

人转化生长因子- α/β -半乳糖苷酶融合基因在昆虫 *Sf* 细胞中的表达

李亦平 李敏棠 吴祥甫 李载平

(中国科学院上海生物化学研究所)

彭素芬 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

摘 要

人转化生长因子- α/β -半乳糖苷酶(hTGF- α/β -gal)融合基因被插入到昆虫核多角体病毒(AcNPV)转移载体 pUAc-5, 构建成质粒 pUAcTL-8。该质粒与野生型 AcNPV DNA 共感染秋粘虫细胞(*Sf*21), 并用蓝色空斑筛选得到重组病毒 VATG-1。重组病毒感染的 *Sf* 细胞产生的融合蛋白占细胞总染色蛋白的 12%, β -半乳糖苷酶测定量为 0.15 mg/10⁶ cell·ml。

关键词 昆虫细胞; 重组苜蓿尺蠖病毒; 人转化生长因子表达

重组昆虫病毒系统是近年来正在发展的一个超强表达外源基因的基因工程新系统。利用核多角体病毒(NPV)的多角体蛋白基因的启动子调控多种外源基因得到了极高的表达^[1]。其中如含流感病毒血凝素基因的重组 AcNPV 感染秋粘虫(*S. frugiperda*) *Sf* 细胞生产的血凝素占细胞总蛋白的 50%^[2]。而重组家蚕病毒(BmNPV)感染家蚕, 人干扰素- α (IFN- α)产量竟达 1.9×10⁸U/条蚕血淋巴液^[3]。感染重组 BmNPV 的家蚕, 产生胰岛素样生长因子融合蛋白量更高达 3.6 mg/条蚕。这样的高强表达是其他真核表达系统所少见的, 因而这一系统越来越受到基因工程研究者的重视。

我们曾报道了组建含苜蓿尺蠖核多角体病毒(AcNPV)的多角体蛋白基因启动子的转移质粒 pUAc-5。在该质粒中保留了启动子的完整顺序^[4]。本文报道利用 pUAc-5 构建含 hTGF- α/β -gal 融合基因的表达转移载体 pUATL-8 及筛选重组病毒 VATG-1, 并在 *Sf* 细胞中获融合基因的高表达。

材 料 和 方 法

1. 酶、试剂及一般操作 所用的酶均为 Boehringer Mannheim 产品。EGF 为 BRL 产品, TGF- β 购自 RaD Systems Inc.。ONPG IPTG 均为 Sigma 产品。人 TGF- α 抗体和羊抗兔 IgG 由细胞所制备。DNA 重组操作等均按 Maniatis 实验手册进行^[5]。

2. 病毒和细胞 AcNPV 和 *Sf*21 细胞由 Doefler 实验室赠给, 培养方法、DNA 转

染和重组病毒筛选同前文^[9]。大鼠肾细胞株 NRK 和人鼻咽癌细胞株 CNE₁ 均为细胞所保存株系,分别培养于 DMEM 和 1640 培液中,补加 10% Gibco 小牛血清。

3. 表达产物(hTGF- α / β -gal)的鉴定和定量 (1) 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE); 重组病毒感染后不同时间的 *Sf* 细胞,离心收集后经反复 3 次冻融裂解。裂解液按 Laemmli^[7] SDS-PAGE(10%)方法进行蛋白电泳后用考马斯蓝染色。(2) β -半乳糖苷酶的定量: 比色法定量 β -半乳糖苷酶活力及推算酶的蛋白量采用 Miller 的方法^[8]。(3) 蛋白免疫印迹法(Western Blot): 细胞裂解液的 PAGE 电泳条带,转移到硝酸纤维素膜上,用兔抗人 TGF- α 抗体和羊抗兔 IgG 作免疫杂交反应,然后按 Vecto Laboratories Inc. 推荐的方法用 ABC kit 显色。

