

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00322

可溶性 HVEM-Ig 融合蛋白的真核表达、鉴定、纯化及生物学活性检测

Eukaryotic expression, identification, and purification of soluble HVEM-Ig fusion protein and examination of its biological activity

秦 琴, 张 鹏, 唐古生, 沈 茜*

第二军医大学长海医院实验诊断科, 上海 200433

[摘要] **目的:**构建含鼠疱疹病毒侵入介质(herpesvirus entry mediator, HVEM)胞外区和 IgG2a Fc 段重组表达质粒,真核表达 HVEM-Ig 融合蛋白,鉴定、纯化,并检测其生物学活性。**方法:**通过 RT-PCR 从 BALB/c 小鼠脾细胞总 RNA 中扩增 HVEM 胞外区片段,WT-1 杂交瘤细胞总 RNA 中扩增鼠 IgG2a Fc 片段,克隆入真核分泌型表达载体 pSecTag2A,转染中国仓鼠卵巢细胞(CHO),表达产物用 rProtein A 凝胶进行亲和层析纯化,获得目的蛋白,并进行 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析。在单向混合淋巴细胞反应中加入不同浓度的 HVEM-Ig 融合蛋白作为处理组,同时以加入 IgG 蛋白的作为阴性对照和未处理的混合淋巴细胞作为空白对照,分别采用 [³H]-TdR 掺入法和 ELISA 法观察淋巴细胞增殖程度和细胞因子分泌情况。**结果:**成功构建重组质粒 pSecTag2A-HVEM-Ig,表达及纯化 HVEM-Ig 融合蛋白,并对蛋白的理化性质进行了鉴定。 [³H]-TdR 掺入法和 ELISA 法结果显示:与对照组相比,该融合蛋白呈剂量依赖性抑制淋巴细胞增殖和 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 等细胞因子的分泌($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**成功构建了 HVEM-Ig 融合蛋白真核表达体系,融合蛋白具有预期的抑制淋巴细胞活性及细胞因子分泌的功能,为后续研究该分子在自身免疫和移植免疫反应中的机制奠定了基础。

[关键词] 疱疹病毒侵入介质;免疫球蛋白 G;融合蛋白;转染

[中图分类号] Q 78 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)03-0322-04

淋巴细胞的活化不仅需要来自于抗原受体[包括 T 细胞受体(T cell receptor, TCR)与 B 细胞受体(B cell receptor, BCR)]的信号,还需要来自于共信号分子的第二信号,这些第二信号共同调控着淋巴细胞活化的程度、质量及持续性。共信号分子根据信号转导的效应分为正性共信号分子和负性共信号分子,根据结构主要分为 CD28/B7 超家族和 TNFR/TNF 超家族,它们对于维持 T 细胞适度有效的免疫应答发挥着重要的调节作用^[1-3]。

疱疹病毒侵入介质(herpesvirus entry mediator, HVEM)是近年来发现的免疫系统活性开关蛋白,属于 TNF 受体超家族成员,可在多种细胞如 T 细胞、B 细胞和未成熟 DC 表达^[4-5]。HVEM 作为受体与本家族的成员 LIGHT 相互作用能够介导正性的共刺激信号,促进 T 细胞的活化与增殖^[6-7];同时 HVEM 又作为 CD28/B7 超家族成员 B、T 淋巴细胞衰减子(B and T lymphocyte attenuator, BTLA)的唯一配体介导和传递负性共抑制信号^[8],抑制 T 细胞的增殖和细胞因子的表达^[9]。因此, HVEM 不仅桥联了共信号分子两大家族,而且将正、负性共信号联系在了一个共信号分子微观网络 HVEM/LIGHT 和 BTLA/HVEM 之中。为了对该共信号分子进行更深入的研究,本研究构建了鼠 HVEM 胞外区和鼠 IgG2a Fc 段重组真核表达质粒,在 CHO 细胞中实现了 HVEM-Ig 融合蛋

