

猪 IgG II 类 Fc 受体基因真核表达重组质粒的构建及表达

张玉杨¹, 张改平², 乔松林², 郭成留¹

(1. 河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 利用本研究小组克隆的猪 IgG II 类 Fc 受体 cDNA (*swFcγRII*) 基因序列(DQ026064) 设计引物, 应用 RT-PCR 技术, 从猪外周血白细胞 cDNA 中扩增了完整的 960 bp *swFcγRII* ORF 序列, 利用基因重组技术将 *swFcγRII* ORF 基因亚克隆到真核表达载体 pcDNA3, 经 PCR 及双酶切鉴定: 扩增出 901 bp 的 PCR 产物; *Kpn* I/*Eco*R I 双酶切, 切出 5 376 和 901 bp DNA 片段, 表明重组质粒 pcDNA3/*swFcγRII* 构建成功。然后脂质体法转染 COS-7 细胞, 用玫瑰花环试验鉴定了 *swFcγRII* 配体亲和特性。

关键词: 猪; IgG II 类 Fc 受体; 表达载体; 玫瑰花环试验

中图分类号: S828.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0052-04

Construction and Expression of the Eukaryotic Expression Plasmid of Porcine Immunoglobulin G Fc Receptor II

ZHANG Yū-yang¹, ZHANG Gāi-píng², QIAO Sōng-lín², GUO Chéng-liú¹

(1. Animal Husbandry and Veterinary Medicine Institute, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: The Fc receptor cDNA sequence of porcine IgG II cloned by us was used to design primers. Using RF-PCR technology, a 960 bp of *swFcγRII* sequence covering the whole coding region was amplified from the peripheral blood leucocyte cDNA, and the was sub-cloned into the expression vector pcDNA3. Through double digestion by *Kpn* I/*Eco*R I and PCR identification, a 5 375 bp and a 901 bp of DNA fragments were obtained, indicating that the recombinant plasmid pcDNA3/*swFcγRII* was successfully constructed. The 901 bp fragment was then transfected into COS-7 cells by the lipofectin method, and the ligand affinity of *swFcγRII* was identified by rosetting procedures.

Key words: Pig; FcγRII; Expression vector; Rosetting

Fc 受体(Fc receptor, FcR) 是一类重要的免疫细胞表面分子, 能特异亲和抗体(Immunoglobulin, Ig) Fc 区域, 具有许多重要的生理功能^[2]。Fc 受体广泛表达于免疫辅助细胞和效应细胞, 是机体体液免疫与细胞免疫间关键的联系纽带, 在机体免疫防御中起着极其关键的作用^[3]。近年来, 调节 IgG 和 Fc 受体亲和活性的免疫制剂在临床试验中取得了很大进展, Fc 受体的研究日益受到重视^[4]。通过小鼠模型研究发现 Fc 受体的活性在疾病控制当中起到相当重要的作用, Fc 受体介导的效应细胞的激活和抑制

可以用于开发治疗癌症、感染性疾病和自身免疫性疾病的新型制剂^[3]。因此, 深入研究表达在免疫效应细胞表面的猪的 IgG Fc 受体对于开发新型免疫制剂有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

猪外周血来自于一 10 kg 重 2 月龄杂交猪, 饲养在郑州市金水区柳林镇杨君刘村张姓个体养猪场。总 RNA 提取试剂盒购自北京鼎国生物公司,

收稿日期: 2007-04-11

基金项目: 国家自然科学基金(3040323)

作者简介: 张玉杨(1972-), 女, 河南开封人, 硕士, 助理研究员, 主要从事畜禽微生物与免疫学研究工作

通讯作者: 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工作。

cDNA 第一链合成试剂盒、菌株、质粒、酶、*E. coli* JM109 菌株均购自宝生物(大连)工程有限公司, pcDNA3 真核表达载体购自 Invitrogen 公司。COS-7 细胞由英国动物健康研究院(Institute for Animal Health, UK) Howard 教授惠赠, 并以含 10% 新生牛血清(杭州四季青)的 DMEM 培养基(Invitrogen)培养。弗氏佐剂、奈氏试剂、硫酸铵饱和溶液、0.2 mol/L NaH_2PO_4 液等均为河南省农业科学院河南省动物免疫学重点实验室配制保存。

