

果蝇 Bves 蛋白的表达、纯化及多克隆抗体的制备

彭佩莹,赵 阳,王 静,周 英,郝建军,曾 群,陈思行,任 恋,
戴 悦,袁葵洲,吴秀山,邓 云,戴 国

(湖南师范大学蛋白质化学及鱼类发育生物学教育部重点实验室
心脏发育研究中心,湖南 长沙 410081)

摘 要: **目的** 为了进一步研究细胞粘附分子 Bves 在肿瘤的发生及转移过程中的作用,需要获得 Bves 蛋白并制备其抗体。 **方法** 根据 Flybase 网站所提供的 Bves 基因序列,以果蝇的总 RNA 为模板进行 PCR 扩增,得到 Bves 部分编码序列,随后将其连接到 pET-28a 载体上获得原核表达载体。重组表达质粒经酶切测序鉴定后,转化入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,并用 IPTG 诱导融合蛋白的表达,使用活化的 Ni-IDA 凝胶柱亲和纯化,将纯化后得到的 His-Bves 融合蛋白免疫注射新西兰大白兔制备 Bves 多克隆抗体,并用 Western blot 对抗体效价进行检测。 **结果和结论** 获得了 Bves 原核表达重组融合蛋白及高效价的兔抗 Bves 多克隆抗体,为后期深入研究 Bves 基因的功能奠定了基础。

关键词: Bves; 果蝇; 融合蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A

The Expression, Purification of Bves Fusion Protein and Preparation of Its Polyclonal Antibody

PENG Peiying, ZHAO Yang, WANG Jing, et al

(The Center for Heart Development, Key Lab of MOE for Development Biology and Protein Chemistry,
Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

Abstract: **Objective** The Bves, as cell adhesion molecules, plays a certain role in tumorigenesis and metastasis. In order to further study the function of Bves, its protein and antibody must be obtained. **Methods** According to the Bves gene sequence provided on Flybase, the Drosophila RNA was constructed and then used for PCR amplification, part of the coding sequence was got, which could be connected to the prokaryotic expression vector pET-28a vector. The recombination plasmids were digested and sequenced correctly, and transformed into E. coli BL21 competent cells. The fusion protein was induced with IPTG, and purified by Ni-IDA gel column affinity. Then the purified His-Bves was immunized and injected to New Zealand white rabbits to prepare the polyclonal antibodies and its titers were detected by Western blot. **Results and Conclusion** The Bves prokaryotic expression recombination fusion protein and a high titer rabbit polyclonal antibody were gained. This study laid the foundation for later in-depth study for the function of Bves gene.

Key words: Bves; drosophila; fusion protein; polyclonal antibody

Bves (blood vessel epicardial substance), 属于

Popdc 基因家族, 该基因家族目前一共有 3 个成员^[1]。迄今为止, Bves 是该家族中被研究得最多的成员。Bves 在 FlyBase 中标记为 Dmel \ bves (CG32513, FBgn0031150), 它位于果蝇一号染色体上, 长 1 245 bp, 编码 414 个氨基酸。Bves 基因编码一个隐形的跨膜糖蛋白, 是一种存在于骨骼肌、心肌和上皮细胞的细胞粘附分子^[2]。

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(81170088), 国家精品课程(教高函 2009-21)。

作者简介: 彭佩莹, 硕士研究生, 研究方向: 分子发育遗传学研究, E-mail: 123071739@qq.com. 通讯作者戴国, 博士, 讲师, 研究方向: 心脏发育研究, E-mail: guodai@126.com.

