

猪 *CCL17* 基因的克隆与原核和真核表达

李燕丽, 孙 柏, 张亚杰, 张德礼

(西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】**克隆猪胸腺活化调节趋化因子 *CCL17* 基因, 研究其在原核及真核系统中的表达。**【方法】**提取仔猪脾脏组织总 RNA, 利用 RT-PCR 技术扩增 *CCL17*, 并将其与已知序列的 *CCL17* 进行同源性比较; *CCL17* 基因经测序验证后, 将其分别克隆入表达载体 pET-32a 和 pEGFP-C1, 构建该基因的重组原核表达载体 pET-CCL17 和真核表达载体 pEGFP-CCL17, 分别进行双酶切和测序鉴定; 前者在大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达目的蛋白, 后者以脂质体介导法转染至猪血管内皮细胞(SUVECs), 通过绿色荧光标记和 Western blot 检测细胞中 *CCL17* 基因的表达水平。**【结果】**PCR 扩增得到 *CCL17* 309 bp 的 DNA 片段; 重组表达质粒 pET-CCL17 和 pEGFP-CCL17 经双酶切鉴定和测序分析证明, 载体构建成功。pET-CCL17 经 IPTG 诱导表达后, SDS-PAGE 分析表明, 目的蛋白在宿主大肠杆菌 BL21(DE3) 中高效表达 *CCL17* 融合蛋白, 分子质量约 32 ku, 与其理论分子质量基本相符; pEGFP-CCL17 转染 SUVECs, 经 Western blot 检测, 证实导入的 *CCL17* 基因得到了表达。**【结论】**克隆了猪的 *CCL17* 基因, 利用大肠杆菌成功表达了 *CCL17* 重组蛋白, 真核重组质粒在 SUVECs 中也得到了表达。

【关键词】 猪; 胸腺活化调节趋化因子; 分子克隆; 原核表达; 真核表达

【中图分类号】 Q785; Q786

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2010)07-0027-06

Cloning and expression of prokaryotic and eukaryotic of swine gene *CCL17*

LI Yan-li, SUN Bai, ZHANG Ya-jie, ZHANG De-li

(College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was done to clone swine thymus activation regulating chemokine *CCL17* and express it in prokaryotic and eukaryotic. **【Method】** The total RNA was extracted from Spleen of Piglet, the gene of *CCL17* was amplified by RT-PCR, the homology was analyzed by expression vector pET-CCL17 and eukaryotic expression vector pEGFP-CCL17, which underwent restriction enzyme digestion and sequencing respectively. The recombinant protein was expressed in BL21 (DE3), eukaryotic expression vector transfected Porcine vascular endothelial cells(SUVECs). **【Result】** A DNA fragment at length of 309 bp was amplified by PCR. Both restriction analysis and sequencing proved that recombinant plasmid pET-CCL17 and pEGFP-CCL17 were constructed correctly. pET-CCL17 by the challenge of IPTG, SDS-PAGE analysis showed that the target protein was overexpressed in *E. coli* BL21 (DE3), the fusion protein was about 32 ku, which was consistent with the prediction of *CCL17* recombinant protein. pEGFP-CCL17 transfected SUVECs, Western blot detection showed that *CCL17* gene was expressed in SUVECs. **【Conclusion】** We cloned swine *CCL17* and expressed it by *E. coli*. The eukaryotic recombinant plasmid was expressed in SUVECs.

* [收稿日期] 2009-12-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30270342); 西北农林科技大学引进人才基金资助项目(01140406)

[作者简介] 李燕丽(1984—), 女, 青海西宁人, 硕士, 主要从事分子病原与免疫学研究。E-mail: liyli84@126.com

[通信作者] 张德礼(1962—), 男, 陕西山阳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事分子病毒学、免疫学、肿瘤学及生物信息学与系统生物医学研究。E-mail: zhangdeli@tsinghua.org.cn

Key words: swine; thymus and activation-regulated chemokine; molecular cloning; prokaryotic expression; eukaryotic expression

趋化因子是一系列结构相似、由 70~100 个氨基酸组成、具有同源性且能控制免疫细胞定向迁移的小分子细胞因子超家族,与感染、白细胞移行和免疫细胞分化的调节有关^[1]。趋化因子通过结合特异的 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体并定位于细胞表面而发挥作用^[2]。根据 N 端保守半胱氨酸的数量及排列方式,趋化因子可分为 CXC、CC、C 和 CX3C 4 个家族^[3]。

