文章编号:1000-5404(2005)15-1551-04

论著

人 sCR1 结合 C3b 结构域基因的克隆及在大肠杆菌中高效表达

罗 雪,汪正清 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要:目的 克隆表达人可溶性补体受体1型(sCR1)结合C3b结构域基因。**方法** 从外周血单核细胞中提取总RNA,RT-PCR克隆编码sCR1-SCR15-18的cDNA,连接pMD-18T载体进行DNA序列分析,再亚克隆pET32原核表达载体,构建pET32-sCR1-SCR15-18重组表达载体,转化BL21菌,用IPTG诱导表达,表达产物通过免疫印迹实验鉴定。**结果** 获得了预期的扩增目的片段,成功构建了pMD-18T重组克隆载体,核苷酸测序结果与GenBank登录的人sCR1-SCR15-18 cDNA序列一致。成功的构建了原核表达载体pET32-sCR1-SCR15-18,目的蛋白的表达量占菌体总蛋白的40%,并在菌体内形成包涵体。免疫印迹实验显示,在分子量约43×10^3处出现单一条带的阳性结果。**结论** 从单核细胞中克隆出sCR1-SCR15-18片段基因,人sCR1-SCR15-18在大肠杆菌中得到高效表达。

关键词: 可溶性补体Ⅰ型受体;反转录多聚酶链式反应;互补DNA克隆;蛋白质表达
中图法分类号: R378.21; R394-33; R394.3 **文献标识码:** A

Cloning and high level expression of gene encoding human sCR1 binding domain in *E. coli*

LUO Xue, WANG Zheng-qing (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone and express the gene encoding the binding domain of human soluble complement receptor type 1 (sCR1). **Methods** sCR1-SCR15-18 cDNA was amplified using RT-PCR from human monocytes of peripheral blood and sequenced using vector pMD-18T. Recombinant pET32-sCR1-SCR15-18 was constructed using prokaryotic expression vector pET32 and transformed into bacterium BL21. IPTG was used to induce gene expression and the obtained expression product was identified by immunoblotting. **Results** The gene segment that specifically encodes sCR1 was synthesized, the sequence of which was consistent with that of sCR1-SCR15-18 cDNA as registered at GenBank. A prokaryotic expression recombinant pET32-sCR1-SCR15-18 was constructed. The amount of target protein accounted for 40% of the total bacterial proteins and inclusion bodies were present in the bacteria. Immunoblotting showed a single positive band at the site of 43×10^3. **Conclusion** The gene encoding sCR1-SCR15-18 was cloned from human monocytes and efficiently expressed in *E. coli*.

Key words: soluble complement receptor 1; reverse transcription-polymerase chain reaction; complementary DNA clone; protein expression

心肌缺血性疾病是威胁人类健康的主要疾病之一,心肌缺血再灌注等炎症损伤是影响治疗结果的主要原因。近年来的研究表明,补体系统的过度活化片段是缺血再灌注损伤的一个重要始动因子[1]。至今尚无一种抗补体人工制剂在特异性和效能方面能满足临床应用的需要。可溶性补体受体1型(soluble complement receptor type 1, sCR1)功能域能与C3b结合,灭活C3/C5转化酶,能在始动部位阻断和调节补体系统的过度活化,抑制经典、旁路、MBL 3个补体激活途径C5a、C5b-9等片段的生成。目前尚未看到结合C3b功能域基因克隆表达方面的研究报道。我们从人外周血单核细胞提取总RNA,用RT-PCR法克隆sCR1-SCR15-18基因片段,目的片段插入pMD18-T中测序,并构建出表达质粒pET32-sCR1-SCR15-18,再转化

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471723);重庆市卫生局基金资助项目(00-2015)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471723) and the Research Foundation of Bureau of Public Health of Chongqing (00-2015)
作者简介: 罗 雪(1976-),女,重庆市人,博士研究生,主要从事感染与免疫方面研究。电话:(023)66968051, E-mail:luoxuecq@hotmail.com
通讯作者: 汪正清,电话:(023)68752242, E-mail:wzq@mail.tmmu.com.cn
收稿日期: 2005-01-10;**修回日期:** 2005-03-28

