

简 报

人 β -干扰素重组质粒在 CHO-dhfr⁻ 细胞中
表达水平与 MTX 的关系

于 曼 李 彤 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 100850)

关键词 人 β -干扰素重组质粒, 基因表达, 氨甲喋呤, 二氢叶酸还原酶缺乏, 中国仓鼠卵巢细胞

人 IFN β 基因编码序列与 pSV₂-dhfr⁻ 载体重组构建的由 SV₄₀ 早期启动子控制的组成性表达 cDNA 克隆, 转染 CHO-dhfr⁻ 细胞, 用氨甲喋呤 (MTX) 逐渐加压, 观察其表达情况。二氢叶酸还原酶 (dhfr) 有一特性, 其基因拷贝数可在 MTX 的选择压力下扩增, 利用这一特性提高人 IFN β 基因的表达。我们分别把两个构建不同的 cDNA 克隆转染 CHO-dhfr⁻ 细胞后, 观察 MTX 与表达水平的关系。

人 IFN β 基因与 pSV₂-dhfr⁻ 载体构建的二个表达载体转染 CHO-dhfr⁻ 细胞后, 获得多株克隆, 其特点如下:

1.87106克隆 此克隆的主要特点是用 HindII 酶制备去除 5' 端调控序列而保留 3' 端调控序列的 IFN β 基因编码片段, 大小为 0.768kb 与 pSV₂-dhfr 载体的 HindIII 位点重组, 此克隆保留 dhfr 序列。

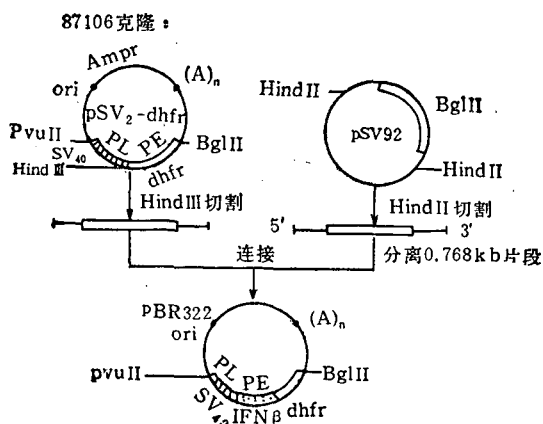


图 1

2.8801克隆 其特点是用 HindII 与 BglII 酶制备去除 5' 端调控序列和 3' 端抑制转译序列的 IFN β 基因编码片段与 pSV₂-dhfr⁻ 的 HindII 和 BglII 位点连接。此克隆去除了 dhfr 序列。

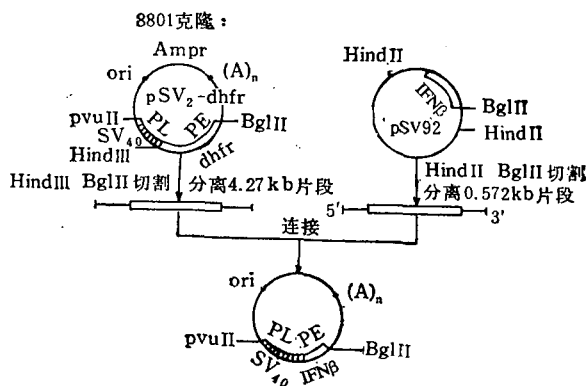


图 2

材料与方法

CHO-dhfr⁻ 细胞: 侯云德教授惠赠; 氨甲喋呤 (MTX methotrexate): Sigma 产品; DMEM: GIBCO 产品; 重组质粒: 87106^[1], 8801

转染方法详见文献^[2]。采用磷酸钙共沉淀方法转染 87106, 8801 质粒于 CHO-dhfr⁻ 细胞。87106 质粒因本身带有 dhfr 基因, 故转染时不加 pSV₂-dhfr 质粒, 而 8801 质粒则与 pSV₂-dhfr 共转染。转染 24h 后更换选择培养基直至细胞克隆出现, 收取细胞培养液检测 IFN β 表达情况。选出的细胞克隆用 MTX 从 0.05 μ mol/L 开始递增加压进行筛选。

