论著

文章编号:1000-5404(2005)12-1204-04

人趋化因子ELC的克隆与表达

罗福康[1],沈大斌[2],郑 红[2] (第三军医大学:[1]新桥医院检验科,重庆 400037,[2]西南医院实验研究中心,重庆 400038)

提 要:目的 克隆人趋化因子ELC基因,表达并初步纯化ELC融合蛋白。**方法** 从扁桃体中提取总RNA,再进行RT-PCR,扩增ELC成熟蛋白基因,并在5′和3′分别添加*Nco* Ⅰ和*Eco*R Ⅰ酶切位点,通过这两个酶切位点重组于pET32a(+)载体上,转化*E. coli* DH5α,筛选阳性克隆,酶切鉴定,DNA测序检测插入序列的正确性,缺失突变获得ELC天然蛋白表达载体pET32a(+)/ELC,SDS-PAGE分析其表达,Western blot验证融合蛋白。大量表达并初步纯化ELC融合蛋白。**结果** 成功克隆了ELC基因,表达并初步纯化得到ELC融合蛋白。**结论** 构建的ELC硫氧还蛋白融合表达载体以可溶性蛋白的方式表达ELC硫氧还蛋白。

关键词:ELC;融合表达;载体;缺失突变;Western blotting;蛋白纯化

中图法分类号:R392.11;R394-33 **文献标识码**:A

Gene cloning and expression of human chemokine ELC

LUO Fu-kang[1], SHEN Da-bin[2], ZHENG Hong[2] ([1]Department of Clinical Laboratory, Xinqiao Hospital, Chongqing 400037, [2]Center of Experimental Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clone human chemokine ELC and express the ELC fusion protein. **Methods** Total RNA from human inflammatory tonsil was extracted and the cDNA was generated with reverse transcription. Mature ELC gene was amplified with PCR and *Nco* Ⅰ and *Eco*R Ⅰ sites were added to the 5′ and 3′ terminal respectively, and then cloned into pET32a(+). *E. coli* DH5α was transformed with the recombinant plasmid, and positive clones were selected. The inserted DNA was verified by enzyme digestion and DNA sequencing. The fusion expression vector of mature ELC was formed with deletion mutation. ELC expression was analyzed by SDS-PAGE and Western blotting and the ELC fusion protein was purified. **Results** Human chemokine ELC was successfully cloned and the fusion protein was expressed and purified. **Conclusion** The ELC fusion protein was expressed with solubility.

Key words: ELC; fusion expression; vector; deletion mutation; Western blotting; protein purification

趋化因子是由小分子分泌蛋白组成的一个大的细胞因子超家族,是能够诱导白细胞作定向运动的细胞因子,在病原体的清除、炎症反应、移植排斥、造血、血管生成、肿瘤转移、HIV感染等过程中发挥着重要作用[1,2]。ELC[Epstein-Barr virus-induced molecule 1 (EBI-1) ligand chemokine],又名MIP3β,组成性表达于次级淋巴组织,主要表达细胞为次级淋巴组织T细胞区基质细胞和DC(dendritic cell)细胞,对初始型T细胞和活化的B细胞有强烈的趋化作用,诱导表达相应受体CCR7的这两类细胞进入次级淋巴组织,由DC细胞提呈抗原,激活T淋巴细胞[3,4]。在免疫排斥反应过程中,DC细胞向T淋巴细胞提呈抗原是免疫排斥反应发生的关键环节。为了阻止或减轻免疫排斥反应的发生,我们希望得到ELC受体CCR7的拮抗剂,以减缓或阻止T/B淋巴细胞进入次级淋巴组织T细胞区。为此,本研究构建了ELC的融合蛋白表达载体,表达并纯化得到ELC融合蛋白,为后续的研究工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本 扁桃体来自西南医院耳鼻喉科慢性扁桃体炎患者手术摘除的扁桃体。

1.1.2 质粒及菌株 *E. coli*. DH5α本室保存,*E. coli*. BL21trxB(DE3),大肠杆菌表达质粒pET32a(+),购自美国Novagen公司。

