

人促红细胞生成素受体胞外区基因的克隆 及其在大肠杆菌中的表达

张映辉 卢一凡 刘一平 邓继先

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 以人胎肝为材料,通过 RT-PCR 的方法扩增出人促红细胞生成素受体(hEpoR)的胞外区基因。将获得的成熟受体胞外区基因起始密码子改构后克隆到原核表达载体 pBV220 中,进行原核温控诱导表达。表达产物经蛋白 N 端测序及 Western-blot 实验证实表达产物是 hEpoR 胞外区蛋白。利用上罐发酵培养获得的包涵体蛋白经复性纯化后,体外生物学活性检测表明表达产物可特异地抑制 TF-1 细胞在 Epo 刺激下的生长,证实了复性表达产物具有人促红细胞生成素受体胞外区结合 Epo 的生物活性。

关键词 人促红细胞生成素受体

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061-(2000)03-0328-05

人促红血细胞生成素是红细胞系前体细胞增殖、分化的主要调节因子。其作用配体是骨髓及其它造血组织细胞表面上的受体—促红血细胞生成素受体(hEpoR)。hEpoR 属于造血因子受体超家族成员,基因定位于人 19 号染色体^[2],是一种类型 I 的跨膜蛋白,胞内域本身不具备酪氨酸激酶活性^[1]。

近年来的研究发现,有三种形式的 EpoR 存在于人体环境中:完整的 EpoR(EpoR-F),截断型受体(EpoR-T)^[3]和可溶性 EpoR(sEpoR)^[4,5]。这些不同形式的受体是受体 mRNA 选择性剪切的结果。其中可溶性受体(sEpoR)基因序列分析表明它实际上就是 hEpoR 的胞外区蛋白,它对于造血系统的正常运转可能具有重要的生理功能。另外,1996 年有报道,利用受体的胞外区从噬菌体显示文库中筛出了类似 Epo 作用的一族小肽,其中一 14 残基环肽(EMP1)经体内、外实验证明与 Epo 作用相似^[6]。这一重要发现为今后 Epo 小分子模拟物的设计奠定了基础。

由于没有糖基化的受体对于 Epo 或其它有效配基的结合力并没有影响^[7]。基于这个原因,本研究利用原核生物表达 Epo 受体的胞外区,经过复性、鉴定证实得到了有 Epo 结合活性的可溶性受体蛋白,从而为进一步研究 Epo-EpoR 的作用机制,开发新型药物提供了基础资料。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α , JM109, BL-21(DE3), 由本室保存,质粒 pGEM-7zf, pBV220 均由本室保存, T 载体购自美国 Promega 公司。

1.2 酶及试剂

各种限制酶、修饰酶购自华美生物工程公司及美国 Promega 公司。cDNA 合成试剂盒, T4 DNA 聚合酶及 Klenow 酶为 Boehringer 公司产品。羊抗人 sEpoR 多克隆抗体购自美国 R&D 公司, QIAprep Spin Miniprep DNA 测序纯化试剂盒购自美国 Gene 公司。人源 Epo, TF-1 细胞株由本所保存。

1.3 受体胞外区和跨膜区基因的克隆和序列分析

用异硫氰胍一步法^[13]从新鲜的人胎肝提取 RNA, 经 RT-PCR 获得特异性的受体胞外区和跨膜区的基因。根据已发表 hEpoR cDNA 序列设计引物如下:

P1 5'-CATGGACCACCTCGGGGCGTC-3'

P2 5'-GAGCAGCGGAGCAGCGTTCAG-3'

利用 Oligo(dT)₁₅ 合成总 mRNA 的第一条链 cDNA, 具体操作见试剂盒说明。取 5 μ L cDNA 产物用 PCR 方法扩增 hEpoR cDNA 胞外区, 循环条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 35s, 58 $^{\circ}$ C 退火 35s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50s。PCR 产物经低熔点琼脂糖回收, Klenow 大片段酶补平后克

隆到 pGEM-7zf 载体,阳性克隆在涂有 IPTG/Xgal 的 LB/Amp 平板上挑出后进行自动测序。

1.4 hEpoR 胞外区基因克隆到原核表达载体

设计引物扩增截去 N 端 24 个信号肽氨基酸残基的 hEpoR 胞外区蛋白基因,在上游添加 *EcoRI* 酶切位点和 ATG,下游添加 *BamHI* 酶切位点和 TAA 终止密码子。另外根据以后表达情况将蛋白起始 3 个氨基酸的密码子进行改构,引物如下:

P1 5'-CCGAATTCATGGCTCCACCACCTAACCTCCC-3'

P2 5'-CGGGATCCTTAGTCCAGGTCGCTAGGGCGTCA-3'

PCR 条件为:94℃ 反应 35s,44℃ 反应 35s,72℃ 反应 50s,30 个循环,72℃ 10min,4℃ 1h。将 PCR 片段克隆到 T 载体,测序正确后利用 *EcoRI*/*BamHI* 酶切下目的片段连接到 pBV220 原核表达载体得到 pBV220-sEpoR。

1.5 大肠杆菌表达和包涵体的提取

将质粒 pBV220-sEpoR 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取单菌落 30℃ 培养过夜,转种后继续培养 4h,而后以 42℃ 诱导表达 4h。超声波破碎法提取包涵体蛋白参见“分子克隆”。

1.6 罐发酵诱导蛋白在大肠杆菌中表达

种子液的制备:将单菌落接种于 5mL 的培养基,30℃ 振荡培养 8h,而后视菌体的生长密度,取适量体积的菌液转接于 150mL 的培养基,30℃ 振荡培养过夜。所得即为上罐用种子液。

仪器及培养液的准备:配制含以下成分的培养液,细胞培养用胰化蛋白胨,细菌培养用酵母提取物,NaCl,葡萄糖 0.3%,磷酸盐缓冲液(50mmol/L, pH7.0),MgSO₄ (1~5mmol/L)。另配 4mol/L NaOH, HCl 作调节 pH 的校正液。

5L 发酵罐培养条件:装料系数为 60%,接种量为 1%(V/V),培养温度为 30℃,诱导温度为 42℃,溶氧电极在线检测,调节搅拌转速和通气量,控制溶氧始终大于 30% 饱和氧浓度,pH 值由 pH 电极在线检测,通过酸碱泵补入 4mol/L HCl 和 4mol/L NaOH 控制。

1.7 表达物的复性和纯化

包涵体的溶解:用 8mol/L 的脲,10mmol/L 的二巯基苏糖醇溶解,搅拌器搅拌 2h。

采用谷胱甘肽法复性:在 Tris·HCl(20mmol/L, pH8.0)缓冲液中,氧化型谷胱甘肽 0.2mmol/L,还原型谷胱甘肽 0.8mmol/L,脲终浓度为 2mol/L,4℃ 静置 24h。

透析:将复性溶液高速离心 5min,用 Tris·HCl

(20mmol/L, pH8.0)缓冲液透析 24h,期间更换透析液。

离子交换层析:将强阴离子柱(Sepharose Fast Flow)用清洗液(20mmol/L Tris·HCl, pH8.0, 1mol/L NaCl)清洗,后用平衡液 Tris·HCl(20mmol/L, pH8.0)平衡,上样,用离子强度呈梯度变化的 NaCl 进行洗脱。

1.8 Western-blot 检测 hEpoR 胞外区蛋白

SDS-PAGE 电泳包涵体蛋白,而后用电转移法转移到硝酸纤维素膜上,检测一抗为羊抗人 sEpoR 多克隆抗体,二抗为兔抗羊酶标抗体。

1.9 表达蛋白 N 端测序

取包涵体蛋白作 SDS-PAGE 电泳,后转移到 PVDF 膜上,考马斯亮蓝 G-250 染色后,送北京大学生命科学研究测定。

1.10 复性表达蛋白的生物学活性检测

用于检测表达产物结合 Epo 的细胞株为 TF-1 细胞。

a、TF-1 细胞在 Epo 刺激下生长情况的确定:源 TF-1 细胞的生长依赖因子为 G-CSF,生长培养基为 1640 培养基。用 1640 培养基清洗细胞 4 次彻底洗去 G-CSF,而后在 96 孔细胞培养板上对添加 Epo 的培养基进行二倍系列稀释,后每孔加上等量的浓度为 10 万/mL 的 TF-1 洗涤细胞,37℃ 二氧化碳孵箱中培养 2~3d,进行 MTT 染色,用酶联仪测定波长 570nm 的 OD 值以测定细胞的生长状况。

b、表达产物对 Epo 刺激下的 TF-1 细胞生长状况的影响。

在 96 孔板上设立四列孔,其中两列孔除添加相同浓度(根据以上实验测定)的 Epo 外,添加倍比稀释的表达物。另两列孔于前一组的区别是其添加的是适宜浓度的 G-CSF,这是为了检测表达物是否对其它因子也有结合影响细胞生长,作出细胞的生长曲线以判定表达产物对 TF-1 细胞生长的影响。

