论著

文章编号:1000-5404(2008)07-0600-03

Myosin-Vc特异性片段的原核表达及其抗血清的制备

陈宗涛[1],刘丽梅[2],徐小峰[1],田衍平[1],张俊磊[1],王嘉丽[1],安 静[1,3] (第三军医大学:[1]基础医学部微生物学教研室,[2]西南医院病理学研究所,重庆 400038;[3]首都医科大学基础医学院微生物学教研室,北京 100069)

摘 要:**目的** 原核表达Myosin-Vc(Myo5c)蛋白并纯化,制备小鼠、家兔多克隆抗体,为探索Myo5c在病毒感染中的作用提供研究工具。**方法** 采用RT-PCR方法从人胃粘膜组织中克隆编码Myo5c特异性蛋白的基因片段,构建该片段与6×His标签的融合蛋白表达质粒pQE-31/Myo5c,原核表达与蛋白纯化后,分别免疫BALB/c小鼠和新西兰兔,制备Myo5c抗血清。采用ELISA检测抗体效价,Western blot和间接免疫荧光染色检验抗体特异性。**结果** 获得Myo5c特异性片段约42×10^3的纯化蛋白。ELISA检测小鼠和家兔抗血清效价分别为1:12 800、1:6 400。Western blot和间接免疫荧光染色显示所制备的抗体能特异性识别Myo5c。**结论** 获得Myo5c特异性蛋白,并成功地制备了Myo5c特异性的小鼠和家兔抗血清。

关键词:Myosin-Vc;原核表达;多克隆抗体

中图法分类号:R392-33;R392.11;R392.7 **文献标识码**:A

Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of human myosin-Vc

CHEN Zong-tao[1], LIU Li-mei[2], XU Xiao-feng[1], TIAN Yan-ping[1], ZHANG Jun-lei[1], WANG Jia-li[1], AN Jing[1,3] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [3]Department of Microbiology, College of Basic Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: **Objective** To obtain purified myosin-Vc (Myo5c) protein and prepare its polyclonal antibodies of mouse and rabbit. **Methods** The fragment encoding Myo5c specific protein (297 amino acids) was amplified with RT-PCR from human gastric mucosa. The product and the prokaryotic expression plasmid pQE-31 containing 6×His were used to construct pQE-31/Myo5c. The recombinant was transformed into *E. coli* JM109 and induced to express with IPTG. The objective product was purified. BALB/c mice and rabbits were immunized with the purified Myo5c protein and the antiserum was obtained. Titer and specificity of the polyclonal antibodies were determined by ELISA and Western blotting. **Results** pQE-31/Myo5c was successfully constructed. The fusion protein of Myo5c with molecular weight 42 000 was obtained and purified. The recombined protein showed immunogenicity. Mouse or rabbit antiserum with high level of specific antibodies for Myo5c was obtained. Indirect immunostaining and Western blotting analysis demonstrated that the antibodies could recognize native Myo5c protein. **Conclusion** Our results suggest that the prepared antibodies might be useful in studying the function of Myo5c in intracellular trafficking of endocytic vesicle, such as viruses.

Key words: myosin-Vc (Myo5c); prokaryotic expression; polyclonal antibody

Myosin-Vc(Myo5c)是肌球蛋白(myosin)超家族中Myosin-V类中的一员,是依赖微丝(actin)运动、参与细胞内物质运输的"摩托蛋白"。一般认为Myosin-V类蛋白在细胞内物质运输中发挥重要作用[1]。虽然Myo5c的相关研究相对于Myo5a、Myo5b少,但随着研究的深入,Myo5c在细胞器之间物质运输中的作用越来越受到重视[2]。

基金项目:国家自然科学基金(30471552,30640065,30671853)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471552,30640065,30671853)

作者简介:陈宗涛,男,重庆市人,博士研究生,助教,主要从事病毒免疫的相关方面的研究。电话:(023)68752239,E-mail:chenzongtao@126.com

通信作者:安 静,E-mail:anjing60@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-09-12 修回日期:2007-11-26

Myo5c 广泛存在于真核细胞内,它由 2 条重链组成,每条重链又由摩托接合区(motor domain,MD)、颈区(neck region)、α-螺旋区(α-helical coiled-coil tail Domain)和货物绑定区(cargo binding domain,CBD)组成[3]。而在 Myosin-V 类蛋白中,Myo5c 区别于 Myo5a、Myo5b 等的特异性区域位于 α-螺旋区内[4]。

