

猪 SIRT1 基因的克隆、表达及多克隆抗体制备

江学斌¹ 马苗鹏² 肖淑君² 司徒嘉欣²
杨军² 施巨清² 蔡海明² 张玲华²

1. 广州大学生物工程研究所,广州 510006;
2. 华南农业大学生命科学学院/广东省农业生物蛋白质功能与调控重点实验室,广州 510642

摘要 根据 GenBank 中猪 SIRT1 mRNA 序列设计引物,使用杜大长商品猪大脑 RNA 经 RT-PCR 扩增得到猪 SIRT1 基因全长表达序列,通过 Q-PCR 将 SIRT1 蛋白末端抗原表位序列插入载体 pET-28a(+),在大肠杆菌中表达并纯化得到 45 ku 大小的蛋白,以其免疫新西兰大白兔并制备出抗体滴度达 2¹² 的多克隆抗体。结果表明,成功制备出可以特异性识别猪 SIRT1 蛋白的抗体。

关键词 猪; SIRT1; PCR; 多克隆抗体

中图分类号 Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2014)05-0080-05

在过去几年,被称为“Sirtuin”的 Sir2 蛋白家族在多种模式生物中已经成为一类对衰老和长寿具有关键作用的调控因子^[1]。它们进化上高度保守,这为衰老领域研究提供了一种新模式。SIR2 基因首先由 Klar 在酵母中鉴定并发现其具有延长寿命、延缓衰老的功能^[2]。随后相继研究发现 SIR2 在线虫及果蝇中的同源基因也具有相似功能。哺乳动物中 Sirtuins 家族有 7 个成员 (SIRT1~SIRT7),其中 SIRT1 与 SIR2 的同源性最高^[3]。研究发现,在热量限制或氧化逆境条件下,SIRT1 蛋白主要是通过抑制 PPAR-γ 减少细胞的脂质过氧化的损伤,调控 p53 的活性及调控 FOXO 的信号通路启动细胞抗氧化来影响细胞的寿命,不仅如此,SIRT1 蛋白还参与多种生理及病理代谢途径^[4-8]。

猪是人类及动物衰老和疾病研究中的重要模型^[9-10],其 Sirtuins 家族也得到了广泛研究^[11-12]。更好的研究 SIRT1 基因在猪体内的作用,准确测定 SIRT1 蛋白在各种生理及病理条件下在各组织中的活动尤为重要,SIRT1 蛋白的抗体则是测定 SIRT1 蛋白活动的关键,笔者克隆出猪的 SIRT1 基因,并制备其多克隆抗体,以期为研究 SIRT1 蛋白提供有力保障。

收稿日期: 2013-12-25

基金项目: 广东省农业攻关项目(2012B020305007)和广东省教育部产学研结合项目(2011B090400471)

江学斌,博士,讲师。研究方向: 发酵工程。E-mail: jxbcalvin@126.com

通信作者: 张玲华,博士,教授。研究方向: 猪的免疫及微生物发酵。E-mail: lhzhang@scau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用猪为广州良种猪场提供的杜大长健康商品猪(杜洛克×大白×大长)。pET-28a(+)载体,克隆菌株 *E. coli* DH5α 和表达菌株 *E. coli* Rosetta (DE3)均由笔者所在实验室保存;pMD18-T Vector 购于宝生物工程(大连)有限公司;抗组氨酸(His)标签兔多克隆抗体、辣根过氧化酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 购自北京康为世纪生物科技有限公司;蛋白纯化柱购自 Bio-rad 公司,组氨酸亲和层析填料 Ni-NTA 购自德国 QIAGEN 生物公司。

1.2 酶与化学试剂

DNA 聚合酶 KOD-FX 购自日本东洋纺(TOYOB)公司;DNAmarker、限制性内切酶、蛋白 marker、RNA 提取及 cDNA 制备试剂盒均购于宝生生物(TaKaRa)公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取吸附柱购自生工生物有限公司; IPTG、X-gal、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)、卡那霉素(kanamycin, Kan)等常用生化试剂均购自翔博生物科技有限公司及鼎国生物科技有限公司。

