

# 中国汉族人 IgE 重链恒定区 CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub> 及 CH<sub>4</sub> 亚基 cDNA 的克隆

## Cloning of cDNA of constant region CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub> and CH<sub>4</sub> on IgE heavy chain in Chinese Han nationality

唐 昊<sup>1</sup>, 修清玉<sup>1\*</sup>, 陆慧琦<sup>2</sup>, 韩焕兴<sup>2</sup>

(1. 第二军医大学长征医院呼吸内科, 上海 200003; 2. 长征医院实验诊断科)

[关键词] 免疫球蛋白 E; 重链恒定区; 基因克隆; 质粒构建

[中图分类号] R 392.3 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2007)10-1146-03

人血清中高水平的 IgE 是哮喘、过敏性鼻炎、慢性荨麻疹等过敏性疾病的标志, 而 IgE 与效应细胞上 IgE 高亲和力受体 (FcεR I) 的相互作用则是这些 I 型变态反应的重要调节步骤<sup>[1]</sup>。很长时间以来, 找到抑制它们结合从而治疗过敏性疾病的方法, 一直是过敏性疾病研究的重点, 所以了解这两个蛋白相互识别的方式以及结合的位点是极为重要的。从已有的研究得知, IgE 与 FcεR I 结合的有效部位是其重链恒定区 CH<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub>, 也就是 IgE 的 Fc 段, 其中 3 个亚基的作用各有不同。本研究利用分子克隆技术, 从过敏性个体的外周血淋巴细胞中分别克隆出中国汉族人 IgE CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub> 和 CH<sub>4</sub> 的 cDNA, 构建了相应的质粒表达载体, 为进一步原核表达出相应蛋白以及研究这 3 个蛋白亚基与 FcεR I 结合活性奠定基础。

### 1 材料和方法

1.1 材料 细菌菌株选用大肠杆菌 Top10, 为本实验室保存菌种; 质粒载体选用 pBAD/g III A, 购自 Invitrogen 公司, 带有氨苄抗性的表达载体, 可由阿拉伯糖诱导表达。

DNA 限制性内切酶 *Xho* I、*Hind* III 以及 T<sub>4</sub> 连接酶购于 TaKaRa 公司, RT-PCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司, RNA 抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒以及胶回收试剂盒均购于华舜生物科技公司。

1.2 淋巴细胞的分离 留取 1 名哮喘患者的外周血, 应用流式细胞仪测得血清中 IgE 含量 4 210 kU/L (正常对照 < 100 kU/L), 肘静脉采取 EDTA 抗凝血, 等体积的生理盐水稀释并混合均匀, 将稀释血缓慢加入到等体积的淋巴细胞分离液中, 2 500 r/min 离心 15 min, 小心吸取中间层细胞, 转移至洁净试管中, 用生理盐水洗涤 2 次, 得到富含淋巴细胞的悬液。

1.3 总 RNA 的抽提以及 cDNA 的制备 将上述细胞悬液转移至 1.5 ml 的离心管中, 按照华舜公司的 RNA 抽提试剂盒的步骤抽提淋巴细胞的总 RNA。RT-PCR 反应体系如下: 2×RT-Reaction Mix 10 μl, RT-Enzyme Mix 2 μl, 样品 RNA 8 μl (600 ng), 总体积为 20 μl。反应条件: 25℃ 10 min; 42℃ 50 min; 85℃ 5 min; 冰浴条件下加入 1 μl (2 U) *E. coli* RNaseH; 37℃ 20 min 后反应结束。

1.4 PCR 的引物设计及目的片段的 PCR 扩增 根据 Gen-Bank 中人 IgE 重链恒定区的基因序列设计引物, 所要克隆的目的片段 CH<sub>2</sub> 321 bp, CH<sub>3</sub> 324 bp, CH<sub>4</sub> 332 bp, 根据引物

