论著

文章编号:1000-5404(2005)17-1742-03

靶向 DC-SIGN 的 Le(x)-OVA 抗原的制备

王靖雪,张小萍,牟芝蓉,魏 静,唐 艳,黎万玲,吴玉章 (第三军医大学基础医学部全军免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 制备用于靶向 DC-SIGN 受体的 Le(x)寡糖介导的靶向抗原。**方法** 利用 Sulfo-SMCC 异源双功能交联试剂交联链霉亲和素(streptavidin, SA)和模式抗原卵白蛋白(ovalbumin, OVA),再利用 SA 与生物素高亲和力结合的特性,将 SA-OVA 复合物与生物素修饰的 Le(x)寡糖反应,由此获得由 Le(x)寡糖介导的靶向抗原 Le(x)-OVA 复合物。**结果** 应用 SDS-PAGE 蛋白质电泳和 Western 免疫印迹方法证实 SA 与 OVA 蛋白成功交联,ELISA 方法证实 SA-OVA 复合物中的 SA 仍具有与生物素反应的功能,根据 SA-OVA 复合物与生物素修饰的 Le(x)寡糖饱和反应的比例,获得所需要的靶向抗原 Le(x)-OVA 复合物。**结论** 获得 Le(x)寡糖介导的靶向抗原 Le(x)-OVA 复合物,为进一步研究经由 DC-SIGN 靶向后的抗原特异性免疫应答奠定了基础。

关键词: Le(x)寡糖; OVA 蛋白; Sulfo-SMCC 交联试剂; 靶向 DC-SIGN 抗原

中图法分类号: R392.33; R392.11 **文献标识码**: A

Preparation of Le(x)-OVA antigen targeting to DC-SIGN

WANG Jing-xue, ZHANG Xiao-ping, MOU Zhi-rong, WEI Jing, TANG Yan, LI Wan-ling, WU Yu-zhang (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To make Le(x)-OVA antigen targeting to DC-SIGN mediated by Le(x) oligosaccharide. **Methods** Utilizing Sulfo-SMCC as cross-linker, the streptavidin was conjugated to OVA, and the SA-OVA were linked with Le(x) sugars through interaction of SA and biotin, thus Le(x)-OVA antigen was obtained. **Results** SA was successfully conjugated to OVA by SDS-PAGE and Western blotting, and SA still had the capacity to react with biotin after conjugated to OVA, as shown in ELISA assay. According to ratio of saturated reaction between SA conjugated to OVA and biotin labeled to Le(x) sugars, the Le(x)-OVA antigen were obtained. **Conclusion** The antigen targeting to DC-SIGN, Le(x)-OVA, was obtained, which prepared the materials for further research of immune response induced by Le(x)-OVA.

Key words: Le(x) oligosaccharide; ovalbumin; Sulfo-SMCC cross-linker; antigen targeting to DC-SIGN

利用树突状细胞(dendric cells, DCs)来改善疫苗的免疫原性是疫苗设计的重要策略之一。目前一般采用间接体内(*ex vivo*)的方式来实现,而直接体内(*in vivo*)的方式,即将抗原直接体内靶向 DCs 是一种更简便更易于临床操作的方式,也是利用 DCs 来改善疫苗免疫原性的理想方式[1],但目前仍没有有效的体内靶向方案,没有适当的靶向受体是其中的原因之一。

DC-SIGN 是新近发现的限制性表达于 DCs 和某些组织巨噬细胞上的凝集素样受体,DC-SIGN 已经被证实是抗原受体,可有效的摄取包括颗粒性抗原和可溶性抗原,继之可以 MHC-Ⅰ[2]类分子和 MHC-Ⅱ[3]类分子限制性方式将抗原呈递出来。鉴于 DC-SIGN 的树突状细胞限制性表达的特性和作为抗原受体的功能特点,DC-SIGN 应是抗原的较好的靶向受体。

为了研究将抗原靶向 DC-SIGN 之后的免疫应答,必须首先制备靶向 DC-SIGN 的抗原。本研究利用蛋白质化学交联的方法,制备了利用 DC-SIGN 的自然配体分子 Le(x)作为导向分子的靶向 DC-SIGN 的抗原,并证实可以成功靶向 DC-SIGN 受体。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

Traut's 试剂和 Suflo-SMCC 活化的 OVA 蛋白购自 PIERCE 公司,兔源 OVA 多抗购自 Rockland 公司,山羊来源抗 SA 购自 Vector 公司,溴化氰活化的 Sepharose 4B 购自 Pharmacia 公司,蛋白质超滤离心管购自 Milipore 公司,Western blot 试剂盒购自 Roche,Le(x)-PAA-bio 购自 Glycotech 公司,鼠源抗 OVA 多抗由本研究所邹强博士惠赠。

