

人 CLEC-2 胞外段 CRD 重组蛋白纯化与多克隆抗体的制备和活性鉴定

李因涛¹⁾ 吴维宾^{2, 3)} 洪 谊²⁾ 王文忠²⁾ 杨俊武²⁾ 谢建辉²⁾ 吴兴中^{1)*}

(¹⁾复旦大学上海医学院生物化学与分子生物学系, 上海 200032; ²⁾复旦大学上海医学院基因中心, 上海 200032;

³⁾复旦大学生物医学研究院, 上海 200032)

摘要 人 C 型凝集素样受体(human C-type lectin-like receptor-2, hCLEC-2)是新克隆的 II 型跨膜受体分子, 研究表明, 它在病毒感染, 血小板活化、聚集, 肿瘤转移和信号转导等方面发挥重要作用. 通过制备针对其胞外段糖类识别结构域(CRD)的抗体来进一步研究该蛋白质的生物学功能及相关信号通路. 构建了 pET23b-CRD 重组表达质粒, 将其转化到大肠杆菌 BL21 中, 用于 hCLEC-2-CRD-His 融合蛋白的表达, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表明, 融合重组蛋白成功获得了高效表达, 分子质量在 18 ku 左右. 经鉴定, 发现 hCLEC-2-CRD-His 表达于包涵体中. 为获得高纯度的可溶性蛋白, 将包涵体溶于 6 mol/L 盐酸胍, 并用镍柱进行纯化. 纯化后的蛋白质经过透析、再折叠后作为抗原, 免疫家兔制备抗血清, 抗血清经蛋白 G 亲和层析纯化后用 Western blot 等方法进行鉴定, 结果显示该抗体能特异性地检测到 GFP-hCLEC-2 和 GFP-CRD. 通过使用该抗体, 进一步发现, 在用 PMA 和 IL-4 诱导单核细胞 THP-1 分化的过程中, 内源性 hCLEC-2 蛋白水平下调, 初步揭示了 hCLEC-2 的表达和单核细胞的分化存在一定的联系. 因此, 该抗体的成功制备将为进一步研究 CLEC-2 的生物学功能提供有利的条件.

关键词 C 型凝集素样蛋白, 糖类识别结构域, 重组质粒, 融合蛋白, 多克隆抗体

学科分类号 R392, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00042

人 C 型凝集素样受体(CLEC-2)是一个 32 ku 的 II 型跨膜受体分子, 属于非经典的 C 型凝集素超家族^[1], 存在磷酸化、糖基化等多种修饰形式^[2]. 结构上, CLEC-2 分为 N 端胞内区、跨膜区、颈区和 C 端胞外区. 其胞外区带有糖类识别结构域(carbohydrate recognition domain, CRD), 可与多种配体结合介导细胞信号转导; 本实验鉴定出鼠源性 CLEC-2 存在多种剪切变异体, 而人源性 CLEC-2 剪切变异体无文献报道^[3]. 人 CLEC-2 的 N 端胞内区则带有单个 D-x-Y-x-x-L 基序, 其中包含一个酪氨酸磷酸化位点, 磷酸化后可激活下游信号分子^[4~7]. CLEC-2 是第一个被发现表达在血小板上并通过 Syk 途径进行信号转导的 C 型凝集素受体, 但其内源性配体尚未明确^[8]. 研究表明, CLEC-2 在病毒感染, 血小板活化、凝集, 肿瘤转移, 信号转导等方面发挥重要的作用^[4~7, 9]. 人 CLEC-2 可能作为血栓性心血管疾病和肿瘤转移的治疗靶点^[5].

Rhodocytin 是马来西亚半岛的一种蛇 *Calloselasma rhodostoma* 分泌的强力蛇毒蛋白, 可

引起血小板凝集^[10]. 采用 Rhodocytin 亲和纯化和质谱分析表明, CLEC-2 表达在血小板表面, 可作为 Rhodocytin 的受体. CLEC-2 与 Rhodocytin 或特异性抗体结合后, 其胞内 YXXL 基序的酪氨酸发生磷酸化, 促进其与 Syk 结合, 在依赖 Syk 作用下活化下游磷脂酶 $\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$)信号分子, 引起血小板活化和聚集^[4]. Podoplanin 是一个跨膜唾液酸糖蛋白, 它与肿瘤诱导的血小板凝集、肿瘤转移、淋巴管形成相关, 但具体机制尚不清楚. Podoplanin 引起的血小板凝集依赖于 Src 及 PLC $\gamma 2$ 活性, 但它并不与血小板膜糖蛋白 VI(GPVI)结合^[6]. 经 X 射线晶体衍射及突变结合研究表明, podoplanin 可能作为 CLEC-2 的内源性配体^[11, 12], 生理条件下 podoplanin 与 CLEC-2 相互作用可诱导血小板聚集, 病理生理条件下, 二者的相互作用可能调节肿瘤侵袭及转

* 通讯联系人.

