

中國協和醫科大學  
中國醫學科学院

博士研究生学位论文

中国协和医科大学研究生院

# 中国协和医科大学博士学位论文

论文题目

## 人 IgA Fc 受体 Fc $\alpha$ RI (CD89) 的结构和功能分析

研究生姓名 : 徐 刚  
导师姓名 : 张 伟 教授  
何 维 教授  
学科专业 : 免疫学  
研究方向 : 免疫球蛋白 Fc 受体生物学  
入学时间 : 一九九九年九月  
所在院所 : 中国协和医科大学基础医学院  
中国医学科学院基础医学研究所

二零零四年四月

谨以此文献给我的母亲

## 摘要

**Fc $\alpha$ RI (CD89)** 是 IgA 的 Fc 受体，介导 IgA 和中性粒细胞、单核巨噬细胞等髓性细胞之间发生的多种免疫效应过程，其中包括：内吞作用、抗原呈递、ADCC、激活细胞产生超氧化物以及释放细胞因子和炎症介质等。**CD89** 是 I 型跨膜蛋白，膜外区包含两个 Ig 样折叠结构域，胞内区很短。染色体分布、序列同源性、配体结合和信号转导上的显著差异使 CD89 区别于经典的 Fc 受体。

本工作拟通过解析 CD89 胞外区 (sCD89) 的晶体结构，从分子水平上解释 CD89 与配体 IgA 的相互作用，为此，多种原核或真核细胞中的表达体系被用于表达重组 sCD89 蛋白。在原核细胞中，非融合蛋白、GST 融合蛋白、His-Tag 融合蛋白和 pelB 引导的周质表达等手段均无法实现 sCD89 的有效折叠，重组蛋白在菌体胞质中形成沉淀；而在昆虫细胞中，我们利用包含 sCD89 编码序列的重组杆状病毒去感染正常 Sf9 细胞，成功地实现了 sCD89 在昆虫细胞中表达，Western blot 检测表明重组蛋白的糖基化程度很低。sCD89 成熟肽链中编码 Arg50 和 Arg51 的两个连续 AGA 密码子对 sCD89 在原核细胞中的表达量有较大影响，将 AGA 同义突变成大肠杆菌常用的 CGC 和 CGT 后，sCD89 的表达量和粗纯化包涵体的纯度都显著提高。

精氨酸盐、尿素、盐酸胍等变性剂被用于对 sCD89 包涵体的重折叠研究，sCD89 在含有 2.40-2.70 M 尿素溶液或 1.8 M 盐酸胍复性液中实现了有效的重折叠，复性蛋白质能够识别多种天然 CD89 分子的单克隆抗体以及配体 IgA 分子，提示复性蛋白已恢复天然构象。

从包涵体复性得到的 sCD89 重组蛋白及其硒代衍生物均成功获得结晶。利用硒代衍生物的多波长反常散色法，我们解析得到了 sCD89 的晶体结构。sCD89 大体上呈现出典型的肘型(或心型)结构特征，两个免疫球蛋白样结构域 EC1 (Gln1 至 Gly100) 和 EC2 (Pro105 至 His199) 之间由一个短的铰链区 (Leu101 至 Lys104) 相连，并形成一个 85° 的夹角，夹角内部存在一个疏水核心结构。EC1 和 EC2 的免疫球蛋白折叠结构都是由多条  $\beta$ -折叠链相对包裹形成两个平行的  $\beta$ -折叠片构成，片层之间由分别位于  $\beta$ -折叠链 B 和 F 上保守的半胱氨酸残基相互形成二硫键而连系， $\beta$ -折叠链的排列模式类似于 KIR 分子。

sCD89 分子的表面电荷分布不均匀, 近膜的 EC2 结构域表面有大量的正电荷, 而远膜的 EC1 结构域表面正电荷极少, 仅散布有少量负电荷, 其中可能与 IgA 结合的区域以疏水性氨基酸残基侧链为主, 几乎没有强烈的电荷存在, 提示电荷相互作用在 CD89 和 IgA 的结合中不起主导作用。

利用分段表达的 sCD89 肽段, 我们将中和抗体 MIP8a 在 CD89 上的结合位点限定在 Ala74 至 Ser91 之间。点突变研究表明, Arg76、Tyr77 和 Gln78 同时突变成 Ala 后, 突变体丧失结合 MIP8a 的能力, 但是任何一个单一位点的突变均不影响同 MIP8a 的结合; Arg82、His85 突变为 Gly 和 Glu 后, 也不再结合 MIP8a。sCD89 的晶体结构显示, Arg76-Gln78 和 Arg82-His85 在 CD89 分子表面上相距较远, MIP8a 不可能同时结合这两个区域。推测 Arg76-Gln78 突变成 Ala 后, 与 Ala74、Gly75 一起可能在 SDS 微球上形成  $\alpha$ -helix 结构, 从而导致后面肽链构象的改变, 失去结合 MIP8a 的能力。MIP8a 在 CD89 分子上的结合位点位于 Arg82-His85 附近。

CD89 胞外区的结构证实了 CD89 与 LIR 和 KIR 等受体的相似性, 保守的疏水性残基在 LRC 受体序列中的存在, 提示结构域间疏水核心和肘型结构可能是多数 LRC 受体的共同特点。

**关键词:** 免疫球蛋白 IgA CD89 Fc 受体 晶体结构 点突变 Sf9 杀伤细胞免疫球蛋白样受体 白细胞免疫球蛋白样受体 白细胞受体复合物

## ABSTRACT

Fc $\alpha$ RI (also called CD89) is the Fc receptor for Immunoglobulin A (IgA). It connects IgA and effector cells that are mainly from the myeloid lineage including neutrophils, eosinophils, monocytes/macrophages, etc. When clustered by IgA immune complexes, CD89 can trigger a broad range of immune responses including phagocytosis, antigen presentation, ADCC, superoxide generation and release of various cytokines and inflammatory mediators. Structurally, CD89 is a type I glycoprotein containing two extracellular Ig-like domains and a short cytoplasmic tail. Although CD89 is an Fc receptor, its sequence is less homology to other Fc receptors. In addition, it has different chromosome location, ligand binding and signal transduction pathways, indicating that CD89 is a distinct Fc receptor.

In order to understand interactions of CD89 with IgA, we tried to resolve crystal structure of CD89. Therefore, cDNA of the extracellular part of CD89 (sCD89) was subcloned into various vectors and expressed in bacteria and insect cells. In *E. coli*, sCD89 with or without expression tags such as GST-tag, His<sub>6</sub>-tag and pelB leader peptide formed inclusion bodies. In insect cells, sCD89 cDNA was cloned in the reformed transfer vector of pAcHLT-Nat and expressed in soluble form. Western blotting showed sCD89 expressed in insect cells had similar molecular weight with that expressed in bacteria. Two consecutive AGA codons corresponding to Arg50 and Arg51 of the mature CD89 peptide were found to be harmful to the expression of CD89 in *E. coli*. Synonymous mutations of AGA to CGC or CGT significantly increased expression of sCD89 in *E. coli*.

Arginine salt, urea and GuHCl were used as reversible detergents for sCD89 refolding. The refolding of sCD89 peptide was achieved in renatured buffer containing 2.40-2.70 M urea or 1.8 M GuHCl but failed in 0.5 M arginine solution. The renatured sCD89 could recognize native IgA, indicating it recovered its biological functions. In addition, sCD89 could be recognized by a set of anti-native CD89 antibodies, indicating it held a right conformation as native CD89.

Refolded sCD89 and its selenomethionine derivative were successfully crystallized. The crystal structure of sCD89 was solved by multiwavelength anomalous diffraction using selenomethionine derivative. The overall structure of sCD89 takes a characteristic shape of elbow or heart with an angle of 85°. The ectodomain of CD89 is consisting of two Ig-like domains (EC1, residues 2-101; EC2, residues 105-200) with a three-residue linker (102-104) that holds a hydrophobic core with several amino acid residues from interface of the two Ig folds. Each domain is composed of two anti-parallels  $\beta$ -sheets connected by an S-S bond formed by two conservative cysteine residues located in B strand and F strand.

respectively, and the arrangement of  $\beta$ -sheets has a KIR-like topology.

The surface of sCD89 has an uneven charge distribution where more positive charges are clustered on the surface of membrane-proximal EC2 domain and less charges on the membrane-distal EC1 domain. Hydrophobic amino residues are mainly located within the potential IgA binding region of CD89, indicating that charges contribute little in the interaction of CD89 with IgA.

Using neutralizing antibody MIP8a to localize CD89 functional sites, we found that residues between Ala74 and Ser91 responded to the interaction of CD89 with IgA. Site-directed mutations were introduced into the residues of Arg76, Tyr77, Gln78, Arg82 and His85. Mutants of R76AY77AQ78A and R82GH85E lost the binding abilities with MIP8a completely, but mutants with single mutation of R76A, Y77A or Q78A retained affinity with MIP8a. The potential binding sites of MIP8a on CD89 were mapped onto the surface of sCD89 crystal structure. Residues Arg76, Tyr77 and Gln78 are located at the opposite side to Arg82 and His85. Since it is impossible that MIP8a binds all these residues at the same time, it is likely that R76AY77AQ78A mutation formed a new  $\alpha$ -helix on SDS micelle-protein complex. The candidate sites for MIP8a binding were close to the residues Arg82 and His85.

The crystal structure of sCD89 shows more similarities to LIR or KIR than those classical Fc receptors. We also found conserved hydrophobic residues existing in the same locations of most so-called LRC coded receptors, which indicates similar hydrophobic cores and elbow shaped structure in these receptors.

**KEYWORDS:** immunoglobulin, IgA, CD89, FcR, crystal structure, site-directed mutation, Sf9, KIR, LIR, LRC

## 缩略语表

ABTS	2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid)	2,2'-连氮基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6磺酸)
ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity	抗体依赖细胞介导的细胞杀伤作用
BHI	brain heart infusion	脑心浸液培养基
BLAST	basic local alignment search tool	局部序列对准搜寻基础工具
bp	base pair	碱基对
cDNA	complementary DNA	互补脱氧核糖核酸
DAB	3,3'-diaminobenzidine	二氨基联苯胺
DMSO	dimethyl-sulfoxide	二甲基亚砜
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核苷酸
DNTB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid )	Ellman试剂
dNTP	deoxynucleotide triphosphate	脱氧三磷酸核苷酸
DTT	dithiothreitol	二硫苏糖醇
ECL	electrochemiluminescence	电化学发光
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	一种常用的大肠杆菌菌种
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
EDTA	ethylenediamine tetraacetic	乙二胺四乙酸
Fc $\alpha$	IgA heavy chain Fc fragment	IgA重链Fc部分
Fc $\alpha$ R	IgA Fc receptor	IgA的Fc受体
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GST	glutathione S-transferase	谷胱甘肽S-转移酶
HRP	peroxidase from Horseradish	辣根过氧化物酶
IPTG	isopropylthio- $\beta$ -D-galactoside	异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷
kDa	kilodalton	千道尔顿
KIR	killer immunoglobulin-like receptor	杀伤细胞免疫球蛋白样受体
LB	Luria broth	一种培养基
LIR	leukocyte immunoglobulin-like receptor	白细胞免疫球蛋白样受体
LRC	leukocyte receptor complex	白细胞受体复合物
MAD	multiwavelength anomalous diffraction	多波长反常散射
mRNA	messenger RNA	信使核糖核酸
OD	optical density	光密度
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙酰胺凝胶电泳
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链反应
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲磺酰氟
rpm	round per minute	转/分
sCD89	soluble CD89	CD89受体胞外区
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
Se-Met	selenomethionine	硒代甲硫氨酸
TB	terrific broth	一种丰富营养培养基
TEMED	N,N,N,N-tetramethyl-ethylene diamine	四甲基乙二胺
TMB	3,3',5,5'- tetramethyl-benzidine	四甲基联苯胺
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galacto-pyranoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷

## 第一章

### 前言

人们都在谈论抗体，无论他（她）是科学家、医生还是关心自身健康的普通人。尤其在 20 世纪以前的时期，抗体可能就是一些人对于免疫学了解的全部。当时由于 Edward Jenner 医生的开创性贡献，疫苗接种成为预防疾病流行最有效的办法。时至今日，我们仍然一如既往地将防治传染病甚至肿瘤的希望寄托在抗体上，同时单克隆抗体技术的出现，也使得抗体成为现代临床研究中最常规的评价手段、最常用的检测指标和研究者手中最得力的研究工具。

抗体生物学功能的实现和人工模拟这一过程，是现代免疫学家、医学家潜心的研究课题之一。2001 年解析出的第一个全长人 IgG 的晶体结构[1]，不仅打破了人们传统上对抗体 Y 型对称结构的认识，还直观地展示出了抗体发挥作用的方式：从这个结构看，人的 IgG 更象是由两条柔软的多肽链连接起来的三个球形功能单位，其中两个识别抗原，另一个识别细胞膜上的 Fc 受体。“抗原—抗体—Fc 受体”三者间的相互作用，构成为免疫学一种核心的效应机制。

从系统这个层面看，多器官、多组织的免疫系统处在一个共通的体液环境中，系统各个组成部分之间的交流、联系和相互调节依赖于体液中运行的多种细胞和分子。其中，具有抗原识别能力的免疫球蛋白分子和它们在细胞表面的 Fc 受体之间的相互作用，是将发生在体液中的免疫识别和免疫细胞的生理功能连接起来的最重要的纽带。尤其是在血液中，免疫效应细胞表面 Fc 受体介导的免疫反应在很大程度上决定着抗体生理功能的发挥。

在“抗原—抗体—Fc 受体”三者的相互作用中，抗原和抗体的识别是现在研究的热点之一，几乎分子生物学研究的每个领域都会涉及到，本文不拟详述。人体中抗体 IgG、IgE、IgA 和 IgM 的 Fc 受体在细胞膜表面都有发现，其中 IgE、IgG 和它们相应的 Fc 受体的研究开展较早，研究者从中得到了很多非常有价值的发现；近年来，由于研究手段的完善，后两种特别是 IgA 及其受体的研究迅速升温，发表的数百篇论文从结构到功能勾勒出“抗体—Fc 受体”识别的诸多细节。由于我们的研究集中于 IgA 和细胞膜上 Fc 受体 (Fc $\alpha$ RI, CD89) 间的相互识别，所以这里将详细叙述 IgA 和其受体的研究情况。

## 一、IgA 生物学

IgA 发现于上世纪 50 年代,但是真正对于 IgA 的研究却是从 60 年代开始,当时发现在人的眼泪、唾液和乳汁中存在高浓度的 IgA, 推测 IgA 与这些地方的免疫有关。接下来的 20 多年时间中, 粘膜系统 IgA 免疫一直是 IgA 研究中的重点; 到 80 年代以后, 血液中 IgA 的作用开始得到研究者们的重视; 而最近几年, 结构生物学的进步, 使多数参与 IgA 免疫功能的分子结构和作用方式得到阐明。

### 1、IgA 的生物合成与代谢

IgA 是成人体内含量最丰富的免疫球蛋白分子。IgA 集中分布于人体的各种粘膜分泌液中, 是乳汁、唾液、呼吸道或肠粘膜分泌液中主要的免疫球蛋白; 在血清中, IgA 的含量约  $2.5 \pm 1.0 \text{ mg/ml}$ , 是血清中免疫球蛋白总含量的 6-15%。虽然血液中 IgA 的含量仅为血清 IgG 含量的五分之一左右, 但其代谢速度却是后者的五倍。事实上, 成人每天产生约  $66 \text{ mg/Kg}$  体重的 IgA, 其中血清中的 IgA 为  $20.9 \text{ mg/Kg}$  体重, 粘膜分泌的 IgA 为  $46.5 \text{ mg/Kg}$  体重, 超过了所产生的其他类型 Ig 的总和, 这说明在产生抗体的 B 细胞群体中多数浆细胞在产生 IgA[2]。

但是在个体发育过程中, IgA 的出现较 IgM 和 IgG 都晚。通常在妊娠 32 周以后, 才能在胎儿体内发现分泌 IgA 的浆细胞; 而分泌 IgM 和 IgG 的浆细胞, 出现在妊娠 15 周左右。在婴儿出生时, 通常检测不到胎儿血清中的 IgA。出生一年以后, 婴儿粘膜分泌液中的 IgA 含量可以达到成人的正常水平; 而血清中的 IgA 要在个体发育 11 至 12 年以后, 也就是直到青春期来临的时候, 才达到成人正常水平。新生儿易患呼吸道、胃肠道感染可能和这些地方 IgA 合成不足有关[3]。

IgA 在人体内的来源有两个: 一是骨髓及外迁至脾中的浆细胞, 二是分布于粘膜相关淋巴组织中的浆细胞。血清中的 IgA 主要由存在于骨髓和脾中的浆细胞分泌产生, 这里分泌 IgA1 的浆细胞占优势, 所以血清中 IgA1 也占优势(血清中 IgA1 与 IgA2 的比例约是 89 : 11), IgA 在血清中基本以单体形式 (mIgA) 存在, mIgA 约占 IgA 总含量的 87%, 其余为二聚体 (dIgA)、多聚体 (pIgA) 以及分泌型 IgA (SIgA); 在粘膜系统中, 由粘膜下固有层中的浆

细胞分泌的 IgA 绝大部分是 dIgA，dIgA 扩散至粘膜表皮细胞基底膜，并结合到基底膜上表达的多聚免疫球蛋白受体（pIgR）上，藉粘膜表皮细胞的内吞和转运作用，被释放至粘膜表面，释放时，pIgR 分子被切割，和 dIgA 结合的部分随 IgA 一起释入分泌液中，形成 SIgA。粘膜下生发中心中由于分泌 IgA2 浆细胞的增加，使分泌液中 IgA2 的含量显著增加[3;4]。研究显示，粘膜系统产生的 IgA 中来源于 B1 细胞和 B2 细胞的比例约为 1 : 3，其中 B1 细胞被认为是非 T 细胞依赖性的抗体产生细胞，分泌的抗体能识别普遍的细菌表面抗原决定簇；而 B2 细胞是 T 细胞依赖的抗体产生细胞，分布于粘膜组织中的生发中心。

肝脏在 IgA 的代谢中扮演重要角色。人体每天产生并释入血液中的 IgA 含量与从血液中清除的 IgA 含量相同，约 21 mg/Kg 体重，其中 mIgA 为 16.4 mg/Kg 体重，pIgA 为 4.5 mg/Kg 体重，对应 mIgA 的半衰期 4.7 天和 pIgA 的半衰期 3.0 天，远远高于血液中 IgG 的代谢速度（半衰期 21 天）。通过转运途径进入粘膜系统（胆汁、唾液和肠液）代谢的 IgA 不足每天 IgA 总代谢量的 10%，其余 90% 的 IgA 通过血液系统的内部机制进行代谢。临床研究表明，肝脏疾病造成的肝实质损伤可能导致血清中 IgA 含量升高，pIgA 的半衰期延长；而胆管堵塞的患者血清中并没有明显的 IgA 含量升高。肝细胞表面表达的去唾液酸糖蛋白受体（ASGP-R）能够特异识别糖链末端的半乳糖残基，从而可以结合血清中失去末端唾液酸的糖蛋白，包括 IgA，并且介导肝细胞产生内吞和消化[2]。ASGP-R 是血清中 IgA2 代谢的主要途径，而 IgA1 却只有一小部分通过这条途径代谢[5]。IgA1 的代谢可能主要是通过肝细胞中的 Kupffer 细胞进行[6]。

## 2、IgA 的结构

人 IgA 重链基因（ $\alpha$  heavy chain）位于 14 号染色体长臂端 14q32.33，其中恒定区基因有两个： $\alpha 1$  和  $\alpha 2$ ，对应于人体中存在的两类 IgA 分子：IgA1 和 IgA2，它们的主要区别在于铰链区的不同。由  $\alpha 1$  基因编码的 IgA1 分子具有较长的铰链区，并且在这段由 23 个氨基酸残基组成的铰链区中，包含有两个串联重复的富含脯氨酸、丝氨酸和苏氨酸的肽段，其中具有 5 个丝氨酸 O- 糖基化位点；而 IgA2 的铰链区较 IgA1 缺失了 13 个氨基酸残基，并且缺乏类似的糖基化位点。所以成熟的 IgA1 分子铰链区具有丰富的糖链结构，而 IgA2 没有，利用这个特点，可以用 Jacalin 等结合糖基的植物凝集素将 IgA1 从 IgA2 中分离出来。IgA1 分子铰链区的另一个重要特征是：IgA1 分子可以在此被来

自某些致病菌的蛋白酶专一性切割。这些蛋白酶特异切割 IgA1 铰链区中 Pro-Ser 或 Pro-Thr 之间的肽键，而产生的 Fab 或 Fc 片段仍保留着生物活性，可通过结合细菌表位或阻碍 Fc $\alpha$ R 介导的细胞反应，来干扰免疫反应进程。现在已知能分泌 IgA1 蛋白酶的致病菌有：奈瑟氏淋球菌、肺炎链球菌、血链球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、流感嗜血菌等[7]。另外，IgA 的 C 末端还具有一段 18 个氨基酸残基长的尾巴，可能对于多聚化的形成非常重要，因为人类另一个能形成多聚化的免疫球蛋白 IgM，也具有（同源的）尾巴。

到目前为止，完整的 IgA 分子的晶体结构数据还没有得到解析。最早的电镜照片显示，IgA 和其它免疫球蛋白分子一样，呈 Y 型结构。但是，Boehm 等基于 X 射线和核磁共振模拟的结构显示 IgA1 分子可能具有 T 型的结构[8]。究竟是 Y 型还是 T 型或许并不重要，因为随后得到的 IgG 全分子晶体结构同样显示了 T 型结构。IgA 构型的核心是由铰链区链接在一起的三个球形功能域（两个 Fab 和一个 Fc），两个识别抗原决定簇，一个识别 Fc 受体。空间位阻和铰链区的长短决定了抗体发挥功能时三个功能域的相对位置和灵活度。

### 3、IgA 的生物学功能

IgA 最早为人们熟知是由于它在眼泪、唾液和乳汁等粘膜分泌液中高浓度的存在。人体的呼吸道、消化道、泌尿生殖道等处覆盖的粘膜表皮总面积超过 400 平方米，这些地方每天要接触来自空气、食物等的大量微生物和对机体有害的物质。阻止这些病原体和有毒物质穿过粘膜进入机体便成为粘膜免疫的首要任务。

SIgA 被认为是粘膜表面体液免疫的主要介导者，因而构成了抵御病原微生物感染的第一道防线。在这里，粘膜分泌液中丰富的 SIgA 结合到病原体表面，并将后者包裹形成一个带负电荷的亲水团，被粘膜表面细胞外被中带同样电荷的粘液素糖蛋白所排斥，无法吸附到粘膜细胞表面；同时，SIgA 还能结合到细菌的鞭毛上，以及中和细菌分泌的酶和毒素，对细菌的运动和相关功能的发挥产生影响。这种免疫排除作用足以阻止多数微生物吸附及穿越粘膜表皮，保护粘膜抵御一些侵袭性的感染。另外，基于粘膜表面 pIgR 介导的转移过程，IgA 还有另外两个作用：第一，位于粘膜下的 IgA 与穿过表皮屏障的抗原结合，并通过 pIgR 介导的运送机制，重新将抗原排除体外；第二，通过类似方式，阻断细胞内病毒的合成和组装：IgA 可与病毒颗粒或蛋白结合，并通过 pIgR 介导的运送机制将它们从细胞中排出[3]。实际上，在粘膜基底层

中，结合抗原形成的 IgA 免疫复合物还可以通过结合到巨噬细胞表面 IgA 的 Fc 受体 (Fc $\alpha$ R)，藉 Fc $\alpha$ R 介导的内吞作用被巨噬细胞吞噬清除[9]。

现在已知，IgA 缺陷是最常见的免疫球蛋白缺陷症，在人群中发生的比例高达 1 : 500。IgA 缺陷通常不会对个体造成严重后果，但是部分个体易对抗原过敏和患自身免疫病[10]。动物实验证实，IgA 基因敲除的小鼠生存正常，肺部感染的感染和致死率与正常小鼠没有显著区别，似乎 IgA 的缺陷完全被 IgM 和 IgG 水平的升高弥补了[11;12]。IgA 在体内的作用仍然有争论。

Devito 等人的研究有助于了解粘膜系统中 IgA 抗病毒的作用。在非洲部分地区，有的人群尽管暴露于 HIV 病毒，但是血清学检测始终阴性，提示这些人能够抵抗 HIV 感染。Devito 等在对肯尼亚从事性相关行业的妇女进行调查后发现，对 HIV 具有抵抗力的妇女中 76% 的人体内有识别 HIV-1 的 IgA 型抗体，而对 HIV 没有抵抗力的妇女中这一比例是 26%。研究还发现，这些人体内的 IgA 抗体不仅具有中和 HIV-1 的作用，同时也可以阻止 HIV-1 病毒穿越粘膜屏障进入血液，提示 IgA 在防治 HIV-1 通过性途径传播中的作用 [13-15]。

关于血清中 IgA 的作用争论更为激烈。有研究指出，血液中的 IgA 免疫复合物被吞噬清除时几乎不会激发机体的炎症反应，甚至 mIgA 还可以抑制 IgG 介导的吞噬、细胞杀伤、氧化爆发和细胞因子释放等作用，扮演一种类似炎症抑制因子的角色[16-19]；同时，IgA 激活补体的能力很差，IgA 无法与 C1q 结合，因此不能激活补体活化的经典途径；只在一定条件下，IgA 可以激活补体活化的替代途径[20-23]，所以，IgA 被比喻成是一个不太合格的管家。但是研究者也注意到，pIgA 和 IgA2 免疫复合物能够通过 Fc $\alpha$ R 受体激发白细胞的炎症反应，尤其 IgA2 免疫复合物激发中性粒细胞等释放的炎症因子量远高于 IgG 复合物和 IgE 复合物所激发的[24]。近期的研究证实，Fc $\alpha$ RI 能够有效参与抗体介导的肿瘤杀伤，也是 CD20 导向抗体治疗中最有效的介导受体 [25;26]。

正常成人血清中存在高浓度的 mIgA，这是人和小鼠、大鼠等的 IgA 系统不同的一个地方。小鼠的血清中只有多聚体 IgA，没有单体型 IgA；大鼠曾经作为人 IgA 免疫的研究模型，可是其血清中的 IgA 含量不足总免疫球蛋白含量的 1% (0.1 mg/ml)，而且单体和多聚体含量相当[16]。在缺乏合适的动物模型条件下，血清中 IgA 的研究主要集中在 IgA 与它位于细胞膜表面的 Fc $\alpha$ R

之间的相互作用。在人类, Fc $\alpha$ R 在多种髓性细胞表面都存在, IgA 免疫复合物与靶细胞膜表面的 Fc $\alpha$ R 结合后, 可以激发后者产生吞噬作用和抗体依赖的细胞介导的细胞杀伤作用 (ADCC), 而效应细胞激活后释放的细胞因子, 还可以吸引其他的效应细胞聚集到感染部位[3]。

## 二、IgA 的 Fc 受体 Fc $\alpha$ RI

人体内, 各种细胞表面能够结合 IgA 的受体目前已经发现有五种: 多聚 Ig 受体 (pIgR)、去唾液酸糖蛋白受体 (ASGP-R)、转铁蛋白受体 (TfR)、Fc $\alpha$ RI (CD89) 和 Fc $\alpha/\mu$ R。pIgR 是人体内最早发现能够结合 IgA 的受体, dIgA 藉借与粘膜表面 pIgR 的结合进入粘膜分泌液中, 成为 SIgA 发挥粘膜免疫作用; 除了转运 IgA 和 IgM 以外, 转运以后被切割而附着在 IgA 上的 pIgR 成分——分泌片 (Secretory component) 被发现能够利用糖基与细胞膜表面的 Mac-1 (CD11b/CD18/CR3) 受体结合[27], Phalipon 等证实分泌片可以增强 IgA 在粘膜系统的免疫功能, 并且游离的分泌片具有类似“清道夫”的功能[28;29]。ASGP-R 识别糖蛋白末端的半乳糖或者去唾液酸化的 N-acetyl-galactosamine, 参与肝脏中 IgA 的代谢[30;31], 其主要亚基 H1 上的糖识别结构域 (carbohydrate recognition domain, CRD) 的晶体结构已于 2000 年得到解析[32]; Moura 等发现肾小球细胞上的 TfR 能够识别 IgA1, 但是不能识别 IgA2[33], TfR-IgA1 结合力受 IgA1 分子上糖基化的复杂程度影响, 并且多聚体 IgA1 能够更好地结合 TfR[34]; Fc $\alpha/\mu$ R 组成性表达于成熟 B 细胞和巨嗜细胞表面, 对 IgM 和 IgA 的 Fc 都能识别[35;36], 但是结构和功能目前并无深入的报道。Fc $\alpha$ RI 表达于多种髓性细胞表面[37], 其全长 cDNA 于 1990 年由 Maliszewski 等克隆到[38], Fc $\alpha$ RI 是专一性的 IgA Fc 受体, 1993 年第五届人类白细胞分化抗原大会 (the Fifth Human Leukocyte Differentiation Antigens Workshop) 将 Fc $\alpha$ RI 命名为 CD89。

### 1、Fc $\alpha$ RI/CD89 的细胞分布和表达调控

在人体中, CD89 分子主要表达于中性粒细胞和单核细胞表面[3;39], 在嗜酸性粒细胞[40]和部分树突状细胞表面[41]也有少量表达。其中, 中性粒细胞是最主要的 CD89 阳性 (CD89 $^+$ ) 细胞, 血液和组织中的中性粒细胞表面均高表达 CD89。活体组织标本的检测显示, CD89 $^+$ 中性粒细胞在扁桃体和阑尾中成簇分布, 同时也散在分布于外周淋巴结、肝、肾、小肠粘膜以及呼吸道分

泌液、腹膜液和血液中[39]。单核细胞表面 CD89 的表达水平低于中性粒细胞，并且组织中的单核细胞 CD89 表达低于血液中的单核细胞。值得注意的是，单核细胞在成熟过程中 CD89 的表达量逐渐下降，在肠粘膜固有层中的成熟巨噬细胞 (CD68<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>) 表面已经检测不到 CD89 分子[39;41-43]。正常或受刺激诱导的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、红细胞、血小板和肥大细胞表面均未检测到 CD89 的表达[3]。

中性粒细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞和某些髓性细胞系细胞(如: HL-60, PBL985、U937) 组成性表达 CD89，其表达可受细胞因子等的调控。其中，能使中性粒细胞表面 CD89 水平升高的有：FMLP、ZAS、IL-8 和 TNF- $\alpha$ 等 [44-46]。FMLP 和 ZAS 作用中性粒细胞产生的 CD89 表达上调作用非常快 (15-20 分钟以内)，是一个  $Ca^{2+}$  依赖的信号传导过程，同时也不受蛋白合成抑制剂影响，说明细胞内存在 Fc $\alpha$ RI 分子贮备[44]。嗜酸性粒细胞表面 CD89 的表达水平受  $Ca^{2+}$  影响， $Ca^{2+}$  处理后表面表达可升高三倍；变态反应患者体内的嗜酸性粒细胞也存在 CD89 表面表达增强[40]。单核细胞和单核细胞系表面 CD89 水平受 Calcitriol、PMA、GM-CSF、LPS、TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  作用上调，而 IFN- $\gamma$ 、Suramin、TGF- $\beta$  和 pIgA 可使其表面 CD89 水平下调[4;47-49]。然而，与 PMN 和嗜酸性粒细胞不同，U937 细胞 CD89 的表达上调似乎不是  $Ca^{2+}$  依赖的，显示颗粒细胞和单核细胞 Fc $\alpha$ RI 表达调控的机制不同（分别是  $Ca^{2+}$  依赖的与非  $Ca^{2+}$  依赖的）[40]。

## 2、Fc $\alpha$ RI/CD89 的基因结构

人 Fc $\alpha$ RI 全长 cDNA 克隆首先从 PMA 激活的单核细胞系 U937 细胞分离得到。全长 1,611 bp 的 cDNA 序列由 39 bp 5'-UTR (untranslated region)、861 bp 开放阅读框和 711 bp 3'-UTR (含 polyA) 组成，其中 3'-UTR 序列中存在几处 AT 富集区和一个 Alu 序列 (1020-1296)，但缺乏多聚腺苷酸信号 AATAAA[38]。人 Fc $\alpha$ RI 编码基因位于 19 号染色体长臂端 19q13.4 区，全长约 12 kb，含有 5 个外显子 (S1、S2、EC1、EC2 和 TM/C) 和 4 个内含子 (A、B、C 和 D)。外显子 S1，长 230 bp，编码 mRNA 的 5'-UTR、起始信号 ATG 和前导肽的大部分序列；外显子 S2 短小，长度仅 36 bp，编码前导肽的剩余部分；外显子 EC1 (291 bp)、EC2 (288 bp) 各编码一个胞外 Ig 样结构域；外显子 TM/C (215 bp) 编码胞外区的茎部以及跨膜区和一个短的带 TAA 终止密码子的胞质尾部。Fc $\alpha$ RI 基因的内含子剪接遵循 GT-AG 规则，通常按照第一类内含子方式剪接，即 5' 剪接位点位于共有剪接序列中 G/gt 之间 (G 是外显

子的最末碱基碱基, gt 是内含子的第一个碱基) [50]。

在Fc $\alpha$ RI基因5'旁侧序列中, 分布有Fc $\alpha$ RI基因的启动子和多种转录调控序列。TATA盒位于转录起始位点上游-30至-20处[50], 4个C/EBP增强子结合蛋白 (CCAAT enhancer-binding protein) 识别位点分别位于-716、+59、+71和+124处, AP-1结合序列位于-295, MS-2结合序列位于-268, NF- $\kappa$ B识别位点在+74, Sp-1位点在+175, Ets家族蛋白共有识别序列位于+106, 以及一个Myb结合位点位于+171[51]。转录起始位点下游+96至+134 (即起始密码子ATG上游-102至-64) 这段区域证明对于Fc $\alpha$ RI基因启动子的活性非常重要, 其中+124处C/EBP结合序列至少在未成熟髓性细胞中是主要的启动子顺式增强元件, 而Elf-1可以结合+106处Ets家族蛋白共有识别序列, 以反式作用激活Fc $\alpha$ RI基因转录。有意思的是, 在Ets家族蛋白共有识别序列上结合的转录调节复合物中, 其中一个主要的Ets样蛋白只在骨髓来源的细胞中被检测到[52]。

Fc $\alpha$ RI基因和其它Fc受体基因的序列同源性很低, 外显子EC1、EC2对应氨基酸序列的同源性分别在17.6-28.2%和20.5-28.2%, 而Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII、Fc $\gamma$ RIII和Fc $\epsilon$ RI  $\alpha$ 相互之间的同源性却高达38.8-55.4%和36.6-45.9%[38], 这其中Fc $\gamma$ RI基因的EC2外显子是个例外, 它和其它Fc受体基因的EC2外显子同源性也不高, 只有20%左右, 但是Fc $\gamma$ RI基因的EC3外显子与其它受体基因EC2外显子的同源性很高。Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII、Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 以及新发现的FcR同源分子均位于1号染色体长臂1q21-23区带[53]。S2小外显子也存在于所有Fc $\gamma$ R基因和Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 基因, 但是都比Fc $\alpha$ RI基因S2外显子少两个碱基对[4]。

人基因组中和Fc $\alpha$ RI基因同源性最高的序列来自同样位于19号染色体19q13.4区带的LIR (leukocyte immunoglobulin-like receptor)、KIR (killer immunoglobulin-like receptor) 和NCR1 (natural cytotoxicity triggering receptor 1), 这一段染色体区段由于富集30-50个表达于免疫细胞膜上的受体, 也被称为白细胞受体复合体 (leukocyte receptor complex, LRC)[54]。在小鼠体内没有发现人Fc $\alpha$ RI的同源基因, 但是寻找工作却导致与Fc $\alpha$ RI基因有部分同源性的小鼠PIR (paired immunoglobulin-like receptor) 基因的发现[55], 小鼠PIR基因被证实是人LIR的同源基因。牛免疫球蛋白IgG2的受体bFc $\gamma$ 2R基因中和人Fc $\alpha$ RI基因相同的碱基数达到56%, 成熟肽链中相同的氨基酸残基达到41%[56]; 更让人感兴趣的是, bFc $\gamma$ 2R基因分布于牛18号染色体, 和牛KIR基因紧密连锁, 而牛18号染色体正好与人19号染色体直系同源。

### 3、Fc $\alpha$ RI/CD89 的蛋白质结构

Fc $\alpha$ RI 基因在体内存在着超过 10 种不同的转录单位[3]。肺泡巨噬细胞转录 a.1 (全长野生型) 和 a.2 (EC2 前 66 bp 缺失型) 两种；而 U937 细胞、PMA 活化的 U937 细胞和从血液中新分离的单核细胞中有 a.1、a.2 和 a.3 (EC2 缺失型) 三种转录单位；嗜酸性粒细胞和中性粒细胞中发现存在 TM/C 外显子缺失和 S2 与 TM/C 外显子双缺失两种转录片段，其中缺失的 TM/C 外显子被一段编码 23 个氨基酸的序列取代，这段序列被证明在 Fc $\alpha$ RI 基因中位于 EC2 外显子下游并紧挨着 EC2，表明 EC2 3'剪接位点没有参与剪接，而是一直转录至编码 23 个氨基酸的序列后遇到终止密码子为止[57-60]。最近，有研究显示 TNF- $\alpha$  可以特异地升高中性粒细胞表面  $\alpha.3/\alpha.1$  的比例，相反却降低单核细胞表面这一比例；肺炎患者体内的中性粒细胞上这一比例也大大低于健康对照组，提示 Fc $\alpha$ RI 的不同剪接片断可能参与 Fc $\alpha$ RI 相关生理功能的免疫调节 [18]。

Fc $\alpha$ RI a.1 是 Fc $\alpha$ RI 基因编码的全长野生型受体，多肽链由 287 氨基酸残基组成，其中前 21 个氨基酸残基组成了一个疏水性前导肽，成熟时在前导肽末位的丙氨酸残基和成熟肽链第一位的谷氨酰氨残基之间被切开，形成成熟的含有 266 个氨基酸残基的跨膜糖蛋白。Fc $\alpha$ RI a.1 受体胞外区含 206 个氨基酸残基，由两个 Ig 样结构域和近膜的茎部组成，有六个可能发生 N-糖苷化修饰的位点 (Gln45、Gln58、Gln120、Gln156、Gln165 和 Gln177) 和几个可能产生 O-糖基化的位点；与胞外区相连的是 19 个氨基酸残基组成的跨膜区（其中含有一个带正电荷的精氨酸残基）和 41 个氨基酸残基组成的胞质区尾[38]。跨膜区精氨酸残基上的正电荷对于 Fc $\alpha$ RI 介导的信号转导非常重要，Fc $\alpha$ RI 藉此与跨膜区带负电荷的 Fc $\gamma$ 二聚体组成受体复合物，通过 Fc $\gamma$ 上的 ITAM 传导活化信号[61]。而 Fc $\alpha$ RI 短小的胞质区尾不含有任何已知的信号基序，但是胞质区的存在可能与同细胞骨架的作用有关，Ser263 突变可能导致整个受体与 IgA 亲和力基本丧失或是不再受细胞因子调节[62]。

不同细胞表面表达的 CD89 分子糖基化程度差异很大。从 PMN、单核细胞、U937 细胞膜上分离得到的 CD89 分子量在 55-75 kDa 之间，而嗜酸性粒细胞上的 CD89 分子量达到 70-100 kDa；N-糖苷是细胞膜表面 CD89 分子的主要糖基化修饰，但至少部分在部分 CD89 受体上也存在 O-糖苷。用糖苷酶切除 CD89 上的糖基以后，电泳显示只有位于 32 kDa 至 36 kDa 之间的条带。Tunicamycin 处理的 U937 细胞中合成的 CD89 分子量约 32 kDa，与理论计算

的 30 kDa 分子量基本相符[40;63;64]。

#### 4、Fc $\alpha$ RI/CD89 与 IgA 的结合

Fc $\alpha$ RI 与 IgA1、IgA2m(1)、IgA2m(2)以及 pIgA 均能结合[63;65]，但是不能单独结合 SIgA[27]。IgA 单体和 Fc $\alpha$ RI 的解离常数  $K_D \approx 0.25\text{--}1 \mu\text{M}$ （数值范围与 Fc $\alpha$ RI 重组蛋白来源有关，昆虫来源的重组蛋白比酵母菌来源的  $K_D$  值低）[66;67]，结合力略强于 IgG1 与 Fc $\gamma$ RIIa ( $K_D = 0.98 \mu\text{M}$ )、IgG1 与 Fc $\gamma$ RIIb ( $K_D = 2.5 \mu\text{M}$ ) 和 IgG1 与 Fc $\gamma$ RIII ( $K_D = 1.8 \mu\text{M}$ )，却远低于 IgG1 与 Fc $\gamma$ RI ( $K_D = 1.67 \text{nM}$ ) 和 IgE 与 Fc $\epsilon$ RI ( $K_D = 4.2 \text{nM}$ )[68-70]，所以 Fc $\alpha$ RI 在高亲合力受体 Fc $\gamma$ RI、Fc $\epsilon$ RI 和低亲和力受体 Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII 之间，属于中低亲和力受体。相反，IgA 与细胞膜表面 Fc $\alpha$ RI 受体的结合却显示了较高的亲和力 ( $K_D = 6\text{--}21 \text{nM}$ )[71]。重组蛋白传感芯片模拟了这一过程：将 IgA 单体固定在芯片上，Fc $\alpha$ RI 作流动相，测得二者复合物的解离常数  $K_D \approx 0.25\text{--}1 \mu\text{M}$ ；反过来，将 Fc $\alpha$ RI 固定在芯片上，IgA 单体作流动相，测得二者复合物的解离常数  $K_D = 9 \text{nM}$ ，与前述间接法测得的数值一致[66;67;72]。实际上，IgA 可以同时结合两个 Fc $\alpha$ RI 分子，所以，前述测得的解离常数均为表观解离常数。以 IgA : Fc $\alpha$ RI = 1 : 2 的结合比例计算，在前一种情况下，IgA 结合两个 Fc $\alpha$ RI 分子的解离常数分别为： $K_{D1} = 176 \text{nM}$ ,  $K_{D2} = 431 \text{nM}$ ；而后一种情况下解离常数分别为： $K_{D1} = 180 \text{nM}$ ,  $K_{D2} = 1.17 \mu\text{M}$ ，两种情况下结果基本一致[72]。

由于血液中 IgA 的正常浓度约 4-22  $\mu\text{M}$ ，远远高于 Fc $\alpha$ RI 与 IgA 结合的  $K_D$  值 ( $0.25\text{--}1 \mu\text{M}$ )，所以细胞表面的 Fc $\alpha$ RI 在正常生理状态下应该被血液中的 IgA 所饱和[67;72]。Fc $\alpha$ RI 结合 IgA 单体的半衰期很短，仅约 25 秒，而人工制备的 Fc $\alpha$ RI 二聚体与固定在 Biocore 传感芯片上的 IgA 结合的半衰期则延长到 10 分钟（模拟 IgA 免疫复合物与细胞表面的 Fc $\alpha$ RI 受体结合），高于 Fc $\alpha$ RI 与 IgA 单体复合物 20 多倍[66]。Fc $\alpha$ RI 与 IgA 结合的动力学常数  $K_{on}$  约  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ,  $K_{off}$  约  $0.04 \text{S}^{-1}$ ，与不易解离的高亲合力受体 Fc $\gamma$ RI ( $K_{on} = 2.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ,  $K_{off} = 4.5 \times 10^{-4} \text{S}^{-1}$ ) 和 Fc $\epsilon$ RI ( $K_{on} = 7.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ ,  $K_{off} = 1.9 \times 10^{-5} \text{S}^{-1}$ ) 相比，结合速度相仿，但解离速度则较后两种受体快多了[72]。提示在体内，表达 Fc $\alpha$ RI 的髓系细胞可以籍此在血液中对各种含有 IgA 的成分进行“取样分析”，对 IgA 单体快速结合又快速分离，而多聚 IgA 或免疫复合物中的 IgA 与细胞表面 Fc $\alpha$ RI 受体的结合力增强，在细胞表面停留时间延长，从而为细胞选择性内吞多聚 IgA 或 IgA 免疫复合物提供一种有效而又节能的方式。

在目前已知的 Fc 受体中，人 Fc $\alpha$ RI 是唯一以远膜端 EC1 结构域与配体 IgA Fc 结合的[73]。人 Fc $\alpha$ RI 与牛 IgG2 的 Fc 受体 Fc $\gamma$ 2R 同源性非常高，但人 Fc $\alpha$ RI 不与牛 IgG2 结合，同样牛 Fc $\gamma$ 2R 也不与人 IgA 结合。Morton 等以人 Fc $\alpha$ RI cDNA 和牛 Fc $\gamma$ 2R cDNA 构造出五种杂交分子：h(uman)EC-b(ovine)Fc $\gamma$ 2R、bEC-Fc $\alpha$ RI、hEC1-bFc $\gamma$ 2R、bEC1-Fc $\alpha$ RI 和 bEC1<sup>1-50</sup>-Fc $\alpha$ RI，再分别与 hIgA 和 bIgG2 作用，结果表明 hEC-bFc $\gamma$ 2R、bEC-Fc $\alpha$ RI 可分别有效结合 hIgA 和 bIgG2；hEC1-bFc $\gamma$ 2R 保留与 hIgA 的结合能力，而不与 bIgG2 结合；而 bEC1-Fc $\alpha$ RI 保留与 bIgG2 的结合能力，不与 hIgA 结合。证实 Fc $\alpha$ RI（及 bFc $\gamma$ 2R）与配体的结合位点位于膜外远膜端的 EC1 结构域[73;74]。点突变显示，位于 EC1 结构域中的 Tyr35、Arg52、Tyr81、Arg82、Ile83、Gly84、His85 和 Tyr86 如果发生突变，可能影响同 IgA 的结合[66;67]。Wines 等在 KIR 结构基础上用同源建模的方法模拟出 Fc $\alpha$ RI 胞外区模型，这个模型显示上述位点分别位于 EC1 结构域中 C strand (Tyr35)、C'-E 区 (Arg52) 和 F-G loop (Tyr81、Arg82、Ile83、Gly84、His85 和 Tyr86) 上，并且在空间结构上紧密相邻[67]。

IgA Fc 上 Fc $\alpha$ RI 的结合位点位于 C $\alpha$ 2 和 C $\alpha$ 3 之间[75]，而相对应的是 IgG、IgE 与各自 Fc 受体结合的区域则位于铰链区附近[76]。点突变证实，IgA Fc 上可能参与同 Fc $\alpha$ RI 结合的氨基酸残基有 Leu257、Leu258 (C $\alpha$ 2 AB helix/loop)、Pro440、Leu441、Ala442 (C $\alpha$ 3 FG loop) 和 Phe443 (C $\alpha$ 3 G strand)[77]。这些氨基酸残基侧链均为疏水结构，提示疏水作用可能是 IgA 与 Fc $\alpha$ RI 结合的主要作用力。同时这个区域也是 IgA 结合 pIgR 的位点[78;79]，因此空间位阻可能是导致与 SIgA 不能结合的原因。SIgA 上的分泌片肽段（切割以后残留在 IgA 分子上的 pIgR 部分）能够单独与细胞膜表面的 Mac-1 (CD11b/CD18/CR3) 受体结合[27]。某些链球菌表面表达的蛋白质也能结合于 IgA Fc 的 C $\alpha$ 2 和 C $\alpha$ 3 交界处，并阻碍 Fc $\alpha$ RI 同 IgA 的结合[80;81]。

## 5、Fc $\alpha$ RI/CD89 的信号转导

Fc $\alpha$ RI 胞质区尾不含任何已知的信号基序，和其它很多免疫识别受体一样，Fc $\alpha$ RI 在信号转导中需要和 Fc $\gamma$ 链相互作用形成受体复合物，利用后者胞质区中的 ITAM 结构转导活化信号[61;82;83]。但和 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RIII、Fc $\epsilon$ RI 等不同的是，Fc $\alpha$ RI 和 Fc $\gamma$ 链之间的作用依赖于 Fc $\alpha$ RI 跨膜区 Arg209 上所带的正电荷[61]。跨膜区中带电荷氨基酸的存在，在跨膜蛋白中很罕见。Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 、Fc $\gamma$ RIII 和 Fc $\gamma$ RI 跨膜区中存在的保守序列 LFAVDTGL 或同源序列

MFLVNTVL，是它们与 Fc $\gamma$ 链相互作用的基础。但是，几乎所有 LRC 中活化型受体的跨膜区均存在类似的正电荷氨基酸残基（Arg 或 Lys），其中尤其以 Arg 居多。提示利用跨膜区带正电荷氨基酸残基与带相反电荷的 Fc $\gamma$ 2 结合形成受体复合物，可能是 LRC 中活化型受体共同的信号转导方式。

Fc $\gamma$ 并不是细胞膜表面 Fc $\alpha$ RI 受体的必要组分，Fc $\alpha$ RI 也可以单独( $\gamma$ -less receptor) 在中性粒细胞或单核细胞表面表达[83-85]。Fc $\alpha$ RI 受体的部分生理功能必须依赖结合的 Fc $\gamma$ 完成，如：Fc $\alpha$ RI 交联引发的酪氨酸激酶 Lyn、Btk 募集要求 Fc $\gamma$ 链的存在[86]；Fc $\alpha$ RI 交联引发的可溶性受体 sFc $\alpha$ RI (sCD89) 释放以 Fc $\gamma$ 链依赖方式进行[87]。而在人 Fc $\alpha$ RI 转基因小鼠中，Fc $\gamma$ 链是 Fc $\alpha$ RI 介导的 ADCC 及吞噬所必须的，因为 Fc $\gamma$ 缺陷 ( $\gamma$ -/-) 的小鼠不能表达人 Fc $\alpha$ RI 受体[88]。体外实验证明， $\gamma$ -less Fc $\alpha$ RI 受体介导的内吞作用不同于正常 Fc $\alpha$ RI/Fc $\gamma$ 受体复合物所介导的，尽管对单体和多聚 IgA 都能发生内吞作用， $\gamma$ -less Fc $\alpha$ RI 受体介导内吞的 IgA 却主要位于初级内吞体中，并未象后者一样在内吞溶酶体中发现，这意味着经 $\gamma$ -less Fc $\alpha$ RI 受体内吞进入的 IgA 可以再次由胞吐作用回到体液中，而细胞通过 Fc $\alpha$ RI 受体是否结合 Fc $\gamma$ 来区分究竟是降解 IgA 免疫复合物还是将 IgA 循环回到体液中[85]。组织学研究对此也提出支持，与血液相比，组织中的中性粒细胞和巨噬细胞表面 Fc $\gamma$ 表达水平明显降低，代表炎症反应的超氧化物释放和 IgA 介导的细胞杀伤作用未检测到，SIgA 的作用呈现出非炎症形式[39;84]。

