

重组人红细胞生成素二聚体不同真核表达载体的构建及表达^{*}

张春莉^{1,2} 李景利² 杜柏榕¹ 李秋生² 有红霞² 李金凤² 朱 迅^{1,2**}

(1 吉林大学基础医学院 长春 130021 2 长春博泰医药生物技术有限责任公司 长春 130012)

摘要 为构建重组人红细胞生成素(recombinant human erythropoietin, rhEPO)二聚体真核表达载体,应用 PCR 方法扩增 EPO cDNA, PCR 产物克隆入 T 载体后,经酶切、连接、转化等过程分别构建了 3 个 EPO 二聚体的真核表达载体 pBT-1c、pBT-2s 及 pBT-3c,经测序序列完全正确。然后将 3 个真核表达载体分别转染于 COS-7 细胞及 CHO-dhfr⁻ 细胞中,用 ELISA 方法检测,它们在 COS-7 的瞬时表达量分别为 4IU/ml、11.5IU/ml 和 7.2IU/ml。其中 EPO 二聚体真核表达载体 pBTsv 稳定转染 CHO-dhfr⁻ 细胞后,用氨甲喋呤(MTX)逐渐加压的方法筛选到阳性克隆,表达量可达到 4000IU/10⁶ cells/72h。

关键词 人重组红细胞生成素 真核表达载体 二聚体

促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是一种刺激骨髓造血的糖蛋白类激素。人类 EPO 含有 165 个氨基酸,相对分子质量为 34.4kDa,其中 3 个 N-糖基化位点(Asn24, 38, 83)和 1 个 O-糖基化位点(Ser126),并有 2 个二硫键连接,60%是蛋白质(单个多肽链),40%为糖类。红细胞生成素在胎儿体内由肾脏及肝脏产生,而在成人体内主要由肾脏产生。肾功能受到损害,如在慢性肾衰竭的病人中,红细胞生成素的产生受到妨碍,可导致贫血的产生。在基因重组技术诞生之前, EPO 主要从贫血患者的尿液和绵羊血中提取,得率非常低。1985 年 Lin 等首先从人类基因库中分离出 EPO 基因,并在哺乳动物细胞中获得表达。1989 年美国 Amgen 公司在国际上首次研制成功重组人红细胞生成素(rhEPO),用于治疗肾性贫血,取得了令人瞩目的疗效^[1]。EPO 在癌症相关性贫血(CRA)、自身免疫性疾病伴发性贫血、骨髓增生异常综合症(MDS)、再生障碍性贫血(AA)、单纯红细胞再生障碍性贫血(PRCA)、慢性髓系白血病(CML)、特发性骨髓纤维化(IMF)、溶血性贫血、造血干细胞移植、艾滋病引起的贫血和化疗引起的贫血及用于择期手术的自

身输血血液储备等方面也有一定疗效。

应用 EPO 可减少输血及提高病人生活质量,但因应用其治疗需大剂量频繁给药,给病人经济上及生活上带来诸多不便,而 EPO 二聚体融合蛋白通过增强生物效应,延长体内半衰期,减少给药次数,能有效地解决这一问题。本实验构建了 EPO 二聚体的真核表达载体,并转染真核细胞,为下一步得到 EPO 二聚体融合蛋白奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株及质粒

见表 1。

1.2 工具酶及试剂

LipofectAMINETM 2000 购自 Invitrogen 公司; EPO ELISA KIT 购自 Roche 公司;TaqDNA 聚合酶、T4 连接酶购自 NEB 公司; pGEM-T Easy Vector Systems 购自 Promega 公司; IPTG、X-gal、Wide Range DNA Ladder Marker 相对分子量标准购自 Takara 公司;DNA 测序由 Takara 公司完成;引物由上海生物工程公司合成,引物序列见表 2。

1.3 EPO 二聚体真核表达载体的构建

以 EPO cDNA 为模板,设计两对不同的引物,通过 PCR 扩增出带有部分连接肽及 EPO 基因的两个片段,将两段扩增片断与 T 载体连接得到含有 EPO 二聚体基因的 pGEMTE 质粒。经酶切、连接、

