

人血清白蛋白-白介素-2 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达

卢慧惠¹, 彭林¹, 段作营¹, 蔡燕飞², 金坚², 李华钟^{*1}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 药学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 白细胞介素-2 在人体免疫应答中具有重要作用, 常用于治疗肿瘤、肝炎和免疫缺陷性疾病等多种疾病, 但因其体内半衰期短而限制了其临床应用。文中构建了含有融合蛋白基因 *HSA-IL-2* 的 pMH3 质粒, 并通过电转染的方法转入中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO 细胞) 中, 利用 pMH3 质粒所携带的 *neo* 基因进行筛选, 经 96 孔板培养并筛选得到稳定表达目的蛋白质的重组细胞, 融合蛋白 *HSA-IL-2* 表达量达到 2.26 mg/L。利用反转录 PCR 和 Western blot 对重组细胞鉴定后发现, 融合蛋白编码基因整合入重组 CHO 细胞基因组中, 而且融合蛋白同时具有 HSA 和 IL-2 双重免疫原性。利用对 IL-2 具有依赖性的 CTLL-2 细胞进行活性分析后发现, 筛选得到的表达细胞分泌得到的融合蛋白具有较高的生物活性, 表明成功构建具有表达 IL-2 生物活性能力的 CHO 细胞。

关键词: 人白介素-2; 人血清白蛋白; 融合蛋白; 中国仓鼠卵巢细胞

中图分类号: Q 786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1689(2017)05-0456-05

Expression of Human Serum Albumin-Interleukin-2 Fusion Protein in Chinese Hamster Ovary Cells

LU Huihui¹, PENG Lin¹, DUAN Zuoying¹, CAI Yanfei², JIN Jian², LI Huazhong^{*1}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Interleukin-2 (IL-2) plays an important role in immune response and is widely used as therapeutic protein to treat diseases, such as cancer, hepatitis and immunodeficiency. In this study, the pMH3 plasmid containing fusion protein of human serum albumin and IL-2 was constructed and then transfected to Chinese hamster ovary (CHO) cells by electroporation. CHO cells stably expressing the target protein were selected by *neo* gene in pMH3 plasmid and determined by Dot-blot during 96-plate culture. The titer of HSA-IL-2 was 2.26 mg/L in the 24-plate culture. Reverse transcription PCR and western blot showed that the gene encoding *HSA-IL-2* was integrated to genome of recombinant CHO cells and the secreted fusion protein was detected by antibody to be

收稿日期: 2015-03-12

基金项目: 国家 863 计划项目(2014AA021003); 中科院先导计划项目(XDA01040202); 江苏省优势学科建设工程资助项目。

* 通信作者: 李华钟(1958—), 男, 山东龙口人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物制药研究。E-mail: hzhli@jiangnan.edu.cn

引用本文: 卢慧惠, 彭林, 段作营, 等. 人血清白蛋白-白介素-2 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(05):

456-460.

HSA and IL-2. The biological activity of fusion protein was analyzed by IL-2 dependent CTLL-2 cells, and the result showed that the recombinant protein possessed a high activity. In conclusion, the recombinant CHO cells producing biological fusion protein of HSA-IL-2 were successfully established.

Keywords: human interleukin-2, human serum albumin, fusion protein, Chinese hamster ovary cells

白细胞介素-2 (Interleukin-2, IL-2) 又称 T 细胞生长因子, 是 Morgan^[1] 等人用丝裂原、刀豆蛋白刺激 T 淋巴细胞时产生的一种因子。IL-2 在机体免疫应答中具有重要的作用, 在临床上用于肿瘤、肝炎、免疫缺陷性疾病的治疗。但 IL-2 相对分子质量小, 体内半衰期仅为 6.9 min^[2], 多次高剂量注射可能造成不良副作用^[3], 给患者带来很大的困扰, 限制了其在临床上的应用^[4]。人们通过白蛋白融合技术增加药物相对分子质量的方法来延长药物半衰期^[5]。关波等人通过 HSA 融合技术在毕赤酵母中成功表达了具有生物活性的融合蛋白 IL-2-HSA, 该融合蛋白在体内半衰期的延长至 13.24 h。但在毕赤酵母中表达融合蛋白时, 产物存在不均一、过度糖基化和降解等问题, 在生产应用中受到很大限制^[6]。目前中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary cell, CHO 细胞) 已经成为表达重组蛋白药物最为理想的宿主之一^[7], CHO 细胞表达的糖基化药物最接近天然蛋白质, 而且很少分泌自身内源蛋白, 产物胞外分泌, 利于纯化。本研究中利用 CHO 表达系统的优势, 在 CHO 表达系统对 IL-2 和 HSA 融合蛋白进行表达, 将 IL-2 连接到 HSA 的 C 端, 期望获得高效表达融合蛋白 HSA-IL-2 的 CHO 细胞系, 为 HSA 融合蛋白药物提供新的表达思路。

