

• 技术方法 •

人 II 型成对免疫球蛋白样受体 β 基因 (PILR β) 的克隆、表达、纯化及其多克隆抗体的制备

厉建中^{1*}, 陈霞², 郭葆玉¹

(1. 第二军医大学药学院生化药理学教研室, 上海 200433; 2. 中国科学院上海生物工程生物研究中心, 上海 200233)

[摘要] **目的:** 表达和纯化人 II 型成对免疫球蛋白样受体蛋白 PILR β , 制备并鉴定其多克隆抗体。 **方法:** 应用 RT-PCR 从人的外周血细胞总 RNA 中反转录并扩增出 PILR β 基因, 将其克隆到表达载体 pET-32a, 在大肠杆菌中 IPTG 诱导表达, 经 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化, 纯化后的蛋白多次注射免疫新西兰大白兔, 获取多克隆抗血清, ELISA 法检测抗体效价, Western 印迹检测抗体特异性。 **结果:** 获得了较高纯度的 PILR β 蛋白 (M_r 约为 42 000) 及其抗体, 多抗效价达到 1 : 10 000, 且特异性较好。 **结论:** 成功克隆了 PILR β 基因并表达纯化了其蛋白, 获得了效价较高、特异性较强的多克隆抗体, 为进一步研究 PILR β 蛋白的功能和潜在的 药物开发打下了基础。

[关键词] II 型成对免疫球蛋白样受体 β ; 克隆, 分子; 基因表达; 多克隆抗体

[中图分类号] Q 78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-1011-03

Isolation, expression and purification of paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta and preparation of its polyclonal antibody

LI Jian-zhong^{1*}, CHEN Xia², GUO Bao-yu¹ (1. Department of Biochemical Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Shanghai Research Center of Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

[ABSTRACT] **Objective:** To express and purify paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta (PILR β) and prepare the polyclonal antibody against its protein. **Methods:** The PILR β cDNA was amplified from the total RNAs extracted from human peripheral blood cells by RT-PCR and was cloned into pET-32a vector. The vector harboring PILR β gene was then expressed in *E. coli* by IPTG induction and the product was purified by Ni²⁺-NTA affinity chromatography. Polyclonal antibody was prepared by immunizing rabbits with the purified protein. The titer and specificity of the antibody were examined by ELISA and Western blot, respectively. **Results:** Highly purified PILR β protein (M_r 42 000) was obtained. The prepared polyclonal antibody was highly specific and had a titer of 1 : 10 000. **Conclusion:** PILR β gene is successfully cloned and the purified PILR β protein is expressed. Polyclonal antibody against PILR β (with high titer and specificity) is successfully obtained, which provides a basis for further study on PILR β .

[KEY WORDS] paired immunoglobulin-like type 2 receptor β ; cloning, molecular; gene expression; polyclonal antibody

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9):1011-1013]

细胞信号途径依赖于激活与抑制间的动态相互作用^[1~4]。受 SHP-1 (Src homology-2 domain-containing protein tyrosine phosphatase) 调控的蛋白酪氨酸残基的去磷酸化是几种细胞信号途径的调控网络中心^[5~7]。其中两类抑制受体超家族成员: 一类为含 ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) 的受体, 另一类为不含 ITIM 的受体, 在细胞信号途径中起重要作用。SHP-1 对细胞信号的调控是通过平衡 PILR α 的调节抑制与 PILR β 的调节激活来实现的^[2,6,8~10]。PILR α 和 PILR β 基因一前一后同方向定位于 7 号染色体上^[6,8]。

本研究利用 RT-PCR 技术从人血细胞总 RNA 中扩增 PILR β 基因, 克隆到表达载体 pET-32a, 在大肠杆菌中经 IPTG 诱导表达, 用 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化, 并注射免疫家兔, 获得了效价较高、特异性较强的多克隆抗体, 为进一步

研究 PILR β 蛋白的功能和潜在的 药物开发打下了基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料 菌株 BL21(DE3), BL21-CondonPlus(DE3) 是本实验室所保存的菌种; 质粒 pET-32a 为本实验室保存; 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 等和 *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司, PCR 产物回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自博彩生物技术公司, TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司, RT-PCR 试剂盒

