

# PTHrP 受体胞外区基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达\*

刁理强<sup>1</sup> 张智清\*\* 刘红兵<sup>2</sup> 周小明  
熊卫东 安乃莉 姚立红 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** PTHrP(甲状旁腺激素相关蛋白, Parathyroid hormone related protein)与多种肿瘤的生物行为有关,尤其对肿瘤的骨转移起重要作用。应用其可溶性受体阻断它的病理作用是一个非常值得研究的课题。从肾癌组织中提取 RNA,采用逆转录 PCR(RT-PCR)方法获得 PTHrP 受体 N 端胞外区 543 碱基对的带信号肽的 cDNA 片段。将其核苷酸序列与国外发表的资料相比,基因中第 262 位核苷酸由 T 变为 C 相应密码子由 TAC 变为 CAC,导致氨基酸变异,即由酪氨酸变为组氨酸。将获得的受体基因克隆到原核表达载体 pET-3a,在大肠杆菌得到高效表达,经 ELISA 证实表达产物可与 PTHrP 特异性结合。体外生物学活性检测表明表达产物可阻断 PTHrP 的生物学活性。

**关键词** 甲状旁腺激素相关蛋白受体,表达,大肠杆菌

**分类号** Q939.92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0154-59

临床上许多疾病与机体产生过量的细胞素有关。细胞素和多肽激素的生物学功能依赖于同靶细胞膜上的特异性受体结合。应用可溶性受体去阻断相应细胞素的病理作用是一个非常值得研究的课题。国外近年来已对此进行了大量的研究,如应用重组的可溶性 IL-1 受体治疗骨髓移植排斥反应目前已进入临床试验阶段<sup>[1]</sup>,TNF 受体治疗炎症已取得令人鼓舞的进展<sup>[2]</sup>。

PTHrP(甲状旁腺激素相关蛋白, Parathyroid hormone related protein)是从引起高钙血症的某种肿瘤细胞分泌的一种蛋白质,其分子量约 23kD,由 141 个氨基酸组成<sup>[3]</sup>。近年来发现 PTHrP 与某些肿瘤的恶性转化和骨转移有关<sup>[4]</sup>。PTHrP 受体属于 G 蛋白偶连的受体超家族,由 593 个氨基酸组成,包括胞外区、穿膜区和胞内区三个部分。其 N 端 181 个氨基酸为膜外区,从 182 至 463 位的氨基酸形成反复 7 次穿膜区,其后为胞内区。N 端的胞外区为与 PTHrP 主要的结合位点<sup>[5]</sup>。

近年来,国外对 PTHrP 受体的结构与功能的关系作了研究,但在大肠杆菌表达该基因的部分片段尚未见报道。我们应用逆转录 PCR(RT-PCR)技术克隆了 PTHrP 受体胞外区基因,并在原核细胞中高效表达,对表达产物的免疫学和生物学活性作了鉴定。本文

\* 国家高技术研究发展计划项目(No. 102-08-01-03)。

\*\* 通讯联系人,Email: zhangzq@public3.bta.net.cn。

1 北京医科大学第一医院泌尿外科研究所 北京 100034。

2 同济医科大学附属同济医院心血管内科 武汉 430030。

收稿日期:1998-05-17,修回日期:1998-11-05。

对进一步研究可溶性受体与 PTHrP 结合的原理,探讨应用可溶性受体治疗 PTHrP 相关的疾病,具有重要的理论与实际意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、JM109 和 BL21 由本室保存。适于 PCR 产物直接克隆的 pGEM-T 载体购于 Promega。质粒 pET3a 由本室保存,是 pBR322 衍生的一种质粒,含 T7 启动子,转化含 T7 RNA 聚合酶的 BL21 宿主菌后可经 IPTG 诱导表达外源蛋白。

### 1.2 酶及试剂

各种限制酶及修饰酶购于 Biolabs 和中国医学科学院基础医学研究所。重组人 PTHrP 由本室制备。鼠抗人 PTHrP(1-34)单克隆抗体由本室制备。cAMP 检测试剂盒购于上海中医药大学同位素室。

### 1.3 受体 cDNA 克隆和序列分析

新鲜肾癌手术标本取自北京医科大学泌尿外科研究所。用异硫氰胍一步法<sup>[6]</sup>提取 RNA 经 RT-PCR 获得特异性的受体 cDNA 片段,所用的引物序列如下:

R<sub>1</sub>: TAGGGATCCATGGGGACCGCCCCGGAT;

R<sub>2</sub>: TACATATGGCTGTGTCTGAACAT;

