

3 讨论

本实验在 pPROEX-1TM基础上构建了原核细胞高效表达 HSP72 的 pEX-HSP72 重组质粒。pPROEX-1TM的优点是能在 DH5 α 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-1TM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^[6,7]。

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- κ 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