



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102066415 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 18

(21) 申请号 200880124056. 0

(22) 申请日 2008. 10. 29

(30) 优先权数据

61/000800 2007. 10. 29 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 06. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2008/012251 2008. 10. 29

(87) PCT申请的公布数据

W02009/058285 EN 2009. 05. 07

(71) 申请人 弗吉尼亚科技知识产权有限公司

地址 美国弗吉尼亚州

(72) 发明人 黄耀伟 孟祥金

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 张萍 郭文洁

(51) Int. Cl.

C07K 14/705(2006. 01)

权利要求书 6 页 说明书 46 页 附图 34 页

(54) 发明名称

猪 DC-SIGN、ICAM-3 和 LSECtin 及其用途

(57) 摘要

本发明涉及编码新型猪 DC-SIGN 和 LSECtin 蛋白的独特、完整基因组序列(包括 pDC-SIGN 基因和 pLSECtin 的全长 cDNA 和基因的新型核苷酸序列)的克隆、鉴定和表征。本发明还提供了编码从猪的单核细胞来源的树突细胞新发现的猪 ICAM-3 同种型的核酸分子及其用途。具体来说,本发明涉及分离的核酸分子,所述核酸分子包括编码猪 DC-SIGN、猪 ICAM-3、猪 LSECtin 中的一种或多种的核苷酸序列、所述核苷酸序列的补体或所述核苷酸序列的功能限定部分或连接到蛋白的蛋白融合产物,所述蛋白可能来源于猪或人。本申请中还描述了分离和克隆所述新型猪基因的方法及将所述新核苷酸序列用于繁殖病毒特别是包膜病毒的改进方法的方法。本发明还包括可稳定地表达所述猪蛋白的新转染细胞或细胞系、新抗体等。

1. 一种分离的核酸分子,所述核酸分子包括编码选自 pDC-SIGN、pICAM-3 和 pLSECtin 的一种或多种蛋白的核苷酸序列、所述核苷酸序列中至少一个的补体和所述核苷酸序列中至少一个的功能性限定部分。

2. 根据权利要求 1 所述的核酸分子,其中所述核苷酸序列编码融合蛋白。

3. 根据权利要求 2 所述的核酸分子,其中所述融合蛋白包括至少两种蛋白,其中 pLSECtin 与 pDC-SIGN 连接,或与所述两种蛋白中至少一种的功能性限定部分连接。

4. 根据权利要求 2 所述的核酸分子,其中所述融合蛋白还包括选自 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 及其组合的至少一种蛋白或其功能限定部分。

5. 根据权利要求 3 所述的核酸分子,其中所述融合蛋白还包括选自 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 及其组合物的至少一种蛋白或其功能限定部分。

6. 根据权利要求 4 所述的核酸分子,其中所述融合蛋白包含 pDC-SIGN 或 pLSECtin 的糖识别结构域和 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 或其组合的胞质尾区、跨膜结构域或重复颈区。

7. 根据权利要求 1 所述的核酸分子,其中所述编码 pDC-SIGN 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO :1 或其互补链。

8. 根据权利要求 1 所述的核酸分子,其中所述编码 pICAM-3 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO :4、SEQ ID NO :39 或其互补链。

9. 根据权利要求 1 所述的核酸分子,其中所述编码 pLSECtin 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO :36 或其互补链。

10. 一种生物学功能质粒或病毒载体,所述生物学功能质粒或病毒载体包含如权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 中任一项所述的核酸分子。

11. 根据权利要求 10 所述的生物学功能质粒或病毒载体,其中所述载体为 pTriEx-1.1Neo。

12. 一种分离的转染细胞或细胞系,所述细胞或细胞系表达选自 pDC-SIGN、pICAM-3 和 pLSECtin 的至少一种或多种蛋白、至少一种所述核苷酸序列的补体和其功能限定部分。

13. 根据权利要求 12 所述的细胞或细胞系,其中所述细胞或细胞系表达融合蛋白。

14. 根据权利要求 13 所述的细胞或细胞系,其中所述融合蛋白包括至少两种蛋白,其中 pLSECtin 与 pDC-SIGN 或所述两种蛋白中至少一种的功能性限定部分连接。

15. 根据权利要求 13 所述的细胞或细胞系,其中所述融合蛋白还包括选自 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 及其组合的至少一种蛋白或其功能限定部分。

16. 根据权利要求 14 所述的细胞或细胞系,其中所述融合蛋白还包括选自 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 及其组合的至少一种蛋白或其功能限定部分。

17. 根据权利要求 15 所述的细胞或细胞系,其中所述融合蛋白包含 pDC-SIGN 或 pLSECtin 的糖识别结构域和 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 或其组合的胞质尾区、跨膜结构域或重复颈区。

18. 根据权利要求 12、13、14 或 15 中任一项所述的细胞或细胞系,其中所述细胞或细胞系选自树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

19. 根据权利要求 12、13、14 或 15 中任一项所述的细胞或细胞系,其中所述细胞或细胞系选自 BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、

3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-I、RAW 264.7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

20. 制备蛋白产物的方法,所述方法包括:在合适的营养条件下以允许所述蛋白产物表达的方式使用权利要求 1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 中任一项所述的核酸分子转染的原核或真核细胞生长,和分离所述核酸分子表达的所需多肽产物。

21. 一种分离的蛋白,所述蛋白包括 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:37。

22. 一种分离的单克隆或多克隆抗体,所述抗体与 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列特异性结合。

23. 根据权利要求 22 所述的抗体,其中所述抗体为多克隆抗体,且所述多克隆抗体与包括 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:13 与 SEQ ID NO:14 的組合的肽区特异性结合。

24. 一种杂交瘤细胞系,所述杂交瘤细胞系产生如权利要求 22 或 23 所述的抗体。

25. 一种天然或人工合成的寡糖配体,所述寡糖配体与 SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列特异性结合。

26. 一种繁殖病毒的方法,所述方法包括:

(a) 提供转染细胞或细胞系,所述转染细胞或细胞系包含编码选自 pDC-SIGN、pICAM-3 和 pLSECtin 的一种或多种蛋白的核苷酸序列、至少一种所述核苷酸序列的补体和至少一种所述核苷酸序列的功能性定义部分;

(b) 在细胞生长培养基中使所述转染细胞或细胞系生长以形成培养物;

(c) 用所述病毒接种所述培养物;和

(d) 在培养中在能有效繁殖所述病毒的条件下游育已接种的培养物。

27. 根据权利要求 26 所述的方法,所述方法还包括游育所述已接种的培养物直到观察到致细胞病变效应或达到高滴度。

28. 根据权利要求 26 所述的方法,所述方法还包括溶解所述细胞以释放胞内病毒体和收获病毒抗原。

29. 根据权利要求 26、27 或 28 所述的方法,其中步骤 (a) 提供包含编码融合蛋白的核苷酸序列的转染细胞或细胞系。

30. 根据权利要求 29 所述的方法,其中步骤 (a) 中的所述融合蛋白包括至少两种蛋白,其中 pLSECtin 与 pDC-SIGN 或所述两种蛋白中至少一种的功能性限定部分连接。

31. 根据权利要求 29 所述的方法,其中步骤 (a) 中的所述融合蛋白还包括选自 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 及其組合的至少一种蛋白或其功能限定部分。

32. 根据权利要求 30 所述的方法,其中步骤 (a) 中的所述融合蛋白还包括选自 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 及其組合的至少一种蛋白或其功能限定部分。

33. 根据权利要求 31 所述的方法,其中步骤 (a) 中的所述融合蛋白包含 pDC-SIGN 或 pLSECtin 的糖识别结构域和 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 或其組合的胞质尾区、跨膜结构域或重复颈区。

34. 根据权利要求 26、27 或 28 所述的方法,其中步骤 (a) 提供包含包括 SEQ ID NO:1 或其互补链的核苷酸序列的转染细胞或细胞系。

35. 根据权利要求 26、27 或 28 所述的方法,其中步骤 (a) 提供包含包括 SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:39 或其互补链的核苷酸序列的转染细胞或细胞系。

36. 根据权利要求 26、27 或 28 所述的方法,其中步骤 (a) 提供包含包括 SEQ IDNO :36 或其互补链的核苷酸序列的转染细胞或细胞系。

37. 根据权利要求 26、27 或 28 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

38. 根据权利要求 26、27 或 28 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

39. 根据权利要求 29 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

40. 根据权利要求 29 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

41. 根据权利要求 30 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

42. 根据权利要求 30 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

43. 根据权利要求 31 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

44. 根据权利要求 31 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-KI、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

45. 根据权利要求 32 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

46. 根据权利要求 32 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

47. 根据权利要求 33 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

48. 根据权利要求 33 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

49. 根据权利要求 34 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

50. 根据权利要求 34 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

51. 根据权利要求 35 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系:树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

52. 根据权利要求 35 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系: BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

53. 根据权利要求 36 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系: 树突细胞、巨噬细胞、单核细胞、淋巴细胞和滋养细胞。

54. 根据权利要求 36 所述的方法,其中步骤 (a) 提供选自如下的转染细胞或细胞系: BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW264. 7、MA-104、293T 和 ST 细胞。

55. 根据权利要求 26、27 或 28 所述的方法,其中所述病毒为包膜或无包膜病毒。

56. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述病毒为选自如下的包膜病毒:猪繁殖和呼吸综合征病毒、猪呼吸道冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪内源性逆转录病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、传染性胃肠炎病毒、日本乙脑病毒、人类免疫缺陷病毒、登革病毒、西尼罗河病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒、猫冠状病毒、人巨细胞病毒、猪巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、猿免疫缺陷病毒、猫免疫缺陷病毒、辛德毕斯病毒、单纯疱疹病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、猪流感病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒、非洲猪瘟病毒、典型猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、假狂犬病毒、猪痘病毒、水泡口炎病毒、狂犬病毒、东方型马脑脊髓炎病毒、马动脉炎病毒。

57. 根据权利要求 29 所述的方法,其中所述病毒为包膜或无包膜病毒。

58. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述病毒为选自如下的包膜病毒:猪繁殖和呼吸综合征病毒、猪呼吸道冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪内源性逆转录病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、传染性胃肠炎病毒、日本乙脑病毒、人类免疫缺陷病毒、登革病毒、西尼罗河病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒、猫冠状病毒、人巨细胞病毒、猪巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、猿免疫缺陷病毒、猫免疫缺陷病毒、辛德毕斯病毒、单纯疱疹病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、猪流感病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒、非洲猪瘟病毒、典型猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、假狂犬病毒、猪痘病毒、水泡口炎病毒、狂犬病毒、东方型马脑脊髓炎病毒、马动脉炎病毒。

59. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述病毒为选自如下的包膜病毒:猪繁殖和呼吸综合征病毒、猪呼吸道冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪内源性逆转录病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、传染性胃肠炎病毒、日本乙脑病毒、人类免疫缺陷病毒、登革病毒、西尼罗河病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒、猫冠状病毒、人巨细胞病毒、猪巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、猿免疫缺陷病毒、猫免疫缺陷病毒、辛德毕斯病毒、单纯疱疹病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、猪流感病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒、非洲猪瘟病毒、典型猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、假狂犬病毒、猪痘病毒、水泡口炎病毒、狂犬病毒、东方型马脑脊髓炎病毒、马动脉炎病毒。

60. 根据权利要求 38 所述的方法,其中所述病毒为选自如下的包膜病毒:猪繁殖和呼吸综合征病毒、猪呼吸道冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪内源性逆转录病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、传染性胃肠炎病毒、日本乙脑病毒、人类免疫缺陷病毒、登革病毒、西尼罗河病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒、猫冠状病毒、人巨细胞病毒、猪巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、猿免疫缺陷病毒、猫免疫缺陷病毒、辛德毕斯病毒、单纯疱疹

病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、猪流感病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒、非洲猪瘟病毒、典型猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、假狂犬病毒、猪痘病毒、水泡口炎病毒、狂犬病毒、东方型马脑脊髓炎病毒、马动脉炎病毒。

61. 根据权利要求 39 所述的方法,其中所述病毒为选自如下的包膜病毒:猪繁殖和呼吸综合征病毒、猪呼吸道冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪内源性逆转录病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、传染性胃肠炎病毒、日本乙脑病毒、人类免疫缺陷病毒、登革病毒、西尼罗河病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒、猫冠状病毒、人巨细胞病毒、猪巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、猿免疫缺陷病毒、猫免疫缺陷病毒、辛德毕斯病毒、单纯疱疹病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、猪流感病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒、非洲猪瘟病毒、典型猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、假狂犬病毒、猪痘病毒、水泡口炎病毒、狂犬病毒、东方型马脑脊髓炎病毒、马动脉炎病毒。

62. 根据权利要求 40 所述的方法,其中所述病毒为选自如下的包膜病毒:猪繁殖和呼吸综合征病毒、猪呼吸道冠状病毒、猪流行性腹泻病毒、猪内源性逆转录病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒、传染性胃肠炎病毒、日本乙脑病毒、人类免疫缺陷病毒、登革病毒、西尼罗河病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒、猫冠状病毒、人巨细胞病毒、猪巨细胞病毒、丙型肝炎病毒、猿免疫缺陷病毒、猫免疫缺陷病毒、辛德毕斯病毒、单纯疱疹病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、猪流感病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒、非洲猪瘟病毒、典型猪瘟病毒、牛病毒性腹泻病毒、假狂犬病毒、猪痘病毒、水泡口炎病毒、狂犬病毒、东方型马脑脊髓炎病毒、马动脉炎病毒。

63. 根据权利要求 55 所述的方法,其中所述病毒为无包膜病毒。

64. 根据权利要求 63 所述的方法,其中所述无包膜病毒为戊型肝炎病毒或猪圆环病毒 2 型。

65. 根据权利要求 57 所述的方法,其中所述病毒为无包膜病毒。

66. 根据权利要求 65 所述的方法,其中所述无包膜病毒为戊型肝炎病毒或猪圆环病毒 2 型。

67. 克隆来自非灵长类大动物种属的未知 DC-SIGN cDNA 同源物的方法,所述方法包括如下步骤:

(a) 从动物静脉血中分离单核细胞来源的树突细胞并在合适宿主细胞中在允许所述树突细胞的生长的合适营养条件下体外培养所述单核细胞来源的树突细胞;

(b) 提取 RNA;

(c) 采用根据编码人和小鼠 DC-SIGN 的核酸分子的多重序列比对设计成与人和小鼠 DC-SIGN 核苷酸序列中保守序列互补的简并引物进行进行逆转录酶 (RT) 和 PCR 以合成第一链 cDNA,并通过 RT-PCR 扩增序列与人 DC-SIGN 同源的短片段;

(d) 采用分别为 5' -RACE 或 3' -RACE 设计的包含 SEQ ID NO:9 的基因特异性引物 PDR-1 和包含 SEQ ID NO:10 的基因特异性引物 PDF-1 并根据简并 PCR 产物的序列信息在所述短片段上进行逆转录和 RACE-PCR;

(e) 通过快速扩增 cDNA 末端 (RACE)-PCR 反应产物克隆动物体内所述未知 DC-SIGN 同源物的全长 cDNA 的两个重叠片段;和

(f) 分离、纯化或测序所述动物的 DC-SIGN 同源物。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述宿主细胞为CD 14阳性外周血液单核细胞、源于脾的淋巴细胞或源于骨髓淋巴细胞的培养物。

猪 DC-SIGN、ICAM-3 和 LSECtin 及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据美国法典 35U. S. C. § 119(e) 要求 2007 年 10 月 29 日提交的美国临时申请 60/000,800 的权益。所述优先权申请的全部内容通过引用结合于本文中。

[0003] 针对联邦赞助的研究或开发的声明不适用

[0004] 联合研究协议的组织名称不适用

[0005] 参考序列表

[0006] 通过引用结合本申请中提供的包含序列表文件的一张光盘上的材料。

[0007] 发明背景

发明领域

[0008] 本发明涉及来源于各种猪单核细胞来源的树突和肝细胞的新型猪 DC-SIGN 和猪 LSECtin 基因、cDNA、猪 DC-SIGN 和猪 LSECtin 蛋白、稳定表达所述新型蛋白的转染细胞或细胞系、融合产物、抗体、分离和克隆所述猪基因的方法及所述猪蛋白用于繁殖病毒的用途。本发明还提供了编码从猪单核细胞来源的树突细胞新发现的猪 ICAM-3 同种型的核苷酸序列。

[0009] 相关技术描述

[0010] 本说明书中引用的所有专利和公开物的全部内容通过引用结合于本文中。

[0011] 树突细胞 (DC) 是遍布外周免疫系统的专门性抗原呈递细胞 (APC)。侵入性外源抗原引发未成熟 DC 从血液向组织迁移,它们在所述组织处检测并捕获所述抗原 (K. Palucka 和 J. Banchereau, "Dendritic cell: a link between innate and adaptive immunity (树突细胞:天然免疫和获得性免疫之间的连接)", " J. Clin. Immunol. 19:12-25(1999))。激活的 DC 通过 MHC 分子将捕获的蛋白加工成免疫原性肽 (称为 MHC 分子或主要组织相容性复合体的一组膜糖蛋白) 并呈递给 T 细胞。通过 DC 识别侵入性病原体受到模式识别受体 (PRR) 包括 Toll 样受体 (TLR) 和凝集素介导 (S. Thoma-Uszynski 等人, "Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors (通过哺乳动物的 toll 样受体诱导直接抗微生物活性)", " Science 291:1544-1547(2001) ;W. I. Weis 等人, " The C-type lectin superfamily in the immune system (免疫系统中的 C-型凝集素超家族)", " Immunol. Rev. 163:19-34(1998))。在 DC 表面表达的凝集素是钙依赖性 C-型凝集素受体 (CLR) 家族中的成员并在抗原捕获和 DC 内在化中起关键作用 (Weis 等人, 1998, 出处同上)。CLR 也在其它 APC, 包括巨噬细胞上表达。

[0012] CLR 家族包括通过以钙依赖性方式结合到糖蛋白配体上的多糖链上进行蛋白-糖相互作用的大量蛋白。许多 CLR 属于在 APC 表面表达的 PRR, 它们能识别外源病原体, 在宿主免疫应答中起关键作用。II 型 CLR 根据它们位于细胞胞质内的 NH₂ 末端结构域-胞质尾区 (CT) 分类。其它 II 型 CLR 结构域包括在 CT 后的跨膜结构域 (TMD)、在暴露于细胞外的羧基末端处单糖识别结构域 (CRD) 和在 TMD 和 CRD 之间的颈结构域。

[0013] II 型 CLR 的人凝集素基因簇, 位于人染色体 19p13.3 处的 CD23/LSECtin/

DC-SIGN/L-SIGN, 越来越引起了人们的关注。人 DC-SIGN、hL-SIGN 和 hLSEctin, 它们具有类似的基因组结构 (W.Liu 等人, " Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSEctin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node (一种新型 C 型凝集素样基因 LSEctin 的表征: 糖结合的展示及在肝和淋巴结的窦状内皮细胞内的表达), " J. Biol. Chem. 279:18748-58 (2004)), 是能介导病原体识别的重要 C-型凝集素。人 CD23 (FCER2) 是低亲和力的 IgE 受体, 其在细胞-细胞粘附、B 细胞存活和抗原呈递中起重要作用。树突细胞特异性细胞间粘附分子-3 (" ICAM-3") 结合非整合素 (人 CD209, 也称为 "DC-SIGN", 一种 44kDa 的 II 型跨膜蛋白), 一种 CLR, 被确定为介导 DC 和 T 细胞相互作用的 ICAM-3 结合蛋白 (T.B.Geijtenbeek 等人, " Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses (DC-SIGN-一种支持初次免疫应答的新型树突细胞特异性 ICAM-3 受体的鉴定), " Cell 100:575-585 (2000)) 和介导 HIV-1 传播到反式易感细胞的 HIV-1 gp120 受体 (T.B.Geijtenbeek 等人, " DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells (DC-SIGN, 一种增强 T 细胞转染的树突细胞特异性 HIV-1 结合蛋白), " Cell 100:587-597 (2000))。此外, 发现 DC-SIGN 与 ICAM-2 结合蛋白相互作用, 调节趋化因子诱导的跨越休止和激活内皮的 DC 运输 (T.B.Geijtenbeek 等人, " DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking (DC-SIGN-ICAM-2 相互作用介导树突细胞运输), " Nat. Immunol. 1:353-357 (2000))。第二种人 DC-SIGN (hDC-SIGN) 同源体 hL-SIGN (CD209L) 或 DC-SIGNR 随后得以确认并显示出具有与 hDC-SIGN 类似的作用, 但病原体识别性能稍微不同 (A.A.Bashirova 等人, " A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection (树突细胞特异性细胞间粘附分子-3 结合非整合素 (DC-SIGN) 相关蛋白在人肝窦状内皮细胞上高度表达且促进 HIV-1 感染), " J. Exp. Med. 193:671-678 (2001))。

[0014] 人 DC-SIGN 在体外主要在单核细胞来源的人 DC 上表达, 在体内主要在正常人淋巴结、真皮、粘膜和脾内的未成熟和成熟 DC 和肺泡内巨噬细胞上表达 (T.B.Geijtenbeek 等人, " Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses (DC-SIGN-一种支持初次免疫应答的新型树突细胞特异性 ICAM-3 受体的鉴定), " Cell 100:575-585 (2000); T.B.Geijtenbeek 等人, " DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells (DC-SIGN: 一种增强 T 细胞转染的树突细胞特异性 HIV-1 结合蛋白), " Cell 100:587-597 (2000); L.Tailleux 等人, " DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis (肺泡巨噬细胞中的 DC-SIGN 诱导为肺结核患者内的分支杆菌定义了特定靶宿主细胞), " PLoS Med. 2:e381 (2005); E.J.Soilleux 等人, " Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro (DC-SIGN 在树突细胞和巨噬细胞

亚群的原位和体外组成性和诱导表达), " J. Leukoc. Biol. 71 :445-457 (2002)), 而 L-SIGN 在肝和淋巴结的窦状内皮细胞内高度表达 (Bashirova 等人, 2001, 出处同上)。已观察到 L-SIGN 同源物仅存在于人和非人灵长类内, 而在其它非灵长类哺乳动物内不存在。

[0015] 最近, 确认了第三种人 DC-SIGN 相关的 C- 型凝集素 (确定为 "CLEC4G" 并命名为 " LSEctin") 具有类似的病原体识别和抗原捕获特性, 它与 hL-SIGN 在肝和淋巴结的窦状内皮细胞 (LSEC) 内共表达 (A. Dominguez-Soto 等人, " TheDC-SIGN-related lectin LSEctin mediates antigen capture and pathogenbinding by human myeloid cells(DC-SIGN 相关的凝集素 LSEctin 通过人骨髓细胞介导抗原捕获和病原体结合)", Blood 109 :5337-45(2007))。除了 hLSEctin 外, 其它哺乳动物内的 LSEctin 同源物还未通过实验确认, 尽管从基因组数据库可检索到有限的基因信息。

[0016] 由于与人在器官大小和生理学上具有相似性, 猪被视为异种移植 (Xenotransplantation) 的优选源动物 (Y. G. Yang 和 M. Sykes, " Xenotransplantation : current status and a perspective on the future(异种移植 :现状与展望)", " Nat. Rev. Immunol. 7 :519-31(2007))。理解跨越分子相互作用的人 - 猪物种屏障的相容性对于猪 - 人异种移植的临床应用是非常关键的。猪造血细胞上受体与人内皮细胞上配体的相互作用在猪造血细胞用于诱导人接受体内的耐受性中起关键作用 (A. N. Warrens 等人, " Human-porcine receptor-ligand compatibility within the immune system : relevance for xenotransplantation(免疫系统内人 - 猪受体 - 配体相容性 :异体移植的相关性)", " Xenotransplantation 6 :75-8(1999))。T- 细胞介导的异种移植排异反应, 一种可能由人 T 细胞对猪抗原比对同种抗原的更强应答诱导引起的现象, 也涉及猪 APC 如 DC 与人 T 细胞之间粘附分子的潜在相互作用 (A. Dorling 等人, " Detection of primary direct and indirect human anti-porcine T cell responses using a porcine dendritic cell population(采用猪树突细胞群检测初次直接和间接人抗猪 T 细胞应答)", " Eur. J. Immunol. 26 :1378-87(1996))。DC-SIGN 还已经表现为 ICAM-2 和 ICAM-3 的内在粘着受体 (T. B. Geijtenbeek 等人, " Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses(DC-SIGN- 一种支持初次免疫应答的新型树突细胞特异性 ICAM-3 受体的确认)", " Cell 100 : 575-585(2000)) ; T. B. Geijtenbeek 等人, " DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking(DC-SIGN-ICAM-2 相互作用介导树突细胞运输)", " Nat. Immunol. 1 :353-357(2000) ; D. A. Bleijs 等人, " DC-SIGN and LFA-I : a battle for a ligand(DC-SIGN 和 LFA-I : 为了配体而争斗)", " Trends Immunol. 22 :457-63(2001))。

[0017] 猪繁殖呼吸综合征病毒 (PRRSV), 一种在全世界存在的经济学上重要的猪病原体, 是动脉炎病毒科家族套式病毒目下的成员。在全世界范围确认的 PRRSV 分离株被分成两个不同的基因型 : 欧洲基因型 (第 1 类) 和北美基因型 (第 2 类), 它们导致相同的疾病症状但是抗原有差异的。就像其它包膜病毒如 HIV 和 HCV 一样, PRRSV 进入宿主细胞即猪肺泡巨噬细胞是一个复杂的多步骤过程, 涉及几个进入因子的存在, 包括唾液酸粘附素、CD163 和硫酸乙酰肝素 (P. L. Delputte 等人, " Analysis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus attachment and internalization : distinctive roles for heparan sulphate and sialoadhesin(猪繁殖呼吸综合征病毒附着和内在化分析 : 硫酸乙

酰肝素和唾液酸粘附素的不同作用), " J. Gen. Virol. 86 :1441-5 (2005))。然而, PRRSV 和猪 PRR 在 APC 上的潜在相互作用还未有报道。由于人 L-SIGN 表现出与 SARS- 冠状病毒进入肺有关, 猪 DC-SIGN/L-SIGN 同源物在猪肺 PRRSV 感染过程中可能起着类似作用, 这是由于 PRRSV 和冠状病毒都属于套式病毒目, 但在做出结论之前需要大量实验。

[0018] 尽管猴肾细胞系 (如美国专利 6, 146, 873 和其它地方所述) 和原始猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 已成为已知支持繁殖性 PRRSV 复制的仅两种细胞, 其它细胞如 BHK-21 细胞系已表现为复制型, 即具有支持 PRRSV 复制的必要能力 (H. Nielsen 等人, " Generation of an infectious clone of VR-2332, a highly virulent North American-type isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (VR-2332 感染性克隆体 - 猪繁殖呼吸综合征病毒的一种高毒力北美型分离株的产生)", J. Virol. 77 :3702-11 (2003); J. J. Meulenberg 等人, " Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (来自猪繁殖呼吸综合征病毒的克隆基因组长度 cDNA 的感染性转录体)", " J. Virol. 72 :380-7 (1998))。例如, 当用病毒 RNA 或用欧洲株 LV 或北美株 VR-2332 的全长基因组 cDNA 在体外合成的 RNA 转录体转染 BHK 细胞时, 在 BHK 细胞中检测到 PRRSV 复制迹象。PRRSV 病毒体产生并被排泄到介质中, 当转染 BHK-21 细胞的上清液转移到 PRRSV 容纳细胞时, 观察到致细胞病变效应 (CPE)。遗憾的是, 转染的 BHK-21 细胞中的复制性病毒不会在细胞之间传播, 表明 BHK-21 细胞上缺乏受体。经报道推定的 PRRSV 结合受体与肺泡巨噬细胞区别开来, 为 210-kDa 的膜蛋白 (E. H. Wissink 等人, " Identification of porcine alveolar macrophage glycoproteins involved in infection of porcine respiratory and reproductive syndrome virus (与猪繁殖呼吸综合征病毒感染有关的猪肺泡巨噬细胞糖蛋白的鉴定)", " Arch. Virol. 148 :177-87 (2003)), 但仍缺少病毒进入水平的这种受体候选物的功能验证。最近, 已经显示猪唾液酸粘附素 (pSn) 介导了 PAM 内 PRRSV 的内化 (N. Vanderheijden 等人, " Involvement of sialoadhesin in entry of porcine reproductive and respiratory syndrome virus into porcine alveolar macrophages (猪唾液酸粘附素参与猪繁殖呼吸综合征病毒进入猪肺泡巨噬细胞的相关实验)", " J. Virol. 77 (15) :8207-15 (2003)), 和 pSn 是唾液酸结合凝集素且 PRRS 病毒体上的唾液酸与 pSn 之间的相互作用对于 PAM 的 PRRSV 感染很重要 (P. L. Delputte 和 H. J. Nauwynck, " porcine arterivirus infection of alveolar macrophages is mediated by sialic acid on the virus (肺泡巨噬细胞的猪动脉炎病毒感染由病毒上的唾液酸介导)", " J. Virol. 78 (15) :8094-101 (2004))。在人、小鼠和猪中, 唾液酸结合凝集素仅在离散的组织巨噬细胞亚组上表达。已知 PRRSV 感染猪体内的呼吸和淋巴系统内的巨噬细胞。由于 PRRSV 还感染体内的其它单核细胞来源的淋巴细胞, 如树突细胞, 且由于 PRRSV 病毒体的结构非常复杂, 多种选择性受体和 / 或共受体可能存在于这些细胞上。此外, 还未确定易感猴肾细胞上的 PRRSV 受体。

[0019] 巨噬细胞和树突细胞对于病原体的识别很重要, 且在抵抗侵入性病原体的免疫中起重要作用。人 DC-SIGN 及相关肝内皮细胞凝集素 L-SIGN 已经被表征并发现在树突样细胞表面上大量表达 (A. Puig-Kroger 等人, " Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and

macrophages(病原体受体树突细胞特异性细胞间粘附分子 3(ICAM-3) 结合非整合素在 THP-I 人白血病细胞、单核细胞和巨噬细胞中的调节表达), " J. Biol. Chem. 279(24) : 25680-8(2004))。此外, C 型甘露糖结合凝集素 hDC-SIGN 和 hL-SIGN(或 DC-SIGNR) 已经由于它们在体外结合和摄取病原体的能力而引起相当关注, 所述病原体包括包膜病毒如 HIV、细菌(分支杆菌)、真菌和寄生虫(Y. van Kooyk 和 T. B. Geijtenbeek, " DC-SIGN: escape mechanism for pathogens(DC-SIGN:病原体的逃避机制), " Nat. Rev. Immunol. 3: 697-709(2003))、登革病毒(E. Navarro-Sanchez 等人, " Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses(树突细胞特异性 ICAM3 结合非整合素对于通过蚊子细胞来源的登革病毒复制性感染人树突细胞很重要), " EMBO Rep. 4(7) : 723-8(2003))、埃博拉病毒(C. P. Alvarez 等人, " C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN mediate cell entry by Ebola virus in cis and in trans(C 型凝集素 DC-SIGN 和 L-SIGN 介导顺式和反式埃博拉病毒的细胞进入), " J. Virol. 76(13) : 6841-4(2002))、马尔堡病毒(A. Marzi 等人, " DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus(DC-SIGN 和 DC-SIGNR 与马尔堡病毒的糖蛋白和严重急性呼吸综合征冠状病毒的 S 蛋白相互作用)", J. Virol. 78(21) : 12090-5(2004))、SARS 冠状病毒(id.)、巨细胞病毒(F. Halary 等人, " Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection(结合到 DC-SIGN 的人巨细胞病毒是树突细胞感染和靶细胞转染所需的)", Immunity 17(5) : 653-64(2002))和丙型肝炎病毒(P. Y. Lozach 等人, " C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles(C-型凝集素 L-SIGN 和 DC-SIGN 捕获和传送传染性丙型肝炎假病毒颗粒)", J. Biol. Chem. 279(31) : 32035-45(2004); E. G. Cormier 等人, " L-SIGN(CD209L) and DC-SIGN(CD209) mediate transinfection of liver cells by hepatitis C virus(L-SIGN(CD209L) 和 DC-SIGN(CD209) 介导丙型肝炎病毒对肝细胞的转染)", Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101 : 14067-72(2004))以促进进入细胞和感染。hDC-SIGN 和 hL-SIGN 都包含 C 型凝集素特异性糖识别结构域(CRD), 所述 CRD 以钙 (Ca^{2+}) 依赖性方式牢固结合到广谱包膜病毒上病毒性包膜糖蛋白内的天冬酰胺酸连接高甘露糖型聚糖(T. B. Geijtenbeek 等人, " Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1(树突细胞特异性受体 DC-SIGN 内不同细胞间粘附分子 3 和 HIV-1 结合位点的确定)", J. Biol. Chem. 277 : 11314-11320(2002))。因此 C-型凝集素将病毒集中在表达 DC-SIGN 或 L-SIGN 的细胞上, 促进了病毒结合并进入细胞内。

[0020] 已报道 DC-SIGN 结合到 HIV gp120 并促进 HIV 传送到 T 细胞(J. F. Arrighi 等人, " DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells(DC-SIGN 介导的传染性突触形成增强了从树突细胞到 T 细胞的 X4 HIV-1 传输)", J. Exp. Med. 200(10) : 1279-88(2004); T. B. Geijtenbeek 等人, " Rhesus macaque and chimpanzee DC-SIGN act as HIV/SIV

gp120trans-receptors, similar to human DC-SIGN(猕猴和黑猩猩 DC-SIGN 作为 HIV/SIV gp120 反式受体, 类似于人 DC-SIGN), " ImmunolLett. 79 :101-7(2001) ;M. Satomi 等人, " Transmission of macrophage-tropicHIV-1by breast-milk macrophages via DC-SIGN(母乳巨噬细胞通过 DC-SIGN 传播巨噬细胞热带 HIV-1), " J. Infect. Dis. 191(2) : 174-81(2005) ;E. J. Soilleux 等人, " Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine verticaltransmission of HIV(DC-SIGN 的胎盘表达可介导 HIV 在子宫内的垂直传播), " J. Pathol. 195 :586-592(2001))。DC-SIGN 和 L-SIGN 已表现为丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 的高亲和力结合载体 (P. Y. Lozach 等人, " DC-SIGN and L-SIGN arehigh affinity binding receptors for hepatitis C virus glycoprotein E2(DC-SIGN 和 L-SIGN 是丙型肝炎病毒糖蛋白 E2 的高亲和力结合受体) ", J. Biol. Chem. 278(22) : 20358-66(2003)), 并介导丙型肝炎病毒对肝细胞的转染 (Lozach 等人, 2004, 出处同上 ;Cormier 等人, 2004, 出处同上)。还发现 DC-SIGN 介导登革病毒对人树突细胞的感染 (Navarro-Sanchez 等人, 2003, 出处同上)。DC-SIGN 和 L-SIGN 都表现出介导顺式和反式埃博拉病毒进入细胞 (Alvarez 等人, 2002, 出处同上 ;G. Simmons 等人, " DC-SIGN and DC-SIGNR bind Ebolaglycoproteins and enhance infection of macrophages and endothelialcells(DC-SIGN 和 DC-SIGNR 结合埃博拉糖蛋白并提高巨噬细胞和内皮细胞的感染), " Virology 305(1) :115-23(2003))。其它报道中, 已报道大量包膜病毒包括逆转录病毒 (人类免疫缺陷病毒 (HIV)、猴免疫缺陷病毒 (SIV) 和猫免疫缺陷病毒 (FIV))、黄病毒科 (登革病毒、西尼罗河病毒和丙型肝炎病毒 (HCV))、纤丝病毒 (埃博拉和马尔堡病毒)、冠状病毒 (严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV))、披膜病毒 (辛德毕斯病毒) 和疱疹病毒 (人巨细胞病毒 (人 CMV)) 采用 DC-SIGN 和 / 或 L-SIGN 作为体外加强的传染的识别和粘附受体 (P. Y. Lozach 等人, " The C type lectins DC-SIGN and L-SIGN : receptors for viralglycoproteins(C 型凝集素 DC-SIGN 和 L-SIGN : 病毒性糖蛋白的受体), " Methods Mol. Biol. 379 :51-68(2007))。

[0021] DC-SIGN 和 L-SIGN 是同源四聚的 II 型膜蛋白并能通过 C 末端糖识别结构域识别病毒性包膜糖蛋白上的相当大量的 N 联糖, 如含甘露糖的糖结合物和含海藻糖的 Lewis 血型抗原 (D. A. Mitchell 等人, " A novel mechanism ofcarbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and bindingto multivalent ligands(通过 C 型凝集素 DC-SIGN 和 DC-SIGNR 识别糖的新机理, 亚基组织并结合到多价配体), " J. Biol. Chem. 276 :28939-28945(2001) ;H. Feinberg 等人, " Structural basis forselective recognition of oligosaccharides by DC-SIGN and DC-SIGNR(通过 DC-SIGN 和 DC-SIGNR 选择性地识别低聚糖的结构基础) ", Science294 :2163-2166(2001))。根据计算机预测, PRRSV 病毒体膜上的四种糖蛋白中, GP2a、GP3、GP4 和 GP5 分别包含 2-7 个 N- 糖基化位点。葡萄糖内酯酶处理表明所有推定位点都被复合型氮聚糖占据 (Meulenberg 等人, 1998, 出处同上)。这些观察表明 DC-SIGN/L-SIGN 可与 PRRSV 病毒体上的一个或多个糖蛋白相互作用, 从而介导 PRRSV 进入和内吞作用。DC-SIGN 在 DC 和一些类型的巨噬细胞上表达, 它们都是 PRRSV 复制的重要目标。发现 L-SIGN 在窦状内皮细胞和胎盘巨噬细胞上表达。发现 DC-SIGN 的胎盘表达介导 HIV 的子宫内垂直传播 (Soilleux 等人, 2001, 出处同上)。巧合的是, 已知 PRRSV 在妊娠母猪内导致严

重的繁殖系统疾病。

[0022] SARS 冠状病毒（和动脉炎病毒家族一起属于冠状病毒家族的尼多病毒目，其中 PRRSV 是动脉炎病毒家族中的一员）也在病毒感染和发病过程中表现出利用 S 糖蛋白来结合 DC-SIGN 和 L-SIGN (Marzi 等人, 2004, 出处同上; Z. Y. Yang 等人, " pH-dependent entry of severe acute respiratory syndrome coronavirus is mediated by the spike glycoprotein and enhanced by dendritic cell transfer through DC-SIGN (严重急性呼吸综合征冠状病毒的 pH 依赖性进入由刺突糖蛋白介导并被树突细胞传送通过 DC-SIGN 增强), " J. Virol. 78 (11) : 5642-50 (2004))。尽管 PRRSV 和冠状病毒属于同一超家族, 需要进一步的测试来确定 PRRSV 是否同样地采用 DC-SIGN 或 L-SIGN 来感染和发病。

[0023] 最新研究报道了尼帕病毒表面糖蛋白 (NiV-G) 能结合 hLSEctin, 而 hLSEctin 是尼帕病毒表面糖蛋白 (NiV-G) 的推定受体 (T. A. Bowden 等人, " Crystal Structure and Carbohydrate Analysis of Nipah Virus Attachment Glycoprotein: A Template for Antiviral and Vaccine Design (尼帕病毒附着糖蛋白的晶体结构和糖分析: 抗病毒和疫苗设计的模板), " J. Virol, in press 2008)。所述相互作用由 NiV-G 中的 GlcNAc β 1-2Man 末端结构介导。埃博拉病毒的膜表面糖蛋白（截短聚糖）及严重急性呼吸综合征冠状病毒的刺突蛋白 (SARS-CoV) 携带这些糖基序且被 hLSEctin 独特地识别 (T. Gramberg 等人, " LSEctin interacts with filovirus glycoproteins and the spike protein of SARS coronavirus (LSEctin 与丝状病毒糖蛋白和 SARS 冠状病毒的刺突蛋白相互作用), " Virology 340 (2) : 224-36 (2005))。与 hDC-SIGN 和 hL-SIGN 不同, hLSEctin 选择性地结合到终止于二糖 GlcNAc β 1-2Man 中的糖蛋白。

