DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.06.006
第22卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 6
2000年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2000

文章编号:1000-5404(2000)06-0523-04

论著

CTLA-4/Ig融合蛋白在COS-7中的表达、纯化及鉴定

易绍萱,吴 军,王锡华,李 彦,刘志刚,姜 庆,罗高兴,周立新,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 探讨pCTLA-4/Ig融合蛋白表达载体在哺乳动物细胞中的表达及表达产物的鉴定、纯化,为其功能研究和临床应用奠定基础。方法 将pCTLA-4/Ig表达质粒转染COS-7细胞,双抗体夹心ELISA检测细胞培养上清中融合蛋白表达;Protein A亲和层析纯化,SDS-PAGE、Western印迹、^{3}H-TdR掺入等进行分子量、纯度、抗原特异性及生物学活性鉴定。结果 在pCTLA-4/Ig质粒转染后的48 h和96 h上清中,均能检测到CTLA-4/Ig融合蛋白表达;经亲和层析纯化后,在SDS-PAGE胶上出现一条分子量约50×10^{3}的与预期分子量大小相符的蛋白条带,该蛋白能与抗人CTLA-4单抗特异结合;该纯化融合蛋白能抑制人MLR,抑制率为60%~70%。结论 在哺乳动物细胞中成功地表达并纯化了有生物学活性的重组人CTLA-4/Ig融合蛋白。

关键词:CTLA-4;融合蛋白;亲和层析;基因表达;纯化;活性鉴定
中图法分类号:R329.21;R394-3 文献标识码:A

Expression, purification and identification of CTLA-4/Ig fusion protein in COS-7 cells

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

Abstract: Objective To study the expression of pCTLA-4/Ig fusion protein expression vector in mammalian cells and the purification and identification of its expressive product *in vitro* for the further study of its function and clinical application. Methods Expression vector pCTLA-4/Ig was transfected into COS-7 with lipid reagent. The expression of fusion protein in the supernatant of the cell culture media was detected with double-antibody sandwich ELISA. After purified with protein A affinity chromatography, the product was studied with SDS-PAGE, Western blot and ^{3}H-TdR incorporation to determine its molecular weight, purity, antigen specificity and bioactivity. Results The fusion protein could be detected in the supernatant of cell culture media 48 and 96 h after the transfection of pCTLA-4/Ig. A protein band with molecular weight of 50×10^{3} was found in the SDS-PAGE gel. This protein specifically bound with human CTLA-4 monoclonal antibody and inhibited 60% to 70% proliferation of peripheral blood mononuclear cell (PBMC) in mixed lymphocyte reaction (MLR). Conclusion Recombined bioactive human CTLA-4/Ig fusion protein can be successfully expressed and purified in mammalian cells.

Key words: CTLA-4; fusion protein; affinity chromatography; gene expression; purification; activity identification

自Linsley等[1]将人细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)胞外区与人IgG Cγ1的铰链区和恒定区CH2、CH3 cDNA融合,构建了可溶性CTLA-4/Ig后,由于CTLA-4/Ig可封闭抗原递呈细胞上的B7分子,阻断共刺激通路,调节T细胞活性,对其在免疫应答中的作用和机制越来越引起人们的关注[2~6]。为了获得CTLA-4/Ig融合蛋白,我们在成功构建CTLA-4/Ig融合蛋

基金项目:国家自然科学基金资助重大项目(39993430-2);军队杰出人才基金资助项目(1996)
作者简介:易绍萱(1966-),女,重庆市万州区人,博士,主治医师,讲师,主要从事移植免疫方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68752688
收稿日期:1999-11-25;修回日期:2000-03-10

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

白表达载体的基础上，利用脂质体转染法，将 pCTLA-4/Ig 融合蛋白表达质粒转染 COS-7 细胞，通过 ELISA、SDS-PAGE、免疫印迹等对 CTLA-4/Ig 融合蛋白表达进行了鉴定及转染条件的优化；并用 Protein A 亲和层析柱对细胞转染上清中融合蛋白进行纯化，为大量获取该融合蛋白其及功能的深入研究和临床应用提供先期工作基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和细胞株

pCTLA-4/Ig 质粒由本所自行构建；COS-7 细胞，中科院上海细胞所中国细胞库购买。

1.2 试剂

质粒提取试剂盒(QIAGEN)；脂质体转染试剂盒 DOSPER(B.M)；鼠抗人 CTLA-4 单抗(Pharmingen)；羊抗人 IgG Fc-HRP，羊抗鼠 IgG-HRP(帮定)；亲和层析柱 HiTrap Protein A(Pharmacia)。

