论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0326-03

大鼠神经球蛋白的原核表达及多克隆抗体制备

朱 继 (重庆医科大学附属第一医院神经外科,重庆 400016)

摘 要:目的 克隆Wistar大鼠神经球蛋白(NGB)基因,通过原核表达制备其多克隆抗体,为进一步研究其功能奠定基础。**方法** 从雄性Wistar大鼠脑组织中提取总RNA,经逆转录PCR得到cDNA,测序证明该基因序列正确后,亚克隆入pET-28a(+)载体中,通过双酶切和测序确定序列和阅读框正确。转化大肠杆菌BL21菌株,获得可溶性表达产物,经鉴定、纯化后免疫新西兰兔,分离血清,ELISA法测定抗体效价。**结果** 神经球蛋白多克隆抗体效价达1∶100 000,此多抗可以与293细胞内表达的重组蛋白发生很好的抗原抗体反应。**结论** 成功制备了兔抗NGB的多抗,为后续研究提供了重要的实验材料。

关键词: 神经球蛋白;原核表达;多克隆抗体

中图法分类号: R341;R392-33;R392.11 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of rat neuroglobin gene

ZHU Ji (Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To clone rat NGB gene and prepare its polyclonal antibody in order to investigate the function of neuroglobin (NGB). Methods The total RNA was extracted from Wistar rat brain and the full length cDNA encoding NGB was obtained by RT-PCR. Confirmed by sequencing analysis, it was inserted in the prokaryotic expression vector pET-28a(+). pET-28a(+)-NGB was expressed in *E. coli* BL21 after its sequence and reading frame were confirmed by two restriction endonucleases and sequencing. The protein of pET-28a(+)-NGB was used to immunize New Zealand rabbits for preparing polyclonal antibody after identification and purification. The antibody titer was tested by ELISA method. Results The titer of polyclonal antibody was 100 000. Immunoblot analysis showed the polyclonal antibody can recognize fusion protein expressed in 293 cells. Conclusion The polyclonal antibody of NGB is prepared and can be used in further study.

Key words: neuroglobin; prokaryotic expression; polyclonal antibody; eukaryotic expression

神经球蛋白(neuroglobin,NGB)是Burmester等发现的一类携氧球蛋白,由151个氨基酸组成。神经球蛋白除了能够特异性地向脑组织供氧以外,其表达调控还在中枢神经系统的功能活动中起重要作用,参与脑细胞缺血缺氧等应激过程[1]。开展对NGB的研究,将有助于了解临床脑缺血缺氧疾病中神经细胞的凋亡机制[2]。我们已经通过逆转录PCR技术得到了大鼠NGB基因的编码序列,并通过建立大鼠模型来研究NGB在神经细胞凋亡过程中的作用机制,目前急需制备其多克隆抗体。因此,本研究应用大鼠NGB基因编码区构建其原核表达载体pET-28a(+)-NGB,转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株,获得可溶性表达产物,经鉴定、纯化后免疫新西兰兔,分离血清,ELISA法测定抗体效价,为以后对NGB的结构与功能进行深入研究提供重要工具。

1 材料与方法

1.1 材料

新西兰兔1只,雄性,体质量2.0 kg;雄性成年Wistar大鼠1只,体质量210 g,均由本校实验动物中心提供。大肠杆菌及质粒pCDNA3.1(+)-NGB为本室保存,pET-28a(+)表达载体购自Novagen公司。转染试剂METAFECTENE为Biontex公司产品。IPTG、标准分子量蛋白购自Promega公司,LA *Taq*酶、限制性内切酶*Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ购自TaKaRa公司,T_4 DNA连接酶为NEB公司产品。RT-PCR试剂盒、Trizol试剂均购自Invitrogen公司。完全福氏佐剂和不完全福氏佐剂购自Sigma公司,Ni-NTA层析柱购自Qiagen公司,ELISA及Western blot检测试剂盒由武汉晶赛生物公司提供。

基金项目: 重庆市卫生局项目(06-2-177)
Supported by the Bureau of Public Health of Chongqing (06-2-177)

作者简介: 朱 继,男,重庆市人,博士,副教授,主要从事神经外科方面的研究。电话:13808399425,E-mail: a68690569@cta.cq.cn

收稿日期: 2007-04-24;**修回日期:** 2007-06-18

1.2　大鼠 NGB 基因编码序列的扩增

取 Wistar 大鼠脑组织,迅速加入液氮和 1 ml Trizol,于研钵中充分研磨至浆状,倒入 EP 管中,提取总 RNA,终产物溶于 35 μl ddH_2O(Rnase free)中。

