

重组人干细胞因子在昆虫细胞中的高效表达

张冬梅 秦浚川* 臧宇辉 朱 洁

(南京大学医药生物技术国家重点实验室 南京 210093)

沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所 北京 100850)

摘 要:含信号肽的可溶性人干细胞因子(hSCF) cDNA 基因重组于杆状病毒转移载体 pVL941 中,重组转移载体 pVL941-SCF 与野生型苜蓿夜蛾核型多角体病毒(AcNPV)DNA 共转染草地夜蛾细胞 Sf9 后,通过体内同源重组构建了重组病毒 AcNPV-SCF。Southern 杂交表明重组病毒基因组中含有 hSCF 基因片段。重组病毒感染单层 Sf9 细胞后,表达产物分泌到胞外培养液中。用 MTT 比色法和 TF-1 细胞株测定表达产物与 IL-3 的协同效应,测得感染重组病毒的培养细胞第三天表达量为 1970 units/mL 培养液。Western-blotting 分析可见分子量为 18×10^3 、 20×10^3 和 22×10^3 三条带。

关键词:人干细胞因子, AcNPV, 昆虫细胞表达

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2000) 01-0044-49

SCF 是近年发现的作用于造血早期的多功能细胞因子,它能刺激造血干细胞、T、B 淋巴细胞前体的增殖,刺激肥大细胞的增殖和分化,促进巨噬细胞的成熟,刺激黑色素细胞的增殖,并在生殖细胞的形成过程中起某种作用。目前对 SCF 的临床前期研究表明,SCF 在治疗各种贫血、恢复放疗化疗后的骨髓造血机能及造血干细胞的体外扩增等方面具有广泛的应用前景。SCF 与多种细胞因子表现出明显的协同作用。SCF 与 M-CSF、IL-3、GM-CSF 或 G-CSF 协同作用刺激巨噬细胞和粒细胞的增殖,与 TPO 协同作用刺激巨核细胞的增殖,与 EPO 协同作用刺激红细胞的增殖,此外,SCF 还能与 IL-1、IL-6 等细胞因子协同作用^[1]。人 SCF 基因曾在 COS 细胞^[2,3], CHO 细胞^[4]和大肠杆菌^[5]中得到表达。以杆状病毒为载体、昆虫细胞或虫体为宿主的基因工程由于具有独特的优点和巨大的发展潜力日益被各国学者所重视。本文首次报道了能表达 hSCF 基因的重组杆状病毒 AcNPV-SCF 的构建以及在 Sf9 培养细胞中的表达。本文采用 MTT 比色法^[6]和 TF-1 细胞株测定 SCF 与人白介素 3(IL-3)的协同效应,作为测定 SCF 生物活性的定量指标。

1 材料和方法

1.1 细胞株、载体与毒株

TF-1 细胞株由军事医学科学院基础医学研究所提供;AcNPV 转移载体 pVL941 是 Invitrogen 产品;野生型 AcNPV 多角体由中山大学昆虫研究所提供;Sf9 细胞由南京大学

* 联系与负责作者

作者简介:张冬梅(1972-),女,浙江镇海人,硕士,南京大学生物化学系教师

收稿日期: 1998-03-23, **修回日期:** 1998-10-15

徐贤秀教授提供。

1.2 生化试剂

限制性内切酶及工具酶均购自 New England Biolabs 公司; [α - 32 P-dATP] 购自 DuPont 公司; TNM-FH 昆虫细胞培养基购自 Sigma 公司; RPMI1640 培养基、共转染介质脂质体购自 GIBCO BRL 公司; MTT 华美公司进口分装, 配制成溶液, 浓度为 5mg/mL。SCF 单抗由军事医学科学院基础医学研究所制备, 用大肠杆菌 (*E. coli*) 表达产物作抗原; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 二抗为 Watson BioMedicals, Inc 产品; rhIL-3 精品由南京医科大学姚坤教授惠赠。

1.3 重组转移载体 pVL941-SCF 的构建

用 RT-PCR 的方法合成的可溶性人 SCF cDNA 基因, 包含 25 个氨基酸的信号肽区和 165 个氨基酸的编码区及双终止密码, 见参考文献[3]。合成的 cDNA 片段克隆于 pUC18 中得到 pUC18-SCF(I)。重组转移载体 pVL941-SCF 的构建按分子克隆实验手册^[7]进行。

