

三黄鸡 CD8 / cDNA 克隆与表达及其多克隆抗体的制备

唐秀山 王磊 廖定为 蒋一男 夏春

(中国农业大学 动物医学院,北京 100094)

摘要 为了获得鸡 CD8 / 蛋白及其多克隆抗体,进一步研究其结构与功能,本实验从三黄鸡 cDNA 文库中克隆了其 CD8 / 胞外区片段,构建了 pQE30/ ChCD8 / 原核表达系统,并经诱导表达、亲和层析纯化,获得了纯化的重组蛋白(rChCD8 /),然后用 rChCD8 / 分别免疫 Balb/c 小鼠制备了其多克隆抗体。结果表明:本实验克隆的 ChCD8 长 483 bp,编码 161 个氨基酸,可在 *E. coli* JM109 中高效表达,蛋白质分子质量为 24.0 ku,表达量占菌体蛋白量的 25.0 %,由该蛋白质所制备的多克隆抗体抗 rChCD8 的 ELISA 效价为 1 1 024 000;另外,克隆的 ChCD8 长 447 bp,编码 149 个氨基酸,蛋白质的分子质量为 18.5 ku,表达量占菌体蛋白量的 20.0 %,抗 rChCD8 多克隆抗体 ELISA 效价为 1 64 000。本实验所得鸡 CD8 / 的多克隆抗体将用于四聚体研究。

关键词 鸡; CD8 ; CD8 ; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号 Q 785; S 831

文章编号 1007-4333(2007)05-0005-05

文献标识码 A

Cloning, expression and production of polyclonal antibodies in extracellular regions of chicken CD8 /

Tang Xiushan, Wang Lei, Liao Dingwei, Jiang Yi 'nan, Xia Chun

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The aim of this research was to prepare proteins and polyclonal antibodies for further study of the structure and function of chicken CD8 / . The extracellular regions of CD8 / chains were amplified by PCR and expression systems (pQE30/ ChCD8 /) were constructed and induced. The recombinant protein (rChCD8 /) was purified to immunize the Balb/c mice. The resulting cloned ChCD8 had 483 bp in length, encoding 161 amino acid residues. SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight was 24.0 ku, and the mounts of the recombinant protein was 25.0 % of total mass of bacterial protein. ELISA analysis showed that the titer of polyclonal anti-ChCD8 was about 1 1 024 000. The cloned ChCD8 had 447 bp in length, encoding 149 amino acid residues. The SDS-PAGE analysis showed that the molecular weight was 18.5 ku, and the mounts of the recombinant protein was 20.0 % of total mass of bacterial protein. ELISA analysis showed that the titer of polyclonal anti-ChCD8 was about 1 64 000. Antibodies provided from the research can be applied to the further study of tetramer.

Key words chicken; CD8 ; CD8 ; prokaryotic expression; polyclonal antibody

细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTL)是人和鼠抗病毒免疫应答的主要效应细胞^[1], CD8 分子是 CTL 的表面标志。CD8 有 2 种形式:同型二聚体和 异型二聚体^[2]。CD8 和 CD8 分子质量均为 34 ku,两者在序列上具有共同特征:N 端均有一个 Ig 的 V 型结构域,随后为铰链区、单一跨膜段和一短胞质尾。CD8 分子的主要功能是作

为 TCR 的共同受体参与识别 MHC -多肽,其中 CD8 的 CDR 环(complement-determining region)参与识别 MHC 3 的一个负电荷区,还能与 MHC 的 2 区以及 2 m 结合,从而增加 CTL 与靶细胞的亲和力^[1-2]。CD8 的胞质尾可与 Src 样酪氨酸激酶 p56^{lck}相互作用,参与胸腺分化以及 T 细胞活化的信号传导^[3]。CD8 的作用主要是协助 CD8 发挥

收稿日期: 2007-01-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671566)

作者简介: 唐秀山,硕士研究生;夏春,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事分子免疫学研究, E-mail: xiachun@cau.edu.cn

