炭疽受体 CMG2-Fc 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达、纯化与鉴定

郗永义 胥照平 高丽华 邵 勇 胡显文△ 陈惠鹏△

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘要 目的：构建炭疽受体 CMG2 和人 IgG1 Fc 片段融合基因载体，转染 CHO 细胞并通过毒素中和试验检测 CMG2-Fc 拮抗炭疽毒素(PA+LF)的能力。方法：将含有 CMG2 胞外区 1-217AA 片度基因和人 IgG1 的 Fc 片段基因共同连接入 pcDNA3.1 载体转染 CHO 细胞并筛选高表达 CMG2-Fc 的 CHO 细胞系，通过小鼠 RAW264.7 巨噬细胞保护试验检测 CMG2-Fc 拮抗炭疽毒素的能力。结果：获得了表达 CMG2-Fc 的细胞株，毒素中和实验显示该蛋白可以有效抑制炭疽毒素引起的细胞损伤。结论：CMG2-Fc 能够保护小鼠巨噬细胞免受炭疽毒素攻击，提示其可以作为抗毒素治疗炭疽感染。

关键词：炭疽杆菌；CMG2；炭疽毒素；融合蛋白

中图分类号：R517.2，Q75，Q78 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-6273(2011)11-2022-04

Expression,Purification and Identification of Anthrax Receptor CMG2-Fc Fusion Protein in CHO Cell

XI Yong-yi, XU Zhao-ping, GAO Li-hua, SHAO Yong, HU Xian-wen△, CHEN Hui-peng△

(Beijing Institute of Biotechnology, Beijing 100071, China)

ABSTRACT Objective: To construct fusion gene vector of anthrax receptor CMG2 and human IgG1 Fc fragent, transfect CHO cell and to testify the inhibit ability of CMG2-Fc on anthrax toxin (PA and LF) by toxin neutralization assay. Methods: An expression vector including CMG2 (1-225AA) gene and Fc fragment of human immunoglobulin G (IgG) were constructed, and CHO cell line with higher CMG2-Fc expression were got. The effect of CMG2-Fc on inhibiting anthrax toxin was detected by mouse macrophage protection assay. Results: The CHO cell line expressing CMG2-Fc protein were got, and toxin neutralization assay showed that CMG2-Fc could protect mouse RAW264.7 macrophage cell against anthrax toxins. Conclusion: CMG2-Fc can protect mouse macrophage against anthrax toxin challenge, which indicated that it maybe used as drugs against anthrax in future.

Key words: Bacillus anthracis; CMG2; Anthrax toxin; Fusion protein

Chinese Library Classification(CLC): R517.2, Q75, Q78 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)11-2022-04

前言

在炭疽感染致死病例中，其死亡原因通常并非由炭疽杆菌本身直接引起(事实上炭疽杆菌对多种抗生素敏感)，而是由炭疽杆菌释放的炭疽毒素所致。由于炭疽病从感染开始到病症出现有长达 2 周左右的潜伏期[1]，因此患者往往错过最好的抗菌治疗时机，目前我国还没有有效药物(除抗血清)来治疗由炭疽毒素导致的死亡。编码炭疽毒素的基因位于炭疽杆菌的 pX01 质粒[2,3]，该质粒编码的毒素蛋白由三部分组成，即保护性抗原(protective antigen，PA)、致死因子(lethal factor, LF)和水肿因子(edema factor，EF)。其中 PA 是介导毒素进入细胞的主要因子，当 PA 与靶细胞膜上的 PA 受体(TEM8 和 CMG2)结合后，PA 和 PA 受体形成七聚体结构，并介导 LF 或 EF 进入靶细胞，从而损伤靶细胞结构功能以及靶器官生理功能[4]。因此，设计能有效阻止 PA 和 PA 受体结合的分子，是抵抗炭疽毒素入侵损伤细胞和器官的有效手段。

作者简介：郗永义(1979-)，男，博士研究生，助理研究员，微生物与生化药学，E-mail: xiyongyixyy@163.com

△通讯作者：胡显文，E-mail：huxianwen1969@126.com；

陈惠鹏，E-mail：chenhuipeng1963@126.com

(收稿日期：2011-03-03 接受日期：2011-03-27)