[基金项目] 国家自然科学基金(30400269)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30400269)。

[作者简介] 厉建中, 博士, 讲师。

* Corresponding author. E-mail: lijianzhong1234@yahoo.com

购自 Promega 公司,BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司,纯化用 Ni²⁺-NTA 柱购自 Qiagen 公司,弗氏佐剂购自 Sigma 公司, Anti-rabbit IgG-HRP 购自 Santa Cruz 公司。免疫用雄性新西兰大白兔,体质量约 2.5 kg,购自中国科学院上海实验动物中心。

1.2 PILRβ 基因的扩增与克隆 离心收集约 1 ml 外周血细胞,TRIzol 提取总 RNA,以 1 μg 总 RNA 为模板在反转录反应体系中以随机引物合成 cDNA,取 2 μl cDNA 产物为模板进行 PCR 扩增。扩增引物根据人成对 II 型免疫球蛋白样受体基因核苷酸序列(GenBank 基因登录号 NM_178238),去除其编码信号肽的序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,并分别于正义链 5'端加 EcoR I 酶切位点,反义链 5'端加 Hind III 酶切位点,PILRβ 正义链引物:5'-GCG AAT TCC AGC CTG GTG GCT CCA CAG G-3';反义链引物:5'-GCA AGC TTC TAG AAG TCA CTG CTT GGC G-3',预期产物片段长度约 640 bp。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。PILRβ 基因 PCR 扩增条件:94℃热启动 5 min 后,94℃变性 1 min,55℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,30 个循环后,72℃反应 5 min。以 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定 RT-PCR 产物。回收纯化后的 PCR 产物克隆到 pMD18-T 载体中。

1.3 基因表达载体的构建 克隆到 pMD18-T 载体中的 PILRβ 经测序鉴定正确后,用 EcoR I 和 Hind III 双酶切,回收约 640 bp 的目的片段。与经 EcoR I 和 Hind III 双酶切的融合表达载体 pET32a 相连接,转化感受态 BL21(DE3)、BL21-CondonPlus(DE3)菌株。经酶切鉴定的阳性克隆,并进一步测序鉴定。

1.4 基因表达与纯化 从平板上挑取单个经鉴定正确的阳性菌落,接种至 5 ml 含 100 μg/ml 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基,37℃ 摇床培养过夜。第 2 天按 5%接种量接种至 100 ml 含 100 μg/ml 的氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养,待菌体浓度达到 D₆₀₀ 值 0.6~0.9 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达,37℃继续振荡培养 3 h,离心收集菌体。在沉淀中加入蛋白上样缓冲液,以 SDS-PAGE 电泳检测 PILRβ 融合蛋白的表达。依照 His·Bind™ Bufer Kit 操作说明,离心收集上述经 IPTG 诱导培养的菌体,将沉淀的细菌重悬于 2 ml 结合缓冲液(10 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl)。冰上超声裂解细菌细胞,离心除去细胞沉淀,收集上清。将上清转入加有 0.2 ml Ni²⁺-NTA 层析柱中。然后分别用 10 倍体积的结合缓冲液和 6 倍体积的冲洗缓冲液(20 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl)洗涤,用 1 ml 洗脱缓冲液(250 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl)洗脱重组蛋白。SDS-PAGE 电泳检测纯化的融合蛋白。洗脱缓冲液洗脱的融合蛋白用生物半透膜脱盐,应用 BCA 法进行蛋白定量。

1.5 多克隆抗体的制备 将透析定量后的 PILRβ 融合蛋白

与弗氏完全佐剂等体积等量乳化。采用脚掌和背部皮下多点注射免疫新西兰家兔,在注射前,先用 70%乙醇棉擦注射部位,共注射 150 μg 蛋白。4 周后,以上述 1/2 剂量的抗原-弗氏完全佐剂采用同样的方法加强免疫 2 次。1 周后颈总动脉取血,37℃孵箱放置 3 h,4℃冰箱过夜。吸取血清,4 000 r/min 离心 10 min。取上清加入 1/2 体积甘油-80℃保存备用。