细胞膜表面的 Fc $\alpha$ RI 受体发生交联后，在细胞膜上会出现一个短暂的成帽过程：Fc $\alpha$ RI 以不依赖 Fc $\gamma$ 链的方式，聚集到膜上形成的一种富含鞘磷脂和胆固醇的特殊结构中（称为 raft），成帽持续约 5 分钟，同时伴随 Fc $\gamma$ 链的募集和 Fc $\gamma$ 链依赖的 Lyn、Btk 募集，随后形成内吞小体，20 分钟以内全部交联的 Fc $\alpha$ RI 被细胞内吞完毕。Fc $\gamma$ 链 ITAM 的磷酸化由 Src 家族蛋白激酶 Lyn 介导，随后募集来 Syk、Blk、Btk、和 PI-3 等酪氨酸磷酸化激酶，以及一系列接头蛋白 Grb2、Shc、SHIP、SLP-76、Cbl 和 CrkL 等，可使许多下游蛋白 PKC、PLC- $\gamma$ 2、Ras、Raf-1/MEK/MAP 激酶等发生磷酸化，这些细胞内信号传递物的活化最终导致细胞发生如吞噬反应、ADCC 等[86;89-93]。

Mac-1作为辅助受体参与中性粒细胞表面Fc $\alpha$ RI和SIgA的结合，以及随后的中性粒细胞活化和呼吸爆发过程[27]。Mac-1受体属于 $\beta_2$ 粘合素家族，由 $\alpha$ 、 $\beta$ 两条异源多肽链组成，能够结合iC3b、ICAM-1、fibrinogen和 $\beta$ -glucan等多种配体。Mac-1胞内区能够与细胞骨架或骨架相关蛋白发生相互作用，这可能是

通过Mac-1能够激活细胞的原因。细胞表面Mac-1与细胞膜表面多种受体之间都存在协同作用，这些受体中也包括Fc受体中的Fc $\gamma$ RIIB和Fc $\gamma$ RIIA[94]。含有C3b/iC3b成分的IgA免疫复合物诱导中性粒细胞活化所产生的脱颗粒过程，比单一IgA免疫复合物诱导的过程更快[95]。转基因小鼠实验的结果提示，CR3对Fc $\alpha$ RI的作用具有选择性：CR3缺陷导致小鼠中性粒细胞丧失Fc $\alpha$ RI介导的肿瘤细胞杀伤活性，但对IgA包被抗原的吞噬能力仍然保留[96]。

## 6、Fc $\alpha$ RI/CD89 介导的生理功能

作为IgA的Fc受体，同其它Fc受体一样，细胞表面的Fc $\alpha$ RI被IgA免疫复合物聚集以后，可以参与介导靶细胞的多种细胞生理功能，其中包括：受体介导的内吞作用、抗原呈递、ADCC、激活细胞产生超氧化物以及释放细胞因子和炎症介质等[3]。

吞噬作用是免疫效应细胞的一项重要的功能，Fc受体介导的内吞作用可以显著增强对外来抗原的呈递。而Fc $\alpha$ RI受体在内吞过程中是否与Fc $\gamma$ 结合可能会导致不同的结果。尽管是否结合Fc $\gamma$ 对Fc $\alpha$ RI受体介导的内吞速度没有影响，但是与Fc $\gamma$ 相连的Fc $\alpha$ RI受体发生内吞作用后，会激活细胞释放Ca<sup>2+</sup>和IL-2，并使细胞产生脱颗粒或是降解内吞的IgA，而没有结合Fc $\gamma$ 的Fc $\alpha$ RI受体不能启动下游过程，这种不结合Fc $\gamma$ 的Fc $\alpha$ RI受体的作用可能是保护IgA免受降解和完成IgA的循环[85]。Fc $\alpha$ RI受体介导的抗原呈递过程需要Fc $\gamma$ 参与，Fc $\gamma$ 上的ITAM如果发生突变将影响抗原的呈递，显示Fc $\gamma$ 对于吞噬小体的运输和其中蛋白质的命运有着决定作用[97]。

Fc $\alpha$ RI在多种不同的实验系统中都显示具有介导ADCC的活性，可以引导靶细胞杀伤细菌、酵母菌、红细胞、曼氏血吸虫和肿瘤细胞等[3]。近年来的研究重点主要集中在Fc $\alpha$ RI介导的（或导向的）肿瘤杀伤和Fc $\alpha$ RI在粘膜抗感染免疫中的作用。Fc $\alpha$ RI作为一种主要表达于中性粒细胞和单核细胞上的活化性受体，其杀伤肿瘤细胞的能力很早就引起研究者的注意[98;99]，和Fc $\gamma$ RI(CD64)、Fc $\gamma$ RIII(CD16)相比，Fc $\alpha$ RI募集的效应细胞主要是中性粒细胞，其杀伤能力在G-CSF或GM-CSF刺激后得到增强，对B细胞系的杀伤范围较Fc $\gamma$ RI和Fc $\gamma$ RIII更广[26;99-102]。由于人工构建的嵌合型双特异抗体在体内作用范围小、半衰期短，而针对肿瘤抗原的IgG型抗体在细胞膜上还存在抑制性受体，因此，以Fc $\alpha$ RI为导向的IgA1或IgA2型肿瘤抗原特异性单克隆抗体最近得到了额外的关注[25]。

粘膜系统中中性粒细胞、单核细胞表面也存在 Fc $\alpha$ RI 受体的表达，作为传统意义上炎症和细胞免疫的象征，Fc 受体在这些组织中的出现引起了人们的注意。van Egmond 等将人 Fc $\alpha$ RI 基因连同调控序列一起转入小鼠胚胎，构建了人 Fc $\alpha$ RI 受体的转基因小鼠模型，在这个模型中，人 Fc $\alpha$ RI 基因的表达类似于它在人体内表达的方式：粘膜系统中的成熟巨噬细胞（包括腹膜巨噬细胞和 Kupffer 细胞）表面检测不到人 Fc $\alpha$ RI 受体，但是将细胞在体外培养过夜后在细胞表面检测到了人 Fc $\alpha$ RI 受体，GM-CSF 刺激能够增加表面人 Fc $\alpha$ RI 的数量[88]。利用肺炎链球菌和百日咳杆菌检测的结果显示，表达人 Fc $\alpha$ RI 基因的小鼠 Kupffer 细胞能够有效地清除 IgA 包被的细菌，但是 Kupffer 细胞吞噬和杀伤能力需要 FcR $\gamma$ 参加[88;96;103;104]。而在人小肠粘膜中的单核巨噬细胞表面，CD89 的表达量下降，相应 LPS 刺激的细胞因子释放和 IgA 介导的吞噬作用都被明显减弱[43]。提示在病理或某些特殊生理状态下，如果粘膜下固有层中的单核巨噬细胞受诱导高表达 Fc $\alpha$ RI 和 R $c$ R $\gamma$ ，这些免疫效应细胞将会对穿越粘膜屏障的抗原或病原体产生吞噬和杀伤。另一个引起注意的现象是，在上述的转基因小鼠模型中，SIgA 并不能起始 Kupffer 细胞的吞噬作用[105]，这与 SIgA 不能结合 Fc $\alpha$ RI 受体的结果一致[27]。

### 三、本论文的研究目标

Fc $\alpha$ RI 和传统的 FcR 之间亲缘关系疏远，不仅表现在染色体分布的不同、基因和蛋白质序列同源性低，而且与配体相互作用的结合区域、信号转导方式均体现出它的独特之处。同样令人感兴趣的是，Fc $\alpha$ RI 在这些方面和同处 19q13.4 区带的 KIR、LILR 等受体表现出很多共同的特点，KIR 和 LILR 受体尽管在结合 MHC 分子和抑制 NK 细胞活化方面的作用为人熟知，但其中不少活化型受体的功能以及配体至今却仍然不解。

近几年，多数 Fc 受体的结构都得到了解析，从结构上人们解释了 Fc 受体与抗体之间的作用方式、结合区域以及参与作用的氨基酸残基等之前的诸多疑问，也为抗体治疗和药物设计给出了明确方向。关于 Fc $\alpha$ RI 和 IgA 之间的相互作用也是近来的研究热点，尤其是在肿瘤治疗中 Fc $\alpha$ RI 显示出不同于其它 Fc 受体的优势。美国、德国等国家的多家研究机构都在研究 Fc $\alpha$ RI 的表达和结晶，但是由于这个蛋白质本身的特点，成功的表达和纯化一直没

有实现。

因此本论文的研究目标是：实现 Fc $\alpha$ RI 胞外区肽段的表达和正确折叠；纯化得到结构均一的重组蛋白；结晶并解析出 Fc $\alpha$ RI 胞外区的空间结构；点突变研究 Fc $\alpha$ RI 配体结合位点；并探索 Fc $\alpha$ RI 和 IgA 的共结晶。我们希望从最直观的角度解释 Fc $\alpha$ RI 与 IgA 的相互作用，在此基础上探讨相关生物学意义。

## 第二章

### 材料和方法

#### 一、主要化学试剂及实验材料

##### 1、主要化学试剂

培养基、抗生素: Tryptone、Yeast Extract、脑心浸液培养基 (Brain Heart Infusion, BHI) 为 Oxoid 产品, SF-900 II SFM (Cat. No. 10902-088) 和 Grace's insect medium supplemented (Cat. No. 11605-094) 为 Gibco 产品, TC-100 Insect Medium (Cat. No. T2000) 购自 USBiological, Fetal Bovine Serum 为 Gibco 或 TBD 公司产品, L-Glutamine 为 Sigma 公司产品, 琼脂粉 Agar 和抗生素 Ampicillin、Kanamycin、Streptomycin 均为国内公司产品。

主要生化试剂: 盐酸胍 (Guandine hydrochloride, Ultra pure) 购自 Gibco 公司, 三羟甲基氨基甲烷 (Tris base, Ultra pure) 购自 Promega 公司, L-Arginine·HCl、ABTS、溴化乙锭、TMB、DNTB 购自 Sigma 公司, 尿素 (Urea, Ultra pure)、IPTG、L-Glutathione (Reduced)、L-Glutathione (Oxidized)、丙烯酰胺、N, N'-亚甲双丙烯酰胺、Tricine、Glycine、过硫酸铵、SDS 等购自 Ameresco 公司, Agrose 购自华美公司 (产自西班牙), D-Galactose、DTT 购自 BBI, 其它各种试剂为进口或国产分析纯试剂。

层析介质: DEAE Sepharose Fast Flow、Sephadex G-25、Glutathione Sepharose 4B、CNBr-activated Sepharose 4B 均为 Amersham Pharmacia 公司产品, Prosep A、Prosep G 和 Jacalin (L-5147) 购自 Sigma, Ni-NTA Agarose 购自 Qiagen, GST·Bind Resin 购自 Novagen, Immobilized Glutathione Column (1 ml, Cat. No. 78250) 为 Pierce 产品。

其它: 硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司或 Amersham Pharmacia 公司 (Hybond-C), 透析袋购自 Medicell (cut off 12,000-14,000 Daltons) 或华美公司 (cut off 12,000-14,000 Daltons, made in USA); 浓缩离心管 (cut off 5,000 Daltons) 为 Millipore 公司产品; ECL 发光底物 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate 购自 Pierce 公司; 医用 X 射线胶片为 Kodak 公司产品。

## 2、工具酶、分子量标准及试剂盒

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 DNA marker (D501A) 购自大连宝生物 (TaKaRa) 公司；低分子量蛋白质分子量标准 LMW Electrophoresis Calibration Kit (17-0446-01) 为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品；*Pfu* DNA 聚合酶购自上海博亚公司，*Taq* DNA 聚合酶购自上海博亚公司或北京鼎国公司；DNA 凝胶回收纯化试剂盒购自北京博大泰克公司；B-PER GST Fusion Protein Purification Kit 购自 Pierce；昆虫表达试剂盒 BaculoGold 6xHis Expression and Purification Kit (Cat. No. 554802) 购自 PharMingen 公司。

## 3、抗体

Anti-sCD89 单克隆抗体 MIP7c、MIP8a、MIP9a、MIP10c、MIP11c、MIP14b、MIP15b、MIP25b、MIP38c、MIP58b、MIP59c、MIP65c、MIP68b 和 MIP71a 及 Anti-IgA Fc 单克隆抗体 6C9 等细胞株为本室保存。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 goat Anti-Mouse IgG (Fc specific) 为 Sigma 公司产品 (A2554)。

## 4、cDNA 克隆和质粒载体

人 IgA Fc 受体 Fc $\alpha$ RI (CD89) cDNA 克隆 (clone4) 由本实验室张伟教授构建；含有 IgA1 heavy chain 全长基因的质粒 pSV1 由 Morton 博士 (University of Oslo, Norway) 惠赠。

原核表达载体 pET-30a(+)、pGEX-4T-1 由本所生化系惠赠，pET-28a(+) 由基础所生化系杨茂君博士惠赠，pET-42a(+) 由基础所免疫系李永海博士惠赠，噬粒 pHEN2 和 Griffin.1 Library 由英国 MRC (Medical Research Council Centre) 授权使用，质粒载体 pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司。载体图谱及多克隆位点见附录 2。

## 5、细胞株

实验中所用到的大肠杆菌 *Escherichia coli* (*E. coli*) 菌株均为本室保存，基因型见表 2-1。淋病奈瑟氏球菌 *Neisseria gonorrhoeae* (Zopf) Trevisan 购自中国生物制品检定研究所 (编号：CMCC (B) 29403, VII 或 III 型)；昆虫细胞系 *Sf9* 购自中国典型培养物保藏中心 (编号：GDC008)，细胞代数为 22 至 23 代。

表 2-1 大肠杆菌 *E. coli* 菌株基因型

STRAIN	RELEVANT GENOTYPE
DH5 $\alpha$	<i>supE44ΔlacU169</i> ( $\phi 80 lacZΔM15$ ) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
BL21(DE3)	<i>F' ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal(λcI857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1) dcm</i> (DE3)
HB2151	K12 <i>ara del(lac-pro) thi/F'proA+B+ lacIq lacZ del M15</i>

## 6、引物

实验中所用引物由上海博亚生物工程技术有限公司或北京三博远志公司合成，合成引物经 PAGE 纯化。引物序列见表 2-2。

表 2-2 正、反向引物序列

Sense primer	sequence (5'-- 3')	Anti-sense primer	sequence (5'-- 3')
P4	tctgtattcccttatccatattg	P3	ccctcgagtttagcctgtcaactaccagtc
P5	caatatggatagggaaatacaga	P6	ccctcgaggtaatgttaccggaaatct
P8	cggaaattcatgtaccgagagataggcaga	P12	ccctcgaggtaatgttaccggaaatct
P9	cggaaattcatggaccacatggacgcaaac	eXohis	ccgctcgaggatcaagtctgcg
P10-m	cggaaattctgccaatataaggata	SP6	catacgtttaggtgacactatag
P11	cggaaattcgcaggcgctatcg	T7 terminator	taatacgtactataggg
sNcoI-m	catgccatggacccaaacagac	MP2	gcacgcagcgccccctgccttgttgcg
sNcoI-20	catgccatggcacaggaagggg	MP4	gcacgcatagcgccccctgccttgttgcg
sBam21	cggatcccaggaaaggggactt	MP6	gcactgagcgcgcctgccttgttgcg
T7	taatacgtactataggg	MP8	gcactgataggccccctgccttgttgcg
MP1	aggggccgtcgctgccaatataaggata	MG2	atcgccccgcgtcgaagtttggaaat
MP3	aggcgctatcgctgccaatataaggata	CH2elink	tgtttccggatttgagagg
MP5	aggcgcgctcagtgccaatataaggata	CH3ehind	ccaagcttttagcggtcgatggctt
MP7	aggggctatcagtgccaatataaggata	pAcM2	ggccatggaaattcagatccgtattata
MG1	cagacggccgcgcgtacgt	pNhis2	tcaagatctcgaggaaattcggtaccgg atccacgagggaccaa
sNdeCH2	gggaattccatatgcgactgtcactgcac		
sCH3link	aaaatccggaaacacattccgg		
pNhis1	ttgctgatatcatggagata		
pAcM1	ctgaattccatggccccctatagatccga		
pAntseq	tttcctcccttcagcag		

## 7、主要仪器和设备

Programmable Thermal Controller, PTC-100 (MJ Research Inc.)

UNO-Thermoblock (Biometra, Gottingen, Germany)

基因扩增仪 JY01 型 (北京市君意机电技术公司)  
台式高速离心机 (TGL-16G, 上海医用分析仪器厂)  
台式低温高速离心机 (UNIVERSAL 32R, Helmer Co.)  
低温高速离心机 (Beckman J2-21, Beckman Co.)  
血压衡流电泳仪 (DF-C/DF-D, 北京东方仪器厂)  
蛋白电泳仪及电转仪 (北京六一仪器厂)  
电导率仪 (DDS-11A, 上海雷磁)  
恒温水浴箱 (S648, 上海医疗器械七厂)  
恒温振荡器 (THZ-C, 江苏太仓医疗器械厂)  
超声波细胞粉碎机 (MSE Soniprep150 sonicator, microprobe, SANYO)  
超声波细胞粉碎机 (新芝 JY92-II, 宁波)  
多通道电子蠕动泵 (浙江象山, DDB-300)  
ELISA 酶标仪 (Labsystems Genesis V3.03)  
酶联免疫检测仪 (DG3022)  
紫外透射反射仪 (北京六一仪器厂, WD-9403C 型)  
紫外透射反射仪 (Bio-RAD, GelDoc2000)  
紫外可见分光光度计 (上海分析仪器厂, 752 型)  
CO<sub>2</sub> 培养箱 (Forma Scientific Inc., 3111)  
ÄKTAprime (Amersham Biosciences)

## 8、软件

蛋白质等电点从氨基酸残基序列推算得到，推算使用网络分析软件 ProtParam tool (<http://cn.expasy.org/tools/protparam.html>) [106]，晶体 MAD 相位分析使用 SOLVE[107]，电子云密度修正使用 RESOLVE[108]，结构模型搭建使用 CNS (Crystallography & NMR system)[109]，结构模型的质量检测使用 PROCHECK v.3.5.4[110]，从蛋白质原子座标生成分子结构示意图使用 Molscript v2.1.2 (<http://www.avatar.se/molscript/>) 和 Deep View Swiss-PdbViewer stable version 3.7 (<http://spdbv.niehs.nih.gov/>)，分子表面计算、C<sub>α</sub>链叠加和均方根计算等使用 Deep View Swiss-PdbViewer，图形渲染使用 Raster3D version 2.7c (<http://www.bmsc.washington.edu/raster3d/raster3d.html>)。

## 9、常用试剂和培养基

常用试剂、贮存液的配制方法见表 2-3。

表 2-3 常用试剂配制方法

试 剂	配 制 方 法
质粒提取试剂	STE: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0); 溶液 I: 50 mM 葡萄糖, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0); 溶液 II: 0.2 M NaOH (临用前用 10 M NaOH 储存液稀释), 1% SDS; 溶液 III: 60 ml 5M 乙酸钾, 冰乙酸 11.5 ml, 加水至 100 ml
TE (pH 8.0)	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
13% PEG 8000	13% (w/v) PEG 8000, 1.6 M NaCl
1.0 M IPTG	2.38 g IPTG 溶于 10 ml 去离子水, 0.22 μm 过滤除菌, -20°C 冻存
Kanamycin(sulfate)	用去离子水配成 30 mg/ml 贮存液, -20°C 冻存, 使用浓度为 50 μg/ml
Ampicillin (sodium salt)	用去离子水配成 25 mg/ml 贮存液, -20°C 冻存, 使用浓度为 100 μg/ml
LB Medium	950 ml 去离子水中加入 10 g Tryptone、5 g Yeast extract 和 10 g NaCl, 搅拌溶解, 用 5N NaOH 调 pH 至 7.5, 加水至 1000 ml, 15psi (1.05 Kg/cm <sup>2</sup> ) 高压灭菌 20 分钟
LB Medium plate	LB Medium 中加入 1.5% Agar, 15psi (1.05 Kg/cm <sup>2</sup> ) 高压灭菌 20 分钟, 冷却至 60°C 以下, 加入相应抗生素, 倒制平板, 无菌台中吹干后, 封口闭光保存于 4°C。使用前取出平衡至室温后再涂布细菌
2×TY Medium	950 ml 去离子水中加入 16g Tryptone、10g Yeast Extract 和 5g NaCl, 搅拌溶解, 加水至 1000 ml, 15psi (1.05 Kg/cm <sup>2</sup> ) 高压灭菌 20 分钟
磷酸钾溶液	800 ml 去离子水中加入 23.1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 和 125.4 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 搅拌溶解后, 加水至 1000 ml, 15psi (1.05 Kg/cm <sup>2</sup> ) 高压灭菌 20 分钟
TB Medium	900 ml 去离子水中加入 12 g Tryptone、24 g Yeast extract 和 4 ml 甘油, 搅拌溶解, 15psi (1.05 Kg/cm <sup>2</sup> ) 高压灭菌 20 分钟, 冷却至 60°C 以下, 加入 100 ml 无菌磷酸钾溶液
M9 Medium	890 ml 无菌去离子水中加入 0.5 g NaCl, 100 ml 10×M9 盐溶液, 1 ml 1M MgSO <sub>4</sub> 和 10 ml 40% glucose
改良 M9 Medium	890 ml 去离子水中加入 10 g N-Z-amine A 和 5 g NaCl, 搅拌溶解, 15psi (1.05 Kg/cm <sup>2</sup> ) 高压灭菌 20 分钟, 冷却后加入无菌 100 ml 10×M9 盐溶液, 1 ml 1M MgSO <sub>4</sub> 和 10 ml 40% glucose
10×M9 盐溶液	900 ml 去离子水中加入 10 g NH <sub>4</sub> Cl、30 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 和 60 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O, 搅拌溶解, 加水至 1000 ml, 15psi (1.05 Kg/cm <sup>2</sup> ) 高压灭菌 20 分钟
BHI Medium	74 g BHI 溶于去离子水中至终体积 2000 ml, 高压灭菌 20 分钟, 冷却至室温后, 加入 20 ml Kellogg's supplement 和 20 ml 4.2% 碳酸氢钠溶液
Kellogg's supplement	40 g 葡萄糖, 1 g 谷氨酰胺, 10 ml 0.5% 硝酸亚铁, 溶于去离子水中至终体积 100 ml, 0.22 μm 滤膜过滤除菌
TAE buffer	1×(工作液): 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA 50×(贮存液): 242 g Tris base, 57.1 ml 冰醋酸、100 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0), 加水至 1000 ml
6×Gel-loading buffer	0.25% 溴酚兰, 40% (w/v) 蔗糖水溶液
30% acrylamide	Acrylamide 58 g, Bisacrylamide 2 g, 加去离子水至 200 ml, 过滤后 4°C 避光保存

试 剂	配 制 方 法
SDS-running buffer	0.025 M Tris base, 0.192 M Glycine, 0.1% SDS, pH 8.3
2×SDS loading buffer	0.125 M Tris-HCl, 4% SDS, 20% (v/v) Glycerol, 0.2 M DTT, 0.02% Bromophenol Blue, pH6.8
2×PAGE loading buffer	0.125 M Tris-HCl, 20% (v/v) Glycerol, 0.02% Bromophenol Blue, pH6.8
SDS-PAGE 固定液	70 ml 冰醋酸, 200 ml 甲醇加水至 1000 ml
考马斯亮蓝染液	1.25g Coomassie Brilliant Blue R-250 溶于 225 ml 甲醇, 加入 50 ml 冰醋酸, 去离子水定容至 500 ml, Whatman 3MM 滤纸过滤除去颗粒
SDS-PAGE 脱色液	20% 甲醇, 7% 冰醋酸
PMSF (100 mM)	17.4 mg PMSF 溶于 1 ml 异丙醇, -20°C 贮存
氨基黑染色液	0.1% Amido Black, 25% 异丙醇, 10% 冰醋酸
Bradford 试剂	100 mg Coomassie Brilliant Blue R-250 溶于 50 ml 95% 乙醇, 加入 100 ml 磷酸, 和 850 ml 去离子水, 过滤除去沉淀
PBS	900 ml 去离子水中加入 8 g NaCl、3.625 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O、0.2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 和 0.2 g KCl, 溶解后加去离子水定容至 1000 ml
PBS-T	PBS 中加入 0.05% (v/v) Tween-20
Western blot 封闭液	含 2.5% BSA 的 PBS 溶液
阳极转移缓冲液 I	300 mM Tris-HCl, pH10.4
阳极转移缓冲液 II	25 mM Tris-HCl, pH10.4
阴极转移缓冲液	40 mM Aminocaproic Acid, 25 mM Tris-HCl, pH9.4
DAB 显色液	50 mg DAB 溶于 100 ml PBS, 加入 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 至终浓度 0.03%
ELISA 包被缓冲液	储备液 A (0.2 M): 21.2g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 加 dH <sub>2</sub> O 到 1000ml; 储备液 B (0.2 M): 16.8g NaHCO <sub>3</sub> 加 dH <sub>2</sub> O 到 1,000ml; 将 80 ml A + 170 ml B + 250 ml 水混合, 即为所需溶液, pH8.9-9.6
ELISA 封闭液	3% BSA/PBS/0.02% 叠氮钠
ELISA 显色液 (TMB, 450 nm)	A 液: 6.2 g 柠檬酸、25 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O, 加水至 500ml, 临用前加入 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 至终浓度为 0.03%; B 液: 1.05 g 柠檬酸、0.093 g EDTA 加水至 480ml 配成基质液; 同时把 140mg TMB 溶于 20ml DMSO 中, 加温溶解, 推滤; 临用时把配好的 TMB 溶液滴加于前面的基质液中
ELISA 显色液(ABTS, 410 nm)	40 mg ABTS 溶于 100 ml 0.1 M 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液, 临用前加入 30% 过氧化氢至终浓度为 0.015%

## 二、实验方法

### 1、分子生物学常规实验操作

#### 1.1 菌种的保藏

本实验中用到的宿主菌和含有重组质粒的转化单克隆菌株保存方法有两

种：一种是在菌液中混入甘油，-80℃低温冻存，用于较长时间内保存菌种；第二种是将涂布的平板封口存放于4℃，可以在一个月内使用。

加甘油冻存菌种的方法为：从平板上挑取单克隆接种50 ml培养基，37℃剧烈振荡培养至菌液OD<sub>600nm</sub>达到0.6-0.8，取其中0.9 ml菌液转移至一只无菌离心管管中，再加入0.1 ml 80%无菌甘油，混匀后速冻于-80℃。

冻存菌种的取用方法为：取-80℃冻存菌种用冷却的接种环在冻存菌种表面轻轻刮取几下，并涂布培养基平板，余下菌种迅速放回-80℃冻存（注意避免将已冻存的菌种融化）。

## 1.2 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳用于区分不同大小的DNA片段。凝胶使用浓度根据所区分DNA片段大小决定：通常使用琼脂糖浓度为1%和1.5%的琼脂糖凝胶，1%的琼脂糖凝胶DNA片段有效分辨范围在500-10,000 bp，实验中用于分析质粒酶切图谱或分离回收DNA片段；1.5%的琼脂糖凝胶，其DNA片段有效分辨范围在200-3,000 bp，主要用于分析PCR产物。

琼脂糖凝胶配制：称取所需量琼脂糖，加入50 ml电泳缓冲液(1×TAE)混匀，微波加热融化，反复沸腾两三次以完全融化所有琼脂糖颗粒；室温静置，待溶液温度降至55℃左右时加入1 mg/ml溴化乙锭2.5 μl(终浓度0.5 μg/ml)，混匀后立即倒入封装好的电泳槽；待琼脂糖完全凝固后(室温下30-45分钟)，拔出加样梳即可加样电泳，通常采用50-80V恒压电泳45-60分钟，电泳结束取出凝胶置紫外透射仪观察，照相在Bio-RADGeldoc2000中进行。

## 1.3 质粒的提取和纯化

### 1.3.1 质粒的小量提取

挑取单个菌落接种于含相应抗生素的3 ml LB培养基中，37℃振荡培养过夜。取1.5 ml菌液于1.5 ml离心管中，在4℃下12,000×g离心1分钟。倒去上层培养液，将沉淀悬浮于200 μl溶液I中振荡。加入400 μl新配制的溶液II，上下颠倒5次混匀，冰浴5分钟。然后加入300 μl溶液III，上下颠倒振荡10秒钟，混匀后静置5分钟。在室温下，12,000×g离心10分钟。收集上

清液，用等体积的酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）抽提两次，每次振荡混匀， $12,000\times g$  离心 2 分钟，取上清液。抽提完的上清中加入 0.6 倍体积的异丙醇，颠倒混匀，室温沉淀 15 分钟， $12,000\times g$  离心 10 分钟。吸去上清液，70% 乙醇洗盐 2 次，室温晾干沉淀，最后溶于 20  $\mu l$  TE (pH8.0)。

### 1.3.2 质粒的大量提取和纯化

挑取单个菌落接种于含相应抗生素的 3 ml LB 培养基中，37°C 振荡培养至菌液浑浊，用以接种 200-500 ml LB 培养基，37°C 振荡培养过夜（8-12 小时），JA-14 转头  $3,000\times g$  离心收集菌体，重悬于 100 ml 冰预冷的 STE 溶液中。以碱裂解法提取质粒：加入 18 ml 溶液 I 重悬，加 2 ml 新配制的溶菌酶溶液（10 mg/ml，溶于 10 mM Tris-HCl, pH8.0），加 40 ml 新配制的溶液 II，缓缓颠倒混匀内容物，室温放置 5-10 分钟，加入 20 ml 冰预冷的溶液 III 颠倒混匀，置冰上放 10 分钟，JA-14 转头  $3,000\times g$  离心 15 分钟（不开刹车自然停转），取上清至新的离心管，加入 0.6 体积异丙醇，充分混匀，室温静置 15 分钟，JA-20 转头大于  $12,000\times g$  离心 15 分钟，回收核酸。室温下 70% 乙醇洗涤沉淀和管壁，吸弃上清，静置待痕量乙醇挥发干净，用 1-2 ml TE (pH8.0) 溶解沉淀。

大量提取的质粒以 PEG 法或玻璃奶法（用于转染细胞）纯化。

**【PEG 法纯化】** 将含有质粒溶液的微型离心管置于冰上预冷，然后加入等体积的冰预冷 5 M LiCl 溶液，混匀后 4°C 下  $12,000\times g$  离心 10 分钟，此时白色的 RNA 沉淀汇集管底；取上清液，加入等体积异丙醇，混匀，室温  $12,000\times g$  离心 10 分钟，弃尽上清，室温下 70% 乙醇洗涤沉淀和管壁，吸弃上清，静置待痕量乙醇挥发殆尽，用 500  $\mu l$  含有 RNase A 的 TE (pH8.0) 溶解沉淀。室温静置 30 分钟以上，等体积酚：氯仿抽提去除 RNase A，再用氯仿：异戊醇（24：1）抽提一次去除残留的酚。加入两倍体积无水乙醇沉淀 DNA，70% 乙醇洗涤沉淀和管壁，吸弃上清，静置待痕量乙醇挥发干净，用 500  $\mu l$  TE (pH8.0) 溶解沉淀。加入 500  $\mu l$  13% PEG 8000 溶液，充分混匀后，4°C 下  $12,000\times g$  离心 15 分钟；吸去上清，用 400  $\mu l$  TE (pH8.0) 溶解沉淀，用酚、酚：氯仿、氯仿各抽提一次；将上层水相转移到新的离心管中，加入 100  $\mu l$  10 M NH<sub>4</sub>Ac 溶液，充分混匀，加入两倍体积无水乙醇，室温静置 10 分钟，4°C 下  $12,000\times g$  离心 10 分钟回收沉淀的质粒 DNA。70% 乙醇洗涤沉淀和管壁，吸弃上清，静置待痕量乙醇挥发干净，用 500  $\mu l$  TE (pH8.0) 溶解沉淀。稀释 100 倍后，测量 OD<sub>260nm</sub> 和 OD<sub>280nm</sub>，计算质粒 DNA 的浓度。

**【玻璃奶法纯化】**在 PEG 纯化的基础上，向质粒溶液中加入三倍体积溶胶液，然后加入 10-20  $\mu\text{l}$  玻璃奶，并将玻璃奶在溶液中吹打混匀，冰上放置 10 分钟(每隔 2-3 分钟颠倒混合一次，以便 DNA 与玻璃奶充分吸附)；12,000 $\times\text{g}$  离心 30 秒，弃上清；向沉淀中加入 250  $\mu\text{l}$  漂洗液，轻柔吹打重悬沉淀，12,000 $\times\text{g}$  离心 30 秒，弃上清，重复漂洗步骤一次。500  $\mu\text{l}$  75% 乙醇漂洗一次（保持无菌），将沉淀置超净台中晾干，至沉淀完全干燥后（30 分钟左右），向干燥的沉淀中加入 30  $\mu\text{l}$  无菌去离子水混匀，60℃水浴 5 分钟，12,000 $\times\text{g}$  离心 1 分钟，回收上清，即为纯化的 DNA 产物。此法用于去除 PEG 法纯化中未能去除干净的一些蛋白质、RNA 和盐类杂质，所得质粒 DNA 用于与杆状病毒 DNA 共转染昆虫细胞 Sf9。

#### 1.4 *E. coli* 感受态细胞的制备

挑取宿主菌单克隆接种于 3 ml LB 培养基中，37℃振荡过夜（12-16 小时）。取 0.5 ml 菌液接种至 50 ml LB 培养基中，37℃振荡培养 1.5 小时左右，至 OD<sub>600nm</sub> 为 0.3-0.4。将该菌液置冰浴冷却 10 分钟，移至 50 ml 离心管中，4℃ 3,000 $\times\text{g}$  离心 10 分钟。弃上清，将细菌沉淀重新悬浮于 25 ml 预冷的 0.1 M MgCl<sub>2</sub> 中，4℃ 3,000 $\times\text{g}$  离心 10 分钟，弃上清，将细菌沉淀重新悬浮于 20 ml 预冷的 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 中，冰浴 30 分钟，4℃ 3,000 $\times\text{g}$  离心 10 分钟收集菌体。将细菌沉淀悬浮于 2 ml 预冷的 0.1M CaCl<sub>2</sub> 溶液中，直接用于转化，或者加入无菌甘油至终浓度 20%，分装，于-80℃保存。此法用于制备 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 和 HB2151 等 *E. coli* 菌株的感受态细胞。

#### 1.5 DNA 转化感受态细胞

取 5  $\mu\text{l}$  连接产物或 1 ml 质粒加入 50-100  $\mu\text{l}$  感受态细胞中，轻轻旋转，温和混匀内容物后，冰浴中静置 20-30 分钟，42℃热激 60 秒，迅速放回冰浴中，静置 1-2 分钟后，加入 500  $\mu\text{l}$  LB 培养基，37℃ 150 rpm 振荡培养 45 分钟，使宿主菌复苏并表达抗性蛋白。3,000 $\times\text{g}$  离心 2 分钟，弃净培养基，将细胞重悬于 100-300  $\mu\text{l}$  新的 LB 培养基中，取 100  $\mu\text{l}$  涂布含相应抗生素的 LB 琼脂培养基平板。待菌液被培养基吸收后，倒置平板 37℃ 培养过夜（16-24 小时）。

#### 1.6 琼脂糖凝胶分离 DNA 片段的回收

用于 DNA 片段的电泳分离回收通常采用 1.0% 琼脂糖凝胶 (TAE)，80 V 恒压电泳 30 分钟左右，使 DNA 条带充分分离的同时仍然带型尖锐。在长波

紫外线下用干净的刀片切下目的条带，切取时体积尽量小，将胶块下层没有 DNA 的部分一并切除，仅留取集中含有目的 DNA 的薄层胶片，并装入一个干净的 1.5 ml 离心管中。琼脂糖凝胶中的 DNA 用玻璃奶回收纯化试剂盒进行回收和纯化，回收和纯化方法为：将切下的胶片瞬时离心，使凝胶汇集于管底，估算凝胶体积，准确加入 3 倍体积的溶胶液，于室温反复轻摇 5 分钟或置 50℃ 水浴加热 5 分钟，使凝胶完全溶解，加入 5-10 μl 玻璃奶，颠倒混合，冰上放置 10 分钟（每隔 2-3 分钟颠倒混合一次，以使 DNA 与玻璃奶充分吸附）；8,000×g 离心 30 秒，弃上清；向沉淀中加入 250 μl 漂洗液，轻柔吹打重悬沉淀，8,000×g 离心 30 秒，弃上清，重复漂洗步骤一次。将沉淀置 37℃ 孵箱干燥 20-30 分钟，至沉淀完全干燥；向干燥的沉淀中加入 20 μl 去离子水或 TE (pH8.0) 混匀，60℃ 水浴 5 分钟，12,000×g 离心 1 分钟，回收上清，即为纯化的 DNA 产物。

### 1.7 SDS-聚丙烯酰胺蛋白凝胶电泳 (SDS-PAGE)

SDS-PAGE 采用加入 0.1% SDS 的 Laemmli 不连续电泳系统[111]，分离胶和积层胶的配制按照 Harlow 和 Lane 的修改方法[112]。实验中通常采用的分离胶浓度为 12%（最佳线性分离范围分别为 15-60 kDa）或是 6-18% 梯度胶。配制方法如表 2-4。电泳采取 15 mA 恒流，直至溴酚蓝条带达到凝胶底部为止。电泳完毕，将凝胶取下用 SDS-PAGE 固定液固定 30-45 分钟，Coomassie Brilliant Blue R-250 染色大于 6 小时或过夜，脱色液（7% 冰乙酸+20% 甲醇）脱色。

表 2-4 SDS-PAGE 的配制

贮存液	分离胶中聚丙烯酰胺的终浓度				积层胶 (5%)
	6%	12%	18%		
去离子水	2.6 ml	1.6 ml	0.6 ml	3.4 ml	
30%丙烯酰胺溶液	1.0 ml	2.0 ml	3.0 ml	0.83 ml	
1.5 M Tris-HCl (pH8.8)	1.3 ml	1.3 ml	1.3 ml	—	
1.0 M Tris-HCl (pH6.8)	—	—	—	0.63 ml	
10%SDS	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.05 ml	
10%过硫酸铵	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.05 ml	
TEMED	0.004 ml	0.004 ml	0.004 ml	0.005 ml	
Total volume	5 ml	5 ml	5 ml	5 ml	

### 1.8 Native PAGE

从 Laemmli 不连续电泳体系中去除 SDS 成分，样品与等体积的不含 SDS 和还原剂的 2×PAGE loading buffer 混合，直接加样电泳，其余同 SDS-PAGE。Native PAGE 用于检测蛋白质样品的均一程度。

### 1.9 小分子量蛋白（多肽）电泳

小分子量蛋白（多肽）电泳参照 Schagger 方法[113]，主要用于分离 15 kDa 以下的小分子蛋白和多肽片段，配制方法如表 2-5，恒流电泳 6-8 小时。电泳完毕，将凝胶取下用 SDS-PAGE 固定液固定 30-45 分钟，Coomassie Brilliant Blue R-250 染色大于 6 小时或过夜，脱色液（7%冰乙酸+20%甲醇）脱色。

**表 2-5 小分子量蛋白（多肽）电泳配制方法**

贮存液	Stacking gel (4%T, 3%C)	Spacer gel (10%, 3% C)	Separating gel (16.5% T, 6% C with 6M Urea)
49.5%T (3%C) 丙烯酰胺	0.25 ml	0.61 ml	—
49.5%T (6%C) 丙烯酰胺	—	—	1.0 ml
Gel buffer	0.775 ml	1.0 ml	1.0 ml
Urea	—	—	1.08 g
H <sub>2</sub> O	2.1 ml	1.39 ml	0.2 ml
10%APS	0.025 ml	0.01 ml	0.01 ml
TEMED	0.0025 ml	0.001 ml	0.001 ml

Gel buffer: 3 M Tris-HCl, 0.3%SDS, pH8.45;

49.5%T (3%C) 丙烯酰胺：将 48.0 g 聚丙烯酰胺和 1.5 g 甲叉双丙烯酰胺溶于去离子水，至终体积 100 ml，过滤除杂；

49.5%T (6%C) 丙烯酰胺：将 46.5 g 聚丙烯酰胺和 3.0 g 甲叉双丙烯酰胺溶于去离子水，至终体积 100 ml，过滤除杂；

阳极电泳缓冲液：0.2 M Tris-HCl, pH8.9；

阴极电泳缓冲液：0.1 M Tris-HCl, 0.1 M Tricine, 0.1%SDS, pH8.25。

### 1.10 DNA 分子的酶切与连接

本实验中 DNA 片段的限制性切割采用大连宝生物 TaKaRa 的限制性内切酶和该公司推荐的酶切反应条件（包括双酶切反应）。用于连接的载体片段酶切后通过琼脂糖电泳回收纯化，浓度通过电泳与 DNA marker 比较估算。DNA 连接反应采用大连宝生物 TaKaRa 的 T4 DNA 连接酶和该公司推荐的连接反应条件。

## 1.11 PCR 产物克隆

本实验中 PCR 产物通常回收纯化后，直接用限制性内切酶切割，然后回收后与预先制备好的载体片段连接，连接产物转化克隆宿主菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞，从转化菌落中选择阳性克隆，DNA 序列测定确定克隆正确的重组质粒。

个别情况下，也利用 pGEM-T Easy 载体辅助克隆。由于亚克隆的 PCR 反应中采用高保真的 *Pfu* DNA 聚合酶，PCR 产物为平末端，不含能与 TA 载体连接的突出的单一 A 粘端。所以在与 pGEM-T Easy 载体连接前，需要利用 *Taq* DNA 聚合酶进行补充单一 A 粘端的加尾反应（表 2-6 左）。加尾反应可直接在 *Pfu* 聚合酶扩增反应结束后进行，A 粘端加尾后的 PCR 扩增产物与 pGEM-T Easy vector 按照普通连接反应的条件进行连接（表 2-6 右）。随后的转化和筛选过程按照 Promega 公司的产品手册进行操作。DNA 测序鉴定后的 T Easy 重组质粒在宿主菌 DH5 $\alpha$  中进行扩增，从大量提取的重组质粒中，用限制性内切酶切割得到克隆所需目的片段，电泳纯化后与表达载体连接。

表 2-6 PCR 产物的加尾和与 T Easy 载体的连接

<i>Taq</i> DNA polymerase 的加尾反应		PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体的连接	
<i>Pfu</i> 扩增产物	80 $\mu$ l	PCR 产物（含末端 A）	7.0 $\mu$ l
10× <i>Taq</i> 反应缓冲液(含 MgCl <sub>2</sub> )	10 $\mu$ l	10×T4 DNA Ligase Buffer	1.0 $\mu$ l
<i>Taq</i> DNA polymerase	5-10 U	pGEM-T Easy vector (50 ng/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	补足至 100 $\mu$ l	T4 DNA Ligase (3 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
Total	100 $\mu$ l	Total	10.0 $\mu$ l
70℃反应 30 分钟		16℃连接 6-8 小时或 4℃连接过夜	

## 1.12 PCR 鉴定重组菌落——菌落 PCR (Colony PCR)

使用不同的上下游引物，菌落 PCR 可用于检测筛选重组克隆中是否有插入片段及其大小和方向。通常使用插入片段的引物检测是否有正确大小的片段插入，使用载体本身引物和插入片段引物的组合检测插入方向和大小。操作方法是：从转化平板上挑取若干单菌落（直径大于 1 mm），转移至预加 50  $\mu$ l 无菌去离子水的 0.5 ml 离心管管中，99℃水浴 5 分钟裂解细胞并变性 DNase，12,000×g 1 分钟去除细胞碎片，取 5  $\mu$ l 上清至新的 0.5 ml 离心管管中准备进行 PCR 反应，4℃保存备用；准备反应混合液，每个反应：20  $\mu$ l 无菌水、4  $\mu$ l

dNTP、5 μl 上游引物 (5 μM)、5 μl 下游引物 (5 μM)、5 μl 10×*Taq* 缓冲液、1 μl *Taq* DNA 聚合酶和 10 μl 细胞裂解上清，终体积为 50 μl。

将上述成分混匀后，置 PCR 仪中进行反应，PCR 反应参数依据具体情况决定。反应结束，加入 0.2 体积 6×Gel loading buffer，用琼脂糖电泳对 PCR 产物进行分析。

### 1.13 PCR 引物诱变 (Site-specific Mutagenesis by Overlap Extension)

PCR 引物诱变需要使用 4 条引物和 3 次 PCR 扩增来实现定点突变。首先是带有突变的引物与上游引物进行 PCR 反应，扩增出带有 3' 端突变的前半部分序列；接着是另一条带有突变的引物和下游引物进行 PCR 反应，扩增出带有 5' 端突变的后半部分序列；因为前后两半部分序列在突变部分完全互补，所以混合后经过变性、退火后，两半部分序列在重叠区域实现互补，并在 DNA 聚合酶作用下延伸至全长形成互补双链，加入上下游引物即可扩增出带有目标突变的全长序列。由于需要经过 3 次 PCR 扩增，PCR 终产物中错配几率也随之增加，所以本论文实验过程中均采用保真效率较高的 *Pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，同时减少首轮前后两部分 PCR 反应的循环次数，实际操作中通常采用 28 个循环以内。

### 1.14 重组克隆的诱导表达——小量分析

挑取一个大小适中、边缘圆滑的阳性单菌落，接种 3 ml LB (含相应抗生素 50 μg/ml Kanamycin 或 100 μg/ml Ampicillin)，置恒温振荡器中 37°C 最大转速 (250 rpm) 振荡培养至 OD<sub>600nm</sub> = 0.4-0.6 (约 3 小时)，取出 1 ml 作为诱导前对照样品，4°C 12,000×g 离心 5 分钟收集菌体，加入 100 μl 1×SDS-loading buffer 重悬，冰浴中超声破碎细胞 (3×10 秒, 4 μm amplitude, MSE Soniprep150 sonicator, microprobe)，100°C 水浴加热 3 分钟变性蛋白质，冻存于 -20°C 备用；余下部分加入 1 M IPTG 贮存液至 IPTG 终浓度为 1 mM，37°C 最大转速继续振荡培养 3 小时。

培养结束，将菌液置冰浴冷却 5 分钟，4°C 12,000×g 离心 5 分钟收集菌体，将收集的菌体重悬于 0.1 倍原培养物体积的 Buffer A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH8.0) 中，冰浴中超声破碎细胞 (3×10 秒, 4 μm amplitude, MSE Soniprep150 sonicator, microprobe)，4°C 12,000×g 离心 15 分钟，分离上清和沉淀。向上清中加入等体积 2×SDS-loading buffer 混合，100

℃水浴加热 3 分钟变性蛋白质；向沉淀中加入 0.05 倍原培养物体积的含 1% SDS 的 Buffer A 溶解沉淀，再加入等体积 2×SDS-loading buffer 混合，100℃水浴加热 3 分钟变性蛋白质。样品冻存于-20℃备用。

HB2151 宿主菌中 pHEN2 重组蛋白的表达程序为：挑取一个大小适中、边缘圆滑的阳性单菌落，接种 3 ml 2×TY 培养基（含 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Ampicillin 和终浓度为 0.1% 的 Glucose），置恒温振荡器中 37℃最大转速（250 rpm）振荡培养至  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 1.0$ ，冷却至室温（或接种 250 ml 2×TY 培养基）；取出 1 ml 作为诱导前对照样品，依上述方法制样，冻存于-20℃备用；余下部分加入 1 M IPTG 贮存液至 IPTG 终浓度为 0.1-1.0 mM，室温下 250 rpm 转速继续振荡培养 14 至 32 小时，如上述步骤分离培养基和菌体沉淀。

培养基中蛋白提取方法：向收集的培养基中加入 0.1 倍体积三氯乙酸 (Trichloroacetic acid, TCA)，振荡 15 秒，冰上放置 15 分钟以上，14,000×g 离心收集蛋白沉淀，加入 0.1 倍原培养基体积的丙酮洗两次，14,000×g 离心 15 分钟，去除上清，让沉淀在空气中敞干；加入 0.1 倍原培养基体积的 PBS 溶解沉淀，并与等体积 2×SDS-loading buffer 混合，100℃水浴加热 3 分钟变性蛋白质。样品冻存于-20℃备用。

周质中蛋白提取方法：将收集的菌体沉淀重悬于 0.8 倍原培养基体积的 30 mM Tris-HCl (pH8.0)/20% Sucrose，加入 EDTA 至终浓度 1 mM，慢慢混匀，室温下放置 10 分钟；4℃ 10,000×g 离心 10 分钟，去尽上清；再悬于 0.8 倍原培养基体积的冰冷 5 mM MgSO<sub>4</sub>，在冰上慢慢混合 10 分钟（此时细胞在光镜下可见已变圆），4℃ 10,000×g 离心 10 分钟，收集上清（其中包括周质蛋白）。而收集完周质蛋白的菌体沉淀将收集的菌体重悬于 0.1 倍原培养物体积的 Buffer A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH8.0)，冰浴中超声破碎细胞后按上述方法分离可溶性部分和不溶的包涵体成分，并制备 SDS-PAGE 样品，冻存于-20℃备用。

将诱导前后样品（包括空载体转化菌诱导前后的样品）以及培养基、周质、胞质可溶性成分和不溶的包涵体样品，进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，Coomassie Brilliant Blue R-250 染色，对比诱导前样品分析外源基因的诱导表达情况和重组蛋白在细胞中的分布。

### 1.15 重组蛋白的大量表达

挑取一个大小适中、边缘圆滑的阳性单菌落，接种 3ml LB（含相应抗生素 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin 或 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin），置恒温振荡器中 37℃最大转速 (250 rpm) 振荡培养至菌液  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4-0.6$ ，全部用以转接 250 ml TB（含相应抗生素 50  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin 或 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin），37℃ 250 rpm 振荡培养至菌液  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4-0.6$  (约 3 小时)，加入 IPTG 至终浓度 0.1-1.0 M (IPTG 浓度经实验优化确定)诱导重组蛋白表达，继续培养 4 小时至过夜(培养时间经实验优化确定)，收获菌体。

将收获的细菌培养物置 4℃冷却 30 分钟，倒入 250 ml 离心管以 Beckman JA-14 转头 4℃ 8,000×g 离心 16 分钟收获菌体，Buffer A 重悬菌体沉淀并合并至 1-2 个 50 ml 离心管，JA-20 转头 8,000×g 离心 16 分钟弃上清；沉淀重悬于 20 ml Buffer A 中，冰浴中超声破碎 (20×10 秒，间隔 15 秒，200-300 W，变幅杆 $\phi 8$ , JY92-II 超声波细胞粉碎机)，JA-20 转头 12,000×g 离心 16 分钟，收集重组蛋白分布 (主要) 的沉淀或上清，供后期纯化。

### 1.16 Semi-dry Western-Blot (蛋白印迹)

标准的 Western-Blot 蛋白方法是将电泳分离的蛋白样品通过电泳转移槽由凝胶转移至固相支持物上，再用各种结合方法测试存留在固相支持物上的蛋白质，以确定其生物活性。本实验中采用 SDS-PAGE 分离蛋白样品，然后半干法转移至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上，利用抗原抗体反应检测蛋白表达情况。方法参照 S&S 公司技术手册 “Blotting, hybridization & detection: an S&S laboratory manual”，具体步骤如下：

- 1) SDS-PAGE 分离蛋白样品，至电泳指示剂溴芬兰涌动到距凝胶底部约 0.5 cm 时停止，卸下一块胶板，用一只干净的刀片在凝胶的一角切下一小块标记方向，然后将胶整个卸下，浸入阴极转移缓冲液中，平衡 5 分钟；
- 2) 准备一张与凝胶大小相同的 NC 膜 (0.2  $\mu\text{m}$  Sigma)，飘在去离子水表面利用毛细管现象使膜润湿，再浸入阳极转移缓冲液 II 中，平衡 5 分钟；
- 3) 准备六张与凝胶大小相同的厚滤纸，其中用三张蘸满阴极转移缓冲液，依次重叠在阴极，放上凝胶、平衡好的 NC 膜、一张蘸满阳极转