结果与讨论

转染到受体细胞内的外源基因必整合到宿主细胞的染色体上,在选择压力(MTX)的影响下,才能有效、持续、稳定的表达。因而我们从转染开始着手,对转染质粒的构型,加 MTX 的浓度、时间等做了摸索,找出最佳条件。

我们把待转染的 87106、8801 质粒分别以开环、闭环二种形式导入 CHO 细胞,将二种转染方法进行比较,见表 1。开环转染是用 EcoRI 酶将其转染克隆的链打开,以开链构型进行转染。

表 1 开闭环结构对转染率的影响

	质粒	质粒构型	转染细胞克隆(株)	转化率
87106	A ₁	开环	203	1.02×10^{-4}
	A ₂	闭环	209	1.05×10^{-4}
8801	B ₁	开环	193	0.97×10^{-4}
	B ₂	闭环	289	1.45×10^{-4}

从表 1 中可看出,开闭环方式转染,两者间无大差别,对转化率无大影响。有文献报告以开环形式的质

粒导入受体细胞后易被整合染色体,且转染率高,但我们所做的结果与此相反,似乎闭环的略好些。开环构型的质粒进入受体细胞后,易被受体细胞核酸酶降解,如果不被降解,可能比闭环结构的易整合染色体,因本身是以开链的形式存在。8801 质粒以闭环的形式表达 IFN β 比 87106 高,8801 克隆耐受 MTX 的能力较 87106 强,见表 2。

当加压力至 $0.3 \mu\text{mol/L}$ 时,约 50% 的细胞已耐受不住,以开环构型的 a₁、b₁ 克隆尤其突出,而能耐受住的细胞克隆过此关后便生长良好。此时表达 IFN β 也较稳定。当选择压力加至 $0.60 \mu\text{mol/L}$ 时,约 70—80% 的细胞已耐受不住,逐渐死亡。总之,每增加 $0.10 \mu\text{mol/L}$ 的压力所转染的细胞克隆需适应一段时间。如在压力不变的情况下,一周之内适应不了,说明细胞已承受不了此浓度的压力。以开环结构转染的细胞克隆在 $0.30 \mu\text{mol/L}$ 的压力下便耐受不住。我们共挑选了 48 株开环结构转染的细胞克隆,压力加至 $0.60 \mu\text{mol/L}$ 后,则细胞全部死亡。无一株能存活。耐住压力的细胞克隆表达 IFN β , 见表 3。

a₃、b₃ 克隆株的表达随着压力的增高而渐上升,同时也受细胞的影响。细胞生长良好,旺盛时期表达 IFN β 的活性也高,并且表达的水平与细胞的数量有很大的关系, 2×10^6 细胞要比 2×10^5 细胞表达高。细胞

表 2 87106 8801 克隆抗 MTX 能力

细胞克隆 MTX ($\mu\text{mol/L}$)		MTX 浓度下细胞存活率 (%)													
		0.05	0.15	0.30	0.40	0.60	0.74	0.82	1.40	1.56	1.60	1.72	2.05	3.05	3.60
87106	a ₁ (开)	50	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	a ₂	95	50	25	65	10	5	0	0	0	0	0	0	0	0
	a ₃	98	90	60	80	15	50	20	10	20	40	80	60	85	85
	b ₁ (开)	60	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	b ₂	90	50	30	80	20	60	80	90	80	95	95	85	95	98
	b ₃	98	95	65	90	30	85	90	98	90	98	90	80	98	98

表 3 MTX 选择压力下 IFN β 表达活性

细胞克隆 MTX ($\mu\text{mol/L}$)		IFN β 表达活性 (u/ml/48h)														
		0	0.15	0.30	0.40	0.60	0.74	0.82	1.40	1.56	1.60	1.72	2.05	2.35	3.05	3.60
87106	a ₁ (开)	364.1	49.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	a ₂	626.3	41.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	a ₃	955.9	62.5	98	47	40	198.4	196	445	213	509	500	300	415	577	643
8801	b ₁ (开)	500	41.5	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	b ₂	955.9	37.3	63	206	56	375	125	445	350	500	425	199	488	788	881
	b ₃	955.9	165.6	299	348	80	250	140	499	213	416	573	394	535	998	1024

