



## 草鱼 $CD8\alpha$ 、 $CD207$ 基因重组真核表达质粒的构建与表达分析

田 丁<sup>1</sup>, 李珂珂<sup>1</sup>, 蒋 飞<sup>1</sup>, 陈春秀<sup>1</sup>,  
念子清<sup>1</sup>, 吴志新<sup>1,2</sup>, 陈孝煊<sup>1,2\*</sup>

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 湖北省水生动物病害防控工程技术研究中心, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 为进一步研究  $CD8\alpha$ 、 $CD207$  在草鱼树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 中的功能, 实验构建了草鱼  $CD8\alpha$ 、 $CD207$  基因重组真核表达质粒并在草鱼 DCs 中成功表达。采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 技术从草鱼 DCs 中获得  $CD8\alpha$ 、 $CD207$  开放阅读框序列 (ORF), 分别插入真核表达质粒 pcDNA3.1, 构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1- $CD8\alpha$ 、pcDNA3.1- $CD207$ ; 经测序鉴定正确后, 采用脂质体法将重组真核表达质粒分别转染至草鱼树突状细胞, 经细胞免疫荧光技术和蛋白免疫印迹 (Western blot) 法验证  $CD8\alpha$ 、 $CD207$  的表达。结果显示, 在蛋白免疫印迹实验中  $CD8\alpha$ 、 $CD207$  蛋白可正常表达, 且大小与预测结果一致。细胞免疫荧光结果显示,  $CD8\alpha$ 、 $CD207$  蛋白主要在草鱼 DCs 的细胞膜上表达。本研究成功构建 pcDNA3.1- $CD8\alpha$ 、pcDNA3.1- $CD207$  重组真核表达质粒, 为后续研究  $CD8\alpha$ 、 $CD207$  基因在 DCs 中的作用机制奠定了基础。

**关键词:** 草鱼; 树突状细胞;  $CD8\alpha$ ;  $CD207$ ; 真核表达质粒

**中图分类号:** S 942

**文献标志码:** A

1973 年, Steinman 等<sup>[1]</sup> 在体外培养小鼠 (*Mus musculus*) 脾细胞时发现了一群具有树枝状突起的独特形态细胞, 并将之命名为树突状细胞 (dendritic cells, DCs)。树突状细胞广泛分布于机体各免疫器官中, 是免疫系统的前哨, 它将先天性免疫和适应性免疫联系在一起, 被认为是功能最强的抗原呈递细胞 (antigen presenting cells, APC)<sup>[2]</sup>。目前认为, 细胞膜表面高表达 MHC-I、II 类分子, 并具有一些相对特异性表面标志, 有典型的树突样形态, 能迁移至淋巴组织或淋巴器官。刺激初始型 T 细胞 (naive T cell, Tn) 增殖活化的一类细胞可称为 DCs<sup>[3]</sup>。DCs 不但能够将病原微生物的抗原信息传递给免疫活性细胞, 而且广泛参与

免疫功能调节, 因此它在免疫应答产生过程中发挥关键作用<sup>[4]</sup>。近年来随着对 DCs 研究的不断深入, 人们已经对其生物学特性及免疫功能有了更多了解, DCs 参与免疫调节的机制被逐步阐明。

与哺乳动物相比, 鱼类的免疫器官缺乏骨髓和淋巴结<sup>[5]</sup>, 但在鱼类的多种器官 (组织) 中均发现树突状细胞 (或类树突状细胞) 分布<sup>[6-8]</sup>。已有研究表明, DCs 在哺乳动物和鱼类中的功能和表型是保守的, 鱼类的 DCs 有经典 DCs 的形态和相似的功能<sup>[9]</sup>; 不同鱼类 DCs 的分子标记也不尽相同<sup>[10-12]</sup>。 $CD8\alpha$  是一种跨膜糖蛋白, 在树突状细胞的一些子群中高表达<sup>[13]</sup>,  $CD8\alpha^+$ DC 可以加工呈递抗原, 同时分泌 IL-12 诱导  $CD4^+$ T 细胞分化为 Th1 型细胞<sup>[14]</sup>;

收稿日期: 2022-01-11 修回日期: 2022-03-03

资助项目: 国家自然科学基金 (31972819)

第一作者: 田丁 (照片), 从事鱼类病理与免疫学研究, E-mail: 1647913815@qq.com

通信作者: 陈孝煊, 从事鱼类免疫与病害防控研究, E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn



Langerin/CD207 是朗格汉斯细胞 (Langerhans cell, LCs) 的特异性分子标记, 属于 C 型凝集素受体家族的 II 型跨膜蛋白<sup>[15]</sup>, 研究发现 CD207 分子可以诱导 Birbeck 颗粒的形成, 参与捕获抗原和处理呈递<sup>[16]</sup>。草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是我国主要淡水养殖鱼类之一, 经济价值和科研价值较高, 开展 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 基因相关研究可为日后进行草鱼 *CD8 $\alpha$* <sup>+</sup>DC、*CD207*<sup>+</sup>DC 的分离鉴定与应用等工作打下基础。

目前, 草鱼 *CD8 $\alpha$*  (GenBank: GQ355586)、*CD207* (GenBank: GBKA01017435.1) 的全长开放阅读框 (ORF) 已被克隆<sup>[17-18]</sup>, 而草鱼 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 在草鱼 DCs 中的功能研究有待深入进行。真核表达质粒可以实现目的基因在靶细胞内的稳定表达, 在鱼类细胞中具有广泛的应用, 构建 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 重组真核表达质粒可为研究 2 个基因的功能与作用机制提供实用工具。本实验分别扩增草鱼 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 的 ORF 区, 进一步构建重组真核表达质粒 pcDNA3.1-*CD8 $\alpha$*  和 pcDNA3.1-*CD207*, 并采用脂质体法分别将重组质粒转染草鱼 DCs, 观察其在真核细胞中的表达与亚细胞中的定位情况, 为进一步研究草鱼 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 的生物学功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) trans5 $\alpha$  与限制性内切酶购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司; 质粒 pcDNA3.1(+) 由本实验室保存; 转染试剂盒 Lipo8000<sup>TM</sup> 购自碧云天生物技术有限公司; 胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒购自上海北诺生物科技有限公司; 高保真 PCR 预混合试剂与 RNA 提取试剂盒、SYBR qPCR Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; L-15 培养基与磷酸盐缓冲液 (PBS) 购自 Hyclone 公司; 胎牛血清 (FBS)、青霉素和链霉素 (penicillin-streptomycin, PS) 和硫酸庆大霉素 (gentamycin sulfate) 购自 Gibco 公司; 蛋白凝胶配制试剂盒、蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京康为世纪生物科技有限公司; HRP Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)、 $\beta$ -actin Rabbit mAb 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; FITC Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)、Cy3 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 购自 Jackson 公司; DAPI、抗荧

