

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00445

## 亲环素 A 的原核表达、蛋白纯化及多克隆抗体制备

### Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of Cyclophilin A

张慧珍\*, 王 钧, 金 蕾, 吴逸明

郑州大学公共卫生学院, 郑州 450001

**[摘要]** **目的** 构建人亲环素 A(CypA)基因的原核表达载体,诱导表达、纯化蛋白,制备抗体,为进一步研究其生物学作用奠定基础。**方法** 以人肺癌组织总 RNA 为模板,RT-PCR 扩增 CypA 基因片段,克隆到 pMD18-T 载体中。扩增产物与原核表达载体 pET30a(+)连接,构建表达质粒 pET30a-CypA,转化大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达,用镍树脂亲和层析柱 High-Affinity Ni-IDA Resin 纯化表达产物,SDS-PAGE 检测纯化蛋白。用获得的蛋白免疫大白兔,制备抗 CypA 蛋白多抗,采用蛋白印迹法检测抗体特异性。**结果** 成功构建了 CypA 的原核表达载体,经大肠杆菌诱导表达、镍亲和层析柱纯化,得到纯度达 80.2% 的融合蛋白,免疫大白兔后得到多抗血清。蛋白印迹结果显示此多克隆抗体能与 CypA 蛋白特异性结合。**结论** 成功获得 CypA 纯化蛋白及 CypA 多克隆抗体,为进一步研究 CypA 在肺癌中的作用机制奠定了基础。

**[关键词]** 亲环素 A;原核表达;分离纯化;亲和层析;多克隆抗体

**[中图分类号]** Q 78 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)04-0445-03

亲环素 A(Cyclophilin A,CypA)是一种在生物界广泛存在、高度保守的蛋白质,具有肽基脯氨酰顺/反异构酶活性,不仅参与蛋白质的折叠、装配与运输,而且参与减数分裂,并起分子伴侣的作用,在细胞外可作为细胞间通讯的媒介<sup>[1]</sup>。目前的研究表明,CypA 参与了许多癌症的发生和发展过程<sup>[2-4]</sup>。在肺癌的形成过程中,CypA 也起着非常重要的作用<sup>[5]</sup>。本研究拟通过构建 CypA 原核表达载体,优化融合蛋白的表达条件,获得重组蛋白纯品,以该融合蛋白为抗原制备多克隆抗体,从而为进一步研究 CypA 在肺癌发生、发展中的作用和机制奠定基础。

#### 1 材料和方法

**1.1 主要试剂和材料** 大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 BL21(DE3)及原核表达载体 pET30a(+)由郑州大学公共卫生学院提供。pMD18-T 载体、内切酶 *Nde* I 及 *Xho* I、 $T_4$  DNA 连接酶购自大连宝生物工程公司,DNA 凝胶回收试剂盒、日常型质粒 DNA 抽提试剂盒系 Vitagen 产品,IPTG 购自 Merck 公司,dNTP、*Taq* DNA 聚合酶购自上海生工生物工程技术有限公司,尿素、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺购自北京康桥生物技术公司,High-Affinity Ni-IDA Resin 购自 Gene Script 公司。日本大白兔购自河南省实验动物中心。

**1.2 RT-PCR 方法获取目的基因** 取 100 mg 新鲜肺癌组织(郑州大学第一附属医院手术切除标本),用 TRIzol 法提取人肺癌组织总 RNA。取总 RNA 3  $\mu$ g,用 Oligo dT18 引物合成 cDNA 第一链。以合成的 cDNA 为模板,用 Pyrobest<sup>TM</sup> DNA 聚合酶扩增 CypA 基因序列。上游引物 5'-CAG GAA TTC ATG GTC AAC CCC ACC GTG TTC T-3',下游引物 5'-ATC CTC GAG TTC GAG TTG TCC ACA GTC AGC-

3',上、下游引物分别带有 *Eco*R I 和 *Xho* I 酶切位点。PCR 反应体系:cDNA 模板 2  $\mu$ l,10 $\times$ 反应缓冲液 5  $\mu$ l,上、下游引物各 1  $\mu$ l,dNTP 4  $\mu$ l,Pyrobest<sup>TM</sup> DNA 聚合酶 1  $\mu$ l;加水至总体积 50  $\mu$ l。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min 完成 PCR。1%琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 扩增产物。

**1.3 原核表达载体的构建** 将扩增的目的 DNA 片段回收纯化,用限制性核酸内切酶 *Eco*R I、*Xho* I 对回收后的 CypA 基因和空质粒 pET30a(+) 分别进行双酶切,凝胶回收,按照 DNA 和载体摩尔比为 8:1 的比例混合,加入  $T_4$  DNA 连接酶,16 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转化感受态细胞大肠杆菌 BL21(DE3),涂于氨苄青霉素抗性的 LB 平板上,37 $^{\circ}$ C 过夜培养,挑取阳性克隆少量提取质粒,然后进行双酶切和 PCR 鉴定,最后经北京三博远志生物技术有限责任公司测序并确认。

