

CD34 分子的胞外结构域 cDNA 分离与表达*

孟磊 刘俊霞 贾海蓉 宋增璇*

(中国医学科学院中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020)

摘要 CD34 分子是一种重要的造血干/祖细胞表面标志,广泛用于造血干/祖细胞的鉴定和分选。由于 CD34 分子具有受体样结构并能传递细胞同型聚集的信号,故它是一种信号分子,但其在造血系统的天然配体与确切的生理功能至今仍不明确。研究中我们分离了 CD34 分子的胞外结构域 cDNA,并进行了原核融合表达及纯化。DNA 序列分析和竞争结合抑制实验证明我们获得了纯化的 CD34 分子的胞外结构域的重组蛋白,可作为 CD34 可溶性受体,用于进一步研究 CD34 分子的生理功能。

关键词: CD34 分子 造血干/祖细胞 原核表达

CD34 分子是一种约 110KD 的 I 型跨膜糖蛋白,选择性地表达于造血干/祖细胞和骨髓血管内皮细胞表面。从其结构和信息传递功能分析,CD34 分子具有受体性质,但至今未发现其在造血系统中的天然配体。CD34 分子作为一种黏附分子存在于造血干/祖细胞表面,对干/祖细胞归巢和迁移可能有重要意义。为研究 CD34 分子的抗原性和可溶性受体性质,本文分离了 CD34 分子的胞外结构域 cDNA 并在大肠杆菌中进行了表达和纯化,为进一步的研究工作奠定了基础。

材料和方法

1. 主要试剂

大肠杆菌 XL1-Blue 和人急性髓系白血病细胞系 KG1a 细胞是我室保存,原核表达载体 pSTE-2 为德国 Braunschweig 大学 Dubel 教授惠赠,载体带有(His)₆和 Streptavidin 标签利于纯化和鉴定。总 RNA 分离试剂 TRIZOL、反转录试剂盒、Taq DNA 聚合酶、dNTP、T₄DNA 连接酶、碱性磷酸酶、细胞培养基 RPMI-1640、各种塑料培养器皿均购自 Gibco BRL 公司。核酸提取与回收试剂盒、引物合成、诱导剂异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl thiogalactoside, IPTG)、各种抗生素均购自上海生工公司。PCR 仪、蛋白质电泳及转移装置为 Bio-Rad 公司产品。抗 CD34 的鼠源单克隆抗体、异硫氰酸胍标记的兔抗鼠 IgG(IgG-FITC)购自协和干细胞公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 Fab(HRP-Fab)购自 PROTOGEN 公司,(长链)生物素标记辣根过氧化物酶(Biotin-HRP)购于华美生物公司。DNA Marker DL2000 购自 TaKaRa 生物工程公司,标准分子量蛋白 Protein mixture 购于 Amersham Biosciences UK 有限公司。SuperSignal 发光底物及 BCA 法

蛋白浓度测定试剂盒购自 PIERCE 公司。

2. 细胞培养

KG1a 细胞用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液培养于 37°C 5% CO₂ 培养箱中,每周更换新鲜培养液两次。

3. 引物设计

按 Simmons 等报道的 CD34 cDNA 全长序列设计引物^[1],扩增其中的胞外结构域,上游引物:5'-CATGC-CATGGCGTACGTGAGTCTTGACAACAACGGTACT-3',含 Nco I 切点;下游引物:5'-CCCAAGCTTAGAGATCTGTCT-TTTGGGAATAGCTCTGGT-3',含 Not I 位点,对应编码 CD34 分子的胞外结构域 258 个氨基酸的 774bp DNA 片段。

4. 总 RNA 提取与反转录

CD34⁺KG1a 细胞的 mRNA 的提取和 cDNA 的合成步骤参考试剂 TRIZOL 厂商提供的方法进行。

5. PCR 扩增

PCR 体系:10 × PCR 反应缓冲液,5μl;25mmol/L MgCl₂,3μl;2.5mmol/L dNTP 混合液,3μl;模板(cDNA),2μl;10pmol/L 5'引物,18μl;10pmol/L 3'引物,18μl;Taq 酶,0.4μl;补灭菌去离子水至总体积为 50μl。条件:95°C 变性 2min;94°C 30s,56°C 45s,72°C 1min,共 30 个循环;72°C 延长 7min。1% 琼脂糖凝胶电泳分析、回收扩增产物。进行限制性内切酶 Nco I、Not I 双酶切后回收目的片段。

