

鸡催乳素受体胞外域的分子克隆及原核表达

刘颖¹, 黎敏义, 刘志, 李孝伟, 施振旦

(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:根据家鸡催乳素受体基因胞外域序列(GenBank号:D13154)设计并合成1对覆盖编码区58~1249位核苷酸的引物,以家鸡垂体总RNA为模板,经反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法获得了特异性片断,将该片断克隆入pMD18-T载体并转化感受态细菌*E. coli* DH5 α 永久保存.通过设计第2对引物扩增PRLR胞外域cDNA片段,该片段经酶切后克隆到表达载体pRSET A的EcoR I和Hind III两酶切位点之间,构建重组质粒pR-PRLR.该质粒在转化感受态细菌*E. coli* BL21(DE3)后,在IPTG诱导下促使重组菌表达了相对分子质量为53 640左右的重组融合蛋白,表达量在0.1 mmol/L IPTG诱导5 h时达到最高,约占总菌体蛋白的17.6%左右.表达产物可经体积分数为50%的Ni-NTA凝胶纯化,说明重组蛋白中具有正确的His-tag标签及之后的鸡催乳素受体编码区胞外域序列.

关键词:鸡催乳素受体基因;胞外域;克隆;表达;纯化

中图分类号:Q78

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2006)04-0073-05

Molecular Cloning and Prokaryotic Expression of Chicken Prolactin Receptor Extracellular Domain

LIU Ying¹, LI Min-yi, LIU Zhi, LI Xiao-wei, SHI Zhen-dan

(College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: A pair of primers were synthesized according to the sequence of chicken prolactin receptor (PRLR) gene extracellular domain (ECD) fragment (GenBank No. D13154). Total RNA was extracted from the chicken pituitary tissue and used as template to amplify the PRLR ECD fragment by RT-PCR. The 1 200 bp PCR product was then cloned into the pMD18-T vector and the resultant plasmid was transformed into *E. coli* DH5 α . A second pair of primers were synthesized for amplification and insertion of the ECD fragment into the EcoR I and Hind III sites of the pRSET A vector, generating the recombinant plasmid pR-PRLR which was subsequently transformed into *E. coli* BL21(DE3). The transformed bacteria were induced with IPTG and produced a recombinant protein of 53 640 relative molecular mass which accounted for 17.6% of the total bacterial protein. The recombinant product was purified by 50% Ni-NTA agarose, which indicated its composition of a correct His-tag amino acid sequence and the subsequent PRLR ECD.

Key words: chicken prolactin receptor gene; extracellular domain; cloning; expression; purification

催乳素(prolactin, PRL)是垂体前叶分泌的一种多肽激素,与生长激素、胎盘催乳素属于同一基因家族.催乳素在鱼类、两栖类、爬行类、鸟类和哺乳类具有多种不同的功能,如电解质平衡、调节渗透压、生长和发育、内分泌和代谢、免疫调控和保护、繁殖功能和就巢行为等超过300种功能,因而也被誉为“万能激素”.催乳素的这些功能是通过其位于细胞表

面的催乳素受体(prolactin receptor, PRLR)而实现的. PRLR属于细胞因子受体,是一跨膜蛋白,由胞外域(extracellular domain, ECD)、跨膜域(transmembrane domain, TMD)和胞内域(intracellular domain, ICD)组成.1个PRL分子先与细胞表面1个受体的ECD结合后形成二聚体,二聚体中的催乳素分子再与另一受体的ECD结合,形成1个激素结合2个受

收稿日期:2005-12-29

作者简介:刘颖(1975—),女,博士研究生;通讯作者:施振旦(1964—),男,教授,博士,E-mail:zdshi@scau.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金团队项目(04205804);教育部博士点基金(20050564001)

体分子的三聚体,再通过 JAK/STAT 途径、Ras/Raf/MAP 激酶途径和 Fyn 3 种途径产生细胞内信号传导^[1]。PRLR 基因转录后经过不同的剪辑,可产生 3 种具有相同 ECD 的不同的 PRLR,即长型、中间型和短型受体,这些不同类型的受体被发现在多种组织中有表达^[2-4],很有可能是其多种功能的分子基础。目前内分泌调控的研究发展方向之一为对受体进行调控,从而研究激素的功能^[5-7]。我们在研究 PRL 对鸡繁殖调控的工作中,开展了对鸡 PRLR 的调控研究工作,本文报告鸡 PRLR 胞外域的表达式和纯化,所获得的重组鸡 PRLR 融合蛋白将用于下一步的研究工作中。

