

线虫 *fat-1* 基因的原核表达 纯化及其抗体的制备^{*}

张 鹏^{1,2}, 曹立雪², 陈 宏^{1,3}, 马润林²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 中国科学院 遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 3 徐州师范大学 细胞与分子研究所, 江苏 徐州 221116)

[摘 要] 通过 RT-PCR 得到线虫 *fat-1* 基因全长, 将其 N 端亲水区克隆至原核表达载体 pGEX-4T-2 中, 构建重组质粒 pGEX-*fat1*-N, 将其转化大肠杆菌, 并进行诱导表达。对表达产物 GST-*fat1*-N 融合蛋白进行纯化, 制备其抗体, 并对抗体效价进行了检测。结果表明, 线虫 *fat-1* 基因能在大肠杆菌中表达, 制备的抗体能识别在原核表达系统内表达的 GST-*fat1*-N 融合蛋白, 且效价很高, 达到 1×10^7 。

[关键词] *fat-1* 基因; 线虫; 原核表达; 抗体制备

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0024-05

Prokaryotic expression of the *C. elegans fat-1* gene and preparation of antibody

ZHANG Peng^{1,2}, CAO Lixue², CHEN Hong^{1,3}, MA Run-lin²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of
Agricultural Molecular Biology, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

3 Institute of Cellular and Molecular Biology, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu 210029, China)

Abstract: *Caenorhabditis elegans fat-1* gene was obtained by RT-PCR, and the sequences of *fat-1* gene N-terminal were cloned into fusion expression vector pGEX-4T-2 to generate recombinant plasmid pGEX-*fat1*-N. After expressing in *Escherichia coli*, the expressed product GST-*fat1*-N fusion protein was purified and used to immunize rabbit. The result showed *C. elegans fat-1* gene could be expressed in *E. coli*, and the antibody against GST-*fat1*-N protein had a good affinity and selectivity by enzyme-linked immunosorbent assay.

Key words: *fat-1* gene; *Caenorhabditis elegans*; prokaryotic expression; antibody preparation

脂肪酸脱氢酶是不饱和脂肪酸合成途径的关键酶, 可催化与载体结合的脂肪酸在脂酰链上脱氢形成双键。根据酶的定位和对辅助因子需求的不同, 脂肪酸脱氢酶可以分成 2 类: 一类为可溶性的脂肪酸脱氢酶, 如植物体中的 δ^9 脂肪酸脱氢酶; 另一类是膜整合脂肪酸脱氢酶, 这种酶一般存在于内质网、植物叶绿体膜及蓝细菌的质膜和类囊体膜上, 如植

物的 δ^{12} 脂肪酸脱氢酶^[1-2]。膜整合脂肪酸脱氢酶按其引入双键的方式不同又可以分为 2 种: 一种是羧基定向的脂肪酸脱氢酶, 可催化已有的双键和羧基之间形成第二个双键^[3], 包括 δ^4 、 δ^5 和 δ^6 脂肪酸脱氢酶; 另一种是甲基定向的脂肪酸脱氢酶, 可催化已有双键和甲基之间形成第二个双键, 包括 δ^{12} 和 ω^3 脂肪酸脱氢酶^[4], 线虫 *fat-1* 基因编码的蛋白

* [收稿日期] 2005-12-22

[基金项目] 中国科学院知识创新工程青年科学家专项基金

[作者简介] 张 鹏(1981-), 男, 山东淄博人, 在读硕士, 主要从事动物遗传学研究。E-mail: pengzhang@genetics.ac.cn

[通讯作者] 马润林(1958-), 男, 甘肃成县人, 研究员, 博士生导师, 主要从事分子遗传学研究。E-mail: rma@genetics.ac.cn

即是 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶^[5]。

$\omega 3$ 多不饱和脂肪酸具有抗炎、抗血栓形成、抗心律失常、降低血脂、舒张血管等功能^[6-8], 是人体必需的脂肪酸。 $\omega 6$ 多不饱和脂肪酸也是人体必需的脂肪酸之一, 但和 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸的许多生理功能相反, 因此两种脂肪酸的平衡非常重要。有研究表明^[6], 食物中 $\omega 6$ 多不饱和脂肪酸和 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸的比例已严重失衡, 约为 (20~ 30) : 1 (正常的 $\omega 6/\omega 3$ 为 (1~ 4) : 1), 表明当今人类饮食中已严重缺乏 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸。线虫 *fat-1* 基因编码的 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶, 通过在甲基端第三个碳原子上引入一个双键, 使 $\omega 6$ 多不饱和脂肪酸转化为 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸, 从而起到平衡两种脂肪酸的作用。然而哺乳动物包括人类没有 *fat-1* 基因, 自身也不能合成 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶, 因而研究 $\omega 3$ 脂肪酸脱氢酶在哺乳动物中的表达具有重要的意义。

