

重组 BPI₂₃-Fcγ1 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达

徐俊杰* 徐 静 童贻刚 王海涛

(军事医学科学院微生物流行病学研究所 北京 100071)

关键词 杀菌/通透性增加蛋白, BPI₂₃-Fcγ1 融合蛋白, 表达, CHO 细胞

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)05-0587-03

杀菌/通透性增加蛋白(Bactericidal/permeability-increasing protein, BPI)是人和许多哺乳类动物白细胞中存在的一种碱性蛋白,它能与革兰氏阴性菌脂多糖(LPS)结合,具有中和内毒素和杀灭细菌作用^[1]。人 BPI 基因位于第 20 号染色体上,完整蛋白由 456 个氨基酸组成,其活性部位主要在蛋白氨基端约 200 个氨基酸(BPI₂₃)^[2,3]。实验室研究和临床试验表明重组 BPI(rBPI)及其衍生物在革兰氏阴性菌感染的治疗方面有良好的发展前景^[4]。

目前 BPI 在应用上存在的主要问题是体内半衰期短,用剂量大,价格昂贵^[5]。因此我们设计将 BPI₂₃ 和人 IgG1 Fc (Fcγ1)进行融合表达,希望重组蛋白在保留 BPI₂₃ 生物活性的同时,又具有 Fcγ1 固定补体、调理作用和较长半衰期的特性,更适合于临床应用。

1 材料与方法

1.1 材料

限制酶, T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司。Pfu 聚合酶购自上海生工公司。Lipofect AMINE 2000 脂质体试剂购自 Gibco-BRL 公司。引物由上海博亚生物公司合成。测序由大连宝生物公司完成。细胞培养基、血清及辅助试剂购自 Gibco-BRL 公司和 HyClone 公司。SP-Sepharose 购自 Pharmacia 公司。羊抗人 IgG Fc 与 HPP 标记羊抗人 IgG Fc 购自 Sigma 公司。表达 BPI 全分子的真核表达质粒 pC-BPI, 插入人 Fcγ1 基因的质粒 pGEM-Fc, 真核表达载体 pCMV-dhfr, CHO(dhfr⁻)细胞, *E. coli* J5 株为本实验室保存。

1.2 BPI₂₃-Fcγ1 融合基因构建

先分别用 PCR 扩增 BPI₂₃(含信号肽)和 Fcγ1 基因, BPI₂₃ 基因模板为质粒 pC-BPI, Fcγ1 基因模板为质粒 pGEM-Fc。BPI₂₃ 基因 3'引物和 Fcγ1 基因 5'引物有 20bp 部分重叠(引物中斜体部分)。以上述两种扩增产物混合做模板,再以 BPI₂₃ 基因 5'引物和 Fcγ1 基因 3'引物扩增,即获得 BPI₂₃-Fcγ1 融合基因。为保证序列的正确性,PCR 均使用高保真的 Pfu 聚合

酶。引物序列如下:

BPI₂₃ 基因 5'引物: 5'-CTAG TCTAGA ATGGCCAGGGTCCTTGC
Xba I
AAC-3'; BPI₂₃ 基因 3'引物: 5'-GTGGGCATGTCAGACTCT
GGAAATAAGGTTG-3'; Fcγ1 基因 5'引物: 5'-CCAGACTCT-
GACATGCCCCACCGTGCCAG CA-3'; Fcγ1 基因 3'引物: 5'-TCC
CCCCGGTTATTACCAGGACAGGG AGAG-3'。
Sma I

1.3 重组表达质粒构建

将上述扩增产物用 *Xba I* 和 *Sma I* 双酶切后与经同样双酶切的真核表达载体 pCMV-dhfr 相连,构建重组质粒 pC-BPI₂₃-Fcγ1,酶切鉴定后进行序列分析。

1.4 质粒的转染

CHO-dhfr⁻ 细胞用含次黄嘌呤及胸腺嘧啶(HT)和 10% 经透析的胎牛血清(FCS)的完全 IMDM 培养液培养于 24 孔板中,重组质粒 1μg 用 Lipofect AMINE 2000 脂质体试剂转染,按试剂盒说明操作。转染 24h 后,用 96 孔板进行克隆化,同时换成无 HT 的培养液。2 周后对长成的单克隆进行检测。

