

网络出版时间:2019-01-24 16:29

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2019.08.001

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20190124.1627.002.html>

牛 IgG2 Fc 受体的真核表达、纯化与结晶

黄晓静^{1,2}, 李睿², 马红芳^{1,2}, 冯丽丽², 乔松林², 邓瑞广², 张改平^{1,2,3}

(1 河南农业大学 牧医工程学院, 河南 郑州 450002; 2 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002;

3 扬州大学 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009)

【摘要】【目的】制备牛 IgG2 Fc 受体(boFcγ2R)蛋白并分析其结构与生物学功能,为进一步研究其免疫学功能奠定基础。【方法】PCR 扩增 boFcγ2R 的胞外区基因片段,将其克隆至真核表达载体 pMT/BiP/V5-His A 构建重组 pMT/BiP-boFcγ2R-His 质粒,利用果蝇胚胎 *Drosophila* Schneider 2(S2)细胞表达 boFcγ2R 胞外区重组蛋白,通过镍柱亲和层析、凝胶过滤层析对目的蛋白进行纯化,利用 Dot-blot 验证其生物学功能;采用蒸汽扩散坐滴法对目的蛋白进行结晶,对晶体进行 X-ray 衍射分析;利用去糖基化酶 Endo Hf 和 PNGase F 对目的蛋白进行处理,以验证其糖基化修饰与晶体无衍射之间是否存在因果关系。【结果】PCR 扩增获得了 663 bp 的 boFcγ2R 基因胞外区片段。成功构建了 pMT/BiP-boFcγ2R-His 载体,将其转染 S2 细胞后诱导表达出 26 ku 的 boFcγ2R 胞外区重组蛋白。SDS-PAGE 结果显示,通过镍柱亲和层析、凝胶过滤层析的纯化方法得到了高纯度的 boFcγ2R 胞外区重组蛋白;Dot-blot 结果显示,该蛋白具有较好的生物学功能。蛋白结晶的 2 个条件是:体积分数 15% Tacsimate™(pH 7.0)、0.1 mol/L HEPES (pH 7.0)、20 g/L PEG 3350 和 0.1 mol/L HEPES (pH 7.5)、250 g/L PEG 3350。蛋白初筛晶体无衍射,去糖基化试验验证了 boFcγ2R 胞外区蛋白初筛晶体无衍射可能与其糖基化有关的推测。【结论】得到了高纯度的 boFcγ2R 胞外区重组蛋白,获得其初筛晶体。

【关键词】 牛 IgG2 Fc 受体;蛋白表达;蛋白结晶

【中图分类号】 S852.4⁺3

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)08-0001-07

Expression, purification and preliminary crystallization of bovine IgG2 Fc receptor

HUANG Xiaojing^{1,2}, LI Rui², MA Hongfang^{1,2},
FENG Lili², QIAO Songlin², DENG Ruiguang², ZHANG Gaiping^{1,2,3}

(1 College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2 Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou, Henan 450002, China;

3 Jiangsu Co-Innovation Center for the Prevention and Control of Important Animal Infectious Disease and Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: 【Objective】This study prepared cattle IgG2 Fc receptor proteins and analyzed its structure and immunological function to provide basis for further research on its immunological function. 【Method】The synthetic cDNA encoding the ectodomain of bovine IgG2 Fc receptor (boFcγ2R) was cloned into pMT/BiP/V5-HisA to construct the eukaryotic expression plasmid. The recombinant boFcγ2R ectodomain was expressed in *Drosophila* Schneider 2 (S2) cells, purified through Ni-chelating affinity and gel filtration

【收稿日期】 2018-07-06

【基金项目】 河南省自然科学基金重点项目(182300410001);河南省农业科学院科研发展专项资金项目(豫财预[2017]76-22, 20188118)

