

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子/白细胞介素-3 融合蛋白的表达研究

张 毅 屈贤铭 杨胜利

(中国科学院上海生命科学院生物工程研究中心 上海 200233)

摘 要 利用 PCR 扩增得到粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF) 白细胞介素-3(IL-3)完整基因片段,将其分别克隆至 pGEM-T 构建成 GM-CSF/IL-3 融合蛋白基因, DNA 序列与设计预期一致。将得到的融合蛋白基因克隆至 T7RNA 聚合酶表达载体 pT7zz, 得到表达质粒 pFu, 经转化至表达宿主 *E. coli* BL21(DE3) 在 IPTG 诱导下获得融合蛋白目的产物的直接表达。经 SDS-PAGE 电泳鉴定扫描分析, 目的基因产物表达量占菌体总蛋白量的 30% 以上, 目的基因表达产物以包涵体的形式表达。Western-blot 鉴定表明, 该表达产物可以与 GM-CSF 抗体及 IL-3 抗体特异性结合。目的基因表达产物经过包涵体变性、透析复性及柱层析纯化, 用 GM-CSF、IL-3 依赖细胞株 TF-1 检测, 具有明显的生物学活性。

关键词 融合蛋白, 基因表达, 细胞因子

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)03-0316-04

迄今为止, 许多重组蛋白质已作为药物用于多种疾病的治疗中。为了寻求更为有效和具有更高生物活性的重组药物, 人们尝试对于天然蛋白质药物进行突变研究, 这些研究取得了很大进展, 一些突变体已投入应用或进入临床试验。构建融合蛋白是寻求高效、新型重组药物的另一研究方向。蛋白质结构研究发现, 自然界中不少大的多功能域蛋白是由不同的蛋白分子通过插入或融合而构成^[1], 从理论上, 人们可以利用基因工程技术构建人工融合蛋白, 它可以同时具备原所构成蛋白各自不同的功能。同时, 由于“邻近效应”等, 融合蛋白往往会产生一些新的功能及生物活性, 这已在许多研究中得到证实。九十年代以来, 人们尝试构建由不同细胞因子所构成的融合蛋白^[2,3], 实验发现, 这些融合蛋白不仅具有原构成因子各自的生物学活性, 而且表现出较相同摩尔数的原构成因子共同使用时更高的生物活性, 显示出细胞因子融合蛋白研究的理论价值与潜在的应用价值。这一研究领域已吸引了众多生物技术公司的参与^[4-8], 其中 Immunix 公司的 GM-CSF/IL-3 融合蛋白已进入三期临床试验阶段^[9]。由于迄今为止尚未有国外公司在我国申请细胞因子融合蛋白的专利保护, 我们的工作不受专利限制, 这一研究对于借鉴国外先进经验, 发展我国自己的基因

工程产品, 具有较高的应用价值与潜在的发展前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 限制酶、高温 DNA 聚合酶(Taq 酶)等均购自 Promega 公司及 GIBICOL-BRL 公司。pGEM-T Vector 购自 Promega 公司。白细胞介素-3、GM-CSF PCR 扩增引物均由上海生工生物工程公司合成。大肠杆菌菌株 DH5 α 、表达载体 pT7zz、大肠杆菌表达宿主 BL21(DE3) 均为本实验室保存。

1.1.2 白细胞介素-3 基因由北京医科大学马大龙教授惠赠, GM-CSF 基因及单抗(鼠抗)由华新公司惠赠; 白细胞介素-3 多抗抗体(兔抗)由本实验室制备, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自 Cal-Biochem 公司, 羊抗鼠二抗购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 酶切、连接、转化、克隆、PCR 扩增、SDS-PAGE 以及 Western-blot 方法均参照文献 [10], PCR 产物克隆至 pGEM-T Vector 中的方法参照其操作说明书。融合蛋白基因序列测定委托大连宝生物工程公司进行全长基因测序。

1.2.2 GM-CSF/IL-3 融合蛋白的生物活性测定: 应用依赖 GM-CSF 及 IL-3 生长的细胞株 TF-1 作

检测细胞,用 MTT 法进行测定。细胞在 RPMI1640 + 10% 小牛血清 + 10 μ g/L IL-3 的培养基中培养,测活前先将细胞用 RPMI 1640 洗 3 次,然后用 RPMI 1640 + 10% 小牛血清稀释细胞,以每孔 15 000 个细胞接种于 96 孔板中,待测样品及用做标准的 GM-CSF、IL-3、GM-CSF + IL-3 分别用 RPMI 1640 + 10% 小牛血清连续稀释后加到各孔,检测液的总体积为 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 培养箱培养 48h 后,加入 5mg/mL 的 MTT 染料 10 μ L/孔,4h 后加入裂解液(20% SDS,50% DMSO,pH4.7)100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C 3h 后测定 620nm 的 OD 值。