1 材料与方法

1.1 载体和菌株

克隆菌 *E. coli* DH5 α ,表达菌 *E. coli* BL21(DE3) 和 pRSET A 载体由华南农业大学动物遗传育种与繁殖实验室保存。

1.2 试剂和酶类

限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、*Hind* III、*Ex* Taq DNA 聚合酶、DNA marker DL2000、pMD18-T 载体试剂盒为 TaKaRa 产品,质粒小量抽提试剂盒(Omega)及胶回收试剂盒(Omega)购于广州齐特科生物工程有限公司,用于纯化的带有 His-tag 的体积分数为 50% 的 Ni-NTA 凝胶(Qiagen)购自基因公司。低相对分子质量蛋白质 marker(Tiagen)和 RNA 抽提试剂盒 Trizol(Invitrogen)购自广州英韦创津生物有限公司。

1.3 试验动物

90 日龄杏花鸡和隐性白洛克杂交 F₃ 代来自广东省温氏食品集团南方育种公司。

1.4 鸡 PRLR 基因 ECD 片段的克隆

根据鸡 PRLR 基因编码区 ECD 序列(GenBank 号:D13154)设计并由上海博亚公司合成 1 对引物。上游引物 PRLR1 序列为:PRLR1:5'-GTGGCTCTGGCAG-GTCAATCAT-3'(编码区 58~79 位),PRLR2:5'-CATG-GTGCTCAGGTTTGCAGTG-3'(编码区 1 228~1 249 位)。取 90 日龄杏花鸡和隐性白洛克杂交 F₃ 代的垂体组织,用 TRIzol 试剂盒抽提总 RNA 作为模板,用引物 PRLR1 和 PRLR2 进行 RT-PCR 扩增。扩增得到的 PCR 产物克隆入 pMD18-T 载体,重组质粒(命名为 pMD-PRLR)在 *E. coli* DH5 α 株中复制,进行 PCR 鉴定(引物 PRLR1 和 PRLR2)、酶切鉴定和测序鉴定。

1.5 鸡 PRLR 基因 ECD 片段原核表达载体构建,表达和纯化

根据获得的鸡 PRLR 基因编码区 ECD 的核苷酸序列,设计并由上海博亚公司合成 1 对引物。上游引物 pRE1 序列为:5'-AGC GAATTC ACGGTCAAT-

CATTCCCTGGA-3'(编码区 70~87 位)含有 *Eco*R I 酶切位点和维持阅读框架的碱基 AC(下划线),下游引物 pRE2 序列为:5'-ATC AAGCTT GATCCATGGTG-GTCAGGTTTTG-3'(编码区 1 233~1 249 位),含有 *Hind* III 酶切位点和补齐编码区 1 250~1 254 位的碱基(下划线),以 pMD-PRLR 为模板进行 PCR 扩增,将扩增后的片段经酶切后插入表达载体 pRSET A 的相应位点 *Eco*R I 和 *Hind* III 之间构建重组质粒 pR-PRLR 并转化 *E. coli* BL21(DE3),用 IPTG 诱导表达重组蛋白,SDS-PAGE 分析重组蛋白的表达和分子大小,并用体积分数为 50% 的 Ni-NTA 凝胶在变性条件下按说明书纯化蛋白。

1.6 重组表达质粒对 *E. coli* BL21(DE3) 生长的影响

挑取 10 个含重组质粒 pR-PRLR 的菌落接种 LA 培养基,37℃(220 r/min)活化过夜。然后将活化菌液按 1:10 的比例接种到新鲜 LA 培养基中,每个菌接种 2 管,37℃(220 r/min)培养,每隔 1 h 取 1 个样品测定 $D_{600\text{nm}}$;当 $D_{600\text{nm}} > 0.6$ 时,其中一管加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,另一管不加 IPTG,继续培养并测定 $D_{600\text{nm}}$ 。加入 IPTG 组每小时同时取样备 SDS-PAGE 分析表达量。

