

表达血型糖蛋白 A 和带 3 蛋白膜段基因的杆状病毒转移载体的构建*

傅国辉¹ 李宏涛¹ 秦 勇² 杜洪清¹ 刘 明³ 孔宪刚³

1. 哈尔滨医科大学 病理生理学教研室, 哈尔滨 150086; 2. 哈尔滨市职工医院, 哈尔滨 150041;
3. 中国农业科学院 哈尔滨兽医研究所生物技术国家重点实验室, 哈尔滨 150001

摘要 用 RT-PCR 方法从 K562 细胞中扩增了 410 bp 的血型糖蛋白 A 基因, 以含有带 3 蛋白全长基因的质粒为模板扩增了 1.5 kb 的带 3 蛋白膜段基因, 分别克隆到 pMD18-T 载体上, 筛选到阳性重组子 pMD18-T-GPA 和 pMD18-T-B3m. 再将基因分别亚克隆到杆状病毒转移载体 pBlueBacHisB 中, 随机筛选得到重组病毒转移载体 pBacGPA 和 pBacB3m, 为表达和进一步研究血型糖蛋白 A 和带 3 蛋白的相互关系打下基础.

关键词 血型糖蛋白 A 带 3 蛋白 杆状病毒

血型糖蛋白 A(GPA)和带 3 蛋白是存在于红细胞膜上的 2 种重要的膜蛋白质, 两者分别占红细胞膜蛋白质总量的 25%^[1,2]. 近几年的研究表明, 两者在结构与功能上具有密切的关系^[3~5]. 带 3 蛋白由 2 个结构域组成, N-结构域位于细胞浆内, 通过锚蛋白与细胞内的骨架蛋白结合; C-结构域 14 次贯穿红细胞膜, 是 Cl^- - HCO_3^- 交换的活性场所. 由 32 个氨基酸残基组成的 C-末端的尾部, 理论上应该游离于细胞浆内, 因为它主要由亲水性氨基酸组成^[4]. 但我们的研究发现, 虽然它有 2 个胰蛋白酶的位点, 但胰蛋白酶能够切断 N-末端却不能切断 C-末端^[5,6]. 同时也发现, 一种新活性的蛋白酶可被带 3 蛋白 C-末端激活, 然后特异地切断血型糖蛋白 A L118-S119 肽键. 因此我们推测, 在红细胞膜的自然状态下, 3 者在结构与功能上相互影响.

本研究构建了血型糖蛋白 A 和带 3 蛋白膜段(B3m)基因的杆状病毒转移载体, 为表达和进一步研究两者的相互关系打下基础.

1 材料和方法

1.1 K562 细胞的培养

K562 细胞系由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所提供. 将 K562 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI 1640(Gibco)培养基中, 在 5% CO_2 , 37℃ 条件下培养. 待细胞总数达 10^9 以上时, 收获细胞.

2000-12-11 收稿, 2001-01-22 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号:39970291)

1.2 血型糖蛋白 A RNA 的提取及反转录

收集增殖状态 K562 细胞 10 mL, 以 1500 g 离心 10 min, 按 Trizol Reagent 使用说明书提取 RNA. 20 μ L 反转录体系中含约 0.1 μ g RNA, 25 pmol GPA 下游引物(序列为 5'-GACACTTGTCT-GCAGTTTCTATTTCAAC-3'), 72 $^{\circ}$ C 水浴 5 min, 冰浴 5 min, 依次加入 5 \times RT 缓冲液 4 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, 1 mmol/L DIT 1 μ L, RNase 1 μ L, M-MLV RT 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h, 反转录完成后于 96 $^{\circ}$ C 5 min 灭活反转录酶.

1.3 血型糖蛋白 A 基因与带 3 蛋白膜段基因的扩增和克隆

根据已发表的血型糖蛋白 A 与带 3 蛋白膜段基因序列, 分别设计两对引物. 血型糖蛋白 A 基因上游引物为 5'-TAGAGATTAGATGTCAGCATCAAGTAC-3', 下游引物为 5'-GACACTTGTCT-GCAGTTTCTATTTCAAC-3'. 以血型糖蛋白 A 反转录产物为模板进行 PCR. 按下列条件进行 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共进行 35 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. 带 3 蛋白膜段基因上游引物为 5'-CGCGGATCCATGTACCCCTATT-3', 下游引物为 5'-GGGAGATCTCCCGCCCCTCACAC-3'. 含带 3 基因的重组质粒 pRGB4 由加拿大阿尔伯塔大学生化研究室 Joseph Casey 教授惠赠. 以带 3 全长 cDNA 为模板进行 PCR. 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共进行 35 个循环, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 产物经电泳后在紫外灯下观察片段大小. 上述 PCR 产物纯化后, 直接连接至 pMD18-T 载体上^[7].

