

铁蛋白轻链的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备

金 蕾,张慧珍,杨继要,赵向锋,王 琳,吴逸明*

(郑州大学公共卫生学院职业卫生与职业医学教研室,郑州 450001)

[摘要] **目的:**构建 FTL 的原核表达载体,获得 FTL 纯化蛋白,制备抗体,为研究其生物学作用奠定基础。**方法:**采用基因重组技术将 PCR 扩增的 FTL 基因产物与原核表达载体 pET30a(+)连接,转化入大肠杆菌 BL21(DE3),通过 PCR、单双酶切及测序鉴定构建结果,用 IPTG 诱导蛋白表达,将融合蛋白纯化后,免疫日本大白兔,制备 FTL 多抗,采用 Western 印迹法检验抗体特异性。**结果:**成功地构建了 FTL 的原核表达载体,经大肠杆菌中诱导表达、镍亲和和层析柱纯化,得到较纯的相对分子质量约 25 800 的融合蛋白,免疫日本大白兔后得到多抗血清,Western 印迹结果显示此多克隆抗体与 FTL 蛋白特异性结合。**结论:**本研究获得 FTL 纯化蛋白,制备了 FTL 多克隆抗体,为进一步研究 FTL 的作用机制及其在肺癌组织中的表达情况奠定了基础。

[关键词] 铁蛋白;原核表达;重组融合蛋白质类;色谱法,亲和;抗体

[中图分类号] Q 78 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)11-1180-04

Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of Ferritin light chain

JIN Lei, ZHANG Hui-zhen, YANG Ji-yao, ZHAO Xiang-feng, WANG Lin, WU Yi-ming* (Department of Occupational Health and Occupational Medicine, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To construct prokaryotic expression vector pET30a-FTL, obtain purified FTL protein and to prepare anti-FTL polyclonal antibody, so as to provide evidence for studying the biological function of the antibody. **Methods:** Gene recombination technology was used to link FTL gene (PCR product) and prokaryotic expression vector pET30a(+); the recombinant plasmid was then transformed into *E. coli* BL21 and the positive clones were identified by restriction enzyme digestion and PCR. Expression FTL protein was induced with IPTG and the expression product was purified. The purified FTL protein was used to immunize rabbits to obtain the antiserum. The specificity of the antibodies was examined by Western blotting. **Results:** The prokaryotic expression vector pET30a-FTL was successfully constructed and a fusion protein, with a molecular weight of 25 800, was obtained after induction with IPTG and affinity chromatography. The anti-FTL antibody was obtained from the immunized rabbits. The results of Western blotting indicated that the polyclonal antibody had high specificity to FTL protein. **Conclusion:** We have successfully obtained the purified FTL protein and anti-FTL polyclonal antibody, which lays a foundation for further research on the biological function of FTL and expression of FTL in lung cancer tissues.

[KEY WORDS] ferritin; prokaryotic expression; recombinant fusion proteins; chromatography, affinity; antibody

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(11):1180-1183]

铁蛋白轻链(ferritin light chain, FTL)是铁蛋白的一种亚基。铁蛋白(ferritin)是一种普遍存在于生物体内的保守性较高的多功能多亚基生物蛋白,是细胞内主要的铁储存蛋白。在体内,铁蛋白的主要生理功能是储存机体中的过剩铁,避免产生铁中毒和释放铁给需铁的细胞,用于体内生物合成含铁的蛋白质或酶^[1-3],因此它可以避免过量铁通过 Fenton 反应产生活性氧(ROS),从而起到保护机体免受氧化损伤的作用^[4]。目前,DNA 的氧化损伤与肿瘤之间的关系已较明确,因此铁蛋白与肿瘤之间关系的研究也备受人们关注。铁蛋白含有 2 种不同的亚基,分别为肝脏型(L 型)和心脏型(H 型),也称为轻链 L(~19 500)和重链 H(~21 000)。铁蛋白 H 亚基与肿瘤之间关系的研究已有很多,二者关系已较确定,而与之具有 55% 序列同源性的铁蛋白 L

基是否具有类似作用,此问题也开始引起一些研究人员的重视。

目前,在肝癌、胃癌等^[5-6]肿瘤的研究中都发现有铁蛋白 L 亚基的异常表达。本课题组运用比较蛋白质组学技术也发现 FTL 基因在肺癌组织中存在异常表达,提示该蛋白可能在肺癌的发生发展中起着重要作用^[7]。本研究拟通过构建 FTL 原核表达

