

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体 α 链 (GM-CSFR α)的克隆与表达

李福胜 王智峰 贡慧宇 张智清 侯云德

(中国预防医学科学院病毒学研究所,病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

摘要 GM-CSF 高亲和力受体至少由两条链组成,低亲和力的 α 链及无结合力活性的 β 链。本文采用 RT-PCR 的方法,从 GM-CSF 依赖细胞株 TF-1 中克隆了全长的 GM-CSFR α 链 cDNA(包括信号肽部分),经酶切及全基因测序鉴定,并分别在原核及真核细胞表达系统中表达。在大肠杆菌中 GM-CSFR α 以 GST 融合蛋白形式表达,谷胱甘肽-Sepharose 4B 亲和层析纯化融合蛋白。GST-CSFR α C 无受体活性,推测主要与缺乏翻译后修饰有关。将全基因克隆入真核表达载体 pSVL 中,转染 COS-7 细胞瞬时表达以重建 GM-CSF 的低亲和力受体, 125 I GM-CSF 平衡结合实验证明转染后的 COS-7 细胞膜上有受体的表达,Cross-linking 显示表达的受体 α 链分子量略低于 TF-1 细胞。胞外区基因(CSFR α B)克隆入 pSVL 构建的 pSVL/CSFR α B 表达载体,转染 COS-7 细胞后,Western blot 检测表达细胞上清,有单一的反应带,表达上清有 GM-CSF 的受体活性。

关键词 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子,可溶性受体,GST 融合蛋白,COS-7 细胞

粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)是一种能够促进多种造血细胞繁殖、分化的细胞因子,其生物学活性的发挥需通过细胞膜上的特异性受体,GM-CSF 受体(GM-CSF Receptor, GM-CSFR)存在于某些造血细胞及某些非造血细胞的膜表面。目前认为 GM-CSF 至少有两条链组成,即 α 链及 β 链。 α 链的全长 cDNA 1989 年由 Gearing 从人的胎盘组织表达文库中克隆^[1],其前体分子由 400 个氨基酸残基组成,N-端为一 22 个氨基酸的信号肽,推导的分子量 45kDa,分子含单一的穿膜区,糖基化的胞外区,及由 54 个氨基酸组成的短胞内区,胞内区与酪氨酸激酶及免疫球蛋白超家族成员无结构域的同源性。 α 链单独表达时仅有低的亲和力($k_d = 10 \sim 40$ nM/L), β 链(又名 KH97)较长,由 800 个氨基酸组成,本身无受体活性,仅当与 α 链共表达时形成高亲和力受体($k_d = 1 \sim 4$ pM/L),与 GM-CSF 稳定结合发挥生物学活性。此外, β 链还参与 IL-3、IL-5 高亲和力受体的形成。一般认为受体 α 链的主要功能是与配体结合, β 链则主要与信号传导有关^[2,3]。GM-CSFR 的两条链均属于细胞因子受体超家族的成员,具有这个超家族的某些共同特征,如胞外区大约 200 个碱基的由两个 7 反平行 β 片层的 fibrinectin 样结构的共有基序,N-端有 4 个保守的半胱氨酸,C-端有 WSXWS 样的序列^[4]。

细胞因子受体的研究是近年来分子生物学研究的热点之一,受体与细胞内的信号传

导途径密切相关,深入阐述受体与信号传导的关系具有重大的理论价值,此外细胞因子受体特别是可溶性受体(Soluble Receptor, Rs)的研究还有广阔的应用前景,可溶性受体可用于多种自身免疫性疾病及恶性肿瘤的观察指标,作为细胞因子的特异性阻断剂具有单克隆抗体所不及的优点。本文在正确克隆 GM-CSFR α cDNA 的基础上,对 GM-CSFR α cDNA 分别在原核及真核表达系统中进行了表达研究。