Tel: 021-54237697, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn

收稿日期: 2009-01-16, 接受日期: 2009-04-29

移^[9]。另外, Kanazawa 等研究发现, CLEC-2 可作为 HIV-1 新的黏附因子, 通过和 DC-SIGN 共同作用促进血小板捕获 HIV-1 病毒, 使该病毒长期处于传染状态, 并可能促进 HIV-1 在感染病人体内扩散^[9]。

CLEC-2-CRD 位于其 C 端胞外区, 经生物信息学搜索, 其抗原表位较丰富, 故选择该段作为抗原免疫家兔制备抗体。本研究主要致力于对构建的 CLEC-2-CRD-His 融合蛋白原核表达系统表达的包涵体进行分离、纯化和鉴定^[10, 13, 14], 制备和纯化 CLEC-2 抗体, 为人 CLEC-2 配体鉴定及功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂。引物合成由上海生工公司完成; Taq DNA 聚合酶购自申能博彩公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒为上海华舜公司产品; 胰蛋白酶、酵母提取物、琼脂粉、异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 均为 Sigma 公司产品; T4 DNA 连接酶、*EcoR* I 和 *Xho* I 内切酶购自 New England Biolabs 公司; Ni-NTA 高亲和组氨酸短肽(6 His)结合树脂为 GE Healthcare 公司产品; 辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔二抗购于 Santa Cruz Biotechnology 公司; Protein Marker 购自 Fermentas 公司; PVDF 膜购自 Roche 公司; Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司; 增强的化学发光 (ECL) 试剂盒购自天根公司; X 光胶片为柯达公司产品; 显微镜成像系统购自 Zeiss 公司; 其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.1.2 载体与菌株。pEF6-CLEC-2 由日本 Yamanashi 医科大学 Yukio Ozaki 教授馈赠; 表达载体 pET-23b 购于 Stratagene 公司。

1.1.3 实验动物。成年雄性新西兰大耳兔 2.8 kg, 2 只, 购自中国科学院上海实验动物中心。

1.1.4 实验标本。海绵状血管瘤的人肝脏标本取自复旦大学附属中山医院病理科。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的扩增与纯化。以含有人 CLEC-2 全长编码区的 pEF6-CLEC-2 重组质粒为模板, 扩增 CLEC-2 基因片段, 分别引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点, 正向引物为 5' GGG AATTC ATG AG-CCCCTGTGACAC, 反向引物为 5' AGCTCGAGA-GGTAGTTGGTCCACCTTG。扩增条件: 94℃ 预变

性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环, 然后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 得到预期 407 bp 的片段。

1.2.2 重组表达载体的构建。将纯化后的 PCR 扩增产物和 pET-23b 表达载体用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 目的片段用琼脂糖凝胶电泳切胶回收, 在 T4 DNA 连接酶的作用下将目的片段插入 pET-23b 载体, 连接产物转化至大肠杆菌 BL21, 筛选阳性克隆进行酶切鉴定, 并进一步送 Invitrogen 公司测序鉴定证实得到 pET23b-CLEC-2-CRD 重组质粒。

1.2.3 重组蛋白 CRD-His 的诱导表达以及鉴定。

转化 pET23b-CLEC-2-CRD 重组质粒至表达菌 *E. coli* BL21, 挑取单克隆接种于 5 ml LB 培养基 (含氨苄青霉素 50 mg/L) 中, 37℃ 200 r/min 的条件下振荡过夜, 按 1% 的比例接种于 100 ml LB 培养基 (Amp⁺) 中, 于 37℃ 200 r/min 振荡培养 2~3 h, 至 A_{550} 为 0.8 时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 30℃ 诱导表达 4 h, 收集菌体。

先取 1 ml IPTG 诱导前的菌液, 8 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 菌体进行 15% SDS-PAGE 后进行考马斯亮蓝染色 (Coomassie brilliant blue); 另取 1 ml IPTG 诱导后的菌液, 以 8 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 沉淀用 1 ml 含 1% Triton X-100, 1 mmol/L aprotinin, 10 mg/L leupeptin 和 1 mmol/L PMSF 预冷的 PBS 重悬, 超声裂解 10 s, 5~10 次。然后 4℃, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清转入另一 EP 管中, 沉淀用 PBS 重悬, 分别取部分上清和沉淀悬浮液做 15% SDS-PAGE 后进行考马斯亮蓝染色, 分析重组蛋白的表达形式和含量。

