

計畫編號：DOH88-TD-1058

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

TR2-Fc 融合蛋白及抗 TR2 單株抗體的製造：
研究宿主血中可溶性 TR2 受體的重要工具

研究報告

執行機構：臺大醫學院藥理學科

計畫主持人：林琬琬

研究人員：張櫻馨

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

目錄

前言.....	1
材料與方法.....	4
結果.....	10
討論及結論.....	13
參考文獻.....	16
圖.....	19

中文摘要

關鍵詞：TR2 融合蛋白，TR2 單株抗體，LIGHT

TNF 受體家族包含了將近 10 個人類蛋白，而一個新近發現的蛋白 TR2 (或是 herpes virus entry mediator) 是從 cDNA 基因庫所得到，它位於染色體 1p36.22-36.3，基因經轉錄後可合成具 283 個胺基酸的 signal transmembrane protein，其分子量約 30 kDa。TR2 主要表現在血液組織系統，特別是淋巴組織如脾臟、胸腺等，並且它與 T 細胞的活化有關。為了研究 TR2 蛋白及其接合物 LIGHT 的生理角色和訊息傳遞，在我們的實驗中，已成功地表現 TR2-ECD-Fc 融合性蛋白，並製造了七株單株抗體，(4A12, 4D10, 3E11, 4D12, 4B12, 5F6 及 6A11)。4A12 是屬於 IgG_{2a} 的型式，而其他都是屬於 IgG₁。我們以 RT-PCR 的方式來偵測 TR2 mRNA 的表現，發現在人類 T 細胞株 CEM、B 細胞株 Ramos、白血球細胞株 HL-60 及內皮細胞株 ECV 在靜止態就有 TR2 mRNA 的表現。ECV 細胞以 IL-1 β (10 ng/ml) 處理 8 小時，而 A549 細胞以 IFN- γ (100 U/ml) 刺激 8 小時，都可看到 TR2 mRNA 明顯地增加。其他的細胞株 HL-60、CEM、U937 也會因不同的刺激而增加 TR2 mRNA 的表現。此外，螢光染色的實驗也可看到相近的結果。總而言之，抗 TR2 單株抗體是一個有用的工具，可幫助我們了解 TR2 蛋白在宿主免疫系統的反應，並可偵測在發炎反應時釋放的可溶性 TR2 蛋白。

Abstract

Key words: TR2 fusion protein, TR2 monoclonal antibody, LIGHT

The tumor necrosis factor receptor (TNFR) superfamily consists of approximately 10 characterized members of human proteins. A newly identified member, TR2 (or herpes virus entry mediator) from a search of an expressed sequence tag data base is encoded by a single gene, which maps to chromosome 1p36.22-36.3, and the TR2 open reading frame sequence encodes a 283-amino acid single transmembrane protein (30 kDa). TR2 is expressed mainly in hemopoietic tissues, particularly in lymphoid tissues such as spleen and thymus, and is involved in T cell activation. In order to study TR2 and LIGHT, we have successfully expressed TR2-ECD-Fc fusion protein and generated seven monoclonal antibodies (4A12, 4D10, 3E11, 4D12, 4B12, 5F6 and 6A11). One antibody is IgG_{2a} isotype and the others are IgG₁ type. TR2 mRNAs, as detected by RT-PCR, are normally expressed in human T-cell line CEM, B-cell line Ramos, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), leukocyte cell line HL-60 and endothelial cell line ECV. TR2 mRNA expression could be induced by various stimuli in T-cell line CEM, monocyte cell line U937 leukocyte, cell line HL-60, endothelial cell line ECV and pulmonary A549 epithelial cells. ECV cells treated with IL-1 β (10 ng/ml) for 8 hr and A549 cells treated with IFN- γ (100 U/ml) for 8hr expressed greater amount of TR2 mRNA. In parallel, the immunostaining of TR2 in both cell lines was increased after cytokine stimulation. In conclusion, the antibodies for TR2 are useful tools to understand the role of TR2 in host immune response and to detect the presence of soluble TR2 during various inflammatory diseases.

前言

TNFR (腫瘤壞死因子受體) 的家族最近已有愈多的成員被發現，包含了 TNFRI, TNFRII, CD27, CD30, CD40, 4-1BB(CDw137), OX40, Fas, nerve growth factor receptor, lymphotoxin- β (LT β R), Apo-3/DR3/Wsl-1/lymphocyte-associated receptor of death (LARD)/TRAMP, DR4, DR5/TNF-related apoptosis-inducing ligand(TRAIL)-R2 and OPG (Beutler and Huffel, 1994; Vandenabeele *et al.*, 1995) (圖 1)。這些 TNFR 家族中的成員皆是第二型蛋白，意即它們的 N 端是在細胞內，而 C 端則伸到細胞外，並會形成三結構成體(homotrimer)；它們的細胞外域之 150 個氨基酸在腫瘤壞死因子群間彼此具有相似性(20-30%)，是負責與受體結合的部分，帶有 2-6 個富含半胱氨酸的重覆區域(cys-rich motif)且促使受體聚合；而其細胞內區域則不具相似性，彼此間不論氨基酸的序列或長度皆顯著不同。然而除了 TNFRI、Fas 及 Wsl-1 等都含有 death domain 外，其他的受體細胞內部分蛋白則皆不相同 (Kitson *et al.*,1996; Marsters *et al.*,1996; Smith *et al.*,1996)。

TNFR 家族的組織分佈性不同，TNFRI, TNFRII 及 Fas 會在許多的區域表現，而 CD27, CD30, CD40, 4-1BB 及 OX-40 則主要侷限在血液細胞中才會表現 (Armitage *et al.*,1994; Gruss and Dower *et al.*,1995)。TNFR 的生物活性具有多樣性，如調控細胞繁殖、分化、細胞存活和細胞死亡 (Armitage *et al.*,1994)。許多 TNFR 成員參與不同方面免疫系統之調控。舉例來說，CD40 主要會在 B 淋巴球表現，它是一種 costimulatory 分子，對 B 細胞活化、Ig class switching 及抗體製造的過程中扮有重要的角色。另外，4-1BB、CD30 及 OX40 主要表現 T 細胞，在與它們接合體結合的情況下，能刺激 T 細胞的活化、細胞激素產生、繁殖及分化 (Armitage *et al.*,1994)。

單純疱疹病毒 (Herpes simplex viruses, HSV) 是一種常見的病

毒，感染後易導致口、臉、眼等部位之皮黏膜潰爛。HSV 侵犯宿主細胞需要有二個動作：那就是先利用 HSV envelope glycoprotein 與宿主細胞上的 proteoglycan 結合 (binding) (Spear, 1993)，之後再利用宿主細胞膜上的 HVEM (herpes simplex virus mediator)，進入宿主細胞。有趣的發現是 HVEM 蛋白是一種新的 TNFR 家族成員 (Montgomery et al., 1996)，它又名為 TR2 (TNFR-related 2) 或 ATAR (another TRAF-associated receptor)。TR2 位於染色體 1P36.22-36.3，基因經轉錄可合成具 283 個胺基酸的 single transmembrane 蛋白，其分子量約 30 kDa，其胺基酸序列與其他 TNFR 家族受體有相似性 (Hsu et al., 1997; Kwon et al., 1997) (圖 2)。

TR2 之 mRNA 在多種人類組織或細胞株均有表現，主要在血液組織，尤其是淋巴組織如脾臟及胸腺，次要表現則在小腸及骨髓。此外，TR2 也會在靜態及活化的 CD4⁺及 CD8⁺的 T 細胞及 CD19⁺的 B 淋巴球中可偵測到。既然 TR2 之基因表現顯示存在於富含 T 淋巴球聚集之組織，因此推測在免疫系統必有其重要性 (Kwon et al., 1997)。目前 TR2 受體除被發現與庖疹病毒感染宿主細胞有直接相關性外，尤其於相似於已知的腫瘤壞死因子受體 (TNFR)，具有多元化的細胞調節功能。雖然 TR2 之細胞內部並沒有 TNFRI 及 Fas 所具有的 death domain，但發現可與 TRAF1、TRAF2、TRAF3 及 TRAF5 結合 (Hsu et al., 1997; Marsters et al., 1997)。TRAF 為一群存在於細胞質，可與 TNFR 結合之因子 (TNFR-associated factor)，與各種 TNFR 傳達特異性訊息傳遞有決定性調控作用。TR2 在轉染 (transfection) 至 293 細胞後發現可活化蛋白激酶 JNK (c-Jun N-terminal kinase)，及基因轉錄因子 NF- κ B, AP-1。NF- κ B 是控制多種免疫調節基因，及發炎基因表現的重要轉錄因子，而 AP-1 也控制一些 stress response genes，因此推測 TR2 可經 TRAF2 來活化免疫的反應 (Hsu et al., 1997)。

LIGHT 是腫瘤壞死因子細胞激素家族的新成員，它來自於活

化 T 細胞 cDNA 資料儲存庫。它在活化的 PBL、腫瘤浸潤淋巴球、顆粒性白血球及單核球都有大量的表現 (Mauri *et al.*, 1998)。LIGHT 是細胞 TR2 及 LT β R 的接合物 (Harrop *et al.*, 1998; Zhai *et al.*, 1998)。LT β R 在控制淋巴結發展及細胞免疫反應中是一個主要的元素。利用重組 LT $\alpha_1\beta_2$ heterotrimer 及使用固定抗體交互接合的方法來活化淋巴素受體會引發腎上腺瘤細胞的死亡 (Zhai *et al.*, 1998)。最近在活體內的研究顯示將 LIGHT cDNA 插入人類乳癌腫瘤細胞會完全抑制腫瘤的生成 (Zhai *et al.*, 1998)。干擾素 γ (IFN γ) 則會有效地促進 LIGHT 引起的細胞凋零。有趣的是，LIGHT 蛋白質也會引發許多有表現 LT β R 及 TR2 受體之癌細胞的細胞凋零，如 MDA-MB-231、MCF-7、HT-29 及 HT3。然而，LIGHT 對只有表現其中一種 LT β R 及 TR2 受體之癌細胞是不具有細胞毒殺性的 (Zhai *et al.*, 1998)。在 HT-29 細胞中，LIGHT 動態性的細胞毒殺作用與 LT $\alpha_1\beta_2$ 作用相似，它需要 2-3 天來引發細胞凋零，其中有 CPP32 蛋白酶及自由基參與細胞凋零的過程中 (陽明大學微免所謝世良老師實驗室之結果，正準備發表中)。

為了進一步了解這一個屬於 TNFR 家族的 TR2 之細胞功能，免疫功能及單純疱疹病毒感染宿主之機制，我們必須得到重組蛋白 TR2-ECD-Fc 及其單株抗體。因此我們將利用基因工程及 Baculovirus 蛋白表現系統產生可溶性的人類 TR2-ECD-Fc，並以此為抗原，產生抗體。TR2-ECD 重組蛋白及其單株抗體且可研發作為抑制 HSV 感染的一個策略，因此唯有抗體的取得，才能深入了解 TR2 在免疫系統的功能及作為 HSV 感染的治療方法之一。