1.1.3 试剂 总RNA(tRNA)提取试剂Tripure Isolation Reagent(德国Roche公司),逆转录试剂盒Improm-Ⅱ RT System,高保真热稳定DNA聚合酶Tli,琼脂糖,胶回收试剂盒,限制性内切酶*Nco* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ,T4连接酶(美国Promega公司),质粒提取试剂盒(德国Roche公司),IPTG(Sigma公司),羊抗人ELC多抗

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30170900)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30170900)

作者简介:罗福康(1974-),男,四川省彭山县人,硕士,医师,主要从事趋化因子方面的研究。电话:(023)68774695,E-mail: luofukang2002@sina.com

通讯作者:郑 红,电话:(023)65460552,E-mail: zhengh@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2004-10-12;**修回日期**:2004-12-15

(R&D 公司)，兔抗羊二抗(辣根过氧化物酶标记)(中山公司)。TALON 金属离子(Co^{2+})亲和层析树脂(CLONTECH 公司)，AKTA Explorer 高效层析系统、Hiprep26/10 除盐柱、Hiprep16/10 CM FF 弱阳离子交换柱(英国 Amersham Pharmacia 公司)，其它化学试剂均为分析纯。

1.2　方法

1.2.1　总 RNA 提取　　标本收集后立即分成 100～200 mg 的小块，液氮冻存 2 h，取出放 -70 ℃冻存。总 RNA 提取采用德国 Roche 公司的 Tripure Isolation Reagent，按操作说明进行。总 RNA -70 ℃保存。

1.2.2　逆转录(Reverse transcription, RT)　　RT 采用美国 Promega 公司的 Improm-Ⅱ RT System，模板为提取的总 RNA，引物为 Oligo(dT)15，逆转录酶为 Improm-Ⅱ Reverse Transcriptase，25 ℃退火 5 min，42 ℃逆转录 1 h，70 ℃灭活逆转录酶 15 min。-20 ℃保存备用。

1.2.3　PCR　　根据 GenBank 公布的 ELC mRNA 序列(登录号 AB000887)，设计上游引物为 5′-CATGCCATGGCTGGCACCAATGATGCTGAAG-3′，下游引物为 5′-CGGAATTCTTAACTGCTGCGGCGCTT-3′。上游引物位于 ELC 序列起始密码子 ATG 下游 63 bp，成熟蛋白起始位置，下游引物至终止密码子 TAG。同时在 5′引入 *Nco* Ⅰ位点，3′引入 *Eco*R Ⅰ位点。以 RT 产物为模板，按 2 U/反应加入 Tli 高保真 DNA 聚合酶，常规 PCR 条件进行扩增。反应条件：94 ℃预变性 5 ℃，然后按如下参数进行 40 个循环：94 ℃，1 min，52 ℃，1 min，72 ℃，2 min。最后一个循环结束后 72 ℃ 延伸 5 min。

1.2.4　PCR 产物回收纯化、质粒提取　　PCR 产物回收纯化采用美国 Promega 公司的 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System，质粒提取采用德国 Roche 公司的 High Pure Plasmid Isolation Kit，按操作说明进行。

1.2.5　酶切反应、连接、转化　　按文献[5]进行。

1.2.6　阳性克隆的挑选　　对阳性克隆进行酶切验证(*Nco*Ⅰ、*Eco*R Ⅰ双酶切)，挑选 3 个含插入片段的质粒送上海基康公司以 S-Tag 、T7 启动子引物同时测序，以保证整个融合蛋白基因的正确性。测序正确的重组质粒命名为 pET32a(+)/ELC(+3)。