移缓冲液Ⅱ的滤纸、两张蘸满阳极转移缓冲液Ⅰ的滤纸组成转移塔，压上阳极， $2.5 \text{ mA/cm}^2$  恒流电泳 30 分钟；

- 4) 转移结束后，切下 NC 膜上分子量 marker 转移的相应部位（分子量 marker 通常加在最外侧泳道），置氨基黑染液中染色 30 分钟，脱色液（25% 异丙醇/10% 冰醋酸）中脱色；
- 5) 将余下部分的膜放入封闭液中，于室温缓慢振荡 3 小时以封闭非特异性结合位点；
- 6) 加入检测抗体，体积大于  $0.3 \text{ ml/cm}^2$ （纯化的单克隆抗体可以一定稀释度用 2% BSA/PBS 稀释），室温孵育 1 小时，PBS-T 洗 3 次，每次 5 分钟；
- 7) 加入 1 : 5,000—1 : 10,000 稀释的 HRP 标记的二抗（anti-mouse IgG Fab-HRP，Sigma A2554），室温孵育 1 小时，PBS-T 洗 3 次，每次 5 分钟；
- 8) 配制 DAB 显色液，将膜置于 30-50 ml DAB 显色液中，于室温下轻轻摇晃 5-10 分钟，使蛋白条带逐渐显色，去离子水冲洗终止反应。
- 9) HRP 也可利用下面的 ECL 化学发光法检测。

**【辣根过氧化物酶 ECL 化学发光法】**参照 Pierce 公司 SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate 说明书，步骤如下：

- 1) 各取等体积 ECL 试剂 Luminol/Enhancer solution 和 Stable Peroxide Solution 在一张 Parafilm 上混合，混合后总体积不小于每平方厘米转印膜 0.125 ml ECL 混合液；
- 2) 将转印膜轻轻覆盖到 ECL 混合液上，有蛋白质的一面朝下，重复两次以便整张转印膜均匀接触反应液，孵育 5 分钟；
- 3) 将转印膜拎出，包裹于保鲜膜中，注意表面要平整，保鲜膜与转印膜间不要存留气泡；
- 4) 用双面胶带将保鲜膜覆盖的转印膜贴在显影盒中，有蛋白质的一面朝向外面；
- 5) 于暗室压 X 光片（Kodak X-Omat K Film 医用 X 射线胶片），曝光 1 秒至 15 秒不等，冲片观察结果。

### 1.17 酶联免疫吸附实验 (ELISA)

将过量的纯化抗原包被在 96 孔酶标板上，利用检测抗体进行抗体捕获实验，利用酶标记的第二抗体羊抗鼠 IgG 与相应底物反应产生颜色变化，测定

对应的吸光度可以确定包被抗原和检测抗体之间的作用强弱。实验步骤如下：

- 1) 将经过纯化的抗原用 ELISA 包被缓冲液液稀释至  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , 按每孔  $100 \mu\text{l}$  包被酶标板(过量包被, 每孔加入  $0.5 \mu\text{g}$  抗原, 高于酶标板每孔的最大吸附量  $50\text{-}100 \text{ ng}$  抗原, 形成饱和吸附), 封口膜封口, 置于湿盒中  $4^\circ\text{C}$  包被过夜;
- 2) 倒掉包被液, 用 PBS-T 洗板 3 次, 每次 5 分钟, 弃净洗液, 然后在吸水纸上拍干;
- 3) 每孔加入  $200 \mu\text{l}$  封闭液 ( $2\%$ BSA/PBS/ $0.02\%$ Az), 封闭反应孔中非特异吸附位点, 室温孵育 2 小时;
- 4) 倒掉封闭液, 用 PBS-T 洗板 3 次, 每次 5 分钟, 弃净洗液, 然后在吸水纸上拍干;
- 5) 将检测抗体用  $2\%$ BSA/PBS 按 10 倍稀释(如  $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 、 $1:10^5$  等), 每孔加入  $100 \mu\text{l}$ , 置湿盒中室温孵育 1 小时;
- 6) 倒掉检测抗体溶液, 用 PBS-T 洗板 3 次, 每次 5 分钟, 弃净洗液, 然后在吸水纸上拍干;
- 7) 加入酶标二抗(预先用  $2\%$ BSA/PBS 把 HRP 标记羊抗鼠 IgG 做  $1:10,000$  稀释), 每孔  $100 \mu\text{l}$ , 置湿盒室温孵育 1 小时;
- 8) 倒掉酶标二抗, 用 PBS-T 洗板 3 次, 每次 5 分钟, 弃净洗液, 然后在吸水纸上拍干;
- 9) HRP 显色可采用多种底物:

**【TMB 450 nm】**取等量的 A 液和 B 液混合, 然后每孔加  $100 \mu\text{l}$ , 室温静置 15 分钟显色, 立即向每孔加  $50 \mu\text{l} 1\text{M H}_2\text{SO}_4$  终止显色反应, 测定各反应孔  $\text{OD}_{450\text{nm}}$  光吸收值 (LABSYSTEMS GENESIS V3.03, Instrument version: MULTISKAN EX PRIMARY EIA V. 2.1-0, Filter 1: 450 nm);

**【ABTS 410 nm】**每孔加入  $100 \mu\text{l}$  ABTS 显色液, 避光处静置 15-20 分钟, 波长  $410 \text{ nm}$  处测定光吸收 (DG3022 酶联免疫检测仪,  $410 \text{ nm}$  滤光片)。

## 1.18 蛋白质浓度测定

### 1.18.1 280 nm ( $A_{280}$ ) 光吸收法

此法是依据蛋白质分子中的酪氨酸、色氨酸、苯丙氨酸等含苯环氨基酸残基在  $280 \text{ nm}$  波长处有最大光吸收, 并且吸收值与蛋白浓度成正比的原理进行的测量。但不同的蛋白质苯环氨基酸含量差异较大, 导致消光系数不同。

通常典型的 GST 蛋白消光系数为 0.5。 $A_{280}$  光吸收法在实验中主要用于柱层析过程中蛋白洗脱峰的检测。

### 1.18.2 Bradford 法

此法通过测定考马斯亮蓝染料与待测蛋白的结合量，并与结合这种染料的不同量的标准蛋白质（通常是牛血清白蛋白）比较来定量未知蛋白。下面的工作方案是本论文中重折叠前包涵体蛋白量的基本测定方法。

- 1) 称取 100 mg 牛血清白蛋白 (BSA), 溶于 1 ml 溶液 A (6 M GuHCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6), 成 BSA 原液 (溶液 B);
- 2) 溶液 B 浓度以  $A_{280}$  光吸收法确定: 将溶液 B 对溶液 A 作 1 : 20 稀释 (50  $\mu$ l 溶液 B : 950  $\mu$ l 溶液 A), 得到工作液 C; 分别取 50  $\mu$ l、100  $\mu$ l 和 200  $\mu$ l 溶液 C 与 950  $\mu$ l、900  $\mu$ l 和 800  $\mu$ l 溶液 A 混合, 测取 280 nm 处光吸收值(以溶液 A 调零标定分光光度计); 1 mg/ml 标准 BSA 的  $OD_{280\text{nm}}=0.6$ , 因此由不同稀释度下的光吸收值可以计算出溶液 C 中的蛋白浓度, 再除以稀释度即可得到溶液 B 的浓度;
- 3) 以  $\mu$ l 为单位取已标定含量的溶液 B 分别与 1 ml Bradford 试剂混合(迅速混合以避免沉淀), 测定  $OD_{595\text{nm}}$ , 并绘制溶液 B 的 Bradford 标准曲线 (图 2-1);
- 4) 将纯化的包涵体蛋白溶于溶液 A 中, 12,000×g 离心 15 分钟, 去除沉淀; 取一定量的上清液对溶液 A 作稀释, 与 1 ml Bradford 试剂迅速混合并测定  $OD_{595\text{nm}}$ , 对照 BSA 的标准曲线查出相应蛋白含量。

此法测定变性液中包涵体蛋白浓度的关键有两点: 一是快速稀释, 减少变性蛋白的聚集和沉淀, 可将包涵体蛋白溶液点至 1.5 或 2 ml 离心管的管盖中, 体积尽可能小但要准确 (0.5-2  $\mu$ l), 然后轻轻合上管盖, 迅速翻转几次, 使管盖内的包涵体蛋白溶液与管底的 Bradford 试剂充分混合; 二是包涵体蛋白溶液的稀释度要合适, 使反应液的  $OD_{595\text{nm}}$  值落入标准曲线前端的线性部分。

### 1.19 Ellman 法测定游离巯基浓度

重折叠缓冲液中游离巯基的测定按照 Pierce 公司 Ellman's Reagent (Number 22582) 的使用说明进行。实验步骤为:

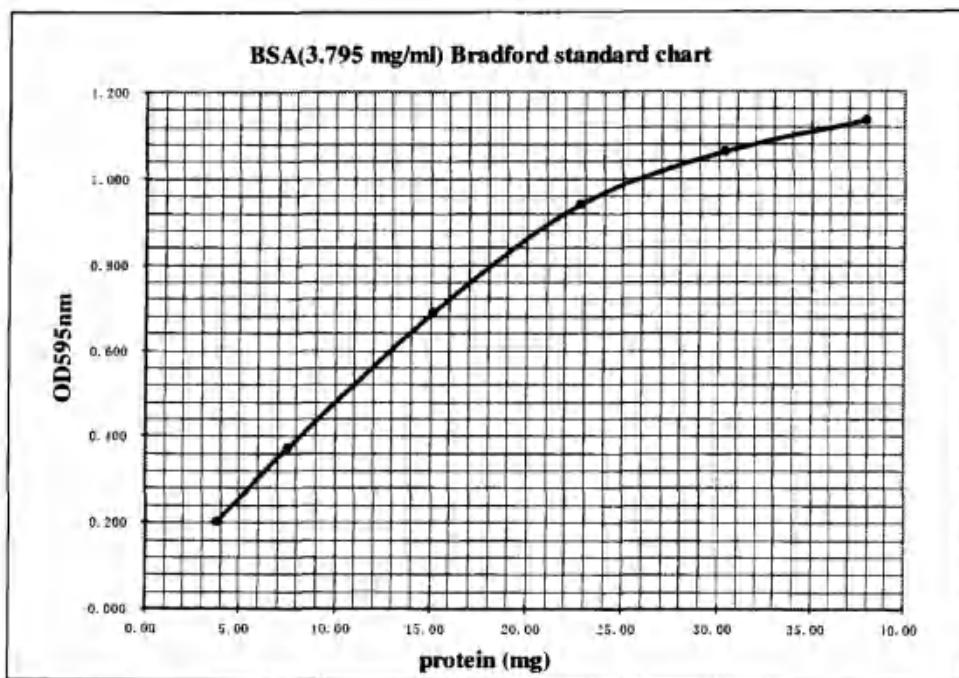


图 2-1 BSA 在 6 M GuHCl/0.1 M Tris-HCl (pH 7.6, R.T.) 溶液中的 Bradford 标准曲线 BSA 溶于 6 M GuHCl/0.1 M Tris-HCl (pH 7.6, R.T.) 后测得蛋白质浓度为 3.795 mg/ml, 分别取 1 ml、2 ml、4 ml、6 ml、8 ml 和 10 ml 迅速混入 1 ml Bradford 试剂中, 以所测得的 OD<sub>595 nm</sub> 值对蛋白质含量作图, 得到此表中的标准曲线。Bradford 曲线前端接近于线性关系, 使未知蛋白以一定稀释度与 Bradford 试剂反应后, 从落在 Bradford 曲线前端线性部分上的 OD<sub>595 nm</sub> 值即可较准确地查出溶液中的蛋白质含量。

- 1) 配制 Reaction Buffer (0.1 M sodium phosphate, 1 mM EDTA, pH 8.0) 和 Ellman's Reagent Solution (4 mg Ellman's Reagent 溶于 1 ml Reaction Buffer);
- 2) 取 50 μl 待测溶液与 50 μl Ellman's Reagent Solution 和 2,500 μl Reaction Buffer 混合, 加入 250 μl Reaction Buffer 调节终体积为 2,800 μl, 空白对照为 50 μl Ellman's Reagent Solution 和 2,500 μl Reaction Buffer 混合液中加入 300 μl Reaction Buffer;
- 3) 以空白对照调零, 测定 412 nm 处光吸收。游离巯基浓度 =  $A_{412} \times 2.80 \text{ ml} / (0.25 \text{ ml} \times 14150 \text{ M}^{-1})$ 。
- 4) Ellman 法在测定中, 要求待测溶液中游离巯基浓度不高于 1 mM, 所以待测溶液测定时应以 Reaction Buffer 作梯度稀释, 使稀释后测得的游离巯基浓度落在 Ellman 法的有效范围内。

## 2、CD89 受体胞外区在原核表达载体中的表达

编码 CD89 受体的胞外区部分片段或全长的 cDNA 序列经 PCR 扩增后, 分别接入原核表达载体 pET-28a(+)、pET-30a(+)、pET-42a(+)、pGEX-4T-1 或 pHEN2 中, 在 BL21(DE3) 或 HB2151 宿主菌中进行表达。亚克隆使用的 PCR

引物和载体的切入位点见表 2-7。

表 2-7 CD89 胞外区编码序列的亚克隆

重组克隆名称	载体	PCR 引物（正向/反向）	酶切位点
<b>ECTOMAINS (EC1+EC2) WITH LEADER PEPTIDE</b>			
Wild-pET30a	pET-30a(+)	T7/SP6	EcoRI/XhoI
Nco-pET28a	pET-28a(+)	sNcoI-m/SP6	NcoI/XhoI
Nco-pET42a	pET-42a(+)	sNcoI-m/SP6	NcoI/XhoI
Nco-pET28ahis	pET-28a(+)	sNcoI-m/eXhohis	NcoI/XhoI
<b>ECTOMAINS (EC1+EC2)</b>			
Nco20-pET28a	pET-28a(+)	sNcoI-20/SP6	NcoI/XhoI
Nco20-pET42a	pET-42a(+)	sNcoI-20/SP6	NcoI/XhoI
Bam21-pGEX	pGEX-4T-1	sBam21/SP6	BamHI/XhoI
Nco20-pHEN2	pHEN2	sNcoI-20/SP6	NcoI/XhoI
Nco20-28aHis	pET-28a(+)	sNcoI-20/eXhohis	NcoI/XhoI
<b>FRAGMENTS</b>			
EC1-pET30a	pET-30a(+)	T7/P3	EcoRI/XhoI
EC2-pET30a	pET-30a(+)	P7/SP6	EcoRI/XhoI
1/4F-pET30a	pET-30a(+)	T7/P6	EcoRI/XhoI
P8-pET30a	pET-30a(+)	P8/SP6	EcoRI/XhoI
P9-pET30a	pET-30a(+)	P9/SP6	EcoRI/XhoI
P10-pET30a	pET-30a(+)	P10/SP6	EcoRI/XhoI
P11-pET30a	pET-30a(+)	P11/SP6	EcoRI/XhoI
P12-pET28a	pET-28a(+)	sNcoI-20/P12	NcoI/XhoI
<b>SITE-MUTATIONS</b>			
Mu10	pET-30a(+)	T7/P4 & P5/SP6	EcoRI/XhoI
MP12	pET-30a(+)	T7/MP1 & MP2/SP6	EcoRI/XhoI
MP34	pET-30a(+)	T7/MP3 & MP4/SP6	EcoRI/XhoI
MP56	pET-30a(+)	T7/MP5 & MP6/SP6	EcoRI/XhoI
MP78	pET-30a(+)	T7/MP7 & MP8/SP6	EcoRI/XhoI
Nco20-pET28a (RR)	pET-28a(+)	sNcoI-20/MG1 & MG2/SP6	NcoI/XhoI
Nco20-pET28ahis (RR)	pET-28a(+)	sNcoI-20/MG1 & MG2/eXhohis	NcoI/XhoI
Nco-pET28ahis (RR)	pET-28a(+)	sNcoI-m/MG1 & MG2/eXhohis	NcoI/XhoI
EC1-pET28a (RR)	pET-28a(+)	sNcoI-20 /P12 (以 Nco20-pET28a (RR) 为模板)	NcoI/XhoI

### 3、重原子衍射用硒标 sCD89 重组蛋白 (Se-sCD89) 的表达

挑取一个大小适中、边缘圆滑的 Nco20-pET28ahis (RR) 转化 BL21 (DE3) 单菌落，接种 3ml LB (含相应抗生素 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin)，置恒温振荡器中 37°C 250 rpm 振荡培养至菌液  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.4\text{-}0.6$  (约 3 小时)，以 1 : 100 的接种量转接 50 ml 适应性培养基 (20% LB, 80% M9, 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin)，37 °C 250 rpm 振荡培养至菌液  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.6\text{-}0.8$ ，离心收集菌体，以 10 ml 表达培养基 (改良 M9 培养基) 重悬后，转入 500-1,000 ml 预热的表达培养基 (含 25  $\mu\text{g/ml}$  Kanamycin) 中继续培养。振荡培养至菌液  $\text{OD}_{600\text{nm}}=0.6\text{-}0.8$  时，加入 L-Se-Methionine、L-Lysine、L-Threonine、L-Phenylalanine、L-Leucine、L-Isoleucine 和 L-Valine，终浓度分别为：L-Se-Methionine 30 mg/ml、L-Lysine 50 mg/ml、L-Threonine 50 mg/ml、L-Phenylalanine 50 mg/ml、L-Leucine 25 mg/ml、L-Isoleucine 25 mg/ml 和 L-Valine 25 mg/ml，继续培养 15 分钟待加入的氨基酸完全溶解，然后加入 IPTG (终浓度 1.0 mM) 诱导重组蛋白表达，继续培养 6-8 小时，收获菌体。

### 4、sCD89 的昆虫细胞表达

编码CD89肽链1-208氨基酸残基的DNA序列从 *Nco I /Xho I*位点被插入到 pAcHLT-Nat vector，重组质粒经过PEG纯化和玻璃奶纯化，按照PharMingen 公司BaculoGold 6xHis Expression and Purification Kit 的操作手册，将2.5  $\mu\text{g}$  重组质粒和0.5  $\mu\text{g}$  病毒基因组 (BaculoGold DNA) 共转染100 mm培养板上生长旺盛的Sf9细胞 (50-70%满)。27.5°C 培养4天后收取培养上清 (感染上清)，4 °C 保存。

对所获得的感染上清做病毒扩增：取10  $\mu\text{l}$  转染细胞的培养上清感染一瓶生长旺盛的Sf9细胞 ( $25 \text{ cm}^2$ , 60-70%满)，三天后用新得到10  $\mu\text{l}$  感染上清再次感染一瓶生长旺盛的Sf9细胞 ( $25 \text{ cm}^2$ , 60-70%满)，以提高感染上清中的病毒滴度，培养三天后收取感染上清，4°C避光保存。检测感染上清中是否含有重组病毒时，用不同量的感染上清感染生长旺盛的Sf9细胞 (100 mm plate, 60-70%满)，4-5天后收获培养物 (细胞尚未裂解死亡)，将细胞沉淀制样。

### 5、单克隆抗体的纯化

本论文中所用单克隆抗体均纯化自相应杂交瘤细胞株在小鼠腹腔接种后产生的小鼠腹水。从小鼠腹腔生产和纯化单克隆抗体的步骤为：

取液氮中冻存的相应小鼠杂交瘤细胞株，复苏后在 DMEM (10% FBS) 37°C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养，三天后传代一次，生长旺盛的细胞 1,500 rpm 10 分钟离心收集，计算活细胞数（大于 98%）；PBS 洗三次后，用 PBS 重悬并稀释至 10<sup>6</sup> cells/ml，按每只小鼠 0.5 ml 细胞悬液的接种量注射至 BALB/c 小鼠腹腔。1-2 周后，收集小鼠腹水。

将待纯化的腹水 4°C 12,000×g 离心 30 分钟，吸弃上层油脂，与等体积上样缓冲液 (1 M Glycine-NaOH, 150 mM NaCl, pH8.6) 混合后，0.22 μm 滤膜过滤，慢速 (2 ml/min) 上样至已平衡在上样缓冲液中的 ProsepA 层析柱 (1-2 ml)，上样结束后用上样缓冲液洗脱非特异吸附蛋白，至流出液 OD<sub>280nm</sub> < 0.10，柱上结合抗体采用 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液 pH6.0-3.0 进行梯度洗脱，小鼠 IgG1 型抗体(MIP8a、Ab1a7) 收集 pH5.5-3.5 时的洗脱峰，小鼠 IgG2a 型抗体(Ab6c9) 收集 pH3.5-3.0 时的洗脱峰。经 ProsepA 纯化的抗体对 1,000 ml PBS 透析三次，4°C 保存。纯度经 SDS-PAGE 检测。

本实验所用其它单克隆抗体的纯化方法，采用在 PBS 条件下与 ProsepA 结合，然后用 1 M NaCl/PBS 溶液洗脱 ProsepA 上的非特异结合蛋白，ProsepA 上结合的抗体利用 0.1 M Glycine 溶液 (pH3.0) 一步洗脱，蛋白峰立即用 1 M Tris-HCl (pH9.0) 中和至 pH7.0。纯化得到的抗体对 1,000 ml PBS 透析三次，纯度经 SDS-PAGE 检测。

## 6、单克隆抗体与层析介质的交连和使用

**MIP68b-linked Sepharose 4B：**将 15 mg 经 ProsepA 纯化的 anti-CD89 MIP68b 单克隆抗体与经稀 HCl 溶胀并活化的 1.5 g CNBr activated Sepharose 4B 混合，按照 Amersham 公司 CNBr activated Sepharose 4B 说明书上的交连程序，完成 MIP68b 和 Sepharose 4B 的交连；然后，用 1 M Tris-HCl (pH8.2) 溶液与结束交连程序的 Sepharose 室温作用 4 小时，以彻底封闭 Sepharose 4B gel 上未与 MIP68b 反应的残留 CNBr 活化基团；再用各 30 ml NaAc-HAc/0.5 M NaCl (pH4.0) 溶液和 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl (pH8.0) 溶液交替洗柱一次，将制备好的 MIP68b-linked Sepharose 4B 单克隆抗体柱平衡于 0.1 M Tris-HCl/0.5 M NaCl(pH8.0)，4°C 保存。

**Ab6c9-linked Sepharose 4B：**将 19 mg 经 ProsepA 纯化的 anti-IgA Ab6c9 单克隆抗体与经稀 HCl 溶胀并活化的 2.0 g CNBr activated Sepharose 4B 混合，

制备程序与上述 MIP68b-linked Sepharose 4B 的相同。

制备的单克隆抗体亲和层析柱使用方法与普通亲和层析相同，结合蛋白的洗脱条件在本论文中通常采用 0.1 M Glycine 溶液 (pH3.0)，进行结合蛋白的一步洗脱，洗脱下来的蛋白峰立即用 1 M Tris-HCl (pH9.0) 中和至 pH7.0。

## 7、GST 亲和层析

以可溶形式存在溶液中的 GST 融合蛋白可用 GST 亲和层析方法纯化。层析步骤如下：

- 1) 将裂解上清过 0.45  $\mu\text{m}$  混合纤维素酯微孔滤膜除去聚集物和沉淀；
- 2) 小心倒转混匀 Glutathione Sepharose 4B 树脂，吸取 2 ml 树脂悬液 (1 ml 沉积的树脂可纯化 5 mg 目的蛋白质) 加到聚丙烯柱内，使树脂在重力作用下沉积，以 5 倍柱体积的 GST binding/washing buffer (138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2) 洗柱；
- 3) 将过滤后的裂解上清上样，使样品靠重力缓慢流过 GST 层析柱；
- 4) 以 10 倍柱体积 GST binding/washing buffer 淋洗，洗脱未结合的蛋白；
- 5) 加入 1 倍柱体积的 GST Elution Buffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM Glutathione, pH 8.0)，室温孵育 10 分钟，收集流出液，测量流出液在 280 nm 处的光吸收值；
- 6) 重复步骤 5) 两次以上，直至流出液在 280 nm 处的光吸收值接近 0；
- 7) 以 10 倍柱体积的 GST binding/washing buffer 洗柱，再生 GST 层析柱。

## 8、含有 His<sub>6</sub>-Tag 融合蛋白的纯化

将溶于 Unfolding buffer (6 M GuHCl/8 M Urea, 20 mM Tris-HCl, pH8.0) 的包涵体蛋白，过 0.45  $\mu\text{m}$  混合纤维素酯微孔滤膜除去聚集物和沉淀，与 1-2 ml 悬在 Unfolding buffer 中的 Ni-NTA 树脂混合，室温下颠倒混合 60 分钟，将包涵体与树脂的混合物小心的加入一空柱。用 4 ml Unfolding buffer 洗两次，然后加入 Elution buffer (6 M GuHCl/8 M Urea, 500 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl, pH8.0) 洗脱蛋白，可每次加 0.5-1 ml 洗脱液，静置 5 分钟后收集流出液。反复洗脱 5 次，测定流出液中蛋白浓度。洗脱液中也可加入 5 mM EDTA 代替 imidazole，结合在柱上的 His 融合蛋白连同 Ni<sup>2+</sup>被一起洗脱下来。

## 9、sCD89包涵体蛋白的重折叠

Nco20-pET28a 重组蛋白以包涵体形式存在于宿主菌胞质内。包涵体的表达量直接影响后面纯化效果。所以用于分离包涵体的重组菌细胞采用营养丰富的 TB 培养基进行培养，按重组蛋白大量表达的方法，在 1,000- 2,000 ml TB 培养基中培养含有重组质粒的 BL21 (DE3) 细菌 (Nco20-pET28aRR 重组蛋白表达量较高，每次只需培养 500 ml TB 培养物)。将收获菌体重悬于 Buffer A (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% PMSF, pH8.0) 中，冰浴中超声破碎 (10 秒 30 次，间隔 15 秒，功率 300 W, φ8 变幅杆, JY92-II 超声波细胞粉碎机)。

Nco20-pET28a 重组蛋白包涵体密度较大，因此采用较低的转速可以将包涵体从大部分无关蛋白中分离出来。裂解物用 JA-20 转头 4°C 8,000×g 离心 30 分钟收集包涵体沉淀，得到的包涵体沉淀中加入 30 ml Buffer A (加入 0.1% PMSF) 并再次超声，以彻底破碎残留细胞。4°C 12,000×g 15 分钟收集沉淀，将包涵体沉淀重悬于 40 ml Buffer B (5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH8.0)，室温静置 3 小时，JA-20 转头 12,000×g 15 分钟收集沉淀；40 ml Buffer B 再重悬，室温静置 15 分钟，12,000×g 15 分钟收集沉淀；加入 40 ml Buffer A 重悬，12,000×g 离心 15 分钟，弃上清；加入 40 ml 2 M 尿素重悬，室温静置 15 分钟，12,000×g 15 分钟收集沉淀，重复 Buffer A 洗涤步骤，直至离心后上清  $OD_{280nm} < 0.05$ 。SDS-PAGE 检测包涵体的分离效果。

由于 sCD89 折叠较难，实验中采用了多种重折叠策略：Arginine 辅助稀释法复性、尿素溶液中的稀释法复性、GuHCl 溶液中的稀释法复性和变性蛋白的柱上重折叠。详细情况见结果部分。

## 10、悬滴法生长晶体的一般方法

### 10.1 晶体生长蛋白样品的准备

用于结晶的蛋白样品通常要求达到 95% 上的电泳纯。与池液混合前，将纯化好的蛋白质样品 4°C 12,000×g 离心 15 分钟，上清部分通过 0.22 μm 滤膜以除去残留沉淀，转入标称截留分子量合适的浓缩离心管，2,000×g 离心浓缩至 150 μl 左右。测定蛋白质浓度，加入 MOPS 缓冲液稀释蛋白至目的浓度。通常初次筛选结晶条件时，蛋白质浓度为 10-30 mg/ml，而优化结晶条件时，

蛋白质浓度为 1-10 mg/ml。处理好的蛋白样品，进行结晶前放入晶体生长室，平衡至晶体的生长温度。

## 10.2 晶体生长环境的准备

**【盖玻片的硅化】**将洗净的盖玻片浸于乙醇中，硅化前取出置于硅化槽中，使乙醇挥发干净。然后将硅化板放入干燥器中，加入 0.2 ml 硅化液（2,6-二氯甲基硅烷），抽真空 5 分钟，使硅烷挥发并附着于盖玻片上，密闭 40 分钟后，再次抽真空处理，除去干燥器中残留的硅烷蒸汽。将硅化的盖玻片取出后，用绸布擦拭表面并用吸耳球吹尽表面上可能附着的灰尘。放入晶体生长室，备用。

**【晶体生长板】**取普通 16 孔培养板，临用前在孔口周缘均匀涂上少量真空脂。板盖四角可用 Parafilm 膜折成团垫起，以免接触孔缘上的真空脂。

**【结晶池液】**准确配置池液，并通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜除去杂质和沉淀。放置于晶体生长室，备用。

## 10.3 悬滴法生长晶体

向晶体生长板的孔池中加入 200-1,000  $\mu\text{l}$  池液；将 1  $\mu\text{l}$  蛋白样品与等体积的池液在硅化盖玻片上混合，然后将盖玻片翻转，液滴向下扣置于池孔上，因为孔缘上有真空脂，所以盖玻片扣下后在池孔与盖玻片之间形成密封的结晶环境；将晶体生长板放置于恒温条件下进行生长，避免振动和温度波动。

筛选结晶条件时，晶体生长的第一周每天观察，第二周后隔周观察一次蛋白结晶情况，记录每孔蛋白质的沉淀、分相和晶体等情况。对初步有结果的条件进行优化以获得高分辨率的蛋白质晶体。通常，能够生长出晶体的条件、混合当时或 24 小时内出现沉淀的条件和两周以后仍然澄清的条件值得重点分析。

优化结晶条件一般采用三个步骤：在初筛最佳晶体条件附近，作 pH 和沉淀剂浓度的二维梯度；对池液中的各种添加剂进行筛选，配体、小分子底物或与之相结合的离子有助于晶体形成；环境温度也是影响晶体生长的重要因素之一，4°C、18°C、室温以及不同温度的相互组合均值得尝试。

## 11、重折叠 sCD89 蛋白的结晶

DEAE Sepharose 层析收集的 300 mM NaCl (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH8.0 纯化) 重折叠 sCD89 蛋白洗脱峰, 经 Superdex-75 柱分离, 收集单体蛋白峰, 利用截留量大于 10 kDa 的超滤管将蛋白浓缩至 20-30 mg/ml。结晶实验在 16 孔板上进行, 采用悬滴气相扩散法。初次结晶条件筛选时, 准备 5 mg/ml、15 mg/ml 和 25 mg/ml 三种浓度的纯化蛋白质溶液, 分别在硅化盖玻片上将 1.0  $\mu$ l 蛋白质溶液和 1.0  $\mu$ l 池液混合, 密封在已预加 200  $\mu$ l 池液的板孔上方, 静置于晶体生长室 18°C 环境。

晶体生长的第一周每天观察, 第二周后隔周观察一次蛋白结晶情况, 直至液滴干涸。对于混合当时或 24 小时内出现沉淀的条件, 改为 2.0  $\mu$ l 蛋白溶液与 1.0  $\mu$ l 池液混合或将沉淀剂和(或)蛋白浓度减半; 而两周以后仍然澄清的条件, 改进方法与前述正好相反。

## 12、奈瑟氏淋球菌的培养和 IgA1 蛋白酶的提取

培养和 IgA 蛋白酶提取方法参照文献[114], 有修改。奈瑟氏淋球菌血琼脂斜面培养物生长两天后, 从生检所收回, 用接种环将斜面上的菌落全部刮下, 转接 50 ml BHI 培养基, 斜面上余留的菌落加入 1 ml BHI 培养基冲洗重悬后, 也加入接种的 50 ml BHI 培养基, 35°C 100 rpm 培养 3 小时至菌液浑浊(在恒温振荡培养箱中点燃一只蜡烛, 关闭箱盖, 让蜡烛燃烧至自动熄灭, 造成厌氧培养环境, 过程中注意温度)。

将全部 50 ml 培养物转接 2,000 ml BHI 培养基, 35°C 100 rpm 厌氧培养 4-5 小时后收获。JA-20 4°C 12,000×g 离心去除菌体沉淀, 上清通过 0.22  $\mu$ m 过滤两遍后, 加入 250 ml 0.5 M EDTA (pH8.0) 溶液, 保持 4°C。分装至两个烧杯, 搅拌同时, 向每 1,000 ml 加有 EDTA 的上清液中加入总计 370 g 固体硫酸铵(少量多次, 每次需等上一次加入的硫酸铵完全溶解后再加入下一次的)。大约加至总量的 2/3 时, 溶液中由于析出大量沉淀, 颜色由血红色变成黄褐色, 继续在 4°C 搅拌。经过 12-14 小时的搅拌后, 结束搅拌, 将悬浊液用 JA-20 4°C 12,000×g 15 分钟离心, 沉淀呈褐色附着于管壁或集聚于管底, 收集沉淀。以 60% 饱和硫酸铵溶液 (37 g 硫酸铵溶于 100 ml 去离子水) 洗涤沉淀, 再次离心后将沉淀合并, 溶于 5 ml PBS, 12,000×g 15 分钟除去沉淀, 上清对透析液 (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH7.5) 透析, 透析结束后体积约有 30 ml, 真空浓缩至 10 ml。

### 13、人 IgA1 的分离和纯化

取 20 ml 肝素抗凝健康人静脉血，室温 1,600 rpm 离心 15 min，吸取上层血浆，4℃ 2,500×g 30 min，小心弃去表面漂浮的脂类；然后加入固体硫酸铵至 50% 饱和度，充分混匀，4℃ 静置 2 小时使沉淀充分。4℃ 12,000×g 60 min，弃净上清，用 50% 饱和度硫酸铵洗涤沉淀一次，加入 1 ml 去离子水溶解沉淀，4℃ 12,000×g 30 min 弃沉淀，上清用 SpinX 离心式过滤管过滤后，加样至凝胶过滤柱 Sepharose 6B (100/20)，平衡液为 20 mM TrisHCl (pH8.0)，流速 0.6 ml/min。OD<sub>280nm</sub> 监测洗脱，收集蛋白峰，用 ELISA 抗体捕获实验 (anti-IgA Ab6c9、Ab1a7) 确定 IgA 在洗脱峰中的分布，SDS-PAGE 分辨多聚体和单体。

收集对应 IgA 单体的蛋白洗脱部分，上样至 Ab6c9-linked Sepharose 4B 亲和柱，平衡液为 PBS，用 0.1 M GlycineHCl (pH3.0) 洗脱，洗脱峰立即用 1 M Tris-HCl (pH9.0) 中和，洗脱物合并后对 PBS 透析。

透析结束后，过滤除去沉淀，上样至 0.5 ml ProsepG (去除可能从 Ab6c9-linked Sepharose 4B 上脱落的 IgG 成分)，流出液接着上样至 1 ml Jacalin 亲和介质，平衡液为 PBS。经过 ProsepG 和 Jacalin 的穿柱峰收集合并，其中为纯化的 IgA2；Jacalin 上结合的 IgA1 用 0.8 M D-Galactose/PBS 洗脱。纯化得到的 IgA1 和 IgA2 分别对 PBS 透析，浓缩后 4℃ 保存。SDS-PAGE 检测纯度。

### 14、IgA Fc (Fc $\alpha$ ) CH2CH3 的克隆和表达

Fc $\alpha$ 的克隆利用大片段重叠 PCR 的方法从质粒 pSV1 (含有 IgA1 重链全长基因，包括 CH1、CH2、CH3 三个外显子和它们之间的内含子) 构建：先分别扩增出 Fc $\alpha$ 的 CH2 (sndeCH2: gggattccatatgcgactgtcactgcac, CH2elink: tgtgttccggatttgagagg) 和 CH3 (sCH3link: aaaatccggaaacacattccgg, CH3ehind: ccaagcttttagcggtcgatggctt) 两个首尾相连的结构域；然后利用引物 CH2elink 和 sCH3link 上设计的重复序列，将第一轮的 CH2 和 CH3 扩增产物退火配对，并延伸形成双链模板；再用首、末端引物 sndeCH2 和 eCH3hind 进行第二轮扩增得到目的片段。

目的片段从 *Nde*I 和 *Hind*III 位点之间被连入原核表达载体 pET-30a(+)，在 *E. coli* 菌株 BL21 (DE3) 中进行表达。

## 15、IgA Fc (Fc $\alpha$ ) CH2CH3 包涵体的重折叠

重组 Fc $\alpha$ CH2CH3 蛋白在 E.coli 中的表达产物集聚在胞质中形成包涵体沉淀。由于表达量非常高，在丰富培养基 TB 中表达的重组 Fc $\alpha$ CH2CH3 蛋白形成较大的包涵体颗粒，分离起来非常容易。采用类似 sCD89 包涵体分离的方法，得到了纯度很高可直接进行重折叠的蛋白。

重组 Fc $\alpha$ CH2CH3 蛋白的复性采用 GuHCl 溶液中的稀释法复性。详细情况见结果部分。

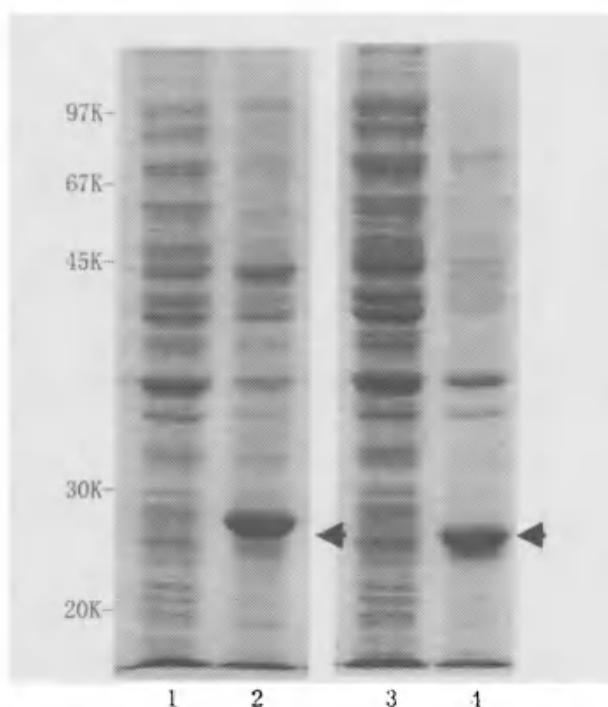
## 第三章 结果

### 一、CD89受体胞外区的表达

在本项工作中，我们尝试了用以下几种方法表达 CD89 受体胞外区。

#### 1、sCD89 的非融合表达（天然蛋白）

将编码 sCD89 的 DNA 序列（包含或不包含前导肽）从 *NcoI* 和 *XhoI* 位点插入到原核表达载体 pET-28a(+)，构建非融合表达质粒 Nco-pET28a 和 Nco20-pET28a。用重组质粒转化 *E. coli* 菌株 BL21(DE3)，挑选克隆进行 IPTG 诱导表达。根据氨基酸残基序列计算的重组蛋白分子量分别为 26 kDa 和 23.9 kDa，等电点分别为 6.59 和 6.33。IPTG 诱导表达后，在菌体的沉淀部分发现了相应的诱导表达条带（图 3-1）。



**图 3-1 sCD89 的非融合表达** 池道 1 和 2 分别是 Nco-pET28a 转化 BL21 (DE3) 后，单菌落培养物 1 mM IPTG 诱导 3 小时后的细胞裂解上清和沉淀；池道 3 和 4 分别是 Nco20-pET28a 转化 BL21 (DE3) 后，单菌落培养物 1 mM IPTG 诱导 3 小时后的细胞裂解上清和沉淀。在裂解细胞的沉淀中（池道 2、4）可以见到 20-30 kDa 之间有明显的诱导特异条带出现（图中箭头所指），分子量大小与预测值相符。

## 2、sCD89 的 GST 融合表达

将编码 sCD89 的 DNA 序列（包含或不包含前导肽）从 *Nco*I 和 *Xho*I 位点插入到原核表达载体 pET-42a(+)，构建 N 端含有 GST 蛋白的 Nco-pET42a 和 Nco20-pET42a 重组克隆；同时将编码 sCD89 的 DNA 序列（不包含前导肽）从 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点插入到原核表达载体 pGEX-4T-1，构建 Bam21-pGEX 重组克隆。将 Nco-pET42a 和 Nco20-pET42a 重组质粒转化 BL21 (DE3) 细胞，而将 Bam21-pGEX 重组质粒转化 BL21 细胞（DH5 $\alpha$ 菌株亦可，因 BL21 菌株蛋白酶缺陷，利于重组蛋白表达，所以优先选择 BL21 菌株），挑选克隆进行 IPTG 诱导表达。按照氨基酸残基序列计算的重组蛋白分子量分别为 57.5 kDa、53.4 kDa 和 50.1 kDa，等电点分别为 6.64、6.55 和 6.34。

在诱导表达后菌体中重组蛋白明显聚集于裂解后的菌体沉淀部分，裂解上清中只有少量（图 3-2）；但是改变诱导条件后，在低温、低 IPTG 浓度长时间诱导条件下，裂解上清中重组蛋白浓度有所增加。GST 和 MIP68b-linked Sepharose 4B 两种分别针对 GST 或 CD89 分子的亲和层析被用于纯化裂解上清中的重组蛋白，但是纯化到的重组蛋白量非常低，而且增加培养体积也不能增加纯化到的重组蛋白的含量和纯度。

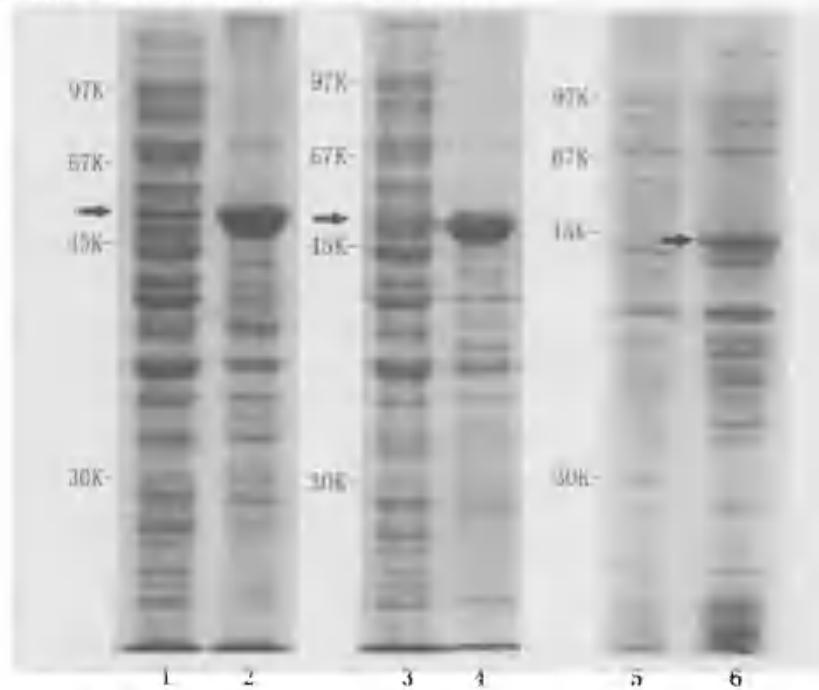


图 3-2 sCD89 的 GST 融合表达 冰道 1-4 依次是 Nco-pET42a 和 Nco20-pET42a 转化 BL21 (DE3) 克隆在 1 mM IPTG 诱导 3 小时后的细胞裂解上清和沉淀，冰道 5 和 6 分别是 Bam21-pGEX-4T-1 转化 BL21 克隆在 1 mM IPTG 诱导 3 小时后的细胞裂解上清和沉淀。在裂解细胞的沉淀中（冰道 2、4、6）可以见到略高于 45 kDa 处有特异诱导条带的出现（箭头所指），Nco-pET42a 和 Nco20-pET42a 的表达量较高，在沉淀中聚集明显；Bam21-pGEX-4T-1 表达量略低，但在沉淀中也明显可见。

### 3、sCD89his 融合蛋白

Nco20-pET28ahis 是利用 5'引物 sNcoI-20 和 3'引物 eXhohis, 直接将 sCD89 基因编码肽链 20-208 氨基酸残基的序列插入原核表达载体 pET-28a(+)的 *NcoI* 和 *XhoI* 位点, 避开了 CD89 cDNA 克隆 clone4 中加在 CD89 胞外区编码序列末位的终止密码子 TAA, 所以重组克隆表达时会在 sCD89 末尾加上从 pET-28a(+)载体序列翻译来的 His<sub>6</sub>-Tag。

Nco20-pET28ahis 重组质粒转化 *E. coli* 菌株 BL21 (DE3), 挑选克隆进行 IPTG 诱导表达。按照氨基酸残基序列计算的重组蛋白分子量和等电点分别为 24.1 kDa 和 6.96。在诱导表达后菌体的沉淀部分发现了相应的诱导表达条带 (图 3-3)。

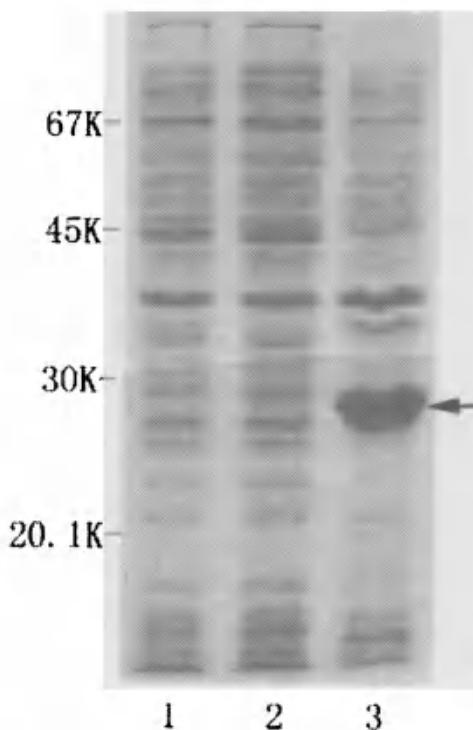
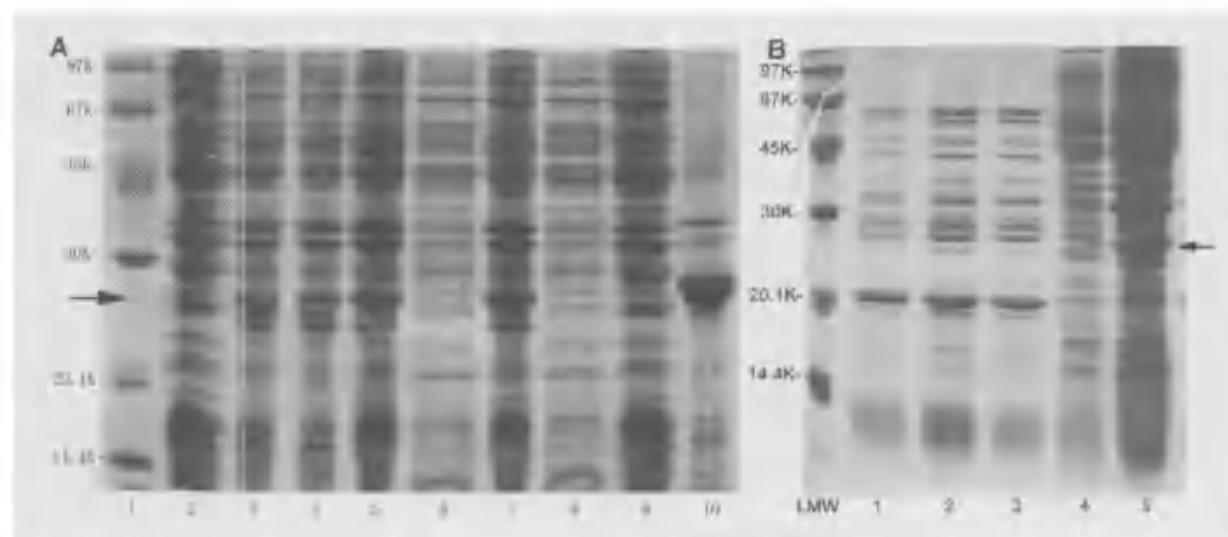


图 3-3 sCD89his 融合蛋白的表达 池道 1 是 Nco20-pET28ahis 转化克隆诱导前菌体总蛋白, 池道 2 和 3 分别是 1 mM IPTG 诱导 3 小时后的细胞裂解上清和沉淀。在裂解细胞的沉淀中 (池道 3) 可以见到 20-30 kDa 处有诱导特异条带的出现, 聚集明显, 分子量大小与预测值相符。

### 4、pel B 引导的周质分泌

编码 sCD89 肽链 20-208 氨基酸残基的序列 (包括末端 TAA 终止密码子) 从 *NcoI* 和 *XhoI* 被连入 pHEN2, 含有重组质粒的 HB2151 单菌落培养物, 加

入低浓度 IPTG 后，在室温下进行诱导表达。结果在诱导表达结束后的培养基、菌体周质和菌体裂解上清中均未发现目标重组蛋白的存在（Western blot 和双抗夹心实验阴性），但是在菌体裂解后的不溶性包涵体部分存在大量目标重组蛋白（图 3-4）。



**图 3-4 sCD89 phagemid 在 *E. coli* HB2151 中的诱导表达** A. 沸道 1 是分子量标准，沸道 2、3、5、6 是室温 (26°C) 1 mM IPTG 诱导表达 18 小时后的样品，沸道 4、7、8、9 是室温 (26°C) 1 mM IPTG 诱导表达 26 小时后的样品，沸道 10 是用作对照的 Nco20-28ahis 包涵体；可以看到室温 (26°C) 1 mM IPTG 诱导表达 18 小时和 26 小时没有明显区别，菌体总蛋白（沸道 3、4）在 20-30 kDa 之间出现的诱导条带（略小于对照 Nco20-28ahis 包涵体，因为不含 His<sub>6</sub>-Tag）集中于菌体裂解后沉淀（沸道 5、7），而在培养基（沸道 2、9）和菌体的裂解上清（沸道 6、8）没有明显积累；B. 沸道 1-3 分别是室温下 0.1 mM、0.5 mM 和 1.0 mM IPTG 诱导表达 18 小时后的细菌周质蛋白样品，沸道 4 和 5 分别是 1.0 mM IPTG 诱导表达 18 小时后的细菌胞质裂解上清和沉淀的蛋白样品；箭头所指为诱导表达的特异蛋白带，仅在沉淀中发现，周质和胞质中均无可溶性重组蛋白的富集。

## 5、昆虫细胞表达

为了方便外源基因片段的插入和表达，实验中对昆虫细胞表达系统中的转运载体 pAcHLT-A 质粒进行了一些改动：在病毒共有序列后加入了一个 *Nco*I 的酶切位点，另外，将一段包含多个限制性酶切位点的序列 `gaatccggtaccgaattcctcgagagatcttga` 加入到改建载体的 Thrombin 水解位点后，供克隆时选择使用（图 3-5）。由于 *Nco*I 的酶切位点本身带有 ATG，能够起始插入序列的翻译，所以从这里插入外源基因待表达序列，可以得到 N 端为非融合蛋白的重组蛋白。

