

切除 GST 标签的重组蛋氨酸酶及多抗制备

张芳¹⁾, 任晓丽¹⁾, 罗得华¹⁾, 罗沈强¹⁾, 王文举²⁾, 张华堂²⁾, 田长富¹⁾

(1) 昆明医科大学生物医学工程研究中心, 基因与蛋白质工程研究室, 云南昆明 650500; 2) 中国科学院昆明动物研究所, 云南昆明 650223)

[摘要] 目的 优化表达条件后纯化出切除 GST 标签的 Met-PGEX-4T-1 蛋白, 制备出假单胞菌来源的多克隆抗体. 方法 将蛋氨酸酶 (L-methionine gamma-lyase, Met) 的基因克隆至 pBSK 载体中, 形成重组质粒 pBSK-Met, 采用基因工程技术将 pBSK-Met 与 PGEX-4T-1 载体连接, 形成 Met-PGEX. 利用大肠杆菌表达系统诱导表达出 Met-PGEX, 采用亲和层析法过柱纯化 Met-PGEX, 凝血酶切除分子量为 26KD 的 GST 标签, 免疫新西兰兔制备出蛋氨酸酶多克隆抗体 Met PcAb, 双向免疫扩散实验测多克隆抗体效价为 1:128, 间接 Elisa 法测效价 $1:1 \times 10^5$. 结果 成功表达纯化出纯度大于 90% 的 Met-PGEX 并制备出多克隆抗体. 结论 所制备的多克隆抗体可用于检测不同来源重组蛋氨酸酶抗原差异性变化.

[关键词] 蛋氨酸酶 GST 标签; 多抗制备

[中图分类号] R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003 - 4706 (2013) 03 - 0008 - 04

Production of L-Methionine Gamma-lyase and Polyclonal Antibody with Cleaved GST Tag

ZHANG fang¹⁾, REN Xiao-li¹⁾, LUO De-hua¹⁾, LUO Shen-qiang¹⁾, WANG Wen-ju²⁾, ZHANG Hua-tang²⁾, TIAN Chang-fu¹⁾

(1) Proteins Engineering Research Center and Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650500; 2) Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, China)

[Abstract] **Objective** To optimize the expression conditions, purify Metase-PGEX-4T-1 protein cleaved GST tag and product polyclonal antibody by *Pseudomonas putida*. **Methods** Recombinant plasmid of pBSK-Metase was obtained by combining L-methionine gamma-lyase and PBSK. Met-PGEX was prepared connecting to PBSK-Metase and PGEX-4T-1 by using gene engineering technique. Met-PGEX was expressed inducible by *Escherichia coli* expression system. The expressed protein was purified by GST SefinoseTM Resin affinity chromatography. The GST tag with the relative molecular mass of 26KD was cleaved by thrombin. The titer of new Zealand white rabbit antiserum was 1:128 on double immunodiffusion, and up to $1:1 \times 10^5$ by indirect ELISA. **Results** The Met-PGEX with a purity of over 90% was successfully expressed and purified. **Conclusions** The polyclonal antibody prepared could be used to detect the changes from different origin recombinant L-methionine gamma-lyase.

[Key words] L-methionine gamma-lyase; GST tag; Polyclonal antibody production

蛋氨酸酶具有旋光性, 在动物体内 L 型易被肠壁吸收, D 型需转化为 L 型才能参与蛋白质合

成^[1], 本文所指的蛋氨酸酶为 L-蛋氨酸酶 γ -裂解酶, 目前已有报到通过基因工程方法生产精氨

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30760287); 云南省科技厅自然科学基金资助项目 (2009CC022)

[作者简介] 张芳 (1981~), 女, 陕西彬县人, 在读硕士研究生, 主要从事肿瘤基因治疗的研究工作.

