

重组人 FLT3 配体的克隆、表达及功能鉴定

郑文婕¹ 刘敬忠¹ 吕 星² 裴雪涛² 孙志贤²

(首都医科大学附属北京朝阳医院基础医学研究中心 北京 100020)

(军事医学科学院放射医学研究所 北京 100850)

摘 要 通过克隆人 FLT3 配体(rhFL)基因,建立其原核高效表达系统,为大规模获得 rhFL 产品,促进干细胞体外扩增移植等新技术在临床的应用创造条件。分离人外周血单个核细胞,提取总 RNA,采用 RT-巢式 PCR 扩增可溶型 FL 基因,以双脱氧终止法进行 DNA 序列分析,将目的基因与 pProEXHT 载体连接,重组体引入大肠杆菌并在 IPTG 诱导下表达,亲和层析纯化表达产物,观察其刺激 CD34⁺ 细胞增殖的情况。从人外周血单核细胞中克隆得到长 481bp 的 rhFL 基因,测序结果与已知人 FL 基因序列一致, rhFL 的表达量约占菌体蛋白总量的 15%,经亲和纯化纯度达 90% 以上, rhFL + G-CSF + EPO 刺激 CD34⁺ 细胞增殖约 400 倍。获得了 rhFL 基因及其在大肠杆菌中的高效表达,初步建立了产物纯化途径,纯化后的 rhFL 具有较强的刺激造血干/祖细胞增殖的能力。

关键词 FLT3 配体,原核表达,造血干细胞

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0708-05

FL 是新近发现的早期造血生长因子,它与 IL-3、IL-6、G-CSF、GM-CSF 和 SCF 等细胞因子协同作用,具有刺激造血干/祖细胞增殖的活性^[1,2];在体内,FL 单独使用即可大幅度扩增和动员造血干细胞^[3]。另外,FL 刺激机体产生大量树突状细胞,从而诱导体内特异的抗肿瘤免疫,可抑制肿瘤生长^[4]。由此可见,FL 在干细胞体外扩增移植、外周血干细胞动员和临床抗肿瘤免疫治疗等方面具有诱人的应用前景,获取 FL 产品以便进行深入研究因而显得极为重要。

本实验以人外周血单个核细胞为来源,克隆得到可溶型 FL 基因,并实现其原核高效表达,产物经亲和层析纯化,通过 CD34⁺ 细胞的体外扩增证实具有良好生物活性,为 FL 的大规模制备及其应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

人外周血(解放军第 307 医院血站),Taq DNA 聚合酶、EcoRI、Kpn I 内切酶、T4 DNA 连接酶、pGEM-T 质粒(Promega),IPTG(Sigma),SUPER-SCRIPT II 逆转录酶、RNaseH、oligo(dT)₁₂₋₁₈、pProEXHT 质粒(pHT)及亲和层析填料(GIBCO

BRL),DNA 测序试剂盒(USB),rhG-CSF(Amgen),rhEPO(Boehringer mannheim),rhFL 标准品(Immunex),其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 反转录 cDNA 第一链:取健康人外周血,分离单个核细胞^[5],提取总 RNA。总 RNA 5 μ g 加 oligo(dT)₁₂₋₁₈ 0.5 μ g,以 DEPC 处理水补足体积至 25 μ L,于 70℃ 水浴放置 10min,然后迅速转移至 50℃,向上述样品中加入 25 μ L 42℃ 预热的反应混合物(DEPC 处理水 7.5 μ L,10 \times PCR 缓冲液 5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L,10 mmol/L 4 \times dNTPs 2.5 μ L,0.1mol/L DTT 5 μ L)和 200u SUPER-SCRIPT II 逆转录酶,50℃ 水浴孵育 50min;70℃ 15min 终止反应后,将样品置于冰上冷却,然后加入 2u RNaseH 并移至 37℃ 水浴孵育 20min。

