

人尿激酶原全长cDNA在中国仓鼠卵 巢细胞中的稳定表达

李风知 李秀珍 唐宏娣 张宏权*
胡宝成 韩素文 俞炜源 方继明 黄翠芬

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京)

通过磷酸钙共沉淀技术, 将含有尿激酶原cDNA的表达载体(pSV₂-proUK)与含有二氢叶酸还原酶基因的表达式粒pSV₂-dhfr或MMTV-dhfr共转染中国仓鼠卵巢细胞二氢叶酸还原酶基因缺陷株(CHO-dhfr⁻)。利用选择培养基选择出二氢叶酸还原酶基因表达阳性(dhfr⁺)的转化细胞灶。用溶解圈法测定尿激酶型纤溶酶原激活剂(u-PA)的生物活性, 其中两株显著高于其他株细胞, 命名为CLF-14和CLF-8, 表达水平依次为24IU/10⁶细胞/48h, 16IU/10⁶细胞/48h。用ELISA测定CLF-14和CLF-8细胞上清, 表现为强阳性, 阳性值比阴性对照值(P/N)大于10, CLF-14和CLF-8细胞表达量分别为0.14—0.22μg/10⁶细胞/48h和0.08—0.14μg/10⁶细胞/48h。分泌产物能被抗尿激酶(UK)血清抑制, 而不被抗组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)的抗血清和正常兔血清抑制。

关键词 尿激酶原cDNA; CHO-dhfr⁻细胞; 基因表达

尿激酶原(Prourokinase), 亦称单链尿激酶, 是一种很有希望的新型溶血栓制剂。尿激酶原与尿中提取的尿激酶不同, 它对血栓有特异性亲合作用, 临床应用引起全身系统性出血的副作用很低。由于尿激酶原在尿中含量很低, 难于大量制备, 有希望的途径是通过基因工程的方法来制备药用尿激酶原制剂。Genentech公司, Holmes, W.E. 发表了尿激酶原(pro-UK) cDNA 全序列^[1], 以后又有一些公司或实验室报道了有关尿激酶原cDNA的研究情况^[2-6]。我们通过反转录途径, 用人工合成5'端部分序列等手段, 在国内首先获得了全长的pro-UK cDNA 基因^[7]。并将此基因导入 CHO-dhfr⁻细胞的基因组中, 获得了能表达有生物活性的尿激酶型纤溶酶原激活物(u-PA)的稳定细胞株。

材 料 和 方 法

(一) 材料

1. 人尿激酶原全长cDNA: 由本课题组克隆获得^[7]。

2. 菌种和质粒: RRI大肠杆菌(受体菌)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; MMTV-dhfr质粒由中国科学院动物所沈孝宙教授提供。

3. 细胞和培养基: CHO-dhfr⁻细胞株由任贵方教授惠赠; 生长培养基是DMEM生长液, 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, 次黄嘌呤

本文于1990年4月14日收到。

* 解放军兽医大学博士生。

0.03mmol/L, 胸腺嘧啶 0.03mmol/L, NaHCO_3 调pH 至 7.0—7.4; 选择培养基是生长培养基内无次黄嘌呤和胸腺嘧啶; 无血清选择培养基是选择培养基内不含小牛血清。

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、医科院基础所、Biolabs 公司; $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \alpha\text{ATP}$ (比活 6000Ci/mmol) 购自 Amersham 公司; DMEM 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; 凝血酶购自天津生化制品厂; 纤维蛋白原购自 Sigma 公司。

6. 抗血清: 兔抗人尿激酶血清为本室制备^[8]; 兔抗人 t-PA 血清由上海第二医科大学任文华教授提供。

(二) 方法

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

2. 质粒 DNA 的酶解、片段回收、补平、连接, 转化和杂交筛选及酶切鉴定: 参照文献[9—11]中的方法进行或稍作改进。

3. DNA 探针的制备: 按 Random primer^[12]的方法进行。

4. CHO-dhfr⁻ 细胞的转染: 参考文献[13]磷酸钙共沉淀转染技术, 将 pSV₂-proUK DNA 和 MMTV-dhfr DNA 或 pSV₂-dhfr DNA 共沉淀转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 加选择培养液培养, 隔 2—4 天换一次选择培养液, 两周后开始在显微镜下能分辨出 dhfr⁺ 阳性细胞克隆灶。

