

# moFcγR III $\gamma$ 链真核表达载体的构建及其共转染稳定细胞系的建立

席俊<sup>1</sup>, 唐志鹏<sup>2</sup>, 张利娜<sup>3</sup>, 宋爱宾<sup>3</sup>, 王少兵<sup>3</sup>, 张改平<sup>4\*</sup>

(1. 河南工业大学 粮油食品学院, 河南 郑州 450052; 2. 福山区畜牧局, 山东 福山 265500;  
3. 招远市畜牧局, 山东 招远 265400; 4. 河南省农业科学院 农业部动物免疫学重点开放  
实验室/ 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 将 moFcγR III $\gamma$  链编码区 cDNA 分别亚克隆到真核表达载体 pcDNA3 的巨细胞病毒启动子下游, 构建了重组表达质粒 pc3moR III、pc3mo $\gamma$ ; 用 *Pvu*I 线性化重组质粒, 以线性化重组质粒共转染 COS-7 细胞, 用玫瑰花环试验检测 moFcγR III 在转染细胞表面的表达, 通过 G418 抗性筛选和单细胞克隆, 在转染细胞表面稳定表达了 moFcγR III 受体分子。稳定转染细胞系的建立和 moFcγR III 受体分子基因的表达, 为进一步研究 moFcγR III 的功能提供了基础。

**关键词:** moFcγR III; COS-7 细胞; 玫瑰花环试验; 真核表达; 共转染

**中图分类号:** Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)08-0190-04

## Establishment of a Cell Line Cotransfected with a Eukaryotic Expression Vector Stably Expressing moFcγR III and $\gamma$ Chain

XI Jun<sup>1</sup>, TANG Zhi-peng<sup>2</sup>, ZHANG Li-na<sup>3</sup>, SONG Ai-bin<sup>3</sup>,  
WANG Shao-bing<sup>3</sup>, ZHANG Gai-ping<sup>4\*</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Henan University of Technology, Zhengzhou 450052, China;

2. Fushan Bureau of Animal Husbandry, Fushan 265500, China;

3. Zhao Yuan Bureau of Animal Husbandry, Zhao Yuan 265400, China;

4. Key Laboratory for Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/ Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** The cDNA for the complete encoding region of moFcγR III and  $\gamma$ -chain were separately cloned into the mammalian expression vector pcDNA3 to construct expressing plasmids, pc3moR III and pc3mo $\gamma$ . COS-7 cells were cotransfected with the linear expressing plasmids, selected by G418 and detected by rosette assay for the expression of moFcγR III. The establishment of the stably-transfected cell line expressing target gene provides a basis for further studies on the function of the moFcγR III gene.

**Key words:** moFcγR III; COS-7 cells; Rosette assay; Eukaryotic expression; Coexpression

Fc 受体是一类重要的免疫细胞表面分子, 特异地亲和抗体的 Fc 区域<sup>[1]</sup>。它广泛表达于免疫辅助细胞和效应细胞, 介导免疫细胞与抗原-抗体复合物

的清除、抗体依赖细胞毒作用、调控 B 细胞的增殖和抗体的产生以及炎症因子的释放等, 是机体体液免疫与细胞免疫间关键的联系纽带, 在机体免疫防

收稿日期: 2011-02-26

基金项目: 河南工业大学引进人才专项(2010BS010)

作者简介: 席俊(1979-), 女, 河南信阳人, 讲师, 博士, 主要从事食品安全检测研究。E-mail: xijunhnu@yahoo.com.cn

\*通讯作者: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 中国工程院院士, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事动物免疫学和食品安全方面的研究。E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

御中起着极其关键的作用<sup>[1-9]</sup>。小鼠 IgG 受体分为 4 类: FcγR I (CD64)、FcγR II (CD32)、FcγR III (CD16) 和 FcγR IV。FcγR III 是高度糖基化膜蛋白, 其分子量为 50 ~ 80 kD, 在巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和肥大细胞中均有表达, 是唯一在 NK 细胞表达的 Fc 受体, FcγR III 在血液单核细胞中未见表达, 但由单核细胞分化的巨噬细胞和腹腔巨噬细胞均表达 FcγR III<sup>[7]</sup>。moFcγR III 胞外区含有 2 个 Ig 样结构域, 为中低亲和力 IgG 受体<sup>[8]</sup>。FcR γ 链或 TCR ζ 链为 moFcγR III 在细胞表面表达所必需, 只有通过共转染 FcR γ 链或 TCR ζ 链, 才能在细胞表面表达 FcγR III。