表 1 HSA-IL-2 融合蛋白 PCR 引物
Table 1 Primers of HSA-IL-2 fusion protein

Primers	Sequences
H1	5' -GCGAATTCCACCATGGAGACAGACACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCACTGGTGATGCACACAAGACTGAGGTTGCT-3'
H2	5'-TAAGCCTAAGGCAGCTTGACTTGCA-3'
I1	5'-GTCAAGCTGCCTTAGGCTTAGCACCTACTTCAAGTTCTACAAAGA-3'
I2	5'-TTCCGCCCGCTTAAGTCAGTGTGAGATGATGCTTTGACAA-3'

1.3 表达载体 pMH3/HSA-IL-2 的构建

分别以表 1 中 H1、H2 和 I1、I2 为引物, 质粒 pPIC9K/IL-2-HSA 为模板, 扩增出 HSA 和 IL-2 基因片段。纯化两 PCR 产物并按照摩尔比 1:1 混合进行拼接, 再以拼接产物为模板, H1 和 I2 为引物扩增 HSA-IL-2 融合基因全长 HSA-IL-2。用 PCR 产物

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pPIC9K/IL-2-HSA, 由作者所在实验室保存; CTLL-2 细胞和 IL-2 标准品, 江苏金斯利药业有限公司馈赠; CHO-S 细胞和 pMH3 质粒, AmProtein 公司馈赠; 大肠杆菌 DH5 α , T4 连接酶, 限制性内切酶 *Eco*RI, *Not*I, DNA 聚合酶等, 购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒, 胶回收试剂盒, PCR 产物回收试剂盒等, 购自上海生工生物公司; DMEM-F12 培养基和胎牛血清 (FBS), 购自 Gibco 公司; G418, MTT, 购自 Sigma 公司; 兔抗人 IL-2 抗体, 鼠抗人 HSA (HRP) 抗体, 鼠抗人 HSA 抗体, 购自 abcam 公司; 山羊抗兔二抗和山羊抗小鼠二抗, 购自碧云天公司; ELISA 试剂盒, 购自联科生物公司; 其余均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 PCR 扩增引物

表 1 中 H1 和 I2 的波浪线分别为 *Eco*R I 和 *Not* I 的酶切位点。H1 中 *Eco*R I 后 CACC 为 Kozac 序列, 下划线部分为 Igk 信号肽序列, 引物 H2 和 I1 有 20 个碱基完全互补, 以上引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

回收试剂盒回收目的片段, 经 *Eco*R I 与 *Not* I 酶切、回收, 并连接至 pMH3 载体的 *Eco*R I 与 *Not* I 酶切位点之间, 转化 DH5 α 感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养皿上 (含 100 μ g/mL 的 Amp), 37 $^{\circ}$ C 培养, 挑取单菌落进行 PCR 及双酶切电泳图谱鉴定, 并测序验证。

1.4 CHO-S 细胞的转染

CHO-S 细胞在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基中培养,当细胞长至汇合度 80% 左右时,用胰酶消化,离心收集细胞,PBS 重悬并调整细胞浓度为 1.5×10^7 cells/mL。取 200 μ L 细胞悬液,10 μ g 质粒进行电转染。电转条件为:500 V, 500 μ s 电击 4 次,每两次电击间隔冰浴 1 min。电击后将电极杯中的细胞悬液均分至两个 10 cm 培养皿(DMEM/F12,含体积分数 10% 胎牛血清)中培养 24 h 后,加入终质量浓度为 1.5 mg/L G418 进行筛选,期间观察细胞状态,待细胞出现大量死亡时(一般 2~3 d) 更换到含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基中培养,待细胞克隆长出。

