

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 97199840. X

[51] Int. Cl.

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

G01N 33/60 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年7月22日

[11] 授权公告号 CN 100516215C

[22] 申请日 1997.11.18 [21] 申请号 97199840. X

[30] 优先权

[32] 1996.11.18 [33] US [31] 08/746,883

[86] 国际申请 PCT/CA1997/000880 1997.11.18

[87] 国际公布 WO1998/022580 英 1998.5.28

[85] 进入国家阶段日期 1999.5.18

[73] 专利权人 韦尔斯利医院基金会

地址 加拿大安大略省

[72] 发明人 M·H·朱利叶斯 D·菲利普

K·阿利扎德-希阿威

[56] 参考文献

WO96/32418A 1996.10.17

US5543303A 1996.8.6

审查员 郝建欣

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 卢新华 齐曾度

权利要求书 1 页 说明书 33 页 附图 26 页

[54] 发明名称

牛泌乳相关的亲免疫性蛋白(CD14),编码基因  
以及在 B 细胞激活中的应用

[57] 摘要

从牛初乳乳清中纯化出一种新蛋白质并鉴定了已分离的编码该蛋白质的核苷酸序列。该分离的牛蛋白被称为牛泌乳相关的亲免疫(Bo-LAIT)蛋白。Bo-LAIT 蛋白的人对应蛋白, Hu-LAIT, 也进行了描述。激活 B 细胞的方法, 尤其是在需要该激活的哺乳动物, 如人, 中通过施用 LAIT 蛋白激活 B 细胞的方法被描述。LAIT 蛋白可加入到婴儿饮食配方中。正是通过这种饮食配方喂养婴儿, LAIT 蛋白可施用于婴儿。LAIT 蛋白可以掺入作为接种的成分。LAIT 蛋白可以施用于患 T 细胞免疫缺陷的病人, 例如, 病人 T 细胞的细胞表面低表达或完全缺乏 gp39 (CD40L) 的特定 T 细胞的机能障碍。也描述了包括 LAIT 蛋白在内的用于激活需要该激活的哺乳动物中 B 细胞的药物的制备。可以使用天然或重组的 LAIT 蛋白。

1. 一种多肽在生产用于激活 B 细胞的药物、食品或者疫苗中的用途，其中该多肽选自：

(a) 核酸序列 SEQ ID NO: 1 编码的多肽；

(b) 核酸序列 SEQ ID NO: 2 编码的多肽；

(c) 核酸序列 SEQ ID NO: 3 编码的多肽；及

(d) (a)、(b)或(c)的保守变换多肽，其可以激活 B 细胞。

2. 权利要求 1 的用途，用于生产激活 B 细胞的药物。

3. 权利要求 1 的用途，用于生产一种食品，该食品是用于激活 B 细胞的婴儿配方。

4. 权利要求 1 的用途，用于生产激活 B 细胞的疫苗。

5. 前述任一权利要求的用途，其中所述多肽选自 (a)、(b) 或 (c)。

6. 权利要求 1 的用途，其中所述多肽是 (a)，该多肽由哺乳动物乳房泌乳中获得。

7. 权利要求 6 的用途，其中所述哺乳动物是牛。

8. 含有编码 SEQ ID NO: 4 的多肽的核苷酸序列的核酸分子。

9. 权利要求 8 的核酸分子，含有 SEQ ID NO: 1 的核苷酸序列。

10. 生产婴儿配方的方法，包括将权利要求 1-7 任一项中的多肽加入到该配方中。

11. 权利要求 10 的方法生产的婴儿配方。

12. 生产含有非 CD14 抗原的疫苗的方法，包括将权利要求 1-7 任一项中的多肽加入到疫苗中。

13. 权利要求 12 的方法，还包括混合抗原和多肽至疫苗中的步骤。

14. 用于疫苗接种的试剂盒，含有预定量的非 CD14 抗原和预定量的权利要求 1-7 任一项中的多肽。

牛泌乳相关的亲免疫性蛋白 ( CD14 ) ，  
编码基因以及在 B 细胞激活中的应用

### 发明领域

本发明属于免疫学，生物化学以及细胞与分子生物学的领域，涉及称为 LAIT 蛋白能激活 B 细胞的蛋白质或者那些转录时修饰的和/或转录后修饰的蛋白质。本发明也涉及该蛋白在药用制剂中的应用，和包含 LAIT 蛋白或其功能衍生物的药用组合物。本发明也涉及编码牛 LAIT 蛋白或其功能衍生物的核酸分子以及纯化激活 B 细胞的天然和重组形式的上述蛋白质的方法。

### 发明背景

骨髓来源的“B”淋巴细胞，通常称为 B 细胞，是在淋巴结、血液，以及免疫系统的次级淋巴器官中存在的一种白血球。B 细胞是抗体分泌细胞，浆细胞的前体细胞，它们对体液免疫反应的诱导是主要的。

在成年人中大部分体液免疫反应的诱导包括许多在胸腺来源的 T 淋巴细胞，通常称为 T 细胞，抗原递呈细胞 ( APC ) ，和 B 细胞之间的细胞相互作用[《实验医学杂志》( J. Exp. Med. ) 147 : 1159 , 1978 ; PNAS 77 : 1612 , 1982 ; PNAS 79 : 1989 , 1989 ; 《免疫学综述》( Immunol, Rev. ) 95 : 914 , 1987 ] 。

正如目前的理解，T 细胞依赖的 B 细胞激活包括 T 细胞一旦识别抗原后的激活，该抗原与主要组织相容性复合物 ( MHC ) 所编码的蛋白质相结合由 APC 递呈，这些蛋白质表达于 APC 的细胞表面。该抗原特异的和 MHC 限制的 T 细胞 APC 相互作用导致两种细胞的相互激活，以及 T 细胞生理功能的改变，如它的辅助功能变得明显。

辅助 T 细胞可以激活抗原特异的 B 细胞。T 细胞 - B 细胞相互作用的抗原特异性因 B 细胞最终能够作为 APC 发挥作用而被保持。这样，尽管静态的 B 细胞不是有效的 APC ( PNAS 79 : 1989 , 1982 ) ，但是它们通过膜结合的免疫球蛋白与抗原特异性地相互作用，该特异性反应了其子细胞将分泌的免疫球蛋白的特异性 ( 《实验医学杂志》 ( J. Exp. Med. ) 140 : 904 , 1974 ) 。

免疫球蛋白介导的特异性 B 细胞的抗原内化 - 包括另一类 APC ，

滤泡树突状细胞, 的递呈 - 导致 B 细胞起始抗原加工过程, 上调 MHCII 类分子和 B7 的表达, 以及与 MHC 相结合的抗原衍生肽的递呈 (《实验医学杂志》 ( J. Exp. Med. ) 178 : 2055 , 1993 )。通过该途径激活的 B 细胞是激活的辅助 T 细胞的靶细胞。

T 细胞的辅助功能包括 T 细胞 - B 细胞相互作用, 以及 T 细胞来源的可溶性介质, 称为细胞因子, 与 B 细胞膜上被表达的其同源配体之间的相互作用所传递的信号。 T 细胞 - B 细胞相互作用也是 MHC 限制的, 类似于 T 细胞 - APC 相互作用 (《欧洲免疫学杂志》 ( Eur. J. Immunol. ) 12 : 627 , 1982 ; 《欧洲免疫学杂志》 ( Eur. J. Immunol. ) 12 : 634 , 1982 )。然而, 那些介导这两种淋巴细胞系之间 MHC 限制的相互作用的分子, 尤其是 T 细胞抗原受体 ( TcR ), 和 B 细胞表达的 MHC/抗原复合物的特异性相互作用并不表明 B 细胞增殖和分化的诱导 (《欧洲免疫学杂志》 ( Eur. J. Immunol. ) 18 : 375 , 1988 )。

主要的分子相互作用, 由 T 细胞 - B 细胞之间相互作用的需求来反映, 是通过 B 细胞浆膜上表达的 CD40, 和其同源配体, gp39(或 CD40L) 它表达于 T 细胞的浆膜上, 来介导的 ( PNAS 89 : 6550 , 1992 ; 《自然》 ( Nature ) 357 : 80 , 1982 )。与该模型一致的观察是随着 T 细胞 - APC 的相互作用, 后者在细胞膜上的表达增加, T 细胞 - B 细胞的相互作用亦然 ( PNAS 89 : 6550 , 1992 )。再者, 膜免疫球蛋白介导的 B 细胞与抗原的相互作用导致 CD40 在膜上的表达增加 ( Sem. in Immunol 6 : 303 , 1994 )。 CD40 与 CD40L 之间的相互作用表明了 B 细胞增殖, B 细胞分化成免疫球蛋白分泌细胞, 以及免疫球蛋白独特型转换的诱导 (《实验医学杂志》 ( J. Exp. Med. ) 198 : 1567 , 1993 )。

与该模型相一致的观察是可溶性 CD40L , 或 CD40 特异的单克隆抗体 ( mAb ) 可以诱导 B 细胞增殖并分化成免疫球蛋白分泌细胞 ( Sem. in Immunol ) 6 : 267 , 1994 ; PNAS 83 : 4494 , 1986 ; 《免疫学杂志》 J. Immunol. 140 : 1425 , 1988 )。

除了必需 T 细胞 - B 细胞相互作用之外, 许多 T 细胞来源的细胞因子, IL - 2 , IL - 4 和 IL - 5 对 B 细胞增殖和分化也是重要的。 B 细胞对这些细胞因子的敏感性很大程度上受到以前与 T 细胞相互作用的限制。这样, 随着与 T 细胞的相互作用, B 细胞增加了细胞因子特异性膜受体的表达 ( PNAS 80 : 6628 , 1983 ; 《免疫学杂志》 ( J.

Immunol.) 145 : 2025, 1990; 《免疫学杂志》( J. Immunol.) 146 : 1118, 1991)。已经证实 IL - 2 和 IL - 5 能促进激活 B 细胞的增殖 ( PNAS 77 : 1612, 1980; 《免疫学综述》( Immunol. Rev.) 52 : 115, 1980)。再者, IL - 4 和抗免疫球蛋白已经证实能够协同促进 B 细胞的增殖 ( 《实验医学杂志》( J. Exp. Med.) 155 : 914, 1982)。

在该事件中值的注意的例外是静止 B 细胞对 IL - 4 和 IL - 5 的反应。IL - 4 诱导 MHC II 类蛋白的从头转录和翻译 ( 《实验医学杂志》( J. Exp. Med.) 155 : 914, 1982; PNAS 81 : 6149, 1984; 《实验医学杂志》( J. Exp. Med.) 160 : 679, 1984), 而 IL - 5 能够在缺乏细胞增殖的情况下促进静止 B 细胞分化成免疫球蛋白高分泌细胞 ( 《欧洲免疫学杂志》( Eur. J. Immunol.) 22 : 2323, 1992)。

在任一事件中, 来自 T 细胞和 B 细胞膜分子之间分子相互作用的信号, 以及来自 T 细胞来源的细胞因子与它们在 B 细胞上的同源配体相互作用的信号均是复杂信号系统的组成部分。每一信号都驱使 B 细胞进展到激活的另一时相, 使它对随后的进展信号敏感。这些信号相互补充, 而不是单独具有驱动 B 细胞增殖和分化全过程的能力 ( 《免疫学综述》( Immunol. Rev.) 95 : 177, 1987)。

1988 年, 发现了羊初乳中的独特活性 ( 《免疫学杂志》( J. Immunol.) 140 : 1366, 1988)。采用蛋白质纯化的经典技术已经部分纯化了脯氨酸富集的蛋白质 ( PRP)。已经证明该蛋白质能够促进静止 B 细胞诱导进入细胞周期, 并且促进它们分化成免疫球蛋白高分泌细胞。很明显, 这是介导这些功能的哺乳动物蛋白质的第一例报告。

随后制备羊 PRP 特异的单克隆抗体。当 PRP 制剂通过已用抗体准备的亲和柱时, 所有的 PRP 被层析柱截获, 这通过对洗脱液和流出液的 Western 杂交分析评估。然而, 所有的 B 细胞刺激活性均见于流出液中。这样, 已发表的羊初乳中存在的 B 细胞系生物活性的特征不能归因于 PRP ( 未发表的资料)。

#### 发明概要

本发明描述一种新牛蛋白质以及编码该蛋白质的分离核苷酸序列, 该蛋白质能够激活哺乳动物来源的 B 细胞。基本纯化的 LAIT 蛋白或其转录时和/或转录后修饰的蛋白质形式可通过生化纯化来制备, 或通过重组的方法在基本上不含其它与之天然相关的蛋白质的原核或真

核宿主中进行制备。再者，本发明也包括从牛初乳乳清中纯化 LAIT 蛋白或转录时和/或转录后修饰形式的本发明 LAIT 蛋白的方法，其包括：

- (i) 对所述的样品中所包含的蛋白质进行盐析
- (ii) 利用经典的蛋白质分离技术从已在 (i) 步中盐析的蛋白质中富集和最终纯化 LAIT 蛋白。

在每种情况下所述的蛋白包含所需要的生物活性。

本发明也涉及包含编码 LAIT 蛋白质的核苷酸序列的核酸分子。该核酸分子可以是 cDNA 或基因组 DNA。

所分离的牛蛋白与人 CD14 和小鼠 CD14 具有同源性，因而也称之为牛 CD14。本发明包括激活 B 细胞的方法，尤其是通过施用 CD14，该蛋白质的重组形式，或其功能性衍生物在需要该激活的哺乳动物中激活 B 细胞的方法。

在优选实施方案中，哺乳动物是病人。

根据一方面，本发明包括将 CD14 加入到婴儿饮食配方中。本发明包括将 CD14 施用于婴儿，给婴儿喂该饮食配方是施用的优选方式。

在另一方面中，本发明包括将 CD14 掺入使之成为接种的成分。本发明包括将 CD14 和抗原施用于需要免疫的病人，施用的优选方式包括施用含 CD14 和抗原的单一制剂。

在另一方面中，本发明包括 CD14 施用于患 T 细胞免疫缺陷的病人。在优选方面中，本发明包括将 CD14 施用于患 gp39 低表达或病人 T 细胞表面完全缺乏的特定 T 细胞功能障碍的病人。

在另一方面中，本发明包括将抗 CD14 抗体施用于患功能障碍的病人，其中由于血清 CD14 高于正常水平因而病人的 B 细胞是高度活化。在优选的方面中，本发明包括将抗 CD14 抗体施用于患类风湿关节炎的患者，其中由于 B 细胞被血清 CD14 的激活而分泌类风湿因子。

本发明的一方面，涉及生产婴儿配方的方法，包括将本发明的多肽加入到该配方中。

本发明的另一方面，涉及生产含有非 CD14 抗原的疫苗的方法，包括将本发明的多肽加入到疫苗中。

本发明的另一方面，涉及用于疫苗接种的试剂盒，含有预定量的非 CD14 抗原和预定量的本发明的多肽。

本发明包括制备分泌所需特异性 mAb 的杂交瘤的方法，即将 B 细

胞与亚最适量有丝分裂浓度的 CD14 和用以产生抗体的抗原一起培养。以该方法激活的 B 细胞群富含激活的抗原特异的 B 细胞，然后将它们用于制备分泌所需特异性 mAb 的杂交瘤。

本发明包括 CD14 在制备用于需要 B 细胞激活的哺乳动物中激活 B 细胞的药物中的应用。

天然或重组 CD14 均可用于本发明。

在本发明的上下文中，术语“CD14”包括小鼠，牛或人 CD14。

#### 术语定义

根据本发明“功能性衍生物”至少保留一部分 CD14 的功能，例如与特异性抗体结合或与具有允许其利用的所述受体的细胞上的同源受体结合。本文所用的术语“功能性衍生物”包括“片断”或“CD14”的“变体”，这些术语定义如下。

CD14 的“片断”指任何亚类的多肽，即，更短的肽。术语“片断”用于指明来源于具有天然存在的蛋白序列，在 C 末端、N 末端，和其序列内的一个或多个位点包含一个或多个氨基酸缺失的 CD14 的多肽。这些片断应该保留完整 CD14 多肽或转录时和/或转录后修饰形式的 CD14 特异性的一种或多种生物活性或功能。

CD14 的“变体”是指具有相似于天然 CD14 或其片断的一级序列的多肽，这样其天然活性至少部分地保留。变体肽可以通过合成法或在编码所述多肽的 cDNA 中产生突变的方法来加以制备，该多肽保留所述多肽的生物活性，在多肽中包括缺失、插入或保守氨基酸的替代。

本文所用的术语“抗体”是能够被所述蛋白质不保守区中的独特表位结合的免疫球蛋白，因而使抗体能够区别一种蛋白质与另一种蛋白质。术语“表位”意思是指任何分子中能够被抗体结合的部位。术语“抗体”包括多克隆抗体，单克隆抗体（mAbs）或嵌合抗体。

多克隆抗体是来自抗原免疫的动物血清的异质抗体分子群。

单克隆抗体是能够结合抗原上一个独特表位的均一抗体群。MAbs 可通过本领域中的技术人员熟知的方法获得。这些抗体可以是任何一类免疫球蛋白，包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD，以及它们的任一亚类。术语“抗体”也包括完整的分子以及它们的片断，例如，Fab 和 F(ab')<sub>2</sub>，它们能够结合抗原。Fab 和 F(ab')<sub>2</sub> 缺乏完整抗体的 Fc 段，更迅速地从血液循环中清除，并且比完整抗体有更少的非特异性组织结合（Wahl 等，J. Nucl. Med. 24: 316 - 325, 1983）。

嵌合抗体是这样一种分子，其不同的部分来自不同的动物种类，例如具有来自小鼠 mAb 的可变区和来自人免疫球蛋白的恒定区的嵌合抗体。

“抗原”是能被抗体结合的一种分子或分子的一部分，它另外能够诱导动物产生能与该抗原的表位相结合的抗体。抗原可以具有一个或不

止一个表位。当抗体对多肽，片断，或其变体被述为“特异的”，或者被述为能与多肽，片断或其变体结合的时候，意思是抗原以高度选择性的方式与其相应抗体反应而不与被其它抗原激发的大量其它抗体反应。

#### 附图简述

图 1A - 1C 表示天然牛 LAIT ( nBo - LAIT ) 蛋白的纯化。图 1A 表示已装载了 50mg 62 % ( v/v )  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀物的阴离子柱 [ FPLC - Mono - Q, Pharmacia ] 的洗脱图。结合的蛋白质用 10mM Bis - tris 丙烷中 50 - 400mM 的梯度 NaCl 洗脱，同时 pH 梯度 7.5 - 9.5。表 1A 表示具有高峰活性的样品，样品#57，的生物活性，正如以前所述分离出高悬浮密度的小鼠脾 B 细胞(《免疫学杂志》( J. Immunol 131:581, 1983 )，并在 0.2ml 无血清培养基中以  $5 \times 10^4$  个细胞培养于 96 孔平底组织培养板中 ( Costar )。在含，或不含 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 的情况下加入每一样品至终浓度 10 % ( v/v )。在 40 小时时，培养物中加入 1  $\mu\text{Ci}$  的  $^3\text{H}$  - TdR，6 小时后收集到滤纸盘上，并用闪烁计数器评估胸苷摄取情况。数字代表  $\text{cpm} \times 10^{-3}$ 。图 1B 表示已装载了 20mg 样品#57 ( 图 1A ) 的分子筛柱 [ FPLC - Superdex 75, Pharmacia ] 的层析图。柱子在含 0.45M NaCl pH 8.0 的 20mM tris - HCl 中平衡。表 1B 表示高峰样品，样品#38，的生物活性，如图 1A 所述进行评估。图 1C 表示已装载了 1mg 样品#38 ( 图 1B ) 的羟基磷灰石柱 [ FPLC - 羟基磷灰石, Pharmacia ] 的洗脱图。结合的蛋白质用含 1mM NaCl pH 6.8 1 - 500mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  的梯度缓冲液洗脱。表 1C 表示高峰样品，样品#25，的生物活性，如图 1A 所述进行评估。图中的插入表示从样品#25 中取出的大约 5 $\mu\text{g}$  蛋白质的银染 SDS - PAGE 胶。左泳道：样品#25；右泳道：MW 标志物，从顶端开始分别是：97、66、45、31、21 和 14kD。

图 2 表示人 CD14 ( SEQ ID NO:5 ) 的已知序列和 nBo - LAIT 的序列片断。Bo - LAIT 片断来自亲和纯化的初乳 nBo - LAIT ( 见图 3 )。与人 CD14 残基 235 - 264 和 344 - 355 相应的片断分别是主要和次要肽，每一片断大约 18kD，用 CnBr 裂解产生，并通过反相 HPLC ( C8 柱, Pharmacia ) 分离。与人 CD14 残基 53 - 67 相应的片断是 CnBr 裂解所产生的 24kD 片断的部分序列，并通过 SDS - PAGE 分离

