

CXCL16/SR-PSOX 基因克隆与原核表达

李丹 陈兴明 许丽艳 易勇 刘春雷 肖敏 敬华

作者单位: 100101 北京市, 解放军第 306 医院检验科

【摘要】 目的 构建 GST-CXCL16/SR-PSOX 融合蛋白原核表达载体并进行原核表达及鉴定。方法 从人外周血单个核细胞中提取总 mRNA, 反转录得到 cDNA 后 PCR 扩增获得 CXCL16/SR-PSOX 基因全长, 构建融合表达载体 pGST-CXCL16/SR-PSOX, 通过酶切、测序及诱导表达后的免疫印迹实验验证重组载体构建的正确性及融合蛋白表达的正确性。结果 PCR 扩增获得预期长度的 DNA 片段 (822 bp), 克隆至 pGEX-6p-1 载体后测序与 GeneBank 相符。诱导表达获得的蛋白相对分子质量与预期一致, 免疫印迹实验证实为 GST 融合蛋白。结论 GST-CXCL16/SR-PSOX 融合蛋白表达载体构建成功, 原核表达顺利。

【关键词】 GST; 融合蛋白; CXCL16/SR-PSOX; 原核表达

The cloning of human CXCL16/SR-PSOX fusion protein and its prokaryotic expression

LI Dan, CHEN Xing-ming, XU Li-yan, et al. Department of Clinical Laboratory, the 306th Hospital, Beijing 100101, China

【Abstract】 Objective To construct a prokaryotic expression vector of GST-CXCL16/SR-PSOX and the fusion protein was expressed and identified. **Methods** The total mRNA was extracted from peripheral blood mononuclear cell, and reverse transcription polymerase chain reaction was performed to amplify the full length of CXCL16/SR-PSOX gene. The pGST-CXCL16/SR-PSOX was constructed by ligating the CXCL16/SR-PSOX gene and pGEX-6p-1. The correctness of recombinant plasmid was verified by enzyme incision and sequencing, and the correctness of expression was verified by electrophoresis and western blot. **Results** A specific DNA fragment (822 bp) was amplified by PCR, and then cloned into pGEX-6p-1. The homology of sequence was confirmed by compared to GeneBank. The molecular mass of induction expression protein was coincidence with anticipation. The expression of GST-CXCL16/SR-PSOX fusion protein was confirmed by western blot using anti-GST antibody. **Conclusion** The prokaryotic expression vector pGST-CXCL16/SR-PSOX is constructed successfully, and the target fusion protein can be expressed well.

【Key words】 GST; Fusion protein; CXCL16/SR-PSOX; Prokaryotic expression

CXCL16/SR-PSOX 既是氧化型低密度脂蛋白的受体, 又是招募炎症细胞的趋化因子, 此蛋白通过何种途径参与平滑肌细胞或单核/巨噬细胞向泡沫细胞的表型转换, 进而促进动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 的发生发展, 迄今为止尚未阐明^[1]。CXCL16/SR-PSOX 的相互作用蛋白的筛选及其功能研究将有助于进一步揭示 AS 形成的分子机制, 在此之前, 克隆该基因并进行原核表达将为探索 CXCL16/SR-PSOX 参与 AS 的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMCs) 本文所需 PBMCs 分离自健康献血员的新鲜肝素抗凝血。

1.2 质粒与工程菌株 大肠杆菌 BL21, JM109 和

pGEX-6p-1 表达载体由中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所惠赠。

1.3 主要试剂 GST 融合蛋白纯化试剂盒购自 GE 公司; 限制性内切酶和 M-MLV 反转录酶购自美国 NEB 生物公司; DNA 标志物 DL2000 购自日本 TaKaRa 公司; RNA 提取试剂 TRIzol 为美国 Invitrogen 公司产品; T4-DNA 连接酶购自美国 Promega 公司; pfu PCR MIX 购自北京天根生物技术公司; 质粒提取试剂盒和 DNA 片段回收试剂盒购自北京博大泰克公司; 引物合成及 DNA 测序由北京奥科生物有限公司完成; 兔抗 GST 抗体, 鼠抗兔 IgG 抗体购自百奥泰斯(北京)生物科技公司。

1.4 引物设计 采用软件 primer premier 5.0, 根据 GeneBank 收录的 CXCL16/SR-PSOX 基因序列进行

设计,上游引物:5'-CGCGGATCCATGTCTGGGAGTCAGAGCGAGG-3',下游引物:5'-CCCCTC-GAGTCAGGTATTAGAGTCAGGTGCC-3'(下划线分别示 BamH1、Xho1 酶切位点)。

1.5 总 mRNA 的提取 采用 Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法从 10 ml 肝素抗凝血中分离 PBMCs,收集细胞,用 1×PBS 洗两次。取 5×10⁶ PBMCs,再用 1×PBS 洗一次,加入 1 ml TRIzol,摇匀至细胞完全裂解,按操作说明提取总 mRNA。