5. u-PA 活性检测: ELISA 法检测按文献[14]的方法进行; 溶解圈试验按文

献[15]的方法进行。

实验结果

(一) pSV₂-proUK 表达载体的构建和鉴定

将 pSV₂-dhfr 表达载体用 Bgl II 酶切后用 Klenow 大片段酶补平, 再用 Hind III 酶切, 分离回收载体大片段; 从 pMM-UK DNA 中, 用 Hind III 和 Sma I 双酶切分离 pro-UK cDNA; 将载体大片段与 pro-UK cDNA 连接形成表达转移载体 (Fig.1)。用此表达载体 pSV₂-proUK 转化 RRI 受体菌, 以 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ dATP 标记的尿激酶基因片段为探针, 对转化菌落印膜后, 进行原位杂交筛选 (图版 I-A)。对杂交阳性克隆菌质粒快抽鉴定大小 (图版 I-B), 从图中可见阳性菌质粒 (pSV₂-proUK) 1—4 号都较对照 5 号 (pSV₂-dhfr) 质粒的分子量增大了。选取之一用 Hind III 和 Xba I 双酶切分析, 结果表明在 1.6kb 附近出现了完整的 pro-UK cDNA 带 (参看图 1 和图版 I-C), 反插双酶切将不出现尿激酶原基因带。

(二) pro-UK cDNA 在 CHO 细胞中的表达

重组的表达载体 pSV₂-proUK 分别与 pSV₂-dhfr 和 MMTV-dhfr 质粒共转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 在选择培养基中培养三周后, 出现大量直径在 0.5—2mm 的 dhfr⁺ 转化细胞克隆灶。挑取单个克隆细胞灶经 96 孔板、48 孔板、24 孔板和小方瓶扩大培养, 并测定培养基中 u-PA 活性 (被测细胞上清均为无血清选择培养基)。

用 pSV₂-dhfr 和 MMTV-dhfr 作为选择标记质粒分别与 pSV₂-proUK 转移质粒共转化 CHO-dhfr⁻ 细胞。从 pSV₂-proUK 与 pSV₂-dhfr 共转化组 (PP 组)

选取66株, 21株能表达 u-PA生物活性; 从pSV₂-proUK与 MMTV-dhfr 共转化组(PM组)选取112株, 92株能表达 u-PA生物活性。从溶解圈测定表明表达水平高低不一, PP组中选出一株显著高于其他株的细胞, 定名为 CLF-14, 表达量不低于24IU/10⁶细胞/48h; PM组中选出一

株表达量最高的一株, 定名为 CLF-8, 表达量不低于16IU/10⁶细胞/48h(参看图版 I-F, 表1)。

ELISA法检测CLF-14和 CLF-8细胞株上清, 均表现为较强的阳性(P/N>10); 在波长为492nm下检测, 扣除本底后, CLF-14表达量为0.14—0.22μg/10⁶