[0024] 此外, DC-SIGN 和 L-SIGN 被认为是人内基因组水平的两种独立基因。由于保守序列, 它们可能具有类似但不同的作用, 如已有的 DC-SIGN/L-SIGN 人体研究中所示。然而, L-SIGN 的生物或生理功能局限于肝 (L-SIGN 的 mRNA 仅在肝内表达) 而 DC-SIGN 在全身内树突细胞中起作用。

[0025] 已经公开了关于人 C- 型凝集素和人 DC-SIGN 的其它相关技术。例如, 美国专利 6, 190, 886 (Hoppe 等人) 描述了包括人 SP-D 的胶原凝集素 (collectin) C- 型凝集素结构域和从被诱导表达重组蛋白的细菌培养基的分解产物提纯的颈区凝集素结构域的一种多肽, 其中所述多肽能在胶原凝集素颈区三聚。三聚多肽的建议用途是接种胶原形成, 作为受体特别是低亲和力结合受体 (例如神经肽、白细胞介素)、抗原、激活后具有反应性的化合物如光活化化学交联剂、有机化合物如咖啡因和吗啡、低亲和力结合结构域的肽配体, 特别用于在药理学研究中筛选潜在抑制剂等。

[0026] 美国专利 6, 455, 683 (Yang 等人) 描述了编码人 C- 型凝集素和称为 "CLAX" (C- 型凝集素, 激活表达) 蛋白的三种同源物的独立 cDNA 序列。该专利公开了使用核酸序列、多肽、具有人 CLAX 蛋白全部或部分 (如胞外区) 的融合蛋白、CLAX 特异性的抗体、人 CLAX 的配体和抑制剂的方法。提出包含所述蛋白的药物组合物可用于预防和治疗感染、炎症和过敏疾病。

[0027] 美国专利 6, 280, 953 (Messier 等人) 提供了鉴定人和 / 或非人灵长类动物内多核苷酸和多肽序列的方法, 所述多核苷酸和多肽序列可能与生理条件如疾病包括对 AIDS 发展的易感性 (人) 或耐受性 (黑猩猩) 有关。生理特性包括对 AIDS 发展的耐受性; 多核苷

酸可为人 DC-SIGN 基因 ;而调节作用是随后提高的对 AIDS 发展的耐受性。提出该序列可用作宿主治疗靶点和 / 或用于筛选分析。

[0028] 美国专利 6, 365, 156 (Lee) 涉及延长待给药的病毒特异性配体在粘膜上的半衰期的方法, 其中所述膜用细菌如乳酸菌 (*Lactobacillus*)、链球菌 (*Streptococcus*)、葡萄状球菌 (*Staphylococcus*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus*)、球菌类杆菌 (*Bacteriodes*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 和奈瑟菌 (*Neisseria*) 形成菌落, 所述方法通过修饰所述细胞特异性配体以结合粘膜上形成菌落的细菌来进行。该专利还公开了包含病毒特异性配体如 CD4、DC-SIGN、ICAM-1、HveA、HveC、脊髓灰质炎病毒受体、玻连蛋白受体、CD21 或 IgA 受体序列和细菌特异性配体如抗体、肽、多肽、蛋白或糖的嵌合分子。

[0029] 美国专利 6, 391, 567 (Littman 等人) 涉及作为受体的人 DC-SIGN, 其在树突细胞上特异性表达并促进人免疫缺陷病毒 (HIV) 对 T 淋巴细胞的感染。该专利提供了鉴定调节 DC-SIGN 和 HIV 和 / 或 T 细胞和巨噬细胞之间相互作用的化合物的分析, 其中所述化合物抑制 HIV 进入细胞的反式增强。

[0030] 美国专利 7, 148, 329 (Figdor 等人) 涉及甘露糖、海藻糖、植物凝集素、抗生素、蛋白或抵抗 C- 型凝集素的抗体 (所述抗体结合到树突细胞表面上的 C- 型凝集素上) 在制备用于通过调节树突细胞表面上的 C- 型凝集素受体对 T 细胞表面上的 ICAM 受体的粘合力来调节免疫应答的组合物中的用途。该专利公开了抑制树突细胞和 T 细胞之间即树突细胞表面上的 DC-SIGN 和 T 细胞表面上的 ICAM-3 受体之间的结合的抗体。提出将所述组合物用于预防 / 抑制对特异性抗原的免疫应答、用于诱导耐受性、用于免疫疗法、用于免疫抑制、用于治疗自身免疫疾病、用于治疗过敏和 / 或用于抑制 HIV 感染。

[0031] 如上所述, 作为免疫超家族的一部分的 DC-SIGN 与 ICAM-3 之间存在生物学关系。细胞间粘附分子 (ICAM) 是属于免疫球蛋白 (Ig) 超家族中一个亚科的 I 型跨膜糖蛋白。迄今为止, 已经在哺乳动物中确定了五个 ICAM 家族成员 (ICAM 1-5) (C. G. Gahmberg 等人, " Leukocyte adhesion-structure and function of human leukocyte beta2-integrins and their cellular ligands (白细胞粘附 - 人白细胞 $\beta 2$ 整合素及其细胞配体的结构与功能) ", *Eur. J. Biochem.* 245 :215-232 (1997))。它们共享功能性及结构性 Ig 样结构域并介导与免疫系统功能有关的细胞与细胞间粘附作用 (T. A. Springer, " Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration : the multistep paradigm (淋巴细胞再循环和白细胞迁移中的路径信号 -- 多步骤范例) ", *Cell* 76 :301-314 (1994))。除了 ICAM-5 以外, 所有其它 ICAM 成员结合到整合素 LFA-1 (CD11a/CD 18) 但在组织分布上显示出大的差异 (Gahmberg 等人, 1997, 出处同上)。这些粘附作用在通过发炎和未发炎组织介导白细胞运输中起着重要作用并有利于抗原特异性 T 细胞应答。ICAM 成员中, ICAM-3 被认为是免疫应答启动过程中 LFA-I 的主要配体, 因为 ICAM-1 和 ICAM-2 没有在休止白细胞和抗原呈递细胞 (APC) 上表达或以非常低的水平表达 (A. R. de Fougereolles 等人, " Cloning and expression of intercellular adhesion molecule 3 reveals strong homology to other immunoglobulin family counter-receptors for lymphocyte function-associated antigen 1 (细胞间粘附分子 3 的克隆和表达揭示出与淋巴细胞功能相关的抗原 1 的其它免疫球蛋白家族反受体的强同一性) ", *J. Exp. Med.* 177 :1187-1192 (1993))。已报道了 ICAM-2 和 ICAM-3 与 C- 型凝集

素、人 DC-SIGN 的结合,在于在抗原呈递过程中 ICAM-3 与 DC-SIGN 的相互作用在树突细胞和休止 T 细胞之间建立了初步接触而 ICAM-2 与人 DC-SIGN 的结合调节树突细胞迁移和通过内皮的移行 (T.B.Geijtenbeek 等人, " Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses (DC-SIGN- 一种支持初次免疫应答的新型树突细胞特异性 ICAM-3 受体的鉴定), " Cell 100: 575-585 (2000); T.B.Geijtenbeek 等人, " DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking (DC-SIGN-ICAM-2 相互作用介导树突细胞运输), " Nat. Immunol. 1: 353-357 (2000))。

[0032] 全长 ICAM 分子包含信号肽序列、两个 (ICAM2 和 ICAM4)、五个 (ICAM1 和 ICAM3) 或九个 (ICAM-5) 胞外 Ig 样结构域、疏水跨膜结构域 TMD) 和胞质尾区 (CT)。各 Ig 样结构域由不同外显子编码 (G.Voraberger 等人, " Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5' -regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester (细胞间粘附分子 1 的人基因克隆及其 5' 调控区分析, 细胞因子和佛波酯的诱导), " J. Immunol. 147: 2777-2786 (1991); C.M.Ballantyne 等人, " Characterization of the murine Icam-1 gene (鼠 Icam-1 基因的特征), " Genomics 14: 1076-1080 (1992))。在 ICAM-1 敲除小鼠中已确认了选择性剪接产生的鼠 ICAM-1 的同种型 (P.D.King 等人, " Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing (选择性 RNA 剪接产生的鼠细胞间粘附分子-1 的新同种型), " J. Immunol. 154: 6080-6093 (1995); N.K.van Den Engel 等人, " Circulating forms of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 in mice lacking membranous ICAM-1 (缺少膜状 ICAM-1 的小鼠中的细胞间粘附分子 (ICAM)-1 循环体), " Blood 95: 1350-1355 (2000))。各鼠 ICAM-1 同种型通过完全跳跃编码 Ig 样结构域 2、3 和 / 或 4 的外显子而产生。此外, 外显子 6 中选择性 5' 剪接位点的存在也产生从外显子 6 的 3' - 末端删除 69-nt 的鼠 ICAM-1 同种型 (J.P.Mizgerd 等人, " Exon truncation by alternative splicing of murine ICAM-1 (通过鼠 ICAM-1 的选择性剪接截短外显子), " Physiol. Genomics 12: 47-51 (2002))。鼠 ICAM-4 中, 还确定了内含子保留引起的跨膜结构域缺失同种型 (G.Lee 等人, " Novel secreted isoform of adhesion molecule: potential regulator of membrane-associated ICAM-4 interactions (粘附分子的新型分泌型同种型: 膜相关的 ICAM-4 相互作用的潜在调节剂), " Blood 101: 1790-1797 (2003))。到目前为止, 所有确认的 ICAM 同种型都是全功能的, 表明选择性 mRNA 剪接在不同免疫应答路径中起不同作用。

[0033] 基于人-猪-小鼠-大鼠或人-狗-小鼠-大鼠基因组区的两种对比序列分析研究揭示: 啮齿动物基因组中缺失 ICAM3 基因 (H. Sugino, " ICAM-3, a ligand for DC-SIGN, was duplicated from ICAM-1 in mammalian evolution, but was lost in the rodent genome (ICAM-3, DC-SIGN 的配体, 在哺乳动物进化中从 ICAM-1 复制, 但啮齿动物基因组中缺失), " FEBS Lett. 579: 2901-2906 (2005); T.Leeb 和 M.Muller, " Comparative human-mouse-rat sequence analysis of the ICAM gene cluster on HSA 19p13.2 and a 185-kb porcine region from SSC 2q (HSA 19p13.2 上 ICAM 基因簇和 SSC 2q 的 185-kb 猪区的对比人-小鼠-大鼠序列分析), " Gene 343: 239-244 (2004))。人、非人灵长类和

牛中 ICAM3 基因组织类似,其包含七个推定外显子,外显子 3-7 在该基因的近 3' 侧区聚集 (P.Kilgannon 等人, " Mapping of the ICAM-5(telencephalin)gene,a neuronal member of the ICAM family, to a location between ICAM-I and ICAM-3 on human chromosome 19p13.2 (ICAM-5(端脑素)基因 (ICAM 家族的神经元成员)定位到人染色体 19p13.2 上 ICAM-1 和 ICAM-3 之间), " Genomics 54:328-330(1998) ;E. K. Lee 等人, " Cloning and sequencing of a cDNA encoding bovine intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3) (编码牛细胞间粘附分子 3 (ICAM-3) 的 cDNA 的克隆和序列分析)", Gene 174: 311-313(1996)). 还没有完全知道猪 ICAM-3 的基因序列,因为仅外显子 1 到部分外显子 5 的区域已确定并测序 (Leeb 和 Muller, 2004, 出处同上)。此外,迄今为止,还未确定猪 ICAM-3 的 cDNA。

[0034] 外显子内的无义突变可在 pre-mRNA 剪接过程 (其命名为无义相关的可变剪接 (NAS)) 中诱导外显子跳跃 (L. Cartegni 等人, " Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing (聆听沉默和理解无义: 影响剪接的外显子突变)", " Nat. Rev. Genet. 3:285-298(2002) ;L. E. Maquat, " The power of point mutations (点突变的力量)", " Nat. Genet. 27:5-6(2001) ;H. C. Dietz 等人, " The skipping of constitutive exons in vivo induced by nonsense mutations (无义突变引起的体内组成型外显子跳跃)", " Science 259:680-683(1993))。NAS 通常是疾病相关的,如几种导致疾病的基因中所示 (Cartegni 等人, 2002, 出处同上),这是由于翻译未成熟终止将导致不能产生功能性蛋白。认为 NAS 的机理是由于在切片、间接无义介导的 mRNA 衰变 (NMD) 或外显子剪接增强子 (ESE) 破坏 (id.) 之前发生翻译样核扫描。

[0035] 尽管人 DC-SIGN 参与了各种包膜病毒如人免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、登革病毒和 SARS 冠状病毒传播到它们各自的靶细胞,但从其它物种获得的 DC-SIGN 的特征和特性还未表现出模仿 hDC-SIGN 的规则。因此,需要进一步的测试来确定任何给定 DC-SIGN 的功能。在本发现之前,来自猪的 DC-SIGN 及其它 LSECtin 相关同源物还未被分离、确认或表征。

[0036] 因此本发明的一个重要目标是获得编码到目前为止猪基因组数据库中还未描述的新型猪 DC-SIGN 和猪 LSECtin 蛋白的全核酸分子的克隆和表征。

[0037] 本发明的另一重要目标是确认和表征编码来自体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞的新型猪 ICAM-3 同种型的全核酸分子。

[0038] 本发明的另一重要目标是将单独的 pDC-SIGN、pLSECtin、pICAM-3 或作为与 hDC-SIGN、hL-SIGN 或 hLSECtin 的融合蛋白在某些组合物中的 pDC-SIGN、pLSECtin、pICAM-3 用于繁殖病毒,具体是包膜病毒,特别是猪包膜病毒的新方法中,利用稳定表达 pDC-SIGN、pLSECtin 和 / 或 pICAM-3 的新型转染细胞或细胞系。

[0039] 本发明的另一目标是制备与 pDC-SIGN 蛋白的氨基酸序列特异性地结合并可用于增强弱抗原物质的免疫活性的抗体。也非常希望制备与 pLSECtin 和 pICAM-3 蛋白的氨基酸序列特异性结合的抗体。

[0040] 本发明的其它目的和目标将随说明书显现出来。

[0041] 通过制备并分离所述编码 pDC-SIGN、pICAM-3 和 pLSECtin 的新型全核酸序列、将编码所述蛋白的核苷酸序列用于特别设计的载体以繁殖包膜病毒、制备抗体等来实现上述目标。

[0042] 发明简述

[0043] 本发明涉及从猪单核细胞来源的树突细胞获得的完整猪 DC-SIGN 基因和 cDNA 克隆,以及该新型基因编码的新型猪 DC-SIGN 蛋白。本发明还涉及从猪的肝组织获得的全基因和 cDNA 及新型编码的 pLSEctin 蛋白。此外,本发明包括从体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞分离的猪 ICAM-3 的两种新型 cDNA 同种型。具体来说,本发明涉及分离的核酸分子,其包括编码猪 DC-SIGN、猪 ICAM-3、猪 LSEctin 中的一种或多种的核苷酸序列、所述核苷酸序列的补体或所述核苷酸序列的功能限定部分,或连接到另一蛋白的某些蛋白融合产物,所述蛋白可能来源于猪或人。本发明范围还包括包含本文中所述的新型核酸分子的生物功能质粒、病毒载体等、被本发明质粒或载体暂时转染的稳定细胞或细胞系和多肽表达产物。本发明的一个重要实施方案还包括所述猪同源物在繁殖病毒,特别是包膜病毒的方法中的新用途。

[0044] 附图简述

[0045] 下面将参考附图对本发明背景及其与现有技术不同进一步描述,其中:

[0046] 图 1 显示了通过 RT-PCR 或 RACE-PCR 进行的来自体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞 (MDDC) 的 pDC-SIGN cDNA 扩增和通过基因组 PCR 进行的来自猪基因组 DNA 的 pDC-SIGN 基因扩增。图 1(a) 显示了放大倍数 = 400x 下在 rpGM-CSF 和 rpIL-4 存在下 CD 14 单核细胞 7 天体外培养后猪 MDCC 的形态发育。图 1(b) 显示了采用简并引物通过 RT-PCR 检测具有预期大小的 ~ 210-bp 产物。图 1(c) 显示了 5' -RACE 和 3' -RACE PCR 的结果。

[0047] 图 2 显示了 pDC-SIGN cDNA 的全长核苷酸序列 (其对应于 SEQ ID NO :1) 及其推测的氨基酸序列 (其对应于 SEQ ID NO :2)。该 1,069-核苷酸序列包含编码 240-aa 蛋白的、从 26 位置的 nt 开始的开放阅读框。预测的跨膜结构域 (TMD) 用虚线框显示而糖识别结构域 (CRD) 用下划线表示。多聚腺苷酸化信号划上框。箭头显示外显子边界。

[0048] 图 3 展示了 pDC-SIGN (构建物 pCI-PDCS) 在转染 BHK-21 细胞中的表达。图 3(a) 用 pDC-SIGN 特异性抗肽多克隆抗体进行转染后 48 小时的免疫荧光测定 (IFA) 结果 (放大倍数 = 200x)。大多数细胞具有漫延的胞质和膜染色。图 3(b) 显示:仅少数细胞具有细胞膜染色。内侧板 (Inner panel) 显示了已染色细胞的放大倍数 (400x)。图 3(c) 显示了用载体 pCI-neo 作为阴性对照的细胞转染 (200x)。图 3(d) 显示了用质粒 pCI-PDCS 或 pCI-neo 转染的 BHK-21 细胞的裂解物的蛋白质印迹分析。

[0049] 图 4 显示了猪 DC-SIGN 基因的克隆,其中图 4(a) 通过一步基因组 PCR 进行的猪 DC-SIGN 基因猪基因组 DNA 的扩增结果而图 4(b) 显示采用各自的测序引物 M13F、2F、3F、4F 和 M13R 的五个独立序列的猪 DC-SIGN 基因的三种克隆之一 (GDSC-6) 的组合物。

[0050] 图 5-1 到 5-2 显示了位于染色体 DNA 上的猪 DC-SIGN 基因的全长核苷酸序列 (包括外显子和内含子) (其对应于 SEQ ID NO :3)。指出了外显子 1-8、基因组 PCR 引物 1F 和 4R 和测序引物 2F、3F 和 4F 的位置。

[0051] 图 6-1 到 6-4 显示了分别通过 RT-PCR 及流式细胞术检测选定的猪组织和细胞群中 pDC-SIGN 表达。图 6-1(a) 展示了 RT-PCR 表达图谱,其显示了 pDC-SIGN 的 mRNA 表达。猪组织 cDNA 用作 PCR 与引物 PDCS-E56F/PDCS-E78R 或猪 GAPDH 特异性引物反应中的模板。图 6-2(b) 到 6-4 显示了确定的猪细胞群和细胞系上 pDC-SIGN 表达的检测。在 Ficoll 上离心分离猪 PBMC 并对其前向角散射和侧向角散射性能进行评估。通过免疫磁珠标记 MACS

系统,采用抗 CD 14 单克隆抗体将外周血淋巴细胞 (PBL, CD 14⁺ 细胞) 和单核细胞 (CD14⁺ 细胞) 分离。其它测试板中,通过用抗 pDC-SIGN 抗体 (灰色柱) 染色对 pDC-SIGN 在 PBL、单核细胞、单核细胞来源的树突细胞 (MDDC)、单核细胞来源的巨噬细胞 (MDMΦ)、猪肺泡巨噬细胞 (PAM)、猪单核细胞系 3D4/31 和猪肾上皮细胞系 PK1 5 上的表达进行评价。虚线开放柱显示了背景对照。数据代表 3 个独立实验。

[0052] 图 7 显示了通过免疫组织化学技术 (IHC) 检测猪淋巴结组织而不是猪肝组织中 pDC-SIGN 蛋白的表达。在猪淋巴结 (a, c, d) 和猪肝 (b) 的石蜡切片上通过 IHC 采用 ABC 方法检测 pDC-SIGN 蛋白表达的定位。图 7(a) 表明:pDC-SIGN 蛋白优选在淋巴结窦 (被膜下窦) 中表达。图 7(b) 表明:pDC-SIGN 蛋白不在猪肝中表达。图 7(c) 表明:窦中用 pDC-SIGN 特异性抗肽抗体免疫染色的大多数细胞为形态上巨噬细胞样 (箭状物) 和树突样细胞 (箭头)。图 7(d) 显示了软组织中的淋巴管内皮细胞也被 pDC-SIGN 特异性抗体免疫染色。

[0053] 图 8-1 到 8-5 显示了人 ICAM-3 和 ICAM-2 免疫黏附素结合到稳定表达 pDC-SIGN 的 BHK 细胞。图 8-1(a) 提供了 pDC-SIGN 蛋白在稳定 BHK 细胞系上的表面表达检测。分别用抗 pDC-SIGN 抗体和 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 染色 BHK-21 及未分选或已分选 BHK-PDCS 细胞系并通过流式细胞术进行分析。虚线开放柱形图表示背景染色。用实心灰色柱形图表示 pDC-SIGN 的表达。通过用 hDC-SIGN 单克隆抗体染色验证 hDC-SIGN 在 3T3-HDCS 细胞系表面上的表达 (最低测试板)。图 8-2(b) 到 8-5 展示了人 ICAM-3 和 ICAM-2 免疫黏附素钙依赖性结合到 BHK-PDCS 和 3T3-HDCS 细胞。虚线开放柱形图代表仅用 FITC 标记的抗人 IgG Fc 抗体进行的细胞染色。结果代表三个独立实验。数据表示成 10,000 个细胞的柱形图分析。

[0054] 图 9-1 到 9-2 提供了猪繁殖呼吸综合征病毒 (PRRSV) 在 BHK-PDCS 细胞中的感染结果。图 9-1(a) 表明:通过修饰的 PRRSV 传染性 cDNA 克隆表达 GFP 转染,PRRSV 在 BHK-PDCS 细胞中是能复制的 (左测试板),而释放的病毒能感染靶 MARC-145 细胞 (右测试板)。直接监测在 BHK-PDCS 细胞中 48 小时后转染或在 MARC-145 细胞中 72 小时后转染的 GFP 信号 (放大倍数 = 100x)。图 9-1(b) 显示了 PRRSV 在 BHK-PDCS 和 BHK-21 细胞系上结合的比较。空心点柱形图表示不用 PRRSV 接种进行培养但用抗 PRRSV mAb SDOW17-A 和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 染色的对照细胞。用病毒接种和用两种抗体培养的细胞用实心灰色柱形图表示。图 9-2(c) 显示了 PRRSV PGXG 株和 VR2385 株都阻碍 hICAM-3 结合到 BHK-PDCS 细胞系。在加入 hICAM-3-Fc 之前,在 4℃ 下用 PGXG 或 VR2385 (M. O. I. = 10FFU/ 细胞) 培养 BHK-PDCS 细胞 60min。如本文中所述采用 FACS 分析染色细胞。提供的数据为标准化到未处理对照物的 (仅加入 hICAM-3-Fc 和 FITC 标记的抗人 IgG Fc 抗体) 的平均荧光强度 ± SD。星号表示与未处理对照物对比的统计差异 ($p < 0.05$)。图 9-2(d) 表明 BHK 细胞介导的 PRRSV 传输被 pDC-SIGN 提高。按照实施例所述采用 BHK-PDCS、BHK-21 和 MARC-145 细胞作为供体细胞、MARC-145 细胞作为靶细胞传输 PRRSV PGXG 或 PRRSV VR2385,并滴定 PRRSV。未接触 PRRSV 的 MARC-145 靶细胞共培养的供体细胞用作模拟传输对照物,结果未显示于图中 (没有检测到病毒)。星号表示 BHK-PDCS 和 BHK-21 细胞之间 PRRSV VR2385 株的统计学差异 ($p < 0.05$)。

[0055] 图 10 显示了通过 RACE-PCR 对来自体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞 (MDDC) 的猪 ICAM-3cDNA 进行的扩增。图 10(a) 展示了通过 5' -RACE PCR 确认两种同种型 (各~

800bp)。图 10(b) 通过 3' -RACE PCR 确认 ~ 700bp 产物的检测。

[0056] 图 11-1 到 11-2 提供了猪 ICAM-3cDNA (其对应于 SEQ ID NO:4) 的全长核苷酸序列和预测蛋白序列 (其对应于 SEQ ID NO:5)。在右侧标记出核苷酸位置,在各残基下标记出氨基酸 (aa) 位置。预计编码 63-aa 肽 (其对应于 SEQ ID NO:38) 的小开放阅读框在括号中显示,所述 63-aa 肽在大的 5' -RACE PCR 中推定 ICAM-3 编码区的上游。小 5' -RACE PCR 产物中发现的缺失核苷酸区的序列 (其对应 SEQ ID NO:39) 显示于虚线框内。推定信号肽用双虚线标出,潜在多聚腺苷酸化信号用虚线标出。粗下划线序列表示预测的跨膜区。潜在的 N-糖基化部位用 ---N--- 显示。Ig-样结构域 1-3 和跨膜结构域 (TMD) 及胞质尾区 (CT) 的建议起始位点用相应核苷酸序列上方的箭状物标记。

[0057] 图 12-1 到 12-2 给出了猪 ICAM-3 基因的建议无义相关可变剪接 (NAS) 的示意图。图 12-1(a) 显示了猪 ICAM-3 与灵长类 / 牛 ICAM-3 之间的 pre-mRNA 剪接和蛋白表达比较。所有 ICAM-3 都具有类似的基因组结构,所述基因组结构包含 7 个推定外显子 (E1-E7),且外显子 3-7 在基因组的近 3' 区聚集。在灵长类和牛中,发生常规 pre-mRNA 剪接,从而包含所有 7 外显子 (用粗线和箭头表示)。外显子 1 编码信号肽,外显子 2-6 分别编码 D1-D5,而外显子 7 编码跨膜结构域和胞质尾区。在本研究的猪种中,提出预测的 ICAM-3 蛋白中缺少 D4 和 D5 导致在 pre-mRNA 剪接过程中 (用细线和箭头表示) 外显子 5 和 6 (e5 和 e6) 连续跳过。猪 ICAM-3 的部分已知基因组 DNA 序列参见 AJ632303 (克隆 RP44-379M9) 而本发明实验确定了猪 ICAM-3 的剩余未知序列。图 12-2(b) 给出了通过采用引物 PIC53 和 PIC58 进行基因组 DNA 片段 (从左框至右框的序列分别对应 SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:41 和 SEQ ID NO:42) 的基因组 PCR 扩增来确定猪 ICAM-3 基因 e5 和 E7 之间的未知区域之间序列的示意图。与灵长类 / 牛 ICAM-3 相比,由于上游 4-nt 缺失 (AAAAG),猪 ICAM-3 外显子 5 包含 3-nt 框内无义突变 (CTT 突变为 TGA,下划线示出的) 而外显子 6 包含 4 个框内无义突变 (下划线示出的)。内含子 6 (I6) 内推定剪切供体位点的第一核苷酸处的点突变 (g 突变为 a) 用星号表示。

[0058] 图 13 描述了从猪肝剪接过程中通过 RT-PCR 扩增 pLSEctin pre-mRNA 中间和最终产物 (同种型) 和通过基因组 PCR 扩增来自猪基因组 DNA 的 pLSEctin 基因。虚线箭头显示了剪接的中间产物;实线箭头显示了同种型和 pLSEctin 基因。

[0059] 14-1 到 14-2 显示了 pLSEctin 的 cDNA 的基因结构和核苷酸序列。图 14-1(a) 提供了 pLSEctin 基因的基因结构。顶行显示了各结构域的外显子分配。下行显示了推定 pLSEctin 编码区的结构域结构。CT:胞质尾区;TMD:跨膜结构域;CRD:糖识别结构域。外显子 1 和 9 中的未翻译区显示成空心框 (openbox)。图 14-2(b) 提供了 pLSEctin cDNA 的全长核苷酸序列 (其对应 SEQ ID NO:36) 及其推导的氨基酸序列 (其对应 SEQ ID NO:37)。本研究中未确定的 pLSEctin cDNA 非编码区两末端处的其它核苷酸序列用虚的下划线表示。两个框内起始密码子和终止密码子用方框表示。CT 中的两个潜在内化基序:YSKW 和 EE 用虚线框表示。推定 TMD 用双线框表示,而糖识别结构域 (CRD) 用下划线示出。颈区中的两个预测糖基化位点用点下划线标记。多聚腺苷酸化信号 (AATAAA) 用大写字母显示。箭头显示外显子的边界。

[0060] 图 15 显示了 pLSEctin 基因与其它 LSEctin 同源物及通过 mVISTA 程序产生的 pDC-SIGN 基因的基因序列和外显子数比较。序列对之间的保守区显示为相似度 (Y 轴)

对 pLSEctin 基因序列位置 (X 轴) 的峰。图上方的深灰色框表示 pLSEctin 基因的 9 个外显子。相同灰色阴影中的峰显示外显子内保守区, 而浅灰色阴影中的峰 (同样其中框上缺少阴影) 显示了内含子内的保守区。百分一致性的截留值设定为 70%。人和黑猩猩 LSEctin 假基因由于在建议的起始密码子处的点突变 (G-A) 而丧失蛋白编码能力。两种猕猴 LSEctin 假基因由于 1-nt 插入或 1-nt 缺失导致移码突变而不能编码功能性 LSEctin 蛋白。目前为止没有获得黑猩猩 LSEctin 基因的外显子 4 序列。缩写: 猪 LSEctin (pLSEctin)、牛 LSEctin (bLSEctin)、犬 LSEctin (caLSEctin)、马 LSEctin (eLSEctin)、人 LSEctin (hLSEctin)、人 LSEctin 假基因 (hpLSEctin)、黑猩猩 LSEctin (chLSEctin)、黑猩猩 LSEctin 假基因 (chpLSEctin)、猕猴 LSEctin 假基因 (rhpLSEctin)、小鼠 LSEctin (mLSEctin)、大鼠 LSEctin (rLSEctin)、负鼠 LSEctin (opLSEctin)、鸭嘴兽 LSEctin (pLSEctin) 和猪 DC-SIGN (pDC-SIGN)。

[0061] 图 16 显示了从猪 LSEctin pre-mRNA 去除的内含子的建议次序。编号 1-9 的框代表 9 个 pLSEctin 外显子序列。8 个内含子序列 (用 A-H 表示), 在外显子之间用黑线表示。箭头显示了剪接路径。显示了通过 RT-PCR 检测到的基因、剪接中间产物和同种型以它们各自的大小显示于左边。

[0062] 图 17 显示了通过 RT-PCR 检测 pLSEctin mRNA 在选定的猪组织中的表达。猪组织 cDNA 用作 PCR 与引物 PLST-E67F/PLST-E89R 或猪 GAPDH 特异性引物反应中的模板。

[0063] 发明详述

[0064] 本发明提供了迄今未知的分离的核酸分子, 所述核酸分子包括编码选自猪 DC-SIGN (pDC-SIGN)、猪 ICAM-3 (pICAM-3)、猪 LSEctin (pLSEctin) 的一个或多个蛋白的核苷酸序列, 以及所述核苷酸序列中至少一个的补体和包含至少一个所述核苷酸序列的功能性限定部分的功能性片段。

[0065] 采用基因组 PCR 技术, 本发明显示了编码从野猪 (野猪, 猪家族的一员) 的体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞分离的独特 pDC-SIGN 的全基因和 cDNA 序列的分子克隆和表征。与文献中已经描述的小鼠和其它物种的基因组数据库中的 DC-SIGN 同源物的计算机筛选不同, 猪基因组数据库中还未获得 DC-SIGN 相关的猪基因序列, 因此, 向克隆全长核酸序列提出了挑战。

[0066] 本发明的范围还包括编码从猪肝组织分离的新 pLSEctin 蛋白的全长基因和 cDNA 序列。本发明公开内容描述了相关猪蛋白的组织 and 细胞分布, 说明了 pDC-SIGN 和 hICAM-3 的交叉相互作用, 显示了 pDC-SIGN 和 hICAM-2 的交叉相互作用, 且特别重要的是, 展示了通过 pDC-SIGN 对 PRRSV 反式输送到靶细胞的提高。

[0067] 本发明的基础在于 hDC-SIGN 和 hL-SIGN 可为许多包膜病毒, 特别是在巨噬细胞和树突细胞如 PRRSV 中复制的那些病毒的结合受体的报道。人 DC-SIGN 可能也介导生殖系统中的 PRRSV 发病并与生殖衰竭有关。既然本文中确定了猪特异性 DC-SIGN 和 pLSEctin 基因并与 hDC-SIGN 和 hL-SIGN 对比, 并观察到蛋白结构出乎意料的类似, 本文中确定: PRRSV 可利用 pDC-SIGN 来促进进入巨噬细胞和树突细胞, pDC-SIGN 在能复制的细胞如 BHK-21 中的表达可导致生殖 PRRSV 复制。同样, 本发明还涉及有效支持生殖 PRRSV 复制的基因工程稳定的转染细胞或细胞系。

[0068] 本发明中还出乎意料地观察到猪 LSEctin 与人 LSEctin 在氨基酸水平方面高度一

致,这表明 pLSEctin 具有与 hLSEctin 相同的糖-蛋白相互作用模式。现有研究报道了尼帕病毒表面糖蛋白 (NiV-G) 与人 LSEctin 结合的能力和 hLSEctin 作为 NiV-G 的推定受体的可能功能 (T. A. Bowden 等人,即将发表,2008,出处同上)。其它研究报道了埃博拉病毒的包膜蛋白以及 SARS-CoV 的刺突蛋白具有相同的糖基序且也可被 hLSEctin 识别 (T. Gramberg 等人,2005,出处同上)。由于现在看到的本发明新发现的 pLSEctin 和 hLSEctin 之间的相似性,新 pLSEctin 可作为病原体识别受体 (PRR) 以在猪感染过程中触发宿主先天免疫应答并促进尼帕病毒或其它致病猪包膜病毒的输送和传播。同样 pLSEctin 的应用包括设计特定的抗病毒药物 (如糖配体、siRNA 等) 来阻止病毒-pLSEctin 相互作用、病毒疫苗的开发等,所述病毒疫苗包含刺激 pLSEctin 依赖性抗原识别和提高宿主先天性免疫应答以提高疫苗功效的因素。

[0069] 本发明还包括融合蛋白。融合蛋白可包括连接到 pDC-SIGN 的 pLSEctin,所述融合蛋白还可包括连接到其它蛋白的功能性限定部分的 pLSEctin 或 pDC-SIGN。单独或融合的 pLSEctin、pDC-SIGN 或其功能性限定部分可进一步融合到至少一个选自如下的蛋白: hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSEctin 及其组合,或其功能性限定部分。所述蛋白的功能性限定部分涉及确定为在猪或人同源物中具有免疫原功能、受体活性或结合能力的结构域或区域,例如 pDC-SIGN 或 pLSEctin 的糖识别结构域、hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSEctin 或其组合的胞质尾区、跨膜结构域或重复颈区。

[0070] 在一个优选实施方案中,所述融合蛋白可包含 pDC-SIGN 或 pLSEctin 的糖识别结构域 (CRD),所述糖识别结构域负责捕获抗原,和 hDC-SIGN、hLSEctin 或 hL-SIGN 的胞质尾区 (CT)、跨膜结构域 (TMD) 和重复颈区负责通过内吞作用将捕获的抗原吸入或吞入细胞。

[0071] 某些包膜病毒如 PRRSV 仅能在有限的细胞系如 MARC-145 细胞系中生长到有限程度且难以在足够滴度中培养。其它细胞系如 BHK-21 细胞的培养基允许 PRRSV 在细胞内复制但不允许 PRRSV 在细胞间传播,这意味着所述病毒不能进入其它未感染的 BHK-21 细胞,使得抗原生产和存活免疫产物的制备成为挑战。有利的是,PRRSV 受体,即 pDC-SIGN、pICAM-3、pLSEctin 等,但优选 pLSEctin、pDC-SIGN 或其融合蛋白构建体可在 BHK-21 表面 (即生物工程设计的 BHK-21 细胞系) 表面稳定表达,允许病毒进入其它未感染细胞并繁殖到足够滴度。

[0072] 因此,本发明一个重要方面包括繁殖病毒的非常有利的新方法,所述病毒优选包膜病毒 (其主要为 RNA 病毒) 且特别是根本不能在细胞培养基中繁殖或不能在合适细胞系中繁殖到有限程度的那些病毒。所述方法的特别优势是稳定表达本发明蛋白或融合蛋白构建体的质粒或载体以用于培养如下病毒:包膜猪病毒如猪繁殖和呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪呼吸道冠状病毒 (PRCV)、猪流行性腹泻病毒 (PEDV)、猪内源性逆转录病毒、猪巨细胞病毒、猪流感病毒 (SIV)、非洲猪瘟病毒、典型猪瘟病毒、猪痘病毒、猪血凝性脑脊髓炎病毒 (PHEV) 等,及传染性胃肠炎病毒 (TGEV)、日本乙脑病毒 (JEV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV)、登革病毒、西尼罗河病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV)、猫冠状病毒、人巨细胞病毒 (人 CMV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、单纯疱疹病毒、A 型流感病毒、B 型流感病毒、C 型流感病毒、猿免疫缺陷病毒 (SIV)、猫免疫缺陷病毒 (FIV)、辛德毕斯病毒、尼帕病毒、亨德拉病毒、牛病毒性腹泻病毒、假狂犬病毒、水泡口炎病毒、狂犬病毒、东方型马脑脊髓炎病毒、马动脉炎病毒 (EAV) 等。优选地,采用所述新方法来显著提

高 PRRSV 的繁殖以制备猪疫苗。无包膜病毒如戊型肝炎病毒 (HEV)、猪圆环病毒 2 型及其它也可用于所述新方法。

[0073] 根据本发明的新方法,采用稳定表达 pDC-SIGN、pICAM-3、pLSECtin、至少一种所述核苷酸序列的补体、其功能性限定部分或相关融合蛋白产物的新生物工程设计的细胞或细胞系来繁殖所述病毒。所表达的蛋白作为病毒载体来捕获并将病毒体摄入细胞内。该方法中猪蛋白的存在通过帮助病毒在细胞间传播提供惊人的益处,从而显著地提高了病毒的繁殖。

[0074] 在一个方面,所述改进的方法采用如下步骤:(a) 提供包含编码选自 pDC-SIGN、pICAM-3 和 pLSECtin 的一种或多种蛋白的核苷酸序列、至少一种所述核苷酸序列的补体和至少一种所述核苷酸序列的功能性限定部分的转染细胞或细胞系;(b) 在细胞生长培养基中使转染宿主细胞或细胞系生长以形成培养;(c) 用所述病毒接种所述培养;和 (d) 在合适病毒培养基中,在有效繁殖所述病毒的条件下游育已接种的培养。所述方法可任选还包括游育所述已接种的培养直到观察到致细胞病变效应或达到更高的滴度;或溶解所述细胞以释放细胞内病毒体;和 (g) 收获病毒抗原。

