文章编号:1000-5404(2006)24-2413-03

论著

Eotaxin 突变体的构建及表达

周锦川[1],朱 瑾[2] ([1]第三军医大学西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038;[2]重庆医科大学生物医学工程系,重庆 400016)

提 要:目的 获得人嗜酸粒细胞趋化因子 Eotaxin N 末端突变体并构建其原核表达载体。**方法** 用点突变的方法,在 PT-Eotaxin 的基础上用 Met 替代(单个)Eotaxin N-端肽氨基酸残基,获得突变体 Met-Eotaxin,使用定向克隆技术将 Met-Eotaxin 克隆到原核表达载体 PET30a+上,获得其表达载体。**结果** 获得了 8 个新的 Eotaxin N-端突变体 Met-Eotaxin 及其原核表达载体。**结论** Eotaxin N-端突变体 Met-Eotaxin 及其原核表达载体的构建,为突变体表达和生物学活性检测,筛选 CCR3 拮抗剂奠定了基础。

关键词: Eotaxin;突变体;原核表达载体
中图法分类号: R392-33;R392.11;R394.2 **文献标识码:** A

Construction and expression of N-terminal mutants of human Eotaxin

ZHOU Jin-chuan[1], ZHU Jin[2] ([1]Department of Otorhinolaryngology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Biomedical Engineering, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To construct prokaryotic cell expression vector of human Eotaxin mutants. **Methods** By point mutation, eight amino acid residues in the N-terminal (residues of 3-7) and N-loop (residue 14) regions of Eotaxin were individually mutated to methionine and residue 14 was delleted or methiomine was inserted after the residue 14, and then cloned respectively into prokaryotic cell expression vector-PET30a+. **Results** Eight N-terminal and N-loop mutants of human Eotaxin and their prokaryotic cell expression vector-PET30a+ were gained. **Conclusion** The successful construction of prokaryotic cell expression vector of human Eotaxin mutants lays a foundation for their expression and biological activity and for filtering antagonists of CCR3.

Key words: Eotaxin; mutant; prokaryotic cell expression vector

Eotaxin 是一种 β2 趋化因子,为 C-C 化学趋化因子(chemokine)家族的成员,以近 N-端处有 2 个相邻的半胱氨酸为特征。Eotaxin 最初发现于致敏豚鼠抗原刺激后的支气管肺泡灌洗液(BALF)中[1],是选择性嗜酸粒细胞趋化因子,通过与嗜酸粒细胞 CCR3 受体的特异性结合,吸引其向炎症部位聚集并激活之,在各种以嗜酸粒细胞为主的炎症中起重要作用。针对 Eotaxin 及其受体 CCR3 进行干预的探索在对 Eotaxin 及其与包括变应性鼻炎、哮喘在内的多种嗜酸粒细胞性炎症疾病关系的研究具有重要意义。本实验用点突变的方法,用 Met 替代(单个)Eotaxin N-端肽氨基酸残基,获得了一系列新的突变体 Met-Eotaxin 其原核表达载体,并获得了正确的表达,为进一步纯化出相应蛋白,筛选 CCR3 拮抗剂奠定了基础。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30200313)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200313)
作者简介: 周锦川(1975-),男,浙江省嵊州市人,硕士研究生,主治医师,主要从事耳鼻咽喉临床及免疫学方面的研究。电话:(023)66769820,E-mail:zhoujc97@163.com
通讯作者: 朱 瑾,电话:(023)68775251,E-mail:zhujok@yahoo.com
收稿日期: 2005-11-08;**修回日期:** 2006-05-23

1 材料与方法

1.1 材料

PT-Eotaxin 质粒(Eotaxin 基因克隆到 PTZ57 载体上所得质粒)由本实验组构建,原核表达载体 PET30a+由西南医院中心实验室郑红教授赠送;突变引物由北京赛百盛生物有限公司合成;PCR 引物由上海博亚生物有限公司合成;内切酶 *Kpn* Ⅰ, *Xho* Ⅰ及 DNA 快速连接试剂盒购自大连宝生物公司;pfu *Taq* 酶购自天为时代生物有限公司;质粒提取及胶纯化试剂盒均为美国 OMEGA 产品;点突变试剂盒- QuikChange® Ⅱ Site-Directed Mutagenesis Kit 购自 Stratagene 公司;一抗为美国 Oncogene 公司的 Eotaxin(Ab-1),兔抗人,二抗为中杉公司产品,羊抗兔 IgG。