1.3 质粒制备

参照质粒提取试剂盒说明，但最后洗脱液用 HBS(pH 7.05)，而不用去离子水或 TE。

1.4 脂质体法转染 COS-7 细胞

取对数生长期的 COS-7 细胞，胰酶/EDTA 常规消化，以 1×10^5 细胞/孔接种 6 孔塑料培养板，37℃，5%CO_2 培养 24 h 后(约 70%融合)，另取不同量的 DOSPER 和 pCTLA-4/Ig 质粒及空载体 DNA 加入 HBS 中，以 100 μl/孔的量制备 DNA-DOSPER 混合液，室温放置 15 min，缓慢滴加至 COS-7 细胞中，培养 6 h，DMEM 彻底洗去 DOSPER，转染 24 h 后，换无血清 DMEM 培养基，收集 48 h 和 96 h 无血清培养上清，用于融合蛋白的检测和纯化。

1.5 双抗体夹心 ELISA 检测 CTLA-4/Ig 融合蛋白表达

用鼠抗人 CTLA-4 单抗(2 μg/ml，100 μl/孔)包被 ELISA 板，4℃ 48 h，分别加入 pCTLA-4/Ig 或空载体 Cpx/Ig 转染上清，4℃过夜，PBS-T 洗板×3，再加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG Fc 抗体(1∶1 000)，37℃ 1 h，PBS-T 洗板×3，然后加入显色液(邻苯二胺)，室温 10 min，2 mol/L H_2SO_4 终止反应，酶联免疫仪测定 D_{490}。

1.6 表达产物的回收与纯化

根据 ELISA 检测确立的转染条件，大量转染 COS-7 细胞，回收 48 h 和 96 h 无血清培养上清，调节 pH 至 7.0，用 HiTrap Protein A 亲和层析预装柱一步纯化融合蛋白，0.5 mol/L 柠檬酸(pH3.0)洗脱，1 mol/L Tris(pH9.0)调节 pH 至 7.0，再对 PBS 透析 12~16 h 备用。

1.7 SDS-PAGE、Western 印迹鉴定融合蛋白

SDS-PAGE 采用垂直板不连续凝胶电泳法。常规灌制 12%分离胶和 4.65%浓缩胶，取经亲和层析法纯化后的样品和蛋白分子量标准以每孔 20 μl 加样，100 V 恒压电泳 4~6 h，硝酸银染色，待蛋白带显示深棕色地终止显色反应；Western 印迹：SDS-PAGE 电泳结束后，取下凝胶，将蛋白质转印至 PVDF 膜(40 V，95 mA，4℃，16 h)，1%BSA 封闭，室温 1~2 h，加入鼠抗人 CTLA-4 单克隆抗体(1∶1 000 稀释)，4℃过夜，再加入 HRP-羊抗鼠 IgG 多克隆抗体(1∶500 稀释)，37℃ 60 min，DAB 显色，待特异性条带出现后，蒸馏水漂洗终止反应。

1.8 ^{3}H-TdR 测定融合蛋白生物学活性

常规分离人外周血淋巴细胞，调整细胞密度为 2×10^6 cells/ml，将两人 PBMC(同种异体双向 MLR)等体积混合后以 2×10^5 cells/孔接种“U”型 96 孔培养板，加入不同体积的纯化融合蛋白，设置等体积相应空载体转染上清或培养基作对照，每组 3 复孔，37℃，5%CO_2 培养 5 d，终止培养前 16 h 加入 ^{3}H-TdR(终浓度 5 μCi/ml)，收集细胞于 0.45 μm 微孔滤膜上，烘干，液体闪烁计数仪测 DPM 值。

1.9 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，Microsoft Excel 统计程序进行均数差异显著性分析。

2 结果

2.1 ELISA 检测 CTLA-4/Ig 融合蛋白表达

在 pCTLA-4/Ig 质粒转染 COS-7 细胞所收集的 48 h 和 96 h 上清中，均能检测到 CTLA-4/Ig 融合蛋白表达，其中 48 h 上清的含量明显高于 96 h 上清含量。而空载体转染上清和用无关抗体包被的结果均接近空白对照，见表 1。

