

• 论 著 •

NGAL 原核表达及多克隆抗体的制备*

王小中¹,熊火梅¹,黄 波¹,李 静²,肖 芸¹,章海斌¹,刘 静¹,王彩纹³
(南昌大学:1. 第二附属医院检验科 330006;2. 第一附属医院检验科 330006;
3. 江西省胸科医院检验科,南昌 330006)

摘 要:目的 构建人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的原核表达载体,制备兔抗人 NGAL 多克隆抗体。方法 利用 DNA 重组技术构建原核表达载体 pET28a-NGAL,诱导表达 NGAL 融合蛋白,分离该融合蛋白后,注射入免疫家兔制备多克隆抗体。结果 成功获得 NGAL,免疫动物所得抗血清效价为 1 : 4 000,该抗体能够识别原核表达的 NGAL。结论 成功克隆 NGAL 基因并制备了特异性的兔抗人 NGAL 多克隆抗体。

关键词:基因; 遗传; 融合表达; 多克隆抗体; 人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 16. 002 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)16-1789-03

Prokaryotic expression and preparation of polyclonal antibody of NGAL*

Wang Xiaozhong¹,Xiong Huomei¹,Huang Bo¹,Li Jing²,Xiao Yun¹,Zhang Haibin¹,Liu Jing¹,Wang Caiwen³
(1. Laboratory Department, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, 330006, China;
2. Laboratory Department, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, 330006, China;
3. Laboratory Department, the Chest Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China)

Abstract:**Objective** To construct the prokaryotic expression vector pET28a-NGAL and prepare the specific polyclonal antibody against NGAL. **Methods** Recombinant plasmid pET28a-NGAL was expressed in E. coli after induction with IPTG. The NGAL fusion protein was identified by sodium dodecyl sulfate-polymacrylamide gel electrophoresis, and was extracted and injected into rabbits to produce polyclonal antibody. **Results** The protein of NGAL was obtained by recombination expression. The titers of the antiserum were up to 1 : 4 000. This antibody could specifically recognize the NGAL protein expressed in the E. coli system. **Conclusion** The gene encoding NGAL is successfully cloned and the specific polyclonal antibody against NGAL was prepared.

Key words: recombination, genetic; fusion expression; polyclonal antibody; neutrophil gelatinase-associated lipocalin

人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)是 1993 年在中性粒细胞的特殊颗粒中首先发现的,定位于染色体 9q34,由 7 个外显子构成,属单拷贝,蛋白编码总长度 591 bp,为 197 个氨基酸残基编码,包括成熟肽段 178 个氨基酸残基和前导序列 19 个氨基酸残基。NGAL 不仅在多种癌组织中表达,而且可通过捕获细菌分泌结合铁的小分子铁螯合物,部分阻断细菌的铁摄取,抑制细菌生长,参与抗微生物的固有免疫应答^[1]。NGAL 还可作为慢性疾病的早期标记物^[2],是一种急性期反应蛋白。同时越来越多的证据表明血液和尿液中 NGAL 的测定可成为判断急性肾损伤的预测性生物学标志物^[3]。本研究克隆并构建了 pET28a-NGAL 的多克隆抗体,为进一步研究 NGAL 分子的功能奠定基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、各种工具酶均购自于美国 Promega 公司;Taq Plus DNA 聚合酶、三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTPs)及引物等购自于上海捷瑞生物工程有限公司;总 RNA 提取试剂盒、2× Taq PCR MasterMix、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒,均购自于天根生化(北京)科技有限公司;异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG)、佛氏佐剂、Bradford 蛋白含量检测试剂盒均为 Sigma 公司产品;质粒 pET28a 原核表达载体购于 Novagen 公司,感受态细胞 E. coli Rosetta DE3 购自于北京金式金生物技术有限公司;蛋白质相对分子质量标

