

HLA-G1的基因表达、纯化及其活性分析*

汤海洋^{1,2}, 张彦明¹, 汪 蕴², 刘亚兵², 丰美福²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国科学院动物研究所 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100080)

[摘 要] 在获得HLA-G1 cDNA 克隆序列的基础上, 构建了pGEX-4T2-HLA-G1 原核表达载体, 对HLA-G1 的诱导表达发现, 融合蛋白以包涵体形式存在于表达菌中。进一步溶解包涵体, 改善复性条件, 最终获得高纯度的GST/HLA-G1 融和蛋白。⁵¹Gr 释放试验表明, 纯化的HLA-G1 具有抑制NK 细胞对靶细胞的杀伤活性。

[关键词] HLA-G1; 原核表达; 蛋白纯化; 融合蛋白; 蛋白活性

[中图分类号] Q 344⁺. 13

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)07-0016-05

人类白细胞抗原 G (Human leukocyte antigen G, HLA-G) 属于一种非经典的主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex I, MHC-I) 类分子, 与 HLA-A, B 和 C 等经典的 MHC-I 类分子的不同之处在于其具有如下几个特征: 低多态性, HLA-G 无论在核苷酸还是氨基酸水平上均表现出较低的多态性, 这可能与诱导天然母胎免疫耐受的功能相关; 组织限定性分布。经典的 MHC-I 类分子几乎在所有的有核细胞中均有表达, 而 HLA-G 最早发现时仅在母胎界面的绒毛外细胞滋养层细胞有高表达; 选择性拼接。目前发现 HLA-G 共有 7 个同种异型体, 包括 4 种膜结合形式 (G1~ G4) 和 3 种可溶性形式 (G5~ G7), 主要因其 mRNA 转录时的选择性拼接而产生^[1~ 3]。母胎界面的细胞滋养层细胞为 HLA-A, B 阴性, 其特异性表达 HLA-G 分子, 提示 HLA-G 可能在保护滋养层细胞免受自然杀伤细胞 (Natural killer cell, NK 细胞) 的杀伤过程中起着重要作用。Chumbley 等^[4]首先研究证实, 转染 HLA-G 的 LCL 721.221 能够抑制 NK 细胞对其的杀伤; 后来的研究^[5, 6]还发现, HLA-G 能抑制抗原特异性细胞毒性 T 细胞 (Cytotoxic T lymphocyte, CTL) 反应, 以及同种免疫的 T 淋巴细胞的增殖反应, 这为人们解决异体移植中的免疫排斥问题带来了新的希望。此外, 在某些类型的肿瘤细胞中, 有学者发现不同水平 HLA-G 的 mRNA 转录产物和蛋白分子的表达, 认为这可能是肿瘤细胞逃避机体免疫监视的一个重要机制^[7, 8]。因此, 对 HLA-G 分

子生物学结构与功能的研究是基础免疫学研究中最活跃的课题之一。

本实验室从健康人外周血单个核细胞中, 克隆了中国人 HLA-G1 的 cDNA 序列, 构建了 pGEMT-HLA-G1 载体, 并对其蛋白结构进行了预测。在此基础上, 将编码 HLA-G1 的胞外区结构域 (274 个氨基酸) cDNA 片断亚克隆到原核表达载体 PGEX-4T-2 上, 并诱导表达和纯化出 HLA-G1 蛋白, 以期为进一步探讨 HLA-G 蛋白结构与功能的关系, 研究 HLA-G 与特异性受体结合及其信号转导过程奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pGEM-T-HLA-G 为本室构建, pGEX-4T-2 原核表达载体、宿主菌 DH5 α 和 BL 21 DE3, 均为本室保存。限制性内切酶 *Bam*H I, *Xho* I, *T4* DNA 连接酶等为 Gibco 公司产品。质粒提取试剂盒购自博亚公司。Glutathione Sepharose 4B 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品。IPTG, DTT, Ure 等化学试剂均为 Promega 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 对 pGEM-T-HLA-G 载体进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳回收目的片段 HLA-G。按照常规方法与相同限制酶酶切的表达载体 PGEX-4T-2 进行连接反应, 构建表达质粒 pGEX-4T2-HLA-

