

次级淋巴组织趋化因子(SLC)基因克隆及在大肠杆菌中的表达 Cloning and Expression in *Escherichia coli* of Secondary Lymphoid-tissue Chemokine(SLC) Gene

刘明学^{1 2 *}, 尹长城², 春 雷², 黄华樑²

LIU Ming-Xue^{1 2 *}, YIN Chang-Cheng², CHUN Lei², HUANG Hua-Liang²

1 西南科技大学生命科学与工程学院 绵阳 621000

2 北京安波特基因工程技术有限公司 北京 102206

1 Life Science and Engineering College, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621000, China

2 Beijing ABT Genetic Engineering Technology Co., Ltd., Beijing 102206, China

摘 要 次级淋巴组织趋化因子(SLC)是通过搜索表达序列标签(EST)数据库克隆出来的一 CC 类趋化因子。以人 SLC 序列为蓝本,利用重叠 PCR(SOE-PCR)的方法获得了适宜在大肠杆菌中表达的 SLC 基因,将此序列分别克隆至表达载体 pTMF 和 pALM 中,转化大肠杆菌,诱导表达。Western Blotting 鉴定结果表明目的蛋白以可溶蛋白和包涵体两种形式表达,两种形式的蛋白所占比例依培养和诱导条件的不同而变化。对两种形式的表达产物分别用 Ni-NTA 金属亲和层析和包涵体复性方法纯化,在实验中还对纯化条件进行了探索。对纯化蛋白的电泳结果显示 纯化样品的分子量比预期的分子量要大。

关键词 次级淋巴组织趋化因子,基因克隆,表达,大肠杆菌

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)02-0352-06

Abstract Secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) is a type of CC chemokine identified by searching the Expressed Sequence Tag(EST) database. The full-length SLC gene was synthesized based on human SLC sequence using SOE-PCR. The sequenced SLC gene was cloned into expression vector pTMF and pALM, which used to transform *Escherichia coli*. Then the *E. coli* was cultured and induced according to protocol. The expressed target protein was identified by Western blotting. The target protein was expressed as soluble protein as well as inclusion bodies, the ratio of these two forms target protein varied with the difference conditions of culture and induction. The target protein was purified with the methods of nickel-nitrilotriacetic acid(Ni-NTA) metal-affinity chromatography. The results of electrophoresis of the purified target protein showed that the molecular weight was larger than the predicted molecular weight.

Key words secondary lymphoid-tissue chemokine(SLC), gene clone, expression, *Escherichia coli*

趋化因子是一类结构和功能相关的多肽超家族,参与一系列的免疫调节和促炎症反应,具有对白细胞的趋化活性。SLC(Secondary lymphoid-tissue chemokine, 次级淋巴组织趋化因子,又名 6ckine,

TCA-4, Exodus-2)是于 1997 年通过搜索表达序列标签(EST, Expressed Sequence Tag)数据库时鉴定出来的,据其 cDNA 序列推断的蛋白质序列为一高度碱性的多肽,全长为 134 个氨基酸,重组蛋白中可能包

Received: September 6, 2006; Accepted: November 8, 2006.

This work was supported by a grant from the National Nature Science Foundation of China(No. 30170531).

* Corresponding author: Tel: + 86-816-6648032; Fax: + 86-816-6089521; E-mail: dragonlhx@263.net

国家自然科学基金资助(No. 30170531)

含一个 23 个氨基酸的信号肽 ,成熟的蛋白为 111 个氨基酸。三个特点表明其是一种介导 T 细胞进入外周淋巴器官的趋化因子 (1)在 LN(lymph node)和 PP(Peyer's patch)的 HEV(high endothelial venule)中以及在 LN、PP 和脾的 T 细胞区表达 ,就目前所知 ,这一表达模式是 SLC 唯一的 (2)SLC 是幼稚 T 细胞的高效趋化物质 ,该细胞类型预定归巢到外周淋巴器官 (3)SLC 是第一个被发现的能刺激在剪切条件下由整合蛋白介导的幼稚 T 淋巴细胞粘附到 ICAM-1 和 Mad CAM-1 上的趋化因子 ,这一步骤是淋巴细胞外渗入 LN 和 PP 所必需的步骤。SLC 同时对成熟 DC(dendritic cell) B 淋巴细胞也有强的趋化能力^[1-6]。SLC 基因定位于 9p13 上 ,这与其他 CC 类趋化因子定位于 17q11.2 不同^[7,8]。

