

[文章编号] 1007-385X(2002)04-

M-CSF 受体配基结合区基因克隆及其在烟草中的表达

杨应华, 李戈, 郑国光, 林永敏, 饶青, 吴克复(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所, 天津 300020)

* 巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)是一种多功能细胞因子,具有促进单核-巨噬细胞生长、增殖、分化等功能。M-CSF 以可溶型和膜结合型等多种形式存在,在髓细胞白血病、卵巢癌、乳腺癌等肿瘤细胞中高表达。M-CSF 受体(M-CSFR)是原癌基因 *c-fms* 编码的跨膜蛋白。近年来发现血清和尿液中有 M-CSFR 可溶型形式(M-CSF-sR)存在,对 M-CSF 有亲和性,可阻断 M-CSF 介导的生物学效应,外源性 M-CSFsR 对 M-CSF 阳性的肿瘤细胞生长有明显的抑制作用,提示重组人 M-CSFsR 或 M-CSFsR 配基结合区(M-CSF receptor ligand binding region, MRB)在恶性肿瘤的抗细胞因子和导向治疗上有潜在的应用价值^[1-2]。

植物生物反应器具有成本低、无污染等优点,而且植物细胞能对表达的外源蛋白进行翻译后加工,使表达产物具有天然活性^[3]。本研究从人白血病细胞系 J6-1 克隆 MRB 基因,取得转基因植株,为使用植物生物反应器研制受体类药物提供实验线索。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒及主要试剂

质粒 pUC-18、pBI121、*Escherichia coli* DH5 α 、根瘤土壤杆菌 LBA4404、人白血病细胞系 J6-1、烟草 NC-89 均为本实验室保存。限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。T4 DNA Ligase, M-MLV 逆转录酶购自 Invitrogen 公司。

1.2 目的基因的扩增与筛选

根据 M-CSFR 的 cDNA 序列及胞外区的结合功能域,设计 MRB 基因的引物,正向引物 P1 5'-CCATGGGCCCAGGAGTT-3',反向引物 P2 5'-CTAGAGGT-TCTGCTCAGAG-3',提取对数生长期的 J6-1 细胞总 RNA,按说明书方法进行 RT-PCR。用低熔点琼脂糖凝胶电泳法回收 924 bp 的目的片段,与经 Sma I 酶切后的 pUC-18 连接并转化感受态的 DH5 α 宿主菌,筛选阳性克隆,提取质粒,酶切鉴定连接方向正确后,由上海生工生物工程有限公司测序。

1.3 植物表达载体的构建

将带有 MRB 的质粒 pUC-18 和植物表达载体 pBI121 分别用 BamH I 和 Sac I 双酶切,回收 MRB 和载体,进行体外连接,转化感受态 DH5 α ,在 kan^r抗性板上挑选阳性克隆,提取质粒,经酶切鉴定确证后,通过冻融法将植物表达载体 pBI121-MRB 导入根瘤土壤杆菌 LBA4404。

1.4 植物的遗传转化及植株再生

以 60 d 苗龄的烟草无菌苗为实验材料,将无菌苗的幼嫩叶片切成 0.5 cm 的小方块,在根瘤土壤杆菌悬液中浸泡 5~10 min,用无菌滤纸吸干,转移到 MS1 (MS + 6-BA 2 mg/L + IAA 0.5 mg/L)培养基,25 $^{\circ}$ C 暗培养 3 d,再转移到 MS2 (MS + 6-BA 2 mg/L + IAA 0.5 mg/L + kan 200 mg/L + Cb 500 mg/L),光照培养 2~3 周,将 2~3 cm 的抗性芽移到生根培养基中(MS + IAA 0.5 mg/L),1 周后逐渐生根。待小苗长到 5~6 cm 高时,移栽到营养钵中。

1.5 转基因植株的 PCR 和 RT-PCR 检测

按文献[3]的方法进行,以上述 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增,预期 PCR 产物长度为 920 bp 左右。

1.6 烟草蛋白的提取、免疫共沉淀及蛋白印迹

2 g 烟草叶片加液氮磨碎后加入 1 mL 蛋白提取缓冲液[50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5), 50 mmol/L NaCl, 400 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT],匀浆,10 000 r/min 离心 10 min 后,取上清备用,免疫共沉淀及蛋白印迹分析按照文献[4]提供的程序进行。

1.7 ELISA 法检测烟草中的目标蛋白

取 0.5 g 新鲜叶片,放入 2 ml 离心管中,加液氮磨碎,再加入 1 ml 包被液(0.008 mol/l Na₂CO₃, 0.042 mol/l NaHCO₃, pH 8.6),然后用匀浆器匀浆,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按照文献[4]提供的方法进行 ELISA 测定。

2 结果与讨论

有结合功能受体的配基结合区可作为细胞因子的

拮抗剂,对由于细胞因子表达过量造成的肿瘤等疾病有治疗作用^[2]。M-CSF/M-CSFR 的高表达与恶性病态造血、肝癌、卵巢癌和子宫内膜癌等恶性肿瘤相关。因而,作为 M-CSF 拮抗剂的 MRB 对这些恶性肿瘤的治疗有潜在的应用价值。