BL21 菌,用 IPTG 诱导产物表达,免疫印迹实验鉴定。为进一步纯化表达产物和体内外抗炎生物活性研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 克隆质粒 pMD-18T 购自 TaKaRa(大连宝工程有限公司),表达质粒 pET32、大肠杆菌 DH5α 及 BL21(DE3)(由本室保存)。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Nco* Ⅰ、*Sal* Ⅰ及 T4DNA 聚合酶(晶美公司);DNA 标准(北京鼎国公司);质粒抽提试剂盒(美国欧米加公司);RNA Isolatio Solvent 抽提纯化试剂盒(成都天泰公司);小鼠抗人补体受体 1 型单克隆抗体(晶美公司),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(华美公司)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增编码 sCR1-SCR15-18 的 cDNA

1.2.1.1 总 RNA 的抽提 Percoll 密度梯度离心法分离和配制外周血单核细胞,按 RNA Isolatio Solvent 抽提纯化试剂盒说明书提取总 RNA,冻存 -70 ℃备用。用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 抽提的质量,用紫外分光法定量。

1.2.1.2 cDNA 的合成 参照 MMLV 第 1 链 cDNA 合成试剂盒(生工公司)进行 cDNA 第 1 条链的合成。

1.2.1.3 PCR 扩增引物及反应体系 针对目的片段的 1 对引物(P_1、P_2),在引物 P_1 和 P_2 的 5′端分别加入 *Nco* Ⅰ及 *Sal* Ⅰ酶切位点。以 cDNA 第 1 条链为模板,用 PCR 扩增试剂盒(上海生工公司)进行 sCR1-SCR15-18 基因的扩增。置于 PCR 仪中进行 PCR 反应。PCR 反应条件为:94 ℃,10 min;94 ℃,1 min;60 ℃ 40 s;72 ℃,1 min(3 个循环);94 ℃,1 min;50 ℃,40 s;72 ℃,1 min(25 个循环);72 ℃,10 min;10 ℃,保温。

1.2.2 sCR1-SCR15-18 基因的克隆及核苷酸序列测定 将 PCR 扩增产物与 pMD-18T 载体连接,并转化 DH5α 感受态菌。将阳性克隆质粒送由上海博雅公司进行核苷酸序列测定。

1.2.3 原核表达载体 pET32-sCR1-SCR15-18 的构建 通过限制性内切酶 *Nco* Ⅰ及 *Sal* Ⅰ双酶切质粒 pMD18-T-sCR1-SCR15-18 得到目的基因片段,同样经过限制性内切酶 *Nco* Ⅰ、*Sal* Ⅰ的双酶切质粒 pET32,在 T4 连接酶的作用下,16 ℃连接 12 h,转化宿主菌 BL21(DE3),双酶切鉴定阳性克隆。

1.2.4 重组质粒 pET32-sCR1-SCR15-18 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达 将构建好的表达质粒转化宿主菌 BL21,分别加入诱导剂 IPTG 0.1、0.5、1、2 mmol/L 的浓度,1、2、3、4、5、6、7 h;诱导温度:20、25、30、37 ℃的条件下,优化出最佳诱导条件,诱导表达产物进行 SDS-PAGE。

1.2.5 免疫印迹实验 用小鼠抗人补体受体 1 型单克隆抗体作为一抗,用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗,进行免疫印迹实验。

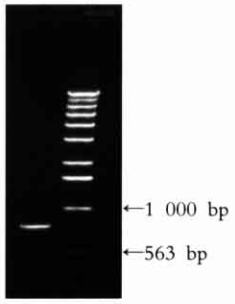
2 结果

2.1 总 RNA 的抽提

$D(260/280)=1.972$。根据 $1D=40$ μg/ml RNA 估算出总 RNA 的量为:1.866 7 μg/μl。总 RNA 经 1% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳,得到高质量的 RNA。

2.2 RT-PCR 扩增 sCR1-SCR15-18 cDNA 结果

RT-PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳鉴定显示,扩增产物为 753 bp,结果见图 1。



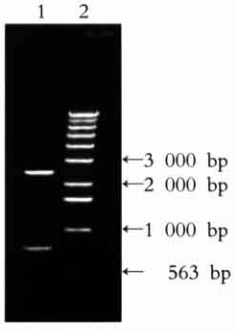
1: RT-PCR product; 2: DNA marker

图 1 RT-PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 1 1% agarose gel electrophoresis of sCR1-SCR15-18 cDNA RT-PCR product