CMG2 和 TEM8 是炭疽 PA 的两个受体[5,6]，其中 CMG2 和 PA 的结合力要高于 TEM8 近 170 倍(两者结合力 KD 值分别为 0.78nM 和 130nM)[7]。而 CMG2 和 PA 结合的结构域主要位于 CMG2 胞外区的 VWA(von Willebrand factor A)区域[8]。本研究根据炭疽毒素入侵细胞机制，设计了人 CMG2(1-217aa)与人 IgG1 Fc 段融合蛋白(本论文中简写为 CMG2-Fc)，进而竞争性干扰炭疽毒素 PA 和靶细胞膜 PA 受体结合，阻止炭疽毒素入侵损伤细胞。亲和力实验证实 CMG2-Fc 和 PA 有较强的结合力，细胞保护实验显示 CMG2-Fc 可以有效拮抗炭疽毒素损伤小鼠 RAW264.7 巨噬细胞。

1 材料和方法

1.1 材料

Pyrobest DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 dNTPs 购自 TAKARA 公司；凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自天根公司；*Nhe* I、*BamH* I 和 *Xho* I 限制性内切酶购自 NEB 公司；脂质体 2000 转染试剂及 G418 购自 invitrogen 公司；DMEM /F12 培养基及胎牛血清购自 HyClone 公司；Protein A 填料购自 GE 公司；ELISA 和 SDS-PAGE 所用试剂购自康威公司；Trans 10 感受体细胞购自全式金公司；pUC19、pcDNA3.1-Fc 载体由本室保存；小鼠 RAW264.7 巨噬细胞购自中国医学

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

科学院协和细胞库。

1.2 pcDNA3.1-CMG2-Fc 基因载体构建

本实验在设计 CMG2-Fc 时，按照真核细胞表达密码子偏爱性原则，对 CMG2 基因进行了信号肽和密码子优化，交由南京金斯瑞公司通过化学合成方法获得(基因两端分别带有 Nhe I 和 BamH I 酶切位点)，而后对 CMG2 和含有人 IgG1 Fc 段基因的 pcDNA3.1-Fc 进行 Nhe I 和 BamH I 双酶切，后 T4 DNA 连接酶连接，转化 Trans10 感受态细胞，挑取阳性单克隆测序，测序确后进行质粒抽提和保存。

1.3 pcDNA3.1-CMG2-Fc 基因载体转染 CHO 细胞及单克隆赛选

按 Invitrogen 公司的脂质体 2000 转染试剂操作说明，对构建正确的 pcDNA3.1-CMG2-Fc 载体进行 CHO 转染，并用 0.5 mg/ml 浓度的 G418 进行加压筛选，待无 G418 抗性的细胞均被杀死后 (约 2 周) 进行单克隆 (有限稀释法)，并用 ELISA 方法筛选细胞表达阳性克隆。

1.4 CMG2-Fc 蛋白表达、纯化及蛋白鉴定

挑选 CMG2-Fc 蛋白表达较高的细胞克隆放大并进行转瓶无血清培养，使用 Protein A 亲和层析柱纯化细胞培养上清，对纯化收获的 CMG2-Fc 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳分析鉴定。并用肽 N- 糖苷酶 F (PNGase F) 进行 CMG2-Fc 去糖基化，并通过电泳比较去糖基化前后的蛋白大小。

1.5 CMG2-Fc 和 PA 的亲和力检测

本研究通过 forté Bio QK 仪器测定了 CMG2-Fc 和 PA 的亲和力 (具体操作见 forté Bio QK 仪器说明书)，并通过 ELISA 和 GST-pull down 测定 CMG2-Fc 和 PA 的结合力。在 ELISA 试验中，本研究以 2000ng/ml 浓度的 PA 溶液包埋 ELISA 孔，封闭结束后加入 20 倍稀释的 CMG2-Fc 无血清培养上清，温浴 1 小时后加入 HRP 标记的羊抗人 IgG，温浴 1 小时后 TMB 显色。而在 GST-pull down 试验中，本试验将表达的 CMG2-Fc 蛋白和本组原先保存的 GST-PA 蛋白通过 GST 亲和填料检测 CMG2 和 PA 的结合能力 (详细操作步骤参见《分子克隆试验指南 (第三版)》)。

