

重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 在哺乳动物细胞中的表达

徐 艳 李 鹏 张蕴惠 章锦才 王大章

【摘要】 目的 检测重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 在哺乳动物细胞系 COS-1 和 CHO 细胞中的表达。方法 采用脂质体介导基因转染技术,将已构建的 pcDNA3/sIL-1R(I) 质粒 DNA 导入体外培养的哺乳动物细胞系 COS-1 和 CHO 细胞中。加入 G418 对转染的细胞加压筛选,获得稳定转染的细胞。酶联免疫吸附实验(ELISA)对重组质粒在 COS-1 和 CHO 细胞表达产物的含量进行检测。结果 G418 筛选获得稳定转染的 COS-1 和 CHO 细胞,对照组加压后第 10~20 天细胞全部死亡。转染组第 15~23 天汇片达 80% 左右。转染组细胞培养液和冻融液中 sIL-1R 表达量均显著高于对照组($P < 0.05$)。结论 以 sIL-1R 胞外成熟肽编码区基因作为目的基因构建的重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 在哺乳动物细胞系中具有表达功能。

【关键词】 人可溶性白细胞介素-1受体; 哺乳动物细胞; 体外转染; 基因治疗

Expression of Constructed Eukaryotic Vectors Carrying Encoding Gene of Soluble Human Interleukin-1 Receptor in Mammalian Cells

XU Yan*, LI Peng, ZHANG Yunhui, et al. (* Department of Oral Medicine, College of Stomatology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

【Abstract】 Objective This study is to make sure if the constructed pcDNA3 carrying encoding gene of sIL-1R can be expressed in mammalian cells *in vitro*. **Methods** COS-1 cells and CHO cells were respectively transfected with recombinant plasmid pcDNA3/sIL-1R by liposome. The protein expression products were detected by ELISA. **Results** The results indicated that the protein expression products could be detected in the cell plasma and the cell culture supernatant. The expression level in experimental groups was much higher than that in control groups($P < 0.05$). **Conclusion** The constructed pcDNA3/sIL-1R can express interest protein in mammalian cells and this establishes the basis for future investigation on gene therapy of periodontitis and other inflammatory diseases.

【Key words】 human soluble interleukin-1 receptor; mammalian cells; *in vivo* transfer; gene therapy

基因治疗是现代医学治疗中的一个崭新领域,利用基因转移技术将炎性细胞因子拮抗剂基因转移到牙周组织中进行抗炎治疗,有望为牙周病治疗提供新模式。白介素-1(interleukin-1, IL-1)是导致牙周病变过程中组织破坏的主要炎症介质,人可溶性白介素-1受体(soluble interleukin-1 receptor, sIL-1R)是 IL-1 的天然拮抗剂,能阻断 IL-1 的生物学活性。将外源 DNA 通过物理或化学的方法导入真核细胞这一过程称为

转染¹⁻³, sIL-1R cDNA 能在哺乳动物细胞中表达是利用其进行基因治疗的关键前提之一。目前认为检验构建的重组质粒是否能够在哺乳动物细胞中表达,最直接的办法就是将该重组质粒导入体外培养的哺乳动物细胞,用相应的方法检测目的蛋白质。本实验采用脂质体介导的转染法,将已构建的人 sIL-1R(I) 真核表达载体 pcDNA3/sIL-1R(I) 导入体外培养的哺乳动物细胞系 COS-1 和 CHO 细胞中,再用酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 sIL-1R(I) 的表达情况。

1 材料和方法

1.1 试剂与设备

COS-1 细胞株(四川大学基础医学院分子生物学实验室提供), CHO 细胞株(四川大学基础医学院免疫教研室提供),重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I)⁴, DMEM 培养基, RPMI-1640 培养

本课题为国家自然科学基金(编号 3917081)及江苏省自然科学基金(编号 2003422)资助项目

作者单位:210029 南京医科大学口腔医院口腔科(徐 艳),浙江省嘉兴市第一医院口腔科(李 鹏),四川大学华西口腔医院口腔科(张蕴惠),广东省口腔医院口腔科(章锦才),四川大学华西口腔医院口腔颌面外科(王大章)

通讯作者:张蕴惠

基、胎牛血清、阳离子脂质体 LipofectAMINE™ 试剂、Geneticin (G418 Sulfate) (GIBCO 公司, 美国), 重组人可溶性 IL-1R(I)、山羊抗人 IL-1R(I) 抗体 (R&D 公司, 美国), QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit(QIAGEN 公司, 美国), 辣根酶标记兔抗山羊 IgG (H+L) (北京中山生物技术有限公司), BSA (Sigma 公司, 美国), ELISA 试剂盒 (Roche 公司, 瑞士)。

