

11G 工程细胞株人尿激酶原 (pro-UK) 基因拷贝数的测定

韩素文 张劲风* 俞炜源 胡宝成

(军事医学科学院生物工程研究所蛋白质工程研究室 北京 100071)

摘要 采用 Southern blot 和狭缝 (Slot blot) 杂交的方法, 对高效表达人尿激酶原 (pro-UK) 的工程细胞——11G 原代细胞及传 134 代后细胞含有的 pro-UK 基因拷贝数进行了测定。结果显示, 11G 工程细胞株内所含的 pro-UK 的拷贝数为 100~200 拷贝/细胞, 传 134 代后其拷贝数基本不变, 说明 11G 细胞株是稳定高表达 pro-UK 的工程细胞, 符合 WHO 规定的关于重组 DNA 转化细胞用于生产的要求。

关键词 尿激酶原, 拷贝数, 工程细胞株, 杂交

分类号 Q78 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-03-0162-165

DETECTION OF COPY NUMBERS OF PRO-UK GENE IN 11G CELL LINE

Han Suwen Zhang Jinfeng Yu Weiyuan Hu Baocheng

(Institute of Biotechnology, Beijing 100071)

Abstract Southern blot and Slot blot hybridization methods were used in this research to detect the copy numbers of pro-urokinase (pro-UK) gene in pro-UK expression engineering cell line (11G cell line and propagated 134 times cell line). The results showed that the copy numbers of pro-UK gene were about 100~200

* 解放军大连医学高等专科学校进修生(大连116013)

1998-05-27收稿, 1998-09-14修回

copies/cell and the copy numbers did not changed after propagating 134 times. This demonstrated that pro-UK gene expression can be stable and high efficient in 11G engineering cell line and it is suitable for WHO request about recombinant DNA transfected cell line for products.

Key words Pro-urokinase, Copy number, Engineering cell line, Hybridization

人尿激酶原(pro-urokinase, pro-UK)为尿激酶前体,亦称单链尿激酶,对血栓有特异的溶解作用,且副作用小,是第二代溶栓制剂。为了能大量生产可用于治疗的尿激酶原,采用DNA重组技术构建了人尿激酶原全长cDNA并在二氢叶酸还原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)缺陷型中国仓鼠卵巢(chinese hamster ovary, CHO)细胞中获得高效稳定表达,得到产pro-UK的CHO工程细胞-11G细胞用于中试生产。为了鉴定该工程细胞株的生物学特性,我们对11G细胞的pro-UK基因拷贝数进行了测定。

1 材料与方法

1.1 细胞株

CHO-dhfr⁻细胞株:为二氢叶酸还原酶缺陷型中国仓鼠卵巢(CHO dhfr⁻)细胞株,由 Urlaub 和 Chasin 建立^[1],本室保存。

11G工程细胞株:11G细胞是高表达pro-UK的原代细胞及经中试生产传134代的工程细胞株,pSV₂·UK重组质粒及11G工程细胞株由本室李凤知构建。

1.2 工具酶及标记探针试剂

限制性内切酶 StuI、BglII、PstI 及 DNA 标记试剂盒为美国 Promega 公司和北京华美生物工程公司产品;[β-³²P]dUTP 购自北京亚辉公司(比放射强度:1.11 × 10³Bq/mmol/L)。

1.3 细胞培养^[2]

采用完全培养基(ρ)(含有10%(φ)小牛血清、0.03mmol/L次黄嘌呤、0.03mmol/L胸腺嘧啶、0.01mmol/L L-脯氨酸、0.01mmol/L甘氨酸的D-MEM培养基)培养CHO-dhfr⁻细胞,用选择培养基(培养基中去除次黄嘌呤和胸腺嘧啶)和氨甲喋呤(MTX)加压培养11G细胞;0.25%胰蛋白酶(含0.02%EDTA)消化细胞进行传代,37℃培养。

1.4 细胞染色体DNA的提取^[3,5]

取11G细胞和CHO-dhfr⁻细胞悬液各2mL(细胞数为2 × 10⁷细胞/mL),分别加入消化缓冲液(100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl pH8.0, 25mmol/L EDTA, 0.5% SDS)及蛋白酶K(0.1mg/mL),于恒温摇床内50℃振荡过夜;加入RNA酶(200μg/mL),37℃温浴1h,酚/氯仿抽提一次;乙醇沉淀DNA;高速离心、真空干燥沉淀物;TE溶解DNA。

1.5 探针制备

将pSV₂·UK质粒DNA以PstI酶解;1%琼脂糖凝胶电泳;用透析膜回收1.5kb的pro-UK DNA片段;采用随机引物法制备[β-³²P]dUTP标记的DNA探针。标记方法按试剂盒说明书进行。