材料及方法

(A)材料:

RPMI 1640 培養基購自於美國 Life Technologies Gibco BRL 公司； PEG1500 (polyethylene glycol 1500)、HAT (hypoxanthine, aminopterin, thymidine)、HT (hypoxanthine, thymidine)均購自 Boehringer Mannheim 公司；融合瘤選殖培養基 (BriClone™ Hybridoma cloning medium) 購自 BioResearch Ireland 公司；其他購自於 Sigma 公司。

TR2-ECD-Fc construct 為將 TR2 蛋白 extracellular domain 之 sequence 接在 plasmid 上，來自陽明大學謝世良老師實驗室。(圖 3)

(B)方法

一、細胞培養

哺乳類黏附細胞以含 10% 胎牛血清 (FBS) 之 DMEM，培養在直徑 10 公分之培養皿 (Falcon Co.)；初始以細胞數 2×10^6 在 10 ml 培養液中培養，待細胞數達 1×10^7 以 5 ml PBS rinse 2 次，再以 3 ml 之 Trypsin-EDTA 處理 3~5 分鐘，使細胞不再附著於培養皿上，利用 10 ml PBS 將細胞沖下、離心，留下 2×10^6 細胞在培養皿中繼續培養，約 3 天為一週期。

人類肺上皮細胞 A549 細胞株以含 10% FBS 之 F12-Nutrient Mixture 培養液培養，方法同哺乳類黏附細胞。哺乳類懸浮細胞株以含 10% FBS 之 RPMI 1640 培養於 25 cm^2 或 75 cm^2 之組織培養瓶，初始以細胞密度 $2 \sim 5 \times 10^5/\text{ml}$ 培養，待生長至 $1 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ 之細胞密度，即可作 passage，約 3 天一次。

蛾類幼蟲 SF-21 細胞株以含 10% FCS 之 TNM-FH (Grace's insect medium, GibcoBRL Co. Cat. No. 13100-043) 細胞培養液培養；初始以細胞數 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 在 25 cm^2 tissue culture flask 中培養，至細胞數目達 $0.5 \sim 1 \times 10^7$ (八分滿)時即可 passage，用新鮮培養液將細胞沖下，留下 $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞繼續培養，約 4~5 天 passage 一次。另外須大量培養此細胞株，則可在含攪拌器之細胞瓶 (spinner flask) 中以初始 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 之細胞密度開始作懸浮培養，至 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 可作病毒增殖，至 $1 \sim 2 \times 10^6/\text{ml}$ 可作蛋白表現。

二、以 Baculovirus 系統表現重組蛋白

1. 病毒斑分析(plaque assay)

利用形成病毒斑方式挑送單一病毒株及作病毒定量。首先準備好 10^6 Sf21 細胞株在 6 well 培養皿中隔夜培養，將培養液吸走，小心自培養皿中心滴入 200 μ l 經過培養液稀釋的病毒 (10^{-2} ~ 10^{-8})，維持細胞完整的單層結構，培養於 28 $^{\circ}$ C，1 小時，隔 15 分鐘搖晃一次培養皿，使細胞都能被液體覆蓋，並讓病毒吸附上去，此時，準備好滅過菌的 2% 低熔點洋菜膠溶液，和含 10% FCS 之培養液 37 $^{\circ}$ C 下等體積混合，待病毒液作用時間到，吸取病毒液後，小心沿培養皿壁加入 2 ml 洋菜膠混合液，在室溫下使其凝固，再加上 1 ml 含 10% FCS 之培養液，28 $^{\circ}$ C 培養 5~7 天直至病毒斑出現，若要更清楚看見病毒斑，可以在洋菜膠層上加上 1 ml 以 PBS 泡成的 0.025% (w/v) 中性紅(Neutral Red, Sigma Co.)溶液，28 $^{\circ}$ C 避免光照下培養 2~4 小時，將單層活細胞染上顏色，則病毒斑更能以肉眼看見。

2. 低濃度病毒液製備

在 25 cm^2 細胞培養瓶中放入 1×10^6 Sf21 細胞株隔夜培養，吸起培養液，加入 250 ml 的單株病毒液，37 $^{\circ}$ C 培養一小時，每十五分鐘輕輕搖晃一遍。吸出病毒液，加入 5 ml 培養液，在 28 $^{\circ}$ C 培養 3~6 天，待細胞產生病毒感染後之細胞病變，收集培養液，儲存於 4 $^{\circ}$ C 及 -70 $^{\circ}$ C，並以病毒斑分析方式作病毒定量。

3. 高濃度病毒之製備

Sf21 細胞株在 spinner flask 自細胞密度 1×10^5 /ml 開始懸浮培養，至 5×10^5 /ml，以病毒細胞比 0.1~0.2 加入中濃度病毒液，在 28 $^{\circ}$ C 培養 4~6 天，收集細胞培養液（除去細胞），分裝，存於 4 及 -70 $^{\circ}$ C，以病毒斑分析作病毒定量。

4. 以懸浮細胞培養大量蛋白表現

Sf21 細胞株在 spinner flask 自細胞密度 1×10^5 /ml 懸浮培養，至 $1 \sim 2 \times 10^6$ /ml，以病毒細胞比 5~10 加入病毒液，在 8 $^{\circ}$ C 培養（欲表現大量人類可溶性 TR2R 約需 4~6 天），收集培養進行蛋白純化。

5. 表現蛋白之純化

人類可溶性 TR2R，經由 Baculovirus 系統作出，因有人類 G1 免疫蛋白 Fc 部分，可以用蛋白 A 洋菜膠純化，以 1 ml 的蛋白 A 洋菜膠和 400 ml 蛋白液在 4°C 混合作用 16 小時，使其結合，再將洋菜膠在分離柱中沈澱，避免氣泡產生，再以 10 到 20 倍 A 蛋白洋菜膠體積之 50 mM Tris-HCl 緩衝液 pH 7.0 沖洗，用 5 倍 A 蛋白洋菜膠體積之 0.1 M Glycine 緩衝液 pH 3.0 將蛋白析出，0.5 ml 收集一管，內須含 1/10 體積之 1 M Tris-HCl 緩衝液 pH 9.0，以 SDS-PAGE 確定蛋白已純化析出，並以蛋白分析套組作定量 (DC protein assay, Biorad Co.)。

三、抗人類 TR2 蛋白單株抗體的製備

1. 單株抗體融合瘤 (hybridoma) 之製備

將純化出的 TR2-ECD-Fc 融合蛋白作為抗原。將 TR2-ECD-Fc 融合蛋白 (50 µg) 溶液和等體積之完全輔劑 (complete Freund's adjuvant, CFA, Sigma Co.) 混合均勻，以皮下注射方式打入 BALB/c 小鼠腹部。之後改以等體積之不完全輔劑 (incomplete Freund's adjuvant, IFA, Sigma Co.) 混合，以四星期為一週期，至少經過 4 次免疫，最後於犧牲小鼠前 3 天以靜脈注射方式打入 TR2-ECD-Fc 融合蛋白溶液。以頸脊脫臼法犧牲小鼠取出脾臟，置於不含 FBS 的 RPMI 1640 培養基中。以 21 號針頭穿刺，再壓擠出脾臟細胞。脾臟細胞以 20 ml 不含 FBS 的 RPMI 1640 沖下後，靜置於 50 ml 離心管。此時取 3-5 倍的 NS-1 細胞，以 10 ml 不含 FBS 之 RPMI 1640 清洗 2 次 (室溫 300g，離心 5 分鐘)。接著於清洗過之 NS-1 細胞液中，加入靜置後位於上層培養液之脾臟細胞 (不取下層含其他組織之細胞) 再一起清洗二次 (室溫 500g，離心 5 分鐘)。倒掉上清液，以殘餘培養液將細胞重新懸浮，在 1 分鐘內加入 1 ml 預溫至 37°C 的 PEG 1500 (Boehringer Mannheim Co.)。邊加邊轉動試管，待加完再持續轉動試管 1 分鐘，讓 PEG 充分作用。再於 2 分鐘內加入 2 ml 含 15% FBS 之 RPMI 1640，於 2 分鐘之內加入 8 ml 前所述之培養液，仍持續轉動試管，最後離心 300g，10 分鐘，倒掉上清液，加入含 HAT 培養液，分佈到數盤 96 槽 (96-well) 細胞培養盤 (Falcon) 中，約 2×10^5 脾臟細胞/槽，培養 7-10 天後，以 ELISA 方式取細胞培養液偵測有無特定抗體產生。當產生所欲得抗體之細胞群，漸漸以 HT 培養液取代 HAT 培養液 (一次換培養液，稀釋 2 倍)，並作該細胞群的限制性稀釋 (limiting dilution)，將稀釋之細胞培養液分注至 96 槽培養盤中，每槽加

200 μl ，使每槽中平均有 1~1.5 顆細胞。持續觀察細胞之生長，若一群落由單一細胞長成，且 ELISA 結果為陽性，則將此株融合瘤移至較大培養盤培養，最後得到的細胞群為單株會分泌所欲得抗體之單株融合瘤。

2. Dot-blot 篩選細胞融合瘤

將適量 TR2-ECD-Fc 及人類 IgG1 蛋白二個一組點於夾有 NC membrane 的 96 槽 Bio-dot 裝置中 (Bio-Rad Co.)。待室溫乾燥後，以 TBST 每槽 200 μl 沖洗 3 次後，加入 blocking solution，每槽 200 μl 室溫下作用 1 小時，再以 TBST 沖洗 3 次後，加入培養過細胞融合瘤的培養液，室溫下作用 1 小時，以 TBST 沖洗 3 次，再加入以 TBST 稀釋 2,000 倍結合有過氧化酵素之羊抗小鼠 G 型免疫球蛋白抗體 (sheep anti-mouse IgG, HRP linked whole Ab, Amersham)，於室溫下作用 1 小時，TBST 沖洗 3 次，取出 NC membrane，加入 ECL™ 溶液 (Amersham Co.) 以 X 光片偵測蛋白。由於打入小鼠的抗原為 TR2-ECD-Fc 融合蛋白，因此所得到的抗體可能是抗 Fc 部分，或是抗人類 TR2 部分，故依呈色的強弱挑出 NC membrane 上對 Fc-TR2 呈陽性反應，而對 Fc 不呈陽性反應的抗體來源之細胞融合瘤。

3. ELISA 篩選細胞融合瘤

將適量抗原(蛋白粗萃取物：100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，50 $\mu\text{l}/\text{well}$ ；純化蛋白：0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，50 $\mu\text{l}/\text{well}$)以固定緩衝液(coating buffer)稀釋後，置於 ELISA 專用 96 well 專用培養盤中 (96-well vinyl assay plates, Costar Co.) 37°C 下，2 小時，經由 TBST (含 0.05% Tween-20 之 TBS) 每次 200 μl 沖洗 3 次後，加入 blocking buffer，在 37 °C 下作用 1 小時，以 TBST 沖洗 6 次，加上細胞融合瘤之培養液，在 37 °C 下作用 1 小時，以 TBST 沖洗 6 次，再加上以 TBST 稀釋 2000 倍結合之過氧化酵素之山羊抗小鼠 G 型免疫蛋白 (Pharmacia.) 37 °C 作用 1 小時，TBST 沖洗 6 次，加上酵素基質 ABTS (B.M.Co.) 溶液，呈色 20 分鐘後，測 OD415 nm 之吸光值。由於抗人類 TR2 之抗體可能抗人類 G₁ 型免疫蛋白 Fc 部分是抗人類 TR2 部分，故依呈色的強弱挑出 NC membrane 上對 TR2-Fc 呈陽性反應，而對 IgG₁ 不呈陽性反應的抗體來源之細胞融合瘤。