2 结果与分析

2.1 鸡 PRLR 基因 ECD 片段的克隆

从 90 日龄杏花鸡和隐性白洛克杂交 F₃ 代垂体组织中抽提出的总 RNA 经 Oligo dT 引物反转录后,经引物 PRLR1 和 PRLR2 扩增后产生了 1 200 bp 左右的一特异性条带(图 1A),初步确定为鸡 PRLR 基因编码区 ECD 片段。将 RT-PCR 产物与 pMD18-T 载体连接并转化感受态细菌 *E. coli* DH5 α 。经 PCR 鉴定(图 1B)和酶切鉴定(图 1C)以及序列测定证明了克隆的正确性,由于 PRLR ECD 序列中含有 *Bam*H I 酶切位点,因此 *Bam*H I/*Hind* III 双酶切后产生 3 条带,分别对应剩余的载体片段,900 bp 和 300 bp 的 PRLR ECD 片段。测序结果表明,RT-PCR 产物全长 1 192 bp,含 PRLR 基因编码区的第 58~1 249 位核苷酸。与参考序列 D13154 相比(引物除外),有 3 个核苷酸发生变化,分别为 T390C, A928G, T1100C,同源率为 99.7%;其中 2 个造成了氨基酸的改变,分别为 Asp310Asn, Leu368Pro,同源率为 99.5%。这些突变都位于非保守区,对 PRLR ECD 的功能不会造成很大的影响。

2.2 鸡 PRLR 基因 ECD 片段原核表达载体构建,表达和纯化

重组质粒 pR-PRLR 经 PCR 鉴定、酶切鉴定和测序证明其序列维持了正确的阅读框架(图 1D 和 1E)。其表达产物为 1 条 466 氨基酸残基的多肽,包含来自载体 pRSET A N-端的 48 个氨基酸残基序列

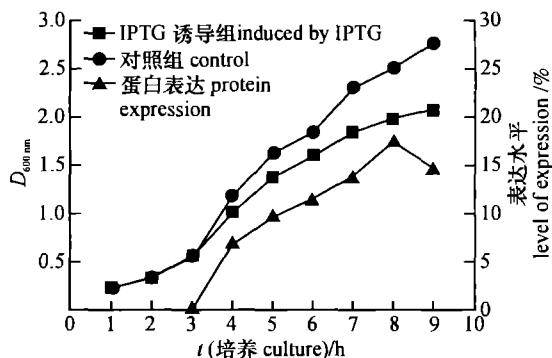


图4 转化重组质粒 pR-PRLR 的细菌的生长曲线

Fig. 4 the growth curve of the bacterial transformed with recombinant plasmid pR-PRLR

3 讨论

由于 PRL 和 PRLR 在垂体的表达量都很高,因此本研究选择从垂体组织提取 RNA 作为模板,利用 RT-PCR 方法扩增鸡 PRLR ECD 片段. 本研究克隆的鸡 PRLR 基因 ECD 序列,全长 1 192 bp(从 58 ~ 1 249 位). Blast 分析显示与鸡 GenBank 登陆号 D13154 的序列相比(引物部分除外)共有 3 处核苷酸改变(T390C, A928G, T1100C),其中 2 处导致了氨基酸改变(Asp310Asn, Leu368Pro),这些有限几处残基的变异都位于非保守区,看来对 PRLR 的空间构象,与 PRL 的结合亲和性不会有太大的影响. 所构建的重组质粒 pR-PRLR 能够在 *E. coli* BL21(DE3) 株中得到表达,并且表达产物可以经体积分数为 50% 的 Ni-NTA 凝胶纯化,以上结果说明成功获得了鸡 PRLR ECD 的融合蛋白,为下一步的研究奠定了基础.

本研究所选择的表达载体 pRSET A 为 T7 启动子控制下的高效表达载体,由于鸡 PRLR ECD 序列中含有多个表达载体 pRSET A 上的单克隆位点,如 *Bam*H I、*Bgl* II、*Pst* I 等,本研究只能将鸡 PRLR ECD 片段的 cDNA 插入到我们通常使用的表达质粒 pRSET A 的 *Eco*R I 和 *Hind* III 两位点之间,构建的重组质粒 pR-PRLR 在大肠杆菌中以包涵体的形式表达了 466 个氨基酸残基的鸡 PRLR ECD 片段融合蛋白,包括质粒编码的 N 端的 48 个残基,其包含一段由 6 个组氨酸残基组成的 His-tag,以利于用 Ni-NTA 树脂进行纯化;载体 C-端的 23 个氨基酸残基序列,以及之间的 PRLR ECD 片段的 395 个氨基酸残基的片段. 虽然未进行免疫印迹验证,但重组蛋白能被 Ni-NTA 树脂纯化,以及表达质粒阅读框架的正确性,所表达的重组蛋白的相对分子质量与理论值相吻合等 3 方面的结果数据,应该可以证明所得的融合蛋白为含有 His-tag 的 PRLR ECD 融合蛋白.

