

中国人促红细胞生成素 cDNA 的克隆 及其在 COS-7 细胞中的表达

韩 峰 吴淑华 薛水星 黄利文 马学军

(中国预防医学科学院病毒学研究所病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘 要 利用 PCR 技术,以中国人促红细胞生成素(EPO)次全基因组为模板,进行了基因修补和重组,克隆出 EPO cDNA 全序列。同时发现中国人 EPO cDNA 与国外的克隆比较有一个核苷酸的差异,导致第 62 位氨基酸是丝氨酸,不是亮氨酸。将人 EPO cDNA 基因插入表达载体 pSV2-dhfr 中的不同克隆位点,构建了 6 种不同的转移载体质粒,即 pSV2-dhfr/F1, pSV2/F2, pSV2-dhfr/F3, pSV2-dhfr/F4, pSV2-dhfr/G1 和 pSV2-dhfr/G3。将它们分别转导入 COS-7 细胞,结果表明 6 种转移载体质粒转染的细胞上清液都有明显的 EPO 活性。人 EPO cDNA 基因转移载体质粒在 COS-7 细胞中的表达水平高于人次全 EPO 基因组转移载体质粒。

关键词 促红细胞生成素, PCR 技术, 基因表达

EPO 是哺乳动物体内调节红系造血的一种主要糖蛋白激素,它通过调控红系祖细胞的增殖、分化和成熟发挥其生物学功能,调节和维持体内外周血中红细胞处于正常生理范围^[1]。

重组 EPO (rhEPO) 具有与天然 EPO 非常相似的结构和生物学作用;Amgen 公司生产的 EPO 产品已于 1989 年 6 月为美国 FDA 批准正式投放市场。现已有 50 多个国家上市 rhEPO 用于临床治疗多种原因引起的红细胞减少症患者,主要包括肾功能衰竭晚期的病人引起的贫血、透析性贫血、AIDS 病人使用 AZT 引起的贫血、各种恶性病变引起的贫血及手术前后使用等,均有明显的疗效,具有巨大的社会效益和经济效益^[2~5]。

本文采用 PCR 技术,以 EPO 次全基因组^[6]为模板,进行了基因修补和重组,克隆出 EPO cDNA 全序列。人 EPO cDNA 基因转移载体质粒在 COS-7 细胞中的表达水平高于人次全 EPO 基因组转移载体质粒。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种和细胞

宿主菌 JM103、质粒 pGEM3zf (+)、pSV2-dhfr 和 pSV2/E2 由本室提供。pSV2/E2 为 1.0kb 的次全 EPO 基因组,插入 pSV2-dhfr 早期启动子下游,去除 dhfr 基因^[6]。COS-7 细胞由北京医科大学赠送。M13mp19、M13mp18 RFDNA 购自美国 New England Biolabs 公司。

国家“863”生物技术领域基金资助。
本文于 1995 年 8 月 14 日收到。

1.2 化学试剂和酶类

限制酶、T4 DNA 连接酶、X-gal、EPO ELISA 盒购自德国 Boehringer Mannheim 公司, Taq DNA 聚合酶, Vent DNA 聚合酶, DNA 序列测定试剂盒为美国 New England Biolabs 公司产品, 超纯低融点琼脂糖、DMEM 培养液购自美国 BRL 公司, 其他主要生化试剂为美国 Sigma 公司产品或国产 AR 级试剂。

1.3 PCR 引物的合成与纯化

采用固相亚磷酸胺法在美国 ABI 公司产 381A 型 DNA 合成仪上合成寡核苷酸引物。在快速液相层析仪 (FPLC) 上用 Mono Q 阴离子交换柱进行纯化。

1.4 PCR 法扩增 DNA

PCR 系统中含: 以中国人促红细胞生成素 (EPO) 次全基因组为模板 (模板 DNA) 4.0 μ g, 上游和下游引物各 100pmol, 4 \times dNTP (各 200nmol), 10 \times 反应缓冲液 10 μ l, 二甲亚砜 4 μ l, Taq DNA 聚合酶 2 单位, 并加去离子灭菌水至反应总体积 100 μ l。循环周期: 首次变性条件 100 $^{\circ}$ C 5min, 最后一次循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

