

尼罗罗非鱼 3 种 Siglecs like 融合蛋白在 COS-7 细胞中的表达及其结合活性的初步研究

魏远征^{1,2}, 董浚键¹, 卢迈新^{1,2}, 孙成飞¹, 田园园¹, 叶 星^{1,2*}

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所,农业部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室,广东 广州 510380;

2. 上海海洋大学水产与生命学院,上海 201306)

摘要: 为获得尼罗罗非鱼 Siglecs like 融合蛋白,开展相关 Siglecs like 蛋白的功能研究,深入了解罗非鱼与无乳链球菌相互作用机制。本研究利用前期构建的 3 个含 Siglecs like ORF 的克隆质粒,PCR 扩增获得 Siglec-1、Siglec-4b 和 Siglec-14 like 的膜外段序列,插入真核表达载体 pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc 中,双酶切、测序鉴定后转染 COS-7 细胞。qPCR、Western-blot 对目的蛋白的表达进行检测;亲和层析法纯化融合蛋白,SDS-PAGE 电泳检测纯化效率。ELISA 检测融合蛋白与 GBS 的结合活性。测序结果显示,成功构建 3 个融合蛋白真核表达载体 pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc-Siglecs like/Ex。检测结果显示,转染细胞中 3 个 Siglecs/Ex-Fc 融合蛋白在 mRNA 和蛋白水平都有高效表达,且过柱后的融合蛋白具有较高纯度;3 个融合蛋白与罗非鱼源 GBS 的结合活性较对照组均有显著差异。研究表明,利用真核表达系统成功制备了具有较高纯度的尼罗罗非鱼 3 种 Siglecs 融合蛋白,且均有与 GBS 的结合活性。

关键词: 尼罗罗非鱼;唾液酸结合型免疫球蛋白样凝集素;重组蛋白;真核表达;结合活性

中图分类号: Q 786; S 965

文献标志码: A

无乳链球菌,即 B 群链球菌(Group B *Streptococcus*, GBS),为革兰氏阳性菌。GBS 依据荚膜多糖的抗原反应鉴定的血清型,可分为 10 个血清型(Ia、Ib、II~IX),其中对鱼类具有较强致病性的为 Ib、Ia 和 III 型^[1-2]。近年来广东、海南等多个罗非鱼主产区暴发了大规模的罗非鱼链球菌病,给罗非鱼产业造成了重大损失,其病原体主要是无乳链球菌^[1],为 Ia 血清型,ST7 型^[3]。目前关于鱼类 GBS 感染的分子机理研究极为匮乏,成为科学有效防控链球菌病的瓶颈。

唾液酸结合型免疫球蛋白样凝集素(sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins, Siglecs)是一类能特异性识别自身及病原菌唾液酸多糖的免疫细胞膜上受体。已发现的 Siglecs 分子超过 15 种,研究表明大多数 Siglecs 都在造血和非特异性免疫细胞上表达,胞内含有一个或多个酪氨酸

抑制性基序(immuo-receptor tyrosine-based inhibition motifs, ITIM)或 ITIM 样结构,在免疫调节中主要起负调控作用,如抑制细胞增殖、诱导凋亡、抑制细胞活化等^[4]。有证据显示在 Siglec-F(类似人 Siglec-5)基因敲除的小鼠中,可以检测到骨髓、外周血和组织中嗜中性粒细胞增加^[5]。

在长期的进化过程中,已知至少 20 种病原微生物获得了自身合成或从外界环境中获取唾液酸的能力,如 GBS、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)、未分型流感嗜血杆菌(nontypeable *Haemophilus influenzae*, NTHi)等^[6]。某些病原微生物可通过“伪装”成宿主成分的唾液酸多糖与宿主免疫细胞的 Siglecs 特异性结合,产生免疫抑制信号,进而逃避宿主免疫^[7]。已有研究证实哺乳动物体内多个 Siglecs 参与宿主与 GBS 等病原体的相互作用^[7-11]。

收稿日期:2014-09-30 修回日期:2014-11-20

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2011AA100404);国家自然科学基金(31272688);现代农业产业技术体系专项(CARS-49)

通信作者:叶 星, E-mail: gzyexing@163.com

目前, Siglecs 的研究主要集中在哺乳类, 包括人与鼠。而非哺乳动物, Siglecs 的研究则只有鹌鹑 (*Coturnix coturnix*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 等为数不多的报道^[12], 且大多数仅有 EST 序列^[13]。因此, 研究罗非鱼中是否也存在 Siglecs 或 Siglecs like 蛋白, 并被 GBS 等病原菌识别利用从而实现“免疫逃逸”, 将有助于探究罗非鱼链球菌病的发病机制和抗链球菌病新途径。本实验室前期从尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 嗜中性粒细胞中筛选克隆到 3 个 Siglecs 样基因, *Siglec-1 like* (KM604643)、*Siglec-4b like* (KM886211) 和 *Siglec-14 like* (KM655818), 并对它们的序列进行了分析预测。本研究克隆此 3 个 Siglecs 样分子的膜外段序列, 构建带有人 IgG1 Fc 标签的融合蛋白真核表达载体 pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc-Siglecs like/Ex, 并在 COS-7 细胞中进行表达。初步鉴定纯化融合蛋白 Siglecs/Ex-Fc 与 GBS 的结合活性, 为进一步了解尼罗罗非鱼 Siglecs 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞系

