

泉古菌的原核表达及其多克隆抗体的制备

田斌 张昌毅 余群新 梁运祥* *

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室,武汉 430070

摘要 泉古菌 *Sulfolobus islandicus* 中 PCNA 有 3 个同源类似蛋白,本研究选取 PCNA1 作为研究对象,为获得可溶性表达的 PCNA1 蛋白,制备多克隆抗体,深入了解 PCNA1 基因的功能,将 PCNA1 基因片段克隆到组氨酸标签融合的表达载体 pET30a 中,利用 IPTG 诱导,金属螯合亲和层析进行纯化分析表明,融合蛋白大部分可溶。紫外分光光度法测定纯化蛋白的纯度可达 90% 以上,浓度约为 2 mg/mL。免疫家兔制备多克隆抗体,ELISA 检测抗血清效价可达 1:10 000 以上,Western 印迹检测证明抗体特异性良好。

关键词 泉古菌; PCNA1 基因; 原核表达; 金属螯合亲和层析; 多克隆抗体

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)01-0059-04

增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen 简称 PCNA) 广泛存在于各种原核生物、真核生物和古菌细胞中,并且与 DNA 复制、重组、修复以及细胞周期调控有着密切的联系^[1-2]。作为 DNA 的靶向因子,PCNA 能够使一些非序列特异性的蛋白与其 DNA 底物结合得更加紧密,这些非序列特异性的蛋白包括有 DNA 聚合酶、内切酶、连接酶、解旋酶、错配修复蛋白以及葡萄糖基转移酶等^[3-4]。此外,PCNA 通过与蛋白质间的相互作用能够在特定的时刻将特定的蛋白召集到特定的地方^[5]。在不同的细胞周期内 PCNA 的表达量会有所差异,所以它也被看作是细胞增殖的一种标记^[6-7]。对癌细胞的研究表明,在同一细胞周期内的癌细胞中 PCNA 的表达量要明显高于正常细胞中的表达量^[8]。因此,有关 PCNA 与相关蛋白质间的相互作用及其在不同时期的表达量的差异对于 DNA 复制、修复和细胞周期调控都有着十分重要的影响。本研究以嗜热古菌中的泉古菌 *Sulfolobus islandicus* 中 PCNA 的 3 个同源类似蛋白中的 PCNA1 为研究对象,对其进行融合表达,做表达形式分析,并将上清中的蛋白用金属螯合层析纯化,免疫家兔制备多克隆抗体,用纯化蛋白作抗原包被,ELISA 检测抗体效价,并用 Western 印迹检测抗体的特异性。

材料与方法

菌株和质粒

Sulfolobus islandicus 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 菌株由华中农业大学农业微生物学国家重点实验室古菌分子生物学研究室保存,表达载体 pET30a 购自 Novagen 公司。

主要试剂

限制性内切酶、*Pyrobest* DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 Takara 公司;PCR 清洁回收试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司;质粒提取试剂盒购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司;基因组 DNA 提取试剂盒购自北京 TIAN-GEN 生物技术有限责任公司;其他化学试剂均为分析纯。

基因的扩增

本研究以 *Sulfolobus islandicus* 的基因组 DNA 为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件设计的 1 对引物 (PCNA1-fwd: TTTTTCATATGATATCTTAAA TCTTTTGAAAGG *Nde* ; PCNA1-rev: TTTCTCGAGAAGCTTTTGGA GCTAATAAATAAGTAA *Xho*) 对 PCNA1 进行 PCR 扩增。反应体系为:DNA 模板 20 ng,上下游引物

收稿日期:2009-03-12; 修回日期:2009-06-23

*科技部“973”计划项目(2003CB716004)资助

** 通讯作者. E-mail: farlyx @163.com

田斌,男,1985年生,硕士研究生.研究方向:古菌分子生物学. E-mail: tb2002 @webmail. hzau. edu. cn

各 1 μL (20 $\mu\text{mol/L}$), *Pyrobest* DNA 聚合酶 0.5 μL , 10 \times PCR buffer 5 μL , dNTP 4 μL , 用去离子水补足到 50 μL 。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

表达载体的构建与鉴定

将 PCR 产物经 DNA 凝胶回收试剂盒进行回收纯化, 然后用 *Nde* 和 *Xho* 同时对纯化的 PCR 产物和 pET30a 进行双酶切, 酶切产物经过 PCR 清洁回收试剂盒回收纯化之后就用 T4 DNA 连接酶进行连接过夜, 接着转化至大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3)。对重组子进行酶切验证并测序, 重组阳性质粒命名为 pET30a-PCNA1。