1.2 方法

1.2.1 Eotaxin N-端氨基酸的特定碱基的突变 通过点突变技术对 PT-Eotaxin 质粒中编码 Eotaxin N-端氨基酸的特定碱基进行突变获得突变体质粒 PT-Met-Eotaxin。引物设计的原则:分别改变 N 末端第 3、4、5、6、7 的氨基酸残基编码由甲硫氨酸编码代替;改变 N-loop 上氨基酸残基编码,对第 14 个氨基酸编码的序列进行甲硫氨酸编码代替和缺失,在第 14 与 15 个氨基酸编码序列中间插入甲硫氨酸编码代。改变 N-端及 N-loop 的氨基酸使其变构,以期获得同正常趋化因子具有相同的与受体结合能力,但不引起信号传导的趋化因子突变体即趋化因子受

体拮抗剂。根据 PT-Eotaxin 质粒中编码 Eotaxin 全长及需要进行突变位点氨基酸残基的 cDNA 序列，使用突变引物设计软件设计引物。设计特异突变引物，正、反向引物共 8 对，由北京赛百盛生物有限公司合成，其中之一序列如下：T30M-1 正义链：5′-GCCAGCTTCTGTCCCAATGACCTGCTGCTTTAACC-3′；反义链：5′-GGTTAAAGCAGCAGGTCATTGGGACAGAAGCTGGC-3′。

根据突变试剂盒的说明进行突变，建立突变 PCR 体系 5 μl 10 × 反应 buffer，8 μl (50 ng) dsDNA 模板，设计的正反引物各 2.5 μl (125 ng)，1 μl dNTP mix，加 30 μl ddH_2O 使最终反应体积正好达 50 μl，最后加 1 μl PfuUltra HF DNA 聚合酶(2.5 U/μl)；反应条件：95 ℃ 30 s，然后 95 ℃ 30 s，55 ℃ 1 min，68 ℃ 3 min，16 循环；循环结束后将反应体系放置于冰上 2 min 使之冷却到 37 ℃以下；每个反应体系加 1 μl *Dpn* Ⅰ (10 U/μl)轻轻吹打匀反应体系，离心 1 min 后立即在 37 ℃下孵育 1 h，以消化模板超螺旋双链 DNA。

1.2.2 转化及阳性克隆的筛选，鉴定 在冰上解冻 XL1-Blue 感受态细胞中加入 1 μl *Dpn* Ⅰ处理过的 DNA 产物，冰浴中轻轻旋转，摇晃 30 min，42 ℃热脉冲下 45 s，后即放置在冰上 2 min，加入预热到 42 ℃的 NZY⁺ broth 0.5 ml，然后在 37 ℃下以 220 r/min 孵育 1 h，取 0.25 ml 涂蓝白平板，37 ℃下孵育转化平板 16 h。挑取蓝色的阳性克隆进行序列分析。

1.2.3 重组表达质粒 PET30a + -Met-Eotaxin 的构建 使用 PCR 技术扩增出 Met-Eotaxin 基因片段，定向克隆到 PET30a + 载体上，获得重组表达质粒 PET30a + -Met-Eotaxin。根据获得的 Eotaxin 突变体序列进行引物设计：在上游引物中加入 *Kpn* Ⅰ酶切位点，以及 L V P R 氨基酸序列。在下游引物中加入 *Xho* Ⅰ酶切位点，两端各加 4 个保护碱基。由上海博亚(Invitrogen)生物技术有限公司合成，序列如下：上游引物 5′-TATAGGTACCCTGGTTCCACGCGGGCCAGCTTCTGTCATG-3′；下游引物 5′-TAATCTCGAGTTATGGCTTTGGAGTTGGAG-3′。