**1.4 融合蛋白诱导表达和纯化** 取 37 $^{\circ}$ C 过夜培养的重组 BL21(pET30a-CypA) 菌液(含卡那霉素 60 mg/L)50  $\mu$ l 接入 5 ml 含卡那霉素(终浓度为 60 mg/L)的 LB 培养液中分管培养,37 $^{\circ}$ C、260 r/min 振荡培养至  $D_{600}$  约为 0.5 时,取出 0.5 ml 培养物作为对照,在剩余培养物中加入化学诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.01、0.03、0.05、0.08、0.1、0.3、0.5、0.8、1.0 mmol/L,继续振荡培养,在 1、2、3、4、5 h,分别取出菌液制备电泳样品(分离胶浓度为 1.2%)。以空质粒 pET30a(+) 的诱导产物为对照。诱导产物用 5 mol/L 的尿素进行洗涤,4 $^{\circ}$ C、8 000 $\times$ g 离心 10 min,透析过夜。用 GenScript 公司 High-Affinity Ni-IDA Resin 亲和层析法纯化蛋白。收集蛋白溶液放入透析袋,用高分子(6 000~12 000)聚合物蔗糖进行浓缩。将浓缩后的样品进行 SDS-PAGE 分析,并用

**[收稿日期]** 2009-09-14 **[接受日期]** 2009-12-14

**[作者简介]** 张慧珍,博士,副教授。

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0371-67781461, E-mail: huizhen2@hotmail.com

Gene Tools 分析融合蛋白含量。

1.5 多克隆抗体的制备及特异性检测 从纯化收集的纯度较高的样品中取 1 ml(1 mg/ml)与等体积弗氏完全佐剂充分混合,背部皮下多点注射于日本大白兔,每间隔 2 周加强免疫 1 次,共加强 3 次。末次免疫后 1 周心脏采血,分离血清,分装置-20℃冻存。纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE,转膜,用制备的兔抗 CypA 血清为一抗和羊抗兔 IgG-HRP 为二抗进行蛋白免疫印迹反应,DAB 显色,检测抗体的特异性。

### 2 结果

2.1 CypA 基因表达载体的鉴定 以 cDNA 为模板,以 P1 和 P2 为引物,用 Taq DNA 聚合酶扩增出的 DNA 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳,大小为 497 bp 左右。扩增的 CypA 基因经 EcoR I、Xho I 双酶切后克隆于原核表达载体 pET30a(+),以阳性质粒为模板进行 PCR,单、双酶切阳性质粒均与预期片段大小相符(图 1)。经北京三博远志生物技术有限责任公司测序鉴定,重组质粒的外源插入片段序列正确,重组载体命名为 pET30a-CypA。

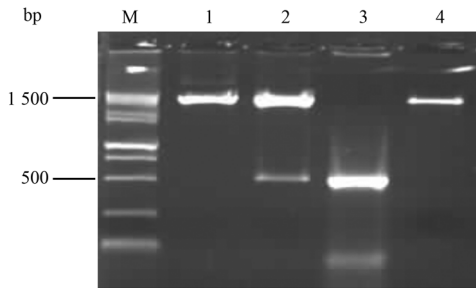


图 1 重组质粒 pET30a-CypA 的鉴定

M:DNA Marker;1,4:重组质粒经 EcoR I 单酶切;2:重组质粒经 EcoR I 和 Xho I 双酶切;3: CypA 基因 PCR 扩增产物

2.2 CypA 融合蛋白的表达和纯化 SDS-PAGE 结果显示,在诱导 4 h 时,蛋白表达量最高(图 2)。经 High-Affinity Ni-IDA Resin 亲和和层析柱纯化后,对所得蛋白样品浓缩,SDS-PAGE 检测蛋白纯化结果,共收集 4 管,其中第 3 管和第 4 管目的蛋白量较大(图 3),收集波峰处样品,用 Gene Tools 软件分析纯化后的融合蛋白的纯度,其中含量高达 80.2%。

2.3 抗血清与 CypA 蛋白反应结果 以兔抗 CypA 血清为一抗,羊抗兔 IgG-HRP 为二抗对纯化蛋白进行检测,结果显示,诱导量较大的 CypA 蛋白能被特异性抗血清识别(图 4)。

### 3 讨论

CypA 是免疫抑制剂环孢素 A 的亲合素,被证实在细胞和组织中广泛分布。研究表明 CypA 在非小细胞肺癌中过量表达,并且可能是一个新的诊断和治疗靶点。Howard 等<sup>[6]</sup>建立了两种非小细胞肺癌的 RNAi 细胞系,在 CypA 基因敲除的有机体中,肿瘤生长缓慢,葡萄糖利用降低,且增殖减少,细胞凋亡增加。本课题组前期的研究发现在肺癌的发生过程中,CypA 蛋白在肺癌组织中高度表达<sup>[7]</sup>。究竟 CypA 在肺癌的发生发展过程中起到什么样的作用,目前尚不清楚。为了研究 CypA 蛋白在肺癌发生发展过程中的生

