

徐志伟,赵杰,刘伟忠,等. 利用 hAPOA1 原核蛋白生产兔多克隆抗体[J]. 江苏农业科学,2016,44(12):85-87.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.12.022

# 利用 hAPOA1 原核蛋白生产兔多克隆抗体

徐志伟<sup>1</sup>, 赵杰<sup>2</sup>, 刘伟忠<sup>1</sup>, 刘照亭<sup>1</sup>, 王期<sup>2</sup>

(1. 江苏丘陵地区镇江农业科学研究所, 江苏句容 212420; 2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏南京 210046)

**摘要:**将 hAPOA1 的阅读框连接到原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 构建成正确的 pGEX-4T-1-hAPOA1 原核表达质粒, 然后将其转入宿主菌 BL21, 经异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导后, 宿主菌表达出与预期分子量大小相符的 55.4 ku 的融合蛋白; 将纯化后的包涵体融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备抗 hAPOA1 血清并检测抗体效价。结果表明, 经间接酶联免疫吸附测定 (ID-ELISA) 及蛋白质免疫印迹 (Western Blot) 方法证实, 获得的融合蛋白免疫新西兰大白兔得到了特异性的多克隆抗体, 抗体效价为 1:40 000, 经济效益可观。

**关键词:**hAPOA1; 原核表达; 新西兰大白兔; 融合表达; 多克隆抗体

**中图分类号:**S852.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)12-0085-03

载脂蛋白 A1 (ApoA1) 是 apoA 族最多的一种组分, apoA1 为单一多肽链, 由 243 个氨基酸残基组成, 是高密度脂蛋白 (HDL) 的主要载脂蛋白, 不仅是生物试剂的重要原料, 也是抗动脉粥样硬化的指标<sup>[1]</sup>。目前, apoA1 的检测多采用免疫比浊法<sup>[2]</sup>, 现有的抗载脂蛋白 A1 抗体的生产采用传统的免疫方式 (免疫原从高密度脂蛋白纯化得到, 免疫动物受限等), 产量、效价及特异性较差, 已无法满足日益增长的使用需求。本研究构建了 hAPOA1 的原核表达载体, 通过大肠杆菌原核表达系统进行 hAPOA1 的蛋白表达与纯化, 并通过免疫新西兰大白兔获得了抗血清, 为自主大规模生产抗 hAPOA1 抗体及后续的免疫检测试剂盒研发奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 菌种和质粒 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、表达载体 pGEX-4T-1、

收稿日期:2016-08-11

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(16)1326]。

作者简介:徐志伟(1965—), 男, 江苏常州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事畜禽养殖研究。E-mail: xzw1729@sina.com。

通信作者:王期, 博士, 主要从事生物技术研究。E-mail: swwq0401@163.com。

(9):808-815。

[3] Chaiseha Y, Mohamed E, Halawani E L. Neuroendocrinology of the female turkey reproductive cycle[J]. Journal of Poultry Science, 2005, 42(2):87-100.

[4] Freeman M E, Kanyicska B, Lerant A, et al. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion[J]. Physiological Reviews, 2000, 80(4):1523-1631.

[5] Yen C F, Lin H W, Hsu J C, et al. The expression of pituitary gland genes in laying geese[J]. Poultry Science, 2006, 85(12):2265-2269.

[6] Larsen C M, Grattan D R. Prolactin, neurogenesis, and maternal behaviors[J]. Brain Behavior and Immunity, 2012, 26(2):201-209.

[7] Dawson A, Sharp P J. The role of prolactin in the development of reproductive photorefractoriness and postnuptial molt in the European

*E. coli* BL21 (DE3) 均由笔者所在实验室保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Not* I、*Eco*R I 为 TaKaRa 公司产品; T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶、核酸标准相对分子质量购自 TaKaRa 公司; 蛋白质分子量标准购自 MBI 公司; 蛋白胨和酵母粉购自英国 OXOID 公司; 氨苄青霉素购自 Ameresco 公司; IPTG 购自 Merck 公司; 丙烯酰胺 (Acr) 及甲叉双丙烯酰胺 (Bis) 购自 Promega 公司; 四甲基乙二胺 (TEMED) 购自 BioRad 公司; 考马斯亮蓝 R-250 购自 Sanland 公司; 胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司; 弗氏完全佐剂和不完全佐剂为 Sigma 公司产品; Goat-Rabbit IgG-HRP 购自 Bioworld; 其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 试验动物 本研究所用动物为健康的新西兰大白兔。

