

鸭 MHC II β 基因的克隆、表达及多克隆抗体的制备

张舒婕^{1,2}, 龚炎长¹, 俸艳萍¹, 李世军¹, 杨庆磊¹, 胡福利¹, 杨 桓¹, 彭秀丽^{1*}

(1. 华中农业大学动物遗传育种与繁殖教育部重点实验室, 武汉 430070;

2. 河南孟津县第一高级中学, 洛阳 471100)

摘要: 据 NCBI 上已发表的序列设计引物, 通过 RT-PCR 从北京鸭脾脏的总 RNA 中扩增得到 MHC II β 基因, 将其克隆至 pMD18-T 载体上, 经酶切分析及测序鉴定后, 进一步亚克隆至原核表达载体 pGEX-KG 中, 转化大肠杆菌 BL21 中诱导表达。蛋白纯化后, 免疫昆明小鼠制备多克隆抗体, 经 1 : 100 倍稀释后用于 Western blot 分析。结果表明: 克隆得到了鸭 MHC II β 链基因, 大小为 798 bp, 经核苷酸测序与已登录的基因序列同源性为 92%; 成功构建了原核表达载体, 融合蛋白得到了高效表达且纯化后纯度达 95%。制备的鼠抗鸭 MHC II β 多克隆抗体, 经酶联免疫吸附实验 (ELISA) 与免疫印迹法 (Western blot) 证实抗体的效价高、特异性强, 为深入研究鸭 MHC II 奠定了基础。

关键词: 鸭; MHC II β 基因; 克隆; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S834; S813.3

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2008)11-1612-04

Cloning, Expression and Polyclonal Antibody Preparation of Duck MHC Class II β Chain Gene

ZHANG Shu-jie^{1,2}, GONG Yan-zhang¹, FENG Yan-ping¹, LI Shi-jun¹, YANG Qing-lei¹, HU Fu-li¹, YANG Huan¹, PENG Xiu-li^{1*}

(1. Key Laboratory of Agricultural Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. No. 1 Senior High School of Mengjin in Henan Province, Luoyang 471100, China)

Abstract: According to mRNA gene sequence registered in GenBank, a pair of specific primers for the gene of duck MHC II β chain was designed and synthesized. Using total RNA from duck spleen, the target gene fragment was obtained by RT-PCR, then cloned into the T cloning vector pMD18-T. After being identified by restriction digestion and DNA sequencing, the insert fragment was subcloned into the expression vector pGEX-KG. After transforming into *E. coli* BL21, the recombinant plasmid were induced to obtain the interest protein. Then the purified protein was immunize to mouse for preparing polyclonal antibody. The results showed that MHC II β gene was cloned, the obtained 798 bp fragment has 92% identities to the previously identified duck MHC II at nucleotide level; The prokaryotic expression vector was successfully constructed and the protein was expressed efficiently. The purity of protein reached 95%. A high titer and specific antibody has been prepared by purified protein, it was proved by the methods of ELISA and Western blot. All this makes it possible to do further studies on duck MHC II gene.

Key words: duck; MHC II β gene; cloning; prokaryotic expression; polyclonal antibody

主要组织相容性复合体 (Major histocompatibility complex, MHC) 是脊椎动物中发现的编码免

疫球蛋白样受体 (Immunoglobulinlike receptors) 的高度多态的基因群, 与机体抗病力和免疫应答相关。

收稿日期: 2007-11-12

基金项目: 湖北省重大科技攻关项目资助

作者简介: 张舒婕 (1982-), 女, 河南省淇县人, 硕士研究生, 主要从事分子遗传育种研究, E-mail: zhshj82@sina.com

* 通讯作者: 彭秀丽, E-mail: xlpengsishun@mail.hzau.edu.cn

MHC 分为 MHC I、MHC II 和 MHC III 等 3 类,其中 MHC II 类分子存在于免疫细胞表面,由 α 链和 β 链以非共价键相连组成的一组高度多态性的跨膜糖蛋白^[1],在细胞介导免疫和体液免疫中起重要作用^[2]。MHC 的 3 类分子提呈经过加工的外来抗原给辅助性 T 细胞的抗原受体(TCR),导致辅助性 T 细胞激活和分化,从而在诱发免疫应答中起重要的作用^[3]。在一定意义上,MHC II 类分子表达与否及其表达水平,直接决定免疫应答的发生及其强度。另外,MHC II 类分子表达水平的改变还参与某些自身免疫病、肿瘤、免疫缺陷等疾病过程的发生和发展^[4]。它的缺陷可能引起自身免疫疾病的发生,因此它在免疫学上具有重要的研究价值。本研究旨在克隆 MHC II β 基因,构建原核表达载体,使其得到高效表达并进行纯化,获得效价高、特异性强的多克隆抗体,为深入研究鸭 MHC II β 基因的分子结构及免疫学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21 菌株及表达载体 pGEX-KG 由华中农业大学动物医学院提供。

