

人尿激酶原cDNA在中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)中高效表达研究

程度胜 俞炜源 韩素文 李秀珍 李风知
胡宝成 方继明 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

通过构建高效表达载体,改进转染方法,与二氢叶酸还原酶(dhfr)基因共扩增等手段在CHO细胞内高效表达了人尿激酶原(Pro-UK)cDNA。首先将pro-UK cDNA插入到SR α 启动子的下游,构建成表达质粒pMG10102,在COS-7细胞内进行暂时性表达,结果表明此启动子的表达水平比SV40早期启动子高约5倍。然后将质粒pMG10102和pSV2-dhfr线性化后用磷酸钙共沉淀法转染CHO-dhfr^r细胞,经一系列筛选后获得20个能表达pro-UK的细胞克隆,纤维蛋白溶解平板法(FAPA)测定表达水平为12.5—100IU/10⁶ cells/d。再经MTX加压共扩增,得到9株高表达细胞系,其中最高的表达水平达到400—500IU/10⁶ cells/d。经2—3个月连续传代,表达水平未下降,表明细胞株是稳定的。Western Blot分析证明细胞分泌的重组pro-UK具有与天然pro-UK相同的分子量,而且培养液中不加蛋白酶抑制剂时,分泌的重组UK大部分为单链(60%以上)。

关键词 人尿激酶原基因cDNA; CHO细胞; 基因共扩增; 高效表达

尿激酶原(Pro-UK)亦称单链尿激酶,它是一种由411个氨基酸残基(Aa)组成,分子量为52 kDa的糖蛋白,经纤溶酶(plasmin)作用变成尿激酶(又称双链尿激酶)。它与尿激酶不同,能特异性地作用于血栓,激活溶血系统,临床应用时不易引起全身性出血,是一种很有希望的新型溶血栓制剂,但自然界中含量甚微,难于大量制备。因而通过基因工程手段来获得大量的尿激酶原是一有希望的途径。1985年Genetech公司的Holmes, W.E.等首次公布了Pro-UK cDNA全序列^[1],随后一些公司和实验室陆续报道了有关Pro-UK cDNA的克隆和表达^[2-6]。1989年,本实验室方继明同志等在国内首次获得Pro-UK全长cDNA克隆^[7],并在CHO细胞中表达了有生物活性的尿激酶原,表达量为50—60IU/10⁶ cells/48 h^[8],

但这一表达水平与中试生产要求尚有差距。为了获得高水平表达Pro-UK的细胞株,本实验室通过构建高效表达质粒,改进转染方法,与二氢叶酸还原酶基因共扩增等手段,获得了高效稳定表达Pro-UK的细胞株。

材料和方法

(一) 材料

1. 人尿激酶原全长cDNA: 由本课题组克隆^[7]。

2. 菌种和质粒: RRI受体菌, pCDS和pSV₂-ProUK质粒由本室保存。pSV₂-dhfr质粒由中国预防医学科学院病毒所任贵方教授惠赠。

本文于1992年4月22日收到。

本工作为国家生物高技术“863”资助项目。

3. 细胞和培养基: CHO-dhfr⁻细胞由本室保存; 生长培养基是 DMEM, 10%小牛血清, 青霉素和链霉素各 100u/ml, 卡那霉素 50u/ml, L-脯氨酸 0.1 mmol/L, L-甘氨酸 0.1mmol/L, 次黄嘌呤 0.03mmol/L, 胸腺嘧啶 0.03mmol/L, 用 NaHCO₃ 调 pH 至 7.0—7.4; 选择培养基是 α -MEM 培养基, 10% 的透析血清, 4 mmol/L 谷氨酰胺。无血清培养基是不加血清的生长培养基。

4. 工具酶和生化试剂: 各种工具酶分别购自 Boehringer Mannheim 公司、华美生物工程公司、南德公司、医学科学院基础所和 Biolabs 公司; [α -³²P]dATP (比活 600 Ci/mmol) 购自 Amersham 公司; DMEM 和 α -MEM 培养基购自 GIBCO 公司; 国产或进口试剂均为分析纯。