* [收稿日期] 2003-06-05

[基金项目] 生物膜与膜生物工程国家重点实验室开放课题资助项目

[作者简介] 汤海洋 (1975-), 男, 江苏盐城人, 在读硕士, 主要从事分子病原学与免疫学研究。

G, 转化宿主菌 DH5 α , 挑取阳性克隆, 进行酶切鉴定并测序。

1.2.2 转化及诱导表达 鉴定无误后, 提取 pGEX-HLA-G 质粒转化表达菌 *E. coli* BL 21 (DE3), 挑取阳性克隆, LB 培养基(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜, 按 1:100 接种量转移到新鲜 LB 培养基, 继续扩增至 A₆₀₀ 为 0.6~1.0 时, 加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 继续培养 4 h, 离心收集菌体, SDS-PAGE 检测表达情况。

1.2.3 包涵体的溶解和蛋白复性 培养物 7 000 $\times g$ 离心 10 min, 收集菌体, 细菌裂解液 (PBS, 5 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lysozyme, pH 7.8) 重悬冰置 15 min 后, 超声破碎, 以 12 000 $\times g$ 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 分别取上清及沉淀物, SDS-PAGE 检测表明, 目的蛋白存在于包涵体中。因此, 对菌体沉淀用包涵体洗涤液 (PBS, 5 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF, 体积分数 2% Triton 100, pH 7.8) 重悬, 以 1 2000 $\times g$ 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 去上清后加入包涵体裂解液 (PBS, 8 mol/L Urea, 5 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L DFP, pH 7.8) 室温放置 30 min。待包涵体完全溶解后, 以 12 000 $\times g$ 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 取上清加体积分数 20% 甘油, 透析。

1.2.4 表达产物的纯化 参照 Marchal-Bras-Goncalves 等^[9]的方法, 用 Glutathione-SepharoseTM 4B 亲和层析柱纯化。透析后蛋白溶解液以 20 000 $\times g$ 离心 30 min, 取上清按每 400 mL 菌体培养液加入 20 μL Glutathione-SepharoseTM 4B 的比例于 4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌混合 16 h, 目的蛋白被充分吸附后装柱, 用 10 倍柱床体积的 PBS 洗柱 3 次以上, 直至 A₂₈₀ 为基线水平。再用洗脱液 (50 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L GSH) 洗脱, 紫外吸收法测定蛋白含量。

1.2.5 融合蛋白的免疫学检测 融合蛋白的 Western 印迹检测按照常规方法进行。一抗为 HLA-G1 和 HLA-G5 的特异性单克隆抗体 87G, 由美国 Fred Hutchinson 肿瘤研究中心的 Geraghty 博士馈赠。

1.2.6 融合蛋白的活性分析 以 K562 为靶细胞, 通过⁵¹Cr 释放实验检测融合蛋白对 NK 细胞杀伤作用的抑制效果。收集对数生长期的 K562 细胞, 以 1.0 $\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ 浓度重悬于 100 μL FCS 中, 加入 100 μCi 的⁵¹Cr。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 每隔 15 min 摇匀 1 次。在 V 型 96 孔板中分别加入 1.0 $\times 10^5$, 0.5 $\times 10^5$, 0.25 $\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的效应细胞 NK-92 各 50 μL , 每份

作 3 个复孔。每组分别加入 10, 5, 2.5 μg 的融合蛋白 GST/HLA-G, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 0.5 h。以未加蛋白或加入 10 μg 的蛋白 GST 为对照。靶细胞 K562 标记后用体积分数 10% FCS RPMI 1640 培养基洗涤 3 次, 调整细胞浓度为 1.0 $\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 每孔加入 50 μL 。200 $\times g$ 离心 2 min, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中孵育, 4 h 后每孔收集上清 50 μL , 测 γ 射线每分钟计数 (Bq), 按以下公式计算杀伤率:

$$\text{杀伤率} = \frac{\text{试验释放组脉冲数} - \text{自然释放组脉冲数}}{\text{最大释放组脉冲数} - \text{自然释放组脉冲数}}$$

