维普资讯 http://www.cqvip.com

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Tripure Isolation Reagent，按操作说明进行。总RNA-70 ℃保存。

1.2.2 RT(逆转录) RT(逆转录)采用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™ Revese 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Genebank公布的MIP-3α mRNA序列(登录号U77035)，设计上游引物为5' CATGCCATGGCTGCAAGCAACTTTGACTGCT3'，下游引物为5'CGGAATTC CTACAGGTTCTTGACTTTTTT3'。同时在5'引入NcoI位点，3'引入EcoRI位点。以RT产物为模板，按每反应2 U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 min，然后按如下参数进行40个循环：94 ℃，1 min，50 ℃，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 采用Wizard(r)SV Gel and PCR Clean-Up System回收纯化，质粒提取采用High Pure Plasmid Isolation Kit，按操作说明进行。

1.2.5 酶切反应、连接和转化 按分子克隆第3版方法进行。

1.2.6 阳性克隆的挑选 对阳性克隆进行酶切验证(*Nco*Ⅰ、*Eco*RⅠ双酶切)，挑选3个含插入片段的质粒由上海基康公司以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(+)/MIP-3α。

1.2.7 缺失突变 为了使融合蛋白经肠激酶酶切后得到MIP-3α天然蛋白，本实验针对肠激酶位点与天然蛋白基因间的3个氨基酸设计了一对特异性缺失突变引物，正向GGTACCGACGACGACGACAAGAAGCAACTTTGACTGCT，反向CCATGGCTGCTG CTGCTGTTCTTCGTTGAAACTGACGA，突变反应按Stratagen QuickChange(r)突变试剂盒操作说明进行。突变后的质粒命名为pET32a(+)/MIP-3α。

1.2.8 pET32a(+)/MIP-3α在大肠杆菌中的表达 以pET32a(+)/MIP-3α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OD600 nm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(+)/MIP-3α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。将菌液按5%分别接种于2 L上述LB培养液中，摇动培养3~4 h，直至OD600 nm在0.6~0.8之间。加入诱导剂IPTG至终浓度1 mmol/L，继续摇动培养3 h。离心收集细菌。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 融合蛋白的金属亲和层析 以TALON金属亲和树脂进行纯化，留样SDS-PAGE电泳。

1.2.11 除盐 以50 mmol/L TrisHcl缓冲液，pH8.0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 TrisHcl缓冲液，pH8.0，洗脱液为20 mmol/L TrisHcl缓冲液，pH8.0，1 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。

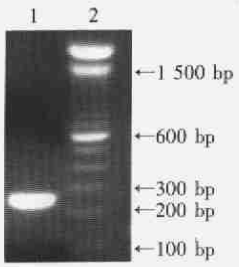
2 结果

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，得到长度在200~300 bp的MIP-3α成熟蛋白DNA扩增产物(图1)。

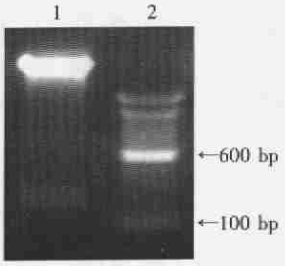


1：MIP-3α PCR产物；2：100 bp DNA标记

图1 琼脂糖凝胶电泳分析MIP-3α PCR产物

2.3 pET32a(+)/MIP-3α质粒的构建

PCR产物经*Nco*Ⅰ、*Eco*RⅠ分别单酶切并纯化后与同样*Nco*Ⅰ、*Eco*RⅠ分别单酶切并纯化的pET32a(+)载体相连接，构建MIP-3α-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NcoI、EcoRI双酶切鉴定阳性重组子(图3)，取3个含插入片段的阳性克隆进行DNA测序分析，缺失突变后再进行DNA测序，结果显示插入的MIP-3α基因、硫氧还蛋白基因与Genbank报道完全一致。



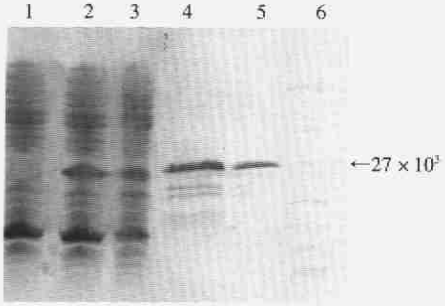
1：MIP-3α阳性克隆(*Nco*Ⅰ、*Eco*RⅠ双酶切)；2：100 bp DNA标记

