

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01110

人 FcγR II 真核表达质粒的构建及稳定转染细胞系的建立

Construction of eukaryotic expression plasmid of human FcγR II and establishment of cell line stably transfected with the constructed plasmid

席俊^{1,2}, 张改平^{2*}, 张利娜², 张红², 乔松林², 苗现伟², 何礼洋¹, 张乃生¹

1. 吉林大学畜牧兽医学院, 长春 130062

2. 河南省农业科学院, 河南省动物免疫学重点实验室, 郑州 450002

[摘要] 目的: 建立稳定表达人 FcγR II (human Fc gamma receptor II, huFcγR II) 的真核细胞系, 为后续研究奠定基础。方法: 采用 RT-PCR 方法从人外周血白细胞合成 FcγR II cDNA, 构建 huFcγR II 表达质粒 pcDNA3-huFcγR II, 经酶切和 PCR 鉴定后, 将 pcDNA3-huFcγR II 质粒通过脂质体转染法转染 COS7 细胞, 并经 G418 筛选获得稳定表达 huFcγR II 的细胞克隆。采用免疫荧光法和玫瑰花环试验检测 huFcγR II 的表达。结果: 构建的 pcDNA3-huFcγR II 真核表达质粒经酶切鉴定与预期一致, 稳定转入 COS7 细胞后, 经免疫荧光染色, 约 90% 的转染细胞可见荧光, 而未转染的 COS7 对照细胞未见荧光。结论: 成功构建 pcDNA3-huFcγR II 真核表达质粒, 建立了稳定表达 huFcγR II 的细胞系, 为进一步研究奠定了基础。

[关键词] huFcγR II 受体; COS7 细胞; 免疫荧光检测; 玫瑰花环试验

[中图分类号] Q 785 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)09-1110-04

Fc 受体广泛表达于免疫辅助细胞和效应细胞, 介导免疫细胞与抗原-抗体复合物及其他细胞间的相互作用, 触发和调控机体多种免疫学效应, 包括诱导吞噬作用、免疫复合物的清除、抗体依赖细胞毒作用、调控 B 细胞的增殖、抗体的产生以及炎症因子的释放等, 是机体体液免疫与细胞免疫间关键的联系纽带, 在机体免疫防御中起着极其关键的作用^[1-6]。人类有 3 种不同的 Fcγ 受体, 分别为 FcγR I (CD64)、FcγR II (CD32) 和 FcγR III (CD16)。其中 FcγR II (CD32) 是 IgG 的低亲和力受体, 在生理条件下只能结合 IgG 复合物或多聚体, 不能结合 IgG 单体^[7-8]。已发现其有 huFcγRIIA、huFcγRIIB 和 huFcγRIIC 共 3 种类型, 其胞外区都含有 2 个高度保守的 Ig 样结构域^[9-10]。通过嵌和受体和定点突变已鉴定出 IgG 与 FcγRII 的结合位点和关键氨基酸残基^[11-12], 但对于 FcγRII 上是否有 IgG 的线性结合表位至今仍不十分清楚。为此, 本研究构建了人 FcγRII 基因的真核表达质粒, 并转染 COS7 细胞, 以建立稳定表达 FcγRII 的细胞系, 为深入研究 FcγRII 受体与配体的相互作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌种及主要试剂 pMD19-T 载体、限制酶 *Eco*R I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶 (Promega 公司); X-Gal、IPTG、*E. coli* JM109 (TaKaRa 公司); pcDNA3 真核表达载体 (Invitrogen 公司); AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) 显色试剂盒

(中杉金桥公司); UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒 (上海生工生物工程有限公司); 脂质体 LipofectamineTM 2000 (Invitrogen 公司); G418 (Amresco 公司); 鼠抗人 CD32 单克隆抗体和羊抗人 IgG (Serotec 公司)。

1.2 引物设计 参照 GenBank 人 FcγR II 的基因核苷酸序列 (NM_021642) 利用引物设计软件 Primer 5.0 设计了两对引物: 上游引物 (huR2A1) 5'-CAC AGT GCT GGG ATG ACT ATG GAG-3', 下游引物 (huR2A2) 5'-GAC CAC ATG GCA TAA CGT TAC TC-3'; 上游引物 PCR2-1: 5'-ATA GAA TTC GCT GGG ATG ACT ATG GAG-3', 下游引物 PCR2-2: 5'-GGG CTC GAG CAT AAC GTT ACT CTT TAG-3', 均由大连宝生生物工程公司合成。为便于后续工作, 在后面一对的表达引物中引入 *Eco*R I、*Xho* I 酶切位点 (下划线所示)。