[0075] 繁殖病毒以进行工艺开发的独特方法也可包含以下基本步骤:(a) 用包含编码选自以下的载体以允许所述多肽产物表达的方式转染合适细胞:pDC-SIGN、pICAM-3 和 pLSECtin 的一种或多种蛋白的核苷酸序列、至少一种所述核苷酸序列的补体和至少一种所述核苷酸序列的功能性限定部分,或本文中描述的融合蛋白;(b) 使稳定表达所述蛋白或融合多肽产物的细胞在合适的细胞生长培养基中生长以形成单层;(c) 去除生长培养基,将病毒原液接种到细胞中,然后在 37℃ 经过通常一小时的起始短游育期;(d) 加入病毒培养基并将所述病毒游育 2-3 天,直到病毒量达到如 CPE (致细胞病变效应) 或高的滴度所示的足够水平;和 (e) 溶解所述细胞以释放细胞内病毒体,进行病毒滴定并冷冻病毒原液。

[0076] 发现独特的猪 DC-SIGN 基因与人 DC-SIGN 和小鼠 SIGNR 家族同源,但具有本文中所述的某些变化。发现新型猪 DC-SIGN 蛋白具有 240 个氨基酸并为 II 型跨膜蛋白。其 C-末端细胞外区包含糖识别结构域 (CRD)。令人惊奇的是,猪 DC-SIGN 的推断氨基酸序列从系统发育上讲相对于人 DC-SIGN、非人灵长类 DC-SIGN 或其它小鼠 SIGNR 同源物而言,与小鼠 SIGNR7 和 SIGNR8 更密切相关,表明了猪 DC-SIGN 的独特进化路径。通过用特殊抗肽猪 DC-SIGN 抗体进行免疫荧光测定证实了猪 DC-SIGN 蛋白在用含有所述基因的真核表达质粒转染的 BHK-21 细胞表面的瞬时表达。

[0077] 通过采用根据人、非人灵长类和小鼠 DC-SIGN 基因的简并 RT-PCR 引物,从体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞扩增序列与人 DC-SIGN (hDC-SIGN) 同源的短片段。根据最初得到的序列,猪 DC-SIGN 同源物的全长 cDNA 和基因相继通过 cDNA 末端 (RACE)-PCR 快速扩增确定。此外,发现猪 DC-SIGN 基因的表达定位于细胞表面,证实了该蛋白的跨膜性能。随后,产生 pDC-SIGN 特异性抗体且开发了表达 pDC-SIGN 的稳定细胞系。pDC-SIGN 的基因结构、组织和细胞分布及与人 ICAM-3 和 ICAM-2 免疫黏附素的体外结合性能及 pDC-SIGN 与 PRRSV 之间的潜在相互作用得到表征。

[0078] 因此,本发明的一个重要实施方案涉及编码 pDC-SIGN 的分离的或纯化的核酸分子及其 cDNA 克隆或从单独或与 hDC-SIGN、hL-SIGN、hLSECtin 或其任一组合连接的 pDC-SIGN 构建的蛋白融合产物。优选地,编码 pDC-SIGN 的核苷酸序列包括 SEQ ID NO:1 或

其互补链。本领域中众所周知的常规方法可用于制备互补链或与 SEQ ID NO :1 高度同源的核苷酸序列,例如通过本领域公认标准或高严格度杂交技术。

[0079] 本发明另一个重要方案涉及编码 pLSEctin 的 cDNA 和全长基因的确认和表征。全长 pLSEctin cDNA 编码 290 个氨基酸的 II 型跨膜蛋白。现在发现猪 LSEctin 基因的基因结构与具有 9 个外显子的人 LSEctin 基因及预测的牛、犬、小鼠和大鼠 LSEctin 基因相同。LSEctin mRNA 的末端 3' 未翻译区处的多种属保守部位预计分别是家畜内 microRNA miR-350 和灵长类 miR-145 的目标。类似于人 LSEctin, pLSEctin mRNA 表达分布于肝、淋巴结和脾内。在从猪肝剪接过程中,还确认了 pLSEctin pre-mRNA 的一系列连续中间产物。

[0080] 本发明的范围还包括含有本文中描述的新核酸分子或融合产物的生物学功能质粒、病毒载体等、被本发明质粒或载体短暂转染的合适细胞和多肽表达产物。就本发明目的而言,所述载体,从广义上讲,可为任何可购买到的标准病毒载体或本领域中技术人员已知的生物学功能相当的质粒,但优选 pTriEx-1.1Neo 以从本发明示例的重组双顺反子载体 pTriEx-PDCS 获得最佳和有益结果。

[0081] 为了说明和比较,构建重组双顺反子载体 pTriEx-PDCS 和产生本文中所述的稳定表达猪 DC-SIGN 的 BHK-21 细胞系的 pTriEx-1.1Neo 明显优于其它载体。pTriEx-PDCS 和 pCI-PDCS 构建物都被设计来产生稳定表达 pDC-SIGN 的 BHK-21 细胞系,然后通过流式细胞分析进行测试来估计瞬时转染细胞的百分率。pCI-PDCS 构建物的结果显示 pCI-PDCS 质粒的瞬时转染有约 10% -30% (图 3) 的 pDC-SIGN 表达。大不相同的是,与载体转染对照物相比,图 8-1(a) 上部第二测试组中显示的流式细胞分选展示了采用 pTriEx-PDCS,新构建的细胞系中的 95% 以上细胞表达了 pDC-SIGN。两个实验的细节都在下文中描述。

[0082] 该方法高度期望采用本领域技术人员已知的 G418 抗性筛选或类似筛选技术以获得最佳转染结果和构建稳定表达本发明蛋白的细胞或细胞系。可被转染以稳定表达 pDC-SIGN、pICAM-3 和 / 或 pLSEctin、特别可用于病毒繁殖、提高病毒产量并诱导免疫应答,特别是提高对猪抗原的免疫应答的合适细胞或细胞系包括但不限于 BHK-21、MARC-145、PK-15、COS-7、VERO、CV-1、LLC-MK2、MDCK、MDBK、Raji B、CHO-K1、3D4/31、SJPL、IPEC-J2、THP-1、RAW 264.7、ST 细胞、MA-104、293T 等的培养物,尽管优选宿主细胞包含 BHK-21 细胞、MARC-145 细胞或其它树突细胞系、巨噬细胞系、单核细胞系、滋养细胞系、淋巴细胞系等,优选单核细胞来源的树突细胞、间质树突细胞等的培养物。本文中描述的新型表达、繁殖及相关方法采用这种稳定表达 pDC-SIGN 或其作为允许病毒进入宿主细胞的病毒受体而衍生的融合构建物的合适的细胞或细胞系。尽管为了本发明目的,这些术语在本文中可交换使用,但术语“宿主细胞”是指直接从动物或人或其外培养的原代细胞,也就是说,本发明宿主细胞意图在微观或微生物水平而不是以整个人或动物的感染为基础。术语“细胞”是指不属于宿主(例如猪)细胞系的最初类型的分离细胞。术语“细胞系”是指代表具体细胞类型的已建立细胞系。

[0083] 特别优选的蛋白或多肽,作为可交换使用的常用术语,包括具有 SEQ IDNO :2 和图 2 中列出的氨基酸序列的分离的 pDC-SIGN 多肽、具有 SEQ ID NO :5 和图 11-1 到 11-2 中列出的氨基酸序列的分离的 pICAM-3 多肽及具有 SEQ IDNO :37 和图 14-2(b) 中所列的氨基酸序列的分离的 pLSEctin 多肽。所述猪蛋白的生物学活性变体也属于本发明。本领域普通技术人员将知道如何修饰、替代、删除所述多肽序列中的氨基酸等以及无需过度努力制备

保留与母序列相同或实质上相同活性的生物学活性变体。

[0084] 为了制备或表达本发明多肽产物,特别是 pDC-SIGN、pLSEctin 或其融合蛋白构建物,所述方法可包括以下步骤:在合适的营养条件下以允许所述多肽产物或多肽融合产物表达的方式,使用选定的核酸分子转染的原核或真核宿主细胞生长,和通过本领域中已知的方法分离所述核酸分子表达的所需多肽产物。用于转染的核酸分子包括,例如编码选自 pDC-SIGN, pICAM-3 和 pLSEctin 的一种或多种蛋白的核苷酸序列、至少一种所述核苷酸序列的补体和至少一种所述核苷酸序列的功能限定部分或本文中所述的融合蛋白。预期本发明猪蛋白、融合蛋白等可通过其它技术例如生物化学合成等制备。

[0085] 本发明的另一重要实施方案涉及制备抵抗并特异性结合到 pICAM-3 特别是 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的分离的单克隆或多克隆抗体,和制备抗 pICAM-3 和 pLSEctin 的抗体,其分别与 SEQ ID NO:5 和 SEQ ID NO:37 的氨基酸序列特异性结合。优选地,所述抗体为多克隆的且所述多克隆抗体与包含 SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14 或 SEQ ID NO:13 与 SEQ ID NO:14 的组合的肽区特异性结合。本发明的范围还包括与 pDC-SIGN,特别是 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列或 pICAM-3 或 pLSEctin 及产生识别 pDC-SIGN、pICAM-3 和 pLSEctin 但优选 pLSEctin 或 pDC-SIGN 的抗体的杂交瘤细胞系特异性结合的天然或人工合成的寡糖配体,例如含甘露糖、海藻糖或半乳糖的寡糖等。所述抗体、寡糖配体和杂交瘤细胞系可通过本文中描述的方法及本领域技术人员已知的标准方法制备。

[0086] 寡糖配体结合到一种或多种猪蛋白如 pDC-SIGN 可由,例如通过生物素-链霉亲和素系统产生多肽抗原-寡糖复合体来介导。首先,所述多肽抗原化学偶联到链霉亲和素。随后,链霉亲和素-抗原缀合物通过链霉亲和素-生物素结合连接到寡糖-PAA-生物素。就体外研究而言,将稳定表达猪蛋白例如 pDC-SIGN 的细胞系与抗原-寡糖缀合物孵育,以研究配体内化,证实其活性并将抗原特异性效应物 T-细胞的活化作用与仅通过多肽诱导的活性作用比较。除了寡糖配体外,抗 pDC-SIGN 抗体、抗 pICAM-3 抗体或抗 pLSEctin 抗体可用于与多肽抗原交联以分别靶向 pDC-SIGN、pICAM-3 或 pLSEctin 受体。加入 pDC-SIGN 特异性寡糖或抗 pDC-SIGN 抗体将抗原集中到引发免疫应答的未成熟树突细胞。

[0087] 基本上,本发明杂交瘤细胞系可通过如下制备:用本发明猪蛋白抗原使小鼠免疫并选择产生杂交瘤细胞的小鼠供体;筛选进行抗体制备的小鼠;制备骨髓瘤细胞;将骨髓瘤细胞与免疫脾细胞融合;通过有限稀释克隆杂交瘤细胞系;和通过腹水生成使克隆膨胀和稳定。预期技术人员将理解如何通过文献中公开的其它常规步骤或方法制备杂交瘤细胞系。

[0088] 本发明还包括新的免疫原性组合物和使用所述猪蛋白抗体的方法,其中所述抗原特异性免疫应答可通过靶向 pDC-SIGN、pICAM-3 和 / 或 pLSEctin 得到加强。如本发明上下文中所用的“靶向”pDC-SIGN 或 pICAM-3 意味着体内的未成熟树突细胞会通过配体(如寡糖或抗 DC-SIGN 抗体)与树突细胞上受体(如 DC-SIGN)之间的相互作用识别免疫的抗原-寡糖缀合物或抗原-抗蛋白抗体复合体,其比用裸抗原免疫更有效。用于靶向 pLSEctin 受体的合适抗体复合体的比较用途将涉及肝细胞。

[0089] 本发明还包括新型兽用组合物,所述组合物包含无毒的生理学上可接受的载体和免疫量的本文中描述的单克隆或多克隆抗体,所述抗体与抗原或,替代性地,带有本文中描述的猪蛋白的载体混合或共价连接。优选地,可采用缀合疫苗且其可通过标准方法,将弱抗

原共价连接到作为载体蛋白的抗体上来制备,从而赋予附着抗原上的载体免疫性能。

[0090] 当给药给猪时,本发明兽用组合物可包含一种或多种猪抗原,如猪环病毒 2 型 (PCV-2)、猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪肺炎支原体、副猪嗜血杆菌、多杀性巴氏杆菌、猪链球菌、胸膜肺炎放线杆菌、支气管败血性博代氏杆菌、猪霍乱沙门氏菌、红斑丹毒丝菌、钩端螺旋体菌、猪流感病毒 (SIV)、猪细小病毒、大肠杆菌、猪呼吸道冠状病毒、轮状病毒、导致 Adjezky' s 病的病原体、猪传染性胃肠炎等。本发明组合物任选包含多种通常的无毒、药物学上可接受的载体、添加剂、稀释剂和助剂。为了进行说明,兽用组合物可制备成,例如包含 pDC-SIGN、pICAM-3 或 pLSECtin 的特异性抗肽多克隆抗体以及合适载体、防腐剂和助剂体系,其中所述抗肽多克隆抗体与一种或多种抗原如 PCV-2 和 PRRSV 混合或缀合。

[0091] 本发明中所需的基因工程疫苗通过本领域中已知的技术制备。这种技术包括但不限于进一步操纵重组 DNA、修饰或替代 DC-SIGN 蛋白的氨基酸序列等。

[0092] 本发明融合蛋白产物可通过,例如将人 DC-SIGN/L-SIGN 的胞质尾区 (CT)、跨膜结构域 (TMD) 和重复颈区与猪 DC-SIGN 的糖识别结构域 (CRD) 融合制备。为了进行说明,可进行包括两轮 PCR 的融合 PCR 技术来产生所需的融合片段。第一轮 PCR 中,采用人 DC-SIGN/L-SIGN cDNA 克隆与引物 P1 和 P2 将从全长人 DC-SIGN/L-SIGN cDNA 获得的包含人 DC-SIGN/L-SIGN 的 CT、TMD 和颈区的上游片段扩增,同时采用引物 P3 和 P4 将包含衍生自全长猪 DC-SIGN cDNA 的猪 DC-SIGN 的 CRD 的下游片段扩增。引物 P2 和 P3 相互反向互补。在其 3' - 或 5' - 末端共享一短链 (~ 25bp) 的两个片段经过纯化并用作第二轮 PCR 的模板,并用引物 P1 和 P4 扩增所述融合片段。第二轮 PCR 产物用所需的限制性酶进行双酶切并克隆至用相同限制性酶酶切的表达载体。这种融合 PCR 技术在 S. U. Emerson 等人, " In vitro replication of hepatitis E virus (HEV) genomes and of an HEV replicon expressing green fluorescent protein (表达绿色荧光蛋白的戊型肝炎病毒 (HEV) 基因组和 HEV 复制子的体外复制), " J. Virol. 78 (9) :4838-4846 (2004) 中进一步描述。

[0093] 为了确定所述片段是活性的且可用于本发明,进行标准配体结合和内存活性分析来证实所述融合蛋白各部分的潜在作用。通常,从 pDC-SIGN 或 pLSECtin cDNA 分离的融合蛋白的 CRD (糖识别结构域) 部分负责识别和捕获能通过配体 - 结合分析证实的猪病原体,而衍生自 hDC-SIGN、hLSECtin 或 hL-SIGN 的融合蛋白的 CT (胞质尾区)、TMD (跨膜结构域) 和重复颈区负责通过内存作用将捕获的病原体摄入细胞中,这可通过内存活性分析证实。

[0094] 本发明包括通过有效诱导未接触抗原和记忆性 T- 细胞应答赋予动物抵抗抗原的被动免疫 (即作为免疫原的病原体) 的新方法,所述方法包括给药给动物免疫有效量的本文中所述的兽用组合物。所述方法,其提供抵抗抗原或病原体的抗原特异性免疫应答,优选设计成通过靶向 pDC-SIGN、pICAM-3 或 pLSECtin 来提高弱抗原或病原体的免疫学活性。在这方面,共价疫苗产物特别有用。需要从抗体组合物获得提高的免疫力的弱抗原或免疫原性物质包括病毒、细菌、真菌或寄生虫。本发明抗体提供了细胞受体部位处病原体的提高的进入能力、帮助诱导免疫应答和最终防止疾病传播。优选地,需要所述免疫原性提高的组合物的动物是猪,但预计其它动物如牛或犬也能受益。

[0095] 在所述方法中,将免疫有效量的本发明组合物给药给需要预防疾病或感染的动物,特别是幼猪,以在动物体内诱导保护性免疫应答。靶向 pDC-SIGN、pICAM-3 或 pLSECtin 在动物内产生提高的免疫应答。有效免疫量是达到足够免疫应答以保护动物免受病原体的

有害影响的量。当兽用组合物能保护至少免疫领域标准值要求的足够量的接种动物时认为达到了保护性免疫应答。接种动物并引起令人满意的免疫效果的免疫有效剂量或有效免疫量可通过常规测试如标准滴定研究容易地确定或滴定测定。

[0096] 本发明新型免疫原性组合物用于健康动物,优选约 3 个月大的小猪的免疫。也可在成熟或成年动物如大母猪(即大于 3 个月)繁殖前给予疫苗。疫苗可单剂量给药,或如果抗体滴定量下降且认为加强疫苗注射必需就重复剂量给药。优选地,以单次接种将疫苗给药给健康动物以提供长期的疾病防疫,保护动物至少一年到三年或更长时间。合适的剂量通过标准剂量滴定研究确定。

[0097] 本发明还包括克隆来自非灵长类大动物种属的未知 DC-SIGN cDNA 同源物的独特方法,所述方法包括以下步骤:(a) 从动物静脉血中分离单核细胞来源的树突细胞,并在合适宿主细胞中在允许所述树突细胞生长的合适营养条件下体外培养所述单核细胞来源的树突细胞;(b) 提取 RNA;(c) 采用根据编码人和小鼠 DC-SIGN 的核酸分子的多重序列比对设计成与人和小鼠 DC-SIGN 核苷酸序列中保守序列互补的简并引物进行逆转录酶(RT)和 PCR,以合成 cDNA 第一链并通过 RT-PCR 扩增序列与人 DC-SIGN 同源的短片段;(d) 采用分别为 5' -RACE 或 3' -RACE 设计并根据简并 PCR 产物的序列信息的包含 SEQ ID NO:9 的基因特异性引物 PDR-1 和包含 SEQ ID NO:10 基因特异性引物 PDF-1 在所述短片段上进行逆转录酶和 RACE-PCR;(e) 通过快速扩增 cDNA 末端(RACE)-PCR 反应产物克隆动物体内所述未知 DC-SIGN 同源物的全长 cDNA 的两个重叠片段;和(f) 分离、纯化或测序所述动物的 DC-SIGN 同源物。

[0098] 以上克隆方法中,合适宿主细胞包括但不限于 CD 14 阳性外周血液单核细胞(PBMC)、源自脾的淋巴细胞、源自骨髓的淋巴细胞等的培养物。优选地,所述新克隆方法中的宿主细胞采用 CD 14 阳性 PBMC 的培养物。

[0099] 作为细胞传代阶段的一个实例,稳定表达 DC-SIGN 的细胞成长成单层,如通过光学显微镜观察到的。根据病毒接种需要,细胞每 3-4 天传代一次。从各瓶子中移走细胞生长培养基,例如用 10% 胎牛血清(FBS)和 1× 抗生素(10,000 单位/mL 青霉素 G、10,000mg/mL 链霉素)加强的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM),用 1mL 蛋白水解酶如胰岛素-EDTA(TE)孵育细胞。第一次细胞分离后移走 TE。将 5 毫升细胞生长培养基加到悬浮细胞中;向悬浮液中通气并分成 5 瓶。将 7 毫升细胞生长培养基加到各瓶中,然后通气。将瓶子转移到培养箱(37°C, 5% CO₂)中并在水平位置孵育以让培养生长。将病毒(例如 PRRSV)接种到瓶中或者当观察到 90% 汇合时将瓶子用于进一步细胞传代。

[0100] 作为病毒培养的一个实例,移走 10% FBS-DMEM/PS 细胞生长培养基;并用 1mL 具有合适滴度的病毒原液接种细胞。水平孵育各瓶 1h(37°C, 5% CO₂)。然后将 9 毫升病毒培养基(2% FBS-DMEM, 无抗生素)加入各瓶中并将各瓶放回培养箱中保持 2-3 天。继续病毒培养直到在光学显微镜下大多数细胞显示出可视的致细胞病变效应(CPE)。当观察到 CPE 时,通过冷冻到 -80°C 终止细胞培养。进行两次以上连续的 -80°C 至室温的冷冻/解冻循环以溶解细胞和释放胞内病毒体。对所得病毒原液进行滴定并冷冻到 -80°C 直到用于工艺开发或病毒接种以进一步处理来制备病毒疫苗。

[0101] 对于 DC-SIGN 基因,本发明第一次描述了 pDC-SIGN cDNA 的克隆,并在效果上,第一次对非灵长类大动物种属的 DC-SIGN cDNA 同源物(hDC-SIGN 的)的克隆进行了报道。

与以前用于小鼠 SIGNR 分子的策略相比,由于猪基因组测序计划 (SGSP) 数据库中无相关序列,本发明采用完全不同的新策略来克隆猪 DC-SIGN 基因。在体外产生猪 MDDC 并将从 MDDC 细胞中提取的总 RNA 用于克隆猪 DC-SIGN 同源物。通过采用根据人和小鼠 DC-SIGN 序列的简并引物,首先通过 RT-PCR 扩增序列与 hDC-SIGN 和小鼠 DC-SIGNR 同源的 210-bp 片段。根据该初始序列,然后分别通过 5' - 和 3' -RACE-PCR 在两个重叠片段中获得猪 DC-SIGN 的全长 cDNA 序列。此外,通过一步基因组 PCR 根据 cDNA 序列独特地克隆全长 pDC-SIGN 基因。本文中采用的克隆策略对于其它动物种属中的无序列信息的 DC-SIGN 同源物的鉴定非常有用。

[0102] 尽管采用猪 MDDC 克隆了猪 DC-SIGN,但 pDC-SIGN 不能采用初始纯化的 CD14 阳性 PBMC 扩增得到,表明在 MDDC 发展过程中 pDC-SIGN 的表达被激活。

[0103] 就小鼠 SIGNR 成员而言,仅 SIGNR3 具有与 hDC-SIGN 相同的与含高甘露糖多糖和海藻糖多糖 (Powlesland 等人,2006,出处同上) 结合的能力。SIGNR2 几乎专门地结合到 GlcNAc 末端多糖,而 SIGNR7 优先结合到 6- 磺基-唾液酸化的路易斯 X 多糖,类似于选择性地识别唾液酸 (id.) 的唾液酸结合受体的 siglec 家族的一些成员。本文中确认的 pDC-SIGN 具有结合于 CRD 中的钙依赖型糖涉及的所有 9 个保守残基。

[0104] 然而,尽管由于序列同源性与其它 DC-SIGN 相关蛋白相比较低,序列比对结果表明 pDC-SIGN 可能具有与 hDC-SIGN 和 L-SIGN 不同的糖结合特性,它们确实与 hDC-SIGN 具有类似的配体结合能力。这主要因为猪和牛 DC-SIGN 蛋白都具有促进 CRD 正确重叠并涉及钙依赖型糖结合的所有结构保守性残基。另一方面,这些相互作用除了蛋白-糖相互作用外可能涉及蛋白-蛋白相互作用,蛋白-糖相互作用已通过 hDC-SIGN 结合到 hICAM-2 和 hICAM-3 的扫描诱变分析显示 (S.V. Su 等人, " DC-SIGN binds to HIV-1 glycoprotein 120 in a distinct but overlapping fashion compared with ICAM-2 and ICAM-3 (DC-SIGN 以与 ICAM-2 和 ICAM-3 不同但重叠的方式结合到 HIV-1 糖蛋白 120), " J. Biol. Chem. 279 : 19122-32 (2004))。此外,已经显示:hDC-SIGN 对 gp120 和 ICAM-3 具有不同但重叠的结合方式 (T.B. Geijtenbeek 等人, " Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1 (树突细胞特异性受体 DC-SIGN 中对胞间粘附分子 3 和 HIV-1 的不同结合部位的鉴定), " J. Biol. Chem. 277 : 11314-11320 (2002) ; Su 等人,2004,出处同上)。hDC-SIGN 中 aa 位置 351 处缬氨酸单突变到甘氨酸消除 ICAM-3 结合但没有消除 HIV-1 gp120 相互作用 (Geijtenbeek 等人,2002,出处同上)。然而,当缬氨酸突变成丙氨酸时与 ICAM-3 或 ICAM-2 的结合没有受到影响 (Su 等人,2004,出处同上)。pDC-SIGN 蛋白在牛、犬和马 DC-SIGN 蛋白唯一共享的 204 位置具有组氨酸残基。从缬氨酸变化到组氨酸可能对 pDC-SIGN-ICAM-3/hICAM-2 相互作用具有极小的影响。

[0105] 已经显示:通过单独的 CRD 识别小分子糖化合物不足以获得 DC-SIGN 和 L-SIGN 与病原体如 HIV-1 gp120 之间高亲和力相互作用。颈区内重复结构域缺失的生化研究也表明需要最少量的三个重复序列来形成四聚体,其它重复序列将使所得四聚体稳定化 (G. A. Snyder 等人, " The structure of DC-SIGNR with a portion of its repeat domain lends insights to modeling of the receptor tetramer (利用具有一部分重复结构域的 DC-SIGNR 结构考察受体四聚体建模), " J. Mol. Biol. 347 : 979-989 (2005))。本发明中新

鉴定的 pDC-SIGN, 及已知牛、犬和马 DC-SIGN 蛋白, 在颈区中不具有重复序列, 表明包含猪 DC-SIGN 的这些蛋白可能不能形成四聚体, 从而支持猪 DC-SIGN 具有不同的糖结合特性的论断。

[0106] 这与这些蛋白的结合能力不直接有关, 这是由于现在已经显示 pDC-SIGN 能有效地与潜在配体如 hICAM-3 和 hICAM-2 相互作用、捕获并将 PRRSV 传输到靶细胞。类似地, 颈区没有重复序列的牛 DC-SIGN 也具有结合 HIV-1gp120 及分支杆菌牛 BCG 并使之内化的能力 (Y.Yamakawa 等人, " Identification and functional characterization of bovine orthologue to DC-SIGN(与 DC-SIGN 牛直系同源物的确认和功能表征)", " J. Leukoc. Biol. 83 :1396-403(2008))。另一实例是 hDC-SIGN 相关凝集素 LSECtin, 其颈区缺少重复序列, 但它仍能通过人骨髓细胞介导抗原捕获和病原体结合 (A. Dominguez-Soto 等人, " The DC-SIGN-related lectin LSECtin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells(DC-SIGN 相关凝集素 LSECtin 通过人骨髓细胞介导抗原捕获和病原体结合)", " Blood 109 :5337-45(2007))。尽管 pDC-SIGN 不参与 PRRSV 进入, 本文中已经显示 pDC-SIGN 能增强反式病毒从工程 BHK 供体细胞到靶 MARC-145 细胞的传播, 尽管这两种细胞系都不是来自于猪。

[0107] 本文中展示了细胞表面上表达的 pDC-SIGN 结合到可溶 hICAM 配体。提高 hICAM-2 与 pDC-SIGN 的结合或阻碍 hICAM-3 与 pDC-SIGN 的结合可能具有治疗价值。具体而言, 由于受体 T 细胞介导异种移植排斥反应, 体内细胞-细胞粘附作用可能对猪到人异种器官移植的临床应用具有重要指征。此外, 组织和细胞位置和 pDC-SIGN 的特性及其与人天然配体交叉结合强烈地暗示了这种凝集素在细胞粘附中的类似生理作用。还预测了 pLSECtin 和 pICAM-3 的类似作用。

[0108] 研究的惊人发现相对其它小鼠 SIGNR 成员而言, pDC-SIGN 与小鼠 SIGNR7 和 SIGNR8 最相关。在小鼠中发现 8 种 DC-SIGN 同源物表明它们具有非常不同的生化和生理学特性 (Powlesland 等人, 2006, 出处同上)。然而, 没有一种被实验证实与人 DC-SIGN 是功能上直系同源的。尽管没有发现小鼠 DC-SIGN 蛋白具有与人蛋白相同的功能, 牛 DC-SIGN 最近表现出在牛 MDDC 上表达, 结合 HIV-1gp120 及分支杆菌牛卡介苗 (BCG) 并使之内化, 表明它与 hDC-SIGN 功能上相关 (Y.Yamakawa 等人, " Identification and functional characterization of bovine orthologue to DC-SIGN(与 DC-SIGN 牛直系同源物的确认和功能表征)", " J. Leukoc. Biol. 83 :1396-403(2008)), 尽管它们被分成两种不同进化路径。这个结论也得到以下实验中组织和细胞分布及 pDC-SIGN 与 hICAM 配体的结合特征的支持。

[0109] 本发明详述中, 显示 pDC-SIGN mRNA 表达主要分布在各种淋巴器官内且在 CD14⁺ 单核细胞或 PBL 表面上没有检测到这种蛋白表达。猪 DC-SIGN 不仅在 MDDC 还在 MDMΦ 和 PAM 上表达, 表明猪 DC 和巨噬细胞发育过程中它被激活。通过采用 IHC 分析, 进一步证实了 pDC-SIGN 在淋巴结窦状 APC 包括巨噬细胞样和树突样细胞上表达, 但不在 B 或 T 淋巴细胞上表达 (图 7)。也在淋巴结内皮细胞上检测到猪 DC-SIGN 表达, 其与 hDC-SIGN 表达具有类似形式 (J.H.Martens 等人, " Differential expression of a gene signature for scavenger/lectin receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis(通过人淋巴结

窦（局部转移的主要部位）中内皮细胞和巨噬细胞差异表达清道夫 / 凝集素受体的基因信号），" J. Pathol. 208 :574-89(2006)）。然而，分别采用 RT-PCR 和 IHC 分析在猪肝组织中既没有检测到 pDC-SIGN mRNA 也没有检测到蛋白。

[0110] 根据这些结果，总结出：尽管 pDC-SIGN 的氨基酸序列没有显示与 hDC-SIGN 或 hL-SIGN 明显的同源性，但克隆的猪基因是 DC-SIGN 同源物（而不是 L-SIGN 同源物）。L-SIGN 基因出现于类人猿的共同 DC-SIGN 祖先复制事件中，并可能不存在于非灵长类哺乳动物中，如牛、犬和马基因组区上所示，其中 C 型凝集素在人染色体 19p13.3 上排列成三基因簇 CD23/LSECtin/DC-SIGN 而不是四基因簇 CD23/LSECtin/DC-SIGN/L-SIGN。这些非灵长类哺乳动物中的 DC-SIGN 同源物的进化路径与灵长类哺乳动物中的 DC-SIGN 同源物的进化路径不同，其导致 DC-SIGN 作为单基因存在。基因组织的系统发育分析和比较显示：猪 DC-SIGN 与这些非灵长类哺乳动物高度相关，因此应具有相同特征。此外，通过 IHC 和 RT-PCR，猪肝中不存在 pDC-SIGN 表达也支持了这个结论，这是由于，如果克隆的 pDC-SIGN 是猪 L-SIGN 同源物，分别通过 RT-PCR 和 IHC 应该已经在肝组织检测到其 RNA 和蛋白表达。

[0111] 猪 DC-SIGN 蛋白的跨膜特性得到本发明相关的实验证据的验证并确定为在猪 DC 上起着粘附受体的作用。

[0112] 为了更好地表征猪 DC-SIGN 的表达，需要确定基因组 DNA 水平的基因。根据确定的猪 DC-SIGN cDNA 的末端序列，GenBank 和其它猪基因组序列库中目前还未发布的猪 DC-SIGN 基因也通过采用基因组 PCR 扩增和克隆（图 4）。猪 DC-SIGN 基因的共有序列为 3438bp 长，编码跨越该基因的整个编码区的 8 个外显子，其中外显子 1 和 8 的大小未知（图 5-1 到 5-2）。内含子大小为 113-689bp 且所述内含子上的所有接受者和供体序列符合 GT-AG 规则。通过计算机程序没有预测到其它替代性剪接的 mRNA 同种型，表明确认的猪单核细胞来源的树突细胞 cDNA 可能是猪 DC-SIGN 表达的唯一存在同种型，这与上述 RACE-PCR 结果一致（图 1(c)）。

[0113] 测试 pDC-SIGN 的组织 and 细胞分布，发现通过 RT-PCR 在初级（胸腺和骨髓）和次级淋巴器官（淋巴结和脾）及肺和骨骼肌中检测到 pDC-SIGN mRNA 表达，但没有在猪的十二指肠、肾、心脏或肝中检测到（图 6-1(a)）。在淋巴结和骨髓中的表达水平最高。检测肌肉中表达的 DC-SIGN 是有趣的。

[0114] 考虑各种淋巴器官中的 pDC-SIGN 表达，推测：除了 MDDC 外，pDC-SIGN 还可能通过特殊的造血细胞群表达。因此，进行流式细胞分析来检测 pDC-SIGN 蛋白在 PBL、单核细胞、MDDC、MDM Φ 和 PAM 的表面表达（图 6-2(b) 到 6-4）。猪 PBMC 的离散图根据形态清楚地显示了两种细胞群：PBL 和单核细胞。由于 CD 14 分子是猪单核细胞的表面标记（H.W. Ziegler-Heitbrock 等人，" The antibody MY4 recognizes CD14 on porcine monocytes and macrophages (抗体 MY4 识别猪单核细胞和巨噬细胞上的 CD14)，" Scand. J. Immunol. 40 :509-14(1994)），这两种细胞群可通过免疫磁珠标记 MACS 系统采用抗猪 CD 14 单克隆抗体进行分离。CD14⁺ 单核细胞通过在不存在细胞因子的条件下分别加入 rpGM-CSF 和 rpIL-4 或 MDM Φ 进一步用于形成 MDDC。PBL 和单核细胞没有显示任何 pDC-SIGN 表达，这在预期之中，因为 hDC-SIGN 或 L-SIGN 没有在淋巴细胞或单核细胞上表达。从而，在猪单核细胞细胞系 3D4/31 上没有可检测到的 pDC-SIGN 表达（图 6-2(b) 到 6-4）。单核细胞在培养基分化成 MDDC 后，从第 3 天到第 7 天 pDC-SIGN 表达上调，平均荧光强度提高约

8 倍。还在 MDM Φ 上发现了猪 DC-SIGN 表达。与 MDDC 相比,大多数 MDM Φ 产生 pDC-SIGN 表型。PAM 也受到 pDC-SIGN 表型控制,但表达水平低于 MDM Φ 上的表达水平。根据猪肾内未检测到 pDC-SIGN mRNA 表达,该蛋白没有在源自猪肾上皮细胞系 PK15 内表达(图 6-2(b)到 6-4)。

[0115] 为了进一步确认 pDC-SIGN 蛋白是否确实在淋巴组织的特定细胞群内表达,在猪淋巴结和肝组织的石蜡切片上进行 IHC 分析。发现 pDC-SIGN 蛋白在淋巴结内的表达显示出突出的窦状小管图谱(图 7(a))。然而,猪肝内没有检测到表达(图 7(b)),这与 RT-PCR 结果一致(图 6-1(a))。淋巴结窦内用 pDC-SIGN 特异性抗肽抗体免疫染色的大多数细胞是巨噬细胞样和树突样细胞(图 7(c))。软组织淋巴管内的内皮细胞也用 pDC-SIGN 特异性抗肽抗体免疫染色(图 7(d))。猪淋巴结内 pDC-SIGN 蛋白的表达图谱类似于人淋巴结内 hDC-SIGN 的表达图谱,其中通过 IHC 不仅在窦状巨噬细胞而且在内皮细胞上都鉴别到 hDC-SIGN 蛋白(J. H. Martens 等人," Differential expression of a genesignature for scavenger/lectin receptors by endothelial cells and macrophages in human lymph node sinuses, the primary sites of regional metastasis(通过人淋巴结窦(局部转移的主要部位)中内皮细胞和巨噬细胞差异表达清道夫/凝集素受体的基因信号)," J. Pathol. 208 :574-89(2006))。猪肝内不存在 pDC-SIGN 表达进一步支持:克隆的 pDC-SIGN 不是 L-SIGN 同源物,因为假定的猪 L-SIGN(如果存在)应在 LSEC 强烈表达。

[0116] 本发明一个独立的实施方案中,现已在体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞确认了猪 ICAM-3 的两种新 cDNA 同种型(编码较大 pICAM-3 同种型的核苷酸序列对应于 SEQ ID NO:4 而编码较小 pICAM-3 同种型的较小核苷酸序列对应于 SEQ ID NO:39)。两种同种型中较小者在非编码区包含 114-nt 缺失。胞间粘附分子-3(人 ICAM-3, CD50)是结合到白细胞整合素 LFA-1(CD11a/CD18)和树突细胞特异性胞间粘附分子-3(ICAM-3)结合非整合素(人 DC-SIGN, CD209)的免疫球蛋白(Ig)超家族成员。ICAM-3 在激活 T 淋巴细胞和树突细胞中起重要作用。

[0117] 出乎意料地是,新发现的同种型都仅编码三个 Ig 样结构域(D1-D3)且缺少 Ig 样结构域 4 和 5(D4-D5),这与有五个 Ig 样结构域(D1-D5)的人 ICAM-3 不同。猪 ICAM-3 中没有 D4 和 D5 可能是由于在 pre-mRNA 剪接过程中猪 ICAM-3 基因的外显子 5 和 6 连续跳过。在确定猪 ICAM-3 基因组 DNA 序列的其余未知近 3' 区后,发现外显子 5 内存在一个框内 3-nt 无义突变而外显子 6 内存在四个框内无义突变,这在猪中是独特的。还确定了内含子 6 的推定剪接供体部位处的点突变(G 到 A)。因此缺少 D4 和 D5 猪的 ICAM-3 同种型的产生可能由无义相关的变化的剪接(NAS)引起,所述剪接与物种有关且在 pre-mRNA 剪接过程中不包含外显子 5 和 6。

[0118] 以下实施例展示本发明的某些方面。然而,应该理解这些实施例仅用于说明,而非对本发明条件和范围进行限定。应该认识到当给出特定反应条件(如温度、反应时间等),具体范围以上和以下的条件都可使用,尽管通常不那么便利。实施例在室温(约 23°C - 约 28°C)和大气压下进行。本文中提到的所有份和百分比以重量计而所有温度表示成摄氏度,除非另有说明。

[0119] 通过以下非限定性实施例可对本发明进一步理解。

[0120] 实施例 1 猪 DC-SIGN cDNA 与基因的克隆和表征

[0121] 材料与方法

[0122] 猪:从 3-7 周大的健康杂交常规猪采集静脉血样品和猪肺泡巨噬细胞 (PAM)。将猪饲养在实验条件下的独立室内。

[0123] 猪肺泡巨噬细胞、猪外周血淋巴细胞、单核细胞、单核细胞来源的树突细胞和单核细胞来源的巨噬细胞的分离和培养:通过采用冷 PBS 进行肺灌洗采集猪肺泡巨噬细胞 (PAM) 并悬浮于含 10% 胎牛血清 (FBS) 的 DMEM 中。新鲜或 3 天体外培养的 PAM 培养物用于染色和随后分析。

