

## 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<sup>[1]</sup>, 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<sup>[2]</sup>。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<sup>[1-2]</sup>。CD8 的胞质尾可与 Src 样酪氨酸激酶 p56<sup>lck</sup>相互作用,参与胸腺分化以及 T 细胞活化的信号传导<sup>[3]</sup>。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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5-7]</sup>;国内克隆了莱航鸡 CD8 链<sup>[8]</sup>,原核表达了 SPF 鸡 CD8<sup>[9]</sup>,并且,鸡外周血液 CD4<sup>+</sup>和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的比值被用于评价病毒疫苗的免疫效果<sup>[10]</sup>。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)<sup>[5]</sup>,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<sup>[11]</sup>;同时,将 BF2 划分为 11 个基因群<sup>[12]</sup>,并重点对 BF2 复等位基因和鸡  $\beta 2m$  蛋白的结构<sup>[13]</sup>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*、*Ex*Taq 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 TGGGGGTGCAAGGCACCTTTC-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  $\mu$ 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

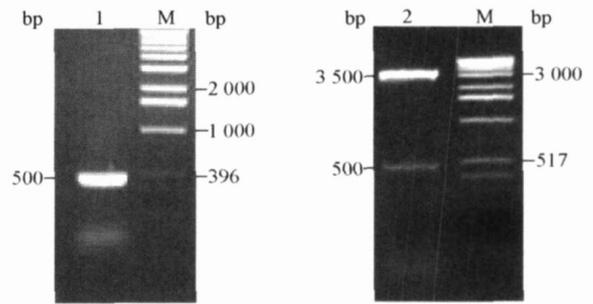
采用 ChCD8 / 纯化蛋白分别免疫 Balb/c 小鼠。初次免疫用弗氏完全佐剂,抗原量为 100  $\mu$ g/只,皮内注射。2 周后加强免疫,抗原量和首次的相同,加弗氏不完全佐剂,皮下注射;以后每隔 1 周加强 1 次,共免疫 4 次;最后 1 次免疫后 7 d,摘眼球取血,分离血清。用 ChCD8 / 纯化蛋白分别包被 96 孔板(0.5  $\mu$ g/孔,溶于 100  $\mu$ L 包被液),4 过夜;用 PBST 洗液洗 3 次,加含 5.0% (体积分数)小牛血清的 PBS 于 37 封闭 2 h;再洗涤 3 次后加入不同稀释度的待检免疫血清;并以免疫前的正常小鼠血清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

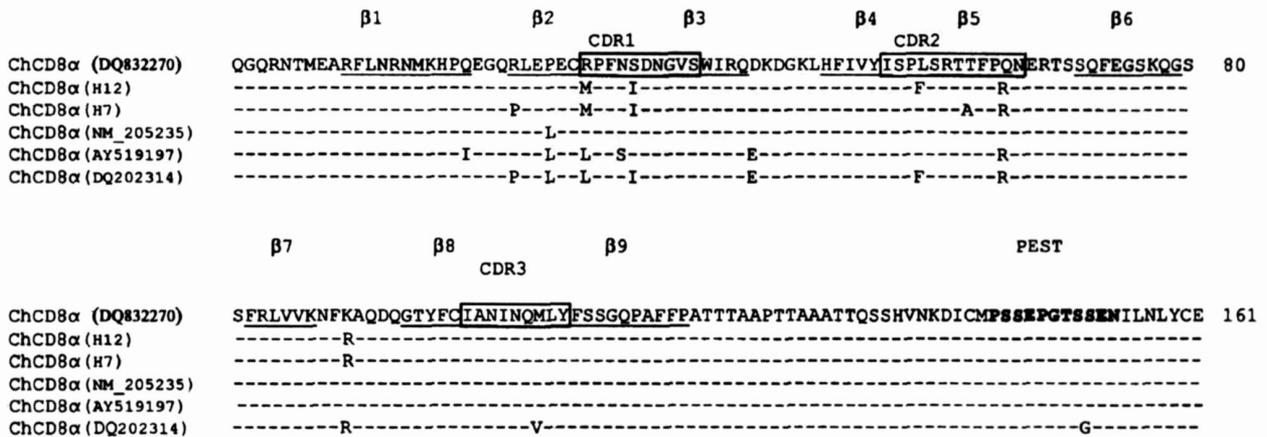
以三黄鸡 cDNA 文库为模板, P1/ P2 引物扩增出了 1 条 500 bp 带, pQE30/ ChCD8 经 *Bam*H 和 *Kpn*I 双酶切后, 在 500 bp 和 3 500 bp 处各有 1 条特异带(图 1)。测序结果表明, 三黄鸡 CD8 胞外区长 483 bp, 编码 161 个氨基酸; 在 GenBank 中的登录号为 DQ832270。通过与 GenBank 上 NM. 205235、AY519197、DQ202314 的 ChCD8 序列的比较结果(图 2)显示, 本实验所克隆的 ChCD8 氨基酸水平



