

日本三角涡虫热休克蛋白 70 (DjHSP70) C-端多肽表达及其抗血清制备

马克学 娄昊 陈广文* 刘德增

河南师范大学生命科学学院 新乡 453007

摘要:首先运用在线生物学软件对日本三角涡虫 (*Degusia japonica*) 热休克蛋白 70 (DjHSP70) 氨基酸序列进行亲水区分析,发现该蛋白 C-端含有较多亲水性氨基酸,然后以该段多肽序列为基础构建原核表达载体。采用 PCR 方法扩增 450 bp cDNA 片段,编码 DjHSP70 C-端 150 个氨基酸多肽。将双酶切的 cDNA 片段与 pET-28a 载体连接后导入 BL21 受体菌,在 IPTG 诱导下表达出 21 ku 融合蛋白,分子量与预期相符。该融合蛋白采用 Ni^{2+} -NTA agarose 树脂进行纯化,纯化结果电泳检测后经灰度扫描分析显示纯度在 95% 以上。融合蛋白免疫新西兰大白兔获得高效价的抗血清,Western blot 检测显示该抗血清不仅具有很强的特异性,而且还识别小鼠 HSP70。此项工作为进一步研究淡水涡虫抗逆性奠定了基础。

关键词:涡虫;HSP70;原核表达;蛋白纯化;抗血清

中图分类号:Q812 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)04-72-06

Expression of the C-terminal Polypeptide of Planarian Heat Shock Protein 70 and Preparation of Its Polyclonal Antibody

MA Ke-Xue LOU Hao CHEN Guang-Wen* LIU De-Zeng

College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China

Abstract:In this paper, hydrophilic domain of DjHSP70 was predicted by using internet biosoftware. The DjHSP70 C-terminal contains numerous hydrophilic amino acids. Based on this hydrophilic domain of DjHSP70, the prokaryotic expression vector was constructed. PCR method was used to amplify 450 bp cDNA fragment encoding DjHSP70 C-terminal 150 amino acid polypeptides. After digested by *Hind* III/*Xho* I, this cDNA fragment was ligated to pET-28a expression vector. Recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 and a 21 ku fusion protein was expressed after the induction with IPTG, which was in agreement with the expected molecular weight. This fusion protein was purified using Ni^{2+} -NTA agarose and detected by SDS-PAGE electrophoresis. Grayscale scanning showed that the purity of the purified protein was over 95%. The fusion protein was used as an antigen to immunize New Zealand rabbits to prepare the polyclonal antibody. The results showed that this anti-serum was not only very specific to DjHSP70, but also recognized mouse HSP70. This work has laid the foundation for further investigating stress responses in freshwater planarians.

Key words:Planarian; HSP70; Prokaryotic expression; Protein purification; Anti-serum

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30870368, 30670247, 30170119),河南省杰出青年科学基金项目(No. 0312001100),河南省创新人才基金项目(No. 2005126)和教育部高等学校博士点基金项目(No. 200804760003);

* 通讯作者, E-mail: Chengw0183@sina.com, Chengw@henannu.edu.cn;

第一作者介绍 马克学,男,副教授,硕士;研究方向:淡水涡虫再生和抗逆性的分子机制;E-mail: makexue@sina.com。

收稿日期:2011-01-22,修回日期:2011-04-10

在生命科学研究中,经常采用原核细胞作为蛋白表达体系。在原核表达体系中,重组蛋白的含量高,但重组蛋白经常以不溶性的包涵体形式存在^[1-3],为后续蛋白的纯化及活性鉴定带来困难。为了获得可溶性蛋白,通常对蛋白质氨基酸序列进行亲水或疏水性分析,选择含亲水性氨基酸较多的肽段构建表达载体。