【作者简介】 黄晓静(1993—),女,河南濮阳人,在读硕士,主要从事动物免疫学研究。E-mail:1592829322@qq.com

【通信作者】 张改平(1960—),男,河南内黄人,院士,主要从事动物免疫学及重大疫病快速检测技术研究。
E-mail:zhanggaip@126.com

chromatography, assayed with Dot-blot, and crystalized by the sitting-drop vapor diffusion method. The crystals were detected by X-ray diffraction. The deglycosylation enzymes Endo Hf and PNGase F was used to verify the relationship between glycosylation modification and crystal non-diffraction. 【Result】 The 663 bp boFcγ2R ectodomain fragment was obtained by PCR amplification. The pMT/BiP-boFcγ2R-His vector was successfully constructed and transfected into S2 cells to induce the expression of the 26 ku recombinant boFcγ2R ectodomain. The SDS-PAGE results showed that the purity of the recombinant boFcγ2R ectodomain was up to 99% through Ni-chelating affinity and gel filtration chromatography. Dot-blot showed the boFcγ2R ectodomain had great biological function. The two conditions for protein crystallization were volume fraction of 15% Tacsimate™ (pH 7.0), 0.1 mol/L HEPES (pH 7.0), and 20 g/L PEG 3 350 and 0.1 mol/L HEPES (pH 7.5), and 250 g/L PEG 3350 conditions by sitting-drop vapor diffusion method. The primary screening crystals were not diffracted, and the deglycosylation test verified that the non-diffraction of the primary screening crystals of the boFcγ2R ectodomain may be related to its glycosylation. 【Conclusion】 High-purity recombinant protein of the boFcγ2R ectodomain and its primary screening crystals were obtained.

Key words: boFcγ2R; protein expression; protein crystallization

Fc 受体(Fc receptor, FcR)是一类特异亲和免疫球蛋白(Immunoglobulin, Ig)Fc 片段的细胞表面分子^[1-2]。FcR 广泛表达于免疫细胞表面,介导免疫细胞与抗原-抗体复合物的相互作用,从而发挥对异己物质的识别与清除、抗原处理与呈递等免疫学功能,是联系体液免疫与细胞免疫的重要桥梁^[3-5]。

根据 FcR 结合配体 Ig 种类(IgG、IgA、IgM、IgD、IgE)的不同,可将 FcR 分为 5 大类,即 FcγR、FcαR、FcμR、FcδR 和 FcεR,其中 FcγR 是最重要的一类 FcR^[6-8]。根据 FcγR 亲和力及功能的不同,可将其分为 FcγR I、FcγR II、FcγR III,分别结合不同的 IgG 亚类^[9-10]。1995 年,本研究团队首次利用牛巨噬细胞 cDNA 文库克隆出一种新的 FcγR,其与所有已发表的人和小鼠 FcγR 差异较大,但与人 I 型 FcαR(huFcαR I)相似度较高^[11-12],其只特异性亲和牛 IgG2 而不亲和人和牛 IgA,为一种新型哺乳动物 FcR,将其命名为牛 IgG2 FcR(boFcγ2R)^[11]。此后,本团队进一步研究发现,绵羊也存在 Fcγ2R 基因,该受体能结合牛和绵羊 IgG2,但不能结合绵羊 IgG1,表明 Fcγ2R 可能是反刍动物特有的一类 FcγR^[13]。

boFcγ2R 是一种跨膜糖蛋白,由 2 个胞外 Ig-like 区域 EC1(Extracellular 1)和 EC2(Extracellular 2)及包含 19 个氨基酸的跨膜区和一段短的胞质尾区组成。2001 年, Morton 等^[14-15]利用定点突变的方法研究证明,boFcγ2R 与 IgG2 特异亲和的区域位于 EC1 的 F-G loop 区,并指出第 82—85 位氨基酸是其特异性结合位点。2006 年,本研究团队利

用合成多肽技术进一步证明,boFcγ2R 第 82 位的苯丙氨酸(F82)、83 位异亮氨酸(I83)及 87 位的色氨酸(W87)在特异性亲和过程中发挥着关键作用^[16]。

FcR 及其与配体复合物的结构生物学研究,不仅可为阐明二者相互作用的分子机制提供技术支持^[17-18],同时也可作为 FcR 靶标药物的研发奠定重要基础^[19]。boFcγ2R 作为一种新型 FcR,对其三维结构进行研究,不仅能够揭示 boFcγ2R 的功能提供分子基础,也能为深入研究人类 FcR 与 Ig 的相互作用提供借鉴。本研究利用果蝇胚胎 *Drosophila* Schneider 2(S2)细胞表达系统获得了 boFcγ2R 胞外区重组蛋白,经过纯化得到了纯度高、具有活性的目的蛋白,并获得初筛晶体,旨在为后续 boFcγ2R 的结构与免疫学功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

