

# 鸡 Ig $\lambda$ 轻链绿色荧光蛋白融合分子 在 COS7 细胞膜的表达

张 红<sup>1,2,3</sup>, 宋海涛<sup>1,2</sup>, 张改平<sup>2\*</sup>, 邢广旭<sup>2</sup>, 赵 东<sup>2</sup>, 杨继飞<sup>2</sup>, 柴书军<sup>2</sup>, 郝青梅<sup>3</sup>

(1. 河南农业大学, 河南 郑州 450002; 2. 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002;

3. 河南教育学院, 河南 郑州 450003)

**摘要:** 将牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ R II 的跨膜区序列嵌合入鸡 Ig $\lambda$  轻链基因中, 并将鸡 Ig $\lambda$  轻链信号肽与 Pegfp-C1 载体的绿色荧光蛋白 N 端融合产生带有信号肽的中间载体 Pegfp-C1-SP。鸡 Ig $\lambda$  轻链基因嵌合分子定向克隆入载体的多克隆位点, 构建了带有信号肽的鸡 Ig $\lambda$  轻链/GFP 融合蛋白真核表达载体。转染 COS7 细胞后, 荧光显微镜观察, 重组鸡 Ig $\lambda$  轻链/GFP 蛋白在 COS7 细胞膜及膜周围有明显表达, 而载体 pEGFP-C1 转染的 COS7 细胞 GFP 则分布在细胞及细胞核。结果表明, 牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ R II 的跨膜区能介导融合蛋白在细胞膜上的表达。

**关键词:** 鸡 Ig $\lambda$  轻链; 牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ R II 跨膜区; COS7 细胞; GFP 融合蛋白

**中图分类号:** S831 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2006)11-0102-04

## Expression of Chicken Ig Lambda Chain Fused with GFP on COS7 Cell Surface

ZHANG Hong<sup>1,2,3</sup>, SONG Hai tao<sup>1,2</sup>, ZHANG Gai ping<sup>2\*</sup>, XING Guang xu<sup>2</sup>,

ZHAO Dong<sup>2</sup>, YANG Ji fei<sup>2</sup>, CHAI Shu jun<sup>2</sup>, HAO Qing mei<sup>3</sup>

(1. Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Key Laboratory for Animal Immunology,

Zhengzhou 450002, China; 3. Henan Educational Institute, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** Recombinant DNA encoding chimeric protein incorporating transmembrane region of bovine IgG Fc receptor  $\gamma$ R II (bFcR $\gamma$ R II) and chicken Ig $\lambda$  light chain was generated. pEGFP-C1-SP, the vector with signal sequence was then created by fusing signal peptide of chicken Ig $\lambda$  to GFP N terminus. Cloned amplicon was extracted using double restriction sites for cloning into modified pEGFP-C1-SP plasmid. DNA sequencing demonstrated that cloned amplicon was inserted in frame and provided the desired coding sequence. Mammalian expression vector pEGFP-C1-SP- $\lambda$ R2T was successfully constructed. Expression of GFP fusion protein was located principally on the plasma membrane in COS7 cells transfected with pEGFP-C1-SP- $\lambda$ R2T vector as observed under fluorescent microscope. The results indicated that transmembrane region of bovine IgG Fc receptor  $\gamma$ R II was able to mediate plasma membrane targeting.

**Key words:** Chicken Ig $\lambda$  light chain; Transmembrane region of bovine IgG Fc receptor  $\gamma$ R II; COS7 cell; GFP fusion protein

收稿日期: 2006-07-10

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助(30230270)

作者简介: 张 红(1967-), 女, 河南光山人, 副教授, 在读博士研究生, 研究方向: 分子生物学及免疫学。

通讯作者: 张改平(1960-), 男, 河南内黄人, 研究员, 博士生导师, 博士, 主要从事分子生物学及免疫学方面的研究。

膜表面免疫球蛋白(sIg)是B细胞重要的膜表面标志,也是B细胞抗原受体BCR的主要组分,由2条轻链和2条重链构成,在抗原识别、B细胞分化和免疫防御等方面有重要作用<sup>[1,2]</sup>。Igλ轻链是鸡sIg轻链的主要类型,与BCR、抗体形成及B细胞增殖分化密切相关<sup>[3~5]</sup>。本研究将鸡λ轻链与牛IgG Fc受体γR II的跨膜区嵌合,并与绿色荧光蛋白(GFP)形成融合蛋白,在跨膜区的膜锚定作用和轻链自身信号肽引导下,将重组鸡Igλ分子表达在细胞膜上,利用GFP的示踪功能,以期能直观地观察其在COS7细胞膜上的定位表达,鉴定跨膜区结构对融合蛋白真核细胞膜定位表达的影响,为进一步研究Igλ的免疫学及其他生物学功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞、质粒和试剂