6. CD34 胞外结构域 cDNA 克隆

用限制性内切酶 Nco I、Not I 消化 pSTE-2 质粒 DNA,1.5% 琼脂糖电泳回收载体大片段并去磷酸化,与经同样酶切的 PCR 扩增片段连接,连接产物以氯化钙方法转化感受

*基金项目:天津市科学技术委员会资助项目(编号 003119611)。

本文 2003 年 4 月 17 日收到,9 月 5 日接受。

**通讯作者。E-mail:hesong@public.tpt.tj.cn

态大肠杆菌 XL1-Blue, 涂布 SOB-GAT 琼脂培养基, 30℃ 倒置培养 15h。挑取单菌落, 分别扩增后进行鉴定, 阳性克隆进行序列分析。

7. CD34 细胞外结构域蛋白的表达和纯化

将序列正确的并有表达的单克隆(pSTE-CD34)接种于 LB-GAT 培养基中, 37℃ 扩增培养至 OD₆₀₀ = 0.8 时, 加入诱导剂 IPTG 进行化学诱导, 诱导时间为 3h, IPTG 终浓度为 1 × 10⁻⁴ mol/L, 诱导温度为 30℃。离心收集菌体, 加入裂解液(0.05mol/L Tris-HCL, 0.1mol/L NaCl, 0.001mol/L EDTA, pH7.0), 反复冻融后超声破碎, 用镍离子螯合柱进行亲和层析, 纯化融合蛋白的洗脱液为 6mol/L 尿素、0.25mol/L 咪唑、0.05mol/L Tris。洗脱产物用磷酸盐缓冲液(PBS)充分透析后超滤浓缩, BCA 法测定蛋白质浓度。

8. 表达产物的点杂交

将抗 CD34 单抗与牛血清白蛋白(BSA)分别在硝酸纤维素薄膜上点样 1μl, 室温晾干, 10% 小牛血清封闭, 与 2.5 × 10⁻⁸g/L CD34-streptavidin 融合蛋白室温反应 1h, 200 倍稀释的 Biotin-HRP 室温反应 45min, 二胺基联苯胺(DAB 6g/L)显色 1min 终止反应。

9. 表达产物的 SDS-PAGE 与 Western-Blot 分析

制备二块 12% 的聚丙烯酰胺凝胶, 样品为 pSTE-CD34 表达的菌体总蛋白及经镍柱纯化后的蛋白, 100V 稳压电泳 2h, 一块凝胶用考马斯亮蓝 G250 染液染色, 另一块凝胶的蛋白电转移至 PVDF 膜上。转移后的 PVDF 膜经脱脂奶封闭, 抗 CD34 鼠源一抗结合, 羊抗鼠 HRP-Fab 二抗结合, SuperSignal kit 进行曝光、定影、显影。

10. 酶联免疫检测(ELISA)

用 NaHCO₃/Na₂CO₃ 缓冲液(pH 9.6)稀释 CD34 细胞外结构域蛋白, 5μg/100μl/孔, 包被 96 孔板。经脱脂奶封闭, 抗 CD34 鼠源一抗结合, 二抗羊抗鼠 Fab-HRP 结合物, 四胺基联苯胺(TMB 0.1mg/ml)显色, 450nm 比色。对照孔用牛血清白蛋白(BSA)包被。实验重复 3 次。

11. 竞争结合抑制实验

收集对数生长期的 KG1a 细胞, PBS 洗 2 次, 每 1 × 10⁶ KG1a 细胞中加抗 CD34 鼠源单抗工作液 10μl 和不同浓度 CD34 细胞外结构域蛋白, 4℃, 30min。PBS 洗 3 次。加免

抗鼠 IgG-FITC 结合物 10μl, 避光, 4℃, 30min。PBS 洗 2 次, 1% 多聚甲醛固定 30min, 进行流式细胞术检测。

结 果

1. 表达载体 pSTE-CD34 的构建

经琼脂糖电泳证明 PCR 扩增片段约为 774bp (图 1), Not1 和 Nco1 酶切后插入经同样酶切的 pSTE-2 载体, 构成重组载体 pSTE-CD34, 其大小为 4389bp。目的片段上游的 Lac 启动子受化学诱导表达, 其下游有链霉亲和素和 6 个组氨酸密码子, 使表达的融合蛋白羧基端有 6 个组氨酸, 便于用金属离子层析柱纯化; 融合蛋白还带有链霉亲和素有利于用生物素标记的酶进行检测(图 2)。