1.5 核苷酸序列测定

采用 Sanger 的末端终止法^[7]。测序工作在美国 ABI 公司 370A 型 DNA 测序仪上进行。

1.6 基因操作的其他技术和方法

质粒 DNA 提取、DNA 琼脂糖凝胶电泳、限制酶消化和基因克隆、以及放射性同位素标记等按文献[8]的方法进行。

1.7 COS-7 细胞培养转染技术

取成片 70%~80% 的 COS-7 细胞, 用 Lipofectin 方法转染^[9]。

1.8 ELISA 法测定 EPO

根据夹心酶联免疫测定法测定 EPO, 按 EPO ELISA 盒介绍的方法进行。

1.9 TF-1 细胞测定 EPO 生物活性

TF-1 细胞是依赖 EPO 或 GM-CSF 或 IL-3 的细胞株^[10]。将用 GM-CSF 纯品维持生长的 TF-1 细胞用培养液 1640 洗 3 次后, 加入 96 孔培养板, 每孔 10⁴ 细胞, 然后加入待测样本; 同时做阳性和阴性对照。每 24h 观察细胞生长情况。

2 结 果

2.1 中国人促红细胞生成素 cDNA 的克隆及序列分析

2.1.1 引物的设计与合成: 用上述中国人促红细胞生成素基因组的一个序列作为模板, 根据其基因结构特点, 设计了三对引物 (图 1), 其目的是补上外显子 1 (EPO 外显子 1 由 4 个氨基酸组成, P1 引物 Xba I 位点 (TCTAGA) 后的 ATGGGGGTG-

P1: XbaI
5'-TATCTAGAAATGGGGGTGCAAGAATGCTCTGCTGGCTGTGGCT-3'

P2:
5'-AGCACAGCCCGTCGTGATATTCTGGGCC-3'

P3:
5'-GAGAATATCACGACGGGCTGTGCTGAAC-3'

P4:
5'-GATGGCTTCTCTCTGGGCTCCAGAGC-3'

P5:
5'-TGGGAGCCCAGAAGAAGCCATCT-3'

P6: BamHI
5'-AAGGATCCTCATCTGTCCCG-3'

图 1 克隆 EPO cDNA 引物设计

Fig. 1 Design of primers for cloning EPO cDNA

CAC 即为外显子 1), 去掉内含子 2 和 4, 以期获得全长 EPO cDNA。

第一对引物: P1 与 P2 扩增外显子 2, 补入外显子 1, 得到 0.16kb 的 A 片段; 第二对引物: P3 与 P4, 扩增外显子 3 和 4, 得到 0.27kb 的 B 片段, 去除了内含子 2; 第三对引物: P5 与 P6 扩增外显子 5, 得到 0.16kb 的 C 片段, 去除了内含子 4。

2.1.2 人 EPO cDNA 的克隆: 每对引物进行的 PCR 反应均重复两次 (PCR 反应示意图见图 2), 均获得相同的扩增产物, 分别经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离纯化。

利用引物 P2 和 B 片段的 5' 端, P3 和 A 片段的 3' 端基因互补, P4 和 C 片段的 5' 端互补, P5 和 B 片段的 3' 端基因互补, 我们将 A 片段和 B 片段进行互补, 退火和 Klenow 酶延伸, 然后用引物 P1 和 P4 进行 PCR 扩增, 得到 AB 片段; 再将 B 片段和 C 片段进行互补, 退火和 Klenow 酶延伸, 然后用 P3 和 P6 引物扩增得到 BC 片段, 上述片段分别用 Klenow 补平, 然后分别克隆到 pGEM3ZF (+) 质粒的 Sma I 位点上, 得到 pGEMQ3 和 pGEMDF 质粒。

