

技术与方法

人 β 干扰素重组质粒导入 CHO-dhfr⁻ 细胞

于 曼 王晓鸣 王嘉玺

(军事医学科学院微生物流行病学研究所, 北京)

提 要

采用磷酸钙共沉淀技术, 将人 β 干扰素编码区基因片段与 pSV₂-dhfr 载体质粒 SV40 早期启动子下游 60 碱基对 (bp) 处重组的 pSVEH β_1 质粒导入中国仓鼠卵巢细胞二氢叶酸还原酶缺陷型株, 简称 CHO-dhfr⁻ 细胞。共转化后, 于选择培养基中长出的 265 个细胞克隆中随机挑出 13 株细胞克隆进行表达水平检测, 其中 7 株细胞有表达, 表达阳性细胞克隆株占 54%, 共转化率为 1.33×10^{-4} 。

前 言

将完整的含各种基因组或片段的重组质粒导入哺乳动物细胞是真核细胞基因工程的一项重要技术。用病毒 DNA 或 RNA 导入细胞而引起的感染过程称为转染 (transfection)。将重组质粒导入细菌后使其发生遗传性状改变的过程称为转化 (transformation)。而同时把带目的基因的重组质粒与一标记基因导入哺乳动物细胞, 使受体细胞发生遗传性状改变的这一过程称为共转化 (cotransformation)。共转化可采用磷酸钙共沉淀技术^[1-3], 脂质体技术^[4], 微量注射和电转移等技术, 把外源基因导入哺乳动物细胞。我们把人 β 干扰素重组质粒导入 CHO-dhfr⁻ 细胞则采用了磷酸钙共沉淀技术。此方法简便易行, 又不需特殊装置设备, 且转化效率高。我们以 pSVEH β_1 质粒为目的基因, 即含人的 β 干扰素基因 (Hu-IFN- β_1), pSV₂-dhfr 质粒为选择标记基因, 即含有二氢叶酸还原酶基因 (dhfr) 进行共转化。使用的受体细胞是中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary

cell) 二氢叶酸还原酶缺陷型株, 简称 CHO-dhfr⁻ 细胞。其细胞来源于 CHO-K₁ 系, 经 γ -射线诱变而挑选出的 dhfr 缺陷株 (dhfr⁻)^[5], 此细胞株是 β 干扰素基因在真核细胞内表达较为理想的细胞株。国外已用此细胞株表达了 β 、 γ 干扰素, 其效果较好^[6]。国内表达了乙型肝炎表面抗原 (HBsAg)。CHO-dhfr⁻ 细胞的特点是: 二氢叶酸还原酶缺陷的细胞不能合成四氢叶酸, 因此细胞培养液中必须附加胸腺嘧啶核苷, 甘氨酸和嘌呤。如果用 pSV₂-dhfr 质粒转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 不加上述物质细胞也可以生长, 因转染细胞有较高的二氢叶酸还原酶活性。而这一选择系统有一个特殊的优点, 野生型细胞可被抗叶酸药物氨甲蝶呤 (methotrexate, MTX) 所杀死。而 dhfr 可在氨甲蝶呤的压力下扩增, 因此在逐步增加氨甲蝶呤浓度的情况下选育出抗氨甲蝶呤的高效表达细胞株。我们利用这一选择系统, 以二氢叶酸还原酶为标记基因, 用磷酸钙共沉淀技术, 把 pSVEH β_1 质粒导入 CHO-dhfr⁻ 细胞, 在氨甲蝶呤压力下筛选出高效表达 β 干扰素的细胞

株。

材料与 方法

材料

- 1. CHO-dhfr⁻ 细胞: 中国预防中心病毒研究所侯云德教授惠赠。
- 2. pSVEH β_1 质粒: 由王晓鸣等构建的人 β 干扰素基因质粒(文章待发表)。
- 3. 氨甲喋呤 (MTX)、胸腺嘧啶脱氧核苷、脯氨酸: 系 Sigma 产品。
- 4. 次黄嘌呤: 系 Sever 产品。
- 5. 甘氨酸, CaCl₂, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄: 系北京化工厂产品, 分析纯。
- 6. Hepes: 系 Sigma 产品。
- 7. DMEM 培养基: 系 GIBCO 产品。
- 8. pSV₂-dhfr 质粒: 系 BRL 公司产品。

