

人 B 淋巴细胞刺激因子的真核表达 以及表达条件的筛选

戴君勇,张双全,刘平

(南京师范大学生命科学学院,南京 210097)

[摘要] 采用基因克隆、重组等方法,将人 B 淋巴细胞刺激因子(hsBLyS)基因片段从人胎盘 cDNA 文库中克隆出来,测序鉴定后重组构建成真核表达载体 pcDNA3.1(+)/hsBLyS.然后用磷酸钙法和脂质体法分别转染真核宿主细胞 COS-7,并在其中表达 48 h、36 h、72 h、96 h,表达细胞经超声处理后离心,上清进行 SDS-PAGE 鉴定.结果表明,对于 hsBLyS 来说,磷酸钙法比脂质体法转染效果好,而且对于磷酸钙法,表达量是 72 h 达到最高.

[关键词] cDNA 文库;脂质体法;真核表达;COS-7;hsBLyS

[中图分类号] Q78; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)02-0087-04

1999 年,美国生物学家 Moore 等人发现了一种新的细胞因子—人 B 淋巴细胞刺激因子(hBLyS),它属于 TNF 超家族并与人体免疫密切相关^[1,2];为 II 型跨膜蛋白,能刺激 B 淋巴细胞分化、增殖,诱导其分泌免疫球蛋白,提高免疫缺乏或低下病人的自身免疫能力.重组 hBLyS(rhBLyS)胞膜外部分的功能片段(hsBLyS)在中国仓鼠细胞(CHO)及 sf9 细胞等真核细胞中的表达已有报道^[1].COS-7 细胞也是一种常用的真核表达宿主细胞,为了探讨 hsBLyS 在其中能否得到表达以及表达条件如何等情况,本实验室运用 PCR 及 Nest-PCR 等方法,将 hsBLyS 的 DNA 片段从人胎盘 cDNA 文库中扩增出来,经纯化、测序鉴定后,运用酶切、连接等重组手段,将其定向插入真核表达载体 pcDNA3.1(+),构建成 pcDNA3.1(+)/hsBLyS 融合表达载体,然后采用磷酸钙法和脂质体法^[3,4]分别转染真核宿主细胞 COS-7,取不同表达时间的细胞进行处理、分析鉴定,从而找出表达时间与表达量的最佳结合点,得到最合适的表达时间及其他条件.结果表明,采用 COS-7 作为真核表达细胞株,其最佳表达靶蛋白的时间是 72 h;而且由本实验结果看,用磷酸钙法转染细胞的转染效率明显比脂质体法高.

1 实验材料

1.1 载体及细胞

真核载体 pcDNA3.1(+)(由本实验室保存)融合表达载体 pcDNA3.1(+)/hsBLyS(由美国 Mayo 医疗中心 Dr. Huang 协助构建并惠赠);COS-7 细胞(由本实验室保存).

收稿日期 2000-01-08

作者简介:戴君勇,1973—,南京师范大学生命科学学院硕士研究生,从事生物化学的学习与研究.

通讯联系人:张双全,1952—,博士,南京师范大学生命科学学院教授,博士生导师,从事生物化学的教学与研究.

1.2 试剂

培养基 DMEM(购自格瑞公司);小牛血清 FBS(购自科威公司);胰蛋白酶(购自格瑞公司);*N,N*-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(购自格瑞公司);台盘蓝(购自格瑞公司);脂质体(由本院戴祝英教授惠赠);其它试剂均为国产分析纯试剂。

2 实验方法

2.1 转染及表达

2.1.1 细胞培养

COS-7 细胞是一种贴壁生长的肿瘤细胞株,因此,按照有关文献^[3]将细胞在 37℃ 水浴复苏后,直接转入培养瓶中,加入 10 mL DMEM 培养基,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,当细胞密度达到 1×10^7 /mL 左右时,倒去培养基,用 2 mL 胰蛋白酶/EDTA 溶液消化后平分 3 瓶传代。当细胞传代扩增到所需量时,分别转入培养皿中培养,以便进行下列实验。