SLC 在肿瘤的生物治疗方面表现出十分诱人的前景。Dubinett 等^[9]发现在肿瘤内注射重组的 SLC 产生潜在的抗肿瘤效果 ,可消除 40% 的实验鼠的肺癌肿瘤。Vicari 等^[10]把鼠 SLC 基因转入鼠结肠癌 C26 细胞内 ,这种细胞在免疫竞争鼠和裸鼠体内肿瘤生成率降低 ,其原因可能是抑制血管生成。Arenberg 等^[11]在 SCID 鼠体内接种上 A549 人肺癌细胞 ,用 SLC 瘤内直接注射 ,发现肿瘤明显减小 ,血管减少 ,肿瘤转移减少。提出 SLC 抗肿瘤是由 CXCR3 介导的抗血管生成活性。而 Kirk 等^[12]认为由于 SLC 的抗肿瘤效果在 CD8⁺ T 细胞缺失的鼠里无效 ,所以不可能 SLC 的抗肿瘤效果是通过直接抑制血管生成 ,但有可能 SLC 间接影响肿瘤血管生成。Nomura 等^[12-15]的实验表明单独使用 SLC 仅产生微弱的抗肿瘤反应 ,但与 IL-2 和 GM-CSF 联合使用可诱发强大的抗肿瘤免疫反应。Qin 等^[16]人将 SLC , 3P 和人 IgG Fc 基因插入到 pcDNA3.1 形成一 DNA 疫苗。实验结果显示其可以产生强的抗肿瘤反应。

本研究采用重叠 PCR 的方法合成了全长的人 SLC DNA 片段 ,并构建了表达载体 ,经诱导表达及 Western blotting 鉴定 ,确定所表达蛋白即为目的蛋白。对纯化蛋白进行了体外活性的研究(另文发表)。通过本研究为 SLC 的应用奠定了一定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

E. coli 菌株 BL21、G1724 ,本实验室保存 ;质粒 pTMF , pALM(pAL-myc)本实验室保存或改造。

1.2 试剂

Ni-NTA : NAVOGEN (Germany) ; rhSLC : R&D

System(USA) ;鼠抗人 SLC 单克隆抗体 : R&D System(USA) ;其余常用试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 目的基因 DNA 片段的克隆

采用重叠 PCR 的方法获得全长的人 SLC 基因^[17]。十个用于重叠 PCR 的片段序列如下 :

SLCFR1 : 5'-AAAAAgAATATCgCATTTCTTCTgCATCTATgTTCgTTTTTTC-3'

SLCFR2 : 5'-gCATCTATgTTCgTTTTTCTATTgCTACAAACgCgTACgCTAgCgATggCggCgCg-3'

SLCFR3 : 5'-AgCgATggCggCgCgCaggATTgCTgCCTgAAATATAgCCAgCgTAAAATTCCg-3'

SLCFR4 : 5'-CAggCTCggTTCCTgTTTACggTAGCTgCgAACAACTTTCgCCggAATTTTACgCTggCT-3'

SLCFR5 : 5'-AAACAggAACCGAgCCTgggCTgCAGCATCCGggCgATCCTgTTTCTgCCgCgTAAACgT-3'

SLCFR6 : 5'-TgCACCCACAgTTCTTTCggATCggCgCACAgTTCCgCCTggCTACgTTTACgCggCgA-3'

SLCFR7 : 5'-CgAAAgAACTgTgggTgCAGCAGCTgATgCgCATCTggATAAAACCCgAgCCCgCag-3'

