DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.034
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

文章编号:1000-5404(2002)05-0575-03

论著

CTLA4胞外区蛋白在GS115酵母中的表达和活性鉴定

朱 瑾,吴 军,易绍萱,陈希炜,郑峻松,罗高兴,张 宁 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 获取具有生物学活性的CTLA4胞外区蛋白。方法 构建CTLA4胞外区($CTLA4_{125}$)蛋白的酵母表达载体,在GS115酵母细胞中表达。通过硫酸铵粗分离和离子交换层析等,获取纯化的目的蛋白,并在CTLL2细胞中鉴定活性。结果 质粒在GS115酵母中可较高水平地表达CTLA4胞外区蛋白。经纯化后的蛋白可抑制IL-2刺激的CTLL2细胞的增殖。结论 GS115酵母可高效表达具有生物学活性的CTLA4胞外区蛋白。

关键词:CTLA4胞外区蛋白;GS115酵母
中图法分类号:R392.12;R394-33 文献标识码:A

Expression and activity of CTLA4 extracellular domain in the yeast GS115

ZHU Jin, WU Jun, YI Shao-xuan, CHEN Xi-wei, LUO Gao-xing (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To obtain the biologically-active protein of the cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4 (CTLA4) extracellular domain. **Methods** The protein of CTLA4 extracellular domain ($CTLA4_{125}$) was generated through the construction of yeast vector expressing CTLA4 extracelluar domain and its expression in yeast GS115. The protein was purified by rough separation with ammonium sulfate sedimentation and ion-exchange chromatography. The activity of the protein was assayed by detecting its inhibitory effect on the proliferation of CTLL2 cells induced by IL-2. **Results** The plasmid encoding the CTLA4 extracellular domain expressed the target protein in high level in the yeast Gs115. The purified protein inhibited the proliferation of CTLL2 cells stimulated by IL-2. **Conclusion** Yeast GS115 can highly express in the protein of CTLA4 extracellular domain with biological activity.

Key words: yeast GS115; CTLA4 extracellular domain

T细胞的活化和克隆扩增除需要抗原递呈细胞(APC)提供的抗原肽-MHC复合物与T细胞上受体结合所提供的第一信号外,还需要共刺激信号系统(第二信号系统)的参与[1,2]。共刺激信号主要由APC上的细胞表面分子与T细胞上相应配体结合形成。T细胞活化中缺乏共刺激信号的作用会导致T细胞活化障碍或T细胞无能(Anergy)。目前发现的最重要的共刺激信号由APC上B7家族分子与T细胞上CD28结合形成[3],在第一信号存在的情况下诱导T细胞的增殖和相关细胞因子的产生。CTLA4(Cytotoxic T lymphocyte associated antigen 4)是主要表达于活化T细胞表面的一种跨膜糖蛋白分子,与B7和CD28同属免疫球蛋白超家族成员,可以比CD28强20余倍的亲和力竞争性地与APC上B7家族结合,并提供负面信号抑制T细胞的活化和增殖[4]。已有文献[5,6]报道证实CTLA4-Ig融合蛋白具有抑制T细胞活化增殖的作用,如可防治实验性自身免疫性疾病和移植物排斥反应。CTLA4-Ig是由CTLA4胞外区序列与IgG Fc区序列融合后表达生成,其功能区是CTLA4胞外区。由于胞外区长度仅400 bp,易于大量表达,因此,我们构建了CTLA4胞外区表达质粒,并在GS115酵母中表达;通过其对IL-2刺激的CTLL2增殖的抑制率鉴定活性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

携带目的片段CTLA4 cDNA的质粒pIC9-CTLA4由本实验室构建[7,8];酵母表达载体pIC9K由本实验室保存;质粒提取试剂盒购自Roche公司;质粒酶切试剂盒和连接试剂盒购自BM公司;酵母GS115由本实验室保存;鼠抗人CTLA4单抗购自Pharmingen公司。

1.2 CTLA4胞外区酵母表达系统的构建

将携带400 bp的胞外区片段插入pIC9K,经酶切和测序证实、扩增后电转酵母GS115,经0.5~4 mg/ml G418梯度筛选获得多拷贝插入的阳性表达菌落。摇床上甲醇诱导发酵,Dot-ELISA测定上清液中CTLA4胞外区蛋白的表达。同时提取转阳性质粒后的GS115酵母DNA,PCR扩增后电泳检测目的片段的存在。将带阳性质粒的不同克隆的菌种传代并分别在摇床上发酵,重复上述鉴定实验,筛选出表达稳定的工程菌。

