

## 抗热休克蛋白 72 多克隆抗体血清的制备和检测

黄帆 徐康 吴兴刚 马中富 林正

**【摘要】** 目的 探讨在大肠杆菌中表达人热休克蛋白 72(hHSP72)与组氨酸(His)的融合蛋白并制备其抗体血清的方法。方法 将 hHSP72 片断插入 His 融合表达载体 pPROEX-1<sup>TM</sup>, 重组载体酶切鉴定后, 在大肠杆菌中经异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达获得 His-hHSP72 融合蛋白。采用纯化后的 HSP72 免疫新西兰白兔, 制备抗血清; 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测重组抗原的免疫活性。结果 重组质粒酶切鉴定结果表明, hHSP72 基因已正确插入到 pPROEX-1<sup>TM</sup> 中, 经 IPTG 诱导后, 表达出分子质量约为 73 ku 的蛋白, 获得了效价为 1:100 000 的多克隆抗体。Western blot 检测证明, 所制备的多克隆抗体可以与 hHSP72 特异性结合, 其效价高于市售的单克隆抗体。结论 用 hHSP72 片断在大肠杆菌中能成功表达, 并能制备得到多克隆抗体; 这种多克隆抗体是一种新的高特异性和高灵敏度的试剂。

**【关键词】** 热休克蛋白 72; 载体构建; 多克隆抗体

**Preparation and identification of polyclonal antiserum against heat shock protein 72** HUANG Fan\*, XU Kang, WU Xing-gang, MA Zhong-fu, LIN Zheng. \* Department of Neuroscience, The First Hospital Affiliated of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, Guangdong, China  
Corresponding author: MA Zhong-fu (Email: ma\_zf@tom.com)

**【Abstract】** **Objective** To express fusion protein of histamine (His) and human heat shock protein 72 (hHSP72) in Escherichia coli (E. coli), and to prepare hHSP72 antiserum in rabbit. **Methods** hHSP72 gene was inserted into pPROEX-1<sup>TM</sup>. The recombinant vector was identified by restriction endonuclease digestion analysis and sequence. Fusion protein His-hHSP72 was expressed in E. coli under isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) induction. The rabbit antibody against His-hHSP72 was prepared by using purified His-hHSP72 protein as immunogen, and the specificity and sensitivity of polyclonal antibody were identified by Western blot. **Results** The restriction endonuclease digestion analysis of recombinant plasmid and sequence demonstrated that the hHSP72 gene had been exactly inserted into pPROEX-1<sup>TM</sup>. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis showed that the relative molecular mass of the fusion protein was about 73 ku. Western blot result proved that the rabbit polyclonal antiserum could fuse with over 20 ng hHSP72 protein when diluted to 1:100 000. **Conclusion** The polyclonal antibody against hHSP72 can be prepared in E. coli, it is a new reagent with high specificity and sensitivity for the research of hHSP72.

**【Key words】** heat shock protein72; construction of vector; polyclonal antibody

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)普遍存在于真核和原核细胞中。它们是一组结构上非常保守的蛋白质, 其中 HSP72 是一个可以被应激所诱导并在应激中发挥分子伴侣作用的重要蛋白质<sup>[1]</sup>。静息状态下, 细胞内 HSP72 处于低水平, 当细胞受到某种应激因素作用时, HSP72 的转录和翻译都迅速增加。细胞内的 HSP72 能够抑制蛋白降解, 使蛋白质肽链重新折叠, 恢复蛋白质功能, 提高细胞在应