1.3 总 RNA 的提取及 RT-PCR 参照文献^[13-14] 中采用红细胞裂解法分离牛外周血白细胞的方法, 从新鲜抗凝人血中分离人白细胞。用 UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 将分离的总 RNA 按照 TaKaRa 3' Full Race 试剂盒说明合成 cDNA。逆转录体系为 30 μl: 总 RNA (约 1.5 μg) 4 μl, Oligo d(T)18 (50 pmol/μl) 3 μl, 5×M-MLV Buffer 6 μl, dNTP Mixture (10 mmol/L each) 3 μl, RNase Inhibitor (40 u/μl) 0.75 μl, Reverse Transcriptase M-MLV (RNaseH, 200 u/μl) 0.75 μl, RNase free Water 12.5 μl。将

[收稿日期] 2008-02-25 **[接受日期]** 2008-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金 (30730068), 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划, 2005CB523200). Supported by National Natural Science Foundation of China (30730068) and National Program on Key Basic Research Project of China (“973” Program, 2005CB523200).

[作者简介] 席俊, 博士生, E-mail: xijunhnu@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 0371-65711364, E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

上述反应液混合后在 PCR 仪中按下面程序进行逆转录反应:42℃ 60 min,72℃ 15 min。以上述 cDNA 为模板,以 huR2A1、huR2A2 为引物,用 TaKaRa LA Taq 酶扩增 huFcγR II 全长,PCR 反应体系为 25 μl:cDNA 4 μl,TaKaRa LA Taq 酶 0.25 μl,10×LA buffer 2.5 μl,dNTP(2.5 mmol/L each) 2 μl,huR2A1(20 pmol/μl) 1 μl,huR2A2(20 pmol/μl) 1 μl,H₂O 14.25 μl。PCR 条件为 94℃ 3 min 1 个循环;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,共 35 个循环;72℃ 10 min。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并回收目的片段。

1.4 目的基因的克隆及测序 将回收、纯化的目的基因片段与 pMD19-T 载体于 16℃ 连接过夜,次日转化到 JM109 感受态细胞中,提取质粒进行酶切鉴定和序列测定。

1.5 重组表达载体的构建及鉴定 以克隆到 T 载体上的阳性质粒为模板,以引物 PCR2-1 和 PCR2-2,用 TaKaRa Premix Taq 扩增 huFcγR II 编码区(ORF)全长 cDNA(含信号肽序列),PCR 反应体系为 50 μl:Premix Taq 25 μl,模板 DNA 2 μl,PCR2-1 2 μl,PCR2-2 2 μl,H₂O 19 μl。PCR 条件为 94℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共 35 个循环;72℃ 10 min。将 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并回收目的片段。经 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后,插入表达载体 pcDNA3 相应酶切位点,重组体 pcDNA3 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,并以含 50 μg/ml 氨苄青霉素的营养琼脂平板培养。挑取单克隆菌落提取质粒进行酶切鉴定,命名为 pcDNA3-huFcγR II。

1.6 细胞转染

1.6.1 质粒制备 用 Qiagen 质粒提取试剂盒提取纯化真核表达质粒 pcDNA3-huFcγR II,以 *Bgl* II 消化质粒,经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,并回收目的片段。以核酸蛋白分析仪(Beckman 公司)测定 DNA 含量。线性化表达质粒用于 huFcγR II 的稳定表达。

1.6.2 细胞转染与筛选 利用脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染试剂以线性化 pcDNA3-huFcγR II 质粒转染 COS7 细胞。转染 48 h 后,消化转染细胞,以 20 ml 含 400 μg/ml G418 的 DMEM/10 完全培养基重悬细胞,然后转至 96 孔培养板,每孔 200 μl,置 37℃ 50 ml/L CO₂ 培养箱中培养,每 3~4 d 换液 1 次。转染后 7~10 d,待细胞克隆长至 1/4~1/2 孔时,消化细胞克隆,将细胞转至另一 96 孔培养板扩大培养,待长成细胞单层后,以免疫荧光检测 huFcγR II 的表达,保留原 96 孔板细胞继续培养。

