

[ ]1000-8861(2007)05-0499-04

## 人 CD226 分子胞膜外区 D1 和 D2 真核表达载体的构建、表达和鉴定

邓虎平,庄 然,贾 卫,张 贇,张 圆,户 义,张新海,金伯泉\* (第四军医大学免疫学教研室,西安 710032)

[ ] 构建含有人 CD226 分子胞膜外区结构域 1(D1)和结构域 2(D2)的真核表达载体,表达并纯化重组蛋白。用特异性引物分别扩增 CD226 D1 和 D2 的基因,定向插入真核表达载体 pSecTag2B-Fc,进行酶切和 DNA 测序鉴定,重组质粒瞬时转染 293T 细胞,收集上清,纯化蛋白及 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表达产物。利用 PCR 方法克隆出 CD226 胞膜外区 D1 和 D2 的基因,并正确插入 pSecTag2B-Fc 载体中,真核表达载体瞬时转染 293T 细胞,Western blot 结果证实转染 293T 细胞的培养上清液中含有 hCD226D1-Fc 和 hCD226D2-Fc 融合蛋白,培养上清经亲和层析柱纯化,可获得较高纯度的重组蛋白。成功的构建了分泌型融合蛋白 hCD226D1-Fc 和 hCD226D2-Fc 真核表达载体,获得纯度较高的融合蛋白,为进一步探讨其配受体的相互作用机制奠定了基础。

[ ] CD226;真核表达;融合蛋白

[ ] R392.11 [ ] A

### Construction and expression of human CD226 extracellular domain 1 and domain 2 gene eukaryotic expression vectors and identification of the fusion proteins

DEHG Huping, ZHUANG Ran, JIA Wei, ZHANG Yun, ZHANG Yuan, HU Yi, ZHANG Xin hai, JIN Bo-quan (Department of Immunology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

[Abstract] **Objective** To construct and express eukaryotic expression vectors of domain 1 and domain 2 in the extracellular region of human CD226 and identify their expressed fusion proteins. **Methods** The hCD226D1 and hCD226D2 genes were amplified from the full length CD226-flag and cloned to pMD18-T vector by PCR. The recombinant plasmids were digested and inserted into the same site of expression vector pSecTag2B to construct pSecTag2B/hCD226D1 and pSecTag2B/hCD226D2. The recombinant plasmids were digested and subjected to gene sequencing before recombinant expression vectors were transfected into 293T cells. The expressed fusion proteins hCD226D1-Fc and hCD226D2-Fc were purified by WT6 conjugated Sepharose-4B affinity column, and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** The D1 and D2 genes of hCD226 were successfully cloned by PCR. And the sequence of hCD226D1-Fc and hCD226D2-Fc genes' ORF were consistent with the sequence of GenBank. Digestion analysis showed a band of about 350 bp. CD226 D1-Fc and D2-Fc fusion proteins were confirmed by SDS-PAGE and Western blotting. **Conclusion** hCD226D1-Fc and hCD226D2-Fc fusion proteins are expressed successfully, which will provide the foundation for further study on the interaction of CD226 with its ligands.

[Key words] CD226; Eukaryotic expression; Fusion protein

CD226 分子最初称为 T 细胞系特异性活化抗原 1 (TLISA 1)<sup>[1]</sup>、后更名为人血小板 T 细胞抗原 1<sup>[2]</sup> (PTA1) 或 DNAM-1<sup>[3]</sup>,是相对分子质量 (Mr) 为 65 000 的跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族<sup>[3,4]</sup>。CD226 广泛分布于绝大多数活化 T 细胞、NK 细胞、NKT 细胞、单核细胞、DC 细胞、巨核细胞/血小板谱

系、部分 B 细胞以及造血祖细胞<sup>[3-5]</sup>。最近研究证实,CD226 的配体是脊髓灰质炎病毒受体 PVR (CD155) 及其家族成员 CD112 (Nectin2)。作为 NK 细胞活化性受体之一,CD226 与配体的结合是 NK 细胞杀伤靶细胞的重要分子基础<sup>[6]</sup>。CD226 与其配体作用还参与细胞的黏附<sup>[7]</sup>、T 细胞的活化和分化等多种生理功能<sup>[8]</sup>。

CD226 胞膜外区含有 2 个 IgV 样结构域,有关 CD226 胞膜外区第一个结构域 (D1) 和第二个结构域 (D2) 与配体的结合及其与功能的关系鲜有报道。本试验构建了含有 CD226 分子胞膜外区 D1 和 D2 的真核表达载体,表达分泌性融合蛋白,为研究

