

红细胞生成素在中国仓鼠卵巢细胞 中稳定表达

卢柏松 徐秀英 陈琳 黄培堂

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100850)

红细胞生成素是调节体内血液生成的一种重要体液因子,对红细胞以及血小板发生都有调节作用,具有非常巨大的临床应用价值^[1]。由于该蛋白在正常体内含量甚微,目前国外已研制出体外高表达红细胞生成素的细胞株^[2],临床应用表明其分泌产物对多种贫血尤其是由肾衰引起的贫血具有十分显著的疗效,而且安全可靠^[3]。国外几年前就有批量生产,但我国至今无自己的重组产品问世。为此,我们进行了红细胞生成素 cDNA 在中国仓鼠卵巢细胞 CHO 中的表达研究,目前已获得中等水平且能稳定表达红细胞生成素的细胞株。本文报道了本研究的部分结果。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和细胞株: *E. coli* RRI 受体菌和 COS-7 细胞株^[4]由本室保存;中国仓鼠卵巢细胞二氢叶酸还原酶缺陷株^[5] (CHO-DHFR⁻)由任贵方教授惠赠。

1.1.2 质粒:含红细胞生成素 cDNA 的原始质粒由本所欧阳应斌博士提供,真核表达载体 pCDS^[6](见图 1)为本室程度胜提供。

1.1.3 工具酶及生化试剂:工具酶分别购自 Boehringer Mannheim 公司和华美生物工程公司;细胞培养基 DMEM 购自 GIBCO 公司;小牛血清为杭州四季青生物制品公司产品;放射性同位素标记物 α -³²P-dATP (>3000Ci/mmol)和甲基-³H-TdR (20Ci/mmol)分别购自福瑞公司和原子能研究所。

1.1.4 EPO-ELISA 试剂盒:德国 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 DNA 常规操作按文献 [7] 进行。

1.2.2 COS-7 细胞和 CHO 细胞的转染:采用电穿孔法^[8]。

COS-7 细胞:0.5%胰酶消化 4×10^6 个对数期细胞悬于 0.8ml PBS 溶液,加 20 μ g pMGL4 质粒 DNA,细胞室温静置 10min 后

在 $U=220V$, $C=1080\mu F$, $t=1s$ 的条件下电击。再于室温静置 10min,转入 5ml 培养基 (DMEM, 含 10%小牛血清, 100IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 2mmol/L 谷氨酰胺) 37 $^{\circ}C$ 培养。

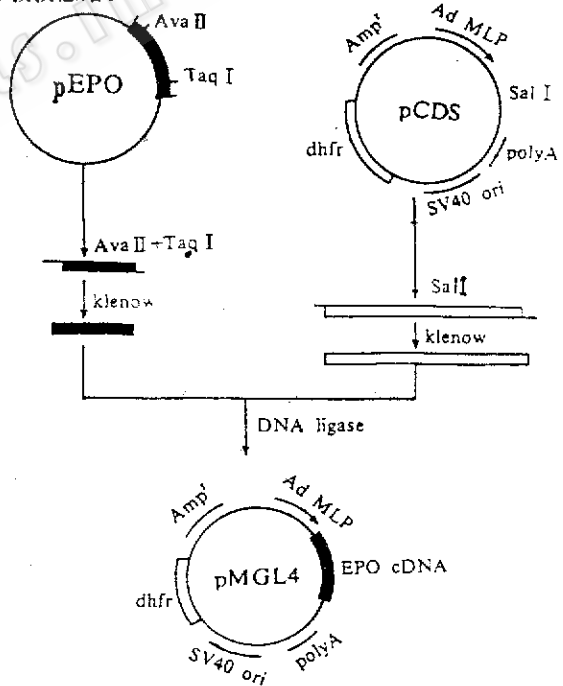


图 1 重组表达质粒 pMGL4 的构建

CHO-DHFR⁻细胞: 胰酶消化 2×10^7 个 CHO 细胞, 悬于 0.8ml PBS 溶液, 加 200 μ g EcoR I 线性化的 pMGL4 和 200 μ g 鲑精 DNA, 室温静置 10min 后用 $U=220V$, $C=760\mu F$, $t=1s$ 的条件电击。细胞室温静置 10min 后转入培养基 (DMEM, 含 10% 小牛血清, 100IU/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素, 0.1mmol/L 甘氨酸和脯氨酸, 0.03mmol/L 次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷) 中 37 $^{\circ}$ C 培养。