胸腺活化调节趋化因子(Thymus and activation-regulated chemokine, CCL17)是新发现的 CC 趋化因子家族成员,主要表达于胸腺,也表达于肺、结肠、小肠等^[3]。CCL17 是 Th2 细胞的一种化学诱导剂,其高亲和力受体为 CCR4,选择性高表达于 Th2 细胞,CCL17 与 CCR4 结合后共同参与 T 细胞和巨噬细胞作用的炎症反应过程^[4]。CCL17 通过诱导活化白介素 4(IL-4)作用于 B 细胞,可增强 IgE 介导的体液免疫和杀伤细胞的杀伤能力,并能促进 B 细胞增殖分化,促进人类 T 细胞增长^[5]。可见,CCL17 基因在免疫细胞的发育和功能中扮演着重要角色。而目前除对人类和小鼠 CCL17 的生物学功能有研究外^[6],在猪上尚未见报道。为此,本试验以猪为供试动物,利用 RT-PCR 技术从其脾脏组织中克隆了 CCL17 基因(包含完整的开放阅读框),构建了猪 CCL17 的原核和真核表达载体,并分别在大肠杆菌及细胞中进行了表达,以期为进一步研究猪 CCL17 的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 猪脾脏样品的采集 取出生后 30 d 仔猪的脾脏组织,保存于 -80°C 。

1.1.2 菌株和质粒 质粒 pET32a(+),大肠杆菌 DH5 α 和 BL21(DE3),由西北农林科技大学动物医学院微生物实验室保存;猪血管内皮细胞(SU-VECs),由西北农林科技大学动物医学院张彦明教授馈赠。载体 pMD-18T simple 为 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司产品。

1.1.3 试剂 Trizol Reagent,购自 Invitrogen 公司;AMV 反转录酶、高保真 DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、BamH I、Hind III、EcoR I、IPTG、脂质体 2000、DMEM 等,均购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司;E. Z. N. A 质粒小提试剂盒购自

Omega 公司;DNA 胶回收试剂盒,购自北京百泰克生物技术有限公司。

1.2 序列来源

登录 NCBI,在猪的 EST 数据库中得到登录号为 DB794536 的 EST 序列,通过 Blast 发现该序列含有完整的 CCL17 基因的 ORF 区,依据该序列设计引物。

1.3 CCL17 基因的克隆

1.3.1 总 RNA 的提取 取仔猪脾脏组织少许,在液氮中充分研磨,称取大约 100 mg,采用 Trizol 提取总 RNA,提取过程按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 引物设计 利用同源序列原理设计 1 对克隆引物,P1:5'-CCATGACCCCCCTGAAG-3',P2:5'-CGAACGGTCTAAGGAGAAATC-3'。引物由上海生工公司合成,预期扩增片段大小为 330 bp。

1.3.3 CCL17 基因的 RT-PCR 扩增 以提取的总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)18 为引物,按照试剂盒说明书用反转录酶 AMV 进行 RT-PCR 反应。PCR 反应体系为 25 μL :反转录产物 2 μL ,10 倍 PCR 缓冲液 2.5 μL ,引物 P1、P2 (25 pmol/ μL) 各 1 μL ,2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL ,ddH₂O 16.4 μL ,Taq plus DNA 聚合酶(5 U/ μL)0.1 μL 。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,53 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.3.4 PCR 产物的克隆与序列测定 PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后,将目的条带用凝胶回收试剂盒回收,然后与 pMD19-T 载体于 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取白色菌落接种于含氨苄青霉素(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 12 h。提取质粒,用限制性内切酶 BamH I 和 Hind III 双酶切,采用 PCR 方法鉴定获得的重组质粒,将鉴定正确的质粒命名为 pMD-CCL17。挑选 2 管阳性菌液送北京三博公司测序。

1.4 原核表达载体 pET-CCL17 的构建

1.4.1 引物设计 根据克隆的序列设计 1 对表达引物,P3:5'-GGGAATTTCATGACCCCCCTGAAG-3',P4:5'-GGAAGCTTATCAGGACTTCTGGGTGA-3'。引物由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成,P3 和 P4 中分别引入 EcoR I 和 Hind III 酶切位点(下划线部分)。

