

人类新细胞因子 CKLFSF2 羧基端蛋白在大肠杆菌中的表达纯化、抗体制备与鉴定*

钟英成 石爽 张颖妹 莫晓宁 刘大振 宋泉声 韩文玲 王应**

(北京大学人类疾病基因研究中心, 北京大学医学部基础医学院免疫学系, 北京 100083)

摘要 哺乳动物细胞表达的人类新细胞因子——趋化素样因子超家族成员-2 (CKLFSF2)存在分泌形式, 位于 CKLFSF2 分子的羧基端, 具有细胞趋化作用. 为进一步研究 CKLFSF2 羧基端蛋白的结构和生物学功能及抗体制备, 构建了 GST-CKLFSF2 C51原核表达质粒, 经原核表达、亲和层析、凝胶过滤, 获得 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白和 CKLFSF2 羧基端蛋白 (CKLFSF2 C51), 纯度可达到 95%以上. GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白用于制备多克隆抗体, ELISA 方法检测抗体效价阳性, 蛋白质印迹检测 CKLFSF2 哺乳动物细胞超表达细胞裂解液, 获得特异性条带与预期大小一致. CKLFSF2 C51 经 N 端测序, 质谱鉴定与预期结果一致, 该蛋白质具有对 PC-3 细胞趋化的活性, 并且该活性可被制备的多克隆抗体中和. 上述结果表明, 原核 CKLFSF2 羧基端蛋白具有与 CKLFSF2 真核表达蛋白类似的细胞趋化活性, 原核 CKLFSF2 羧基端蛋白制备的多克隆抗体可用于免疫组织化学、蛋白质印迹检测, 并能中和 CKLFSF2 蛋白的趋化活性作用.

关键词 趋化素样因子超家族成员-2, 重组蛋白纯化, 多克隆抗体, 趋化, 免疫组织化学, 抗体中和作用

学科分类号 Q718

趋化素样因子超家族 (*chemokine-like factor superfamily*, *CKLFSF*) 是新近克隆的一个新基因超家族^[1], 在人类包括趋化素样因子 (*chemokine-like factor*, *CKLF*) 和趋化素样因子超家族成员 1~8 (*chemokine-like factor super family member 1~8*, *CKLFSF1~8*) 共 9 个基因, 其中, *CKLF* 与 *CKLFSF1*、*CKLFSF2* 基因在 16 号染色体上紧密连锁, *CKLF* 与 *CKLFSF1*、*CKLFSF2* 编码的蛋白质序列具有一定的同源性.

CKLF 有 4 种剪切形式: *CKLF1*, *CKLF2*, *CKLF3*, *CKLF4*. *CKLF1* 具有趋化因子 CC 基序及部分结构和功能特点, 对白细胞具有广谱的趋化效应^[2], 并且已经证明 *CCR4* 是一个 *CKLF1* 作用的受体^[3].

前面的研究工作已经证实, *CKLFSF2* 存在分泌形式, 这个分泌形式位于 *CKLFSF2* 分子的 C 端^[4]. *CKLFSF2* 真核表达质粒 COS-7 细胞转染上清对 PC-3, U937, TM4 细胞系和小鼠脾细胞具有趋化作用(数据未发表), 提示 *CKLFSF2* 的分泌形式是一具有趋化活性的细胞因子. 说明 *CKLFSF2* 与

它同家族成员 *CKLF1*, 不仅于 16 号染色体上紧密连锁, 氨基酸序列有一定同源性, 而且功能也有相似之处.

为了进一步研究 *CKLFSF2* 功能及制备 *CKLFSF2* 抗体, 我们构建了 *CKLFSF2* 原核表达质粒. 与该家族的绝大多数成员相似, *CKLFSF2* 具有潜在的 4 次跨膜结构, 疏水性强, 其完整蛋白难以利用原核表达系统表达. 利用 DNASTAR 软件对 *CKLFSF2* 亲水性和抗原性进行了分析, 表明仅在 *CKLFSF2* 两端具有较强的亲水性和抗原性. 在这个研究工作中, 我们构建了 pGEX-4T-3 *CKLFSF2* C51 原核表达质粒, 在大肠杆菌中进行了诱导表达, 并对原核表达的蛋白质进行了纯化、鉴定、抗体制备和生物活性检测, 首次证明, *CKLFSF2* C 端 51 个氨基酸的原核表达蛋白具有与 *CKLFSF2*

*国家自然科学基金资助项目(30271203).