1.4 血型糖蛋白 A 和带 3 蛋白膜段基因亚克隆

1.4.1 杆状病毒转移载体的处理 纯化的杆状病毒转移载体 pBlueBacHisB 用 *Bam*H I 酶切、纯化, 去磷酸化后的载体溶于 Tris-EDTA 溶液中, 20 $^{\circ}$ C 保存备用.

1.4.2 血型糖蛋白 A 基因和带 3 蛋白膜段基因与转移载体的连接和鉴定 将已测序的阳性质粒用 *Bam*H I 酶切后, 将血型糖蛋白 A、带 3 蛋白膜段基因片段与转移载体在 T_4 DNA 连接酶催化的条件下进行连接反应, 得阳性重组子分别命名为 pBacGPA 和 pBacB3m. 提取质粒后进行酶切鉴定和 PCR 鉴定.

1.4.3 阳性重组杆状病毒转移载体的测序 采用杆状病毒转移载体通用引物进行测序, 由大连宝生物工程公司进行. 测序用引物 N598-02 序列如下: 5'-AAATGATAACCATCTCGC-3'.

2 结果和讨论

2.1 血型糖蛋白 A 基因转移载体的构建

血型糖蛋白 A cDNA RT-PCR 扩增结果见图 1. pBacGPA 重组质粒鉴定结果见图 2.

以杆状病毒转移载体的测序通用引物, 测定重组子 pBacGPA 的序列, 结果表明构建的 pBacGPA 转移载体阅读框架正确.

2.2 带 3 蛋白膜段转移载体的构建

带 3 蛋白膜段基因的 PCR 扩增结果见图 3. pBacB3m 重组子的鉴定见图 4.

以杆状病毒转移载体通用测序引物 N598-02 测定重组子 pBacB3m 的序列, 测序结果表明构建的带 3 蛋白膜段基因转移载体阅读框架正确.

自从 1983 年 Smith 和 Summer 首次使用杆状病毒表达载体系统表达人 β -干扰素以来, 因该系统表达量高, 后加工系统完备, 使用安全而被人们所青睐, 到目前为止已表达了数百种生物

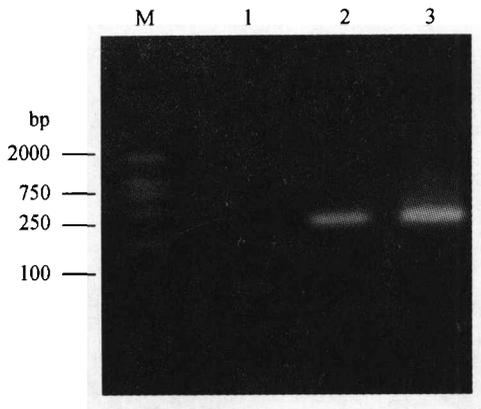


图 1 血型糖蛋白 A cDNA RT-PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果
M, DNA 标准; 1, 阴性对照(无模板); 2, 3, 血型糖蛋白 A cDNA RT-PCR 产物

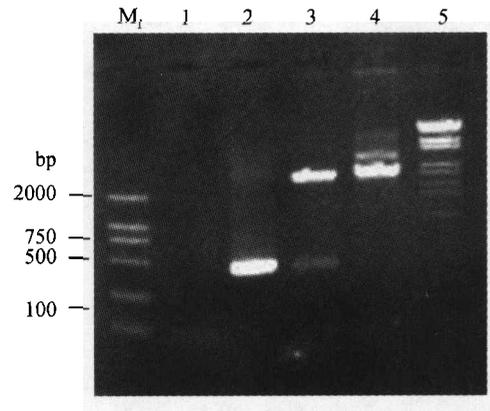


图 2 pBacGPA 重组质粒酶切及 PCR 鉴定
M₁, DNA 标准(DL2000); 1, PCR 阴性对照(无模板); 2, 重组质粒鉴定 PCR; 3, 重组质粒酶切鉴定; 4, pMD18-T 空质粒酶切对照; M₂, DNA 标准(λ DNA *Hind*III + *Eco*R I 酶切片段)