UV-265 型紫外分光光度计 (岛津公司, 日本), L8-60M HXSO 低温超速离心机 (Beckman 公司, 美国), BIO-TEK EL404 全自动洗板机 (BIO-TEK 公司, 美国), HTS 7000 Plus 微型紫外荧光/可见光高效分析仪 (PE 公司, 美国)。

1.2 重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 转染 COS-1 和 CHO 细胞

1.2.1 超纯重组质粒 DNA 的中等量制备

吸取已构建的携带重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 的转化子保种菌液 200 μ l 至 25 ml 含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡, 将菌悬液收集于离心管中, 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 弃培养液, 使细菌沉淀尽可能干燥。用 QIAfilter Plasmid Midi and Maxi Kit 进行重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 的中等量制备, ddH₂O 溶解沉淀。紫外分光光度计测定质粒 DNA 的 OD₂₆₀ 及 OD₂₈₀ 值, 计算其浓度及纯度。

1.2.2 COS-1 细胞培养及质粒稳定转染

COS-1 细胞复苏后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM (含青霉素 1 $\times 10^5$ 万单位/L 和链霉素 1 $\times 10^5$ 万单位/L) 培养液常规培养。

将 pcDNA3/sIL-1R(I) 质粒稀释浓度为 1 g/L, 取 3 μ l 加入至 100 μ l 无血清、无双抗的 DMEM 中, 混匀为 A 液。取 10 μ l LipofectAMINE™ 脂质体加入至 90 μ l 无血清、无双抗的 DMEM 中, 混匀为 B 液。A、B 液混匀, 室温静置 45 min。

转染前 24 h 将 COS-1 细胞传代至 6 孔培养板中, 细胞当天处于 50% 的汇合率。用无血清、无双抗的 DMEM 洗 2 次, 弃培养液。吸取 800 μ l 无血清、无双抗的 DMEM, 加入 AB 混合液中, 混匀。均匀滴加在 COS-1 细胞表面, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 继续培养 5 h。加入 1 ml 含 20% 胎牛血清的 DMEM, 继续培养过夜。24 h 后, 弃转染液, 换用含 10% 胎牛血清的 DMEM 继续培养 48 h。加入 G418 (终浓度 1 g/L) 和含 10% 胎牛血清的 DMEM, 对转染的 COS-1 细胞进行加压筛选, 以获得稳定转染的 COS-1 细胞。每 4 d 换液 1 次, 加压筛选至对照组细胞 (未转染的 COS-1 细胞) 全部死亡。将 G418 浓度降为 500 mg/L, 继续培养至转染组细胞生长汇合, 即可转至 30 cm² 的培养瓶中培养, 收集细胞培养上清液及细胞悬液, -20 $^{\circ}$ C 冻存, 以备 ELISA 检测。同时, 以未转染质粒的 COS-1 细胞为对照组。

1.2.3 CHO 细胞培养及质粒稳定转染

质体介导的稳定转染 CHO 细胞的步骤与稳定转染 COS-1 细胞的相同, 只是 DMEM 培养液全部换成 RPMI 1640 培养液。同时, 以未转染质粒的 CHO 细胞为对照组。

1.3 直接 ELISA 法检测细胞培养液及细胞冻融液中 sIL-1R(I) 的表达

将待测样品 100 μ l/孔包被酶标板, 37 $^{\circ}$ C 160 r/min 转速离心 2 h (湿盒); 4 $^{\circ}$ C 静置过夜 (湿盒), 洗板 3 次, 保留 30 s, 振荡; 加入 120 μ l/孔 5% BSA-PBS 封闭, 37 $^{\circ}$ C 170 r/min 转速离心

1 h; 洗板 3 次, 加入山羊抗人 sIL-1R(I) 抗体 100 μ l/孔, 稀释度 1 200, 37 $^{\circ}$ C 140 r/min 转速离心 3.5 h; 加入兔抗山羊 IgG-HRP 100 μ l/孔, 稀释度 1 2 000, 37 $^{\circ}$ C 140 r/min 转速离心 1 h; 洗板 4 次, 加底物邻苯二胺-柠檬酸盐缓冲液, 37 $^{\circ}$ C 显色 30 min; 加入 7% H₂SO₄ 50 μ l/孔, 终止反应。紫外荧光/可见光高效分析仪自动测定吸光度, 换算其含量。

