

人可溶性 CD₁₄ 基因克隆表达及功能研究

白洁^{2*} 荫俊¹ 王占东² 王威¹ 王忠泽¹ 宋伟¹

¹(北京微生物流行病学研究所 北京 100071)

²(白求恩医科大学第二临床医院 长春 130021)

摘要 利用反转录 PCR 技术,从 U₉₃₇ 细胞总 RNA 中,扩增编码人可溶性 CD₁₄ 的基因序列,构建了重组表达质粒 pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa};用脂质体转染法,实现了在真核细胞中的高效表达;用免疫亲和和层析纯化表达产物,纯度达 90% 以上;LPS 刺激 U₉₃₇ 细胞产生 CD₁₄ 的变化,证明了表达产物具有结合 LPS 的功能。

关键词 CD₁₄, 基因克隆, 序列分析, 真核表达, 纯化, 生物学功能

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0269-04

CD₁₄ 是一种主要表达于单核细胞、巨噬细胞和中性粒细胞上的糖蛋白,其分子量为 55kD。人 CD₁₄ 的前体蛋白多肽链由 375 个氨基酸组成,成熟的 mCD₁₄ 由 356 个氨基酸组成,是将前体多肽的前 19 位信号肽去除而成。mCD₁₄ C-端缺少 8 个氨基酸即为 sCD₁₄, sCD₁₄ 有两种异型,分子量分别为 49 和 55kD 均缺乏 GPI 锚。目前研究认为, sCD₁₄ 与膜 CD₁₄ 竞争结合 LPS,并且介导不表达 CD₁₄ 的内皮、上皮和平滑肌细胞对 LPS 应答,在细菌性感染中具有重要的炎症介导作用^[1-4]。

我们利用反转录 PCR 技术,从 U₉₃₇ 细胞总 RNA 中,扩增编码人可溶性 CD₁₄ 的基因序列,构建了重组表达质粒,实现了在真核细胞中的高效表达,并进行了表达产物纯化及生物学功能的研究。

1 材料和方法

1.1 菌种、细胞株及质粒

大肠杆菌 DH-5 α 、COS-7 细胞、U₉₃₇ 细胞为本室保存, *E. coli* 0111 :B₄ LPS 购自 Sigma 公司。真核表达质粒 pEF1/HisC 购自 Invitrogene,免疫亲和层析柱为本室组装。

1.2 试剂

DNA 限制酶 BamH I、Xba I 购自宝生物工程技术有限公司;T4 连接酶、Taq DNA 聚合酶、总 RNA 抽提

试剂盒、RT-PCR 和 PCR 产物回收及质粒纯化试剂盒等购自 Promega 公司, DNA 纯化回收试剂盒购自北京博大公司;Lipofectin、DMEM 培养基、RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司;蛋白酶抑制剂 CompleteTM 购自 Boehringer Mannheim 公司,质粒 pEF1/HisC、Anti-XpressTM 抗体购自 Invitrogene 公司,HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体购自 Gibcol 公司, FITC 标记的抗 CD₁₄ 单抗购自 Pharmingen 公司。

1.3 U₉₃₇ 细胞的培养与总 RNA 的提取

U₉₃₇ 细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养。用 LPS(浓度为: 100ng/mL)刺激培养的 U₉₃₇ 细胞 48h,按 Promega 公司 RNAgentsTM 总 RNA 提取系统操作指南,从培养细胞中分离总 RNA,溶于无菌水。

1.4 反转录聚合酶链反应(RT-PCR)

根据文献报道的人 sCD₁₄^{348aa} 基因序列,设计引物。上游引物 5'CGC GGA TCC ACC ACG CCA GAA CCT TGT GAG 3',含 BamH I 酶切位点,为适应表达载体 pEF1/HisC,没有设计信号肽和 ATG;下游引物: 5'GC TC T AGA TTA CAG CAC CAG GGT TCC CG3'含 Xba I 酶切位点(引物由北京赛百盛生物公司合成)。RT-PCR 采用 Promega 公司 Gene-Amp^R RNA PCR kit, mRNA 反转录模板为 1 μ g,在 PE480 扩增仪上扩增,扩增参数为:反转录(RT)-42 $^{\circ}$ C 1h, 95 $^{\circ}$ C

收稿日期 2000-09-25, 修回日期 2001-02-12。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(39870316)。

* 联系作者。Tel 86-431-4630311; E-mail: haku@263.net。

5min;PCR-94℃ 40s,55℃ 1min,72℃ 1min 循环 30 次,72℃ 延伸 15min,将产物回收。

1.5 重组质粒 pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa} 的构建和鉴定

将 PCR 回收产物用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切,纯化回收,定向克隆至经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切的 pEF1/HisC 真核表达测序载体上,以常规一步转化法转化 DH-5 α 感受态细胞,用 PCR 方法和酶切分析方法鉴定重组子。