早在 1999 年,在心脏组织的基因克隆研究中, Reese 等^[3-4]第一次发现了一种新的蛋白,并将其命名为 Bves 蛋白,即血管心外膜活性物质。在心外膜的前体组织中,心肌间充质细胞及处在早期发育阶段的心血管系统的平滑肌细胞中都能够检测到 Bves 蛋白的表达^[5]。因此,Bves 作为血管平滑肌细胞发育的一个早期标志,它可能参与了血管形成过程中平滑肌细胞的调控过程。然而,Ripley 等^[6-7]研究发现,在眼角膜、视网膜和晶状体等上皮组织中也有 Bves 的表达,并且它可能参与了上皮细胞的形成和再生过程。由于 Bves 在上皮细胞的形成及细胞相互作用中发挥的功能逐渐被揭示,提示该蛋白可能作为细胞粘附分子在细胞的增殖、分化、胚胎发育、炎症细胞的迁移及肿瘤的形成过程中发挥着一定作用。

目前研究认为 Bves 作为细胞粘附分子在肿瘤的转移过程中发挥着重要的作用^[8];对于 Bves 其他功能的研究报道并不多见,为了进一步利用果蝇模型研究 Bves 基因的功能,本文通过生物信息学方法,选取了编码 Bves 蛋白中亲水性较高的一段核苷酸序列(481 bp ~ 1 042 bp)进行 PCR 扩增,构建了可在原核细胞中表达果蝇 Bves 基因的重组质粒 pET-28a-Bves,并将诱导表达的 His-Bves 融合蛋白纯化后对新西兰大白兔进行免疫注射,制备果蝇 Bves 蛋白的多克隆抗体,并且对免疫血清的特异性和效价进行了检测。Bves 多克隆抗体的制备为进一步探索 Bves 的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试剂及材料

大肠杆菌 *E. coli* BL21 菌株和 *E. coli* DH5 α 菌株,由本实验室提供保种;pMD18-T 克隆表达载体购自大连宝生物公司;pET-28a 空表达载体的菌种由本实验室提供保种。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、Taq DNA 聚合酶、10 $\times$ Loading buffer 均购自深圳晶美公司;RNase 购自 Sangon 公司;T4 连接酶购自大连宝生物公司;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收纯化试剂盒、Ni-IDA 凝胶柱蛋白纯化试剂盒购自上海生工公司;质粒提取试剂盒(离心柱型)购自 OMEGA 公司;弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;其他的实验试剂为国产分析纯;新西兰大白兔购自中南大学湘雅医院。

1.2 Bves 基因序列生物信息学分析

依据 Flybase 网站所提供的果蝇 Bves 基因序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 引物序列,外引物:sense:5' - AAC TTC ATC TAT CTC GTC GTG G - 3', anti-sense:5' - GTA TCA ACA TGG GCT TGT CCT - 3',内引物:sense:5' - AAC GGA TCC TAT CTC GTC GTG G - 3' (下划线为 *Bam*H I 酶切位点), anti-sense:5' - GTC TCG AGA TGG GCT TGT CCT - 3' (下划线为 *Xho* I 酶切位点),引物序列由上海生工公司进行合成。

1.3 基因扩增及载体构建

挑选野生型成体果蝇 30 只,放入液氮中冷冻处理 0.5 h 后,用 Trizol 法提取总 RNA^[9],并以其为模板进行反转录和 PCR 扩增,得到的 PCR 产物长 562 bp,经纯化回收后连接到 pMD18-T 克隆载体上,并转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,酶切检测筛选出阳性克隆,测序正确后用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Xho* I 将目的片段从 pMD18-T-Bves 质粒上切下,纯化回收,连入 pET-28a 载体的相同酶切位点,转化入 DH5 α 感受态细胞,挑去单克隆,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切检测鉴定及测序分析确定后,获得重组表达质粒 pET-28a-Bves。

1.4 Bves 融合蛋白的诱导表达

将构建好的重组表达质粒 pET-28a-Bves 转化入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中。挑取单克隆菌落接种于含 50 mL 卡那霉素的 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 封闭摇床中振荡培养过夜,然后转接扩大培养至菌液 OD₆₀₀ $\approx$ 0.6 时,取 1 mL 菌液用作空白对照,然后加入 0.2 mmol/L IPTG 进行诱导,37 $^{\circ}$ C 继续培养,诱导 0、2、4、6、8、10 h 后分别取 1 mL 菌液用于制备电泳样品进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析。

