DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.042
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1224 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1224-03

中国人膜结合型干细胞因子cDNA的克隆及初步表达

李渝萍,李蓉芬,周建新 (第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 获得干细胞因子的cDNA以利于进一步对干细胞因子的重组表达进行研究。方法 利用RT-PCR技术,从中国妇女早期妊娠的蜕膜和绒毛膜组织总RNA中扩增得到660 bp的干细胞因子cDNA,克隆入质粒pGEM-4z载体构建了pGSM重组质粒,将已测定序列的cDNA亚克隆入pET-11c质粒,得到干细胞因子的重组表达质粒pESM。结果 证实所获序列是外显子6缺失的膜结合型干细胞因子cDNA,且其分子量与预期的一致。结论 成功克隆了膜结合型干细胞因子的cDNA。

关键词:干细胞因子;分子克隆;序列测定;基因表达
中图法分类号:Q785 文献标识码:A

Cloning and expression of cDNA encoding human membrane-bound stem cell factor (SCF)

LI Yu-ping, LI Rong-fen, ZHOU Jian-xin (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To obtain a recombinant plasmid of stem cell factor for further study on the expression of membrane-bound SCF. Methods A 660 bp cDNA encoding human membrane-bound SCF was amplified from normal chorionic and decidual tissues of a Chinese woman at the early stage of pragnancy by RT-PCR. This PCR product was inserted into plasmid vector pGEM-4z, to reconstructed a new plasmid pGSM. Having been identified the sequence, the cDNA was then subcloned into the expression vector pET-11c, and a recombinant expression plasmid pESM was obtained. Results The product was proved to be the cDNA of SCF with loss of exon 6 and confirmed by sequencing. The actual molecular weight of the expression product was coincided with the expected value. Conclusion The cDNA of membrane-bound SCF is cloned successfully.

Key words: stem cell factor (SCF); molecular cloning; DNA sequencing; gene expression

干细胞因子(Stem cell factor, SCF)又名肥大细胞生长因子(Mast cell growth factor, MGF)、Steel因子(Steel factor, SLF)或Kit配体(Kit ligand, KL),是1990年才发现的一种新型多功能细胞因子[1,2],由小鼠Steel基因所编码,是小鼠白斑(White, W)位点原癌基因c-kit所编码酪氨酸激酶受体c-Kit的配体,能作用于早期造血干/祖细胞,在肥大细胞、生殖细胞和色素细胞的发育中起着重要的作用。SCF可单独或协同多种细胞因子,如IL-1, IL-3, GM-CSF, G-CSF, IL-6等调控各谱系造血细胞的生长和发育,在辐射防护、放化疗病人造血机能恢复和基因治疗等方面具有广泛的应用前景[3]。为进一步对SCF的重组表达进行研究,我们以中国妇女妊娠早期的蜕膜及绒毛膜作为组织来源,完成了膜结合型SCF cDNA的克隆及序列分析,并进行了初步表达的研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与载体

克隆载体pGEM-4z质粒和JM109大肠杆菌由本室保存;BL21(DE3)菌株、表达载体pET-11c质粒由周度金教授惠赠。

1.2 组织标本

中国妇女早期妊娠蜕膜及绒毛膜组织由西南医院门诊手术室提供。

1.3 酶及主要生化试剂

RNA抽提一步法试剂RNAzol由钟维国教授惠赠;M-MLV反转录酶,RNAsin,T7测序试剂盒购自Promega公司;TagDNA聚合酶,4种dNTP,T4连接酶购自上海生工公司;PCR引物由上海生工公司合成;*EcoR*Ⅰ,*Sac*Ⅰ,*Pst*Ⅰ,*Nde*Ⅰ,*BamH*Ⅰ,DNaseⅠ,RNase购自宝灵曼公司;α-^{32}P-dATP购自北京亚辉生物制品公司。

1.4 组织总RNA的提取及纯化

采用RNAzol一步法抽提组织总RNA,方法参照说明书进行。用不含RNase的DNase Ⅰ去除其中可能污染的DNA。

1.5 PCR引物设计

参考文献[2,4]进行设计。在引物的两端引入*Sac*Ⅰ/*Nde*Ⅰ和*BamH*Ⅰ酶切位点。*Sac*Ⅰ和*BamH*Ⅰ酶切位点可以方便目的片段插入pGEM-4z质粒的多克隆位点中,*Nde*Ⅰ位点的引入则为进一步将cDNA克隆入pET系列表达质粒提供了方便。