1.2.2 巢式 PCR 扩增 FL cDNA:外引物 1:5'-ATG ACA GTG CTG GCG CCA GCC TGG-3',外引物 2:5'-TCA GTG CTC CAC AAG CAG CAG GTC-3',内引物 1:5'-CGGAA TTC ACC CAG GAC TGC TCC TTC C-3',内引物 2:5'-GG GGT ACC CTA TGT CGG GGC TGT GGC CTC C-3'。引物均为本研究室设计合成。取 1 μ L cDNA 为模板,加入 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L,10

mmol/L 4 × dNTPs 1μL, 10μmol/L 外引物 1、2 各 1μL, 以水补足体积至 50μL, 上覆石蜡油。94℃ 预变性 3min 后, 加入 Taq DNA 聚合酶 2.5u, 94℃ 60s, 55℃ 120s, 72℃ 180s, 扩增 30 个循环。取第一轮 PCR 扩增产物 1μL 为模板, 加入内引物进行第二轮 PCR 扩增(其它成分同上)。94℃ 预变性 3min, 94℃ 60s, 60℃ 90s, 72℃ 120s, 扩增 30 个循环。

1.2.3 重组质粒 pGEM-T-FL 的构建:取纯化的 FL 基因片段 50ng, pGEM-T 载体 50ng, T4DNA 连接酶 1u, T4DNA 连接酶 10× 缓冲液 1μL, 无菌水补足体积至 10μL, 14℃ 连接 18h, 以 5μL 连接产物转化 200μL 大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 挑取转化皿上生长的单菌落, 扩大培养后提取质粒, 用 *EcoRI*、*Kpn I* 限制酶进行酶切鉴定。

1.2.4 DNA 序列分析:取重组质粒 3~5μg 为模板, 以 α-³²P dATP 标记反应, T7、SP6 Promotor 引物为测序引物从正反两方向测序, 具体操作参照 Sequenase™2.0 Version DNA 测序试剂盒说明书。

1.2.5 pHT 质粒连接 FL cDNA 重组体的构建:将 pGEM-T-FL 质粒用 *EcoRI*、*Kpn I* 双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离并纯化长 481bp 的 FL cDNA, 将其插入至 pHT 质粒的 *EcoRI*-*Kpn I* 克隆位点, 构成 pHT-FL 重组体。

1.2.6 rhFL 在 *E. coli* 中的表达及产物亲和纯化^[6, 7]:取活化过夜的 pHT-FL 重组体转化菌 *E. coli* DH5α, 1:500 接种 LB 培养液, 37℃ 培养 3h 后, 加入 IPTG 诱导表达。将全菌裂解物离心收集菌体, 加入裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L 2-巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF)和溶菌酶, 冰浴 30min, 超声破碎菌体, 12000r/min 离心收集包涵体。以高浓度尿素法溶解包涵体, 继之以稀释法复性。取复性的蛋白稀溶液上柱(1×4.5cm), 控制流速为 0.5mL/min; 洗去杂蛋白后, 以 C 液(20 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 100mmol/L KCl, 10mmol/L 2-巯基乙醇, 10% 甘油, 100mmol/L 咪唑)洗脱。0.5mL 分步收集流出液, SDS-PAGE 鉴定各管所含蛋白成分, 将含有预期分子量蛋白的各管流出液合并。

1.2.7 rhFL 刺激 CD34⁺ 细胞增殖实验:采用免疫磁珠法分离人脐血中的 CD34⁺ 细胞, FACS 分析其纯度, 在含 IMDM 培养液、12.5% 马血清、12.5% 胎牛血清、5 × 10⁻⁷ mol/L 氢化可的松的悬浮培养体系中, 加入 1 × 10⁴ /mL CD34⁺ 细胞和所需细胞因子, 于 5% CO₂、37℃ 条件下培养 10d 后计数, 细胞因子

每 48h 添加 1 次, 共 4 次; 按细胞因子的不同组合, 设置 4 个实验组: ① FLt ② G-CSF + EPO ③ FLc + G-CSF + EPO ④ FLt + G-CSF + EPO; 其中, FLc 为标准品, FLt 为实验品, 两者添加量均为 40ng/mL; G-CSF 和 EPO 的添加量分别为 20ng/mL、2u/mL。

2 结 果

2.1 反转录-巢式 PCR

巢式 PCR 扩增后琼脂糖电泳的结果显示产物为 481bp 的一条带, 大小与预计相符。

2.2 重组质粒 pGEM-T-FL 的构建及鉴定

图 1 显示 pGEM-T-FL 质粒的构建过程。重组体用 *EcoRI* 酶切产生 3500bp 左右的片段; 用 *EcoRI*、*Kpn I* 双酶切得到 481bp 的目的基因片段(图 2), 证明获得了 pGEM-T-FL 重组体。

