

· 基础论著 ·

CCL3L1 融合蛋白的表达纯化及其多克隆抗体的制备

张薇 周育森 吴昊 陈新月 陈德喜

【摘要】 目的 表达和纯化 CCL3L1 融合蛋白,并对其免疫原性进行分析。**方法** 应用分子生物学技术将 pGEX-4T-1-CCL3L1 质粒进行酶切,收集 CCL3L1 片段与 pET-32a(+)表达载体连接,构建 pET-32a(+)-CCL3L1 重组质粒,将其转化 BL-21 大肠埃希菌进行蛋白表达并纯化。应用酶切鉴定、SDS-PAGE 及 Western blot 等方法确保基因片段的正确性及表达蛋白的特异性。以间接 ELISA 法测定 BALB/c 小鼠多克隆抗体滴度。**结果** 成功获得了高纯度的 CCL3L1 融合蛋白,且该蛋白为可溶性表达,以其制备的多克隆抗体滴度最高可达 1:51 200。**结论** 获得高纯度可溶性表达的 CCL3L1 融合蛋白及其高效价的多克隆抗体。

【关键词】 CCL3L1;趋化因子;HIV 易感性;原核表达

Expression and purification and activity assay of CCL3L1 fusion protein ZHANG Wei*, ZHOU Yu-sen, WU Hao, CHEN Xin-yue, CHEN De-xi. *Beijing Youan Hospital, Beijing 100069, China

Corresponding author: CHEN De-xi, Email: dxi09@yahoo.com

【Abstract】 Objective To express and purify CCL3L fusion protein and test its immunoactivity. **Methods** Recombinant plasmid pET-32a(+)-CCL3L1 was constructed by inserting CCL3L1 gene fragment which was digested with *Bam*H I and *Xho*I from pGEX-4T-1-CCL3L1 plasmid, into the expressive vector pET-32a(+). The recombinant prokaryotic expression plasmid, namely pET-32a(+)-CCL3L1, was transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3). Subsequently, fusion protein was expressed efficiently in prokaryotic system through IPTG induction and purified by Ni²⁺-NAT. The pET-32a(+)-CCL3L1 fusion protein could specifically react with His antibody and anti-CCL3L1 polyclonal antibody by Western blot technique. The product was also analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and a protein about 27 kD was observed. Using the purified fusion protein, we immunized female BALB/c mice by subcutaneous injection three times. Serum samples were tested by an enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) to determine the level of antibodies. The result

基金项目:北京市科委艾滋病重大项目基金(D0906003040591)

作者单位:100069 北京,首都医科大学附属北京佑安医院(张薇、吴昊、陈新月、陈德喜);军事医学科学院五所十室(周育森)

通讯作者:陈德喜 Email: dxi09@yahoo.com

showed that fusion protein could stimulate animals to produce special and sensitive antibody. **Results** pET-32a(+) -CCL3L1 fusion protein mainly exist solubly and its purity was above 80%. The titer of the antibodies was 1:51 200. **Conclusions** pET-32a(+) -CCL3L1 fusion protein with high purity was obtained and its corresponding polyclonal antibodies with high titer were produced.

【Key words】 CCL3L1; Chemokine; HIV susceptibility; Prokaryotic expression

巨噬细胞炎症蛋白 1 α (MIP-1 α) 是趋化因子 C-C 家族的一个重要成员。CCL3L1 为 MIP-1 α 的同源蛋白, 与 HIV-1 病毒感染宿主细胞的辅助受体 CCR5 具有高亲和力, 是阻止 HIV-1 病毒进入细胞的最有效的趋化因子天然抑制剂^[1]。

本研究将 CCL3L1 基因片段与原核表达载体 pET-32a(+) 进行重组, 在大肠埃希菌 BL21 (DE3) 中高效表达 pET-32a(+) -CCL3L1 融合蛋白(相对分子质量约 27 000), 以此免疫 BABL/c 小鼠制备多克隆抗体并测定其免疫原性, 为后续 CCL3L1 趋化因子单克隆抗体的研制、HIV 疫苗保护效力的检测、试剂盒的研发等研究领域奠定基础。