**pAcHLT-A**

pHis1>  
GAAATGTCTATCAATATATAAGTTGCTGATATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTOGCAAATAAAATAAGTAT  
*EcoRV*

pAcM1>  
TTTACTGTTTCGTAACAGTTTGTAATAAAAAAACCTATAAAATACGGATCTGTATTCATGTCCCCTATAGATCGA  
<pAcM2  
GGGGACATCATCATCATCACGGAGGAGAAGGGCCAGTGTGCGGCCGGGAATTTTGGTCCCTCGTQGAAGGCCA  
His tag Protein kinase A site Thrombin cleavage site

GGACTCGATGGCATATGCTCGATOGAGGAATTCAAGGCTOCATGGAGCTCGCGGCOGCGCTGCAGGGTACCCCGGG  
AGATCTGTAC

pHis1: 5' TTGCTGATATCATGGAGATA 3'  
pAcM1: 5' CTGAATTCCATGGCCCTATAGATCGA 3'  
pAcM2: 5' GGCCATGGAATTCAAGATCGTATTTATA 3'  
pHis2: 5' TCAAGATCTCGAGGAATTGGTACCGATCCACGAGGGACCAA 3'

**pAcHLT-Nat vector**

EcoRV

GAAATGTCTATCAATATATAAGTTGCTGATATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTOGCAAATAAAATAAGTAT

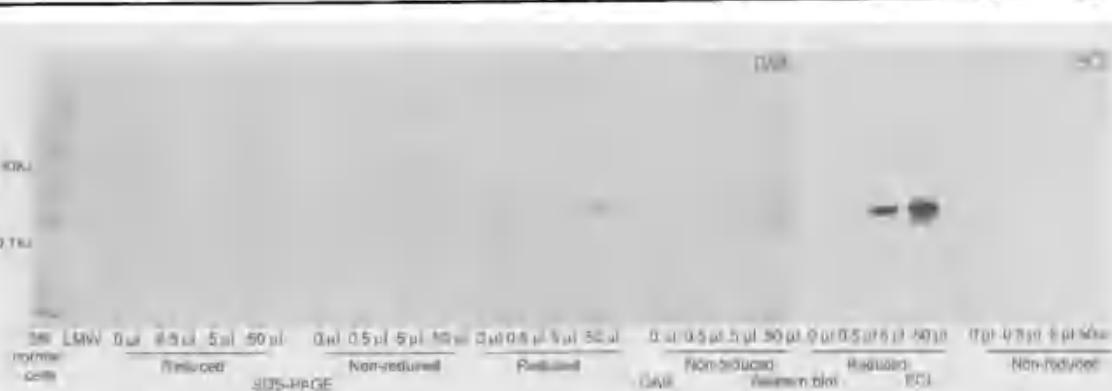
EcoRI NcoI  
TTTACTGTTTCGTAACAGTTTGTAATAAAAAAACCTATAAAATACGGATCTGAATTCATGTCCCCTATAGATCGA  
His tag Protein kinase A site Thrombin cleavage site *BamH*I  
M G H H M H H H Q R R R A S V A A G I L Y P R G  
*Kpn*I *EcoR*V *Xba*I *Bgl*II  
CCGGTACCGAATTCTCGAGAGATCTTGA  
S G T E F L E R S

**图 3-5 昆虫病毒转运载体的改造** pAcM1 和 pAcM2 是一对含有突变的引物，目的是在 pAcHLT-A 编码翻译起始位点的地方加入 EcoRI 和 NcoI 的酶切位点，以供 N 端非融合蛋白的插入和表达。pHis2 引物中携带了 BamHI、KpnI、EcoRI、XhoI 和 BgIII 等多个酶切位点，除 EcoRI 外，其余位点在改造后的 pAcHLT-Nat 载体中均为单一切点，而 EcoRI 位点与 XhoI 或 BgIII 合用时可以定向插入含有 ATG 起始密码子的序列，插入序列起始表达的同样是 N 端非融合蛋白。

编码成熟CD89肽链20-208氨基酸残基的DNA片段被插入到改建后的 pAcHLT-Nat载体，与病毒DNA(BaculoGold DNA)共转染Sf9细胞，pAcHLT-Nat载体上的CD89外源基因片段在昆虫细胞中与BaculoGold DNA发生同源重组，形成具有生物活性的重组病毒DNA。重组病毒基因组在昆虫细胞中复制和包装，病毒颗粒通过细胞出芽或裂解释放到的培养基中。4天后收获包含重组病毒颗粒的培养基(感染上清)，经过两次病毒滴度的扩增，以高滴度的感染上清再次感染Sf9细胞后，病毒在Sf9细胞中表达的sCD89重组蛋白清晰可见(图 3-6)。

## 二、抗体对CD89结合区域的定位

在前期的工作中，我们得到了 14 种抗 CD89 胞外区的抗体：MIP7c、MIP8a、MIP9a、MIP10c、MIP11c、MIP14b、MIP15b、MIP25b、MIP38c、



**图 3-6 sCD89 在昆虫细胞 sf9 中的表达** 分别以 0、0.5、5、50 μl 感染上清感染  $6 \times 10^4$  sf9 insect cells, 4 天后将全部细胞裂解制样, 分别进行还原和非还原 SDS-PAGE; 右面是 Western blot 实验中 anti-CD89 MIP68b 与 NC 膜上结合蛋白的作用结果(分别用 DAB 和 ECL 显色), 清晰显示了 20-30 kDa 之间出现了 MIP68b 识别的阳性条带, 并且重组蛋白的表达量与感染上清用量成正比。

MIP58b、MIP59c、MIP65c、MIP68b 和 MIP71a。这些抗体在 CD89 胞外区上的定位, 尤其是 MIP8a 等几个能够阻碍 IgA 分子结合 CD89 受体的单克隆抗体, 它们在 CD89 上的结合位点对于研究 IgA 和 CD89 的相互作用有直接提示。

我们构建了多种包含 CD89 胞外区不同长度片段的重组克隆, 并在原核细胞中得到表达。这些重组多肽片段与 anti-CD89 单克隆抗体的相互作用, 使我们有可能在 CD89 分子上绘制出各种单克隆抗体的结合区域。CD89 胞外区包含两个结构域 EC1 和 EC2, 我们首先检测这些抗体在 CD89 上不同结构域上的结合情况。重组克隆 EC1-pET30a 和 EC2-pET30a 分别表达 CD89 胞外区的 EC1 和 EC2 结构域, 在 BL21 (DE3) 中诱导表达时, EC1 重组蛋白完全集中于菌体中包涵体部分, 而 EC2 区重组蛋白部分以可溶性形式存在于裂解上清中(图 3-7A)。Western blot 结果显示, MIP8a 能够识别变性条件下转移至 NC 膜上的 EC1 区多肽(图 3-7B), MIP68b 能够识别变性条件下的 EC2 多肽, 而其余单抗在 Western blot 实验中不能检测到与变性蛋白的结合。

在灵敏度更高的 ELISA 检测中, 纯化的 sCD89 包涵体蛋白(Nco20-pET28a)被 SDS 溶解后包被于酶标板上, 和我们保存的所有 14 种 anti-CD89 单克隆抗体进行 ELISA 测试, 检测结果显示:除了 MIP8a 和 MIP68b 这两种在 Western blot 实验中已得到验证的抗体以外, MIP10c、MIP38c 以及 MIP71a 与 SDS 包裹的 sCD89 也有程度不同的结合。其余的抗体对 CD89 的结合仍然很低, 提示它们识别的可能是 CD89 上的构象决定簇(图 3-8)。

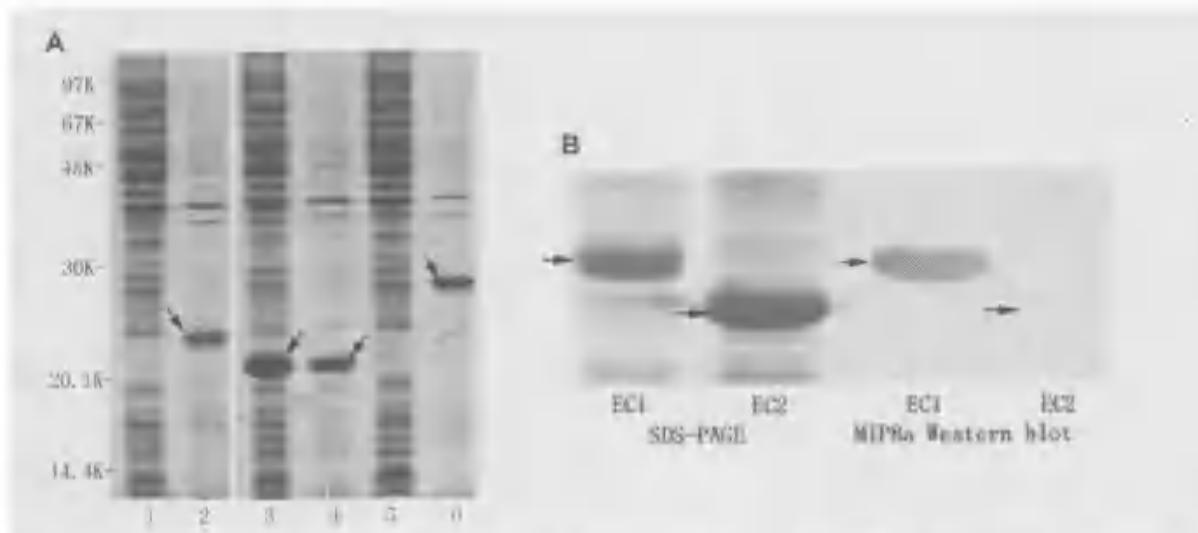
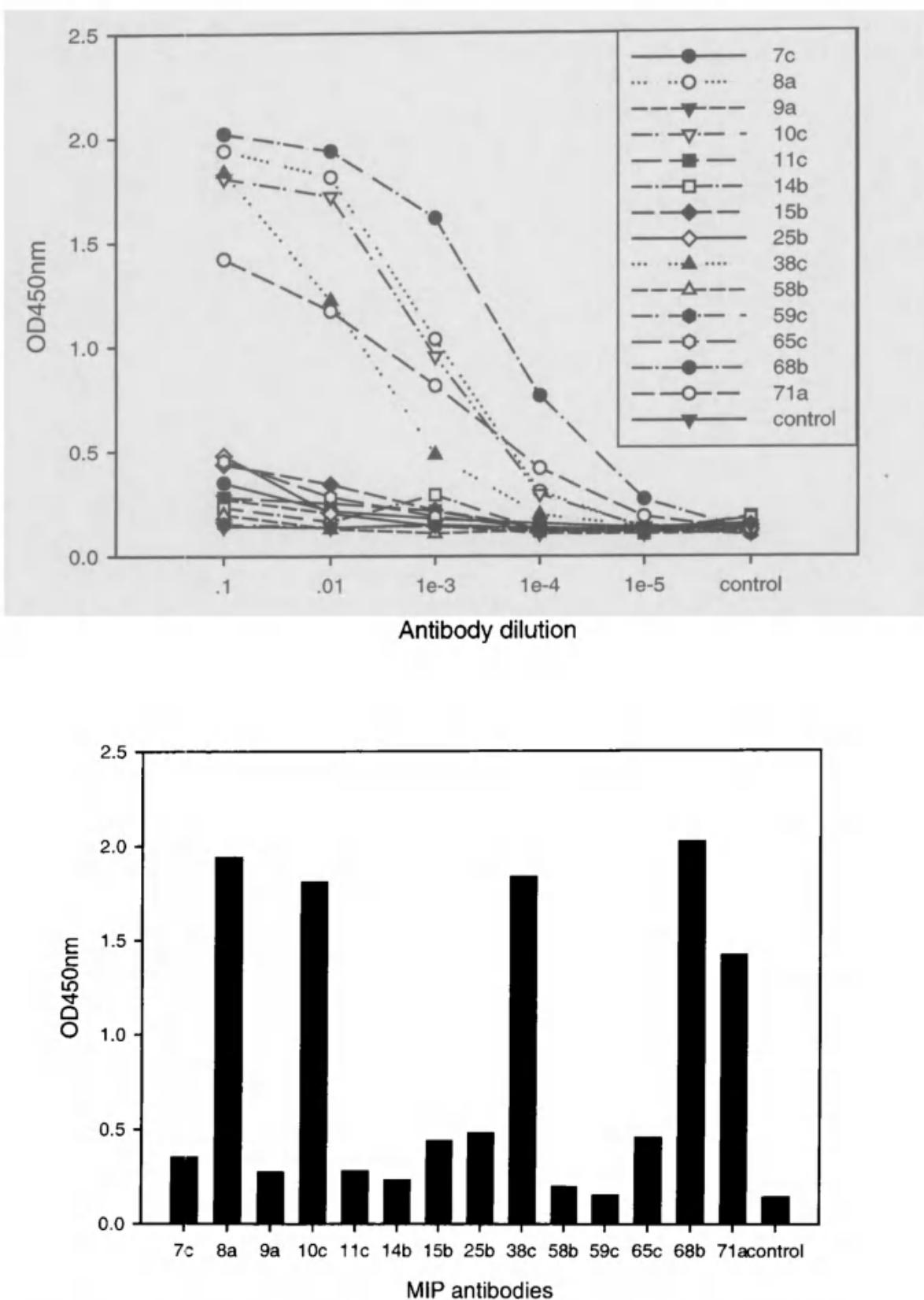
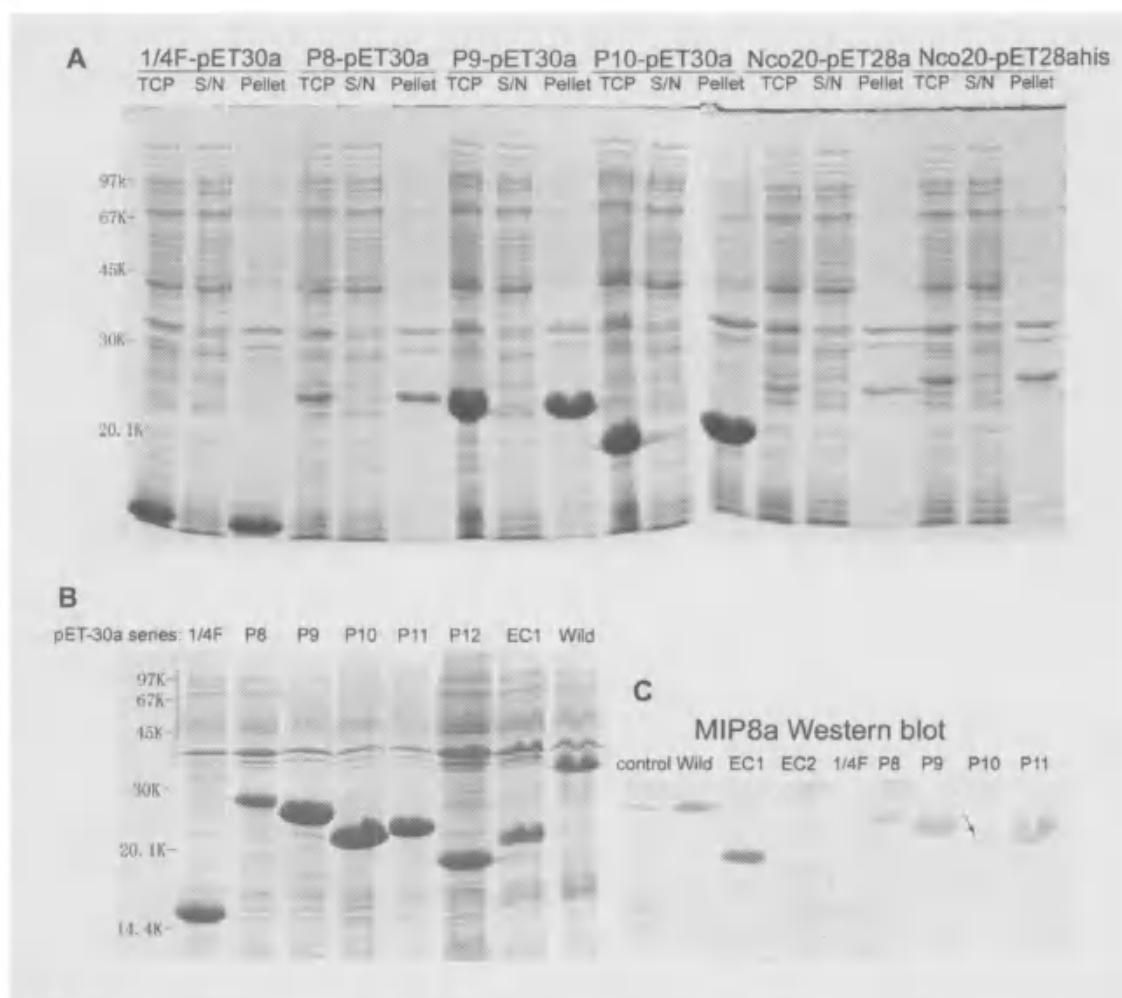


图 3-7 CD89 EC1、EC2 结构域与 MIP8a 的结合 A. 冰道 1、2 分别是 EC1-pET30a 在 BL21 (DE3) 中诱导表达后的细胞裂解上清和沉淀，冰道 3、4 分别是 EC2-pET30a 在 BL21 (DE3) 中诱导表达后的细胞裂解上清和沉淀，冰道 5、6 分别是 Wild-pET30a 在 BL21 (DE3) 中诱导表达后的细胞裂解上清和沉淀。EC1 和野生型全长 sCD89 的重组蛋白几乎都集中在胞质沉淀中，而 EC2 重组蛋白在沉淀和上清中各占一部分（见箭头所指）；B. 将 EC1-pET30a 和 EC2-pET30a 重组克隆表达的包涵体沉淀进行 Western blot，可以见到 MIP8a 结合 EC1 重组蛋白，而与 SDS-PAGE 上 EC2 重组蛋白相对应的部分却没有 MIP8a 的结合（见箭头所指）。由于 EC1-pET30a 和 Wild-pET30a 中包含前导肽，所以和 EC2 重组蛋白相比，EC1 重组蛋白的分子量较大。

MIP8a 是 5 种能够结合 SDS 溶解 sCD89 包涵体的单克隆抗体中，唯一具有阻断 IgA 和 CD89 作用的抗体，所以在研究过程中我们陆续构建了多种包含不同 EC1 结构域片段的重组蛋白和突变体（图 3-9 A），用于检测 MIP8a 在 CD89 EC1 结构域上的结合位点。1/4F-pET30a、P8-pET30a、P9-pET30a 和 P10-pET30a 覆盖了 CD89 受体的 EC1 结构域，并将后者分为 4 个肽片段。结果 1/4F-pET30a、P8-pET30a 和 P10-pET30a 重组肽段不能与 MIP8a 结合，而 P9-pET30a 重组肽段保留与 MIP8a 的结合能力，说明 EC1 结构域中引物 P9 和 P10 对应氨基酸残基之间的部分影响 MIP8a 识别 CD89 分子（图 3-9 C）。P11-pET30a 和 P12-pET30a 是为进一步确定 MIP8a 作用区域构建的，这两个重组肽段都能结合 MIP8a，所以 MIP8a 作用的候选位点已限定在 Ala74 至 Ser91 之间 18 个氨基酸残基之中，尤其 P11 和 P10 之间 Ala74、Gly75、Arg76、Tyr77 和 Gln78 肯定影响 MIP8a 与 NC 膜上的 CD89 肽段结合。

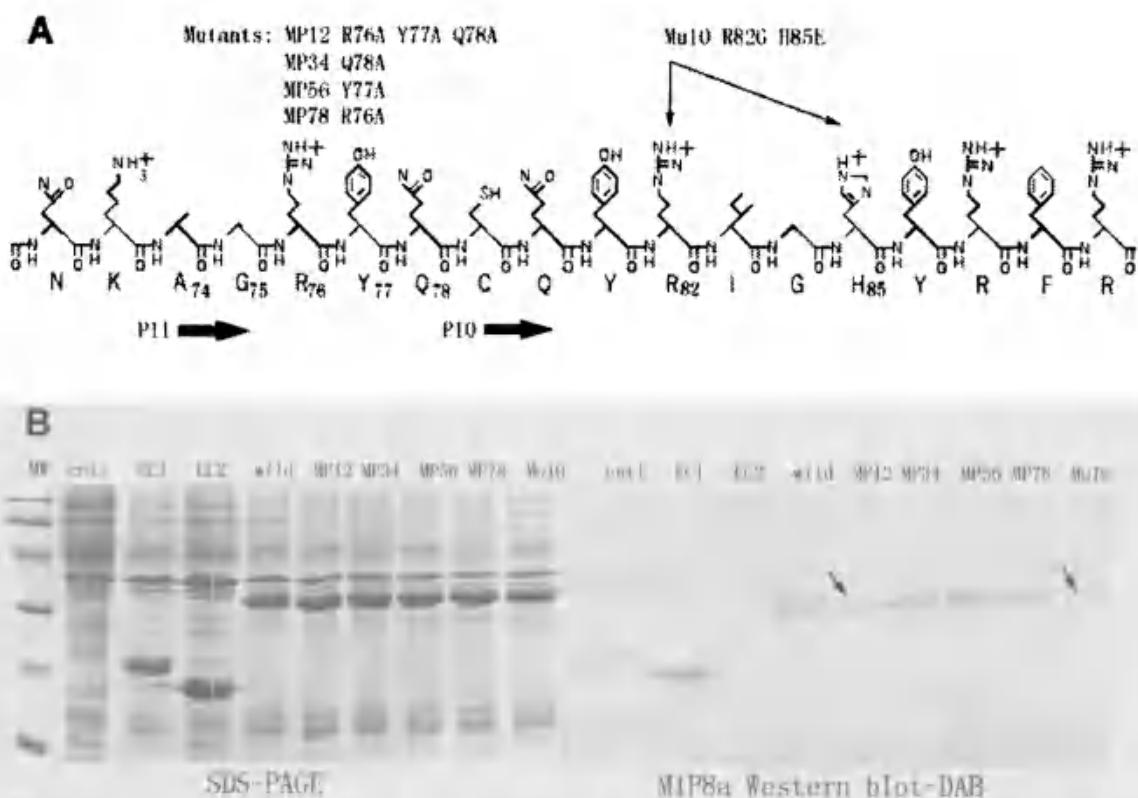


**图 3-8 sCD89 包涵体与抗体的 ELISA 反应** 粗纯化的 sCD89 包涵体蛋白被 SDS 溶解后，包被于 ELISA 板上与抗体进行 ELISA 反应，上图为抗体在不同稀释度下与板上包被的 sCD89 变性蛋白的 ELISA 显色反应结果，下图为抗体在初始稀释度（0.014 μg/ml）下与 sCD89 ELISA 反应结果的柱状图。MIP8a、MIP10c、MIP38c、MIP68b 和 MIP71a 都能够有效识别 SDS 溶解的 sCD89 包涵体。



**图 3-9 Antibody Mapping of MIP8a** A. 包含 CD89 EC1 结构域不同肽段的多个重组克隆被构建进行原核表达，它们表达的重组肽段全部集中于诱导后的胞质沉淀中；B. 不同重组肽段的包涵体沉淀，可以见到明显的重组蛋白聚集；C. 将 SDS-PAGE 分离的重组包涵体片段转移至 NC 膜上，与 MIP8a 进行结合实验，DAB 显色结果证实 MIP8a 不结合 EC1 结构域的前半段（1/4F）、P10 重组肽段（箭头所指处）和 EC2 结构域，但能够结合 EC1 的全长和 P8、P9、P11 肽段。

接着，我们构建了 MP12、MP34、MP56 和 MP78 突变体，分别对 Arg76、Tyr77 和 Gln78 进行了整体或单一替换，突变成在配体相互识别中相对比较惰性的丙氨酸（图 3-10A）。结果在和 MIP8a 的 Western blot 实验中，MP34 和 MP56 仍然保留和 MIP8a 的结合能力，MP78 和 MIP8a 的结合能力减弱，而 MP12 基本上已失去和 MIP8a 的结合能力；同时，根据报道中 Arg82 和 His85 可能参与同 IgA 的结合而构建的 Mu10 (R82G H85E) 在实验中完全不结合 MIP8a（图 3-10B）。



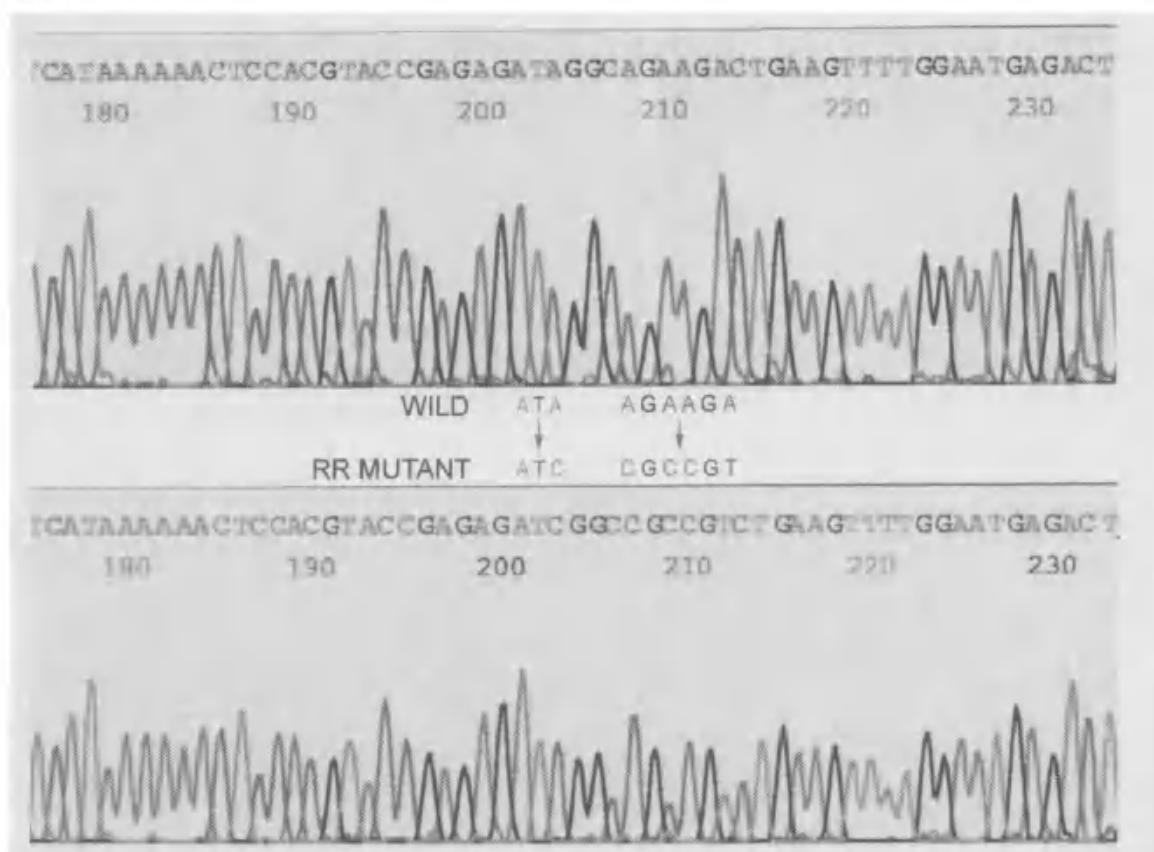
**图 3-10 CD89 EC1 突变体与 MIP8a 的结合** A. P10 和 P11 之间氨基酸残基分析和突变体构建；B. 各突变体重组蛋白 SDS-PAGE 和 Western blot 结果，MP34、MP56、MP78 均保持同野生型 sCD89 与 MIP8a 相同的结合能力，而 MP12 和 Mu10 突变导致结合力的完全丧失。

### 三、RR同义突变提高sCD89在E. coli中的表达量

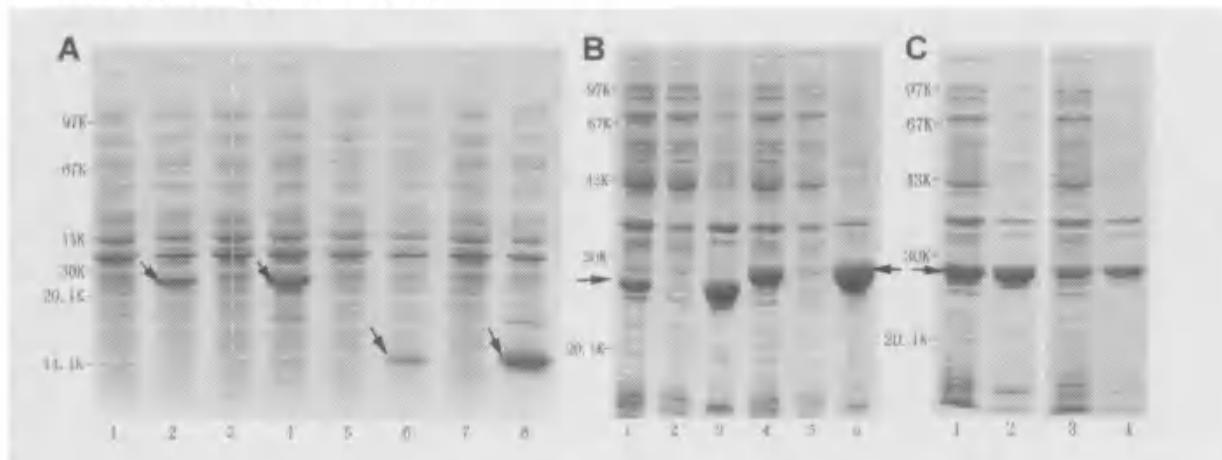
在构建 CD89 胞外区不同长度片段时，我们发现一个有趣的现象：EC2 结构域重组蛋白的表达量明显高于 EC1 结构域的；进一步 EC1 结构域的多个片段的表达中，P9 以后的表达量显然高于 P8 以前的。推测 P8 和 P9 之间的 DNA 编码序列对重组蛋白的表达量有很大影响。sCD89 编码序列密码子的分析对比显示，在这一段编码序列的密码子结构中，具有整个编码序列唯一的连续两个 AGA 密码子（编码成熟肽链中的 Arg50 和 Arg51），AGA 是大肠杆菌 *E. coli* 罕用的密码子，因为 AGA 对应的 tRNA 在大肠杆菌含量很低，所以有可能导致 sCD89 在 *E. coli* 中表达下调。

构建同义突变体 Nco20-pET28a(RR)将 AGA AGA 改为 CGC CGT，同时将附近上游的 ATA（编码成熟肽链中的 Ile48）改为 ATC 后（测序结果见图 3-11），CD89 胞外区重组蛋白的表达量明显升高，EC1 结构域的亚克隆也同样证实 RR 同义突变对 CD89 EC1 肽段表达量的促进（图 3-12 A）。另外两个克隆 Nco-pET28a（含有前导肽）和 Nco20-pET28ahis（C 端融合有 His<sub>6</sub>-Tag）

进行同样的 RR 突变后，在 BL21 (DE3) 中的表达量也相应升高（图 3-12 B、C）。



**图 3-11 CD89 的 RR 同义突变** 上面的测序结果为野生型 sCD89 (Nco20-pET28a)，下面的测序结果为 RR 点突变重组质粒 Nco20-pET28a(RR) 的测序结果。测序结果显示图中 200 base 附近的 ATA 和 210 base 附近的 ATA 和 AGAAGA 分别成功地突变为 ATC 和 CGCCGT。重组质粒由测序引物 T7 promoter primer 和 T7 terminator primer 在 377 型 DNA 测序仪上进行双向测序，图中箭头所指为突变前后的序列。



**图 3-12 RR 同义突变对 sCD89 在 *E.coli* 中表达量的影响** A. 沸道 1-8 分别是野生型 sCD89 (Nco20-pET28a)、点突变 sCD89RR (Nco20-pET28aRR)、野生型 sCD89 EC1 (P12-pET28a) 和点突变 sCD89 EC1RR (EC1-pET28aRR) 在 IPTG 诱导前后菌体总蛋白，可以看到加入 1mM IPTG 诱导 3 小时后，sCD89 和 sCD89RR 在 20-30 kDa 之间、sCD89 EC1 和 sCD89RR EC1 在小于 14 kDa 处出现了特异性诱导条带，与预期 22.9 kDa 和 11.9 kDa 大小基本相符；突变后的 sCD89RR 全长和 EC1RR 在菌体总蛋白中的含量明显高于突变前；B. 沸道 1-3 是突变

前的 sCD89 菌体总蛋白、裂解上清和包涵体沉淀，泳道 4-6 是进行 RR 突变后的 Nco-pET28a 菌体总蛋白、裂解上清和包涵体沉淀，突变后 Nco-pET28a 目标蛋白的含量明显高于突变前的 sCD89；C. 泳道 1-2 是进行 RR 突变后的 Nco20-pET28ahis 菌体总蛋白和包涵体沉淀；泳道 3-4 是突变前的 Nco-pET28ahis 菌体总蛋白和包涵体沉淀，Nco-pET28ahis (RR) 目标蛋白的含量明显高于突变前。

## 四、从包涵体中复性和纯化重组蛋白

### 1、包涵体蛋白的纯化

粗纯化得到的 sCD89 和 sCD89his 包涵体分别在去折叠以后进行了复性。由于 sCD89 表达量的提高，粗纯化包涵体的纯度也得以明显提高（图 3-13）。这使得复性之前再对重组蛋白进行纯化已经没有必要，粗纯化得到得包涵体蛋白可以直接用于蛋白质去折叠和复性。

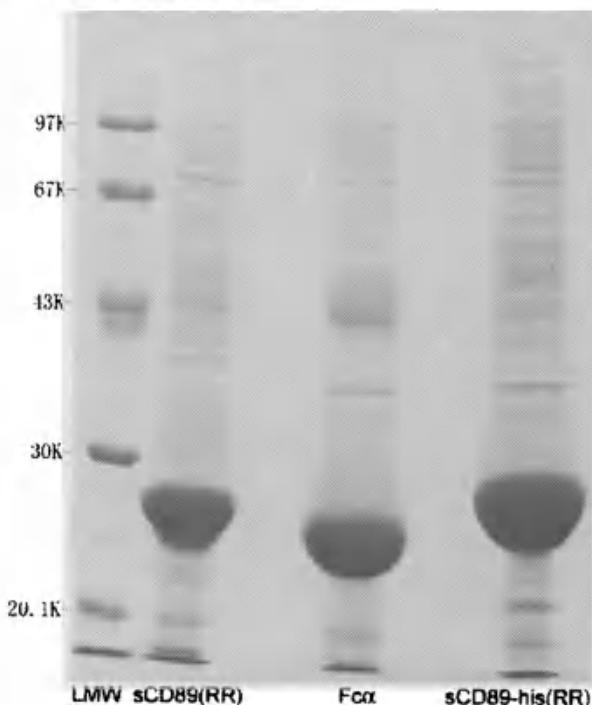


图 3-13 粗纯化包涵体蛋白的 SDS-PAGE 进行 RR 同义突变以后，粗纯化的 sCD89 和 sCD89his 包涵体的纯度也得到进一步的提升；中间泳道的  $\text{Fc}\alpha\text{CH}_2\text{CH}_3$  重组蛋白由于本身表达量很高，所以经过粗纯化以后，它的包涵体蛋白纯度也很高。

### 2、sCD89 包涵体蛋白的重折叠

#### 2.1、sCD89 包涵体蛋白在精氨酸盐复性液中的重折叠

在粗纯化的包涵体蛋白中加入 Unfolding buffer (6 M GuHCl, 20 mM

Tris-HCl, pH8.0) 溶解沉淀，使包涵体蛋白去折叠，室温静置 1 小时， $12,000\times g$  离心 15 分钟，弃去沉淀，用 Bradford 法测定蛋白质浓度，然后加入 DTT 至终浓度 5 mM，室温静置 6 小时或 4°C 过夜。复性前，用 Unfolding buffer 将蛋白浓度调至 10 mg/ml。

配制 1 升 Refolding buffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 500 mM Arginine HCl, 5 mM GSH, 0.5 Mm GSSG, pH8.0)，4°C 预冷。将 20 mg 去折叠的包涵体蛋白以 0.1ml/hr 速度缓慢加入 350 ml 4°C 预冷的 Refolding buffer 中，磁力搅拌器不断搅拌，使滴入 Refolding buffer 的蛋白溶液迅速稀释，4°C 继续搅拌 3-5 天，至溶液中游离巯基浓度低于 1 mM (Ellman 法检测)。

当去折叠的包涵体蛋白加入 Refolding buffer 时，产生了很多沉淀。离心去除沉淀后，上清中蛋白质在 280nm 的光吸收已很小。将上清转入透析带(截留量大于 12 kDa) 中，对 2000 ml 4°C 预冷透析液 (20mM Tris-HCl, pH8.0) 透析，以除去 GunHCl 和 Arg。每 4 小时换液，约两天透析完毕 (可用电导率仪测量透析液的电导率，透析袋内复性蛋白溶液的电导率值与 4°C 预冷透析液的相同时，透析结束)。透析后溶液体积膨胀至原体积的约 1.5 倍，但是蛋白质浓度已接近于零。

以 0.5 M 精氨酸盐辅助折叠进行的 sCD89 稀释法复性不成功，大部分去折叠蛋白在加入重折叠缓冲液的瞬间，就聚集形成沉淀析出。说明复性液中 0.5 M 精氨酸所提供的极性吸引力不足以保证 sCD89 重折叠的进行。

## 2.2、sCD89 包涵体蛋白在尿素复性液中的重折叠

在粗纯化的包涵体蛋白中加入 Unfolding buffer (8 M Urea, 20 mM Tris-HCl, pH8.0) 溶解沉淀，室温静置 1 小时，使包涵体蛋白去折叠。 $12,000\times g$  离心 15 分钟，弃去沉淀，用 Bradford 法测定蛋白质浓度。然后加入 DTT 至终浓度 5 mM，室温静置 6 小时或 4°C 过夜，彻底还原包涵体中的二硫键。复性前，用 Unfolding buffer 将蛋白浓度调至 10 mg/ml。

先用小量样品测试去折叠的 sCD89 包涵体蛋白在不同浓度尿素溶液中的折叠情况。取 20 μl 样品，用 20 μl Unfolding buffer 稀释一倍，以一定比例将样品、20 mM Tris-HCl (pH8.0) 和 Unfolding buffer 混合 (表 3-1)，室温静置 1 小时后，4°C  $12,000\times g$  离心 10 分钟，测定上清 OD<sub>280nm</sub> 值以比较上清中残留蛋白质的含量。结果显示去折叠的 sCD89 包涵体蛋白在尿素溶液中的重折叠

率（上清中的可溶性分子），基本和 Urea 浓度成正比（图 3-14）。在随后的折叠中，Urea 浓度选择在 2.40-2.70 M 之间，因为和浓度在 2.40 M 以下的复性液相比，去折叠蛋白加入这个浓度的复性液时形成的可见沉淀最少。

表 3-1 sCD89 在尿素溶液中折叠中点的确定

Sample(μl)	20 mM Tris-HCl (pH8.0) (μl)	Unfolding buffer (μl)	Urea 终浓度 (M)
25	475	0	0.4
25	450	25	0.8
25	425	50	1.2
25	400	75	1.6
25	375	100	2.0
25	350	125	2.4
25	325	150	2.8
25	300	175	3.2
25	275	200	3.6
25	250	225	4.0
25	225	250	4.4
25	200	275	4.8

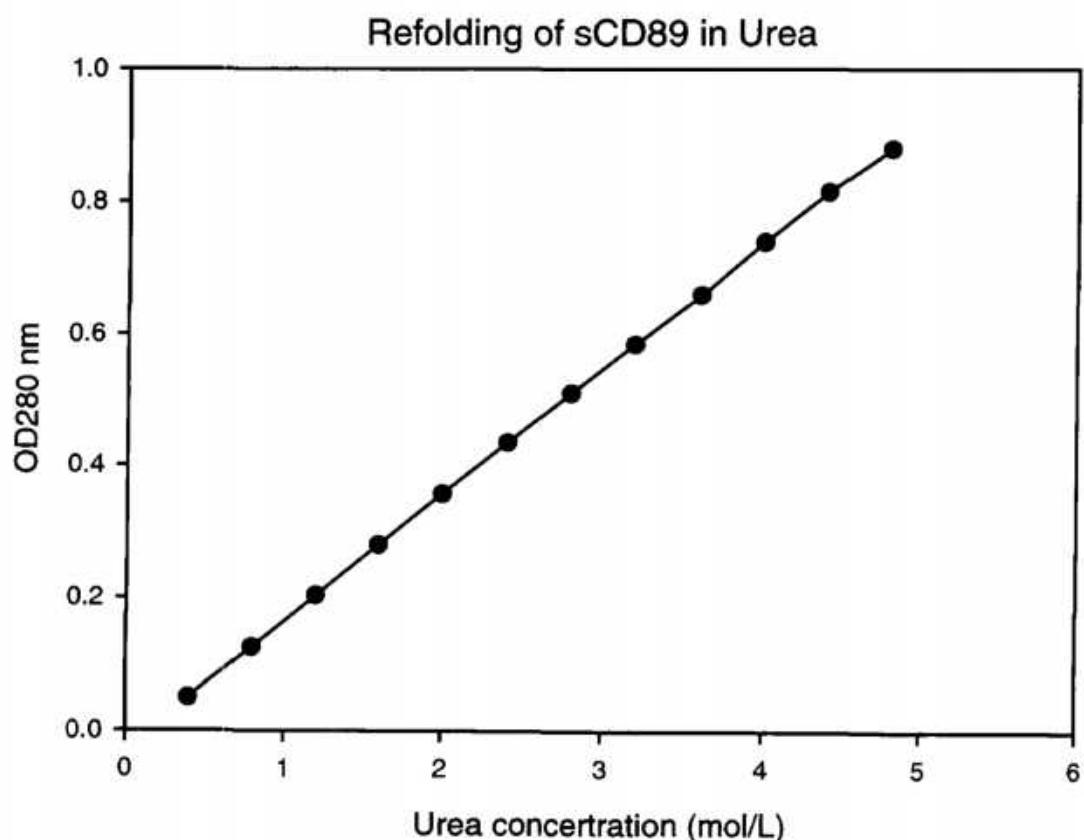


图 3-14 去折叠 sCD89 包涵体在尿素溶液中的重折叠

配制 Refolding buffer (2.40-2.70 M Urea, 20mM Tris-HCl, 2.5mM GSH and 0.5mM GSSG, pH8.0), 4℃预冷；将 40 mg 去折叠的包涵体蛋白以 0.1ml/hr 速度缓慢加入 750 ml 4℃预冷的 Refolding buffer 中，磁力搅拌器不断搅拌，使滴入 Refolding buffer 的蛋白溶液迅速稀释。4℃继续搅拌 24 小时，测得复性液中  $OD_{280nm}=0.111$ 。将复性液置于透析袋中对 5,000 ml 20 mM Tris-HCl (pH8.0) 透析，每隔 8 小时换液一次，至透析结束共换液四次。滤去复性液中的沉淀以后，将复性液慢速通过单抗亲和柱 MIP68b-linked Sepharose 4B，上样结束后以 0.1 M Glycine-HCl (pH2.5) 洗脱，1 M Tris-HCl 迅速中和。洗脱液对 20 mM Tris-HCl (pH8.0) 透析，透析结束后，通过 DEAE Sepharose Fast Flow 层析纯化（图 3-15）。

纯化得到的重折叠 sCD89 分子生物活性的检测利用两个途径：一是与标准样品（CHO 细胞表达的 sCD89 分子）比较结合多种单克隆抗体的能力，由于这些抗体中多数识别 CD89 上的构象决定簇（图 3-8），因此与它们的结合实验（ELISA）有助于更好地评价复性蛋白质表面地恢复情况；二是检测复性蛋白与它的天然配体 IgA 的结合能力，这是 sCD89 包涵体恢复生物活性的基本要求。两项检测中，复性 sCD89 分子同标准样品相比，结合趋势一致，说明复性过程成功（图 3-16、3-17）。

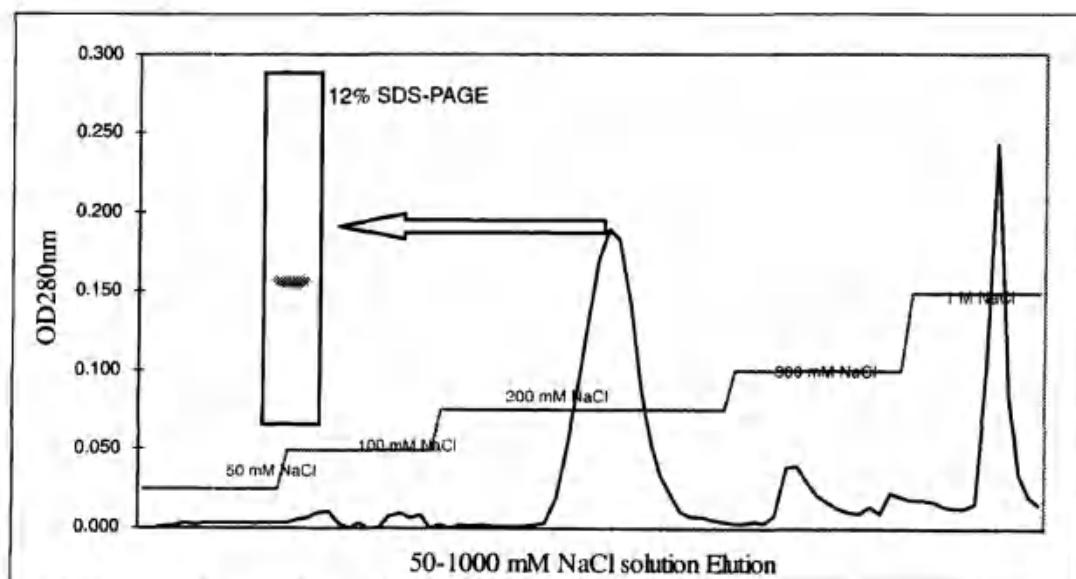


图 3-15 sCD89 在 Urea 中的复性 sCD89 包涵体蛋白在尿素溶液中复性以后，经过单抗亲和柱 MIP68b-linked Sepharose 4B 纯化；亲和层析的洗脱峰透析后，上样至 DEAE Sepharose Fast Flow，NaCl 梯度洗脱。目标蛋白峰（sCD89 单体）出现在 200 mM NaCl 浓度处，纯度经 SDS-PAGE 检测。

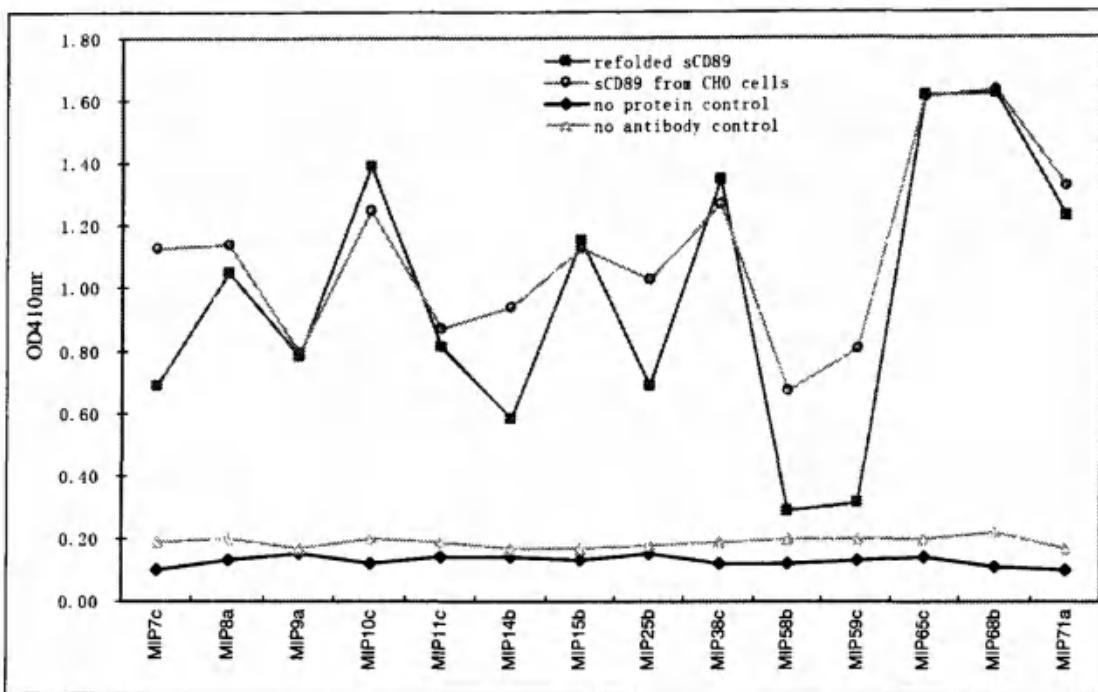


图 3-16 复性 sCD89 与标准样品同单克隆抗体的结合比较 过量包被的抗原（复性 sCD89 蛋白和 CHO 细胞表达的 sCD89 蛋白）与不同的 anti-CD89 单克隆抗体进行抗体捕获 ELISA，除了 MIP58b 和 MIP59c，复性 sCD89 和标准品的结合力一致。

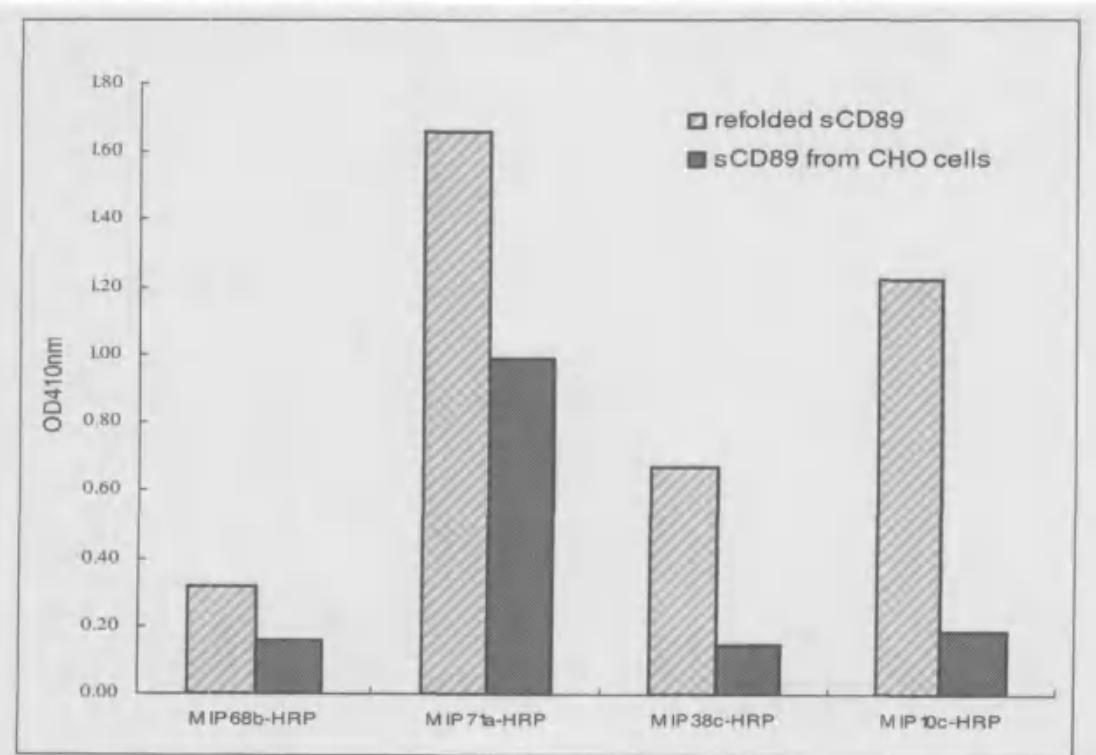


图 3-17 复性 sCD89 与标准品同 IgA 结合的比较 将 anti-NIP IgA2 通过 ELISA 板上包被的 NIP 锚定于板上，IgA Fc 段暴露在溶液中，加入复性的 sCD89 或 CHO 细胞表达的 sCD89 蛋白（标准样品）与板上的 IgA 反应，1 小时后洗去未结合的蛋白，再利用 HRP 标记的 anti-CD89 单克隆抗体 MIP68b、MIP71a、MIP38c 和 MIP10c，检测被结合的 CD89 分子。结果显示，sCD89 能够被板上的 IgA 结合而得以保留，其结合力略强于 CHO 细胞表达的 sCD89 蛋白。

