DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.009
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
834 2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)09-0834-04

人CTLA-4胞外区cDNA的克隆及Ig融合蛋白表达载体的构建

易绍萱,吴 军,姜 庆,王锡华,李 彦,刘志刚,张 宁,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人CTLA-4胞外区cDNA、构建人CTLA-4胞外区与人免疫球蛋白IgG Fc融合蛋白表达载体,为研究CTLA-4/Ig融合蛋白及其临床应用奠定基础。方法 从抗人CD3单克隆抗体和PMA活化的健康中国人外周血淋巴细胞总RNA中,扩增人CTLA-4基因胞外区cDNA片段,经*Hind*Ⅲ+*Bcl*Ⅰ双酶切后定向插入Ig融合蛋白表达载体。结果 从活化人T细胞中扩增出人CTLA-4胞外区cDNA片段,并将其正确插入Ig融合蛋白表达载体,成功构建了CTLA-4/Ig融合蛋白表达载体,表达载体的构建与预期设计相符;CTLA-4基因胞外区cDNA序列与文献报道一致。结论 本研究成功地克隆了人CTLA-4胞外区cDNA片段,构建了CTLA-4/Ig融合蛋白表达载体,为进一步在哺乳动物细胞中表达CTLA-4/Ig融合蛋白、探讨其在实验室及临床的应用奠定了基础。

关键词:CTLA-4;融合蛋白;基因表达
中图法分类号:R394-3;R394.3 文献标识码:A

Cloning of extracellular region of human CTLA-4 and construction of Ig fusion protein expression vector

YI Shao-xuan, WU Jun, JIANG Qing, WANG Xi-hua, LI Yan, LIU Zhi-gang, ZHANG Ning, XIAO Guang-xia (Research Institute of Burn Injury, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone an extracellular region of human CTLA-4 and construct an immunoglobulin IgG Fc fusion protein expression vector for the study of potential clinical usage of sduble CTLA-4. Methods Three PCR primers were designed based on the published CTLA-4 cDNA, a cDNA fragment was amplified by reverse-transcription methods followed by two cycles of PCR from the total RNA of anti-CD3 antibody and PMA activated human peripheral blood mononuclear cells, this fragment was then cloned into a transient expression vector containing human IgG1 Fc (including the hinge, CH2 and CH3 domain of IgG $C_{\gamma}1$) which was restricted by *Hind*Ⅲ+*Bcl*Ⅰ. Results A 470 bp cDNA fragment was amplified and cloned into IgG Fc fusion protein expression vector successfully. Nucleotide sequence analysis verified that the amplifed cDNA fragment was identical to human CTLA-4 extracellular region. Conclusion Human CTLA-4/Ig fusion protein expression vector is successfully constructed. These results lay the foundation for further research in expression of CTLA-4/Ig fusion protein in mammal cells and its clinical trial.

Key words: CTLA-4; fusion protein; gene expression

CTLA-4(Cytotoxic T lymphocyte associated antigen)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,是T细胞活化中重要的负调节分子[1]。可溶性CTLA-4是人CTLA-4分子胞外区与人免疫球蛋γ1绞链区、CH2、CH3区组成的融合蛋白,与B7有高度的亲和力,可以阻断B7与CD28或CTLA-4结合[2]。在TCR识别外来抗原的同时给予可溶性CTLA-4,在体外可诱导T细胞无应答,在体内则可诱导特异性免疫耐受。由于其在抗器官移植排斥和治疗自身免疫病等方面的广阔应用前景,正越来越引起人们的重视。为了进一步研究可溶性CTLA-4作为特异性免疫抑制剂或免疫耐受诱导

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39993430-2);国家科技部重点项目(96-920-20-10);军队杰出人才基金(1996)
作者简介:易绍萱(1966—),女,重庆市万州区人,博士,讲师,主要从事分子生物学和移植免疫学方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68752688
收稿日期:1999-11-12;修回日期:2000-05-18

