

人 RANTES 基因克隆及其体外表达

曾庆平* 杨瑞仪 冯丽玲 符林春

(广州中医药大学热带医学研究所 广州 510405)

关键词 RANTES 基因克隆 体外表达 艾滋病

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0349-03

1995年,Cocchi等^[1]发现 RANTES、MIP-1 α 和 MIP-1 β 等 β -趋化因子具有抗 HIV-1 感染活性。1997年,Feng等^[2]和 Deng等^[3]证实 β -趋化因子受体 CXCR4 和 CCR5 分别是 HIV-1 侵袭 T 淋巴细胞和巨噬细胞的辅助受体(co-receptor)。T 淋巴细胞嗜性(T-tropism)分离株被称为 X4 毒株,巨噬细胞嗜性(M-tropism)分离株则被称为 R5 毒株^[4]。RANTES 与 CCR5 有着高度的亲和力,二者的结合可对 HIV-1 的细胞附着产生空间位阻效应,并下调 CCR5 在细胞表面的表达。这一结果使 RANTES 抗 HIV-1 感染机制在分子水平上得到合理的解释。最近,Garzino-Demo等^[5]证明 β -趋化因子的诱导分泌与 HIV-1 感染后疾病进程的控制有着密切的关系,而且人群中 β -趋化因子水平存在着显著的个体差异,表明 β -趋化因子对艾滋病具有潜在的预防和治疗价值。为此,我们在克隆人 RANTES 基因的基础上,在体外转录与翻译系统中实现了该基因的表达,有利于今后进一步开展艾滋病的基因治疗。

1 材料与方 法

1.1 淋巴细胞分离与激活

预备盛有 3mL 生理盐水和肝素的试管,加入等体积正常人全血。在预先加有 2/3 体积淋巴细胞分离液的试管中,缓慢加入稀释血液,2 500r/min 离心 30min。汲取中层白细胞,用 PBS 洗 1 次,2 500r/min 离心 10min。在加有 10mL 1640 培养基(Gibco 公司)的培养瓶内移植细胞,再加入 10 μ g/mL PHA(Sigma 公司),于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 下培养 24h。

1.2 RNA 提取

离心收集培养细胞,PBS 洗涤,2 500r/min 离心 10min。加入 1mL RNA 提取液(中山医科大学达安公司),室温放置 5min,再加 0.2mL 氯仿,用力振荡,室温放置 3min,4 $^{\circ}$ C 下 11 000r/min 离心 15min,取上层水相,加入等体积异丙醇,混匀,室温静置 10min,4 $^{\circ}$ C 下 11 000r/min 离心 10min。用 1mL 75% 乙醇洗涤沉淀,4 $^{\circ}$ C 下 7 000r/min 离心 5min。除去乙醇,室温干燥 10min,加入 50 μ L 无核酸酶重蒸水溶解,-70 $^{\circ}$ C 保存

备用。

1.3 RT-PCR 扩增

据文献[6]设计 RANTES 基因扩增引物 Ran5(5' AT-GAAGGTCTCCGGGACGCCTC3')和 Ran3(5' CTAGCTCATCTC-CAAAGAGTTGAT3')由上海 Sangon 生物工程公司合成。采用 Roche 公司的 Titan One-tube RT-PCR System 进行 RT-PCR,先在 50 $^{\circ}$ C 逆转录 30min,然后按以下条件扩增 40 个循环:94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 1min,68 $^{\circ}$ C 2min。

1.4 重组质粒鉴定及序列测定

将 RT-PCR 产物直接与 pTarget 载体(Promega 公司)连接,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,涂板,蓝白斑筛选重组子。以 Qiagen 公司试剂盒提取质粒 DNA,用 *Eco*RI 酶切鉴定重组质粒,然后在 ABI Prism 310 DNA 测序仪上以 T7 启动子通用引物测序。

1.5 体外转录与翻译

用 Roche 公司的 Linked *in vitro* SP6/T7-Transcription/Translation Kit 进行体外转录与翻译。取重组质粒 5 μ L,与 5 μ L 4 \times T7 转录缓冲液和 10 μ L 无核酸酶重蒸水混合,30 $^{\circ}$ C 保温 15min。取 10 μ L 转录混合液,加入 38.4 μ L 翻译混合液和 1.6 μ L 非标记甲硫氨酸,混匀,30 $^{\circ}$ C 保温 1h。