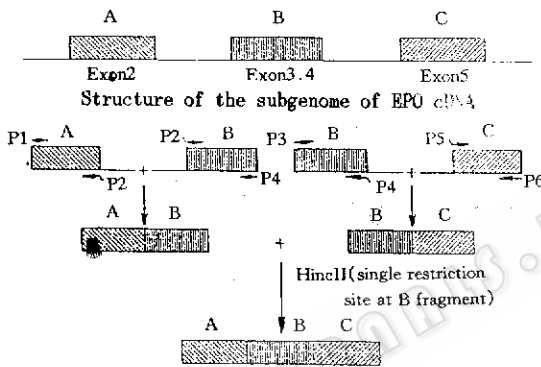


图 2 克隆 EPO cDNA PCR 反应示意图

Fig. 2 Schematic diagram of PCR reaction for cloning EPO cDNA

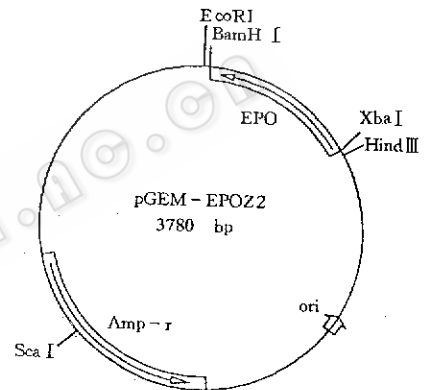


图 3 pGEM EPOZ2 质粒图

Fig. 3 Plasmid pGEM EPOZ2

鉴于在 B 片段中外显子 3 和 4 之间有一 Hinc II 位点, 为得到完整的 EPO cDNA, 先将重组质粒 pGEMQ3 用 Xba I 和 Hinc II 双酶切, 低熔点琼脂糖回收约 0.25kb 大小的 DNA, 重组质粒 pGEMDF 用 BamH I 和 Hinc II 双酶切, 低熔点琼脂糖回收 0.34kb 大小的 DNA, 将二个片段同时插入用 Xba I 和 BamH I 双酶切的 pGEM3ZF (+) 载体中, 连接后转化 JM103, 经鉴定, 编号为 pGEMZ2 的重组质粒含有正确拼接的 EPO cDNA 0.6kb 片段, 包括 EPO 外显子 1, 2, 3, 4 和 5 的完整 EPO cDNA (图 3)。

核苷酸测序表明, 从该 EPO 次全基因组克隆的 cDNA 序列中在编码第 62 位氨基酸的核苷酸中, 不是 T 而是 C, 而使编码的氨基酸由原来的亮氨酸变为丝氨酸。

2.2 中国人促红细胞生成素 cDNA 在 COS-7 细胞中的表达

2.2.1 转移质粒的组建: 采用 pSV2-dhfr 质粒为载体, 该质粒是由 pBR322 和含有 SV40 的 DNA 复制起点 (ori), SV40 早期及晚期启动子和 dhfr 基因组成, 我们将 0.6kb 的 EPO cDNA 分别插入 pSV2-dhfr 质粒的不同部位, 组建成下述 6 种质粒。

(1) pSV2-dhfr/F1 质粒: 先将 0.6kb 的 EPO cDNA 置于 SV40 早期启动子下游, 再将上述片段插入 pSV2-dhfr 质粒的 dhfr 基因的下游。

```

-6          15          30          45
TCTAGA ATG GGG GTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

          60          75          90
CTG TCG CTC CCT CTG GGC CTC CCA GTC CTG GGC GCC CCA CCA CGC CTC ATC TGT
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys

105          120          135          150
GAC AGC CGA GTC CTG GAG AGG TAC CTC TTG GAG GCC AAG GAG GCC GAG AAT ATC
Asp.Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile

          165          180          195          210
ACG ACG GGC TGT GCT GAA CAC TGC AGC TCG AAT GAG AAT ATC ACT GTC CCA GAC
Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Ser Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp

          225          240          255
ACC AAA GTT AAT TCT TAT GCC TGG AAG AGC ATG GAG GTC GGG CAG CAG GCC GTA
Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val

          270          285          300          315
GAA GTC TGG CAG GGC CTG GCC CTG CTG TCG GAA GCT GTC CTG CGG GGC CAG GCC
Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala

          330          345          360
CTG TTG GTC AAC TCT TCC CAG CCG TGG GAG CCC CTG CAG CTG CAT GTG GAT AAA
Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys

          375          390          405          420
GCC GTC AGT GGC CTT CGC AGC CTC ACC ACT CTG CTT CGG GCT CTG GGA GCC CAG
Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln

          435          450          465          480
AAG GAA GCC ATC TCC CCT CCA GAT GCG GCC TCA GCT GCT CCA CTC CGA ACA ATC
Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile

          495          510          525
ACT GCT GAC ACT TTC CGC AAA CTC TTC CGA GTC TAC TCC AAT TTC CTC CGG GGA
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly

          540          555          570          588
AAG CTG AAG CTG TAC ACA GGG GAG GCC TGC AGG ACA GGG GAC AGA TGA GGATCC
Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg *

