

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)07-0627-03

## 人可溶性 CD40L cDNA 的克隆及表达

赵振国 江 渝 彭家和 (第三军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室 重庆 400038)

Cloning of human sCD40L cDNA and construction of vector for expression in *E. coli*

ZHAO Zhen-Guo JIANG Yu PENG Jia-He

Department of Biochemistry and Molecule Biology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

**【Abstract】** AIM: To clone human sCD40L(184-831) cDNA and construct a prokaryotic vector for expression in *E. coli*.**METHODS:** The human sCD40L(184-831) cDNA was amplified with the total RNA from the human tonsil by reverse transcriptase (RT)-PCR, and was analyzed by enzymatic digestion and sequencing. Then, the insert of human sCD40L(184-831) cDNA was cloned into the vector pET-28a+ for expression in BL21, and then the interest protein was identified by Western blot. **RESULTS:** The result of sequencing was accordant with the one reported. The prokaryotic expression vector was constructed successfully and the interest protein was expressed in BL21. **CONCLUSION:** The human sCD40L(184-831) cDNA has been successfully cloned and a prokaryotic system been constructed for expression. The interest protein was expressed successfully in BL21.**【Keywords】** CD40L; cloning; prokaryotic expression**【摘要】** 目的: 利用基因技术克隆 CD40L 分子的胞外区 184~831 片断 cDNA 构建其原核表达载体, 从而建立原核表达体系。方法: 采用 RT-PCR 方法从人扁桃体的总 RNA 中扩增 CD40L 分子 184~831 片断的 cDNA 以限制性酶切和 DNA 测序进行鉴定, 并将目的片断克隆至原核表达载体 pET-28a+, 让重组质粒在 BL21 中表达, 利用 Western blot 鉴定目的蛋白。结果: 克隆到人 sCD40L 分子 184~831 片断的 cDNA, DNA 测序结果与报道的完全一致, 构建了该片断的原核表达载体, 且目的蛋白能在 BL21 中表达。结论: 成功克隆人 sCD40L 分子 184~831 片断的 cDNA 并构建了其原核表达载体。在 BL21 中成功表达了目的蛋白。**【关键词】** CD40L; 克隆; 原核表达**【中图分类号】** Q78 **【文献标识码】** A

收稿日期 2006-02-28; 接受日期 2006-03-02

通讯作者: 江 渝. Tel (023) 68752263 Email yujiang61@gmail.com

作者简介: 赵振国. 硕士生(导师江 渝). Tel (023) 60823515

Email zhangtian2046@126.com

## 0 引言

人 CD40L 由 261 个氨基酸残基组成, 为典型的 II 型跨膜蛋白, CD40L 包括胞浆内区、跨膜疏水区及胞浆外区组成, 其中胞膜外区 214 个氨基可形成可溶性蛋白, 与其膜型分子一样可与 B 细胞表面的 CD40 分子交连传递信息, 不仅参与体液免疫, 而且参与炎症反应, 在疾病的发病机制和临床治疗中具有重要作用<sup>[1]</sup>。在本文中, 利用反转录聚合酶链反应从人扁桃体组织总 RNA 中扩增出人 CD40L 基因胞外区 47~261 氨基酸残基的 cDNA 序列, 并利用原核表达载体构建了其重组表达质粒, 为该序列蛋白质的进一步的功能研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 所用的人扁桃体组织是由西南医院耳鼻喉科提供, pUC19 质粒 pET28a+ 质粒 DH5 $\alpha$  菌种和 BL21 菌种是由第三军医大学生化与分子生物学教研室保存。限制性内切酶 *Bam*H I、*Pst* I 购自大连宝生物公司, Tripure 总 RNA 抽提试剂盒等购自 Roche 公司; RT2PCR 试剂盒购自 Promega 公司, PCR 产物回收纯化试剂盒购自天为时代公司。用液氮罐把新鲜的扁桃体组织从西南医院取回, 按 Roche 公司 Tripure 试剂盒操作指南从培养细胞中提取细胞总 RNA。

