

# 腺病毒载体介导的重组蛋白 sTNFRII-gAD 快速表达和制备

陆月<sup>1,2</sup>, 刘丹<sup>1,2</sup>, 张孝任<sup>1,2</sup>, 刘雪荣<sup>1,2</sup>, 沈炜<sup>3</sup>, 郑刚<sup>3</sup>, 柳云帆<sup>2</sup>, 董小岩<sup>2,3</sup>,  
吴小兵<sup>2</sup>, 高基民<sup>1</sup>

1 温州医学院 浙江省模式生物技术与应用重点实验室, 温州 325035

2 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所 病毒基因工程国家重点实验室, 北京 100052

3 北京五加和分子医学研究有限公司, 北京 100176

**摘要:** 利用腺病毒载体高效感染哺乳动物细胞及表达外源基因的特性, 建立一种快速高效表达及制备重组蛋白的方法, 并用该方法获得 sTNFRII-gAD (可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部融合蛋白) 蛋白纯品。首先用携带 *EGFP* 基因的腺病毒载体 rAd5-EGFP 以不同的腺病毒用量 (MOI) (0~1 000) 感染 BHK21c022 细胞, 观察比较其转导效率和细胞毒性。用 AdMax 腺病毒载体系统制备携带融合基因 *sTNFRII-gAD* 的重组复制缺陷型 5 型腺病毒 rAd5-sTNFRII-gAD。用 rAd5-sTNFRII-gAD 以不同的 MOI (0~1 000) 感染 BHK21c022 细胞, 收取上清进行 Western blotting 分析, 比较上清中 sTNFRII-gAD 蛋白的表达量。在此基础上, 用 rAd5-sTNFRII-gAD 以 MOI 100 感染大量培养的 BHK21c022 细胞, 在无血清培养条件下反复多次收取培养上清, 经过硫酸铵浓缩、分子筛柱层析、透析等步骤浓缩和纯化 sTNFRII-gAD 融合蛋白, 并体外测定该融合蛋白拮抗 TNF $\alpha$  的活性。结果获得了携带 *sTNFRII-gAD* 融合基因的重组腺病毒 rAd5-sTNFRII-gAD; 用 rAd5-EGFP 感染 BHK21c022 细胞结果表明, 随着腺病毒用量的增高, 表达 EGFP 蛋白的 BHK21c022 细胞数量和亮度明显增加; MOI 在 0~100 之间被感染的 BHK21c022 细胞未表现出明显的细胞毒性, MOI 为 1 000 时可观察到细胞变圆和少量死亡现象。Western blotting 分析结果表明, 随着腺病毒用量的增高, 培养上清中 sTNFRII-gAD 融合蛋白表达量明显增加, 以 MOI 为 1 000 时最高。在此基础上, 我们用 MOI 为 100 的 rAd5-sTNFRII-gAD 感染 5 个转瓶培养的 BHK21c022 细胞以制备 sTNFRII-gAD 融合蛋白。每个转瓶加无血清培养液 100 mL, 每 48 h 收获上清 1 次并换液, 反复 6 次收取培养上清共约 3 L, 经过纯化获得了约 11 mg 的 sTNFRII-gAD 融合蛋白。体外活性测定实验表明, 获得的 sTNFRII-gAD 融合蛋白能有效拮抗 TNF $\alpha$  对 L929 细胞的杀伤作用。腺病毒载体/BHK21 细胞表达系统是一个简便、高效、通用的表达系统, 利用该系统成功制备了有生物学活性的 sTNFRII-gAD 融合蛋白。该表达系统的特点是生产规模易于放大, 适应无血清培养, 可以反复多次收获目标蛋白。

**Received:** December 16, 2010; **Accepted:** March 25, 2011

**Supported by:** National Major Specific Project for Innovation of New Pharmaceuticals (No. 2009ZX09103-649), National Major Specific Project for Infectious Diseases (No. 2008ZX10001-012), Zhejiang Provincial Major Research Program (No. 2008C14082), Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. R2080407), Zhejiang Provincial Program for the Cultivation of High-level Innovative Health Talents, Wenzhou Municipal Research Program (No. G20090142), National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering Open Program, Science & Technology Innovation Program for College/University Students in Zhejiang Province (No. 2009R413042).