而且电转到 PVDF 膜上。与人 CD14 残基 19 - 36 和 151 - 165 相对应的片段是用胰蛋白酶裂解产生的，并通过反相 HPLC 分离（C8 柱，Pharmacia）。对每一片段将牛序列与人 CD14 预计序列重叠的长度标以下划线。短线表示相同氨基酸，而不同于人序列的那些被标出。

图 3 表示从牛和人中亲和纯化的初乳 LAIT 蛋白的 SDS - PAGE 和银染。泳道 1：MW 标志物，如图 1C 中所示；泳道 2：牛初乳乳清中的 62.5 % (v/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  沉淀物；泳道 3：从 #842 - Sepharose 亲和柱中 pH 2.5 的洗脱液；泳道 4：从 CD14 特异性 mAb 63D3 (PNAS 77:6764, 1980) - Sepharose 亲和柱，已装载了泳道 5 中代表的物质，中 pH 2.5 的洗脱液；泳道 5：Sephacryl S 100 HR 分离的人初乳乳清。泳道 1 - 5 中每一泳道均含 5 $\mu\text{g}$  蛋白质。5  $\times 10^4$  高悬浮密度的小鼠脾 B 细胞在指定的刺激物存在下培养于无血清培养基中至 40 小时，加入 1  $\mu\text{Ci}$  的  $^3\text{H}$  - TdR，6 小时后收集到滤纸盘上，通过液体闪烁计数仪来评估胸苷摄入，所获得的结果示于表 2，数字代表  $\text{cpm} \times 10^{-3}$ 。生物测定的详细情况如图 1A 所述。对照  $\text{cpm} \times 10^{-3}$ ：无刺激物，0.3；50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS，75.0；0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS [LPS $\downarrow$ ]，0.8；和 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$  mlgM 特异的 mAb b - 7 - 6 (《欧洲免疫学杂志》(Eur. J. Immunol.) 14:753, 1984)，0.7。

图 4A 和 4B 表示热不稳定性和抗体介导的 nBo - LAIT 活性的抑制。图 4A 表示在 95  $^\circ\text{C}$  已加热 10 分钟的指定浓度的亲和纯化的 nBo - LAIT 存在下，按图 1A 所述而培养的 5  $\times 10^4$  高悬浮密度的小鼠脾 B 细胞的胸苷摄入情况 (●)，和未被加热的 nBo - LAIT 存在下的胸苷摄入情况 (○)。在 40 小时培养物中加入  $^3\text{H}$  - TdR，6 小时后收集，然后液体闪烁计数仪评估胸苷摄入。插入表示含指定浓度 LPS 的培养物的反应，LPS 已按照对 nBo - LAIT 的处理被加热 (或未加热)。图 4B 表示在 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  亲和纯化的 nBo - LAIT 或 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 存在下，按图 4A 所述而建立的培养物的胸苷摄入。这些刺激物每一种均在指定浓度的多克隆兔 IgG 抗 - Bo - LAIT，#842，或正常兔 IgG 存在下进行培养。#842 IgG 对 nBo - LAIT 和 LPS 介导的刺激的胸苷摄入的抑制百分数示于括号中。正常兔 IgG 介导的对 nBo - LAIT 和 LPS 刺激的抑制水平分别为 9 ~ 20 %，和 12 ~ 31 %。#842 IgG 在 0.4 和 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  单独直接诱导的 CPM 分别为 454  $\pm$  53 ~ 764  $\pm$  69，对正常兔 IgG 来说，

在 0.4 和 50 $\mu$ g/ml 分别为  $297 \pm 34$  的  $420 \pm 31$ 。未刺激的对照对两组实验均为  $195 \pm 29$ 。

图 5A 表示含牛 CD14 基因的 7.1kb EcoRI - XhoI 片断的限制性图谱。限制性位点的简称是：X, XhoI; P, PstI; O, NcoI; B, BamHI; N, NotI; D, BssHI; T, BstE1I; M, SmaI; S, SacII; C, HpaI; R, EcoRV; A, SphI; G, BglII; H, HindIII; E, EcoRI。图 5B 是牛 CD14 位点的图表。阴影区表示基因的编码区，空白区是内含子序列。ATG 起始密码子上游的短线区是 5' 非翻译区，而 TAA 终止密码子下游的短线区是 3' 非翻译区。图 5C 是表示所采用的测序策略的图表。箭头表示测序的方向。片断数在右侧指明（详见正文）。

图 6 表示牛（SEQ ID NO: 1），人（SEQ ID NO: 2）和小鼠（SEQ ID NO: 3）CD14 编码区的核酸序列的比较图。第一个碱基的位置对应于 ATG 密码子的第一个核苷酸，最后一个核苷酸对应于 TAA 终止密码子的第三个核苷酸。采用 DNA STAR - Megalign 软件，利用具有重要残基表的 Clustal 法进行序列对比。在该对比中使用的人 cDNA 序列（登记号 PO8571）和小鼠 cDNA 序列（登记号 PO8571）均来自瑞士 - 蛋白质数据库。

图 7 表示牛（SEQ ID NO: 4），人（SEQ ID NO: 5）和小鼠（SEQ ID NO: 6）CD14 蛋白质氨基酸序列的比较图。氨基酸序列是从示于图 6 的相应 cDNA 序列中推导出来的。与 PAM 250 残基重要性表相结合，采用 J. Hein 所述的方法（《酶学方法》（Methods in Enzymology）183:626, 1990）将 DNA Star - Megalign 软件用于进行该序列对比。

图 8 表示用于扩增牛 CD14 cDNA 编码区的引物。图 8A 表示用于杆状病毒表达系统的正向（SEQ ID NO: 7）和反向（SEQ ID NO: 8）引物。图 8B 表示用于哺乳动物表达系统的正向（SEQ ID NO: 9）和反向（SEQ ID NO: 10）引物。

图 9 表示天然和重组牛 CD14 的免疫印迹。采用 Western 杂交分析来评估和比较 nBo - LAIT 蛋白与重组 CD14 蛋白的大小。250ng CD14 蛋白在 12.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上电泳并在 180mA 电泳转移到 PVDF 膜（Millipore）上 30 分钟。膜在溶于 TBST（20mM Tris

HCl, pH 7.5, 150mM NaCl, 0.025 % Tween 20) 的 5 % 脱脂奶粉中封闭 1 小时, 随后在补充了 5 % 脱脂奶粉的 TBST 中与浓度为 2.5 $\mu$ g/ml 的兔抗 Bo - LAIT #842 共育 1 小时。在 TBST 中将杂交的斑点冲洗 3 次, 每次 10 分钟。用偶联了辣根过氧化物酶 (BioRad) 的羊抗兔 IgG 来检测兔抗体。然后该膜用 TBST 冲洗 3 次 (10 分钟/次)。利用 ECL 试剂盒 (Amersbam) 使蛋白质显现。泳道 1: MW 标志物; 泳道 2: nBo - LAIT - 842 - Sepharose 亲和纯化的 nBo - LAIT 蛋白; 泳道 3: rBo - Sf9 - 12CA5 亲和纯化的, Sf9 昆虫细胞来源的重组牛 CD14; 泳道 4: rBo - C127 - 842 - Sepharose 亲和纯化的, C127 小鼠乳腺肿瘤细胞系来源的重组牛 CD14。

图 10 比较 nBo - LAIT 和 LPS 的增殖促进活性。按图 1A 所述制备, 培养和收集高悬浮密度的静止小鼠脾 B 细胞。在培养开始时加入指定浓度的亲和纯化的 nBo - LAIT, (按图 1 所述亲和纯化的) 或 LPS, 其来源于 *S. typhosa* (Difco)。

图 11 比较 nBo - LAIT 和 LPS 的分化促进活性。按图 1A 所述制备和培养高悬浮密度, 静止的, 小鼠脾 B 细胞。用 10 $\mu$ g/ml LPS [*S. typhosa* (Difco)], 或 500ng/ml 亲和纯化的 nBo - LAIT 开始复孔培养, 并在指定时间收集。利用商业上可获得的 ELISA 试剂盒定量测定上清中存在的 IgM 来评估累积的 IgM 产量。

图 12 比较 nBo - 和 rBo - LAIT 蛋白与 LPS 的生长促进活性。按图 1A 所述制备, 培养, 并收集高悬浮密度的, 静止的, 小鼠脾 B 细胞。在培养开始时加入指定浓度的 nBo - LAIT [按图 1A 所述纯化的], 在昆虫细胞或哺乳细胞中产生的 rBo - LAIT, 和 LPS [*S. typhosa* (Difco)]。来自昆虫细胞的重组 Bo - LAIT 是从已转染了 Bo - LAIT cDNA 的 Sf9 细胞的培养上清中亲和纯化的。表达载体包括编码来自流感血凝集素 (HA tag) 的非肽的 3' 27 聚体。亲和纯化是通过将 Sf9 上清通过 mAb 12 CA5 偶联的 Sepharose 来进行的(《细胞》(Cell) 57: 787, 1984), 其中该抗体能识别 HA 标志。来自哺乳动物表达系统, C127, 的重组 Bo - LAIT 的亲和纯化如同对 nBo - LAIT 进行的一样, 采用已偶联了 IgG 的 Sepharose, 该 IgG 是从来自兔 842 的多克隆抗血清中分离的。

图 13 表示 nBo - LAIT 对纯化的原代 B 和 T 细胞群的增殖促进活

性的比较分析。按图 1A 所述制备高悬浮密度的、静止的、小鼠脾 B 细胞。原代 T 细胞是从脾 B 细胞分离的相同动物的淋巴结中分离的。具体地说，根据制造商的说明，以及按照以前的描述（《欧洲免疫学杂志》（Eur. J. Immunol.）24：967，1994）将淋巴结悬液通过抗 Ig 柱（Biotex labora）。通过免疫荧光染色和 FACS 分析来评估 T 细胞群是  $>95\% \text{ CO}_3^+$ ，以及  $<0.5\% \text{ mlg}^+$ 。左侧表示含  $1.5 \times 10^5$  纯化的 T 或 B 细胞的培养物对指定浓度亲和纯化的 nBo - LAIT 的增殖反应。右侧表示相同数量的 B 或 T 细胞对  $50\mu\text{g/ml}$  的 LPS [ *S. typhosa* (Difco) ] 或  $1\mu\text{g/ml}$  的伴刀豆球蛋白 A (Sigma) 的增殖反应。采用无血清的培养条件，并且所有的刺激物在培养开始时加入。在 40 小时，培养物中加入  $1 \mu\text{Ci}$  的  $^3\text{H} - \text{TdR}$ ，6 小时后收集到滤纸盘上，并用闪烁计数器来评估胸苷摄入。标明的数字代表复孔培养的平均 cpm。

图 14 表示 nBo - LAIT 介导的小鼠 B 细胞增殖的胎牛血清的非依赖性。按图 1A 所述制备，培养，并收集高悬浮密度的，静止的，小鼠脾 B 细胞。无血清培养基补充指定浓度的热灭活的（ $56^\circ\text{C}$  1 小时）胎牛血清（Gibco BRL）以及不加刺激物（■）， $0.5\mu\text{g/ml}$  亲和纯化的 nBo - LAIT（○），或  $50\mu\text{g/ml}$  LPS（*S. typhosa* (Difco)）（●）。在 40 小时，培养物中加入  $1 \mu\text{Ci}$   $^3\text{H} - \text{TdR}$ ，6 小时后收集到滤纸盘上，并用闪烁计数器评估胸苷摄入。标明的数字代表复孔培养的平均 cpm。

图 15 表示包含于以下细胞中的 CD14 的 Northern 杂交分析：（1）未分离的脾细胞，（2）按图 1A 所述制备的高悬浮密度的，静止的，小鼠脾 B 细胞，以及（3）来自后者高悬浮密度静止群的 FACS 分类的  $\text{mlg}^+$  细胞。为了进行 FACS 分类，高悬浮密度的细胞与 FITC 偶联的 mAb187.1 - 对小鼠 IgK 特异的（Hybridoma 1:5，1981）- 共育。三种细胞群每一种中的  $\text{mlg}^+$  细胞的比例被指明。根据制造商的说明用 Trizol 法（Gibco BRL Life Technologies）从三种细胞群的每种  $10^7$  个细胞中分离总 RNA 并且溶于 1.2% 的甲醛凝胶中。用真空杂交系统（Pharmacia）将 RNA 转移到尼龙膜（Genescreen）上。按照膜制造商的推荐进行交联，预杂交和杂交。小鼠 CD14 特异的探针来自通过 PCR 获得的基因组小鼠 CD14 片断，PCR 采用正向引物  $5' - \text{CTA GAA TTC TCT CCC GCC CCA CCA GAG CCC TGC G} - 3'$ （SEQ ID NO :

11 ) , 和反向引物 5' - CTA GAA TTC TTA AAC AAA GAG GCG ATC TCC TAG G - 3' ( SEQ ID NO : 12 ) 。扩增的片断通过琼脂糖凝胶电泳分离, 酶切并纯化。L32 cDNA 探针 ( Nucl. Acid. Res. 16 : 10751 , 1988 ) , 对大核糖体亚单位蛋白组成性表达的 mRNA 是特异的, 被用于标化 RNA 负荷 ( loading ) 。该探针 ( 每种 100ng ) 用寡核苷酸标记试剂盒 ( Pharmacia ) 标记至特异性活性  $0.2 - 1 \times 10^9$  cpm/ $\mu$ g DNA 。然后膜在 65 °C 于  $0.2 \times$  SSC , 1 % SDS 中冲洗 2 小时并对 X 光胶片 ( Kodak, Biomax MS ) 曝光 1 - 5 天。

图 16 表示已按图 15 所述为  $mlg^+$  细胞而进一步纯化的, 或未纯化的, 高悬浮密度, 静止的, 小鼠脾 B 细胞对 50 $\mu$ g/ml LPS [ *S. typhosa* ( Difco ) ] 和 0.5 $\mu$ g/ml 亲和纯化的 nBo - LAIT 的反应。建立培养, 加入氘标记的胸苷, 收集, 并按对图 1A 所述来评估胸苷摄入。标明的数字代表复孔培养的平均 cpm 。

图 17 表示重组 Bo - LAIT 介导的 B 细胞激活对 CD40 的非依赖性。高悬浮密度的, 静止的, 小鼠脾 B 细胞分离于常规 C57BL/6 小鼠。或者通过 CD40 位点的靶向破坏而制备的 CD40 缺陷动物 ( 《免疫学》 ( Immunity ) 1 : 167 , 1994 ) 。细胞 (  $1.5 \times 10^5$  ) 在 10 $\mu$ g/ml LPS , 或指定浓度的来源于昆虫细胞表达系统的 rBo - LAIT 存在下进行培养。如图 1A 所述加入胸苷并收集培养物。标明的数字代表复孔培养的平均 cpm 。

图 18 比较来源于人 ( nHu ) , 牛 ( nBo ) 和小鼠 ( nMo ) 的天然 CD14 的银染 ( 左侧 ) 和免疫杂交 ( 右侧 ) 分析。按以前所述, nHu 从肾病病人的尿中分离 ( 《欧洲免疫学杂志》 ( Eur, J. Immunol. ) 24 : 1779 , 1994 ) 。按图 3 所述 nBo 从牛初乳中亲和纯化。nMo 从小鼠杂交瘤 OKT3 ( PNAS USA 77 : 4914 , 1980 ) 的上清中分离, 利用 CD14 特异性 mAb 3C10 固化的 Sepharose 4B 通过亲和层析进行 ( 《实验医学杂志》 ( J. Exp. Med. ) 15 : 126 , 1983 ) 。为了进行银染, 1 $\mu$ g 的每种样品在 200V 于 10 % SDS - PAGE 上分离 45 分钟。按照制造商的说明蛋白质通过银染 ( Biorad ) 使之显色。为了进行免疫杂交, 250ng 样品在 180mA 通过 10 % SDS - PAGE 分离 45 分钟, 在 180mA 电泳转移到 PVDF 膜 ( Millipore ) 上 30 分钟。膜在溶于 TBST ( 20mM Tris HCl , pH 7.5 , 150mM NaCl , 0.025 % 吐温 20 ) 的 5 % 脱脂奶粉中

封闭 1 小时，随后在补充了 5 % 脱脂奶粉的 TBST 中与浓度为  $10\mu\text{g/ml}$  的 mAb 3C10 (《实验医学杂志》( J. Exp. Med. ) 15 : 126, 1983 ) 共育 1 小时。杂交斑点在 TBST 中冲洗 3 次，每次 10 分钟。用偶联了辣根过氧化物酶 ( BioRad ) 的羊抗小鼠 IgG 来检测小鼠抗体。然后膜用 TBST 冲洗 3 次 ( 10 分钟/次 )。用 ECL 试剂盒 ( Amersham ) 使蛋白质显色。

图 19 比较分析刺激小鼠 B 细胞增殖的来源于人 ( nHu )，牛 ( nBo ) 和小鼠 ( nMo ) 的天然 CD14。这三种蛋白按图 18 中所述来纯化。评估按图 1A 中所述而分离的高悬浮密度的，静止的，小鼠脾 B 细胞对指定浓度的这三种蛋白的反应。在 40 小时时培养物中加入  $1\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  - TdR 并在 6 小时时收集。标明的数字代表刺激指数，该数是用不含刺激物的复孔培养的平均 cpm 除以用指定浓度的 nHu、nBo, 和 nMo 刺激的复孔培养的平均 cpm 而得到的。

图 20A 和 B 分别表示 nBo - LAIT 对从脐血和扁桃体中分离的人 B 细胞的增殖促进活性。图 20A 表示通过阳性选择而分离的脐血 B 细胞的胸苷摄入。脐血淋巴细胞悬液用荧光标记的 B 细胞标记物 CD72 特异的 mAb 来加以染色。然后在荧光激活的细胞分类器 ( FACStar Plus, Becton Dickenson ) 上分离 CD72 阳性的脐血淋巴细胞至纯度  $>98\%$ 。不存在刺激物或  $2\mu\text{g/ml}$  nBo - LAIT 存在下，按图 1A 所述来培养 B 细胞 (  $1.5 \times 10^5$  )。无另外的刺激物，或  $2\mu\text{g/ml}$  nBo - LAIT 存在下，B 细胞也培养于已用两种 mAbs 预包被 9 小时的培养孔中，两种 mAbs 一种是人 Igk 特异的 [ LO - HK3, (《大鼠杂交瘤和大鼠单克隆抗体》“Rat Hybridomas and Rat Monodonal Antibodies” ed, H. Bazin, CRC 出版社, Boca Raton, FL, 美国) ]，另一个是人 Ig $\lambda$  特异的 [ LO - HL2, (《大鼠杂交瘤和大鼠单克隆抗体》“Rat Hybridomas and Rat Monodonal Antibodies” ed, H. Bazin, CRC 出版社, Boca Raton, FL, 美国) ]，每一种使用  $1.5\mu\text{g/ml}$  的包被浓度。在 60 小时时培养物加入  $1\mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$  - TdR, 12 小时后收集到滤纸盘上，用闪烁计数器评估胸苷摄入。图 20B 表示采用阴性选择而制备的 B 细胞所获得的结果。具体地说，白细胞悬液用生物素化的 CD3 $\epsilon$  特异的 mAb ( Becton Dickenson ) 标记，随后用含“微珠”的用铁偶联的亲合素 ( Becton Dickenson ) 处理。标记的细胞群通过 MACS

( Becton Dickenson )，并收集流出液。通过细胞系特异性 mAbs 的免疫荧光染色所进行的评估，该细胞群含 <1 % T 细胞，和 >97 % B 细胞。如图 1A 所述来培养 B 细胞 (  $1.5 \times 10^5$  )。正如对脐血 B 细胞的处理一样，扁桃体 B 细胞在存在和缺乏培养板结合的人 Igk 和  $\lambda$  特异性 mAbs 的条件下进行培养，但在该情况下，培养孔用浓度为  $0.5\mu\text{g/ml}$  的每种 mAbs 进行预包被。培养物加入胸苷，收集并按对图 20A 所述的那样评估胸苷摄入。

图 21 表示分娩后乳房奶中 CD14 随着时间的浓度。乳房奶在分娩后指定的时间从两位供者 ( A. D. 和 S. B. ) 中收集。制备澄清的乳清，并按制造商的说明用 CD14 特异的 ELISA 试剂盒 ( 1BL, Hamburg ) 来评估所含 CD14 的浓度。

