论著

文章编号:1000-5404(2010)03-0278-04

小鼠 CD25 分子胞外段的原核表达载体的构建及表达鉴定

徐 林[1],张 凤[2],周 涯[3],罗军敏[1],覃 明[1] (563000 贵州 遵义,贵州省遵义医学院:免疫学教研室[1],医学物理学教研室[3];200032 上海,复旦大学上海医学院免疫学系[2])

[摘要] 目的 构建小鼠 CD25 分子胞外段的原核表达载体,并在大肠杆菌中进行表达。**方法** 从 BALB/c 小鼠脾细胞中提取总 RNA,利用 RT-PCR 方法获得 CD25 分子胞外段序列;将其亚克隆入原核表达载体 PET-32a,构建好 PET-32a-CD25 胞外段,并进行酶切及测序鉴定;将 PET-32a-CD25 胞外段转染大肠杆菌 BL21 进行表达,并对表达产物进行纯化和鉴定。**结果** RT-PCR 扩增出 708 bp 的 CD25 胞外段的基因片段;pET32a-CD25 胞外段/BL21 经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 显示有新生的蛋白表达条带,相对分子质量约为 47×10^3,重组蛋白用镍树脂纯化后经 Western blot 检测显示具有良好的免疫反应性,并且可以在体外有效刺激自体 T 细胞疫苗免疫小鼠脾细胞的增殖并高分泌 IL-4。**结论** CD25 胞外段蛋白在原核细胞中成功表达,纯化后的蛋白保持良好的免疫反应性。

[关键词] CD25 胞外段;原核表达,T 细胞疫苗

[中图法分类号] R392.13; R394-33; R394.4 **[文献标志码]** A

Construction of prokaryotic expression vector of mouse CD25 extracellular domain

Xu Lin[1], Zhang Feng[2], Zhou Ya[3], Luo Junmin[1], Qing Ming[1] ([1]Department of Immunology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000; [2]Department of Immunology, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai, 200032; [3]Department of Medical Physics, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China)

[Abstract] Objective To construct the prokaryotic expression vector of mouse CD25 extracellular domain and to express it in *E coli*. Methods Total RNA was isolated from splenocytes of Balb/c mice. The CD25 extracellular domain gene was amplified by RT-PCR and cloned into the PET-32a vector. A positive recombinant, PET-32a-CD25e, was identified by enzyme cleaving and sequencing before its expression in *E. coli*, and transferred into *E. coli* BL21 (DE3) plysS for its expression. After purification with Ni^+ resin and renaturation *in vitro*, a relative molecular mass (Mr) of the interesting protein was detected by SDS-PAGE and Wes-tern blotting. Effect of the purified interesting protein on the proliferation of splenocytes from T cell vaccine-immunized syngeneic mice was detected by MTT assay. Results The cloned CD25 extracellular domain gene was identified to be functional by sequencing and expression. The purified interesting protein could significantly induce the proliferation and IL-4 secretion of splenocytes from T cell vaccine-immunized mice *in vitro*. Conclusion Mouse CD25 extracellular domain gene can be successfully expressed in prokaryotic cells with biological activity, which lays a foundation for further relative studies.

[Key words] CD25 extracellular domain; prokaryotic expression; T cell vaccine

Corresponding author: Xu Lin, Tel: 86-852-8609530, E-mail: xulinzhouya@163.com

T 细胞疫苗(T cell vaccine, TCV)作为一种治疗自身免疫病、病毒性疾病、器官移植排斥反应等的重要手段,目前在临床上得到大量的应用[1-4]。在探讨 TCV 作用机制中,体液免疫应答相关的国内外研究仍较少[5-8]。近年来研究发现 TCV 可以在自体体内诱导针对 T 细胞的 IgG 抗体,该抗体可以有效抑制 T 细胞的增殖[9,10]。我们在新近研究中利用小鼠 CD25 分子胞外段(extracellular domain)的基因免疫也成功诱导了针对自体 CD25 胞外段的体液免疫应答[11]。这些研究提示在 TCV 诱导的免疫抑制效应中,体液免疫反应也发挥了重要作用。本研究中我们构建小鼠 CD25 分子胞外段的原核表达载体,并观察表达纯化蛋白对 TCV 免疫小鼠脾细胞的刺激作用,为后续深入研究工作型抗原 CD25 分子诱发的体液免疫应答在 TCV 中的作用及机制提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物和材料

