

GST hBLyS 融合蛋白基因的构建 及其在大肠杆菌中的表达^{*}

张志方¹, 张春艳¹, 付涌水², 林学颜¹, 潘敬运¹

(1. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510089;

2. 广州血液中心, 广东 广州 510095)

摘要: 根据 hBLyS (human B lymphocyte stimulator) 基因序列设计合成特异性引物, 用 RT-PCR 从人外周血淋巴细胞扩增出 858bp 的 hBLyS 基因, 并将其插入到融合蛋白原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 得到重组表达质粒 pGEX-4T-1/hBLyS。将此重组质粒转化大肠杆菌 BL21, 经用 IPTG 诱导, 表达出了 GST hBLyS 融合蛋白。

关键词: 人 BLyS; 基因表达; 融合蛋白

中图分类号: R392.11; R331.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 03-0072-04

BLyS (B lymphocyte stimulator) 是肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 家族的一个新成员, 它含有 285 个氨基酸, 是 II 型跨膜蛋白。BLyS 主要由 T 淋巴细胞和树突状细胞合成, 其受体仅位于 B 淋巴细胞膜表面。BLyS 的主要作用是: 保持生发中心 B 淋巴细胞的增生和延长成熟 B 淋巴细胞的存活^[1-6]。动物实验证明, BLyS 的过度表达可以导致自身免疫性疾病, 例如系统性红斑狼疮 (systemic lupus erythematosus, SLE); 用抗鼠的 BLyS 抗体可以阻断 BLyS 分子与其受体的结合, 减轻模型鼠 SLE 的症状^[7,8]。当前, 探讨人 BLyS (human BLyS, hBLyS) 与自身免疫性疾病的关系已成为自身免疫性疾病诊断和治疗领域中的一个新的研究热点。本文拟构建含全长 hBLyS 基因的原核表达质粒, 在大肠杆菌中表达谷胱甘肽硫基转移酶 (glutathione S transferase, GST) hBLyS 融合蛋白, 为制备 hBLyS 单克隆抗体来研究 BLyS 与自身免疫性疾病的关系, 研制一种新的特异性抑制 B 淋巴细胞功能的免疫抑制剂创造条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 BL21 为本校免疫学教研室保存菌株; pGEX-4T-1 质粒为 Pharmacia 公司产品。

1.1.2 主要试剂 各种 DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、标准相对分子质量蛋白等均购自上海生工生物工程有限公司; 引物

由上海生工生物工程有限公司合成; 其它常规化学试剂为分析纯以上产品。

1.2 方法

1.2.1 人外周血淋巴细胞总 RNA 提取 分离健康人外周血淋巴细胞, 加入植物凝集素 (phytohamagglutinin, PHA) 1 μ g/mL 和佛波酯 (phorbol 12 myristate 13 acetate, PMA) 10 ng/mL 激活, 37 $^{\circ}$ C 培养 8 h 后, 收集培养细胞, 按异硫氢酸胍一步法提取总 RNA, 紫外分光光度计定量。

1.2.2 引物的设计和反转录 PCR 根据基因库 (GenBank, 登录号 AF132600) 中 hBLyS 基因序列, 设计合成一对引物, P1 5' GTCGAATTCATGGATGACTCCACAG 3', P2 5' CACGTCTGACTCACAGCAGTTTCAATG 3', 其中 5' 端引物含有 EcoRI 酶切位点和起始密码, 3' 端引物含有 SalI 酶切位点和终止密码。以提取的总 RNA 为模板, 先逆转录合成 cDNA 第一链, 然后进行常规 PCR 扩增, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 35 次。取 PCR 产物 5 μ L 在 $w=1.0\%$ 的琼脂糖凝胶中电泳, 用紫外分析仪检测电泳结果。

1.2.3 pGEX-4T-1/hBLyS 重组质粒的构建及大肠杆菌转化 按参考文献 [9] 所述方法进行。

1.2.4 重组质粒 DNA 序列测定 由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2.5 GST hBLyS 融合蛋白的诱导表达 分别将含有 pGEX-4T-1/hBLyS 质粒和 pGEX-4T-1 空载体的菌株放入含氨苄青霉素的 2 $\times$ YTG 培养基中 37

