

[文章编号] 1007-385X(2003)02-00115-04

人 T 细胞受体 ζ 链基因在昆虫细胞中的表达

韩 扬, 周春霞, 马文波, 王冬梅, 张叔人(中国协和医科大学中国医学科学院肿瘤医院研究所免疫室, 北京 100021)

[摘要] 目的: 克隆人 T 细胞受体 (TCR) ζ 链基因, 运用昆虫杆状病毒系统表达该蛋白。方法: 用 RT-PCR 从人外周血单个核细胞 (PBMC) 中克隆 TCR ζ 链 cDNA, 构建到昆虫杆状病毒系统专用的 Transfer 载体中, 并与杆状病毒共转染昆虫 sf9 细胞。用 SDS-PAGE 电泳和用小鼠抗人 ζ 链蛋白的单抗在流式细胞仪中鉴定重组蛋白的表达。结果: 克隆的人 TCR ζ 链 cDNA 插入昆虫杆状病毒载体, 并在昆虫 sf9 细胞中特异地表达了蛋白。表达量约为细胞裂解上清液总蛋白的 11%。经 SDS-PAGE 分析, 其分子量大小与预期的重组 ζ 链蛋白一致。用胞内标记流式细胞仪检测证实, 转染重组杆状病毒的昆虫细胞含有人的 ζ 链蛋白。结论: 从人 PBMC 中成功克隆了 T 细胞受体 ζ 链的基因, 并在昆虫细胞中获得高效表达。用生物工程技术获得 TCR ζ 链蛋白有利于深入研究其生物学功能。

[关键词] T 细胞受体; ζ 链; 杆状病毒; 昆虫细胞

[中图分类号] R392 [文献标识码] A

Expression of Human T Cell Receptor ζ Chain Gene in Insect Cell

HAN Yang¹, ZHOU Chun-xia, MA Wen-bo, WANG Dong-mei, ZHANG Shu-ren² (1. Department of Infectious Diseases, Peking Union Medical College Hospital; 2. Department of Immunology, Cancer Institute, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

[Abstract] **Objective:** To clone human T cell receptor (TCR) ζ chain gene and express its encoding protein by baculoviral expression system in insect cells. **Methods:** TCR ζ chain cDNA was cloned from normal human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by RT-PCR and inserted into baculoviral transfer vector. This vector was co-transfected with baculovirus into insect sf9 cells. The recombinant protein expressed was identified by SDS-PAGE and flow cytometry with mouse anti-human ζ chain monoclonal antibody. **Results:** Human TCR ζ chain cDNA cloned and inserted into baculoviral vector specifically expressed protein in the insect sf9 cells, accounting for about 11% of the total protein yield in the supernatant of cell lysate. The molecular weight of the recombinant protein determined by SDS-PAGE was identical to what we anticipated. The insect cells transfected with recombinant baculovirus were demonstrated by intracellular labeling flow cytometry to express ζ chain protein. **Conclusion:** Human T cell receptor ζ chain gene was successfully cloned from human PBMC, and its encoding protein was highly expressed in insect cells. The TCR ζ chain protein obtained by bioengineering technique is useful for in depth biological function study.

[Key words] TCR; ζ chain; baculovirus; insect cell

* 人 T 细胞的膜上表达的 ζ 链是一种跨膜信号分子, 其成熟肽链的 cDNA 为 426 bp, 蛋白约为 16 kD。 ζ 蛋白在胞外部分较短, 为 9 个氨基酸残基, 而胞浆内则有 113 个氨基酸残基, 并具有多个酪氨酸磷酸化位点。它以二聚体参与构成 T 细胞受体 (TCR)/CD3 复合物, 负责向胞内传递 T 细胞活化的信号^[1]。在肿瘤免疫治疗中, 细胞免疫是关键因素。最近的研究表明, 肿瘤患者免疫功能低下的原因之一就是肿瘤及其微环境下调

了 T 细胞中 ζ 蛋白的水平^[2-3]。为了制备抗体和深入研究 ζ 链的功能、表达调节机制, 以及与疾病的关系, 我们克隆了人的 ζ 链基因, 运用基因重组技术, 采用昆虫和杆状病毒系统表达 ζ 链蛋白。