1.2.4 重组蛋白纯化。菌液在 4℃, 5 000 r/min 离心 10 min, 收集细菌, 弃上清, 沉淀用 1 ml 1×PBS (含 1% Triton X-100, 1 mmol/L aprotinin, 10 mg/L leupeptin 和 1 mmol/L PMSF) 重悬, 在冰浴条件下超声破菌, 沉淀用 1×包涵体裂解液溶解 (Tris 10 mmol/L pH 8.0, EDTA 0.2 mmol/L, NaCl 20 mmol/L, 盐酸胍 6 mol/L, PMSF 1 mmol/L), 离心取上清, 加入 100 μ l 用镍柱结合缓冲液预洗过的 Ni-NTA 亲和柱中, 4℃ 轮转 4 h, 8 000 r/min 离心 1 min 后, Ni-NTA 亲和柱用镍柱结合缓冲液洗 2 遍, 再用镍柱洗脱缓冲液 (20 mmol/L Na₃PO₄, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L 咪唑, 6 mol/L 盐酸胍) 洗脱 CLEC-2-CRD 蛋白, 在冰上用盐酸胍从高浓度到低浓度逐渐透析, 离心取上清, 15%

SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色 2 h 后用脱色液脱色, 观察蛋白质条带。

1.2.5 多克隆抗体的制备与纯化. 将纯化好的重组蛋白与弗氏完全佐剂混合乳化, 作为免疫原, 用常规方法分 3 次免疫两只新西兰大耳兔, 分别编号 #07129、#07130。加强免疫后收集血清, -70°C 保存。兔血清在 56°C , 30 min 灭活补体后, 取 500 μl 血清加入 Ni-NTA 树脂亲和层析, 将纯化抗体保存于 -20°C 。

1.2.6 Western blot 鉴定抗体特异性. 将 pEGFP-N3、pEGFP-N3-CLEC-2、pEGFP-N3-CLEC-2-CRD 空载体或重组质粒用 Lipofectamine 2000 转染人胚肾 T 细胞 293T 48 h 后收集细胞, 用 1 $\times$ SDS 裂解液 (40 mmol/L Tris pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% SDS, 1 mmol/L aprotinin, 10 mg/L leupeptin 和 1 mmol/L PMSF) 裂解细胞提取细胞总蛋白, 煮沸 5 min, 离心后取上清液, 取大约 50 μg 蛋白质进行 SDS-PAGE 后, 电转移至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂牛奶的 PBST 封闭 2 h, 分别用 GFP 单克隆抗体和纯化后的 anti-CRD 抗体为一抗 (1:1 000) 室温孵育 2 h, 分别用 HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔为二抗 (1:2 000) 室温孵育 1 h, ECL 显色进行蛋白质印迹检测。

1.2.7 免疫组织化学染色鉴定抗体特异性. 将用 10% 福尔马林固定的患有海绵状血管瘤的肝组织, 经常规脱水、透明、进行石蜡包埋后切片, 常规脱蜡, 水洗后经抗原修复, 切片入 0.3% H_2O_2 - 甲醇溶液, 37°C , 30 min, 切片经水洗、蒸馏水漂洗后再用 PBS 洗 5 min $\times$ 3 次, 用正常山羊血清 (1:20) 封闭 30 min, 然后加入 CLEC-2 抗血清 (1:400) 于 4°C 孵育过夜, PBS 漂洗后加入羊抗兔二抗 (1:200), 室温孵育 1 h, PBS 漂洗后加入 PAP 试剂 (1:200), 室温孵育 1 h, PBS 漂洗后滴加 DAB 显色液, 显色 7 min, 梯度乙醇脱水、二甲苯透明后中性树脂封片。空白对照用免疫前血清取代一抗, 其他步骤相同。

1.2.8 THP-1 诱导分化. 用 10 $\mu\text{g/L}$ 乙酸肉豆蔻佛波酯 (PMA) 刺激人白血病单核细胞系 THP-1 细胞 72 h, 或者先用 10 $\mu\text{g/L}$ PMA 刺激 THP-1 细胞 24 h 后, 改用 25 $\mu\text{g/L}$ IL-4 刺激 48 h, 诱导 THP-1 向成熟的巨噬细胞分化^[15]。刺激结束后收集细胞, 提取细胞总蛋白加入 1 $\times$ SDS 上样缓冲液, 煮沸 5 min, 离心后取上清液进行 SDS-PAGE 后电转移至 PVDF 膜上, 用上述制备的免疫血清为一抗 (1:1 000),

用 HRP 标记的羊抗兔为二抗 (1:2 000), 按上述方法进行蛋白质印迹检测。

2 结 果

2.1 重组表达载体 pET23b-CLEC-2-CRD 的构建与鉴定

以含人 CLEC-2 全长 cDNA 的重组质粒 pEF6-CLEC-2 为模板进行 PCR, 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 在约 400 bp 处可见特异性扩增片段 (图 1), 其分子质量大小与理论计算值相符。

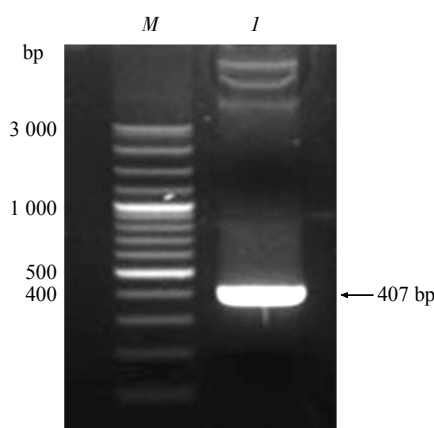


Fig. 1 Agarose gel electrophoretic of PCR product of CLEC-2-CRD gene

M: DNA marker; I: PCR product of CLEC-2-CRD.