准预染蛋白质标记购自于 Fermentas 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的多克隆抗兔抗体购自于北京中杉金桥有限公司;家兔(雄性,体质量 1.5~2.5 kg)购自于南昌大学医学院动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建 根据 NGAL 基因的序列及 pET28a 的克隆位点,利用引物设计软件设计 NGAL 的上下游引物 5'-TAG AAA GCT TCA CTC AGC CGT CGA TAC AC-3'和 5'-ATA GGG ATC CGA AAT CAT GCC CCT AGG TC-3',其中斜体部分为酶切位点前加的保护碱基,划横线部分分别为 Hind Ⅲ, BamH I 酶切位点。按 Trizol 试剂盒使用说明书提取人白血病细胞 K562 总 RNA,并按逆转录酶说明书进行逆转录,以 K562 细胞 cDNA 为模板进行 PCR,扩增条件为:94 ℃ 5 min 预变性;94 ℃ 变性 50 s,59 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 50 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。扩增片段与载体 pET28a 同时用 Hind Ⅲ 和 BamH I 双酶切,回收后将目的片段连接入原核表达载体 pET28a 中,以双酶切、载体测序引物进行测序。将测序结果和 pET28a 载体多克隆位点及 NGAL 基因的读码框序列进行同源比较,验证重组质粒 pET28a-NGAL 克隆。

1.2.2 重组质粒诱导表达 将测序正确的 NGAL 重组质粒转化到 E. coli Rosetta DE3 中,挑选含有表达质粒 Rosetta DE3 单个菌落接至 5 mL 培养液中,37 ℃、200 r/min 振荡过夜。按

* 基金项目:江西省科技厅科技支撑项目(赣科发计字[2007]196 号);江西省教育厅科技项目(赣教技字[2007]100 号)。

1:100 的量扩增过夜培养的菌液, 37 °C 振荡培养至 $A_{600}=0.4 \sim 0.6$ 时, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达。于诱导后 3 h 离心, 收集菌体, 150 g/L 的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 电泳检测目的蛋白表达情况。

1.2.3 目的蛋白的凝胶电泳纯化 细菌总蛋白经 50 g/L 积层胶, 150 g/L 分离胶进行 SDS-PAGE, 倒积层胶时不插梳子, 让积层胶的顶端和玻璃板的顶端之间有 1 cm 的距离 (便于大量上样), 电泳完毕后, 用预冷的 0.25 mol/L 的 KCl 溶液染色 5~10 min, 参照同样条件下用考马斯亮蓝 R250 染色的凝胶, 仔细辨认融合蛋白条带后, 用洁净的手术刀片切下目的蛋白所在的凝胶块, 用 PBS 洗 3 次后, 将凝胶块切成 0.1~0.3 mm 左右的小颗粒, 加入适量 PBS 反复冻融 3~4 次, 再经过 4 °C 浸泡过夜, 使目的蛋白释放到溶液中, 10 000 r/min 离心 5 min 收集上清液, 用 120 g/L 的 SDS-PAGE 对纯化效果进行鉴定, 用 Bradford 测蛋白浓度。

1.2.4 抗 NGAL 多克隆抗体的制备和纯化 首次免疫, 将含目的蛋白的 PBS 液与等体积的弗氏完全佐剂混匀乳化, 鉴定完全乳化后多点注射于实验兔背部皮内, 每点 100 μ L, 每只兔约注入 300 μ g 的目的蛋白。分别于首次免疫后的第 4、6、8 周末进行加强免疫。第 1 次免疫前采血并分离血清作为空白对照, 末次免疫 10 d 后颈动脉采血分离血清, 免疫血清于 -70 °C 保存。用标准的 ELISA 方法测定抗体效价, 抗原为通过凝胶纯化的 NGAL 蛋白, 一抗从 1:100 至 1:20 000 开始作倍比稀释, 每孔重复 3 次, 二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1 000 倍稀释), 显色底物为四甲基联苯胺 (TMB)。将抗血清于 4 °C, 12 000 r/min, 离心 20 min, 上清液用 0.01 mol PBS 稀释 4 倍, 加饱和硫酸铵到 50% 饱和度, 4 °C 搅拌 2 h, 离心去上清液, 0.01 mol PBS 溶解沉淀并 4 °C 透析, 每次 4 h 共 4 次。再离心, 上清液过羊抗兔 IgG 亲和柱, 流速 15 mL/h, 通过完毕用 0.01 mol PBS 清洗柱子, 蛋白检测液检测到无蛋白流出, 用 0.2 mol 甘氨酸洗脱液洗脱部分收集液, 测蛋白浓度后合并, 再次透析后离心, 上清液用 0.22 μ m 滤膜过滤后分装, 置于 -20 °C 保存。