2.3 sCR1-SCR15-18 的克隆

将 RT-PCR 扩增的基因片段与 pMD18-T 载体连接,并转化至大肠杆菌 DH5α 中,经氨苄青霉素与蓝白斑筛选,抽提质粒行双酶切后能够分别得到目的片段与 pMD18-T 载体的白斑质粒为阳性转化子。阳性转化子经 *Nco* Ⅰ + *Sal* Ⅰ酶切后,琼脂糖凝胶电泳结果可见大小约 753 bp 的目的片段以及片段大小为 2 692 bp 的 pMD18-T,见图 2。



1: The recombinant pMD18-T-sCR1-SCR15-18 by enzyme digestion; 2: DNA marker

图 2 pMD18-T-sCR1-SCR15-18 酶切产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig 2 1% agarose gel electrophoresis of pMD18-T-sCR1-SCR15-18 by enzyme digestion

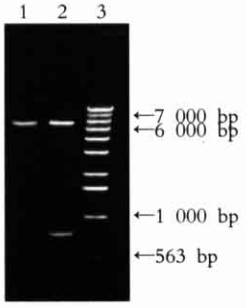
2.4 核苷酸序列测定结果

所获得的 sCR1-SCR15-18 序列与预期的 sCR1-SCR15-18 cDNA 序列完全一致。将其命名为 pMD18-T-sCR1-SCR15-18。

2.5 原核表达载体的构建及酶切鉴定结果

将质粒 pMD18-T-sCR1-SCR15-18 经限制性内切酶 *Nco* Ⅰ、

Sal Ⅰ双酶切的产物，定向插入经同样双酶切的 pET32 载体中，获得重组质粒命名为 pET32-sCR1-SCR15-18。经限制性内切酶 *Nco* Ⅰ、*Sal* Ⅰ双酶切后重组质粒电泳，可见约 753 bp 的目的基因片段和约 6 000 bp 的载体片段，见图 3。



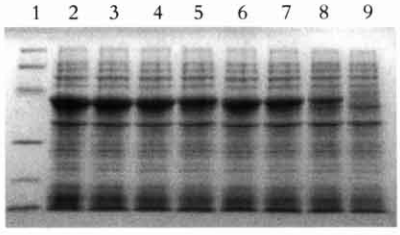
1：pET32 by single enzyme；2：Recombinant vector by enzymes；3：DNA marker

图 3　重组表达载体酶切产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果图

Fig 3　Agarose gel electrophoresis of recombinant vector by enzyme digestion

2.6　重组质粒 pET32-sCR1-SCR15-18 的表达

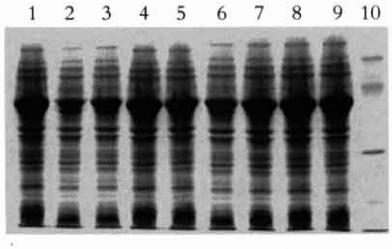
SDS-PAGE 分析显示，蛋白表达量的最佳表达条件是诱导温度 37 ℃、IPTG 的诱导终浓度 1 mmol/L 和 4 h 的诱导时间。蛋白的分子量为 43×10^3，与预期的分子量吻合。经凝胶扫描分析，重组蛋白占总菌体蛋白的 40%，见图 4、5。



1：Protein molecular weight marker；2 - 8：BL21/pET32-sCR1-SCR15-18 induction from 1 to 7 h；9：Before BL21/pET32-sCR1-SCR15-18 induction

图 4　不同时间诱导后蛋白表达的 SDS-PAGE

Fig 4　SDS-PAGE analysis of recombinant protein in different time



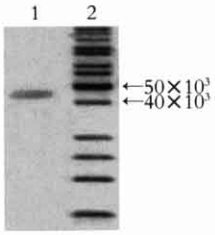
1：Total tropina in the optimal condition；2 - 5：Total tropina when IPTG final concentration is 0.1，0.5，1 and 2 mmol/L；6 - 9：Total tropina at 20，25，30，37 ℃；10：Protein molecular weight marker

