DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.14.002
第26卷第14期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 14
2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004 

文章编号:1000-5404(2004)14-1231-04

论著

# 人趋化因子SLC原核表达载体的构建与表达

罗福康[1],郑 红[1],何凤田[2] (第三军医大学:[1]西南医院实验研究中心,[2]基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 构建趋化因子SLC(secondary lymphoid-tissue chemokine)的硫氧还蛋白融合表达载体并表达融合蛋白。方法 从人扁桃体中提取总RNA,再进行RT-PCR,扩增SLC成熟蛋白基因,并在5′和3′分别添加*Nco*Ⅰ和*Eco*RⅠ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,经突变删除因*Nco*Ⅰ位点引入而在肠激酶位点和目的基因间多余的3个氨基酸,DNA再测序检测突变结果,SDS-PAGE分析其表达,并通过金属离子亲和层析、除盐、弱阳离子交换层析,得到纯化的融合蛋白,Western blot验证纯化的融合蛋白。结果 成功构建了SLC天然蛋白的硫氧还蛋白融合表达载体,表达并纯化出融合蛋白,Western blot证明该融合蛋白能与羊抗人SLC一抗结合。结论 构建的天然SLC硫氧还蛋白融合表达载体以可溶性蛋白的方式稳定表达SLC硫氧还蛋白,并对融合蛋白进行了初步纯化。

关键词:SLC;突变;融合表达;载体;蛋白纯化
中图法分类号:Q782;R392.11 文献标识码:A

## Construction and prokaryotic expression of SLC

LUO Fuo-kang[1], ZHENG Hong[1], HE Feng-tian[2] ([1]Center of Medical Research, Southwest Hospital, [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract**: **Objective** To construct an expression vector pET32a(+)/SLC and express the fusion protein TrxA-SLC. **Methods** Total RNA from human inflammatory tonsil was extracted and its cDNA was generated with reverse transcription. Mature secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) gene was amplified by RT-PCR and cloned into plasmid pET32a(+) with *Nco*Ⅰ and *Eco*RⅠ sites added to the 5′ and 3′ ends respectively. *E. coli* DH5α was transformed with the recombinant plasmid, and the grown clones were selected. The inserted DNA was verified by enzyme digestion and DNA sequencing. The 3 amino acids between enterokinase site and target gene were deleted with mutation and the new vector was verified by sequencing. Expression of SLC was analysed by SDS-PAGE. The fusion protein was purified by metal affinity chromatography and weak cation exchange chromatography, which was analysed by SDS-PAGE and Western blotting. **Results** Trx-SLC fusion protein expression vector was successfully construced, and the fusion protein was expressed with solubility. The purified fusion protein displayed the ability of binding the goat anti-human SLC polyclonal antibody. **Conclusion** The SLC fusion protein can be expressed with stability and solubility and primary purification is performed with metal affinity chromatography and weak cation exchange chromatography.

**Key words**: secondary lymphoid-tissue chemokine; mutation; fusion expression; vector; 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,是能够诱导白细胞做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、肿瘤发生、HIV感染等过程中发挥着重要作用[1~4]。SLC(归巢趋化因子),主要由HEV(高内皮静脉)上皮细胞、淋巴管上皮细胞和次极淋巴组织T细胞区的基质细胞表达,诱导表达相应受体的T淋巴细胞和DC细胞进入次级淋巴组织,并由DC细胞提呈抗原,激活T淋巴细胞[5~7]。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。为了阻止或减轻免疫排斥反应的发生,我们希望得到SLC受体CCR7的拮抗剂,以减缓或阻止DC细胞进入次级淋巴组织。为此,本研究构建了SLC的融合蛋白表达载体,并稳定表达并纯化出SLC融合蛋白。

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,硕士研究生,医师,主要从事趋化因子方面的研究。电话:(023)68602472
通信作者:郑 红,电话:(023)65460552,E-mail:zhengh@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-09-24;修回日期:2004-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