1.6 序列测定

将含有构建好的重组子的菌种扩增,送上海博亚生物公司测序。

1.7 pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa} 质粒在 COS-7 细胞中的表达

细胞转染用 Lipofectin 法,将 8 μ g 质粒 DNA 和 10 μ L 质脂体分别溶于不含血清的 DMEM 中,混匀,室温放置 15min,转染一瓶 25cm² COS-7 细胞,共转染 15 瓶,48h 后收集细胞。

1.8 表达产物的 SDS-PAGE、WB 检测

将收集的细胞超声破碎取上清,按常规方法,用 15% 的分离胶进行 SDS-PAGE 分析,用薄层扫描测定表达水平。然后进行 WB 检测,WB 检测所加一抗为 Invitrogene 公司的 Anti-XpressTM 抗体,二抗为 Gibcol 公司的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 抗体,显色剂为 DAB。

1.9 表达产物的免疫亲和层析纯化

收集阳性表达细胞,经超声破碎、离心过滤后取上清,经制备的 3C10 单抗免疫亲和层析柱进行纯化,SDS-PAGE 分析纯化效果,用紫外吸收法测定纯化产物的蛋白浓度。

1.10 重组 sCD₁₄^{348aa} 的 LPS 结合活性实验

U₉₃₇ 细胞分成两组,加入 LPS 或同时加入纯化的表达产物 sCD₁₄^{348aa},浓度分别为:100ng/mL,1 μ g/mL,37℃ 5% CO₂ 孵育 48h,收集细胞,按常规方法洗涤细胞,加入 FITC 标记的抗 CD₁₄ 单抗 20 μ L,4℃ 放置 2h,常规方法收集细胞,固定 4℃ 保存;进行流式细胞仪检测。

2 结果

2.1 U₉₃₇ 细胞总 RNA 的提取和人 sCD₁₄^{348aa} 基因的扩增

以 U₉₃₇ 细胞总 RNA 为模板,经 RT-PCR 扩增出一条特异性条带,大小约为 1000bp,与预计的 1044bp 基本一致(图 1)。

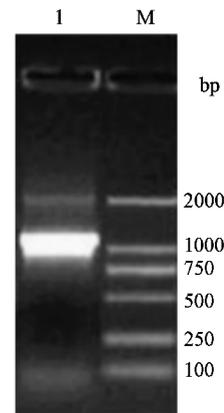


图 1 RT-PCR 产物 sCD₁₄^{348aa} cDNA 的电泳鉴定

Fig.1 Electrophoresis analysis of RT-PCR

product sCD₁₄^{348aa} cDNA

1. RT-PCR product; M. DNA marker

2.2 重组质粒 pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa} 的构建及序列测定

将电泳回收的 PCR 产物,用 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切,DNA 纯化回收试剂盒回收片段,将其定向克隆至经 *Bam*H I 和 *Xba* I 双酶切的 pEF1/HisC 真核表达测序载体上,将连接产物以常规一步转化法转化 DH-5 α 感受态细胞,用 PCR 方法和酶切方法鉴定重组子。结果表明,用 PCR 及 *Bam*H I、*Xba* I 双酶切方法鉴定,均可获得预期大小的 DNA 片段(1044bp),说明已将片段插入至质粒中,DNA 测序结果分析证明与已报道的基因序列一致。将此重组质粒命名为 pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa}(图 2)。

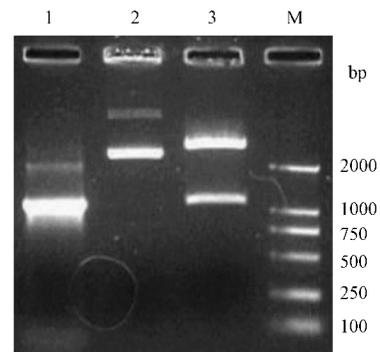


图 2 pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa} 的 PCR 及限制酶酶切分析

Fig.2 PCR and restriction analysis of recombinant

plasmid pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa}

1. PCR product; 2. pEF1/HisC plasmid;

3. pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa}/*Bam*H I + *Xba* I; M. DNA marker

2.3 sCD₁₄^{348aa} 基因在 COS-7 细胞中的表达

将重组质粒 pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa} 转染 COS-7 细胞,48h 后,收集细胞裂解液,进行 SDS-PAGE、WB 检