1 材料与方 法

1.1 菌株、细胞株与质粒

宿主菌 DH5 α 、JM109 及 COS-7 细胞由本室提供。质粒 pGEX-5X-1 购自 Pharmacia 公司。pSVL、pGEM3zf(+)及 pUC19 克隆载体由本室提供。质粒 pBV220 由本室张智清教授组建。

1.2 酶与主要试剂

限制酶购自华美生物技术公司及友谊生物技术公司。T4DNA 连接酶、Klenow 酶购自美国 Biolabs 公司。 ^{125}I GM-CSF 购自 Dupont 公司。谷胱甘肽-Sepharose 4B 及 GST 检测试剂盒购自瑞典 Pharmacia 公司。地高辛杂交试剂盒及蛋白交联剂 DSS 购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.3 DNA 引物的人工合成与纯化

在美国 ABI 公司 381A 型 DNA 合成仪上合成寡聚 DNA 片段,脱保护后溶于 TE 缓冲液,用 Pharmacia 公司的 FPLC Mono Q 交换柱纯化。为克隆及表达的不同需要,合成了多个引物,引物序列及在基因上的对应位置见表 1。为便于快速克隆,在 PCR 引物内引入了合适的酶切位点。

表 1 克隆与表达 GM-CSFR α 基因所用的引物

Table 1 Primer sequences in cloning and expression of GM-CSFR α

Primers	Primer sequences(5'-3')	Location in cDNA
P1	ATAAGCTTACCATGCTTCTCCTGGTGACAAG	1-20
P2	ATGCCTTCATGGAGAAATCGGATCTGCCG	66-83
P3	GACACCGGATCTCCCTCCTT	456-476
P4	ACGCTCGAGTTACCCGTCGTCAGAACC	927-944
P5	ATGGATCCTCAGGTAATTTCCCTCACGG	1185-1204

1.5 RT-PCR

TF-1 细胞总 RNA 的提取采用异硫氰胍一步法。以 oligo(dT)-纤维素柱层析纯化 mRNA,纯化的 poly(A)RNA 直接用于 RT-PCR。反转录反应体系:5 \times Buffer 6 μl , 10 mol/L dNTP 3 μl , 1mol/L DTT 3 μl , Rnasin 60 单位, mRNA 1.5 μg , oligo(dT)或上游特异性引物 10 pmol/L, MoMLV 反转录酶 200 单位,总反应体积 30 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 1h。取出 15 μl 直接用于 PCR 扩增,扩增条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 45s; 58 $^{\circ}\text{C}$ 45s; 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5min; 共 35 个循环。为降低非特异性扩增,采用热启动 PCR 的方法。PCR 产物以低熔点琼脂糖回收后克隆入相应的载体。

1.5 核苷酸序列测定

采用 Sanger 的链末端终止法和双链测序系统,用荧光染料标记法在 ABI 公司 373 型

DNA 自动测序仪上测定克隆片段的核苷酸序列。

1.6 分子克隆操作

按常规操作。

1.7 GST 融合蛋白的表达与纯化

按文献[5]。带有表达质粒的细菌单菌落接种于 LB 中, 摇菌过夜, 次日以 1:10 转入 LB 中, 摇菌 1h 后, 加入 1mmol/L IPTG, 诱导表达 4~6h, 离心收集细菌, 悬浮于 PBS 中, 超声破碎, 以 CDNB 法鉴定融合蛋白的形成部位。上清加 1% Triton X-100, 室温作用 1h, 直接谷胱甘肽-Sepharose 4B 层析, 5mmol/L 还原型谷胱甘肽特异洗脱融合蛋白。纯化的融合蛋白用于免疫兔子制备抗血清。

1.8 SDS-PAGE 及 Western blot

SDS-PAGE 按常规操作。表达产物电泳分离后, 在 Bio-Rad 电转移槽上转到 PVDF (聚偏二氟乙烯)膜上, 依次用抗血清、HRP 标记的羊抗兔 IgG 结合物显色。

