

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)09-0773-03

人 Lrp 蛋白多克隆抗体的制备

于欣平¹ 宋庆贺² 侯立朝¹ 杜可军³ 熊利泽¹ 陈苏民² 陈南春² 代忠明² (第四军医大学¹ 西京医院麻醉科,² 基础部生物化学与分子生物学教研室,³ 预防医学系劳动与环境卫生教研室 陕西 西安 710033)

Preparation of human Lrp polyclonal antibody

YU Xin-Ping¹, SONG Qing-He², HOU Li-Chao¹, DU Ke-Jun³, XIONG Li-Ze¹, CHEN Su-Min², CHEN Nan-Chun², DAI Zhong-Ming²

¹Department of Anesthesiology, Xijing Hospital, ²Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, ³Department of Occupational and Environmental Health, School of Preventive Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To prepare the human Lrp polyclonal antibody. METHODS: To research the function of lrp gene further, we cloned total length coding sequence of human lrp-cDNA and made the prokaryotic expression and identification of it. Total length Lrp protein was expressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA chelating column. Polyclonal antibody was prepared by immunizing New Zealand rabbits with purified protein, then the anti-serum was adsorbed to remove the non-specific reaction components. RESULTS: Western Blot showed that the band of interest protein at 69 kD was all found before and after the anti-serum was purified, indicating that the adsorbed and purified antibody could combine with Lrp specifically. However, Western Blot also showed that there was only one band of interest protein after the antibody was purified, indicating that the high specific anti-serum was prepared after adsorption and purification. The immunoblotting titer of it was above 10^{-6} , a very high immunoblotting titer. CONCLUSION: We succeed in preparing the high potency and high specific human Lrp polyclonal antibody, offering an important experimental tool for further researching the function of Lrp.

【Keywords】 lipopolysaccharides; human lipopolysaccharide responsive gene; human lipopolysaccharide responsive proein; antibody preparation

【摘要】目的 制备人 Lrp 蛋白多克隆抗体。方法 克隆全长 lrp-cDNA 编码序列并进行原核表达与鉴定。用镍离子螯合柱

收稿日期 2006-11-20; 接受日期 2006-12-29

基金项目 国家自然科学基金(30170361, 30471675)

通讯作者 侯立朝。Tel (029) 84775337 Email Hou2001@fmmu.edu.cn

作者简介 于欣平。硕士生(导师侯立朝, 陈苏民), 住院医师。Tel: (029) 84775343 Email yuxinping1026@yahoo.com.cn

(Ni-NTA) 纯化原核表达的全长 Lrp 蛋白, 获得纯度较高的目的蛋白。用纯化后蛋白免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体并吸附去除非特异性反应成分。结果: Western 印迹结果表明, 纯化前后的抗血清在 69 ku 处均检测到目的蛋白条带, 说明吸附纯化后的抗体可以与 Lrp 蛋白特异结合。而纯化后抗体 Western 印迹结果目的条带只有一条, 说明吸附纯化后得到高特异性抗血清, 其免疫印迹的效价在 10^{-6} 以上, 有较高免疫印迹滴度。结论 成功制备了高效价高特异性的兔抗人 Lrp 蛋白的多克隆抗体, 为 Lrp 功能的进一步研究提供了重要的实验工具。