光淬灭封片剂购自索莱宝科技有限公司; 草鱼 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 多克隆抗体由本实验室制备并保存, 分别表达 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 的胞外区片段作为抗原免疫新西兰大白兔 (*Oryctolagus cuniculus*), 酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 其效价均为 1 : 128 000, 可识别组织和细胞水平分别对应的内源性蛋白, 特异性较高。

嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*) Ah1 菌株分离自细菌性败血症异育银鲫 (*Carassius auratus gibelio*) 肠道, 调整菌液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 后置于恒温水浴锅中 60 °C 加热处理 30 min。将经热灭活处理的菌液涂布于 LB 固体培养基, 28 °C 培养 24 h 确定 Ah1 已被彻底灭活后方可进行后续的实验。Ah1 菌株保存于华中农业大学水产学院细菌学实验室。

AIM 液含有 47.5 mL L-15 培养基, 2.5 mL 双抗, 2.5  $\mu$ g/mL 两性霉素 B 和 25  $\mu$ g/mL 庆大霉素, 置于 4 °C 备用。

细胞原代培养基含有 44.5 mL L-15 培养基, 0.5 mL 双抗, 5 mL 胎牛血清 FBS, 2.5  $\mu$ g/mL 两性霉素 B 和 25  $\mu$ g/mL 庆大霉素, 置于 4 °C 备用。

### 1.2 引物合成

根据草鱼 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 的核苷酸序列, 利用 Primer premier 5.0 软件设计特异性引物分别扩增 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 的 ORF 区, 引物上下游分别引入 *Hind* III 和 *Bam*H I 限制性酶切位点, 引物序列见表 1, 由武汉擎科生物技术有限公司合成。

表 1 引物碱基序列

Tab. 1 Nucleotide sequences of primers

| 引物 primers                       | 序列 (5'-3') sequences (5'-3')  | 用途 purpose                          |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|
| <i>CD8<math>\alpha</math></i> -F | CCCAAGCTTCATCGGATTTGTGTGAGTT  | 扩增 <i>CD8<math>\alpha</math></i> 基因 |
| <i>CD8<math>\alpha</math></i> -R | CGCGGATCCTGTCTGGGTTGAGGTTGTCT | 扩增 <i>CD8<math>\alpha</math></i> 基因 |
| <i>CD207</i> -F                  | CCCAAGCTTGACAATATCAACATTCCCG  | 扩增 <i>CD207</i> 基因                  |
| <i>CD207</i> -R                  | CGCGGATCCGTGCTGCCATCAACCCATT  | 扩增 <i>CD207</i> 基因                  |
| <i>CD80/86</i> -F                | TTTGAACAAGCGTTTACCCA          | 荧光定量PCR (qPCR)                      |
| <i>CD80/86</i> -R                | TGGCACGGTTTGAATACTA           | qPCR                                |
| <i>CD83</i> -F                   | AAAACAATGGCAAAGTGGA           | qPCR                                |
| <i>CD83</i> -R                   | CAAGAGGAGCAGACATAAAAGC        | qPCR                                |
| <i>MHC II</i> -F                 | TTGTGGGGTTTACAGAGTTTGG        | qPCR                                |
| <i>MHC II</i> -R                 | TTGATTGGTTGAGGGTAGAAG         | qPCR                                |
| $\beta$ -actin-F                 | CCTTCTGGGTATGGAGTCTTG         | qPCR                                |
| $\beta$ -actin-R                 | AGAGTATTTACGCTCAGGTGGG        | qPCR                                |

### 1.3 草鱼脾脏 DCs 的分离和纯化

草鱼脾脏树突状细胞分离富集方法参考李思思等<sup>[9]</sup>, 在无菌条件下剖取草鱼脾脏, 于 AIM 液中浸泡, 用无菌注射器橡胶塞轻轻按压通过 200 目 (70  $\mu\text{m}$ ) 细胞筛获得单细胞悬液, 并按照 2:1 (体积比) 的比例轻轻铺加在盛有 Ficoll 分离液的 15 mL 离心管中。800 $\times$ g 室温离心 20 min 后, 吸取界面层之间的“白膜层”细胞, 无菌 PBS 洗涤 2 次, 加入细胞原代培养基重悬并调整密度为  $1 \times 10^7$  个/mL 细胞, 并转移至 25  $\text{cm}^2$  细胞培养瓶中, 于 28  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中培养, 隔天吸出原培养瓶中一半的培养液, 离心收集悬浮细胞, 再加入一半新鲜培养基。培养 7 d, 收集非贴壁细胞, 使用密度为 1.067 和 1.077 g/mL 的 Percoll 密度分离液, 按照说明书的步骤操作富集上一步收集到的非贴壁细胞。富集后的细胞用无菌 PBS 洗涤 2 次备用。吉姆萨染色进行形态学观察。

### 1.4 草鱼脾脏 DCs 膜表面标记分子的测定

调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL, 向 24 孔板中每孔加入 100  $\mu\text{L}$  DCs, 实验组添加灭活嗜水气单胞菌 (MOI=100), 对照组为未处理的草鱼 DCs。28  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱中孵育 12 h, 收集细胞, 按照 TRIzol 试剂盒说明书提取收集到的草鱼 DCs 的总 RNA, 按照 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书将草鱼 DCs 总 RNA 反转录为 cDNA, 用于检测 DCs 膜表面标记分子 *CD83*、*CD80/86* 和 *MHC-II* 表达情况,  $\beta$ -actin 为内参基因; 每个样品重复 3 次。qPCR 根据 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒说明书进行, 采用 20  $\mu\text{L}$  反应体系: SYBR qPCR Master Mix (2 $\times$ ) 10  $\mu\text{L}$ , 上下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , cDNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu\text{L}$ 。扩增条件: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 40 个循环。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  方法计算各组相对表达量, 并进行显著性差异分析。实验结果用平均值 $\pm$ 标准误 (mean $\pm$ SE) 表示。

