

人 Tim-3 基因真核表达载体的构建及表达

刘津麟¹ 刘东升² 李冬宏¹ 周南进¹ 谢 勇^{2△}

(1 南昌大学医学科学研究所 江西 南昌 330006 2 南昌大学第一附属医院消化研究所 江西 南昌 330006)

摘要 目的:为了构建可在真核细胞中高效表达人 Tim-3(hTim-3)的真核表达质粒,以便用于 hTim-3 肿瘤免疫治疗研究。**方法:**取健康人外周血的单个核细胞,用高保真聚合酶扩增 hTim-3 基因,先进行 hTim-3 基因的亚克隆,用 Bgl¹ 和 Sal¹ 限制性内切酶切下带有酶切位点的 hTim-3 基因,最终构建 hTim-3 基因的真核表达质粒 pEGFP-N1-hTim-3。用脂质体方法转染质粒至肝癌细胞 SMMC7721 和巨噬细胞 U937 中。48h 后荧光显微镜观察转染细胞绿色荧光表达情况,初步判断转染效率。**结果:**酶切和测序鉴定证实目的基因 hTim-3 正确插入到真核表达载体 pEGFP-N1 中,转染肝癌细胞 SMMC7721 和巨噬细胞 U937 后,在荧光显微镜下观察到绿色荧光蛋白的表达。**结论:**成功构建了可在真核细胞中高效表达 hTim-3 基因的真核表达质粒 pEGFP-N1-hTim-3,为进一步研究 hTim-3 的肿瘤免疫治疗奠定了基础。

关键词: Tim-3 基因;克隆;表达

中图分类号: Q75, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)18-3427-04

Construction of Eukaryotic Expression Vector of Human TIM-3 Gene

LIU Jin-lin¹, LIU Dong-sheng², LI Dong-hong¹, ZHOU Nan-Jin¹, XIE Yong^{2△}

(1 The Medical Institute of Nanchang University, Nanchang 330006;

2 Institute of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006; Jiangxi Province, China)

ABSTRACT Objective: To construct eukaryotic expression plasmids which can efficiently express Human TIM-3 Gene in eukaryotic cells for the research of tumor immunology. **Methods:** The hTim-3 cDNA was particularly amplified with primers from the total RNA of the PBMC of the health person and then cloned to the vector pGEM-T. The pGEM-T-hTim-3 recombinant plasmid was purified and digested with Bgl¹ and Sal¹, then the hTim-3 was inserted into the Bgl¹ and Sal¹ sites of the eukaryotic expression plasmid pEGFP-N1. Use the method of lipofectine to transfect the plasmid into the SMMC7721 cell and macrophage U937. Observe the expression of GFP under the fluorescence microscope 48 hours later to detect the hTim-3 expression. **Results:** Digestion and sequencing demonstrate that pEGFP-N1-hTim-3 recombinant plasmid was successfully constructed. The expression of GFP in pEGFP-N1-hTim-3 transfected hepatocarcinoma cell SMMC7721 and macrophage U937 was observed and located at the membrane of the cell. It was consistent with that the hTim-3 was the type I membrane protein and demonstrated that the fusion gene could be effectively translated. **Conclusion:** We have successfully constructed pEGFP-N1-hTim-3 eukaryotic expression plasmid. The newly constructed recombinant vector is useful for follow-up identification of the function of hTim-3 protein in different cells, and it lays the foundation for the follow-up tumor immunology research.

