

利用多克隆抗体检测纺锤体蛋白基因 *INMAP* 在肝癌细胞中的表达

朱艳^{1,2}, 康璟妍^{1,4}, 王钰¹, 孙乐³, 张海江^{3,5}, 梁前进^{1,2}

1. 北京师范大学生命科学学院, 抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室, 北京 100875
2. 北京师范大学生命科学学院, 细胞增殖与调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875
3. 京天成生物技术(北京)有限公司, 北京 101111
4. 兰州市第四中学, 兰州 730050
5. 北京康乐卫士生物技术股份有限公司, 北京 100176

摘要 为探究纺锤体蛋白 INMAP 的功能及其在细胞恶性增殖中发挥的作用, 制备 INMAP 多克隆抗体。利用 0.1 mmol/L IPTG 于 16°C 诱导 His-INMAP 融合蛋白进行原核表达, SDS-PAGE 及免疫印迹检测蛋白表达。4.0 mol/L 尿素处理包涵体获得可溶性融合蛋白, 镍亲和柱分离纯化融合蛋白抗原并检测蛋白浓度及纯度。以所获抗原免疫 4 只 Balb/c 小鼠, 收集心脏抗血清。以纯化前、后的原核表达产物作为抗原, 检测 INMAP 多克隆抗体的特异性。通过免疫印迹分析 INMAP 在正常肝细胞系 L-02 及 5 个肝癌细胞系 (PLC、HepG2、SUN449、SMMC-7721 和 BEL-7402) 中的表达差异。结果显示, His-INMAP 融合蛋白主要以包涵体形式存在, 经 4.0 mol/L 尿素处理可获得可溶性目的蛋白, 且纯化后的抗原纯度较高 (94.1%)。INMAP 多克隆抗体能与 INMAP 抗原特异结合。INMAP 在 6 种肝细胞中具有多态性, 除 PLC 外, 在其他肝癌细胞中其基因表达水平显著下调。本研究制备的 INMAP 多克隆抗体特异性高, 为 INMAP 基因功能的进一步研究奠定了基础。

关键词 INMAP; 肝癌细胞; 多克隆抗体; 包涵体

中图分类号 Q753

文献标志码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2015.01.002

Detecting expression of spindle protein gene *INMAP* in hepatoma cells by polyclonal antibody

ZHU Yan^{1,2}, KANG Jingyan^{1,4}, WANG Yu¹, SUN Le³, ZHANG Haijiang^{3,5}, LIANG Qianjin^{1,2}

1. Beijing Key Laboratory of Gene Resource and Molecular Development, School of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China
2. Key Laboratory for Cell Proliferation and Regulation Biology, Ministry of Education; School of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China
3. AbMax Biotechnology Co., Ltd., Beijing 101111, China
4. No. 4 High School of Lanzhou City, Lanzhou 730050, China
5. Beijing Health Guard Biotechnology Inc., Beijing 100176, China

Abstract To investigate the function of INMAP of spindle protein and its role in malignant cell proliferation, an INMAP polyclonal antibody is prepared. The prokaryotic expression of His-INMAP fusion protein is induced at 16°C by adding 0.1 mmol/L isopropyl- β -

收稿日期: 2014-06-06; 修回日期: 2014-09-30

基金项目:《科技导报》博士生创新研究资助计划项目(kjdb2012003);北京市自然科学基金项目(5122017);北京师范大学抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室开放基金项目(201204,201307);北京师范大学细胞增殖与调控生物学教育部重点实验室开放基金项目(201001)

作者简介:朱艳,博士研究生,研究方向为分子细胞遗传与功能基因,电子信箱:zhzyhmz@163.com;梁前进(通信作者),教授,研究方向为分子细胞遗传与功能基因,电子信箱:Lqj@bnu.edu.cn

引用格式:朱艳,康璟妍,王钰,等.利用多克隆抗体检测纺锤体蛋白基因 *INMAP* 在肝癌细胞中的表达[J].科技导报,2015,33(1):17-21.