方法

CHO-dhfr⁻ 细胞培养 CHO-dhfr⁻ 细胞以 1—2 × 10⁶ 细胞量接种底面积约 38cm² 方瓶中, 加 10ml DMEM 生长液(含 10% 灭活小牛血清, 0.03mmol/L 次黄嘌呤 0.003mmol/L 胸腺嘧啶脱氧核苷, 0.1mmol/L 甘氨酸和脯氨酸, 1% 谷氨酰胺和青霉素、链霉素), 37℃, 5% CO₂ 孵箱中培养 2—3 天, 长成单层即可使用。

磷酸钙共沉淀技术

- 1. 刚长成单层的细胞, 弃去原生长液, 换新鲜选择培养基 (DMEM 含 10% 灭活小牛血清, 0.1mmol/L 脯氨酸, 1% 谷氨酰胺和青霉素、链霉素) 37℃ 5% CO₂ 孵箱培养 4 小时。
- 2. DNA-Ca₃(PO₄)₂ 悬液的制备 pSVEH β_1 质粒与 pSV₂-dhfr 质粒量之比为 5:1, 然后依

次补加 10mmol/L Tris · HCl pH7.10 缓冲液, 2mol/L CaCl₂ 63 μ l(250mmol/L), 使体积为 0.5ml, 然后加等体积 2 × HeBS 缓冲液(50mmol/L Hepes, 280mmol/L NaCl, 0.75mmol/L Na₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄, pH7.10) 迅速混匀, 室温放置 15—20 分钟, 待出现雾状混浊即可使用。

- 3. 将出现沉淀的 DNA-Ca₃(PO₄)₂ 悬液直接加到细胞培养液中, 1ml/瓶, 轻轻混匀, 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养 16—20 小时。
- 4. 弃尽含 DNA-Ca₃(PO₄)₂ 悬液的原液体, 加 10ml 新鲜生长液, 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养 24 小时。
- 5. 弃尽原液, 换新鲜选择培养基, 不加选择压力, 37℃, 5% CO₂ 孵箱培养。此后 2—3 天换一次不含选择压力的培养基。一般 3—4 周后转化成功的细胞长出直径约 1—2mm 的克隆。

转化细胞克隆的选择 共转化后在选择培养基中长出的细胞克隆即为共转化成功的克隆。用 0.1% 胰酶室温消化 2 分钟, 弃尽消化液, 用一弯头的巴氏吸管对准克隆轻轻吹打下细胞, 接种于 24 孔细胞培养板。其挑选出的克隆继续在不含选择压力的选择培养基中培养, 待成单层后, 收取上清检测 β 干扰素 (IFN- β_1) 即可查明共转化是否成功并表达 IFN- β_1 的阳性细胞株。

CHO-dhfr⁺ 细胞克隆生长液中 IFN- β_1 的检测 经克隆纯化后长成单层, 按正常细胞传代, 待细胞长成单层时换液, 再经 24 或 48 小时收获生长液, 用作检测样品。于 Hep-2 细胞, 加入水泡口炎病毒 (VSV) 0.1ml, 37℃, 24 小时后, 结晶紫-甲醛液染色观察检测结果。方法

表 1 转化 CHO-dhfr⁻ 细胞 Hu-IFN- β_1 表达水平测定结果

取样次数	Hu-IFN- β_1 表达水平 (IU/(ml · 48h))												
	转化细胞克隆株序号 No.												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	32.5	29.5	22.5	—	—	—	43.8	—	—	—	—	—	—
2	53.1	133	78.1	—	—	59	40	—	—	—	—	—	—
3	851.9	478.5	39.1	—	—	—	39.1	—	69.5	—	145.3	—	126

