

次级淋巴趋化因子 SLC 的克隆及其在原核系统中的表达

王东宁^{1,2} 李明峰^{2,*} 曾而良¹ 张惟杰¹ 吴祥甫^{2,*}

¹(上海交通大学生命科学与技术学院,上海 200030)

²(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

摘 要 以中国人的淋巴组织为材料抽提总 RNA,用 RT-PCR 的方法扩增了次级淋巴组织趋化因子(Secondary lymphoid-tissue chemokine, SLC)的成熟肽基因。序列分析表明,我们克隆的 SLC 基因与文献报道的仅有一个核苷酸的差异,且并不影响氨基酸的编码。将 SLC 的 cDNA 插入含 T7 启动子的表达载体 pET-28a(+)中构建重组质粒 pET-SLC,转化大肠杆菌 BL21(DE3)筛选表达菌株。表达菌株经 1mmol/L IPTG 诱导表达 3~5h 后,超声破菌,离心后将上清进行 SDS-PAGE,可以看到在 18kD 左右处有明显的表达条带。用 Ni²⁺亲和层析柱纯化表达产物,纯度达到 90% 以上。

关键词 次级淋巴组织,趋化因子,克隆,表达,趋化作用

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0392-04

次级淋巴组织趋化因子(Secondary lymphoid-tissue chemokines, SLC)是人们最近发现的一种起源于内皮细胞的 CC 型趋化因子,它的存在可使机体内 T 淋巴细胞产生极高效的趋化作用^[1]。研究表明 SLC 在人体的淋巴结、阑尾以及脾脏等组织中有较高的表达。Nagira 等人于 1997 年首先发现了这一新的因子,随后人们在确定了其基因序列的基础上成功地通过 Bac-to-Bac 系统将其在真核细胞中加以表达,并纯化^[2]。之后人们又陆续对真核表达系统产生的重组 SLC 蛋白的功能及其体内趋化作用作了较深入的研究^[3-7]。

研究已表明 SLC 由 134 个氨基酸残基组成,其中 23 个氨基酸为信号肽序列。111 个氨基酸的成熟肽含有 4 个半胱氨酸残基,与其他人类 CC 型趋化因子有 21%~33% 的同源性。然而这种新型的趋化因子只能特异地趋化淋巴细胞^[2]。

正是由于 SLC 在体内对于 Th1 淋巴细胞和树突状细胞的趋化作用,促使人们联想到通过局部瘤内用药的方法来提高肿瘤组织周围的淋巴细胞数量,从而达到用免疫治疗法攻克肿瘤的目的,目前国外在模型动物的治疗方面已取得可喜的效果。有报道表明,用重组的鼠源 SLC 对肿瘤进行瘤内注射,使

受治疗鼠的 40% 获得了完全的肿瘤根除^[8]。

我们以中国人的组织为材料,通过 RT-PCR 的方法扩增了 SLC 基因,并与国外报道的同源基因序列做了比较,证明了该蛋白的保守性。同时我们首次尝试了将该基因在原核系统中进行表达并纯化了表达的产物。这使得通过一种简单而便于扩大生产的表达系统获得大量 SLC 重组蛋白变为可能,为日后研究 SLC 蛋白的结构与功能及开发一种具有抗肿瘤活性的新型药物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肿瘤患者淋巴结由上海市第九人民医院手术室提供,大肠杆菌 TG1, BL21(DE3),质粒载体 pBlue-Script II-SK, pET-22b, pET-24a, pET-28a 由本室保存;焦碳酸二乙酯(DEPC)为 Fluka 公司产品;DNA 限制酶, T4 DNA 连接酶, Klenow 酶, Taq DNA 聚合酶及 cDNA 合成试剂盒为 Gibco BRL 公司产品,测序试剂盒与总 RNA 抽提试剂盒为 Promega 公司产品, X-Gal, IPTG 为 Boehringer mannheim 产品。