BALB/c 小鼠(H-2^d、4~6 周龄,雌性,体质量 15~18 g)由

[通信作者] 徐 林,电话:(0852)8609530,E-mail:xulinzhouya@163.com

重庆医科大学实验动物科学部提供,饲养于 SPF 级环境。pET-32a(+)-vector(TaKaRa 公司)、BL21(DE3)plysS、DH5α 为本实验室保存株,限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Hind*Ⅲ、DNA 胶回收试剂盒、质粒纯化试剂盒及 T_4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司),Trizol(Invitrogen 公司),Revert First strand cDNA synthesis Kit(MBI 公司),DEPC(Sigma 公司),DNA 聚合酶(TaKaRa 公司),Ladder DNA marker (MBI 公司),HRP 标记羊抗兔 IgG 抗体(BD 公司),兔抗鼠 CD25 抗体(eBioscience 公司),化学发光试剂(ECL)及硝酸纤维素膜购自 GE 公司,MTT 试剂盒(TIANGEN 公司),EasySee Western Marker(联博志达公司)。引物的设计与合成:根据检索 NCBI 数据库提供的鼠 CD25 基因的 cDNA 编码序列(NM_008367.2)进行 PCR 引物设计。设计引入终止密码子(TAA)的扩增 CD25 胞外段对应编码区的 1 对引物。上游引物: 5′-CGGAATTCATGGAGCCACGCTTGCTG-3′, 5′ 引入 *Eco*R Ⅰ酶切位点;下游引物: 5′-CCCAAGCTTCTTATACTCCATTGTGAGCA-3′, 5′引入 *Hind*Ⅲ酶切位点,由上海生工合成。

1.2 小鼠脾细胞的分离及总 RNA 的抽提

常规分离 BALB/c 小鼠的脾细胞,取 1×10^6 个/ml 脾细胞,加入 1 ml Trizol,室温混匀;加入 200 μl 氯仿,混匀,室温静置 15 min,12 000×*g*,4 ℃离心 15 min;小心将上层水相移至 1.5 ml 离心管中加入 500 μl 异丙醇,振荡混匀。4 ℃放置 30 min 沉淀 RNA,12 000×*g*,4 ℃离心 10 min;经 1 ml 75% 冰乙醇洗涤、室温风干后,加 DEPC 处理水溶解。

1.3 目的基因的扩增与纯化

通过 PCR 扩增出 CD25 分子胞外段基因序列,PCR 反应条件为: 94 ℃预变性 5 min,94 ℃变性 30 s, 54 ℃退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环后 72 ℃ 10 min 终止反应。琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,将目的条带切下,用 DNA 回收试剂盒回收纯化。

1.4 重组质粒 pET32a(+)-CD25 胞外段的构建与鉴定

将纯化的 PCR 产物和载体 pET32a (+)-vector 用 *Hind*Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切后,分别回收酶切产物。在 T_4 DNA 连接酶作用下定向将 CD25 胞外段基因片段与 pET32a (+)-vector 连接,以连接产物转化入 DH5α 感受态细菌,在 LB (Amp^+)培养基中筛选培养,挑取阳性克隆,培养后小样提取质粒, 用 *Hind*Ⅲ和 *Eco*R Ⅰ双酶切筛选阳性重组质粒,并送上海生工公司测序。

1.5 重组质粒的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将鉴定成功的重组质粒 DNA 转化感受态细菌 *E. coli* BL21 (DE3) plysS,在 LB(Amp^+)培养基中筛选培养。将含有重组质粒的 BL21(DE3) plysS 在 LB (Amp^+)中培养过夜。以 1% 接种于 LB(Amp^+)培养液中。于 37 ℃培养至 *D*(600)约为 0.6 时,加入 0.1 mmol /L IPTG 继续培养 4 h,经超声碎菌后,提取融合蛋白,进行 SDS-PAGE 分析后,用考马斯亮蓝 R250 染色后观察结果。