P1:5'-GAGCTC *ATATG* AAG AAG ACA CAA ACT-3'
(正向引物)*Sac*Ⅰ *Nde*Ⅰ

P2:5'-GGATCC CAC TTC TTG AAA CTC TCT-3'
(反向引物)*BamH*Ⅰ

两个引物之间的序列则是SCF从信号肽后至终止密码之

作者简介:李渝萍(1969-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事基因表达及调控方面的研究。电话:(023)68752261

收稿日期:2000-11-13;修回日期:2001-03-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

间的序列。

1.6　RT-PCR 反应

1.6.1　RT 反应　　以去除 DNA 的总 RNA 为反转录反应的模板, 寡聚 dT 为引物, 在 M-MLV 反转录酶的作用下 37 ℃反应 1 h, 反转录总 RNA 中的 mRNA 序列得到总 cDNA。

1.6.2　PCR 反应　　以总 cDNA 为模板, P1、P2 为引物依以下条件进行 PCR 反应(缓冲液中 Mg^{2+}浓度为 1.5 mmol/L): 94 ℃变性 1 min; 55 ℃退火 1 min; 72 ℃延伸 1 min; 循环 35 次。

1.7　重组质粒 pGSM 的构建及筛选

*Sac*Ⅰ/*BamH*Ⅰ 双酶切分别处理 pGEM-4z 质粒和扩增片段, 用 T4 DNA 连接酶连接载体及目的片段。连接产物转入 JM109 感受态细胞中, 于含氨苄青霉素的 LB 平板上 37 ℃培养过夜。

随机挑选平板上的抗氨苄阳性克隆, 提取质粒 DNA, 挑选分子量大于空载体 pGEM-4z 的质粒, 进一步以其为模板, P1、P2 为引物进行 PCR 反应, 筛选能扩增到目的条带的阳性重组质粒。根据已知的载体及目的基因上的酶切位点, 用内切酶进行重组质粒酶切图谱分析, 鉴定阳性重组质粒, 命名为 pGSM。

1.8　重组质粒 pGSM 的序列测定

大量抽提 pGSM 质粒, 经 PEG 法纯化后, 用 T7 测序试剂盒测定序列, α-^{32}P-dATP 标记测序引物。

1.9　重组表达质粒 pESM 的构建及筛选

用 *Nde*Ⅰ/*BamH*Ⅰ 分别酶切 pGSM 和 pET-11c 质粒, 连接目的片段和载体片段, 连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞。

挑选质粒分子量大于 pET-11c 的阳性克隆, 用 *Nde*Ⅰ/*BamH*Ⅰ 酶切筛选出有插入片段的阳性重组子, 小量提取质粒, 用内切酶谱分析和 SCF 特异性引物 P1、P2 进行 PCR 扩增, 鉴定重组质粒, 命名为 pESM。

1.10　pESM 在大肠杆菌中的初步表达

pESM 转化入 BL21(DE3)大肠杆菌表达菌株的感受态细胞中, LB 液体培养基培养, 用 2 mmol/L 的 IPTG 诱导目的基因的表达。培养物用 SDS 上样缓冲液变性后进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色。

2　结果

2.1　RT-PCR 结果

为防止 RNA 的降解没有对血管丰富的组织标本进行灌注清洗, 因此, 血细胞中有较高含量的可溶型 SCF mRNA 也会被扩增, 所以 RT-PCR 结果可见分子量标准 700 bp 左右有两条带, 亮度较强的条带为 SCF^{248}扩增后形成的, 较弱的条带即 677 bp (含两端设计的克隆位点)的膜结合型 SCF^{220}目的条带, 见图 1, 小心回收目的条带。

2.2　重组质粒的序列测定结果

测序反应产物用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 放射自显影后与文献发表的序列对照, 发现 149～177 位氨基酸残基构成的外显子 6 由一个甘氨酸残基(密码子为 GGG)所取代, 证实获得的是外显子 6 缺失的膜结合型 SCF 的 cDNA。同时发现有两处碱基改变以前未见报道: 编码第 166 位丙氨酸的密码子第三位碱基不是 A 而是 G, 见图 2, 编码第 203 位谷氨酸的密码子第三位碱基不是 G 而是 A。

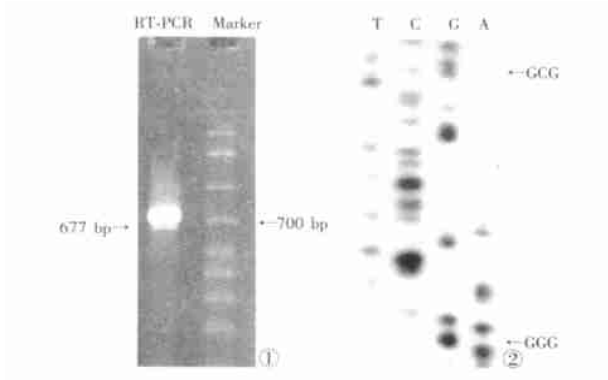


图 1　RT-PCR 产物(1.2%琼脂糖凝胶电泳)

