

• 实验研究 •

人外周血单个核细胞 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 的克隆、表达和纯化

Cloning, expression and purification of human BLyS₁₂₇₋₂₈₅ from peripheral blood mononuclear cells

周演武¹, 谢菲², 周琳¹, 姜加陶¹, 侯彦强¹, 耿红莲¹, 仲人前^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 上海市杨思医院检验科, 上海 200126)

[摘要] 目的: 从人外周血单个核细胞中克隆出 B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BLyS)胞外区片段 BLyS₁₂₇₋₂₈₅, 并进行表达和纯化。方法: 采用 RT-PCR 技术, 从人外周血单个核细胞中扩增 BLyS₁₂₇₋₂₈₅, 测序后构建原核表达载体, 经 IPTG 诱导表达及 Ni-NTA 纯化, 以 SDS-PAGE 和 Western 印迹法进行鉴定。结果: RT-PCR 扩增出一个 480 bp 的 DNA 片段, 序列分析与 GenBank 中报道的人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 的 cDNA 序列一致, 该胞外区片段在大肠杆菌中得到高效表达, 表达量可达菌体总蛋白的 49.8%, 纯化后纯度可达 97.0%。结论: 成功地从人外周血单个核细胞中扩增出人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅, 并获得高效表达, 其纯化产物为进一步研究其功能、开发与临床应用奠定了基础。

[关键词] 人外周血单个核细胞; BLyS₁₂₇₋₂₈₅; 基因表达

[中图分类号] R 593.2

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)12-1335-03

B 淋巴细胞刺激因子(B lymphocyte stimulator, BLyS)又称为 BAFF、THANK、TALL1、zTNF、TNFRSF 等, 是 1999 年瑞士和美国的一些研究小组发现的肿瘤坏死因子(TNF)超家族的第 17 位新成员^[1,2]。作为 B 淋巴细胞的共刺激因子, BLyS 的正常表达是脾脏生发中心形成、抗体亲和力成熟、记忆性 B 细胞形成及 B 细胞正常发育的必须条件, 它能与 B 淋巴细胞特异结合并诱导其增殖、分化并分泌 IgG、IgA 和 IgM 等免疫球蛋白, 在体液免疫反应中发挥着重要作用^[3,4]。近年来的研究显示 BLyS 在自身免疫性疾病的发生发展过程中起着重要的作用, 但 BLyS 的作用机制还不十分明了。本实验从人外周血单个核细胞中成功克隆出 BLyS 胞外区片段 BLyS₁₂₇₋₂₈₅, 通过原核表达得到高产量、高纯度的融合蛋白, 为进一步探讨其生物学功能以及在临床方面的应用打下基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂 大肠杆菌 JM109, DH5α 以及 pQE-30 由本室保存, pGEM-T 购自 Promega 公司, RNA PCR 试剂盒、IPTG、X-gal、Kpn I、Hind III 等购自 TaKaRa 公司, RNA 抽提试剂盒购自华舜生物公司, DNA 胶回收试剂盒购自 Fermentas 公司, 质粒抽提试剂盒购自博光生物公司, 抗-His 单抗和 Ni-NTA 层析系统购自德国 Qiagen 公司。

1.2 引物设计 根据 GenBank 中编码人 BLyS 的基因序列, 设计人可溶性 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 片段的特异性引物。上游引物为 BLyS-KPN: 5'-GCG GGT ACC AGA ACA GCA GAA ATA AG-3' (画线部分为 Kpn I 酶切位点), 下游引物为 BLyS-HIN: 5'-GCC AAG CTT CGC AGC AGT TTC AAT GC-3' (画线部分为 Hind III 酶切位点)。

1.3 人外周血单个核细胞的分离和总 RNA 的提取 抽取正常人静脉抗凝血 3 ml, 用淋巴细胞分离液按常规操作方法分离单个核细胞。将分离的人外周血单个核细胞参照华舜公

司 RNA 抽提试剂盒的说明书抽提总 RNA, -80℃ 保存。

1.4 RT-PCR 扩增 BLyS cDNA 及其产物的回收 取抽提的人外周血单个核细胞总 RNA 1 μl (约 0.2 μg), 分别以引物 oligo dT-Adaptor Primer、BLyS-KPN 和 BLyS-HIN 进行逆转录反应和 PCR 反应, 琼脂糖电泳观察结果。然后将 PCR 产物进行胶回收, 回收产物经紫外分光光度计检测浓度和纯度并 -20℃ 保存。