1.1.2 主要工具酶及试剂 RevertAidTM First Stand cDNA Synthesis Kit cDNA 第一链反转录试剂盒, *Bam*H I、*Hind* III 及 T4 DNA 连接酶为 Fermentas 公司产品;pMD18-T Vector 为 TaKaRa 公司产品;Trizol 为百泰克生物技术有限公司产品;IPTG、DTT、考马斯亮蓝为 Sigma 公司产品;羊抗鼠 IgG 购于博士德生物技术有限公司;其他试剂为国产分析纯。

1.1.3 实验动物 4 周龄健康雌性昆明小鼠购于武汉市动物疾病控制中心。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计 参照 GenBank 中鸭 MHC II β 基因(AF:390589)的 mRNA 序列以及 pGEX-KG 的多克隆位点,应用 Primer premier5.0 设计 1 对引物,PR:5'-ATGGATCCGCAGCCATGGGGAGC-3'(引入 *Bam*H I 位点),PF:5'-ATAAGCTTGGAGCTGCTTCAGGAGCC-3'(引入 *Hind* III 位点)。预期扩增片段为 798 bp(包含完整的编码区)。

1.2.2 鸭 MHC II β 链基因的扩增 用 Trizol 法从鸭脾脏中提取总 RNA,并用反转录试剂盒对总

RNA 进行反转录,然后以反转录的 cDNA 为模板对目的基因在 65 $^{\circ}$ C 进行 PCR 扩增。

1.2.3 MHC II β 基因的克隆与重组质粒的构建

将 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定并用 DNA 凝胶回收试剂盒回收,然后连入 pMD18-T 克隆载体,16 $^{\circ}$ C 水浴过夜,转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,涂布于含 Amp 的 LB 琼脂平板上,37 $^{\circ}$ C 温箱培养过夜,初步筛选阳性克隆,并用小量碱法提取质粒。用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定 MHC II β 基因,同时用设计的引物进行 PCR 鉴定。构建的阳性质粒命名为 pMD18-T- β 。阳性重组质粒测序,测序结果用 Blast 软件与已报道的相应基因序列比对。用同样的方法将 MHC II β 基因亚克隆于表达载体 pGEX-KG 中,构建的阳性重组质粒命名为 pGEX-KG- β 。

1.2.4 重组质粒的原核表达 挑取 pGEX-KG- β 阳性克隆单菌落,接种于 1 mL 含 Amp 的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 静置培养过夜。取 50 μ L 过夜培养物接种于 5 mL 的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 2~3 h,使其 OD₆₀₀ 值在 0.4~0.6。每管吸出 1 mL 未经诱导的培养物分别放于微量离心管中,在剩余的培养物中加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 继续培养;在诱导 1、2、3、4 及 5 h 后取 1 mL 样品放于微量离心管中,测定 OD 值,室温 12 000 r/min 离心 1 min。沉淀悬于 100 μ L 1 \times SDS 凝胶加样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,室温 12 000 r/min 离心 1 min,取上清进行 12% SDS-PAGE 电泳,用考马斯亮蓝染色。凝胶制备方法参照《分子克隆实验指南》^[5]。

1.2.5 融合蛋白纯化 从 SDS-PAGE 胶上切取目的蛋白,放入透析袋中,加入适量的电洗脱液后,在水平电泳槽中衡压 60 V 进行电洗脱,至凝胶无色时再反转电泳 5 min。在洗脱液中按 1:15 加入冷丙酮,在 -20 $^{\circ}$ C 静置 30 min 后于 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,沉淀在室温下放置至丙酮完全挥发,加入 PBS 溶解,取少量进行 SDS-PAGE 电泳^[6]。

1.2.6 鸭 MHC II β 多克隆抗体的制备 切下含有目的蛋白的凝胶条带研碎后免疫 5 周龄的雌性昆明小鼠。初免用 100 μ g 的抗原与等体积的完全弗氏佐剂乳化后,背部多点皮下注射;每 14 d 加强免疫一次,100 μ g 的抗原与等体积的不完全弗氏佐剂乳化后腹腔注射。三免 1 周后眼球采血分离血清。