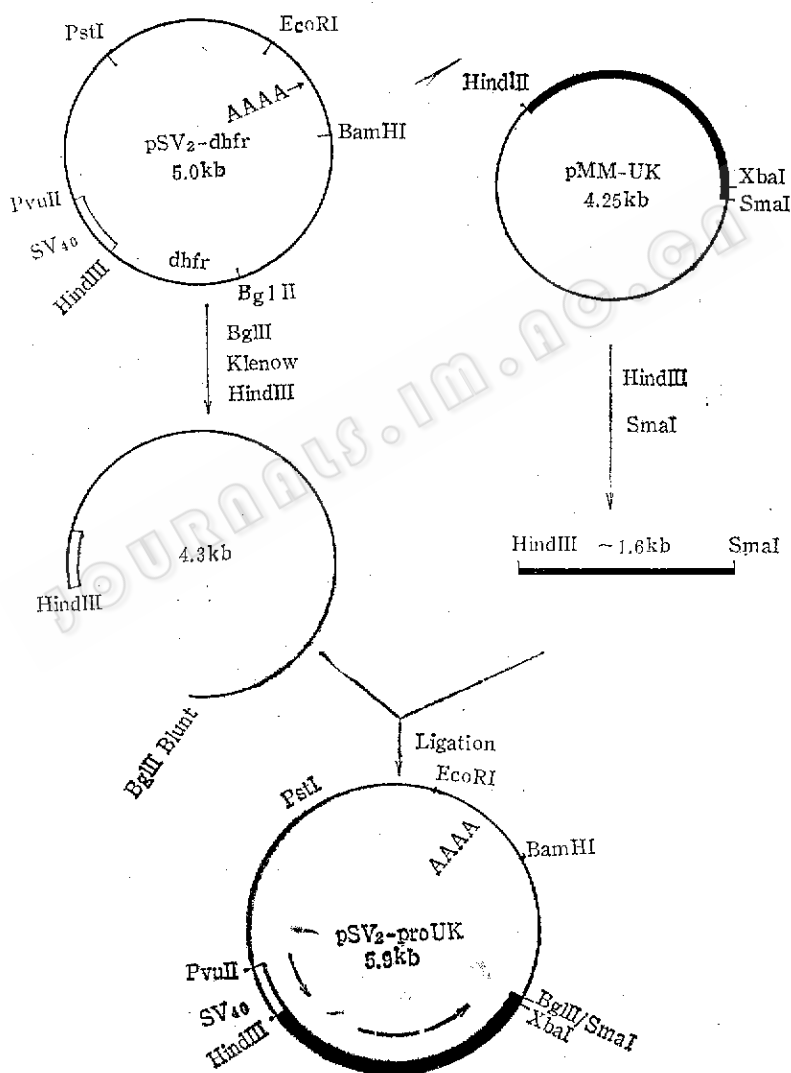


图1 转移载体pSV₂-proUK的构建

Fig.1 Construction of transfer vector pSV₂-proUK

SV₄₀的早期启动子序列 SV₄₀ early promoter
 尿激酶原cDNA序列 (pro-UK cDNA)
 AAAAA多聚腺嘌呤信号 (PolyA signal)

表 1 细胞株CLF-14和CLF-8表达u-PA量的有关数据

Table 1 The concentration of the u-PA in serum-free supernatant expressed by CLF-14 and CLF-8

实验 Experiment UK来源 UK Source	实 验 Experiment						
	样 品 Samples						对照 Control
标准尿激酶 Standard UK	国际单位数 (IU)	1	0.5	0.2	0.1	0.05	0*
	溶圈面积 Lysis zone(mm ²)	113	93	75	30	8.7	0
	ELISA (A ₄₉₂)	2.04	1.1	0.41	0.2	0.09	0
CLF-14	加样量 Added sample (μl)	30	20	15	10	5	30**
	溶圈面积 Lysis zone(mm ²)	75	—	—	—	—	4.1
	ELISA (A ₄₉₂)	0.4	0.19	0.18	0.09	0.06	0.02
CLF-8	加样量 Added sample (μl)	30	20	15	10	5	30***
	溶圈面积 Lysis zone(mm ²)	44	—	—	—	—	4.5
	ELISA (A ₄₉₂)	0.33	0.17	0.13	0.1	0.05	0.03

Specific activity of UK 10—20×10⁴ IU/mgCell numbers of CLF-14 and CLF-8 were 2.28×10⁶ and 2.40×10⁶, respectively

Supernatant volumes and culture time of CLF-14 and CLF-8 were 10ml and 48h, respectively

* PBS; ** non-engineered strain (1); *** non-engineered strain (2)

细胞/48h; CLF-8 表达量为 0.08—0.14μg/10⁶ 细胞/48h (参阅表 1)。由溶解圈法和 ELISA 法测定证明表达产物既有 u-PA 生物活性又有 u-PA 抗原性。

在筛选过程中我们注意到有些在 ELISA 测定中表现明显 u-PA 抗原性的细胞株, 在溶解圈试验中确表现很低或不表现 u-PA 生物活性。对我们来说, 以表达 u-PA 生物活性为筛选指标是合适的, 但那些 u-PA 生物活性很低或没有, 而 ELISA P/N 值又比较高的细胞株, 在尿激酶原基因表达理论探讨上是有一定价值的。

为确证引起溶解圈形成的细胞表达产物是 u-PA, 而不是由其他的蛋白水解酶如胰蛋白酶所引起, 我们进行了如下鉴别试验: (1) 将制好的纤溶平板于 80℃ 保温 1h, 使纤溶酶原灭活, 当加入纤溶酶原激活物如 t-PA、u-PA 时, 就不再产生溶解圈活性, 而其他蛋白水解酶如胰蛋白酶仍能形成溶解圈。由图版 I-D 灭活实验

结果证实标准 UK 和 CLF-14 细胞上清都不再产生溶解圈活性, 而胰蛋白酶仍照常形成溶解圈; (2) 抗血清中和抑制试验: 取标准 UK 和 CLF-14 上清分别与抗 UK 血清, 抗 t-PA 血清及正常兔血清 37℃ 保温 1h, 中和后再加样于纤溶平板上, 抗 UK 血清能完全中和抑制标准 UK 及 CLF-14 细胞株上清的溶解圈, 而抗 t-PA 血清及正常兔血清无中和抑制作用 (图版 I-E, 正常兔血清结果未给出)。以上鉴定实验有力地确证 CLF-14 细胞株分泌的确实为 u-PA。

讨 论

pro-UK 的分子量较大 (411个氨基酸), 含有 12 对二硫键, 和一个糖基化位点, 对这样比较复杂的蛋白质分子要想得到有天然酶活性的蛋白, 往往需要使用高等真核细胞表达系统才可能获得成功的表达, 但文献中 pro-UK cDNA 在哺乳动