SLCFR8 : 5'-TTTTgCTCgCgCCACgATCTTTACggCagCCCTgCgCCggTTTCTgCgggCTCggggTTTT-3'

SLCFR9 : 5'-CgTggCgCgAgCAAAACCGgCAAAAAAggCAAAggCagCAAAggCTgCAAAACgTACCg-3'

SLCFR10 : 5'-CTACgggCCTTTTCggggTCTggCTACgTTCggTACgTTTgCagCCTT-3'

五条接头引物如下 :

SLCPR1 : 5'-ggCTCgAgATggCgCagTCTCTggC-3'

SLCPR2 : 5'-CAggCTCggTTCCTgTTTACg-3'

SLCPR3 : 5'-AAACAggAACCGAgCCTgg-3'

SLCPR4 : 5'-TTTTgCTCgCgCCACg-3'

SLCPR5 : 5'-CCgAATTCCTACgggCCTTTCgggg-3'

SOE-PCR 反应体系 :模板 ,两种 ,各 2 μ L ;引物 ,各 2 μ L ;dNTP ,2 μ L ;10 \times buffer ,2 μ L ;ddH₂O ,8 μ L ;pfu 聚合酶 ,1u。经 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min 后 ,94 $^{\circ}$ C 变性 35s ;55 $^{\circ}$ C 复性 35s ;72 $^{\circ}$ C 延伸 60s ;进行 25 个循环 ,电泳检测扩增产物 ,柱离心法回收特异条带 ,溶于 30 μ L TE 中 ,取 2 μ L 作为下一轮扩增的模板。

1.4 载体构建

按常规分子克隆方法 ,阳性克隆挑选后 ,按酶切、PCR 扩增鉴定 ,然后测序 ,数据采用 DNAMAN 软件比对分析。

1.5 诱导表达和分离纯化

质粒 pTMF-SLC 在 BL21 中的表达 :挑取经测序鉴定序列正确的克隆转接在 2mL 含卡那霉素

(30μg/mL)的LB培养基中37℃振荡培养过夜,次日按1:100转接快速摇至 $OD_{600} > 1$,再以1:100转接,放大培养。在37℃摇至 $OD_{600} \approx 0.6$ 时(约3h)加入IPTG至终浓度为0.4mmol/L,诱导3h后5000g离心5min收集菌体。

质粒pALM-SLC在GI724中的表达:将含有SLC的重组质粒pAL,首先转化大肠杆菌GI724,然后挑取单克隆菌于2mL RM培养基中30℃过夜培养,次日以1:50的比例接种于50mL RM培养基中30℃放大培养,然后以1:50的比例转接于2L RM培养基中,于30℃生长至 $OD_{600} = 0.5 \sim 0.7$,在以1:100的比例加入Tip于37℃诱导表达4h后,离心收集菌体。

在收获的菌体中加入适当量的超声缓冲液(如用于分离纯化则加入相应的缓冲液)破碎菌体。如菌体较少,用超声细胞破碎仪,如菌体量较大,则用高压细胞破碎仪(63kPa)。菌体破碎后高速离心($12\,000 \times 40\text{min}$)分离上清和沉淀备用。

亲和层析简单概述如下(1)取适量的Ni-NTA悬浮液(slurry)与样品混合,在4℃温和振荡3~5h使目的蛋白与树脂结合(2)将此混合液上样到亲和层析柱中,打开柱下端开关,使液体缓慢流出(3)用ddH₂O洗,并连接到紫外检测仪上(4)用binding

buffer洗30CV,收集峰样品(5)用washing buffer洗30CV,收集峰样品(6)用elution buffer洗20~30CV,收集峰样品(7)柱再生(8)样品进行电泳分析。