4. 單株抗體的分類鑑定

將適量抗原(純化蛋白：0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，50 $\mu\text{l}/\text{well}$)以固定緩衝液(coating buffer)

稀釋後，點於夾有 NC membrane 的 96 槽 Bio-dot 裝置中，待乾燥後，以 TBST 每槽 200 μ l 沖洗 3 次後，加入 blocking solution 每槽 200 μ l 作用 1 小時，再以 TBST 沖洗 3 次，加入確認過的含抗 TR2 抗體的細胞融合瘤培養液，作用 1 小時，以 TBST 沖洗 3 次，再於不同槽中加入 200 μ l 以 TBST 稀釋 2,000 倍結合有過氧化酵素之山羊抗小鼠 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM、IgA 抗體 (SBA Clonotyping™ System/HRP, Southern Biotechnology Associates, Inc)，作用 1 小時。TBST 沖洗 3 次，取出 NC membrane，以 DAB 溶液呈色得到陽性反應的第二抗體種類即為單株抗體的分類。

5. 腹水 (Ascites) 之製備

將 0.5 ml 之 Pristane (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) 打入 8~10 週大 BALB/c 小白鼠之腹腔；待 7 天後打入 2×10^6 個融合瘤細胞。數天後當老鼠之腹部隆起，每隔兩天用 18 號針頭插入老鼠腹腔收取腹水直至老鼠死亡為止。取得之腹水經離心除去結締組織及紅血球後，儲存於 -20°C 及 -80°C 備用。

四、免疫螢光染色法

將鋪於蓋玻片上的細胞，以 PBS 清洗 2 次，加入含有 10% 福馬林 (formaldehyde) 之 PBS 溶液，反應 5 分鐘，接著加入含有 5% 脫脂奶粉之 PBS 溶液處理 15 分鐘，加入以 PBS 稀釋為 1/100 的 1 級抗體於 37°C 下反應 1 個小時，以 PBS 清洗 3 次後，加入以 PBS 稀釋 1/100 的帶有 FITC 之 2 級抗體 (Fluorescein-conjugated goat IgG fraction to mouse IgG whole molecule, Cappel Co.)，以 PBS 清洗 3 次，封片後以螢光顯微鏡觀察並拍照。

五、人類週邊血液單核細胞 (PBMC) 之分離

抽取人血 20 ml，並加入抗凝劑 5 ml EDTA (0.1 mM) 混合均勻備用。先在 50 ml 離心管中加入 12.5 ml 之 HISTOPAQUE 1119 (Sigma) 於底層，再沿管壁緩慢加入 12.5 ml 之 HISTOPAQUE 1077 (Sigma)，小心操作注意不要使兩層混合，再沿管壁加入先前製備的人血及 EDTA 混合液，同樣小心操作注意不要使三層混合。於室溫下離心 700g 30 分鐘後，吸取 HISTOPAQUE 1077 與上層 plasma 交界處的液體。加入 10 ml PBS 混合後，再於室溫下離心 200g 10 分鐘，倒去上層清洗溶液，再各以 10 ml PBS 清洗 2 次，將細胞以含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培養液於 37°C 培養 2 小時，使 monocyte 黏附至培養皿底部，吸

取上層培養液並經計算細胞數目後，將適當數目的細胞分裝於培養皿以供實驗使用。

六、RNA 萃取及 RT-PCR 反應：參照第一部分

聚合酶連鎖反應增殖 cDNA 所用的 primers：

TR2

sense：5'-GGA ATT CCT GAG GCA TGG AGC CTC C-3'

antisense：5'-GGA ATT CGC TGC ACT TGG TCT GGT GC -3'

PCR 條件為 95°C, 40 秒; 57°C, 40 秒及 72°C, 2 分鐘，總共反應 30 個循環最後保存於 16°C 直到由機器中取出。

結果

一、產生抗人類 TR2 單株抗體

1. 以 Baculovirus 系統表現 TR2 蛋白

為了能夠鑑定人類 TR2 蛋白及研究其與功能，必須要得到能認知 TR2 的抗體，且希望能拿到可刺激 TR2 的抗體 (agonist antibody) 以利 TR2 功能方面的研究。為了製備抗 TR2 的單株抗體，首先必需製備大量的 TR2 蛋白做為抗原。經由得到陽明大學謝世良老師實驗室轉染含有 TR2-ECD-Fc 的 baculovirus，我們以其感染 SF-21 昆蟲細胞可大量表現含有 TR2-ECD-Fc 的蛋白。TR2-ECD-Fc 蛋白經蛋白 A 純化後即為免疫注射小鼠的抗原 (圖 4)。

2. 單株抗體融合瘤之製備

我們以 TR2-ECD-Fc 做為抗原去免疫小鼠，希望得到抗 TR2 的細胞融合瘤 (hybridomas)，再以酵素接免疫基質分析法(ELISA)及 dot blotting 分別以人類 IgG 及 TR2-ECD-Fc 作單株抗體的區分篩選，希望得到只會對抗 TR2-ECD 抗原而不會對抗 Fc 抗原的細胞株。

經過三次的細胞融合瘤實驗中，利用 ELISA 及 Dot-blot 方法篩選的結果共得 7 株可抗人類 TR2 之細胞融合瘤，分別是 3E11、4A10、4D10、4D12、4B12、5F6 及 6A11 共七株。以上及株融合瘤細胞再經二次的限制性稀釋 (limiting dilution)所得之細胞株即是會分泌抗人類 TR2 單株抗體的融合瘤 (圖 5)。

3. 腹水的製備

我們以 0.5ml 之 Pritane 打入小老鼠體內誘發炎反應的產生，

再打入融合瘤細胞株 4A12、4D10、5F6 及 611A 使小老鼠產生腹水。抽取出之腹水經 ELISA 及 Dot-blot 鑑定後，發現仍具有抗 TR2 蛋白之能力。

4. 單株抗體分類的鑑定

為了實驗的應用，必須對我們所得的這九個單株抗體做分類上鑑定。圖 6 以針對各類老鼠抗體包括對抗重鏈 (heavy chain) 的 IgG₁、IgG_{2a}、IgG_{2b}、IgG₃、IgM、IgA 及輕鏈 (light chain) 的 κ 及 λ 等八種的二級抗體作 Dot-blot 及 ELISA，結果 4A12 屬 IgG_{2a}，輕鏈屬於 κ ；而 3E11、4D10、4D12、4B12、5F6 及 6A11 均屬於 IgG₁，輕鏈屬於 κ 。

二、內生性 TR2 之偵測

1. RT-PCR 偵測 TR2 mRNA 的表現

在文獻中指出 TR2 基因會表現於單核球，T 淋巴球，B 淋巴球，肝細胞及上皮細胞等人類細胞中，我們想進一步偵測在我們的人類細胞株中是否有表現 TR2 mRNA，以便研究人類細胞中內生性的 TR2 蛋白。圖 7 中，我們以 RT-PCR 方法偵測了一些人類細胞株，結果發現在 T 細胞 CEM、單核球 U937、B 細胞 Ramos、週邊血液單核細胞 PBMC、白血球 HL-60、內皮細胞 ECV 及肺上皮細胞 A549 等細胞中均有 TR2 mRNA 的表現，RT-PCR 的產物為 200 bp。在 CEM 人類 T 細胞分別以 ConA (3 μ M)，PHA (5 μ M)，或 PMA (1 μ M) 併用 ionomycin (1 μ M) 處理 8 小時，均可以見到 TR2 mRNA 有增加 (圖 7A)。在 U937 單核球可看到原本沒有 TR2 之表現，但以 PMA (10 nM) 處理經 1 天、2 天及 3 天則有明顯增加 (圖 7B)。人類白血球細胞 HL-60 細胞原本只有少量 TR2 之表現，但以 LPS (1 μ g/ml)、IFN- γ (100 U/ml)、TGF- β (10 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、TNF- α (10 ng/ml) 及 PMA

(1 μ M)刺激 8 小時後，發現 IFN- γ (100 U/ml)及 TGF- β (10 ng/ml)可增加 TR2 之表現 (圖 7C)。Ramos 人類 B 細胞以 PWM(1%) 及 SAC (0.1%) 處理 8 小時亦無太大變化 (圖 7D)。PBMC 人類週邊血液單核細胞以 PWM、SAC 或並用 PWM 及 SAC 處理 8 小時，發現 PWM 可稍微增加 TR2 之表現 (圖 7E)。人類內皮細胞 ECV 以 TNF- α (10 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、IFN- γ (100 U/ml)、LPS (1 μ g/ml)、PMA (10 nM)及 TG (30nM)刺激 8 小時後，發現 IL-1 β 、IFN- γ 及 LPS 可明顯增加 TR2 mRNA 之表現 (圖 7F)。在人類肺上皮細胞 A549 以 TNF- α (10 ng/ml)、IL-1 β (10 ng/ml)、IFN- γ (100 U/ml)、LPS (1 μ g/ml) 處理 8 小時後，發現 IFN- γ 單獨刺激或 TNF- α 、IL-1 β 及 IFN- γ 共同刺激可使 A549 細胞其 TR2 之 mRNA 表現有增加的現象 (圖 7G)。在這個實驗結果，得知在這些人類的細胞株中均表現有 TR2 mRNA，受到這些 cytokines 刺激的時候 TR2 mRNA 表現會有增加的現象。

2. 免疫螢光染色

由於 TR2 是 TNF 受體家族中的一員，是位於細胞膜上的受體，並且從圖 7F 及 G 的結果得知以 cytokine 可以增加 ECV 及 A549 細胞中 TR2 mRNA 表現，為了證明這一點，ECV 細胞以誒有 IL-1 β (10 ng/ml)刺激 24 小時，A549 細胞以 IFN- γ (100 U/ml) 24 小時後，再以抗 TR2 蛋白之單株抗體 (4D10)對 A549 及 ECV 細胞做免疫螢光染色，發現 ECV 未加藥前在細胞膜表面上誒具有螢光活性，以 IL-1 β 刺激 24 小時後，螢光活性增加 (圖 8-1)，而在 A549 細胞原本沒有螢光活性產生，但以 IFN- γ 刺激後螢光活性也有增加的情形(圖 8-2)，這證明了 4D10 這個單株抗體可應用於螢光染色的實驗，此外也可更確定 TR2 是位於細胞膜上的受體。