[0124] 室温下,猪肝素化血用 1:2 磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 稀释并在 Ficoll-PaquePREMIUM (GE Healthcare, Sweden) 上以 1000g 力离心分离 40min。4℃ 下分离包含外周血单核细胞 (PBMC) 的血沉棕黄色层并用 250g PBS 洗涤三次,每次 10min。通过细胞的免疫磁珠标记 MACS 系统采用抗 CD14mAb (M-M9, VMRD Inc., Pullman, WA, USA) 和山羊抗小鼠 IgG1 磁性微珠 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) 分选 PBMC 表面上的 CD14 阳性单核细胞。根据通过流式细胞分析确定的细胞形态,CD14 阴性细胞被认为是猪外周血淋巴细胞 (PBL)。纯化的单核细胞以 1×10^5 细胞/mL 悬浮于含有 10% 热灭活胎牛血清 (FBS)、 $55 \mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇和抗生素的这尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM)。然后在 6 孔板或 60-mm 细菌培养皿中 37℃ 下在 25ng/mL 重组猪粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (rpGM-CSF, R&D Systems, Minneapolis, MN) 和 25ng/mL 重组猪白细胞介素-4 (rpIL-4, Endogen, Rockford, IL) 存在下培养单核细胞。每三天用新鲜培养基替换一半培养基。观察细胞以确定 DC 的特征形态。在第三天或第七天收集细胞并用作单核细胞来源的树突细胞 (MDDC)。单核细胞来源的巨噬细胞 (MDM Φ) 以类似步骤发育,但在两种细胞因子不存在下培养。在第五天收集细胞并用作 MDM Φ 。

[0125] 连续细胞系的培养:37℃ 下在培养器内在含 10% FBS 和抗生素的 MEM 中使幼仓鼠肾成纤维细胞系 BHK-21、猴肾细胞系 MARC-145 和猪肾上皮细胞系 PK15 生长,而 37℃ 下在培养器内在含有 10% FBS 和抗生素的 RPMI 1640 培养基中使猪单核细胞系 3D4/31 (ATCC CRL-2844) 生长。稳定表达 hDC-SIGN 的小鼠成纤维细胞 NIH3T3 细胞系通过 NIH 艾滋病研究与参照试剂计划 (Germantown, MD) 获得并在本研究中重命名为 3T3-HDCS。该细胞系在含有 10% FBS 的 DMEM 中培养。

[0126] cDNA 末端 (RACE)-PCR 的 RNA 提取、反转录 (RT) 和简并 PCR 和快速扩增:在第七天和第十天之间收集在 rpGM-CSF 和 rpIL-4 存在下获自猪单核细胞的体外培养的猪单核细胞来源的树突细胞 (MDDC)。采用 Rneasy 小试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 从 MDDC 分离总 RNA,然后进行无 RNA 酶的 DNase I 处理。采用 oligo-dT (寡脱氧胸苷酸) (Promega Corporation, Madison, WI) 作为反向引物用 SuperscriptII 阴性逆转录酶 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 从总 RNA 合成第一链 cDNA。根据可获得的人和小鼠 DC-SIGN 相关基因的多重序列比对设计几对与人和小鼠 DC-SIGN 基因中保守序列互补的简并引物。用 Advantage 2PCR 试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA) 在 $50 \mu\text{L}$ 反应物中用简并引物进行 PCR,采用如下 PCR 参数:94℃:2min;然后 94℃:15sec, 357.5℃:30sec 和 72℃:1min, 30 个循环,最后在 72℃ 孵育 3min。仅当一组引物 (NF-05 和 NR-05, 下表 1) 用于扩增时,PCR 片段得到扩增。获得的 PCR 产物直接进行测序并与人和小鼠 DC-SIGN 相关基因的 GenBank 序列进行比较。用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA) 按照生产商的用

户手册进行 RT 和 RACE-PCR。用于 5' -RACE 或 3' -RACE 的基因特异性引物分别为 PDR-1 和 PDF-1 (表 1), 它们是根据从简并 PCR 产物获得的序列信息设计的。通过 TA 克隆策略将 RACE 反应产物克隆到 pCR2.1 载体中 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 并测序。

[0127] 表 1pDC-SIGN 的猪组织中简并 RT-PCR、5' -RACE 和 3' -RACE PCR、基因组 PCR 的寡核苷酸引物、基因测序、亚克隆和 PCR 检测

[0128]

引物 ID	序列(5'-3') ¹	位置 ²
NF-05	ATCAAAASTGMTGAGGAGCAGA (SEQ ID NO:6)	473-494
NR-05	CATTTGTCRTTCRTTCCAGCC (SEQ ID NO:7)	671-690
NF-06	AACCGCTTCACCTGGATGGG (SEQ ID NO: 8)	524-543
5'-RACE PDR-1	CAGAAGCTGAGTTGGAGGGGGCTG (SEQ ID NO:9)	589-612
3'-RACE PDF-1	GCCACCTGGATTGGCCTCAGTGATG (SEQ ID NO: 10)	530-554
PCI-XHO	agtctcgagcgccaccATGGCAGAGATATG (SEQ ID NO:11)	26-39
DCS3	tatctagaTCAGAGCATGGGGCAGGGAGA (SEQ ID NO: 12)	728-748
IF	GATGGCAGAGATATGTGACCCCAAGGA (SEQ ID NO: 15)	25-54
4R	CGGAGGGGCTGCTGAGACCATC (SEQ ID NO: 16)	966-987
2F	TCGTCTCATTGGGTTTCTTCATGCTCC (SEQ ID NO: 17)	168-194
3F	CTGCAGAGAGAGAGAGAGACCAGCAGGA (SEQ ID NO: 18)	236-263
4F	TGCCCCTGGCATTGGGAATTCTT (SEQ ID NO: 19)	359-381
Nco-DCS-5	atoccATGGCAGAGATATG (SEQ ID NO:25)	26-39
Xho-DCS-3	agtctcgagTCAGAGCATGGGGCAGGGAGA (SEQ ID NO: 26)	728-748
PDCS-E56F	GAATGCCACCCTGGCTGGCCT (SEQ ID NO:27)	328-348
PDCS-E78R	GGGTTCTCCTTCTTTCCAGAAGCTGAGTT (SEQ ID NO:28)	600-628

[0129]

[0130] 1 为简并引物 (NF-05 和 NR-05) 设计的混合碱 (S = C+G, M = A+C 和 R = A+G) 显示为粗体和下划线。注意到引物 NF-05、NF-06 和 NR-05 的序列与 pDC-SIGN 的最终 cDNA 序列不完全相同。就引物 PCI-XHO、DCS3、Nco-DCS-5 和 Xho-DCS-3 而言, 小写字母表示非猪 DC-SIGN 序列; 有下划线的核苷酸代表用于亚克隆的限制位点 (Xho I、Xba I 或 Ncp I) 而斜体核苷酸表示起始密码子 ATG 之前的最优 Kozak 序列。

[0131] 2 位置对应于 pDC-SIGN 的全长 cDNA (图 2)。

[0132] 基因组 PCR 和 基因 测 序: 用 于 一 步 基 因 组 PCR 的 引 物 以 本 文 中 确 定 的 猪 DC-SIGN cDNA 序 列 为 基 础。正 向 引 物 IF (**5'-GATGGCAGAGATATGTGACCCCAAGGA-3'** (其对应于 SEQ ID NO: 15)) 包含起始密码子 ATG (有下划线) 而反向引物 4R (5' - **CGGAGGGGCTGCTG** AGACC ATC-3' (其对应于 SEQ ID NO: 16)) 与 cDNA 的 3' - 非编码区内的序列互补。采用 Platinum PCR HiFi Supermix 试剂盒 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 用总体积为 50 μ L 的 150ng 猪基因组 DNA (购自 Novagen, Madison, WI) 进行基因组 PCR。PCR 条件为: 94°C:30sec, 68°C:5min, 35 次循环; 起始时模板 DNA 在 94°C 变性 2min。通过 TA 克隆策略将所得片段克隆到 pCR2.1 载体中 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA)。M 13 正向和反向引物及三种基因特异性引物 2F (5' -TCGTCTCATTTGGGTTTCTTCATGCTCC-3' (其对应于 SEQ ID NO: 17))、3F (5' -CTGCAGAGAGAGAGAGAGACCAGCAGGA-3' (其对应于 SEQ ID NO: 18)) 和 4F (5' -TGCCCCTGGCATTGGGAATTCTT-3' (其对应于 SEQ ID NO: 19)) 用于测序。用 Lasergene 软件包的 SeqMan 程序 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 进行全长基因组装。

[0133] 序列和系统发育分析: 采用 Lasergene 软件包 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 进行 DNA 和氨基酸序列的分析和比对。采用在线程序 ASPic (Alternative Splicing Prediction, <http://t.caspar.it/ASPIC/home.php>) 进行 pDC-SIGN 基因的序列分析和 mRNA 剪接预测。

[0134] 猪 DC-SIGN 的特异性抗肽多克隆抗体的制备: 为了制备 pDC-SIGN 特异性抗肽多克隆抗体以检测 pDC-SIGN 蛋白的表达, 对应预计暴露于猪 DC-SIGN 的 CRD 内的区域的两种肽 (乙酰基 -VDNSPLQLSFWKEGEPNNHGC- 酰胺 (其对应于 SEQ ID NO: 13) 和乙酰基 -AEQKFLKSWYRYNKAC- 酰胺 (其对应于 SEQ ID NO: 14)) 由 21stCentury Biochemicals Corporation (Marlboro, MA) 商业合成以用于本发明。随后纯化该肽并一起用于接种两种新西兰白兔, 作为在 21stCentury Biochemicals Corporation 的定制抗体生产服务。通过亲和纯化采用免疫兔的血清制备 0.73mg/mL 的猪 DC-SIGN 特异性抗肽多克隆抗体。

[0135] 表达猪 DC-SIGN 的重组载体的构建和体外表达: 采用引物 PCI-XHO 和 DCS3 (表 1) 通过 PCR 扩增 pDC-SIGN 的全长编码区并随后采用 Xho I 和 Xba I 限制位点克隆到 CMV 即时早期增强子 / 启动子下游的 pCI-neo 载体中 (Promega Corporation, Madison, WI)。对构建物进行测序以核实同一性并命名为 pCI-PDC。为了进行转染, 以 4×10^4 细胞 / 孔将 BHK-21 细胞接种到 8-孔 Lab-Tek 腔室玻片 (Nalge Nunc International, Rochester, NY) 上, 并在无抗生素条件下培养 24 小时。采用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 按照生产商的用户手册并稍许改进将质粒 pCI-PDCS 和 pCI-neo 瞬时转染到 BHK-21 细胞中。简而言之, 将 0.4 μ g 质粒 DNA 与 1.5 μ L Lipofectamine 2000 和 150 μ L Opti-MEM (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 在室温下混合 20 分钟, 随后加入细胞

中。6 小时后用新鲜生长培养基替换。培养细胞 24-48 小时,然后用于免疫荧光测定 (IFA) 或蛋白质印迹以检测 pDC-SIGN 蛋白的表达。

[0136] 免疫荧光测定 (IFA) 和蛋白质印迹 :用 PBS 洗涤转染细胞 2 次,用 4%多聚甲醛 /PBS 固定 20min,然后用 0.5% **Triton**[®] X-100 (通常已知为聚乙二醇叔辛基苯基醚的非离子表面活性剂, Union Carbide Corp., Houston, TX 的注册商标,可从 Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO 购买到) 进行通透化 10min。将以 1 : 100 稀释于 PBS 中的 100 微升 pDC-SIGN 的特异性抗肽抗体加到细胞上,在 37℃ 孵育 1 小时。用 PBS 洗涤细胞 3 次,然后加入以 1 : 100 稀释的 100 μ L FITC 标记的山羊抗兔 IgG (KPL, Inc., Gaithersburg, MD)。37℃ 孵育 30min 后,用 PBS 洗涤细胞 3 次,然后在荧光显微镜下观察。采用抗体在 PBS 的 1 : 50 或 1 : 100 两种不同的稀释下进行两次以上 IFA,得到类似的成功结果。

[0137] 为了进行蛋白质印迹分析,将每 10^6 细胞的 pCI-PDCS 或 pCI-neo 转染细胞溶解于 125 μ L CellLytic M 裂解液 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) 中。收集蛋白提取物,进行等分并在 -20℃ 冷冻。样品和蛋白标记 (Precision PlusProtein Kaleidoscope Standards, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) 在 SDS-PAGE 上分离并转移到聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜上,随后用含 3% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 Tris 缓冲盐水 (TBS) 在 4℃ 密封过夜。采用 pDC-SIGN 特异性抗体在 TBS 中以 1 : 200 稀释在室温下检测 pDC-SIGN 蛋白 90min,用辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合抗兔 IgG (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) 在室温下孵育 90min。然后用氯萘酚使膜显色。

[0138] 通过 RT-PCR 检测的 pDC-SIGN 组织分布 :采用 Rneasy 小型试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 从匀化的猪组织、选定细胞群和细胞系中分离总 RNA,然后用无 RNA 酶的 DNase I 处理,采用 oligo-dT (Promega Corporation, Madison, WI) 作为反向引物用 Superscript II 逆转录酶 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 合成 cDNA。就难以分离的猪组织如胸腺和骨髓而言,它们的组织 cDNA 购自 Zyagen Laboratories (San Diego, CA, USA)。用 Advantage 2PCR 试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA) 在 50 μ L 反应物中用跨越 pDC-SIGN 基因的外显子 5 和外显子 6 之间边界的引物 PDCS-E56F 和跨越外显子 7 和外显子 8 之间边界的引物 PDCS-E78R 进行 PCR (参见上表 1 中的序列)。PCR 参数包括 :95℃ :20sec ;68℃ :1min,30 次循环 ;起始时模板 DNA 变性 2min。看家基因 - 猪甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 也用引物 GAPDH5 (5' -GCTGAGTATGTCGTGGAGTC-3' ,其对应于 SEQ ID NO :29) 和 GAPDH3 (5' -CTTCTGGGTGGCAGTGAT-3' ,其对应于 SEQ ID NO :30) 通过 PCR (95℃ :1min, 然后 95℃ :20sec,55℃ :20sec,68℃ :40sec,30 次循环,和 72℃ :3min) 扩增。pDC-SIGN 和猪 GAPDH 的 PCR 产物的预计大小分别 301bp 和 285bp。

[0139] 免疫组织化学 (IHC) :用抗生物素蛋白 - 生物素复合物 (ABC) 通过已经描述的方法对猪淋巴结和肝 (Zyagen Laboratories, San Diego, CA) 的石蜡切片进行免疫染色 (W. Li 等人, " Chronic Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis :Effects of Insulin-like Growth Factor-I Treatment on Clinical Deficits, Lesion Severity, Glial Responses, and Blood Brain Barrier Defects (慢性复发实验性自身免疫性脑脊髓炎 :胰岛素样生长因子 -I 处理对临床障碍、病变程度、胶质细胞应答和血脑屏障缺陷的影响), " J. Neuropath. Exp. Neurol. 57 :426-38 (1998))。简而言之,为了阻挡内源性过氧化物酶活性和非特异性免疫染色,将切片浸泡在 3% H₂O₂ 保持 10 分钟,然后用在 PBS (pH =

7.4) 中的 10% 正常山羊血清 (NGS) 在室温下处理 30 分钟。初级抗体 pDC-SIGN 特异性抗肽多克隆抗体和次级抗体生物素化 IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA), 都在 PBS 缓冲液中的 2% NGS 中稀释。初级和次级抗体分别在 4℃ 孵育过夜和在室温下 30 分钟。制备 ABC 试剂并按照 VECT AST **AIN**[®] Elite ABC 试剂盒 (抗生物素蛋白或链霉亲和素与生物素酶之间的复合物, Vector Laboratories, Burlingame, CA 的注册商标为 ABC) 生产商的用户指南使用, 然后应用 DAB/Ni 底物 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 5 分钟。对照物包括没有初级或次级抗体的、用兔 IgG 替代初级抗体、正常兔血清或抗原-抗体复合物 (预抗体吸收)。切片用苏木精染剂复染色并用 Permount 封片溶液密封。用 Nikon DS-FiI 数码相机和 NIS-Elements 软件 (购自 Nikon Instruments, Inc., Melville, NY) 获得 IHC 数据。

[0140] 结果与讨论

[0141] 来源于体外培养的猪 MDDC 的与人 DC-SIGN 同源的全长猪 cDNA 的分子克隆: 最初假设猪的 DC-SIGN 同源物具有与 hDC-SIGN 类似的表达和分布图谱, 因此可能主要在猪 MDDC 表面上高水平表达, 所述猪 MDDC 可用作未知 pDC-SIGN cDNA 的克隆源, 但是需要进一步实验和确定未知克隆参数以获得编码 pDC-SIGN 蛋白的 cDNA 和全长基因。几个研究组已经报道了猪 MDDC 的制备 (C. P. Carrasco 等人, "porcine dendritic cells generated in vitro: morphological, phenotypic and functional properties (体外产生的猪树突细胞: 形态学、表现型和功能性质)", "Immunology 104:175-84(2001); R. Paillot 等人, "Functional and phenotypic characterization of distinct porcine dendritic cells derived from peripheral blood monocytes (衍生自外周血单核细胞的不同猪树突细胞的功能和表型特征)", "Immunology 102:396-404(2001); C. L. Loving 等人, "Differential type I interferon activation and susceptibility of dendritic cell populations to porcine arterivirus (树突细胞群的差分型 I 干扰素活化和对猪动脉炎病毒的易感性)" "Immunology 120:217-29(2007))。采用文献中描述的步骤, 在 rpGM-CSF 和 rpIL-4 存在下培养固有猪 CD14 阳性单核细胞三天后观察单个和聚集的面罩型细胞。培养皿中几乎从单核细胞转化的细胞的典型树突状形态在七天后更明显 (图 1(a))。所述细胞的表型分析为 MHC H⁺CD1⁺CD11b/c⁺CD80/86⁺, 这与其它报道一致并被认为是 MDDC(id)。从 NCBI 中的猪基因组测序计划数据库 (SGSP, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=genomeDri&cmd=ShowDetailView&TermToSearch=13421>) 中的序列相似性检索没有得到任何与人 DC-SIGN 同源的猪 DC-SIGN 序列。此外, 当开始本发明相关实验时, 所述基因组数据库还有没有发布家兽的其它预计 DC-SIGN 同源物。因此, 为了确认新型猪 DC-SIGN 基因, 首先根据以已知人、非人灵长类和小鼠 DC-SIGN 相关 cDNA 的多重比对为基础的保守序列设计一系列简并引物 (T. B. Geijtenbeek 等人, "Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immuneresponses (DC-SIGN- 一种支持初级免疫应答的新型树突细胞特异性 ICAM-3 受体的确认)", "Cell 100:575-585(2000); Bashirova 等人, 2001, 出处同上; F. Baribaud 等人, "Functional and antigenic characterization of human, rhesus macaque, pigtailed macaque, and murine DC-SIGN (人、猕猴、豚尾猴和鼠 DC-SIGN 的功能性和抗原性表征)", "J. Virol. 75:10281-10289(2001); Park 等人, 2001, 出处同上; A. A. Bashirova

等人, " Novel member of the CD209(DC-SIGN)gene family in primates(灵长类 CD209(DC-SIGN) 基因家族的新成员), " J. Virol. 77 :217-27(2003)). 通过 RT-PCR 采用引物 NF-05 和 NR-05 从 MDDC 的总 RNA 首先扩增得到约 210-bp 产物(图 1(b)). 采用凝胶纯化片段作为模板,用相同正向引物 NF-05 和引物 NR-05 上游的新的反向引物的 NR-06 的巢式 PCR 也产生(即扩增)了较小的片段,表明了 PCR 的特异性。序列分析显示这种起始 PCR 片段的序列分别与人 DC-SIGN、人 L-SIGN 和小鼠 DC-SIGN(SIGNR5)cDNA 序列的相应区(其代表 DC-SIGN 的 CRD 内的一个区)具有 62.6%、61.2%和 57.6%序列同源性。

[0142] 根据该起始序列,可设计两种基因特异性引物以分别通过 5' - 和 3' -RACEPCR 扩增该 cDNA 的近 5' 侧区和近 3' 侧区。由于用于 5' -RACE PCR 的反向引物 PDR-1 位于 3' -RACE PCR 引物 PDF-1 的下游,扩增的 5' -RACE 和 3' -RACE PCR 产物预计具有 82-nt 重叠区,因此覆盖该 cDNA 的整个序列。所得两个 PCR 产物,各自具有来自各 RACE PCR 的约 600bp(图 1(c)),组装成全长 cDNA 序列。对该 cDNA 的 BLAST 检索在野猪中没有得到任何同源序列,表明它是新型猪 DC-SIGN 等同物(也就是,种同源物),其对应于人 DC-SIGN。新发现的 cDNA 命名为猪 DC-SIGN(pDC-SIGN)。

[0143] 猪 DC-SIGN cDNA 及其推导蛋白产物的表征:1069-bp pDC-SIGN cDNA 包含编码 240 个氨基酸的蛋白的从位置 26 到 728 的 723 个核苷酸的开放阅读框(ORF)(图 2)。与其它 C 型凝集素相同,推导的 pDC-SIGN 产物预计为 II 型跨膜蛋白,从推定 39-aa 胞质尾区(CT)开始,接着是推定 31-aa 跨膜结构域(TMD)。胞外结构域由 38-aa 颈区和随后的 132-aa CRD 组成(图 2)。在所述 CT 内发现一内化基序 - 在 aa 位置 27-28 的二亮氨酸基序。由于跨膜受体 CT 中的内化基序对于配体 - 受体复合物的内化很重要,猪 DC-SIGN 可能能介导内吞作用并将潜在结合的病原体转移到 DC 的细胞质内。人 DC-SIGN、hL-SIGN、非人灵长类 DC-SIGN 和 mSIGNR1 在颈区内包含可变重复序列而其余 mSIGNR 成员,除了 SIGNR2 和 SIGNR6 外,没有重复序列。pDC-SIGN 颈区中的序列是不重复的,且长度接近于 SIGNR 3-5 但与小鼠 SIGNR7 和 SIGNR8 高度相关。

[0144] pDC-SIGN 的 CRD 与所有其它已知 DC-SIGN 同源蛋白具有类似大小,尽管它们的总体大小由于颈区变化而非常不同。该 CRD 也是猪和其它非猪 DC-SIGN 同源蛋白都具有的最保守区域,包含形成 Ca^{2+} -和糖结合位点的关键残基。hDC-SIGN 的 CRD 已显示出用两个接近但不同的位点结合两个钙离子(T. B. Geijtenbeek 等人, " Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1 (胞间粘附分子 3 和 HIV-1 的树突细胞特异性受体 DC-SIGN 内不同结合位点的确定), " J. Biol. Chem. 277 :11314-11320(2002))。 Ca^{2+} 位点 1 包含氨基酸残基 Asp 176、Glu180、Asn203 和 Asp208,这些对于 DC-SIGN 与其配体之间的相互作用是必需的。所有这四种残基在 pDC-SIGN 中都是保守的。猪 DC-SIGN 也具有涉及 Ca^{2+} 位点 2 的常见 Glu-Pro-Asn 序列(EPN 序列,aa 位置 200-202)和 Glu207 及 Asn218,这些对于结合含甘露糖、海藻糖或半乳糖的寡糖是关键的。此外,在 CRD 内发现了预测形成二硫键的 8 个保守半胱氨酸。

[0145] 由于编码马、负鼠、犬和牛 DC-SIGN 同源物的计算机预测 cDNA 可在基因组数据库中找到,对它们编码蛋白的推定全长氨基酸序列和来自灵长类和小鼠 DC-SIGN 相关蛋白的那些进行系统发育分析。还包括新型猪 LSECTin- 一种与 DC-SIGN 非常相关但不同的 C 型

凝集素,作为编外组来构建邻接进化系统树。结果显示猪和牛蛋白彼此最密切相关,超过与其它的相关性。一个惊人的发现是:mSIGNR7、mSIGNR8、犬和马 DC-SIGN 与猪和牛蛋白聚集在一起,形成独立的簇(即进化枝),其不同于包含其它小鼠和灵长类同源物的簇。全长 pDC-SIGN 蛋白和来自其它物种的 DC-SIGN 同源物的两两序列比较揭示了 pDC-SIGN 与牛、犬和马蛋白及 SIGNR7 和 SIGNR8 更相似(超过 50%),超过与其它 DC-SIGN 同源物的比较(不到 50%),这与 CRD 序列的系统进化比较一致。

[0146] 猪 DC-SIGN 蛋白的体外表达:为了确定 pDC-SIGN 是否被有效地翻译,以及如此的话,是否所得翻译产物具有推定跨膜特性,采用 BHK-21 细胞进行转染实验。通过 PCR 从猪 MDDC 的 RNA 提取物扩增了具有 720bp 的 pDC-SIGN 基因的全长编码区,并随后亚克隆到真核表达载体 pCI-neo,获得质粒 pCI-DCS。用该构建物或仅载体转染 BHK-21 细胞。采用针对 CRD 中的两种肽的 pDC-SIGN 特异性抗肽抗体通过 IFA 检测 pDC-SIGN 蛋白的表达。IFA 结果显示:表达 pDC-SIGN 的大多数细胞具有扩展的细胞质和膜染色(图 3a)。一些细胞显示了仅位于细胞膜上的荧光信号(图 3b)。相比之下,用 pCI-neo 载体转染的细胞没有任何阳性 IFA 信号(图 3c)。从这些结果总结出:编码猪 DC-SIGN 的 cDNA 在体外被有效地翻译,所得产物确实是 II 型跨膜蛋白,也就是说,pDC-SIGN 的 cDNA 编码 II 型跨膜蛋白。尽管结果说明了有效翻译,这个分析通过 pCI-PDCS 质粒的瞬时转染仅显示了约 30% 的 pDC-SIGN 阳性表达。抗 pDC-SIGN 抗体也在用 pCI-PDCS 转染的细胞的溶解产物中检测到了 -48kDa 特异条带,但在空载体对照物转染的细胞内没有检测到(图 3d)。分子大小比从推导的氨基酸序列预测的大小(28kDa)大,这可能是由于糖基化,因为 pDC-SIGN 在颈区包含推定的 N-连接的糖基化位点(aa 102)。

[0147] 编码猪 DC-SIGN 蛋白的全长基因的特征:克隆 pDC-SIGN 的 cDNA 克隆并对其进行测序后,然后寻找并获得了 pDC-SIGN 的基因序列。通过采用一步基因组 PCR,仅在 68℃ 下 PCR 循环的退火和延伸步骤结合在一起时扩增了约 3.5kb 的单一带(图 4(a))。在将 PCR 产物克隆到 TA 载体中后,将采用共享串联重叠区的各自测序引物通过 DNA 序列分析确定的五个独立序列组装成重叠群,其代表编码 pDC-SIGN 基因的基因组序列(图 4(b))。通过三种不同的独立克隆之间的序列比较确定长度为 3438bp 的 pDC-SIGN 基因共有序列。序列分析和与 cDNA 序列的两两比对揭示了 pDC-SIGN 基因由跨越该基因整个编码区的八个外显子编码,其中外显子 1 和 8 的大小未确定。尽管该基因中不包含已确定的猪 cDNA 未编码区两末端处的其它核苷酸序列,所有八个外显子的序列与 cDNA 的编码区和部分 3' 末端非编码区的序列完全一致,表明该基因的真实性(图 5-1 到 5-2)。

[0148] 内含子大小为 113-689bp,且内含子上的所有接受者和供体序列符合 GT-AG 规则。计算机软件程序 ASPic 没有预测到其它替代性剪接 mRNA 同种型,表明猪单核细胞来源的树突细胞的已确定 cDNA 可能是 pDC-SIGN 表达的唯一存在同种型,这与本文中描述的 RACE-PCR 结果一致。详细序列展示于图 5-1 到 5-2 中。翻译起始位点开始于外显子 1 中。外显子 1 的 3' 末端、整个外显子 2 和外显子 3 的 5' 末端编码胞质尾区(CT)。外显子 3 的剩余部分和外显子 4 的 5' 末端编码跨膜结构域(TMD)。颈区在外显子 4 中的 TMD 序列后,跨过整个外显子 5 和外显子 6 的首 8 个核苷酸。外显子 6 的其余部分、整个外显子 7 和外显子 8 的 5' 末端编码糖识别结构域(CRD)。

[0149] pDC-SIGN 基因与预计的牛、犬 DC-SIGN 基因和已确定的小鼠 SIGNR8 基因的 8 个

外显子的结构和大小相似,包括相应的外显子的 4 个结构域的位置也相似。pDC-SIGN 与牛 DC-SIGN、犬 DC-SIGN 或小鼠 SIGNR8 的基因组序列两两比较揭示了编码 CRD 的最后三个外显子具有最高序列同源性(70-85%)。pDC-SIGN 基因组序列与其它物种的总体同源性(牛 DC-SIGN > 犬 DC-SIGN > 小鼠 SIGNR8) 也与 DC-SIGN 蛋白的系统进化分析结果一致。尽管这四种基因显示总体内含子序列的序列同源性是有限的,但与该外显子相邻的一些内含子区是保守的,特别是猪和牛 DC-SIGN 基因之间以及猪和犬 DC-SIGN 基因之间的一些内含子。这些保守序列可能包含调节所述基因表达的共同元件。

[0150] 为了进一步证实猪 DC-SIGN 基因是非灵长类大哺乳动物种属中最早实验确认的基因,在 NCBI 网站通过图阅读器 (map viewer) 进行与人基因组的猪转录物和 Unigene 簇比对。采用 NCBI 图阅读器 Build 36.2 的 7,400K-8,040K 局部展示 (regional display) 进行人与猪染色体片段包括猪基因组的 Ssc UniGene 和 Ssc RNA 之间的 DC-SIGN(CD209) 对比作图。根据 NCBI 图阅读器 build36.2,人 DC-SIGN 基因位于染色体 19p13.3 上。根据人和猪染色体片段之间的对应关系 (correspondence),预计 pDC-SIGN 基因分配在 (位于) SSC 2q1.1 到 q2.1 之间的猪染色体 2。

[0151] pDC-SIGN 的组织 and 细胞分布:通过 RT-PCR 检测猪的初级 (胸腺和骨髓) 和次级淋巴器官 (淋巴结和脾) 及肺和骨骼肌内的 pDC-SIGN mRNA 表达,但不检测猪十二指肠、肾、心脏或肝内的表达 (图 6-1(a))。淋巴结和骨髓内的表达水平最高。肌肉内 DC-SIGN 表达的检测是有趣的,尽管发现小鼠 SIGNR7 和 8 也在骨骼肌内表达。

[0152] 考虑各淋巴器官内的 pDC-SIGN 表达,推测除了 MDSC 外,pDC-SIGN 可能也通过特定造血细胞群表达。因此,进行流式细胞分析来检测 pDC-SIGN 蛋白在 PBL、单核细胞、MDSC、MDM Φ 和 PAM 的表面表达 (图 6-2(b) 到 6-4)。根据其形态,猪 PBMC 的离散图清楚地显示两个细胞群:PBL 和单核细胞。由于 CD 14 分子是猪单核细胞的表面标记,这两种细胞群可通过免疫磁性标记 MACS 系统采用抗猪 CD 14 单克隆抗体分离。CD 14⁺ 单核细胞进一步用于通过在细胞因子不存在下分别加入 rpGM-CSF 和 rpIL-4 或 MDM Φ 发育成 MDSC。PBL 和单核细胞没有显示出任何 pDC-SIGN 表达,这是有所预料的,因为 hDC-SIGN 或 L-SIGN 没有在淋巴细胞或单核细胞上表达。因此,在猪单核细胞系 3D4/31 上没有可检测到的 pDC-SIGN 表达 (图 6-2(b) 到 6-4)。在单核细胞分化为培养中的 MDSC 后,从第 3 天到第 7 天 pDC-SIGN 表达上调,平均荧光强度提高约 8 倍。MDM Φ 上也发现了猪 DC-SIGN 表达。与 MDSC 相比,大多数 MDM Φ 表现出 pDC-SIGN 表型。PAM' 受到 pDC-SIGN 表型控制,但表达水平比 MDM Φ 上的表达水平低。根据猪肾内未检测到 pDC-SIGN mRNA 表达,该蛋白不在猪肾的上皮细胞系 PK15 内表达 (图 6-2(b) 到 6-4)。

[0153] 为了进一步验证 pDC-SIGN 蛋白是否确实在淋巴组织的特殊细胞群内表达,在猪淋巴结和肝组织的石蜡切片上进行 IHC 分析。发现 pDC-SIGN 蛋白在淋巴结内呈现窦状小管表达图形 (图 7(a))。然而,猪肝内没有检测到表达 (图 7(b)),这与 RT-PCR 结果一致 (图 6-1(a))。淋巴结窦内大多数用 pDC-SIGN 特异性抗肽抗体免疫染色的细胞是巨噬细胞样和树突样细胞 (图 7(c))。软组织淋巴管内的内皮细胞也用 pDC-SIGN 特异性抗肽抗体进行免疫染色 (图 7(d))。猪淋巴结内 pDC-SIGN 蛋白的表达图形类似于人淋巴结内 hDC-SIGN 的表达图形,其中通过 IHC 在窦状巨噬细胞和内皮细胞上都确定有 hDC-SIGN 蛋白。猪肝内不存在 pDC-SIGN 表达支持克隆的 pDC-SIGN 不是 L-SIGN 同源物的论点,因为假定的猪 L-SIGN

如果存在,会在 LSEC 上强烈表达。

[0154] 实施例 2 表达猪 DC-SIGN 的稳定细胞系的产生

[0155] 材料与方法

[0156] 包含猪 DC-SIGN 的双顺反子表达载体的构建:通过 PCR 采用引物 Nco-DCS-5(5' -ATACC ATGGCAGAGATATG-3' (其对应于 SEQ ID NO:25)) 和 Xho-DCS-3(5' -AGTCTCGAGTCAGAGCATGGGGCAGGGAGA-3' (其对应于 SEQ ID NO:26)) 扩增 pDC-SIGN 的完整编码区(723bp)并随后采用 NcoI 和 XhoI 限制性位点将其克隆到双顺反子表达载体 pTriEx-1.1Neo 载体(购自 Novagen, Madison, WI)(pTriEx-1.1Neo 载体的序列和图显示于 <http://www.emdbiosciences.com/docs/docs/PROT/TB293.pdf>), 所述 pTriEx-1.1Neo 载体位于由融合到小鸡 β 肌动蛋白启动子的 CMV 即时早期增强子组成的杂交启动子的下游。所得构建物命名为“pTriEx-PDCS”, 经过测序来核实并确定长度为 7243bp(包括骨干载体 pTriEx-1.1Neo(6664bp) 加上插入猪 DC-SIGN 蛋白编码区(723bp) 而载体上缺少 NcoI 和 XhoI 之间的序列(144bp))。pTriEx-PDCS 构建物随后用于产生稳定表达 pDC-SIGN 的稳定细胞系(BHK-21)。

[0157] 转染和稳定细胞系选择:在转染之前将 BHK-21 细胞以每孔 2×10^5 细胞接种到 6 孔板上,并在无抗生素的完全生长培养基(含 10%胎牛血清的 DMEM)中培养约 24 小时直到它们达到 80% -90% 的汇合。采用 Lipofectamine 2000(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 按照生产商的用户指南分别用质粒 pTriEx-PDCS 或空载体 pTriEx-1.1Neo 转染各孔细胞。简而言之,在室温下将 2 μ g 质粒 DNA 与 6 μ L Lipofectamine 2000 和 500 μ L Opti-MEM(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 混合 20min, 然后加到细胞中。培养转染细胞约 36 小时以允许目标 pDC-SIGN 基因在无生长培养基下表达,然后用加有 1mg/mL 的 **Geneticin**[®] 选择性抗生素(G-418 试剂,是与庆大霉素有关的硫酸新霉素的氨基糖苷类似物,购自 Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 的完全生长培养基替换。每两天更换含 **Geneticin**[®] 的培养基以除去已死或将死的细胞。

[0158] 12 天后,存活细胞用胰岛素处理并稀释接种到 60-mm 培养皿内使得单细胞会产生良好分离的独立集落。培养细胞约两周直到存在几百个细胞的独立集落,并通过克隆环技术分离。标记待除去的集落的位置并小心地放置克隆环以环绕集落。克隆环内的细胞经胰岛素化,然后转移到 24 孔板的各孔中。当转移细胞生长到足够密度时,将它们在接种到 T-25 瓶中,生长直到细胞达到 100% 汇合并作为工程细胞系被识别。

[0159] 人 ICAM-3 和 ICAM-2 结合测定:用 BHK-PDCS 和 BHK-21 细胞通过 FACS 分析测定结合可溶免疫粘合素的检测细胞评价人 ICAM-3 或 ICAM-2 对 pDC-SIGN 蛋白的粘附性。3T3-HDCS 细胞用作阳性对照。将细胞($1 \sim 3 \times 10^5$ /样品)再悬浮于 100 μ L 含 2% FBS 的 PBS 中并在 4°C 下在甘露聚糖(100 μ g/mL)或乙二醇四乙酸(EGTA, 10mM)存在或不存在下用 1 μ g 重组人 IgG₁Fc(hFc)、人 ICAM-3-Fc(hICAM3-Fc)嵌合体或 hICAM2-Fc 嵌合体(R&D Systems, Minneapolis, MN)孵育 60min。然后洗涤细胞两次并在 4°C 下在 100 μ L 含 2% FBS 的 PBS 中用 0.5 μ g FITC- 标记的抗人 IgG Fc 抗体(KPL, Inc., Gaithersburg, MD)孵育另外 45min。采用 FACSaria(BD Biosciences, San Jose, CA)监测荧光。

[0160] 流式细胞分析:通过胰岛素处理收集用于表面染色的 BHK-3D4/31、PK15 和 3T3-HDCS 细胞,计数并在冷却洗涤缓冲剂(含 0.1%叠氮化钠和 0.2% BSA 的 PBS 缓冲液)

中调节到 1×10^6 细胞 /mL。对于猪 PBL、PAM、MDDC 和 MDM Φ 中的每一个,将细胞浓度调节到 $2 \sim 5 \times 10^5$ 细胞 /mL。在微量离心并除去缓冲液后,用在 PBS 中最佳稀释比(就 BHK 细胞而言:1 : 25,就猪细胞而言,1 : 100,尽管在对猪细胞的 1 : 50 稀释比下进行的较早的流式细胞分析也良好地进行)的抗猪 DC-SIGN 的 $10 \mu\text{L}$ pDC-SIGN 特异性抗肽抗体培养约 $2 \sim 10 \times 10^5$ 细胞 30-60min。洗涤细胞以除去未结合的抗体并用在 PBS 中稀释比为 1 : 100 的 $10 \mu\text{L}$ FITC 标记的山羊抗兔 IgG(KPL, Inc., Gaithersburg, MD) 染色 30min。这两个染色步骤在 4°C 下进行。为了检测 3T3-HDCS 上表达的人 DC-SIGN,采用小鼠抗 hDC-SIGN mAb(clone 120507, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program) 和 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG(KPL, Inc., Gaithersburg, MD) 进行染色。采用 FACSaria(BD Biosciences, San Jose, CA) 或 FACSCalibur(BD Biosciences, San Jose, CA) 监测荧光并采用 FlowJo 软件(Tree Star, Ashland, OR) 分析结果。通过流式细胞分析证实的、在表面表达猪 DC-SIGN 的代表性细胞系命名为“BHK-PDCS”。为了获得高水平的 pDC-SIGN 表达,通过荧光激活细胞分选(FACS) 采用 pDC-SIGN 抗体进一步对细胞系 BHK-PDCS 分选。

[0161] 结果与讨论

[0162] 表达猪 DC-SIGN 的稳定细胞系的产生:双顺反子表达载体 pTriEx-1.1Neo 可用于产生表达目标基因的细胞系。所述载体采用获自脑心肌炎病毒 (ECMV) 的内部核糖体插入位点 (IRES), 允许目标基因插入和新霉素抗性基因从单 mRNA 翻译过来。将编码 pDC-SIGN 的完整编码区的 PCR 扩增子引入杂合启动子的下游作为帽依赖性 (cap dependent) 第一顺反子, 而新霉素抗性基因作为第二顺反子处于 IRES 的控制之下。通过此载体体系, 用 pTriEx-PDCS 转染的稳定细胞系的选择比采用 pCI neo 载体构建物 (pCI-PDCS) 更有效, 大概因为两种基因的相连表达。

