文章编号:1000-5404(2010)14-1579-03

技术方法

人 YB-1 蛋白的高效原核表达、纯化及其多抗的制备

李 朴,孔飞飞,余雪梅,成 凤,涂植光 (400016 重庆,重庆医科大学临床检验诊断学教育部重点实验室)

[摘要] 目的 构建 YB-1 原核表达系统,诱导表达后纯化 YB-1 融合蛋白并制备其多抗。方法 采用 RT-PCR 扩增 YB-1 编码序列,将该序列克隆至载体 pET-32a(+)转化 BL21(DE3),确定最佳表达条件;采用亲和层析与超滤纯化目的蛋白,经 Western blot 鉴定后免疫家兔,制备其抗体。结果 成功扩增 YB-1 编码序列并构建了其表达载体;SDS-PAGE 结果显示,表达条件经优化后(28 ℃,5 h,0.5 mmol/L IPTG),YB-1 融合蛋白在 BL21 中得到高效可溶性表达;Western blot 结果证实,表达产物经纯化后获得了纯度较高的 YB-1 融合蛋白,将该蛋白免疫家兔后获得了效价与特异性较高的抗体。结论 成功建立了 YB-1 蛋白的原核表达系统及蛋白纯化方法,并制备了其抗体。

[关键词] YB-1;原核表达;亲和层析;多抗制备
[中图法分类号] R392-33;R392.11 [文献标志码] B

Y-box 结合蛋白 1(Y-box binding protein 1,YB-1)为人类细胞中广泛表达的 Y-box 结合蛋白家族之一。YB-1 含 324 个氨基酸残基,相对分子质量 42×10^3。研究发现,YB-1 参与 mRNA 的选择性剪接、稳定和翻译功能调控、DNA 的修复、细胞增殖和再生调节,表现出多功能核转录调控因子特性[1]。研究表明,YB-1 在恶性肿瘤的发生、发展以及化疗耐药性中起关键作用[2,3]。尽管研究证实 YB-1 在多种肿瘤细胞中呈异常高水平表达,提示 YB-1 可作为肿瘤的临床诊断或判断预后的标志物。但到目前为止,针对 YB-1 对恶性肿瘤的诊断以及肿瘤预后判断的相关研究报道甚少。本研究拟构建携 YB-1 编码序列的原核表达载体,将其转入 BL21(DE3),表达、纯化以获得 YB-1 融合蛋白,并进一步制备其多克隆抗体,为研究血浆 YB-1 作为一种生物标志物在恶性肿瘤诊断及化疗耐药性判断的临床应用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒、培养基和生长条件

人乳腺癌细胞系 MCF-7、大肠杆菌 DH5α 与 BL21(DE3)、载体 pET-32a(+)由本室保存。MCF-7 用 DMEM 37 ℃培养;DH5α、BL21(DE3)常规培养用 LB 培养基,37 ℃振荡培养;羧苄青霉素二钠的工作浓度为 50 μg/ml。

1.2 主要试剂

RT-PCR Kit、连接酶与限制性内切酶均购自大连 TaKaRa 公司;RNA 与质粒提取试剂盒、PVDF 膜购自 Sigma 公司;DNA 与蛋白质标准购自 Fermentas 公司;YB-1 mouse monoclonal Antibody 购自 Santa Cruz 公司;Ni-NTA his Bind Resin、Ni-NTA 缓冲液试剂盒为 Merck 公司产品;引物委托上海英骏公司合成。

1.3 方法

1.3.1 YB-1 基因编码序列的 PCR 扩增及原核表达载体的构建

1.3.1.1 细胞总 RNA 提取及 cDNA 制备 收集对数生长期的 MCF-7 细胞提取总 RNA,并以此为模板进行 RT-PCR 以制备 cDNA。总 RNA 提取及 RT-PCR 操作参照试剂盒说明书进行。

1.3.1.2 目的片段的 PCR 扩增 根据 GenBank 中 YB-1 mRNA 序列中的编码序列(NM_004559.3),设计并合成 YB-1 基因编码序列的 PCR 扩增引物(YB-1 上游:5′-GGATCCATGAGCAGCGAGGCCGAGACCCAGCAGCCG-3′,下游:5′-AAGCTTTTA*GTGGTGGTGGTGGTGGTG*CTCAGCCCCGCCCTGCT-3′;下划线部分为酶切位点 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ,斜体部分为设计增加的 His-tag 序列)。