设计的原则, 依据目的片段两端的核苷酸序列设计引物如下 (引物交由上海生工生物公司合成): CH<sub>2</sub> P1 ACC ACT CTC GAG GTC TGC TCC AGG GAC TTC, P2 GCT AGT AAG CTT TGC ACA CTT CTT GGT GCT; CH<sub>3</sub> P1 ACC ACT CTC GAG GAT TCC AAC CCG AGA GGG, P2 GCT AGT AAG CTT GCT GGT CTT GGT CGT GGA; CH<sub>4</sub> P1 ACC ACT CTC GAG GGC CCG CGT GCT GCC CCG, P2 GCT AGT AAG CTT TTT ACC GGG ATT TAC AGA (画线处为 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点, 前方为保护碱基)。

以上步骤逆转录的 cDNA 为模板, 应用设计的引物进行 PCR 扩增, 分别在 54.8℃、56℃、57.4℃ 和 58℃ 的退火条件下进行扩增, 根据条带亮度, 设定最佳退火温度为 58℃, 设计大量扩增的反应体系: 2×Premix 100 μl, cDNA 8 μl, P1 (20 μmol/L) 8 μl, P2 (20 μmol/L) 8 μl, H<sub>2</sub>O 76 μl, 总体积 200 μl。反应条件: 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 60 s 共 35 个循环; 72℃ 5 min 结束。

1.5 PCR 产物的胶回收及纯化 对上一步的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结束后在紫外灯下观察, 3 个 PCR 产物均可在 300 bp 左右见到明亮条带, 与目的片段的预计值吻合, 割胶回收。

1.6 重组质粒的构建 分别对胶回收的 3 个目的片段以及质粒载体 pBAD/g III A 进行 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切, 酶切后用乙醇沉淀法进行纯化。T<sub>4</sub> 连接酶分别连接 3 个目的片段和质粒, 16℃ 过夜, 得到 3 个目的片段的连接产物。

1.7 连接产物的转化以及重组子的筛选与鉴定 各取 10 μl 连接产物转化 Top10 感受态菌, 在氨苄抗性的平板上涂布, 同时行阳性对照和阴性对照 (使用空质粒转化 Top10 作为阳性对照; 未转化的 Top10 作为阴性对照)。转化成功后每个目的片段各挑取 2~3 个单克隆菌落于 2 ml 含氨苄的 LB 培养基中, 扩增后抽提质粒, 对质粒进行双酶切鉴定; 用各自的引物对抽提的质粒进行 PCR 鉴定, 反应条件同前, 反应结束后电泳观察。

1.8 目的片段的序列测定 CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、CH<sub>4</sub> 各取两个鉴定成功的重组子交给上海联合基因公司进行自动测序。

[基金项目] 国家自然科学基金 (20043303)。Supported by National Natural Science Foundation of China (20043303)。

[作者简介] 唐 昊, 博士生, E-mail: tanghao\_0921@yahoo.com.cn

\* Corresponding author.

## 2 结果

2.1 RNA 抽提结果 抽提结束后用紫外线分光光度计检测 RNA 的质量浓度和纯度,  $D_{260}/D_{280} = 2.0$ , 质量浓度为  $84 \text{ ng}/\mu\text{l}$ , 并对 RNA 行琼脂糖凝胶电泳, 以确保 RNA 的存在及

含量。

2.2 PCR 扩增 IgE CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、CH<sub>4</sub> 的 cDNA 片段 针对 RNA 逆转录后的 cDNA, 用各自的引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 摸索最佳退火温度, 产物行琼脂糖凝胶电泳, 发现各自条带的相对分子质量与预计值一致(图 1)。