## 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*. BL21(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 公司产品，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 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System，限制性内切酶 *Nco*Ⅰ、*Eco*RⅠ，T4 连接酶，美国 Promega 公司产品，质粒提取试剂盒 High Pure Plasmid Isolation Kit，德国 Roche 公司产品，QuikChange® Ⅱ Site-Directed Mutagenesis Kit，美国 Stratagene 公司产品，IPTG 为 Sigma 公司产品。羊抗人 SLC 多抗购自 R&D 公司，兔抗羊二抗(辣根过氧化物酶标记)购自中山公司，TALON 金属离子亲和层析树脂购自 CLONTECH 公司，AKTAExplorer 高效层析系统、Hiprep26/10 除盐柱、Hiprep16/10 CM FF 弱阳离子交换柱均购自英国 Amersham Pharmacia 公司。其他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 RT(逆转录) RT(逆转录)采用美国 Promega 公司的 Improm-Ⅱ RT System，模板为提取总 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 SLC mRNA 序列(gi:2335034)，设计上游引物为 5′CATGCCATGGCTAGTATGGAGGGGCTCAG3′，下游引物为 5′CGGAATTCCTATGGCCCTTTAGGGGT3′。上游引物位于 SLC 序列起始密码子 ATG 下游 69 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*RⅠ位点。以 RT 产物为模板，按 2U/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，51 ℃，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 参照文献[8]介绍的方法。

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送上海基康公司测序以 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。重组质粒命名为 pET32a(+)/SLC(+3)。

1.2.7 突变反应 由于 *Nco*Ⅰ位点的引入，SLC 基因 N 端与肠激酶酶切位点之间多了 3 个氨基酸，针对这 3 个氨基酸，我们设计了特异的点突变引物：

正向：5′-GGTACCGACGACGACGACAAGAGTGATGGAGGGGCTCAG-3′

反向：5′-CTGAGCCCCTCCATCACTCTTGTCGTCGTCGTCGGTACC-3′

突变反应按试剂盒说明书进行。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(+)/SLC。

1.2.8 pET32a(+)/SLC 在大肠杆菌中的表达 以 pET32a(+)/SLC 质粒转化感受态大肠杆菌 BL21trxB(DE3)。取 5 个克隆，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 1 ml 菌液，与未诱导菌液一道 100 ℃，5 min 裂菌。取 1 个克隆余下的菌液离心，将沉淀悬于 1/10 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 pET32a(+)/SLC 在大肠杆菌中的表达的稳定性 取 5 个单克隆菌分别培养，培养方法同上，IPTG 诱导 2 h 后取样电泳。

1.2.10 SDS-PAGE 采用 Bio-Rad 电泳系统，4% 浓缩胶，15% 分离胶。电泳完毕后，考马斯亮蓝染色，凝胶扫描。

1.2.11 目的蛋白的大量表达 将含有重组原核表达质粒 pET32a(+)/SLC 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 $D_{600}$ 在 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 Lysis Buffer 重悬，－80 ℃冻存。次日将冻存菌液 37 ℃解冻，可见菌液变粘稠。以 BioNeb 挤压式细胞破碎仪，700 MPa，挤压 4 次，粘稠的菌液变清亮。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。

1.2.12 融合蛋白的金属亲和层析 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。

1.2.13 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。条件为：HPLC 系统为英国 Amersham Pharmacia 公司 AKTAExplorer，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。留样电泳。

1.2.14 弱阳离子交换层析 按蛋白等电点的不同分离蛋白。条件为：HPLC 系统为英国 Amersham Pharmacia 公司 AKTAExplorer，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 8.0，洗脱液为 20 mmol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 8.0，1 mol/L NaCl。流速为 5 ml/min，上样 3 ml/min。梯度洗脱 0～100%B，20 柱床体积(CV)，收集洗脱下的蛋白峰。取样电泳。

1.2.15 Western blot 检测 采用 Bio-Rad 电泳系统，4% 浓缩胶，15% 分离胶。将纯化的融合蛋白上样电泳，电泳完毕后，一部分考马斯亮蓝染色，凝胶扫描；另一部分电转移(80 V，70 min)至硝酸纤维膜上，1% 脱脂奶粉 3 ml 室温封闭 2 h，加入 SLC 多抗(羊抗人)6 μl，终浓度 0.2 μg/ml，室温摇动孵育过夜，PBS 洗涤 2 次，每次 10 min，再加入 3 ml 封闭液，1.5 μl 兔抗羊酶标

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二抗, 室温孵育 2 h, PBS 洗涤 2 次, 每次 10 h, 加入 TBS 新鲜配制的 DAB 显色液, 显色 5 h。阴性对照为 pET32a(+)转化 BL21trxB(DE3)后相同条件表达的蛋白。

