

# 小鼠 CD47-Fc 融合蛋白表达载体构建、 表达纯化及其生物学活性研究

郭亚楠, 陈阳, 崔利董, 赵梅杰, 张守涛

(郑州大学 生命科学学院 河南 郑州 450001)

**摘要:** 构建 CD47 重组蛋白真核表达载体 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc. 在真核细胞 293T 中成功表达重组蛋白,经亲和层析获得较高纯度重组蛋白 CD47-Fc. 通过免疫荧光染色、流式细胞技术和细胞黏附实验测定重组蛋白 CD47-Fc 的生物学活性,结果显示制备的 CD47-Fc 蛋白可与腹腔巨噬细胞表面的 SIRP $\alpha$  很好地相互作用,制备的 CD47-Fc 具有较高的生物学活性.

**关键词:** CD47; SIRP $\alpha$ ; 亲和层析; 重组蛋白

**中图分类号:** Q786

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1671-6841(2018)02-0106-05

**DOI:** 10.13705/j.issn.1671-6841.2017088

## 0 引言

CD47,又名整合素相关蛋白(integrin associated protein, IAP),是一种广泛表达的抗原. CD47 为跨膜糖蛋白,几乎在所有组织不同细胞表面表达,属于免疫球蛋白超家族成员. 在不同物种间,CD47 相当保守,大鼠、小鼠、牛和人的 CD47 蛋白中 60% ~ 70% 的氨基酸序列都是相同的<sup>[1]</sup>. 目前研究 CD47 的免疫调控机制及其在肿瘤的免疫监视中的功能多采用 CD47 单克隆抗体,用 CD47 抗体来抑制或阻断细胞表面 CD47 抗原与其配体的结合,从而阐明 CD47 在病理和生理中的作用机理<sup>[2]</sup>. 为了进一步探索研究 CD47 信号通路在免疫调控及肿瘤免疫监视中的分子机制,有必要表达纯化 CD47,通过 CD47 融合蛋白发挥“占位”作用,深入探索 CD47 的分子机制. 我们构建了一个带有 CD47-Fc 基因的真核表达载体 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc,它可以在 293T 细胞中表达 CD47-Fc 融合蛋白,纯化后的 CD47-Fc 可以结合 SIRP $\alpha$ ,为进一步研究 CD47 体内外分子机制以及肿瘤、自身性免疫疾病等相关疾病的治疗奠定了基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 质粒、菌株和细胞** 质粒 pcDNA3.1(-)由本实验室保存;大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$  购自康为生物(北京)公司;293T 细胞株为本室液氮保存.

**1.1.2 实验动物** 选择野生型 BALB/c 纯系小鼠 5 只,雌性,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 20 g,购于河南省实验动物中心,饲养于本实验室 SPF 级动物室.

**1.1.3 主要试剂** *Pfu* 酶、限制性内切酶 *Bam*HI、*Xho* I、*Eco*R1 和 T4 DNA 连接酶购自 NEB(北京);DNA 回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自生工生物(上海)公司;DNA、蛋白 Marker、琼脂糖等常用分子生物学试剂购自康为生物(北京)公司;辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔 IgG 抗体、兔 IgG1 抗体购自博士德生物(武汉)公司;ECL 化学发光检测试剂盒购自 Sigma(美国);血清及培养基购自生工生物(上海)公司;引物或基因由金维智生物(北京)公司合成. 亲和层析柱料购自 GE Healthcare(美国).

收稿日期:2017-04-20

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(31501094);河南省基础与前沿技术研究项目(152300410032).

作者简介:郭亚楠(1983—),男,河南沈丘人,讲师,主要从事分子免疫学、干细胞与再生生物学研究,E-mail: guoyan@zzu.edu.cn;通信作者:张守涛(1972—),男,河南杞县人,教授,主要从事生物技术药物、干细胞与再生生物学研究,E-mail: zhangst@zzu.edu.cn.