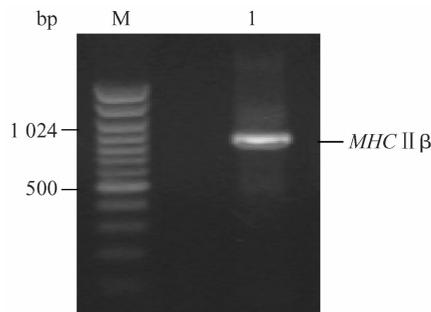
1.2.7 抗体检测 用间接 ELISA 法测定效价,以

终浓度为 10 mg/L 的 MHC II β 蛋白包被 ELISA 检测板,一抗为不同稀释度的抗血清、未经免疫的小鼠血清、PBS,以 HRP-羊抗鼠 IgG(1 : 10 000)作为二抗,最后以 TMB 底物液显色后,用酶标仪测定 A_{450} 。用 Western blot 鉴定特异性,将表达的 MHC II β 蛋白用 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上,用制备的抗血清 1 : 100 稀释后作为一抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,1 : 5 000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗孵育 2 h,充分洗涤后,加入 3,3-二氨基联苯胺 (DAB)显色。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 扩增的鸭 MHC II β 基因

用 MHC II β 特异性引物进行 RT-PCR 扩增,产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,可见约 798 bp 的扩增片段,与预期大小相符(图 1)。



M. DL100 DNA marker; 1. RT-PCR product

图 1 RT-PCR 扩增结果

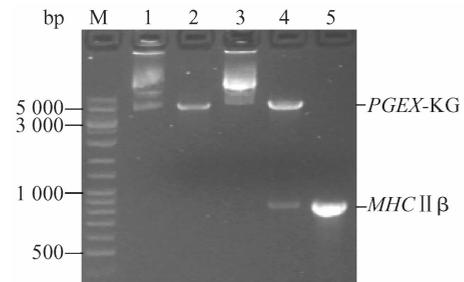
Fig. 1 The result of RT-PCR amplification

2.2 MHC II β 基因的测序与重组质粒的鉴定

重组质粒 pMD18-T- β 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切及 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,可见 2.7 kb 和 798 bp 2 条带。对质粒 pMD18-T- β 进行测序及 Blast 比对分析,证实所克隆的 MHC II β 片段与已报道的序列同源率为 92%,预测氨基酸同源率为 91%。结果证明 MHC II β 基因已成功克隆到 pMD18-T 载体上。重组质粒 pGEX-KG- β 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切,可见 5.0 kb 和 798 bp 2 条带(图 2,泳道 4)。用特异性引物扩增分别可见约 798 bp 的片段(图 2,泳道 5)。酶切及 PCR 扩增结果表明 MHC II β 基因已被插入到表达载体 pGEX-KG 内,成功构建了重组质粒 pGEX-KG- β 。

2.3 融合蛋白的表达

将诱导前后的菌液收集,SDS-PAGE 结果显

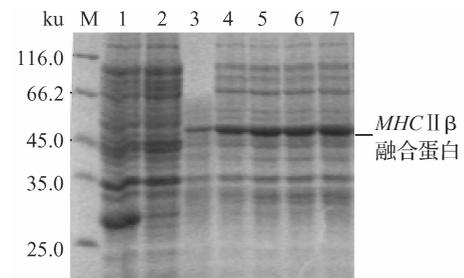


M. DNA 相对分子质量标准; 1. pGEX-KG 质粒; 2. pGEX-KG- β 重组质粒; 3. pGEX-KG 质粒双酶切鉴定; 4. pGEX-KG- β 重组质粒经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定; 5. PCR 产物

图 2 重组质粒 pGEX-KG- β 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pGEX-KG- β

示,诱导后在 55 ku 处出现 1 条特异性蛋白条带,大小与预期的相同,经凝胶薄层扫描分析,融合蛋白占菌体总蛋白的 24.8%(图 3)。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1. 空载体对照; 2. 未诱导对照; 3~7. 诱导 1、2、3、4 和 5 h

M. Protein marker; 1. Control of hollow vector; 2. Control of uninduced; 3-7. Induced for 1, 2, 3, 4 and 5 h

图 3 MHC II β 总蛋白的 SDS-PAGE

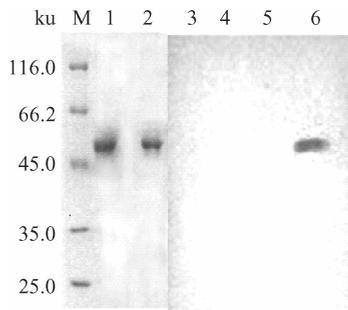
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of total protein of MHC II β

2.4 融合蛋白的纯化

融合蛋白经电洗脱纯化后,凝胶薄层扫描分析,纯度为 95%(图 4,泳道 1 和 2)。

2.5 抗体效价与特异性的鉴定

用纯化的蛋白以 10 μ g/mL 包被酶标板,用间接 ELISA 法检测抗体滴度,抗体滴度为 1 : 102 400。Western blot 检测,其他对照均无条带,而用 MHC II β 蛋白可检测到特异性条带(图 4,泳道 6),结果表明制备的抗体效价高,特异性强。