^{*} 收稿日期: 2001-10-26

作者简介: 张志方 (1964-), 男, 博士研究生, 副教授; E-mail: zhangzf01@yahoo.com.cn

℃过夜摇菌培养,次日按体积比为 1:100 稀释培养过夜的菌液转种,培养至菌液 $A_{600}=0.4\sim 0.6$ 时,加入异丙基硫代半乳糖苷(isopropyl β D-thiogalactoside, IPTG)至终浓度为 0.2 mmol/L,未加 IPTG 诱导的菌液作为对照,继续培养 4 h 后,离心收集菌体进行 SDS PAGE 分析。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增 hBLyS cDNA

PCR 产物的电泳结果表明,所扩增的目的基因片段与预期的一致,约为 876 bp (含保护碱基和酶切位点),见图 1。

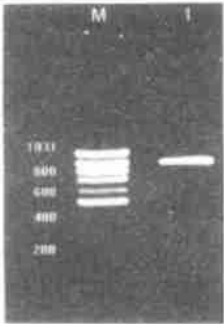


图 1 hBLyS cDNA PCR 产物凝胶电泳
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of the PCR product of hBLyS cDNA
M 1 kb DNA 标准; 1 RT-PCR 产物

2.2 含 GST hBLyS 融合蛋白基因重组质粒的构建

hBLyS 基因的 PCR 扩增产物经 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切后,插入 pGEX 4T-1 的 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切窗口,得到含 GST hBLyS 融合蛋白基因的重组质粒,构建过程如图 2 所示。

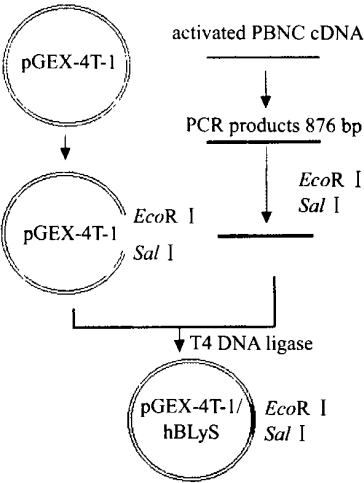


图 2 pGEX 4T-1/hBLyS 重组质粒构建示意图
Fig. 2 The sketch map of the construction of recombinant plasmid pGEX 4T-1/hBLyS

用重组质粒转化大肠杆菌 BL21,然后把大肠杆菌 BL21 铺于含氨苄青霉素的 LB 平板,37℃过夜,次日观察到 pGEX 4T-1/hBLyS 质粒转化菌较稀疏地均匀分布在平板上,分别取 pGEX 4T-1/hBLyS 和 pGEX 4T-1 质粒转化菌进行扩增后,抽提质粒 DNA 进行酶切鉴定,经 $w=1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳,可见经 *EcoRI* 和 *SalI* 双酶切后,成为两个片段,分别为约 4.9 kb 的 pGEX 4T-1 和约 858 bp 的 hBLyS 基因片段,与理论值相符(图 3)。

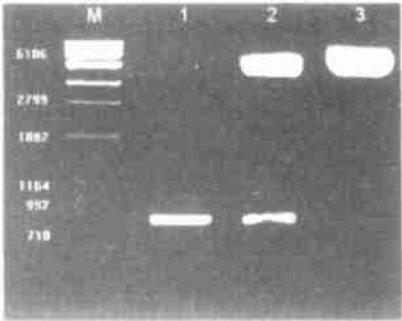


图 3 重组质粒 pGEX 4T-1/hBLyS 的酶切鉴定
Fig. 3 Restriction map of recombinant plasmid pGEX 4T-1/hBLyS

M Lambda DNA/*Eco911* (*BstE II*) 标准
1 RT-PCR 产物;
2 经 *EcoRI* + *SalI* 双酶切的重组 pGEX 4T-1/hBLyS 质粒;
3 经 *EcoRI* 酶切的 pGEX 4T-1 质粒

2.3 重组质粒 DNA 序列测定

重组表达质粒测序结果如图 4 所示,重组质粒中所含的目的基因片段与文献 [1] 报道的 hBLyS cDNA 序列完全一致,对阅读框架分析,证明该重组质粒已正向插入了目的基因,肯定了该重组表达质粒能正确表达 GST hBLyS 融合蛋白。

