

棕头蜘蛛猴 Atfu-B 基因 $\alpha 2$ 结构域缺失 剪切异构体的表达及其细胞内定位

曹玉华^{1 2}, 严翔^{3 2}, 刘一^{4 2}, 曾林², 隋丽华²,
赵彦斌², 刘冰², 刘慧芳^{4 2}, 孙兆增², 李莲瑞¹

(1. 塔里木大学生命科学学院, 新疆阿拉尔 843300; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 沈阳农业大学畜牧兽医学院, 辽宁 沈阳 110161; 4. 青岛农业大学动物科技学院, 山东 青岛 266109)

【摘要】 目的 Atfu-B* sv1 是棕头蜘蛛猴主要组织相容性复合体 (major histocompatibility complex, MHC) I 类分子的一种剪切异构体, 其 $\alpha 2$ 结构域缺失。本实验旨在初步获得其在细胞内的表达和定位信息, 并与全长的 Atfu-B 基因的表达情况进行比较, 观察两者之间的差异。方法 分别构建 Atfu-B* sv1 以及全长 Atfu-B 基因 Atfu-B* 02: 03 和 Atfu-B* 03: 01 的真核表达载体, 并将这三种重组质粒分别转染 293T 细胞。利用 Western blot 免疫印迹实验检测这三种基因在细胞内的表达情况, 并利用免疫荧光和激光共聚焦显微镜技术分别分析这三种基因在细胞内的表达定位。结果 Atfu-B* sv1、Atfu-B* 02: 03 和 Atfu-B* 03: 01 均能在 293T 细胞内正常表达, 并且都发生了糖基化的修饰, 三种基因都在细胞膜上表达。结论 虽然 Atfu-B* sv1 的 $\alpha 2$ 结构域缺失, 但其细胞内的表达和定位与全长 Atfu-B 基因没有明显差异, 其功能有待于进一步探索。

【关键词】 棕头蜘蛛猴; Atfu-B 基因; 剪切异构体; 表达与定位

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2013)10-0063-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2013.010.014

Expression and intracellular localization of splice variants of *Ateles fusciceps* gene Atfu-B with $\alpha 2$ domain deletion

CAO Yu-hua^{1 2}, YAN Xiang^{3 2}, LIU Yi^{4 2}, ZENG Lin^{1 2}, SUI Li-hua^{1 2},
ZHAO Yan-bin^{1 2}, LIU Bing^{1 2}, LIU Hui-fang^{4 2}, SUN Zhao-zeng², LI Lian-rui¹

(1. Tarum University College of Life Sciences, Xinjiang Alar, 843300, China; 2. Academy of Military Medical Sciences Laboratory Animal Center, Beijing 100071; 3. Shenyang Agricultural University College of Veterinary and Animal Science, Liaoning Shenyang 110161; 4. Qingdao Agricultural University College of Animal Science and Technology, Shandong Qingdao 266109)

【Abstract】 Objective Atfu-B* sv1 with $\alpha 2$ domain deletion is a splice variant of major histocompatibility complex class I B in *Ateles fusciceps*. The aim of this study was to obtain the basic information of expression and intracellular localization of Atfu-B* sv1, and to compared them with that of the full-length Atfu-B gene. **Methods** Eukaryotic expression vectors of Atfu-B* sv1, Atfu-B* 02: 03 and Atfu-B* 03: 01 were constructed and transfected into 293T cells, respectively. Expression of the three genes in the cells was detected by Western blotting, and the intracellular localization of the three

[基金项目] 国家自然科学基金项目 31071987, 31272387。

[作者简介] 曹玉华 (1987 -), 女, 在读研究生, 动物基因工程。

[通讯作者] 李莲瑞 (1968 -), 女, 教授, 硕士生导师, 动物基因工程; 孙兆增 (1977 -), 男, 副研究员, 硕士生导师, 实验动物免疫遗传学。

genes was analyzed by immunofluorescence and laser confocal microscopy. **Results** Atfu-B* sv1, Atfu-B* 02:03 and Atfu-B* 03:01 were all expressed on the plasma membrane of 293T cells and were glycosylated. **Conclusions** The expression and intracellular localization of Atfu-B* sv1 is not significantly different from those of full length Atfu-B genes. Further studies on the functions of Atfu-B* sv1 are needed to be done.