蛋白的诱导表达及其表达形式分析

将含有重组阳性质粒 pET30a-PCNA1 的大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3) 接种于 5 mL 含有卡那霉素 50 mg/L 的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜, 次日以 1:100 比例接种到 100 mL 同样的培养基中继续培养, 直到 $D_{600\text{nm}} = 0.6$ 时, 加入 100 mmol/L IPTG 至体积分数 1 mmol/L, 在 28 ~ 29 $^{\circ}\text{C}$ 下, 200 r/min 开始诱导表达 13 ~ 16 h。离心收集菌体, 加入 1 \times PBS (含 0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.144% Na_2HPO_4 , 0.024% KH_2PO_4 , pH 7.6) 离心漂洗。将菌体沉淀重悬于 2 mL 冰预冷的裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 0.1 mg/mL 溶菌酶, 1 mmol/L PMSF, pH 8.0) 中, 冰浴 15 min, 超声波破碎裂解细胞。分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。在剩余上清中加入 Triton X-100 至体积分数 2%, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 再加入 NaN_3 至体积分数 0.02%, 存放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。

表达产物的纯化

确定 PCNA1 蛋白在上清中存在后, 将上清过 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖层析柱进行纯化。先用 10 mL 含有 20 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液平衡层析柱, 然后使上清在重力作用下流过层析柱, 再依次用含有不同浓度咪唑的洗涤缓冲液进行洗脱 (30、40、50、60、70、80、90、100、110 mmol/L), 取每个浓度梯度下的适量过柱成分进行 SDS-PAGE, 最后根据电泳结果决定最佳的纯化条件。

免疫家兔制备多克隆抗体

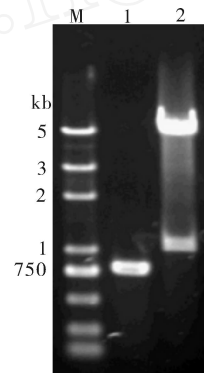
取上述纯化的 PCNA1 重组蛋白免疫雄性成年

新西兰大白兔 3 只, 在两侧脚掌皮下进行注射, 每侧注射 0.5 ~ 1.0 mg 抗原。首次注射后的 4 周加强免疫 1 次, 此后每 7 ~ 10 d 加强免疫 1 次。第 3 次免疫后 7 d, 每只兔子取血 50 mL, 离心分离血清, 并从血清中分离特异性抗体, 利用 ELISA 和 Western 印迹检测抗体效价和免疫原性。

结果与分析

目的片段的 结果

以 PCNA1-fwd 和 PCNA1-rev 为引物, *Sulfolobus islandicus* 的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 得到了 1 条约 780 bp 的片段 (图 1), 与预期片段大小一致。



M. PCR marker; 1. PCNA1 基因的克隆 Cloning of PCNA1 gene; 2. 经 *Xho* 和 *Sph* 双酶切的表达载体 pET30a-PCNA1 digested with *Xho* and *Sph* I.

图 1 PCNA1 基因的克隆及其表达载体 pET30a-PCNA1 的酶切验证

Fig. 1 Cloning of PCNA1 gene and restriction analysis of its expression vector pET30a-PCNA1

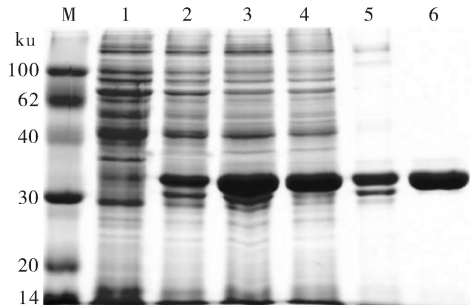
表达载体的酶切验证

利用 *Xho* 和 *Sph* 对重组质粒进行双酶切, 经 pDRAW32 软件分析, 理论上重组阳性质粒可以得到 2 条大小约为 4 929 bp 和 1 086 bp 的片段, 凝胶电泳结果表明, 双酶切验证得到的 2 条 DNA 分子条带与预期分析的片段大小一致, 这说明得到的质粒是插入了目的基因 PCNA1 片段的阳性重组质粒。将该阳性重组质粒送去测序结果表明, 插入的 PCNA1 基因片段的序列没有发生突变。