1.2 淋巴结组织总 RNA 的抽提

将手术取下的新鲜淋巴结组织剪成小块,取

50mg 左右的组织于液氮中研磨成粉末,总 RNA 的抽提按照 Promega 总 RNA 抽提试剂盒的说明进行。

1.3 cDNA 合成和 PCR 体外扩增

cDNA 合成按照试剂盒推荐的方法操作。PCR 反应以 2 μ L cDNA 为模板,反应体系参照文献 [9],反应条件按常规设置进行:先将 PCR 反应混合物于 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;之后按下列参数循环 30 次:94 $^{\circ}$ C 变性 1min,56 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s;最后在 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。PCR 产物回收参照文献 [9] 稍加修改进行。

1.4 重组克隆和 DNA 序列分析

限制酶反应,DNA 的连接、转化,重组克隆的蓝、白斑筛选,质粒的提取等技术参考文献 [9] 稍加修改进行。将筛选到的有目的基因插入的重组质粒测序,然后将测序结果与报道的同源基因进行序列比较分析。

1.5 外源基因在大肠杆菌中的表达

含表达质粒的单克隆菌在 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,以 2%接种量转接于 2 管 3mL LB 培养基中,250r/min 培养至 OD_{600} 在 0.4~0.6 之间(约 2h),取其中一管加 IPTG 至终浓度为 1mmol/L,继续诱导培养 3~5h 后收集菌液备用,另一管则不加诱导剂作为对照。

1.6 SDS-PAGE

SDS-PAGE 操作参照文献 [9] 以 15%的聚丙烯酰胺凝胶为分离胶。菌体裂解蛋白电泳后,用 0.25%考马斯亮蓝染色,经脱色液脱色后观察表达条带的大小。

1.7 Ni²⁺亲和层析柱纯化表达蛋白

将含有重组质粒 pET28a-SLC 的表达菌株接种于 500mL LB 中做大量表达,离心收集诱导表达后的菌体。超声波破碎菌体,离心后取上清,用 Ni²⁺亲和层析柱,纯化方法按照 Novagen 公司的 PET 系统操作手册进行。

2 结果与讨论

SLC 是淋巴细胞高效的趋化因子,它对原始 T 细胞有优先活性。另外,SLC 还介导原始 T 细胞稳定的粘附,经整合蛋白结合到相应的受体——细胞内粘附分子-1 上,这是调动淋巴细胞关键的一步^[1]。SLC 是被论证的第一个具有介导淋巴细胞归巢到次级淋巴器官特性的趋化因子。另外,SLC 在淋巴内皮的表达暗示了淋巴细胞从组织到输出淋巴管的迁移可能是这种分子介导的一个活性过程。正是由于对淋巴细胞强烈的趋化作用,导致了 SLC 在肿瘤免

疫治疗中确实有较强的功效。

2.1 PCR 扩增 SLC 基因片段

从淋巴结组织中抽提总 RNA 后,反转录成 cDNA 作为模板。根据 Nagira 等报道的人类 SLC 基因中的成熟肽序列^[2],我们设计了一对引物:

引物 1 5'-TGCATATGGGCATCCCCAGGACCCAAGGC-3'

引物 2 5'-TCGAATTCCTATGGCCCTTTAGGGGTCTG-3'

引物 1 为 SLC N 端编码序列,引入酶切位点 *Nde*I。引物 2 为 SLC C 端编码序列的互补序列,并引入酶切位点 *Eco*RI。以 cDNA 为模板进行 PCR 反应,取 5 μ L 扩增产物经 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检查,可清晰见到单一的一条约 360bp 长的扩增产物(图 1)。

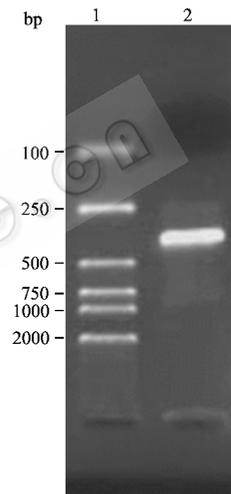


图 1 PCR 结果

Fig.1 The product of PCR

2.2 SLC 基因序列分析

将 PCR 产物补平后与用 *Eco*RV 酶切的 pSK 载体相连接,转化大肠杆菌 TG1。挑取白斑克隆,抽质粒后通过 *Eco*RI 和 *Xho*I 双酶切鉴定出含有外源片段的重组质粒。取两个阳性质粒克隆送出测序。所测序列与文献报道序列比较可知,该基因序列相当保守,在 357 个碱基里仅有 1 个碱基的差异,这可能是由个体的突变造成,然而这一个碱基的差异并不影响所编码的氨基酸,也就是说我们克隆的基因所编码的蛋白与报道的完全相同。