详见文献[7]。检测过的阳性细胞株继续在含选择压力的培养基中(选择培养基中加 MTX)培养。

结果与讨论

我们共转化了 pSVEH β_1 -106 质粒,转化后于选择培养基中长出 265 个直径约 1—2mm 细胞克隆,从中随机挑出 13 株细胞克隆进行表达水平检测,其中 7 株细胞有表达,表达阳性细胞克隆株占 54%,转化率为 1.33×10^{-4} (见表 1、2)。

在选择培养基使用的时间上,我们进行了摸索,所用的转化细胞单层在转化前 4 小时, A 瓶换上新鲜配制的选择培养基, B 瓶则换上新鲜配制的生长液。结果 A 瓶长出的细胞克隆数比 B 瓶的多一倍(见表 2),转化率显然比 B 瓶高。这可能是因选择培养基中不含 CHO-dhfr⁻细胞核酸代谢的急需物质,暂时使细胞核酸代谢途径受阻,当共转化时加入 pSVEH β_1 -dhfr-Ca₃(PO₄)₂共沉淀物时,则使得细胞对其亲合力增加,易于被细胞利用,整合到染色体上。这样外源 DNA 进入细胞的机率也就增大。

表 2 转化前加选择培养基与不加选择培养基的比较

细胞瓶号	转化前接种细胞量	转化前 4 小时所加液体		转化细胞克隆(株)	转化率
		选择培养基	常规生长液		
A	2×10^6	10ml		265	1.33×10^{-4}
B	2×10^6		10ml	134	0.67×10^{-4}

此外单层细胞的好坏是共转化成败的重要因素。细胞在使用之前需连续传 3 代并加少量的 MTX($0.01 \mu\text{mol/L}$)以去除回复突变细胞,保证所用的细胞正处于生长旺盛时期,因此时的细胞敏感性最佳。单层细胞的密度不宜过大,否则 dhfr⁻的细胞不易死亡,因细胞之间可交叉饲养^[9]。出现假阳性细胞克隆,给挑选带来困难。

共转化最关键的因素之一是 DNA-Ca₃(PO₄)₂悬液的制备。性质良好的 DNA-Ca₃(PO₄)₂共沉淀物首先取决于 DNA 的浓度

与纯度。DNA 总量一般不超过 $30 \mu\text{g/ml}$,以 $20 \mu\text{g/ml}$ 左右为宜。各种 DNA 用量可按下述原则确定: a. 携带 DNA 用量最佳值为 10— $12 \mu\text{g/ml}$,低于或高于此量均降低其促进转化的能力; b. 共转化基因与标记基因的比例越大越好^[8]。有的文献报道加载体 DNA(鲑鱼精子 DNA)可提高转化率^[9],但有的报道认为无此必要^[1]。我们均未加载体 DNA,看来效果也很好。另外共转化的各种 DNA 要纯,否则 DNA 中蛋白质含量对沉淀物性质影响极大,在 250 mmol/L 盐浓度下易析出的蛋白质造成粗颗粒沉淀物而影响转化实验^[8]。其二取决于 pH 值。试验中发现 pH 值低于 6.9 以下则不出现沉淀,而大于 pH7.5 以上沉淀颗粒出的又快又粗不能使用。最适 pH 在 7.0—7.10 之间。只要掌握好上述两因素就能制备出性质良好的共转化悬液(图 1,见图版 IV)

外源基因导入哺乳动物细胞后有的滞留于细胞质中,这样的表达只能持续 80 小时,为暂时性表达。而有的则被整合到染色体上,进行基因重排,这样就能把导入的基因稳定遗传而持久的表达。但具有这种功能的细胞只占 1/10 万。共转化导入的基因可以是目的基因和标记基因,但不一定都整合到染色体上。导入的也可能只是目的基因或标记基因。只导入目的基因的则 dhfr⁻细胞活不了,仅导入标记基因的 dhfr⁻细胞可以在选择培养基和氨甲蝶呤(MTX)的压力下存活,但不表达。实验中观察到类似于此类的细胞生长速度比正常细胞快 2—3 倍,是否癌变尚需进一步探讨。