PCR 产物及载体 pET23b 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 纯化后按比例进行连接, 转化大肠杆菌 BL21 进行培养, 挑取阳性克隆, 少量扩增后抽提质粒, 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析, 得到与预期大小一致的片段 (图 2b)。阳性重组质粒的 DNA 测序结果与预期序列完全一致。因此, 已成功构建重组表达载体 pET23b-CLEC-2-CRD。

2.2 CRD-His 融合蛋白的原核表达及纯化

用构建成功的 pET23b-CLEC-2-CRD 质粒转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 以 pET23b 质粒转化菌作对照, 经 IPTG 37°C 诱导表达 4 h 后, 在收集的菌液中可以检测到分子质量为 18 ku 左右的 CRD-His 蛋白, 分析菌体超声裂解后的上清和沉淀, 发现 CRD-His 融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中, 上清液中并没有表达 (图 3)。收集包涵体沉淀, 用 6 mol/L 盐酸胍的包涵体裂解液溶解, CRD-His 蛋白大部分溶于包涵体裂解液中。包涵体溶解液经 Ni-NTA 亲和柱纯化, 重新折叠和透

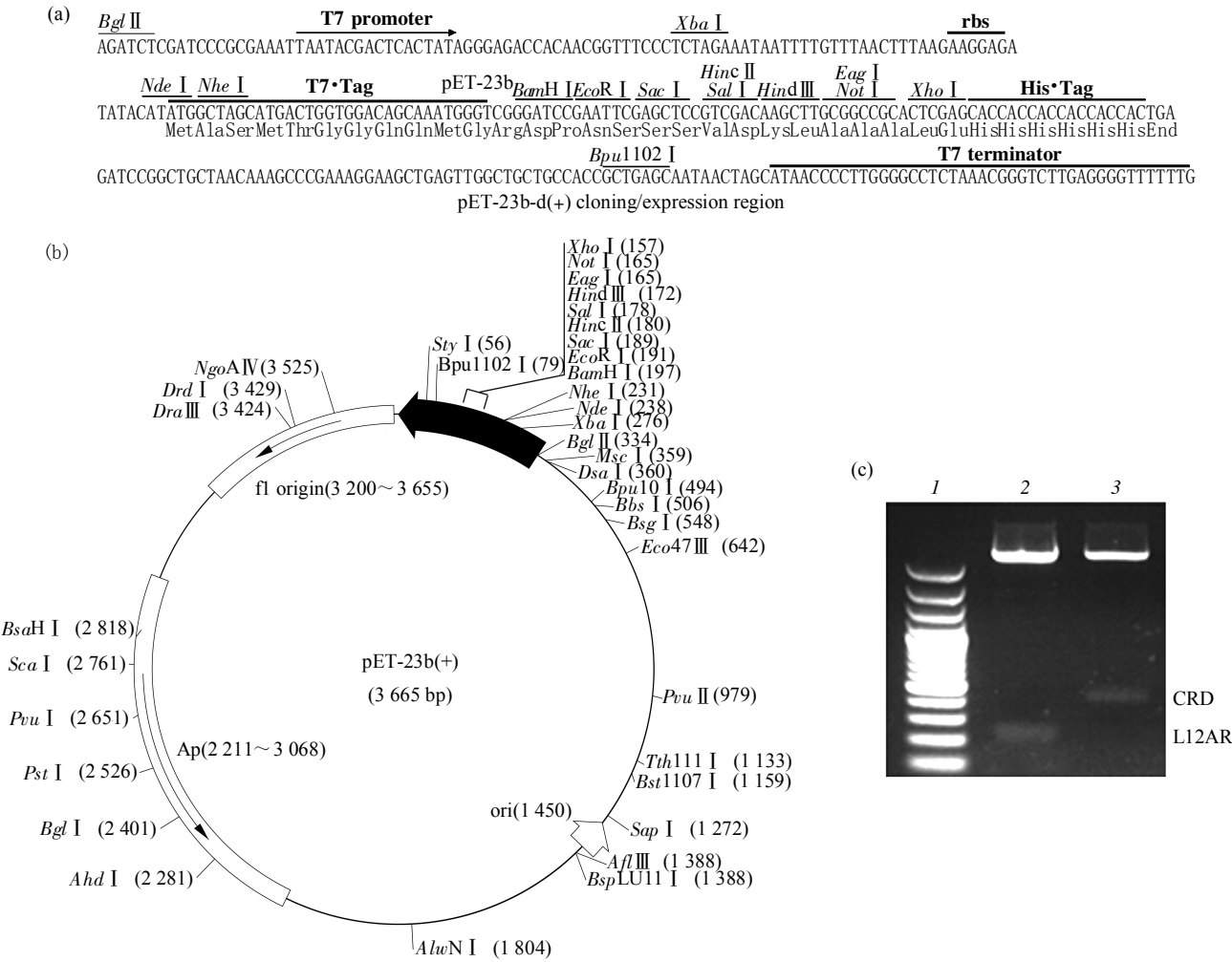


Fig. 2 Schematic diagram of the ORF cloned in pET23b expression vector and restriction enzyme digestion analysis
(a) Cloning sites of pET23b(+). (b) Map of pET23b(+) cloning region. (c) Restriction mapping of recombinant vector pET23b-CLEC-2-CRD. pET23b-L12AR was used as a positive control. 1: Marker; 2: pET23b-L12AR; 3: pET23b-CRD.

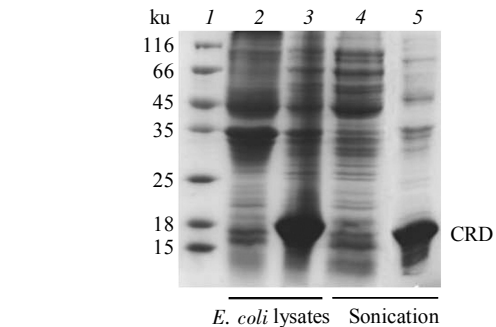


Fig. 3 Expression of CLEC-2-CRD in E. coli BL21