1.6 SDS-PAGE 和 Western Blotting

样品处理及电泳按常规进行,但改用预染蛋白质分子量标准。一抗:鼠抗人SLC单克隆抗体;二抗:兔抗鼠IgG-HRP;显色剂:DAB。

2 实验结果

2.1 人次级淋巴组织趋化因子(SLC)的克隆
本研究中依据去除了信号肽的氨基酸序列为蓝本按照大肠杆菌偏爱的密码子设计了10条片段,通过重叠PCR方法人工合成了适合大肠杆菌表达的SLC序列(图1)。为保证合成的真实性将整个序列拆分为10个长度小于60nt的片段,并在接头处设计PCR引物用于提高两两复性的片段的扩增效率,其中SLCFR1-2为大肠杆菌内毒素信号肽序列,SLCFR3-10为SLC的成熟蛋白编码区序列,为在不同载体中表达SLC还设计了含不同酶切位点的引物以方便利用。SLC基因拼接过程示意图见图2。

1ATGAAAAAGAATATCGCATTTCTTCTGTCATCTATGTTCTTTTCTATTTGCTACAAACGGGTACCGT
AGCGATGCGCGCGCAGGATGTGCTGCTGAAATATAGCCAGCGTAAATTCGCGCGAAAGTTGTTCC
GCAGCTACCGTAAACAGGAACCGAGCCTGGGCTGCAGCATCCCGGCGATCCTGTTTCTGCCGCGTAA
ACGTAGCCAGGCGGAAGTGTGCGCCGATCCGAAAGAACTGTGGGTGCAGCAGCTGATGCAGCATCT
GGATAAAACCCGAGCCCGCAGAAACCGCGCAGGGCTGCCGTAAGATCGTGGCGCGAGCAAAA
CCGCGCAAAAAAGCAAAGGCAGCAAAGGCTGCAAACGTACCGAAGCTAGCCAGACCCCGAAAGGC
CCGTAG 405

图1 SLC基因碱基序列

Fig.1 Gene sequence of SLC

第一轮拼接为10个片段两两复性,延伸,因为片段间重叠的部分退火温度均设计为55℃(重叠15~22nt)经5次94℃变性1min,55℃退火-延伸1min的两步循环后可生成大小为80bp左右的片段,电泳检测,柱离心回收各片段,最后溶于30μL TE中,各取回收产物2μL作为模板,加入两侧短序列引物,经5次94℃变性1min,55℃退火-延伸1min的两步循环后进入常规程序扩增20个循环,电泳回收如前。依次操作直至合成出全长的Sig-SLC序列。各拼接序列的电泳结果见图3,SLC基因拼接出来后将此基因亚克隆进载体中进行测序鉴定。

2.2 SLC在pTMF和pALM中的构件及表达
pTMF载体是由pET28a改造而来的T7启动子

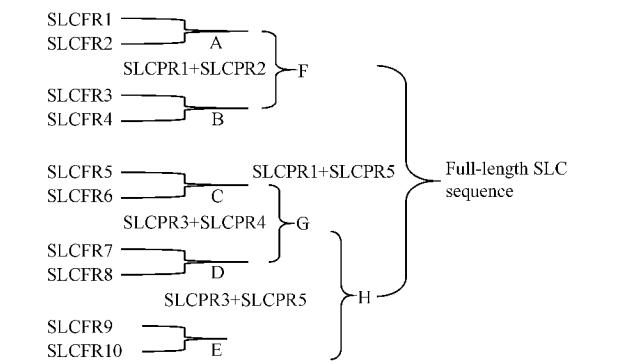


图2 SLC基因的拼接示意图

Fig.2 Diagram of sequence assembly of SLC gene

表达载体pALM是由pAL781改造来的,含PL启动子。
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

由 *Nco* I 酶切后即可产生带有起始密码子 ATG 的序列,因此要将 SLC 的 5' 序列改造以适合此特征。利用引物将 SLC 序列改造后对它们进行操作。首先将纯化的 SLC 扩增产物和质粒载体 pTMF 经 *Nco* I 酶切后用 pfuDNA 聚合酶补平, pfu DNA 聚合酶在 70℃ 反应 10min 后,柱纯化回收以除去蛋白,回收产物经鉴定后进行第二次酶切,回收,连接,称为 pTMF-SLC,转化 Top10(测序),经 PCR 鉴定,挑选阳性克隆保存并测序。