1.3 引物设计及合成

根据 GenBank 上发表的猪的 SIRT1 基因序列

(GenBank:EU030283.2)设计克隆全基因表达序列的引物,上游引物S1:5'-AGAGGCAGTT-GAAAGATGGCGGACGAG-3',下游引物S2:5'-CACCTTCTGGTTCCCTGCGCTACTAGGTT C-3'。选择SIRT1蛋白序列抗原表位比较集中且GC含量适中的C末端序列进行抗原制备,根据其序列及pET-28a(+)Vector的序列设计Ω-PCR插入引物,上游引物S3:5'-TGGTGCCGCGCAGCAG CCATATGAAGTATGACAAAGATGAAGTTG ATC-3',下游引物S4:5'-GTGGTGGTGGTGGTG GTGCTCGAGTGCGTTATGATTGTTGAT GGA-3'。引物合成及基因测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.4 目的基因的克隆

Trizol法提取猪的大脑组织RNA,使用反转录酶M-mlv,以OligoDT为引物合成猪的cDNA。以cDNA为模板,使用引物S1、S2及聚合酶KOD-FX,进行SIRT1基因的扩增,回收纯化扩增产物并与pMD18-T Vector连接。将重组质粒转化,筛选阳性克隆并进行测序。PCR的扩增条件为:94℃预变性2 min;98℃10 s,63℃30 s,68℃2 min 30 s,进行28个循环;68℃延伸10 min,16℃低温结束。

1.5 pET-28a-SIRT1 表达载体的构建和鉴定

使用KOD-FX聚合酶,以鉴定正确的pMD18-T-SIRT1质粒为模板,以引物S3、S4扩增SIRT1抗原表位序列。再以扩增出来的抗原表位序列为超级引物,以pET-28a质粒为模板,使用KOD-FX聚合酶以Ω-PCR的方法^[13]将SIRT1蛋白抗原表位碱基序列插入pET-28a(+)。Ω-PCR产物立即转入表达菌株*E. coli* Rosetta(DE3),卡那霉素(终质量浓度为30 μg/mL),氯霉素(终质量浓度为30 μg/mL)PCR筛选阳性克隆送基因公司测序。

Ω-PCR扩增抗原表位条件为:94℃预变性2 min;98℃10 s,62.5℃30 s,68℃1 min 20 s,进行28个循环;68℃延伸10 min,16℃低温结束。Ω-PCR插入抗原表位条件为:94℃预变性2 min;98℃12 s,57℃30 s,68℃4 min 20 s,进行6个循环;98℃12 s,68℃5 min进行23个循环;68℃延伸7 min,16℃低温结束。

1.6 目的基因表达分析及纯化

将空载体pET-28a(+)转化*E. coli* Rosetta (DE3)细胞,卡那霉素、氯霉素筛选单菌落。将空载

体pET-28a(+)阳性克隆及测序正确的pET-28a-SIRT1阳性菌落分别划线活化后,挑取单菌落接种于含卡那霉素、氯霉素的LB培养液中,37℃振荡培养过夜。加入不同梯度浓度IPTG,分别在诱导2、3、4、5、6 h时取培养菌液,煮沸裂解后以10%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析,以确定最佳诱导条件。

以最优条件诱导pET-28a-SIRT1阳性菌落,离心收集菌体。收集的菌体重悬后裂解破碎,分别收集上清液及沉淀物,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,对融合蛋白进行可溶性分析。分析确定表达形式的样品,进行Western blot以HIS标签鉴定目的蛋白。样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转至PVDF膜上,封闭后依次使用抗组氨酸(His)标签兔多克隆抗体及辣根过氧化酶(HRP)标记的羊抗兔IgG进行孵育,后使用增强型HRP-DAB显色剂进行显色,携带His标签的蛋白可看出明显颜色。

以最优条件大量诱导pET-28a-SIRT1阳性菌落,离心收集菌体,经洗涤缓冲液洗涤后,置破碎液中冰浴、超声裂解菌体,直至溶液不再粘稠,离心取上清液用0.45 μm滤膜过滤。然后目的蛋白经过镍柱进行纯化和收集,将样品经10%聚丙烯酰胺凝胶电泳切取目的条带,将含有目的条带的胶条置于透析袋中通过低温电泳回收蛋白溶液。将蛋白溶液超滤浓缩后,再次进行Western blot鉴定纯化出的蛋白是否带His标签。