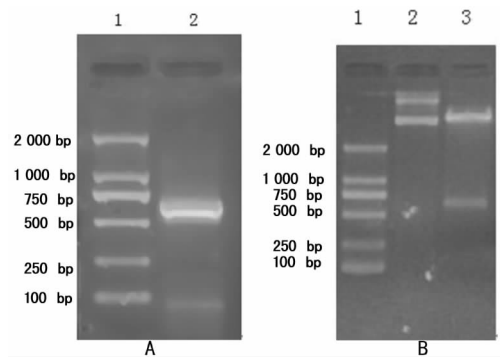
1.2.5 免疫印迹法 (Western blot) 检测 IPTG 诱导前后融合蛋白 pET28a-NGAL 的总蛋白及凝胶纯化后的融合蛋白经 SDS-PAGE 后电转移 (300 mA, 110 min) 至硝酸纤维膜上, 磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 数次洗膜后, 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, 分别滴加自制的 NGAL 抗血清 1:500、1:1 000、1:1 500、1:2 000, 4 °C 过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000 室温反应 1 h) 后, PBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 显色。

1.2.6 免疫组织化学检测乳腺癌组织中 NGAL 的表达 参照 ElivisionTM Plus 免疫组化染色步骤, 石蜡切片脱蜡及水化后, 高压修复 2 min, 加 NGAL 一抗 (1:300 稀释), 4 °C 冰箱孵育过夜, 滴加聚合物增强剂, 室温孵育 20 min, 再滴加酶标记二抗, 室温孵育 30 min, DAB 显色。

2 结果

2.1 原核表达载体的构建 提取人白血病细胞 K562 的总 RNA, 经 RT-PCR 扩增出约 625 bp 的目的片段, 与预期结果一致 (图 1), 常规方法连接得到的重组质粒 pET28a-NGAL, 经 *Hind* III、*Bam*HI 双酶切后, 分别在 5 369 bp 和 625 bp 处有两条清晰的条带, 与质粒 pET28a 和 NGAL 基因片段的分子量一致 (图 1), 测序结果与 pET28a 载体多克隆位点和 NGAL 序列进行同源比较后, 证明融合区域的读码框正确, 并有正确

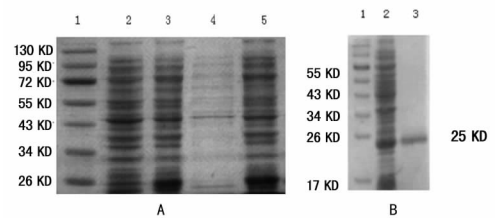
的方向, 表明质粒 pET28a-NGAL 克隆正确。



A1、B1: DNA 标准 DL2000; A2: NGAL 的 PCR 产物; B2: pET28a-NGAL 重组质粒; B3: *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切重组质粒。

图 1 重组质粒 pET28a-NGAL PCR 及酶切图

2.2 NGAL 在原核细胞中表达及目的蛋白的纯化 SDS-PAGE 电泳结果 重组质粒经 IPTG 诱导 3 h 后可见与理论相对分子质量 25×10^3 大小相符的目的蛋白带。融合蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中, 上清液中的融合蛋白表达量很低, 包涵体沉淀中融合蛋白明显较高 (图 2)。将切下含目的蛋白的凝胶颗粒用 PBS 4 °C 溶解过夜后, 离心收集上清液, 12% SDS-PAGE 对纯化效果进行鉴定, 纯化后的 NGAL 蛋白不含杂蛋白, 纯化效果较好, Bradford 检测蛋白浓度为 0.74 μ g/ μ L, 见图 2。



A1、B1: 蛋白相对分子质量标准; A2: 未诱导的 pET28a-NGAL; A3、B2: IPTG 诱导表达的 pET28a-NGAL 总蛋白; A4: IPTG 诱导表达的 pET28a-NGAL 上清液; A5: IPTG 诱导表达的 pET28a-NGAL 沉淀; B3: 纯化的 NGAL 融合蛋白。