1.5 序列测定 将胶回收的 PCR 产物和 Promega 的 pGEM-T 载体(图 1)按照试剂盒要求进行连接。用常规 Ca-Cl₂ 法制备大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 然后将连接产物转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 经蓝白斑筛选获得阳性重组子, 用小量质粒抽提试剂盒抽提质粒, 经 Kpn I 和 Hind III 双酶切鉴定重组子, 阳性者命名为 BLyS-pGEM-T, 测序由上海联众基因研究院完成。

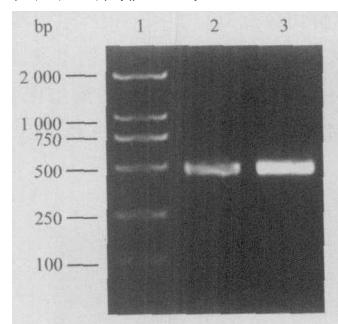


图 1 人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 基因 RT-PCR 电泳结果

1: DNA marker; 2, 3: 人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 基因 RT-PCR 扩增产物

[基金项目] 国家自然科学基金(30080027); 上海市基础研究重大项目(02JC14005); 上海市卫生系统百人跨世纪优秀学科带头人培养基金(沪卫科 9713)。

[作者简介] 周演武(1975-), 男(汉族), 硕士生。

E-mail: summer_breeze@sohu.com

*Corresponding author, E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

1.6 重组人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 的表达 将 BLyS-pGEM-T 进行 *Kpn* I + *Hind* III 酶切, 回收目的片段并连接于高效表达载体 pQE-30 中, 经酶切鉴定, 得到重组原核表达载体 BLyS-pQE-30。挑取含重组原核表达载体的单个菌落于 LB 培养液中, 37℃ 200 r/min 振荡过夜, 次日以 1% 接种到 5 ml LB 培养液中, 37℃ 振荡至 D_{600} 为 0.8 时, 加 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 继续培养 4 h, 诱导目的蛋白的表达。

1.7 重组蛋白的鉴定 表达的目的蛋白先按常规方法进行 SDS-PAGE, 然后以 Western 印迹法作进一步鉴定; 将 SDS-PAGE 产物以半干法电转移至硝酸纤维素膜上, 丽春红 S 染色后标记 Marker, 洗膜除去丽春红 S, 5% 脱脂奶粉室温封闭, 加 His 单抗孵育, 洗涤后加 HRP 标记的二抗室温孵育, 洗膜后加 DAB 闭光显色。

1.8 重组蛋白的纯化 将含重组质粒 BLyS-pQE-30 的表达菌在 100 ml LB 培养液中扩大培养, 并以上述条件行 IPTG 诱导表达, 离心收集细菌, 超声碎菌后离心沉淀包涵体, 用缓冲液 A (8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH₂PO₄、0.01 mol/L Tris-HCl pH8.0) 裂解包涵体, 裂解上清过 Ni-NTA 层析柱; 依次用缓冲液 A 和缓冲液 B (8 mol/L 尿素、0.1 mol/L NaH₂PO₄、0.01 mol/L Tris-HCl pH6.3) 洗柱, 直至 D_{280} 小于 0.01; 用缓冲液 C (缓冲液 B 中含 250 mmol/L 咪唑) 洗脱目的蛋白。对收集的蛋白行 SDS-PAGE 分析, 并采取逐步降低尿素浓度的方法, 透析除去尿素, 使变性的目的蛋白在此过程中自然复性, 从而得到纯化的重组人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅。最后毛细管电泳分析纯化蛋白纯度, 紫外分光光度计检测蛋白浓度, 行冻保存。

2 结果

2.1 人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ RT-PCR 电泳结果 图 1 为 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ RT-PCR 产物的电泳图谱, 可见清晰显示的约 500 bp 的 DNA 条带(含酶切位点)。

2.2 BLyS-pGEM-T 的酶切图谱 图 2 为 BLyS-pGEM-T 重组子经 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切的酶切图谱, 图中可见酶切出的 pGEM-T 载体(约 3 000 bp)和 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 片段(约 500 bp)。

