文章编号:1000-5404(2005)17-1729-03

论著

人层粘连蛋白α4链LG4-5组件的原核表达及多克隆抗体制备

连继勤[1],戴旭芳[2],张玉静[3],江 渝[1],何凤田[1] ([1]第三军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038;[2]重庆师范大学特殊教育学院,重庆 400047;[3]解放军军需大学军事兽医系生物化学与分子生物学教研室,长春 130062)

提 要:目的 利用基因工程技术克隆、表达人层粘连蛋白α4链LG4-5组件(human laminin alpha4 LG4-5 module, hLNα4LG4-5)蛋白并制备其特异性多克隆抗体。**方法** 采用RT-PCR方法从人胎盘组织扩增hLNα4LG4-5的cDNA片段,T/A克隆法将其插入pMD-18T载体进行测序。采用DNA重组技术构建原核表达载体pET-28a-LG4-5,用BL21(DE3)/pET系统表达hLNα4LG4-5融合蛋白,以SDS-PAGE鉴定所表达的融合蛋白。用含融合蛋白的聚丙烯酰胺凝胶颗粒免疫家兔,制备抗hLNα4LG4-5多克隆抗体,Western印迹法检测抗体的特异性。**结果** 成功克隆了hLNα4LG4-5的cDNA片段,12% SDS-PAGE电泳检测显示,经IPTG诱导后BL21(DE3)/pET28a-LG4-5总蛋白中出现一条分子质量为42×10^3的新蛋白带,制备了效价为1:10 240的hLNα4LG4-5多克隆抗体,Western印迹分析证实可检测到特异性目的蛋白带。**结论** 克隆并原核表达了hLNα4LG4-5蛋白,制备了特异性抗hLNα4LG4-5的多克隆抗体,为进一步研究LG组件在疾病发生中所起的作用打下了基础。

关键词:hLNα4LG4-5;克隆;表达;多克隆抗体
中图法分类号:Q503;Q51;Q786 **文献标识码**:A

Prokaryotic expression and polyclonal antiserum preparation of human laminin alpha4 LG4-5 module

LIAN Ji-qin[1], ZHANG Yu-jing[2], DAI Xu-fang[2], JIANG Yu[2], HE Feng-tian[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Medicine, Third Millitary Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Military Veterinary, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: Objective To clone and express human laminin alpha4 LG4-5 module(hLNα4LG4-5) protein by gene engineering techniques, and to prepare specific polyclonal antibody against hLNα4LG4-5. **Methods** The cDNA encoding hLNα4LG4-5 was amplified by RT-PCR, then inserted into pMD-18T vector by T/A cloning and sequenced. Prokaryotic expression vector pET-28a-LG4-5 was constructed by recombinant DNA technique. The hLNα4LG4-5 fusion protein was expressed in BL21(DE3)/pET system and identified by SDS-PAGE. Rabbits were immunized with the polyacrylamide gel particles containing the fusion protein for polyclonal antibody preparation and the sera were detected for antibody specificity by Western blotting. **Results** The cDNA fragment of hLNα4LG4-5 was cloned successfully. While BL21(DE3)/pET28a-LG4-5 bacterium was induced with IPTG, a new protein band with a relative molecular weight of 42 000 was shown on SDS-PAGE profile. After rabbits were immunized, the high titer (1:10 240) polyclonal antiserum was isolated. The protein band of hLNα4LG3-4 module expressed by BL21(DE3) was detected specifically by Western blotting in which the polyclonal antiserum of hLNα4LG4-5 was used as the first antibody. **Conclusion** The hLNα4LG4-5 protein was cloned and expressed successfully, its specific polyclonal antibody was prepared.

Key words: hLNα4LG4-5; clone; expression; polyclonal antibody

层粘连蛋白α4链(laminin alpha4, LNα4)是构成LN-8和LN-9的一个组份,主要在内皮、外周神经的束膜及发育中肌纤维周围的基底膜中表达[1]。α4链的缺失会导致胚胎及新生儿期出血和微血管生成受到抑制,LG组件在这一过程中发挥着重要作用[2]。对LG组件结构与功能的研究最初是通过水解LN-1的E3和E8片段进行的,其中E3为α1LG4-5,E8为α1LG1-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20400559)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (20400559)
作者简介:连继勤(1974-),男,山西省长治县人,博士,讲师,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究。电话:(023)68775193
通讯作者:张玉静,电话:(0431)6985211
何凤田,电话:(023)68752262
收稿日期:2004-07-19;**修回日期**:2005-01-29

