

人血小板生成素(hTPO)全长 cDNA 克隆及在 CHO 细胞中的表达

邢桂春 郭树华 胡志远 张咏 董波 贺福初*

(北京放射医学研究所 北京 100850)

摘 要 以人胎肝 mRNA 为模板,采用 RT-PCR 扩增了人 TPO 编码区全长 cDNA,全序列测定结果表明与国外报道序列一致;进而构建了 pcDNA3-TPO 永久表达载体,转染 CHO 细胞后经 G418 加压筛选、TPO 表达稳定性等项指标测试,获得了稳定分泌 TPO 的工程细胞株。

关键词 人血小板生成素,PCR,序列分析,CFU-Meg,CHO 细胞表达

人血小板生成素(hTPO)是血液学界寻找已久但只是在 94 年才被克隆的重要调控因子。由于 TPO 具有特异刺激巨核系-血小板生成的作用,人们普遍预期它对于治疗各种原因引起的血小板减少症会具有显著的效果,因此重组 TPO 有着乐观的医疗应用前景。

我们利用反转录 PCR 技术成功地从人胎肝 mRNA 中分别克隆了 TPO N-端和 C-端 cDNA 片段,在其序列分析与国外文献报道完全一致的基础上,酶切、回收、连接其 N-端、C-端 cDNA,并以此为模板,用 PCR 法扩增出全长 TPO cDNA 片段,将其分别克隆至 pSVK3 和 pcDNA3 载体中。pcDNA3-TPO 经 lipofectin 法转入 CHO 细胞,最终得到稳定高效表达的工程细胞株。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株与质粒

大肠杆菌 JM109 系本室保存;含 TPO N、C-端 cDNA 的重组质粒 pUC-19-N-TPO1、2、3 和 pUC-19-C-TPO 24、28,由本室构建^[1];中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1,美国 UCSF Cell Culture Facility 赠送;pcDNA3 由 California Institute of Technology Dr M Y Liu 惠赠;pUC 18 购自华美生物工程公司。

1.2 酶类及主要生化试剂

DNA 限制酶 EcoR I, Kpn I, BamH I, 碱性磷酸酶, T4 DNA ligase 分别购自华美生物工程公司、Promega 公司。实验所用试剂如 Profection^R Mammalian Transfection Systems, 质粒纯化及 PCR 产物回收等试剂盒购自 Promega 公司。DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司。 α -³²P-dATP 购自亚辉生物医学工程公司, T7 测序 Kit 为上海 Promega 公司产品。

863 计划(863-102-08-5)与自然科学基金(39570275)部分资助。

* 通讯联系人。

本文于 1996 年 8 月 21 日收到。

1.3 寡核苷酸引物

根据国外文献报道的 TPO cDNA 序列^[2]设计,由本室合成。上游引物为:5'-CCG-GAATTC TTA GAC ACC TGG CCA GAA TG 3',含 EcoR I 位点。下游引物为:5'-CCG-GAATTC TGA TGT CGG CAG TGT CTG AGA ACC 3',含 EcoR I 位点。

引物 1,4 分别与 TPO cDNA 的 5'NTR 和 3'NTR 互补,并且在 5'端引入了 EcoR I 酶切位点,以利于目的片段的重组克隆。

1.4 人全长 TPO cDNA 片段的 PCR 扩增

用 EcoR I, Kpn I 分别酶切、回收 pUC-19-N-TPO 1、2、3 和 pUC-19-C-TPO 24、28 的 cDNA 片段,再按 1:1 摩尔比进行连接。取 1 μ l 连接产物做模板,在 PE480 扩增仪上进行 PCR 扩增,扩增参数为:94 $^{\circ}$ C 1.5min, 58 $^{\circ}$ C 1.5min, 72 $^{\circ}$ C 2 min。循环 35 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

