

研究报告

两种跨膜蛋白携带 myc 于细胞表面的能力比较

刘庆军^{1,2}, 韩化敏², 张兆山¹, 高斌²

1 中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 在细胞表面表达具有某种功能的蛋白后, 这些细胞就具备了某些新功能, 可以对其进行功能研究和应用。将功能蛋白连接到某些跨膜蛋白的胞外区是实现目的蛋白表达于细胞表面的手段之一。本研究比较了 2 种跨膜蛋白 A2TM 和 Δ LNGFR 携带外源蛋白 - myc 于细胞表面的能力。利用重叠 PCR 法合成的 A2TM 和 Δ LNGFR 基因片段与载体 pEF/myc/ER 和载体 LL3.7 进行酶切、连接、转化、鉴定, 成功构建了 pEF-A2TM、pL-A2TM 和 pL-LN 真核表达载体。利用磷酸钙沉淀法转染 293FT 细胞, 荧光显微镜下观察 EGFP 的表达、流式细胞术检测 myc 在细胞表面的表达情况, Western blotting 检测 myc 目的蛋白的表达。pL-A2TM 和 pL-LN 转染 293FT 细胞 36 h 后的荧光强度基本相同, 表明 A2TM 和 Δ LNGFR 在细胞内表达的强度相似。流式细胞术分析显示, Δ LNGFR 和 A2TM 均可在细胞表面表达, 但 A2TM 只有在指示蛋白 EGFP 表达非常高的情况下才能在细胞表面被检测到。Western blotting 显示 Δ LNGFR 表达量很高, 而 A2TM 没有达到检测水平。结果表明, 以糖基化形式存在的 Δ LNGFR 比没有糖基化的内源 A2TM 的表达更稳定, A2TM 在表达量低时可能易被细胞内的蛋白酶降解, 因而 Δ LNGFR 是一种能携带外源蛋白于细胞表面的比较理想的跨膜蛋白。

关键词: 跨膜蛋白, myc 抗原决定簇, 细胞表面, 表达差异

Comparison of Two Transmembrane Proteins as Fusion Partner for Protein Expression on the Surface of Cell

Qingjun Liu^{1,2}, Huamin Han², Zhaoshan Zhang¹, and Bin Gao²

1 Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: The expression of a soluble protein on cell surface is often desirable for study of a functional protein, wide application of a protein or investigation of protein-protein interaction. The expression of a soluble protein on the surface of a cell is often achieved by genetically linking a protein to the extra-cellular fragment of a transmembrane partner. In this study, the myc epitope was linked with N terminal of transmembrane proteins either A2TM or Δ LNGFR amplified by overlapping PCR. The plasmids expressing fusion protein were transfected into 293FT cells and the expression of target proteins was evaluated by fluorescent microscope, flow cytometry and Western blotting. The results of flow cytometry revealed that both A2TM and Δ LNGFR were expressed on the cell surface, but A2TM could only be detected with high copy number. Western blotting showed that the expression level of Δ LNGFR was very high and protein was heavily glycosylated, by contrast the expression of A2TM was hardly detected. The results indicate that glycosylated Δ LNGFR is a good candidate partner for the expression of a soluble protein on the cell surface.

Received: April 25, 2008; **Accepted:** May 27, 2008

Supported by: the National Natural Science Foundation of China (No. 30771953).

Corresponding author: Bin Gao. Tel: +86-10-64807408; Fax: +86-10-64807338; E-mail: bgao2008@gmail.com

国家自然科学基金项目(No. 30771953)资助。

Keywords: transmembrane protein, myc epitope, surface expression, expression difference

在细胞表面表达某些目的蛋白使其增强或获得新的功能是改造细胞的一种重要手段。研究者一般是在对蛋白性质比较清楚的情况下,利用基因工程手段将表达某种目的蛋白的基因与跨膜蛋白基因相连,目的蛋白在跨膜蛋白的作用下表达于细胞表面,最终达到对细胞的功能进行研究和应用的目的。而该技术的关键步骤在于选择跨膜蛋白,即能够较好的将外源蛋白携带到细胞表面,从而获得某种具有特异性功能的细胞。本研究选取 2 种跨膜蛋白分别是 A2TM 和 Δ LNGFR。以抗原决定簇 myc(EQKLISEEDL)作为外源蛋白,将其连接到 2 种跨膜蛋白的 N 端,通过细胞表面的 myc 蛋白表达情况来比较 2 种跨膜蛋白携带外源蛋白到细胞表面的能力。