4. 细胞转化活性及与细胞 EGF 受体结合能力 分别采用 Rosenthal 的软琼脂法^[9]和 Derynck 的 EGF 受体竞争抑制检测^[10]。

结 果

一、表达质粒 pUATL-8 的组建

质粒 pTL1 的 BamHI-ScaI 片段含有 TGF- α / β -gal 基因^[11]。经在 pUC19 中限制酶位点转移克隆到转移载体 pUA α -5 中,使融合基因位于多角体蛋白启动子(Ph)的下游。获得表达转移载体 pUATL-8 如图 1 所示。

二、含 h-TGF- α / β -gal 融合基因 AcNPV-VATG-1 的重组

pUATL-8 与 AcNPV DNA 均按摩尔比 100:1 混合,用磷酸钙共沉淀法转染 *Sf* 单层培养细胞,并覆盖薄层 1% 浓度的低熔点琼脂糖凝胶(BRL 产品),凝胶含有 100 μ g/ml IPTG 和 Xgal。经 5~6 天培养,在倒置显微镜下挑出蓝色重组病毒空斑。多次重复筛选可以得到不污染有多角体的重组病毒蓝斑 VATG-1。

三、TGF- α / β -gal 融合蛋白的表达和定量

VATG-1 重组病毒感染 *Sf* 细胞(感染指数 MoI 为 20)不同时间收集细胞,低速离心弃去培液并用 PBS 溶液洗净细胞。沉淀细胞经反复 3 次冻融裂解,离心除去细胞碎片得到的清裂解液用于比色法测定 β -半乳糖苷酶活力。酶的活力从感染后 20 小时出现并持续升高到 48 小时,此时 *Sf* 细胞产生的 β -半乳糖苷酶量推算可达 150 μ g/ 10^6 cell \cdot ml,54 小时后逐渐下降(图 2)。

取 5×10^4 细胞量的 48 小时感染细胞的清裂解液进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果如图 3 所示。与 AcNPV 感染细胞样品比较,重组病毒感染细胞中 30 kd 多角体蛋白消失,而增加了 130 kd 新的区带,分子量与 h-TGF- α / β -gal 蛋白一致。扫描分析融合蛋白产量占细胞总染色蛋白的 12%(图 3)。蛋白免疫印迹法(Western blot)分析,130 kd 区带能与 h-TGF- α 抗体结合,专一性地显示较强的色带(图 4)。

四、转化细胞活性的测定

转化细胞区别于正常细胞失去接触抑制行为,因而可在软琼脂中生长形成集落。我们用大鼠肾细胞株(NRK)作测试细胞确定融合 TGF- α 蛋白的转化功能。*Sf* 细胞裂解液中融合蛋白中所含 TGF- α 的量是按 β -半乳糖苷酶量推算出所含的 h-TGF- α 的量加

