

dan (Department of Cell Biology, China Medical University, Shenyang 110001, China;

¹⁾Department of Biochemistry, China Medical University, Shenyang 110001, China).

Abstract Protein kinase C (PKC) and its inhibitor activities were measured in human colorectal cancer cell line CCL₂₂₉ induced by retinoic acid (RA) and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ (1, 25 (OH)₂VD₃) both for two days and phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for six hours. The results showed that total PKC activity was markedly increased after treatment with three inducers ($P < 0.05$). The cytosolic PKC activities were significantly increased in RA and 1, 25 (OH)₂VD₃ treated

CCL₂₂₉ cells ($P < 0.05$). In PMA-treated cells, the membrane ratio (membrane activity/total activity) was significantly increased ($P < 0.01$). The levels of PKC inhibitor in cytosolic membrane supernatants after treatment with three inducers were all decreased. Among these three inducers, 1, 25 (OH)₂VD₃ caused significantly difference compared with control. The results implied that PMA translocates PKC from the cytosolic to membrane fraction, PKC and its inhibitor in RA, 1, 25 (OH)₂VD₃ and PMA-induced cells are in different relatively parallel relationship.

Key words protein kinases C, inhibitor, human colorectal cancer cells, differentiation

人 GM-CSF 在链霉菌中分泌表达的研究

刘岱岚 强伯勤 袁建刚 李元¹⁾ 梁植权

(中国医学科学院基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005)

摘要 对链霉菌表达体系 pIJ459/*S. lividans* TK54 中表达外源基因 hGM-CSF 的可行性进行了探索, 分析了影响外源基因表达的某些因素如: SD 与 ATG 之间的距离, 时间对表达的诱导等. 为获得外源基因的高效表达探索了最适条件, 然后利用 MEL 信号肽与目的基因片段融合, 在链霉菌中获得了分泌型 hGM-CSF 表达产物, 其中有 1/3 直接分泌到培养基中, 其纯化产物经 TF-1 细胞培养及集落形成实验均证实其生物学活性达到 5 MU/L.

关键词 集落刺激因子, 基因表达, 链霉菌, 信号肽

1 引言

链霉菌是一种很有应用前景的表达体系, 它可以获得外源基因的分泌表达, 表达产物直接进入培养基中, 并且具有糖基化形式. 粒细胞-单核巨噬细胞集落刺激因子有多种生物学活性, 作用于多种细胞系, 其主要作用是刺激造血祖细胞增殖, 从静止期进入 S 期并分化为粒细胞、单核巨噬细胞. 临床上用于治疗多种原因引起的白细胞减少症. 首先在链霉菌中获得了 GM-CSF 的胞内表达产物, 在此基础上利

用 MEL 信号肽分泌表达 GM-CSF, 其中有 1/3 直接分泌到培养基中. 表达蛋白占菌体总蛋白的 15%. 集落形成实验及 TF-1 细胞培养均证实了表达产物的生物学活性.

2 材料与方法

2.1 材料

链霉菌表达质粒 pIJ459^[1]、pIJ702^[2] 和变铅青链霉菌 *S. lividans* TK54 菌株均来自英

¹⁾中国医学科学院医药生物技术研究所.

收稿日期: 1995-02-13, 修回日期: 1995-06-10

国 Hopwood 实验室. TF-1 测活细胞株由预防医学科学院病毒所李玉英教授惠赠. hGM-CSF 的 PCR 扩增测序片段由本所陈松森教授惠赠. 人肋骨 (骨髓细胞) 来自协和医院外科手术病人 (未经放疗、化疗的非血液病人). 各种工具酶均为本所医学科学院友谊开发公司产品.

2.2 方法

2.2.1 GM-CSF 基因片段的克隆及表达: 将 GM-CSF 全长基因片段 EcoR I 酶切补齐后, 与 Xba I 酶切补齐的表达载体 pIJ459 连接, 构建成两种非分泌型重组表达载体 pIJ459/GM-CSF2 和 pIJ459/GMCSF1, 使其 SD 的 3' 端与 ATG 之间的距离分别为 13 bp 和 18 bp. 将 GM-CSF 与信号肽 MEL398 融合, 克隆进 pIJ459 的 Xba I 和 Hind III 位点之间构建成分泌型重组表达质粒 pIJ459/MEL398-GMCSF. 上述三种重组质粒以原生质体方式转化链霉菌 *S. lividans* TK54 菌株, 杂交筛选及酶切鉴定得到阳性克隆, 将重组菌株于 28℃、YEME 培养基中, 培养数天进行表达.