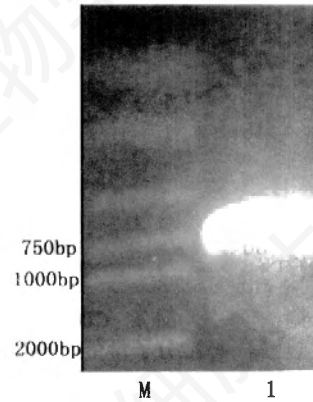


图 1 PCR 扩增结果

M. DL2000 DNA marker; 1. PCR 扩增的 CD34 胞外区片段。

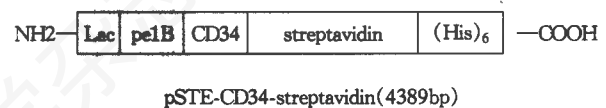


图 2 pSTE-CD34 载体示意图

Lac. 启动子 pel; B. 果胶酶信号肽; CD34. 目的片段; streptavidin. 链霉亲和素 (His)₆. 组氨酸六联体。

表 1 CD34 分子 N 端部分 DNA 序列及其演绎的氨基酸残基

5'	AGT	CIT	GAC	AAC	AAC	GGT	ACT	GCT	ACC	CCA	GAG	TTA	OCT	ACC	CAG	GGA	ACA	TTT	TCA	AAT
GTT	TCT	ACA	AAT	GTA	TCC	TAC	CAA	GAA	ACT	ACA	ACA	OCT	AGT	ACC	CIT	GGA	AGT	ACC	AGC	CTG
V	S	T	N	V	S	Y	Q	E	T	T	T	P	S	T	L	G	S	T	S	L
CCT	GTG	TCT	CAA	CAT	GGC	AAT	GAG	GCC	ACA	ACA	AAC	ATC	ACA	GAA	ACG	ACA	GTC	AAA	TTC	ACA
P	V	S	Q	H	G	N	E	A	T	T	N	I	T	E	T	V	K	F	T	S
ACC	TCT	GTG	ATA	ACC	TCA	GTT	TAT	GGA	AAC	ACA	AAC	TCT	TCT	GTC	CAG	TCA	CAG	ACC	TCT	GTA
S	T	S	V	N	T	N	S	S	V	Q	S	Q	T	S	V	I	S	T	V	F
AGC	ACA	GTG	TTC	ACC	CCA	GCC	AAC	GTT	TCA	ACT	CCA	GAG	ACA	ACC	TTG	AAG	OCT	AGC	CTG	TCA
T	P	A	N	S	T	P	E	T	T	L	K	P	S	L	S	P	C	N	V	S
OCT	GGA	AAT	GTT	TCA	GAC	CIT	TCA	ACC	ACT	AGC	ACT	AGC	CIT	GCA	ACA	TCT	CCC	ACT	AAA	CCC
L	S	T	T	S	T	S	L	A	T	S	P	T	K	P	Y	T	S	S	S	P
ACA	TCA	TCT	TCT	CCT	ATC	CTA	AGT	GAC	ATC	AAG	GCA	GAA	ATC	AAA	TGT	TCA	GGC	ATC	AGA	GAA
L	S	D	I	K	A	E	I	K	C	S	G	I	R	E	V	K	L	T	Q	G
AAA	TTG	ACT	CAG	GGC	ATC	TGC	CTG	GAG	CAA	AAT	AAG	ACC	TCC	AGC	TGT	GCG	GAG	TTT	AAG	AAG
C	L	E	Q	N	K	T	S	S	C	A	E	F	K	K	D	R	G	E	G	L
GAC	AGG	GGA	GAG	GGC	CTG	GCC	CGA	GTG	CTG	TGT	GGG	GAG	GAG	CAG	GCT	-3'				
L	A	R	V	L	C	G	E	E	Q	A	D	A	D	A	G					

2. CD34 细胞外结构域 DNA 序列分析

根据测得的 CD34 分子 N 端 DNA 序列, 并根据其演绎出 CD34 N 端 189 个氨基酸残基, 与文献相比结果正确(表 1)。

3. 表达产物的点杂交

CD34 分子细胞外结构域-streptavidin 融合蛋白能够与抗 CD34 单抗结合, 通过其携带的 streptavidin 与 Biotin-HRP 结合并使 DAB 显色。对照组 BSA 不结合 Biotin-HRP, 不能使 DAB 显色(图 3)。