表 1 脂质体转染 COS-7 细胞上清的 ELISA 鉴定

Tab 1 ELISA analysis of COS-7 cell culture supernatant after DOSPER transfection

Coated antibody	Supernatant		Result
	Transfect supernatant	Second antibody	
Anti-human CTLA-4	pCTLA-4/Ig 48 h	HRP-hIgGFc	++
Anti-human CTLA-4	pCTLA-4/Ig 96 h	HRP-hIgGFc	+
Anti-human CTLA-4	pX/Ig	Anti-human CTLA-4	−
Anti-human B7-1	pCTLA-4/Ig 48 h	HRP-hIgGFc	−

2.2 SDS-PAGE、Western 印迹鉴定融合蛋白

pCTLA-4/Ig 质粒和空载体 pX/Ig 转染上清直接进行 SDS-PAGE 检测，未见明显的与预期大小相符的蛋白条带(照片略)；而将转染上清经 Protein A 亲和层析柱纯化，再进行 SDS-PAGE 检测，有一条分子量约为 50×10^3 的清晰蛋白条带，与预期分子量大小相符，见图 1。且空载体转染的纯化物中相应位置无明显条带；以鼠的人 CTLA-4 单克隆抗体为一抗，HRP-羊抗鼠 IgG 多克隆抗体为二抗进行免疫印迹分析，结果表明，pCTLA-4/Ig 质粒转染上清纯化物中，该 50×10^3 蛋白条带能与抗人 CTLA-4 单抗特异结合，见图 2，而空载体转染纯化物中相应位置无特异显色带，说明该 50×10^3 蛋白条带正是我们所构建并表达的 CTLA-4/Ig 融合蛋白。

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

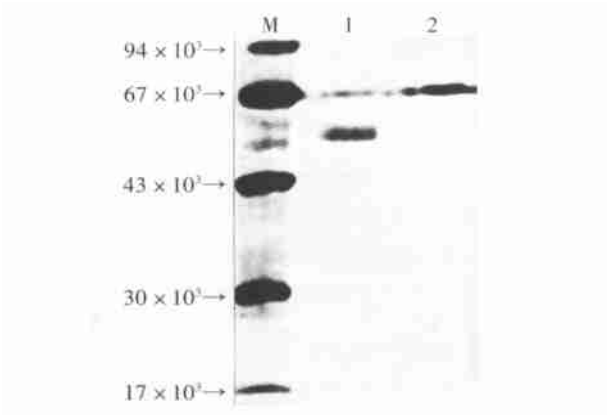


图 1　**Protein A** 亲和层析纯化 **CTLA-4/ Ig** 融合蛋白的 **SDS-PAGE** 图谱

M：低分子量蛋白标准；1：pCTLA-4/Ig 转染 COS-7 上清；2：pX/Ig 转染 COS-7 上清

Fig 1　SDS-PAGE of CTLA-4/ Ig fusion protein after Protein A purification

M: Standard proteins marker; 1: Supernatant after pCTLA-4/ Ig transfection; 2: Supernatant after pX/ Ig transfection

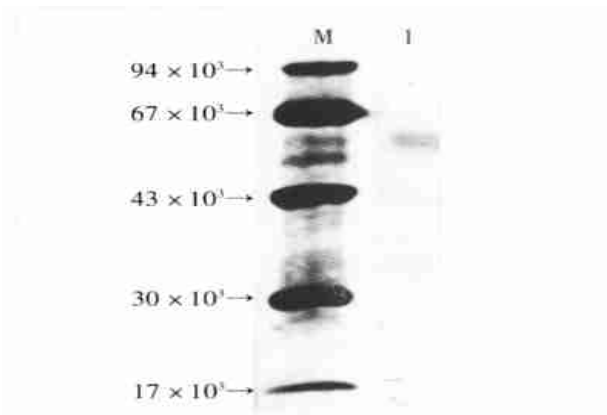


图 2　**CTLA-4/ Ig** 融合蛋白免疫印迹图谱

M：低分子量蛋白标准；1：Protein A 亲和层析纯化 pCTLA-4/Ig 转染 COS-7 上清

Fig 2　Western Blot analysis of CTLA-4/ Ig fusion protein

M: Standard proteins marker; 1: Protein A purified transfected supernatant (pCTLA-4/ Ig)

