

牛 IgG Fc 受体 II 胞外区在大肠杆菌中的表达及特性鉴定

张改平^{*}, 王 丽, 李青梅, 张 华, 乔松林, 乔宏星, 席 俊, 王选年, 郭军庆
(河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 从牛肺巨噬细胞 cDNA 文库中扩增编码牛 IgG Fc 受体 II (boFcγR II) 胞外区基因, PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 插入原核表达载体 pET28a 的 T7 启动子下游, 构建重组表达质粒 pETboR II。以 pETboR II 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达。SDS—PAGE 分析诱导表达菌体可见分子量约为 27kDa 的蛋白条带, 该表达蛋白在细胞质中主要以不溶性包涵体形式存在。Western blotting 和 Dot blot 检测表明, boFcγR II 重组蛋白在变性条件下可与牛 IgG 特异结合, 提示牛 FcγR II 胞外区可能存在 IgG 线性结合表位。

关键词: 牛 IgG Fc 受体 II; 胞外区基因; 原核表达

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004—3268(2005)07—0086—04

Expression and Characterization of the Extracellular Domain of Bovine IgG Fc Receptor Type II in *E. coli*

ZHANG Gai-ping^{*}, WANG Li, LI Qing-mei, ZHANG Hua, QIAO Song-lin,
QIAO Hong-xing, XI Jun, WANG Xuan-nian, GUO Jun-qing
(Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The DNA fragment encoding the extracellular domain of bovine IgG Fc receptor type II (boFcγRII, CD32) was amplified from the cDNA library of bovine alveolar macrophage. The PCR product digested by *EcoR* I and *Hind* III was inserted into an expression vector of pET28a under the control of T promoter, and the recombinant plasmid designated as pETboR II. Sodium dodecyl sulfate (SDS)—polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis showed that *E. coli* BL21 (DE3) transformed with pETboR II expressed a recombinant protein of approximate 27kDa. The protein predominantly existed as inclusion bodies in the cytoplasm. It was shown that the denatured protein of boFcγR II was able to bind bovine IgG specifically as analyzed by western blotting and dot-blot, suggesting that there be linear epitopes on the protein responsible for binding of bovine IgG.

Key words: Bovine IgG FcγR II; Extracellular domain; Prokaryotic expression

Fc 受体(Fc receptor, FcR)是表达于多种细胞表面的免疫球蛋白(Ig)Fc 段的特异性受体, 属于 Ig 基因超家族成员。Fc 受体通过与 Ig Fc 区域的结

合, 参与 Ig 介导的生理功能或病理损伤过程, 它不仅赋予免疫细胞杀伤病毒与细菌、清除免疫复合物、溶解癌变细胞的能力, 而且参与免疫反应的启动与

收稿日期: 2005—03—25

基金项目: 国家杰出青年基金项目(30125035); 国家自然科学基金重点项目(30230270)

作者简介: 张改平(1960—), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士, 主要从事动物免疫学与生物技术研究。

E-mail: zhanggaiping2003@yahoo.com.cn

通讯作者: 张改平

调节,在免疫防御中发挥非常重要的作用^[1]。

目前,有关人和哺乳动物 IgG Fc 受体研究得较为透彻,主要包括 3 种类型:即 FcγR I (CD64)、FcγR II (CD32)、FcγR III (CD16),其胞外区具有相似的 Ig 样结构域,但胞内区以及对 Ig 的亲合力存在明显差异。FcγR I 胞外区有 3 个 C2 结构域,是高亲合力受体,主要与人 IgG₁ 和 IgG₃ 单体结合,与人 IgG₄ 结合的亲合力明显降低,与 IgG₂ 则无结合能力。FcγR II 和 FcγR III 胞外区均含 2 个 C2 结构域,二者均为低亲合力受体,FcγR II 与 IgG₁、IgG₃ 及 IgG₄ 单体低亲合力结合,FcγR III 则与人 IgG₁ 和 IgG₃ 结合。