```

图 4 人 EPO cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence and deduced amino acid of human EPO cDNA

- (2) pSV2-dhfr/G1: 质粒与前者完全相同, 仅 EPO cDNA 离 SV40 启动子更接近。
- (3) pSV2-dhfr/F3 质粒: EPO cDNA 位于 dhfr 基因的前面。
- (4) pSV2-dhfr/G3 质粒: 与 pSV2-dhfr/F3 相同, 只是 EPO cDNA 与 SV40 早期启动子位置更近。
- (5) pSV2/F2 质粒: 将 0.6kb 的 EPO cDNA 插入 pSV2-dhfr 早期启动子下游, 去除 dhfr 基因。
- (6) pSV2-dhfr/F4 质粒: 将 0.6kb 的 EPO cDNA 插入 pSV2-dhfr 质粒晚期启动子下游。

2.2.2 转染 COS 细胞: 将 6 种重组转移质粒分别转染 COS-7 细胞, 收集 48h、72h 上清, 用 Boehringer-Mannheim 公司的 ELISA-EPO 检测试剂进行检测, 结果表明, 上述 6 种质粒转染 COS-7 细胞后, 都有不同程度的表达, 其中以 pSV2/F2 和 pSV2-dhfr/G1 表达量最高, 其次序为: pSV2/F2 > pSV2-dhfr/G1 > pSV2-dhfr/F1 > pSV2-dhfr/F4 > pSV2-

dhfr/G3>pSV2-dhfr/F3.

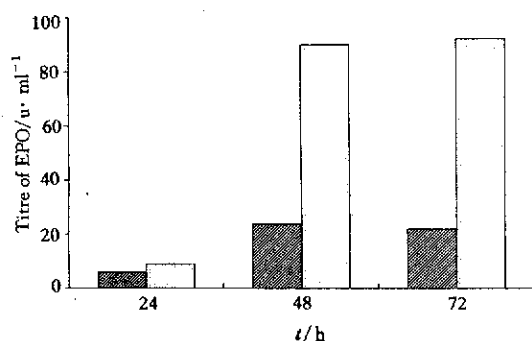


图5 pSV2/E2 和 pSV2/F2 转染 COS-7 细胞表达量的比较 (ELISA 方法检测)

Fig. 5 Comparison with expression EPO by COS-7 cells transfected with plasmid pSV2/E2 and pSV2/F2 (ELISA essay)

□ pSV2/E2, □ pSV2/F2

3 讨 论

1985 年, Lin^[11]等首先从人染色体中

分离到 EPO 的基因组并在 CHO 细胞中获得高效表达, EPO 基因组由 5 个外显子和 4 个内含子组成; 与此同时, Jacobs^[12]等也从人胎肝 cDNA 库中克隆到了 EPO 的 cDNA, 并在 COS 细胞中进行了表达。

1991 年我们用 PCR 技术, 从中国人的胎肝染色体 DNA 中分离了中国人 EPO 次全基因组^[6], 它包括除信号肽中第 2、3、4 位氨基酸外的所有编码区及两个内含子序列, 为了进一步提高表达量, 本文采用 PCR 技术, 以中国人 EPO 次全基因组为模板, 克隆了中国人 EPO cDNA 全序列, 并将其插入 pSV2-dhfr 表达载体的不同克隆位点, 构建了 6 种转移载体质粒, 转染导入 COS-7 细胞, 用 ELISA 法和依赖性细胞系 TF-1 进行测定, 均证明上述表达产物具有明显的 EPO 活性。