测,将 SDS-PAGE 结果用薄层扫描测定表达水平。结果表明,转染的 COS-7 细胞裂解蛋白在大小约 53kD 附近有一条较强的特异性棕色条带,说明 sCD₁₄^{348aa} 基因在 COS-7 细胞中得到表达(图 3)。SDS-PAGE 进行薄层扫描,表明 sCD₁₄^{348aa} 在 COS-7 细胞中实现了高效表达,表达量占细胞可溶性蛋白的 20% 以上(图 4)。

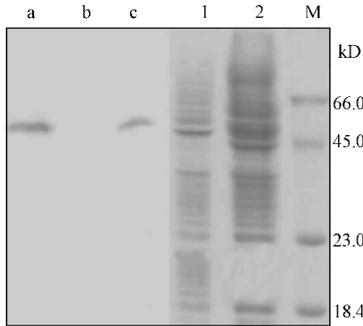


图 3 COS-7 细胞表达蛋白的 SDS-PAGE、WB 结果

Fig. 3 Expression analysis of sCD₁₄^{348aa} molecule

M. MW standards (Mr) of protein; 1. Induced pEF1/HisC/s CD₁₄^{348aa}
2. Uninduced pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa}; a. Induced pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa}
b. Uninduced pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa} c. Purified sCD₁₄^{348aa}

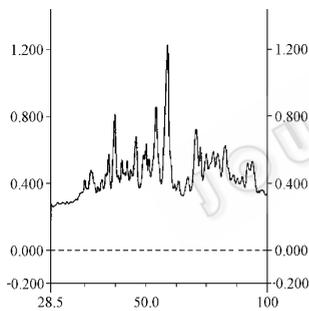


图 4 薄层扫描图

Fig. 4 Picture of scan

2.4 免疫亲和层析纯化 sCD₁₄^{348aa}

用免疫亲和层析纯化表达产物,纯化产物用 SDS-PAGE 检测纯度(图 5),可见接近分子量 53kD 处有明显的单一条带,纯度高于 90%,WB 结果见图 3c。

2.5 重组 sCD₁₄^{348aa} 的 LPS 结合活性实验

在 U₉₃₇ 细胞中,加入 LPS 或同时加入纯化的表达产物 sCD₁₄^{348aa} 刺激后,按常规方法收集细胞,加入 FITC 标记的 CD₁₄ 单抗,固定后上流式细胞仪检测,结果见表 1。

U₉₃₇ 细胞为人组织淋巴瘤细胞,属人单核细胞,在一定浓度的 LPS 刺激时,可使 mCD₁₄ 的表达量增加,本实验在不致死细胞的前提下,尽量加大 LPS 的使用浓度,终浓度为 100ng/mL, 1μg/mL,或同时用表

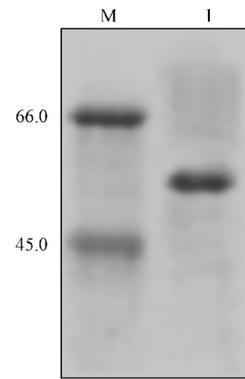


图 5 纯化产物的 SDS-PAGE

Fig. 5 Purified sCD₁₄^{348aa}

M. MW standards (Mr) of proein; 1. Purified sCD₁₄^{348aa}

表 1 重组 sCD₁₄^{348aa} 的 LPS 结合活性

Table 1 Active of recombinanced sCD₁₄^{348aa} combining LPS

	Add LPS (X ± SD)	Add LPS and sCD ₁₄ ^{348aa} (X ± SD)
100ng/mL	23.40 ± 0.07	14.92 ± 0.11
1μg/mL	18.17 ± 0.12	11.60 ± 0.09

达产物刺激培养的 U₉₃₇ 细胞 48h,观察重组 sCD₁₄ 对 LPS 诱导 U₉₃₇ 细胞产生 CD₁₄ 的影响。结果表明,重组的 sCD₁₄^{348aa} 与 U₉₃₇ 细胞表面的 mCD₁₄ 竞争性结合 LPS,使系统中游离 LPS 浓度大大降低,从而对 U₉₃₇ 的刺激减少,抑制了 U₉₃₇ 细胞生成 CD₁₄,实验两组间差别显著,具有统计学意义,说明通过 COS-7 细胞表达的 sCD₁₄^{348aa} 具有天然 CD₁₄ 的 LPS 结合活性。

3 讨论

本实验从 U₉₃₇ 中提取总 RNA,反转录获得 sCD₁₄ cDNA,目前尚未见文献报道。本文用 LPS(浓度为: 100ng/mL)刺激培养的 U₉₃₇ 细胞 48h,提取总 RNA,克隆,测得的序列与文献报道的完全一致。

对于 CD₁₄ 的纯化目前尚未见报道,本文采用 3C10 单抗免疫亲和层析柱建立了重组蛋白纯化系统,一步即可将重组 CD₁₄ 蛋白纯化至 90% 以上,为规模制备重组蛋白和生物学活性研究奠定了基础。