#### 优选实施方案的描述

从下所述的实验说明从初乳乳清中纯化天然的牛 LAIT 蛋白 ( nBo - LAIT )，本文也称为牛 CD14。纯化的 nBo - LAIT 的氨基酸序列分析已列出，而且与人 CD14 的同源性已证实。纯化人 CD14 的方法已列出。从杂交瘤上清中纯化小鼠 CD14 的方法已列出。

对亲和纯化的初乳 Bo - LAIT，人初乳 CD14，来源于尿的人 CD14，和来源于杂交瘤上清的小鼠 CD14 描述了体外的 B 细胞刺激试验。来自小鼠的高悬浮密度静止的脾 B 细胞在对来自这三种的 LAIT 蛋白的反应中能进入并进展完成细胞周期，而对来自牛的 LAIT 蛋白的反应中则分化成免疫球蛋白的高分泌细胞。这些激活事件发生在成分明确的无血清培养基中，而且也证明培养基中胎牛血清的存在不影响 LAIT 蛋白介导的 B 细胞激活。实验证实 nBo - LAIT 特异地激活小鼠 B 细胞，而不激活小鼠 T 细胞，而且 LAIT 蛋白激活不能检测到 CD14 mRNA 的 B 细胞群，这些实验被描述。也描述了证实牛 CD14 诱导不表达 CD40 的 B 细胞的生长的实验。

本文描述了编码牛 CD14 的基因组 DNA 和 cDNA 的分离，克隆和测序。与文献中已知的小鼠和人 CD14s 的序列比较表明 Bo - LAIT 和这些以前已知的 CD14s 的序列相关性。与重组牛 CD14 相关的 B 细胞的增殖和分化也被描述。

描述了重组牛 CD14 在昆虫和哺乳动物系统中的表达方法。具体地说，杆状病毒表达载体被用于帮助重组蛋白在昆虫细胞中的表达。天然

Bo - LAIT ( nBo - LAIT ) 和来源于杆状病毒表达系统的重组 Bo - LAIT ( rBo - LAIT ) 对 B 细胞增殖和分化特性的比较表明后者是功能性的, 并且具有 nBo - LAIT 特异活性的大约 50 %。

将小鼠乳腺癌细胞系, C127, 用作编码来自牛的 CD14 的 cDNA 的受者。cDNA 被克隆进牛乳头瘤病毒表达载体中。建立稳定的 C127 转染体, 并通过亲和层析从汇合的 C127 上清中分离出重组 CD14 蛋白。昆虫细胞和 C127 来源的重组 LAIT 蛋白的 Western 杂交分析表明在两个表达系统中产生了不同的转录时和/或转录后的修饰体。哺乳动物来源的重组牛 CD14 的特异活性与昆虫细胞来源的重组蛋白相同。

对昆虫细胞和哺乳动物细胞来源的天然 Bo - LAIT 和重组牛 CD14 所支持的 B 细胞增殖促进活性进行了比较。再者, 描述了天然 Bo - LAIT 活性对人 B 细胞的增殖促进活性, 其中 B 细胞是从扁桃腺, 或从脐血中分离的。结果证实从新生儿或成年人中分离的人 B 细胞是对 Bo - LAIT 介导的增殖敏感的, 正如小鼠 B 细胞一样。

已经证明人初乳, 以及分娩后 78 天的乳房奶中存在的 CD14 的浓度是健康供者血清中观察到的浓度的 3 ~ 20 倍。

## 方法

### 牛 LAIT 蛋白的纯化

从刚分娩的牛的第一次乳房泌乳中获得 5 升以上的初乳。

( i ) 首先将 4420g 初乳离心 30 分钟以除去细胞和细胞残片来制备澄清的初乳乳清。该离心的上清再在 250,000g 离心 2 小时。弃去漂浮的脂质和沉淀的酪蛋白, 并且对澄清的初乳乳清进行进一步的分离。

在体外评估每一种分离技术来源的每一样品的 B 细胞生长促进活性。这样, 每一样品在宽的浓度范围来评估它刺激小鼠脾来源的高悬浮密度, 静止的 B 细胞增殖的能力, 这正如以前所述(《免疫学杂志》( J. Immunol ) 131 : 581, 1983 )。在这些分析中均采用成分明确的无血清培养基 [ IMDM ( Gibco ), 补充  $5 \times 10^{-5}$  2 -  $\beta$  - 巯基乙醇, 5 $\mu$ g/ml 铁饱和的转铁蛋白 ( Boehringer, Lewes, GB ), 0.5mg/ml 脱脂 BSA ( Boehringer ), 100U/ml 青霉素 ( Gibco ), 100 $\mu$ g/ml 链霉素 ( Gibco ), 和必需氨基酸]。同时结合亚有丝分裂浓度的 LPS ( 0.25 $\mu$ g/ml ), 直接检测下述分离计划中获得的样品。因为 LAIT 蛋白接近纯净, 所以表现它直接的促有丝分裂特性, 这将在以下加以描

述。

( ii ) 利用在 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 中的系列沉淀来完成初乳乳清制备物中所含蛋白质的盐析。所采用的增加的盐浓度的顺序是42 % : 50 % : 62 % : 65 % ( v/v ) 硫酸铵 ( AS )。这样, 在42 % 沉淀的沉淀物上清中的AS 浓度增加到50 %; 回收在50 % 沉淀的物质, 然后在剩余上清中的AS 浓度增加到62 %, 以此类推。每次AS 沉淀的小团溶于10mM Tris - HCl pH 8.0, 它含0.15M NaCl 和1mM AEBSF ( TNAEBSF )。这些样品进行脱盐并用10DG 柱将缓冲液换成TNAEBSF, 然后测定生物活性。根据以上步骤大部分B 细胞的增殖促进活性分离于62 % AS 的沉淀物 ( 数据未列 )。

( iii ) 随后富集活性, 并用三步系列蛋白质分离技术最终将其纯化。50mg 62 % AS 富集的样品加到阴离子交换柱上, 用溶于10mM Bis - tris 丙烷的50mM ~ 400mM NaCl 的盐梯度来分离蛋白质, 同时pH 梯度7.5 ~ 9.5。图1A 表示从这个柱上得到的洗脱图, 而表1A 表示含高峰活性的样品, 样品# 57。然后20mg 样品# 57 加到已在含0.45M NaCl pH 8.0 的20mM Tris - HCl 中平衡的分子筛柱上。该分离的洗脱图见图1B, 高峰样品# 38 的活性见表1B。

表 1A	CPM $\times 10^{-3}$
无刺激物	0.8
LPS 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	152.5
LPS 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	3.9
样品 57 + 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS	108.7

表 1B	CPM $\times 10^{-3}$
无刺激物	0.4
LPS 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	102.1
LPS 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	1.3
样品 36 + 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS	76.0

然后将1mg 样品# 38 加以1mM NaCl 的羟基磷灰石柱上, 并用pH 6.8 1 - 500mM 的梯度磷酸钾洗脱。洗脱图见图1C, 相关活性见表1C。

表 1C	CPM $\times 10^{-3}$
无刺激物	0.7
LPS 50 $\mu$ g/ml	135.2
LPS 0.25 $\mu$ g/ml	3.5
样品 25 + 0.25 $\mu$ g/ml LPS	112.0

图 1C 中的插入代表银染之后具有高峰活性的样品的 SDS - PAGE 分析, 并且证实了具有相对分子量 46 - 50kD 的单一主要条带。

#### 牛 LAIT 蛋白的序列分析

对纯化的 nBo - LAIT 进行序列分析。发现 N 末端是封闭的。用溴化氰, 或胰蛋白酶水解该物质。获得 5 个片断并在测序前用反相 HPLC, 或 SDS - PAGE 然后电转到 PVDF 上来纯化这些片断。

如图 2 所示, 5 个片断均与人 CD14 对比, 具有明显的同源性。

#### 从牛和人初乳中亲和纯化 LAIT 蛋白

用经典蛋白质分离技术分离的 nBo - LAIT 被用于制备兔( # 842 ) 多克隆抗体。该抗血清的 IgG 部分在蛋白质 A - Sepharose 上纯化, 然后偶联于 Sepharose 4B。

nBo - LAIT 和人 CD14 ( HuCD14 ) 的序列同源性表明 Bo - LAIT 可能是 CD14 的牛同源物。通过用可获得的 HuCD14 特异的单克隆抗体 ( mAb ) 制备亲和柱来对此进一步探索。该抗体, 63D3 ( PNAS 77: 6764, 1980 ), 是在包含已偶联于 Sepharose 4B 的 mAb 187.1 [ 大鼠抗小鼠 Kappa ( 杂交瘤 1:5, 1981 ) ] 的亲和柱上从相应的杂交瘤血清中纯化的, 然后将纯化的 mAb 偶联于 Sepharose 4B。

如上所述, 用硫酸铵对牛澄清的初乳乳清进行系列盐析。人初乳乳清在 Sephacryl S 100 HR 柱上进行分离。然后含高峰 B 细胞增殖促进活性的样品用针对牛来源物质的 842 - Sepharose 柱, 或用针对人来源物质的 63D3 - Sepharose 柱加以亲和纯化。

亲和纯化的初乳 Bo - LAIT, 和亲和纯化的人初乳 CD14 的 SDS - PAGE 分析见图 3, 相关的 B 细胞增殖促进活性见表 2。正如所示, 从两种初乳制备物, p46 - 50 牛物质 ( 图 3, 泳道 3 ) 和 p50 - 52 人分子 ( 图 3, 泳道 4 ), 中分离出优势条带。

表 2	牛#842 pH 2.5 洗脱液	人 6303 pH 2.5 洗脱液
100ng/ml	20.00*	0.3
10ng/ml	1.49	0.3
· +LPS↓	16.5	21.1
· +b-7-6	5.17	8.5

\* 数字代表培养 40 小时时的  $\text{cpm} \times 10^{-3}$ 。

表 2 所示的生物活性证明亲和纯化的 Bo - LAIT 在浓度 100ng/ml 时，能刺激静止小鼠 B 细胞的增殖。当以 10ng/ml 加入时该物质不再是促有丝分裂的，但是同时加入亚促有丝分裂浓度的 LPS，或小鼠 IgM，b - 7 - 6 特异的 mAb 时可获得共刺激（《欧洲免疫学杂志》（Eur. J. Immunol.）14 : 753，1984）。亲和纯化的人物质在检测的浓度本身不是促有丝分裂的，但是在 10ng/ml 时，B 细胞增殖被激活，具有与牛物质同样有效的共刺激。

nBo - LAIT 的生物活性是热不稳定的。如图 4A 所示，亲和纯化的 Bo - LAIT 在 95 °C 处理 10 分钟消除其相关的 B 细胞生长促进活性。对 LPS 进行相似处理不影响其活性（图 4A 的插入）。再者，多克隆抗体 - Bo - LAIT，# 842，有效地阻断 nBo - LAIT 的 B 细胞生长促进活性，然而不影响 LPS 的活性。见图 4B 和插入。

#### 基因组牛 CD14 的分子克隆

用人 CD14 cDNA（从 R. Ulevitch, Scripps 研究所获得）1.5kb 的片断来筛选牛基因组 EMBL3 SP6/T7  $\lambda$  文库（Clontech）。获得 15 个阳性信号，选择最强的信号，克隆“B2”来进一步分析和克隆牛 CD14。

从克隆 B2 分离和纯化的噬菌体 DNA 具有大约 15kb 的插入片断。纯化的 DNA 被酶解，获得的 7.1kb 的 EcoR1 - XhoI 片断 - 含人 CD14 的同源序列 - 被亚克隆进 pBluescriptSK<sup>+</sup>（Stratagene）。用多种酶酶切再与人 CD14 探针酶切获得的限制性图谱能在克隆片断内定位牛 CD14 基因（图 5A）。限制性图谱进一步用于将更短的几个片断（I - IV）亚克隆进 pBluescriptSK<sup>+</sup>，并且随后测序大约 5kb 含全长牛 CD14 基因的片断（图 5C）。片断 I（EcoR1 - BamHI；3.2kb）；II（PstI - PstI，1.35kb）；III（PstI - PstI，0.3kb）；和 IV（PstI

- XhoI, 0.95kb) 被用于构造巢式重叠的单向缺失。这些片断提供了牛 CD14 位点的相邻序列。图 5B 描述了牛 CD14 基因组片断的结构。

#### 牛 CD14 cDNA 的分子克隆

从牛外周血单核细胞中分离 Poly(A<sup>+</sup>) RNA, 并且用 Gigapack II Packaging Extract (Stratagene) 来包装重组λ噬菌体 DNAs。采用带节省时间 cDNA 合成试剂盒的 Excell EcoRI/CIP 载体 (Pharmacia) 来制备 cDNA 文库。

通过 PCR 用从牛基因组 CD14 片断的编码翻译区来源的探针筛选文库 (详见以下描述携带牛 CD14 片断的杆状病毒重组表达载体的制备部分)。探针通过随机六核苷酸引物第二链的合成用 <sup>32</sup>P 标记 (Oligolabelling 试剂盒, Pharmacia Biotech)。筛选过程是在高度严格的条件下进行 (0.1 × SSC, 1% SDS, 65 °C 3 小时)。所获得的克隆之一 (ExCell/BoCD14 - 1), 含 1.4kb 的插入片断, 它被亚克隆进 pBluescriptSK<sup>+</sup>, 并用含渐进重叠单向缺失的 pBS/BoCD14 亚克隆 (Nested Deletion 试剂盒, Pharmacia) 进行测序。

该牛 CD14 cDNA 克隆由 1327 bp 组成。ATG 起始密码子的下游是 1116 nt 的开放阅读框架, TAA 终止密码子在核苷酸 1202。开放阅读框架的旁侧是 82bp 的 5' 非翻译序列和 122bp 的 3' 非翻译序列。多聚腺苷酸信号, 5' - ATTA AAA - 3', 位于终止密码子 3' 的 105bp 处。

牛 CD14 基因组和 cDNA 序列的序列比较表明它们从 5' cDNA 的起始点开始是共线性的 (colinear), 直至紧挨 ATG 起始密码子之后的第一个和唯一的内含子 (88bp)。编码序列的其余部分未受影响。这样, 以前对人和小鼠 CD14 描述的内含子 - 外显子结构在牛 CD14 中是明确保守的。牛 CD14 cDNA 翻译的核苷酸序列与人和小鼠 CD14 cDNA 的相同区比较表明在编码区分别有 74.2% 和 62.6% 的核苷酸相同 (图 6)。

牛 CD14 蛋白质的一级结构是从 cDNA 序列中推导出来的, 由 374 个氨基酸组成。第一蛋氨酸之后是 15 个疏水和/或中性的残基, 典型的真核细胞信号肽。牛 CD14 氨基酸序列与人和小鼠 CD14 的序列比较表明分别有 73.1% 和 62.3% 的相同 (图 7)。有三个潜在的 N 键糖基化位点 (Asn - X - Thr/Ser), 所有这些位点在人和小鼠 CD14 中均是保守的。再者, 牛 CD14 包括富含 10 个亮氨酸的重复基元 (LXXLXL),

与人和小鼠 CD14 相同(《免疫学杂志》( J. Immunol 145 : 331 , 1990 )。重组牛 CD14 在昆虫细胞中的表达

在制备编码重组 CD14 蛋白的 DNA 片断的过程中, CD14 翻译区的全长片断通过 PCR 进行制备。根据从牛 CD14 cDNA 获得的序列信息来设计特异的 PCR 引物对。5'端的 PCR 引物包括: NheI 的两个识别序列; 一个 Kozak 序列; ATG 起始密码子; 和翻译编码区最初的 17 - 21 核苷酸。3'端的 PCR 引物包括: NheI 的两个识别序列; 翻译编码区最后的 21 - 24 个核苷酸直至但不包括 TAA 终止密码子(图 8A)。

牛 CD14 的翻译区用 7.1kb 的 EcoRI - XhoI 基因组 CD14 片断(见上述)作为模板来进行扩增。PCR 用 Pwo DNA 聚合酶(Boehringer)进行。扩增方法包括在 100 $\mu$ l 的终体积中加入 5ng 的模板 DNA, 10mM Tris - HCl pH 8.85, 25mM KCl, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 250mM 的每种 dNTP, 250nM 的每种引物, 和 5 个单位的 DNA 聚合酶。用 DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer) 在 70 °C 退火温度对样品扩增 30 个循环。

扩增的片断用 NheI 酶切, 并亚克隆进杆状病毒转移载体 pETL - HA (C. Richardson, OC1/Amgen) 中多面体启动子的下游。该载体来自 pETL (《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology) 39: 161, 1995), 并含编码流感凝集素(HA)来源的非肽的 3' 30bp NheI - BamHI DNA 片断, 随后是终止密码子 TAG (5' - TAC CAA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT TAG - 3') (SEQ ID NO: 13)。重组转移载体每个与野生型杆状病毒苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(AcMNPV, Linear Transfection Module, Invitrogen)共转染进 Sf9 细胞中(《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology) 39: 161, 1995)。根据已建立的方案筛选出重组杆状病毒克隆并纯化(《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology) 39: 161, 1995)。以 5 - 10:1 的倍数用重组杆状病毒感染 Sf9 细胞。

分析时间过程以测定感染的 Sf9 细胞分泌重组 CD14 蛋白所必须的最适时间段。用抗 - HA 单克隆抗体 12CA5(《细胞》(Cell) 57: 787, 1984) 对不同时间点所收集的细胞培养基进行免疫杂交分析表明在 96 小时时重组 CD14 蛋白的表达达到最大水平。在随后的实验中选择该时间段以制备生物试验用的重组蛋白(见下)。Sf9 来源的重组牛 CD14

的 Western 杂交分析见图 9 所示。

### 重组牛 CD14 在哺乳动物细胞中的表达

我们采用改变版的 pBPV Episomal 哺乳动物表达载体 ( Pharmacia ) 以获得重组牛 CD14 在哺乳动物细胞中的稳定表达。为了能够直接筛选转化的细胞, pBPV 通过包括新霉素抗性基因而进行改良。该抗性基因插入到表达框上游 3.4kb 处。为此, 来自 pBCMGSneo ( 《欧洲免疫学杂志》 ( Eur. J. Immunol ) 18 : 98 , 1988 ) , 1.95kb 的 HindIII - XbaI 片段被亚克隆进 pCRII ( Invitrogen )。重组构建体, pCRII - neo , 被纯化, 并通过 PCR 扩增克隆的片段。设计 PCR 引物以使 SalI 的识别序列包含在 5' 和 3' 端。引物序列互补于 pCRII 载体的多聚连接子区, 位于 HindIII ( 引物 A ) 和 XbaI ( 引物 B ) 克隆位点的旁侧。

引物 A: 5' - GCA GTC GAC ACT ATA GAA TAC TCA AGC - 3'  
( SEQ ID NO : 14 )

引物 B: 5' - TTC GTC GAC ATT GGG CCC TCT AGA - 3'  
( SEQ ID NO : 15 )

终产物用 Sal I 酶切, 凝胶纯化, 并亚克隆进 pBPV 的 Sal I 克隆位点, 转录方向与所含的表达框的方向相同。进行改良表达载体, pBPVneo - 13 , 的质粒制备 ( Plasmid Maxi 试剂盒, Quiagen )。

编码牛 CD14 翻译区的 DNA 片段通过 PCR 扩增 pETL - HA 载体中的基因来制备。该扩增反应中所用的 5' 端 PCR 引物包括: XhoI 识别序列; 随后是 NheI 识别序列 ( 含在 pETL - HA 载体中 ); Kozak 序列; ATG 起始密码子; 和翻译区最初的 11 - 13 个核苷酸。3' 端的核心 PCR 引物包括被延伸的 HA 编码序列, 对 5' 序列来说, 包括一个 XhoI 识别序列。引物见图 8B。

PCR 用 Pwo DNA 聚合酶 ( Boehringer Mannheim ) 进行。扩增方法包括在 100 $\mu$ l 的终体积中加入 5ng DNA 模板, 10mM Tris - HCl pH 8.85, 25mM KCl, 5mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 250mM 的每种 dNTP, 250nM 的每种引物, 和 5 个单位的 Pwo DNA 聚合酶。样品在 70 °C 退火温度用 DNA Thermal Cycler ( Perkin Elmer ) 扩增 30 个循环。

扩增的片段用 XhoI 酶切并且凝胶纯化。这些片段然后亚克隆进

pBPVneo - 13 中小鼠金属硫蛋白 1 启动子的下游。亚克隆之前, pBPVneo - 13 用适当的限制性酶预处理, 并用牛小肠磷酸酶去磷酸化。重组质粒用 Plasmid Maxi 试剂盒 ( Quiagen ) 进行制备。