1.6 Slot blot杂交制膜^[4]

检测样品为10μg 11G细胞染色体DNA;阴性对照为CHO-dhfr⁻细胞染色体DNA(10μg);计算并稀释pSV₂·UK质粒DNA,浓度分别相当于每个细胞含10、20、50、100、200、300拷贝的DNA含量作为标准对照(计算方法见结果与讨论)。分别将各样品于100℃热变性10min后,加入2 × SSC 200μL,用狭缝抽滤器(Bio-Rad公司)将各样品温和抽吸于硝酸纤维素滤膜上,室温干燥后,80℃烘烤2h以备杂交用。

1.7 Southern blot转印^[5-6]

分别取CHO-dhfr⁻细胞染色体DNA,11G细胞染色体DNA各10μg,以及相当于50、100、200拷贝数的pSV₂·UK质粒DNA(各加入10μg CHO-dhfr⁻细胞染色体DNA以消除本底)用StuI、BglII酶解,1%琼脂糖凝胶电泳;凝胶于变性液(1.5mol/L NaCl, 0.5mol/L NaOH)中浸泡30min后,移至中和液(1.5mol/L NaCl, 0.5mol/L Tris-HCl pH7.4)中浸泡30min;变性后凝胶覆盖硝酸纤维素膜及多层滤纸并加压

500g重物;于 $20 \times \text{SSC}$ 中室温过夜,将凝胶中DNA转印至硝酸纤维素膜上;转印膜自然干燥后, 80°C 烘烤2h以备杂交用。

1.8 预杂交及杂交^[4]

将狭缝抽滤制备的硝酸纤维素膜及Southern转印的硝酸纤维素膜置于预杂交液(50%甲酰胺, $5 \times \text{Denhardt}$ 液, $6 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 鲑鱼精DNA)中, 42°C 振荡4h;预杂交液中加入标记探针(加入前 95°C 热变性10min,冰浴速冷), 42°C 杂交过夜;杂交膜用洗涤液分别于 65°C 和室温各振荡3次,每次15min;待杂交膜干燥后压X光片, -70°C 放射自显影24~48h。

2 结果与讨论

2.1 pSV₂·UK质粒DNA、11G细胞DNA拷贝数计算

已知pSV₂·UK质粒DNA为5900bp,其分子量为 $3.9 \times 10^6\text{D}$ 。CHO细胞基因组分子量为 $1.98 \times 10^{12}\text{D}$ (1摩尔含 6.02×10^{23} 分子),即 1.5×10^6 CHO细胞含 $10\mu\text{g}$ DNA, 10pg 的pSV₂·UK质粒DNA相当于细胞中含1拷贝

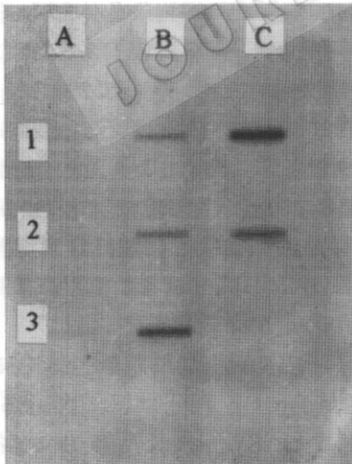


图1 11G原代细胞整合 pro-UK基因拷贝数

Slot blot狭缝杂交结果

A1 CHO-dhfr⁻细胞染色体DNA($10\mu\text{g}$), A2 pSV₂-UK DNA相当10拷贝, A3 pSV₂-UK DNA相当20拷贝, B1 pSV₂-UK DNA相当50拷贝, B2 pSV₂-UK DNA相当100拷贝, B3 pSV₂-UK DNA相当200拷贝, C1 pSV₂-UK DNA相当300拷贝, C2 11G原代细胞染色体DNA($10\mu\text{g}$)

的 pro-UK基因。根据上述计算,配制100、200、500pg和1、2、3ng pSV₂·UK质粒DNA(分别相当于 pro-UK基因10、20、50、100、200、300拷贝/细胞的DNA量)制膜杂交。

2.2 11G工程细胞株基因组拷贝数的测定

Slot blot各杂交条带比较结果显示,11G工程细胞株DNA条带杂交强度相当于1ng的pSV₂·UK的DNA(图1),表明其基因拷贝数相当于100拷贝数/细胞;11G细胞株中 pro-UK基因酶切片段经Southern blot杂交显示其拷贝数接近200拷贝/细胞(图2),上述两种方法对11G细胞中 pro-UK基因拷贝数的检测均得到相近的结果,提示11G工程细胞株内所含的 pro-UK的拷贝数为100~200拷贝/细胞。此细胞经传134代后,再测定细胞拷贝数,其结果无明显变化(图3、图4)。这些结果证明,表达 pro-UK的11G工程细胞株均符合世界卫生组织(WHO)规定的关于用于基因工程产品的外源基因转化细胞的标准^[7]。