淡水涡虫以再生能力强而闻名,在当今生命科学舞台上具有重要地位^[4]。本实验室成功克隆出日本三角涡虫(*Dugesia japonica*)热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)基因(GenBank 注册号: EU380241),该基因编码 648 个氨基酸的蛋白质,分子量为 71.18 ku,命名为 DjHSP70^[5]。研究 DjHSP70 在涡虫抗逆性中的作用,抗体是关键。目前购买到的商业化 HSP70 一抗不识别涡虫(未发表资料),给研究工作带来困难。DjHSP70 C-末端的 EEVD 序列是 HSP70 蛋白家族的标签序列,通过该序列与 HSP90(heat shock protein 90, HSP90)形成分子伴侣复合体^[6],并且通过氨基酸亲水性分析表明,C-末端含有较多亲水性氨基酸。为此,我们构建了 DjHSP70 C-端多肽原核表达载体,在 IPTG 诱导下表达出可溶性融合蛋白,并对该蛋白进行了亲和纯化。将融合蛋白免疫新西兰大白兔(*Oryctolagus cuniculus*)获得高效价抗血清,Western blot 检测表明该抗血清具有很强的特异性,且能识别涡虫和小鼠(*Mus musculus domesticus*)。此项研究为 DjHSP70 的组织学定位奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和主要试剂 日本三角涡虫采自新乡塔岗水库,实验前至少饥饿一周。高保真 Taq 酶、DNA 连接酶、逆转录酶、限制性内切酶购自 TaKaRa, DNA 凝胶回收试剂盒、总 RNA 提取试剂盒购自上海生工,所用引物由北京三博远志合成。Ni²⁺-NTA Agarose 树脂购自 Qiagen 公司,预染蛋白质 Marker(MP204)购自天根公司,碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京鼎国, BL21 菌株和 pET-28a 表达载体由

我校梁卫红教授惠赠。

1.2 氨基酸亲水性分析 DjHSP70 氨基酸亲水性分析采用在线生物学软件 <http://www.expasy.org/tools/protscale.html> 进行。

1.3 总 RNA 提取 取 3~4 条涡虫于液氮中研磨成粉末后,在液氮挥发完全前加入 Trizol,按照试剂操作说明提取总 RNA,取 2 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA,并以此为模板进行 PCR 扩增。

1.4 DjHSP70 C-端多肽表达载体的构建 通过对 DjHSP70 氨基酸序列亲水性分析,设计一对特异性引物 *Hind* III F: 5'-ACAAGCTTGCA-GCACTGGCAAAGAGAACA-3' 和 *Xho* I R: 5'-CACTCGAGTTAGATGGTTGGCCTTGTC-3',以 cDNA 为模板扩增 450 bp cDNA 片段,编码 DjHSP70 C-端 150 个氨基酸(从 494 位丝氨酸~644 位异亮氨酸)多肽,分子量 16.5 ku。PCR 参数如下(PrimesSTAR HS DNA Polymerase): 94℃ 5 min, 30 个循环, 98℃ 10 s, 62℃ 15 s, 72℃ 1 min, 终延伸 72℃ 5 min。PCR 产物凝胶回收后进行 *Hind* III 和 *Xho* I 双酶切,目的片段与双酶切的 pET-28a 连接后转化 BL21 感受态细胞。将经过 PCR 筛选和酶切鉴定后的阳性重组克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 DjHSP70 C-端多肽原核诱导表达 将 1.4 鉴定的阳性重组克隆接种到 20 ml LB 培养液中(含 50 μg/ml 卡那霉素), 37℃ 振荡培养至菌液 OD₆₀₀ 值为 0.5 时,加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L, 37℃ 诱导表达。在加入诱导剂后 4 h 收集菌液 1 ml 经 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清后用 100 μl pH 7.4 的 PBS 悬浮细菌沉淀物,加入等体积的 2 × 样品缓冲液,水浴煮沸 10 min, SDS-PAGE 检测表达产物。