1.2.7　缺失突变　　为了使融合蛋白经肠激酶酶切后得到 ELC 天然蛋白，我们针对肠激酶位点与天然蛋白基因间的 3 个氨基酸设计了 1 对特异性缺失突变引物，正向：GGTACCGACGACGACGACAAGGGCACCAATGATGCTGA；反向：CCATGGCTGCTG CTGCTGTTCCCGTGGTTACTACGACT，突变反应按 Stratagen QuickChange® 突变试剂盒操作说明进行。①PCR 反应：在 200 μl PCR 管中依次加入 10×Reaction Buffer 5 μl，pET32a(+)/ELC(+3) 模板 (20 ng/μl) 1 μl，正向、反向引物(均为 125 ng/μl)各 1 μl，dNTP mix 1 μl，加入灭菌 Milli-Q 纯水至 50 μl，最后加入 PfuUltra 高保真 DNA 聚合酶(2.5 U/μl) 1 μl，混匀后进行扩增，条件为：95 ℃预变性 30 s，然后 95 ℃ 30 s，55 ℃ 1 min，68 ℃ 6.5 min，18 个循环。冰浴备用。阳性对照反应：在 200 μl PCR 管中依次加入 10×Reaction Buffer 5 μl，pWhitescript 质粒(5 ng/μl) 2 μl，正向、反向引物(均为 100 ng/μl)各 1.25 μl，dNTP mix 1 μl，加入灭菌 Milli-Q 纯水至 50 μl，最后加入 PfuUltra 高保真 DNA 聚合酶(2.5 U/μl)1μl，混匀后进行扩增，条件为：95 ℃预变性 30 s，然后 95 ℃ 30 s，55 ℃ 1 min，68 ℃ 5 min，12 个循环。冰浴备用。②消化模板：在 PCR 反应产物中加入 DpnⅠ (10 U/μl) 1 μl，轻轻吹打几次混匀反应液，瞬时离心后立即放入 37 ℃孵育 1 h。反应结束后冰浴备用。③ 转化 XL1-Blue 感受态细菌：冰上化冻 XL1-Blue 感受态细菌，将 1 μl *Dpn* Ⅰ消化后的 PCR 反应产物加入 50 μl 感受态细菌，轻轻混匀后冰浴 30 min，然后 42 ℃热休克 45 s，冰浴 2 min，然后加入 0.5 ml 预热到 42 ℃的 NZY+培养基，37 ℃、250 r/min 摇动培养 1 h。然后 pET32a(+)/ELC(+3)突变反应管 250 μl/板铺板于 100 μg/ml 氨苄平板，pWhitescript 阳性对照反应铺板于 100 μg/ml 氨苄、80 μg/ml X-gal、20 mmol/L IPTG 平板，放入 37 ℃孵箱培养 16 h 以上。④ 挑选阳性克隆扩增、提取质粒测序，测序由上海申友公司完成。突变后的质粒命名为 pET32a(+)/ELC。

1.2.8　pET32a(+)/ELC 在大肠杆菌中的表达　　以 pET32a(+)/ELC 质粒转化感受态大肠杆菌 BL21trxB(DE3)。将 1.5 ml 过夜培养的菌液转入 50 ml 培养液 37 ℃摇瓶培养，待悬液 *D*(600) 达到 0.55 时，留 1 ml 菌液电泳，再加入 IPTG(终浓度为 1 mmol/L)，继续培养 3 h，取 3 ml 菌液离心，将沉淀悬于 1/10 倍培养体积的 PBS 中，超声裂菌，离心，取上清和沉淀与前述样品同时进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.9　目的蛋白的表达　　将含有重组原核表达质粒 pET32a(+)/ELC 的大肠杆菌 BL21trxB(DE3)接种于 100 ml 含 50 μg/ml 氨苄青霉素、15 μg/ml 卡那霉素的 LB 培养液中，37 ℃、250 r/min 摇动培养过夜。将振荡过夜的菌液按 5%分别接种于 2 L 含 50 μg/ml 氨苄青霉素、15 μg/ml 卡那霉素的 LB 培养液中，37 ℃、250 r/min 摇动培养 3～4 h，直至 *D*(600)为 0.6～0.8。加入诱导剂 IPTG 至终浓度 1 mmol/L。37 ℃、250 r/min 继续摇动培养 3 h。4 ℃、3 000×*g* 离心 15 min 收集细菌。PBS 洗涤 1 次。每升发酵菌以 100 ml PBS 重悬，-80 ℃冻存。次日将冻存菌液于 37 ℃冻融裂解，以 BioNeb 挤压式细胞破碎仪，100 psi，挤压 4 次，以去除裂解菌液的粘性。4 ℃，15 000×*g* 离心 20 min，分别收集上清和沉淀，各取少量用于 SDS-PAGE 电泳。

