

翟晓虎,贺卫华,沈晓鹏,等. S100A16 蛋白多克隆抗体表达条件的优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):39-41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.012

S100A16 蛋白多克隆抗体表达条件的优化

翟晓虎¹, 贺卫华¹, 沈晓鹏¹, 陈世杰²

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 江苏省药物研究所有限公司, 江苏南京 211500)

摘要:探索优化并构建 S100A16 原核表达载体、制备 S100A16 蛋白多克隆抗体的条件。试验方法为,将 RT-PCR 扩增得到的小鼠肝脏组织的 *S100A16* 基因克隆片段连接到带有 His 标签的原核表达载体 pET-28a 多克隆位点,并转化大肠杆菌 BL21(DE3),用不同温度、不同浓度 IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)诱导融合蛋白表达,通过亲和层析柱纯化获得纯化的蛋白质。经免疫动物得到 His-S100A16 抗血清,通过免疫亲和层析获得了具有高度特异性抗体,通过 Western Blot 和 Elisa 检测抗体的特异性和效价,结果表明,在温度 25 ℃、IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下,可溶性蛋白的表达效果较好。

关键词:S100A16; Western Blot; 融合蛋白表达; ELISA; 小鼠

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0039-02

S100A16 基因是在应用全基因组微阵列芯片技术筛查代谢性疾病相关基因的研究中新获得的差异表达基因,是钙调蛋白 S100 家族的新成员,除了具有 S100 家族的基本结构特征,还存在更复杂的调节机制。S100 家族在细胞的增生、分化、迁移与凋亡,神经轴突的生长与认知形成及肿瘤发展中均发挥着重要作用^[1]。关于其新成员 *S100A16* 基因与疾病发展的研究尚浅,目前尚无明确结论,经有关科研机构研究,初步阐明 *S100A16* 基因在代谢性疾病的发生发展中发挥作用。本研究拟探讨并优化 S100A16 多克隆抗体的制备条件与方法。

1 材料与方法

1.1 试验动物

新西兰白兔,购自江苏省农业科学院,成年公兔体质量 4~5 kg,母兔体质量 4.5~5.5 kg。

1.2 试验仪器

主要试验仪器有:Eppendorf 5810 冷冻离心机,凝胶成像仪,BioTek 酶标仪,BioTek 洗板机,普通 PCR 仪,冷冻离心机,Thermo 电动移液器,Nuaire 生物安全柜,三洋高压灭菌锅,Revco 超低温冰箱,Milipore 纯水仪,制冰机,振荡器,分光光度计,电泳设备,国产大龙移液器。

1.3 试验试剂

PBS(磷酸盐缓冲液,含蛋白酶抑制剂、1% TritonX-100、5% 甘油)、PBST(磷酸盐吐温缓冲液)、1 L TBS(Tris-HCl 缓冲盐溶液)、TBST 洗脱液(1 L TBS 溶液中加入 0.5 mL Tween20)、LB 培养基、SDS(十二烷基磺酸钠)电泳液、转膜液、封闭液、10% SDS、10% APS、Na₂HPO₄·2H₂O、Na₂HPO₄·12H₂O、EDTA(乙二胺四乙酸二钠)、UREA(尿

素)、PMSF(苯甲基磺酰氟)、IPTG(异丙基- β -D-硫代半乳糖苷)、AMP(氨苄西林)、卡那霉素(Kana)、曝光显色剂、0.25% 考马斯亮蓝 G250、脱色液等。

1.4 试验方法

1.4.1 接种活化 接种活化方法按常规方法进行。

1.4.2 传代培养 于灭菌三角摇瓶内加 50 mL LB(含 50 μ g/mL Kana),接种 1 mL 已转化 His-S100A16 的大肠杆菌 BL21(DE3)过夜活化,于 37 ℃、220 r/min 培养 5~6 h。