### 1.2 试验方法

1.2.1 pGEX-4T-1-hAPOA1 原核表达质粒的构建 根据人源的 hAPOA1 基因序列 (Gene ID:335) 设计引物, 5' 和 3' 端分别加入 *Eco*R I 和 *Not* I 酶切位点。上游引物: 5'-CCG-GAATTCATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTT-3'; 下游引物: 5'-AAAGCGCCGCTCACTGGGTGTTGAGCTTCTTAGT-3'。以 hAPOA1 的全长 cDNA 序列为模板进行 PCR 扩增, 反应程序: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 59 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物和 pGEX-4T-1 载体分别经

starling (*Sturnus vulgaris*) [J]. Endocrinology, 1998, 139(2):485-490.

[8] Reddy I J, David C G, Sarma P V, et al. The possible role of prolactin in laying performance and steroid hormone secretion in domestic hen (*Gallus domesticus*) [J]. General and Comparative Endocrinology, 2002, 127(3):249-255.

[9] 陈兴勇, 何艳, 时丹, 等. 皖西白鹅催乳素基因克隆、表达及主动免疫后就巢行为分析[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2014, 35(2):33-37.

[10] Jiang R, Xu G. Association of polymorphisms for prolactin and prolactin receptor genes with broody traits in chickens[J]. Poultry Science, 2005, 84(6):839-845.

[11] 姜润深, 杨宁. 家禽垂体特异转录因子 POU1F1 研究进展[J]. 遗传学, 2004, 26(6):957-961.

*EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,并用  $T_4$  DNA 连接酶连接,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。重组质粒经 PCR 和双酶切筛选阳性克隆,并进行 DNA 测序,该重组质粒命名为 pGEX-4T-1-hAPOA1 (具体操作参考 Novagen 公司 pET System Manual)。

**1.2.2 谷胱甘肽转移酶(GST)-hAPOA1 融合蛋白的小试诱导表达及鉴定** 将测序正确的重组质粒 pGEX-4T-1-hAPOA1 转化宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3),在平板上挑取 3 个克隆,各接种于 4 mL 含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 液体培养基(含胰蛋白胨 0.04 g,酵母提取物 0.02 g,NaCl 0.04 g),37 °C 振荡培养 4 h,使  $D_{600\text{ nm}}$  达到 0.8~1.0,加异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L,继续振荡培养 6 h,12 500 g 离心 10 min 后收集菌体并留样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),结合考马斯亮蓝 G-250 染色,脱色后分析融合蛋白表达与否。

**1.2.3 GST-hAPOA1 融合蛋白的大量表达及表达产物分布** 将上述鉴定正确表达的 pGEX-4T-1-hAPOA1-BL21 (DE3)冻存菌株接种于 4 mL 含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 液体培养基(含胰蛋白胨 0.04 g,酵母提取物 0.02 g,NaCl 0.04 g)中,37 °C 振荡培养 16 h,然后取 4 mL 接种到 400 mL LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养 2~4 h, $D_{600\text{ nm}}$  达到 0.8~1.0 时,加 IPTG 至终浓度 0.5 mmol/L,20 °C 继续振荡培养 12 h,12 500 g 离心 10 min 收集菌体并留样,按 1 g 菌体沉淀加 5 mL 磷酸缓冲盐溶液(PBS)重悬诱导表达后的菌体沉淀,经超声破碎(设置为工作 5 s,间歇 6 s,功率 300 W,全程时间 20 min)后,12 500 g、4 °C 离心 15 min 后取上清和沉淀留样,进行 SDS-PAGE,结合考马斯亮蓝 G-250 染色,脱色后分析 GST-hAPOA1 融合蛋白表达产物的表达量及存在形式。