【关键词】 脂多糖类; 人脂多糖应答基因; 人脂多糖应答蛋白; 抗体制备

【中图分类号】 Q257, Q78

【文献标识码】 A

0 引言

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是细菌内毒素, 是革兰氏阴性(G^-)细菌感染的主要致病因子, 它与某些炎症的发生密切相关^[1]。探讨脂多糖刺激后表达发生改变的基因的功能, 有针对性地研究其在 LPS 信号转导通路中的作用部位及作用性质, 有助于增加对炎症反应分子机制的认识。人 lrp(lipopolysaccharide responded gene, lrp)是一种脂多糖应答基因。系本课题组采用基于 PCR 的改良消减杂交技术, 从 LPS 刺激后的人牙髓细胞差异表达基因文库中筛选出的应答基因^[2], GenBank 录入号为 AF143740。但当时得到的只是该基因编码 N-端 186 个氨基酸的序列。随后全长 cDNA 也被克隆并录入 GenBank(录入号 NM018360)。本课题组克隆了全长 lrp-cDNA 编码序列并进行了原核表达与鉴定^[3]。分析表明, 全长人 lrp 编码 528 个氨基酸, 并有亮氨酸拉链的特征结构。本实验对原核表达的 Lrp 蛋白进行纯化, 用纯化后的蛋白免疫新西兰大白兔制备抗血清。

1 材料和方法

1.1 材料 大肠杆菌 BL21(DE3)由本室保存; 重组人 lrp 融合表达载体 pcTAT-hlrp 由本课题组构建保存。LPS(Sigma 公司); HRP 标记的羊抗兔 IgG 及化学发光底物(Pierce 公司); 弗氏完全、不完全佐剂(GibcoBRL 公司); Ni-NTA 纯化系统(Qiagen 公司);

纯种新西兰大白兔(第四军医大学实验动物中心)。

1.2 方法

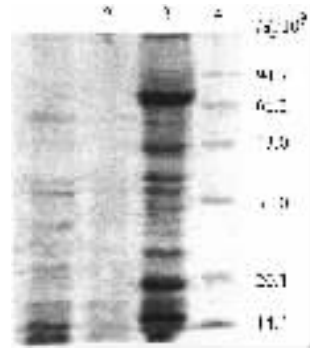
1.2.1 Lrp 的表达纯化 将重组人 *lrp* 融合表达载体 pcTAT-*hlrp* 转化 BL21(DE3)感受态细菌,挑单菌落扩大培养后 IPTG(终浓度为 0.2 mmol/L)诱导表达 6His-TAT-Lrp 融合蛋白。将诱导后的菌液 2292 g/min 离心 10 min,收集菌体,用 STE(100 g/L 蔗糖,10 mmol/L Tris-Cl pH 8.0,1 mmol/L EDTA pH 8.0)洗 1 遍;离心收集菌体后用 STE 重悬,超声破碎菌体(整个过程均在冰浴中),13 201 g 4℃,离心 30 min,收集包涵体沉淀,再用包涵体溶解缓冲液(50 mmol/L Tris-Cl pH 8.0,1 mmol/L EDTA pH 8.0,100 mmol/L NaCl,8 mol/L 尿素)溶解沉淀,13 201 g/min 4℃,离心 30 min,收集上清;用镍离子金属整合柱(Ni-NTA)纯化 Lrp 蛋白(按公司提供的操作说明进行)并作 SDS-PAGE 分析。

1.2.2 抗体制备 用约 40 μg 纯化的 Lrp 蛋白于脊柱两侧多点注射免疫新西兰大白兔,免疫周期为 0 d,7 d,28 d,35 d。第 1 次加弗氏完全佐剂,其余 3 次加弗氏不完全佐剂。第 4 次免疫 1 wk 后颈动脉取血 37℃ 静置 12 h 分离血清,1467 g/min 离心 10 min 去除残留红细胞。将制备的抗血清按 1:10⁴ 稀释,以免疫前兔血清为对照对诱导表达 Lrp 后的全菌蛋白样品进行 Western Blot 分析检测抗体。