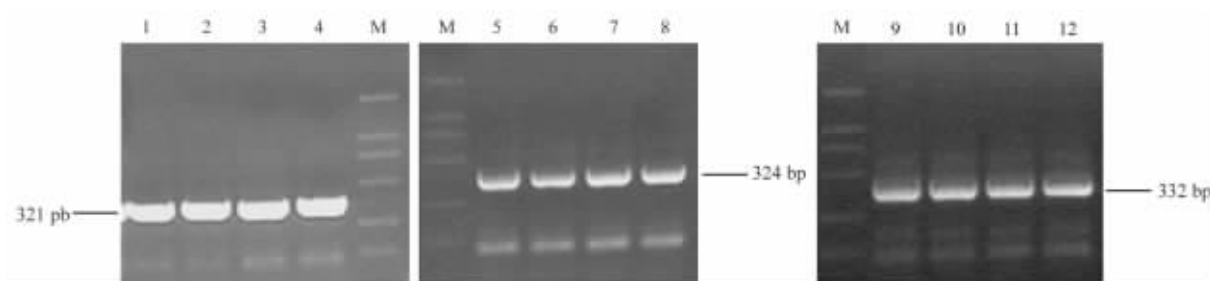


图 1 不同温度(54.8、56、57.4 和 58℃)下 PCR 扩增结果

1~4: CH<sub>2</sub> 不同退火温度下的 PCR 扩增产物(321 bp); 5~8: CH<sub>3</sub> 不同退火温度下的 PCR 扩增产物(324 bp); 9~12: CH<sub>4</sub> 不同退火温度下的 PCR 扩增产物(332 bp); M: Marker DL2000

2.3 重组质粒的构建与鉴定 3 个重组质粒进行 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 电泳后观察, 除了一个 CH<sub>3</sub> 的克隆, 其余均可看见 2 个条带, 一条为 4 100 bp 左右的质粒 pBAD/gIII A, 另一条大小与目的片段预计值吻合, 为 300 bp 左右(图 2)。用各自的引物对重组质粒行 PCR 反应, 电泳观察也是除了一个 CH<sub>3</sub> 克隆外, 其余均可在预计位置看见明亮条带(图 3)。重组质粒构建成功, 分别记作 pBAD-CH<sub>2</sub>、pBAD-CH<sub>3</sub> 以及 pBAD-CH<sub>4</sub>, 各有 2 个重组子。

2.4 DNA 的序列测定 自动测序交由上海联合基因公司, 从正反两个方向测序, 目的片段 CH<sub>2</sub> 大小 321 bp, CH<sub>3</sub> 大小 324 bp, CH<sub>4</sub> 大小 332 bp, 结果显示, 3 个目的片段均至少有一个重组子序列与 GenBank 中的 IgE 的 CH<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub> 相应的序列完全一致, 提示得到含有 IgE 重链恒定区 CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub> 的 CH<sub>4</sub> 基因序列的重组质粒。

## 3 讨论

IgE 的主要功能是介导 I 型变态反应及参与寄生虫感染的免疫, 当过敏原初次侵入机体时, 由抗原提呈细胞摄取过敏原, 将抗原信息提呈给 T 辅助淋巴细胞, 在其分泌的一系列细胞因子的作用下, B 淋巴细胞分化为浆细胞, 并分泌大量过敏原特异性 IgE, 分泌的 IgE 与肥大细胞和嗜碱性粒细胞表面的高亲和力 IgE 受体(FcεR1)结合; 当过敏原再次侵入机体时, 诱导 IgE-FcεR1 复合物发生交联, 从而引起肥大细胞内一系列信号转导, 使肥大细胞发生脱颗粒并释放大炎症性介质<sup>[2]</sup>, 导致速发性或迟发性过敏反应的发生。无过敏体质的正常个体血清中 IgE 水平很低, 一般均低于  $150 \text{ ng}/\text{ml}$ , 而正常个体的 IgG 可达  $10 \text{ mg}/\text{ml}$ <sup>[3]</sup>。血清中 IgE 水平的高低反映了血循环中分泌 IgE 的 B 细胞数量<sup>[4]</sup>, 所以本实验首先应选取血清 IgE 水平较高患者的外周血作为实验标本, 他们的外周血中分泌 IgE 的 B 细胞也相对较多, 这样才能最大限度地获得编码 IgE 的 RNA。

IgE 的重链恒定区由 4 个亚基组成, 分别记作 CH<sub>1</sub>~CH<sub>4</sub>, 其中 CH<sub>2</sub>-CH<sub>4</sub> 在与 FcεR1 结合时发挥着非常重要的作用。CH<sub>3</sub> 是最关键的一个亚基, 是直接与受体结合的部位, 该亚基在 IgE 与 FcεR1 结合的时候会发生结构的改变, 以一种有序的折叠性结构与 FcεR1 进行相互作用<sup>[5]</sup>, 而且这种折叠过程会伴随能量的下降<sup>[6]</sup>; CH<sub>4</sub> 并不直接与 FcεR1α 作用, 而是作为一个“脚手架”, 使得 CH<sub>3</sub> 以正确的位置与 FcεR1 接触<sup>[7]</sup>, 最近研究也表明, 如果没有 CH<sub>4</sub> 存在, CH<sub>3</sub> 单体与受体的亲和力极低, 荧光光谱学显示这时的 CH<sub>3</sub> 处于未折叠状