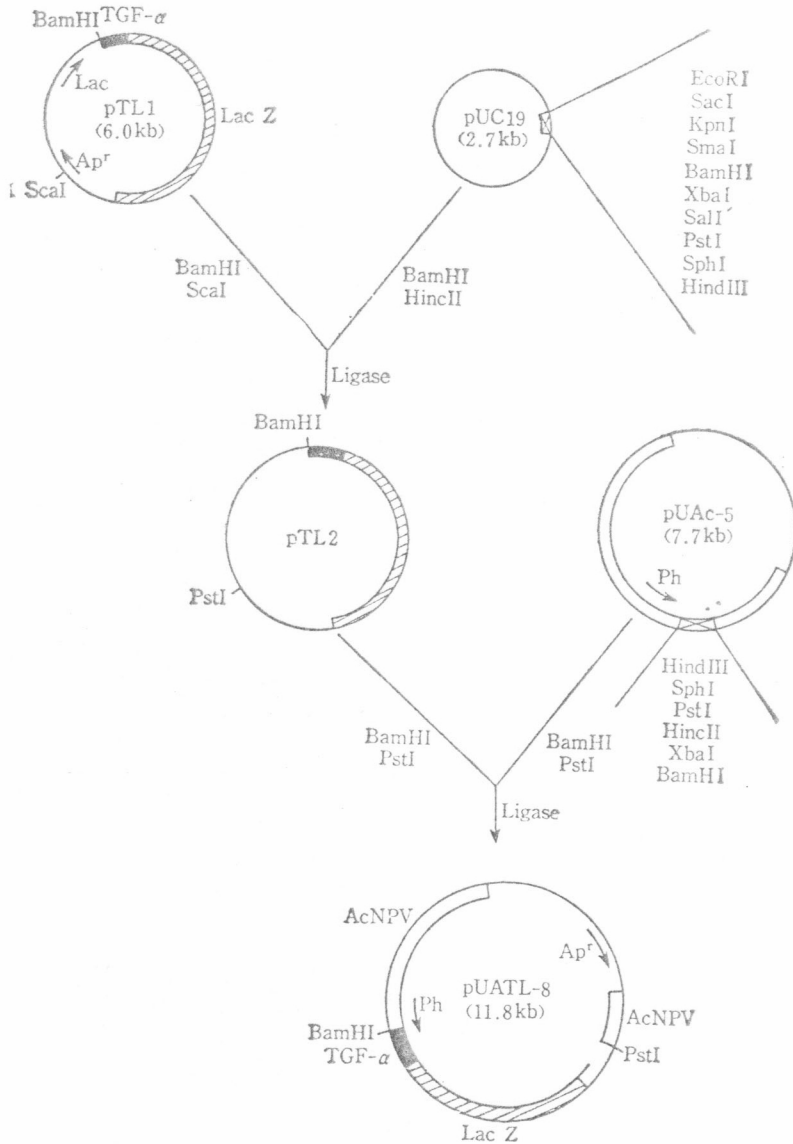


Fig. 1 Schematic diagram showing construction of pUATL-8 transfer vector

入软琼脂(以后均以 h-TGF- α 表示)。EGF 对 NRK 的转化活力作为转化实验可靠性的正对照。在加有 h-TGF- α 或 EGF 软琼脂的培养物经 8~10 天培养, 可见到细胞集落。h-TGF- α 浓度为 10 ng/ml 时有 110 个集落形成, 而 5 ng/ml EGF 时有 270 个集落, 没有补加 TGF- α 或 EGF 的培养物(野生 AcNPV 感染 *Sf* 细胞的清裂解液)无集落形成。补加 TGF- β 能诱导更多的集落, 反映了协同作用效应(图 5)。

五、与 EGF 受体竞争结合

CNE₁(人鼻咽癌细胞株)细胞膜具有 EGF 受体, 可以结合 ¹²⁵I-EGF。以结合 50 ppm ¹²⁵I-EGF 为 100% (cpm 值), 比较 h-TGF- α/β -gal 和 EGF 对 ¹²⁵I-EGF 的竞争效率,

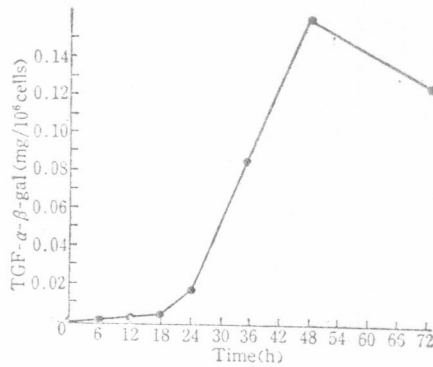


Fig. 2 Temporal regulation of TGF-α-β-galactosidase fusion protein expression after infection with vATG-1

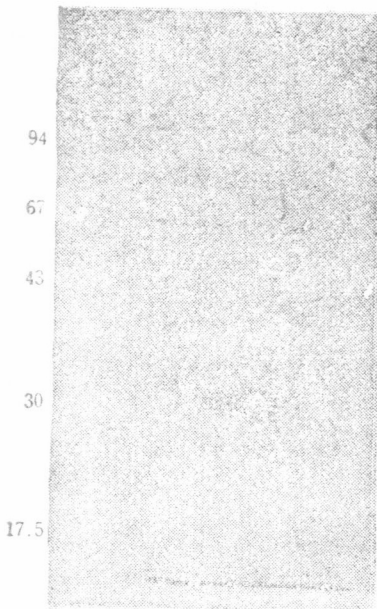


Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis profile of proteins from *S. frugiperda* cells infected with wild-type AcNPV or the recombinant virus AcTG-1 expressing TGF-α-β-galactosidase fusion