**Corresponding author:** Jimin Gao. Tel: +86-577-86689746; Fax: +86-577-86689977; E-mail: jimingao@yahoo.com

Xiaobing Wu. Tel: +86-10-63523187; Fax: +86-10-63532053; E-mail: wuxb0168@vip.sina.com

国家新药创新重大专项 (No. 2009ZX09103-649), 国家传染病重大专项 (No. 2008ZX10001-012), 浙江省重大科技专项 (No. 2008C14082), 浙江省自然科学基金 (No. R2080407), 浙江省卫生高层次创新人才培养工程, 温州市科技计划 (No. G20090142), 病毒基因工程国家重点实验室开放课题, 浙江省新苗计划 (No. 2009R413042) 资助。

关键词: 腺病毒, 重组蛋白, BHK21 细胞, 哺乳动物细胞, sTNFRII-gAD

## Rapid expression and preparation of the recombinant fusion protein sTNFRII-gAD by adenovirus vector system

Yue Lu<sup>1,2</sup>, Dan Liu<sup>1,2</sup>, Xiaoren Zhang<sup>1,2</sup>, Xuerong Liu<sup>1,2</sup>, Wei Shen<sup>3</sup>, Gang Zheng<sup>3</sup>, Yunfan Liu<sup>2</sup>, Xiaoyan Dong<sup>2,3</sup>, Xiaobing Wu<sup>2</sup>, and Jimin Gao<sup>1</sup>

1 Zhejiang Provincial Key Laboratory for Technology & Application of Model Organisms, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

2 National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100052, China

3 Beijing Fiveplus Molecular Medicine Institute, Beijing 100176, China

**Abstract:** We expressed and prepared the recombinant fusion protein sTNFRII-gAD consisted of soluble TNF receptor II and the globular domain of adiponectin by Adenovirus Vector System in mammalian BHK21c022 cells. First we used the adenovirus vector containing *EGFP* gene (rAd5-EGFP) to infect BHK21c022 cells at different MOI (from 0 to 1 000), and then evaluated their transduction efficiency and cytotoxicity. Similarly, we constructed the replication-deficient adenovirus type 5-sTNFRII-gAD (rAd5-sTNFRII-gAD). We collected the supernatants for Western blotting to determine the optimal MOI by comparing the expression levels of sTNFRII-gAD fusion protein, 48 h after the BHK21c022 cells were infected by rAd5-sTNFRII-gAD at different MOIs (from 0 to 1 000). Then, we chose rAd5-sTNFRII-gAD at MOI 100 to infect five bottles of BHK21c022 cells in 100 mL of serum-free chemically defined media 100 mL, harvested the supernatant every 48 h for 6 times, and condense and purify sTNFRII-gAD fusion protein by ammonium sulfate salt-out and size-exclusion chromatography, respectively. Finally, we analyzed anti-TNF $\alpha$  activity of sTNFRII-gAD fusion protein on L929 cells *in vitro*. The results showed that the number of BHK21c022 cells expressing EGFP protein was increased significantly with the increase of MOI. However, some cells died at MOI of 1 000 while there was no significant cytotoxicity at MOI from 0 to 100. Western blotting analysis showed that the more adenoviruses, the higher expression of sTNFRII-gAD fusion protein in the supernatant with the highest expression at MOI 1 000. We successfully obtained about 11 mg bioactive and purified sTNFRII-gAD fusion protein at last. The *in vitro* assay demonstrated that the sTNFRII-gAD fusion protein was potent to antagonize TNF $\alpha$ 's cytotoxicity to L929 cells. Put together, we established a recombinant adenovirus vector/BHK21 cell expression system, characteristic of the efficient serum-free culture and easy scaling-up.

**Keywords:** adenovirus, recombinant proteins, BHK21 cells, mammalian cells, sTNFRII-gAD

哺乳动物细胞表达系统具有指导蛋白质的正确折叠、提供复杂的 N 型糖基化和准确的 O 型糖基化等多种翻译后加工功能。因此, 对于用基因工程方法获得结构复杂的高等生物蛋白质具有优势。哺乳动物细胞表达系统不仅已成为多种基因工程药物的生产平台, 在新基因的发现、蛋白质的结构和功能研究中亦起了极为重要的作用。CHO/dhfr 缺陷型细胞表达系统是最为常用的哺乳动物表达系统, 用该系统成功地获得了多种重组蛋白的高效表达<sup>[1-3]</sup>。然

而, 这种表达系统需要漫长的筛选加压过程才能得到高产量的稳定细胞株, 故不适合于短时间内获得较大量重组蛋白。

瞬时表达系统因实验周期短, 操作简便而受到青睐。常用的瞬时表达系统有 COS-7 细胞系统<sup>[4]</sup>、杆状病毒载体表达系统<sup>[5]</sup>、腺病毒载体/HEK293 细胞表达系统<sup>[6]</sup>等。

本实验利用重组腺病毒能高效感染哺乳动物细胞及高效表达外源基因的特点, 拟建立一种不需要

转染和加压筛选的腺病毒载体/BHK21 细胞表达系统,并用于快速制备重组可溶性肿瘤坏死因子受体与脂联素球部融合蛋白 (sTNFR<sub>II</sub>-gAD)。

