

重组人粒细胞集落刺激因子 cDNA 在哺乳动物细胞中高效表达的研究

陈 坚 曹 韞 旭 陆 德 如

(第二军医大学医学生物技术和分子遗传研究所 上海 200433)

摘 要 利用 PCR 反应、DNA 测序、基因重组等技术, 构建了两个表达人粒细胞集落刺激因子 cDNA 的重组质粒 pED-GCSF 和 pEF-GCSF, 两质粒分别转染 COS7 细胞作瞬时表达, 转染 CHO-dhfr⁻ 细胞作稳定表达。结果两质粒在 COS7 细胞和 CHO 细胞均获得了表达, pED-GCSF 转染 COS7 细胞 48h、72h 的表达量分别为 5.2×10^4 pg/ml 和 2.3×10^5 pg/ml, pEF-GCSF 转染 COS7 细胞后 48h、72h 的表达量分别为 2.8×10^5 pg/ml 和 1.4×10^5 pg/ml。转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 随着加入的氨甲喋呤(MTX)浓度升高, CHO-dhfr⁺ 克隆数减少, 但平均每个克隆的 rhG-CSF 表达量升高, 在 $0.5 \mu\text{mol/L}$ MTX 下最高表达 rhG-CSF 细胞株的量是 $4.46 \mu\text{g/ml/3d}$ 。且表达的 rhG-CSF 注射小鼠腹腔可提高小鼠外周白血球的数量。

关键词 人粒细胞集落刺激因子, 基因重组, 哺乳动物细胞
学科分类号 Q75

造血干细胞在体内不断增殖、分化, 与各种造血刺激因子有关。粒细胞集落刺激因子(G-CSF)是特异作用于粒系祖细胞, 促其向中性粒细胞增殖、分化及维持其功能、存活所必需的一种多肽生长因子^[1]。其来源及产量有限, 而基因工程的重组 G-CSF 的生物活性与天然的相似, 且可大规模生产。因此, 1986 年 Nagata^[2]和 Souza^[3]各自克隆了人 G-CSF cDNA 后, 即分别尝试在哺乳动物细胞和原核细胞进行表达。1993 年瞿成奎等在国内首先克隆了人 G-CFS cDNA^[4], 并在大肠杆菌中获得表达^[5]。虽然, 大肠杆菌表达的 rhG-CSF 也有良好的生物活性, 但大肠杆菌表达的蛋白质不能自动进行糖基化等翻译后修饰; 也不能自动形成高级结构; 与天然蛋白质比较, 常有抗原性的不同或其 N 端和 C 端的生化性质的不同^[6]。而哺乳动物培养细胞表达的 rhG-CSF 带有糖基链, 其高级结构和体内外活性与天然的 G-CSF 更为相似。国内尚无有关哺乳动物培养细胞表达 rhG-CSF 的研究报道。本文对人 G-CSF cDNA 的 5' 端 AUG 侧翼序列进行翻译优化突变, 经测序确证后, 构建成两个含不同启动子的重组高表达质粒。分别转染 COS7 细胞获得瞬时的高表达, 进一步转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 加入并逐渐升高氨甲喋呤(MTX)浓度, 使 rhG-CSF 获得了稳定性高表达。

1 材料与方 法

1.1 质粒与菌株

M13mp18、M13mp19 双链 DNA 由本室保存, 表达质粒 pED 由美国遗传学研究所的

收稿日期: 1996-12-26, 修回日期: 1997-07-23。

Kaufman 教授赠送, pEF - BOS 由日本东京大学的 nagata 教授赠送, 宿主菌为大肠杆菌 JM109 和 HB101。

1.2 细胞株和培养基

表达 SV40 病毒 T 抗原的猴细胞系 COS7 为军事医科院王嘉玺教授赠送, 其培养基为 F12/DMEM 完全培养基, 其中含 10% 小牛血清, 二氢叶酸还原酶缺陷的中国仓鼠卵巢细胞(CHO - dhfr⁻) 由美国哥伦比亚大学 Chasin 教授赠送, 本室保存。其完全培养基是 F12, 含 5% 小牛血清, 次黄嘌呤 10mg/L, 甘氨酸 50mg/L, 胸腺嘧啶 10mg/L, 选择性培养基是 DMEM, 含 5% 小牛血清。

1.3 工具酶和生化试剂

BamH I、Xba I、EcoR I、Hind III、T4DNA 连接酶均购自 Boehringer Mannheim 公司, 其它生化试剂均为国产分析纯。

1.4 用 PCR 法对 G - CSF cDNA 进行翻译优化突变

化学合成的 5' 端引物含翻译优化序列的突变, 并引入 BamH I 切点, 3' 端引物引入 EcoR I 切点, 以含有人 G - CSF cDNA 的原始质粒为模板, 在热循环仪上进行 PCR。