2.2.2 表达产物的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳及蛋白质印迹分析: 重组菌株经溶菌酶处理后, 超声破碎, 离心制备裂解上清液. 蛋白电泳按 Laemmli^[3] 的方法进行. 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶为 12.5%, 考马斯亮蓝 R250 染色. 蛋白电泳结束后, 将胶转移到电转装置上, 60 V、0.26 A 电转 4~6 h, 切下转有蛋白质分子量标准的部分, 0.1% 氨基黑染色. 其余的膜用 6% 小牛血清封闭后, 加入一抗、二抗进行特异反应, 显色观察. 一抗为 1:1000 的兔 hGM-CSF 抗血清, 二抗为 1:2000 的碱性磷酸酶-羊抗兔 IgG, 反应底物为 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸 (BCIP) 和氮蓝四唑 (NBT).

2.2.3 表达产物的纯化及其生物学活性的测定: a. 菌体培养液经过透析, 33%~65% 过硫酸铵沉淀和 Sephadex G-75 柱层析纯化后, 得到分泌型 GM-CSF 的纯化产物. TF-1 细胞是 Kitamura 博士用白血病患者血细胞建立的细胞株, 其生存依赖于 hGM-CSF^[4]. 细胞培养于 RPMI 1640 培养基中, 含有 10% 胎牛血清和

2 μg/L 的 hGM-CSF, 每 2~3 天传代一次. b. 集落形成实验^[5]: 测试 CFU-GM 的培养体系是 35% 小牛血清, 0.3% 琼脂, 2×10⁵ 骨髓细胞和 RPMI1640. 从人肋骨制备的骨髓细胞中分离出单个核细胞, 稀释为 2×10⁸ 个/L 的骨髓细胞悬液. 每个 Φ3.5 mm 的平皿中加入 1 ml 培养体系和 100~200 ml 待测样品 (阳性对照组为胎肌条件培养液^[6]). 37℃、5% CO₂ 孵箱中培养 7~9 d, 每个实验点重复做三只小平皿.

3 结 果

3.1 两种非分泌型表达质粒的构建

将 GM-CSF 基因片段 EcoR I 酶切补齐后, 连接到 Xba I 酶切补齐的表达载体 pIJ459 上, 构建成非分泌型重组表达质粒 pIJ459/GMCSF2, 其 SD 的 3' 端与 ATG 之间的距离为 13 bp. 将 GM-CSF 片段 EcoR I 酶切后其 5' 端为 EcoR I 位点 3' 端为 TGATGA 平末端, 插入 pBSSK 质粒的 EcoR I 和 EcoR V 位点之间, 构建成质粒 PG. PG 质粒经 Xba I 和 Hind III 双酶切下 GM-CSF 片段, 连接到 pIJ459 的 Xba I 和 Hind III 位点之间, 构建成非分泌型重组表达质粒 pIJ459/GMCSF1, 其 SD 的 3' 端与 ATG 之间的距离为 18 bp.

3.2 分泌型表达质粒的构建

pIJ702 经 Bcl I 酶切下 1567 bp 的 MEL 序列 (酪氨酸酶基因), 经 Sma I 酶切, 得到 MEL398 信号肽片段, 连接在 PG 质粒上 GM-CSF 片段之前. 经酶切鉴定翻译框架正确, 将所需重组菌株 pIJ459/MEL398-GMCSF 转化链霉菌 *S. lividans* TK54 菌株, 杂交筛选及酶切鉴定得到阳性克隆, 将重组菌株于 28℃、YEME 培养基中培养数天, 进行表达.