** 通讯联系人. Tel: 010-82802846-5032, Fax: 010-82801149

E-mail: yw@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2006-06-22, 接受日期: 2006-07-29

真核表达蛋白类似的生物学活性, 原核 CKLFSF2 羧基端蛋白制备的多克隆抗体可用于免疫组织化学、蛋白质印迹检测, 并能中和 CKLFSF2 蛋白的趋化活性作用.

1 材料和方法

1.1 材料

质粒、菌株和细胞系: 原核表达质粒 pGEX-4T-3 购自 Amersham-Pharmacia Biotech 公司; 大肠杆菌 BL21 由本室保存, Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱料为 Amersham-Pharmacia Biotech 公司产品. 细胞系: PC-3, 前列腺癌来源, 由本室传代培养.

1.2 方法

1.2.1 pGEX-4T-3-CKLFSF2 C51 的构建.

a. pGEM-Teasy-CKLFSF2 C51 的构建和测序. 以 pcDNA3.1B-CKLFSF2^[4] 为模板, 扩增 CKLFSF2 C51 基因片段, 并引入 *EcoR* I 酶切位点, 上游引物为 GGAATTCCTTCAAAGAAACCACTTCAG-AGGC, 下游引物为 GCGAATTCTATTTCTTT-CCCTTGCTGGCC. 扩增条件: 4°C 5 min; 94°C 15 s, 59°C 15 s, 72°C 30 s, 25 个循环; 72°C 7 min. 回收 CKLFSF2 C51 PCR 产物, 克隆入 pGEM-Teasy, 使用 ABI PRISM 3100 Sequencer 遗传分析仪进行 DNA 序列测定.

b. 表达质粒 pGEX-4T-3-CKLFSF2 C51 的构建. 将测序正确的 pGEM-Teasy-CKLFSF2 C51 质粒, 用 *EcoR* I 酶切, 释放出 CKLFSF2 C51 片段, 连接到 *EcoR* I 处理的 pGEX-4T-3 载体上. 连接产物转化大肠杆菌 JM105, PCR 筛选正确插入克隆, 限制性内切酶鉴定正确后, 提取质粒命名为 pGEX-4T-3-CKLFSF2 C51.

1.2.2 重组 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白的诱导表达纯化.

a. 重组 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白的诱导表达. 转化 pGEX-4T-3-CKLFSF2 C51 质粒至表达菌株 *E. coli*. BL21, 用 PCR 方法挑选阳性克隆. 挑取单菌落, 于 3 ml 含氨苄青霉素(100 mg/L)的 LB 培养基中于 37°C 250 r/min 条件下培养过夜. 按 1% 的比例接种于 100 ml LB (Amp⁺) 中, 于 37°C 250 r/min 条件下, 振荡培养, 至 $A_{600} \approx 1.5$, 加入终浓度为 100 μ mol/L 的 IPTG 30°C 诱导表达 1 h, 终止培养.

b. 重组 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白的纯化.

以 6 000 r/min, 15 min 离心收集诱导菌, 每 1 L 诱导菌重悬于 50 ~ 100 ml PBS (10 mmol/L PB pH 7.4, 0.14 mol/L NaCl), 含 5 mmol/L 的 DTT. 在冰浴条件下超声破菌, 收集超声后的液体, 混匀, 20 000 r/min (Beckman JA25.50) 4°C 离心 20 min, 收取上清, 保存在 4°C. 用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱料(已溶胀)在 4°C 进行蛋白质的纯化. 用冷 PBS 进行预平衡, 上柱流速为 5 ml/min, 上柱后用冷 PBS 洗至 A_{280} 到基线水平. 然后用 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0 (含 10 mmol/L 的还原型谷胱甘肽) 进行洗脱. 对洗脱蛋白用 BCA (Pierce 公司产品) 方法进行蛋白质定量. 取部分样品进行 SDS-PAGE 分析.

c. 重组 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白的凝血酶切割. 将所需要的凝血酶 (10 U/mg) 加至已纯化的融合蛋白液体中, 在 27°C 条件下凝血酶切 2 h. 将酶切产物装入截留分子质量为 8 000 的透析袋中, 在 400 ml PBS (10 mmol/L PB pH 7.4, 0.14 mol/L NaCl), 4°C 条件下透析 3 h, 共 2 次. 吸取透析好的融合蛋白酶切产物, 重新吸附于 1 ml Glutathione Sepharose TM 4B 亲和层析柱料 (每毫升柱料大致可以吸附 10 mg 蛋白质), 收集融合蛋白酶切产物.

d. CKLFSF2 C51 蛋白 Sephacryl S-200 凝胶过滤. 用截留分子质量 6 000 的超滤装置浓缩蛋白质浓度至 2~3 g/L, 再用 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱分离目的蛋白, 纯化蛋白质用 BCA (Pierce 公司产品) 方法进行定量.