1.4 统计分析方法

采用 SPSS 10.0 统计软件包对实验数据进行 *t* 检验。

2 结 果

2.1 重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 的浓度及纯度

中等量制备的质粒经紫外分光分析法测定发现, 25 ml 菌液中可提取约 80 μ g 的质粒 DNA。重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) OD₂₆₀ 与 OD₂₈₀ 比值为 1.75。证实获得高纯度质粒。

2.2 脂质体介导的稳定转染

未转染质粒的 COS-1 和 CHO 细胞对照组在加压后第 7~14 天, 细胞大多数死亡, 仅少数细胞贴壁, 但形态小而圆, 大多数细胞漂浮, 折光性下降, 胞质皱缩, 培养液中可见大量细胞碎屑; 第 10~20 天, 全部细胞死亡, 未见有细胞贴壁。

转染组在加压后第 1~14 天内, 大部分细胞形态变小变圆, 胞质皱缩, 培养液中有较多漂浮的死细胞和细胞碎屑, 贴壁的细胞未见分裂相; 第 9~18 天, 6 孔板内剩下约 5~10 个细胞集落; 第 12 天, CHO 细胞集落开始增殖, 贴壁细胞分裂相多见, 每个细胞集落约 15 个细胞, 未见细胞漂浮; 第 20 天, COS-1 细胞集落开始增殖, 贴壁细胞分裂相多见, 每个细胞集落约 8~15 个细胞, 未见细胞漂浮。第 13~22 天, COS-1 和 CHO 细胞汇片达 40%; 第 15~23 天汇片达 80% 左右, 未见细胞漂浮, 表明已筛选出稳定转染的 COS-1 和 CHO 细胞 (图 1~4)。

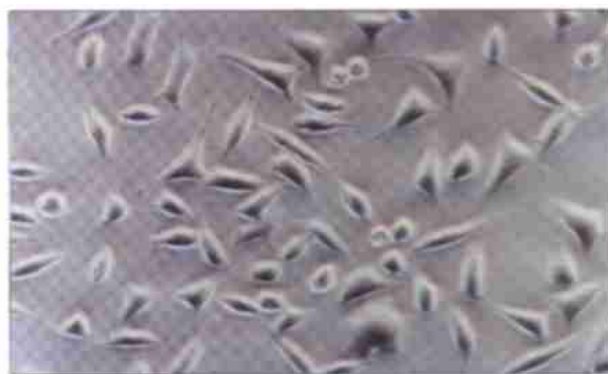


图 1 转染前的 COS-1 细胞 倒置相差显微镜 $\times 200$

Fig 1 COS-1 before transfection phase-contrast micrograph $\times 200$

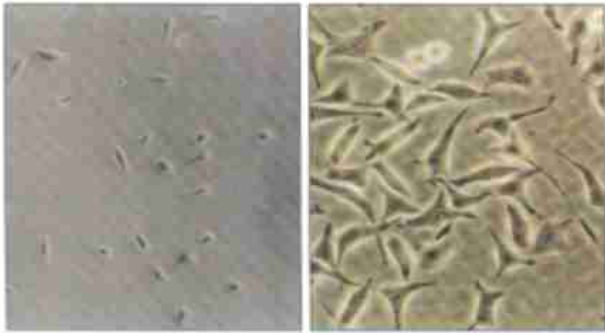


图 2 转染 pcDNA3/sIL-1R(I) 的 COS-1 细胞

A: 转染 14 d 后 倒置相差显微镜 ×100;

B: 转染 23 d 后 倒置相差显微镜 ×150

Fig 2 COS-1 after transfection by pcDNA3/sIL-1R(I)

A: after 14 days transfection phase-contrast micrograph ×100;