[0163] 选择 **Geneticin**[®] 抗生素 (G-418 试剂, 是与庆大霉素有关的硫酸新霉素的氨基糖苷类似物, 购自 Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 时, 用 pDC-SIGN 表达质粒 pTriEx-PDCS 转染的代表性 BHK-21 细胞集落形成细胞系, 所述细胞系命名为 BHK-PDCS。为了确定 pDC-SIGN 是否可在细胞表面上表达, 用多克隆 pDC-SIGN 抗体对细胞系 BHK-PDCS 和 BHK-21 进行染色以进行流式细胞分析。如图 8-1(a) 中所示, BHK-21 细胞上没有展示可检测到的抗体染色, 而检测到了 pDC-SIGN 蛋白在 BHK-PDCS 细胞上的表面表达, 表明 BHK-PDCS 细胞系能合成 pDC-SIGN 蛋白。这个结果也证实了 pDC-SIGN 属于 II 型整合膜蛋白家族。进一步富集并通过 FACS 分选 BHK-PDCS, 以得到有 pDC-SIGN 表达的纯细胞群, 并用于随后的结合实验。此外, 通过用 hDC-SIGN 特异性 mAb(图 8-1(a)) 染色证实的、稳定表达 hDC-SIGN 的 3T3-HDCS 细胞系 (L. Wu 等人所述, " Functional evaluation of DC-SIGN monoclonal antibodies reveals DC-SIGN interactions with ICAM-3 do not promote human immunodeficiency virus type 1 transmission (DC-SIGN 单克隆抗体的功能评价揭示了 DC-SIGN 与 ICAM-3 相互作用不促进人免疫缺陷病毒 1 型传播), " J. Virol. 76 :5905-14(2002) 中描述) 用作阳性对照。

[0164] 人 ICAM-3 和 ICAM-2 免疫黏附素与稳定表达 pDC-SIGN 的 BHK 细胞的结合:没有观察到在甘露聚糖或 EGTA 存在或不存在下可溶 hFc、hICAM-3-Fc 和 hICAM-2-Fc 与 pDC-SIGN 阴性 BHK-21 细胞的结合(图 8-2(b) 到 8-5)。然而, 观察到 hICAM-3-Fc 或 hICAM-2-Fc 与 DC-SIGN 阳性细胞的结合。hICAM-3-Fc 与 BHK-PDCS 细胞的结合比 hICAM-2-Fc 与

BHK-PDCS 细胞的结合具有更高亲和力。这种结合是特异性的,因为单独的 hFc 与 BHK-PDCS 或 3T3-HDCS 的结合是阴性的。此外,加入甘露聚糖阻碍了 hICAM-3-Fc 和 hICAM-2-Fc 的结合,在 EGTA 存在下也是如此。在两种 DC-SIGN 阳性细胞中通过 EGTA 抑制都比通过甘露聚糖抑制更有效(图 8-2(b) 到 8-5)。所述结果表明 pDC-SIGN 能与人 ICAM-3 或 ICAM-2 交叉反应且该相互作用依赖于 Ca^{2+} 并受到 pDC-SIGN 的 CRD 的介导。

[0165] 实施例 3 猪 DC-SIGN 参与猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV) 的传播或感染材料和方法

[0166] PRRSV 病毒原液的生成:本研究中采用来自不同基因型的两种不同 PRRSV 株。表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的基因型 1 型 PRRSV 的病毒原液,为了本研究目的命名为“PGXG”,通过 MARC-145 细胞转染产生,所述 MARC-145 细胞能支持用 PRRSV 感染性 cDNA 克隆 (Dr. Ying Fang, South Dakota State University 的礼物) 感染 PRRSV。将感染性 PRRSV cDNA 克隆修饰成具有更高效率的 DNA 发起的 (DNA-launched),然后对 MARC-145 细胞两次传代。病毒原液是无细胞碎片的含 PRRSV 的上清液,所述细胞碎片通过离心分离除去。通过 IFA 进行 MARC-145 细胞有限稀释确定保存在储存条件下的 PGXG 和 2 型 North American PRRSV VR2385 株的病毒滴度并分别以荧光形成单元 (FFU)/mL 定量。

[0167] PRRSV 结合测定:通过用细胞离散缓冲液 (购自 Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 的无酶 PBS 基缓冲液) 培养来分散 BHK-PDCS 和 BHK-21 细胞单层并用含 2% FBS 的 PBS 洗涤两次。用 PRRSV VR2385 株以感染复数 (M. O. I.) 为 10FFU/细胞接种悬浮液中的总共 5×10^5 细胞。在 4℃ 下病毒吸收 60min 后并洗涤两次,4℃ 下用稀释比为 1 : 1000 的 PRRSV mAb SDOW 17-A (Rural Technologies, Inc., Brookings, SD) 孵育细胞 30min。随后洗涤细胞两次以除去游离抗体,然后用稀释比为 1 : 50 的 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) 孵育以通过 FACS 分析确定 PRRSV 与所述细胞的结合。为了 PRRSV 阻碍 ICAM-3 结合测定,在 4℃ 下用 PGXG 或 VR2385 (M. O. I. = 10FFU/细胞) 孵育 BHK-PDCS 细胞 60min,然后加入 hICAM-3-Fc。

[0168] PRRSV 捕获和反向传播测定:用 PGXG 或 PRRSV VR2385 病毒以 M. O. I 为 0.5FFU/细胞在 500 μ L 体积中孵育 BHK-PDCS、BHK-21 或 MARC-145 供体细胞 (各自 2.5×10^5 细胞) 3 小时以吸收病毒。然后细胞用 PBS 洗涤,与在 1mL 含 2% FBS 的 MEM 中的 MARC-145 靶细胞 (1.0×10^5) 混合并接种到 12 孔板的各孔上。感染三天后,刮下细胞并通过三次冻融循环后回收 PRRSV 病毒。如上所述确定病毒滴度。

[0169] 结果与讨论

[0170] BHK 细胞表面上表达的猪 DC-SIGN 不参与 PRRSV 病毒进入但提高了 PRRSV 反式传播到目标 MARC-145 细胞:BHK-21 表现出支持细胞内的包膜 PRRSV 复制但不允许病毒的细胞间传播 (参见 J. J. Meulenberg 等人的早期研究, "Infectious transcripts from cloned genome-length cDNA of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (猪繁殖与呼吸综合征病毒的克隆基因组长度 cDNA 的感染性转录)," J. Virol. 72 : 380-7 (1998))。由于 pDC-SIGN 在 PRRSV 的易感宿主细胞 PAM (其包含高度糖基化的包膜病毒蛋白) 上表达,观察在细胞表面上表达的 pDC-SIGN 是否参与 PRRSV 附着和进入很重要。用 1 型 PRRSV 感染性 cDNA 克隆转染 BHK-PDCS 细胞可回收具有 GFP 表达的病毒,所述病毒随后在目标 MARC-145 细胞中繁殖 (图 9-1(a))。然而,释放到细胞培养基中的病毒 (PGXG) 不

能感染未转染的 BHK-PDCS 细胞,表明 pDC-SIGN 不参与 PRRSV 进入。由于也已知 BHK-21 细胞系对 PRRSV 结合敏感(参见例如,D. Therrien 等人," Preliminary characterization of proteinbinding factor for porcine reproductive and respiratory syndrome virus on the surface of permissive and non-permissive cells(受纳和非受纳细胞表面上猪繁殖与呼吸综合征病毒蛋白结合因子的初步表征)," Arch. Virol. 145 :1099-16(2000)),随后进行 PRRSV 特异性结合测定以比较 BHK-PDCS 和 BHK-21 细胞之间细胞表面上的病毒附着。发现 PRRSV 确实结合到两种细胞系上,尽管难以对这种差别进行定量(图 9-1(b))。为了确定 PRRSV 附着在 BHK-PDCS 细胞上是否干扰与 pDC-SIGN-hICAM-3 的相互作用,在 hICAM-3-Fc 结合之前,细胞用 1 型 PRSV PGXG 株或 2 型 PRRSV VR2385 株进行预处理。结果显示两种 PRRSV 株都阻碍 hICAM-3 结合,表明 PRRSV 附着与 pDC-SIGN 在 BHK 细胞表面上表达之间未预料到的相互关系(图 9-2(c))。

[0171] 此外,由于 hDC-SIGN 已经显示出将病毒有效地传播到靶细胞,pDC-SIGN 是否具有通过供体细胞-目标细胞反式接触促进 PRRSV 传播的类似能力还在讨论中。PRRSV 捕获和传播测定中,BHK-PDCS 和 BHK-21 细胞用作供体细胞,而易感 MARC-145 细胞用作靶细胞(或对照组中的供体细胞)。供体细胞分别用培养基(作为模拟培养对照)、PRRSV PGXG 株和 PRRSV VR2385 株孵育。与从用 PRRSV 以 M. O. I 同样为 0.5FFU/细胞直接感染 MARC-145 细胞获得的病毒滴度(其可达到 1×10^7 FFU/mL)相比,通过三类供体细胞传播的 MARC-145 细胞中生成的 PRRSV 的病毒滴度低许多,为 2.9×10^2 FFU/mL- 2.5×10^4 FFU/mL(图 9-2(d)),表明可对 PRRSV 传播进行定量分析,尽管效率低。由于存在更多细胞(供体细胞也用作靶细胞),通过 MARC-145 细胞传播 PRRSV 比通过两种 BHK 细胞传播更有效。与通过 BHK-21 细胞进行的传播相比,就 PRRSV PGXG 株而言,通过 BHK-PDCS 进行的 PRRSV 传播被提高 52% ($p = 0.07$),而就 PRRSV VR2385 株而言,提高 72% ($p = 0.02$)(图 9-2(d)),表明在这些条件下,pDC-SIGN 可能与 PRRSV 反式传播有关。

[0172] 实施例 4 猪 ICAM-3cDNA 同种型的克隆与表征

[0173] 材料和方法

[0174] 猪:从 3-7 周大的健康杂交常规猪采集静脉血样品。将猪饲养在实验条件下的独立室内。

[0175] 从猪制备和培养 CD14 阳性单核细胞:用磷酸盐缓冲盐水(PBS)以 1:2 稀释从猪采集到的肝素化血,然后在室温下在 Ficoll-Paque PREMIUM(GE Healthcare, Sweden)以 1000g 力离心分离 40min。分离含外周血单核细胞(PBMC)的浅黄色表层并在 4℃ 下以 250g 用 PBS 洗涤三次,每次洗涤 10min。通过细胞的免疫磁珠标记 MACS 系统采用抗 CD14mAb(M-M9,VMRD Inc., Pullman, WA, USA)和山羊抗小鼠 IgG1 磁性微珠(Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany)分选出 PBMC 中表面上的 CD14 阳性单核细胞。纯化的单核细胞以 1×10^5 细胞/mL 再悬浮于含有 10% 热灭活胎牛血清(FBS)、 $55 \mu\text{mol/L}$ β -巯基乙醇和抗生素的达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM)。然后 37℃ 下在 6 孔板或 60-mm 培替氏培养皿中在 25ng/mL 重组猪粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(rpGM-CSF, R&D Systems, Minneapolis, MN)和 25ng/mL 重组猪白细胞介素-4(rpIL-4, Endogen, Rockford, IL)存在下培养单核细胞。每三天用新鲜培养基替换一半培养基。

[0176] RNA 萃取:在第七天和第十天之间收获体外培养的猪单核细胞并用作猪单核细胞

来源的树突细胞 (MDDC)。采用 Rneasy 小试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 按照生产商的方法从猪 MDDC 分离总 RNA。

[0177] 5' -RACE、3' -RACE 和 RT-PCR: 采用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒和 Advantage 2PCR Enzyme Systems (Clontech, Palo Alto, CA) 按照生产商的用户指南进行 RT 和 RACE-PCR。用于 5' -RACE 和 3' -RACE 的基因特异性引物分别是 PIC54 (5' -GCGTCCAGG TTAAGACACGCCG-3' (其对应于 SEQ ID NO:20)) 和 PIC51 (5' -TCCGCGAGCAGAGACGACCACG-3' (其对应于 SEQ ID NO:21)), 它们是根据已知部分猪 ICAM-3 基因的序列 (GenBank 登录号 AJ632303) 设计的 (Leeb and Muller, 2004, 出处同上)。用各引物对 RACE 反应产物直接测序并随后通过 TA 克隆策略克隆到 pCR2.1 载体中 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 并用 the Virginia Bioinformatics Institute (Blacksburg, VA) 的 M13 正向和反向引物测序。

[0178] 为了证实全长猪 ICAM-3 的两种同种型的完整性, 正向引物 PIC5E (5' -CTGTGGGT TCATGTGGGATCAGGGT-3' (其对应于 SEQ ID NO:22)) 和反向引物 PIC58 (5' -GGGGAC AGC AGAAACGGAACGTCA-3' (其对应于 SEQ ID NO:23)) 用于扩增全长猪 ICAM-3cDNA。将所得的两种 PCR 产物分别亚克隆到 pCR2.1 载体中, 测序并命名为 pPIC3L 和 pPIC3S。

[0179] 基因组 PCR: 采用 QIAamp DNA 血小试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 从猪 MDDC、全血或 PBMC 分离 DNA。猪 ICAM-3 基因组序列扩增的引物根据本研究中确定的全长猪 ICAM-3cDNA 序列设计。正向引物 PIC53 (5' -CCCACGAGATTGTCTGCAACGTGACC-3' (其对应于 SEQ ID NO:24)) 和反向引物 PIC58 分别位于外显子 4 和外显子 7 内。KOD 高保真 DNA 聚合酶 (Novagen, Madison, WI)、具有 GC 缓冲的 TaKaRa LA Taq (TaKaRa, 日本) 或 Advantage 基因组 PCR 试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA) 按照各生产商的方法用于所述基因组 PCR 扩增。直接对猪 ICAM-3 基因组片段的 PCR 产物的两条链进行序列分析。

[0180] 序列分析: 采用 Lasergene 软件包 (DNASTAR Inc., Madison, WI) 进行 DNA 和氨基酸序列的分析。

[0181] 结果与讨论

[0182] 从培养的固有 PBMC 产生猪 MDDC: 在含有 rpGM-CSF 和 rpIL-4 的培养基中培养固有猪 CD 14 阳性 PBMC 细胞。

[0183] 单个和聚集的面罩形细胞在培养一天后首先出现。具有从细胞体突出的长面罩 (veil) 的形状不规则的较大细胞和簇形成在第七天出现, 显示产生了猪 MDDC。没有加入 rpGM-CSF 和 rpIL-4 的培养细胞没有显示任何形态变化或聚集。

[0184] 猪 ICAM-3cDNA 的两种同种型的克隆和表征: 尽管已报道了部分猪 ICAM-3 基因 (Leeb and Muller, 2004, 出处同上), 到目前为止还没有确认猪 ICAM-3 的 cDNA。根据预计的部分猪 ICAM-3 编码区, 设计了两种引物 PIC54 和 PIC51 并采用从猪 MDDC 提取的总 RNA 进行 5' -和 3' -RACE PCR。由于 5' -RACE PCR 的反向引物 PIC54 位于 3' -RACE PCR 引物 PIC51 的下游, 扩增的 5' -RACE 和 3' -RACE PCR 产物具有 55-nt 重叠区, 因此覆盖了猪 ICAM-3 的全长序列。

[0185] 从 5' -RACE PCR 扩增出分别为约 850bp 和 750bp 的两个片段 (图 10(a)), 而在 1% 琼脂糖凝胶上仅能看到从 3' -RACE PCR 得到的约 700bp 的一段 (图 10(b))。所得序列的组合和分析确认了猪 ICAM-3cDNA 的两种同种型, 所述两种同种型的 5' 末端区不同。随

后通过采用分别与可得序列的两末端互补的两种引物进行 RT-PCR 获得 ICAM-3 的全长大、小同种型。两种同种型产物的序列分析证实了 5' - 和 3' -RACE 产物的组装结果。

[0186] 大同种型 (ICAM-3L) 为 1,493bp 长,其两个开放阅读框 (ORF) 分别从 nt 位置 13 或 258 开始 (图 11-1 到 11-2)。第一个 ORF 编码一个 63-aa 小型肽,所述小型肽不与第二个 ORF 重叠。长度为 1,119bp 的第二个 ORF 预计编码猪 ICAM-3,猪 ICAM-3 后面是 117bp 的 3' 非编码区、nt 位置 1452 的多腺苷酸化信号和在 nt 位置 1469 开始的聚腺苷酸尾。预计的 ICAM-3 蛋白具有 34-aa 推定信号肽,然后是成熟蛋白的 338 氨基酸。从 aa 位置 321 处开始的预计 26-aa 疏水跨膜结构域后面是 26-aa 推定胞质尾区。

[0187] 与大同种型 ICAM-3L 相比,长度为 1,379bp 的小同种型 (ICAM-3S) 在 nt 位置 145 处具有 114-nt 缺失 (图 11-1 到 11-2)。所述缺失从第一个 ORF 的 aa 位置 45 开始框内缺失并在第二个 ORF 的 ATG 起始密码子之前,导致第二个 ORF 与第一个截短 ORF 融合。因此,小同种型猪 ICAM-3S 仅编码具有 416 个氨基酸的一个 ORF。大同种型猪 ICAM-3L 中的小 ORF 是否能表达功能肽或小同种型 ICAM-3S 中的单个 ORF 是否从 nt 位置 13 开始仍然有待确定。两种同种型共享从推定信号肽开始的主编码区 (图 11-1 到 11-2)。

[0188] 发现:所述结果表明猪 ICAM-3 同种型仅由三个 Ig 样结构域组成。由于人、非人灵长类和牛 ICAM-3 由五个 Ig 样结构域组成,将它们定义为 Ig 基因超家庭的子成员,人们将预料猪 ICAM-3 应具有相似结构,这是由于,除了非人灵长类外,猪是与人最接近的物种。然而,出乎意料的是,发现克隆猪 ICAM-3 仅编码具有通常为 Ig 样环的链内二硫化物键的三个胞外 Ig 样结构域。与从报道的部分基因推断出来的部分猪 ICAM-3cDNA 相比,存在的三个 Ig 样结构域是相同的且被认作结构域 1-3。此外,各结构域与猪 ICAM-1 和 ICAM-2 中相应各结构域的最高序列同源性也表明克隆 ICAM-3 包含结构域 1-3 (参见下表 2) (C. J. Stocker 等人, " Cloning of porcine intercellular adhesion molecule-1 and characterization of its induction on endothelial cells by cytokines (猪胞间粘附分子-1 的克隆及通过细胞因子表征其在内皮细胞上的诱导), " Transplantation 70 :579-586 (2000) ;J. W. Godwin 等人, " Characterization of porcine intercellular adhesion molecule-2 and its interaction with human LFA-1 (猪胞间粘附分子-2 的表征及其与人 LFA-1 的相互作用), " Am J Transplant. 4 :515-525 (2004))。与 ICAM-1 和 ICAM-2 类似,Ig 样结构域 1D1 包含两个推定二硫键。猪-人或猪-牛 ICAM-3 各结构域之间的序列比较表明结构域 2 (D2) 和结构域 3 (D3) 都相当保守,猪和人之间 D2 为 67% 而 D3 为 68.8%,以及猪和牛的 D2 为 71.4%,D3 为 66%。D1 显示了猪与人及猪与牛的较低序列同源性。有趣的是,尽管牛 ICAM-3 由 5 个 Ig 样结构域组成,其与猪 ICAM-3 的系统进化关系比与灵长类近,氨基酸同源性为 40.7%,并形成了来源于灵长类 ICAM-3 的各簇。这种关系表明牛和猪 ICAM-3 从不同的路径进化而来。

[0189] 表 2 猪 ICAM IgSF 结构域之间的氨基酸序列同源性

[0190]

ICAM-3		结构域 1	结构域 2	结构域 3
ICAM-1	结构域 1	24.4*	8.2	8.5
	结构域 2	5.6	59.2	16.0
	结构域 3	12.2	15.3	31.9
	结构域 4	12.2	18.4	13.8
	结构域 5	6.7	9.2	12.8
ICAM-2	结构域 1	23.3	12.2	8.5
	结构域 2	7.8	30.6	19.1
ICAM-3	结构域 1	NA	8.2	11.7
	结构域 2	NA	NA	19.1
	结构域 3	NA	NA	NA

[0191]

[0192] *通过 Megalign 软件计算 Ig 样结构域之间的百分氨基酸序列同源性。猪 ICAM-3 的结构域 1-3 与猪 ICAM-1 或 ICAM-2 中的对应结构域的比较用粗体标记。

[0193] 八个潜在 N 连接糖基化位点预计位于所述三个结构域 (图 11-1 到 11-2)。D1 中的第一个位点包括与人 ICAM-3 相同的保守残基 Asn57 和 Ser59, 这些对于 LFA-1 结合很关键 (L. B. Klickstein 等人, " Localization of the binding site on intercellular adhesion molecule-3 (ICAM-3) for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) (胞间粘附分子-3 (ICAM-3) 上淋巴细胞功能相关抗原 1 (LFA-1) 结合位点的定位), " J. Biol. Chem. 271 :23920-23927 (1996)), 表明猪中 LFA-1 和 ICAM-3 之间分子相互作用可能具有与人 ICAM-3 相同的模式。

[0194] 猪 ICAM-3 跨膜结构域 (TMD) 和胞质尾区 (CT) 显示出与猪 ICAM-1 和 ICAM-2 或与人或牛 ICAM-3 的跨膜区 (TMD) 和胞质尾区 (CT) 极少保守性。发现人和牛 ICAM-3 的 CT 中的丝氨酸残基是独特的, 人、大鼠或小鼠 ICAM-1 或 ICAM-2 的 CT 都不含任何丝氨酸残基 (F. Lozano 等人, " Effect of protein kinase C activators on the phosphorylation and the surface expression of the CDw50 leukocyte antigen (蛋白激酶 C 激活剂对 CDw50 白细胞抗原的磷酸化和表面表达的影响), " Eur. J. Biochem. 203 :321-326 (1992))。有趣地是, 与人和牛 ICAM-3 一样, 猪 ICAM-3 及猪 ICAM-1 和 -2 的 CT 内都包含丝氨酸残基。已显示人 ICAM-3 上的丝氨酸残基发生暂时磷酸化, 产生不同胞内信号和在细胞粘附中的不同作用。猪 ICAM 成员是否与人 ICAM-3 一样采用磷酸化的丝氨酸残基进行信号转导仍有待确认。

[0195] ICAM 成员的各 Ig 样结构域由不同外显子编码。在 ICAM-1 缺失小鼠中, 鼠 ICAM-1 基因的完全外显子跳跃产生 Ig 样结构域 2、3 和 / 或 4 缺失的剪接变体。然而, 这些变体的出现可能由于病理条件产生。不管是病理或正常生理条件下, 还没有报道人 ICAM-3 的剪接同种型。人和牛 ICAM-3 基因都具有 7 个外显子: 外显子 1 编码信号肽; 外显子 2-6 分别编码 D1-D5, 而外显子 7 编码 TMD 和 CT。猪 ICAM-3 基因的现有序列不完整, 仅包含从外显

子 1 到部分外显子 5 的区域。本研究中确认的、D4 和 D5 缺失的猪 ICAM-3 同种型可能是猪 ICAM-3 基因外显子 5 和 6 的连续跳跃结果 (图 12-1(a))。因此,为了更好地理解剪接机理,对猪 ICAM-3 基因的未知区域进行了克隆和序列分析。

[0196] 猪 ICAM-3 基因的近 3' 侧区的克隆和表征:猪 ICAM-3 的 TMD 及 CT 区假定由外显子 7 编码。本研究中已确定了猪 ICAM-3cDNA 的外显子 7 的序列,因此用于设计基因组 PCR 的反向引物以确定该基因的未知近 3' 区。为了使不需要的突变最少化和避免由于富 GC 区的 PCR 扩增导致的任何潜在的人工缺失,所述基因组 PCR 扩增中采用了三种不同商品试剂盒。采用所有三种 PCR 试剂盒所得的 PCR 产品具有长度为约 1.5kb 的大小。这些 1.5-kb PCR 产物的序列分析揭示了它们都是相同的,因此代表猪 ICAM-3 基因的近 3' 区,包含外显子 4 的 72bp、内含子 4 的全部 273bp、外显子 5 的全部 255bp、内含子 5 的全部 119bp、外显子 6 的全部 244bp、内含子 6 的 360bp 和外显子 7 的 217bp (图 12-2(b))。当已经报道的部分猪 ICAM-3 基因与本研究确认的剩余序列接合在一起时,全长猪 ICAM3 基因的组成显示出与人、非人灵长类和牛的组成类似,所述人、非人灵长类和牛的组成均包含覆盖 7kb 的 7 个推定外显子。外显子 3-7 在该基因的 3' 半处簇集。

[0197] 分别对猪 ICAM-3 的外显子 5、6 和 7 的未知边界序列进行分析,并将所述序列与人 和牛的序列比较 (参见下表 3)。包含内含子 6 的剪接接受者位点 (SAS) 的外显子 7 的边界序列类似于人的。外显子 7 从编码 TMD 和 CT 区的起始丝氨酸残基的三联体 (AGT) 的两个 (GT) 开始,这与猪 ICAM-3cDNA 结构一致 (图 11-1 到 11-2)。就外显子 5 和 6 而言,除了内含子 6 的剪接供体位点 (SDS) 外,其它边界序列执行已知参与剪接的共有元件且在这三种物种是保守的 (表 3,图 12-2(b))。由于大多数内含子从序列 GT 开始,内含子 6 的推定 SDS 处的点突变 (G-A) 可能消除了剪接信号,因此导致外显子 6 的跳过。下游序列中没有发现其它替代性 SDS。

[0198] 与人和牛 ICAM-3 基因中相应位置相比,外显子 5 的预计编码区中,在该外显子的起始序列的 nt 位置 141 处观察到明显的 3-nt 取代,CTT 到 TGA。所述突变是框内的,但将亮氨酸残基变成了终止密码子。猪的外显子 5 的 255-bp 大小与人和牛的相同。

[0199] 推定外显子 6 的序列更复杂。分别在外显子的起始序列的 nt 位置 53 处和终止序列的 nt 位置 -7 处发现 4-nt 缺失和 1-nt 缺失。4-nt 缺失导致框移,因此产生 4 个随后的框内终止密码子 (图 12-2(b))。

[0200] 为了确保没有错过的包含外显子 5 或 6 的 RNA 转录,根据获得的外显子 5 和 6 的序列信息,特别尝试了采用与外显子 5 或外显子 6 的序列互补的正向引物 PIC 53 和几种反向引物扩增 cDNA 片段。没有具体的片段被扩增,表明猪 ICAM-3 基因可能仅产生成熟 mRNA,其中外显子 5 和 6 已被跳过。

[0201] 表 3 人、牛和猪 ICAM-3 基因中外显子 5-7 的内含子 / 外显子边界序列比较

[0202]

物种	外显子 5		外显子 6		外显子 7	
	SAS	SDS	SAS	SDS	SAS	SDS
人	<u>tttag</u> /GCTTC	CCTGT/ <u>gtgag</u>	<u>cacag</u> /ATGGT	TGAGG/ <u>gtgag</u>	<u>cacag</u> /CTGGG	N/A
牛	<u>tttag</u> /GATTC	CCTGT/ <u>gtgag</u>	<u>cacag</u> /ACGGC	TCAAG/ <u>gtgag</u>	<u>cacag</u> /GTCGG	N/A
猪	<u>attag</u> /GCTTC	CCTGT/ <u>gtgag</u>	<u>cacag</u> /ACGGC	TCAAG/ <u>gtaag</u>	<u>cacag</u> /GTCAG	N/A

[0203] SAS:剪接受者位点;SDS:剪接供体位点;N/A:不可用内含子序列用小写字母表示而外显子序列用大写字母表示。内含子起始序列“gt”和终止序列“ag”有下划线。猪 ICAM-3 基因的内含子 6 的推定 SDS 处的点突变 (g 到 a) 用粗斜体字母表示。

[0204] 外显子 5 和 6 中框内终止密码子或未成熟终止密码子 (PTC) 的存在与猪 ICAM-3 的成熟 mRNA 中不包含它们相关。这种现象,称为无义相关变化剪接 (NAS),已出现在几种致病基因中。然而,根据所知所信,还从未报道物种相关 NAS。从猪 MDCC 确认的缺少外显子 5 和 6 的猪 ICAM-3 同种型可能是猪中的天然 ICAM-3RNA 转录产物。外显子 5 的跳过可能是 TGA 无义突变的结果,而外显子 6 的跳过可来自四个无义密码子或内含子 6 的 SDS 处点突变。需要不在本研究范围内的其它工作如诱变分析来证实 NAS 机制并进一步确认猪 ICAM-3 基因的相关剪接机制。

[0205] 人 ICAM-3 蛋白中的 Ig 样结构域 4 和 5 的准确作用还未得到表征。在第一 N 连接糖基化位点包含一些关键残基包括 Asn57 和 Ser59 的结构域 1 是必需的并足以进行 LFA-1 结合。认为结构域 2 与人 DC-SIGN 相互作用。克隆猪 ICAM-3 同种型由这两个结构域组成,其应保留与猪 LFA-1 和 DC-SIGN 的潜在黏附性能,因此在相应猪免疫应答中起着类似作用。

[0206] 实施例 5 猪 LSEctin cDNA 和基因的克隆和表征

[0207] 材料与方法

[0208] RNA 提取和反向转录 PCR (RT-PCR):7 周龄的健康杂交常规猪用于采集组织样品。将猪饲养在实验条件下的独立室内。用 Rneasy 小试剂盒 (Qiagen Inc., Valencia, CA) 从匀化的猪肝中分离出总 RNA,然后用无 RNA 酶的 DNase I 处理。用 Superscript II 逆转录酶 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 并用 oligo-dT (Promega Corporation, Madison, WI) 作为反向引物从总 RNA 合成第一链 cDNA。根据 GenBank 登录号为 AK232603 的猪 EST 序列设计一对基因特异性引物 PLST-F (5' -TATGCCAGAGCAGGGCACC-3', 其对应于 SEQ ID NO:31) 和 PLST-R (5' -GGGCTAGGTCAGCAGTTGTGC-3', 其对应于 SEQ ID NO:32) 来扩增 pLSEctin cDNA 的整个编码区。用 Advantage 2PCR 试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA) 在 50 μL 反应物中进行 PCR,采用以下 PCR 参数:94℃:2min;94℃:15sec,60.0℃:30sec 和 72℃:90sec,30 次循环,最后在 72℃孵育 3min。所得 PCR 产物分别切离、纯化并随后通过 TA 克隆策略克隆到 pCR2.1 载体 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 中,然后测序。

[0209] 基因组 PCR 和基因测序:采用相同引物 PLST-F (SEQ ID NO:31) 和 PLST-R (SEQ ID NO:32) 进行一步基因组 PCR。用 Platinum PCR HiFiSupermix 试剂盒 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 采用 150ng 猪基因组 DNA (购自 Novagen, Madison, WI) 在 50 μL 总体积中进行基因组 PCR。PCR 条件为:94℃:30sec,68℃:4min,循环 35 次;起始时模板 DNA 在 94℃变性 2min。通过 TA 克隆策略将所得片段克隆到 pCR2.1 载体

(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 中。M13 正向和反向引物与基因特异性引物 PLST-E3F (5' -C AGG ATCTACTGAGGAC AAACG-3' , 其对应于 SEQ ID NO :33) 一起用于测序。

[0210] 通过 RT-PCR 检测的 LSEctin 组织分布:采用 Rneasy 小型试剂盒 (Qiagen Inc. , Valencia, CA) 从十种匀化的猪组织包括脾、十二指肠、胸腺、肾、肺、淋巴结、心脏、骨髓、肝和肌肉中分离总 RNA, 然后用无 Rnase DNase I 处理。用 Superscript II 逆转录酶 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 并用 oligo-dT (Promega Corporation, Madison, WI) 作为反向引物合成 cDNA。为了避免基因组 DNA 污染, 用 Advantage 2PCR 试剂盒 (Clontech, Palo Alto, CA) 在 50 μ L 反应物中采用引物 PLST-E67F (5' -GAGAGTCCGGTTCCA GAACAGCTCCT-3' 其对应于 SEQ ID NO :34) 和引物 PLST-E89R (5' -TCCCCAGATTCCAGTGGCT GAAG-3' , 其对应于 SEQ ID NO :35) 进行 PCR, 所述 PLST-E67F 跨越通过基因组序列分析确定的 pLSEctin 基因序列的外显子 6 和外显子 7 之间的边界, 所述 PLST-E89R 跨越外显子 8 和外显子 9 的边界。PCR 参数包括: 95 $^{\circ}$ C :20sec, 68 $^{\circ}$ C :1min, 30 次循环; 起始时模板 DNA 变性 2min。看家基因, 猪甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 也采用引物 GAPDH5 (5' -GCTGAGTAT GTCGTGGAGTC-3' , 其对应于 SEQ ID NO :29) 和 GAPDH3 (5' -CTTCTGGGTGGCAGTGAT-3' , 其对应于 SEQ ID NO :30) 进行 PCR 扩增 (95 $^{\circ}$ C :1min ; 95 $^{\circ}$ C :20sec, 55 $^{\circ}$ C :20sec, 68 $^{\circ}$ C :40sec, 30 次循环和 72 $^{\circ}$ C :3min)。pLSEctin 和猪 GAPDH 的 PCR 产物的预计大小分别为 303bp 和 285bp。

[0211] 序列和系统进化分析:采用 Lasergene 软件包 (DNASTAR Inc. , Madison, WI) 进行 DNA 和氨基酸序列的分析和比对。

[0212] 结果与讨论

[0213] 猪 LSEctin cDNA 和基因的分子克隆和结构:为了发现 hLSEctin 的猪同源物, 在 GenBank EST 数据库中进行了一系列的序列相似度检索。发现了与 hLSEctin cDNA 具有显著同源性、GenBank 登录号为 AK232603 的 EST 序列。基于该序列, 我们设计了基因特异性引物并通过 RT-PCR 成功地扩增了包含 pLSEctin cDNA 的整个编码区的 909-bp 片段, 其与猪肝的 EST 序列相同 (图 13)。还确认了代表缺少跨膜结构域 (807bp) 的另一 pLSEctin 同种型一个弱片段 (图 13)。除了这两种同种型外, 扩增了一系列较高分子量条带 (图 13), 这可认为是剪接过程中 pLSEctin pre-mRNA 的中间产物 (参见下述讨论)。在用相同 PCR 引物对进行基因组 PCR 后, 猪基因组计划的公共设计组合体 (public draft assembly) 上还没有的 pLSEctin 基因 (2721bp) 也被克隆 (图 13)。

[0214] 如图 14-1 (a) 中所示, pLSEctin 基因被跨越该基因整个编码区的 9 个外显子编码, 其中外显子 1 和 9 未确定大小。所有 9 个外显子的序列与克隆的 909-bpcDNA 及 pLSEctin EST 的序列完全相同, 显示了该基因的真实性。8 个内含子的大小为 110-320bp, 且所述内含子上的所有接受者和供体序列符合 GT-AG 规则。与其它 II 类 C 型凝集素一样, pLSEctin 的推定编码区编码从氨基到羧基末端的 4 个结构域:CT、TMD、颈区和 CRD (图 14-2 (b))。外显子 1 的 3' 末端和外显子 2 的 5' 末端编码 CT。外显子 2 的剩余部分编码 TMD。颈区跨越整个外显子 3 到 6 和外显子 7 的首 5 个核苷酸。外显子 7 的其余部分、整个外显子 8 和外显子 9 的 5' 末端编码 CRD (图 14-1 (a))。

[0215] pLSEctin 基因与从其基因组数据库中可获得的其它推定哺乳动物 LSEctin 同源物的比较:pLSEctin 基因与人及预计的牛、犬、小鼠和大鼠 LSEctin 基因的 9 个外显子具有

相似的结构和大小,包括所述四个区相对对应外显子的定位(图18)。在马基因组数据库中发现了三种 LSEctin 基因同源物,为了本发明目的,称为马 LSEctin 1-3。马 LSEctin 1 和 LSEctin 2 也具有基因结构相同的 9 个外显子,而马 LSEctin 3 仅包含 8 个外显子。马 LSEctin 3 中缺少一个外显子是由于规范的含 9-外显子 LSEctin 基因的两个颈区编码外显子(对应于 pLSEctin 基因的外显子 3 和 4)融合成一个所致。类似地,规范的含 9-外显子的 LSEctin 基因的外显子 3 和 4 合并成一个,导致推定人 LSEctin 假基因中存在总共 8 个外显子。然而,人假基因与黑猩猩 LSEctin 假基因失去蛋白编码能力归因于提出的起始密码子 ATG 处的点突变(G 到 A)(图15)。根据基因组序列分析数据预测了两种猕猴 LSEctin 同源物 LSEctin 1 和 LSEctin 2。然而,尽管存在 9 个外显子,任一同源物编码由于外显子 3 的 1-nt 插入(就 LSEctin 1 而言)或外显子 5 的 1-nt 缺失(就 LSEctin2 而言)导致 CRD 缺失的羧基末端截短的蛋白产物,它们也被认为是假基因(图15)。

[0216] 除了这两种猕猴 LSEctin 假基因外,所有确认的 LSEctin 同源物都具有一个重要的结构特征,即 CRD 总是跨越最后三个外显子。到目前为止确认的哺乳动物内 DC-SIGN 同源物具有该相同特征。

[0217] 采用 mVISTA 计划进行的 pLSEctin 与牛、犬、马、人、黑猩猩、猕猴、小鼠、大鼠、负鼠或鸭嘴兽基因组序列两两比对揭示了驯养动物和灵长类动物的 pLSEctin 和 LSEctin 同源物之间外显子(特别是编码 CRD 的最后三个外显子)和内含子(特别是内含子 1、3、5、6 和 8)序列中存在明显保守性(图15)。pLSEctin 和啮齿动物 LSEctin 同源物之间显示出较小保守性,主要存在于外显子序列中,而负鼠和鸭嘴兽 LSEctin 具有最少保守性。pLSEctin 和 pDC-SIGN 之间没有发现明显同一性(图15)。

[0218] 编码预计在 LSEctin mRNA 的 3' - 未翻译区(3' -UTR)具有多物种保守 microRNA 目标序列的产物的 pLSEctin 的序列和系统进化分析:1,327-bppLSEctin cDNA 具有两个分别在 nt 位置 10 或 37 处的框内起始密码子 ATG(图14-2(b))。与对应位置没有第一个 ATG 的其它 LSEctin 同源物相比,推测的 pLSEctin 蛋白预计在第二个框内 ATG 开始并包含 873 核苷酸的开放阅读框(ORF),所述开放阅读框编码 290 个氨基酸的蛋白(图14-2(b))。猪 LSEctin 蛋白为推定 II 型跨膜蛋白,从 28-aa 胞质尾区开始,然后是预测的 22-aa TMD。所述胞外结构域由 111-aa 颈区组成,然后是 129-aa CRD(图17b)。在 CT 内发现两个位于 aa 位置 6-9 和 14-15 的潜在内化基序 YSKW 和 EE,它们在人、黑猩猩、牛、绵羊和犬 LSEctin 中是保守的。诱变分析业已表明 hLSEctin 的内化能力依赖于两种基序的完整性。马 LSEctin 1 和 3、小鼠、大鼠和两种鸭嘴兽 LSEctin 同源物也包含酪氨酸基基序作为潜在内化信号。hLSEctin 的颈区包含两个潜在 N 连接糖基化位点并具有典型的七残基重复图谱,预计形成 α -螺旋型卷曲螺旋结构。最新研究也揭示了 hLSEctin 通过颈区的两个半胱氨酸残基作为二硫键相连二聚物(disulfide-linked dimer)存在(A.S.Powlesland 等人,"A novel mechanism for LSEctin binding to Ebola virus surface glycoprotein through truncated glycans(LSEctin 通过截短的多糖结合到埃博拉病毒表面糖蛋白的新机理),"J. Biol. Chem. 283(1):593-602(2008))。除了马 LSEctin 3、负鼠和鸭嘴兽 LSEctin 外,所有这些特征在 pLSEctin 及其它哺乳动物 LSEctin 中是相同的。已经发现人 DC-SIGN、L-SIGN、非人灵长类 DC-SIGN 和小鼠 SIGNR 1 颈区内包含可变的重复序列而其余小鼠 SIGNR 成员(除了 SIGNR2 和 SIGNR6 外)与猪、牛、绵羊、犬和马 DC-SIGN 不具有重复序列。这些数据表明