尿素复性的优点在于消耗低、纯化方便。但是在结构研究中，由于尿素不稳定，容易发生降解并与蛋白质侧链发生反应，因而其应用受到限制。

### 2.3、sCD89 包涵体蛋白在盐酸胍复性液中的重折叠

在粗纯化的 sCD89 包涵体蛋白中加入 Unfolding buffer (6 M GuHCl, 20 mM Tris-HCl, pH8.0) 溶解沉淀，使包涵体蛋白去折叠，室温静置 1 小时，12,000×g 离心 15 分钟，弃去沉淀，用 Bradford 法测定蛋白质浓度，然后加入 DTT 至终浓度 5 mM，室温静置 6 小时或 4°C 过夜。复性前，用 Unfolding buffer 将蛋白浓度调至 10 mg/ml。

按照与 2.2 同样的测定方法，检测去折叠的 sCD89 包涵体蛋白在 GuHCl 溶液中的折叠情况：取 20 μl 样品，用 20 μl Unfolding buffer 稀释一倍，以一定比例将样品、20 mM Tris-HCl (pH8.0) 和 6 M GuHCl 混合（表 3-2），室温静置 1 小时后，测定 OD<sub>600nm</sub> 以比较出现的沉淀量，随后 4°C 12,000×g 离心 10 分钟，测定上清 OD<sub>280nm</sub> 值以比较上清中残留的蛋白质含量。与 sCD89 在尿素溶液中的情况略有不同的是，去折叠的 sCD89 包涵体蛋白在 1.80 M GuHCl 浓度附近有一个明显的变化，上清中保留的可溶性蛋白在 1.80 M GuHCl 前后的变化幅度将近 5 倍。

表 3-2 sCD89 在 GuHCl 中折叠中点的确定

Sample(μl)	20 mM Tris-HCl (pH8.0) (μl)	6 M GuHCl (μl)	GuHCl 终浓度 (M)
50	850	100	0.90
50	800	150	1.05
50	775	175	1.35
50	750	200	1.50
50	725	225	1.65
50	700	250	1.80
50	650	300	2.10

以 1.80 M GuHCl 配制 Refolding buffer (1.80 M GuHCl, 50mM Tris-HCl, 2.5mM GSH and 0.5mM GSSG, pH8.0)，4°C 预冷；将 100 mg 去折叠的包涵体蛋白以 0.1ml/hr 速度缓慢加入 800 ml 4°C 预冷的 Refolding buffer 中，磁力搅拌器不断搅拌，使滴入 Refolding buffer 的蛋白溶液迅速稀释，不形成肉眼可见的沉淀。4°C 继续搅拌 3-5 天，至溶液中游离巯基浓度低于 1 mM (Ellman 法检测)。

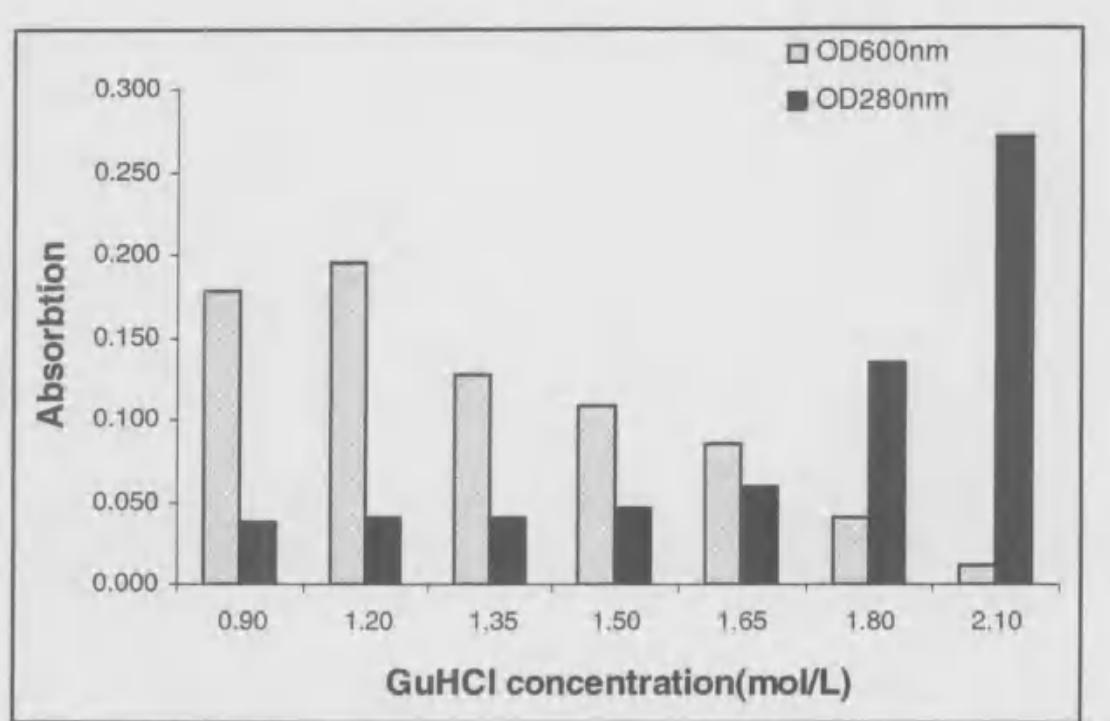


图 3-18 去折叠 sCD89 包涵体在 GuHCl 溶液中的重折叠

重折叠后的蛋白溶液转入透析带中（截留量大于 12 kDa），对 2,000 ml 4 °C 预冷透析液 (20 mM Tris-HCl, pH8.0) 透析，以除去 GuHCl。每 4 小时换液，直至重折叠蛋白溶液的电导率与透析液的电导率相同，约换液 4-5 次。透析后产生很多沉淀，以 Beckman JA-14 转头 4°C 5,000×g 离心 10 分钟除去沉淀。离心后的上清再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤 2 次，进一步除去沉淀。sCD89 在 pH8.0 条件下带负电荷，透析完毕的样品，0.22 μm 过滤后，上预先已用 20 mM Tris-HCl (pH8.0) 平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow，流速 0.5 ml/min，柱上结合蛋白采取 NaCl 梯度洗脱，收集 300 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH8.0) 洗脱峰。

洗脱峰蛋白通过 SDS-PAGE 检测纯度、Native PAGE 检测蛋白的均一度，同时以不同浓度的复性蛋白包被 ELISA 板，并与各种单抗进行抗体捕获 ELISA 实验，检测复性蛋白识别各种抗体的能力。检测结果显示 GuHCl 中复性的 sCD89 蛋白均一性尚可，但是有少量杂蛋白夹杂（图 3-20）；复性蛋白能够识别各种 anti-sCD89 的单克隆抗体，结合趋势与表中 Urea 中复性的 sCD89 蛋白以及 CHO 表达的 sCD89 一致，并且随浓度的降低而减弱，说明结合作用具有特异性（图 3-21）。

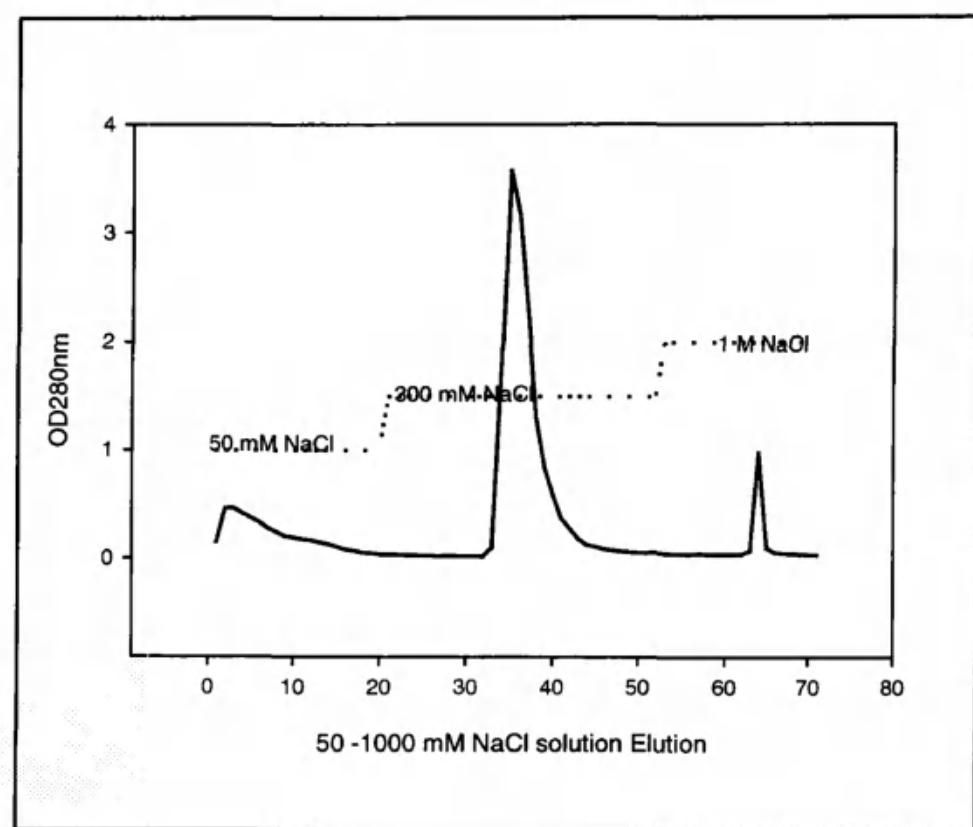


图 3-19 复性 sCD89 蛋白的 DEAE Sepharose FF 纯化 sCD89 包涵体蛋白在 GuHCl 溶液中复性以后，上样至 DEAE Sepharose Fast Flow，50 mM NaCl 可以洗脱 DEAE 上吸附的部分核酸等阴离子，目标蛋白峰（sCD89 单体）出现在 300 mM NaCl 浓度处，多聚体在更高浓度 NaCl 下被洗脱。

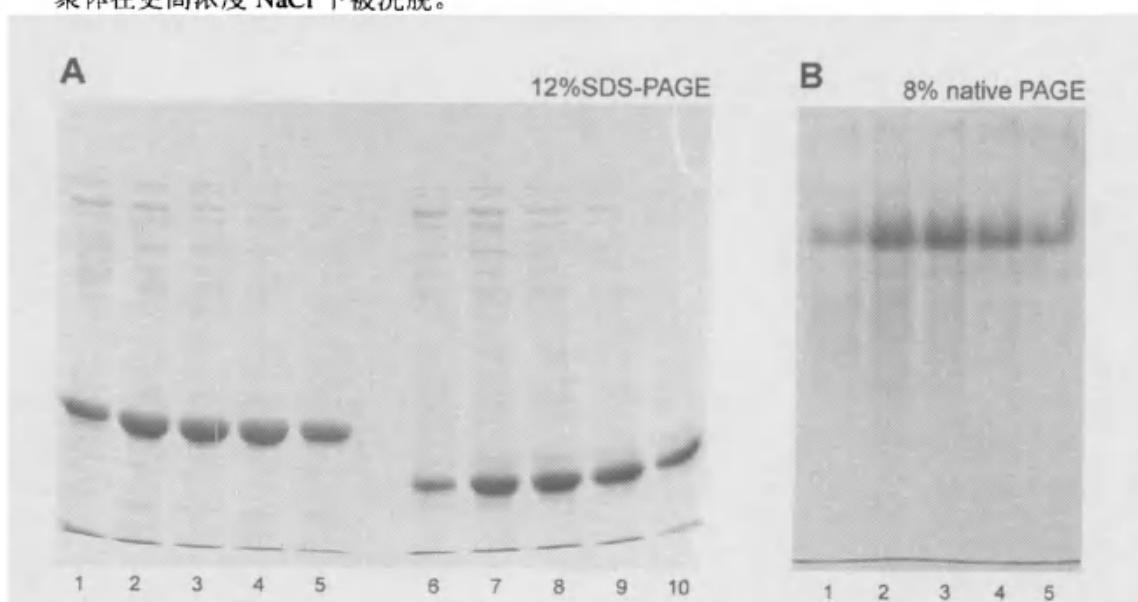


图 3-20 复性 sCD89 蛋白的纯度和均一度 A. 从 DEAE Sepharose FF 收集的 sCD89 单体蛋白洗脱峰进行 reduced SDS-PAGE(泳道 1-5)和 non-reduced SDS-PAGE(泳道 6-10)，未还原的 sCD89 蛋白电泳迁移率较还原的高，说明 sCD89 分子中有二硫键的形成；B. sCD89 单体蛋白洗脱峰在 8% native PAGE 中有较高的电泳迁移均一性。

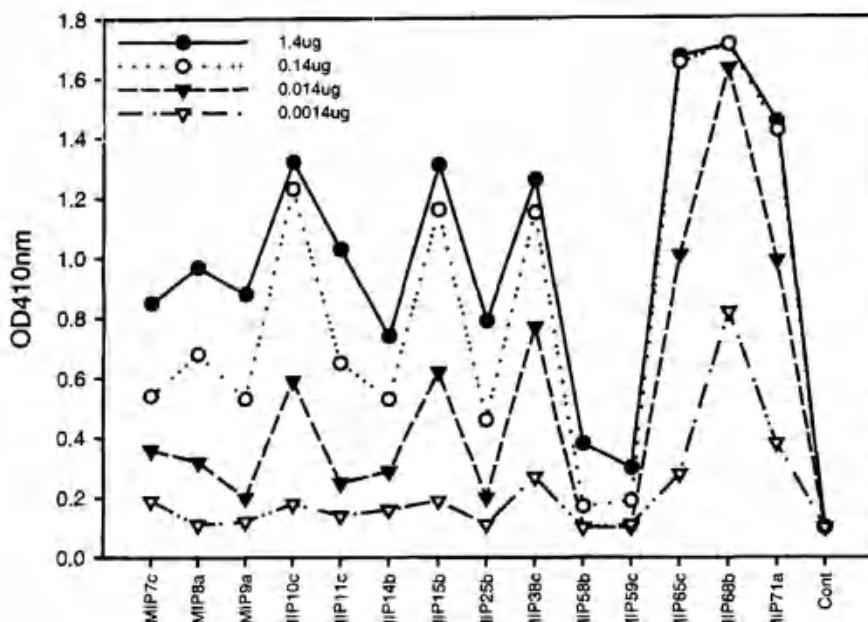


图 3-21 复性 sCD89 与单克隆抗体的结合 不同浓度的复性 sCD89 蛋白包被于 ELISA 板上，进行不同的 anti-CD89 单克隆抗体的抗体捕获 ELISA，结果显示 GuHCl 中复性得到的 sCD89 与不同抗体作用的强弱与抗原包被量成正比，总体趋势与图 3-16 一致。

#### 2.4、sCD89his 包涵体蛋白在盐酸胍复性液中的重折叠

C 端带有 His<sub>6</sub>-Tag 的 sCD89his 包涵体在 GuHCl 溶液中的折叠表现与 sCD89 一致（图 3-22），所以 sCD89his 包涵体采用与 sCD89 完全相同的复性条件。将 15 mg 去折叠的 sCD89his 包涵体加入 450 ml 4℃ 预冷的 Refolding buffer (1.80 M GuHCl, 50 mM Tris-HCl, 2.5 mM GSH and 0.5 mM GSSG, pH 8.0)，磁力搅拌器不断搅拌，使滴入 Refolding buffer 的蛋白溶液迅速稀释，不形成肉眼可见的沉淀。4℃ 继续搅拌 3-5 天，至溶液中游离巯基浓度低于 1 mM (Ellman 法检测)。

重折叠后的蛋白溶液转入透析带中（截留量大于 12 kDa），对 2,000 ml 4℃ 预冷透析液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0) 透析，以除去 GuHCl。每 4 小时换液，直至重折叠蛋白溶液的电导率与透析液的电导率相同，约换液 4-5 次。透析后产生很多沉淀，以 Beckman JA-14 转头 4℃ 5,000×g 离心 10 分钟除去沉淀。离心后的上清再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤 2 次，进一步除去沉淀。sCD89 在 pH 8.0 条件下带负电荷，透析完毕的样品，0.22 μm 过滤后，上预先已用 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow，流速 0.5 ml/min，柱上结合蛋白采取 NaCl 梯度洗脱，收集 300 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH 8.0) 洗脱峰（图 3-23）。

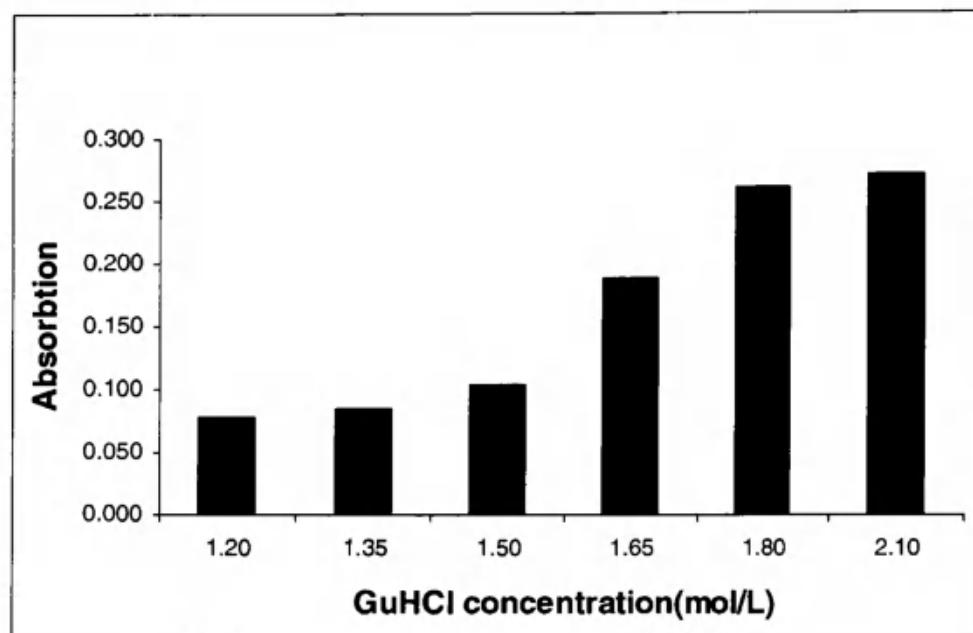


图 3-22 去折叠 sCD89his 包涵体在 GuHCl 溶液中的重折叠

300 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH8.0) 洗脱峰直接上 1 ml Ni-NTA 亲和柱，以 10-500 mM Imidazole/20 mM Tris-HCl (pH8.0) 进行梯度洗脱，由于高浓度咪唑干扰 OD<sub>280nm</sub> 光吸收用，因此，洗脱同时也用 Bradford 试剂监测蛋白峰的出现（图 3-24），蛋白洗脱峰走 SDS-PAGE 检测纯度（图 3-25）。

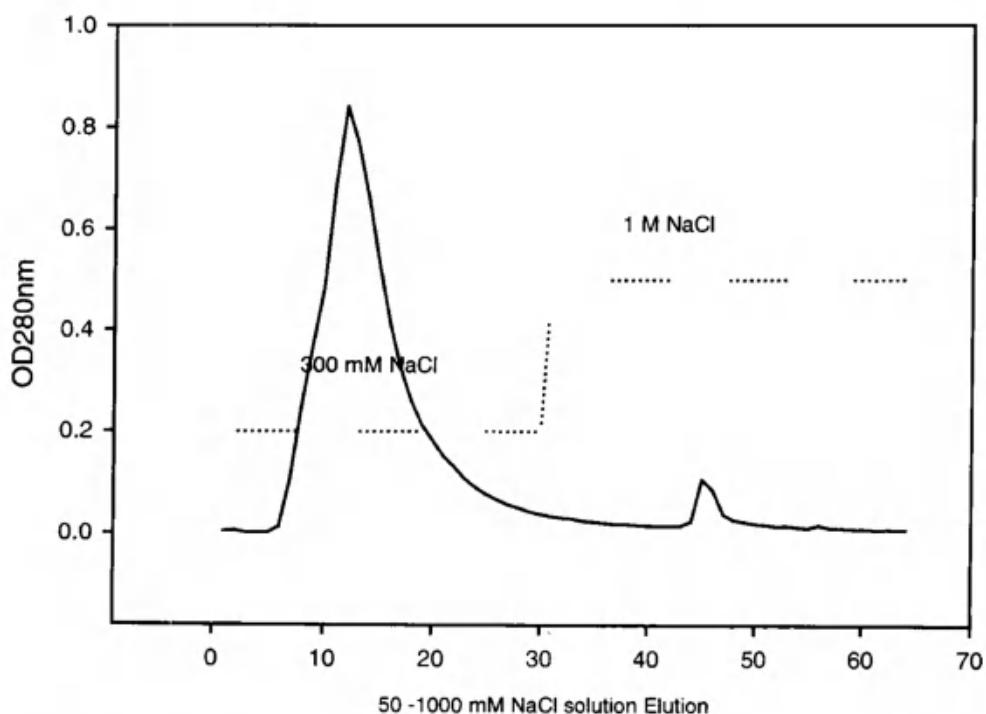


图 3-23 复性 sCD89his 蛋白的 DEAE Sepharose FF 纯化 sCD89 单体在 300 mM NaCl 浓度处被洗脱。

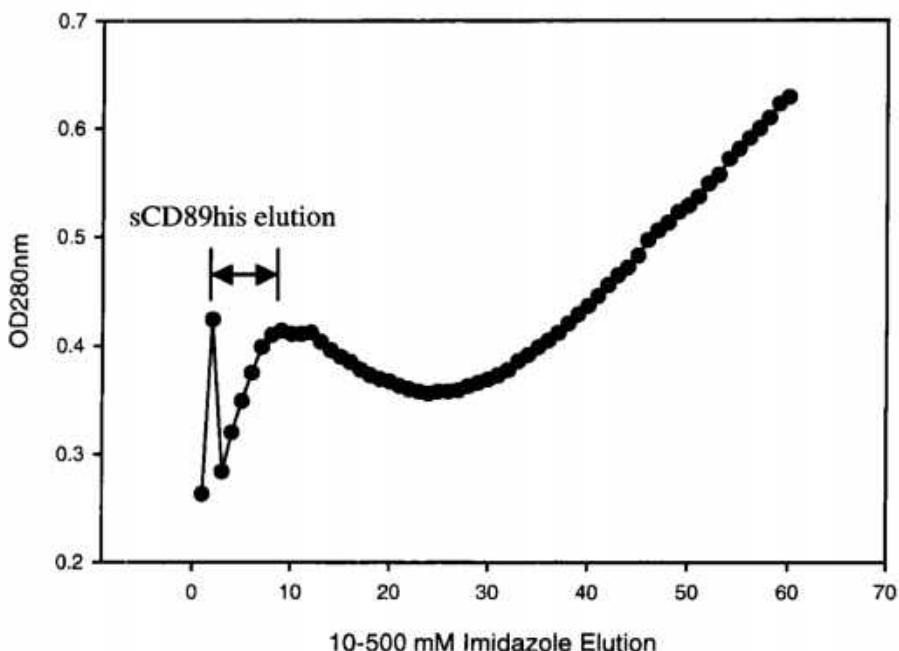


图 3-24 sCD89his 蛋白的 Ni-NTA 亲和层析 sCD89his 从 Ni-NTA 上洗脱非常容易，蛋白洗脱峰如图所示。

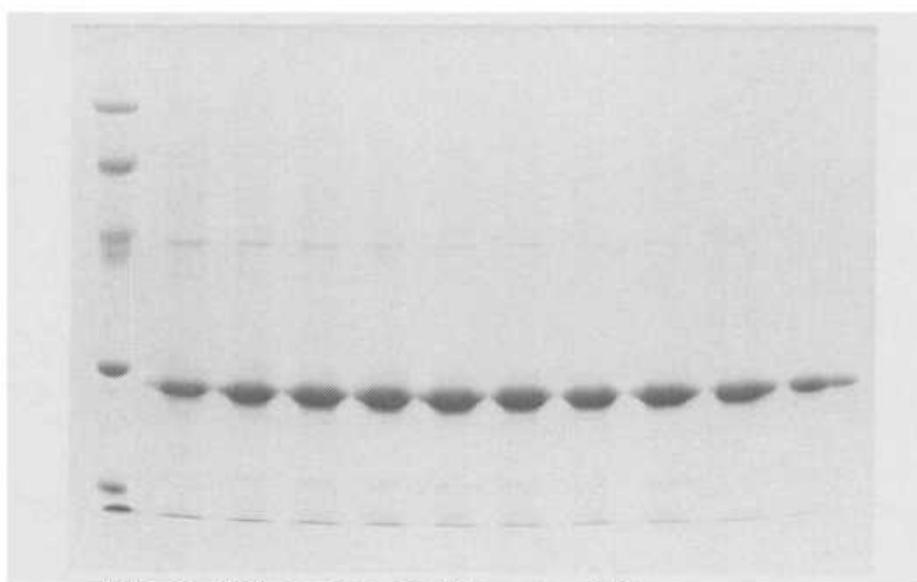


图 3-25 复性 sCD89his 蛋白的 Ni-NTA 纯化

## 2.5、sCD89his 包涵体蛋白的柱上重折叠

### 2.5.1、自装 Ni-NTA 层析柱上的重折叠

轻混 Chelating Sepharose Fast Flow(Pharmacia Biotech)，使其与保存液(20%乙醇溶液)混匀呈完全悬浮状态。吸取 2.5ml 树脂悬液(1ml 沉积的树脂

可纯化 8mg 目的蛋白质)加到一只 5 ml 聚丙烯管中, 低于 500×g 离心 2 分钟, 吸弃上清, 加入 1 ml 去离子水, 混匀树脂, 脱气 5 分钟, 按层析柱操作手册将脱气后的树脂装入一只 5 ml 层析柱, 立即在树脂上层加上去离子水, 接上层析柱接头, 调节蠕动泵流速为 2 ml/min, 过柱 100 ml 去离子水以压实树脂; 分别以 3 倍柱床体积去离子水、5 倍体积 1 M NiSO<sub>4</sub>、3 倍体积 Binding Buffer (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH8.0) 及 5 倍体积含有 8 M 尿素的 Binding Buffer 洗柱; 将溶于 Unfolding buffer 中的变性蛋白样品上柱, 调节流速约为 7 滴/分钟或 0.5 ml/分钟; 将 100 ml 含有 8.0-0 M 尿素梯度的 Binding Buffer 缓慢过柱 (流速约为 7 滴/min 或 0.5 ml/min), 使结合在柱上的变性蛋白在逐渐降低的变性剂环境中开始重折叠, 重复一次以提高重折叠产率; 用 15 ml 20 mM 咪唑缓冲液洗涤柱床; 用 15 ml Elution Buffer (50 mM TrisHCl pH7.9, 50 mM NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, 500 mM Imidazole) 洗脱蛋白, 收集并测定蛋白浓度。结果洗脱液中的蛋白质浓度很低, 改用 8 M Urea 配制的 Elution buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 8 M Urea, 500 mM Imidazole, pH7.9) 再次洗脱层析柱, 得到了大量蛋白, SDS-PAGE 检测为 sCD89 蛋白。

### 2.5.2、预装 Ni-NTA 层析柱上的重折叠 (ÄKTAprime)

收获的菌体沉淀以 2% TritonX-100 重悬, 短暂超声裂解, 12,000×g 离心 5 分钟; 沉淀部分用 2 M NaCl 重悬, 再次短暂超声, 12,000×g 离心 5 分钟; 重复 2 M NaCl 洗涤步骤一次, 至包涵体沉淀呈乳白色; 获得的包涵体沉淀再用 Buffer A (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, pH7.9) 洗涤一次。用 Buffer B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 5% Glycerol, 10 mM DTT, 6 M GuHCl, pH7.9) 溶解粗纯得到的包涵体, 室温下搅拌至少 30 分钟或 4°C 6 小时。16,000×g 离心 20 分钟, 收集上清。ÄKTAprime 上用 1 ml 的 Ni-NTA 预装亲和柱纯化。上清以 1 ml/min 的流速过柱, 泵 A 为 Buffer B, 泵 B 为 Buffer A; 过柱梯度为每 30 分钟内有 100%、80%、60%、40%、20% 和 0% 的 Buffer B 变到 Buffer A。将泵 A 换成 Buffer C (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, 500 mM Imidazole, pH7.9), 梯度洗脱将蛋白质洗脱下来。但是, 洗脱液中的蛋白质浓度仍然极低, 大部分蛋白质在梯度复性时形成沉淀聚集在层析柱内, 改用变性剂后可将这些蛋白洗脱下来。

## 2.6、硒代 sCD89his 包涵体蛋白的重折叠

硒代 sCD89his 包涵体蛋白的重折叠程序与 sCD89his 的完全相同。从 1000 ml 培养物中收获的包涵体蛋白经粗纯化后, 溶于 1 ml Unfolding buffer (6 M

GuHCl, 20 mM Tris-HCl, pH8.0), 其蛋白含量约 30 mg/ml。在 Unfolding buffer 中加入 10 mM DTT 室温作用 6 小时。去除沉淀后, 将去折叠的硒代 sCD89his 包涵体蛋白加入 350 ml 4℃ 预冷的 Refolding buffer (1.80 M GuHCl, 50mM Tris-HCl, 2.5mM GSH and 0.5mM GSSG, pH8.0), 磁力搅拌器不断搅拌, 使滴入 Refolding buffer 的蛋白溶液迅速稀释, 不形成肉眼可见的沉淀。4℃ 继续搅拌 3-5 天, 至溶液中游离巯基浓度低于 1 mM (Ellman 法检测)。

重折叠后的蛋白溶液转入透析带中 (截留量大于 12 kDa), 对 2,000 ml 4℃ 预冷透析液 (20mM Tris-HCl, pH8.0) 透析, 以除去 GuHCl。每 4 小时换液, 直至重折叠蛋白溶液的电导率与透析液的电导率相同, 约换液 4-5 次。透析后产生很多沉淀, 以 Beckman JA-14 转头 4℃ 5,000×g 离心 10 分钟除去沉淀。离心后的上清再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤 2 次, 进一步除去沉淀。sCD89 在 pH8.0 条件下带负电荷, 透析完毕的样品, 0.22 μm 过滤后, 上预先已用 20 mM Tris-HCl (pH8.0) 平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow, 流速 0.5 ml/min, 柱上结合蛋白采取 NaCl 梯度洗脱, 收集 300 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH8.0) 洗脱峰(图 3-26); 或者通过 ÄKTAp prime 上的阴离子交换层析预装柱 Resource Q 纯化, sCD89 重组蛋白在 Resource Q 上的平衡液为 A 液 (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 5% Glycerol, 1 mM DTT, pH7.9), 用 B 液 (50 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, 1 mM β-巯基乙醇, pH8.0) 进行梯度洗脱, 流速为 3 ml/min, SDS-PAGE 分析不同位置的洗脱峰, 目标蛋白约在 15%NaCl 浓度位置洗脱下来。

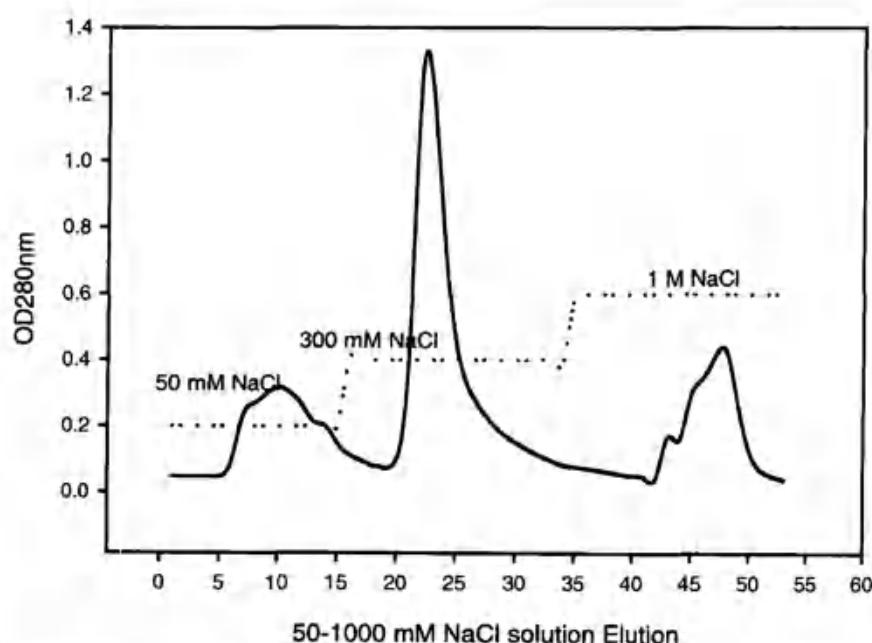


图 3-26 复性 Se-sCD89his 蛋白的 DEAE Sepharose FF 纯化 Se-sCD89 单体在 300 mM NaCl 浓度处被洗脱。

## 五、sCD89 的结晶和晶体结构

sCD89 蛋白质的结晶、衍射数据分析和结构解析在清华大学结构分子生物学实验室完成。

### 1、结晶前的蛋白质溶液

复性得到的蛋白质在结晶前，通过 Superdex G75 纯化：收集经过 DEAE Sepharose FF 纯化的样品并浓缩至 0.5 ml，Superdex G75 凝胶过滤，平衡液为 (25 mM MOPS, 20 mM NaCl, 1 mM β-巯基乙醇, pH7.2)，流速为 1.0 ml/min；蛋白洗脱峰利用截留量大于 10 kDa 的超滤管将蛋白质浓度浓缩至 20-30 mg/ml，进行结晶实验。

但是，已经有晶胞时，可以略过这一步，如：硒代衍生物因为培养较为艰难，而且费用不菲，从 DEAE 柱上收集的 300 mM NaCl/20 mM Tris-HCl 洗脱峰直接离心浓缩，改换至 MOPS 缓冲体系后，用于已含有晶体母体的晶体生长。

### 2、结晶条件

初次结晶条件筛选时，池液采用的是 Crystal Screening Kit I 和 Kit II (Hampton Co.)，共 98 个配方。实验结果是两周后分别在 Crystal Screening Kit I 和 Kit II 的 37 号条件发现有晶体生长。但是，在初筛找到的条件下，晶体生长状态不好，形成孪晶。在优化结晶条件的多种尝试中，池液 (12% PEG8000, 100 mM Hepes pH7.6, 8%(v/v) 乙二醇) 显示出具有使蛋白质形成单晶的趋势。以此作为起始条件，通过改变沉淀剂的浓度、蛋白质溶液的浓度和调节池液的 pH 值，尝试加入一些新的沉淀剂、二价离子 ( $Mg^{2+}$ ) 和 DMSO (抑制孪晶) 等，在池液 (11.4% PEG8000, 50 ml  $MgCl_2$ , 100 mM Hepes pH7.6, 8%(v/v) 乙二醇, 3% DMSO) 条件下得到单晶。

晶体产量并不高，所以将已得到的单晶击碎后作为晶胞加入结晶体系中，从而得到了大量外形很好的小晶体；继而利用小晶体作为成核中心，又得到了可供衍射分析的大单晶。

### 3、硒代衍生物的结晶

硒代衍生物的结晶是从母体的大晶体出发，击碎后作为晶胞加入结晶体

系，一步就得到了可供衍射的大的单晶。

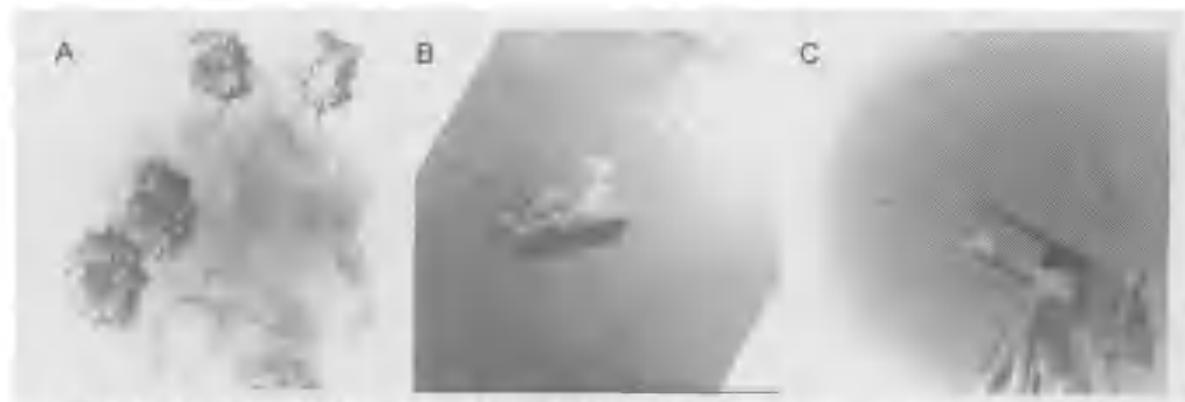


图 3-27 sCD89his 蛋白晶体 A. 最初得到的 sCD89his 蛋白李晶；B. 条件优化得到的 sCD89his 单晶；C. Se-sCD89his 单晶。

#### 4、晶体的衍射和结构解析

得到的 sCD89 单晶在清华大学结构分子生物学实验室的 X 射线衍射仪上收集的数据很好，分辨率最高达到  $1.9 \text{ \AA}$ 。解析结构时，首先以同源性较高的 Fc $\gamma$ RIII 和 LIR-1 胞外区晶体结构作为起始模型，尝试用分子置换法解析 sCD89 的结构。但是，胞外区第一个结构域 EC1 的结构和模型不匹配，尝试只获得了胞外区第二个结构域 EC2 的结构。同时重原子浸泡进行多波长反常反射法求解相位的努力，也因为重原子结合不好而没有成功。

sCD89 多肽链中含有 4 个甲硫氨酸残基 (Met2、Met7、Met40 和 Met69)，我们在培养基中加入 Se 代甲硫氨酸代替甲硫氨酸，并诱导 sCD89 硒代衍生物蛋白的表达。复性的 sCD89 硒代衍生物蛋白进行了晶体生长，对得到的硒代衍生物单晶进行衍射和数据收集处理。由于在重组蛋白中成功地引入了 Se 作为重原子，利用多波长反常反射法 (MAD) 求解，很容易得到了衍射的初始相位。

sCD89 硒代衍生物晶体的衍射是在日本筑波光子工厂同步辐射 BL6A 光源上完成的。收集 sCD89 硒代衍生物晶体的衍射数据时，晶体处于在 100 K 条件下，光源波长分别为 Peak: 0.9798, Edge: 0.9800, Remote: 0.9000  $\text{\AA}$ ，衍射分辨率最高达到  $2.1 \text{ \AA}$  (图 3-28)。从衍射图上可以看到，数据收集时有明显的冰环，所幸并未严重影响数据质量。该晶体属于  $C222_1$  空间群，晶胞参数为  $a=59.0, b=69.4, c=106.3 \text{ \AA}, \alpha=\beta=\gamma=90^\circ$ 。收集的一套 sCD89 硒代衍生物晶体衍射数据统计结果见表 3-3。

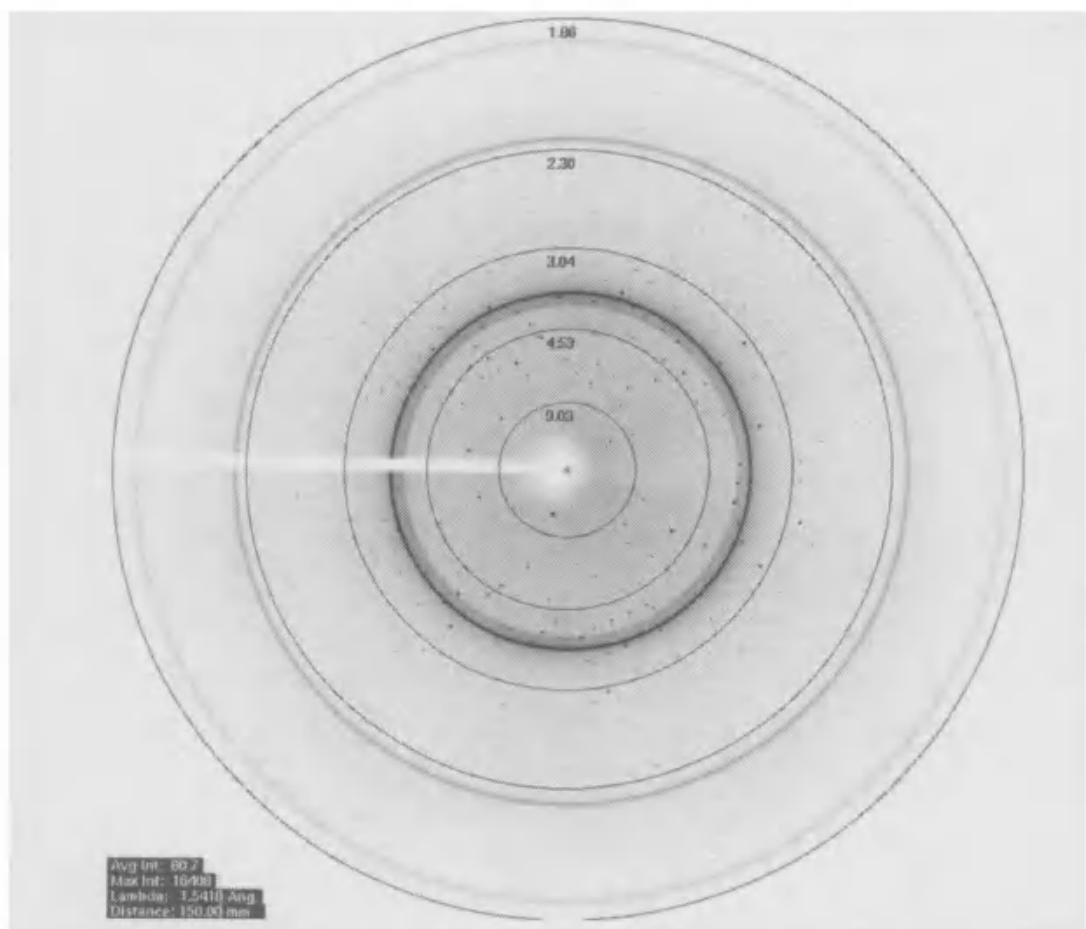


图 3-28 Se-sCD89 晶体衍射图 (Spring-8 上收集, Japan)

表 3-3 Spring-8 上收集的一套 Se-sCD89 晶体衍射数据统计表

	$\lambda 1$ (peak)	$\lambda 2$ (edge)	$\lambda 3$ (remote)
Wavelength (Å)	0.9798	0.9800	0.9000
Resolution range	50-2.1 Å	50-2.1 Å	50-2.1 Å
Completeness (%)	100 (100)	99.9 (99.5)	100 (99.9)
Total Reflections	95646	95900	95489
Unique reflections	13117	13133	13108
Rsym (%)	6.8 (20.7)	5.2 (18.9)	6.1 (23.4)
I/σ(I)	15.9 (7.4)	16.2 (7.7)	15.2 (6.7)
Redundancy	7.3 (7.1)	7.3 (7.1)	7.3 (7.0)
Distance (mm)	150	150	160
f'/f'' (electrons)	-7 / 7	-12 / 2	-1.6 / 3.3

收集 sCD89 硒代衍生物晶体的衍射数据时, 光源的 peak 和 edge 波长较一般硒代晶体衍射时略长, 而 remote 波长短许多, 是考虑到复性时二硫键的氧化过程可能造成 Se 原子形成氧化物的因素。目前所用波长是收集数据时通过实验找到最大吸收边确定的。表中括号内为最高壳层 2.18-2.1 Å 的统计数据。

从得到的 sCD89 硒代衍生物衍射数据出发, 用 SOLVE 软件包确定 Se 原子的位置以及初始相位; 接着利用 RESOLVE 软件包进行密度修饰得到了电子云密度图, 图上除了几个比较活跃的 loop 区和肽链末端表现较差外, 其余部分非常清晰; 随后在 CNS 软件中进行了主链跟踪和模型搭建, 并在  $F_{obs} > 0$  条件下合并了三套数据。

最初用于刚体模型搭建的是 8.0-4.0 Å 之间的数据, 然后逐渐扩展到较高的分辨率。首先统一所有原子的温度因子进行位置修正, 在开始阶段采用分子动力学模拟退火修正, 这种修正可以固定键长和键角, 仅使基团围绕单键旋转。大大减少了所修正的参数量, 提高观测值与参数量的比例; 同时在高温下分子构象运动具有较大的动能, 有利于跨过能量势垒, 跳出局部极小区域, 增大了收敛半径。

结构的修正与模型的手工调整交替进行, 利用 CNS 软件作 Omit Map, 以减少修正偏差。调整过程中, 遇到侧链密度不清楚时, 先暂定为丙氨酸, 等相角修正准确侧链密度表现出来时, 再修改至正确的氨基酸。

在位置修正与结构模型重建调整交替进行几轮之后, R 因子和自由 R 因子基本不再继续下降时, 开始修正原子的温度因子。先修正每个残基主侧链统一的温度因子 B-group, 再修正每个原子单独的温度因子 B-individual。相邻原子之间温度因子差异不可过大, 并与位置修正交替进行, 防止温度因子造成的位置偏差。

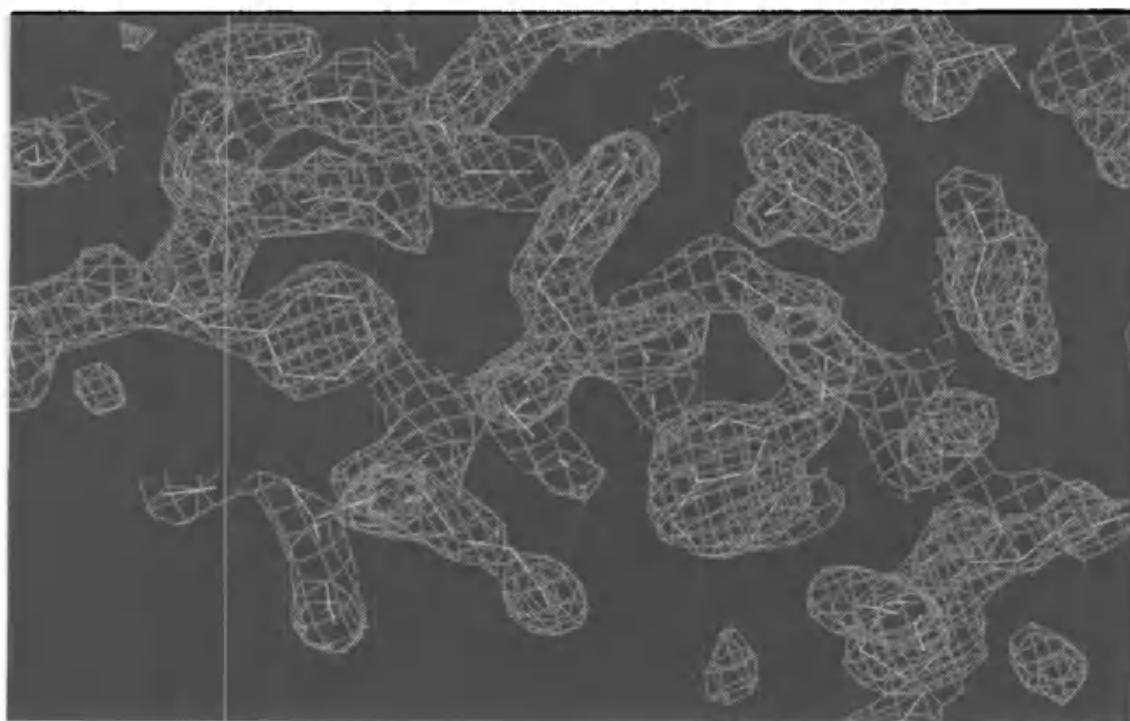
整个结构修正过程中, 始终以 R 因子作为判断指标, 同时检测自由 R 因子的数值, 使之不与 R 因子发生大的偏离。结构中的键长和键角等立体化学数值也要基本与标准值保持一致。几轮修正后, 找到了一些原先看不到的 loop 区和侧链, 最后又添加了 68 个 H<sub>2</sub>O 分子。

最终完成的 sCD89 结构模型中, 每个不对称单位中包含一个 sCD89 分子, 分子由两个免疫球蛋白样结构域组成, 共有 195 个氨基酸残基和 68 个水分子; R 因子为 0.210, 自由 R 因子为 0.239。晶体结构修正的数据见表。该结构坐标已投送 PDB 库, 编号为 IUCT。

由最终模型计算得到的  $2|F_o| - |F_c|$  电子云密度图与模型的主侧链吻合很好 (图 3-29)。最终模型中各键的键长和键角与标准值的均方根偏差分别为

表 3-4 sCD89 晶体结构的修正

RESOLUTION RANGE HIGH (ANGSTROMS)	2.10
RESOLUTION RANGE LOW (ANGSTROMS)	40.00
NUMBER OF REFLECTIONS	21565
R VALUE(WORKING SET)	0.210
FREE R VALUE	0.239
FREE R VALUE TEST SET COUNT	2222
PROTEIN ATOMS	1522
SOLVENT ATOMS	68
RMS DEVIATIONS FROM IDEAL VALUES	
BOND LENGTHS(A)	0.015
BOND ANGLES(DEGREES)	1.80

图 3-29 FcαRI/CD89 最终模型的  $2|F_o| - |F_c|$  图

0.015 Å 和 1.8°。用 PROCHECK 软件对模型进行的立体化学检查表明，大部分残基（142/153，占 92.5%）的二面角落在了最适宜的区域中，少量残基（10 个，占 6.29%）的二面角落在了额外允许区域，落在一般允许区域的仅 His130，而不允许区域仅 Asn45。Asn45 和 His130 处于整个免疫球蛋白折叠的 loop 区域，结构柔性较强，所以整个模型中二面角的安排和立体构象比较合理（图 3-30）。