Fig 1　Product of RT-PCR (1.2% agarose)

图 2　外显子 6 的缺失和^{166}Ala 密码子的改变

Fig 2　Lacking of exon 6 and variation of the codon of ^{166}Ala

2.3　pGSM 重组质粒的内酶切谱分析结果

已知目的基因第 96、340 bp 处有 *Pst*Ⅰ, *EcoR*Ⅰ 酶切位点, 无 *Hind*Ⅲ位点, 载体 pGEM-4z 的多克隆位点也已经知道。重组质粒用 *Hind*Ⅲ能切成线性分子, *EcoR*Ⅰ 能切出 350 bp 的片段; 用 *Sac*Ⅰ/*BamH*Ⅰ 能切出同目的条带同样大小的 660 bp 的片段; 用 *Pst*Ⅰ 能切出 668 bp 的条带; 用 *Nde*Ⅰ 能切出 256 bp 的片段, 也证明了 *Nde*Ⅰ 位点已正确引入, 见图 3。

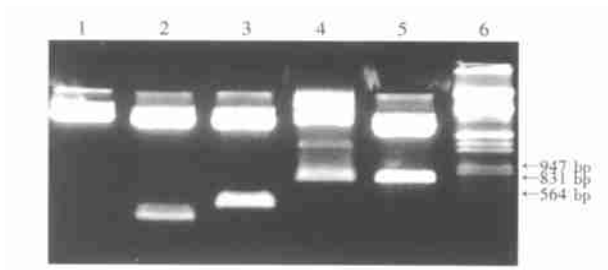


图 3　pGSM 的酶切鉴定

Fig 3　Identification of pGSM by digestion of restriction endonuclease

1: pGSM/*Hind*Ⅲ; 2: pGSM/*Nde*Ⅰ; 3: pGSM/*EcoR*Ⅰ; 4: pGSM/*Sac*Ⅰ + *BamH*Ⅰ; 5: pGSM/*Pst*Ⅰ; 6: Marker: λ/*EcoR*Ⅰ + *Hind*Ⅲ

2.4　pESM 在大肠杆菌中的初步表达

pESM 用 IPTG 诱导表达 3 h 产物与未诱导产物和对照 pET-11c 空质粒诱导和未诱导的产物各取同等的量进行 SDS-PAGE。结果用考马斯亮蓝染色后, 可见 m-SCF 表达菌株有一明显较高表达的蛋白产物。通过和分子量标准比较, 计算出该条带的分子量约 26×10^3, 与预期 220 个氨基酸组成的膜结合型 SCF 分子量一致, 见图 4。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

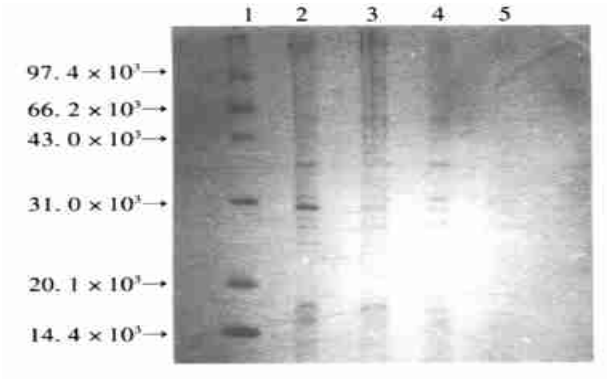


图 4 SDS-PAGE 鉴定诱导表达产物分子量

Fig 4 Determination of molecular weight of induced products by SDS-PAGE

1: Marker; 2: pESM induced; 3: pESM not induced; 4: pET-11c induced; 5: pET-11c not induced

3 讨论

SCF 定位于鼠染色体 10 上的 steel 位点，人染色体 12q22－12q24 上。人 SCF mRNA 全长 5.4 kb，包括一个短的 197nt 的 5' 非翻译区（Untranslated region, UTR），一个 819nt 的开放读框和一个 4432nt 的 3'-UTR[5]。SCF 819nt 的开放读框共编码 273 个氨基酸，由 25 个氨基酸组成的信导肽，189 个氨基酸胞外区，23 个疏水氨基酸组成的跨膜区和 36 个氨基酸的胞内区所组成，共 8 个外显子，其中外显子 6 编码胞外区近膜端的蛋白水解位点[2,3]。