白的稳定分泌性表达,并在体外对其生物学活性进行了初步鉴定,为后续实验奠定了基础,提供了研究工具。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及细胞株 真核分泌型表达质粒 pSecTag2A 购自 Invitrogen 公司;宿主菌 DH5 α 、中国仓鼠卵巢巢细胞(CHO)由本室保存。

1.2 主要试剂 TRIzol、RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FCS)、EDTA 胰蛋白酶购自 Gibco 公司,各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 标记物购自 TaKaRa 公司;质粒抽提试剂盒、胶回收纯化试剂盒购自杭州维特洁生物公司;脂质体转染试剂盒 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;Hygromycin B 购于 Sigma 公司;rProtein A 亲和凝胶购于 Pharmacia 公司;Serum-Free Medium 购于 Biosciences 公司;抗小鼠 HVEM 单克隆抗体、HRP 标记二抗购于 Pierce 公司;鼠 IgG2a ELISA 试剂盒购于 Bethyl 公司。其余常规试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 PCR 引物 根据 GenBank 提供小鼠 HVEM cDNA 序列设计引物:上游 5'-GGC CCA GCC GGC CCA GCC CTC ATG CAGA CAG GAG-3',下游 5'-GGT CTA GAG GAG GAG CAG GTG GTG TCT GT-3';根据 GenBank 提供鼠

[收稿日期] 2008-09-27 **[接受日期]** 2008-11-07

[基金项目] 国家自然科学基金(30500501), Supported by National Natural Science Foundation of China(30500501).

[作者简介] 秦 琴, 硕士. E-mail: qq_46@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81873611, E-mail: misminli@hotmail.com

IgG2a 序列设计引物:上游 5'-GGT CTA GAG AGC CCA GAG GGC CCA CAA TC-3',下游 5'-GGG CGG CCG CTC ATT TAC CCG GAG TCC GGG A-3',引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4 目的基因的克隆与载体构建

1.4.1 RT-PCR 获得 HVEM 胞外区和 IgG2a Fc 片段 取 BALB/c 小鼠脾细胞,用 TRIzol 试剂提取总 RNA,同法从 WT-1 杂交瘤细胞中提取总 RNA,经过优化的逆转录体系为:RNA 4 μ l、随机引物 1 μ l、5 \times Buffer 4 μ l、dNTP(各 10 mmol/L) 2 μ l、Mg²⁺ (25 mmol/L) 1.5 μ l、MMLV 1 μ l 和纯水 6.5 μ l,共计 20 μ l,反应条件为:42 $^{\circ}$ C 60 min,94 $^{\circ}$ C 5 min,4 $^{\circ}$ C 5 min。利用设计的引物进行 PCR,循环条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s(循环 30 次);72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,并在紫外灯下割胶,用胶回收试剂盒回收目的片段。

1.4.2 PCR 产物经胶回收后得到目的片段 HVEM 胞外区片段和 IgG2a Fc 片段,将此两个片段用 T4 DNA 连接酶连入真核表达载体 pSecTag2A,22 $^{\circ}$ C 反应 2 h。再将连接产物转化感受态 DH5 α 大肠杆菌,涂布于含氨苄霉素的 LB 平板上,质粒抽提,经 *Sfi* I 和 *Not* I 双酶切鉴定筛选得到阳性克隆,送上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.5 HVEM-Ig 融合蛋白的表达、纯化和鉴定

1.5.1 HVEM-Ig 融合蛋白的表达 经酶切和测序鉴定的 pSecTag2A-HVEM-Ig 质粒转染 CHO 细胞,用含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基培养细胞,加入 Hygromycin B 600 μ g/ml 加压筛选,挑选阳性细胞克隆进行转种,用双抗体夹心 ELISA 法监测细胞分泌蛋白情况,最终获得稳定高效表达目的蛋白的细胞株。将获得的细胞株进行大规模滚瓶细胞培养,并保持 Hygromycin B 的筛选压力,待细胞长满滚瓶后换无血清培养基培养 5~7 d,收集培养液。10 000 \times g 离心 20 min 收集上清。