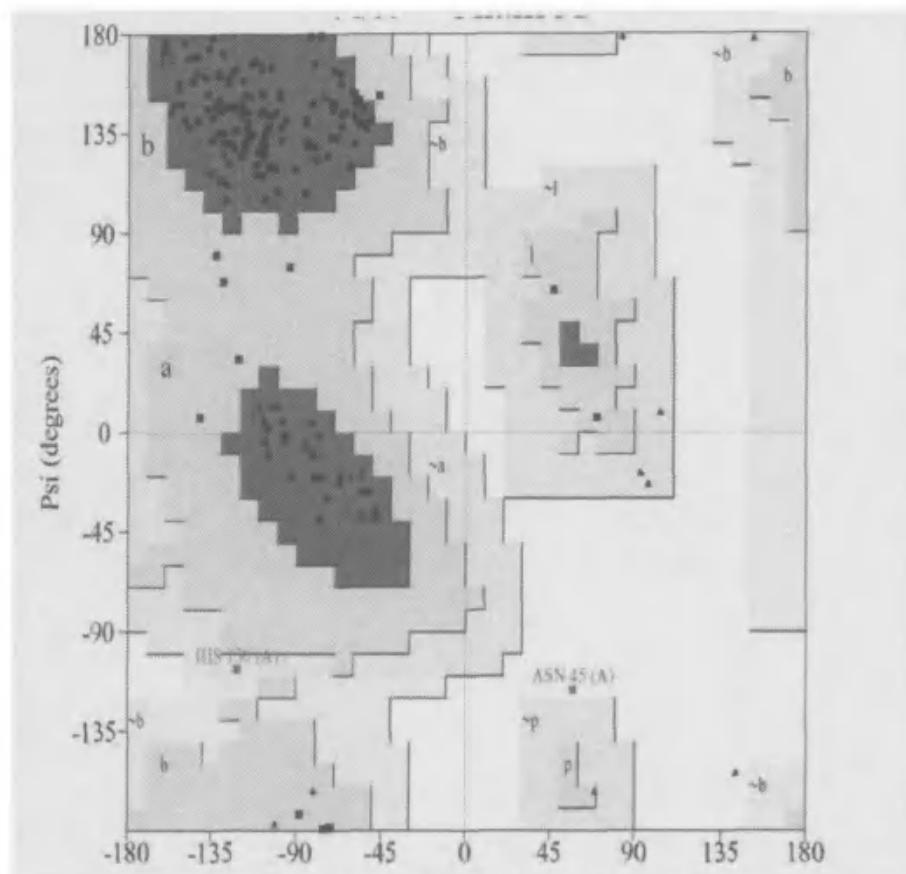


图 3-30 sCD89 结构模型中的二面角分布

从温度因子的分布来看，侧链的温度因子比主链高，处于 loop 区的氨基酸残基的温度因子比处于 $\beta$ 折叠和 $\alpha$ 螺旋内部的氨基酸残基的高，位于分子表面的氨基酸残基的温度因子比位于分子内部的氨基酸残基的高，因此温度因子的分布基本合理（图 3-31）。

CD89主侧链温度因子分布图

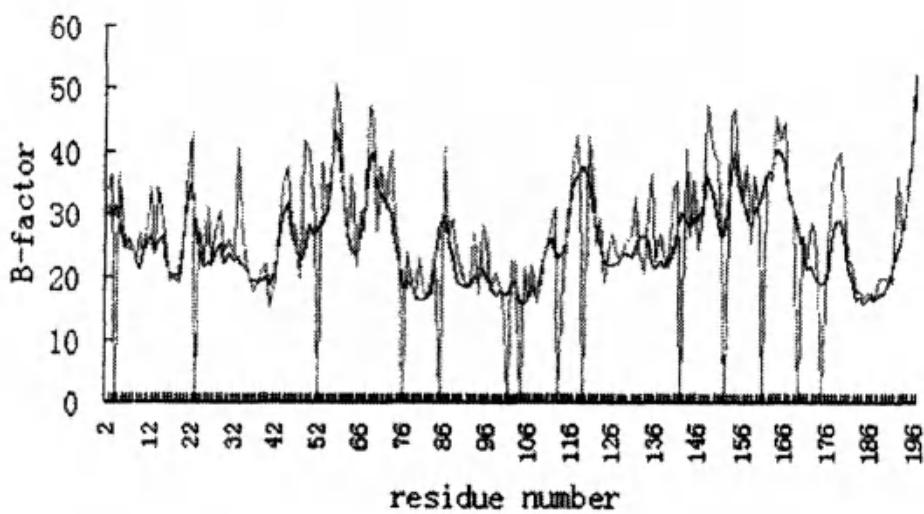
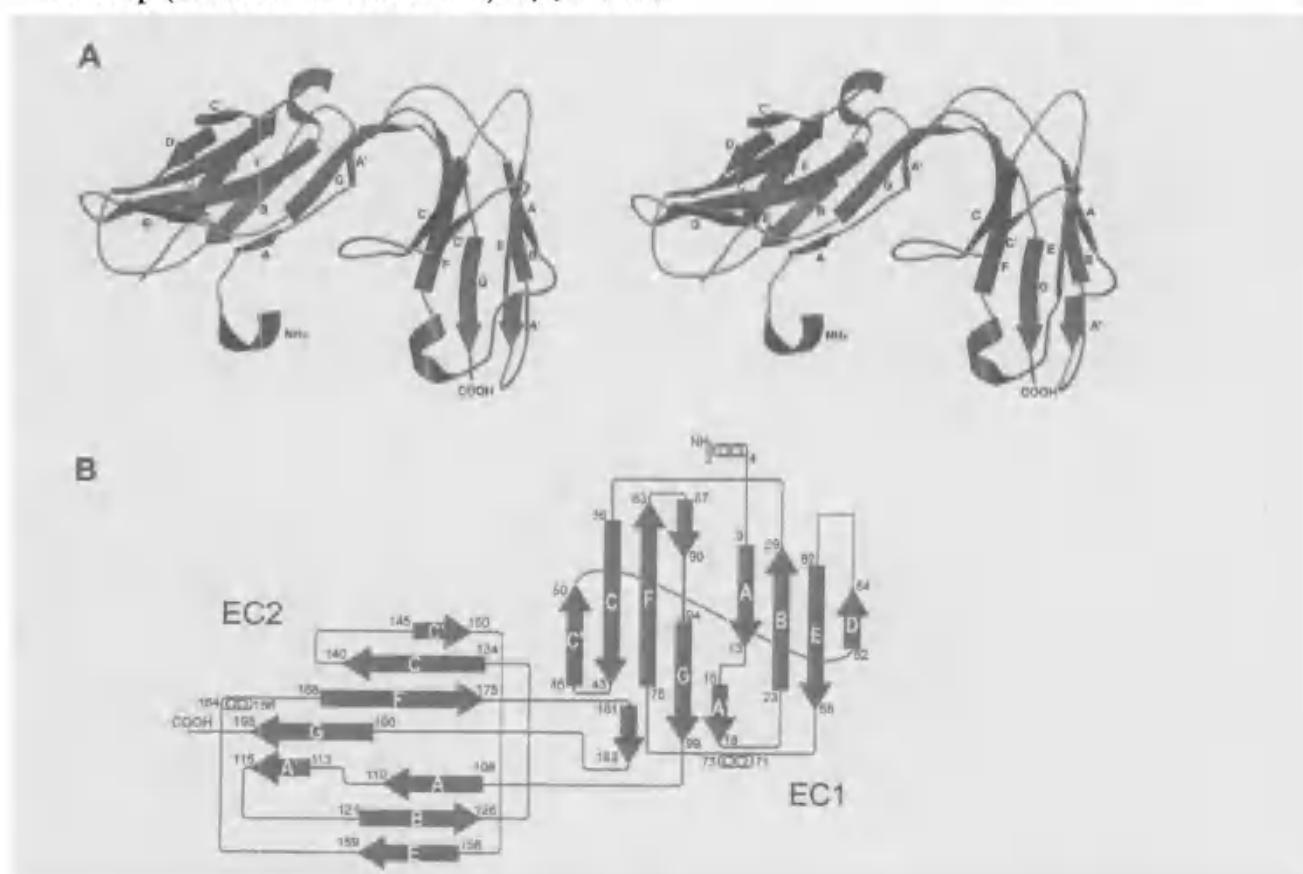


图 3-31 sCD89 结构模型中主侧链的温度因子分布

## 5、sCD89 的晶体结构

sCD89 的大体结构体现出典型的肘型（或心型）结构特征，两个免疫球蛋白样结构域 EC1 (Gln1 至 Gly100) 和 EC2 (Pro105 至 His199) 之间由一个短的铰链区 (Leu101 至 Lys104) 相连。EC1 和 EC2 的免疫球蛋白折叠结构都是由多条 $\beta$ -折叠链相对包裹形成两个平行的 $\beta$ -折叠片构成，片层之间由分别位于 $\beta$ -折叠链 B 和 F 上保守的半胱氨酸残基相互形成二硫键而连系， $\beta$ -折叠链的排列模式类似于 KIR 分子。在整个 sCD89 结构中，还存在 3 个  $3_{10}$  helix，分别位于 EC1 的 N 端 (Glu2Pro3Asp4)、EF loop (Ala71Asn72Lys73) 和 EC2 的 EF loop (Leu164Asn165Val166) (图 3-32)。



**图 3-32 CD89 胞外区的晶体结构 A.** CD89 胞外区晶体结构的立体显示，整个分子由两个 Ig 折叠结构域构成，结构域之间形成肘型结构，夹角为  $85^\circ$ ，CD89 分子中主要折叠类型为 $\beta$ -折叠（紫色条带，箭头指示 $\beta$ -折叠的走向），折叠链之间以转角或卷曲（橙色）连接，另外还存在 3 个  $3_{10}$  螺旋结构（红色）；B. CD89 胞外区的拓扑折叠模式，两个结构域的第一个 $\beta$ -折叠链 A 均不连续，分别与两个 $\beta$ -折叠片层形成互补配对，EC1 区还有一条很短的 $\beta$ -折叠链 D，这条 $\beta$ -折叠链在 EC2 中不存在；EC2 中 FG loop 区的一部分伸向 EC1 结构域，并与 EC1 结构域中的 $\beta$ -折叠链 G 之间形成了氢键的互补配对。

EC1 结构域中， $\beta$ -折叠链 A、B、E 和 D 平行排列在一个片层上，另一个片层由 $\beta$ -折叠链 C'、C、F、G 和 A' 构成，其中 $\beta$ -折叠链 G 中间存在一个称为

$\beta$ -bugle 的结构 (Ser91 至 Thr93)，将完整的 $\beta$ -折叠链 G 分割成为不连续的两部分：EC2 结构域比 EC1 要少一个 $\beta$ -折叠链，EC1 结构域中短小的 $\beta$ -折叠链 D 在 EC2 中不存在，EC2 的两个 $\beta$ -折叠片分别由 $\beta$ -折叠链 A、B、E 和 C'、C、F、G、A' 构成，FG loop 上的 3 个氨基酸残基 Tyr181、Leu102 和 Trp183 从 EC2 结构中向外伸出，并与 EC1 结构域和铰链区中氨基酸残基相互作用：Tyr181 和 Trp183 与 Val98 之间形成氢键，Tyr181 侧链上的 OH 基团与 Glu95 之间也形成一个氢键，另外，Trp183 还与 Gly100 以及 Leu101 之间形成氢键。

EC1 结构域和 EC2 结构域之间的夹角约为  $85^\circ$ ，相互包裹的面积达到  $1134 \text{ \AA}^2$ 。在两个结构域之间相互作用的绝大部分氨基酸残基的侧链是疏水性的，因而在两个结构域之间形成了一个疏水核心结构，这其中参与作用的氨基酸残基有 12 个：EC1 结构域 $\beta$ -折叠链 A' 上的 Val17、EF loop 上的 Ala74 和 Gly75、 $\beta$ -折叠链 G 上的 Val97、Val98、Thr99 和 Gly100、铰链区上的 Leu101 和 Tyr102、EC2 结构域 $\beta$ -折叠链 F 上的 Tyr173、FG loop 上的 Tyr181 和 Trp183，疏水核心在 sCD89 的结构中起着稳定两个结构域之间夹角的作用。在这 12 个氨基酸残基中，对疏水核心贡献最多的是 Val17、Tyr97、Tyr173、Tyr181 和 Trp183 这 5 个氨基酸残基的侧链，而 Trp183 侧链中的具有强烈疏水倾向的咪唑环在其中占的空间最大（图 3-33）。在两个结构域之间还发现存在一些氢键：Glu95

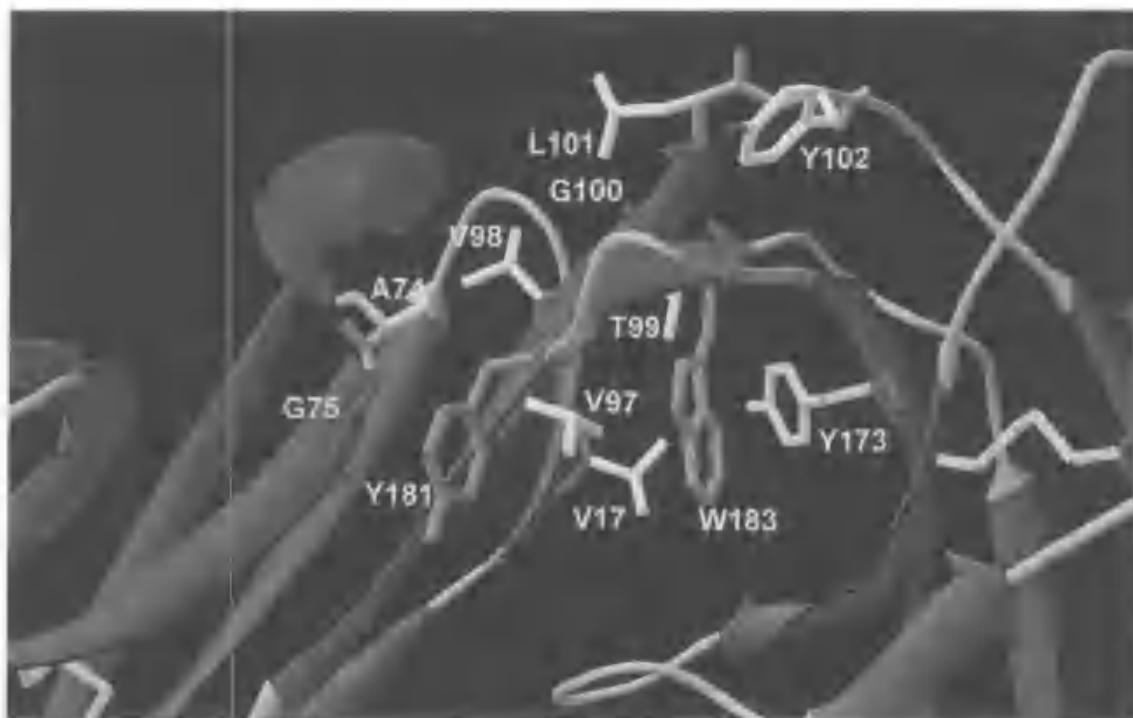
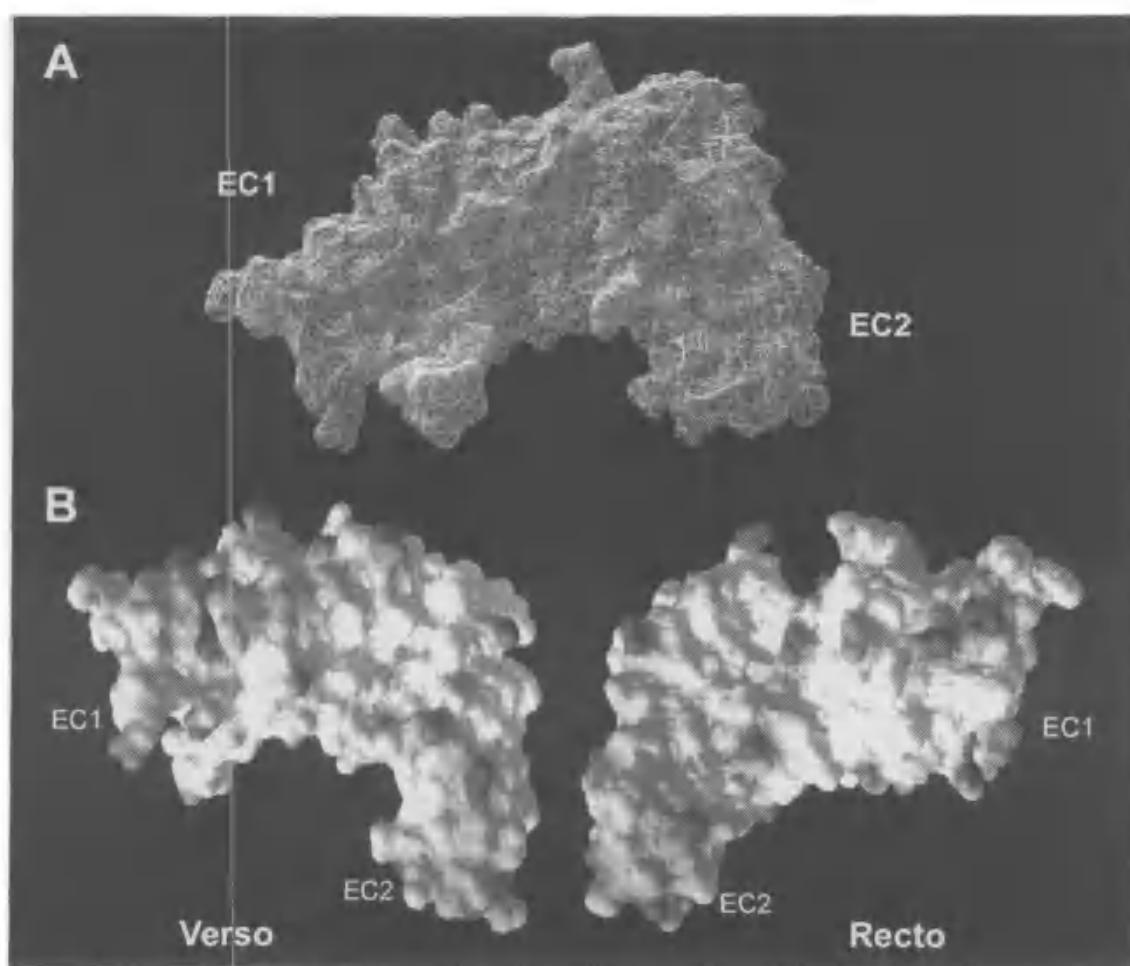


图 3-33 CD89 结构域之间的疏水核心结构 在 CD89 肘型结构的夹角中，存在大量的疏水性氨基酸残基，这些氨基酸残基的侧链相互聚集形成一个疏水核心结构，使夹角得以稳定维持；参与疏水核心结构的氨基酸残基在整个 LRC 区域的多个受体家族中都非常保守。

的 Oε 和 Tyr181 的 OH、Val98 的 N 和 Tyr181 的 O、Val98 的 O 和 Trp183 的 N 以及 Gly100 的 N 和 Trp183 的 O。

CD89 胞外区的分子表面多数由亲水性氨基酸侧链组成，分布有大量的电荷。EC1 和 EC2 结构域表面电荷分布呈现较大差异，多数侧链呈酸性的氨基酸残基集中于 EC2 结构域的近膜部分，使 EC2 结构域的表面带有强烈的正电荷，有利于同带负电荷的质膜双分子层相互作用；而 EC1 结构域表面散布有少数负电荷基团，正电荷极少，尤其可能结合配体 IgA 的部位，几乎没有强烈的电荷存在，说明电荷相互作用可能不是 CD89 同 IgA 结合的主要作用力，Tyr 等疏水性氨基酸残基侧链提供的疏水作用力可能在结合中占据主导（图 3-34）。



**图 3-34 CD89 胞外区的分子表面** A. CD89 胞外区的分子表面（网格），网格内部为 CD89 分子结构的带状图，红色部分代表 $\beta$ -折叠链，其它折叠类型均表示为橙色；B. CD89 胞外区分子表面的电荷分布（正、反），EC1 和 EC2 两个结构域表面的电荷分布具有明显差异，近膜端的 EC2 结构域表面集中了大量的正电荷（红色），而负电荷（蓝色）则散在分布于 EC1 结构域表面，EC1 结构域远膜端（点突变提示的同 IgA 结合的区域）表面有散在分布的少数负电荷和正电荷，主要的结合部位是不带任何电荷的中性区域，提示极性作用在 CD89 同 IgA 的结合中不是主导作用力。

## 六、IgA Fc 的制备

### 1、IgA1 的分离纯化

来自 20 ml 健康人静脉血的血浆，用 60% 饱和硫酸铵沉淀后，加水溶解至 2-3 ml 体积，上样至 Sepharose 6B (100/20) 凝胶过滤，检测洗脱峰(图 3-35)，收集对应于 IgA 单体的洗脱峰，用 anti-IgA 单克隆抗体亲和柱层析 (Ab6c9-linked Sepharose 4B) 纯化得到 IgA (含 IgA1 和 IgA2)；亲和柱层析得到的 IgA 洗脱峰，通过 ProsepG 吸附掉可能从 Ab6c9-linked Sepharose 4B 上脱落的 IgG 成分，流出液接着上样至 1 ml Jacalin 亲和介质，穿柱峰中含有 IgA2，Jacalin 上结合的 IgA1 用 0.8 M D-Galactose/PBS 洗脱 (图 3-36)。

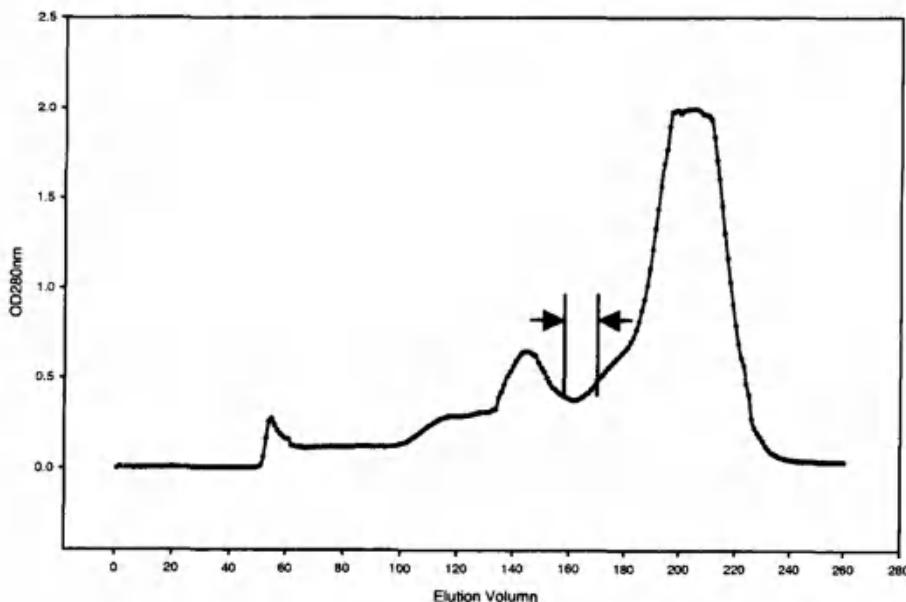
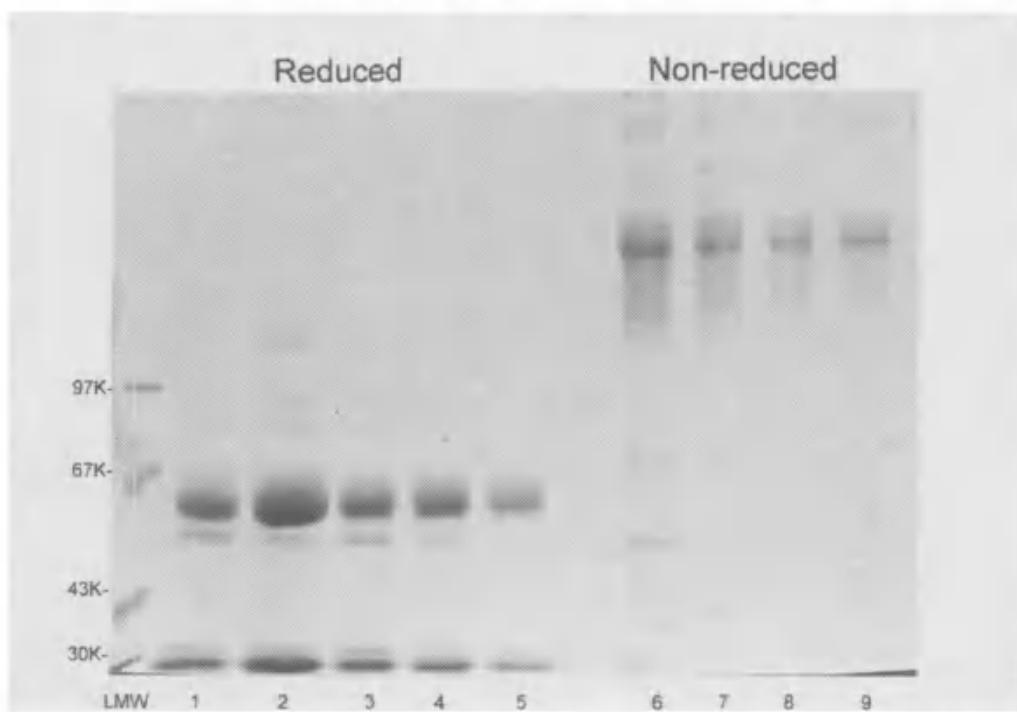


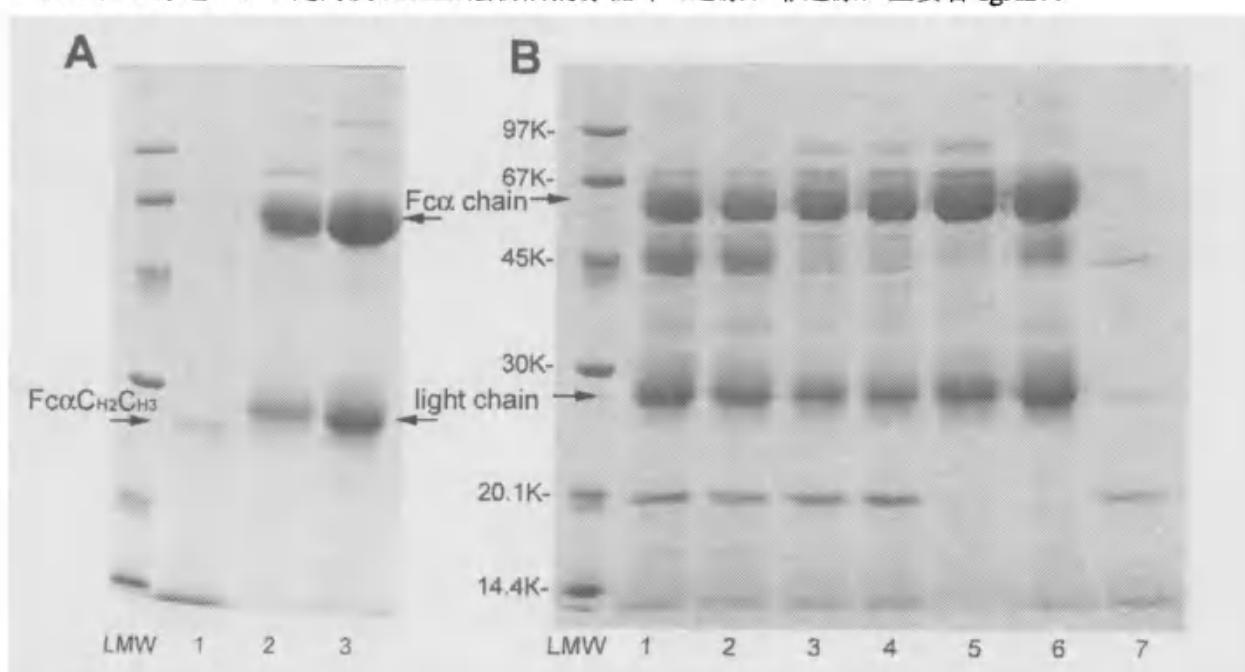
图 3-35 人外周血 IgA 的凝胶过滤 ELISA 和 SDS-PAGE 检测表明含有 IgA 单体的洗脱峰位于图中箭头之间。

### 2、IgA1 的酶切

将含有 IgA1、IgA2 的纯化峰分别合并，对 PBS 透析，并浓缩至 1 mg/ml。走 SDS-PAGE 检测纯度，目的蛋白纯度高于 90% (图 3-37A)。用提取的 IgA1 protease 粗制品对 IgA1 进行酶切，同时以 IgA2 作为对照，酶切反应时间为 8 小时和 16 小时。SDS-PAGE 检测酶切效果，未发现 IgA1 protease 粗制品对 IgA1 或 IgA2 的酶切活性 (图 3-37B)。



**图 3-36 Jacalin 纯化 IgA1 和 IgA2** 池道 1 和 6 分别是还原和非还原的 Jacalin 上样前蛋白样品（anti-IgA 单克隆抗体亲和柱层析 Ab6c9-linked Sepharose 4B 纯化得到的 IgA，含 IgA1 和 IgA2），池道 2 和 7 分别是还原和非还原的经 Jacalin 纯化的 IgA1，池道 3 是 Jacalin 层析的穿柱峰，池道 4 和 8 是第一次 Jacalin 层析的穿柱峰再次经过 Jacalin 纯化得到的 IgA1（还原、非还原），池道 5 和 9 是两次 Jacalin 层析后的穿柱峰（还原、非还原，主要含 IgA2）。



**图 3-37 IgA1 的酶切** A. 池道 1 为原核表达的 IgA1 重链 CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 肽段 ( $\text{Fc}\alpha\text{CH}_2\text{CH}_3$ )，分子量约 22.9 kDa，由于不含 IgA1 的尾部肽段，所以应比切割得到的 IgA1 Fc 分子量稍小一些；池道 2 和 3 分别是纯化得到的 IgA2 和 IgA1，箭头所指为 IgA 的重链和轻链；B. 池道 1、2 分别为酶切 8 小时和 16 小时的 IgA1，池道 3、4 分别为酶切 8 小时和 16 小时的 IgA2，池道 5、6 是作为空白对照的 IgA2 和 IgA1（未加 IgA1 protease），池道 7 是 IgA protease 粗制品；和 IgA2 和空白对照相比，酶切 8 小时和 16 小时的 IgA1 样品重链部分没有明显的变化，酶切目的条带 ( $\text{Fc}\alpha$ ) 的目标区域未出现新增条带或与原有条带重合而的增强原有条带。

## 七、Fc $\alpha$ 的克隆和表达

### 1、Fc $\alpha$ 的克隆和表达

分别从 IgA1 重链基因上扩增得到 Fc $\alpha$  的 CH2 和 CH3 外显子序列，利用大片段重叠的方法将 CH2 和 CH3 序列连接成为 Fc $\alpha$  的表达序列，编码氨基酸与 IgA1 天然蛋白的 CH2CH3 部分完全一致。Fc $\alpha$  的表达序列被连接至 pET-30a(+)（NdeI 和 XhoI 插入，表达非融合蛋白），在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行了表达。目的蛋白的分子量约 22.9 kDa，等电点为 7.19，IPTG 诱导后在相应位置出现了目的表达条带，重组蛋白集中于胞质中形成包涵体（图 3-38）。

### 2、IgA Fc (Fc $\alpha$ ) CH2CH3 包涵体的重折叠

Fc $\alpha$ CH2CH3 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中的表达量非常高，经过粗纯化后，包涵体的纯度已高于 95%（图 3-13），可直接用于复性实验。

在粗纯化的包涵体蛋白中加入 Unfolding buffer (6 M GuHCl, 20 mM Tris-HCl, pH8.0) 溶解沉淀，使包涵体蛋白去折叠，室温静置 1 小时，12,000×g 离心 15 分钟，弃去沉淀，用 Bradford 法测定蛋白质浓度，然后加入 DTT 至终浓度 5 mM，室温静置 6 小时或 4℃过夜。复性前，用 Unfolding buffer 将蛋白浓度调至 10 mg/ml。

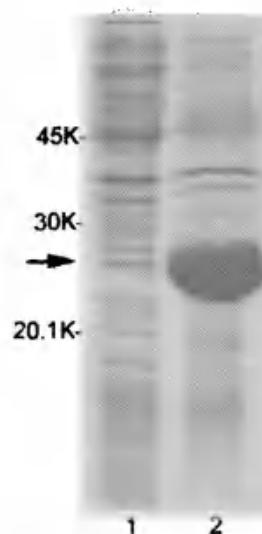


图 3-38 Fc $\alpha$ 的原核表达 池道 1 和 2 分别是 IPTG 诱导后菌体的裂解上清和沉淀，泳道 2 在 20-30 kDa 之间出现了明显的诱导表达蛋白聚集，分子量与预期吻合。

按照类似“2.3、sCD89包涵体蛋白在盐酸胍复性液中的重折叠”的方法，确定  $\text{Fc}\alpha\text{CH}_2\text{CH}_3$  重组蛋白在 GuHCl 溶液中的折叠中点，实验中测得的折叠中点约为 0.8 M GuHCl。

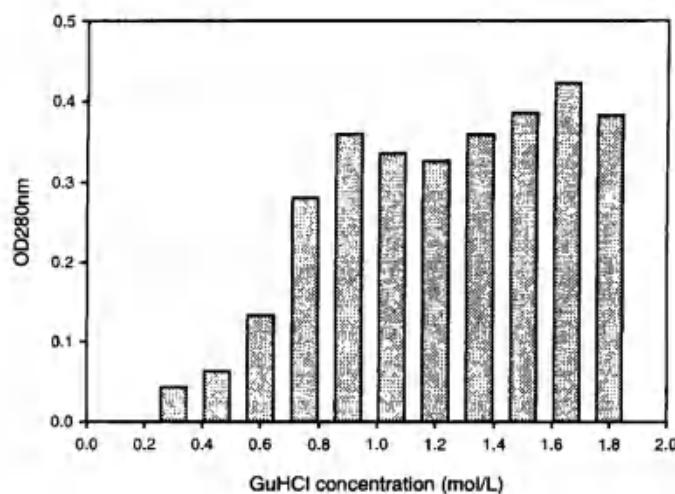


图 3-39  $\text{Fc}\alpha\text{CH}_2\text{CH}_3$  在 GuHCl 中的重折叠

以确定的折叠中点变性剂浓度配制 Refolding buffer (0.8 M GuHCl, 50mM Tris-HCl, 2.5mM GSH and 0.5mM GSSG, pH8.0), 4℃预冷；将 40 mg 去折叠的包涵体蛋白以 0.1ml/hr 速度缓慢加入 350 ml 4℃预冷的 Refolding buffer 中，磁力搅拌器不断搅拌，使滴入 Refolding buffer 的蛋白溶液迅速稀释，4℃继续搅拌 3-5 天，至溶液中游离巯基浓度低于 1 mM (Ellman 法检测)。

重折叠后的蛋白溶液转入透析带中（截留量大于 12 kDa），对 2,000 ml 4 ℃预冷透析液 (20mM Tris-HCl, pH8.0) 透析，以除去 GuHCl。每 4 小时换液，约两天透析完毕。透析后以 Beckman JA-14 转头 4℃ 5,000×g 离心 10 分钟除去沉淀。离心后的上清再用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤 2 次，进一步除去沉淀。

$\text{Fc}\alpha$  在 pH8.0 条件下带负电荷，使用阴离子交换树脂 DEAE Sepharose Fast Flow 浓缩并纯化。取透析完毕的样品，0.22 μm 过滤后，上预先已用 20 mM Tris-HCl (pH8.0) 平衡的 DEAE Sepharose Fast Flow，流速 0.5 ml/min，洗脱采取 NaCl 梯度洗脱，收集 300 mM NaCl/20 mM Tris-HCl (pH8.0) 洗脱峰（图 3-40）。SDS-PAGE 检测洗脱峰中目的蛋白的纯度（图 3-41）。

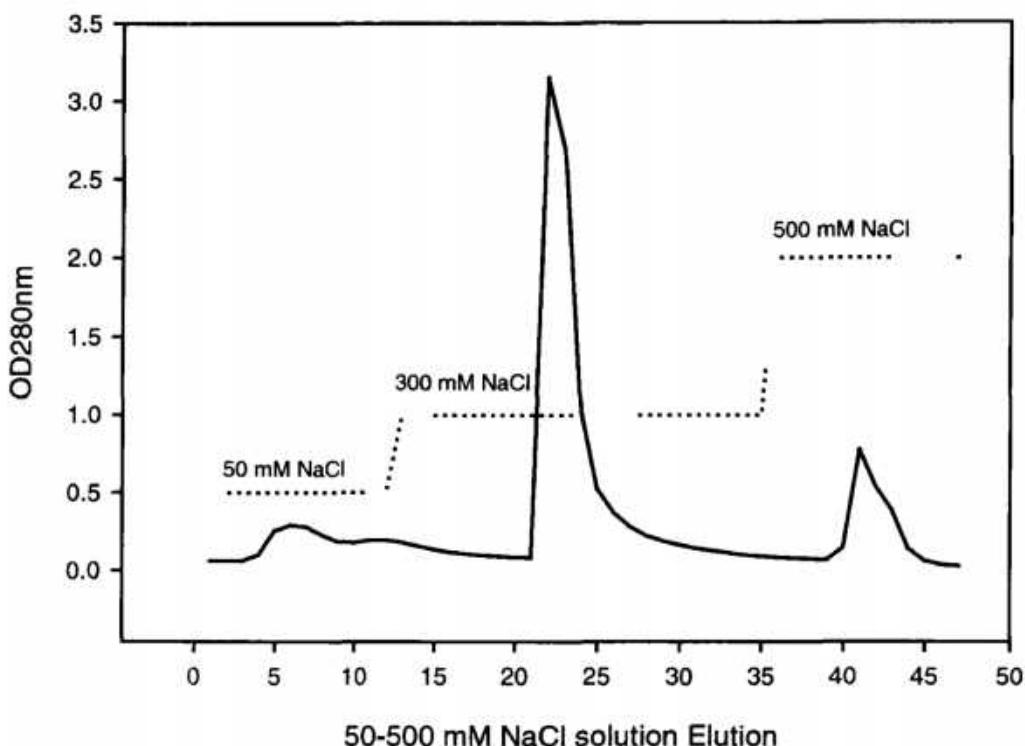


图 3-40 重折叠 Fc $\alpha$ 蛋白的 DEAE Sepharose FF 层析

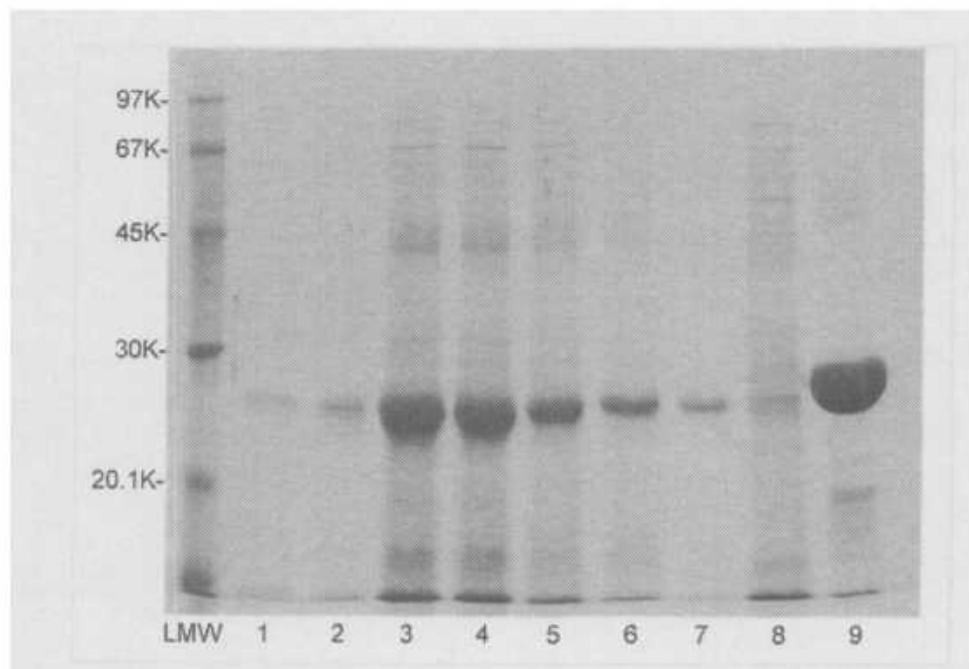


图 3-41 复性的 Fc $\alpha$ CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 洗道 1-7 为 DEAE sepharose FF 在 300 mM NaCl 下的洗脱峰，洗道 8 和 9 为 Fc $\alpha$ CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> 在原核中表达的菌体裂解上清和沉淀。

## 第四章 讨论

### 一、功能 CD89 的制备和纯化

CD89 (也被称为 Fc $\alpha$ RI a.1) 是由 Fc $\alpha$ RI 基因编码的全长野生型受体，多肽链由 287 氨基酸残基组成，其中前 21 个氨基酸残基组成了一个疏水性前导肽，成熟时在 21 位的丙氨酸残基和 22 位的谷氨酰胺残基之间被切开，形成成熟的含有 266 个氨基酸残基的跨膜糖蛋白。CD89 受体属于 I 型跨膜受体，N 端在胞外，C 端在胞内。CD89 受体胞外区含 206 个氨基酸残基，由两个 Ig 样结构域 EC1 和 EC2 和近膜的茎部组成，CD89 胞外区也是 CD89 受体与 IgA 相互作用的部分。在结构得到解析前，本论文中将成熟肽链第 1 位谷氨酰胺残基(Gln1)开始至 98 位苏氨酸残基(Thr98)的部分称为 EC1 区，其中包含部分铰链区；将从 99 位甘氨酸残基(Gly99)开始至 206 位天冬酰胺残基(Asn206)的部分称为 EC2 区，其中包括部分铰链区和连接至膜表面的茎部，另外构建重组克隆时在 EC2 区末端还包括两个可能属于跨膜区的氨基酸残基 Leu207 和 Ile208 (图 4-1)。

CD89 受体胞外区分别被亚克隆至原核表达载体 pET-28a(+)、pET-42a(+)、pGEX-4T-1、pHEN2 和杆状病毒表达载体 pAcHLT-Nat，在 *E. coli* 或昆虫细胞中进行表达，以尝试实现高效表达和获取具有活性形式 sCD89 重组蛋白。由于前导肽的序列是根据推测判定的，所以在部分重组克隆中含有这部分序列。

在尝试进行非融合表达时，编码 CD89 胞外区的序列从 NcoI 位点被插入到原核表达载体 pET-28a(+)中，构建了 Nco-pET28a 和 Nco20-pET28a 两个重组克隆。这两个重组质粒在 *E. coli* 菌株 BL21 (DE3) 中诱导表达时，重组蛋白集聚于胞质中，并形成不溶性包涵体。

GST 蛋白融合在重组蛋白 N 端时，通常对后面临段的正确折叠具有一定的促进作用。为此实验中选取了 pET-42a(+)和 pGEX-4T-1 两个可以表达 N 端 GST 融合蛋白的原核表达载体，分别构建 Nco-pET42a、Nco20-pET42a 和 Bam21-pGEX 重组克隆。由于这两个表达载体使用的启动子不同 (T7 promoter 和 tac promoter)，所以也可以尝试不同表达速度下 GST 融合蛋白的折叠情况。

T7 promoter primer	HindIII	KpnI	BamHI
1 AATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAAGCTTGGTACCGAGCTGGATCCACTAGTAACGGCCGCAAGTGT			
EcoRI	<u>sEcoI&gt;</u>		
21 GCTGGAATTCTGCAGATTCAAGCACGATGGACCCCCAACAGACCACCCCTCTGTCTTGCTCTGTCTG	1P M D P K Q T L L C L V L C L		
	<u>sBamHI&gt;</u>		
	EC1 →		
	<u>sMscI&gt;</u>		
141 GGCCAGAGGATTCAAGGCACAGGAAGGGACTTTCCATGCCCTTCATATCTGCCAAATCGAGTCCTGTGA			
151 G O R I Q A Q E G D F P M P F I S A K S S P V			
181 TTCCCTTGGATGGATCTGTGAAAATCCAGTGCAGGCCATTCTGTGAAGCTTACCTGACCCAGCTGATGAT			
211 I P L D G S V K I Q C D A I R E A Y L T Q L M I			
	<u>&lt;P6 P8&gt;</u>	▼ ▼	
241 CATAAAAAACTCACGTACCGAGAGATAGGCAGAAGACTGAAGTTTGGAAATGAGACTGATCCTGAGTC			
251 I K N S T Y R E I G R R L K F W N N E T D P E F			
	P9>	P11>	P10>
281 GTCATTTGACCACATGGACGCCAAACAAGGCAGGGCGCTATCAGTGCCTAACATAGGATAGGGCACTACAGAT			
301 V I D H M D A N K A G R Y Q C Q Y R I G H Y R			
	<u>&lt;P3&gt;</u>		
	EC2 →		
	<u>&lt;P1t&gt;</u>	← EC1      P7>	
321 TCCGGTACAGTGACACCCCTGGAGCTGGTAGTGACAGGGCTTGTATGCCAAACCCCTCCCTCTGCAGATCG			
331 F R Y S D T L E L V V T G L Y G K P F L S A D R			
361 GGGTCTGGTGTGATGCCAGGAGAGAAATATTCCTCACGTGCAGCTCAGCACACATCCCATTGATAGA			
391 G L V L M P G E N I S L T C S S A H I P F D R			
421 TTTTCACTGGCCAACGGAGGGAGAACTTTCTCTGCCACAGCACCAAAGTGGGGAACACCCGGCCAACCTCT			
451 F S L A K E G E L S L P Q H Q S G E H P A N F			
481 CTTTGGGTCTGTGGACCTCAATGTCTCAGGGATCTACAGGTGTACCGGTGGTACAACAGGAGCCCCCTA			
511 S L G P V D L N V S G I Y R C Y G W Y N R S P Y			
541 CCTGTGGTCTTCCCCAGTAATGCCTGGAGCTTGTGGTCACAGACTCCATCCACCAAGATTACACGGACG			
571 L W S F P S N A L E L V V T D S I H Q D Y T T			
	← EC2      <GAGCTCTG--exobis>	XbaI	XbaI
601 CAGAACTTGATCTAAATGATCCATCACACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTAT			
621 Q N L I			
	<u>&lt;3PE_promotor_primer&gt;</u>		
651 AGTGTACCTAAATG			

**图 4-1 CD89 胞外区 cDNA 克隆 clone4 的序列结构** CD89 胞外区全长 cDNA（包括前导肽编码序列）在 EcoRV 位点被克隆进入 pcDNA3 载体构成重组克隆 clone4。CD89 胞外区全长 227 个氨基酸残基，其中前 21 个氨基酸残基主要由疏水性氨基酸组成，预测为 CD89 的前导肽；成熟肽链从 22 位谷氨酰胺残基开始，至 98 位苏氨酸残基为 EC1 结构域（和部分铰链区），99 位甘氨酸残基至 207 位天冬酰胺残基为 EC2 结构域（包括部分铰链区和连接至膜表面的茎部）。CD89 胞外区有六个可能发生 N-糖苷化修饰的位点 N65、N79、N141、N177、N186 和 N198 和多个可能产生 O-糖基化的位点。各 PCR 引物的起始位点和方向示意如图。向下箭头示意的 73、72 位连续的两个精氨酸残基，其密码子在 *E. coli* 中罕用。

这三个重组质粒在 *E. coli* 菌株 BL21 (DE3) 中诱导表达时, N 端融合 GST 的 CD89 胞外区肽段仍然得不到正确折叠, 绝大部分重组蛋白在菌体中形成包涵体沉淀, 但是 SDS-PAGE 检测中也能在裂解后的上清中见到少许重组蛋白条带, 并且在低温、低 IPTG 浓度诱导条件下裂解上清中重组蛋白浓度有所增加。GST Fusion Protein Purification Kit 和 MIP68b Sepharose 4B 两种分别针对 GST 或 CD89 分子的亲和层析被用于纯化裂解上清中的重组蛋白, 但是纯化到的重组蛋白量非常低, 而且增加培养体积也不能增加纯化到的重组蛋白的含量和

纯度。Native PAGE 和 ELISA 证实存在于裂解上清中的重组蛋白大多为多聚体，不能有效结合多数 CD89 的单克隆抗体。

重组克隆 Nco20-pET28ahis 表达的融合蛋白在 CD89 胞外区 C 端引入 His<sub>6</sub>-tag，以方便纯化；同时因为 C 末端引入 His-tag 通常不会对重组蛋白的折叠产生影响，此融合蛋白也被用于蛋白质的复性和结晶研究。C 端融合有 His<sub>6</sub>-tag 的 CD89 重组蛋白仍旧表达于胞质中并形成不溶性包涵体。

考虑到 CD89 分子胞外区预测存在两个 Ig 样折叠结构域，其中各含有一对二硫键，而细菌胞质中相对处于高还原态，氧化还原态势不利于肽链中二硫键的正确形成。因此实验中也设计利用 *peiB* 等引导肽将重组蛋白重新定位到周质或胞外培养基中进行折叠，以提高表达产物中正确折叠多肽链的比例。Phagemid pHEN2 曾被用于抗体 scFv 文库的构建，有过成功表达 Ig 样蛋白的先例。在实验中，CD89 胞外区全长（开放阅读框末尾含 TAA 终止密码子）从 *NcoI* 和 *XbaI* 位点被连入 pHEN2 载体，并按照抗体 scFv 文库的表达条件进行诱导表达。结果在诱导表达结束后的培养基、菌体周质和菌体裂解上清中均未发现目标重组蛋白的存在（western blot 和双抗夹心实验阴性），但是在菌体裂解后的不溶性包涵体部分存在大量目标重组蛋白。提示在多肽链的正确折叠方面，CD89 的胞外区 Ig 结构域和抗体 scFv 中的 Ig 结构域可能存在较大的差别。

为了获取具有天然构象的重组蛋白用于结构研究，实验中选取了另一种表达体系——杆状病毒昆虫表达系统。昆虫细胞由于具备辅助蛋白质折叠的机制，在表达人或者其它真核生物的基因方面具有原核表达系统不能比拟的优势。尤其因为在昆虫细胞中表达的糖蛋白糖链分支少、结构简单，近年来已较多地应用于结构生物学的研究中。编码成熟 CD89 受体膜外区的 DNA 序列被插入到 pAcHLT-Nat 载体中，重组质粒经过 PEG 纯化和玻璃奶纯化，与缺陷病毒 DNA 共转染 Sf9 细胞。得到的感染上清滴度较低，经过两轮病毒滴度扩增后，用得到的高低度病毒感染上清再次感染细胞，从感染细胞中检测到了 sCD89 的表达。SDS-PAGE 显示，昆虫细胞表达的 sCD89 重组蛋白和细菌中表达的 sCD89 重组蛋白分子量基本相同，说明前者的糖基化程度并不高。

CD89 受体胞外区在原核细胞中难以实现有活性的可溶性表达，使得我们的视线转移到了杆状病毒昆虫表达系统。而 sCD89 确实在昆虫细胞中得到了表达，显示出良好的前景，我们正在完善条件进行昆虫细胞的大规模培养。本