1.5 稳定表达 HSA-IL-2 细胞株的筛选

待细胞克隆长至合适大小后将所有单克隆挑至 96 孔板中。在含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基中培养 7~8 d 后,PBS 清洗细胞,每孔加入 100 μ L 无血清培养基,48 h 后,取上清液用鼠抗人 HSA(HRP)抗体进行 Dot-blot 检测,进行快速筛选。得到的 HSA-IL-2 高表达克隆转入 24 孔板中,培养 2~3 d 后用 PBS 清洗,每孔加入 200 μ L 无血清培养基,48 h 后,取上清液进行 Dot-blot 检测,并用 HSA 标准品作为阳性对照,进一步筛选高表达细胞株。同时 ELISA 法检测细胞株的表达水平,并挑选表达量最高的细胞株,命名为 CHO-HI。

Dot-blot 检测的具体步骤如下:培养上清液按照顺序点到 NC 膜上,5 g/dL 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,鼠抗人 HSA (HRP) 抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST (TBS 含体积分数 0.5% Twen-20)漂洗 3 次,ECL 显色成像。

1.6 稳定表达 HSA-IL-2 细胞株的鉴定

1.6.1 RT-PCR 法 用 Trizol 法分别提取细胞株 CHO-HI 和 CHO-S 细胞的总 RNA,分别取 1 μ L RNA 为模板进行逆转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板,扩增目的基因片段。PCR 扩增产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析鉴定。

1.6.2 Western blot 检测 取细胞株 CHO-HI,48 h 表达上清液后进行 SDS-PAGE 分离,转至 NC 膜上,5 g/dL 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h,兔抗人 IL-2 或鼠抗人 HSA 抗体 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,TBST (TBS 含体积分数 0.5% Twen-20)漂洗 3 次,山羊抗兔二抗或山羊抗小鼠二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,TBST (TBS 含体积

数 0.5% Twen-20)漂洗 3 次,ECL 显色成像。

1.7 重组 HSA-IL-2 生物活性的测定

参照中国药典中的 CTLL-2/MTT 法^[8],测定 CHO-HI 细胞培养液中的重组 HSA-IL-2 的生物活性。样品 IL-2 效价按下式(1)计算待测样品生物学活性

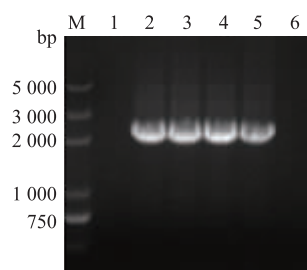
$$P(\text{IU/mL}) = P_r \times \frac{D_s \times E_s}{D_r \times E_r}$$

式中, P_r 为标准品生物学活性, IU/mL; D_s 为待测样品预稀释倍数; D_r 为标准品预稀释倍数; E_s 为待测样品相当于标准品半效的稀释倍数; E_r 为标准品半效稀释倍数。

2 结果与讨论

2.1 表达载体 pMH3/HSA-IL-2 的构建

在平板上随机挑选 5 个克隆,经菌落 PCR 鉴定,其中 2、3、4、5 号克隆在 2 200 bp 处有阳性条带(图 1)。

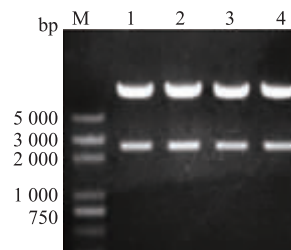


M:DNA 相对分子质量标准;1—5:pMH3-HSA-IL-2 菌液 PCR 产物;6:阴性对照。

图 1 pMH3-HSA-IL-2 菌液 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pMH3-HSA-IL-2 by PCR

提取质粒进行双酶切鉴定,结果在 2 200 bp 处均出现特异性条带(图 2)。测序结果与设计的基因序列比对结果一致,证实重组质粒构建成功。



M:DNA 相对分子质量标准;1—4:pMH3-HSA-IL-2 双酶切验证(EcoRI/NotI)。

图 2 pMH3-HSA-IL-2 质粒双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pMH3-HSA-IL-2 by enzyme digestion

2.2 细胞株的筛选

将挑取的 232 株克隆在 96 孔板中分别进行培养,表达并取上清液进行 Dot-blot 检测,图 3 显示了部分结果。将其中表达量较高的 48 株细胞,分别转到 24 孔板中进一步筛选。选取其中表达量较高 7 株用 ELISA 检测其表达量,结果如表 2 所示。其中 1D3、2B4 和 2C1 这 3 株的表达量均高于 1 mg/L,将其置于液氮中进行超低温冷冻保藏,并将表达量最高的 2B4 命名为 CHO-HI。