SDS-PAGE analysis of CRD-His fusion protein expressed in E. coli BL21. 1: Protein marker; 2: Total bacteria proteins into which pET23b vector was transformed after IPTG induction; 3: Total bacteria proteins into which pET23b-CLEC-2-CRD recombinant vector was transformed after IPTG induction; 4: Supernatant proteins after sonication of 4 h induced BL21 of transformed with pET23b-CLEC-2-CRD; 5: Debris after sonication of 4 h induced BL21 of transformed with pET23b-CLEC-2-CRD.

析处理后, 得到杂蛋白少、较为单一的目的蛋白条带(图 4b), 符合 CRD-His 的理论分子量. 说明已经纯化得到了 CRD-His 融合蛋白, 且纯度大于 95%, 经过灰度分析, BSA 电泳条带灰度与其浓度成正比, 估计 CRD 浓度大约为 1 g/L(图 4a), 符合抗体制备的抗原纯度和浓度要求.

2.3 多克隆抗体的制备和纯化

两只新西兰大耳兔分别编号为 #07129、#07130, 从其血清各取出 500 μ l 采用 Ni-NTA 树脂凝胶柱结合 CLEC-2-CRD-His 抗原亲和纯化. 纯化后的抗体经 Western blot 直接用 HRP-羊抗兔二抗及 ECL 检测(图 5). 两个抗血清均显示为清晰的单条带, 可用于后续 Western blot、流式细胞术和免疫荧光等检测.

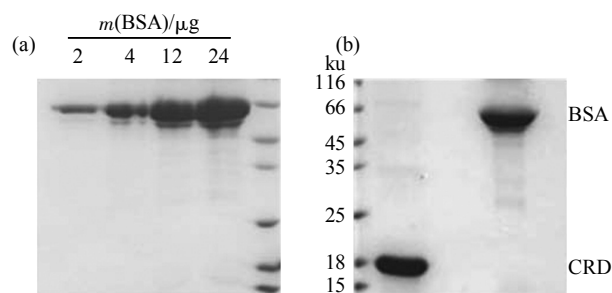


Fig. 4 Purification and quantification of CLEC-2-CRD recombinant protein

(a) Quantification analysis of 2, 4, 12, 24 μg BSA; (b) SDS-PAGE analysis of purified CRD-His using BSA as control.

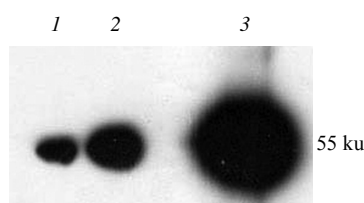


Fig. 5 Western Blot analysis of purified anti-CLEC-2-CRD polyclonal antibody

1: Anti-CLEC-2-CRD serum of #07129; 2: Anti-CLEC-2-CRD serum of #07130; 3: IgG heavy chain of 1 μg rabbit as a control.