1.2.3 重组 CKLFSF2 C51 蛋白的鉴定.

a. 氨基酸 N 端序列测定. 使用 Applied Biosystem 491 PROCISE 蛋白质序列分析仪, 采用 Edman 降解法测定氨基酸 N 端序列.

b. 质谱测定分子质量.

使用 AXIMA-CFRTM plus MALDI-TOF 质谱仪测定分子质量.

1.2.4 抗 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白抗体的制备. 弗式完全佐剂 (FCA) 完全乳化的 500 μ g GST-CKLFSF2 C51 (1:1) 1 ml, 初次免疫新西兰白兔, 间隔 2~3 天第 2 次免疫, 间隔 7~10 天, 从耳缘静脉采血, 以 ELISA 方法检测血清效价, 每隔 2~3 周加强免疫, 5 次免疫至效价达到要求后放血. 分离血清经 GST 吸收后, HiTrapTM ProteinG 亲和层析, 将纯化抗体保存于 0.01 mol/L PBS 中.

1.2.5 抗 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白抗体的鉴定.

a. ELISA 方法检测血清效价. 将 CKLFSF2 C51

用碳酸盐缓冲液稀释至 1 mg/L, 按照 100 μ l/ 孔的量包被 NUNC 96 孔酶标板, 4 $^{\circ}$ C 过夜包被; 用 PBS-T (10 mmol/L PB, 140 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4) 洗涤 3 次, 然后按照 200 μ l/ 孔的量加入封闭液 (3% BSA + PBS); 用 PBS-T 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μ l 倍比的免疫血清 (0.1% BSA + PBS 稀释), 正常兔血清作为阴性对照, 每个样品设 3 个复孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 用 PBS-T 洗涤 3 次, 每孔均加入 100 μ l 用含 0.1% BSA PBS 稀释的二抗 (Anti-Goat-monoantibody-HRP 1 : 4 000 稀释, Sigma 公司), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时; 用 PBS-T 洗涤 3 次, 加入 50 μ l OPD 显色液, 室温避光显色 10~15 min, 用 25 μ l 2 mol/L 的硫酸终止反应; 在 490 nm 波长下用 EL-311SX ELISA Reader 读数。

b. 蛋白质印迹鉴定抗体的特异性. 将重组 CKLFSF2 C51 蛋白进行 SDS-PAGE, 电泳后用半干式转移槽将胶上的蛋白质转移到硝酸纤维膜上, 随后做免疫反应. 首先用 3% (体积分数) 的牛血清白蛋白封闭 1 h, 再用 PBS 洗 2 次, 接着加一抗, 室温作用 2 h, 用含 0.2% Tween 20 的 PBS 洗 2 次, 加酶标二抗 (碱磷酶标记的抗小鼠 IgG 抗体), 室温作用 2 h, 再用含 0.2% Tween 20 的 PBS 洗 5 次, 最后加底物显色。

c. 组织免疫组化检测. 将组织石蜡切片置于二甲苯中脱蜡 20 min; 脱二甲苯, 分别于 100%、90% 乙醇中浸泡脱二甲苯 5 s (2 次); PBS 洗后, 组织切片用 3% 的 H₂O₂ 室温下孵育 5~10 min, 0.01 mol/L 的 PBS 浸泡 5 min, 切片放入抗原修复液中, 加热 15 min (保持温度在 92~98 $^{\circ}$ C 之间), 室温下冷却 20~30 min, PBS 平衡后, 用 10% 的正常羊血清室温封闭 20 min, 弃去羊血清, 加 1 : 100 稀释抗 CKLFSF2 C51 抗体, 37 $^{\circ}$ C 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 二抗羊抗兔抗体 (1 : 200 稀释), 37 $^{\circ}$ C 1 h, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min, 加 DAB 显色, 苏木精复染, 封片, 显微镜观察结果。

1.2.6 重组 CKLFSF2 C51 蛋白趋化活性及抗体中和活性测定.