A2TM 是表达主要相容性复合体(MHC)I 类分子 A2 重链跨膜域(Transmembrane domain of HLA-A2, A2TM)的简写。MHC-I 分子表达在几乎所有的有核细胞表面,它由 1 条糖蛋白重链(α 链)和 1 条轻链(β_2m)通过非共价结合形成的异二聚体。 α 链由胞外区、跨膜区和胞内区组成,它通过跨膜区和胞内区固定在细胞膜上。胞外区从 N 端起为 α_1 、 α_2 和 α_3 结构域。人的 α 链上只有在 α_1 域上有 1 个糖基化位点^[1]。本研究所用的 A2TM 跨膜蛋白位于 HLA-A2 的 293~343 位,含有 51 个氨基酸残基,其包括 HLA-A2 基因型的 α 链的一部分 α_3 区、跨膜区和胞内区的一部分。

LNGFR 是低亲和力神经生长因子受体(Low affinity nerve growth factor receptor)的简写,又名 p75^{NTR}受体,属于死亡受体家族^[2],是 1 个 75 kD 高度保守性的糖蛋白,由位于 17 号染色体的长为 23 kb 的基因编码^[3]。LNGFR 只含有 1 个跨膜螺旋,在其胞外区由包含有 4 个半胱氨酸域(Cysteine-rich domain, CRD)的 222 个氨基酸组成,胞内区包含 1 个由 150 个氨基酸组成的“Chopper”域^[4]和 1 个含有 80 氨基酸的死亡域(Death domain)^[5]。广泛地存在于外周神经系统和其他非神经组织,空间结构比较保守,人的 LNGFR 与大鼠、小鼠和鸡的空间结构相似^[6]。 Δ LNGFR 是截短的低亲和力的神经生长因子受体的简写,它位于成熟 LNGFR 蛋白的 31~277 位,含有 247 个氨基酸残基,其包括胞外区、

跨膜区和胞内区的一小部分(不包括胞内的 2 个功能域)。据报道, Δ LNGFR 在 JurkatT^[7]、293T 和 K562 细胞膜上^[8]都可以表达。

本研究将抗原决定簇 myc 直接与 A2TM 和 LNGFR 的 N 端连接,转染真核细胞,比较 A2TM 和 Δ LNGFR 携带抗原决定簇 myc 并表达于细胞表面的能力。

1 材料与方法

1.1 材料

所用的限制性内切酶均为 NEB 公司产品;引物是利用 VECTOR NTI 和 Primer6 软件设计并由上海英骏生物技术有限公司合成;序列测定由北京奥科生物技术有限责任公司完成。

磷酸钙转染所用试剂均为国产;D10(含有 10% 胎牛血清,100 单位/mL 青霉素 G 钠盐,100 μ g/mL 链霉素的 DMEM)。

抗体:Anti-myc 单抗(EpigenBiotec)、anti-LNGFR 单抗(BD)、山羊抗小鼠 IgG-PE(EpigenBiotec)、山羊抗小鼠 IgG-PE/Cy5(BD)、过氧化物辣根酶标记的山羊抗小鼠二抗 IgG-HRP(Santa Cruz)。

Western blotting: 电泳缓冲液(0.025 mol/L Tris、0.192 mol/L 甘氨酸、0.1% SDS)、电转缓冲液(0.02 mol/L Tris、0.15 mol/L 甘氨酸、20% 甲醇)、4%~12% SDS-PAGE 梯度胶(Invitrogen)、硝酸纤维素膜(Amersham Biosciences)、0.5% 丽春红、ECL 超敏发光液(北京普利来基因技术有限公司)、X 光片(KODAK)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的构建

(1)真核表达载体 pEF-A2TM 的构建:以 HLA-A2 基因为模板利用重叠 PCR 法将 myc 基因连接到 A2TM 的 N 端,同时在 myc 的 N 端通过(GGGGS)₂ linker 连接了 BirAtag 短肽(GLNDIFEAQKIEWHE)。然后用 *Pst* I/*Not* I 酶切后插入到 pEF/myc/ER 载体(Invitrogen)中,从而引入了 EF-1a 启动子和内质网(Endocoplasmic reticulum, ER)信号肽(图 1)。此 ER 信号肽为小鼠的 Vh 链信号肽,具有引导目的蛋白进入 ER,最终使目的蛋白分泌到细胞表面的功能(详见产品说明书)。经过酶切和测序鉴定正确。构建

成了 pEF-A2TM 载体。所用引物如下(5'-3'):

TM-1: AACTGCAGGGCCTGAACGACATCTT
CGAGGCCAGAAAGATCGAGTGGC

TM-2: CACCTCCGCCAGATCCGCCACCTCC
CTCGTGCCACTCGATCTTCTGGG

TM-3: GCGGATCTGGCGGAGGTGGCTCGGG
TGGCG GCGGAT CCGGCGGCGGCG

TM-4: CCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCG
CTGC CGCCG CCGCC GGATC CGC