1.6 Western blot 分析

利用 His bind resin 亲和层析纯化柱对诱导表达产物进行纯化,然后经 SDS-PAGE 电泳后,电转移至硝酸纤维素膜上,用封闭液(含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST)室温振摇封闭 2 h。依次加入兔抗鼠 CD25 抗体及 HRP 标记羊抗兔 IgG,ECL 发光试剂盒曝光显色,观察结果。

1.7 T 细胞疫苗免疫

根据文献[5],常规无菌分离 BALB/c 小鼠肠系膜淋巴结,无菌制备不含红细胞的淋巴细胞悬液, 常规培养并调整细胞数至 2×10^6/ml, 加入终浓度 2.5 μg/ml 的 ConA,置 5% CO_2, 37 ℃孵箱中培养 48 h 后收集细胞。镜检证实 90% 细胞为活化细胞, 以 0.3% 的戊二醛处理细胞 15 min, 沉淀细胞以 0.1 mol/L、pH 7.2 PBS 洗涤 3 次后调整细胞数为 10^8/ml。以每只 0.2 ml 腹腔注射给同一品系正常小鼠,免疫 3 次,每次间隔 1 周。

1.8 淋巴细胞增殖实验

常规无菌分离 TCV 免疫小鼠脾细胞, 并调整细胞数 5×10^6/ml, 按每孔 100 μl 加入 96 孔细胞培养板中, 分别于实验孔中加入原核表达纯化的终浓度为 20 μg/ml 的 CD25 胞外段蛋白, 同时设未加蛋白的阴性对照, 每组设 3 个复孔。MTT 法检测淋巴细胞增殖, 用刺激指数(SI)表示细胞增殖活性。

SI = 实验孔 *D*(570)/对照孔 *D*(570)

1.9 ELISA 法检测 IL-4 和 IFN-γ 的分泌

按前述方法得到 TCV 免疫小鼠脾细胞, 分别于实验孔中加入纯化的终浓度为 10 μg/ml 的 CD25 胞外段蛋白,刺激 72 h 后,收集培养上清,按试剂检测说明书操作,检测上清中 IL-4 和 IFN-γ 的浓度。

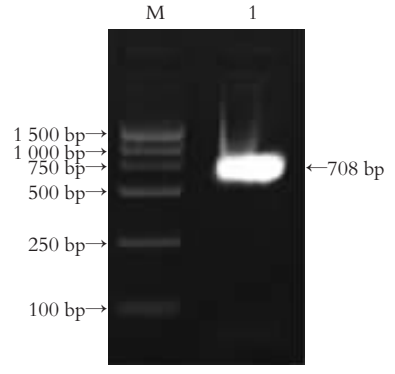
1.10 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 CD25 胞外段基因的 RT-PCR 结果

以 BALB/c 小鼠脾细胞所提总 RNA,逆转录合成 cDNA 并作为模板, 经 PCR 扩增后得到单一的与预期目的序列长度 708 bp 相符的特异条带(图 1)。

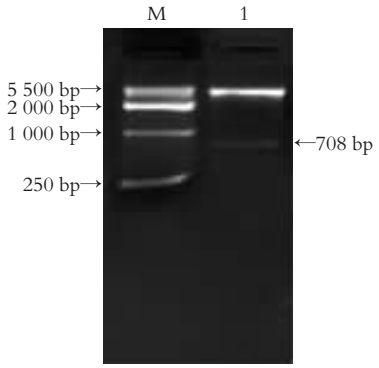


M: 标准; 1: PCR 产物

图 1 CD25 胞外段基因的 PCR 电泳结果

2.2 目的基因的克隆鉴定及测序结果

结果显示 PET-32a-CD25 胞外段经双酶切、电泳后可见大小 708 bp 的条带(图 2),测序结果显示插入片段与 GenBank 中小鼠 CD25 胞外段序列 NM_008367.2 的编码 cDNA 序列完全一致。构建好的原核表达载体命名为 PET-32a-CD25e。