激时的存活率。所以 HSP72 的诱导不仅仅是细胞应激结果, 更是细胞受刺激后的抗衰老表现。研究指出: HSP72 能够保护神经元、心、肾、肠、肝细胞免受热和(或)缺血诱导的细胞凋亡和细胞坏死, 并将蛋白质分子移位至线粒体、内质网或叶绿体内发挥作用, 使细胞蛋白质恢复原有的功能<sup>[2,3]</sup>; 单核细胞的胞内 HSP72 诱导能够抑制炎症因子释放, 维护细胞基本生存<sup>[4]</sup>。为了深入研究 HSP72 的性质和功能, 更清楚地分析细胞的保护机制以及为阐明某些疾病的发生机制创造条件, 本研究旨在构建一个能够在原核细胞高效表达 HSP72 的载体, 优化表达条件, 获取大量高纯度的 HSP72, 用纯化的 HSP72 作为抗原免疫新西兰大白兔, 获得效价高、特异性高的抗 HSP72 多克隆抗体血清, 为研究 HSP72 的相关功能提供条件。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070829); 广东省自然科学基金资助项目(5001731)

作者单位: 510080 广州, 中山大学附属第一医院神经内科(黄帆), 中心实验室(徐康, 吴兴刚, 林正), 普内科(马中富)

通讯作者: 马中富, 教授, 博士研究生导师, 主任医师 (Email: ma\_zf@tom.com)

作者简介: 黄帆(1965-), 男(汉族), 广东人, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 主要从事衰老和脑血管病的基础和临床研究。

## 1 材料和方法

**1.1 材料:**各种限制性内切酶及 T4DNA 连接酶购自 New England Biolabs. Inc; 免疫印迹化学发光法 (ECL Western) 检测药盒购自 Amersam Pharmacia Biotech 公司; pH2.3 - HSP72 重组质粒由美国 RUGERS 大学实验室赠送; 载体 pPROEX - 1<sup>TM</sup> 购自 Invitrogen Inc; 抗 HSP72 单克隆抗体 SPA - 80、辣根过氧化物酶 (HRP) - 羊抗兔 IgG 购自 Stress-Gen 公司; 健康雄性新西兰白兔由本院实验动物中心提供; 弗氏佐剂购自 Gibico BRL 公司; 感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自 Invitrogen Inc。

### 1.2 方法

**1.2.1 pEX - HSP72 的构建:**首先用 BamH I 酶切开目的蛋白 pH 2.3 - HSP72 重组质粒, 然后用绿豆核酸酶纯化其 5' 端, 提纯后再用 Hind III 处理纯化后的 DNA 片段, 再克隆至原核细胞高效表达载体 pPROEX - 1<sup>TM</sup> 中。构建成的 pEX - HSP72 于 37 °C 转化入 DH5 $\alpha$  菌株。培养后鉴定阳性菌落, 提取质粒进行酶切和 DNA 序列鉴定。

**1.2.2 确定异丙基 -  $\beta$  - D - 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导目的蛋白的最佳浓度:**挑取 pEX - HSP72 转化的 DH5 $\alpha$  菌落, 在 LB 培养液中 37 °C 振荡过夜, 次日将该菌液以 1 : 20 接种于含有氨苄青霉素的多管 LB 培养基中, 继续于 37 °C 振荡培养 1 h, 然后分别加入 0 ~ 2.0 mmol IPTG 诱导表达 4 h。4 °C 离心收集菌体经裂解后, 使用 QIAGEN 公司的镍亲和试剂盒纯化组氨酸 (His) - HSP72。用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 鉴定 IPTG 诱导目的蛋白的最佳浓度。

**1.2.3 蛋白质免疫印迹法 (Western blot):**混合不同量的纯化 HSP72 与 5  $\mu$ g 转化 pPROEX - 1<sup>TM</sup> 的 DH5 $\alpha$  细菌总蛋白, 用质量分数为 10% 的 PAGE 后, 然后通过 SD - Dry 半干转移槽把凝胶中的蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。用不同稀释度的抗 HSP72 多克隆抗体血清和抗 HSP72 单克隆抗体作为第一抗体, 使用 ECL 药盒检测结果。