[基金项目] 国家自然科学基金(30571552);郑州市科技攻关项目(052SGYS33210);河南省自然科学基金(0611044900)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30571552), the Key Science and Technique Foundation Program of Zhengzhou city(052SGYS33210) and Natural Science Foundation of Henan Province(0611044900)。

[作者简介] 金 蕾,硕士生。

* Corresponding author. E-mail: wuyim@zzu. edu. cn

载体,获得重组蛋白纯品,制备以该融合蛋白为抗原的抗体,从而为进一步研究其在肺癌发生、发展中的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株、动物 大肠杆菌 BL21 及原核表达载体 pET30a(+) 由本实验室保存。日本大白兔购自河南省实验动物中心。

1.2 主要仪器及试剂 TGL-16G 高速低温离心机, Gene 公司的凝胶成像系统, HITACHI 公司 U-2001 紫外分光光度计, 上海新芝生物技术研究所以 JY92-II 超声波细胞破碎仪, 上海新芝生物技术研究所以数控超级低温恒温槽, Bio-Rad 公司 POWER/PAC200 半干式电转移槽。

EcoR I、*Xho* I、 T_4 DNA 连接酶购自 TaKaRa, DNA 标准相对分子质量 M 15 000+2 000、100 bp Marker、蛋白标准分子质量(14 400~94 000)、DNA 凝胶回收试剂盒、日常型质粒 DNA 抽提试剂盒均系 Vitagen 产品, IPTG 购自 Merck 公司, dNTP、DNA *Taq* plus Polymerase 购自上海生工生物工程技术有限公司, High-Affinity Ni-IDA Resin 购自 Gene Script 公司, 透析袋、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSH)购自 Roche 公司; 羊抗兔 IgG-HRP 购自 Solarbio, 硝酸纤维素膜购自郑州康桥生物公司, 其他试剂均为国产分析纯。

1.3 FTL 基因的 PCR 扩增 根据 GenBank 中的 FTL 的 cDNA 序列, 结合质粒载体 pET30a(+) 上的多克隆位点, 运用 Primer Premier 5.0 软件设计引物, FTL 的上游引物 5' 端加 *EcoR* I 酶切位点, 在下游引物 5' 端加 *Xho* I 酶切位点, 引物序列为: 上游引物: 5'-CAA GAA TTC ATG AGC TCC CAG-3' (21 bp), 下游引物: 5'-ACC CTC GAG TTA GTC GTG CTT-3' (21 bp), 反应条件: 95℃ 预变性 10 min, 然后 95℃ 变性 50 s, 52.8℃ 复性 50 s, 72℃ 延伸 50 s, 共循环 32 次, 最后 72℃ 终延伸 10 min, 4℃ 停止。以从肺癌组织中提取的 RNA 逆转录的 cDNA 为模板扩增 FTL。

1.4 FTL 基因表达载体的构建及鉴定 将 FTL 基因的 PCR 扩增产物行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 参照 V-gene DNA 凝胶回收试剂盒说明进行胶回收, 用限制性核酸内切酶 *EcoR* I、*Xho* I 对回收后的 FTL 基因产物和空质粒 pET30a(+) 分别进行双酶切, 再分别进行凝胶回收, 按照 DNA : vector 摩尔比为 8 : 1 的比例混合, 加入 T_4 连接酶, 在数控超级低温恒温槽中 16℃ 连接过夜, 取 10 μ l 连接产物转

化 200 μ l 大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 挑取卡那霉素筛选的阳性克隆培养后提取质粒, 对质粒进行单、双酶切和 PCR 鉴定。将酶切和 PCR 鉴定后的阳性重组质粒送北京三博远志公司测序, 测序结果与 GenBank 中的序列进行比较和分析。

1.5 FTL 融合蛋白的诱导表达及 SDS-PAGE 取重组菌 BL21(pET30a-FTL) 的 37℃ 过夜培养物(含卡那霉素 60 mg/L) 50 μ l 接入到 5 ml 含卡那霉素(终浓度为 60 mg/L) 的 LB 液体培养基中, 37℃, 260 r/min 振荡培养至 $D_{600} \approx 0.5$ 时, 加入化学诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.03 mmol/L, 继续培养, 在培养的第 0、1、2、3、4、5 小时, 分别取出 0.5 ml 菌液制备电泳样品, 并以空 BL21 及空质粒 pET30a(+) 的诱导产物为对照。

