

# 人粒细胞集落刺激因子受体膜外区在昆虫细胞中的表达

赵炳文 李 蕾 李福胜 陈爱君 曾革非 张智清 侯云德

(中国预防医科院病毒基因工程国家重点实验室 北京 100052)

**摘 要** 以胎盘组织提取的 mRNA 为模板, RT-PCR 扩增人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)受体膜外区 CRH 的 cDNA 片段, 克隆于供体质粒 pF<sub>AST</sub>B<sub>AC</sub> I, 与杆状病毒表达载体 Bacmid 同源重组后, 转染昆虫细胞 SF-9, 获得重组杆状病毒并证明了 CRH 的高效表达。表达产物经 G-CSF 亲和层析进一步纯化, 纯度可达 90% 以上。受体竞争性结合实验结果表明, 该表达产物能特异性结合 G-CSF, 具有较高的亲和力(K<sub>d</sub>=3.8nmol/L)。

**关键词** 人粒细胞集落刺激因子, 受体, 聚合酶链反应, 杆状病毒表达系统, 亲和层析

**分类号** Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0466-69

人粒细胞集落刺激因子(G-CSF)受体是生长因子受体超家族成员之一, 能与 G-CSF 特异性结合, 引发造血干细胞及外周血粒细胞的分化增殖, 从而使外周血粒细胞数量增加<sup>[1]</sup>。1990 年 Nagata 成功地克隆了 G-CSF 受体基因的全序列, 继而对其结构与功能进行了初步探讨<sup>[2]</sup>。受体蛋白可分为胞浆区、跨膜区、膜外区三个部分。膜外区由免疫球蛋白样结构域(Ig-like)、细胞因子同源结构域(CRH)、肌纤蛋白 III 结构域(FN III)组成。其中 CRH 是与配体结合的主要功能区<sup>[3]</sup>。因此, 该受体的研究, 对进一步探讨其与 G-CSF 相互作用的机制, 研究 G-CSF 结构功能的关系, 发现具有更高生物活性的 G-CSF 突变体, 以及此可溶性受体临床治疗作用的开发, 都具有重要的理论价值和实际应用价值。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒:** pF<sub>AST</sub>B<sub>AC</sub> I, pGEM-3zf 和菌株 DH5 $\alpha$  均由本室保存, 各种酶如 *Eco*RI、*Xba*I、T4DNA Ligase 购自 NEW ENGLAND Biolab 公司。

**1.1.2 感受态细胞** DH10B<sub>AC</sub>、昆虫细胞 SF-9、Grace 培养液、CellFectin 购自 Gibco1BRL 公司。

**1.1.3 引物合成:** 由中国科学院微生物研究所合成。抗 G-CSF 受体抗体用大肠杆菌表达的受体片段纯化后免疫家兔制得。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因的扩增与克隆**<sup>[4]</sup>: 取新鲜胎盘组织, 常规方法提取 mRNA, RT-PCR 扩增 CRH cDNA。

**1.2.2 受体片段 CRH 的基因扩增、克隆及序列分析:**

CRH 区引物序列:

上游:5'-CGGAATTCATGTACCCCTCCAGCCATACCCGAC-3'

下游:5'-GCTCTAGATTAGGCCCGTTCGGTAGTTCTCAG-3'

100 $\mu$ L 体系 PCR 扩增 CRH 片段。热循环条件:94 $^{\circ}$ C 40s, 63 $^{\circ}$ C 40s, 72 $^{\circ}$ C 60s, 30 个循环。PCR 产物以 *Eco*RI, *Xba*I 酶切后与克隆载体 pGEM-3zf(+/-) 连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 提取双链模板, ABI373 DNA 自动测序仪测序。

**1.2.3 重组表达质粒的构建及转化:** 测序确证后 CRH 片段与供体质粒 pF<sub>AST</sub>B<sub>AC</sub> 连接。挑取正确插入质粒, 转化含有杆状病毒表达载体 Bacmid 的感受态细胞 DH10B<sub>AC</sub>, 涂 AGTLB 平皿(氨苄青霉素 50 $\mu$ g/mL, 庆大霉素 50 $\mu$ g/mL, 四环素 70 $\mu$ g/mL, IPTG, X-Gal)。挑白斑, 温和提取同源重组质粒, 立即进行细胞转染。

**1.2.4 细胞转染、病毒培养及表达产物分析:** 取同源重组质粒 5 $\mu$ L, 用 CellFECTIN 将质粒转染生长状态良好的 SF-9 细胞。48~72h 后离心收获细胞。SDS-PAGE 电泳分析蛋白表达产物。

**1.2.5 表达产物的纯化:** 离心收集病毒感染 72h 后的昆虫细胞, PBS 洗涤后加 50mL 预冷的 PBS, 混悬, 冰浴超声, 上清立即用 G-CSF 亲和柱进行纯化。用不同盐浓度的洗脱液洗脱, 收集每一洗脱浓度下的洗脱峰, TCA 沉淀蛋白, SDS-PAGE 电泳分析蛋白大小及纯度。