1.6 细胞保护实验检测 CMG2-Fc 拮抗炭疽毒素能力

选取小鼠 RAW264.7 巨噬细胞作为试验细胞[10]，使用含有 10%胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养细胞，于试验前一天用 0.25%胰蛋白酶消化小鼠 RAW264.7 巨噬细胞并传入 96 孔细胞培养板 (3×10^4 细胞 / 孔)，第二天换取新鲜无血清 DMEM 培养基培养，取不同浓度的 CMG2-Fc 蛋白和炭疽毒素 (PA 和 LF 终浓度均为 100 nmol/L) 混匀后加入细胞培养孔中，为排除 CMG2-Fc 中 Fc 片段带来的影响，本研究取 rhTNFR-Fc (为人肿瘤坏死因子受体和人 IgG1 的 Fc 段融合蛋白，商品名为益赛普) 做阴性对照，以排除 Fc 影响。待观察到单加炭疽毒素的细胞孔有大量细胞死亡时 (约 4 小时) 加入 CCK-8，显色并进行 OD 450nm 读数分析，每个试验组均设立两个复孔，且重复三次，以检验试验结果的可靠性和稳定性。

1.7 统计结果分析

使用 EXCEL 统计软件包对试验数据进行统计学分析，使用药物抑制浓度计算软件 1.0.0 (Logit 法) 计算 CMG2-Fc 蛋白抑制毒素杀伤细胞的 IC_{50} (50% inhibiting concentration，IC_{50})。所有试验均设立 2 个复孔，并进行 3 次重复试验，以验证试验结果的可靠性和稳定性。

2 结果

2.1 pcDNA3.1-CMG2-Fc 基因载体构建

CMG2 基因与 pcDNA3.1-Fc 载体经 Nhe I+BamH I 双酶切连接，转化感受态细胞 Trans10，挑选测序正确菌落扩增，提取质粒后，pcDNA3.1-CMG2-Fc 用 Nhe I+BamH I+Xho I 三酶切电泳将出现 660bp (CMG2)、1500bp (Fc) 和 5370bp (pcDNA3.1) 三条带，而经 Nhe I+BamH I 双酶切电泳将出现 660bp (CMG2) 和 6870bp (pcDNA-Fc) 两条带，电泳鉴定结果和预期结果相符 (图 1)。

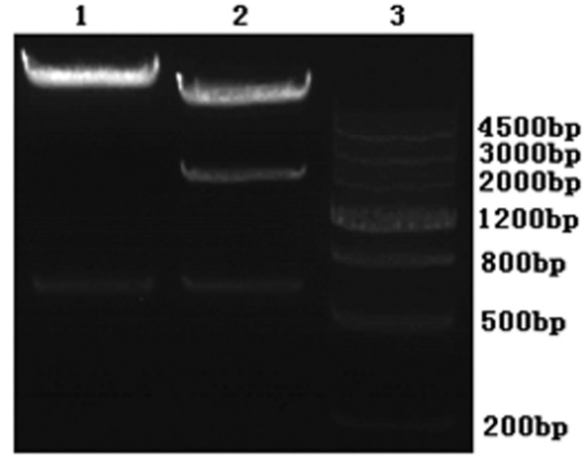

图 1 质粒酶切后电泳凝胶电泳图:1 :CMG2(Nhe I+BamH I), 2 :CMG2 和 Fc (Nhe I+BamH I+Xho I), 3 :Marker III

Fig.1 The gel electrophoretogram after plasmid by Enzyme digestion:Lane 1: CMG2(Nhe I+BamH I), Lane 2: CMG2 and Fc (Nhe I+BamH I+Xho I), Lane 3: Marker

2.2 CMG2-Fc 在真核 CHO 细胞中的表达及纯化

CHO-K1 是目前常用的真核转染用细胞系，本研究使用 CHO-K1 细胞作为转染细胞，用 G418 抗生素加压和单克隆 (有限稀释法) 筛选，阳性克隆 ELISA 结果显示 CMG2-Fc 在 CHO-K1 细胞中得到较好的表达，挑取表达量较高的细胞株进行转瓶无血清培养，通过亲和层析方法 (Protein A 凝胶柱) 纯化培养上清，洗脱结果为单一的蛋白洗脱峰 (图 2)。