2.1.2 磷酸钙法转染及表达

转染前 1 天,接种呈指数生长的细胞,密度为 5×10^6 /平皿,加 10 mL DMEM 培养液(做 3 个皿)。

吸取表达载体质粒 DNA-TE 溶液(含 $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 载体) $150 \mu\text{L}$,再加入 $1500 \mu\text{L}$ CaCl₂ 溶液,充分混匀;在冰浴中逐滴加入 $2 \times \text{BBS } 1500 \mu\text{L}$,室温下放置 20 min;用滴管平均滴加入上述 3 个平皿的培养物中,边滴加边轻轻摇动培养皿,使之混合均匀。然后将培养皿置于 35℃、3% CO₂ 的培养箱中培养 25 min;取出培养皿,用适量 PBS(pH7.4)洗 1 次,各加 DMEM 培养液 10 mL,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,使其表达靶蛋白 hsBlyS。分别将表达 48 h、72 h 及 96 h 的表达细胞用胰蛋白酶/EDTA 消化液消化,同时取适量培养基贮于 -20℃ 备用;细胞用适量 PBS(pH7.4)洗 1 次,洗液取适量贮于 -20℃ 备用。消化好的细胞 $1000 \text{ r}/\text{min}$ 离心,弃上清,收集细胞沉淀,再各加 7 mL 细胞裂解液,超声破碎细胞,再离心,上清留作电泳。

2.1.3 脂质体法转染及表达

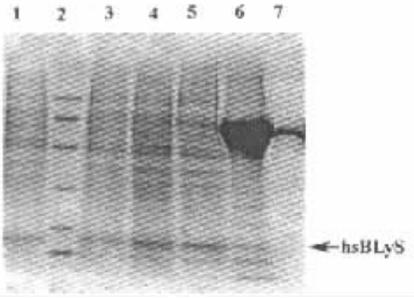
吸取 $40 \mu\text{L}$ 载体 DNA-TE 溶液(含载体 DNA $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)于装有 32 mL 不含 FBS 的 DMEM 的离心管中,混匀,加入 $160 \mu\text{L}$ 脂质体悬液,混合均匀并室温下放置 5-10 min。

将培养皿中的培养基倒去,用不含 FBS 的 DMEM 洗 1 次,每个平皿加入 8 mL 上述制得的 DNA/脂质体悬液(做 4 个皿),置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h,弃去 DNA/脂质体悬液,每个皿加入 DMEM 培养基 15 mL,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养 48 h。取适量培养基贮于 -20℃ 备用;用消化液消化后离心,弃上清,收集细胞(4 个皿合并到一起),再同磷酸钙法处理后,上清电泳。

2.2 SDS-PAGE 电泳

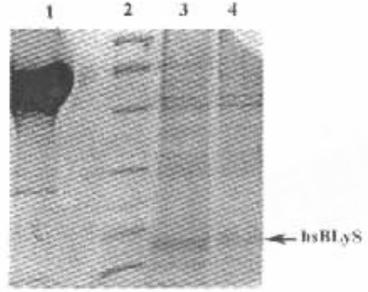
吸取上述磷酸钙法表达 48 h、72 h 及 96 h 的离心上清各 $25 \mu\text{L}$,加入等量的加样缓冲液;再吸取培养表达细胞的培养基以及 PBS 洗细胞后的离心上清各 $25 \mu\text{L}$ 加入等量的加样缓冲液;同时再处理一个没有进行转染的 COS-7 细胞作为空白对照一起进行 SDS-PAGE(12%)电泳,结果如图 1。