5. 标准尿激酶、凝血酶和纤维蛋白原: 标准尿激酶购自卫生部生物制品检定所和日本 (Green Cross, Osaka), 凝血酶和纤维蛋白原购自天津生化制品厂; 纤溶酶购自 Sigma 公司。

6. 抗血清和 IgG、酶标 SPA: 兔抗人尿激酶血清和 IgG 为本室制备。辣根酶标记的 SPA 购自兰州生物制品所。

(二) 方法

1. 质粒 DNA 的提取: 采用煮沸裂解法 (少量制备) 和温和裂解法^[9,10]。

2. 质粒 DNA 的酶解、片段回收、补平、连结、转化和杂交筛选及酶切鉴定: 参照文献[9-11]中的方法进行。

3. DNA 探针制备: 按 Random primer^[12]法制备。

4. CHO-dhfr⁻细胞和 COS-7 细胞的转染: 按参考文献[13]磷酸钙共沉淀法和电穿孔法^[14]操作。

5. U-PA 活性检测: ELISA 法按文献[15]的方法进行; 纤维蛋白溶解平板法

(FAPA) 测定按文献[15]的方法进行。

6 Western Blot 试验: 首先将样品经 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离, 再经半干法转移到硝酸纤维素膜上, 用含 3% BSA 的 Tris-HCl, pH 7.4 封闭 1 h, 加兔抗 UK 血清 (1:100), 室温反应 5—6 h, 0.01 mol/L PBS-Tween 20 洗 4 min, 加酶标 SPA (1:20), 室温反应 1 h, 二氨基联苯胺显色, 2% 的硫酸终止反应。

实验结果

(一) Pro-UK 表达质粒 pMG10102 的构建和在 COS-7 细胞中的暂时性表达

首先从 pMmUK 质粒中分离 Pro-UK 全长 cDNA 片段 (HindIII-HincII), 补平后插入到表达载体 pCDS 中的 SR α 启动子 (SV 40 早期启动子 + HTLV 的部分 LTR) 下游, 获得表达质粒 pMG 10102 (见图 1)。然后通过电击法转染 COS-7 细

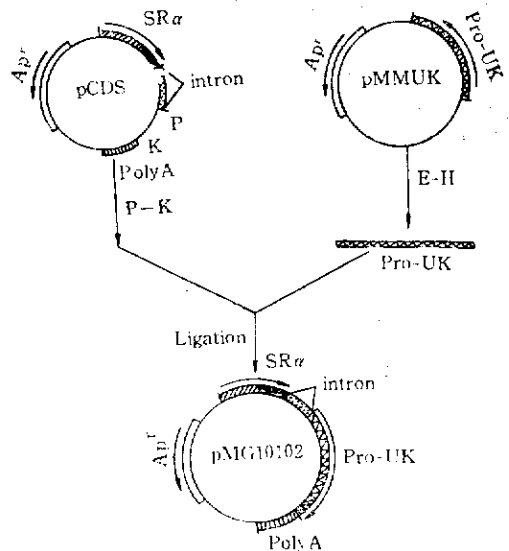


图 1 表达质粒 pMG10102 的构建

Fig. 1 Construction of expression plasmid pMG10102

P: PstI, K: KpnI E: EcoRV, H: HincII, SR α : SR α promoter

胞,进行暂时性表达,并同pSV₂-ProUK质粒(SV 40早期启动子控制)进行比较,结果表明(见表1)。质粒pMG10102能有

效地表达有生物活性的Pro-UK,表达水平比pSV₂-Pro-UK质粒高约5倍。

(二) Pro-UK在CHO细胞中高效表达

表1 质粒pSV₂-ProUK与pMG10102在COS-7细胞中表达Pro-UK水平比较

Table 1 Comparison of expression levels of Pro-UK between plasmid pSV₂-ProUK and pMG 10102 in COS-7 cells

Plasmid	DNA(μg)	Cell	Media(ml)	Pro-UK expression level IU/ml
pSV ₂ -ProUK	20	5 × 10 ⁶	5	20
pMG10102	20	5 × 10 ⁶	5	100