PC-3 细胞趋化活性检测^[5,6]: 采用 Boyden 小室法进行趋化性迁移实验 (chemotaxis assay), 用 0.1% BSA/RPMI 1640 将待测样品稀释成不同浓度, 加于 48 孔趋化小室的下层孔中, 每孔 27 μ l, 每个样品设 3 个复孔. 收获对数生长期的 PC-3 细胞, 用 0.1% BSA/RPMI 1640 洗细胞 2 遍, 调整细胞密度

至 5×10^5 /ml, 加于上层孔中, 每孔加 50 μ l. 两层之间用 10 μ m 孔径的聚炭膜隔开 (polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate filter), 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱孵育 4 h 后, 收膜, 甲醇固定, Giemsa 染液染色. 在高倍镜下, 随机选取 5 个视野, 计数细胞, 取平均值, 实验组趋化细胞数与对照组趋化的细胞数的比值即为趋化指数, 趋化作用用趋化指数来表示, 所谓的趋化指数是: 实验组迁移的细胞数与对照组非特异迁移细胞数的比值, 一般来说, 趋化指数大于 2 有意义。

2 结 果

2.1 pGEX-4T-3CKLFSF2 C51 质粒鉴定

pGEX-4T-3CKLFSF2 C51 质粒 DNA 测序结果表明, 所获克隆序列与理论序列完全一致 (图 1)。

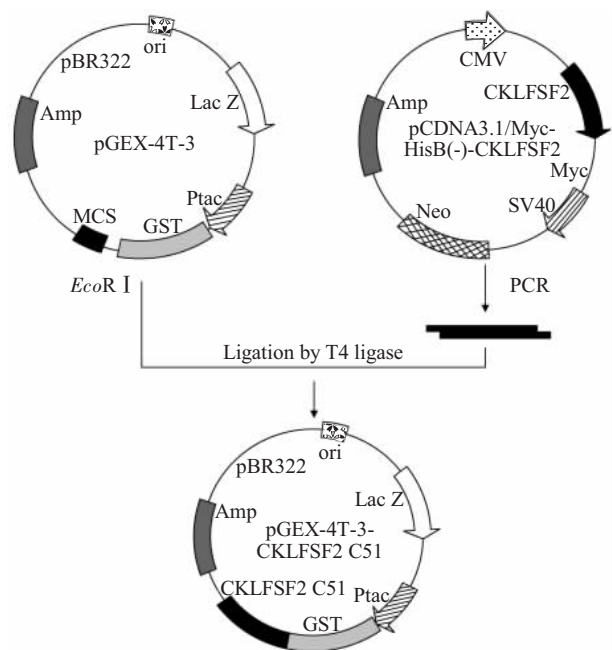


Fig. 1 pGEX-4T-3CKLFSF2 C51 plasmid map

2.2 蛋白质电泳鉴定

SDS-PAGE 分析发现, GST-CKLFSF2 C51 转化的大肠杆菌 BL21 诱导表达后, 在分子质量为 32 ku 处有一明显表达带, 经凝胶成相分析仪分析, 其表达量可达 25%, 蛋白质大小与预期的分子质量大小是一致的. 经 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析, 凝血酶切割和 Sephacryl S-200 凝胶过滤柱纯化后可获得纯化的蛋白质, 其纯度可达到 95% 以上 (图 2)。

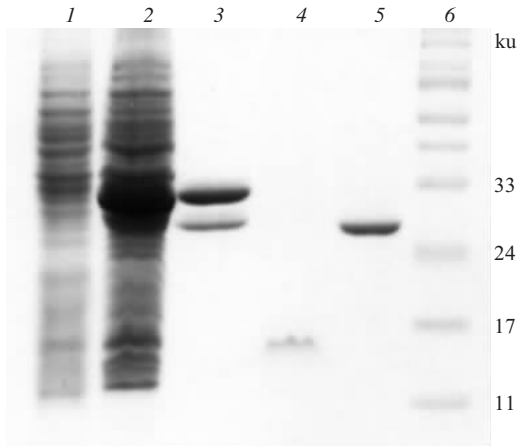


Fig. 2 SDS-PAGE electrophoresis analysis protein

1: Uninduced; 2: Induced; 3: Purified GST-CKLFSF2 C51; 4: Purified CKLFSF2 C51; 5: GST; 6: Molecular mass marker (SM Biotech).