图 5　最佳诱导条件的确定

Fig 5　SDS-PAGE analysis to ensure the optimal condition

2.7　表达蛋白的免疫印迹分析

结果显示，在 1 泳道的 43×10^3 处出现明显阳性反应带，证明表达出的蛋白是所构建的目的蛋白，见图 6。



1：pET32-sCR1-SCR15-18/BL21 expression；2：Protein molecular weight marker

图 6　重组质粒表达产物的蛋白质免疫印迹

Fig 6　Western blotting of recombinant plasmid expression product

3　讨论

补体受体 1 型（complement receptor type 1，CR1）是一种糖蛋白，分布于多种细胞表面[2]。sCR1 是 CR1 的胞外片段，保留了抑制补体活化作用等功能单位。sCR1 结合 C3b 功能域片断（SCR15-18）既可灭活 C3/C5 转化酶，又能结合 C3b，抑制 C5a、C5b - 9 等片断的生成。根据文献报道，补体受体 1 型在人外周血单核细胞有高水平的表达，因此，我们从外周血白细胞中提取了总 RNA。采用 RT-PCR 法扩增 cDNA 时，模板的制备是关键。为了获得高质量的模板，必须保证整个操作过程中每一个环节均应无 RNA 酶存在，在整个操作过程中操作速度应迅速；采用了快速提取高质量 RNA Isolation Solvent 试剂盒；紫外分光光度计检测鉴定。结果证实，我们获得了高质量的 RNA。

近年来，国外学者研制的 sCR1 已用于动物保护实验[3,4]，但均为 CHO 细胞表达，其产量不高造成生产成本过高，使 sCR1 制品的临床应用研究受到限制。文献[5，6]报道，有糖基化修饰的真核细胞蛋白在原核细胞表达的产物有生物活性，从 CR1 的 N-末端截取 3 个 SCR 于大肠杆菌中表达，将表达产物复性后仍然能够具有抑制补体活性的功能[7,8]。这为原核表达活性产物的途径提供了实验依据。所以，考虑到外源性基因的表达水平、产量和产物纯化的方便，我们探索用原核表达系统来提高产量。

为了使目的蛋白在大肠杆菌中获得高水平的表达，除了选择理想的表达载体和宿主菌外，还需优化其诱导条件。我们首先对 IPTG 浓度、诱导温度、诱导时间进行了分析。观察了 4 个不同剂量 IPTG 时的表达情况，发现随着 IPTG 浓度的增加目的蛋白的表达量升高，当

IPTG 终浓度为 1 mmol/L 时，目的蛋白的表达量最高，而在 2.0 mmol/L 时，目的蛋白的表达量有所下降。诱导时间对目的蛋白的表达水平也有较为明显的影响，诱导 4 h 后，表达量达到最大值，进一步延长诱导时间，目的蛋白的表达无明显增加，我们选择了 4 个温度进行比较，结果显示 37 ℃时外源蛋白的表达量最高，低温（如 20 ℃）表达会抑制包涵体的形成，使分泌形式的外源蛋白增加，但由于低温时表达量太低而不适合采用。因此，在 37 ℃、IPTG 终浓度 1 mmol/L 和 4 h 诱导时间的条件下，重组蛋白获得了较好的表达。Western blot 分析，在分子量约 43×10^3 处出现明显的单一条带，说明表达出的蛋白是所构建的目的蛋白。

参考文献：

[1] Stahl G L, Xu X, Hao L, *et al*. Role for the alternative complement pathway in ischemia/reperfusion injury [J]. Am J Pathol, 2003, 162 (2): 449 - 455.

[2] Noriyuki I, Hisamune K, Wang P C. Observation by electron microscopy on recombinant soluble human complement receptor type 1 (sCR1) and its derivative, aglyco-sCR1, from CHO cells [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2003, 33 (4): 482 - 487

[3] Mizuno M, Nishikawa K, Okada N, *et al*. Soluble complement receptor type 1 protects rats from lethal shock induced by anti-Crry antibody following Lipopolysaccharide priming [J]. Int Arch Allergy Immunol, 2002, 127 (1): 55 - 62.

[4] Azimzadeh A, Zorn G L 3rd, Blair K S, *et al*. Hyperacute lung rejection in the pig-to-human model. 2. Synergy between soluble and membrane complement inhibition [J]. Xenotransplantation, 2003, 10 (2): 120 - 131.

[5] 叶 飞，李卓娅，尹丙姣，等. 人可溶性 TNF 受体（sTNFRI）在大肠杆菌中的表达及其活性鉴定[J]. 中国免疫学杂志，2002，18 (11): 743 - 746.