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

剂的作用及其机制, 本研究采用基因工程的方法, 克隆中国人 CTLA-4 基因胞外区 cDNA 片段, 构建人 CTLA-4 胞外区融合蛋白表达载体, 为表达、纯化 CTLA-4/Ig 融合蛋白, 进一步探讨其在实验室及临床应用的可行性奠定基础。

1　材料与方法

1.1　质粒、菌株和细胞

融合蛋白表达载体 pX/Ig 由美国耶鲁大学尹志楠博士惠赠, pUC19 质粒、大肠杆菌 MC1061 由本校分子生物学教研室保存, 健康人外周血由西南医院血库提供。

1.2　试剂

鼠抗人 CD3 单抗(北京帮定), PMA(Sigma), 100 bp DNA Ladder(Gibco), 总 RNA 提取、cDNA 合成、质粒提取、凝胶片段回收、DNA 快速连接等 Kit(Roche)。

1.3　引物设计合成

根据基因库中人 CTLA-4 基因序列, 设计如下 3 条引物:

引物 1#: CTCAGTCTGGTCCTTGACCTCCTGTTTCCAAGCATGGCGAGCATGGCAATGCACGTGGCCCAGCC

引物 2#: TTTGGGCTCC TGATCA (*Bcl* I) GAATCTGGGCACGGTTC

引物 3#: GC AAGCTT (*Hind* III) CAATGGGTTGACTGCTCACACAGAGGACGCTGCTCAGTTCGGTCCTTGCATCT

引物由中科院上海细胞所合成, PAGE 纯化。

1.4　外周血单个核细胞(PBMC)的分离、活化及细胞总 RNA 的提取、鉴定

常规分离新鲜健康人 PBMC, RPMI1640 调节细胞密度为 1×10^6/ml, 加入 PMA(15 nmol/ml)和抗 CD3 单抗(10 μg/ml), 37 ℃ 5% CO_2 6 h。Tripure 试剂提取活化 PBMC 总 RNA, 甲醛变性琼脂糖凝胶检测 RNA 完整性, 紫外分光光度仪鉴定其纯度和浓度。

1.5　cDNA 第一链合成及 PCR 扩增

以活化 PBMC 总 RNA 为模板, 每 20 μl 逆转录体系含总 RNA 1.0 μg, 5×缓冲液 5 μl, 1.25 mmol/L dNTP 4 μl, Oligo(dT12) 0.1 μg, 100 mmol/L DTT 1 μl, 65 ℃水浴变性 10 min, 迅速置冰上, 再加入 RNasin 40 U, AMV 40 U, 42 ℃ 1 h, 沸水浴 10 min 后进行 PCR 反应。先以 cDNA 第一链为模板, 以引物 1# 和 2# 进行第一轮扩增, 条件为: cDNA 第一链 5 μl, 10×PCR buffer 5 μl, 10 mmol/L dNTP 4 μl, 引物 1# 和 2# 各 1 μl(终浓度 100 nmol/L), ddH_2O 29.5 μl, 95 ℃变性 7 min, 加 Taq 酶 0.5 μl, 总体积 50 μl, 循环条件: 94 ℃ 1 min, 55 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 30 个循环后 72 ℃ 7 min; 随后以第一轮 PCR 反应产物为模板, 以引物 2# 和 3# 进行第二轮扩增, 反应条件同前, 扩增产物进行 2%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6　融合蛋白表达载体构建

用琼脂糖凝胶片段回收试剂盒回收目的片段, 经 *Hind* III、*Bcl* I 双酶切后, 与经同样酶切的 pX/Ig 载体以片段:载体为 3:1 的比例, 按 DNA 快速连接 kit 说明连接, 即用 5×DNA 稀释缓冲液将片段和载体 DNA 稀释至 10 μl, 加入 2 倍连接缓冲液 10 μl, 混匀后加入 1 μl T_4 DNA 连接酶, 室温连接 1 h, 取 2 μl 连接产物转化大肠杆菌 MC1061, 挑选阳性转化菌落, *Hind* III、*Xba* I 酶切鉴定重组质粒。