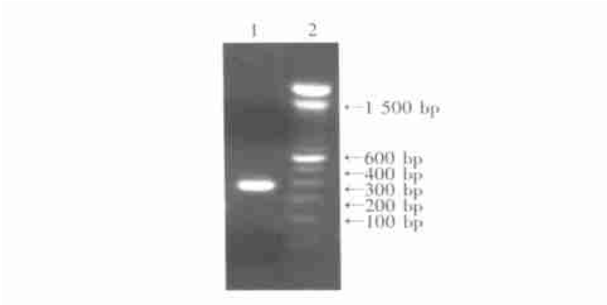
## 2　结果

### 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 28 S 和 18 S, 28 S∶18 S 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 300～400 bp 的 SLC 成熟蛋白 DNA 扩增产物(图 1)。



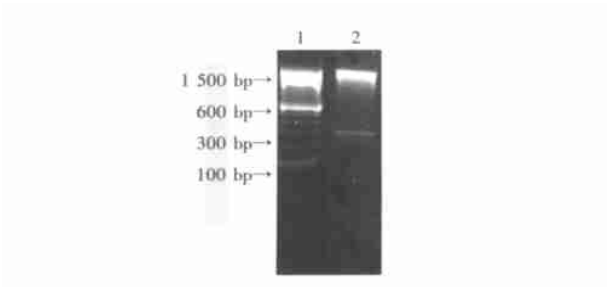

1: SLC PCR product; 2: 100 bp DNA ladder

图 1　琼脂糖凝胶电泳分析 SLC PCR 产物

**Fig 1　Agarose gel electrophoretic analysis of SLC PCR product**

### 2.3　pET32a(+)/SLC 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SLC-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*RⅠ 双酶切鉴定阳性重组子(图 2), 取 3 个含插入片段的阳性克隆 pET32a(+)/SLC(+3)进行 DNA 测序分析(测序图略), 经突变删除肠激酶位点和目的基因间 3 个氨基酸, 将突变后的质粒 pET32a(+)/SLC 进行 DNA 测序分析(测序图略)。插入的 SLC 基因、硫氧还蛋白基因与 GenBank 报道完全一致。



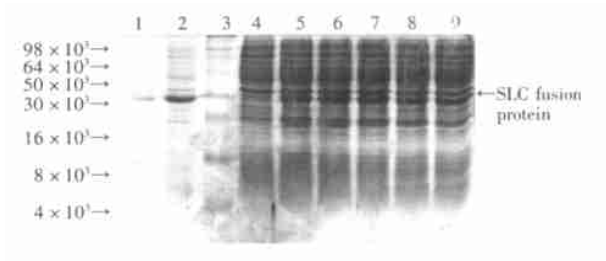

1: 100 bp DNA ladder; 2: SLC positive clone cleaved by *Nco*Ⅰ and *Eco*RⅠ

图 2　SLC 阳性克隆酶切验证

**Fig 2　SLC positive clones digested with *Nco*Ⅰ and *Eco*RⅠ**

### 2.4　pET32a(+)/SLC 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, 不同单克隆菌间融合蛋白表达量无明显差异, 表明所构建菌株能稳定表达 SLC 融合蛋白。SDS-PAGE 电泳结果表明 SLC-Trx 融合蛋白大小约 $30\times10^3$, 与理论值 $29.58\times10^3$ 基本一致(图 3)。



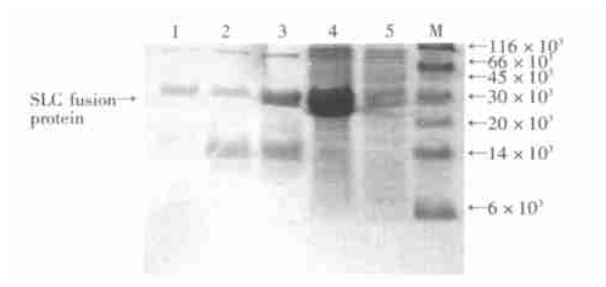

1: Proteins in precipitation of induced fertilized bacteria (IPTG induction for 3 h); 2: Proteins in supernatant of induced fertilized bacteria (IPTG induction for 3 h); 3: Marker; 4: Proteins in lysate of fertilized bacteria (not induced); 5—9: Proteins in lysate of 5 clones of induced fertilized bacteria (IPTG induction for 3 h)

图 3　SDS-PAGE 分析融合蛋白表达

**Fig 3　SDS-PAGE analysis of fusion protein**

### 2.5　SLC 融合蛋白的纯化

融合蛋白经 TALON 金属亲和树脂吸附后, 融合蛋白占总蛋白的 90% 以上。除盐后经弱阳离子交换, SLC 融合蛋白首先被洗脱下来, 各蛋白分离良好(图 4)。