以  $20\mu\text{g}$  DNA/ $10^7$  个细胞, 将重组质粒 ( pBPVneo 13 - BoCD14 ) 转入小鼠乳腺肿瘤细胞系, C127 ( PNAS 78 : 2727 , 1981 )。用 Gene pulser ( Bio - Rad 实验室) 在  $960\mu\text{F}/280\text{v}$  通电穿孔来完成 DNA 转移。在  $1.5\text{mg}/\text{ml}$  G418 ( Life Technologies ) 的存在下筛选出稳定转化体。

高表达膜 CD14 的转染体 ( 未转染的 C127 对 CD14 是阴性的 ) 通过免疫染色, 随后用 Becton Dickenson FACStar Plus 进行荧光激活的细胞分类来加以富集。外源蛋白质的膜表达水平与转染的 C127 细胞 48 小时汇合培养物上清中回收的分泌 CD14 的量密切相关。不象昆虫细胞中合成的重组物质的纯化, 已发现用 12CA5 - Sepharose 亲和柱亲和纯化 C127 来源的物质是不可能的。这可能是由于 C127 细胞来源的重组蛋白质上缺失了 C 末端 HA 标志。因此, C127 来源的重组牛 CD14 在 842 - Sepharose 上亲和纯化。C127 来源的重组牛 CD14 的免疫杂交分析见图 9 所示。

比较 nBo - LAIT 和 LPS 的增殖和分化促进活性

示于图 10 的结果说明了天然 Bo - LAIT 支持高悬浮密度的, 静止的, 小鼠脾 B 细胞的增殖, 效率大约为 LPS 的 200 倍。这样, nBo - LAIT 在  $50\text{ng}/\text{ml}$  诱导 DNA 合成, 水平与  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 存在时所观察到的结果相当。

nBo - LAIT 诱导 B 细胞增殖的能力与它诱导高悬浮密度, 静止的, 小鼠 B 细胞分化至免疫球蛋白分泌细胞的能力相一致。如图 11 所示, nBo - LAIT  $500\text{ng}/\text{ml}$  累积诱导的 IgM 量可与  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 诱导的量相当。评估培养 24 小时内的 IgM 分泌量。  $500\text{ng}/\text{ml}$  的 nBo - LAIT 在 48 - 72 小时培养的 24 小时之内; 72 - 96 小时; 和 96 - 120 小时分别诱导  $956 \pm 10\text{ng}/\text{ml}$ ;  $754 \pm 8.7\text{ng}/\text{ml}$ ; 和  $25 \pm 1.4\text{ng}/\text{ml}$  IgM。  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS 刺激的培养所获得的相应值分别为:  $1442 \pm 71\text{ng}/\text{ml}$ ;  $874 \pm 32\text{ng}/\text{ml}$ ; 和  $183 \pm 3\text{ng}/\text{ml}$ 。这样, nBo - LAIT 以效率可比于用目前已知的最强刺激物刺激 B 细胞时所观察的效率, 具有诱导高悬浮密度静止的小鼠 B 细胞分泌免疫球蛋白的能力。再者, 它在 LPS 浓度的 1

- 10 % 时仍具有诱导的能力。

nBo - LAIT 诱导小鼠静止 B 细胞独特型转换的能力进行了评估。上述培养物来源的上清也评定了 IgG 独特型的存在。已观察到 500ng/ml nBo - LAIT 和 10 $\mu$ g/ml LPS 分别诱导 IgG1 累积量 ( ng/ml 第 5 天 ) 是  $7.0 \pm 0.1$  和  $5.6 \pm 0.6$  ; IgG2a :  $358 \pm 3$  和  $406 \pm 8$  ; IgG2b :  $8 \pm 1$  和  $11 \pm 2$  ; IgG3 :  $75 \pm 5$  和  $75 \pm 0.5$  ; 以及 IgA :  $6.5 \pm 1.5$  和  $5.0 \pm 0.3$  。这样, nBo - LAIT 在缺乏 T 细胞时有能力诱导静止小鼠 B 细胞的某些独特型转换。

比较 nBo - 和 rBo - LAIT 蛋白的增殖促进活性

昆虫细胞和哺乳细胞来源的重组形式的牛 CD14, 均具有诱导高悬浮密度, 静止的, 小鼠 B 细胞增殖的能力。如图 12 所示, 昆虫细胞来源的, 并在 12CA5 - Sepharose 上纯化的 rBo CD14 在 0.2 - 3 $\mu$ g/ml 的浓度时诱导强烈的 DNA 合成。哺乳动物表达系统来源的重组物质支持可比的活性, 两种重组形式在 ng/ml 浓度均支持 B 细胞增殖, 与初乳来源的 nBo - LAIT 所观察到的活性可比。

通过经典蛋白质分离技术, 或亲和纯化从牛初乳中分离的 nBo - LAIT 介导的生物活性, 是由被观察的蛋白质所介导的确定证据来自评估重组牛 CD14 介导的生物活性。如图 9 所示, 没有重组形式的牛 CD14 的表观分子量与 nBo - LAIT 相同。所观察到的表观分子量上有差异的原因是不清楚的, 但可能是因为不同的转录时和/或转录后修饰, 核心蛋白的不同大小, 或两者兼而有之。单核细胞来源的可溶性 CD14 已有文献报道并能以三个已知的机制之一进行制备, 每种机制将会导致不同分子量的蛋白质。它可以全长分子被分泌 (《欧洲免疫学杂志》( Eur, J. Immunol. ) 23 : 2144, 1993 ;《欧洲免疫学杂志》( Eur, J. Immunol. ) 25 : 604, 1995 ), 膜表达的 GPI 连结的形式可被磷脂酶裂解 (《免疫学杂志》( J. Immunol. ) 141 : 547, 1988 ; EMBO J. 13 : 1741, 1994 ), 以及膜表达的 GPI 连结的形式可被丝氨酸/苏氨酸蛋白酶裂解, 假设它本身可以表达在单核细胞的外浆膜上, 并以尚未理解的方式被激活 (《免疫学杂志》( J. Immunol. ) 147 : 1567, 1991 ), 仍需确定 rBo - LAITs 和初乳来源的 nBo - LAIT 不同的表观分子量是否是因为它们各自的表达系统所支持的重组物质不同的转录时和/或转录后修饰, 或不同的核心蛋白大小, 或两者兼而有之。

nBo - LAIT 的增殖促进活性是 B 细胞特异的

检测已经观察到的 nBo - LAIT 对小鼠 B 细胞的生物活性, 对小鼠 T 细胞生理功能的影响。分离纯化的 B 细胞的确对 nBo - LAIT 发生反应的事实不能排除 Bo - LAIT 也能激活 T 细胞的可能性。

按以前所述 (《欧洲免疫学杂志》(Eur, J. Immunol.) 24 : 976, 1994) 淋巴结 T 细胞在抗 Ig 柱上 (Biotex Labora) 通过阴性选择来加以分离。根据免疫荧光染色和 FACS 分析, 所获得的流出细胞群含 >95 % CD3<sup>+</sup> 细胞和 >0.5 % mlg<sup>+</sup> 细胞。高悬浮密度的脾 B 细胞也从同一小鼠中分离, 淋巴结 T 细胞和脾 B 细胞均被评估它们对 nBo - LAIT 的反应。通过分析它们对 B 细胞特异性有丝分裂原 LPS 的反应, 和 T 细胞特异性有丝分裂原, 刀豆蛋白 A (ConA), 的反应来功能性评估这些细胞群的纯度。如图 13 的右侧所示, 是 B 细胞, 而不是 T 细胞, 对 LPS 反应, 伴随大量的 DNA 合成, 是 T 细胞, 而不是 B 细胞, 对刀豆蛋白 A 发生反应。如左侧所示, 在检测的剂量范围 T 细胞不对 nBo - LAIT 发生反应, 而 B 细胞对浓度为 10ng/ml 或更高的 nBo - LAIT 发生反应。

LAIT 蛋白诱导的 B 细胞增殖和胎牛血清

最近已经证实单核细胞对从肾病病人的尿中所分离的可溶性 CD14 (sCD14) 发生反应, 伴随产生炎症前 (pro inflammatory) 细胞因子 (《欧洲免疫学杂志》(Eur, J. Immunol.) 24 : 17790, 1994), 这是在缺乏血清来源的脂多糖结合蛋白 (LBP) 的条件下发生的。相比之下, 低浓度的 LPS 刺激表达 CD14 的单核细胞产生这些相同细胞因子的能力是血清依赖性的 (《实验医学杂志》(J. Exp. Med.) 176 : 719, 1992)。高浓度的 LPS 可以克服该血清依赖性。因此, 10ng/ml LPS 诱导单核细胞产生细胞因子是严格依赖血清/LBP 的, 然而 50µg/ml LPS 所诱导的细胞因子合成则不需要。

为了确定胎牛血清 LBP 的存在是否影响低浓度 nBo - LAIT 诱导高悬浮密度小鼠 B 细胞增殖的能力, 500ng/ml nBo - LAIT 所诱导的反应在宽的 FBS 浓度范围内进行评估, 与 50µg/ml LPS 诱导的反应相比较。如图 14 所示, B 细胞对这两种刺激物的反应不受培养基中存在的高达 9 % 的 FBS 的影响。

LAIT 诱导的 B 细胞增殖和 mCD14

B 细胞和单核细胞对 LPS 介导的激活的不同敏感性可能与后者表

达膜 CD14 ( mCD14 ) 有关。已经直接证实反应细胞上存在 mCD14 可以大大增强 LPS 介导的激活的敏感性。具体地说, 已经证实一旦被迫表达外源性 GPI 联结的 mCD14, mCD14 阴性的前 B 细胞系对 LPS 的敏感增加大约 1000 倍(《实验医学杂志》( J. Exp. Med. ) 175 : 1697, 1992 )。原代 ( primary ) B 细胞是否表达 mCD14 仍是有争论的。在 B 细胞的激活中, 与 LPS 相比的 Bo - LAIT 的高特异性活性与它不依赖 mCD14 的激活方式相一致。

为了直接评估 mCD14 的表达在 Bo - LAIT 介导的 B 细胞激活中的参与情况, 在用作反应细胞的高悬浮密度小鼠 B 细胞群中评估 CD14 特异性的 mRNA 的存在情况。从三种脾来源的细胞群的每种  $10^7$  个细胞中分离总 RNA: 未分离的脾细胞; T 细胞缺失的, Percoll 分离的, 高悬浮密度细胞, 那些常规用于 LAIT 蛋白介导的生长试验的细胞; 以及从高悬浮密度的 T 细胞缺失的细胞群中分离出来的膜 Ig 表达细胞, 其分离方法包括用 FITC 偶联的小鼠 IgK 特异的大鼠 mAb 标记的免疫荧光染色 [ 187.1 ( 杂交瘤 1 : 5, 1981 ) ] 以及随后用 Becton Dickinson FACStar Plus 细胞分类仪进行纯化。如图 15 所示, 这三种细胞群分别含 59.2 %; 83.5 %; 和 99.8 % mlg<sup>+</sup> 细胞。从这种细胞群中分离的 RNA 在 1.2 % 的甲醛凝胶上分离, 并按顺序转移到尼龙膜 ( GeneScreen ) 上, 交联, 预杂交, 并与两探针杂交。

小鼠 CD14 探针通过 PCR 来自基因组 DNA。具体地说, 扩增方法包括 Pwo DNA 多聚酶 ( Bcehringer Mannheim ) 加到 0.4 $\mu$ g 的 Balb/c 基因组 DNA 中, 同时加入正向引物: 5' - CTA GAA TTC TCT CCC GCC CCA CCA GAG CCC TGC G - 3' ( SEQ ID NO : 11 ); 和反向引物: 5' - CTA GAA TTC TTA AAC AAA GAG GCG ATC TCC TAG G - 3' ( SEQ ID NO : 12 )。样品在 DNA Thermal Cycler ( Perkin Elmer ) 上以 55 °C 的退火温度扩增 30 循环。扩增的片断通过琼脂糖凝胶电泳分离, 从胶上切下, 并纯化。L32 探针(《核酸研究》( Nucl. Acid. Res. ) 16 : 10751, 1988 ) 用于 RNA 负荷标准化。每种探针 ( 100ng ) 用寡核苷酸标记试剂盒 ( Pharmacia ) 进行标记至特异性活性 0.2 - 1  $\times 10^9$  cpm/ $\mu$ g DNA。膜与探针杂交并在 0.2  $\times$  SSC, 1 % SDS 中于 65 °C 冲洗 2 小时, 然后曝光。

如图 15 所示, 从未分离的脾细胞, 和 T 细胞缺失的高悬浮密度脾

细胞中分离的 RNA 含有 CD14 特异的 mRNA，然而 FACS 纯化的 B 细胞则不含。在 T 缺失的高悬浮密度脾细胞 - 在此之前称为静止 B 细胞 - 中的 CD14 信号可能是由于污染的单核细胞，因为根据免疫荧光染色和 FACS 分析的评估这些细胞 85 - 90 % 为 mIg<sup>+</sup>，而且 >98 % 为 MHC II 类<sup>+</sup>。因此有可能在该细胞群中 Bo - LAIT 介导的 B 细胞增殖是间接的，并且是通过所含的单核细胞的激活来介导的。

比较 T 缺失的， Percoll 分离的脾细胞，和从该细胞群来源的 FACS 纯化的 mlg<sup>+</sup> 细胞对 nBo - LAIT，和 LPS 诱导的增殖的反应。如图 16 所示，两细胞群对两种刺激物均强烈反应。用 99.8 % 纯度的 B 细胞群所获得的高 10 倍的刺激指数是因为在这些培养物中降低的非刺激背景（图 16）。

#### LAIT 蛋白诱导的 B 细胞增殖和 CD14

如上所述，已经观察到 CD40 特异的 mAbs，其在 B 细胞膜上表达，能诱导小鼠 B 细胞的增殖（Sem, in Immunol 6 : 267, 1994; PNAS 83 : 4494, 1986; 《免疫学杂志》（J. Immunol.）140 : 1425, 1988）。

为了确定抗 CD40 和 LAIT 蛋白诱导的 B 细胞激活之间是否存在某种关系，检测 rBo - LAIT 刺激高悬浮密度脾 B 细胞增殖的能力，其中 B 细胞是从常规 C57BL/6 小鼠或者已通过靶基因破坏而除去 CD40 表达的 C57BL/6 小鼠中分离的（《免疫力》（Immunity）1 : 167, 1994）。如图 17 所示，在检测的 rBo - LAIT 浓度范围内未观察到这些 B 细胞的反应中有差异。

这些结果表明 CD40 本身不必参与 LAIT 蛋白的信号传递，但是 CD40 和 LAIT 蛋白假定的膜受体共享第二位使产生系统的可能性不能排除。

#### 比较分析人、牛和小鼠 CD14

检测已经观察到的 nBo - LAIT 和 rBo CD14 对小鼠 B 细胞的活性，从体液而不是初乳中分离的小鼠 CD14（Mo）和人 CD14（Hu）的活性。已经证实 Hu - CD14 存在于肾病患者的尿中（《欧洲免疫学杂志》（Eur, J. Immunol.）24 : 1779, 1994）。Hu - CD14 是用改良法分离的。尿液通过加入饱和 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 至终浓度 45 %（v/v）来加以沉淀，并且沉淀物质在 14000g 离心 30 分钟来澄清。然后该离心上清中的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 浓度增加到 75 %（v/v）。沉淀物在 14000g 离心 30 分钟聚

集成小团，然后溶于含 10mM Tris，150mM NaCl，和“完全”蛋白酶抑制剂鸡尾酒（Boehringer Mannheim）的 TN 缓冲液 pH 8.0 中。不溶物在 13000g 离心 15 分钟去除。该离心的上清在已于 TN 缓冲液 pH 8.0 中平衡的 G - 10 柱（Bio Rad）上脱盐。然后将其通过人 CD14 特异性 mAb，3C10（《实验医学杂志》（J. Exp. Med.）15 : 126，1983），已经偶联的 Sepharose 4B。结合物在 100mM 乙酸盐，150mM NaCl，pH 2.8 中洗脱，并立即加入 10 倍体积的 1M Tris，pH 8.0 加以中和。洗脱液在 Speed - vac 中浓缩，并比色法测定蛋白质浓度。

小鼠 CD14 从小鼠杂交瘤 OKT3（PNAS USA 77 : 4914，1980）的上清中分离。在细胞群筛选分析 CD14 特异性 mRNA 表达的过程中，观察到每种测定的杂交瘤均含信号。因此，如果供体和融合配体均是鼠源的，那么所产生的 CD14 也是鼠源的。杂交瘤 OKT3 满足这些标准。为了评估 CD14 蛋白是否能被 OKT3 产生，并达到足够的量允许分离，1 升 OKT3 培养上清中所含的物质在 3C10 - Sepharose 上亲和纯化，按以上对人尿来源的 CD14 的描述进行。3C10 的特异性已定位到人 CD14 的残基 7 - 10 上（《生物化学杂志》（J. Biol. Chem.）270 : 361，1995）。这些残基在牛和小鼠 CD14 中是高度保守的。

图 18 的左侧比较亲和纯化的人尿 CD14（nHu），初乳牛 CD14（nBo），和 OKT3 起源的小鼠 CD14（nMo）每种 1 $\mu$ g 的银染分析。图 18 的右侧比较相同三种 CD14 每种 250ng 的免疫杂交分析，用 mAb 3C10 作探针检测。正如所示，所有这三种制品的纯度是可比的，它们与 mAb 3C10 的反应性也一样。

伴随各自 cDNAs 编码的氨基酸数目有差异的这三种 CD14 在分子量上的明显差异可能是由于转录时和/或转录后修饰的缘故。在本文中，明显看出小鼠，人，和牛 CD14s 分别含 5，4 和 3 个潜在的 N 糖基化位点。

评估这三种 CD14 制品刺激小鼠 B 细胞增殖的能力。如图 19 所示，从这三种属中分离的 CD14 具有可比的特异性活性，并且在 ng/ml 浓度范围是有活性的。结果也证实同源物质是功能性的，具体地说，小鼠 CD14 可以激活小鼠 B 细胞。结果也证实初乳 CD14 在其刺激 B 细胞的能力方面不是奇特的，因此不可能是泌乳的特定环境中所产生的特定分子形式。

### nBo - LAIT 对人脐血 B 细胞的增殖促进活性

检测已观察到的 nBo - LAIT 对小鼠 B 细胞的多种生物活性, 对人 B 细胞生理功能的影响。采用两种来源的 B 细胞。因为 LAIT 蛋白的一个可能作用是参与增强新生儿免疫系统的发育, 所以需要评估其刺激来自新生儿的 B 细胞, 具体地说, 是从脐血分离的 B 细胞, 发生增殖的能力。

脐血在磷酸盐缓冲盐溶液 ( PBS ) 中 1:1 稀释, 并加在  $\rho = 1.077$  的 Percoll ( Pharmacia ) 之上。如图 1A 所述进行梯度离心。收集  $\rho = 1.077/1.000$  的界面并在补充了 5 % 胎牛血清 ( FBS ) 的 PBS 中冲洗两次。然后用已偶联了 B 细胞膜标记物 CD72 特异的 mAb 的荧光素对所获得的淋巴细胞染色。随后通过 FACS 阳性筛选 CD72 阳性的脐血淋巴细胞, 纯度 >98 %。其后这些阳性选择的 B 细胞培养于无血清培养基, 正如对小鼠 B 细胞的处理一样。在小鼠和人 B 细胞增殖试验中的唯一区别是后者是在 60 小时用胸苷处理, 维持 12 小时, 而不是在 40 小时, 维持 6 小时。

如图 20A 所示, nBo - LAIT 在其诱导新生儿 B 细胞增殖的能力方面与 Igk 和 Ig $\lambda$  特异性 mAb 发生作用。尽管固化的 ( 培养板结合的 ) 抗轻链 mAbs 和 2 $\mu$ g/ml nBo - LAIT 单独均可诱导超过背景的胸苷摄入增加, 但两者的组合支持 5 倍的增加。

这些结果表明在缺乏完全发育的 T 细胞区时, 有可能乳汁喂养的新生儿所消耗的 LAIT 蛋白作为 T 细胞的替代物发挥功能, 帮助刺激已遇到抗原的 B 细胞增殖和分化成 Ig 分泌细胞 ( 《实验医学杂志》

( J. Exp. Med. ) 169 : 2149, 1989; 《科学》( Science ) 245 : 749, 1989; Intl, Immunol.2 : 859, 1990; Intl Immunol.2 : 869, 1990 )。人初乳和正常血清中的 CD14