## 1 材料与方 法

### 1.1 质粒、细胞及试剂

pBHGlox(delta)E1,3Cre 骨架质粒、pDC316 原始质粒、BHK21c022 细胞、无血清培养基和磷酸钙共沉淀转染试剂盒由北京五加和分子医学研究所提供;L929 细胞购自美国 ATCC,用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养;蛋白 Marker 购自 Invitrogen 公司;放线菌素 D 购自 Fluka;鼠抗人脂联素单抗由谭淑萍老师提供;鼠抗人 TNFR<sub>II</sub> 单抗购自 abcam 公司;马抗小鼠 IgG/磷酸酶标记抗体购自中杉金桥公司;BCIP/NBT 购自 Calbiochem 公司;重组人 TNF $\alpha$  标准品购自北京博奥森生物技术有限公司;Superdex 200 prep grade (16/60) 购自 GE Healthcare。

### 1.2 融合基因的构建及重组腺病毒的产生

以融合蛋白基因 *pAAV2neo-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* 为模板设计引物。上游引物为 5'-CGCGGATCCATGGCGCCCGTCCG-3',下游引物为 5'-ACGCGTCTGACTCAGTTGGTGTCATG-3',下划线处表示酶切位点,上游引物的酶切位点为 *Bam*H I,下游引物的酶切位点为 *Sal* I。引物合成由 Invitrogen 公司完成。PCR 扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 90 s,25 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,回收试剂盒回收目的片段,将片段用 *Bam*H I、*Sal* I 进行双酶切。再用 *Bgl* II 和 *Sal* I 双酶切载体 *pDC316*。*Bam*H I 和 *Bgl* II 是同尾酶,用 T4 DNA 连接酶将上述目的基因片段和 *pDC316* 片段连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,得到重组穿梭质粒 *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD*。

将 *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* 和腺病毒基因组质粒 *pBHGlox(delta)E1,3Cre* 共转染 HEK293 细胞,用磷酸钙共沉淀法进行转染。在 6 孔细胞培养板中接种

HEK293 细胞,5 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/孔,培养过夜;转染前 4~6 h 换新鲜培养基(含 10% FBS 的 DMEM 培养基);取 4  $\mu$ g 的 DNA 与水混合成总体积为 67.5  $\mu$ L 的液体加入到 EP 管中。然后加入 2.5 mol/L CaCl<sub>2</sub> 7.5  $\mu$ L,混匀后 4 °C 孵育 20 min;向 EP 管中贴壁加入 2 $\times$ HBS (4 °C 保存) 75  $\mu$ L,轻柔地混匀后室温静置 5 min。最后将 150  $\mu$ L 液体加入 6 孔细胞培养板中,轻轻混匀。镜下观察可以看到十分细小而均匀的颗粒;37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行培养。9 d 后见到病毒噬斑,收集病变细胞和上清作为 Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 毒种。

### 1.3 重组腺病毒的制备与纯化

将获得的 Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 毒种委托北京五加和分子医学研究所进行扩增和纯化,得到滴度为 1 $\times$ 10<sup>15</sup> vg/L 的纯化病毒。用 TCID<sub>50</sub> 方法<sup>[7]</sup>测定腺病毒的感染性滴度。

### 1.4 Ad5-EGFP 对 BHK21c022 细胞的感染

在 24 孔细胞培养板中接种 BHK21c022 细胞(含 10% FBS 的 DMEM 培养基),1 $\times$ 10<sup>5</sup> 个细胞/孔,同时按梯度加入重组腺病毒 Ad5-EGFP (MOI 分别为 0、1、10、100、1 000),共 5 个孔。12 h 后换成无血清培养基,继续培养 48 h 后,荧光显微镜下观察,在相同的曝光时间(1/3 s)观察各孔中细胞的荧光强弱以及细胞的形态变化。

### 1.5 Western blotting 检测

用 MOI 分别为 0、1、10、100、1 000 的重组腺病毒 Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 感染 BHK21c022 细胞,12 h 后换成无血清培养基。48 h 后收取细胞无血清培养上清。将上清和无水乙醇按 1:3 的比例混合到一起,-70 °C 放置 0.5 h。13 000 r/min 离心 5 min,倒掉上清,用少量(一般为收取上清体积的 1/10) PBS 溶液溶解沉淀,用于做 SDS-PAGE 及 Western blotting 实验。

取 10  $\mu$ L 浓缩 10 倍的上清,加入 10  $\mu$ L 2 $\times$ 上样缓冲液,100 °C 沸水煮 5 min,20  $\mu$ L 样品上样,12%分离胶进行 SDS-PAGE 分离,然后用湿胶转移

