

# hsBLyS 分泌型表达载体构建及 CHO 表达

吴海涛<sup>1,2</sup>, 胡云龙<sup>1,3</sup>, 刁振宇<sup>1,4</sup>, 金丽娜<sup>1</sup>, 李洁<sup>1</sup>, 张双全<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 210097, 江苏, 南京)

(2. 南京中医药大学基础医学院, 210029, 江苏, 南京)

(3. 南京华欣药业生物工程有限公司, 210002, 江苏, 南京)

(4. 南京军事医学研究所, 210002, 江苏, 南京)

**[摘要]** 本实验引物延伸合成成人红细胞生成素信号肽序列; 信号肽序列和人可溶性 B 淋巴细胞刺激因子(human soluble B Lymphocyte Stimulator, hsBLyS)基因重叠延伸拼接成融合基因; 融合基因插入 pcDNA3、pcDNA3.1、pEFneo 质粒; 信号肽引物设计时, 突变同义密码, 最终重组质粒成为分泌表达质粒; 磷酸钙共沉淀将表达质粒和标志质粒 pSV-dhfr, 共转染 CHO—dhfr<sup>-</sup> 细胞; 选择培养液筛选, 氨甲喋呤扩增表达, 获稳定表达 rhsBLyS 细胞株; ELISA 检测浓缩表达上清, 结果表明: rhsBLyS 表达量由 0.13 μg/mL 上升至 0.55 μg/mL.

**[关键词]** hsBLyS, 信号肽, CHO, 分泌表达

**[中图分类号]** Q987, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)02-0081-06

1999 年, Moore、Shu、Sxhneider 以及 Mukhopadhyay 等搜索人嗜中性粒细胞和单核细胞的 cDNA 文库时, 先后发现一种新细胞因子, 根据不同的功能对其进行相应命名: BLyS(B lymphocyte stimulator)<sup>[1]</sup>、THANK(a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor-κB, and c-JUN NH2-terminal kinase)<sup>[2]</sup>、BAFF(B cell activating factor belonging to the TNF family)<sup>[3]</sup>、TALL-1(TNF and apoptosis ligand-related leukocyte expressed ligand 1)<sup>[4]</sup> 以及 zTNF4<sup>[5]</sup> 和 TNFSF20<sup>[6]</sup> 等. 人 BLyS 基因定位于 13q32-q34, mRNA 长约 2.6 kb, 高表达于外周血单个核细胞、脾、淋巴结和骨髓, 以膜结合型和水溶型两种活性形式存在, 膜结合型由 285 个氨基酸残基组成, 相对分子质量 31 300, 包括胞外区、跨膜区及胞内区, 胞外区有一二硫键(C<sub>232</sub> - C<sub>245</sub>), 含两个潜在的糖基化位点: N124 和 N242, 无信号肽<sup>[1]</sup>. 可溶型含 152 个氨基酸残基(134 ~ 285), 是膜结合蛋白经特定蛋白酶水解得到的功能区片段(hsBLyS)<sup>[1]</sup>, 相对分子质量 17 000, 目前国内外主要以可溶型蛋白进行研究开发. THANK 通过诱导凋亡抑制一些肿瘤细胞系的生长, 具剂量依赖性, 但作用较 TNF 弱<sup>[2]</sup>. 抗 IgM 预刺激 B 细胞后, BLyS 对 B 细胞有强烈的促增殖和刺激分泌免疫球蛋白作用<sup>[1]</sup>, 且参与 T 细胞介导的免疫功能<sup>[7]</sup>, 可显著提高机体细胞和体液免疫力, 是一种新免疫调节因子.

BLyS 缺陷或过量表达均引起机体的免疫失衡, 诱发多种疾病, 其过度表达是发生系统性红斑狼疮的重要因素之一<sup>[5,8]</sup>. 美国 FDA 已批准, BLyS 及其抗体作为药物针对多种疾病进入人体 I 期临床. 目前 rhs-BLyS 来源多为原核表达, 在 HEK293、sf9 昆虫细胞和 CHO 等真核细胞中的表达也有报道<sup>[1]</sup>, 但在 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞中, 利用选择培养液筛选阳性克隆, 氨甲喋呤(Amethopterin, MTX)浓度梯度升高, 扩增筛选表达 rhs-BLyS 的稳定细胞株, 尚未见报道.