1.6 DjHSP70 C-端多肽的纯化 诱导 200 ml 阳性表达菌液,离心收集菌体沉淀,加入适量含 20 mmol/L 咪唑的裂解液超声破碎细胞, 15 000 r/min 离心 20 min 收集上清液。把上清液加到 Ni²⁺-NTA agarose 树脂中轻轻混匀, 4℃ 结合 1 h,用含 50 mmol/L 咪唑的洗涤液洗去未结合蛋

白,再用 250 mmol/L 咪唑溶液洗脱,收集各个组分,SDS-PAGE 电泳分析蛋白纯化结果。具体操作参照 Qiagen 公司蛋白质纯化手册。

1.7 DjHSP70 抗血清的制备 将纯化的融合蛋白进一步用 SDS-PAGE 电泳分离,0.3 mol/L CuCl_2 负染色,将透明的目的蛋白条带切下。蛋白胶条用洗涤液(0.25 mol/L Tris-HCl, 0.25 mol/L $\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2$, pH 8.0)脱色过夜后水洗胶条,至少 5 遍。水洗后,每一个胶条加 1.5 ml PBS 洗液用匀浆器在冰上开始匀浆。匀浆彻底后,加入等量的弗氏佐剂,继续匀浆,直到匀浆液用枪吸 10 μl 滴在水面不扩散为止。将乳化后目的蛋白胶条吸入一次性注射器中,在新西兰大白兔背部分 8 个位点皮下注射 20 ~ 300 μl 抗原-佐剂乳化液。每隔 2 周分别加强免疫一次,在第 3 次加强免疫之后取血清检测抗体水平,第 6 次加强免疫后,通过耳动脉取血,分离血清冻存备用。

1.8 DjHSP70 抗血清的特异性检测 将涡虫

组织匀浆液和小鼠组织匀浆液用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,然后 200 mA 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜转移到 NC 膜上。转移电泳结束后,将 NC 膜用含 3% BSA 的 PBS 封闭 1 h,然后加 1:100 稀释的抗血清 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,用 PBS/Tween 20 洗膜 3 次后加碱性磷酸酶标记的二抗(1:2 000 稀释)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,用 PBS/Tween 20 洗膜 3 次, NBT/BCIP 暗处避光显色。

2 结果

2.1 氨基酸亲水性分析 采用在线生物学软件 <http://www.expasy.org/tools/protscale.html> 对 DjHSP70 的氨基酸序列进行亲水性分析,结果显示在 648 个氨基酸中,120 ~ 220 氨基酸之间、330 ~ 500 氨基酸之间含有较多的疏水性氨基酸,而 C-端含有较多的亲水性氨基酸(图 1)。氨基酸亲水性分析为后续表达肽段的选择和引物设计奠定了基础。