## 1.2 方法

**1.2.1 表达载体 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc 的构建及鉴定** 从 NCBI 数据库中查到家兔 IgG1 重链基因序列(登陆号:K00752.1),委托金维智生物(北京)公司合成兔 IgG1 重链基因部分序列(编码氨基酸 175~402).以合成 DNA 序列为模板,序列 Fc-For:TTTGGATCCGGTGGAGCGGTTTCAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGCGGATCC;Fc-Rev:AACTAAGCTTTCATTTACCCGGAGAGCG 为引物,通过 PCR 扩增目的基因;然后分别用 *Bam*H1 和 *Hind* III 对 PCR 产物和载体 pcDNA3.1(-)进行双酶切,用 T4 连接酶连接产物;转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株,涂平板、筛选阳性克隆;随后提质粒、*Bam*H1 和 *Hind* III 双酶切验证,阳性质粒测序,保存测序正确的 pcDNA3.1(-)-Fc 质粒和菌种.提取 BALB/c 小鼠脾脏 RNA,经逆转录得到 cDNA 文库,使用引物 CD47-For 和 CD47-Rev.

CD47-For:ATCTCTCGAGATGTGGCCCTTGGCGGCG,CD47-Rev:AATCTGGATCCCGTGGCGTTTTTCAGCTC.

通过 PCR 扩增 CD47 基因.以 pcDNA3.1(-)-Fc 为载体构建质粒 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc,构建方法同上.保存测序正确的质粒和菌种.上述所有引物中下划线序列皆为酶切位点.

**1.2.2 CD47-Fc 融合蛋白的表达和纯化** 用含 90% DMEM、双抗和 10% FBS 的完全培养基,在 5% CO<sub>2</sub> 的 37 °C 温箱中培养 293T 细胞.待细胞铺满培养皿约 60%~70% 的时候,将阳性 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc 质粒通过磷酸钙法转染 293T 细胞.磷酸钙转染 48 小时后,每隔一天收集培养基一次,共计收集 4 次.然后离心,收集上清用 0.22  $\mu$ m 膜过滤,使用 HiTrap Protein A HP 纯化柱纯化目标蛋白(纯化步骤按说明书进行),通过 SDS-PAGE 和 Western Blotting 检测蛋白纯化结果.

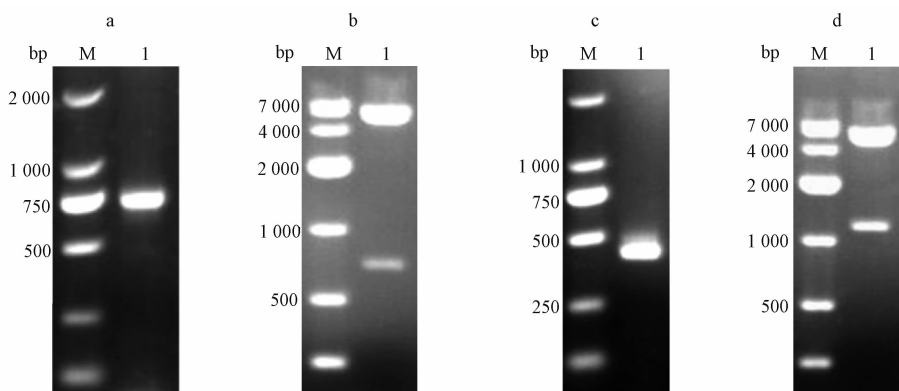
**1.2.3 细胞黏附分析** 纯化的 CD47-Fc(终浓度 5  $\mu$ g/mL)或 BSA(5%)使用 HBSS 稀释,通过 4 °C 过夜孵育固定在 96 孔 ELISA 板上.用含 10% 正常马血清的 HBSS 溶液室温孵育 1 小时封闭非特异性结合位点,然后每孔加入  $1 \times 10^6$  个 BALB/c 小鼠腹腔巨噬细胞(腹腔巨噬细胞分离方法参见文献[3])室温孵育 30 min.孵育结束后,每孔用 HBSS 轻轻洗 3 次,除去未结合的细胞.然后在显微镜下分析巨噬细胞与 CD47-Fc 或 BSA 结合状况.

