

Wilson 蛋白 N 端多克隆抗体的制备和纯化

王莹, 丰岩清, 国宁, 黄帆, 徐琳, 陈曦, 梁秀龄
(中山大学附属第一医院神经内科, 广东 广州 510080)

摘要 【目的】制备并纯化 Wilson 蛋白(ATP7B)的 N 端多克隆抗体,为进一步研究其基因表达蛋白的结构和功能打下基础。【方法】RT-PCR 扩增目的基因, GST 基因融合载体表达融合蛋白,亲和层析进行蛋白纯化, Thrombin 酶切并收集目的蛋白,免疫家兔, ELISA 检测抗体滴度,离子交换层析纯化抗体血清, Western blot 检测抗体特异性。【结果】ELISA 方法检测抗体滴度达到了 1:2 500, Western blot 表明该抗体有很好的特异性,非变性 SDS-PAGE 显示纯化后的抗体 IgG 纯度很高。【结论】应用该方法成功制备了 Wilson 病蛋白质量的多克隆抗体。

关键词: 肝豆状核变性; 融合蛋白; 基因表达; 多克隆抗体

中图分类号: R742.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2003)06-0560-04

Preparation and Purification of Polyclonal Antibody Against N-Terminal of ATP7B

WANG Ying, FENG Yan-qing, GUO Ning, HUANG Fan, XU Lin, CHEN Xi, LIANG Xiu-ling
(Department of Neurology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To prepare and purify specific antibody against N-Terminal of ATP7B (Wilson Protein), and to make a good foundation for study of the structure and function of ATP7B. 【Methods】The target gene was amplified by RT-PCR. Fusion protein was expressed with GST gene fusion system. Affinity chromatography was used for protein purification. Thrombin was used to cleave fusion protein with on-column cleavage method. The aimed protein was gathered as antigen. Rabbits were immunized subcutaneously. The titre of the antibody was detected by ELISA assay. The antiserum was purified with DEAE-Sephadex A-25 columns. Western blot was applied to confirm the specificity of the antibody. 【Results】ELISA assay revealed that the titer of the prepared antiserum against fusion protein was as high as 1:2 500. Western blot showed that the antibody was able to react with the proteins. Non-denatured SDS-PAGE confirmed high purity of IgG. 【Conclusion】Polyclonal antibody against ATP7B, is successfully prepared.

Key words: Hepatolenticular degeneration; fusion protein; gene expression; polyclonal antibody

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2003, 24(6): 560 ~ 563]

肝豆状核变性(hepatolenticular degeneration, HLD)又称为 Wilson 病(WD),是常染色体隐性遗传病,主要表现为铜代谢障碍以及由此引起的肝硬化、脑变性和肾损害^[1]。目前已经确定该病主要由 WD 基因突变引起,目前国内外已经发现的突变有

200 余种^[2]。该基因的表达产物 Wilson 蛋白为铜转运 P 型 ATP 酶(P-type ATP7B)。制备该基因的特异性抗体是进一步研究该基因结构和功能的关键。自 1993 年 Wilson 病的基因得到克隆以来,国外多采用组氨酸标签(his-tagged)法^[3]来制备该基因的多

收稿日期 2003-03-21

基金项目: 211 工程重点建设基金资助项目(中山医科大学 98138);广东省自然科学基金资助项目(001413 和 21894)

作者简介: 王莹(1966-),女,福建厦门人,博士,讲师,主要研究方向为神经遗传病学;梁秀龄,教授,博士生导师,课题负责人。

克隆抗体,但该方法存在着目的蛋白纯化量较少的缺点。我们通过 GST 融合蛋白表达系统,获得了大量、纯度很高的 ATP7B 的铜离子结合区蛋白,从而制备并纯化了 WD 蛋白 N 端高质量的多克隆抗体,该抗体的制备为进一步研究 Wilson 蛋白的功能提供了基础条件。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

正常人肝脏组织来源于 1 例 33 岁行肝血管瘤手术的患者。Trizol,RT-PCR 试剂盒,Plantinum Taq DNA polymerase 均购自 Invitrogen 公司。310 测序仪及 Bigdye 测序试剂盒购自 Perkin Elmer 公司。DNA 纯化试剂盒购自 Qiagen 公司。pGEX-4T-1、蛋白酶缺陷型大肠杆菌 BL-21、GST HiTrap 亲和层析柱、Thrombin、DEAE Sephadex A-25 等均购自美国 Amersham Pharmacia 公司。T4 连接酶购自 Promega 公司。Western-blot 试剂盒购自 New England Biolab 公司。