1.6 扩增 CXCL16/SR-PSOX 基因 取 2 μg 总 mRNA,加入 Oligo dT、M-MLV 反转录酶、dNTP、RNasin 及反应缓冲液,42 ℃ 孵育 1 h,产物为 cDNA,作为模板直接用于后续的 PCR 反应。反应体系:cDNA 2 μl,上下游引物(10 pmol/μL)各 1 μl,pfu Mix 10 μl,ddH₂O 6 μl。反应条件:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,57 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,重复 30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后,用 DNA 回收纯化试剂盒回收。

1.7 pGEX-CXCL16/SR-PSOX 载体构建及鉴定 将回收产物和 pGEX-6p-1 分别经 BamH1、Xho1 双酶切,回收后在 T4-DNA 连接酶的作用下定向连接,连接产物转化 JM109 感受态,在含有氨苄青霉素的 LB 培养板上筛选菌落,摇菌小量培养后进行双酶切鉴定,酶切阳性的菌落提取质粒测序。

1.8 GST-CXCL16/SR-PSOX 融合蛋白的诱导表达 将测序正确的 pGEX-CXCL16/SR-PSOX 转化 BL21 感受态,涂布于含有氨苄青霉素的 LB 培养板,次日挑取生长良好的菌落接种于 100 ml 含有氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃ 200 r/min 扩增培养至 OD=0.4~0.5,加入 1 mmol/L IPTG 在 30 ℃ 诱导表达,收集未诱导菌液、诱导后 3 h 和 5 h 的菌液,反复冻融并超声裂解细菌,将上清液和沉渣进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

1.9 免疫印迹实验验证融合蛋白的表达 将菌体蛋白采用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后湿法转印至硝酸纤维素膜(40 V,3 h),1% 牛奶封闭过夜,以免抗 GST 抗体作为一抗结合 1 h,辣根过氧化物酶标记的鼠抗兔 IgG 为二抗结合 1 h,洗膜后用化学发光底物 ECL 检测。

2 结果

2.1 CXCL16/SR-PSOX 基因的扩增 将总 mRNA 反转录后,经 PCR 扩增获得预计大小的 DNA 片段(822 bp),见图 1。

2.2 pGEX-CXCL16/SR-PSOX 载体构建及鉴定

在氨苄青霉素抗性平板上挑取生长良好菌落,分别标记为 1~4 号,摇菌培养后提取质粒,进行 BamH1/Xho1 双酶切鉴定,其中 1 号、3 号、4 号均为阳性克隆,见图 2。取 1 号克隆的质粒进行测序,所得序列与 GeneBank 完全一致。

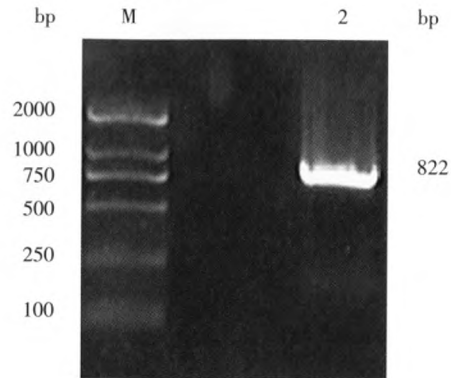


图 1 CXCL16/SR-PSOX 基因的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

注:1 泳道为 DL2000;2 泳道为 PCR 产物

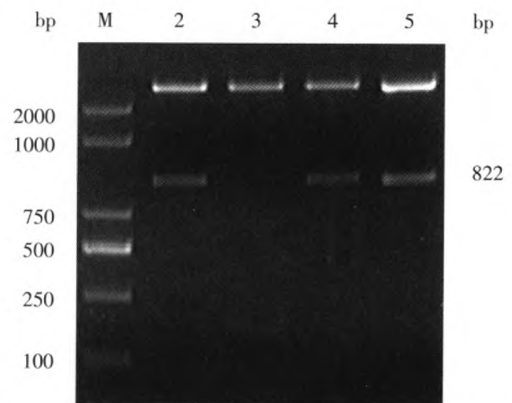


图 2 pGEX-CXCL16/SR-PSOX 载体酶切鉴定电泳图

注:1 泳道为 DL2000;2~5 泳道分别为 1~4 号菌落中提取的质粒

2.3 GST-CXCL16/SR-PSOX 融合蛋白的诱导表达 含有重组表达载体的 BL21,经 IPTG 诱导后,在相对分子质量约 65×10³ 附近有明显的表达条带,与预期相符,见图 3。

2.4 免疫印迹实验验证融合蛋白的表达 经免疫印迹实验证实相对分子质量 65×10³ 附近的蛋白为 GST 融合蛋白,见图 4。其中重组融合蛋白泳道中相对分子质量为 28×10³ 左右的蛋白条带为 GST,考虑为小量的渗漏表达引起,有待于通过进一步优化诱导表达的实验条件消除。

3 讨论

炎症反应介导的血管内皮损伤在 AS 的发生发展中发挥重要作用,局部的慢性炎症反应可能通过多种途径促进平滑肌细胞或单核/巨噬细胞向泡沫细胞发生表型转换,甚至诱发粥样斑块破裂引起急