pEGFP-C1质粒(Clontech公司)、COS7细胞株(中科院上海细胞生物所)、脂质体LipofectamineTm2000(Invitrogen公司)、质粒提取试剂盒(Qiagen公司)、限制酶、T4连接酶、DNA聚合酶(购自TAKARA公司)、DMEM培养基(GIBCO公司)。

### 1.2 鸡Igλ轻链(cIgλ)与牛IgG Fc受体γR II跨膜区(R2T)嵌合分子(λR2T)的获得

设计引物将cIgλ从鸡B细胞双链cDNA中扩增出来,R2T以河南省动物免疫学重点实验室保存的牛IgG Fc受体γR II质粒为模板进行扩增。

cIgλ引物:P1 5'-CAGAAGCTTACAGCTGCTGGGATTC

P2 5'-AGCTGTCATCGAGCACTCGGACCTCTT

R2T引物:P3 5'-GTCCGAGTGCTCGATGACAGCTGTGGCT

P4 5'-TCTGGATCCAAGGCGTTCTTGTAATC

λR2T嵌合分子采用融合PCR方法,分2步进行,先在100μl PCR反应体系中加入EX-Taq premix(TaKaRa)50μl,cIgλ 2μl,R2T 2μl,ddw 46μl,94℃变性1min,58℃退火2min。10个循环后再加入引物P1和P4,进行第二步PCR;反应条件为94℃变性50s,58℃退火50s,72℃延伸90s,30个循环。PCR产物纯化后连接于pGEM-T easy载体,转化感受态细胞JM109,转移至含有氨苄青霉素的LB固体平板上培养,挑单菌落PCR鉴定和

测序验证。

### 1.3 信号肽中间载体pEGFP-SP的构建

利用载体pEGFP-C1绿色荧光蛋白序列的起始密码作为鸡Igλ信号肽序列的第一个氨基酸密码,将编码信号肽剩余20个氨基酸的60个核苷酸平均分配,上游引物带有后30个碱基,下游引物带有前30个碱基,扩增pEGFP-C1质粒,构建引入有鸡Igλ信号肽序列的中间载体pEGFP-SP。上游和下游引物:FP 5'-TGCCTGCACCAGGGAACCTGAGGTGTGGGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACCAC,BP 5'-GCCTGGGCTCCTCTCCTCC TGGCGGTGCTGGGTGGCGACCGGTAGCGCTAGCGGATCTC。用高保真的PrimeSTAR HS DNA聚合酶扩增pEGFP-C1质粒,然后用TaKaRa BKL kit进行末端磷酸化和高效平滑末端连接(按试剂盒说明操作),连接产物转化感受态细胞DH5α,挑选阳性菌落测序确定插入信号肽序列正确。

### 1.4 λR2T跨膜分子绿色荧光蛋白基因重组表达载体的构建及鉴定

限制性内切酶Hind III和BamH I双酶切λR2T cDNA和pEGFP-SP,将λR2T嵌合分子定向克隆入pEGFP-SP载体,构建重组表达载体pEGFP-C1-SP-λR2T,转化感受态细胞DH5α,转移至含有卡那霉素的固体平板培养基上,37℃培养12~16h,挑单菌落PCR扩增,并进一步经酶切鉴定和测序验证后提取超纯质粒用于真核细胞转染。

### 1.5 重组λR2T绿色荧光蛋白基因在COS7细胞膜上的定位表达

COS7细胞用含10%FBS的DMEM培养基培养于细胞培养板上,转染前24h细胞传代,培养至细胞单层达80%~90%,用脂质体LipofectamineTm2000介导转染(按操作说明进行)。转染后48~72h置入荧光显微镜下观察并照相。