果蝇胚胎 S2 细胞、pMT/BiP/V5-HisA、pCo-Blast 载体、牛 IgG2、猪源 CD163 重组蛋白,均为本实验室保存^[20];大肠杆菌 DH5α 感受态细胞、DL2000 DNA Marker,均购自大连宝生物有限公司;Q5® High-Fidelity DNA 聚合酶、限制性核酸内切酶 *Bgl* II、*Mlu* I 及 T4 DNA 连接酶,均购自美国 New England Biolabs 公司;DNA 回收试剂盒,购自北京天根生化有限公司;E. Z. N. A.® Plasmid Midi Kit 质粒提取试剂盒,购自美国 OMEGA 公司;Cellfectin® II Reagent 阳离子脂质体转染试剂、果蝇胚胎 S2 细胞无血清培养基 Sf-900 II (serum-

free medium, SFM)、筛选抗生素 blasticidin S HCl, 均购自美国 Invitrogen 公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS), 购自美国 Gibco 公司;纯化用镍填料、Superdex 200 Increase 10/300 GL 预装柱, 均购自美国 GE 公司;His 标签抗体(anti-6×His tag monoclonal antibody), 购自武汉三鹰生物技术有限公司;山羊抗小鼠酶标二抗(goat-anti-mouse IgG-HRP), 购自美国 Abbkine 公司;偏二氟乙烯膜(polyvinylidene fluoride, PVDF)、硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC)、超滤管, 均购自美国 Millipore 公司;化学发光 HRP 底物显色液、彩虹 180 蛋白 Marker、245 plus 蛋白 Marker、BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 均购自北京索莱宝科技有限公司;果蝇胚胎 S2 细胞培养基(Schneider's insect medium)、去糖基化酶 Endo Hf 和 PNGase F, 均购自美国 Sigma 公司;48 孔晶体板及结晶试剂盒, 购自美国 Hampton Research 公司。

1.2 pMT/BiP-boFcy2R-His 重组表达载体的构建

从 GenBank 下载 *boFcy2R* 全长基因序列(GenBank 登录号: NM-001001138), 交由上海生工生物工程有限公司合成 *boFcy2R* 全长基因, 根据其全长氨基酸序列, 采用 TMHMM Server v. 2.0 软件预测 *boFcy2R* 胞外区片段。根据预测的 *boFcy2R* 胞外区片段序列, 利用 Prime5 软件设计 1 对 PCR 扩增引物。其中上游引物 F: 5'-GAAGATCTCAGGTGCAGGCCGGCACCTTC-3' (下划线标识 *Bgl* II 酶切位点), 下游引物 R: 5'-CGACGCGTATTCTGCATGGTGTAATCGGCCAC-3' (下划线标识 *Mlu* I 酶切位点)。以 *boFcy2R* 全长基因为模板, 使用 Q5 高保真 DNA 聚合酶对 *boFcy2R* 胞外区进行 PCR 扩增, PCR 反应体系按照 Q5 高保真 DNA 聚合酶使用说明配制, 同时设置以水代替模板的体系作为阴性对照。PCR 反应体系 (50 μ L) 为: 2×Master Mix 25 μ L, 上游引物 *boFcy2R*-F (10 μ mol/L) 2 μ L, 下游引物 *boFcy2R*-R (10 μ mol/L) 2 μ L, 模板 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。反应条件为: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 二次延伸 10 min。PCR 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后回收。

回收的 *boFcy2R* 胞外区片段经 *Bgl* II 和 *Mlu* I 双酶切处理后, 与经同样双酶切处理的 pMT/BiP/V5-HisA 通过 T4 DNA 连接酶进行连接, 构建 pMT/BiP-boFcy2R-His 重组表达载体, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 通过氨苄

青霉素抗性(氨苄青霉素的质量浓度为 100 μ g/mL) 筛选获得单克隆菌落; 挑选 5 个单克隆菌落进行 PCR 鉴定, 将阳性克隆送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.3 pMT/BiP-boFcy2R-His 果蝇胚胎 S2 细胞稳定转染细胞系的筛选

将 pMT/BiP-boFcy2R-His 与 pCoblast 混合, 通过 Cellfectin® II Reagent 脂质体转染果蝇胚胎 S2 细胞^[20]; 3 d 后, 更换含体积分数 10% 热灭活 FBS 的果蝇胚胎 S2 细胞培养基, 同时添加终质量浓度为 25 μ g/mL 的 blasticidin S HCl 抗生素进行筛选, 每隔 3 d 左右更换 1 次培养液, 观察细胞状态, 最终得到稳定转染的细胞系。

1.4 boFcy2R 胞外区重组蛋白的表达

使用果蝇胚胎 S2 细胞 SFM 培养基对筛选出的稳定转染细胞系进行扩大培养, 待细胞密度达到 $(3\sim6)\times10^6$ 个/mL 时, 加终浓度为 0.75 mmol/L 的硫酸铜, 28 °C 诱导表达 120 h 后, 4 °C 下 200 g 离心 10 min, 收集上清液, 调节其 pH 至 8.0 后, 4 °C 下 12 000 g 离心 30 min, 收集上清液。上清液样品经 SDS-PAGE 电泳后, 在 15 V、40 min 条件下转 PVDF 膜, 采用 His 标签抗体对目的蛋白进行 Western-blot 鉴定。

