文章编号:1000-5404(2010)11-1237-02

技术方法

人心脏发育相关基因 *ZNF382* 的原核表达及多克隆抗体的制备

罗开梅[1],冷 波[1], 张国广[1],马旭东[2] (363000 福建 漳州,漳州师范学院生物科学与技术系[1]; 363000 福建 漳州,福建省漳州市医院血液科[2])

[摘要] **目的** 表达、纯化 *ZNF*382 融合蛋白及制备兔多克隆抗体。**方法** 通过 PCR 扩增 *ZNF*382 编码区,将其克隆到 pRSET C 载体中,重组载体酶切鉴定,测序,转化大肠杆菌 BL21(DE3)并用 IPTG 进行诱导表达,原核表达产物经鉴定、纯化后,免疫新西兰大白兔。通过 ELISA 和 Western blot 检测抗血清的效价和特异性。**结果** 成功构建了 pRSET C-*ZNF*382 原核表达重组质粒,His_6-*ZNF*382 融合蛋白被强烈诱导表达,以包涵体的形式存在,其相对分子质量约为 64×10^3,纯化后免疫产生的多克隆抗体效价约为 1∶10 000,与 *ZNF*382 原核表达蛋白特异性结合。**结论** 获得了大量高效价、高特异性的兔抗人 *ZNF*382 多克隆抗体。

[关键词] *ZNF*382;心脏发育;原核表达;抗体制备
[中图法分类号] R392-33 **[文献标志码]** A

心脏发育是一个非常复杂的过程,它需要精确的基因表达调控,研究发现许多基因(如 *Nkx*2.5、*MEF*2*C*、*GATA*4、*dHAND* 以及 *IRX*4 等)参与模型动物心脏的诱导、形成和发育[1-3],虽然人类对心脏发育和心脏疾病的生理和临床方面的研究已取得较大的进展,然而大多数心血管疾病的识别和治疗都是从表型上入手,随着基因组学和蛋白质组学的研究进展,将来阻止和治疗心血管疾病将依赖于遗传和分子物质的阐明,尤其需要对参与正常心脏发育过程中的转录因子及其信号转导途径进行深入探讨。

许多锌指蛋白作为转录因子参与心脏的形成和疾病的发生,*ZNF*382 属 KRAB/C2H2 型的锌指蛋白转录因子,其 mRNA 在成体心脏组织特异表达已报道[4]。本研究旨在构建一个能够在原核细胞高效表达 *ZNF*382 的载体,获取大量高纯度的抗原,用纯化的 *ZNF*382 蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔,获得效价高、特异性高的多克隆抗血清,为深入研究 *ZNF*382 的性质和功能,分析其参与心脏的发育机制乃至疾病的发生机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

蛋白酶缺失菌株-*E. coli* BL21(DE3)和体质量约 2 kg 成年雌性新西兰大白兔由湖南师范大学基因敲除实验室赠送;各种 DNA 限制性内切酶、T_4连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、标准分子量蛋白购自上海生工生物有限公司;pMD 18-T 载体及质粒抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司;Ni-NTA 胶购自 Qiagen 公司;弗氏完全及不完全佐剂购自 Sigma 公司;HRP-羊抗鼠 IgG 购自北京华美生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 及重组质粒 pRSET C-*ZNF*382 的构建 以 *ZNF*382 全长质粒为模板,设计开放阅读框引物,*ZNF*382*Y*1(5′-GATGGATCCGTATGCCCTTACAGGGATCAG-3′)和 *ZNF*382*Y*2(5′-GCAGGATCCACATACTGAATTCCCGTGG-3′),引物两端引入 *Bam*H 酶切位点,PCR 扩增产物用 *Bam*H 酶切、纯化后,克隆入融合表达载体 pRSET C,转化 *E. coli* BL21 (DE3),提取质粒,*Bam*H 单酶切和 *Hind*/*Nde* 双酶切鉴定连接顺反,测序。