牛 IgG 与人和鼠差别较大,仅有 IgG₁ 和 IgG₂ 2 个亚型。目前已克隆的牛 IgG Fc 受体有 FcγR I、FcγR II、FcγR III 和 Fcγ2R,其中,牛 Fcγ2R 是一类新型的 IgG Fc 受体,与人 FcαR 同源。受体单基因转染 COS7 细胞的玫瑰花环形成试验证明,牛 FcγR II 和 Fcγ2R 分别对牛 IgG₁ 和 IgG₂ 具有特异的亲合力^[2, 3]。

为深入了解牛 FcγR II (boFcγR II) 的生物学特性、结构及其免疫调节机制,试验克隆和表达了牛 FcγR II 胞外区的结构基因,对表达产物进行了初步纯化,并鉴定了其与人 IgG 的特异性结合,为进一步研究 boFcγR II 结构与功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 牛肺巨噬细胞 cDNA 文库 由张改平构建^[3]。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 JM109 购自大连宝生物工程有限公司,表达载体 pET28a 为美国 Novagen 公司产品。

1.1.3 牛 IgG 牛 IgG 分离自健康奶牛血清,由河南省动物免疫学重点实验室制备;采用改良过碘酸钠法以辣根过氧化物酶(HRP)标记牛 IgG^[4]。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物的设计及合成 参照张改平等^[3]发表的 boFcγR II 基因序列 (Genbank 登录号 X75671),利用 Primer 5.0 设计 1 对 PCR 引物,上游引物为 5'-ACGCGAATTCAAACC-TGATCTCC-CA-3',下游引物为 5'-ACAGAAGCTTCG-CAACAATAGCCACT,分别含有 *Eco*R I 和 *Hind* III 酶切位点。

1.2.2 PCR 扩增 在 50 μl 反应体系中,加 cDNA

文库 1 μl, dNTP 至终浓度为 0.2 mmol/L, MgCl₂ 为 2.5 mmol/L,上下游引物各 0.2 μmol/L, Taq 酶 1.5 U (大连宝生物工程有限公司产品)。反应条件为 94 °C 变性 2 min, 59 °C 退火 1 min, 68 °C 延伸 2 min, 30 个循环后, 68 °C 温育 7 min, 以 1% 琼脂糖凝胶电泳检查。

1.2.3 BoFcγR II 重组表达载体的构建 以 *Eco*R I / *Hind* III 双酶切后,用 DNA 回收试剂盒(北京赛百盛生物工程公司产品)回收 PCR 产物,方法参照试剂盒操作手册。用 T4 DNA 连接酶(Promega)将 boFcγR II 胞外区基因与经 *Eco*R I / *Hind* III 双酶切的 pET28a 载体连接,插入片段与 N 端 His-tag 序列融合,转化大肠杆菌 (*E. coli*) JM109 感受态细胞,在卡那霉素 (Kan) 营养琼脂平板上进行选择性培养。挑取转化菌落,提取重组质粒,以 *Eco*R I + *Hind* III 酶切鉴定,构建重组表达质粒 pETboR II。

1.2.4 DNA 序列测定 由大连宝生物工程公司测定。

1.2.5 BoFcγR II 在大肠杆菌中的表达 以重组表达质粒 pETboR II 转化 *E. coli* BL21 (DE3),挑取单菌落培养至对数生长期 (OD₆₀₀ = 1.0),加异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 mmol/L, 37 °C 诱导表达,分别在不同表达时间取表达菌体进行 SDS-PAGE 检查。

1.2.6 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹 以 SDS-PAGE 和蛋白免疫印迹 (Western blotting) 分析 boFcγR II 在诱导表达菌体中的表达。制备 5% 积层胶和 12% 分离胶,在样品中加入等量 2×SDS 上样缓冲液 (pH 为 6.8 的 0.1 mmol/L 的 Tris-HCl, 1% SDS, 20% 甘油, 0.05% 溴酚蓝和 10% β-ME),煮沸 5 min 后上样,先以 5 V/cm 电泳,待溴酚蓝指示剂进入分离胶后,调电压至 10 V/cm。电泳结束后,取下分离胶以 0.25% 考马斯亮蓝 R250 染色液 RT 染色 4h 以上,加脱色液 (45% 甲醇、10% 冰乙酸) RT 脱色至背景透亮。