1.7　序列测定

酶切鉴定插入片段大小正确的重组质粒, 经 *Hind* III、*Xba* I 双酶切后定向插入 pUC19 质粒中, 采用 Sanger 双脱氧测序法, 以质粒双链 DNA 为模板, 在 pUC19 通用引物引导下, ABI Prism377 全自动测序仪自动测序。

2　结果

2.1　RT-PCR 扩增 CTLA-4 胞外区 cDNA 片段

从两批活化 PBMC 提取的总 RNA, 清晰可见其内对照标准 28S、18S 和 5S RNA 条带, 说明所提 RNA 分子完整(照片略); 所提 RNA 经紫外分光光度计测得 D_{260}/D_{280} 比值为 1.8, 纯度符合要求, 可作为逆转录反应的模板。由引物 2#、3# 引导的第一轮 PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳后, 在紫外灯下未观察到明显的目的条带, 仅见一些微弱的 DNA 阳性区域; 以第一轮 PCR 产物为模板, 由引物 1#、3# 引导的第二轮 PCR 产物, 2%琼脂糖凝胶上可见大小约 470 bp 的扩增带, 与预期大小相符, 见图 1。

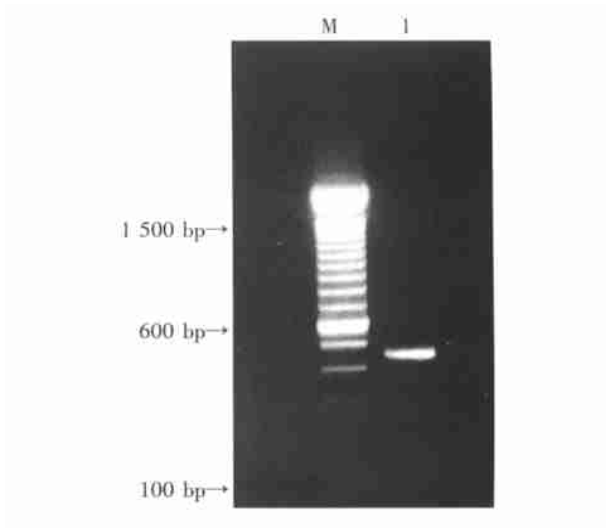


图 1　RT-PCR 扩增产物

M: 100 bp DNA 标准; 1: 第二轮 PCR 扩增 CTLA-4 基因片段

Fig 1　Amplification of extracellular region of human CTLA-4 gene by RT-PCR

M: 100 bp DNA marker; 1: PCR amplified CTLA-4 gene fragment

2.2　CTLA-4 胞外区与人 IgG Fc 融合蛋白表达载体的构建

融合蛋白表达载体构建策略如图 2 所示, 即: 将第二轮 PCR 扩增片段经 *Hind* III、*Bcl* I 双酶切后, 与经同样酶切的 pX/Ig 载体连接, 提取阳性转化菌落质粒 DNA, *Hind* III、*Xba* I 酶切, 能切出扩增片段与 IgG Fc cDNA 融合的 1.2 Kb 片段, 与预期设计相符, 将阳性质粒命名为 pCTLA-4/Ig, 图 3 为质粒构建和酶切鉴定图谱。