D-thiogalactoside (IPTG), which is identified by SDS-PAGE analysis and western blotting assay. The inclusion body is treated with 4.0 mol/L urea to obtain soluble His-INMAP fusion protein antibody, fusion protein is purified using Ni Sepharose High Performance, and then the protein concentration and purity are detected. The purified protein antibody is injected into 4 Balb/c mice, then blood samples are collected from their hearts, and the anti-serum is isolated. The specificity of polyclonal anti-INMAP antibodies in unpurified and purified prokaryotically expressed products are analysed. In addition, the expression difference between normal liver cell L-02 and 5 hepatoma cell (PLC, HepG2, SUN449, SMMC-7721 and BEL-7402) is determined by western blotting assay. The results show that His-INMAP fusion protein mainly exists in insoluble inclusion bodies. Soluble protein is obtained with 4.0 mol/L urea treatment to solubilise inclusion bodies. Highly protein purity (94.1%) is harvested after purification. The polyclonal anti-INMAP antibody can bind antigen specifically. Moreover, INMAP is found existing polymorphically in hepatoma cells and its gene expression is down-regulated significantly in all tested hepatoma cells except PLC cell. Obviously, in this study the anti-INMAP polyclonal antibody is of high specificity, which lays a foundation of further study of INMAP functions.

Keywords INMAP; hepatoma (liver cancer) cell; polyclonal antibody; inclusion body

INMAP(interphase nucleus and mitotic apparatus protein)是一种保守的纺锤体相关蛋白^[1,2],本实验室前期主要从它的分子来源、基因表达和生理功能几个方面证明其很可能是一种调控纺锤体组装的蛋白分子,在维持正常细胞周期进程方面起到重要作用。

INMAP基因定位于12q23.3,其编码的蛋白分子量约38.2 kD;经5'RACE和Northern印迹分析证明为POLR3B的一个差异转录本。经亚细胞定位分析发现该蛋白在细胞有丝分裂间期细胞核内呈点状分布,在分裂期定位于纺锤体微管,而在分裂末期定位于中体。功能研究表明INMAP在纺锤体形成、着丝粒蛋白(CENP-B)保持完整性等方面发挥重要作用^[2,3],跟染色体精确分离息息相关,影响肿瘤细胞的生长命运和增殖属性。INMAP是细胞生命活动中不可或缺的成分,其异常表达影响细胞正常分裂,可致基因组不稳定。为了制备高特异性的INMAP多克隆抗体和研究INMAP在肝癌细胞中的表达差异,本研究通过原核诱导表达重组蛋白、尿素处理包涵体,用镍亲和柱分离纯化的融合蛋白免疫小鼠,获得特异性较高的INMAP多克隆抗体,拟为制备INMAP多克隆抗体提供一种经济、便捷的方法,同时也为细胞恶性增殖机理和抑癌途径的探究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料及主要试剂

1.1.1 菌株、细胞及实验动物

重组载体pET-30a-INMAP由抗性基因资源与分子发育北京市重点实验室构建并保存,阳性重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21菌株由本实验室保存。

正常肝细胞系L-02、3株肝癌细胞系(BEL-7402、SMMC-7721和HepG2)由本实验室保存,2株肝癌细胞系(PLC和SUN449)由北京大学医学部基础医学院教授鲁凤民馈赠。

4只Balb/c小鼠(8~12周龄,雌性,SPF级动物培养)由京天成生物技术(北京)有限公司提供;动物的免疫、培养和抗

血清初检也由该公司进行。

1.1.2 主要试剂

主要试剂包括:鼠源单克隆抗体GAPDH和HRP标记的山羊抗小鼠IG抗体(Santa Cruz,美国),鼠源单克隆抗体His(MBL,日本),ECL发光液试剂盒(Vigorous,中国),DMEM培养基和胎牛血清(Invitrogen,美国),Ni Sepharose High Performance(GE,美国)。

1.2 实验方法

1.2.1 INMAP蛋白的原核诱导表达

挑取单克隆菌落接种于15 mL含卡那霉素(终质量浓度为100 mg/L)的LB液体培养基,37℃、220 r/min培养过夜;重组菌以1:100扩大培养于1 L含卡那霉素(终质量浓度为100 mg/L)的LB表达培养基,37℃、220 r/min培养3 h;*OD*₆₀₀为0.6~0.8时,0.1 mmol/L异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG)16℃低温诱导表达3~4 h;4℃、5000 r/min离心4 min收集菌体;加与菌体等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)进行超声破碎(功率200 W,超声3 s,间隔10 s,工作时间35 min,保护温度45℃),4℃、14000 r/min离心20 min,收集上清和沉淀;参考Wei等^[4]的12% SDS-PAGE和免疫印迹方法,利用His抗体检测融合蛋白的表达。