1.2 方法

1.2.1 猪外周血白细胞 cDNA 第一链的合成 根据 Zhang^[1] 文献中红细胞裂解法分离牛外周血白细胞的方法稍加改进, 进行猪外周血白细胞总 RNA 的提取。猪外周血白细胞 cDNA 第一链的合成按照宝生物(大连)工程有限公司的 M-MLV cDNA 第一链合成试剂盒操作说明合成。

1.2.2 扩增基因 *swFcγRII* 根据本研究小组在 Genbank 上注册的猪 IgG II 类 Fc 受体 cDNA (*swFcγRII*) 基因克隆序列, 设计扩增 *swFcγRII* 特异引物, 引物序列及扩增片段长度: S₂₉: 5'-AGG TGA TGG GGA TCC CCT CGT T-3 (forward); S₂₀: 5'-CAC CAA ATC CTT ATT CTC TTC CCC AAG TCG-3 (reverse)。引物由宝生物(大连)工程有限公司(Takara)合成, PCR 试剂盒购自宝生物(大连)工程有限公司(Takara)。PCR 反应: 以上述 cDNA 为模板, 用引物 S₂₉ 和 S₂₀, 扩增 *swFcγRII* 基因。采用宝生物公司的 Ex Taq PCR Kit。PCR 反应体系为 50 μL; PCR 反应条件: 94℃ 预变性 1 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1.5 min, 共 30 个循环; 72℃ 10 min; 10℃ 保存。反应结束后取 5 μL 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。切胶回收。

1.2.3 *swFcγRII* 基因与 T 载体连接、转化及重组质粒的鉴定 参照《分子克隆实验指南》^[8] 方法进行。

1.2.4 真核表达重组质粒 pcDNA-SR2 的构建 根据 *swFcγRII* cDNA 序列(DQ026064), 设计合成上、下游引物 ES₂₁/ES₂₂(大连宝生物公司合成), ES₂₁: 5'-AATTGGTACCGTGATGGGGATCCCCCTCGT-3; ES₂₂: 5'-GGCTGAATTCATTTAAATGTGGTTCTG-3。利用 pyrobest 高保真 PCR 扩增试剂盒(Takara)从质粒 T-SR2 中扩增 *swFcγRII* 编码区(ORF) cDNA, 在 PCR 产物两端分别引入 *Kpn*I 和 *Eco*R I 位点。PCR 反应参数为: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 *Kpn*I/*Eco*R I 双酶切^[7, 9, 10], 回收并克隆入真核表达载体 pcDNA3 的 *Kpn*I/*Eco*R I 位点间, 转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 并以含 100 μg/mL 氨

苄青霉素(Amp⁺)营养琼脂平板进行选择培养。挑取转化菌落, 以引物 ES₂₁/ES₂₂进行 PCR 鉴定, 提取阳性克隆质粒以 *Kpn*I 和 *Eco*R I 酶切鉴定, 并进行序列测定, 重组真核表达质粒命名为 pcDNA-SR2。

1.2.5 细胞转染 用 Qiagen 质粒提取试剂盒(Qiagen Plasmid Mini Kit)提取纯化真核表达质粒 pcDNA-SR2。利用脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂(Invitrogen)以纯化的 pcDNA-SR2 质粒转染 COS-7 细胞, 细胞转染参照 Invitrogen 操作说明进行。