1.9 GM-CSFR α C 融合蛋白多克隆抗体的制备

日本大耳白兔首次免疫用 200 μ g GM-CSFR α C 融合蛋白, 加弗氏完全佐剂在双侧前臂内肌肉注射, 2 周后以 100 μ g GM-CSFR α C 融合蛋白溶于不完全佐剂加强免疫, 以后每两周加强免疫一次, 第 4 次加强后 10d 取血分离血清。

1.10 COS-7 细胞的转染

采用 DEAE-葡聚糖介导的转染方法, DEAE-葡聚糖的浓度为 250 μ g/mg, 每 10^5 细胞采用 300ng 质粒 DNA, 转染 8h 后收集上清或细胞测定表达。

1.11 平衡结合实验

根据文献[6]方法略作改进, 转染后 48h 的 COS-7 细胞按常规消化, 洗细胞, 2×10^5 细胞悬浮于 100 μ l Binding buffer(DMEM 含 4ng/ml BSA, pH7.4), 125 I GM-CSF 加入量为 10pmol/L 至 10mmol/L 不等, 加 50 μ l 含与不含 100 倍过量的 GM-CSF Binding Buffer, 4 $^{\circ}$ C 120min。离心沉淀重悬于冷的 Binding buffer, 离心通过 0.7ml FCS, 切除沉淀, 用 γ 计数器测定放射性(cpm 值)。

1.12 竞争结合实验^[6]

TF-1 细胞 5×10^5 , 悬浮于 Binding Buffer 中, 加不同稀释度的细胞表达上清及融合蛋白, 1nmol/L 125 I GM-CSF, 其它步骤与平衡结合实验相同。

1.13 Cross-linking

按文献[7]方法, 5×10^5 细胞与 1nmol/L 125 I GM-CSF 于 37 $^{\circ}$ C 反应 30min, 0.25mg/ml DSS 中冰浴 1h, 重悬于 1% Triton X-100, 2mmol/L PMSF 的 PBS 中, 25 $^{\circ}$ C 30min, 细胞用 10% SDS 裂解, 上清 10% PEG-6000 沉淀, 8% SDS-PAGE 电泳, 常规放射自显影。

2 实验结果

2.1 GM-CSFR α 全基因的克隆与鉴定

以 P1、P5 为引物, 经 RT-PCR 从 TF-1 细胞中扩增出一大约 1.2kb 的片段(图 1), 此片段为带信号肽的完整 cDNA 分子, 大小与预期的相同。为了分别在不同的表达系统中表达, 采用不同的 PCR 引物扩增了不同长度的 PCR 片段, 分别命名为: CSFR α A(P1 + P5),

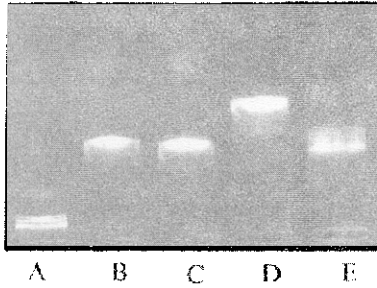


图1 CSFR α 不同的 PCR 片段

Fig.1 Different PCR segments of GM-CSFR α cDNA

A. λ DNA Hind III marker, B. P2 + P4
C. P1 + P4, D. P2 + P3, E. P1 + P5

1.2kb; CSFR α B(P1 + P4), 0.94kb; CSFR α C(P2 + P4), 0.86kb。CSFR α A cDNA 经 Hind III 及 BamHI 酶切后, 克隆入 pUC19 克隆载体, 经酶切鉴定证实。对克隆的基因进行了全序列的测定, 测序策略是: CSFR α A cDNA 基因亚克隆于 pGEM3zf(+)载体, 正、反向分别测序, 之后以 PstI 与 BamHI 双酶切, 回收大片段, 补平, 连接, 反向测序, 从而得到了全部的核苷酸序列, 结果显示与国外文献报道相同。

2.2 GM-CSFR α C 基因在大肠杆菌中的表达

首先采用 PCR 的方法去除 N 端的信号肽序列(P2 + P5), 扩增的 PCR 片段以 EcoRI, BamHI 双酶切克隆入原核高效表达载体 pBV220 中。经 42°C 诱导表达后, SDS-PAGE 电泳分析未发现明显的表达