质粒 pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc、COS-7 细胞系均购自湖南长沙赢润生物技术有限公司 (YRGene)。pMD 20-T 克隆载体、DH5 α 感受态菌株均购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要的试剂及仪器

Lipofectamine 2000 转染试剂、Trizol 试剂均购自 Invitrogen 公司。高保真酶 PrimeSTAR Max DNA Polymerase、T₄ DNA 连接酶、QuickCut Afl II、BamH I、Hind III 和 Kpn I 内切酶均购自 TaKaRa 公司; 反转录试剂盒购自 Roche 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; 小鼠抗人 IgG (733179) 购自 Beckman 公司; 胎牛血清 (SV30087)、Opti-MEM I 培养基、Protein A IgG Purification Kit (Pierce 44667)、ECL 化学发光试剂盒 (Pierce 32109) 均购自 Thermo 公司, Western blot 等试剂购自生工生物工程(上海)有限公司; 荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司的 PRISM 7300; 酶标仪为 TECAN 公司的 Infinite 200。

1.3 重组真核表达载体的构建

设计 Siglecs 膜外段的扩增引物(表 1), 分别以 pMD-Siglec-1、4b、14 like(均由本实验室前期构建)为模板, PCR 扩增其膜外段 *Siglec-1/Ex*、*Siglec-4b/Ex* 及 *Siglec-14/Ex* 序列。PCR 扩增条件: 94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 60 °C 15 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。3 个 Siglecs/Ex PCR 纯化产物分别经过双酶切回收后, 用 T₄ DNA 连接酶插入经相同双酶切的 pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc 载体中, 构建成 3 个重组表达载体 pcDNA 3.1(+)-hIgG1 Fc-Siglecs like/Ex, 并转入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 酶切、测序鉴定。

表 1 构建罗非鱼 Siglecs like 真核表达载体及 qPCR 分析使用的引物序列
Tab. 1 Primers for construction of recombinant plasmids and qPCR analysis

目标序列 target gene	引物序列(5'-3') primer sequence	用途 amplification
<i>Siglec-1/Ex/F/Afl</i> II	5'-TCTTAAGATTGCCACCATGGTGACA-3'	PCR
<i>Siglec-1/Ex/R/Kpn</i> I	5'-GGGGTACCCCTCTCTGCTGATGCTGATTACC-3'	PCR
<i>Siglec-4b/Ex/F/Afl</i> II	5'-TCTTAAGGCCACCATGTTGACAGTCGG-3'	PCR
<i>Siglec-4b/Ex/R/Kpn</i> I	5'-CGGGGTACCCCGTCCAGGAAGTAGCCACAGTG-3'	PCR
<i>Siglec-14/Ex/F/Hind</i> III	5'-CCCAAGCTTGGGCCACCATGGACAATCAAACAAAGTTTATGA-3'	PCR
<i>Siglec-14/Ex/R/Bam</i> H I	5'-CGGGATCCCGCAATCCCACTACAGCAG-3'	PCR
<i>Siglec-1 like/F</i>	5'-CATCAGTCCATCAGGTTTGG-3'	qPCR
<i>Siglec-1 like/R</i>	5'-TGCTCTTCTGAACCAGGTG-3'	qPCR
<i>Siglec-4b like/F</i>	5'-CATCAGTCCATCAGGTTTGG-3'	qPCR
<i>Siglec-4b like/R</i>	5'-TGCTCTTCTGAACCAGGTG-3'	qPCR
<i>Siglec-14 like/F</i>	5'-TGGAAGGCCATTGTTGTAAA-3'	qPCR
<i>Siglec-14 like/R</i>	5'-TTGCCTTTATCATGCCACAT-3'	qPCR
β -actin/F	5'-ATGGATGATGATATCGCCGCGCTC-3'	qPCR
β -actin/R	5'-CTAGAACCATTGCGGTGGACGAT-3'	qPCR

注: PCR 引物上的酶切位点用下划线表示

Notes: the restriction enzyme sites in the primers are underlined

1.4 重组表达载体转染 COS-7 细胞

COS-7 细胞复苏后,培养于含 10% 胎牛血清的 Opti-MEM I 培养基中。转染前 24 h,每孔 $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$ 个细胞接种于 6 孔培养板上,在 37°C 、6% CO_2 下培养至 90%~95% 汇合度后进行转染。采用 Lipofectamine 2000 转染试剂盒进行细胞转染,pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc 空载作为阴性对照。转染过程如下,用 Opti-MEM I 培养基稀释 4 μg DNA(A 液)至 100 μL ,温和混匀;稀释 5 μL Lipo 2000(B 液)终体积 100 μL ,轻轻混合 A、B 液,室温静置 15~20 min。弃去 6 孔培养板上的培养基,PBS(500 μL /孔)漂洗 1 次,将 A、B 混合液加入 1.6 mL 无血清的 Opti-MEM I 培养基混匀,缓慢加入培养板,在 37°C 、6% CO_2 体积分数的培养箱中培养 6 h 后弃培养液,每孔加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的 Opti-MEM I 培养基再培养 24 h 并检测。

