

大鼠睾丸黄体生成素受体剪切变异体 cDNA 在昆虫细胞中的高效表达

申庆祥 沈 惠 李昌麟 刘海湖 Om P. Bahl*

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

(美国纽约州立大学布法罗分校生物科学系 纽约 14260)*

摘 要 研究了大鼠睾丸黄体生成素受体剪切变异体 cDNA 在昆虫细胞中的表达,并对其产物性质作了初步鉴定。SDS-PAGE 银染和免疫印迹结果显示,表达产物呈两条带,分子量为 38.5kDa 的主带和分子量为 40kDa 的次带。¹²⁵I-hCG 结合印迹分析表明,表达产物 R316 具有与配基专一性结合的生物活力。竞争性配基结合曲线和 Scatchard 分析结果显示,重组受体 R316 和配基 hCG 有较高的亲和力,平衡解离常数 K_d 为 8.15×10^{-10} mol/L。表达产物为与膜结合的蛋白,在条件培养基中未检测到它的存在。

关键词 LH/hCG 受体,核型多角体病毒表达载体,剪切变异体,表达,昆虫细胞

黄体生成素/人绒毛膜促性腺激素(LH/hCG)及其受体在性腺甾体激素形成调节中起重要作用。这包括促进腺苷环化酶的形成和与 G-蛋白偶联的受体所特有的蛋白磷酸化作用^[1]。LH/hCG 受体是与 G-蛋白偶联的受体族中的一员,由 674 个氨基酸残基组成,其 N-端 341 个氨基酸位于膜外,且与配基有很高的亲和性^[2~4]。我们已作了大鼠 LH/hCG 受体 N-端膜外微区(1~341 氨基酸残基片段)在昆虫细胞中的表达研究,结果发现表达产物均为与膜结合的蛋白^[5]。Tsai-Morris 等人在 COS1 细胞中表达大鼠睾丸黄体生成素受体剪切变异体(N-端 316 个氨基酸残基,简称 R316),表达产物大部分是与膜结合的蛋白,但有极少部分为可溶性产物,分泌到培养液中。分泌到培养液中的产物与受体的亲和性高于位于膜上的表达产物^[6]。本文报道大鼠 LH/hCG 受体剪切变异体 N-端(1~316 个氨基酸残基)cDNA 在昆虫细胞中的表达及产物性质的初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠 LH/hCG 受体 cDNA 由大鼠卵巢 cDNA 库中筛选获得^[7]。hCG(13,000IU/mg)、兔抗大鼠 LH/hCG 受体氨基酸残基 24-42 抗血清和兔抗 hCG 抗体均由本实验室制备。昆虫细胞株 Fall army spodotera (Sf9)购自 American Type Culture Collection (ATCC),培养液和培养条件参照文献[8]。用于聚合酶链反应(PCR)的引物为:(I)

本文于 1995 年 9 月 20 日收到。

GCTCGAATTCAGGCTGGGCCACCATGGGGCGGCG(34mer);(II)TTGAATTCATAGTACTGGCCTTTTGTTTGGGAGTCCACGGAGGCAATGAGCAGCAGGTAGAGCCCCATGCAAAAAGAAGCGTCTCGTTATCTGC(93mer)(图1),用 Applied Biosystem DNA 合成仪合成。

1.2 含 R316 cDNA 转移载体的构建和重组病毒的筛选

分子克隆主要参考 Sambrook 等的方法^[9]。限制酶、修饰酶等为 Gibco-BRL 和 Promega 公司产品,反应条件按厂家所附使用说明。PCR 试剂盒购自 Perkin-Elmer 公司,反应按厂商建议条件进行。野生型核型多角体病毒(AcNPV)和载体 pVL1393 由 Texas A&M 大学 M. Summers 教授惠赠。为获得重组病毒 AcNPV-LH/hCG-R316,用 PCR 制备编码大鼠 LH/hCG 受体信号肽及 N-端剪切变异体 316 氨基酸残基的 cDNA 片段(称作 R316 cDNA),经测序证明序列正确后,克隆入 pVL1393 的 EcoRI 位点,产生的质粒 pVL1393-R316 与 BaculoGold™线性化的病毒 DNA(PharMingen 公司产品)共转染 Sf9 细胞^[8],借助于倒置显微镜观察被转染的细胞形态的变化,筛选出重组病毒 AcNPV-LH/hCG-R316。