收稿日期:2004-11-08 修回日期:2004-11-30

^{*} 吉林省科技发展计划项目(20020404)

^{**} 通讯作者,电子信箱:zxunzhux@sohu.com

表 1 本实验所用细胞、菌株及质粒

Table 1 Cell line, bacteria and plasmid used in this paper

| 种类 | 名称 | 主要遗传标志 | 来源 |
|----|-----------------------|---------------------------------------|------------------|
| 菌株 | DH5 α | <i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> | 吉林大学医学部基础医学院免疫三室 |
| 细胞 | COS-7 | | 长春博泰医药生物技术有限责任公司 |
| 质粒 | CHO-dhfr ⁻ | dhfr 基因缺陷 | 同上 |
| | pBTc | CMV 启动子 | 同上 |
| | pBTsv | SV40 启动子 dhfr 基因 | 同上 |
| | pBTcmv | CMV 启动子 dhfr 基因 | 同上 |
| | pSV2 | dhfr 基因 | 同上 |

表 2 本实验所用引物序列

Table 2 primer sequence used in this paper

| 引物名称 | 序列 |
|------|---|
| P1 | 5'-ATTGCTAGCATGGGGTGCACGAATG-3' |
| P2 | 5'-AGCTAAAGCTTTTCATCTGTCCCCTGTCTGCAG-3' |
| P3 | 5'-ATAAAGCTTATGGGGTGCACGAATG-3' |
| P4 | 5'-ATTCTCGAGTCATCTGTCCCCTGTCC-3' |

转化^[2],得到含有 EPO 二聚体基因的真核表达载体。

1.4 COS-7 细胞瞬时转染

将生长状态良好的 24h 前换液的 COS-7 细胞按 1×10^6 个/孔的密度接种至 6 孔板中,使其在转染时达到 90% ~ 95% 汇合。将 4 μ g 质粒 DNA 与 100 μ l DMEM 混合,10 μ l LipofectAMINE™ 2000 与 100 μ l DMEM 混合,室温孵育 5min 后将二者混合,并在室温下孵育 20min。将 6 孔板中的细胞用无血清培养基洗两遍,加入含上述混合物的无血清培养基。37℃、5% CO₂ 培养 6h 后,换成含血清的正常培养基。于转染后 48h 及 72h 吸取上清检测活性,同时观察细胞形态。

1.5 CHO-dhfr⁻ 细胞稳定转染及高表达细胞株的筛选

CHO-dhfr⁻ 细胞的转染步骤同 COS-7 细胞。于转染后 24h 换成不含 H、T 的筛选培养基,48h 后消化,按 1:10 比例传代,同时加 MTX。逐渐提高 MTX 的浓度,出现阳性克隆后,消化,再做稀释克隆,筛选出表达量最高的克隆做为工作细胞株。

1.6 ELISA 检测转染细胞上清中 EPO 二聚体的表达

于转染后各时间点吸取上清,应用 ELISA 检测其 EPO 二聚体的表达情况,具体方法参照试剂盒说明书。

2 结 果

2.1 重组质粒 pGEMTE 及 pBT-1c 的构建

设计了 14 个氨基酸组成的 linker,以 EPO cDNA 为模板,分别用引物 P1 和 P2 通过 RT-PCR 扩增出带有部分 linker 的 EPO 基因,并在第一个 EPO 的上游引入 *Nhe*I 位点,第二个 EPO 的下游引入 *Hind*III 位点;在 linker 中引入 *Sac*II 位点。将两段扩增片断与 T 载体连接、转化并通过蓝白筛选得到含有 EPO 二聚体基因的 pGEMTE 质粒。用 *Nhe*I/*Hind*III 双酶切 pGEMTE 质粒及 pBTc 质粒,连接、转化并通过筛选 Amp 抗性克隆,得到含有 EPO 二聚体基因的真核表达载体质粒 pBT-1c。构建过程见图 1,用 *Nhe*I/*Hind*III 限制性内切酶消化质粒 pGEMTE 及 pBT-1c 后,得到的片段分别为 3000bp、1200bp 及 5000 bp、1200bp,与理论计算大小相符。目的基因片段的序列测定结果与已知序列一致(见图 2)。