2 结果与分析

2.1 重组质粒的构建和鉴定

用限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Xho* I 分别对 pGEM-T-HLA-G 载体和 PGEX4T2 进行双酶切, 琼脂糖电泳回收目的片段。常规方法连接后, 转化大肠杆菌 DH5, 挑选阳性克隆进行酶切鉴定, 其中目的基因 HLA-G1 片段为 822 bp, 与理论值相符 (图 1)。DNA 测序结果证实, 重组质粒中目的基因片段与 Genbank 中收录的中国人 HLA-G1 胞外区 cDNA 序列一致 (图 2)。

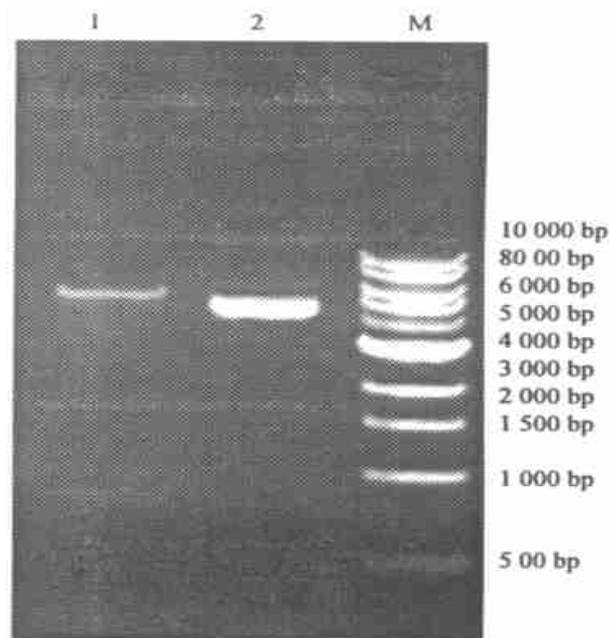


图 1 重组质粒酶切鉴定

1. 双酶切结果; 2. 重组 pGEX-4T2-HLA-G; M. Marker

Fig 1 Identification of recombinant

plasmid by restriction enzyme

1. pGEX-4T2-HLA-G digested by *Bam* H I and *Xho* I;

2. pGEX-4T2-HLA-G; M. DNA marker

2.2 融合蛋白的诱导表达

重组质粒转化 BL 21 宿主菌, 经 IPTG 诱导表

达, 以 150 g/L 的 SDS-PAGE 进行分析, 结果见图 3。可见过量表达的 GST/HLA-G 融合蛋白分子质

3. 可见过量表达的 GST/HLA-G 融合蛋白分子质

```

... CCT CCA AAA TCG GAT CTG GTT CCG CGT GGA TCC GGC TCC CAC TCC ATG AGG
TAT TTC AGC GCC GCC GTG TCC CGG CCC GGC CGC GGG GAG CCC CGC TTC ATC GCC
ATG GGC TAC GTG GAC GAC ACG CAG TTC GTG CGG TTC GAC AGC GAC TCG GCG TGT
CCG AGG ATG GAG CCG CGG GCG CCG TGG GTG GAG CAG GAG GGG CCA GAG TAT TGG
GAA GAG GAG ACA CGG AAC ACC AAG GCC CAC GCA CAG ACT GAC AGA ATG AAC CTG
CAG ACC CTG CGC GGC TAC TAC AAC CAG AGC GAG GCC AGT TCT CAC ACC CTC CAG
TGG ATG ATT GGC TGC GAC CTG GGG TCC GAC GGA CGC CTC ATC CGC GGG TAT GAA
CGG TAT GCC TAC GAT GGC AAG GAT TAC CTC GCC CTG AAC GAG GAC CTG CGC TCC
TGG ACC GCA GCG GAC ACT GCG GCT CAG ATC TCC AAG CGC AAG TGT GAG GCG GCC
AAT GTG GCT GAA CAA AGG AGA GCC TAC CTG GAG GGC ACG TGC GTG GAG TGG CTC
CAC AGA TAC CTG GAG AAC GGG AAG GAG ATG CTG CAG CGC GCG GAC CCC CCC AAG
ACA CAC GTG ACC CAC CAC CCT GTC TTT GAC TAT GAG GCC ACC CTG AGG TGC TGG
GCC CTG GGC TTC TAC CCT CGG AGA TCA TAC TGA CCT GGC AGC GGG ATG GGG AGG
ACC AGA CCC AGG ACG TGG AGC TCG TGG AGA CCA GGC CTG CAG GGG ATG GAA CCT
TCC AGA AGT GGG CAG CTG TGG TGG TGC CTT CTG GAG AGG AGC AGA GAT ACA CGT
GCC ATG TGC AGC ATG GGG GGC TGC CGG AGC CCC TCA TGC TGA GAT GGA AGC TTG
CGG CCG CAC TCG AGC GGC CGC ATC GTG ACT GAC TGA CGA TCT GCC TCG CGC ...