本试验将 *fat-1* 基因 N 端亲水区在原核细胞中进行了表达, 对表达产物进行了纯化, 并对其抗体的制备以及抗体的特异性进行了研究, 以期免疫印迹法检测 *fat-1* 基因在其他物种中的表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 线虫由复旦大学发育生物学研究所韩珉教授馈赠。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B、BL21 (DE3) 由中国科学院遗传与发育生物学研究所马润林课题组保存; 质粒 pGEM-T Easy 购自 Promega 公司; pGEX-4T-2 购自 Amersham Pharmacia 公司; pET-28a 购自 Novagen 公司。

1.1.3 试剂 RNAgents 总 RNA 分离试剂盒和辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 标记的羊抗兔二抗购自 Promega 公司; RevertAid 第一链 cDNA 合成试剂盒购自 Fementas 公司; 胶回收试剂盒购自 Omega 公司; DL2000 DNA 分子量标样和限制性内切酶 *Sal*I 购自 TaKaRa 公司; D2000 DNA 分子量标样购自 TianGen 公司; 低分子量蛋白标样购自华美生物工程公司; 内切酶 *Bam*H I 购自 NEB 公司; T4 DNA 连接酶和 Bradford 蛋白质定量测定试剂盒购自上海申能博彩公司; 谷胱甘肽硫转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 融合蛋白纯化用谷胱甘肽-琼脂糖树脂购自 Amersham Pharmacia 公司。

1.1.4 引物设计与合成 根据发表的线虫脂肪酸脱氢酶序列 (GenBank 登录号: L41807) 设计 2 对引物。引物 1 由上海生工合成: 1F: 5'-ATG GTC GCT CAT TCC TCA GAA GGG T-3'; 1R: 5'-TTA CTT GGC CTT TGC CTT CTC CTC G-3'。引物 2 由北京赛白盛公司合成: 2F: 5'-GGA TCC ATG GTC GCT CAT TCC TCA GA-3'; 2R: 5'-GTC GAC AAA CAG TGT GCT GGA ATT GC-3'。

1.2 线虫 *fat-1* 基因的 RT-PCR 扩增

1.2.1 *fat-1* 基因第一链 cDNA 的合成 (RT 反应)

收集培养 4~ 5 d 的线虫, 用 RNAgents 总 RNA 分离试剂盒提取总 RNA。按反转录试剂盒要求, 取 1 μ g 总 RNA 为模板, 加入 0.5 μ g Oligo (dT)₁₈ 为反转录引物, 72 °C 变性 5 min, 冰浴 2 min, 然后依次加入 4 μ L 5 $\times$ reaction buffer, 1 μ L Ribonuclease inhibitor (20 U/ μ L), 2 μ L 10 mmol/L dNTP, 37 °C 5 min, 加入 1 μ L RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L), 加 ddH₂O 至 20 μ L, 42 °C 反应 1 h, 70 °C 10 min 终止反应。

1.2.2 *fat-1* 基因的 PCR 扩增 取 2 μ L cDNA 进行 PCR 扩增。反应体系为: 5 μ L 10 $\times$ PCR buffer, 5 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 10 μ mol/L 引物 1F 和 1R 各 5 μ L, 1 μ L Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ L), 加 ddH₂O 至 50 μ L。扩增条件为: 94 °C 1 min; 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min, 34 个循环; 然后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后, 将约 1.2 kb 的目的片段回收并克隆到 pGEM-T Easy 载体上 (TA 克隆), 转化大肠杆菌 DH10B, 蓝白斑筛选, 将阳性克隆送上海英骏公司测序。

1.3 pGEX-*fat1*-N 重组表达质粒的构建及鉴定

重组表达质粒 pGEX-*fat1*-N 的构建见图 1。将线虫 *fat-1* 基因 PCR 扩增产物 TA 克隆后, 挑阳性克隆经 *Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切, 酶切产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后回收, 与经同样酶切处理的 pGEX-4T-2 载体连接, 构建重组表达质粒 pGEX-*fat1*-N。连接产物电击转化大肠杆菌 DH10B, 用碱裂解法提取质粒, 进行 *Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切鉴定, 将阳性克隆送上海英骏公司测序。