1.4 共转染和重组病毒的纯化

共转染的方法参照文献[8]的方法。重组病毒筛选参照文献[9]。用 Southern blot 鉴别重组病毒^[7], 放射自显影观察杂交结果。

1.5 重组病毒在 Sf9 细胞中的表达

以 MOI = 10 PFU/cell 剂量感染培养的单层 Sf9 细胞, 在含 10% 小牛血清的 TNM-FH 培养基中 27℃ 培养, 不同时间离心收集细胞培养液检测活性, 作出表达时间曲线。

1.6 生物活性测定

参考文献[6]的方法。将培养在 10% 小牛血清(含 2ng/mL IL-3)的 1640 培养基中的 TF-1 细胞取出, 用 1640 培养基洗 3 次, 用含 20% 小牛血清的 1640 培养基配成密度为 4×10^5 个/mL 的悬液备用。用 1640 培养基适当稀释的待测样品在 96 孔板上做 2 倍的系列稀释, 每孔保留 50 μ L, 同时做空白对照(无样品, 只有 50 μ L 1650 培养基), 然后各孔加入 50 μ L 细胞悬液(含 0.25ng/mL IL-3), 至终体积为 100 μ L/孔。37℃、5% CO₂ 培养 48h 后各孔加 MTT 溶液 10 μ L, 继续培养 4~6h, 加入 SDS 溶液(10% SDS-0.01mol/L HCl) 100 μ L, 37℃、5% CO₂ 保温过夜。在 595nm 处比色。作出量效曲线, 按稀释倍数计算 SCF 活性。

1.7 Western-blotting 分析

参照分子克隆手册方法。分离胶浓度为 12%。

2 实验结果

2.1 重组转移载体 pVL941-SCF 的构建

pUC18-SCF(I) 中 SCF 基因的 5'-端有 Bgl II 切点, 3'-端有 Bam HI 切点, 用 Bgl II、Bam HI 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离 SCF 基因片段, 再经 Klenow 补平, 克隆入 pUC18 的 Sma I 位点, 用 EcoR I 酶解分析筛选出 SCF 基因 5'端带 Bam HI 位点、3'端带 Kpn I 位点的重组质粒 pUC18-SCF(II)。pUC18-SCF(II) 和 pVL941 质粒分别经 Bam HI 和 Kpn I 双酶切, 连接后使 SCF 定向地克隆在多角体启动子之后, 得到 SCF 基因片段编码