**1.2.4 细胞标记、荧光显微镜及流式分析** 小鼠腹腔巨噬细胞用含 5% 正常山羊血清的 HBSS 溶液冰浴封闭 1 小时,然后用纯化的 CD47-Fc(终浓度 5 mg/mL)冰浴孵育 30 min 并标记细胞表面的 SIRP $\alpha$  蛋白.孵育结束后用 4 °C 预冷的 HBSS 溶液轻轻润洗 3 次,用 FITC 标记的羊抗兔二抗冰浴孵育 30 min,标记 CD47-Fc 融合蛋白.孵育结束后用 4 °C 预冷的 HBSS 溶液轻轻润洗 3 次,然后通过荧光显微镜或流式细胞仪分析标记结果.使用兔 IgG1 抗体作为阴性对照.

## 2 结果与分析

### 2.1 鼠 CD47 真核表达载体 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc 构建与鉴定

从 NCBI 数据库下载委托公司化学合成家兔 IgG1 编码氨基酸 175~402 的部分 Fc DNA 序列.为了构建 pcDNA3.1(-)-Fc 重组质粒,首先通过 PCR 扩增 Fc DNA 序列.PCR 反应产物经琼脂糖凝胶电泳分析后,结果显示扩增条带大小为 750 bp 左右,与预期理论值相符(图 1).质粒 pcDNA3.1(-)、切胶回收纯化的 Fc DNA 经 *Bam*H1 和 *Hind* II 酶切、T4 连接酶处理后形成重组载体 pcDNA3.1(-)-Fc,反应混合物转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,氨苄青霉素抗性筛选后挑取阳性单克隆,扩大培养后提取质粒进行酶切,电泳结果显示酶切产物大小与理论值相符(图 1).测序鉴定酶切阳性质粒,序列比对结果显示与数据库一致,说明质粒 pcDNA3.1(-)-Fc 正确构建.接下来 PCR 扩增 CD47 DNA 序列,PCR 产物电泳分析,显示条带大小为 470 bp 左右,与理论值相符(图 1).质粒 pcDNA3.1(-)-Fc、纯化 PCR 产物经酶切、T4 连接酶处理后形成 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc 重组载体,载体转化感受态细胞 DH5 $\alpha$ ,氨苄青霉素抗性筛选后挑取阳性单克隆,提取质粒进行酶切,电泳结果显示酶切产物大小与理论值相符(图 1).测序鉴定酶切阳性质粒,序列比对显示结果与数据库一致,确定质粒 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc 构建正确.



a) 兔 IgG1 Fc 基因的 PCR 扩增;M:DNA marker,1:PCR 扩增兔 IgG1 Fc 基因  
b) 质粒 pcDNA3.1(-)-Fc 经 *Bam*HI/*Hind* III 双酶切电泳图;M:DNA marker,1:质粒双酶切  
c) PCR 扩增小鼠 CD47 基因;M:DNA marker,1:PCR 扩增小鼠 CD47 基因  
d) 质粒 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc 经 *Xho*I/*Hind* III 双酶切电泳图;M:DNA marker,1:质粒双酶切