为了测定在初乳和正常血清中存在的 CD14 的浓度, 用特异性 ELISA ( IBL - Hamburg ) 测定来自两位供者的初乳, 和来自五位健康供者的血清样品中 CD14 的存在。如表 3 所示, 来自该健康个体群体的血清所包含的 CD14 浓度为 1.7 - 3.2 $\mu$ g/ml, 并且是性别非依赖性的。这些结果与 Grunwald 等人报道的结果非常符合 ( 《免疫学方法杂志》( J. Immunol. Method ) 155 : 225, 1992 )。

供者	性别	$\mu\text{g/ml}^*$
A. M.	F	2.8
N. J.	F	2.7
M. J.	M	1.7
E. K.	M	2.9
A. D.	M	3.2

\* 2.6-3.4 $\mu\text{g/ml}$  根据 ELISA 试剂盒制造商 (IBL, Hamburg)

如图 21 所示, 分娩后 22 小时采集的初乳 (A. D.), 以及分娩后 4 天采集的早期乳奶 (S. B.) 中含的 CD14 均大约是正常血清中所含量的 20 倍。在试验的筛选期中, 从一位供者 (S. B.) 获得延长到分娩后 78 天的多份样品, 尽管 CD14 的浓度与第 4 天所观察到的相比已大大下降, 但它们仍然是正常血清中所观察到的大约 3 ~ 5 倍 (图 21)。

在泌乳妇女中关于血清 CD14 浓度的资料仍不能得到。因此, 仍需确定在初乳和乳奶中所观察到的高浓度 CD14 是限于这些体液, 还是反映了泌乳妇女所有体液中 CD14 浓度的普遍增加。

可能是新生儿免疫系统对初乳 CD14 的 B 细胞增殖和分化活性的短暂暴露在新生儿免疫反应机制的发育中发挥部分作用。该活性在初乳中存在的生理相关性符合该观察结果, 正如以上所述, 在新生儿中 T 细胞功能是受损的, 这可能是由于在初乳和早期乳奶中存在高浓度的 TGF $\beta$ 1 和 TGF $\beta$ 2 (《细胞生物学杂志》(J. Cell. Biol.) 105:1039, 1987; 《细胞》(Cell) 49:437, 1987; EMBO J. 6:1633, 1987)。如表 2 所示, 亚促有丝分裂浓度的 CD14 与亚促有丝分裂浓度的膜免疫球蛋白特异的 mAb 组合, 支持 B 细胞的活化。CD14 在发育的新生儿免疫系统中可能作为 T 细胞的替代物发挥功能。因此, 在缺乏合成的饮食配方时, 通过暴露于 CD14 的免疫刺激效果新生儿可从 CD14 作为婴儿饮食配方添加剂的应用中获益。

#### nBo - LAIT 对人扁桃体 B 细胞的增殖促进活性

评估 nBo - LAIT 对从成年人分离的 B 细胞的生物活性, 单独, 以及与固化的 (培养板结合的) 抗轻链 mAbs 组合, 以刺激从人扁桃体中分离的 B 细胞。

扁桃体 B 细胞通过阴性选择来加以制备。扁桃体淋巴细胞按照对脐血淋巴细胞的处理进行制备。所得到的细胞群用生物素化的 CD3 $\epsilon$  特异的 mAb 标记 ( Becton Dickenson )，然后用含铁的“微珠”标记。冲洗 1 次后，标记的细胞群通过 MACS ( Becton Dickenson )，并收集流出液。根据系特异性 mAbs 免疫荧光染色的评估，该细胞群含 <1 % T 细胞，和 >97 % B 细胞。这些 B 细胞然后在 Percoll 不连续密度梯度上进一步分离，与分离高悬浮密度小鼠 B 细胞所用的步骤相同。所述的试验采用在  $\rho = 1.085/1.079$  界面上的那些 B 细胞。这些阴性选择的，密度分离的静止 B 细胞按以下所述培养，脉冲处理，并按对脐血 B 细胞的处理来收集。

如图 20B 所示，与用新生儿分离的 B 细胞所获得的结果相比，nBo - LAIT 在 300ng/ml 的低浓度时，单独激活这些静止扁桃体 B 细胞的强烈增殖。再者，当与固化的抗轻链 mAbs 组合时，在一些浓度下的 nBo - LAIT 反应被大大增强 ( 图 20B )。

成熟人 B 细胞对 nBo - LAIT 的增殖促进活性是敏感的，当与 B 细胞抗原受体的同时结合相组合时，该活性被放大。这些结果表明了 LAIT 蛋白潜在应用于疫苗载体，帮助增加它们的佐剂性，或可能降低对佐剂的需要。

接种技术的限制是特定抗原制剂的免疫原性。某些佐剂被认为是通过聚集和激活抗原特异性 T 细胞来发挥作用。CD14，作为抗原特异性 B 细胞反应的 T 细胞替代物，可提供改善的方式来激活抗原特异性 B 细胞以使它们不仅仅扩增和分化成抗体分泌细胞，而且一旦激活，将会作为聚集 T 细胞的有效 APC 来发挥作用。这会增特异性免疫反应的放大和 T 细胞介导的独特型转换。

T 细胞的免疫缺陷是已知的。由于缺乏 gp39 ( CD40L ) ( 已定位至 X 染色体 ) 的表达而致的与 T 细胞功能障碍有关的免疫缺陷已被鉴定：( i ) X 连锁的高 IgM 综合征 ( HIM )；( ii ) 常见多变型免疫缺陷 ( CVI )；和 ( iii ) X 连锁的无丙种球蛋白血症 ( XLA )。在某些这些疾病中 ( HIM )，已经证明从病人中分离的 T 细胞不能够激活 B 细胞 ( 《科学》 ( Science ) 259 : 990, 1993 )，并且该表型与功能性 gp39 ( CD40L ) 的缺乏有关。在这些情况下，CD14，或者目的为诱导特异性体液反应，或者作为多克隆 B 细胞激活剂来使用，均能

发挥功能以诱导/维持同系 Ig 的水平，这与抗潜在的环境病原体的每日屏障的保护相一致。

CD14 在初乳中的存在是与它在乳儿中发挥刺激 B 细胞的作用相一致。CD14 在辅助新生儿免疫系统发育中的有效性可在动物模型中加以评估。

CD14 缺陷的雌性动物，通过 CD14 位点的有意破坏来制备，将与异源性的或 CD14 缺陷的雄性动物交配。这将能够在表达或不表达 CD14 的幼狗中评估初乳 CD14 的缺乏对 B 细胞发育的影响。具体地说，将比较 B 细胞的个体发育和血清 IgM 和 IgG 水平的累积发展，以及这些幼狗增强特异性免疫反应的能力。

再者，评估血清 CD14 ( sCD14 ) 在维持“天然” IgM 循环量中发挥的作用。循环的 IgG 和 IgM 量是处在不同的调控下。血清 IgG 在无抗原环境中饲养的小鼠中实际上是缺乏的，然而 IgM 却不受影响。为说明 sCD14 在血清 IgM 水平调控中潜在作用，来自上述交配的 CD14 充足和缺乏的小鼠将限菌饲养。

sCD14 的表达调节障碍与特定疾病的病理学相关。sCD14 量在患类风湿关节炎 ( RA ) 的病人的血清中是增加的 ( Clin. Exp. Immunol 91 ( 2 ) : 207, 1993 )。也已经报道活化 CD14<sup>+</sup>单核细胞的数目在 RA 病人的滑液中有增加 ( Br. J. Rheumatol, 29 ( 2 ) : 84, 1990 ; 《风湿病学》 ( J. Rheumatol ), 22 ( 4 ) : 600, 1995 )。尽管仍需确定 sCD14 的量在 RA 病人的滑液中是否是增加的，但是 CD14<sup>+</sup>单核细胞一旦激活，就能表达膜相关的能裂解膜 CD14 的蛋白酶，导致产生 sCD14 ( 《欧洲免疫学杂志》 ( Eur, J. Immunol. ) 25 : 604, 1995 )。与 sCD14 激活人 B 细胞的能力相一致，RA 病人滑液中含有大量的活化 B 细胞，至少一部分 B 细胞能产生类风湿因子 ( 《临床免疫学与免疫病理学》 ( Clin Immunol. Immunopathol 31 ( 2 ) : 272, 1984 ; Clin. Exp. Immunol. 55 ( 1 ) : 91, 1984 )。这样，出现一种模型，它涉及 sCD14 在 RA 病人合成增加，以及它可能参与 B 细胞的激活，导致类风湿因子产生。因此抗体介导的 sCD14 的清除可使症状缓解，该缓解是由 B 细胞激活和 RA 病人中类风湿因子产生的调节障碍所介导的。再者，抗体介导的 sCD14 的清除会缓解炎症，该炎症是由 sCD14 诱导单核细胞产生炎症前细胞因子所支持的 ( 《欧洲免疫学杂志》 ( Eur,

J. Immunol.) 24 : 1779 , 1994 ) 。

常规制备人单克隆抗体 ( mAbs ) 存在多种困难, 非常重要是不能够富集所需抗原特异性的活化人 B 细胞。 sCD14 具有诱导所需抗原特异性的人 B 细胞的能力。 sCD14 在体外诱导人 B 细胞增殖和分化的能力使之可能用于制备抗原特异性 mAbs 。 在此我们表明高浓度 ( 0.5 - 1 $\mu$ g/ml ) 的 sCD14 以多克隆的方式激活人 B 细胞。然而, 亚最适量促有丝分裂浓度的 sCD14 被证明能与 B 细胞抗原受体 ( BcR ) 特异的 mAb 协同发挥作用。因此, 亚最适量促有丝分裂浓度的 sCD14 优选激活那些通过 BcR 收到互补信号的 B 细胞。在这些情况下, BcR 特异的 mAb 作为抗原替代物发挥功能。如果特异性是强加在 BcR 信号的传递过程中, 那么随之发生的 B 细胞反应也将是特异的。因此, 当抗 BcR 由特异性抗原替代时, sCD14 同时存在所提供的协同刺激将会全部集中在抗原特异性 B 细胞上。这样, 随之发生的抗体的合成将是抗原特异的。以该方式激活的 B 细胞群对活化的, 抗原特异的 B 细胞来说是高度富集的, 因此有利于制备分泌所需特异性的 mAb 的人杂交瘤。

CD14 在接种技术中作为佐剂的有效性可用动物模型加以评估。 Bo 和 Hu - CD14 将用半抗原 TNP 加以改良。半抗原化的物质将被评估其体外诱导多克隆 B 细胞激活的能力, 以确保半抗原化没有改变 CD14 的生物活性。偶联物将进行皮下或肌肉内注射, 并随着时间, 测定血清中特异性抗体的含量。使用另外系列的小鼠, 收集引流的淋巴结, 并计数所包含的抗体分泌细胞。另外, 某些受者将用变量的 CD14 和蛋白质或细胞抗原组成的混合物来进行免疫。然后计算血清抗体滴度, 以及抗原特异性的, 和所有 Ig 分泌细胞的数目。

CD14 的毒性可在小鼠, 大鼠和猴的急性静脉内的研究中加以评估。可以进行大鼠的急性皮下灌注研究, 以及在长期研究中, 在三种动物中涉及多次皮下和静脉内注射的研究。将进行大体病理学 ( Gross pathologic ) 和组织病理学的评估, 以及血清化学和血液病学的分析。基因毒性潜力可在体外哺乳动物细胞, 和小鼠小核试验中进行。致畸潜力可在受孕小鼠, 大鼠, 和猴中进行评估。

将 CD14 施用于人受试者时, 可采用常规的制药实践。作为婴儿饮食配方的添加剂, 它可以在生产时加入到饮食配方中。它可以制备成片剂或胶囊, 或仅在使用前混合的粉末。在疫苗制剂的情况下, 根据其它

标准步骤它可以作为所制备的疫苗的成分而包括在内。使用法可以采取任何方便的方式，例如，静脉内、皮下、肌肉内、胃内、颅内、囊内、脊柱内、脑池内、腹腔内，或口服。

肠胃外的制剂可以是液体溶液或悬液的形式。

本领域中已知的用于制备制剂的方法均可见于，如，“雷明顿制药科学”（Remington's Pharmaceutical Sciences）。肠胃外用药的制剂，例如，可以包含作为赋形剂的无菌水或盐，聚二醇如聚乙二醇，植物油，氯化萘等。

CD14 使用的浓度将根据，如，使用量和使用途径，而有所变化。

在 CD14 天然氨基酸序列的变异方面，至少，可以进行保守的替换。保守替换见述于专利文献，例如，见美国专利 No. 5, 2264, 558。因此期望，例如，非极性脂肪族中性氨基酸甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、缬氨酸和异亮氨酸，之间的互换可能是可行的。同样，极性脂肪族中性氨基酸丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、天门冬酰胺和谷氨酰胺，之间的替换可能是可行的。带电荷的酸性氨基酸，天门冬氨酸和谷氨酸，之间的替换可能是可行的，带电荷的碱性氨基酸，赖氨酸和精氨酸，之间的替换也是如此。芳香族氨基酸，包括苯丙氨酸、组氨酸、色氨酸和酪氨酸之间的替换也可能是可行的。这些替换和互换对本领域的那些技术人员来说是熟知的。其它的替换也是很可能的。当然，也预期变异蛋白质与天然存在的蛋白质的同源性百分数越大，代谢活性的保持也越高。