材料与方法

一、材料

pGEX-4T-1-CCL3L1 质粒由北京佑安医院陈德喜教授保存, 含有 pET-32a(+) 质粒的 XL-1 甘油菌、*E. coli* BL21 (DE3) 甘油菌等由军事医学科学院五所十室保存。各种限制性核酸内切酶、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶为日本 Takara 公司产品。DNA 凝胶回收与纯化试剂盒(玻璃奶型)为威格拉斯生物技术有限公司产品。质粒抽提试剂盒为上海申能博彩生物科技有限公司产品。山羊抗 LD78beta/CCL3L1 多克隆抗体为 Novus Biologicals 公司产品。

二、方法

(一) pET-32a(+) -CCL3L1 重组质粒的制备

1. pET-32a(+) 质粒酶切回收: 将含有 pET-32a(+) 表达载体的 XL-1 甘油菌进行增菌培养后, 采用质粒抽提试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司)提取 pET-32a(+) 质粒, 以 *Bam* H I、*Sal* I 双酶切后进行 DNA 凝胶回收线性 pET-32a(+) 表达载体备用。

2. pGEX-4T-1-CCL3L1 质粒酶切回收: 用 *Bam* H I、*Xho* I 双酶切后进行 DNA 凝胶回收 CCL3L1 cDNA 片段(同上)备用。

3. pET-32a(+) -CCL3L1 重组质粒的构建: 10 μ l 连接体系如下: T4 DNA 连接缓冲液 1 μ l、T4 DNA 连接酶 0.5 μ l、pET-32a(+) 酶切回收产物 1 μ l、pGEX-4T-1-CCL3L1 质粒酶切回收产物 7.5 μ l, 将上述各成分混匀后放入 16 $^{\circ}$ C 保温瓶中连接约 6 h 左右。

4. 重组质粒转化大肠杆菌 XL-1 和质粒提取: 将 pET-32a(+) -CCL3L1 连接

产物转化大肠埃希菌 XL-1, 并采用质粒抽提试剂盒进行质粒提取, 并进行酶切鉴定。

(二) 融合蛋白的表达与纯化

1. IPTG 诱导小量表达: 将重组质粒 pET-32a(+) -CCL3L1 转化大肠埃希菌 BL21(DE3) 感受态细胞。挑单克隆重组菌接种到含氨苄西林 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、氯霉素 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 3 ml LB 培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中以 250 r/min 振荡培养 12 h 左右, 取 60 μl 上述菌液转接到 3 ml 新鲜 LB 培养基中, 以 IPTG 进行诱导(终浓度为 1 mmol/L), 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中以 250 r/min 振荡培养 3 h, 收集全菌体裂解产物行 12% SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定。

2. IPTG 优化诱导表达: 将菌液按 1:50 的比例转接入新鲜 LB 培养基中, 共转接 7 管, 分别编号为 0、1、2、3、4、3'、4', 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床中以 250 r/min 振荡培养 3 h 后取出, 其中将 0 号管作为阴性对照组, 其余管均加入 IPTG 诱导, 其终浓度分别为 1 号管 0.1 mmol/L, 2 号管 0.2 mmol/L, 3 号管 0.4 mmol/L, 4 号管 0.8 mmol/L, 诱导温度均为 25 $^{\circ}\text{C}$, 摇床摇速为 100 r/min; 3' 号管 IPTG 终浓度为 0.4 mmol/L, 4' 号管为 0.8 mmol/L, 诱导温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 摇床摇速 220 r/min。诱导 3 h 后菌液高速离心 6 min, 低温超声破碎并高速离心, 分别将上清与沉淀分装成两管, 上清组分别为 0 s、1 s、2 s、3 s、4 s、3' s、4' s, 沉淀组分别为 0c、1c、2c、3c、4c、3c'、4c', 以 12% SDS-PAGE 蛋白电泳进行鉴定。

3. IPTG 大量诱导表达: 将通过鉴定为阳性且可溶性蛋白量最大的表达菌转接到新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、250 rpm 摇床摇菌 12 h 左右后, 取 5 ml 菌液转接到 500 ml LB 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床摇菌 3 h 后, 加入 IPTG(终浓度 0.6 mmol/L), 继续摇菌 3 h。低温高速离心, 弃上清, 加入 25 ml 结合缓冲液, 12 μl PMSF(终浓度为 100 mmol/L), 混匀后低温超声破碎并离心, 将上清和沉淀分装在两个试管中, 分别取样作 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定。

4. 蛋白纯化: 采用镍柱纯化, 将样品过柱后依次用结合缓冲液(pH 7.8)、洗涤缓冲液(pH 6.0)、浓度依次为 10 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、150 mmol/L 的咪唑洗脱缓冲液过柱。分别取样作 SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定。