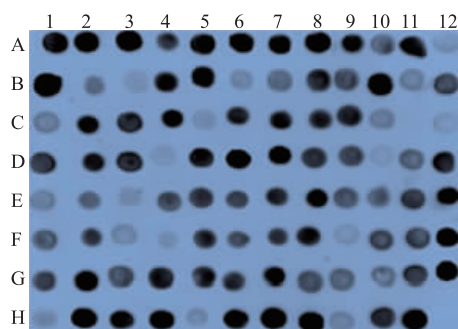


图 3 96 孔板克隆筛选结果

Fig. 3 Screening results in the 96-well plate by Dot-blot

表 2 不同 HSA-IL-2 克隆表达量 Elisa 检测结果

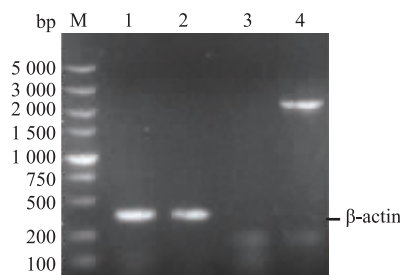
Table 2 Expression level of HSA-IL-2 in different clone detected by Elisa

细胞株	质量浓度/(mg/L)
1A3	0.58
1B1	0.87
1D3	1.52
2B4	2.26
2C1	1.56
2C5	0.80
2D3	0.55

2.3 细胞株的鉴定

RT-PCR 结果(图 4)表明,筛选得到的 CHO-HI 细胞中有 HSA-IL-2 融合蛋白 mRNA 表达,而在未转染质粒的 CHO-S 对照组中并未见 mRNA 表达。证实 HSA-IL-2 基因已成功整合至 CHO-S 细胞基因组中。Western blot 检测结果(图 5)显示:筛选得到的细胞株 CHO-HI 培养上清液无论采用 HSA 抗体,还是采用 IL-2 抗体,均在 82×10^3 左右出现单一的阳性条带,与目标融合蛋白理论相对分子质量相符。这表明目标蛋白质具有 HSA 和 IL-2 的双重免疫原性,筛选得到的细胞株 CHO-HI 能够成功表达

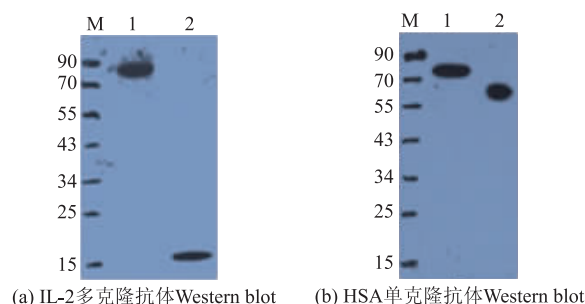
HSA-IL-2 融合蛋白。



1,3;CHO-S 细胞 RT-PCR 分别克隆 β -actin 片段和 HSA-IL-2 片段;2,4;CHO-HI 细胞 RT-PCR 分别克隆 β -actin 片段和 HSA-IL-2 片段。

图 4 RT-PCR 鉴定 CHO-HI 阳性细胞株

Fig. 4 Identification of CHO-HI positive transformants by RT-PCR



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. CHO-HI 表达上清;2. HSA 标准品。

图 5 HSA-IL-2 融合蛋白 Western blot 鉴定

Fig. 5 Characterization of the recombinant HSA-IL-2 by Western blot

2.4 融合蛋白 HSA-IL-2 活性测定

采用 IL-2 依赖型细胞株 CTLL-2,以标准品 IL-2 (925 IU/mL) 为阳性对照,未转染质粒的 CHO-S 培养上清液(预稀释 2.7 倍)为阴性对照,对 CHO-HI 表达上清液(预稀释 2.7 倍)的生物学活性进行了测定见图 6。结果显示,上清液中的融合蛋白 HSA-IL-2 可以有效刺激 CTLL-2 细胞的增殖,其生物学活性约为 4.5×10^4 IU/mL。

3 结 语

研究中将 HSA 与 IL-2 基因融合并克隆至 pMH3 质粒,成功构建了融合蛋白真核表达质粒 pMH3/HSA-IL-2,并成功在 CHO 细胞中进行了表达。经过筛选得到一株阳性克隆 CHO-HI,ELISA 试剂盒测定融合蛋白表达量为 2.26 mg/L。经 mRNA