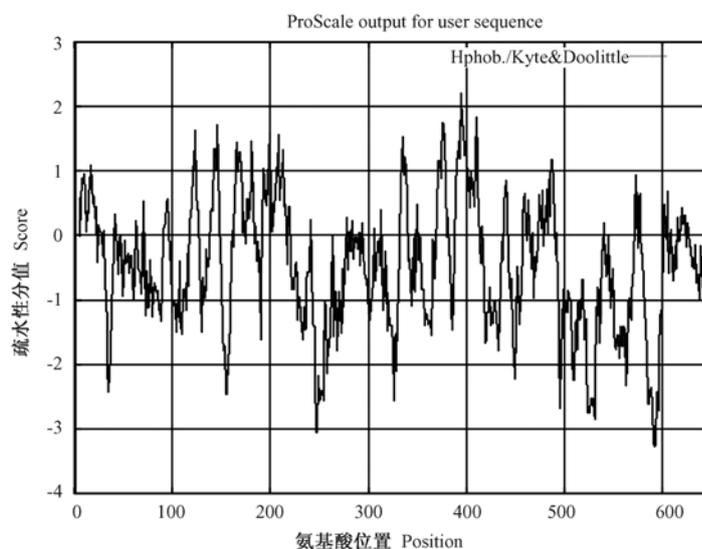


图 1 DjHSP70 氨基酸序列亲水性分析

Fig. 1 Hydrophilic analysis of amino acid sequences of DjHSP70

2.2 DjHSP70 C-端多肽表达载体的构建 在上述氨基酸亲水性分析的基础上,我们选择 DjHSP70 C-端多肽构建表达载体,利用设计的特异性引物成功从 cDNA 中克隆出目的片段

(图 2A),PCR 产物经 *Hind* III 及 *Xho* I 双酶切和凝胶回收处理,目的片段与双酶切的 pET-28a 表达载体连接后转化 BL21 感受态细胞。从阳性克隆中提取质粒 DNA,经 *Hind* III 和 *Xho*

I 双酶切后释放出目的基因(图 2B),说明 DjHSP70 C-端多肽表达载体构建成功,并经上海英骏生物公司测序证实读码框架完全正确。

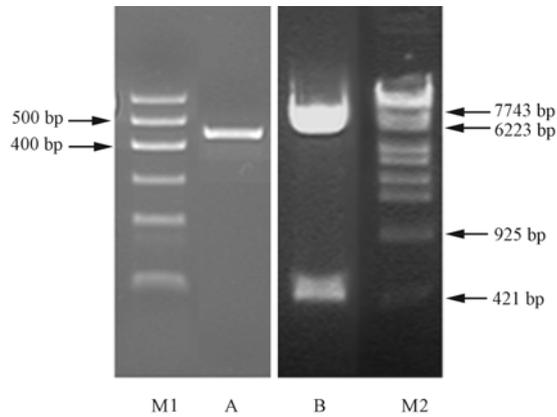


图 2 DjHSP70 C-端多肽表达载体的构建与鉴定

Fig. 2 Construction and identification of the C-terminal polypeptide

M1: 100 bp DNA 分子量标准; M2: λ -EcoT14 I 分子量标准; A: 目的基因 PCR 扩增片段; B: pET-28a-DjHSP70 阳性重组表达质粒的双酶切产物。

M1: 100 bp DNA marker; M2: λ -EcoT14 I digest DNA marker; A: PCR product of target gene; B: pET-28a-DjHSP70-positive recombinant expression plasmid digested by *Hind* III and *Xho* I.

2.3 DjHSP70 C-端多肽融合蛋白的表达及纯化 将阳性重组克隆接种到 20 ml LB 培养液中,在 IPTG 诱导 4 h 后收集菌液,SDS-PAGE 电泳检测显示在 18 ~ 27 ku 之间出现大量诱导表

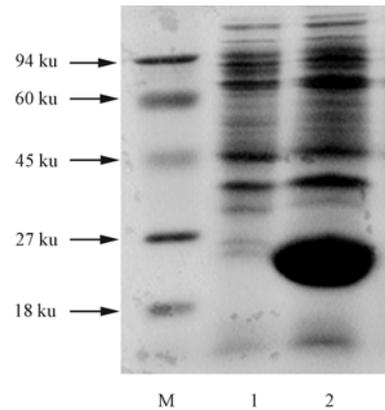


图 3 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的表达
Fig. 3 Detecting the fusion protein expression by SDS-PAGE electrophoresis

M: 蛋白质分子量标准; 1: IPTG 诱导前;
2: IPTG 诱导后。

M: Protein marker; 1: Before the IPTG induction;
2: After the IPTG induction.