1.4 融合蛋白 GST-*fat1*-N 的原核表达及纯化

1.4.1 原核表达 重组质粒 pGEX-*fat1*-N 电击转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。挑取单菌落接种 2 $\times$ YTA 培养液中, 37 °C 培养过夜。次日以体积比 1 : 100 接种至 2 $\times$ YTA 培养液中。37 °C 振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~ 0.8, 加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (Isopropyl-

β D-thiogalactopyranosid, IPTG) 至终浓度 0.2 mmol/L, 37℃ 诱导表达 4 h, 离心收集菌体。

1.4.2 纯化 菌体用预冰冷 1×PBS 溶液 (pH 7.4) 重悬后, 加入 2×SDS-PAGE 上样缓冲液, 沸水浴 10 min, 室温 13 000 r/min 离心 5 min 后吸取上清液, 120 g/L 的 SDS-PAGE 分析表达结果, 以诱导前样品为对照。表达的融合蛋白 GST-*fat1*-N 过谷胱甘肽-琼脂糖树脂柱, 用含游离谷胱甘肽的缓冲液洗脱, 收集洗脱液, 用 120 g/L 的 SDS-PAGE 分析纯化结果。

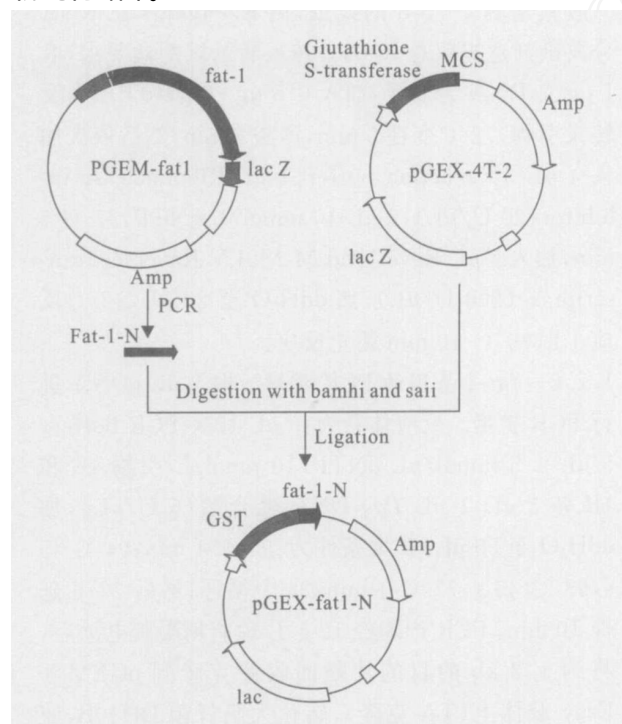


图 1 重组表达质粒 pGEX-*fat1*-N 的构建示意图

Fig 1 Schematic representation of the expression plasmid pGEX-*fat1*-N

1.5 GST-*fat1*-N 融合蛋白抗血清的制备

纯化的 GST-*fat1*-N 融合蛋白用 Bradford 蛋白质定量测定试剂盒定量。定量的融合蛋白交中国科学院遗传与发育生物学研究所实验动物中心制备抗血清, -70℃ 保存。

1.6 GST-*fat1*-N 融合蛋白抗血清效价的测定

取少量血清进行间接酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA) 测定其效价。用 0.05 mol/L Na_2CO_3 - NaHCO_3 (pH 9.6) 包被液将纯化的融合蛋白稀释为 0.01 mg/mL, 按每孔 1 μ g (100 μ L) 加至酶标板中, 4℃ 包被过夜。PBST (含体积分数 0.05% 吐温-20 的 PBS) 洗涤酶标板 3 次后, 每孔加 200 μ L 封闭液 (含体积分数 5

g/L BSA 的 PBST) 于 37℃ 封闭 1 h。用 PBST 洗板 3 次后, 将待测血清与免疫前血清分别用封闭液从 1:10 开始倍比稀释, 每孔加 100 μ L, 37℃ 温育 1 h。用 PBST 再次洗板 3 次后, 向每孔中加入 100 μ L 1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 温育 1 h。用 PBST 洗板 3 次, 每孔加入 100 μ L 显色液 (磷酸-柠檬酸缓冲液, 临用时加终浓度为 0.4 mg/mL 邻苯二胺和 1.5 μ L/mL 体积分数 30% H_2O_2), 室温避光反应 5 min, 加入 50 μ L 2 mol/L H_2SO_4 终止反应。Bio-Rad 450 全自动酶标仪测定各孔在 490 nm 的吸光值 (OD 值)。