1.4.2 PCR 扩增体系 PCR 反应体系为 25 μL :

ddH₂O 9.5 μ L, P3、P4(20 pmol/L)各 0.5 μ L, 克隆载体 pMD-CCL17 2 μ L, rTaq(5 U/L) 12.5 μ L。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,61 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书纯化回收目的片段。

1.4.3 重组质粒 pET-CCL17 的构建 将回收得到的 CCL17 基因与克隆载体 pMD-18T simple 相连,构建重组质粒 pMD-CCL17。将 pET-32a 和 pMD-CCL17 质粒进行 EcoR I 和 Hind III 双酶切(37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h),酶切产物按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行回收,用 T₄ DNA 连接酶于 4 $^{\circ}$ C 条件下连接过夜,连接体系为 10 μ L, pET-32a 载体与 PCR 产物的体积比为 3:1。用 10 μ L 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆菌落接种到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养,提取重组质粒,并对重组质粒进行 PCR 和双酶切鉴定,将鉴定正确的质粒转化 E. coli BL21(DE3)感受态细胞,挑取单克隆菌落接种到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养,提取重组质粒,并对重组质粒进行 PCR 和双酶切鉴定,将 PCR 和双酶切鉴定正确的质粒送北京三博公司测序。将获得的阳性重组质粒命名为 pET-CCL17。

1.5 重组质粒的诱导表达与鉴定

将含重组质粒(pET-CCL17)的 BL21(DE3)转化菌,接种于含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。然后将培养物按 1:100 的体积比接种于新鲜的含有氨苄青霉素(100 μ g/mL)的 2 $\times$ YT 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 A₆₀₀ 值达 0.6~0.8 时取出 1 mL,其余培养液加入 IPTG(终浓度 0.8 mmol/L)于 28 $^{\circ}$ C 诱导培养 6 h,分别在诱导后 3,4,5,6 h 各收集菌液 1 mL。在相同条件下培养、诱导含表达质粒 pET-28a 的空载体及未加诱导剂的受体菌,分别作为空白和阴性对照。按常规方法于 10 000 r/min 离心收集菌体,用 1 mL PBS 重悬菌体,并加入等体积 2 $\times$ SDS-PAGE 电泳上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 变性 10 min,进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色后观察结果,分析目的蛋白的表达情况。

1.6 真核表达载体 pEGFP-CCL17 的构建

1.6.1 引物设计 根据克隆的序列设计 1 对表达

引物,P5:5'-GC GAATTCCATGACCCCCCTGAA-G-3', P6: 5'-CCGATCCAAATCAGGACTTCT-GGG-3'。引物由 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司合成,P5 和 P6 中分别引入 EcoR I 和 BamH I 酶切位点(下划线部分)。

1.6.2 PCR 扩增体系 PCR 反应体系为 25 μ L: ddH₂O 9.5 μ L, P5、P6(20 pmol/L)各 0.5 μ L, 克隆载体 pMD-CCL17 2 μ L, rTaq(5 U/L) 12.5 μ L。反应程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 30 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后,按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行纯化回收。

1.6.3 重组质粒 pEGFP-CCL17 的构建 将回收得到的 CCL17 基因与克隆载体 pMD-18T simple 相连,构建重组质粒 pMD-CCL17,将 pEGFP-C1 和 pMD-CCL17 质粒分别进行 EcoR I 和 BamH I 双酶切(37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h),酶切产物按照琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒说明书进行回收。取回收的酶切产物,用 T₄ DNA 连接酶于 4 $^{\circ}$ C 条件下连接过夜,连接体系为 10 μ L, pEGFP-C1 载体与 PCR 产物的体积比为 3:1。将 10 μ L 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 固体培养基中于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆菌落接种到含有 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养,提取重组质粒,并对重组质粒进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定,将鉴定正确的质粒送北京三博公司进行测序鉴定,并将获得的阳性重组质粒命名为 pEGFP-CCL17。