2.2 重组质粒 pBT-2s 及 pBT-3c 的鉴定

以 pGEMTE 质粒为模板,P3 和 P4 为引物,通过 PCR 方法在 EPO 二聚体基因的上游及下游分别引入 *Hind*III 和 *Xho*I 酶切位点。用 *Hind*III/*Xho*I 双酶切 pGEMTE 质粒及质粒 pBTsv、pBTcmv,连接、转化并通过筛选 Amp 抗性克隆,得到含有 EPO 二聚体基因的真核表达载体质粒 pBT-2s 及 pBT-3c。构建过程见图 1。将重组质粒 pBT-2s 用 *Hind*III/*Xho*I 限制性内切酶消化后,得到 4838bp 和 1200bp 两个基因片段。用 *Hind*III/*Sac*II 内切酶消化后,得到 5438bp 和 600bp 两个基因片段(图 3),与理论计算大小相符。目的基因片段的测序结果与已知序列一致,将重组质粒 pBT-3c 用 *Hind*III/*Xho*I 限制性内切酶消化后,得到 6145bp 和 1200bp 两个基因片

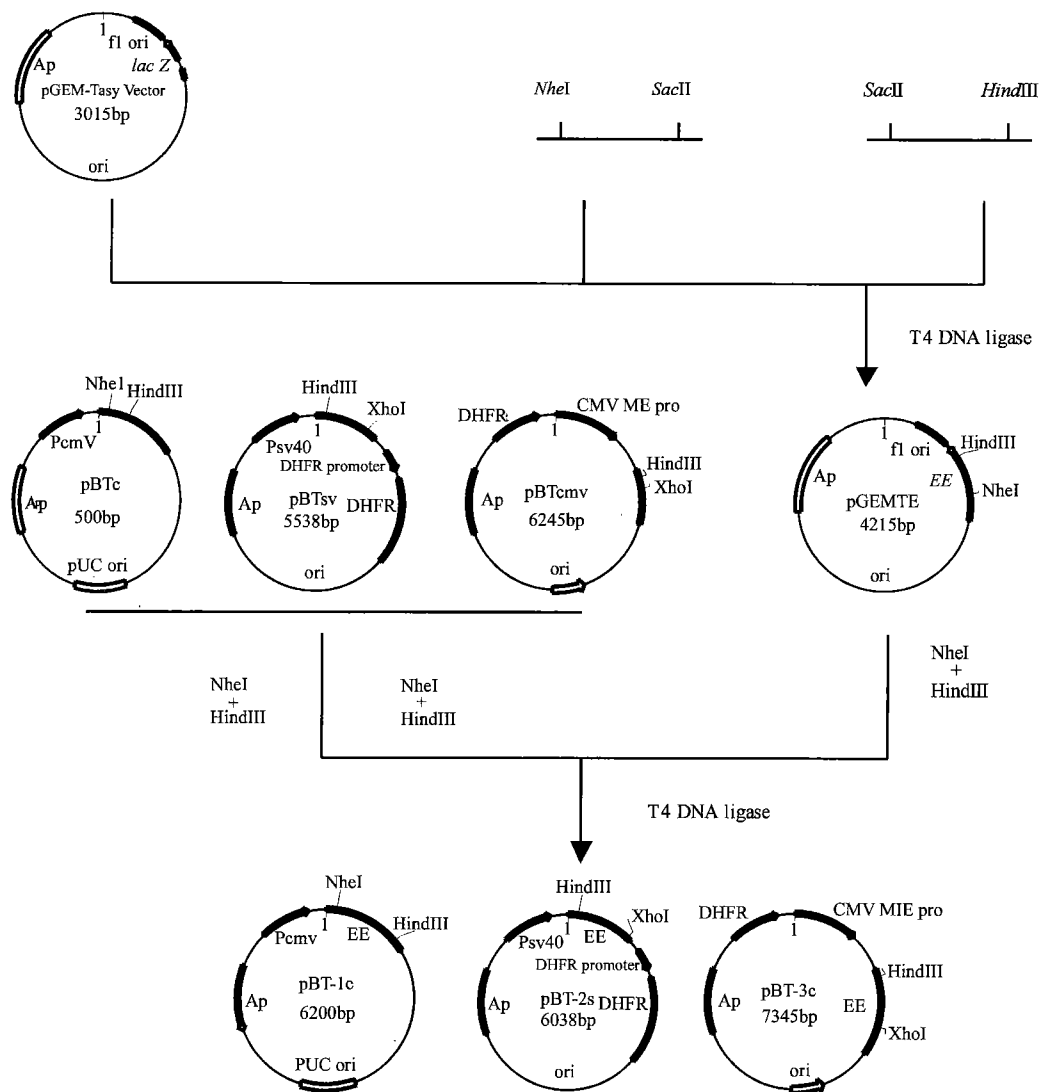


图 1 重组人红细胞生成素二聚体真核表达载体的构建

Fig.1 Construction of recombinant human erythropoietin dimer eukaryotic expression vector

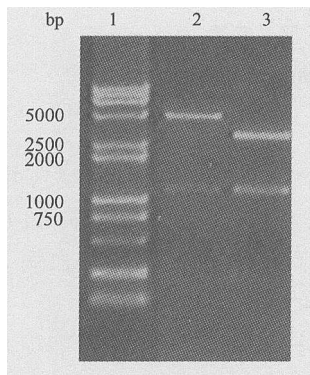


图 2 质粒 pGEMTE 及 pBT-1c 的鉴定