### 1.5 草鱼 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 基因的扩增和重组真核表达质粒的构建与鉴定

25  $\mu\text{L}$  PCR 扩增体系: PrimerSTAR12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$  草鱼树突状细胞 cDNA 作为模版, ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s、57  $^{\circ}\text{C}$  30 s、72  $^{\circ}\text{C}$

40 s, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 对 PCR 扩增、纯化的 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 片段和表达质粒 pcDNA3.1 进行双酶切, 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴酶切 1 h, 纯化后连接。连接体系: T4 连接酶 1  $\mu\text{L}$ , Buffer 1  $\mu\text{L}$ , pcDNA3.1 质粒 1.5  $\mu\text{L}$ , *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 片段均为 6.5  $\mu\text{L}$ 。16  $^{\circ}\text{C}$  水浴连接过夜。转化 DH5 $\alpha$  菌株, 提取质粒, 经菌液 PCR 进行阳性单克隆鉴定正确后, 由武汉擎科生物技术有限公司进行测序, 经确认的重组质粒命名为 pcDNA3.1-*CD8 $\alpha$*  和 pcDNA3.1-*CD207*。

### 1.6 细胞的培养与转染

在转染前 1 天 (18~24 h) 将 DCs ( $1 \times 10^6$  个/mL) 按照每孔 1 mL 接种到 12 孔板内进行培养。取一个洁净无菌离心管, 加入 50  $\mu\text{L}$  不含抗生素和血清的 L-15 培养液、1  $\mu\text{g}$  重组质粒 DNA, 并用移液枪轻轻吹打混匀; 再加入 1.6  $\mu\text{L}$  Lipo8000<sup>TM</sup> 转染试剂并轻轻吹打混匀, 室温孵育 20 min。向待转染的 12 孔板中每一个孔的细胞均加入 DNA 混合物。同时设立空载质粒 pcDNA3.1 对照, 每组重复 3 次。

### 1.7 转染细胞的免疫印迹法 (Western blot) 分析

分别收集转染 pcDNA3.1 真核表达质粒和 pcDNA3.1-*CD8 $\alpha$* 、pcDNA3.1-*CD207* 重组真核表达质粒的草鱼 DCs 细胞, 制备细胞总蛋白提取液, 采用 Western blot 检测各组 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 表达情况, 一抗分别为 1:2000 稀释的草鱼 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 多克隆抗体。将制备的细胞总蛋白提取液分别进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 半干转膜法转移至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 膜上, 于 5% 的 BSA 封闭液中室温封闭 2 h; 与稀释后的一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜; 二抗为 1:5000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h; 每次反应后均用 TBST 洗 3 次, 每次 15 min。ECL 显色液显色并观察结果。ImageJ 软件 (National Institutes of Health) 进行灰度分析, 并进行显著性差异分析。“\*”表示与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ )。

### 1.8 *CD8 $\alpha$* 、*CD207* 的亚细胞定位分析

①固定。离心收集悬浮的树突状细胞于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 4% 多聚甲醛固定 24 h, 配制琼脂糖溶液, 使用液态琼脂糖将细胞沉淀充分包裹, 包裹后的细胞琼脂糖冷却成块;

②脱水、透明、浸蜡。采用从低浓度到高浓度逐级升高的梯度乙醇对细胞块进行脱水, 然后



浸入二甲苯中将细胞块透明,脱水透明后的细胞块在熔化的石蜡包埋剂中浸蜡;

③包埋、切片、脱蜡至水。将完成浸蜡的细胞块放入包埋框内包埋,于-20℃冻台冷却,将预冷的蜡块固定在石蜡切片机上切4 $\mu$ m厚度切片,将切片在摊片机的温水(45℃)上摊平,放置65℃烤片机上烤1h,再放置烤箱内烘烤2h,之后经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水,最后蒸馏水洗;

④抗原修复、画圈、血清封闭。切片置于盛满乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复缓冲液(PH 8.0)的修复盒中于微波炉内进行抗原修复,自然冷却后将玻片置于PBS(PH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5min,切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈,在圈内滴加牛血清白蛋白(BSA)孵育30min;

⑤加草鱼CD207一抗(CD8 $\alpha$ 一抗)。轻轻甩掉封闭液,在切片上滴加1:200(体积比)稀释的一抗,切片平放于湿盒内4℃孵育过夜;

⑥加Cy3(FITC)Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)。玻片置于PBS(PH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5min。切片稍甩干后在圈内滴加1:200(体积比)稀释的二抗,避光室温孵育50min;

⑦DAPI复染细胞核。切片稍甩干后在圈内滴加DAPI染液,避光室温孵育10min;

⑧自发荧光淬灭。切片稍甩干后,在圈内加

入自发荧光淬灭剂5min,流水冲洗10min;

⑨封片。玻片置于PBS(PH 7.4)中在脱色摇床上晃动洗涤3次,每次5min,切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片;

⑩镜检拍照。切片置于扫描仪下采集图像或荧光显微镜下拍照。DAPI紫外激发波长330~380nm,发射波长420nm,发蓝光;FITC激发波长465~495nm,发射波长515~555nm,发绿光;Cy3激发波长510~560nm,发射波长590nm,发红光;DAPI染细胞核在紫外的激发下为蓝色,阳性表达为相应荧光素标记的蓝光,绿光。

## 2 结果

### 2.1 PCR扩增CD207、CD8 $\alpha$ 及重组真核表达质粒构建

PCR扩增CD207、CD8 $\alpha$ ,1%琼脂糖凝胶电泳检测结果显示,分别在903、648bp处有一条特异性条带,与理论大小一致(图1)。利用限制性内切酶Hind III和BamH I对扩增片段及质粒pcDNA 3.1进行双酶切,连接、转化大肠杆菌trans5 $\alpha$ 菌株、阳性单克隆鉴定、测序确认。