1.6 FTL 包涵体的复性和融合蛋白的纯化 200 ml 菌体培养液诱导表达后离心收集菌体, 用 PBS 洗涤 2 次, 重悬菌液, 加入 PMSF、溶菌酶, 超声破碎后于 4℃ 12 000 \times g 离心 20 min, 收集沉淀, 最后用含 5 mol/L 尿素的 0.1 mol/L Tris-Cl(pH 8.5) 重悬, 室温作用 15 min 后, 4℃, 12 000 \times g 离心 15 min, 收集上清。将上清装入透析袋放入透析液 I (20 mmol/L Na_2HPO_4 , 50 mmol/L NaCl, 4 mmol/L 尿素, 2 mmol/L GSH, 1 mmol/L GSSH, pH 7.4) 中复性, 4℃ 过夜。次日, 将透析袋放入透析液 II (20 mmol/L Na_2HPO_4 , 50 mmol/L NaCl) 中, 不断摇动, 每 4 h 换液 1 次, 更换 3 次后透析过夜。取出经复性处理的溶液, 将 High-Affinity Ni-IDA Resin 装柱后进行亲和层析, 纯化 FTL 融合蛋白, 具体步骤见 High-Affinity Ni-IDA Resin 说明书。

1.7 FTL 融合蛋白含量和浓度分析 纯化后的样品进行 SDS-PAGE 分析, 并用 Genetools 分析融合蛋白含量, 用 Bradford 法测定蛋白浓度。

1.8 多克隆抗体的制备 从纯化后收集的纯度较高的样品中(第 3 管)取 1 ml(浓度为 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。

1.9 Western 印迹检测 FTL 融合蛋白免疫学活性 将纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE、半干转印, 转移至硝酸纤维素滤膜上(转印条件为: 10 V, 30 min)。用制备的兔抗 FTL 血清为一抗, 羊抗兔 IgG-HRP 为二抗, 进行抗原-抗体反应, 经 DAB 显色, 至目的条带染色清晰时终止反应。

2 结果

2.1 FTL 基因的 PCR 扩增 以 cDNA 为模板,用 DNA *Taq* plus polymerase 扩增出单一特异条带,大小 500~600 bp,与预期 528 bp 分子大小一致。表明已获得人 FTL 基因,取 4 μ l 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 1 所示。

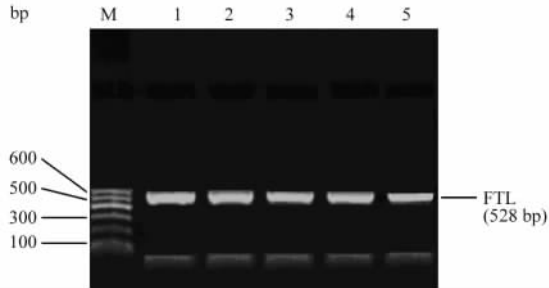


图 1 FTL 基因扩增条带

Fig 1 Results of PCR amplification of FTL gene

M: 100 bp DNA marker; 1-5:FTL strands by PCR amplification

2.2 FTL 基因表达载体的构建及鉴定结果 挑取重组子阳性克隆培养后抽提质粒,对质粒进行单、双酶切鉴定。结果显示,质粒单酶切产物长度为 5.95 kb 左右,双酶切产物分别是 5.42 kb 和 0.52 kb,与预期结果一致。以阳性质粒为模板,用 FTL 基因的上下游引物进行特异 PCR,扩增出 528 bp 的片段(图 2),证明 pET30a-FTL 重组质粒构建成功。

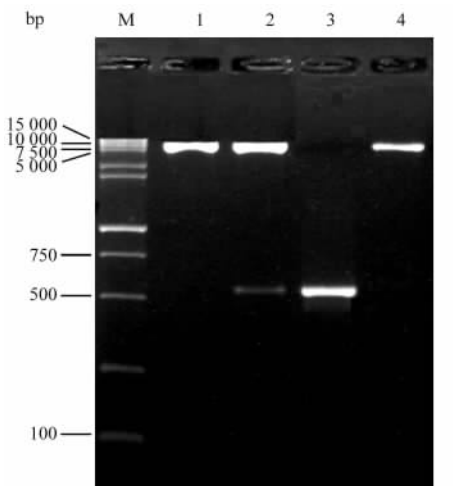


图 2 重组质粒 pET30a-FTL 的鉴定

Fig 2 Identification results of recombinant plasmid

M: DNA marker M15 000+2 000; 1: *Eco*R I enzyme digestion of recombinant plasmid pET30a-FTL; 2: Recombinant plasmid pET30a-FTL digested with *Eco*R I and *Xho*I; 3: Identification result by PCR amplification; 4: *Eco*R I enzyme digestion of pET30a(+) plasmid