1.5.2 HVEM-Ig 融合蛋白的纯化 利用 rProtein A 亲和凝胶与目的蛋白 IgG2a Fc 段的特异性结合,直接采用蛋白 A 亲和层析,快速获取目的蛋白。先用平衡液平衡柱床,再将上述离心收集的培养液上样,然后用洗涤液充分洗涤层析柱,最后 D_{280} 监测下,用洗脱液洗脱收集蛋白,调节 pH 至 7.4。将得到的该纯化蛋白样品再用磷酸盐缓冲液 (PBS) 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,0.22 μ m 滤器过滤除菌。最后用 BCA 的方法对蛋白进行定量。

1.5.3 HVEM-Ig 融合蛋白的鉴定 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE): 配制 12% 的聚丙烯酰胺凝胶,将制备好的样品分别加入还原型和非还原型加样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后加样品和蛋白标志,80 V 电压电泳 30 min,然后在 120 V 电压下跑完。电泳胶用考马斯亮蓝染色 30 min,再脱色至背景清晰。最后将胶放于 3%~5% 甘油中浸泡 1 h,用 2 层玻璃纸包胶、晾干。Western 印迹分析:取融合蛋白进行 SDS-PAGE,电泳完毕把蛋白转印 PVDF 膜上,0.5 g/L 脱脂奶粉室温封闭 1 h,抗 HVEM 抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育,HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,TBST 洗膜,ECL 试剂曝

光显影定影分析。

1.6 HVEM-Ig 融合蛋白的生物学活性检测 [³H]-TdR 掺入法检测淋巴细胞增殖反应及 ELISA 法检测细胞因子分泌情况。尼龙毛柱分离法收集 BALB/c 小鼠脾 T 细胞作为反应细胞;收集 C57BL/6 小鼠脾细胞,用 80 μ g/ml 的丝裂霉素处理 30 min,作为刺激细胞;将两种细胞混合加入 96 孔细胞培养板培养,进行单向混合淋巴细胞反应 (MLR),分为未处理组、IgG 对照组和不同浓度的 HVEM-Ig 处理组。各组均设 3 个复孔,37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养 54 h 后实验组及对照组均加入 3.7 \times 10⁴ Bq [³H]-TdR/孔,18 h 后收集培养上清用 ELISA 法检测细胞因子;同时收集细胞至玻璃纤维膜,置于 24 孔板,每孔加入闪烁液 400 μ l,液闪仪测定每分钟脉冲计数,观察细胞增殖程度。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计分析软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼠 HVEM 胞外区片段和 IgG2a 重链基因 Fc 恒定区片段的克隆 分别从 BALB/c 小鼠脾细胞和 WT-1 杂交瘤细胞中提取总 RNA,逆转录后 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物(图 1),得到与预期大小一致的 DNA 片段(522 bp 和 720 bp)。

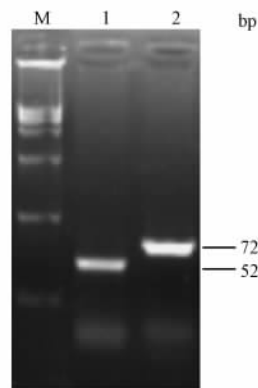


图 1 HVEM 胞外区片段以及 IgG2a 重链基因 Fc 恒定区片段的琼脂糖凝胶电泳结果

M: DNA 标志物;1:经 RT-PCR 得到的 HVEM 胞外区片段;2:经 RT-PCR 得到的 IgG2a Fc 段

2.2 重组真核表达质粒 pSecTag2A-HVEM-Ig 的鉴定 重组 pSecTag2A-HVEM-Ig 质粒经 *Sfi* I 和 *Xba* I 双酶切后电泳,显示切出与目的基因大小一致的 DNA 片段(图 2)。插入片段经测序证明插入位置正确,无突变,表明克隆载体含有 HVEM-Ig 基因序列,测序结果见图 3。