1.5 Bves 融合蛋白的纯化

通过比较各个诱导时间,选取 0.2 mmol/L IPTG 诱导 8 h 的条件下进行大量诱导。离心收集菌液,经液氮反复冻融 PBS 重悬后超声裂解,离心取上清。将上清在 4 $^{\circ}$ C 条件下与经 Binding Buffer 活化后的 Ni-IDA 凝胶柱结合过夜,Washing Buffer 漂洗 3 次去除杂蛋白,目的蛋白用 Elution Buffer 洗脱,由此获得纯化后的 His-Bves 融合蛋白,-80 $^{\circ}$ C 保存备用^[10]。

1.6 Bves 多克隆抗体的制备

选取一只成年健康适龄的新西兰大白兔,耳缘处静脉取血约 5 mL,用于制备免疫前的正常血清,

作为阴性对照。将纯化后得到的 His-Bves 蛋白按体积比 1:1 的比例与弗氏完全佐剂充分混匀,在注射器中推成乳剂后,对大白兔分 15~20 个点进行背部皮下免疫注射;注射速度应尽量慢而均匀,其分布位置需尽量均匀分布在大白兔的身体背部各个部位;在第 14 天、第 21 天、第 28 天分别加强 1 次免疫,将溶于 0.5 mL 生理盐水中的 0.5 mg 抗原蛋白与弗氏不完全佐剂按体积比 1:1 在注射器中推成乳剂,进行背部皮下多点注射。第 40 天时主动脉取血后放入 4℃ 冰箱静置过夜,3 000 rpm 离心 10 min,取血清加入 0.01% NaN₃ 分装于 -80℃ 保存备用。

1.7 Bves 多克隆抗体的效价检测

收获免疫兔血清,将 pET-28a-Bves 重组表达质粒转化入大肠杆菌 BL21 菌株,诱导表达的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转膜后用免疫兔血清作为一

抗进行 Western blot 检测,抗体的浓度分别设置为 1:500、1:1 000、1:1 500。

2 结 果

2.1 重组表达载体 pET-28a-Bves 的构建及鉴定

从果蝇中提取总 RNA 作为模板,反转录构建果蝇 cDNA 文库,随后以该 cDNA 文库为模板进行 PCR 扩增。纯化出的 Bves 基因片段克隆连接到载体 pMD18-T 中,经测序确定后,通过 BamH I 和 Xho I 双酶切质粒 pMD18-T-Bves 得到目的片段后连入 pET-28a 载体,转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,挑取单克隆,经 BamH I 与 Xho I 双酶切鉴定(如图 1A)及测序分析确定后,表明重组表达质粒 pET-28a-Bves 已构建成功(如图 1B)。

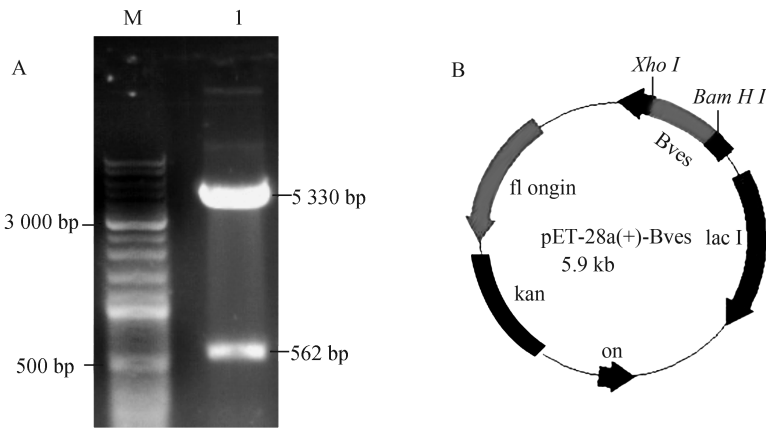


图 1 pET-28a-Bves 质粒鉴定图及其质粒示意图 A: BamH I/xho I 双酶切鉴定结果;B: pET-28a-Bves 质粒示意图

2.2 诱导表达 His-Bves 融合蛋白

将重组表达质粒 pET-28a-Bves 转化入 BL21 感受态细胞后,以 0.2 mmol/L IPTG 浓度进行不同时间的诱导表达,并分别对表达产物进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析(如图 2),可观察到相对分子量约为 25 kDa 的特异性蛋白条带,与预期的 Bves 融合蛋白相对分子质量相一致。融合蛋白经活化的 Ni-IDA 凝胶柱亲和纯化后,进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色,纯化后的蛋白纯度有显著提高,为后期 Bves 基因的研究及多克隆抗体的制备提供了良好的基础。