[作者简介] 韩 扬 (1973-), 男, 安徽六安人, 硕士, 主要从事肿瘤免疫和 AIDS 免疫研究, 现工作于北京协和医院感染内科。

[通讯作者] 张叔人, E-mail: zhangsr@pubem.cicams.ac.cn

1 材料与方法

1.1 主要材料

RNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒购自博大公司。RT-PCR 试剂盒、Taq 酶等购自 TaKaRa 公司。限制性内切酶购自 MBI 公司。测序载体 pUCm-T Vector 购自上海生工公司。淋巴细胞分离液购自中国医学科学院血研所。*E. coli* 菌株 DH5a 由本实验室提供。昆虫细胞表达试剂盒购自 PharMingen 公司,昆虫细胞专用培养基购自 BD 公司,昆虫细胞 sf9 由医科院肿瘤所病毒室孙亚洲老师和清华大学庞海老师惠赠。PE 荧光标记的小鼠抗人 ζ 蛋白的单克隆抗体购自 Coulter 公司。PCR 引物由上海生工公司合成。

1.2 人 ζ 链基因的克隆

取健康成年人外周血,用淋巴细胞分离液经密度梯度离心分出单个核细胞,按试剂盒说明提取细胞总 RNA,再用随机引物通过逆转录得到 cDNA。根据实验要求, ζ 链基因上游引物 5'-GGAATTCGCAGAGCTTTG-GC-3' 引入 EcoRI 酶切位点,下游引物 5'-GCTCAGATTAGCGAGGGGGC-3' 引入 Xba I 酶切位点。 ζ 链 cDNA 全长为 426 bp,PCR 产物的长度达到 444 bp。PCR 采用 25 μ l 体系,反应条件和过程为:94 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 50 $^{\circ}$ C 65 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min 终止反应。

将玻璃奶纯化的 PCR 产物与测序载体 pUCm-T Vector 连接,在 DH5a 内扩增后用 EcoR I, Xba I 双酶切和 PCR 测定挑选出阳性克隆,经测序后在 Genebank 中作同源性比较。

1.3 ζ 链的昆虫表达质粒构建

将含有 ζ 链阳性克隆的 pUCm-T vector 用 EcoR I, Xba I 双酶切下人的 ζ 链基因,与同样酶切的昆虫表达专用 Transfer Vector 连接形成重组质粒。经双酶切和 PCR 鉴定后的重组载体在 DH5a 内扩增,纯化后备用。

1.4 昆虫 sf9 细胞的培养

sf9 细胞置于昆虫细胞专用的培养基中,27 $^{\circ}$ C 培养,每间隔 12~24 h 换液。

1.5 重组杆状病毒转染昆虫 sf9 细胞

按照 PharMingen 的说明,将杆状病毒和重组的 Transfer vector 混合后共转染昆虫 sf9 细胞,并设无 transfer vector 的对照组。5 d 后收获培养上清和 sf9 细胞,培养上清中含有重组的杆状病毒;细胞经专用裂解液处理后,12 000 g 离心 45 min,取上清液,用 SDS-PAGE 蛋白电泳银染色鉴定。

1.6 重组病毒滴度的噬斑分析和扩增

在直径为 100 mm 的平皿中加 2×10^7 sf9 细胞,使

细胞均匀平铺;将原始转染上清按 10^{-3} , 10^{-4} 和 10^{-5} 稀释后分别加到平皿中,27 $^{\circ}$ C 培养 1 h,使病毒感染昆虫细胞;同时准备 2% 的低熔点琼脂糖在无蛋白培养基中用微波加热,使胶溶化并用水浴冷却到 45 $^{\circ}$ C 后与室温预热的完全培养基等体积混合;趁热将混合的胶倒入平皿中,待胶凝固后置于 27 $^{\circ}$ C 的潮湿环境中培养约 6~10 d,噬斑在暗视野或 45 度侧强光下可见。根据噬斑数计算出病毒滴度,并筛选出单个重组病毒。

取 100 ml 低滴度的病毒转染 2×10^7 sf9 细胞,27 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后用 12 000 r/min 离心收集上清,4 $^{\circ}$ C 避光保存。

1.7 人 ζ 链基因在昆虫细胞中表达

在直径为 150 mm 的平皿中加入 2×10^7 sf9 细胞,使培养基的体积在 30 ml 左右,将适当滴度的病毒液 1 ml 加到平皿中,27 $^{\circ}$ C 培养 3~4 d,离心 1 000 r/min,5 min,收集细胞。裂解细胞后用 12 000 g 离心 45 min 去除细胞碎片和沉淀,上清中含有重组蛋白。随后,用 SDS-PAGE 和银染色鉴定 ζ 链蛋白的表达。用生物学软件 TotalLab v1.11 分析电泳结果。