Fig.2 Restriction map of plasmid pGEMTE and pBT-1c

1: DNA marker; 2: pBT-1c/ *NheI* + *HindIII*;
3: pGEMTE/ *NheI* + *HindIII*

段(图 4),与理论计算大小相符。目的基因片段的测序结果与已知序列一致。

2.3 三种表达载体在 COS-7 细胞中的瞬时表达

三种表达载体转染 COS-7 细胞 72h 后,收集细胞培养液上清。用 ELISA 方法测定其瞬时表达量,结果见表 2。

表 2 三种表达载体在 COS-7 细胞中的瞬时表达
Table 2 Instantaneous expression of three EPO dimer plasmids in COS-7 cells

| Expression plasmid | Intro activation(IU/ml) |
|--------------------|-------------------------|
| pBT-1c | 4.0 |
| pBT-2s | 11.5 |
| pBT-3c | 7.2 |

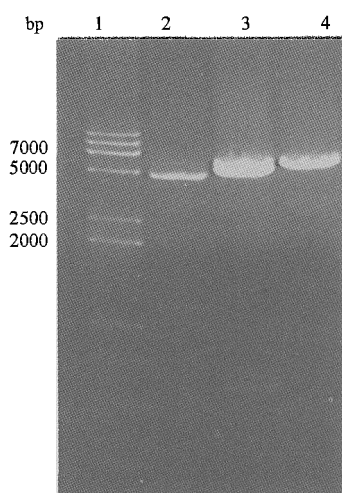


图3 质粒 pBT-2s 的鉴定

Fig.3 Restriction map of plasmid pBT-2s

1: DNA marker; 2: pBT-2s /NheI + HindIII;

