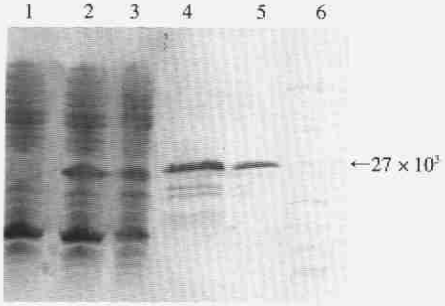
维普资讯 http://www.cqvip.com

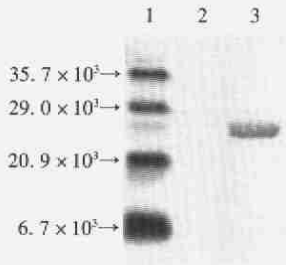
2.4 pET32a(+)/MIP-3α 质粒在 E. coli. BL21trxB(DE3)中的表达

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)