1.2.3 抗 Lrp 抗血清的吸附纯化和特异性鉴定 培养转化 pcTAT 载体的 BL21(DE3),收菌后用 STE 重悬浮菌体沉淀,加入溶菌酶(每克湿菌 3 mg)作用 1.5 h,加脱氧胆酸钠(每克湿菌 4 mg)搅动 10 min,再加 1 g/L 的 DNase I(每克湿菌 4 μL)搅拌直至不再粘稠(以上操作均在冰浴进行);此时向裂菌液中加入等体积的 4℃ 预冷丙酮,混匀,冰浴 30 min 沉淀全菌蛋白,然后 5867 g,4℃ 离心 10 min 收取全菌蛋白沉淀;沉淀用 PBS 洗涤 1 遍后与所制备抗血清于 37℃ 摇动共孵 2 h 吸附去除非特异性反应成分。将吸附前和吸附后的抗体分别按 1:10³,1:10⁴,1:10⁵,1:10⁶ 稀释作一抗,对诱导表达 Lrp 后的全菌蛋白样品进行 Western Blot 分析。

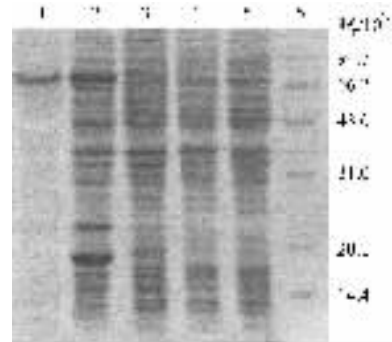
2 结果

2.1 Lrp 蛋白的表达与纯化 诱导 2 L 菌液,表达后的工程菌经超声裂解后分别取上清和沉淀样品进行蛋白电泳,结果显示目的蛋白在包涵体中(图 1)。将所得包涵体用包涵体溶解缓冲液溶解后经 Ni-NTA 一步纯化,得到约 8 mg 蛋白,且纯度较高(图 2)。



1: 蛋白浓缩后的上清;2: 上清;3: 沉淀;4: 低分子质量蛋白 marker.

图 1 诱导细菌裂解后 SDS-PAGE 的上清和沉淀



1: Ni-NTA 纯化的融合蛋白;2,3: 诱导和未诱导的 pcTAT-*hlrp*;4,5: 诱导和未诱导的未转化的 pcTAT 对照;6: 低分子质量蛋白 marker.

图 2 通过 Ni-NTA 纯化融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.2 抗血清的检测 用收集未纯化抗血清作一抗,以免疫前兔血清为对照对诱导表达 Lrp 后的全菌蛋白样品进行 Western Blot 分析,结果显示(图 3),用所制备的抗血清在 69 ku 位置明显杂到了一条预期的条带,而对照血清泳道相同位置处无相应条带出现,说明所制备抗血清中确有一定浓度的抗目的蛋白的抗体。

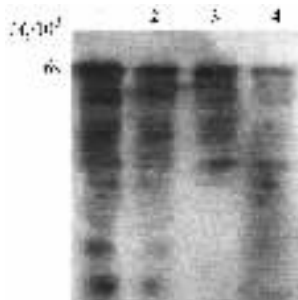


1: 第一抗体对所制备抗血清的检测;2: 第一抗体对正常血清的检测。

图 3 所制备抗血清的 Western Blot 检测

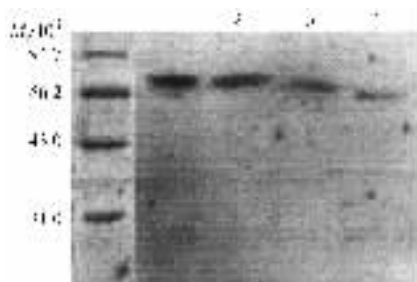
2.3 Lrp 抗体的制备纯化及特异性鉴定 免疫新西兰大白兔后,获得抗血清。抗体吸附纯化后,以分别

按 $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ 稀释纯化前和纯化后的抗兔血清作为一抗,用 Western 印迹方法检测全菌蛋白样品。结果显示(图 4, 5) 纯化前后的抗血清在 69 ku 处均检测到了目的蛋白条带,说明所制备抗体可以与所表达目的蛋白结合,但纯化前抗体所检测到的非特异条带较多,而纯化后抗体 Western 印迹结果就只有一条目的条带。说明吸附纯化后得到了高特异性的抗血清,并且其免疫印迹的效价在 10^{-6} 以上。