病毒所阮力同志在转染方面予以指导;王汝懿,辛颜彬,厉新奇同志在表达水平检测及细胞培养方面给予大力帮助,特此致谢。

参考文献

- [1] Chu. G. et al.: *Gene*, 1981, 13, 197.
- [2] Wigler. M. et al.: *Cell*, 1979, 16, 777.
- [3] Wigler. M. et al.: *Cell*, 1977, 11, 223.
- [4] Schaefer, R. M. et al.: *Science*, 1982, 215(4529), 166.
- [5] Urlaub. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, 77(7), 4216.

(下转第 223 页)

A_{260}/A_{280} 比值在 1.7—2.0 之间,平均高于 1.8。表明基本上无蛋白质污染。从图 2 还可以看出 TLS 法制备的 DNA 与蛋白酶水解法制备的 DNA 分子量基本相当。本工作通过控制沉淀条件去除 RNA,结果尚满意。对于微量样品一般不采用沉淀手段,针对下一步研究的要求考虑是否去除 RNA 及去除方法。

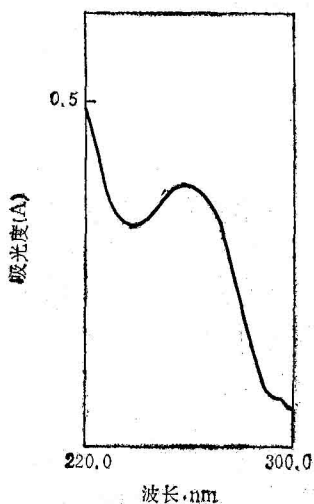


图 3 TLS 法制备 DNA 的吸收光谱曲线

图 4 显示 TLS 法制备的 DNA 经限制酶水解后的凝胶电泳图谱和凝胶原位杂交结果。从电泳结果上看, TLS 法制备的 DNA 可被限制酶完全降解。杂交结果也得到 DNA 被完全降解时才能产生的特异区带。上述结果表明经酚、氯仿、乙醇或乙醚处理后样品中已不再含有 TLS,不会影响下一步的酶促反应。

用蛋白酶水解法制备 DNA 一般要 1—2 天时间。由于 TLS 与蛋白质作用速度快,一般 2—3 小时内即可完成全部制备过程。 TLS

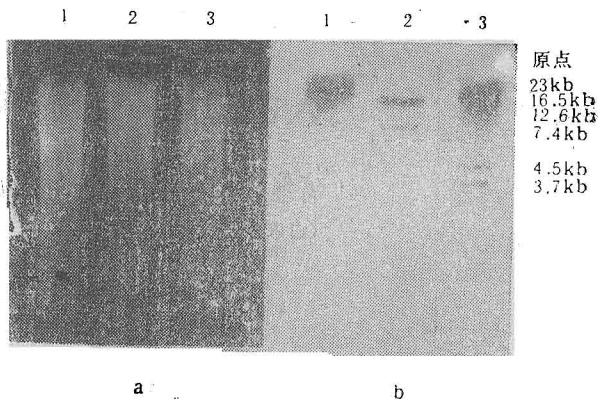


图 4 TLS 法制备的 DNA 限制酶图谱 (a) 及凝胶原位杂交放射自显影结果 (b)

1. EcoRI 水解; 2. Egl II 水解; 3. Hind III 水解经 α - ^{32}P 标记的人 α -珠蛋白基因探针杂交

法所需设施、试剂亦较蛋白酶水解法简单和经济。该法广泛适用于从外周血、组织、培养细胞、羊水细胞等组织、细胞中提取 DNA。尤其适用于直接从微量血,细胞及活检组织中提取 DNA。对于基因筛查、产前基因诊断,法医物证的基因分析及实验动物医学等研究有实际应用价值。并有可能推广到病毒、微生物基因的提取。在医学生物学研究领域中有着广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] 王德宝等:《核酶——结构与功能与合成》(下册)。科学出版社,北京,1987,387。
- [2] 罗 格等:《中国医学科学院学报》1987,9(6),401。
- [3] 沈 岩等:《中国医学科学院学报》1987,9(6),402。