M. 蛋白质相对分子质量标准; 1—2. 纯化蛋白;
3. 空载体; 4. 阴性血清; 5. 鸭 MHC II α 蛋白;
6. 鸭 MHC II β 蛋白

M. Protein marker; 1—2. Purified fusion protein;
3. Western blot of hollow vector; 4. Western blot
of negative serum; 5. Western blot of MHC II α
protein; 6. Western blot of MHC II β protein

图 4 纯化的 MHC II β 融合蛋白及 Western blot 分析

Fig. 4 Purified the MHC II β fusion protein and Western blot analyses

3 讨论

MHC II 类分子的分布比较局限,主要表达于 B 细胞、单核-巨噬细胞和树突状细胞等抗原递呈细胞上^[7],所以本研究以富含淋巴细胞的鸭脾脏为材料。在扩增鸭 MHC II β 基因时,退火温度是影响 PCR 特异性的因素。笔者采用的退火温度为 65 $^{\circ}\text{C}$,徐志本等^[8]扩增鸡 MHC II β 时的退火温度是 67 $^{\circ}\text{C}$;而 Alberto 等^[9]扩增硬骨鱼 MHC II 基因的退火温度为 55 $^{\circ}\text{C}$,说明退火温度与物种有关。扩增的鸭 MHC II β 链基因含有完整的编码框,预测其蛋白相对分子质量约 29 ku,因其与 26 ku 的 GST 标签蛋白融合表达,故本试验得到的蛋白为 55 ku。

鸭 MHC II β 融合蛋白主要以包涵体的形式表达,有研究表明低温诱导能降低蛋白质合成的速率,改变多肽折叠的动力学,从而导致正确折叠的蛋白增加。笔者通过降低诱导表达时的温度试图将蛋白表达于上清中,但结果表明无论在什么样的温度下该蛋白都是以包涵体的形式存在。因包涵体表达量较高,所以采用切胶后电洗脱的方式进行纯化,这种纯化方式与常用的亲和层析、凝胶过滤层析、离子交换层析和疏水层析^[10]相比操作简单、快速,成本低,效率比较高。

据研究鸡的 MHC II 与马立克氏病^[11]、劳斯氏肉瘤^[12]疾病的抵抗性和易感性有密切关系,推断 MHC II 分子对鸭抗病性也应起着很重要的作用,然

而目前在鸭中还没有报道它与疾病的相关性。本试验克隆了鸭的 MHC II β 基因且构建了原核表达载体,成功表达了融合蛋白,用成本低、效率高的电洗脱的方法对蛋白进行了纯化,纯化的蛋白免疫小鼠后得到了效价高、特异性强的多克隆抗体,为深入研究蛋白性质及抗病育种打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] NIEMIEC P K, READ L R, SHARIF S. Synthesis of chicken major histocompatibility complex class II oligomers using a baculovirus expression system [J]. Protein Expression and Purification, 2006, 46: 390-400.
- [2] ZHOU H, LAMONT S J. Chicken MHC class I and II gene effects on antibody response kinetics in adult chickens [J]. Immunogenetics, 2003, 55 (3): 133-140.
- [3] SRISAPOOME P, OHIRA T, HIRONO I, et al. Cloning, characterization and expression of cDNA containing major histocompatibility complex class I, II α and II β gene of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Fisheries Science, 2004, 70: 264-276.
- [4] RECHE P A, GLUTTING J P, ZHANG H, et al. Enhancement to the PANKPEP resource for the prediction of peptide binding to MHC molecules using profiles [J]. Immunogenetics, 2004, 56: 405-419.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 等译. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [6] 康 彬, 童 哲. 一种利于蛋白质回收的快速 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色-脱色方法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 210-211.
- [7] LONG A B, FERGUSON A M, MAJUMDER P, et al. Conserved residues of the bare lymphocyte syndrome transcription factor PFXAP determine coordinate MHC class II expression [J]. Molecular Immunology, 2006, 43: 395-409.
- [8] 徐志本, 余为一, 仲大莲, 等. 鸡 MHC II β 链基因的克隆和表达及其抗体制备 [J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(1): 51-55.
- [9] ALBERTO C, MARIA A E, JOSE M. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells [J]. Molecular Immunology, 2006, 43: 1 275-1 285.
- [10] 王海林, 高向阳. 包涵体纯化技术 [J]. 生物技术通报, 2007, 1: 78-80.
- [11] HAERI M, READ L R, SHARIF S, et al. Identification of peptides associated with chicken major histocompatibility complex class II molecules of B21 and B19 haplotypes [J]. Immunogenetics, 2005, 56(11): 854-859.
- [12] COLLINS W M, BRILES W E, ZSIGRAY R M, et al. The B locus (MHC) in the chicken: association with the fate of RSV-induced tumors [J]. Immunogenetics, 1997, 5: 333-343.