本实验利用 3' 端互补, 引物延伸合成成人红细胞生成素信号肽序列; 信号肽序列和 hsBLyS 基因采用重叠延伸拼接法形成融合基因, 融合基因分别插入 pcDNA3、pcDNA3.1、pEFneo 真核质粒; 信号肽序列引物设计时, 利用同义密码进行突变, 最终重组载体上的信号肽序列之后, 形成酶切位点, 从而三种载体成为分泌表达质粒; 磷酸钙共沉淀分别将表达质粒和标志质粒 pSV-dhfr, 共转染入 CHO-dhfr<sup>-</sup> 细胞; DMEM 选择培养液筛选 dhfr 阳性细胞克隆, 氨甲喋呤浓度梯度升高, 扩增筛选表达 rhsBLyS 的稳定细胞株; ELISA 检测 rhs-BLyS 表达. 本研究的开展为利用 CHO 表达系统生产 rhsBLyS 提供了一定的实验依据.

收稿日期: 2003-01-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30270193).

作者简介: 吴海涛, 1973 - , 硕士, 南京中医药大学基础医学院讲师, 从事医学生物学教学与研究, E-mail: wuht@njutcm.edu.cn

通讯作者: 张双全, 1952 - , 南京师范大学生命科学学院教授, 博士生导师, 从事生物化学教学与研究, E-mail: shyjsl@email.njnu.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

宿主菌 *E. coli* TG1、质粒 pcDNA3、pcDNA3.1、pEFneo、pUC18 本室保存;pGEM-T Vector 购自 Promega 公司;中华仓鼠卵巢细胞二氢叶酸还原酶缺陷株(CHO—dhfr<sup>-</sup>)和转染标志质粒 pSV-dhfr 由胡云龙博士提供.

引物和信号肽序列分别由上海生工和博亚生物公司合成.

Taq DNA 聚合酶,限制内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Marker 购自 TaKaRa 公司; IPTG、X-gal 购自上海生工;细胞培养基 F12、DMEM、透析胎牛血清购自 GIBCO 公司;新生牛血清购自杭州四季清生物制品公司; 氨甲喋呤、抗 IgM 购自 Sigma 公司; 山羊抗兔 IgG-HRP 购自华美生物工程公司; hsbLyS 多克隆抗体,本实验室刘俊红制备; ELISA 底物 A、B 液,南京军事医学研究所提供.

1.2 方法

1.2.1 引物延伸合成成人红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)信号肽序列

EPO 信号肽引物序列如下:

ES1: 5' GAAC GGT A<sup>-3</sup>CC ATG G<sup>+4</sup>GG GTG CAC GAA TGT CCT GCC TGG CTG TGG CTT CTC CTG TCC CTG C 3'  
Kpn I ESI 和 ES2 互补碱基

ES2: 5' TCG ACC CTG AAC GGC GCC T<sup>\*</sup>AG GAC TGG GAG GCC CAG AGG GAG CGA CAG CAG GGA CAG GA 3'  
hsBLyS 前 15 个碱基 Bln I ESI 和 ES2 互补碱基

2 条引物通过 ES1 和 ES2 3'端互补碱基,PCR 引物延伸合成信号肽序列;引物 ES2 5'末端连有 hsbLyS 前 15 个碱基,目的为利用 SOE 法,将 hsbLyS 和信号肽序列,PCR 融合为单一产物;EPO 信号肽倒数第二位氨基酸为 Leu,利用同义密码,将 CTG 突变为 CTA,使形成 *Bln* I (*Aur* II)酶切位点 CCTAGG;引物 ES1 中,起始密码 ATG 前设计 *Kpn* I 酶切位点,使 ATG 的 -3 和 +4 位均为嘌呤,符合真核核糖体翻译起始部位的 Kozak 序列.2 条引物 PCR 延伸,得到 EPO 信号肽序列,反应条件为:94℃,40 s;50℃,40 s;72℃,1 min;72℃,延伸 7 min;4℃保存.

