

南方红豆杉的苯丙基转移酶异源表达和抗体制备

仇燕¹ 曹红² 王刚^{2,*}

¹河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018; ²河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

Heterologous Expression of Phenylpropanoyltransferase in *Taxus chinensis* var. *mairei* and Preparation of Its Antibody

QIU Yan¹, CAO Hong², WANG Gang^{2,*}

¹College of Biological Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; ²College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

摘要 构建了紫杉醇生物合成途径中连接紫杉醇主链 bac III 与侧链 C-13 O 的苯丙基转移酶原核表达载体, 并在大肠杆菌中表达了这种蛋白, 以纯化的重组蛋白为抗原免疫新西兰兔, 获得了高效价(1:102400)抗体。免疫印迹检测表明, 制备的抗体具有较高的特异性。

关键词 南方红豆杉; 苯丙基转移酶; 抗体

紫杉醇(taxol)是红豆杉分泌的一种天然产物, 对多种癌症具很好的疗效^[1]。其天然产量极低, 目前化学全合成的成本较高, 还不具商业生产的可行性^[2], 因而生物合成仍占主导地位。我们在研究红豆杉细胞次生代谢途径中发现中间产物bac III大量积累^[3,4], 这可能是C-13 O侧链与bac III结合处的酶——苯丙基转移酶(baccatinIII:3-amino-3-phenylpropanoyltransferase, BAPT)表达量低而造成的。我们采用RT-PCR方法已克隆到南方红豆杉中该酶的cDNA全长^[5]。本文以纯化的BAPT融合蛋白为抗原制备抗体, 以期能用此抗体对植物细胞中BAPT进行定量和生理功能分析。

材料与方 法

大肠杆菌DH5 α 由我室保存, 表达质粒pET-28b(+)及表达宿主菌BL21(DE3)由本校细胞生物学实验室赠送。重组质粒pGEM-BAPT(1)(pGEM-T easy Vector+BAPT cDNA成熟蛋白编码区)由我室构建^[5]。质粒pGEM-T easy Vector购自Promega公司, 限制性内切酶NdeI和BamHI、Taq DNA聚合酶及IPTG购自TaKaRa公司, T₄ DNA连接酶购自Promega公司, RNA酶及X-gal购自鼎国公司。丙烯酰胺(Acr)及甲叉双丙烯酰胺(Bis)为Bebco公司产品, 过硫酸铵(AP)及四甲基乙二胺(TEMED)购自Sigma公司。标准DNA分子量购自华美公司, 低分子量标准蛋白由中国科学院上海生物化学研究所研制。HIS亲和层析柱购自Novagon公司, 小量胶回收试剂盒为上海华舜公司产品, 其余试剂为国产分析纯。

经OMIGA软件分析设计, 引物由赛百盛公司合成。为了便于基因重组, 在引物分别导入NdeI和BamHI酶切位点。

P1: 5'GGAATT**CATATG**AAGAAGACAGGTTTCGTT3'

NdeI

P2: 5'CG**GGATCC**TCATAACTTTGACGGACA3'

BamHI

构建和鉴定BAPT表达载体时, 以插入BAPT cDNA全长片段的质粒pGEM-BAPT(1)为模板, P1、P2为引物进行PCR扩增。反应条件为: 94℃预变性3 min; 94℃变性20 s, 55℃退火30 s, 72℃延伸1.5 min, 35个循环; 72℃延伸10 min。将扩增片段酶切后插入到表达载体pET-28b(+)中, 转化大肠杆菌BL21(DE3)并筛选获得阳性克隆, 进行序列测定。

诱导和纯化BAPT融合蛋白时, 取含重组质粒pET-BAPT的大肠杆菌BL21(DE3)在含卡那霉素(10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的LB液体培养基中37℃下培养过夜, 次日按2%接种量转接, 37℃培养至OD₆₀₀=0.6~0.8, IPTG(终浓度1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)诱导4 h。在4℃下以10 000 $\times g$ 离心10 min, 收集经IPTG诱导的菌体, 以100 mL菌液:40 mL 1 \times Binding缓冲液(40 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑、4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、160 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.9)的比例重悬菌体; 超声破碎(超

收稿 2004-10-17 修定 2005-01-24

资助 河北省自然科学基金(300162)。

*通讯作者(E-mail: qiu-yan-yan77@sohu.com, Tel: 0311-8632163)。

声5 s后以间隔25 s, 15次, 功率400 W), 5 000×g离心15 min; 收集的沉淀以20 mL 1×Binding缓冲液(包含20 μL溶菌酶50 mg·L⁻¹)孵育5~10 min, 按上述条件再次超声破碎5次后以5 000 ×g离心15 min; 最后以5 mL 1×Binding缓冲液(含6 mol·L⁻¹尿素)重悬沉淀, 冰浴1 h以溶解蛋白。4℃下以16 000×g离心30 min, 上清液以0.45 μm滤膜过滤, 4℃下存放。按Novagen用户手册的方法, 用HIS亲合层析柱纯化重组BAPT蛋白。