1.5 转染细胞的转染水平检测

荧光定量检测 培养 24 h 后取部分细胞,qPCR 检测细胞 Siglecs/Ex-Fc mRNA 的表达。以 pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc 转染细胞作为对照。转染细胞用胰蛋白酶消化后,PBS 漂洗并悬浮。室温离心,500 $\times g$ 10 min 沉淀细胞,每 5×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol,抽吸几次促进细胞裂解,具体操作按照 Trizol 试剂提取说明进行。提取的总 RNA 用电泳检测其完整性,并用超微量分光光度计检测其浓度及纯度, -80°C 保存备用。

用 Roche 反转录试剂盒进行 cDNA 反转录,具体步骤参考说明书。反转录的 cDNA 检测后 -20°C 保存。 β -actin 作为 qPCR 内参基因^[14]。20 μL qPCR 体系如下,0.8 μL 模板 cDNA,10 μL 2 \times Master Mix,0.3 μL Forward Primer(10 $\mu\text{mol/L}$),0.3 μL Reverse Primer(10 $\mu\text{mol/L}$),8.6 μL ddH₂O。设 3 个重复,以不加模板 cDNA 为阴性对照。扩增条件为, 95°C 10 min; 95°C 15 s, 60°C 30 s, 72°C 15 s,循环 40 次。溶解曲线设定: 95°C 15 s, 60°C 1 min, 95°C 15 s。 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对荧光值,平均值 \pm 标准差($n=4$)表示 Siglecs like 的相对表达值。

Western-blot 检测 取 24 h 时收集的部分细胞,用 100 μL 1 \times SDS Loading Buffer 裂解, 4°C 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液。BCA 法测蛋白总浓度。取 40 μL 上清液加入 5 \times loading buffer(4:1)混匀,煮沸 5 min;SDS-PAGE 电泳 90

V,20 min;120 V,120 min;半干电转移至醋酸纤维膜上;用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭,洗膜后用 HRP 标记鼠抗人 IgG-Fc 抗体(用 TBST 按 1:1 000 稀释)室温孵育 1 h,TBST 洗 3 次后用 ECL 显色;GAPDH(1:10 000)抗体 4°C 孵育过夜,相应二抗为 HRP 标记的鼠抗人 GAPDH 抗体(1:1 000),ECL 显色。Western-blot 结果采用软件 Image J 分析。

1.6 融合蛋白的亲层析纯化

检测后的细胞 1:2 000 比例传代至 100 mm 培养皿中培养,500 $\mu\text{g/mL}$ G418 进行压力筛选,13 d 后将培养皿中形成的细胞单克隆挑至 96 孔板培养。待细胞长满后依次转入 24 孔板,鉴定并取上清液作 Western-blot 筛选。稳定表达的单克隆株培养至 80%~90% 汇合度时换无血清培养基,培养 24 h 后 2 000 r/min 离心 5 min 收集细胞上清液中的分泌蛋白。

亲和层析法纯化融合蛋白:室温放置 Protein A 柱子和试剂,打开柱子引流贮存缓冲液。加入 5 mL 的 Binding buffer 平衡 Protein A 预装柱子,流速 1 mL/min。上清液分泌蛋白用 Immunopure IgG Binding buffer 1:1 稀释后上样。15 mL 的 Binding buffer 清洗柱床以除去非特异性结合,5 mL 的 Immunopure IgG Elution buffer 洗脱融合蛋白,收集 0.5~1 mL 的洗脱液(即目的蛋白)。SDS-PAGE 电泳检测,并测定蛋白浓度。

1.7 融合蛋白与 GBS 结合活性的检测

GBS(血清型为 Ia 型,由本实验室鉴定、保存)1:100 接种在脑心浸液(BHI)培养基中, 30°C 、220 r/min 培养至对数期($\text{OD}_{600\text{nm}}=0.6$)。室温 3 000 r/min 离心 5 min,PBS 重悬,用碳酸盐缓冲液(pH 9.5)配成 0.5×10^9 个/mL 悬液。加入异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)溶液(10 mg/mL,二甲基亚砜配制),FITC 终浓度为 0.1%, 37°C 孵育 1.5 h。3 000 r/min 离心并用 PBS 充分漂洗,用 ELISA buffer(20 mmol/L HEPES-NaOH buffer,pH 7.45;125 mmol/L NaCl,0.02% NaN_3 ,1% BSA)重悬至 1×10^7 CFU/mL 浓度后,荧光显微镜检查标记效果, 4°C 保存备用。

取 96 孔黑色酶标板,每孔加入 100 μL 含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 的 protein A(pH 9.5,50 mmol/L carbonate buffer), 4°C 封闭过夜。弃包被液,加入 150 μL ELISA buffer 洗涤 2 次,并用 ELISA

buffer 室温孵育 1 h。弃洗涤液分别加入融合蛋白 Siglecs/Ex-Fc (经 ELISA buffer 稀释至 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和阴性对照 hIgG1 Fc (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 每孔 150 μL , 室温孵育 2 h。每孔用 150 μL ELISA buffer 冲洗 3 次后加入 100 μL FITC-GBS (1×10^7 CFU/mL), 2 000 r/min 离心 10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min 使 GBS 与蛋白充分结合。酶标仪检测初始荧光值, 然后去除孔中液体 (含未结合的 GBS), 加入 ELISA buffer 洗涤后, 检测残余荧光值 (激发波长, 485 nm; 发射波长, 538 nm)。