1.2 SA 和 OVA 蛋白的化学交联和纯化

取 SA 5 mg 和 Traut's 试剂(2 mg/ml)68.8 μl,反应体系为

作者简介:王靖雪(1974-),女,四川省内江市人,博士研究生,助教,主要从事分子免疫学方面的研究。电话:(023)68752234; E-mail: wang-jx2000@tom.com

通讯作者:吴玉章,电话:(023)68752680

收稿日期:2005-02-23;修回日期:2005-05-26

SA 5 mg + 68.8 μl Traut's 试剂 + 10 × PBS 0.2 ml + 0.5 mol/L 的 EDTA 8 μl + 超纯水 723.2 μl 混合,4 ℃冰箱避光约 2 h;超滤离心管超滤去盐。1 × PBS, 2 mmol/L EDTA 平衡溶液稀释后继续超滤以稀释 Traut's 试剂,由此获得修饰后的 SA。取活化的 OVA 溶液 2 mg/ 200 μl(PBS 配制,内含 2 mmol/L EDTA),加入到修饰后的 SA 5 mg 中,立即加样枪吹打混合,4 ℃冰箱反应约 4 h。取少许稀释后蛋白质电泳和 Western 免疫印迹鉴定证实。其后立即亲和纯化 OVA-SA 化合物,即应用溴化氰活化的 Sepharose 4B 填料与兔源 OVA 多抗交联制备亲和介质,与需纯化的样品结合后装柱,0.1 mol/L 乙酸 0.5 mol/L NaCl(pH 3.0)洗脱后定量。

1.3　Western 免疫印迹证实蛋白化学交联

根据试剂盒方法,将需电泳蛋白以等体积 2 × 上样缓冲液混匀(无 DTT),煮沸 10 min,10% SDS-PAGE 胶蛋白质电泳,10 mV,2A 条件下转膜 50 min,封闭过夜,适当稀释一抗孵育 2 h,二抗孵育 30 min,漂洗干净后,化学发光法显影。

1.4　ELISA 检测 SA-OVA 与生物素的结合

将 1 μg/ 200 μl 的标记生物素的鼠源 IgM 1 μg/ 200 μl、Le(x)-PAA-biotin 1 μg/ 200 μl 或适当稀释的 200 μl OVA 蛋白包被 ELISA 板,4 ℃过夜,5% BSA/PBS 封闭,4 ℃过夜,将适当稀释的 SA-OVA 复合物加入包被有标记生物素的孔,而包被 OVA 蛋白的孔加入 PBS,37 ℃ 1 h,继之均加入鼠源抗 OVA 多抗和辣根过氧化物酶标记的二抗,OPD 显色系统显色。

1.5　蛋白质定量

采用标准的 Bradford 方法微量蛋白质定量方法,即准备已知不同稀释度的 OVA 蛋白总体积为 200 μl,同时准备未知浓度的待测样本(可将样本稀释)总体积为 200 μl,加 800 μl Bradford 染液孵育 5 min,即检测每孔的 $D(595)$ 值。

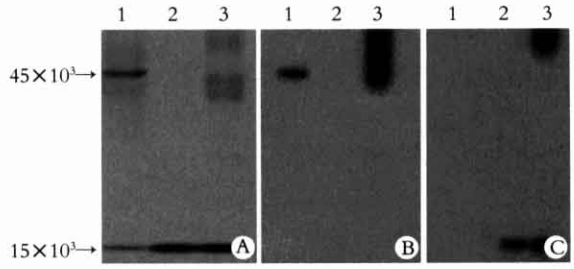
1.6　激光共聚焦显微镜检测靶向抗原被 DC-SIGN 受体特异摄取

用构建好的 DC-SIGN 绿色荧光融合蛋白(DC-SIGN-EGFP,具体构建及证实方法待发表中)转染 K562 细胞,48 h 后取出,其后加入 20 μg/ml 的 Le(x)-OVA,在 37 ℃孵育 30 min;PBS 洗 1 次,将摄取抗原的 K562 细胞涂片于预先用多聚赖氨酸处理的玻片,待玻片半干即用 4% 多聚甲醛/PBS 固定 30 min;0.2% Triton X-100 孵育 15 min;加入鼠源抗 OVA 多抗,37 ℃孵育 30 min;10% 羊血清/PBS 封闭 15 min,PE 标记羊抗小鼠 IgG 37 ℃孵育 30 min,PBS 洗 2 次,上机检测。