实验中最终获得的具有天然结构和活性的重组 sCD89 蛋白，却是从结构学研究中常用的另一种方法——蛋白质重折叠实验中得到的。

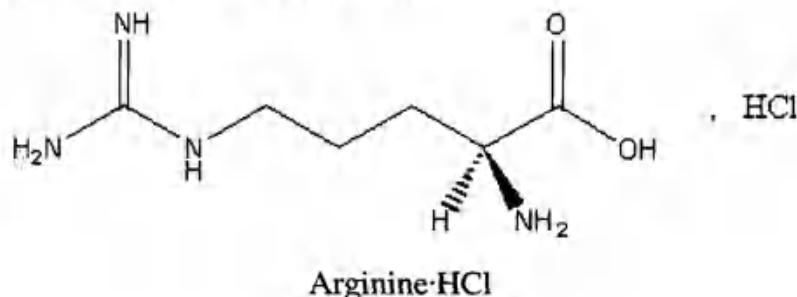
蛋白质纯化和重折叠的起始点都是蛋白质的表达量，表达量越高，纯化就越简单；而纯化时间与蛋白质的半衰期之间的比值，则是关系结晶能否成功的关键因素之一。在实验中很偶然发现编码成熟肽链中 Arg50 和 Arg51 的两个连续 AGA 密码子对整个 sCD89 的表达量有影响，做了相应的同义突变以后，果然提高了整个 sCD89 的表达水平。表达量增加对整个实验的促进是明显的，从丰富营养培养基中收获的包涵体洗涤后，已经不必再做任何纯化，其纯度已经高于 95%。

蛋白质进行重折叠前需要将原来包涵体蛋白中各种复杂的链间、链内二硫键全部还原，并且让肽链完全伸展。实验中利用 DTT 还原包涵体中的二硫键，是因为 DTT 氧化后自身环化，不会与反应体系中其它物质结合，而另一种常用还原剂  $\beta$ -巯基乙醇氧化后有可能与肽链上的巯基形成二硫键，从而可能对肽链构象产生影响，形成人为误差。同样，实验初期利用 Urea 作为变性剂解离包涵体内部各种非共价相互作用，也因为 Urea 易于降解形成自由基攻击肽链上的基团，而改用非常稳定的 GuHCl 作为变性剂。

蛋白质重折叠的策略有很多[115-117]，但原理基本相同：变性液中的多肽链当变性剂的浓度逐渐降低时，慢慢由完全伸展的状态开始逐步形成二级结构（这个中间态也被称为融球中间态），然后疏水性区域向内包裹，亲水性残基侧链翻转到分子表面，从而恢复原有构象。这一个过程是一个热力学自发驱动的过程，天然结构的蛋白质结构往往也是热力学上最稳定的结构。在多肽链恢复构象的过程中，会经历一个疏水区域外露的阶段，然后疏水区域相互聚集、包裹，稳定已经形成的构象，所以进行重折叠时蛋白质浓度要求很低，减少蛋白质分子之间相互碰撞和疏水区域相互聚集的机会[118;119]。形成正确折叠的蛋白质能够保留于溶液上清中，而不能够形成正确折叠或是相互聚集的蛋白质会形成沉淀从溶液中析出来。在实验中尝试了很多种复性过程，目的是寻找适合 sCD89 恢复天然构象的条件。

尝试最先从 Urea 和 Arginine 开始，二者其实作用机制一样（Arginine 的末端实际上就是 Urea），伸展的多肽链在 Urea 提供的极性环境中进行错误尝试，逐步从彻底的线性肽链折叠形成天然结构。在 Urea 的尝试中，引入了一个折叠中点的概念 (Hua Chen, research seminar on 2<sup>nd</sup> Nov 2000)：在接近折叠

中点时，蛋白溶液中析出得蛋白沉淀量很少而上清中保留的蛋白量较多；但一旦超过折叠中点，大量的蛋白质会聚集为沉淀析出。在不同浓度的尿素溶液中，sCD89 去折叠肽链重新形成折叠的行为基本和 Urea 的浓度成比例，实验中确定 2.40-2.70 M Urea 浓度最接近折叠中点的下限。在这一浓度下的重折叠获得了成功，复性得到的重折叠 sCD89 分子能够结合天然配体 IgA，也能够被多种识别天然结构的单克隆抗体识别。

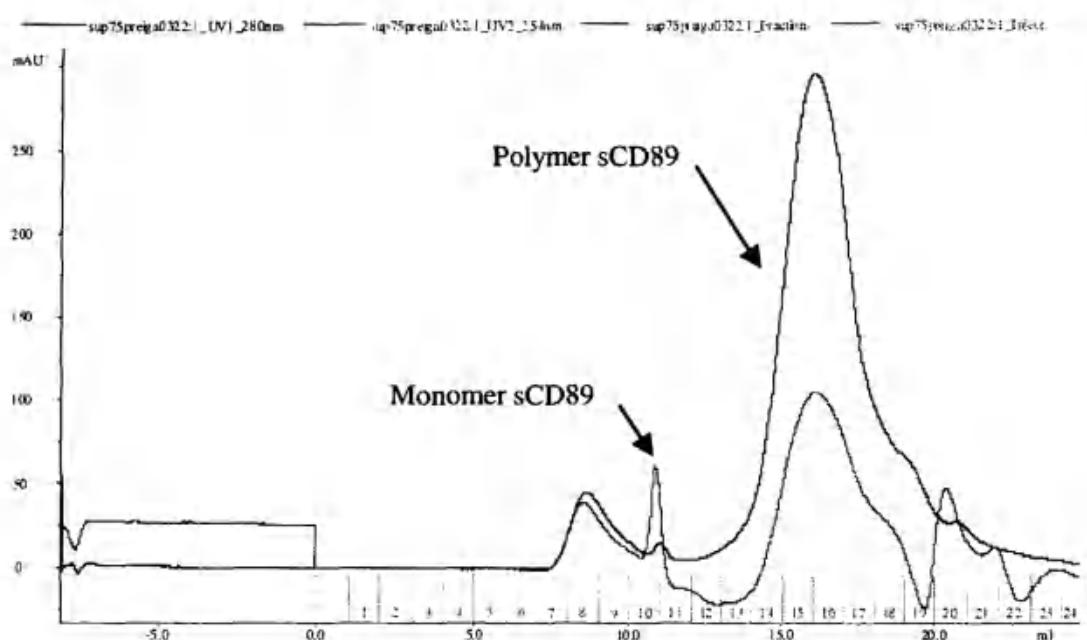


而 Arginine 复性液中浓度选择 0.5 M 的原因，是参考同类受体 Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII 等的复性条件，这几个受体在进行重折叠时多采用 0.5-1.6 M Arginine 浓度[76;120]。利用 Arginine 促进复性的过程多为大体积高度稀释的条件，由于复性液体积增加涉及成本、透析和浓缩设备等因素，而且含有高浓度 Arginine 的复性液在透析时，由于 ArginineHCl 产生的渗透压很高，致使透析后复性液体积增加近一半。实验中在尝试 0.5 M Arginine 复性失败后，我没有进行进一步更高浓度 Arginine 浓度下复性的尝试。最近，德国 Max-Plank 生化研究所 Wenig 等通过分次加入变性蛋白进行稀释的方式，实现了 sCD89 分子在 1 升 1.0 M Arginine 溶液中的重折叠[121]。

在 Urea 中复性的 sCD89 蛋白在浓缩时易于聚集（图 4-2），部分原因可能是从 MIP68b Sepharose4B 单抗柱上洗脱时采用了低 pH 值的洗脱液（0.1 M Glycine pH2.5），造成部分蛋白质构象发生变化。为避免可能产生的影响有缺陷蛋白形成结晶，结晶实验中未采用经 MIP68b Sepharose 4B 纯化的蛋白。



GuHCl 由于比 Urea 多一个 NH 基团，极性和稳定性都高于后者。sCD89 在 GuHCl 溶液中的重折叠和在 Urea 中有所区别，在 1.8 M GuHCl 左右，sCD89 的折叠有一个明显的变化，在溶液中保留的蛋白质浓度差距达到 5 倍左右。



**图 4-2 Urea 中复性的 sCD89 浓缩后进行 Superdex-75 凝胶过滤** 浓缩时的缓冲液与凝胶过滤的平衡液相同，均为 20mMTris-Cl/50mMNaCl (Ph7.5)。图中箭头所指为层析分离的 sCD89 蛋白峰，可以看到大部分 sCD89 蛋白已聚集成多聚体。

实验中选取 1.8 M GuHCl 作为复性液中变性剂的浓度，经过 DEAE Sepharose Fast Flow 层析纯化，收集 300 mM NaCl 洗脱峰，Native PAGE 和抗体捕获 ELISA 证实洗脱峰中包含结构均一并已恢复天然构象的 sCD89。但是蛋白的纯度不及在 Urea 中复性并经过单克隆抗体柱 MIP68b Sepharose 4B 纯化的蛋白。

sCD89his 是解决这个问题的简单方法。在 sCD89 分子的 C 端加上含有 6 个 His 残基的尾巴，因为处于 CD89 分子免疫球蛋白折叠的外部，尤其是茎部末端，所以加上的 His 残基不会对整个 CD89 分子的构象产生明显的影响。sCD89his 的复性行为和 sCD89 一致，所以重折叠体系和纯化方式也一样。只是从 DEAE 阴离子交换柱上洗脱下来的 300 mM NaCl 蛋白洗脱峰，在这里接着又经过 Ni-NTA 亲和层析，得到了纯度相当高的 sCD89his 复性蛋白。浓缩并改换缓冲体系后，复性的 sCD89his 蛋白用于晶体实验。

在蛋白质复性过程中，大体积低浓度是实现有效重折叠的关键因素，其原因是避免复性过程中正处于折叠中间态的多肽链相互聚集形成沉淀。但是大体积的弊端在于复性率和实验成本，本实验中 sCD89 (his) 在 GuHCl 复性液中的复性率在 5-10% 之间。为此，有人尝试在层析介质上进行复性实验

[122]。在本论文的研究过程中，我们也尝试将 sCD89his 固定在 Ni-NTA Sepharose 介质上，限制分子间碰撞的机会，然后在 Urea 梯度中进行重折叠。为了实现 Urea 浓度稳定和缓慢的变化，我们在 ACTA primer 上制备了连续 6 个 30 分钟内分别由 100%、80%、60%、40%、20% 和 0% Unfolding buffer 变到 Binding buffer 的梯度，但是没有实现预期的高复性率。同时，由于 sCD89 包含二硫键，需要在合适的氧化还原势中尝试正确的配对方式，而 Ni-NTA 层析柱上含有具有较强氧化能力的  $\text{Ni}^{2+}$ ，一旦被还原成  $\text{Ni}^{1+}$  将失去部分和 His 残基的亲和力，因此很难在 Ni-NTA 上形成一个可调节的氧化还原势。

## 二、IgA 配体片段的制备

在 sCD89 进行结晶实验的同时，对于它的配体 IgA 的研究也在进行。全长 IgA 的结构在 1999 年曾经有人提出过模型，显示 IgA 分子呈 T 型，佐证来自电镜照片和低分辨率的 X 衍射[8]。由于 IgA 分子含糖量丰富，全长蛋白结晶不容易，我们打算先从它的 Fc 段做起，同时也是因为 IgA 结合 CD89 的位点在它的 Fc 部分。IgA1 分子较 IgA2 分子多一段铰链区，这一段区域集中了多种蛋白酶的识别位点，其中包括：奈瑟氏淋球菌、肺炎链球菌、血链球菌、脑膜炎奈瑟氏球菌、流感嗜血菌等分泌的蛋白酶[7]。从实验室的实际情况，我们选择了奈瑟氏淋球菌进行培养以提取 IgA1 蛋白酶。奈瑟氏淋球菌有多个菌株和血清型，其中有部分血清型的奈瑟氏淋球菌可以分泌 IgA1 蛋白酶，在这其中又分 I 型和 II 型 IgA1 蛋白酶，I 型较为稳定[123]。遗憾的是，国内分离和保存的菌株并没有关于蛋白酶的分析数据，从国外购买菌株和商品酶的努力也没有成功。我们在实验室环境下培养的奈瑟氏淋球菌没有检测到 IgA 蛋白酶的活性。

作为天然蛋白的替代方案，克隆和表达 IgA Fc 进展顺利。从 IgA1 重链全长基因中，我们利用大片断重叠 PCR 的方法将编码 IgA1 重链 CH2、CH3 的序列（未包含编码尾部的序列）连接成完整的  $\text{Fc}\alpha$  编码序列（图 4-3），并亚克隆到原核表达载体 pET-30a(+)，在大肠杆菌 *E. coli* 中进行了表达。IgA1CH2CH3 重组蛋白的表达量非常高，形成了大量得包涵体并聚集在胞质中。采用与 sCD89 包涵体相同重折叠复性方法，我们得到了可溶性的  $\text{Fc}\alpha$  蛋白，并尝试在 sCD89 的结晶实验中加入复性的  $\text{Fc}\alpha$  蛋白以促进 sCD89 的结晶，同时期望得到 sCD89 和  $\text{Fc}\alpha$  蛋白的共结晶。

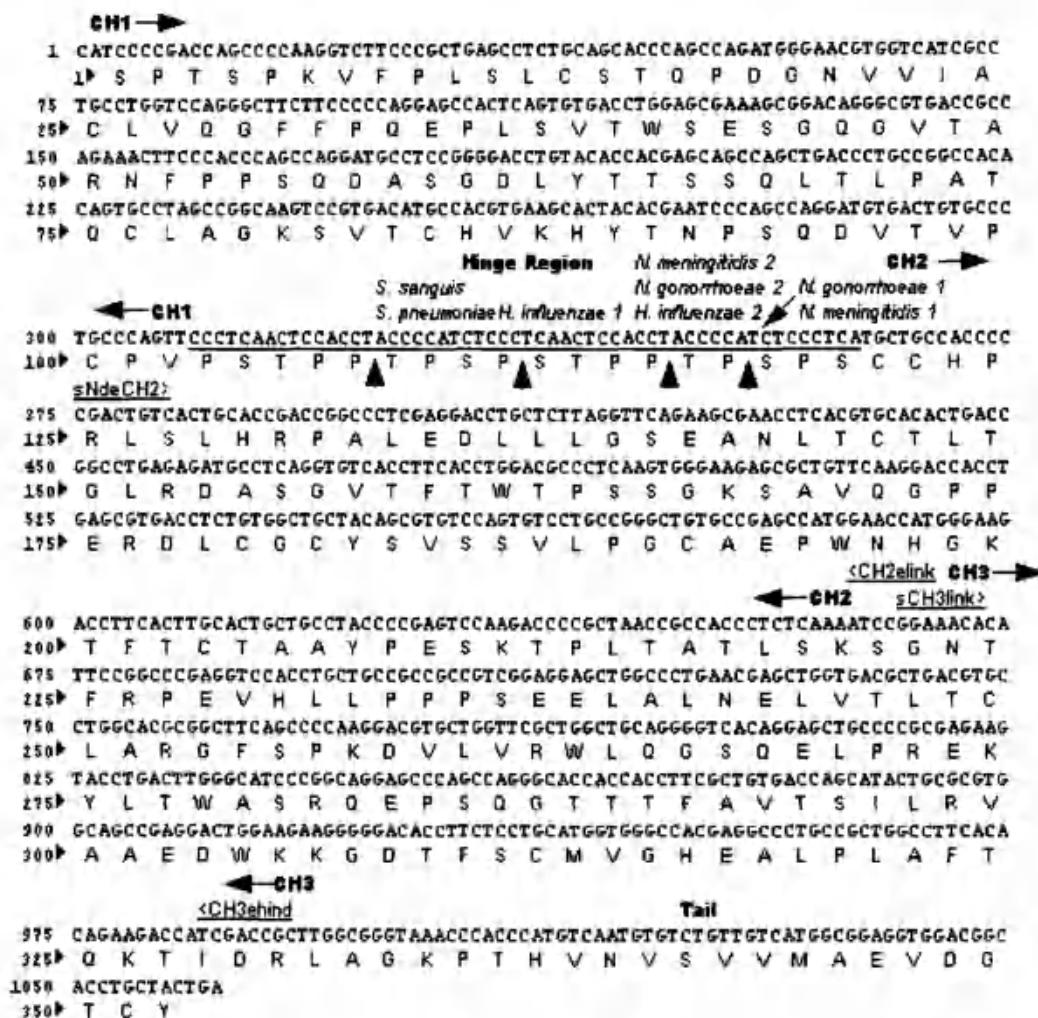


图 4-3 IgA1 重链恒定区序列  $\alpha 1$  chain 恒定区由 3 个外显子编码 (exon1: 1-306 bp, exon2: 307-666 bp, exon3: 667-1061 bp), 开放阅读框为 3-1058 bp, 编码 352 氨基酸残基。第二个外显子还编码一段铰链区 (图中有下划线部分), 其中具有多个可被细菌蛋白酶专一性水解的位点(向上的箭头)。实验中设计的引物 CH2elink 和 sCH3link 之间具有较长的互补片段, 利用大片断重复 PCR 方法将编码 CH2 和 CH3 的序列连接在一起, 随即亚克隆至 pET-30a(+)。

### 三、sCD89 的晶体结构及其配体结合特征

最先得到的是在 GuHCl 中复性的 sCD89his 蛋白晶体。在晶体生长两周后, 分别在 Crystal Screening Kit I 和 Kit II 的 37 号条件发现有晶体生长, 晶体形成孪晶。生长条件优化后, 在 11.4% PEG8000 + 50 mM MgCl<sub>2</sub> + 100 mM Hepes (pH7.6) + 8% (v/v) 乙二醇 + 3% DMSO 条件下得到了体积很小的单晶。随后利用这些小的单晶, 我们又得到了大的单晶, 并进行了 X 射线衍射, 衍射数据非常好。但是从同源性最高的 3 个蛋白质 KIR2DL1、KIR2DL2 以及 LIR-1 进行的分子置换没有解析出 EC1 的结构。最终, 我们从 Se 代 sCD89his

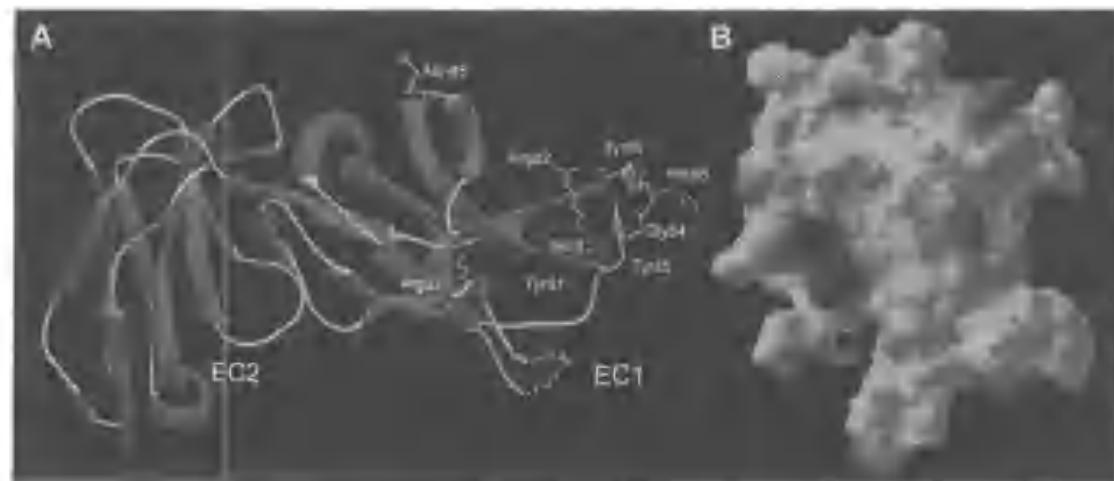
的复性蛋白得到了 Se 代 sCD89his 的单晶，采用 MAD 方法，得到了初始相位，从而解析出 sCD89 的晶体结构。

从受体膜外区的大体结构上看，CD89 和所谓经典的 Fc 受体之间有相似之处，但是不同的地方更多。CD89 胞外区由两个串联的免疫球蛋白样折叠结构域组成，结构域之间形成一个锐角，使整个分子呈肘型结构。这样的肘型结构也是之前解析出的 Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII 和 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  等 Fc 受体膜外区的共同特点[76;124-127]。不过，CD89 结构域之间的夹角角度更大，达到 85°，已经接近于直角，而且夹角之间存在一个来自两个结构域上多个氨基酸残基侧链参与组成的疏水性核心结构，而 Fc $\gamma$ RIIa、Fc $\gamma$ RIIb、Fc $\gamma$ RIII 和 Fc $\epsilon$ RI $\alpha$  结构域之间的夹角主要靠氢键作用维持。

晶体结构显示，CD89 的两个结构域中的 Ig 折叠属于两种不同的拓扑模式（Greek key strand topology）。EC1 中的 Ig 折叠属于 I 型 Ig 折叠[128]，折叠的第一个  $\beta$ -折叠被分割成不连续的两部分 A 和 A'，分别属于平行的两个  $\beta$ -片层，这两个  $\beta$ -片层分别由反向平行的  $\beta$ -折叠 B、E 与 C、F、G 构成为折叠的核心（这也是 Ig 折叠的基本结构），在核心结构周围，前一个片层  $\beta$ -折叠 B 和 F 的外侧分别有  $\beta$ -折叠 A 和 D，后一个片层  $\beta$ -折叠 C 和 G 的外侧分别有  $\beta$ -折叠 C' 和 A'；EC2 中的 Ig 折叠介于 I 型 Ig 折叠和 C2 型 Ig 折叠之间[129]，和典型的 I 型 Ig 折叠相比，CD89 EC2 结构域中的 Ig 折叠在  $\beta$ -折叠 E 的外侧没有  $\beta$ -折叠 D，而和典型的 C2 型 Ig 折叠相比，CD89 EC2 结构域中的 Ig 折叠的第一个  $\beta$ -折叠和 EC1 结构域中一样，并不是单独属于由  $\beta$ -折叠 A、B、E 构成的  $\beta$ -片层，这个折叠被分割成不连续的两部分 A 和 A'，一部分属于平行的另一个  $\beta$ -片层（由  $\beta$ -折叠 A'、G、F、C、C' 组成）。类似 EC1 中 Ig 折叠的拓扑模式在 KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DS2 以及 NKp46 也有发现[130-133]，而类似 EC2 中 Ig 折叠的拓扑模式在 Fc 受体中比较常见，同时也见于上述 KIR 受体、NCR 受体以及另一个受体家族的 LIR-1 和 LIR-2 中[134;135]。

CD89 上可能参与和配体 IgA 结合的残基全部位于 EC1 结构域，显示了与经典的 Fc 受体完全不同的特征。点突变显示，位于 CD89 胞外区 EC1 结构域的氨基酸残基 Tyr35、Arg52、Tyr81、Arg82、Ile83、Gly84、His85 和 Tyr86 如果发生突变，将影响同 IgA 的结合力[66;67]。从我们得到的 CD89 胞外区晶体结构分析，上述位点分别位于 EC1 结构域中 C strand (Tyr35)、D strand (Arg52) 和 F-G loop (Tyr81、Arg82、Ile83、Gly84、His85 和 Tyr86) 上，并且在空间结构上紧密相邻，整个结合面处于 EC1 结构域远端（图 4-4）。类似的

结合位点在经典的 Fc 受体中并未发现，Fc $\epsilon$ RI、Fc $\gamma$ RIII 与相应的免疫球蛋白配体结合时，结合区域位于 Fc 受体的 EC2 结构域 BC loop、FG loop 和结构域之间的铰链区上，来自免疫球蛋白 Fc 的一个 Pro 残基夹在 FcR 上的两个 Trp 残基之间形成一种疏水性脯氨酸三明治结构 (Proline sandwich)，在参与配体结合所有的作用力中起主要作用[127;136]；组成这种疏水三明治结构的疏水性残基不仅存在于 Fc $\epsilon$ RI、Fc $\gamma$ RIII 和 IgG1、IgE 中，在其它 FcR 结构的相应位置也存在，提示这是经典 Fc 受体同它们的配体 IgG 或 IgE 相结合的共同特征[76]。有意思的是，IgA 分子在铰链区附近（相当于 IgG 和 IgE 与相应 Fc 受体的结合部位）也存在一个类似的脯氨酸残基 (Pro328)，而 CD89 受体 EC2 Ig 折叠的 FG loop 上存在空间结构上相邻的两个色氨酸残基 (Trp174 和 Trp182)，不过，由于这两个残基的侧链伸向结构域之间的夹角中，参与结构域之间的疏水核心组成，因此无法和 IgA 上的 Pro 形成类似经典 FcR-Ig 结合中的 Proline sandwich。CD89 同 IgA 结合作用中，另一个值得注意的现象是在这个结合平面边缘存在一个 N 糖基化位点 Asn45，这似乎可以解释在去除糖基以后 CD89 受体和 IgA 的亲和力提高的现象，因为复杂的糖链结构可能会掩蔽 CD89 上的部分决定簇，从而使部分 IgA 无法结合到 CD89 受体上。



**图 4-4 IgA 在 CD89 上的可能结合位点** A: 条带模型显示影响 IgA 结合的氨基酸残基在 CD89 分子上的分布；B: CD89 受体 EC1 结构域的分子表面图，部分影响 IgA 结合的氨基酸残基其侧链被埋在分子内部，而侧链参与表面组成的氨基酸残基则标记于图上。在 CD89 分子上的分布点突变证明影响结合的 8 个氨基酸 Tyr35、Arg52、Tyr81、Arg82、Ile83、Gly84、His85 和 Tyr86 分布于 CD89 远膜端的 EC1 结构域，其中 Tyr81 和 Ile83 侧链伸向折叠内部，它们的作用应该是维持整个折叠的稳定，而不是参与同 IgA 的结合；其余 6 个氨基酸残基分布于分子表面，具备与 IgA 分子 Fc 段接触的条件。Asn45 虽然不参与结合作用，但是它距离结合位点不远，体内这个位点上可能发生的复杂糖链结构，对 CD89 与 IgA 的结合会产生负面影响。

中和抗体MIP8a在CD89上的结合位点也佐证了EC1远膜端可能参与IgA的结合。点突变实验证实, MIP8a在CD89上的结合与EC1结构域上Arg76、Tyr77、Gln78、Arg82和His85有关, 其中Arg76、Tyr77和Gln78发生单一突变的时候, MIP8a均能结合突变体, 结合能力基本不变; 而当Arg76Tyr77Gln78同时变成Ala时, 突变体失去了和MIP8a的结合能力; 同时Arg82和His85发生突变时, 突变体也失去了和MIP8a的结合能力。从结构上看, Arg76、Tyr77、Gln78、Arg82和His85分别位于EC1结构域F strand和FG loop上, 其中Tyr77侧链包埋于结构域内部, 其余4个氨基酸残基Arg76、Gln78、Arg82和His85侧链位于分子表面(图4-5)。但是Arg76、Gln78与Arg82、His85的侧链在分子表面上位于相距较远的两个区域上, 似乎MIP8a分子Fab段很难同时识别相距这么远的两个决定簇。根据变性肽段在SDS微团中可能具有一定二级结构的理论[137], 我们推测Arg76至Gln78的区域不是MIP8a的结合区域, 而MIP8a在CD89上的结合位点应该是Arg82和His85所在区域。因为Arg76、Tyr77和Gln78分别单点突变后仍与MIP8a结合, 并且Tyr77侧链包埋于结构内部, 不可能参与作用; 将Arg76、Tyr77和Gln78这一部位同时突变成3个Ala, 可能导致这一区域从原先一种类似线性的构型, 变成为由一种3个Ala与前面Ala74、Gly75在SDS微团表面形成的 $\alpha$ 螺旋结构, 从而对后面Arg82至His85部分的空间构型产生影响, 从而丧失了与MIP8a的结合能力。Morton等利用多个真核表达的突变体, 证实Arg82突变影响MIP8a同CD89的结合(个人通讯, 未发表)。

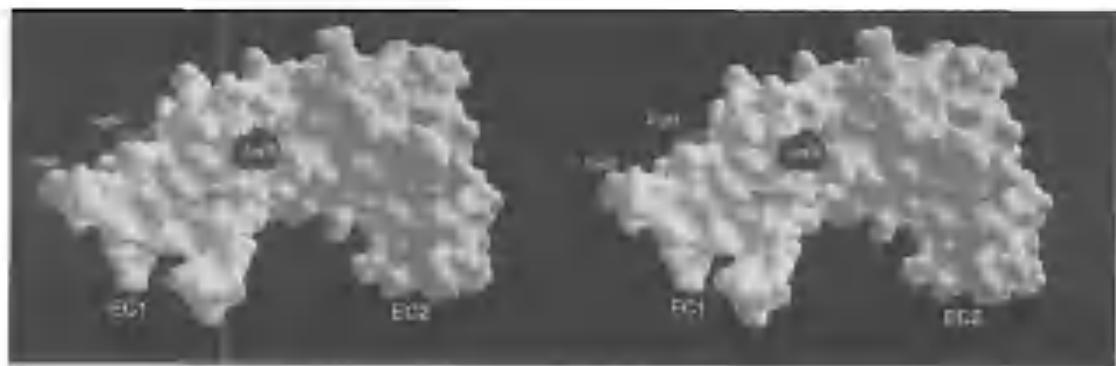


图4-5 单克隆抗体MIP8a在CD89受体上的结合位点 Arg76(蓝色)、Gln78(绿色)和Arg82(红色)、His(橙色)分别位于CD89 EC1结构域表面的不同区域, 间隔较远, MIP8a的Fab似乎不可能同时结合在这两个区域。

CD89受体同IgA的结合位点还提示同一个IgA分子可以同时结合两个CD89受体。IgA分子上参与同CD89结合的位点被定位在CH2和CH3之间的区域[77], 而CD89上的结合区域位于EC1结构域远端, 因此理论上, 类似IgE结

合Fc $\epsilon$ RI $\alpha$ 以及IgG1结合Fc $\gamma$ RIII时的空间位阻不存在于IgA和CD89的结合作用中。这一推测已经被实验所证实，Herr等在溶液中发现一个IgA分子可以同时结合两个重组的CD89胞外区蛋白[72]；并且得到了IgA和CD89胞外区蛋白的共结晶，共结晶结构再次证实IgA同CD89之间可以具有1:2的结合比率[138]。在CD89和IgA Fc的共结晶中，除了原先发现的CD89受体上Tyr35、Arg52、Arg82、Gly84、His85以外，新发现Arg53、Leu54、Lys55（D strand）、Phe56、Trp57（DE loop）以及连接在Asn58上的糖链也参与同IgA的结合；而IgA上参与结合的残基为Leu257、Leu258、Arg382、Glu389、Glu437、Met433、Leu441、Ala442和Phe443。IgA同CD89结合作用中的主要作用力为疏水相互作用，附近的一些极性氨基酸侧链也参与了结合作用。和结合前相比，CD89分子与IgA分子间的相互作用，使DE loop的空间走向发生了较大改变，同时FG loop也有少许变化（图4-6）。



图4-6 IgA与CD89的结合 A：一个IgA分子可以同时结合两个CD89受体，Fc $\alpha$ 的两条链分别标示为黄色和蓝色，CD89受体胞外区标示为绿色和红色；B：CD89受体EC1结构域中DE loop和FG loop在结合IgA以后空间走向发生改变。CD89和Fc $\alpha$ -CD89复合物的座标取自Brookhaven蛋白质结构数据库，PDB编号分别为1OW0和1OVZ。

#### 四、CD89与同源分子的比较

CD89的晶体结构以及和配体IgA的结合特点将它与经典的Fc受体区别开来。确实，CD89的基因位于19号染色体19q13.4，而经典的Fc受体分布在1号染色体1q21-23；同样，编码CD89受体胞外区两个Ig样结构域的外显子和经典Fc受体的外显子之间也没有显著同源性。全基因组BLASTP比对的结果显示，人体内和CD89 EC1结构域氨基酸序列同源性最高的是LILR家族受体和platelet glycoprotein VI的胞外区第一个结构域，而和EC2结构域氨基酸序列同源性最高的也是LILR家族受体；在同目前NCBI数据库中现有的其

它哺乳动物基因组序列的比对中,发现和人 CD89 同源的蛋白质,除了近期刚刚公布的大鼠 Fc $\alpha$ R[139]和牛 Fc $\alpha$ R[140],在灵长目有 *Pan troglodytes* 的 LILR 受体 (ILT)、马的 LILR 受体、牛的 Fc $\gamma$ 2R (和人 LILRA4 受体的同源性很高) 和 KIR3DL1、啮齿类的 PIR、NKp46 和 KIR3DLs 受体 (图 4-7、表 4-1)。非常有意思的是,人、大鼠和牛的 Fc $\alpha$ R 基因分别定位于人 19 号染色体 19q13.4、大鼠 1q12 和牛 18 号染色体长臂 (微卫星标记 TGLA132 附近),这三个区域在进化上属于直系同源,而与 Fc $\alpha$ R 具有序列同源性的 LILR、KIR 等受体的基因也分布于同样的染色体区带。



**图 4-7 CD89 胞外区氨基酸序列与 LIR、KIR 和牛 Fc $\gamma$ 2R 等的比对** 序列上面的箭头表示 CD89 受体中相应β-折叠的位置和方向, 不同受体间的保守氨基酸残基以阴影表示, 序列比对中的缺失部分以破折号表示。

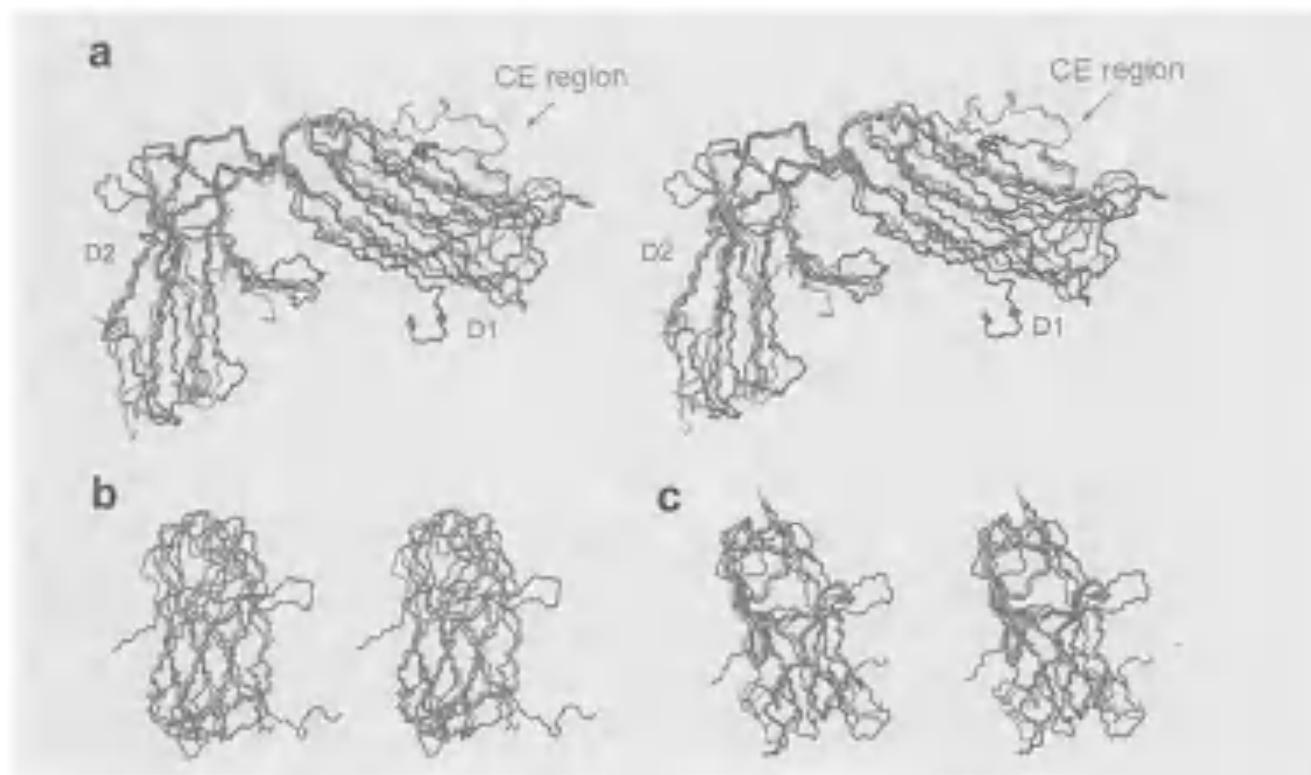
**表 4-1 CD89 胞外区氨基酸序列的 BLASTP 结果**

Human CD89 EC1 domain	Identities	Positives	Gaps
<i>Homo sapiens</i>			
LILRA4 precursor (gi: 37537905)	35/96 (36%)	44/96 (45%)	2/96 (2%)
LILRB3 precursor (gi: 37537903)	33/97 (34%)	41/97 (42%)	2/97 (2%)
LILRA2 precursor (gi: 37537906)	30/97 (30%)	47/97 (48%)	3/97 (3%)
platelet glycoprotein VI (gi: 37574620)	30/97 (30%)	44/97 (45%)	11/97 (11%)
<i>Pan troglodytes</i>			
ILT-7 (gi: 16930371)	35/92 (38%)	43/92 (46%)	2/92 (2%)
<i>Bos taurus</i>			
IgA Fc receptor (gi: 32396010)	50/96 (52%)	66/96 (68%)	2/96 (2%)
Fc $\gamma$ 2R precursor (gi: 2136749)	34/96 (35%)	48/96 (50%)	2/96 (2%)
<i>Rattus norvegicus</i>			
IgA Fc receptor (gi: 42558277)	43/96 (44%)	63/96 (65%)	2/96 (2%)
PIR-A2 (gi: 5758945)	30/97 (30%)	43/97 (44%)	2/97 (2%)
<i>Macaca mulatta</i>			
NKp46SD (gi: 21307661)	32/95 (33%)	46/95 (48%)	2/95 (2%)
<i>Mus musculus</i>			
platelet glycoprotein VI (gi: 28476918)	32/98 (32%)	49/98 (50%)	13/98 (13%)

<b>Human CD89 EC2 domain</b>	<b>Identities</b>	<b>Positives</b>	<b>Gaps</b>
Homo sapiens	Identities	Positives	Gaps
LILRB2 (gi: 5031911)	47/101 (46%)	62/101 (61%)	7/101 (6%)
LILRB1 (gi: 37537910)	47/101 (46%)	56/101 (55%)	7/101 (6%)
LILRA3 (gi: 31543056)	45/101 (44%)	58/101 (57%)	7/101 (6%)
Pan troglodytes			
LILR a (gi: 16930375)	46/98 (46%)	57/98 (58%)	4/98 (4%)
LILR c (gi: 16930379)	46/101 (45%)	57/101 (56%)	7/101 (6%)
Equus caballus			
ILT-11(gi: 45597283)	44/102 (43%)	61/102 (59%)	7/102 (6%)
Bos taurus			
IgA Fc receptor (gi: 32396010)	59/96 (61%)	74/96 (77%)	
KIR3DL1 (gi: 32189324)	41/101 (40%)	60/101 (59%)	6/101 (5%)
Rattus norvegicus			
IgA Fc receptor (gi: 42558277)	63/96 (65%)	74/96 (77%)	
similar to killer cell inhibitory receptor p91A precursor - mouse (gi: 34854711)	48/101 (47%)	66/101 (65%)	7/101 (6%)
Macaca mulatta			
KIR3DL4 (gi: 13447845)			
KIR3DL12 (gi: 19880117)	49/101 (48%)	60/101 (59%)	8/101 (7%)
KIR3DL3 (gi: 19880119)			

我们将 CD89 和已知的 LIR-1 和 KIR2DL2 胞外区 C<sub>α</sub>的走向进行了叠加，发现这三个受体的相似程度要远远高于 CD89 同其它 FcR 的相似程度。其中尤其以膜外第二个结构域相似程度最高，而第一个结构域的差异主要在于从 β-折叠 C 至 D 之间的部分，这一段区域也是 CD89、LIR-1[141]和 LIR-2[135]结合各自配体的区域。三个受体的结构域夹角也相近，LIR-1 是 84-90°，KIR2DL2 是 60-80°，而 CD89 是 85°（图 4-8）。

组成结构域间疏水核心的 12 个氨基酸残基在所有 LRC 受体中显示了非同寻常的高度保守性，LIR-1 中仅 Leu101 变成了 Ala，KIR2DL2 中有 3 个氨基酸残基 Val17、Val98 和 Tyr173 变成了同样属于疏水性氨基酸的 Leu、Ile 和 Phe，而 KIR2DL1 比 KIR2DL2 多一个变化 Thr99 变成了 Ile。从已经解析得到结构的 LIR-1 和 KIR2DL2 中，都可以看到类似 CD89 分子的结构域间疏水核心结构。人的 LRC 受体有大约 30-50 个受体，尽管多数都没有得到结构解析，但是从序列上我们发现类似位置上基本都是疏水性的氨基酸，其中尤其以 Tyr181 和 Trp183 最为保守，几乎存在于每个受体的相应位置。说明类似 CD89、LIR-1 和 KIR2DL2 的结构域间疏水核心结构是所有 LRC 受体的共同特征。值得注意的是，在具有 3 个以上 Ig 结构域的受体中，最近膜端的 Ig 结构域中没



**图 4-8 CD89 和 LIR、KIRs、FcRs 胞外区  $C\alpha$  走向比较** a、CD89(紫)、LIR-1(橙)和 KIR2DL2(蓝)的  $C\alpha$  走向叠加图,  $C\alpha$  的均方根值 (root mean square deviation values) 分别为: 1.312 Å (CD89 EC1 和 LIR-1 D1 叠加的 46  $C\alpha$  atoms)、1.444 Å (CD89 EC1 和 KIR2DL2 D1 叠加的 46  $C\alpha$  atoms)、0.967 Å (CD89 EC2 和 LIR-1 D2 叠加的 64  $C\alpha$  atoms)、0.979 Å (CD89 EC2 和 KIR2DL2 D2 叠加的 64  $C\alpha$  atoms); b、CD89(紫)、KIR2DL1(绿)和 KIR2DL2(蓝)胞外区 EC1 的  $C\alpha$  走向比较, CD89 的 C strand 和 C' strand 更接近 FG loop, 并和后者之间形成了一个明显的槽状结构; c、CD89(紫)、FcεRI(蓝)、FcγRIIa(橙)、FcγRIIb(绿)和 FcγRIII(红)胞外区 EC1  $C\alpha$  走向比较, 令人吃惊的是 CD89 和这几个经典 Fc 受体 C strand 至 E strand 之间的  $C\alpha$  几乎完全重合。

有类似 Tyr181 和 Trp183 的强疏水性氨基酸残基, 而从第二个 Ig 结构域开始, 类似位置有两种选择: 第一种为 Tyr/SerXTrp, 第二种为 TyrXLeu, 说明参与疏水核心组成的氨基酸残基是在进化过程中保留下来的, 具有两个结构域的 LRC 受体如: CD89、LIR-1、KIR2DL1、KIR2DL2 等, 它们编码第二个结构域的外显子亲缘关系紧密, 都来源于含有 Tyr/SerXTrp 的祖先基因。

最近, 相继有两篇论文报道分别在大鼠和牛基因组中找到了 IgA Fc 受体  $Fc\alpha R$  的基因, 这两条基因同人 CD89 基因的相似性均高于 60% (见表)。但是很有意思的是, 尽管同源性这么高, 但是在所有识别人 CD89 的单克隆抗体中却没有一个能同时也识别这两个受体。同时, 牛的  $Fc\alpha R$  不仅能识别牛 IgA 分子, 也能识别人 IgA, 而且人 CD89 受体上参与结合 IgA 的氨基酸残基 Tyr35、

Arg82 和 His85 在牛 Fc $\alpha$ R 中也保守[140]。

我们正在进行大鼠和牛 Fc $\alpha$ R 的研究工作，也可能涉及马、猪等其它哺乳动物。这些直系同源 Fc $\alpha$ R 受体的表达调控、信号转导、与各自 IgA 的相互作用以及与人 Fc $\alpha$ R-IgA 作用的比较，有助于更深入地了解人 IgA 在机体免疫系统中的作用和地位。

## 综述

# 古老的家族，现实的故事

## ——LILR 白细胞免疫球蛋白样受体家族

### 摘要

**LILR** 受体家族是近年来新发现的一个免疫调节类受体分子家族，主要分布于人骨髓、脾、淋巴结和外周血，细胞分布范围较 **KIR** 受体更为广泛。**LILR** 基因位于人 19 号染色体 19q13.4，与临近的 **KIR**、**Fc $\alpha$ RI**、**NCR1** 等基因具有较高同源性。基因结构显示 **LILR** 基因可能和其它 LRC 受体来源于同一个祖先基因，并且演化年代较 **KIR** 基因更久远。**LILR** 受体按照胞内区结构不同，被划分为三类：胞内区含 **ITIM** 样基序的跨膜受体分子、胞内区较短并不含 **ITIM** 样基序的跨膜受体分子和没有胞内区和跨膜区的可溶性分子。晶体结构显示，**LILR** 受体具有和其它 LRC 受体共同的空间结构特点：断裂的 A $\beta$  折叠股、结构域间的肘形夹角和疏水核心区，而十分保守的疏水核心区组成残基成为推断 LRC 受体亲缘关系的新手段。多数 **LILR** 受体分子的配体目前尚不知晓，所有已经发现的结合 **LILR** 分子的配体均是 **HLA-I** 分子或其病毒类似物以及非经典 **HLA** (**HLA-G**) 分子。**LILRB1** 和 **LILRB2** 与 **HLA-G** 的结合，可能介导怀孕母体与胎儿之间的免疫忽视作用；而与抑制性 T 细胞之间的相互作用，可以引起单核细胞和树突状细胞表面 **LILRB2** 和 **LILRB4** 表达水平的上调，并对抗原产生耐受。**LILRB1** 受体在 **HLA-I** 分子上的结合区域位于 $\alpha_3$  结构域和 $\beta_2$  微球蛋白，和 **CD8** 分子在 **HLA** 分子上的结合区域重叠，提示可以竞争抑制 **CD8** 分子辅助 **TCR** 受体活化 T 细胞的作用。

1997 年，瑞士 **Basel** 研究所、美国 **Immunex** 公司和国立卫生院的几位科学家在研究 **NK** 细胞表面抑制性受体 (**KIR**) 与 **MHC** 分子相互作用时，各自发现 **KIR** 受体基因所在的人 19 号染色体长臂端 19q13.4 处，还存在一个不同于 **KIR** 受体但与 **KIR** 有较高同源性的免疫球蛋白受体超家族 [54;142;143]。由于这个家族成员分子的胞外区均由 2 或 4 个免疫球蛋白样折叠结构域组成，表达在单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等白细胞表面，因而被命名为白细胞免疫球蛋白样受体 (**Leukocyte immunoglobulin-like receptor, LIR**) [142]。随后，**Banham** 等证实，早在 1991 年发现 [144] 并在第五届白细胞抗原工作会议上命名为 **CD85** 的白细胞抗原，即属于白细胞免疫球蛋白样受体家族的一员 [145]。

和许多新发现的基因一样，**LIR** 受体分子被不同的发现者给予了不同的命名：**Immunoglobulin-like transcript (ILT)** [143]、**monocyte/macrophage inhibitory receptor (MIR)** [54]、**Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LIR)** [142]、**HM transcript (HM)** [146] 和 **CD85** [147]。为了方便研究，2000 年由 **Long** 等提出，统一用 **Leukocyte immunoglobulin-like receptor (LILR)** 来命名这个家族的受

体分子 (<http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/genefamily/lilr.html>)。在 LILR 命名中，英文全称仍采取的是和 LIR 相同的全称——白细胞免疫球蛋白样受体 (Leukocyte immunoglobulin-like receptor)，但为了区别原 LIR 命名，将名称缩写改成了 LILR；同时，按照受体分子的结构特点将 LILR 家族成员划分为 A、B 两个亚群：A 亚群受体分子通常由胞外 Ig 样结构域、跨膜区和短小的胞内区组成，跨膜区含有一个带正电荷的精氨酸，胞内区部分不含 ITIM 样基序，一般认为是活化型受体；B 亚群为抑制型受体，通常不仅有胞外区和跨膜区，还具有包含多个 ITIM 样抑制性基序的胞内区。LILR 命名得到 Human Genome Organization (HUGO) 的支持，目前在人类基因组图谱中采用的即是 LILR 命名方式。但是，由于目前部分新发现的基因 LILR 命名未得到公认，LIR 和 ILT 两种命名仍然较多地为研究者们使用。本文中采用 LILR 命名系统，并在表 1 中给出不同命名系统的对照。

表 1：白细胞免疫球蛋白样受体的命名和分布

HGMW	LIR	ILT	Others	Action	Cell
LILRA1	LIR-6		CD85i	Activating	monocytes, B cells
LILRA2	LIR-7	ILT1	CD85h	Activating	myeloid lineage
LILRA3	LIR-4	ILT6	HM31; HM43 CD85c	?Activating	NK
LILRA4		ILT7	CD85g	Activating	
LILRB1	LIR-1	ILT2	CD85; CD85j MIR-7	Inhibiting	NK, T, B, monocytes, DC, PMN
LILRB2	LIR-2	ILT4	CD85d MIR-10	Inhibitinga	monocytes, DC, PMN
LILRB3	LIR-3	ILT5	CD85a; HL9	Inhibiting	monocytes, DC, PMN
LILRB4	LIR-5	ILT3	CD85k; HM18	Inhibitinga	monocytes, DC
LILRB5	LIR-8		CD85c	Inhibiting	NK, monocytes
LILRA5		ILT10	CD85m	Activating	
LILRA6P		ILT9	CD85l	pseudogene	
LILRB6		ILT8	CD85b	Inhibiting	
LILRB7	LIR-9	ILT11	CD85f	Inhibiting	myeloid lineage

## 一、LILR 受体的细胞分布

LILR 受体家族包括 13 个成员，主要分布在骨髓、脾、淋巴结和外周血细胞等处，尽管胞外区同源性非常高，但是不同 LILR 受体之间在细胞分布和表达水平上体现出较大的差异 [142;148-154]。LILRA1 存在于部分单核细胞表面，B 细胞中也检测到 LILRA1 mRNA 的转录；LILRA2 在多种髓性细胞表面都有表达，如：单核（巨嗜）细胞、中性粒细胞、部分树突状细胞和嗜酸性粒细胞以及少数的 NK 细胞；LILRA3 是一个可溶性受体，RT-PCR 的结果显

示其在 NK 细胞中有表达; LILRB1 除了表达在单核(巨嗜)细胞、树突状细胞和 B 细胞表面, 还在部分中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、T 细胞(包括记忆 TCL 细胞)和 NK 细胞有低水平表达; 虽然 LILRB2 和 LILRB1 的同源性很高, 但是 LILRB2 的表达似乎只局限在单核(巨嗜)细胞、树突状细胞、部分中性粒细胞和嗜酸性粒细胞, 而在 B 细胞、T 细胞和 NK 细胞表面都没有检测到表达; LILRB3 存在于所有被检测的单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞表面, 树突状细胞中也有其 mRNA 的转录; LILRB4 表达于单核细胞、树突状细胞和多种单核细胞系, 有意思的是, 除了其克隆来源的 C1R 细胞系, 其他所有检测的 B 细胞和 B 细胞系中都未见表达; LILRB5 原来认为只在 NK 细胞中表达, 但是近来的工作显示在部分单核细胞中也有表达; LILRB7 有两种形式: 膜结合型和分泌型, 膜结合型的 LILRB7 表达于单核细胞等髓性细胞表面, 而分泌型在体外实验中显示为 35 kDa 左右大小的分子。值得注意的是, 有的受体在某些细胞类型中检测到了相应 mRNA 的表达, 但在蛋白质或细胞水平却检测不到, 如: LILRB2 可以用 RT-PCR 方法检测到在 B 细胞和 NK 细胞中的转录, 但是特异的单克隆抗体无法显示其在细胞表面的存在。