【Key words】 *Ateles fusciceps*; Atfu-B gene; Splice variants; Localization; Distribution

灵长类动物的 MHC I 类分子,通常包括 MHC-A 和 MHC-B 两种分子,并且这两种分子的结构基本相同,都包括信号肽、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 结构域、跨膜区和细胞内尾五种结构单元。 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 结构域各包含 90 个氨基酸,其中 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 形成的 β 折叠区域称之为肽结合区(peptide binding region, PBR), $\alpha 3$ 主要负责与 $\beta 2m$ 结合。MHC I 类分子具有高度的多态性,是机体细胞免疫反应的基础。

MHC I 类分子基因存在一定的剪切异构现象,通常缺失某一种结构单元,产生功能各异的剪切蛋白。在白血病人和正常人的血液内,都发现第 5 外显子,即跨膜区缺失的剪切异构体,该异构体以可溶形式存在^[1]。在中国源恒河猴中,发现一种 $\alpha 3$ 结构域缺失的 MHC-A 剪切异构体,该异构体可以与全长蛋白结合,调节 MHC-A 分子的降解^[2];且 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 结构域同时缺失的剪切异构体,可能发挥类似的功能^[3]。缺失 $\alpha 1$ 结构域的 HLA-A2 分子,不在细胞膜上表达,但功能未知^[4]。

课题组在对新大陆猴棕头蜘蛛猴 MHC-B 分子的克隆和序列测序研究中,发现了一种新的剪切异构体分子。该剪切异构体的长度为 780 bp,与 MHC-B 的全长分子相比,缺少了 $\alpha 2$ 结构域,但具有完整的阅读框,命名为 Atfu-B* sv1。因此本实验拟对该剪切异构体在细胞内的表达情况进行初步的研究,为下一步功能的研究奠定基础^[9-10]。

1 材料和方法

1.1 材料

棕头蜘蛛猴的血液由北京市动物园提供。DH5 α 感受态细胞购自北京博迈德科技发展有限公司,293 细胞购自中国科学院上海细胞库。LA Taq、pMD-18T、dNTP 购自 TaKaRa 公司。T4 连接酶、限制性内切酶 *Not* I、*Kpn* I、*Bam* H I、*Xho* I 等,购自 NEB 公司。DMEM(Dulbecco's modified Eagle's)培养基、胎牛血清、Hanks 平衡盐溶液、胰酶、青链霉素双抗,购自 Hyclone 公司。Myc 标签一抗、二抗,购自 AB-Mart 公司。辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG,购自中杉金桥公司。PI、IPTG、过硫酸铵

(ammonium persulfate, AP),购自 Sigma 公司。Triton X-100、抗猝灭封片剂,购自北京索来宝科技有限公司。转染试剂 Lipofectamine 2000,购自 Invitrogen 公司。Western 发光检测试剂盒,购自威格拉斯公司。TEMED(N,N,N',N'-四甲基乙二胺)购自 LKB Bromma 公司。细胞核-胞浆-胞膜制备试剂盒,购自普利莱基因技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 Atfu-B* sv1 及其对照基因表达载体的构建:由于 EGFP 片段长度为 717 bp 左右,可能会对新构建的融合蛋白有影响,因此首先利用基因工程的方法将载体中的 EGFP 基因去掉。根据 Atfu-B* sv1 基因的序列,设计含有 myc 标签的基因特异性引物,Atfu-B* sv1 上游:5'-ctcgag gccaccatgg cgcctcgaacct-3'; Atfu-B* sv1 下游:5'-gga tcc tcacagatcctcttcagaga-tgagtttctgctcggtttacaagccgtgag-3'。将扩增获得的片段连接到 pMD-18T 载体,并利用 *Bam* HI、*Xho* I 双酶切后,连接到去除 EGFP 片段的 PEGFP-N3 质粒,获得重组质粒 PEGFP-N3'-Atfu-B* sv1。利用同样的方法获得 PEGFP-N3'-Atfu-B* 02:03 和 PEGFP-N3'-Atfu-B* 03:01 基因的重组质粒。对重组质粒进行酶切和测序鉴定^[7]。