討論及結論

TNFR 這個超級家族包含了將近 10 個成員，它們參與許多生物活性方面的調控，如免疫調控、細胞增生、細胞存活及死亡。在 1996 及 1997 時有兩個實驗室分別選殖了 TR2 這個蛋白 (Montgomery *et al.*, 1996; Kwon *et al.*, 1997)，它的序列與 TNFR 的相似性很高，因而在細胞訊息傳遞及調控方面想必具有相當的重要性。此外，TR2 會幫助單一疱疹病毒進入細胞中，因而在單一疱疹病毒感染中是一個不可或缺的角色。

基於上述的理由，為了能進一步鑑定人類 TR2 蛋白及研究其功能與分佈，則我們第一步必須要製備能夠認知 TR2 蛋白的抗體。為了生產抗 TR2 蛋白的單株，首先必須製備大量的 TR2 抗原，因此在這個實驗中選擇以 Baculovirus 系統表現人類 TR2-Fc 可溶性的蛋白並以其蛋白做為免疫小鼠的抗原。

BALB/c 小鼠在經過數次免疫注射四個月後，取其脾臟細胞與 NS-1 細胞融合的實驗中，我們用 ELISA 及 Dot-blot 的方式，選到了七株能認知 TR2 蛋白的特定抗體，由結果中發現除了 4A12 是屬於 IgG_{2a} 外，其他都是屬於 IgG₁。我們並測試它們對抗 TR2 蛋白的強度，發現 4A12 最高，而 4D10 次之，其他五株較弱，我們便利用由小老鼠腹水中的高單位 4A12 及 4D10 單株抗體做研究。使用 ELISA 的篩選方式，可得到偵測非還原性的抗 TR2 蛋白單株抗體，因而可應用於免疫沈澱及螢光染色的實驗。我們從螢光染色的實驗中，發現可偵測到人類 A549 及 ECV 細胞膜上的 TR2 蛋白。

以前文獻由北方點墨法分析 TR2 mRNA 會在許多的組織如心臟、肺脾臟及小腸中會有表現，另外在靜置及活化的 CD8⁺及 CD4⁺ T 細胞、B 細胞及單核球中也有高量的表現。TR2 在 T 細胞及 B 細胞

中的大量表現，暗示著 TR2 可能參與 T 及 B 細胞的調控及增生。此外，經由 CHO 細胞表現及純化的 TR2 蛋白發現具有抑制 mixed-lymphocyte 所產生的反應 (T cell-dependent)，這也再次可佐證 TR2 或其結合物參與 T 細胞的作用中 (Kwon *et al.*, 1997)。

而我們在 RT-PCR 的實驗中，也的確發現在 CEM 人類 T 細胞分別以 ConA、PHA (5 μ M)、或 PMA (1 μ M) 並用 ionomycin (1 μ M) 處理 8 小時，均可以見到 TR2 mRNA 有增加。在 U937 單核球可看到原本沒有 TR2 之表現，但以 PMA (10 nM) 處理經 1 天及 2 天則有明顯增加。人類白血球細胞 HL-60 細胞原本只有少量 TR2 之表現，但以 IFN- γ (100 U/ml) 及 TGF- β (10 ng/ml) 可增加 TR2 之表現。人類週邊血球細胞 PBMC 原本就有 TR2 表現，但以 PWM 刺激後其表現會有增加的現象。人類內皮細胞 ECV 以 IL-1 β (10 ng/ml)、IFN- γ (100 U/ml) 及 LPS (1 μ g/ml) 刺激後，發現也可明顯增加 TR2 mRNA 之表現。在人類肺上皮細胞 A549 以 IFN- γ (100 U/ml) 單獨處理或以 TNF- α 、IL-1 β (10 ng/ml) 及 IFN- γ (100 U/ml) 合併處理後，發現可使 A549 細胞其 TR2 之 mRNA 表現有增加的現象。

經仔細比較後發現，在大部分的血球細胞中，TR2 的表現可受生長活劑如 PMA 或 PHA 的調控而增加，另外 IFN- γ 、IL-1 β 及 TGF- β 等細胞激素也具有調控 TR2 表現的情形發生。生長活化刺激劑促使 TR2 的表現增加，再次暗喻 TR2 在細胞的活化增生的過程中佔有重要的角色。IFN- γ 是一種從 T 細胞分泌出來的細胞激素，會促使巨噬細胞及 T 細胞的活化，在體液性細胞免疫上扮有重要的角色 (Kuby, 1990)，在 1997 的報導指出 IFN- γ 會促使 TR2 的結合物，Light 在含有 TR2 及 LT β R 的細胞中所引發的細胞凋亡 (Yifan *et al.*, 1997)。而在含有 TR2 的活化 PBL 中，給與 light 也會導致 IFN- γ 的釋出，這表示在活體中 IFN- γ 在 TR2 與 LIGHT 的交互作用中，可能調控 TR2 的表

現而來促進 LIGHT 的作用。IL-1 β 是由單核球、巨噬細胞及 B 細胞中所分泌出來的，會促使內皮細胞及上皮細胞中 ICAM 之表現，並誘發發炎反應的產生 (Kuby, 1990)，在我們 RT-PCR 的結果中，IL-1 β 會促使 A549 及 ECV 細胞中 TR2 的表現增加，顯示 TR2 在發炎反應中也佔有重要的地位。TGF- β 是由血小板、巨噬細胞及淋巴球中所分泌，具有誘發巨噬細胞中 IL-1 的釋放，刺激免疫細胞的分化及誘發單核球趨化性和分泌 IL-6 的能力，但它也會抑制發炎反應及 B 細胞分化 (Kuby, *et al.*, 1990)。不過，在我們 PCR 的結果中，人類血球細胞株 HL-60 會因 TGF- β 的刺激而增加 TR2 之表現，這應顯示 TR2 同樣在免疫及發炎反應中扮有重要的角色。

根據以上的結果可推測 TR2 在免疫及發炎反應中，可能參與許多細胞反應及訊息傳遞，尤其是在 T 細胞的活化上佔有重要的角色，因而我們所製造單株抗體可以專一認知 TR2 蛋白，這將是對於 TR2 蛋白的研究上的一個重要工具，藉此可以對於 TR2 蛋白及其接合物 LIGHT 的功能和訊息傳遞做更深入的研究，並釐清 LIGHT 在細胞存亡調控中所扮演的角色，此外 TR2 也是單一疱疹病毒進入細胞中的媒介物，因而我們所製造出來的 TR2 單株抗體將可應用於偵測病人血中病毒感染的程度，並可幫助我們進一步研究單一疱疹病毒進入細胞中的機制。

參考文獻

- Armitage R. Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* 1994, 6: 407-413.
- Baker SJ, Reedy EP. Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene* 1996, 12:1-9.
- Beutler B, Huffer CV. Unraveling function in the TNF ligand and receptor families. *Science* 1994, 264:667-668.
- Gruss HJ, Dower SK. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 1995, 85: 3378-3383.
- Harrop JA, McDonnell PC, Brigham-Burke M. Herpesvirus entry mediator ligand (HVEM-L), a novel ligand for HVEM/TR2, stimulates proliferation of T cells and inhibits HT29 cell growth. *J Biol Chem* 1998, 273:27548-27556.
- Harrop JA, Reddy M, Dede K. Antibodies to TR2 (Herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *J Immunol* 1998, 161:1786-1794.
- Hsu H, Solovyev I, Colombero A, Elliott R, Kelley M, Boyle WJ. ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J Biol Chem* 1997, 272: 13471-13474.
- Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinhma C J, Brown R, Farrow SN. A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. *Nature* 1996, 384:372-374.

- Kuby, J Immunology W. H. Freeman and company, New York. pp. 245-270.
- Kwon BS, Tan KB, Ni J, Lee KO, Kim KK, Kim YJ, Wang S, Gentz R, Yu GL, Harrop J. A newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J Biol Chem* 1997, 272:14272-14276.
- Marsters SA, Sheridan JP, Donahue CJ, Pitti RM, Gray CL, Goddard AD, Bauer KD, Ashkenazi A. APO-3, a new member of the TNF receptor family, contains a death domain and activates apoptosis and NF- κ B. *Curr Biol* 1996, 6:1669-1674.
- Mauri DN, Ebner R, Kochel KD, Montgomery R, Cheung TC, Yu GL, Ruben S, Murphy M, Eisenberg RJ, Cohen GH. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin α are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 1998, 8: 21-30.
- Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG. Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 1996, 87: 427-436.
- Spear PG. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Semin Virol* 1993, 4:167-180.
- Tan KB, Harrop J, Reddy M, Young P, Terrett J, Emery J, Moore G, Truneh A. Characterization of a novel TNF-like ligand and recently described TNF ligand and TNF receptor superfamily genes and their constitutive and inducible expression in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Gene* 1997, 204 (1-2):35-46.

Vandenabeele P, Declercq W, Beyaert R, Fiers W. Two tumor necrosis factor receptors: structure and function. *Trends Cell Biol* 1995 5: 392-399.

Whitbeck JC, Peng C, Lou H, Xu R, Willis SH, Ponce de Leon M, Peng T, Nicola AV, Montgomery RI, Warner MS, Soulika AM, Spruce LA, Moore WT, Lambris JD, Spear PG, Cohen GH, Eisenberg RJ. Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J Virology* 1997, 71(8):6083-6093.

Zhai Y, Guo R, Hsu TL, Yu GL, Ni J, Kwon BS. LIGHT, a novel ligand for lymphotoxin β receptor and TR2/HVEM induces apoptosis and suppresses in vivo tumor formation via gene transfer. *J Clin Invest* 1998, 102: 1142-1151.