An arrowhead on the right indicates the position of the 13000 dalton TGF-α-β-galactosidase fusion protein

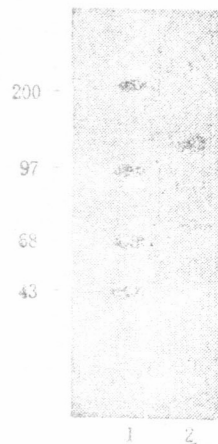


Fig. 4 Immunological identification of h-TGF-α-β-gal fusion protein by immunoblot

Lane 1, protein standards; Lane 2, lysate from vATG-1-infected cells.

结果如图 5。当 EGF 为 50 ppm 时竞争结合为 50%，准确反映了受体所结合的 EGF 的同源性，而达到同等程度的竞争结合时 h-TGF-α 浓度为 60 pmol/L (按 TGF-α 在融合蛋白中含量计算的浓度)。说明融合蛋白中 TGF-α 与 EGF 受体结合能力比 EGF 低 1000 倍，但图 6 仍显示了 TGF-α 与受体结合典型曲线。

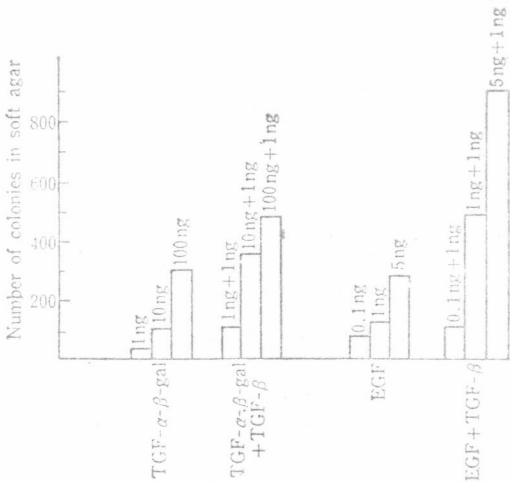


Fig. 5 Soft-agar colony-forming activity of EGF and h-TGF- α - β -galactosidase

The assay was performed with NRK cells in the presence of 1 ng/ml TGF- β or in the absence of TGF- β .

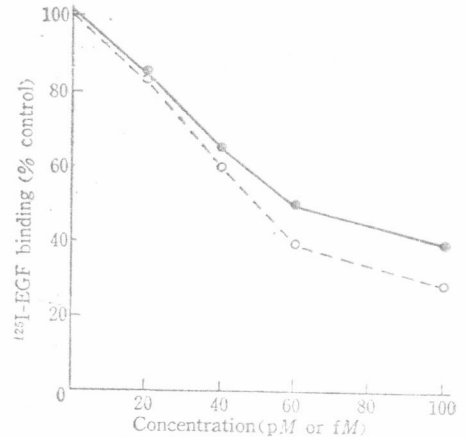


Fig. 6 Competitive inhibition of the binding of ^{125}I -EGF to the EGF receptors by TGF- α - β -galactosidase and EGF

CNE₁ cells were incubated for 60 min at 37°C in the presence of 50 fM ^{125}I -EGF and with the indicated concentrations of unlabeled TGF- α - β -galactosidase (pM, solid line) or EGF (fM, dashed line). Membrane-bound radioactivity was then determined as described under "Experimental Procedures". Data are expressed as per cent fraction of specific binding to membranes in the absence of unlabeled ligands.

