

网络出版时间: 2015-12-30 14:38 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20151230.1438.002.html>

◇基础医学研究◇

KSHV K15 蛋白多克隆抗体的制备及其初步鉴定

陈伟, 方圆, 汪小五, 许常青, 朱晨辰, 杨宇, 张龙龙, 王林定

摘要 目的 制备卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) K15 蛋白多克隆抗体, 并将其应用于细胞内 K15 蛋白的检测。方法

选择 K15 基因第 8 个外显子(K15P_{ex8}) 序列做为模板, 构建 K15P_{ex8} 的表达载体 pQE-80L-K15P_{ex8}。诱导重组菌蛋白表达, 免疫新西兰兔, 制备抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体, 并用间接 ELISA 法测定抗体效价。将 pFJ 和 pFJ-K15P 两种重组质粒分别转入 HEK 293T 细胞, 用 Western blot 法检测抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体对 K15P-Flag 蛋白的识别。结果 由 K15P_{ex8} 制备的抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体效价大于 1:6 400, 能特异性识别重组质粒 pFJ-K15P 转染 293T 细胞产生的 K15P-Flag 融合蛋白。结论 初步证明 K15P_{ex8} 蛋白有免疫反应性, 该多克隆抗体可用于重组的 K15P-Flag 融合蛋白的检测。

关键词 卡波氏肉瘤相关疱疹病毒; K15 基因; 多克隆抗体
中图分类号 R 373.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)01-0001-04

卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, KSHV) 又被称为人类疱疹病毒 8 型(human herpesvirus 8, HHV-8), 于 1994 年 Chang et al^[1] 在卡波氏肉瘤(Kaposi's sarcoma, KS) 组织中发现, 是引起 KS 的病原体^[2]。研究^[3] 证明 KSHV 还是原发性淋巴瘤(primary effusion lymphoma, PEL) 多中心性 Castleman 病(multicentric Castleman disease, MCD) 的病原体。K15 基因位于 KSHV 最右端, 由 8 个外显子构成, 编码一个有 12 个跨膜区域的糖蛋白^[4]。该蛋白能与抗凋亡蛋白 HAX-1 结合, 参与抗凋亡机制^[5]。该实验选择 K15 的第 8 个外显子序列为模板, 通过 PCR 扩增, 诱导表达, 融合蛋白免疫新西兰兔, 产生多克隆抗体, 旨在为 KSHV 的致病机制研究提供实验基础。

2015-10-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271837); 安徽高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2012A161); 安徽医科大学博士科研经费资助项目(编号: XJ200914)

作者单位: 安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 陈伟, 男, 硕士研究生;

王林定, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wan-glinding@ahmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料来源 pFJ、pFJ-K15P、pQE-80L 3 种质粒, HEK293T 细胞、宿主菌 DH5 α 均由本实验室保存。其中 HEK293T 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 该培养基含有 100 U/ml 青霉素和 100 g/ml 链霉素。清洁级新西兰白兔(约 3 kg) 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂 限制性内切酶 BamH I、PCR 高保真酶和蛋白质预染 Marker(美国 Thermo 公司); 提取试剂盒和凝胶纯化试剂盒(北京天根生化有限公司); ClonExpressTM II One Step Cloning Kit(一步法无缝克隆试剂盒)(南京诺唯赞生物科技有限公司); 兔抗 His 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶(HRP) 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司); 不完全/完全福氏佐剂(美国 Sigma 公司)。

1.3 K15P_{ex8} 重组质粒的构建和鉴定

1.3.1 K15P_{ex8} 基因的扩增 根据 NCBI 上 K15 基因第 8 个外显子的基因序列, 引物设计合成由上海生工生物工程有限公司完成, F: 5'-TCACCAT-CACGGATCCACTTTACAAGGACTGCTGGTAT-3'; R: 5'-GCTCGCATGCCGATCCCTAGTTCCTGGGAAATA-AAACC-3' (下划线部分代表 BamH I 的酶切位点)。以已有的 pFJ-K15P 质粒为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总共 25 μ l, 包括 pFJ-K15P 质粒模板 1 μ l, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ l, dNTP 2 μ l, 上下游引物各 1 μ l, 高保真酶 1 μ l, ddH₂O 17.5 μ l。PCR 反应体系: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s; 55 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 2 min, 此过程共 35 个循环; 之后 72 $^{\circ}$ C 10 min。产物经 1% 琼脂糖电泳, 以 DL 2 000 Marker 为参照, 切胶回收目的条带并测定其浓度。

1.3.2 pQE-80L-K15P_{ex8} 重组载体构建及鉴定 用 BamH I 单酶切 pQE-80L 载体, 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h, 将其线性化, 切胶回收, 并测定其浓度。按照 ClonExpressTM II One Step Cloning Kit 的说明书进行重组载体构建。将构建好的重组质粒转化 DH5 α 感受态细胞