### 2.2 草鱼脾脏DCs的形态学观察和膜表面分子测定

收集培养至第7天的非贴壁细胞,使用密度

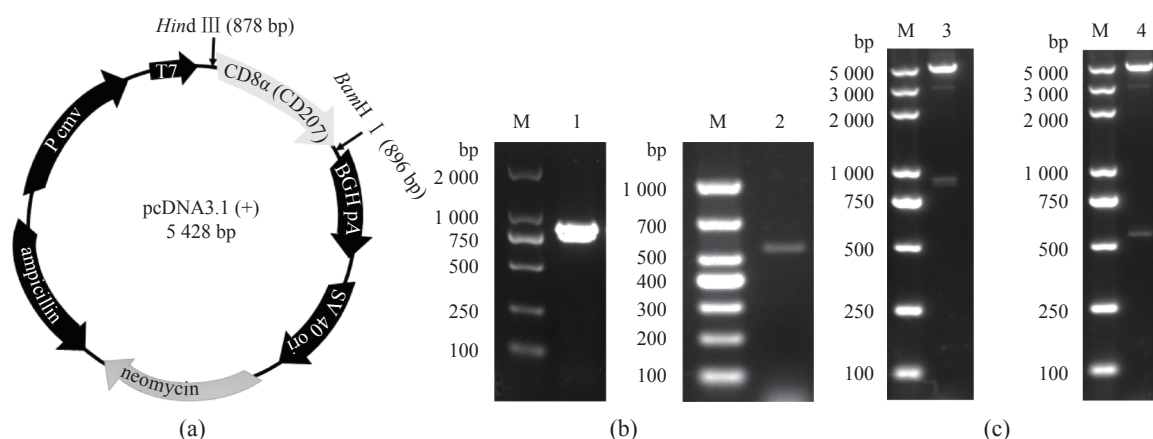


图1 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ 、pcDNA3.1-CD207 重组真核表达质粒的构建

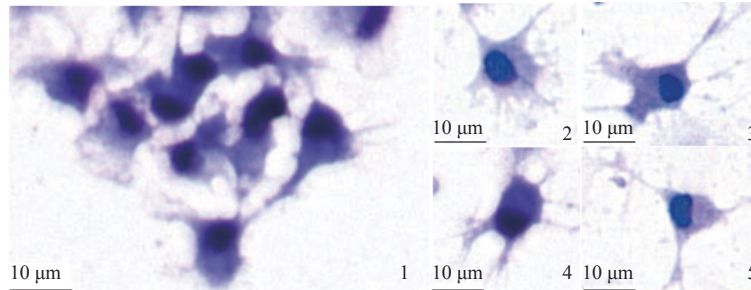
(a) pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ /CD207 重组真核表达质粒图谱, (b) PCR 扩增 CD8 $\alpha$ 、CD207 目的片段, (c) pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ 、pcDNA3.1-CD207 的双酶切鉴定; M. 分子质量标准, 1. CD207 基因 PCR 产物, 2. CD8 $\alpha$  基因 PCR 产物, 3. Hind III 和 BamH I 双酶切 pcDNA3.1-CD207, 4. Hind III 和 BamH I 双酶切 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$

### Fig. 1 Construction of recombinant eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ and pcDNA3.1-CD207

(a) pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ /CD207 recombinant eukaryotic expression plasmid map, (b) PCR amplification of CD8 $\alpha$  and CD207 fragments, (c) enzyme digestion identification of pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  and pcDNA3.1-CD207; M. molecular weight standard, 1. CD207 PCR products, 2. CD8 $\alpha$  PCR products, 3. enzyme digestion of pcDNA3.1-CD207 by Hind III/BamH I, 4. enzyme digestion of pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  by Hind III/BamH I

梯度分离法纯化, 流式细胞术分析结果显示 DCs 纯度约为 80%。吉姆萨染色结果显示, 草鱼 DCs 具有典型的树突样形态, 胞体形态不规则, 细胞核呈椭圆形, 整体呈星形或细长形的细胞形态

(图版 I)。在灭活嗜水气单胞菌处理 12 h 后, 草鱼 DCs 膜表面标记分子 CD83、CD80/86、MHC-II 表达显著提升, 与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。



图版 I 草鱼 DCs 的形态学观察

1. DCs 的集群, 2~5. 不同细胞形态的 DCs

#### Plate I Morphological observation of DCs in *C. idella*

1. the DCs cluster, 2-5. DCs of different cell morphology

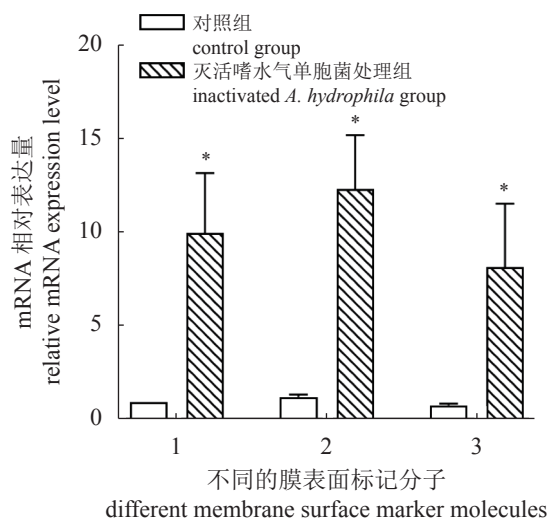


图 2 灭活嗜水气单胞菌处理草鱼 DCs 12 h 后测定膜表面分子表达情况

1. CD83, 2. CD80/86, 3. MHC-II; 图中数据表示为平均值±标准误差 ( $n = 3$ ); “\*”代表显著差异,  $P < 0.05$

Fig. 2 Determination of membrane surface molecular expression in DCs of *C. idella* after treatment with inactivated *A. hydrophila* for 12 h

1. CD83, 2. CD80/86, 3. MHC-II; error bars indicate the mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ); “\*” represents significant difference,  $P < 0.05$

### 2.3 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ 、pcDNA3.1-CD207 重组质粒表达的 Western blot 分析

为检测重组真核表达质粒的表达情况, 对分别转染 pcDNA3.1 空载质粒和重组真核表达质粒的草鱼 DCs 细胞进行 Western blot 分析, 使用自制的草鱼 CD8 $\alpha$ 、CD207 多克隆抗体作为一抗。