仪将蛋白转移至 NC 膜。取出 NC 膜,用封闭液(5%脱脂牛奶, PBS 配制) 37 °C 封闭 NC 膜 1 h。弃去封闭液,加入 1:300 (用封闭液稀释) 的鼠抗人脂联素单抗或 1:500 (用封闭液稀释) 的鼠抗人 TNFR II 的单抗, 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤 NC 膜 3 次后,加入 1:1 000 (用封闭液稀释) 的马抗小鼠 IgG/磷酸酶标记抗体 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤 NC 膜 3 次后,加入 BCIP/NBT, 避光显色。约 15~30 min 后弃去显色液,用超纯水洗涤 NC 膜中止反应,观察结果。

### 1.6 蛋白点杂交方法检测 sTNFR II-gAD 蛋白

用 MOI 为 100 的重组腺病毒 Ad5-sTNFR II-gAD 感染 BHK21c022 细胞 12 h 后,换成无血清培养基,然后每隔 48 h 换液,多次收集培养液上清,进行蛋白质点杂交实验。

将每次收集的细胞培养上清各取 5  $\mu$ L,分别点到 NC 膜上,用封闭液(5%脱脂牛奶, PBS 配制) 37 °C 封闭 NC 膜 1 h。弃封闭液,加入 1:300 (用封闭液稀释) 的鼠抗人脂联素单抗, 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤 NC 膜 3 次后,加入 1:1 000 (用封闭液稀释) 的马抗小鼠 IgG/磷酸酶标记抗体 37 °C 孵育 1 h。PBS 洗涤 NC 膜 3 次后,加入 BCIP/NBT, 避光显色。约 15~30 min 后弃去显色液,用超纯水洗涤 NC 膜中止反应,观察结果。

### 1.7 sTNFR II-gAD 蛋白的浓缩和纯化

用 MOI 为 100 的 rAd5-sTNFR II-gAD 感染 5 个转瓶培养的 BHK21c022 细胞来大量制备 sTNFR II-gAD 融合蛋白。每个转瓶加无血清培养液 100 mL,每 48 h 收获上清一次并换液,反复 6 次收取培养上清。共得到约 3 L 含有融合蛋白的细胞培养上清。向上清中缓慢均匀的加入硫酸铵粉末(40%, W/V)。用磁力搅拌器在 4 °C 冷库中搅拌 24 h。13 000 $\times$  g, 1 h 离心后弃去上清。用少量的 PBS 溶解沉淀(3~5 mL)。然后将溶液进行透析,除去多余的硫酸铵,得到重组融合蛋白的粗纯品。依据 Hiload

16/60 Superdex 200 prep grade 的说明书对得到的粗纯品进行凝胶过滤层析。将层析后各个收集峰进行免疫印迹分析,收集含有目标融合蛋白的峰合并获得融合蛋白纯品。

### 1.8 sTNFR II-gAD 融合蛋白的活性测定

96 孔细胞培养板中铺入 L929 细胞,  $1.5\times 10^4\sim 1.8\times 10^4$  个细胞/孔, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜。第 2 天,将 sTNFR II-gAD 融合蛋白纯品,用含放线菌素 D 20 mg/L, TNF $\alpha$  20 U/mL 的 DMEM 培养液进行 4 倍比梯度稀释,共稀释 10 个梯度;弃去 96 孔板中 L929 细胞的上清,加入前面已经倍比稀释好的 sTNFR II-gAD 融合蛋白样品,每孔 100  $\mu$ L,每个梯度做 3 个复孔;同时加入放线菌素 D 20 mg/L 与 TNF $\alpha$  20 U/mL 的 DMEM 培养液(两者结合杀伤性最大)作为阴性对照。继续培养 24 h 后,每孔加入 MTT 溶液(5 g/L) 20  $\mu$ L,再培养 4 h 后,将 96 孔中的 120  $\mu$ L 液体吸出,换入 100  $\mu$ L DMSO 终止培养。检测各孔的 OD<sub>570</sub> 值<sup>[8-9]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 腺病毒 Ad5-EGFP 感染 BHK21 c022 细胞

分别用 MOI 为 0、1、10、100、1 000 的 Ad5-EGFP 感染 BHK21 c022 细胞,荧光显微镜下观察。如图 1 所示,随着 MOI 的增大,荧光细胞数量和亮度逐渐增强,表明腺病毒载体能够有效转染 BHK21 c022 细胞,并且表达量与病毒用量呈正相关。但在 MOI 达到 1 000 时,出现细胞变长、少数细胞死亡的现象。

### 2.2 重组载体质粒 pDC316-sTNFR II-gAD 的鉴定及重组腺病毒的获得

用 Xba I 和 Hind III 双酶切 pDC316-sTNFR II-gAD 应得到大小为 3 777 bp 和 1 327 bp 的基因片段, Sal I 和 EcoR I 双酶切应得到 3 883 bp 和 1 221 bp 的基因片段;图 2 显示酶切结果与预期相符,表明重组质粒构建成功。

