论著

文章编号:1000-5404(2006)24-2410-03

大肠杆菌在巨噬细胞中的降解与交叉递呈研究

刘 娜,吴玉章,周镜然,邹丽云,郭 晟,万 瑛 (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 通过表达的红色荧光蛋白(DsRed)与卵白蛋白(ovalbumin, OVA)表位融合蛋白,研究表达此融合蛋白的大肠杆菌在巨噬细胞中降解与交叉递呈的时相。**方法** 构建红色荧光蛋白与卵白蛋白表位融合蛋白的原核表达质粒(pET-16bOR),流式细胞计数仪检测表达融合蛋白的大肠杆菌,然后动态观察此大肠杆菌在巨噬细胞中的降解与交叉递呈。**结果** 表达红色荧光蛋白(DsRed)与卵白蛋白(ovalbumin, OVA)表位融合蛋白的大肠杆菌能被488 nm波长激发荧光。在巨噬细胞中,内质网与吞噬的大肠杆菌共聚;吞噬的大肠杆菌3~5 h快速降解;而在此时相产生的H-2Kb-$OVA_{257-264}$复合物达到顶峰。**结论** 表达此红荧光蛋白与OVA表位融合蛋白的大肠杆菌具有荧光特性,内质网参与大肠杆菌吞噬体形成,巨噬细胞吞噬大肠杆菌后3~5 h是抗原快速降解和交叉递呈的时相。

关键词: 红色荧光蛋白;抗原递呈;交叉递呈

中图法分类号: R378.21;R392.12 **文献标识码:** A

Degradation and cross-presentation of *Escherichia coli* in macrophage

LIU Na, WU Yu-zhang, ZHOU Jing-ran, ZOU Li-yun, GUO Sheng, WAN Ying (Institute of Immunology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To dynamically investigate the cross-presentation and degradation of *E. coli.* that expresses a fusion protein DsRed tagged OVA epitope antigen in macrophage. Methods A plasmid that contains the expression element of fusion protein DsRed tagged OVA epitope was constructed and expressed in *E. coli.*. The cross-presentation and degradation of the *E. coli.* in macrophage were dynamically assessed with cytometry by using a MHC class Ⅰ-peptide complex antibody. Results The expression of recombinant protein was confirmed by cytometry by 488 nm excitation. The phagosome containing *E. coli.* co-localized with endoplasmic reticulum (ER). The phagocytosed *E. coli.* degraded rapidly in 3 – 5 h and at same phase the H-2Kb-$OVA_{257-264}$ complex reached the maximum. Conclusion The *E. coli.* containing recombinant protein has similar fluorescence with DsRed. ER mediates the phagocytosis of *E. coli.*. The cross-presentation and degradation of *E. coli.*. are mainly completed in 3 – 5 h after phagocytosis.

Key words: DsRed; antigen presentation; cross-presentation

巨噬细胞吞噬穿过体表的细菌是机体的重要防御机制之一。传统的观点认为,巨噬细胞主要是降解被吞噬的细菌。近年的研究表明巨噬细胞吞噬的大肠杆菌能被MHC Ⅰ类分子限制性递呈,从而活化细胞毒性T细胞[1]。这提示特异性的$CD8^+$ T细胞参与了细菌的保护性免疫应答。同时基于这种特性,Radford等[2,3]还尝试将大肠杆菌发展成一种有效的疫苗载体。另一方面,我们对大肠杆菌如何能完成MHC Ⅰ类分子限制性递呈的细节还知之甚少。本研究在细菌中表达了含有红色荧光蛋白与OVA表位的融合蛋白,DsRed蛋白是一种来源珊瑚的红色荧光蛋白[4],$OVA_{257-264}$表位是MHC Ⅰ类分子H-2Kb限制性的免疫显性表位[5],使用抗Kb/$OVA_{257-264}$复合物的单抗25.D1.16同时动态了分析大肠杆菌抗原的抗原递呈和降解。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400392)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30400392)

作者简介:刘 娜(1979-),女,山东省枣庄市人,硕士研究生,主要从事疫苗及抗原递呈方面的研究。电话:(023)68752236-607,E-mail:aina416@sohu.com