BAPT抗体制备和检测参照文献6的方法略有改动, 蛋白样品经SDS-PAGE分离后, 用含3 mol·L⁻¹ KCl的显色液显色, 直至出现明显的蛋白条带(约5 min), 切下相应分子量大小的蛋白带, 放于-20℃中保存。采用电洗脱技术将目的蛋白(抗原)从凝胶中洗脱出来, 置于低温冰箱(-40℃)中保存备用。

动物免疫步骤为: (1)初次基础免疫(0 d): 2.0 mL 0.1 mg·L⁻¹抗原加等体积的福氏完全佐剂, 混匀后注射于腹股沟皮下及后脚掌; (2)二次基础免疫(16 d): 2.0 mL 0.06 mg·L⁻¹抗原加等体积的福氏不完全佐剂, 混匀后注射于腹股沟皮下及后脚掌; (3)加强免疫(36 d): 1.0 mL 0.6 mg·L⁻¹抗原加等体积的福氏不完全佐剂, 混匀后注于腹股沟及背部皮下多点; (4)第3次免疫后第5天耳静脉采血, 分离血清, 测定效价; (5)若效价符合要求, 则进行颈动脉采血, 所采兔血于室温放置2 h后转入4℃中; (6)室温下以10 000×g离心10 min, 吸取抗血清分装存于-20℃中备用。

采用ELISA法测定抗血清效价; 用Western-blot检测抗血清的特异性; 以纯化的融合蛋白为材料, 一抗稀释度为1:2 000, 用碱磷酸检测。

实验结果

1 BAPT表达载体的构建

以测序正确的pGEM-BAPT(1)为模板, 用引物P1和P2扩增得到1 338 bp左右的DNA片段(图1), 连接至pET-28b(+)原核表达载体中, 再转化至大肠杆菌(*E. coli*) BL21(DE3)中进行测序, 结果与文献5一致。抽提质粒DNA, 经NdeI与BamHI双酶切鉴定的外源插入片段(图2)与预期片段大小相符, 重组表达载体命名为pET-BAPT。

2 BAPT蛋白的纯化

IPTG诱导使pET-BAPT融合蛋白表达。SDS-PAGE电泳的结果表明: 融合蛋白在BL21(DE3)

中经IPTG诱导有很强的表达, 其分子量约为51 kD(图3中箭头所指)。诱导表达的pET-BAPT细菌全蛋白样品按前述方法经HIS亲合层析纯化, 洗脱收集液经SDS-PAGE分离检测的结果(图4)显示, 各收集管中除了BAPT的主要条带外, 还有其它一些微弱的蛋白条带。

3 BAPT抗体制备及效价的测定

考虑到上述实验未能获得高纯度的pET-BAPT重组蛋白, 因此将细菌蛋白经SDS-PAGE电泳, KCl显色后寻找到BAPT融合蛋白的位置, 切下来并经电洗脱后测定其浓度用于抗血清制备。

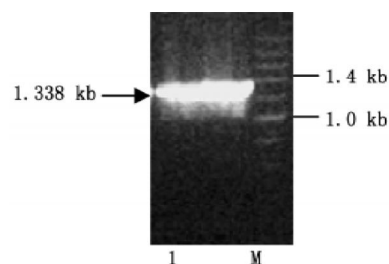


图1 PCR扩增BAPT成熟蛋白编码区蛋白片段
1: PCR产物; M: 标准DNA分子量。

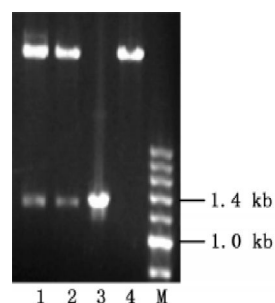


图2 重组质粒pET-BAPT的酶切鉴定
1、2: 酶切pET-BAPT; 3: PCR产物; 4: pET-28b(+)载体; M: 标准DNA分子量。

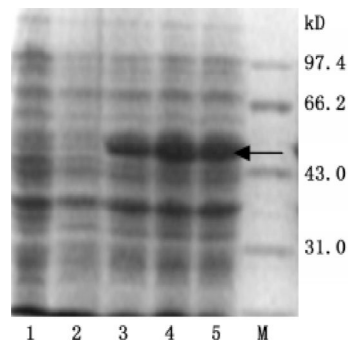


图3 融合蛋白诱导表达的SDS-PAGE分析
1: 诱导后pET-28b(+)总蛋白; 2: 未诱导的pET-BAPT总蛋白; 3~5: 诱导后的pET-BAPT总蛋白; M: 标准蛋白质分子量。

