

人白细胞介素-3 基因在酿酒酵母中的分泌表达

杨立宏* 韩丽英* 陈常庆** 高长寿 苏成芝*

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

(第四军医大学生物化学教研室 西安 710032)*

摘要 利用 PCR 突变方法,改造了人白细胞介素-3 (hIL-3) cDNA,在成熟蛋白编码顺序 5'端前突入 Xba I 酶切位点和酵母类胰蛋白酶加工位点 Lys-Arg 的密码子。改造后的 hIL-3 cDNA 插入大肠杆菌-酵母穿梭质粒 pVT102u/ α ,使其准确融合于 α -交配因子前导序列之后,并置于启动子 ADH1 调控之下。转入酿酒酵母宿主菌 S-78 筛选后,30℃培养 48h,上清能明显促进 hIL-3 依赖细胞 TF-1 生长。上清中分泌表达的 hIL-3 经 ELISA 鉴定并定量,其表达量大于 1.0mg/L。³H-TdR 掺入法测定上清中 hIL-3 活性为 1.8×10^3 u/ml。

关键词 人白细胞介素-3 基因, PCR, 酵母中分泌表达, α -交配因子, 乙醇脱氢酶启动子

人白细胞介素-3 (Human interleukin 3, hIL-3) 又称多功能集落刺激因子 (Multi-CSF), 是一种造血前体细胞早期分化的关键调节因子, 能促进髓系、红系和巨核系等祖细胞的分化和增殖⁽¹⁾。hIL-3 成熟蛋白由 133 个氨基酸组成, 含有由两个半胱氨酸残基形成的一对二硫键, 有两个糖基化位点, 但有无糖基化对生物活性无影响⁽²⁾。hIL-3 结构与功能关系的研究显示, 其分子内含有四个 α -螺旋结构, 位于第一 α -螺旋后的 Pro³³、Leu³⁴ 氨基酸残基和位于第四 α -螺旋中的 Lys¹¹⁰、Leu¹¹¹ 氨基酸残基与其生物功能密切相关^(3,4)。hIL-3 的生物活性是通过与靶细胞膜上受体作用, 信号传递等过程来完成的。进一步研究 hIL-3 结构与功能的关系是阐明其生物活性机制的关键。我们曾报道在大肠杆菌中高效表达了 hIL-3⁽⁵⁾, 但其表达产物为 hIL-3 包含体, 难以进行结构与功能关系的研究。本文则采用 PCR 方法改造 hIL-3 cDNA, 利用酵母细胞 α -交配因子信号肽在酿酒酵母中分泌表达 hIL-3, 获得了天然结构的 hIL-3, 为研究其结构与功能的关系创造了条件。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

E. coli JM 109 (recA1 SupE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi Δ [lac-proAB]); 酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* S-78; 质粒 pUCIL3-01⁽⁵⁾; 含 hIL-3 成熟蛋白 cDNA、ATG 起始码及 TGA 终止码; pUCBM20: 为 pUC18 衍生质粒, 其多克隆酶切位点不同; pVT102u/ α ⁽⁶⁾: 为酵母-大肠杆菌穿梭质粒, 含有 ADH₁ 启动子和转录终止子、酵母 α -交配因子前导肽 (MF- α L)、Ura3 筛选标志、氨基青霉素抗性。

1.2 酶、化学试剂、同位素化合物

** 通讯联系人。

本文于 1994 年 5 月 26 日收到。

限制酶、T4 DNA 连接酶、Klenow 酶购自德国 Boehringer 公司、华美生物工程公司；Taq DNA 聚合酶、hIL-3 标准纯品、hIL-3 单抗 ELISA 试剂盒、 $(\alpha\text{-}^{32}\text{P})\text{-dATP}$, $(\alpha\text{-}^{35}\text{S})\text{-dATP}$ 购自英国 Amersham 公司； $^3\text{H-TdR}$ ，中国科学院上海原子能研究所产品；DNA 序列试剂盒为美国 USB 公司产品；5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D 半乳糖苷 (X-gal)、异丙基- β -D-硫代乳糖苷 (IPTG) 购自美国 Sigma 公司。

1.3 培养基

大肠杆菌用 LB 培养基；酵母细胞的转化、培养用 YPD 培养基 (1% 酵母浸出液、2% 蛋白胨及 2% 葡萄糖) 和 SC 培养基 (YNB 培养基和 2% 葡萄糖和所需氨基酸)。