图 2 SDS-PAGE 鉴定 pET28a-NGAL 的表达和纯化结果

2.3 多克隆抗体的效价及特异性检测 末次免疫后 10 d 用标准 ELISA 法测定血清的效价, 稀释倍数小于 4 000 时, 多抗血清的吸光度值均比对照血清高两倍, 判定免疫血清的效价为 1:4 000。分别以细菌总蛋白及凝胶纯化后的蛋白为研究对象, 使用纯化的多克隆抗体进行蛋白质印迹法检测, NGAL 抗血清检测细菌总蛋白及纯化蛋白中的 NGAL, 在大约 25×10^3 左右处可见一条明显蛋白带。

2.4 抗 NGAL 多克隆抗体检测乳腺癌组织中 NGAL 的表达 用自制的多克隆抗体进行免疫组化检测, 发现 NGAL 在乳腺癌组织细胞有阳性表达, 蛋白定位主要在细胞质。说明自制多克隆抗体可以检测内源性 NGAL 蛋白。

3 讨论

同源分析发现, NGAL 与小鼠癌基因产物 24p3 同源性高, 是人类的一种新的癌基因, 在乳腺癌^[4]、食管癌^[5]、结肠癌^[6]、慢性粒细胞性白血病^[7]等细胞系中均有过表达, 并在癌细胞的浸润与不良分化中发挥重要的作用。NGAL 依组织类型不同在肿瘤中的表达是不均一的, 并且参与肿瘤组织的表达调控, 如核转录因子 NF- κ B 可能调控甲状腺癌中 NGAL 的表

达^[8],而 BCR-ABL 通过 JAK/STAT 信号传导途径,主要是 STAT3 激活白血病细胞中 NGAL 基因的表达^[9]。进一步研究证明 NGAL 与肿瘤的侵袭、转移及凋亡密切相关。研究发现,在乳腺癌肿瘤组织中 NGAL 无论从 mRNA 水平还是蛋白水平都是过表达,而在其癌旁组织中导管上皮几乎消失;Bauer 等^[4]研究也表明 NGAL 的表达与乳腺癌细胞的淋巴结转移、不良组织学分级、HER-2/neu 表达及类固醇激素受体阴性等高度相关;研究也表明 NGAL 是一个促肿瘤生长因子,能够对抗氧化应激所诱导的肺腺癌细胞 A549 发生凋亡^[10]。由此可见,NGAL 参与了许多肿瘤的发生和发展,但 NGAL 在肿瘤中的许多功能尚需进一步研究。应用 NGAL 多克隆抗体通过免疫印迹、免疫组化等方法观察 NGAL 在病变组织中的表达情况对相关疾病的诊断、预后及疗效观察具有重要意义。

选择合适的表达载体对重组蛋白的产生相当重要,本研究用 pET28a 表达载体,原核蛋白得到了高效表达。pET28a 表达载体是一种高效的大肠埃希菌表达系统,当目的基因被克隆至载体的多克隆位点(T7 Lac 强启动子的下游)后,宿主菌在 IPTG 诱导作用下能产生大量的 T7RNA 聚合酶,后者特异性地识别表达载体的 T7 启动子序列,并且 Rosetta DE3 补充了大肠杆菌缺乏的 6 种稀有密码子对应的 tRNA,能够提高外源基因、特别是真核基因在原核表达系统中的表达水平,从而高效表达目的蛋白。

抗体是研究基因功能的重要工具,制备一种效价高、特异性好的抗体,是研究疾病相关基因的表达、定位和生物学功能非常重要的一步。本实验室构建的 pET28a-NGAL 融合蛋白在实验设计之初采用 HIS 标签亲和层析纯化,但是实验过程中发现蛋白在大肠杆菌中高水平表达形成包涵体,自包涵体中溶解出目的蛋白需经过洗涤、溶解、复性、透析脱盐等多个步骤,在这个过程中易造成蛋白变性、浓度降低,使所纯化的融合蛋白难以达到预期的纯度且纯化步骤繁琐、费时。包涵体的形成虽然影响目的蛋白的正确折叠,却不会影响蛋白的免疫原性,因此本实验组使用 KCl 对凝胶进行短暂染色,直接从聚丙烯酰胺凝胶上切割下含有 NGAL 的凝胶条带无需去除 KCl, PBS 溶解切碎后的凝胶作为抗原直接免疫家兔制备 NGAL 抗血清,进一步简化了免疫原的制备过程。本研究组制备的兔抗人 NGAL 多克隆抗血清不仅能与重组体表达的融合蛋白结合,也能与纯化后的融合蛋白结合,说明融合的目的蛋白对 NGAL 抗原性没有影响,制备的 NGAL 抗血清能特异性地识别 NGAL 蛋白,可用于进一步的功能检测。随后通过免疫组化检测 NGAL 在乳腺癌组织中的表达,结果显示在乳腺癌组

