

人体 c Mpl 分子配体不同表达载体的构建及其优化表达策略^{*}

张 擎, 葛怡琛, 潘瑞敏, 徐培林

(中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 利用酵母双杂交系统从人体肝脏 cDNA 文库筛选到血小板生成素受体 Mpl 分子配体的 *xp1* 基因, 构建 pET-28(b)-*xp1*, pBV220-*xp1* 和 pBAD/g IIIA-*xp1* 表达质粒, 分别进行 IPTG、温度和果糖诱导, 表达产物利用小鼠巨核细胞集落形成单位测定活性。表达分析显示 BL21/pET-28(b)-*xp1* 水溶性 XP1 目的蛋白表达量为最高, 活性最大; BL21/pBV220-*xp1* 被短时、低温诱导后可增加表达目的蛋白的水溶性, 但稳定性差, 表达量和活性均不及 BL21/pET-28(b)-*xp1* 高; TOP10/pBAD/g IIIA-*xp1* 不能分泌到细胞质周膜, 以包涵体形式存在细胞内中, 并且为无活性表达。

关键词: c-Mpl; XP1; 表达; 水溶性; 稳定性; 活性

中图分类号: Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0059-05

血小板生成素 (Thrombopoietin, TPO), 又称 c-Mpl 配体, 是近年分离的一种造血生成因子, 它特异地刺激巨核细胞增殖、分化、成熟及其促血小板的产生^[1,2], 对维持机体的正常生理功能有着重要意义。TPO 可诱导血小板生成素受体 (c-Mpl) 进行同源二聚化, 激活下游细胞调控蛋白, 刺激巨核细胞生成血小板^[3,4]。TPO 的 N 端存在二对二硫键, 为功能活性部位; C 端有糖基化位点, 与其半衰期和蛋白分泌有关^[5]。本研究利用 c-Mpl 的细胞外膜区域作为饵蛋白, 克隆了与其相互作用的靶基因, 命名为 *xp1*^[6], 其表达的基因 *xp1* 和 TPO 的基因进行 GeneBank 的 Blast 序列分析, 分析 XP1 和 TPO 基因虽无序列同源性, 但 XP1 具有刺激小鼠巨核细胞形成集落单位的活性, 提示 XP1 可能为一新型的造血细胞因子。

本研究选择了原核表达系统对 XP1 进行功能性表达, 构建了含有 T7、PBAD 和 PRPL 启动子的表达质粒、优化了培养条件的和纯化条件, 研究发现由 T7 启动子控制下的和 6 个组氨酸的长融合载体能够提高 XP1 的表达量和水溶性组分, 这为进一步研究 XP1 功能蛋白和人体 c-Mpl 受体的相互作用打下了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

pB42AD-*xp1* 含有人体 c-Mpl 分子配体全长

cDNA, 本实验室通过酵母双杂交系统从人体肝脏 cDNA 文库筛选获得; 克隆表达载体 pET-28b (+) 和 pBAD/g IIIA 购自 Invitrogen 公司; pBV220 由中国科学院构建惠赠。大肠杆菌表达宿主菌 BL21 (DE3)、TOP10 和克隆宿主菌 XL1-Blue 由本室保存。

1.2 工具酶和试剂

工具酶购自 MBI Fermentas 公司; 质粒提取试剂盒 (E. Z. N. A. Plasmid Minipreps Kit I) 和琼脂糖凝胶直接回收试剂盒 (E. Z. N. A. Gel Extraction Kit) 购自 Omega 公司; 使用试剂购自 Sigma 公司。

1.3 引物设计及 PCR

根据 *xp1* 基因序列和 3 种表达质粒的多克隆酶切位点, 设计 3 对引物:

上游引物 1:

5' CGGGATCCGATTGCCCGAAGAAGCAGGAGGA 3',

下游引物 2:

5' CCGCTCGAGCTAGGATGTAATTAGCCTTGA 3'

其上分别含质粒 pET-28b (+) 双酶切 *Bam*H I 和 *Xho* I 点位。

上游引物 3:

5' CCGCTCGAGATTGCCCGAAGAAGCAGGAGGA 3';

下游引物 4:

5' GCTCTAGAATTGCCCGAAGAAGCAGGAGGA 3',

其上分别含质粒 pBAD/g IIIA 酶切 *Xho* I 和 *Xba* I 位

* 收稿日期: 2003-02-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070424)

作者简介: 张擎 (1966 生), 男, 讲师, 通讯联系人, 徐培林, E-mail: lsbr6@zsu.edu.cn

点。
上游引物 5:
5'CGGGATCCGATGATTGCCGAAGAAGCAGGAGGA 3';
下游引物 6:
5'ACGCGTCGACATTGCCGAAGAAGCAGGAGGA 3',
其上分别含质粒 pBV220 双酶切 *Bam*H I 和 *Sal*I 位点。PCR 反应为: 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.4 诱导表达

挑单菌落接种 20 mL 含 Kan 或 Amp 的 LB 培养液, 37 °C 振荡过夜培养。把过夜培养的菌液, 按 1 :100 接种于 1 L LB 培养液中, 加 1 mL 的 Kan (50 mg/mL) 或 Amp (50 mg/mL), 37 °C 振荡培养 3~5 h (BL21/pBV220-*xp1* 为 30 °C 培养), 至 $A_{600}=0.5\sim0.6$ 。分别设定如下诱导条件: BL21/pET28b (+) -*xp1* 加 0.10 mL, 0.50 mL, 1 mL 的诱导剂 IPTG (1 mg/mL), 30 °C, 培养 4 h。BL21/pBV220-*xp1* 在 39, 42, 45 °C 温度诱导培养 4 h。TOP10/pBAD/g IIIA -*xp1* 加 2 mL, 0.2 mL, 0.002 mL 的诱导剂果糖 (1 mg/mL), 37 °C, 培养 4 h。

1.5 表达产物的裂解

将发酵完毕的 BL21/pET28b (+) -*xp1*、BL21/pBV220-*xp1* 和 TOP10/pBAD/g IIIA -*xp1* 细胞培养液, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液。细菌用 50 mL, 20 mol/L Tris HCl (pH 7.4) 的缓冲液洗涤 2 次, 5 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液。细胞沉淀用 100 mL, 20 mol/L Tris HCl (pH 7.4) 的缓冲液 (含 1 mL 10 mol/L PMSF 和 100 μ L BME) 重悬, 加少量溶菌酶 (1 mg/mL), 37 °C 振荡 30 min。最后菌液用液氮反复冻融 3 次, 使细胞完全破壁; 裂解液再用乳化机间断乳化 5 min 左右, 将核酸打碎, 直至裂解液不再粘稠。9 000 r/min 离心 30 min, 取上清液。TOP10/pBAD/g IIIA -*xp1* 细胞培养液进行渗透休克: 将菌体溶于高渗液 (20 mol/L Tris HCl, pH 8.0, 2.5 mol/L EDTA, $w=20\%$ 蔗糖), 4 °C 放置 15 min 后, 9 000 r/min 离心 10 min, 吸去上清, 加入与高渗液等体积的 4 °C 预冷的低渗液 (20 mol/L Tris HCl, pH 8.0, 2.5 mol/L EDTA) 混匀, 冰上放置 30 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 上清液为渗透休克释放的蛋白。细菌表达产物量由岛津薄层扫描仪 CS 930 扫描确定, SDS PAGE 分析目的蛋白表达量和溶解性。

1.6 包涵体的溶解和复性

将表达产物裂解后 9 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 将沉淀用含去垢剂 $\varphi=0.5\%$ Triton X 100

和 1 g/L 脱氧胆酸盐的 50 mol/L PBS, pH 8.0 洗涤 2 次, 得纯化的包涵体。每克包涵体沉淀用 10 mL 的含 10 mol/L dithiothreitol, 6 mol/L 尿素 50 mol/L PBS, pH 8.0 裂解液, 25 °C 裂解 2 h, 13 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液。包涵体的裂解上清液中加等体积的含 2 mol/L 尿素、 $w=5\%$ Sucrose、1 mmol/L EDTA 的 50 mol/L PBS, pH 8.0 复性溶液, 再按 1 :50 比例加入复性液, 使蛋白终质量浓度在 50 μ g/mL 下, 置 4 °C 过夜。最后将复性液在 4 L 的 50 mol/L PBS, pH 8.0 进行透析 2 次, 各 24 h。