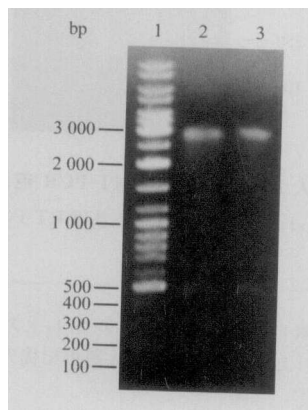


图 2 BLyS-pGEM-T 的酶切鉴定

1: DNA marker; 2, 3: BLyS-pGEM-T 的 *Kpn* I 和 *Hind* III 双酶切结果

2.3 序列测定结果 对构建的 BLyS-pGEM-T 进行单向测序, 结果人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ DNA 中 1 条链序列与 GenBank 中编码人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 的 cDNA 序列完全互补, 证明克隆构建的人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 序列完全正确。

2.4 重组人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 的诱导表达 携带 BLyS-pQE-30 的大肠杆菌 DH5α 菌株, 经 IPTG 诱导表达了重组目的蛋白, 主要位于菌体包涵体内, 其相对分子质量约为 19 000, 灰度扫描显示表达量可达菌体总蛋白的 49.8%, 结果见图 3。

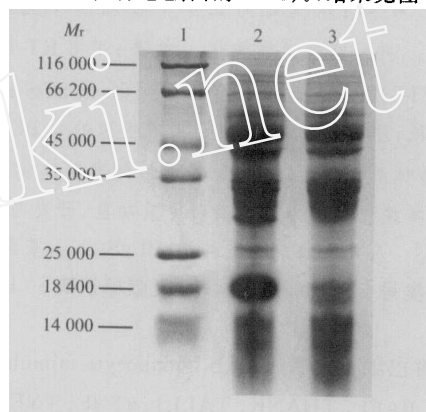


图 3 重组蛋白的 SDS-PAGE

1: 蛋白 Marker; 2: 培养 4 h 后的 BLyS-pQE-30/DH5α;
3: 培养 4 h 后的 pQE-30/DH5α

2.5 重组人 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 的鉴定 Western 印迹分析表示, 经诱导的菌体裂解产物与抗-His 单抗反应, 在相对分子质量约 19 000 出现单一条带, 而未经诱导的菌体则无此反应, 说明所表达的融合蛋白是目的蛋白, 结果见图 4。

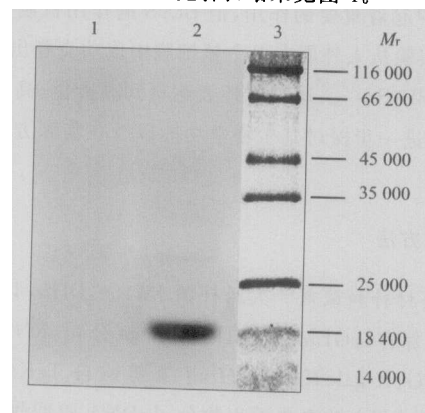


图 4 重组蛋白的免疫印迹分析

1: 阴性对照; 2: BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 重组蛋白; 3: 蛋白 Marker

2.6 重组蛋白的纯化 重组蛋白经 Ni-NTA 纯化后进行 SDS-PAGE, 在电泳谱中呈单一条带, 结果见图 5, 说明目的蛋白得到了较高程度的纯化。进一步经毛细管电泳分析纯度达 97.0%。

3 讨论

人 BLyS 基因位于染色体 13q32-34 上, mRNA 长约 2.6 kb。BLyS 蛋白同大部分 TNF 超家族成员相似, 为 II 型膜蛋白, 有典型的 TNF 超家族的同源三聚体结构。BLyS 有

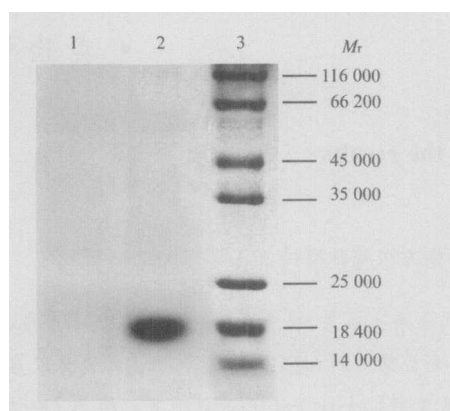


图 5 纯化产物的 SDS-PAGE

1: 阴性对照; 2: 纯化的重组蛋白; 3: 蛋白 Marker

膜结合型和可溶型两种活性形式,膜结合型含有 285 个氨基酸,相对分子质量约 52 000,其中 L47-Q73 为跨膜区,胞外区 A134-L285 是其发挥功能的主要区域,它通常在蛋白酶的作用下发生水解,形成 152 个氨基酸相对分子质量约 16 500 的可溶型片段(sBLyS)^[5]。