生物学功能。由于 CD8 为 2 个基因编码并有 7 种剪接形式,其详细功能尚不完全清楚。

目前,禽类的免疫学研究远远滞后于人和鼠^[4]。迄今为止,鸡细胞性免疫应答的相关分子 MHC (BF)、 $\beta 2m$ 、TCR、CD8 / 基因已被克隆^[5-7];国内克隆了莱航鸡 CD8 链^[8],原核表达了 SPF 鸡 CD8^[9],并且,鸡外周血液 CD4⁺和 CD8⁺ T 细胞的比值被用于评价病毒疫苗的免疫效果^[10]。值得注意的是鸡呈递病毒抗原多肽的 MHC /BF 有 2 个等位基因座位(BF1 和 BF2)^[5],其中 BF2 基因座呈显性表达,BF2 的多态性决定了鸡对病毒的免疫应答水平^[11];同时,将 BF2 划分为 11 个基因群^[12],并重点对 BF2 复等位基因和鸡 $\beta 2m$ 蛋白的结构^[13]及其复合体结合禽流感病毒多肽的形式进行研究。本实验克隆了三黄鸡 CD8 和 CD8 链(ChCD8 /),表达、纯化了其重组蛋白 rChCD8 / ,并制备了其多克隆抗体,旨在推进 BF2-多肽-TCR 以及 CD8 组装体的精细结构及其呈递病毒抗原多肽分子机理的深入研究。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

E. coli JM109、表达载体 pQE30 为本室保存。限制性内切酶 *Bam*H、*Kpn*、*Hind*、*ExTaq* 酶、T4 DNA 连接酶均为宝生物工程(大连)有限公司产品。DNA 回收试剂盒为博大泰克生物基因技术有限公司产品。弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品。6~8 周龄 Balb/c 小鼠购自军事医学科学院实验动物中心。

1.2 ChCD8 / cDNA 克隆

根据 GenBank 鸡 CD8 序列(NM. 205235)设计了一引物对。上游引物(P1)序列为 5'-CGGGATCCCA GGGACA GCGCAACACGATGGAG GCCCGCTTCCCTTAACCGC AAC-3 (含 *Bam*H 酶切位点),下游引物(P2)序列为 5'-GGGGTACCCTCACAGTACAAATTCA GA ATGTTCTC-3 (含 *Kpn* 酶切位点)引物由上海生物工程公司合成。另外,再根据鸡 CD8 基因序列(NM. 205247)设计一表达引物对。上游引物(P3)序列为 5'-CGGGATCCCTTTTCATCCCA GACTCCA GG-3 (含 *Bam*H 酶切位点),下游引物(P4)序列为 5'-CCA AGCTTCA TGGGGGTGCA GGCACCTTTC-3 (含

Hind 酶切位点)。以三黄鸡 cDNA 文库为模板,采用 P1/P2 和 P3/P4 引物对分别扩增 ChCD8 / cDNA 胞外区。PCR 反应条件为:94 45 s,62 45 s,72 1 min;35 个循环,72 延伸 10 min。

1.3 ChCD8 / 表达载体的构建

采用 *Bam*H 和 *Kpn* 以及 *Bam*H 和 *Hind* 分别双酶切含 ChCD8 / PCR 产物,再将 ChCD8 / 酶切片段分别插入原核表达质粒 pQE30 的 *Bam*H 和 *Kpn* 或 *Hind* 位点,获得阳性重组质粒。阳性重组质粒转化 *E. coli* JM109 后再双酶切鉴定,送上海生工生物工程公司进行序列测定。

