

人促血小板生成素受体 c-Mpl 编码区全长 cDNA 的克隆 及其稳定表达的细胞株的构建

赵新燕 蔡静莉 戴卫列 周伟国 李昌本 赵寿元*

(复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 以人 HEL 细胞总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 方法扩增了人促血小板生成素受体 c-Mpl 编码区全长 1.9kb cDNA,测序结果表明与已报道的序列一致。然后构建了 *c-mpl* 的 pcDNA3 表达载体 pcMPL,转染不表达 *c-mpl* 的 K562 细胞后,经 G418 抗性筛选,Northern blot 和 Southern blot 检测证实获得稳定表达 *c-mpl* 的细胞株。为进一步研究 c-Mpl 的生物学功能提供有用的实验材料。

关键词 人促血小板生成素受体 c-Mpl,RT-PCR,转染,K562 细胞表达

中图分类号 Q753 文献标识码 A 文章编号 1000-3061-(2000)03-0320-04

在生理状态下,人的血小板生成是一个复杂的过程,受到多种造血因子的影响。最近克隆的促血小板生成素(Thrombopoietin,TPO)是调节血小板生成最主要的细胞因子。它专一性促进巨核细胞的生长发育和血小板的生成,其生物学效应由其受体 c-Mpl 介导^[1]。c-Mpl 是骨髓增生性白血病病毒 MPLV 的 v-Mpl 的同源对应物,属于造血因子受体超家族,其特征为 N 端含有 4 个半胱氨酸的 200 个氨基酸的保守区域和位于该区域 C 端附近的 Trp-Ser-X-Trp-Ser 顺序。对表达 c-Mpl 的细胞或转基因克隆细胞株的体外研究表明,TPO 的结合可能激活 Jak-STAT 信号转导途径和 MAPK 途径。尽管如此,人们仍然还不太清楚所涉及的信号传递因子及其激活事件的顺序^[2,3]。为了研究参与 c-Mpl 介导的信号转导的蛋白质,我们用 RT-PCR 方法,成功地从人 HEL 细胞总 RNA 中克隆了 c-Mpl 编码区 cDNA 片段,进而构建了 pcMPL 永久表达载体,并且在天然状态下不表达 *c-mpl* 的人 K562 细胞中得到了稳定表达,为研究 c-Mpl 介导的信号转导途径打下了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、细胞株与质粒

E. coli XL1-Blue 和 pUC119、pcDNA3 均为本

室保存的菌株和质粒。人红白血病细胞 HEL 和人慢性髓性红白血病细胞 K562 细胞系均购自中科院上海细胞生物学研究所。

1.2 总 RNA 抽提

以 RPMI-1640 培养基(含 10% 小牛血清)培养 HEL 细胞,收集 5×10^6 细胞,PBS 洗涤 1 次后按异硫氰酸胍-苯酚-氯仿法^[4]提取总 RNA, -80°C 保存。

1.3 RT-PCR 扩增 cDNA 人全长 c-MPL cDNA 片段

采用 GIBCO BRL 公司 cDNA 第一链合成系统(Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis Kit),并按说明书操作, -20°C 保存。设计了一对引物用于扩增 c-MPL cDNA:

5'引物 5'-GGAATTCATGCCCCCTCTGGGCCCTCTTCATG-3',
3'引物 5'-GGTCGACCTCAAGGCTGCTGCCAATAGCTT AG-3'。

取 cDNA $2\mu\text{L}$ 为模板,采用 Boeringer-Mannheim 公司 ExpandTM Long Template PCR System,扩增目的片段。PCR 反应条件为: 93°C 变性 3.5min 然后按 93°C (10 s) \rightarrow 55°C (30 s) \rightarrow 72°C (120 s) 反应 30 个循环 最后 72°C 保温 400 s。