本试验将 moFcγR III moFcR γ 编码区 cDNA 克隆入真核表达载体, 并在 COS-7 细胞表面表达该受体分子, 通过抗性筛选和克隆化建立共转染稳定表达 moFcγR III 的转染细胞株, 以期为进一步研究 moFcγR III 与配体相互作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株、载体、细胞和主要试剂

*E. coli* JM109 菌株 (TaKaRa 公司); pcDNA3 真核表达载体 (Invitrogen 公司); COS-7 细胞由英国动物健康研究院 Howard 教授惠赠; 限制酶 *EcoRI*、*XhoI*、*HindII* 和 T4 DNA 连接酶 (Promega 公司); 脂质体 Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen 公司); 羊抗鼠 IgG 和羊抗人 IgG (Serotec 公司)。

### 1.2 mRNA 的提取和 cDNA 的合成

用 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取健康鼠外周血单核细胞总 RNA, 用反转录酶将 mRNA 反转录为 cDNA。

### 1.3 鼠 FcγR IIIγ 链全长基因的扩增及克隆载体的构建

根据鼠 FcγR III 基因序列 (NM\_010188)、γ 链 (NM\_010185) 基因序列, 利用引物设计软件 Primer 5.0 分别各设计 1 对克隆引物: moR III F: 5'-TTGAATGACTTTGGACACCCAGATG-3', moR III R: 5'-ATAGGATGGATGGGGTGTCTACTTG-3'; moγ F: 5'-CCAGCGCACCCAGGATGAT, moγ R: 5'-AGCACAGAGGTGACCAAGAGG-3'。用 TaKaRa Premix Taq 试剂盒从 cDNA 中扩增出鼠 FcγR III γ 链全长基因并构建到 T 载体中, 经测序得到阳性克隆。

### 1.4 重组表达载体的构建和鉴定

利用引物设计软件 Primer 5.0 分别设计 1 对扩增引物 moR III pc+: 5'-CGAAAGCTTAGAATG-

GCTTTGGACACCCA-3', moR III pc-: 5'-TATTCGAGGATGGGGTGTCTACTTG-3'; moγ pc+: 5'-CCAAAGCTTCCAGGATGATCTCAGC-3', moγ pc-: 5'-TGAGAATTCTGCAGCCAAGCACGTC-3', 引物由 TaKaRa 公司合成。以 moFcγR III γ 链全长质粒为模板, PCR 扩增获得 moFcγR III γ 链编码区产物。PCR 反应条件为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 10 min。纯化后的 PCR 产物分别经 *Hind III*+*XhoI*、*Hind III*+*EcoRI* 双酶切后, 克隆入 pcDNA3 载体, 然后转化大肠杆菌 JM109, 挑取阳性克隆, 经酶切鉴定与预期结果相符, 并命名为 pc3moR III、pc3moγ。

### 1.5 细胞的转染与筛选

用 Qiagen 质粒提取试剂盒提取纯化真核表达质粒 pc3moR III、pc3moγ。以 *PvuI* 消化该质粒, 然后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 回收目的片段用无菌水溶解, 以核酸蛋白分析仪测定 DNA 含量。利用脂质体 Lipofectamine™ 2000 转染试剂以线性化质粒 pc3moR III、pc3moγ 共转染 COS-7 细胞, 转染 48 h 后消化转染细胞, 以含饲养细胞的 DMEM/10 完全培养基重悬细胞, 经细胞计数后稀释到适合密度, 然后转至 96 孔培养板, 每孔 1 个细胞, 置 37℃ 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每 3 ~ 4 d 换液 1 次。转后 7 ~ 10 d, 待细胞克隆长至 1/4 ~ 1/2 孔时, 消化细胞克隆, 将细胞转至另一 96 孔培养板扩大培养, 待长成细胞单层后, 以玫瑰花环试验检测 moFcγR II 的表达。

### 1.6 玫瑰花环试验

1.6.1 抗鸡红细胞高免血清的制备及纯化 采集健康鸡抗凝外周血制备红细胞悬液。参照《动物生物化学实验指导》免疫小鼠, 每次免疫间隔 10 d, 第 4 次免疫 2 周后加强免疫 1 次, 第 5 次免疫后第 5 周无菌采集 30 mL 耳静脉血。首先用硫酸铵盐析法粗提, 然后再用 DEAE 柱纯化, 最后以 0.5% 健康鸡红细胞进行血球凝集试验, 测定血凝效价。