**1.2.4 GST-hAPOA1 融合蛋白的纯化** 对于上述大量诱导的包涵体蛋白,分别用 2、3、4、6、8 mol/L 尿素溶液对沉淀进行梯度重悬、洗涤处理,每次洗涤完后于 4 °C、12 500 g 离心 20 min 重新收集沉淀,接着将洗脱下的目的蛋白装入透析袋,放入 PBS 中透析过夜。SDS-PAGE 结合 Western-Blot 检验洗脱后的蛋白;采用二喹啉甲酸(BCA)法微量蛋白浓度测量试剂盒测定纯化后蛋白浓度,分装后于 -80 °C 保存。

**1.2.5 hAPOA1 多克隆抗体的制备** 将纯化并透析过的包涵体融合蛋白按常规方法免疫新西兰大白兔(注射总量为 500  $\mu\text{g}$ /只),首次免疫加等体积弗氏完全佐剂乳化后,大腿肌肉多点位注射;3 周后以同样的抗原剂量与弗氏不完全佐剂乳化后增强免疫;此后每隔 7 d 以同样的抗原剂量加强免疫 1 次,共 3 次。第 2 次、第 3 次加强免疫前均耳缘静脉采血,分离血清,以 hAPOA1 纯化融合蛋白(2  $\mu\text{g}$ /mL)为抗原进行间接酶联免疫吸附测定(ID-ELISA)测定<sup>[3]</sup>,以免疫前家兔血清作为阴性对照,PBS 作为空白对照,效价检测合格后在第 3 次加强免疫后 7 d 进行颈动脉采全血作为阳性血,同样用 ID-ELISA 方法测定免疫兔血清抗体效价。血液处理方法:37 °C 静置 1 h,4 °C 静置过夜,5 000 r/min 离心 15 min,吸取上清于 50 mL 离心管,再次 5 000 r/min 离心 15 min,吸取上清,留取近期使用量于 2~8 °C 存放,其余分装后置于 -80 °C。

**1.2.6 hAPOA1 血清抗体特异性检测** 取纯化后的融合蛋白 GST-hAPOA1 及空载体 pGEX-4T-1 表达蛋白样品进行 SDS-PAGE 后,采用电转膜法(100 V,60 min)转移至硝酸

纤维素(NC)膜上,5% 脱脂奶粉封闭后,以本试验制备的兔抗血清(1:500 稀释)为一抗,辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (1:12 000 稀释)为二抗进行反应。二氨基联苯胺(DAB)避光显色 15 min 左右,条带清晰后用双蒸水洗以终止反应。

## 2 结果与分析

### 2.1 pGEX-4T-1-hAPOA1 原核表达质粒的构建

利用上述设计的引物对 *hAPOA1* 进行 PCR 扩增,PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳结果(图 1-a)显示,扩增出 1 个特异性的 DNA 条带,分子量大小介于 750 bp 与 1 000 bp 之间,与理论值 804 bp 相符。对重组质粒用 *EcoR* I、*Not* I 双酶切,获得大小约为 5 000、800 bp 的 2 个条带(图 1-b),与理论值 4 969、804 bp 一致,初步说明重组成功。重组质粒经上海英骏生物技术有限公司测序,结果正确,可以确定 pGEX-4T-1-hAPOA1 原核表达质粒构建成功。

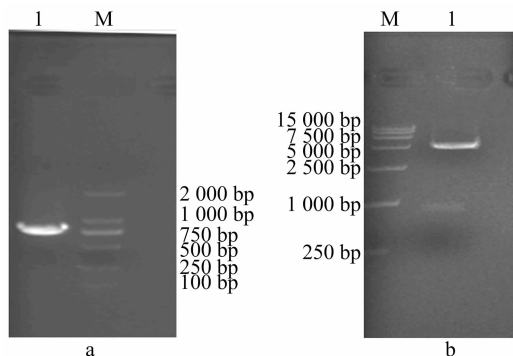


图1 *hAPOA1* 基因的扩增(a)及pGEX-4T-1-hAPOA1 重组质粒的酶切验证(b)