用限制酶HindIII线性化的质粒pMG10102 30 μg, EcoRI线性化的质粒pSV₂-dhfr 3μg, 鲑鱼精DNA(超声破碎成500—1000 bp) 10 μg, 磷酸钙共沉淀法转染CHO-dhfr-细胞, 48 h后按1:5接种, 加选择培养液培养, 一周后培养液中加入10 nmol/L的氨甲喋呤(MTX)进行筛选。4周后挑选克隆, 共挑出了100多个dhfr基因阳性转化灶, 其中20个能较高地表达Pro-UK, 表达水平为12.5—100IU/10⁶ cells/d(见表2)。

达400—500IU/10⁶ cell/d。在加压过程中, 不同转化灶对MTX的抗性不等, Pro-UK的表达水平也不一致, 最高的比最低的差6倍多。这可能是由于dhfr和Pro-UK cDNA整合到CHO细胞染色体中的相对位置不同和整合的拷贝数不等所致。

表2 不同细胞克隆表达Pro-UK水平比较

Table 2 Comparison of expression levels of Pro-UK among different cell clones

Pro-UK expression level (IU/10 ⁶ cells/d)	Cell clones
12.5	CD-26
18.5	CD-27
	CD-5, CD-9, CD-10
25	CD-12, CD-13, CD-14,
	CD-47, CD-51,
37.5	CD-2
50	CD-42, CD-53
62.5	CD-1
80	CD-41
85	CD-26
90	CD-28
100	CD-3, CD-4, CD-44

表3 MTX加压共扩增后不同细胞株表达Pro-UK的情况

Table 3 Amounts of Pro-UK expressed by different cell clones after coamplification under MTX selective pressure

Cell lines	MTX conc. (mol/L)	Pro-UK expression level(IU/10 ⁶ cells/d)
CD-3-1	10 ⁻⁵	300—350
CD-3-2	10 ⁻⁵	400—500
CD-4	10 ⁻⁶	250—350
CD-5	10 ⁻⁶	200
CD-2	10 ⁻⁶	170
CD-4	10 ⁻⁶	75
CD-13	10 ⁻⁷	100
CD-12	2 × 10 ⁻⁶	150—200
CD-44	10 ⁻⁶	250—300

(三) 表达产物的鉴定

为了进一步提高Pro-UK的表达水平, 在培养液中逐渐增加MTX的浓度加压共扩增, 结果获得了9株能高效表达Pro-UK的细胞株, 表达水平(见表3)比加压前提高了3—10倍, 最高表达水平可

对克隆细胞表达的rUK特性进行了溶纤活性、抗原性、分子量和单双链比例等一系列测定。FAPA试验结果(见图2)显示rUK具有溶纤活性且能被兔抗UK血清中和。ELISA试验结果(图3)表明rUK具有与天然UK相同的抗原性。Western Blot结果(图4)表明rUK在非还原条件下为一条带与日本标准UK的大带相同为52

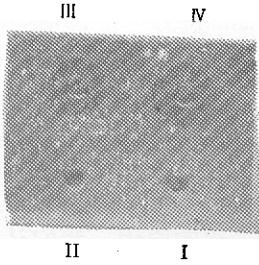


图2 FAPA法测定rUK的溶纤活性

Fig. 2 Assaying for fibrinolysis activity of rUK by FAPA method

- I. Standard UK + anti-UK serum
 II. rUK + anti-UK serum
 III. Standard UK
 IV. rUK

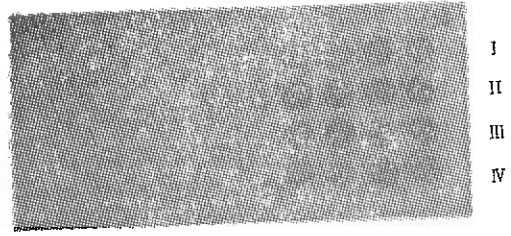


图3 ELISA检测rUK的抗原性

Fig. 3 Assaying for antigenicity of rUK by ELISA

- I. standard UK,
 II. rUK expressed by CD-3-1
 III. rUK expressed by CD-3-2
 IV. rUK expressed by CD-4

kDa, 在还原条件下为三条带, 主带为52 kDa, 次带与日本UK相同分别为32kDa和20 kDa; 这说明rUK与天然UK具有相同的分子量, 而且绝大多数为单链UK (rscUK)。为了进一步证实单双链比, 用S 2444底物法测定了rUK经纤溶酶处理前后的溶酰胺水解活性, 结果发现: 用纤溶酶处理后比处理前溶酰胺水解活性提高一倍多, 说明单链仅占50—60%。