图 1 构建质粒 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc

Fig. 1 Construction of plasmid pcDNA3.1(-)-CD47-Fc

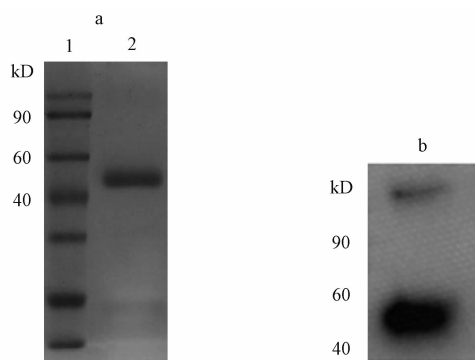
## 2.2 鼠 CD47-Fc 融合蛋白的表达和纯化

培养 293T 细胞,待细胞铺满培养皿约 60% ~ 70% 的时候,将阳性 pcDNA3.1(-)-CD47-Fc 质粒通过磷酸钙法转染 293T 细胞.质粒转染 48 h 后,每隔一天收集培养基一次,共计收集 4 次.然后离心收集上清用 0.22  $\mu$ m 膜过滤,使用 HiTrap Protein A HP 亲和层析柱纯化目标蛋白,通过 SDS-PAGE 检测融合蛋白纯化结果,结果显示融合蛋白分子量为 45 kD,与预期值相符(见图 2).同时通过 Western Blotting 鉴定兔 Fc,结果证实鼠 CD47-Fc 融合蛋白成功表达(见图 2).

## 2.3 鼠 CD47-Fc 融合蛋白活性分析

**2.3.1 细胞标记及流式分析 CD47-Fc 活性** 大量研究已证实 CD47 蛋白的配体为 SIRP $\alpha$ ,而巨噬细胞高表达 SIRP $\alpha$  蛋白.要想分析纯化的 CD47 融合蛋白活性,可通过 CD47 与巨噬细胞表面表达的 SIRP $\alpha$  是否相互作用来检测.分离的小鼠腹腔巨噬细胞用 5% 血清冰浴封闭,然后用纯化的 CD47-Fc(终浓度 5 mg/mL)融合蛋白冰育标记细胞表面的 SIRP $\alpha$  蛋白.随后用 PBS 润洗除去未结合的 CD47-Fc,用 FITC 标记的羊抗兔二抗冰育标记 CD47-Fc.孵育结束后轻轻润洗除去未结合的荧光二抗,然后通过荧光显微镜或流式细胞仪分析标记结果.使用兔 IgG1 抗体作为一抗标记的腹腔巨噬细胞做阴性对照.荧光显微镜和流式细胞仪都显示:CD47-Fc 可以标记腹腔巨噬细胞(见图 3、图 4),而作为对照的兔 IgG1 蛋白则不结合腹腔巨噬细胞.这些结果说明纯化的 CD47-Fc 活性较高.

**2.3.2 细胞黏附分析 CD47-Fc 活性** 纯化的 CD47-Fc 用 HBSS 稀释至终浓度 5  $\mu$ g/mL,通过 4  $^{\circ}$ C 过夜孵育固定在 96 孔 ELISA 板上.用含 10% 正常马血清 HBSS 溶液室温孵育 1 小时,封闭 ELISA 板上非特异性位点,然后每孔加入  $1 \times 10^6$  个纯化的小鼠腹腔巨噬细胞,室温孵育 30 分钟.孵育结束后,每孔用 HBSS 轻轻洗 3 次除去未结合的细胞.用固定的兔 IgG1 抗体作为阴性对照.然后在显微镜下分析腹腔巨噬细胞与 CD47-Fc 或兔 IgG1 结合状况.镜下观察,显示大量腹腔巨噬细胞与固定的 CD47-Fc 蛋白相结合,而作为对照的兔 IgG1 蛋白则几乎没有腹腔巨噬细胞与之结合.已证实腹腔巨噬细胞高表达 CD47 蛋白的配体 SIRP $\alpha$ .大量腹腔巨噬细胞与固相 CD47-Fc 蛋白相结合,不结合兔 IgG1 蛋白进一步说明纯化的 CD47-Fc 活性较高.



a) SDS-PAGE 检测纯化的 CD47-Fc 蛋白  
b) Western Blotting 检测 CD47-Fc 蛋白

图 2 分析检测纯化的 CD47-Fc 蛋白

Fig. 2 Analysis and detection of purified CD47-Fc protein

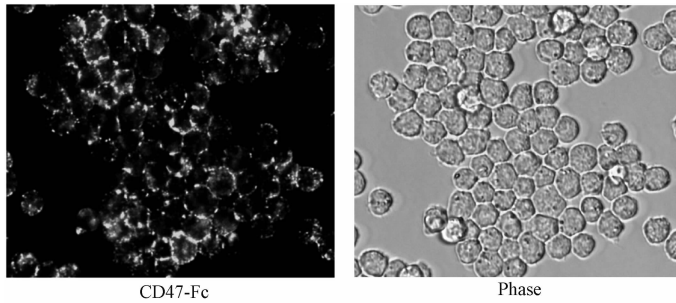


图3 标记腹腔巨噬细胞表面 SIRP $\alpha$  用 CD47-Fc 融合蛋白

Fig.3 Label SIRP $\alpha$  of peritoneal macrophage cells by CD47-Fc fusion protein