LSEctin 家族成员的颈区进化不如 DC-SIGN 家族成员分散。

[0219] pLSEctin 的 CRD 是猪和所有其它 LSEctin 同源蛋白共有的最保守区域, 包含形成 Ca^{2+} -和糖结合位点的关键残基。除了具有额外的 119-aa 尾区的负鼠 LSEctin 1 外, 所有 LSEctin 同源物的 CRD 中发现预计形成二硫键的 8 个保守半胱氨酸。所有 LSEctin 及 DC-SIGN 家族成员拥有 5 个保守氨基酸残基 Glu260、Asn262、Asn268、Asn280 和 Asp281(aa 位置对应 pLSEctin) 作为钙结合位点 2 和常见的 Glu-Pro-Asn 序列 (EPN 序列; aa 位置 260-262), 这些对于结合含甘露糖、海藻糖或半乳糖的寡糖很关键。然而, 形成钙结合位点 1 的四个残基 (aa 位置 233、237、263 和 269) 中的三个在 LSEctin 家族成员中是独特的。所有有胎盘哺乳动物 LSEctin 都在 aa233 有不同于 DC-SIGN 的独特 Ala 残基, 而 LSEctin 同源物 aa 237 处的残基是变化的。所有 LSEctin 成员都在 aa 263 具有 Asp 残基, 而不是保守 Asn 残基。C 型凝集素的保守 Asp269 在大多数 LSEctin 蛋白中相同, 但在人和黑猩猩 LSEctin 及负鼠 LSEctin1 中被 Asn 残基取代。此外, 所有哺乳动物 LSEctin 蛋白和有胎盘哺乳动物 LSEctin 都具有的 CRD 中分别存在 9 和 29 个独特残基。这些独特取代表明 LSEctin 家族成员将有望具有不同的糖结合能力。

[0220] 最近, 人 LSEctin 显示出通过 EPN 基序和两个附近的残基 Gly259 和 Trp265 结合一种新型二糖 GlcNAc β 1-2Man (Powlesland 等人, 2008, 出处同上)。GlcNAc 残基和 Trp265 的侧链之间的接触预计由靠近 GlcNAc (id) 的 N-乙酰取代基的甲基的色氨酸的吲哚环的堆积 (packing) 介导。然而, 尽管 Gly259 在所有 LSEctin 蛋白中保守, 仅黑猩猩 LSEctin 与 hLSEctin 具有 Trp265。其它 LSEctin 蛋白中这个位置的残基是变化的: pLSEctin:Leu; 牛、绵羊和犬 LSEctin:Met; 三种马 LSEctin:Gln。

[0221] MicroRNA(miRNA) 是一类小型 (~ 22nt 长) 内生非编码 RNA, 它们结合到目标 mRNA 的 3' -UTR 中的部分互补部位, 因此抑制 mRNA 表达 (D. P. Bartel, " MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function (MicroRNA: 基因组、生源论、机理和功能), " Cell 116(2):281-97(2004); B. R. Cullen, " Transcription and processing of human microRNA precursors (人 microRNA 前体的转录和加工), " Mol. Cell 16(6):861-5(2004))。来自多细胞机体的上千种不同 miRNA 和一些病毒已被确认并表现出具有组织特异性和发展阶段特异性表达, 这被认为调节几乎所有生物过程。已经估计三分之一以上人基因能受到 microRNA(id.) 控制。MiRNA 介导的抑制通常要求 miRNA 种子区 (miRNA 5' -末端开始的 nt 2-7) 与 mRNA 目标序列的 3' -UTR 完美碱基配对 (Bartel, 2004, 出处同上; Cullen, 2004, 出处同上)。在许多情况下 miRNA 及其 3' -UTR 结合部位在进化上保守。迄今为止, 还未将功能性 C 型凝集素表达与 miRNA 调节相联系。采用不同哺乳动物 LSEctin 基因的 3' -UTR 序列的现有信息, 设计了一个实验来观察 miRNA 目标序列是否存在, 所述序列在多种哺乳动物中是保守的。

[0222] 采用 TargetScan 程序, 在推定犬 LSEctin mRNA 中发现了位于多腺苷酸化信号 (AAUAAA) 27-nt 上游的独特位点, 推定犬 LSEctin mRNA 预计是狗 miRNA cfa-miR-350 的目标。猪、牛和羊 LSEctin 及两种马同源物 LSEctin 1 和 3 中这个位点的 7-nt 序列是完全保守的。观察到 3' -UTR 处的其它保守序列少于 6-nt, 这没有实现提出的 miRNA 种子区的完美碱基配对。尽管从 miRBase 还没有猪、牛、绵羊和马中的 miR-350 同源物, 由于进化上的保守, 它们应该具有相同序列。有趣的是, hLSEctin mRNA 中相同部位的 8-nt 序列 AACUGGAA

也是人 miRNA has-miR-145 的目标。这种独特序列是黑猩猩 LSEctin 和马 LSEctin 2 所共有的,但其它灵长类假基因不具有。啮齿和非胎盘 LSEctin 成员内没有发现识别相同部位的特异性 miRNA,可能由于从 miRBase 获得的这些物种的 miRNA 数据有限。基于计算机确认驯养动物和灵长类动物的 LSEctin 成员中的位置保守和多物种保守 miRNA 目标序列对于理解 LSEctin 的潜在 miRNA 介导的调节机理是有用的。

[0223] 因此对哺乳动物中所有现有 DC-SIGN、LSEctin 和 CD23 家族成员的全长编码蛋白进行系统进化分析以确定其分化水平和进化关系。它们被分成三个单独的簇,其中 LSEctin 家族与 DC-SIGN 家族的关系比与 CD23 家族的关系更密切相关。驯养动物包括猪、牛、绵羊、马和犬的 LSEctin 聚集在一起,这与它们的 DC-SIGN 和 CD23 蛋白的进化关系类似。

[0224] pLSEctin pre-mRNA 的剪接中间产物的确认和建议的内含子除去次序:当猪肝的 pLSEctin cDNA 的编码区扩增时,观察到 pLSEctin pre-mRNA 的可能进程,其特征是,除了预期的成熟 mRNA 外,出现了一系列高分子量片段(图 13a)。将每个片段切离并 T-A 克隆以确定各自的序列。原来这些转录物是 pLSEctin mRNA 前体的剪接中间产物,其大小分别为 1707、1491、1381 和 1176bp,与已经确定的 pLSEctin 基因(2721bp)相比,它们保留了各种内含子。根据这些剪接中间产物的内含子去除,建议了 pLSEctin pre-mRNA 剪接路径的暂时次序(图 16)。首先,内含子 A、E、G 和 H 似乎同时或以不能从 RT-PCR 结果预料的次序去除以产生 1707bp 的中间产物,导致被最后三个外显子编码的 CRD 及被首两个外显子编码的 CT 的完整性。1707-bp 中间产物通过剪接内含子 F 的进一步加工产生了 1491-bp pre-mRNA。随后去除内含子 D 产生了 1381bp 的 mRNA。内含子 C 似乎在这个点被剪接,产生仅保留内含子 B 的 1176-bppre-mRNA。成熟 pLSEctin mRNA,被检测为 909-bp 产物,通过去除内含子 B 产生。编码颈区的 pLSEctin 外显子加工似乎按照一严格的暂时位置次序:从 3' 外显子 E 到 5' 外显子 B 一个接一个地剪接相关内含子。此外,从成熟 mRNA 产物除去外显子 2,得到缺少 TMD 的 807-bp 同种型。或者,由于外显子 2 和内含子 B 连接在一起,该同种型可通过同时将它们从 1176-bp pre-mRNA 剪接而产生(图 16)。

[0225] 根据剪接中间产物的量达到能被 RT-PCR 检测的水平从而表明它们占有中间产物中的大多数的事情提出剪接路径(splicing pathway)的暂时次序。在肝内进行检测以精确反映这些 pre-mRNA 的体内加工路径。编码这里观察到的 TMD 和颈区之前的 CRD 和 CT 结构域的外显子的加工是否也可能存在于其它 C-型凝集素如 DC-SIGN 和 L-SIGN 中仍有待确定。由于编码 TMD 的外显子跳过和/或编码颈区的外显子上存在隐蔽剪接位点,已知 DC-SIGN/L-SIGNmRNA 及迄今为止确认的 hLSEctin 同种型作为 TMD 缺失或部分颈区串联重复(tandem-neck-repeats)缺失变体存在(A. Dominguez-Soto 等人, " TheDC-SIGN-related lectin LSEctin mediates antigen capture and pathogenbinding by human myeloid cells(DC-SIGN 相关凝集素 LSEctin 通过人骨髓细胞介导抗原捕获和病原体结合), " Blood 109(12):5337-45(2007);S. Mummidi 等人, " Extensive repertoire of membrane-bound and soluble dendriticcell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin 1(DC-SIGN1)and DC-SIGN2isoforms. Inter-individual variation in expression of DC-SIGN transcripts(膜结合和可溶树突细胞特异性 ICAM-3-结合非整合素 1(DC-SIGN 1)和 DC-SIGN 2 同种型的大量清单;DC-SIGN 转录体表达的个体间变异), " J. Biol. Chem. 276(35):33196-212(2001))。这可能与之后剪接事

件中出现不同异常剪接图谱中的剪接的暂时次序相关。此外, L-SIGN 的变异颈区串联重复与几种感染型疾病如 SARS-CoV、HIV-I、HCV 和分支杆菌肺结核的易感性相关 (U. S. Khoo 等人, " DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNS for infection (DC-SIGN 和 L-SIGN: 感染用 SIGN), " J. Mol. Med. 86 (8) :861-74 (2008))。其它因素包括供体 / 接受者部位的“质量”、剪接增强子或抑制子、RNA 次级结构或内含子和外显子的大小也可能对控制内含子除去次序起作用 (A. L. Lear 等人, " Hierarchy for 5' splice site preference determined in vivo (体内确定的 5' 剪接位点优先层次), " J. Mol. Biol. 211 (1) :103-15 (1990); B. L. Robberson 等人, " Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons (外显子定义可促进带有多个外显子的 RNA 中剪接位点的选择), " Mol. Cell Biol. 10 (1) :84-94 (1990); A. J. McCullough 和 S. M. Berget, " G triplets located throughout a class of small vertebrate introns enforce intron borders and regulate splice site selection (位于一类小脊椎动物内含子内的 G 三联体增强了内含子边界并调节剪接位点选择), " Mol. Cell Biol. 17 (8) :4562-71 (1997))。pLSECtin pre-mRNA 的体内连续剪接中间产物的确认为研究剪接体系如何选择正确的剪接位点对以确保持有序地除去 C 型凝集素中的内含子和这些是否能和与病原体的相互作用相关提供了良好的模型。

[0226] pLSECtin 的组织分布: 通过 RT-PCR 在猪的脾、淋巴结和肝中检测到了 pLSECtin mRNA 表达, 但在十二指肠、胸腺、肾、肺、心脏、骨髓或骨骼肌中没有检测到 (图 17)。淋巴结中的表达水平最高。已报道 hLSECtin 不仅在 LSEC, 还在单核细胞来源的巨噬细胞和树突细胞 (W. Liu 等人, " Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECtin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node (一种新型 C 型凝集素样基因 LSECtin 的表征: 肝和淋巴结的窦状内皮细胞内的糖结合和表达的证明), " J. Biol. Chem. 279 (18) : 18748-58 (2004); Dominguez-Soto 等人, 2007, 出处同上)、淋巴结和骨髓窦 (T. Gramberg 等人, " Interactions of LSECtin and DC-SIGN/DC-SIGNR with viral ligands: Differential pH dependence, internalization and virion binding (LSECtin 和 DC-SIGN/DC-SIGNR 与病毒配体的相互作用: 差分 pH 依赖性、内化和病毒体结合), " Virology 373 (1) :189-201 (2008)) 上表达。然而, 在外周血淋巴细胞、NK 细胞、CD34⁺ 来源的内皮样细胞 (Dominguez-Soto 等人, 2007, 出处同上)、肝枯否细胞、胸腺或胎盘 (Gramberg 等人, 2008, 出处同上) 上没有发现 hLSECtin 表达。目前已经观察到 pLSECtin 表达具有与 hLSECtin 相似的图谱。

[0227] 以上提供了本发明具体实施方案的详细描述, 以对本发明进行说明而非限定。应该理解, 在本发明公开内容基础上, 对本领域技术人员显然的所有其它改进、分支和等同物属于要求保护的本发明范围。

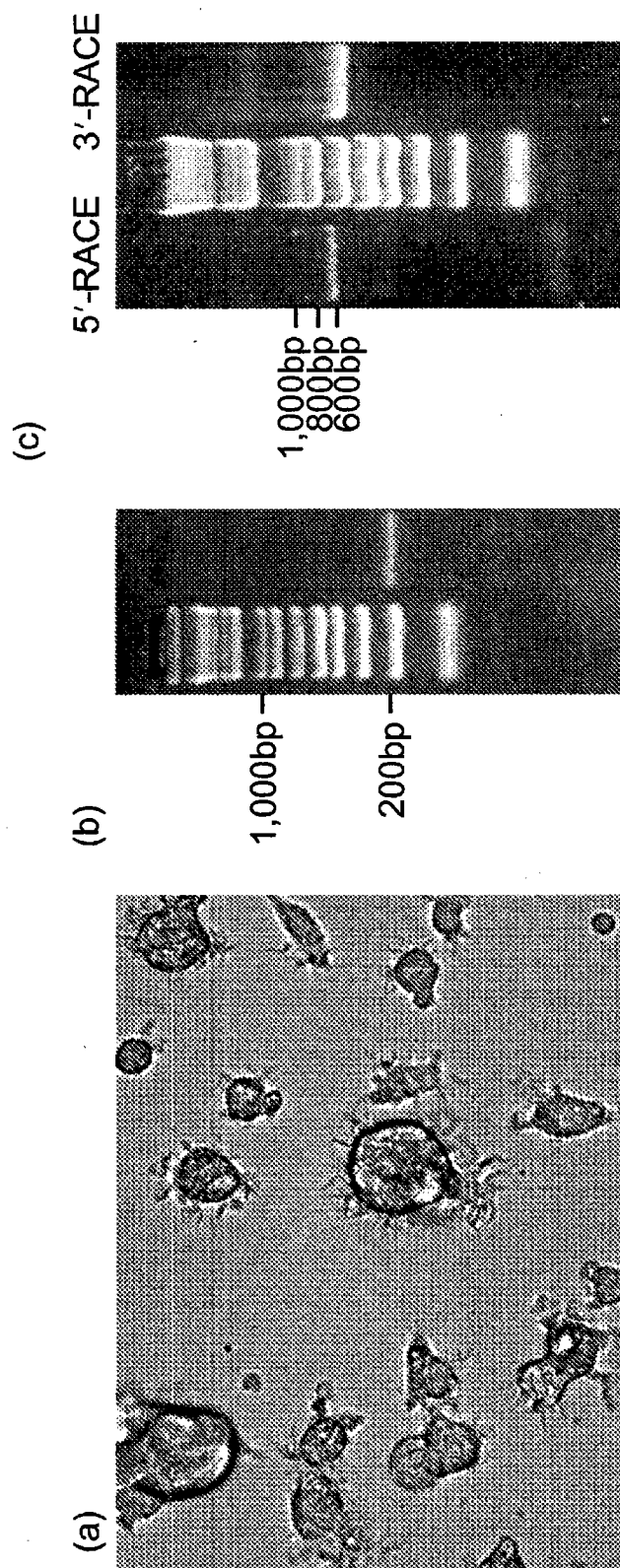


图 1

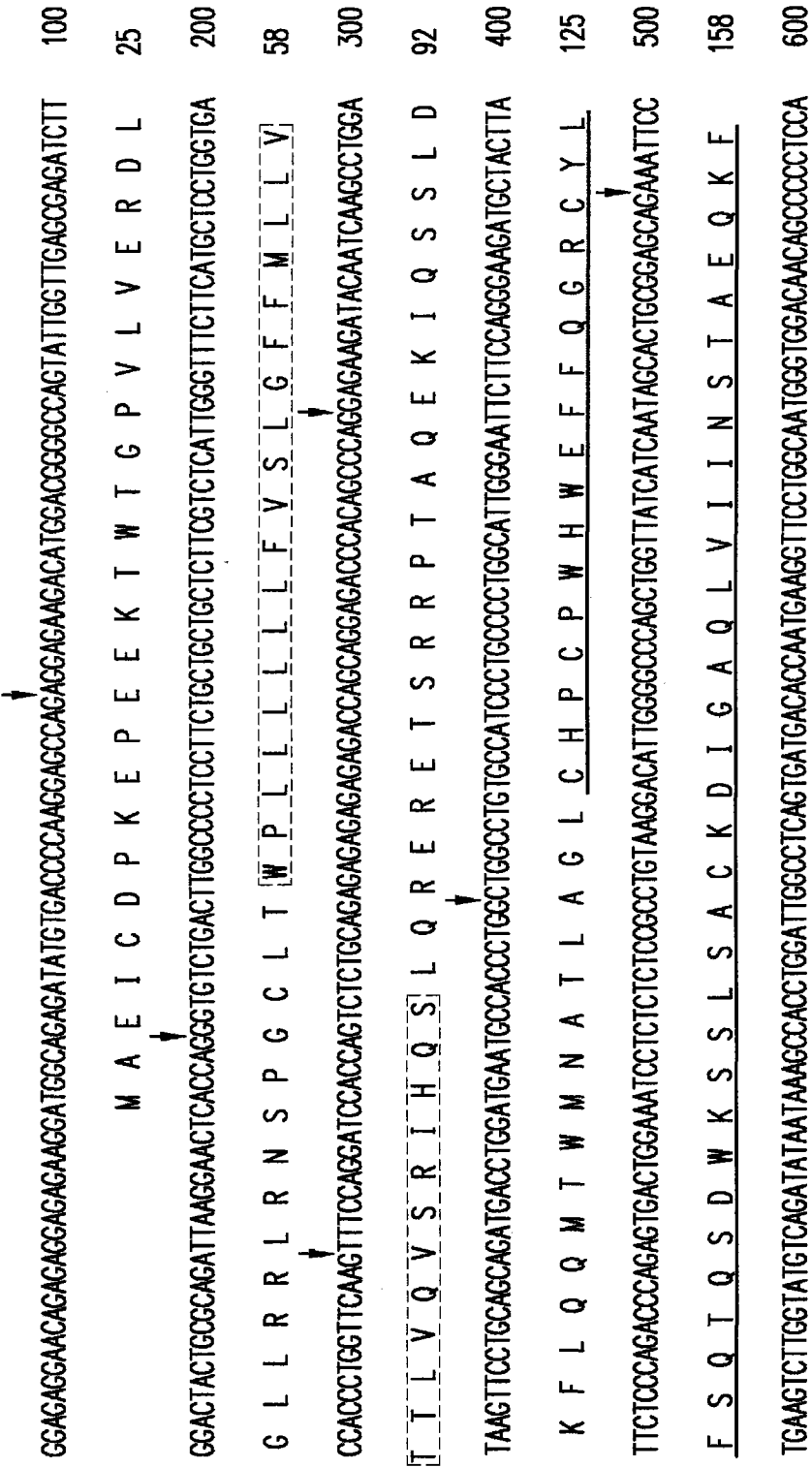


图 2a

L L K S W Y V R Y N K A T W I G L S D D T N E G S W Q W V D N S P L Q 192
 ACTCAGCTTCTGGAAGAGGAGAACCCACAATCACGGAGATGAAGACTGTGCAGATTGCACAACGATGGCTGGAATGATAGCAAAATGTACGGTAGAA 700
 L S F W K E G E P N N H G D E D C A E L H N D G W N D S K C T V E 225
 AAGCCCTGGATCTGTGAGAAGCCCTCGTCTCCCTGCCCCATGCTCTGAGGGCCACTGCCAGCCCTCCTACTCCCCATCAGCAGAGAAATAGGCAACAGGCC 800
 N A W I C E K P S S P C P M L * 240
 CTCAGCTGGTTTCCCTTTGGCTCCACCCCTCTCCATCTTTACCCCTTGGTGAAATCCCATCCCCCTTCTTGAACGACGGTCTTTTTAGATCCTACGAGAGAT 900
 TCTGAACCCCGCTTAICCTCGAACCCCTCCTTCCATAGGCTACAAACCCCTCTCTCTTCATCTGCAGATGGTCTCAGCAGCCCTCCGCCCGCCCCCCCCC 1000
 ATGACATCCCGCTTAATAAGTCACATTGCATTATGTGTTCCAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1069

图 2b

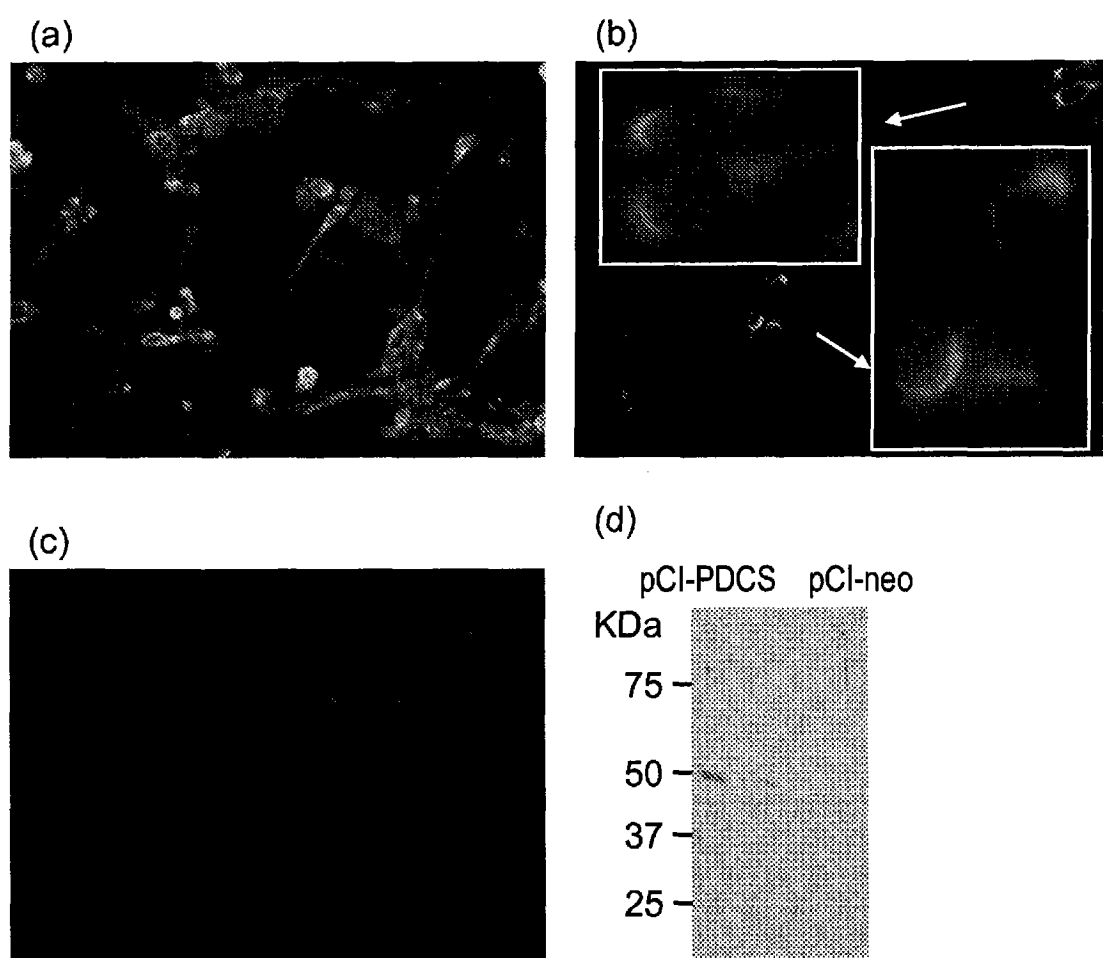


图 3

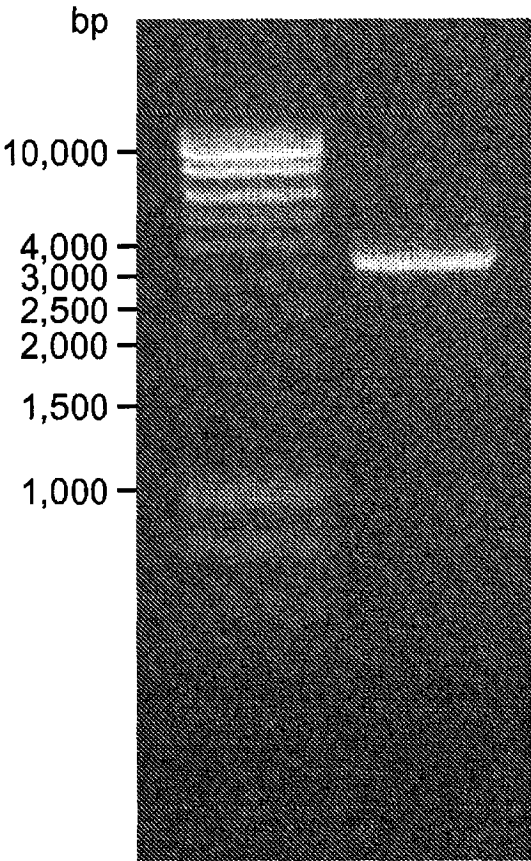


图 4a

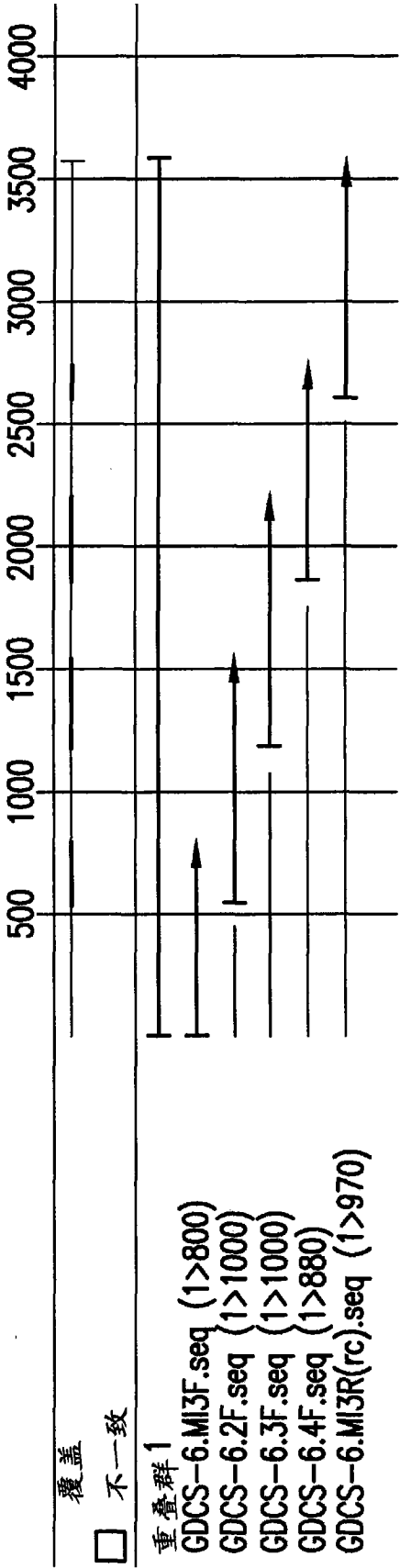


图 4b

5' GATGGCAGAGATATGTGACCCCAAGGAGCCAGGTAGCCCCCAGTGAGGGTGGACCCCAATTCCTGGGAGTGATGATGGGGAGGACAGGCT 90
 1F
 5' CCTGGTCTTGAGCGGAGCCGAGCGGCGCTAGCATCCAGCTTGCAATCCCTGAGAGCAGGCGCCAGCAGCTCTCCAAGTTCAAATGAATAT 180
 5' CCTCTGTCTTATTCAGAGGAGAGACATGGACGGGCGCCAGTATTGGTTGAGCGAGATCTTGGACTACTGCGCAGATTANGGAACCTCACCA 270
 外显子2
 5' GGTACTAGGCTGGCTGTTTACAGGAGTAGCCCCACTGCGGGAAGGGGGTGGTAGGGGGTAGGGTGGGGGCAGGGTCTGCCCTCTGAGCCCCCTAGC 360
 5' GCTGCCCATCTGCTGGTCCCTGCAGGGTGCTGACTTTGGCCCCCTCCTTCTGCTGCTGCTCTTCGCTCTCATTTGGGTTTCTTCATGCTCCTGG 450
 外显子3
 2F
 5' TGACCACCTGGTTCAAGGTGAGTCAGGGGTTGGGGGCTTCGAGTCCCTGGTCCCGTTGGGTTTCTCTCTGGGATGGTTTTTGACCTTT 540
 外显子3
 5' TCCCTAGTCCCTGAAACCTACTGGGGCTGGGGCATTTGGACTCTGTGTGCCCTCTGTGTGACTGGGGGCAGTTACTCCCTTCTCTGG 630
 5' ACCTGTTTCCTTATGTGAAATGTAGCTCATCCTCCCTGTGGGGAGCTTAGGCTGCACTTGAAAAATGAACCTGGGAGTTCCCGTTGTGGC 720
 5' ACAGTGGTTAACCAATCCGACTAGGAACCAATGAGGTTTCGGGTTCCGTTCCCTGCGCTTGCCTAGTGGGTTAACGATCCCGGCTTGCCTGTG 810
 5' AGCTGTGGTGTAGATTGGCAGATCGGGCTCGGATCCCGCGTTGCTGTGGGCTGGCATAGGCCAGTGGCTACAGCTCCAATTCACCCCTA 900
 5' ACCTGGGAACCTCCATATGCCACCGGAGCGGGCCCAAGAGAAATAGTAAAAAGACAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAATGAAC 990