2.3 HVEM-Ig 融合蛋白的表达及其纯化产物的 SDS-PAGE 分析和 Western 印迹鉴定 ELISA 法筛选高表达量的细胞株,最终获得表达量为 1 μ g/(cell \cdot 24 h) 的细胞克隆,扩增、收集纯化蛋白并进行鉴定分析。HVEM 在体内可以二聚体或三聚体形式表达。SDS-PAGE 结果显示:在还原状态下检测到相对分子质量约为 45 000 的特异蛋白,而在非还原状态下可检测到相对分子质量为 45 000、90 000、120 000

的特异蛋白,表明表达产物可能存在多种形式。凝胶经灰度扫描分析显示蛋白纯度达到90%。Western印迹分析结果:该蛋白样品可被 anti-HVEM 抗体特异性识别,证明该蛋白为 HVEM 融合蛋白(图4)。

2.4 HVEM-Ig 融合蛋白的生物学活性检测 $[^3\text{H}]$ -TdR 掺入法检测结果(图5)显示:与对照组相比,HVEM-Ig 呈剂量依赖性地抑制同种异体 T 细胞的活化增殖($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。ELISA 法检测培养上清中细胞因子 IL-2、IFN- γ 、TNF- α 的水平,结果(图6)显示:当浓度为 40~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,HVEM-Ig 组培养上清中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 的水平低于对照 IgG 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