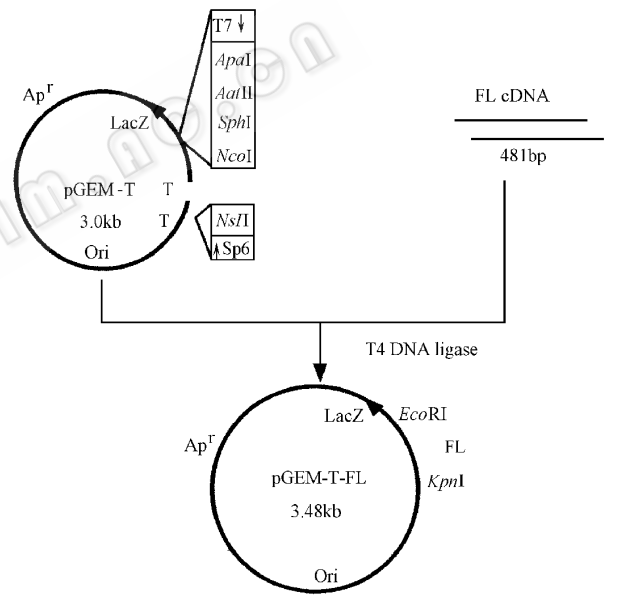


图 1 pGEM-T-FL 重组质粒构建图

Fig. 1 Strategy for the construction of recombinant plasmid pGEM-T-FL

2.3 DNA 序列分析

以 T7、SP6 Promotor 引物从 pGEM-T-FL 模板的正反两方向进行测序, 结果表明克隆的基因序列与文献报道的人 FL cDNA 序列一致(见图 3)。

2.4 pHT-FL 重组体的构建与鉴定

pHT-FL 重组质粒经 *EcoRI*、*Kpn I* 双酶切, 可释放出 481bp 大小的 FL cDNA 片段。

2.5 rhFL 在 *E. coli* 中的表达及表达形式的确定

重组质粒 pHT-FL 转化的 *E. coli* DH5α 经 IPTG 诱导后, 其 SDS-PAGE 图谱显示在分子量 25kD 处有一新增蛋白带, 25kD 的分子量大小与基

因表达产物分子量推算值相符,证明转化菌表达了 FL 胞外段蛋白。光密度扫描分析结果表明,FL 表达量占菌体总蛋白的 15% 以上。IPTG 诱导表达的 pH_T-FL 转化菌经超声破碎,分离上清与沉淀,分别进行 SDS-PAGE 分析。结果如图 4 所示,上清中不存在目标蛋白,而沉淀,即包涵体的裂解物在 25kD 的位置有一清晰蛋白带,说明 FL 蛋白主要以不溶形式存在于包涵体中。

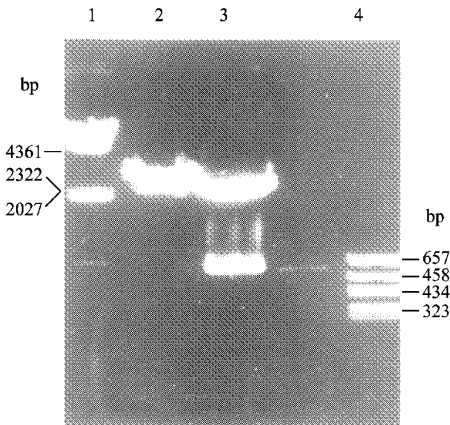


图 2 重组质粒 pGEM-T-FL 酶切鉴定结果

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of the restriction pattern of pGEM-T-FL