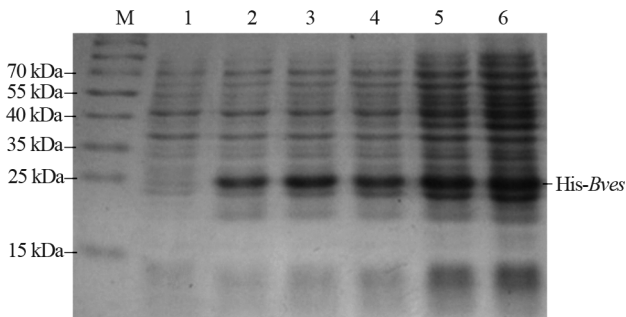


图 2 His-Bves 融合蛋白的原核表达 M:Marker # 0671;1: pET-28a-Bves 未诱导蛋白表达;2~6:0.2 mmol/L IPTG 诱导 pET-28a-Bves 蛋白分别表达 2、4、6、8、10 h

2.3 Bves 多克隆抗体 Western blot 检测效价

将免疫新西兰大白兔后获得的血清作为一抗进行 Western blot 效价检测, 浓度梯度分别设置为 1:500、1:1 000、1:1 500, 同时用免疫前获得的血清作为阴性对照。结果显示, 阴性对照无目的条带, 而其他浓度梯度均有特异性蛋白条带(如图 3), 说明 Bves 多克隆抗体制备成功, 且在抗体稀释浓度为 1:500 时效价最好, 抗体的特异性和敏感性均达到实验需要。

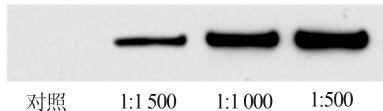


图 3 Bves 多克隆抗体 Western blot 检测效价

3 讨 论

果蝇 Bves 基因的表达水平与上皮细胞紧密连接的形成直接相关^[11-13]。2011 年, Russ 等^[11]研究发现, Bves 基因在上皮细胞的运动、细胞粘附、细胞分化及组织损伤的愈合修复中起到了一定作用。近年来, 随着分子生物学技术的不断发展, 在肿瘤的致病因素及发病机理的研究方面有了很大进展^[14-15]。最新的研究发现, Bves 这一类细胞粘附分子在癌细胞的侵入及转移过程中起到了重要作用^[16-19]。因此, 对 Bves 基因的深入研究, 有助于更有效的寻找针对于各类粘附分子所介导的肿瘤侵入和转移的抑制剂, 为防治肿瘤的侵入和转移提供更多更完善的策略。

本研究的目的是为了获得特异性好且效价高的 Bves 多克隆抗体。本实验室目前常用的载体有 pMD 系列载体和 pET 系列载体。在 Bves 抗体制备的过程中, 本研究所采用的 pET-28a 载体与其他载体不同之处在于, 该载体的 N 端携带有 His 标签、T7 启动子标签序列及凝血酶基因; 在 C 端同样具有 His 标签序列。因此可在 BL21、Rosseta 等表达菌株中高效表达融合蛋白。

通常在进行融合蛋白诱导时, 蛋白极易以包涵体的形式表达出来, 而包涵体形成后的缺点是需经变性、复性等一系列处理过程后才能得到可溶性融合蛋白。为了避免这一复杂处理过程, 可通过改变

诱导的时间、温度和 IPTG 的浓度, 摸索到最适宜的条件, 即在诱导温度为 37 ℃、IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下诱导表达 8 h, 使 Bves 融合蛋白在上清表达, 这样使得利用 Ni-IDA 凝胶柱进行融合蛋白的纯化过程变得更为简单、快捷。