2.3　纯化 CTLA-4/Ig 融合蛋白对 PBMC 增殖活性的影响

在 MLR 反应体系中，分别加入 1 μl、5 μl 和 10 μl Protein A 纯化 pCTLA-4/ Ig 或空载体转染 COS-7 细胞上清，结果表明，即使加入 1 μl Protein A 纯化 pCTLA-4/Ig 融合蛋白，也能显著抑制人外周血 MLR，抑制率为 60%～70%；而加入同样体积的空载体转染 COS-7 细胞上清，则无此作用，经单因素方差分析，结果有统计学意义，见表 2。同样，我们也曾用未纯化 pCTLA-4/ Ig 转染上清直接进行 MLR 实验，未能观察到显著的抑制作用，这可能与未纯化细胞转染上清中异源蛋白的刺激作用与微量 CTLA-4/ Ig 融合蛋白的抑制作用相互抵消有关。

表 2　纯化 **CTLA-4/ Ig** 对人 **MLR** 中淋巴细胞增殖的影响（**DPM**，$n=3$）

Tab 2　Effects of purified CTLA-4/ Ig fusion protein on human MLR (DPM, $n=3$)

Group(μl/well)	0	1	5	10
Purified CTLA-4/ Ig	4229±374	1698±257 *△	1165±140 *△	1101±183 *△
Control	4229±374	3924±287	4198±334	4872±398

*：$P<0.01$ *vs* control；△：$P<0.01$ *vs* 0

3　讨论

融合蛋白表达载体 pX/ Ig 具有人 IgG1 重链恒定区的铰链区及 CH2，CH3 结构域[3]；通过逆转录-PCR 扩增的 CTLA-4 胞膜外区基因片段具有 Ig 超家族可变区样结构域，将扩增的 CTLA-4 胞膜外区基因片段克隆入 pX/ Ig 载体后获得的 pCTLA-4/ Ig 融合蛋白表达载体，转染哺乳动物细胞后表达的融合蛋白有人 Ig 重链样结构，这不但可利用抗人 CTLA-4 抗体和抗人 IgG Fc 抗体的双抗体夹心 ELISA 法，检测以分泌蛋白形式表达的融合蛋白，还可利用蛋白 A 亲和层析法，从融合蛋白含量远低于血清、腹水等抗体含量的细胞培养上清中将融合蛋白高度纯化。在短暂表达系统中，外源蛋白的表达量与重组 DNA 对细胞的转染效率直接相关。为确立脂质体转染的最佳条件，对转染条件进行了优化。在 DNA 用量相同的情况下（1 μg/ 孔），不同的脂质体用量能明显影响融合蛋白的表达，若以相同的脂质体量与不同的 DNA 量混合制备脂质体-DNA 复合物，外源蛋白的表达量则随 DNA 量增加而增加，但当 DNA 量达一定水平时，不能再提高融合蛋白表达。对 pCTLA-4/ Ig 转染上清纯化后，在还原性 SDS-PAGE 中发现，除了在约 50×10^3 处出现与预期蛋白分子量一致的条带外，在相当于牛血清白蛋白分子量大小的 67×10^3（与分子量标准比较）处也出现明显的蛋白条带；在 Protein A 纯化 pX/Ig 转染上清中未见 50×10^3 条带，而只有 67×10^3 蛋白条带；Western 印迹检测发现：抗人 CTLA-4 单克隆抗体只能与 SDS-PAGE 中约 50×10^3 蛋白条带反应，且在 pX/ Ig 转染上清样品的相应位置无显色带，因此，SDS-PAGE 中出现的 67×10^3 蛋白条带可能是未去除干净牛血清白蛋白的细胞培养上清，由于流经蛋白 A 亲和层析柱的体积过大（＞ 100 倍柱床体积），未能彻底洗脱非特异性吸附的杂蛋白所至。MLR 实验表明该纯化融合蛋白具有抑制免疫应答反应的活性。以上结果表明，我们成功克隆并在 COS-7

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

细胞中表达了有生物学活性的CTLA-4/Ig融合蛋白，为进一步大量表达纯化CTLA-4/Ig融合蛋白、及其免疫学活性研究和临床应用奠定了基础。

参考文献：

[1] Linsley P S, Brady W, Urnes 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.