1.5 boFcy2R 胞外区目的蛋白的纯化

量取一定体积浸泡在体积分数 20% 乙醇中的镍填料进行装柱, 用 10 倍柱体积的超纯水冲洗后, 以 10 倍柱体积的缓冲体系 (20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl) 对镍柱进行平衡处理。将离心后的 S2 细胞表达上清液加至平衡后的镍柱中, 让其自然缓慢地流过镍柱, 流穿结束后再次用 10 倍柱体积的上述缓冲体系平衡, 然后依次使用 10, 30, 50, 100 mmol/L 的咪唑溶液进行洗脱处理, 并分别收集洗脱液样品。对纯化前 S2 细胞表达上清液、过镍柱后流穿液及不同浓度咪唑洗脱液样品进行 SDS-PAGE 检测。使用凝胶过滤层析柱 Superdex 200 Increase 10/300 GL 对经过镍柱纯化后的蛋白进一步纯化, 并将收集的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳鉴定, 最后利用超滤管对收集的目的蛋白进行浓缩, 并使用 BCA 试剂盒测定蛋白的质量浓度。

1.6 boFcy2R 胞外区蛋白的 Dot-blot 检测

根据 boFcy2R 可与牛 IgG2 特异性结合的特点, 利用 His 单抗对结合牛 IgG2 后的 boFcy2R 胞外区重组蛋白进行检测。将牛 IgG2 (质量浓度为 1 mg/mL) 以 10 μ L 的量点样于 NC 膜, 自然干燥后浸

入 50 g/L 脱脂奶中,于 4 ℃ 封闭过夜,分别用 0.5, 1.0 和 2.0 μL 的 boFcγ2R 胞外区重组蛋白液(质量浓度为 1.0 mg/mL)对其进行孵育,同时设置空白对照(不含任何蛋白)及阴性对照(加 2 μL 质量浓度为 1.0 mg/mL 的带 His 标签的猪源 CD163 重组蛋白);以 His 标签抗体作为一抗(1 : 5 000),37 ℃ 作用 1 h,PBST 洗涤 3 次;加入 HRP 标记的羊抗鼠作为二抗(1 : 1 000),37 ℃ 作用 1 h,PBST 洗涤 3 次;最后使用化学发光 HRP 底物显色液对 NC 膜进行显色,对目的蛋白功能进行 Dot-blot 检测。

1.7 boFcγ2R 胞外区蛋白结晶条件的筛选

将纯化后的 boFcγ2R 胞外区蛋白经超滤管浓缩至 12.6 mg/mL,备用。采用蛋白结晶筛选试剂盒 HR2-144(其中包括 96 个结晶条件),用蒸汽扩散坐滴法在不同结晶条件下对目的蛋白进行结晶,筛选蛋白结晶条件。具体做法为:将浓缩后的蛋白液与不同结晶条件溶液按照 1 : 1 的体积比加至晶体板,置于 20 ℃ 晶体培养箱中,每天数次观察晶体板中有无晶体生长。

1.8 boFcγ2R 胞外区蛋白的去糖基化处理

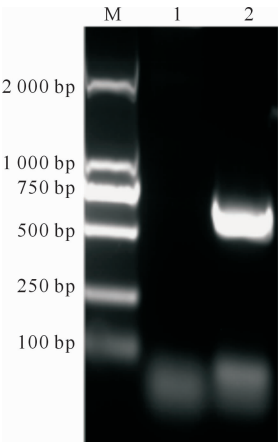
挑取初筛晶体送至上海同步辐射光源 BL17U1

线站收集数据,结果显示本研究得到的初筛晶体无衍射。因之前有报道称,boFcγ2R 属于糖基化修饰的蛋白,所以推测 boFcγ2R 胞外区蛋白初筛晶体无衍射可能是其糖基化造成的。因糖基化最常见的形式是 N-糖基化,所以同时利用 2 种去 N-糖基化酶 Endo Hf 和 PNGase F,分别在变性与非变性条件下对目的蛋白进行去糖基化处理。取适量纯化后的目的蛋白,在变性及非变性条件下分别与去糖基化酶 Endo Hf、PNGase F 混合,37 ℃ 孵育 1 h,然后利用 SDS-PAGE 电泳检测 boFcγ2R 胞外区蛋白的去糖基化效果。

2 结果与分析

2.1 pMT/BiP-boFcγ2R-His 载体的构建及鉴定

利用合成的 boFcγ2R 全长基因为模板扩增出其胞外区 cDNA 片段,结果得到了约 633 bp 的片段(图 1),与预期结果一致。pMT/BiP-boFcγ2R-His 载体 PCR 鉴定获得了约 633 bp 的目的片段(图 2),测序鉴定结果也显示获得了 633 bp 的片段,表明 pMT/BiP-boFcγ2R-His 载体构建成功。



