

· 论著 ·

文章编号: 1007 - 8738 (2009) 05 - 0396 - 04

人 DC-SIGN全长编码区基因的克隆及其胞外段的原核表达

刘莹, 左大明, 卢晓, 张丽芸, 陈政良* (南方医科大学基础医学院免疫学教研室, 广东广州 510515)

Cloning of the intact encoding gene of human DC-SIGN and prokaryotic expression of its extracellular region

LIU Ying, ZUO Daming, LU Xiao, ZHANG Liyun, CHEN Zheng-liang*

Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

[Abstract] **AM:** To obtain the intact encoding gene of human DC-SIGN and express its extracellular region in *E. coli*. **METHODS:** The intact cDNA encoding human DC-SIGN was amplified from total RNA of placenta of healthy parturient by RT-PCR, and its extracellular region was inserted into prokaryotic expression vector pET-41a. The recombinant plasmid pET-41a-sDC-SIGN was transformed into *E. coli* BL21 (DE3). The expressed product was purified by GST affinity chromatography and identified by SDS-PAGE and Western blot. **RESULTS:** The DNA fragment of about 1 300 bp was amplified by RT-PCR, and cloned into pGM-T vector to obtain the recombinant plasmid pGM-DC-SIGN. The DNA fragment encoding the extracellular region of human DC-SIGN was amplified from pGM-DC-SIGN plasmid and the recombinant expression vector pET-41a-sDC-SIGN was constructed. The component of M_r 66 000 in the purified recombinant product was found to be recognized by anti-DC-SIGN antibody. **CONCLUSION:** The cDNA of human DC-SIGN is cloned and the protein of its extracellular region is obtained successfully, which lay the foundation for further research on functions of DC-SIGN.

[Keywords] DC-SIGN; gene cloning; extracellular domain; protein expression

[摘要] 目的: 克隆人 DC-SIGN 全长编码区基因, 获得其胞外段的原核表达产物。方法: 采用 RT-PCR 方法, 从健康产妇胎盘中克隆 DC-SIGN 全长 cDNA, 扩增其胞外段基因并构建 pET41a-sDC-SIGN 重组表达质粒, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达, 以 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定表达产物。结果: 从健康产妇胎盘总 RNA 中, 扩增获得约 1 300 bp 的 DNA 片

段, 克隆至 pGM-T 载体获得重组质粒 pGM-DC-SIGN。从 pGM-DC-SIGN 扩增 DC-SIGN 的胞外段基因, 构建重组表达质粒 pET-41a-sDC-SIGN; 纯化表达产物 sDC-SIGN-GST, 鉴定其相对分子质量 (M_r) 为 66 000, Western blot 证明其可与抗 DC-SIGN 抗体特异性结合。结论: 成功克隆 DC-SIGN 全长编码区基因, 并在大肠杆菌中成功表达其胞外段融合蛋白 sDC-SIGN-GST, 为进一步研究 DC-SIGN 的功能奠定了基础。

[关键词] DC-SIGN; 基因克隆; 胞外区; 蛋白表达

[中图分类号] R392.1 **[文献标识码]** A

树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是抗原提呈功能最强的专职抗原提呈细胞, 通过其表面多种识别受体, 启动并调控特异性免疫应答。其中 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptor, CLR) 是一类重要的天然免疫模式识别受体, 可广泛结合病原体的糖基。DC 特异性的结合细胞间黏附分子 3 的非整合素 (DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin, DC-SIGN) 属于 DC 表面 CLR, 是 M_r 44 000 的 II 型跨膜蛋白。DC-SIGN 肽链从 N 端至 C 端依次为胞质区、跨膜区、颈区和糖识别域 (carbohydrate recognition domain, CRD), 四聚体是其基本功能单位。其 CRD 识别并结合糖基, 天然配基是细胞或病原体表面的岩藻糖、Lewis 糖、甘露糖等^[1]; 胞质区主要参与抗原的内吞。人 DC-SIGN 基因位于 19p13^[2]。DC-SIGN 主要分布在除朗格汉斯细胞以外的不成熟 DC 表面^[3]。DC-SIGN 可与 T 细胞表面细胞间黏附分子 3 (intercellular adhesion molecule 3, ICAM-3) 结合, 参与初始 T 细胞的活化; 亦能与血管内皮细胞上的细胞间黏附分子 2 (intercellular adhesion molecule 2, ICAM-2) 结合, 介导 DC 的黏附与迁移^[4, 5]。DC-SIGN 通过捕获、提呈抗原和分泌细胞因子, 参与免疫应答。然而, DC-SIGN 与某些病原体表面糖基结合后, 不但不能触发有效的免疫应答, 反而逆转 DC 的功能, 成为其在体内播散的载体, 导致机体持续感染。这些病原体包括 HIV、结核分枝杆菌、幽门螺杆菌、肺炎杆菌、Ebola 病毒、登革热病毒、巨细胞病毒、Sindbis 病毒、马尔堡病毒、利氏曼原虫、血吸虫、烟曲霉菌、白色念珠菌等^[6-8]。目前认为这些病原体或绕过抗原提呈途径, 或改变 Toll 样受体信号传导通路, 阻止 DC 的成熟, 削弱 T 细胞应答,