1.3 LH/hCG R316 cDNA 在昆虫细胞中的表达

离心收集重组病毒 AcNPV-LH/hCG-R316 转染 72h 后的昆虫细胞(2×10^6),细胞悬浮于 200 μ l SDS-PAGE 样品缓冲液中,作 SDS-PAGE 银染和免疫印迹分析^[4]。按相同方法处理野生型病毒 AcNPV 感染的昆虫细胞,作对照样品。

1.4 表达产物在昆虫细胞内的分布

取重组病毒感染 72h 后的昆虫细胞(1×10^9),悬浮于 5ml 缓冲液 A(0.25mol/L 蔗糖、1mmol/L MgCl₂、1mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、1 μ mol/L Na-P-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK)、5mmol/L N-Ethylmaleimide (NEM)、5mmol/L EDTA 和 20mmol/L Tris-HCl, pH7.5),高速匀浆后,离心($2800 \times g$)10min,取上清液。上清液超离心($47000 \times g$)1h,上清液称作 S1,沉淀部分即为粗制的含受体的膜部分(P1)。粗制的膜部分(P1)悬浮于 5ml 缓冲液 B(含 20% 甘油、1mmol/L PMSF、2 μ mol/L TLCK 和 50mmol/L Tris-HCl, pH7.4)。低速匀浆后,加入 Lubrol PX 至最终浓度为 1%,于 4 $^{\circ}$ C 搅拌 3h,超离心($100000 \times g$)1h,取含可溶性重组受体 R316 的上清液(S2),贮于 -80 $^{\circ}$ C 备用。沉淀悬浮于缓冲液 B 中(P2)。制备的各部分作 SDS-PAGE 和免疫印迹分析^[4]。

1.5 ¹²⁵I 标记配基印迹分析和配基结合活性测定

hCG 的¹²⁵I 标记按 Lee 和 Ryan 方法^[10]。¹²⁵I 标记配基的印迹分析方法参照文献[11]。配基结合活性测定按文献[7]。

2 结 果

2.1 含 R316 cDNA 核型多角体病毒表达载体的构建和重组病毒的筛选

为制备 LH/hCG R316 cDNA,以全长 LH/hCG cDNA 为模板,用两个合成的引物进行 PCR 反应。引物 I (34mer)为 5'端引物。引物 II (93mer)为 3'端引物,其中包括编码变异体 295~316 氨基酸残基的密码子(图1)。两引物各引入 EcoRI 位点,便于克隆(图1和2)。

5'-GCTCGAATTCAGGCTGGGCCACC ATG GGG CGG CG
 1 TCACACACTCAGGCTGGCGGGCC ATG GGG CGG GGA GTC CCA GCT CTG AGA
 -26 Met Gly Arg Arg Val Pro Ala Leu Arg

51 CAG CTG CTG GTG CTG GCA GTG CTG CTG CTG AAG CCT TCA CAG CTG
 -17 Gln Leu Leu Val Leu Ala Val Leu Leu Leu Lys Pro Ser Gln Leu

96 CAG TCC CGA GAG *** ** AAA GCA GAT AAC GAG ACG
CGT CTA TTG CTC TGC
 -2 Gln Ser Arg Glu *** ** Lys Ala Asp Asn Glu Thr

981 CTT *ctt ttg cat ggg gct cta cct gct gct cat tgc ctc cgt gga*
GAA GAA AAC GTA CCC CGA GAT GGA CGA CGA GTA ACG GAG GCA CCT
 294 Leu Leu-Leu His Gly Ala Leu Pro Ala Ala His Cys Leu Arg Gly