脂质体法转染的细胞表达 48 h 后,收集细胞也按上述磷酸钙法同样处理后进行 SDS-PAGE(12%)电泳,结果如图 2。



1 对照 2 Marker 3 48 h 4 72 h ;
5 96 h 6 培养基 7 PBS 上清

图 1 磷酸钙法产物的 SDS-PAGE



1 培养基 2 Marker 3、4 表达 48 h 的产物
图 2 脂质体法产物的 SDS-PAGE

3 结果与讨论

3.1 磷酸钙法与脂质体法的比较

hsBLyS 的真核表达已有相关报道^[1,2],但都是用 CHO 细胞或者 sf9 细胞作为表达宿主细胞,而用 COS-7 细胞作为真核表达细胞,目前尚未见有报道.因此,本实验尝试用 COS-7 细胞来表达 hsBLyS 这一新发现的细胞因子,并获得了成功.从实验结果看,磷酸钙法和脂质体法都获得了转染成功,并都有靶蛋白 hsBLyS 的表达.由图 1、2 知道,COS-7 细胞表达的靶蛋白没有分泌到胞外,在培养基及洗涤细胞的 PBS 中均不存在靶蛋白的电泳条带,因此靶蛋白主要存在于细胞质中.

在磷酸钙转染方法中,转染 24 h 后,在倒置显微镜下观察,发现转染情况较好,转染效率较高(可达 30% ~ 40%),表达靶蛋白的水平也较高,而且随着表达时间的增加,表达水平也不相同.脂质体转染方法中,本实验没有进行表达时间的筛选,但仅从转染后表达 48 h 所得到的表达产物(图中箭头所指)的 SDS-PAGE 看,其表达水平不如磷酸钙法表达水平高,这就说明在本实验中,磷酸钙法的转染效率要比脂质体法的转染效率高.

3.2 真核表达的最佳条件

由图 1 看,尽管对照细胞也有相应的本底水平的表达,但从表达 48 h、72 h 及 96 h 的靶蛋白的电泳条带的比较分析可知,靶蛋白在 COS-7 细胞中的表达水平在同一种转染方法中,随着表达时间的不同,其表达水平是不相同的.本实验结果告诉我们,在表达 72 h 时,靶蛋白在 COS-7 细胞中的表达水平达到最高;48 h 时的表达水平不如 72 h 时的高;而 96 h 时的表达水平与 72 h 时的表达水平相比基本上差不多.

因此,用 COS-7 细胞作为载体 pcDNA3.1(+)/hsBLyS 的表达宿主来表达 hsBLyS 时,表达的最佳时间应该是 72 h;而且在转染方法上,磷酸钙法要优于脂质体法.

[参考文献]

- [1] Moore P A ,Belvedere O ,Orr A ,*et al* . BlyS :Member of the Tumor Necrosis Factor Family and B Lymphocyte Stimulator[J]. *Science* ,1999 ,285 :260—263 .
- [2] Mukhopadhyay A ,Ni J ,Zhai Y ,*et al* . Identification and characterization of a novel cytokine ,THANK ,a TNF homologue that activates apoptosis ,nuclear factor- κ B ,and c-jun NH2-terminal kinase[J]. *J Biol Chem* ,1999 ,274 :680—683 .
- [3] Ausubel F M ,Brent R ,Kingston R E ,*et al* . Short protocols in molecular biology[M]. 3rd ed . John Wiley & Sons ,Inc . 1995 . 277—287 .
- [4] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T . MOLECULAR CLONING A Laboratory Manual[M]. 2nd ed . Cold Spring Harbor Laboratory Press . 1989 . 786—793 .

Eukaryotic Expression of HsBLyS and Screening of Expressing Conditions

Dai Junyong ,Zhang Shuangquan ,Liu Ping

(Academy of Life Science ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210097 ,PRC)

Abstract :The full length cDNA of human B lymphocyte stimulator(hBLyS) was amplified by using PCR method from cDNA library of human placenta . After purifying and sequencing ,the DNA fragment of functional domain of hBLyS (hsDNA fragment) was amplified by using nest-PCR method from the PCR product . The eukaryotic expression plasmid pcDNA3 . 1 (+)/hsBLyS was constructed with recombinant DNA techniques after purifying and identifying the hsDNA fragment . Then the plasmid pcDNA3 . 1 (+)/hsBLyS was transformed into COS-7 cells with the calcium phosphate method and lipofection method . The recombinant protein was found to be expressed and the calcium phosphate method was better than lipofection method . The best expression time in the calcium phosphate method was 72 h .

Key words :cDNA library ;lipofection ;eukaryotic expression ;COS-7 ;hsBLyS

[责任编辑 孙德泉]