结果显示, 转染 pcDNA3.1 空载质粒和 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  重组真核表达质粒的细胞蛋白提取物中均出现 1 条大小约 32 ku 的条带; 转染 pcDNA3.1 空载质粒和 pcDNA3.1-CD207 重组真核表达质粒的细胞蛋白提取物中均出现 1 条大小约 35 ku 的条带, 与预期大小相符。且分别转染 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  (泳道 1)、pcDNA3.1-CD207 (泳道 3) 的细胞 CD8 $\alpha$ 、CD207 蛋白相对表达水平显著提高 ( $P < 0.05$ ), 表明该重组真核表达质粒在草鱼 DCs 细胞中获得了有效表达且分别可被草鱼 CD8 $\alpha$ 、CD207 抗体识别; 使用  $\beta$ -actin 抗体作内参在 2 种细胞中均能检测到相应条带 (图 3)。

### 2.4 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ 、pcDNA3.1-CD207 重组真核表达质粒在草鱼 DCs 中的表达

对转染 pcDNA3.1 空载质粒和分别转染 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$ 、pcDNA3.1-CD207 重组真核表达质粒的草鱼 DCs, 通过免疫荧光分别检测 CD8 $\alpha$ 、CD207 蛋白的分布情况。发现分别转染 pcDNA3.1-CD207、pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  重组真核表达质粒的草鱼 DCs 中的红色荧光信号 (图版 II)、绿色荧光信号 (图版 III) 主要分布于细胞膜上; 而转染 pcDNA3.1 空载质粒的草鱼 DCs 中可以分别观察到红色荧光信号和绿色荧光信号, 但荧光信号较转染重组真核表达质粒的 DCs 中的荧光信号更加微弱。

## 3 讨论

在哺乳动物中, 关于树突状细胞的分类、发

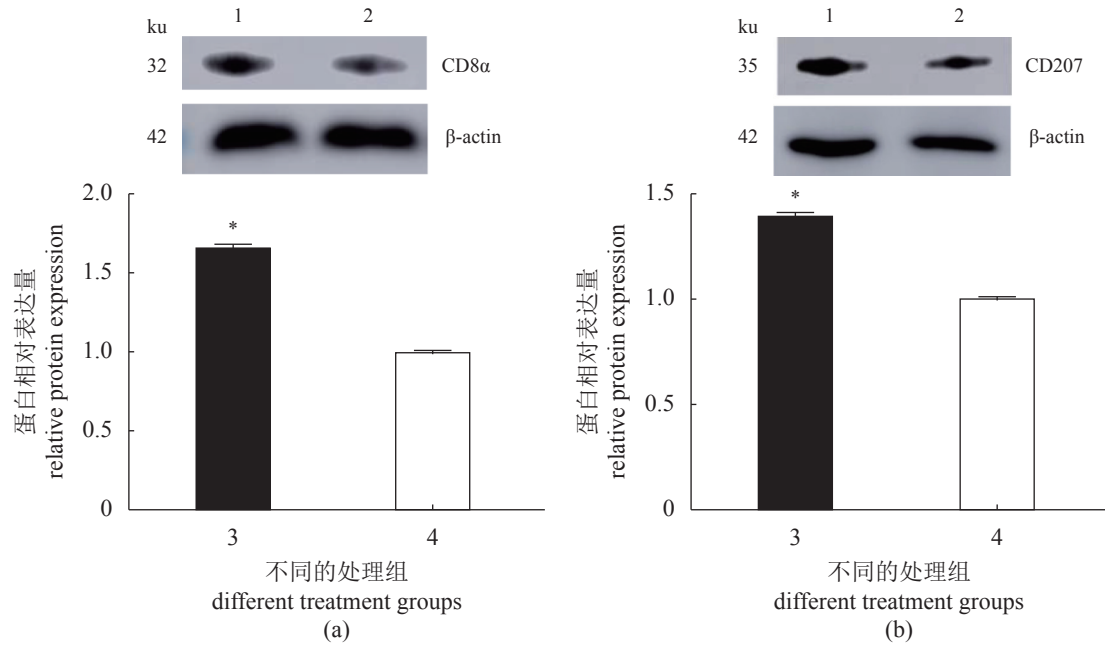
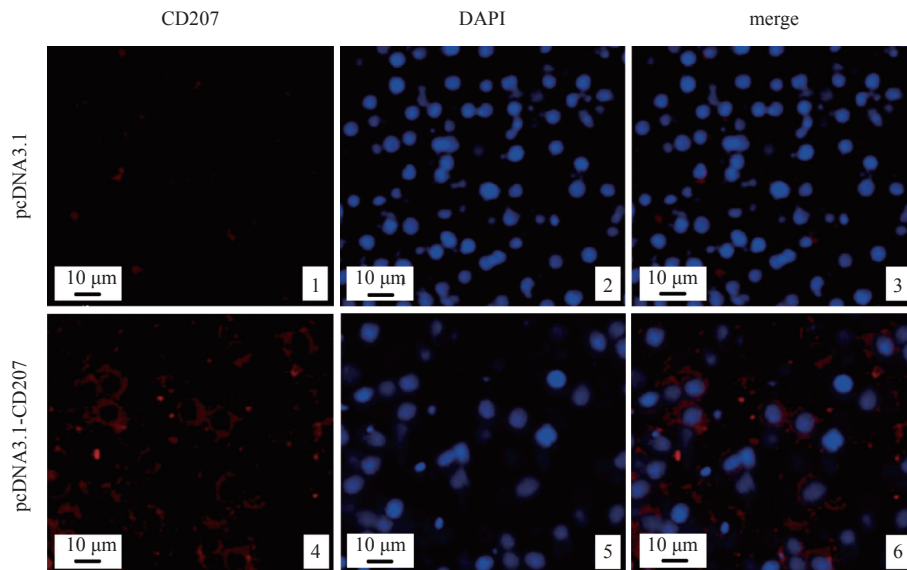


图 3 Western blot 检测 pcDNA3.1-CD8α (a)、pcDNA3.1-CD207(b) 重组真核表达质粒的表达

(a)Western blot 检测 CD8α 表达情况; 1. 转染 pcDNA3.1-CD8α, 2. 转染 pcDNA3.1, 3~4. 灰度分析转染 pcDNA3.1-CD8α、pcDNA3.1 后 CD8α 蛋白相对表达; (b)Western blot 检测 CD207 表达情况; 1. 转染 pcDNA3.1-CD207, 2. 转染 pcDNA3.1, 3~4. 灰度分析转染 pcDNA3.1-CD207、pcDNA3.1 后 CD207 蛋白相对表达量; 图中数据表示为平均值±标准差 (n = 3); “\*”代表显著差异, P < 0.05