LILRA5 和 LILRA6P 是 LILR 受体家族中特殊的两个成员。由于编码基因突变, 它们各有一个编码 Ig 样结构域的外显子在正常的剪接位置缺乏已知的剪接位点, 从而不能正常剪接加工, 从骨髓细胞 mRNA 逆转录得到的 cDNA 显示, 这两个基因的表达量非常低, 并且大部分 mRNA 未能剪接去除内含子。另外, 在外周血中也检测不到它们的表达[155]。因此, 推测这两个基因是 LILR 受体家族演化过程中产生的假基因。

## 二、LILR 的基因结构

LILR 基因分布于人 19 号染色体长臂端 19q13.4 处, 紧邻 KIR 基因家族并位于 KIR 基因座位的着丝粒一侧。最新公布的人类基因组序列(NCBI *Homo sapiens* Genome build34 Version 1) 显示, 目前由人类基因组计划完成全序列测定的两个单体型(来源于同一个体)中, 共发现存在 12 或 13 个 LILR 基因座位(其中一个单体型缺失 *LILRA3* 基因), 分布在染色体 19q13.4, 并且形成 2 个聚集的基因簇: LILRcen 基因簇 (centromeric LILR cluster) 和 LILRtel 基因簇 (telomeric LILR cluster)。LILRcen 基因簇靠近着丝粒, 其中分布的 LILR 基因有 *LILRB3*、*LILRB6*、*LILRB5*、*LILRB2*、*LILRA3*、*LILRB7* (*ILTII*) 和 *LILRA4*, 在染色体上占据约 130 kb 区域; LILRtel 基因簇比 LILRcen 基因簇稍长, 和 LILRcen 基因簇之间相隔约 200 kb, 其中分布的 LILR 基因有 *LILRA2*、*LILRB1*、*LILRA1*、*LILRB4*、*LILRA6P* (*ILT9*) 和 *LILRA5*, 在染色体上占据约 160 kb 区域。

19号染色体上19q13.4处除LILR基因外，在LILR两个基因簇之间存在两个与LILR同源的基因LAIR1 (Leucocyte associated Ig-like receptor 1) 和LAIR2 (Leucocyte associated Ig-like receptor 2), LAIR1基因靠近LILRcen基因簇，距离LILRcen基因簇约15 kb, LAIR2基因靠近LILRtel基因簇，距离约50 kb; 而LILRtel基因簇端粒一侧仅10 kb处分布着另一个Ig样受体家族——KIR基因家族；紧邻KIR基因家族的端粒一侧还有另外两个与LILR同源的基因Fc $\alpha$ RI (IgA Fc receptor) 和NCR1 (Natural cytotoxicity triggering receptor 1), Fc $\alpha$ RI与KIR的距离约是20 kb, NCR1和Fc $\alpha$ RI相隔约15 kb。LILR基因与KIR、Fc $\alpha$ RI以及NCR1基因之间基因结构组成类似，并且编码膜外区部分具有30%左右的序列同源性，提示LILR基因与这些基因在起源上有较为密切的亲缘关系。由于这些免疫球蛋白超家族受体多表达于白细胞表面，参与免疫应答和免疫调节，在起源上有一定的亲缘关系，因此，人染色体19q13.4区带中包含上述基因的这一段区域（约900 kb），也被称为白细胞受体复合体 (leukocyte receptor complex , LRC) [54]或白细胞受体簇 (leukocyte receptor cluster , LRC) [156]。

和 KIRs 基因在染色体上的紧密排列相比，LILRs 基因的分布相对更为松散，基因簇中两个基因间的距离约为 20-50 kb。LILR 基因组织具有 KIR、Fc $\alpha$ RI 等 LRC 中基因的共同特点：由多个外显子和内含子组成，内含子的剪接遵循“GT-AG”规则；信号肽前端部分序列（包括翻译起点）由外显子 1 编码，信号肽余下部分由长度为 36 bp 的外显子 2（也称为 mini-exon）编码；所有的 Ig 样结构域均由单独的外显子编码；活化性受体基因中编码跨膜区的外显子序列中编码一个精氨酸，胞内区编码序列很短；抑制性受体基因中有多个外显子编码胞内区，其中含有 ITIM 基序的编码成分。

LILRs 基因的内含子和临近的KIR基因不同，序列缺乏保守性，重复序列含量相对较低。作为评价基因进化速率的尺度，Alu家族中的亚类：演化年代较近的S-Alu和较远的J-Alu，在LILRtel基因簇中的比例约为5，接近基因组中的平均值3，而在KIRs基因中这一比值为70，提示KIRs基因家族在进化上出现较晚，而LILRs基因的演化远比KIRs基因早，基因结构已趋于成熟[157]。

模式生物基因组研究证实，LILRs同源基因较KIR基因的分布更为广泛 [158]。LILRs同源基因广泛存在于哺乳动物中，在鸟类中也发现有同源基因的存在；而KIR同源基因目前只在哺乳动物中发现，并且在基因组中的分布显示了较大差异，例如：人类存在14个KIRs基因，而小鼠只发现存在两个KIRs基因。与此相对应，人们发现LILRs基因多态性现象也不如KIRs基因丰富，等位

基因最多的是 *LILRB3*, 在 50 名志愿者中共发现有 18 个等位基因, 其次是 *LILRA3*, 存在 12 个等位基因。

**LILR** 基因两个独立的基因簇的起源一直是一个让人们感觉困惑的问题。**LILR** 基因散布于两个相邻的基因簇中, 并且位于 *LILRcen* 和 *LILRtel* 基因簇内部的基因具有相同的转录方向, 但两个基因簇之间的转录方向却正好相反 [159;160]。这是否意味着 **LILR** 基因两个基因簇的形成有可能来源于染色体的倒转重复? 分析位于两个 **LILR** 基因簇之间的染色体区域, 发现一个有趣的现象: 两个和 **LILR** 基因同源的基因 *LAIR1* 和 *LAIR2*, 分别与和各自相邻的 **LILR** 基因簇的转录方向一致。提示如果 **LILR** 基因的两个基因簇是由于染色体倒转形成的, 那么倒转发生的位点应该位于 *LAIR1* 和 *LAIR2* 基因之间。染色体全序列的测定为此提供了支持的证据: 序列显示在 *LAIR1* 基因和 *LAIR2* 基因之间存在两个腺相关病毒整合位点, 支持由病毒介导的染色体倒转重复发生。

Wende 和 Volz 等据此提出了一个 **LRC** 基因演化过程的假想[159;160]。他们设想 **LRC** 基因复合物和 **LILR** 家族的产生可能是一个基因“倍增—反转—倍增”的结果, 即: 首先由多轮的基因倍增产生 *FcαRI*、*NCRI*、*KIRs*、*LAIRs* 和 *LILRs* 的祖先基因, 它们具有相同的转录方向, 跨膜区含有精氨酸残基, 可能都是活化型受体分子; 然后这群祖先基因各自分化, 有的保持了原有的活化特性, 另一些在演化中丢失了跨膜区的精氨酸, 但却捕获了编码胞内区抑制性基序的外显子, 成为抑制性的受体, 从而产生现在 **LRC** 中的众多既有活化功能又有抑制功能的基因群。在目前 *LILR* 家族中, *LILRA1* 基因具有与上述特征最接近的性质, 因而被认为可能是从最早的 *LILRs* 的祖先基因直接进化而来的基因; 随后, *LILRA1* 早期基因的倍增导致 *LILRA6P* (*ILT9*)、*LILRB1* 和 *LAIR2* 早期基因的出现; 染色体倒转重复使 *LILRA1*、*LILRA6P* (*ILT9*)、*LILRB1* 和 *LAIR2* 基因获得了转录方向相反的一套拷贝: *LILRB2*、*LILRB3*、*LILRB2* 和 *LAIR1* 基因; 随后, 两个基因簇各自进化, 并继续倍增导致新的基因 *LILRA2*、*LILRB4*、*LILRA5* 和 *LILRB5*、*LILRB6*、*LILRA4*、*LILRB7* (*ILT11*) 的陆续出现。

### 三、**LILR** 受体的蛋白质结构

**LILR** 家族受体分子具有高度的同源性, 它们的胞外区由 2 或 4 个 Ig 样结构域组成, 成员相互之间的氨基酸序列同源性达 63-84%。除了 *LILRA3* 是可溶性分子以外, 其余 **LILR** 受体均为 I 型跨膜蛋白。根据跨膜区和胞内区结构

的差异, LILR 家族受体分子可以划分为 3 个亚群: 胞内区含 ITIM 样基序 (YxxV/L) 的跨膜受体分子、胞内区较短并且不含 ITIM 样基序的跨膜受体分子和不含跨膜区、胞内区的可溶性分子。

第一类 LILR 受体分子亚群为胞内区含有 ITIM 样结构基序的跨膜分子, 包括 LILR 家族中 LILRB1、LILRB2、LILRB3、LILRB4 和 LILRB5 等 5 个成员。结构上它们的胞外区均是由 2 或 4 个 Ig 样结构域组成的, 含有单一跨膜区, 胞内区含 2 至 4 个 ITIM 样 (YxxV/L) 结构基序, 其中至少有一个是传统的结合 SHP-1 磷酸化酶 (Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 1) SH2 结构域的序列 VxYxxV/L, 其它的 ITIM 样基序在 -2 位为 N 或 S, 替代了传统的 I 或 V 等疏水性氨基酸残基。位于 ITIM 基序中的酪氨酸残基发生磷酸化后, 周围细胞质环境中的 SHP-1 磷酸化酶被募集, 水解活性磷酸基团, 抑制细胞活化。

部分 LILR 抑制性受体分子胞内存在多达 4 个 ITIM 样结构, 这 4 个 ITIM 样结构是否对受体分子的功能是必须的, 或者说它们有着同等重要的作用? LILRB1 的研究显示, LILRB1 胞内存在的 4 个 ITIM 结构中, 接近胞内区碳末端的第三(VTYAQL)和第四(SIYATL)两个 ITIM 中的酪氨酸残基 (Y614, Y644) 是作为 SHP-1 磷酸化酶的停泊位点, 对 LILRB1 的功能必不可少; 而替换掉第二个 ITIM 样结构(VTYAEV)中的酪氨酸残基 (Y562) 并不影响受体的功能; 相反, 如果突变近膜端的第一个 ITIM 样结构(NLYAAV)中的酪氨酸 Y533, 会影响整个受体的磷酸化, 以及随后的 SHP-1 磷酸化酶募集。

第二类 LILR 受体分子亚群为胞内区短小, 并且不含 ITIM 样结构基序的跨膜分子, 包括 LILR 家族中 LILRA1、LILRA2、LILRA4、LILRB6 和 LILRB7 等 5 个成员。它们的胞内区短小, 不含已知的结构基序, 但是和 Fc $\alpha$ RI 和 KIR 活化受体一样, 在跨膜区含有一个带电荷的精氨酸残基。活化信号通过这个精氨酸残基与临近 Fc $\gamma$ 链的相互作用, 从而传递到细胞内。

第三类 LILR 受体分子亚群只含一个分子 LILRA3。LILRA3 的胞外区含有 4 个 Ig 样结构域, 没有跨膜区和胞内区, 是 LILR 受体分子中发现的唯一一个可溶性分子。推测 LILRA3 分子可能作为竞争性拮抗剂发挥免疫调节作用。

LILR 受体分子的胞外区和其它 LRC 受体分子的胞外区具有较高的同源

性,从目前解析出来的两个晶体结构 LILRB1 D1D2[134]和 LILRB2 D1D2[135]看, LILR 分子 D1D2 区的结构和 Fc $\alpha$ RI[161]、NCR1[131]以及 KIR 分子 D1D2 区[130;133]的结构非常相似, 结构域内部均是由两个 $\beta$ 折叠片相对包裹, 片层间以一对二硫键连接而成; 每个结构域的第一个 $\beta$ 折叠链在结构上分成为两段 (A 和 A'), 其中 A 链与 B 链之间形成氢键, 而 A' 链与另一个 $\beta$ 折叠片上的 G 链之间形成氢键, 由于 LILR 分子 A 链和 G 链上的氨基酸残基相对保守, 所以这种配对方式在球形的 Ig 样折叠结构域间这一侧形成了一个保守的封口; 这个保守的封口区域内, 存在一些非常保守的疏水作用区, 它们与铰链区和相邻结构域中小片段 G 链上保守的疏水性氨基酸残基之间相互作用, 形成一个疏水性核心结构, 构成维持结构域间相互作用的主要作用力。LILRB1 分子和 LILRB2 分子 D1D2 区间由于疏水性核心的存在, 形成一个基本固定的夹角, 或者称为“肘型结构”, LILRB1 分子 D1D2 区的夹角约 84-90 $^{\circ}$ , LILRB2 分子的结构与 LILRB1 分子相似。

组成 D1 和 D2 结构域疏水性核心结构的疏水性氨基酸残基在 LILR 受体分子的 D3 和 D4 结构域中同样以保守形式存在, 提示疏水核心结构和肘型夹角可能是 LILR 分子 4 个结构域的共同特征。值得注意的是, 在 LILRB1 分子 D1D2 结构域疏水核心结构中起重要作用的 Trp185 (类似作用也可见于 Fc $\alpha$ RI 的 Trp183、KIR2DL1 的 Trp188 和 KIR2DL2 的 Trp188), 在所有 LILR 分子 D2 和 D3 结构域中相应位置都存在, 严格保守, 但是在 D4 结构域的相应位置却被 Leu 所代替。尽管 Leu 和 Trp 都是疏水性氨基酸, 但是 Leu 残基侧链的疏水性弱于 Trp, 是否意味着近膜结构域与相邻结构域之间的夹角具有更大的活动性, 仍有待研究。

#### 四、LILR 受体的生物学功能

从基因序列和蛋白质结构上推测, LILR 受体家族包含活化性受体、抑制性受体和可溶性受体三类, 由于受体的蛋白结构和类别组成都类似于 KIR 受体家族, 预示 LILR 可能具有和 KIR 受体或者相同或者相近的免疫调节能力。随后的实验工作证明了这个推断: 将 LILRB4 和细胞表面的活化受体 (如 CD11b、HLA-DR 和 CD16) 交连, 可以明显消除由于活化受体激活所带来的 Ca $^{2+}$  浓度上升和酪氨酸残基磷酸化[162]; 与此类似, LILRB1 传递的抑制信号可以抑制 NK 细胞和 T 细胞的杀伤作用, 以及由 B 细胞抗原受体或 HLA-DR 交连引起的 B 细胞或单核细胞内 Ca $^{2+}$  浓度的变化[149]; 相反, 交连 LILRA2 分子引起单核细胞和转染大鼠 basophilic leukemia cells 细胞中 Ca $^{2+}$  浓度升高, 并导致细胞活化,

由于LILRA2胞内区很短，推测活化信号可能和Fc $\alpha$ RI、KIR中活化受体一样，也是通过跨膜区的精氨酸残基与细胞膜上的FcR $\gamma$ 链分子相作用，藉后者胞内区的ITAM基序进行传导，研究证实：FcR $\gamma$ 链分子对于LILRA2在转染细胞中的表达必不可少，免疫共沉淀显示，在单核细胞表面，LILRA2与FcR $\gamma$ 链二聚体相连[163]。

尽管在免疫细胞中已经发现了很多抑制性或活化性受体，并且又和 KIR 受体拥有如此多的共同点，LILR 受体的生物学功能仍然得到了特别的关注。因为 LILR 基因相对 KIR 基因进化年代更久远，但又比 KIR 更保守，在哺乳动物中至今仍然广泛分布，这意味着 LILR 受体对于生物个体而言一定具有不可或缺的重要功能。

LILRB1 和 LILRB2 是目前我们了解最多的 LILR 受体。LILRB1 最早发现可以结合于人巨病毒 HCMV 膜蛋白 UL18，UL18 的结构类似于 MHC-I 类分子。随后的研究显示，LILRB1 和 LILRB2 受体还可以结合多种经典的 MHC-I 类分子(HLA-A, -B)以及非经典的 HLA-G 分子，它们的亲和力范围在 2-45  $\mu$ M 之间。晶体结构显示，LILRB1 分子通过远膜端的 Ig 样结构域结合到 MHC-I 类分子的 $\alpha_3$ 结构域和 $\beta_2$ 微球蛋白上，通过胞内区的 ITIM 基序传导抑制信号，或是和 CD8 竞争 MHC-I 类分子，来抑制通过 TCR 产生的 T 细胞活化。HLA-G 是一种选择性地表达在与母体接触的胎儿滋养层组织中的组织相容性抗体，长久以来被认为是能够和 KIR 受体结合，并抑制来自母亲体内的 NK 细胞对胎儿组织发生杀伤的重要分子。研究发现，HLA-G 复合体可以识别外周血中的单核细胞以及转染细胞上的 LILRB1 和 LILRB2 受体，其中主要是 LILRB2 受体；而 LILRB1 和 LILRB2 分子与 HLA-G 的亲和力较与经典 HLA 分子亲和力高 3-4 倍，提示 LILRB1、LILRB2 与单核细胞表面 HLA-G 分子的相互作用，可能是怀孕过程中调节母体与胎儿之间免疫排斥的重要机制之一 [154;164]。

同LILRB1和LILRB2一样，LILRA1也能与经典的MHC分子结合，它是一个活化性受体，但是没有关于其功能的进一步报道。另一个研究较多的受体是LILRA2，它表达于单核细胞、中型粒细胞和嗜酸性粒细胞表面，尽管受体的配体仍然未知，但是研究发现细胞表面的LILRA2受体交连以后，嗜酸性粒细胞被激活，释放嗜酸性粒细胞衍生神经毒素C4等细胞毒颗粒蛋白[153]。

抗原提呈细胞和 T 细胞之间的相互作用让我们对 LILR 受体的功能有了更

进一步的认识。 $CD8^+CD28^-$ 同种异体抗原抑制性 T 细胞可以引起单核细胞和树突状细胞表面的 LILRB2 和 LILRB4 表达上调，并导致这些抗原提呈细胞对抗原发生耐受；产生耐受的抗原提呈细胞表面共刺激分子表达下调，导致抗原特异的  $CD4^+T$  辅助细胞对抗原无反应；同时，这些已经耐受的树突状细胞又将耐受传递给同种异体抗原特异的  $CD4^+ CD45RO^+ CD25^+$  T 细胞，使之转化为调节 T 细胞，而后者能够诱导其他的抗原提呈细胞对抗原产生耐受，由此产生级联效应。

总之，LILR 受体家族是一个在进化上比 KIR 更古老的家族，它们在长期的生物演化过程中得以保存说明这个家族受体的生理功能必然对生物个体的生存和繁衍是不可或缺的。所幸我们已经开始对它们有所了解，更深入的研究或许会揭示出更多的自然定则。

## 参考文献

1. Saphire,E.O., P.W.Parren, R.Pantophlet, M.B.Zwick, G.M.Morris, P.M.Rudd, R.A.Dwek, R.L.Stanfield, D.R.Burton, and I.A.Wilson. 2001. Crystal structure of a neutralizing human IgG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science* 293: 1155-1159.
2. Conley,M.E. and D.L.Delacroix. 1987. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann. Intern. Med* 106: 892-899.
3. Monteiro,R.C. and J.G.van de Winkel. 2003. IgA Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 177-204.
4. Morton,H.C., M.van Egmond, and J.G.van de Winkel. 1996. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit Rev. Immunol.* 16: 423-440.
5. Rifai,A., K.Fadden, S.L.Morrison, and K.R.Chintalacharuvu. 2000. The N-glycans determine the differential blood clearance and hepatic uptake of human immunoglobulin (Ig)A1 and IgA2 isotypes. *J Exp Med* 191: 2171-2182.
6. Rifai,A. and M.Mannik. 1984. Clearance of circulating IgA immune complexes is mediated by a specific receptor on Kupffer cells in mice. *J Exp Med* 160: 125-137.
7. Senior,B.W., J.I.Dunlop, M.R.Batten, M.Kilian, and J.M.Woof. 2000. Cleavage of a recombinant human immunoglobulin A2 (IgA2)-IgA1 hybrid antibody by certain bacterial IgA1 proteases. *Infect. Immun.* 68: 463-469.
8. Boehm,M.K., J.M.Woof, M.A.Kerr, and S.J.Perkins. 1999. The Fab and Fc fragments of IgA1 exhibit a different arrangement from that in IgG: a study by X-ray and neutron solution scattering and homology modelling. *J Mol. Biol.* 286: 1421-1447.
9. Robinson,J.K., T.G.Blanchard, A.D.Levine, S.N.Emancipator, and M.E.Lamm. 2001. A mucosal IgA-mediated excretory immune system in vivo. *J Immunol.* 166: 3688-3692.
10. Schaffer,F.M., R.C.Monteiro, J.E.Volanakis, and M.D.Cooper. 1991. IgA deficiency. *Immunodefic. Rev.* 3: 15-44.
11. Arulanandam,B.P., R.H.Raeder, J.G.Nedrud, D.J.Bucher, J.Le, and D.W.Metzger. 2001. IgA immunodeficiency leads to inadequate Th cell priming and increased susceptibility to influenza virus infection. *J Immunol.* 166: 226-231.
12. Mbawuike,I.N., S.Pacheco, C.L.Acuna, K.C.Switzer, Y.Zhang, and G.R.Harriman. 1999. Mucosal immunity to influenza without IgA: an IgA knockout mouse model. *J Immunol.* 162: 2530-2537.
13. Broliden,K., J.Hinkula, C.Devito, P.Kiama, J.Kimani, D.Trabattoni, J.J.Bwayo, M.Clerici, F.Plummer, and R.Kaul. 2001. Functional HIV-1 specific IgA antibodies in HIV-1 exposed, persistently IgG seronegative female sex workers. *Immunol. Lett.* 79:

29-36.

14. Devito,C., K.Broliden, R.Kaul, L.Svensson, K.Johansen, P.Kiama, J.Kimani, L.Lopalco, S.Piconi, J.J.Bwayo, F.Plummer, M.Clerici, and J.Hinkula. 2000. Mucosal and plasma IgA from HIV-1-exposed uninfected individuals inhibit HIV-1 transcytosis across human epithelial cells. *J Immunol.* 165: 5170-5176.
15. Devito,C., J.Hinkula, R.Kaul, J.Kimani, P.Kiama, L.Lopalco, C.Barass, S.Piconi, D.Trabattoni, J.J.Bwayo, F.Plummer, M.Clerici, and K.Broliden. 2002. Cross-clade HIV-1-specific neutralizing IgA in mucosal and systemic compartments of HIV-1-exposed, persistently seronegative subjects. *J Acquir. Immune. Defic. Syndr.* 30: 413-420.
16. Kerr,M.A. 1990. The structure and function of human IgA. *Biochem. J* 271: 285-296.
17. Russell,M.W., D.A.Sibley, E.B.Nikolova, M.Tomana, and J.Mestecky. 1997. IgA antibody as a non-inflammatory regulator of immunity. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 466-470.
18. Togo,S., T.Shimokawa, Y.Fukuchi, and C.Ra. 2003. Alternative splicing of myeloid IgA Fc receptor (Fc alpha R, CD89) transcripts in inflammatory responses. *FEBS Lett.* 535: 205-209.
19. Wolf,H.M., I.Hauber, H.Gulle, A.Samstag, M.B.Fischer, R.U.Ahmad, and M.M.Eibl. 1996. Anti-inflammatory properties of human serum IgA: induction of IL-1 receptor antagonist and Fc alpha R (CD89)-mediated down-regulation of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and IL-6 in human monocytes. *Clin. Exp Immunol.* 105: 537-543.
20. Bogers,W.M., R.K.Stad, L.A.Van Es, and M.R.Daha. 1991. Immunoglobulin A: interaction with complement, phagocytic cells and endothelial cells. *Complement Inflamm.* 8: 347-358.
21. Suankratay,C., Y.Zhang, D.Jones, T.F.Lint, and H.Gewurz. 1999. Enhancement of lectin pathway haemolysis by immunoglobulins. *Clin. Exp Immunol.* 117: 435-441.
22. Zhang,W. and P.J.Lachmann. 1994. Glycosylation of IgA is required for optimal activation of the alternative complement pathway by immune complexes. *Immunology* 81: 137-141.
23. Zhang,W., Y.M.Lucisano, and P.J.Lachmann. 1997. Complement in IgA immune-complex-induced neutrophil activation. *Biochem. Soc. Trans.* 25: 462-466.
24. Zhang,W., J.Voice, and P.J.Lachmann. 1995. A systematic study of neutrophil degranulation and respiratory burst in vitro by defined immune complexes. *Clin. Exp Immunol.* 101: 507-514.

25. Peipp,M. and T.Valerius. 2002. Bispecific antibodies targeting cancer cells. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 507-511.
26. Stockmeyer,B., M.Dechant, M.van Egmond, A.L.Tutt, K.Sundarapandian, R.F.Graziano, R.Repp, J.R.Kalden, M.Gramatzki, M.J.Glennie, J.G van de Winkel, and T.Valerius. 2000. Triggering Fc alpha-receptor I (CD89) recruits neutrophils as effector cells for CD20-directed antibody therapy. *J Immunol.* 165: 5954-5961.
27. van Spriel,A.B., J.H.Leusen, H.Vile, and J.G van de Winkel. 2002. Mac-1 (CD11b/CD18) as accessory molecule for Fc alpha R (CD89) binding of IgA. *J Immunol.* 169: 3831-3836.
28. Phalipon,A., A.Cardona, J.P.Kraehenbuhl, L.Edelman, P.J.Sansonetti, and B.Corthesy. 2002. Secretory component: a new role in secretory IgA-mediated immune exclusion in vivo. *Immunity* 17: 107-115.
29. Phalipon,A. and B.Corthesy. 2003. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol.* 24: 55-58.
30. Kolatkar,A.R., A.K.Leung, R.Isecke, R.Brossmer, K.Drickamer, and W.I.Weis. 1998. Mechanism of N-acetylgalactosamine binding to a C-type animal lectin carbohydrate-recognition domain. *J Biol. Chem.* 273: 19502-19508.
31. Weigel,P.H. and J.H.Yik. 2002. Glycans as endocytosis signals: the cases of the asialoglycoprotein and hyaluronan/chondroitin sulfate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 341-363.
32. Meier,M., M.D.Bider, V.N.Malashkevich, M.Spiess, and P.Burkhard. 2000. Crystal structure of the carbohydrate recognition domain of the H1 subunit of the asialoglycoprotein receptor. *J Mol. Biol.* 300: 857-865.
33. Moura,I.C., M.N.Centelles, M.Arcos-Fajardo, D.M.Malheiros, J.F.Collawn, M.D.Cooper, and R.C.Monteiro. 2001. Identification of the transferrin receptor as a novel immunoglobulin (Ig)A1 receptor and its enhanced expression on mesangial cells in IgA nephropathy. *J Exp Med* 194: 417-425.
34. Moura,I.C., M.Arcos-Fajardo, C.Sadaka, V.Leroy, M.Benhamou, J.Novak, F.Vrtovsnik, E.Haddad, K.R.Chintalacharuvu, and R.C.Monteiro. 2004. Glycosylation and size of IgA1 are essential for interaction with mesangial transferrin receptor in IgA nephropathy. *J Am. Soc. Nephrol.* 15: 622-634.
35. Sakamoto,N., K.Shibuya, Y.Shimizu, K.Yotsumoto, T.Miyabayashi, S.Sakano, T.Tsuji, E.Nakayama, H.Nakauchi, and A.Shibuya. 2001. A novel Fc receptor for IgA and IgM is expressed on both hematopoietic and non-hematopoietic tissues. *Eur. J Immunol.* 31: 1310-1316.
36. Shibuya,A., N.Sakamoto, Y.Shimizu, K.Shibuya, M.Osawa, T.Hiroyama, H.J.Eyre,

- GR.Sutherland, Y.Endo, T.Fujita, T.Miyabayashi, S.Sakano, T.Tsuji, E.Nakayama, J.H.Phillips, L.L.Lanier, and H.Nakauchi. 2000. Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol.* 1: 441-446.
37. Fanger,M.W., L.Shen, J.Pugh, and G.M.Bernier. 1980. Subpopulations of human peripheral granulocytes and monocytes express receptors for IgA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3640-3644.
38. Maliszewski,C.R., C.J.March, M.A.Schoenborn, S.Gimpel, and L.Shen. 1990. Expression cloning of a human Fc receptor for IgA. *J Exp Med* 172: 1665-1672.
39. Hamre,R., I.N.Farstad, P.Brandtzaeg, and H.C.Morton. 2003. Expression and modulation of the human immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and the FcR gamma chain on myeloid cells in blood and tissue. *Scand. J Immunol.* 57: 506-516.
40. Monteiro,R.C., R.W.Hostoffer, M.D.Cooper, J.R.Bonner, G.L.Gartland, and H.Kubagawa. 1993. Definition of immunoglobulin A receptors on eosinophils and their enhanced expression in allergic individuals. *J Clin. Invest* 92: 1681-1685.
41. Geissmann,F., P.Launay, B.Pasquier, Y.Lepelletier, M.Leborgne, A.Lehuen, N.Brousse, and R.C.Monteiro. 2001. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J Immunol.* 166: 346-352.
42. Heystek,H.C., C.Moulou, A.M.Woltman, P.Garonne, and C.Van Kooten. 2002. Human immature dendritic cells efficiently bind and take up secretory IgA without the induction of maturation. *J Immunol.* 168: 102-107.
43. Smith,P.D., L.E.Smythies, M.Mosteller-Barnum, D.A.Sibley, M.W.Russell, M.Merger, M.T.Sellers, J.M.Orenstein, T.Shimada, M.F.Graham, and H.Kubagawa. 2001. Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS- and IgA-mediated activities. *J Immunol.* 167: 2651-2656.
44. Hostoffer,R.W., I.Krukovets, and M.Berger. 1993. Increased Fc alpha R expression and IgA-mediated function on neutrophils induced by chemoattractants. *J Immunol.* 150: 4532-4540.
45. Hostoffer,R.W., I.Krukovets, and M.Berger. 1994. Enhancement by tumor necrosis factor-alpha of Fc alpha receptor expression and IgA-mediated superoxide generation and killing of *Pseudomonas aeruginosa* by polymorphonuclear leukocytes. *J Infect. Dis.* 170: 82-87.
46. Nikolova,E.B. and M.W.Russell. 1995. Dual function of human IgA antibodies: inhibition of phagocytosis in circulating neutrophils and enhancement of responses in IL-8-stimulated cells. *J Leukoc. Biol.* 57: 875-882.
47. Grossetete,B., P.Launay, A.Lehuen, P.Jungers, J.F.Bach, and R.C.Monteiro. 1998.

- Down-regulation of Fc alpha receptors on blood cells of IgA nephropathy patients: evidence for a negative regulatory role of serum IgA. *Kidney Int.* 53: 1321-1335.
48. Reterink,T.J., E.W.Leverht, N.Klar-Mohamad, L.A.Van Es, and M.R.Daha. 1996. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) down-regulates IgA Fc-receptor (CD89) expression on human monocytes. *Clin. Exp Immunol.* 103: 161-166.
  49. Schiller,C., A.Spitler, M.Willheim, Z.Szepfalusi, H.Agis, M.Koller, M.Peterlik, and G.Boltz-Nitulescu. 1994. Influence of suramin on the expression of Fc receptors and other markers on human monocytes and U937 cells, and on their phagocytic properties. *Immunology* 81: 598-604.
  50. De Wit,T.P., H.C.Morton, P.J.Capel, and J.G.van de Winkel. 1995. Structure of the gene for the human myeloid IgA Fc receptor (CD89). *J Immunol.* 155: 1203-1209.
  51. Shimokawa,T., T.Tsuge, K.Okumura, and C.Ra. 2000. Identification and characterization of the promoter for the gene encoding the human myeloid IgA Fc receptor (FcalphaR, CD89). *Immunogenetics* 51: 945-954.
  52. Shimokawa,T. and C.Ra. 2003. C/EBP alpha and Ets protein family members regulate the human myeloid IgA Fc receptor (Fc alpha R, CD89) promoter. *J Immunol.* 170: 2564-2572.
  53. Davis,R.S., G.Dennis, Jr., M.R.Odom, A.W.Gibson, R.P.Kimberly, P.D.Burrows, and M.D.Cooper. 2002. Fc receptor homologs: newest members of a remarkably diverse Fc receptor gene family. *Immunol. Rev.* 190: 123-136.
  54. Wagtmann,N., S.Rojo, E.Eichler, H.Mohrenweiser, and E.O.Long. 1997. A new human gene complex encoding the killer cell inhibitory receptors and related monocyte/macrophage receptors. *Curr. Biol.* 7: 615-618.
  55. Kubagawa,H., P.D.Burrows, and M.D.Cooper. 1997. A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5261-5266.
  56. Zhang,G., J.R.Young, C.A.Tregaskes, P.Sopp, and C.J.Howard. 1995. Identification of a novel class of mammalian Fc gamma receptor. *J Immunol.* 155: 1534-1541.
  57. Morton,H.C., A.E.Schiel, S.W.Janssen, and J.G.van de Winkel. 1996. Alternatively spliced forms of the human myeloid Fc alpha receptor (CD89) in neutrophils. *Immunogenetics* 43: 246-247.
  58. Patry,C., Y.Sibille, A.Lehuen, and R.C.Monteiro. 1996. Identification of Fc alpha receptor (CD89) isoforms generated by alternative splicing that are differentially expressed between blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.* 156: 4442-4448.

59. Pleass,R.J., P.D.Andrews, M.A.Kerr, and J.M.Woof. 1996. Alternative splicing of the human IgA Fc receptor CD89 in neutrophils and eosinophils. *Biochem. J* 318 ( Pt 3): 771-777.
60. Reterink,T.J., C.L.Verweij, L.A.Van Es, and M.R.Daha. 1996. Alternative splicing of IgA Fc receptor (CD89) transcripts. *Gene* 175: 279-280.
61. Morton,H.C., van den Herik-Oudijk IE, P.Vossebeld, A.Snijders, A.J.Verhoeven, P.J.Capel, and J.G.van de Winkel. 1995. Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. *J Biol. Chem.* 270: 29781-29787.
62. Bracke,M., J.W.Lammers, P.J.Coffer, and L.Koenderman. 2001. Cytokine-induced inside-out activation of Fc $\alpha$ R (CD89) is mediated by a single serine residue (S263) in the intracellular domain of the receptor. *Blood* 97: 3478-3483.
63. Monteiro,R.C., H.Kubagawa, and M.D.Cooper. 1990. Cellular distribution, regulation, and biochemical nature of an Fc alpha receptor in humans. *J Exp Med* 171: 597-613.
64. Monteiro,R.C., M.D.Cooper, and H.Kubagawa. 1992. Molecular heterogeneity of Fc alpha receptors detected by receptor-specific monoclonal antibodies. *J Immunol.* 148: 1764-1770.
65. Stewart,W.W. and M.A.Kerr. 1990. The specificity of the human neutrophil IgA receptor (Fc alpha R) determined by measurement of chemiluminescence induced by serum or secretory IgA1 or IgA2. *Immunology* 71: 328-334.
66. Wines,B.D., M.D.Hulett, G.P.Jamieson, H.M.Trist, J.M.Spratt, and P.M.Hogarth. 1999. Identification of residues in the first domain of human Fc alpha receptor essential for interaction with IgA. *J Immunol.* 162: 2146-2153.
67. Wines,B.D., C.T.Sardjono, H.H.Trist, C.S.Lay, and P.M.Hogarth. 2001. The interaction of Fc alpha RI with IgA and its implications for ligand binding by immunoreceptors of the leukocyte receptor cluster. *J Immunol.* 166: 1781-1789.
68. Henry,A.J., J.M.McDonnell, R.Ghirlando, B.J.Sutton, and H.J.Gould. 2000. Conformation of the isolated cepsilon3 domain of IgE and its complex with the high-affinity receptor, FcepsilonRI. *Biochemistry* 39: 7406-7413.
69. Maenaka,K., P.A.van der Merwe, D.I.Stuart, E.Y.Jones, and P.Sondermann. 2001. The human low affinity Fcgamma receptors IIa, IIb, and III bind IgG with fast kinetics and distinct thermodynamic properties. *J Biol. Chem.* 276: 44898-44904.
70. Shopes,B. 1995. Temperature-dependent binding of IgG1 to a human high affinity Fc receptor. *Mol. Immunol.* 32: 375-378.
71. Weisbart,R.H., A.Kacena, A.Schuh, and D.W.Golde. 1988. GM-CSF induces human

- neutrophil IgA-mediated phagocytosis by an IgA Fc receptor activation mechanism.  
Nature 332: 647-648.
72. Herr,A.B., C.L.White, C.Milburn, C.Wu, and P.J.Bjorkman. 2003. Bivalent binding of IgA1 to Fc $\alpha$ RI suggests a mechanism for cytokine activation of IgA phagocytosis. J Mol. Biol. 327: 645-657.
73. Morton.H.C., G van Zandbergen, C.Van Kooten, C.J.Howard, J.G van de Winkel, and P.Brandtzaeg. 1999. Immunoglobulin-binding sites of human Fc $\alpha$ RI (CD89) and bovine Fc $\gamma$ 2R are located in their membrane-distal extracellular domains. J Exp Med 189: 1715-1722.
74. Morton.H.C., C.J.Howard, A.K.Storset, and P.Brandtzaeg. 2001. Identification of residues within the extracellular domain 1 of bovine Fc $\gamma$ 2R essential for binding bovine IgG2. J Biol. Chem. 276: 47794-47800.
75. Carayannopoulos,L., J.M.Hexham, and J.D.Capra. 1996. Localization of the binding site for the monocyte immunoglobulin (Ig) A-Fc receptor (CD89) to the domain boundary between Calpha2 and Calpha3 in human IgA1. J Exp Med 183: 1579-1586.
76. Sondermann,P., J.Kaiser, and U.Jacob. 2001. Molecular basis for immune complex recognition: a comparison of Fc-receptor structures. J Mol. Biol. 309: 737-749.
77. Pleass,R.J., J.I.Dunlop, C.M.Anderson, and J.M.Woof. 1999. Identification of residues in the CH2/CH3 domain interface of IgA essential for interaction with the human fcalpha receptor (Fc $\alpha$ RI) CD89. J Biol. Chem. 274: 23508-23514.
78. Hexham,J.M., K.D.White, L.N.Carayannopoulos, W.Mandecki, R.Brisette, Y.S.Yang, and J.D.Capra. 1999. A human immunoglobulin (Ig)A calpha3 domain motif directs polymeric Ig receptor-mediated secretion. J Exp Med 189: 747-752.
79. White,K.D. and J.D.Capra. 2002. Targeting mucosal sites by polymeric immunoglobulin receptor-directed peptides. J Exp Med 196: 551-555.
80. Pleass,R.J., T.Areschoug, G.Lindahl, and J.M.Woof. 2001. Streptococcal IgA-binding proteins bind in the Calpha 2-Calpha 3 interdomain region and inhibit binding of IgA to human CD89. J Biol. Chem. 276: 8197-8204.
81. Woof,J.M. 2002. The human IgA-Fc alpha receptor interaction and its blockade by streptococcal IgA-binding proteins. Biochem. Soc. Trans. 30: 491-494.
82. Pfefferkorn,L.C. and G.R.Yeaman. 1994. Association of IgA-Fc receptors (Fc $\alpha$ R) with Fc epsilon RI gamma 2 subunits in U937 cells. Aggregation induces the tyrosine phosphorylation of gamma 2. J Immunol. 153: 3228-3236.
83. Saito,K.. K.Suzuki, H.Matsuda, K.Okumura, and C.Ra. 1995. Physical association of Fc receptor gamma chain homodimer with IgA receptor. J Allergy Clin. Immunol. 96:

1152-1160.

84. Honorio-Franca,A.C., P.Launay, M.M.Carneiro-Sampaio, and R.C.Monteiro. 2001. Colostral neutrophils express Fc alpha receptors (CD89) lacking gamma chain association and mediate noninflammatory properties of secretory IgA. *J Leukoc. Biol.* 69: 289-296.
85. Launay,P., C.Patry, A.Lehuen, B.Pasquier, U.Bank, and R.C.Monteiro. 1999. Alternative endocytic pathway for immunoglobulin A Fc receptors (CD89) depends on the lack of FcRgamma association and protects against degradation of bound ligand. *J Biol. Chem.* 274: 7216-7225.
86. Lang,M.L., L.Shen, and W.F.Wade. 1999. Gamma-chain dependent recruitment of tyrosine kinases to membrane rafts by the human IgA receptor Fc alpha R. *J Immunol.* 163: 5391-5398.
87. van Zandbergen,G, R.Westerhuis, N.K.Mohamad, J.Gvan de Winkel, M.R.Daha, and C.Van Kooten. 1999. Crosslinking of the human Fc receptor for IgA (FcalphaRI/CD89) triggers FcR gamma-chain-dependent shedding of soluble CD89. *J Immunol.* 163: 5806-5812.
88. van Egmond,M., v.Hanneke, V, and J.Gvan de Winkel. 1999. The human Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) on transgenic peritoneal macrophages triggers phagocytosis and tumor cell lysis. *Immunol. Lett.* 68: 83-87.
89. Bracke,M., E.Nijhuis, J.W.Lammers, P.J.Coffer, and L.Koenderman. 2000. A critical role for PI 3-kinase in cytokine-induced Fcalpha-receptor activation. *Blood* 95: 2037-2043.
90. Gulle,H., A.Samstag, M.M.Eibl, and H.M.Wolf. 1998. Physical and functional association of Fc alpha R with protein tyrosine kinase Lyn. *Blood* 91: 383-391.
91. Lang,M.L., Y.W.Chen, L.Shen, H.Gao, G.A.Lang, T.K.Wade, and W.F.Wade. 2002. IgA Fc receptor (FcalphaR) cross-linking recruits tyrosine kinases, phosphoinositide kinases and serine/threonine kinases to glycolipid rafts. *Biochem. J* 364: 517-525.
92. Launay,P., A.Lehuen, T.Kawakami, U.Bank, and R.C.Monteiro. 1998. IgA Fc receptor (CD89) activation enables coupling to syk and Btk tyrosine kinase pathways: differential signaling after IFN-gamma or phorbol ester stimulation. *J Leukoc. Biol.* 63: 636-642.
93. Park,R.K., K.D.Izadi, Y.M.Deo, and D.L.Durden. 1999. Role of Src in the modulation of multiple adaptor proteins in FcalphaRI oxidant signaling. *Blood* 94: 2112-2120.
94. Petty,H.R., R.G.Worth, and R.F.Todd, III. 2002. Interactions of integrins with their partner proteins in leukocyte membranes. *Immunol. Res.* 25: 75-95.
95. Zhang,W. and P.J.Lachmann. 1996. Neutrophil lactoferrin release induced by IgA immune complexes can be mediated either by Fc alpha receptors or by complement

- receptors through different pathways. *J Immunol.* 156: 2599-2606.
96. van Egmond,M., A.J.van Vuuren, H.C.Morton, A.B.van Spriel, L.Shen, F.M.Hofhuis, T.Saito, T.N.Mayadas, J.S.Verbeek, and J.Gvan de Winkel. 1999. Human immunoglobulin A receptor (FcalphaRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR gamma chain and CR3 (CD11b/CD18). *Blood* 93: 4387-4394.
97. Shen,L., M.van Egmond, K.Siemasko, H.Gao, T.Wade, M.L.Lang, M.Clark, J.Gvan de Winkel, and W.F.Wade. 2001. Presentation of ovalbumin internalized via the immunoglobulin-A Fc receptor is enhanced through Fc receptor gamma-chain signaling. *Blood* 97: 205-213.
98. Deo,Y.M., K.Sundarapandian, T.Keler, P.K.Wallace, and R.F.Graziano. 1998. Bispecific molecules directed to the Fc receptor for IgA (Fc alpha RI, CD89) and tumor antigens efficiently promote cell-mediated cytotoxicity of tumor targets in whole blood. *J Immunol.* 160: 1677-1686.
99. Valerius,T., B.Stockmeyer, A.B.van Spriel, R.F.Graziano, van den Herik-Oudijk IE, R.Repp, Y.M.Deo, J.Lund, J.R.Kalden, M.Gramatzki, and J.Gvan de Winkel. 1997. Fc $\alpha$ RI (CD89) as a novel trigger molecule for bispecific antibody therapy. *Blood* 90: 4485-4492.
100. Dechant,M., G.Vidarsson, B.Stockmeyer, R.Repp, M.J.Glennie, M.Gramatzki, J.Gvan de Winkel, and T.Valerius. 2002. Chimeric IgA antibodies against HLA class II effectively trigger lymphoma cell killing. *Blood* 100: 4574-4580.
101. Huls,G, I.A.Heijnen, E.Cuomo, L.J.van der, E.Boel, J.Gvan de Winkel, and T.Logtenberg. 1999. Antitumor immune effector mechanisms recruited by phage display-derived fully human IgG1 and IgA1 monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 59: 5778-5784.
102. Stockmeyer,B., D.Elsasser, M.Dechant, R.Repp, M.Gramatzki, M.J.Glennie, J.Gvan de Winkel, and T.Valerius. 2001. Mechanisms of G-CSF- or GM-CSF-stimulated tumor cell killing by Fc receptor-directed bispecific antibodies. *J Immunol. Methods* 248: 103-111.
103. Hellwig,S.M., A.B.van Spriel, J.F.Schellekens, F.R.Mooi, and J.Gvan de Winkel. 2001. Immunoglobulin A-mediated protection against *Bordetella pertussis* infection. *Infect. Immun.* 69: 4846-4850.
104. van der,P.W., G.Vidarsson, H.A.Vile, J.Gvan de Winkel, and M.E.Rodriguez. 2000. Pneumococcal capsular polysaccharide-specific IgA triggers efficient neutrophil effector functions via Fc $\alpha$ RI (CD89). *J Infect. Dis.* 182: 1139-1145.
105. van Egmond,M., E.Van Garderen, A.B.van Spriel, C.A.Damen, E.S.van Amersfoort, Gvan Zandbergen, J.van Hattum, J.Kuiper, and J.Gvan de Winkel. 2000. Fc $\alpha$ RI-positive liver Kupffer cells: reappraisal of the function of immunoglobulin A in immunity. *Nat Med* 6: 680-685.

106. Gill,S.C. and P.H.von Hippel. 1989. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* 182: 319-326.
107. Terwilliger,T.C. and J.Berendzen. 1999. Automated MAD and MIR structure solution. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55 ( Pt 4): 849-861.
108. Terwilliger,T.C. 2000. Maximum-likelihood density modification. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56 ( Pt 8): 965-972.
109. Brunger,A.T., P.D.Adams, G.M.Clore, W.L.DeLano, P.Gros, R.W.Grosse-Kunstleve, J.S.Jiang, J.Kuszewski, M.Nilges, N.S.Pannu, R.J.Read, L.M.Rice, T.Simonson, and G.L.Warren. 1998. Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 54 ( Pt 5): 905-921.
110. Laskowski,R.A., J.A.Rullmann, M.W.MacArthur, R.Kaptein, and J.M.Thornton. 1996. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. *J Biomol. NMR* 8: 477-486.
111. Laemmli,U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
112. 1988. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
113. Schagger,H. and Gvon Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
114. Plaut,A.G. 1988. Production and isolation of Neissereal IgA proteases. *Methods in Enzymology* 165: 117-120.
115. Lilie,H., E.Schwarz, and R.Rudolph. 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 497-501.
116. Mayer,M. and J.Buchner. 2004. Refolding of inclusion body proteins. *Methods Mol. Med* 94: 239-254.
117. Rudolph,R. and H.Lilie. 1996. In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J* 10: 49-56.
118. Baldwin,R.L. and G.D.Rose. 1999. Is protein folding hierachic? I. Local structure and peptide folding. *Trends Biochem. Sci* 24: 26-33.
119. Baldwin,R.L. and G.D.Rose. 1999. Is protein folding hierachic? II. Folding intermediates and transition states. *Trends Biochem. Sci* 24: 77-83.
120. Sondermann,P. and U.Jacob. 1999. Human Fcgamma receptor IIb expressed in *Escherichia coli* reveals IgG binding capability. *Biol. Chem.* 380: 717-721.

121. Wenig,K. and P.Sondermann. 2003. Purification, crystallization and X-ray diffraction analysis of the extracellular part of the human Fc receptor for IgA, FcalphaRI (CD89). *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 59: 2247-2250.
122. Creighton T.E. Process for the production of a protein. [4977248]. 12-11-1990. USA. Patent
123. Lin,L., P.Ayala, J.Larson, M.Mulks, M.Fukuda, S.R.Carlsson, C.Enns, and M.So. 1997. The Neisseria type 2 IgA1 protease cleaves LAMP1 and promotes survival of bacteria within epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 24: 1083-1094.
124. Garman,S.C., J.P.Kinet, and T.S.Jardetzky. 1998. Crystal structure of the human high-affinity IgE receptor. *Cell* 95: 951-961.
125. Maxwell,K.F., M.S.Powell, M.D.Hulett, P.A.Barton, I.F.Mckenzie, T.P.Garrett, and P.M.Hogarth. 1999. Crystal structure of the human leukocyte Fc receptor, Fc gammaRIIa. *Nat Struct. Biol.* 6: 437-442.
126. Sondermann,P., R.Huber, and U.Jacob. 1999. Crystal structure of the soluble form of the human fcgamma-receptor IIb: a new member of the immunoglobulin superfamily at 1.7 A resolution. *EMBO J* 18: 1095-1103.
127. Sondermann,P., R.Huber, V.Oosthuizen, and U.Jacob. 2000. The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc gammaRIII complex. *Nature* 406: 267-273.
128. Harpaz,Y. and C.Chothia. 1994. Many of the immunoglobulin superfamily domains in cell adhesion molecules and surface receptors belong to a new structural set which is close to that containing variable domains. *J Mol. Biol.* 238: 528-539.
129. Williams,A.F. and A.N.Barclay. 1988. The immunoglobulin superfamily--domains for cell surface recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 6: 381-405.
130. Fan,Q.R., L.Mosyak, C.C.Winter, N.Wagtmann, E.O.Long, and D.C.Wiley. 1997. Structure of the inhibitory receptor for human natural killer cells resembles haematopoietic receptors. *Nature* 389: 96-100.
131. Foster,C.E., M.Colonna, and P.D.Sun. 2003. Crystal structure of the human NK cell activating receptor NKp46 reveals structural relationship to other leukocyte receptor complex immunoreceptors. *J. Biol. Chem.*
132. Saulquin,X., L.N.Gastinel, and E.Vivier. 2003. Crystal structure of the human natural killer cell activating receptor KIR2DS2 (CD158j). *J Exp Med* 197: 933-938.
133. Snyder,G.A., A.G.Brooks, and P.D.Sun. 1999. Crystal structure of the HLA-Cw3 allotype-specific killer cell inhibitory receptor KIR2DL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 3864-3869.

- molecules. *Immunity*. 7: 273-282.
143. Samardis,J. and M.Colonna. 1997. Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways. *Eur. J. Immunol.* 27: 660-665.
144. Pulford,K., K.Micklem, J.Thomas, M.Jones, and D.Y.Mason. 1991. A 72-kD B cell-associated surface glycoprotein expressed at high levels in hairy cell leukaemia and plasma cell neoplasms. *Clin. Exp. Immunol.* 85: 429-435.
145. Banham,A.H., M.Colonna, M.Cella, K.J.Micklem, K.Pulford, A.C.Willis, and D.Y.Mason. 1999. Identification of the CD85 antigen as ILT2, an inhibitory MHC class I receptor of the immunoglobulin superfamily. *J. Leukoc. Biol.* 65: 841-845.























