

人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)组合突变体 FrGGI 在 CHO 细胞中的高效表达

赵庆国* 黄培堂 刘士辉

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

(解放军白求恩国际和平医院 石家庄 050082)*

摘 要 为了得到 t-PA 组合突变体 FrGGI 在 CHO 细胞中的高效表达,将表达质粒筛选基因启动子上游的增强子(enhancer)去除,构建了 FrGGI 真核表达质粒 pZLFrGGI。酶切线性化后,采用大剂量 DNA 电击介导法,转染 dhfr 基因缺陷型中国仓鼠卵巢细胞系(CHO-dhfr⁻)。氨甲喋呤(MTX)筛选转染细胞,混合加压,挑选克隆,在 1×10^{-7} mol/L MTX 压力下,获得表达水平达 $1\,500 \sim 2\,500$ IU/ 10^6 细胞·24h 的细胞株。此细胞株表达水平稳定,形态良好,倍增时间约为 36h,且有进一步提高表达水平的潜能,有望发展为工程细胞株。

关键词 组织型纤溶酶原激活剂,突变体,基因表达,增强子

血栓性疾病已成为我国重点防治的疾病之一,每年约有 500 万人需要溶栓治疗。迄今临床上批准使用的溶栓药物中,人组织型纤溶酶原激活剂(Tissue-type plasminogen activator, t-PA)是一种高效特异的生理性溶血栓药物,很受欢迎。但在血中半衰期短(约 5min),活性可被血浆中的纤溶酶原激活剂抑制剂 I (Plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)快速抑制,治疗剂量大,易引发出血副作用,且费用昂贵。为了研制新型溶栓剂,现已获得一株很有希望的组织型纤溶酶原激活剂(Tissue-type plasminogen activator, t-PA)组合突变体 FrGGI^[1]。FrGGI 与野生型 t-PA 相比含有如下突变:1. 为了延长半衰期, F 区与 E 区间的连接序列 His44~Ser50 被置换为纤粘蛋白(fibronectin)的 finger 1 与 finger 2 间的连接序列 GluSerLysProGluAlaGluGlu。2. Asn 117 置换为 Gln 117; Asn 184 置换为 Gln 184, 去除了 K1 和 K2 区的糖基化位点,有利于提高特异性。3. 缺失了 PAI-1 结合位点 Lys296~Gly 302 7 个氨基酸残基,获得了 PAI-1 抗性。对其在 CHO 细胞中的表达产物初步分析表明,在与纤维蛋白亲和力和未下降的同时,半衰期显著延长,获得了对 PAI-1 的抗性。因此 FrGGI 很可能成为优于野生 t-PA 的新型溶栓剂候选株。本工作欲实现 FrGGI 在 CHO 细胞的高效表达,为建立工程细胞株奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株: 含 FrGGI 组合突变体 cDNA 序列的质粒 pLFrGGI, 以及选择基因

国家自然科学基金资助项目。

本文于 1995 年 8 月 17 日收到。

dhfr 启动子上游无 enhancer 的 pMJK-3 质粒, 本室构建。菌株 *E. coli* RRI 由本室保存。

1.1.2 细胞株: 宿主细胞株为 CHO-dhfr⁻, 系二氢叶酸还原酶(Dihydrofolate reductase, dhfr)缺陷型中国仓鼠卵巢细胞。由 Urlaub 和 Chasin 构建^[2], 本室冻存复苏。

1.1.3 主要试剂和仪器: 氨甲喋呤(Methotrexate, MTX)购自 Sigma 公司, 电击仪为 Hoefer 产品。

1.2 方法

1.2.1 CHO 细胞的转染及克隆筛选^[3~5]: 真核细胞表达质粒约 200μg 用 XbaI 完全酶切线性化, 加入等量超声破碎的鲑精 DNA, 溶于 0.8ml PBS(0.1mol/L, pH7.2), 与 2×10⁷ 对数生长期 CHO-dhfr⁻ 细胞混匀, 转入电击槽电击。电击参数为: 电容 760μF、电压 250V、放电时间 1 000ms。混合加压, 渐进提高选择压力。适当时等待克隆出现, 挑选克隆。细胞长满后换培养基, 24h 取培养基测其表达量。