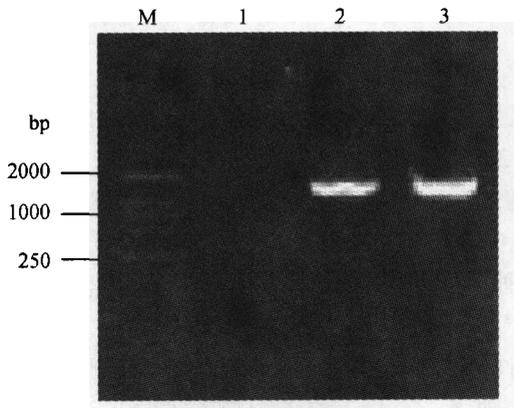


图 3 B3m 基因 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果
M, DNA 标准(DL2000); 1, 阴性对照(无模板); 2, 3, 带 3 蛋白膜段基因 PCR 产物

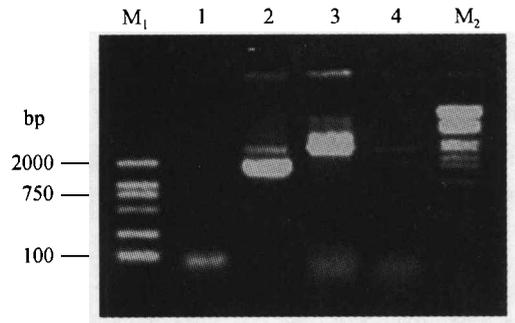


图 4 pBacB3m 重组质粒酶切及 PCR 鉴定
M₁, DNA 标准(DL2000); 1, PCR 阴性对照(无模板); 2, 重组质粒鉴定 PCR; 3, 重组质粒酶切鉴定; 4, pMD18-T 空质粒酶切对照; M₂, DNA 标准(λ DNA *Hind*III + *Eco*R I 酶切片段)

活性分子^[8,9]. 杆状病毒转移载体的构建是实现杆状病毒表达外源基因的第一步. 本研究所用的转移载体 pBlueBacHis B 是一个表达融合蛋白的转移载体, 载体中包含 *Ocu* 基因 5' 端前导序列, 包含有转录信号和核糖体结合位点, 在 ATG 下游含有编码 6 个组氨酸的核苷酸序列, 连接下游为肠激酶切割位点, 在肠激酶切割位点下游为多克隆位点. 我们将血型糖蛋白 A 和带 3 蛋白膜段基因插入到多克隆位点中的 *Bam*H I 位点, 通过序列分析显示插入的血型糖蛋白 A 和带 3 蛋白膜段基因序列与多角体蛋白的读框相吻合. 构建的重组转移载体 pBacGPA 和 pBacB3m 可用于杆状病毒转染实验, 进而为在体外表达血型糖蛋白 A 和带 3 蛋白以及研究两

者在离子转运过程中的相互关系提供了有用的工具。

参 考 文 献

- 1 Casey J R, et al. The role of cysteine residues in the erythrocyte plasma membrane anion exchange protein, AE1 *J Biol Chem*, 1995, 270(15): 8521
- 2 Chasis J A, et al. Erythrocyte glycoporins. *Blood*, 1992, 80(8): 1869
- 3 Young M T, et al. Red-cell glycoporin A-band 3 interactions associated with the movement of band 3 to the cell surface. *Biochem J*, 2000, 350(1): 53
- 4 Groves J D, et al. Topology studies with biosynthetic fragments identify interacting transmembrane regions of the human red-cell anion exchanger (band 3; AE1). *Biochem J*, 1999, 344(3): 687
- 5 傅国辉, 等. 氢氧化钠对红细胞膜带 III 蛋白作用的研究. *生物医学工程学杂志*, 1999, 16(4): 435
- 6 傅国辉, 等. 红细胞带 III 蛋白 C1 肽链的纯化及其功能的初步研究. *中国病理生理学杂志*, 1999, 15(3): 271
- 7 萨姆布鲁克 J, 等著, 金冬雁, 等译. *分子克隆实验指南*. 北京: 科学出版社, 1995
- 8 Rao U S, et al. Expression of amiloride-sensitive sodium channel: A strategy for the coexpression of multimeric membrane protein in Sf9 insect cells. *Anal Biochem*, 2000, 286(2): 206
- 9 Brys R, et al. Reconstitution of the human 5-HT (1D) receptor-G-protein coupling: evidence for constitutive activity and multiple receptor conformations. *Mol Pharmacol*, 2000, 57(6): 1132