以制备的 cDNA 为模板,用设计引物进行 PCR 扩增 YB-1 编码序列。PCR 反应体系如下:5 × PCR PrimerSTAR Buffer (Mg + plus) 10 μl,dNTP Mixture 4 μl,模板 1 μl,引物各1 μl,DNA Polymerase 0.5 μl,补 ddH_2O 至 50 μl。反应条件:98 ℃预变性 30 s;98 ℃ 10 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.1.3 pET-YB1 原核表达载体的构建 PCR 产物与载体 pET-32a(+)经 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切后连接,连接产物转化感受态 DH5α,涂布于含羧苄青霉素的 LB 平板,37 ℃培养过夜,次日挑取单菌落增菌,提取质粒进行 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定,并进一步测序确证。构建的重组载体命名为 pET-YB1。

1.3.2 YB-1 融合蛋白诱导表达条件的确定

将 pET-YB1 转化感受态 BL21(DE3),参考文献[4],比较以下表达条件:时间(3、4、5、10 h),温度(37、35、33、30、28 ℃)及 IPTG 浓度(0.5、0.8、1.0、1.2 mmol/L),根据 SDS-PAGE 结果确定其最佳表达条件并分析融合蛋白的表达形式。

1.3.3 YB-1 融合蛋白的表达、纯化与鉴定

1.3.3.1 融合蛋白的诱导表达与纯化 在最佳表达条件下(28 ℃,5 h,IPTG 0.5 mmol/L)诱导表达,离心收集菌体,与1 ×

[基金项目] 国家自然科学基金(30872417)
[通信作者] 涂植光,电话:(023)68485759,E-mail:tuzhiguang@yahoo.com.cn

Ni-NTA Bind Buffer(50 mmol/L NaH_2PO_4,pH=8.0,300 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑,1 mmol/L PMSF)充分混匀后,冰水浴超声破碎至菌液清亮,离心收集上清(20 000×*g*,20 min,4 ℃),随后操作参照亲和纯化试剂盒说明进行。取适量纯化的融合蛋白进行 SDS-PAGE,以检测其纯度。

1.3.3.2 融合蛋白的超滤浓缩与鉴定 收集上步中蛋白洗脱液,置超滤杯中进行超滤浓缩与脱盐,其操作参照仪器说明进行。取适量超滤后所得产物进行 SDS-PAGE,将目的蛋白条带电转移至 PVDF 膜上,以 YB-1 mouse monoclonal Antibody 为一抗(1∶500 稀释)、羊抗鼠 IgG-HRP(1∶2 000 稀释)为二抗,ECL 化学发光系统检测目的蛋白表达情况与纯度。

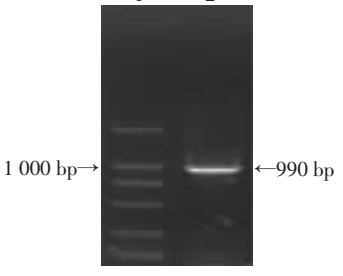
1.3.4 YB-1 抗血清的制备及纯化 选取 2.0 kg 左右健康雄性大白兔,取 2 mg 纯化的融合蛋白与等体积的弗氏完全佐剂乳化,于家兔背部、足垫、皮下多点注射;14 d 后以同样量蛋白与弗氏不完全佐剂混合、乳化,加强免疫;在 21、28 d 再用纯蛋白于兔腹股沟肌肉加强免疫;33 d 经兔耳缘静脉取血,ELISA 法检测效价符合要求后,心脏采血,分离血清;经硫酸氨盐析纯化、超滤脱盐后,-80 ℃保存备用。

1.3.5 YB-1 抗血清的鉴定 取融合蛋白经 SDS-PAGE 后,电转移到 PVDF 膜,用制备的兔抗血清为一抗(1∶1 000 稀释),羊抗兔 HRP-IgG 为二抗(1∶3 000 稀释),Western blot 分析其特异性。具体操作参考 1.3.3.2 进行。

2 结果

2.1 PCR 扩增目的片段及其原核表达载体的构建

经琼脂糖凝胶电泳鉴定,PCR 产物片段约 990 bp,符合预期目的片段长度(图 1)。将 PCR 产物克隆到表达载体多克隆位点上,对该重组载体进行 *Bam*HⅠ和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定(图 2),并进一步测序确证,测序结果证实与 YB-1 编码序列完全一致,表明携 YB-1 基因编码序列的原核表达载体 pET-YB1 构建成功。