收稿日期: 2008 - 10 - 25; 接受日期: 2009 - 02 - 26

作者简介: 刘莹 (1972 -), 女, 吉林长春人, 博士生

* Corresponding author, Tel: 020-61648477

E-mail: zhchen@fmmu.com

逃避免疫攻击。最近报道, DC-SIGN 可与肿瘤细胞表面的糖蛋白结合, 且肿瘤浸润 DC 均为不成熟 DC, 提示肿瘤细胞通过与 DC-SIGN 结合, 抑制 DC 的成熟^[9]。因此, DC-SIGN 是一把双刃剑, 不仅参与体内重要的生理功能, 也与多种病原体致病及肿瘤发病有着密切的关系。

本实验中, 我们克隆了 DC-SIGN 的全长编码区基因, 构建其胞外段的原核表达载体并在大肠杆菌中表达, 为进一步探讨 DC-SIGN 在生理和疾病状态下的双重功能奠定了一定的物质基础。

1 材料和方法

1.1 材料 TOP10F⁺ BL21 (DE3) 菌株为本室保存。RTase M-MLV (RNaseH⁻)、LA *Taq* 酶、T4 DNA ligase、限制性内切酶 (*Bam*H I、*Eco*R I)、dNTP、Oligo (dT)₁₈ 购自 TaKaRa 公司。pGM-T vector、DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、快速质粒提取试剂盒和增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒购自 TANGEN 公司。pET-41a 质粒购自 Invitrogen 公司。抗 DC-SIGN 抗体 (DCN46) 购自美国 BD Biosciences Pharmingen 公司。抗 GST 亲和层析柱系 GE Healthcare Life Sciences 公司产品。超滤膜购自 Millipore 公司。HRP 羊抗小鼠 IgG 购自 Jackson 公司。健康产妇产胎盘来自南方医院, 取得产妇本人同意, 符合医学伦理要求。

1.2 DC-SIGN 全长编码区基因的克隆 新鲜胎盘组织分装后于液氮中保存, 将其研磨成粉末状, TRzol 法提取总 RNA, 以 RTase M-MLV (RNaseH⁻) 将其逆转录为 cDNA。根据 GenBank 中 DC-SIGN 基因序列 (NM_021155), 以软件 primer 5.0 设计扩增 DC-SIGN 编码区基因的 2 对引物。第一对引物 P1 序列为 5'-TGGGGTGACA TGAGTGAC-3', P2 序列是 5'-CGAGGAGGAAGAA TCTGAC-3'; 第二对引物 (巢式引物) P3 序列是 5'-GCTGGGGTGACA TGAGTGACT-3', P4 序列为 5'-TACTTGC-TACGCAAGGAGGGG-3'。引物由赛百盛公司合成。以 cDNA 为模板, 采用 LA *Taq* 酶进行巢式 PCR, 扩增 DC-SIGN 全长编码区基因。PCR 反应体系为 20 μ L。第一轮 PCR 反应参数为: 95 预变性 5 min; 95 变性 30 s, 52 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 延伸 10 min。第二轮 PCR 反应参数是: 95 预变性 5 min, 95 变性 30 s, 57 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 延伸 10 min。取 PCR 产物进行电泳鉴定, 凝胶回收试剂盒纯化 DNA, 并连接至 pGM-T 载体。将连接产物转化 TOP10F 感受态菌, 进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落培养扩增后, 提取质粒进行 PCR 鉴定, 将阳性克隆送 TaKaRa 公司测序。鉴定正确的重组质粒命名为 pGM-DC-SIGN。