1.5 表达产物的检测和表达细胞株的加压筛选

用羊抗人 IgG Fc 包被酶联板, HPP 标记羊抗人 IgG Fc 为二抗,建立双抗体夹心 ELISA,检测培养上清中的 Fcγ1 来证实重组蛋白的表达。对表达量较高的单克隆转至 24 孔板中培养,用氨甲喋呤(MTX)加压筛选提高表达量。

1.6 重组 BPI₂₃-Fcγ1 的初步纯化

培养上清离心去细胞残渣,按每 50μL/mL 比例加入 SP-Sepharose,在摇动状态下室温结合 2h。树脂用 10 倍体积 20mmol/L Tris-Cl 缓冲液(pH7.6, 含 0.1mol/L NaCl)洗 2 次,用含 1mol/L NaCl 的同样缓冲液洗脱下结合蛋白。获得的蛋白抽提液用 12% SDS-PAGE 观察纯化效果,并以 HPP 标记羊抗人 IgG Fc 为抗体进行 Western blot 分析。

1.7 杀菌试验

E. coli J5 株用 PBS 稀释至 5×10^6 /mL, 取 200μL 与不同体积的 BPI₂₃-Fcγ1 蛋白抽提液或 rBPI(本实验室制)在 37℃ 作用 1h,然后取一定量混合液涂布 LB 平板计数菌落;或在

收稿日期:2001-01-20,修回日期:2001-04-18。

* 通讯作者。Tel:86-10-66948580; Fax:86-10-66948563; E-mail: xujunjie@sina.com

混合液中加入 2mL LB 培养基, 37℃ 摇床培养, 每隔 2h 测 OD_{600} 。以正常 CHO 细胞抽提液为对照。

2 结 果

2.1 BPI₂₃-Fcγ1 融合基因及表达质粒构建

用 PCR 方法成功获得 BPI₂₃-Fcγ1 融合基因, 序列分析结果表明融合基因序列与设计一致(氨基酸序列见图 1), 其中, BPI₂₃ 基因长 660bp, 编码 27 个氨基酸的信号肽和 BPI 前 193 个氨基酸; Fcγ1 基因长 669bp, 编码 223 个氨基酸。将融合基因插入表达载体, 构建了重组质粒 pC-BPI₂₃-Fcγ1(图 2), 该质粒带有 dhfr 基因, 在转染 CHO(dhfr⁻) 细胞后可用 MTX 进行加压筛选。

2.2 BPI₂₃-Fcγ1 融合蛋白的表达

将重组质粒 pC-BPI₂₃-Fcγ1 转染 CHO(dhfr⁻) 细胞, 经克隆化和 MTX 加压筛选, 获得稳定表达的细胞株。表达产物的检测和表达量的评估采用双抗体夹心 ELISA 检测 Fcγ1。在 MTX 浓度为 0.1μmol/L, 工程细胞株培养上清的表达量约 2μg/mL。

10	20	30	40	50	60
MARGPCNAPR	WASLMVLVAI	GTAVTAA	GVVVRISQKG	LDYASQQGTA	ALQKELKRIK
70	80	90	100	110	120
IPDYSDFKI	KHLGKGHYSF	YSMDIREFQL	PSSQISMVPN	VGLKFSISNA	NIKISCKWKA
130	140	150	160	170	180
QKRFLKMSGN	FDSLIEGMSI	SADLKLGSNP	TSGKPTTCS	SCSSHINSVH	VHISKSKVCW
190	200	210	220	230	240
LIQLFHKIE	SALRNKMNSQ	VCEKVTNSVS	SELQPYFQTL	CPPCPAPEL	LGGPSVFLFP
250	260	270	280	290	300
PKPKDTLMIS	RTPEVTCVVV	DVSHEDPEVK	FNWYVDCVEV	HNAKTKPREE	QYNSTYRVVS
310	320	330	340	350	360
VLTVLHQDWL	NGKEYCKKVS	NKALPAIEK	TISKAKGQPR	EPQVYTLPPS	RDELTKNQVS
370	380	390	400	410	420
LTCLVKGFYP	SDIAVEWESN	GQPENNYKIT	PPVLDSDGPF	FLYSKLTVDK	SRWQQGNVFS
430	440	450	460	470	480
CSVMHEALHN	HYTQKSLSLS	PGK #			