1.2.2 包涵体的处理

在超声破碎后的沉淀中,加等体积的溶解液(20 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, 4.0 mol/L 尿素),4℃、旋转仪旋转3 h;4℃、14000 r/min离心20 min,收集上清和沉淀;利用考马斯亮蓝染色及免疫印迹分析上清和沉淀,检测包涵体的溶解情况。

1.2.3 融合蛋白的纯化

采用镍亲和柱分离纯化INMAP融合蛋白,根据Ni Sepharose High Performance使用说明书,Ni琼脂糖珠子与包涵体处理后收集的上清按1:10(体积比)混匀,4℃、旋转仪旋转孵育过夜;4℃、1500 r/min离心1 min,收集Ni琼脂糖珠子;分别用浓度为20、40、80、300、500 mmol/L的咪唑缓冲液(20 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 500 mmol/L NaCl)洗涤Ni琼脂糖珠

子,4℃、1500 r/min 离心 1 min,收集上清;采用免疫印迹法对收集的上清进行鉴定,用分光光度计和 12% SDS-PAGE 检测蛋白浓度和纯度。

1.2.4 多克隆抗体的制备

用 PBS 缓冲液将纯化的蛋白稀释成 0.5 mg/mL,免疫 4 只 Balb/c 小鼠。初次免疫,将抗原与弗氏完全佐剂等体积混合并充分乳化,小鼠皮下多点注射,每只 Balb/c 小鼠每次注射量为 100 μg。14 d 后首次加强免疫,多点注射 50 μg 融合蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合液;随后每 2 d 加强免疫 1 次,共 3 次;取小鼠心脏血,4℃、4000 r/min 离心 15 min 取血清,加等体积的甘油和叠氮钠(终质量浓度 0.01%), -20℃ 保存备用。

1.2.5 细胞培养及蛋白提取

参照 Shen 等^[2]的方法进行细胞培养及蛋白提取。

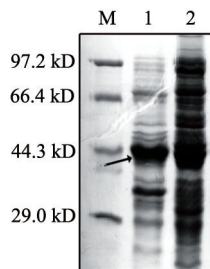
1.2.6 INMAP 多克隆抗体的特异性检测

利用纯化前、后的原核表达产物作为抗原,经免疫印迹检测 INMAP 多克隆抗体的特异性;运用新制备抗体检测 INMAP 在正常肝细胞及肝癌细胞中的表达差异。实验重复 3 次,以 Image J 软件进行灰度分析,以 SPSS 19.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 His-INMAP 融合蛋白的原核表达

经 SDS-PAGE 及免疫印迹检测重组菌体 His-INMAP 融合蛋白的表达(图 1、图 2),结果显示,重组菌体蛋白印迹中出现一条 44 kD 条带(图 1 中箭头所示),上清中很少。目的蛋白分子量为 38.2 kD,pET-30a 的 N 端带有 6 个组氨酸,分子量约 6 kD,可见 His-INMAP 融合蛋白主要以包涵体形式存在。



M—蛋白分子质量标准;1—沉淀;2—上清

图 1 12% SDS-PAGE 分析 pET-30a-INMAP 表达产物
Fig. 1 Analysis of expression products of pET-30a-INMAP by SDS-PAGE

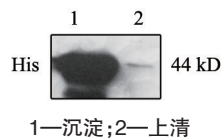


图 2 免疫印迹检测融合蛋白的表达
Fig. 2 Detection of His-INMAP fusion protein using Western blotting

采用 Image J 软件进行灰度分析,根据公式:

$$\text{包涵体体积分数} = \left[\frac{\text{沉淀中 INMAP 的灰度值}}{\text{沉淀中 INMAP 的灰度值} + \text{上清中 INMAP 的灰度值}} \right] \times 100\%$$

得到包涵体体积分数为 98.8%(图 3)。

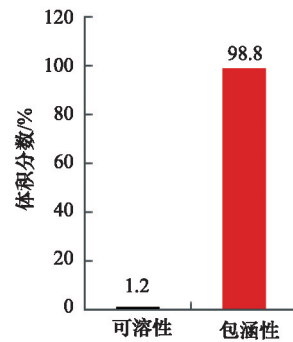
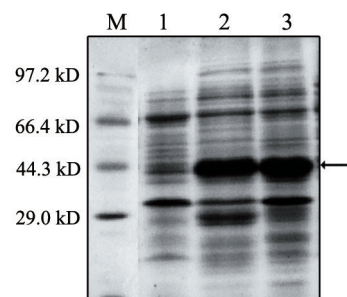