织细胞中 NGAL 阳性染色主要以细胞质为主,说明自制的抗体也可用于细胞内源性的检测。为进一步验证自制抗 NGAL 多克隆抗体,本研究下一步将构建 NGAL 真核表达载体,转染宿主细胞,以此抗体检测真核细胞内 NGAL 的表达。

参考文献

[1] Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron[J]. Nature, 2004, 432(7019): 917-921.

[2] 何小洁, 杨毅. NGAL 与糖尿病肾病[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(9): 806-807.

[3] Haase M, Bellomo R, Devarajan P, et al. Accuracy of neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL) in diagnosis and prognosis in acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis[J]. Am J Kidney Dis, 2009, 54(6): 1012-1024.

[4] Bauer M, Eickhoff JC, Gould MN, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a predictor of poor prognosis in human primary breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2008, 108(3): 389-397.

[5] Zhang H, Xu L, Xiao D, et al. Upregulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in oesophageal squamous cell carcinoma: significant correlation with cell differentiation and tumour invasion [J]. J Clin Pathol, 2007, 60(5): 555-561.

[6] Hu L, Hittelman W, Lu T, et al. NGAL decreases E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and increases cell motility and invasion through Rac1 in colon carcinoma cells[J]. Lab Invest, 2009, 89(5): 531-548.

[7] 黄华, 陈林兴, 陈慎仁, 等. NGAL 在慢性粒细胞性白血病中的表达及其诊断意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(6): 313-314.

[8] Iannetti A, Pacifico F, Acquaviva R, et al. The neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL), a NF-kappaB-regulated gene, is a survival factor for thyroid neoplastic cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(37): 14058-14063.

[9] Sheng Z, Wang SZ, Green MR. Transcription and signalling pathways involved in BCR-ABL-mediated misregulation of 24p3 and 24p3R[J]. EMBO J, 2009, 28(7): 866-876.

[10] Roudkenar MH, Halabian R, Ghasemipour Z, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin acts as a protective factor against H (2)O(2) toxicity[J]. Arch Med Res, 2008, 39(6): 560-566.

(收稿日期: 2011-05-09)

(上接第 1788 页)

[2] National Committee for Clinical Laboratory. EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples[S]. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory, 1995.

[3] 刘斌剑, 郑淑辉, 胡俊, 等. 不同检测系统生化指标测定结果的偏倚评估与可比性研究[J]. 中华医学杂志, 2007, 31(1): 13-16.

[4] 杨剑虹, 倪红兵. 不同检测系统常用血清酶测定结果对比及偏倚评估[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(22): 1366-1369.

[5] 初开秋, 任立晟, 田清武, 等. 同种项目在不同生化分析仪测定结果的偏倚评估与可比性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(9): 853-854.

[6] 刘月芳, 刘正洁. 国产与进口生化试剂的分析与比较[J]. 中国医

药导刊, 2009, 11(2): 286-287.

[7] 夏昌宇, 刘岩, 郭红雁, 等. 中国四家参考实验室间 ALT 和 AST 的测定结果比对分析[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(5): 499-503.

[8] 王珏, 张勤寂. 室内两种检测系统测定血清酶的可比性研究[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(2): 88-89.

[9] 郭良友, 陈亚洁, 刘键. 血清 AST/ALT, PAB, TBA 在肝炎诊断中的重要意义[J]. 中国民康医学, 2011, 23(1): 27-28.

[10] 王惠莹, 贾雄飞, 滕毅, 等. 不同试剂检测血清 ALT 结果的可比性及偏倚评估研究[J]. 现代检验医学杂志, 2009, 24(5): 61-63.

(收稿日期: 2011-05-09)