图 1 BPI₂₃-Fcγ1 融合蛋白氨基酸序列分析

Fig.1 Amino acid sequence of BPI₂₃-Fcγ1 fusion protein

Note: residues of signal peptide are underlined. First residues of BPI₂₃ and Fcγ1 are boxed

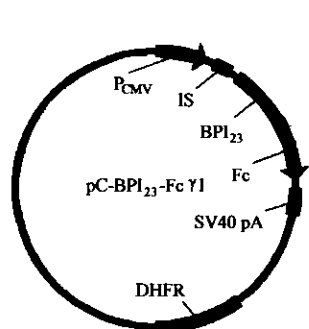


图 2 表达质粒 pC-BPI₂₃-Fc 示意图

Fig.2 Model of Expression plasmid pC-BPI₂₃-Fc

PCMV, CMV promoter; SV40pA, SV40 poly(A) signal; IS, Intron sequence; DHFR, Dihydrofolate reductase gene

2.3 重组 BPI₂₃-Fcγ1 的初步纯化

经 SP-Sepharose 初步纯化, 可去除培养上清中大量血清蛋白, 并使重组蛋白有效浓缩, SDS-PAGE 结果中可见分子量约 47kD 的重组蛋白条带(图 3), Western blot 结果显示该条带可与 HPP 标记羊抗人 IgG Fc 特异结合, 表明此蛋白为 BPI₂₃-Fcγ1 重组蛋白。初步纯化的重组蛋白尚不能精确定量, 从电泳条带粗略估计, 抽提液中重组蛋白含量在 10μg/mL 左右。

2.4 杀菌试验结果

分别用平板计数法或测 OD_{600} 法评价杀菌试验结果, 二者均显示重组融合蛋白具有抗菌活性(图 4, 5)。在加入 1μL 抽提液时, 对 *E. coli* J5 菌生长即产生抑制; 在加入 10μL 时, 抑制率大于 90%, 与加入同体积的 rBPI(10μg/mL)作用接近。

3 讨 论

BPI 在 70 年代末被发现, 人 BPI 基因在 80 年代末被首次克隆^[6]。目前国外对 BPI 晶体结构和杀菌机理已有深入研究^[7]。重组 BPI 及其衍生物作为潜在的革兰氏阴性菌治疗药物的优点在于它源自人体自身蛋白, 并且具有杀菌和中

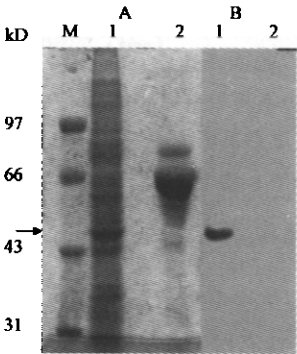


图 3 重组 BPI₂₃-Fc 初步纯化结果

Fig.3 Simple purification of rBPI₂₃-Fc

1. SP-sepharose eluate. The arrow shows position of rBPI₂₃-Fc; 2. Culture supernatant; M. Protein marker

A. SDS-PAGE; B. Western blot

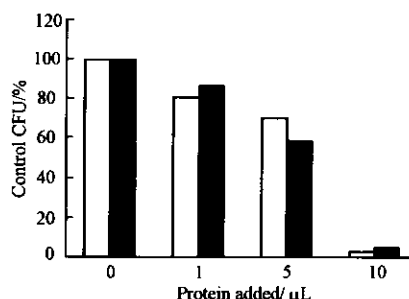
图4 平板计数试验检测 BPI₂₃-Fc 杀菌活性结果

Fig.4 Bactericidal activity of BPI₂₃-Fc determined with a plating assay
□ BPI₂₃-Fc; ■ rBPI (10 μg/mL)

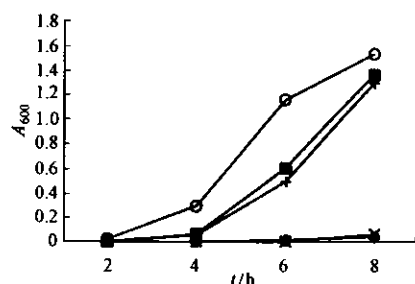
图5 细菌培养试验检测 BPI₂₃-Fc 的杀菌活性结果

Fig.5 Bactericidal activity of BPI₂₃-Fc determined with a broth growth assay

◆ BPI₂₃-Fc (10 μL); ■ BPI₂₃-Fc (5 μL); × rBPI (10 μL); + BPI (5 μL); ○ Control (10 μL)