因此,本研究构建了表达 Myo5c 特异性蛋白片段(α-螺旋区中的 297 个氨基酸)的原核表达质粒 pQE-31/Myo5c,表达并纯化该蛋白,制备了 Myo5c 的小鼠和兔的特异性抗血清,为后续研究 Myo5c 的在病毒感染过程中的作用奠定基础。

1　材料与方法

1.1　菌株、质粒、细胞、动物和主要试剂

大肠杆菌 JM109 为本实验室保存;pQE-31 质粒购自 QIAGEN 公司;BALB/c 小鼠、新西兰大耳白兔由重庆医科大学动物所提供;镍离子亲和层析柱购自 Bio-Rad 公司;各种 DNA 限制性内切酶、T_4 连接酶、高保真 *Taq* DNA 聚合酶等以及引物合成及序列测定由 Takara 公司完成。

1.2　引物的设计和 Myo5c 大小片段的扩增

根据 GenBank(AF272390.1,GI:8705239)的人类 Myo5c mRNA 全序列,设计合成一对引物来扩增 Myo5c 特异性的 α-螺旋区,3179 – 4069 共 891 bp 的片段:上游引物 5′-GGATCCT-TCTGATGGCTTGAAGGCG-3′,下游引物 5′-GTCGACATCATTG-GCTTTTCCAATT-3′,其中上游引物含有 *Bam*HⅠ酶切位点,下游引物含有 *Sal*Ⅰ酶切位点。从人胃黏膜组织中提取总 mRNA 作为模板,通过 RT-PCR,获得目的片段。

1.3　pQE-31/Myo5c 表达质粒的构建

将带有 6×His 的原核表达载体 pQE-31 和 Myo5c PCR 产物经 *Bam*HⅠ/*Sal*Ⅰ双酶切后,从琼脂糖凝胶回收 pQE-31 约 3 500 bp片段和 Myo5c 约 900 bp 片段,T_4 连接酶连接反应 16 ℃、16 h,构建重组质粒 pQE-31/Myo5c[5]。

1.4　JM109 菌的转化及重组质粒的鉴定

制备感受态 JM109 细菌,化学转化重组质粒 pQE-31/Myo5c。挑取转化菌落培养后,提取质粒经 *Bam*HⅠ/*Sal*Ⅰ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 TaKaRa 公司测序。

1.5　Myo5c 融合蛋白的表达纯化

1.5.1　融合蛋白 Myo5c 6×His 的诱导表达　　pQE-31/Myo5c 质粒和 pQE-31 空质粒的菌株分别在含氨苄青霉素的 2×YT 培养基中 37 ℃过夜摇菌培养,次日按 1∶100 稀释菌液,培养约 3 h,当菌液的 $D(600)>1$ 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,诱导表达 24 h 后收获菌液。进行 SDS-PAGE 分析,积层胶 5%,分离胶 10%,稳压 80V 电泳 3 h。通过 Western blot(抗 6×His 小鼠单克隆抗体为一抗、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 为二抗)检测融合蛋白的特异性和相对分子质量大小。

1.5.2　表达蛋白的纯化　　200 ml 菌体培养液离心收集菌体,用 TBS 洗涤 2 次并重悬,加入 PMSF 和 TritonX-100,超声破碎后于 4 ℃、12 000×*g* 离心 20 min,收集沉淀,用含 1% Triton X-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 pH=4.5 的 8 mol/L 尿素液洗脱目的蛋白。经透析去除尿素,获得纯化 Myo5c 复性蛋白。–80 ℃储存备用。

1.6　Myo5c 多克隆抗体的制备及鉴定

1.6.1　多克隆抗体的制备　　将 200 μg/ml 的目的蛋白与等体积的弗氏(不)完全佐剂充分混合,皮下、腹股沟、腹腔、肌肉多点注射 BALB/c 小鼠和新西兰大耳白兔。小鼠 0.5 ml/只、兔 3 ml/只,间隔 3 周免疫。腹腔注射蛋白加强免疫 1 周后采血。分离血清,ELISA 检测抗体效价。

1.6.2　Western blot 检测抗血清　　将纯化的 Myo5c 蛋白和 HepG2 细胞的裂解物(作为含有 Myo5c 完整蛋白的代表)经 SDS-PAGE、半干转印,转移至硝酸纤维素滤膜上(15 V,30 min)。用制备的鼠抗、兔抗 Myo5c 血清与膜 4 ℃孵育过夜。以 HRP 标记的羊抗小鼠、羊抗兔 IgG 为二抗,DAB 显色观察。