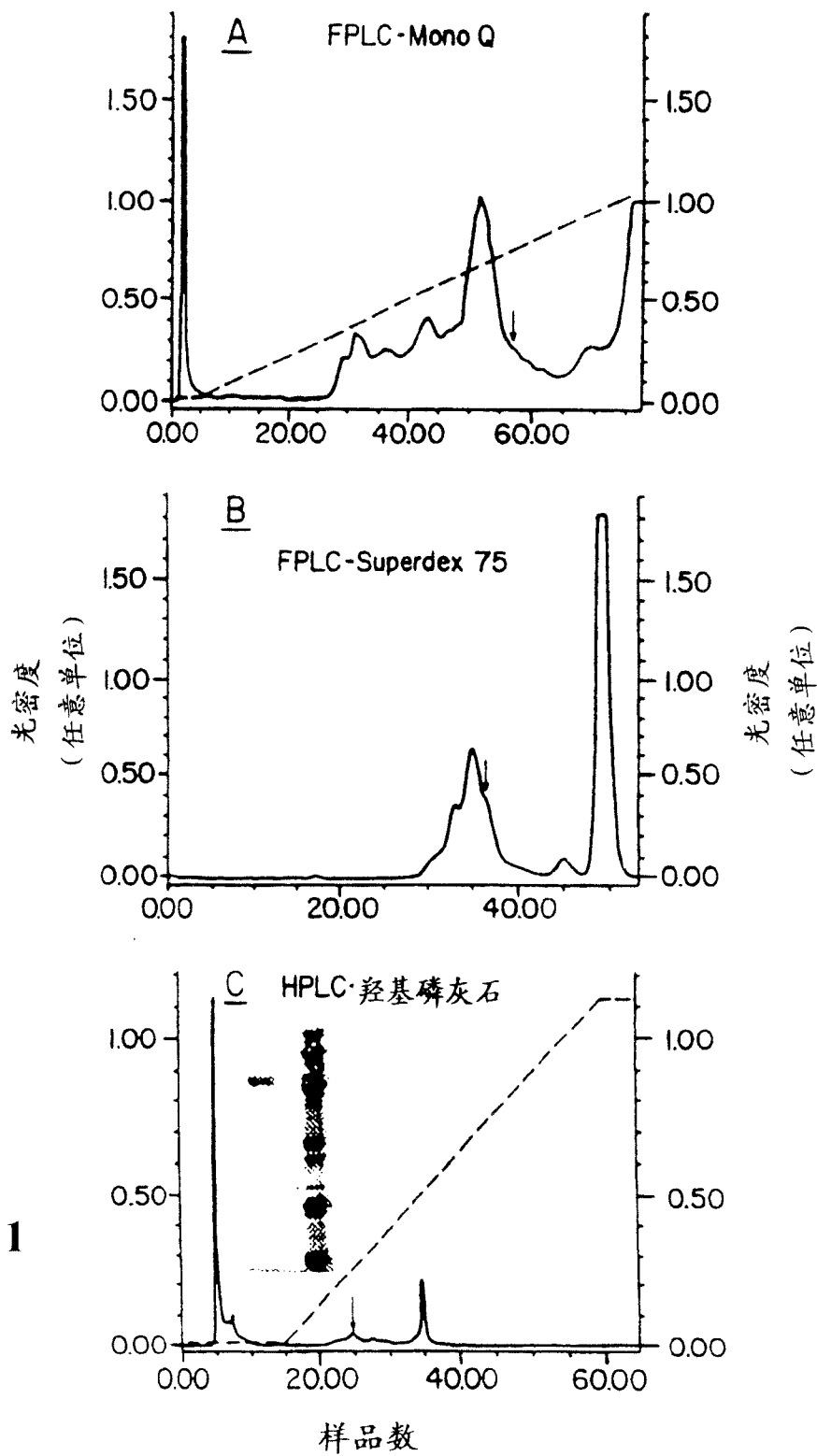


图 1

1  
 MERASCLLLL LLPLVHVSAT TPEPCELDDE DFRCVCFNFSE POPDWSEAFQ  
 D -?--?--NN? ??-?-?

51  
 CVSAVEVEIH AGGENCEPFL KRVDADADPR QYADTVKALR VRRLTVGAAQ  
 V----?-S ---LSL?

101  
 VPAQLLVGAL RVLAYSRLKE LTLEDLKITG TMPPLPLEAT GLALSSLRLR

151  
NVSWATGRSW LAELOQWLKP GLKVLSIAQA HSPAFSYEQV RAFPALTSLD  
 ?---T--GA? -G---

201  
 LSDNPGLGER GLMAALCPHK FPAIQNLALR NTGMETPTGV CAALAAAGVO  
 ---S-P A-----LR--

251  
PHSLDLSHNS LRATVNPSAP ROMWSSALNS LNLSFAGLEQ VPKGLPAKLR  
 -Q-----? -?V?

301  
 VLDLSCNRLN RAPOPDELPE VDNLTLDGNP FLVPGTALPH EGSMNSGVVP  
 L----V

351  
ACARSTLSVG VSGTLVLLQG ARGFA  
 ???--

图 2



图 3