[ ] 2006-10-20; [ ] 2007-05-07

[ ] 国家自然科学基金面上项目 (30672370,30500219)

[ ] 邓虎平 (1982-),男,甘肃环县人,硕士生,主要从事细胞与分子免疫学方面的研究。(Tel) 029-84774531-807; (E-mail) dhpmmu@yahoo.com.cn

\* 通讯作者



CD226 与其配体 (CD112 与 CD155) 相互作用的分子机制打下基础。

## 1

**1.1** 、 293T 细胞系本室保存, 培养于含 100 mL/L 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基。含有全长 CD226 基因的载体 pFlag-CD226 及 *E. coli* DH5 为本室保存。pMD18-T 购自宝生物工程(大连)有限公司。真核表达载体 pSecTag2B 购自 Invitrogen 公司, 经本室改造后可表达 Ig Fc 融合蛋白 (pSecTag2B-Fc)。

**1.2** 、 限制性内切酶、DNA 连接试剂盒、dNTPs、*rTaq* 酶及 *Pyrobest* 酶购自宝生物工程(大连)有限公司, DNA Marker 购自海碧基因 (Hybigen) 生物技术有限公司, 质粒小量制备试剂盒和琼脂糖凝胶核酸纯化回收试剂盒为上海华舜生物工程有限公司产品, RPMI 1640 培养基为 Hyclone 公司产品, 新生牛血清为杭州四季青生物工程材料有限公司产品; 磷酸钙法细胞转染试剂盒购自碧云天生物技术公司。DNA 序列测定由北京三博远志公司进行。抗 hIgFc mAb WT6 与 WT7-HRP 为本室制备<sup>[9]</sup>, 增强型化学发光试剂盒为 Roche 公司产品。

**1.3 CD226** 为了克隆 CD226 分子胞膜外区的 D1 和 D2 基因, 我们设计了下列 2 对引物: P1: 5'-AAAGCTTPGAAAGGGTGCCTTGGCAT 3', 5' 端引入酶切位点 *Hind*, P2: 5'-CGGGATCCCA CAGCTGCCTCAAAACT 3', 3' 端引入酶切位点 *Bam*H ; P3: 5'-AAAGCTTCCATCAAATAGCCACATF 3', 5' 端引入酶切位点 *Hind*, P4: 5'-GGTACCGGIATATTGGTATCGGF 3', 3' 端引入酶切位点 *Kpn*。其中 P1、P2 针对 CD226 D1 (简称 hCD226D1), P3、P4 针对 CD226 D2 (简称 hCD226D2) 的序列设计而成, 以 CD226 全长载体为模版, PCR 体系按 *Pyrobest* DNA 聚合酶体系说明书配制。PCR 方案: 95 预变性 5 min; 94 30 s, 60 30 s, 72 50 s, 进行 33 个循环; 72 10 min, 最后于 4 冷却。

### 1.4 CD226 D1 D2

完成 PCR 反应后, 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 观察结果与预期片段大小相符时, 回收 PCR 产物。回收片段接入 pMD18-T 中, 连接采用 Takara Ligation Kit, 反应体系: Solution 5  $\mu$ L, pMD18-T 载体 1  $\mu$ L、回收片段 2.5  $\mu$ L 及去离子水 1.5  $\mu$ L, 16 下连接 3 h。连接后的产物转化 DH5 感受态菌, 转化子在氨苄青霉素抗性的 LB 琼脂平板上进行筛选。随机挑取数个克隆菌进行 PCR 和 *Hind* +

*Bam*H 或 *Hind* + *Kpn* 双酶切鉴定。鉴定正确后分别将重组质粒用 *Hind* + *Bam*H 或 *Hind* + *Kpn* 进行双酶切, 电泳并进行胶回收, 将回收片段接入相同限制性内切酶双酶切后的真核表达载体 pSecTag2B-Fc 中, 构建的质粒命名为 pSecTag2B/hCD226D1 和 pSecTag2B/hCD226D2, 转化 DH5 感受态菌, 做酶切鉴定并测序列。