2 结果与分析

2.1 线虫 *fat-1* 基因全长的扩增

RT-PCR 扩增得到长度约 1.2 kb 的片段 (图 2)。将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 测序结果显示扩增序列与 NCBI 上序列一致。

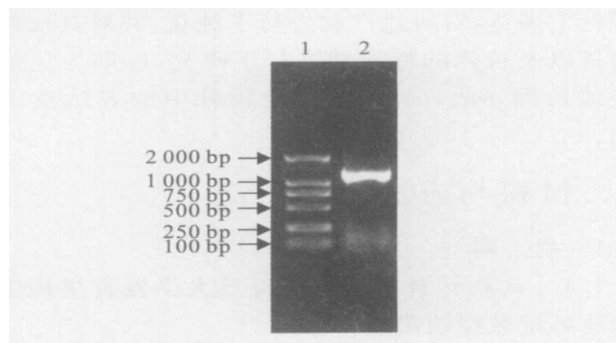


图 2 线虫 *fat-1* 基因的 RT-PCR 产物电泳图谱
1 DNA 分子量标样; 2 *fat-1* 基因

Fig 2 Electrophoresis pattern of RT-PCR product of *fat-1* gene
1 DNA Marker; 2 *fat-1* gene

2.2 线虫 *fat-1* 基因原核表达载体的鉴定

线虫 *fat-1* 基因 N 端 203 bp 扩增结果见图 3, TA 克隆后对阳性克隆进行酶切连入表达载体 pGEX-4T-2。用 *Bam*H I 和 *Sal*I 双酶切, 结果 (图 4) 与预期相符, 测序后结果表明重组表达质粒 pGEX-*fat1*-N 构建成功。

2.3 重组表达质粒 pGEX-*fat1*-N 在大肠杆菌中的表达

将重组表达质粒 pGEX-*fat1*-N 转化大肠杆菌 BL 21 (DE3), 经 IPTG 诱导后将得到的细菌总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 结果见图 5。由图 5 可知, 表达的融合蛋白 GST-*fat1*-N 约为 34 ku, 与估计的理论值一致。

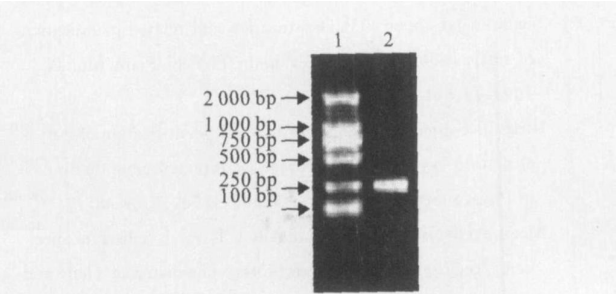


图 3 线虫 *fat-1* N 端 PCR 产物电泳图谱
1. DNA 分子量标样;2. PCR 产物
Fig. 3 Electrophoresis pattern of PCR
of *fat-1* N terminal
1. DNA Marker;2. PCR product

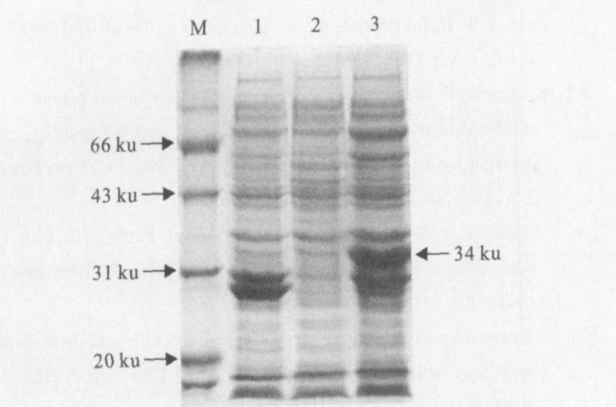


图 5 GST-*fat1*-N 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白标样;1. 经 IPTG 诱导的转化有 pGEX-4T-2 的 BL21(DE3);
2. 未经 IPTG 诱导的转化有 pGEX-*fat1*-N 的 BL21(DE3);3. 经
IPTG 诱导的转化有 pGEX-*fat1*-N 的 BL21(DE3)
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of GST-*fat1*-N fusion protein
M. Low protein NW Marker;1. Total protein of *E. coli* BL21(DE3)
transformed by pGEX-4T-2,induced by IPTG;2. Total protein of *E. coli* BL21(DE3) transformed by pGEX-*fat1*-N, not induced by
IPTG;3. Total protein of *E. coli* BL21(DE3) transformed by pGEX-*fat1*-N,induced by IPTG