## 1.2 方法

**1.2.1 反转录 PCR (RT-PCR)** 扩增 184~831 片断的 CD40L 基因, 引物根据 GenBank 库的 CD40L cDNA 序列设计, 上游引物为: GCGGATCC CATAGAA GGTGGACAAG, 含 *Bam*H I 酶切位点, 下游引物为: GCCTGCAGTCAGAGTTTGAGTAAGCC 含 *Pst*I 酶切位点。(引物由上海生工公司合成) 按 RT2PCR 试剂盒说明进行, 其扩增参数为: 50  $\mu$ L 总反应体积, 2  $\mu$ L 抽提的总 RNA 为模板, 48 $^{\circ}$ C 反转录 45 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min; 然后以 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 2 min 的程序循环 35 次, 68 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。在 PCR 仪上进行扩增, PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 扩增基因片断预期为 648 bp。

**1.2.2 重组质粒 pUC19 的构建和鉴定** 将 PCR 产物及 pUC18 质粒经酶切后用纯化试剂盒回收, 以 T4

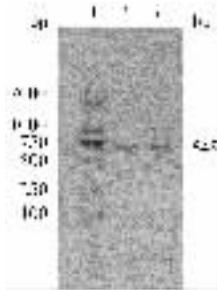
DNA 连接酶 4℃ 连接 16 h , 常规氯化钙法转化 DH5α α2 互补筛选 , 经碱裂法提取质粒 , 用限制性酶切分析和 DNA 序列测定进行了鉴定( 序列测定由上海生工公司完成 ) .

1.2.3 原核表达载体的构建 大量扩增、抽提鉴定过的重组质粒 , 用限制性内切酶消化 , 经琼脂糖凝胶电泳回收相应片段 , 再将该片段连接于 pET28a + 表达载体 , 转化 BL21 菌种后 , 少量提取质粒 , 以限制性酶切进行鉴定 .

1.2.4 sCD40L 的表达及鉴定 经过酶切鉴定阳性的 pET28a + -sCD40L 克隆在 IPTG 的诱导下表达 sCD40L , 用 SDS-PAGE 蛋白电泳检测蛋白的表达 , 用 his 抗体进行 Western blot 鉴定目的蛋白 .

### 2 结果

2.1 RT-PCR 以人扁桃体组织提取总 RNA , 以总 RNA 为模板 , RT-PCR 扩增出一特 R 异性条带 , 位置相当于 648 bp , 与预期的大小一致( 图 1 ) .



1 Marker 2 3 : PCR 反应物 .

图 1 RT-PCR 图

2.2 PCR 产物克隆及重组质粒序列测定 分别用限制性内切酶 BamH I Pst I 消化 PCR 产物和 pUC19 质粒 , 以 T4 DNA 连接酶连接后 , 转化感受态 E. coli DH5α , 经 α2 互补筛选出白色菌落 , 再用限制性酶切鉴定 , 得到的重组子进行 DNA 序列测定 , 酶切鉴定( 图 2 ) .

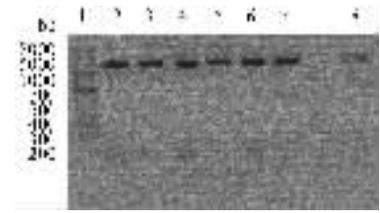


1 Marker 6 12 阴性重组子 ; 其余 阳性重组子 .

图 2 pUC19-sCD40L 酶切鉴定图

2.3 原核表达质粒的构建 对经序列测定确证的重组质粒 DNA 用 BamH I Pst I 双酶切 , 经琼脂糖电泳

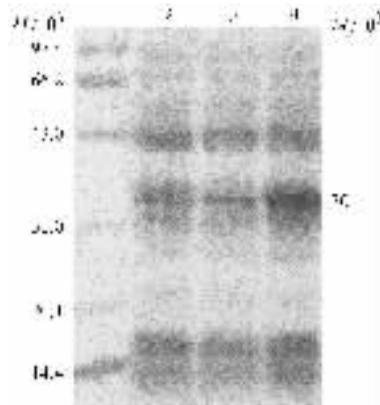
回收目的片段 , 然后将其定向克隆至新型原核表达载体 pET28a + , 用限制性酶切方法鉴定重组子 . 结果获得了预期大小的 DNA 片段( 图 3 ) .