3.3 GM-CSF 基因表达及产物分析

将上述重组表达菌株 28℃ 培养 20 h, 分組转种后再分别培养 24、48、72、96 和 120 h, 超声破碎菌体制备裂解上清液, 并收集胞外培养基, 进行 SDS-PAGE 电泳分析. 为了研究培养时间对外源基因表达的影响, 以目的基因表达量占菌体总蛋白的百分含量 (SDS-PAGE 凝胶

扫描分析)为标准,对不同培养时间作曲线,观察这一动态过程.结果表明:菌体培养第3天时,外源蛋白表达量最高.蛋白电泳及凝胶扫描分析表明:重组菌株 pIJ459/GMCSF1(SD的3'端与ATG之间的距离为18 bp)的表达量比 pIJ459/GMCSF2(SD的3'端与ATG之间的距离为13 bp)高,胞内裂解产物的蛋白质印迹分析可见在16 000处有明显的特异反应带.

分泌型重组表达菌株 pIJ459/MEL398-GMCSF 中目的基因的表达占菌体总蛋白的15%,其SDS-PAGE分析见图1,根据蛋白电泳时胞内外表达产物的上样量和蛋白质印迹分析比较结果见图2,表达产物中有1/3直接分泌到胞外培养基中.

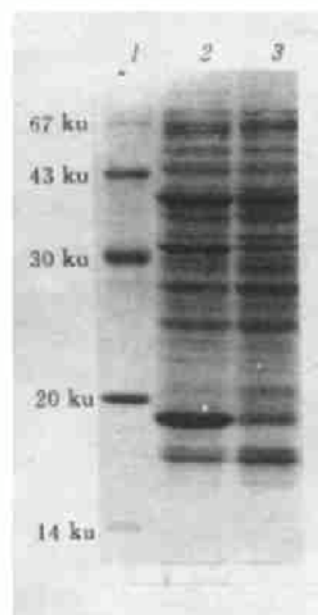


图1 pIJ459/MEL398-GMCSF 菌体蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
1: 标准分子量(67, 43, 30, 20, 14 ku), 2: pIJ459/MEL398-GMCSF, 3: 阴性菌株对照.

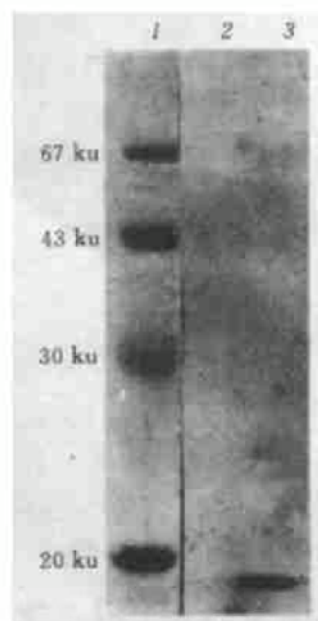


图2 pIJ459/MEL-GM-CSF 中分泌表达产物蛋白质印迹分析
1: 标准分子量(67, 43, 30, 20, 14 ku), 2: 阴性菌株对照, 3: pIJ459/MEL398-GMCSF.

3.4 表达产物的纯化及其生物学活性的检测

rGM-CSF 纯化产物可维持 TF-1 细胞的生存,未加 rGM-CSF 的对照组 TF-1 细胞在2~3 d裂解死亡.

取不同量分泌型重组菌株 pIJ459/MEL398-GMCSF 的菌体裂解上清液,加入到骨髓细胞半固体培养体系中,37℃、5% CO₂ 孵箱中培养9 d,形成的集落见图3,并进行集落计数,推算表达产物的生物学活性达到5 MU/L.