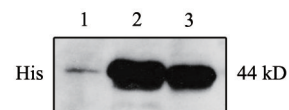
图 3 原核表达产物中可溶性蛋白和包涵体体积分数统计
Fig. 3 Histogram of His-INMAP relative quantity in the soluble and insoluble fractions of prokaryotically expressed products

采用 4.0 mol/L 尿素溶解包涵体(图 4、图 5、图 6),经尿素处理后上清和沉淀中明显有 1 条 44 kD 条带(图 4 中箭头所示)。对免疫印迹结果进行灰度分析,发现 55.6% 的包涵体被溶解,表明 4.0 mol/L 尿素处理包涵体可获得部分可溶性的 His-INMAP 融合蛋白。



M—蛋白分子质量标准;
1—处理前上清;2—处理后上清;3—处理后沉淀

图 4 SDS-PAGE 分析 4.0 mol/L 尿素处理的包涵体
Fig. 4 Treatment of inclusion body using 4.0 mol/L urea by SDS-PAGE



1—处理前上清;2—处理后上清;3—处理后沉淀

图 5 免疫印迹检测包涵体处理结果
Fig. 5 Treatment of inclusion body assayed through Western blotting

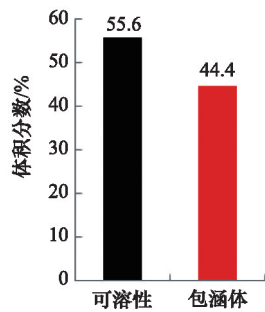
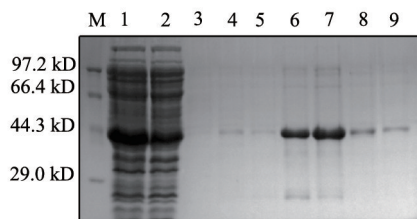


图6 尿素处理后可溶性蛋白和包涵体的体积分数统计
Fig. 6 Volume fractions of soluble and insoluble fusion proteins after urea treatment

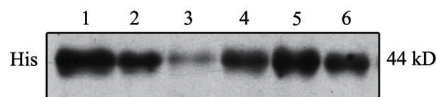
2.2 His-INMAP 融合蛋白的纯化

镍亲和柱分离纯化 His-INMAP 融合蛋白,以 SDS-PAGE 及免疫印迹检测纯化效果。如图7、图8所示,咪唑浓度低于 80 mmol/L 的洗脱液未得到融合蛋白,300 mmol/L 咪唑第2次洗脱后得到的蛋白呈现1条44 kD的主带,杂蛋白较少,纯度为94.1%,蛋白量较大。表明镍亲和柱纯化的 His-INMAP 融合蛋白纯度较高。



M—蛋白分子质量标准;1—纯化前蛋白;2—纯化后上清;
3—20 mmol/L 咪唑洗涤后的上清;4—40 mmol/L 咪唑洗涤后的上清;
5—80 mmol/L 咪唑洗涤后的上清;6,7,8—300 mmol/L 咪唑洗涤后的上清;
9—500 mmol/L 咪唑洗涤后的上清

图7 SDS-PAGE分析纯化的 His-INMAP 融合蛋白
Fig. 7 SDS-PAGE analysis of purified His-INMAP fusion protein



1—纯化前蛋白;2—纯化后上清;3—80 mmol/L 咪唑洗涤后的上清;
4,5,6—300 mmol/L 咪唑洗涤后的上清

图8 免疫印迹检测纯化的融合蛋白
Fig. 8 Western blotting analysis of purified fusion protein

2.3 INMAP 多克隆抗体的特异性检测

INMAP 多克隆抗体检测结果如图9所示,纯化前、后的原核表达蛋白均能检测出约44 kD的单一主带,表明 INMAP 抗体的特异性较好,抗体制备成功。6株肝细胞系的 INMAP 表