参照 RT-PCR 试剂盒说明,反转录合成 cDNA。两条引物分别加上 *Bam*HⅠ、*Xho*Ⅰ限制性酶切位点。引物 1:5′-CGGGATCCGCCACCATGGAGCGCCTAGAGT-3′,引物 2:5′-CCGCTCGAGCTTGTCTCTTACTCCCCGTC-3′。PCR 反应条件:94 ℃预处理 5 min;94 ℃变性 20 s,54 ℃退火 25 s,72 ℃延伸 30 s,30 个循环后 72 ℃再延伸 3 min。1% 琼脂糖凝胶电泳观察后将目的片段连接到 T 载体(TS-NGB)。

1.3　目的片段的酶切鉴定及测序

将连接产物转化至 DH5α 中,挑取克隆进行酶切鉴定。为了进一步确证所扩增的片段为 NGB 基因,选取酶切鉴定结果正确的克隆进行测序。

1.4　原核表达载体的构建及鉴定

用 *Bam*HⅠ和 *Xho*Ⅰ将 TS-NGB 及原核表达载体 pET-28a(+)分别进行两步法双酶切,然后进行连接。连接产物转化至 DH5α 中,挑取克隆进行鉴定。

1.5　NGB 的诱导表达

将成功构建得到的 pET-28a(+)-NGB 质粒转化 BL21(DE3)感受态菌株,加入 LB 培养液 37 ℃震荡培养 45 min 后涂布于 LB 平板上(含终浓度 100 μg/ml 卡那霉素)培养过夜。次日挑取单菌落,接种于含卡那霉素的 LB 培养液中,37 ℃摇床培养扩增至 $D(600)$ 为 0.4 左右,加入终浓度为 0.1 mg/ml 的异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG),诱导表达 4 h,4 ℃离心收集菌体。

1.6　表达蛋白的分离、纯化

菌体用 PBS 洗涤 2 次,Tris 缓冲液悬浮,以 300 W、15 s 进行超声破碎 4 次。4 ℃,10 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀。以含 0.5% TritonX-100,10 mmol/L EDTA 的缓冲液洗涤后,加入裂解缓冲液(含 0.1 mmol/L PMSF,8 mol/L 尿素,10 mmol/L DTT)溶解包涵体,室温放置 1 h。加入氧化还原缓冲液,室温离心收集上清液,即为初步纯化的 NGB。以浓度为 13.5% 的分离胶进行 SDS-PAGE,根据标准蛋白切取目的蛋白带,冷冻干燥后用 Ni-NTA 柱层析纯化并回收 NGB。

1.7　多克隆抗体的制备

取 200 μg 纯化的 NGB 用适当体积生理盐水稀释,加等体积完全福氏佐剂充分乳化,于新西兰兔背部皮下多点注射,此为基础免疫。每间隔 14 d,用 100 μg 纯化的 NGB,加等体积不完全福氏佐剂进行加强免疫,共加强免疫 4 次。从第 3 次免疫后 1 周开始取少量耳缘静脉血,分离血清,ELISA 法测定抗体效价。最后 1 次免疫后第 10 天从颈动脉放全血,分离血清,制备抗体,分装冷冻保存。

1.8　Western blot 检测

将真核表达产物经 SDS-PAGE 后,按 1.0 mA/cm^2 将蛋白质电转至硝酸纤维素膜上。PBS 洗膜,加入封闭液,室温摇动 2 h。加入一抗,4 ℃过夜;洗膜 3 次,每次 10 min。加入酶标二抗,室温下作用 2 h,洗膜 3 次,每次 10 min。Western blot 检测试剂盒进行检测。