由于 SCF 在 mRNA 水平的不同剪切，现已发现至少两种类型的 SCF：SCF^{248} 和 SCF^{220}。完整的 SCF 为 SCF^{248}，是由胞外区（189 个氨基酸组成）、跨膜区（23 个疏水氨基酸组成）和胞内区（36 个氨基酸组成）所构成的跨膜蛋白，在近膜处由外显子 6 编码蛋白水解位点。完整蛋白形成后可很快水解，形成可溶型 SCF；SCF^{220} 外显子 6 缺失，这一段氨基酸序列由一个甘氨酸残基所取代，不能形成蛋白剪切位点，不能水解出可溶形式，而形成膜结合型 SCF[3,5]。

两种 SCF 在不同组织中含量有差异。妊娠早期的蜕膜及绒毛膜组织中，膜结合型 SCF^{220} 含量明显高于妊娠后期[6]，因此，我们选取易于取得的蜕膜及绒毛膜组织作为组织来源。

进一步的研究发现，两种 SCF 活性存在差异，膜结合型 SCF 在体外及体内对其 c-kit 受体酪氨酸激酶活性的刺激作用更强，更持久，与可溶型 SCF 相比，体内及体外实验中均显示对造血祖细胞系显著增强的分化能力，对肥大细胞的刺激作用却更小[7,8]，因此，是更有应用前景的一种形式。

在我们的研究中发现所得到的膜结合型 SCF 的序列与国外文献报道中的序列有两处碱基的差异，导致出现两处原因尚不清楚的同义密码，分别是 166 位丙氨酸密码子 GCA→GCG，203 位谷氨酸密码子 GCG→GCA。密码子的简并性在进化学上具有重要意义，进化过程中，蛋白质是相对较稳定的，不同种属和组织对氨基酸密码子存在偏性选择，国外文献报道的人 SCF 序列均来自对西方人细胞株 cDNA 的测定，而我们应用的是中国人的正常组织 cDNA，人种或组织的差异可能导致密码子选择的不同。由于 Taq DNA 聚合酶缺乏校正功能，也不能排除错配的可能。我们在实验中已考虑到 Taq DNA 聚合酶错配的频率随 dNTP 和 Mg^{2+} 浓度升高而升高这一因素，尽可能使用较小的工作浓度。本实验中发现的碱基改变的原因尚待确定，但并未影响所编码的氨基酸，对进一步研究重组膜结合型 SCF 的表达并无影响。

天然表达的 SCF 为酸性糖蛋白，其糖基化位点在文献中已有详细描述，但糖基并非其生物学活性所必需[2]，因此，用简单的原核系统表达的基因工程重组蛋白具有和天然形式相同的活性。本实验应用了 BL21(DE3)/pET-11c 系统对重组的膜结合型 SCF cDNA 基因进行了初步的表达，得到了分子量与目的蛋白基本一致的表达蛋白。这进一步证实所得到的是完整的膜结合型 SCF 的 cDNA 序列。优化表达条件，提高表达效率，进一步对表达蛋白进行分离纯化并进行活性分析有待以后工作的进行。

参考文献：

[1] Owen N. Steel locus defines new multipotent growth factor[J]. Cell, 1990, 63(1): 5－6.

[2] Martin F H, Suggs S V, Langley K E, *et al*. Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor cDNAs[J]. Cell, 1990, 63(1): 203－211.

[3] Broudy V C. Stem cell factor and hematopoiesis[J]. Blood, 1997, 90(4): 1 345－1 364.

[4] Okajima T, Goto S, Tanizawa K, *et al*. Cloning, sequencing and expression in escherichia coli of cDNA encoding porcine brain UMP-CMP kinase [J]. J Biochem (Tokyo), 1995, 117(5): 980－986.

[5] Anderson D M, Lyman S D, Baird A, *et al*. Molecular cloning of mast cell growth factor, a hematopoietin that is active in both membrane bound and soluble forms[J]. Cell, 1990, 63(1): 235－243.

[6] Saito S, Enomoto M, Sakakura S, *et al*. Localization of stem cell factor (SCF) and c-kit mRNA in human placental tissue and biological effects of SCF on DNA synthesis in primary cultured cytotrophoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 205(3): 1 762－1 769.

[7] Miyazawa K, Williams D A, Gotoh A, *et al*. Membrane-bound steel factor induces more persistant tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encode protein than its soluble form[J]. Blood, 1995, 85(3): 641－649.

[8] Kapur R, Majumdar M, Xiao X, *et al*. Signaling through the interaction of membrane-restricted stem cell factor and c-kit receptor tyrosine kinase: genetic evidence for a differential role in erythropoesis[J]. Blood, 1998, 91(3): 879－889.

（编辑 郭建秀）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net