达水平检测如图10、图11所示,肝细胞中均能检测出特异的条带,并且出现多态性。与正常肝细胞 L-02 相比,除 PLC 外,INMAP 在肝癌细胞中的表达水平显著下调 ($P < 0.01$),表明 INMAP 可能与肝癌发生(细胞癌化)有关。

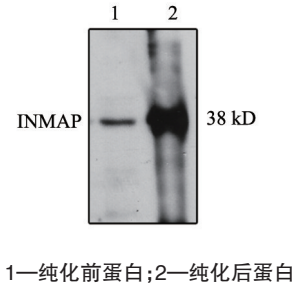


图9 免疫印迹检验 INMAP 多克隆抗体的特异性
Fig. 9 Specificity of polyclonal anti-INMAP antibody was identified by Western blotting analysis

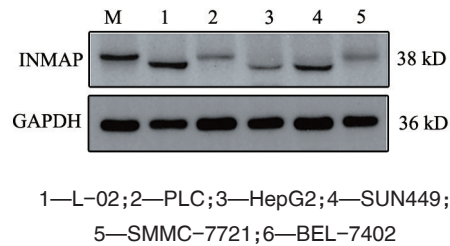


图10 免疫印迹检测 INMAP 在肝细胞中的表达水平
Fig. 10 Western blotting analysis of INMAP protein expression in liver cell lines

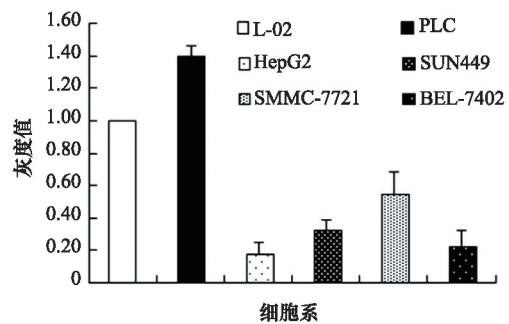


图11 INMAP 蛋白表达水平的灰度分析
Fig. 11 Band quantification of INMAP protein expression

3 讨论

融合蛋白技术是解决原核和真核细胞的重组蛋白快速、经济有效的表达和纯化的最好方法^[5],用带有标签的融合蛋白作为抗原制备抗体已经成为有效的途径^[6-9]。本研究运用具有快速、高效表达特点的 pET-30a(+) 作为表达载体,经其表达的目的蛋白带有 6×His 标签——被翻译蛋白的金属结合

域,有利于与NI-NTA结合,不影响重组蛋白的结构和功能^[10],可直接通过镍亲和柱纯化系统纯化获得目的蛋白。

本研究利用IPTG低温诱导形成的His-INMAP融合蛋白主要以包涵体形式存在于菌体的蛋白沉淀中,上清中获得的可溶性融合蛋白较少(图1和图2)。原核蛋白表达缺乏真核蛋白必需的折叠机制,因此外源蛋白在大肠杆菌中表达容易聚集成包涵体。强变性剂尿素可通过离子间作用,打断包涵体蛋白分子内和分子间的化学键,使多肽链伸展。已有研究表明用浓度为2.0~8.0 mol/L的尿素^[11,12]溶解包涵体可获得可溶性蛋白。本研究采用4.0 mol/L尿素处理包涵体,结果有55.6%转变为可溶性蛋白。分析原因可能是菌体超声破碎不完全,未破碎的菌体与包涵体一起沉淀,也可能是尿素浓度低,可尝试采用高浓度的尿素来溶解包涵体。本研究获得的可溶性蛋白已经满足了实验需要,故未进一步对尿素浓度进行优化。

提高多克隆抗体的特异性,抗原纯度是关键。本研究利用镍亲和柱纯化His-INMAP融合蛋白,用不同浓度(20、40、80、300、500 mmol/L)的咪唑洗脱液洗脱,经300 mmol/L咪唑第2次洗脱获得的融合蛋白纯度较高(94.1%)且蛋白量较大,用于免疫小鼠制备抗体。用免疫印迹方法检测了多克隆抗体的特异性,纯化前后的融合蛋白抗原能与之特异结合;本课题组前期研究中用单抗发现,INMAP在肝癌细胞系HepG2和BEL-7402中出现1个40 kD的成分^[1],本研究与其一致,进一步证明多克隆抗体制备成功。INMAP在肝癌细胞中均有表达并出现多态性,说明INMAP可能与癌症发生有关,可能是某个碱基发生突变造成翻译提前终止,或发生了如磷酸化、泛素化、甲基化等蛋白修饰。与正常肝细胞L-02相比,4株肝癌细胞系中INMAP表达水平显著降低。本课题组前期研究发现INMAP在宫颈癌细胞HeLa中过表达抑制细胞生长,促进凋亡^[2]。可以推测INMAP蛋白水平的变化关联着细胞癌化或抑癌作用,但不同组织来源的肿瘤中分子间的作用关系比较复杂,INMAP在肿瘤发生发展中的作用机制还需进一步的探索。