1.2.10　融合蛋白的金属(Co^{2+})亲和层析　　以 TALON 金属亲和树脂进行纯化，方法参照 Clontech 公司说明书。留样 SDS-PAGE 电泳。

1.2.11　除盐　　以 50 mmol/L Tris·HCl 缓冲液，pH 8.0 除盐，除去洗脱产物中的 NaCl 和咪唑。除盐柱为 Hiprep26/10 Desalting，流速为 5 ml/min，上样 3 ml/min，收集洗脱下的蛋白峰。

1.2.12　弱阳离子交换层析　　按蛋白等电点的不同分离蛋白。弱阳离子交换层析柱为 Hiprep16/10 CM FF，平衡液为 20 mmol/L Tris·HCl 缓冲液，pH 8.2，洗脱液为 20 mmol/L Tris·Hcl 缓冲液，pH 8.2，1 mol/L NaCl。流速为 5 ml/min，上样 3 ml/min。连续梯度洗脱液(0%～100%)洗脱，20 柱床体积(CV)，收集洗脱下的蛋白峰。取样电泳。

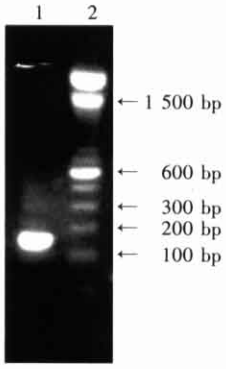
2　结果

2.1　总 RNA 提取

提取出的总 RNA 经 1%琼脂糖电泳鉴定，可看到两条清晰的条带，分别为 28S 和 18S，28S:18S 约为 2:1。

2.2 RT-PCR

扩增产物经1%琼脂糖电泳鉴定，得到一条长度在200～300 bp的ELC成熟蛋白DNA扩增产物(图1)。



1: ELC PCR product; 2: 100 bp DNA marker

图1 琼脂糖凝胶电泳分析ELC PCR产物

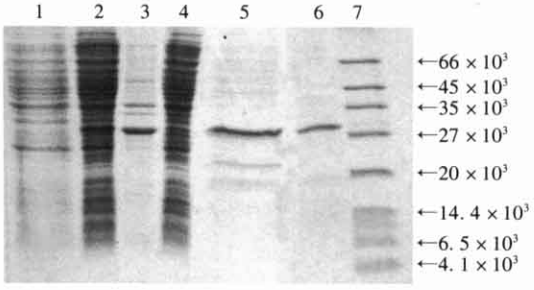
Fig 1 Electrophoresis of ELC PCR product on agarose gel

2.3 pET32a(+)/ELC质粒的构建

PCR产物经*Nco* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ分别单酶切并纯化后与同样*Nco* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ分别单酶切并纯化的pET32a(+)载体相连接，构建ELC-Trx融合表达质粒。连接产物转化感受态*E. coli*. DH5α，氨苄青霉素抗性LB平板筛选，采用*Nco* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ双酶切鉴定阳性重组子，取3个含插入片段的阳性克隆进行DNA测序分析(测序图略)，缺失突变后再进行DNA测序(测序图略)，结果显示插入的ELC基因、硫氧还蛋白基因与GenBank报道完全一致。

2.4 pET32a(+)/ELC质粒在E. coli. BL21trxB(DE3)中的表达

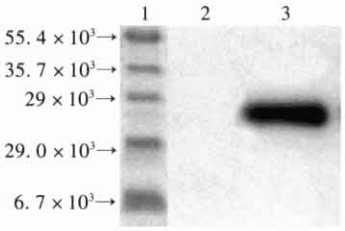
发酵菌在用IPTG诱导与未诱导样中表达量差异明显，所表达的融合蛋白大部分以可溶性蛋白形式存在。SDS-PAGE电泳结果表明ELC-Trx融合蛋白大小约27×10^3，与理论值27.1×10^3基本一致(图2)。Western blot证实表达的为ELC融合蛋白(图3)。