TNF ligand and receptor families

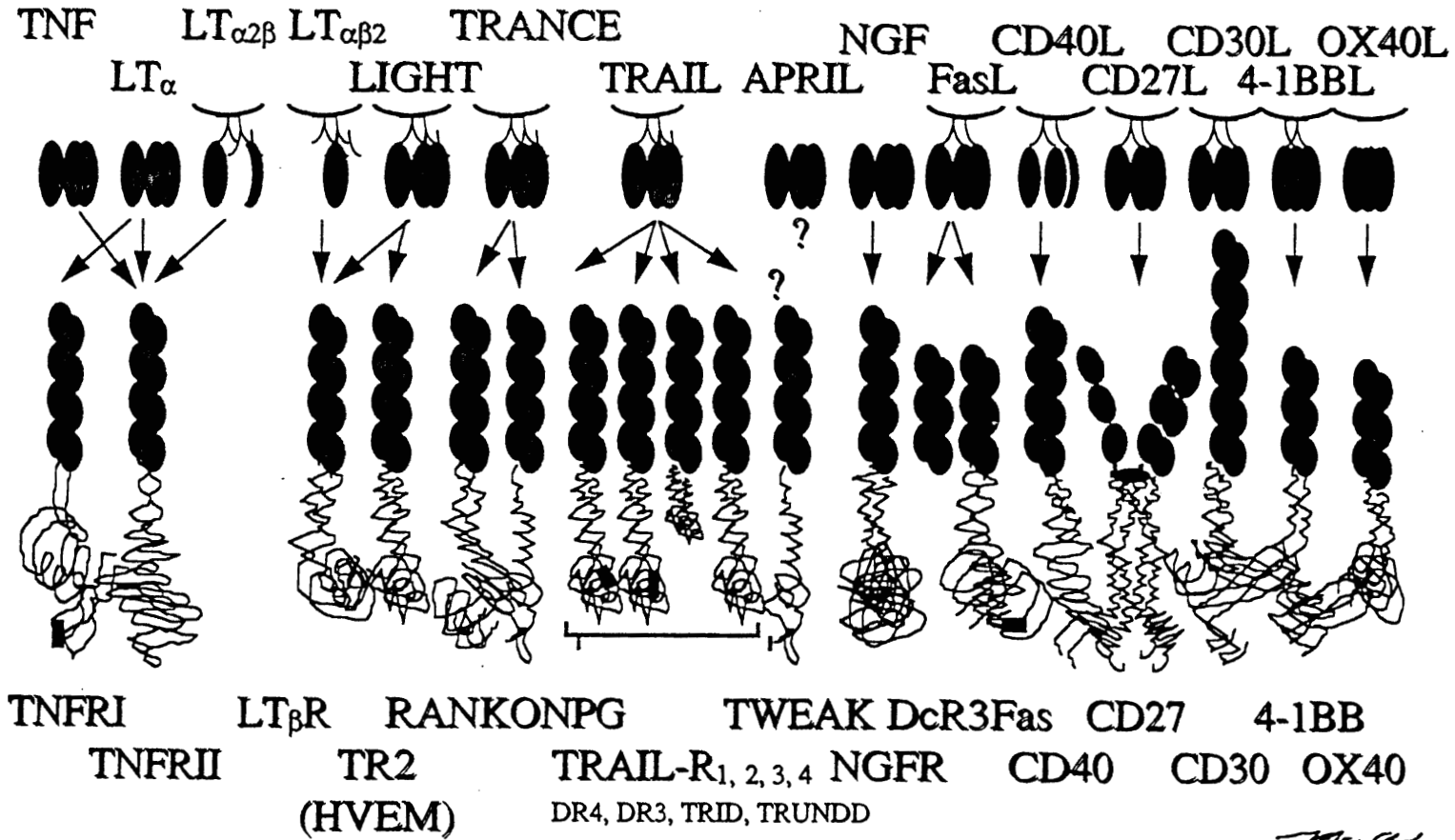
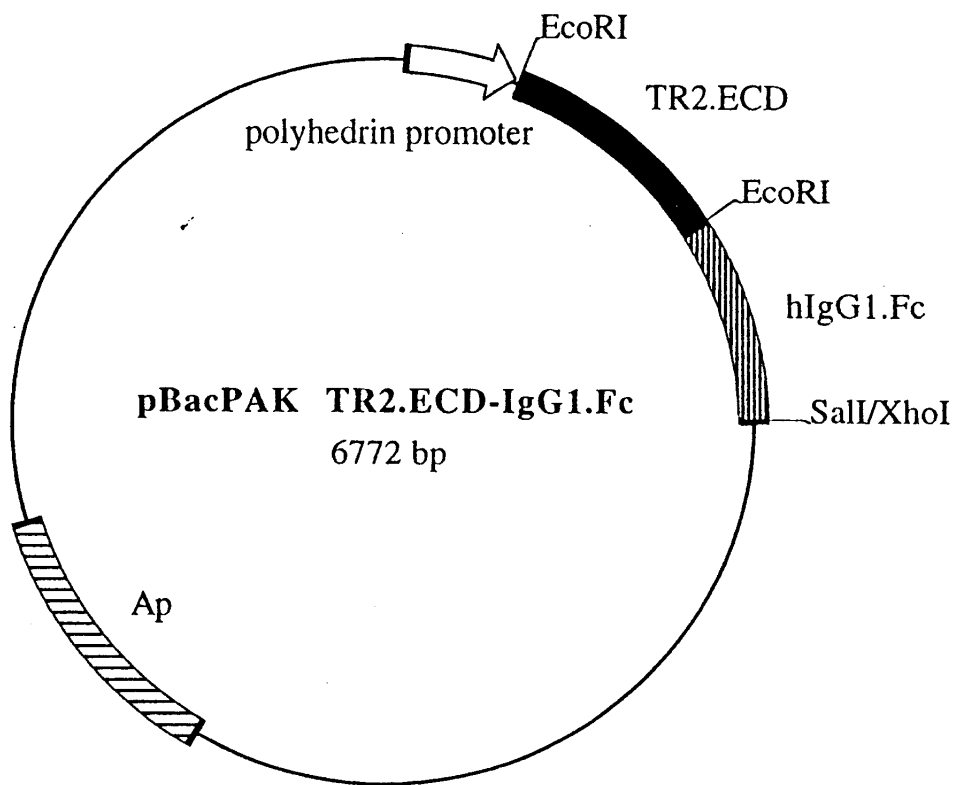


Fig1. The TNFR and TNF ligands families.

1 CCTTCATACCGGCCCTTCCCTCGGGCTTGCCTGGACAGCTCCTGCCTCCCGCAGGGCCACCTGTGTCCCC
 73 CAGCGCCGCTCCACCCAGCAGGCCTGAGCCCTCTCTGCTGCCAGACACCCCTGCTGCCACTCTCCTGCT
 145 GCTCGGGTTCTGAGGCACAGCTTGTACACCGAGGCGGATTCTCTTCTCTTTCTTTCTGGCCACAGCCG
 217 CAGCAATGGCGCTGAGTTCCTCTGCTGGAGTTCATCCTGCTAGCTGGGTCCCGAGCTGCCGGTCTGAGCCT
 289 GAGGCATGGAGCCTCTGGAGACTGGGGCCTCCTCCCTGGAGATCCACCCCAAGACCGCTCTTGAGGC

1 M E P P G D W G P P P W R S T P R T D V L R
 361 TGGTGTGTATCTCACCTTCTGAGGACCCCTGCTACGCCCAGCTCTGCCGCTCTGCAAGGAGGACGAGT
 23 L V L Y L T F L G A P C Y A P A L P S C K E D E
 433 ACCCAGTGGGCTCCGAGTGTGCCCAAGTGCAGTCCAGTTATCGTGTGAAGGAGGCTGCCGGGAGCTGA
 47 Y P V G S E C C P K C S P G Y R V K E A C G E L
 505 CGGGCACAGTGTGTGAACCCTGCCCTCCAGGCACCTACATTGCCACCTCAATGGCCTAAGCAAGTGTCTGC
 71 T G T V C E P C P P G T Y I A H L N G L S K C L
 577 AGTGCCAAATGTGTGACCCAGCCATGGGCTGCGCGGACGCGGAACTGCTCCAGGACAGAGAACGCCGTGT
 95 Q C Q M C D P A M G L R A T R N C S R T E N A V
 649 GTGGCTGCAGCCAGGCCACTTCTGCATCGTCCAGGACGGGACCACTGCGCCGCTGCCGCCGTTACGCCA
 119 C G C S P G H F C I V Q D G D H C A A C R R Y A
 721 CCTCCAGCCCGGGCCAGAGGGTGCAGAAGGGAGGCACCGAGAGTCAGGACACCCTGTGTGAGAACTGCCCC
 143 T S S P G Q R V Q K G G T E S Q D T L C Q N C P
 793 CGGGGACCTTCTCTCCAATGGGACCCCTGGAGGAATGTCAGCACCAGACCAAGTGCAGCTGGCTGGTGCAG
 167 P G T F S P N G T L E E C Q H Q T K C S W L V T
 865 AGGCCGGAGCTGGGACCCAGCAGCTCCCACTGGGTATGGTGGTTTCTCTCAGGGAGCCTCGTCATCGTCATTG
 191 K A G A G T S S S H W V W W F L S G S L V I V I
 937 TTTGCTCCACAGTTGGCCTAATCATATGTGTGAAAAGAAGAAAGCCAAGGGGTGATGTAGTCAAGGTGATCG
 215 V C S T V G L I I C V K R R K P R G D V V K V I
 1009 TCTCCGTCAGCGGAAAAGACAGGAGGCAGAAGGTGAGGCCACAGTCATTGAGGCCCTGCAGGCCCTCCGG
 239 V S V Q R K R Q E A E G E A T V I E A L Q A P P
 1081 ACGTCACCACGGTGGCCGTGGAGGAGACAATACCCTCATTACGGGGAGGAGCCCAAACCACTGACCCACAG
 263 D V T T V A V E E T I P S F T G R S P N H -
 1153 ACTCTGCACCCCGACGCCAGAGATACCTGGAGCGACGGCTGCTGAAAGAGGCTGTCCACTGGCGAAACCAC
 1225 CGGAGCCCGGAGGCTTGGGGGCTCCGCCCTGGGCTGGCTTCCGCTCTCCTCCAGTGGAGGGAGAGGTGGGGCC
 1297 CCTGCTGGGGTAGAGCTGGGACGCCACGTGCCATTCCCATGGCCAGTGGGGCCTGGGGCCTCTGTTCTG
 1369 CTGTGGCCTGAGCTCCCAGAGTCTGAGGAGGAGCGCCAGTGGCCCTCGCTCACAGACCACACACCCAGC
 1441 CCTCCTGGGCCAGCCAGAGGGCCCTTCAGACCCAGCTGTCTGGCGTCTGACTCTTGTGGCCTCAGCAGG
 1513 ACAGGCCCGGGCACTGCCTCACAGCAAGGCTGGACTGGGTGGCTGCAGTGTGGTGTTTAGTGGATACCA
 1585 CATCGGAAGTGATTTCTAAATTGGATTGAATCCGGTCTGTCTTCTATTGTGCATGAACAGTGTATT
 1657 GGGGAGATGCTGTGGGAGGATGTAAATATCTTGTTCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Figure 2. Nucleotide sequence of the TR2 cDNA and amino sequence of the opening reading sequence. Features of the 283 amino acid open reading frame include a signal peptide (dotted underline), two potential sites for the addition of N-linked carbohydrate (single underline), and the probable membrane-spanning domain (double underline). Also indicated by patterned bars under the amino acid sequence are the three complete and one partial cystein-rich repeats characteristic of members of the TNF/NGF receptor family. Asterisks show the positions of amino acids that are highly conserved in the family. (Adapted from Montgomery *et al.*, 1996)



The 0.6 kb PCR fragment containing TR2.ECD was cloned into pBacPAK9-IgG1 vector by EcoRI site.

Figure 3. The construct of TR2-ECD-Fc.