2.3 氨基酸 N 端序列测定

GST-CKLFSF2 C51 蛋白 N 端测序 13 个氨基酸为 GSPNSLQRNHFRG, 与预期序列一致。

2.4 质谱测定分子质量

经质谱检测 CKLFSF2 C51 相对分子质量为 5871.48, 相对理论分子质量为 5908.86 (图 3)。

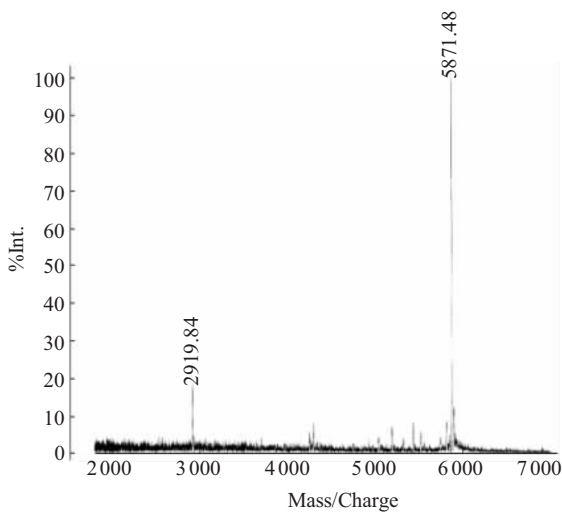


Fig. 3 AXIMA-CFR™ plus MALDI-TOF measuring the molecular mass of CKLFSF2 C51

2.5 兔抗 GST-CKLFSF2 C51 多克隆抗体的鉴定

利用纯化的 GST-CKLFSF2 C51 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体, 我们分别用 ELISA 法和蛋白质印迹检测抗体效价、鉴定抗体特异性。

2.5.1 抗体效价测定. 用纯化后的融合蛋白免疫家兔, 获得抗血清, 以常规间接 ELISA 法测定抗体

的效价. 该抗血清的效价为阳性。

2.5.2 抗体特异性鉴定. 为了进一步确定所制备的多克隆抗体的特异性, 以转染 pcDNA3.1B-CKLFSF2 和 pcDNA3.1B-CKLFSF2/Myc-His6 的 293T 细胞裂解液为抗原进行蛋白质印迹检测, 结果可以形成反应条带, 而转染 pcDNA3.1B 载体的 293T 细胞裂解液则不与 CKLFSF2 多克隆抗体反应, 抗 Myc 抗体与 CKLFSF2/ Myc-His6 融合蛋白的反应条带作为阳性对照, CKLFSF2 多克隆抗体与 CKLFSF2/ Myc-His6 融合蛋白的反应条带与阳性对照在同一位置. 提示所制备的抗体可以与真核细胞表达的 CKLFSF2 蛋白和 CKLFSF2/ Myc-His6 融合蛋白发生特异性反应 (图 4)。



Fig. 4 Identification of anti-CKLFSF2 antibody by Western blot

(a) Probed with anti-CKLFSF2 antibody. 1: Control pcDNA3.1 transfectants; 2: pcDNA3.1-CKLFSF 2 transfectants; 3: pcDNA3.1-CKLFSF 2/Myc-His6 transfectants. (b) Probed with anti-Myc antibody. 1: pcDNA3.1-CKLFSF 2/Myc-His6 transfectants; 2: Control, pcDNA3.1 transfectants.

2.6 正常前列腺组织免疫组织化学结果

生物信息学及组织表达谱分析均提示, CKLFSF2 在睾丸组织中高表达^[4], 生物信息学分析及 RT-PCR 结果(数据未发表)也提示 CKLFSF2 在前列腺组织中高表达. 因此, 我们利用免疫组织化学的方法, 检测了 CKLFSF2 在前列腺组织中的表达情况. 图 5 可见, 前列腺腺体组织柱状分泌细胞表达较高的 CKLFSF2, 主要分布于胞浆。

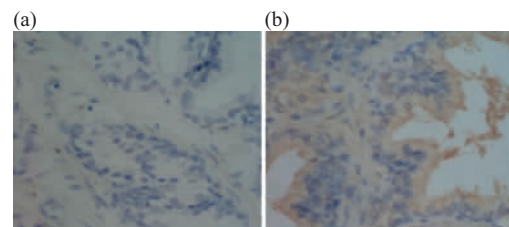


Fig. 5 Analysis of CKLFSF2 protein expression in human prostate tissue by immunohistochemistry

Sections of human prostate tissue were immunohistochemically stained with normal rabbit IgG as control (a) and with polyclonal antibodies specific to CKLFSF2 (b).

2.7 体外趋化活性及抗体中和活性检测

2.7.1 纯化的重组 CKLFSF2 C51 蛋白的趋化活性. 纯化的重组 CKLFSF2 C51 蛋白对 PC-3 细胞, 具有明显的趋化活性(图 6), 剂量依赖, 呈趋化因子特有的哑铃型分布.