3。研究表明,LG 组件中含有许多 LN 受体的结合位点,如肝素、整合素等。2000 年,Talts 等[3]将重组的小鼠 α4 LG1-3 和 α4 LG1 组件在哺乳动物细胞中进行了表达,并将表达的组件与层粘连蛋白受体肝素、整合素、α-营养不良聚糖及硫脂类进行了结合研究,发现 LG 组件上含有这些受体的结合位点,并能够增加由整合素介导的细胞粘附。Yokoyama 等[4]还在 LG4 组件中发现了一种环状肽,这种肽对肿瘤细胞具有强的粘附性,并含有肝素结合位点。进一步的研究表明 LG 组件还与肿瘤细胞的浸润转移密切相关[5]。本研究以人 hLNα4LG4-5 为研究对象,旨在建立起一套可快速、廉价、大量表达该蛋白的方法及有效的检测体系,为进一步研究其功能及作用位点打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织材料 新鲜的人胎盘组织(产后),取自解放军 208 医院。

1.1.2 实验动物 清洁级新西兰实验用兔 3 只,1.5 月龄,体质量 700 ~ 1 000 g,由解放军军需大学实验动物中心提供。

1.1.3 菌株与质粒 JM109 菌株为本室保存,pMD-18T 克隆载体为 TAKARA 公司产品,原核表达载体 pET28a 及其宿主菌 BL21(DE3)购自 Novagen 公司。

1.1.4 分子生物学试剂 Trizol 试剂购自 GIBECO 公司;限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ、*Xho* Ⅰ及 T4 DNA 连接酶、*Ex Taq* 酶为 TaKaRa 公司产品,AMV 反转录酶为 Promega 公司产品、质粒纯化试剂盒及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为北京鼎国生物公司产品,其它试剂均购自长春宝泰克公司。

1.1.5 酶联反应材料 96 孔酶联板产于深圳,辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 为北方同正生物公司产品,其它材料为酶联反应的常规材料。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 GenBank 中的 hLNα4LG4-5 mRNA 序列(登录号:002290),利用引物设计软件 DNASIS 分别设计了 LG4-5 组件的上、下游引物 GTCAGAATTC CACCTTTCCAACAGCCCTAGAG 和 GTCACTCGAGCTAGGCTGCTGGACAGGAGTTGAT。在上、下游引物的 5′端分别加入 *Eco*R Ⅰ和 *Xho* Ⅰ酶切位点及保护碱基 GTCA,在下游引物中加入终止密码子互补序列 CTA。

1.2.2 hLNα4LG4-5 cDNA 的克隆与序列测定 按 Trizol 试剂使用说明书提取胎盘组织总 RNA,以提取总 RNA 为模板,RT-PCR 扩增目的片段,条件为 94 ℃,30 s、55 ℃,30 s、72 ℃,2 min。扩增产物回收后用 T/A 法克隆入 pMD-18T 载体进行序列测定。

1.2.3 hLNα4LG4-5 原核表达载体的构建及表达 按常规的分子生物学实验方法将 hLNα4LG4-5 cDNA 片段定向亚克隆至原核表达载体 pET-28a 中,转入 BL21(DE3)工程菌中用 IPTG 诱导表达(终浓度 1 mmol/L),12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定表达结果。

1.2.4 目的蛋白的凝胶电泳纯化及动物免疫 参照文献[6]进行。细菌总蛋白经 5% 积层胶/12% 分离胶 SDS-PAGE 分离,凝胶在冰冷的 0.25 mol/L KCl 溶液中浸泡 10 min 以使蛋白条带显现。用洁净的手术刀片切下融合蛋白所在的凝胶块,并将凝胶块切成 0.1 ~ 0.3 mm^3 左右的小颗粒,用 PBS 4 ℃溶解过夜后离心,上清中即含有纯度较高的目的蛋白。免疫时,将含目的蛋白的凝胶颗粒与等体积的弗氏完全佐剂混匀,多点注射于实验兔背部皮下,每点约 100 μl,每只兔约注入 500 μg(约 500 μl 混合液)目的蛋白。分别于首次免疫后的第 4、6、8 周末进行加强免疫,每次用约含 500 μg 目的蛋白的凝胶粒与弗氏不完全佐剂混合液对实验兔进行肌肉注射。第 1 次免疫前采血并分离血清作为空白对照,末次免疫后 10 d 采血分离血清,测定抗体效价。分离到的血清即为 hLNα4LG4-5 的多克隆抗体。对抗体效价的检测采用标准的 ELISA 方法进行。抗原为通过凝胶纯化的 hLNα4LG4-5 蛋白,一抗为 20、40、80 等倍比稀释的兔血清,二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(2 000倍稀释),显色底物为邻苯二胺(OPD)。显色结果用酶标仪进行测定。