R<sub>3</sub>: TAGGATCCTTACACCGTTACAGAGTCTC。

分别用于扩增带信号肽(R<sub>1</sub>、R<sub>3</sub>)和去信号肽(R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>)目的基因。反转录反应的体积为 20 $\mu$ L,含 1 $\times$ Buffer,细胞总 RNA 8 $\mu$ g,4 $\times$ dNTP 1mmol/L,下游引物 10pmol,MLV 逆转录酶 50 单位,RNasin 10 单位。42 $^{\circ}$ C 反应 50min,65 $^{\circ}$ C 10min 终止反应。PCR 反应体系为 50 $\mu$ L,含 1 $\times$ Buffer,4 $\times$ dNTP 200 $\mu$ mol/L,上游引物 1 $\mu$ mol/L,下游引物 1 $\mu$ mol/L,反转录产物 4 $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶 3 单位。循环参数为:94 $^{\circ}$ C,45s,68 $^{\circ}$ C,45s,72 $^{\circ}$ C,1min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经酚/氯仿抽提,酒精沉淀后直接克隆至 pGEM-T 载体。挑 3 个独立的带信号肽目的基因的克隆,采用通用引物在自动荧光测序仪上进行核苷酸序列测定。

### 1.4 原核细胞表达及 SDS-PAGE

将质粒 pET-3a/PTHrP-R 转化 BL21,挑取单菌落活化过夜,转种后以终浓度为 1mmol/L IPTG 诱导表达 4~6h 后收集菌体进行 SDS-PAGE。详见文献 [7]。

### 1.5 表达产物的电泳纯化

将诱导表达的细菌超声裂解收集包涵体,洗涤后溶于样品缓冲液,上样到制备型 SDS-PAGE(15%)。电泳结束后把凝胶浸泡在冰预冷的 0.1mol/L KCl 中轻轻震摇,染色 3~5min 后从凝胶中切下所需片段。放入透析袋中,置水平电泳槽用 1 $\times$ SDS-PAGE 缓冲液,50mV 恒压电泳过夜。

### 1.6 表达产物的免疫学鉴定

将电泳纯化的 PTHrP 受体按每孔 0.5 $\mu$ g 浓度,再 10 倍连续稀释,包被到 96 孔酶标板上。牛血清白蛋白封闭后每孔加入 0.5 $\mu$ g 重组 PTHrP 蛋白。再依次与抗人 PTHrP 单抗和羊抗鼠 IgG 反应。显色底物为 OPD,加入 4mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中止反应后,在 450nm 波

长检测各孔 OD 值。

### 1.7 生物学活性检测

用于生物学活性检测的 ROS 17/2.8 细胞株由美国哈佛大学医学院 Juppner 教授惠赠, PTHrP 刺激可以使该细胞内 cAMP 水平升高。将 ROS 17/2.8 以 F12 培养基培养于 24 孔细胞培养板。0.1 μg PTHrP 与不同浓度的 PTHrP 受体 37℃ 共孵育 1h 后, 加入到 1mL 含 0.2mmol/L IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine) F12 培养基中, 处理 ROS 17/2.8 细胞 5min。吸出培养基以终止反应, 同时加入 0.5mL 正丁醇抽提 cAMP, 按试剂盒说明的方法检测 cAMP。详细方法参见文献 [8], cAMP 的单位为 pmol/孔, 各组数值均为 3 孔或 3 孔以上的平均值。