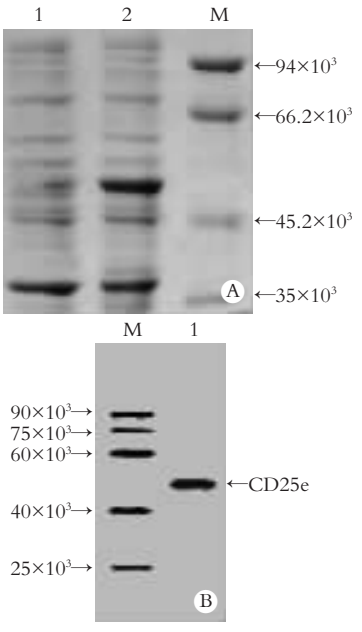


M:标准;1:PET-32a-CD25e 双酶切

图2 PET-32a-CD25e 的双酶切电泳结果

2.3 原核表达载体诱导表达的 SDS-PAGE 和 Western blot 结果

用 IPTG 诱导转化了 PET-32a-CD25e 的表达宿主菌 BL21(DE3) plysS,收集菌体,超声裂解后,进行 SDS-PAGE 检测,重组蛋白经镍柱纯化后进行 Western blot 检测。结果显示在相对分子质量为 47×10^3 处有一条较深的条带,而未经 IPTG 诱导的在此位置上条带不明显(图3A)。Western blot 检测结果表明目的蛋白具有良好的抗原性(图3B)。



M: 标准;1:未诱导;2:IPTG 诱导

图3 SDS-PAGE(A)和 Western blot(B)检测 CD25e 的表达

2.4 原核表达蛋白体外对脾细胞增殖的刺激作用

与对照组相比,纯化的 CD25e 蛋白可以在体外有效刺激 TCV 免疫小鼠的脾细胞增殖吸光度值分别为(0.31 ± 0.03)和(0.72 ± 0.05)($P<0.05$),提示原核表达的 CD25e 蛋白可以有效的刺激抗工作型淋巴细胞。

2.5 原核表达蛋白体外对脾细胞的细胞因子分泌的作用

与对照相比,CD25e 蛋白刺激的 TCV 免疫小鼠脾细胞高分泌 IL-4 分别为(61 ± 2.4) pg/ml 和(127.3 ± 11.6) pg/ml($P<0.05$),而 IFN-γ 的分泌变化不显著($P>0.05$)。

3 讨论

CD25 分子作为自体工作型抗原性分子,研究者们发现其可以有效诱发免疫应答。Mimran 等[12]用大鼠的 CD25 蛋白免疫同系大鼠,结果发现可以有效抑制后续类风湿关节炎的诱导,并认为其机制与 CD25 分子作为工作型抗原激活抗工作型 T 细胞有关。我们新近的研究表明,小鼠 CD25 分子胞外段成分的基因免疫可以在同系小鼠体内诱发有效的体液免疫应答[11]。然而 CD25 分子这一类工作型抗原诱发机体免疫应答的具体机制仍不明。后续深入研究工作型抗原 CD25 诱发自体免疫应答的确切机制,对于 TCV 诱导免疫调节机制的阐明有重要意义。

在本研究中,考虑到对于跨膜蛋白而言,其胞外段序列可以较全长序列更有效的诱导体液免疫应答[13-16],我们克隆了小鼠 CD25 分子胞外段(extracellular domain)cDNA 序列,全长 708 bp,亚克隆入原核表达载体 PET-32a。经酶切鉴定和测序,证实成功构建小鼠 CD25e 的原核表达载体 PET-32a-CD25e。进一步,我们在体外利用 IPTG 诱导 BL21 宿主菌表达 CD25e 蛋白。为了获得有生物学活性的 CD25e 蛋白,本实验中,我们直接将菌体通过超声波裂解,经镍株纯化 CD25e 蛋白后复性,通过 Western blot 证实诱导表达的 CD25e 蛋白具有良好的免疫反应性,更重要的是,纯化后的 CD25e 可以有效刺激 TCV 免疫小鼠脾细胞的增殖。我们在同期实验中发现,CD25e 胞外段基因免疫主要诱发的是以 Th2 型为主的体液免疫应答。为了进一步确定该结果,本研究检测了 CD25e 蛋白刺激 TCV 免疫小鼠脾细胞的细胞因子分泌情况,结果显示 CD25e 刺激的 TCV 免疫小鼠脾细胞高分泌 IL-4,低分泌 IFN-γ,这与前期体内实验结果一致。这些结果均提示我们,工作型抗原 CD25e 刺激机体主要产生 Th2 型为主的体液免疫应答,其具体的机制还有待深入研究。

参考文献:

[1] Hellings N, Stinissen P. Tovaxin, radiation-attenuated, patient-specific T-cells for the therapeutic vaccination of multiple sclerosis[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2008, 9(5): 534-540.