PRL 是禽类就巢发生和维持的关键激素. 就巢时高水平的 PRL 通过抑制下丘脑 GnRH 的分泌从而降低垂体促性腺激素的分泌,降低产蛋性能^[8-9],以往的研究都集中于免疫 PRL 或其释放激素-血管活性肠肽,通过抗体免疫中和 PRL 活性或抑制其分泌来抑制就巢,以期促进产蛋^[10-12],但是激素的生物学作用由受体介导,如果阻止 PRL 与受体结合,也应该可以达到抑制就巢促进产蛋的目的. 我们因此考虑构建 PRLR ECD 区的重组蛋白作为抗原,在免疫鸡产生抗 PRLR ECD 的抗原后,使抗体与 PRLR ECD 结合后阻止 PRL 的结合及由此引发的细胞内信号传导和细胞对 PRLR 的反应. 然而根据不同的受体分子片段所产生的抗体在与受体结合时,可能产生抑制或促进信号传导的作用. 如对性成熟前雄性小鼠(3 周龄)免疫猪 LHR N-端 1 ~ 297 或 1 ~ 370 氨基酸残基的试验显示,随着抗 LHR 抗体滴度的升高血液中的睾酮水平下降,处理组的受精率下降了 75%^[13],说明 LHR 免疫抑制了激素的信号传导过程. 但对雄性大鼠(40 日龄)主动免疫抗猴腺垂体 GnRH 的 164 ~ 266 氨基酸片段的抗血清,处理组血浆中和睾丸中的睾酮水平均显著高于对照组,说明免疫这一特定的 GnRH 片段将模拟 GnRH 激素的作用^[5]. 另外,免疫细胞膜表面的离子通道,可以抑制部分但是不能全部抑制离子进入细胞,这可能是因为部分抗体具有促进离子通道活性的作用^[7]. 造成这些免疫受体产生不同的内分泌效应,主要是由于采用了不同的受体胞外域片段作为免疫原进行免疫,使产生的特异性抗体结合到受体的不同部位,对受体的空间构象产生了不同的改变,抑制或促进受体的细胞内信号传导.

PRLR 结构有多种类型,即长型受体(long form)、中间型受体(intermediate form)、短型受体(short form),以及一种可溶性的 PRLR ECD 在血液循环中作为 PRL 的结合蛋白. 3 种膜锚定受体的差别在于其胞内域 C-端长度不同,而胞外域则完全相同. 鸡的 PRLR 胞外域呈独特的“双天线结构”,由 438 个氨基酸组成,分为 2 个衔接重复,高度同源的单位,分别对应于哺乳动物的胞外域,其中编码区 70 ~ 675 位核苷酸编码的 202 个氨基酸残基为第一配体结合区(D1),编码区 730 ~ 1 254 位核苷酸编码的 173 个氨基酸残基为第二配体结合区(D2)^[14]. 本研究选择将 PRLR 基因 ECD 序列(除信号肽外)共编码 395 个氨基酸的核苷酸序列插入到表达载体 pRSET A 的 *Eco*R I 和 *Hind* III 两酶切位点之间构建重组表达载体. 由于所构建的 PRLR ECD 肽链含载体在内共有 466 个氨基酸残基,导致表达量较低仅占

菌体蛋白的17.6%左右.而我们此前构建的大部分重组融合蛋白如鸡抑制素^[15]、瘦素^[16]和催乳素^[17]重组融合蛋白的肽链长度一般仅有150~250氨基酸残基,其在大肠杆菌中的表达量一般都达到总菌体蛋白的25%~40%,而且这种长度的蛋白在动物免疫试验中都表现出了良好的免疫原性.因此,我们也曾经试图按照PRLR ECD的2个配体结合区,构建较短的PRLR ECD或2个不同的配体结合区的重组融合蛋白,用于提高表达量和测试PRLR ECD不同部位在信号传导中的作用.但在选择和更换了多种表达载体后,都未能在大肠杆菌中表达PRLR ECD的2个配体结合区.而目前所构建的包含PRLR ECD的2个配体结合区的重组融合蛋白,其在免疫试验中如何发挥作用,如何产生拮抗性或抑制PRL激素的抗体,则还需继续进行动物试验加以证实.