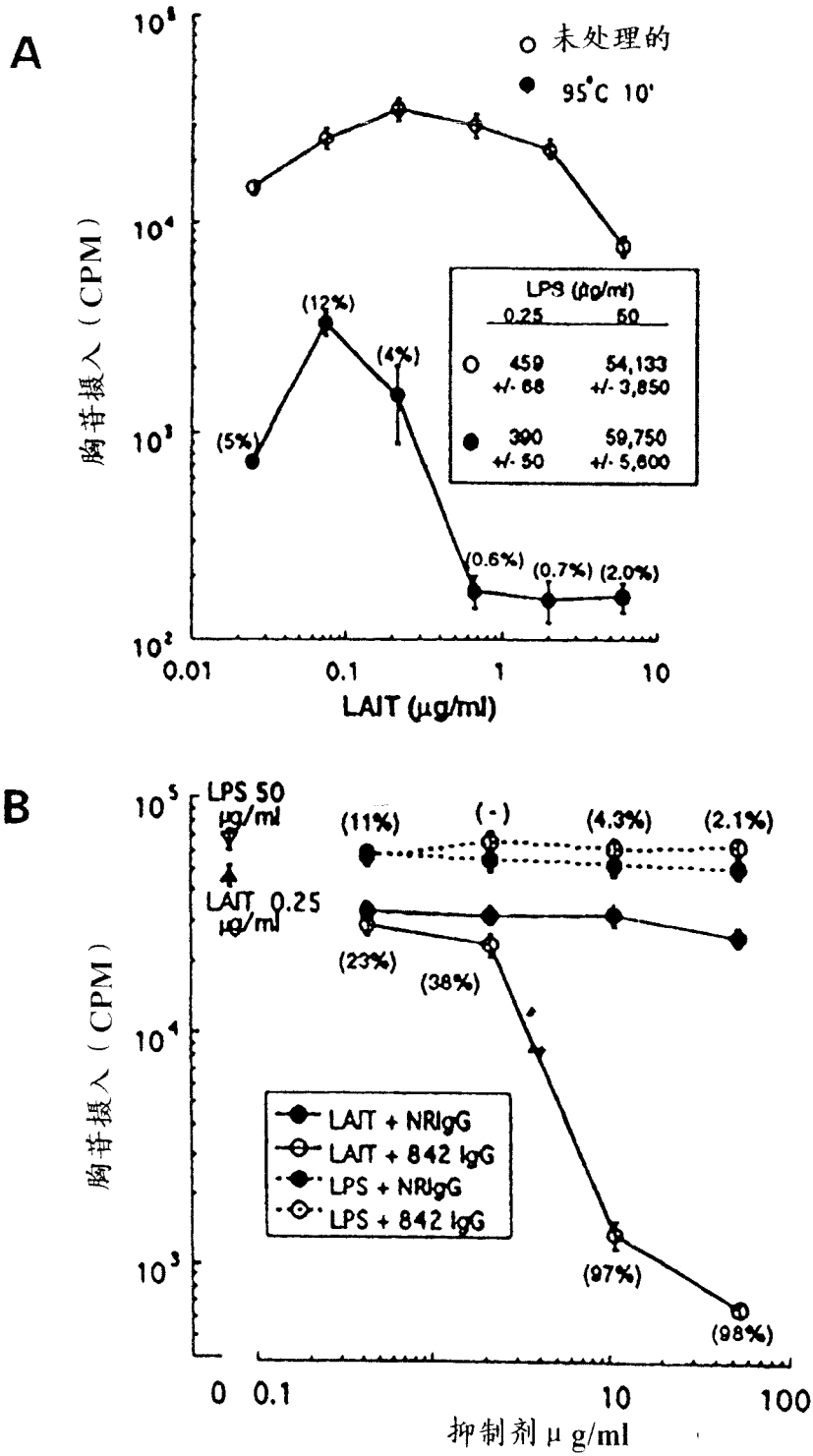


图 4

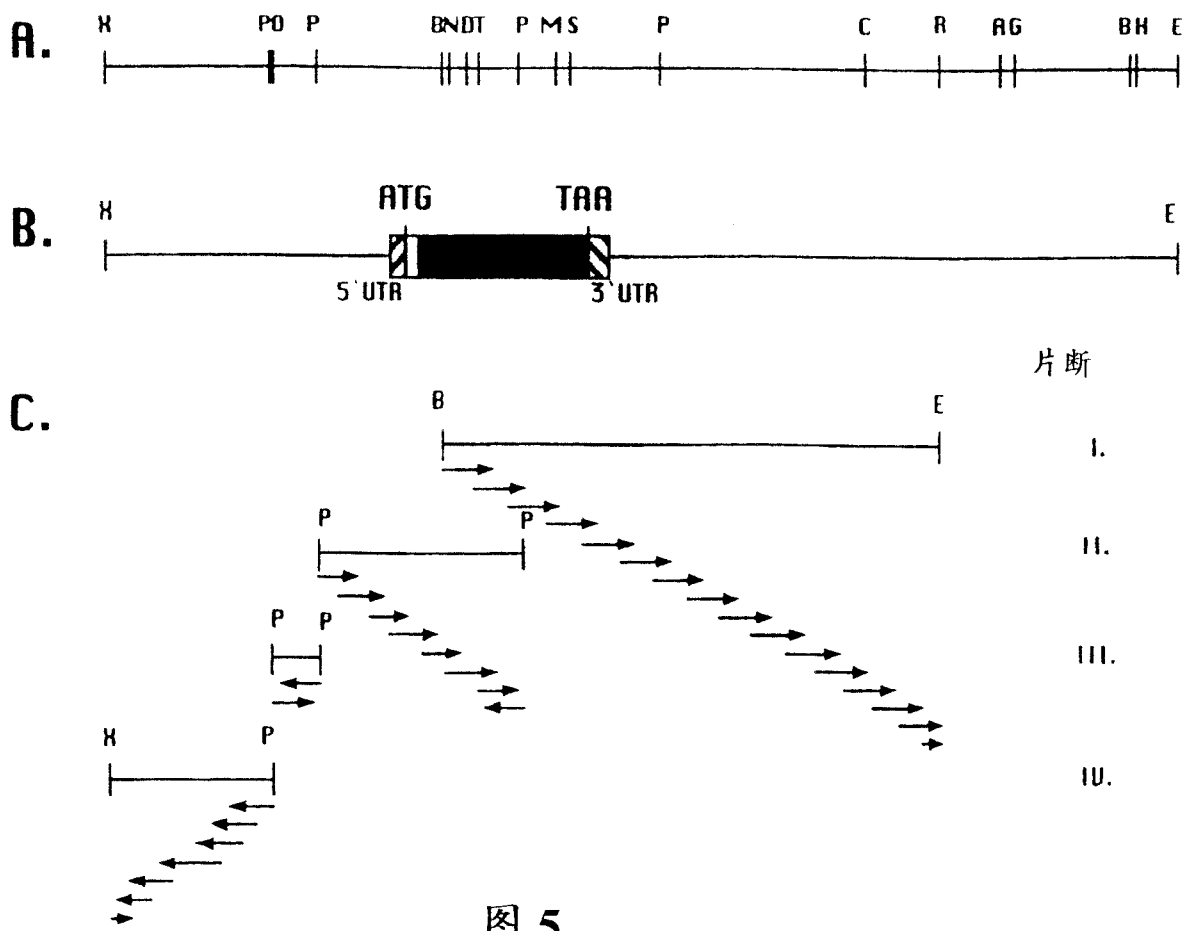


图 5

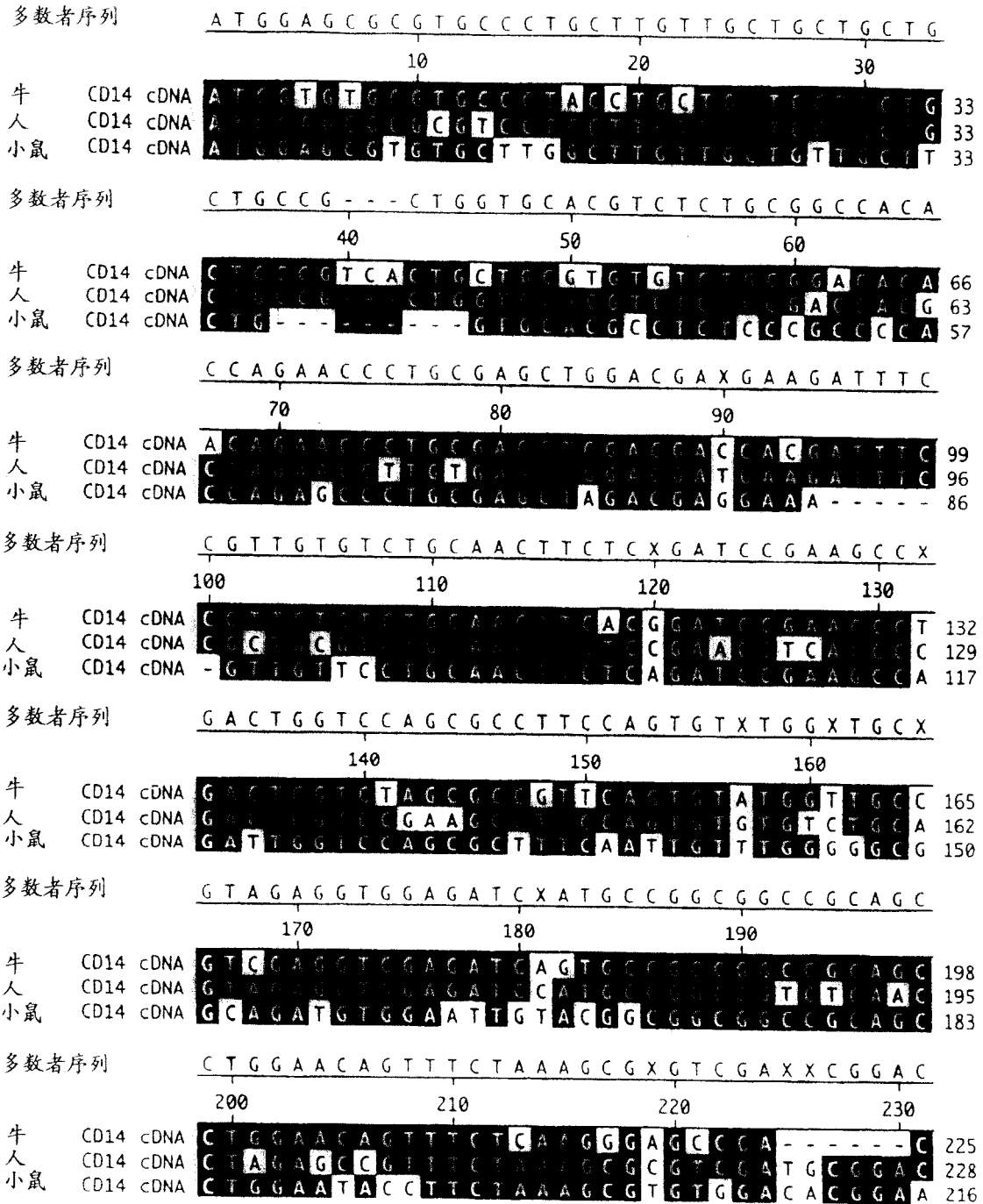


图 6A

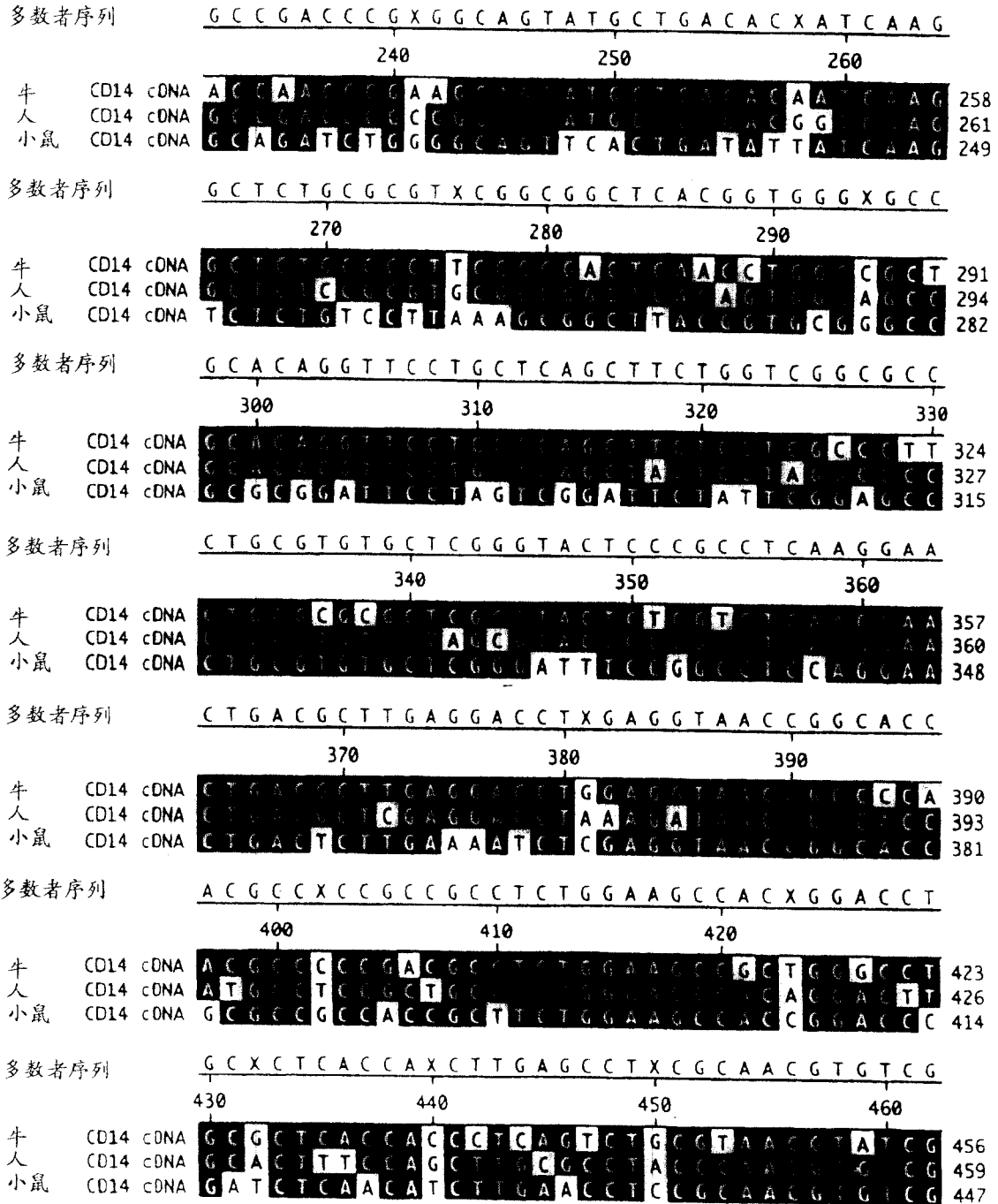


图 6B

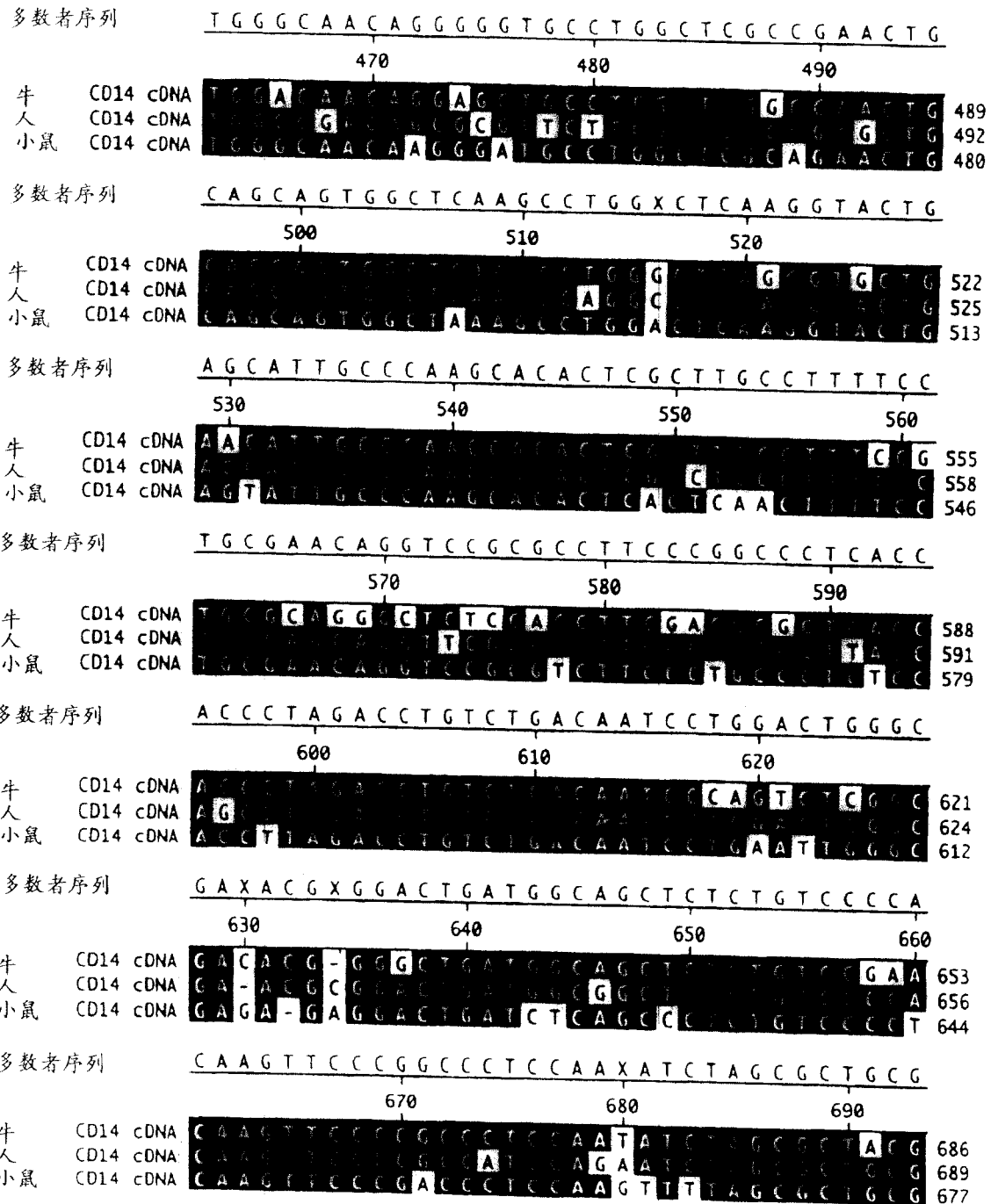


图 6C

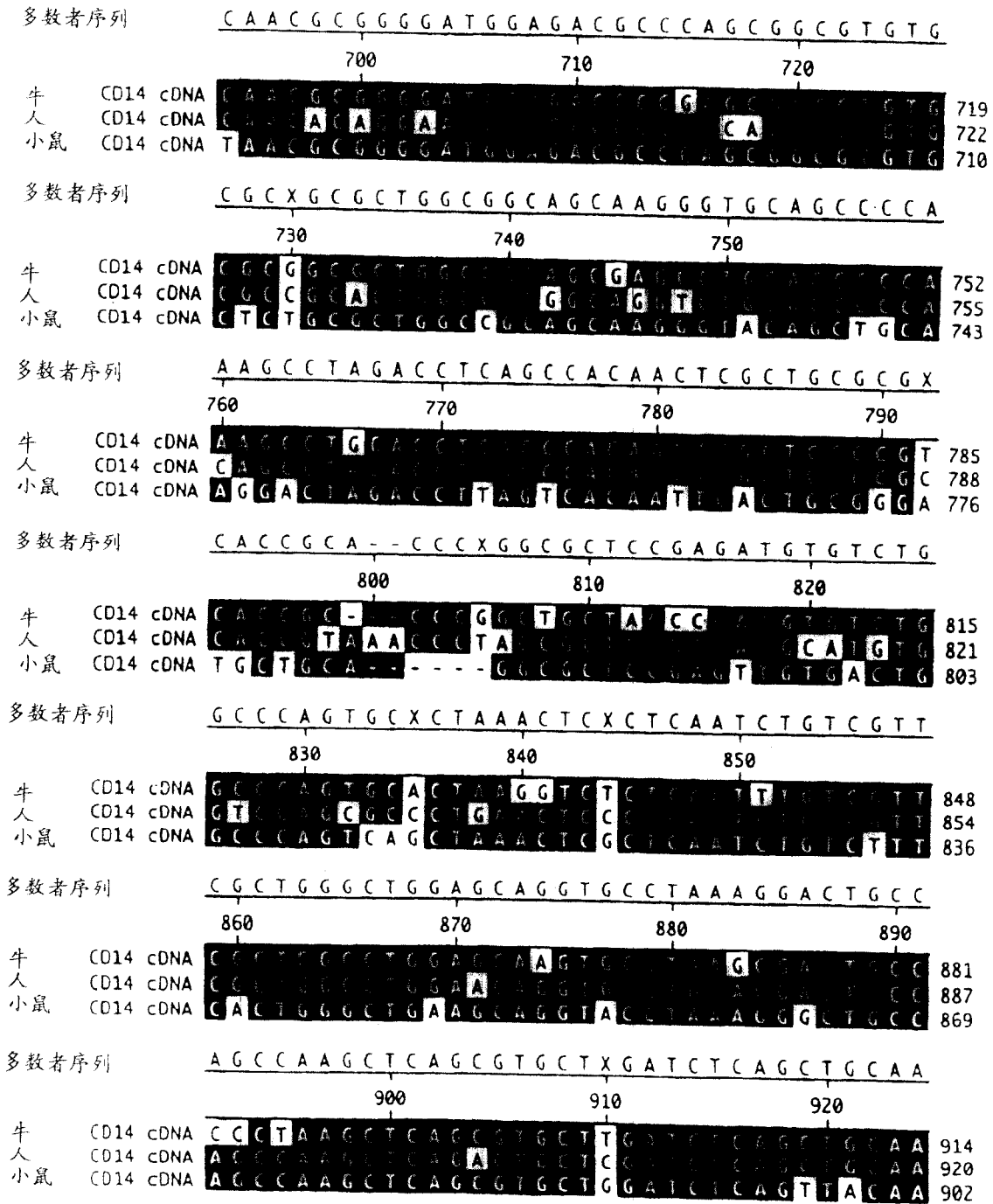


图 6D

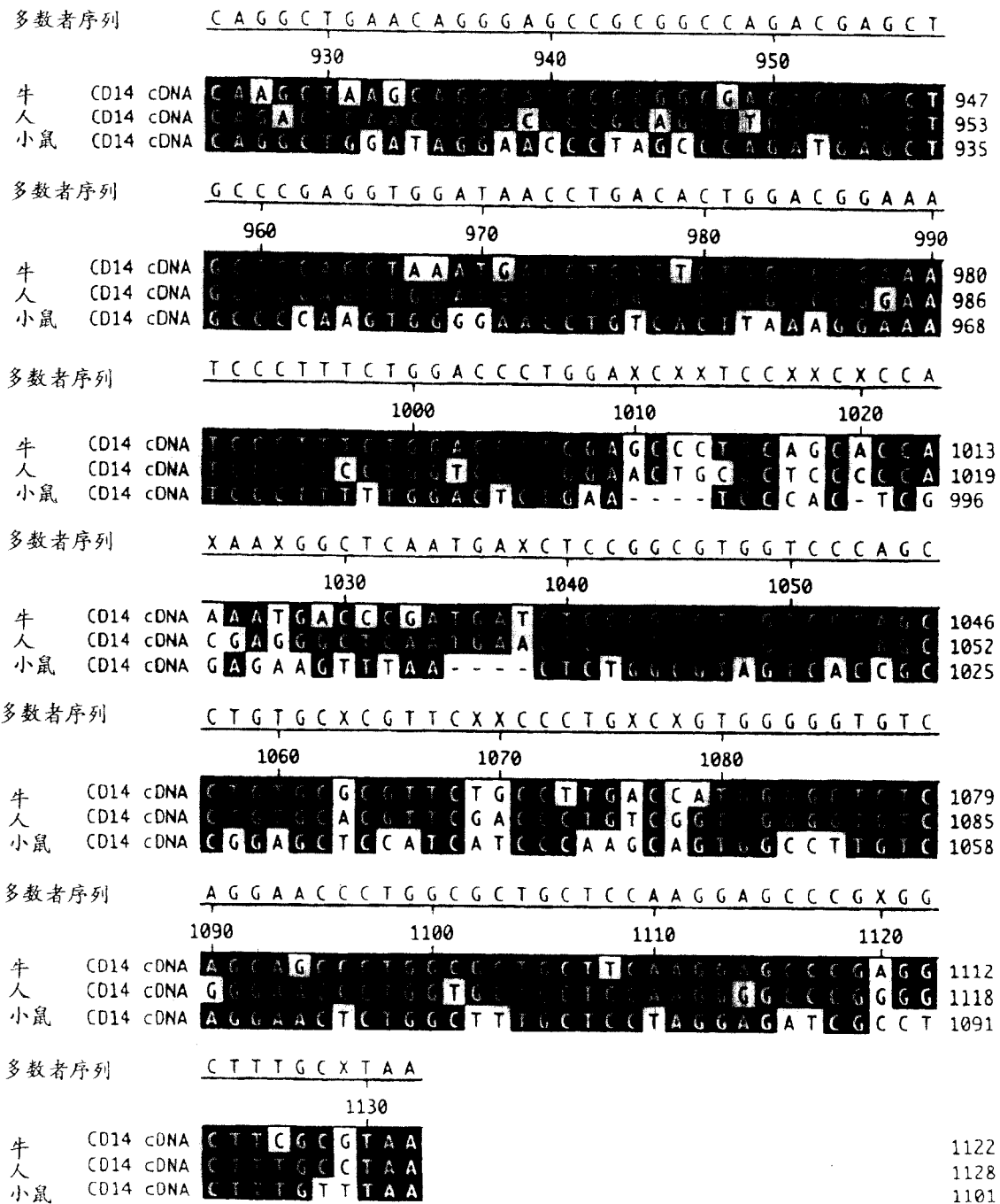


图 6E



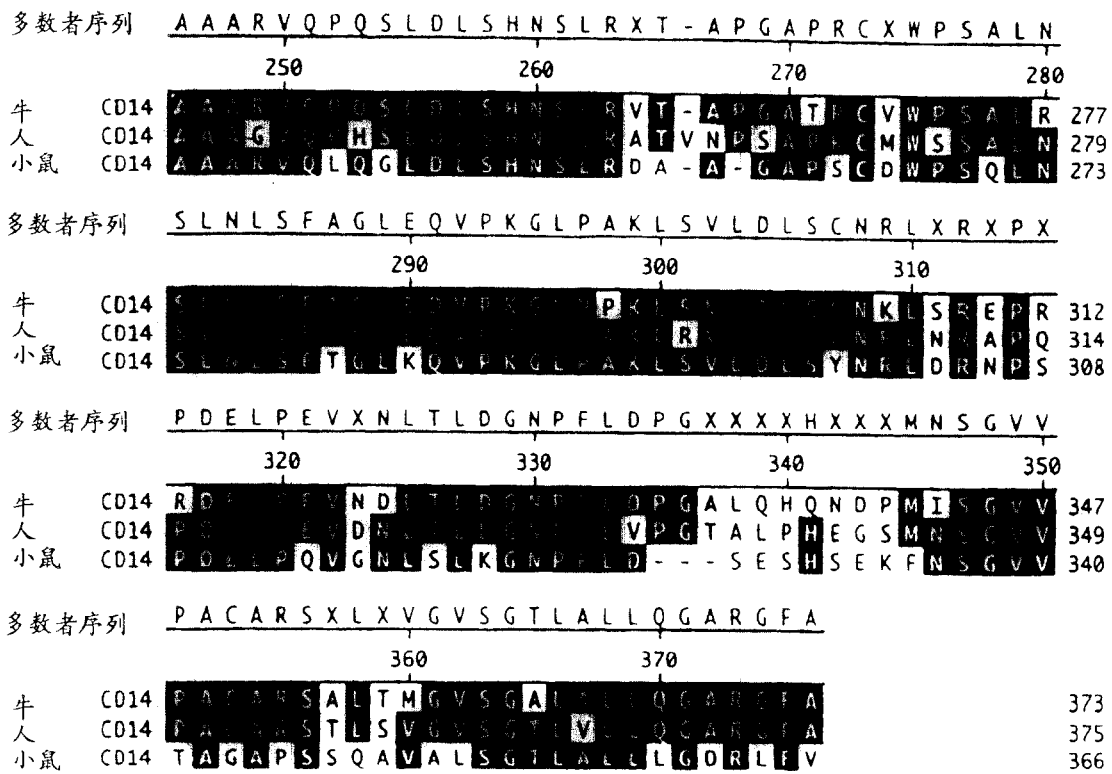


图 7B

**A**

杆状病毒表达系统

正向 5' - GCT AGC GCT AGC CAC CAT GGT GTG CGT GCC CTA CCT GCT - 3'

反向 5' - GCT AGC GCT AGC CGC GAA GCC TCG GGC TCC TTG AAG - 3'

**B**

哺乳动物表达系统

正向 5' - CTC GAG CTC GAG GCT AGC CAC CAT GGT GTG CGT GCC - 3'

反向 5' - CTC GAGCTGAG GGA TCC CTA AGC GTA ATC TGG AAC - 3'