以 8 个正确的突变体质粒 PT-Met-Eotaxin 为模板，使用各自对应的引物作 PCR，扩增出相应的 Met-Eotaxin 基因片段。37 ℃下 *Xho* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ双酶切 Met-Eotaxin 基因片段及 PET30a + 载体，2 h 后胶纯化回收 Met-Eotaxin 基因片段及 PET30a + 载体，使用 DNA 快速连接试剂盒(TaKaRa)连接 Met-Eotaxin 基因片段和 PET30a + 载体；连接产物转化 DH5α 感受态菌，使用含卡那霉素的 LB 平板筛选阳性克隆，阳性克隆进行 PCR(使用 PET30a + 质粒的通用引物 T7 来鉴定)、酶切鉴定及序列分析。

1.2.4 重组表达质粒 PET30a + -Met-Eotaxin 的表达 重组质粒 PET30a + -Met-Eotaxin 转化入原核表达菌株 BL-21 (DEλ3)，37 ℃，200 r/min 培养 2 h 左右，测 $D(600)$ 值为 0.75 ~ 1.0，开始诱导表达，条件为 37 ℃，IPTG 1.0 mmol/L，分别在诱导前以及诱导后 2 h 取 1 ml 培养物，10 000 × *g* 离心 1 min，弃上清。沉淀用 1 × SDS 上样缓冲液 100 μl 悬浮后，沸水浴 3 min，然后 10 000 × *g* 离心 1 min。行 SDS-PAGE 电泳，使用 Tricine-SDS 缓冲系统。同时取其中 1 个重组质粒 PET30a + -Met-Eotaxin(T30M-1)的表达产物作 dot-blot 检测。

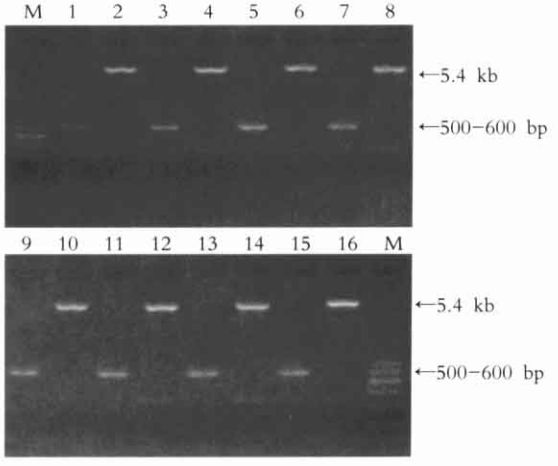
2 结果

2.1 突变体的序列分析

见图 1，取阳性克隆进行序列分析(上海博亚，现改名为 Invitrogen)，所获得的 8 个 Eotaxin N 末端突变体的序列完全和设计一致。

2.2 PET30a + -Met-Eotaxin PCR、酶切鉴定及序列分析

PET30a + -Met-Eotaxin PCR、酶切鉴定 PCR 扩增出 500 ~ 600 bp 的片段(泳道 1、3、5、7、9、11、13、15)，酶切出约 250 bp 的小片段(泳道 2、4、6、8、10、12、14、16)，鉴定正确。



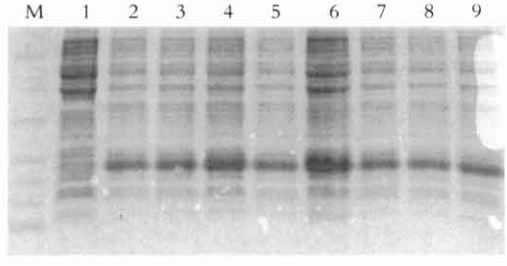
M：标准(100 ~ 600 bp)；1、3、5、7、9、11、13、15 泳道：A26-M、S27-M、V28-M、P29-M、T30-M、A37-M、109 + M、Del 108-110，8 个阳性重组子的 PCR 产物；2、4、6、8、10、12、14、16 泳道：A26-M、S27-M、V28-M、P29-M4、T30-M、A37-M、109 + M、Del 108-110，8 个阳性重组子的酶切产物