1.2.2 PCR 扩增 hsbLyS 基因

以 hBLyS 第 134~285 位氨基酸所对应的 cDNA 序列为模板,引物设计如下:

P1:5' GCC GTT CAG GGT CCA G 3',  
P2:5' G GAATTC TCA CAG CAG TTT CAA TG 3'.

下游引物中添加 *EcoR* I 酶切位点.反应条件为:

95℃,3 min;94℃,40 s,50℃,40 s,72℃,1 min,30 个循环;72℃,7 min;4℃保存.

1.2.3 重叠延伸拼接技术(gene splicing by overlap extension,SOE)连接信号肽序列和 hsbLyS 基因

以 EPO 信号序列和 hsbLyS 的 cDNA 为模板,利用 EPO 信号肽 3'末端后连接的 hsbLyS 前 15 个碱基,通过 SOE 法,将信号肽序列和 hsbLyS 序列 PCR 融合为单一产物.引物设计如下:

P3:5'GAAC GGTACC ATG GGG GTG CAC 3'.  
P2:5'G GAATTC TCA CAG CAG TTT CAA TG 3'(与扩增 hsbLyS 基因 P2 引物同).

上游引物和下游引物分别添加 *Kpn* I 和 *EcoR* I 酶切位点.反应条件为:95℃,3 min;94℃,40 s,45℃,40 s,72℃,1 min,30 个循环;72℃,7 min;4℃保存.

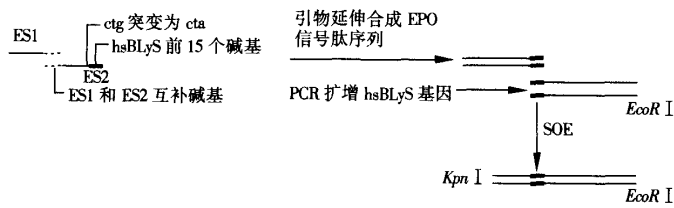


图 1 基因操作流程

#### 1.2.4 分泌型真核重组质粒构建

SOE产物与pGEM-T Vector连接,连接产物AIX平板筛选、双酶切鉴定。*Kpn* I和*Eco*R I双酶切阳性T-A重组质粒,酶切产物分别克隆入pcDNA3和pcDNA3.1.pEFneo载体上无*Eco*R I酶切位点,故选择*Kpn* I和*Eco*R V双酶切pcDNA3重组质粒,酶切产物克隆入pEFneo.三种重组质粒双酶切、PCR初步鉴定之后,正确的重组质粒测序分析.质粒DNA的提取、酶切反应、连接反应、感受态制备及转化等操作均参照《分子克隆实验指南手册》。

#### 1.2.5 细胞培养,转染和阳性克隆的加压筛选

CHO-dhfr<sup>-</sup>细胞完全培养基为添加8%小牛血清及三抗(青霉素100 U/mL,链霉素100 U/mL,卡那霉素50 U/mL)的F12培养基(粉末含有甘氨酸、脯氨酸、次黄嘌呤和胸腺嘧啶),NaHCO<sub>3</sub>调pH至7.2.选择培养基是添加100 mg/L脯氨酸、8%透析胎牛血清和三抗的DMEM(粉末中不含脯氨酸、次黄嘌呤和胸腺嘧啶).标志质粒pSV-dhfr<sup>-</sup>分别和表达质粒pcDNA3/hsBLyS、pcDNA3.1/hsBLyS、pEFneo/hsBLyS以1:5(摩尔比),磷酸钙共沉淀法转染含3 mL F12的15 cm<sup>2</sup>培养瓶中10<sup>5</sup>个CHO-dhfr<sup>-</sup>细胞,48 h后,更换DMEM选择培养液进行筛选,3~4 d换液1次,使大量未转染细胞死亡.待出现dhfr<sup>+</sup>阳性单细胞克隆,混合克隆,选择培养液中加入MTX,浓度梯度设为5×10<sup>-8</sup> mol/L、1×10<sup>-7</sup> mol/L、2×10<sup>-7</sup> mol/L、5×10<sup>-7</sup> mol/L,每隔4 d天更换并收集培养液,-20℃保存.不同的3 mL细胞培养上清冷冻干燥,再溶解在120 μL P.B.S中,浓缩25倍,-20℃保存。