1.7 重组质粒 pEGFP-CCL17 在 SUVECs 中的转染

将 SUVECs 接种于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,在含体积分数 5% CO₂ 的培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 连续培养,每 2~3 d 换液 1 次进行传代培养,使细胞维持对数生长。将处于指数生长期时 60%~70% 的 SUVECs 接种于盛有无血清 DMEM 培养液的六孔细胞培养板中,按 Lipofectamine 2000 说明书进行转染。取 4 μ L 质粒,加入 250 μ L 不含血清和抗生素的 DMEM 中,混匀后室温静置 5 min;另取 10 μ L 脂质体,加入 250 μ L DMEM 中,混匀后室温静置 5 min,之后将二者混合,室温静置 15 min。用不含抗生素和血清的新鲜营养液洗涤 3 次后留少许,加入上述质粒-脂质体混合液 500 μ L,轻缓混合后置 37 $^{\circ}$ C、体积分数 5% CO₂ 培养箱中培养 5 h,再吸出转染混合液,加入含

体积分数 10% 犊牛血清的 DMEM 营养液继续培养。同时设质粒载体转染和空白细胞对照组。

1. 8 Western blot 检测 pEGFP-CCL17 在 SU-VECs 中的表达

收集转染后具有绿色荧光的细胞,裂解处理后进行 Western blot 检测,一抗是小鼠单克隆抗体 IgG₁,二抗为 HRP 标记的羊抗小鼠。

2 结果与分析

2.1 CCL17 基因的 RT-PCR 扩增

以仔猪脾脏提取的总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)18 为引物,以反转录所得到的 cDNA 为模板,扩增得到约 309 bp 的片段,片段长度与预期结果相近(图 1);阳性质粒测序结果与 NCBI 提供序列的 ORF 具有 100% 的同源性,共编码 102 个氨基酸。

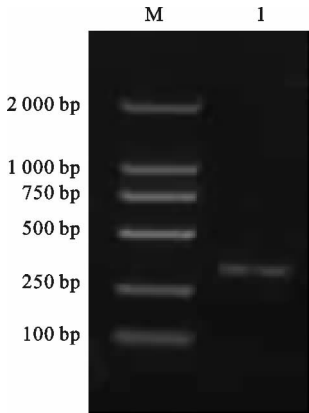


图 1 猪 CCL17 基因的 PCR 扩增

M, DNA marker DL2000;1. CCL17 基因 PCR 扩增产物
Fig. 1 Electrophoretic profile of PCR product of CCL17 gene
M, DNA marker DL2000;1. PCR product of CCL17 gene

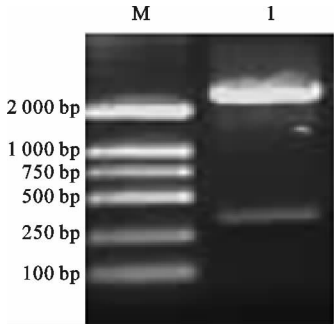


图 2 重组质粒 pMD-CCL17 的 BamH I 和 HindIII 双酶切鉴定

M, DNA marker DL2000;1. 重组质粒 pMD-CCL17 的 BamH I 和 HindIII 双酶切产物
Fig. 2 Identification of constructed plasmid pMD-CCL17
M, DNA marker DL2000;1. pMD-CCL17 digested by BamH I and HindIII

2.2 重组克隆载体 pMD-CCL17 的构建与测序

将 CCL17 克隆转化入感受态细胞 DH5 α 后,在含氨苄青霉素的 LB 平板上长出菌落,挑取单菌落,进行 BamH I 和 Hind III 双酶切,可得到 309 bp 的目的基因片段和 2 700 bp 的载体片段(图 2),长度均与预期相符。将重组质粒 pMD-CCL17 用全自动测序仪进行序列分析,测序结果与 NCBI 提供序列的 ORF 具有 100% 的同源性,共编码 102 个氨基酸,证实目的基因已成功克隆入 pMD18-T 载体。

2.3 重组原核表达载体 pET-CCL17 的双酶切鉴定

pET-CCL17 经 EcoR I 和 HindIII 双酶切鉴定,其电泳结果(图 3)显示,在 309 bp 左右有明亮条带出现,与目的基因理论长度基本一致,表明重组原核表达载体 pET-CCL17 构建成功。