## 2 结果

### 2.1 鸡Igλ轻链与牛IgG Fc受体γR II跨膜区嵌合跨膜分子(λR2T)的形成

cIgλ,R2T PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳观察到预期的约700bp,300bp特异性条带。融合PCR将受体跨膜区嵌合入cIgλ基因,形成1000bp重组跨膜嵌合分子(图1)。切胶回收后连接pGEM-T easy载体,转化感受态JM109细胞,筛选的阳

性克隆经 DNA 测序证实为目的片段( $\lambda$ R2T), cIg $\lambda$  基因终止密码子前连接有跨膜区序列。

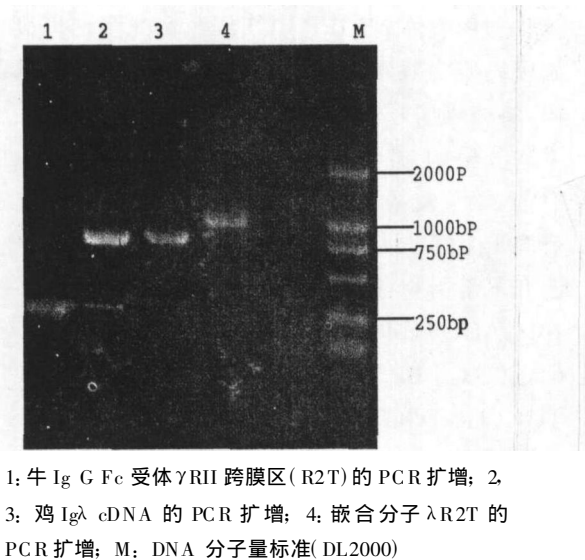


图 1 基因的 PCR 扩增产物

2.2  $\lambda$ R2T 绿色荧光蛋白重组跨膜分子融合基因的构建

*Hind* III 和 *Bam* H I 双酶切的  $\lambda$ R2T cDNA 和 pEGFP - SP 载体经连接转化后, 提取质粒进行双酶切鉴定(图 2)。DNA 测序结果表明, 插入片段为插入方向正确的目的基因, 且读码框正确。

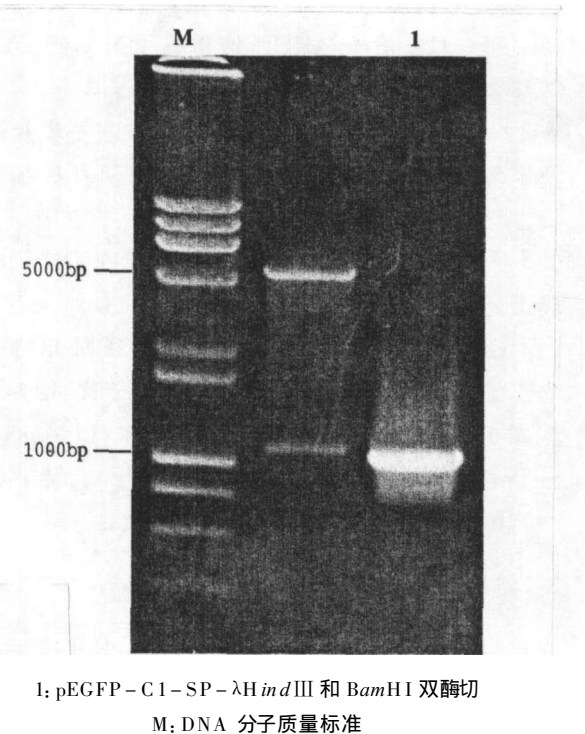
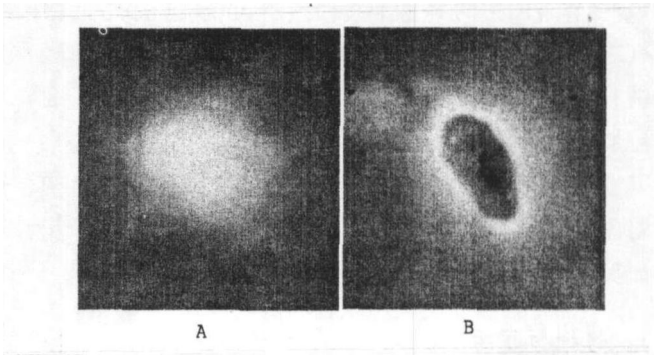