1: Proteins in lysate of fertilized bacteria (not induced); 2: Proteins in precipitation of induced fertilized bacteria (3 h after IPTG induction); 3: Proteins in supernatant of induced fertilized bacteria (3 h after IPTG induction); 4: Flowpath of metal affinity chromatography; 5: Elution of metal affinity chromatography; 6: Peak 1 of elutions of cation exchange; 7: Marker

图2 SDS-PAGE分析融合蛋白表达

Fig 2 SDS-PAGE analysis of ELC fusion protein



1: Marker; 2: Proteins in lysate of induced fertilized pET32a(+)/BL21trxB (DE3) (3 h after IPTG induction); 3: Proteins in lysate of induced fertilized pET32a(+)/ELC/BL21trxB(DE3) (3 h after IPTG induction)

图3 ELC重组蛋白的Western blot分析(羊抗人ELC多抗血清为一抗)

Fig 3 Western blot analysis of recombinant ELC fusion protein

2.5 ELC融合蛋白的初步纯化

融合蛋白经TALON金属亲和树脂吸附后，融合蛋白占总蛋白的65%～80%以上。除盐后经弱阳离子交换，ELC融合蛋白得到有效纯化(图2)。

3 讨论

ELC主要由次级淋巴组织T细胞区基质细胞和DC细胞表达，诱导表达相应受体CCR7的初始型T细胞和活化的B细胞进入次级淋巴组织。ELC生物学功能的发挥依靠其受体CCR7介导，表达CCR7的主要为DC和T细胞。因此，ELC是DC和T细胞进入次级淋巴组织T区的重要趋化因子。目前，国内外尚少有关于ELC与移植免疫排斥关系的研究，对与ELC的研究多集中在以下几方面：①ELC是一种强有力的肿瘤抑制剂，转染了ELC的肿瘤细胞通过招募NK细胞和$CD4^+$细胞可明显抑制肿瘤细胞生长[6]；体外实验表明，ELC可抑制CML白血病细胞的生长[7]。②Annunziato等[8]的实验结果提示ELC参与了T细胞成熟过程中的阴性选择。在免疫排斥反应过程中，DC细胞向次级淋巴组织提呈抗原是免疫排斥反应发生的关键环节。为了阻断或减轻免疫排斥反应的发生，我们希望得到ELC受体CCR7的拮抗剂，以阻止或减缓DC细胞进入次级淋巴组织，从而阻止或减少T细胞的活化。本研究成功构建了ELC表达载体，可稳定地大量表达ELC融合蛋白，在此基础上可利用基因突变技术筛选CCR7的拮抗剂，为研究趋化因子ELC在移植免疫学中的功能奠定基础。我们在研究中构建了ELC融合蛋白的原核表达载体，该融合蛋白在优化的宿主菌中主要以可溶性形式存在于细菌裂解液上清中，经纯化得到ELC融合蛋白。研究中我们初步建立了ELC融合蛋白表达、纯化的操作流程，并纯化得到ELC融合蛋白。构建的ELC融合蛋白表达载体为构建ELC突变体并进一步获得ELC的拮抗剂奠定了基础。目前

国内外尚少有关于 ELC 与移植免疫排斥关系的报道，我们目前和后续的工作将对此研究领域进行积极的探索，期望可得到特异性强的免疫抑制剂应用于抗移植排斥反应，延长移植物存活时间。

参考文献：

[1] David J, Mortari F. Chemokine receptors - A brief overview[J]. Clin Appl Immunol Rev, 2000, 1(2): 105 - 125.

[2] Horuk R. Chemokine receptors[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12(7): 313 - 335.

[3] Ngo V N, Tang H L, Cyster J G. Epstein-Barr virus-induced molecule 1 ligand chemokine is expressed by dendritic cells in lymphoid tissues and strongly attracts naive t cells and activated b cells[J]. J Exp Med, 1998, 188(1): 181 - 191.