5. 蛋白鉴定: pET-32a(+) -CCL3L1 融合蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 考马斯亮蓝染色后, 通过扫描鉴定其纯度。分别以抗-His 抗体和山羊抗 CCL3L1 抗体作为一抗, 以 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 和兔抗羊 IgG 作为二抗, 进行 Western blot 鉴定。

(三) 多克隆抗体的制备

选取 2 只 6~10 周龄 BALB/c 小鼠, 分别采尾静脉血作阴性对照, 将纯化后 pET-32a(+) -CCL3L1 蛋白溶液约 50 μg , 与等体积完全福氏完全佐剂混匀, 采用皮下多点注射免疫。14 d 和 28 d 后采取同样剂量和方式, 将重组蛋白与福氏不完全佐剂混匀进行强化免疫 2 次。分别采尾静脉血, 分离血清用 ELISA 法测定其抗体滴度。

(四) 抗体滴度的测定

以间接 ELISA 法测定多克隆抗体滴度。用包被液稀释经纯化的 pET-32a (+)-CCL3L1 融合蛋白,以 60 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 包被 ELISA 板,置湿盒中于 4℃ 冰箱包被过夜;第 2 天尽量甩净孔内液体,每孔加入 100 μl ELISA 封闭液,置于 37℃ CO_2 孵箱湿盒内孵育 1 h;洗板后加入 CCL3L1 融合蛋白免疫小鼠的血清,按以下倍数稀释(1:100 ~ 1:102 400),同时以免疫前血清为阴性对照,于 37℃ CO_2 孵箱作用 1 h;洗板后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1:5000),37℃ CO_2 孵箱作用 1 h 后,甩净孔内液体,洗板后依次加入显色液 A、显色液 B 每孔各 50 μl ,避光 37℃ 作用 15 min,加 50 μl 终止液(2 mol/L H_2SO_4) 终止反应。于 ELISA 酶标检测仪 450 nm 处测量 A 值。

结 果

一、重组质粒的构建及鉴定

重组表达质粒 pET-32a (+)-CCL3L1 的构建流程图(图 1)所示,经酶切鉴定表明,条带大小与预期一致,分别位于 200 bp、6000 bp 左右,如(图 2)所示。