1.4 质粒 DNA 的制备、大肠杆菌转化、PCR 方法、SDS-PAGE 电泳、Western-blot 参照“分子克隆手册”^[7]进行。

1.5 酵母细胞的转化

参照 Ito 等^[8]的醋酸锂方法进行。

1.6 寡核苷酸引物的设计、合成及 PCR 方法

寡核苷酸引物采用固相亚磷酸法，在 ABI 381A 型 DNA 合成仪 (美国 Applied Biosystems 公司) 上合成。合成产物经 PAGE 电泳纯化。文献 [5] 设计合成了用于在 hIL-3 N 端编码顺序前突变入 Xba I 酶切位点和类胰蛋白酶酶切位点 Lys-Arg 密码子的 PCR 引物 IL-3-3，以及与其配对进行 PCR 反应的 3' 端引物 IL-3-2，引物序列见表 1。

表 1 寡核苷酸引物的序列

Table 1 The sequence of oligonucleotides

Name	Sequence (5' → 3')
	Xba I
IL-3-3	GGTCTAGATAAAAAGAGCTCCCATGACCCAG
	BamH I
IL-3-2	CGGATCCAGCTGGACTGGTTAC

1.7 DNA 序列测定

突变后 hIL-3 cDNA 克隆入 pUCBM20 质粒，经低熔点琼脂糖回收后以质粒双链为模板，按 Sanger 的末端终止法，用序列测定试剂盒推荐的条件下，测定突变后 hIL-3 cDNA 核苷酸序列。

1.8 hIL-3 在酵母细胞的分泌表达及 ELISA 检测

在合成培养基中筛选 Ura^r 菌落，接种于 YPD 或 SC 培养液中，30℃ 培养过夜，按 1:100 转接种于 5ml 上述培养液中，30℃ 培养 48h。培养液离心去菌体后的上清冷冻干燥浓缩体积 1/10 倍，用包被液连续稀释后包被于 96 孔板中，同时设阴性、阳性对照，按 hIL-3 ELISA 测定试剂盒条件进行检测。

1.9 生物学活性的检测

离心去菌体后的上清用 0.22 μm 滤膜除菌，用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法在依赖 hIL-3 的 TF-1 细胞上测定^[9]。TF-1 细胞培养于 RPMI1640 培养基，含 10% 胎牛血清、5 $\mu\text{g/ml}$ 转铁蛋白、10 $\mu\text{g/ml}$ 胰岛素和 5ng/ml hIL-3，每 2~3 d 传代一次。测活前用 1640 培养液洗涤细

胞,然后按每孔 1×10^4 细胞转接到 96 孔培养板中,待测样品连续稀释后加入孔中,在 CO_2 培养箱中 37°C 培养 48h 后,每孔加 $0.5\mu\text{Ci } ^3\text{H-TdR}$,继续培养 8h,将细胞抽滤在玻璃纤维滤纸上,红外线干燥,放入闪烁瓶中,加入 0.5ml 闪烁液后在液闪计数仪上测定 cpm 值。以最大 cpm 值一半时的 hIL-3 稀释度作为 1 单位。

2 结果

2.1 hIL-3 基因 5' 端的改造

以 pUCIL-3-01 质粒 DNA 为模板,用突变引物 IL-3-3 和配对引物 IL-3-2 进行 PCR 反应,产物经 2% 琼脂糖电泳鉴定后,用低熔点琼脂糖回收。产物 DNA 片段经 Xba I / BamH I 位点酶切后构建入 pUCBM20 相应酶切位点,成为 pUCIL-03 质粒,进行 DNA 序列分析。结果表明 hIL-3 基因 5' 端突变了 Xba I 识别位点及类胰蛋白酶加工识别顺序 Lys-Arg 的密码子,同时消除了原位于 5' 端的 Nco I 位点和 ATG 起始码,使表达的分泌蛋白 N 端为 hIL-3 天然 N 端氨基酸 Ala,且读框及全序列正确。序列见图 1。

2.2 质粒 pVTHL-31 的构建及在酵母中分泌表达

pUCIL-03 质粒 DNA 经 BamH I 酶切、Klenow 补平/Xba I 酶切的小片段与 pUC19 质粒 DNA 经 Sal I 酶切、Klenow 补平/Xba I 酶切的大片段连接,成为 pUCIL-03 H/X 质粒,其 Hind III /Xba I 位点间含改造后的编码序列,如图 2 流程构建 pVTHL-31 酵母分泌表达质粒,使 hIL-3 cDNA 融合于 α -交配因子前导肽。转入大肠杆菌 JM109,提取质粒酶切鉴定后命名为 pVTHL-3。