1.7 XP1 蛋白稳定性检测

蛋白质含量测定采用紫外吸收法,

$$\text{蛋白质含量}(\text{mg/mL}) = (1.46A_{280} - 0.74A_{260}) \times \text{稀释倍数}$$

蛋白质质量含量低于 0.1 mg/mL, 采用 Lowry's 法定量。将初步纯化的 XP1 蛋白 0.5 mg/mL (50 mol/L PBS, pH 8.0) 室温 24 h 放置, 用 751 型分光光度计测上清液光密度变化, 计算光密度指数

$$\text{光密度指数} = \frac{\text{上清液放置前蛋白质含量}}{\text{上清液放置后蛋白质含量}} \times 100\%$$

其变化率反映水溶性目的蛋白在溶液中的稳定性。

1.8 表达产物生物学活性测定

体质量为 18~22 g 的 BALB/c 小鼠, 剥离两侧股骨, 使用 IMDM 培养液冲洗和收集有核细胞。经淋巴细胞分离液分离, 取中间单核细胞层, 计数, 终浓度稀释为 5×10^5 /mL 单核细胞。采用琼脂培养体系, 见参考文献[7]。进行小鼠骨髓巨核细胞一血小板的标志酶乙酰胆碱酯酶染色观察, 倒置显微镜下计算集落数目。通过观察水溶性和包涵体复性后的 XP1 蛋白产物对小鼠巨核细胞形成集落单位的活性的刺激作用, 测定 XP1 蛋白的活性。

2 结 果

2.1 c Mpl 分子配体 XP1 整合质粒的构建

以 pB42AD -*xp1* 质粒为模板, 经相应引物扩增出带有与质粒 pET28(b)、pBAD/g IIIA 和 pBV220 上双酶切位点两端相同的 *xp1* 基因, 然后和同样双酶切的质粒分别做连接。3 种表达质粒酶切鉴定结果和预期大小一致。整合质粒的构建示意图见图 1。

2.2 c Mpl 分子配体 XP1 基因的表达

结果见图 2, BL21 和 TOP10 诱导表达前有共同的条带, 诱导表达后受体菌的蛋白裂解液中出现了一条明显的相对分子质量约 44 000 诱导表达带, 与推算的相对分子质量相符, 说明人 c Mpl 配体 *xp1* 基因得到高表达, 其中 pET28b (+) -*xp1* 水溶性表达最高, pBV220 -*xp1* 和 pBAD/g IIIA -*xp1* 主要以