1.2.5 hLNα4LG4-5 抗血清的 Western 印迹分析 以 hLNα4LG3-4 的原核表达产物为抗原,按常规方法进行 Western 印迹分析,其中一抗使用 800 倍稀释的 hLNα4LG4-5 多抗血清、二抗为1 500倍稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG,最后经 DAB 显色。

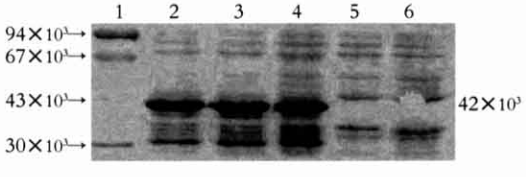
2 结果

2.1 hLNα4LG4-5 的序列测定

将克隆的 hLNα4LG4-5 cDNA 片段连入 pMD-18T 载体中,用通用引物 M13 进行测序,测序结果与 GenBank 中序列(登录号 002290)用 DNASIS 软件进行同源性比较,结果表明大小为 1 098 bp 的 hLNα4LG4-5 cDNA 序列与 GenBank 中序列同源性为 99.8%,共有 2 处发生了突变,分别为 399 位的 T 变为 C 和 519 位的 T 变为 C,但编码氨基酸并没有发生改变,仍为 Asp 与 Ser。

2.2 hLNα4LG4-5 在原核细胞中的表达结果

将构建好的原核表达载体转入 BL21(DE3)大肠杆菌中用 IPTG 进行诱导表达,12% SDS-PAGE 电泳结果可见与理论分子质量(42×10^3)大小相符的目的蛋白带(图 1)。



1: Protein marker; 2 - 4: Recombinants expressed the hLNα4LG4-5; 5,6: negative control

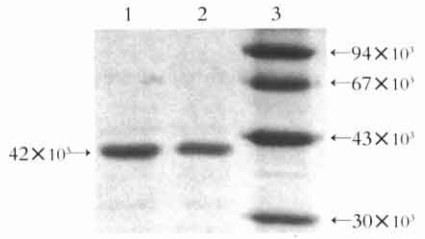
图 1 hLNα4LG4-5 重组菌的 12% SDS-PAGE 分析结果

Fig 1 Analysis of the hLNα4LG4-5 recombinants by 12% SDS-PAGE

2.3 目的蛋白的纯化结果

将切下的含目的蛋白的凝胶块用 PBS(pH 7.2)4 ℃溶解过夜后离心收集上清,用 12% SDS-PAGE 对纯化效果进行鉴定。

从图 2 可看出，纯化后的 hLNα4LG4-5 蛋白含很少的杂蛋白，纯化效果明显。



1,2: hLNα4LG4-5 protein after purification; 3: Protein marker

图 2　hLNα4LG4-5 蛋白的纯化

Fig 2　Purification of hLNα4LG4-5 protein

2.4　抗体效价的检测结果

末次免疫后 10 d 用标准 ELISA 法测定血清的效价，在酶标仪上的检测结果见表 1。

表 1　血清效价测定结果 D (490)

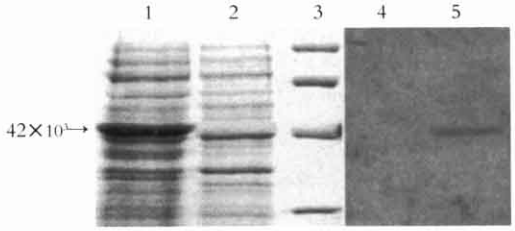
Tab 1　Result of ELISA Assay D(490)