2　结果

2.1　NGB 基因编码序列的获取

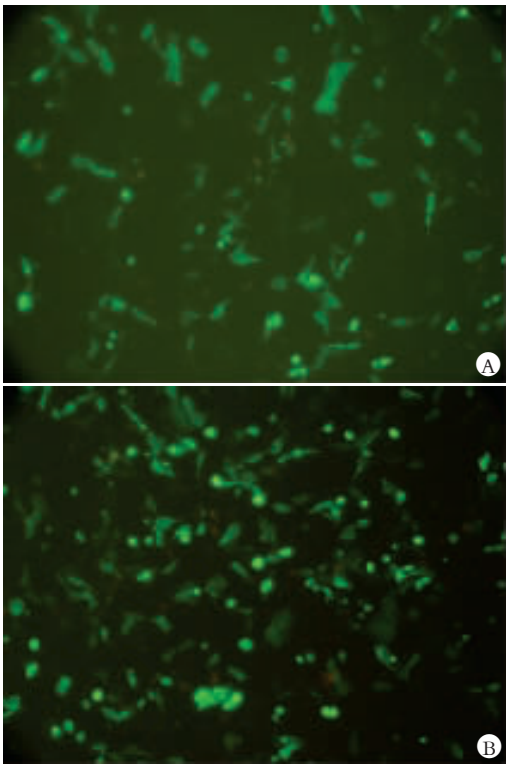
应用设计的特异性引物,采用逆转录 PCR 对提取的 Wistar 大鼠脑组织 RNA 进行扩增,得到 1 条 500 bp 左右的目的片段,与理论设计完全相符[3]。

2.2　重组质粒酶切鉴定及目的基因序列分析

经过蓝/白斑和抗生素进行初步筛选,随机挑取 4 个含重组质粒的菌落,制备重组质粒用 *Eco*RⅠ和 *Xho*Ⅰ进行双酶切鉴定。每个克隆都得到了两条较清晰的带,酶切成功。参照标准 DNA 的大小,在 300 bp 都有一条明显的泳带,选取最亮的一条带记为克隆①进行序列测定,得出本研究扩增、克隆得到的大鼠 NGB 基因全长 465 bp,共编码 151 个氨基酸。用 BLAST 工具与 NCBI 数据库中序列比对,结果发现在第 124、313、373 位发生了由 A-G 的突变,340 位发生了 G-A 的突变,从而造成了第 42、105、114 个和第 125 个氨基酸的改变。Goldkey 软件分析表明原来的抗原表位不受影响。

2.3　重组 NGB 在 293 细胞中表达

将我们已经构建成功的 pCDNA3.1-NGB 真核表达载体,以 GFP 为报告基因,利用基因重组技术构建真核表达质粒 pcDNA3.1-NGB-GFP,并按照转染试剂 METAFECTENE 操作说明,将其转染 293 细胞,培养 24、48 h 后在倒置荧光显微镜下可明显观察到细胞呈绿色荧光(图 1),说明融合蛋白成功表达。转染后 48 h 融合蛋白在 293 细胞中表达明显增强。



A:转染后 24 h;B:转染后 48 h

图 1　NGB 融合蛋白在 293 细胞中的表达情况

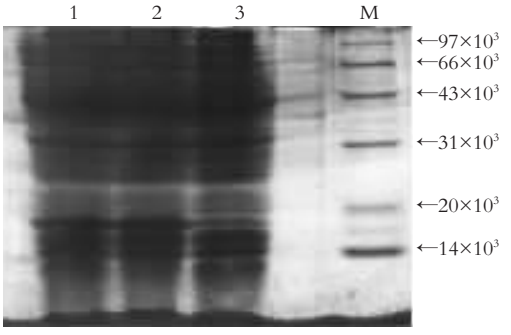
(倒置荧光显微镜 ×400)

2.4 NGB 重组原核表达载体的构建及鉴定

用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ将 TS-NGB 及目的载体 pET-28a(+)两步法双酶切,然后进行连接,构建成重组 NGB 原核表达载体[pET-28a(+)-NGB]。挑取克隆用 *Bam*H Ⅰ和 *Xho* Ⅰ双酶切鉴定,应得到 1 条约 500 bp 的片段。选取的 4 个克隆经酶切都得到了 2 条清晰的电泳带,在 500 bp 处都有 1 条明亮的带,与理论设计基本相符。选取克隆①进行培养,提取重组质粒经进一步测序后证明,所插入片段的核苷酸序列与我们所克隆的 NGB 基因的序列完全一致,阅读框也正确无误。说明 NGB 基因已成功插入到原核表达载体 pET-28a(+)中,其原核表达载体构建成功。

2.5 NGB 原核表达与鉴定

将成功构建得到的 pET-28a(+)-NGB 质粒转入 BL21(DE3)菌株,37 ℃摇床培养扩增至 $D(600)$为 0.4 左右,加入终浓度为 0.1 mg/ml 的 IPTG 诱导表达,4 ℃离心收集菌体。通过超声破碎和裂解液溶解包涵体的方式,收集上清液,即为初步纯化的 NGB。以浓度为 13.5% 的分离胶进行 SDS-PAGE,得到 1 条相对分子质量为 17×10^3 的蛋白带(图 2)。