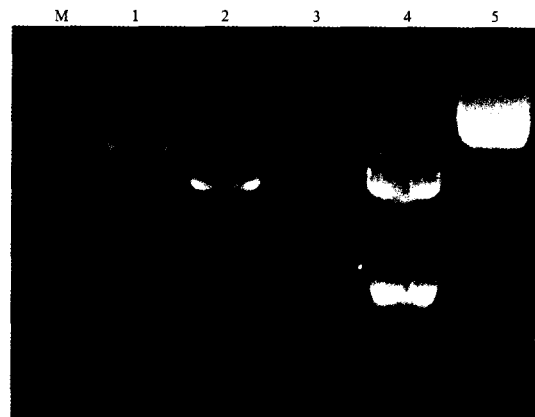
**1.2.4 兔抗 His - hHSP72 融合蛋白抗体的制备:**使用 Qiagen 提供的 Ni - NTA agrose 试剂盒提纯 His 标记的目的蛋白。采用大体积细菌裂解液与 Ni - NTA agrose 混合、多次洗脱, 小体积溶解缓冲液溶解目的蛋白的方法, 经纯化后再用聚乙二醇 8000 (PEG8000) 浓缩。以成年雄性新西兰白兔作为免疫对象, 免疫前取血制备免疫前血清作为对照。用纯化后的 His - HSP72 融合蛋白作为免疫原, 初次

皮下多点注射 500  $\mu$ g 混合完全弗氏佐剂的融合蛋白, 免疫后 21 d 及 28 d 分别用 250  $\mu$ g 融合蛋白和完全弗氏佐剂加强免疫 2 次, 满 5 周制备血清进行检测。

**1.2.5 His - HSP72 免疫后的兔血清对人、鼠细胞表达 HSP72 的特异性:**42 °C 热处理人 HeLa 细胞和鼠 N18 神经母细胞瘤细胞 2 h, 37 °C 继续孵育 4 h 和 8 h 后收获细胞, 未热处理的 HeLa 和 N18 细胞作为对照; 按林正等<sup>[5]</sup>方法制备全细胞提取液, 经 10% PAGE 后, 用 1 : 10 000 稀释的抗 HSP72 多克隆抗体血清进行 Western blot 检测。

## 2 结果

**2.1 重组表达载体的构建及酶切鉴定:**图 1 显示 pEX - HSP72 酶切鉴定图谱, 泳道 4 显示经 Stu I 和 Hind III 双酶切后, pEX - HSP72 被分为约 5.0 kb 的载体 pPROEX - 1<sup>TM</sup> 和 2.4 kb 的 HSP72 DNA 带。DNA 的测序结果亦证实, 在预期位点上插入了目的片段。



M: 1 kb DNA Marker; 1: 载体 pPROEX - 1<sup>TM</sup> DNA;  
2: Stu I / Hind III 双酶切后的线性 pPROEX - 1<sup>TM</sup> DNA;  
3: 连接用片段 HSP72 DNA; 4、5: pEX - HSP72 经  
Stu I / Hind III 双酶切后 5.0 kb 的载体 pPROEX - 1<sup>TM</sup> DNA 带  
和 2.4 kb 的 HSP72 DNA 带

图 1 重组表达载体 pEX - HSP72 酶切鉴定

Figure 1 Analysis of restriction endonuclease digestion on recombinant expression vector pEX - HSP72

**2.2 HSP72 在原核细胞中的表达:**图 2 显示, 含有目的蛋白基因的原核表达质粒 pEX - HSP72 能在 DH5 $\alpha$  细菌中被 IPTG 严谨地调节目蛋白的表达, 当 IPTG 含量低于 0.2 mmol/L 时没有 HSP72 表达, 而 IPTG 浓度从 0.4 ~ 2.0 mmol/L 均出现明显的 HSP72 表达。图 3 显示, 1 mmol/L IPTG 诱导表达后再用 QIAGEN 公司的 Ni - NTA His 吸附胶进行纯化结果, 泳道 1、2 表示高浓度的目的蛋白, 泳