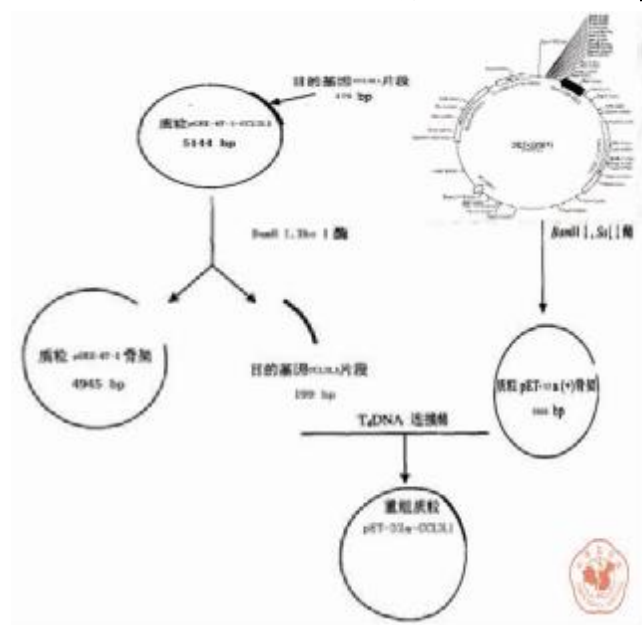


图 1 pET-32a(+)-CCL3L1 重组质粒的构建

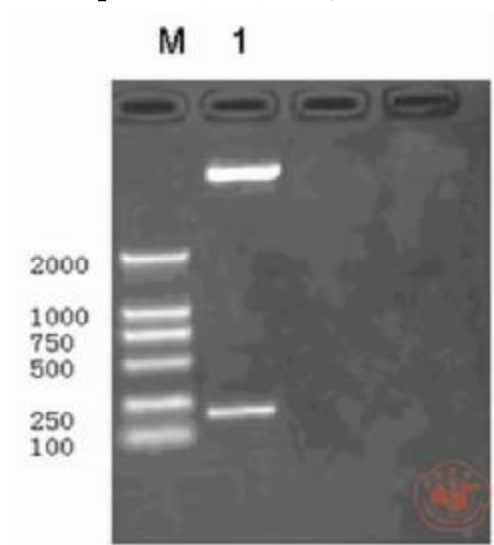


图 2 pET-32a(+)-CCL3L1 重组质粒酶切鉴定

M: DNA Marker (DL2000); 1: pET-32a (+)-CCL3L1/BamH I + Xho I

二、融合蛋白的诱导表达

1. IPTG 小量诱导:pET-32a (+)-CCL3L1 重组质粒经 IPTG 诱导后于 27 kD 处出现一条较明显的表达带,与预期大小一致(图 3)。

2. IPTG 优化诱导:结果表明,表达菌在 IPTG 诱导终浓度为 0.4 ~ 0.8 mmol/L,37℃,220 r/min 的摇菌条件下,融合蛋白表达量最高,且主要为可溶性表达(图 4)。

3. IPTG 大量诱导表达:据以上 IPTG 优化诱导结果,将 IPTG 终浓度定为 0.6 mmol/L,诱导环境为 37℃,220 r/min 摇床中,经 SDS-PAGE 蛋白电泳显示:该蛋白为可溶性表达,表达量大,蛋白分子质量大小约为 27 kD (图 5)。

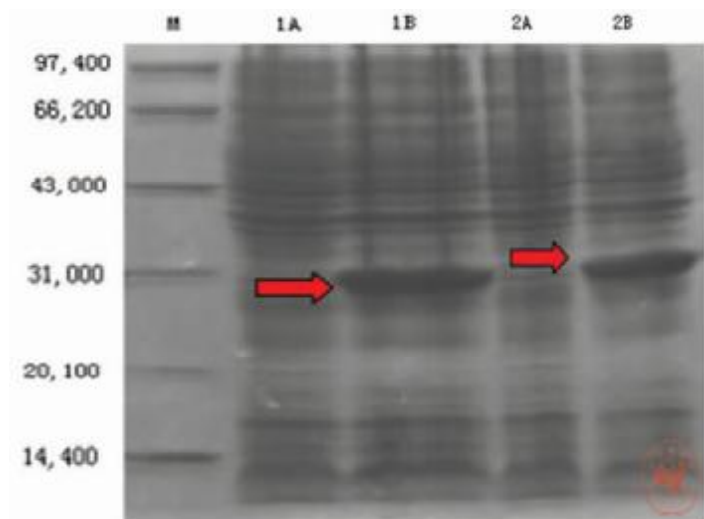


图 3 pET-32a(+)-CCL3L1 重组质粒经 IPTG 小量诱导产物 SDS-PAGE 鉴定

M:标准相对分子质量蛋白质对照;1A:样本 1 未诱导的全菌体裂解产物;1B:样本 1 诱导的全菌体裂解产物;2A:样本 2 未诱导的全菌体裂解产物;2B:样本 2 诱导的全菌体裂解产物。