1.2.2 重组质粒的转染:用含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养 293 细胞,置 37℃ 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞复苏后传至 3 代方可进行试验。转染前 12 h ~ 18 h,将盖玻片擦拭干净并进行灭菌处理,在无菌环境下将盖玻片放入 6 孔培养板中,按合适的浓度(以转染细胞长至 50% ~ 70% 为宜)接种细胞于培养板中。

转染前,将细胞换液,将含血清的 DMEM 培养基换成不含血清和双抗的 DMEM 培养基与培养箱孵育。在两个无菌离心管中各加入 250 μ L 的 DMEM,分别加入质粒及脂质体(质粒加入量为 4 μ g;脂质体 8 μ L)。室温孵育 5 min。将质粒及脂质体混合,并室温孵育 20 min,严格按照规定时间,不超过 25 min。将混合均匀的含质粒脂质体贴壁缓慢的加入到细胞中。37℃、5% CO₂ 培养箱孵育 4 ~ 6 h。换成含有 10% 血清无双抗的 DMEM 培养基。

1.2.3 Western blot 免疫印迹实验: 根据普利莱基因公司的细胞核-胞浆-胞膜制备试剂盒,提取膜蛋白。其操作方法如下:每 1×10^7 个细胞加入 500 μL CER 试剂,震荡重悬,冰浴 2 min。将细胞悬液转移至冰预冷的玻璃匀浆器中,冰上匀浆 20~30 次。将裂解混合物转移至 1.5 mL 离心管中,800 r/min, 4°C 离心 5 min,上清为胞膜和胞浆,沉淀为细胞核。将上清液转移至一新离心管中加入 1/10 体积的 MER 混合并冰浴 5 min,14 000 r/min、 4°C 离心 30 min,上清液为胞浆成分,沉淀为细胞膜成分。取沉淀加入 50 μL suspension buffer 重悬。

进行 Western blot 实验。将抽提到的细胞膜蛋白进行 10% SDS-PAGE 蛋白电泳,电转移至 PVDF 膜上进行 Western blot 检测,5% 脱脂奶粉封闭后加入 myc 小鼠多克隆抗体(1:5 000) 4°C 摇床孵育 12 h, TBST 清洗后加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG (1:8 000)。ECL 显色液加到含有蛋白的膜面(A, B 液等体积各 1 mL 混匀)避光反应 60 s, X-film 压片,暗室中曝光,显影,定影,清水洗涤胶片,干燥后进行分析,并扫描存档^[8]。

1.2.4 细胞表达定位实验: 连续培养 24 h 后,利用 4% 多聚甲醛固定 15 min 对细胞进行固定,0.3% Triton X-100 透化处理。加入 10% 的 BSA 封闭后再孵育 myc 标签一抗, FITC 荧光二抗。接着用浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RNase(1 mL/孔)消化 RNA,最后加入 PI 600 μL 左右染色 10 min。

在作好标记的干净载玻片上滴适量抗荧光猝灭封固液,封片固定,室温避光干燥。于激光共聚焦显微镜(德国蔡司 Zeiss Ism 510 Meta 荧光共聚焦成像显微镜)下观察、拍照。