1.2.2 表达产物的测定方法: 采用纤维蛋白琼脂糖平板法(FAPA 法)^[6]。

2 结果

2.1 FrGGI 真核表达质粒 pZLFrGGI 的构建

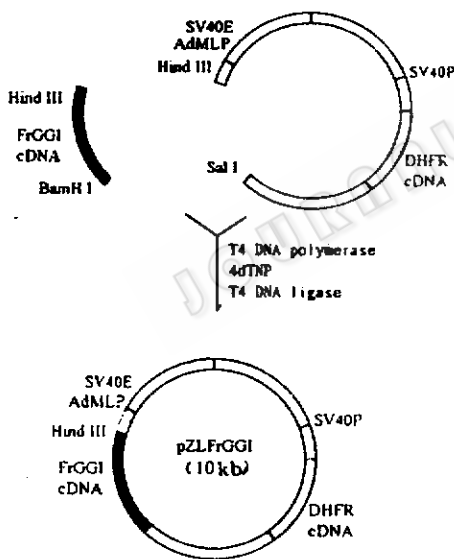


图 1 真核表达质粒 pZLFrGGI 的构建

Fig.1 Construction of the eukaryotic expression plasmid pZLFrGGI

首先验证了 FrGGI cDNA 的正确性, 然后构建了 dhfr 基因上游无 enhancer 的 pZLFrGGI 真核表达质粒。构建路线如图 1 所示。pZLFrGGI 有如下特点: 1. FrGGI 转录由其上游的腺病毒主要晚期启动子(Adenovirus major later promoter, adMLP)和 SV40 增强子(SV40 enhancer, SV40E)控制; 2. 选择标志基因 dhfr 的转录仅由其上游的 SV40 早期启动子(SV40 early promoter, SV40P)控制。采用二氢叶酸还原酶的竞争性抑制剂氨甲喋呤(MTX)选择加压共扩增外源基因。

2.2 FrGGI 在 CHO 细胞中的高效表达

采用电击介导法转染 CHO-dhfr⁻ 细胞系, 混合加压筛选高表达克隆株。其流程图如下:

在 5×10⁻⁸mol/L MTX 压力下, 共挑出 73 个克隆, FAPA 法测所挑克隆中有 45 个具有 t-PA 活性表达。表 1 列出了部分克隆的表达水平。

63 号克隆可望是一高表达株, 但经一个多月的加压, 发现表达水平下降 70%, 有可能是克隆株不纯, 需亚克隆。在 1×10⁻⁷mol/L MTX 浓度下, 逐级稀释细胞培养, 共挑选出 71 个亚克隆, FAPA 法显示所挑克隆中有 20 株有表达, 其它的没有表达。表 2 给出部分亚克隆在 1×10⁻⁷mol/L MTX 浓度下的表达水平。

CHO-dhfr⁻ 细胞 2×10^7 个 + 表达质粒 200 μ g + 鲑精 DNA 200 μ g

电击(电容 760 μ F、电压 250V、放电时间 1 000ms)

完全培养基(细胞恢复 2d 后 1:5 传代)

选择培养基(选择转染细胞 4 ~ 5d)

1×10^{-9} mol/L MTX 加压

约 14d 后克隆出现

胰酶消化混合克隆,逐步提高 MTX 浓度到 2×10^{-8} mol/L

30d

用 5×10^{-8} mol/L MTX 选择培养基逐级稀释传代

14d

挑选单克隆细胞,测表达水平

将高表达阳性克隆株扩展,在 1×10^{-7} mol/L MTX 下再亚克隆

获得高效稳定表达克隆株

表 1 FrGGI 克隆株在 5×10^{-8} mol/L MTX 选择压力下的表达水平

Table 1 Expression level of FrGGI clones in 5×10^{-8} mol/L MTX

Clones	Expression(IU/ 10^6 cells·24h)
No14	~0
No23	~400
No29	~0
No45	~0
No61	~500
No63	~1 000