Fig. 3 The expression levels of pcDNA3.1-CD8α and pcDNA3.1-CD207 recombinant eukaryotic expression plasmid detected by Western blot

(a) CD8α expression detected by Western blot; 1. transfection of pcDNA3.1-CD8α, 2. transfection of pcDNA3.1, 3-4. gray scale analysis of the relative expression of CD8α protein after transfection pcDNA3.1-CD8α and pcDNA3.1 respectively; (b) CD207 expression detected by Western blot; 1. transfection of pcDNA3.1-CD207, 2. transfection of pcDNA3.1, 3-4. gray scale analysis of the relative expression of CD207 protein after transfection pcDNA3.1-CD207 and pcDNA3.1 respectively; error bars indicate the mean and standard deviation (n = 3); “\*” represents significant difference, P < 0.05

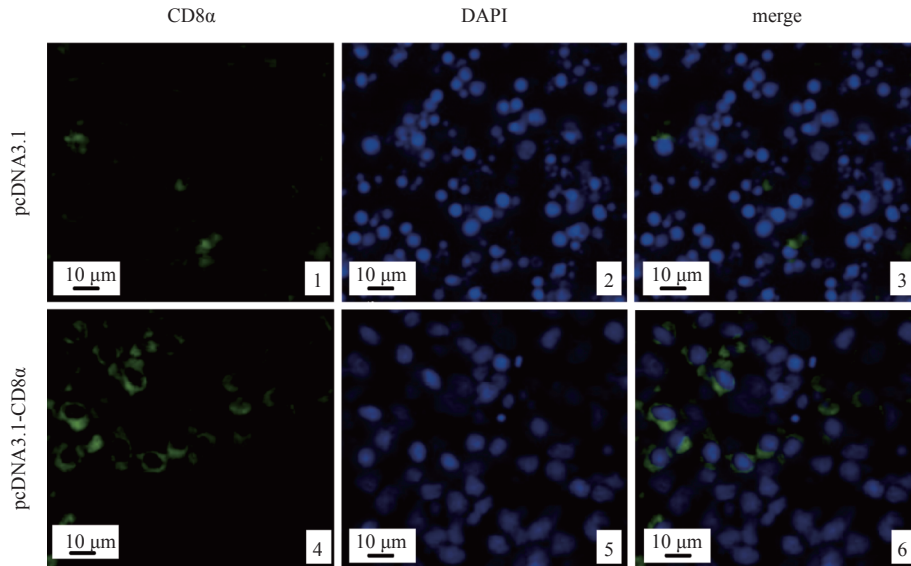


图版 II 细胞免疫荧光检测重组真核表达质粒 pcDNA3.1-CD207 在草鱼 DCs 中的表达

1~3. 转染 pcDNA3.1 空载质粒之后 CD207 的分布情况, 4~6. 转染 pcDNA3.1-CD207 重组真核表达质粒之后 CD207 的分布情况

Plate II Expression of recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-CD207 in DCs of *C. idella* detected by cellular immunofluorescence assay

1-3. the distribution of CD207 after transfection of the empty plasmid of pcDNA3.1, 4-6. the distribution of CD207 after transfection of the recombinant eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-CD207



图版III 细胞免疫荧光检测重组真核表达质粒 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  在草鱼 DCs 中的表达

1~3. 转染 pcDNA3.1 空载质粒之后 CD8 $\alpha$  的分布情况, 4~6. 转染 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  重组真核表达质粒之后 CD8 $\alpha$  的分布情况

**Plate III Expression of recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  in DCs of *C. idella* detected by cellular immunofluorescence assay**

1-3. the distribution of CD8 $\alpha$  after transfection of the empty plasmid of pcDNA3.1, 4-6. the distribution of CD8 $\alpha$  after transfection of the recombinant eukaryotic expression plasmid of pcDNA3.1-CD8 $\alpha$

育、激活、抗原呈递、信号通路和调节机制已经进行充分研究。在表面表型分子中, 共刺激分子 (CD83、CD80 和 CD86)、同源二聚体 CD8 $\alpha$ 、整合素 CD103 和 C 型凝集素分子 (CD207、CD209) 被认为是哺乳动物中 DCs 的重要标志, 它们在 DCs 介导的适应性免疫中发挥重要作用<sup>[19-20]</sup>。CD83 是一种在成熟 DCs 上表达的跨膜糖蛋白, 它在 DCs 介导的初始 T 细胞和辅助性 T 细胞的活化中发挥关键作用<sup>[21]</sup>。CD80 和 CD86 是表达在 DCs 表面的 I 型跨膜糖蛋白, 通过与 CD28 的相互作用可活化 T 淋巴细胞, 促进 T 细胞的增殖与分化, CD80 和 CD86 在哺乳动物中独立存在, 而硬骨鱼中只存在单一分子标记即 CD80/86<sup>[22-23]</sup>。C 型凝集素 CD207 和 CD209 为 II 型跨膜糖蛋白, CD209 在 DCs 的细胞黏附、迁移、激活初始 T 细胞、引发免疫反应及参与病原体免疫逃逸等多个方面发挥免疫调节作用<sup>[24]</sup>; CD207 可与多种病原微生物结合, 通过内吞抗原的作用将抗原传递至伯贝克颗粒从而保护机体<sup>[25]</sup>。CD207 在 CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 和 CD103<sup>+</sup>DC 上均有表达<sup>[26]</sup>, CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 可将细胞相关抗原和可溶性抗原通过 MHC I 类分子呈递给 CD8<sup>+</sup>T 淋巴细胞, 在抗病毒免疫、抗肿瘤免疫以及抗胞内寄生虫免疫中发挥重要作用<sup>[27]</sup>; CD103<sup>+</sup>DC 有较强的迁移能力, 同时也在递呈抗原激活 CD8<sup>+</sup>T 细胞的