图 8

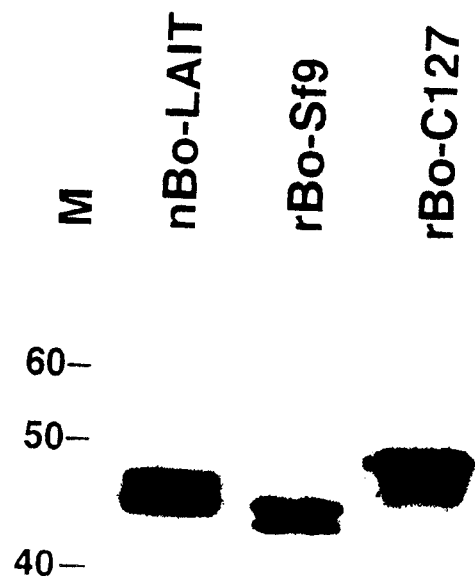


图 9

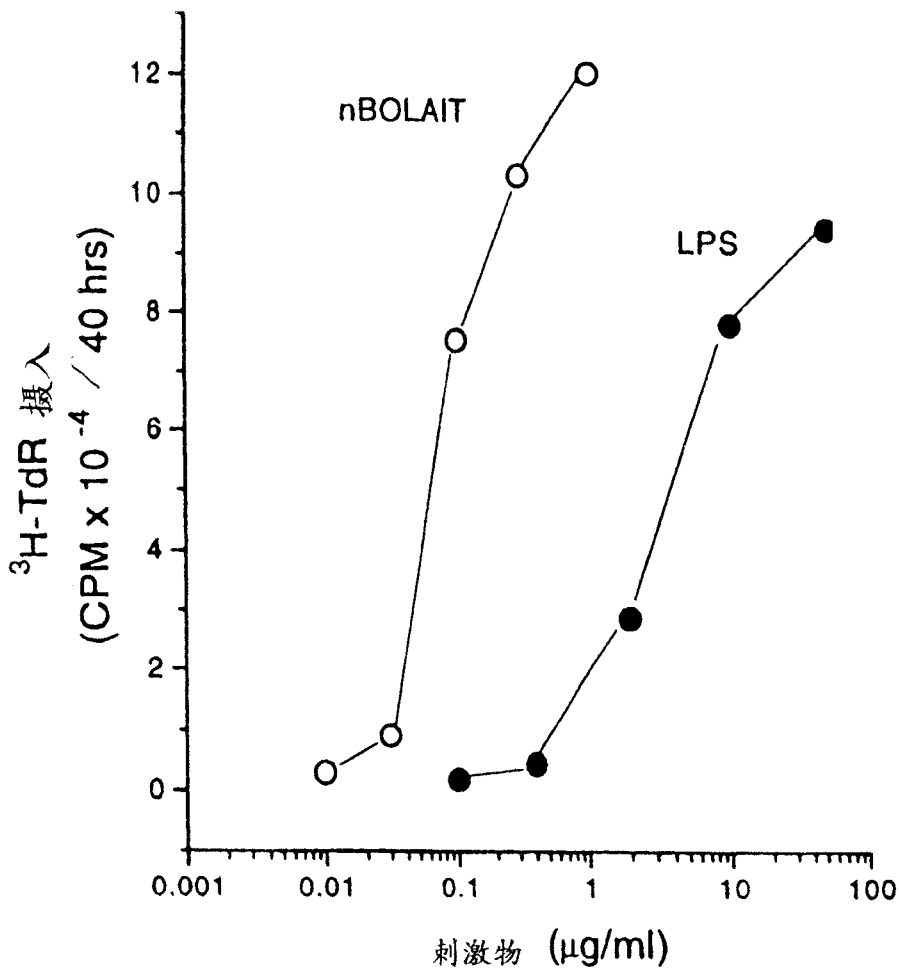


图 10

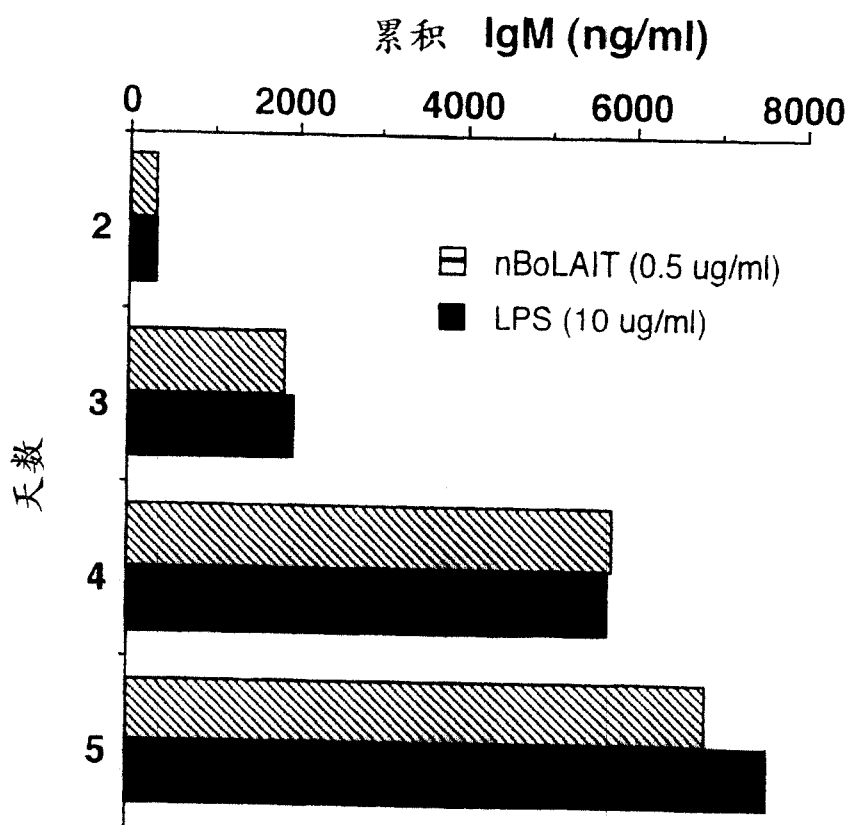


图 11

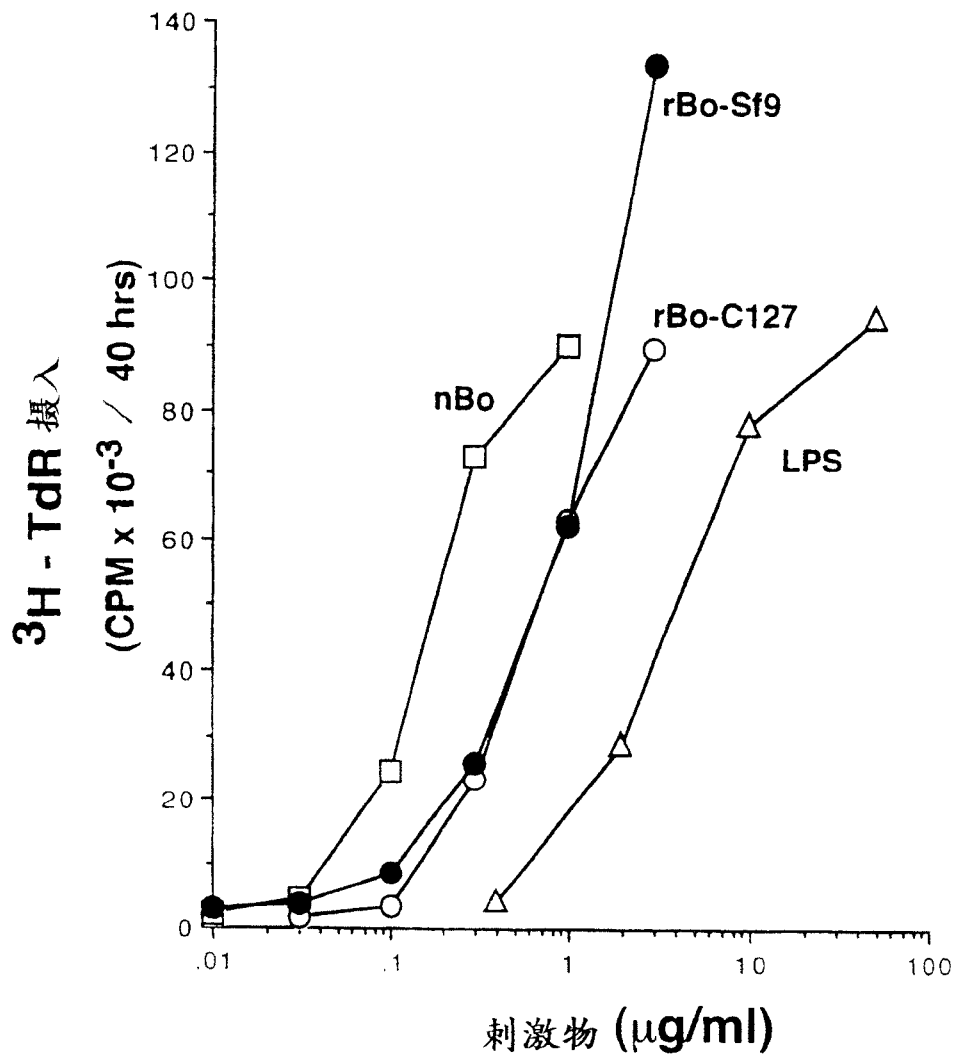


图 12

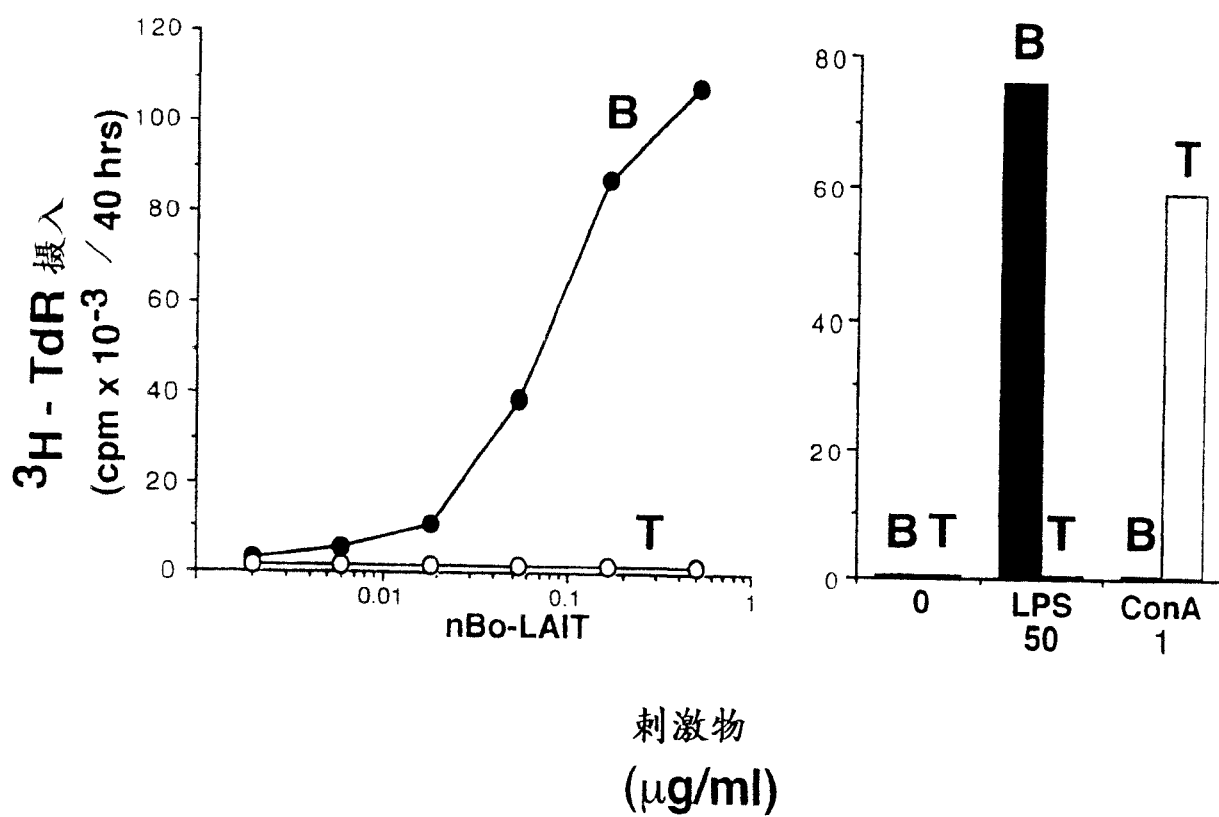


图 13

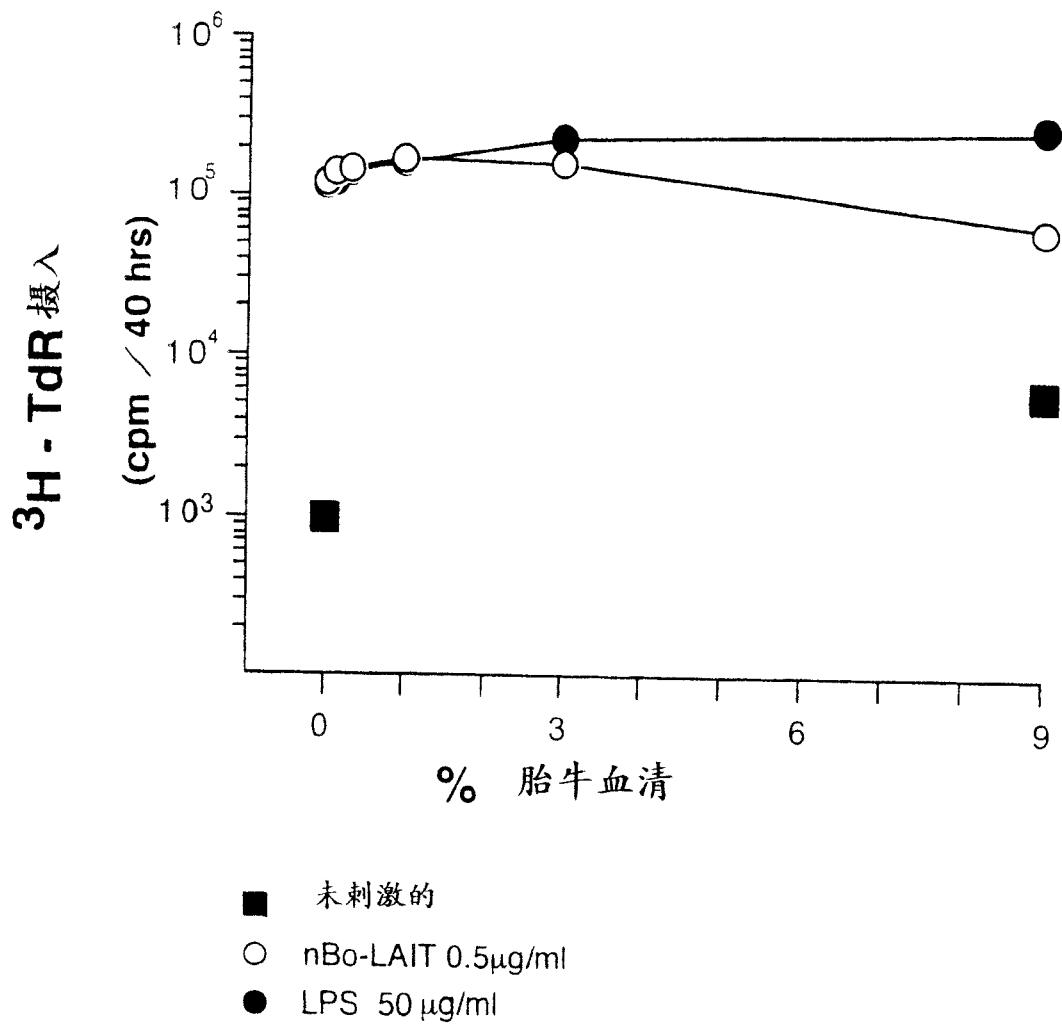
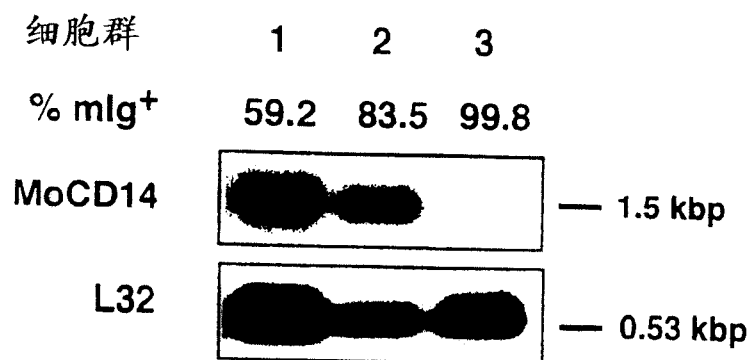
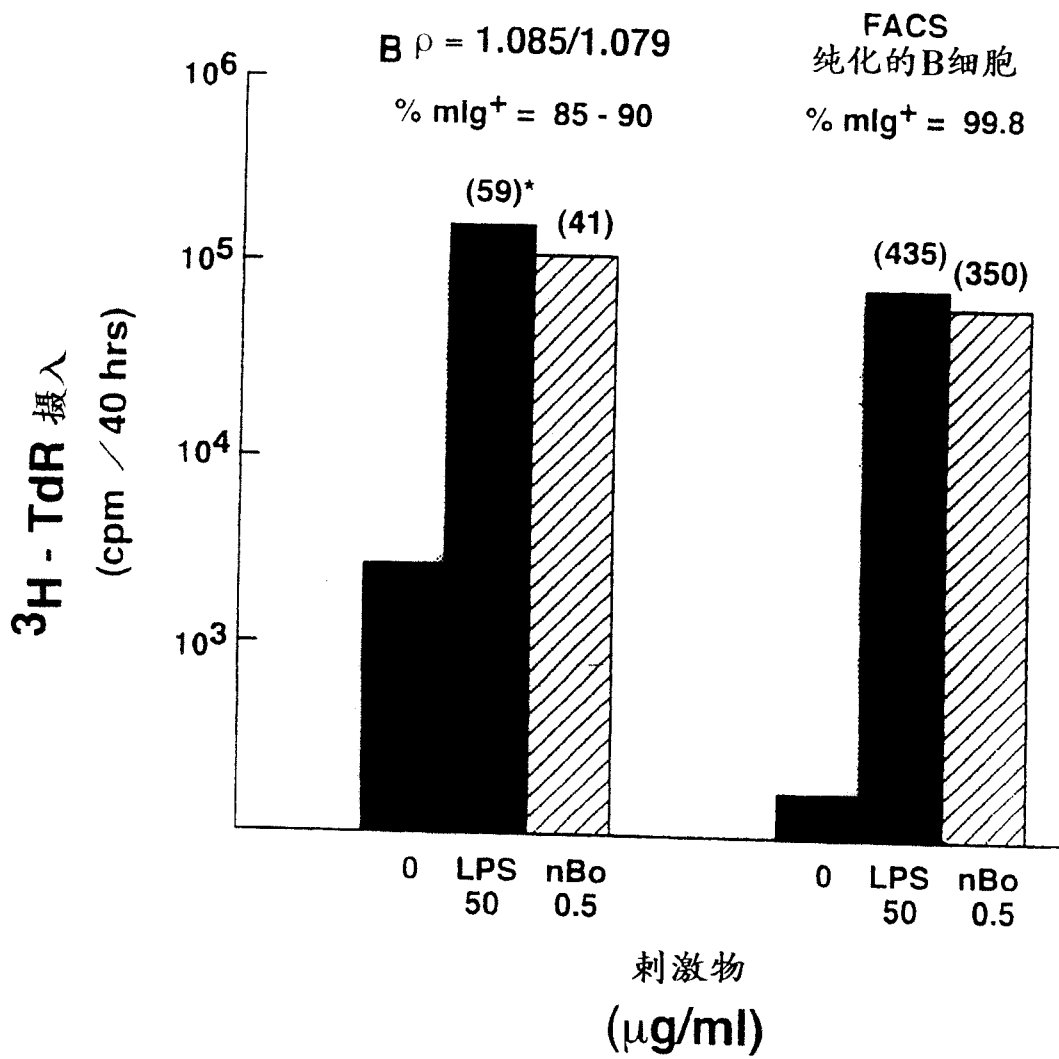


图 14



细胞群: 1 - 未分离的脾细胞  
2 - T- 缺失的,  $\rho=1.085/1.079$  脾细胞  
3 - FACS 从细胞群2中纯化的 mlg<sup>+</sup> B细胞

图 15



\* ( ) = 刺激指数

图 16

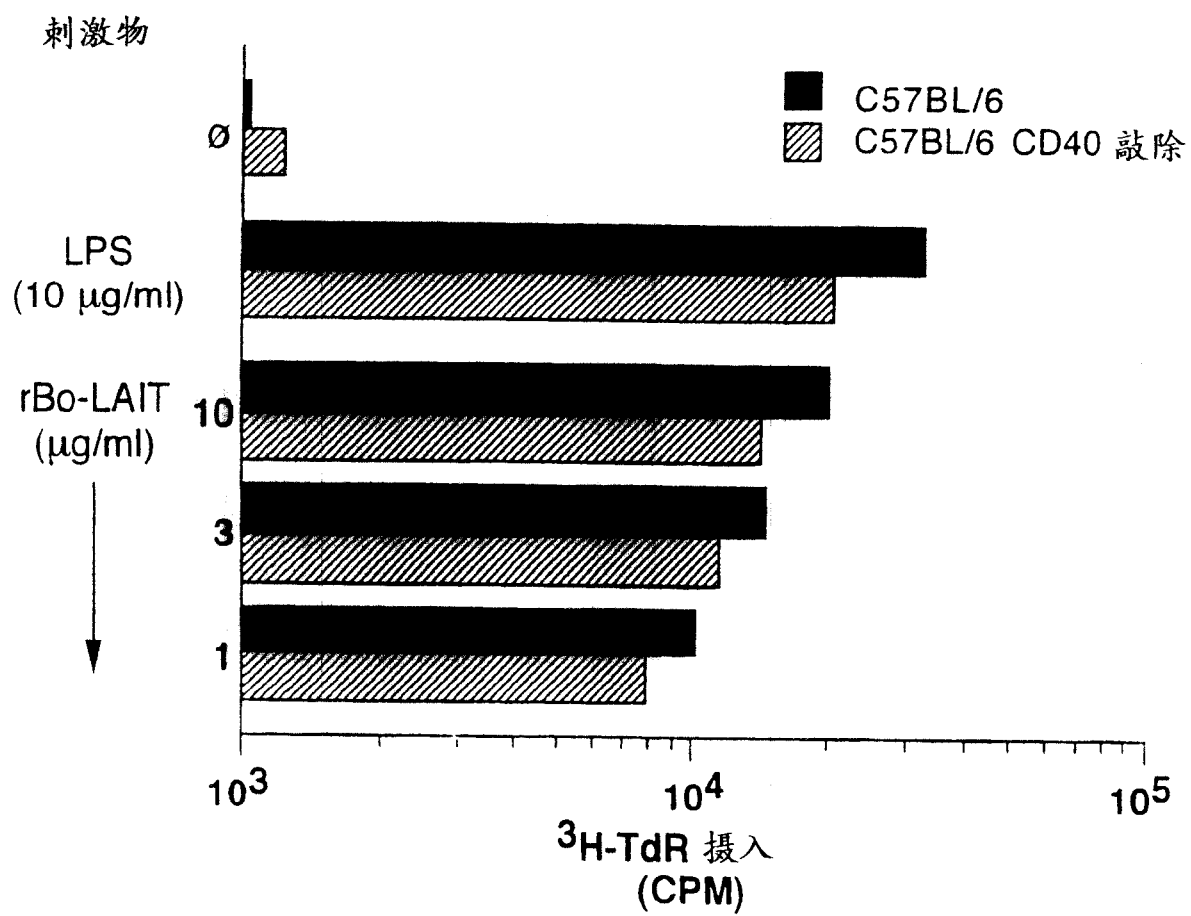
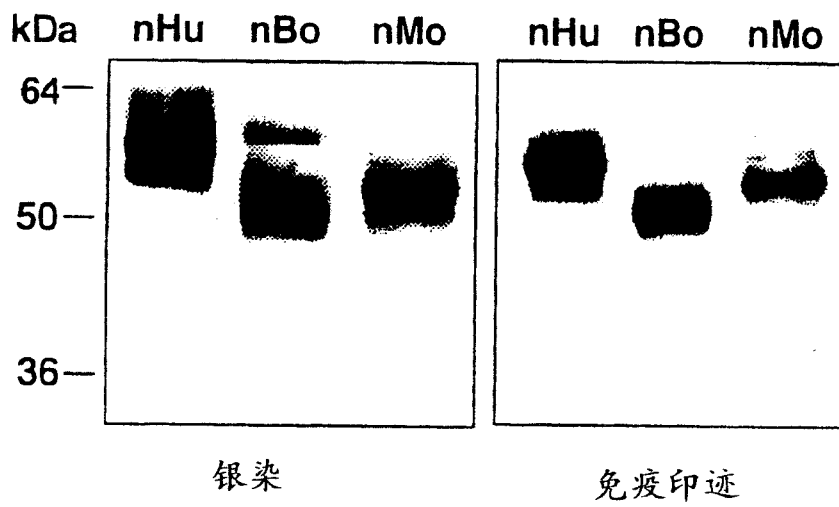


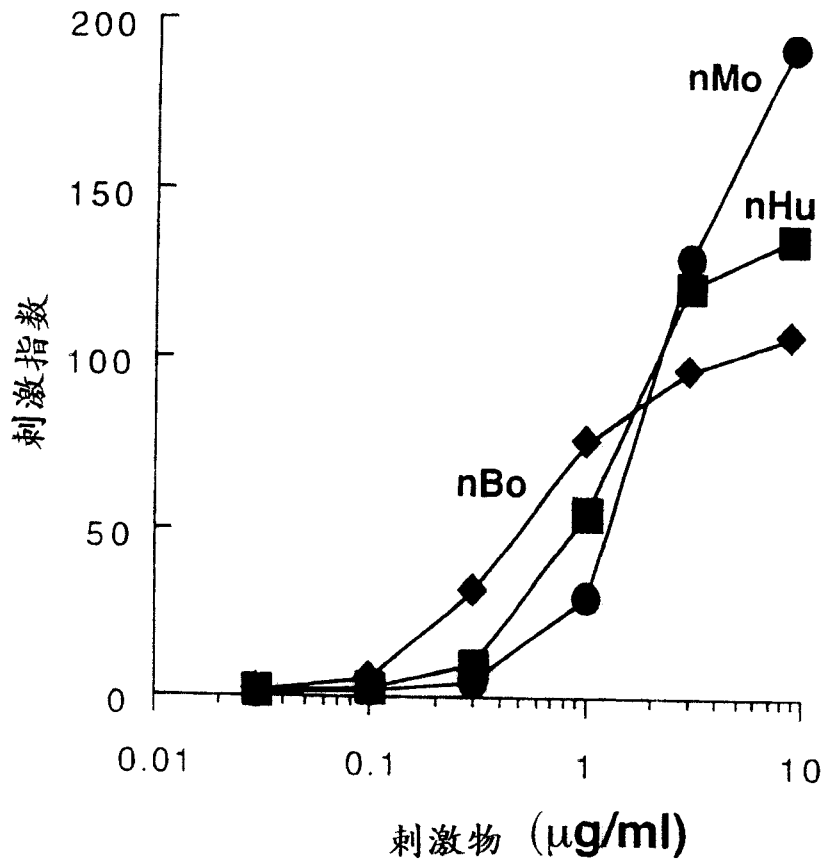
图 17



词源

- nHu - 肾病病人的尿
- nBo - 初乳
- nMo - 杂交瘤上清

图18

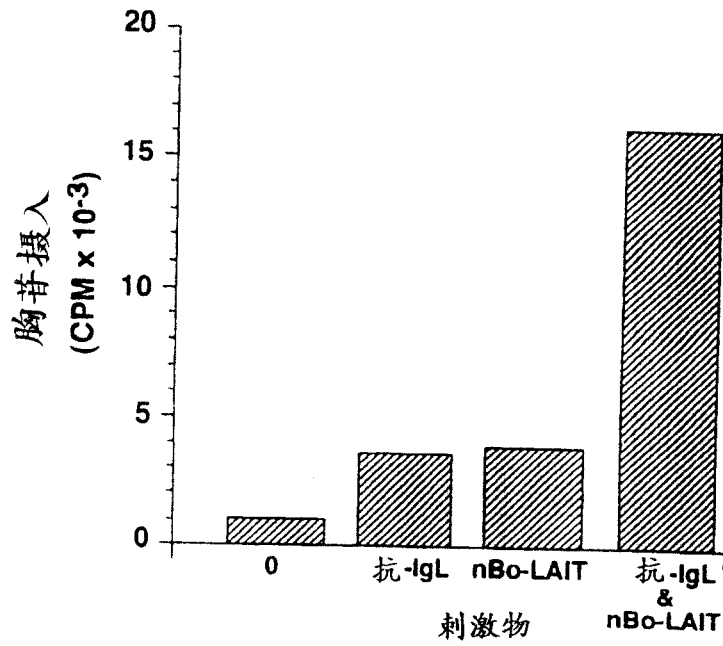


词源

- nBo - 初乳
- nHu - 肾病病人的尿
- nMo - 杂交瘤上清

图 19

A. 脐带B细胞



B. 扁桃体B细胞

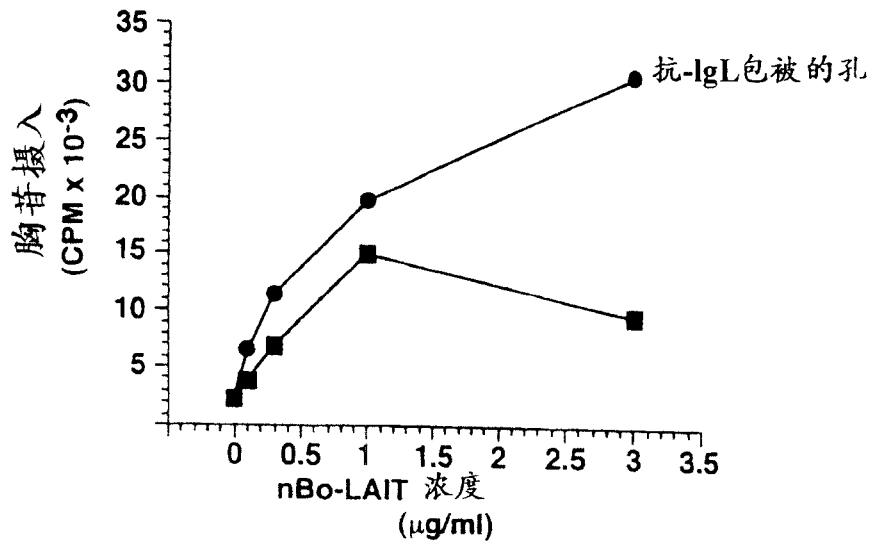


图 20

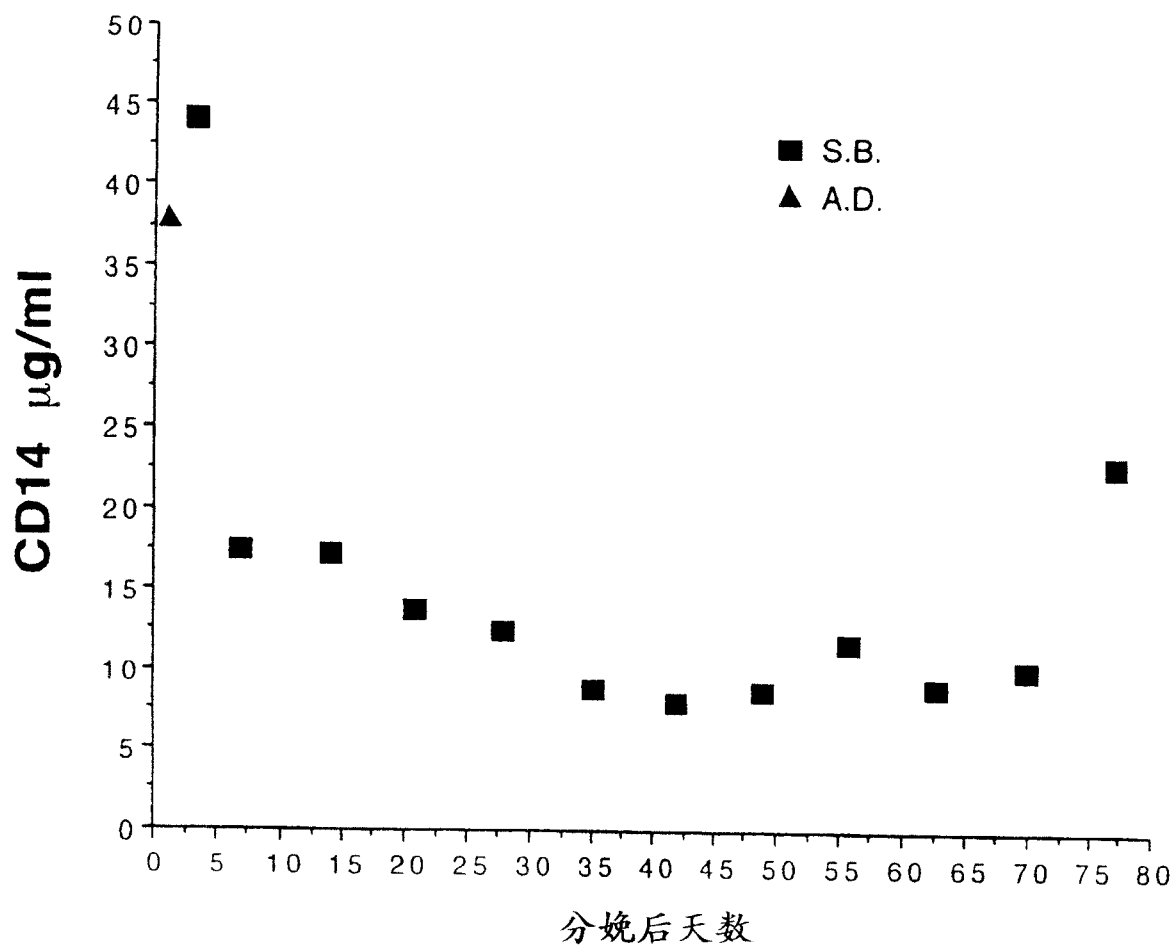


图 21