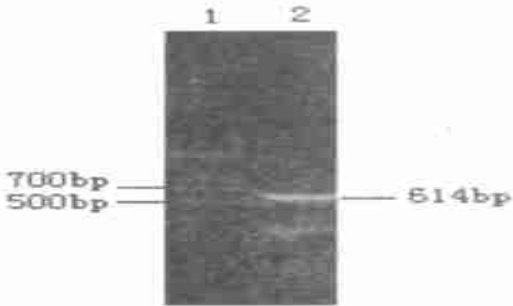
Western blotting 分析时,在 4 °C 以 50 mA 电流将 SDS-PAGE 电泳分离的蛋白带电转到 PVDF 蛋白印迹膜 (polyvinylidene fluoride, Roche), 5% 鸡血清 RT 封闭 2h,以 Tris 洗涤缓冲液 (1.5 mmol/L NaCl, pH 为 7.4 的 10 mmol/L 的 Tris-HCl, 0.02% Tween20, TBS) 充分洗涤,加 0.5 μg/ml HRP 标记牛 IgG, RT 作用 2h, TBS 充分洗涤后,以 AEC 试剂盒 (郑州华美生物工程公司产品) 进行显色,用水冲洗中止显色反应。

1.2.7 斑点杂交分析(Dot blot) 以6 mol/L 盐酸胍溶解含表达蛋白的包涵体,测定其蛋白浓度。以大肠杆菌表达的IBDV VP3 重组蛋白为阴性对照,将不同稀释度的样品点于AE99 硝酸纤维素膜(德国S &S 公司)上(1 μ l/点),37℃干燥20 min,用5%(v/v)鸡血清封闭2h,加0.5 μ g/ml HRP 标记牛IgG RT 孵育2h,同上进行洗涤和显色。

2 结果

2.1 BoFc γ R II胞外区基因的PCR 扩增

从牛肺巨噬细胞 cDNA 文库扩增到约600bp 的DNA 条带,其大小与预期一致(图1)。

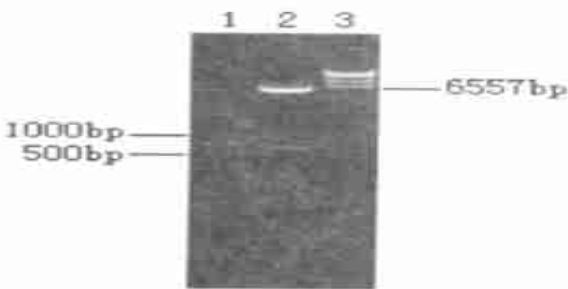


1. DL2000 DNA marker; 2. Fc γ R II 基因扩增产物(614bp)

图1 BoFc γ R II 胞外区基因的扩增

2.2 重组表达质粒 pETboR II 的构建

BoFc γ R II胞外区基因经酶切后,克隆入原核表达载体 pET28a 的 *Eco*R I / *Hind* III位点,构建重组表达质粒 pETboR II,表达236aa 的重组蛋白,分子量约为27.5 kDa。以 *Eco*R I + *Hind* III酶切鉴定重组质粒,结果切出600 bp 的DNA 片段(图2),序列测定表明插入DNA 片段为boFc γ R II胞外区基因,其序列与文献[3]报道一致,核苷酸未发生突变。