将 pSV2/F2 和 pSV2/E2 分别转染 COS-7 细胞, 并对其表达产物进行比较, 结果表明人 EPO cDNA 基因转移载体质粒在 COS-7 细胞中的表达水平高于人次全 EPO 基因组转移载体质粒, 可能由于人次全 EPO 基因组内缺少了外显子 1 和内含子 1 和 3, 使 EPO 基因组不全导致表达水平不高。

参 考 文 献

- [1] Krantz S B, Jacobson L O. Erythropoietin and the Regulation of Erythropoiesis Chicago IL, University of Chicago Press, 1970.
- [2] Rodgers G P, Dover G J, Uyesaka N *et al.* New England J of Med. 1993, 328: 73~80.
- [3] Timonen T T T, Kauma H, European J. Haematology, 1992, 49: 234~238.
- [4] Steegmann J L, Lopez J, Otero M J *et al.* Bone Marrow Transplantation, 1992, 10: 541~546.
- [5] Ohls R K, Wirkus P E, Christensen, R D. Pediatrics, 1992, 90: 678~680.
- [6] 黄利文、韩 峰、郑秋君等. 中国科学, 1994, 24 (2): 178~184.

将人 EPO 次全基因组和人 EPO cDNA 分别插入 pSV2-dhfr 表达质粒的早期启动子下游, 去除 dhfr 基因, 得到 pSV2/E2 和 pSV2/F2 两个转移质粒, 并将二者分别导入 COS-7 细胞, 收集 24、48、72h 细胞上清液, 用 ELISA 法检测活性, 结果表明, 人 EPO cDNA 基因转移载体质粒在 COS-7 细胞中的表达水平明显高于人次全 EPO 基因组转移载体质粒 (图 5)。

利用依赖性细胞系 TF-1 进行测定, 当对照组细胞死亡时, pSV2-dhfr/G1 转染 COS-7 细胞所收获的上清液维持的细胞生长良好, 表明上述表达产物具有明显的 EPO 活性。

- [7] Goldberg M A, Dunning S P, Bunn H F. *Science*, 1988, **242**: 1412~1415.
- [8] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2nd, Ed., Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- [9] 侯云德等. *基因工程原理与方法*, 北京, 人民卫生出版社, 1988.
- [10] Kitamura T, Tojo A, Kuwaki T *et al.* *Blood*, 1989, **73**: 375~380.
- [11] Lin F K, Suggs S, Lin C H *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1985, **82**: 7580~7584.
- [12] Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R *et al.* *Nature (London)*, 1985, **313**: 806~810.

Cloning of a Human Erythropoietin cDNA and Its Expression in COS-7 Cells

Han Feng Wu Shuhua Xue Shuixing Huang Liwen Ma Xuejun

(*National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering*

Institute of Virology, Chinese Academic Preventive Medicine, Beijing 100052)

Abstract The human erythropoietin (EPO) cDNA has been isolated from a human EPO subgenome established from a Chinese fetal liver by PCR method. Isolated EPO cDNA contains full coding sequence for mature erythropoietin gene. It contains five exons (582 base pairs). The human EPO cDNA is characterized by DNA sequencing of twice separately amplified fragments using dideoxy Sanger method. In comparison with foreign erythropoietin gene, the Leucine-62 is replaced with serine. The erythropoietin cDNA has been cloned in the pSV2-dhfr vector at different site to construct six transfection vector: pSV2-dhfr/F₁, pSV2/F₂, pSV2-dhfr/F₃, pSV2-dhfr/F₄, pSV2-dhfr/G₁, pSV2-dhfr/G₃. It is transfected into Cos-7 cells. Its product has erythropoietin activity which was checked by a EPO dependent cell line and ELISA assay. Results indicate that the activities of EPO cDNA coding for Erythropoietin was higher than that of EPO genome.

Key words Erythropoietin, PCR, gene expression