对重组质粒 pET30a-FTL 测序,由起始密码子 ATG 到终止密码子 TAG 止,扩增得到的目的基因片段具有完整的阅读框。将测序结果输入 GenBank,经 BLAST 软件分析,与人 FTL 基因 cDNA 序列进行比较,同源性达到 99.8%,有 1 个碱基突变,即序列中的第 361 个碱基 C 被 T 置换,密码子 CTG 变为 TTG,编码的氨基酸均为亮氨酸,因此对蛋白结构和功能不会有影响。

2.3 FTL 在 BL21(pET30a-FTL)中的表达 将重组质粒以 0.03 mmol/L IPTG 诱导表达时,蛋白诱导表达不同时间的 SDS-PAGE 结果显示,在 25 800 处均有蛋白条带,与 FTL 融合蛋白的相对分子量一致,在诱导 4 h 时蛋白表达量最高(图 3)。

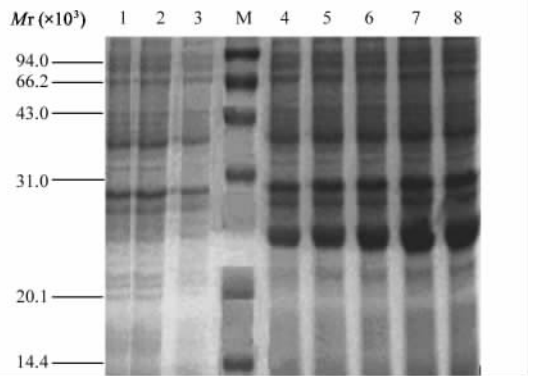


图 3 0.03 mmol/L IPTG 诱导不同时间蛋白表达的 SDS-PAGE 结果

Fig 3 SDS-PAGE analysis of FTL fusion protein

induced by 0.03 mmol/L IPTG for different time periods

1: BL21 induced for 4 h; 2:pET30a(+) plasmid induced for 4 h;3: Recombinant plasmid pET30a-FTL without IPTG induction. M: Protein molecular weight (14 400-94 000); 4-8: Fusion protein expressed at 0.30 mmol/L IPTG for 1,2,3,4 and 5 h, respectively

2.4 FTL 融合蛋白的纯化结果和分析 用 High-Affinity Ni-IDA Resin 进行亲和层析纯化融合蛋白,SDS-PAGE 检查蛋白纯化结果,共收集 4 管,结果融合蛋白主要出现在第 1~3 管中,其中第 2 管和第 3 管目的蛋白量较大,收集波峰处样品,用 Gene-tools 软件分析纯化后的 FTL 融合蛋白的纯度,其中含量高达 85.47%,用 Bradford 法测定纯化后目的蛋白的浓度高达 2.476 mg/ml(图 4)。

2.5 FTL 抗血清的检测结果 带有重组质粒 FTL 的 BL21 诱导后的全菌蛋白及提取的肺腺癌、肺鳞癌组织总蛋白经 SDS-PAGE 后,在半干式电转移仪中将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,分别与 1:300 稀释的免疫兔血清孵育进行 Western 印迹分析,结果在(pET30a-FTL)BL21 总蛋白中 258 000 处出现反

应带,与预期融合蛋白位置一致,而在肺腺癌、肺鳞癌组织总蛋白中 FTL 蛋白表达位置 195 000 处有反应带,而用免疫前取的兔血清(对照血清)孵育时则没有反应带(图 5)。

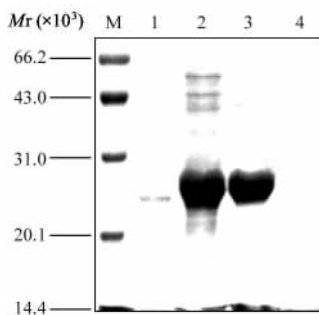


图 4 亲和层析纯化 FTL 融合蛋白结果

Fig 4 Purification results of FTL fusion protein by high-affinity Ni-IDA resin

M: Molecular weight marker(14 400-94 000); 1-4: Purified protein collected in the first four tubes