图2 MIP-3α阳性克隆酶切验证

维普资讯 http://www.cqvip.com

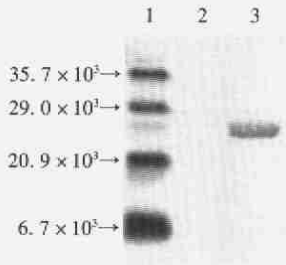
2.4 pET32a(+)/MIP-3α 质粒在 E. coli. BL21trxB(DE3)中的表达

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 MIP-3α-Trx 融合蛋白大小约 26 KDa，与理论值 27.1 KDa 基本一致(图 3)。Western blot 证实表达的为 MIP-3α 融合蛋白(图 4)。



1：未诱导菌裂解液总蛋白；2：诱导菌裂解液上清蛋白；3：诱导菌裂解液沉淀蛋白；4：金属离子亲和层析蛋白流出峰；5：离子交换层析蛋白流出峰 1；6：蛋白分子量标记

图 3 SDS-PAGE 分析融合蛋白表达



1：蛋白分子量标记；2：pET32a(+)/BL21trxB(DE3)诱导菌裂解液总蛋白；3：pET32a(+)/MIP-3α/BL21trxB(DE3)诱导菌裂解液总蛋白

图 4 MIP-3α 重组蛋白的 Western blot 分析(羊抗人 MIP-3α 多抗血清为一抗)

2.5 MIP-3α 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，MIP-3α 融合蛋白得到有效纯化(图 3)。

3 讨论

本研究首次在国内报道成功克隆人 MIP-3α 基因，并在 pET32 原核表达系统中得到有效表达，经金属亲和层析和离子交换得到初步纯化的 MIP-3α 融合蛋白。初步建立了 MIP-3α 融合蛋白表达和纯化的流程。通过该方法来表达和纯化 MIP-3α 的突出优点是流程短，成本较低，技术成熟，可靠性高。本研究构建的 MIP-3α 融合蛋白表达载体为构建 MIP-3α 突变体并进一步获得 MIP-3α 的拮抗剂奠定了基础。目前，国内外尚无关于 MIP-3α 与移植免疫排斥关系的研究，对于 MIP-3α 的研究多集中在肿瘤免疫方面。一方面，研究发现多数肿瘤细胞可表达 CCR6 受体，因此表达 MIP-3α 较多的器官会有肿瘤转移。应用 MIP-3α 抗体中和 MIP-3α 后，可阻断 CCR6 与 MIP-3α 的结合，可显著减少肿瘤转移[5]。另一方面，MIP-3α 是一种强有力的肿瘤抑制剂，肿瘤内直接注射 MIP-3α 可使 DC 和 $CD8^+$ T 细胞侵润到肿瘤实质内，能明显抑制肿瘤的生长[6]。本研究成功构建了 MIP-3α 表达载体，可稳定地大量表达 MIP-3α 蛋白，在此基础上可利用基因突变技术筛选 CCR6 的拮抗剂，为研究趋化因子 MIP-3α 在移植免疫学中的功能奠定基础。

[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(4): 313－335.

[3] Izadpanah A, Dwinell MB, Eckmann L, et al. Regulated MIP-3α/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(4): G710－G719.

[4] Tohyama M, Shirakara Y, Yamasaki K, et al. Differentiated keratinocytes are responsible for TNF－α regulated production of macrophage inflammatory protein 3α/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells[J]. J Dermatol Sci, 2001, 27(2): 130－139.

[5] Vicari AP, Caux C. Chemokines in cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(2): 143－154.

[6] Balkwill F. Chemokine biology in cancer[J]. Semin Immunol, 2003, 15(1): 49－55.

(编辑：余汇洋)

关于日期的用法

公历世纪、年代、年、月、日和时刻 例如：公元前5世纪、20世纪90年代、1995年6月8日14时30分。

表示年份要写全称，1995年不能写成95年或'95年；1953—1958年不能写在1953—58年。年月日可以写在1995－06－08。时刻用":"分隔的形式。如：13时45分8秒可以写成13:45:08。

(本刊编辑部)