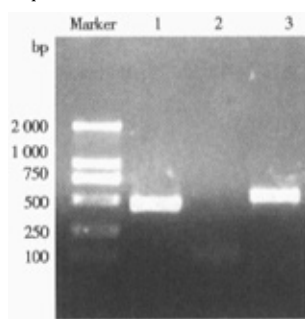
#### 1.2.6 ELISA检测hsBLyS表达

常规间接法,待测浓缩上清双复空包被,第一、二抗体分别为rhBLyS多克隆抗体和山羊抗兔IgG-HRP,阳性对照为本室原核表达rhBLyS样品,阴性对照为未转染细胞培养浓缩液,检测、参比波长分别为490 nm、630 nm.同时以原核表达hsBLyS为标准品,倍比稀释,ELISA法检测,OD值为横坐标,rhBLyS浓度为纵坐标,做标准曲线。

## 2 结果

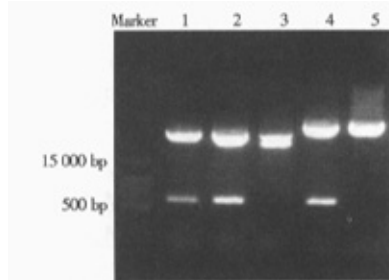
### 2.1 引物延伸合成EPO信号肽序列及PCR扩增hsBLyS基因

EPO信号肽片段共81 bp,5'端添加保护碱基和*Kpn* I酶切位点,3'端连接15 bp的hsBLyS 5'端序列,产物共106 bp,与电泳结果相同(图2).hsBLyS PCR产物3'端添加*Eco*R I酶切位点和保护碱基,产物大小为466 bp,与电泳结果相同(图2)。



1. cDNA product band of hsBLyS, 466 bp.  
2. cDNA product band of EPO's signal peptide, 106 bp.  
3. SOE product band, 557 bp.

图2 PCR产物条带



1. recombinant pcDNA3 digested with *Kpn* I/*Eco*R V.  
2. recombinant pcDNA3.1 digested with *Kpn* I/*Eco*R V.  
3. pcDNA3 digested with *Kpn* I/*Eco*R V.  
4. recombinant pEFneo digested with *Kpn* I/*Eco*R V.  
5. pEFneo digested with *Kpn* I/*Eco*R V.

图3 酶切产物条带

### 2.2 重叠延伸拼接技术连接信号肽基因和hsBLyS基因

以上述两产物为模板,进行SOE-PCR,连接二者为融合基因,5'端、3'端分别添加*Kpn* I、*Eco*R I酶切位点,产物大小557 bp,与电泳结果相同(图2);利用突变产生酶切位点,*Bln* I单切此产物,得相对分子质量相符的两条带,大小分别为466 bp、91 bp(图略)。