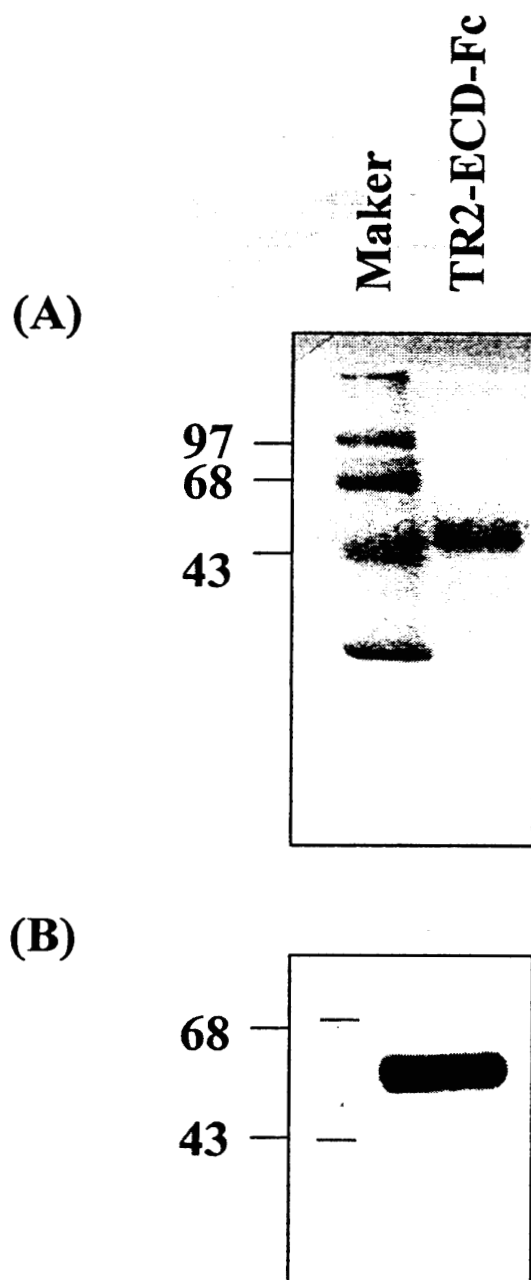


Figure 4. Purification and Detection of Recombinant TR2-ECD-Fc protein . Recombinant TR2-ECD-Fc fusion protein was expressed by the Baculovirus system. After purification the cell culture supernatant with the protein A-agarose , recombinant TR2-ECD-fusion protein was subjected to Coomassie blue staining (A) and Western blotting (B) using a anti-human-Fc antibody .

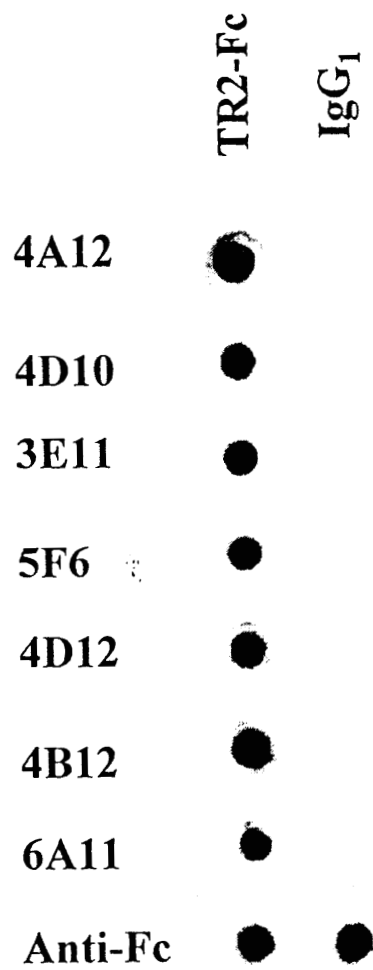


Figure 5. Screening of hybridoma by Dot-blotting. Supernatant from hybridoma 4A12, 4D10, 3E11, 5F6, 4D12, 4B12 and 6A11 clones was applied to IgG₁ or TR2-ECD-Fc containing NC membrane. Apparently, these seven antibodies only recognized TR2-ECD-Fc, but not IgG₁. In contrast, anti-Fc antibody recognized IgG₁ and TR2-ECD-Fc.