[本文于 1988 年 4 月 15 日收到]

(上接第 217 页)

- [6] Chernajovsky. Y. et al.: *DNA*, 1984, 3(4), 279.
- [7] 肖成祖等:《中华微生物和免疫学杂志》,1985,5(3), P20—23。
- [8] 侯云德主编:《病毒基因工程的原理与方法》,人民卫

生出版社,1985,151—158。

- [9] Graham. F. L. et al.: *Virology*, 1973, 52, 456.

[本文于 1988 年 1 月 4 日收到]

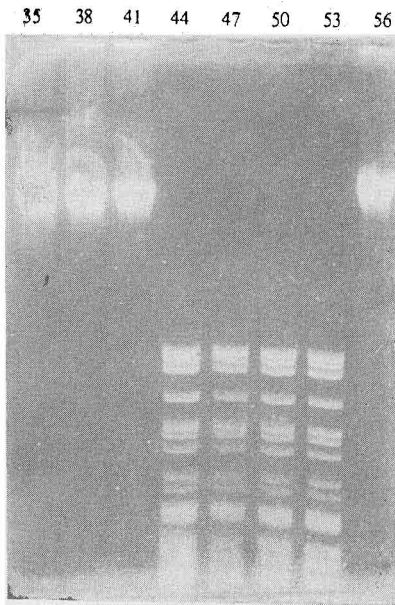


图 1 P_{11} 柱层析后酶活性分布



图 2 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀后酶液对 λ DNA 反应 18 小时的酶切图谱

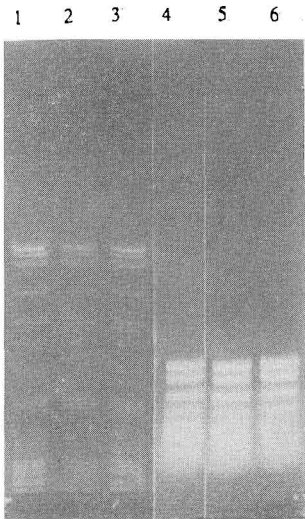


图 4 *MspI* 和 *HpaII* 对 λ DNA 和 pBR322 的酶切图谱

(1) *MspI* + λ DNA (2) *HpaII* + λ DNA (3) (*MspI* + *HpaII*) + λ DNA (4) *MspI* + pBR322 (5) *HpaII* + pBR322 (6) (*MspI* + *HpaII*) + pBR322

丁 曼等:“人 β 干扰素重组质粒导入 CHO-dhfr⁻细胞”一文的图 1

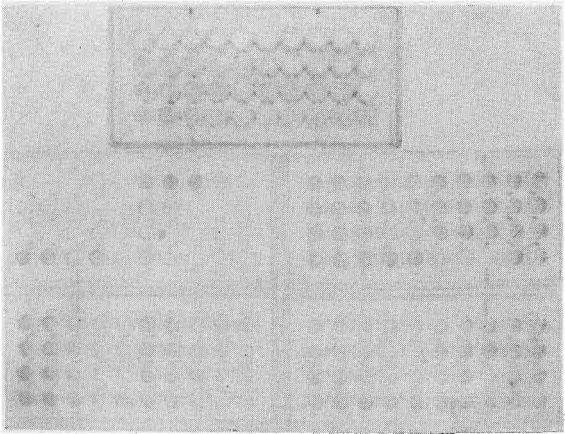


图 1 40 孔板测定 Hu-IFN- β_1 表达水平
图板第一排(横向)均为 Hu-IFN- β_1 国际标准品, 阳性对照。其余各排孔为筛选的细胞株培养上清液。最下面的一板最后一排为正常细胞培养基上清, 阴性对照