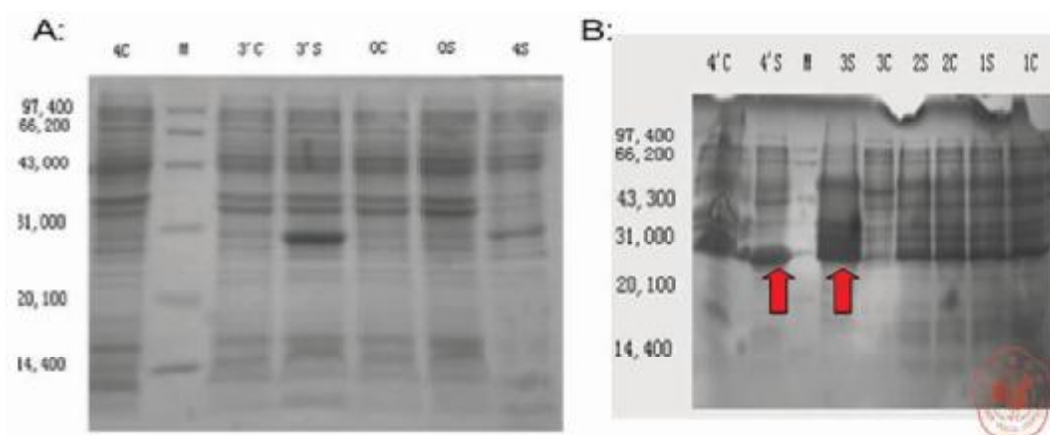


图 4 pET-32a(+)-CCL3L1 重组质粒经 IPTG 优化诱导产物 SDS-PAGE 鉴定图

M:标准相对分子质量蛋白质对照;0S、1S、2S、3S、4S 为在 25℃、100 r/min 下, IPTG 终浓度分别为 0、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L 诱导后经超声破碎离心后获得的上清;0C、1C、2C、3C、4C 为在 25℃、100 r/min 下, IPTG 终浓度分别为 0、0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.8 mmol/L 诱导产物经超声破碎离心后获得的沉淀;3'S、4'S 为在 37℃、220 r/min 下, IPTG 终浓度分别为 0.4 mmol/L、0.8 mmol/L 诱导产物经超声破碎离心后获得的上清;3'C、4'C 为在 37℃、220 r/min 下, IPTG 终浓度分别为 0.4 mmol/L、0.8 mmol/L 诱导产物经超声破碎离心后获得的沉淀。

三、融合蛋白的纯化

将 pET-32a(+) -CCL3L1 融合蛋白过镍柱纯化,依次以浓度为 10、50、100、150 mmol/L 的咪唑洗脱蛋白,经 12% SDS-PAGE 蛋白电泳鉴定表明:100 mmol/L 的咪唑液洗脱的蛋白量最大,且杂蛋白较少(图 6)。

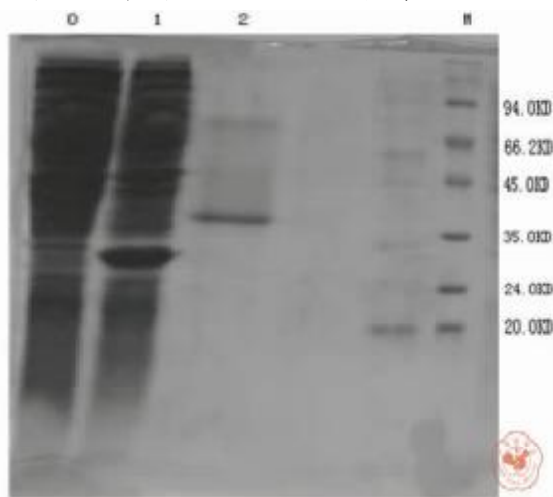


图 5 pET-32a(+) -CCL3L1 重组质粒经 IPTG 大量诱导产物 SDS-PAGE 鉴定

M:标准相对分子质量蛋白质对照;0:未经诱导的阴性对照组;1:IPTG 终浓度 0.6 mmol/L 的全菌体裂解产物上清;2:IPTG 终浓度 0.6 mmol/L 的全菌体裂解产物沉淀。

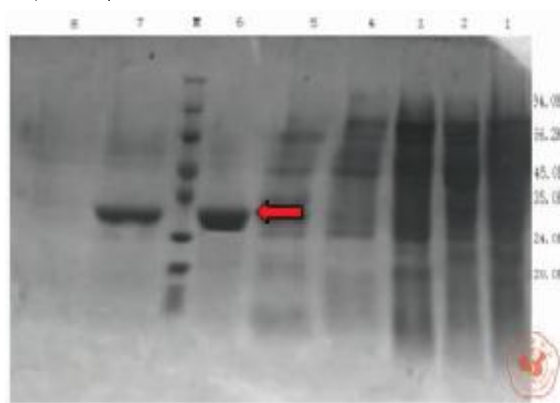


图 6 pET-32a(+) -CCL3L1 融合蛋白纯化后 SDS-PAGE 鉴定图

M:标准相对分子质量蛋白质对照;1:蛋白上清过柱产物;2:结合缓冲液洗脱产物;3:洗涤缓冲液洗脱产物;4:10 mmol/L 咪唑洗脱产物;5:50 mmol/L 咪唑洗脱产物;6:100 mmol/L 咪唑洗脱产物;7:150 mmol/L 咪唑洗脱产物