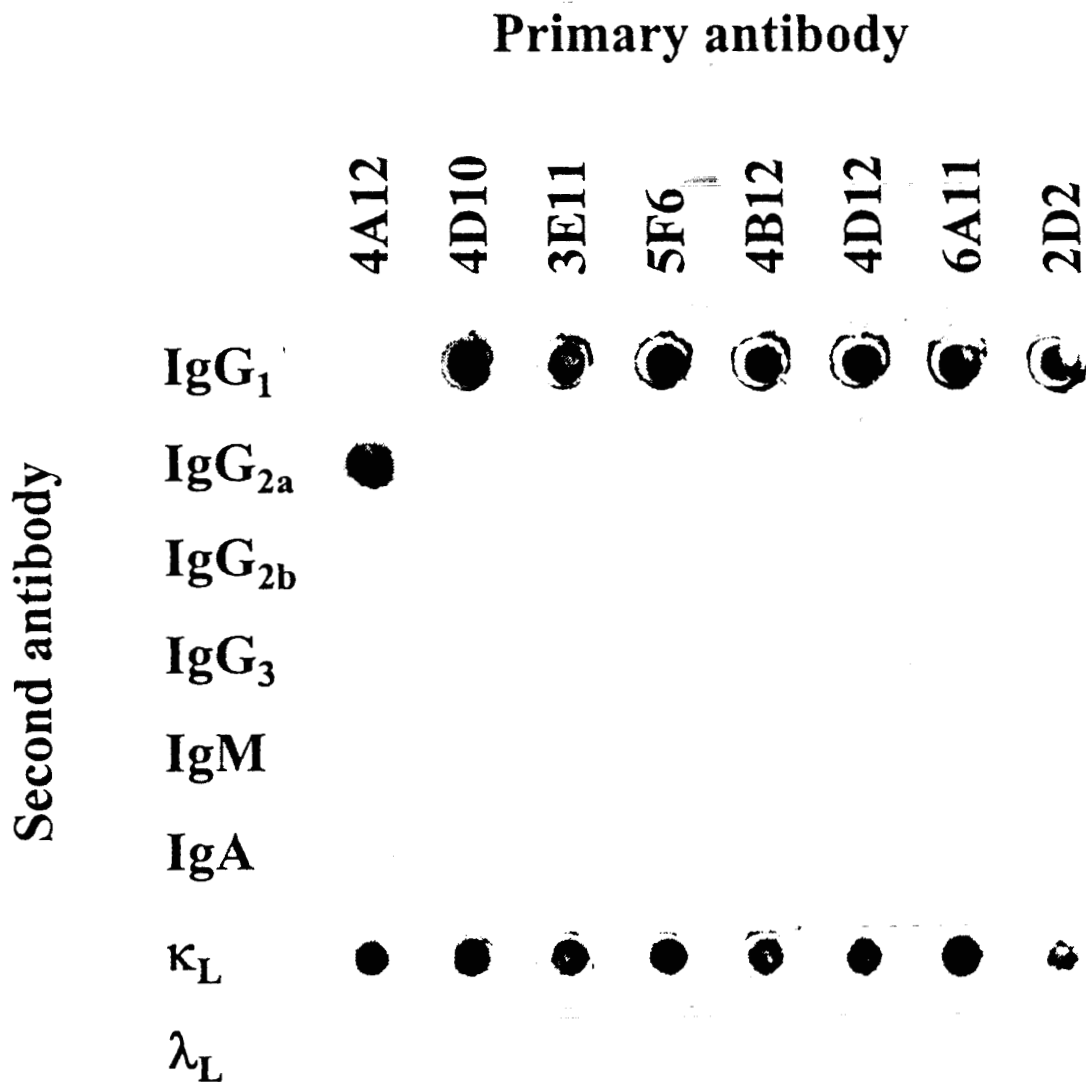
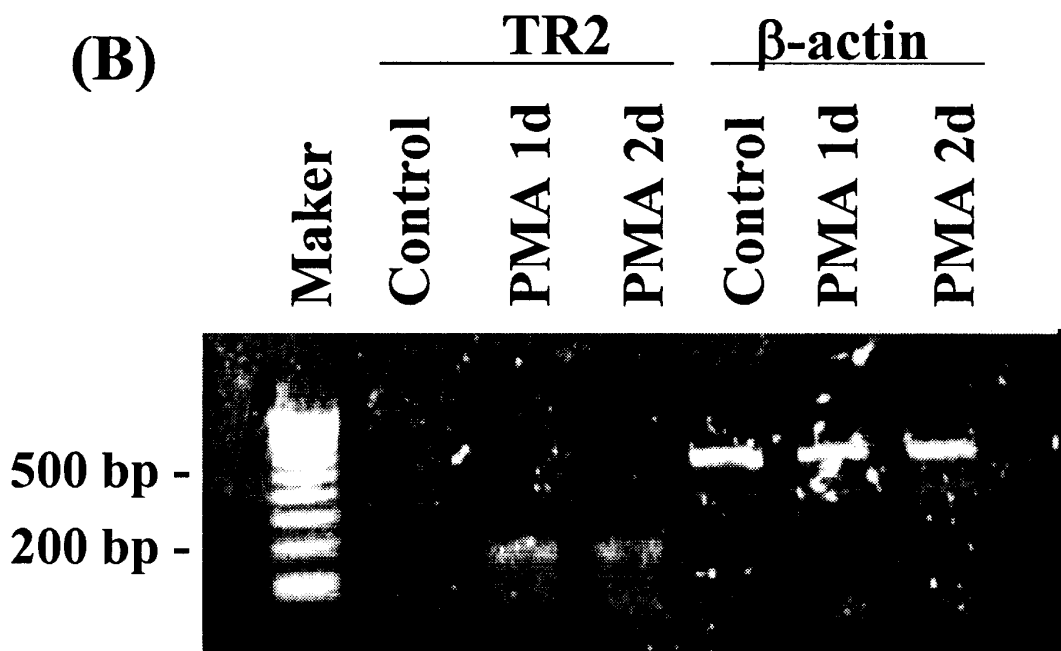
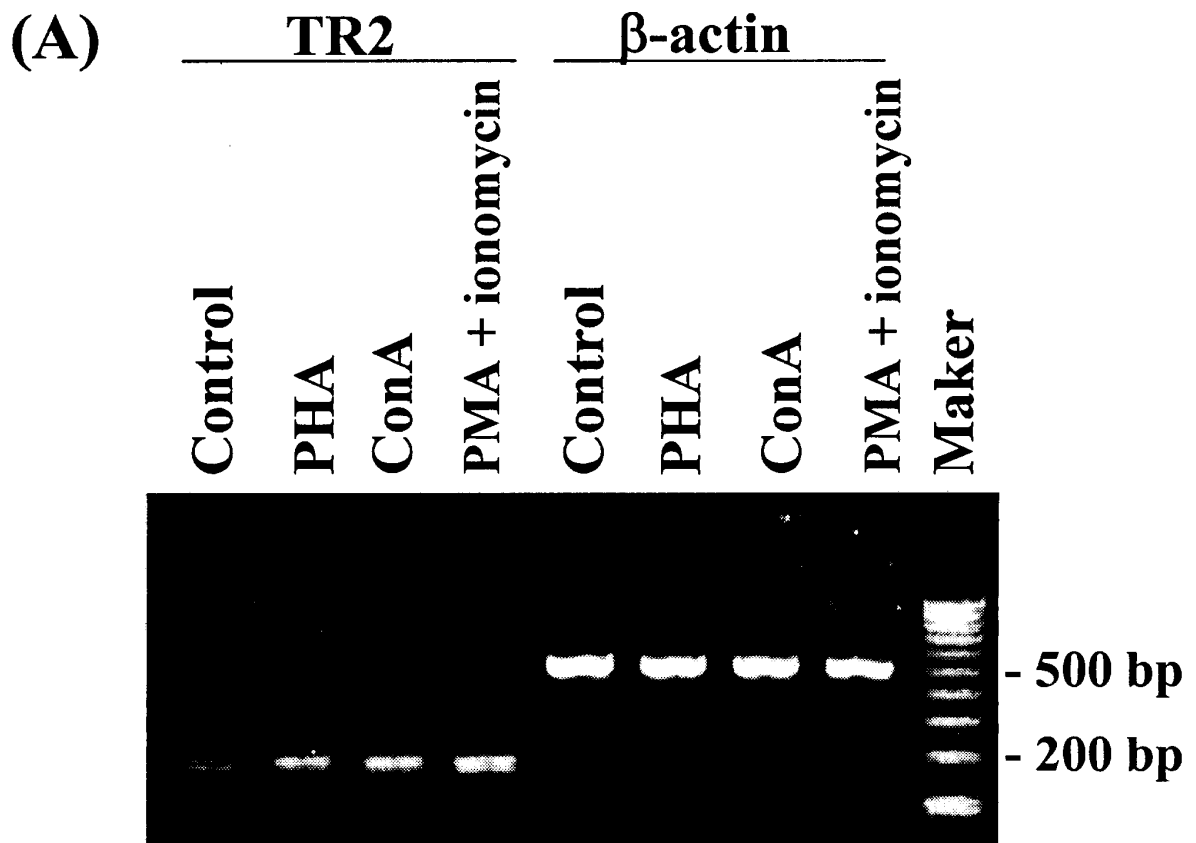
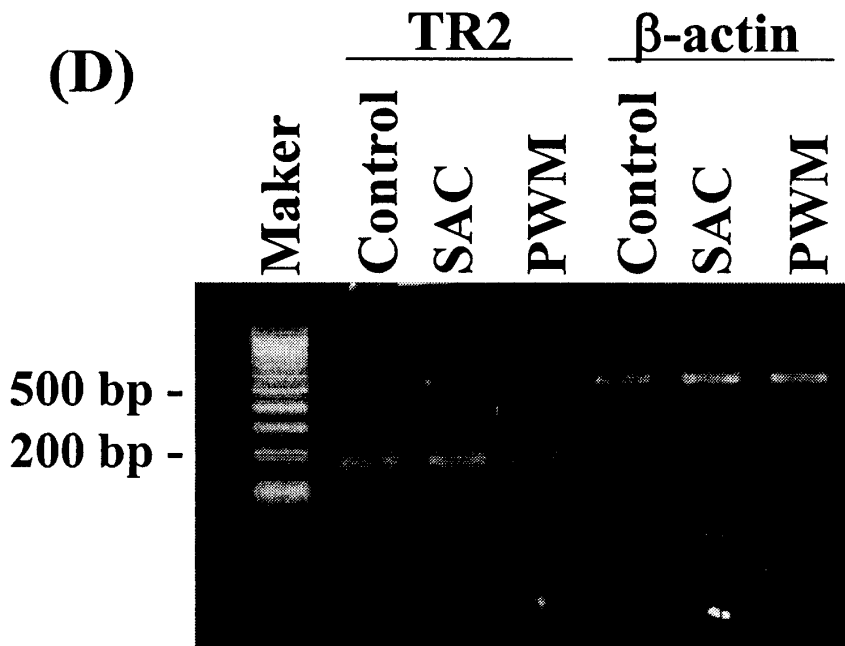
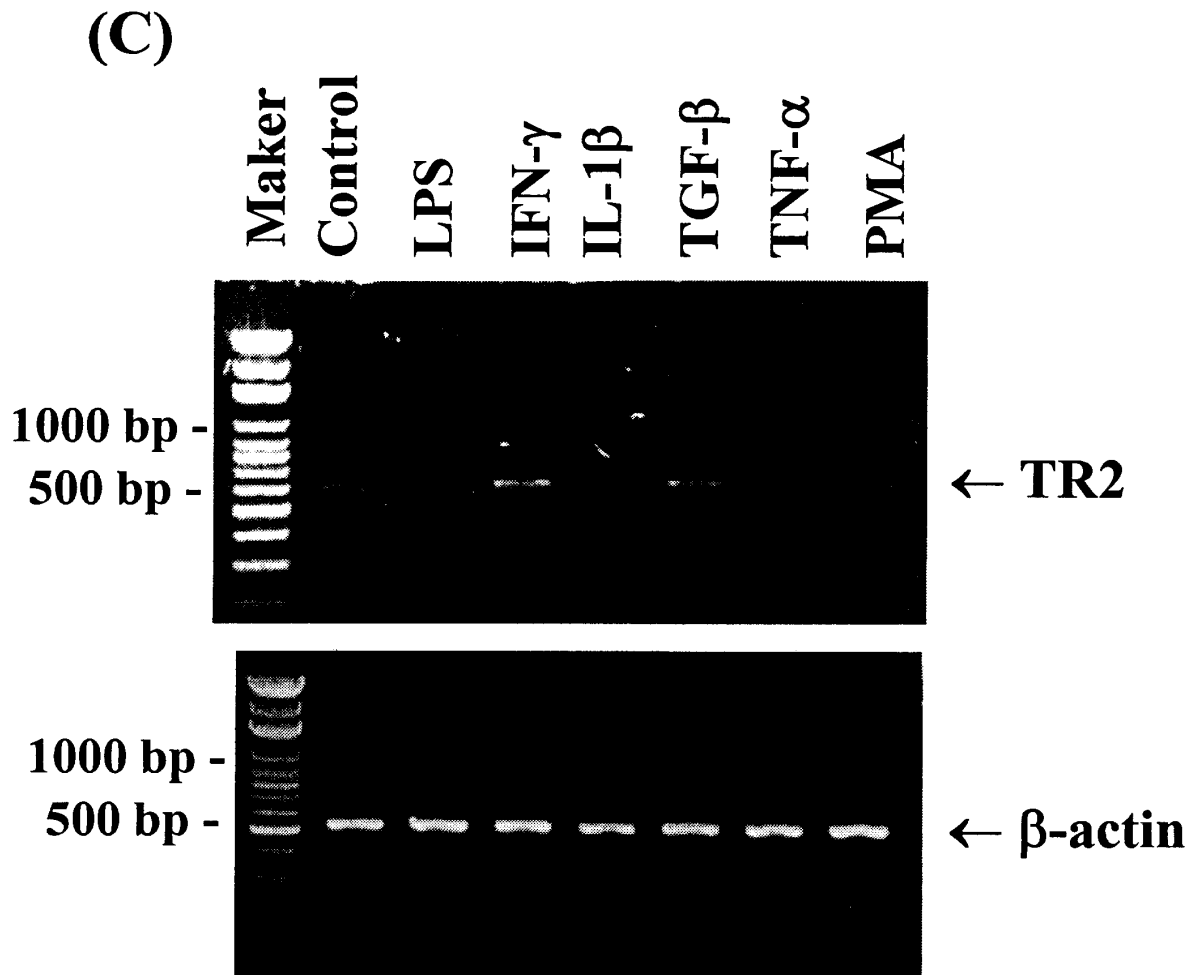
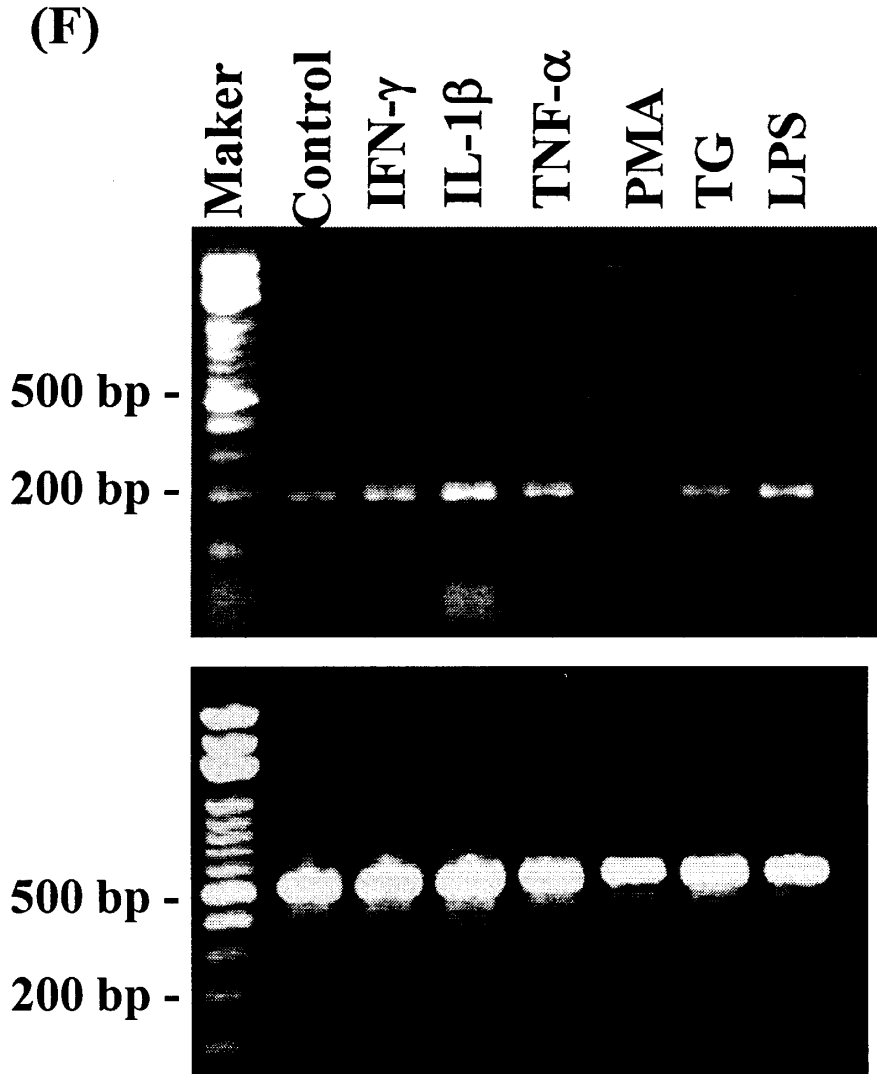
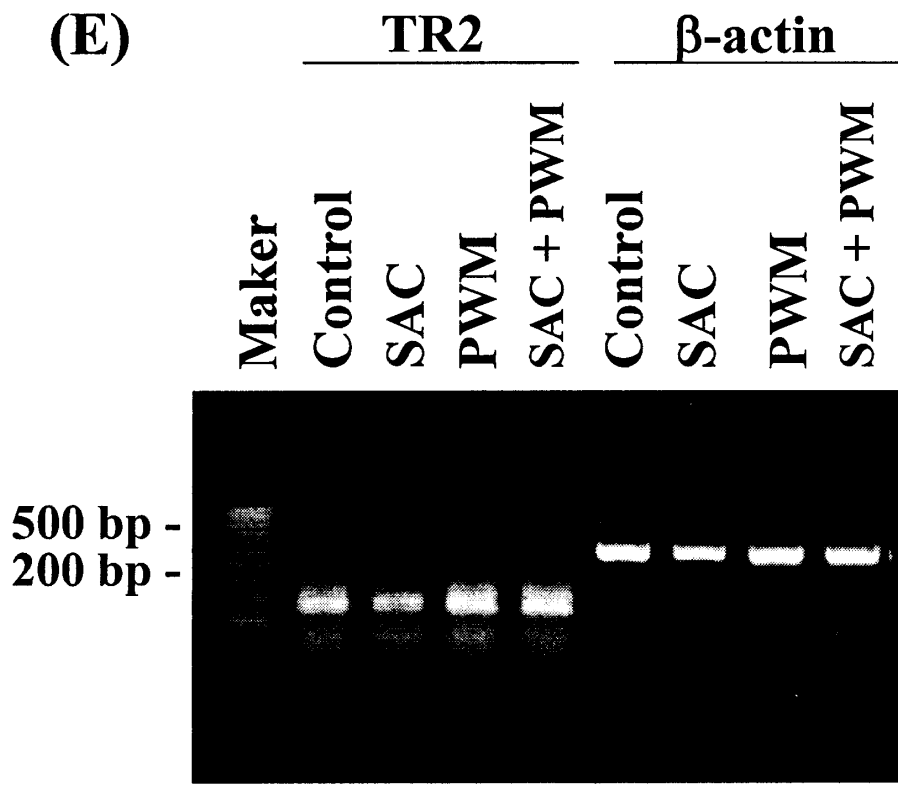