1.6 免疫印迹杂交

取 2 μ L 体外表达产物点样于 BioBlotTM PVDF 膜(Amresco 公司)上,用马来酸稀释的 1% 封闭液于 37 $^{\circ}$ C 下保温 1h,轻微振荡,再用 1% 封闭液稀释的山羊抗 RANTES(C-19)多克隆抗体(Santa Cruz 公司)于 37 $^{\circ}$ C 下结合 1h。用 TBST(含 0.1% Tween 20 的 TBS)和 0.5% 封闭液分别洗膜 2 次,每次 10min,再用 1% 封闭液稀释的辣根过氧化物酶标记驴抗山羊 IgG 抗体(华美公司)于 37 $^{\circ}$ C 下结合 30min,最后用 TBST 洗 4 次,每次 15min。

1.7 化学发光测定

按 Roche 公司 Chemiluminescence Western blotting Kit(鼠/羊)说明书操作。在暗室内,将 TBST 浸润的膜转入塑料袋

中,加入 1mL 显色液,封口,反应 1min。将塑料袋连同膜一起置于胶片夹(Kodak X-ray Exposure Holder)内,其上放入同样大小的 X-Omat Blue XB-1 胶片(Kodak 公司),锁定胶片夹,曝光 1~5min,显影、定影后观察结果。

2 结果与讨论

2.1 RANTES 基因的扩增、克隆和鉴定

按引物内侧序列预计,RANTES 基因的理论长度应为 276bp。人外周血淋巴细胞 RNA 经 RT-PCR 扩增后,检测到 300bp 左右的电泳区带,推测是由 RANTES mRNA 经逆转录产生的 cDNA 的扩增产物。

将扩增产物与 pTarget 载体连接获得的重组质粒 pT-RAN 用插入位点两翼各有一个切点的 *EcoRI* 酶切,可见一条载体大片段和一条 300~400bp 的小片段。该片段中除包含 RANTES 基因外,尚有 68bp 的载体片段,其实际大小应为 344bp。

2.2 RANTES 基因的序列分析

RANTES 基因的测序结果表明,它是一个含有起始密码(ATG)和终止密码(TAG)的完整开读框(ORF),共编码 91 个氨基酸残基,其中包括 23 个氨基酸组成的信号肽和 68 个氨基酸组成的成熟蛋白。该序列已由 GenBank 收录,注册号为 AF266753。

根据美国生物技术资讯中心(NCBI)数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)的检索结果,本研究测得的 RANTES 基因的成熟蛋白编码区与所有已发表的序列完全相同,但信号肽编码区则略有差异(表 1)。

表 1 RANTES 信号肽的氨基酸序列同源性比较

Table 1 Homology comparison of signal peptide region of RANTES

Signal peptide	Accession Number	Submission data	Author
MKVSAAARLAVILIATALCAPASA	M21121	03-AUG-1993	Schall <i>et al.</i>
MKVSAAALAVILIATALCAPASA	AF043341	21-FEB-1998	Jang <i>et al.</i>
MKVSAAALAVILIATALCAPASA	AF088219	11-JAN-2000	Nomiyama <i>et al.</i>
MKVSAAARLAVILVITALCAPASA	AF266753	31-MAY-2000	Zeng <i>et al.</i>
MKVSAAARLAVILIATALCAPASA	NML_002985	31-OCT-2000	Nomiyama <i>et al.</i>

人 CC 类趋化因子种类繁多,而且多以基因簇的形式串联存在于染色体上^[7]。我们测得的 RANTES 信号肽第 7 位氨基酸为 R(由 CGC 编码),这与 Schall 等(1993)及 Nomiyama 等(2000b)的结果相同,但与 Jang 等(1998)及 Nomiyama 等(2000a)测得的 A(由 GCC 编码)不同;其次,我们测得的 RANTES 信号肽第 14 位氨基酸为 V(由 GTT 编码),这与其他作者测得的 A(由 GCT 编码)均不同,推测可能是由 GCT 突变为 GTT(基因飘移)而产生的单核苷酸多态性(SNP)。