TM-5: AACTCATCTCAGAAGAGGATCTGCC
CAAGCCCCTCACCTGAG

TM-6: CGTAGCGGCCGCCTATTTTCTATCTG
AGCTCTTCC

(2)表达 A2TM 的慢病毒质粒载体 pL-A2TM 的构建: 以 pEF/myc/ER-A2TM 为模板, 扩增出的 EF-1a-ER-A2TM 片段插入到 LL3.7 载体^[9]的 *Xba* I 和 *Not* I 之间, 替换掉载体原来的 U6 表达盒。经酶切和测序鉴定正确, 成功构建成了 pL-A2TM, 所用引物(5'-3'):

EF-*Xba* I: GCTCTAGAAAGCTTCGTGAGGCT
CCGGT

TM-6: CGTAGCGGCCGCCTATTTTCTATCTG
AGCTCTTCC

(3)表达 LNGFR 的慢病毒质粒载体 pL-LN 的构建: 以质粒 SFIL^[7]为模板, 利用重叠 PCR 法将 myc 连接到 LNGFR 的 5'端, 在其两端引入 *Bgl* II(*Bam*HI 的同尾酶)和 *Not* I 酶切位点, 经 *Bgl* II/*Not* I 酶切后然后插入到 1.2.1(2)构建的载体 pL-A2TM 的 *Bam*HI (位于 pL-A2TM 载体上的 myc 之前)和 *Not* I 之间, 最终完全替换掉了 1.2.1(2)中的 A2TM 基因。至此构建成了 pL-LN 载体。所用引物(5'-3'):

LN-*Bgl* II: GCATGGAAGATCTGAACAAAAAC
TCATCTCAGAAGAGGA

LN-1: CATCTCAGAAGAGGATCTGGGAGGT
GCATGCCCCACAGGCT

LN-*Not* I: GATAAGAATGCGGCCGCTCTAGA
ACTAGT

1.2.2 转染 293FT 细胞

利用磷酸钙沉淀法转染 293FT 细胞, 所用质粒 pEF-A2TM、pL-A2TM 和 pL-LN 皆为用酚、氯仿抽提去除内毒素的大提质粒。转染方法(针对 10 cm 培养皿)主要步骤: 在转染前 1 h 用无血清的 DMEM 换 D10; 用 25 μ g 质粒融入转染用水(2.5 mmol/L HEPES, pH 7.4)中, 终体积为 250 μ L, 然后加入 250 μ L 0.5 mol/L CaCl_2 , 混匀; 将质粒- CaCl_2 混合物逐滴加到 500 μ L 2 \times HEPES(NaCl 0.28 mol/L; HEPES 0.05 mol/L; 无水 Na_2HPO_4 1.5 mmol/L; pH 7.0)中,

同时以最大转速进行涡旋; 静置 20 min 后加到细胞培养皿中。6 h 后更换成新鲜的 D10。

1.2.3 流式细胞术检测 myc 的表达

转染 36 h 后, 用 0.1%胰酶-EDTA 消化细胞, 然后用 D10 终止反应, 用 PBS 洗 3 次。将样品分置于流式管中, 样品 pEF-A2TM 为 7 份, pL-A2TM 和 pL-LN 为 5 份, 每份 100 万细胞。3 种样品的 2 份进行 anti-myc 标记, 为防止二抗由于非特异性吸附造成对流式结果误判, 用二抗 IgG-PE 和 IgG-PE/Cy5 分别进行标记; 各取 2 份分别只用二抗 IgG-PE 和 IgG-PE/Cy5 标记, 作为阴性对照; 2 份 pEF-A2TM 用 W6/32 标记后分别用二抗 IgG-PE 和 IgG-PE/Cy5 标记作为阳性对照; 一份 pL-LN 用 anti-LNGFR 标记, 然后用二抗 IgG-PE/Cy5 进行标记; 3 种样品各取一管不标记。一抗冰上标记 0.5 h 后, 用冰浴的 PBS 洗 3 次后标记二抗, 避光置于冰上标记 0.5 h, PBS 洗 3 次后进行流式细胞仪(BD)检测。

1.2.4 Western blotting 检测

用裂解缓冲液(0.5% NP40 PBS, 含蛋白酶抑制剂混合物)裂解细胞, 取上清, 加入上样缓冲液(含 DTT), 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 各取 10 μ L 上样进行 SDS-PAGE (200 V, 40 min); 转膜(300 mA, 40 min); 3%牛奶 PBS 封闭 1 h, 加入含有 anti-myc(1:1000) 3%牛奶 PBST 摇动 1 h; PBS 洗 3 次, 用含有 IgG-HRP(1:2000) 的 3%牛奶 PBST 摇动 1 h; 用 PBST 洗 2 次后再用 PBS 洗 2 次; 将膜晾干, 加显色液于膜上, 静置 5 min, 用吸水纸将液体吸干, 用封口膜将膜包住放入暗盒内, 加入 X 光胶片, 进行曝光、显影和定影。