达的蛋白(图 3),分子量与预期相符。pET-28a 表达载体表达出的融合蛋白含有 6 个组氨酸标签序列,可用 Ni^{2+} -NTA agarose 树脂进行纯化。菌体超声破碎后离心收集上清,电泳检测显示融合蛋白主要存在于上清液中(图 4),沉淀中几乎没有,说明该融合蛋白是可溶性蛋白,这与氨基酸亲水性分析预测的结果一致。将收集的上清液与树脂结合 1 h 后用含 50 mmol/L 咪唑的洗涤液洗涤树脂,然后用 250 mmol/L 咪唑溶液洗脱结合蛋白,电泳显示洗脱液中含有大量

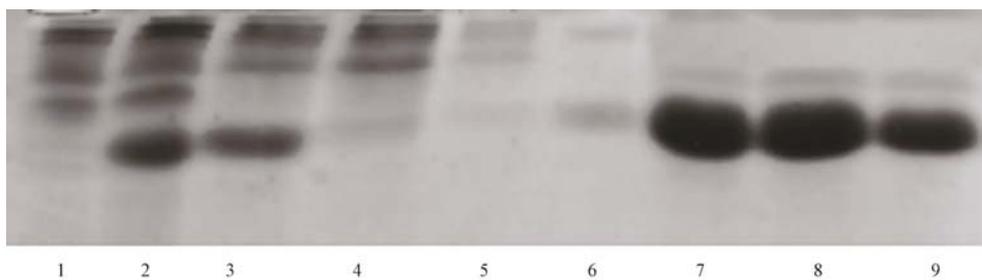


图 4 SDS-PAGE 电泳检测纯化结果

Fig. 4 Detecting the purification by SDS-PAGE electrophoresis

1: 诱导前; 2~3: 超声波上清; 4: 超声波沉淀; 5~6: 50 mmol/L 咪唑洗脱液; 7~9: 250 mmol/L 咪唑洗脱液。

1: Before the IPTG induction; 2-3: Supernatant after ultrasonication; 4: Pellet after ultrasonication;
5-6: 50 mmol/L imidazole elution; 7-9: 250 mmol/L imidazole elution.

融合蛋白,凝胶自动扫描分析显示纯度达 95% 以上,可用于后续实验。

2.6 DjHSP70 抗血清特异性检测 将获得的血清 1:100 倍稀释,Western blot 检测,结果显示在 94~60 ku 之间出现明显的单一蛋白条带(图 5),说明制备的抗血清具有很强的特异性。此外,该抗血清不仅能识别涡虫,而且还能识别小鼠,说明表达的 DjHSP70 C-端多肽含有 HSP70 高度保守序列。

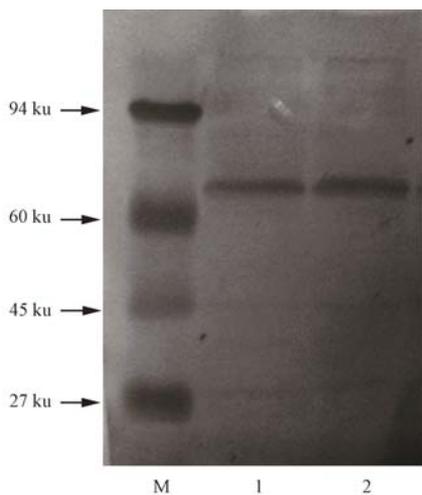


图 5 Western blot 检测 DjHSP70 抗血清的特异性

Fig. 5 Detecting the specification of anti-DjHSP70 serum by Western-blotting

M: 蛋白分子量标准; 1: 涡虫组织匀浆液;
2: 小鼠肝组织匀浆液。

M: Protein marker; 1: Planarian tissue;
2: Liver tissue of mouse.

3 讨论

抗体在生命科学研究中具有重要地位,目前多采用多肽作为免疫原^[7]。选择合适的多肽抗原是制备特异性强、效价高的免疫血清的先决条件。氨基酸序列的亲水性、表露性、柔韧性决定了它的抗原性。自然状态下的蛋白质其亲水序列暴露在外侧,而疏水氨基酸序列包埋在内部。预测蛋白特性(例如亲水性、疏水性)及二级结构有助于选择表露性较高、有抗原性的多肽序列以用来做抗原。此外,选择含亲水

