DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.010
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003 

文章编号:1000-5404(2003)24-2185-04

论著

# 人重组CD137-Fc分子的构建与真核表达

黄 钢[1],黎万玲[2],姜 曼[2],白 云[1] (第三军医大学基础医学部:[1]分子遗传学教研室;[2]免疫学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 构建人CD137-Fc基因的真核表达质粒,并表达有生物学活性的纯化人CD137-Fc融合蛋白。方法 从cDNA文库中用PCR扩增CD137全长编码基因,并导入真核表达载体pcDNA3中。测序证实后,继续用PCR扩增其膜外区cDNA,,酶切后与hIgG1Fc基因一起装入真核表达载体pcDNA3中,转染293T细胞瞬时表达,用夹心ELISA检测其表达情况,经蛋白A亲和纯化,用SDS-PAGE与免疫印迹进行鉴定。结果 测序证实构建的CD137与CD137-Fc cDNA阅读框完整,连接部位序列正确;ELISA证实CD137-Fc蛋白的表达;SDS-PAGE与免疫印迹证实其为人CD137-Fc蛋白。结论 获得了纯化的hCD137-Fc融合蛋白,为探讨CD137在免疫自稳调节中的地位,以及探索CD137的其它生物学功能奠定了坚实的实验基础。

关键词:人CD137;CD137-Fc;真核表达
中图法分类号:R394.3;Q781 文献标识码:A

# Construction and eukaryotic expression of human CD137-Fc chimeric molecule

HUANG Gang, LI Wan-ling, JIANG Man, BAI Yun (Department of Molecular Genetics, College of Basic Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: Objective To construct eukaryotic expression plasmid of hCD137-Fc gene and express hCD137-Fc fusion protein with high biological activity. Methods PCR technique was employed to clone the human CD137 cDNA from a normal human activated T cells cDNA library, and then clone its extramembrane encoding region. The extramembrane sequence together with human IgG1 Fc cDNA were inserted into the eukaryotic expression plasmid pcDNA3. CD137-Fc gene was expressed transiently in 293T cells, and then CD137-Fc protein was purified by recombinated protein A affinity chromatography column. At last, the MW, purity and antigenicity of CD137-Fc were identified by sandwich ELISA, SDS-PAGE and Western blotting, respectively. Results The ORF of CD137-Fc gene was coincident with what we expected. ELISA and SDS-PAGE confirmed protein expression in 293T cells. Western blotting proved the antigenicity of the purified CD137-Fc protein. Conclusion We obtained a purified recombinated CD137-Fc protein with biological activity and the expected MW. This lays the foundation for further studies of CD137 such as its role in immune homeostasis and other biological functions.

**Key words**: CD137; CD137-Fc; eukaryotic expression

CD137是一个TNF受体超家族的成员,又名ILA(人)/4-1BB(小鼠)或TNFRSF-9,为一种27 899(糖基化后约为39×$10^3$)的Ⅰ型跨膜糖蛋白,多以三聚体的形式诱导表达于活化的T、B淋巴细胞和单核细胞上,主要作为一个共刺激分子在T细胞的持续活化过程中发挥重要作用,并参与抗原提呈和CTL的产生,通过CD137介导的信号可维持CD8+T细胞的长期存活并诱导辅助性T细胞无能,进而调节T细胞的活化、增殖及程序性死亡[1]。此外,已有证据提示CD137可促进粒细胞的凋亡[2]。在小鼠体内,用抗CD137单抗激活T细胞后可有效地消除已建立的移植肿瘤[3]。现有研究表明,CD137表达异常可能与HIV感染[4]、自身免疫性疾病[5]及肿瘤发展[6]有较密切关系,探索其作用机制对了解免疫细胞活化、增殖、凋亡、生存、移行及机体调节免疫细胞数量与功能的平衡均具有重要意义。本研究拟构建并表达重组可溶性CD137-Fc蛋白分子。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

正常人的活化T细胞cDNA文库phAD.CAD和质粒mFas-hIgG1Fc-pcDNA3,均由美国NIH郑力新教授惠赠。核酸酶类购自大连宝生物公司。HiTrap重组蛋白A亲和层析柱(5 ml),购

作者简介:黄 钢(1976-),男,湖北省宜昌市人,博士研究生,主要从事免疫遗传学方面的研究。电话:(023)68753670
通信作者:白 云,电话:(023)68752224;E-mail:geneby@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-01;修回日期:2003-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