1.2 RNA 的提取和铜离子结合区的扩增、纯化

将新鲜的肝脏组织切成米粒大小的小块,按 Trizol 的操作说明提取总 RNA。RT-PCR 采用两步法进行,以 Oligo dT 为引物合成第一链。第一链合成后,用特异性引物扩增铜离子结合区(1~6 号外显子),引物序列为:up: 5'-TATCGGATCCATGCC TGAGCAGGAGAGA-3'(含 BamH I 酶切位点),down: 5'-ACTTGTCTGACTCACTGCTTTATTTCCATT TTG-3'(含 Sal I 酶切位点)应用 cDNA 第一链为模板,Taq 酶为 Platinum Taq High Fidelity,反应条件为 94 ℃ 2 min, 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 70 ℃ 120 s, 35 个循环。反应产物大小在 1.95 kb 左右,经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定,然后将反应产物切胶回收、纯化。

1.3 铜离子结合区片段的克隆和鉴定

应用 BamH I 和 Sal I 酶双酶切 PCR 产物及 pGEX-4T-1 载体,以 20 g/L 的低熔点琼脂糖进行电泳,切胶回收目的片段和载体,T4 DNA 连接酶进行连接,氯化钙法将重组质粒转化入大肠杆菌 BL-21 中,在 LB/氨苄西林平板上选择转化子。将重组质粒进行纯化,经双酶切和基因测序进行鉴定。

1.4 融合蛋白的诱导、纯化和铜离子结合区蛋白

的产生

挑取经测序鉴定的含有目的克隆的 BL-21 单菌落接种到 10 mL LB 培养基(含有 50 μg/mL 的氨苄西林)培养过夜;用 10 mL 过夜的培养物接种到 4L 锥形瓶中含 1L 2 × YT 液体培养基,26 ℃ 摇动培养至 A_{600} 值达到 0.8,加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,以诱导融合蛋白的表达,继续培养 4~5 h,收获细菌。4 ℃ 5 000 × g 离心,弃上清,按每克细菌 3 mL 加入裂解缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 体积分数 10% 甘油, 1 mmol/L PMSF, 0.1 mg/mL lysozyme),每克大肠杆菌加入去氧胆酸钠 4 mg/g;迅速冻溶 2 次,每克细菌加入体积分数为 0.2% Triton X-100 20 mL/g,充分摇荡,分别加入 DNase 和 RNase 至终浓度为 5 μg/mL 37 ℃ 震荡 30 min。3 000 g 4 ℃ 离心 30 min,除去不溶性的细胞碎片,加入 DTT 至终浓度 1 mmol/L。

融合蛋白的纯化采用 GSTrap (1 mL)亲和层析柱,用一 0.45 μm 的微孔滤膜过滤细菌裂解后的上清;用蠕动泵以 0.5 mL/min 的速度过柱并收集融合蛋白,Binding Buff 冲洗后以 80 U 的 Thrombin 在柱上 23 ℃ 酶切 3 h,收集目的蛋白,然后用 Bradford 方法进行定量检测。

1.5 免疫家兔

取目的蛋白 400 μg(约 0.5 mL)和 0.5 mL 的弗氏完全佐剂混合,乳化后采用多点皮下注射的方法免疫家兔,1 月后用 100 μg 目的蛋白加弗氏不完全佐剂乳化后进行加强免疫,加强免疫 10 d 后再次加强免疫。每次加强免疫后 7~10 d 从耳缘静脉取血 1 mL,应用酶联免疫吸附实验进行抗体滴度测定。加强免疫 3 次后,ELISA 方法检测抗体滴度达到 1:2 500。从心脏穿刺取血,收集抗体血清。

1.6 离子交换层析纯化抗体

将抗体血清应用硫酸铵分级分离,收集硫酸铵浓度在 400 g/L 以内的沉淀,用 pH 8.0 的缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L NaCl)溶解并透析,装填一支 DEAE-Sephadex-25 层析柱,将样品加于柱上,依次以 10 倍柱床体积的 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 和 10 倍柱床体积的 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 洗柱。用 A_{280} 检测 IgG 的浓度,汇集 A_{280} 大于等于 0.2 的组分。

1.7 Western-blot 检测

对融合蛋白和目的蛋白使用 100 g/L 聚丙烯稀

酰胺凝胶,进行蛋白电泳分别取 25 μg 于 120 V 的电压下行 SDS-PAGE 电泳 1 h,然后进行电转,使用 PVDF 膜,再进行免疫检测。二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体。

2 结 果

2.1 RT-PCR

RT-PCR 的结果得到在 1.95 kb 左右的 PCR 产物;将其克隆到 pGEX4T-1 载体上用后进行双酶切证实(图 1),酶切后的载体位于 4.9 kb 左右,目的片段位于 1.95 kb 左右,部分测序后未见突变存在。