**1.2.6 表达蛋白的生物学特性分析:** ① Western blot: 表达产物按常规方法进行 SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭, 依次加入抗 G-CSF 受体抗体和酶标二抗, 最后用底物液显色。② 亲和力大小的测定: 用 <sup>125</sup>I-G-CSF 及表达产物按标准方法进行受体结合实验<sup>[5]</sup>。

以包被液稀释受体蛋白, 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。

1% BSA 室温封闭后 PBS 洗涤。在两组管中分别加入不同浓度的 <sup>125</sup>I-G-CSF, 第二组补加未标记的 G-CSF 10 $\mu$ L (100 $\mu$ g/ $\mu$ L) 为非特异结合的对照组。补加 PBS 至 500 $\mu$ L 充分混匀后冰浴 2h, 吸尽上清液, 用 PBS 洗涤后于  $\gamma$  计数仪上测定两组各孔的放射性。计算特异性结合值(B)及 B/F, 做图分析, (B)对 B/F 回归分析并计算 Kd 值。

## 2 结 果

### 2.1 受体基因的扩增、克隆与序列分析

重组质粒双酶切鉴定结果证明有 600 大小片段插入, PCR 鉴定有 CRH 基因插入(图 1)。DNA 测序分析结果进一步表明该受体基因序列没有发生变异。

### 2.2 表达产物的分析及纯化结果

以第一代病毒感染昆虫细胞, 培养 72h 后离心收集细胞, 用样品缓冲液裂解后做 SDS-PAGE 分析。结果表明有一条大小为 31kD 左右与受体分子量极为接近的条带产

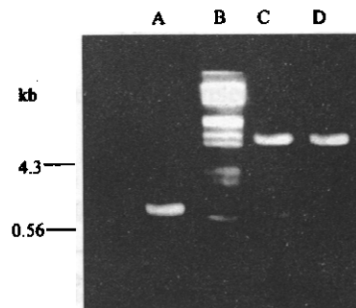


图 1 受体基因 CRH 的扩增及克隆鉴定结果

Fig.1 Restriction enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid  
A. PCR products B.  $\lambda$ DNA *Hind*III Marker  
C. pFastbac1-CRH *Xba*I/*Eco*RI  
D. pFastbac1 *Eco*RI

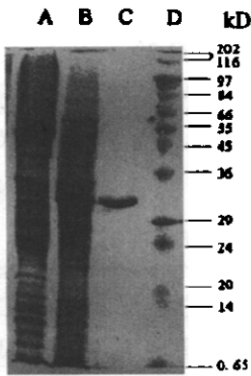


图2 表达产物的 SDS-PAGE 分析  
Fig.2 Analysis of the expression products and the purified products

A. Negativ control; B. Expression products, C. Purified products; D. Molecular weight marker

生。细胞裂解稀释后过 G-CSF 层析柱纯化后可见 31kD 左右的单一条带(图 2)。

2.3 表达产物 Western blot 分析

表达产物 Western blot 分析结果显示在 32kD 处有一条主带及一条附带产生。结果见图 3。

2.4 受体结合实验结果

以放射性同位素<sup>125</sup>I 标记的 G-CSF 与纯化后的受体做受体结合实验,结果表明,该受体能特异性结合 G-CSF 且具有较高的亲和力。其 Kd 值为 3.8nmol/L,图 4。

3 讨论

G-CSF 受体膜外区是一富含半胱氨酸的糖蛋白,CRH 区的 cDNA 全长为 600bp,含有 4 对二硫键,由 BN, BC 两个区段构成,是与配体结合的主要功能区,能特异性结合 G-CSF,且具有较高的亲和力<sup>[6]</sup>。因其结构的复杂性,其原核细胞表达产物的复性率较低,稳定性较差。Smith 建立了该受体片段的 cos-7 细胞表达系统<sup>[3]</sup>,但此真核细胞表达系统操作复杂,表达量不高,分离纯化过程复杂费时,难以满足以该受体为工具进行的实验研究工作需要。

G-CSF 受体膜外区是一富含半胱氨酸的糖蛋白,CRH 区的 cDNA 全长为 600bp,含有

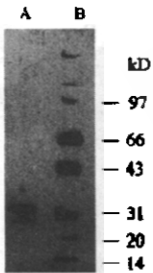


图3 表达产物 Western blot 结果  
Fig.3 Western blot analysis of the expression products  
A. Expression products; B. Molecular weight marker