不溶包涵体的形式存在。

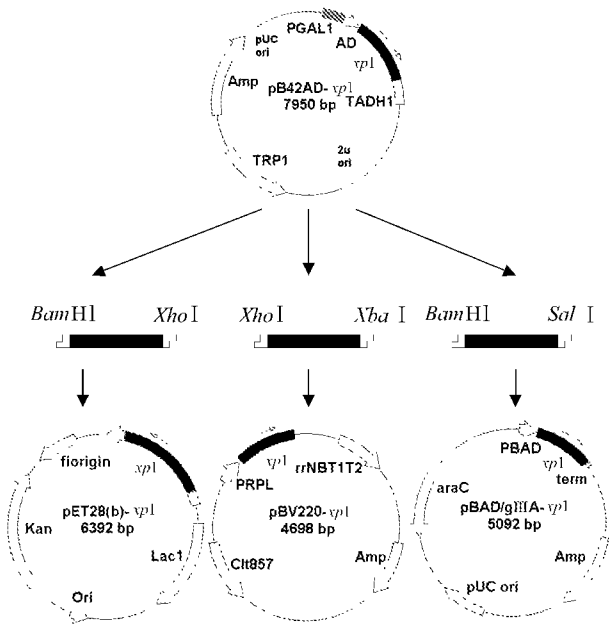


图 1 pET-28(b)-vp1, pBV220-vp1 和 pBAD/g IIIA-vp1 构建示意图

Fig 1 Construction of recombinant plasmid

pET 28(b)-vp1, pBV220-vp1 and pBAD/g IIIA-vp1

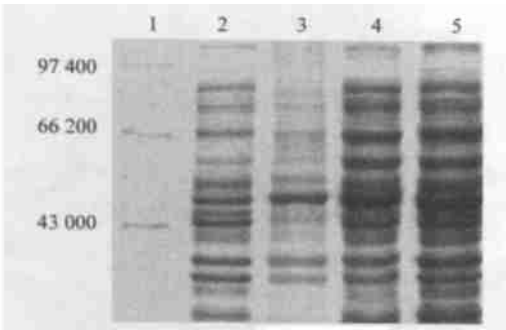


图 2 不同表达载体的宿主菌 xp1 蛋白的表达

Fig 2 SDS-PAGE analysis of pET-28(b)-vp1, pBV220-vp1 and pBAD/g IIIA-vp1 expressed in *E. coli* BL21 and TOP10

1. 标准蛋白相对分子质量;
2. 诱导表达前受体菌;
3. 诱导表达后 BL21/pET-28(b)-vp1 上清液;
4. BL21/pBV220-vp1 包涵体沉淀;
5. Top10/pBADg III-vp1 包涵体沉淀

2.3 不同条件因子对 XP1 表达量的影响

如图 3 所示，在 BL21/pET-28b (+)-vp1 中，0.50 mol/L IPTG 诱导的 XP1 表达量较 0.10 mol/L 和 1.00 mol/L 的 IPTG 表达量高，但无显著性差异，表达量约为总菌体蛋白的 21.8%。在 BL21/pBV220-vp1 中，39℃ 温度诱导表达较 42℃ 和 45℃ 产生的水溶性 XP1 目的蛋白为高，表达量约为总菌体蛋白的 15.0%。随着温度的升高，表达量降低，形

成的包涵体增多。在 TOP10/pBAD/g IIIA-vp1 中，0.2%、0.02%、0.002% 的 3 种阿拉伯糖终浓度诱导后，表达的包涵体量未有变化，表达量约为总菌体蛋白的 8.5%。

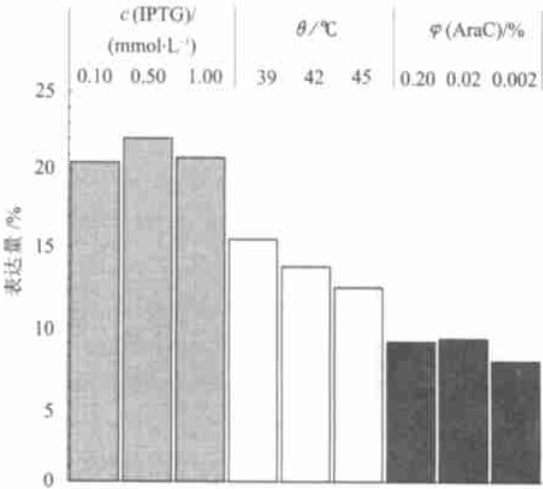


图 3 不同条件因子对 XP1 表达量的影响

Fig 3 Effect of different inducer on XP1 expression

2.4 不同表达体系对 XP1 蛋白性质的影响

根据 XP1 蛋白表达的溶解性、稳定性和活性，进行对比分析，结果如图 4，pET 28(b)-vp1 大肠杆菌 BL21 的表达体系水溶性、稳定性和活性为在最高，pBV220-vp1 大肠杆菌 BL21 虽然有活性，但水溶性和稳定性较差。pBAD/g IIIA-vp1 大肠杆菌 TOP10 表达体系绝大部分以包涵体形式存在，经溶解再复性后，稳定性差，大部分重新产生沉淀，活性丧失。

Colning region	Solution	Stability	Activity
T7promoter His-Tag xp1 T7terminotor	++	92%	14
P _R P _L xp1 rrnBT ₁ T ₂	+	54%	5
PBAD genIII ss xp1 Myc(His) ₆	-	10%	0

图 4 不同表达体系对 XP1 蛋白性质的影响

Fig 4 Effect of expression systems on

XP1 protein characteristic

“+” 和 “-” 为诱导表达后细胞裂解液上清可溶部分的多少变化

3 讨 论

大肠杆菌具有生长迅速、生长周期短、安全性好、可以进行高密度培养，大量的有价值基因产物

在大肠杆菌获得了表达^[8]。然而, 重组蛋白在大肠杆菌中的高水平表达经常导致蛋白聚集而形成不溶的包涵体。TPO 的活性功能结构域在 N 端, 其 196 氨基酸多肽未有糖基化发生, 适于原核生物系统表达, 存在的主要问题是易形成包涵体, 活性较低。这可能 TPO 基因的结构特点有关^[8]。因此建立一个高效的原核生物的表达系统对于 XP1 的功能研究具有重要的意义。