四、pET-32a(+) -CCL3L1 融合蛋白的 Western blot 鉴定

pET-32a(+) 在非融合蛋白表达时产生一个大约 20 kD 的蛋白产物。当与 CCL3L1 融合时产生一个大约 27 kD 的融合蛋白。咪唑洗脱蛋白经免疫电泳和转膜后利用抗组氨酸多肽抗体检测显示 IPTG 诱导 pET-32a(+) 产生一个 20 kD 的蛋白产物,pET-32a(+) -CCL3L1 产生一个 27 kD 的蛋白产物(图 7A)。进一步用抗-CCL3L1 特异的抗体检测发现只有 pET-32a(+) -CCL3L1 产生一个 27 kD 的蛋白产物(图 7B)。结果证实我们的 pET-32a(+) -CCL3L1 融合蛋白产物是一个具有很强 CCL3L1 抗原性的蛋白。

五、多克隆抗体的 ELISA 鉴定

由图 8 可见,A、B 两鼠在免疫前均无相应抗体产生,由此可以排除假阴性可能,在用 pET-32a(+) -CCL3L1 融合蛋白结合福氏佐剂免疫 3 次后,产生了效价较高的抗体,最高可达 1:51 200。

讨 论

HIV 病毒进入宿主细胞,除 CD4 分子介导外,CCR5 和 CXCR4 是其主要协同受体。最初,CCR5 是作为 3 种 CC 趋化因子 MIP-1 α /CCL3、MIP-1 β /CCL4 和

RANTES/CCL5 的受体而被提出来的^[2]。CCL3L1 和 CCL4L1 分别为 CCL3 和 CCL4 基因经复制后产生的两种变异基因^[3,4], 同样能与 CCR5 受体结合, 尤其是 CCL3L1。当其成熟蛋白切除前 2 个氨基酸后即 CD26/DPPIV 缺失体, 为高效 CCR5 激动剂, 也是 R5 HIV 毒株进入细胞最为有效的抑制剂^[5]。

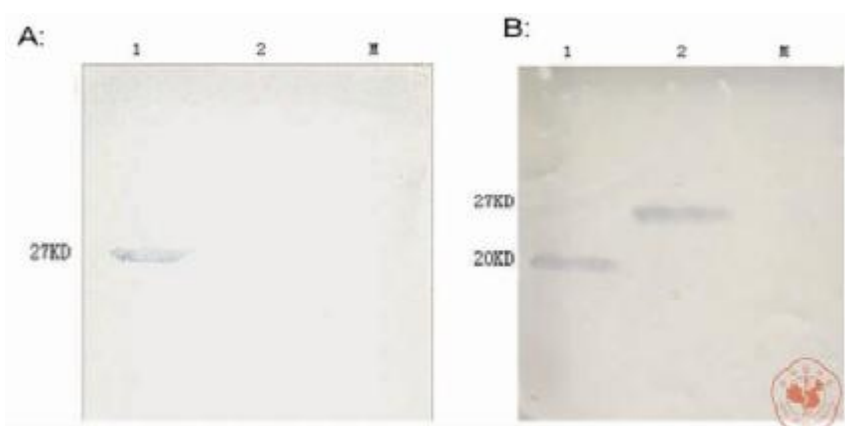


图 7 pET-32a (+)-CCL3L1 融合蛋白和 pET-32a (+)载体 Western blot 鉴定

A: M, 标准相对分子质量蛋白质对照; 1, pET-32a(+)-CCL3L1 蛋白表达产物; 2, pET-32a(+)空载体蛋白对照。B: 1, pET-32a(+)空载体蛋白对照; 2, pET-32a(+)-CCL3L1 蛋白表达产物

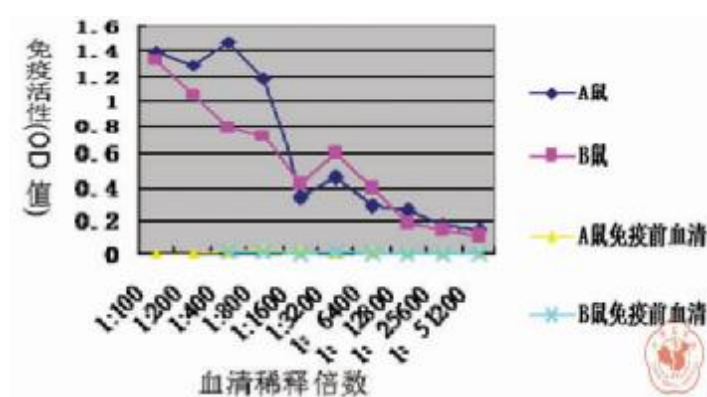


图 8 pET-32a(+)-CCL3L1 融合蛋白抗体效价分析

众所周知, 染色体上一些基因拷贝数量的增加在生物进化尤其是灵长类动物进化过程中具有重要作用^[6-8]。多拷贝基因常常会引起相应产物的过量表达, 在某些情况下会引起人类疾病的产生。但在另一些情况下, 尤其是宿主防御性基因的复制, 却可以对机体免疫功能的维持起到保护性作用^[9]。