2 结果

2.1 不同重组质粒的构建

以 HLA-A2 为模板, 以重叠 PCR 法扩增出的 A2TM 首先插入到 pEF/myc/ER 的 *Pst* I/*Not* I 之间, 所挑的克隆经酶切和测序鉴定正确(图 1, B), 构建成了真核表达载体 pEF-A2TM。以 pEF-A2TM 为模板扩增出的 EF-A2TM 插入到 LL3.7 的 *Xba* I/*Not* I 之间(图 1, A 和 B), 所挑的重组质粒克隆经 *Xba* I/*Not* I 酶切鉴定, 切出约 1615 bp 的条带(图 2), 构建的慢病毒载体 pL-A2TM 经测序鉴定正确。以质粒 SFIL 为模板扩增出的 LNGFR 片段经 *Bgl* II/*Not* I 切割后, 插入到 pL-A2TM 的 *Bam*HI/*Not* I 之间, 替换掉载体

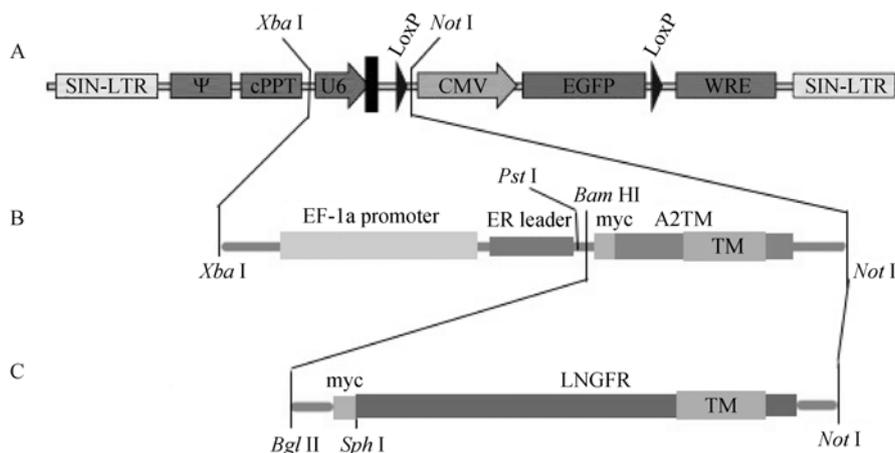


图1 重组质粒载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids

A: the initial construct of pLentiLox3.7 (LL3.7); B: the cassette construct of pEF-A2TM; C: the construct of Δ LNGFR

中的 myc-A2TM 片段(图 1, A、B 和 C)。所挑的重组克隆质粒经 *Sph I/Not I* 酶切鉴定, 切出约 761 bp 条带(图 2), 构建的慢病毒载体 pL-LN 经测序验证正确。

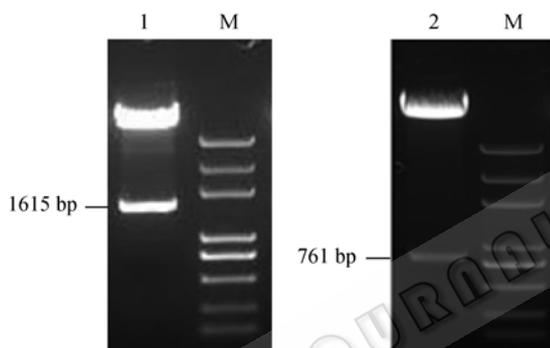


图2 重组质粒 pL-A2TM、pL-LN 的酶切分析

Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of recombinant plasmids pL-A2TM and pL-LN

1: pL-A2TM; 2: pL-LN; M: DNA marker (DL2000)

2.2 转染 293FT 细胞

用磷酸钙沉淀法转染 293FT 细胞后 36 h, 荧光显微镜下观察: pEF-A2TM 未见绿色荧光, pL-A2TM 和 pL-LN 转染的细胞所发 EGFP 绿色荧光表达未见明显差别(图 3), 但二者转染的细胞所发的 EGFP 绿色荧光强度都不同, 有的很强, 有的则比较弱。