后均匀涂布于含有氨苄青霉素(Amp)的平板中,18~24 h后挑取阳性克隆,摇菌30%甘油保存于-80℃冰箱。用试剂盒提取质粒,进行酶切鉴定,并送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.4 目的蛋白的诱导表达及纯化

1.4.1 目的蛋白诱导表达 -80℃冰箱取出含有重组质粒的转化菌,5 μl菌液加到5 ml含5 μl Amp的液体培养基中摇菌培养过夜,进行复苏,次日将菌液按1:100的比例接种于3 ml含3 μl Amp的新鲜LB培养基中,37℃、250 r/min培养4 h,之后取1 ml菌液12 000 r/min离心1 min,弃去上清液,加入1×SDS-PAGE的上样缓冲液100 μl,-20℃保存,作为诱导前样本。剩余菌液加入IPTG诱导(终浓度1 mmol/L),继续培养6 h,取1 ml菌液12 000 r/min离心1 min,弃上清液留沉淀,同样加入1×SDS-PAGE的上样缓冲液100 μl。诱导前后样本SDS-PAGE电泳检测目的蛋白的表达。

目的蛋白表达后进行扩大培养。-80℃冰箱取出转化菌进行复苏,次日5 ml菌液转入500 ml含Amp的培养基中,37℃、250 r/min摇床培养4 h后加入IPTG(终浓度1 mmol/L)继续培养6 h后菌液经4℃、12 000 r/min离心10 min,收集沉淀。菌体沉淀用100 ml裂解缓冲液(非变性)重悬,加入蛋白酶抑制剂(PMSF)和溶菌酶混匀,终浓度分别为(1 mmol/L和1 mg/ml),冰上静置20 min后,在冰浴中进行超声破碎:功率300 W,工作3 s,暂停5 s,每次工作6 min,总时间18 min,每次间隔5 min。超声破碎后,4℃、12 000 r/min离心10 min,上清液即为上清粗蛋白。沉淀用50 ml裂解液(变性)溶解,4℃、12 000 r/min离心10 min,上清液即为包涵体粗蛋白,所得蛋白分别经SDS-PAGE电泳,确定目的蛋白的表达形式。

1.4.2 目的蛋白的纯化 将已预处理好的Ni-NTA悬浮液混匀填装到亲和层析柱中,用10倍柱体积的超纯水清洗柱子,上清粗蛋白经Ni-NTA柱进行纯化。先后用10 ml裂解缓冲液和10 ml洗脱缓冲液过柱,去除杂蛋白,最后用10 ml洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。纯化的蛋白经SDS-PAGE电泳鉴定。

1.5 多克隆抗体的制备及检测

1.5.1 动物免疫制备多克隆抗体 取3只健康的新西兰白兔分别标记为RA1、RA2、RA3。免疫前心脏取血2 ml,取血清作为阴性对照。将制备好的蛋白抗原200 μg与完全弗氏佐剂1:1充分混匀后,经皮下、背部等多点注射。第2周将蛋白抗原100

μg与不完全弗氏佐剂充分混匀,同上加强免疫。每隔1周加强免疫1次,总共免疫4次,末次免疫前取耳缘静脉血,Western blot检测抗体是否产生。第4次加强免疫后7 d,采集兔心脏血60~80 ml,分离出血清,无菌分装,于-80℃冰箱保存。

1.5.2 ELISA法检测抗K15P_{ex8}多克隆抗体效价 用1 μg/L K15P_{ex8}蛋白包被ELISA板,4℃孵育过夜,每孔100 μl。次日以含1%小牛血清的封闭液37℃条件下封闭2 h后洗涤,以免免疫前采集的兔血清为对照,将抗血清1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800、1:25 600稀释后每孔100 μl加到包被好的ELISA检测板,37℃温育30 min后PBST洗涤3次,每孔加入1:5 000稀释的HRP标记羊抗兔IgG 100 μl,37℃孵育1 h后洗涤5次,每孔加入100 μl四甲基联苯胺(TMB)底物后于37℃温育10 min,加终止液终止反应。酶标仪检测450 nm波长下的吸光度(absorbance, A)值。结果判定: A_{450 nm} < 0.1为阴性血清, A_{450 nm} > 1.0为阳性血清,以阳性血清的最高稀释倍数作为抗体血清ELISA效价。

1.5.3 检测抗K15P_{ex8}多克隆抗体的特异性 将本实验室保存含K15基因的真核表达载体pFJ和pFJ-K15P对照两种载体分别转入HEK 293T细胞,通过Western blot检测该多克隆抗体能否特异性识别细胞表达的K15P-Flag蛋白。