参考文献:

- [1] BOLE-FEYSOT C, GOFFIN V, EDERY M, et al. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knock-out mice [J]. *Endocrine Reviews*, 1998, 19(3): 225-268.
- [2] OHKUBO T, TANAKA M, NAKASHIMA K, et al. Prolactin receptor gene expression in the brain and peripheral tissues in broody and nonbroody breeds of domestic hen [J]. *Gen Comp Endocrin*, 1998, 109(1): 60-68.
- [3] ZHOU J F, ZADWORN D, GUÉMÉNÉ D, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and expression of the prolactin receptor during various reproductive states in *Meleagris gallopavo* [J]. *Biol Reprod*, 1996, 55(5): 1081-1090.
- [4] ZADWORN D, KANSAKU N, BEDECARRATS G, et al. Prolactin and its receptor in galliformes [J]. *Avian Poult Biol Rev*, 2002, 13(3): 223-229.
- [5] SANTRA S, RAO A J. Effect of active and passive immunization of male and female rats with a recombinantly expressed bonnet monkey pituitary GnRH receptor fragment [J]. *Am J Endocri Immun*, 2002, 48(2): 117-125.
- [6] JEYAKUMAR M, MOUDGAL N R. Immunization of male rabbits with sheep luteal receptor to LH results in production of antibodies exhibiting hormone-agonistic and -antagonistic activities [J]. *J Endocri*, 1996, 150(3): 431-443.
- [7] BENHAM C D. Simple recipe for blocking ion channels [J]. *Nature Biotech*, 2005, 23(10): 1234-1235.
- [8] WONG E A, SILSBY J L, ISHII S, et al. Pituitary luteinizing hormone and prolactin messenger ribonucleic acid levels are inversely related in laying and incubating turkey hens [J]. *Biol Reprod*, 1992, 47(4): 598-602.
- [9] ROZENBOIM I, TABIBZADEH C, SILSBY J L, et al. Effect of ovine prolactin administration on hypothalamic vasoactive intestinal peptide (VIP), gonadotropin releasing hormone I and II content, and anterior pituitary VIP receptor in laying turkey hens [J]. *Biol Reprod*, 1993, 48(6): 1246-1250.
- [10] CRISOSTOMO S, GUÉMENE D, GARREAU-MILLS M, et al. Prevention of incubation behavior expression in turkey hens by active immunization against prolactin [J]. *Theriogenology*, 1998, 50: 675-690.
- [11] MARCH J B, SHARP P J, WILSON P W, et al. Effect of active immunization against recombinant-derived chicken prolactin fusion protein on onset of broodiness and photoinduces egg laying in bantam hens [J]. *J Repro Fertil*, 1994, 101: 227-233.
- [12] 陈峰,施振旦,毕英佐,等.主动免疫血管活性肠肽对泰和鸡生殖性能的影响[J].*华南农业大学学报*, 1997, 18(增刊): 45-50.
- [13] REMY J J, BOZON V, COUTURE L, et al. Suppression of fertility in male mice by immunization against LH receptor [J]. *J Reprod Immunol*, 1993, 25(1): 63-79.
- [14] TANAKA M, MAEDA K, OKUBO T, et al. Double antenna structure of chicken prolactin receptor deduced from the cDNA sequence [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 188(2): 490-496.
- [15] 于迎春,施振旦,刘颖,等.免疫抑制素提高粤黄鸡产蛋性能的研究[J].*农业生物技术学报*, 2006, 14(1): 27-32.
- [16] 邵西兵,施振旦,于迎春,等.鸡Leptin基因正确性的免疫验证[J].*动物学研究*, 2005, 26(2): 168-173.
- [17] 刘颖,施振旦,黄运茂,等.鸡催乳素和抑制素 α 亚基片段重组蛋白的构建及表达鉴定[J].*中国兽医学报*, 2002, 22(4): 365-367.

【责任编辑 柴 焰】