2.3 流式细胞术检测分析

利用 anti-myc 检测 pL-LN、pL-A2TM 和 pEF-A2TM 转染的 293FT 细胞表面的 myc 表达情况。利用二抗 IgG-PE 标记的流式结果表明(图 4A), pL-LN 转染的细胞, 凡是 EGFP 阳性的细胞, myc 皆为阳性; 而 pL-A2TM 转染的细胞只有 EGFP 荧光强度非常强的细胞表面才能检测到 myc 的表达, 这些

表达 myc 的细胞大约占 EGFP 阳性细胞总数的 20%; 在同样的转染效率之下, pL-A2TM 转染的细胞表面 myc 阳性的细胞与 pL-A2TM 转染的 myc 阳性细胞基本相同。利用二抗 IgG-PE/Cy5 标记流式结果与用二抗 IgG-PE 标记的流式结果相同(图 4B)。用一抗 anti-LNGFR 标记 pL-LN 转染的细胞, 流式结果表明, 其与 myc 的流式检测结果基本一致(图 4B 和图 4C)。

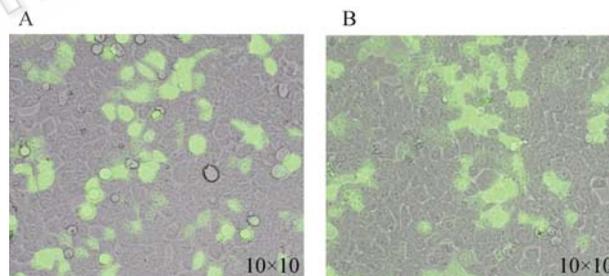


图3 重组质粒 pL-LN、pL-A2TM 转染 293FT 细胞的荧光照片(10×10)

Fig. 3 Fluorescence micrographs of 293FT cells transiently transfected with recombinant plasmids pL-LN and pL-A2TM respectively (10 × 10)

A: pL-LN; B: pL-A2TM

2.4 Western blotting 检测结果

在蛋白转膜之后, 利用 0.5% 丽春红染色结果显示, 各泳道的条带颜色基本一致, 而且蛋白从 SDS-PAGE 胶转移到醋酸纤维素膜上的效率比较高(图 5A)。带有 myc 的跨膜蛋白印迹结果显示: pL-LN 出现两条条带, 大小分别约为 50 kD 和 65 kD。这与 myc-LNGFR 蛋白大小的理论值约为 31 kD 相差甚远(图 5B)。pL-A2TM 和 pEF-A2TM 均应表达理论大小为 9.4 kD 的目的蛋白, 但蛋白印迹未出现此目的条带。

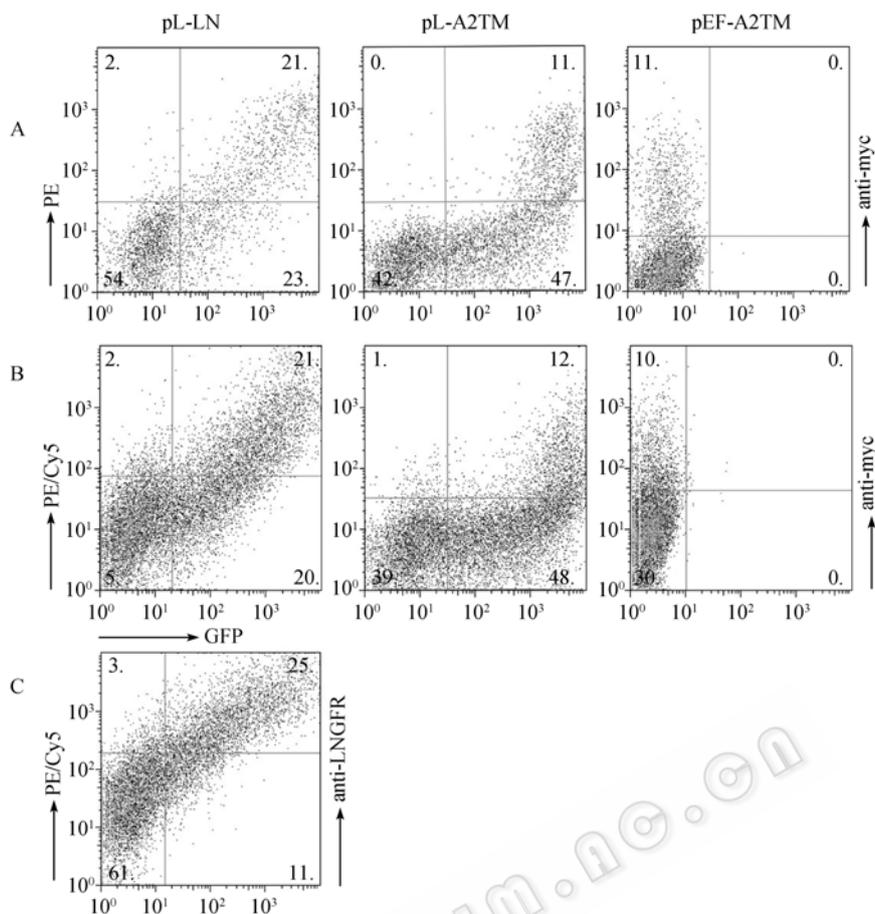


图 4 重组质粒 pL-LN、pL-A2TM 和 pEF-A2TM 转染 293FT 细胞的流式分析
 Fig. 4 FACS analysis of 293FT transiently transfected with recombinant plasmids pL-LN, pL-A2TM and pEF-A2TM respectively