1026 *ctc cca aac aaa agg cca gta cta tga att caa*
GAG GGT TTG TTT TCC GGT CAT GAT ACT TAA GTT-5'
 309 Leu Pro Asn Lys Arg Pro Val Leu

图 1 大鼠睾丸 LH 受体剪切变异体部分 cDNA 序列和翻译的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide sequence and predicted amino acid sequence
 of partial truncated variant cDNA of rat testicular LH
 Small letters represented nucleotide sequence of varied region.
 Underlined nucleotides represented synthetic primers for PCR reaction.

用 PCR 方法产生的 LH/hCG R316 cDNA 片段经 EcoRI 酶解, 低熔点琼脂糖电泳纯化后克隆入 pVL1393 的 EcoRI 位点, 用 PstI 酶解重组质粒, 经琼脂糖电泳鉴定 cDNA 的插入方向, 有 984 bp 片段出现, 说明 cDNA 插入方向是正确的, 构建的质粒称作 pVL1393-R316(图 2)。在这种情况下, 大鼠 LH/hCG R316 cDNA 的表达受控于 AcNPV 多角体病毒启动子, 以非融合蛋白形式表达。产生的重组质粒和 BaculoGold™ 线性化的病毒 DNA 共转染昆虫细胞, 筛选出重组病毒 AcNPV-LH/hCG-R316。

2.2 LH/hCG R316 cDNA 在昆虫细胞中的表达

用重组病毒转染昆虫细胞, 按“材料和方法”所述, 制备细胞裂解液。取 2 μ l 样品作 SDS-PAGE 银染, 取 10 μ l 样品作免疫印迹分析。结果如 Plate I-A、B 所示。银染(Plate I-A, Lane 2)和免疫印迹分析(Plate I-B, Lane 3)显示表达产物呈两条带, 主带分子量为 38.5kDa, 次带分子量为 40.0kDa, 而对照实验未见这两条带(Plate I-A, Lane 1 和 Plate I-B, Lane 1)。表达产物在还原和非还原条件下的免疫印迹分析显示, 表达产物均呈两条带(Plate I-D Lane 2 和 5), 分子量分别为 38.5kDa 和 40.0kDa, 说明表达产物没有发生

明显的凝集作用, Plate I-D 中 Lane 1 和 4 为野生型病毒感染的昆虫细胞裂解, 均未见相应条带。这表明 38.5kDa 和 40.0kDa 的蛋白带是表达产物。