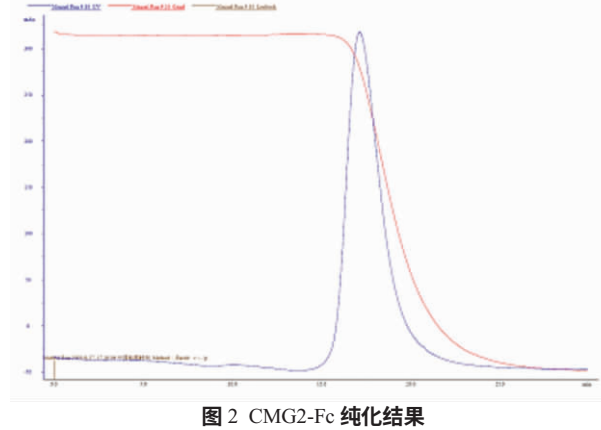

图 2 CMG2-Fc 纯化结果

Fig.2 Purification result of CMG2-Fc

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 CMG2-Fc 蛋白鉴定

由于 CMG2-Fc 为二聚体结构，在 β - 巯基乙醇等还原状态下链间二硫键会破坏而呈现单体状态，因此在蛋白电泳时，我们分别通过还原和非还原 SDS-PAGE 电泳检测 CMG2-Fc 的大小。图 3 和图 4 分别为 CMG2-Fc 在非还原和还原电泳状态下电泳图，结果和理论大小位置一致（非还原 CMG2-Fc 大小为 100kDa，而还原 CMG2-Fc 为 50kDa）。

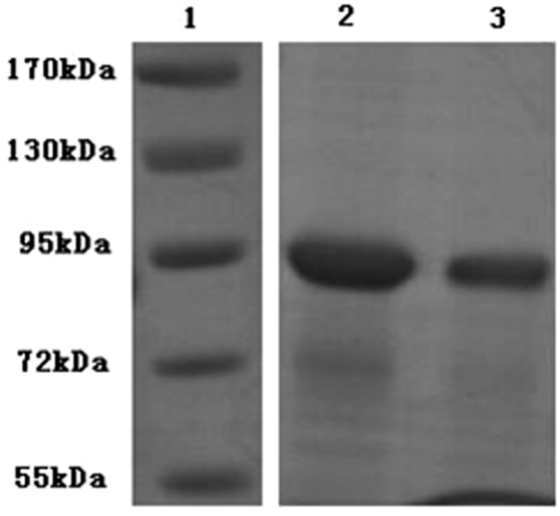

图 3 CMG2-Fc 非还原电泳结果 1：Marker，2 和 3：CMG2-Fc

Fig.3 Non-reduction electrophoresis of CMG2 Lane 1: Marker; Lane 2&3: CMG2-Fc

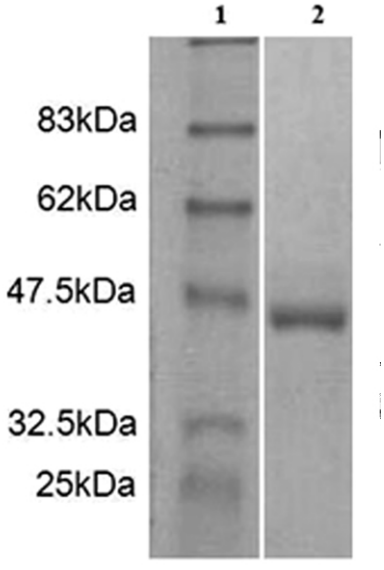

图 4 CMG2-Fc 还原电泳结果 1：Marker，2：CMG2-Fc

Fig.4 Reduction electrophoresis of CMG2 Lane 1: Marker; Lane 2: CMG2-Fc

2.4 CMG2-Fc 和 PA 的亲和力检测

本研究通过 forté Bio QK 测定 CMG2-Fc 和其配体 PA 的亲和力测定，并和本组先前保存的 TEM8-Fc 蛋白做亲和力测定比较（表 1），结果显示 CMG2-Fc 和 PA 有较强的亲和力，KD 为 4.85× 10^{-9} mol/L （图 5），高于 TEM8-Fc 和 PA 的亲和力（KD=3.26× 10^{-8} mol/L），提示 CMG2-Fc 比 TEM8-Fc 可能具有更高结合 PA 的能力。此外，我们还通过 ELISA 和 GST-pull down 检测 CMG2-Fc 和 PA 的结合能力，结果显示 CMG2-Fc 均能够很好的结合 PA（图 6）。

表 1 CMG2-Fc\TEM8-Fc 和 PA 亲和力

Table 1 Affinity of PA and CMG2/TEM8

	Ka(1/Ms)	Kd(1/s)	KD(M)
PA&CMG2-Fc	1.19× 10^{4}	5.77× 10^{-5}	4.85× 10^{-9}
PA&TEM8-Fc	5.73× 10^{3}	1.87× 10^{-4}	3.26× 10^{-8}