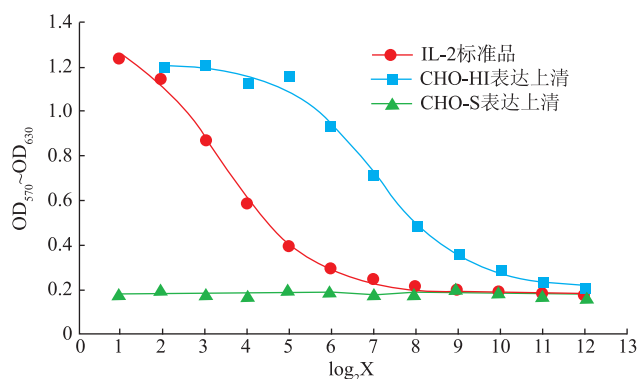


图6 HSA-IL-2生物活性测定

Fig. 6 Bioactivity assay of HSA-IL-2

和蛋白质水平检测,表明 *HSA-IL-2* 基因已经整合入 CHO 细胞基因组,表达产物相对分子质量为 8 200 与 *HSA-IL-2* 融合蛋白理论相对分子质量相符,而且具有 HSA 和 IL-2 双重免疫原性,得到了稳定表达 *HSA-IL-2* 融合蛋白的细胞株 CHO-HI,而且 Western blot 检测没有观察到降解现象。所表达的融合蛋白 *HSA-IL-2* 可以有效促进 CTLL-2 细胞的增殖,表现出较高的生物活性。

作者所在研究室已经在毕赤酵母中成功表达了多种白蛋白融合药物,以延长小分子蛋白质药物的半衰期。实验发现,各种白蛋白融合药物的分泌表达量都有一定的差异。即使是同一种多肽类药物,其表达量和活性也会因其与 HSA 的连接方式(即接入 HSA 的 C 端或 N 端)、培养条件等因素的不同而有较大差异。可能是因为不同外源蛋白质分子构象复杂程度有差异,而且毕赤酵母糖基化水平、对蛋白质的折叠修饰功能与哺乳动物细胞有所不同,分泌表达具有天然构象的活性分子需要在细胞水平进行更多的改造^[9]。CHO 表达系统与其他表达系统相比更适于重组蛋白表达^[10]:具有准确的转录后修饰功能,表达的糖基化药物蛋白在分子结构、理化特性和生物学功能方面最接近于天然蛋白质分子;适应悬浮培养;重组基因高效扩增表达;产物胞外分泌。目前已筛选出可高效表达具有生物活性的 *HSA-IL-2* 融合蛋白的 CHO-HI 细胞株,经过悬浮驯化后,可以达到高密度培养,提高融合蛋白表达量,实现融合蛋白的高效表达,为以后融合蛋白的研究提供新的思路。

参考文献:

- [1] MORGAN D A, RUSCETTI F W, GALLO R. Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows[J]. *Science*, 1976, 193(4257): 1007-1008.
- [2] KONRAD M W, HEMSTREET G, HERSH E M, et al. Pharmacokinetics of recombinant interleukin 2 in humans[J]. *Cancer research*, 1990, 50(7): 2009-2017.
- [3] PAU A K, TAVEL J A. Therapeutic use of interleukin-2 in HIV-infected patients[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2002, 2(4): 433-439.
- [4] MELDER R J, OSBORN B L, RICCOBENE T, et al. Pharmacokinetics and in vitro and in vivo anti-tumor response of an interleukin-2-human serum albumin fusion protein in mice[J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 2005, 54(6): 535-547.
- [5] SUBRAMANIAN G M, FISCELLA M, SMITH A L, et al. Albinterferon alpha-2b: a genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C[J]. *Nature Biotechnol*, 2007, 25: 1411-1419.
- [6] LEI J, GUAN B, LI B, et al. Expression, purification and characterization of recombinant human interleukin-2-serum albumin (rhIL-2-HSA) fusion protein in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Expression & Purification*, 2012, 84(1): 154-160.
- [7] KIM J Y, KIM Y G, LEE G M. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(3): 917-930.
- [8] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典(第三部)[M]. 2005 年版. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [9] 关波, 金坚, 李华钟. 改良毕赤酵母分泌表达外源蛋白能力的研究进展[J]. *微生物学报*, 2011, 57(7): 851-857.
GUAN Bo, JIN Jian, LI Huazhong. Genetic engineering of *Pichia pastoris* expression system for improved secretion of heterologous proteins-A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 57(7): 851-857. (in Chinese)
- [10] 王登, 刘煜. 用于重组蛋白表达的哺乳动物细胞系的研究进展[J]. *药物生物技术*, 2014(5): 478-482.
WANG Deng, LIU Yu. Advancing in mammalian cell line for expressing recombinant protein[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2014(5): 478-482. (in Chinese)