2.4 CCL17 重组蛋白的表达

CCL17 蛋白分子质量为 11. 47 ku, pEF32a 质粒分子质量为 20. 4 ku,因此推测 CCL17 重组蛋白分子质量约为 32 ku。pET-CCL17 诱导表达产物的 SDS-PAGE 结果显示,在约 32 ku 处出现外源蛋白条带(图 4),该条带蛋白的分子质量与 CCL17 重组蛋白的理论分子质量基本相符。IPTG 诱导温度及时间变化对诱导表达略有影响,在 28 $^{\circ}$ C 下的表达水平略高于 37 和 35 $^{\circ}$ C,诱导 5 h 的表达水平略高于 4 和 3 h。

2.5 重组真核表达载体 pEGFP-CCL17 的鉴定

重组真核表达质粒 pEGFP-CCL17 用 BamH I 和 EcoR I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳中出现了预期为 309 bp 的目的条带,pEGFP-C1 大小为 5 000 bp(图 5),表明目的片段已成功插入了表达载体 pEGFP-C1。

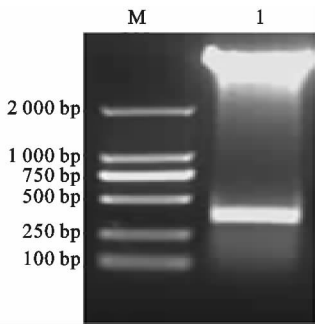


图 3 重组质粒 pET-CCL17 的 EcoR I 和 HindIII 双酶切鉴定

1. 重组质粒 pET-CCL17 的 EcoR I 和 Hind III 双酶切产物;M, DL-2000 Marker
Fig. 3 Recombinant plasmid digested by EcoR I and Hind III of pET-CCL17
1. pMD-CCL17 digested by EcoR I and Hind III ;M. DL-2000 Marker