1.3 CTLA4胞外区蛋白在发酵罐中的表达和纯化

将所选工程菌在发酵罐中通过控制诱导菌体密度和时间

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(39993430-2);国家科技部重点项目(96-920-20-10);重庆市科委院士基金(96-901-05-18);重庆市99重点攻关资助项目(1999-6-40)
作者简介:朱 瑾(1967-),女,江苏省海门市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事与耳鼻咽喉相关的免疫学的研究,发表论文6篇。电话:(023)68754512
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:Junwupro@public.cta.cp.cn
收稿日期:2002-02-05;修回日期:2002-04-12

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

等使其大量表达。发酵液离心后收集上清液，超滤浓缩后，收集30%～70%饱和度的硫酸铵粗分离的沉淀物，重新溶解后在pH 7.0条件下采用QFF柱纯化(条件：A液采用20 mmol/L PBS、B液采用1 mol/L NaCl)，纯化出目的蛋白。蛋白定量显示每升发酵上清中可纯化出约1 mg的CTLA4胞外区蛋白。

1.4 Western-blot 鉴定 CTLA4 胞外区蛋白

将纯化后的目的蛋白、空载质粒发酵上清等行 SDS-PAGE 电泳后，转膜至 PVDF 膜。以鼠抗人 CTLA4 单抗为一抗、HRP-羊抗鼠多克隆抗体为二抗检测 PVDF 膜上的阳性条带。

1.5 CTLA4 抑制 IL-2 诱导的 CTLL2 细胞的增殖

用 RPMI1640 细胞培养液调节 CTLL2 细胞浓度至 5×10^5/ml。在96孔板中每孔加入细胞悬液100 μl，并加入20 U/ml的IL-2刺激CTLL2的增殖。以无细胞的培养液为空白对照；无CTLA4胞外区蛋白为实验对照。实验组CTLA4胞外区蛋白浓度分别为：0.1 μg/ml、0.2 μg/ml、0.5 μg/ml、1.0 μg/ml、2.0 μg/ml和5.0 μg/ml。每组3孔。于37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养44 h后，每孔加入MTT液20 μl，继续培养4 h。加入二甲基亚砜与无水乙醇混合液150 μl。以空白对照调零后酶标仪测定 A_{570}。计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%)=\frac{(A\text{ 实验对照}-A\text{ 实验组})}{A\text{ 实验对照}}\times 100\%$$

2 结果

2.1 质粒的酶切鉴定

酶切后经琼脂糖凝胶电泳，显示质粒带有400 bp的CTLA4胞外区片段，见图1。



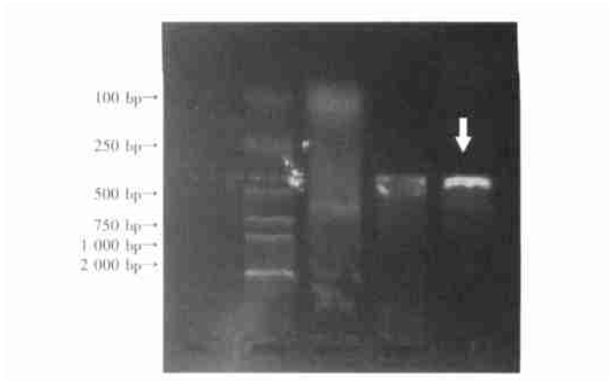
From left to right: DNA Marker; Plasmid, Plasmid, DNA Marker

图 1 质粒酶切后经琼脂糖凝胶电泳显示质粒带有 **400 bp** 的 **CTLA4** 胞外区片段(⇦)

Fig 1 Agarose electrophoresis showing CTLA4 extracellular domain (400 bp) in the constructed plasmid after enzyme digestion