1.5 TPO 永久表达载体的构建、阳性重组子的酶切鉴定及序列测定

重组方案详见结果与讨论部分,基因操作按文献[3]进行。

1.6 阳性重组子质粒在 CHO 细胞中的稳定表达

DNA 转染按 Lipofectin 方法进行,转染 48h 后,经 2~3 周的持续 G418 加压筛选,收集细胞上清测活。去 G418,连续传代培养;对混合克隆细胞极限稀释,选择具有较高分泌活性的细胞亚克隆。将部分细胞冷冻保存,观察重组质粒在 CHO 细胞中的整合稳定性及表达稳定性。

1.7 表达产物生物活性测试

以小鼠骨髓细胞,按 CFU-Meg 集落培养方法^[4]测活,7d 后 AchE 染色,显微镜下计数由 3 个以上巨核细胞组成的集落数。

2 结果与讨论

2.1 hTPO 全长 cDNA 的 PCR 扩增

以 19.5ng 的 N、C 端 TPO cDNA 连接产物为模板,PCR 35 循环后取 10 μ l 扩增物于 1.2% 琼脂糖凝胶上电泳,结果表明,扩增出的一条单带其分子量介于 1543bp 与 994bp 之间,与 TPO cDNA 分子量的理论值(1059bp)一致(图 1)。

2.2 重组 TPO 永久表达载体的构建及重组子鉴定

构建方案见图 2。在重组实验中,获得 Ap^R 菌落 30 个,经 PCR 法粗筛得到 12 个候选克隆,为鉴定 TPO cDNA 插入有无错误和重组片段是否完全以及外源 cDNA 片段的插入方向,进行了重组位点 EcoRI、BamHI 酶切的电泳鉴定。结果表明(图 3),12 个候选克隆质粒用 EcoRI 均能切下 TPO cDNA 条带,其分子量大小正确。进而被分别命名为

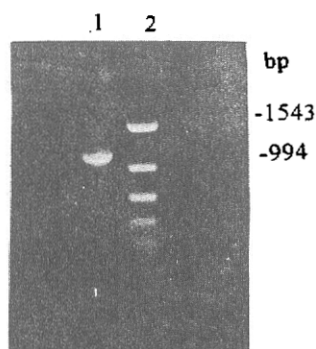


图 1 hTPO 全长 cDNA 的 PCR 产物电泳分析

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR product of full length hTPO cDNA