2.3 SLC 基因在大肠杆菌中的表达

将克隆在 pSK 质粒中的 SLC 基因片段用 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切,低熔点胶电泳回收片段后,分别与同样经 *Nde*I 和 *Eco*RI 双酶切的 pET-22(b),pET-24(a),pET28(a)表达载体相连接,构建大肠杆菌表达质粒。将此表达质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),筛

选表达菌株。

含表达质粒的单菌落在含相应抗生素的 LB 培养液中于 37℃ 摇床培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.6$, 加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导表达 3~5h, 离心收集菌体, 进行 SDS-PAGE 电泳。

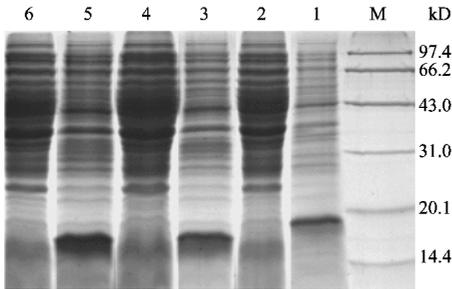


图 2 SDS-PAGE 图

Fig.2 SDS-PAGE

1,3,7. The expressed products of pET28a-SLC, pET24a-SLC, pET22b-SLC after inducing respectively; 2,4,6. The controls not inducing of the above; M. Marker

结果表明在 3 种表达质粒载体中, 经 IPTG 诱导后均可表达表观分子量约为 16~18kD 的重组蛋白(图 2), 其中由于 pET-28a-SLC 中 N 端融合了 6 个组氨酸残基, 因而比 pET24a-SLC 及 pET-22b-SLC 中表达的蛋白的分子量偏大。根据 SLC 成熟肽的氨基酸计算得出其分子量约为 14kD, 这比从电泳图中看到的分子量略小, 这可能是由于 SLC 成熟肽中半胱氨酸含量比较丰富, 而使蛋白形成了复杂的空间构象, 从而导致电泳的表观分子量增大。经抗 6×his 单抗的 Western blot 检测, 只有 pET28a-SLC 的诱导表达物形成了特异的杂交带(图 3), 这表明外源基因确实与编码 6 个组氨酸残基的基因共同表达了一段融合了 6 个 his 的重组蛋白。

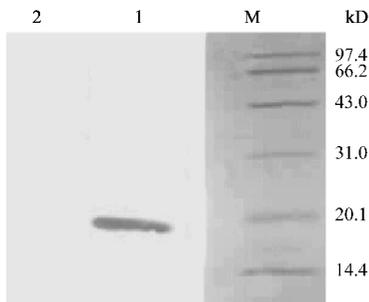


图 3 Western-blot 图

Fig. 3 Western-blot

1. The expressed product of pET28a-SLC 2. The control not inducing M. Marker

2.4 表达蛋白的纯化

用 pET28a-SLC 做大量表达。取少量破菌后的

细胞离心, 分别取上清和沉淀样品走 SDS-PAGE 电泳, 知道表达的 SLC 在上清中。将用不含尿素的结合缓冲液溶解的大量表达产物, 经 0.45 μ m 的滤膜过滤后上 Ni^{2+} 亲和层析柱进行纯化。适当调整洗涤缓冲液与洗脱缓冲液中咪唑的浓度后, 可得较纯的单一蛋白条带(图 4)。

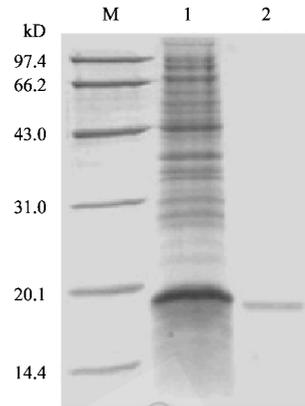


图 4 纯化的 SLC 蛋白

Fig.4 Purified recombinant SLC protein

1. The product before purifying 2. Purified SLC; M. Marker

目前, 国外对于 SLC 的研究已经进入到对其生物学功能及其在抗肿瘤方面活性的测定阶段, 但在国内尚无关于该蛋白研究的报道。我们首次从中国人的淋巴结组织中成功地克隆了编码 SLC 成熟蛋白约 360bp 的基因, 与文献报道的相比仅有一个核苷酸的差异, 但不影响蛋白的编码。可见该蛋白在不同的人群中具有极高的保守性。