自Amersham Pharmcia Biotech 公司。脂质体 DOTAP 购自德国 Roche 公司。羊抗人 IgG Fc 段多克隆抗体(pAb)购自英国 KPL 公司。鼠抗人 CD137 单克隆抗体购自美国 Ancell 公司。HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自北京中山公司。人 IgG 购自深圳晶美公司。增强化学发光系统购自美国 NEN 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 利用引物设计软件 Primer Premier 5.00 进行。在引物 P1、P2、P3、P4 的 5′端分别加上 *Eco*RⅠ、*Xba*Ⅰ、*Hind*Ⅲ、*Xba*Ⅰ位点及保护碱基。全部引物均由大连宝生物公司合成。

CD137 cDNA: 引物 P1: 5′-CGGAATTCATCATGGGAAACAG-3′, 引物 P2: 5′-TGCTCTAGACAGCCCTATTGACTTCC-3′; CD137 EM gene: 引物 P3: 5′-ATCAAGCTTCATCATGGGAAACAG-3′, 引物 P4: 5′-GCTCTAGAAAGAAAGAAGGAGATGAT-3′。

1.2.2 CD137-pcDNA3 的构建与鉴定 用引物 P1 和 P2 直接从文库中扩增 CD137 cDNA 全长, 100 μl 体系, 反应条件: 94 ℃ 2 min→{94 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 进行 30 个循环}→72 ℃保温 8 min。将产物电泳切胶回收, 再用 *Eco*RⅠ + *Xba*Ⅰ双酶切回收后, 与 *Eco*RⅠ + *Xba*Ⅰ双酶切线性化的 pcDNA3 载体相连接(连接酶为 T4 DNA 连接酶, 按说明书进行, 插入片段与载体的摩尔比约为 10∶1, 16 ℃ 4 h), 并转化 DH5α 宿主菌。经 Ampr 筛选出阳性克隆后, 用 *Eco*RⅠ + *Xba*Ⅰ和 *Sac*Ⅰ分别酶切鉴定, 将阳性重组子送上海生工公司测序。

1.2.3 CD137-Fc-pcDNA3 的构建与鉴定 构建过程见图 1。①以含 CD137 cDNA 全长的质粒 CD137-pcDNA3 作为 PCR 模板, 用引物 P3 和 P4 扩增 CD137 膜外区部分的 cDNA, 100 μl 体系, 反应条件: 94 ℃ 2 min→{94 ℃ 30 s, 54 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 进行 30 个循环}→72 ℃ 保温 8 min。扩增产物进行电泳鉴定和切胶回收。②*Hind*Ⅲ+ *Xba*Ⅰ双酶切 PCR 产物, 回收; 用 *Eco*RⅠ + *Xba*Ⅰ及 *Hind*Ⅲ+ *Eco*RⅠ分别酶切质粒 mFas-hIgG1Fc- pcDNA3, 回收 hIgG1Fc 片段和线性化空载体 pcDNA3。③将酶切回收的 CD137 膜外区编码片段、hIgG1Fc 片段与线性化载体 pcDNA3 连接(方法同上), 并转化 DH5α 宿主菌。经 Ampr 筛选出阳性克隆后, 用 *Hind*Ⅲ+ *Eco*RⅠ双酶切鉴定。将阳性重组子送上海生工公司测序。

1.2.4 CD137-Fc 基因的表达与融合蛋白的纯化 ①重组质粒的准备: 参照《分子克隆实验指南》用碱裂解法, 大量抽提质粒 DNA, 用紫外 $A_{260}/A_{280}$ 测定其浓度和纯度。②DNA/脂质体(DOTAP)法瞬时转染 293T 细胞: 按其说明书进行(每 μg 质粒 DNA 添加 6 μl 脂质体原液)。同时转染空载体 pcDNA3 作为对照, 收集上清。③上清中 CD137-Fc 蛋白表达的夹心 ELISA 法检测: 包被抗体羊抗人 IgG Fc 抗体的终浓度为 0.2 mg/L, 一抗为鼠抗人 CD137 mAb 终浓度为 1 mg/L, 酶标记抗体为 HRP 标记羊抗鼠 IgG, 终浓度为 0.16 mg/L。以空载体转染细胞上清为阴性对照, 以纯化的人 IgG 为阳性对照。④蛋白 A 亲和层析柱纯化: 按说明书进行。纯化样品的浓度用紫外 $A_{280}$ 光吸收法测定。