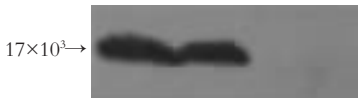


1、2:IPTG 诱导表达;3:未诱导表达;4:标准

图 2 神经球蛋白 SDS-PAGE 图谱

2.6 重组蛋白的 Western blot 检测

以原核表达的 NGB 为免疫原制备了兔抗 NGB 的多抗,经纯化后 ELISA 法测定其效价为 1∶100 000。将真核表达质粒 pcDNA3.1-NGB-GFP 转染 293 细胞,培养 48 h 后提取蛋白。Western blot 检测可见阳性条带,而对照组无条带(图 3)。结果表明大鼠 NGB 在真核细胞内得到表达,同时也说明了本实验制备的多克隆抗体特异性较强。



1、2:NGB 融合蛋白;3:对照

图 3 NGB 融合蛋白 Western blot 检测结果

3 讨论

神经球蛋白为新发现的一种携氧蛋白,具有独特的外显子和内含子结构,NGB 基因缺乏 TATA 阅读框。NGB 能够可逆地结合氧,且与氧有很高的亲和力,能够特异性地向脑组织供氧[5]。NGB 基因的表达调控至少有两条信号转导途径参与,在中枢神经系统的功能活动中可能起重要作用[6]。我们选用 Wistar 大鼠克隆得到的 NGB 基因与文献[3,4]报道基本一致,但与 Zhang 等[4]选用 Norway 大鼠的研究报道不完全相同,有 4 个碱基发生了突变,同源性为 99%,所对应的氨基酸序列也有 4 个发生了改变。这是由于生物的多样性,同一个基因在不同品系或个体间出现基因编码不一致是普遍存在的现象。因此,理论上来讲这些突变不是由于实验操作引起的。经分析发现,这些氨基酸的改变没有影响原来的抗原表位,但是否影响到蛋白质的结构和功能,还需作进一步的研究。

孙健伟等[7]利用 Norway 大鼠的 NGB 基因编码区构建原核表达载体 pGEX-4T-2/NGB,通过原核表达产物免疫 BALB/c 小鼠,采用细胞融合方法制备了抗大鼠 NGB 的单克隆抗体,其目的是为了研究检测试剂盒。我们选用 pET 高效表达载体,经 IPTG 诱导表达目的蛋白,利用 SDS-PAGE 和 Ni-NTA 层析住分离、纯化 NGB,经皮下多点注射免疫新西兰兔,制备多抗。ELISA 检测多抗效价可达 1∶100 000,利用 Western blot 对多抗进行检测,其可与 293 细胞中表达的融合蛋白特异性结合。目前,NGB 保护神经细胞的作用机制尚不十分清楚[8]。我们已经用 Wistar 大鼠建立了脑缺血模型,NGB 多抗的制备有利于我们研究其在神经细胞凋亡中的作用机制。

参考文献:

[1] Li R C, Lee S K, Pouranfar F, *et al*. Hypoxia differentially regulates the expression of neuroglobin and cytoglobin in rat brain [J]. Brain Res, 2006, 1096(1): 173-179.

[2] Sun Y, Jin K, Peel A, *et al*. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke *in vivo*[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6): 3497-3500.

[3] 朱 继, 唐文渊. 大鼠神经球蛋白基因的克隆及其真核表达载体构建[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(2): 144-146.

[4] Zhang C, Wang C, Deng M, *et al*. Full-length cDNA cloning of human neuroglobin and tissue expression of rat neuroglobin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290(5): 1411-1419.

[5] Brunori M, Giuffre A, Nienhaus K, *et al*. Neuroglobin, nitric oxide, and oxygen: functional pathways and conformational changes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102 (24): 8483-8488.

[6] Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric Galpha protein guanine nucleotide dissociation inhibitor [J]. J Biol Chem, 2003, 278(38): 36505-36512.

[7] 孙健伟, 韩洪彦, 徐文琳, 等. 大鼠脑红蛋白(NGB)可溶性原核表达和单克隆抗体制备及鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2003, 19(6): 751-756.

[8] Fordel E, Thijs L, Martinet W, *et al*. Neuroglobin and cytoglobin overexpression protects human SH-SY5Y neuroblastoma cells against oxidative stress-induced cell death[J]. Neurosci Lett, 2006, 410(2): 146-151.

(编辑 张大春)