文章编号:1000-5404(2006)03-0205-03

论著

转录因子 Blimp-1 的原核表达、纯化及抗体制备

邓少丽,胡福泉,蔓 锐,饶贤才,蒋 静,程小星 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038)

提 要:目的 获得 Blimp-1 纯化蛋白,制备多克隆抗体,为研究浆细胞发育的调控奠定基础。**方法** 采用 PCR 方法从 Blimp-1 质粒中克隆 Blimp-1 编码前 350 个氨基酸的基因片段,构建 Blimp-1 与 6 个 His 的融合蛋白原核表达质粒,进行原核表达与蛋白纯化后,免疫动物,制备 Blimp-1 多抗。采用 ELISA 方法检测其效价,Western 检验抗体特异性及在骨髓瘤细胞株中的表达。**结果** 构建了表达 Blimp-1 前 350 个氨基酸的原核表达质粒 PQE-Blimp-1,经过大肠杆菌表达、镍亲和层析柱纯化,得到分子量约 46×10^3 的融合蛋白,免疫家兔后得到多抗血清。ELISA 显示抗体效价达 1/20 000。Western blot 结果显示此多克隆抗体与 Blimp-1 蛋白特异性结合,并在骨髓瘤细胞中表达。**结论** 本研究获得 Blimp-1 纯化蛋白,制备了 Blimp-1 多克隆抗体,为进一步研究 Blimp-1 的作用机制及与血液疾病间的关系奠定了基础。

关键词: Blimp-1; 原核表达; 抗体制备
中图法分类号: R392-33; R392.11; R392.13 **文献标识码**: A

Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of Blimp-1

DENG Shao-li, HU Fu-quan, JIAN Rui, RAO Xian-cai, JIANG Jing, CHENG Xiao-xing (Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 40038, China)

Abstract: **Objective** To obtain purified Blimp-1 protein and prepare anti-Blimp-1 polyclonal antibody. **Methods** The gene segment consisting of first 350 amino acids of the Blimp-1 ORF was amplified from Blimp-1 plasmid. The prokaryotic expression plasmid containing 6 His was constructed. The plasmid was expressed in *E coli*. JM109, and the expression product was purified. Rabbits were immunized with the purified Blimp-1 protein and the antiserum was obtained. The titers and specificity of the antibodies were measured by ELISA and Western blotting. **Results** The plasmid PQE-Blimp-1 was constructed and a molecular weight of 46 103 fusion protein was obtained after induction with IPTG. The anti-Blimp-1 antibody was obtained and purified. The results of ELISA and Western blotting indicated that the polyclonal antibody had high titer and specificity. **Conclusion** The purified Blimp-1 protein and anti-Blimp-1 polyclonal antibody have been acquired, which lays the foundation for further research on Blimp-1 mechanism in hemopathy.

Key words: Blimp-1; prokaryotic expression; antibody preparation

浆细胞是终末分化细胞,是 B 淋巴细胞发育的最终阶段,它能分泌大量的抗体,从而发挥抗感染等重要的体液免疫功能。初始 B 淋巴细胞(native B cell)在抗原刺激下,经过激活、增殖和分化,最终发育为浆细胞,这一过程受到严格的调控。浆细胞的发育异常可能与多发性骨髓瘤的发病密切相关。研究浆细胞发育的调控机制对了解体液免疫的产生及探讨自身免疫性疾病和多发性骨髓瘤的治疗有重要意义。

近年来研究证明,在成熟 B 淋巴细胞终末分化为浆细胞的过程中,转录因子 Blimp-1(B lymphocyte induced maturation protein 1)起了关键作用。单纯表达转录因子 Blimp-1 就可以诱导浆细胞的发育并分泌抗体,因此 Blimp-1 被称为"B 淋巴细胞终极分化的主调控子"[1]。小鼠基因条件敲除的研究证明,Blimp-1 是浆细胞形成和免疫球蛋白分泌所必需的转录因子。Blimp-1 基因缺失的小鼠中,浆细胞的发育严重受阻,血清免疫球蛋白的基础水平及受抗原刺激后的水平都明显降低[2]。我们最近的研究也证明,LPS 诱导小鼠原代 B 淋巴细胞分化为浆细胞的过程中,Blimp-1 的表达显著增高,可能同分化的调控密切相关[3]。本研究构建了 Blimp-1 的原核表达质粒,原核表达并纯化了 Blimp-1 蛋白片段,制备了 Blimp-1 的抗体,为进一