本研究中 Bves 抗体制备成功后, 在保存的过程中加入了 0.01% NaN₃, 它具有防霉及血清防腐的作用, 可使抗体保存的更长久^[20]。Western blot 检测结果显示, 制备的 Bves 抗体效价及特异性好。这为进一步研究 Bves 基因在果蝇这一模式动物中的功能打下了基础, 同时也为 Bves 基因在肿瘤等方面的研究工作提供了材料。

参考文献:

- [1] DiAngelo JR, Vasavada TK, Cain W, et al. Production of monoclonal antibodies against chicken Pop1 (BVES) [J]. Hybrid Hybridomics, 2001, 20(5-6): 377-381.
- [2] Shengyin L. Blood vessel/epicardial substance (bves) expression, essential for embryonic development, is down regulated by Grk/EFGR signaling [J]. Dev Biol, 2007, 31: 37-44.
- [3] Reese DE, Bader DM. Cloning and expression of hbves, a novel and highly conserved mRNA expressed in the developing and adult heart and skeletal muscle in the human [J]. Mamm Genome, 1999, 10(9): 913-915.
- [4] Reese DE, Zavaljevski M, Streiff NL, et al. Bves: A novel gene expressed during coronary blood vessel development [J]. Dev Biol, 1999, 209(1): 159-171.
- [5] Andree B, Hillemann T, Kessler G, et al. Isolation and characterization of the novel popeye gene family expressed in skeletal muscle and heart [J]. Dev Biol, 2000, 223(2): 371-382.
- [6] Ripley AN, Osier ME, Wright CV, et al. Xbves is a regulator of epithelial movement during early Xenopus laevis development [J]. Proc Natl Acad Sci, 2006, 103(3): 614-619.
- [7] Ripley AN, Chang MS, Bader DM. Bves is expressed in the epithelial components of the retina, lens, and cornea [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(8): 2475-2483.
- [8] Williams CS, Zhang B, Smith JJ, et al. BVES regulates EMT in human corneal and colon cancer cells and is silenced via promoter methylation in human colorectal carcinoma [J]. J Clin Invest, 2011, 121(10): 4056-4069.

- [9] 刘红,任笑蒙,李君,等.果蝇组织总 RNA 的电泳谱型鉴定[J].医学研究通讯,2004,33(4):48-49.
- [10] 朱婷,黄文,王跃群,等.斑马鱼 hand2 基因的克隆、抗体制备及分析[J].湖南师范大学自然科学学报,2010,33(1):108-113.
- [11] Russ PK, Pino CJ, Williams CS, et al. Bves modulates tight junction associated signaling[J]. PLoS One, 2011, 6(1):e14563.
- [12] Jayagopal A, Yang JL, Haselton FR, et al. Tight junction-associated signaling pathways modulate cell proliferation in uveal melanoma [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011, 52(1):588-593.
- [13] Gingold-Belfer R, Bergman M, Alcalay Y, et al. Popeye domain-containing 1 is down-regulated in failing human hearts[J]. Int J Mol Med, 2011, 27(1):25-31.
- [14] Cappellani A, Cavallaro A, Di Vita M, et al. Diet and pancreatic cancer: many questions with few certainties [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2011, 16(2):192-206.
- [15] Zitvogel L, Kepp O, Galluzzi L, et al. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses [J]. Nat Immunol, 2012, 13(4):343-351.
- [16] Bazzoni G. Pathobiology of junctional adhesion molecules [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 15(5):1221-1234.
- [17] Martin TA, Mason MD, Jiang WG. Tight junctions in cancer metastasis[J]. Front Biosci, 2011, 16:898-936.
- [18] Arpin M, Chirivino D, Naba A, et al. Emerging role for ERM proteins in cell adhesion and migration [J]. Cell Adh Migr, 2011, 5(2):199-206.
- [19] Liang QL, Chen GQ, Li ZY, et al. Function and histopathology of a cell adhesion molecule TSLC1 in cancer [J]. Cancer Invest, 2011, 29(2):107-112.
- [20] 任恋,唐超,刘宪楚,等.斑马鱼 ISL1 蛋白多克隆抗体的制备 [J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(2):135-139.

(此文编辑:朱雯霞)