2 实验结果

2.1 hEpoR 胞外区和跨膜区基因的克隆

以胎肝组织总 RNA 的反转录产物为模板的 PCR 产物(图 1)是一大小约 0.8kb 的片段。克隆到 pGEM 质粒后测序结果与 hEpoR 胞外区和跨膜区基因国外发表序列一致。前面 72 个核苷酸编码的 24 个氨基酸构成 hEpoR 的信号肽,最后 69 个核苷酸编码 hEpoR 的跨膜区部分。在近膜区可以看到编码“WSAWS”结构的核苷酸序列,“WSXWS”是造

血因子受体超家族共有的结构。

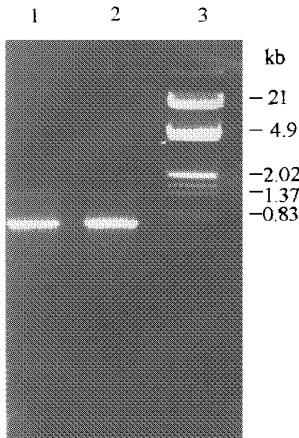


图 1 人促细胞生成素受体胞外区、跨膜区基因片段 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR product of extracellular and transmembrane domains of hEpoR

1, 2. PCR product ; 3. λ DNA/*EcoRI* + *Hind*III markers

2.2 hEpoR 胞外区蛋白(sEpoR)克隆到原核表达载体

利用已克隆的 pGEM-7Zf-EpoR 质粒作模板设计引物扩增 hEpoR 胞外区基因。由于在使用原基因编码序列表达情况不理想,我们在设计扩增基因所用引物时不改变编码意义将基因起始 3 个氨基酸编码子 GCGCCCCCG 改成 GCTCCACCA(大肠杆菌偏嗜性密码子),基因扩增结果见图 2。克隆到 T 载体上测序,结果正确,编码成熟 hEpoR 胞外区蛋白共 226 个氨基酸。此基因片段导入 pBV220 表达载体构建出克隆有 sEpoR 的原核表达载体。

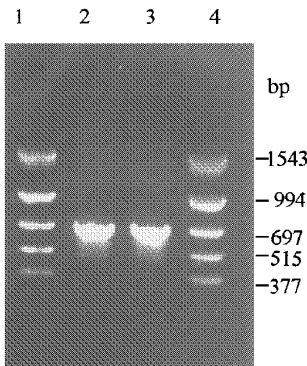


图 2 EpoR 胞外区基因片段 PCR 结果

Fig.2 PCR product of extracellular domain of hEpoR

1, 4. PCR markers

2, 3. PCR product of extracellular domain of hEpoR

2.3 sEpoR 在大肠杆菌中的表达

pBV220 - sEpoR 导入不同的宿主菌 :JM109 , DH5 α ,BL21(DE3) ,JM103。最后发现只有改构后的受体胞外区基因能在 BL21(DE3)中获得表达,表达效率大约 12% ,菌体破碎后洗脱的包涵体纯度大约为 67%。由于蛋白的表达量不高,鉴于此,采用发酵罐培养,保证菌体各项生长指标参数,以期获得较高的表达率,满足后面的纯化需要。具体表达情况见图 3。可以看出,发酵罐培养大大增加了蛋白的表达效率,达到 30% ~ 40% ,这样获得的大量包涵体满足了以后的纯化需要。

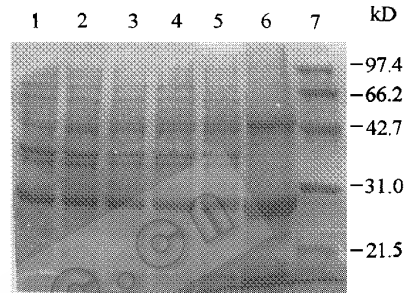


图 3 发酵培养细菌的表达情况

Fig.3 SDS-PAGE of fermentation products

1-5. Protein expression in fermentation ;

6. Inclusion body protein ;

7. *Mr* markers

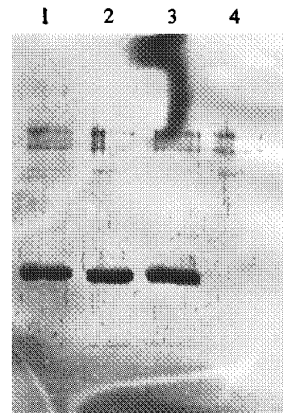


图 4 Western blotting 结果

Fig.4 Western blotting of expressed protein

1-3. Western blotting of inclusion body ;