2.4 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

将 pEGFP-N3、pEGFP-N3-CLEC-2、pEGFP-N3-CLEC-2-CRD 空载体或重组质粒转染 293T 细胞 48 h 后用 1×SDS 裂解液裂解细胞提取蛋白质，分别用纯化的 CLEC-2 抗体和抗 -GFP 作为一抗，分别用 HRP-羊抗兔、HRP-羊抗鼠作为二抗，检测 CLEC-2 表达。用纯化的 CLEC-2 抗体做免疫印迹，可以清晰地观察到 54 ku 的 GFP-CLEC-2 和 45 ku 的 GFP-CLEC-2-CRD 条带，空载体转染对照并未检测到条带(图 6)。

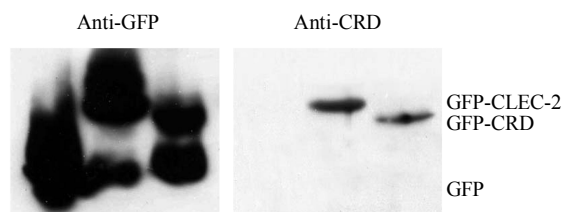


Fig. 6 Identification of anti-CRD antibody with ectopic expressed GFP-hCLEC-2 and GFP-CRD

About 2 μg pEGFP-N3, pEGFP-N3-CLEC-2, pEGFP-N3-CLEC-2-CRD plasmids were transfected into 293T cells for about 48 h. Whole cellular proteins were extracted as described above. Immunoblotting was performed using purified anti-CRD polyclonal antibody (1 : 1 000 dilution) or mouse monoclonal anti-GFP antibody (1 : 1 000) respectively.

2.5 多克隆抗体的免疫组织化学鉴定

用免疫组织化学的方法检测 hCLEC-2 抗体的活性。结果显示：在人肝脏海绵状血管瘤的癌旁组织中，hCLEC-2 蛋白主要分布于肝细胞的细胞膜及细胞浆中，在核膜和细胞核中有少量表达(图 7b, d)；在海绵状血管瘤组织中，hCLEC-2 蛋白在血窦内皮细胞膜上呈强阳性表达(图 7f, h)。而在阴性对照组则无显示(图 7a, c, e, g)。

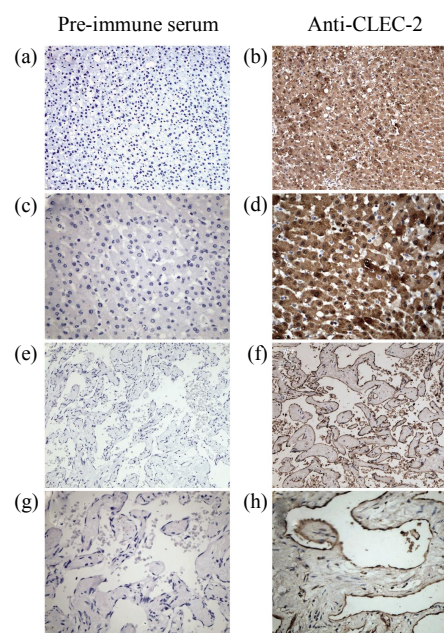


Fig. 7 Immunohistochemical detection of hCLEC-2 in human liver tissues

(a ~ d) Normal liver tissue. (e ~ h) Hepatic cavernous hemangioma. (a, c, e, g) Tissue was stained with pre-immune serum (×20, ×40). (b, d, f, h) Tissue was stained with anti-hCLEC-2 antibody (×20, ×40).

2.6 内源性 hCLEC-2 在 THP-1 诱导分化过程中的表达变化

THP-1 细胞悬浮生长至约 1×10^5 个/ml 时，用 PMA 或 PMA 和 IL-4 处理，收集细胞提取细胞总蛋白，用上述纯化的抗体进行 Western blot 检测(图 8) 内源性 CLEC-2 的表达变化。结果显示纯化的

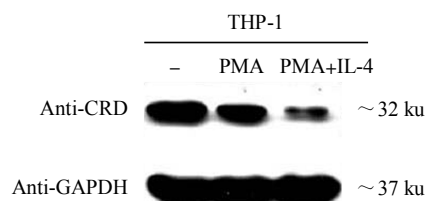


Fig. 8 PMA and IL-4 treatments induce downregulation of hCLEC-2 in THP-1 cells

Western blot analysis of endogenous CLEC-2 expression in THP-1 cells.

抗 -CRD 抗体能够检测出清晰的 32 ku 的目的条带. 和未处理的 THP-1 细胞相比, 经 PMA 或者 PMA 和 IL-4 处理后, CLEC-2 在 THP-1 细胞中表达量降低.

3 讨 论

人 CLEC-2 基因于 2000 年由 Colonna 等从人外周血细胞 cDNA 克隆得到^[2], 人 CLEC-2 是 32 ku 的 II 型跨膜受体分子, 含有单个的 C 型凝集素样结构域, 通过颈部与跨膜区相连, 其胞浆尾部含有 D-x-Y-x-x-L 基序, 能促进内吞作用和介导细胞内信号传导^[6]. 由于缺少与 Ca^{2+} 结合的保守序列, hCLEC-2 属于非经典的 C 型凝集素受体, CLEC-2 主要表达在肝血窦内皮细胞、血管内皮细胞、血小板、巨细胞以及抗原递呈细胞的表面^[9, 12].