将亚克隆 63-3 在 1×10^{-7} mol/L 浓度下扩展传代培养 3 个多月,三次不同日期收集 24h 细胞培养液测其表达水平,表达量均在 1 500~2 500IU/ 10^6 cell·24h 范围内。证明表达水平稳定。

3 讨论

以往表达研究中, dhfr 标记基因的 SV40 早期启动子上游含有 SV40 enhancer, dhfr 基因表达良好, MTX 浓度一般要提高到 1×10^{-6} mol/L 才能得到 t-PA 较高水平表达,细胞常会产生抗 MTX 的突变,限制了进一步提高 MTX 浓度来实现外源基因的高效表达。去掉促进 dhfr 基因转录的 enhancer, dhfr 表达能力减弱,在较低 MTX 浓度下,就能迫使 dhfr 与外源基因共扩增,获得较高水平的 t-PA 表达,且提高表达水平的潜能较大。本研究在 1×10^{-7} mol/L MTX 较低浓度下获得了 FrGGI 较高水平的表达,得到了预期目的。

选择标记基因上游的启动子太弱,起始选择转染了质粒 DNA 的细胞就变得相当困难,有更多的可能选择到没有转染 DNA 而对 MTX 有耐性的突变细胞株。去掉标记基因启动子上游 enhancer 后,启动子变弱,第一次挑出的克隆有近 40% (28/73) 没有 t-PA 表达,可能与此有关。

表 2 63 号亚克隆株在 1×10^{-7} mol/L MTX 压力下 FrGGI 的表达水平
 Table 2 FrGGI expression level of № 63 sub-clones in 1×10^{-7} mol/L MTX

Clones	63-1	63-2	63-3	63-4	63-5	63-6	63-7	63-8
Expression	0	2000	2500	0	0	0	2200	0

63 号克隆可能混有少量未转染的 MTX 抗性细胞, 由于它生长明显优于转染细胞, 经过升压、传代后, 它的细胞数迅速占多数, 因此克隆表达水平下降很快(一个月内降了 70%)。经亚克隆主要得到两类细胞株: 不表达 t-PA 的 MTX 的抗性细胞系(占 73%)和高表达株细胞系。

63-3 细胞株表达水平稳定, 形态良好, 倍增时间为 36h, 且有进一步提高表达水平的潜能, 有望发展为工程细胞株。

参 考 文 献

- [1] 刘士辉, 黄培堂, 赵庆国等. 生物技术通讯, 1995, 6(1): 6~10.
- [2] Urlaub G, Chasin L. Proc Natl Acad Sci USA. 1980, 77: 4216~4220.
- [3] Chy G. Nucleic Acids Research. 1987, 15(3): 1311.
- [4] Potter H, Weir L, Leder P. Proc Natl Acad Sci USA. 1984, 81: 7161~7165.
- [5] Barsoum J. DNA and Biology. 1990, 9(4): 293~300.
- [6] Nabel R. Human Gene Therapy. 1990, 1: 327.

High-level Expression of a Combination Mutant (FrGGI) of Human Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA) in Chinese Hamster Ovary Cells

Zhao Qingguo* Huang Peitang Liu Shihui

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

(International peace hospital of PLA, Shijiazhuang 050082)*

Abstract pZLFrGGI, the eukaryotic expression plasmid of t-PA combination mutant FrGGI, was constructed, in which the transcription of foreign gene was controlled by adenovirus major later promoter (AdMLP) and SV40 enhancer and the transcription of dhfr selective gene was controlled only by SV40 promoter. Then the large amount of linearized pZLFrGGI was transfected into CHO-dhfr⁻ cells by electroporation. The expression clones appeared after two weeks of selection in selective medium plus MTX. Then mixed the clones and continued to co-amplify the foreign gene in the selective medium with stepwise increasing concentrations of MTX to 1×10^{-7} mol/L. After two round of cloning of the expression cells, a high-level, stable expression cell line was obtained with expression level reached to $1\,500 \sim 2\,500 \text{ IU}/10^6 \text{ cells} \cdot 24 \text{ h}$. The biological properties indicated this cell line may be used as a candidate for engineering purpose.

Key words Tissue-type plasminogen activator, mutant, enhancer, gene expression