道 3 为纯化前的细菌总蛋白质。

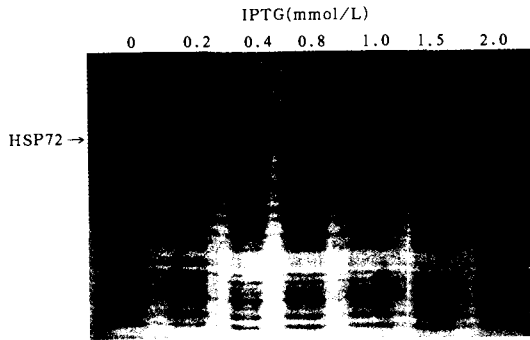
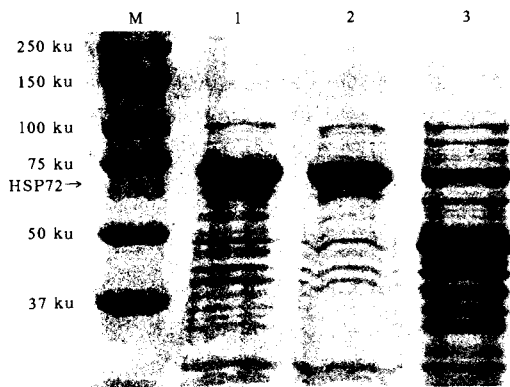


图 2 10% SDS - PAGE 诱导表达目的蛋白的 IPTG 浓度分析  
Figure 2 Analysis of different concentrations of IPTG for inducing HSP72 protein expression with 10% SDS - PAGE



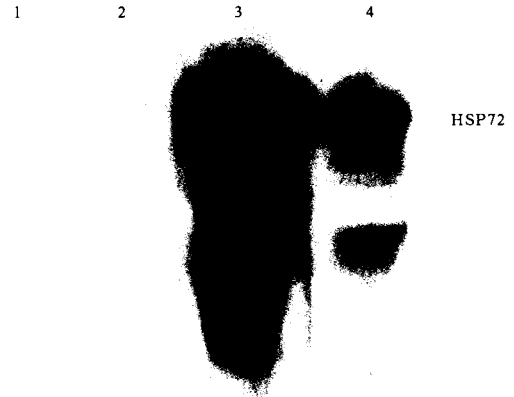
M: Marker; 1, 2: 经纯化后的 HSP72 蛋白质;  
3: 从 DH5α 细菌分离的总蛋白质

图 3 10% SDS - PAGE 分析目的蛋白的纯化  
Figure 3 Purification of HSP72 protein analyzed by 10% SDS - PAGE

2.3 His - HSP72 免疫兔血清对细菌表达 HSP72 的特异性和敏感性: 图 4 结果显示, 100 ng 纯化的 HSP72 经 10% 的 PAGE 作用后, 用免疫前后兔血清作为抗体进行 Western blot 检测。泳道 1, 2 使用免疫前兔血清(稀释 1 : 5 000 和 1 : 50 000)在预期位置未出现条带; 泳道 3, 4 使用免疫后兔血清(稀释 1 : 5 000 和 1 : 50 000)出现了特异的 HSP72 带。图 5 结果显示, 用不同量纯化 HSP72 与 5 μg 转化了 pPROEX - 1™ 的 DH5α 细菌总蛋白混合后进行 SDS - PAGE, 以不同稀释度抗 HSP72 多克隆抗体血清或抗 HSP72 单克隆抗体进行对比的 Western blot 检测结果显示, 抗 HSP72 多克隆抗体血清在以 1 : 100 000 倍比稀释后能清晰检测出 20 ng 水平以上的 HSP72 抗原。

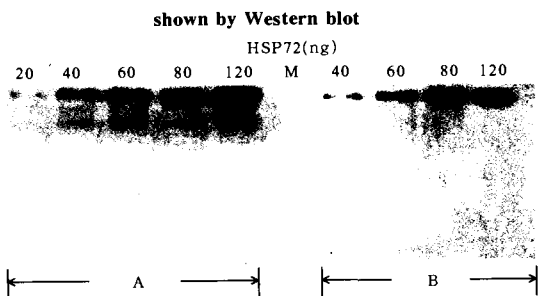
2.4 His - HSP72 免疫兔血清对人、鼠细胞 HSP72 抗原的特异性(图 6); Western blot 显示真核细胞表达的 HSP72。无论在 HeLa 细胞(图 6A)或鼠 N18