3: pBT-2s/SacII + HindIII; 4: pBT-2s

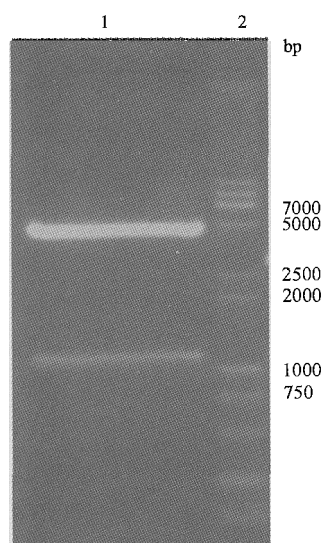


图4 质粒 pBT-3c 的鉴定

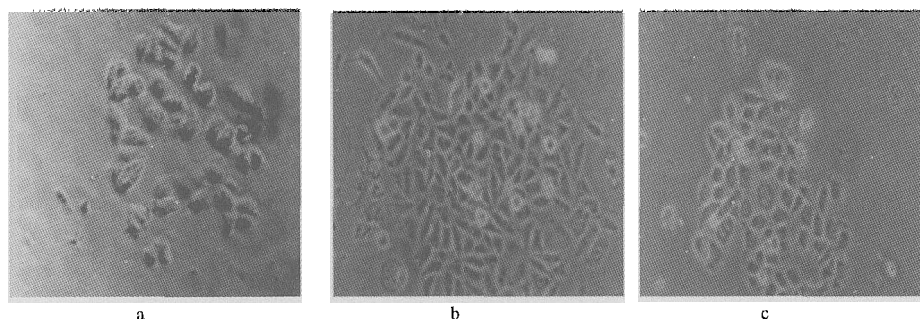
Fig.4 Restriction map of plasmid pBT-3c

1: pBT-3c /HindIII + XhoI; 2: Marker

2.4 CHO-dhfr⁻ 细胞稳定转染及高表达细胞株的筛选

三种表达载体分别转染 CHO-dhfr⁻ 细胞,其中质粒 pBTc 和 pSV2 为共转染。经 MTX 加压得到混合克隆(图 5)。经 ELISA 检测,加压至 100nM MTX

时,EPO 二聚体的表达都在 10IU/10⁶ cells/72h 左右(见图 5)。其中,转染了质粒 pBT-2s 的细胞经继续加压筛选高表达的单克隆,筛选到表达量达 4 000IU/10⁶ cells/72h 的高表达细胞株。

图5 不同质粒稳定转染 CHO-dhfr⁻ 细胞的阳性克隆Fig.5 Positive CHO-dhfr⁻ clones transfected by different plasmids

a: positive clones transfected by pBT-1c; b: positive clones transfected by pBT-2s; c: positive clones transfected by pBT-3c

3 讨论

目前唯一上市的长效 EPO 是美国 Amgen 公司研制的 Aranesp。Aranesp 含 5 个 N-糖基化位点及比 rhEPO 高 2 倍的唾液酸残基,在一级结构中多了 5 个氨基酸和 N 端另外 2 个糖基化位点,从而达到较大的代谢稳定性和 3 倍于 rhEPO 的半衰期^[3,4]。但有学者指出,Aranesp 并不像 Amgen 公司宣称的那样有效,对慢性肾衰(chronic renal failure, CRF)所

致贫血的治疗没有更大的益处^[5],并提出几个理由:(1)NESP 仅仅是比 Erythropoietin alfa 和 beta 糖基化的程度高。(2)CRF 所致贫血病人的临床资料显示,NESP 的功效并没有提高。

但有资料显示,EPO 二聚体能提高生物活性及延长半衰期。如哈佛大学的 Sytkowski 等,用化学交联法构建了 EPO 的二聚体及三聚体^[6],二聚体在家兔体内的半衰期可达 24h,比单体(4h)有显著提高。其体内生物学活性比单体增加 26 倍。随后

又在 COS 细胞中用基因工程方法构建和表达了编码两个完整的人 EPO 结构域及一个由 17 个氨基酸组成的连接肽融合蛋白^[7]。其 COS 细胞分泌的 EPO-EPO 融合蛋白比单体 EPO 多 8 倍, EPO-EPO 融合蛋白的体外活性比单体 EPO 有显著提高。而化学交联法生产的 EPO 多聚体, 其产物成份复杂, 均为大分子混和物, 基因工程方法生产的 EPO 的二聚体或多聚体更有成为高活性的长效 EPO 制剂的可能。