本实验所用的真核表达载体是商品化的 pEF1/HisC,其表达元件中含有高效表达启动子 EF-1α,经脂质体转染 COS-7 细胞,结果显示重组 CD₁₄ 得到了高效表达。占细胞内可溶性蛋白的 20% 以上。文献报道 EF-1α 启动子强度高于 CMV,本实验结果证实了 pEF1/HisC 是一高效表达载体。

研究表明,CD₁₄ N-末端 152 个氨基酸具有完整

的结合 LPS 和诱导炎症应答功能^[5],说明 CD₁₄上结合 LPS 和激活细胞的功能区域位于前 152 个氨基酸以内。目前推测 CD₁₄上与结合 LPS 相关的区域有:氨基酸 57-64^[6]、39-44^[7],这些区域的删除将导致 LPS 结合能力完全丧失;与细胞激活相关的区域有:氨基酸 7-10、9-13 和 91-101,删除这些区域后 CD₁₄尚能结合 LPS,但其激活细胞的能力丧失。sCD₁₄能与 mCD₁₄竞争结合 LPS,部分取代 mCD₁₄的作用,与 LPS 形成复合物,介导细胞结合 LPS,借此提高清除内毒素的能力,同时介导不表达 CD₁₄的内皮细胞、上皮细胞、平滑肌细胞对 LPS 的应答。

从生物学治疗角度考虑,阻断 CD₁₄的信号转导功能,有可能为脓毒症治疗提供新的思路,尤其是保留 LPS 结合能力,丧失细胞激活能力的 sCD₁₄信号缺失突变体,在感染性休克治疗中,可能具有潜在应用价值^[8,9]。

REFERENCES (参考文献)

[1] Bufer P, Stiegler G. Soluble lipopolysaccharide (LPS) receptor CD₁₄ is released via two different mechanisms from human monocyte and

CD₁₄ transfections. *Eur J Immunol*, 1995, **25** (3) :604 ~ 610

- [2] Bazil V, Horejsi V, Baudys M *et al*. Biochemical characterization of a soluble form of the 53kD monocyte surface antigen. *Eur J Immunol*, 1986, **16** :1583 ~ 1589
- [3] Juan TSC, Hailman E. Identification of a domain in soluble CD₁₄ is essential for LPS binding. *J Biol Chem*, 1995, **270** :17237 ~ 17242
- [4] Schutt C, Schilling T, Grunwald U *et al*. Endotoxin-neutralizing capacity of soluble sCD₁₄. *Res Immunol*, 1992, **143** :71 ~ 78
- [5] Juan TSC, Kelly MJ, Hailman E *et al*. Soluble CD₁₄ truncated at amino acid 152 binds lipopolysaccharide (LPS) and enable cellular response to LPS. *J Biol Chem*, 1995, **270** :1382 ~ 1387
- [6] Juan TSC, Hailman E. Identification of a lipopolysaccharide binding domain in CD₁₄ between amino acids 57 and 64. *Immunity*, 1996, **4** :407 ~ 414
- [7] Steler F, Bernheiden M. Mutation of amino acids 39 ~ 44 of human CD₁₄ abrogates binding of LPS and *E. coli*. *Eur J Biochem*, 1997, **243** :100 ~ 109
- [8] Yu B, Hailman E. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD₁₄ catalyses exchange of phospholipids. *J Clin Invest*, 1997, **99** :315 ~ 324
- [9] Steler F, Bernheiden M, Horejsi V *et al*. The molecular basis for therapeutic concepts utilizing CD₁₄. *Prog Clin Biol Res*, 1998, **377** :301 ~ 313

Clone and Expression of Human Soluble CD₁₄ and Study of its Function

BAI Jie^{2*} YIN Jun¹ WANG Zhan-Dong² WANG Wei¹ WANG Zhong-Ze¹ SONG Wei¹

¹(Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

²(The Second Clinical Hospital, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract Human soluble CD₁₄ (sCD₁₄) cDNA fragment was amplified using total RNA extracted from U₉₃₇ cells by RT-PCR of sCD₁₄ gene and the recombinant expression plasmid pEF1/HisC/sCD₁₄^{348aa} was constructed. Then the expression in eukaryotic cell was carry out by liposome transfection method. It demonstrated that the expression level was relatively high by scanning map identification. The expressed product was purified by immunoaffinity chromatography and the purity was above 90%. The changes of CD₁₄ brought by LPS stimulating U₉₃₇ cell proved the product had the function of combine with LPS.

Key words CD₁₄, gene cloning, sequence analysis, eukaryotic expression, purification biology function