重组蛋白的表达形式分析

将酶切验证正确的质粒转化 BL21 (DE3), 选取一个单菌落进行 IPTG 的诱导表达。在 SDS-PAGE (图 2) 上可以看到, pET30a-PCNA1 经诱导表达后有一明显的新生蛋白条带出现, 分子质量约为 33

ku,与预计大小一致。结果显示,表达的新生蛋白绝大部分存在于上清液中,说明 PCNA1 蛋白是以可溶形式表达为主。



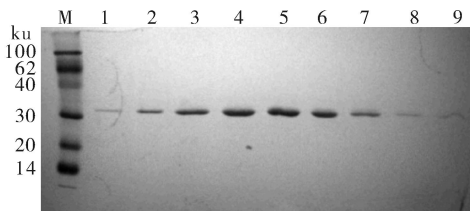
M. Protein marker; 1. pET30a 空载体做的负对照 Negative control of pET30a; 2. 未诱导的菌体蛋白 Proteins from non-induced culture; 3. 诱导后的菌体蛋白 Proteins from induced culture; 4. 诱导后的上清 Supernatant from induced culture; 5. 诱导后的沉淀 Deposition from induced culture; 6. 纯化蛋白 Purified proteins.

图 2 SDS-PAGE 对带有组氨酸标签的 PCNA1 蛋白的可溶性分析

Fig. 2 Identification of solubility of His-tagged PCNA1 protein by SDS-PAGE

重组蛋白的纯化

将细胞裂解液离心后的上清过 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖层析柱,取在各个浓度梯度下洗脱的过柱成分进行 SDS-PAGE 纯化效果检测(图 3),结果表明含有 30 mmol/L 咪唑和 80 mmol/L 咪唑的洗涤缓冲液分别为较理想的去除杂蛋白和洗脱目的蛋白的溶液。通过紫外分光光度法测定在该条件下纯化的 PCNA1 蛋白,其纯度达 90% 以上,质量浓度约为 2 mg/mL。



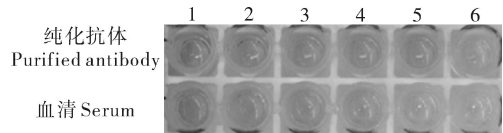
M. Protein marker; 1~9. 分别为 30 ~ 110 mmol/L 洗脱液的过柱成分 Samples collected from the chromatography column which washed by 30 ~ 110 mmol/L elution buffer respectively.

图 3 PCNA1 蛋白的纯化条件分析

Fig. 3 Analysis of purification of PCNA1 protein

免疫家兔制备多克隆抗体

在第 3 次免疫家兔后的 7 d 取血,用间接 ELISA 法测定抗体效价,如图 4 所示,抗血清效价可达 1 10 000 以上,而对于分离纯化后的抗体其



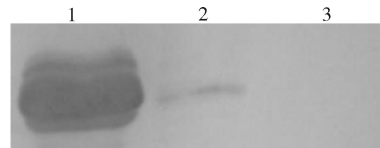
1.1 500; 2.1 2 000; 3.1 5 000; 4.1 10 000; 5.1 100 000; 6.1 1 000 000.

图 4 ELISA 检测多克隆抗体的效价

Fig. 4 The titer of polyclonal antibody detected by ELISA 效价则可高达 1 100 000 以上。

印迹检测抗体特异性

将 PCNA1 融合蛋白、*Sulfolobus islandicus* 细胞裂解液及 BSA 同时进行 SDS-PAGE,然后转移至 NC 膜,通过辣根过氧化物酶 HRP 与底物 DAB 显色的方法来检测。结果表明:融合蛋白与细胞裂解液泳道中均可检测到分子质量正确的蛋白条带存在,而 BSA 泳道中未检测到任何条带(图 5)。



1. 纯化的 PCNA1 蛋白 Purified PCNA1 protein; 2. *Sulfolobus islandicus* 细胞裂解液 Cell lysis of *Sulfolobus islandicus*; 3. 负对照 Negative control.