4. CD34 重组蛋白的表达与纯化

含 pSTE-CD34 重组载体转化菌经 IPTG 诱导

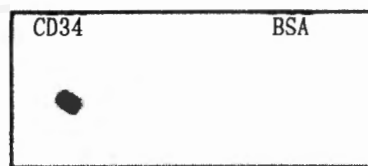


图 3 CD34 分子细胞外结构域-streptavidin 融合蛋白的点杂交

表达后的总蛋白及纯化蛋白在 SDS-PAGE 图上显示约 52KDa 大小的融合蛋白带, Western 印迹结果证明融合蛋白被抗 CD34 单抗识别(图 4)。

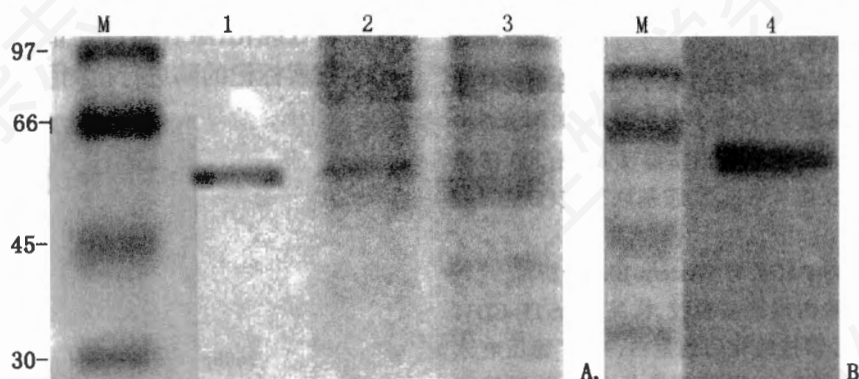


图 4 CD34 融合蛋白的 SDS-PAGE(A) 与 Western blot(B) 结果
M. 标准分子量蛋白(KD); 1. IMAC 纯化后的蛋白; 2. IPTG 诱导的菌体蛋白;
3. 未诱导的菌体蛋白; 4. Western blot 结果。

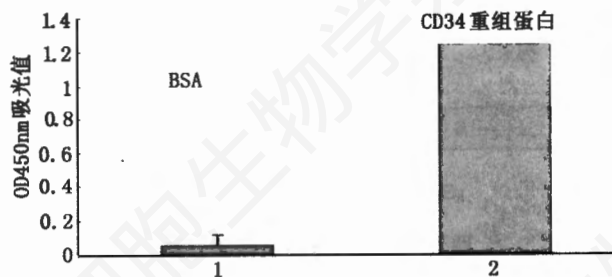


图 5 CD34 细胞外结构域重组蛋白的结合特异性

5. CD34 重组蛋白的结合特异性

ELISA 结果表明 CD34 重组蛋白包被孔 450nm 吸光值均在 1.0 以上, 而包被牛血清白蛋白的对照孔 450nm 吸光值低于 0.1。结果表明 CD34 细胞外结构域重组蛋白与抗 CD34 单抗有特异结合(图 5)。

6. CD34 重组蛋白竞争性抑制 CD34 单抗的结合活性

不同浓度的 CD34 重组蛋白与定量的抗 CD34 单抗于 37℃ 反应 30 分钟后明显降低 CD34 抗体与 KG1a 细胞的结合活性, 降低程度与所用 CD34 重组

蛋白浓度呈剂量依赖关系(图 6)。

讨 论

CD34 是高度糖基化的 I 型跨膜糖蛋白, 属唾液酸黏蛋白表面分子家族成员之一。人 CD34 基因全长 38Kb, 包含 9 个外显子(I - VIII), 其 mRNA 有两种剪接形式, 一种含外显子 1 - 8, 编码 373 个氨基酸残基, 包括信号肽(20aa), 细胞外结构域(258aa), 跨膜结构域(22aa) 和细胞内结构域(73aa); 另一种 mRNA 形式在外显子 VII 和 VIII 之间插入外显子 X, 它引入一个终止密码子导致其翻译产物是一种截短形式的蛋白, 其细胞内结构域只有 16 个氨基酸残基^[1,2]。两种转录本的细胞外结构域编码同样的成熟蛋白。CD34 多肽主链只有 40Kda, 由于存在大量的糖基侧链, 使 CD34 的分子量达 110Kda 左右。我们从 KG1a 细胞分离的 CD34 细胞外结构域 cDNA, 经 DNA 序列分析及演绎的氨基酸残基证明 RT-PCR 扩增片段正确。重组载体转化大肠杆菌后经 IPTG 诱导表达, 表达产物在 SDS-PAGE 电泳图上