[通讯作者] 田长富. E-mail: tiancf@21cn.com

酸酶、蛋氨酸酶、苯丙氨酸酶等,但都处于临床前期研究阶段,限制其临床应用的主要问题是专一性和免疫原性,通过对含蛋氨酸酶基因的构建,使其专一性更强、免疫原性更低是研究关键。厉保秋等研究表明,蛋氨酸酶在人肿瘤裸鼠模型中表现出广泛的抑瘤作用,在猕猴模型中能降低血浆蛋氨酸水平,蛋氨酸酶是一种良好的抗肿瘤药,但因其免疫原性强限制临床应用,如能进行化学修饰增加药物作用时间降低其免疫原性,可增加用药安全性^[2]。制备出原核来源 IgG 型多克隆抗体 (Met PcAb) 以下简称多抗,检测不同来源重组蛋氨酸酶抗原差异性变化,为更好研究重组蛋氨酸酶抗肿瘤作用提供坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

IPTG、PMSF、L-Glutathione (Reduced)、Thrombin (1000U) 购自上海索莱宝生物科技有限公司, SDS L5750、FCA、FICA 购自 Sigma 公司, GST Sefinose TM Resin 购自上海生工, TMB 底物显色试剂盒 (20 ×)、山羊抗兔 IgG (H+L)、HRP 购自康为世纪公司, 化学发光成像系统 Bio-RAD chemical XRS+, 电泳凝胶成像分析仪 Bio-RAD Universal Hood II, Tween-80 购自 Biosharp 公司, DH5a D9057、蛋白 MakerD531 购自 TakaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 重组蛋氨酸酶的表达条件优化 将质粒 Met-PGEX 转入大肠杆菌 DH5 a 中, 挑取单菌落在含氨苄青霉素的 5 mL LB 培养基中, 置 37℃, 180 r/min 摇床过夜培养 12 h 后转入 100 mL 菌液, 紫外分光光度计测 OD₆₀₀ 值为 0.6 时加入终浓度 0.6 cm IPTG 诱导 5 h, 诱导温度为 31℃, 4℃ 下 10 000 r/min 离心菌液沉淀 10 min, PBS 洗涤 2 次并称重^[3]。

1.2.2 重组蛋氨酸酶纯化及柱上切除标签 将收集好的菌液沉淀按每 0.1 g 湿菌加入 6 mL PBS 悬浮, 加入终浓度 0.5 mM PMSF, 置于冰水混合物中超声裂解, 功率 30%, 工作 5 s, 间歇 5 s, 共超声 30 次, 显微镜下观察无杆状菌体, 4℃, 10 000 r/min, 离心 10 min, 肉眼观察离心后沉淀少, 上清清亮并无黑色碳化物质出现, 破碎上清过 0.45 μm 滤膜。取 4 mL 上清过 GST 柱, 反复挂柱 2 次, 流速控制为 5 s 1 滴, 10 倍柱床体积 PBS 清洗杂蛋白, 800 r/min 离心柱子 2 min, 加入 20 U Thrombin 于 1 mL PBS 中柱上切除标签蛋白, 柱子置于 4℃

冰箱 12 h 后, 离心收集切后蛋白, 43 kD Met-PGEX 流出, 26 kD 标签蛋白则挂在柱子上, 20 mM 还原型谷胱甘肽洗脱液 3 mL 洗脱标签蛋白, PBS 冲洗柱子。收集各步洗脱液 20 μL 留样, SDS-PAGE 电泳鉴定^[4,5]。