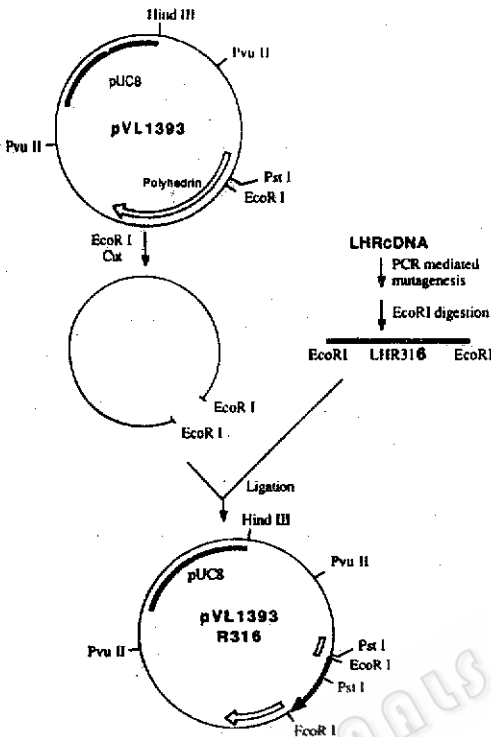


图2 核型多角体病毒表达载体 pVL1393-R316 的构建

Fig.2 Construction of nuclear polyhedrosis virus expression vector pVL1393-R316

2.3 表达产物 R316 在细胞内的分布

重组病毒 R316 感染的昆虫细胞经高速匀浆、低速度离心去除细胞碎片, 超离心后分成可能含受体的膜部分 P1 和细胞质部分 S1。粗制的可能含受体的膜部分 P1 经增溶超离心后, 分成可溶性部分 S2 和沉淀部分 P2。样品 P1、S1、S2 和 P2 的免疫印迹分析如 Plate I-C。表达的产物 R316 存在于粗制的膜部分和增溶超离心后的上清液部分 S2 (Plate I-C, Lane 5 和 3), 在细胞质部分 S1 和增溶超离心后的 P2 中几乎不存在 (Plate I-C Lane 4 和 2)。用重组病毒 R316 感染的昆虫细胞的条件培养液作配基结合测活, 但未能发现这种活性, 这可能是表达产物不能分泌到培养液中所致。这提示, 表达产物为与膜结合的蛋白。

2.4 表达产物的配基结合印迹分析

为证实表达产物具有与配基专一性结合能力, 粗制含受体的膜部分 P1, 作非还原条件下的 SDS-PAGE, 蛋白带转移至硝基纤维素膜上, 加入 ^{125}I -hCG 进行配基结合印迹分析。如 Plate I-E, Lane 4 所示, 只有表达产物能与 ^{125}I -hCG 结合, 对照实验无此类条带 (Plate I-E, Lane 3)。在过量的非标记 hCG

存在下均无此两条带 (Plate I-E, Lane 1 和 2), 这提示表达产物与配基的结合是专一性的。

2.5 表达产物的竞争性配基结合分析

从重组 R316 病毒感染的昆虫细胞制备的可溶性受体 (S2), 进行竞争性配基结合分析, 测定表达重组受体与 hCG 的结合能力。图 3A 显示在不同浓度非标记 hCG 存在下表达重组受体竞争性结合 ^{125}I -hCG 的实验结果。由图可见, 随着非标记的 hCG 浓度的增加, 对表达受体结合 ^{125}I -hCG 呈明显的竞争抑制, 提示表达受体对配基的亲合结合特性。由图 3A 曲线所作 Scatchard Plot 分析如图 3B, 表达受体结合 hCG 的解离常数为 $8.15 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$, 结合能力明显高于在 CHO 细胞中表达的重组受体 R341 和在昆虫细胞中表达的全长的受体^[4,7]。

3 讨论

构建重组病毒 AcNPV-LH/hCG-R316, 我们采用 PharMingen 公司的 BaculoGoldTM 线

性化病毒 DNA 代替野生型病毒 AcNPV DNA, 与表达质粒 pVL1393-R316 一起共转染昆虫细胞, 产生重组病毒。由于线性化病毒 DNA 具有致死缺失, 只有当与 pVL1393-R316

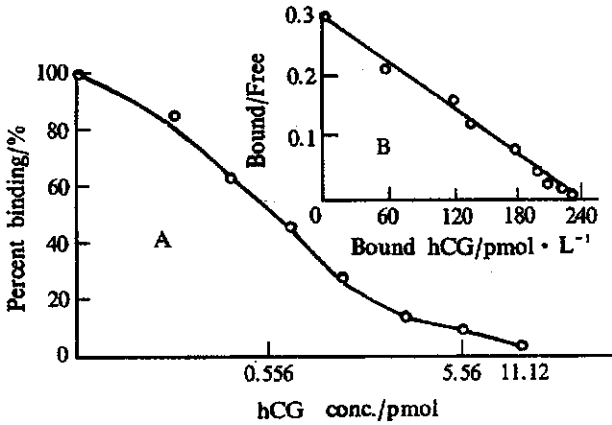


图3 在不同浓度的 hCG 存在下, 由重组 R316 病毒感染的昆虫细胞制备的可溶性受体与 ^{125}I -hCG 的竞争抑制

Fig.3 Competitive inhibition of ^{125}I -hCG binding with soluble protein extraction from recombinant R316 virus infected insect cells in the presence of various concentration of hCG