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370603)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370603)
作者简介:邓少丽(1972-),女,重庆市人,博士研究生,讲师,主要从事微生物学及免疫学方面的研究,发表论文 10 篇。电话:(023)68752241
通讯作者:程小星,电话:(023)68752241, E-mail: xiaoxing@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2005-04-12;**修回日期**:2005-10-05

步研究 Blimp-1 的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、细胞和动物

大肠杆菌 JM109 和 DH5α 为本实验室保存，PQE-31 为 QIAGEN 公司产品，Blimp-1 质粒由本室保存，J558L 细胞购自上海午立生物有限公司。2 kg 左右雌性新西兰大白兔由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

镍亲和层析柱购自 Invitrogen 公司。各种 DNA 限制性内切酶、T4 连接酶、TaqDNA 聚合酶、标准分子量蛋白均购自上海生工生物有限公司。RPMI1640 细胞培养基购自 GIBCO 公司。PUCm-T 载体及质粒抽提试剂盒购自上海博亚生物技术有限公司。其他常规化学试剂为分析纯以上产品。引物合成及序列测定由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.3 引物的设计和 Blimp-1 片段的扩增

根据 GenBank(登录号 U08185)中小鼠 Blimp-1 基因序列，设计合成一对引物。引物序列如下，上游引物：5′- TACCCGGGATCCCATGAGAGAGGCTTATCTCAG，下游引物：5′- GATCGGAAGCTTTTATCCATCCCATAGGCCAGGGACG，其中上游引物含有 *Bam*HⅠ酶切位点和起始密码，下游引物含有 *Hind*Ⅲ酶切位点和终止密码。以 Blimp-1 质粒为模板，进行常规 PCR 扩增，取 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中电泳，用紫外分析仪检测电泳结果。

1.4 PQE-31/Blimp-1 表达质粒的构建

将纯化回收的 PCR 产物 TA 克隆至 PUCm-T 载体，转化 DH5α，挑取白色菌落送上海博亚测序鉴定。将带有 6 个 His 的原核表达载体 PQE-31 和 PUCm-T-Blimp 经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切后，从琼脂糖凝胶回收 PQE-31 3 500 bp 左右片段和 PUCm-T-Blimp 1 100 bp 片段，T4 连接酶连接反应 16 ℃ 16 h，构建重组质粒 PQE-31/Blimp-1。

1.5 肠杆菌的转化及重组质粒的鉴定

制备感受态 JM109 细胞，转化重组质粒 PQE31/Blimp-1。挑取转化菌落培养后，提取质粒经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切，通过限制性内切酶图谱分析，鉴定载体中是否插入目的基因。将含目的基因的重组质粒送上海博亚公司测序。

1.6 融合蛋白 Blimp-6×His 的诱导表达

将含 PQE-31/Blimp-1 质粒和 PQE-31 空质粒的菌株于含氨苄青霉素 2×YT 培养基中 37 ℃过夜摇菌培养，次日按 1∶100 稀释培养过夜的菌液，培养 2 h，菌液 $D(600)=1.0$ 时，加入 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L，诱导表达后 4.5 h 收获菌液，进行 SDS-PAGE 分析，积层胶 5%，分离胶 12%，稳压 80 V 电泳 2 h。

1.7 表达蛋白的纯化

200 ml 菌体培养液离心收集菌体，用 TBS500 洗涤 2 次，TBS 重悬菌液，加入 PMSF、溶菌酶和 Triton X-100，超声破碎后于 4 ℃ 12 000×*g* 离心 20 min，收集沉淀，用含 1% Triton-100 的 TBS 洗涤沉淀 3 次，最后用含 1 mol/L DTT 的 8 mol/L 尿素悬浮沉淀。采用镍亲和层析柱，用含 8 mol/L 尿素的咪唑洗脱目的蛋白。经透析去除尿素，制备溶于 PBS 的纯化 Blimp-1 融合蛋白，-80 ℃储存备用。

1.8 多克隆抗体的制备

将 1 ml 200 μg/ml 的目的蛋白与等体积弗氏完全佐剂充分混合，皮下多点注射家兔，每间隔 10 d 加强免疫 1 次，共加强 4 次。末次免疫后 2 周心脏采血，分离血清，分装置 -20 ℃冻存。ELISA 检测其效价达 1/20 000。

1.9 Western blot 检测 Blimp-1 融合蛋白免疫学活性

将纯化融合蛋白经 SDS-PAGE、半干转印，转移至硝酸纤维素滤膜上(转印条件 400 mA，转印 1 h)。用制备的兔抗 Blimp-1 多抗与膜上的蛋白进行抗原-抗体反应，用生物素-亲和素标记系统进行检测，DAB 显色，至目的条带染色清晰时终止反应。