2 结果

2.1 GM-CSF、IL-3 单一基因的扩增与克隆

GM-CSF 基因采用以下引物进行扩增:

5'端引物 5' CACCATGGCACCTGCTCGTTCTCCAAAG CCCAGC3'

3'端引物 5' GTCAGGATCCCTCTCGGACTGGCTCCC3'

5'端引物中,在 GM-CSF 基因 N 端加上 ATG 起始密码子及 *Nco*I 位点,同时,由于 GM-CSF 基因 N 端 GC 含量很高,且含有大肠杆菌中不常用的密码子,因此,在设计 5'端引物时对 GM-CSF 基因 N 端前 6 个氨基酸的密码子进行了修改,引入较多的 A、T,并选用大肠杆菌偏爱的密码子。在 3'端引物终止密码子前引入 GGATCC(*Bam*HI 位点,编码 Gly-Ser),以利于同 IL-3 基因的连接。

GM-CSF 基因 PCR 扩增产物用 pGEM-T Vector 进行克隆,用 *Apa*I 酶切鉴定克隆质粒,选择出含有 GM-CSF 基因插入片断的质粒(GM-CSF 基因含有 *Apa*I 单一酶切位点,pGEM-T Vector 多克隆位点区亦含有单一 *Apa*I 位点),将挑选出含 GM-CSF 基因的质粒再用 *Nco*I 进行酶切,选择出可被 *Nco*I 切出一条带的质粒备用,记作 pTGM(图 1)。

IL-3 基因用下列引物进行 PCR 扩增:

5'端引物:5' GGATCCGGCGGTGGCGGTGGCAGCGCT CCCATGACCCAG3'

3'端引物 5' AAGCTTATCAAAAAGATCGCGAGGC3'

5'端引物中在 IL-3 基因 N 端加入 GGATCCG-GCGGTGGCGGTGGCAGC,即编码 Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser 柔性连接肽序列,以利于 GM-CSF 及 IL-3 各自的折叠。3'端引物中引入 TGATAA 双终止密码,并引入 *Hind*III 位点。

IL-3 基因 PCR 扩增产物亦克隆至 pGEM-T Vector 中,用 *Apa*I/*Bam*HI 酶切鉴定克隆质粒,

*Apa*I/*Bam*HI 切出一条带的质粒为 IL-3 基因以所期望的方向插入的质粒。记作 pT-IL-3(图 1)。

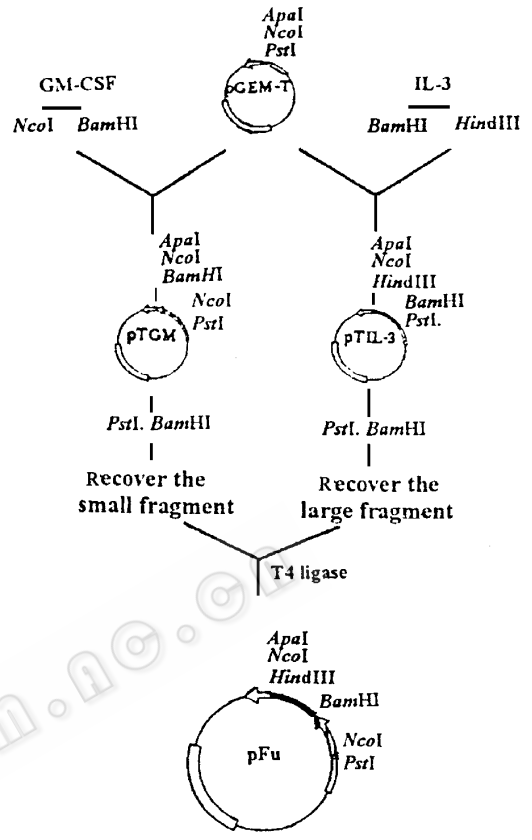


图 1 GM-CSF/IL-3 融合蛋白基因的构建

Fig.1 Construction of the GM-CSF/IL-3 fusion gene

2.2 GM-CSF-IL-3 融合基因的构建

pT-IL-3 质粒用 *Pst*I/*Bam*HI 酶切后回收大片段,pTGM 用 *Pst*I/*Bam*HI 酶切后回收小片段,将两者连接,转化后得到的克隆抽质粒后用 *Apa*I,*Pst*I/*Eco*RI 酶切鉴定筛选克隆质粒,选择 *Apa*I,*Pst*I/*Eco*RI 均可切出一条约 700bp 条带的质粒,记作 pFu(图 1)。