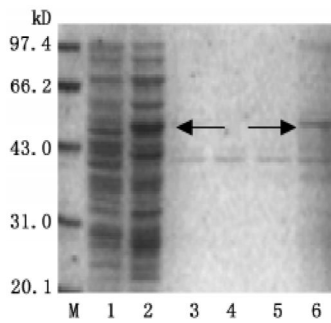


图4 融合蛋白分离提纯的SDS-PAGE分析

1: pET-28b(+) 诱导后蛋白; 2: 诱导后的 pET-BAPT 蛋白; 3~6: 分别为洗脱收集部分; M: 标准蛋白质分子量。

新西兰大白兔经融合蛋白3次免疫后采血, 制备抗血清。ELISA 检测结果表明, 抗血清效价达1:102 400。图5显示, 在第1次免疫后第16天检测到抗体的产生, 抗体效价从第36~41天迅速升高, 第41天时抗体效价达到1:102 400, 颈动脉采血, 分离血清。

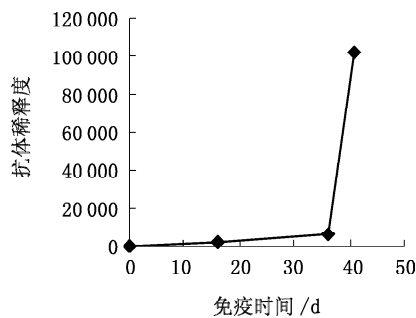


图5 抗体产生的时间进程

4 抗血清特异性检测

采用免疫印迹检测抗血清特异性的结果(图6)

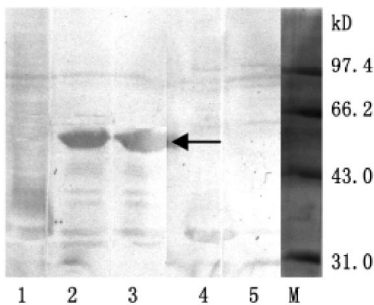


图6 BAPT融合蛋白抗血清的Western检测

1~3: BAPT 抗血清检测。1: 未诱导 pET-BAPT; 2、3: 诱导后 pET-BAPT。4、5: 分别为免疫前血清检测诱导及非诱导 pET-BAPT。M: 标准蛋白质分子量。

表明, 非诱导 pET-BAPT 及免疫前血清均无特异性条带, 诱导后 pET-BAPT 检测到了 BAPT 条带(图6中箭头所指), 说明本实验中制备的抗体仅与 BAPT 结合, 为 BAPT 的特异性抗体。

讨 论

随着基因工程技术的发展, 人们愈加可以通过蛋白质异源表达的方法为生产和研究提供蛋白质多肽。大肠杆菌以其易于操作、遗传背景清楚、发酵成本低和蛋白表达水平高等优点成为生产重组蛋白的首选表达系统。本文将克隆到的带有合适酶切位点的 BAPT 基因与经 *NdeI* 与 *BamHI* 酶切的表达质粒 pET-28b(+) 连接, 将其转化到宿主菌 BL21(DE3) 中, 经培养、诱导、纯化等一系列程序得到所需要的目的蛋白。

宿主 BL21(DE3) 经 IPTG 诱导后, 提取全蛋白, SDS-PAGE 分析表明, 在 43.0~66.2 kD 之间有一强表达蛋白条带, 而未经诱导的菌体蛋白则没有, 因而可以初步确定此条带为目的融合蛋白。由于重组蛋白具有 HIS 标签的结构, HIS 亲和柱分离纯化得到分子量约 51 kD 的蛋白, 经证明此蛋白确为 BAPT 融合蛋白。但由于蛋白纯度和含量均较低, 因此采用 SDS-PAGE 分离切割目的蛋白再用电洗脱方法可以获得纯度和含量均较高的融合蛋白, 即抗原。融合蛋白免疫新西兰兔后, 可以制备得到抗 BAPT 融合蛋白的抗体, 以 ELISA 检测抗体效价为 1:102 400。免疫印迹方法检测显示, 抗体具较高的特异性, 这为以后研究红豆杉细胞 BAPT 生理功能和转 BAPT 基因细胞的 Western 检测提供了可能。

参考文献

- Alexander RW. Teasing apart the taxol pathway. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26:152
- Wildung MR, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J Biol Chem*, 1996, 270: 9201~9204
- 庄晓蕾. 红豆杉细胞培养中紫杉醇代谢调节机理的研究 [硕士学位论文]. 石家庄: 河北师范大学, 2003
- 贾宁, 仇燕, 王丽等. 南方红豆杉细胞培养中紫杉醇代谢调节的研究. *河北师范大学学报*, 2003, 27(3): 295~297
- 仇燕, 王刚. 紫杉醇合成代谢途径中苯丙基转移酶 cDNA 的克隆. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(1): 43~45
- 丁存宝, 毛国红, 孙大业. 白芷细胞外钙调素结合蛋白 (ECBP21) 免疫组化及金标定位分析. *实验生物学报*, 2004, 37: 22~26