A: the cell labelled with anti-myc and IgG-PE; B: the cell labelled with anti-myc and IgG-PE/Cy5; C: the cell labelled with anti-LNGFR and IgG-PE/Cy5

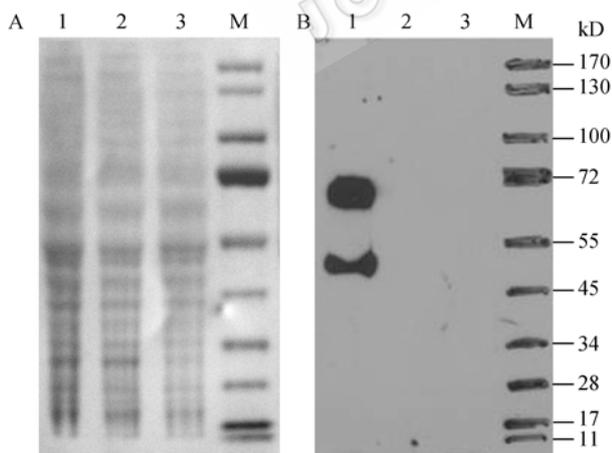


图 5 重组质粒 pL-LN、pL-A2TM 和 pEF-A2TM 转染 293FT 细胞的 Western blotting 分析
 Fig. 5 Western blotting analysis of 293FT cells transfected with recombinant plasmids pL-LN, pL-A2TM and pEF-A2TM respectively

A: the image of nitrocellulose filter dyed with ponceau red; B: Western blotting of myc fusion partner 1: pL-LN; 2: pL-A2TM; 3: pEF-A2TM

3 讨论

外源基因在真核细胞的表达除了转录和翻译两个水平上的调控外,还存在转录后的 mRNA 剪接和翻译后的修饰加工,如乙酰化、糖基化等。在本研究中所采用的启动子是 pEF/myc/ER 载体自身的 EF-1a 强启动子,而且还采用了此载体上的 ER 信号肽序列。此信号肽序列含有内含子,据报道其具有增强蛋白表达的功能。所构建的 3 个载体 pL-LN、pL-A2TM 和 pEF-A2TM 在启动子和 ER 信号肽内含子的水平上是完全相同的。pL-LN、pL-A2TM 都具有 2 个表达盒,除了带有 myc 的跨膜蛋白表达盒外,还有 1 个由 CMV 启动子启动表达 EGFP 的表达盒。通过瞬时转染 293FT 细胞的荧光照片(图 3)可以看出, pL-LN、pL-A2TM 的 EGFP 表达水平是一样的。由此推测,2 个载体上由 EF-1a 启动表达的在 N 端带有

myc 跨膜蛋白 LN 和 A2TM 表达也应该处于相同的水平。虽然通过其他实验表明, EF-1a 的启动蛋白表达能力比 CMV 的要弱(数据未列出), 但从 pL-LN、pL-A2TM 转染细胞的绿色荧光强度上推测, 2 种启动子对聚合酶的相互竞争对目的蛋白表达的影响不是很大。