1.4.3 扩大培养 在 1 L 灭菌三角摇瓶内加 450 mL LB(含 50 μ g/mL Kana),接种 50 mL 传代 His-S100A16 转化的大肠杆菌 BL21(DE3),于 37 ℃、220 r/min 条件培养 1~2 h。

1.4.4 诱导培养 待扩大培养的 His-S100A16 的 $D_{600\text{nm}}$ 约为 0.6 时,取 500 μ L 菌液留样,再加诱导剂 IPTG,150 r/min 下过夜诱导。为了使蛋白尽量以可溶性形式表达,试验设 5 个温度条件,A、B、C、D、E 组分别为 16、20、25、30、37 ℃,每个组的 IPTG 浓度均设 4 个梯度:0.2、0.4、0.6、0.8 mmol/L。

1.4.5 菌体收集处理 (1)菌体收集:先取 500 μ L 菌液,于 12 000 r/min 离心 2 min,弃上清,加 100 μ L 1 \times loading buffer,用漩涡器将 EP 管底部菌体打散,在干式恒温器中 96 ℃ 变性 10 min;然后于 12 000 r/min 离心 2 min,转移上清到新的 EP 管中,作标记后-20 ℃ 保存;取出后于 4 ℃、6 000 r/min 离心 15 min,弃上清。(2)破碎(冰上操作):加 30 mL PBS 混匀菌体沉淀^[2]。(3)超声:在冰水混合物中进行,超声条件:65% Amp,超声 3 s,间歇 5 s,累计 10 min,超声后离心:4 ℃、12 000 r/min 离心 5 min,取上清,0.22 μ m 滤器过滤。(4)SDS 电泳检测。

1.4.6 过柱纯化和超滤 (1)His-S100A16 蛋白纯化(冰上操作)。(2)稀 HCl 清洗系统 20 min,75% 乙醇清洗系统 20 min,水洗系统 20 min,绑定 5 min,调节流速为 1 mL/min,连接 His-Trap 柱,绑定 15 min,平衡柱,上样;过滤,绑定洗杂蛋白 20 min,洗脱,接 8 管,每管 1 mL,绑定,加 20% 乙醇^[3]。(3)超滤 S100A16 蛋白:根据蛋白电泳的结果,混合纯化的 S100A16,用 PBS 置换 buffer(向加入样品的超滤管中加

收稿日期:2014-04-01

基金项目:江苏省泰州市农业项目(编号:TN2013012)。

作者简介:翟晓虎(1981—),男,山西浑源人,硕士,讲师,主要从事小動物疾病方面的研究。Tel:(0523)86651732;E-mail:zhaixiao-hu010@163.com。

入 PBS,几乎加满后离心,保留滤液,洗 2 次;用考马斯亮蓝 G250 测蛋白浓度,如果还有蛋白则收集后再次超滤,超滤至考马斯亮蓝 G250 测蛋白浓度颜色较深为止),收集 S100A16 蛋白,SDS 电泳检测 S100A16。

1.4.7 SDS-PAGE 电泳 电泳时间一般为 3~5 h,电压为 50~120 V,以溴酚蓝为指示。

1.4.8 转膜 转膜按常规方法进行。

1.4.9 免疫反应 (1)将聚偏氟乙烯(PVDF)膜用 TBS 浸湿后,移至封闭液的平皿中,室温下摇床封闭 1 h;注意蛋白面朝上,接触封闭液。(2)将一抗用封闭液稀释至适当浓度,放入 PVDF 膜,蛋白面朝内摇于垂直混悬仪,室温下孵育 1~2 h 或者 4℃过夜,后移至干净肥皂盒中,于室温下用 TBST 清洗,在摇床上洗 3 次,每次 15 min。(3)同上方法准备二抗稀释液,并与膜接触,室温下孵育 1~2 h 后,同样在 TBST 摇床上洗 3 次,每次 15 min。(4)电化学发光(ECL)反应及曝光、显影。将制备的血清纯化,并稀释作为一抗进行 Western Blot 鉴定(按 1:3 000 比例稀释),检测纯化的 His-S100A16 融合蛋白(带有 His 标签)。