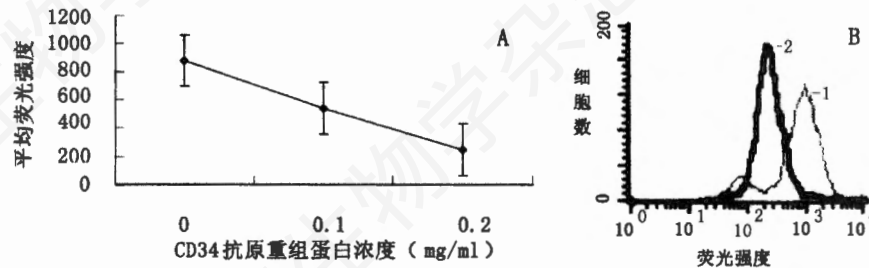


图6 CD34重组蛋白的竞争性结合结果

A. 不同浓度的CD34重组蛋白对抗CD34单抗的竞争性抑制曲线; B. CD34重组蛋白竞争结合抗CD34单抗后的KG1a细胞荧光强度, -1未加CD34重组蛋白的KG1a细胞CD34的荧光曲线, -2CD34重组蛋白与KG1a细胞竞争抗CD34单抗使KG1a细胞CD34荧光强度减弱, 曲线左移。

显示出符合预期目标的蛋白质带型。表达产物经镍离子亲和层析柱一步纯化获得纯化蛋白(8mg/L培养体系)。点杂交表明CD34重组蛋白能与抗CD34抗体结合并携带streptavidin。ELISA分析和竞争结合实验结果表明抗CD34单克隆抗体能识别CD34重组蛋白, 而且CD34重组蛋白能与KG1a细胞表面的天然CD34分子竞争抗CD34单克隆抗体, 证明表达产物具有CD34抗原性。在本项研究中, 把CD34细胞外结构域cDNA与链霉亲和素核心蛋白DNA拼接, 重组载体转化的工程菌表达出CD34-链霉亲和素融合蛋白。由于融合蛋白中的CD34部分具有明确的抗原性, 链霉亲和素部分与生物素极强的亲和力, 使融合蛋白在抗CD34单抗的鉴别、分离、纯化方面将有应用前景。

CD34分子包括细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域, 具有典型的受体结构。此种结构提示CD34可能具有信号传递功能。有研究报告, 抗CD34单克隆抗体能激活细胞表面的信号传递途径, 使细胞内的Lyn、PP60和PP69酪氨酸磷酸化^[3]。CD34作为一种受体分子, 其天然配体至今仍未明确。虽然存在于淋巴结血管内皮细胞上的CD34分子可结合L-

选择素, 但造血干/祖细胞表面的CD34分子并不结合L选择素, 表明L选择素还不是CD34的唯一天然配体^[4]。由于存在于造血干/祖细胞表面的CD34具有黏附分子功能, 在调节造血干/祖细胞归巢和移行方面有重要意义。关于CD34分子的研究主要集中在分离干/祖细胞应用方面, 鲜有以其细胞外结构域为研究对象。我们分离的CD34细胞外结构域蛋白作为CD34可溶性受体, 无论在寻找CD34天然配体, 或在动员造血干/祖细胞进入循环血液的研究方面将是有益的生物材料。

参 考 文 献

- [1] Simmons DL, et al., 1992 Molecular Cloning of a cDNA Encoding CD34, a Sialomucin of Human Hematopoietic Stem Cells., *The Journal of Immunology*, 480:267-271.
- [2] Yukio N, et al., 1993 Two Alternative Form of cDNA Encoding CD34., *Exp Hematol*, 21:236-242.
- [3] Jun-ichi T, et al., 1999 A Common Pathway Via Syk and Lyn Tyrosine Kinases Generated from Capping of Sialomucin CD34 and CD43 in Immature Hematopoietic cell., *Blood*, 93(11):3723-3735.
- [4] Susanne B, et al., 1993 Binding of L-selectin to the Vascular Sialomucin CD34., *Science*, 262:436-438.