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

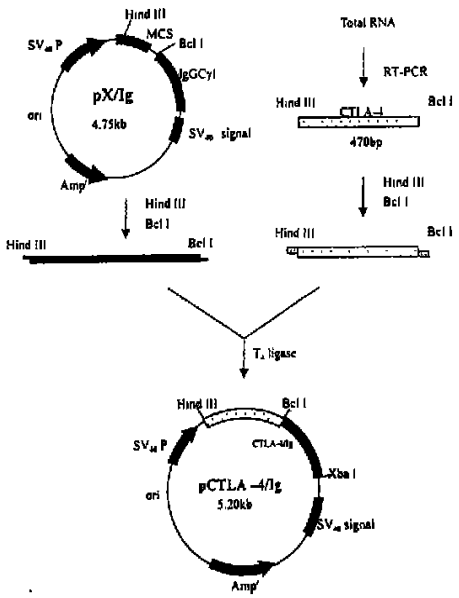


图2 pCTLA-4/Ig 融合蛋白表达载体构建示意图

Fig 2 Diagram of the construction of recombinant expression vector of pCTLA-4/Ig

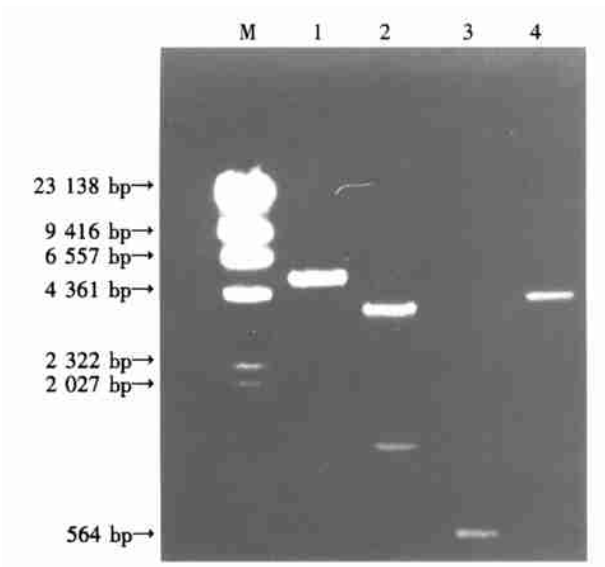


图3 pCTLA-4/Ig 质粒构建及酶切鉴定

M: λDNA/*Hind* III marker; 1: pCTLA-4/Ig *Hind* III 酶切; 2: pCTLA-4/Ig *Hind* III、*Xba* I 双酶切; 3: RT-PCR扩增CTLA-4胞外区片段 *Hind* III、*Bcl* I 双酶切; 4: pX-4/Ig 载体 *Hind* III、*Bcl* I 双酶切

Fig 3 Construction and identification of recombinant plasmid pCTLA-4/Ig

M: λDNA/*Hind* III marker; 1: pCTLA-4/Ig/*Hind* III; 2: pCTLA-4/Ig *Hind* III, *Xba* I; 3: PCR amplified CTLA-4 gene fragment /*Hind* III, *Bcl* I; 4: Expression vector pX-4/Ig/*Hind* III, *Bcl* I

2.3 CTLA-4融合蛋白 cDNA 序列测定

将 pCTLA-4/Ig 质粒中包括 CTLA-4 胞外区 cDNA 片段和 IgG Fc cDNA 的 1.2 Kb *Hind* III-*Xba* I 片段定向亚克隆入经同样酶切的 pUC19 质粒，采用双链质粒 DNA 双向测序，经测序结果分析软件分析表明，在所测片段上下游分别找到 *Hind* III和 *Xba* I 酶切位点，以及 CTLA-4 胞外区 cDNA 与 IgG Fc cDNA 交界处的 *Bcl* I 酶切位点，经同源性比较分析证实，与文献[2]报道 CTLA-4 胞外区 cDNA 序列一致。

3 讨论

CTLA-4 蛋白是主要表达于活化 T 细胞表面的跨膜糖蛋白，多种因素刺激 T 细胞活化均可上调 CTLA-4 mRNA 及膜表面蛋白表达[3~6]。在抗 CD3 单抗处理 PBMC 时，早在活化 1 h 即可检测到 CTLA-4 mRNA，6 h 即达高峰，膜表面蛋白的表达则在 24~48 h 达高峰；CD28 受体交联、蛋白激酶 C 活化剂、钙离子通道剂、以及粘附分子 ICAM-1、VCAM-1 等均可诱导或增强 CTLA-4的表达；活化 T 细胞还可通过细胞与细胞直接接触的方式诱导 B 细胞表达高水平的膜表面 CTLA-4[7]；在胸腺细胞中也发现有 CTLA-4 蛋白[8]。我们用抗 CD3 单抗（10 μg/ml）和 PMA（15 nmol/L）刺激人 PBMC，在共培养 6 h 后的细胞总 RNA 抽提物中，成功地扩增出 CTLA-4 胞外区片段。我们也曾用抗 CD3 单抗和 PMA 与人 PBMC 共培养，再用 mRNA capture kit 提取 mRNA，经 RT-PCR 反应后并未得到预期大小的扩增带，其原因可能与 CD3 单抗和 PMA 处理诱导细胞 CTLA-4表达早在 6 h 即可达高峰，而在 24 h 时，细胞 mRNA水平已下降[3]；还可能与 mRNA capture kit 捕获 mRNA 的量有限，大量高丰度的 mRNA 占据了有限的 Oligo dT 结合位点，使低丰度的 CTLA-4 mRNA 不能有效被固定，从而不能有效扩增目的片段。