方向与启动子方向一致的重组转移载体 pVL941-SCF(图 1)。

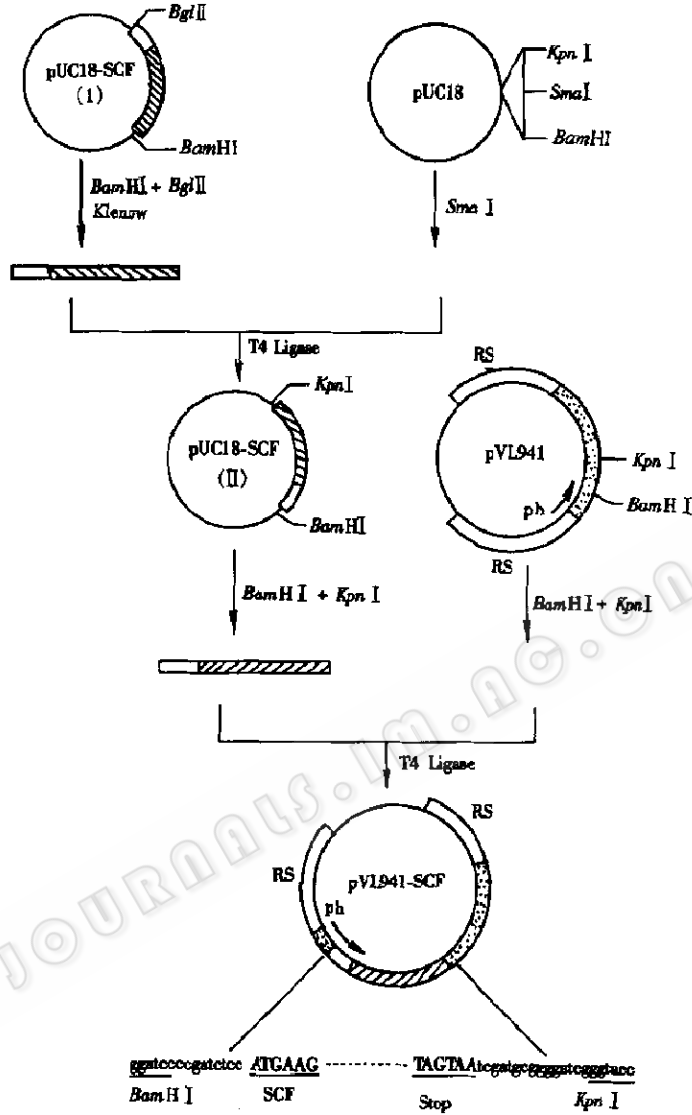


图 1 重组转移载体 pVL941-SCF 的构建

Fig.1 Construction of recombinant transfer vector pVL941-SCF

□: SCF gene signal peptide sequence;

▨: SCF gene encoding sequence;

→: Polyhedrin gene promoter.

2.2 重组病毒 AcNPV-SCF 的纯化和鉴定

pVL941-SCF 与野生型 AcNPV DNA 经 Lipofectin 介导共转染 Sf9 细胞, 用 96 孔板有限稀释法并结合放射性同位素杂交筛选 4 轮后得到 6 株重组病毒, 测活比较筛选出表达量最高并能稳定传代的一株。分别收集感染 AcNPV-SCF 与野生型病毒的 Sf9 细胞, 提取病毒 DNA, 经 BamHI 和 KpnI 双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳后用 α - 32 P-dATP 标记的 SCF 基因片段探针进行 Southern 印迹杂交分析, 结果证实 AcNPV-SCF DNA 中存在大约 570bp 左右的 hSCF 基因片段(图 2)。

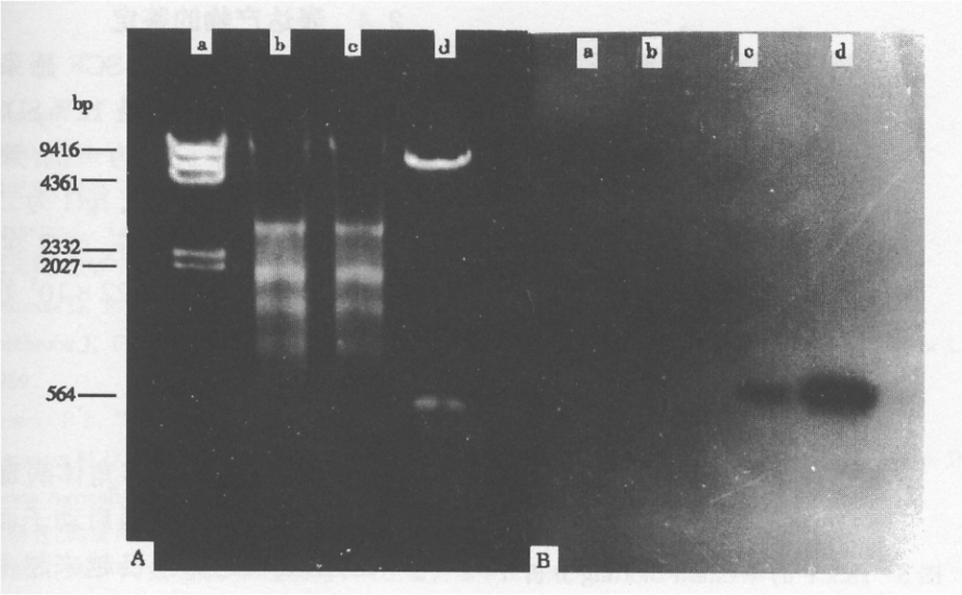


图 2 重组病毒 DNA 的 Southern 印迹杂交分析
Fig. 2 Southern-hybridization analysis of recombinant viral DNA
A. Restriction pattern; B. Southern-hybridization with SCF probe.
a. λ DNA/*Hind* III marker; b. Wild type viral DNA/*Bam* HI + *Kpn* I;
c. Recombinant viral DNA/*Bam* HI + *Kpn* I; d. pVL941-SCF/*Bam* HI + *Kpn* I.