**1.5 pSecTag2B/hCD226D1 pSecTag2B/hCD226D2 293T** 采用 SDS 碱裂解法、聚乙二醇沉淀法大量制备质粒, 具体步骤参见分子克隆(第 3 版)。293T 细胞用含有 100 mL/L 新生牛血清的 RPMI 1640 培养基在 37、50 mL/L CO<sub>2</sub> 的孵箱中培养。瞬时转染按照碧云天磷酸钙法细胞转染说明书进行操作, 以 2  $\times 10^6$  细胞/瓶接种处对数生长期的 293T 于 75 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶中, 培养 24 h 后加入新鲜完全培养基。将转染试剂分别与 pSecTag2B/hCD226D1、pSecTag2B/hCD226D2 以及空载体 pSecTag2B 质粒混匀, 室温静置 15 min, 逐滴均匀加入细胞培养瓶中, 轻柔混匀, 质粒用量为 40  $\mu$ g/瓶, 7.5 h 后轻晃培养瓶, 缓慢移去上清液, 并加入新鲜配制的完全培养基, 继续培养 72 h 后收集培养上清液。

### 1.6 、SDS-PAGE Western blot

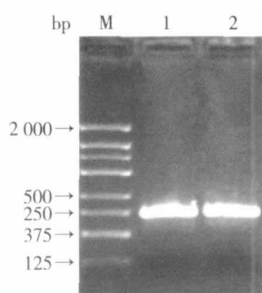
293T 细胞表达上清液收集后通过 WT6 标记的 Sepharose-4B 凝胶纯化。首先用滤过的 0.15 mol/L PBS (pH 7.4) 淋洗 2 遍, 293T 细胞转染上清液与 WT6 交联的 Sepharose-4B 凝胶孵育一定时间, 用上述 0.15 mol/L PBS (pH 7.4) 淋洗 3 遍, 采用 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液 (pH 2.4) 作为洗脱液洗脱蛋白, 紫外分光光度仪定量蛋白。SDS-PAGE (50 g/L 的浓缩胶以及 120 g/L 的分离胶) 分析。

取 20  $\mu$ g 总蛋白进行 SDS-PAGE, 并转至硝酸纤维素膜 (100 V, 90 min 转膜), 封闭液封闭 2 h (含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBS 液), WT7-HRP 按 1:250 稀释于封闭液中, 4 孵育过夜, 最后加入底物 (Lumi-Light Western Blotting Kit), 在 X-ray 胶片上检测发光信号。

## 2

### 2.1 CD226 D1 D2 PCR

以含有全长 CD226 基因的质粒为模板, 分别用两对引物进行 PCR 扩增, 获得 hCD226D1 和 hCD226D2 基因, 两基因大小均约为 350 bp, 与预期大小相符 (图 1)。

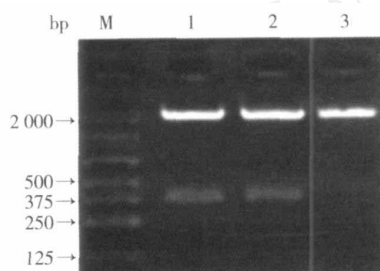


1) hCD226D1 gene; 2) hCD226D2 gene; M) HBI 125 bp DNA ladder

图 1 hCD226D1 和 hCD226D2 基因 PCR 产物电泳图

Fig 1 PCR amplification of hCD226D1 and hCD226D2 genes

**2.2 DNA 将**  
 将 pMD18-T/hCD226D1 和 pMD18-T/hCD226D2 重组质粒分别用 *Hind* + *Bam*H 或 *Hind* + *Kpn* 进行双酶切之后分别纯化回收,连接构建成 pSecTag2B/hCD226D1 和 pSecTag2B/hCD226D2 真核表达质粒。重组质粒酶切鉴定,大小均为约 350 bp 左右,表明重组质粒带有目的基因片段 hCD226D1 和 hCD226D2(图 2)。进一步进行 2 组质粒测序,序列与 GenBank 一致,开放读框正确。



1) pSecTag2B/hCD226D1 digested by *Hind* + *Bam*HI; 2) pSecTag2B/hCD226D2 digested by *Hind* + *Kpn*I; 3) Plasmid control; M) HBI 125 bp DNA ladder