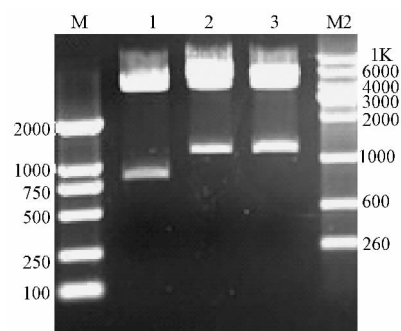
2 结果

2.1 三种重组质粒的鉴定

利用 *Bam*HI 和 *Xho* I 双酶切的方法,对 PEGFP-N3'-Atfu-B* sv1、PEGFP-N3'-Atfu-B* 02:03 和 PEGFP-N3'-Atfu-B* 03:01 重组质粒进行鉴定,结果见图 1。鉴定正确的重组质粒,利用测序的方法进行确定。

2.2 三种基因表达的 Western-blot 鉴定

利用 Western-blot 方法,对 Atfu-B* sv1、Atfu-B* 02:03 和 Atfu-B* 03:01 三种基因的表达情况进行鉴定。Atfu-B* sv1 的预测分子量为 28 kDa,而显示的分子量在 35 kDa 左右,说明蛋白表达后经过一定的糖基化。Atfu-B* 02:03 和 Atfu-B* 03:01 的预测分子



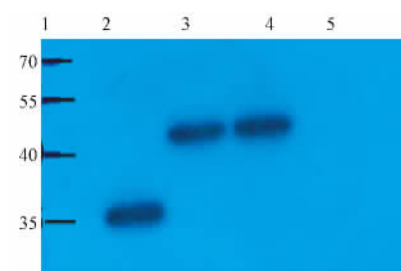
M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: PEGFP-N3'-Atfu-B* sv1 的酶切鉴定; 2: PEGFP-N3'-Atfu-B* 02:03 的酶切鉴定; 3: PEGFP-N3'-Atfu-B* 03:01 酶切鉴定; M2: DL2000 DNA 分子量标准。

图 1 三种重组质粒的酶切鉴定结果

M: DL2000 DNA molecular standard; 1: Identification of PEGFP-N3'-Atfu-B* sv1 with restriction enzyme digestion; 2: Identification of PEGFP-N3'-Atfu-B* 02:03 with restriction enzyme digestion; 3: Identification of PEGFP-N3'-Atfu-B* 03:01 with restriction enzyme digestion; M2: DL2000 DNA molecular standard.

Fig. 1 Identification of the recombinant plasmids using restriction enzyme digestion

量为 40 kDa,而显示分子量大于预测分子量,同样说明该蛋白经过一定的糖基化修饰。上述结果说明 Atfu-B* sv1 基因与全长基因一样,在细胞内可以正确翻译和进行翻译后的加工修饰。



1: 低分子量蛋白质标准; 2: Atfu-B* sv1 基因的表达鉴定结果; 3: Atfu-B* 02:03 基因的表达鉴定结果; 4: Atfu-B* 03:01 基因的表达鉴定结果; 5: 空白对照。

图 2 三种基因表达的 Western-blot 鉴定

1: Low molecular weight protein marker; 2: Identification of the expression of Atfu-B* sv1; 3: Identification of the expression of Atfu-B* 02:03; 4: Identification of the expression of Atfu-B* 03:01; 5: Negative control.

Fig. 2 Identification of the expression of three genes using Western blot

2.3 三种基因在细胞内的表达定位

利用激光共聚焦显微镜对转染后处理的 293T 细胞进行观察,其中重组蛋白经过 FITC 标记的抗体

染色后,发出绿色的荧光,经过 PI 染色,细胞核发出红色荧光。由图 3(彩插 6)可以看出,Atfu-B* sv1 基因与 Atfu-B* 02:03 和 PEGFP-N3'-Atfu-B* 03:01 基因的表达类似,主要在细胞膜上表达。ATFU-B* sv1 的表达方式为胞膜表达。ATFU-B* 0301 与 ATFU-B* 0203 基因的表达方式也相同均为胞膜内表达。说明 $\alpha 2$ 结构域的缺失对细胞的表达定位没有影响。