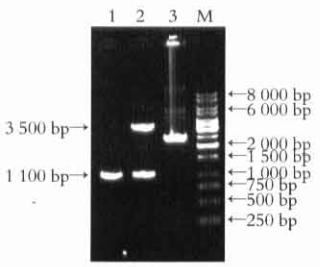
1.10 Blimp-1 多抗检测骨髓瘤细胞的表达

1×10^7 个骨髓瘤 J558L 细胞，经 PBS 洗涤 2 次，加 100 μl PBS、100 μl 2×SDS，超声破碎后，100 ℃ 10 min，行 SDS-PAGE，用半干转印仪将蛋白转移至 NC 膜上。用制备的兔 Blimp-1 多抗与膜上的特异蛋白反应，用生物素-亲和素标记系统进行检测，DAB 显色。

2 结果

2.1 Blimp-1 DNA 片段的获得与亚克隆

用设计的两条引物从 Blimp-1 质粒中扩增出 1 100 bp 大小的 DNA 片段，与预期分子量大小相符。经 TA 克隆将 PCR 产物亚克隆至 PUCm-T 载体，测序结果证实为所需 Blimp-1 片段。以 *Bam*HⅠ/*Hind*Ⅲ双酶切 PQE-31 和 PUCm-T-Blimp，连接 PQE-31 3 500 bp 左右片段和 PUCm-T-Blimp 1 100 bp 片段，连接产物 PQE31/Blimp-1 经 *Bam*HⅠ/*Hind*Ⅲ双酶切鉴定，酶切产物含 1 100 bp 的目的片段，见图 1。连接产物 PQE31/Blimp-1 测序结果表明，目的基因正确插入 PQE-31，并保持正确的读码框架。

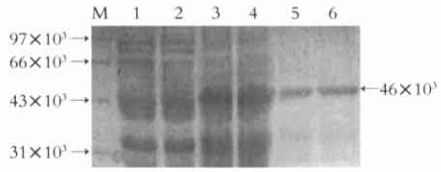


1：PCR 扩增的靶基因；2：*Bam*HⅠ/*Hind*Ⅲ酶切的 PQE31/Blimp-1；3：PQE31/Blimp-1 质粒；M：DNA 标准

图 1 表达载体的酶切鉴定

2.2 Blimp-1 融合蛋白的原核表达及纯化

按前述方法进行 Blimp-1 蛋白的诱导表达，经 0.5 mmol/L IPTG 终浓度，37 ℃诱导 4.5 h 后，收获的菌液中有分子量约 46×10^3 左右的 His_6-Blimp-1 蛋白表达。通过对目的蛋白的可溶性分析可知，在诱导菌超声处理后，只有沉淀中有诱导物生成，提示目的蛋白以包涵体的形式存在。用 Ni^{2+} 亲和层析柱纯化，可得到电泳均一的目的蛋白，见图 2。

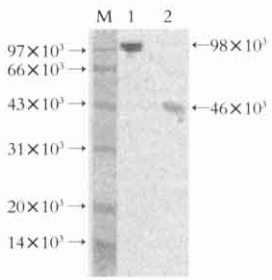


M：蛋白标准；1，2：诱导前 PQE31/Blimp-1/JM109；3，4：IPTG 诱导后 PQE31/Blimp-1/JM109；5，6：纯化后 Blimp-1 融合蛋白

图 2　Blimp-1 的诱导表达与纯化

2.3　Blimp-1 抗血清的制备及检测

经 ELISA 检测，制备的抗血清效价达 1/20 000。Western blot 实验证明，1∶1 000 稀释的自制抗体与诱导表达的 His_6-Blimp-1 蛋白有特异的抗原抗体反应。同时 Blimp-1 抗血清 1∶1 000稀释后可检测小鼠淋巴瘤细胞 J558L 裂解液中的内源性 Blimp-1 蛋白，分子量为 98×10^3，与文献[1]报道一致，见图 3。