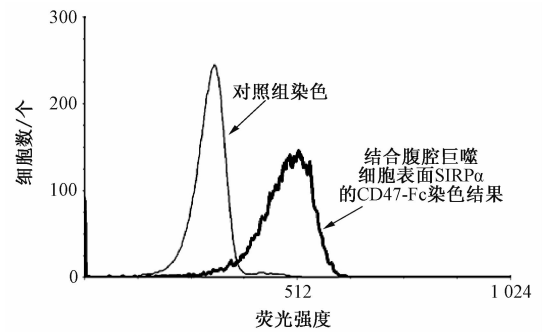


图4 用 CD47-Fc 标记腹腔巨噬细胞 SIRP $\alpha$  的流式分析结果

Fig.4 Flow cytometry analysis of SIRP $\alpha$  on the surface of peritoneal macrophages by CD47-Fc fusion protein

### 3 讨论

近年来 CD47 作为自体识别作用中的关键分子——“细胞免死”标志而引起重视. 研究还证实 CD47 蛋白涉及多种临床疾病. 在多种恶性肿瘤中, CD47 蛋白皆呈现高表达与 SIRP $\alpha$  结合, 产生抑制信号使肿瘤细胞逃避免疫细胞吞噬杀伤. 研究还发现肿瘤细胞表面 CD47 蛋白表达水平与疾病预后成负相关. 因此, CD47 成为肿瘤靶向治疗的一个新靶点<sup>[4]</sup>. 已有报道以 CD47 作为靶点, 通过制备 CD47 的单克隆抗体来阻断或抑制 CD47 与 SIRP $\alpha$  相互作用, 可以治疗肿瘤<sup>[5-6]</sup>. 但人源化抗体制备耗时较长, 成本较高. 本文尝试表达 CD47 融合蛋白, 为进一步研究移植、自身免疫性疾病治和肿瘤等相关疾病奠定基础. 因 CD47 胞外区 IgV 结构域含有二硫键, 在大肠杆菌系统中表达 CD47 易形成包涵体发生降解. 通过与 Trx 标签融合, Lin 等在大肠杆菌中成功表达出 CD47 融合蛋白<sup>[7]</sup>. 但大肠杆菌表达融合蛋白常含有内毒素, 限制了 CD47 的应用. 因此, 大多数研究采用真核细胞表达 CD47, 并用 Fc 作为融合标签, 不仅方便纯化, 而且有利于提高 CD47-Fc 融合蛋白在体内的半衰期. 经研究, 本文采用真核表达系统 HEK293T 细胞表达鼠 CD47 胞外区. HEK293T 细胞转染效率非常高, 可通过瞬转质粒, 实现外源蛋白的高表达, 不需要筛选稳定表达细胞株, 节约了时间. HEK293T 细胞表达鼠 CD47-Fc 后, 通过亲和层析纯化得到了纯度较高的 CD47-Fc 融合蛋白. 进一步通过免疫荧光染色、流式细胞技术和细胞黏附实验, 检测融合蛋白 CD47-Fc 的生物学活性. 结果显示, 所制备的融合蛋白 CD47-Fc 具有较高的生物学活性, 可与 SIRP $\alpha$  很好地相互作用, 为进一步研究 CD47 的生物学功能以及肿瘤等相关疾病奠定了基础.