1.2.5 纯化蛋白的鉴定 ①SDS-PAGE: 以纯化前的样品为对照, 进行 120 g/L SDS-PAGE, 鉴定纯化 hCD137-Fc 蛋白的纯度和相对分子质量(MW), 电泳完毕后, 用考马斯亮蓝对凝胶染色。②Western blotting: 一抗鼠抗人 CD137 mAb 终浓度为 2 mg/L, HRP 标记羊抗鼠 IgG 终浓度为 1 mg/L。以纯化的人 IgG 为阴性对照。按操作指南进行化学发光。

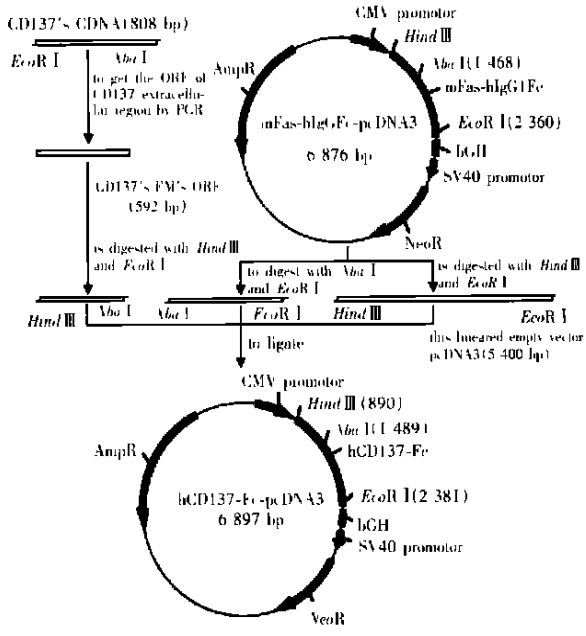



图1 质粒 **hCD137-Fc- pcDNA3** 的构建

**Fig 1 Construction of the recombinant plasmid hCD137-Fc-pcDNA3**

## 2 结果

### 2.1 CD137 全长 cDNA 的扩增及 CD137-pcDNA3 重组子的鉴定

以活化 T 细胞 cDNA 文库为模板, 用 PCR 扩增编码 CD137 全长 255aa 的 DNA 序列, 扩增产物的电泳结果显示特异性较好, 见图 2A。切胶回收后, 连入载体 pcDNA3。结合软件 SimVector1.2 电子酶切分析, 对筛选出的阳性重组子进行酶切鉴定, 见图 2B: *Eco*RⅠ + *Xba*Ⅰ双酶切获得 5 412、803 bp 两个片段, *Sac*Ⅰ酶切获得 5 261、872 和 87 bp 3 个片段, 与电子酶切结果一致。将 T7/Sp6 双向测序结果与公布的 CD137 cDNA 的序列(L12964)相比较, 发现两者的 ORF 完全一致, 未发现错配和移位等改变, 即获得 ORF 完整的 CD137 全长编码基因。

### 2.2 CD137-Fc-pcDNA3 的构建与鉴定

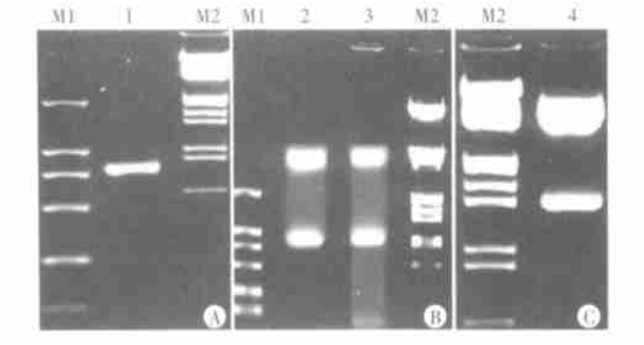
①用 PCR 扩增编码 CD137 膜外区的 cDNA, 将 PCR 产物酶切回收后与 hIgG1Fc 基因片段连入线性化载体 pcDNA3 中。②结合软件 SimVector1.2 电子酶切分析, 对筛选的阳性重组子进行酶切鉴定: *Hind*Ⅲ+ *Eco*RⅠ双酶切获得 1 500、5 397 bp 两个片段。酶切鉴定结果与电子酶切结果一致, 见图 2C。③T7 单向测序未发现 CD137 膜外编码区有错配或突变, 证实 CD137-Fc-pcDNA3 构建成功。