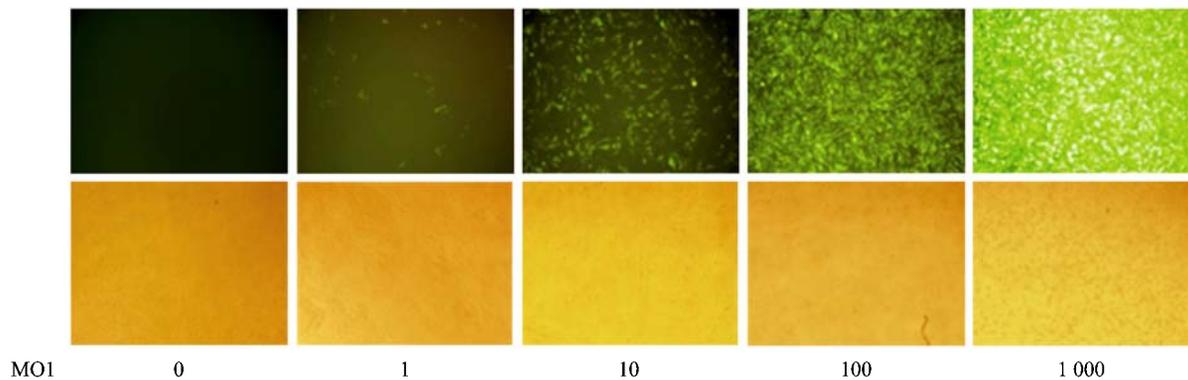


图 1 不同 MOI 的 rAd5-EGFP 对 BHK21 c022 细胞的转导效率

Fig. 1 Transduction efficiency of Ad5-EGFP virus at different MOI for BHK21 c022 cells.

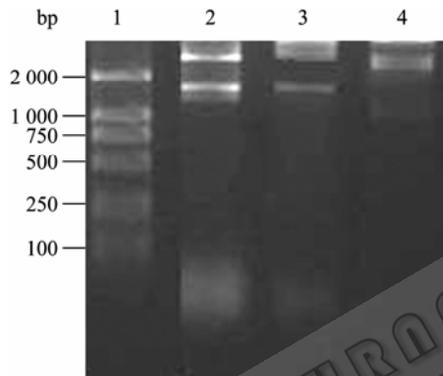


图 2 *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* 质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction digestion analysis of *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* plasmid. 1: DNA marker; 2: *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* digested with *Sal* I and *EcoR* I; 3: *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* digested with *Xba* I and *Hind* III; 4: *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD*.

将重组穿梭质粒 *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* 与腺病毒基因组质粒 *pBHGlox(delta)E1,3Cre* 共转染 HEK293 细胞, 9 d 后见到病毒噬斑, 如图 3 所示。收集病变细胞和上清作为 Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 毒种。大量制备和纯化获得 Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 制品。TCID<sub>50</sub> 方法测定纯化的 Ad-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 病毒的感染性滴度为  $1.58 \times 10^{13}$  IU/L。

### 2.3 不同 MOI 的 Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 的表达效率

将无血清培养 48 h 后的细胞培养上清浓缩后进行 Western blotting 检测, 结果如图 4 所示。用脂联素单抗 (图 4A) 和肿瘤坏死因子单抗 (图 4B) 检测

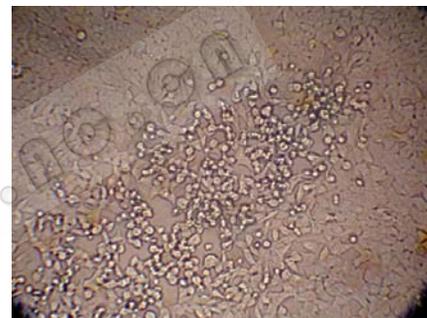


图 3 共转染 *pBHGlox(delta)E1,3Cre* 和 *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* 后产生重组腺病毒 Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD

Fig. 3 Plaques of recombinant virus Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD generated by co-transfection of *pDC316-sTNFR<sub>II</sub>-gAD* and *pBHGlox(delta)E1,3Cre*.

都出现了一致的特异性条带, 分别为 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白的单体、三聚体和多聚体形式, 其表达效率随着重组腺病毒 MOI 的提高而增加。

### 2.4 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白的持续表达

Ad5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 感染无血清培养的 BHK21 c022 细胞后, 48 h 收集细胞上清, 连续收集 6 次, 用蛋白点杂交方法检测其中 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 的表达。用已知浓度的 sTNFR<sub>II</sub>-Fc 融合蛋白作为标准品, 分别稀释成 100、50、10、5、1 mg/L, 膜上各加样 5  $\mu$ L。结果如图 5 所示, 可见经重组腺病毒感染过的 BHK21 c022 细胞在 2~10 d 内都持续分泌较高浓度的融合蛋白。