Key words: Tim-3 gene; Clone; Expression

Chinese Library Classification(CLC): Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3427-04

前言

Tim 是一个在进化中保守的家族。到目前为止,已在小鼠和大鼠、猴及人类中得以鉴定。现已在小鼠中鉴定了 8 个 Tim 基因,位于第 11 号染色体上 11B1.1,包括编码 4 个蛋白 Tim (1~4)和 4 个假想蛋白 Tim(5~8);而在人类鉴定了 3 个 Tim 基因(Tim-1、Tim-3 和 Tim-4)位于第 5 号染色体上 5q33.2^[1]。其中

Tim-3 是终末分化的 Th1 细胞表面标志,不表达于初始 T 细胞、B 细胞。但近年研究表明 Tim-3 除了在 Th1 细胞上表达外,还在 Th17 细胞、Treg、单核巨噬细胞、NK 细胞、树突状细胞、肥大细胞和某些肿瘤细胞上表达^[2-7]。Tim-3 与 Tim-3L(galectin-9)结合能下调 Th1 型免疫应答^[8],许多研究已证实^[9,10,11],在许多 Th1 反应异常的自身免疫反应及病原体感染引起的慢性炎症性疾病中存在着 Tim-3/Tim-3L 信号通路的异常。Sánchez-Fueyo 等^[10]研究还发现,阻断 Tim-3 通路可阻止移植耐受和外周耐受的形成。这些都提示 Tim-3 除了调节 Th 免疫反应外可能还具有多种生物学作用,但是其确切作用尚不清楚。我们推测 Tim-3 可以通过调节 Th1 细胞反应,从而调节肿瘤免疫。为进一步探索 hTim-3 在肿瘤基因治疗中的作用,我们构建了 hTim-3 基因的真核表达载体,为今后研究提供材料。

1 材料与方法

作者简介: 刘津麟(1985-),男,硕士,上海交通大学在读博士,主要研究方向:分子生物学和免疫学 E-mail: jiuliu8524.student@sina.com
△通讯作者: 谢勇(1959-),女,博士,教授、主任医师,主要研究方向:消化系病的基础与临床研究 E-mail: xieyong_med@163.com
共同通讯作者: 周南进(1959-),男,研究员,主要研究方向:消化系病的分子生物学和免疫学 E-mail: jxznj@tom.com
(收稿日期:2011-04-10 接受日期:2011-04-30)

1.1 细菌、载体及细胞株

大肠杆菌 DH5 α 菌株为南昌大学第一附属医院消化研究所保存菌种 pGEM-T 载体向 Promega 公司购买；真核表达质粒 pEGFP-N1 载体由华中科技大学同济医学院免疫系惠赠；肝癌细胞株 SMMC7721 由南昌大学第一附属医院消化研究所保存，巨噬细胞株 U937 购买自中国科学院细胞库，培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基，培养条件为 5% CO₂、37℃。

1.2 主要试剂

限制性内切酶 Bgl 和 Sal 、pfuDNA 聚合酶、X-Gal 和 IPTG 均购自美国 Fermentas 公司；T4 DNA 连接酶和 WizardTM SV Gel and PCR Clean-Up System 均购自美国 Promega 公司；无血清高糖型 DMEM 细胞培养基购自美国 GIBCO 公司，胎牛血清购自杭州四季青公司。

1.3 引物设计

根据 GenBank hTim-3 利用 Primer Premier 5 软件设计带有特定限制性内切酶的正义和反义引物。引物设计原则：Tim-3 正义引物的限制性内切酶位点须置于起始密码 ATG 前，而反义引物的限制性内切酶位点须置于终止密码部位并能将终止密码删除，以保证 hTim-3 基因能正确完整地表达且不影响其后的 GFP 基因的正确表达。PCR 扩增 Tim-3 上游引物 GGTC-GACCTTGGCATTGCAAAGCGACGA，下游引物 CAGATCT-GCCACCATGTGTTTCACATCTTCCC，上下游引物分别加入 Bgl 和 Sal 限制性内切酶切位点，引物由上海生工生物有限公司合成。