和内毒素的双重作用。美国 XOMA 公司将 BPI 的衍生物 rBPI₂₃ 用作治疗小儿脑膜炎菌血症已完成三期临床,即将上市,其它临床和临床前研究也正在进行^[8]。

目前 BPI 在应用上存在的问题是体内半衰期短,因此用药剂量较大,影响其临床应用。从基因水平上对 BPI 加以改造是解决这个问题的重要途径。IgG Fc 不仅是决定 IgG 免疫功能的重要部位,而且是 IgG 在体内保持较长半衰期的主要原因。由于 IgG Fc 具有稳定蛋白的作用,它被用来与多种蛋白融合,希望以此增强蛋白稳定性,延长其体内半衰期。此

外 IgG Fc 本身具有的结合补体,调理作用等免疫功能,有可能使融合蛋白功能增强。因此我们设计将 BPI 的活性片段 (BPI₂₃) 和人 IgG1 Fc (Fcγ1) 进行融合表达,希望重组蛋白在保留 BPI₂₃ 生物活性的同时,又具有 Fcγ1 的特性,更适合于临床应用。

为检测重组蛋白的杀菌活性,我们首先进行了初步纯化。由于 BPI₂₃ 是碱性蛋白 (等电点约为 9.8),而 Fcγ1 是中性,所以融合蛋白仍为碱性,我们选用阳离子交换树脂 SP-Sepharose 进行纯化。经过一步纯化,大量的血清蛋白被去除,重组蛋白得到富集。由于融合蛋白带有人 Fcγ1,因此下一步可用抗人 Fcγ1 抗体进行亲和纯化,这部分工作正在进行。

杀菌试验证实了重组融合蛋白具有与 rBPI 同样的杀菌活性,但此蛋白是否同预期一样能提高 BPI₂₃ 的稳定性,还需要实验验证。

本研究成功实现了 BPI₂₃-Fcγ1 融合基因的构建及在 CHO 细胞中的表达,为下一步工作打下了基础。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Elsbach P. The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol*, 1998, 64(1): 14 ~ 18
- [2] Gray P W, Corcoran A E, Eddy R L *et al*. The genes for LBP and BPI are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics*, 1993, 25(1): 188 ~ 190
- [3] Gazzano-Santoro H, Meszatos K, Birr C, *et al*. Competition between rBPI₂₃ and rLBP to LPS and gram-negative bacteria. *Infect Immun*, 1994, 62: 1185 ~ 1191
- [4] Elsbach P, Weiss J. Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defenses. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(1): 45 ~ 49
- [5] Elsbach P, Weiss J, Levy O *et al*. Preliminary evaluation of recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in children with severe meningococcal sepsis. *Lancet*, 1997, 350: 1439 ~ 1443
- [6] Gray P W, Flaggs G, Leong S R *et al*. Cloning of the cDNA of a human neutrophil bactericidal protein. *J Biol Chem*, 1989, 264(16): 9505 ~ 9509
- [7] Beamer L J, Carroll S F, Eisenberg D. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science*, 1997, 276: 1561 ~ 1564
- [8] [Http://www.xoma.com/](http://www.xoma.com/).

Expression of Recombinant BPI₂₃-Fc γ1 Fusion Protein in CHO Cells

XU Jun-Jie* XU Jing TONG Yi-Gang WANG Hai-Tao

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract The fusion gene of BPI₂₃ and human Fcγ1 was obtained by PCR method, and the expression plasmid was constructed to express recombinant BPI₂₃-Fcγ1 fusion protein in CHO cells. After transfection with the plasmid and selection by methotrexate, the cell lines expressing the fusion protein were obtained. The recombinant protein was purified using cation-exchange chromatography and its bioactivity was proved with bactericidal assays.

Key words bactericidal/permeability-increasing protein, BPI₂₃-Fcγ1 fusion protein, expression, CHO cells

Received: January 20, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-10-66948580; Fax: 86-10-66948563; E-mail: xujunjie@sina.com