1.2.3 Met PcAb 制备 (1) 抗原准备: 切掉标签的 Met-PGEX, 第 1 次免疫取 300 μg 稀释到 1 mL PBS 中, FCA 1 mL 超声乳化至乳白色, 取一滴滴入水中不扩散为可以注射, 注射前滤膜过滤。首次免疫使用 FCA 乳化蛋白, 其余 4 次免疫使用 FICA 乳化蛋白; (2) 免疫过程: 选取 2~2.5 kg 雄性耳缘静脉明显易于抽血的新西兰兔, 免疫前采血 1 mL 作为阴性对照。每次免疫注射用量为 2 mL, 共免疫 5 次。使用 1 mL 注射器皮下多点注射, 1 个部位 0.5 mL 注射量, 倾斜 45° 回抽无出血皮下刺入。首次免疫至第 2 次间隔 14 d, 其余 3 次间隔时间为 7 d。第 2 次免疫后耳缘静脉采血, 双向免疫扩散法粗测效价^[6]; (3) 多抗收集: 采血前动物禁食 12 h, 采用颈动脉放血法收集兔血。术前先用 10 mL 5% 水合氯醛麻醉动物检查无角膜反射。剪去手术区域兔毛, 钝性分离颈部皮肤, 剪开筋膜。观察颈总动脉位于食管气管两旁斜行, 摸到动脉搏动。用手术线结扎远心端颈总动脉, 针头向心方向刺入颈总动脉, 另一人收集血液, 共收集 90 mL, 收集的兔血室温放置 2 h, 有血凝块形成分层, 取上清室温离心 5 000 r/min, 离心 10 min, 吸出上层血清分装, 共收集 35 mL 多抗血清, -80℃ 冰箱保存; (4) 蛋氨酸酶多克隆抗体效价检测: 双向免疫扩散实验粗测多抗效价。铺板微波炉加热 1.2% 琼脂糖盐水, 厚度为 2~3 mm, 倒板时勿剧烈震荡以防止气泡产生。打孔待琼脂冷却后, 用直径 3 mm 的吸管打孔, 梅花形孔间距 4~5 mm。加样取纯化后 1 mg/mL Met 融合蛋白 20 μL 加入中间孔, 依次加入阴性对照 PBS, 多抗原液, 1:2, 1:4, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 倍数稀释, 每孔加样 20 μL; (5) 抗原抗体反应性检测: 棋盘滴定法筛选出最佳抗原包被浓度为 50 ng/孔, 二抗反应浓度为 1:2 × 10⁴。间接 Elisa 法测多抗效价, 设置空白、阴性、阳性 3 组, 每组 3 个平行孔。包被时用酶切后纯度 90% 以上 Met-PGEX 蛋白, 50 ng/100 μL 每孔包被聚丙烯板, 4℃ 过夜。次日 PBST 甩干洗涤 3 次后用 5% 脱脂奶粉 37℃ 水浴中封闭 2 h。洗涤后空白组一抗加入 100 μL PBST, 阴性组一抗加入未免疫过兔血清 1:100 倍稀释, 阳性组一抗分别加入稀释 800 倍、6 400 倍、12 800 倍、25 600 倍、51 200 倍、102 400 倍稀释血清,

每孔 100 μL , 37 度反应 1 h. 洗涤后加入 $1:2 \times 10^4$ 羊抗兔 IgG (HRP) 作为二抗, 每孔 100 μL , 37 度反应 1 h. TMB 底物显色剂每孔 100 μL , 避光反应 20 ~ 30 min. 每孔加 1 M 硫酸 50 μL 终止反应. 酶标仪 OD450 读数.

2 结果

2.1 酶切后蛋白纯度分析

Met-PGEX 诱导表达后, SDS-PAGE 电泳分析切除标签之前 Met-PGEX 融合蛋白分子量为 69 κD (见图 1 第 2 泳道), 切除 GST 标签蛋白部分后 Met-PGEX 分子量为 43 κD (见图 1 第 4 泳道), 分子量与标准蛋白 Maker 相对应, Image Lab 软件分析切掉标签后的 Met-PGEX 纯度大于 90%.