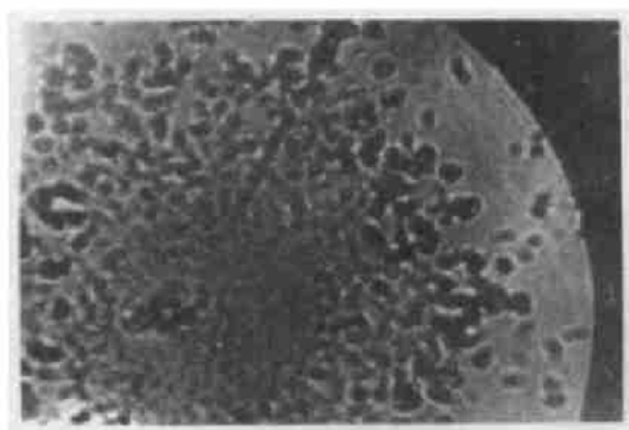


图3 集落形成实验

4 讨论

链霉菌属于放线菌目链霉菌科,是介于原核与真核之间的微生物,它既具有原核生物高表达特点,又使表达蛋白更接近天然构象.链霉菌表达体系的特点:a.具有类似原核启动子-10区和-35区序列、SD序列.b.近6000种微生物来源的抗生素中,60%以上是链霉菌产生的,因此对链霉菌中外源基因的下游工程十分熟悉.其最显著的优点是可以获得外源基因的分型产物.在构建的两种分型重组表达质粒中 pIJ459/GMCSF1(SD的3'端与ATG之间的距离是18 bp)的表达量比距离为13 bp时高,与大肠杆菌3~11个核苷酸的距离相比,链霉菌中此段序列偏长.这与链霉菌的特点有关,链霉菌DNA组成中GC含量高达70%~75%(*E. coli*中56%),一些富含GC的密码子如CGG、CGC(Arg)和GCC、GCG(Ala)

等高度重复使用,核糖体结合位点周围易形成“发卡”和回文结构,SD的3'端与ATG之间的距离较长有利于核糖体结合位点的暴露。

链霉菌中蛋白质表达无明显的诱导过程,不同阶段菌体培养物表达的各种蛋白成分不同,外源基因的表达也无例外,是一个动态的连续过程。本实验表明:GM-CSF基因在链霉菌中表达时,目的基因表达的峰值时间在48~72 h之间,即对数生长晚期和生长静止相早期,此现象可能具有一定的普遍性,说明链霉菌中基因表达在时间上的调控虽然复杂,但仍是有规律可循的。

链霉菌信号肽 MEL398 是一段典型的疏水序列信号肽,其长度为30 aa。我们构建的分泌型菌株其表达产物的1/3直接分泌到培养基中,胞内表达产物占菌体总蛋白的15%,活性测定达到5 MU/L。本工作为利用链霉菌表达体系分泌表达外源基因提供了一些理论依据,并为在链霉菌中大规模生产hGM-CSF创造了一定的前期条件。

参 考 文 献

- 1 Perman, D. J Mol Biol, 1983; 167: 391
- 2 Kieser T. Mol Gen Genet, 1982; 18: 223
- 3 Laemmli U K. Nature, 1970; 227: 680
- 4 Burgess A W. Blood, 1987; 69 (1): 43
- 5 吴祖泽. 造血干细胞移植基础. 北京: 人民卫生出版社, 1988; 53

- 6 杨景山. 医学细胞化学与细胞生物技术. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1990; 301

Study on Secretive Expression of hGM-CSF in Streptomyces. Liu Dailan, Qiang Boqin, Yuan Jiangang, Li Yuan¹⁾, Liang Zhiqian (Liang Chih-chuan) (*Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China*; ¹⁾*Institute of Medical Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China*).

Abstract The high level secretive expression of hGM-CSF in streptomyces was obtained. The factors, which can influence the exogenous expression in prokaryotes, such as the distance between SD and ATG, and the features of expression induction in streptomyces, etc. were studied. Then the secreted hGM-CSF protein in streptomyces using the signal peptide MEL were obtained. One third of the expression products were secreted. By the experiment of colony stimulating factor formation and cell culture of TF-1 (hGM-CSF dependent cell line), its biological activity determined is 5 MU/L.

Key words GM-CSF, gene expression, streptomyces, signal peptide

H₂O₂-Fe³⁺所致人淋巴细胞 DNA 双链断裂损伤

隋建丽 吕 星 周平坤 方允中

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 采用脉冲电场凝胶电泳法检测 H₂O₂-Fe³⁺体系产生的 OH· 对人淋巴细胞 DNA 的双链断裂损伤。H₂O₂-Fe³⁺浓度与 DNA 双链断裂呈明显量效关系; 随 OH· 作用时间延长, 细胞 DNA 双链断裂加重; 过氧化氢酶对 OH· 损伤有明显抑制作用。脉冲电场凝胶电泳法可检测到的 H₂O₂ 和 FeCl₃ 引起细胞 DNA 双链断裂的最低浓度为 0.3 mmol/L 和 6 μmol/L。