在真核细胞内, 蛋白表达后要在 ER 中进行加工修饰。在 ER 中存在着大量的蛋白酶, 它们负责细胞内功能蛋白的检测, 一旦发现某些蛋白翻译错了, 这些蛋白酶就会将有问题的蛋白降解。从 pL-LN 与 pL-A2TM 转染细胞的 EGFP 荧光强度来看, 二者都存在细胞间的 EGFP 强弱差别, 推测此差别是由进入细胞的拷贝数不同(或者说细胞间的转染效率不同)造成的。当进入细胞的质粒拷贝数高时, EGFP 的表达强度就高, 反之则弱。流式检测结果(图 4)表明, pL-LN 转染的细胞, EGFP 阳性的细胞表面 myc 都有表达, 而且随着 EGFP 荧光强度增强, myc 的表达强度也增强, 在细胞表面的密度增加。pL-A2TM 和 pEF-A2TM 所表达的目的蛋白都是 myc-A2TM, 通过流式结果来看, 二者转染的 293FT 细胞表面的 myc 表达一致, 但二者都较 pL-LN 转染的细胞细胞表面的 myc 强度(密度)低很多。通过对流式结果进一步分析发现, pL-A2TM 转染的细胞只有在 EGFP 的荧光强度(或者说表达强度)非常高时, 细胞表面的 myc 才能通过流式细胞术检测到。这也就是说, 在 EGFP 的荧光强度(或者说表达强度)非常高时, 在同一个载体上的另一个表达盒由 EF-1a 启动子启动表达的 A2TM 也同样达到很高的水平。pL-LN 与 pL-A2TM 转染细胞的 EGFP 荧光强度基本相同(图 3), 但细胞表面 myc 的表达存在较大的差别, 由此推测, A2TM 可能被 293FT 内的蛋白酶认作为翻译错了的内源蛋白 HLA-A2, 从而将表达的 A2TM 降解掉; 特别是 A2TM 比较小, 更容易被细胞质内的蛋白酶降解。当转入细胞的质粒数低(1 个或 2 个), 虽然 A2TM 与 EGFP 都表达, 但表达的 A2TM 随即被蛋白酶降解掉了, 故在此种细胞表面检测不到 myc 的表达。只有当进入细胞内质粒拷贝数较高时, 没有被完全降解掉的 A2TM 才可以表达达到细胞表面。293FT 细胞本身是一种 HLA-A2 阳性的细胞系, 推测在细胞内存在着对 HLA-A2 蛋白进行检测的蛋白酶体, 故通过基因工程改造过的 A2TM 很容易被

细胞内的蛋白酶体认为是翻译错的 HLA-A2 后被降解掉。LNGFR 在 293FT 细胞内完全作为一种外源蛋白, 它被降解的几率比 A2TM 要小。

真核细胞内有些蛋白还要在高尔基体内进行糖基化修饰, 被糖基化的蛋白稳定性会增强。从 Western blotting 结果来看, pL-LN 转染的细胞表达的 myc-LNGFR 出现了 2 条带(图 5), 而且比预想的条带大小大很多, 65 kD 条带比 50 kD 条带的灰度强很多。经对 LNGFR 的氨基酸序列分析后发现, LNGFR 内含有大量的 Cys, 所以这里存在表达的 LNGFR 形成二聚体的可能性。但是, 在上样缓冲液和电泳缓冲液中都加入了 DTT, 而且, LNGFR 只有在神经生长因子的作用下才能发生二聚体化^[10], 所以在蛋白印迹上的条带以二聚体形式存在的 LNGFR 的几率很小。在蛋白印迹上出现 2 条大小不等的 myc 条带, 经过一抗 anti-LNGFR 标记确认, 这两条带都为 anti-LNGFR 阳性, 两条带的差异可能是由于蛋白的 C 端长度不同或蛋白在成熟过程中被糖基化造成的。Dechant 和 Barde^[11]在 1997 年与 Roux 和 Barker^[5]在 2002 年分别报道, 细胞中存在跨膜域和胞内区都保持完整的 LNGFR 截短形式, 这由于外显子 3 在剪接过程中被剪切掉后造成 CRD1-3 域缺失造成的。Chao^[12]和 Kanning 等^[13]在 2003 年报道, 由于 ADAM-10 和 ADAM-17 金属蛋白酶的作用, 在 LNGFR 的胞外域可以在靠近细胞膜的位点被剪切下来。LNGFR 的胞内域也可以从靠近细胞膜的位点被剪切下来^[13]。本试验所采用的是 Δ LNGFR, 它基本上不包括胞内域, 所以也就没有胞内靠近跨膜域被金属蛋白酶消化的可能性。但是如果在 mRNA 发生剪接, CRD1-3 缺失, 但 myc 连接到 CRD4 的 N 端, 所产生的蛋白至少减小 115 个氨基酸, 但这样的条带在蛋白印迹上并没有出现, 这说明这种剪切几率比较小, 而且 Δ LNGFR 没有胞内域, 也可能影响了 mRNA 的剪接。所以本研究小组认为, mRNA 的剪接和蛋白酶对 LNGFR 的消化占总的 LNGFR 的比例很小, 更相信蛋白印迹上的这两条带是由于蛋白糖基化程度不同造成的。Chapman 等^[14]追踪了 LNGFR 胞外区在 CHO 细胞内的 O-糖基化动态过程, 其开始的 45 kD 和由连接有分子伴侣 GRP78 的 45 kD 蛋白组成的 80 kD 蛋白逐步成熟为 58 kD 的经糖基化修饰的成熟蛋白, 在转染后 5.5 h 时经糖基化修饰的