1.4.10 蛋白浓度测定 (1)将蛋白浓度测定试剂盒中 A 液和 B 液以 50:1 比例混合后加入 ELISA 板孔中,A 与 B 混合液的总量为 200 μL/孔。分别取 0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL 标准蛋白,按 B 至 G(第 2 至第 7 孔)依次加入到孔内,其中 B 为 PBS,H 为空白,标准品各 25 μL/孔。(2)加入待检样品,首先原液上样,做复孔,然后根据颜色反应深浅做梯度稀释(一般 2~3 个梯度)后读板,根据数值判断蛋白

浓度。(3)纯化过程中,Elution 洗脱过程用考马斯亮蓝 G250 检测,1、2、3 颜色较深,4 颜色较浅,后面没有颜色变化。将 1、2、3、4 管合并后超滤,超滤得到约 4.5 mL。

1.4.11 免疫兔子 采用多点皮下注射的方法进行免疫。1 个月免疫 2 次,共免疫 4~6 次,具体看抗体在体内的效价情况。初免疫子的抗原用完全佐剂乳化,抗原量 0.5 mg/mL;次免疫子的抗原用不完全佐剂乳化,抗原量 0.25 mg/mL;乳化后的抗原注射量 1.2 mL/只。

1.4.12 ELISA 检测 ELISA 抗血清效价,第 4 次免疫 10 d 后,采血制备多克隆抗体血清,用梯度稀释进行 ELISA 检测,以免疫前正常血清为阴性对照,计算 P/N 值(P 为阳性值,N 为阴性对照值),以 P/N≥2.1 时的稀释度作为抗血清效价。

1.4.13 血清纯化 亲和层析法,使用 protein A 柱子的纯化过程得到 S100A16 的多克隆抗体。

2 结果与分析

2.1 His-S100A16 蛋白的分离、鉴定结果

图 1 为超声破碎后的 S100A16 蛋白电泳结果,图 2 为 SDS 电泳检测 S100A16 蛋白结果,可知蛋白在上清中,为可溶性蛋白,且用 SDS 法可成功收集。图 3 为 S100A16 抗血清的 Western Blot 鉴定结果,表明以免疫前血清为对照,所制备的多克隆抗血清与 His-S100A16 纯化蛋白在大约 17 ku 的位置出现特异性的杂交条带,而免疫前正常血清按同样稀释度在相同位置处无相应条带出现,表明所制备的抗血清可以高效地检测到 S100A16 蛋白。