	Dilution						
	320	640	1 280	2 560	5 120	10 240	20 480
Polyclonal-antiserun	2.421	2.182	1.820	1.484	1.132	0.972	0.665
Negative Serum	1.150	1.029	0.853	0.710	0.560	0.485	0.462
Ratio(P/N)	2.105	2.121	2.134	2.090	2.021	2.004	1.439

从表 1 可以看出，在稀释倍数小于 10 240 时，多抗血清的吸光度值均为对照血清的 2 倍以上，判定免疫血清的效价为 1∶ 10 240。

2.5　抗体的特异性检测结果

以 hLNα4LG3-4 的原核表达菌体蛋白及空白菌蛋白进行 SDS-PAGE，以制备的 hLNα4LG4-5 多抗血清为一抗，HRP 标记的山羊抗兔 IgG 为二抗，进行 Western blotting 印迹分析，结果见图 3。



1,5: SDS-PAGE and Western blotting of hLNα4LG3-4 protein; 2,4: SDS-PAGE and Western blotting of negative control; 3: protein marker

图 3　hLNα4LG3-4 表达产物的 Western blotting 印迹分析

Fig 3　Western blot of hLN24LB3-4 expression product

从图 3 可看出，使用所制备的 hLNα4LG4-5 多抗血清可特异地检测到 hLNα4LG3-4 的目的蛋白带，具有良好的特异性，说明所表达的 hLNα4LG4-5 蛋白具有良好的免疫原性。

3　讨论

目前对于 LG4-5 组件的研究主要集中在小鼠的 LNα4，为进一步研究人 LNα4LG4-5 的功能及特性，本研究克隆了 hLNα4LG4-5 cDNA 片段，克隆的片段经分析可满足表达工作的要求。为高效表达 hLNα4LG4-5 蛋白，本研究选用了 T7 表达系统中的 pET-28a 表达载体。pET 系列载体以 T7 为启动子，可使目的基因得到高效转录与翻译。在实验中观察到，在 IPTG 终浓度为 2 mmol/L，诱导时间 4 h 时，目的蛋白表达量达到最大(约占菌体总蛋白量的 30% 左右)，此后随时间的延长，细菌培养物的浑浊度越来越低，目的蛋白也越来越少。使用凝胶电泳可较好地纯化目的蛋白，用 16 cm ×20 cm 大小的 SDS-PAGE 凝胶一次可纯化目的蛋白 2 ~ 3 mg，可满足整个免疫过程的需要，且使用凝胶颗粒与目的蛋白的混合物免疫动物取得了很好的免疫效果。在对多抗血清的特异性进行检测时，由于 hLNα4LG4-5 与 hLNα4LG3-4 具有共同的 LG4 结构域，因此采用了 hLNα4LG3-4 的原核表达产物作为抗原可充分体现抗体的特异性，而阴性对照的结果也表明所制备的抗体基本排除了菌体蛋白污染所导致的非特异性。

综上所述，我们成功地表达了 hLNα4LG4-5 重组蛋白，并制备了高特异性和高效价的抗血清，为进一步研究 LG 组件在介导细胞粘附、血管生成及肿瘤转移过程中的作用和途径提供了良好的分子工具。

参考文献：

[1] Iivanainen A, Kortesmaa J, Sahlberg C, *et al*. Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin alpha4 chain[J]. J Biol Chem, 1997, 272(44): 27862 - 27868.

[2] Kleinman H K, Koblinski J, Lee S, *et al*. Role of basement membrane in tumor growth and metastasis[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2001, 10(2): 329 - 338, IX.

[3] Talts J F, Sasaki T, Miosge N, *et al*. Structural and functional analysis of the recombinant G domain of the laminin alpha4 chain and its proteolytic processing in tissues[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 35192 - 35199.

[4] Yokoyama F, Suzuki N, Haruki M, *et al*. Cyclic peptides from the loop region of the laminin alpha 4 chain LG4 module show enhanced biological activity over linear peptides[J]. Biochemistry, 2004, 43(42): 13590 - 13597.

[5] Zhou Z, Doi M, Wang J, *et al*. Deletion of laminin-8 results in increased tumor neovascularization and metastasis in mice[J]. Cancer Res, 2004, 64(12): 4059 - 4063.

[6] Oettinger H F, Pasqualini R, Bernfield M. Recombinant peptides as immunogens: a comparison of protocols for antisera production using the pGEX system[J]. Biotechniques, 1992, 12(4): 544 - 559.

(编辑　陈聪连)