```

图 2 HLA-G1 核苷酸序列

Fig. 2 The sequence of HLA-G1

2.3 Western Blot 检测结果

对 87G 特异性单克隆抗体的 Western Blot 检测发现, 经 IPTG 诱导的菌体蛋白泳道在 56 ku 处出现明显的杂交条带, 而未经 IPTG 诱导的全菌蛋

白泳道中没有明显条带 (图 4), 说明转有质粒 pGEX-4T2-HLA-G1 的表达菌, 经 IPTG 诱导后有 HLA-G1 的表达。

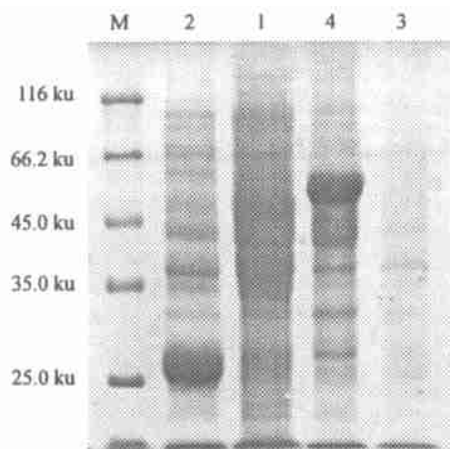


图 3 宿主菌表达 GST 和融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. Marker; 1, 3. 诱导前菌体总蛋白; 2. 质粒载体 pGEX-4T2 经 IPTG 诱导表达; 4. 重组质粒 pGEX-4T2-sHLA-G 转化菌体经 IPTG 诱导表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of fusion proteins in *E. coli* BL21

M. Protein molecular marker; 1, 3. Total cell protein before induction of expression; 2. pGEX-4T2 induced by IPTG; 4. pGEX-4T2-sHLA-G induced by IPTG

2.4 融合蛋白的纯化

融合蛋白在宿主菌中形成包涵体, 因此将诱导

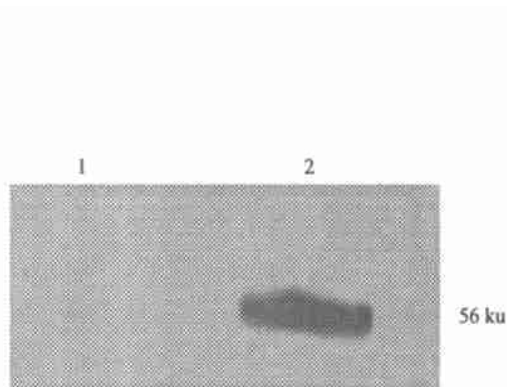


图 4 融合蛋白 GST/HLA-G 的 Western Blot 分析

1. 诱导前菌体总蛋白; 2. IPTG 诱导 4 h 后表达蛋白

Fig. 4 Western blot analysis of GST/HLA-G fusion protein

1. Total cell protein before induction;
2. Total cell protein induced by IPTG for 4 h.

菌超声裂解, 提取包涵体并洗涤、溶解、透析、浓缩后, 用 Glutathione-Sepharose™ 4B 亲和层析柱一次

纯化, SDS-PAGE 的检测结果见图 5。

2.5 融合蛋白 GST/HLA-G 抑制 NK 细胞杀伤活性分析

在以 K562 作为靶细胞的⁵¹Cr 释放试验中, 当融合蛋白 GST/HLA-G 在效靶比为 5:1 和 2.5:1 时, 能够显著抑制 NK 细胞对靶细胞的杀伤, 而空白对照组和纯化的 GST 蛋白组的杀伤率没有变化(图