研究报道 TPO 和 N 端的 196 个氨基酸都含有其生物学活性必需的两对二硫键, 其二硫键的错误连接不仅容易导致包涵体的形成, 而且在包涵体溶解、复性后, 使其二级结构破坏, 活性丧失^[9,10]。本研究的 *xp1* 基因有着和 TPO 基因表达相似的特点, 通过比较 3 种不同形式的表达系统, 发现表达载体 pET-28b (+)-*xp1* 的 N 端 6 个组氨酸和 XP1 进行长融合能够提高 XP1 蛋白溶解性和稳定性, 6 个组氨酸起到了助溶作用, 而且其不影响 XP1 的活性。对 BL21/pBV220-*xp1* 进行的缩短诱导时间、降低诱导温度的调整, 没有起到降低包涵体的显著性效果, 其 XP1 的表达多为包涵体, 溶解、复性后的 XP1 不仅不稳定, 而且活性降低。TOP10/pBAD-g III A-*xp1* 经采用 XP1 分泌细胞周质定位表达的策略, 虽然有利于分离和纯化, 但当本试验进行渗透压破膜处理后, 未有 XP1 的产生, 而在胞内有包涵体的产生, 说明表达载体信号分泌肽未能引导 XP1 分泌表达, 其融合蛋白包涵体复性后的可溶蛋白的重新聚集, 沉淀。有研究报道硫氧还蛋白还原酶活性缺失突变的大肠杆菌菌株有利于二硫键在细胞质内的形成^[11]。但本研究中选择受体表达菌 BL21 和 TOP10 对 XP1 表达蛋白没有影响, 且其含有空载体受体菌表达前后, 蛋白表达条带无显著差别, 提示对于含有二硫键的重组蛋白而言, 细菌细胞质内的还原环境也可能不利于二硫键的正确形成。

在巨核细胞的增殖和分化中, 不仅 TPO 能和其上 c-Mpl 受体有结合刺激作用, 而且一些小分子多肽表现出了较强的受体激活作用^[12], 提示 c-Mpl 受体可能存在着不同的细胞因子结合位点来激活下游共同的信号传导通路。本研究的 XP1 具有和 TPO 同样的刺激小鼠巨核细胞形成集落单位的活性, 其和 c-Mpl 相互作用机制还需进一步探讨。

外源蛋白在原核系统的表达是遵循基本的遗传学途径寻找蛋白质的一个重要步骤, 这需要在载体的选择、培养条件的调节和受体菌的确立等策略上进行灵活运用, 才能不同程度改善外源蛋白在大肠杆菌中的表达水平。本研究对 XP1 的表达系统进行了优化, 提高了水溶性 XP1 的表达效率, 这将

有助于促进有关人体 c-Mpl 受体结构和功能的研究, 其有望成为新型的刺激血小板生成的药物。

参考文献:

[1] SAUVAGE D E F, HASS P E, SPENCER S D, et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-mpl ligand[J] . Nature, 1994, 369(6481): 533—538.

[2] KAUSHANSKY, LOK S, HOLLY D H, et al. Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin[J] . Nature, 1994, 369(6481): 568—571.

[3] BARTLEY T D, BOGENBERGER J, HUNT P, et al. Identification and cloning of megakaryocyte growth and development factor that is ligand for the cytokine receptor Mpl[J] . Cell, 1994, 77(7): 1117—1124.

[4] AMY E G, LINDEN M L, KAUSHANSKY K. Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine[J] . Cytokine & Growth Factor Reviews, 2002, 13: 61—71.

[5] KAUSHANSKY K, JONATHAN G, DRACHMAN . The molecular and cellular biology of thrombopoietin: the primary regulator of platelet production[J] . Oncogene, 2002, 21(21): 3359—3367.