2.3 pcDNA3、pcDNA3.1、pEFneo 分泌型重组载体构建

重组载体双酶切鉴定、回收外源基因 PCR 鉴定、测序鉴定,结果均正确.其中为确认突变酶切位点的存在, *Bln* I 酶切 T-A 克隆载体,与 T-A 克隆未切载体相比,无超螺旋条带(图略); *Kpn* I 和 *EcoR* V 双酶切 pcDNA3、pcDNA3.1、pEFneo 重组载体,结果如图 3. pcDNA3 重组载体采用 T7 Promoter 引物正向测序,结果见图 4.

```
TTGGTACATG GGGGTGCACGAATGTCCTGCCTGGCTGTGGCTTCTCCTGTCCTGCTGTCCTCCCTCTGGGCGCTCCCAGTCCT
AGGCGCCGTTTCAGGGTCCAGAAAGAAACAGTCACTCAAGACTGCTTGCAACTGATTGCAGACAGTGAACACCAACTATACA
AAAAGGATCTTACACATTTGTTCCATGGCTTCTCAGCTTTAAAAGGGGAAGTGCCCTAGAAGAAAAAGAGAATAAAATATTGG
TCAAGAAACTGGTTACTTTTATATATGTTCAAGTTTTATATACTGATAAGACCTACGCCATGGGACATCTAATTCAGAGGAA
GAAGTGCCATGCTTTTGGGGATGAATTGAGTCTGGTGACTTTGTTTCGATGTATTTCAAAAT ATGCTGAAACACTACCCAATAA
TTCTGTCTATTTCAGCTGGCATTGCAAACTGGAAGAAGGAGATGAACCTCAACTTGCAATACCAAGAGAAAAATG CACAATAT
CACTGGATGGAGATGTACATTTTTTGGTGCAATTGAACTGCTGTGAGAAATCTGCAGATATCCATCACACTGGCGGCGCTCG
AGCATG CATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCCTTCTAGTTGC
CAGCCATCTGTTGTTTGGCCCCCTCCCGGTGCCTTCTTGACCCCTGGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCTAATAAAATG
AAGGAAATGTCATCGCATTGGCCTGAGTAGGTGTCATT
```

图 4 pcDNA3 载体上重组基因测序结果

2.4 共转染及 MTX 扩增多克隆稳定表达

距转染约 20 d,标志质粒 pSV-dhfr 和表达质粒 pEFneo/hsBLyS 共转染组有多个单细胞克隆生长,阳性多克隆约 12 d 长满培养瓶底(图 5),选择培养液中加入 MTX,终浓度为  $5 \times 10^{-8}$  mol/L,此后 MTX 浓度  $1 \times 10^{-7}$  mol/L、 $2 \times 10^{-7}$  mol/L、 $5 \times 10^{-7}$  mol/L 上升,每个梯度维持约 10 d.当 MTX 浓度上升至  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 时,细胞出现畸变,开始大量死亡,从而停止 MTX 加压扩增. pSV-dhfr 和 pcDNA3/hsBLyS 组、pSV-dhfr 和 pcDNA3.1/hsBLyS 组无单细胞克隆生长,选择培养液继续培养,距转染约 35 d,细胞最终全部死亡.

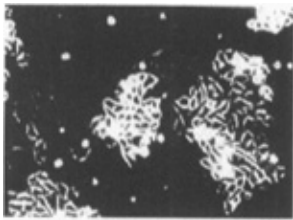


图 5 转染阳性克隆

2.5 ELISA 检测 rhsBLyS 表达

pSV-dhfr 和 pEFneo/hsBLyS 组,自 dhfr 阳性单细胞克隆汇满瓶底后的浓缩上清,均检测到 rhsBLyS 表达,说明表达产物分泌至细胞外的培养液中,且能够与 rhsBLyS 多克隆抗体发生特异的抗原抗体结合反应;在 MTX 共扩增作用下,随着 MTX 浓度由  $0.5 \times 10^{-8}$  mol/L、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L、 $2 \times 10^{-7}$  mol/L 依次上升, rhsBLyS 表达量逐步提高,对照标准曲线,3 mL 细胞培养液、 $10^5$  个细胞、培养 4 d, rhsBLyS 表达量依次约为 0.13  $\mu$ g/mL、0.24  $\mu$ g/mL、0.36  $\mu$ g/mL、0.55  $\mu$ g/mL.结果见图 6.

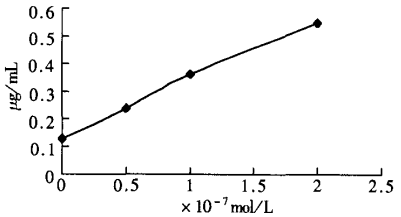


图 6 MTX 加压下, rhsBLyS 的不同表达水平

3 讨论

BLyS 是 1999 年发现的 TNF 超家族成员,最早发现其可诱导肿瘤细胞凋亡,之后发现它是一新免疫调节因子,在体外及转基因动物体内可明显刺激 B 细胞的生长,免疫球蛋白分泌,并导致动物自身免疫性改变. BLyS 的生物功能,作用机制极其复杂,缺陷或过量表达均能引起机体的免疫失衡,从而和一些临床疾病的诊断、治疗、预防密切相关, hsBLyS、其可溶性受体和单克隆抗体均有望开发为治疗自身免疫综合症的新型药物.