1.4 ChCD8 / 的表达、纯化及 SDS-PAGE 分析

分别挑取 *E. coli* JM109 (pQE30/ChCD8) 和 *E. coli* JM109 (pQE30/ChCD8) 单菌接种于含 100 μ g/mL 氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基,37、200 r/min 培养至对数生长期,加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L,37 诱导表达 5 h,同时设未诱导菌组和 JM109 空质粒对照组。随后,离心收集菌体,进行 SDS-PAGE 分析;采用 Alpha Imager 2000 Analysis Systems 系统分析目的蛋白的表达量。另外,取 1 L 经 IPTG 诱导 5 h 的菌液,离心收菌,超声裂解、包涵体重悬,用 8 mol/L 尿素变性缓冲液溶解包涵体,然后用镍柱亲和层析纯化 6 \times His-ChCD8 和 6 \times His-ChCD8。在 4 条件下将纯化后的融合蛋白先用含 1 mmol/L 还原型谷胱甘肽和 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽的复性缓冲液透析 6 h,然后用 1 \times PBS 缓冲液透析 5 次,每次 6 h。随后进行蛋白浓缩、SDS-PAGE 电泳和蛋白的浓度测定。

1.5 ChCD8 / 多克隆抗体的制备

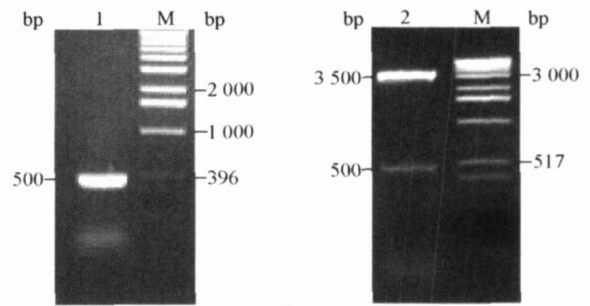
采用 ChCD8 / 纯化蛋白分别免疫 Balb/c 小鼠。初次免疫用弗氏完全佐剂,抗原量为 100 μ g/只,皮内注射。2 周后加强免疫,抗原量和首次的相同,加弗氏不完全佐剂,皮下注射;以后每隔 1 周加强 1 次,共免疫 4 次;最后 1 次免疫后 7 d,摘眼球取血,分离血清。用 ChCD8 / 纯化蛋白分别包被 96 孔板(0.5 μ g/孔,溶于 100 μ L 包被液),4 过夜;用 PBST 洗液洗 3 次,加含 5.0% (体积分数)小牛血清的 PBS 于 37 封闭 2 h;再洗涤 3 次后加入不同稀释度的待检免疫血清;并以免疫前的正常小鼠血清作对照,37 温育 1 h;洗涤 3 次后加 HRP-羊抗小鼠 IgG(1:1000 稀释),37 温育 1 h,再洗涤 3 次;37、1 h 后加底物,37 避光显色 15 min;以 2

mol/L H₂SO₄ 终止反应;测 490 nm 的吸收值, P/ N 2.1 者判为阳性。

2 结果

2.1 ChCD8 / cDNA 克隆

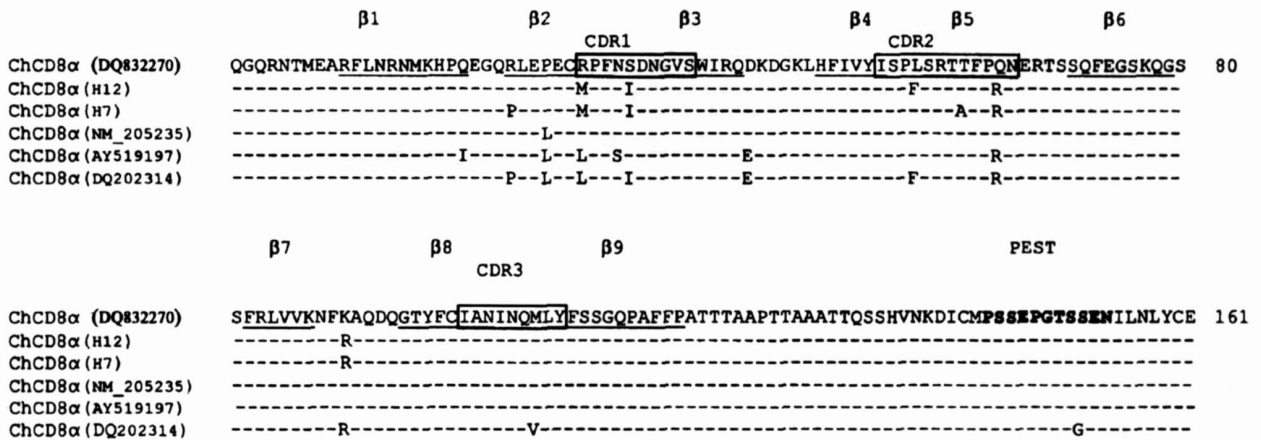
以三黄鸡 cDNA 文库为模板, P1/ P2 引物扩增出了 1 条 500 bp 带, pQE30/ ChCD8 经 *Bam*H 和 *Kpn* 双酶切后, 在 500 bp 和 3 500 bp 处各有 1 条特异带(图 1)。测序结果表明, 三黄鸡 CD8 胞外区长 483 bp, 编码 161 个氨基酸; 在 GenBank 中的登录号为 DQ832270。通过与 GenBank 上 NM. 205235、AY519197、DQ202314 的 ChCD8 序列的比较结果(图 2)显示, 本实验所克隆的 ChCD8 氨基酸水平