## 2 实验结果

### 2.1 PTHrP 受体胞外区 cDNA 的克隆

克隆的 PTHrP 受体胞外区 cDNA 带信号肽片段为 543bp, 从带信号肽 cDNA 片段再次 PCR 获得去信号肽 cDNA 片段为 468bp。带信号肽 PCR 产物直接克隆入 pGEM-T 载体之后, 用 *Bam*HI 可切出克隆的受体 cDNA 片段。其核苷酸序列(图 1)与国外发表资料相符<sup>[2]</sup>, 只是基因中 262 位核苷酸是 C 而不是 T, 相应密码子由 TAC 变成 CAC, 导致氨基酸变异, 即由酪氨酸变为组氨酸。

```

GGATCC ATG GGG ACC GCC CGG ATC GCA CCC GGC CTG GCG CTC CTG
          M G T A R I A P G L A L L
CTC TGC TGC CCC GTG CTC AGC TCC GCG TAC GCG CTG GTG GAT GCA GAT GAC GTC ATG
L C C P V L S S A Y A L V D A D D V M
ACT AAA GAG GAA CAG ATC TTC CTG CTG CAC CGT GCT CAG GCC CAG TGC GAA AAA CGG
T K E E Q I F L L H R A Q A Q C E K R
CTC AAG GAG GTC CTG CAG AGG CCA GCC AGC ATA ATG GAA TCA GAC AAG GGA TGG ACA
L K E V L Q R P A S I M E S D K G W T
TCT GCG TCC ACA TCA GGG AAG CCC AGG AAA GAT AAG GCA TCT GGG AAG CTC CAC CCT
S A S T S G K P R K D K A S G K L H P
GAG TCT GAG GAG GAC AAG GAG GCA CCC ACT GGC AGC AGG TAC CGA GGG CGC CCC TGT
E S E E D K E A P T G S R Y R G R P C
CTG CCG GAA TGG GAC *CAC ATC CTG TGC TGG CCG CTG GGG GAC CCA GGT GAG GTG GTG
L P E W D H I L C W P L G D P G E V V
GCT GTG CCC TGT CCG GAC TAC ATT TAT GAC TTC AAT CAC AAA GGC CAT GCC TAC CGA
A V P C P D Y I Y D F N H K G H A Y R
CGC TGT GAC CGC AAT GGC AGC TGG GAG CTG GTG CCT GGG CAC AAC AGG ACG TGG GCC AAC
R C D R N G S W E L V P G H N R T W A N
TAC AGC GAG TGT GTC AAA TTT CTC ACC AAT GAG ACT CGT GAA CGG TGATAAGGATCC
Y S E C V K F L T N E T R E R

```

图 1 PTHrP 受体 cDNA 的核苷酸序列图

Fig. 1 Nucleotide sequence of PTHrP-R gene

Underlined region shows signal peptide sequences, asterisk indicates site 262 of PTHrP-R gene

### 2.2 PTHrP 受体 cDNA 表达质粒的构建

去信号肽 PCR 产物直接克隆入 pGEM-T 载体之后, 用 *Nde*I/*Bam*HI 双酶切出 PTHrP 受体 cDNA 片段, 经低熔点琼脂糖回收后与同样酶切处理的原核表达载体 pET-3a

连接 组成质粒 pET-3a/PTHrP-R (图 2), 同样用 *Nde*I/*Bam*HI 可切出 PTHrP 受体基因目的片段 (图 3)。将该质粒转化 BL21 菌种以表达外源基因。

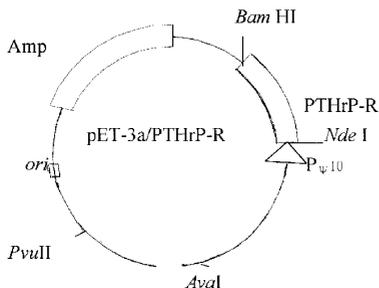


图 2 质粒 pET-3a/PTHrP-R 的结构图

Fig.2 Structure of pET-3a/PTHrP-R

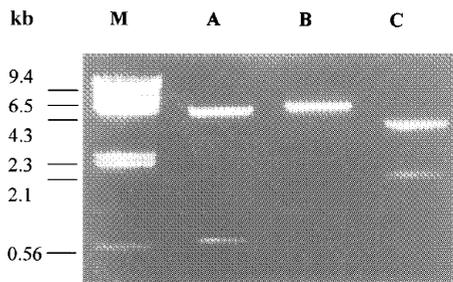


图 3 pET-3a/PTHrP-R 的酶切鉴定图

Fig.3 Restriction map of pET-3a/PTHrP-R  
M: DNA/HindIII A: BamHI/NdeI (0.5kb 4.5kb)  
B: SalI C: PstI (1.6kb 3.4kb)

### 2.3 PTHrP 受体在大肠杆菌中的表达

含质粒 pET-3a/PTHrP-R 的大肠杆菌于 37°C 活化过夜后, 用 LB 培养液 1:100 稀释, 37°C 摇床培养至对数生长中期, 加入 1mmol/L IPTG, 继续培养 4~6h。收集菌体进行 SDS-PAGE (15%), 考马斯亮蓝染色显示 IPTG 诱导后出现了 18kD 的一条蛋白带 (图 4), 与根据氨基酸序列推测的 PTHrP 受体的分子量相符, 表达量约占总蛋白 20%。