1.4 人外周血单核细胞(PMBC)中 Tim-3 的提取

无菌抽取健康人静脉血 4ml 肝素抗凝，应用淋巴细胞分离液常规分离单个核细胞，按常规用 TRIzol 试剂盒提取细胞总 RNA，测含量后用逆转录酶逆转录成 cDNA。cDNA 为模板用高保真 pfu 酶进行聚合酶链反应扩增，聚合酶链反应条件为 94℃2 min，94℃45s，60℃45s，72℃1.5min，30 个循环。72℃10 min 取出 PCR 试管，加入 Taq 聚合酶 2 μ l 72℃继续延伸 30min。产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定，按照 WizardTM SV Gel and PCR Clean-Up System 回收试剂盒回收已鉴定正确的电泳条带。

1.5 亚克隆载体的构建

把带有 A 尾的 PCR 产物用 T4 连接酶连接到 pGEM-T 载体上，连接产物转化进感受态大肠杆菌 DH5 α ，菌液涂布在含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上，37℃培养 16~24h 出现蓝白斑菌落，挑取白斑单克隆菌落放入含 Amp 的 LB 液体培养基中摇菌，提取质粒，PCR、酶切和测序鉴定是否为 hTim-3 基因。

1.6 真核表达载体 pEGFP-N1-Tim-3 的构建

双酶切后的表达载体和从 pGEM-T-hTim-3 重组质粒中双酶切下的 hTim-3 基因用 T4 连接酶连接过夜，载体与目的基因的摩尔比为 1：3，连接后转化进感受态大肠杆菌 DH5 α ，菌液涂布在含卡那霉素的 LB 固体培养基上，培养 16~24h 出现单克隆菌，挑取单克隆菌，在含卡那霉素的 LB 液体培养基中扩增大肠杆菌，提取质粒，最后 PCR、酶切和测序鉴定是否为 hTim-3 基因。

1.7 重组质粒的表达鉴定

pEGFP-N1-hTim-3 真核表达质粒溶液和脂质体溶液孵育后转染至肝癌细胞 SMMC7721 和巨噬细胞 U937 中。48h 后荧光显微镜下观察质粒转染细胞绿色荧光表达情况，判断转染效率。

2 结果

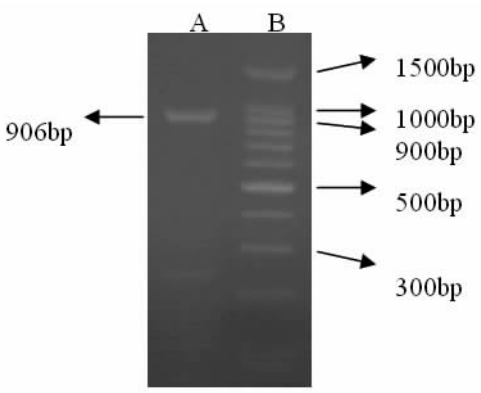


图1 PCR 扩增健康人外周血单个核细胞

A PCR 扩增 hTim-3 基因产物

B DNA Marker

Fig.1 Amplification of hTim-3 from the PBMC of normal volunteer by the RT-PCR

A: hTim-3

B: DNA Marker

2.1 反转录 - 聚合酶链反应扩增 hTim-3 基因结果

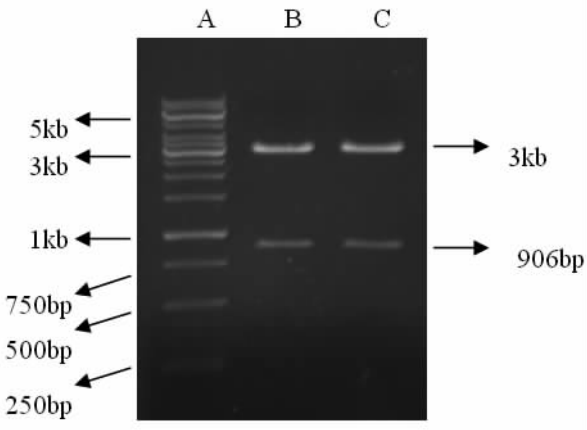


图2 酶切 pGEM-T-hTim-3 融合质粒

A DNA Marker

BC Sal 和 Bgl 双酶切结果

Fig.2 Identification of recombinant pGEM-T-hTim-3 plasmid.