阳性克隆测序分析后再以此质粒转化 BL21。依程序诱导表达,表达产物的电泳结果见图 4,由图可见,在此条件下可以诱导产生分子量为 17kD 的目的蛋白,产物以包涵体为主,在菌体沉淀中可占到总蛋白的 40%。

在诱导条件的确定中,用 0.4mmol/L、0.8 mmol/L、1.0mmol/L 终浓度的 IPTG 分别诱导,发现 0.8mmol/L 终浓度的 IPTG 诱导效果要好于其他浓度。

在确定诱导时间的实验中,分别在加入诱导剂 2、3、4、5h 后收菌,电泳结果表明诱导 3~4h 目的蛋白表达较好。

将 SLC 序列克隆至 pALM 载体中,称为 pALM-SLC,经 PCR 鉴定,阳性克隆经测序分析,正确的克隆转化 GI724,依常规程序在 30℃ 诱导表达,电泳结果显示表达产物以可溶蛋白为主,分子量在 20kD 左右。

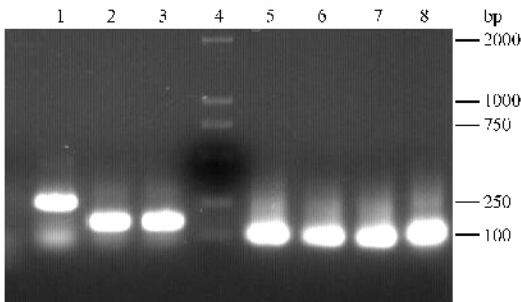


图 3 SLC 基因拼接过程的部分中间片段

Fig.3 Middle fragment during splicing

1 :H fragment 2 :F fragment 3 :G fragment 4 :marker 5 :D fragment 6 :C fragment 7 :B fragment 8 :A fragment.

2.3 亲和层析及 Western blotting 鉴定

亲和层析条件好掌握,纯化效率也最高。从电泳结果看,纯化产物纯度很高,达到 90% 以上,见图 5。另外,从结果来看,用 500mmol/L 的咪唑已完全把目的蛋白洗脱下来,所以不用 1mol/L 的咪唑。图 6 是对纯化的 SLC 的 Western blotting 检测情况,在 17

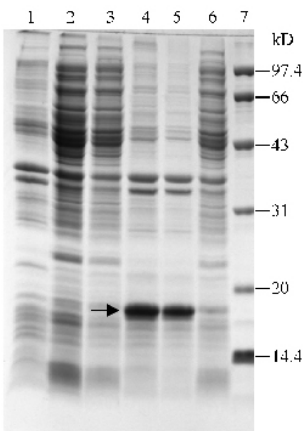


图 4 SLC 基因在 pTMF-SLC 质粒中的表达的电泳结果

Fig.4 Result of SLC expression in pTMF-SLC

1 2 :sonic precipitate and supernatant of pTMF-SLC not induced 3 4 5 , 6 :sonic supernatant ,precipitate ,precipitate ,supernatant of pTMF-SLC 7 : marker. → SLC.

~20kD 的位置,有一条特异的条带。这些结果说明,表达载体的构建,目的蛋白的诱导表达是正确的。

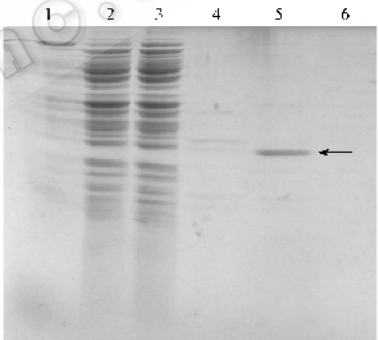


图 5 亲和层析结果

Fig.5 Electrophoresis of affinity chromatography

1 :binding buffer peak 2 :injecting sample peak 3 :supernatant fluid of SLC 4 :washing buffer peak 5 :elution buffer I (500mmol/L imidazole) peak 6 :elution buffer II (1mol/L imidazole) peak. ← SLC purified from sonic supernatant.