物细胞中表达的报道不多,在cos-1做过暂时性表达^[3],在鼠myeloma细胞中做过永久性表达^[5],均能测到有生物活性的u-PA,但表达量较低或未具体提到表达量。Pierard^[5]提到各株细胞表达量波动于0.001—0.1pg/细胞/24h,最高一株达1.25pg/细胞/24h。由于测定方法及表示方法的不同,难以进行严格的比较。*E. coli*表达存在一个“复性”问题,所得活性也是不高的^[2]。我们用CHO细胞成功地表达了有生物活性的u-PA,这就

证明所克隆的pro-UK cDNA能正确无误地进行工作,在国内首先在哺乳动物细胞中表达成功。其次是表达量初步测定已达到0.07—0.11pg/细胞/24h,表明表达量还是比较高的。后续工作将对CLF-14细胞株进一步亚克隆纯化,以MTX(氨甲喋呤)加压扩增基因拷贝数,改善和找出最合适的培养条件,进行诱导和高密度培养,有可能较大幅度地提高表达量,从而发展成性能稳定有一定生产价值的第一代工程细胞株。

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., *Biotechnology*, 3:990—1000, 1985.
- [7] 方继明等: 解放军医学杂志, 15:10, 1990.
- [8] 李秀珍等: 军事医学科学院院刊, 12:195—198, 1988.
- [9] 彭秀玲主编: 基因工程实验技术, 1987.
- [10] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring, 1982.
- [11] Davis, et al., *DNA cloning*, Vol. 1, 1985.
- [12] Feinberg, A.P. et al., *Analytical Biochemistry*, 132: 6—13, 1983.
- [13] Graham, R. et al., *Virology*, 52:456—467, 1973.
- [14] 李秀珍等: 军事医学科学院院刊, 12:138—141, 1988.
- [15] 韩素文等: 军事医学科学院院刊, 11:101—108, 1987.

Expression of Pro-urokinase cDNA in Chinese Hamster Ovary Cell Lines

Li Fengzhi Li Xiuzhen Tang Hongdi
Zhang Hongquan Hu Baocheng Han Suwen
Yu Weiyan Fang Jiming Huang Cuifen

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

Expression vectors containing the pro-UK cDNA (pSV₂-proUK) and a dihydrofolate reductase cDNA (pSV₂-dhfr or MMTV-dhfr) were co-transfected into CHO-dhfr⁻ cells by calcium phosphate precipitation tec-

hnique. The dhfr⁺ transformants were selected by fibrinolytic agarose plate assay. Two colonies, named as CLF-14 and CLF-8, exhibited significantly higher expression level of u-PA activity. They reached more than 24IU/10⁶ cells/48h and 16IU/10⁶ cells/48h, respectively. Examination of the cell supernatants for u-PA using ELISA method also showed strong positive results, the quantity of expression is about 0.14—0.22 μg/10⁶ cells/48h and 0.08—0.14μg/10⁶ cells/48h, respectively. The u-PA secreted by stable transformed cells can be completely inhibited by UK anti-serum, but not by t-PA anti-serum and normal rabbit serum.

Key words

Prourokinase cDNA; CHO-dhfr⁻ cells; gene expression

图 版 说 明

Explanation of Plate I

- A. ³²P 标记的DNA探针与重组pSV2-proUK质粒转化菌落原位杂交结果 (1. 阳性对照; 2—5. 阳性重组子杂交点)

Hybridization of recombinant plasmid pSV2-proUK with ³²P-labelled pro-UK cDNA probe (1. positive control; 2—5 positive recombinant dots)

- B. 阳性菌质粒快抽结果 (1—4 阳性菌质粒; 5. 阴性菌质粒对照)

Analysis of plasmids extracted by boiling method in agarose gel (1—4: plasmids from positive colonies; 5. negative control plasmid)

- C. 对增大的质粒进行Hind III和Xba I 双酶切鉴定基因大小

Identification of pro-UK gene within positive colony plasmid by digesting with Hind III and Xba I (1. pSV2-proUK; 2. pSV2-dhfr control)

- D. 80℃灭活后平板中纤溶酶原的溶解圈试验结果

The results of lysis zone test after incubating the fibrinolytic agarose plate at 80℃ for 1h (1. 0.5IU standard UK; 2. CLF-14 supernatant; 3. 50BAEE trypsin)

- E. 抗血清中和试验结果

Inhibition of lysis zone by anti-serum (1. standard UK plus UK anti-serum; 2. standard UK plus t-PA anti-serum; 3. CLF-14 supernatant plus UK anti-serum; 4. CLF-14 supernatant plus t-PA anti-serum)

- F. pro-UK cDNA在CHO细胞中的表达

Expression of pro-UK cDNA in CHO cells (Top line 1—4: standard UK 1IU, 0.5IU, 0.2IU, 0.05IU; 5. CHO-dhfr⁻ supernatant control. Bottom line 1—5: supernatant of CLF-8, CLF-14, CLF-23, CLF-21, and CLF-18)