神经母细胞瘤细胞(图 6B)用 1 : 10 000 稀释的抗 HSP72 多克隆抗体血清进行检测都可见清晰的特异性 HSP72 带。



1, 2: 免疫前兔血清; 3, 4: 免疫后兔血清  
图 4 Western blot 显示 HSP72 免疫前后兔血清对 100 ng 纯化的 HSP72 抗原反应

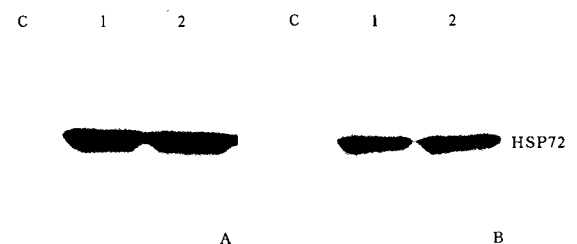
Figure 4 Immunoreactions of rabbit serum to 100 ng purified HSP72 before and after immunization



A: 第一抗原为 1 : 100 000 抗 HSP72 多克隆抗体血清;  
B: 第一抗原为 1 : 1 000 抗 HSP72 单克隆抗体; M: Marker

图 5 Western blot 显示抗 HSP72 多克隆抗体血清的特异性和灵敏度

Figure 5 Specificity and sensitivity of anti-HSP72 polyclonal serum shown by Western blot



A: 人 HSP72 抗原; B: 鼠 HSP72 抗原; C: 空白对照;  
1: 细胞孵育 4 h; 2: 细胞孵育 8 h

图 6 Western blot 显示 1 : 10 000 抗 HSP72 多克隆抗体血清对 HSP72 抗原的特异性

Figure 6 Specificity of 1 : 10 000 anti-HSP72 polyclonal serum to HSP72 shown by Western blot

### 3 讨论

本实验在 pPROEX-1<sup>TM</sup>基础上构建了原核细胞高效表达 HSP72 的 pEX-HSP72 重组质粒。pPROEX-1<sup>TM</sup>的优点是能在 DH5 $\alpha$  细菌中高拷贝数复制具有 Trcq 促进子和 LacIq 基因,单拷贝的 LacIq 等位基因表达过来 10 倍的 lac 阻遏物,确保目的蛋白的紧密性调节,使目的蛋白能被 IPTG 高效诱导表达,使具有 IPTG 诱导启动子的质粒表达外源蛋白的总量可以达到全细菌蛋白的 30% 以上;pPROEX-1<sup>TM</sup>具有 6xHis-Tag 结构,易分离纯化目的蛋白,而不影响目的蛋白结构<sup>[6,7]</sup>。

用表达的融合蛋白制备抗体时需高浓度和高纯度的抗原。本实验用 Qiagen 的 Ni-NTA agarose 试剂盒提纯 His 标记的目的蛋白,采用大体积细菌裂解液与 Ni-NTA agarose 混合,多次洗脱,小体积溶解缓冲液溶解目的蛋白的方法,纯化后用 PEG8000 浓缩,从而取得高浓度和高纯度的目的蛋白 HSP72。

制备抗 HSP70 多克隆抗体的目的是为了进行真核细胞 HSP72 的相关研究,考虑到由原核细胞表达的蛋白与真核细胞表达的蛋白间差异性,用原核细胞表达的蛋白质作为抗原诱导的抗体会丧失某些结构的特异性。为证实制备抗 HSP70 多克隆抗体对真核细胞的作用,本实验选取人 HeLa 细胞和鼠 N18 神经母细胞瘤细胞作为对象并对细胞进行热休克处理。结果显示,抗 HSP72 多克隆抗体血清能在 1:10 000 稀释时检测出真核细胞表达的 HSP72。