M 为 D016-2 marker; 1 为 CD8 PCR 产物; 2 为重组质粒 pQE30/ ChCD8 的双酶切结果

图 1 PCR 产物和重组质粒 pQE30/ ChCD8 双酶切鉴定电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR product of CD8 and the recombinant plasmid of pQE30/ ChCD8 digested by *Bam*H / *Kpn*



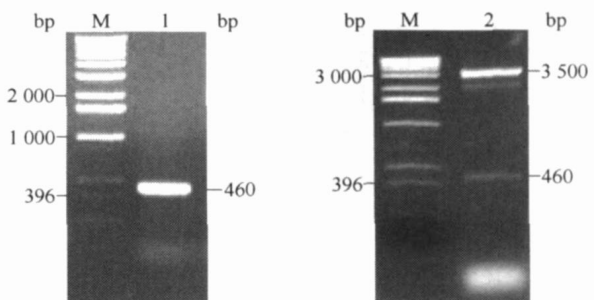
划线部分为 1- 9 折叠; 方框部分为 CDR 区域; 黑体字为 PEST 基序

图 2 ChCD8 胞外区氨基酸序列比较

Fig. 2 Comparison of the amino acid sequence of extracellular region of CD8 from different sources

的同源率为 93.8% ~ 96.2%。另外, ChCD8 胞外区均不存在 N 糖基化位点, 且各氨基酸的变异发生在同一品系内和不同品系之间, 主要集中在其 Ig V 型结构域的 2、3 和 5 折叠区。

ChCD8 扩增结果(图 3)显示, 用 P3/ P4 引物扩增出一条 460 bp 带。pQE30/ ChCD8 经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切后, 在 460 和 3 500 bp 处各有 1 条特异带。测序结果表明 ChCD8 胞外区长 447 bp, 编码 149 个氨基酸。三黄鸡 CD8 在 GenBank 中的登录号为 DQ832271。三黄鸡 CD8 与 Tregaskes (Z26484)、Luhtala (NM. 205247、Y11475、Y11474) 等克隆的 CD8 序列比较, 氨基酸水平的同源率为 98.0% ~ 99.3%。



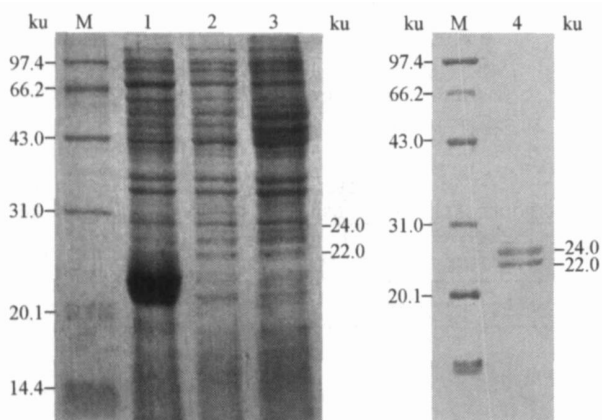
M 为 D016-2 marker; 1 为 CD8 PCR 产物; 2 为重组质粒 pQE30/ ChCD8 的双酶切结果