将 pVTHL-31 质粒 DNA 转化酵母菌 S-78,挑一转化后在合成培养基 (SC 培养基) 上长出的单菌落接种于 YPD 或 SC 培养液中, 30°C 培养 48h 后离心去菌体后的上清,经 60% 丙酮沉淀后溶于 50mmol/L Tris pH8.0 中,透析后冷冻干燥缩小体积,进行 SDS-PAGE 和 Western-blot,结果见图 3。

2.3 酵母分泌表达产物的定量及活性测定

对标准品 hIL-3 进行梯度稀释,于包被有 hIL-3 单克隆抗体的 96 孔板上进行 ELISA 反应,450nm 波长测定 OD 值,做标准曲线。S-78/pVTHL-31 于合成培养基 30°C 、48h 培养后,1000g 离心 10min,上清冷冻干燥使之体积缩小至 1/10,在相同的 hIL-3 单克隆

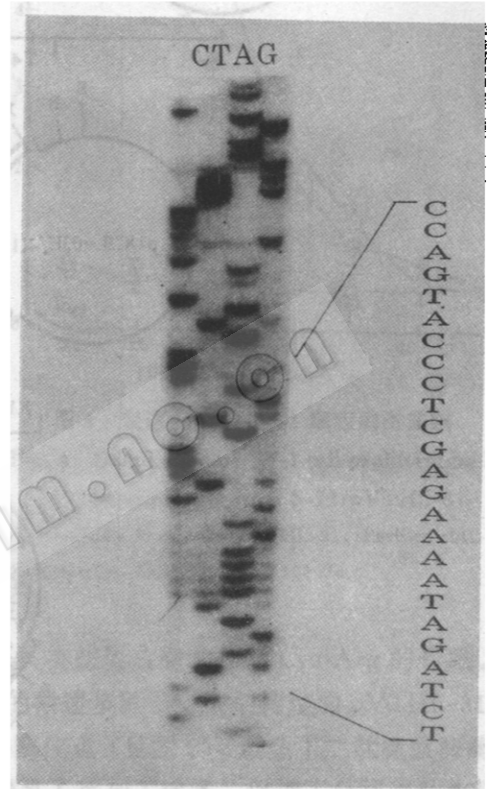


图 1 PCR 改造后的 hIL-3 基因 5' 端序列
Fig. 1 The sequence of 5' end of mutation of hIL-3 gene by PCR