据 Sytkowski 等^[7]报道, 用 3~7 个氨基酸构成 linker 的 EPO 二聚体, 其体外生物活性低于野生型单体 EPO。法国学者 Dalle 等^[8]以 9 肽作为 linker 的基因工程 EPO 二聚体, 体内、体外实验都证明其有高于单体数倍的促红细胞再生能力。本文采用 14 个氨基酸构成 linker, 以保证 EPO 二聚体有较高的生物活性。

本实验构建了 EPO 二聚体的真核表达载体, 及高效表达 EPO 二聚体融合蛋白的细胞株。为后期生产生物活性提高, 半衰期加长的促红细胞生成素奠定了基础。我们选择了二氢叶酸还原酶(dhfr)缺陷型细胞 CHO(dhfr⁻)为表达体系, 以二氢叶酸还原酶为可扩增性选择基因, 而 MTX 是二氢叶酸还原酶的类似底物, 可竞争抑制二氢叶酸还原酶的活性, 当环境存在高浓度的 MTX 时, dhfr 基因可自发在染色体上扩增其拷贝数, 以产生更多的二氢叶酸还原酶来维持细胞的正常代谢。当其扩增时, 可以连带它两侧几十至上千 kb 的序列一起扩增, 也就实现了目的基因的扩增, 从而极大地提高了表达产量。内源性 dhfr 基因的存在会降低由外源性 dhfr 基因带动扩增的目的基因的扩增倍数, 从而降低表达产量^[9]。因此, 本实验选择了 dhfr 基因缺陷型细胞 CHO-dhfr⁻, 以高效表达外源蛋白。

其中, 在稳定转染 CHO-dhfr⁻ 细胞时, 因质粒 pBT-1c 不带有 dhfr(二氢叶酸还原酶)基因, 需与带此基因的质粒 pSV2 共转染 CHO-dhfr⁻ 细胞。而质粒 pBT-2s 及 pBT-3c 的启动子分别为 SV40 启动子和 CMV 启动子, 二者稳定转染后表达量也会有不同。因此, 本实验构建三种不同表达载体, 以不同的方式转染真核细胞, 经瞬时转染初步显示, 质粒

pBT-2s 表达量较高, 又经稳定转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 仍是转染了质粒 pBT-2s 的细胞株表达量最高。稳定转染混和克隆的细胞形态(图 5)可见, 经质粒 pBT-2s 转染的克隆细胞形态最为伸展, 细胞间连结更为紧密。而质粒 pBT-1c 与 pSV2 共转染的克隆细胞形态稍差。以上实验结果初步表明, 带有 SV40 启动子及 dhfr 基因的质粒 pBT-2s 最适于 rhEPO 在 CHO-dhfr⁻ 细胞中的表达。后期工作将进行重组蛋白的纯化, 若动物实验证明此二聚体 EPO 融合蛋白比单体生物活性提高, 半衰期加长, 即可生产出可减少给药次数, 增强疗效的长效红细胞生成素。