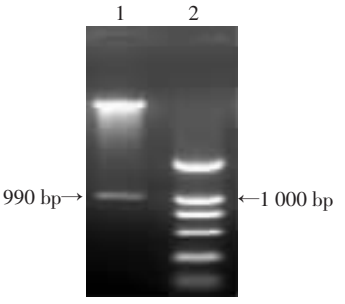


1∶DNA 标准;2∶PCR 扩增产物

图1 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物

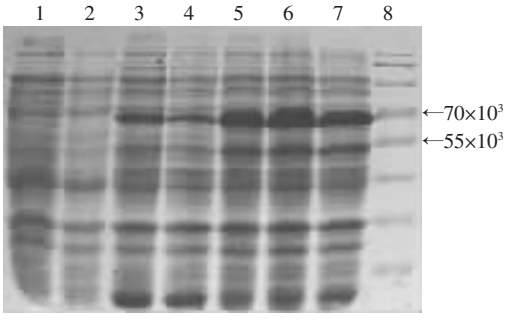
2.2 YB-1 融合蛋白的最佳诱导表达条件

将 pET-YB1 转化 BL21 后,对表达的时间、温度、IPTG 浓度及表达形式分别进行了表达与鉴定。SDS-PAGE 结果显示,与诱导前相比,在 70×10^3 附近有一明显条带,与融合蛋白相对分子质量(65×10^3)大小相符(图 3)。在 28 ℃,5 h,IPTG 0.5 mmol/L(图 4)表达条件下,目的蛋白得到了高效可溶性表达(图 5)。



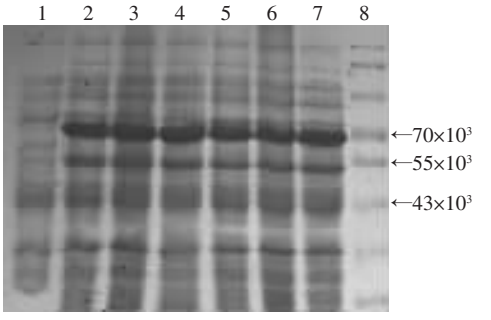
1:双酶切重组质粒;2∶DNA 标准

图2 pET-YB1 重组质粒的双酶切鉴定



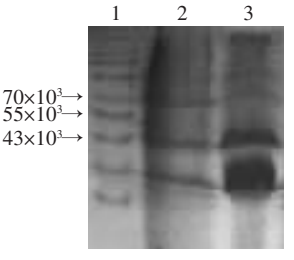
1:28 ℃,诱导前;2:37 ℃;3:35 ℃;4:33 ℃;5:30 ℃;6:28 ℃;7:28 ℃,诱导过夜;8:蛋白质标准

图3 SDS-PAGE 检测 YB-1 在不同温度诱导下的表达



1:诱导前;2∶0.5mmol/L;3∶0.8 mmol/L;4∶1.0 mmol/L;5∶1.2 mmol/L;6∶1.5 mmol/L;7∶0.5 mmol/L,诱导过夜;8:蛋白质标准

图4 SDS-PAGE 检测 YB-1 在不同 IPTG 浓度的表达

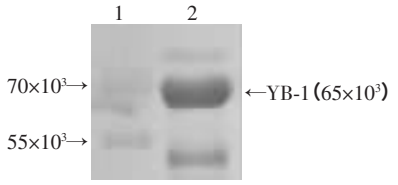


1:蛋白质标准;2:超声破菌离心后上清;3:超声破菌离心后沉淀

图5 SDS-PAGE 分析 YB-1 在大肠杆菌中的表达形式

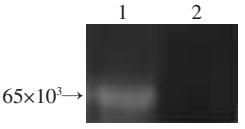
2.3 YB-1 融合蛋白的纯化与鉴定

表达产物经亲和层析和超滤脱盐后,取适量进行 SDS-PAGE 并进一步 Western blot 鉴定。SDS-PAGE 结果显示纯化后融合蛋白纯度较高(图 6),Western blot 结果证实成功获得 YB-1 融合蛋白(图 7)。



1:蛋白质标准;2:纯化后 YB-1 融合蛋白

图 6 SDS-PAGE 分析纯化后融合蛋白的纯度



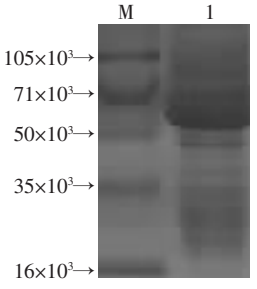
1:纯化后 YB-1 融合蛋白;2:阴性对照

图 7 Western blot 鉴定纯化后融合蛋白

2.4 人 YB-1 蛋白抗血清的鉴定

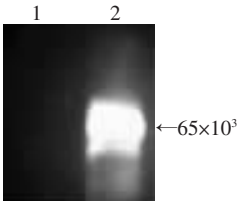
SDS-PAGE 结果显示在蛋白质标准(50 ~ 71) × 10^3 之间有一明显条带,说明制备的抗体纯度较高(图 8)。