(四) 细胞稳定性试验

经MTX 共扩增获得的高效表达异源基因的克隆细胞经长时间传代, 扩大培养冻存或除去MTX 等处理, 往往不稳定, 使表达水平下降。为此, 对CD-3-1和CD-3-2两株细胞的稳定性进行了观察。一方面将两株细胞经液氮冻存两个月后复苏培养, 测定其表达水平; 另一方面将两株细胞除去MTX或加10 μmol/L MTX 同时传代两个月, 比较其表达水平。结果(表4)表明: 冻存前、后MTX的去留, 以及两个月的传代培养, 表达水平均无显著变化, 说明这两株细胞是稳定的, Pro-UK cDNA已稳定地整合到CHO细胞染色体的均质区。

(五) CD-3-1细胞分泌Pro-UK的动态

我们对CD-3-1细胞分泌Pro-UK的动态进行了观察, 当CD-3-1长满单层后, 换成含2%小牛血清的α-MEM 维持液, 37℃, 每24 h换一次液, 连续培养6天, 分别测定每天细胞分泌Pro-UK的含

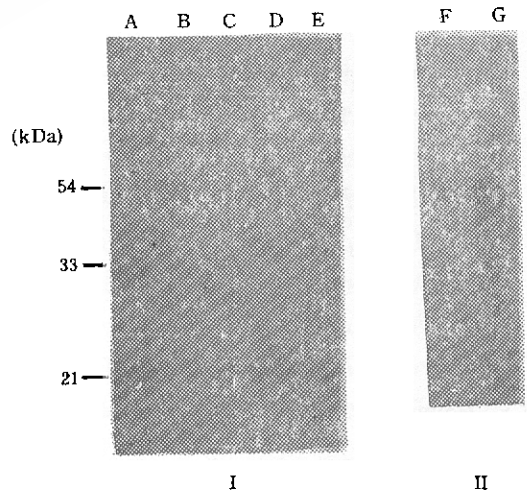


图4 Western Blot分析结果

Fig. 4 The results of Western Blot analysis

- I: Electrophoresis under reducing condition
 A. UK from Japan; B and C. rUK; D and E. rUK + plasmin
 II: Electrophoresis under non-reducing condition
 G. UK from Japan

表 4 细胞稳定性测定

Table 4 Assaying for stability of cell lines

Cell lines	Pro-UK expression level (IU/10 ⁶ cells/d)			
	Cryopreservation		MTX concentration (mol/L)	
	No	Yes	10	0
CD-3-1	350	320	350	350
CD-3-2	500	480	480	480

量,测定结果(图5)表明CD-3-1细胞每天分泌Pro-UK的量是稳定的,为180—200IU/ml,说明CD-3-1细胞在维持液中分泌Pro-UK的速率是稳定的。