1.7 SIRT1 兔多克隆抗体制备

纯化出的蛋白经定量后分4次免疫健康新西兰大白兔,第1次免疫使用完全弗氏佐剂,后3次使用不完全弗氏佐剂,每次免疫量为100 μg蛋白,背腹部皮下注射,免疫间隔为1~2周。每次免疫前后均抽取耳沿静脉血3 mL,4℃静置过夜后,离心保留血清。第3次免疫后以抗原包被,ELISA鉴定血清效价,抗体滴度达到2¹²即可,若没达到则补充免疫达到目标滴度后取兔全血血清,ELISA鉴定后即可于-80℃条件下保存。

2 结果与分析

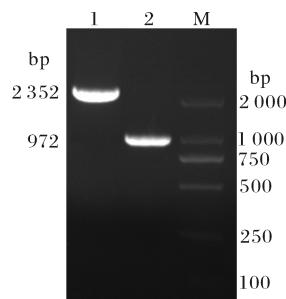
2.1 SIRT1 基因的 PCR 扩增与 pET-28a-SIRT1 表达载体的构建

SIRT1基因RT-PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳,使用DL2000 DNA marker作为对照,约在2 353 bp处出现1条清晰条带,与预期片段大小相近,连接克隆载体后经双酶切大小正确,生物测序

序列正确,表明已获得 SIRT1 基因。Ω-PCR 第 1 轮扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,使用 DL2000 DNA marker 作为对照,约在 972 bp 处出现 1 条清晰条带,与设计片段大小一致,表明得到设计序列,第 2 轮 Ω-PCR 筛选出阳性质粒,由生工生物工程有限公司测序证实结果正确,表明成功构建表达质粒。PCR 扩增产物电泳结果如图 1 所示,表达质粒测序结果如图 2 所示。

2.2 目的基因的诱导表达及重组蛋白鉴定表达形式的分析

将表达质粒 pET-28a-SIRT1 转入大肠杆菌 Rosetta(DE3)中进行诱导表达,优化诱导 IPTG 浓度、诱导温度及诱导时间,然后进行电泳分析。结果发现,经 5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 的菌株在预测的



1: RT-PCR 扩增的基因 The target gene amplified by RT-PCR; 2: Ω-PCR 第一步扩增的目的片段 The target gene amplified by the first step Ω-PCR; M: 分子质量标记物 DNA marker DL2000.

图 1 PCR 扩增目的片段电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis result of gene fragment of PCR products

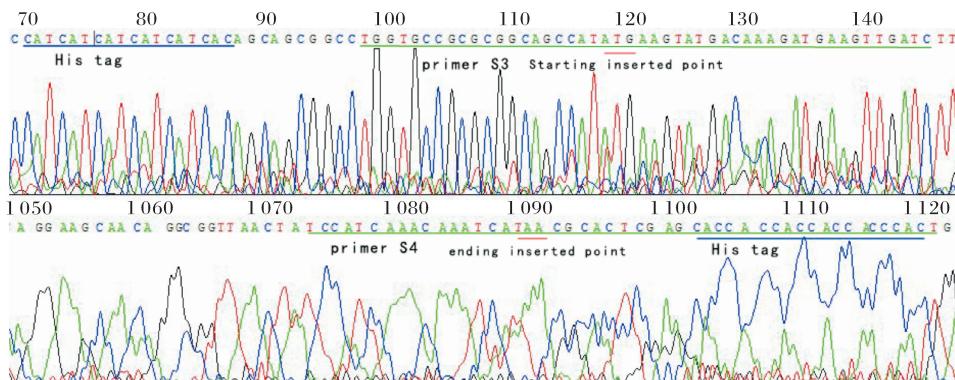


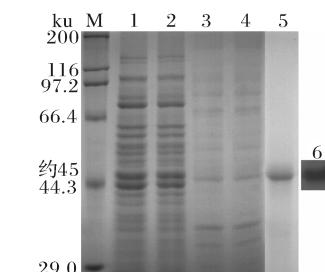
图 2 pET-28a-SIRT1 重组质粒克隆片段的部分 DNA 测序图

Fig. 2 Partial sequence of the DNA fragment inserted in recombinant plasmid pET-28a-SIRT1