克隆于质粒 pFu 中的融合蛋白基因经 DNA 序列测定分析,其全部序列与预期一致。

2.3 融合蛋白基因的表达

融合蛋白表达质粒 pT7Fu 的构建如图 2。将 pT7Fu 质粒转化于大肠杆菌 BL21(DE3),得到转化子,即得到融合蛋白基因的表达菌株。将其接入 LB 培养基中,在对数生长期(OD₆₀₀ 约 0.5 左右)加入 0.5mmol/L IPTG 进行诱导,诱导后的菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测,观察产物表达情况。电泳经扫描得到目的基因表达产物占菌体总蛋白 30% 以

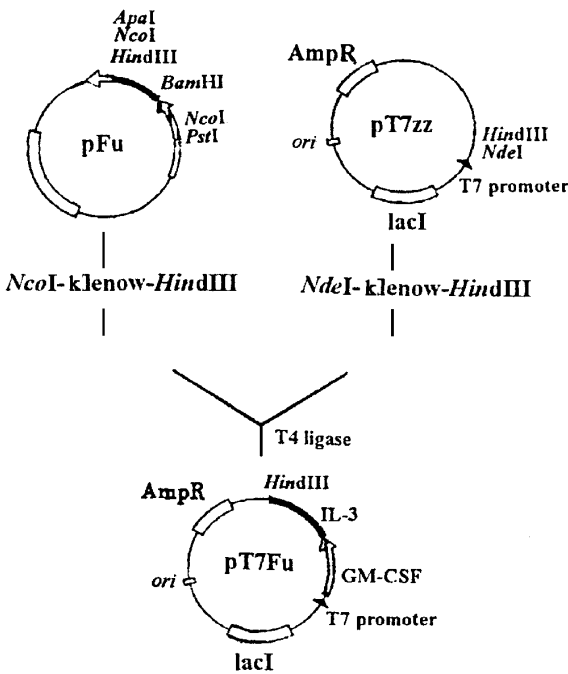


图 2 GM-CSF/IL-3 融合蛋白表达质粒的构建
Fig.2 Construction of the GM-CSF/IL-3 fusion gene expression vector

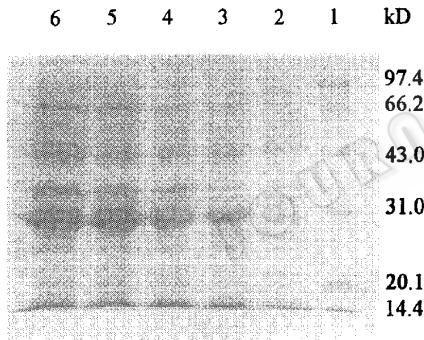


图 3 融合蛋白表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expressed recombinant GM-CSF/IL-3 fusion protein

1. Protein molecular weight marker ; 2. Before induction ; 3. 1 hour after induction ; 4. 2 hours after induction ; 5. 3 hours after induction ; 6. 4 hours after induction

2.4 Western-blot 鉴定

融合蛋白表达菌株培养后经 IPTG 诱导,离心收集菌体,用超声波破碎菌体,离心,洗涤,得到含有融合蛋白的包涵体,将包涵体用 8mol/L 尿素变性后做 SDS-PAGE 电泳,以 IL-3、GM-CSF 作为对照,实验结果如图 4。由图可见,融合蛋白同时具有 IL-3 及 GM-CSF 的免疫原性(图 4。)

2.5 生物活性检测

含有融合蛋白的包涵体用 8mol/L 尿素变性溶

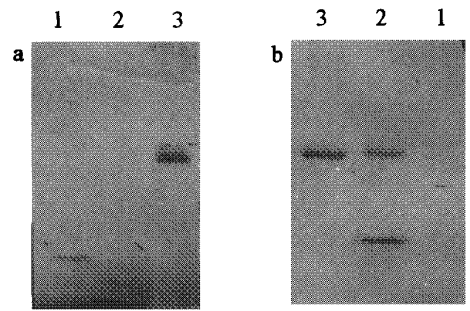


图 4 GM-CSF/IL-3 融合蛋白免疫印迹检测

Fig.4 Western-blot analysis of GM-CSF/IL-3 fusion protein.

a. With GM-CSF antibody ; b. With IL-3 antibody
1. GM-CSF ; 2. IL-3 ; 3. GM-CSF/IL-3 fusion protein

解后,进行透析复性,复性好的样品用 DEAE Sepharose FF 离子交换柱层析进行分离纯化(具体实验结果将另文发表)。纯化样品采用 MTT 法用对 IL-3、GM-CSF 依赖的 TF-1 细胞株检测生物活性。检测结果表明,融合蛋白具有明显的维持 TF-1 细胞株生长的生物活性。其比活约为 $10^6 \mu/\text{mg}$ 蛋白(图 5)。