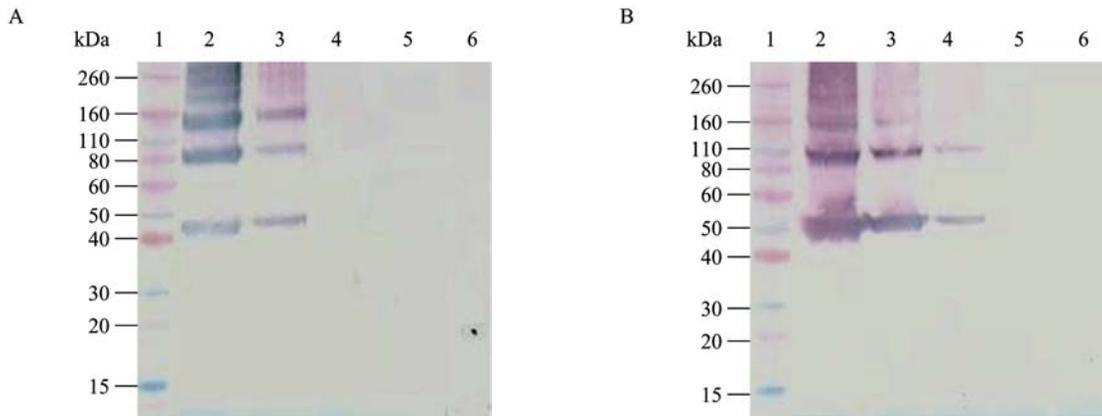


图 4 sTNFRII-gAD 融合蛋白的免疫印迹分析

Fig. 4 Western blotting analysis of sTNFRII-gAD fusion protein. (A) Western blotting of non-reduced sTNFRII-gAD fusion protein with monoclonal antibody against adiponectin. (B) Western blotting of non-reduced sTNFRII-gAD fusion protein with monoclonal antibody against TNFRII. Lane 1: Protein molecular weight standards; Lanes 2 to 6: Western blotting of non-reduced sTNFRII-gAD fusion protein at 1 000 MOI, 100 MOI 10 MOI, 1 MOI and 0 MOI of Ad5-sTNFRII-gAD.

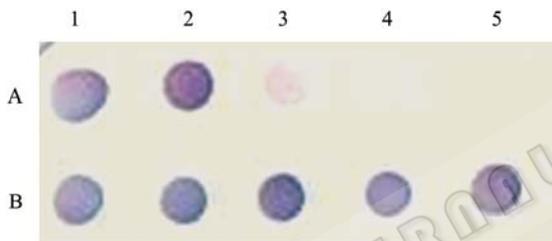


图 5 蛋白点杂交分析验证融合蛋白的持续表达

Fig. 5 Confirmation of continuous expression of the fusion protein sTNFRII-gAD by protein dot blotting with monoclonal antibody against TNFRII. (A) Lanes 1 to 5: positive controls at 5 µL of 100 µg/L, 50 µg/L, 10 µg/L, 5 µg/L and 1 µg/L; (B) Lanes 1 to 5: detection of sTNFRII-gAD fusion protein in the supernatants of BHK-21S cells after the culture of 48 h, 96 h, 144 h, 192 h and 240 h.

### 2.5 sTNFRII-gAD 的分子筛层析纯化及生物学活性鉴定

分子筛纯化重组融合蛋白时，出现 2 个比较明显的峰，如图 6 所示。第 1 个峰为外水峰 (峰 1)，是分子量相对较大的高聚体峰。而第 2 个峰主要为融合蛋白的三聚体峰 (峰 2)，收集该峰，并测定其对 TNFα 杀伤 L929 细胞的中和活性。结果显示，通过腺病毒表达系统生产出来的融合蛋白 sTNFRII-gAD 具有中和 TNFα 的活性 (图 7)，且其抑制 TNFα 杀伤 L929 细胞的活性呈剂量依赖性。

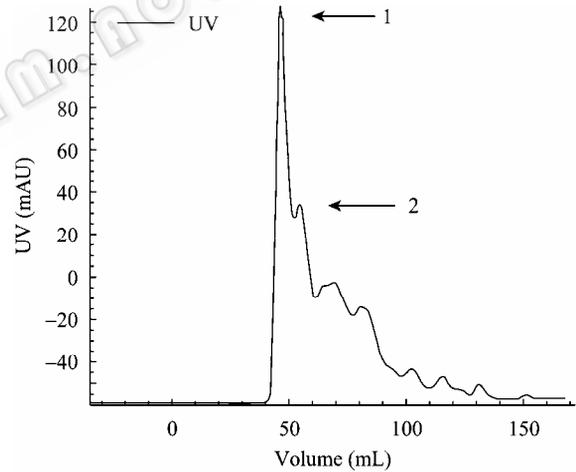


图 6 sTNFRII-gAD 融合蛋白的分子筛层析

Fig. 6 Map of size exclusion chromatography of sTNFRII-gAD fusion protein. Peak1: multimers of sTNFRII-gAD in external solution; Peak2: trimer of sTNFRII-gAD.