1.2.5.1 抗鸡红细胞(RBC)高免血清的制备及分离和纯化 采集健康鸡抗凝外周血制备 RBC 悬液, 用细胞计数板计数。抗原制备及免疫方法参照《动物生物化学实验指导》^[5] 进行。四免 2 周后加强免疫一次。每次免疫间隔 10 d。五免后第 5 周无菌采集 30 mL 耳静脉血, 先用硫酸铵盐析法粗提 IgG。再用 DEAE 纤维素离子交换柱层析纯化抗鸡红细胞(RBC)IgG。最后以 0.5% 健康鸡 RBC 进行血球凝集试验(HA), 测定血凝效价。

1.2.5.2 鸡 RBC 的致敏 在 0.5% 的新鲜鸡 RBC 悬液中加入半数凝集量的猪 IgG, 温和混匀后, 4℃ 孵育 2 h; 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 用 PBS 洗涤 3 次, 去除未结合的 IgG; 以无血清的 DMEM/0 培养基重悬猪 IgG 致敏 RBC, 制备 0.5% IgG-RBC 悬液^[5]。

1.2.5.3 玫瑰花环试验 参照 Zhang^[1] 文献中采用的方法, 以玫瑰花环试验检测 swFcγR II 在 COS-7 转染细胞表面的表达, 以及猪 IgG 与细胞表面受体的结合情况。

2 结果与分析

2.1 猪外周血白细胞总 RNA 的提取和外周血白细胞 cDNA 的合成

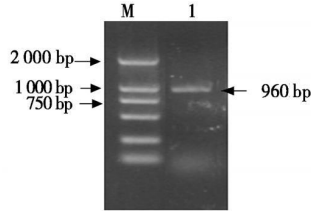
根据 Zhang^[1] 文献中红细胞裂解法分离牛外周血白细胞的方法稍加改进, 进行猪外周血白细胞总 RNA 的提取, 结果表明, 猪外周血白细胞总 RNA 的含量为 60 μg/μL。将上述分离的总 RNA 按照大连宝生物公司 M-MLV cDNA 第一链合成试剂盒说明合成 cDNA, 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 核酸带很亮, 表明合成 cDNA 的质量很好。

2.2 PCR 扩增 *swFcγRII* (SR₂) 基因

以猪外周血白细胞 cDNA 为模板, 用引物 S₂₉ 和 S₂₀ 进行扩增, 反应液用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳。如图 1 在 960 bp 处有一特异条带, 大小和预期相符。

2.3 重组质粒 T-SR₂ 的酶切和 PCR 鉴定

PCR 产物和 pGEM T-easy 质粒连接后, 用限制

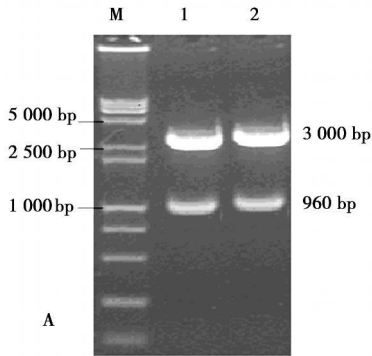


M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR 产物
M. DL2000 DNA Marker; 1. PCR product

图 1 PCR 扩增 *swFcγRII*

Fig. 1 PCR amplification of *swFcγRII*

性内切酶 *EcoR* I 进行酶切鉴定^[6], 如图 2A 所示, 酶切产物在紫外凝胶成像仪上可以看到一大一小 2 个片段, 其中小片段所处位置与目的基因大小一致; 用引物 S₂₉和 S₂₀从重组质粒当中扩增出特异片段,

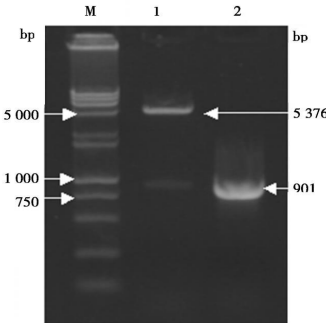


M. 宽范围 DNA Marker; 1, 2 T-SR2 用 *EcoR* I 酶切产物;

M. Wide range DNA Marker; 1, 2 T-SR2/ *EcoR* I (3 000 bp/ 960 bp);

图 2 重组质粒 T-SR2 的酶切及 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmid T-SR2