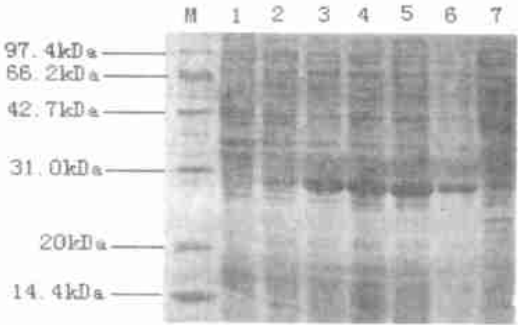
1. DL2000 DNA marker; 2. pETboR II/ *Eco*R I + *Hind* III双酶切产物(5369bp, 614bp); 3. λ DNA/ *Hind* III DNA marker

图2 重组质粒 pETboR II 的酶切鉴定

2.3 BoFc γ R II胞外区基因的诱导表达

用表达质粒 pETboR II 转化 *E. coli* BL21

(DE3),1 mmol/L IPTG 诱导重组蛋白表达,含表达载体 pET28a 的菌体为阴性对照。以 SDS-PAGE 分析表达产物,结果可见含 pETboR II 的诱导菌体大量表达约28 kDa 的重组蛋白,与理论预测结果一致,其表达量在诱导后7 h 达到峰值;而未诱导菌体以及诱导的 pET28a 对照菌体均未见明显的蛋白条带(图3)。裂解诱导表达菌体,对表达蛋白进一步分析,结果大部分表达蛋白存在于裂解菌体的不溶性沉淀中;而在可溶性裂解菌体溶液中的含量很少,表明表达蛋白在菌体内主要以不溶性包涵体形式存在(图3)。

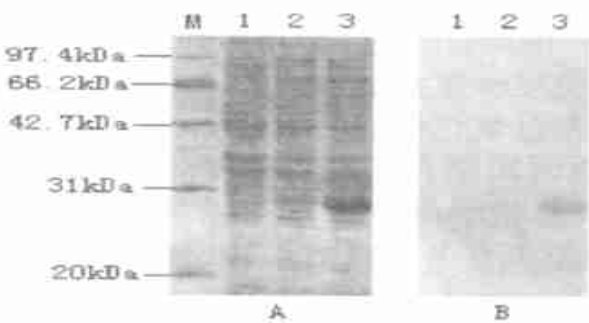


M:宽范围蛋白分子标尺; 1. pET28a 转化 *E. coli*BL21(DE3) 诱导产物; 2. pETboR II 转化 *E. coli*BL21(DE3)诱导产物; 3. pETboR II 转化 *E. coli*BL21(DE3)诱导2h; 4. pETboR II 转化 *E. coli*BL21(DE3)诱导3h; 5. pETboR II 转化 *E. coli*BL21 (DE3)诱导7h; 6. 表达产物不溶成分; 7.表达产物可溶成分

图3 BoFc γ R II 胞外区基因的诱导表达

2.4 BoFc γ R II 重组蛋白 特异亲和牛 IgG

Western blotting 和 Dot blot 结果显示,与 HRP 标记牛 IgG 反应后,表达蛋白呈现明显显色,而 IBDV VP3 等无关蛋白未见显色,表明表达蛋白与牛 IgG 特异结合,为boFc γ R II胞外区重组蛋白(图4、图5)。重组蛋白在变性条件下仍具有亲和牛 IgG Fc



A: 12%SDS-PAGE; B: Western blotting
M:宽范围蛋白分子标尺; 1. pET28a 转化 *E. coli*BL21(DE3) 诱导产物; 2. pETboR II 转化 *E. coli*BL21(DE3)未诱导产物; 3. pETboR II 转化 *E. coli*BL21(DE3)未诱导产物