### 3 讨论

目前利用哺乳动物表达系统生产高生物学活性的蛋白是获得重组蛋白最为广泛的方式。其中应用最普遍的是 CHO/dhfr<sup>-</sup>表达系统<sup>[10-11]</sup>。CHO 细胞很少分泌内源蛋白，利于外源蛋白的表达和分离纯化，而且表达的外源蛋白保持天然的空间结构和生物学活性。所以 CHO 表达系统常用于长期稳定表达重

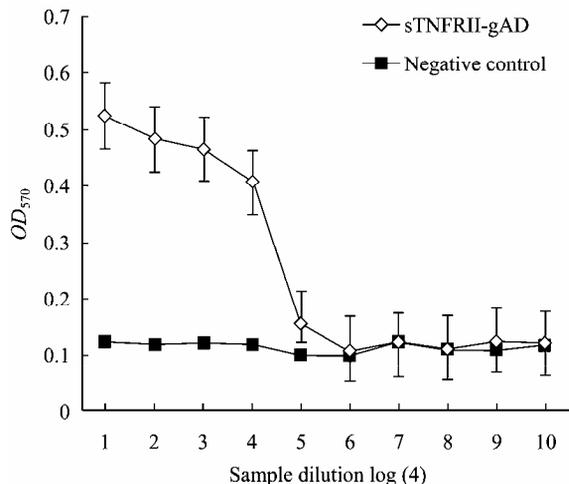


图7 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白拮抗 TNF $\alpha$  的活性测定  
Fig. 7 TNF $\alpha$  neutralizing activity of the purified sTNFR<sub>II</sub>-gAD fusion protein.

组蛋白。但是得到高效稳定表达重组蛋白的 CHO 细胞株需要漫长的加压过程, 不能满足短期快速得到蛋白纯品的要求。

病毒载体因能高效感染宿主细胞及表达外源基因而被用于瞬时高效表达<sup>[12]</sup>。常用的病毒载体有杆状病毒载体、甲病毒 SFV (semliki 森林病毒) 载体、腺病毒载体等。其中腺病毒表达载体系统因安全性好、高效感染哺乳动物细胞、高效表达外源基因等优点而在重组蛋白制备方面得到应用。尤其是该表达系统对重组蛋白的糖基化、磷酸化等翻译后加工等过程与人体天然过程相似, 因此表达的蛋白具有高生物活性<sup>[13-14]</sup>。

sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白是一种双功能蛋白质分子, sTNFR<sub>II</sub> 可以与 TNF $\alpha$  结合, 减轻炎症的发生, 达到治疗类风湿性关节炎等疾病的目的。已经上市的 TNF $\alpha$  拮抗药物 sTNFR<sub>II</sub>-Fc 是二聚体形式的 sTNFR<sub>II</sub>。但 TNF $\alpha$  天然状态下是三聚体形式, 重组蛋白 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 是利用了脂联素球部自动形成三聚体的特性而设计的, 预计获得的三聚体化 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白拮抗 TNF $\alpha$  的活性将比二聚体化 sTNFR<sub>II</sub>-Fc 更高。本研究尝试用重组腺病毒载体/BHK21 细胞表达系统来制备三聚体化的

sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白。

制备腺病毒载体最常见的生产细胞是 HEK293 细胞<sup>[15]</sup>, 它能够反式提供 *E1* 基因功能, 使 *E1* 基因缺失的重组腺病毒能够高效复制和产生子代病毒, 在这个过程中外源基因也得到高效表达。故目前也常用腺病毒载体/HEK293 细胞来生产重组蛋白<sup>[16]</sup>。然而, 利用重组腺病毒感染 HEK293 细胞会产生明显的细胞病变, 只能一次性收获产物, 而不能较持续地表达外源蛋白及反复多次收获细胞上清来制备目标蛋白。另外利用 HEK293 细胞生产重组蛋白的同时, 会产生子代病毒, 具有感染性, 并且病毒自身的蛋白会影响重组蛋白的纯化。

本研究采用了 BHK21 细胞作为重组蛋白的生产细胞。BHK21c022 细胞是一种从 BHK21 细胞中单克隆化挑选并且无血清驯化的悬浮适应细胞株, 生长迅速, 适应性强, 既可以在含有血清的培养液中贴壁生长, 又可以在无血清的培养液中悬浮生长。为了观察腺病毒载体对于 BHK21c022 细胞的转染和表达效率以及细胞毒性, 我们用不同量的 rAd5-EGFP 病毒感染 BHK21c022 细胞, 结果发现: 虽然该细胞是小鼠来源的细胞, 但对 rAd5-EGFP 病毒感染仍然十分敏感, 并且感染和表达效率随着病毒 MOI 的增加而明显增加。细胞毒性只有在很高的用量 (MOI=1 000) 时才明显 (图 1)。这为我们建立腺病毒载体/BHK21 细胞表达系统以及选择病毒的用量提供了依据。