带, 推测全基因中疏水性较强的跨膜区对基因表达的影响。继以引物 P2 + P4 做 PCR, 删除基因的胞内区和跨膜区, 扩增的仅有胞外区的 PCR 片段, 再次克隆入 pBV220 表达, 表达量仍然不佳。继之我们探索其它启动子的原核高效表达载体, 如 pKK233-2、pGEX-1 等, 仍没有明显的表达, 因此认为由于 GM-CSFR α 基因本身的某些原因, 在原核细胞中以非融合性蛋白的形式是难以表达的。

我们选择了 pGEX-5X-1 载体表达 GST 融合蛋白, 将胞外区基因(CSFR α c)以 EcoRI 及 XhoI 酶切克隆入 pGEX-5X-1 载体。酶切及杂交筛选阳性克隆, IPTG 诱导表达, 细菌破碎后, CNDB 测活法确定融合蛋白是以可溶性蛋白的形式存在的。上清以谷胱甘肽-Sepharose 4B 柱层析, 洗脱后 SDS-PAGE 在 62kDa 处出现一条新的蛋白电泳带, 同时在 27kDa 的位置有 GST 蛋白带(图 2)。推测 27kDa 蛋白的形成原因是 GST 从融合蛋白上降解脱落所致。受体竞争结合实验表明这种融合蛋白无受体结合活性, 其原因可能是缺乏翻译的修饰机制; 也可能由于 GST 对 CSFR α 空间构型的影响。将融合蛋白直接免疫兔子, 制备抗血清用于检测。抗血清 CSFR α 抗体的 ELISA 检测敏感度达 10ng/ml。

2.3 GM-CSFR α 链在 COS-7 细胞膜表面的表达

COS-7 细胞上不表达 GM-CSF 受体, 为检测克隆的全长 CSFR α 基因有无受体亲和性, 首先在 COS-7 上重建 GM-CSF 的低亲和性受体。将

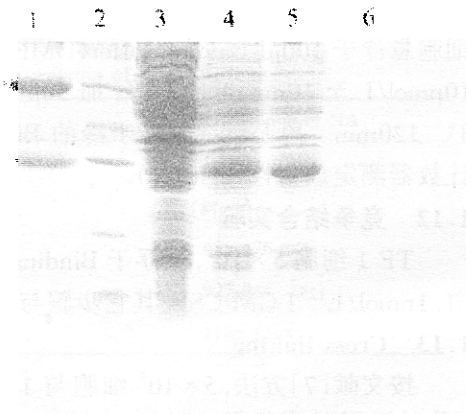


图2 pGEX-5X-1/CSFR α C 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of pGEX-X/CSFR α C

1. pGEX-5X-1CSFR α C purification; 2. Molecular marker; 3. pGEX-5X-1/CSFR α C control; 4. pGEX-5X-1 CSFR α C expression; 5. pGEX-5X-1 expression; 6. pGEX-5X-1 purification.