1.4 基因克隆、pcMPL 表达载体的构建与 DNA 序列测定

重组方案详见结果部分,DNA 操作按《分子克

隆》常规方法^[5]进行。对重组子序列测定。

1.5 细胞转染与稳定表达

DNA 转染按 Lipofectin 方法进行, DNA 用量为 5 μ g, Lipofectin 用量为 20 μ L, 起始细胞数为 3 \times 10⁶, 转染 10 h 后加入 4mL 细胞培养液(含血清), 37 $^{\circ}$ C 继续孵育 48 h 后, 换含 600 μ g/mL 的 G418 的培养液筛选转染细胞, 并分装至 96 孔板, 2~3 周后可见有些孔中有明显克隆, 扩增这些混合克隆, 按方法 1.3、1.4、1.5 抽提总 RNA, 并以 RT-PCR 初步确定 *c-mpl* 的表达, 对 PCR 结果阳性的混合克隆, 去除 G418 连续传代培养, 极限稀释获得单个克隆细胞株。

1.6 Northern blot、Southern 与 Western blot

参考文献^[5]方法进行, K562 细胞克隆总 RNA 按方法 1.3 抽提, 基因组 DNA 按文献^[5]方法抽提, *Bam*HI 酶切。以 *c-mpl* 经 *Bam*HI 酶切所得的 343bp 的小片段为探针模板, 以 Promega 公司的 Prime-a-gene labeling system 进行 α -³²P-dATP 标记。进行 Northern blot 时, 为确定 RNA 总量, 同一张膜用 β -actin DNA 探针杂交。Western blot 参考文献^[5]方法。

2 结果

2.1 c-Mpl 编码区全长 cDNA 的 RT-PCR 扩增

c-mpl 在 HEL 细胞中有较高的表达^[11], 我们以培养的 HEL 细胞为材料提取总 RNA 合成 cDNA。再以此 cDNA 为模板, 以 *c-Mpl* 编码序列 5' 端和 3' 端引物进行 PCR 合成 1.9kb 左右的 DNA 片段(图 1), 其长度相当于 *c-Mpl* 的完整的含信号肽的编码区序列。低熔点胶法回收该片段。

2.2 c-Mpl 编码区全长 cDNA 的克隆和序列测定

纯化回收的 PCR 产物, 克隆入 pUC119 的 *Eco*RI 和 *Sal*I 位点之间, 对其中的 3 个候选克隆 pUMPL2、4、5 进行酶切分析, 发现酶切结果与预期的完全一致。从而初步证实我们克隆得到 *c-Mpl* 编码区全长 cDNA。由于 *c-Mpl* cDNA 长达 1908bp, 为了检验克隆的 PCR 产物碱基序列的正确性, 利用基因内的 *Sph*I 和 *Bam*HI 位点, 制备 *c-Mpl* cDNA 片段 3 个亚克隆, 用 M13/pUC19 正反向引物进行序列分析(图 2)。

测序结果表明: 单个克隆中含有突变, 系由 *Taq* 酶不完全精确复制导致。为了得到完全正确的 *c-Mpl* 编码区全长 cDNA, 将不同克隆进行拼接, 得到不含任何突变的 *c-Mpl* 编码区全长 cDNA, 该序列

的 GenBank 登录号为 NML_005373。

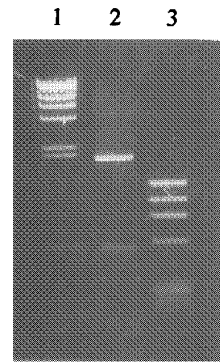


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR product

1. λ Hind III DNA marker ;
2. PCR product ;
3. ϕ x174/Hae III DNA marker

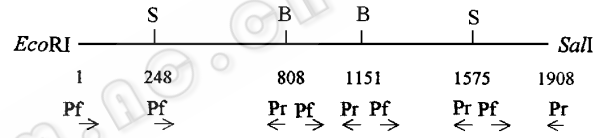


图 2 重组质粒 pUMPL 的测序策略

Fig.2 Sequencing strategy of recombinant plasmid pUMPL

- B : *Bam*HI ; S : *Sph*I Pf ϕ UC/M13 forward sequence primer ;
Pr ϕ UC/M13 reverse sequence primer