A: DNA Marker

BC: Sal and Bgl analysis of pGEM-T-hTim-3

2.2 重组载体 pGEM-T-hTim-3 的酶切鉴定

2.3 重组表达载体 pEGFP-N1-hTim-3 的酶切鉴定

2.4 重组表达质粒的测序鉴定结果

2.5 荧光显微镜观察绿色荧光蛋白在肝癌细胞 SMMC7721 和

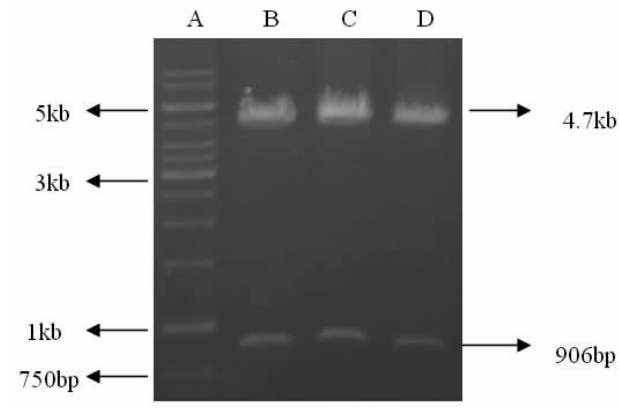


图 3 pEGFP-N1-hTim-3 双酶切电泳图

A :DNA Marker

BCD :Sal 和 Bgl 双酶切结果

Fig.3 Identification of recombinant pEGFP-N1-hTim-3 plasmid

A: DNA Marker

BCD: Sal and Bgl analysis of pEGFP-N1-hTim-3

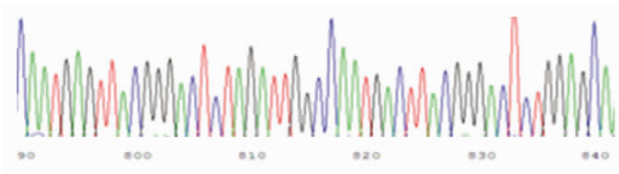


图 4 pEGFP-N1-hTim-3 部分片段测序结果

Fig.4 The partial sequence map of recombinant pEGFP-N1-hTim-3 plasmid

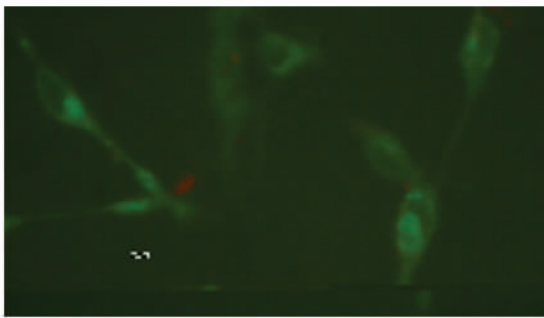


图 5 转染 pEGFP-N1-hTim-3 的肝癌细胞 SMMC7721 (100×)

Fig.5 Analysis of the expressed hTim3-GFP in the transfected Hepatoma cell line SMMC-7721 by fluorescence microscope (100×)

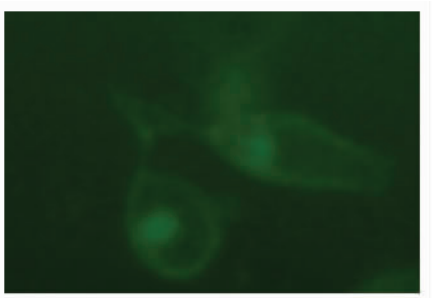


图 6 转染 pEGFP-N1-hTim-3 的巨噬细胞 U937 (400×)

Fig.6 Analysis of the expressed hTim3-GFP in the transfected human macrophage cell line U937 by fluorescence microscope (400×)