1.2.2 *ZNF*382 融合蛋白的诱导表达及产物分析 阳性单克隆菌落于含 50 mg/ml 羧卞青霉素钠盐和 34 mg/ml 氯霉素 LB 培养基中培养至 $D(600) = 0.5 \sim 0.7$,加 IPTG 至终浓度 2 mmol/L 诱导蛋白表达 4 h,菌体经裂解缓冲液(100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 50 mmol/L Tris, pH = 8.0)重悬后,依次用溶菌酶、0.1% 的去氧胆酸盐、DNase、1% NP-40 处理,再用尿素洗涤,最后用 5 ml 溶液 B(100 mmol/L NaH_2PO_4, 10 mmol/L Tris · Cl, 8 mol/L 尿素, pH = 8.0)重悬。对上述各步收集的样品(共 9 个)进行 SDS-PAGE 分析。

1.2.3 *ZNF*382 融合蛋白的纯化、复性 取 1 ml 50% Ni-NTA 胶于 4 ml 溶于溶液 B 的蛋白溶液当中,用溶液 C(成分同 B, pH = 6.3)、D(成分同 B, pH = 5.9)、E(成分同 B, pH = 4.5)逐步洗脱目的蛋白,并用 SDS-PAGE 观察纯化效果。将纯化所得蛋白用冷 PBS 透析复性。

1.2.4 兔抗人 *ZNF*382 多克隆抗体的制备 免疫接种前采集血样 1 ml,取复性的抗原 500 μg 共 1 ml 混入等体积弗氏完全佐剂,乳化后在新西兰大白兔背部分散多点进行皮下注射,4 周后取 200 μg 共 400 μl 抗原与等体积的不完全弗氏佐剂乳化液进行初次加强,每隔 2 周进行加强注射,共加强 3 次,每次加强 10 d 后心脏采血 10 ml,兔血于 4 ℃冰箱静置过夜,并用间接 ELISA 检测抗血清效价。

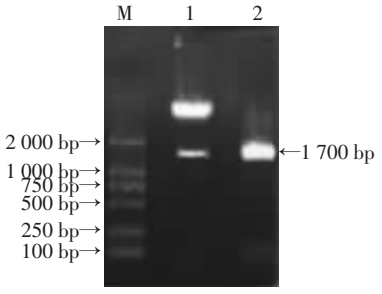
[基金项目] 福建省教育厅科技项目(JA06021, JB06153);卫生部科学研究基金—福建省卫生教育联合攻关计划资助项目(WKJ2008-2-55)
[通信作者] 罗开梅,电话:(0596)2528735, E-mail:luokaimei@yahoo.com.cn

1.2.5 多克隆抗体特异性检测 用制备的兔抗 *ZNF*382 多抗与膜上的蛋白进行抗原－抗体反应，一抗为 *ZNF*382 兔血清，按1∶1 000稀释，二抗为羊抗兔IgG血清按1∶2 000稀释，反应完毕后，用DAB染色，至目的条带染色清晰时终止反应。

2 结果

2.1 *ZNF*382 cDNA片段的获得与亚克隆

用设计的2条引物从 *ZNF*382 质粒中扩增出约1 700 bp大小的cDNA片段，转化产物经酶切鉴定、测序，显示目的基因已正确插入pRSET C，保持正确的读码框架，并成功转入 *E. coli* BL21(DE3)。见图1。

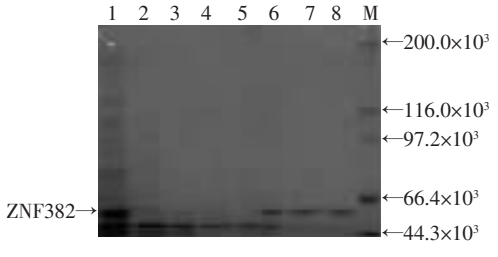


M：DNA标准(DL 2000)；1：*Bam*H酶切的pRSETC-*ZNF*382；2：PCR扩增的靶基因

图1 重组表达载体 pRSET C-*ZNF*382 酶切鉴定

2.2 *ZNF*382 融合蛋白的原核表达与纯化

对9个样品进行分析，*ZNF*382 融合蛋白大量且只存在于溶液B中，说明融合蛋白以包涵体的形式存在于菌体中。利用pRSET C的特性，表达6个连续的组氨酸，用Ni-NTA胶溶液在碱性环境结合6个组氨酸的性质，经溶液C、D充分洗涤后，融合蛋白 His_6-*ZNF*382 被溶液E特异洗脱(图2)，达到了纯化的目的，其纯化背景干净，无杂带。