M. 宽范围 DNA Marker; 1. pcDNA-SR2 的双酶切产物;
2. pcDNA-SR2 的 PCR 产物;

M. Wide range DNA marker;

1. pcDNA-SR2/ *Kpn* I/ *EcoR* I (5 376, 901 bp); 2. PCR product (901 bp)

图 3 真核表达质粒 pcDNA-SR2 的鉴定

Fig. 3 Identification of the eukaryotic expression plasmid pcDNA-SR2

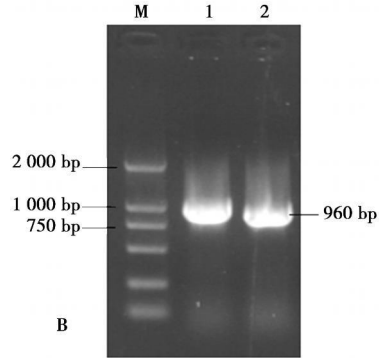
2.5 真核表达、玫瑰花环试验

2.5.1 抗鸡红细胞(RBC)高免血清的制备结果在 5 免后第 5 周无菌采集 30 mL 耳静脉血, 用硫酸铵盐析法粗提 IgG。结果表明, 经硫酸铵盐析粗提的 IgG 浓度为 9.33 mg/mL, HA 效价为 1:256 和猪血清比下降一个滴度。粗提的 IgG 经 DEAE52 离子交换层析, 合并洗脱峰测得 IgG 浓度为 5.82 mg/mL,

如图 2-B。表明重组质粒构建成功。重组质粒 T-SR2 经上海生物工程公司测序后, 获得一 947 bp 序列, 包括一完整 ORF (open reading frame, 全长 894 bp), 编码 297 氨基酸的糖蛋白, 没有突变。

2.4 构建真核表达质粒 pcDNA-SR2

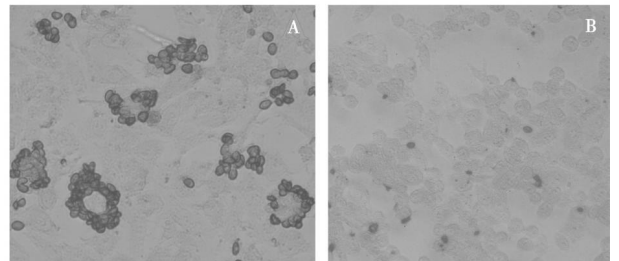
将 *swFcγRII* cDNA 亚克隆到 pcDNA₃ 的巨细胞病毒启动子 (P_{CMV}) 下游, 经 PCR 及 *Kpn* I/ *EcoR* I 双酶切鉴定, 构建了真核表达质粒 pcDNA-SR2, 结果见图 3。引物 ES₂₁/ ES₂₂ 扩增出 901 bp 的 PCR 产物; *Kpn* I/ *EcoR* I 双酶切, 切出 5 376, 901 bp DNA 片段, 均与理论值相符。pcDNA-SR2 质粒表达的 2R 蛋白, 能在细胞表面有效表达 *swFcγRII* 受体分子 (图 3)。



M. DL2000 DNA Marker; 1, 2. PCR 扩增产物 (960 bp)

M. DNA Marker DL2000; 1, 2. PCR product with S₂₉/ S₂₀ primer (960 bp)

HA 效价为 1:160, 纯化效果良好。



A. 转染 *swFcγRII* 基因的 COS-7 细胞; B. 未转染 *swFcγRII* 基因的对照 COS-7 细胞

A. COS-7 cells transfected with the cloned pig *FcγRII* gene and incubated with erythrocytes sensitized with porcine IgG. Extensive binding of erythrocytes to individual cells was evident; B. Control COS-7 cells transfected with the pcDNA₃ plasmid and incubated with IgG-sensitized erythrocytes