1.6.3　间接免疫荧光染色鉴定　　取人十二指肠黏膜切片,4% 多聚甲醛固定后,加制备的小鼠抗 Myo5c 血清 4 ℃孵育过夜,正常小鼠血清为对照。分别以 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 为第二抗体,37 ℃孵育 30min 后洗涤,荧光显微镜观察。

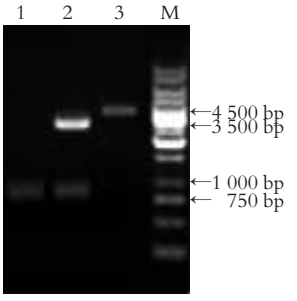
2　结果

2.1　Myo5c DNA 片段的获得与亚克隆

经电泳观察,用设计的引物从人胃组织总 mRNA 中扩增出约 900 bp 的 DNA 片段。以 *Bam*H/*Sal*Ⅰ双酶切 pQE-31 和 Myo5c 约 900 bp 片段,胶回收后 T_4 连接酶连接。产物 pQE-31/Myo5c 经 *Bam*HⅠ/*Sal*Ⅰ双酶切鉴定,酶切产物含 900 bp 的目的片段。

2.2　pQE-31/Myo5c 表达质粒的获得

pQE-31/Myo5c 重组质粒转化 JM109 菌,挑取菌落摇菌、提质粒。经 *Bam*HⅠ/*Sal*Ⅰ双酶切出约900bp 的目标片段(图 1)。Takara 公司测序结果表明,目的基因正确插入 pQE-31,并保持正确的读码框架。

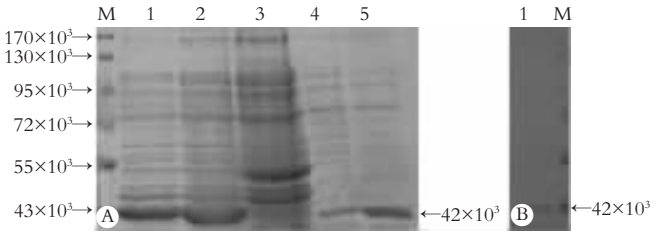


M:1kb DNA ladder;1:pQE-31/Myo5c PCR 扩增;2:*Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切 pQE-31/Myo5c 产物;3:pQE-31/Myo5c 重组质粒

图 1　重组质粒 pQE-31/Myo5c 的 PCR 及酶切鉴定

2.3　Myo5c 蛋白的原核表达

按前述方法进行 Myo5c 蛋白的诱导表达,收获的菌液中有相对分子质量约 42×10^3 的蛋白表达。通过对目的蛋白的可溶性分析,目的蛋白以包涵体的形式存在。用镍亲和层析柱纯化,得到电泳均一的目的蛋白(图 2A),并通过抗 His-tag 单克隆抗体染色鉴定(图 2B)。

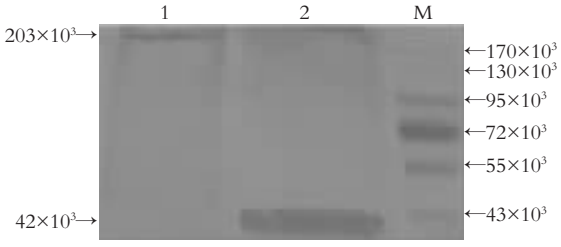


A：Myo5c 蛋白纯化 SDS-PAGE 图 M：蛋白分子量标记；1、2：1 mmol/L IPTG 诱导 pQE31/Myo5c 表达 12、24 h；3：诱导前的 pQE31/Myo5c；4：纯化的 Myo5c 融合蛋白；5：冷冻干燥后的 Myo5c B：Myo5c 纯化蛋白 Western blot 验证图 1：Myo5c 融合蛋白；M：蛋白分子量标记

图2 10%SDS-PAGE 分析表达和纯化 Myo5c

2.4 Myo5c 抗血清的检测

分别收获鼠抗、兔抗血清后，经间接 ELISA 检测，效价分别达 1∶12 800、1∶6 400。Western blot 证明 1∶1 000 稀释的自制抗体与诱导表达的 Myo5c 蛋白有特异的抗原抗体反应，并且也能识别 HepG2 细胞裂解液中约 203×10^3 的 Myo5c 蛋白（图3）。