1.5 采用 Sanger 双脱氧终止法测定 PCR 产物的序列^[7]

PCR 产物分次克隆到 M13mp19 和 M13mp18, 以重组 M13 噬菌体单链为模板, 按 USB 公司的测序试剂盒说明书操作。

1.6 构建重组表达质粒 pED - GCSF 和 pEF - GCSF

质粒 DNA 的酶切、片段回收、连接、转化和酶切鉴定, 参照文献^[7]进行。

1.7 转染哺乳动物细胞

按 Pharmacia 公司哺乳动物细胞转染试剂盒操作说明书, 用 DEAE - dextran 法将质粒转染 COS7 细胞; 用磷酸钙共沉淀法将质粒转染 CHO - dhfr⁻ 细胞。

1.8 表达产物的测定

收集转染细胞的培养液上清, 按 Amersham 公司的试剂盒操作说明书, 用 ELISA 法测其表达量和免疫原性; 参照文献^[6, 8, 9]将上清注射入小鼠腹腔, 初步测定表达产物的体内活性。

2 结果与讨论

2.1 表达质粒的构建

根据 Kozak^[10, 11] 研究发现, 在哺乳动物细胞的 mRNA 上, 翻译起始区 AUG 侧翼的最佳一致序列是 CCA(G)CCAUGG, 其翻译起始效率比非最佳序列高 2~20 倍^[11]。因此, 为使人 G - CSF cDNA 在哺乳动物细胞中得到最高效翻译, 我们采用人工化学合成寡核苷酸引物, 经 PCR 反应, 对 G - CSF cDNA 起始区 AUG 侧翼序列进行了同样的改造。PCR 反应后的产物经测序的结果显示, PCR 产物的序列与文献报道的人高活性 G - CSF cDNA 一致, ATG 上游和 TGA 下游的碱基序列分别与 5' 端和 3' 端引物的顺序相同。经测序确证的这种翻译优化突变的 G - CSF cDNA 插入表达载体 pED, 构建成 pED - GCSF。用 pEF - BOS 的肽链延长因子基因的启动子替换 pED - GCSF 的启动子而构建成另一表达质粒 pEF - GCSF, 见图 1。

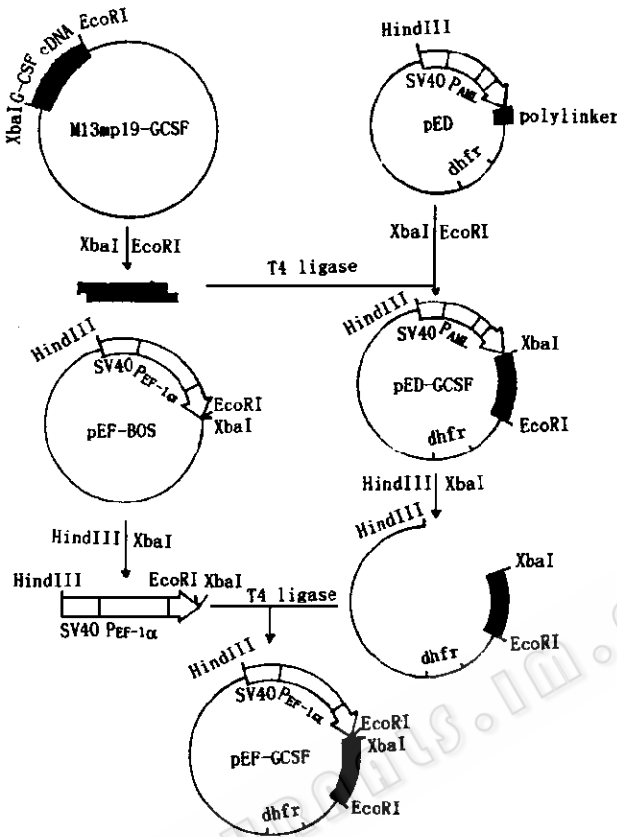


图1 pED-GCSF和pEF-GCSF的构建

Fig. 1 Construction of pED-GCSF and pEF-GCSF

上述结果显示,两质粒在COS7细胞中均获得高效暂时表达。pED-GCSF转染COS7细胞72h表达量比48h高;pEF-GCSF转染COS7细胞48h的表达量比72h的高。