2 结果与讨论

2.1 融合蛋白重组质粒的鉴定

扩增 3 个 Siglecs like 的胞外段序列 Siglec-1/Ex、Siglec-4b/Ex 和 Siglec-14/Ex, 分别插入 pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc 载体中 (图 1)。对筛选获得的重组子分别进行双酶切鉴定, 并经测序证明插入序列正确。融合基因由 Siglec/Ex 和 738 bp 的 Fc 片段组成, Siglec-1/Ex Fc、Siglec-4b/Ex Fc 和 Siglec-14/Ex Fc 的融合基因大小分别为 1 701、1 776 和 1 542 bp, 预期编码 62.4、65.0 和 57.5 ku 的融合蛋白。

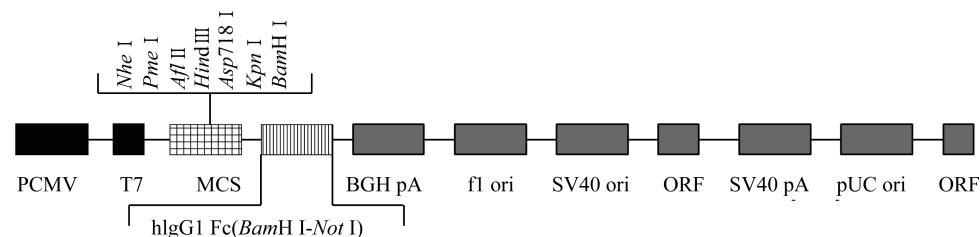
2.2 qPCR 检测重组基因在 COS-7 细胞中的表达

重组表达载体转染 COS-7 细胞培养 24 h 后, 提取 RNA 并逆转录成 cDNA, 荧光定量分析分别检测 3 个融合基因 mRNA 的表达水平, 结果显示与对照组相比, 3 个 Siglecs/Ex-Fc 的基因均能在 COS-7 细胞中高效表达 (图 2)。方差分析显示, Siglec-4b/Ex-Fc 和 Siglec-14/Ex-Fc 的 mRNA 表达较对照组有极显著差异 ($P < 0.01$), 而 Siglec-14/Ex-Fc 虽表达量高, 但与对照组相比无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.3 融合蛋白的 Western-blot 检测及亲和层析纯化

收集转染后培养 24 h 的细胞, 破碎并收集总蛋白。经 SDS-PAGE 分离后进行 Western-blot 检测, 3 个转染细胞株蛋白样品均有分子量约 60 ku 的单一目的条带, 与预测大小一致 (图 3-a), 说明 COS-7 细胞能有效表达 3 种 Siglecs/Ex-Fc 重组蛋白。灰度分析显示相比对照组, 3 个融合蛋白的表达量 (Siglecs/Ex-Fc/GAPDH) 都较高, 且表达量由高到低依次为 Siglec-4b/Ex-Fc、Siglec-1/Ex-Fc 和 Siglec-14/Ex-Fc (图 3-b)。

(a) pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc



(b) Siglecs/Ex-Fc

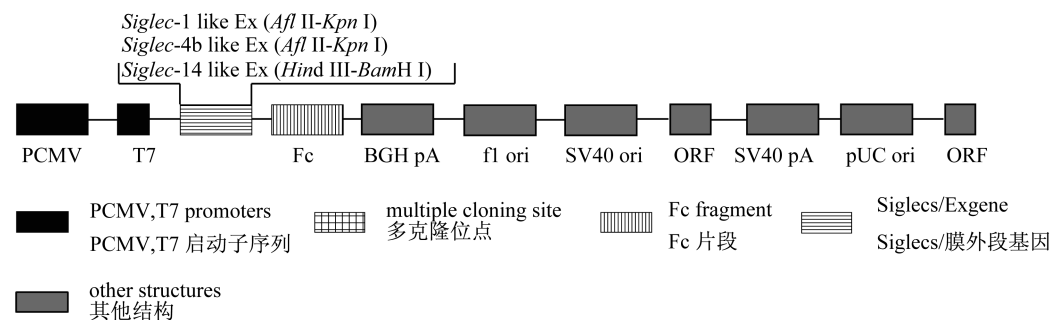


图 1 3 个融合基因 Siglecs/Ex-Fc 的结构

(a) pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc 质粒结构示意图; (b) 3 个 Siglecs/Ex-Fc 融合基因结构

Fig. 1 Structure of the three fusion gene Siglecs/Ex-Fc

(a) the structure of pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc vector; (b) the fusion gene structure of Siglecs/Ex-Fc

