

研究快报

可溶性人 SCF 在大肠杆菌中高效表达*

朱元晓 赖春宁 沈倍奋

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

李慧云

(河南农业大学, 河南 450002)

关键词 人 SCF, 表达, 大肠杆菌

干细胞因子(SCF)是一种参与机体生长发育过程中多种细胞生长调控的多功能细胞因子, 该因子是 c-kit 原癌基因编码受体的配体, 主要由基质细胞产生. 研究发现 SCF 在机体内以两种形式存在, 一种是表达于细胞膜表面的膜型 SCF, 另一种为分泌至细胞外的可溶性 SCF, 后者相当于膜型 SCF 的膜外活性区域, 由 164—165 个氨基酸(aa)组成^[1], 目前国外用于研究的重组 SCF 产品主要指在大肠杆菌或真核系统中表达的分泌型 SCF^[3], 此研究首次在国内报道在大肠杆菌中表达这种类型的重组人 SCF.

首先设计并合成一对用于扩增编码人 SCF 膜外 165aa 的 cDNA 引物, 引物两端设有酶切位点, 起始码及终止码的序列, 即: 5'CAG-CATATGGAAGGGATCTGCAGGAATCG-T3' 和 5'GAGGATCCGGCTGCAACAGGGG-GTAACATA3' 以本实验室克隆的人 SCF cDNA 为模板^[3], 应用 CETUS 公司生产的 PCR kit 进行扩增. 模板为 50ng 经核酸序列分析鉴定的含人 SCF cDNA 插入片段的重组质粒, 经 100℃ 变性 10min 进入 PCR 循环, 引物浓度为 1.2μmol/L, Taq 酶为 0.75U, 反应体积为 100μl, 热循环扩增条件为: 94℃ 60s→55℃ 60s→72℃ 100s, 共 25 个循环, 在 72℃ 延伸 8min, 取 5μl 在 1% 琼脂糖胶上电泳检测. 将纯化的 PCR 产物用 Nde I 和 BamH I 酶切, 插入到表

达载体 pET3a 中, 转化大肠杆菌 HB101, 按常规筛选重组质粒 pET-SCF, 将筛选出的 pET-SCF 转入表达菌株 BL-21 (DE₃) 中, 在含 Amp 的 LB 中于 37℃ 孵育. 当细菌长至对数生长期时, 加 IPTG (终浓度为 1mmol/L) 诱导 4—5h, 取少量培养物作 PAGE 电泳, 检测表达水平. 大部分细菌培养物经超声破碎、包涵体纯化、变性和复性过程后, 在含 30ng/ml GM-CSF 的培养体系中, 观察其对正常人骨髓 GM-CFU 形成的影响.

研究结果显示, 经 PCR 扩增出来的产物分子量接近 600bp, 与编码人 SCF 膜外活性区域的 cDNA 大小一致, 该片段经插入 pET3a 载体后获得 4 株含有重组质粒的阳性克隆菌, 重组质粒 pET-SCF 经 Nde I 和 BamH I 消化, 插入的 SCF cDNA 片段可被切下 (见图 1), 与原设计意图相符. 经 EcoR I 等进一步酶切后证实, 插入片段的酶切位点与发表的人 SCF cDNA 片段的酶切位点一致. 将上述阳性质粒转化宿主表达菌后可诱导出一分子量接近 20 000 的蛋白条带, 与文献报道的无糖基化的游离型 SCF 大小一致, 表达蛋白占菌体总蛋白的 20% 以上 (见图 2), 主要以包涵体形式存在. 经初步纯化后, 包涵体纯度约为 70%, 将包涵

* 国家青年 863 基金资助项目.

收稿日期: 1993-04-28 修回日期: 1993-07-08

体变性、复性后测定其活性,结果发现约 $1\mu\text{g}$ 初步纯化的蛋白与阴性对照组相比,可使人骨髓体外 GM-CFU 数量增加 2 倍左右,并且集落增大,这表明在大肠杆菌中表达的 SCF 蛋白具有 SCF 的生物学活性。

目前国外对 SCF 的临床前期研究表明,SCF 在治疗各种贫血、恢复放化疗后的骨髓造血机能以及辐射防护等方面具有广泛的应用前景. 本研究工作为在国内开展 SCF 的基础研究和应用研究奠定了较好的基础。

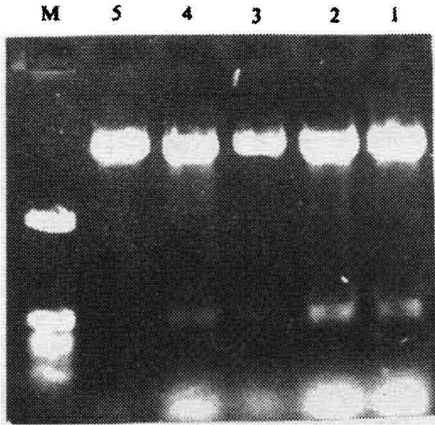


图 1 pET-SCF 经 Nde I 和 BamH I 酶切后的电泳图

1—4: 4 个阳性克隆中的重组质粒

5: pET3a

M: pBR322/Hinf I.

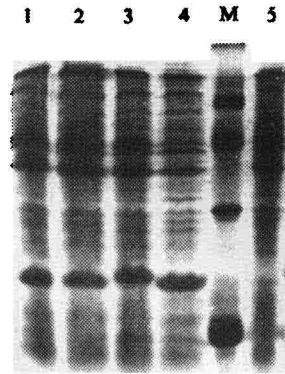


图 2 pET-SCF 在 BL-21 (DE₃) 中的表达

1—4: 4 个 pET-SCF 重组质粒

5: pET3a 作为空载体对照

M: 蛋白质标记, 分子量自上而下为: 67 000, 43 000, 31 000, 14 400

参 考 文 献

- 1 Zsebo K M, Wypych J, McNiece I K *et al.* Identification, purification and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver-conditioned medium. *Cell*, 1990; **63**:195
- 2 Martin F H, Sidney V S, Keith E L *et al.* Primary structure and functional expression of rat and human stem cell factor DNAs. *Cell*, 1990; **63**:203
- 3 朱元晓, 王建安, 沈倍奋等. 人 SCF 基因 cDNA 克隆及分析. 中华流行病学杂志, 1992; **13**(特刊 2 号):407

血清脂蛋白 (a) 双单抗夹心 ELISA 测定方法

谢玉才 丁怀翌 蔡伟菁 吴春芳 戚文航 龚兰生

(上海第二医科大学瑞金医院心内科, 上海 200025)

关键词 脂蛋白 (a), 单克隆抗体, ELISA

脂蛋白 (a) [Lp (a)] 是不同于低密度脂蛋白 (LDL) 的一种独立脂蛋白, 其血清浓度的增高是动脉粥样硬化的独立危险因子. 制备 Lp (a) 单克隆抗体 (单抗) 和建立测定方法将为开展冠心病和动脉粥样硬化研究提供重要手

段.

1 单抗制备及特性 利用 Fless 和 Scanu 教授惠赠的人 Lp (a) 纯抗原, 应用淋巴细胞杂