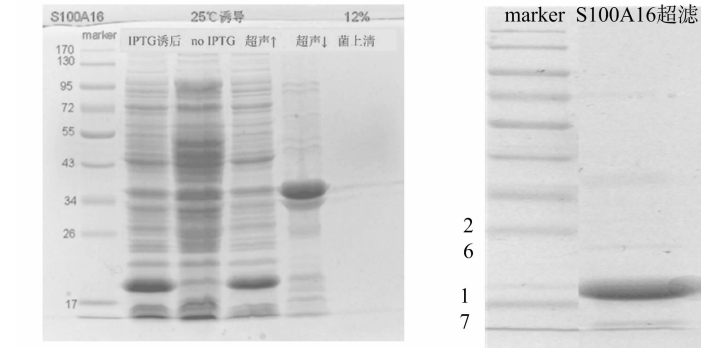


图1 超声破碎后的 S100A16 蛋白电泳结果

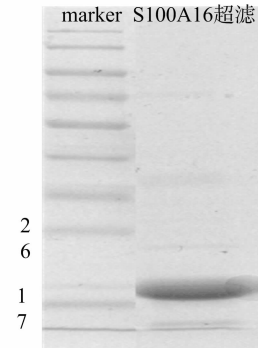


图2 SDS 电泳检测 S100A16

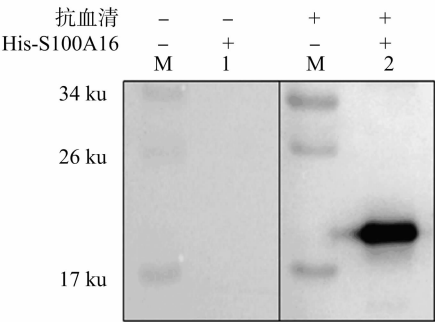


图3 S100A16 抗血清的 Western Blot 鉴定结果

由表 1 可知,His-S100A16 浓度约为 1.10 mg/mL 时,可用于兔子免疫。

表 1 His-S100A16 免疫浓度试验结果

组别	不同样品的吸光度 $D_{450\text{ nm}}$			
	1	2	3	4
A	<0.000	<0.000	<0.000	<0.000
B	0.278	0.238	1.114	1.279
C	0.560	0.520	1.249	1.264
D	1.055	0.992	1.199	1.274
E	2.006	1.949	1.154	1.258

注:A 孔至 E 孔为蛋白标准品,浓度依次为:0、0.25、0.50、1.00、2.00 mg/mL,2 个复孔;1、2 号为标准样品;3、4 号为样品(His-S100A16)。

2.2 融合蛋白表达结果

在温度 25℃、IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下,可溶性蛋白的表达效果好,条带清晰,详见图 3。

2.3 ELISA 检测结果

第 4 次免疫后,家兔血清效价可达 1:10⁶,详见表 2。

表 2 兔血清效价 ELISA 检测结果

稀释度	$D_{600\text{ nm}}$
1:10 ³	1.22
1:10 ⁴	1.17
1:10 ⁵	1.06
1:10 ⁶	0.43
1:10 ⁷	0.14
1:10 ⁸	0.09

付胜勇,刘宏祥,谢 鹏,等. 中国部分鸽 mtDNA D-loop 区遗传多态性与系统进化分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):41-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.013

中国部分鸽 mtDNA D-loop 区遗传多态性与系统进化分析

付胜勇¹, 刘宏祥¹, 谢 鹏¹, 童海兵¹, 徐善金², 陈卫彬², 卜 柱¹

(1. 中国农业科学院家禽研究所, 江苏扬州 225125; 2. 江阴威特凯鸽业有限公司, 江苏江阴 225539)

摘要:利用 PCR 测序及生物信息学分析技术,测定中国境内 8 个品种(系)鸽 108 份样本 mtDNA D-loop 区部分序列,研究中国部分肉鸽品种(系)的遗传多态性与系统进化关系。结果表明,在扩增的 761 bp mtDNA D-loop 区序列间发现 3 个变异位点,约占分析位点总数的 0.39,具 4 个单倍型;8 个群体内单倍型多样性为 0.333~0.867,总体单倍型变异度为 0.559,总体核苷酸多样性为 0.000 85,表现出较为贫瘠的遗传多态性,未表现出显著的遗传分化;石岐鸽与欧洲肉鸽 I、银羽王鸽与欧洲肉鸽 I、泰深鸽与银羽王鸽间呈现出较大的遗传距离,在后期配套系培育及杂交优势利用方面具较大遗传选育空间。

关键词:鸽;mtDNA D-loop;遗传多态性;系统进化

中图分类号: S836.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0041-03

高等动物的线粒体 DNA (mtDNA) 为共价闭合的环状双链 DNA 分子,大小为 16 355~16 359 bp,其结构简单稳定,由 37 个基因和 1 段 D-loop 区(控制区)组成,符合母系遗传,不受引进品种杂交改良的影响,可以真实地反映当地物种起源^[1]。哺乳动物及鸟类在 mtDNA 中进化速度最快、多态性最