### 参考文献:

- [1] BROWN E J, FRAZIER W A. Integrin-associated protein (CD47) and its ligands[J]. Trends Cell Biol, 2001, 11(3): 130 - 135.
- [2] MURATA Y, KOTANI T, OHNISHI H, et al. The CD47-SIRPalpha signalling system: its physiological roles and therapeutic application[J]. J Biochem, 2014, 155(6): 335 - 344.
- [3] 范仕郡, 刘鑫, 黄敏, 等. 小鼠腹腔巨噬细胞的快速提取及培养[J]. 局解手术学杂志, 2015, 24(2): 130 - 131.
- [4] SOTO-PANTOJA D R, STEIN E V, ROGERS N M, et al. Therapeutic opportunities for targeting the ubiquitous cell surface receptor CD47[J]. Expert Opin Ther Targets, 2013, 17(1): 89 - 103.
- [5] WEISKOPF K. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRPalpha axis[J]. European journal of cancer, 2017, 76: 100 - 109.
- [6] BRIGHTWELL R M, GRZANKOWSKI K S, LELE S, et al. The CD47 “don't eat me signal” is highly expressed in human ovarian cancer[J]. Gynecologic oncology, 2016, 143(2): 393 - 397.
- [7] LIN Y, YAN X Q, YANG F, et al. Soluble extracellular domains of human SIRP $\alpha$  and CD47 expressed in *Escherichia coli* enhances the phagocytosis of leukemia cells by macrophages in vitro[J]. Protein expression and purification, 2012, 85(1): 109 - 116.

## Expression, Purification and Characterization of Mouse CD47-Fc Fusion Protein in Mammal Cells

GUO Ya'nan, CHEN Yang, CUI Lidong, ZHAO Meijie, ZHANG Shoutao  
(School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** By using the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(-), recombinant proteins of CD47-Fc were expressed in the eukaryotic cells of 293T. Purified by affinity chromatography, high purity of CD47-Fc proteins was obtained. The activities of the recombinant protein were evaluated by immunofluorescence staining, flow cytometry, and cell adhesion assay. The results showed that CD47-Fc proteins bound to SIRP $\alpha$  expressed on the surface of peritoneal macrophage cells. A fusion protein of CD47-Fc which was biological active, was successfully expressed in the eukaryotic cells of 293T.

**Key words:** CD47; SIRP $\alpha$ ; affinity chromatography; recombinant protein

(责任编辑:王浩毅)

(上接第 105 页)

- [2] HONE A N W, WANG J P. Integrable peakon equations with cubic nonlinearity[J]. J PHYS A: MATH THEOR, 2008, 41(37): 4359 - 4380.
- [3] LUO W, YIN Z. Local well-posedness and blow-up criteria for a two-component Novikov system in the critical Besov space[J]. Nonlinear analysis, 2015, 122: 1 - 22.
- [4] 郑晓翠, 高晓红. 两分支 Camassa-Holm 系统 Cauchy 问题解的解析性[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2016, 46(2): 14 - 18.
- [5] LIU J, YIN Z. On the Cauchy problem of a two-component b-family system[J]. Nonlinear analysis real world applications, 2011, 12(6): 3608 - 3620.
- [6] YAN K, YIN Z. Analytic solutions of the Cauchy problem for two-component shallow water systems[J]. Mathematische zeitschrift, 2011, 269(3/4): 1113 - 1127.
- [7] HIMONAS A A, MISIOLEK G. Analyticity of the Cauchy problem for an integrable evolution equation[J]. Mathematische annalen, 2003, 327(3): 575 - 584.

## Analyticity of the Cauchy Problem for the Two-component Novikov System

ZHANG Li<sup>1,2</sup>, GAO Juanjuan<sup>1,2</sup>

(1. School of Mathematics, Northwest University, Xi'an 710127, China;

2. Center for Nonlinear Studies, Northwest University, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** The analyticity of the Cauchy problem for the two-component Novikov system was concerned. Based on the well posedness result for this problem, the analyticity of its solutions was proved in both variables, globally in space and locally in time by Cauchy-Kowalevski theorem.

**Key words:** two component Novikov system; well posedness; analyticity

(责任编辑:方惠敏)