2.2 工程菌目的 DNA 的鉴定

从电转质粒后的GS115中提取DNA，PCR扩增后琼脂糖凝胶电泳，显示400 bp的CTLA4胞外区片段已存在于GS115菌体中，见图2。



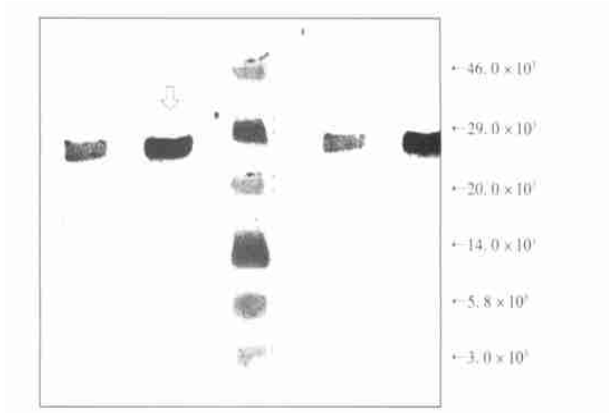
From left to right: DNA Marker, control, DNA of GS115 with plasmid, DNA of GS115 with plasmid

图 2 从工程菌中提取 **DNA**，**PCR** 扩增后琼脂糖凝胶电泳，显示 **400 bp** 的目的片段存在于工程菌中(⇦)

Fig 2 Agarose electrophoresis showing CTLA4 extracellular domain (400 bp) in the DNA from yeast GS115 with the constructed plasmid transfection

2.3 Western-blot 鉴定 CTLA4 胞外区蛋白的存在

经SDS-PAGE，显示工程菌甲醇诱导后上清在 28×10^3 处有蛋白条带，与预期分子量大小相符。而空载体转染的发酵上清和工程菌甲醇诱导前的上清中相应位置无明显条带；Western-blot结果显示在 28×10^3 处的蛋白条带能与抗人CTLA4单抗特异结合，说明该蛋白是目的蛋白，见图3。经硫酸铵粗分离和离子交换层析后可得到目的蛋白的纯品。



From left to right: GS115 without plasmid, Supernatant of GS115 with unpurified plasmid, Supernatant of GS115 with plasmid before methanol induction, Purified protein of CTLA4 extracellular domain, Blank, Pre-stain protein marker, Supernatant of GS115 with plasmid before induction with methanol, Supernatant of GS115 with unpurified plasmid, GS115 without plasmid, Purified protein of CTLA4 extracellular domain

图 3 **Western-blot** 显示转质粒的 **GS115** 发酵上清在 **28×10³** 处有 **CTLA4** 蛋白阳性条带(⇦)

Fig 3 Western blot showing CTLA4 positive band with a molecular weight of 28×10^3 in the supernatant of fermentation GS115 with plasmid insertion

2.4 纯化的 CTLA4 胞外区蛋白对 IL-2 刺激的 CTLL2 细胞增殖的影响

实验发现纯化的CTLA4胞外区蛋白能明显抑制IL-2依赖

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

性细胞株 CTLL2 的增殖, 且抑制率随培养液中 CTLA4 胞外区蛋白浓度的升高而增加。蛋白浓度为 5.0 μg/ml 时的抑制率近 50%, 结果见表 1。

表 1　CTLA4 胞外区蛋白对 CTLL-2 细胞增殖的抑制作用

Tab 1　Inhibition of CTLA4 extracellular domain protein on the proliferation of CTLL2 cells

CTLA4 concentration (μg/ml)	mean value of A_{570}	Suppression rate (%)
0.1	0.433	13.4
0.2	0.428	14.4
0.5	0.391	21.8
1.0	0.369	26.2
2.0	0.284	43.3
5.0	0.254	49.3

Note: The mean value of A_{570} in experimental control group was 0.501.

3　讨论

CTLA4 作为 CD28 这一 T 细胞上的重要的共刺激分子的竞争性拮抗剂, 在抑制 T 细胞活化和增殖中的作用已被大量的实验所证实。过去主要是通过大肠杆菌和 293 细胞表达获取 CTLA4Ig 融合蛋白。目前仅有一篇关于 CTLA4 胞外区蛋白在酵母细胞中表达的报道[9], 作者为了达到使蛋白纯化方便的目的, 在质粒构建中加入了组胺标签。我们认为这不利于保护蛋白的生物学活性和进一步运用于临床研究, 为此, 我们的质粒中未加组胺标签, 通过对纯化工艺的摸索找到该蛋白纯化的最佳方案。