丰富,在动物起源演化、遗传距离测算生物地理学、系统发育等方面得到广泛的应用^[2]。从已公布的序列来看,鸽线粒体 DNA 由 17 229 对碱基构成^[3],分布有 13 个基因位点,其中,第 15 573~17 229 bp 序列为 D-loop 区,全长 1 656 bp。本研究对中国鸽 mtDNA D-loop 区多态性及系统进化进行取样分析研究,以推进我国肉鸽的系统选育工作。

收稿日期:2014-05-16

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(12)3073];江苏省扬州市农业科技攻关(编号:yz2011068);江苏省苏北科技发展规划(编号:BN2013043)。

作者简介:付胜勇(1985—),男,四川内江人,硕士,助理研究员,从事家禽营养与品种选育研究。E-mail:xnfsy@163.com。

通信作者:卜 柱,硕士,副研究员,从事肉鸽生产与装备创新研究。E-mail:jsbuzhu@163.com。

2.4 Western Blot 检测结果

经双酶切和核酸序列分析证实,本试验成功构建 pET-28a-S100A16 原核表达质粒。考马斯亮兰染色结果证实,IPTG 可以有效诱导融合蛋白表达。用纯化融合蛋白免疫新西兰白兔得到的 S100A16 抗体血清,经 ELISA 和 Western Blot 检测结果显示,该抗体效价高、特异性好(图 3)。

3 结论与讨论

3.1 探索 S100A16 的高表达条件

为了使得蛋白尽量以可溶性蛋白的形式表达,可以从不同的诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度条件出发进行试验,探寻最佳的可溶性蛋白表达的条件,通过超声破碎、SDS 检测来确定获得更高表达效果的条件。

3.2 优化对组氨酸标签的纯化条件

His 标记蛋白对于 Ni²⁺ 等金属离子具有高亲和性,使用螯合配体能够将这些金属离子固定在色谱层析介质上。His 标记蛋白能够特异性地结合而大多数其他胞内蛋白不能结合。由于咪唑具有组氨酸基团,利用竞争机制,提高咪唑的浓度可以将蛋白洗脱下来。

1 材料与方法

1.1 材料

石岐鸽和银羽王鸽血样各 12 份,采自广东省中山市石岐鸽场;2002 年引自法国的欧洲肉鸽 I、II、III 系血样各 12 份、源自美国的白羽王鸽和银羽王鸽血样各 12 份、源自深圳天翔达祖代种鸽场的卡奴鸽和泰深鸽血样各 12 份,均采自江苏省

优化的目的在于最大限度地洗涤杂蛋白,但不影响目的蛋白或较少影响目的蛋白的结合,通过 SDS 确定在哪个浓度下洗涤后没有杂蛋白带或者很少,同时目的蛋白很少被洗脱,结果表明:A 组用 10 mmol/L 咪唑洗脱,绑定中不加咪唑,洗脱留样;B 组用 20 mmol/L 咪唑洗脱,绑定中不加咪唑,洗脱留样;C 组用 30 mmol/L 咪唑洗脱,绑定中不加咪唑,洗脱留样;D 组用 40 mmol/L 咪唑洗脱,绑定中不加咪唑,洗脱留样;E 组用 50 mmol/L 咪唑洗脱,绑定中不加咪唑,洗脱留样。

总体看出,本研究构建出了带有 His 标签的 S100A16 原核表达载体,并获得高纯度的 His-S100A16 融合蛋白及多克隆抗体,为进一步研究 S100A16 的生物学功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 杜新丽,薛 一,张媛媛,等. S100A16 转基因小鼠的构建与鉴定[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(3):325-328.
- [2] 薛 一,孙 静,刘梦兰,等. S100A16 基因的原核表达和多克隆抗体制备[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2012,32(10):1376-1380.
- [3] 辛 婧,张日华,杜新丽,等. S100A16 基因 shRNA 真核表达质粒的构建及其干扰效果的初步鉴定[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,31(3):324-327.