[2] Vandenbark A A, Abulafia-Lapid R. Autologous T-cell vaccination for multiple sclerosis: a perspective on progress[J]. BioDrugs, 2008, 22(4): 265-273.

[3] Abulafia-Lapid R, Mayan S, Bentwich Z, *et al*. T-cell vaccination against anti-CD4 autoimmunity in HIV-1 subtypes B and C-infected patients—an extended open trial[J]. Vaccine, 2005, 23(17-18): 2149-2153.

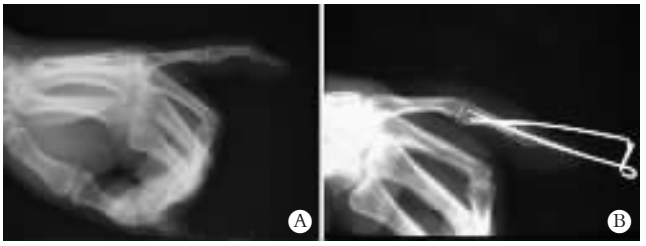
[4] Wang J, Jiang S, Shi H, *et al*. Prolongation of corneal xenotransplant survival by T-cell vaccination-induced T-regulatory cells[J]. Xeno-

transplantation, 2008, 15(3): 164 – 173.
[5] Quintana F J, Cohen I R. Anti-ergotypic immunoregulation[J]. Scand J Immunol, 2006, 64(3): 205 – 210.
[6] Yang Y, Ratts R B, Hussain R Z, *et al*. CD28:B7 interaction is necessary for the protective effect of T cell vaccination in EAE[J]. Eur J Immunol, 2007, 37(7): 2032 – 2042.
[7] Cohen I R, Quintana F J, Mimran A. Tregs in T cell vaccination: exploring the regulation of regulation[J]. J Clin Invest, 2004, 114(9): 1227 – 1232.
[8] Kumar V. Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs[J]. J Clin Invest, 2004, 114(9): 1222 – 1226.
[9] Herkel J, Brunner S, Meyer-zum-Buschenfelde K H, *et al*. Humoral mechanisms in T cell vaccination: induction and functional characterization of anti-lymphocytic autoantibodies[J]. J Autoimmun, 1997, 10(2): 137 – 146.
[10] 陈永良,何球藻. 同种特异 T 细胞疫苗诱导移植物存活期延长的研究—Ⅲ. 抗 T 细胞抗体的活性分析[J]. 上海免疫学杂志, 1997, 17(6): 330 – 333.
[11] Xu L, Zhang F, Xu W, *et al*. Specific antibodies induced by DNA vaccination with extracellular domain of CD25 gene protect against ConA-induced autoimmune hepatitis[J]. Clin Immunol, 2009, 132(3): 412 – 419.
[12] Mimran A, Mor F, Carmi P, *et al*. DNA vaccination with CD25 protects rats from adjuvant arthritis and induces an antiergotypic response[J]. J Clin Invest, 2004, 113(6): 924 – 932.
[13] Wang S, Taaffe J, Parker C, *et al*. Hemagglutinin (HA) proteins from H1 and H3 serotypes of influenza A viruses require different antigen designs for the induction of optimal protective antibody responses as studied by codon-optimized HA DNA vaccines[J]. J Virol, 2006, 80(23): 11628 – 11637.
[14] Jegerlehner A, Tissot A, Lechner F, *et al*. A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses[J]. Vaccine, 2002, 20(25 – 26): 3104 – 3112.
[15] Cherpelis S, Shrivastava I, Gettie A, *et al*. DNA vaccination with the human immunodeficiency virus type 1 SF162DeltaV2 envelope elicits immune responses that offer partial protection from simian/human immunodeficiency virus infection to CD8(+) T-cell-depleted rhesus macaques[J]. J Virol, 2001, 75(3): 1547 – 1550.
[16] Zur-Megede J, Otten G R, Doe B, *et al*. Expression and immunogenicity of sequence-modified human immunodeficiency virus type 1 subtype B pol and gagpol DNA vaccines[J]. J Virol, 2003, 77(11): 6197 – 6207.