1.3 重组表达质粒 pET-41a/ Δ DC-SIGN 的构建及鉴定 以重组质粒 pGM-DC-SIGN 为模板, 设计扩增 DC-SIGN 胞外段基因的引物: P5 序列为 5'-CGGGA TCCAAGG TCCCA GCTC-CATAAGT-3', P6 序列为 5'-CCGGAATCCAAGG TCGAAG-GATG-3'。PCR 反应体系为 20 μ L, 反应参数为 95 预变性

5 min; 95 变性 30 s, 57.5 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 延伸 10 min。纯化 PCR 产物, 将其与 pET-41a 质粒分别用 *Bam*H I、*Eco*R I 进行双酶切, 16 连接 8 h。连接产物转化 TOP10F 感受态菌, 进行蓝白斑筛选。挑取白色菌落扩增, 提取质粒以 *Bam*H I、*Eco*R I 行双酶切鉴定, 对酶切分析正确的重组质粒送上海英骏生物技术有限公司行双向测序。

1.4 融合蛋白 Δ DC-SIGN-GST 在大肠杆菌中的诱导表达及纯化 将鉴定正确的重组表达质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, 蓝白斑筛选。挑取白色菌落, 接种于含 Kanamycin 的 LB 液体培养基中, 37 振荡培养过夜活化。按 10% 比例转种于同种液体培养基中, 37 振荡培养至 $A_{600\text{nm}} = 0.6 \sim 1.0$, 加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 30 继续培养 8 h。离心收集菌体, 经超声波裂解细菌后, 分别收集沉淀和上清, 进行 SDS-PAGE 分析蛋白表达形式。沉淀经洗涤后, 溶解于 8 mol/L 尿素溶液中, 用渐降浓度的尿素溶液进行梯度透析复性。将复性后蛋白溶于 0.01 mol/L PBS 中, 超滤离心浓缩。用抗 GST 亲和层析柱纯化融合蛋白, 以 SDS-PAGE 鉴定纯化蛋白。

1.5 表达产物的 Western blot 分析 纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE 分离后, 电转移至 PVDF 膜, 以 30 g/L 脱脂奶粉于 4 封闭过夜。加入抗 DC-SIGN 抗体, 于室温反应 1 h, 洗涤后加入 HRP 羊抗小鼠 IgG 抗体于室温反应 30 min, 洗涤后用 DAB 显色试剂盒显色。

2 结果

2.1 DC-SIGN 编码区基因的克隆 以健康产妇产胎盘总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增获得约 1 300 bp 产物 (图 1), 与目的基因 DC-SIGN 开放阅读框长度相符。将其克隆入 pGM-T 载体, 选取阳性克隆测序, 结果与 GenBank 中 DC-SIGN 基因 (NM_021155) 比对, 有 6 个碱基差异, 分别为 C154T、T162A、T188C、A552G、T1004C 和 T1076C。此阳性克隆命名为 pGM-DC-SIGN。

2.2 重组表达载体 pET41a- Δ DC-SIGN 的构建及鉴定 从 pGM-DC-SIGN 扩增 DC-SIGN 的胞外段基因, 插入表达质粒 pET-41a, 构建的重组表达质粒 pET-41a- Δ DC-SIGN 经双酶切, 获得约 6 000 bp 和 1 300 bp 两个片段。其中前者为载体片段, 后者系目的片段 (图 2)。测序结果正确。

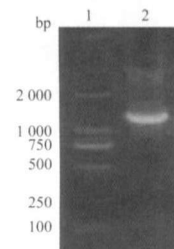


图 1 DC-SIGN 基因 PCR 扩增结果

Fig 1 The result of DC-SIGN gene amplification using PCR
1: DNA marker; 2: PCR product of DC-SIGN gene

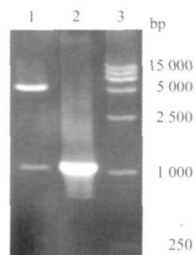


图2 重组载体 pET41a-ΔDC-SIGN的酶切鉴定

Fig 2 Identification of recombinant vector pET-41a/ΔDC-SIGN by restriction enzyme digestion

1: pET41a-ΔDC-SIGN digested with *Eco*R I and *Bam*H I; 2: PCR product of ΔDC-SIGN gene; 3: DNA marker

2.3 融合蛋白 ΔDC-SIGN-GST的表达、纯化及鉴定

转化 pET-41a-ΔDC-SIGN 的细菌经诱导培养后, 超声破碎菌体, 以 SDS-PAGE 分析诱导后菌体、包涵体及细菌裂解上清中的蛋白, 发现目的蛋白主要存在于包涵体, 其 M_r 约 66 000, 与 ΔDC-SIGN-GST 融合蛋白的计算 M_r 值相符, 将包涵体进行复性、超滤并纯化后, 得到纯度较高的蛋白 (图 3)。