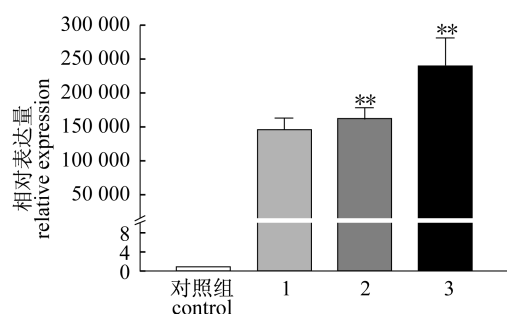


图 2 荧光定量检测转染 COS-7 细胞中 Siglecs/Ex-Fc 的 mRNA 水平

对照组: pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc 质粒转染 COS-7 细胞; 实验组 1,2,3: pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc-Siglec-1/Ex, pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc-Siglec-4b/Ex 和 pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc-Siglec-14/Ex 分别转染的 COS-7 细胞; ** 表示相比对照组, 转染 COS-7 细胞中 Siglec/Ex-Fc 融合蛋白的 mRNA 表达存在极显著差异 ($P < 0.01$), 下同

Fig. 2 Expressions of three Siglecs/Ex-Fc in COS-7 cells by qPCR

Control: pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc transfected COS-7 cells; experimental groups 1,2,3: pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc-Siglec-1/Ex, pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc-Siglec-4b/Ex and pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc-Siglec-14/Ex transfected COS-7 cells; ** means the difference of mRNA expression between pcDNA3.1 (+) hIgG1 Fc-Siglecs/Ex and control transfected cells was extremely different ($P < 0.01$), the same as below

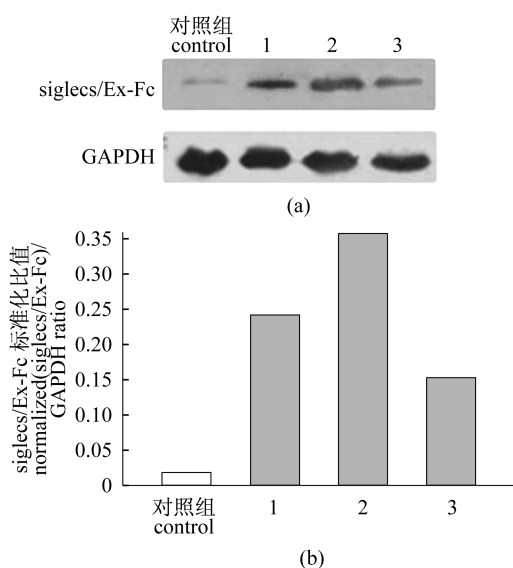


图 3 Western-blot 检测 Siglecs/Ex-Fc 融合蛋白的表达 (a)GAPDH, 内参蛋白 GAPDH 在 COS-7 细胞中的表达; (b) 对照组和 Siglec-1/Ex-Fc (1)、Siglec-4b/Ex-Fc (2) 和 Siglec-14/Ex-Fc (3) 融合蛋白在 COS-7 细胞中相对 GAPDH 内参蛋白的表达

Fig. 3 Expression of fusion proteins of Siglecs/Ex-Fc by Western-blot analysis

(a)GAPDH, internal control of GAPDH in the COS-7 cells; (b) expression of control and fusion proteins Siglec-1/Ex-Fc (1), Siglec-4b/Ex-Fc (2) and Siglec-14/Ex-Fc (3) relative to GAPDH

经 G418 压力筛选并经 Western-blot 检测确认的稳定表达株扩大培养至 72 h 时, 收集上清液分泌蛋白过柱纯化。SDS-PAGE 电泳显示 3 个重组蛋白纯化样品条带均一, 仅在 60 ku 处有一明显主带(图 4), 说明过柱后蛋白纯度较高。酶标仪检测显示蛋白浓度分别为 0.12 (Siglec-1/Ex-Fc)、0.10 (Siglec-4b/Ex-Fc) 和 0.13 mg/mL (Siglec-14/Ex-Fc)。

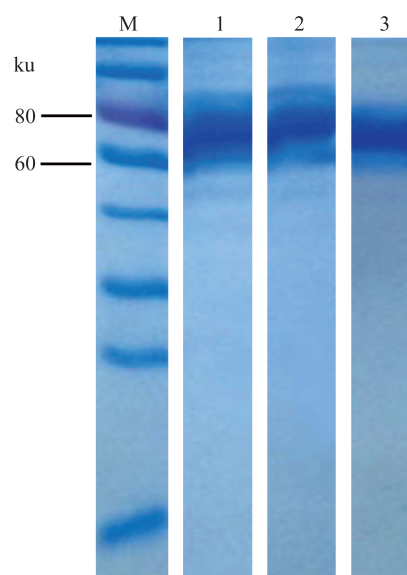


图 4 纯化后融合蛋白的 SDS-PAGE 检测

M. 蛋白 marker; 1. Siglec-1/Ex-Fc 融合蛋白; 2. Siglec-4b/Ex-Fc 融合蛋白; 3. Siglec-14/Ex-Fc 融合蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified fusion proteins

M. protein marker; 1. Siglec-1/Ex-Fc fusion protein; 2. Siglec-4b/Ex-Fc fusion protein; 3. Siglec-14/Ex-Fc fusion protein