物学作用,就需要获得人肺癌源性 CypA 蛋白。而获得蛋白有多种方法,如从肺癌组织中直接纯化获得,但是这种方法费时、费力,需要有很严格的纯化条件,因而本研究采用基因工程的方法,从肺癌组织中扩增 CypA 基因,构建原核表达载体,在体外表达和获得了大量的人肺源性 CypA 蛋白,并制备了多克隆抗体,为进一步研究其在肺癌发生发展过程中的作用奠定了基础。

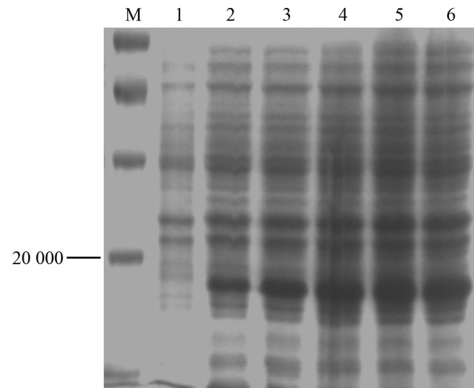


图 2 SDS-PAGE 检测 IPTG 诱导不同时间融合蛋白的表达

M:Marker; 1:未诱导;2,6:1.0 mmol/L IPTG 分别诱导 15 h

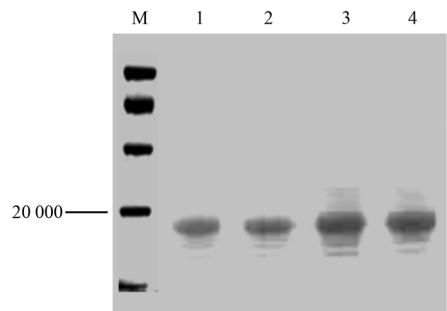


图 3 SDS-PAGE 检测纯化的 CypA 融合蛋白

M:Marker; 1,4:收集的 4 管纯化蛋白

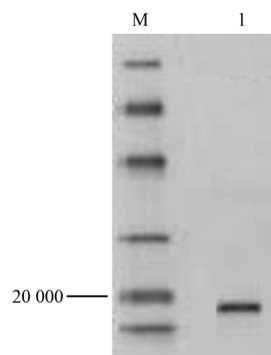


图 4 蛋白印迹法检测抗 CypA 多克隆抗体的特异性

M:Marker; 1:CypA 融合蛋白与 CypA 多克隆抗体杂交条带

本研究中选用的载体 pET30a(+),是带有 6 个组氨酸标签的质粒,诱导表达后形成的融合蛋白可通过镍离子亲和层析法进行纯化,该方法是利用融合于重组蛋白的组氨酸标记

物与  $\text{Ni}^{2+}$  特异性结合,使其结合到吸附有  $\text{Ni}^{2+}$  的层析介质上,然后再将其洗脱而达到分离的目的。该方法特异性强,方便快捷,利用此方法纯化获得的 CypA 蛋白,经初步鉴定,纯度较高,达到 80.2%。

本实验利用人肺源性的 CypA 基因表达蛋白,经纯化后免疫实验大白兔,成功制备了该蛋白的多克隆抗体,这种蛋白和抗体制备的方式保障了此抗体对于人源性肺癌组织表达蛋白的特异性识别,对于检测肺癌组织中 CypA 蛋白的表达情况以及进一步研究 CypA 蛋白在肺癌发生发展过程中的作用具有实际应用意义。

#### [参考文献]

- [1] Wang P, Heitman J. The cyclophilins[J]. *Genome Biol*, 2005, 6:226-230.
- [2] Shen J, Person M D, Zhu J, Abbruzzese J L, Li D. Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry[J]. *Cancer Res*, 2004, 64:9018-9026.
- [3] Chen J, He Q Y, Yuen A P, Chiu J F. Proteomics of buccal squamous cell carcinoma: the involvement of multiple pathways in tumorigenesis[J]. *Proteomics*, 2004, 4:2465-2475.
- [4] Campa M J, Wang M Z, Howard B, Fitzgerald M C, Patz E F Jr. Protein expression profiling identifies macrophage migration inhibitory factor and cyclophilin as potential molecular targets in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:1652-1656.
- [5] Yao Q, Li M, Yang H, Chai H, Fisher W, Chen C. Roles of cyclophilins in cancers and other organ systems[J]. *World J Surg*, 2005, 29:276-280.
- [6] Howard B A, Furumai R, Campa M J, Rabbani Z N, Vujaskovic Z, Wang X F, et al. Stable RNA interference-mediated suppression of cyclophilin A diminishes non-small-cell lung tumor growth *in vivo*[J]. *Cancer Res*, 2005, 65:8853-8860.
- [7] 张慧珍,巴月,杨继要,范清堂,吴逸明. 肺癌相关蛋白的筛选与鉴定[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28:6-8.

[本文编辑] 孙岩