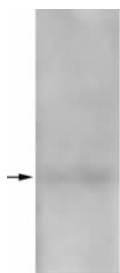


图 5 FTL 表达蛋白与免疫兔血清反应 Western 印迹结果

Fig 5 Western blotting result of FTL protein incubated with rabbit serum(arrow indicates the protein band)

3 讨论

目前,人们对于 FTL 与肿瘤关系的认识,多是源于在筛选肿瘤相关基因的过程中发现有 FTL 基因的异常表达。孙秀菊等^[6]研究发现铁蛋白轻链等基因在高级阶段胃癌中及转移的淋巴结中的表达持续高于在正常黏膜的表达。Maresca 等^[8]发现人为致使 FTL 基因表达下调的 LM 黑色素瘤细胞总黑色素水平显著低于对照,同时伴有酪氨酸酶活动的急剧下降,这表明 FTL 的过量表达可能黑色素瘤的发生有关。

还有一些研究发现在一些肿瘤中 FTL 的表达是下调的。Park 等^[9]在研究人肝细胞癌的铁消耗分子机制时发现,与对照相比,在肝细胞癌组织中 FTL 的表达受到显著抑制或减少到不可检测的水平。类似研究还有很多。Ricolleau 等^[10]在寻找乳腺癌相关的新型生物标志物时,发现有 FTL 的低表达,从而提示 FTL 或许可以作为乳腺癌的诊断性标志物。目前,关于铁蛋白轻链在肺癌组织中表达情

况的研究还不多,表达上调或是下调还不确定。

本实验拟先构建 FTL 的原核表达载体,获得 FTL 蛋白纯品,为进一步通过动物实验及细胞实验研究其生物学机制奠定基础。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 Ni^{2+} 特异性结合,使其结合于吸附有 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,在本研究中纯化的铁蛋白轻链纯度达到 85.47%,可进一步优化纯化条件以增加其纯度,获得高纯度样品。本实验利用 FTL 蛋白的原核表达产物经纯化后免疫新西兰大白兔,成功制备了该蛋白的多克隆抗体,可用于检测肺癌组织中 FTL 蛋白的表达情况。

(志谢 本研究是在河南省分子医学重点学科开放实验室完成,特此致谢!)

[参考文献]

- [1] Ferreira C, Bucchini D, Martin M E, et al. Early embryonic lethality of H ferritin gene deletion in mice[J]. J Biol Chem, 2000, 275:3021-3024.
- [2] Stites S W, Plautz M W, Bailey K, et al. Increased concentrations of iron and isoferritins in the lower respiratory tract of patients with stable cystic fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160:796-801.
- [3] Goto F, Yoshihara T, Shigemoto N, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17:282-286.
- [4] Balla G, Jacob H S, Balla J, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strateger of endothelium[J]. J Biol chem, 1992, 267:18148-18153.
- [5] Kuramitsu Y, Nakamura K. Current progress in proteomic study of hepatitis C virus-related human hepatocellular carcinoma[J]. Expert Rev Proteomics, 2005, 2:589-601.
- [6] 孙秀菊, 郝冬梅, 郑志红, 等. 胃癌发生发展相关基因的筛查和表达分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22:31-34.
- [7] 张慧珍. 蛋白质组学方法筛选肺癌相关蛋白及人源性肺癌单抗抗体库的构建[D]. 郑州: 郑州大学, 2005.
- [8] Maresca V, Flori E, Cardinali G, et al. Ferritin light chain down-modulation generates depigmentation in human metastatic melanoma cells by influencing tyrosinase maturation[J]. J Cell Physiol, 2006, 206:843-848.
- [9] Park KS, Kim H, Kim NG, et al. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2002, 35:1459-1466.
- [10] Ricolleau G, Charbonnel C, Lode L, et al. Surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry protein profiling identifies ubiquitin and ferritin light chain as prognostic biomarkers in node-negative breast cancer tumors[J]. Proteomics, 2006, 6:1963-1975.

[收稿日期] 2007-03-28

[修回日期] 2007-04-23

[本文编辑] 尹 茶