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*I



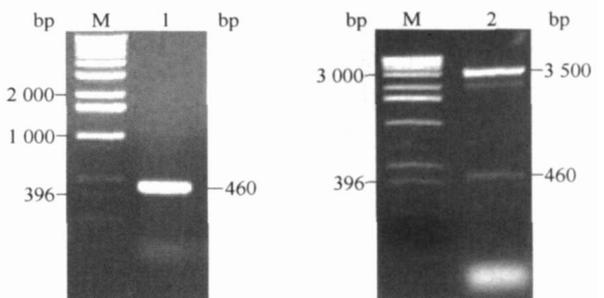
划线部分为 1- 9 折叠; 方框部分为 CDR 区域; 黑体字为 PEST 基序

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*III 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%。



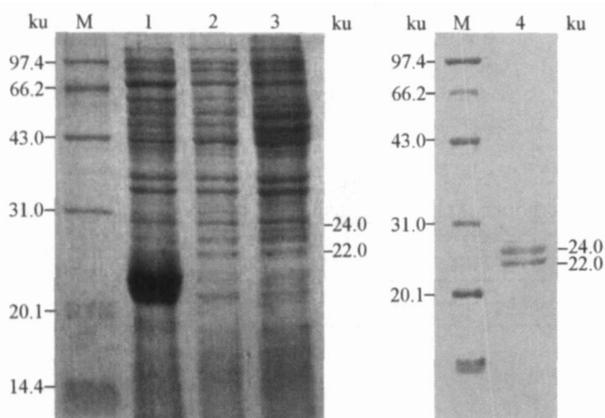
M 为 D016-2 marker; 1 为 CD8 PCR 产物; 2 为重组质粒 pQE30/ ChCD8 的双酶切结果

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*III

## 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。

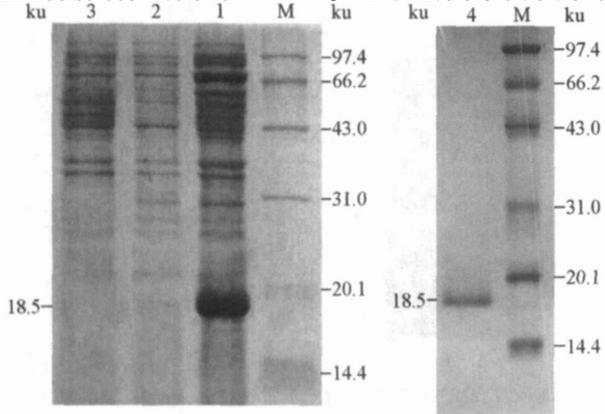


M 为低分子量蛋白 marker; 1 为 ChCD8 诱导表达菌; 2 为未诱导表达菌; 3 为 JM109 空白对照; 4 为纯化后的表达带

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<sup>[7]</sup>。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<sup>[12]</sup>; 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<sup>[14]</sup>, 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