2.4 融合蛋白与 GBS 的结合

采用 ELISA 检测融合蛋白与 GBS 的结合。包被 Protein A 的酶标板分别用 3 种融合蛋白孵育后, 加入 FITC 标记的 GBS, 酶标仪测定荧光值以检测融合蛋白同 GBS 的结合效率。以人 IgG1 Fc 蛋白作为空白对照。结果显示, 与空白组相比, 3 个 Siglecs/Ex-Fc 融合蛋白组都能检测到较高的荧光值, 说明这 3 个融合蛋白具有与 GBS 结合的活性。方差分析显示 3 个 Siglecs/Ex-Fc 融合的结合活性较空白对照组都有显著差异 ($P < 0.05$), 其中 Siglec-4b/Ex-Fc 和 Siglec-14/Ex-Fc 融合蛋白与其差异极显著 ($P < 0.01$) (图 5)。

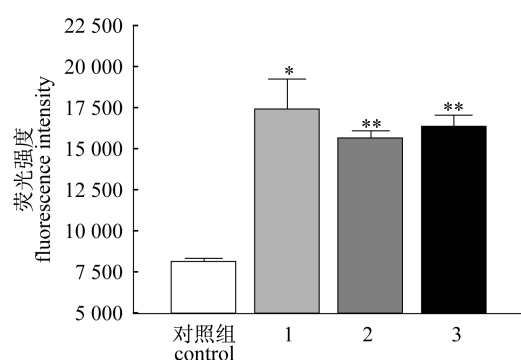


图5 FITC 标记的 GBS 与 Siglecs/Ex-Fc 融合蛋白的结合

对照组. 人 IgG1 Fc 蛋白; 1. Siglec-1/Ex-Fc 融合蛋白; 2. Siglec-4b/Ex-Fc 融合蛋白; 3. Siglec-14/Ex-Fc 融合蛋白; * 表示与对照组相比融合蛋白结合活性存在显著差异 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$)

Fig. 5 FITC-GBS adheres to Siglecs/Ex-Fc fusion proteins

Control. human IgG1 Fc protein; 1. the Siglec-1/Ex-Fc fusion protein; 2. Siglec-4b/Ex-Fc fusion protein; 3. Siglec-14/Ex-Fc fusion protein; * means the binding activities between Siglecs/Ex-Fc fusion protein and control was significantly different ($P < 0.05$); ** means the difference of binding activities was extremely different ($P < 0.01$)

3 结论

免疫细胞上的 Siglecs 受体在非特异性免疫过程中发挥着特殊的调节作用。研究表明哺乳动物的 Siglecs 能与唾液酸多糖的结合促进细胞间的结合与相互作用、介导细胞信号转导,从而调节非特异性免疫与特异性免疫细胞的功能,防止机体产生自身免疫病^[15]。某些病原微生物为逃避脊椎动物非特异性免疫,在进化过程中获得合成唾液酸或获取宿主唾液酸的能力,通过与补体因子 H 结合阻断 C3 转化酶通路形成,或与免疫细胞上的唾液酸结合,传导负调控信号从而阻止宿主非特异性免疫细胞的杀灭作用^[16]。GBS 在人体内能通过分子模拟,利用其荚膜多糖上的唾液酸与宿主细胞上的 Siglecs 结合,启动宿主炎症反应的负调控信号,实现免疫逃逸^[7-9]。因此, Siglecs 在病菌与宿主相互作用中起着重要作用。

Siglecs 家族属 I 型免疫球蛋白样凝集素,其分子结构包括细胞外区、跨膜区和胞内区 3 段,其膜外的 N 端都有 1 个免疫球蛋白 V 区和 1~2 个免疫球蛋白 C 区,是配体唾液酸的结合位点^[17]。

本实验室前期克隆筛选获得尼罗罗非鱼 3 个 Siglecs like 基因,其蛋白结构预测 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 显示:3 个 Siglecs 分子均由胞外区、跨膜区和胞内区 3 部分组成;其膜外段均具有与唾液酸结合的关键结构,即至少 2~3 个 Ig-like (免疫球蛋白样) 结构;胞内区 Siglec-1, -4b like 各含有 1 个 ITIM (酪氨酸抑制性结构域)/ITIM-like 结构,而 Siglec-14 like 无此结构,但存在 1 个 Grb2 (生长因子受体结合蛋白 2) 类似结构。人 Siglec5~11 的研究显示具有 ITIM/ITIM-like 结构的 Siglec 分子,与配体结合后可对胞内下游信号产生抑制作用^[7,18-19],而 Grb2 则能激活胞内相关免疫信号^[20-21]。因此,尼罗罗非鱼 Siglec-1 和 Siglec-4b like 与配体唾液酸的结合可能起免疫抑制的功能,而 Siglec-14 like 则可能起免疫激活作用。

唾液酸多糖是 Siglecs 蛋白的主要配体, Siglecs 与唾液酸多糖的结合活性是其功能研究的关键步骤,通常通过 ELISA 实验验证 Siglecs 融合蛋白与唾液酸多糖的结合活性^[9,21]。因此,融合蛋白的制备对所克隆 Siglecs 分子的特性验证和开展进一步的功能研究至关重要。