2.4 GST hBLyS 融合蛋白的诱导表达

含质粒 pGEX 4T-1/hBLyS 的菌株和含质粒 pGEX 4T-1 的菌株经 IPTG 诱导后,进行 $w=10\%$ SDS PAGE 分析,结果表明,分别在相对分子质量约为 58 000 (融合蛋白) 和 26 000 (GST 蛋白) 处有明显的蛋白质表达条带,而未经诱导的 pGEX 4T-1/hBLyS 在 58 000 处无条带产生(图 5)。说明 pGEX 4T-1/hBLyS 在宿主菌 BL21 中表达了重组 GST hBLyS 融合蛋白。

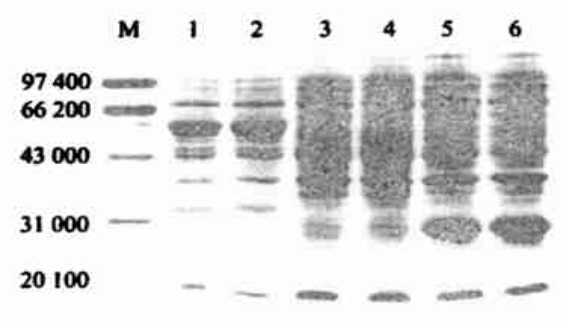


图 5 pGEX-4T-1/hBLyS 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig 5 SDS-PAGE analysis of the expressed products of pGEX-4T-1/hBLyS

M 标准相对分子质量蛋白;

1—2 IPTG 诱导后的含 pGEX-4T-1/hBLyS 重组质粒细菌的裂解物;

3—4 含 pGEX-4T-1/hBLyS 重组质粒的细菌的裂解物;

5—6 IPTG 诱导的含 pGEX-4T-1 质粒的细菌的裂解物

果表明, BLyS 转基因小鼠表现出外周血 B 淋巴细胞数量增加、B 淋巴细胞存活时间延长以及血浆 IgM、IgG、IgA、IgE、IgD 显著增加等表现, 5 个月小鼠出现免疫复合物沉积在肾脏和蛋白尿现象。采用抗 hBLyS 单克隆抗体研究 BLyS 与人类自身免疫性疾病的关系, 以及探讨阻断 BLyS 与 B 淋巴细胞膜上受体结合从而达到抑制 B 淋巴细胞活化的目的等方面的研究将越来越受到人们重视, 并且将成为治疗自身免疫性疾病新途径研究的热点^[10]。BLyS 分子主要存在于激活的 T 淋巴细胞膜上, 要想得到纯化的抗原免疫动物研制抗体十分困难。国外现在普遍采用激活的人 T 淋巴细胞直接免疫小鼠, 由于激活的 T 淋巴细胞或树突状细胞膜表面除了含有 hBLyS 外, 还有其它的膜表面分子, 这就给筛选能特异性分泌抗 hBLyS 单克隆抗体的杂交瘤细胞株带来一定困难。本文采用分子克隆方法, 克隆并表达 GST-hBLyS 融合蛋白, 用此融合蛋白作为抗原, 既增加了抗原的免疫原性, 又给筛选工作带来方便。在下一步筛选阳性克隆时, 可采取两种方法: ①用 hBLyS 蛋白筛选: 将表达的 GST hBLyS 融合蛋白通过谷胱甘肽 agarose 柱进行亲和层析, 再用凝血酶将其 GST 切除, 从而获得目的蛋白, 选择与目的蛋白反应的特异性杂交瘤细胞株为阳性细胞株; ②用融合蛋白筛选: 选择与 GST-hBLyS 融合蛋白反应而与 GST 不反应的特异性杂交瘤细胞株为阳性细胞株; 最后再用激活的人 T 淋巴细胞鉴定, 即可得到特异性抗 hBLyS 蛋白的单克隆抗体。本文为以后制备抗 hBLyS 单克

隆抗体以及用此抗体研究 BLyS 与自身免疫性疾病的关系打下了基础。

pGEX-4T-1 为表达 GST 融合蛋白的原核高效表达载体, 带有强的 tac 启动子。构建的质粒中, pGEX-4T-1 的多克隆酶切位点位于 GST 基因之后; 目的基因插入后, 接在 GST 基因下游; 重组质粒 DNA 序列测定结果证实了含有目的基因; 当基因进行表达时, 表达产物为 GST 和目的基因表达蛋白的融合体。目的基因预期表达蛋白相对分子质量为 32 000, GST 相对分子质量为 26 000, 融合蛋白相对分子质量为 58 000 (26 000+32 000), 蛋白表达结果表明, 与我们预期的结果和文献报道的相对分子质量相符。