1.1.3 产物检测: 抗原性检测: EPO ELISA 试剂盒。生物活性检测: 按文献 [9] 的集落法和文献 [10] 的 3H -TdR 掺入法进行。

2 实验结果

2.1 EPO 真核表达质粒的构建

用 Ava I 和 Taq I 分别切除原始克隆质粒 pEPO 上 EPO cDNA 5' 和 3' 端的非编码部分, Klenow 酶补平后平端插入表达载体 pCDS 的 Sal I 位点 (见图 1)。为了挑选有外源目的片段插入的重组子, 用 ^{32}P 标记的 EPO cDNA 探针进行菌落原位杂交, 对杂交阳性质粒进行酶切鉴定, 酶切产物的电泳图谱 (酶切电泳图见文献 [11]) 表明得到了 EPO cDNA 插入方向正确的重组真核表达质粒 pMGL4。

2.2 重组表达质粒在 COS-7 细胞中表达及其表达产物活性的检测

为检验所构建重组表达质粒 pMGL4 能否在哺乳动物细胞中正确表达以及表达产物是否具有生物活性, 将 pMGL4 用电穿孔法引入 COS-7 细胞后, 从抗原性和生物活性两方面检测转染后 COS-7 细胞的表达产物。表 1 和表 2 分别是 ELISA 和红系祖细胞集落刺激法测定表达产物的抗原性和生物活性结果, 可见重组质粒转染哺乳动物细胞后能表达出有生物活性的产物, 该质粒可以用于构建稳定表达细胞株。

表 1 ELISA 检测 pMGL4 转染 48h 后的 COS-7 细胞上清

Samples	Dilution	A ₄₉₀	cEPO/ng·ml ⁻¹
Standard sample a	1:1	0.46	0.5
Standard sample b	1:1	0.68	1
pCDS transfection	1:50	0.03	0
pMGL4 transfection	1:50	1.46	100

表 2 pMGL4 转染 COS-7 细胞 48h 上清的红系集落刺激活性

Samples	Volume (μ l)	Colonies/plate	Cells/colony
pCDS	20	9.5	4~7
pMGL4	10	29.5	50

2.3 重组表达质粒在 CHO 细胞中表达

采用电穿孔法用 pMGL4 转染 CHO 细胞, 将所得氨甲喋呤 (MTX) 抗性克隆混合培养, 并用浓度逐步提高的 MTX 加压扩增外源目的基因的拷贝数。在不同时期 ELISA 检测 28cm² 玻璃细胞瓶中混合细胞 24h 上清的红细胞生成素浓度。随着 MTX 浓度的升高, 细胞表达水平随之提高。在 MTX 浓度为 2×10^{-7} mol/L 时, 细胞平均表达水平为每 24h $2 \sim 3 \mu$ g/ 10^6 cells。用 3H -TdR 掺入法检测了混合细胞上清的生物活性, 结果表明 CHO 细胞分泌的 EPO 也具有生物活性^[11]。

2.4 细胞的冻存稳定性及均一性

在 MTX 浓度为 10^{-7} mol/L 时把部分细胞冻存, 3 个月后复苏, 细胞形态恢复后检测同样条件下的表达水平, 结果 24h 上清中 EPO 的浓度为 500ng/ml (培养基 5ml, 细胞数未计), 与表 3 比较可见表达水平无显著下降, 表明该细胞表达水平基本不受冻存的影响。

表 3 不同 MTX 浓度下混合细胞 EPO 的分泌浓度

MTX concentration/mol·L ⁻¹	cEPO/ng·ml ⁻¹	Medium/ml	Cell number/ $\times 10^6$
5×10^{-8}	100	5	2
1×10^{-7}	400	5	1
2×10^{-7}	700~800	5	1.5

由于细胞为多克隆混合的结果, 我们随机挑取 5 个克隆, 在 96 孔板扩增后检测了 EPO 的分泌水平, 结果 5 个克隆都有表达, 且表达水平并不完全一致 (图 2)。这一方面表明尽管细胞为多克隆混合的结果, 经过一段时间的加压选择已经比较均一, 基本上很少有不分泌 EPO 的细胞; 另一方面也表明通过进一步提高 MTX 的浓度和筛选大量克隆有可能挑选到表达水平更高的细胞株。