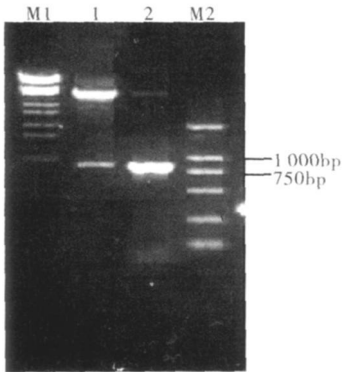
1.6.2 鸡 RBC (红细胞) 的致敏 在 0.5% 的新鲜鸡 RBC 悬液中加入半数凝集量的鼠 IgG, 温和混匀, 在 4℃ 条件下孵育 2 h, 1000 r/min 离心 5 min, 弃掉上清液, 用 PBS 洗涤 3 次, 去除没有结合的 IgG; 以 DMEM/0 培养基重悬鼠 IgG 致敏红细胞, 制备 0.5% IgG RBC 悬液。

1.6.3 玫瑰花环试验 参照 Lund 等<sup>[9]</sup> 和 Zhang 等<sup>[10]</sup> 的玫瑰花环形成方法, 以玫瑰花环试验检测 moFcγR II 在 COS-7 转染细胞表面的表达情况。

2 结果与分析

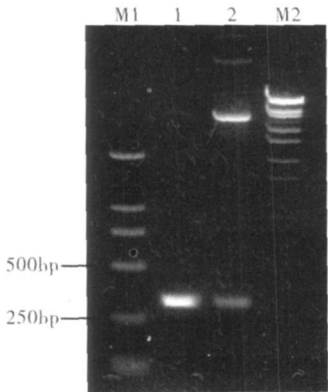
2.1 真核表达质粒 pc3moRⅢ、pc3moγ 的构建

以克隆到 T 载体上的阳性质粒为模板, 分别用 moFcγR Ⅲ、moγ-chain 真核引物扩增到 moFcγR Ⅲ、moγ-chain 编码区序列。将扩增产物分别插入 pcDNA3 相应位点, 经 PCR 及 *Hind* Ⅲ+*Xho* Ⅰ、*Hind* Ⅲ+*Eco* R Ⅰ 双酶切鉴定, 成功构建了真核表达质粒 pc3moR Ⅲ、pc3moγ(图 1、图 2)。



M1. λ-*Eco*T14 Ⅰ DNA Marker; 1. 将 pc3moR Ⅲ用 *Hind*Ⅲ+*Xho*Ⅰ 酶切的产物; 2. 用 moRⅢpc+/moRⅢpc- 扩增的 PCR 产物; M2. DL2000 DNA Marker

图 1 真核表达质粒 pc3moRⅢ的鉴定图谱

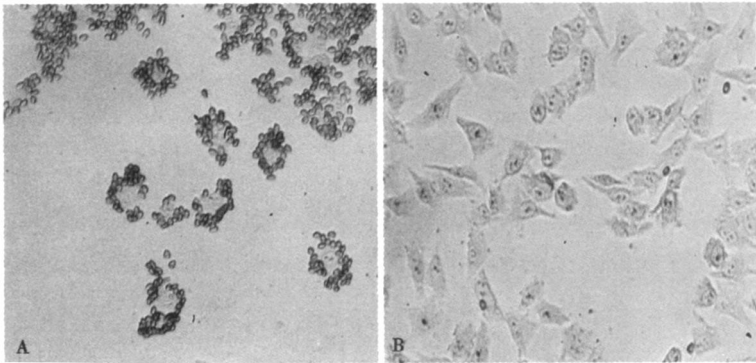


M1. DL2000 DNA Marker; 1. 用 moγpc+/moγpc- 扩增的 PCR 产物; 2. 将 pc3moγ 用 *Hind* Ⅲ+*Eco* R Ⅰ 酶切的产物; M2. λ-*Eco*T14 Ⅰ DNA Marker

图 2 真核表达质粒 pc3moγ 的鉴定图谱

2.2 稳定表达 moFcγRⅢ转染细胞株的建立

以线性化表达质粒 pc3moR Ⅲ、pc3moγ 共转染 COS-7 细胞, 经 G418 抗性筛选、玫瑰花环检测和有限稀释克隆化, 建立了稳定表达小鼠 FcγR Ⅲ的转染细胞株, 图 3A 所示, 95% 以上的转染细胞可看到玫瑰花环, 而没有转染的对照细胞未看到玫瑰花环(图 3B), 表明小鼠 FcγR Ⅲ受体分子有效表达于转染细胞表面。