同理, 我们构建并重组获得了 rAd5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 病毒。用该重组病毒感染 BHK2c022 细胞, 在上清中成功检测到了 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白的表达, 并且发现: rAd5-sTNFR<sub>II</sub>-gAD 病毒用量的增加, 上清中的 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 表达量也呈明显增加趋势 (图 4); 利用转瓶培养, 在换成无血清培养基后连续培养了 12 d, 反复 6 次收集上清; 且 6 次上清中 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 蛋白表达量相对稳定 (图 5), 这说明腺病毒载体表达系统可以短期稳定表达重组蛋白。另外。用复制缺陷型腺病毒载体感染 BHK21c022 细

胞,再用 LK021 培养液进行培养,由于 LK021 是无血清、无蛋白和多肽的化学成分限定的培养液,收获的培养上清中杂蛋白很少,对纯化非常有利。因此, BHK21c022 细胞是用腺病毒载体表达系统表达重组蛋白的理想细胞株。

总而言之,本实验建立了一种用腺病毒载体/BHK21 细胞系统表达和制备重组 sTNFR<sub>II</sub>-gAD 融合蛋白的方法,从而为快速高效获得较大量(毫克级)、结构复杂并具有生物学活性的重组蛋白提供了有力工具。

## REFERENCES

- [1] Pilbrough W, Munro TP, Gray P. Intracloal protein expression heterogeneity in recombinant CHO cells. *PLoS ONE*, 2009, 4(12): e8432.
- [2] Chusainow J, Yang YS, Yeo JH, et al. A study of monoclonal antibody-producing CHO cell lines: what makes a stable high producer? *Biotechnol Bioeng*, 2009, 102(4): 1182-1196.
- [3] Gaillet B, Gilbert R, Amziani R, et al. High-level recombinant protein production in CHO cells using an adenoviral vector and the cumate gene-switch. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(1): 200-209.
- [4] Aruffo A, Seed B. Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(23): 8573-8577.
- [5] Kost TA, Condreay JP, Jarvis DL. Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(5): 567-575.
- [6] Schiedner G, Hertel S, Kochanek S. Efficient transformation of primary human amniocytes by E1 functions of Ad5: generation of new cell lines for adenoviral vector production. *Hum Gene Ther*, 2000, 11(15): 2105-2116.
- [7] Svensson L, Hjalmarsson A, Everitt E. TCID<sub>50</sub> determination by an immuno dot blot assay as exemplified in a study of storage conditions of infectious pancreatic necrosis virus. *J Virol Methods*, 1999, 80(1): 17-24.
- [8] Zhang Y, Gao K, Han CM, et al. Study on methods and requirements for quality control of recombinant human tumor necrosis factor receptor Fc fusion protein. *Acta Pharm Sin*, 2003, 38(3): 165-168.  
张翊,高凯,韩春梅,等.重组人肿瘤坏死因子受体-Fc融合蛋白质控方法和标准的研究. *药学报*, 2003, 38(3): 165-168.
- [9] Chen SY, He QS, Dong XY, et al. Eukaryotic expression and bioactivity determination of the fusion protein sTNFR<sub>II</sub>-gAD consisting of soluble tumor necrosis factor receptor II and globular domain of adiponectin. *Chin J Biotech*, 2010, 26(2): 207-215.  
陈素云,何秋山,董小岩,等.可溶性肿瘤坏死因子受体 II-脂联素球部融合蛋白的真核表达及生物学活性检测. *生物工程学报*, 2010, 26(2): 207-215.
- [10] Rosser MP, Xia W, Hartsell S, et al. Transient transfection of CHO-K1-S using serum-free medium in suspension: a rapid mammalian protein expression system. *Prot Expr Purif*, 2005, 40(2): 237-243.
- [11] Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Revs Genet*, 2003, 4(5): 346-358.
- [12] Deng J, Xia WY, Hung MC. Adenovirus 5 E1A-mediated tumor suppression associated with E1A-mediated apoptosis *in vivo*. *Oncogene*, 1998, 17(17): 2167-2175.
- [13] Ma YW, Zhou XS, Qian XL, et al. Inhibitory effect of the adenovirus type 5 E1A protein expressed in the yeast system on the human tumor cell growth. *Chinese Sci Bull*, 2003, 48(7): 687-691.
- [14] Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 1997, 233(2): 423-429.
- [15] Garnier A, Côté J, Nadeau I, et al. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology*, 1994, 15(1/3): 145-155.