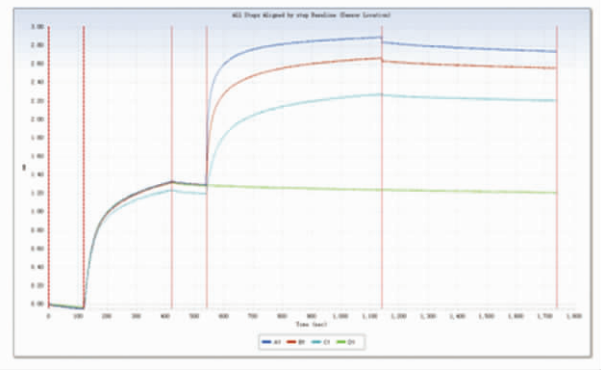

图 5 CMG2-Fc 和 PA 的结合 - 解离曲线

Fig.5 Association and dissociation curve of CMG2-Fc and PAq

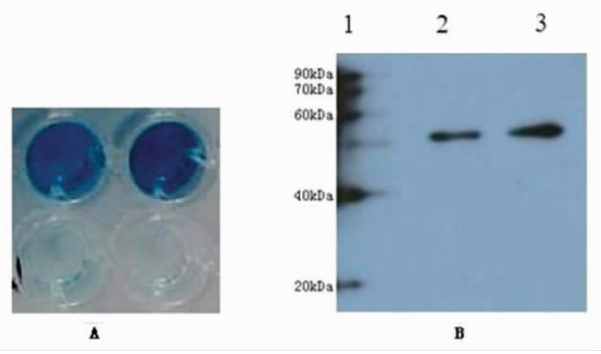

图 6 CMG2-Fc 的 ELISA 和 GST-pull down 结果：图 6A 上孔：PA4 包埋；下孔：阴性对照

图 6B 1：Marker；2 和 3：CMG2-Fc

Fig.6 ELISA and GST-pull down resultsof CMG2-Fc:

Fig6A Up: PA4 embed; Down:Negative control

Fig 6B Lane1: Marker; Lane2&3: CMG2-Fc

2.5 CMG2-Fc 的体外细胞保护试验

选取 RAW264.7 小鼠巨噬细胞检测 CMG2-Fc 蛋白的拮抗炭疽致死毒素（Lethal Toxin，LeTx，为等质量 PA 和 LF 的混合液）杀伤效应[9]。通过预试验得出 LeTx 的 LD50（50%致死剂量，50% Lethal dose）为 155ng/ml。本研究在保护试验中将毒素浓度设定在 200ng/ml，为排除 Fc 片度影响，本实验取已经上市的含人 IgG1 Fc 片段的 " 注射用重组人 II 型肿瘤坏死因子受体 - 抗体融合蛋白 "（商品名：益赛普，YISAIPU® ）作为阴性对照，细胞保护试验证实 CMG2-Fc 能够拮抗炭疽毒素杀伤小鼠 RAW264.7 巨噬细胞，其 IC_{50} 分别为 2.84nM（图 7）。

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

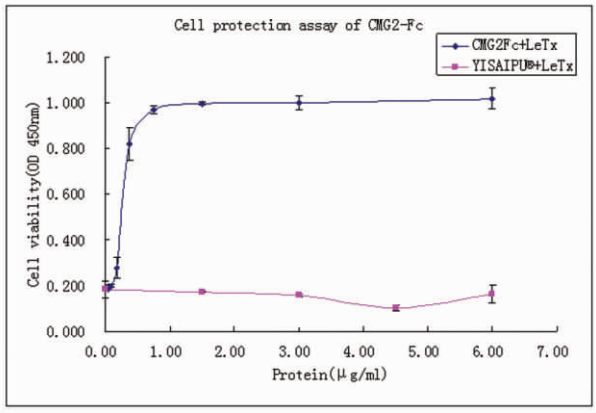

图 7 CMG2-Fc 的毒素中和试验

Fig.7 Toxin neutralization assay of CMG2-Fc

3 讨论

炭疽是严重威胁人类健康的一类疾病，而炭疽杆菌从感染到发病往往有 5-7 天的潜伏期，这期间病毒常在体内大量繁殖，并产生大量毒素，如不及时治疗，常对机体产生严重损伤，目前对于炭疽的暴露后防治主要是通过抗生素治疗，炭疽杆菌对大多数抗生素敏感，普通抗生素如青霉素、乙酰红霉素等均可以将其杀死[10]，但对于炭疽杆菌产生的炭疽毒素，目前我国还没有治疗药品上市，而这些毒素往往是造成炭疽感染死亡的关键因素，对于炭疽毒素防治，最好的方法就是构建针对毒素 PA 的抗体或诱捕性蛋白分子（如 sCMG2 和 sTEM8），通过竞争性拮抗 PA 和细胞表面的 PA 受体结合来减少炭疽毒素进入细胞，从而减少细胞伤亡[11]。