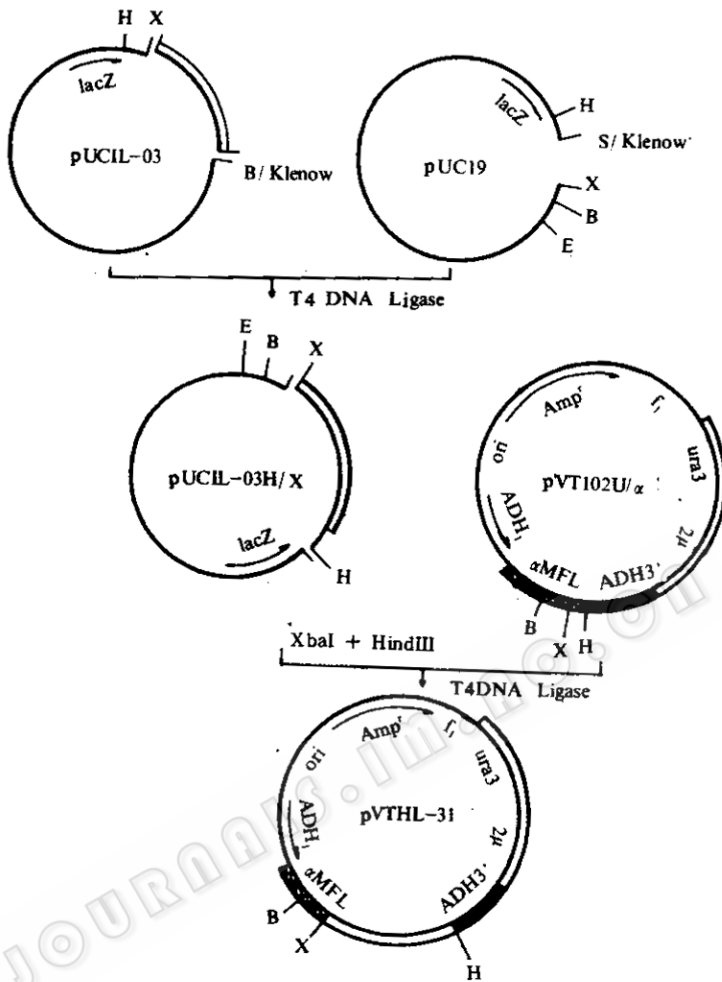


图2 表达质粒 pVTHL-3 构建示意图

Fig. 2 Construction of the expression plasmid pVTHL-3

抗体 96 孔板上包被, 进行 ELISA 反应。样品孔测定 OD 值后于标准曲线上查出 hIL-3 蛋白量。结果表明, 上清中 hIL-3 表达量大于 1mg/L。表达菌上清经无菌处理后在 TF-1 细胞上进行活性测定, 其活性为 1.8×10^3 u/ml (见图 4)。

3 讨论

酵母细胞被广泛应用于真核表达, 与大肠杆菌比较具有产物分泌、加工 (前体蛋白的剪接、糖基化、蛋白质的折叠及二硫键的形成等方面) 的优越性。分泌表达由于具有以下优点常被选用: (1) 避免了细胞内产物的堆积, 利于细胞正常生长, 同时防止产物在细胞内的降解; (2) 细胞内质网膜上的蛋白质二硫键异构酶可催化分泌产物二硫键的形成; (3) 产物分泌前可被正确剪切, 形成天然蛋白质。

在酵母细胞中分泌表达外源基因受到转录、翻译和翻译后加工三个水平的调控^[10]。转录水平主要受启动子的强弱和质粒拷贝数多少的影响, 翻译水平主要受 5' 端上游翻译

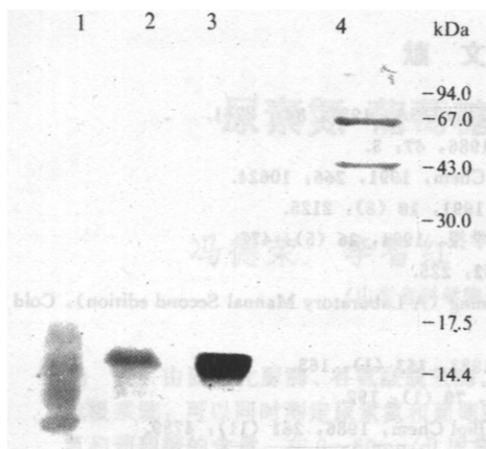


图 3 S-78/pVTHL-31 表达上清的 SDS-PAGE 电泳和 Western-blot

Fig. 3 SDS-PAGE and Western-blot of supernatants from S-78/pVTHL-31
1. S-78/pVT102/α, 2. S-78/pVTHL-31, 3. Western-blot, 4. Molecular weight

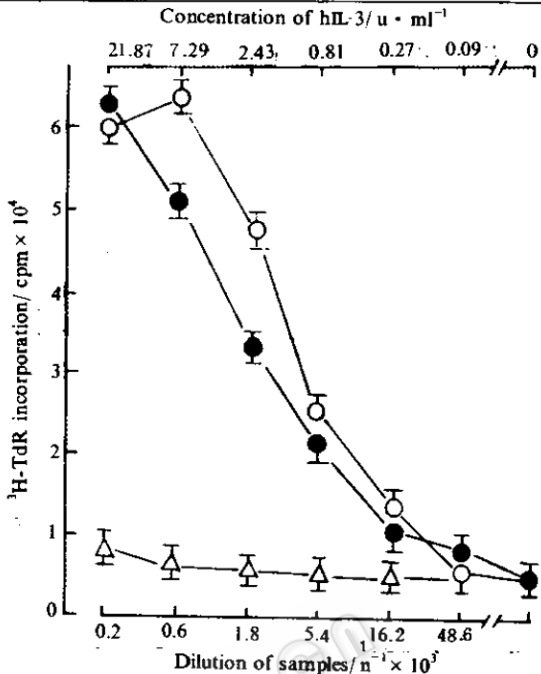


图 4 表达上清对 TF-1 细胞刺激曲线

Fig. 4 Stimulation of TF-1 cell proliferation by supernatants from S-78/pVTHL-31
Supernatants from S-78/pVTHL-31, Purified rhIL-3
Supernatants from S-78/pVT102/α