4. Western blotting of total protein of

bacteria without pBV220-sEpoR

2.4 Western-blot 检测表达蛋白的抗原性

检测一抗为多克隆羊抗人 sEpoR 抗体,其主要结合 sEpoR 的(LeuProAspProLysPhe)的表位结构,检测结果表明,表达蛋白具有 sEpoR 的抗原性质

(图4)。表达蛋白 N 端的 11 个氨基酸残基与天然蛋白的 N 末端序列完全一致。所测序列 (APPNLPDPKF) 包括 sEpoR 的表位结构。由此证明表达蛋白就是 hEpoR 胞外区蛋白。

2.5 hEpoR 胞外区蛋白的复性和纯化

包涵体蛋白经尿素溶解,谷胱甘肽复性后,根据胞外区氨基酸残基组成推测蛋白的等电点在 5~6 之间,故采取 DEAE-sepharose 强阴离子柱进行纯化。纯化后除去了大部分杂蛋白和核酸物质,蛋白纯度为 82%,蛋白分子量大约 29kD,见图 5。

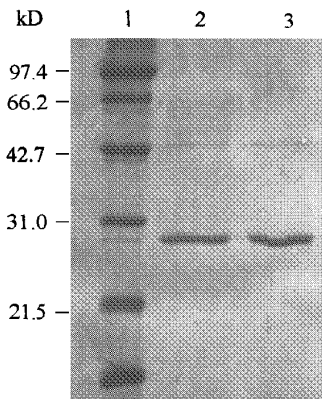


图 5 离子层析纯化蛋白

Fig.5 SDS-PAGE of purified protein by DEAE sepharose

1. Mr markers ; 2. 3. Purified protein

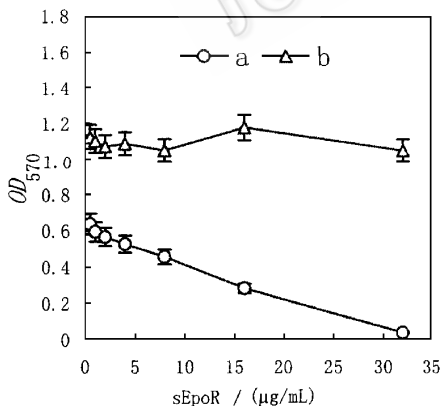


图 6 表达物对 Epo 刺激下的 TF-1 细胞的生长抑制作用

Fig.6 Renatured protein's growth-repressing effect

on TF-1 cells stimulated by Epo

a. Renatured protein's influence on TF-1 cells stimulated by Epo ;

b. Renatured protein's influence on TF-1 cells stimulated by G-CSF

2.6 hEpoR 胞外区蛋白的生物活性检测

支持细胞生长的 Epo 浓度为 2ng/mL。另实验结果表明,随着表达物 sEpoR 浓度提高,TF-1 细胞

在此 Epo 浓度下生长增殖的能力越来越低,直至细胞由于缺乏生长因子而全部死亡。这说明表达复性产物确实对 Epo 有结合活性。由于在对照组中表达产物并没有对 G-CSF 刺激下的 TF-1 细胞生长产生明显的影响,且 G-CSF 与 Epo 同属同族造血因子超家族成员,所以证实,复性蛋白具有与人促红细胞生成素特异结合的能力。

3 讨论

目前人促红细胞生成素受体已发现有 3 种由于 hEpoR mRNA 不同剪接而形成的形式:完整的 EpoR (EpoR-F),截断型受体 (EpoR-T) 和可溶性 EpoR (sEpoR)。EpoR-F 主要存在于成熟的红细胞系前体细胞,接受 Epo 刺激传递增殖分化的正常信号。EpoR-T 主要存在于不成熟的红细胞系前体细胞,它和 EpoR-T 共表达形成异源二聚体使细胞停滞在 G1 期的时间延长,这一方面减弱了 Epo 引发的增殖信号传导,另一方面促进了造血细胞的分化^[9]。sEpoR 的 mRNA 序列分析表明 hEpoR 基因编码部分停滞在第 5 个外显子,因此蛋白本身就是 hEpoR 胞外区蛋白,它存在于红系细胞成熟早期和人的血浆中,它与 Epo 呈 1:1 结合^[10]。由于现在对它的研究尚不够深入,因此对它的生理作用多属推测。例如由于血浆中存在 sEpoR 而血清中很少,使人猜测 sEpoR 可能对凝血过程有一定影响^[5]。另外 Epo 属于细胞因子超家族成员,这其中白介素 4 的可溶性受体有报道是 IL-4 的转运载体^[11],因此 sEpoR 也有可能结合 Epo 调节 Epo 在体内的分布,从而对整个造血系统的运转起到调节作用。