P. pastoris GS115 酵母已运用于一系列同源蛋白的表达[10, 11]。我们在质粒构建中运用了 pIC9K 载体质粒, pIC9K 载体质粒为整合型质粒, 带有甲醇诱生型的甲醇氧化酶启动子, 转入 GS115 酵母细胞后在甲醇的诱导下呈分泌型表达。同时由于 neo^+ 基因的存在可通过 G418 筛选多拷贝克隆, 从而有利于高效表达。

B7-CD28 途径作为主要的共刺激通路在 T 细胞的活化中发挥关键性的作用。增强或是阻断这一共刺激通路都可能防治一些疾病的发生。如免疫缺陷病、自身免疫性疾病和移植排斥反应等。理论上 CTLA4 胞外区蛋白可竞争性结合 B7 分子, 从而使 T 细胞由于缺乏第二信号而无能。CTLL2 细胞作为一种 IL-2 依赖型 T 淋巴细胞株可同时表达 B7 和 CD28 分子, 两者相互作用并在 IL-2 刺激下可增殖[12]。我们在实验中发现运用 CTLA4 胞外区蛋白后 CTLL2 细胞的增殖受到抑制, 并呈剂量依赖型。这说明通过 GS115 酵母表达的 CTLA4 胞外区蛋白在离体实验中具有生物学活性-可竞争性结合 CTLL2 细胞上的 B7 分子, 从而使 CTLL2 由于缺乏第二信号而失活。

我们的实验证明可通过 GS115 酵母高效表达具有生物学活性的 CTLA4 胞外区蛋白, 并可通过分步纯化工艺获取高纯度的目的蛋白。这为进一步的在体实验以及 CTLA4 胞外区蛋白最终运用于临床研究提供了重要的物质保障。

参考文献:

[1] Lenschow D J, Walunas T L, Bluestone J A. CD28/B7 system of T cell costimulation [J]. Annu Rev Immunol, 1996, 14: 233—258.

[2] Croft M, Dubey C. Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response [J]. Crit Rev Immunol, 1997, 17(1): 89—118.

[3] Boussiotis V A, Freeman G J, Gribben J G, *et al*. The role of B7-1/B7-2: CD28/CTLA4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down—regulation of the immune response [J]. Immunol Rev, 1996, 153: 5—26.

[4] Waterhouse P, Marengere L E, Mittrucker H W, *et al*. CTLA-4, a negative regulator of T-lymphocyte activation [J]. Immunol Rew, 1996, 153(1): 181—207.

[5] 罗高兴, 吴　军, 易绍萱, 等. 重组腺病毒载体局部介导 CTLA4Ig 延长小鼠异体移植皮肤的存活 [J]. 中华烧伤杂志, 2000, 16(1): 37—39.

[6] Comoli P, Locatelli F, Moretta A, *et al*. Human alloantigen-specific anergic cells induced by a combination of CTLA4-Ig and CsA maintain anti-leukemia and anti-viral cytotoxic response. Bone Marrow Transplant [J]. 2001, 27(12): 1 263—1 273.

[7] 易绍萱, 吴　军, 王锡华, 等. CTLA4-Ig 融合蛋白在 COS-7 中的表达、纯化及鉴定 [J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(6): 523—526.

[8] 易绍萱, 吴　军, 姜　庆, 等. 人 CTLA4 胞外区 cDNA 的克隆及 Ig 融合蛋白表达载体的构建 [J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(9): 834—837.

[9] Gerstmayer B, Pessara U, Wels W. Construction and expression in the yeast Pichia pastoris of functionally active soluble forms of the human costimulatory molecules B7-1 and B7-2 and the B7 counter-receptor CTLA-4 [J]. FEBS, 1997, 407(1): 63—68.

[10] Zhang Y J, Jin N Y, Jiang W Z, *et al*. Cloning and expression of the external-glycoprotein gene mutant from HIV-2 in the methylotrophic yeast Pichia pastoris and identification of the glycoprotein[J]. Biotechnol Appl Biochem, 2001, 34(3): 1—4.

[11] 杨　晟, 黄　鹤, 章如安, 等. 重组人血清白蛋白在 Pichia pastoris 中分泌表达影响因素的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(6): 675—678.

[12] Belani R, Weiner G J. Expression of both B7-1 and CD28 contribute to the IL-2 responsiveness of CTLL-2 cells [J]. Immunology, 1996, 87(2): 271—274.

（编辑　王　红）

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