图 3 PCR 产物和重组质粒 pQE30/ ChCD8 双酶切鉴定电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR product of CD8 and the recombinant plasmid of pQE30/ ChCD8 digested by *Bam*H / *Hind*

2.2 ChCD8 / 的表达、纯化与 SDS-PAGE

构建后的重组质粒 pQE30/ChCD8 和 pQE30/ChCD8 转化 *E. coli* JM109 后, 组建了 JM109 (pQE30/ChCD8) 和 JM109 (pQE30/ChCD8) 表达系。IPTG 诱导表达 *E. coli* JM109 (pQE30/ChCD8) 结果如图 4 所示。SDS-PAGE 显示在 22.0 和 24.0 ku 处分别有 1 条特异蛋白带, 其表达量约占菌体蛋白的 25.0%, 并且这 2 条蛋白带均能被亲和层析柱纯化。经紫外分光仪检测, ChCD8 蛋白浓缩后的质量浓度为 1.2 mg/mL。

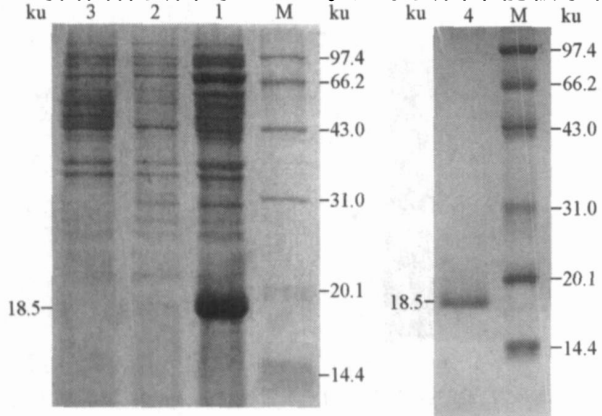


M 为低分子量蛋白 marker; 1 为 ChCD8 诱导表达菌; 2 为未诱导表达菌; 3 为 JM109 空白对照; 4 为纯化后的表达带

图 4 SDS-PAGE 分析 ChCD8 融合蛋白的表达与纯化

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant fusion protein and purified protein of ChCD8

E. coli JM109 (pQE30/ChCD8) 的 SDS-PAGE 分析(图 5)所示, 在 18.5 ku 处有 1 条特异带, 表达量约占菌体蛋白的 20.0%。这条蛋白带能被亲和



M 为低分子量蛋白 marker; 1 为 ChCD8 诱导表达菌; 2 为未诱导表达菌; 3 为 JM109 空白对照; 4 为纯化后的表达带

图 5 ChCD8 重组融合蛋白表达与纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the recombinant fusion protein and purified protein of ChCD8

层析柱纯化。紫外分光仪检测结果表明 ChCD8 蛋白浓缩后的质量浓度为 0.9 mg/mL。

2.3 抗 ChCD8 / 多克隆抗体的制备

小鼠经免疫 4 次后的第 7 天放血, 取血清。以 ChCD8 / 纯化蛋白分别包被 96 孔板, 用 ELISA 方法检测制备的多克隆抗体滴度。结果显示抗 ChCD8 抗体的最终效价为 1 1 024 000; 抗 ChCD8 抗体的最终效价为 1 64 000。

3 讨论

1) 类似于哺乳动物, 鸡存在 CD8 同型和 CD8 异型二聚体, 不同的是鸡 CD8 存在多态性^[7]。本研究证实了 ChCD8 存在变异, 其胞外区不存在 N 糖基化位点。ChCD8 氨基酸的变异发生在同一品系内及不同品系之间, 主要集中在其 Ig V 型结构域的 2、3、5 折叠区以及 CDR1 与 CDR2 区(图 2)。另外, 笔者首先报道了鸡 MHC /BF2 可分为 11 类型以及 2 m 可分为 2 类^[12]; CD8 多态性与这些的关联仍有待研究。有一点可以肯定, 在鸡 CD8 分子的进化过程中, CD8 和 CD8 所面临的选择压力是不一样的。