本研究通过计算机辅助分析，根据人 CTLA-4 基因序列，设计了 3 条引物，其中引物 1# 包括 CTLA-4 胞外区 N' 末端 7 个氨基酸残基和致瘤素 M 信号肽 C 端 15 个氨基酸残基；引物 2# 对应于 CTLA-4 119-125 位氨基酸残基，引物 3# 包含致瘤素 M 信号肽其余氨基酸残基并与引物 1# 的致瘤素 M 信号肽部分重叠，并在引物 2#、3# 的 5' 端分别引入 *Bcl* I、*Hind* III酶切位点，以使扩增产物能以粘性末端定向插入 Ig 融合蛋白表达载体；引物设计还满足了真核细胞基因表达"－3，＋4 效应理论"[9]，即：起始密码 ATG 上游－3 位的 A 和下游＋4 位的 G 可使真核基因从该 ATG 高效起始翻译，若－3 位不是 A 则＋4 位必须是 G 才能进行有效翻译；致瘤素 M 信号肽序列可使融合蛋白高效分泌至细胞培养上清中[10]，有利于融合蛋白产物的鉴定和分离、纯化。

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

融合蛋白表达载体 pX/Ig 是将人 IgG $C_\gamma 1$ cDNA 部分序列(含铰链区及 CH2, CH3)克隆入 pCDM8 构建而成, 将待克隆片段以正确的阅读框架插入其多克隆位点和 *Bcl* Ⅰ 位点之间, 即可构建目的蛋白与 IgG Fc 的融合蛋白表达载体[11]。这不但能利用金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA)与 IgG Fc 端特异结合的特性, 达到从表达系统中一步纯化目的蛋白的目的; 目的蛋白与人 IgG 的融合蛋白作为人类治疗制剂还有如下优点: CTLA-4蛋白属于免疫球蛋白超家族成员, 由于结构上的同源, 在体内的半寿期可能与人源抗体相似, 它与抗体一样可以和靶分子特异结合, 影响病理过程中起主要作用的一些反应, 还可以避免由于目前临床上常用的鼠源单克隆抗体引起的异种蛋白反应。

因此, 我们选择并构建了 CTLA-4/Ig 融合蛋白表达载体, 为进一步在哺乳动物细胞中表达 CTLA-4/Ig 融合蛋白, 探讨其在实验室及临床的应用奠定了基础。

参考文献:

[1] Walunas T L, Lenschow D J, Bakker C Y, *et al*. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation[J]. Immunity, 1994, 1(5): 405—413.

[2] Linsley P S, Brady W, Umes M, *et al*. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7[J]. J Exp Med, 1991, 174(3): 561—569.

[3] Perkins D, Wang Z, Donovan C, *et al*. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation[J]. J Immunol, 1996, 156(11): 4 154—4 159.

[4] Finn P W, He H, Wang Y, *et al*. Synergistic induction of CTLA-4 expression by costimulation with TCR plus CD28 signals mediated by increased transcription and messenger ribonucleic acid stability[J]. J Immunol, 1997, 158(9): 4 074—4 081.

[5] Linsley P S, Greene J L, Tan P, *et al*. Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes[J]. J Exp Med, 1992, 176(6): 1 595—1 604.