性氨基酸较多的多肽片段构建原核表达载体有利于提高融合蛋白的水溶性^[8],有利于后续蛋白的纯化。本文构建的表达载体表达出的融合蛋白是可溶性的,证实氨基酸亲水性分析对表达载体的构建具有指导意义。在以往的研究工作中^[9-11],多直接采用纯化蛋白免疫动物,虽然也取得良好的效果,但我们认为这种方案不能保证抗原的纯度。我们将纯化的融合蛋白进一步用 SDS-PAGE 电泳分离后免疫新西兰大白兔,结果显示所获得抗血清具有很强的特异性,说明我们的研究策略行之有效。

HSP70 是热休克蛋白家族中的重要成员,它在保护生物体免受外界各种损伤刺激(如高温、组织创伤、病原体感染和重金属污染等)中发挥重要作用^[12-14]。淡水涡虫表现出很强的抗逆性。连续切割一条成体涡虫,切割下来的组织块小到涡虫虫体的 1/279 时仍然能够再生出一条小涡虫^[15]。此外,涡虫具有极强的耐饥饿能力。一条成体涡虫饥饿数月生理功能基本不受影响,一旦获得食物供应又重新生长^[16]。作为水生动物,涡虫很容易受温度变化、水体污染等影响。然而,有关 HSP70 在涡虫抗逆性中的作用至今未见报道。本实验成功构建了 DjHSP70 C-端多肽表达载体,并成功获得抗血清,为下一步实验奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Baneyx F, Mujacic M. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. Nat Biotechnol, 2004, 22: 1399-1408.
- [2] Baneyx F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. Curr Opin Biotechnol, 1999, 10: 411-442.
- [3] 时宏伟,张萍,王春梅,等. GST-SDF-1 α 融合蛋白的原核表达及纯化. 科学技术与工程, 2007, 7(14): 3365-3367.
- [4] Umeson Y, Agata K. Evolution and regeneration of the planarian central nervous system. Dev Growth Differ, 2009, 51: 185-195.
- [5] Ma K X, Chen G W, Hao L, et al. Cloning and expression analysis of a heat shock protein 70 gene from freshwater planarian *Dugesia japonica*. Biologia, 2009, 64: 1018-1024.

- [6] Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the HSP70-HSP90 multichaperone machine. *Cell*, 2000, 101: 199 - 210.
- [7] Orii H, Sakurai T, Watanabe K. Distribution of the stem cells (neoblasts) in the planarian *Dugesia japonica*. *Dev Genes Evol*, 2005, 215: 143 - 157.
- [8] Trevino S R, Scholtz J M, Pace C N. Amino acid contribution to protein solubility: asp, glu, and ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in Rnase Sa. *J Mol Biol*, 2007, 366: 449 - 460.
- [9] 金丰良, 许小霞, 张文庆, 等. 家蝇泛素编码区 cDNA 序列的克隆及在原核细胞中的表达. *昆虫学报*, 2008, 51(5): 473 - 479.
- [10] 郝凤霞, 胡文革, 付伟超, 等. 抗冻蛋白 AFPⅢ的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备. *水产科学*, 2009, 28(11): 671 - 374.
- [11] 宋振, 王劫, 安宁, 等. 人 SUMO-1 基因原核表达、纯化及多克隆抗体的制备与鉴定. *免疫学杂志*, 2009, 25(2): 125 - 129.
- [12] Schlesinger M J. Heat shock proteins. *J Biol Chem*, 1990, 265: 12111 - 12114.
- [13] Feder M E, Hofmann G E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*, 1999, 61: 243 - 282.
- [14] Hashiguchi N, Ogura H, Tanaka H, et al. Enhanced expression of heat shock proteins in leucocytes from trauma patients. *J Trauma*, 2001, 50: 102 - 171.
- [15] Morgan T H. Experimental studies of the regeneration of *Planaria maculata*. *Arch Entw Org*, 1898, 7: 364 - 397.
- [16] Newmark P A, Alvarado A S. Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nature Reviews Genetics*, 2002, 3: 210 - 219.