然而目前用于动物实验的重组 SLC 蛋白均是真核表达系统的产物, 这使得获得 SLC 产品的周期加长, 成本提高, 这势必影响 SLC 作为高效药物开发的进程。我们尝试了用大肠杆菌对其进行迅速而大量的表达, 实验证明表达产物以可溶形式存在, 这使得其生物活性的维持成为可能。我们目前已获得纯化的原核表达的重组 SLC 蛋白(图 4)。

国外已有用原核系统表达出具有体外趋化活性的 CC 型趋化因子 ELC 的报道。这更增强了我们通过简单快速的过程获得有活性蛋白的信心。本实验室对于原核系统表达的重组 SLC 的功能活性测定工作仍在进行中。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Gunn M D, Tangemann K, Tam C *et al.* A chemokine expressed in lymphoid endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(1): 258~

- [2] Nagira M ,Imai T ,Hieshima K *et al.* .Molecular cloning of a novel human CC chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine that is a potential chemoattractant for lymphocytes and mapped to chromosome 9p13. *J Biol Chem* ,1997 **272**(31):19518 ~ 19524
- [3] Nagira M ,Imai T ,Yoshida R *et al.* .A lymphocyte-specific CC chemokine secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) ,is a highly efficient chemoattractant for B cells and activated T cells. *Eur J Immunol* ,1998 **28**(5):1516 ~ 1523
- [4] Pachynski R K ,Wu S W ,Gunn M D ,Erle D J. Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) stimulates integrin alpha 4 beta 7-mediated adhesion of lymphocytes to mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1) under flow. *J Immunol* ,1998 **161**(2) 952 ~ 956
- [5] Tangemann K ,Gunn M D ,Giblin P ,Rosen S D. A high endothelial cell-derived chemokine induces rapid ,efficient ,and subset-selective arrest of rolling lymphocytes on a reconstituted endothelial substrate. *J Immunol* ,1998 **161**(11) 6330 ~ 6337
- [6] 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 location. *J Exp Med* ,1999 **189**(3) 451 ~ 460
- [7] Chan V W ,Kothakota S ,Rohan M C *et al.* .Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is chemotactic for mature dendritic cells. *Blood* ,1999 **93**(11) 3610 ~ 3616
- [8] Sharma S ,Stolina M ,Luo J *et al.* .Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses *in vivo* . *J Immunol* 2000 **164**(9) 4558 ~ 4563
- [9] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual. 2nd ed ,New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989

Cloning of Secondary Lymphoid-tissue Chemokine (SLC) and Its Expression in Prokaryotic System

WANG Dong-Ning¹ LI Ming-Feng^{2**} ZHEN Er-Liang¹ ZHANG Wei-Jie¹ WU Xiang-Fu^{2*}

¹(College of Life Science and Technology ,Shanghai Jiao Tong University ,Shanghai 200030 ,China)

²(Institute of Biochemistry and cell biology ,Shanghai Institutes for Biological Sciences ,Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200031 ,China)

Abstract The total RNA from lymphoid tissue in Chinese was extracted ,and the gene encoding the mature peptide of secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) was cloned by RT-PCR. Nucleotide sequence analysis showed that there is only one nucleotide different from that reported ,but it doesn't alter the amino acid encoded. The SLC cDNA was inserted into an expression vector pET-28a(+) under T7 promoter and constructed recombinant plasmid pET28a-SLC. pET28a-SLC was transformed to *E. coli* BL21(DE3) and the expression strain was gotten. After inducing with IPTG for 3 ~ 5 hours the bacterium were sonicated. After centrifuging the supernatant was analysed by SDS-PAGE. An obvious expression band about 18kD can be seen. The expressed product was purified by Ni²⁺ affinity chromatography column ,and the purity is up to 90 percent.

Key words secondary lymphoid-tissue , chemokine , cloning , expression , chemotaxis