分子质量 45 ku 位置出现最显著表达量差异,超声波破碎后离心定位分析表明,此差异在破碎液上清中比较明显,并且此差异条带经免疫印迹(Western blot)检测表明携带 HIS 标签,故确定此融合蛋白即为插入 SIRT1 基因的目的片段所表达。经纯化,得到预期大小、条带单一的纯净蛋白质样品。重组转化菌中 His-SIRT1 融合蛋白的表达分析、纯化与免疫印迹鉴定结果如图 3 所示。

2.3 SIRT1 兔多克隆抗体制备结果

第 3 次免疫之后,ELISA 检测结果显示兔血清对试验中纯化的 SIRT1 蛋白抗体滴度已达到 2^8 ,如图 4 A,加强免疫后,抗体滴度达到 2^{12} ,如图 4 B,符合多克隆抗体使用要求,即取全血,保存血清。此血清与猪肌肉及大脑总蛋白进行 ELISA 及免疫印迹分析,ELISA 结果如图 4 C、D,表明此多克隆抗体效价符合试验预期。



M: 标准分子质量蛋白质 Protein molecular weight standard; 1: 5 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后的重组菌 Transformed bacteria induced with 5 mmol/L IPTG for 4 h; 2: 诱导重组菌破碎后的上清液 The supernatant of induced recombinant bacteria fragmentation; 3: 未诱导的重组菌 Uninduced recombinant bacteria; 4: 诱导的野生表达菌株 Induced wild type expression strain of bacteria; 5: 纯化后的蛋白质 Purified protein; 6: 免疫印迹分析 Western bolt analysis.

图 3 重组转化菌中 His-SIRT1 融合蛋白的表达(1~4)、纯化(5)与免疫印迹鉴定(6)

Fig. 3 Expression(1~4), purification(5) and Western bolt analysis(6) of His-SIRT1 fusion protein from the transformed bacteria

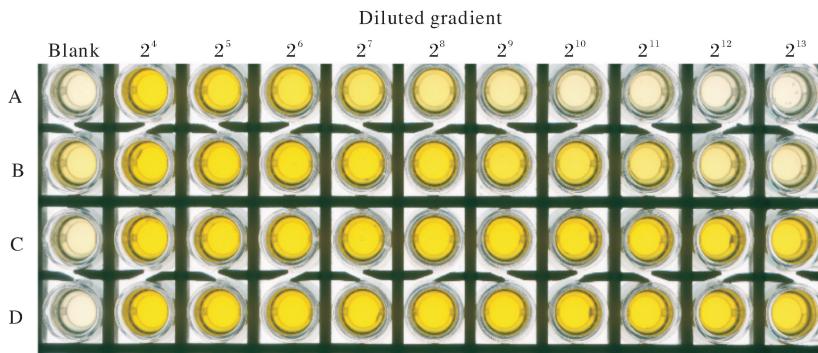


图4 ELISA检测结果

Fig. 4 Test results of ELISA

3 讨 论

目前,SIRT1基因已较广泛应用于细胞的生存、衰老、凋亡等研究中,并在猪及人的器官衰老方面具有潜在的应用价值,李碧霞等^[14]建立了猪SIRT1基因荧光定量的检测方法。本研究的积极意义就是制备了猪的SIRT1蛋白多克隆抗体。只有很少的商业抗体能够和猪的SIRT1蛋白相互反应,但是它们的活性和特异性并不充分,因此我们打算制备专门对猪的SIRT1多克隆抗体。为此,猪的SIRT1蛋白抗原表位被异源表达并且被高度纯化。本试验中由新西兰大白兔产生的抗体能够特异地识别猪的SIRT1蛋白,通过ELISA及免疫印迹分析,表明它可以很特异地识别猪的SIRT1蛋白。也就是说,这个多克隆蛋白不仅能够特异性地识别重组表达的SIRT1抗原表位序列,也能够特异地识别猪体内完整的SIRT1蛋白。

研究中选择的SIRT1蛋白抗原表位蛋白质分子质量大小应为35.3 ku,然而试验中表达出来的蛋白质分子质量大小约为45 ku,这可能和蛋白质在大肠杆菌中的修饰过程有关。总的来说,我们使用重组SIRT1蛋白作为免疫原制备了猪的SIRT1的多克隆抗体,这个多克隆抗体能够高效特异识别猪的P53蛋白,不管这种蛋白是变性的还是非变性的。