1.8 用流式细胞术鉴定重组人 ζ 链蛋白在昆虫细胞中的表达

取 1×10^6 个转染病毒的 sf9 细胞在流式检测管中,用含 2% 多聚甲醛的 PBS 固定,再用含 0.1% Triton-X100,10% FCS 和 0.01% NaN₃ 的 PBS 处理,离心后加 10 μ l 用 PE 标记的小鼠抗人 ζ 链的单抗,4 $^{\circ}$ C 避光放置 45 min, PBS 洗 3 遍,用 1 ml PBS 悬浮细胞,在流式细胞仪(FACS)上测定其荧光强度,同时用正常 sf9 细胞和 Isotype Ig 做对照实验。

2 结果

2.1 RT-PCR 获得人 ζ 链 cDNA

从健康人外周血单个核细胞中提取的总 RNA,用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳观察提取的细胞总 RNA 的质量,结果 18S 和 28S 条带清晰(图略)。

人成熟 ζ 链的 cDNA 为 426 bp,加上两端引入的酶切位点,PCR 产物应为 444 bp。实验中 RT-PCR 产物的电泳结果显示所获得的基因片段与预期大小一致(图 1)。

2.2 克隆人 ζ 链基因序列的鉴定

ζ 链 RT-PCR 产物连入 pUCm-T 质粒,以克隆后的重组质粒为模板,用 ζ 链进行 PCR 鉴定,结果显示所获 PCR 产物与 ζ 链大小一致(图 2A)。该重组质粒用 EcoR I 和 Xba I 双酶切,同样可得到 444 bp 的片段(图 2B)。鉴定后的重组质粒经测序后,与 NCBI 的 Genebank 进行同源性比较,结果显示本实验中克隆的

基因与人 ζ 链 cDNA 序列 100% 吻合(图略)。

2.3 重组 Transfer vector 中 ζ 链基因的鉴定

在 Transfer vector 中含有和昆虫杆状病毒上一基因特定部位两端相同的同源重组序列,而目的基因正是插在载体的同源重组序列中的多克隆位点上,在适当的 buffer 中载体上的同源序列区可以同源重组到杆状病毒的基因上,从而实现目的基因导入杆状病毒并实现外源蛋白的表达。从重组 pUCm-T 质粒中双酶切出 ζ 链的 cDNA 连接到 Transfer vector 上,重组后的克隆用 PCR 和双酶切鉴定。电泳显示所获片段与预计大小一致(图 3)。

2.4 SDS-PAGE 银染色鉴定昆虫细胞表达人 ζ 链蛋白
实验中用含有 ζ 链 cDNA 的重组杆状病毒转染昆虫 sf9 细胞 4 d 后,离心收获细胞并裂解细胞。从 SDS-PAGE 电泳图中可见感染重组病毒的 sf9 细胞裂解液中含有新的电泳带,用 TotalLab v1.1 软件分析蛋白电泳结果,分子量约为 19 kD 和预计重组蛋白大小相近(此蛋白为融合蛋白,其中包括 6 个组氨酸及酶切位点多肽序列)。其表达量约占裂解上清液蛋白总量的 11%(图 4)。

图 3 用 PCR 和双酶切鉴定重组 Transfer vector 上人 ζ 链 cDNA 的

Fig. 3 Identification of human ζ chain cDNA in transfer vector by PCR and double enzyme-digestion

M: Marker; 1 and 3: double-digested identification; 2 and 4: PCR identification

图 1 RT-PCR 克隆 ζ 链基因的电泳结果

Fig. 1 Results of electrophoresis of ζ chain gene produced by RT-PCR

M: Marker; 1-5: RT-PCR results

图 4 人 ζ 链重组蛋白在昆虫细胞 sf 9 中表达

Fig. 4 Expression of recombinant human ζ chain protein in insect sf 9 cells

M: Marker; 1: ζ chain expression in baculovirus transfected sf9 cell; 2: Lysate of normal sf 9

图 2 重组质粒用 PCR 和双酶切鉴定插入的 ζ 链基因

Fig. 2 Identification of inserted ζ chain gene in recombinant plasmid by PCR and double enzyme-digestion

M: Marker; 1-4: Identification of PCR product;

A: PCR identification; B: Double enzyme-digestion

2.5 流式细胞检测人 ζ 链蛋白在昆虫细胞 sf9 中的表达

为了进一步验证昆虫细胞表达的特异蛋白就是人 ζ 链蛋白,我们采用细胞内单抗标记的流式荧光检测方法进行了验证。特异性抗体为 PE 荧光标记的小鼠抗人 ζ 链蛋白的单抗。取感染病毒 4 d 后的昆虫细胞做检测,流式结果为阳性,实验中的正常昆虫细胞和无