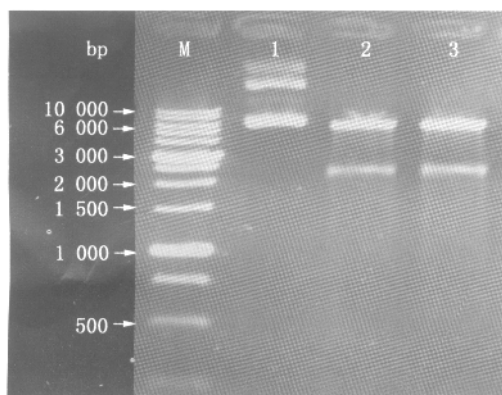


图 1 铜离子结合区克隆质粒的酶切鉴定

Fig. 1 Restriction analysis and identification of recombinant plasmid

Lane 1: Recombinant plasmid; Lane 2, 3: restriction identification. Lane M: DNA marker

2.2 蛋白的表达和纯化

将含有目的基因的重组质粒转化入 BL-21,用 IPTG 进行诱导后,可见在 92 ku 附近有铜离子结合

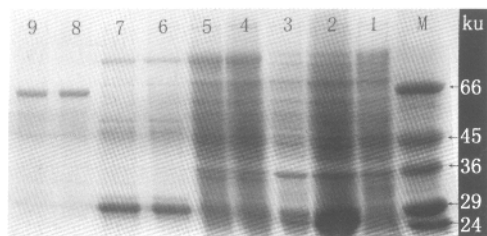


图 2 融合蛋白的表达和纯化及目的蛋白的产生

Fig. 2 Expression and purification of fusion protein and the product of target protein

Lane M: protein SDS-PAGE marker; Lane 1: recombinant pGEX-4T-1 vector without IPTG induction; Lane 2, 3: Non-recombinant pGEX-4T-1 vector express 26 ku GST; Lane 4, 5: recombinant vector express GST fusion protein; Lane 6, 7: Purification of GST fusion protein; Lane 8, 9: Required protein purification after on-column cleavage with thrombin

区融合蛋白的出现,对照的空质粒在 26 ku 左右有目的蛋白的出现。融合蛋白有两条主带,说明在融合蛋白表达过程中目的克隆有部分发生了丢失。用 Thrombin 酶切后,蛋白只在 66 ku 左右出现一条条带,纯度较高(图 2)。经酶切和纯化后,目的铜离子结合区的浓度多在 0.1 mg/L 左右。

2.3 ELASIA 和 Western-blot 结果

家兔加强免疫 3 次后,测量其抗体滴度为在 1:2 500 左右,抗体纯化后,应用免疫印记试验表明抗体有较高的特异性(图 3)。

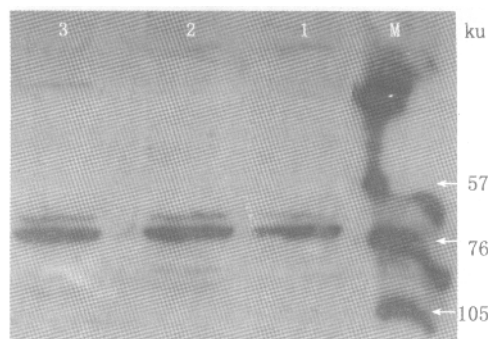


图 3 免疫印迹结果

Fig. 3 Western-blot results

Lane M: marker; Lane 1, 2, 3: the reaction between antibody and the aimed protein

3 讨 论

GST 融合载体对于表达、纯化和检测大肠杆菌表达的融合蛋白是非常有用的工具,融合蛋白可以通过 IPTG 加以诱导,并通常有较高水平。分子的 GST 部分可以通过蛋白酶消化予以除去,该蛋白的纯化可以使多肽在非变性的条件下,维持蛋白质的完整性,所获得的蛋白可以用于抗体的制备、大分子相互作用的分析,酶学分析等^[4]。应用 GST 融合载体表达多肽基因有以下特点:① 整个表达位于 tac 启动子操纵之下,tac 启动子是较强的原核启动子,在其控制之下,融合蛋白的表达量可以达到细菌总蛋白的 30% 以上;② 插入的多肽位于 26 ku 的 GST 基因的下流,避免了插入基因对于启动子的影响;③ 表达的多肽融合有 GST,可以用谷胱甘肽柱进行纯化;④ 在 GST 和融合的多肽之间,具有凝血酶的切割位点^[5, 6]。而该系统所应用的蛋白酶缺陷型大肠杆菌 BL-21 更能有效的防止目的蛋白的水解。