### 2.4 重组 PTHrP 受体的电泳纯化

批量表达后用超声粉碎仪破菌, 离心后蛋白电泳表明表达产物主要形成包涵体。经电泳纯化后目的蛋白的纯度达 90% 以上 (图 4)。

### 2.5 ELISA 免疫学检测

将大肠杆菌生产的 PTHrP 受体胞外区包被到 ELISA 板上, 与重组 PTHrP 反应后, 再与抗 PTHrP 抗体作 ELISA, 可以判断 PTHrP 受体是否与 PTHrP 结合。结果表明 (图 5), ELISA 显色的程度与板上包被的 PTHrP 受体的量成正比, 浓度越大, 颜色越深。空白对照和包被无关蛋白的对照均为阴性, 说明重组 PTHrP 受体胞外区可与 PTHrP 特异结合。

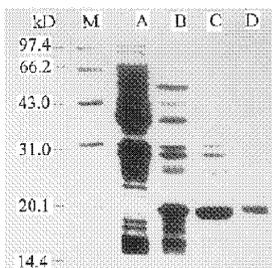


图 4 PTHrP 受体在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 图

Fig.4 SDS-PAGE analysis of PTHrP-R expressed in *E. coli*  
M: Protein marker, Lane A: Bacterial protein, Lane B: IPTG induced, Lane C: Purified inclusion body, Lane D: Purified products by electrophoresis

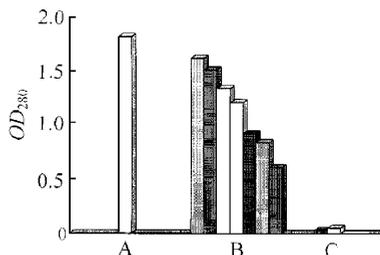


图 5 PTHrP 受体与 PTHrP 结合的 ELISA 结果

Fig.5 Binding activity of PTHrP-R to PTHrP by ELISA

A. Recombinant PTHrP control, B. 10 serial dilution of PTHrP-R binding to recombinant PTHrP, C. PBS and PTHrP control

## 2.6 PTHrP 受体的生物学活性

重组人 PTHrP 蛋白处理 ROS17/2.8 细胞后可以引起该细胞内 cAMP 水平的升高,而预先用一定浓度的重组 PTHrP 受体胞外区结合 PTHrP 能否抑制 PTHrP 引起的 cAMP 水平升高,可以推断重组 PTHrP 受体胞外区是否具有阻断 PTHrP 的生物学活性。实验结果如图 6,  $5\mu\text{g}$  重组 PTHrP 受体胞外区包括电泳纯化产物与包涵体盐酸胍裂解后稀释复性,透析去除盐酸胍的粗制品,均可显著抑制 cAMP 水平的升高,而无关蛋白的对照为阴性。说明我们研制的重组 PTHrP 受体胞外区可在体外阻断 PTHrP 的活性。

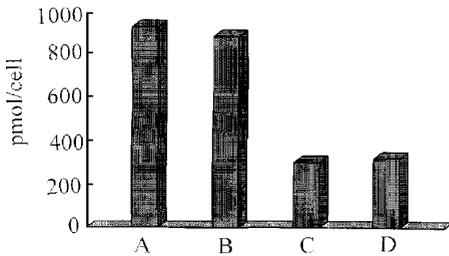


图 6 PTHrP 受体的生物学活性检测

Fig. 6 Bioactivity detection of PTHrP-R expressed in *E. coli*

A. Recombinant PTHrP ; B. Renatured crude extract of recombinant TNF control ; C. Renatured crude extract of recombinant PTHrP-R ; D. Purified products of PTHrP-R by electrophoresis

## 3 讨 论

国外近年来对各种具有信号传递功能受体的分子生物学研究发展很快,已克隆了多种受体基因,其结构属于几个超家族,如 G 蛋白耦连的受体超家族,细胞素受体超家族和 Ig 超家族。它们都包括胞外区、穿膜区和胞内区三个部分。胞外区负责与细胞因子或激素结合,胞内区与激活细胞内一系列生化过程有关,如激活腺苷酸环化酶和磷酸脂酶。各种不同的受体分子可以是一个单体分子,如我们研究的 PTHrP 受体<sup>[4]</sup>,也可以是多聚体,包括同源多聚体和异源多聚体,如 TNF 受体<sup>[9]</sup>、IL-2<sup>[10]</sup>受体。可溶性受体通常是截短形式的膜结合受体,缺乏穿膜区和胞内区,保留配体结合活性的胞外区<sup>[11]</sup>。

