

# 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 超家族并人体免疫密切相关<sup>[1,2]</sup> ; 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<sup>[1]</sup> . 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<sup>[3,4]</sup> 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<sup>[3]</sup>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% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,当细胞密度达到  $1 \times 10^7$ /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  $5 \times 10^6$ /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  $\mu\text{L}$  CaCl<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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 r/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

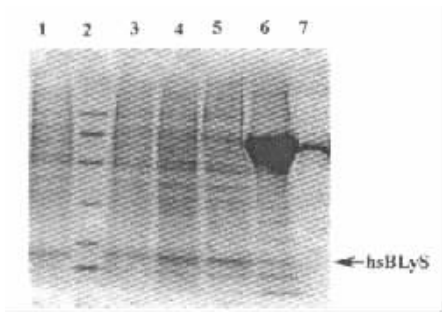
吸取 40  $\mu\text{L}$  载体 DNA-TE 溶液(含载体 DNA  $0.8 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ )于装有 32 mL 不含 FBS 的 DMEM 的离心管中,混匀,加入 160  $\mu\text{L}$  脂质体悬液,混合均匀并室温下放置 5-10 min。

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% CO<sub>2</sub> 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% CO<sub>2</sub> 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。

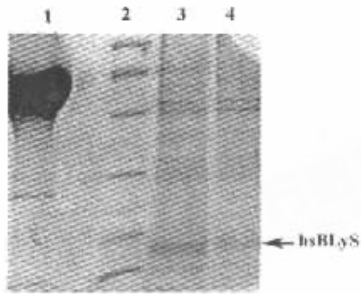
### 2.2 SDS-PAGE 电泳

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<sup>[1 2]</sup>,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- $\kappa$ 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 ]