尽管已有市售的抗 HSP72 单克隆抗体,但其制备过程复杂、价格高昂,且效价不高,仅从 1:200~

1:1 000 不等。本研究制备的 HSP72 抗血清不需要纯化则可以直接用于对 HSP72 的检测,在倍比稀释 1:100 000 时,能检测出 20 ng 以上细菌表达的 HSP72 蛋白;并且能够特异地检测出经热休克处理后 HeLa 和 N18 细胞表达的 HSP72 蛋白,证实该抗 HSP72 多克隆免疫血清的高效性和高特异性。该免疫血清的制备为进行大量有关 HSP72 研究提供了较好的基础,也提供了一条比较简洁地制备高效多克隆抗体的途径,为其他抗体制备提供了一个参照。

### 参考文献:

- 1 Manalo D J, Lin Z, Liu A Y. Redox-dependent regulation of the conformation and function of human heat shock factor 1 [J]. *Biochemistry*, 2002, 41: 2580-2588.
- 2 Black P H, Garbutt L D. Stress, inflammation and cardiovascular disease [J]. *J Psychosom Res*, 2002, 52: 1-23.
- 3 Basu S, Binder R J, Suto R, et al. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int Immunol*, 2000, 12: 1539-1546.
- 4 Ding X Z, Fernandez-Prada C M, Bhattacharjee A K, et al. Over-expression of hsp-70 inhibits bacterial lipopolysaccharide-induced production of cytokines in human monocyte-derived macrophages [J]. *Cytokine*, 2001, 16: 210-219.
- 5 林正, 罗兰, 张式鸿, 等. 谷胱甘肽合成抑制对人热激因子 1 结合 DNA 功能的影响 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2003, 24: 540-543.
- 6 Walsh R C, Koukoulas I, Garnham A, et al. Exercise increases serum HSP72 in humans [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6: 386-393.
- 7 Chandrashekar R, Curtis K C, Rawot B W, et al. Molecular cloning and characterization of a recombinant *Histoplasma capsulatum* antigen for antibody-based diagnosis of human histoplasmosis [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35: 1071-1076.

(收稿日期: 2006-04-29 修回日期: 2006-08-12)

(本文编辑: 李银平)

## • 科研新闻速递 •

### 缺血/再灌注联合盲肠结扎穿孔术大鼠肠系膜血管白细胞与内皮细胞的相互作用

失血性休克导致的缺血/再灌注(HS/R)损伤常诱发脓毒症和微循环紊乱,甚至多器官功能障碍综合征(MODS)。巴西学者最近进行了一项研究,对大鼠实施 HS/R 联合盲肠结扎穿孔术(CLP),随后行盲肠切除加腹腔灌洗(REL),观察肠系膜血管中白细胞与内皮细胞的相互作用。实验中将 81 只 Wistar 大鼠(200~250 g)随机分为 3 组:①对照组:无 HS/R 损伤;②HS/R 损伤 I 组:HS 加 25% 失血量的血液进行再灌注;③HS/R 损伤 II 组:HS 加 25% 失血量的血液以及 3 倍失血量的乳酸林格液(LRS)再灌注。3 组动物 24 h 后全部行 CLP,再过 24 h 行 REL。通过活体显微镜观察、免疫组化法检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的表达来评估白细胞与内皮细胞间相互作用的变化,同时观察肺组织 ICAM-1 表达和中性粒细胞浸润情况。与对照组相比,HS/R 损伤 I 组和 HS/R 损伤 II 组大鼠的白细胞黏附均增加 5 倍,聚集增加了 7 倍;而 ICAM-1(0.5 倍)和血小板选择蛋白(0.5 倍)的表达均减少。REL 可使 HS/R 损伤 I 组大鼠的肠系膜血管白细胞与内皮细胞间相互作用恢复正常,而 HS/R 损伤 II 组大鼠的白细胞黏附和聚集虽有所减少,但未恢复正常。对肺组织 ICAM-1 表达和中性粒细胞浸润的观察结果与肠系膜血管类似。由此认为,HS/R+CLP+REL 并活体观察肠系膜微循环的大鼠模型是适于研究机体局部和广泛炎症反应的模型。该实验结果提示,采用外科手术清除引起脓毒症的病灶对控制脓毒症和 MODS 有重要意义。

车晋伟, 编译自《Shock》, 2006, 26: 180-186; 胡森, 审校