成熟蛋白达到最高水平, O-糖基在 LNGFR 胞外区的结构为(NeuNAc)₁₋₂-Gal β 1-3GalNAc, 成熟的糖基化蛋白与不成熟的蛋白大小相差约 13 kD。在本实验中, 进行蛋白印迹的蛋白样品为细胞转染后 36 h 的裂解物, 50 kD 与 65 kD 的蛋白大小也正好相差约 13 kD, 所以我们推测约 50 kD 的条带相当于 Chapman 实验中的 45 kD 不成熟蛋白, 约 65 kD 的蛋白即为经糖基化修饰的 58 kD 成熟蛋白。蛋白印迹结果表明, 约 65 kD 条带灰度非常深, 说明经糖基化修饰的成熟蛋白表达量很高。在不加蛋白酶抑制剂时, 蛋白放置一段时间后进行的蛋白印迹结果发现, 50 kD 条带变弱或完全消失, 65 kD 条带没有变化(结果没有显示), 这说明了没有被完全糖基化的约 50 kD 不成熟蛋白的稳定性大大降低。在本研究中, A2TM 不包括 HLA-A2 的 α 1 和 α 2 域, 所以此蛋白没有糖基化位点, 没有被蛋白酶降解的 A2TM 虽然经流式细胞术能够检测出来, 但是用 Western blotting 检测不到, 这可能是由于剩余的 A2TM 没有达到 Western blotting 的检测水平。没有被糖基化的 A2TM 也和约 50 kD 的 LNGFR 一样, 其不稳定性大大增强, 这也进一步解释了本研究中在 293FT 细胞表达的 LNGFR 与 A2TM 在流式细胞术的结果和 Western blotting 结果上的差别原因。

综上所述, 利用基因工程手段构建改造的 2 种跨膜蛋白 A2TM 和 Δ LNGFR 虽然都可以将 myc 表达到细胞表面, 但是由于在细胞内存在着对 mRNA 剪接和蛋白酶的消化以及糖基化等因素造成它们在细胞表面表达 myc 的差别。这为以后的跨膜蛋白设计和应用打下了基础。 Δ LNGFR 是一种比较稳定的糖蛋白, 较 A2TM 携带 myc 的于细胞表面的能力要强很多, 所以 Δ LNGFR 是一个比较理想的能携带外源蛋白于细胞表面的跨膜蛋白。

REFERENCES

- [1] Maloy WL. Comparison of the primary structure of class I molecules. *Immunol Res*, 1987, **6**(1-2): 11-29.

- [2] Chapman BS. A region of the 75 kD neurotrophin receptor homologous to the death domains of TNFR-I and Fas. *FEBS Lett*, 1995, **374**(2): 216-220.
- [3] Huebner K, Isobe M, Chao M, *et al.* The nerve growth factor receptor gene is at human chromosome region 17q12-17q22, distal to the chromosome 17 breakpoint in acute leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**(5): 1403-1407.
- [4] Coulson EJ, Reid K, Shipham KM, *et al.* The role of neurotransmission and the chopper domain in p75 neurotrophin receptor death signaling. *Prog Brain Res*, 2004, **146**: 41-62.
- [5] Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol*, 2002, **67**(3): 203-233.
- [6] Yamamoto M, Sobue G, Mutoh T, *et al.* Gene expression of high- (p140trk) and low-affinity nerve growth factor receptor (LNGFR) in the adult and aged human peripheral nervous system. *Neurosci Lett*, 1993, **158**(1): 39-43.
- [7] Qasim W, Thrasher AJ, Buddle J, *et al.* T cell transduction and suicide with an enhanced mutant thymidine kinase. *Gene Ther*, 2002, **9**(12): 824-827.
- [8] Nesbeth D, Williams SL, Chan L, *et al.* Metabolic biotinylation of lentiviral pseudotypes for scalable paramagnetic microparticle-dependent manipulation. *Mol Ther*, 2006, **13**(4): 814-822.
- [9] Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, *et al.* A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*, 2003, **33**(3): 401-406.
- [10] Freund-Michel V, Frossard N. The nerve growth factor and its receptors in airway inflammatory diseases. *Pharmacol Ther*, 2008, **117**(1): 52-76.
- [11] Dechant G, Barde YA. Signalling through the neurotrophin receptor p75NTR. *Curr Opin Neurobiol*, 1997, **7**(3): 413-418.
- [12] Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci*, 2003, **4**(4): 299-309.
- [13] Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, *et al.* Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci*, 2003, **23**(13): 5425-5436.
- [14] Chapman BS, Eckart MR, Kaufman SE, *et al.* O-linked oligosaccharide on the 75-kDa neurotrophin receptor. *J Neurochem*, 1996, **66**(4): 1707-1716.