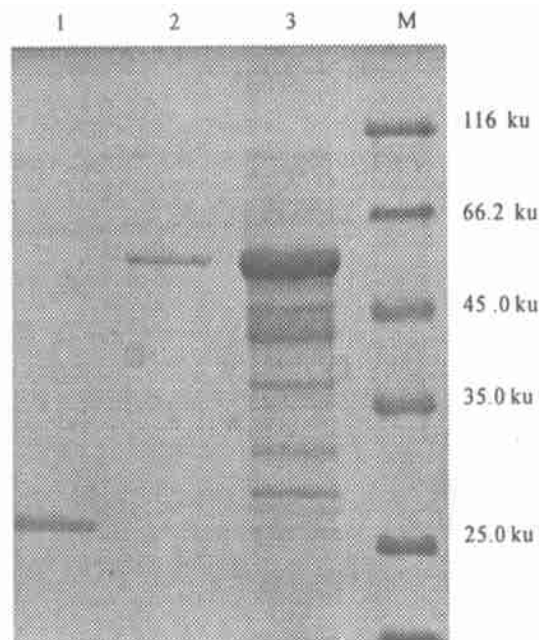


图 5 纯化的 GST 蛋白和 GST/HLA-G 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

M. Marker; 1. 纯化的 GST 蛋白; 2. GST/HLA-G 融合蛋白; 3. 重组质粒 pGEX-4T2-sHLA-G 转化菌株经 IPTG 诱导表达

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified GST and GST/sHLA-G fusion proteins

3 讨论

HLA-G 作为非经典的 MHC-I 类分子, 选择性表达于母胎界面的绒毛膜外细胞滋养层细胞, 在诱导母体和半同种异体胎儿之间的免疫耐受过程中起着重要作用。本研究应用基因工程手段, 通过原核表达获得了具有 HLA-G 生物学活性的 GST/sHLA-G1 融合蛋白。

pGEX-4T-2 是一种高效的原核表达载体, 产生的 GST 融合蛋白可用 Glutathione-Sepharose™ 4B 亲和层析柱一次纯化。但是, 在细菌中高效表达的目的蛋白多以无活性包涵体形式存在, 这虽然有利于目的蛋白的分离纯化及抵御宿主菌蛋白酶的降解等, 但关键在于如何将包涵体溶解和复性而得到有生物活性的目的蛋白。据 Marchal-Bras-

6)。随着融合蛋白浓度的增加, 这种免疫抑制作用越明显。当融合蛋白 GST/HLA-G 浓度达到 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, NK 细胞的杀伤活性几乎被完全抑制, 而 GST 蛋白对于 NK 细胞的活性没有影响。说明纯化的融合蛋白 GST/HLA-G 对 NK 细胞的杀伤活性具有抑制作用, 而这种抑制活性并非由融合蛋白的 GST 部分所引起。

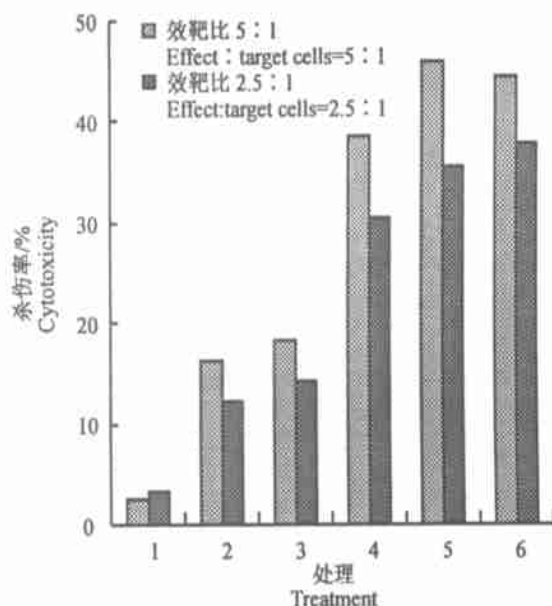


图 6 融合蛋白 GST/HLA-G 抑制 NK92 杀伤活性分析

1~4. 融合蛋白 GST/HLA-G 质量浓度分别为 10, 5, 2.5 和 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5. 空白对照; 6. GST 蛋白 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Fig. 6 GST-HLA-G mediated NK92 lysis inhibition