图4 表达蛋白的 Western blotting 分析



A: BoFcγR II; B: 阴性对照

图 5 表达产物的斑点杂交分析

的活性,提示 boFcγR II 胞外区存在 IgG 结合的线性表位。

3 讨论

FcγR II (CD32)的分子量为 40 kDa,对单体 IgG 的亲合力极低,并倾向于同 IgG 复合物相结合。根据 DNA 序列和功能不同,人的 FcγR II 分 3 种形式:FcγR II A、FcγR II B 和 FcγR II C,其区别主要存在于胞浆区。FcγR II A 胞浆区含有受体激活结构域(immunoreceptor tyrosine—based activation motif, ITAM),为激活型 FcγR;FcγR II B 则含有抑制结构域(immunoreceptor tyrosine—based inhibitory motif, ITIM),是唯一的抑制型 FcγR;牛 FcγR II 主要由 Ig 样胞外区、穿膜区和胞浆区 3 个部分构成,其胞外区的 2 个 Ig 样结构域决定了其本身与配体的亲合力,靠近膜的环状结构是与 IgG Fc 段结合的主要部位^[5~7]。玫瑰花环试验已经证明牛 FcγR II 与牛

IgG₁ 特异结合,而不亲和牛 IgG₂^[2]。试验将编码 198 aa 的牛 FcγR II A 胞外区(含 17aa 穿膜区)基因片段克隆于原核载体 pET28a,成功表达了牛 FcγR II A 胞外区,并证明该重组蛋白在变性条件下也可与牛 IgG Fc 区域特异结合,提示牛 FcγR II 胞外区存在牛 IgG Fc 的线性结合表位,为进一步研究 FcγR II 与 IgG 的相互作用奠定基础。

参考文献:

[1] Sinclair N R S, Panosdaltis A. Immunoregulation by Fc signal[J]. Immunol Today, 1987, 8: 76—79.
[2] Zhang G, Young J R, Tregaskes C R, *et al.* Cattle FcγR II: molecular cloning and ligand specificity[J]. Immunogenetics, 1994, 39: 423—427.
[3] Zhang G, Young J R, Tregaskes C R, *et al.* Identification of a Novel Class of Mammalian Fcγ Receptor[J]. J Immuno, 1995, 155: 1534—1541.
[4] 吴雄文. 实用免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2002.
[5] Kacsokovics I . Fc receptors in livestock species[J]. Vet Immunol Immunopathol 2004 102(4): 351—362.
[6] 闫玉河, 张改平, 李学伍, 等. 牛 IgG Fc 受体 III 的分子克隆和序列分析[J]. 免疫学杂志, 2000 16(1): 20—23.
[7] Morton H C, Howard C J, Storset A K, *et al.* Identification of residues within the extracellular domain 1 of bovine Fcγ2R essential for binding bovine IgG2[J]. J Biol Chem, 2001, 276: 47794—47800.

(上接第 83 页)

3 结论与讨论

1) 供试 7 种生物农药对黄瓜霜霉病的防治均有一定效果。以 3 %克菌康可湿性粉剂、帕克素、6%农用抗生素 120 水剂、10%农用抗生素 120 可湿性粉剂防效较好; 3%多氧霉素可湿性粉剂、0.05 %大蒜素浓乳剂、2 亿活孢子/g 特立克可湿性粉剂 3 种药剂的高剂量防效亦可。建议使用浓度为: 3%克菌康可湿性粉剂 500 ~ 700 倍液、帕克素 100 ~ 200 倍液、6%农用抗生素 120 水剂 750 ~ 1 000 倍液、10%农用抗生素 120 可湿性粉剂 1 500 ~ 2 000 倍液、3%多氧霉素可湿性粉剂 400 倍液、0.05 %大蒜素浓乳剂 100 倍液、2 亿活孢子/g 特立克可湿性粉剂 400 ~ 500 倍液。

2) 供试 7 种生物农药对黄瓜安全性好, 无任何药害。

3) 药后 8d 与 5d 相比, 防效略有下降, 这可能与生物农药药效持效期较短有关。

4) 生物杀菌剂的杀菌谱, 品种之间可能有差异, 因此, 供试药剂有些品种对霜霉菌效果相对稍差, 可能对灰霉类病菌、晚疫类病菌效果较好, 这一问题将另作专题进行试验研究。

参考文献:

[1] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准则 (一)[M]. 北京: 中国标准出版社, 1994.
[2] 程有普, 周荣艳. 五种杀菌剂防治大棚黄瓜霜霉病药效试验[J]. 农药, 2001(9): 37.