[6] 朱晗玉，陈香美，何娅妮，等. 人钠/二羧基转运蛋白 2 融合蛋白载体的构建及其原核表达[J]. 军医进修学院学报，2004，25(1): 47 - 49.

[7] Dodd I, Mossakowska D E, Camilleri P, *et al*. Overexpression in Escherichia coli, folding, purification, and characterization of the first three short consensus repeat modules of human complement receptor type 1 [J]. Protein Expr Purif, 1995, 6 (6): 727 - 736.

[8] Mossakowska D, Dodd I, Pindar W, *et al*. Structure-activity relationships within the N-terminal short consensus repeats (SCR) of human CR1 (C3b/C4b receptor, CD35): SCR 3 plays a critical role in inhibition of the classical and alternative pathways of complement activation [J]. Eur J Immunol, 1999, 29 (6): 1955 - 1965.

（编辑 陈聪连）

（上接 1550 页）

3 讨论

糖皮质激素是由肾上腺皮质束状带分泌的甾体激素，在机体的代谢和应激等过程中起着重要的作用。体外实验表明，糖皮质激素通过增加离体培养的子宫平滑肌组织中的前列腺素水平而增加子宫的收缩力[2]，孕晚期妇女糖皮质激素通过促进胎盘合成和分泌促肾上腺皮质激素释放激素，调节前列腺素的代谢，增加前列腺素的水平而参与分娩[3]，并促进胎儿合成更多的硫酸脱氢表雄酮（DHEA-S），后者作为胎盘合成雌激素的底物，雌激素的增加，能促进引起子宫收缩的物质如缩宫素，前列腺素，缩宫素受体的增加及缝隙连接的形成[4]，因而糖皮质激素被认为是启动分娩的关键性激素[5]。正常人血清中的糖皮质激素每日有着周期性的变化，上午高于下午。妊娠晚期糖皮质激素主要来源于母体及胎儿的下丘脑-垂体-肾上腺轴。Bell 等[6]发现妊娠晚期胎羊下丘脑-垂体-肾上腺轴无周期性的变化，但在分娩前 3 d，胎羊血清中的可的松含量明显升高。本研究提示，在无宫缩组，血清及羊水中的糖皮质激素含量上午明显高于下午，推测妊娠晚期母血中的糖皮质激素主要来自母体的肾上腺，并且有节律性的变化。在宫缩正常组及宫缩乏力组血清及羊水中的糖皮质激素上下午比较，均无统计学意义。一方面可能是在临产后，胎儿下丘脑-垂体-肾上腺轴的活性加强[7]，另一方面由于宫缩阵痛导致母体的应激反应，大量的雌激素、睾酮对糖皮质激素的正反馈作用，致糖皮质激素的合成增加。由于母体和胎儿合成高浓度的糖皮质激素，致该激素在临产后失去了节律性，高浓度的糖皮质激素加强了宫缩[1,7]。因此，糖皮质激节律性的改变，与临产宫缩的启动关系密切。

关键词：糖皮质激素；分娩启动

中图法分类号：R714.12　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] Challis J R G. Mechanism of parturition and preterm labor[J]. Obstet Gynecol Surv, 2000, 55(10): 650 - 660.

[2] Morimoto K, Oku M. Effect of progesterone, cortisol and dehydroepiandrosterone-sulfate on prostaglandin production by cultured human myometrial cells[J]. Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi, 1995, 47 (4): 391 - 397.

[3] 李东至，黄 婉. 早产发生机制的研究进展[J]. 国外医学妇幼保健分册，2002，13(1): 1 - 3.

[4] Majzoub J A, Karalis K P. Placental corticotropin-releasing hormone: function and regulation[J]. Am J Obstet Gynecol, 1999, 180(1 Pt 3): S242 - S246.

[5] Chaim W, Mazor M. The relationship between hormones and human parturition[J]. Arch Gynecol Obstet, 1998, 262(1 - 2): 43 - 51.

[6] Bell M E, Wood C E. Do plasma ACTH and cortisol concentrations in the late-gestation fetal sheep vary diurnally[J]? J Dev physiol, 1991, 15(5): 277 - 282.

[7] 何 平，孙 刚. 分娩启动分子机制研究的新进展[J]. 现代妇产科进展，2002，11(3): 218 - 220, 223.

（编辑 薛国文）