### 2.3 CD137-Fc 的表达、纯化与鉴定

2.3.1 CD137-Fc 表达的 ELISA 检测 为了检测转染上清中是否有 CD137-Fc 蛋白的表达, 我们建立了一种针对该融合蛋白中 CD137 膜外区的夹心 ELISA 检测法。阴性对照为转染空载体 pcDNA3 的 293T 细胞的培养上清, 阳性对照为纯化人 IgG。纯化的人 IgG 阳性对照与阴性对照的 $A_{490\,nm}$ 值之比约为 3, 而每次收集的瞬时转染表达上清与阴性对照的 $A_{490\,nm}$ 值之比在 4~10 之间甚或更高, 据此我们初步判定上清中有目的蛋白 CD137-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Fc 的表达。取一次收集的培养上清原液作倍比稀释用夹心 ELISA 检测的结果, 见图 3。




A: PCR amplification of CD137 cDNA; B: hCD137-pcDNA3 restrictive enzyme digestion analysis; C: hCD137-Fc-pcDNA3 restrictive enzyme digestion analysis; M1: DL-2000 markers (2 000, 1 000, 750, 500, 250, and 100 bp, from top to bottom); M2: λDNA/*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ markers (21 226, 5 148, 4 973, 4 268, 3 530, 2 027, 1 904, 1 584, 1 375, 947, 821, and 564 bp, from top to bottom); 1: CD137 cDNA (808 bp); 2: hCD137-pcDNA3/*EcoR* Ⅰ + *Xba* Ⅰ (803/5 412 bp); 3: hCD137-pcDNA3/*Sac* Ⅰ (87/872/5 261 bp); 4: hCD137-Fc-pcDNA3/*Hind* Ⅲ+ *EcoR* Ⅰ (1 500/5 397 bp)

图 2　CD137 cDNA 的 PCR 扩增及其重组质粒的酶切鉴定

**Fig 2　PCR amplification of CD137 and restrictive enzyme digestion analysis of its recombinated plasmid**

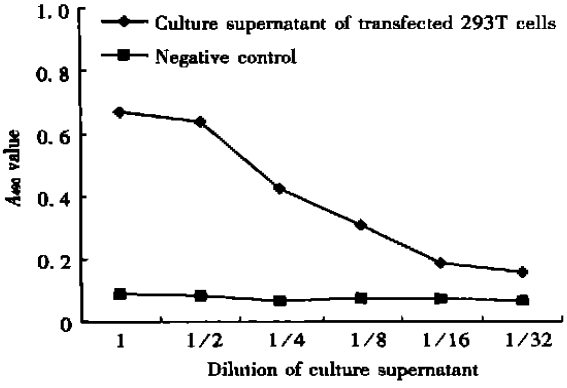
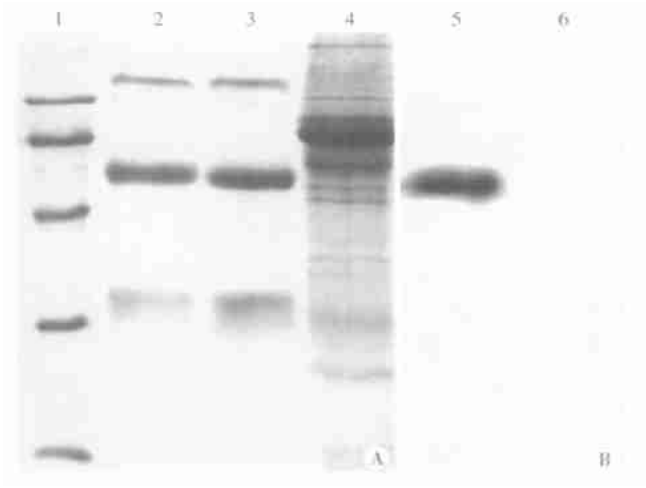



图 3　CD137-Fc 表达的夹心 ELISA 检测

**Fig 3　Detection of the CD137-Fc expression by sandwich ELISA**

2.3.2　纯化 CD137-Fc 蛋白的 SDS-PAGE 与 Western blotting 分析

CD137-Fc 融合基因的 ORF 编码 430 aa, 去掉软件 Signal P Version 2.0 预测的 17 aa 信号肽后, 还剩 413 aa, 见图 4。通过软件 DNA Star 计算其 MW, 在未糖基化的单体状态时, 应为 47 230 (pI 7.69)。纯化的 CD137-Fc 融合蛋白经 120 g/L SDS-PAGE 鉴定纯度高达 90%以上。加入还原剂 DTT 处理与不加 DTT 处理的纯化蛋白样品电泳迁移距离相当, MW 均在 66 200～42 700 之间, 考虑到真核表达过程中糖基化对 MW 的影响, 可认为与预计的 47 230 基本相符。另外, 该融合蛋白的表达形式可能为单体而非多聚体。Western blotting 分析显示: 在 66 200～42 700 之间出现一个特异的条带, 而纯化的人 IgG 则未出现发光带, 提示该条带为 CD137-Fc 融合蛋白。