2 4 融合蛋白 GST-*fat1*-N 的纯化

用谷胱甘肽-琼脂糖亲和层析纯化 GST-*fat1*-N 融合蛋白, 结果见图 6。由图 6 可知, 第四泳道蛋白是纯化程度较高的 GST-*fat1*-N 融合蛋白, 分子量

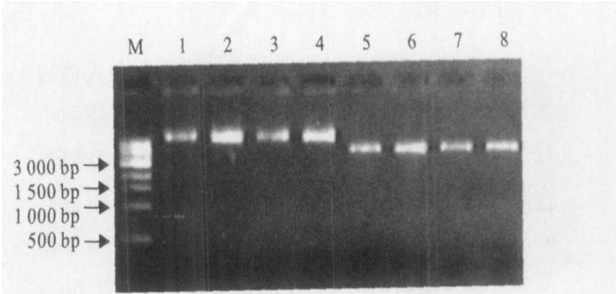


图 4 重组表达载体 pGEX-*fat1*-N 的双酶切电泳图谱
1. DNA 标样;1~4. pGEX-*fat1*-N 质粒 DNA;5~8. 双酶切产物
Fig. 4 Electrophoresis pattern of plasmid DNA and
double digestion of the expression vector pGEX-*fat1*-N
1. DNA Marker;1~4. Plasmid DNA of pGEX-*fat1*-N;
5~8. Digestion products of pGEX-*fat1*-N
约为 34 ku,蛋白纯度大于 90%,产量为 3.5 mg/L。

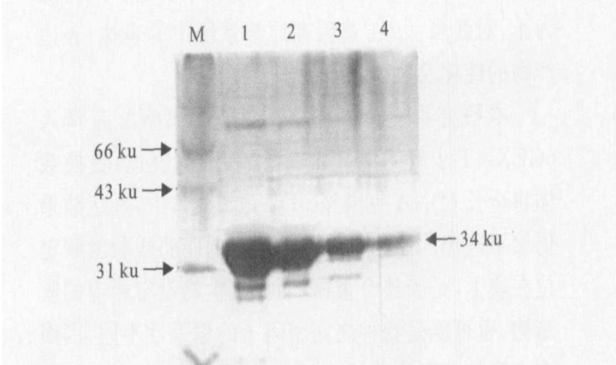


图 6 GST-*fat1*-N 融合蛋白的纯化
M. 低分子量蛋白标样;1~4. 依次为洗脱
1~4 次得到的 GST-*fat1*-N 融合蛋白
Fig. 6 Purification of GST-*fat1*-N fusion protein
M. Low protein MW Marker;1~4. Purified
GST-*fat1*-N fusion protein eluted
by adding elution buffer, respectively

2 5 GST-*fat1*-N 融合蛋白血清抗体的效价

结果显示, 制备的抗血清可以有效地识别在原核生物体内表达的融合蛋白。由表 1 可知, 按 P/N 值 ≥ 2.1 判为阳性的标准(P 为待测血清的 OD 值, N 为免疫前血清的 OD 值), 抗体效价已达到 1×10^7 。

表 1 EL ISA 法检测 GST-*fat1*-N 融合蛋白抗体的效价

Table 1 Determination of GST- <i>fat1</i> -N fusion protein antibody titer by ELISA														
血清类型 Species of serum	各稀释倍数的OD 值 Serum OD value													
	1	10	1	10 ²	1	10 ³	1	10 ⁴	1	10 ⁵	1	10 ⁶	1	10 ⁷
免疫前血清 Control	2	188	0	730	0	116	0	024	0	009	0	006	0	007
抗血清 Antibody	*	*	*	*	*	*	*	*	2	081	1	636	0	828

注: * 表示OD₄₉₀> 2.500。 Note: * stands for OD₄₉₀> 2.500

3 讨 论

由于 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸在哺乳动物和人体内无法合成, 但其对诸多疾病有着很重要的预防和治疗作用^[9-15], 现已成为营养学和临床医学研究的热点。线虫 *fat-1* 基因编码的脂肪酸脱氢酶可以提高 $\omega 3$ 多不饱和脂肪酸的含量, 并能有效改善 $\omega 6$ 脂肪酸和 $\omega 3$ 脂肪酸的比例。鉴于此, 研究线虫 *fat-1* 基因的表达, 尤其是在哺乳动物中的表达, 对于提高哺乳动物体内 $\omega 3$ 不饱和脂肪酸的含量具有重要的意义。