1.6 兔抗 PILRβ 多克隆抗体的 ELISA 检测和 Western 印迹鉴定 将纯化的 His-PILRβ 融合蛋白以 10 μg/ml 每孔 50 μl 包被 96 孔酶标板,以免疫前的兔血清作为阴性对照。以同样方法纯化的其他 His 融合蛋白作为交叉反应对照,将已纯化的免疫血清做(×10、×10²、×10³、×10⁴、×10⁵、×10⁶)不同稀释后,进行间接 ELISA 法检测抗体效价。取 BL21(DE3)感受态空菌、转化了重组 pET-PILRβ 质粒的 BL21(DE3)在 IPTG 诱导前、诱导后的细菌和纯化的 His-PILRβ 融合蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,以免抗融合蛋白血清为一抗, Anti-rabbit IgG-HRP 为二抗进行 Western 印迹测定抗体的特异性。

2 结果

2.1 PILRβ 基因的克隆 RT-PCR 产物经 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定,可见大小约为 640 bp 的 DNA 片段(图 1)。胶回收目的片段并将其克隆到 pMD18-T 载体中,阳性克隆经测序鉴定,其序列与预期序列完全一致。

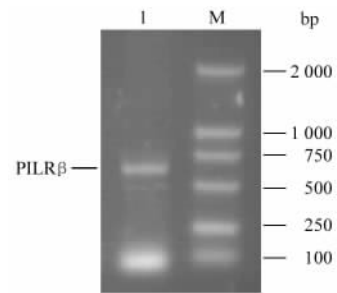


图 1 PCR 结果

Fig 1 Results of PCR

1: RT-PCR product of PILRβ; M: DNA marker(DL2000)

2.2 基因表达及纯化结果 我们所克隆到的 PILRβ(去除编码信号肽序列)读码框长 627 bp,编码 208 个氨基酸残基,克隆至 pET-32a 为 pET-PILRβ 载体,其表达的融合蛋白为 379 个氨基酸,预期相对分子质量约为 42 000。将重组质粒在 BL21(DE3)菌株表达,目的蛋白表达量较低,且在诱导前后表达没有明显增加,这可能是由于脯氨酸等稀有密码子含量过高所致。于是将重组质粒转化入 BL21-CondonPlus(DE3)菌株中,通过 IPTG 诱导实现了较高水平的表达,所表达蛋白的相对分子质量与预期相对分子质量相符。经 Ni²⁺-NTA 亲和柱层析纯化后,获得了较高纯度的目的蛋白(图 2)。

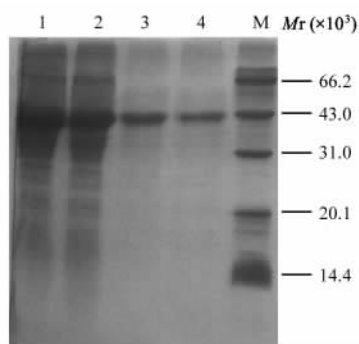


图2 PILRβ融合蛋白的表达与纯化

Fig 2 Expression and purification of PILRβ fusion protein

1,2: IPTG induction for 3 h; 3,4: Purified fusion protein of PILRβ; M: Protein marker

2.3 兔抗PILRβ多克隆抗体的ELISA检测和Western印迹鉴定 ELISA实验检测结果表明,抗血清的滴度可以达到1:10 000,且无交叉反应。Western印迹分析可见,IPTG诱导前、后的BL21-CondonPlus(DE3)细菌裂解液可检测到与纯化的PILRβ融合蛋白大小相一致的特异性条带(图3),诱导前也有条带,说明存在“渗漏”表达,同纯化时结果一致,而空菌裂解液则无可见条带,说明本实验所制备的兔抗血清能够同PILRβ发生特异性反应。