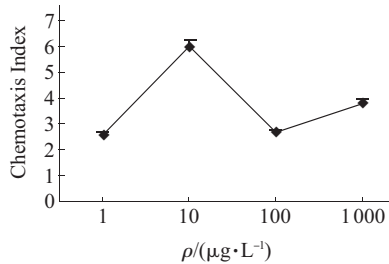


Fig. 6 Chemotaxis on PC-3 cells by CKLFSF2 C51

2.7.2 兔抗 GST-CKLFSF2 C51 多克隆抗体具有中和 CKLFSF2 C51 蛋白趋化活性的作用. pcDNA3.1-CKLFSF2 转染细胞后, 在转染细胞上清中存在 CKLFSF2 蛋白分泌形式, 这个分泌形式位于 CKLFSF2 分子的 C 端^[4]. CKLFSF2 真核表达质粒 HEK293T 细胞转染上清对 PC-3 细胞具有趋化作

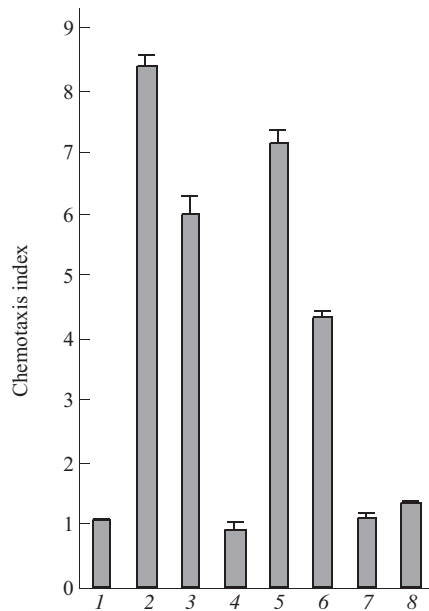


Fig. 7 Anti-CKLFSF2 C51 polyantibody neutralises the chemotactic effects of recombinant CKLFSF2 C51 protein in PC-3 cells

1: Control, 0.1% BSA/RPMI 1640; 2: EGF, 10 ng; 3: CKLFSF2 C51, 10 ng; 4: CKLFSF2 C51 + CKLFSF2 C51 Ab, CKLFSF2 C51 10 ng + CKLFSF2 C51Ab 10 mg/L; 5: CKLFSF2 C51 + control Ab, CKLFSF2 C51 10 ng + control Ab 10 mg/L; 6: Control supernatant of pcDNA3.1-CKLFSF2 transfectants, dilution 1 : 10; 7: Control supernatant of pcDNA3.1 transfectants, dilution 1 : 10; 8: Boiled CKLFSF2 C51 (endotoxin control), 10 ng.

用. CKLFSF2 C51 蛋白有着与 CKLFSF2 真核表达蛋白相似的趋化活性. 兔抗 GST-CKLFSF2 C51 多克隆抗体具有中和 CKLFSF2 C51 蛋白趋化活性的作用(图 7).

3 讨 论

CKLFSF2 为我室发现和克隆的趋化素样因子超家族成员^[1], CKLFSF2 编码基因定位在人 16 号染色体 16q22, 全长 cDNA 为 747 个碱基组成, 有一个编码 248 个氨基酸的完整开放阅读框架, 富含碱性氨基酸和脯氨酸. 生物信息学分析, CKLFSF2 含有多个磷酸化位点, 2 个 SH3 结合区, 1 个 PI (4,5) P2 结合位点, 1 个 caveolin 结合位点和 2 个雄激素受体结合位点. RT-PCR 组织表达谱分析 CKLFSF2 高水平表达在睾丸, 其次在骨髓、外周血白细胞、前列腺、胰腺组织也有较高水平的表达. 细胞定位研究, CKLFSF2 定位于胞浆, 并存在分泌形式, 这个分泌形式位于 CKLFSF2 分子的 C 端^[1,4]. CKLFSF2 真核表达质粒 COS-7 细胞转染上清对 PC-3, U937, TM4 细胞系和小鼠脾细胞具有趋化作用(数据未发表), 提示 CKLFSF2 可能是与免疫系统、造血系统和生殖系统相关的一类新型细胞因子.

由于真核表达的 CKLFSF2 表达量低, 无法获得足量的重组蛋白进行深入研究, 为此我们制备 CKLFSF2 的原核表达蛋白, 利用 ProtScale 软件分析亲疏水性, 结果表明, CKLFSF2 具有潜在的 4 次跨膜结构, 疏水性强. 疏水性强的蛋白质较难用原核细胞表达完整蛋白, 因而我们试图在大肠杆菌表达全长 CKLFSF2 重组蛋白未能成功. 所以我们进一步根据氨基酸序列进行抗原性预测, 以选择抗原性强的部分表达蛋白片段, 利用 DNASTAR 软件分析亲水性和抗原性, CKLFSF2 氨基端 (1~95 氨基酸) 和羧基端 (198~248 氨基酸) 抗原性较强, 利用亲水性和抗原性好的 C 端, 我们构建了 CKLFSF2 C51 原核表达质粒 pGEX-4T-3-CKLFSF2 C51. 使用 ABI PRISM 3100 Sequencer 遗传分析仪对该质粒进行 DNA 序列测定, 结果与预期完全一致.