A: Identification of the purity and MW of CD137-Fc protein; B: Immunoblot analysis of purified CD137-Fc protein; 1: Protein markers (MW: 97 400, 66 200, 42 700, 31 000 and 14 400, from top to bottom); 2: Purified sample treated with DTT; 3: Purified sample treated without DTT; 4: Concentrated culture supernatant before purification; 5: Immunoblot analysis of purified sample with anti-CD137 mAb; 6: Negative control: immunoblot analysis of purified human IgG with anti-CD137 mAb

图 4　CD137-Fc 融合蛋白的鉴定

**Fig 4　Identification of CD137-Fc fusion protein**

## 3　讨论

人 CD137 基因定位于 1p36, 与 TNFR 超家族的其它共刺激分子如 CD30、OX40、TNFR Ⅱ、HVEM (TR2)、AITR(GITR)位于同一个基因簇内[6]。被配体 CD137L 或抗 CD137 单抗交联后, CD137 主要通过 TRAF2/JNK+NIK 途径向细胞内传递共刺激信号, 促进 T 细胞活化、增殖、分化, 也能诱导慢性活化的 T 细胞凋亡; CD137 共刺激信号还可抑制活化诱导的细胞死亡 (AICD), 并可在 post-CD28 期, 维持免疫系统的效能[8～10]。而 CD137L 也具有信号转导功能: 交联 CD137L 可以协同抗 IgM 刺激导致很强的 B 细胞增殖反应; 诱导单核细胞活化, IL-6、IL-8、TNF-α 和 ICAM 的表达上调, 以及单核细胞存活因子 M-CSF 大量表达, 而 FcγR Ⅲ的表达下调; 在 T 细胞则抑制抗 CD3 激发的 T 细胞增殖反应, 并诱导非 Fas 途径依赖的 PCD[11, 12]。临床方面, 抗 CD137 单抗可促进 GVHD, 加速心脏和皮肤移植排斥反应[13], 并能消除业已存在的肿瘤[14]。可溶性 CD137 在类风湿性关节炎及多发性硬化症的病理生理过程中发挥作用[5, 15]。深入研究 CD137 对探讨肿瘤的病理过程及自身免疫病的发病机制具有潜在的重要意义。本实验中, 在设计构建重组人 CD137-Fc 融合分子时, 保证了融合分子 ORF 的延续性。CD137 的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

膜外区,长169 aa,含有4个特征性的半胱氨酸假性重复区(CRP),该CRP区又称为TNFRSF成员的结构基序,是其结合配体后发挥生物学功能的结构基础。人IgG1Fc基因片段编码人IgG1 Fc段的铰链区、CH2与CH3 3个功能区,但缺失激活补体的CH1功能区[16]。将CD137膜外区与人IgG1Fc段,不仅提高了表达的CD137膜外区的稳定性,还为该融合蛋白的纯化与检测提供了一个方便的标记。

为检测重组质粒转染的真核细胞培养上清中是否有目的蛋白表达,我们建立了一个针对CD137段的夹心ELISA检测体系,检测结果证实上清中有该融合蛋白的表达。并通过SDS-PAGE鉴定了亲和纯化的融合蛋白的MW与纯度,用免疫印迹证实其为人CD137-Fc蛋白。

综上所述,我们应用重组DNA技术与真核表达系统,获得了纯化的hCD137-Fc融合蛋白,为后续的工作打下了一定的基础:一方面,可溶性的CD137-Fc结合配体后,在体内即可阻断CD137L-CD137之间的相互作用,为将其用于自身免疫病的治疗提供实验依据;另一方面,获得纯化的可溶性CD137蛋白,为进一步探讨CD137在免疫自稳调节、自身免疫性疾病和肿瘤免疫中的地位,以及探索CD137的其它生物学功能,提供了试剂保证。

参考文献:


[1] Gami-Wagner B A, Lee Z H, Kim Y J, *et al*. 4-1BB is expressed on CD45-RAhiROhi transitional T cell in humans[J]. Cell Immunol, 1996, 169(1): 91-98

[2] Simon H U. Evidence for a pro-apoptotic function of CD137 in granulocytes [J]. Swiss Med Wkly, 2001, 131(31-32): 455-458

[3] Melero I, Shuford W W, Newby S A, *et al*. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors[J]. Nat Med, 1997, 3(6): 682-685.