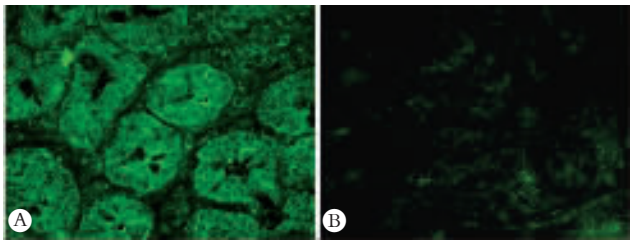


M：蛋白分子量标记；1：HepG2 细胞裂解液；2：重组 Myo5c

图3 Western blot 检测鼠抗 Myo5c 血清

2.5 间接免疫荧光染色鉴定

荧光显微镜观察显示肠腺体细胞由于有丰富的 Myo5c 蛋白而出现强染。证实小鼠抗 Myo5c 血清该抗血清能特异地识别天然的 Myo5c 蛋白（图4A）。而对照组无特异显色（图4B）。家兔抗血清免疫荧光染色结果与小鼠的一致。



A：小鼠抗 Myo5c 血清染色后的十二指肠黏膜；B：正常小鼠血清染色后的十二指肠黏膜

图4 十二指肠黏膜切片免疫荧光染色 （荧光显微镜×400）

3 讨论

越来越多的证据显示 Myosin-V 类蛋白在膜运输中发挥着重要作用，其被广泛认为是 actin 依赖的细胞器运输中的主要分子基础。人类 Myo5c 是 2002 年才发现 Myosin V 家族中的新成员，他与同家族的 Myo5a、Myo5b 有近 50% 的相同基因序列。在分布上，Myo5c 主要存在于非神经组织，并且在上皮细胞和腺体组织中最为丰富。在许多重要生理组织的 actin 依赖运输中，Myo5c 可能发挥着重要作用。

Myosin、驱动蛋白（Kinesin）和动力蛋白（Dynein）等‘摩托’蛋白是实现细胞器运输的基本分子单位[6]。它们之间的关系复杂。Myosin-V 与其他 Motor 蛋白在有的情况下是竞争关系，如在黑色素运输中，Myosin-V 能阻碍微管运输；而在从微管到微丝的运输转换过程中则是协同效应[7]。有研究证实 Myosin-V 类蛋白在缺少中间丝的情况下，运动‘步伐’加大、运动速度加快，提示中间丝的网状结构所形成的粘滞曳力可能阻碍了细胞器之间的运输[8,9]。

近年来对 Myosin-V 在 actin 上的运动和循环都进行了较深入的研究，如其运动方式为“hand over hand”，每一步跨越 36 nm 等[10,11]。而 Myo5c 作为新发现的成员，为相关研究提供了新的方向。加之 Myo5c 在上皮细胞和腺体组织最活跃，因此，Myo5c 在细胞内运输的相关功能研究，以及在病毒感染时是否为病毒所利用等成为我们关注的新焦点。本实验克隆出人 Myo5c 特异性的基因片段，原核表达蛋白，并制备出能特异性识别人 Myo5c 的小鼠、兔抗血清，为后续研究其功能提供了有利的工具。

参考文献：

[1] Reck-Peterson S L, Provance D W, Jr., Mooseker M S, *et al*. Class V myosins[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1496(1): 36-51.

[2] Tuxworth R I, Titus M A. Unconventional myosins: anchors in the membrane traffic relay[J]. Traffic, 2000, 1(1): 11-18.

[3] Taylor K A. Regulation and recycling of myosin V[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(1): 67-74.

[4] Rodriguez O C, Cheney R E. Human myosin-Vc is a novel class V myosin expressed in epithelial cells[J]. J Cell Sci, 2002, 115(Pt 5): 991-1004.

[5] 邓少丽，胡福泉，蹇 锐. 转录因子 Blimp-1 的原核表达、纯化及抗体制备[J]. 第三军医大学学报，2006, 28(3): 205-207.

[6] Sellers J R, Veigel C. Walking with myosin V[J]. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18(1): 68-73.

[7] Gross S P, Tuma M C, Deacon S W, *et al*. Interactions and regulation of molecular motors in Xenopus melanophores[J]. J Cell Biol, 2002, 156(5): 855-865.

[8] Levi V, Gelfand V I, Serpinskaya A S, *et al*. Melanosomes transported by myosin-V in Xenopus melanophores perform slow 35 nm steps[J]. Biophys J, 2006, 90(1): L07-L09.

[9] Kural C, Serpinskaya A S, Chou Y H, *et al*. Tracking melanosomes inside a cell to study molecular motors and their interaction[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(13): 5378-5382.

[10] Komori Y, Iwane A H, Yanagida T. Myosin-V makes two brownian 90 degrees rotations per 36-nm step[J]. Nat Struct Mol Biol, 2007, 14(10): 968-973.

[11] Cappello G, Pierobon P, Symonds C, *et al*. Myosin V stepping mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(39): 15328-15333.

（编辑 薛国文）