图 5a

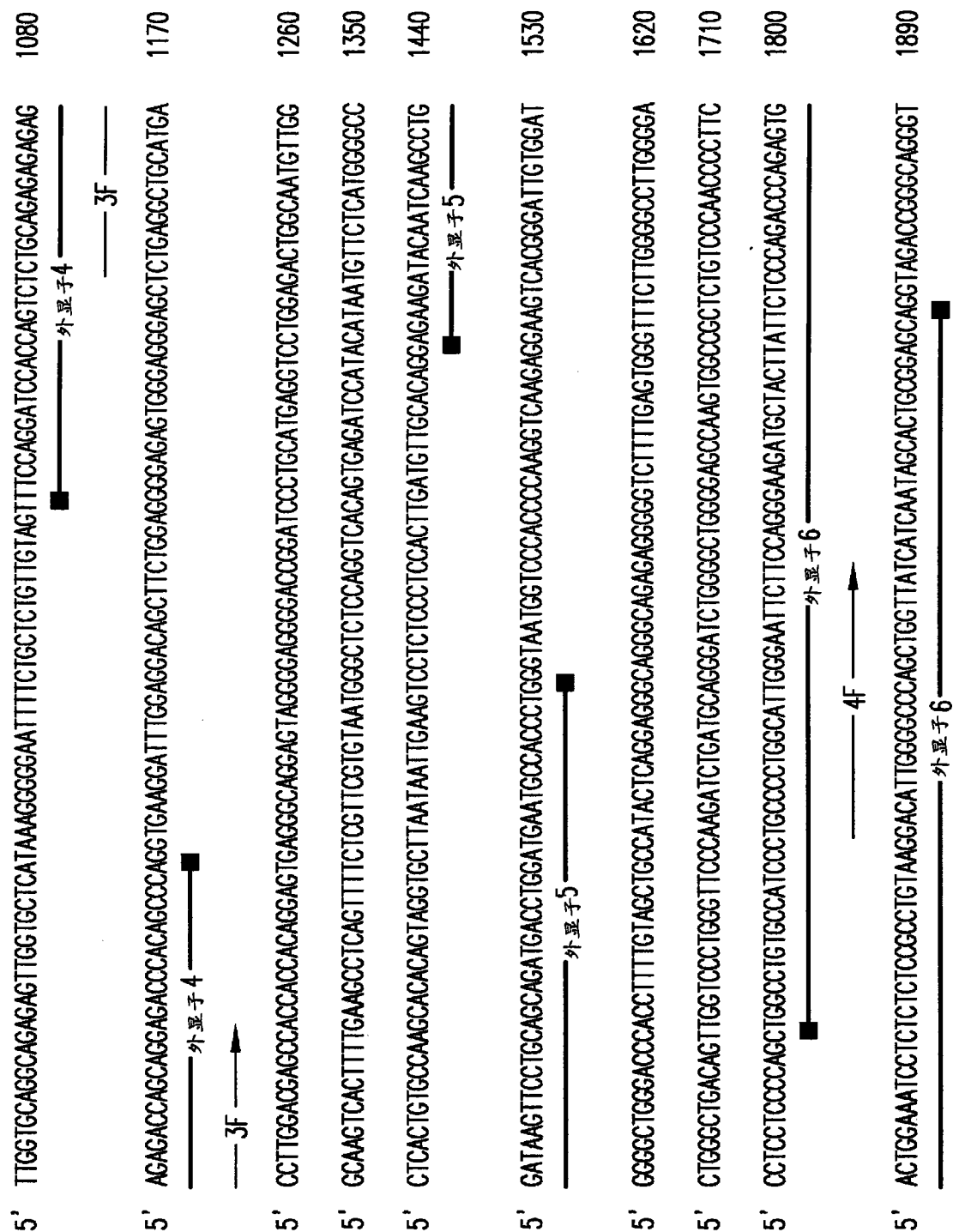


图 5b

1980 5' TCCTGTTGGGGCTGGGTGCTAGGGCTGGTCAACAAGAGCCCTTCTGCCACCCCTCCTCTGCCCCCTGAGAGATGGAGGTCCAGTGGATAGC

2070 5' TGGAGATGGGAGGGTAATGCCAGTCAGGGAAGGCTTCCCTGGAGGAGGAACCATACGGGACTCAGGAAGGTCACATGAGAGAGAAGAACCGGA

2160 5' TGGGAGGAGCCCATATATGGATAGAAAGGAAGTCAAGAAAGCCCTCGAAGAGTTCCCGTCCCTGGCTCAGCAGTGAAGTAACTGACTCT

2250 5' CATCCATGAGGATGCAGGTTCCGATTCCTGGCCCTGGCTCTGTTAGGATCCGACATTCCTGTGGTATAGGACAGCAGCTACAGCTCT

2340 5' GATTCAGTCCCTAGCCTGGGAACCTCTATATGTGGCTGGTCTTAAGAAGCAAGAAAGAAATGCCCTTGGAAACCATCCATAACGCTAG

2430 5' GGTCAACTGGAGATACAAGTTAACATATCCACACATGTATGGGTAGGAATACACATTCACAGCCTACTTGCACATGTGAACATACACAAC

2520 5' TTGAGTAGAGGCTATGGACTAGACTGCAGAAGGAACCTTTTGTGAGAGCGAGGACAGAGGAACGTTGGGAGACATGTGCAGATGTCA

2610 5' TTGAGGAACTTCCCTTAATGCCCTTCTCACCCTTCTCAGGATTCCTGAGTCTTGGTATGTCAGATATAATAAGCCACCTGGAT

2700 5' TGGCCTCAGTGTACACACCAATGAAGTTCCCTGGCAATGGGTGGACAAACAGCCCTCCAACTCAGGTGACCTGCCAGTGACAAATGGCCC

2790 5' AGGAAGGGCTGGGCAGGGAAAAAACCCACCTTTCCCAACACAGGGGTGCTCAGATTCCTGGGACTGAAAAGTACCACCTGAAGAGCTTGGT

2880 5' GAAGATGCAGCGTCCCGCCCTCCAGCGTCTGTGGGGACGGGAGGGGGTCTGAGTCAGTACGGGGCCCAAGAACCTGCAATTTTACTTT

2970 5' GCCAGAGCTGATTCGTATGGAGGTGGTATTTGAGCCCAACATTTTGAAACCAACCCCTCTGGCTGGTACCTGGCAATCAACTGCCACAGC

3060 5' CTAGGGACAGCTTCTCCAAGGGGGGGTGGGTGGAGGGTGGGTTCTGGGTAGAGTAGGGTCCCAGAGCTCTGATGGGGTTCACAGCTT

外显子7

图 5c

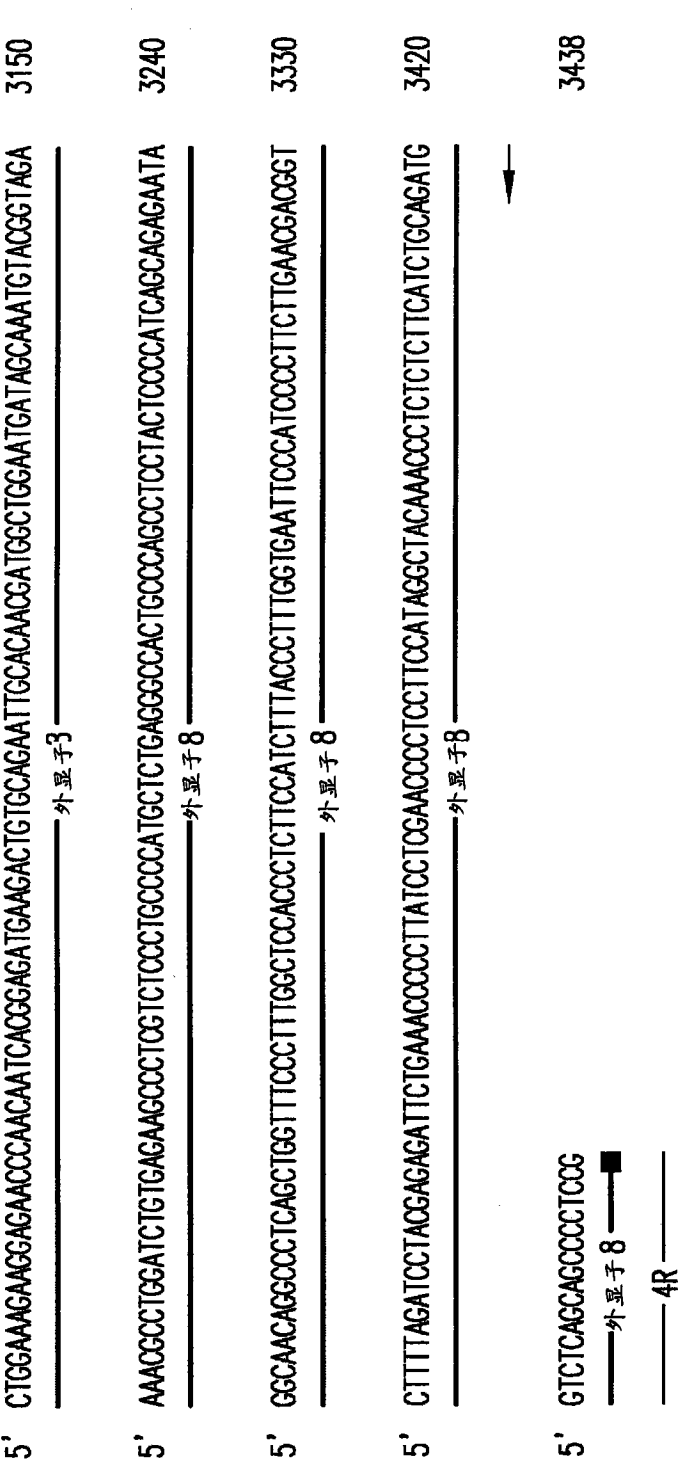


图 5d

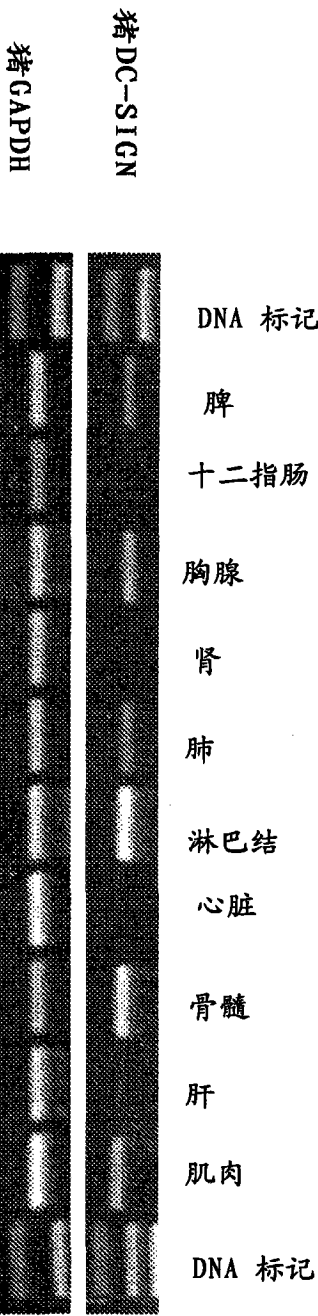


图 6a

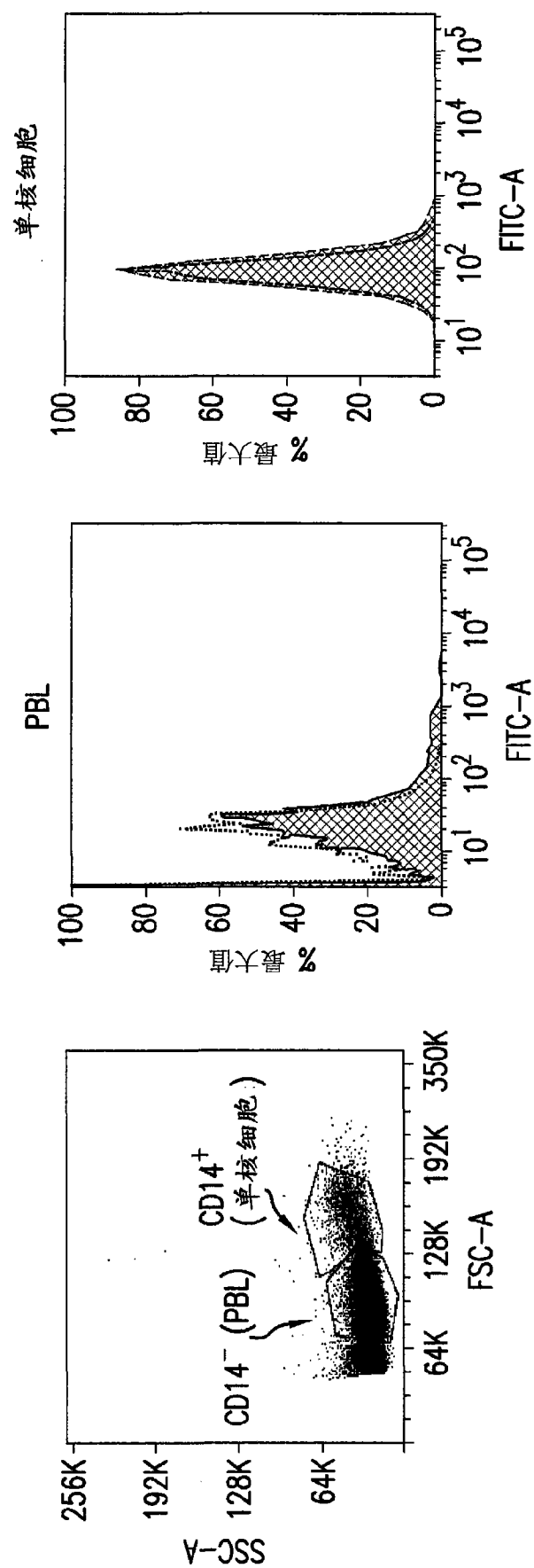


图 6b

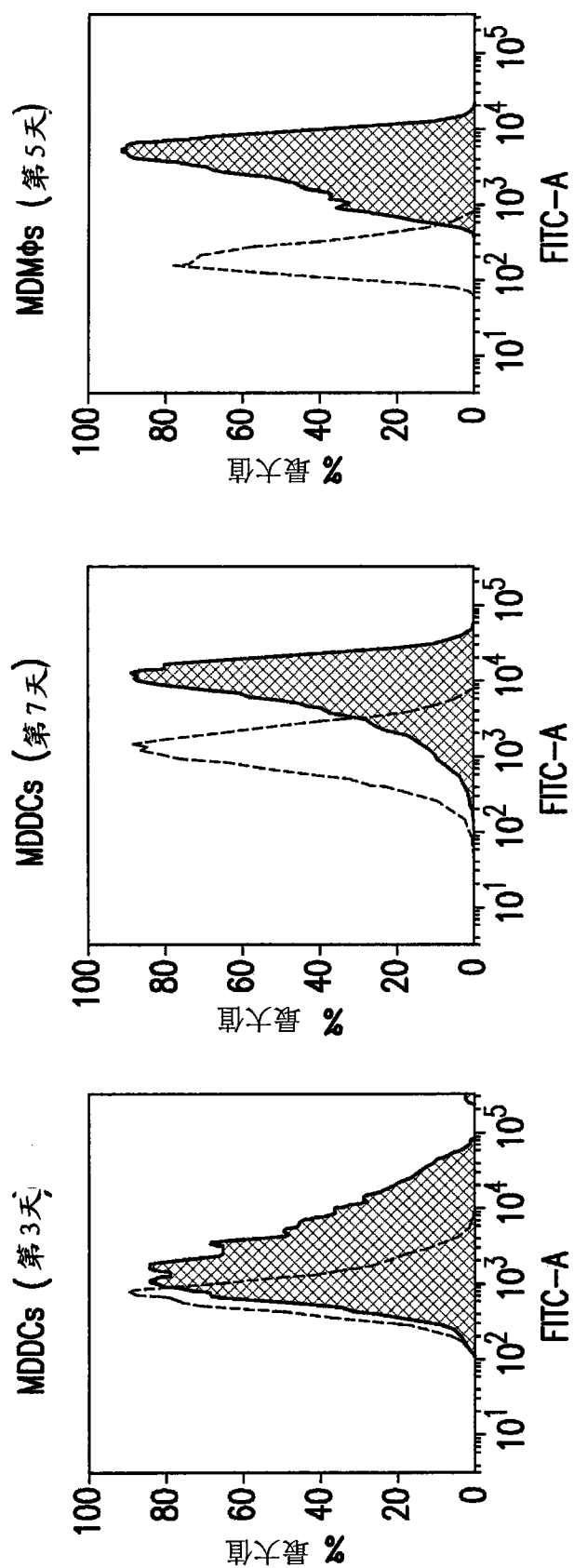


图 6c

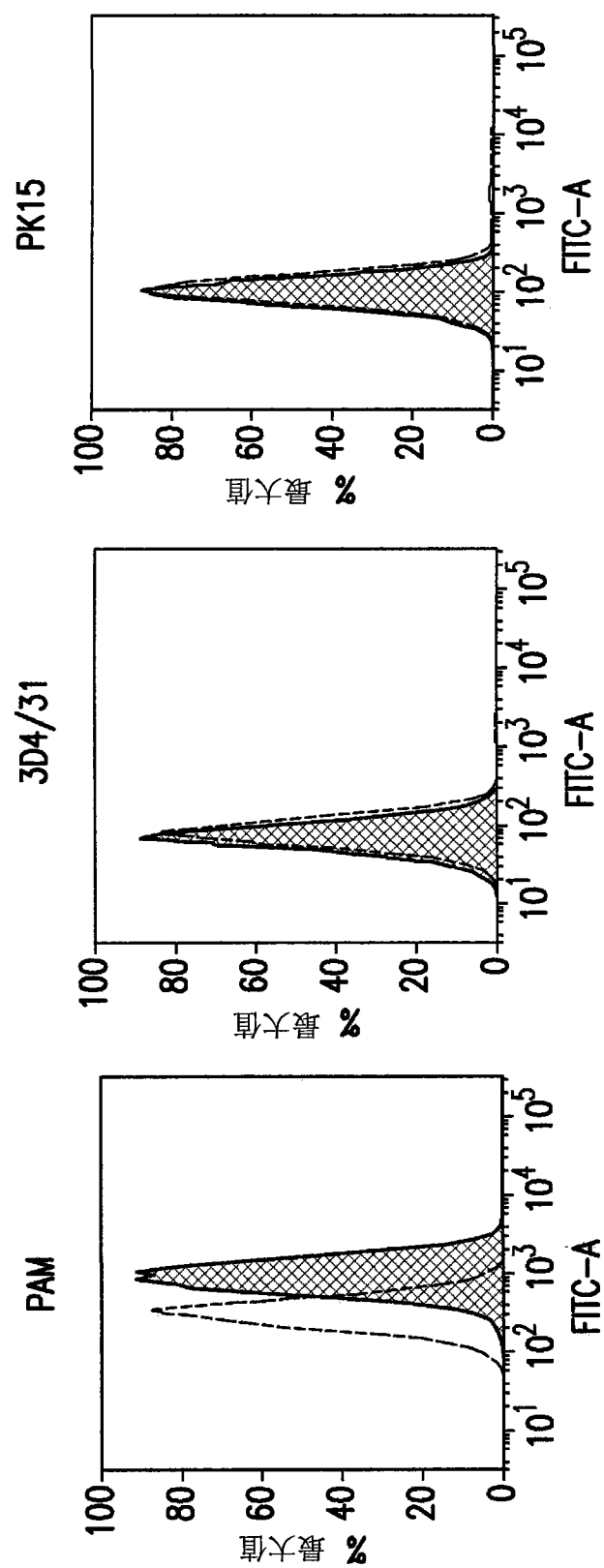


图 6d

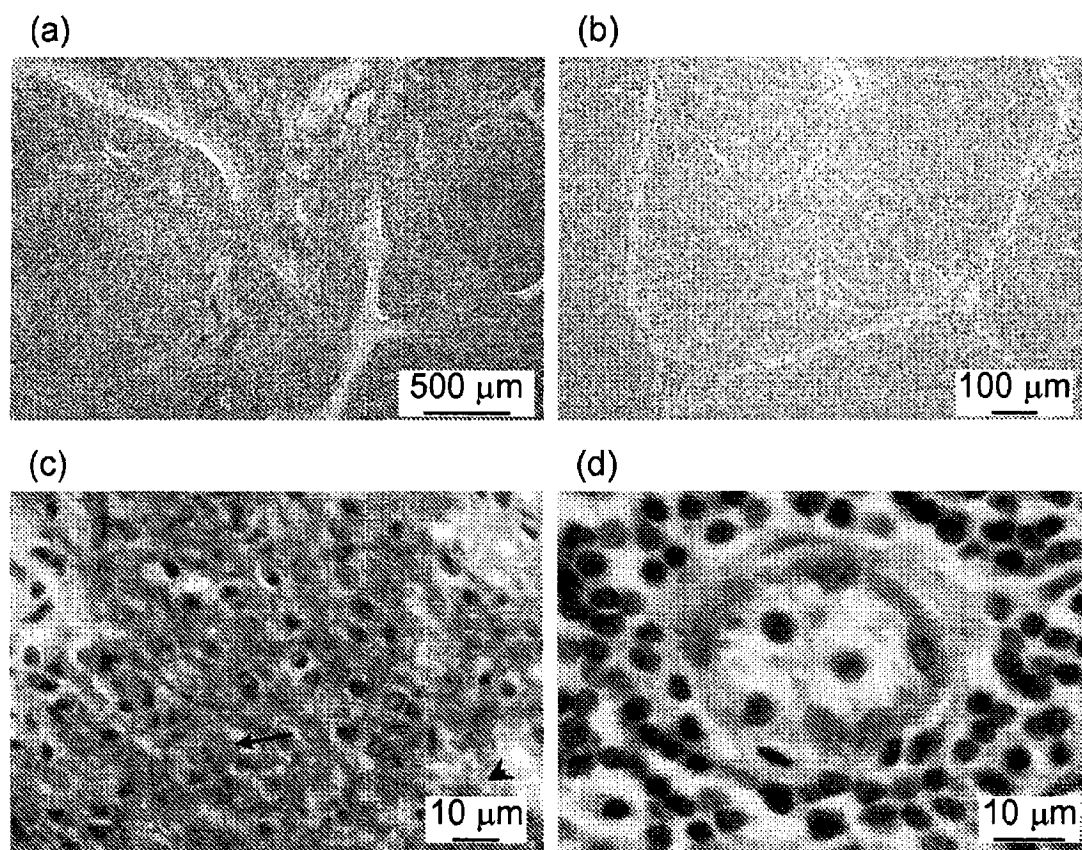


图 7

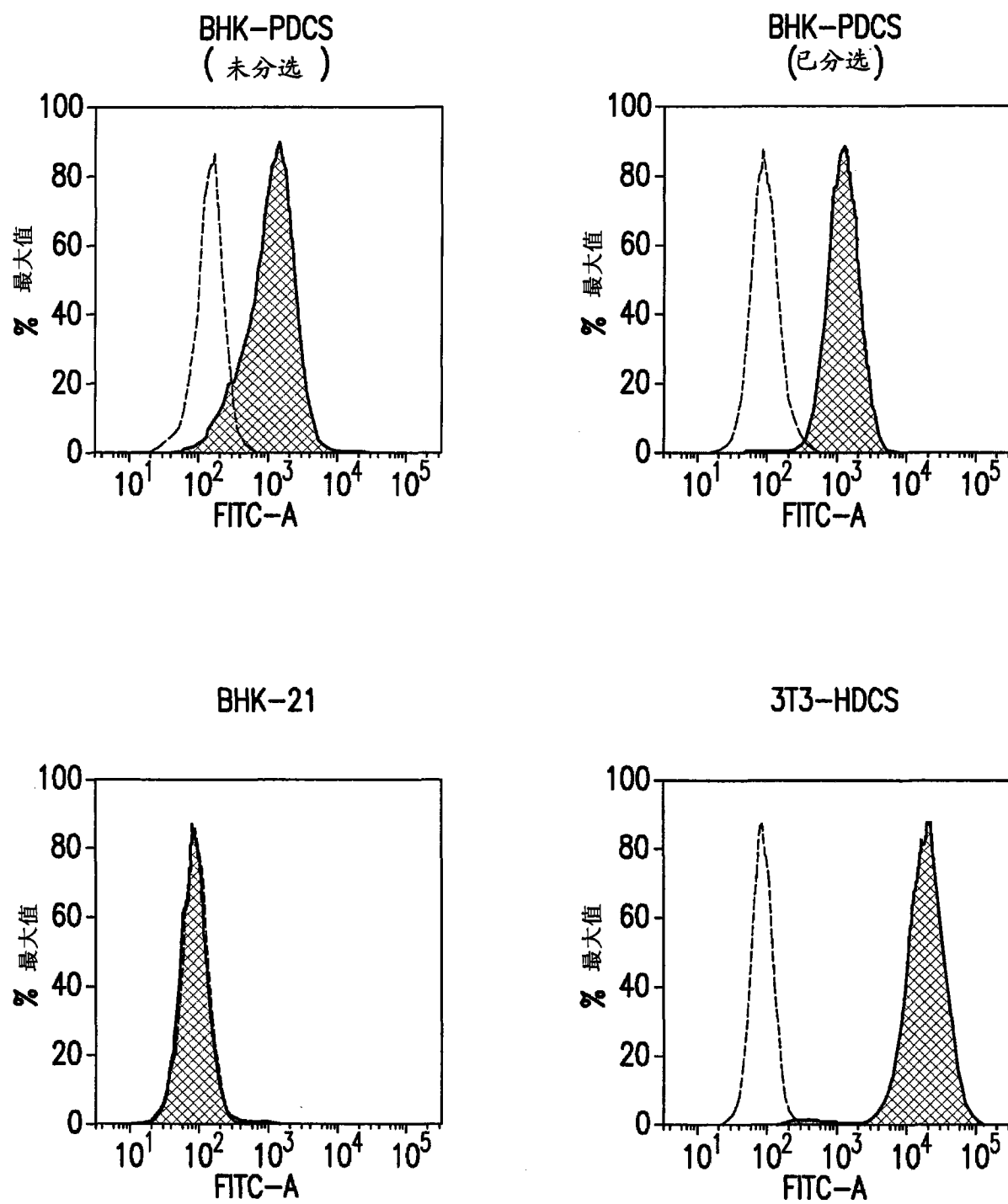


图 8a

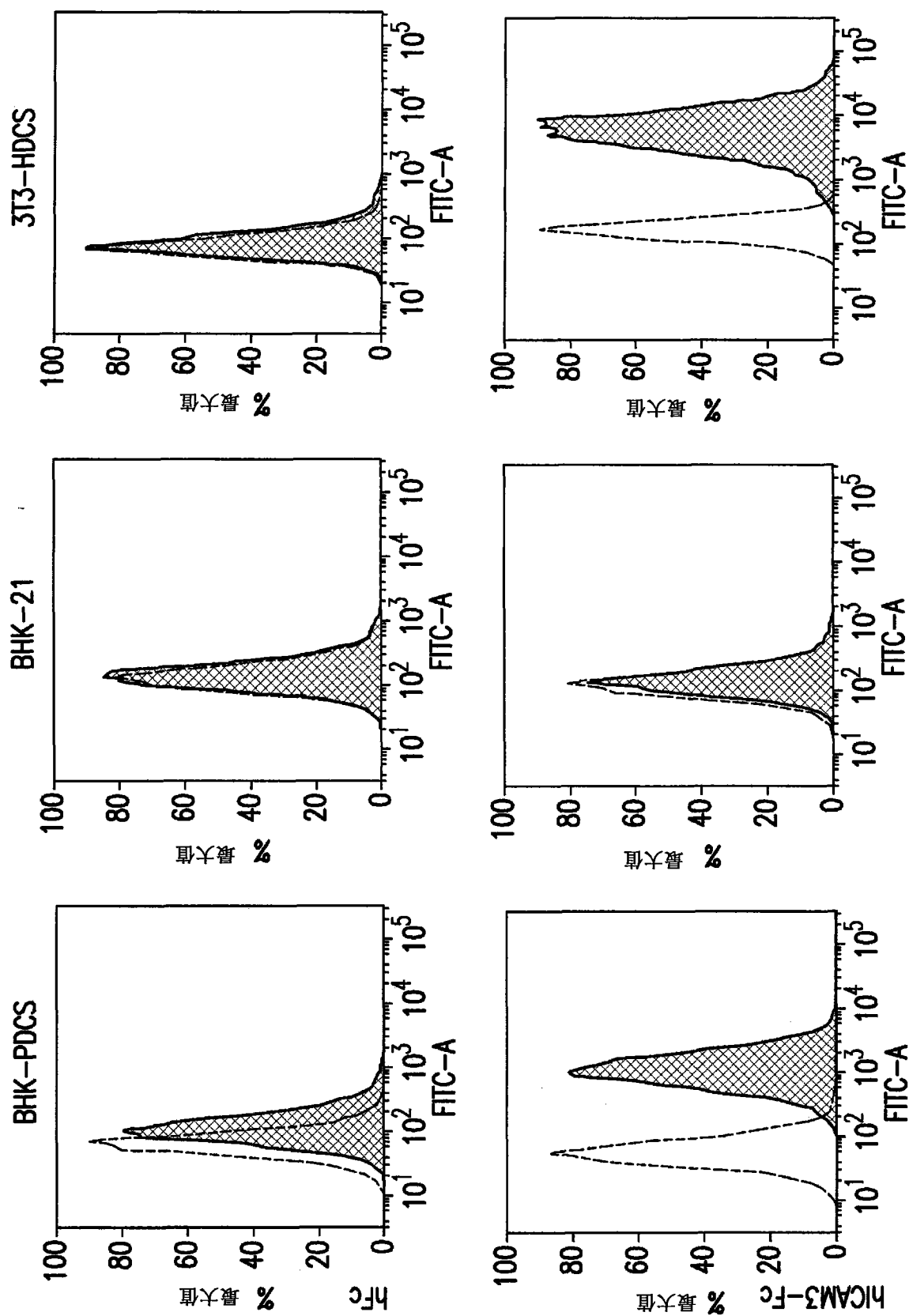


图 8b

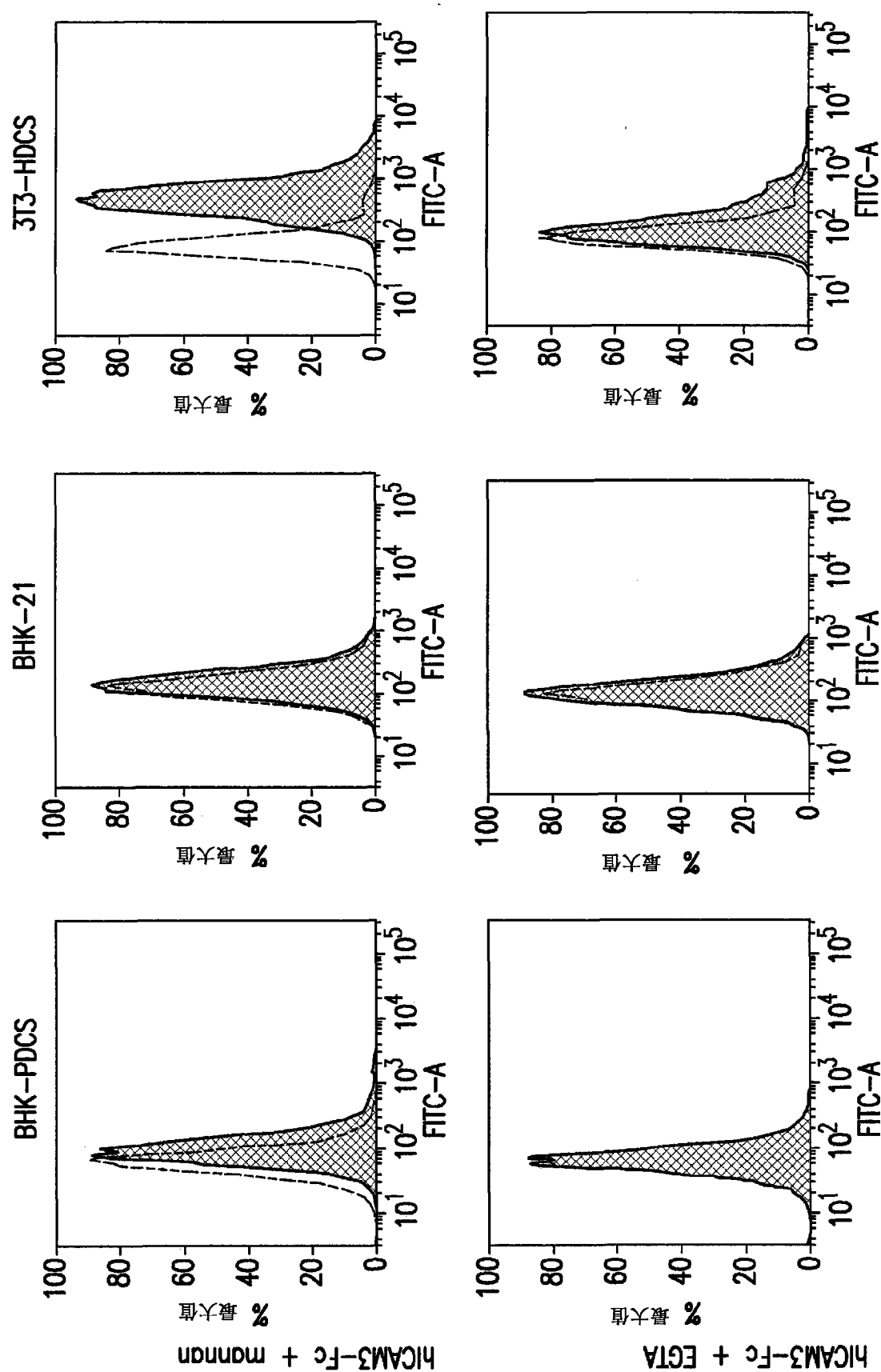


图 8c

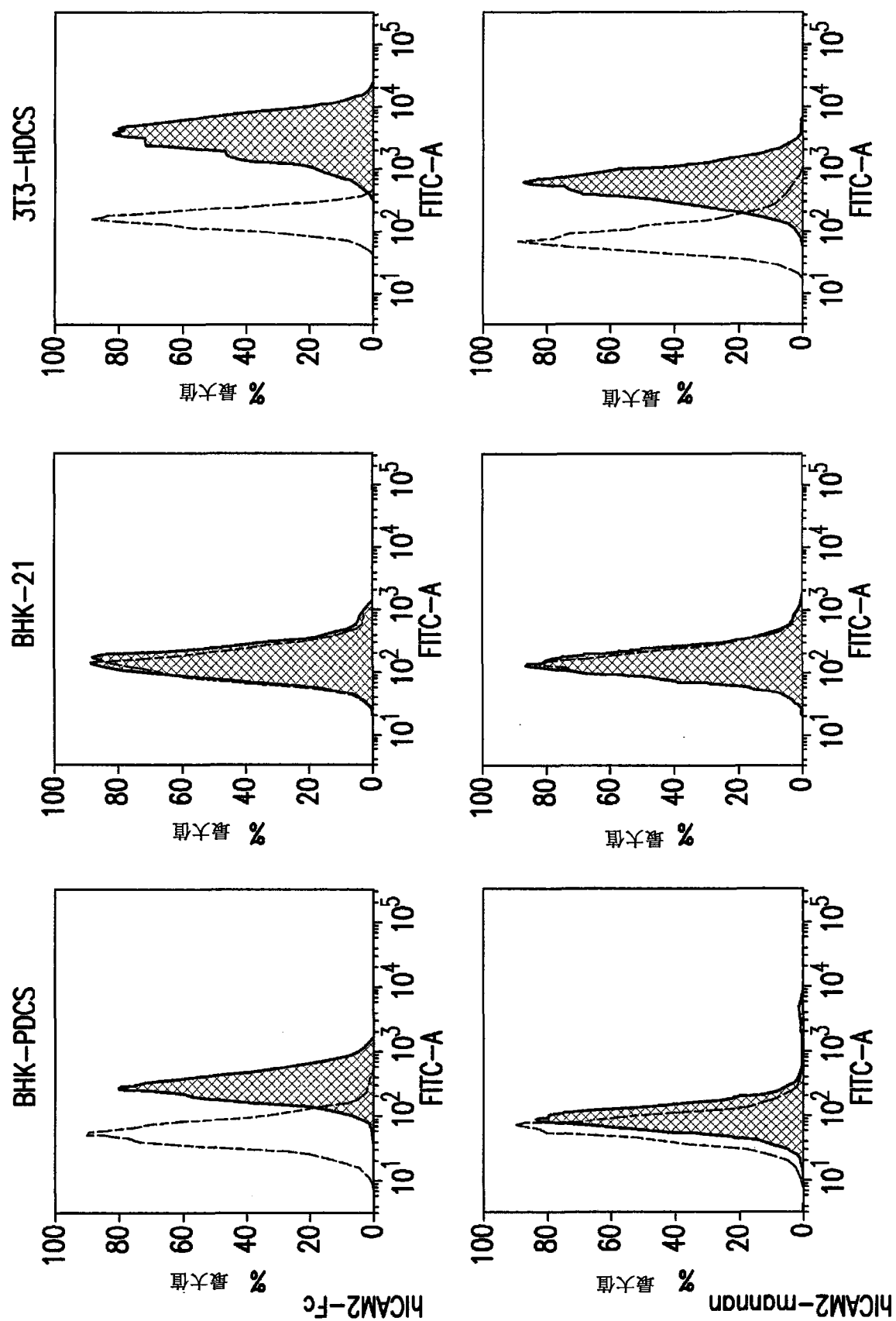


图 8d

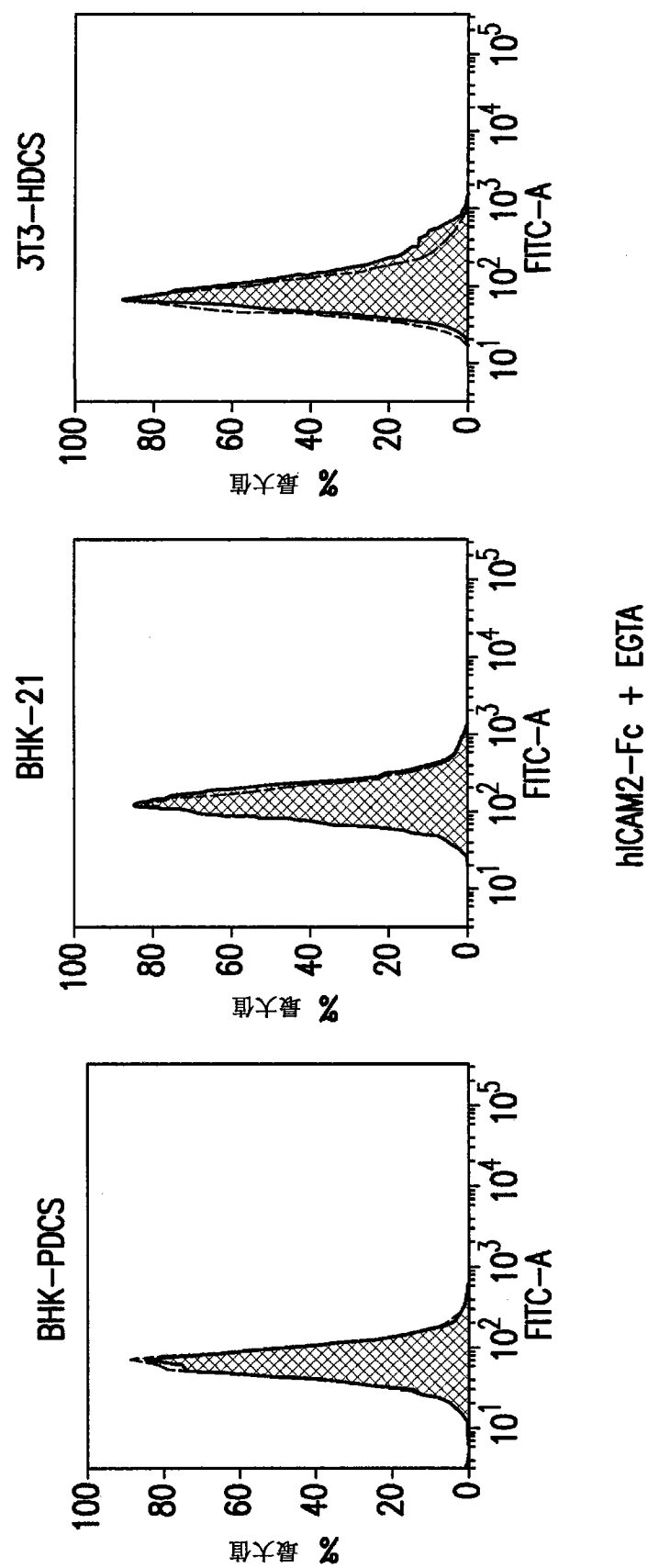


图 8e

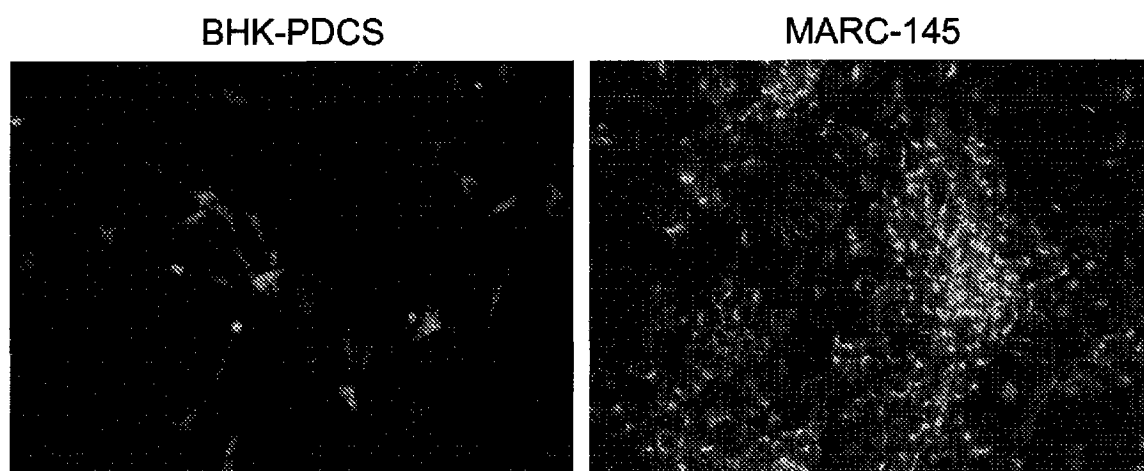


图 9a

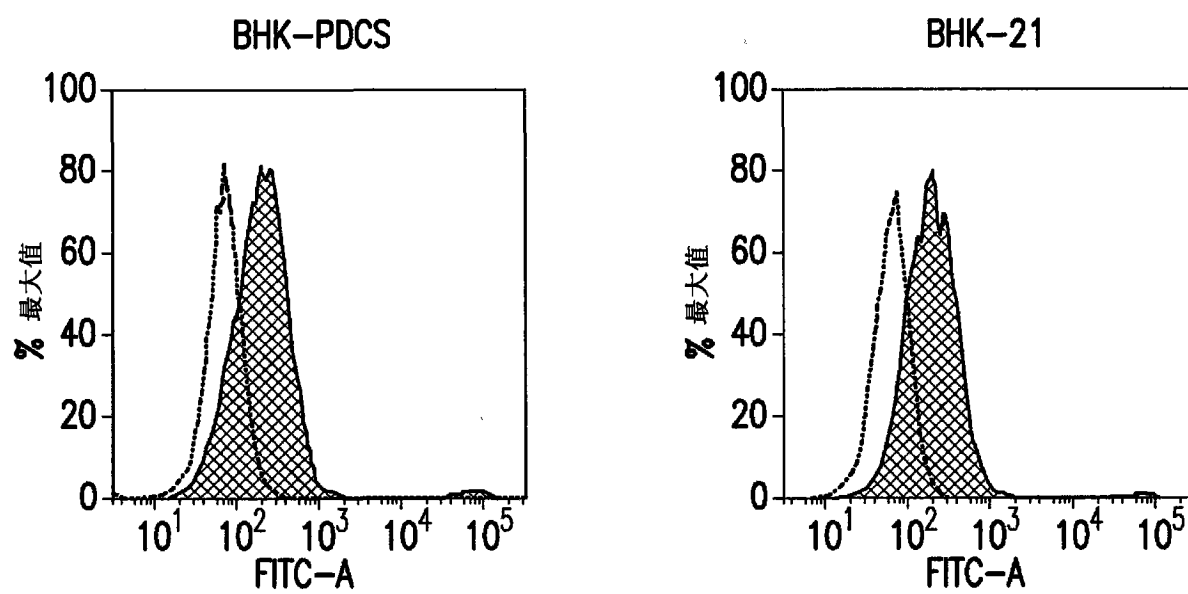


图 9b

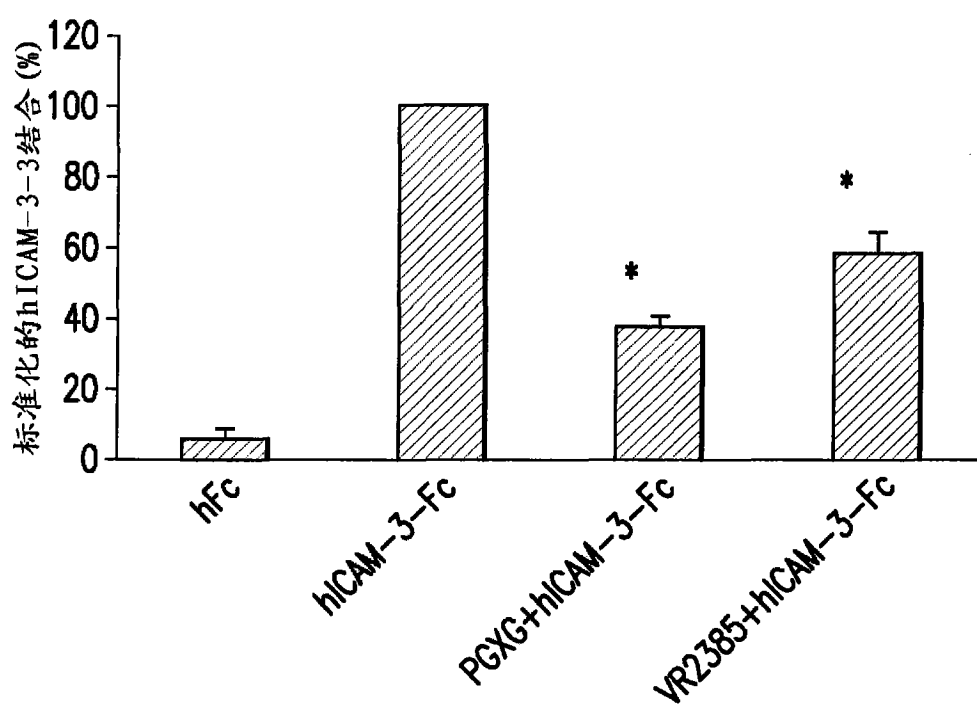


图 9c

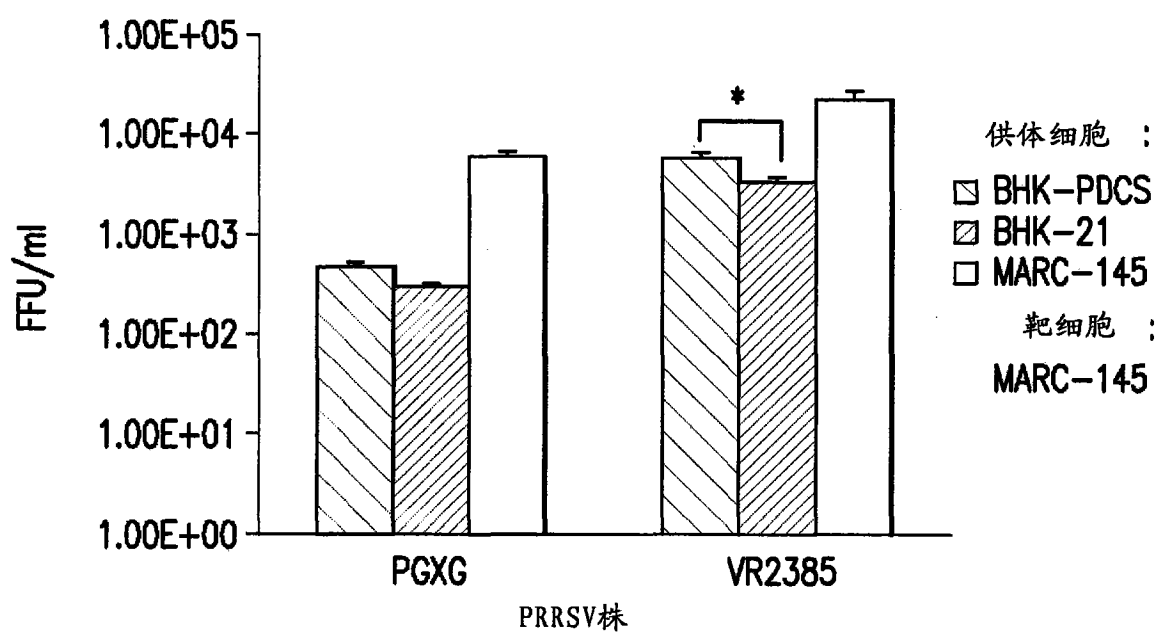


图 9d

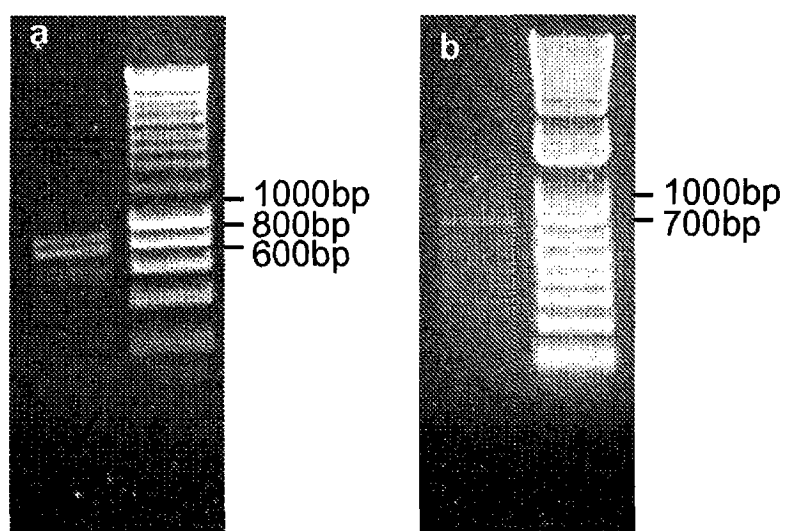


图 10

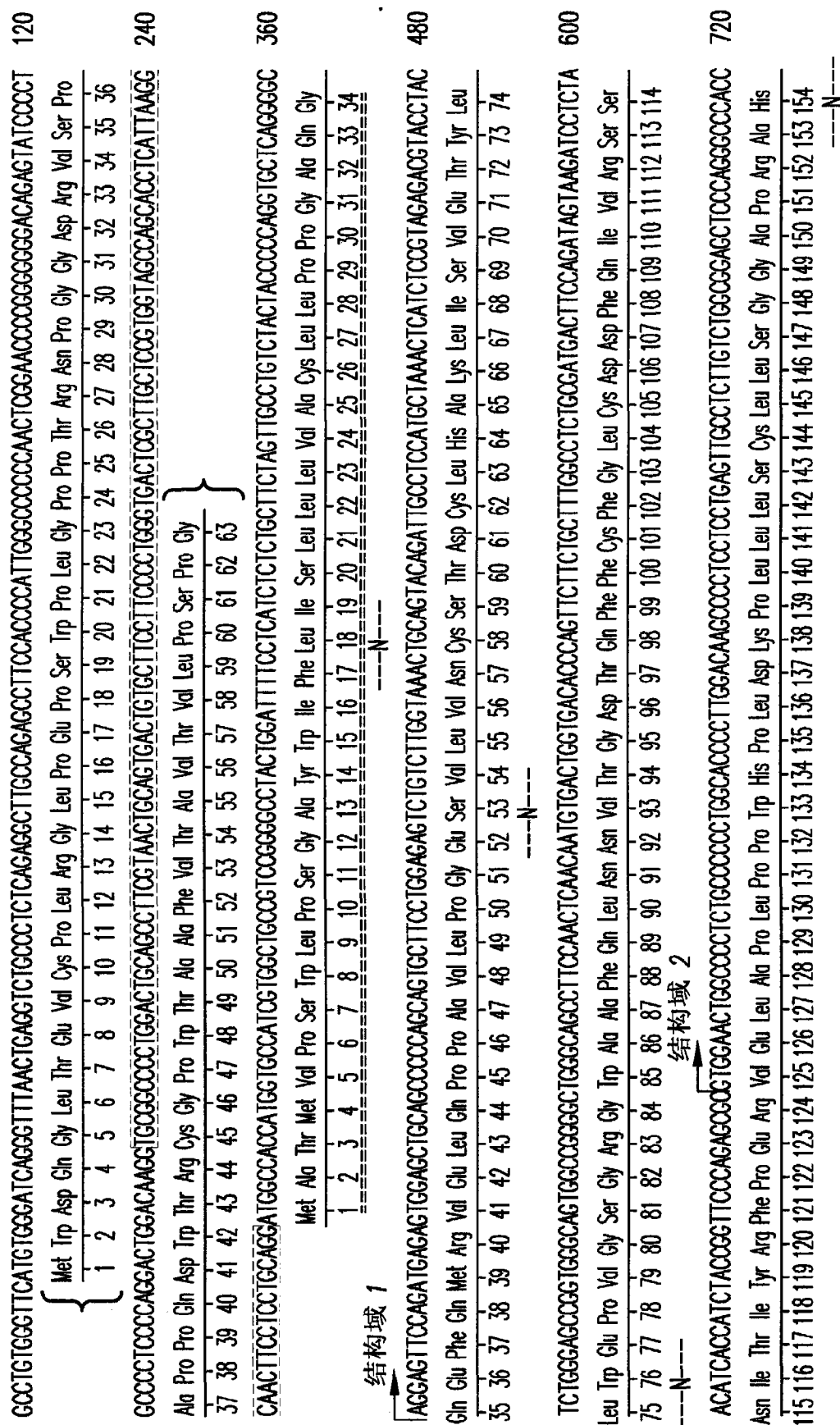


图 11a

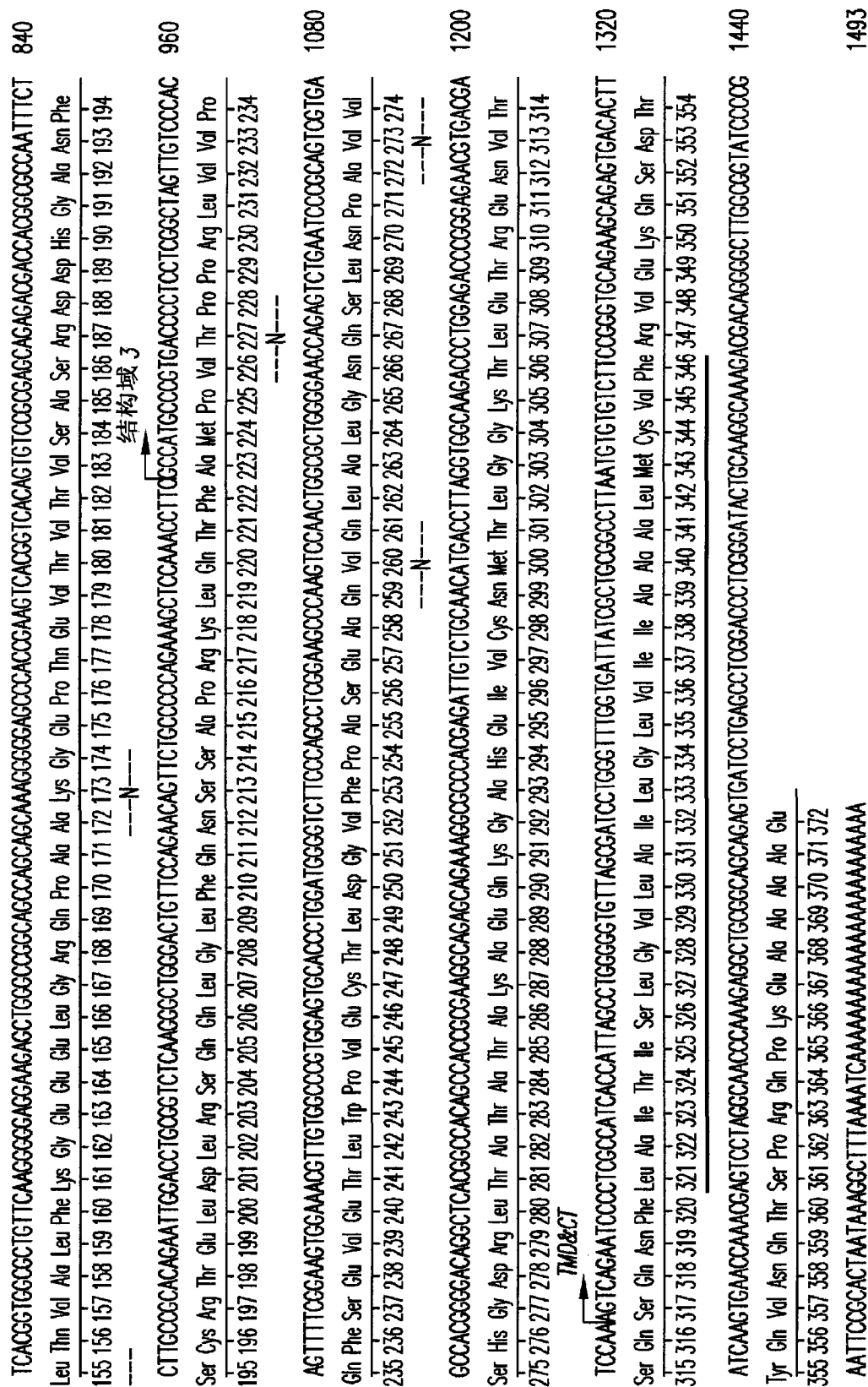


图 11b

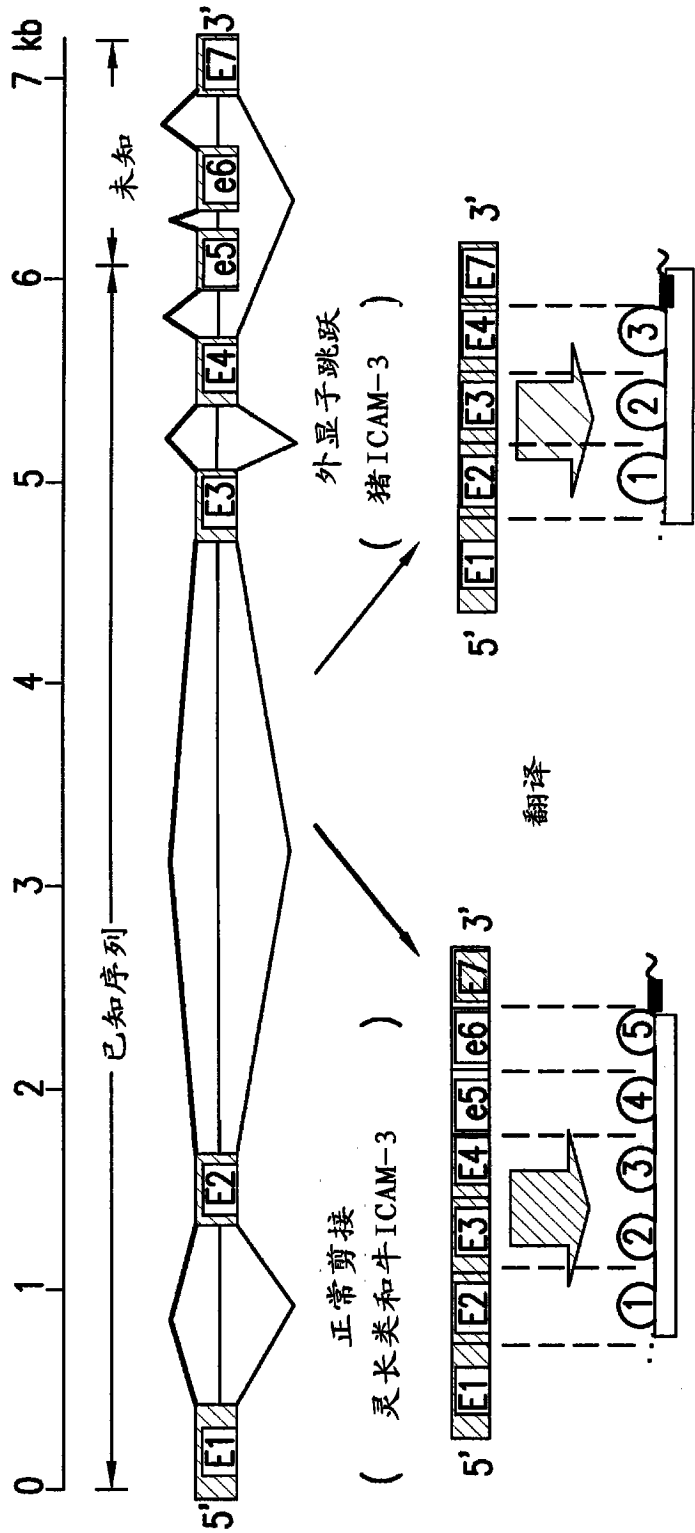


图 12a

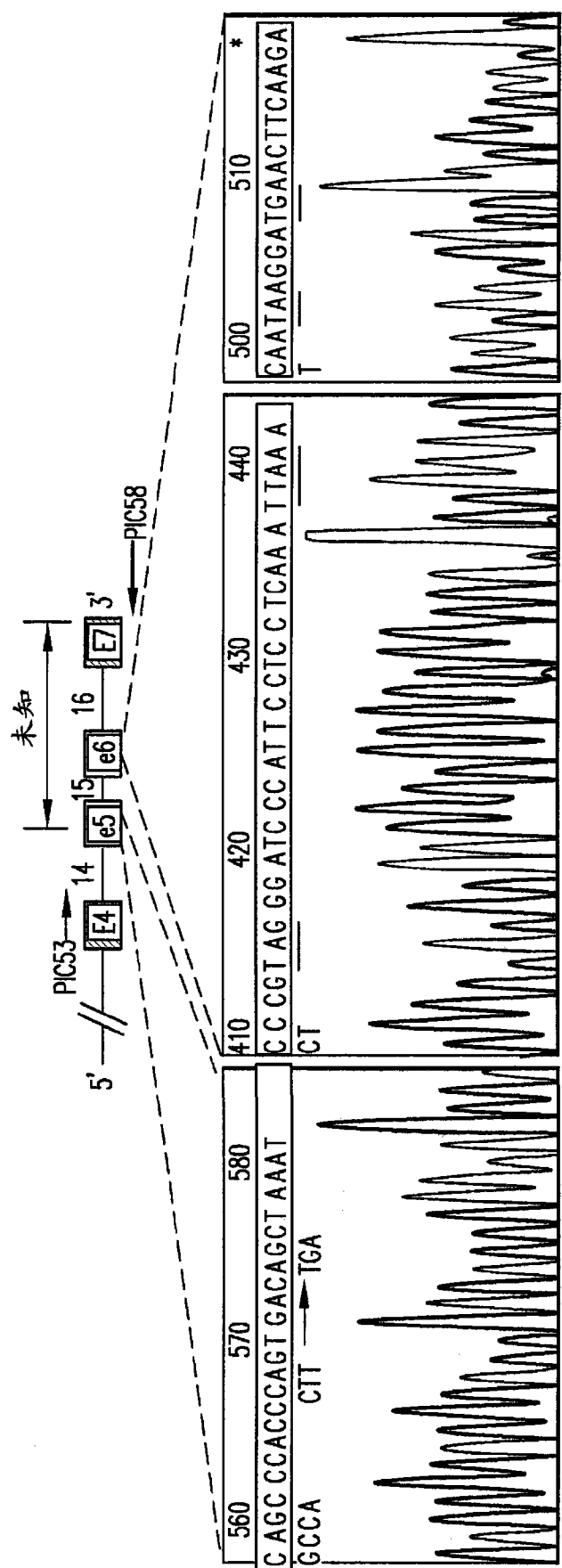


图 12b

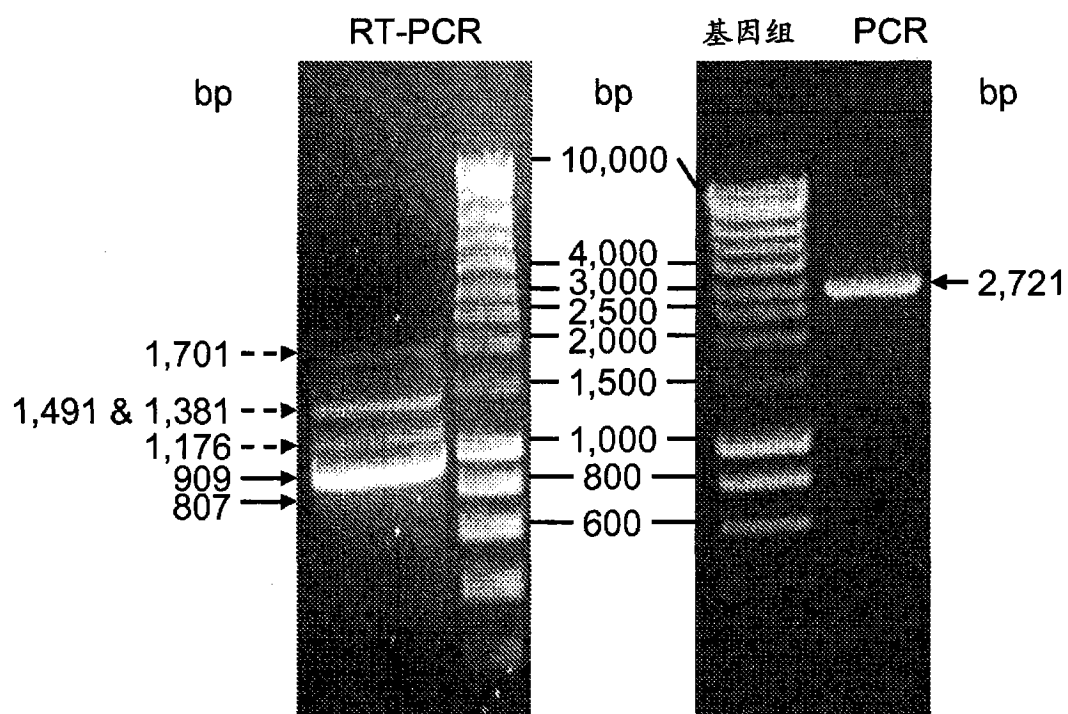


图 13

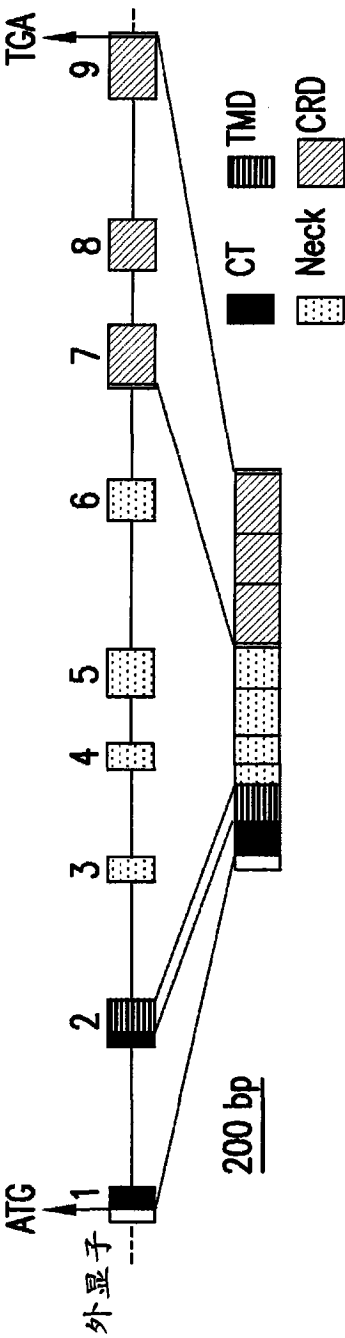