本实验通过 RT-PCR 方法成功地从人白血病细胞系 J6-1 扩增了 924 bp 的 MRBcDNA,经琼脂糖凝胶电泳鉴定,与预期大小相符。2 次独立 PCR 产物的克隆与测序结果同源性分析显示其 cDNA 序列与文献报道序列的同源性为 99%(GenBanK accession no. x03663),有 3 个点突变。分别是 C84T, G160C, T726C, 其中,第 1、第 3 为同义突变,第 2 个突变为错义突变,由 Ala 变为 Pro,这个突变对 MRB 的结构可能会有影响,是否影响 MRB 与 M-CSF 的亲合力,需要进一步探讨。

分别将 pBII21 和 pUC-MRB 质粒用 BamH I 和 Sac I 双酶切,取 pBII21 酶切后 11.3 kb 的片段,与 pUC-MRB 酶切后的 0.9 kb 的片段经 T4 Ligase 连接,组成植物表达载体,该表达载体携带一个 CaMV-35S 启动子、MRB 基因、Nos 终止子以及用于筛选的标记基因 NptII。载体通过冻融法导入根瘤土壤杆菌用于烟草转化。共获得 40 株抗性苗,随机选取 11 棵抗性植株和 1 棵未转化的对照植株,经 PCR 检测有 9 棵植株扩增出约 920 bp 的目的条带,说明目的基因已整合到烟草基因组中。为验证 MRB 基因在转基因烟草中的转录水平,对 PCR 阳性植株进行了 RT-PCR 检测,有 7 棵植株检测到了与预期大小一致的产物。分别提取 RT-PCR 阳性植株的叶片总蛋白,免疫共沉淀后,Western 印迹分析,都有条带,这说明 MRB 基因在烟草中有表达。

ELISA 测定结果显示有 2 棵植株表达量较高,含量分别为 204 ng/克鲜重和 184 ng/克鲜重,其余 6 棵表达量很低。MRB 基因在烟草中表达量偏低的机理有待研究,本实验直接将 MRBcDNA 导入烟草中表达,没有将其改造成植物偏爱的密码子,可能造成烟草的识别系统对这些 MRB 基因进行甲基化等修饰影响基因转录。如能将 MRB 的 cDNA 改造成植物偏爱的序列,或者在表达载体上加入 AMV 等翻译增强序列,加上特定的信号序列让外源基因定点表达于内质网或者叶绿体可能会提高表达量。以上研究表明 MRB 基因可以在烟草中表达,但要大幅度提高 MRB 的表达量还需要做大量工作。

[关键词] M-CSFR; 基因克隆; 植物表达

[中图分类号] Q753 [文献标识码] A

[参 考 文 献]

[1] Rao Q, Han JS, Geng YQ, *et al.* Serum soluble macrophage colony stimulating factor receptor in leukemia patients[J]. *Haematologica*, 2001, 86: 989-990.

[2] Wu KF, Zheng GG, Rao Q, *et al.* Cellular macrophage colony-stimulating factor and its role[J]. *Hematologica*, 1999, 84(10): 951-952.

[3] 左晓峰, 张晓钰, 掸 龙, 等. 人小肠三叶因子(hITF)基因在生菜中的整合与表达[J]. *植物学报*, 2001, 43(10): 1047-1051.

[4] 沙晓津, 宋玉华, 饶 青, 等. 巨噬细胞集落刺激因子可溶性受体与儿童血液病关系初探[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2002, 11(4): 195-198.

[收稿日期] 2002 - 08 - 12

[修回日期] 2002-11-01

《中华微生物学和免疫学杂志》2003 年征订启事

《中华微生物学和免疫学杂志》为中华医学会主办。1981 年创刊,主要报道医学微生物学和免疫学方面的研究论文、简报、评论、综述、国内外学术动态、书评及消息等。

本刊辟有:细菌学、病毒学、分子微生物学、临床微生物学、疫苗学、感染免疫、基础免疫学、临床免疫学、分子免疫学、免疫遗传学、肿瘤免疫学、中药与免疫、免疫学技术、检测技术等栏目。

本刊为基础医学、生物学两学科的核心期刊,是中国科学引文数据库、中国学术期刊合评价数据、中国医学生物学文献数据(英文版)、中国学术期刊文摘、中国医学文摘等的来源期刊。被美国化学文摘(CA)、生物学文摘(BA)、荷兰医学文摘(EM)、Medline 等国外著名检索期刊收录。

读者对象:医学微生物学和免疫学专业的科研人员、教师及有关的中、高级卫生、防疫、检验工作者。

本刊为月刊,大 16 开本,每期 80 页,每期定价 10.00 元,于每年 11 月开始收订,国内由全国各地邮电局发行。国外由中国国际图书贸易公司(中国国际书店)发行。如错过邮局征订,亦可直接向编辑部订购(款从邮局寄本刊编辑部,邮政编码:100024,电话:010-65756595。E-mail: cjmi@public. bta. net. cn)。

邮发代号: 2-55 国外刊号: BM507