用原核表达载体在大肠杆菌 BL21 中可高效表达 GST-CKLFSF2 C51, 其表达产物以可溶的形式表达于细菌内. 经超声裂解, GST 亲和层析, 凝血酶切割和 S-200 凝胶过滤层析, 得到了纯度大于 95% 的 CKLFSF2 C51 原核蛋白. 确定了纯化

CKLFSF2 C51 原核蛋白比较简单的两步层析技术步骤, 即第一步亲和层析, 第二步凝胶过滤层析. 为 CKLFSF2 今后的研究工作打下了良好的基础.

对于 CKLFSF2 C51 原核蛋白蛋白质水平的鉴定, 我们进行了氨基酸 N 端测序, 分子质量质谱鉴定, 结果表明, 在蛋白质水平上与理论完全一致. 氨基酸 N 端测定了 13 个氨基酸, 结果与预期完全一致. 在对该蛋白质进行纯化过程中, SDS-PAGE 测定 CKLFSF2 C51 原核蛋白分子质量约在 15 ku 左右, 而 CKLFSF2 C51 原核蛋白相对理论分子质量为 5908.86, 二者相差比较多, 为此使用 AXIMA-CFR™plus MALDI-TOF 质谱仪测定该蛋白质的分子质量, 经质谱检测 CKLFSF2 C51 相对分子质量为 5871.48, 与理论值基本一致.

为了进一步的功能研究, 我们用纯化的 GST-CKLFSFC51 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体, 分别用 ELISA 法和蛋白质印迹, 检测抗体效价, 鉴定抗体的特异性. ELISA 法测定抗体的效价为 1 : 10 000. 蛋白质印迹鉴定结果显示, 所制备的抗 CKLFSFC51 抗体可以与真核细胞表达的 CKLFSF2 蛋白和 CKLFSF2/ Myc-His6 融合蛋白发生特异性反应. 上述两个实验证实 CKLFSF2 抗体效价高, 特异性好, 可以用于检测和功能研究.

生物信息学分析及 RT-PCR 结果(数据未发表)提示, CKLFSF2 在前列腺组织中高表达. 因此, 我们利用免疫组织化学的方法, 检测了 CKLFSF2 在前列腺组织中的表达情况, 发现前列腺腺体组织柱状分泌细胞表达较高的 CKLFSF2, 主要分布于胞浆. 在研究 CKLFSF2 体内活性时, 我们发现将 CKLFSF2 真核质粒注射小鼠后, 发现小鼠睾丸组织生精小管内生精细胞增多(数据未发表). 体外 CKLFSF2 功能研究发现, CKLFSF2 具有上调雄激素受体转录功能(文章正在准备), 因此我们推断, 在前列腺组织中, CKLFSF2 可能在保持前列腺功能和内环境稳定中具有重要作用.

真核 CKLFSF2 质粒转染的细胞培养上清中, 存在着 CKLFSF2 分泌形式. 在研究 CKLFSF2 趋化活性时发现, 真核 CKLFSF2 质粒转染的细胞培养上清对 PC-3, U937, TM4 细胞系和小鼠脾细胞具有趋化活性. 为了验证原核蛋白 CKLFSF2 C51 是否也具有真核 CKLFSF2 的趋化活性, 我们选用了 PC-3 细胞系检测 CKLFSF2 C51 原核蛋白趋化活性. 从对 PC-3 细胞趋化实验结果看, 原核蛋白

CKLFSF2 C51 对 PC-3 细胞有明显的趋化作用, 表明重组 CKLFSF2 C51 蛋白具有与真核 CKLFSF2 可溶形式相似的趋化活性, 也表明真核 CKLFSF2 可溶形式相似的趋化活性功能区可能位于 CKLFSF2 C 端 51 个氨基酸的序列中.

我们还进一步做了抗 GST-CKLFSF2 C51 多克隆抗体对 CKLFSF2 C51 趋化 PC-3 细胞的活性具有中和作用的实验. 从实验结果看, 在有抗 GST-CKLFSF2 C51 多克隆抗体存在条件下, CKLFSF2 C51 对 PC-3 细胞趋化活性明显下降, 而在对照无关抗体存在条件下, CKLFSF2 C51 对 PC-3 细胞趋化活性则不受影响, 这个结果提示抗 GST-CKLFSF2 C51 多克隆抗体具有中和 CKLFSF2 趋化活性的作用.