M：蛋白标准；1：J558L 裂解液；2：纯化后 Blimp-1 融合蛋白

图 3　抗 Blimp-1 血清的 Western blot 分析

3　讨论

B 淋巴细胞的发育过程可分为几个阶段。包括祖 B 细胞、前 B 细胞、未成熟 B 细胞、成熟 B 细胞、记忆 B 细胞和浆细胞。在由祖 B 细胞向浆细胞发育的过程中，转录因子起着非常重要的作用。近年来研究结果表明，在成熟 B 淋巴细胞终末分化为浆细胞的过程中，转录因子 Blimp-1 起了关键作用[5]。Blimp-1 是 Davis 研究小组于 1994 年在实验中发现，由 prdm1 (positive regulatory domain zinc finger protein 1) 基因表达。转录因子 Blimp-1 是一个有 5 个锌指结构分子量约 98×10^3 的蛋白，其最为显著的特点是使体外培养的成熟 B 淋巴细胞发育为具有浆细胞表型的 B 淋巴细胞并能分泌抗体，也能在体外诱导巨噬细胞的分化。鼠的 Blimp-1 基因全长约 23×10^3 bp，包含 8 个外显子。Blimp-1 cDNA 全长 5.1×10^3 bp，开放阅读框架共编码 856 个氨基酸，除含 5 个锌指结构外，还含脯氨酸富集区。Blimp-1 引起浆细胞终极分化的可能机制是抑制 c-myc、Bcl-6、Pax5、Spi-B、Id3、CIITA 等的表达[6,7]。Blimp-1 在 B 细胞分化为浆细胞的过程中发挥了关键的作用，研究证实 Blimp-1 在浆细胞发育中的作用是不可缺少的[8]。但 Blimp-1 在浆细胞发育中的作用机制还未确定，还需对 Blimp-1 进行大量研究。浆细胞及其前体细胞的恶性转化与多发性骨髓瘤相关，长寿记忆型浆细胞在抗体依赖性自身免疫性疾病中也发挥了重要作用。研究 Blimp-1 在浆细胞分化中的作用机制，可为治疗多发性骨髓瘤和自身免疫性疾病提供理论依据。

我们选取编码 Blimp-1 前 350 个氨基酸的基因片段用于原核表达蛋白，制备抗体，避开了 Blimp-1 的锌指结构[1]。本实验采用的 PQE-31 原核表达载体带有 6 个连续组氨酸残基序列(6×His tag)，在重组质粒进行诱导表达时，6×His tag 与 Blimp-1 蛋白片段共同表达，为进一步纯化蛋白提供了亲和位点，它可与金属镍发生螯合，从而使目的蛋白流经亲和柱时被特异性吸附，再利用咪唑置换，可洗脱特异性结合的目的蛋白，达到纯化蛋白的目的，而且制备的融合蛋白还可增加抗原的免疫原性。蛋白表达结果表明融合蛋白分子量为 46×10^3 左右，用自制抗血清检测 J558L 细胞表达的 Blimp-1 蛋白分子量为 98×10^3，与国外报道的 Blimp-1 分子量相符[1]。

本实验利用 Blimp-1 蛋白的原核表达产物经纯化后免疫家兔，成功制备了该蛋白的多克隆抗体，并可检测骨髓瘤细胞株内源性表达的 Blimp-1 蛋白。本研究制备的抗血清为开展 Blimp-1 分子后续功能的研究提供了条件。

参考文献：

[1] TURNER C A JR, MACK D H, DAVIS M M. Blimp-1, a novel zinc finger-containing protein that can drive the maturation of B lymphocytes into immunoglobulin-secreting cells[J]. Cell, 1994, 77(2): 297 - 306.

[2] SHAPIRO SHELEF M, LIN K I, MCHEYZER WILLIAMS L J, *et al*. Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells[J]. Immunity, 2003, 19(4): 607 - 620.

[3] 程小星，邓少丽，蹇　锐，等. LPS 诱导 B 淋巴细胞分化过程中部分基因表达的改变[J]. 现代免疫学，2005，25(1)：33 - 36.

[4] SHAPIRO SHELEF M, CALAME K. Plasma cell differentiation and multiple myeloma[J]. Curr Opin Immunol, 2004, 16(2): 226 - 234.

[5] SCIAMMAS R, DAVIS M M. Modular nature of Blimp-1 in the regulation of gene expression during B cell maturation[J]. J Immunol, 2004, 172(9): 5427 - 5440.

[6] MESSIKA E J, LU P S, SUNG Y J, *et al*. Differential effect of B lymphocyte-induced maturation protein (Blimp-1) expression on cell fate during B cell development[J]. J Exp Med, 1998, 188(3): 515 - 525.

[7] ANGELIN DUCLOS C, CATTORETTI G, LIN K I, *et al*. Commitment of B lymphocytes to a plasma cell fate is associated with Blimp-1 expression *in vivo*[J]. J Immunol, 2000, 165(10): 5462 - 5471.

[8] SHAPIRO SHELEF M, CALAME K. Regulation of plasma-cell development[J]. Nat Rev Immunol, 2005, 5(3): 230 - 242.

（编辑　周　芳）