### 2.2 GST-hAPOA1 融合蛋白的诱导表达及表达产物 SDS-PAGE 分析

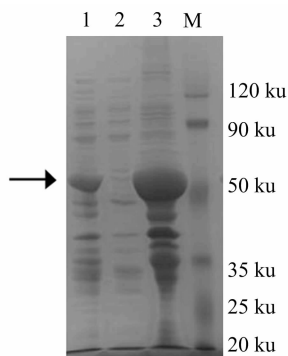
*hAPOA1* 基因编码 267 个氨基酸,由于克隆的 *hAPOA1* 基因插入位置在 pGEX-4T-1 载体的 GST-tag 下游,使用 *hAPOA1* 基因自带的终止密码子,谷胱甘肽转移酶(GST)标签蛋白分子量约为 26 ku,所以重组菌表达的 *hAPOA1* 分子量约为 55.4 ku。将重组原核表达质粒 pGEX-4T-1-hAPOA1 转化大肠杆菌感受态 BL21,随机挑取 3 个克隆,37 °C 经 IPTG 诱导小试,收集菌体进行 SDS-PAGE 分析,结果显示,在 55 ku 位置有较浓的特征蛋白条带出现,与预期分子量一致,而对照组均无此条带,说明重组菌能表达出 *hAPOA1* 蛋白(图未显示)。将上述鉴定正确的 pGEX-4T-1-hAPOA1-BL21 冻存菌于 20 °C 放大诱导培养,收集菌体进行超声破碎,取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE,上清中几乎无融合蛋白 GST-hAPOA1 表达(图 2),证明融合蛋白 GST-hAPOA1 以包涵体形式在宿主菌内高效表达。

### 2.3 GST-hAPOA1 融合蛋白的纯化

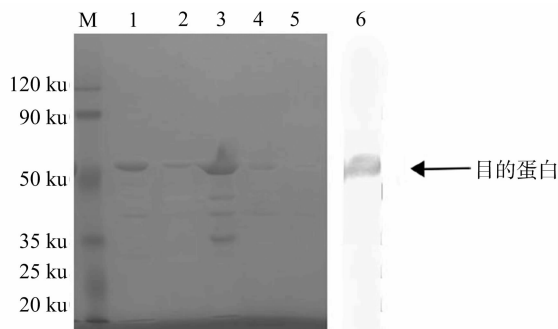
对包涵体纯化后,收集的蛋白经 SDS-PAGE 分析、Western Blot 检测并经 BCA 法计算可得,其浓度为 1.10 mg/mL,纯度约为 90%,6 mol/L 尿素溶液洗脱后获得的融合蛋白的纯度及产量最佳(图 3)。

### 2.4 hAPOA1 抗血清效价测定

将纯化后并经过透析的融合蛋白作为免疫原,采用肌肉多点注射免疫新西兰大白兔,4 次注射后进行抗血清的效价



箭头所示为目的蛋白；M—蛋白分子量标准；  
1—全菌蛋白；2—上清蛋白；3—沉淀蛋白  
图2 pGEX-4T-1-hAPOA1-BL21放大诱导后的  
全菌蛋白、上清蛋白及沉淀蛋白SDS-PAGE分析



1~5—沉淀蛋白分别经2、3、4、6、8 mol/L尿素洗脱纯化后的  
SDS-PAGE检测结果；6—Western-Blot 检测纯化后的  
GST-hAPOA1融合蛋白

图3 GST-hAPOA1 融合蛋白的纯化及Western-Blot检测

测定。以蛋白溶液(2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )为抗原进行 ID-ELISA 测定，以表达的 hAPOA1 融合蛋白作抗原，抗血清稀释 40 000 倍以上仍明显地呈阳性反应(图 4)。效价判断标准为大于最大  $D_{450\text{ nm}}$  的 50% 的最小  $D_{450\text{ nm}}$  所对应的稀释度，本抗血清效价为 1 : 40 000。