[6] DENNIS P H, SUSAN HUXTABLE, KIT F N G, et al. Determination of interactions between human thrombopoietin and its receptor MPL by yeast two-hybrid system and affinity biosensor[J] . IJBCB, 2000, 32: 481—488.

[7] BIJIA D, NAHEED B, BETH M, et al. An agonist murine monoclonal antibody to the human c-Mpl receptor stimulates megakaryocytopoiesis[J] . Blood, 1990, 92(6): 1981—1988.

[8] SWARIZ J R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins[J] . Curr Opin Biotechnol, 2001, 12(2): 195—201.

[9] HAMBURGER J B, CHEN E, NARHI L O, et al. Multiple conformational states of a new hematopoietic cytokine (megakaryocyte growth and development factor): pH- and urea-induced denaturation[J] . Proteins, 1998, 32(4): 495—503.

[10] KATO T. Protein characteristics of thrombopoietin[J] . Stem Cells, 1996, 14(Suppl 1): 139—147.

[11] DERMAN A I, PRINZ W, BELIN D, et al. Mutations that allow disulfide bond formation in the cytosol of *Escherichia coli* [J] . Science, 1993, 262: 1744—1747.

[12] CWIRLA S E, BALASUBRAMANIA P, DUFFIN D J, et al. Peptide agonist of the thrombopoietin receptor as potent as the natural as cytokine[J] . Science, 1997, 276(5319): 1696—1699.

(下转第 81 页)

参考文献:

[1] McDONALD M B, ELLIOT L J, SWENEY P M. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies[J]. Seed Sci & Tech, 1995, 7(2): 171—176.

[2] 郭景伦, 赵久然. 利用 RAPD 技术鉴定玉米[J]. 玉米科学, 1998, 6(4): 6—7.

[3] 郭景伦. 玉米种子 DNA 提取新方法[J]. 北京农业科学, 1997, 15(2): 1—2.

[4] 孙志良, 张超良. RAPD 技术在玉米自交系亲缘关系中的应用[J]. 遗传学报, 1999, 26(1): 709—717.

[5] 傅骏骅, 李连成. 玉米 RAPD 程序化的研究和初步分析[J]. 作物学报, 1997, 23(1): 56—61.

Extraction of Maize Seed DNA and RAPD Analysis

XU Qi fang¹, ZHU Su wen², CHANG Hong¹

(1. School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2. School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The genome of *Zea mays* seeds was respectively extracted from embryo or endosperm by two different kinds of methods (normal method and improving method). The results showed that the genome made of improving method had purer DNA, less RNA, bigger DNA fragments than that of normal method. The genome from embryo or endosperm can meet for RAPD (Random Amplified polymorphic DNA). This experiment provides the RAPD of maize, molecular marker, quality identification with the useful pathway.

Key words: maize; embryo; endosperm; genome; RAPD

(上接第 62 页)

Different Construction for Human c Mpl Ligand Expressed Plasmid and Their Optimizing Strategy for Expression in *Escherichia coli*

ZHANG Qing, GE Yi chen, PAN Rui min, XU Pei lin

(School of Life Sceinces //The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Thrombopoietin (TPO), the major cytokine affecting the proliferation and differentiation of megakaryocytes through its interaction with the c Mpl receptors, is believed to be the major physiological regulator of circulating platelet levels. c Mpl was used as the bait protein to screen human liver cDNA library using a yeast two hybrid system. A clone, *xp1* gene, was obtained. The constructions of expression plasmid pET 28(b) -*xp1*, pBV220-*xp1* and pBAD *g IIIA* -*xp1* were selected by using different promote controlling *xp1* gene expression, then by inducing with IPTG, temperature, arabinose. The biological activity of XP1 protein was measured by culturing colony forming units of murine megakaryocyte (CFU MK). Comparison of these expressions indicates that the solution and the stability of pET 28(b) -*xp1* expression were higher than the others, The solution and the stability of pBV 220 -*xp1* expression were enhanced after induced a little time in the low temperature, but its expression capacity was weaker than that of pET 28(b) -*xp1*, and its activity was decreased. The expression proteins of pBAD *g IIIA* -*xp1* were not secreted to the periplasmic space, which existed in inclusion body and presented no activity.

Key words: c mpl; XP1; expression; solution; stability; activity