图 14a

110 ttttatctatgcccagagcaggccactgcttaccatggacactgccgggtacagcaagtgggacacacagctggaggaggtccctggaggcactggggacactgggg
 外显子 1 ↓ 外显子 2
 34 M D T A G [Y S K W] D H K L [E E] V P G G H W G H W G
 外显子 2 ↓ 外显子 3
 220 acagagatccctctctctggtctgggtggctcacagtccctgtggccctcgcttctgagcatccctattttccaaggcctccacagagcgcgggcgctgcttg
 外显子 3
 70 Q R S [L L L A F G L V V V T V L W A L V L S I L F S K A] S T E R G A L L
 3 ↓ 4 外显子 4 ↓ 外显子 5
 330 gccacaggatctactgaggacaaacgcctcgagcgacggcgactctgaaggtcttgaaggaggaggtccgagcctgcacacagctgctgctgggggtgcagggcgag
 107 G H D L L R T N A S K D T A T L K V L K E E V R A C N S C L G V D A Q
 外显子 5 ↓ 外显子 6
 440 ctgcagacggtgcacacccagcttgagaggaacaggcgagctgttgagcagggagagcgccctgaaggaaactgagcgagcgctgacccagggcttggtgaagccgg
 144 L Q T V H T Q L G E A K A K L L E Q E S A L K E L S E R V T Q G L A E A G
 外显子 6 ↓ 外显子 7
 550 tagggaccgtgagaaacatccgcagtgagctctccgggagctggagagagtcagggtccagaaacagctcctgcgagacagtgcccaagtcgtggctgccattccagggct
 180 R D R E H I R S E L F R E L E R V R F Q H S S C E Q C P K S W L P F Q G
 外显子 7 ↓ 外显子 8
 660 cttgttactttttctcggcgaaggggccacgtgggtggaggctcagagccactgcgaggggtcggggcgcacctggtgattgtgggggctggaggagcagggcttc
 217 S C Y F F S A Q G A T W V E A Q S H C E G A G A H L V I V G G L E E Q G F
 外显子 8 ↓
 770 ctgagtcgggaatactgcggcgcggtactggtggctgagggctgtgcgcaggggcgcgcaaatccagagctaccagtggtggatggagtcacactcagcttcag

图 14b

L S R N T A G R G Y W L G L R A V R R A R K I Q S Y Q W V D G V P L S F S

外显子9

254

ccactgggaatctgggggaacccaatgactctctggggcgaggactgcatcatgatgtacggagcggggatgtggaatgacgcaccgtgcacacagcaagacgacagct

880

H W N L G E P N D S L G R E D C I M M L R T G M W N D A P C N S K D D S

290

ggatctgcgagagaggcaccaactgctgacctagccccagtgccccagagcgaagcccactggcacttgtccaatcgccctgagctgcttactgccctggctccgcccccca

990

W I C E K R H N C

299

ctatatccctcccaactgcttccagcnaaaacaccccttcaccagagcctaggccaataactggacctcagctccaaccccgctgcataccctcaccctatgagcctaa

1100

tgtatctacattcgctccaaatctggcctcctctgccctgtgatctggcccatcacctccctaaccaaggctcagctcagggaaggagctgttggttgcttg

1210

cttttaccacagagggggcctcaagatagagattttgtgagctttctcacagccttagggagcatcAAIAAAtgagaatgaatcttaaaaaaanaaaaaa

1320

aaaaaa

1327

图 14c

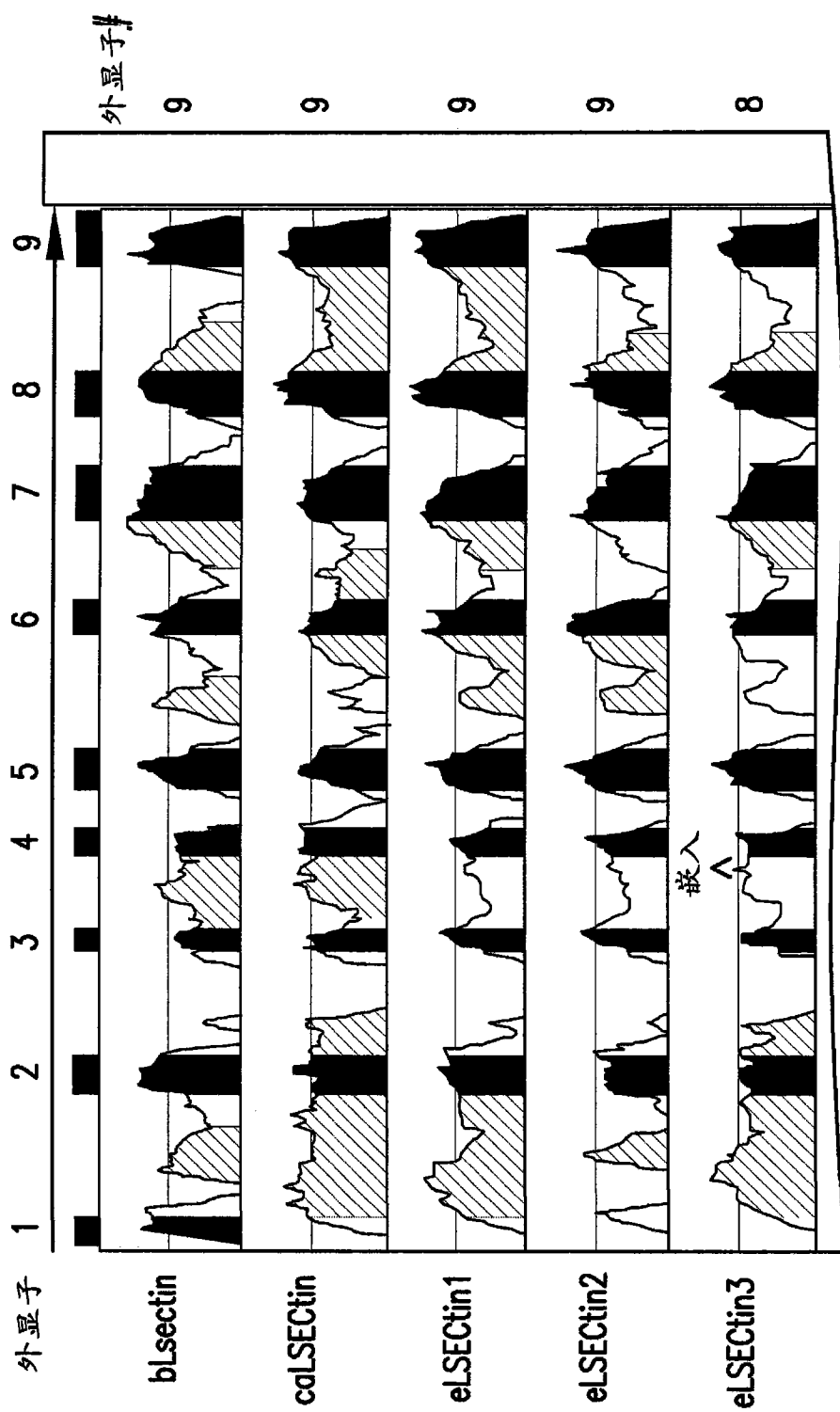


图 15a

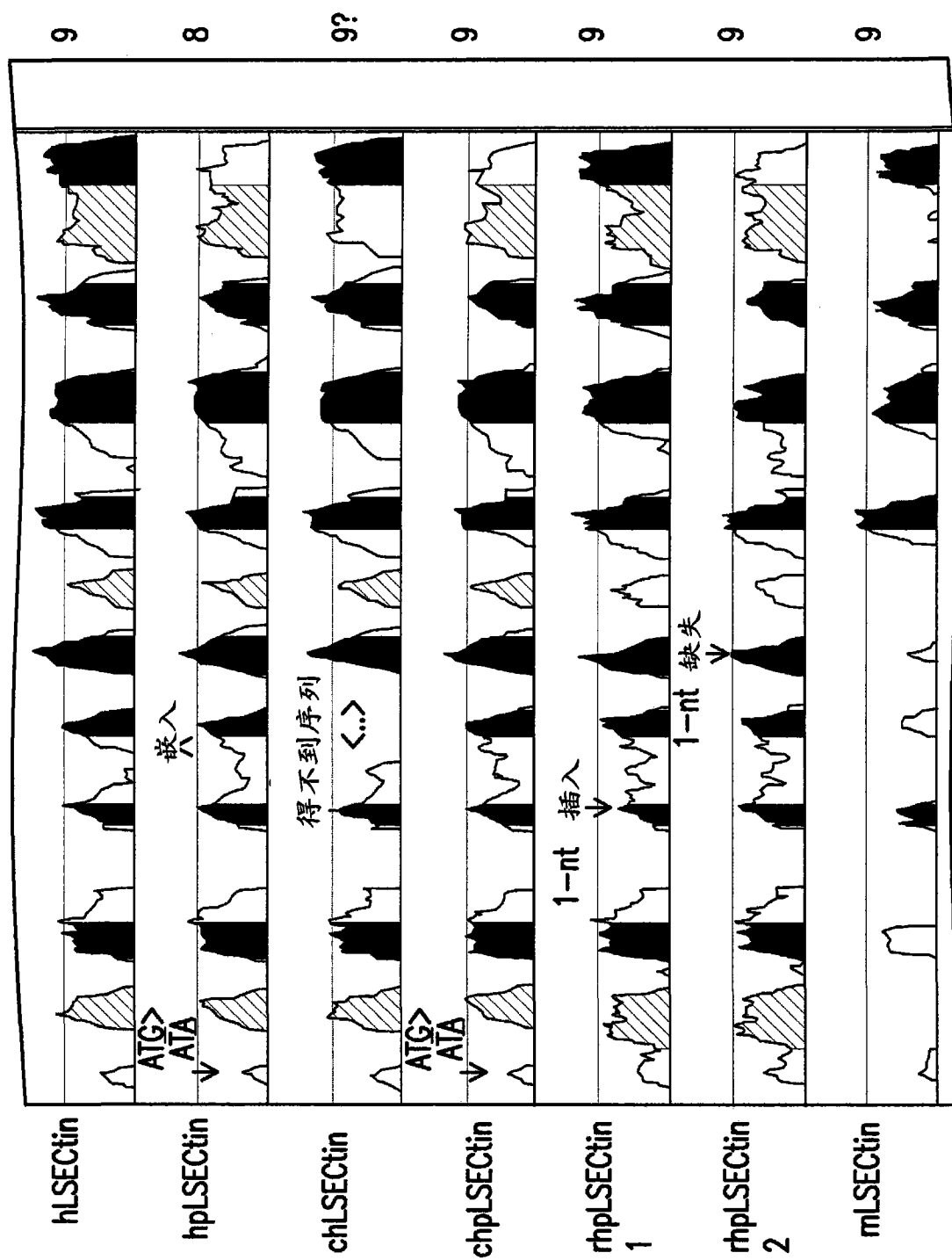


图 15b

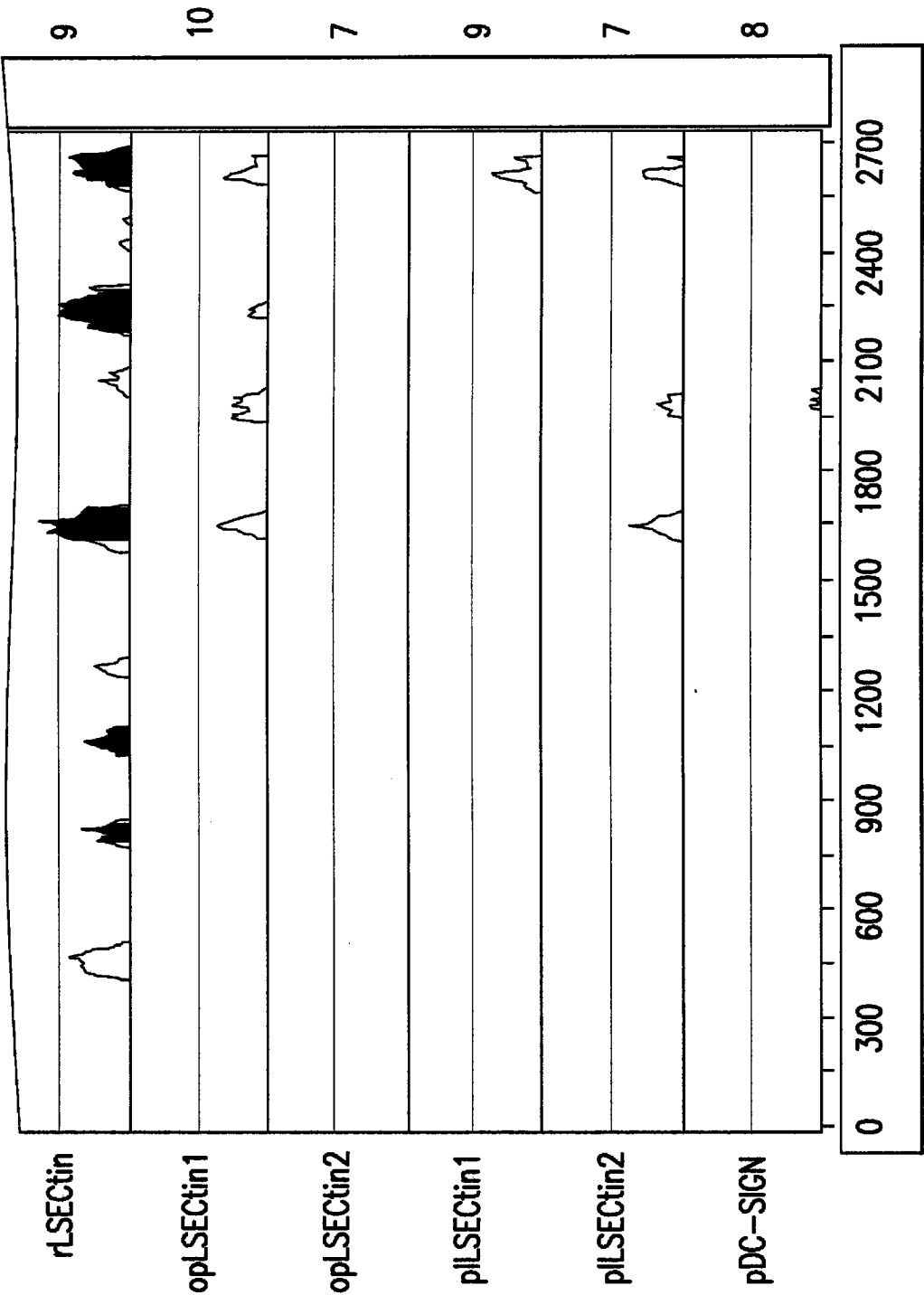


图 15c

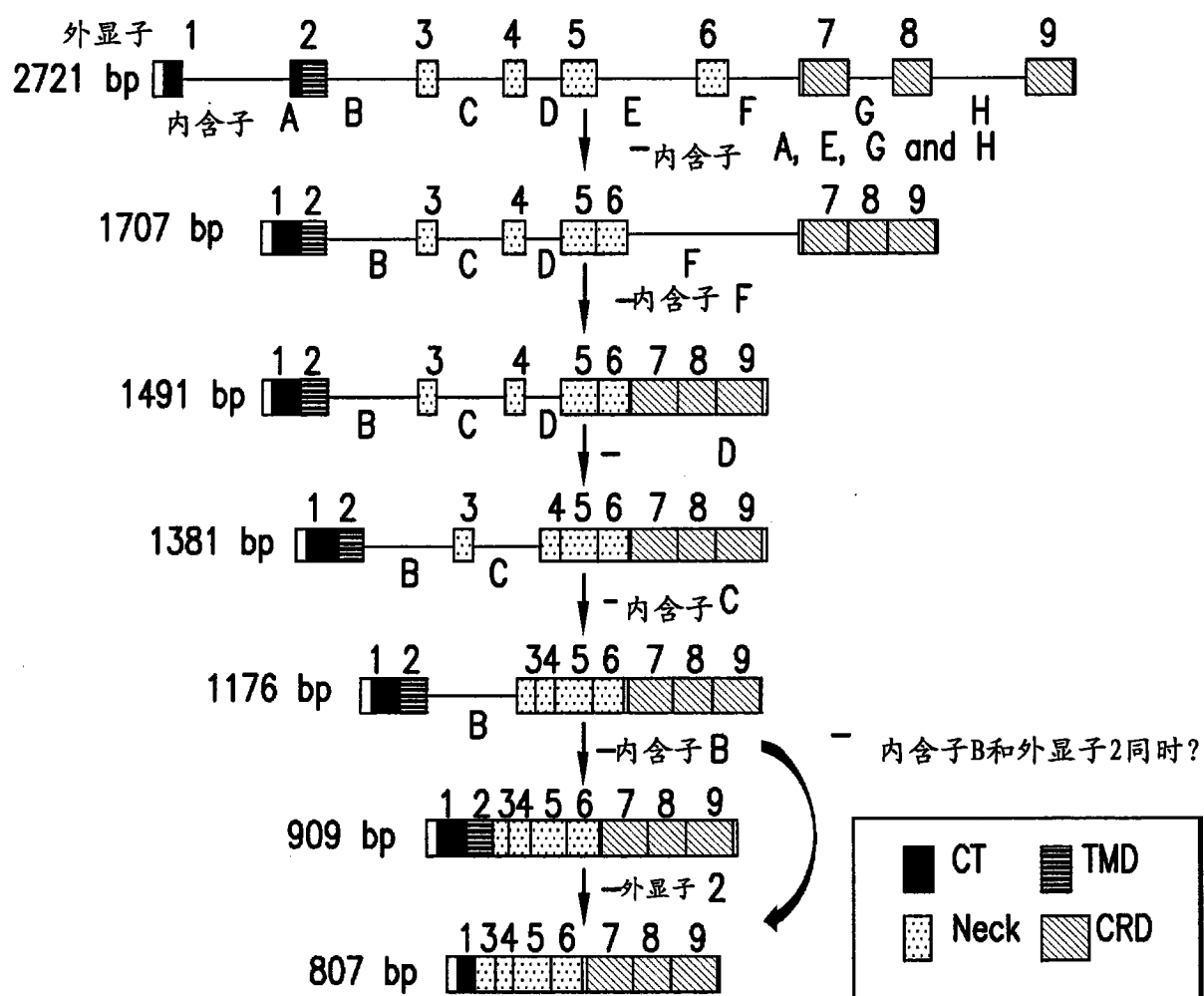


图 16

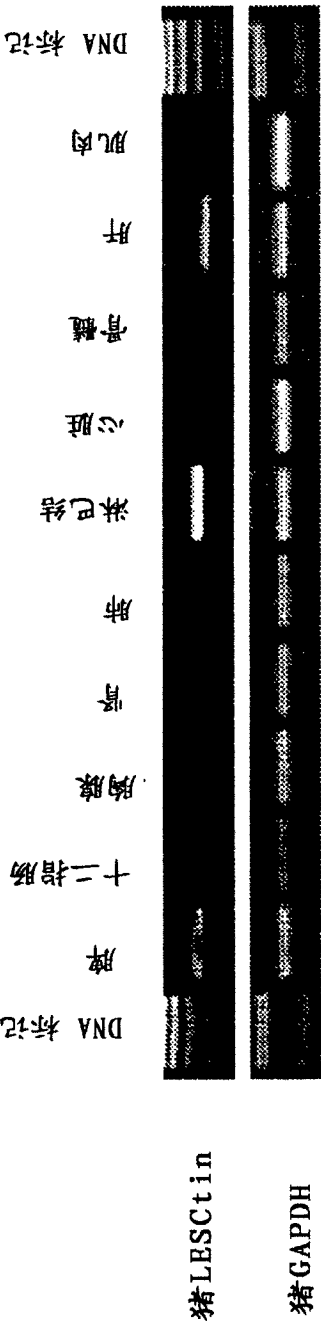


图 17