图 2 重组质粒 pSecTag2B/hCD226D1 和 pSecTag2B/hCD226D2 的双酶切鉴定

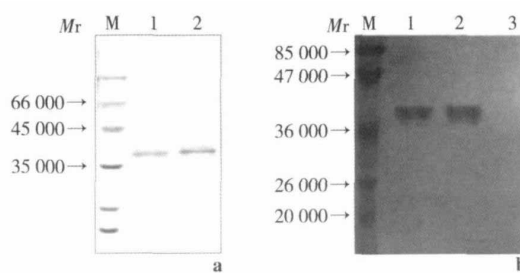
Fig 2 Double enzyme digestion analysis of recombinant pSecTag2B/hCD226D1 and pSecTag2B/hCD226D2

**2.3 SDS-PAGE Western blot**

重组质粒 pSecTag2B/hCD226D1 和 pSecTag2B/hCD226D2 转染的 293T 细胞表达出可溶型融合蛋白,即 hCD226D1-Fc 和 hCD226D2-Fc,纯化后蛋白浓度为 1.3 g/L,纯化的 hCD226D1-Fc 和 hCD226D2-Fc 融合蛋白经 SDS-PAGE 分析可见在  $M_r$  38 000 处有清晰条带,纯度可达 90 % (图 3a)。Western blot 检测得  $M_r$  均为 38 000,空载体组则未见目的条带表达 (图 3b)。

**3**

CD226 是免疫球蛋白超家族成员<sup>[1]</sup>,人 CD226 由 318 个氨基酸残基组成,胞膜外区的 232 个氨基



a) SDS-PAGE; b) Western blotting; 1) hCD226D1-Fc; 2) hCD226D2-Fc; 3) Negative control; M) Protein marker

图 3 hCD226D1-Fc 和 hCD226D2-Fc 融合蛋白的 SDS-PAGE 和 Western blot 分析

Fig 3 SDS-PAGE and Western blot analysis of the purified hCD226D1-Fc and hCD226D2-Fc fusion proteins

酸残基形成了 2 个 IgSF V 样结构域<sup>[4]</sup>。CD226 的配体有 2 种:CD155 和 CD112。CD226 在人、猴和猴中序列高度保守,提示 CD226 与其配体相互作用发挥着十分重要的生物学作用<sup>[10]</sup>,其研究近年来逐渐受到重视。CD226 分子介导 T 细胞的杀伤、活化以及分化<sup>[3,8]</sup>,并且作为 NK 细胞的一种主要活化性受体,与其它 NK 细胞表面的受体协作参与 NK 细胞对靶细胞的杀伤<sup>[6]</sup>。CD226 与配体的作用还在 NKT 细胞凋亡中发挥调节作用<sup>[11]</sup>。

鉴于 CD226 多方面的功能,确定 CD226 发挥配受体相互作用的分子机制显得十分重要。贾卫等<sup>[12]</sup>表达并鉴定了胞膜外区截短体的膜型表达形式,本实验则是对蛋白可溶形式分子的表达和分析,有利于蛋白的大量制备、纯化和进一步的功能研究<sup>[13]</sup>。在本试验中,我们采用的真核表达载体含有 Ig 链的信号肽基因,保证了融合蛋白的高效分泌表达。并且在载体中插入了编码 IgG1 Fc 段的基因,可表达带有 Fc 标签的融合蛋白,有助于下一步的检测、纯化和应用<sup>[14]</sup>。我们将 CD226 分子胞膜外区的 D1 和 D2 基因分别插入到真核表达载体 pSecTag2B 中,测序及酶切鉴定结果均正确,瞬时转染后,免疫印迹结果证实融合蛋白得到成功表达。分泌性融合蛋白 hCD226D1-Fc 和 hCD226D2-Fc 的成功表达,可以为研究 CD226 与 CD155 或 CD112 相互作用的分子机制及生物学功能提供重要的实验基础。

[ ]

[1] Burns GF, Triglia T, Werkmeister JA, et al. TLI SA, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors [J]. J Exp Med, 1985, 161 (5) : 1 063 - 1 078.

(下转第 505 页)

转移结节数,结果发现 CXCL10 治疗明显抑制了肺转移。

这项研究中,我们重点探索了免疫趋化因子 CXCL10 联合顺铂对肿瘤肺转移的抑制作用,对进一步探索肺癌的联合治疗途径具有重要意义,同时也为 CXCL10 的进一步临床应用打下基础。CXCL10 的抗血管生成作用我们已另文发表<sup>[6]</sup>,CXCL10 联合顺铂抑制肿瘤肺转移是否完全依赖于抗血管生成作用,尚需进一步研究。

( :此研究部分工作在四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室完成,特此致谢)

[ ]

- [1] 孙 燕. 每位呼吸科医师都应关注肺癌的防治[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 4(1): 1 - 3.
- [2] 赵伟鹏, 朱 波, 段玉忠, 等. 衰变加速因子在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(1): 58 - 60.
- [3] Arriagada R, Bergman B, Dunant A, *et al.* Cisplatin-based adjuvant chemotherapy in patients with completely resected non-small-cell lung cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350(4): 351 - 360.
- [4] Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma interferon trans-

criptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins [J]. *Nature*, 1985, 315(78): 672 - 676.