过程中起关键作用<sup>[28]</sup>。

鱼类 DCs 的研究开展较晚, 尽管部分硬骨鱼类中已被证明存在 DCs<sup>[10,29]</sup>, 对鱼类 DCs 的功能研究取得了一定进展, 但其免疫表型的研究报道较少。目前, 在虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*) 的皮肤、鳃和肠道中鉴定出一种 CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC, 能够吞噬小的颗粒, 被 TLR 的配体激活, 在体内具有迁移能力, 并且这类 DC 群体相比其他 DC 亚群, 可以通过交叉呈递抗原更有效地激活细胞毒性 T 淋巴细胞 (CTL) 从而触发针对胞内病原体和肿瘤的杀伤作用<sup>[6-8]</sup>。CD207 的表达广泛应用于虹鳟和大西洋鲑<sup>[30]</sup> (*Salmo salar*)、斑点叉尾鲟 (*Ictalurus punctatus*)<sup>[31]</sup> 等硬骨鱼类的朗格汉斯细胞鉴定, 并且有研究表明, CD207 在细菌感染后的免疫应答中起关键作用<sup>[18]</sup>。

本实验室在之前的研究中首次从草鱼脾脏中分离培养了一类具有典型树突样形态的细胞, 通过形态学观察、生物学功能分析和膜表面标记分子的研究, 证实这类细胞和哺乳动物树突状细胞具有高度同源性<sup>[9]</sup>。为了深入研究草鱼 DCs 的表面表型分子及其功能, 本实验成功构建了重组真核表达质粒 pcDNA3.1-CD8 $\alpha$  和 pcDNA3.1-CD207, 2 个重组真核表达质粒均能在草鱼 DCs 中表达, 可分别用草鱼 CD8 $\alpha$ 、CD207 多克隆抗体进行鉴



定, 免疫荧光显示, CD8 $\alpha$ 、CD207 主要表达于草鱼 DCs 的细胞膜上。实验结果证明, CD8 $\alpha$ 、CD207 为草鱼 DCs 表面的 2 种表型分子, 草鱼 DCs 表现出与哺乳动物相似的免疫表型, 同时丰富了鱼类 DCs 表面表型分子的研究。构建的重组真核表达载体为深入研究 CD8 $\alpha$ 、CD207 在草鱼 DCs 中所行使的功能提供了有力工具, 对阐明草鱼 DCs 参与免疫应答的调节机制具有重要意义, 并且为后续 CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>DC 和朗格汉斯细胞的分选、功能鉴定以及明晰 DCs 亚群的作用机制提供了理论依据。

目前鱼类 DCs 缺乏明确的细胞标记, 加强对鱼类 DCs 相关免疫表型的研究有助于提高鱼类 DCs 的分离、体内分布与功能的研究水平<sup>[32]</sup>, 并且开展草鱼 DCs 免疫表型的研究对深入分析草鱼 DCs 介导的免疫调节机制有积极作用。草鱼养殖过程中, 极易受病原体感染, 诱发炎症反应, 开展以草鱼 DCs 为基础的免疫治疗可以为草鱼相关疾病的防治提供新思路, 在减少鱼类病害和增强鱼用疫苗的免疫效力方面有着广泛的应用前景。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Steinman R M, Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice I. Morphology, quantitation, tissue distribution[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1973, 137(5): 1142-1162.
- [ 2 ] Waisman A, Lukas D, Clausen B E, *et al.* Dendritic cells as gatekeepers of tolerance[J]. *Seminars in Immunopathology*, 2017, 39(2): 153-163.
- [ 3 ] Steinman R M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future[J]. *Annual Review of Immunology*, 2012, 30: 1-22.
- [ 4 ] Ueno H, Klechevsky E, Morita R, *et al.* Dendritic cell subsets in health and disease[J]. *Immunological Reviews*, 2007, 219(1): 118-142.
- [ 5 ] 李凤铃, 李兆新, 翟毓秀, 等. 鱼类适应性免疫系统研究概述[J]. *水产科学*, 2012, 31(4): 240-244.
- Li F L, Li Z X, Zhai Y X, *et al.* Adaptive immune system in fish[J]. *Fisheries Science*, 2012, 31(4): 240-244 (in Chinese).
- [ 6 ] Soletto I, Fischer U, Tafalla C, *et al.* Identification of a potential common ancestor for mammalian cross-presenting dendritic cells in teleost respiratory surfaces[J]. *Frontiers in Immunology*, 2018, 9: 59.
- [ 7 ] Soletto I, Granja A G, Simón R, *et al.* Identification of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2019, 89: 309-318.
- [ 8 ] Granja A G, Leal E, Pignatelli J, *et al.* Identification of teleost skin CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic-like cells, representing a potential common ancestor for mammalian cross-presenting dendritic cells[J]. *The Journal of Immunology*, 2015, 195(4): 1825-1837.
- [ 9 ] 李思思, 周成翀, 王欢, 等. 草鱼树突状细胞的分离鉴定及益生芽孢杆菌对其免疫功能的影响[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(2): 245-251.
- Li S S, Zhou C C, Wang H, *et al.* Identification of grass carp dendritic cells (*Ctenopharyngodon idellus*) and regulatory effects of *Bacillus subtilis* on the immune functions[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(2): 245-251 (in Chinese).
- [10] Bassity E, Clark T G. Functional identification of dendritic cells in the teleost model, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33196.
- [11] Zoccola E, Delamare-Deboutteville J, Barnes A C. Identification of barramundi (*Lates calcarifer*) DC-SCRIPT, a specific molecular marker for dendritic cells in fish[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132687.
- [12] Shao T, Zhu L Y, Nie L, *et al.* Characterization of surface phenotypic molecules of teleost dendritic cells[J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2015, 49(1): 38-43.
- [13] Winkel K, Sotzik F, Vremec D, *et al.* CD4 and CD8 expression by human and mouse thymic dendritic cells[J]. *Immunology Letters*, 1994, 40(2): 93-99.
- [14] Kulig P, Musiol S, Freiberger S N, *et al.* IL-12 protects from psoriasisiform skin inflammation[J]. *Nature Communications*, 2016, 7(1): 13466.
- [15] Figdor C G, Van Kooyk Y, Adema G J. C-type lectin receptors on dendritic cells and langerhans cells[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(2): 77-84.
- [16] Valladeau J, Ravel O, Dezutter-Dambuyant C, *et al.* Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules[J]. *Immunity*, 2000, 12(1): 71-81.
- [17] 王俊亚. 草鱼 CD8 $\alpha$  和 IL-2 分子晶体结构及相关信号通路研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2018.