图 2 鸡 Ig $\lambda$  真核表达载体 pEGFP - C1 - SP -  $\lambda$ R2T 的酶切鉴定

2.3  $\lambda$ R2T 重组跨膜分子在 COS7 细胞膜上的定位表达

$\lambda$ R2T 与绿色荧光蛋白融合的重组跨膜分子在 COS7 细胞膜上有明显表达; 作为对照的 pEGFP - C1 转染的 COS7 细胞, 其 GFP 荧光蛋白的荧光则均匀分布在 COS7 细胞核、细胞浆和细胞膜上(图 3)。由此说明, 牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ R II 跨膜区能将鸡 Ig $\lambda$  分子锚定在细胞膜。



A: pEGFP - C1; B: pEGFP - C1 - SP -  $\lambda$ R2T  
图 3 鸡 Ig $\lambda$ /GFP 融合跨膜分子在 COS7 细胞中的表达

3 讨论

膜蛋白依靠信号肽引导进入内质网合成并完成部分翻译后修饰, 再通过高尔基体的囊泡运输向细胞膜转移, 信号肽在多肽链合成及转移至内质网腔过程中发挥启动和引导作用<sup>[6]</sup>。因此, 重组基因在真核细胞膜上的表达, 选择合适的信号肽序列至关重要。鸡 Ig $\lambda$  基因 N 端编码有 21 个氨基酸构成的信号肽, 利用该信号肽并将其融合于 GFP 的 N 端, 构建了带有鸡 Ig $\lambda$  信号肽序列的中间载体 pEGFP - SP。试验结果显示, 鸡 Ig $\lambda$  信号肽能够引导融合蛋白在内质网中合成及高尔基体的分泌。

膜蛋白在细胞膜上的定位表达还需要跨膜区将蛋白锚定在膜上, 能否完成膜定位与膜的厚度、跨膜区的结构、蛋白的结构和种类等多种因素有关<sup>[7]</sup>。试验采用牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ R II 跨膜区(R2T)与 Ig $\lambda$  构建嵌合分子, 克隆入带有信号肽的 pEGFP - SP 载体, 形成了融合的跨膜蛋白能够在 COS7 细胞膜上表达, 说明牛 IgG Fc 受体  $\gamma$ R II 跨膜区具有较好的膜锚定功能。

分泌蛋白和膜蛋白在合成和分泌过程中经历了内质网和高尔基体内进行的蛋白质翻译后修饰阶段, 使得蛋白质容易保持天然状态和活性。选择适当的跨膜区使重组分子能够锚定在膜上, 实现在真核细胞膜上的高效表达, 能够为研究细胞表面结构及蛋白质与蛋白质间的相互作用奠定重要基础。

(下转第 109 页)

### 3 小结与讨论

#### 3.1 关于所用的 ELISA 方法

分析多个单抗识别的抗原表位及其相互关系,通常使用单抗竞争结合试验<sup>[4]</sup>。而单抗相加 ELISA 试验,是简便方法之一<sup>[2]</sup>,因为不需要标记单抗,但该方法需要在抗原量相对固定的情形下测定所用单抗与抗原反应的饱和浓度。为了尽可能显示单抗与自然状态 IBDV 的识别情况,研究建立单抗 AC-ELISA 及其相加试验,采用纯化的鸡法氏囊源 IBD 强毒作为测定与单抗识别反应的抗原。

#### 3.2 关于单抗相加 ELISA 结果

单抗相加 ELISA 结果的判断标准参考 Fahey 等<sup>[2]</sup>的方法,即 AI 值接近零时,认为 2 种单抗识别相同的抗原表位;AI 值接近 100 时,认为 2 种单抗识别结构不相关的抗原表位;而 AI 值等于 40,认为是 2 种单抗识别不同抗原表位的最低标准。本研究 AC-ELISA 和间接 ELISA 相加试验的 AI 值<40,表明单抗 A, B, D, E, F, G 识别 IBDV 蛋白上(间接 ELISA 结果进一步表明识别 VP<sub>2</sub> 蛋白而非 VP<sub>3</sub>)相近或相似的抗原表位。2 种相加 ELISA 的结果相符合。