1 : 1 kb plus marker ; 2 4 6 pET28a + 酶切 ; 3 5 7 pET28a + -sCD40L .

图 3 pET28a + -sCD40L 酶切鉴定

2.4 sCD40L 的表达及鉴定 经过酶切鉴定阳性的 pET28a + -sCD40L 克隆在 IPTG 的诱导下表达 sCD40L , 用 SDS-PAGE 蛋白电泳检测蛋白的表达( 图 4 ) , 由于 pET28a + 带有 his 标签 , 所以表达的蛋白尾端带有多聚组氨酸 , 用 his 抗体进行 Western blot 鉴定目的蛋白( 图 5 ) .



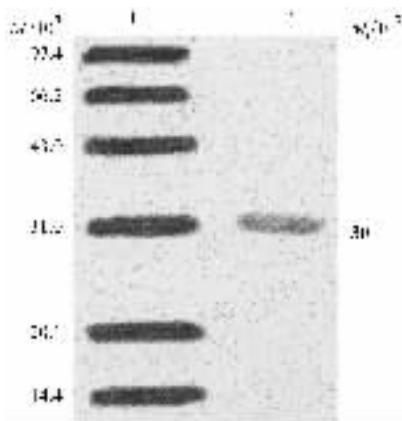
1 Marker ; 2 不含有质粒的 BL21 蛋白表达 ; 3 : 含重组质粒但未诱导 BL21 蛋白表达 ; 4 : 含重组质粒诱导后 BL21 蛋白表达 , 约在 M<sub>r</sub> 30 × 10<sup>3</sup> 处有目的蛋白 .

图 4 sCD40L 的 SDS-PAGE 电泳

### 3 讨论

CD40 配体( CD40L ) , 即 CD154 , gp39 , 肿瘤坏死因子相关激活蛋白( TNF associated activation protein , TRAP ) , T 细胞-B 细胞活化分子( T cell-B cell-activating molecule , T-BAM ) , 一种与 TNF 家族同源的膜蛋白<sup>[2]</sup> , 不仅存在于 CD4 + T 细胞表面 , 而且在其他细胞表面也发现有表达 , 其表达受多种因素调节 . CD40L 的膜结合型与 sCD40L 均具有活性 , 且均以同源三聚体形式存在<sup>[2]</sup> . CD40L 首先在激活的 CD4 + T 细胞发现 , 随后发现在肥大细胞 , 自然杀伤细胞都有表达 . 现在研究认为动脉粥样硬化是一种炎症反应性疾病 , 在动脉粥样硬化的炎症反应中 ,

CD40L 参与了炎症反应的全过程. CD40L 不仅在炎症初期诱导产生 VCAM-1 引发炎症,而且还会在炎症中期诱导巨噬细胞产生组织因子加重炎症,其中诱导巨噬细胞产生的 metalloproteinase-1 会进一步损害血管壁<sup>[3]</sup>. 所以抑制 CD40L 的功能会抑制动脉粥样硬化的血管壁损害<sup>[4]</sup>,CD40L 也被认为是动脉粥样硬化发生、发展的关键分子.



1 小分子蛋白 Marker; 2 目的蛋白.

图5 Western blot 鉴定 sCD40L 蛋白

研究发现,CD40L 与 CD40 相互作用不仅在体液免疫中起作用,而且发现可促进抗原呈递细胞的成熟,上调 ICAM-1,CD80 和 CD86 的表达,以及促进 IL-12 的分泌,从而增强 CD8<sup>+</sup> CTL 的应答,在细胞免疫中发挥重要作用. 另外,近来发现 CD40L 与 CD40 相互作用可诱导单核细胞产生白细胞介素-1 以及 TNF $\alpha$  等炎症因子,抑制单核细胞和淋巴细胞凋亡,从而在动脉粥样硬化的炎症反应中起重要作用<sup>[5]</sup>.

因此,CD40L 在基础免疫和临床疾病研究中有重要的应用价值.