M: Marker; 1: SLC fusion protein in the elution peak of weak cation exchange chromatography; 2: Proteins in the elution peak of desalting; 3: Proteins in the elution of the metal affinity chromatography; 4: Proteins in lysate of induced fertilized bacteria (IPTG induction for 3 h); 5: Proteins in lysate of fertilized bacteria (not induced)

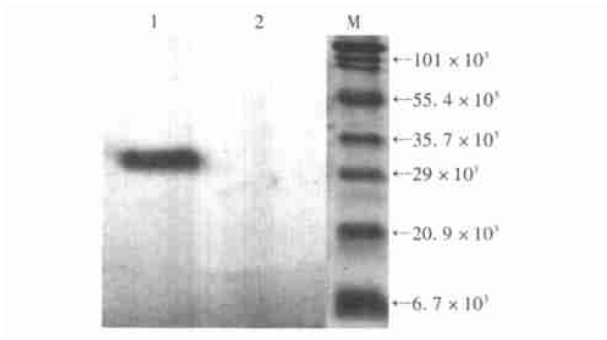
图 4　SLC 融合蛋白的纯化

**Fig 4　Purification of the SLC fusion protein**

### 2.6　Western blot 分析纯化的融合蛋白

Western blot 证实纯化的融合蛋白能与羊抗人 SLC 多克隆抗体特异性结合。见图 5。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net




M: Marker; 1: Purified SLC fusion protein; 2: Proteins in lysate of induced fertilized pET32a(+)/BL21trxB(DE3) (IPTG induction for 3 h)

图5 SLC重组蛋白的Western blot分析(羊抗人SLC多抗血清为一抗)

**Fig 5 Western blotting of recombinant SLC fusion protein**

## 3 讨论

SLC主要由HEV(高内皮静脉)上皮细胞、淋巴管上皮细胞和次极淋巴组织T细胞区的基质细胞表达,通过CCR7发挥其生物学功能,表达CCR7的主要为DC和T细胞。因此,SLC是DC和T细胞向次级淋巴组织归巢的重要趋化因子。研究表明,缺乏SLC的plt小鼠其T细胞归巢和DC定位障碍[9]。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SLC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。本研究构建的SLC融合蛋白表达载体为构建SLC突变体并进一步获得SLC的拮抗剂奠定了基础。目前,国内外尚少见关于SLC与移植免疫排斥关系的研究,对与SLC的研究多集中在肿瘤免疫方面:一方面,多数肿瘤细胞可表达CCR7受体,因此表达SLC较多的器官会有肿瘤转移。应用SLC抗体中和SLC后,可阻断CCR7与SLC的结合,可显著减少肿瘤转移。另一方面,SLC是一种免疫增强剂,肿瘤内直接注射SLC可使DC和$CD8^+$T细胞的浸润到肿瘤实质内,能明显抑制肿瘤的生长[10~12]。本研究成功构建了SLC融合蛋白表达载体,可稳定地大量表达并纯化SLC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SLC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: 105—125.

[2] Horuk R. Chemokine receptors [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2001, 12(4): 313—335.

[3] Campbell J J, Butcher E C. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(3): 336—341.

[4] Hancock W W, Gao W, Faia K L, *et al*. Chemokines and their receptors in allograft rejection[J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12(5): 511—516.

[5] Wells T N, Proudfoot A E, Power C A. Chemokine receptors and their role in leukocyte activation[J]. Immunol Lett, 1999, 65(1-2): 35—40.

[6] Nagira M, Imai T, Hieshima K, *et al*. Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potent chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13[J]. J Biol Chem, 1997, 272(31): 19518—19524.

[7] Campbell J J, Bowman E P, Murphy K, *et al*. 6-C-kine (SLC), a lymphocyte adhesion-triggering chemokine expressed by high endothelium, is an agonist for the MIP-3β Receptor CCR7[J]. Journal Cell Biol, 1998, 141(4): 1053—1059.

[8] J.萨姆布鲁克, D.W.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—114.

[9] Gunn M D, Kyuwa S, Tam C, *et al*. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization[J]. J Exp Med, 1999, 189(3): 451—460.

[10] Kirk C J, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff B J, *et al*. T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy[J]. Cancer Res, 2001, 61(5): 2062—2070.

[11] Vicari A P, Caux C. Chemokines in cancer[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13(2): 143—154.

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

(编辑 张 宁)

# 血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明mmHg与千帕[斯卡](kPa)的换算系数。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net