1.6.3 转染细胞的克隆 以有限稀释法对阳性转染细胞克隆进行连续 3 次克隆化,建立稳定表达 huFcγR II 的细胞株。将免疫荧光检测阳性的细胞克隆转入 24 孔培养板中扩大培养,用含 200 μg/ml G418 的 DMEM/10 选择培养基稀释细胞至 5~10 cells/ml,接种 96 孔细胞培养板,每孔 200 μl,37℃ 50 ml/L CO₂ 培养箱中培养 10~15 d,以免疫荧光检测 huFcγR II 的表达。对 huFcγR II 阳性细胞克隆进行 2 次和 3 次克隆化,使其克隆孔免疫荧光阳性率达 85% 以上,并在液氮中冻存克隆细胞。

1.7 免疫荧光检测 将转染 pcDNA3-huFcγR II 的 COS7-

huFcγR II 细胞以 1×10⁵/孔种植在 96 孔板中,同时以未转染 pcDNA3-huFcγR II 的 COS7 细胞作为对照,24 h 细胞贴壁后用 PBS 缓冲液冲洗 3 次,封闭液(0.002 g/ml 明胶)封闭 30 min,以鼠抗人 CD32 单克隆抗体(20 μg/ml)为一抗 4℃ 孵育 1 h,用 PBS 轻柔漂洗 6 次;以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,避光孵育 1 h,PBS 缓冲液冲洗后,用激光扫描共聚焦显微镜观察 huFcγR II 在细胞上的表达情况。

1.8 玫瑰花环试验 参考文献^[14-15],以玫瑰花环试验检测 huFcγR II 在 COS7 转染细胞表面与其配体人 IgG 的结合。绵羊红细胞(SRBC)经鞣酸处理后用 PBS 配成 50 ml/L 的红细胞悬液,取 1 ml 鞣酸处理的 SRBC 与等体积的 200 μg/ml 的人 IgG 混合,在室温条件下混合孵育 45 min,用 PBS 漂洗 3 次,最终配成 10 ml/L 的人 IgG-SRBC。在 96 孔板中培养 huFcγR II 转染细胞,待细胞长成单层,以预温的无血清 DMEM/0 培养基(37℃)漂洗细胞,加入 DMEM/0 培养基,每孔 200 μl,37℃ 孵育 2 h,以洗脱结合在细胞表面的牛 IgG;将 10 ml/L 人 IgG-SRBC 悬液缓慢加到细胞单层,每孔 50 μl;37℃ 孵育 10 min,室温静置 35 min;用 PBS 轻柔漂洗 6 次;用甲醇(含 3 ml/L H₂O₂)室温固定细胞 10 min,PBS 漂洗 3 次;每孔加 PBS 100 μl,在显微镜下观察细胞表面形成的玫瑰花环。在细胞单层加入 10 μg/ml HRP 标记的羊抗人 IgG 抗体,每孔 50 μl,37℃ 孵育 30 min;用 PBST 充分洗涤,以 AEC 染色试剂盒染色;用显微镜观察玫瑰花环中 SRBC 的显色。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果 如图 1 所示,RT-PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测,可以看到大小为 987 bp 左右的条带,与预期大小相符。

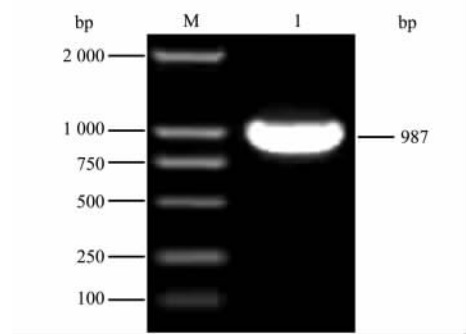


图 1 人 FcγR II PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳结果

M:DL2000 marker;1:Human FcγR II (987 bp)

2.2 真核表达质粒 pcDNA3-huFcγR II 的构建 以克隆到 T 载体上的阳性质粒为模板,用引物 PCR2-1 和 PCR2-2,扩增 huFcγR II 编码区(ORF)全长 971 bp cDNA(含信号肽)序列,亚克隆到 pcDNA3 的巨细胞病毒启动子(Pcmv)下游,经 PCR 鉴定及 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,成功构建了真核表达质粒 pcDNA3-huFcγR II,鉴定结果见图 2,与预期一致。

2.3 稳定表达 huFcγR II 转染细胞株的建立 以线性化表达质粒 pcDNA3-huFcγR II 转染 COS7 细胞,经 G418 选择性培养、免疫荧光检测和连续克隆化,建立了稳定表达 huFcγR