巨噬细胞 U937 中的表达和细胞定位

3 讨论

Tim-3 主要在分化成熟的 Th1 细胞表达 ,Tim-3 与其配体 Galectin-9 共同组成 Tim-3/ Galectin-9 通路,对 Th1 免疫反应进行负性调控^[12]。但近年来研究表明它也在非 Th1 细胞上表达 ,发挥着不同的生物学效应。Nagahara^[13]等研究表明在树突状细胞和 CD8⁺ T 细胞上表达的 Tim-3 与其配体 Galectin-9 作用后产生的不是免疫负性调控作用 ,而是增强它们的抗肿瘤免疫活性。Anderson 等^[14]研究发现 Tim-3 在固有免疫细胞上的表达可与 TLR 起协同作用,起免疫促进作用。Wiener 等^[15]发现 Tim-3 在黑色素瘤细胞上的表达,可降低肿瘤细胞的黏附能力 ,有利于肿瘤一生存和转移。前面已述及 Tim-3 还可作为配体进行信号逆向传递 ,发挥不同的生物学效应 ,并且在不同亚型的巨噬细胞中表达有差异 ,其所产生的效应也所不同。因此,到目前为止对 hTim-3 功能的了解还非常有限,它的许多功能及作用机制尚未阐明 ,有待进一步研究探讨。我们的研究表明所构建的 pEGFP-N1-hTim-3 真核表达质粒可成功的在人肝癌细胞 SMMC7721 和人巨噬细胞 U937 中表达 ,将该重组质粒转染到人肝癌细胞 SMMC7721 和人巨噬细胞 U937 后 ,在荧光显微镜下可看到载体上带有的 GFP 基因顺利表达 ,且具有细胞膜蛋白的定位 ,符合 hTim-3 蛋白为跨膜蛋白的特性 ,这更加说明了我们的 hTim-3 基因能够在肝癌细胞 SMMC7721 和人巨噬细胞 U937 中顺利表达。总之 ,pEGFP-N1-hTim-3 真核表达质粒构建成功 ,并且在两种真核细胞中表达 ,说明其可用性。为后续研究 hTim-3 对肿瘤免疫和巨噬细胞活性调节作用 ,以及 hTim-3 为靶点治疗疾病奠定基础。

参 考 文 献(References)

[1] Kuchroo VK, Umetsu DT, DeKruyff RH, et al. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease [J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(6): 454-462

[2] Hastings WD, Anderson DE, Kassam N, et al. TIM-3 is expressed on activated human CD4 (+) T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines[J]. Eur J Immunol, 2009,39(9):2492-2501

[3] Wang F, Wan L, Zhang C, et al. Tim-3-Galectin-9 pathway involves the suppression induced by CD4+CD25+ regulatory T cells[J]. Immunobiology, 2009,214(5):342-349

[4] Susumu Nakae, Motoyasu Iikura, Hajime Suto, et al. TIM-1 and TIM-3 enhancement of Th2 cytokine production by mast cells[J]. Blood, 2007,110(7):2565-2568

[5] Khademi M, Illé s Z, Gielen AW, et al. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) and Tim-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis [J]. J Immunol, 2004, 172(11):7169-7176

[6] Frisnacho-Kiss S, Nyland JF, Davis SE, et al. Cutting edge: T cell Ig mucin-3 reduces inflammatory heart disease by increasing CTLA-4 during innate immunity[J]. J Immunol, 2006, 176(11): 6411-6415

[7] Su EW, Lin JY, Kane LP. TIM-1 and TIM-3 proteins in immune regulation[J]. Cytokine, 2008, 44(1): 9-13