图 4 *swFcγRII* 转染 COS-7 细胞的玫瑰花环形成试验
Fig. 4 COS-7 cells transfected with the gene pig *FcγRII* bind IgG-sensitized erythrocytes

2.5.2 玫瑰花环试验结果 用真核表达质粒 pcDNA-SR2 转染 COS-7 细胞, 转染 48 h 后, 以猪 IgG 致敏鸡 RBC 进行玫瑰花环试验, 可见在转染细胞周围形成明显的玫瑰花环 (图 4-A), 而未转染的 COS-7 对照细胞即转染 pcDNA₃ 空质粒均不结合鸡 RBC (图 4-B), 表明 *swFcγRII* 受体分子有效表达于转染

细胞表面, 并与猪 IgG 特异结合。

3 结论与讨论

在总 RNA 提取过程中所有试验耗材均用 0.1% DEPC 水处理, 并分装高压灭菌同时去除残留的 DEPC; 并且每个包装仅限一次使用。所用玻璃器皿均用 180℃ 烘烤 8 h 以消除 RNase 的污染。试剂应以 0.1% DEPC 处理的水配制。

RT-PCR 检测基因表达是一个相对操作简便、结果稳定的技术, 其中主要涉及的步骤是细胞总 RNA 的提取、反转录和 PCR^[8]。为保证结果的可靠性, 应尽可能规范 RT-PCR 过程中的每一步操作, 本研究使用小量提 RNA 试剂盒能够在 30 min 内完成 RNA 的提取, 减少了 RNA 在操作过程中的降解, 从而得到了较高质量的猪外周血白细胞 cDNA。

在试验中发现, *swFcγRII* 的瞬时表达受许多因素影响, 如质粒纯度、细胞活性和转染效率等, 表达受体分子的细胞比例较少(一般只有 10%~40%)。因此, 为深入研究 IgG-swFcγRII 相互作用有必要建立稳定表达 swFcγRII 的细胞系, 相关研究正在进行之中。

本研究利用细胞免疫学和分子生物学等技术, 利用从 GeneBank 中获得的 *swFcγRII* 序列进行分析, 设计合成引物, 扩增得到了 *swFcγRII* 编码区(ORF)基因。通过基因重组的方法构建了 pcDNA3-SR2 重组质粒, 脂质体转染 COS-7 细胞, 首次在 COS-7 细胞系统表达了这一受体, 初步搭建了猪 FcγRII 与 IgG

相互作用的研究平台, 对进一步了解这一重要免疫调控分子在猪免疫系统中的作用机制及 IgG 介导的免疫制剂开发有着重要意义。

参考文献:

- [1] Zhang G. Bovine IgG Fc Receptors(PhD Thesis) [M]. Hatfield University of Hertfordshire, 1994.
- [2] Daeron M. Fc receptor biology[J]. Annu Rev Immunol, 1997, 15: 203–234.
- [3] Ravetch J V. Fc receptors[J]. Curr Opin Immunol, 1997, 9: 121–125.
- [4] Ravetch J V, Bolland S. IgG Fc receptors[J]. Annu Rev Immunol, 2001, 19: 275–290.
- [5] 周顺伍. 动物生物实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [6] 赵光辉, 张改平, 王选年, 等. 猪囊尾蚴 18KD 蛋白基因的克隆及其序列分析[J]. 河南农业科学, 2006, 12: 87–90.
- [7] 张改平, 席俊, 王选年, 等. IBDV VP₃ 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: 88–90.
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(上下册) [M]. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002: 8.
- [9] 张芳, 郭万柱, 吴华, 等. 荣昌猪白细胞介素-2 基因的原核表达[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 355–358.
- [10] 姚清侠, 钱平, 曹毅, 等. 猪口蹄疫病毒 VP1-3 免疫表位基因与猪 γ-干扰素基因的融合表达[J]. 中国预防兽医学报, 2007, 29(5): 346–349.