- Wang J Y. The crystal structures and related signal pathways of the grass carp CD8 $\alpha$  and interleukin-2 molecules[D]. Beijing: China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [18] Wang H, Chen X, Li S S, *et al.* Identification and expression analysis of langerhans cells marker langerin/CD207 in grass carp, *Ctenopharyngodon idella*[J]. *Gene*, 2021, 768: 145315.
- [19] Merad M, Sathe P, Helft J, *et al.* The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting[J]. *Annual Review of Immunology*, 2013, 31: 563-604.
- [20] Satpathy A T, Wu X D, Albring J C, *et al.* Re(de)fining the dendritic cell lineage[J]. *Nature Immunology*, 2012, 13(12): 1145-1154.
- [21] Lechmann M, Berchtold S, Steinkasserer A, *et al.* CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation[J]. *Trends in Immunology*, 2002, 23(6): 273-275.
- [22] Orabona C, Grohmann U, Belladonna M L, *et al.* CD28 induces immunostimulatory signals in dendritic cells via CD80 and CD86[J]. *Nature Immunology*, 2004, 5(11): 1134-1142.
- [23] Sharpe A H, Freeman G J. The B7-CD28 superfamily[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2002, 2(2): 116-126.
- [24] Relloso M, Puig-Kröger A, Pello O M, *et al.* DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF- $\beta$ , and anti-inflammatory agents[J]. *The Journal of Immunology*, 2002, 168(6): 2634-2643.
- [25] Igyártó B Z, Kaplan D H. Antigen presentation by Langerhans cells[J]. *Current Opinion in Immunology*, 2013, 25(1): 115-119.
- [26] Bursch L S, Wang L C, Igyarto B, *et al.* Identification of a novel population of Langerin<sup>+</sup> dendritic cells[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 2007, 204(13): 3147-3156.
- [27] Lorenzi S, Mattei F, Sistigu A, *et al.* Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming[J]. *The Journal of Immunology*, 2011, 186(9): 5142-5150.
- [28] Del Rio M L, Bernhardt G, Rodriguez-Barbosa J I, *et al.* Development and functional specialization of CD103<sup>+</sup> dendritic cells[J]. *Immunological Reviews*, 2010, 234(1): 268-281.
- [29] Lugo-Villarino G, Balla K M, Stachura D L, *et al.* Identification of dendritic antigen-presenting cells in the zebrafish[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(36): 15850-15855.
- [30] Lovy J, Savidant G P, Speare D J, *et al.* Langerin/CD207 positive dendritic-like cells in the haemopoietic tissues of salmonids[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, 27(2): 365-368.
- [31] Kordon A O, Scott M A, Ibrahim I, *et al.* Identification of Langerhans-like cells in the immunocompetent tissues of channel catfish, *Ictalurus punctatus*[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016, 58: 253-258.
- [32] 陈孝焯, 李思思, 周成翀, 等. 鱼类树突状细胞研究进展[J]. *水产学报*, 2019, 43(1): 54-61.
- Chen X X, Li S S, Zhou C C, *et al.* A review of the dendritic cells research in fish[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2019, 43(1): 54-61 (in Chinese).

## Construction and expression analysis of recombinant eukaryotic expression plasmids of *CD8 $\alpha$* and *CD207* genes in *Ctenopharyngodon idella*

TIAN Ding<sup>1</sup>, Li Keke<sup>1</sup>, JIANG Fei<sup>1</sup>, CHEN Chunxiu<sup>1</sup>,  
NIAN Ziqing<sup>1</sup>, WU Zhixin<sup>1,2</sup>, CHEN Xiaoxuan<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Engineering Research Center for Aquatic Animal Diseases Control and Prevention, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** Dendritic cells are the outposts of the immune system, which link innate immunity with adaptive immunity, and thus are considered as the most powerful antigen-presenting cells *in vivo*. To further investigate the functions of *CD8 $\alpha$*  and *CD207* in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) dendritic cells (DCs), the recombinant eukaryotic expression plasmids of *CD8 $\alpha$*  and *CD207* genes were constructed and successfully expressed in DCs of *C. idella*. The open reading frames (ORFs) of *CD8 $\alpha$*  and *CD207* were obtained from DCs of *C. idella* by RT-PCR and inserted into recombinant eukaryotic expression plasmid pcDNA3.1, respectively, to construct recombinant eukaryotic expression plasmids pcDNA3.1-*CD8 $\alpha$*  and pcDNA3.1-*CD207*; after the sequencing was confirmed to be correct, the recombinant eukaryotic expression plasmids were transfected into DCs of *C. idella* using liposome method, and the expressions of *CD8 $\alpha$*  and *CD207* were verified by cell immunofluorescence technology and Western blot. The results showed that in the Western blot assay, the *CD8 $\alpha$*  and *CD207* proteins were expressed normally and significantly overexpressed after transfection of the recombinant eukaryotic expression plasmid, and the size was consistent with that of the predicted result. Cellular immunofluorescence showed that the *CD8 $\alpha$*  and *CD207* proteins were mainly expressed on the cell membrane of DCs. Hence, DCs of *C. idella* exhibit immunophenotypes and functions that are conserved in their mammalian counterparts. The recombinant eukaryotic expression plasmids of pcDNA3.1-*CD8 $\alpha$*  and pcDNA3.1-*CD207* were successfully constructed, which laid a foundation for further research on the action mechanism of *CD8 $\alpha$*  and *CD207* genes in DCs. Carrying out studies on the immunophenotype of DCs will play a positive role in analyzing the DCs-mediated immune regulation mechanism of *C. idella*. In the cultivation process, *C. idella* are easily infected by pathogens and induce inflammatory reactions. The development of DCs-based immunotherapy can provide new ideas for the prevention and control of *C. idella* related diseases, which has a wide application prospect in reducing diseases and enhancing the immune efficacy of vaccines for teleost fish.

**Key words:** *Ctenopharyngodon idella*; dendritic cells; *CD8 $\alpha$* ; *CD207*; eukaryotic expression plasmid

**Corresponding author:** CHEN Xiaoxuan. E-mail: chenxx@mail.hzau.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31972819)