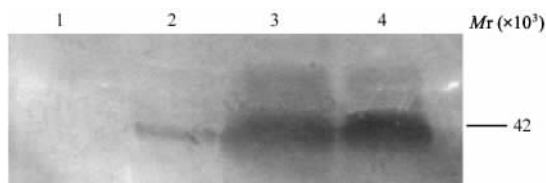


图3 兔抗PILRβ血清的Western印迹鉴定

Fig 3 Western blotting of rabbit anti-PILRβ serum

1: Cell lysate of BL21-CondonPlus(DE3); 2: Cell lysate of BL21-CondonPlus(DE3) transformed with pET-PILRβ without IPTG induction; 3: Cell lysate of BL21-CondonPlus(DE3) transformed with pET-PILRβ with IPTG induction for 3 h; 4: Purified fusion protein of PILRβ

3 讨论

由于原核表达载体系统缺乏翻译后加工修饰功能,不能切除真核生物蛋白的信号肽,因此设计引物时,去除了PILRβ cDNA的信号肽,从而构建了人II型成对免疫球蛋白样受体PILRβ成熟蛋白编码序列的原核表达载体。

质粒pET-32a是由T7启动子控制的含有硫氧还蛋白(thioredoxin)和6×His标签的融合表达载体。Ni²⁺-NTA亲和柱可与6×His标签相互作用以纯化目的蛋白,十分方便。表达时先进行少量试管表达实验,检测到表达后再进行

规模稍大的摇瓶发酵。我们在实验中发现重组pET-PILRβ质粒在BL21(DE3)菌株中目的蛋白表达量较低,且在诱导前后表达没有明显增加。分析PILRβ蛋白氨基酸组成,其脯氨酸等稀有密码子含量较高。于是,采用了可弥补其缺陷的表达菌株BL21-CondonPlus(DE3),结果其表达水平明显提高。这表明PILRβ含较多的脯氨酸等稀有密码子,导致其在BL21(DE3)菌株中低水平的表达。

我们利用RT-PCR方法从人血细胞中扩增PILRβ基因,获得了PILRβ无编码信号肽的序列,构建了带His标记的PILRβ原核表达载体,纯化得到较高纯度的目的蛋白,并制备出其特异性的多克隆抗体,这为进一步对其生物学功能及其参与细胞信号途径的研究打下了基础。

[参考文献]

- [1] Moretta A, Bottino C, Vitale M, et al. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity[J]. *Ann Rev Immunol*, 2001,19:197-223.
- [2] Diefenbach A, Raulet DH. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors[J]. *Curr Opin Immunol*, 2003,15:37-44.
- [3] Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors[J]. *Science*, 2000,290:84-89.
- [4] Lanier LL. On guard—activating NK cell receptors[J]. *Nat Immunol*, 2001,2:23-27.
- [5] Daeron M, Vivier E. Biology of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif-bearing molecules[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999,244:1-12.
- [6] Mousseau DD, Banville D, LAbbe D, et al. PILRalpha, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing protein, recruits SHP-1 upon tyrosine phosphorylation and is paired with the truncated counterpart PILR beta[J]. *J Biol Chem*, 2000,275:4467-4474.
- [7] Toyama-Sorimachi N, Omatsu Y, Onoda A, et al. Inhibitory NK receptor Ly49Q is expressed on subsets of dendritic cells in a cellular maturation and cytokine stimulation-dependent manner[J]. *J Immunol*, 2005,174:4621-4629.
- [8] Fournier N, Chalus L, Durand I, et al. FDF03, a novel inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is expressed by human dendritic and myeloid cells[J]. *J Immunol*, 2000,165:1197-1209.
- [9] Fujishima N, Hirokawa M, Aiba N, et al. Gene expression profiling of human erythroid progenitors by micro-serial analysis of gene expression[J]. *Int J Hematol*, 2004,80:239-245.
- [10] Velten FW, Duperrier K, Bohlender J, et al. A gene signature of inhibitory MHC receptors identifies a BDCA3(+) subset of IL-10-induced dendritic cells with reduced allostimulatory capacity *in vitro*[J]. *Eur J Immunol*, 2004,34:2800-2811.

[收稿日期] 2006-05-08

[修回日期] 2006-06-23

[本文编辑] 尹 茶