B: after 23 days transfection phase-contrast micrograph ×150

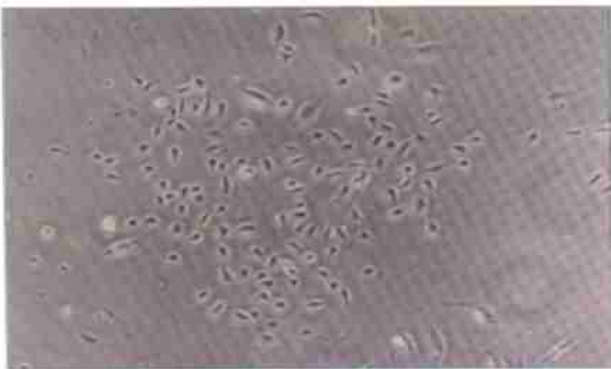


图 3 转染前的 CHO 细胞 倒置相差显微镜 ×100

Fig 3 CHO before transfection phase-contrast micrograph ×100



图 4 转染 pcDNA3/sIL-1R(I) 13 d 后的 CHO 细胞 倒置相差显微镜 ×100

Fig 4 COS-1 after transfection by pcDNA3/sIL-1(I) phase-contrast micrograph ×100

2.3 sIL-1R(I) 的表达

pcDNA3/sIL-1R(I) 稳定转染 COS-1 细胞培养液和冻融液中 sIL-1R(I) 测定结果为 $(0.3112 \pm 0.1173) \mu\text{g/L}$ 和 $(0.1310 \pm 2.9470 \times 10^{-2}) \mu\text{g/L}$, 对照组分别为 $(6.3330 \times 10^{-3} \pm 9.8320 \times 10^{-3}) \mu\text{g/L}$ 和 $(1.9830 \times 10^{-2}$

$\pm 1.6070 \times 10^{-2}) \mu\text{g/L}$ 。pcDNA3/sIL-1R(I) 稳定转染 CHO 细胞培养液和冻融液中 sIL-1R(I) 测定结果为 $(0.288 \pm 4.575 \times 10^{-2}) \mu\text{g/L}$ 和 $(0.133 \pm 2.406 \times 10^{-2}) \mu\text{g/L}$, 对照组分别为 $(2.54 \times 10^{-2} \pm 2.80 \times 10^{-2}) \mu\text{g/L}$ 和 $0 \mu\text{g/L}$ (ELISA 法检测其含量认定为零值)。经 *t* 检验, pcDNA3/sIL-1R(I) 组细胞培养液及冻融液中 sIL-1R(I) 的表达量均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。显示重组质粒稳定转染的 COS-1 和 CHO 细胞的胞外及胞内具有 sIL-1R(I) 表达产物。

3 讨 论

基因转移是基因治疗的关键。基因转移载体可分为病毒和非病毒载体两类。本实验中选用非病毒载体——脂质体⁵。尽管脂质体介导的转染效率较低,但脂质体具有病毒载体不可比拟的安全性,它完全由磷脂类分子组成,不含有任何蛋白质成分,也就不会引起任何的人体免疫反应,因而可以被多次地重复使用。此法已被广泛地用来介导 DNA 对哺乳动物细胞的转染^{6~10}。

要取得转染成功,必须对影响转染的各因素很好调控,影响脂质体介导的转染效率因素包括:脂质体和 DNA 的浓度。细胞生长状况和细胞密度。DNA 纯度。血清的影响。双抗的影响。细胞对于脂质体—DNA 复合物的暴露时间。本实验所用 DNA 是 QIAGEN 公司生产的质粒提取盒制备,其纯度相当于 2 次 CsCl 梯度离心的 DNA 纯度,达到了转染要求的纯度;人牙龈成纤维细胞用于转染前维持在一致的健康状态,保持了良好的生长状况和适当的细胞密度;对 DNA 与脂质体比例进行了优化;复合物在无血清环境中制备,复合物与细胞也在无血清环境中培养,以保证达到最高的转染效率;转染前和转染时的细胞培养基中均未加入双抗,以避免在正常状态下双抗对细胞产生毒性损伤。总之,本实验正是对以上影响转染效率因素严格控制之下才取得转染的成功¹¹。

随着真核基因表达和调控研究的深入,证明用哺乳动物细胞作宿主表达体系具有以下主要优点¹²:

哺乳动物细胞能识别和除去外源基因中的内含子,剪接加工成成熟的 mRNA; 哺乳动物细胞表达的蛋白质在翻译后被加工的机会较多(如糖基化),可提高产品正确构型机率,有可能被改造成类人体原型,加工后的蛋白质免疫原性好; 哺乳动物细胞易被重组 DNA 质粒转染,具有遗传稳定性和可重复性; 经转染的哺乳动物细胞可将表达的产物分泌到培养基中,