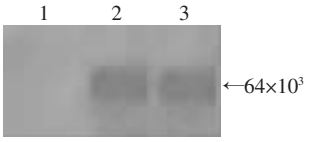


1：溶液B溶解的样品；2、3：用溶液C先后2次洗脱的收集液；4、5：用溶液D先后2次洗脱的收集液；6－8：用溶液E先后3次洗脱的收集液；M：蛋白质标准

图2 8%SDS-PAGE 分析 His_6-*ZNF*382 蛋白的表达、纯化

2.3 多克隆抗体的制备与检测

利用纯化的重组人 *ZNF*382 为抗原免疫兔，获得兔抗人 *ZNF*382 抗血清，ELISA结果显示效价约为1∶10 000，阴性对照的免疫前兔血清与 His_6-*ZNF*382 不结合，其 D(450)值小于0.2。利用1∶1 000稀释的抗血清对原核表达和纯化的蛋白进行免疫印迹检测，在未经IPTG诱导的菌体总蛋白中检测不到信号，说明抗血清与大肠杆菌的菌体蛋白无交叉反应，在诱导后总蛋白和纯化蛋白均检测出 64×10^3 的单一条带(图3)，表明制备的抗血清具有很高的特异性。



1：诱导前的菌体蛋白；2：诱导后的总蛋白；3：纯化的融合蛋白

图3 Western blot 检测兔抗人 *ZNF*382 抗血清的特异性

3 讨论

*ZNF*382 是本研究克隆的一个基因，虽然已发现它在成体心脏和肌肉特异表达[4]，而且也证明了其在肌肉生成中起重要作用[5]，但它对心脏发育的具体作用和作用机制还不清楚，这正是我们进一步研究的工作，而抗体是研究蛋白质性质和功能及其与疾病关系的重要工具。本实验制备抗体时，与邓少丽等[6]大多数研究者采用的方法不同，在表达分析融合蛋白时，采用试剂温和逐步处理的方案代替超声操作，进行蛋白质的可溶性分析，并有效地去除了杂蛋白和核酸，纯化时不使用咪唑，用pH递降的缓冲液从金属镍亲和柱洗脱 His_6-*ZNF*382，达到纯化蛋白的目的，此方法快速、简便、成本低。

利用纯化的 *ZNF*382 融合蛋白免疫新西兰大白兔，成功制备了大量多克隆抗体，抗血清的效价约为1∶10 000，1∶1 000稀释的抗体与诱导表达的 His_6-*ZNF*382 蛋白有特异的抗原抗体反应，该抗体的成功制备为开展 *ZNF*382 基因后续功能的研究提供了条件。

参考文献：

[1] Bruneau B G. Transcriptional regulation of vertebrate cardiac morphogenesis[J]. Circ Res, 2002, 90(5): 509－519.

[2] Wagner M, Siddiqui M A. Signal transduction in early heart development (I): cardiogenic induction and Heart tube formation[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2007, 232(7): 852－865.

[3] Wagner M, Siddiqui M A. Signal transduction in early heart development (II): ventricular chamber specification, trabeculation, and heart valve formation[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2007, 232(7): 866－880.

[4] Luo K, Yuan W, Zhu C, *et al*. Expression of a novel Krupple-like zinc-finger gene, *ZNF*382, in human heart[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002,299(4): 606－612.

[5] 廖鹏，王瑛，白彦，等. 人类锌指蛋白 *ZNF*382 对肌生成的调控作用[J]. 激光生物学报，2009，18(1)：31－34,78.

[6] 邓少丽，胡福泉，蹇锐，等. 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.

(**收稿**:2009-11-11;**修回**:2010-01-06)

(编辑 王小宴)