2.2 转染COS7细胞瞬时表达rhG-CSF

两质粒分别转染COS7细胞后48h、72h收集转染细胞上清,用ELISA法测其rhG-CSF表达量,以未转染COS7的培养上清作阴性对照,结果如表1。

上述结果显示,两质粒在COS7细胞中均获得高效暂时表达。pED-GCSF转染COS7细胞72h表达量比48h高;pEF-GCSF转染COS7细胞48h的表达量比72h的高。

2.3 转染CHO-dhfr⁻细胞稳定表达rhG-CSF

两质粒分别转染CHO-dhfr⁻细胞48h后,各以1:9稀释,并加入不同浓度的氨甲喋呤(MTX)(0, 0.01μmol/L,

0.05μmol/l),每隔4d换液1次,2周后长出CHO-dhfr⁺克隆,计数CHO-dhfr⁺克隆数,并测出平均每个克隆的rhG-CSF表达量,结果如表2。

上述结果显示,MTX直接加压刚转染的细胞,rhG-CSF的表达量较低,一是由于所测的是平均每个克隆的表达量,细胞数较少;二是由于所加MTX浓度较低,使扩增的外源

基因的拷贝数可能较少。随着MTX浓度的增加,所形成的CHO-dhfr⁺克隆数逐渐减少,而平均每个克隆的rhG-CSF表达量逐渐升高,同时在相对较高浓度的MTX,例0.05μmol/L MTX直接选择下,pEF-GCSF转染者比pED-GCSF转染者更易形成CHO-dhfr⁺克隆,且平均每个克隆所表达的rhG-CSF量也较多。这可能与pEF-

表1 rhG-CSF在COS7细胞中表达量

Table 1 The expression level of rhG-CSF in COS7

Post transfection /h	Expression level of rhG-CSF/pg·ml ⁻¹		
	pED-GCSF	pEF-GCSF	No transfection
48	5.2 × 10 ⁴	1.8 × 10 ⁵	—
72	2.3 × 10 ⁵	1.4 × 10 ⁵	—

GCSF 的肽链延长因子基因启动子的转录效率比 pED - GCSF 的腺病毒主要晚期启动子的转录效率更高有关^[12~14]。

表 2 不同 MTX 浓度下 CHO - dhfr⁺ 克隆数及 rhG - CSF 表达量

Table 2 Numbers of CHO - dhfr⁺ clone and rhG - CSF expression level in different concentration of MTX

MTX concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Average numbers of CHO - dhfr ⁺ clone per plate		Average rhG - CSF expression level per clone/ $\text{pg}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot 3\text{d}^{-1}$	
	pED - GCSF	pEF - GCSF	pED - GCSF	pEF - GCSF
0	>200	>200	3.45×10^2	3.72×10^2
0.01	25	24	1.80×10^3	1.60×10^3
0.05	4	11	2.64×10^3	4.68×10^3

选择 pEF - GCSF 转染后,在 0.05 $\mu\text{mol/L}$ MTX 长出的 CHO - dhfr⁺ 克隆,混合后,再以 1:9 稀释传代,加入 MTX 至 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 。每隔 4d 换液 1 次,2~3 周后,长出少量 CHO - dhfr⁺ 克隆,测得各个克隆中 rhG - CSF 最高表达者的细胞株,在 25cm² 培养皿,5ml 培养基中,10⁶ 细胞每 3d 的表达量为 4.46 $\mu\text{g/ml}$ 。这一表达水平已接近 Tsuchiya 等报道的水平^[6],他们在小鼠 C127 I 细胞中表达 rhG - CSF,9d 的表达量为 10~20 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.4 表达产物的体内活性初步测定

人 G - CSF 对小鼠粒细胞有交叉效应,可通过分析给药前后的小鼠外周血白细胞数量的变化来测定表达产物 rhG - CSF 是否具有体内生物学活性^[6,8,9]。实验分两组,每组昆明种小白鼠 10 只,实验组每只小鼠腹腔注射 CHO - dhfr⁺ 克隆培养液稀释上清 1ml(含 2.5 μg rhG - CSF)/次。对照组每只

小鼠腹腔注射 CHO - dhfr⁻ 培养上清 1ml/次,两组分别连续注射 5d,每天各 1 次,每次注射后 6h 测小鼠外周血白细胞数量,停止注射后 1,2,4,6,8d 继续测外周血白细胞数量。