最近的研究表明, CLEC-2 能够结合到 HEK293T、Susa、HT1080、U2OS 等肿瘤细胞表面, 导致血小板的活化聚集, 从而在肿瘤细胞的表面形成一个包裹样的结构使肿瘤更容易逃避免疫攻击, 从而促进了肿瘤细胞的转移^[11, 16]. 通过免疫沉淀和蛋白质谱进一步分析表明, CLEC-2 能够结合肿瘤细胞表面蛋白 Podoplanin. Podoplanin 作为 CLEC-2 的内源性配体, 能够使血小板表面受体 CLEC-2 活化血小板, 导致血小板的聚集^[11, 14]. 此外, 血小板表面的 CLEC-2 还能够与 DC-SIGN 协同促进 HIV-1 感染血小板, 从而导致 HIV-1 逃避免疫攻击^[9].

通过基因工程构建包含特定蛋白基因的质粒或其他载体, 然后将该载体导入大肠杆菌进行原核表达, 仍是目前获得融合蛋白较为常用的方法^[17]. 本文通过原核表达载体 pET23b 的构建, 成功地将人 CLEC-2 胞外段 CRD 基因的原核表达质粒, 转化到受体菌 BL21 后, 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 获得约 18 ku 大小的表达条带(图 3). 另外, pET23b 载体能够表达 6 个 His 氨基酸组成的短肽, 能与镍凝胶树脂亲和层析和透析袋电洗脱法纯化表达蛋白.

以融合蛋白作为抗原不仅使蛋白质的纯化变得容易, 而且使制备抗体时有较高的免疫原性. 本实验中采用依赖抗原的亲亲和纯化方法可得到高纯度的特异性抗体, 将抗原 CLEC-2-CRD 结合于镍亲和纯化柱上, 采用 Protein G 亲和纯化法从兔免疫血清中获得 CLEC-2 抗体. 纯化后的抗体用于检测外源性蛋白 GFP-hCLEC-2 和 GFP-CRD 的表达, 使

用 GFP 特异性抗体作为对照, 我们发现, 抗 -CRD 抗体能清晰地检测出 hCLEC-2 和 CRD 对应条带(图 6), 表明该抗体能与 hCLEC-2-CRD 结构域特异性结合.

同时, 我们用该抗体来检测正常肝脏组织和人肝海绵状血管瘤中 CLEC-2 蛋白的表达, 免疫组织化学染色结果显示, CLEC-2 蛋白表达于肝细胞和肝血窦内皮细胞中, 这和 Pohlmann 等研究的结果一致^[9]. 另外也说明了我们制备的 hCLEC-2 抗体不仅能应用于 Western blot 分析, 而且能应用于免疫组织化学分析. 多克隆抗体的成功制备为研究 hCLEC-2 的生物学功能奠定了基础, 并为通过胞外端激活 hCLEC-2 并研究其下游通路提供了有利的工具.

近来的研究表明, THP-1 单核白血病细胞系是研究单核 / 巨噬细胞分化的良好的细胞模型. THP-1 是前单核细胞, 属于单核细胞系, 悬浮生长. PMA 处理能抑制 THP-1 生长, 诱导其向巨噬样细胞分化, 并贴壁生长^[18]. 在此基础上用 IL-4 诱导能使其向树突状细胞分化, 呈现更好的抗原递呈能力^[15]. 我们收集用这两种诱导剂处理后的 THP-1 细胞, 取其裂解液进行凝胶电泳, 并用先前获得的抗 -CRD 抗体进行 Western blot 检测. 结果显示, 内源性 hCLEC-2 的蛋白质水平随着 THP-1 向巨噬细胞和树突状细胞分化而明显下调. 该结果初步提示了 hCLEC-2 的表达和单核细胞的分化存在一定的联系. 在后续的工作中, 我们将以此为基, 深入研究 hCLEC-2 在单核细胞的分化过程中发挥什么作用, 以揭示其相关的生物学功能.

参 考 文 献

- 1 Suzuki-Inoue K, Kato Y, Inoue O, *et al.* Involvement of the snake toxin receptor CLEC-2 in podoplanin-mediated platelet activation by cancer cells. *J Biol Chem*, 2007, **282**(36): 25993~26001
- 2 Robinson M J, Sancho D, Slack E C, *et al.* Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*, 2006, **7**(12): 1258~1265
- 3 Xie J, Wu T, Guo L, *et al.* Molecular characterization of two novel isoforms and a soluble form of mouse CLEC-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, **371**(2): 180~184
- 4 Zelensky A N, Gready J E. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*, 2005, **272**(24): 6179~6217
- 5 Kanazawa N. Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci*, 2007, **45**(2): 77~86
- 6 Colonna M, Samaridis J, Angman L. Molecular characterization of two novel C-type lectin-like receptors, one of which is selectively expressed in human dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2000, **30**(2): 697~704