3 讨论

MHC 分子在机体免疫中的重要性,引发了世界范围内多学科领域的广泛关注,其中许多的研究表明,MHC I 类分子的转录可以发生一定程度的剪切,这种现象可能在多种细胞和物种中存在^[5,6]。基因的复杂功能与基因的不同剪切方式也有一定的关系。所以剪切异构体的存在,可以进一步丰富 MHC I 类分子的功能。Atfu-B* sv1 是课题组新发现的一种剪切异构体基因,其 $\alpha 2$ 结构域完全缺失,但具有完整的阅读框。在同一蜘蛛猴内,共发现 5 种全长 Atfu-B 基因和 1 种剪切异构体基因,这种剪切异构体基因共出现了 6 个克隆,符合新的等位基因鉴定标准。

在对 Atfu-B* sv1 基因进行细胞内表达和定位的过程发现,该基因能够正常表达,并且能进行正常的翻译后糖基化修饰。对其进行的细胞表达定位结果表明,Atfu-B* sv1 基因主要在细胞膜上表达,与全长等位基因没有明显差异,与已报道的剪切异构体多以可溶的形式存在明显不同。这种不同有可能是由于 Atfu-B* sv1 基因的 $\alpha 2$ 结构域的缺失,以及不能正确的与多肽结合,不能组装成熟的抗原-抗体复合物,不能发挥抗原递呈的作用,与全长基因的功能存在较大的差异造成的。因此这种差异的形成还有待于进一步的探索。这类剪切变构体可能在机体免疫反应中具有重要意义。MHC I 类分子剪切变体的研究报道尚少,此次发现与实验为今后的研究提供了重要信息,同时此次实验对于积累非人灵长类实验动物的基础研究资料也具有一定的

帮助。

参考文献:

- [1] Krangel MS. Secretion of HLA-A and -B antigens via an alternative RNA splicing pathway [J]. J Exp Med. 1986, 163: 1173-1190.
- [2] Dai ZX, Zhang GH, Zhang XH, et al. The b2-microglobulin-free heterodimerization of rhesus monkey MHC class I A with its normally spliced variant reduces the ubiquitin-dependent degradation of MHC class I A [J]. J Immunol. 2012, 188: 2285-2296.
- [3] Dai ZX, Zhang GH, Zhang XH, et al. Identification and characterization of a novel splice variant of rhesus macaque MHC IA [J]. Mol Immunol, 2013, 53: 206-213.
- [4] Wang Z, Marincola FM, Rivoltini L, et al. Selective histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 loss caused by aberrant pre-mRNA splicing in 624MEL28 melanoma cells [J]. J Exp Med, 1999, 190: 205-215.
- [5] Tabaczewski PH, Shirwan KL, Stroynowski I. Alternative splicing of class Ib major histocompatibility complex transcripts in vivo leads to the expression of soluble Qa-2 molecules in murine blood [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91: 1883-1887.
- [6] Norgaard LL, Fugger HOM, Svejgaard A. Identification of 4 different alternatively spliced HLA-A transcripts [J]. Tissue Antigens 1999, 54: 370-378.
- [7] 欧阳东云,徐丽慧,高琦,等. 中国恒河猴 Mamu-B* 1703/EGFP 在 K562 和 B16 细胞中的表达及分布 [J]. 第三军医大学学报, 2010(09): 874-878.
- [8] 何贤辉,徐丽慧,曾耀英,等. PD-L2 剪切异构体与 EGFP 融合蛋白的表达及其亚细胞定位研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2004(11): 40-44.
- [9] Rosner C, Kruse PH, Lubke T, et al. Rhesus macaque MHC class I molecules show differential subcellular localizations [J]. Immunogenetics. 2010, 62(3): 149-158.
- [10] Belicha-Villanueva A, Blickwedehl J, McEvoy S, et al. What is the role of alternate splicing in antigen presentation by major histocompatibility complex class I molecules? [J]. Immunol Res, 2010, 46(1-3): 32-44.