图 5 Western blot 检测 PCNA1 多克隆抗体的特异性

Fig. 5 The specificity of polyclonal antibody to PCNA1 protein detected by Western blot

讨 论

古细菌作为比较特殊的一类生物,在遗传信息处理加工方式上与真核生物有着十分相似的地方,而在细胞结构上却像原核生物那样比较简单,因此成为了比较理想的用于研究真核生物的一类模式生物^[1,9-10]。本研究以古菌中的泉古菌 *Sulfolobus islandicus* 为研究对象,将 PCNA1 基因克隆到组氨酸融合表达载体,在大肠杆菌中进行原核表达。因为选择的表达载体 pET30a 上带有 T7 启动子,故可以采用 IPTG 诱导蛋白表达。重组表达载体 pET30a-PCNA1 经诱导后 SDS-PAGE 电泳可表达 33 ku 的蛋白,而同时作为对照的 pET30a 载体上却无此蛋白表达,说明此蛋白很可能就是 PCNA-His 的融合蛋白。该蛋白经过金属螯合亲和层析纯化之后,用紫外分光光度法测定其蛋白纯度在 90% 以上。接着免疫家兔制备多克隆抗体,间接 ELISA 法测定抗体效价后,用 Western 印迹检测多克隆抗体

的特异性,得到了特异性较好的多克隆抗体,同时也反过来进一步证实了表达纯化的蛋白就是 PCNA1-His 的融合蛋白。

本研究制备的特异性较好的兔抗 PCNA1 蛋白多克隆抗体,可用于检测 *PCNA1* 基因在细胞不同周期的蛋白表达水平,也为研究其表达调控,鉴定细胞内与 PCNA1 发生相互作用的蛋白提供了一个有利的工具。此外,本研究中只是对嗜热古菌中 3 个 PCNA 同源类似蛋白中的 *PCNA1* 进行了原核表达及其多克隆抗体的制备,今后还将进一步对 *PCNA2* 和 *PCNA3* 进行同样的原核表达及其多克隆抗体的制备,继而为深入研究 *PCNA* 在 DNA 复制、修复以及细胞周期调控中的作用奠定一定的实验基础。

参 考 文 献

- [1] 刘薇,余群新,梁运祥. 冰岛硫化叶菌反螺旋酶基因的遗传学分析[J]. 华中农业大学学报,2009,28(1):39-42.
- [2] WARBRICK E. The puzzle of PCNA's many partners[J]. *Bioessays*,2000,22:997-1006.
- [3] VIVONA J B,KELMAN Z. The diverse spectrum of sliding clamp interacting proteins[J]. *Federation of European Biochemical Societies Letters*,2003,546:167-172.
- [4] MOLDOVAN G L,PFANDER B,JENTSCH S. PCNA, the maestro of the replication fork[J]. *Cell*,2007,129:665-679.
- [5] MAGA G,HUBSCHER U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners[J]. *Journal of Cell Science*,2003,116:3051-3060.
- [6] VAN-DIEST P J,BRUGAL G,BAAKJ P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value[J]. *Journal of Clinical Pathology*,1998,51:716-724.
- [7] NARYZHNY S N. Proliferating cell nuclear antigen: a proteomics view[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*,2008,65:3789-3808.
- [8] NARYZHNY S N,LEE H. Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) isoforms in normal and cancer cells: there is no cancer-associated form of PCNA[J]. *Federation of European Biochemical Societies Letters*,2007,581:4917-4920.
- [9] THORSTEN A,MOSHE M. Archaeal genetics — the third way[J]. *Nature Reviews Genetics*,2005,6:58-73.
- [10] 赵萍,邹正中,王革娇. 1 株来自陕西盐湖的极端嗜盐古菌的分离及鉴定[J]. 华中农业大学学报,2009,28(5):573-576.

Prokaryotic Expression of PCNA1 from Crenarchaeon *Sulfolobus islandicus* and Preparation of Its Polyclonal Antibody

TIAN Bin ZHANG Chang-yi SHE Qur-xin LIANG Yun-xiang

College of Life Science and Technology/ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Based on the result of sequence analysis, there are three homologues of PCNA in Crenarchaeon *Sulfolobus islandicus* and PCNA1 was selected as the subject of the current study. To obtain soluble protein of PCNA1 and its polyclonal antibody for studying the function of *PCNA1* gene, the fragment of *PCNA1* gene was amplified and cloned into the expression vector pET30a. Induced by IPTG, soluble protein of interest could be obtained. The protein was purified by metal chelate affinity chromatography and its purity and content were detected with UV-spectrophotometric method. Rabbits were immunized by PCNA1 protein. The titer and specificity of polyclonal antibody were detected with indirect ELISA assay and Western blotting. The result of UV-spectrophotometric method showed that its purity reached at least 90% and the protein concentration was about 2 mg/mL. The titer of antiserum was as high as 1:10 000, with a very high specificity detected by the Western blotting.

Key words *Sulfolobus islandicus*; *PCNA1* gene; prokaryotic expression; metal chelate affinity chromatography; polyclonal antibody

(责任编辑:张志钰)