Ⅱ 的转染细胞株,约 90 % 的转染细胞可见荧光(图 3A);而未转染的 COS7 对照细胞未看到荧光(图 3B),表明 huFcγRⅡ 受体分子有效表达于转染细胞表面。

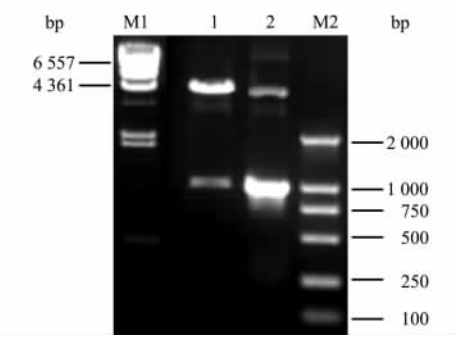


图 2 真核表达质粒 pcDNA3-huFcγRⅡ 的 PCR 和酶切鉴定 M1: λ-HindⅢ digest Marker; 1: The products from pcDNA3-huFcγRⅡ digested by EcoRⅠ and XhoⅠ; 2: PCR product with PCR2-1 and PCR2-2 (971 bp); M2: DL2000 marker

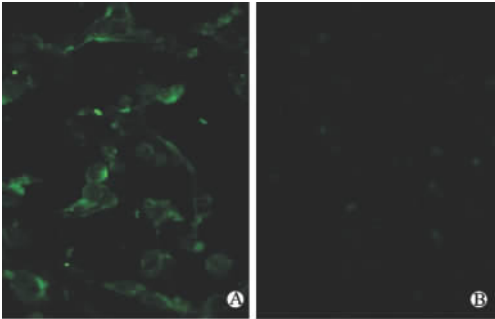


图 3 稳定转染 pcDNA3-huFcγRⅡ 细胞的免疫荧光检测 A: COS7 cells transfected with pcDNA3-huFcγRⅡ; B: Untransfected COS7 cells. Original magnification: ×200

2.4 huFcγRⅡ 在 COS7 转染细胞表面与其配体的结合 表达 huFcγRⅡ 受体分子的转染细胞,以人 IgG-SRBC 进行玫瑰花环试验,在转染细胞周围形成明显的玫瑰花环(图 4A),而未转染的 COS7 对照细胞不结合人 IgG-SRBC 没有玫瑰花环的形成(图 4B),表明表达于转染细胞表面的 huFcγRⅡ 受体分子能与 人 IgG 特异结合。

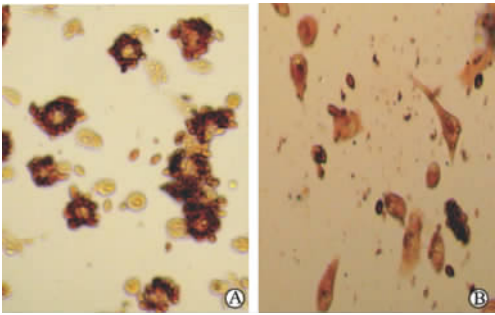


图 4 huFcγRⅡ 转染细胞的玫瑰花环试验 A: COS7 cells transfected with pcDNA3-huFcγRⅡ; B: Untransfected COS7 cells. Original magnification: ×200

3 讨 论

将基因克隆到真核表达载体,并转入到该基因的宿主细胞中,从而观察宿主细胞的变化是研究基因功能的一种有效方法。Stengelin 等^[16] 在克隆鉴定 huFcγRⅡ 分子时,将 huFcγRⅡ cDNA 克隆到表达载体,通过转染 COS 细胞,在细胞表面成功瞬时表达了 huFcγRⅡ。然而 huFcγRⅡ 的瞬时表达受许多因素影响,如质粒纯度、细胞活性和转染效率等,不仅表达受体分子的细胞比例较少,而且每次细胞转染的效率也有较大差别,即使是同批转染,不同转染孔细胞的玫瑰花环形成率也不一致,难以形成均一、稳定的受体功能检测平台。