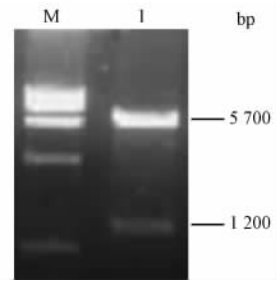


图2 重组质粒 pSecTag2-HVEM-Ig 酶切鉴定的电泳分析
M:DNA 标志物;I: Sfi I + Not I 双酶切产物

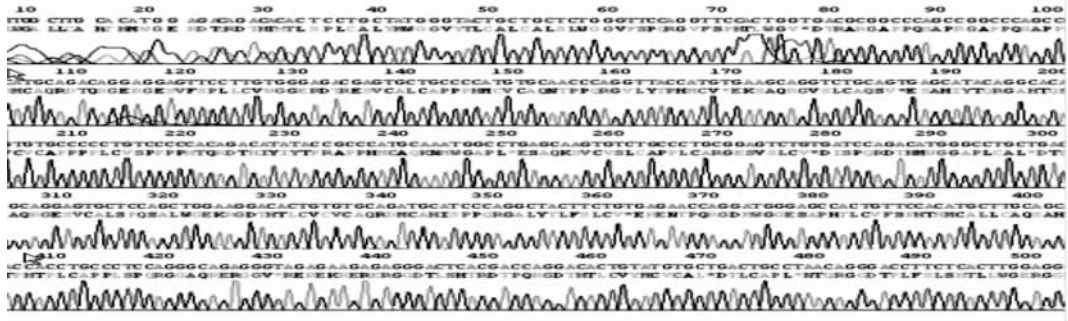


图3 pSecTag2A-HVEM-Ig 测序图

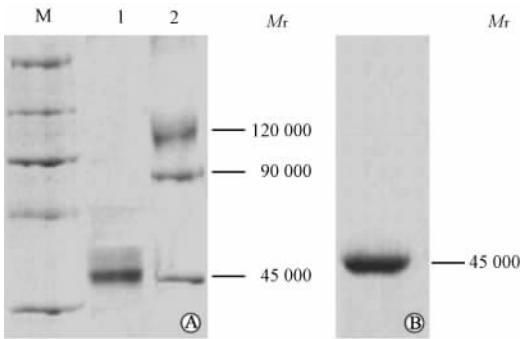


图4 SDS-PAGE 和 Western 印迹
鉴定重组融合蛋白 HVEM-Ig

A: SDS-PAGE 结果。M: 蛋白质相对分子质量标志物; 1: 还原态蛋白; 2: 非还原态蛋白。B: Western 印迹分析结果

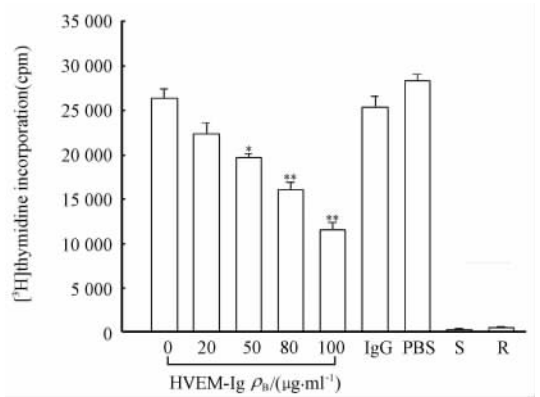


图5 HVEM-Ig 抑制单向混合淋巴细胞增殖反应

S: 单一刺激细胞组; R: 单一反应细胞组; IgG: 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IgG 对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 IgG 组相比; $n = 5, \bar{x} \pm s$

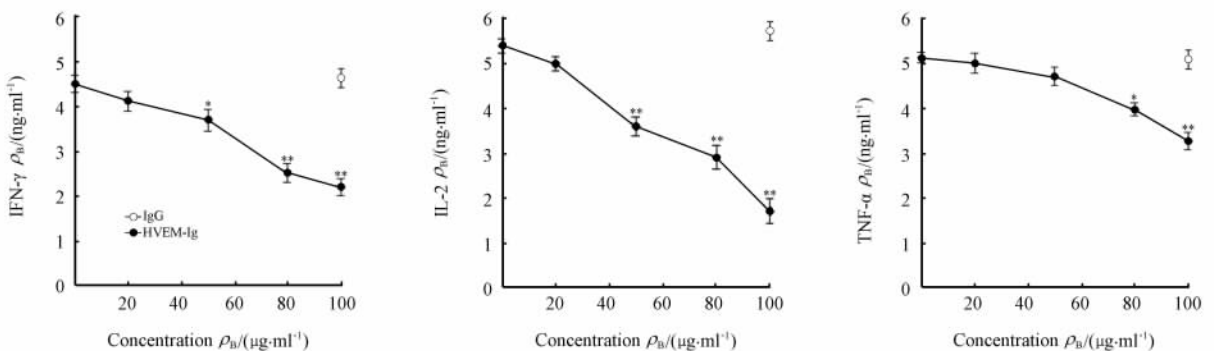


图6 MLR 培养上清细胞因子水平检测结果

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 IgG 组比较; $n = 5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

T 淋巴细胞介导的免疫反应在自身免疫及移植免疫中占有关键地位,共信号分子表达于 T 细胞表面,其与配体结合不仅能增强 T 细胞与抗原递呈细胞(APC)的连接及促进 TCR 与 MHC 抗原肽复合物的结合,还可向 T 细胞传递其完全活化所必须的辅助信号。T 细胞不同的共信号通路组成了相互影响、相互依存的多层次级联调控网络,为调控 T 细胞活化及其介导的免疫应答提供了有效的靶点,将 T 细胞作为靶细胞通过各种途径阻断其活化是免疫治疗的可行方案。作为 TNFR 家族成员之一的 HVEM 其功能表现出明显的多样性,不仅参与传递正性共刺激信号,又能介导负性共抑制信号。因此分析 HVEM 分子介导的正、负性调控作用具有重要的生物学意义。可溶性 HVEM 存在于许多疾病患者的血清中,推测其可能在一些疾病的发生发展中发挥作用,因此在某些疾病的病因分析及治疗存在着潜在的应用价值。