1. PCR product
2. PCR marker

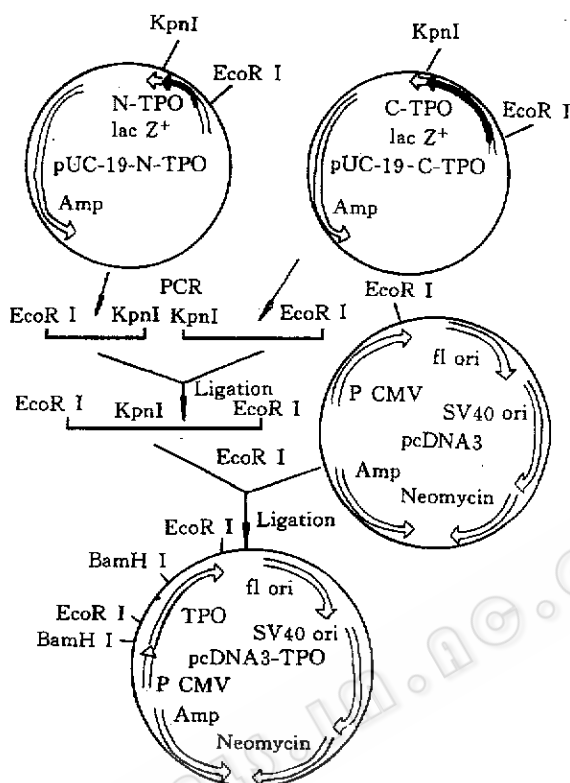


图 2 重组表达质粒 pcDNA3-TPO 的构建图

Fig.2 Construction of recombinant expression vector pcDNA3-TPO

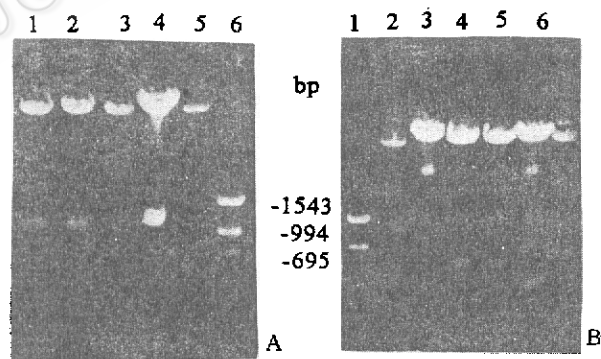


图 3 pcDNA-TPO 限制酶酶切的琼脂糖凝胶电泳分析图谱

Fig.3 Restriction enzyme analysis of recombinants of hTPO cDNA

- A. 1~4. pcDNA3-TPO(12, 23, 27, 30)-EcoRI

5. pcDNA3-EcoRI

6. PCR marker
- B. 1. PCR marker

2. pcDNA3-BamHI

3~6. pcDNA3-TPO(12, 23, 27, 30)-BamHI

pcDNA3-TPO 2、7、9、10、11、12、15、17、19、23、27、30。由于 TPO cDNA 两端只有 EcoRI 酶切位点,若外源 cDNA 片段正向插入,经 BamHI 完全酶切后应产生一 430bp 的片段,若为反向插入,则可切下一 630bp 左右的片段,BamHI 酶切表明,12 个阳性克隆 7 个为正向插入,5 个为反向插入。

2.3 TPO cDNA 的序列测定

为检查在第二次 PCR 过程中有无突变产生,用 EcoRI、BamHI 直接从 pcDNA 3-TPO30 号重组质粒上切下了 430bp、630bp 的两个片段,并将其与相应酶切的 pUC19 质粒连接,转入感受态 JM109 中,通过 PCR 粗筛和 EcoRI、BamHI 双酶切鉴定阳性重组子,再用通用测序引物分别从其两端进行测序。

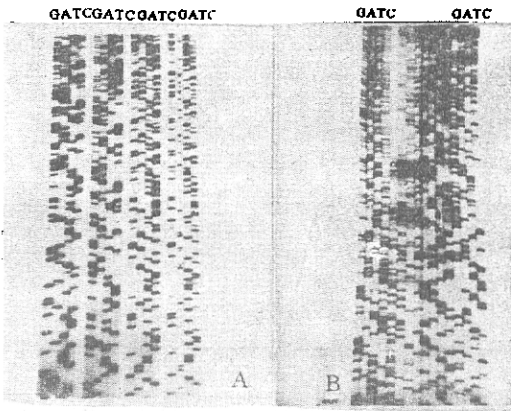


图 4 hTPO cDNA 部分序列图谱
Fig.4 Mapping of hTPO cDNA sequence
A. N-terminal nucleotide sequence of hTPO cDNA
B. c-terminal nucleotide sequence of hTPO cDNA

全序列测定结果表明所测序列未发生点突变(图 4)。上述亚克隆方案见图 5。

2.4 pcDNA3-TPO 重组子在 CHO 细胞中的稳定表达

转染 CHO-K1 细胞经 G418 加压筛选,最终得到多个抗 G418 的细胞克隆,即 pcDNA3 或 pcDNA3-TPO 的转基因细胞。本实验采用 lipofectin 转染方法,既保证了较高的转染效率又免去了 CsCl 超离心等技术要求,混合细胞克隆 G418 大剂量加压可将低拷贝整合的细胞淘汰掉,保留了带有高拷贝的克隆。

混合阳性细胞克隆经极限稀释后分选出单个亚克隆,撤掉 G418 后经过连续 3 个月的传代培养,随机挑出的 7 个克隆的分泌上清均具有比较高的活性(表 1)。该结果提示,我们选择的载体系统比较适合 TPO 在 CHO 细胞中的表达。如果对混合克隆细胞进行更进一步的筛选有可能找到分泌活性更高的细胞株。