2.3 c-Mpl 真核表达载体构建及在 K562 细胞中的稳定表达

以 *Eco*RI 和 *Sal*I 酶切获得 *c-mpl* 片段, 克隆至 pcDNA3 的 *Eco*RI 和 *Sal*I 间, 得到 *c-Mpl* 真核表达质粒 pcMPL。用 Lipofectin 方法, 将 pcDNA3 与 pcMPL 分别转染不表达 *c-mpl* 的 K562 细胞, 经 G418 抗性筛选, 获得多个抗 G418 的混合细胞克隆, 即 pcDNA3 或 pcMPL 的转基因细胞。这些阳性细胞克隆经连续传代培养, 分别抽提总 RNA 后经 RT-PCR 筛选表达 *c-mpl* 的克隆细胞株。对于 PCR 阳性的克隆细胞 K562/pcMPL-G5 经极限稀释后分选出单个克隆并撤掉 G418 连续培养 2 个月。转染有 pcDNA3 的 K562 细胞则直接经极限稀释分选出单克隆 K562/pcDNA3-B1。

为了进一步确证 *c-mpl* 在 K562 细胞克隆中表达, 扩增克隆细胞 K562/pcMPL-G5 和 K562/pcDNA3-B1 作 Northern、Southern 和 Western 分析。Northern blot 仅在克隆细胞株 K562/pcMPL 总 RNA 出现阳性杂交信号, 对照 K562/pcDNA3 和

K562 均无杂交信号(图 3)。Southern blot 表明, K562 细胞在 7kb 处有内源 *c-mpl* 基因的 *Bam*HI 酶切片段的杂交条带^[6], 而只有在 K562/pcMPL 的基因组 DNA 中可另外检测到 343bp 的阳性条带, 这进一步证实外源 *c-Mpl* cDNA 已整合到 K562 细胞基因组中(图 4)。在 Western 分析中, 只有转染了 pcMPL 的细胞能检测到 *c-MPL* 蛋白质(图 5)。

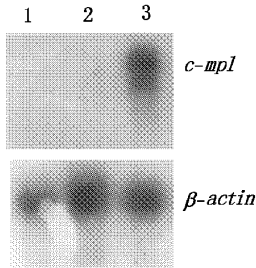


图 3 转基因 K562 细胞的 Northern 杂交

Fig.3 Northern analysis of transgenic K562 cells

1. K562 2. K562/pcDNA3 3. K562/pcMPL

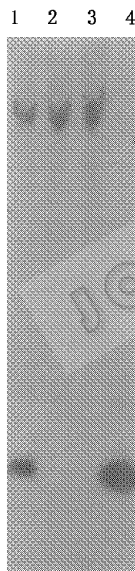


图 4 转基因 K562 细胞的 Southern 杂交

Fig.4 Southern analysis of transgenic K562 cells

1. K562/pcMPL 2. K562/pcDNA3 3. K562 ;
4. Positive control 343bp fragment of *c-mpl* cDNA digested with *Bam*HI

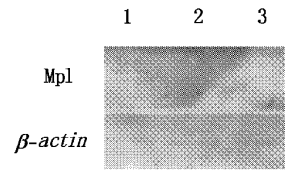


图 5 转基因 K562 细胞的蛋白免疫印迹分析

Fig.5 Immunoblotting analysis of MPL expression

in transgenic K562 cells

Top :MPL Bottom β -actin 1. K562/pcMPL ;