总之,我们扩增得到猪的SIRT1基因并且通过外源表达SIRT1蛋白的抗原表位来免疫新西兰大白兔,从而获得能够特异地识别猪的SIRT1蛋白多克隆抗体。借此,猪各个器官在生理和病理状况下其SIRT1蛋白的活动水平就可以很容易地被研

究,这个抗体也可以成为以猪为模型来研究人类疾病中SIRT1通路的一个有力工具。

参 考 文 献

- NAKAGAWA T, GUARENTE L. Sirtuins at a glance[J]. J Cell Sci, 2011, 124(6): 833-838.
- HOWITZ K T, BITTERMAN K J, COHEN H Y, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan[J]. Nature, 2003, 425: 191-196.
- FRYE R A. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(2): 793-798.
- IWABU M, YAMAUCHI T, OKADA-IWABU M, et al. Adiponectin and AdipoR1 regulate PGC-1 alpha and mitochondria by Ca(2+) and AMPK/SIRT1[J]. Nature, 2010, 464: 1313-1319.
- LIU Y, DENTIN R, CHEN D, et al. A fasting inducible switch modulates gluconeogenesis via activator/coactivator exchange [J]. Nature, 2008, 456: 269-273.
- MOYNIHAN K A, GRIMM A A, PLUEGER M M, et al. Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice[J]. Cell Metab, 2005, 2(2): 105-117.
- PURUSHOTHAM A, SCHUG T T, XU Q, et al. Hepatocyte-specific deletion of SIRT1 alters fatty acid metabolism and results in hepatic steatosis and inflammation[J]. Cell Metab, 2009, 9(4): 327-338.
- RODGERS J T, LERIN C, HAAS W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1[J]. Nature, 2005, 434: 113-118.
- 刘莹,曹军皓.衰老动物模型研究进展[J].动物医学进展,2007(12):96-98.
- 董晓华,张丹参,武海霞.衰老动物模型的研究进展及评价[J].河北北方学院学报,2004(6):46-48.
- SHAN T, REE Y, WANG Y. Sirtuin 1 affects the transcrip-

- tional expression of adipose triglyceride lipase in porcine adipocytes[J]. J Anim Sci, 2013, 91(3):1247-1254.
- [12] 刘炳婷. Sirt2 在猪前体脂肪细胞分化中的作用及其机理研究 [D]. 西北农林科技大学图书馆, 2010.
- [13] CHEN L, WANG F, WANG X, et al. Robust one-tube Ω-PCR strategy accelerates precise sequence modification of plasmids for functional genomics[J]. Plant Cell Physiology, 2013, 54 (4):634-642.
- [14] 李碧霞, 赵芳, 任守文, 等. 猪 SIRT1 基因荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 华北农学报, 2011(S1):44-46.

Cloning, expression and preparation of polyclonal antibody of porcine SIRT1 gene

JIANG Xue-bin¹ MA Miao-peng² XIAO Shu-jun² SITU Jia-xin²
YANG Jun² SHI Ju-qing² CAI Hai-ming² ZHANG Ling-hua²

1. Research Institute of Bioengineering of Guangzhou University, Guangzhou 510006, China;

2. College of Life Sciences of South China Agricultural University/
Function and Regulation of Agricultural Biotechnology Protein of Guangdong
Province Key Laboratory, Guangzhou 510642, China

Abstract Based on the porcine SIRT1 mRNA sequence from GenBank, primers of porcine SIRT1 gene were designed and coding region of SIRT1 gene was amplified. The epitope sequences located on the rear section of SIRT1 protein were then inserted into pET-28a(+) by Ω-PCR. The SIRT1 protein was expressed in *E. coli*, purified and its polyclonal antibody was produced by immuning rabbit, the protein weight is about 45 ku and the antibody titers is about 2¹². The results showed that antibody is capable of detecting the porcine SIRT1 protein specifically and provided a new tool for studies of the cellular path way involving in porcine SIRT1.

Key words porcine; SIRT1; PCR; polyclonal antibody

(责任编辑:边书京)