1. λ DNA/*Hind*III Markers ; 2. pGEM-T-FL/*Eco*R I
3. pGEM-T-FL/*Eco*R I、*Kpn* I 4. pGEM-7z/ + *Hae*III markers

```
ACC CAG GAC TGC TCC TTC CAA CAC AGC CCC ATC TCC 36
T   Q   D   C   S   F   Q   H   S   P   I   S
TCC GAC TTC GCT GTC AAA ATC CGT GAG CTG TCT GAC 72
S   D   F   A   V   K   I   R   E   L   S   D
TAC CTG CTT CAA GAT TAC CCA GTC ACC GTG GCC TCC 108
Y   L   L   Q   D   Y   P   V   T   V   A   S
AAC CTG CAG GAC GAG GAG CTC TGC GGG GGC CTC TGG 144
N   L   Q   D   E   E   L   C   G   G   L   W
CGG CTG GTC CTG GCA CAG CGC TGG ATG GAG CGG CTC 180
R   L   V   L   A   Q   R   W   M   E   R   L
AAG ACT GTC GCT GGG TCC AAG ATG CAA GGC TTG CTG 216
K   T   V   A   G   S   K   M   Q   G   L   L
GAG CGC GTG AAC ACG GAG ATA CAC TTT GTC ACC AAA 252
E   R   V   N   T   E   I   H   F   V   T   K
TGT GCC TTT CAG CCC CCC CCC AGC TGT CTT CGC TTC 288
C   A   F   Q   P   P   P   S   C   L   R   F
GTC CAG ACC AAC ATC TCC CGC CTC CTG CAG GAG ACC 324
V   Q   T   N   I   S   R   L   L   Q   E   T
TCC GAG CAG CTG GTG GCG CTG AAG CCC TGG ATC ACT 360
S   E   Q   L   V   A   L   K   P   W   I   T
CGC CAG AAC TTC TCC CGG TGC CTG GAG CTG CAG TGT 396
R   Q   N   F   S   R   C   L   E   L   Q   C
CAG CCC GAC TCC TCA ACC CTG CCA CCC CCA TGG AGT 432
Q   P   D   S   S   T   L   P   P   P   W   S
CCC CGG CCC CTG GAG GCC ACA GCC CCG ACA 462
P   R   P   L   E   A   T   A   P   T
```

图 3 人外周血可溶型 FL 的核苷酸及相应氨基酸序列

Fig.3 Sequence of nucleotide and corresponding amino acid of rhFL

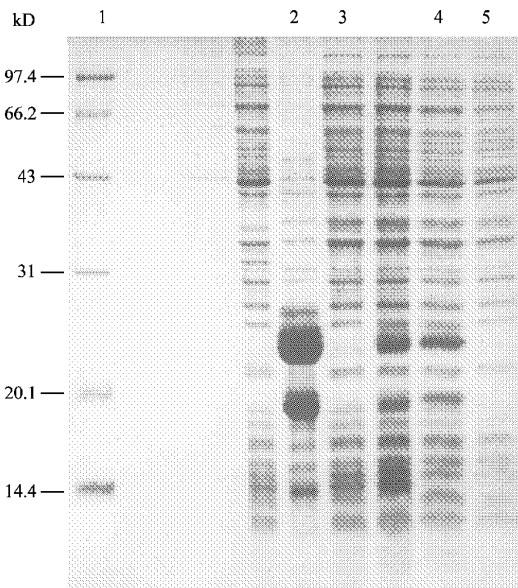


图 4 rhFL 在 DH5 α 中表达形式的确定

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the location of rhFL expressed in DH5 α

1. MW standards ; 2. Inclusion body ;
3. Supernatant 4. DH5 α pH_T-FL λ induced by IPTG
5. DH5 α pH_T-FL λ without induction of IPTG

2.6 包涵体的处理及亲和纯化

图 5 显示包涵体经变性、复性等步骤处理,再通

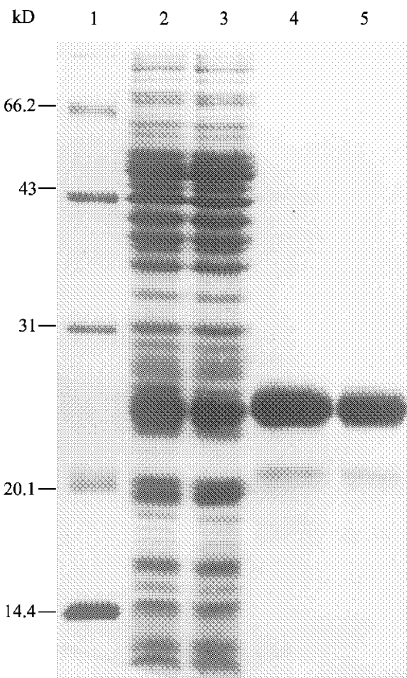


图 5 全菌裂解物与 FL 纯化产物的对照

Fig.5 SDS-PAGE analysis of purified rhFL and total proteins of DH5 α (pH_T-FL)