其提纯工艺简单、成本低。本研究选用的哺乳动物细胞系为 COS-1 和 CHO 细胞。COS-1 细胞株源自复制子缺失的猴空泡病毒 (SV₄₀) 基因组转化的非洲绿猴肾细胞⁷。COS-1 细胞表达 SV₄₀ 大 T 抗原¹³, 而 SV₄₀ T 抗原正是 SV₄₀ 复制子引发 DNA 复制所必需的, T 抗原介导的复制可使每个 COS-1 细胞积聚大于 10⁵ 带 SV₄₀ 复制起点的重组表达质粒, 并高效表达外源 DNA 序列¹⁴。质粒载体 pcDNA3 是公认的和 COS-1 细胞相匹配的一种真核表达载体, pcDNA3 具有 SV₄₀ 复制起点, 当重组质粒转染表达有 SV₄₀ 大 T 抗原的 COS-1 细胞时, 由于大 T 抗原的反式作用, 病毒的 DNA 复制起点就可以启动质粒的复制。因此以 pcDNA3 作为真核表达载体转染 COS-1 细胞后, 外源基因可获得较高水平表达。CHO 为中国仓鼠卵巢上皮细胞, 也是常用的哺乳动物细胞表达系统之一, 可用于表达并产生基因工程疫苗、活性蛋白和多肽等产品。美国的基因技术公司 (Gene Tech) 曾用 CHO 表达的含糖基化多肽乙型肝炎表面抗原免疫黑猩猩, 证明该产品有良好的免疫原性。

为了检测 pcDNA3/sIL-1R(I) 在真核细胞中的表达, 本实验进行了稳定转染, 质粒 DNA 进入细胞后整合入基因组, 可永久稳定表达外源蛋白质。pcDNA3 中的 *neo* 基因整合于宿主细胞染色体基因组中, 与能有效转录的真核 DNA 序列发生连锁, 使 *neo* 基因有效表达, G418 失活。G418 为新霉素的类似物, 可通过干扰原核细胞和真核细胞核糖体的功能而阻断哺乳动物细胞的蛋白质合成。所以, 当转染的真核细胞表达了这种 *neo* 抗性基因后, 就会在含 G418 选择培养基中存活。

本研究稳定转染细胞后选用 ELISA 法检测细胞内表达产物, 以精确地定量分析转染产物的表达。通过对细胞进行定量的收集, 保证实验组与对照组细胞数的一致, 经过 ELISA 法的精确定量, 能够在表达产物的量上区分转染细胞与非转染细胞。证明通过脂质体介导的转染方法, 可成功地将重组质粒 pcDNA3/sIL-1R(I) 在哺乳动物细胞系中进行表达, 表达的蛋白

质产物可位于细胞内及细胞外, 为牙周病及其他炎症性疾病基因治疗的动物实验提供了理论依据和实验根据。

参考文献

- 1 Anderson WF. Human gene therapy. *Science*, 1992, 256(5058): 808-813
- 2 Weissman SM. Gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(23): 11111-11112
- 3 Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science*, 1993, 260(5110): 926-932
- 4 李鹏, 徐艳, 张蕴惠, 等. 人 sIL-1R 真核表达载体 pcDNA3/sIL-1R 的构建. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(2): 140-143
- 5 Felgner PL, Gadek TR, Holm M, et al. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84(21): 7413-7417
- 6 Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, 1989, 337(6205): 387-388
- 7 Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, et al. Mode of formation and structural features of DNA-cationic liposome complexes used for transfection. *Biochem*, 1993, 32(28): 7143-7151
- 8 Tomita N, Morishita R, Higaki J, et al. *In vivo* gene transfer to insulin gene into neonatal rats by the HVJ-liposome method resulted in sustained transgene expression. *Gene Ther*, 1996, 3(6): 477-482
- 9 Stephan DJ, Yang ZY, San H, et al. A new cationic liposome DNA complex enhances the efficiency of arterial gene transfer *in vivo*. *Hum Gene Ther*, 1996, 7(15): 1803-1812
- 10 Felgner PL, Mallet J. Nonviral strategies for gene therapy. *Sci Am*, 1997, 276(6): 102-106
- 11 Caplen NJ, Alton EFWF, Middleton PG, et al. Liposome-mediated CETR gene transfer to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Nature Med*, 1995, 1(1): 39-46
- 12 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993: 239-301
- 13 Harvey TJ, Macnaughton TB, Gowans EJ. The development and characterization of a SV₄₀ T-antigen positive cell line of human hepatic origin. *J Virol Methods*, 1997, 65(1): 67-74
- 14 Zhang C, Sriratana A, Minamikawa T, et al. Photosensitisation properties of mitochondrially localized green-fluorescent protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 242(2): 390-395

(2002-12-16 收稿, 2003-09-20 修回)

(本文编辑 汤亚玲)