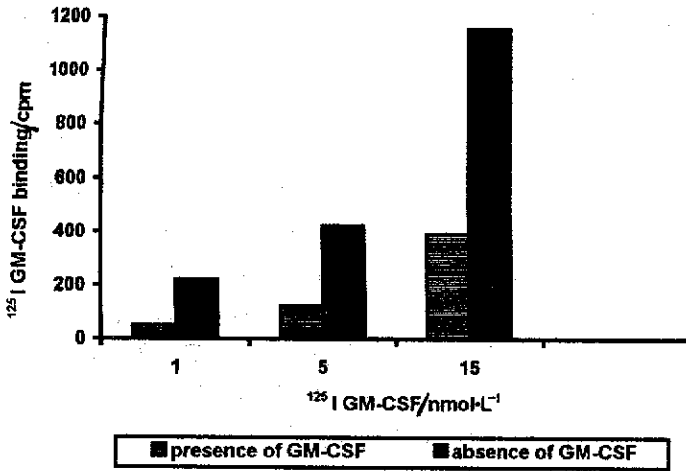


图3 ¹²⁵I GM-CSF 与 pSVL/CSFR α A 转染的 COS-7 细胞的受体亲和和作用

Fig.3 Binding of ¹²⁵I GM-CSF to COS-7 cells transfected by pSVL/CSFR α A

染后的 COS-7 细胞膜上有分子量大约 70~80kDa 的 GM-CSF 受体分子, TF-1 细胞对照显示 80kDa 及 120kDa 的受体带出现, 分别为 GM-CSFR 的 α 链和 β 链(图 4)。

2.4 可溶性 GM-CSFR α 在 COS-7 细胞的表达

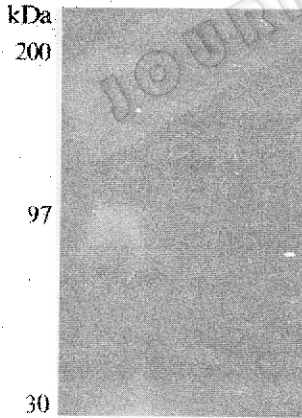


图4 转染后的 COS-7 细胞 Cross-linking 结果

Fig.4 Cross-linking of COS-7 cells after transfection
A. TF-1 cells; B. COS-7 cells after transfection;
C. COS-7 cells control.

全长的基因 3' 端用 BamHI 酶切后克隆入 pSVL 载体的 SmaI 与 BamHI 位点间, 转染 COS-7 细胞瞬时表达后, ¹²⁵I GM-CSF 平衡结合实验证实, 在 COS-7 细胞膜上有 GM-CSF 受体的表达(图 3)。因 ¹²⁵I GM-CSF 来源量的限制, 未测出结合的 Kd 值及细胞表面表达的受体结合数, 但证明我们克隆的 CSFR α cDNA 确实能在 COS-7 细胞上重建 GM-CSF 的低亲和力受体功能, 为进一步表达可溶性受体提供了实验依据。

Cross-linking 结果显示, 转

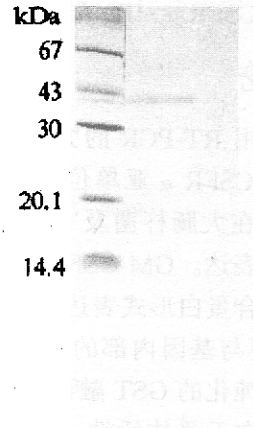


图5 COS-7 细胞表达上清的 Western blot 分析

Fig.5 Western blot analysis of COS-7 cell supernatant
A. Molecular marker, B. Supernatant after transfection;
C. COS-7 cell control.

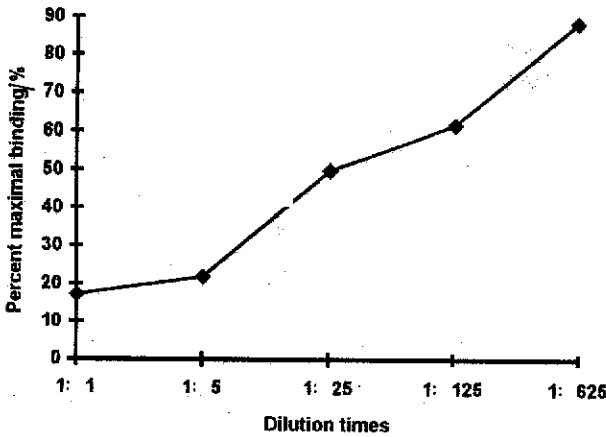


图 6 pSVL/CSFR α B 转染的 COS-7 细胞表达上清对 125 I GM-CSF 与 COS-7 细胞结合的竞争抑制作用

Fig. 6 Competition of binding effect of 125 I GM-CSF transfected COS-7 cell supernatant