本研究制备的尼罗罗非鱼 Siglecs 融合蛋白,选用人 IgG1 Fc 作为融合蛋白标签,不仅便于用 Protein A 进行亲和层析以实现高效纯化,且引入的 IgG 重链稳定区可延长融合蛋白的半衰期,增加蛋白稳定性^[22-24]。Fc 标签蛋白前面以尼罗罗非鱼 Siglecs like 胞外 N 端的前 2 个 Ig/Ig-like 结构域作为插入序列,保留了 Siglecs 蛋白与唾液酸多糖的完整识别功能域。插入序列与 Fc 片段间有 33 bp 即 11 个氨基酸的 linker 连接,能够增强融合蛋白 Fab 段 (即 Siglecs 胞外段部分) 与受体或底物结合的稳定性,防止 2 段序列单独表达互补配对形成二聚体、降低融合蛋白的生物活性^[25-26]。同时 COS-7 转染细胞具有转染效率高、易于培养的优点。

Siglecs 融合蛋白与 GBS 等病原体的结合实验,可从分子水平上探究 Siglecs 蛋白对病原体的识别作用。研究显示人的 Siglec-5 和 Siglec-14 与 FITC 标记的唾液酸多糖依赖型流感嗜血杆菌 (NTHi) 具有较高的结合强度,结合的荧光强度是阴性对照组的 2.2~2.7 倍^[11],在人 Siglec-5、-6、-7、-9 与不同血清型的 GBS 结合实验中

发现,这些 Siglecs 分子与 Ia 型 GBS 的结合强度较强,是 III 型 GBS 突变株(唾液酸缺乏型)的 15~21 倍^[9]。不同血清型 GBS 所带唾液酸数量不同,血清型 Ia 和 Ib 唾液酸密度最高(2 个单糖/Sia),II 型最低(5 个单糖/Sia),而 GBS 唾液酸的密度与 Siglecs 结合的位点数、结合力呈正相关^[27]。鱼类 Siglecs 的研究非常有限,仅有红鳍东方鲀 Siglec-4 融合蛋白与唾液酸多糖的结合实验,其结合 $\alpha 2, 3$ -型唾液酸的能力高于 $\alpha 2, 6$ -型^[12]。本研究制备的罗非鱼 3 个 Siglecs like 融合蛋白与罗非鱼源 GBS(Ia 型)^[3]结合的荧光强度是阴性对照组的 1.9~2.1 倍(图 5),不仅初步证明制备的融合蛋白有较高的结合活性,为罗非鱼 3 个 Siglecs like 分子与 GBS 的结合活性提供直接证据,而且丰富了鱼类 Siglecs 分子结合活性的研究。

本研究成功构建了尼罗罗非鱼 3 种 Siglecs like 融合蛋白的表达质粒,并在 COS-7 细胞中感染、表达纯化获得罗非鱼 Siglecs/Ex-Fc 融合蛋白。实验为进一步揭示罗非鱼 Siglecs 的具体功能、了解 GBS 与宿主免疫反应的互作机制提供实验基础。

参考文献:

- [1] Lu M X, Li J, Ye X, *et al.* Identification and characterizations of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia cultured in Guangdong and Hainan provinces [J]. *Microbiology*, 2010, 37 (5): 766 - 774. [卢迈新,黎炯,叶星,等.广东与海南养殖罗非鱼无乳链球菌的分离、鉴定与特性分析.微生物学通报,2010,37(5):766-774.]
- [2] Li L P, Wang R, Liang W W, *et al.* Rare serotype occurrence and PFGE genotypic diversity of *Streptococcus agalactiae* isolated from tilapia in China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2013, 167 (3 - 4): 719 - 724.
- [3] Ye X, Li J, Lu M X, *et al.* Identification and molecular typing of *Streptococcus agalactiae* isolated from pond-cultured tilapia in China [J]. *Fisheries Sciences*, 2011, 77 (4): 623 - 632.
- [4] Crocker P R, Paulson J C, Varki A. Siglecs and their roles in the immune system [J]. *Nature Reviews Immunology*, 2007, 7 (4): 255 - 266.
- [5] Zhang M, Angata T, Cho J Y, *et al.* Defining the *in vivo* function of Siglec-F, a CD33-related Siglec expressed on mouse eosinophils [J]. *Blood*, 2007, 109 (10): 4280 - 4287.
- [6] Vimr E, Lichtensteiger C. To sialylate, or not to sialylate: That is the question [J]. *Trends in Microbiology*, 2002, 10 (6): 254 - 257.
- [7] Cao H, Crocker P R. Evolution of CD33-related siglecs: Regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation [J]. *Immunology*, 2011, 132 (1): 18 - 26.
- [8] Carlin A F, Uchiyama S, Chang Y C, *et al.* Molecular mimicry of host sialylated glycans allows a bacterial pathogen to engage neutrophil Siglec-9 and dampen the innate immune response [J]. *Blood*, 2009, 113 (14): 3333 - 3336.
- [9] Carlin A F, Lewis A L, Varki A, *et al.* Group B *Streptococcal* capsular sialic acids interact with siglecs (immunoglobulin-like lectins) on human leukocytes [J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189 (4): 1231 - 1237.
- [10] Jones C, Virji M, Crocker P R. Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 49 (5): 1213 - 1225.
- [11] Angata T, Ishii T, Motegi T, *et al.* Loss of Siglec-14 reduces the risk of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2013, 70 (17): 3199 - 3210.
- [12] Lehmann F, Gähje H, Kelm S, *et al.* Evolution of sialic acid-binding proteins: Molecular cloning and expression of fish siglec-4 [J]. *Glycobiology*, 2004, 14 (11): 959 - 968.
- [13] Angata T. Molecular diversity and evolution of the Siglec family of cell-surface lectins [J]. *Molecular Diversity*, 2006, 10 (4): 555 - 566.
- [14] Bertinato J, Swist E, Plouffe L J, *et al.* Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells [J]. *Biochemical Journal*, 2008, 409 (3): 731 - 740.
- [15] Jandus C, Simon H U, von Gunten S. Targeting Siglecs-A novel pharmacological strategy for immuno-and glycotherapy [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2011, 82 (4): 323 - 332.
- [16] Pangburn M K, Rawal N, Cortes C, *et al.* Polyanion-induced self-association of complement factor H [J]. *Journal of Immunology*, 2009, 182 (2): 1061 - 1068.
- [17] Pillai S, Netravali I A, Cariappa A, *et al.* Siglecs and immune regulation [J]. *Annual Review of*