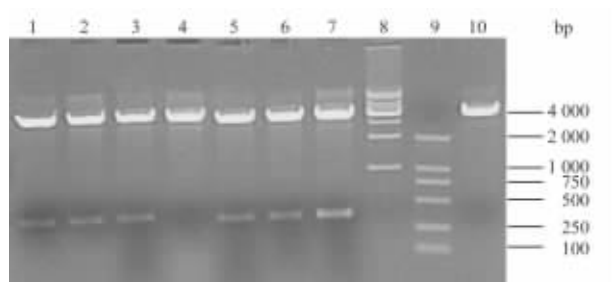


图 2 各个重组子的双酶切鉴定结果

1, 2: CH<sub>2</sub>; 3~5: CH<sub>3</sub>; 6, 7: CH<sub>4</sub>。除 4 外, 均可见 4 100 bp 的质粒和 300 bp 左右的目的片段; 8, 9: DNA marker; 10: 空质粒 pBAD 单酶切(阴性对照)

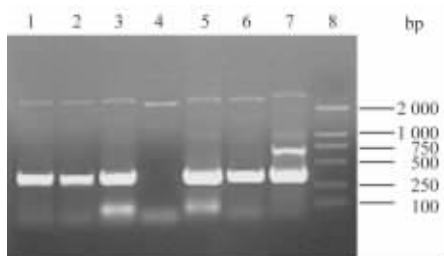


图 3 各个重组子的 PCR 鉴定结果

1, 2: CH<sub>2</sub>; 3~5: CH<sub>3</sub>; 6, 7: CH<sub>4</sub>。除 4 外, 均可扩增出 300 bp 左右的目的片段; 8: DNA marker

态<sup>[8]</sup>,即是以线性结构与 FcεR I α 结合;CH<sub>2</sub>的作用目前还有一些争议,最近的研究证实 CH<sub>2</sub>可能在稳定 IgE-FcεR I 复合物及阻止 IgE 从其受体上解离方面起一定作用<sup>[9]</sup>。

本实验克隆了 IgE Fc 段的各个亚基,构建了相应的表达载体,有利于下一步原核表达制备相应的蛋白,为进一步研究 IgE Fc 段各亚基在 IgE 与其高亲和力受体结合过程中的作用奠定基础。

[参考文献]

[1] Harwood N E, Price N C, McDonnell J M. Catalytic folding of the Cε3 domain by its high affinity receptor[J]. FEBS Lett, 2006, 580: 2129-2134.

[2] Turner H, Kinet J. Signaling through the high-affinity IgE receptor FcεRI[J]. Nature, 1999,402:B24-B30.

[3] Gould H G, Sutton B J, Beavil A J, et al. The biology of IgE and the basis of allergic disease[J]. Annu Rev Immunol, 2003, 21:579-628.

[4] King C L, Poindexter R W, Ragunathan J, et al. Frequency analysis of IgE-secreting B lymphocytes in persons with normal

or elevated serum IgE levels[J]. J Immunol, 1991,146:1478-1483.

[5] Schreiber G, Serrano L. Folding and binding: an extended family business[J]. Curr Opin Struct Biol, 2005, 15:1-3.

[6] Clark P L. Protein folding in the cell: reshaping the folding funnel[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29:527-534.

[7] Vangelista L. Current progress in the understanding of IgE-FcεR I interaction[J]. Int Arch Allergy Immunol, 2003,131: 222-233.

[8] Henry A J, McDonnell J M, Ghirlando R, et al. Conformation of the isolated Cε3 domain of IgE and its complex with FcεR I [J]. Biochemistry, 2000,39:7406-7413.

[9] McDonnell J M, Calvert R, Beavil R L, et al. The structure of IgE Cε2 domain and its role in stabilizing the complex with its high-affinity receptor FcεR I α [J]. Nat Struct Biol, 2001,8: 437-441.

[收稿日期] 2007-03-25

[修回日期] 2007-07-21

[本文编辑] 尹 茶