[4] Luther S A, Tang H L, Hyman P L, *et al*. Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(23): 12694 - 12699.

[5] J·萨姆布鲁克，DW.拉萨尔 著，黄培堂 译. 分子克隆[M]. 第 3 版. 北京：科学出版社，2002. 68 - 113.

[6] Braun S E, Chen K, Foster R G, *et al*. The CC chemokine CK β-11/MIP-3 β/ELC/Exodus 3 mediates tumor rejection of murine breast cancer cells through NK cells[J]. J Immunol, 2000, 164(8): 4025 - 4031.

[7] Hromas R, Cripe L, Hangoc G, *et al*. The exodus subfamily of CC chemokines inhibits the proliferation of chronic myelogenous leukemia progenitors [J]. Blood, 2000, 95(4): 1506 - 1508.

[8] Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, *et al*. Macrophage-derived chemokine and EBI1-ligand chemokine attract human thymocytes in different stage of development and are produced by distinct subsets of medullary epithelial cells: possible implications for negative selection[J]. J Immunol, 2000, 165(1): 238 - 246.

（编辑　王　红）

文章编号：1000-5404(2005)12-1207-01

个案与短篇

慢性乙型肝炎肝硬变与肝癌患者血清可溶性 Fas ligand 水平检测

Detection of the serum soluble Fas ligand in patients with chronic hepatitis B, liver cirrhosis and hepatocarcinoma

曾晓波，陈　军，苏先狮，蒋永芳，何　艳　（中南大学湘雅二医院传染科，长沙 410011）

Fas/Fas 配体(Fas ligand, FasL)是目前研究较为广泛的诱导细胞凋亡分子，研究发现，可溶性 FasL 分子也有诱导靶细胞凋亡的作用[1]。为研究可溶性 FasL 分子在肝病患者中的作用，我们对慢性乙型肝炎、肝硬变、肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平进行了检测，为探讨可溶性 FasL 分子对各种肝病肝细胞凋亡的调控作用提供帮助。

1　材料与方法

1.1　病例选择与试剂

选用 2003 年 1 - 2 月中南大学湘雅二医院传染科住院患者 22 例，其中慢性重度病毒性肝炎(乙型)12 例，肝炎肝硬变(活动期)6 例，男性 14 例，女性 4 例，平均年龄(38.5 ± 11.2)岁，诊断标准遵照 2000 年 9 月西安中华医学会传染病与寄生虫病学分会、肝病学分会联合修订《病毒性肝炎防治方案》。选用 2002 年 6 月至 2003 年 1 月中南大学湘雅二医院肝胆外科住院患者 16 例，经病检确诊为肝细胞癌，均为男性患者，平均年龄(49.5 ± 19.7)岁。另选 6 名健康者为正常对照。人 FasL 定量 EIA 试剂盒购自 MBL。

1.2　主要仪器

酶标仪：LABSYSTEMS, Wellscan K3 全自动酶标仪。

1.3　方法

参照操作说明书严格执行，每个样品检测两次。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件行独立 t 检验。

2　结果

慢性肝炎、肝硬变、肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平比较见表 1。统计学分析表明，肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平与慢性肝炎、肝硬变患者比较，均存在显著性差异($P < 0.05$)。

表 1　慢性肝炎、肝硬变、肝癌患者血清的可溶性 FasL 水平比较

组别	n	血清可溶性 FasL 浓度(pg/ml)
肝癌	16	2 759.07 ± 365.65
慢性肝炎	12	3 186.30 ± 362.25*
肝硬变	6	3 782.00 ± 1 051.63*
正常对照	6	3 521.25 ± 1 562.25*

*：与肝癌组比较，$P < 0.05$

3　讨论

可溶性 FasL(soluble Fas ligand, sFasL)最先由 Tanaka 等[1]

（下转 1210 页）

作者简介：曾晓波(1960 -)，男，湖南省娄底市人，硕士，副教授，主要从事临床肝病方面的研究。电话：13308452846
通讯作者：陈　军，E-mail: drchenjun@yahoo.com.cn
收稿日期：2005-04-05；修回日期：2005-05-26