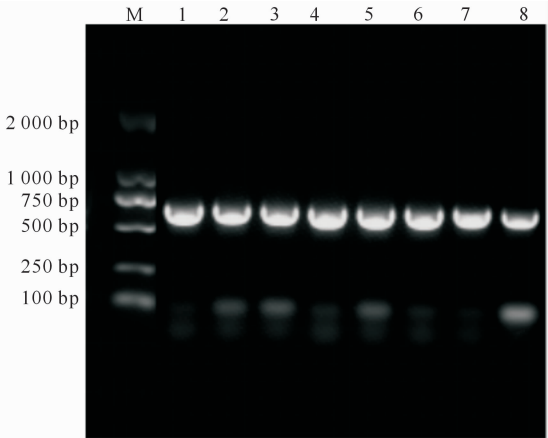
M, DL 2000 DNA 标准品; 1. 阴性对照;
2. boFcγ2R 基因胞外区片段扩增产物
M, DL 2000 DNA Marker; 1. Negative control;
2. PCR amplification product of boFcγ2R gene segment of extracellular region

图 1 boFcγ2R 基因胞外区片段的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of boFcγ2R gene segment of extracellular region

2.2 boFcγ2R 胞外区重组蛋白的诱导表达与纯化

收集诱导后的 S2 重组细胞表达上清液,利用 His 标签抗体进行 Western-blot 分析,结果在 26 ku 左右出现目标蛋白条带(图 3),表明 boFcγ2R 胞外



M, DL 2000 DNA 标准品;
1—8. 单克隆菌落的 pMT/BiP-boFcγ2R-His 基因胞外区片段 PCR 扩增结果

M, DL 2000 DNA Marker; 1—8. Colony PCR products of pMT/BiP-boFcγ2R-His gene segments of extracellular region

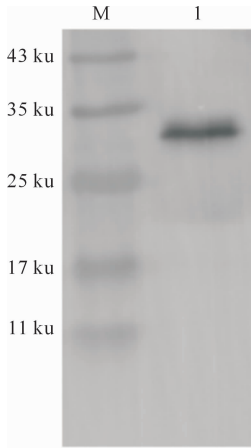
图 2 pMT/BiP-boFcγ2R-His 载体的 PCR 鉴定

Fig. 2 Colony PCR identification of pMT/BiP-boFcγ2R gene segments of extracellular region

区重组蛋白诱导表达成功。

对镍柱亲和层析法纯化前 S2 细胞表达上清液、过镍柱后流穿液及不同浓度咪唑洗脱液样品进行 SDS-PAGE 检测,结果表明 50 mmol/L 咪唑洗脱液

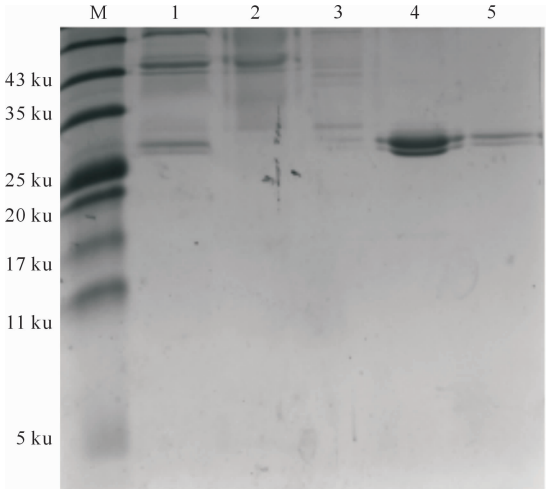
中含有目的蛋白(图 4)。



M. 蛋白 Marker;1. 稳定转染的 S2 细胞表达上清液
M. Protein Marker;1. Supernatant of stably-transfected S2 cells

图 3 boFcy2R 胞外区重组蛋白的 Western-blot 检测

Fig. 3 Western-blot analysis of recombinant boFcy2R ectodomain



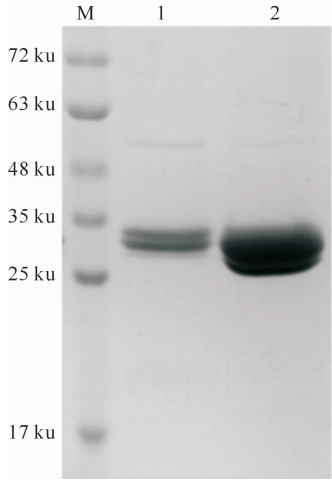
M. 蛋白 Marker;1. 纯化前细胞表达上清液;2. 过镍柱后流穿液;
3~5. 分别为 10,50 和 100 mmol/L 咪唑洗脱液