A. The binding displacement curve;

B. Scatchard Plot derived from the curve A.

发现有产物分泌到培养液中。表达产物与配基结合的平衡解离常数 K_d 为 8.15×10^{-10} mol/L, 为 COS1 细胞中表达的位于膜上的产物的 54%。R316 在昆虫细胞中表达水平较高, 达 $6\mu\text{g}/10^6$ 细胞。最近我们又发现用 High Five 昆虫细胞, 表达量又可提高 2~3 倍。这为大量提取纯化表达产物提供了可能, 我们将进一步提取纯化表达产物, 以研究其生物学功能, 并进行结晶结构分析, 目前, 工作正在进行中。

参 考 文 献

- [1]Pierce J G, & Parsons T F. *Ann Rev Biochem*, 1981, 50:465~495.
- [2]McFarland K C, Sprengel R, Phillips H S *et al.* *Science*, 1989, 245:494~499.
- [3]Xie Y B, Wang H, Segaloff D L. *J Biol Chem*, 1990, 265:21411~21414.
- [4]刘海湖, 黄有国, 申庆祥等. *生物化学与生物物理学报*, 1995, 27:47~56.
- [5]申庆祥, 李昌麟, 沈惠等. *实验生物学报*, 1995, 28:381~387.
- [6]Tsai-Morris C H, Buczko E, Wang W *et al.* *J Biol Chem*, 1990, 265:19385~19388.
- [7]申庆祥, 刘海湖, 陈文永等. *实验生物学报*, 1995, 28:284~290.
- [8]Chen W, Shen Q X, Om P Bahl. *J Biol Chem*, 1991 266:4081~4087.
- [9]Sambrook J, Fritsh E F and Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Labo

ratory Press, 1989.

[10] Lee, C Y, Ryan R J. *Biochemistry*, 1973, 12:4609~4615.

[11] Chen W, Om P Bahl. *Mol Cell Endocrin*, 1993, 91:35~41.

High Expression of Truncated Variant cDNA of Rat Testicular Luteinizing Hormone(LH) Receptor in Insect Cell

Shen Qingxiang Shen Hui Li Changlin

Liu Haihu Om P. Bahl*

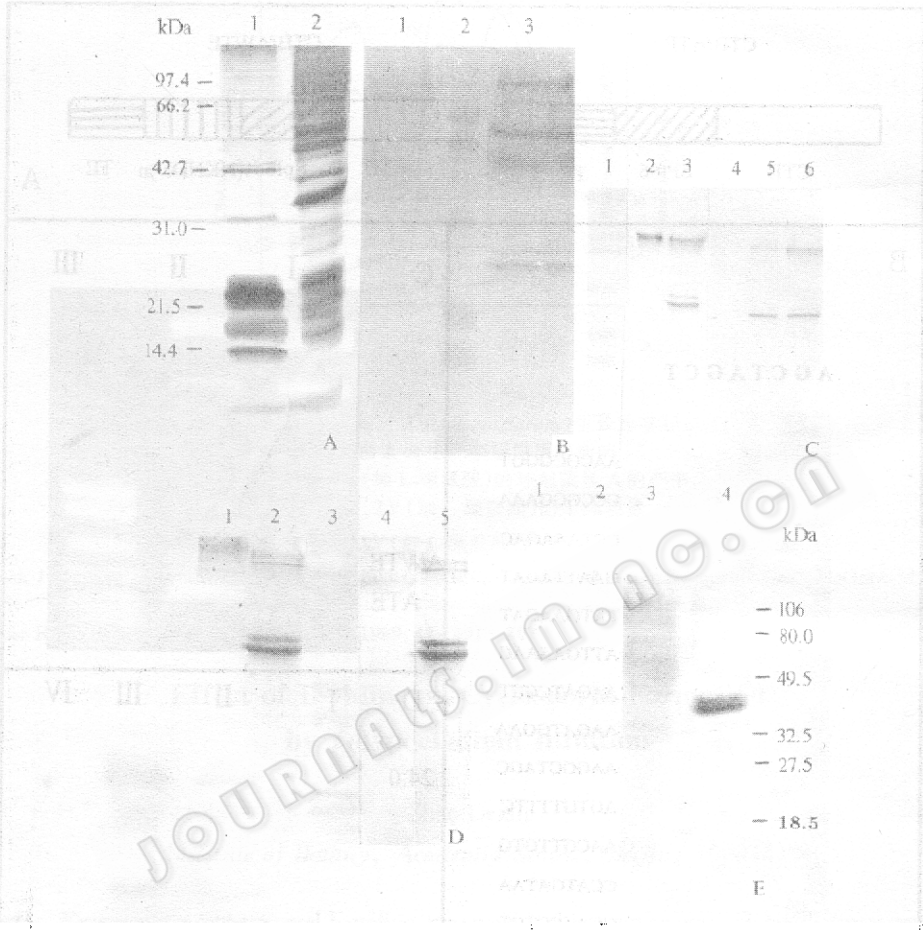
(*Shanghai Institute of Cell Biology, Academia Sinica, Shanghai 200031*)