BLyS 无信号肽,故在 CHO 表达中,需拼接一个重组蛋白的信号前导肽,因为信号肽序列在结构、功能及切割位点上具有一定的相似性,虽然不同分泌型蛋白的氨基酸序列存在很大差异,但其信号肽可互换,不影响正确的分选信号功能.本实验采用人 EPO 信号肽,通过 3' 端互补进行引物延伸来合成信号肽序列,快速、方便、节约费用.信号肽序列和 hsBLyS 基因形成融合基因采用 SOE 法,与传统的重组 DNA 技术相比,它不需要使用限制性内切酶和连接酶,可以避免引入限制性酶切位点的核苷酸序列,同时将两个基因片段精确连接在一起,是构建融合基因的一种有效手段<sup>[9]</sup>.信号肽引物设计时,利用 Leu 同义密码,将信号肽序列的倒数第二个密码 CTG 突变为 CTA.最终在重组载体上的信号肽序列之后,形成 *Bln* I 酶切位点 CCTAGG,这样 pcDNA3、pcDNA3.1、pEFneo 均成为分泌型表达载体,便于不同外源基因的分泌型表达.由于

信号肽序列的存在,三种重组质粒可应用于 rhBLyS 基因疫苗的制备.因为信号肽的存在,抗原蛋白将分泌到肌细胞周围,然后随组织液、淋巴液甚至血清扩散,有利于抗原信息传递给免疫系统<sup>[10]</sup>.我实验室杜秋丽利用 pcDNA3.1/hsBLyS、pEFneo/hsBLyS 重组载体进行基因免疫,已成功得到 rhBLyS 的抗血清.

CHO 真核表达具有许多优点,特别是对于真核蛋白具有准确的转录后修饰功能,表达的糖基化蛋白在分子结构、理化特性和生物学功能方面最接近天然蛋白分子;而且具有重组基因的高效扩增和表达能力,本研究采用二氢叶酸还原酶基因扩增系统,DHFR 可被叶酸类似物 MTX 所抑制,MTX 浓度梯度升高,进行性选择抗氨甲喋呤的细胞系,结果会导致与 dhfr 串联在一起的外源基因的共扩增,其拷贝数可增加几百到几千倍<sup>[11]</sup>.基因扩增也可通过弱化选择标记基因的表达来达到,本实验使用的标志质粒 pSV-dhfr,是由 pSV<sub>2</sub>-dhfr 去除 SV40 的增强子构建而成,从而起到弱化 dhfr 基因表达的作用.

经 DMEM 选择培养基筛选,MTX 浓度梯度升高至  $2 \times 10^{-7}$  mol/L, rhBLyS 表达量由  $0.13 \mu\text{g/mL}$  上升至  $0.55 \mu\text{g/mL}$ .当 MTX 浓度上升至  $5 \times 10^{-7}$  mol/L 时,细胞出现畸变,从而停止 MTX 加压扩增.本实验所获表达细胞株为多克隆细胞株,如在此基础上,有限稀释化挑单克隆,进一步 MTX 加压筛选,有望获得更高表达的稳定单克隆细胞株.实验进行中,只有 pSV-dhfr 和 pEFneo/hsBLyS 共转染组最终表达 rhBLyS,pcDNA3 和 pcDNA3.1 共转染组未能成功稳定表达,有报道认为 pcDNA3 不适于用作稳定表达的载体,这可能是由于 pcDNA3 不易于整合到宿主细胞染色体中,也可能存在别的原因<sup>[12]</sup>;另有人认为,只有在抗生素 G418 的作用下,pcDNA3 才能稳定于细胞中.

BLyS 生物活性、作用机制极其复杂,具有共刺激和凋亡活性仅是其中一个方面,再比如 BLyS 可以提高患者的免疫能力,但过量的 BLyS 有可能引起自身免疫性疾病……所以对于 BLyS 的深入研究,不仅有助于揭示 BLyS 刺激不同细胞后,激活各种转录因子的确切信号通路、以及 BLyS 在整个免疫系统中的确切功能,最终将有助于相关疾病发病机理的阐明、早期诊断 Marker 和临床治疗药物的问世.