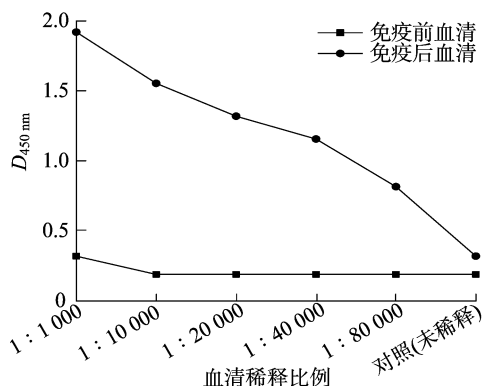
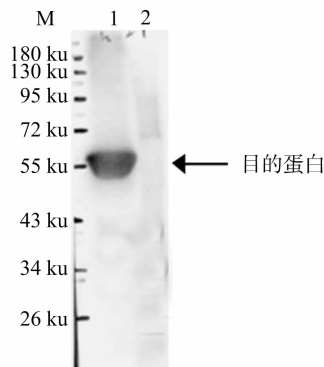


图4 ID-ELISA 测定 hAPOA1 抗血清效价结果

## 2.5 抗体免疫原性鉴定

对纯化的融合蛋白 GST-hAPOA1 及空载体 pGEX-4T-1 表达蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳，将凝胶上的目的蛋白转移到 NC 膜中，并对 NC 膜进行封闭、一抗、二抗孵育，然后用 DAB 显色，结果在 55 ku 处出现明显的特异性杂交条带(图 5)，表明本试验制备的多克隆抗体具有免疫反应性和蛋白特异性，同时也表明融合蛋白在大肠杆菌中的表达获得了成功。



M—蛋白分子量标准；1—纯化的GST-hAPOA1蛋白；  
2—纯化的空载体pGEX-4T-1表达蛋白

图5 GST-hAPOA1 融合蛋白的免疫印迹分析

## 3 讨论

高密度脂蛋白(HDL)具有促进胆固醇的逆向转运及动脉硬化作用,ApoA1 是 HDL 的结构蛋白,几乎有所 HDL 都含有 ApoA1,其水平可直接反映 HDL 在体内情况,ApoA1 在 HDL 功能如抗氧化、抗炎方面至关重要,与冠心病呈负相关性<sup>[4]</sup>。另外,有研究表明,联合检测载脂蛋白 A 与载脂蛋白 B (ApoB)对血脂的判断具有重要的临床价值<sup>[5-6]</sup>,测定载脂蛋白及脂蛋白 HDL、低密度脂蛋白(LDL)对分析病理发生状态很有帮助。由此可见 ApoA1 对于医学诊断及疾病治疗的重要性。目前生产大量 ApoA1 抗血清,主要采用高密度脂蛋白纯化的 ApoA1 作为抗原免疫得来。由于大量血清中分离纯化 ApoA1 的过程中不可避免会有一些血清蛋白等杂蛋白的污染,去掉这些影响抗体交叉反应的杂蛋白成分,势必会提高抗体生产成本。如果用含杂蛋白污染的 ApoA1 作为抗原免疫动物后,必然会导致非特异性抗体的产生,而 ApoA1 的临床精确检测需要高质量的抗体。本研究详细报道了抗 ApoA1 抗体的制备过程,利用自主表达的 ApoA1 的重组蛋白抗原,不存在大量血清蛋白残留的问题,且生产成本低,抗体特异性及效价均很好,是一种非常经济可取的抗体制备方法。

## 参考文献:

- [1]徐宝华. 动脉粥样硬化不稳定斑块的研究进展[J]. 心血管病学进展,2005,26(5):498-501.
- [2]李培英,王 抒. 载脂蛋白免疫比浊法有关问题解答[J]. 临床检验杂志,1995,13(3):158-159.
- [3]萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂,译. 3 版. 北京:科学出版社,2002:1256-1259.
- [4]刘姗姗,王 璐,邱建平. 血清载脂蛋白 A1、载脂蛋白 B 及其比值与冠脉病变程度相关性分析[J]. 中国实验诊断学,2013,17(7):1216-1218.
- [5]Hirata T, Fujioka M, Takahashi K A, et al. ApoB C7623T polymorphism predicts risk for steroid-induced osteonecrosis of the femoral head after renal transplantation[J]. Journal of Orthopaedic Science, 2007,12(3):199-206.
- [6]陈保生. 载脂蛋白的结构和功能与病毒病的预防和治疗[J]. 中国医学科学院学报,2007,29(3):448-451.