M. Protein Marker;1. Cell supernatant before purification;
2. Flowthrough after purification;3-5. Eluent with 10,50,
100 mmol/L imidazole respectively

图 4 镍柱纯化 boFcy2R 胞外区重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant boFcy2R ectodomain purified by Ni-affinity chromatography

采用镍柱亲和层析初步纯化后的目的蛋白中仍有部分杂蛋白没有除去,因此采用凝胶过滤层析对其进行进一步纯化,SDS-PAGE 检测结果表明,凝胶过滤层析纯化后的蛋白纯度较镍柱纯化明显提高(图 5);进一步经超滤管浓缩后,蛋白质量浓度高达12.6 mg/mL。



M. 蛋白 Marker;1. 凝胶过滤层析纯化后的目的蛋白;
2. 超滤管浓缩后的目的蛋白

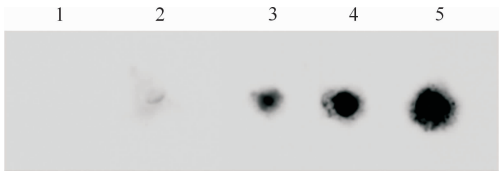
M. Protein Marker;1. Recombinant target protein purified by gel filtration chromatography; 2. Concentrated target protein by ultrafiltration tube

图 5 凝胶过滤层析纯化 boFcy2R 胞外区重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant boFcy2R ectodomain purified by gel filtration chromatography

2.3 boFcy2R 胞外区重组蛋白活性的 Dot-blot 检测

试验结果(图 6)显示,纯化后的 boFcy2R 胞外区重组蛋白可与牛 IgG2 结合,表明目的蛋白具有生物学活性。



1. 空白对照;2. 阴性对照;3~5. 分别为 0.5,1.0,2.0 μ L boFcy2R 胞外区重组蛋白的孵育结果

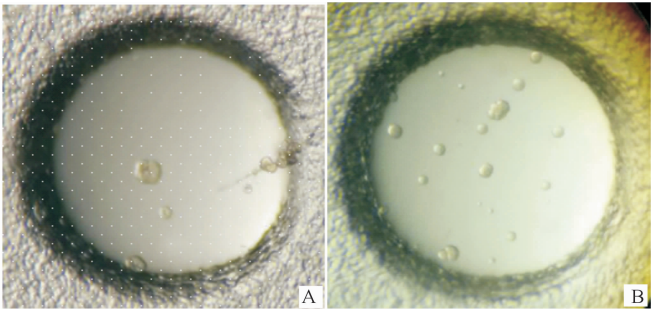
1. Blank control;2. Negative control;3-5. Results of incubated 0.5,1.0,2.0 μ L recombinant boFcy2R ectodomain respectively

图 6 boFcy2R 胞外区重组蛋白功能的 Dot-blot 鉴定

Fig. 6 Dot-blot analysis of recombinant boFcy2R ectodomain

2.4 boFcy2R 胞外区重组蛋白结晶条件的确定

纯化后目的蛋白的纯度、质量浓度、活性均满足结晶要求,因此本研究利用蛋白结晶筛选试剂盒 HR2-144 对蛋白结晶条件进行筛选,最终蛋白结晶的 2 个条件是体积分数 15% Tacsimite™ (pH 7.0)、0.1 mol/L HEPES (pH 7.0)、20 g/L PEG 3350 和 0.1 mol/L HEPES (pH 7.5)、250 g/L PEG 3350(图 7)。



A. 15% TacsimateTM(pH 7.0)、0.1 mol/L HEPES (pH 7.0)、20 g/L PEG 3350 条件下 24 h 生长的晶体;

B. 0.1 mol/L HEPES (pH 7.5)、250 g/L PEG 3350 条件下 24 h 生长的晶体

A. Crystals grown in the condition of 15% TacsimateTM(pH 7.0)、0.1 mol/L HEPES (pH 7.0)、20 g/L PEG 3350 for 24 h;

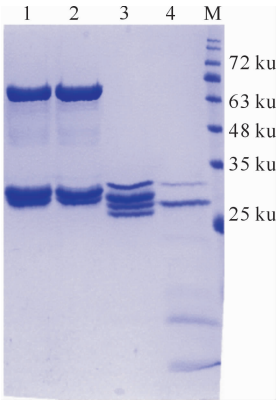
B. Crystals grown in the condition of 0.1 mol/L HEPES (pH 7.5)、250 g/L PEG 3350 for 24 h