4 结论

成功处理了包涵体,获得可溶性的His-INMAP融合蛋白,并利用镍亲和柱分离纯化出高纯度的融合蛋白。制备了特异性较高的鼠源INMAP多克隆抗体,为研究INMAP相关的细胞恶性增殖调控机理奠定了基础。INMAP在肝癌细胞中出现多态性,可能与细胞癌化或抑癌相关。

参考文献(References)

- [1] Zhou Y L, Chen Z, Lei Y, et al. INMAP, a novel truncated version of POLR3B, represses AP-1 and p53 transcriptional activity[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2013, 374(1/2): 81-89.
- [2] Shen E Z, Lei Y, Liu Q, et al. Identification and characterization of INMAP, a novel interphase nucleus and mitotic apparatus protein that

- is involved in spindle formation and cell cycle progression[J]. *Experimental Cell Research*, 2009, 315(7): 1100-1116.
- [3] Tan T, Chen Z, Lei Y, et al. A regulatory effect of INMAP on centromere proteins: Antisense INMAP induces CENP-B variation and centromeric halo[J]. *PloS One*, 2014, 9(3): e91937.
- [4] Wei Y, Shen E Z, Zhao N, et al. Identification of a novel centrosomal protein CrpF46 involved in cell cycle progression and mitosis[J]. *Experimental Cell Research*, 2008, 314(8): 1693-1707.
- [5] Uhlen M, Forsberg G, Moks T, et al. Fusion proteins in biotechnology [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1992, 3(4): 363-369.
- [6] Wang R, Shen W B, Liu L L, et al. Prokaryotic expression, purification and characterization of a novel rice seed lipoxygenase gene *OsLOXI*[J]. *Rice Science*, 2008, 15(2): 88-94.
- [7] 安丽君, 李天红. 桃成花基因 *PpLFY* 的克隆与表达及多克隆抗体制备[J]. *园艺学报*, 2008, 35(11): 1573-1580.
An Lijun, Li Tianhong. Cloning, expression and production of polyclonal antibodies of peach *PpLFY*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2008, 35(11): 1573-1580.
- [8] Wu C, Wang Y Y, Zou M J, et al. Prokaryotic expression, purification, and production of polyclonal antibody against human polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase14[J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 56(1): 1-7.
- [9] Murad H, Ali B, Makeya R, et al. Prokaryotic overexpression of TEV-rhGH and characterization of its polyclonal antibody[J]. *Gene*, 2014, 542(1): 69-76.
- [10] 刘平, 张昀, 郑喜邦, 等. 山羊 Sox2 多克隆抗体制备[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(1): 178-183.
Liu Ping, Zhang Yun, Zheng Xibang, et al. Preparation of polyclonal anti-Sox2 antibody in *Capra hircus*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(1): 178-183.
- [11] Moricoli D, Muller W A, Carbonella D C, et al. Blocking monocyte transmigration *in vitro* system by a human antibody scFv anti-CD99. Efficient large scale purification from periplasmic inclusion bodies in *E. coli* expression system[J]. *Journal of immunological methods*, 2014, 408: 35-45.
- [12] Whittaker M M, Whittaker J W. Expression and purification of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial carrier protein YGR257Cp (Mtm1p)[J]. *Protein Expression and Purification*, 2014, 93: 77-86.

(责任编辑 王媛媛)

《科技导报》“卷首语”栏目征稿

“卷首语”栏目每期邀请一位中国科学院院士和中国工程院院士就重大科技现象、事件,以及学科发展趋势、科学研究热点和前沿问题等,撰文发表个人的见解、意见和评论。本栏目欢迎院士投稿,每篇文章约2000字,同时请提供作者学术简历、工作照和签名电子文档。投稿邮箱:kjdbbjb@cast.org.cn。