利用基因工程得到的重组可溶性细胞因子受体,具有亲和力高、分子量小和无抗原性等优点,是理想的细胞因子活性阻断剂<sup>[12]</sup>。重组可溶性细胞因子受体应用于炎症、自身免疫性疾病和肿瘤的治疗,有其独到的优点,因为这些疾病的病因复杂,传统的治疗方式往往效果不大。

PTHrP 最初认为只与晚期肿瘤病人的高钙血症有关。近年来发现 PTHrP 具有多种重要的生物学功能<sup>[3]</sup>。它是许多肿瘤的自分泌生长因子<sup>[13,14]</sup>,且与某些肿瘤的恶性转化和骨转移有十分密切的关系。我们在国内首次应用 RT-PCR 的技术克隆了可溶性受体基因,其序列除 262 位密码子由 TAC 变为 CAC 外,其余序列与文献报道相同。PTHrP 受体胞外区在大肠杆菌的表达国外未见报道。我们获得的原核表达产物的体外生物学检测的结果表明,电泳纯化产物与包涵体盐酸胍裂解后稀释复性,透析去除盐酸胍的粗制品皆能使重组蛋白得到了一定程度的复性,它们可与 PTHrP 结合,并能在体外阻断 PTHrP 的生物学活性。电泳纯化产物可提供制备抗体用途的抗原,包涵体盐酸胍裂解后稀释复性产物具有生物学活性,为进一步的纯化工作奠定了良好基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] P. L. McCarthy , L. Williams , M. Harris-Bacile *et al.* *Transplantation* ,1996 **62**( 5 ) :626~631.
- [ 2 ] J. Verhoef , W. M. Hustinx , H. Frasa *et al.* *J. Antimicrob Chemother* ,1996 **38** :167~182.
- [ 3 ] L. J. Suva , G. A. Winslow , R. E. H. Wettenhall *et al.* *Science* ,1987 **237** :893~182.
- [ 4 ] J. J. Orloff , D. Reddy , A. E. D. E. PAPP *et al.* *Endocr Rev.* ,1994 **15** :40~59.
- [ 5 ] H. Juppner. *Bone* ,1995 **17**( Suppl ) :39S~42S.
- [ 6 ] M. Nakashima , A. Ohtsuru , W. T. Luo *et al.* *J. Pathol* ,1995 **175** :227~236.
- [ 7 ] A. Z. Ge , R. M. Pfister , D. H. Dean. *Gene* ,1990 **93** :49~54.
- [ 8 ] J. Green , C. R. Kleeman , S. Schotland *et al.* *Endocrinology* ,1991 **129** :848~858.
- [ 9 ] J. H. Naismith , T. Q. Devine , B. J. Brandhuber *et al.* *J. Biol. Chem.* ,1995 **270**( 22 ) :13303~13307.
- [ 10 ] P. L. Amlot , E. Rawlings , O. N. Fernando *et al.* *Transplantation* ,1995 **60**( 7 ) :748~756.
- [ 11 ] R. G. Goodwin , D. Friend , S. F. Ziegler *et al.* *Cell* ,1990 **60**( 6 ) :941~951.
- [ 12 ] R. Fernandez-Botran , E. S. Vitetta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ,1990 **87**( 11 ) :4202~4206.
- [ 13 ] P. B. J. Burton , C. Moniz , D. E. Knight. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* ,1990 **167** :1134~1138.
- [ 14 ] M. Iwamura , G. Wu , P. A. Abrahamsson *et al.* *Urology* ,1994 **43** :675~679.

## Cloning cDNA of Soluble Parathyroid Hormone Related Protein Receptor and Its Expression in *Escherichia coli* \*

Dou Liqiang Zhang Zhiqing Liu Hongbing Zhou Xiaoming  
Xiong Weidong An Naili , Yao Lihong Hou Yunde

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

**Abstract** To evaluate the effects of recombinant soluble parathyroid hormone related protein receptor (sPTHrPR) ,the RNA prepared from renal cell carcinoma was reverse-transcribed and amplified by polymerase chain reaction( PCR ). The 543 base pairs fragment corresponding to extracellular domain of PTHrPR was obtained and cloned. Sequencing was performed for three clones by the dideoxy chain-termination method. Comparison of the nucleic acid sequences with the published data revealed that one nucleotide changed. One high level expression vectors referred as pET-3a/sPTHrPR was constructed. The specificity of the expression products was proved by ELISA. Our preliminary experiment also showed the expression products can block the biological activity of PTHrP.

**Key words** Parathyroid hormone related protein receptor ,RT-PCR ,expression in *E. coli*

\* Project of Chinese National Programs for High Technology Research and Development( No. 102-08-01-03 ).