图 7 boFcγ2R 胞外区重组蛋白初筛晶体

Fig. 7 Primary screening crystals of recombinant boFcγ2R ectodomain

2.5 boFcγ2R 胞外区重组蛋白的去糖基化分析

试验结果显示,在变性条件下,boFcγ2R 胞外区重组蛋白经去糖基化酶 Endo Hf 和 PNGase F 处理后,得到较纯的单一目的蛋白条带(图 8),从而验证了 boFcγ2R 胞外区重组蛋白初筛晶体无衍射可能与其糖基化有关。



M. 蛋白 Marker;1,3. 分别为非变性条件下去糖基化酶 Endo Hf 和 PNGase F 处理后的目的蛋白;2,4. 分别为变性条件下去糖基化酶 Endo Hf 和 PNGase F 处理后的目的蛋白

M. Protein Marker;1,3. The target protein treated with Endo Hf and PNGase F under non-denatured condition;2,4. The target protein treated with Endo Hf and PNGase F under denatured condition

图 8 经去糖基化酶处理后 boFcγ2R 胞外区目的蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of recombinant boFcγ2R ectodomain after de-glycosylation

3 讨 论

FcR 不仅使免疫细胞具备杀伤病毒和细菌、清除免疫复合物、溶解癌变细胞的能力,而且还参与免

疫反应的启动与调节,在机体免疫防御方面起着极为关键的作用^[1]。相对人 FcR 而言,牛 FcR 研究比较滞后。boFcγ2R 作为一种新型哺乳动物 FcR^[21],对其结构和功能进行研究具有非常重要的意义。2008 年,本研究团队曾经利用原核表达系统表达了 boFcγ2R 胞外区,验证了其可与 IgG2 特异结合^[22]。但是,由于原核系统表达蛋白不能进行翻译后加工,如糖基化修饰及二硫键形成等,可能导致重组表达蛋白的结构与天然结构不符。在真核系统表达方面,本研究团队在克隆 boFcγ2R 时,采用瞬时转染的方法通过 COS-7 细胞成功表达了 boFcγ2R,并对其功能进行了鉴定^[23]。然而,瞬时转染受很多因素影响,有可能出现转染效率低的问题;同时,瞬时转染表达无法保证不同批次试验的均一性及稳定性。此后,本研究团队通过抗性筛选和玫瑰花环检测方法建立了稳定表达 boFcγ2R 的 COS-7 转染细胞系,虽然为研究 boFcγ2R 功能提供了很好的技术平台^[21],但是通过此方法获得的蛋白量远远不能满足后续对其结构与功能研究的需求。

本研究构建 pMT/BiP-boFcγ2R-His 表达载体,通过果蝇胚胎 S2 细胞真核表达系统对目的蛋白进行了表达。利用该真核表达系统,目的蛋白可在翻译后进行加工修饰使其更接近蛋白天然构象,同时该系统还具有蛋白表达量高等特点^[20,24-25]。采用镍柱亲和层析及凝胶过滤层析纯化后,经 SDS-PAGE 电泳检测蛋白纯度高达 99%。经 Dot-blot 检测纯化后的 boFcγ2R 胞外区重组蛋白具有特异结合牛 IgG2 的生物学活性。本研究最终获得了目的蛋白初筛晶体,但是这些晶体无衍射。经分析,boFcγ2R 属于糖基化修饰蛋白,推测可能是糖基化

不均一所致。为了验证这个推测,本研究采用 2 种去糖基化酶对目的蛋白进行去糖基化处理,结果发现处理后可获得纯度较高而且均一的目的蛋白,为进一步利用结构生物学方法研究该受体的免疫学功能打下了坚实基础。

[参考文献]