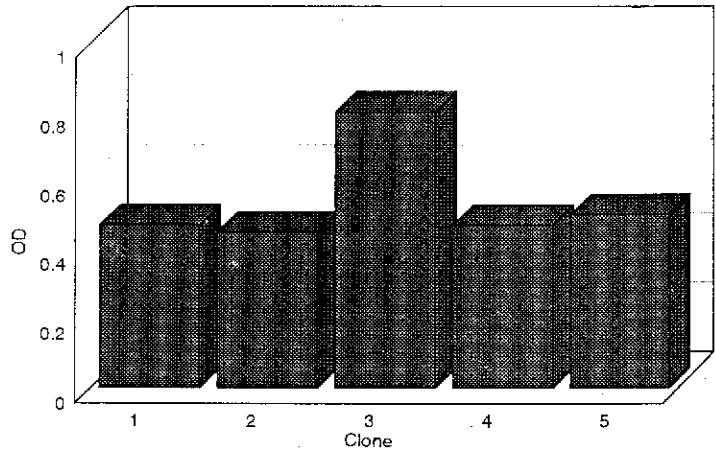


图 2 5 个克隆 24h 上清的 OD₄₃₀ 值

3 讨论

本研究采用红细胞生成素 cDNA 构建重组表达质粒, 避开了分离其基因组 DNA 难度大的问题。体外表达的产物具有与天然 EPO 一样的抗原性和生物活性, 混合细胞在 MTX 浓度为 2×10^{-7} mol/L 时表达水平为 24h $2 \sim 3 \mu\text{g}/10^6$ Cells, 且尚有提高选择压力和纯化细胞以进一步提高表达水平的潜力, 细胞在冻存复苏后表达水平不下降, 这为建立体外高表达红细胞生成素的工程细胞株打下了基础。

本研究筛选克隆不是采取对单个克隆分别培养的方法, 而是先将多克隆混合培养, 最后挑选高表达克隆。这样既节省了劳动力, 又有利于筛选到那些能优先扩增外源目的基因的克隆^[12]。随机挑取的 5 个克隆都有一定的表达, 这表明经得起 MTX 挑战的细胞大都来自那些能表达目的基因的克隆。

目前国外构建红细胞生成素工程细胞株大多用的是 EPO 基因组 DNA, 从文献报道看, 所得到的表达水平明显高于用 EPO cDNA 所达到的水平。现在普遍认为 EPO 基因组 DNA 中可能存在对其表达起增强作用的调控成分^[13], 因而用 EPO 基因组 DNA 可能更容易得到高表达。但由于分离完整 EPO 基因组 DNA 难度和费用都较大, 因而我们选择 cDNA。现有实验结果表明, 通过提高 MTX 的浓度和筛选大量克隆, 得到更高的表达水平是可能的。

参 考 文 献

- [1] Liberato N L, Costa A, Barosi G. *Haematologica*, 1990, **75**: 346~362.
- [2] Brady V C, Tait J F, Powell J S. *Arch Biochem Biophys*, 1988, **265**: 329~336.
- [3] Imad A. *Arch Intern Med*, 1993, **153**: 298~304.
- [4] Gluzman Y. *Cell*, 1981, **23**: 175~182.
- [5] Urlaub G, Chasin L A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 4216~4220.
- [6] 程度胜, 俞炜源, 韩素文等. *生物工程学报*, 1993, **9**: 204~209.
- [7] Sambrook, J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2nd ed), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, p1. 21~1. 84.
- [8] Barsoum J. *DNA and Cell Biol*, 1990, **9**: 293~300.
- [9] Adamson J W, Torok S B, Lin N. *Blood Cells*, 1978, **4**: 89~103.
- [10] Krystal G. *Exp Hematol*, 1983, **11**: 649~654.
- [11] 卢柏松, 黄培堂. *生物化学与生物物理进展*, 1995, **22**: 256~260.
- [12] Kaufman R J, Wasley L C, Spiliotes A J. *Mol Cell Biol*, 1985, **5**: 1750~1759.
- [13] Powell J S, Berkner K I, Lebo R V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 6465~6469.

Stable Expression of Erythropoietin cDNA in Chinese Hamster Ovary Cells

Lu Baisong Xu Xiuying Chen Lin Huang Peitang

(Molecular Genetic Center, Beijing 100850)

Abstract An plasmid for the expression of erythropoietin is constructed by inserting erythropoietin cDNA in cloning site of eucaryotic expression vector. The expression plasmid is introduced into COS-7 cells and biologically active erythropoietin is expressed, which is indicated by ELISA and colony formation assays. The plasmid is then introduced into CHO cells by means of electroporation and the foreign gene is amplified by exposing the cells to gradually higher concentration of methotrexate. The expression level reaches $2\sim 3\mu\text{g}/10^6$ cells/24hrs when MTX concentration is 2×10^{-7} mol/L. The expression level of the cells remain stable after 3 months of cryopreservation. It is possible to obtain higher expression level by further amplification and selection.

Key words Erythropoietin cDNA, CHO cell, electroporation, stable expression