本研究通过分离人白细胞,提取其总 RNA 然后逆转录为 cDNA,以 cDNA 为模板通过 PCR 的方法获得了人 FcγRⅡ cDNA 编码区,并成功地将其插入 pcDNA3 载体的 Pcmv 启动子下游,构建了 pcDNA3-huFcγRⅡ 的真核表达载体。经酶切和 PCR 鉴定后,通过脂质体介导,将 pcDNA3-huFcγRⅡ 重组载体转染 COS7 细胞,经 G418 筛选建立了稳定转染细胞系。为鉴定该细胞系是否能正确表达目的蛋白,本研究以未转染 pcDNA3-huFcγRⅡ 的 COS7 细胞作为对照,应用免疫荧光技术检测到 FcγRⅡ 基因在 COS7 细胞中能 有效表达。进一步的玫瑰花环试验表明表达于转染细胞表面的 huFcγRⅡ 受体分子与其配体人 IgG 有良好的结合活性,可以用于后续生物学活性的研究,并且为以后 FcγRⅡ 线性配体结合表位的鉴定提供了良好的技术平台。

[参 考 文 献]

[1] Ravetch J V, Bolland S. IgG Fc receptors[J]. Annu Rev Immunol,2001,19:275-290.

[2] Baudino L, Nimmerjahn F, Azeredo da Silveira S, Martinez-Soria E, Saito T, Carroll M, et al. Differential contribution of three activating IgG Fc receptors (Fc gamma RⅠ, Fc gamma RⅢ, and Fc gamma RⅣ) to IgG2a- and IgG2b-induced autoimmune hemolytic anemia in mice[J]. J Immunol,2008,180:1948-1953.

[3] Rosa G T, Gillet L, Smith C M, de Lima B D, Stevenson P G. IgG fc receptors provide an alternative infection route for murine gamma-herpesvirus-68[J]. PLoS ONE,2007,2:e560.

[4] Nimmerjahn F, Anthony R M, Ravetch J V. Agalactosylated IgG antibodies depend on cellular Fc receptors for *in vivo* activity[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104:8433-8437.

[5] Baumann U, Schmidt R E, Gessner J E. New insights into the pathophysiology and *in vivo* function of IgG Fc receptors through gene deletion studies[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz),2003,51:399-406.

[6] Cohen-Solal J F, Cassard L, Fridman W H, Sautès-Fridman C. Fc gamma receptors[J]. Immunol Lett,2004,92:199-205.

[7] Nasr A, Elghazali G, Giha H, Troye-Blomberg M, Berzins K. Interethnic differences in carriage of haemoglobin AS and Fc-gamma receptor Ⅱ a (CD32) genotypes in children living in eastern Sudan[J]. Acta Trop,2008,105:191-195.

[8] Flesch B K, Neppert J. Functions of the Fc receptors for immunoglobulin G[J]. J Clin Lab Anal, 2000, 14: 141-156.

[9] Brooks D G, Qiu W Q, Luster A D, Ravetch J V. Structure and expression of human IgG FcR II (CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes[J]. J Exp Med, 1989, 170: 1369-1385.

[10] Stuart S G, Simister N E, Clarkson S B, Kacinski B M, Shapiro M, Mellman I. Human IgG Fc receptor (hFcR II, CD32) exists as multiple isoforms in macrophages, lymphocytes and IgG-transporting placental epithelium[J]. EMBO J, 1989, 8: 3657-3666.

[11] Hulett M D, Witort E, Brinkworth R I, McKenzie I F, Hogarth P M. Identification of the IgG binding site of the human low affinity receptor for IgG Fc gamma R II. Enhancement and ablation of binding by site-directed mutagenesis[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 15287-15293.

[12] Guiraldelli M F, Berenstein E H, Grodzki A C, Siraganian R P, Jamur M C, Oliver C. The low affinity IgG receptor Fc gamma R II B contributes to the binding of the mast cell specific antibody, mAb BGD6[J]. Mol Immunol, 2008, 45: 2411-2418.

[13] Zhang G, Guo J, Zhou J, Wang X, Li Q, Yang Y, et al. Identification of the linear epitope for Fc-binding on the bovine IgG2 Fc receptor (boFc gamma 2R) using synthetic peptides[J]. FEBS Lett, 2006, 580: 1383-1390.

[14] Zhang G, Young J R, Tregaskes C R, Howard C J. Cattle Fc gamma R II: molecular cloning and ligand specificity[J]. Immunogenetics, 1994, 39: 423-427.

[15] Lund J, Takahashi N, Pound J D, Goodall M, Nakagawa H, Jefferis R. Oligosaccharide-protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors[J]. FASEB J, 1995, 9: 115-119.

[16] Stengelin S, Stamenkovic I, Seed B. Isolation of cDNAs for two distinct human Fc receptors by ligand affinity cloning[J]. EMBO J, 1988, 7: 1053-1059.

[本文编辑] 贾泽军