[6] Freeman G J, Lombard D B, Gimmi C D, *et al*. CTLA-4 and CD28 mRNA are coexpressed in most T cells after activation: Expression of CTLA-4 and CD28 mRNA does not correlate with the pattern of lymphokine production[J]. J Immunol, 1992, 149(12): 3 795—3 801.

[7] Kuiper H M, Brouwer M, Linsley P S, *et al*. Activated T cells can induce high levels of CTLA-4 expression on B cells[J]. J Immunol, 1995, 155(4): 1 776—1 783.

[8] Castan J, Klauenberg U, Kalmar P, *et al*. Expression of CTLA-4 (CD152) on human medullary CD4+ thymocytes[J]. Med Microbiol Immunol Berl, 1998, 187(1): 49—52.

[9] Kozak M. The scanning model for translation: An update[J]. J Cell Biol, 1989, 108(2): 229.

[10] Malik N, Kallestad J C, Junderson N L, *et al*. Molecular cloning, sequence analysis and functional expression of the growth regulator, oncostatin M[J]. Mol Cell Biol, 1989, 9(7): 2 847—2 852.

[11] Seidman M M, Calos M P. The development of transient SV40 based shuttle vector[J]. Mol Cell Biol, 1989, 9(1): 55—60.

(编辑　潘式文)

(上接 833 页)

3　讨论

乳牙反𬌗矫治的常用方法为上颌𬌗垫式活动矫治器和下颌斜导板矫治器[1]。前者通过双曲腭簧加力推乳上前牙唇移而达到矫治目的; 后者可以被认为是一种功能矫治器[2], 当咬合时, 斜导板对上颌前牙产生一定唇向作用力, 同时对下颌产生一个后退力, 以达到矫治目的。因此它们均有各自的作用特点。改良𬌗垫矫治器运用和结合了二者的作用特点, 既保留了双曲腭簧对上颌前牙有较好的唇移作用优点, 同时斜导板又能起到功能矫治的作用。因为下后牙与𬌗垫间有 1~2 mm 间隙, 所以当咬合时, 咀嚼肌收缩力通过斜导板的斜面产生舌向移动下前牙的分力, 并使下颌向下向后方旋转。这种对下颌的作用, 由于乳牙期矫治时间很短, 因此难以象混合牙列期所使用的矫形面具那样, 能有足够的时间促进下颌骨向下向后方生长, 使前下面高有所增长, 达到矫形作用[3]。但是在乳牙反𬌗的矫治过程中对迅速解除反𬌗是有促进作用的, 同时这种矫治器避免了对上前牙的单一加力作用。因上乳前牙过分唇向倾斜, 而牙根会反向移动, 这可能会压迫恒牙胚, 将其推向腭侧, 导致恒牙反𬌗。改良𬌗垫矫治器的矫治作用是一种综合的作用, 即对上前牙、下前牙及下颌均有作用, 这样对避免患儿今后恒牙反𬌗可能是有益的。

经此矫治器治疗后有 2 例成前牙对刃𬌗。对此我们复习、分析了治疗前研究模型和病历, 发现其可能原因有两方面: ①矫治前这 2 例患儿反覆𬌗浅。②矫治时间偏长, 分别为 21 d 和 30 d。由于上前牙的唇向倾斜移动和斜导板对下前牙的压低分力作用以及后牙伸长, 使前牙覆𬌗减小, 这对覆𬌗深者有利, 但对反覆𬌗过浅者则会出现上述乳牙对刃𬌗情况。所以我们在选择病例时, 应尽量避免反覆𬌗过浅者; 另外, 斜导板的斜面不可过于平坦, 应注意减小斜面对下前牙的垂直向分力(压低力)。

关键词: 乳牙反𬌗; 矫治器

中图法分类号: R783.5　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 林　珠, 段银钟, 丁　寅 主编. 口腔正畸治疗学[M]. 西安: 世界图书出版西安公司, 1997. 399—400.

[2] 罗颂椒 主编. 当代实用口腔正畸技术与理论[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996. 259.

[3] Graber T M, Vanardall R L 主编. 口腔正畸学——现代原理与技术[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 1996. 533.

(编辑　刘　鹏)

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