ISOLATION AND EXPRESSION OF CD34 EXTRACELLULAR DOMAIN

MENG Lei LIU Jun Xia JIA Hai Rong SONG Zeng Xuan*

(National Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Science, Tianjin 300020 China)

ABSTRACT CD34 molecule is an important hematopoietic stem/progenitor cell surface marker, which has been used for identifying and sorting hematopoietic stem/progenitor cells. It is also a signaling molecule because it has receptor-like structure and can transduce signal for cell homotypic adhesion. However, the natural ligand and exact biological function of the CD34 molecule in hematopoietic system have not been clearly identi-

fied yet. In this study, we isolated the extracellular domain of the CD34 cDNA and expressed as a fusion protein. The results from DNA sequencing and specific binding assay demonstrated that we have obtained a purified recombinant protein of the extracellular domain of CD34 molecule. It will be very helpful for our further studies on the physiological significance of the CD34 molecule.

Key words: CD34 antigen Hematopoietic stem/progenitor cell Prokaryotic expression

Supported By the Foundation of Science and Technology Committee in Tianjin(003119611), China

* Corresponding author. E-mail: hesong@public.tpt.tj.cn

非折叠蛋白质应答对人胚肾细胞 293A 迁移特性的影响

苏荣健 陈誉华 宋今丹*

(中国医科大学发育生物学研究室, 卫生部细胞生物学重点实验室 沈阳 110001)

摘要 为了研究非折叠蛋白质应答对器官发生的影响,应用衣霉素诱导非折叠蛋白质应答并观察其对入胚肾细胞系 293A 迁移特性的影响。在实验中,应用划痕法对细胞迁移进行观察,并应用细胞黏附实验、荧光染色技术、扫描电镜技术及免疫印迹实验分别对细胞黏附特性、微管及微丝、细胞表面边缘的突起及小分子 GTPase 的表达水平进行研究。结果表明,非折叠蛋白质应答可以抑制细胞迁移,进一步的研究发现,非折叠蛋白质应答可以降低细胞的黏附能力、引起细胞骨架的重排、抑制伪足的形成并降低 RhoA 的表达水平。这提示,非折叠蛋白质应答可能通过抑制应激细胞的迁移为应激细胞的功能修复赢得了时间,在器官发生过程中发挥作用。

关键词: 细胞迁移 非折叠蛋白质应答 器官发生

非折叠蛋白质应答 (the unfolded protein response, UPR) 是指真核细胞在受到某些刺激导致错误折叠或未折叠的蛋白质在内质网中聚集时,通过上调分子伴侣等某些基因的表达,使错误折叠或未折叠的蛋白质正确折叠;对不能正确折叠的蛋白质,通过内质网相关的降解作用 (ER associated degeneration, ERAD) 使之降解。非折叠蛋白质应答是细胞的一种应激反应。

近年来的研究表明,非折叠蛋白质应答在胚胎发育、人类疾病等生理和病理过程中具有重要的意义^[1]。本研究应用内质网糖基化抑制物衣霉素诱导非折叠蛋白质应答以观察其对入胚肾细胞系 293A 迁移特性的影响,旨在对非折叠蛋白质应答在器官发生中的作用加以研究。

材料与amp;方法

1. 细胞培养和内质网非折叠蛋白质应答的诱导

入胚肾细胞系 293A (美国南加州大学医学院惠赠) 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中;为诱导内质网非折叠蛋白质应答,向培养液中加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的衣霉素,继续培养 6 h^[2]。

2. 划痕法 (scratch wound assay) 检测细胞迁移特性

在 35mm 的培养皿中接种 2×10^5 个 293A 细胞,待细胞汇合成细胞单层后,用灭菌移液器头在细胞单层上小心的做一个划痕,用 PBS 彻底漂洗 3 次,加入含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素的培养液继续培养 24 h,观察划痕愈合指数,该实验反复进行 3 次,比较划痕愈合指数^[3]。

3. 细胞黏附实验

将 293A 细胞在含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素的培养液中培养 6 h 以诱导非折叠蛋白质应答,胰蛋白酶消化,用含 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 衣霉素的培养液稀释细胞至 3×10^5 个/ml,接种于纤粘连蛋白处理的 24 孔板中,每孔加 100 μl 继续培养。分别于 30、40、50、60、90 min,计数贴壁细胞数,计算黏附指数,黏附指数 = 贴壁细胞数/贴壁细胞数 + 未贴壁细胞数^[4]同时以正常培养

本文 2003 年 5 月 29 日收到,9 月 6 日接受。

* 通讯作者。E-mail: jdsong@mail.cmu.edu.cn