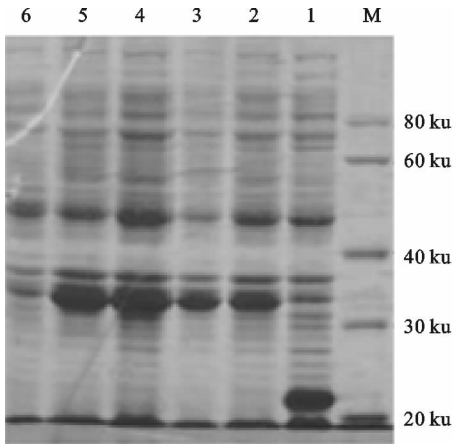


图 4 猪 CCL17 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

M. 蛋白质标准;1. pET-32a 转化菌(诱导后);
2~5. 分别为 pET-CCL17 转化菌诱导后 3,4,5,6 h 的
表达产物;6. pET-CCL17 转化菌(未诱导)

Fig. 4 SDS-PAGE detection of protein expressed in *E. coli*

M. Protein Marker;1. pET-32a (Induced);2-5. pET-CCL17
induced by IPTG for 3,4,5,6 h;6. pET-CCL17(Uninduced)

2. 6 重组质粒 pEGFP-CCL17 在 SUVECs 中的转染

利用荧光倒置显微镜对转染质粒的 SUVECs
进行观察,发现在转染 36 h 后,试验组和空载体组

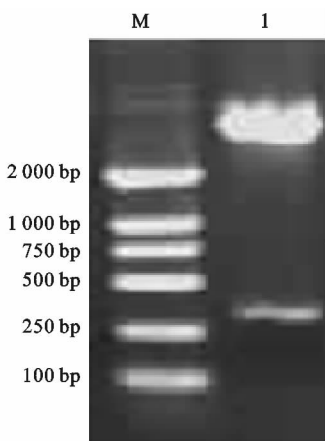


图 5 重组质粒 pEGFP-CCL17 的 *EcoR* I 和

*Bam*H I 双酶切鉴定

1. pEGFP-CCL17 重组质粒的 *EcoR* I 和 *Bam*H I
双酶切产物;M. DL-2000 Marker

Fig. 5 Identification of recombinant plasmid pEGFP-CCL17

1. pEGFP-CCL17 digested by *EcoR* I ,*Bam*H I ;
M. DL-2000 Marker

细胞均出现绿色荧光,未转染的阴性对照组细胞无
绿色荧光;60 h 后,试验组阳性细胞已非常典型(图
6)。证明 2 种质粒均已成功转入了 SUVECs。

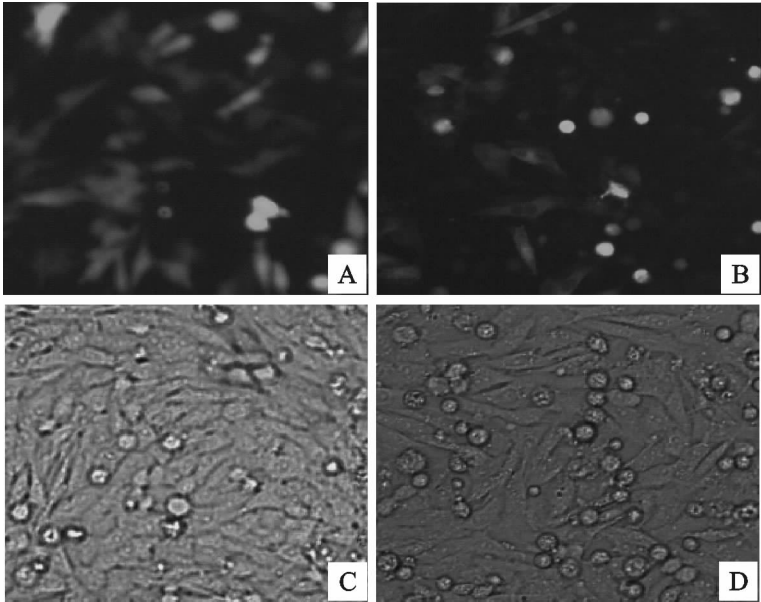


图 6 pEGFP-CCL17 和 pEGFP-C1 转染 SUVECs 60 h 后的荧光显微镜检测与细胞形态观察(×40)

A,B. 分别为转染 pEGFP-C1 和 pEGFP-CCL17 后 SUVECs 的荧光显微镜检测结果;
C,D. 分别为转染 pEGFP-C1 和 pEGFP-CCL17 的细胞形态检测结果

Fig. 6 Fluorescence and morphology of SUVECs transferred pEGFP-CCL17 and pEGFP-C1 at 60 h(×40)

A,B. Fluorescence of SUVECs transferred pEGFP-C1 and pEGFP-CCL17;C,D. Morphology of pEGFP-C1 and pEGFP-CCL17

2. 7 pEGFP-CCL17 在 SUVECs 中表达产物的
Western blot 检测

由图 7 可以看出,转染 pEGFP-CCL17 重组质粒

的 SUVECs 可检测出 pEGFP-CCL17 的表达,而转染
空载体 pEGFP-C1 和空白对照的 SUVECs 均未检测
到 CCL17 的表达,表明 pEGFP-CCL17 转染成功。