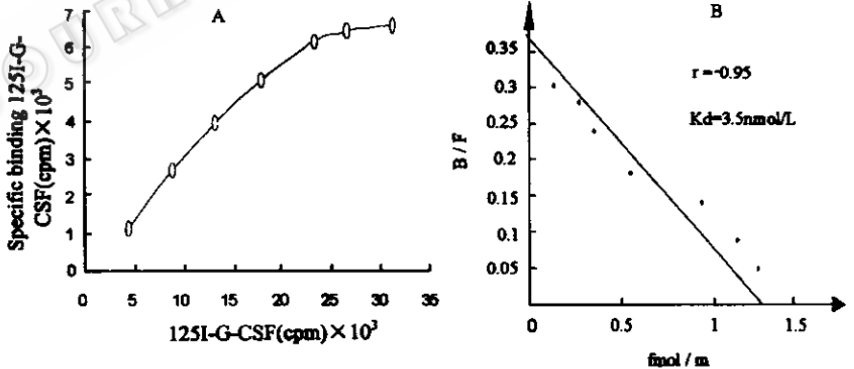


图4 重组 CRH 的受体亲和力分析结果  
Fig.4 Binding activity analysis of recombinant CRH  
A. Binding curve of CRH; B. Scatchard plot of the binding experiment

与普通的真核细胞表达系统相比,杆状病毒表达系统既具有糖基化功能又具有高效表达的特性,其表达产物更接近于该蛋白的天然结构。因此,本研究利用杆状病毒表达系统对 CRH 片段进行了高效表达,并利用 G-CSF 亲和层析柱对该产物进行了纯化。其纯度达到了 90% 以上。Western blot 分析结果表明,该产物能特异性结合 G-CSF 受体的抗

体,并在 31kD 处有一特异性主带产生及弱反应条带产生。而根据 CRH cDNA 序列测出的蛋白分子量应为 28kD 左右,说明 CRH 在昆虫细胞的表达过程中已被糖基化,分子量较小的弱带产生可能与糖基化程度不同有关。受体结合实验结果表明,纯化后的 CRH 片段能特异性结合 G-CSF 且具有较高的亲和力( $K_d = 3.8\text{nmol/L}$ ),比其原核表达产物的亲和力( $K_d = 9.8\text{nmol/L}$ )高,<sup>[7]</sup>但比具有完整结构的天然 G-CSF 受体亲和力低( $K_d = 0.67\text{nmol/L}$ )<sup>[3]</sup>。说明受体结构的完整性与及糖基化程度与其亲和力大小密切相关。

G-CSF 受体是研究 G-CSF 结构与功能的重要工具。最近有文献报道,可溶性粒细胞集落刺激因子受体能特异性结合髓性粒细胞白血病细胞分泌的 G-CSF,阻断 G-CSF 对白血病细胞的增殖刺激作用,推测在髓性粒细胞白血病的治疗中可能有一定应用前景<sup>[8]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] Kaori Shinjo, Akihiro Takeshita, Kazunori Ohnishi *et al.* *Leukemia and Lymphoma*, 1997, 25, 37~46.
- [2] Rikiro Fukunaga, Yoshiyuki Seto, Shigekazu Nagata *et al.* *Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87, 8702~8706.
- [3] Alf Larsen, Terri Davis, Craig A. Smith *et al.* *J. Exp. Med.* 1990, 172:1559~1572.
- [4] J. 萨姆布鲁克等著,金冬雁,黎孟枫译.《分子克隆实验指南》,北京:科学出版社,1992.
- [5] 吕宝璋,田英著.《受体学概论》,北京:科学出版社,1991.
- [6] Mitsure Haniu, Thomas Horan, Tsutomu Arakawa *et al.* *Biochemistry*. 1996, 35:13040~13046.
- [7] Osamu Hiraoka, Hiroyuki Anaguchi, Kazuhiko Yamasaki *et al.* *J. Biological Chemistry*, 1994, 269(35):22412~22419.
- [8] Yoshinobu Asano, Toshihiro Yokoyama, Shoichiro Shibata *et al.* *Cancer Research*, 1997, 57:3395~3397.

## Expression of the CRH Region of G-CSF Receptor in Insect Cell

Zhao Bingwen Li Lei Li Fusheng Chen Aijun Zeng Gefei Zhang Zhiqing Hou Yunde

(State Key Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Beijing 100052)

**Abstract** The CRH cDNA of G-CSF receptor gene was cloned into the plasmid pFASTBAC. After transformed the *E. coli* DH10BAC, recombinant baculovirus genome which contained CRH cDNA was obtained. By transfecting the insect cell SF-9 with the recombinant baculovirus genome, the recombinant baculovirus was obtained. SDS-PAGE and Western blot analysis of the infected cell lysate showed that CRH was expressed in the SF-9 cell. The result of the receptor binding experiment also proved that the expression product purified by the G-CSF affinity column can specifically bind the <sup>125</sup>I-G-CSF with the  $K_d$  of 3.8nmol/L.

**Key words** G-CSF, receptor, baculovirus expressing system, purification