一特异性的表达带(图 5), 表达的重组蛋白分子量 40kDa 左右, 说明 COS-7 细胞中对其进行了糖基化修饰。竞争结合实验表明, 表达上清有明显的受体亲和活性(图 6)。

pSVL/CSFR α A 及 pSVLCSFR α B 转染的 COS-7 细胞提取总 RNA, RT-PCR 检测细胞内 GM-CSFR α mRNA 的转录(图 7)。

3 讨 论

本文采用 RT-PCR 的方法, 从 TF-1 细胞中克隆出 GM-CSFR α 亚单位的全长 cDNA 基因, 并对 cDNA 在大肠杆菌及 COS-7 细胞中进行了不同形式的表达。GM-CSF α cDNA 在原核表达系统以非融合蛋白形式表达时属于难于表达的基因, 推测主要与基因内部的特性有关。我们采取了可以快速纯化的 GST 融合蛋白的表达策略, 纯化的融合蛋白无受体活性, 其原因可能是缺乏翻译后修饰, 特别是缺失糖基化, 或是两种蛋白高级结构之间的干扰。表达融合蛋白的主要目的是制备抗血清, 建立 GM-CSFR α 可溶性受体的检测系统, 用于真核表达时的检测指标, 或用于某些疾病状态下的 GM-CSFR α 可溶性受体的研究。以

pSVL 做载体, 在 COS-7 细胞中瞬时表达全长的基因在细胞膜上重建了 GM-CSF 的受体活性, 进而在 COS-7 细胞中表达了 GM-CSFR α 的胞外区, Western blot 及受体竞争结

为得到有活性的可溶性 GM-CSFR α 受体, 采用 P1 + P4 引物做 PCR 以删除 CSFR α cDNA 的胞内区及跨膜区, 截短的 cDNA 分子(CSFR α B)经 Hind III 与 XhoI 酶切后, 克隆入 pUC18 的 Hind III 与 SalI 酶切位点之间, 构建成重组质粒 pUC18/CSFR α B。pUC18/CSFR α B 经 Hind III 酶切补平, BamHI 酶切后回收小片段亚克隆入 pSVL 的 SmaI 及 BamHI 之间, 构建的表达质粒 pSVL/CSFR α B 以 DEAE-葡聚糖转染 COS-7 细胞, 48h 后收集表达上清, 高分子量 PEG 法浓缩上清, 用于受体的活性检测。

Western blot 显示表达上清有单

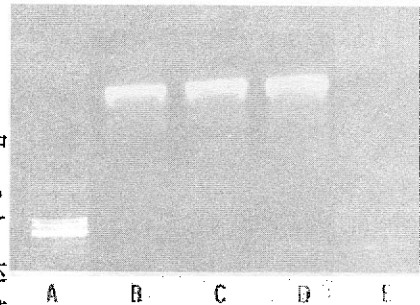


图 7 RT-PCR 鉴定转染后的 COS-7 细胞表达

Fig. 7 Expression in COS-7 cells after transfection analyzed by RT-PCR

A. λ DNA Hind III marker; B. TF-1 cell; C. pSVL/CSFR α A transfection; D. pSVL/CSFR α B transfection; E. COS-7 cell control.

合实验证明表达上清有受体活性,说明在 COS-7 细胞中表达可溶性的 GM-CSFR α 是可行的,为进一步得到大量有活性的 GM-CSFR α 可溶性受体以期用于临床奠定了基础。