- [5] Sgadari C, Angiolillo AL, Chernerly BW, *et al.* Interferon inducible protein 10 identified as a mediator of tumor necrosis *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(1): 13 791 - 13 796.
- [6] Li G, Tian L, Hsu JM, *et al.* Improved therapeutic effectiveness by combining cisplatin with recombinant CXCL10 in solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(11): 4 217 - 4 224.
- [7] Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333(1): 1 757 - 1 763.
- [8] Sparano JA, Gray R, Gantoni B, *et al.* Evaluating antiangiogenesis agents in the clinic: the Eastern Cooperative Oncology Group portfolio of Clinical Trials [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(4): 1 206 - 1 211.
- [9] Teicher BA, Sotomayor EA, Huang ZD. Antiangiogenic agents potentiate cytotoxic cancer therapies against primary and metastatic disease [J]. *Cancer Res*, 1992, 52(23): 6 702 - 6 704.

( 李海鸥)

(上接第 501 页)

- [2] Scott JL, Dunn SM, Jin B, *et al.* Characterization of a novel membrane glycoprotein involved in platelet activation [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(23): 13 475 - 13 482.
- [3] Shibuya A, Campbell D, Hannum C, *et al.* DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes [J]. *Immunity*, 1996, 4(6): 573 - 581.
- [4] Sherrington PD, Scott JL, Jin BQ, *et al.* TLISA1 (PTA1) activation antigen implicated in T cell differentiation and platelet activation is a member of the immunoglobulin superfamily exhibiting distinctive regulation of expression [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(35): 21 735 - 21 744.
- [5] Shibuya A, Lanier LL, Phillips JH, *et al.* Protein kinase C is involved in the regulation of both signaling and adhesion mediated by DNAX accessory molecule-1 receptor [J]. *J Immunol*, 1998, 161(4): 1671 - 1676.
- [6] Bottino C, Castriconi R, Pende D, *et al.* Identification of PVR (CD155) and nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(4): 557 - 567.
- [7] 陈丽华, 金伯泉, 贾 卫, 等. 一种新的人内皮细胞可诱导性粘附分子 PTA1 的表达、调变及粘附功能 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, 16(1): 23 - 26.
- [8] Shibuya K, Shirakawa J, Kameyama T, *et al.* CD226 (DNAM-1) is involved in lymphocyte function-associated

antigen 1 costimulatory signal for naive T cell differentiation and proliferation [J]. *J Exp Med*, 2003, 198(12): 1 829 - 1 839.

- [9] 户 义, 刘雪松, 朱 勇, 等. 抗 Ig 融合蛋白 Fc 段单克隆抗体的制备、鉴定和应用研究 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2003, 19(2): 170 - 171.
- [10] Fang T, Demin L, Haibin X, *et al.* Isolation of cDNAs encoding gibbon and monkey platelet and T cell activation antigen 1 (PTA1) [J]. *DNA Sequence*, 1999(3): 10: 155 - 161.
- [11] Deng T, Liu S, Wu Q, *et al.* CD226 expression deficiency causes high sensitivity to apoptosis in NK T cells from patients with systemic lupus erythematosus [J]. *J Immunol*, 2005, 174(3): 1 281 - 1 290.
- [12] 贾 卫, 刘雪松, 张新海, 等. 人 CD226 (PTA1) 分子胞膜外区截短体真核表达载体的构建、表达及其识别结构域的分析 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23(1): 9 - 13.
- [13] 薛松果, 范丽安. 人 LAIR-1-IgFc 融合蛋白基因真核细胞表达载体的克隆及鉴定分析 [J]. *免疫学杂志*, 2006, 22(3): 348.
- [14] 段文元, 白云, 张华欣, 等. 人 PD-1-Fc 融合分子的构建及其在 CHO 细胞中的表达与鉴定 [J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(6): 460 - 462.

( 李海鸥)