- Immunology, 2012, 30: 357 – 392.
- [18] Yohannan J, Wienands J, Coggeshall K M, *et al.* Analysis of tyrosine phosphorylation-dependent Interactions between stimulatory effector proteins and the B cell co-receptor CD22 [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1999, 274 (26): 18769 – 18776.
- [19] Avril T, Floyd H, Lopez F, *et al.* The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells [J]. *Journal of Immunology*, 2004, 173(11) : 6841 – 6849.
- [20] Poe J C, Fujimoto M, Jansen P J, *et al.* CD22 Forms a quaternary complex with SHIP, Grb2, and Shc. A pathway for regulation of B lymphocyte antigen receptor-induced calcium flux [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (23): 17420 – 17427.
- [21] Angata T, Hayakawa T, Yamanaka M, *et al.* Discovery of Siglec-14, a novel sialic acid receptor undergoing concerted evolution with Siglec-5 in primates [J]. *The Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2006, 20 (12): 1964 – 1973.
- [22] Subramanian G M, Fiscella M, Lamouse-Smith A, *et al.* Albinterferon alpha-2b: A genetic fusion protein for the treatment of chronic hepatitis C [J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25 (12): 1412 – 1419.
- [23] Wang L, He J, Xiao W H. Enhanced circulation half-life for Human IFN α 2b and IgG Fc Fusion [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(1) : 53 – 62. [王磊,何剑,肖卫华. 人干扰素 α -2b 和 IgG Fc 片段融合蛋白显著延长体内半衰期. *生物工程学报*, 2008, 24(1) : 53 – 62.]
- [24] Peters R T, Low S C, Kamphaus G D, *et al.* Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein [J]. *Blood*, 2010, 115 (10): 2057 – 2064.
- [25] Gustavsson M, Lehtio J, Denman S, *et al.* Stable linker peptides for a cellulose-binding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Engineering*, 2000, 14(9) : 711 – 715.
- [26] Arai R, Ueda H, Kitayama A, *et al.* Design of the linkers which effectively separate domains of a bifunctional fusion protein [J]. *Protein Engineering*, 2001, 14(8) : 529 – 532.
- [27] Crocker P R, Redelinghuys P. Siglecs as positive and negative regulators of the immune system [J]. *Biochemical Society Transactions*, 2008, 36 (6): 1467 – 1471.

Expression of three *Oreochromis niloticus* Siglecs-like fusion proteins in COS-7 cells and characterization of their binding activities with GBS

WEI Yuanzheng^{1,2}, DONG Junjian¹, LU Maixin^{1,2}, SUN Chengfei¹, TIAN Yuanyuan¹, YE Xing^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fisheries Resource Application & Cultivation of China Ministry of Agriculture;

Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Siglecs, sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins is a class of membrane receptors which could specifically recognize sialic acid polysaccharide of self or some pathogens. In order to prepare Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Siglecs-like fusion proteins and study their functions in the interaction of host-pathogen, we prepared *O. niloticus* Siglecs like fusion proteins using eukaryotic expression system. In this research, the extracellular domain of the three *O. niloticus* Siglecs like were respectively amplified from the cloned vectors containing the ORF of Siglec-1/-4b/-14 like and then inserted into the expression vector of pcDNA3.1(+)-hIgG1 Fc. After double digestion and sequencing, they were transfected into the COS-7 cells *in vitro*. The expressions of target genes was detected by qPCR and Western-blot analysis. The fusion proteins were purified by affinity chromatography, and their purity was detected by SDS-PAGE electrophoresis. To study the biological activities of these Siglecs like fusion proteins, binding activities of the fusion proteins to Group B *Streptococcus* (GBS) were detected by ELISA. The results showed that these three recombinant plasmids containing extracellular domains of tilapia Siglecs like with human IgG1 Fc fragment were constructed successfully. These three genes were highly expressed in COS-7 cells both in mRNA and protein levels. Three Siglecs/Ex-Fc fusion proteins were proved to be of high purity. The binding activities between fusion proteins and control were significantly different ($P < 0.05$). This research showed we successfully obtained purified fusion proteins by COS-7 cells expression system. A preliminary study proved they could bind GBS.

Key words: *Oreochromis niloticus*; Siglecs; recombinant protein; eukaryotic expression; binding activities

Corresponding author: YE Xing. E-mail: gzyexing@163.com