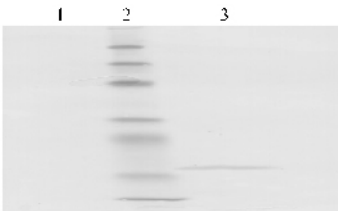


图 6 Western blotting 结果

Fig.6 Result of Western blotting

1 :control 2 :prestained marker, up to down :33kD ,25kD ,17kD ,7kD ; 3 :purified SLC.

3 讨论

3.1 SLC 基因的人工合成及表达载体的构建

单重叠延伸 PCR (Single Overlap Extension-PCR ,
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

SOE-PCR)方法主要用于定点突变(Sit-Directed Mutagenesis)^[17]。利用PCR方法在特定的位点引入突变,它也是一种有效的基因融合方法。抗体工程中多用于抗体的人源化改造。本研究中依据去除了信号肽的氨基酸序列为蓝本按照大肠杆菌偏爱的密码子设计了10条片段,通过重叠PCR方法人工合成了适合大肠杆菌表达的SLC基因。从结果来看,通过四轮的扩增,即可拼接出目的基因片段。把拼接出的基因片段亚克隆进载体中的测序结果表明拼接结果完全正确。与传统的通过反转录方法再用特定引物的PCR方法克隆已知序列基因的方法相比较,在DNA序列较短时具有时间短、可操作性强、准确率高的优点。

3.2 表达载体与序列特异性对表达量的影响

在实验过程中发现SLC在pTMF中前后两次的表达量明显不一样,其序列差异为第一次构建载体的基因序列在组氨酸Tag前有一终止密码子(400bp位置),目的蛋白不能表达组氨酸Tag。通过新合成引物使终止密码子突变为正常氨基酸,重新构建载体。再表达过程中筛选了四十多个克隆,未筛选到高表达克隆。pALM为本实验室改造的具有较高免疫毒素表达量的PL启动子载体^[18]。研究结果表明SLC在该载体中的表达量也不高。PL启动子为温度敏感型,受控于温度敏感的阻遏物(cI857),后者可在低温下但不能在高温下阻抑PL启动子的转录^[19]。本研究表达采用低温培养,高温诱导,但高温诱导容易产生包涵体。

已有实验表明当细菌适应了高盐环境后,所表达的外源蛋白可溶性会得到改善^[20]。此时,大肠杆菌对K⁺的摄取急剧增加,谷氨酸也迅速合成;然后大肠杆菌自身合成或是从培养基中吸收一些相容性溶质(compatible solute)和抗渗透压物质,如甜菜碱、脯氨酸、海藻糖(trehalose)等^[21];与此同时,一些与渗透胁迫相关的基因也相继表达,这些复合因素使细菌能够尽快适应环境的变化。任永明等的研究结果表明,在胁迫条件下,可溶性免疫毒素占总表达免疫毒素的量可达80%^[18]。但本研究在pTMF与pALM中的实验表明在胁迫条件下,SLC的表达情况没有明显的变化。因此推测,表达载体对序列特异性有较高的要求。

另外,本研究推测,分子量可能对表达量有影响。从图7可看出,把SLC与CD3的重链连在一起后表达,表达量明显增高了。从本实验室其他人的工作来看,明显可看出大分子量的分子表达量明显

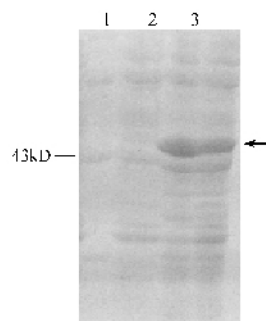


图7 SLC与CD3重链融合表达的电泳结果

Fig.7 Result of fusion expression of SLC and CD3 heavy chain
1: marker 2: sonic precipitate of pALM-SLC-CD3 3: sonic supernatant of pALM-SLC-CD3 *— SLC-CD3 heavy chain fusion protein.