(*Department of Biological Sciences, State University of New York at*

Buffalo, Buffalo, NY 14260, U. S. A.)*

Abstract This paper described the expression of the truncated variant cDNA in insect cells and preliminary identification of the expressed proteins. SDS-PAGE silver staining and immuno-blotting analysis showed the expressed product appeared in two bands, major band had molecular weight 38.5kDa, and weak band, 40.0kDa. The ¹²⁵I-hCG-binding blotting analysis indicated that the expressed product R316 had specific binding affinity for ligands. The competitive binding assay of ligand and Scatchard analysis indicated that recombinant receptor R316 had high binding affinity for hCG and Kd was 8.15×10^{-10} mol/L. The expressed product was found to be linked with membrane and was absent from the conditioned medium.

Key words LH/hCG receptor, nuclear polyhedrosis virus expression vector, truncated variant, expression, insect cell



A. Silver staining; analysis of lysates from insect cells infected with recombinant R316 virus under reducing condition
 1. wild type virus infected insect cells. 2. recombinant R316 virus infected cells.

B. Immuno-blotting; analysis of lysates from insect cells infected with recombinant R316 virus under reducing condition
 1. wild type virus infected insect cells.

2. prestained SDS - PAGE standards from Bio - Rad; rabbit muscle phosphorylase B, 106kDa; bovine serum albumin, 80kDa; hen egg white ovalbumin, 49.5kDa; bovine carbonic anhydrase, 32.5kDa; soybean trypsin inhibitor, 27.5kDa; hen egg white lysozyme, 18.5kDa. 3. recombinant R316 virus infected insect cells.

C. Immuno - blotting analysis of cellular fractions of recombinant R316 virus infected cells

Preparation of the cellular fractions was described in the section of Materials and Methods.

Lane 1, prestained SDS - PAGE standards from Bio - Rad referring to the legend of Plate I - B; Lane 2, P2; Lane 3, S2; Lane 4, S1; Lane 5, P1; Lane 6, lysate from insect cells infected with recombinant R316 viruses.

D. Immuno - blotting analysis of lysates from insect cells infected with recombinant viruses under reducing and non - reducing conditions.

Lane 1 and 2, under reducing condition; Lane 4 and 5, under non - reducing condition. Lane 1 and 4, wild type virus infected insect cells; lane 2 and 5, recombinant R316 virus infected cells. lane 3, prestained SDS - PAGE standards from Bio - Rad referring to the legend of Plate I - B.

E. ¹²⁵I labelled ligand blotting analysis of lysate from recombinant R316 virus infected insect cells

Lane 1 and 2, in the presence of overamount hCG; Lane 3 and 4, without the presence of hCG.

Lane 1 and 3, lysate from insect cells infected with wild type viruses; Lane 2 and 4, lysate from insect cells infected with recombinant R316 viruses.