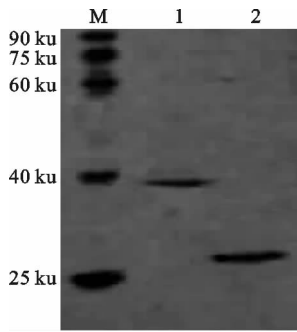


图 7 pEGFP-CCL17 表达产物的 Western blot 分析

M. 蛋白质标准;1. pEGFP-CCL17;2. 空载体 pEGFP-C1

Fig. 7 Western blot analysis of pEGFP-CCL17

M. Protein Marker;1. pEGFP-CCL17;2. pEGFP-C1

3 讨 论

所有趋化因子均含有 4 个半胱氨酸的保守基序,组成特征性的 2 个二硫键。CCL17 与其他 CC 亚族的趋化因子一样,在结构上其第 1、22 个半胱氨酸相连,在功能上能够趋化 T 细胞。CCL17 是第 1 个被认为对 Th2 细胞具有高度选择性趋化作用的因子。CCL17 具有特异性的受体 CCR4,是产生这种选择性趋化作用的分子基础;CCL17 与其他的 CC 亚族趋化因子不存在受体竞争关系,后者能与多种不同的受体结合,而 CCL17 却几乎只能与表达 CCR4 的细胞(少数为 CCR8/CXCR3 阳性细胞)起作用^[7],而 Th2 细胞为 CCR4 阳性细胞,Th1 细胞为 CCR4 阴性细胞,即 CCL17 趋化的 Th 细胞是 CCR4 阳性的 Th2 细胞。同样,CCL17 能对其他表达 CCR4 的细胞,如单核细胞、淋巴瘤细胞产生趋化作用。CCL17 在胸腺部位持续表达,主要的来源细胞是激活的单核细胞、树突状细胞。但身体其他多个部位如皮肤、黏膜、腺体上一些上皮来源的细胞也有其 mRNA 的表达,并能被这些细胞分泌到细胞外产生趋化作用。例如,支气管哮喘患者血清和痰液中 CCL17 升高,并发挥趋化作用,吸引 Th2 细胞向炎症部位移动,参与哮喘发作^[8]。另外,CCL17 因其趋化作用,还参与了其他过敏性疾病及一些皮肤病的发生和发展^[9]。以往研究表明,CCL17 的高亲和力受体 CCR4,选择性高表达于人类和小鼠的 Th2 细胞^[7],而 CCL17 在猪体内是否存在,是否能在细胞中表达并参与疾病发生尚未见报道。

综上所述,本试验通过对 CCL17 的序列分析,采用电子克隆的途径找到猪体内与 CCL17 基因同源性近似的基因序列,结合分子生物学技术,首次克隆出了猪的 CCL17 基因,该序列含一个完整开放阅

读框(ORF),大小为 309 bp,共编码 102 个氨基酸,测序结果与 NCBI 提供序列的 ORF 具有 100%的同源性。通过提取仔猪脾脏组织的总 RNA,设计简并引物,经 RT-PCR 成功地克隆了 CCL17 基因,并将其连接到 pMD19-T 载体上,经测序证实克隆的目的基因片段正确。将该目的基因分别重组到原核表达载体 pET-32a 和真核表达载体 pEGFP-C1 上,在原核表达 pET-CCL17 时,IPTG 不同剂量诱导结果没有明显差异,诱导温度及时间变化对诱导表达略有影响,28 ℃下的表达水平略高于 37 和 35 ℃,诱导 5 h 的表达水平略高于 4 和 3 h。IPTG 诱导表达后,经 SDS-PAGE 分析,结果在约 32 ku 处出现外源最后条带,表明重组基因 pET-CCL17 在宿主大肠杆菌 BL21(DE3)中得到了高效表达。同时,将构建的 CCL17 基因真核表达载体 pEGFP-CCL17 与 pEGFP-C1 成功转染入 SUVECs 中,并通过 Western blot 法证实导入的 CCL17 基因得到了表达。本研究结果为下一步研究猪 CCL17 的生物学功能及单克隆抗体的制备奠定了基础。

[参考文献]

[1] Sallusto F, Mackay C R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation [J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16: 724.

[2] Stein J V, Nombels-Arrieta C. Chemokine control of lymphocyte trafficking, a general overview [J]. Immunology, 2005, 116 (1): 1-12.

[3] Charo I F, Ransohoff R M. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation [J]. N Engl J Me, 2006, 354(6): 610-621.

[4] Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, et al. CC chemokine ligand 17 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by human gingival fibroblasts [J]. Periodontal Res, 2008, 43(4): 471-477.

[5] Wirnsberger G, Hebenstreit D, Posselt G, et al. IL-4 induces expression of TARC/CCL17 via two STAT6 binding sites [J]. Eur J Immunol, 2006, 36: 1882.

[6] Chae J I, Ju S K, Lee M K, et al. Cloning of rat TARC cDNA and analysis of tissue-specific mRNA expression [J]. Biol, 2008, 42(4): 639-644.

[7] Imai T, Nagira M, Takagi S, et al. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen presenting cells by the CC chemokines thymus and activation regulated chemokine and macrophage derived chemokine [J]. Int Immunol, 2003, 11: 81-88.

[8] Sekiya T, Yamada H, Yamaguchi M, et al. Increased levels of a TH2-type CC chemokine thymus and activation-regulated chemokine(CCL17) in serum and induced sputum of asthmatics [J]. Allergy, 2003, 57: 173-177.

[9] Kusumoto M, Xu B, Shi M, et al. Expression of chemokine receptor CCR4 and its ligands (CCL17 and CCL22) in murine contact hypersensitivity [J]. Interferon Cytokine Res, 2007, 27 (11): 901-910.