在本研究中,通过 RT-PCR 的方法从人扁桃体组织中成功地克隆出人 CD40L 分子胞外区 184 ~ 831 氨基酸残基的 cDNA 片段,并通过序列分析加以确证,还构建了原核表达体系,为后续基因工程研究奠定了基础. 在所建立的表达体系中,采用了原核表达载体 pET28a + 质粒,并在原核细胞中成功表达. 由于所选的载体 pET28a + 末端带有 his 标签,因此纯化时,选用能与 his 结合的镍离子亲和层析柱,获得纯度较高的表达蛋白,为进一步制备 sCD40L 抗体,研究动脉粥样硬化的发生奠定了坚实的基础.

### 【参考文献】

- [1] Mulhaupt F, Matter CM, Kwak BR, et al. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells [J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(3): 755-766.
- [2] Anand SM, Juan F, Gonzales V, et al. Membrane-associated CD40 and sCD40L in atherothrombotic disease [J]. Thromb Haemost, 2003, 90: 377-384.
- [3] Pillariseti S, Alexander CW, Saxena U. Atherosclerosis - new targets and therapeutics [J]. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents, 2004, 2: 327-334.
- [4] Elkind MS, Rundek T, Sciacca RR, et al. Interleukin-2 levels are associated with carotid artery intima-media thickness [J]. Clin Invest, 2001, 107: 1255-1262.
- [5] Lawson C, Ainsworth ME, McCormack AM, et al. Effect of cross-linking ICAM-1 on the surface of human vascular smooth muscle cells: induction of VCAM-1 but no proliferation [J]. Cardiovasc Res, 2001, 50(3): 547-555.

编辑 许昌泰

### · 期刊文摘 · 超抗原对 NK 细胞 CD226 分子表达与功能的调节

[张 贇,程 光,韩卫宁,曹云新,金伯泉. 细胞与分子免疫学杂志 2006 22(1): 4-6]

目的:研究超抗原对 NK 细胞 CD226 分子表达与功能的调节. 方法:以超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素 A/B (SEA/B) 活化 PBMC 为模型,应用双重免疫荧光染色和流式细胞术分析,观察 CD226 分子在 NK 细胞上的变化;采用<sup>51</sup>Cr 释放实验,观察 NK 细胞在超抗原作用下杀伤功能的改变;利用激光共聚焦显微镜,观察 CD226 分子在 NK 细胞杀伤相的分布. 结果:在静止 PBMC 中,CD56<sup>+</sup> NK 细胞的百分率为 12.3%,CD56<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> 细胞仅为 1.4%. 当效靶比为 5:1 时,NK 细胞对 K562 细胞的杀伤率为 (3.2 $\pm$ 0.2)%. 当 0.1 mg/L SEA 或 SEB 刺激 PBMC 1 d 后,CD56<sup>+</sup> NK 细胞的百分率分别为 13.5% 和 14.1%,CD226 在 NK 细胞上的表达水平明显升高,且主要表达在 CD56<sup>dim</sup> 细胞上. 在刺激第 2 天,SEA 组 CD56<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> 占 CD56<sup>+</sup> 细胞 69.1%,SEB 组 CD56<sup>+</sup> CD226<sup>+</sup> 占 CD56<sup>+</sup> 细胞 64.3%. 刺激第 3 天,CD226 在 NK 细胞上的表达水平较第 2 天明显下降. 在超抗原 0.1 mg/L 作用 3 d 中,SEA 组和 SEB 组 NK 细胞杀伤率均明显高于同期未刺激组 NK 细胞的杀伤率及新鲜分离 NK 细胞的杀伤率 ( $P < 0.05$ ),在作用的第 2 天,SEA 组和 SEB 组杀伤率均达到峰值分别为 (82.3 $\pm$ 6.9)% 和 (80.6 $\pm$ 7.5)%. 激光共聚焦结果显示,CD226 分子与 LFA21 分子共定位于 NK 细胞与 K562 细胞的接触部位. 结论:超抗原 SEA 和 SEB 可提高 NK 细胞杀伤活性,可能与其促进 CD226 分子在 NK 细胞上的表达相关,CD226 分子可能参与 NK 细胞免疫突触的形成.