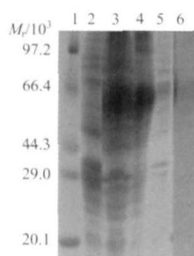


图3 SDS-PAGE分析重组表达产物的 SDS-PAGE分析

Fig 3 Analyses of the recombinant product by SDS-PAGE

1: Protein marker; 2: BL21 (DE3); 3: ΔDC-SIGN induced with IPTG; 4: Inclusion body; 5: Lysate; 6: Purified ΔDC-SIGN.

2.4 Western blot结果

以抗 DC-SIGN 单克隆抗体进行 Western blot 分析, 发现融合蛋白可与抗 DC-SIGN 抗体特异性结合 (图 4), 证明该融合蛋白含有 DC-SIGN。



图4 融合蛋白 ΔDC-SIGN-GST 纯化产物的 Western blot 分析

Fig 4 Analysis of ΔDC-SIGN-GST by Western blot

1: ΔDC-SIGN-GST; 2: BL21 (DE3).

3 讨论

早在 1992 年, Cruits 等从人胎盘中分离到一种

可以结合 HM-1 包膜糖蛋白的分子, 后来命名为 DC-SIGN。随后许多研究发现, DC-SIGN 不仅参与 T 细胞活化等重要的生理功能, 也在多种病原体感染中扮演重要角色。病原体与 DC-SIGN 结合后, 可“绑架”DC, 使之成为病原体播散的载体, 逃避宿主的免疫攻击, 造成慢性感染。2000 年 3 月, 《Cell》同一期发表 3 篇关于 DC-SIGN 研究的文章。从此, DC-SIGN 分子倍受人们关注。

DC-SIGN 全长编码区基因的克隆是本实验的关键。在设计引物及选用 *Taq* 酶时, 要充分考虑模板的特点。DC-SIGN 基因编码区的 GC 含量为 53%, 但局部 GC 含量较高, 属于复杂模板。本实验应用不同的 *Taq* 酶摸索条件, 并采用巢式 PCR 进行基因扩增, 即利用 2 对 PCR 引物扩增完整的片段, 可增加扩增片段的特异性。我们最终选用 LA *Taq* 酶, 成功扩增出 DC-SIGN 全长编码区基因。测序结果与 GenBank 中相应基因比对, 存在 6 个碱基差异, 分别为 C154T、T162A、T188C、A552G、T1004C 和 T1076C。其中 2 个位于跨膜区, 2 个位于颈区, 2 个位于 CRD 区。这 6 个碱基的差异引起 4 个氨基酸变异, 分别位于跨膜区 (L52F)、颈区 (V63A) 和 CRD 区 (L335P、F359S)。这是由于 DC-SIGN 基因在不同种族之间存在多态性。颈区介导该蛋白的寡聚化, 形成螺旋, 而寡聚化是 DC-SIGN 与相应糖基配体结合的结构基础; CRD 则以钙离子依赖方式与相应的糖基结合。故颈区和 CRD 的变异可能影响 DC-SIGN 的空间构象, 从而影响其与相应配体的结合, 可能与不同人群对不同病原体的易感性有关。

DC-SIGN 属于 I 型 CLR, 即 C 端位于胞外段。我们构建了 DC-SIGN 胞外段 (aa61 ~ 404, 包括颈区和 CRD) 原核表达载体, 在大肠杆菌中表达, 目的蛋白主要位于包涵体。用尿素进行梯度透析, 可防止蛋白在透析过程中变性。蛋白经超滤管离心后, 可去除盐分并达到浓缩的目的而且不影响蛋白的活性。SDS-PAGE 及 Western blot 结果显示, 在 M_r 66 000 出现特异条带, 证明融合蛋白带有 DC-SIGN 并可与抗 DC-SIGN 抗体特异结合。

许多感染性疾病, 尤其是病毒感染性疾病的致病机理及其防治一直是医学界的难题。DC-SIGN 作为双刃剑, 不仅为 DC 的研究带来新的热点, 也为感染性疾病的防治提供了新的靶标。以 DC-SIGN 为靶点, 改变免疫活化与免疫抑制之间的平衡, 可为感染性疾病的防治提供新的思路。我们进行了 DC-SIGN 全长编码区基因的克隆及胞外段蛋白表达, 下一步

(下转 405 页)

而转染 pDsRed1-C3/LOC51255重组质粒的 HpG₂ 细胞,其融合蛋白则集中表达于细胞质,这与我们前期的序列分析结果相符。

总之,我们利用基因克隆技术成功构建了 LOC51255与 pDsRed1-C3的融合表达质粒,并转染至 HpG₂ 细胞,结果提示 LOC51255在 HpG₂ 细胞中可能主要在细胞质内发挥作用。LOC51255红色荧光表达载体的成功构建、表达及定位为该基因的进一步功能研究奠定了基础。

致谢:感谢上海复旦大学生命学院遗传所季朝能教授对本课题的协助和支持!