通讯作者:万 瑛,电话:(023)68752236-813, E-mail: wanying2003cn2003@yahoo.com

收稿日期:2006-01-04;修回日期:2006-03-27

1　材料与方法

1.1　菌种、质粒

克隆菌 XL1-Blue 为本室保存,表达菌为大肠杆菌 BL21(DE3)购自天为时代公司,表达质粒:pET-16b 购自美国 Novagen 公司,pDsRed-C1 购自美国 Clontech 公司。巨噬细胞 Ana-1 购自上海细胞所。单抗 25. D1. 16 由 Germain 教授惠赠。

1.2　主要试剂

限制性内切酶 *Not* Ⅰ,*Bam*HⅠ,*Age* Ⅰ,*Xba* Ⅰ,*Xho* Ⅰ购自 New England BioLabs 公司,T_4 DNA 连接酶购自 Promega 公司,DiOC6 购自 Sigma 公司,小量质粒纯化抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3　pET16bOR 表达质粒构建和表达

构建的具体步骤参看文献[6],简单描述如下,合成的序列 GGCCGCAGTATAATCAACTTTGAAAAACTGGGACCGGTCGCCAG 和 GATCCTGGCGACCGGTCCCAGTTTTTCAAAGTTGATTATACTGC 变性退火后,经酶切反应、连接与转化,鉴定重组子命名为 pET-16bOR。重组子送上海申友生物技术公司测序鉴定。表达质粒 pET-16bOR 转化感受态大肠杆菌 BL21(DE),挑选含表达质粒的单克隆菌 37 ℃培养过夜,取 100 μl 接种于 10 ml LB 培养基中,37 ℃ 培养 8 h 后[$D(600)=1.0\sim1.2$],加异丙基硫代半糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L,26 ℃培养 12 h,4 ℃放置 24 h,并收集菌体。

1.4　流式细胞计数仪检测融合蛋白的表达

收集大肠杆菌 BL21(DE)和诱导后的细菌样品,PBS(0.01 mol/L)洗涤 2 次,1 ml PBS 重悬细菌沉淀送 FACS Calibur 流式细胞计数仪检测,488 nm 激光激发下计数,收集波长为 620 ~ 670 nm。

1.5　吞噬细菌的定位

将生长良好的 Ana-1 铺至含玻片的六孔板上。细胞培养过夜后加入大肠杆菌,冰上置 30 min。将细胞转至 37 ℃放置 3 h。PBS 洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 10 min,用 0.5 μg/ml DiOC6(溶于 PBS 中)染细胞 5 min,50% 甘油封片,于激光共聚焦显微镜下观察。

1.6　流式细胞计数仪检测大肠杆菌的降解和抗原递呈

收集生长良好的 Ana-1 细胞,细胞计数后,以(5 ~ 7)× 10^5/管分装到 1.5 ml 离心管中,在不同时相加入 10 倍于细胞数量的大肠杆菌,4 次 PBS 洗涤后,加入 25. D1. 16 单克隆细胞培养上清,4 ℃孵育 30 min,洗涤后加入 FITC-羊抗鼠 IgG,4 ℃孵育 30 min,洗涤后进行流式细胞计数仪检测。