[2] Boussiotis V A, Freeman G J, Gribben J G, *et al*. The role of B7-1/B7-2: CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response[J]. Immunol Rev, 1996, 153: 5—26.

[3] Tarumi K, Yagihashi A, Tsuruma T, *et al*. Induction and maintenance of tolerance by CTLA-4/Ig in rat small bowel allografts [J]. Transplant Proc, 1999, 31(1-2): 878—881.

[4] Elwood E T, Larsen C P, Cho H R, *et al*. Prolonged acceptance of concordant and discordant xenografts with combined CD40 and CD28 pathway blockade[J]. Transplantation, 1998, 65(11): 1 422—1 428.

[5] Finck B K, Linsley P S, Wofsy D. Treatment of murine lupus with CTLA-4/Ig[J]. Science, 1994, 265(5176): 1 225—1 227.

[6] Nishikawa K, Linsley P S, Collins A B, *et al*. Effect of CTLA-4 chimeric protein on rat autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis[J]. Eur J Immunol, 1994, 24(6): 1 249—1 254.

[7] Seidman M. The development of transient SV40 based shuttle vectors mutagenesis studies: problems and solutions[J]. Mutat-Res, 1989, 220(2—3): 55—60.

（编辑 薛国文）

经验与短篇

文章编号：1000-5404(2000)06-0526-01

大鼠脊髓压迫伤后PMN浸润的变化及MPS的治疗作用

Changes of polymorphonuclear leukocytes infiltration after spinal cord compression injury in rats and the therapeutic effects of methylprednisolone

袁 涛[1]，鞠明兵[2] （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所：[1]肝胆外科；[2]第二研究室；重庆 400042）

脊髓损伤在战时和平时的创伤发生率中均占有一定的比例，其原发损伤后继发性损伤是致瘫的重要原因，但确切机制目前尚不清楚。近年来多形核白细胞(PMN)在继发性脊髓损伤中的作用受到重视[1]，研究PMN在脊髓继发性损伤中的作用及其机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 动物的压迫损伤模型

选用77只Wistar大鼠，体重200～300 g，腹腔麻醉后，俯卧位固定，于L1水平行椎板切除术，暴露脊髓。动物稳定1 h后，用30 g重物压L1节段脊髓20 min。

1.2 实验分组

1.2.1 分组 实验共分3组：伤前组、损伤组和甲基强的松龙(MPS)治疗组：①损伤组(n=35)：以30 g重物压迫L1脊髓20 min复制损伤模型。②治疗组(n=35)：复制损伤模型后，于伤后30 min首次给予MPS 30 mg·kg^{-1}·h^{-1}剂量维持、持续23 h。③伤前组(n=7)：行椎板切除术，但不以重物压迫脊髓。

1.2.2 时相点 损伤组及治疗组，设伤后2、4、6、12、24 h共5个时相点；伤前组设椎板切除后60 min一个点，每时相点7只大鼠。

1.3 观察指标

1.3.1 用紫外分光光度法测损伤脊髓组织髓质过氧化物酶(MPO)活性。

1.3.2 改良TBA比色法测脊髓组织丙二醛(MDA)含量。

1.3.3 病理学观察 取得各时相点损伤脊髓后，于多聚甲醛液中固定。光镜标本经石蜡包埋，切片，HE染色，用OLYMPUS显微照像系统观察并照像；电镜标本作常规包埋、定位、切片、染色，用JEM-2000型透射电子显微镜观察并照像。

1.4 统计学处理

数据资料均以$\bar{x}\pm s$表示。组间比较用Students′s t进行统计分析，指标的变化趋势间行相关分析。

2 结果

2.1 脊髓压迫伤后组织MPO的变化，见表1

2.2 脊髓压迫伤后组织MDA的变化，见表2

2.3 病理学观察

脊髓损伤后，从光镜可观察到组织水肿，神经元肿胀及核固缩，弥漫性出血，多形核白细胞浸润组织。电镜证实伤后6 h可见微血管内有PMN粘附，浸润。治疗组则血管损伤明显减轻。

（下转533页）

作者简介：袁 涛(1968—)，男，河南省信阳市人，主治医师，讲师，主要从事胆道肿瘤的诊断与治疗方面的研究。电话：(023)68757247

收稿日期：1999-02-03；修回日期：1999-12-22

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