关抗体对照则为阴性结果(图5)。因此,进一步证实了重组人ζ链蛋白在昆虫细胞中获得高效表达,并且保留了完好的抗原性。

功用昆虫系统表达了人ζ链蛋白,并保留了完好的抗原性。

目前,对ζ链传递信号的通路知之甚少,它与疾病的关系有待于深入研究。ζ链重组蛋白在昆虫系统中高效表达为制备ζ链抗体和深入研究ζ链功能和下游信号传导机制,以及与疾病的关系打下了基础。

图5 流式细胞仪检测重组人ζ链蛋白在昆虫细胞 sf9 中的表达

Fig. 5 Expression of recombinant human ζ chain protein in insect sf9 cells detected by FACs

3 讨论

ζ链一直被认为是 TCR/CD3 复合物的组成部分,但最近的研究显示,ζ链作为专门的信号蛋白,和 TCR/CD3 的形成是不同的,现在更倾向认为这是一种信号蛋白家族^[4]。目前发现该分子除了特异的表达在 T 细胞膜上以外,在 NK 细胞上也有表达。该链专门负责传递 T 和 NK 细胞的活化信号,所以ζ链蛋白水平和功能的异常都会对免疫细胞的活性产生影响^[5]。在肿瘤免疫领域的研究中发现,患者机体免疫能力的低下和ζ链蛋白的水平相关^[6]。

昆虫表达系统能高效的表达外源蛋白,特别是有真核系统的翻译后加工、修饰,使重组蛋白能最大限度的接近天然蛋白的结构和生物学活性^[7]。本实验中成

[参考文献]

- [1] Khattri R, Sperling AI, Qian D, et al. TCR-gamma delta cells in CD3 zeta-deficient mice contain Fc epsilon RI gamma in the receptor complex but specifically unresponsive to antigen [J]. J Immunol, 1996, 157(6): 2320-2327.
- [2] Kurt RA, Urba WJ, Smith JW, et al. Peripheral T lymphocytes from women with breast cancer exhibit abnormal protein expression of several signaling molecules[J]. Int J Cancer, 1998, 78(1): 16-20.
- [3] Whiteside TL. Signaling defects in T lymphocytes of patients with malignancy [J]. Cancer Immunol Immunother, 1999, 48: 346-352.
- [4] Finke JH, Zea AH, Stanley J, et al. Loss of T cell receptor chain and p56lck in T cell infiltrating human renal cell carcinoma [J]. Cancer Res, 1993, 53: 5613-5616.
- [5] Healy CG, Simons JW, Carucci MA, et al. Impaired expression and function of signal transducing zeta chains in peripheral T cells and natural killer cells in patients with prostate cancer[J]. Cytometry, 1998, 32: 109-119.
- [6] Kuss I, Saito T, Johnson JT, et al. Clinical significance of decreased zeta chain expression in peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5: 329-334.
- [7] Kidd IM, Emery VC. The use of baculoviruses as expression vector [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1993, 42: 137-159.

[收稿日期] 2002-11-20

[修稿日期] 2003-01-20

《肿瘤》期刊 2003 年征订启事

《肿瘤》期刊创刊于 1981 年,公开发行人。《肿瘤》是肿瘤专业的学术期刊,为国内中文科技核心期刊,入选《中文核心期刊要目总览》肿瘤学类核心期刊。为国内众多医学院校指定的博士、硕士生科研论文刊登期刊,深受广大肿瘤科研工作者的厚爱。本刊主要报道有关肿瘤的基础和实验研究以及西医、中西医结合的临床研究成果。设有肿瘤研究的著名学者撰写论文的专家论坛、国内外肿瘤前沿研究的快速报道以及流行病学研究、基础研究及临床研究、综述等栏目。主要读者对象为从事肿瘤防治和研究工作的中、高级医务科技人员和医学院校的师生。欢迎广大作者投稿。

《肿瘤》邮发代号 4-289,双月刊,大 16 开本,每期 88 页,每册定价 9.00 元,全年 54.00 元。全国各地邮局均可订阅,欢迎订阅。如邮局订阅延误,可汇款到上海市斜土路 2200 弄 25 号(邮编 200032)上海市肿瘤研究所《肿瘤》编辑部补订。

联系电话:(021)64047029-2301

E-mail: tumor@sci.shmu.edu.cn