本研究构建了人 CMG2 胞外区 1-225AA 和人 IgG1 Fc 的融合基因载体。其出发点在于通过外源性 CMG2-Fc，进而和细胞膜 PA 受体竞争性结合 PA，从而干扰 PA 和宿主细胞膜 PA 受体的结合，拮抗 PA+LF 进入和损伤细胞。而融合的 Fc 片段可以延长其在体内的半衰期[12,13]，进而增强其生物学活性，而且融合 Fc 片段还方便 CMG2-Fc 蛋白通过 Protein A 亲和层析纯化。由于天然 CMG2 为真核表达蛋白，而且其蛋白序列上有多个半胱氨酸及二硫键，为保证蛋白的生物学活性，我们对 CMG2-Fc 基因进行了真核 CHO 细胞转染和单克隆筛选，并获得了表达 CMG2-Fc 的高表达克隆株。并通过转瓶培养和 Protein A 层析纯化得到了 CMG2-Fc 单一蛋白，还原和非还原 SDS-PAGE 电泳显示表达的 CMG2-Fc 蛋白大小和本试验预期一致。通过 forté Bio QK 仪器测定了 CMG2-Fc 和 PA 的亲和力，结果两者的亲和力达到 1.31×10^{-11} mol/L。在小鼠 RAW264.7 巨噬细胞保护试验中，用致死剂量的炭疽毒素攻击细胞，并加入不同剂量的 CMG2-Fc，观察 CMG2-Fc 的保护效果，结果显示 CMG2-Fc 能有效的抑制炭疽毒素引起的细胞损伤，其 IC_{50} 为 0.49 nM。这表明我们构建的 CMG2-Fc 融合蛋白具有 CMG2 的天然生物学活性，而且其能用于炭疽感染后的抗毒素治疗。

参 考 文 献 (References)

[1] Mock M, Fouet A. Anthrax [J]. Annu Rev Microbiol, 2001 (55): 647-671

[2] Jonah G, Rainey A, John A. Antitoxins: novel strategies to Target agents of bioterrorism [J]. Nature reviews microbiology, 2004 (2): 721-726

[3] Collier RJ,Young JA. Anthrax toxin[J]. Annu Rev Cell Dev Biol,2003 (19):45-70

[4] Gisou van der Goot, John A. Receptors of anthrax toxin and cell entry [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2009 (30) :406-412

[5] Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, et al. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin[J]. Nature, 2001, (414):225-229

[6] Scobie HM, Rainey GJ, Bradley KA, et al. Human capillary morphogenesis protein 2 functions as an anthrax toxin receptor [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003(100):5170-5174

[7] Scobie HM, Thomas D, Marlett JM, et al. A Soluble Receptor Decoy Protects Rats against Anthrax Lethal Toxin Challenge[J]. The Journal of Infectious Diseases, 2005(192):1047-1051

[8] Sun JJ, Collier RJ. Disulfide Bonds in the Ectodomain of Anthrax Toxin Receptor 2 Are Required for the Receptor Bound Protective Antigen Pore to Function[J]. PLoS ONE, 2010,5(5): 1-9

[9] Ngundi MM, Meade BD, Lin TL,et al. Comparison of Three Anthrax Toxin Neutralization Assays [J]. Clinical and vaccine immunology, 2010,17(6): 895-903

[10] Office of the Secretary (OS),HHS.Determination and Declaration Regarding Emergency Use of Doxycycline Hyclate Tablets Accompanied by Emergency Use Information [C]. Federal Register, 2008,73 (194):58242-58243

[11] Sharma S, Thomas D, Marlett J, et al. Efficient Neutralization of Antibody-Resistant Forms of Anthrax Toxin by a Soluble Receptor Decoy Inhibitor[J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 2009,53 (3): 1210-1212

[12] Roopenian DC, Akilesh S. FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age[J]. Nature reviews immunology, 2007(7):715-725

[13] Roopenian DC, Christianson GJ, Sproule TJ. The MHC class I?like IgG receptor controls perinatal IgG transport, IgG homeostasis, and fate of IgG-Fc?coupled drugs[J]. J. Immunol, 2003(170):3528-3533

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net