生长状况、数量与表达有一定关系。以 b_3 克隆为例, 当在 $0.60 \mu\text{mol/L}$ 压力下细胞生长较差, 存活细胞只占 30% 时, 表达也随之降低。从表 3 中看出 a_3 、 b_2 、 b_3 细胞克隆早期表达很理想, 为什么突然降低, 分析有以下几方面原因: ① 拷贝数的迅速丢失。Kaufman, R.J. 等人报告^[1], 外源基因转染往往也只有 1—5 个拷贝整合染色体, 这为数不多的拷贝在无 MTX 的作用下会很快丢失。只有在 MTX 的压力下才能稳定存在逐渐增加, 以此推断早加 MTX 对以后的稳定表达可能起一定的作用。 a_3 、 b_2 、 b_3 克隆是在转染后第 62 天才开始加压。② 细胞生长状况: 细胞生长的好坏直接关系到 IFN β 的转录、翻译及分泌功能, 因刚加 MTX, 细胞不适应, 约 1/3 的细胞被淘汰, 细胞处在生长低落期, 故也影响其表达。③ 暂时性表达: 这种可能不大, 暂时性表达只限于 80h 内。④ IFN β 本身就不太稳定, β 干扰素多肽一级结构第 17 位的半胱氨酸 (Cys) 影响其分子稳定, 对干扰素的活性发挥有一定的影响, 如将其位点的 Cys 换成 Ser (丝氨酸), 可使分子稳定^[4], 而不影响其生物活性。我们也发现将放置一周后 (4°C) 的 IFN β 表达样品与放置 (4°C) 48h 的样品进行检测, 放置一周的 IFN β 活性明显低于 48h

的, 不知这是否与分子稳定性有关。

我们将二种不同构型的 IFN β 重组质粒转染 CHO-dhfr⁻ 细胞进行比较, 87106 质粒与 8801 质粒在 IFN β 编码序列的 5' 端构建上完全相同, 均由 SV α 早期启动子调控, 所不同的是 87106 保留了 3' 端全部序列, 而 8801 则去除了 3' 端非编码区全部序列。Kruys. V. 等人报道了 3' 端的非翻译区 (untranslated regions UTRs) 对表达有抑制效应^[5]。从上述的表达情况看 8801 似乎比 87106 略好些, 但不甚理想。总之, 基因表达是受诸方面因素影响, 有许多问题还需继续研究, 尤其是表达的稳定性尚需深入探讨。

参 考 文 献

- 1 王晓鸣等. 遗传学报, 1989; 16(4): 312
- 2 于曼等. 生物化学与生物物理进展, 1989; 16(3): 215
- 3 Kaufman R J *et al.* *Molecular and Cellular Biology*, 1983; 3(4):699
- 4 Mark D F *et al.* *PNAS*, 1984; 81: 5662
- 5 Kruys V *et al.*, *PNAS* 1987; 84: 6023

[本文于 1990 年 3 月 9 日收到,

6 月 21 日修回]

(上接第 223 页)

参 考 文 献

- 1 Chang L, Clifton P, Barter P *et al.* *Hepatology*, 1986; 6:46
- 2 Vanzetti G. *Clin Chim Acta*, 1964; 10: 389
- 3 Sahagian B, Levinet V E. *Clin Chem*, 1964; 10:

116

- 4 上海市医学化验所. 临床生化检验(上册). (上海: 上海科学技术出版社, 1979: 183
- 5 Richmond W. *Clin Chem*, 1976; 22:1579
- 6 Yao T, Sato M, Kobayashi Y *et al.* *Anal Biochem*, 1985; 149:387

[本文于 1990 年 1 月 16 日收到, 3 月 9 日修回]