Y 1989 1. 53, 1.76, 1.86, 13.3-13.6.
- [5] *Idem*, *ibid* to [2].
- [6] 赵春文等. *中国科学 (B辑)*, 1993, 23 (9): 940-942.
- [7] Lee F *et al.* *Proc. Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 4360-4364.
- [8] Burgess AW *et al.* *Blood*, 1987, 69 (1): 43-51.

Molecular Cloning and Expression of Human Granulocyte-macrophage Colony stimulating factor in *Escherichia coli* System

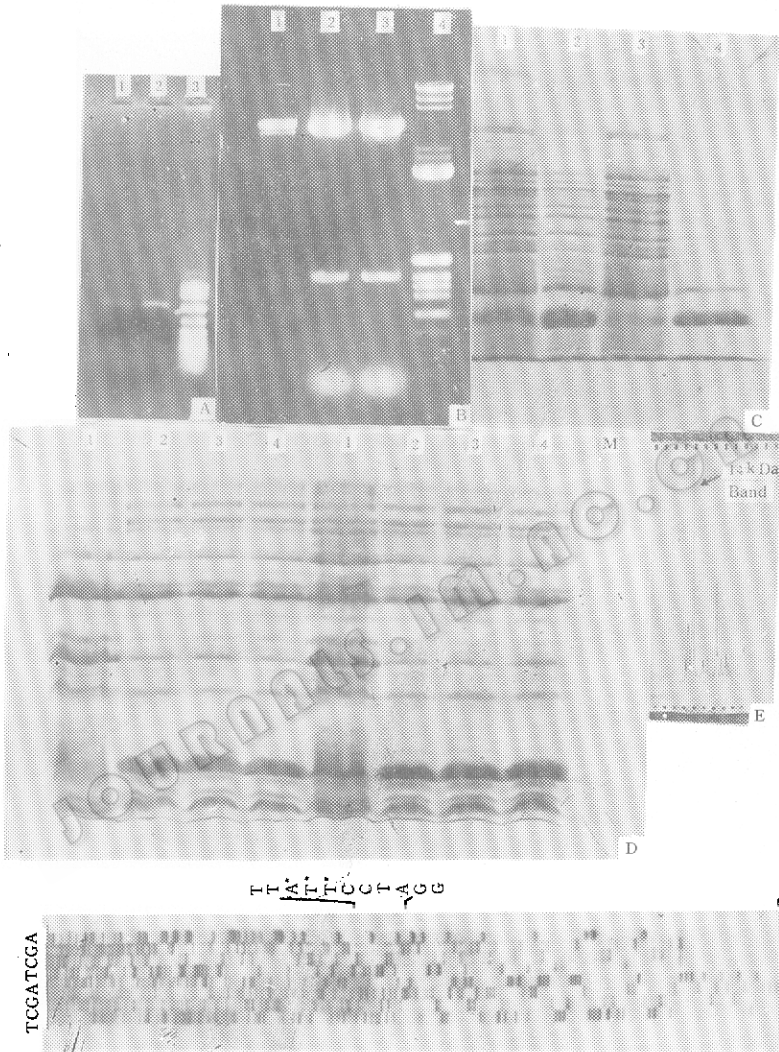
Wang Jiayi Zou Minji Huang Bilian Zhang Mingwei Mao Ning

(*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*)

Abstract Human granulocyte-macrophage stimulating factor (hGM-CSF) is an important hematopoietic growth factor. hGM-CSF is able to stimulate hematopoietic progenitors to produce granulocytes, macrophages and eosinophils. hGM-CSF also shows the potential to treat myeloid leukemias. In order to prepare enough amount of hGM-CSF, a genetically engineered strain *E. coli* HB101/pZW. GM47 was constructed by DNA recombination technologies, and characterized by restriction analysis, DNA sequencing, SDS-PAGE, Western blotting and bioassays. The strain has been shown to produce a

14kDa mature hGM-CSF protein with expression level higher than 40% and a specific activity of 5.0×10^7 u/mg. It shows a good potential of clinical applications.

Key words hGM-CSF, gene recombination, high expression



A. Amplification of a designed cDNA fragment encoding mature hGM-CSF by polymerase chain reaction. 1, 2; the amplified band; 3; DNA MW standard, pBR322-MspI fragments
 B. Restriction analysis of pZW.GM47
 1. pBV220 cut by EcoRI/BamHI; 2, 3. pZW.GM47 cut by EcoRI/BamHI; 4. DNA MW standard, pBR322-HinfI plus λ Hind III fragments
 C. Treatment of rhGM-CSF inclusion bodies (I. B) with Triton X-100 and GnHCl
 1. Supernatant of Triton X-100-treated I. B; 2. Precipitate of Triton X-100 treated I. B; 3. Precipitate of GnHCl-solubilized I. B; 4. Supernatant of GnHCl-solubilized I. B.
 D. Analysis of expressed protein by SDS-PAGE
 1. *E. coli* HB101/pBV220; 2-4 *E. coli* HB101/pZW.GM47; M. Protein MW standard.
 E. Densitometry graph.
 F. DNA sequencing of pZW.GM47 minus strand