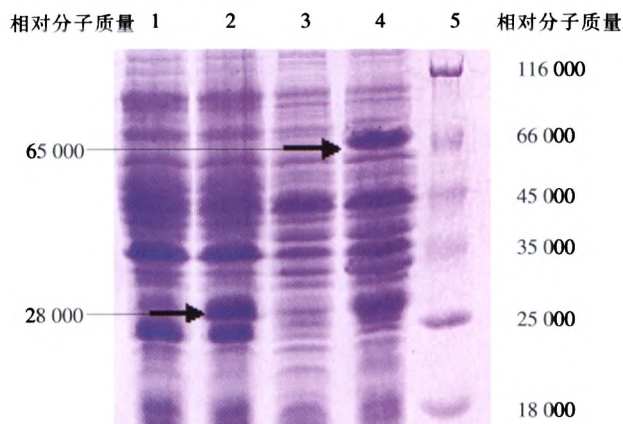


图 3 GST-CXCL16/SR-PSOX 融合蛋白的诱导表达

注:1 为空载体未诱导;2 为空载体诱导(箭头示 GST);3 为重组载体未诱导;4 为重组载体诱导(箭头示融合蛋白);5 为蛋白 Marker

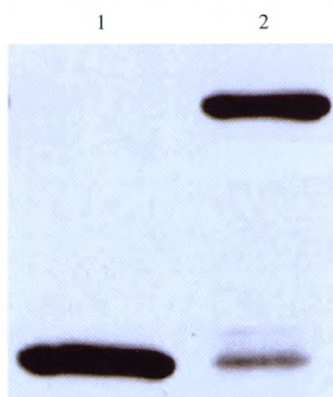


图 4 免疫印迹实验检测重组融合蛋白

注:1 为 GST;2 为 GST-CXCL16/SR-PSOX

性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)。SR-PSOX 是 2000 年首先在巨噬细胞膜上发现的一种新型的清道夫受体, 同年发现了一种可与 T 淋巴细胞表面的 CXCR6 受体结合的趋化因子, 命名为 CXCL16, 其功能主要是招募表达 CXCR6 的 T 淋巴细胞。氨基酸序列分析发现二者为同一分子, 故称为 CXCL16/SR-PSOX^[2,3]。研究^[4-6]发现 CXCL16/SR-PSOX 在 AS 动物模型和冠状动脉粥样硬化患者的单核/巨噬细胞、树突状细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞的转录和表达明显高于对照组。同时, AS 患者的粥样斑块附近 CXCL16/SR-PSOX 的表达明显高于非粥样斑块区。除此以外, 近年研究^[7]还发现血浆游离 CXCL16/SR-PSOX 水平是 AS 发作的独立危险因素。多项研究结果均支持其与 AS 的发生发展关系密切。但国内外大多数研究尚停留在分析临床数据的水平, 仅有个别研究对 CXCL16/SR-PSOX 参

与 AS 形成的分子机制进行了初步探讨且结论不一。以 CXCL16/SR-PSOX 与体内关键蛋白之间的相互作用作为切入点, 深入探讨 CXCL16/SR-PSOX 参与 AS 形成的分子机制显得尤为重要。

GST 融合蛋白沉降技术是利用 GST 对谷胱甘肽偶联球珠的亲性和, 从细胞裂解液中纯化相互作用蛋白的有效手段。本文研究成功克隆了目的基因 CXCL16/SR-PSOX, 首次将此基因装入 GST 融合表达载体 pGEX-6p-1 中, 并诱导表达了融合蛋白 GST-CXCL16/SR-PSOX。将 CXCL16/SR-PSOX 与 GST 进行融合表达, 目的就是为将来筛选能与 CXCL16/SR-PSOX 发生相互作用的细胞蛋白奠定基础, 使从分子水平上揭示 CXCL16/SR-PSOX 如何参与 AS 的发生发展成为可能。此外, 本文研究在基因克隆的过程中使用了 pfu PCR MIX, 与传统的 Taq 酶相比, 在大大增加扩增效率的同时保证了 PCR 反应的保真性, 最终的测序结果也支持了我们的预期。

4 参考文献

- 1 Bui QT, Prempeh M, Wilensky RL. Atherosclerotic plaque development. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 2109-2113.
- 2 Shimaoka T, Kume N, Minami M, et al. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem*, 2000, 275: 40663-40666.
- 3 Matloubian M, David A, Engel S, et al. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol*, 2000, 1: 298-304.
- 4 Hofnagel O, Luechtenborg B, Plenz G, et al. Expression of the novel scavenger receptor SR-PSOX in cultured aortic smooth muscle cells and umbilical endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22: 710-711.
- 5 Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, et al. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4⁺ T cells. *J Leukoc Biol*, 2005, 77: 777-786.
- 6 Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, et al. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325: 1187-1193.
- 7 Jansson AM, Aukrust P, Ueland T, et al. Soluble CXCL16 predicts long-term mortality in acute coronary syndromes. *Circulation*, 2009, 119: 3181-3188.

(收稿日期: 2011-04-06)

(本文编辑: 陈淑莲)