参考文献

- [1] Cuzzole M, Mercurial F, Brugnara C. Use of recombinant human erythropoietin outside the setting of uremia. *Blood*, 1997, 84: 4248 ~ 4267
- [2] Sambrook J F, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 16 ~ 572
- [3] Egne J C, Browne J K. Development and characterization of novel erythropoietin stimulating protein (NESP). *Br J Cancer*, 2001, 84 (supple 1): s3 ~ s10
- [4] Jelkmann W. The enigma of the metabolic fate of circulating erythropoietin (EPO) in view of the pharmacokinetics of the recombinant drugs rhEPO and NESP. *Eur J Haematol*, 2002, 69: 265 ~ 274
- [5] Darbepoetin alfa: new preparation. Just a me-too: no advantage in anaemia of chronic renal failure. *Prescrire Int*, 2003, 12(63): 14 ~ 16
- [6] Sytkowski A J, Lunn E D, Davis K L, et al. Human erythropoietin dimers with markedly enhanced *in vivo* activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1184 ~ 1188
- [7] Sytkowski A J, Lunn E D, Risinger M A, et al. An erythropoietin fusion protein comprised of identical properties. *J Biol Chem*, 1999, 274: 24773 ~ 24778
- [8] Dalle B, Henri A, Rouyer Frssard P, et al. Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity *in vitro* and *in vivo*. *Blood*, 2001, 97(12): 3776 ~ 3782
- [9] 宁金鹰, 王尊荣, 许佐良. 利用 CHO(dhfr⁻) 细胞高效表达 GM-CSF/Fcγ2 融合蛋白. *济宁医学院学报*, 2001, 24: 27 ~ 29
Ning J Y, Wang Z R, Xu Z L. *Journal of Jining Medical College*, 2001, 24: 27 ~ 29

Construction and Expression of Recombinant Human Erythropoietin Dimmer in Three Different Eukaryotic Expression Vectors

ZHANG Chun-li^{1,2} LI Jing-li² DU Bai-rong¹ LI Qiu-sheng² YOU Hong-xia² LI Jin-feng² ZHU Xun^{1,2}

(1 School of Basic Medical Sciences, Jilin University Changchun 130021, China)

(2 Changchun Botai Medicine and Biological Technology Limited Company Changchun 130012, China)

Abstract To construct recombinant human erythropoietin dimmer eukaryotic expression vector, EPO gene was generated by Polymerase Chain Reaction(PCR) from cDNA, the PCR products were cloned to pGEM-T vector and the DNA was digested with *NheI/HindIII* or *HindIII/XhoI* to obtain 1.2 kb fragments. Then the fragments were subcloned into eukaryotic expression vector to generate plasmid pBT-1c (6.2kb), pBT-2s (6.0kb) and pBT-3c (7.3kb), respectively. The sequences were confirmed completely by sequencing analysis. All the three plasmids were transfected to COS-7 cell and the EPO dimmer expression was detected by Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA). The expression level was 4IU/ml, 11.5 IU/ml and 7.2IU/ml respectively. The pBT-2s plasmid was transfected to CHO-dhfr⁻ cell and the positive clone was selected by increasing the methotrexate (MTX). The expression level of EPO dimmer was up to 4 000IU/10⁶ cell/72h.

Key words Recombinant human erythropoietin Eukaryotic expression vector Dimmer

(上接第 34 页)

Separating and Purification of a New Opioid Peptide

HAN Fei¹ SHI Yong-hui¹ LIU Yong¹ CHEN Yun² LE Guo-wei¹

(1 Food Science and Technology School, Southern Yangtze University Wuxi 214036, China)

(2 The Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University Wuxi 214036, China)

Abstract A new opioid peptide, OP1, was obtained by separating and purification. Supernatant was collected by centrifugation from the recombinant *Pichia pastoris* fermented. The supernatant was ultrafiltrated and then separated by Sephadex G-10 chromatography. On account of the common structural feature among endogenous and exogenous opioid peptides, that is, the presence of a tyrosine residue at the amino terminal end and the presence of another aromatic residue, e.g. phenylalanine or tyrosine, in the third or fourth position, all potential existent opioid peptides in zymotic supernatant can be obtained. According to the molecular weight of these opioid peptides identified by HPLC-MS, all possible opioid peptides in active component were ascertained. Depending on pI and the molecular weight of these opioid peptides, the active component was purified by the AKTA-100 Purifier system with DEAE-cellulose ion exchange chromatography and Sephasil peptide C18 reversed phase chromatography. The peptide OP1 was obtained finally. The OP1 showed one peak on capillary electrophoresis. The amino acid composition of OP1 was determined. The sequence of OP1 was YPFPGPIRYG.

Key words A new opioid peptide Separating Purification