参考文献:

[1] MOORE P A, 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] M UKHOPADHYAY A, NI J, ZHAI Y, et al. Identification and characterization of a novel cytokine, THANK, a TNF homologue that activates apoptosis, nuclear factor- κ B, and c-Jun NH₂-terminal kinase[J] . J Biol Chem, 1999, 274(23): 15978—15981.

[3] SHU H B, HU W H, JOHNSON H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens[J] . J Leukoc Biol, 1999, 65(5): 680—683.

[4] GROSS J A, JOHNSTON J, MUDRI S, et al. TACI and BCMA are receptors for a TNF homologue implicated in B cell autoimmune disease [J] . Nature, 2000, 404(6781): 995—999.

[5] H U S, TAMADA K, NI J, et al. Characterization of TNFRSF19, a novel member of the tumor necrosis factor receptor superfamily[J] . Genomics, 1999, 62(1): 103—107.

[6] SCHNEIDER P, MACKAY F, STEINER V, et al. BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth[J] . J Exp Med, 1999, 189(11): 1747—1756.

[7] MACKAY F, WOODCOCK S A, LAWTON P, et al. Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations[J] . J Exp Med, 1999, 190(11): 1697—1708.

[8] KHARE S D, SAROSI I, XIA X Z, et al. Severe B cell hyperplasia and autoimmune disease in TALL-1 transgenic mice[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3370—3375.

[9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M] . 2th ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

[10] LAABI Y, STRASSER A. Lymphocyte survival — ignorance is BLyS[J] . Science, 2000, 289(5481): 883—884.

Construction of Recombinant Plasmid of GST-hBLYS Fusion Protein Gene and Expression of GST-hBLYS Fusion Protein in *E. coli* BL21

ZHANG Zhi fang¹, ZHANG Chun yan¹,
FU Yong shui², LIN Xue yan¹, PAN Jing yun¹

(1. Zhongshan Medical School, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510089, China;
2. Guangzhou Blood Center, Guangzhou 510095, China)

Abstract: The human B lymphocyte stimulator (hBLYS) gene, a 858 bp DNA fragment, was amplified by RT-PCR using a pair of primers which were designed and synthesized according to the hBLYS gene sequence in GenBank. The hBLYS gene was cloned into pGEX-4T-1 plasmid, a GST expression Vector. The recombinant expression plasmid of pGEX-4T-1/hBLYS was transformed into *E. coli* BL21. The recombinant GST-hBLYS fusion protein was expressed after induced by IPTG in *E. coli* BL21.

Key words: hBLYS; gene expression; fusion protein

(上接第 71 页)

The Scale Effect of α Diversity Measurement in Forest Community Succession Series at Heishiding Nature Reserve, Guangdong

WANG Yong fan, YU Shi xiao, HUANG Xiang, LIU Wei qiu
(School of Life Sciences, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The α diversity on different spatial scales and the fractal power law relationship between α diversity and sample size in coniferous broad leaved mixed forest and evergreen broad leaved forest at Heishiding nature reserve in Guangdong Province, were studied, using transect sampling, with species richness index and Shannon index analysis. The results showed that, α diversity indices values abruptly increased at the beginning and then kept steady while scale enlarged, indicating the strong influence of scale on α diversity in some scale ranges on the two transects. The sampling scale of α diversity on evergreen broad leaved forest transect is obviously greater than that with coniferous broad leaved mixed forest transect, based on the scale changing curves of α diversity indices. The fractal power law relationship of α diversity indices versus sample scales on coniferous broad leaved mixed forest transect is significant than that with evergreen broad leaved forest transect. It shows that the evergreen broad leaved forest transect had greater spatial variation on community structure than that with the coniferous broad leaved mixed forest transect. The problem of standard sampling scale in α diversity research is discussed as well, the concept of relatively maxima expression scale (RMES) is proposed.

Key words: coniferous broad leaved mixed forest; evergreen broad leaved forest; α diversity; scale; transect sampling; fractal analysis; relatively maxima expression scale