2.3 rhSCF 的表达的时间曲线

重组病毒 AcNPV-SCF 感染 Sf9 细胞后不同时间的培养上清用 MTT 比色法和 TF-1 细胞测定 SCF 生物活性, 分别作量效曲线(图 3)。按通用方法定义最大光密度值 50% (实质即为 SCF 对 IL-3 的最大协同作用的 50%) 所对应的 SCF 的量(即 ED_{50})为 1 个单位(u)。测定重组病毒感染 Sf9 细胞后不同天数细胞培养液中 SCF 的表达水平, 作出时间曲线(图 4)。可以看出, 病毒感染 Sf9 细胞后 72h 表达量最高, 达到 1970u/mL(10^6 细胞)。此后因细胞裂解释放的蛋白酶可使 SCF 降解, 导致活性明显下降。

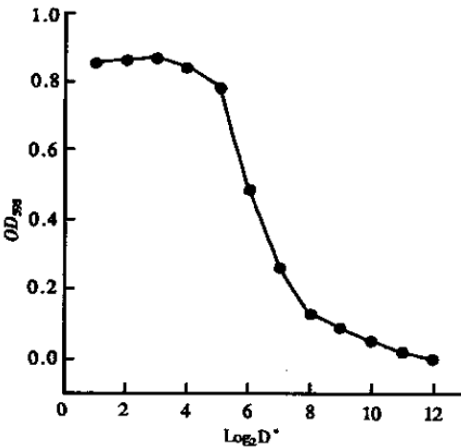


图 3 重组病毒感染 Sf9 细胞的量效曲线
Fig. 3 Relationship curve of Sf9 cells infected with recombinant viruses
* DF: Dilution Factor.

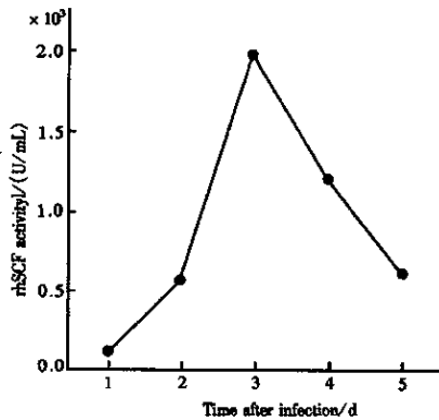


图 4 rhSCF 在 Sf9 细胞中表达的时间曲线
Fig. 4 Time course of the production of rhSCF in Sf9 cells

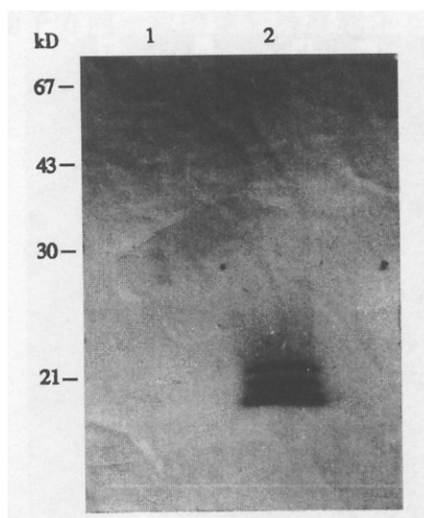


图 5 rhSCF 的 Western-Blotting 分析

Fig. 5 Analysis of rhSCF by WEstern-blot

1. Supernatant of Sf9 cells infected with wild-type AcNPV;
2. Supernatant of Sf9 cells infected with recombinant AcNPV-SCF.

统,能有效地进行蛋白质翻译后的加工,如转运、分泌、糖基化、脂酰化;表达产物的抗原性、酶活力等生物学活性与天然蛋白十分相似等。而 *E. coli* 表达体系的产物大多以包涵体形式存在,需要经过体外变复性后才能得到有生物活性的产物,且产物活性高低取决于变复性条件。美国 Micro Gene Sys 公司用该系统试制的艾滋病病毒疫苗于 1987 年曾获准进入临床试用。利用该系统已成功地表达了 α -干扰素、IL-3、M-CSF 等基因。本文首次应用杆状病毒 AcNPV 为载体在 Sf9 细胞中成功高效地表达了 hSCF。重组病毒感染 Sf9 细胞 72 小时后低速离心收集 Sf9 细胞,经三次冻融破碎细胞后的细胞抽提液中测出 SCF 活性低于 100 单位/mL(10^6 细胞),证明表达的 SCF90% 以上分泌到胞外培养液中,有利于分离纯化,为大量生产重组人 SCF 提供了一个新的途径。