2　结果

2.1　SA 与 OVA 蛋白成功交联

由图 1A 可看出,在 SDS-PAGE 胶电泳中见到的各蛋白质条带位置显示 SA-OVA 复合物蛋白质条带分子质量大于 OVA(约 45 000)和 SA(煮沸变性后条带位于约 15 000),由于 SA-OVA 复合物是经过化学修饰,其电泳行为有所改变,所以 SA-OVA 复合物质条带不如未修饰的 OVA 蛋白和 SA 蛋白条带清楚,SA-OVA 复合物泳道中尚有未反应的 SA 和 OVA 存在。图 1B 是用 OVA 多抗所作的免疫印迹,可检测到在 SA-OVA 复合物条带相应位置处有 OVA 蛋白存在,继之用抗 SA 抗体做免疫印迹实验(图 1C),可见到在同一位置也存在 SA 蛋白,但在 OVA 蛋白条带相应的位置处没有 SA 蛋白的存在;在图 2 中,我们将生物素包被到 ELISA 板上,与 SA-OVA 复合物中的 SA 反应,在洗去其余未结合的蛋白质后,用抗 OVA 抗体检测到 OVA 蛋白的存在,这样,从两个不同的实验中得到的结果可以证实已经成功将 SA 和 OVA 蛋白交联到一起。



A: OVA conjugated and unconjugated SA ran by SDS-PAGE gel and stained with Coomassie blue; B: Immunoblotting with anti-OVA antibody to detect OVA in the SA-OVA conjugates; C: Immunoblotting with anti-SA antibody to detect SA in the SA-OVA conjugates; 1: OVA; 2: SA; 3: SA-OVA

图 1　SA-OVA 复合物的蛋白质电泳和 Western 免疫印迹

Fig 1　SDS-PAGE and Western blotting of SA-OVA conjugates

2.2　交联到 OVA 蛋白的 SA 仍具有生物素结合的功能

应用 OVA 蛋白亲和纯化和分子质量截留的超滤离心,可以去除反应产物中的 SA 和大部分的 OVA 蛋白。收获纯化后的 SA-OVA 复合物后,根据 Bradford 方法对 SA-OVA 复合物进行定量并做不同浓度稀释。我们将生物素连接到 ELISA 板上,用不同浓度的 SA-OVA 复合物与之反应,利用 ELISA 的方法,发现 SA-OVA 复合物能有效的与生物素的结合,并且结合能力随反应量加大而增强,当 SA-OVA 复合物反应剂量加大到 4.25 μg 时与 1 μg Le(x)-PAA-bio 结合达到饱和。根据 SA-OVA 复合物与 1 μg Le(x)-PAA-bio 结合的饱和反应时(490 nm)的吸光度值以及同时所作 OVA 蛋白的标准曲线,我们计算得到与 1 μg Le(x)-PAA-bio 饱和反应的 SA-OVA 复合物中含有约 1.5 μg OVA 蛋白(图 2)。

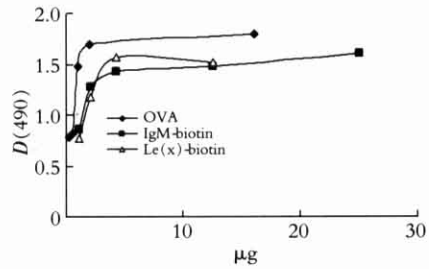
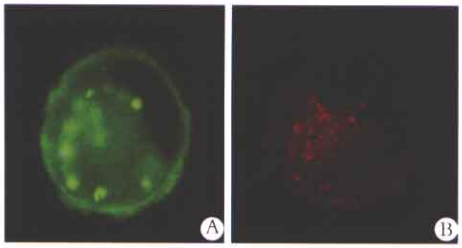


图 2　SA-OVA 复合物与生物素特异性结合曲线

Fig 2　Curve of specific binding of conjugates and biotin

2.3　DC-SIGN 受体对 SA-OVA 复合物的特异性摄取

我们应用表达了 DC-SIGN-EGFP 的 K562 细胞(K562-ED)来摄取 Le(x)-OVA 抗原,用抗 OVA 抗体染色后(红色荧光),可见红色荧光与 DC-SIGN 的绿色荧光有明显共聚现象发生,见图 3。本实验证实我们制备的 Le(x)-OVA 抗原被 DC-SIGN 特异摄取。



A: K562-ED (Green); B: K562-ED stained by anti-DC-SIGN antibody (Red)

图3 Le(x)-OVA 被 DC-SIGN 受体特异性摄取

Fig 3 Specific capture of Le(x)-OVA by DC-SIGN

3 讨论

将疫苗抗原靶向 DCs 可有效提高疫苗抗原的呈递效率从而达到,利用 DCs 来提高疫苗的免疫原性这一目的。这是目前疫苗设计中的常用策略。近来发现的 C-型凝集素受体,DC-SIGN,是限制性表达于树突状细胞和某些组织巨噬细胞,已有文献证实经由 DC-SIGN 摄取的抗原可由 MHC-Ⅰ和 MHC-Ⅱ类途径呈递出来,并且呈递效率比非靶向抗原高 100 倍,从理论而言是较好的疫苗靶向受体。