2.3 RANTES 基因的体外表达

将不同稀释度的体外表达产物用不同滴度的一抗(山羊抗 RANTES 抗体)结合后,经酶联二抗(驴抗山羊 IgG)结合及化学发光检测,结果如图 1 所示。

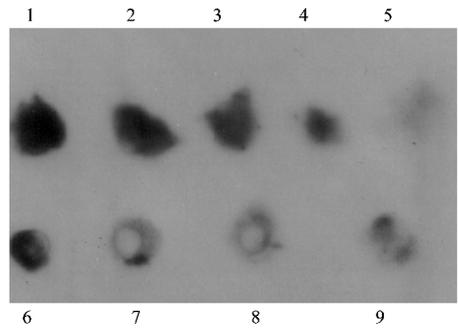


图 1 RANTES 的化学发光酶联免疫斑点印迹测定

Fig. 1 Chemiluminescence-mediated immunodot blotting assay of RANTES. Dilution of RANTES: 1. $1 \times$, 2. $10 \times$, 3. $100 \times$, 4. $1000 \times$, 5. Blank; 6~9. $1 \times$ (9. denatured by SDS); Titer of antibody to RANTES: 1~6 ρ , 1:100, 7. 1:1000, 8. 1:10 000

由上图可见,除对照为阴性外,其它曝光斑均清晰可辨,表明 RANTES 基因已成功实现体外表达。抗原浓度对杂交信号的强度影响似乎较小,如 1000 倍稀释液(见图中 4)与原液(见图中 1)的信号强度基本接近。相反,一抗的滴度则能显著影响检测结果,如 1:100(见图中 1~4,6)的信号强于 1:1000(见图中 7)和 1:10 000(见图中 8)。另外,用 SDS 处理样品后可使信号减弱(见图中 9),可导致 SDS-PAGE 检测呈现阴性。

人 RANTES 基因克隆与表达的成功是今后进一步开展艾滋病基因治疗的重要的前提条件,在此基础上,也可望利用原核表达系统制备抗 HIV-1 感染的基因工程药物,为配合艾滋病的高效抗逆转录病毒治疗(HAART)发挥应有的作用。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Cocchi F, DeVico A L, Garzino-Demo A *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. *Science*, 1995, **270**: 1811~1815
- [2] Feng Y, Broder C C, Kennedy P *et al.* HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 1996, **272**: 872~877
- [3] Deng H K, Liu R, Ellmeier W *et al.* Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 1996, **381**: 661~666
- [4] Berger E A, Doms R W, Fenyo E M *et al.* A new classification for HIV-1. *Nature*, 1998, **391**: 240
- [5] Garzino-Demo A, Moss R B, Margolick J B *et al.* Spontaneous and antigen-induced production of HIV-inhibitory chemokines are associated with AIDS-free status. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 11986~11991
- [6] Schall T J, Jongstra J, Dyer B J *et al.* A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *J Immunol*, 1988, **141**: 1018~1025
- [7] Homiyama H, Fukuda S, Iio M. Organization of the chemokine gene cluster on human chromosome 17q11.2 containing the genes for CC chemokine MIP-1, HCC-2, HCC-1, LEC, and RANTES. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, **19**: 227~234

Cloning Sequencing and *in vitro* Expression of Human RANTES Gene

ZENG Qing-Ping* YANG Rui-Yi FENG Li-Ling FU Lin-Chun

(Tropical Medicine Institute ,Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine ,Guangzhou 510405 ,China)

Abstract An expected 276bp fragment of the gene precursor encoding the signal peptide and mature protein of human β -chemokine RANTES was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) from RNA of PHA-activated human peripheral blood lymphocytes. This putative interested gene was inserted directly into a T-vector and the ligation was confirmed by restriction enzyme digestion. The sequence data of the cloned fragment showed that it was almost identical with published sequences of RANTES gene ,except for only one nucleotide substitution within the signal peptide region. The *in vitro* expressed recombinant RANTES protein was detected by the chemiluminescence enzyme-linked immune Dot blotting assay after combining the recombinant plasmid with the *in vitro* SP6/T7 transcription and translation system. The successful cloning and expression of RANTES gene should shed light on future's gene therapy of AIDS.

Key words RANTES , gene cloning , *in vitro* expression ,AIDS

Received :November 15 , 2000

This work was supported by NSFC(39870725) and NSFGD(980642).

* Corresponding author. Tel 86-20-86550606 ~ 6 ; Fax 86-20-86373516 ; E-mail :qzeng@usa.net