A. 转染 pc3moRⅢ、pc3moγ 的 COS-7 细胞 (200×); B. 未转染的 COS-7 细胞 (200×)

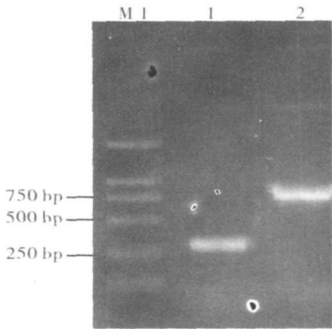
图 3 pc3moRⅢ、pc3moγ 共转染细胞玫瑰花环试验结果

2.3 共转染细胞株 PCR 鉴定

将共转染 pc3moR Ⅲ、pc3moγ 的 COS-7 细胞于细胞培养瓶中培养, 待长至单层时消化, 提取细胞 RNA, 反转录成 cDNA, 用 moRⅢpc+和 moRⅢpc-, mγpc+和 mγpc- 为引物, 分别扩增到小鼠的 FcγR Ⅲ与 moγ-chain 基因。如图 4 所示, 表明基因 FcγR Ⅲ与 moγ-chain 已成功整合到 COS-7 细胞中。

3 讨论

研究基因功能一种十分有效的方法就是将外源基因克隆到表达载体, 然后转入到该基因相应的宿



M1. DL2000 DNA Marker; 1. moγ-chain PCR 扩增产物; 2. moFcγR Ⅲ PCR 扩增产物

图 4 moFcγRⅢ、moγ-chain 共转染细胞的 PCR 检测图谱

主细胞,最终看外源基因的表达情况。FcγR II在细胞表面的表达需要 $\gamma$ 链这样的因子, $\gamma$ 链不仅是免疫细胞表面的一类细胞因子,而且它在信号转导方面也具有相当重要的作用,主要是通过跨膜区来增强受体与配体的亲和力。试验中发现,当单独转染线性的pc3moR III于COS-7细胞后,经玫瑰花环检测只能见极少量的花环,表明鼠FcγR II在COS-7细胞表面能表达但表达量较少,且不能建立稳定的表达鼠FcγR III的细胞系,分析原因或许是COS-7细胞表面有某种辅助表达因子,能辅助鼠FcγR II的表达,具体原因还不清楚,有待进一步去研究。尽管瞬时表达比起稳定表达更容易建立,但瞬时表达有很多的弊端:比如转染效率不稳定,即便是同批次的转染细胞,不同转染孔细胞的表达率也会不一样,很难形成均一且稳定的检测平台,所以建立一个稳定的表达moFcγR III的细胞系是很有必要的。本试验中,将moFcγR II及mo $\gamma$ -chain cDNA分别亚克隆到表达载体pcDNA3,然后共转染COS-7细胞,经抗性筛选、玫瑰花环检测和共转染细胞株PCR鉴定,最终获得了克隆化的共转染moFcγR III和mo $\gamma$ -chain的细胞株,并在COS-7细胞表面稳定表达了鼠FcγR III的分子,经检测玫瑰花环形成率达到95%左右,不仅表达量比较高,且传代过程中基本保持稳定,形成了均一、稳定的细胞表达体系,为进一步研究鼠FcγR III与其配体的相互作用提供了良好的技术平台。

#### 参考文献:

- [1] Ravetch J V, Bolland S. IgG Fc receptors[ J ]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 275-290.
- [2] Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity[ J ]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(8): 580-592.
- [3] Gessner J E, Heiken H, Tamm A, *et al.* The IgG Fc receptor family[ J ]. *Ann Hematol*, 1998, 76(6): 231-248.
- [4] Baumann U, Schmidt R E, Gessner J E. New insights into the pathophysiology and *in vivo* function of IgG Fc receptors through gene deletion studies[ J ]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2003, 51(6): 399-406.
- [5] Cohen-Solal J F, Cassard L, Fridman W H, *et al.* Fcγ receptors[ J ]. *Immunol Lett*, 2004, 92(3): 199-205.
- [6] Sondermann P, Kaiser J, Jacob U. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures[ J ]. *J Mol Biol*, 2001, 309(3): 737-749.
- [7] Flesch B K, Neppert J. Functions of the Fc receptors for immunoglobulin G[ J ]. *J Clin Lab Anal*, 2000, 14(4): 141-156.
- [8] Raghavan M, Bjorkman P J. Fc receptors and their interactions with immunoglobulins[ J ]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, 12: 181-220.
- [9] Lund J, Takahashi N, Pound J D, *et al.* Oligosaccharide protein interactions in IgG can modulate recognition by Fc gamma receptors[ J ]. *FASEB J*, 1995, 9(1): 115-119.
- [10] Zhang G P. Bovine IgG Fc receptors[ M ]. Hatfield: University of Hertfordshire, 1994.