图 1 8 个重组质粒的酶切(*Kpn* Ⅰ、*Xho* Ⅰ)及 PCR 鉴定(使用 T7 引物)电泳图

Eotaxin N 末端突变体的序列分析(上海博亚，现改名为 Invitrogen)，所获得的 8 个 Eotaxin N 末端突变体的序列完全和设计一致，说明我们获得了正确的突变体。

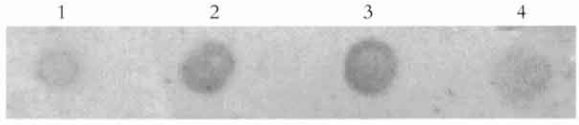
2.3 重组表达质粒 PET30a + -Met-Eotaxin 的表达

见图 2，3。进一步 Western blot 分析表明，各融合蛋白均能和特异性 Eotaxin 一抗结合，证实所表达的确系目的蛋白，见图 4。



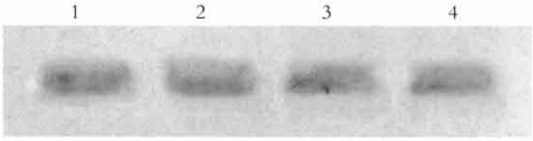
M：分子量标准；1：空载细菌对照；2：A_3-Met-Eotaxin；3：S_4-Met-Eotaxin；4：V_5-Met-Eotaxin；5：P6-Met-Eotaxin；6：T_7-Met-Eotaxin；7：A_{14}-Met-Eotaxin；8：del-10g-110-Eotaxin；9：109 Met-Eotaxin

图 2 重组质粒 PET30a + -Met-Eotaxin 表达产物 SDS-PAGE 电泳图



1：3 μl 表达产物；2：4 μl 表达产物；3：5 μl 表达产物；4：空载细菌裂解产物对照

图 3 PET30a + -Met-Eotaxin (T30M-1)诱导表达产物的 dot-blot 检测



1：PET30a + -Eotaxin（即野生型）；2：PET30a + -Met-Eotaxin（T30-M）；3：PET30a + -Met-Eotaxin（109 + M）；4：PET30a + -Met-Eotaxin（A37-M）

图 4　重组表达质粒诱导产物 western-blot 分析

3　讨论

嗜酸性细胞趋化因子（Eotaxin）是一种高度选择性趋化嗜酸性细胞的趋化因子，属于 β 或 C-C 趋化因子[2]。1996 年 hEotaxin 基因被克隆，人成熟 Eotaxin 分子量为 8.4×10^3，由 74 个氨基酸残基组成[2-4]。在生理 pH 条件下，Eotaxin 依浓度以单体和二聚体的形式存在，并保持动态平衡，活性形式为单体。单体的三维结构具有趋化因子典型的折叠特征，即含有三分支的 β 平面和 1 个覆盖于其上的 α 螺旋，并具有与受体结合时起灵活、定向作用的暴露的 N-端。这样的结构及 N-端对受体结合和信号传导都是很关键的，形成 Eotaxin 对大量存在于嗜酸粒细胞上的 CCR3 受体具高度选择性的结构基础[5]。2001 年 Mayer 等[6]用点突变的方法对 Eotaxin N-端肽及 N-loop 的功能进行了研究，发现用 A 替代了 Eotaxin N-端肽氨基酸残基后，可改变其趋化活性。2002 年 Shinkai 等[7]用逐个去除 Eotaxin-3 N-端肽氨基酸残基的方法对 Eotaxin-3 与 CCR3 的结合功能进行了研究，发现去除了 8、9 N-端氨基酸残基后的突变体没有了趋化活性，但是仍然具有与野生型 Eotaxin-3 一样的结合能力。目前越来越多的研究表明，Eotaxin 在过敏性鼻炎及过敏性哮喘的发病过程中起重要的作用；尤其是在嗜酸粒细胞募集的机制中起主要的作用[8,9]。从趋化因子 N-端突变体出发筛选其受体拮抗体目标性强，可能性高。已有的趋化因子拮抗剂如 Met-RANTES、AOP-RANTES 正是通过修饰相应趋化因子的 N-端生成，并通过阻断趋化因子与受体结合而影响其生物学活性的发挥[10,11]。所以改变 Eotaxin N 末端和 N-loop 上的氨基酸残基编码由甲硫氨酸编码代替；使 N-端及 N-loop 变构，可能获得同正常趋化因子具有相同的与受体结合能力，但不引起信号传导的趋化因子突变体即趋化因子受体拮抗剂。Eotaxin 是目前发现的作用最强的嗜酸粒细胞趋化因子，CCR3 是其唯一的受体。而 Met-RANTES 等除阻断 CCR3 的作用外，还可作用于 CCR5、CCR1 等[10,11]。因此，理论上 Eotaxin 突变体阻断 CCR3 的特异性高、作用也最强。本实验在 PT-Eotaxin 质粒基础上使用点突变技术对 Eotaxin N-端进行突变，获得了一系列 PT-Met-Eotaxin，在此基础上又使用了定向克隆技术将 Met-Eotaxin 克隆到原核表达载体 PET30a + 上，获得了一系列原核表达质粒 PET30a + -Met-Eotaxin，并获得了正确的表达，为进一步纯化出相应蛋白，筛选 CCR3 拮抗剂奠定了基础。