我们利用大肠杆菌表达了 hEpoR 胞外区蛋白,无论在尿素溶解还是蛋白复性过程中均发现它的可溶性很好,因此 hEpoR 胞外区蛋白复性后得到的就是 sEpoR。在活性检测时,它能使人红白血病 TF-1 细胞株的生长受到抑制。鉴于这是一种因人源细胞表面 EpoR 的异常使细胞对 Epo 敏感而引发的白血病^[12],我们认为表达的 hEpoR 胞外区蛋白 (sEpoR) 为临床上治疗以红白细胞增多为特征的白血病提供了一个有价值的线索。

本文通过基因测序、蛋白测序、蛋白抗原性检测、分子量测定,证明所获蛋白就是 hEpoR 胞外区蛋白。细胞学检测结果证明它具备与 Epo 的结合活性。这就为下面通过进一步亲和层析纯化活性受体筛选噬菌体肽库获取 Epo 类似小肽提供了物质基础。另外通过获得的蛋白免疫动物获得针对

sEpoR的抗体可进行免疫组化分析,进一步研究 sEpoR的生理机制。目前国内尚未见到这方面研究

的报道,本文获得的原核表达的人源 sEpoR 为今后相关研究奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Patrick Mayeux ,Sylric ,Stephanic Gobert *et al.* . *Soci Exp Bio Med* ,1994 **206** :201~204
- [2] John C. Winkelmann ,Laura A *et al.* . *Blood* ,1990 **76**(1) :24~30
- [3] Yukio Nakamura ,Norio Komatsu ,Hiromitsu Nakachi , *Science* ,1992 **257** :1138~1141
- [4] Alan D ,D 'Andrea ,Harvey F , Lodish Gordon G , Wong. *Cell* ,1994 **57** :277~285
- [5] Kevin W ,Harris John C ,Winkelmann *et al.* . *Am J Hem* ,1996 **52** :8~13
- [6] Nicholas C ,Wrighton ,Francisx Farrell ,Ray Chang *et al.* . *Science* ,1996 **273** :458
- [7] Nagao M ,Morita E *et al.* . *FEBS LETT* ,1995 **373**(3) :225~228
- [8] Emi Morishita ,Hiroshi Narita ,Motoyuki Nishida *et al.* . *Blood* ,1996 **88**(2) :465~471
- [9] Yukio Nakamura *et al.* . *Biochem Biophy Res Com* ,1996 **218** :205~209
- [10] Philo J S ,Aoki K H ,Arakawa T *et al.* . *Biochemistry* ,1996 **35**(15) :1681~91
- [11] Rafael Fernandez-Borton ,Ellen S Vitetta. *J Exp Med* ,1991 **174** :673~681
- [12] Wrighto N C ,Balasubramanian P *et al.* . *Nat Biotechnol* ,1997 **15**(12) :1261~1265

Cloning cDNA of Extracellular Domain of Human Erythropoietin Receptor and its Expression in *Escherichia coli*

ZHANG Ying-Hui LU Yi-Fan LIU Yi-Ping DENG Ji-Xian

(*Beijing Institute of Biotechnology ,Beijing 100071*)

Abstract Human erythropoietin receptor(hEpoR) plays an important role in regulating the red blood cell production by promoting the proliferation and differentiation of RBC from erythroid precursors. hEpoR is a transmembrane protein and its extrocellular domain(sEpoR) is of great importance in Epo signal transduction pathway. We cloned the gene of sEpoR by RT-PCR from the total RNA of human fetal liver and expressed it in *E. coli* after insertion of the gene in the expression vector pBV220. The cloned gene was confirmed by sequencing analysis and gene product was confirmed by both Western blot and its first 11 amino acid residues sequence of the N-terminal. *In vitro* bioassay showed that the purified gene product can repress the growth of TF-cells in the presence of Epo.

Key words Human erythropoietin receptor