起始区的影响。我们采用的 pVT102u/α 表达质粒含有 ADH₁ 强启动子和翻译起始区，使下游基因受到转录和翻译两个水平的促进。已知天然 α-交配因子前导肽与成熟 MF-α 之间有 6~8 个氨基酸残基的间隔区，受到二种

酶的剪切，其中二肽氨肽酶位点为 Glu/Asp-Ala、类胰蛋白酶位点为 Lys-Arg 的 C 端。二肽氨肽酶由于酶切效率较低，是分泌蛋白加工的限速步骤^[11]。我们构建的 pVTHL-31 中 hIL-3 融合于 MF-αL 之后，中间仅有类胰蛋白酶位点（见图 5），避免了二肽氨肽酶酶切加工对分泌的限速及产物 N 端加工不完全，提高了后加工效率，促进了分泌表达水平。

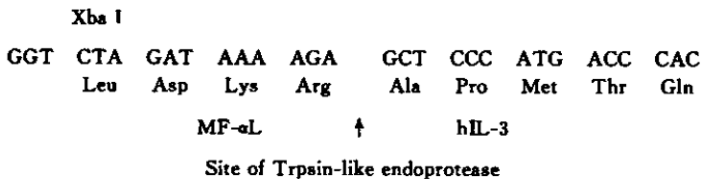


图 5 α-交配因子前导肽与 hIL-3 融合区示意图

Fig. 5 The fusion region of MF-αL and hIL-3

构建的 pVTHL-31 质粒含有 f₁ 线性噬菌体的复制区，在辅助噬菌体 (Help phage) 的共感染下，pVTHL-31 在大肠杆菌可复制单链 DNA，便于进行定点突变。pVTHL-31 的构建及在酵母中分泌表达天然的 hIL-3，为蛋白质后工程改造 hIL-3、研究其结构与功能的关系创造了条件。

致谢：第四军医大学神经免疫室黄传书博士在活性测定方面给予帮助，特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Lopez A F, To L B, Yang Y C *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84 : 2761.
- [2] Yang Y C, Ciarletta A B, Temple P A *et al.* Cell, 1986, 47: 3.
- [3] Lokker N A, Mowa N R, Strittmater V *et al.* J Biol Chem, 1991, 266, 10624.
- [4] Lokker N A, Ienke G, Strittmater V *et al.* EMBO, 1991, 10 (8): 2125.
- [5] 杨立宏, 陈常庆, 周 斌等. 生物化学与生物物理学学报, 1994, 26 (5): 477.
- [6] Vernet T, Dignard D, Thomas D Y. Gene, 1987, 52, 225.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning (A Laboratory Manual Second edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Ito H, Fukuda Y, Murata K *et al.* J Bacteriology, 1983, 153 (1): 163.
- [9] Lange B, Valtieri M, Semtoli D *et al.* Blood, 1987, 70 (1), 192.
- [10] Valasek G P, Berceer G H, Scarborough R M *et al.* J Biol Chem, 1986, 261 (11), 4789.
- [11] Julius D, Schekmen R, Thorner J. Cell, 1984, 36: 309.

Secretor Expression of Human Interleukin 3 in Yeast

Yang Lihong* Han Liying* Chen Changqing Gao Changshou Su Chengzhi*

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Academia Sinica, Shanghai 200233)

(The Fourth Military Medical University, Department of Biochemistry, Xi'an 710032)*

Abstract Using the PCR technique, mutated human interleukin 3 (hIL-3) gene was obtained, in which the restriction site Xba I and site of trypsin-like endoprotease were made in front of the 5' terminal encoding sequence. This gene was fused to the leader sequence of α -mating factor behind and cloned into pVT10 $2\mu/\alpha$, a shuttle plasmid between yeast and *E. coli*, the fused gene can be transcribed under the control of ADHI promoter in yeast. After transformation of the plasmid containing the hIL-3 gene into *Saccharomyces cerevisiae* S-78 and fermentation at 30°C for 48 hours, it was observed that the culture supernatant was able to obviously stimulate proliferation of the hIL-3 dependent TF-1 cell line. The expressed rhIL-3 in the supernatant was more than 1.0mg/L identified and quantified by ELISA. It was also found that the biological activity of rhIL-3 in this supernatant was about 1.8×10^3 u/ml after being analysed by ^3H -thymidine incorporation method using TF-1 cells.