(修回日期)2013-09-12

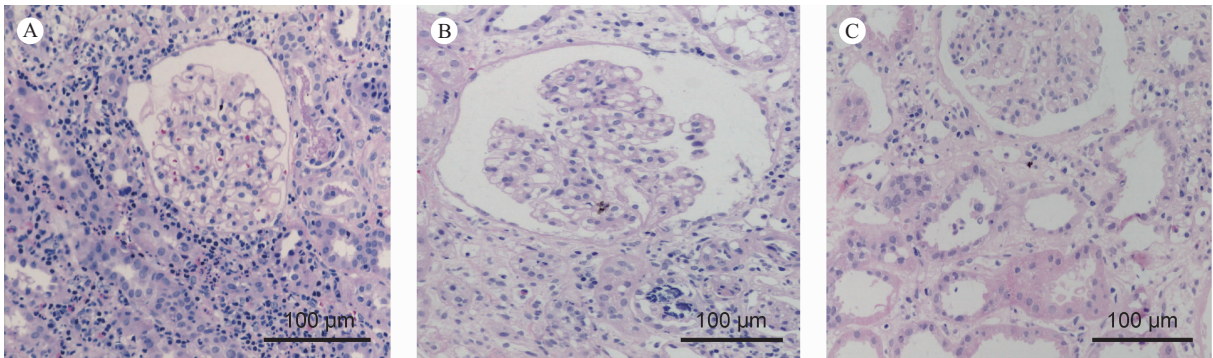
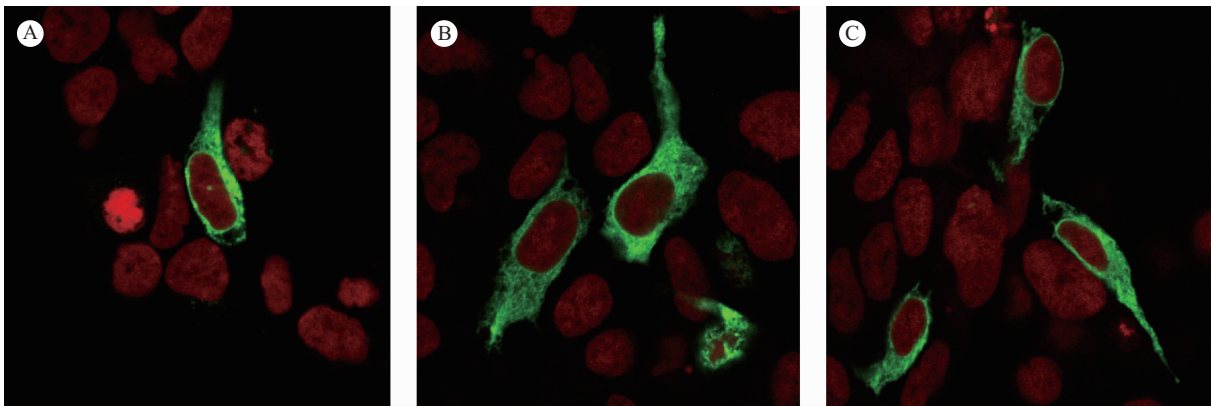


图 1 各组肾脏病理组织学反应(HE)(A:IR 组; B:RIPC 组; C:S 组)
Fig. 1 Histopathological appearances of the kidneys in the three groups. HE staining.
(A: Group IR; B: Group RIPC; C: Group S)



A:Atfu-B*sv1 蛋白的细胞定位; B:Atfu-B *02:03 蛋白的细胞定位;C:Atfu-B *03:01 蛋白的细胞定位
图 3 三种基因的表达产物在 293 细胞的定位结果
A: Distribution of Atfu-B *sv1 protein; B: Distribution of Atfu-B *02:03 protein; C: Distribution of Atfu-B *03:01 protein
Fig. 3 Distribution of the expression of three genes in the 293 cells