1. MW standards ; 2. 3. Strain DH5 α (pH_T-FL) ;
4. 5. Purified rhFL protein

过 Ni 离子柱层析纯化, 所得纯化产物的 PAGE-SDS 结果。光密度扫描分析表明目标蛋白的纯度可达 90% 以上。

2.7 rhFL 的功能鉴定

CD34⁺ 细胞在不同细胞因子刺激下培养 10d , FLt 组细胞总数比培养前增加了约 14 倍, 略低于 G-CSF + EPO 组, 可见 rhFL 单独使用对 CD34⁺ 细胞的增殖有一定刺激作用, 但不显著; FLt + G-CSF + EPO 组细胞总数较培养前增加将近 400 倍, 而 G-CSF + EPO 组细胞仅增加了约 22 倍, 前者对造血细胞增殖的影响远大于不加 rhFL 的 G-CSF + EPO 组, 二者之间存在显著性差异($P < 0.001$), 说明 rhFL 在与 G-CSF、EPO 结合使用时, 具有很强的促进原始造血祖细胞增殖的能力; 但 FLt + G-CSF + EPO 和 FLc + G-CSF + EPO 两组结果的比较表明, 纯化产物 rhFL 刺激 CD34⁺ 细胞增殖的活性略低于标准品。(见图 6)

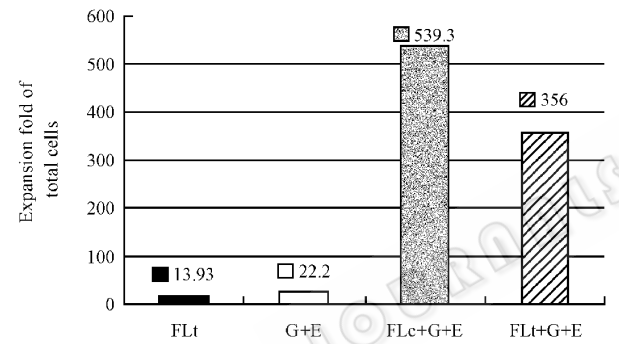


图 6 液体培养 10d 后的细胞扩增倍数
Fig. 6 Expansion fold of total cells grown in suspension cultures for ten days
FLt :purified rhFL ;FLc :standard FL 40ng/mL ;
G :G-CSF 20ng/mL ;E :EPO 2u/mL

3 讨 论

根据文献报道, 国外克隆 FL 基因多采用骨髓、胎盘等造血组织^[8], 事实上人外周血单核细胞中 FL mRNA 的含量相对较高^[9], 而且来源广泛、操作方便, 因而我们尝试从外周血单核细胞中分离 FL 基因。正常生理条件下, FL 蛋白有膜结合型和可溶型两种形式, 前者是由 N 端信号肽、胞外区、跨膜区和胞质区组成的 I 型跨膜蛋白, 表达在细胞表面, 可能通过作用于临近细胞上的特异性受体发挥作用; 后者实际上是膜结合型蛋白的胞外区, 它以可溶形式存在, 保留了与特异受体识别和结合的能力, 可以作用于远程细胞或组织上的受体。蛋白酶对膜结合蛋

白的切割或 mRNA 的不同拼接是可溶型 FL 生成的机制^[10]。设计引物扩增 FL 胞外区 cDNA, 使其表达后产生可溶型 FL, 为功能研究提供了条件。

FL mRNA 在正常细胞和组织中的含量很低, 为提高 PCR 反应的效率及特异性, 设计了内外两对引物, 采用巢式 PCR 的方法扩增目的基因。外引物扩增 FL 跨膜蛋白的整个编码序列, 长 713bp; 内引物扩增编码第 27~180 个氨基酸的 FL 胞外区, 删除了引导肽序列以便在原核中进行表达, 由于内引物 5' 端引入了 EcoR I、Kpn I 限制性酶切位点, 内引物 2 引入了终止密码子, 因而内引物扩增片段总长度为 481bp。

真核基因在原核宿主中表达不但行之有效, 而且具有蛋白表达量高、细菌宿主易于培养、成本低廉的优势, 虽然有些细菌表达的真核蛋白或因折叠的方式不正确, 或因折叠的效率低下, 结果比活性较低, 但是人们在基因工程的多年实践中, 也取得了不少成功的例子。如 hG-CSF 在大肠杆菌中的高效表达。具体到 FL, 国外已有人进行了这方面的尝试^[11], 希望其原核表达产物可用于进一步的功能研究。

pHT 表达质粒在多克隆位点上游、起始密码子下游连接了一段 6 个组氨酸残基的编码序列, 以融合基因的方式使目的蛋白在 N 末端带上 6×His 寡聚多肽。组氨酸的咪唑基团与亲和层析填料 Ni-NTA(Nitrilo-tri-acetic acid)树脂中的 Ni 离子特异性结合, 使目的蛋白被分离出来。全部操作只经过一步层析即可完成, 大大简化了蛋白的纯化过程。由于 FL 主要以包涵体形式表达, 在此之前需经过变性、复性等步骤使其转变为适于进行 MCAC 纯化的可溶性蛋白。

