

Snail/ GST 融合蛋白的原核表达及其多克隆抗体制备

张儒英¹, 云昆仑², 乔惠珍¹, 王冰晶³, 张志谦³

关键词: Snail; 融合蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: Q249 文献标识码: B

文章编号: 1000-8578(2006)07-0549-01

0 引言

上皮型钙粘附素(E-cadherin, E-cad)介导的粘附系统的破坏,是肿瘤从非浸润性转化为浸润性的关键步骤^[1]。而锌指转录因子 Snail,具有下调 E-cad 的作用^[2],本研究通过制备 Snail 抗体,为进一步开展 E-cad 的功能研究和应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和菌株 主要试剂购自北京中山公司;大肠杆菌 DH5a 和 BL21 由北京大学临床肿瘤学院北京市肿瘤防治研究所细胞实验室保存。

1.2 pGEX-4T-1 / Snail 原核表达载体的克隆

从人血管内皮细胞提取总 RNA,在逆转录酶作用下,合成 cDNA。以逆转录的 cDNA 为模板,用上游引物 5'-CTGCA GGACTCTAATCCA G3 (含有 EcoR I 内切酶位点)和下游引物 5'-ATCCTTGGCCTCA GAGA GC-3 (含有 Sal I 内切酶位点),进行 PCR 扩增,得到 Snail C-末端 377bp 的 DNA 片段,酶切、琼脂糖凝胶电泳分离后,用玻璃奶法(自制)纯化回收,与 pGEX-4T-1 原核表达载体定向连接。转化 DH5 感受态细菌,提取质粒并酶切鉴定重组体。

1.3 融合蛋白的诱导表达与纯化

1.3.1 表达鉴定 表达质粒 Snail/pGEX-4T-1 转化大肠杆菌 DH5 后,经过酶切鉴定,挑取阳性细菌克隆至 3ml LB/Amp + 试管中培养 3~5h。SDS-PAGE 分析融合蛋白的诱导表达情况。

1.3.2 可溶性鉴定 离心诱导菌液,收集菌体,以 PBS 重悬(50μl PBS/1ml 菌液),加细菌裂解液混匀,冰浴。加入 Triton X-100 至终浓度为 1%,冰浴。冰上以 20 Hz 间歇超声裂解。再离心并分

别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE,证实融合蛋白以包涵体形式存在。

1.3.3 纯化 加 5 倍体积超声缓冲液悬浮沉淀,冰上间歇超声 30s,离心弃上清。重复 3~4 次。沉淀加等体积 SDS-PAGE loading buffer,超声重悬,沸水煮 5min 后上样,100V 电泳 6~7h。用冷 0.1M KCl 浸泡胶,切下目的条带放入透析袋内。将透析袋置于水平电泳洗脱装置内,60V 洗脱过夜,次日 100V 继续洗脱 1h,然后反转电极向相反方向洗脱 3~5min。吸出透析带内液体,蔗糖包埋浓缩, PBS 透析。行 SDS-PAGE 定量,即获得纯化的融合蛋白。

1.4 抗 Snail 多克隆抗体的制备 抗原为原核表达并经 SDS-PAGE 胶纯化的 GST/Snail 融合蛋白,免疫新西兰白兔。取耳血,用 ELISA 法测定抗体效价,当效价达到 10^{-5} 时,放血,收集血清。

1.5 抗体效价和特异性免疫学鉴定

1.5.1 酶联免疫吸附实验(ELISA)检测抗体滴度:观察结果并用 ELISA Reader 测 OD490nm。

1.5.2 Western Blot 鉴定抗体 SDS-PAGE 分析融合蛋白的诱导表达情况。

2 结果

2.1 Snail/pGEX-4T-1 原核表达载体的构建和鉴定结果 以 Snail 全长为模板,PCR 大量扩增出 Snail 片段,经鉴定在约 400bp 处有条带扩出,与推算值相符;将目的片段装入 pGEX-4T-1 原核表达载体后,酶切鉴定正确,在近 400bp 处有条带释放。

2.2 融合蛋白 GST/Snail 的诱导表达和纯化 经纯化的 GST/Snail 融合蛋白只有一条蛋白带。

2.3 Snail 多克隆抗体活性鉴定

2.3.1 ELISA 鉴定 经制备型 SDS-

PAGE 进一步纯化的融合蛋白 GST/Snail 免疫新西兰兔获得抗血清,ELISA 实验结果表明,其效价为 5×10^5 。

2.3.2 Western Blot 鉴定抗体 Snail/pGEX-4T-1 感染的细胞在近 40KD 处出现条带。

3 讨论

本课题通过基因工程手段原核表达 Snail 羧基端的 GST 融合蛋白^[3],然后免疫新西兰兔获得效价高、特异性强的抗 Snail 抗体,与一些进口抗体相比造价低,且适用于免疫荧光、石蜡切片等^[4],为深入研究其功能和探讨其与肿瘤等疾病的相关性提供了工具。我们利用该抗体研究了宫颈不同组织学阶段的蜡块标本,Snail 表达的免疫组织化学反应在宫颈癌中呈上升趋势,阳性表达率为 81.9%,与正常及非典型增生组差别明显($P < 0.05$),证明 Snail 与癌分化程度相关。表明了 Snail 是肿瘤进展过程中浸润的一个重要的调节因素^[5],为今后进一步揭示肿瘤的浸润和转移开创了新的途径和工具。

参考文献:

- [1] Cano A, Perez-Moreno MA, et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(2): 76-83.
- [2] Comijn J, Berx G, Vermassen P. Mechanisms of inactivation of E-cadherin in breast carcinoma: modification of the two-hit hypothesis of tumor suppressor gene[J]. Mol Cell, 2001, 7(6): 1267-1278.
- [3] Bolos V, Peinado H, Perez-Moreno MA, et al. The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors[J]. J Cell Sci, 2003, 116(Pt 3): 499-511.
- [4] Comijn J, Berx G, Vermassen P. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion [J]. Mol Cell, 2001, 7(6): 1267-1278.
- [5] Blanco MJ, Moreno-Buero G, et al. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas[J]. Oncogene, 2002, 21(20): 3241-3246.

[编辑: 刘红武]

收稿日期: 2005-07-14; 修回日期: 2005-10-31

作者单位: 1. 010059 呼和浩特, 内蒙古医学院第一附属医院妇产科; 2. 内蒙古自治区医院肿瘤科; 3. 北京大学临床肿瘤学院暨北京市肿瘤研究所

作者单位: 张儒英(1972-), 硕士, 主治医师, 主要从事妇科肿瘤专业