较高。这一结论是否正确,还有待进一步验证。因此,在今后的工作中,有必要找到一种适合SLC表达的合适载体。

3.3 Cys残基对分子量的影响

根据计算机模拟,SLC有一个额外的其他趋化因子所没有的Cys环^[1,2]。从已发表的文章来看,分子量在SDS-PAGE电泳上的结果都比根据基因序列推测出来的要大,Nagira等克隆的人SLC分子量为15kD^[1,4],而王东林等人^[22,23]的电泳结果为18kD。本研究的结果与后者接近。但从本研究的表达结果经Western blotting验证,存在单体、二聚体(也可能为与其它蛋白结合在一起的形式)两种形式。根据以前的研究认为可能是由于SLC中所含Cys残基较多,有6个,容易形成聚合体,由于有6个Cys残基及碳端尾巴,使得其单体在空间构象上也较复杂,其表观分子量比预期的大^[21]。同时由于所含Cys残基较多,在纯化后,目的蛋白浓度增大,增加了SLC聚合的几率,有可能在电泳时用巯基乙醇或高温变性时都不能使聚合体完全打开,从而使得表观分子量增大。当然,也有可能是SLC与其它蛋白牢固结合在一起。有报道SLC的碳端尾巴可与GAG糖蛋白相连接^[24-26],可使其固定在内皮细胞膜上,形成固相的浓度梯度,指导淋巴细胞的定向迁移。因此在本研究所表达的蛋白中,SLC也易与其它菌体糖蛋白结合。在pALM中表达的SLC虽然与糖蛋白结合的可能性不很大,但也可能与其它蛋白形成复合物,当然也可能是Cys残基和其碳端序列共同起作用的结果,使得SLC容易形成二聚体或与其他蛋白形成复合物。在纯化SLC时发现其特别容易聚合,在用HPLC做离子交换和包含体复性时,发现流速大于0.3mL/min时,蛋白便聚合在一起,形成不溶的小颗粒(溶液变浑浊)。这也可能对解释SLC容易聚合