2) 由于 ChCD8 在品系之间存在差异, 以三黄鸡为模型研究抗原多肽的识别机制, 表达了 ChCD8 /。最初, ChCD8 在 pQE30/JM109 中不表达, 经分析发现 ChCD8 N 端有 3 组 *E. coli* 稀有密码子 AGG, 编码精氨酸(R); 因此, 重新设计了上游表达引物, 即用密码子 CGC 代替 AGG, 结果导致 ChCD8 高效表达于 pQE30/JM109 系统。另外, 表达的重组蛋白 N 端含有 6 个组氨酸的标签 (6 × His), 使 rChCD8 蛋白容易被亲和层析纯化; 但是 rChCD8 纯化产物中有 22.0 和 24.0 ku 的 2 种蛋白, 其原因可能是由于 ChCD8 氨基酸中第 144 至 153 位存在 PEST 结构域(图 2)。由于 PEST 的磷酸化使蛋白与钙的结合力提高, 从而可能导致钙依赖蛋白酶降解了 rChCD8^[14], 而 rChCD8 不具备 PEST 结构域, 其纯化的重组蛋白分子与推定的分子质量相符。

本研究克隆了三黄鸡 ChCD8 / cDNA, 表达、纯化了其重组蛋白 rChCD8 /, 并分别制备了鼠抗 ChCD8 / 的多克隆抗体, 为进一步研究 BF2-TCR-CD8 / 的结构与功能以及建立禽类病毒 CTL 表位测定系统奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Gao G F, Tormo J, Gerth U C, et al. Crystal structure of the complex between human CD8alpha (alpha) and HLA-A2[J]. *Nature*, 1997, 387: 630-634
- [2] Naeher D, Luescher I F, Palmer E. A role for the alpha-chain connecting peptide motif in mediating TCR-CD8 cooperation[J]. *J Immunol*, 2002, 169(6): 2964-2970
- [3] Barber E K, Dasgupta J D, Schlossman S F, et al. The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (*p56lck*) that phosphorylates the CD3 complex [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86(9): 3277-3281
- [4] Luhtala M. Chicken CD4, CD8alphabeta, and CD8alphaalpha T cell co-receptor molecules [J]. *Poult Sci*, 1998, 77: 1858-1873
- [5] Kaufman J, Milne S, Gobel T W, et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex[J]. *Nature*, 1999, 401(6756): 923-925
- [6] Gobel T W, Chen C L, Lahti J, et al. Identification of T-cell receptor alpha-chain genes in the chicken[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91(3): 1094-1098
- [7] Luhtala M, Tregaskes C A, Young J R, et al. Polymorphism of chicken CD8-alpha, but not CD8-beta[J]. *Immunogenetics*, 1997, 46(5): 396-401
- [8] 胡青海, 焦新安, 徐耀辉, 等. 鸡 CD4 和 CD8 基因 cDNA 的克隆及其真核表达质粒的构建[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2004, 25(4): 56-60
- [9] 谢国化, 鲍鸣, 仲大莲, 等. 编码鸡 CD8 链无信号肽基因片段的克隆与表达 [J]. *安徽农业大学学报*, 2006, 33(1): 56-60
- [10] 罗坤, 金宁一, 郭志儒, 等. 中国流行株 HIV-1B 亚型 *Gag* 重组鸡痘病毒构建及其免疫原性[J]. *中国兽医学报*, 2001, 21(5): 463-465
- [11] Kaufman J, Wallny H J. Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of birds[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996, 212: 129-141
- [12] Yan R Q, Li X S, Yang T Y, et al. Characterization of BF2 and beta2m in three Chinese chicken lines[J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 108(3-4): 417-425
- [13] Yan R Q, Li X S, Yang T Y, et al. Structures and homology modeling of chicken major histocompatibility complex protein class I (BF2 and beta2m) [J]. *Mol Immunol*, 2006, 43(7): 1040-1046
- [14] Scott R, Rodney W, Martin R. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: The PEST hypothesis[J]. *Science*, 1986, 234:364-368