综上所述, 我们在这部份研究工作中, 成功地将原核表达纯化了 CKLFSF2 羧基端蛋白, 制备了 CKLFSF2 羧基端蛋白的多克隆抗体, 并首次发现, 原核 CKLFSF2 羧基端 C51 蛋白与真核 CKLFSF2 分泌形式一样, 具有明显的细胞趋化活性. 原核 CKLFSF2 羧基端蛋白制备的多克隆抗体可用于免疫组织化学、蛋白质印迹检测, 并能中和 CKLFSF2 蛋白的趋化活性作用, 为进一步研究 CKLFSF2 趋化功能受体及机制、在前列腺中的功能及前列腺癌转移中的作用及其他生物活性打下了基础.

致谢 感谢北京大学人类疾病基因研究中心、北京大学医学部基础医学院免疫学系的马大龙教授对本论文的修改和指导.

参 考 文 献

- 1 Han W L, Ding P G, Xu M X, *et al.* Identification of eight genes encoding chemokine-like factor superfamily members 1-8 (CKLFSF1-8) by in silico cloning and experimental validation. *Genomics*, 2003, **81** (6): 609~617
- 2 Han W L, Lou Y X, TANG J M, *et al.* Molecular cloning and characterization of chemokine-like factor 1 (CKLF1), a novel human cytokine with unique structure and potential chemotactic activity. *Biochemical Journal*, 2001, **357** (part 1): 127~135
- 3 Wang Y, Zhang Y M, Yang X, *et al.* Chemokine-like factor 1 is a functional ligand for CC chemokine receptor 4 (CCR4). *Life Science*, 2006, **78** (6): 614~621
- 4 Shi S, Rui M, Han W L, *et al.* CKLFSF2 is highly expressed in testis and can be secreted into the seminiferous tubules. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, **37** (8): 1633~1640
- 5 Reiland J, Furcht L T, McCarthy J B. CXC-chemokines stimulate invasion and chemotaxis in prostate carcinoma cells through the

CXCR2 receptor. Prostate, 1999, **41** (2): 78~88
6 Imai T, Yoshida T, Baba M, *et al.* Molecular cloning of a novel T cell-directed CC chemokine expressed in thymus by signal sequence

trap using Epstein-Barr virus vector. J Biol Chem, 1996, **35** (35): 21514~21521

Expression, Purification and Identification of A Novel Human Cytokine C-terminal 51 Amino Protein of CKLFSF2 in *E. coli**

ZHONG Ying-Cheng, SHI Shuang, ZHANG Ying-Mei, MO Xiao-Ning,
LIU Da-Zhen, SONG Quan-Sheng, HAN Wen-Ling, WANG Ying**

(Laboratory of Medical Immunology, School of Basic Medical Science, Peking University Health Science Center, Beijing 100083)

Abstract Overexpressed CKLFSF2 (chemokine-like super family member 2) can be secreted into the supernatant of cultured cells, which exhibits the effects on cell-chemotaxis. To study the structural and functional characteristics of CKLFSF2 and make the polyclonal antibody, the recombinant plasmid pGEX-4T-3-CKLFSF C51 was constructed, following the expression in *E. coli* with high efficiency, purification using Glutathione Sepharose 4B and Sephacyl S-200, the recombinant CKLFSF2 C51 protein (typically >95% pure) was obtained. The N-terminal amino acid sequencing of CKLFSF2 C51 was performed and relative molecular mass is 5871.48 measured by ASIMA-CFR™ plus MALDI-TOF. ELISA assay detected the reactivity of the polyclonal antibody and Western blot show that CKLFSF2 was overexpressed in mammalian cells and the specific band was corresponding to the expectation. The recombinant CKLFSF2 C51 protein exhibits significantly chemotactic effect in PC-3 cells, which can be neutralised by anti-CKLFSF2 C51 polyantibody. The anti-CKLFSF2 C51 antibody can also be used for immunohistochemistry. Taken together, the recombinant CKLFSF2 C51 from *E. coli* has similar bioactivity as that from eukaryocytic expression system. The polyclonal antibodies of recombinant CKLFSF2 C51 can be used in immunohistochemistry, Western blot and to neutralize the chemotactic effect.

Key words CKLFSF2 (chemokine-like super family member 2), recombinant protein purification, polyclonal antibody, chemotaxis, immunohistochemistry, antibody neutralization

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30271203).

**Corresponding author . Tel: 86-10-82802846-5032, Fax: 86-10-82801149, E-mail: yw@bjmu.edu.cn

Received: June 22, 2006 Accepted: July 29, 2006