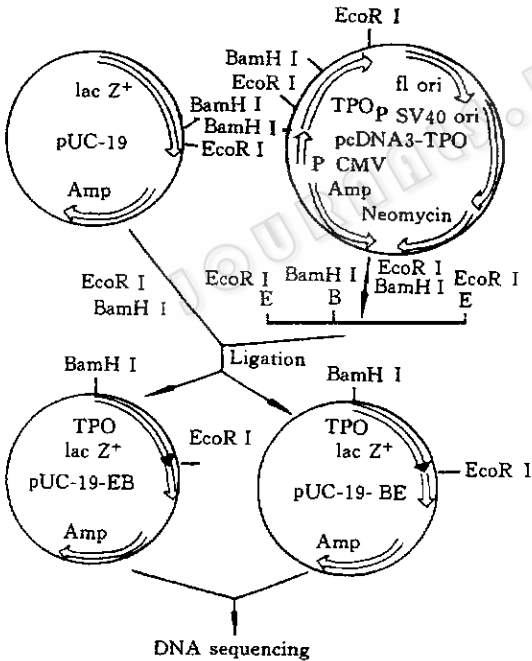


图 5 第二次 PCR 产物碱基序列测定操作流程
Fig.5 Subcloning of the secondary PCR HTPO cDNA for sequencing

EB: N-terminal fragment of TPO cDNA cut off by EcoRI and BamHI
BE: c-terminal fragment of TPO cDNA cut off by BamHI and EcoRI

细胞经液氮冻存后分泌 TPO 的活性没有明显的降低(表 2),表明 TPO cDNA 在 CHO 细胞中的整合是稳定的。我们下一步的工作将对得到的高效、稳定表达 TPO 的细胞株进行更进一步的研究和鉴定,努力使其成为中试生产 TPO 的工程细胞株。

表 2 冻存对 TPO 转基因 CHO 细胞 TPO 表达水平的影响

Table 2 Effect of cryopreservaion on the expression level of TPO in CHO cells

CFU-Meg/ 2×10^5 cells($\bar{X} \pm SD$)	
Before cryopreservation	31.0 \pm 11.5
After cryopreservation	30.0 \pm 9.2 *

n = 3, * P > 0.5

表 1 不同 TPO 转基因 CHO 细胞集落的上清对 Mo7e 细胞的增殖刺激差别

Table 1 Effect of supernatant from different transfected CHO cell colonies on the proliferation of Mo7e cells

Cell colonies	OD ₄₉₂ value($\bar{X} \pm SD$)
Control	0.517 \pm 0.017
Mix	0.614 \pm 0.011
A	0.776 \pm 0.017
B	0.904 \pm 0.012
I	0.822 \pm 0.023
P	0.773 \pm 0.010
R	0.703 \pm 0.028
T	0.845 \pm 0.011
U	0.779 \pm 0.011

n = 2

致 谢:邱丽玲副教授、柳晓兰实验师帮助进行部分生物活性测试(CFU-Meg),硕士生欧阳曙光帮助计算机绘图。

参 考 文 献

[1] 邢桂春、胡志远、杨晓明等. 高技术通讯, 1996, 6(3): 12~14.
[2] de Sauvage F J, Hass P E, Spencer S D *et al.* Nature, 1994, 369: 533.
[3] Sambrood J, Friston E F, Maniatis T, Molecular Cloning: A Laboratory Mannual, Cold Sprin Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 1: 53~1. 85.
[4] 刘秀珍,造血祖细胞培养技术实验手段. 北京:北京出版社, 1992, p. 111.

Cloning and Expression of a Full Length cDNA of Human Thrombopoietin (hTPO) in CHO Cells

Xing Guichun Guo Shuhua Hu Zhiyuan Zhang Yong Dong Bo He Fuchu
(Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850)

Abstract A full length cDNA of the coding region of hTPO, whose sequence is identical to those previously reported, has been amplified by means of RT-PCR with human fetal liver mRNA as the templates and then sequenced. Further, this insert was subcloned into a mammalian expression vector pcDNA3 (pcDNA3-TPO), transformed into CHO cells, and screened by G418 and then tested by expression level of hTPO. A group of stably secreting engineered strains of hTPO has been obtained.

Key words Human thrombopoietin, CFU-Meg, CHO cell, PCR, sequencing analysis, expression