多拷贝的 CCL3L1 基因即是一种典型范例。一项跨越 57 个人种, 受访者超过 1000 例的大型研究表明: CCL3L1 基因的过量表达可能是导致 HIV 易感性下

降和 AIDS 进展减慢的原因之一^[10]。研究发现 CCL3L1 基因的拷贝数存在个体差异和种族差异。在同种族中, CCL3L1 基因拷贝数低, HIV 易感性更大^[10]。CCL3L1 高表达引起 HIV 易感性降低的机制可能有以下几个方面: (1) 趋化因子 CCL3L1 能够与 HIV-1 竞争 CCR5 上的结合位点; (2) 它能够介导 CCR5 表达下调, 并使其内化; (3) 它可以启动效应淋巴细胞抗病毒免疫应答, 诱发更多 CCR5 Th1 细胞和 CD8 效应 T 细胞参与抗 HIV-1 的免疫应答^[11]。

由此可见, CCL3L1 基因拷贝数的高低对 HIV-1 易感性的影响主要是通过其蛋白产物发挥作用, 而 CCL3L1 蛋白产量的多少也是其基因拷贝数高低的直接反映^[12]。而要验证以上问题, 尤其是 CCL3L1 基因在亚洲人种中的分布情况以及其与 HIV 易感性之间关系的深入探讨, 就要研究趋化因子 CCL3L1 的结构和功能。然而目前国内这方面的研究较少, 且尚无相应产品问世。

本研究中, pET-32a(+)-CCL3L1 融合蛋白表达量大、纯度高, 而且蛋白均为可溶性表达, 较好的保证了其空间构型的一致。同时, 以该蛋白免疫动物, 获得了高效价的多克隆抗体, 为今后单克隆抗体的制备、HIV 疫苗保护效力的检测创造了条件。

参 考 文 献

- 1 Menten P, Wuyts A, Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13:455-481.
- 2 Wu L, LaRosa G, Kassam N, et al. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. J Exp Med, 1997, 186:1373-1381.
- 3 Olszewski MA, Huffnagle GB, McDonald RA, et al. The role of macrophage inflammatory protein-1 α /CCL3 in regulation of T cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection. J Immunol, 2000, 165:6429-6436.
- 4 Ishizuka K, Igata-Yi R, Kimura T, et al. Expression and distribution of CC chemokine macrophage inflammatory protein-1 α /LD78 in the human brain. Neuroreport, 1997, 8:1215-1218.
- 5 Aquaro S, Menten P, Struyf S, et al. The LD78 β isoform of MIP-1 α is the most potent CC-chemokine in inhibiting CCR5-dependent human immunodeficiency type 1 replication in human macrophages. J Virol, 2001, 75:4402-4406.
- 6 Bailey JA, Gu Z, Clark RA, et al. Recent segmental duplications in the human genome. Science, 2002, 297:1003-1007.
- 7 Ciccarelli FD, von Mering C, Suyama M, et al. Complex genomic rearrangements lead to novel primate gene function. Genome Res, 2005, 15:343-351.
- 8 Li WH, Yang J, Gu X. Expression divergence between duplicate genes. Trends Genet, 2005, 21:602-607.
- 9 Arenzana-Seisdedos F, Parmentier M. Genetics of resistance to HIV infection: role of co-receptors and co-receptor ligands. Semin Immunol, 2006, 18:387-403.
- 10 Gonzalez E, Kulkarni H, Bolivar H, et al. The influence of CCL3L1 gene-containing segmental duplications on HIV-1/AIDS susceptibility. Science, 2005, 307:1434-1440.
- 11 Bugeja MJ, Booth DR, Bennetts BH, et al. Analysis of the CCL3-L1 gene for association with HIV-1 susceptibility and disease progression. AIDS, 2004, 18:1069-1071.
- 12 Townson JR, Barcellos LF, Nibbs RJ. Gene copy number regulates the production of the human chemokine CCL3-L1. Eur J Immunol, 2002, 32:3016-3026.

(收稿日期:2007-06-30)

(本文编辑:温少芳)