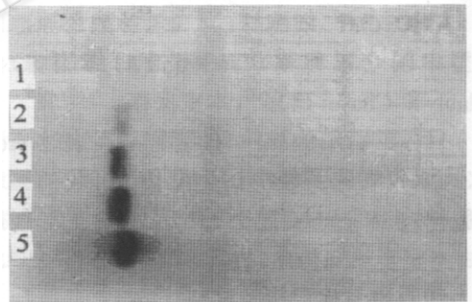


图2 11G原代细胞整合 pro-UK基因拷贝数

Southern blot杂交结果

1 CHO-dhfr⁻细胞染色体DNA($10\mu\text{g}$), 2 pSV₂-UK DNA相当50拷贝, 3 pSV₂-UK DNA相当100拷贝, 4 pSV₂-UK DNA相当200拷贝, 5 11G原代细胞染色体DNA($10\mu\text{g}$)

2.3 11G细胞株 pro-UK基因拷贝数与 pro-UK表达的关系

通过逐渐提高细胞培养基中MTX浓度促使11G细胞中dhfr基因得以扩增,使外源性 pro-UK基因拷贝也随之增加。检测结果显示,11G细胞中 pro-UK基因拷贝数达到100~200拷贝数/细胞。 pro-UK基因拷贝的增加提高了 pro-UK在11G细胞中的表达量,其表达量达到

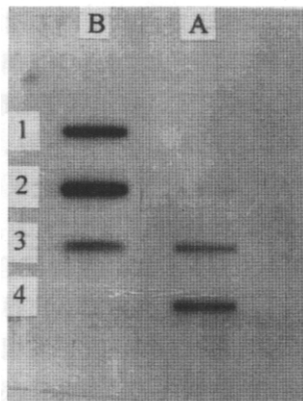


图3 11G134代细胞整合 pro-UK基因拷贝数

Slot blot 狭缝杂交结果

A1 CHO-dhfr⁻ 细胞染色体 DNA (10 μ g), A2 pSV₂-UK DNA 相当 20 拷贝, A3 pSV₂-UK DNA 相当 50 拷贝, A4 pSV₂-UK DNA 相当 100 拷贝, B1 pSV₂-UK DNA 相当 200 拷贝, B2 pSV₂-UK DNA 相当 300 拷贝, B3 11G134 代细胞染色体 DNA (10 μ g)

> 500U/10⁶细胞/24h(未经 MTX 加压培养的 11G 细胞 pro-UK 基因的表达量为 100U/10⁶细胞/24h)。实验证明, 11G 细胞中 pro-UK 基因的扩增使其表达水平明显提高。因此, 11G 细胞株是稳定的、高表达 pro-UK 的工程细胞株, 具有良好的开发应用前景。

参 考 文 献

[1] Urlaub G, Chasin LA. Proc Natl Acad Sci, 1980, 77: 4216.

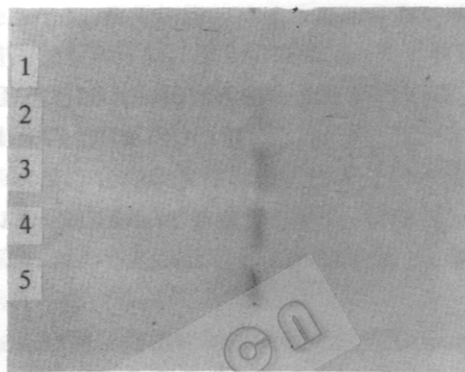


图4 11G134代细胞整合 pro-UK基因拷贝数
Southern blot 杂交结果

1 CHO-dhfr⁻ 细胞染色体 DNA (10 μ g), 2 pSV₂-UK DNA 相当 100 拷贝, 3 pSV₂-UK DNA 相当 200 拷贝, 4 11G 原代细胞染色体 DNA (10 μ g), 5 11G134 代细胞染色体 DNA (10 μ g)

- [2] 郭征. 组织培养技术. 北京: 人民卫生出版社, 1982, 163~168.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993, 96~105.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T *et al.* Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 45~67.
- [5] Southern EM. J Mol Bio, 1975, 98: 503.
- [6] Blin N, Stafford DW. Nucleic Acids Res, 1976, 3: 2303.
- [7] WHO. Requirements for Biological substances. No. 39. Geneva, 1986, 1~8.