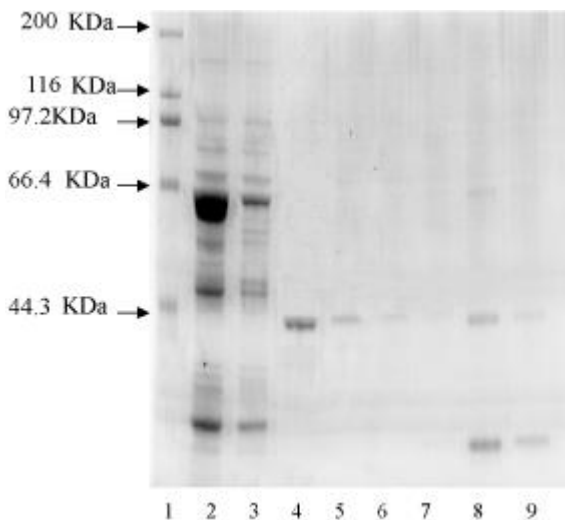


图 1 切除标签后 Met-PGEX

Fig. 1 The Met-PGEX cleaved of GST Tag

1:Marker; 2:破碎后上清; 3:过柱后废液; 4:切后流出液; 5:PBS 洗脱; 6:PBS 洗脱; 7:PBS 洗脱; 8:20 mM 还原型谷胱甘肽洗脱; 9:20mM 还原型谷胱甘肽洗脱.

2.2 双向免疫扩散法抗体效价测定

新西兰兔第 2 次免疫 7 d 后耳缘静脉采血, 梅花形打孔逆时针方向依次为 PBS 孔、多抗原液、1:2 倍、1:4 倍、1:8 倍、1:16 倍稀释, 观察周围孔与中间孔出现沉淀线, 1:8 处消失, 抗体效价为 1:4 (见图 2). 最后一次免疫后采集血清分别与原核、真核重组蛋氨酸酶做双向免疫扩散实验, 周围孔顺时针方向依次为 PBS 孔, 1:16 倍、1:32 倍、1:64 倍、1:128 稀释出现明显沉淀线, 第 5 次免疫后测多抗效价为 1:128 (见图 3A), 多抗与真核来源重组蛋氨酸酶反应后测效价为 1:128 (见图 3B).

2.3 间接 Elisa 法多抗反应性测定

空白组一抗加 PBS, 阴性对照组一抗为免疫前新西兰兔血清, 阳性组一抗为不同稀释倍数多抗. 酶标仪测 OD450 多抗效价 P/N 比值大于 2, 多抗效价在 $1:1 \times 10^5$ 以上 (见表 1). 随着多抗稀释倍数增大, OD450 读数逐渐减小, 图 4 为阳性血清与阴性血清读数比较.

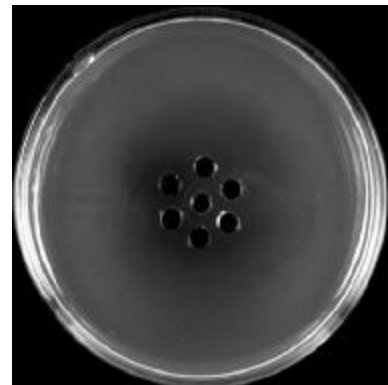


图 2 二免后双向免疫扩散测多抗效价

Fig. 2 The titer detected by double immuno diffusion after secondary immune

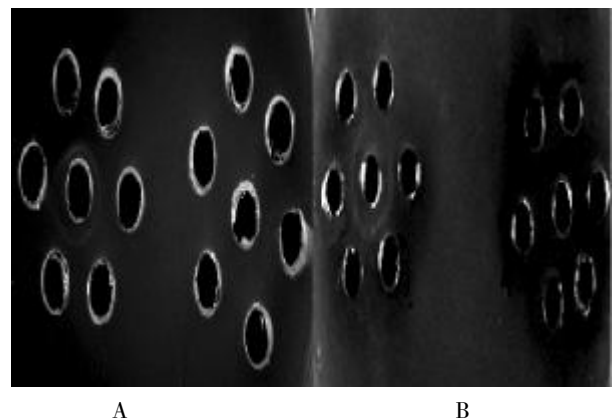


图 3 五免后双向免疫扩散后测多抗效价

Fig. 3 The titer detected by double immuno diffusion after the fifth immune injection

A:原核来源蛋氨酸酶与多抗反应; B:真核来源蛋氨酸酶与多抗反应.