讨 论

一、h-TGF- α/β -gal 融合蛋白在昆虫 *Sf* 细胞中的表达

前文^[1]报道了苜蓿尺蠖核多角体病毒 AcNPV 转移载体 pUA α -5 的构建。此文报道将人 h-TGF- α/β -gal 融合基因插入其中构成表达型转移质粒，在细胞内与野生型 AcNPV DNA 进行同源重组，形成重组的 AcNPV。由于 β -gal 基因的表达很容易由没有病毒多角体的蓝色空斑筛选。重组病毒在被感染的 *Sf* 细胞中产生的 h-TGF- α/β -gal 蛋白占细胞染色总蛋白 12%， β -半乳糖苷酶定量为 150 $\mu\text{g}/10^6\text{cell}\cdot\text{ml}$ 说明 pUA α -5 质粒由于保留了多角体蛋白基因 5' 端完整调控结构，具有高水平表达外源基因的能力。由昆虫细胞产生的融合蛋白既有 β -半乳糖苷酶的活力，又具有人 TGF- α 生物功能。表达产物是准确的。

二、融合蛋白的人 TGF- α 生物功能

软琼脂法测定昆虫细胞产生的 TGF- α 融合蛋白的细胞转化能力，虽然低于天然 EGF 5 倍，但确实显示了较强的转化细胞的功能。因为我们没有人 TGF- α 标准样品，不

能直接与之比较,而借助于 EGF 作对照,这样的比较还是不够确切的。融合蛋白虽显示了典型的与 EGF 受体结合竞争曲线,说明能与受体专一结合,但低了 EGF 1000 倍。可以推断由于 TGF- α C 端融合分子较大的 β -半乳糖苷酶,在构型上影响了 TGF- α 与 EGF 受体的有效结合。转化功能相对高于受体结合能力说明这两个功能在机理上的差别,而后者较大程度上受到 C 端融合蛋白的分子量和构型影响。TGF- α 在肿瘤研究中的重要意义,如设计改为在 TGF- α C 端融合较小的肽段可能消除融合对生物功能的影响。

参 考 文 献

- [1] Luckow, V. A. and Summers, M. D., Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology*, 1988, 6, 47.
- [2] Kuroda, K. et al., Expression of the influenza virus haemagglutinin in insect cells by a baculovirus vector. *EMBO J.*, 1986, 5, 1359.
- [3] Horiuchi, T. et al., High-level expression of the human- α interferon gene through the use of an improved baculovirus vector in the silkworm *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, 51, 1573.
- [4] 李亦平等: 定点突变法构建 AcNPV 通用表达载体 pUAc-5. *生物化学与生物物理学报*, 1989, 21, 344.
- [5] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1982, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N. Y.
- [6] 忻纪厚等: 核多角体病毒运载的外源基因在昆虫细胞中的表达. *生物化学与生物物理学报*, 1987, 19, 75.
- [7] Lammli, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)*, 1970, 227, 680.
- [8] Miller, J. H., *Experiments in Molecular Genetics*, 1972, 352, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N. Y.
- [9] Rosenthal, A. et al., Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- α cDNA results in transformation. *Cell*, 1986, 46, 301.
- [10] Derynck, R. et al., Human transforming growth factor- α : Precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell*, 1984, 38, 237.
- [11] 钱苏雯: 人的转化生长因子- α 在 *E. coli* 中的表达. 上海生化所博士论文, 1989, 待发表.

Expression of Human TGF- α/β -galactosidase Fusion Gene in Insect Cells with a Baculovirus Vector

Li Yi-ping, Li Min-tang, Wu Xiang-fu and Li Zai-ping

(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Peng Su-fen and Xu Yon-hua

(Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica)

ABSTRACT

A TGF- α/β -galactosidase fusion gene has been inserted into the baculovirus (AcNPV) transfer vector pUAc-5 to construct plasmid pUATL-8. Through cotransfection of insect cells (*Sf*) with pUATL-8 and wild type AcNPV genomic DNA, the recombinant virus VAG-1 was selected as blue plaques in the presence of Xgal. The amounts of TGF- α/β -galactosidase fusion protein produced from *Sf* cells infected with recombinant viruses at a level of 12% of total stainable proteins and about $150 \mu\text{g}/10^6$ cells β -galactosidase.

KEY WORDS: Insect cell; Recombinant; AcNPV; Expression; Human TGF- α -gene