SCF 是一种糖蛋白。hSCF 具有 4 个潜在的 N-糖基化位点: Asn⁶⁵、Asn⁷²、Asn⁹³ 和 Asn¹²⁰。实验证明, Asn⁷² 和 Asn⁹³ 不发生糖基化,只有 Asn⁶⁵ 和 Asn¹²⁰ 发生糖基化^[4]。因此推测昆虫细胞表达的 hSCF 可能存在 3 种 N-糖基化程度不同的产物: 0-N、1-N 和 2-N 糖基化。在 Sf9 细胞中表达的 hSCF 经 Western-blotting 分析显示出 3 条带,证实了我们的推测。这种情况类似于昆虫细胞中表达的 rhGM-CSF^[10] 和家蚕细胞中表达的 rhGM-CSF^[11]。

我们表达的 SCF 生物活性的测定采用的是 MTT 比色法。该方法比传统的骨髓细胞集落法有很多优点: (1) 操作简便; (2) 误差小, 约为 5% 左右, 骨髓细胞集落法则达 30% 左右; (3) 周期短, 前后只需 3d, 而骨髓细胞集落法则需 7 ~ 10d。本文提供了一个 SCF 定量的简便方法, 利用 SCF 与 IL-3 的协同作用, 以 TF-1 作为 IL-3 的依赖细胞建立了检测 SCF 活性的 MTT 法, 灵敏度和重复性均有明显提高。

2.4 表达产物的鉴定

重病毒 AcNPV-SCF 感染 Sf9 细胞后的细胞培养液经 12% SDS-PAGE 后, 用 hSCF 单抗作为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western-blotting 分析, 可见在分子量 18×10^3 、 20×10^3 和 22×10^3 处有 3 条带(图 5)。

3 讨 论

利用昆虫核型多角体病毒(NPV)多角体蛋白基因的强启动子而建立起来的昆虫表达体系已越来越多为人们所重视。该系统具有很多优于其它表达体系的特点, 如表达量高; 具有真核生物蛋白质翻译后修饰所必需的酶系

参 考 文 献

- [1] Broudy V C. *Blood*, 1997, **90**:1345~1364.
- [2] Martin F H, Suggs S V, Langley K E, *et al.* *Cell*, 1990, **63**:203~211.
- [3] 朱元晓, 赖春宁, 沈倍奋, 等. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20**(2):127~128
- [4] Arakawa T, Langley K E, Kameyama K, *et al.* *Biochemistry*, 1992, **203**:53~57.
- [5] 朱元晓, 赖春宁, 沈倍奋, 等. 生物化学与生物物理进展, 1993, **20**(5):373~374.
- [6] Francois D, Rita L. *J Immunol Methods*, 1986, **89**:271~277.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
- [8] Felgner P L, Thomas R G, Hoim M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**:7413~7417.
- [9] Summers M D, Smith G E. *A Manual of Method for Baculovirus Vectors and Insect Cell Culture Procedures*. Texas Agricultural Experiment Station Bulletin, No.1555, 1987, 42.
- [10] 施晓青, 秦浚川, 朱 洁, 等. 生物化学与生物物理学报, 1995, **27**(5):559~564.
- [11] 秦浚川, 邱 平, 施晓青, 等. 生物化学与生物物理学报, 1995, **27**(4):459~463.

EXPRESSION OF RECOMBINANT HUMAN STEM CELL FACTOR IN INSECT CELLS

Zhang Dongmei Qin Junchuan Zang Yuhui Zhu Jie

(*Department of Biochemistry and State Key Laboratory of Pharmaceutical
Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093*)

Shen Beifen

(*National Institute of Military Medical Science, Beijing 100850*)

Abstract: The cDNA of human stem cell factor(hSCF) containing signal sequence was cloned into the transfer vector pVL941 of AcNPV to construct a recombinant transfer vector pVL941-SCF. Sf9 cells were cotransfected with wild type viral DNA and pVL914-SCF to produce the recombinant virus AcNPV-SCF by homologous recombination in cell. Southern-hybridization analysis suggested that the recombinant viral DNA contained hSCF cDNA fragment. The Sf9 cells infected with the recombinant baculovirus AcNPV-SCF expressed biologically active rhSCF which was secreted into the cell culture. The synergistic activities of SCF in conjunction with human interleukin-3(hIL-3) was measured by MTT colorimetric method and TF-1 cell line. The expression level of Sf9 cells reached its highest at about 1970 units/ml in the 3rd day after the infection with AcNPV-SCF. Three SCF bands with molecular masses of 18×10^3 , 20×10^3 and 22×10^3 were detected by immunoblotting.

Key words: Human stem cell factor, AcNPV, Expression in insect cell