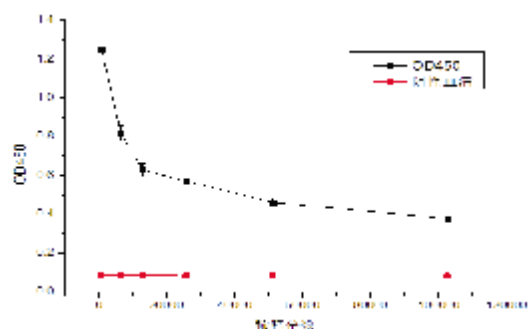


图 4 不同稀释倍数多抗间接 Elisa 法测多抗效价

Fig. 4 The titer of polydonal antibody detected by indirect ELISA with different dilution ratio

表1 不同对照组间接 Elisa 法测多抗效价

Tab. 1 The titers of polyclonal antibody detected by indirect ELISA in different control groups

分 组	空白组	阴性对照组	阳性 1:102400 组	P:N 比值
酶标仪测 OD ₄₅₀	0.16	0.18	0.23	3.5 > 2

3 讨论

蛋氨酸酶融合表达时引入 GST 部分, 占总标签蛋白的 38%, 考虑这部分所占比例大对目标蛋白活性产生影响, 因此选择切除标签后的蛋氨酸酶来免疫新西兰兔制备多抗. 切除标签蛋白采用柱上酶切法, 分子量为 69 kD 的融合蛋白被切为 43 kD 和 26 kD 两部分, 43 kD 的目标蛋白没有 GST 结合位点, 从柱上流穿, 而 26 kD 的标签蛋白挂在柱子上, 实现了目的蛋白与标签蛋白分离. 酶切过程中, 将柱子置于摇床振摇 2 h 后, 保证每个切开的标签蛋白挂在柱子上^[7].

获得接近天然结构, 纯度较高可溶性的蛋氨酸酶是制备特异性抗体的关键. 通过优化表达条件, 降低诱导温度来提高可溶性蛋氨酸酶表达, SDS-PAGE 电泳分析仍存在 50% 不可溶性表达, 所以本实验中所用纯化蛋氨酸酶一次过柱适合于小量纯化. 制备的原核来源多抗可用于检测所有含蛋氨酸酶基因物质的免疫原性, 对判断不同重组蛋氨酸酶抗原差异性变化具有重要价值, 用于细胞及动物实验中研究蛋氨酸酶抗肿瘤作用及机理分析^[8].

[参考文献]

[1] ASHRAF S, EL-SAYED. Microbial L-methioninase: pro-

duction, molecular characterization, and therapeutic applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 86(2):445 - 467

[2] 厉保秋, 杨志坚, 朱振平, 等. 猕猴静注重组蛋氨酸酶后的药代动力学、免疫原性及系统毒性[J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3):278.

[3] 姜茵, 王小平, 何殿殿, 等. 柱上切除 GST 标签制备幽门螺杆菌 Lpp20 蛋白 [J]. 中国公共卫生杂志, 2012, 28(7):987 - 989.

[4] 李朴, 孔飞飞, 余雪梅, 等. YB-1 蛋白的高效原核表达、纯化及其多抗的制备 [J]. 中国公共卫生杂志, 2010, 32(14):1 579 - 1 581.

[5] ARNAU J, LAURITZEN C. Petersen GE. Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins [J]. Protein Expression, 2006, 48(1):1 - 13.

[6] CARRIO M, VILLAVARDE A. Construction and deconstruction of bacterial inclusion bodies [J]. Biotechnol, 2002, 96(1):3 - 12

[7] QUERIOZ J A, TOMAZ C T. Cabral J Hydrophobic interaction chromatography of proteins [J]. Biotechnol, 2001, 87(2):143 - 159.

[8] ABDOLALIZADEH J, MAJIDI J, FARAJNIA S. Production and purification of polyclonal Antibody Human Kappa [J]. Journal of Biological sciences, 2008, 8(3):683-686.

(2013 - 02 - 07 收稿)