目前对 Ig 融合蛋白的研究非常广泛,是科学研究的重要工具,在临床治疗方面也有极好的应用前景^[10]。本实验采用基因工程的方法以 pSecTag2a 为载体,构建了融合蛋白 HVEM-Ig 的真核表达质粒,转染入 CHO 细胞进行表达,并利用 rProtein A 亲和凝胶与目的蛋白 IgG2a Fc 段的特异性结合,纯化 HVEM-Ig 蛋白,并采用 Western 印迹法进行鉴定。为了验证 HVEM-Ig 融合蛋白的生物学活性,我们在混合淋巴培养体系中加入了 HVEM-Ig,通过阻断 LIGHT-HVEM 共刺激通路和激活 HVEM-BTLA 抑制通路来阻止 T 细胞的激活。实验结果显示:在体外用^[3H]-TdR 掺入法检测混合淋巴细胞增殖反应时发现 HVEM-Ig 处理组 T 淋巴细胞的增殖程度比对照组明显降低,ELISA 法检测结果也显示培养上清中 IFN- γ 、TNF- α 、IL-2 等细胞因子分泌水平降低,说明 HVEM-Ig 融合蛋白具有明显的抑制 T 细胞增殖活化的作用。因此,本研究成功获得的具有生物学活性的鼠 HVEM 重组蛋白,为研究 HVEM 及其相关的配(受)体共信号分子提供了有价值的工具,为进一步探讨其在自身免疫和移植免疫中的作用奠定了物质基础。

[参考文献]

- [1] Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3: 609-620.
- [2] Chen L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4: 336-347.
- [3] Sharpe A H, Freeman G J. The B7-CD28 superfamily[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2: 116-126.
- [4] Morel Y, Truneh A, Sweet R W, Olive D, Costello R T. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity[J]. J Immunol, 2001, 167: 2479-2486.
- [5] Jung H W, La S J, Kim J Y, Heo S K, Kim J Y, Wang S, et al. High levels of soluble herpes virus entry mediator in sera of patients with allergic and autoimmune diseases[J]. Exp Mol Med, 2003, 35: 501-508.
- [6] Mauri D N, Ebner R, Montgomery R I, Kochel K D, Cheung T C, Yu G L, et al. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator[J]. Immunity, 1998, 8: 21-30.
- [7] Tamada K, Shimozaki K, Chapoval A I, Zhai Y, Su J, Chen S F, et al. LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response[J]. J Immunol, 2000, 164: 4105-4110.
- [8] Sedy J R, Gavrieli M, Potter K G, Hurchla M A, Lindsley R C, Hildner K, et al. B and T lymphocyte attenuator regulates T cell activation through interaction with herpesvirus entry mediator[J]. Nat Immunol, 2005, 6: 90-98.
- [9] Wang Y, Subudhi S K, Anders R A, Lo J, Sun Y, Blink S, et al. The role of herpesvirus entry mediator as a negative regulator of T cell-mediated responses[J]. J Clin Invest, 2005, 115: 711-717.
- [10] Lioussis S N, Tsokos G C. Monoclonal antibodies and fusion proteins in medicine[J]. J Allergy Clin Immunol, 2005, 116: 721-729.

[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《传染病护理学》已出版

本书由石宏、石雪松、江智霞等主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-81060-838-1,16开,定价 29.00 元。

本书主要阐述传染病护理学的基本概念和理论、工作原则和方法,传染病防治法规定的传染病(含新列入的,如高致病性禽流感、传染性非典型肺炎、手足口病等)的病原学、流行病学、临床特征、诊治措施、护理诊断和方法,以及相关的健康教育知识。与第 1 版相比,变更的内容有传染病隔离、医院获得性感染及传染性非典型肺炎防治管理办法等,并对新发传染病如传染性非典型肺炎、禽流感、手足口病等内容进行了完善和补充。

本书适合临床护理专业本、专科以及成人教育等不同层次学生学习使用,也可作为临床护理工作自学提高时学习参考书。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595

<http://www.smmup.com>