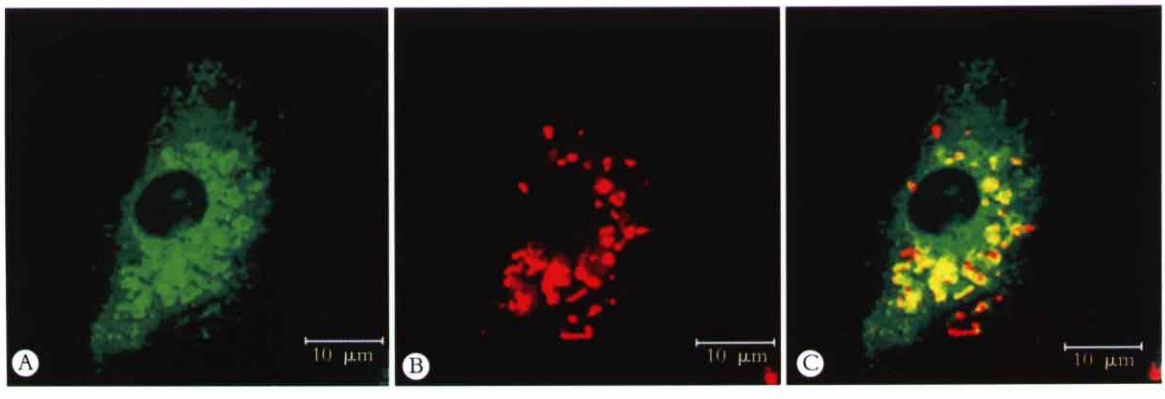
2　结果

2.1　pET16bOR 质粒的构建及在大肠杆菌 BL21 中的表达

构建红荧光蛋白 DsRed 与 OVA 表位融合蛋白的表达载体(pET-16bOR)转化大肠杆菌后,经异丙基硫代半糖苷(IPTG)诱导表达,肉眼可见细菌成明显红色,收集诱导前后的细菌,PBS 洗涤后,流式细胞计数仪观察,激发波长为 488 nm,收集通道为 525 nm (FL2) 或 620 nm (FL3),结果显示阳性表达比例为 100%,这说明大肠杆菌高效表达了红荧光蛋白与 OVA 表位的融合蛋白,并且此重组表达的融合蛋白仍具有 DsRed 蛋白荧光特性。

2.2　大肠杆菌的内吞囊泡与内质网共聚

为了解大肠杆菌吞噬囊泡的定位,巨噬大肠杆菌后,采用一种阳离子脂质染料——DiOC6 特异地标示巨噬细胞内质网,共聚焦荧光显微镜观察发现大肠杆菌主要位于内质网阳性的内吞囊泡中(图 1),这与 Desjardin 提出的 ER 介导的内吞模式是一致的[7],提示内质网参与了大肠杆菌吞噬体的形成,大肠杆菌可能在 ER 与吞噬体融合的囊泡中降解。



A: DiOC6; B: *E. coli.*; C: Merge　　红色:表达红荧光蛋白 DsRed 与 OVA 表位融合蛋白的细菌;绿色:DiOC6 染的内质网

图 1　共聚焦显微镜观察巨噬细胞吞噬表达红荧光蛋白与 OVA 表位融合蛋白的细菌

2.3　大肠杆菌被巨噬细胞吞噬后的降解

由于 pH 在 8 ~ 4 之间的变化并不影响 DsRed 的荧光强度[8],故大肠杆菌吞噬体成熟过程中 DsRed 荧光变化反应了此抗原的降解过程。当细菌和巨噬细胞为 100∶1,不同时相取出吞噬大肠杆菌的巨噬细胞,流式细胞计数仪测定细胞的平均荧光强度,结果显示吞噬大肠杆菌后,平均荧光强度(MFI)逐步降低,3 ~ 5 h 最为显著,此结果采用表达红荧光蛋白的大肠杆

菌可实时反映外源蛋白的降解，而 3 ~ 5 h 的降解程度较大，提示此时段是此吞噬体主要成熟降解的时间（图 2）。

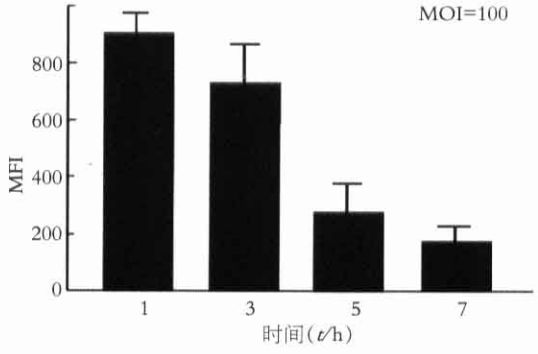
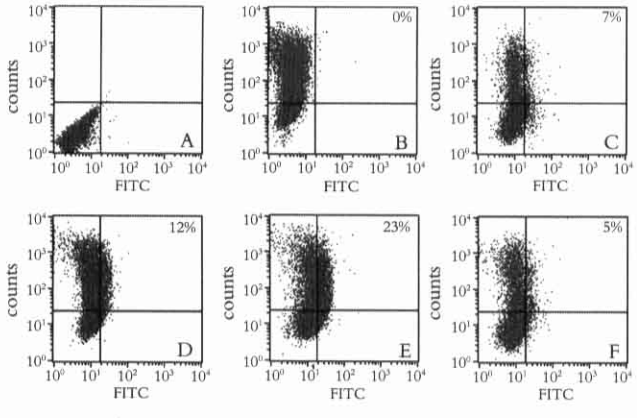