1~4. The concentration of GST/HLA-G was 10, 5, 2.5 and 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5. Medium; 6. GST 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Goncalves 等^[9]报道, 用 pGEX4T 系列的原核表达载体可获得可溶性 HLA-G 蛋白, 于是笔者也曾尝试使用其表达载体和诱导条件, 然而表达的目的产物始终以包涵体形式存在于表达菌株中。此外, HLA-G 蛋白结构预测表明, 其含有 2 个链内二硫键, 在包涵体复性过程中容易发生错配, 融合蛋白往往会发生聚集而形成无活性的沉淀物, 因此笔者不得不摸索融合蛋白正确折叠所需的最适过程参数, 通过降低浓度、缓慢透析以及在透析液中添加巯基乙醇和甘油等手段, 最终获得了较高的复性率。本试验证实, 经纯化的 GST/sHLA-G 融合蛋白同样具有对 NK 细胞杀伤的抑制作用, 这就为进一步用单分子技术研究 HLA-G 与其受体的相互作用机制及其信号转导过程提供了可能。

[参考文献]

- [1] Carosella E D, Khalil-Daher I, Dausset J, et al HLA-G mediates protection from natural killer cytotoxicity: implications in immune tolerance [J]. Transplantation Proceedings, 1999, 31(1- 2): 1192- 1193
- [2] Khalil-Daher I, Rouas-Freiss N, Carosella E D, et al Human Leukocyte Antigen-G: immunotolerant major histocompatibility complex molecule in transplantation[J]. World J Surgery, 2000, 24(7): 819- 822
- [3] Paul P, Cabestre F A, Ibrahim E C, et al Identification of HLA-G7 as a new splice variant of the HLA-G mRNA and expression of soluble HLA-G5, -G6, and -G7 transcripts in human transfected cells[J]. Human Immunology, 2000, 61(11): 1138- 1149
- [4] Chumbley G, King A, Robertson K, et al Resistance of HLA-G and HLA-A2 transfectants to lysis by decidual NK cells[J]. Cell Immunol, 1994, 155(2): 312- 322
- [5] Le Gal F A, Riteau B, Sedlik C, et al HLA-G mediated inhibition of antigen specific cytotoxic T lymphocytes [J]. International Immunology, 1999, 11(8): 1351- 1356
- [6] Bainbridge D R J, Ellis S A, Sergeant I L. HLA-G suppresses proliferation of CD4⁺ T-lymphocytes[J]. J Reprod Immunol, 2000, 48(1): 17- 26
- [7] Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, et al HLA-G expression in melanoma: A way for tumor cells to escape from immunosurveillance [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(8): 4510- 4515
- [8] Cabestre F A, Lefebvre S, Moreau P, et al HLA-G expression: immune privilege for tumour cells[J]. Cancer Biology, 1999, 9(1): 27- 36
- [9] Marchal-Bras-Goncalves R, Rouas-Freiss N, Connan F, et al A soluble HLA-G protein that inhibit natural killer cell-mediated cytotoxicity[J]. Transplantation Proceedings, 2001, 33(3): 2355- 2359

Expression, purification and activity identification of HLA-G1

TANG Hai-yang^{1,2}, ZHANG Yan-ming¹, WANG Yun², LIU Ya-bing², FENG Mei-fu²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 State Key Laboratory of Biomedicine and Biotechnology, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: HLA-G, which is a non-classical HLA class I molecule, plays an important role of immunotolerance. Based on the cloning of HLA-G1 cDNA, we constructed prokaryotic expression plasmid, pGEX-4T2-sHLA-G1, and transformed into *E. coli* BL 21 (DE3). GST fusion proteins highly expressed in *E. coli* after being induced by IPTG, but they formed inclusion bodies which have no native structures and no biological activities. So we had to lyse and renature them for the further research. Finally, we got purified GST/HLA-G fusion protein which can inhibit the cytotoxicity of NK cell.

Key words: HLA-G; prokaryotic expression; protein purification; fusion protein; protein activity