由图 4 可见, 除 25kD 的目的蛋白之外, 诱导后的细菌在约 18kD 的位置也有一条新增蛋白带。国外曾有报道, 与 FL 密切相关的细胞因子 SCF(干细胞因子)存在可溶型不同分子量的表达形式, 因此推断 FL 也存在这种情况, 即 18kD 的蛋白带是 FL 的另一种表达形式, 也可能是蛋白酶作用的产物。

通过 CD34⁺ 细胞液体培养增殖实验发现, rhFL 单独作用对 CD34⁺ 细胞的增殖有一定刺激活性; rhFL 与 G-CSF 和 EPO 协同作用, 具有很强的促进造血干/祖细胞增殖的能力, 说明原核表达产物缺少糖基化并不影响 rhFL 具有良好的生物活性。虽然与标准品相比, rhFL 的活性稍低, 但是在产品纯度进一步提高后, 这一差异应可被克服。

参 考 文 献

- [1] Broxmeyer H E , Lu L , Cooper S *et al.* *Exp Hematol* ,1995 ,**23** (10) :1121~1129
- [2] Rusten L S , Lyman S D , Veiby O P *et al.* *Blood* ,1996 ,**87** :1317~1325
- [3] Papayannopoulou T , Nakamoto B , Andrews R G *et al.* *Blood* ,1997 ,**90** (2) :620~629
- [4] Lynch D H. *Critical Reviews in Immunology* ,1998 ,**18** :99~107
- [5] 杨景山主编 . 医学细胞化学与细胞生物技术 . 北京 :北京医科大学中国协和医科大学联合出版社 ,1990 :6
- [6] Sambrook J E , Fritsch F , Maniatis T. *Molecular Cloning : a Laboratory Manual* 2nd. New York : Cold Spring Harbor ,1992 :822~849
- [7] Ausubel F M , Brent R , Kingston R E *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology* 3rd. John Wiley and Sons , Inc. 1995 :pp. 16~17
- [8] Lyman S D , James L , Johnson L *et al.* *Blood* ,1994 ,**83** :2795~2801
- [9] Hannum C , Culpepper J , Campbell D *et al.* *Nature* ,1994 ,**368** :643~648
- [10] Lyman S D , Stocking K , Davison B *et al.* *Oncogene* ,1995 ,**11** :1165~1172
- [11] Muench M O , Roncarolo M G , Menon S *et al.* *Blood* ,1995 ,**85** (4) :963~972

Cloning , Expression , Purification and Function Research of Recombinant Human FLT3 Ligand

ZHENG Wen-Jie¹ LIU Jing-Zhong¹ LÜ Xing² PEI Xue-Tao² SUN Zhi-Xian²

¹(Beijing Chaoyang Hospital , Beijing 100020)

²(Beijing Institute of Radiation Medicine , Beijing 100850)

Abstract Clone human FLT3 ligand gene , establish a highly efficient expression system of rhFL in *E. coli* and a suitable purification method of expression products. A cDNA encoding soluble FL was cloned through RT-nested PCR from the total RNA extracted from human peripheral blood mononuclear cells and identified by analyzing the nucleotide sequences , then introduced into pProEXHT plasmid to express a 6×His-FL fusion protein in *E. coli* . The fusion protein expressed in inclusion body was isolated , solubilized and refolded , and then purified by chromatography on a Ni-chelating affinity column. Its activity was detected by stimulating CD34⁺ cells to expand. RhFL gene with a length of 481bp was isolated. The expression amount of rhFL reached to 15% of total bacterial proteins and the purity of rhFL was 90% after MCAC. RhFL + G-CSF + EPO stimulated CD34⁺ cells to expand up to 400 times. The purified rhFL had a powerful activity to stimulate hematopoietic stem cells to expand *in vitro* .

Key words FLT3 ligand , prokaryotic expression , hematopoietic stem cells