图 2 流式细胞计数仪分析巨噬细胞降解吞噬重组细菌后平均荧光强度变化

2.4 实时观察大肠杆菌在巨噬细胞中的降解和递呈

为同时观察抗原的降解和递呈，使用抗 $Kb/OVA_{257-264}$ 复合物的单抗 25. D1. 16 动态观察了抗原的递呈情况（图 3）。在不同时相吞噬大肠杆菌的巨噬细胞中，加入 25. D1. 16 单克隆细胞培养上清，洗涤后加入 FITC-羊抗鼠 IgG 进行流式细胞计数仪检测，结果显示在 3 ~ 5 h，巨噬细胞膜上的 $Kb/OVA_{257-264}$ 复合物达到高峰，随后下降，这说明当大肠杆菌快速降解时，也是生成 MHC 一类分子和肽复合物最多的时候。



A：对照；B：0 h；C：1 h；D：3 h；E：5 h；F：7 h

图 3 流式细胞计数仪分析巨噬细胞交叉递呈重组细菌的时相变化

3 讨论

红色荧光蛋白 DsRed 是近年发现的一个新的荧光蛋白，它可发射很强的红色荧光，最强的激发波长是 558 nm，最强发射波长是 583 nm，但在 488 nm 有 1 个小的吸收波峰，可使用常规的流式细胞计数仪 488 nm 激发荧光。另外此荧光蛋白对 pH 值的变化不敏感，故适合作为模式抗原，采用流式细胞计数仪和激光共聚焦荧光显微镜用于抗原吞噬和递呈研究。为示踪外源蛋白在巨噬细胞中吞噬和降解，我们构建了红荧光蛋白 DsRed 与 OVA 表位融合蛋白的表达质粒。此融合蛋白可在大肠杆菌高效表达，488 nm 波长激发在通道 3 可检测很强的红色荧光。

采用表达此融合蛋白的大肠杆菌，我们研究大肠杆菌的吞噬和递呈。结果显示大肠杆菌的吞噬囊泡与内质网特异性染料阳性区域共聚，这提示内质网参与了大肠杆菌吞噬囊泡的形成，这个发现和 Desjardins 提出的 ER 介导内吞模式相符，但是在抗原递呈过程中内质网的参与和大肠杆菌递呈的关系还有待进一步的研究。采用流式细胞计数仪，同时动态观察了外源的大肠杆菌在巨噬细胞的降解和递呈。结果显示 3 ~ 5 h 是抗原的主要降解和递呈时相，此时的吞噬抗原应主要位于晚期吞噬体中，所以从我们结果可推测，大肠杆菌的降解和交叉递呈主要在晚期吞噬体中完成。

参考文献：

[1] PFEIFER J D, WICK M J, ROBERTS R L, *et al*. Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells [J]. Nature, 1993, 361(6410): 359 - 362.

[2] RADFORD K J, HIGGINS D E, PASQUINI S, *et al*. A recombinant *E. coli* vaccine to promote MHC class I-dependent antigen presentation: application to cancer immunotherapy [J]. Gene Ther, 2002, 9(21): 1455 - 1463.

[3] BAIRD G S, ZACHARIAS D A, TSIEN R Y. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(22): 11984 - 11989.

[4] SHASTRI N, GONZALEZ F. Endogenous generation and presentation of the ovalbumin peptide/Kb complex to T cells [J]. J Immunol 1993, 150(7): 2724 - 2736.

[5] HOUDE M, BERTHOLET S, GAGNON E, *et al*. Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation[J]. Nature, 2003, 425(6956): 402 - 406.

[6] 刘 娜，万 瑛，周镜然，等. 红色荧光蛋白与卵白蛋白表位融合蛋白的表达与纯化[J]. 免疫学杂志，2005，21(5)：382 - 385.

[7] DESJARDINS M. ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(4): 280 - 291.

[8] MALVEZZI-CAMPEGGI F, JAHNZ M, HEINZE K G, *et al*. Light-induced flickering of DsRed provides evidence for distinct and interconvertible fluorescent states [J]. Biophys J, 2001, 81(3): 1776 - 1785.

（编辑 汪勤俭）