多种细胞因子存在相应的可溶性细胞因子受体,如 IL-2、TNF、 γ 干扰素等^[8], GM-CSFR α 也存在天然的可溶性受体,GM-CSFRs α 基因与 α 受体亚基比较,基因内有 97 个核苷酸的缺失,由 cDNA 编码的蛋白质缺失穿膜区及胞内区的 84 个氨基酸,且 C-端的 16 个氨基酸也不相同^[9]。克隆表达可溶性细胞因子受体具有以下几方面的意义:(1)作为细胞因子的特异性阻断剂。已知多种细胞因子与疾病状态密切相关,如 γ 干扰素、TNF、IL-1 等,对几种细胞因子的受体进行了深入的基础与临床研究,IL-1ra 等受体阻断剂已进行了 I、II 期临床实验,显示了明显的效果。重组的可溶性细胞因子受体与细胞因子抗体类拮抗剂相比具有更显著的优点,亲和力至少要比抗原-抗体间相互作用大 100~1000 倍,分子量小,在体内分布广泛,无单克隆抗体的种属特异性。GM-CSF 可能在多种白血病的发生发展过程中起着重要的作用^[10],因此采用可溶性 GM-CSF 受体作为 GM-CSF 的特异性阻断剂,探索治疗某些与 GM-CSF 过量密切相关的白血病,这方面将会有广阔的应用前景。(2)受体结构与功能的研究,尤其是受体与信号传导的关系,这是近年来分子生物学的研究热点之一。(3)建立细胞因子受体特别是可溶性受体的检测系统,研究与多种疾病之间的关系,可溶性受体在血浆中水平的提高可作为许多免疫性疾病及肿瘤的诊断、疾病进展、治疗效果评价的有效指标,这方面研究最多的是 IL-2 的可溶性受体。(4)依据与细胞因子的特异性亲和作用,建立受体或其片段的亲和层析方法,用于纯化难于获得的有临床价值的细胞因子。

目前存在的主要问题是 GM-CSF α 可溶性受体在 COS-7 细胞中的表达量不高,欲得到大量的具有生物学活性的蛋白质,有必要尝试其它的表达系统,如杆状病毒表达系统有可能达到此目的^[11]。

参 考 文 献

- [1] Gearing D P, King J A, Gough N M *et al.* EMBO J, 1989, 8: 3667~3676.
- [2] Hayashida K, Kitamura T, Gorman D *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 9655~9659.
- [3] Kastelein R A, Shanafelt A B. Oncogen, 1993, 8: 231~236.
- [4] Bazen J F. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6934~6938.
- [5] Smith D B, Johnson K S. Gene, 1988, 67: 31~40.
- [6] Munson P J. Meth Enzymol, 1983, 92: 543~576.
- [7] Polotskaya A, Zhao Y, Lilly M L *et al.* Cell Growth Differentiation, 1993, 4: 523~531.
- [8] Fernandez-Botman R. FASEB J, 1991, 5: 2567~2574.
- [9] Crosier K E, Wong G G, Mathey-Prevot B *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7744~7748.
- [10] Areces L B. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 3963~3967.
- [11] Browbe M J. Current Opinion in Biotechnology, 1993, 4: 553~557.

Cloning and Expression of Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor Receptor α Subunit(GM-CSFR α)

Li Fusheng Wang Zhifeng Gong Huiyu Zhang Zhiqing Hou Yunde

(National Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Virology, CAPM, Beijing 100052)

Abstract The high affinity receptor for GM-CSF is consisted of two subunits, α chain and β chain. We have cloned whole length of GM-CSFR α cDNA from TF-1 cells by RT-PCR method and verified by restriction analysis and DNA sequencing. *E. coli* and COS-7 cell expression system are used to express the GM-CSFR α cDNA. PCR is first used to modify the GM-CSFR α cDNA and expressed in *E. coli* by fusing to GST. The fusion protein can be purified by Glutathione-Sepharose 4B. GM-CSFR α fusion protein can't bind with GM-CSF. The reason exists in lack of post-translation modification. GM-CSFR α cDNA is then cloned into eukaryotic expression vector pSVL and transfect the COS-7 cell. ^{125}I GM-CSF binding experiment indicate GM-CSFR α is expressed on the COS-7 cell membrane. But MW of expressed GM-CSFR is a little lower compared with that of TF-1 cells. Then we subcloned extracellular domain of GM-CSFR α (CSFR α B) into the pSVL and transfected COS-7 cells. The supernatant of the transfected cells has a reaction band with specific antisera using Western blot. It also has GM-CSFR activity.

Key words Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor, soluble receptor, GST fusion protein, COS-7 cell