[4] Wang S, Kim Y J, Bick C, *et al*. The potential roles of 4-1BB costimulation in HIV type 1 infection[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998, 14(3): 223-231.

[5] Michel J, Langstein J, Hofstadter F, *et al*. A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis[J]. Eur J Immunol, 1998, 28(1): 290-295.

[6] Schwarz H, Arden K, Lotz, M. CD137, a member of the tumor necrosis factor receptor family, is located on chromosome 1p36, in a cluster of related genes, and colocalized with several malignancies[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 235(3): 699-703.

[7] 黎万玲,黄 钢,姜 曼,等. 人CD137分子基因克隆及其在COS-7细胞中表达的研究[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(11): 1343-1345.

[8] Jang I K, Lee Z H, Kim Y J, *et al*. Human 4-1BB (CD137) signals are mediated by TRAF2 and activate nuclear factor-kappa B[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 242(3): 613-620.

[9] Cannons J L, Hoeflich K P, Woodgett J R, *et al*. Role of the stress kinase pathway in signaling via the T cell costimulatory receptor 4-1BB[J]. J Immunol, 1999, 163(6): 2990-2998.

[10] Michel J, Schwarz H. Expression of soluble CD137 correlates with activation-induced cell death of lymphocytes[J]. Cytokine, 2000, 12(6): 742-746.

[11] Iangstein J, Michel J, Fritsche J, *et al*. CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling[J]. J Immunol, 1998, 160(5): 2488-2494

[12] Kwon B, Moon C H, Kang S, *et al*. 4-1BB: still in the midst of darkness [J]. Mol Cells, 2000, 10(2): 119-126

[13] Nozawa K, Ohata J, Sakurai J, *et al*. Preferential blockade of CD8(+) T cell responses by administration of anti-CD137 ligand monoclonal antibody results in differential effect on development of murine acute and chronic graft-versus-host diseases[J]. J Immunol, 2001, 167(9): 4981-4986.

[14] Miller R E, Jones J, Le T, *et al*. 4-1BB-specific monoclonal antibody promotes the generation of tumor-specific immune responses by direct activation of CD8 T cells in a CD40-dependent manner[J]. J Immunol, 2002, 169(4): 1792-1800.

[15] Sharief M K. Heightened intrathecal release of soluble CD137 in patients with multiple sclerosis[J]. Eur J Neurol, 2002, 9(1): 49-54

[16] Ellison J W, Berson B J, Hood L E. The nucleotide sequence of a human immunoglobulin C gamma1 gene[J]. Nucleic Acids Res, 1982, 10(13): 4071-4079.


(编辑 王 红)

(上接2184页)

麻醉、试穿,到粗针穿刺、置管均反复用手按压颈前三角区,而该位置正在颈动脉窦周围,因反复刺激了颈动脉窦,反射性引起迷走神经兴奋,而引起呼吸心率减慢。若技术不熟练,反复多次进针,甚至可使穿刺针误入颈动脉窦周围或直接刺入颈动脉窦处,引起心跳呼吸骤停。因此,在行颈内静脉穿刺置管时应做到:①仔细询问病史,对有心肺功能不全、迷走神经张力增高的患者,应慎用或禁用本操作;②穿刺前应向患者作好解释,减轻其精神紧张[2],嘱其在穿刺过程中如有不适及时提出,但要保持体位不变;③摆体位时头颈部不要过偏过伸,尽量使患者颈部放松;④穿刺宜在有急救设备的处置室进行,若在病床旁进行则应备有急救药品;⑤术者须熟悉颈部解剖,掌握正确的穿刺技术,力求一针成功;⑥术中操作要轻柔,减少不必要的按压、揉搓等可能刺激颈动脉窦的操作,并密切观察患者神志、面色、呼吸、脉搏等的变化;⑦穿刺后让患者平卧10 min后再进行其它活动。

关键词:颈内静脉置管;心率呼吸减慢
中图法分类号:R619 文献标识码:B

参考文献:


[1] 喻荔娟. 颈内静脉穿刺置管术的解剖学基础[J]. 解剖学研究, 2000, 22(2): 152.

[2] 宋 娟. 颈内静脉置管在183例化疗病人中的应用和护理体会[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(10): 1252-1253.


(编辑 薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net