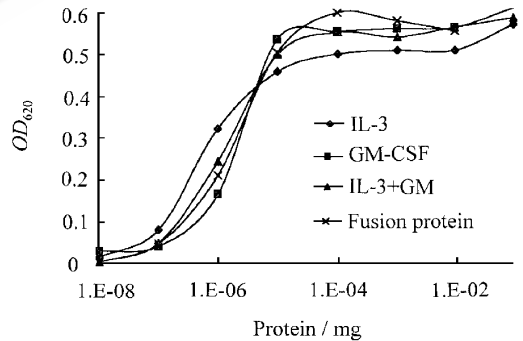


图 5 重组 GM-CSF/IL-3 融合蛋白生物活性测定结果

Fig.5 Biological activity analysis of recombinant GM-CSF/IL-3 fusion protein using TF-1 cell

3 讨论

本文在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得重组 GM-CSF/IL-3 融合蛋白的直接表达。重组目的基因产物表达量占菌体总蛋白 30% 以上。Western-blot 鉴定结果表明,目的基因表达产物可以分别与 GM-CSF 抗体及 IL-3 抗体特异性结合。重组蛋白包涵体经复性、纯化后,具有维持 TF-1 细胞生长的生物学活性。然而由于 TF-1 细胞株在仅有 GM-CSF 或 IL-3 时亦可较好的生长(图 5,比活均在 $10^6 \text{u}/\text{mg}$ 左右),这一活性测定结果仅能初步地证明纯化的重组

融合蛋白具有一定的生物学活性。下一步我们将寻找对于 GM-CSF 及 IL-3 单一因子专一的细胞株,以及某些特定的细胞系 进行进一步的研究。

这一重组菌的构建成功,为 GM-CSF/IL-3 融合蛋白这一具有潜在应用价值的基因工程药物的开

发打下了基础。

致 谢 本工作得到华新公司刘新垣院士、曾以申研究员、包惠芳研究员的帮助和支持。本室陆坚峰进行了融合蛋白的生物活性测定工作,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Russel R B. *Protein Engineering* ,1994 ,7(12) :1407~1410
- [2] Curtis B M ,Williams D E ,Broxmeyer H E *et al. Proc Natl Acad Sci USA* ,1991 ,88 :5809~5813
- [3] Weich N S ,Tullai J ,Guido E *et al. Experimental Hematology* ,1993 ,21 :647~655
- [4] Patent :Seale. WO9521197 ;10.08.95 95-283735/37 04.02.94-94US-0192299 25.01.95 as 95WO-US00549
- [5] Patent :WO9533-057 27.5.94-94IT-FI0106(07.12.95)26.05.95 as WO-EPO 2011.96-03568/03
- [6] Patent :Immunix. US5108910 28.04.92 92-166521/20 22.03.91-US-674288 22.03.91 as 674288
- [7] Patent :Ortho-Pharm. WO9206116 ;16.04.92 92-150891/18 28.09.90-US-589958 26.9.91 as U07053
- [8] Patent :Genetic-Inst. WO9204455 ;19.03.92 92-114361/14 29.08.90-US-575003 29.08.91 as U06186
- [9] The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (Washington, DC) ,*Genetic Engineering News* ,1995 ,15(14) :12~16
- [10] Sambrook J ,Frisch E F ,Maniatis T ,*Molecular Cloning :A Laboratory Manual* ,2nd Edition ,Cold Spring Harbor Laboratory Press ,New York ,1989

Studies on the Expression of the Recombinant Human GM-CSF/IL-3 Fusion Protein

ZHANG Yi QU Xian-Ming YANG Sheng-Li

(Shanghai Research Center of Biotechnology ,The Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200233)

Abstract A human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) /interleukin-3 (IL-3) fusion gene with a short linker between the GM-CSF and IL-3 gene has been successfully constructed and expressed in *E. coli* under the control of T7 promoter. The recombinant fusion protein was expressed as inclusion bodies after the IPTG induction. The yield of the GM-CSF/IL-3 fusion protein was over 30% of the total cellular proteins. Western-blotting results showed that the fusion protein could specifically combined with GM-CSF antibody and IL-3 antibody. The biological activity was detected by the GM-CSF and IL-3 dependent cell line TF-1. After solubilizing with 8mol/L urea and renaturing with dialysis against Tris. HCl solution ,the refolded fusion protein showed obvious activities to maintain the growth of TF-1 cell.

Key words Fusion protein , gene expression , haemopoietic growth factors