或其它蛋白结合在一起提供了一定的佐证。

致 谢 本研究是在中科院遗传与发育所 102A 组实验室内完成的,在此对 102A 组全体成员的鼎力帮助指导表示衷心的感谢,对论文提出修改指导的王子仁教授表示衷心的感谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] 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 Biol Chem*, 1997, **272**:19518 – 19524.
- [2] Hedrick JA, Zlotnik A. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J Immunol*, 1997, **159**:1589 – 1593.
- [3] Hromas R, Kim CH, Klemsz M, *et al.* Isolation and characterization of Exodus-2, a novel C-C chemokine with a unique 37 amino acid carboxyl-terminal extension. *J Immunol*, 1997, **159**: 2554 – 2558.
- [4] Tanabe S, Lu Z, Luo Y, *et al.* Identification of a new mouse beta-chemokine, thymus-derived chemotactic agent 4, with activity on T lymphocytes and mesangial cells. *J Immunol*, 1997, **159**:5671 – 5679.
- [5] Gunn MD, Tangemann K, Tam C, *et al.* A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**:258 – 263.
- [6] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*, 2000, **28**:217 – 242.
- [7] Nakano H, Gunn MD. Gene duplications at the chemokine locus on mouse chromosome 4: multiple strain-specific haplotypes and the deletion of secondary lymphoid-organ chemokine and EBI-1 ligand chemokine genes in the plt mutation. *J Immunol*, 2001, **166**(1): 361 – 369.
- [8] Vassileva G, Soto H, Zlotnik A, *et al.* The reduced expression of 6ckine in the plt mouse results from the deletion of one of two 6ckine genes. *J Exp Med*, 1999, **190**(8):1183 – 1188.
- [9] 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.
- [10] Vicari AP, Ait-Yahia S, Chemin K, *et al.* Antitumor effects of the mouse chemokine 6Ckine/SLC through angiostatic and immunological mechanisms. *J Immunol*, 2000, **165**(4):1992 – 2000.
- [11] Arenberg DA, Zlotnick A, Strom SR, *et al.* The murine CC chemokine, 6C-kine, inhibits tumor growth and angiogenesis in a human lung cancer SCID mouse model. *Cancer Immunol Immunother*, 2001, **49**(11):587 – 592.
- [12] Kirk CJ, Hartigan-O'Connor D, Nickoloff BJ, *et al.* T cell-dependent antitumor immunity mediated by secondary lymphoid tissue chemokine: augmentation of dendritic cell-based immunotherapy. *Cancer Res*, 2001, **61**(5):2062 – 2070.
- [13] Nomura T, Hasegawa H, Kohno M, *et al.* Enhancement of anti-tumor immunity by tumor cells transfected with the secondary lymphoid tissue chemokine EBI-1-ligand chemokine and stromal cell-derived factor-1alpha chemokine genes. *Int J Cancer*, 2001, **91**(5):597 – 606.
- [14] He YF, Zhang GM, Wang XH, *et al.* Blocking programmed death-1 ligand-PD-1 interactions by local gene therapy results in enhancement of antitumor effect of secondary lymphoid tissue chemokine. *J Immunol*, 2004, **173**(8):4919 – 4928.
- [15] Sharma S, Yang SC, Hillinger S, *et al.* SLC/CCL21-mediated anti-tumor responses require IFNgamma, MIG/CXCL9 and IP-10/CXCL10. *Mol Cancer*, 2003, **2**:22.
- [16] Qin H, Zhou C, Wang D, *et al.* Enhancement of antitumor immunity by a novel chemotactic antigen DNA vaccine encoding chemokines and multi-epitopes of prostate-tumour-associated antigens. *Immunology*, 2006, **117**(3):419 – 430.
- [17] Dieffenbach CW, Dveksler GS. PCR Primer: A Laboratory Manual (PCR 技术实验指南). Beijing: Science Press, 1999: pp.429 – 430.
- [18] Ren YM(任永明), Zhang MS(张明生), He D(何丹), *et al.* Compatible-solute-supported periplasmic expression of recombinant immunotoxins and the effects of glucose thereby. *Hereditas(遗传)*, 2003, **25**(1):40 – 44.
- [19] Shimatake H, Rosenberg M. Purified regulatory protein cII positively activates promoters for lysogenic development. *Nature*, 1981, **292**:128 – 132.
- [20] Barth S, Huhn M, Matthey B, *et al.* Compatible-solute-supported periplasmic expression of functional recombinant protein under stress condition. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**:1572 – 1579.
- [21] Roberts MF. Osmoadaption and osmoregulation in Archaea. *Frontiers in Biosciences*, 1998, **9**:d796 – 812.
- [22] Wang DN(王东宁), Li MF(李明峰), Zeng EI(曾而良), *et al.* Cloning of secondary lymphoid-tissue chemokine(SLC) and its expression in prokaryotic system. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2001, **17**(4):392 – 395.
- [23] Dong Z(董忠军), Zhao YR(赵跃然), You L(游力), *et al.* Cloning and prokaryotic expression of human secondary lymphoid tissue chemokine. *Acad J Sec Mil Med Univ(第二军医大学学报)*, 2002, **23**(10):1099 – 1102.
- [24] Hirose J, Kawashima H, Yoshie O, *et al.* Versican interacts with chemokines and modulates cellular responses. *J Biol Chem*, 2001, **276**(7):5228 – 5234.
- [25] Uchimura K, Morimoto-Tomita M, Bistrup A, *et al.* HSulf-2, an extracellular endoglucosamine-6-sulfatase, selectively mobilizes heparin-bound growth factors and chemokines: effects on VEGF, FGF-1, and SDF-1. *BMC Biochem*, 2006, **7**:2.
- [26] Patel DD, Koopmann W, Imai T, *et al.* Chemokines have diverse abilities to form solid phase gradients. *Clinical Immunology*, 2001, **99**(1):43 – 52.