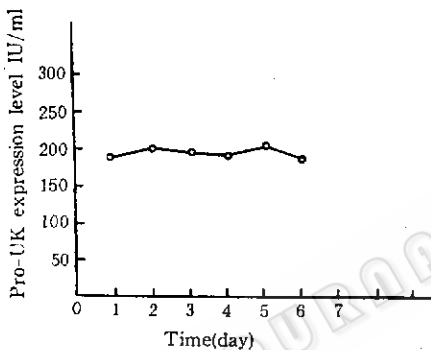


图 5 CD-3-1细胞分泌Pro-UK动态曲线
Fig. 5 Curve of secretion of Pro-UK by CD-3-1 cell line

讨 论

以上的试验结果表明,我们在CHO细胞内高表达了人尿激酶原,表达水平为400—500 IU/10⁶ cells/d,接近国际最高水平(500—1000IU/10⁶ cells/d)^[17]。分析高效表达的原因,我们认为有以下几点:其一采用了较强的SR α 启动子,COS-7细胞中的暂时性表达研究表明,此启动子比SV 40早期启动子高5倍;其二,采用线性化质粒进行转染,有可能在整合前,线性质粒串联起来形成多连体,一次可整合多个拷贝;Jame, Barsoum^[18]曾报道用电击法进行线性质粒多拷贝整合,在CHO细胞中高效表达了t-Pac DNA (45 pg/cell/d);其三,整合的位点有利于基因共扩增;其四,采用逐步加压共扩增的方法,使Pro-UK cDNA随着dhfr基因的扩增而增加拷贝数,从而提高表达水平。

细胞稳定性试验表明所得细胞株是稳定的,且分泌Pro-UK的速率也是稳定的,下一步我们将对表达的rUK的比活,纤维蛋白的亲性等做进一步的测定,同时通过改变培养条件,培养基的成份和高密度培养研究,以期得到更高水平的表达。

参 考 文 献

- [1] Holmes, W. E. et al., *Biotechnology*, 3:923—927, 1985.
- [2] Jacobs, P. et al., *DNA*, 4:139—146, 1985.
- [3] Cheng, S. M. et al., *Gene*, 69:357—363, 1988.
- [4] Klein, B. et al., ICSU Short Reports, *Advances in Gene Technology*, Proceeding of the 1988 Miami Bio/Technology Winter Symposium, IRL Press, Oxford Washington D. C., Vol. 8, p. 206, 1988.
- [5] Pierard, L. et al., *DNA*, 8:321—328, 1989.
- [6] Winkler, M. E. et al., *Biotechnology*, 3:990—1000, 1985.
- [7] 方继明等, *解放军医学杂志*, 15:10, 1990.
- [8] 李凤知等, *生物工程学报*, 7:114—119, 1991.
- [9] 彭秀玲等, *基因工程实验技术*, 科学出版社, 1987.
- [10] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [11] Glover, D. M., *DNA Cloning: A Practical Approach*, Oxford, IRL, 1985.

- [12] Feinberg, A. P. et al., *Analytical Biochemistry*, 132:6—13, 1983.
- [13] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] 程度胜等, 军事医学科学院院刊, 15:320, 1991.
- [15] 李秀珍等, 军事医学科学院院刊, 12:138—141, 1988.
- [16] 韩素文等, 军事医学科学院院刊, 11:101—108, 1987.
- [17] George, C. et al., *Biotechnology*, 8:54—58, 1990.
- [18] James, B., *DNA and Cell Biology*, 9:293—300, 1990.

High Level Expression of Human Prourokinase cDNA in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells

Cheng Dusheng Yu Weiyuan Han Suwen Li Xiuzhen Li Fengzhi
Hu Baocheng Fang Jiming Huang Cuifen
(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850)

We have used Chinese Hamster Ovary (CHO) cells to express high levels of human prourokinase gene cDNA with recourse to construction of good expression vector, the improvement of transfection technique and gene coamplification. First, we constructed expression plasmid pMG10102 by placing Pro-UK cDNA under the control of SR α promoter/SV 40 polyadenylation signals and expressed it transiently in COS-7 cells. Expression level was about 5 folds higher comparison with SV40 early promoter. Linear plasmids pMG 10102 and pSV 2-dhfr were then cotransfected into CHO-dhfr⁻ cells by calcium phosphate coprecipitation and cells were cultured in selective medium. Twenty transformants expressing Pro-UK were picked, the range of expression levels was 12.5—100 IU/10⁶ cells/day. When subjected to stepwise selection of methotrexate (MTX), stable cell lines were obtained that secreted up to 400—500 IU/10⁶ cells/day. Western Blot analysis showed that molecular weight of secreted recombinant Pro-UK was the same as that of natural Pro-UK which is 52 kDa and more than 60 percent of expression production was single chain urokinase (rscUK) without protease inhibitor in medium.

Key words Human prourokinase gene cDNA; CHO cell; gene coamplification; high level expression