### [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(5425): 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 NH<sub>2</sub>-terminal kinase[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(23): 15978—15981.
- [3] Schneider P, Machay F, Steiner V, *et al.* BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth[J]. *J Exp Med*, 1999, 189(11): 1747—1756.
- [4] Shu H B, Hu W H, Johnson H, *et al.* TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens[J]. *J Leukoc Biol*, 1999, 65(5): 680—683.
- [5] Mackay F, Woodcock S A, Lawton P, *et al.* TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B cell autoimmune disease[J]. *Nature*, 2000, 404: 995—999.
- [6] Tribouley C, Wallroth M, Chan V, *et al.* Characterization of a new member of the TNF family expressed on antigen presenting cells[J]. *Biol Chem*, 1999, 380: 1443—1447.
- [7] Wang H, Marsters S A, Baker T, *et al.* TACI ligand interactions are required for T cell activation and collagen induced arthritis in mice[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2: 632—637.
- [8] Khare S D, Sarosi I, Xia X Z, *et al.* Severe B cell hyperplasia an autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice[J]. *Proc Natl Aca Sci USA*, 2000, 97(7): 3370—3375.
- [9] Horton R M, Hunt H D, Ho S N, *et al.* Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension Gene[J]. 1989, 77(1): 61—68.
- [10] Yu Xinglong, Tu Changchun, Li Hongwei, *et al.* Construction of Eukaryotic Expression Plasmids of CSFV E2 Gene and the Study on DNA Vaccine[J]. *Virologica Sinica*, 2000, 15(3): 264—271.
- [11] Kaufman R J, Sharp P A, Latt S A, *et al.* Evolution of chromosomal regions containing transfected and amplified dihydrofolate reductase sequences[J]. *Mol Cell Biol*, 1983, 3(4): 699—711.
- [12] Zhao Wei, Dai Chang-Bai, Shun Maosheng, *et al.* Stable Expression of Human Erythropoietin cDNA in Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells[J]. *Journal of Yunnan University*, 1999, 21(3): 175—178.

## Secreting Plasmid Construction and CHO Expression of the Recombinant Human Soluble B Lymphocyte Stimulator

Wu Haitao<sup>1,2</sup>, Hu Yunlong<sup>1</sup>, Diao Zhenyu<sup>1</sup>, Jin Lina<sup>1</sup>, Li Jie<sup>1</sup>, Zhang Shuangquan<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

(2. Basic Medical College of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, 210029, Nanjing, China)

(3. Nanjing Huaxin Pharmaceutical and Bioengineering Co. Ltd, 210002, Nanjing, China)

(4. Military Medical Institute of Nanjing Army, 210002, Nanjing, China)

**Abstract:** The B Lymphocyte Stimulator(BLyS), a novel immune regulator, is the most recent addition to the tumor necrosis factor family(TNF) ligands. BlyS induces B cell proliferation, differentiation and immunoglobulin secretion, and involves in immune response of T cell. It also strongly suppresses the growth of tumor cell lines. Furthermore, BLyS is associated with the development of some autoimmune disease. Here, EPO signal peptide sequence and hsBLyS gene were linked by SOE method. The fusion product was cloned into eukaryotic plasmids: pcDNA3, pcDNA3.1, pEFneo, respectively. Meanwhile, the EPO signal peptide sequence was mutated so as to form a restriction enzyme cut site: *Bln* I. Thus the recombinant plasmid can be used as secreting plasmid expressing other gene. The recombinant expression plasmid and marker plasmid: pSV-dhfr were co-transfected into CHO-dhfr<sup>-</sup> cells. After screened and amplified by selection medium and MTX respectively, we constructed a CHO cell line which secreting express rhsBLyS stably. The level of rhsBLyS expression raised from 0.13  $\mu\text{g/mL}$  to 0.55  $\mu\text{g/mL}$  under the pressure of MTX.

**Key words:** hsBLyS, Signal peptide, CHO, Secreting expression

[责任编辑:孙德泉]