参考文献:

- [1] 李付广,杨桂枝,王芳,等.重组人肝脏胶原样凝集素 1 在中国仓鼠卵巢细胞内定位 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24 (6): 617 - 619.
 - [2] Wolfsberg TG, McEntyre J, Schuler GD, et al. Guide to the draft human genome [J]. *Nature*, 2001, 409(15): 824 - 826.
 - [3] Zahra A, Alireza A, Shahana A, et al. Finishing the euchromatic sequence of the human genome [J]. *Nature*, 2004, 431(21): 931 - 945.
 - [4] Brophy TM, Raab M, Daxecker H, et al. RN181, a novel ubiquitin E3 ligase that interacts with the KVGFFKR motif of platelet integrin alpha (Ib) beta3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 369(4): 1088 - 1093.
 - [5] Lorick KL, Jensen JP, Fang S, et al. RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11364 - 11369.
 - [6] Singh RK, Iyappan S, Scheffner M. Hetero-oligomerization with MdmX rescues the ubiquitin/Nedd8 ligase activity of RING finger mutants of Mdm2 [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 10901 - 10907.
 - [7] Takano Y, Adachi S, Okuno M, et al. The RING finger protein, RNF8, interacts with retinoid X receptor alpha and enhances its transcription-stimulating activity [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(18): 18926 - 18934.
 - [8] Guo WJ, Zeng MS, Yadav A, et al. Mel-18 acts as a tumor suppressor by repressing Bmi-1 expression and down-regulating Akt activity in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(11): 5083 - 5089.
 - [9] Marot D, Opolon P, Bailly-Tabard S, et al. The tumor suppressor activity induced by adenovirus-mediated BRCA1 overexpression is not restricted to breast cancers [J]. *Gene Ther*, 2006, 13: 235 - 244.
 - [10] Badciong JC, Haas AL. MdmX is a RING finger ubiquitin ligase capable of synergistically enhancing Mdm2 ubiquitination [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(51): 49668 - 49675.
-
- (上接 398页)
- 将制备其抗体,为进一步探索 DC-SIGN与病原体感染的关系提供研究工具。通过深入研究,希望能揭示 DC-SIGN在病原体免疫逃逸过程中所起的作用,并为以 DC-SIGN为靶的感染性疾病防治提供有前景的治疗策略。
- 参考文献:
- [1] Steirman RM. DC-SIGN: A guide to some mysteries of dendritic cells [J]. *Cell*, 2000, 100(5): 491 - 494.
 - [2] Soilleux EJ, Barten R, Trowsdale J. DC-SIGN: a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13 [J]. *J Immunol*, 2000, 165(6): 2937 - 2942.
 - [3] Feinberg H, Mitchell DA, Drickamer K, et al. Structural basis for selective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR [J]. *Science*, 2001, 294(5549): 2163 - 2166.
 - [4] Geijtenbeek TBH, Torensma R, van Vliet SJ, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses [J]. *Cell*, 2000, 100(5): 575 - 585.
 - [5] Bleijs DA, Geijtenbeek TBH, Figdor CG, et al. DC-SIGN and LFA-1: a battle for ligand [J]. *Trends Immunol*, 2001, 22(8): 457 - 463.
 - [6] Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Koppel EA, et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function [J]. *J Exp Med*, 2003, 197(1): 7 - 17.
 - [7] Ji X, Olinger GG, Aris S, et al. Mannose-binding lectin binds to Ebola and Marburg envelope glycoproteins, resulting in blocking of virus interaction with DC-SIGN and complement-mediated virus neutralization [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(9): 2535 - 2542.
 - [8] 季莉平. DC-SIGN和 DC-SIGNR与 HIV-1传播的关系 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(5): 643 - 645.
 - [9] van Gisbergen KP, Aamoudse CA, Meijer GA, et al. Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(13): 5935 - 5944.