ELISA 间接法测定纯化后抗血清效价达 1∶10 000 以上。经 Western blot 鉴定,抗血清能与 YB-1 融合蛋白发生特异性结合反应(图 9)。



M:蛋白质标准;1:纯化后多抗

图 8 SDS-PAGE 检测纯化后抗 YB-1 多克隆抗体



1:阴性对照;2:纯化后的 YB-1 融合蛋白

图 9 Western blot 鉴定纯化后抗 YB-1 多克隆抗体

3 讨论

研究证明,在多种应激、致癌因素及化疗药物作用下,通过多种信号转导途径,将诱导 YB-1 在细胞质中过表达[5,6]。此外,YB-1 可识别并结合多重耐药性 1 启动子区的反向 CCAAT 序列[7],从而诱导肿瘤细胞的多重耐药;YB-1 还可以通过激活其他耐药相关蛋白,保护肿瘤细胞 DNA 不受化疗药损害。

由此可见,YB-1 在细胞周期的调控以及肿瘤细胞的发生、发展和耐药性的产生中发挥重要作用,提示可作为一个肿瘤治疗靶点和化疗耐药性及预后判断标志物。为此,我们采用 RT-PCR 技术获得 YB-1 编码序列,进一步构建了其原核表达载体;将载体转入表达菌,确定诱导表达条件,并对表达产物进行纯化后获取 YB-1 融合蛋白,以制备其抗体。

在表达温度、羧苄青霉素与 IPTG 浓度、表达时间等诸多因素中,以温度因素影响本实验中目的蛋白的表达量最为明显。结果显示,37 ℃诱导表达条件下,其他条件不管如何改变,都未见目的蛋白有明显表达。当温度降至 30 ℃左右时,目的蛋白即得到较高水平可溶性表达。此外采用羧苄青霉素(50 μg/ml)作为抗性压力,将使重组载体在 BL21 中更为稳定、拷贝数更高[4]。在 5 h、30 ℃、IPTG 0.5 mmol/L 的表达条件下,目的蛋白表达水平即达到最高,延长表达时间和提高 IPTG 浓度都未见表达量有明显改变。

亲和层析是利用镍离子对组氨酸特异性吸附的原理来达到纯化目的。组氨酸标签(His-tag)无免疫原性,对蛋白质的分泌、折叠、功能基本无影响,能高度亲和镍离子。我们在下游引物中设计增加了一个 His-tag 的基因序列,使得亲和纯化的效率大为提高。

总之,通过表达与纯化,成功获得了含硫氧还蛋白的 YB-1 融合蛋白,其中硫氧还蛋白抗原性很小,表达后可直接免疫动物制备抗血清。我们采用常规方法对家兔进行免疫,最终获得了高质量的 YB-1 抗血清,为研究血浆 YB-1 作为一种生物标志物在恶性肿瘤预后和化疗耐药性判断的临床应用以及进一步探讨 YB-1 在肿瘤细胞中的生物学功能提供了基础。

参考文献:

[1] Kohno K, Izumi H, Uchiumi T, *et al*. The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1[J]. Bioessays, 2003, 25(7):691 - 698.

[2] Kuwano M, Oda Y, Izumi H, *et al*. The role of nuclear Y-box binding protein 1 as a global marker in drug resistance[J]. Mol Cancer Ther, 2004, 3(11):1485 - 1492.

[3] Basaki Y, Hosoi F, Oda Y, *et al*. Akt-dependent nuclear localization of Y-box-binding protein 1 in acquisition of malignant characteristics by human ovarian cancer cells[J]. Oncogene, 2007, 26(19):2736 - 2746.

[4] Graslund S, Nordlund P, Weigelt J, *et al*. Protein production and purification[J]. Nat Methods, 2008, 5(2):135 - 146.

[5] Bader A G, Vogt P K. Phosphorylation by Akt disables the anti-oncogenic activity of YB-1[J]. Oncogene, 2008, 27(8):1179 - 1182.

[6] McCubrey J A, Steelman L S, Abrams S L, *et al*. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformatin and drug resistance[J]. Adv Enzyme Regul, 2006, 46:249 - 279.

[7] Scherf U, Ross D T, Waltham M, *et al*. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer[J]. Nat Genet, 2000, 24(3):236 - 244.

(收稿:2009-12-15 修回:2010-01-05)

(编辑 张 维)