BLyS 是一种重要的免疫调节分子,广泛参与调节 B 细胞发育和分化以及抗体的产生^[2,3],另一方面也广泛参与 T 细胞的活化与应答过程^[6];BLyS 的过量表达则与 B、T 淋巴细胞功能亢进的系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、干燥综合征等多种自身免疫性疾病的发生和发展密切相关^[7,8],而 BLyS 缺陷则会出现成熟 B 细胞数目减少^[3]。BLyS 作为一种配体蛋白,通过与其受体结合而发挥其生物学作用。目前已发现的 BLyS 受体有 3 种:属于 TNF 受体家族成员的 B 细胞成熟抗原 (BCMA) 及跨膜激活与 CAML 作用因子 (TACI)、BR3。BCMA 和 TACI 具有促进 B 细胞的发育和抗体形成的功能,而可溶性的 BCMA 和 TACI 能竞争性地和 BLyS 结合,抑制 BLyS 的促 B 细胞发育和抗体生成作用^[9,10]。BCMA 和 TACI 同时还是另一 TNF 超家族成员——增殖诱导链 (APRIL) 的受体,而 BR3 则只与 BLyS 结合,与 B 细胞的增殖和功能有着密切的关系。鉴于 BLyS 和其受体的功能特点,人们已开始尝试设计以 BLyS 及其受体为作用靶点的方式来治疗某些疾病,如重组 sBLyS 和抗-BLyS 抗体已进入临床前试验,前者针对普通变异免疫缺乏症(CVID),后者用来治疗自身免疫性疾病^[11]。

为了研究 BLyS 及其受体的生物学功能以及在临床应用中的意义,本实验首先从人外周单个核细胞中克隆 BLyS 胞外区片段 BLyS₁₂₇₋₂₈₅。一般认为 BLyS 主要表达于人外周血单个核细胞、淋巴结、脾脏和骨髓等组织以及 K562、HL60、THP1 和 U937 等髓质起源的细胞株,不存在于 B 和 T 系淋巴细胞株^[1]。国内有些报道从人外周血单个核细胞中

难以克隆出 BLyS 基因,本实验采用 RT-PCR 技术,从人外周血单个核细胞中总 RNA 中扩增出 BLyS 胞外区片段 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ cDNA,并通过 pGEM-T 载体克隆成功,其序列与文献报道的完全一致。提示从人外周血单个核细胞中提取 BLyS 基因仍是可行的,并且较其他方法更简单方便。本研究将成功克隆的片段 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ 构建于高效原核表达载体 pQE-30,其表达的是在 BLyS₁₂₇₋₂₈₅ N 端带有 6 个 His 标签的融合蛋白,经 IPTG 诱导后该融合蛋白得到高效表达,并通过层析技术制备了高纯度的目的蛋白,为后续的研究创造了条件。

[参考文献]

- [1] Mocre FA, Belvedere O, Orr A, et al. BLyS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator[J]. *Science*, 1999, 285(5425): 260-263.
- [2] Rolink AG, Tschopp J, Schneider P, et al. BAFF is a survival and maturation factor for mouse B cells[J]. *Eur J Immunol*, 2002, 32(7): 2004-2010.
- [3] Batten M, Groom J, Cachero TG, et al. BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(10): 1453-1466.
- [4] Schiemann B, Gommerman JL, Vora K, et al. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway[J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2111-2114.
- [5] Nardelli B, Belvedere O, Roschke V, et al. Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells[J]. *Blood*, 2001, 97(1): 198-204.
- [6] Huard B, Schneider P, Mauri D, et al. T cell costimulation by the TNF ligand BAFF[J]. *J Immunol*, 2001, 167(11): 6225-6231.
- [7] Mackay F, Mackay CR. The role of BAFF in B-cell maturation, T-cell activation and autoimmunity[J]. *Trends Immunol*, 2002, 23(3): 113-115.
- [8] Groom J, Kalled SL, Cutler AH, et al. Association of BAFF/BLyS overexpression and altered B cell differentiation with Sjögren's syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(1): 59-68.
- [9] Xia XZ, Treanor J, Senaldi G, et al. TACI is a TRAF-interacting receptor for TALL-1, a tumor necrosis factor family member involved in B cell regulation[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(1): 137-143.
- [10] Yan M, Wang H, Chan B, et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(7): 638-643.
- [11] Haseltine WA. Genomics and drug discovery[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2001, 45(3): 473-475.

[收稿日期] 2004-07-23

[修回日期] 2004-10-28

[本文编辑] 曹 静