- [1] Ravetch J V, Kinet J P. Fc receptors [J]. *Current Opinion in Immunology*, 1991, 9(1): 121-125.
- [2] Gessner J E, Schmidt R E. Fc γ receptors [J]. *Zeitschrift Für Rheumatologie*, 2013, 72(1): 68-70.
- [3] Takai T. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity [J]. *J Clin Immunol*, 2005, 25(1): 1-18.
- [4] Ravetch J V, Bolland, S. IgG Fc receptors [J]. *Annu Rev Immunol*, 2001, 19: 275-290.
- [5] Nimmerjahn F, Ravetch J V. Fc γ receptors as regulators of immune responses [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2008, 8(1): 34-47.
- [6] Daeron M. Fc receptor biology [J]. *Annu Rev Immunol*, 1997, 15(15): 203-234.
- [7] Deo Y M, Graziano R F, Repp R, et al. Clinical significance of IgG Fc receptors and Fc γ R-directed immunotherapies [J]. *Immunol Today*, 1997, 18(3): 127-135.
- [8] Wang G, Chopra R K, Royal R E, et al. A T cell-independent antitumor response in mice with bone marrow cells retrovirally transduced with an antibody/Fc- γ chain chimeric receptor gene recognizing a human ovarian cancer antigen [J]. *Nature Medicine*, 1998, 4(2): 168.
- [9] Jg V D W, Capel P J. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications [J]. *Immunology Today*, 1993, 14(5): 215-221.
- [10] Kcskovics I. Fc receptors in livestock species [J]. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 2004, 102(4): 351-362.
- [11] Zhang G, Young J R, Tregaskes C A, et al. Identification of a novel class of mammalian Fc receptor [J]. *J Immunol*, 1995, 155: 1534-1541.
- [12] Duncan A R, Woof J M, Partridge L J, et al. Localization of the binding site for the human high-affinity Fc receptor on IgG [J]. *Nature*, 1988, 332(6164): 563-564.
- [13] Qiao S, Yang Y, Liu Y, et al. Characterization and ligand specificity of sheep IgG2 receptor [J]. *Immunogenetics*, 2009, 61(8): 597-601.
- [14] Morton H C, Howard C J, Storset A K, et al. Identification of residues within the extracellular domain 1 of bovine Fc γ 2R essential for binding bovine IgG2 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 47794-47800.
- [15] Morton H C, van Zandbergen G, van Kooten C, et al. Immunoglobulin-binding sites of human Fc α RI (CD89) and bovine Fc γ 2R are located in their membrane-distal extracellular domains [J]. *J Exp Med*, 1999, 189: 1715-1722.
- [16] Zhang G, Guo J Q, Zhou J Y. Identification of the linear epitope for Fc-binding on the bovine IgG2 Fc receptor (boFc γ 2R) using synthetic peptides [J]. *FEBS Letters*, 2006, 580: 1383-1390.
- [17] Sondemann P, Huber R, Oosthuizen V, et al. The 3.2-Å crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc γ RIII complex [J]. *Nature*, 2000, 406: 267-273.
- [18] Burmeister W P, Huber A H, Bjorkman P J. Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc [J]. *Nature*, 1994, 372(6504): 379-383.
- [19] 郭军庆. 牛 IgG Fc 受体线性配体结合表位鉴定 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- Guo J Q. Identification of linear ligand binding epitopes of bovine IgG Fc receptor [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [20] 侯 婕, 李 睿, 马红芳, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒入侵受体唾液酸黏附素的表达与纯化 [J]. *河南农业科学*, 2016, 45(3): 130-134.
- Hou J, Li R, Ma H F, et al. Expression and purification of Sia-loadhesin, a putative receptor of Porcine Reproduction and Respiratory Syndrome Virus [J]. *Henan Academy of Agricultural Sciences*, 2016, 45(3): 130-134.
- [21] 史平玲, 王爱萍, 乔松林, 等. 家畜 IgG Fc 受体研究进展 [J]. *河南农业科学*, 2010(1): 124-128.
- Shi P L, Wang A P, Qiao S L, et al. Research progress of IgG Fc receptor in domestic animals [J]. *Henan Academy of Agricultural Sciences*, 2010(1): 124-128.
- [22] 席 俊, 张改平, 何礼洋, 等. 牛 IgG2Fc 受体 (boFc γ 2R) 胞外区基因原核表达载体的构建及其表达 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2008(2): 178-180.
- Xi J, Zhang G P, He L Y, et al. The construction and expression of ectodomain of bovine IgG2 Fc receptor [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2008(2): 178-180.
- [23] 李青梅, 郭军庆, 张改平, 等. 牛 IgG2 Fc 受体在 COS-7 细胞表面的稳定表达 [J]. *中国兽医科学*, 2007, 37(2): 121-124.
- Li Q M, Guo J Q, Zhang G P, et al. Stable expression of bovine IgG2 Fc receptor cDNA on the surface of COS-7 cells [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2007, 37(2): 121-124.
- [24] Ma H, Jiang L, Qiao S, et al. The crystal structure of the fifth scavenger receptor cysteine-rich domain of porcine CD163 reveals an important residue involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection [J]. *J Virol*, 2017, 91(3): JVI. 01897-16.
- [25] 马红芳, 乔松林, 黄明东, 等. Crystal structure of a CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain produced in *pichia pastoris* [J]. *结构化学*, 2017, 36(9): 1409-1417.
- Ma H F, Qiao S L, Huang M D, et al. Crystal structure of a CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain produced in *pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Structure and Chemistry*, 2017, 36(9): 1409-1417.