参考文献：

[1] GRIFFITHS-JOHNSON D A, COLLINS P D, ROSSI A G, *et al*. The chemokine, eotaxin, activates guinea-pig eosinophils *in vitro* and causes their accumulation into the lung *in vivo*[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(3): 1167 - 1172.

[2] PONATH P D, QIN S, RINGLER D J, *et al*. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils[J]. J Clin Invest, 1996, 97(3): 604 - 612.

[3] KITAURA M, NKAJIMA T, IMAI T, *et al*. Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3[J]. J Biol Chem, 1996, 271(13): 7725 - 7730.

[4] GARCIA-ZEPEDA E A, ROTHENBERG M E, OWNBEY R T, *et al*. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia[J]. Nat Med, 1996, 2(4): 449 - 456.

[5] CRUMP M P, RAJARATHNAM K, KIM K S, *et al*. Solution structure of eotaxin, a chemokine that selectively recruits eosinophils in allergic inflammation[J]. J Biol Chem, 1998, 273(35): 22471 - 22479.

[6] MAYER M R, STONE M J. Identification of receptor binding and activation determinants in the N-terminal and N-loop regions of the CC chemokine eotaxin[J]. J Biol Chem, 2001, 276(17): 13911 - 13916.

[7] SHINKAI A, KOMUTA-KUNITOMO M, SATO-NAKAMURA N, *et al*. N-terminal domain of eotaxin-3 is important for activation of CC chemokine receptor 3[J]. Protein Eng, 2002, 15(11): 923 - 929.

[8] SALIB R J, LAU L C, HOWARTH P H. Nasal lavage fluid concentrations of eotaxin-1 (CCL11) in naturally occurring allergic rhinitis: relationship to disease activity, nasal luminal eosinophil influx, and plasma protein exudation[J]. Clin Exp Allergy, 2005, 35(8): 995 - 1002.

[9] IM G J, HWANG C S, JUNG H H. Quantitative expression levels of regulated on activation, normal T cell expressed and secreted and eotaxin transcripts in toluene diisocyanate-induced allergic rats[J]. Acta Otolaryngol, 2005, 125(4): 370 - 377.

[10] CHVATCHKO Y, PROUDFOOT A E, BUSER R, *et al*. Inhibition of airway inflammation by amino-terminally modified RANTES/CC chemokine ligand 5 analogues is not mediated through CCR3 [J]. J Immunol, 2003, 171(10): 5498 - 5506.

[11] SHAHRARA S, PROUDFOOT A E, WOODS J M, *et al*. Amelioration of rat adjuvant-induced arthritis by Met-RANTES [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(6): 1907 - 1919.

（编辑　张大春）