1-4: 抗血清的稀释比 $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ 。

图 4 未纯化抗血清的 Western Blot 分析



1-4: 抗血清的稀释比 $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$ 。

图 5 纯化后抗血清的 Western Blot 分析

3 讨论

LPS 是细菌内毒素,与某些炎症的发生密切相关^[1]。它是 G^- 细菌感染的主要致病因子,也是一种危及人类健康乃至生命的重要的病原菌相关模式分子(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)。LPS 进入体循环时,就会形成内毒素血症,引起明显的病理生理反应。

近年来的实验显示^[4], LPS 除引起危及生命的 G^- 菌毒血症外,也参与一些局部特定疾病,如泌尿系统、心血管系统、呼吸系统、消化系统等多个系统疾病。目前认为 LPS 也是引起人和实验动物中毒性休克的主要因素^[5]。而所有这些作用的发挥,都是藉一系列被称为模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs)^[6]的膜蛋白分子对 LPS 识别^[7-9],以及一系列相关的胞内信号传导途径对所识别信号的传

递和放大来实现的。LPS 信号传导途径非常复杂,单凭现有的信号传导分子很难解释其中的一些通路。研究 LPS 的致病机制,必须寻找新的信号传导分子。

人 *lpr* 就是新发现的一种 LPS 应答基因。功能位点的分析发现, *lpr* 的基因序列中包含两条相互重叠的亮氨酸拉链结构[L-x(6)-L-x(6)-L-x(6)-L]。亮氨酸拉链结构是 DNA 结合蛋白的特征型结构,该结构往往出现在几种特定的蛋白质中,即与细胞生长代谢相关的分子中(如转录因子、癌基因)。对 *lpr* 进行研究可能会有助于进一步认识 LPS 介导的信号转导通路,增加对炎症反应分子机制的认识,并可能为内毒素血症等 LPS 相关疾病寻找新的治疗靶点。

本实验成功制备了高效价高特异性的兔抗人 *Lrp* 蛋白的多克隆抗体,为 *Lrp* 功能的进一步研究提供了重要的实验工具。

【参考文献】

- [1] 宋庆贺,柴玉波,陈苏民,等. 人 *lpr*-cDNA 全长编码区的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(5): 458-461.
- [2] Zhao ZL. Direct cloning of cell differential expression genes with full length by a new strategy[J]. J Biotechnol, 1999, 73(1) 35-42.
- [3] Chai YB. Development of an improved subtractive hybridization and batch cloning of LPS specific response genes from human dental pulp cells[J]. J Dental Res, 2001, 18(5) 126-130.
- [4] Inada T, Hamano N, Yamada M, et al. Inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor-alpha in delayed gastric emptying and gastrointestinal transit induced by lipopolysaccharide in mice[J]. Braz J Med Biol Res, 2006, 39(11) 1425-1434.
- [5] Hwang YH, Park BK, Lim JH, et al. Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock[J]. Eur J Pharmacol, 2007, 556(1-3) 166-171.
- [6] Muta T. Molecular basis for invertebrate innate immune recognition of (1-3)-beta-D-glucan as a pathogen-associated molecular pattern[J]. Curr Pharm Des, 2006, 12(32) 4155-4161.
- [7] Tang X, Metzger D, Leeman S, et al. LPS-induced TNF-alpha factor(LITAF)-deficient mice express reduced LPS-induced cytokine: Evidence for LITAF-dependent LPS signaling pathways[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(37) 13777-13782.
- [8] Trent MS, Stead CM, Tran AX, et al. Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis[J]. J Endotoxin Res, 2006, 12(4) 205-223.
- [9] Doyle SL, O'Neill LA. Toll-like receptors: from the discovery of NF kappa B to new insights into transcriptional regulations in innate immunity[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(9) 1102-1113.

编辑 许福明