#### 3.3 关于多肽 AC-ELISA 阻断试验结果

阻断试验结果表明,IBDV VP<sub>2</sub> 蛋白多肽片段 PJ1, PJ2, PJ5, PJ14 均可明显阻断单抗 A, B, D, E, G 分别与 IBDV 的结合反应;多肽 CDK VTS, 抑制 IBDV 与单抗 A 反应的能力是 CPJ2, CPJ5, CPJ14 的 1~2 倍。上述结果验证了单抗间接 ELISA 相加试验和 AC-ELISA 相加试验的结果,即所用单抗属于同一类群的构像性单抗。

总之,抗 IBDV 单抗 A, B, D, E, G 识别 IBDV VP<sub>2</sub> 蛋白上相近或相似的抗原表位,属于同一类群的构像性单抗,均识别 IBDV VP<sub>2</sub> 蛋白多肽序列 PJ1, PJ2, PJ5, PJ14, 并有识别差异,氨基酸 D, K, T, S 或是其中的几个氨基酸可能是单抗 A, B, D, E, G 共同识别 IBDV VP<sub>2</sub> 蛋白多肽序列的关键氨基酸。研究结果为 IBDV 细胞抗原表位的研究和单抗的应用提供了基础或依据。

#### 参考文献:

[1] Cui X, Nagesha H S, Holmes I. Mapping of conformational epitopes on capsid protein VP<sub>2</sub> of IBDV by fd-tet phage display[J]. J Virology Methods, 2003, 114: 109-112.

[2] Eterradossi N, Toquin D, Rivallan G, *et al.* Modified activity of a VP<sub>2</sub>-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of IBDV[J]. Archives of Virology, 1997, 142: 255-270.

[3] Yamaguchi T, Iwata K, Kobayashi M, *et al.* Epitope mapping of capsid proteins VP<sub>2</sub> and VP<sub>3</sub> of IBDV[J]. Archives of Virology, 1996, 141: 1493-1507.

[4] 杨艳艳, 张改平, 郭军庆, 等. 高亲和力抗 IBDV 单克隆抗体的生产与免疫学鉴定[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(7): 384-386.

[5] 张改平, 席俊, 王选年, 等. IBDV VP<sub>3</sub> 结构蛋白在大肠杆菌中的表达与鉴定[J]. 河南农业科学, 2005(8): 88-91.

[6] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2003.

[7] 肖治军, 刘文蕙, 胡毓驥, 等. 鸡传染性法氏囊病细胞毒的浓缩粗提[J]. 中国家禽, 1998, 20(8): 6-7.

(上接第 104 页)

#### 参考文献:

[1] Meffre E, Nussenzweig M C. Deletion of immunoglobulin  $\beta$  in developing B cells leads to cell death[J]. Proc Natl Acad Sci, 2002, 99: 11334-11339.

[2] Niño H, Clark E A. Regulation of B cell fate by antigen receptor signals[J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2: 945-956.

[3] Rosnet O, Blanco Betancourt C, Grivel K, *et al.* Binding of free immunoglobulin light chains to VpreB3 inhibits their maturation and secretion in Chicken B cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279: 10228-10236.

[4] Fang T, Smith B P, Roman C A J. Conventional and surrogate light chains differentially regulate Ig $\mu$  and D $\mu$  heavy chain maturation and surface expression[J]. J Immuno, 2001, 166: 3846-3857.

[5] Magari M, Sawatari T, Kawano Y, *et al.* Contribution of light chain rearrangement in peripheral B cells to the generation of high affinity antibodies[J]. Eur J Immunol, 2002, 32(4): 957-966.

[6] Boyd G W, Doward A I, Kirkness E F, *et al.* Cell surface expression of 5-hydroxytryptamine type 3 receptors is controlled by an endoplasmic reticulum retention signal[J]. J Biol Chem, 2003, 278(30): 27681-27687.

[7] Brock S C, Heck J M, McGraw P A, *et al.* The transmembrane domain of the respiratory syncytial virus F protein is an orientation independent apical plasma membrane sorting sequence[J]. J Virology, 2005, 79(19): 12528-12535.