2. K562/pcDNA3 3. K562

3 讨 论

c-mpl 只在造血干细胞(如纯化的 CD34⁺)、巨核细胞系、血小板以及 HEL、DAMI、UT-7、Mo7e、TF-1 等细胞株中表达。上皮细胞中也可检测到微弱表达信号。人体中胎盘、骨髓、胎肝、胎肝血(34 周)、脐带血等组织表达 *c-mpl*。*c-mpl* 可被转录成 P 型和 K 型两种转录本(Mpl-P 和 Mpl-K)。相对于 Mpl-P 而言, Mpl-K 的表达量很低,但两者在生理上是同时表达的,HEL 细胞中也是如此^[7,8]。我们所克隆表达的是 Mpl-P cDNA,因为 Mpl-P 转导 TPO 的刺激信号,而 Mpl-K 在正常生理状态下可能起着调节 Mpl-P 水平的作用。实验采用 Lipofectin 转染,保证了较高的转染效率,成功地转染了真核重组表达质粒 pcMPL。Southern 印迹证实了 *c-mpl* 基因的整合,而 Northern 印迹和 Western 印迹分别从 RNA 水平和蛋白质水平上验证了该基因的表达。

K562 细胞是用 RT-PCR 都无法检测到 *c-mpl* 表达的细胞株,但是 Mignotte 等^[6]用 CAT 分析发现 700bp 长的人 *c-mpl* 启动区(promoter)在 HEL 细胞和 K562 细胞中都有活性,这表明 *c-mpl* 的启动区在骨髓来源的细胞中有功能。K562 和 HEL 同为红白血病细胞,*c-mpl* 的表达何以有如此大的差异?如果 K562 细胞表达 *c-mpl* 又会对 TPO 的刺激有什么反应?这种反应与 TPO 依赖的细胞系(如 Mo7e)又有什么不同?我们希望 K562/pcMPL 克隆细胞株的建立将有助于解答这些疑问及进一步了解 *c-Mpl* 介导的信号转导途径。

参 考 文 献

- [1] Bartley T D, Bogenberger J, Hunt P *et al.*. *Cell*, 1994, **77** :1117~1124
- [2] Pallard C, Gouilleux F, Benit I *et al.*. *EMBO J*, 1995, **14** :2847~2856
- [3] Wendling F, Vainchenker W. *Eur Cytoine Netw*, 1998, **9**(3) :221~231
- [4] Chomzynski P, Sacchi N. *Anal Biochem*, 1987, **162** :156~159

- [5] Sambrook J ,Fritsh E F ,Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* ,2nd ed ,New York : Cold Spring Harbor Laboratory ,Cold Spring Harbor ,1989
- [6] Mignotte V ,Vigon I ,Crevecoeur E B *et al.* *Genomics* ,1994 **20** :5~12
- [7] Methia N ,Louache F ,Vainchenker W *et al.* *Blood* ,1993 **82** (5) :1395~1401
- [8] Debeli N ,Wendling F ,Cosman D *et al.* *Blood* ,1995 **85** (2) :391~401

Cloning of a Full Length cDNA of Human Thrombopoietin Receptor c-Mpl and Construction of Engineered Cells that Stably Express *c-mpl*

ZHAO Xin-Yan CAI Jing-Li DAI Wei-Lie ZHOU Wei-Guo LI Chang-Ben ZHAO Shou-Yuan
(State Key Laboratory of Genetic Engineering ,Institute of Genetics ,Fudan University ,Shanghai 200433)

Abstract A full length cDNA fragment encoding for human thrombopoietin receptor c-Mpl has been amplified by RT-PCR from the total RNA of human HEL cells. The complete sequence of the cloned cDNA was determined and is identical to that previously reported. Then the fragment was subcloned into the mammalian expression vector pcDNA3 and the resulting plasmid is designated as pcMPL. K562 cells ,which do not express *c-mpl* ,were transfected with pcMPL and pcDNA3 ,respectively. The transformants were selected with G418 and then tested by Northern and Southern blotting. A group of engineered cell lines stably expressing *c-mpl* have been obtained ,which will facilitate further research on the signaling mediated by c-Mpl.

Key words Human thrombopoietin receptor c-Mpl ,RT-PCR ,transfection ,K562 cell ,expression