- 7 Suzuki-Inoue K, Fuller G L, Garcia A, *et al.* A novel Syk-dependent mechanism of platelet activation by the C-type lectin receptor CLEC-2. *Blood*, 2006, **107**(2): 542~549
- 8 Hofer E, Sobanov Y, Brostjan C, *et al.* The centromeric part of the human natural killer (NK) receptor complex: lectin-like receptor genes expressed in NK, dendritic and endothelial cells. *Immunol Rev*, 2001, **181**: 5~19
- 9 Chaipan C, Soilleux E J, Simpson P, *et al.* DC-SIGN and CLEC-2 mediate human immunodeficiency virus type 1 capture by platelets. *J Virol*, 2006, **80**(18): 8951~8960
- 10 Watson A A, Brown J, Harlos K, *et al.* The crystal structure and mutational binding analysis of the extracellular domain of the platelet-activating receptor CLEC-2. *J Bio Chem*, 2007, **282** (5): 3165~3172
- 11 Kato Y, Kaneko M K, Kunita A, *et al.* Molecular analysis of the pathophysiological binding of the platelet aggregation-inducing factor podoplanin to the C-type lectin-like receptor CLEC-2. *Cancer Sci*, 2008, **99**(1): 54~61
- 12 Sobanov Y, Bernreiter A, Derdak S, *et al.* A novel cluster of lectin-like receptor genes expressed in monocytic, dendritic and endothelial cells maps close to the NK receptor genes in the human NK gene complex. *Eur J Immunol*, 2001, **31**(12): 3493~3503
- 13 Watson A A, O'Callaghan C A. Crystallization and X-ray diffraction analysis of human CLEC-2. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 2005, **61**(12): 1094~1096
- 14 Kanazawa N, Tashiro K, Inaba K, *et al.* Dendritic cell immunoactivating receptor, a novel C-type lectin immunoreceptor, acts as an activating receptor through association with Fc receptor γ chain. *J Biol Chem*, 2003, **278**(35): 32645~32652
- 15 Puig-Kröger A, Serrano-Gómez D, Caparrós E, *et al.* Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem*, 2004, **279**(24): 25680~25688
- 16 Christou C M, Pearce A C, Watson A A, *et al.* Renal cells activate the platelet receptor CLEC-2 through podoplanin. *Biochem J*, 2008, **411**(1): 133~140
- 17 Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **72** (2): 211~222
- 18 Takashiba S, Van Dyke T E, Amar S, *et al.* Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation *via* accumulation of cytoplasmic nuclear factor κ B. *Infect Immun*, 1999, **67**(11): 5573~5578

Purification of hCLEC-2 Recombinant Protein in Engineering Bacteria and Preparation and Identification of Its Antibody

LI Yin-Tao¹⁾, WU Wei-Bin^{2,3)}, HONG Yi²⁾, WANG Wen-Zhong²⁾,
YANG Jun-Wu²⁾, XIE Jian-Hui²⁾, WU Xing-Zhong^{1)*}

¹⁾Department of Biochemistry, Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China;

²⁾Gene Research Center, Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032, China;

³⁾Institute of Biomedical Sciences of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract hCLEC-2(human C-type lectin-like receptor-2) is a novel identified type II transmembrane receptor protein. It is found to be closely associated with virus infection, platelet aggregation, tumor metastasis and signal transduction. To study the biological function of hCLEC-2 and signaling pathways it is involved in, a specific antibody against the extracellular domain of hCLEC-2 was prepared. Then, a pET23b-CRD recombinant plasmid was constructed and transformed into BL21 for protein expression. After the induction with IPTG, hCLEC-2-CRD-His was found to be expressed in the inclusion body. The fusion protein in inclusion body was dissolved in 6 mol/L guanidine hydrochloride, purified using Ni-agarose, refolded and dialyzed against PBS. The purified hCLEC-2-CRD-His was used as an antigen to prepare polyclonal antiserum in rabbits, which was subjected to affinity purification with Protein G Sepharose. The specificity of anti-CRD antibody was identified by Western blot analysis of the ectopic expressed GFP-hCLEC-2 and GFP-CRD in comparison with that of GFP antibody. By using this specific antibody, the endogenous hCLEC-2 was revealed to be down-regulated in human monocyte THP-1 cells treated with PMA and IL-4. This preliminary result suggests a correlation between the expression of hCLEC-2 and the differentiation of monocyte. Collectively, the studies here provide a favorable tool for further investigation of hCLEC-2 associated biological functions.

Key words CLEC-2, CRD, recombinant plasmid, fusion protein, polyclonal antibody

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00042

*Corresponding author. Tel: 86-21-54237697, E-mail: xz_wu@shmu.edu.cn

Received: January 16, 2009 Accepted: April 29, 2009