[8] Zhu C, Anderson AC, Schubart A, et al. The Tim-3 ligand galectin-9

- negatively regulates T helper type 1 immunity [J]. *Nat Immunol*, 2005,6(12):1245-1252
- [9] Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2003,4(11): 1102-1110
- [10] Sánchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance[J]. *Nat Immunol*, 2003, 4(11): 1093-1101
- [11] Anderson DE. Tim-3 as a therapeutic target in human inflammatory diseases[J]. *Expert Opin Ther Targets*. 2007,11(8):1005-1009.
- [12] Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity [J]. *Curr Opin Immunol*, 2006,18(6): 665-669
- [13] Kelko Nagahara,Tomohiro Arikawa, et al. Galectin-9 Increases Tim-3- dendritic cells and CD8 T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions [J]. *J Immunol*, 2008,181(11): 7660-7669
- [14] Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells[J]. *Science*, 2007,318(5853): 1141-1143
- [15] Zoltan Wiener, Barbara Kohalmi, Peter Pocza, et al. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells[J]. *J Invest Dermatol*, 2007,127(4): 906-914
-
- (上接第 3407 页)
- [5] Bonato VLD, Lima VMF, Tascon RE, et al. Identification and Characterization of Protective T Cells in hsp65 DNA-Vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-Infected Mice [J]. *Infect Immun*, 1998,66: 169 - 175
- [6] Wang LM, Bai YL, Shi CH, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding the fusion protein of mycobacterium heat shock protein 65 (Hsp65) with human interleukin-2 against Mycobacterium tuberculosis in BALB/c mice [J]. *APMIS*, 2008, 116: 1071-1081
- [7] Sutherland JS, Adetifa IM, Hillet PC, et al. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease[J]. *Eur J Immunol*, 2009, 39: 723-729
- [8] 何炬斌. 白细胞介素 -2 在结核病治疗中的应用 [J]. *上海免疫学杂志*, 1994, 14: 245-246
- He Ju-bing. The usage of interleukine-2 in tuberculosis treatment [J]. *Shanghai Immunology*, 1994, 14: 245-246 (In Chinese)
- [9] Johnson BJ, Ress SR, Willcox P, et al. Clinical and immune responses of tuberculosis patients treated with low-dose IL-2 and multidrug therapy[J]. *Cytokines Mol Ther*, 1995,1:185-196
- [10] 王丽梅,师长宏,张海,等. 结核分枝杆菌 HSP65-IL-2 融合蛋白的表达和纯化[J]. *中国人兽共患病杂志*. 2006, 22(9):801-804
- Wang Li-mei, Shi Chang-hong, Zhang Hai, et al. The Mycobacteria tuberculosis HSP65-IL-2 fusion protein expression and purification [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2006, 22(9): 801-804 (In Chinese)
- [11] Zhu X, Venkataprasad N, Ivanyi J, et al. Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against Mycobacterium tuberculosis infection[J]. *Immunology*, 1997, 92:6-9
- [12] Hess J, Grode L, Hellwig J, et al. Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant Salmonella typhimurium vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of Mycobacterium bovis BCG [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2000, 27:283-289
- [13] 赵宝华,张莉,石振华. 基因重组卡介苗的优点及应用[J]. *生物学通报*, 2002, 37:18-20
- Zhao Bao-hua, Zhang Li, Si Zheng-hua. The advantage and application of Genetic recombinated BCG [J]. *Bullitin of Biology*, 2002, 37: 18-20 (In Chinese)
- [14] Falcone V, Bassey E, Jacobs W Jr, et al. The immunogenicity of recombinant mycobacterium smegmatis bearing BCG genes [J]. *Microbiology*, 1995, 141: 1239-1245
- [15] 史皆然,李元,戚好文,等. 利用 Hsp 基因调控元件构建胞内表达的 E.coli-BCG 穿梭载体 [J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2003, 23: 629-632
- Shi Jie-ran, Li Yuan, Qi Hao-wen, et al. Using the Hsp gene control component to compose expressin shuttle vector in E.coli-BCG[J]. *Journal of microbiology and immunology*, 2003, 23: 629-632. (In Chinese)