铜离子结合区融合蛋白是一个分子为 92 ku

左右的蛋白质,如果在蛋白诱导时温度过高或 IPTG 浓度过高均会导致蛋白产生过快,在胞质内形成不溶性蛋白,从而形成包涵体。我们通过降低温度、降低 IPTG 浓度的方法,获得了可溶性的融合蛋白,为抗体的制备奠定了基础。在表达目的蛋白的过程中,我们发现重组的目的基因的载体在表达蛋白的过程中存在在目的片段的丢失现象,原因可能是由于重组质粒的不稳定引起^[7]。在实验中发现最佳 IPTG 的剂量为 1.0 mmol/L 时表达量最高,0.1 mmol/L 时表达量明显减少,和 2.0 mmol/L 时表达量比 1.0 mmol/L 时略低。 A_{600} 为 0.8 时加入 IPTG 融合蛋白的表达量最高。值得注意的是,用此系统表达的融合蛋白较空载体 GST 的表达量明显少,在培养和诱导过程中未见细菌生长减慢和质粒拷贝数降低的情况,这一现象可能是由于 tac 启动子转录下降或转录后 mRNA 的翻译效率降低所致^[8]。

在该多肽的选择过程中,对多肽的氨基酸序列进行了检测,未发现有 Thrombin 的酶切位点。为了保持目的多肽的抗原性和活性,我们未使用包涵体来纯化目的蛋白,因为蛋白质在包涵体中均已经发生了变性,在制备抗体的过程中需要进行蛋白复性,并有可能导致目的抗体不能产生或滴度产生较低。为了保持目的多肽在菌体内的可溶性,我们应用降低温度^[9]和缩短表达时间来解决,我们摸索的最佳温度为 28℃,加诱导蛋白表达的时间为 4 h,然后进行菌体的裂解和蛋白的纯化。

抗体的重要性在于它的特异性和纯度,只有高质量的抗体才能用于免疫荧光标记、免疫电镜定位,才能作为免疫检测试剂用于免疫测定和免疫印迹等技术中,也可以通过免疫沉淀来鉴定蛋白质混合物。我们在设计制备抗体的过程中,对于要制备抗体的多肽序列在 GENE BANK 上进行了同源性分析,没有发现交叉反应的蛋白。到目前为止,已经开发出大量的技术用于抗体的纯化,从单纯的硫酸铵沉淀到蛋白 A 或抗-Ig 亲和柱。目前最为先进的纯化抗体的方法是 A 蛋白珠和抗原亲和柱,这两种

方法所制备的抗体非常纯净,而且易于操作,但价格昂贵,纯化抗体的量少。我们使用的硫酸铵加离子交换的方法,这种方法步骤多,产量中等,但价格便宜,所纯化的抗体也非常纯净,而且可以用于大规模纯化。我们应用 ATP7B 的铜离子结合区的多肽制备了 ATP7B 的多克隆抗体,特异性和滴度均较高,为进一步的 Wilson 病结构和功能的研究打下基础。

参考文献:

- [1] 梁秀龄. 肝豆状核变性研究的过去、现在和未来[J]. 中国神经精神疾病杂志, 2001, 27(2): 81.
- [2] 徐评议,梁秀龄,马少春,肝豆状核变性基因突变分析[J]. 中山医科大学学报, 1999, 20(2): 97.
- [3] Forbes J R, Cox D W. Functional characterization of missense mutations in ATP7B: Wilson disease mutation or normal variant[J]. Am J Hum Genet, 1998, 63(6): 1663.
- [4] Simons P C, van der Jagt D L. Purification of glutathione S-transferases by glutathione affinity chromatography[J]. Methods Enzymol, 1981, 77(1): 235.
- [5] Wu X, Oppermann U. High-level expression and rapid purification of rare-codon genes from hyperthermophilic archaea by the GST gene fusion system[J]. J Chromatogr Br Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003, 786(1-2): 177.
- [6] Kaelin W G Jr, Krek W, Sellers W R, et al. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties[J]. Cell, 1992, 70(2): 351.
- [7] Smith, B D, Johnson K S. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase[J]. Gene, 1988, 67(1): 31.
- [8] Johnson K S, Harrison G B L, Lightowlers M W, et al. Vaccination against ovine cysticercosis using a defined recombinant antigen[J]. Nature, 1989, 338(6216): 585.
- [9] Oh-hashi K, Naruse Y, Amaya F, et al. Cloning and characterization of a novel GRP78-binding protein in the rat brain[J]. J Biol Chem, 2003, 278(12): 10531.

(编辑 刘清海)