结果显示:表达上清中含有能刺激小鼠白细胞增多的 rhG - CSF,表明 CHO - dhfr⁺ 克隆表达的 rhG - GCSF 有体内生物学活性,见图 2。

本研究构建的两个表达 rhG - CSF 重组质粒,转染细胞后,暂时性和永久性表达水平都比较高。其原因有以下几点:(1)G - CSF cDNA 的 AUG 侧翼序列进行了翻译起始的优化突变;(2)两个质粒的增强子、启动子的转录效率都比较高^[12~14];(3)MTX 浓度的逐渐升高,扩增了与

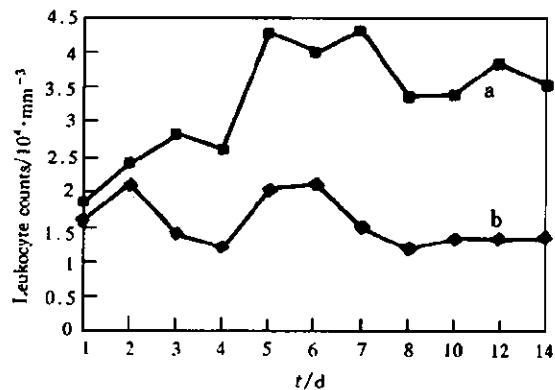


图 2 注射培养上清后小鼠白细胞数量的变化

Fig. 2 The change of mouse Leukocyte counts after injection of medium

1ml(containing 2.5 μg rhG - CSF) of medium was injected each day (day 2 to day 6), at the time indicated, blood samples were determined. a. CHO - dhfr⁺; b. CHO - dhfr⁻

dhfr 基因连锁 G-CSF cDNA 的拷贝数,从而使表达量得以提高。本研究在 0.5 μ mol/L MTX 下的 CHO-dhfr⁺ 克隆中 rhG-CSF 最高表达量每 3d 达 4.46 μ g/ml,且表达的 rhG-CSF 有较好的体内生物学活性,这一结果的获得为进一步提高 MTX 浓度,从而建立更高表达重组人粒细胞集落刺激因子的工程细胞株打下了基础。

致谢 rhG-CSF 体内测活是由第二军医大学放射医学教研室杨如俊教授协助完成,特此致谢。

参 考 文 献

- 1 Demetri G D, Griffin J D. *Blood*, 1991, **78**(11):2791~2808
- 2 Nagata S, Tsuchiya M, Anano S *et al.* *Nature*, 1986, **319**(30):415~418
- 3 Souza L M, Boone T C, Gabrilove J *et al.* *Science*, 1986, **232**:61~65
- 4 瞿成奎, 贺福初, 邢桂春等. *中华血液学杂志*, 1993, **14**(6):293~295
- 5 瞿成奎, 贺福初, 刘福陆等. *生物化学与生物物理学报*, 1993, **25**(6):623~629
- 6 Tsuchiya M, Nomura H, Asano S *et al.* *EMBO*, 1987, **6**:611~616
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- 8 Cohen A M, Zsebo K M, Inoue H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:2484~2488
- 9 Tamura M, Hattori K, Nomura H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1987, **142**:454~460
- 10 Kozak M. *Nucleic Acids Res*, 1987, **15**:8125~8148
- 11 Kozak M. *Cell*, 1986, **44**:283~292
- 12 Kaufma R J, Davies M V, Wasley L C *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**:4485~4490
- 13 Uetsuki T, Naito A, Nagata S *et al.* *J Biol Chem*, 1987, **264**:5791~5798
- 14 Mizushima S, Nagata S. *Nucleic Acids Res*, 1990, **18**(17):5322

Studies on High Level Expression of Recombinant Human Granulocyte Colony-stimulating Factor cDNA in Mammalian Cells

Chen Jian Cao Yunxu Lu Deru

(Genetics, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Two recombinant human granulocyte colony-stimulating factor expression plasmids pED-GCSF and pEF-GCSF were constructed. Each plasmid was transfected into the COS7 cells for transient expression, and into CHO-dhfr⁻ cells for stable expression. The results were: Both plasmids expressed effectively in COS7 cells and CHO cells. The expression level of 48 hours and 72 hours in COS7 cells transfected by pED-GCSF were 5.2×10^4 pg/ml and 2.3×10^5 pg/ml respectively, and the level by pEF-GCSF were 1.8×10^5 pg/ml and 1.4×10^5 pg/ml. With the MTX concentration increasing, the numbers of CHO-dhfr⁺ clone decreased, but the expression level of per clone raised. The highest level expression clone was selected under 0.5 μ mol/L MTX, and the level was 4.46 μ g/ml/3 days. Moreover, this rhG-CSF could increase the mouse leuckocyte counts in the peipheral blood.

Key words Human granulocyte colony-stimulating factor, gene recombination, mammalian cell