为了将线虫 *fat-1* 基因在哺乳动物中表达, 并对其功能进行研究, 首先要得其全部序列、编码的蛋白及其抗体。Spychalla 等^[5]于 1997 年首先克隆了 *fat-1* 基因, 并在植物拟南芥中进行了表达。到目前为止, 对线虫 *fat-1* 基因在原核系统中的表达、表达产物的纯化及抗体制备尚未见报道。

本研究将克隆到的 *fat-1* 全长 cDNA 克隆入 pGEX-4T-2 载体中, 但未获得满意的表达; 更换载体将全长 cDNA 克隆至 pET-28a 载体中, 表达结果仍然不理想。原因可能是其编码的脂肪酸脱氢酶定位在膜上, 是膜整合蛋白, 而原核生物没有相应的膜结构; 也可能是物种之间密码子的偏爱性不同, 因而在大肠杆菌中表达线虫 *fat-1* 基因全长 cDNA 是非常困难的。但将 *fat-1* N 端亲水区克隆至 pGEX-4T-2 载体中, 表达量较高。

获得高纯度的、足量的蛋白是制备抗体、研究蛋白质的结构和功能所必需的。本研究诱导表达了大量的融合蛋白 GST-*fat1*-N, 并对目的蛋白进行了亲和层析纯化, 获得了高纯度的 GST-*fat1*-N 蛋白。用得到的蛋白抗原制备的抗体, 经 ELISA 检测, 抗体效价达到 1×10^7 , 为该基因在其他物种中的表达验证提供了依据。

[参考文献]

- [1] Heinz E. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids [C]// Moore T. S. Lipid Metabolism in Plants. Boca Raton: CRC

Press, 1993: 33-89

- [2] Shanklin J, Cahoon E B. Desaturation and related modification of fatty acids [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1998, 49: 611-641.
- [3] Girke T, Schmidt H, Zahringer U, et al. Identification of a novel delta 6-acyl-group desaturase by targeted gene disruption in *Physcomitrella patens* [J]. Plant J, 1998, 15: 39-48.
- [4] Meesapyodsuk D, Reed D W, Savile C K, et al. Substrate specificity, regioselectivity and cryptoregiochemistry of plant and animal omega-3 fatty acid desaturases [J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28: 632-635.
- [5] Sychalla J P, Kinney A J, Brow se J. Identification of an animal omega-3 fatty acid desaturase by heterologous expression in *A. rhabdopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94: 1142-1147.
- [6] Sinopoulos A P. Essential fatty acids in health and chronic disease [J]. Am J Clin Nutr, 1999, 70 (Suppl): 560-569.
- [7] Connor W E. Importance of $\omega 3$ fatty acids in health and disease [J]. Am J Clin Nutr, 2000, 71 (Suppl): 171-175.
- [8] Kitajka K, Puskas L G, Zvara A, et al. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99: 2619-2624.
- [9] Salem N Jr, Sinopoulos A P, Galli C, et al. Fatty acids and lipids from cell biology to human disease [J]. Lipids, 1996, 31 (Suppl): 1-326.
- [10] Sinopoulos A P. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development [J]. Am J Clin Nutr, 1991, 54: 438-463.
- [11] Sinopoulos A P, Kifer R R, Martin R E, et al. Health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods [M]. Orlando FL: Academic Press, 1986: 315-386.
- [12] Galli C, Sinopoulos A P. Dietary n-3 and n-6 fatty acids: biological effects and nutritional essentiality [M]. New York: Plenum Press, 1989: 203-245.
- [13] Sinopoulos A P, Kifer R R, Martin R E, et al. Health effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in seafoods [J]. World Rev Nutr Diet, 1991, 66: 1-592.
- [14] Galli C, Sinopoulos A P, Tremoli E, et al. Fatty acids and lipids: biological aspects [J]. World Rev Nutr Diet, 1994, 75: 1-197.
- [15] Galli C, Sinopoulos A P, Tremoli E, et al. Effects of fatty acids and lipids in health and disease [J]. World Rev Nutr Diet, 1994, 76: 1-152.