Figure 6. Characterization of the antibody isotype. NC membrane containing TR2-ECD-Fc fusion protein was sequentially reacted with mAb against TR2 (primary antibody) and HRP-labeled goat anti-mouse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgM, IgA, κ_L, or λ_L (secondary antibody), then detected by ECL system.

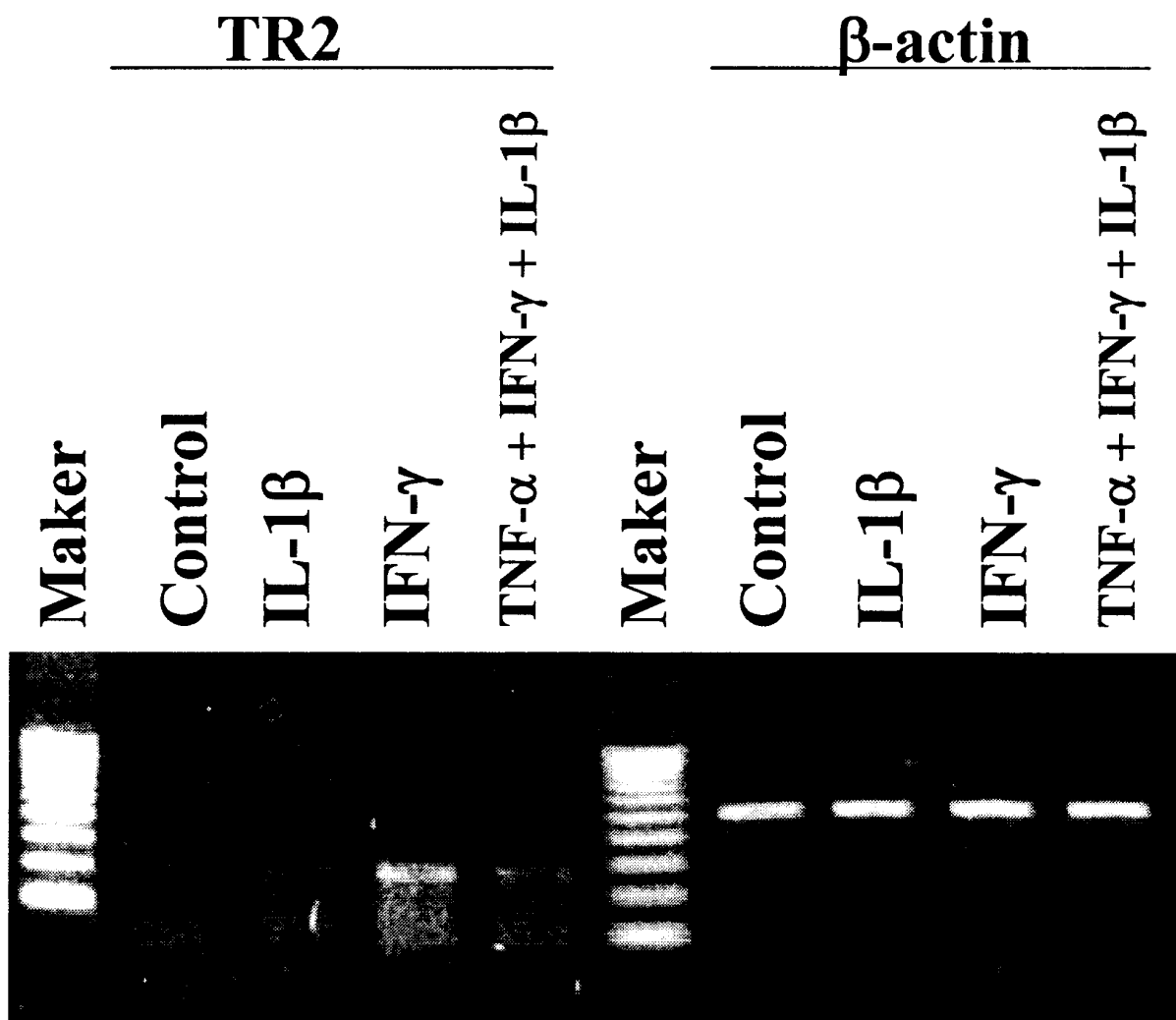
Figure 7. RT-PCR analysis of TR2 mRNA expression by various stimulation. (A) CEM cells were treated with ConA (3 μ M), PHA (1 μ M) or PMA (1 μ M)+ionomycin (1 μ M) for 8hr. (B) U937 cells were treated with PMA (10 nM) for 1 or 2days. (C) HL-60 cells were treated with LPS (1 μ g/ml), IFN- γ (100 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml), TGF- β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) or PMA (10 nM) for 8hr. (D) Ramos cells were treated with 0.1% SAC or 1% PWM for 8hr. (E) PBMC cells were treated with 0.1% SAC ,1% PWM or both for 8hr. (F) ECV cells were treated with IFN- γ (100 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml), PMA (10 nM), TG (10 nM) or LPS (10 μ g/ml) for 8hr. (G) A549 cells were treated with IL-1 β (10 ng/ml), IFN- γ (100 U/ml) or IL-1 β (10 ng/ml)+ IFN- γ (100 U/ml) + TNF- α (10 ng/ml) for 8hr.







(G)



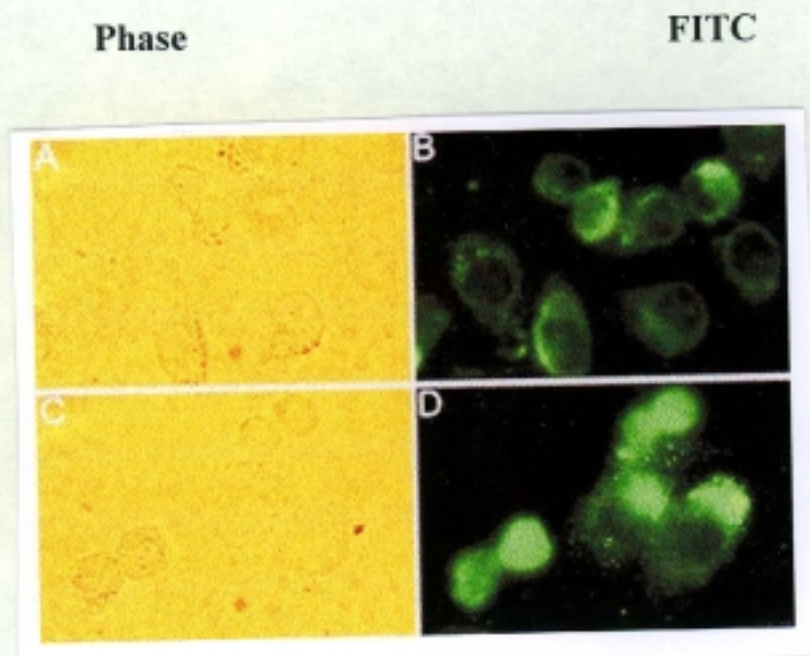


Figure 8-1. TR2 is located on the cell membrane. Immunofluorescent staining of ECV cells with the anti-TR2 antibody (4D10) (1:100). Cells were fixed and stained as described in the methods. Control (B), and after IL-1 β (10 ng/ml) 24hr treatment (D). Morphology of ECV were shown in (A), (C) at 1,000X magnification.

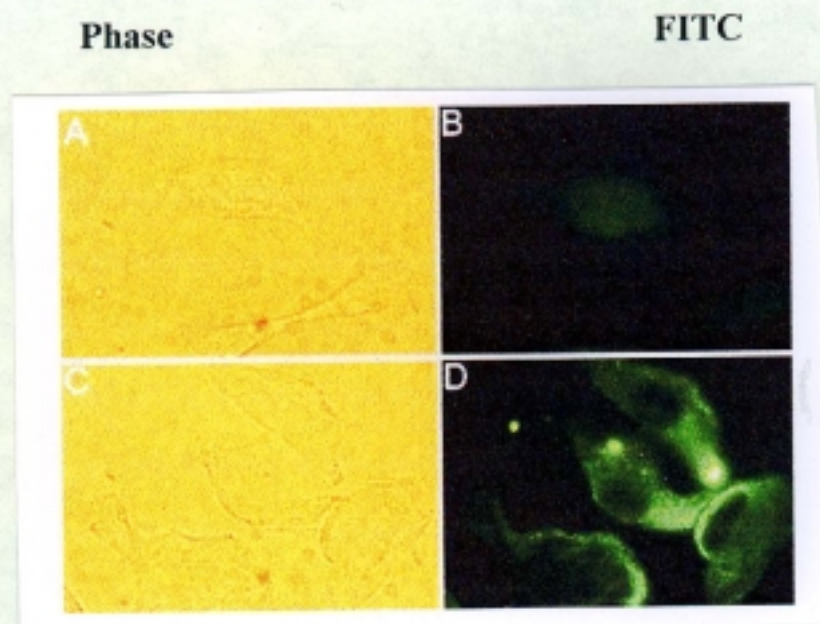


Figure 8-2. TR2 is located on the cell membrane. Immunofluorescent staining of A549 cells with the anti-TR2 antibody (4D10) (1:100). Cells were fixed and stained as described in the methods. Control (B) and after IFN- γ (100 U/ml) 24 hr treatment (D) Morphology of A549 were shown in (A), (C) at 1,000X magnification.