但关于 DC-SIGN 的免疫学功能的研究却暗示它可能参与免疫抑制和抑制感染中 Th1 的极化:①DC-SIGN 可能调节 TLR4 受体下传的免疫激动信号,DC-SIGN 的自然配体 ManLAM 与 LPS 联合应用可介导 IL-10 的分泌,由于 IL-10 这一细胞因子在人类免疫功能中多倾向于认为可以抑制免疫[4],所以 DC-SIGN 被暗示可能参与涉及免疫抑制的免疫调节过程;②在 *Helicobacter pylori* 中表达的 DC-SIGN 配体——含有 Le(x)糖的 LPS 可抑制 Th1 极化[5],可能有利于 *H. pylori* 在胃粘膜的感染。

综上,研究 DC-SIGN 靶向后抗原特异性免疫反应,尤其是用其自然配体分子作为导向分子介导模式抗原的摄取和呈递,可能有助于提供直接的证据。所以我们制备了 Le(x)糖分子导向的 OVA 抗原来研究靶向 DC-SIGN 的抗原特异性免疫反应。

靶向抗原的制备常采用基因工程重组和化学交联的方法来获得。基因工程重组的方法在设计等上游工作方面较为容易,但其后的靶向抗原的大量表达、纯化相对困难,另外在基因工程重组的靶向抗原中想要在设计之初就确知能否保留靶向抗原中各组分原来的结构特征和功能活性从而达到靶向目的也是较为困难。

化学交联也是目前常采用的方法[6]。异源双功能试剂是目前较好的用于蛋白交联的试剂,主要在于异源双功能试剂拥有两个或更多的反应基团,可以与不同的蛋白用不同的活性基团反应,从而尽可能减少在蛋白交联中不期望的蛋白同源多聚体或自身交联物的形成;根据我们交联的目的,我们需要交联后的 SA 保留自己结合生物素的活性,因此要尽可能的保留 SA-OVA 复合物中两组分原有的结构特征和功能活性,所以我们需要选择具有较长空间臂的交联试剂;另外,由于我们的 SA-OVA 复合物是非正常生理状态下的蛋白,必须考虑交联物对生物体以及生物实验的目的有无影响,例如 SA-OVA 复合物是否有生物毒性,能否降解,能否呈递等问题。Bonifaz 等[7]曾利用异源双功能交联试剂 Sulfo-SMCC 来交联 αDEC-205 抗体和 OVA 蛋白,体内注射靶向 DEC-205 受体,实验发现与抗体化学交联的 OVA 蛋白可以无障碍的在 DCs 细胞中释放,其免疫反应性相似与原来的 OVA 蛋白,在靶向之后微量的抗原也可以有效呈递。这说明该交联试剂对生物体和抗原进入抗原呈递细胞之后的下游事件影响不大。依据以上考虑,我们选择来 Sulfo-SMCC 异源双功能交联试剂来交联 SA 和 OVA 蛋白。

本研究中,我们首先制备了一种人工抗原——Le(x)-OVA 复合物,并证实可以被 DC-SIGN 受体特异性摄取,为进一步研究抗原靶向 DC-SIGN 受体之后的免疫应答情况提供了必要的前提。但是,Le(x)-OVA 能否引起有效的免疫应答,其靶向 DC-SIGN 之后有无免疫抑制信号下传或 T 细胞极化的影响还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Figdor C G, de Vries I J, Lesterhuis W J, *et al*. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way[J]. Nat Med, 2004, 10(5): 475-480.

[2] Moris A, Nobile C, Buseyne F, *et al*. DC-SIGN promotes exogenous MHC-I-restricted HIV-1 antigen presentation[J]. Blood, 2004, 103(7): 648-2654.

[3] Engering A, Geijtenbeek T B, van Vliet S J, *et al*. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells[J]. J Immunol, 2002, 168(5): 118-2126.

[4] Geijtenbeek T B, van Vliet S J, Koppel E A, *et al*. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function[J]. J Exp Med, 2003, 197(1): -17.

[5] Bergman M P, Engering A, Smits H H, *et al*. *elicobacter pylori* modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN[J]. J Exp Med, 2004, 200(8): 79-990.

[6] 沈关心, 周汝鳞. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2002. -21.

[7] Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, *et al*. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral $CD8^+$ T cell tolerance[J]. J Exp Med, 2002, 196(12): 627-1638.

(编辑 栗 嘉)