(**收稿**:2009-07-17;**修回**:2009-09-14)
(编辑　龙　亮)

(上接 277 页)

典型病例:患者,女性,主因右手环指重物戳伤疼痛、肿胀、畸形、远指间关节不能伸 1 h,于 2007 年 10 月 10 日入院。入院诊断:右手环指末节指骨基底背侧骨折(Ⅱa 型)。急诊在指根神经阻滞麻醉下行末节指骨基底背侧骨折闭合复位穿针改良 Ishiguro 法内固定术,术后行右手短臂石膏掌侧托固定,6 周拍片见骨折愈合,去克氏针及石膏托进行功能练习,术后随诊 19 个月,功能恢复正常,效果满意(图 1)。



A:术前末节指骨基底背侧骨块移位;B:术后末节指骨基底背侧骨块复位

图 1　右手环指末节指骨基底背侧骨折(Ⅱa 型)患者手术前后 X 线表现

3　讨论

骨性锤状指在临床上治疗方法报道很多[2-4]。Ishiguro 法认为远指间关节在一定屈曲角度能完成骨折的复位[4]。我们采用远指间关节过伸 5° ~ 10°位固定基于以下 3 点:①伸指位固定远指间关节,使蚓状肌和骨间肌移行的侧键束处于低张力状态,有利于缓解伸肌腱张力,有利于肌腱的血运及骨折的愈合;②减轻远指间关节掌板挛缩,有利于后期功能练习;③采用其他方法治疗的骨性锤状指即使 0°位达到骨折解剖复位,仍出现 5° ~ 10°位的欠伸,采用远指间关节过伸 5° ~ 10°位固定,为可能出现的欠伸预留了一定的缓冲空间。

此术式优点:①手术操作简单易行,固定牢靠,取针方便,近期效果优良,未发现关节退变。②无需切口,不破坏肌腱终末端供给末节指骨基底背侧的血管网,有利于骨折愈合并减少创伤性关节炎。③无手术瘢痕,从美容角度更让人愿意接受。缺点:过伸位固定使侧副韧带处于松弛位固定,后期增加了远指间关节屈曲功能位的强度。

注意事项:①保持远指间关节过伸位,不应伸直过大,若伸度过大会导致背侧皮肤循环障碍和后期挛缩,并发生屈曲功能障碍;②术中斜向穿针角度,过大起不到固定目的,过小容易压伤皮肤及甲基质;③尽量避免反复多次穿针,以免骨块碎裂,损伤指背三角韧带、腱-骨移行区、关节软骨、屈肌腱及掌板。④去除内、外固定进行渐进性、保护性功能练习,先行主动练习 1 周,然后开始被动功能练习,逐渐加大力度,练习程度以伤指轻度肿胀,第 2 天肿胀基本消退不影响练习为原则,不可急于求成。

禁忌证:大于 3 周的陈旧性骨折;局部有皮肤擦伤创面未愈合的患者。

参考文献:

[1] Wehbe M A, Schneider L H. Mallet fractures[J]. J Bone Joint Surg Am, 1984, 66(5): 658 – 669.
[2] 吴克俭,王富,张伟佳,等. 末节指骨基底背侧撕脱骨折的手术治疗[J]. 中华手外科杂志,2004,20(3):169 – 170.
[3] 田敏,李坤. 微型锚钉在治疗锤状指中的应用[J]. 中国矫形外科杂志,2006,14(24):1906 – 1907.
[4] 宫旭,路来金. Ishiguro 法治疗指伸肌腱撕脱骨折[J]. 中华手外科杂志,2002,18(2):96 – 97.

(**收稿**:2009-07-07;**修回**:2009-07-28)
(编辑　张　维)