2 结果

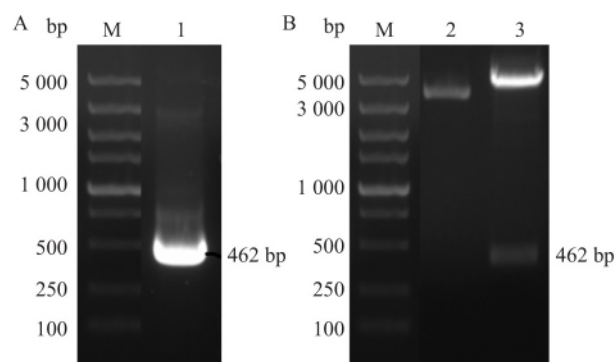
2.1 pQE-80L-K15P_{ex8}重组载体构建及鉴定 以实验室保存的重组质粒pFJ-K15P为模板,扩增出K15P_{ex8}基因,在462 bp位置处出现目的条带。见图1A。根据ClonExpress™ II One Step Cloning Kit的说明书进行重组载体构建。经BamH I酶切后出现载体pQE-80L和K15P_{ex8},大小分别为4 751 bp和462 bp两条条带。见图1B。重组质粒进行测序,并与GenBank中的序列进行比对,结果正确,证明重组质粒连接成。

2.2 目的蛋白的表达纯化 重组质粒转化到DH5α中,经IPTG诱导表达出约15 ku的目的蛋白,如箭头所指。见图2。

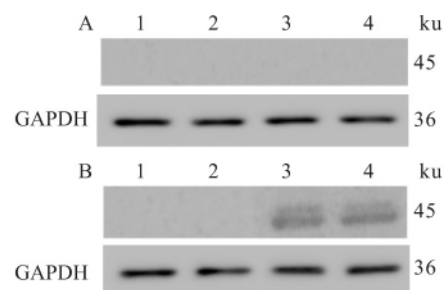
2.3 抗K15P_{ex8}多克隆抗体效价测定结果 未免疫前心脏取血作为阴性对照血清。第5次加强免疫后的第7天,取得血清,通过间接ELISA方法分别检测3只兔所产生的抗K15P_{ex8}血清的效价,结果3份血清的效价均大于1:6 400。见表1。

表1 抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体效价测定

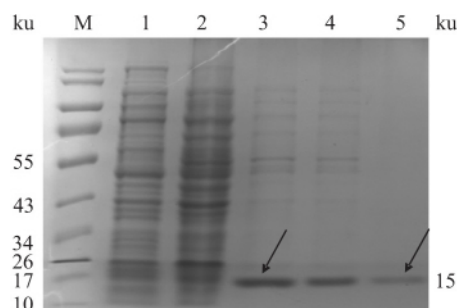
兔号	空白	阴性	抗 K15P _{ex8} 多克隆抗体稀释倍数							
			1 : 200	1 : 400	1 : 800	1 : 1 600	1 : 3 200	1 : 6 400	1 : 12 800	1 : 25 600
RA1	0.206	0.221	3.309	2.717	2.051	1.910	1.502	1.261	0.506	0.445
RA2	0.172	0.205	3.204	2.567	2.039	1.900	1.670	1.268	0.690	0.599
RA3	0.164	0.184	3.231	2.498	1.985	1.843	1.618	1.164	0.499	0.389

图1 K15P_{ex8} 基因的 PCR 扩增及重组质粒构建及鉴定

A: K15P_{ex8} 基因 PCR 扩增图; B: 重组质粒酶切鉴定图; M: DNA Marker; 1: PCR 扩增产物 462 bp; 2: 重组 pQE-80L-K15P_{ex8} 质粒; 3: 重组质粒酶切

图3 Western blot 检测 抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体的特异性

A: 阴性血清; B: 含抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体的血清; 1、2: 转染 pFJ 载体产生的蛋白样品; 3、4: 转染 pFJ-L15P 重组质粒产生的蛋白样品; GAPDH: 内参

图2 K15P_{ex8} 蛋白的表达及纯化

M: Marker; 1: 诱导前的重组菌; 2: 诱导 6 h 后的重组菌; 3: 超声破碎后的上清液; 4: 超声破碎后的包涵体; 5: Ni²⁺ 柱亲和和层析纯化后的上清蛋白

2.4 抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体的特异性的检测结果

采用阴性和阳性的血清作为一抗,收集转染到 HEK 293T 细胞的 pFJ 和 pFJ-K15P 两种质粒产生的蛋白,检测所制备多抗的特异性。结果显示 pFJ-K15P 质粒产生的蛋白与抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体有免疫印迹,而其他均无免疫印迹,初步判断抗 K15P_{ex8} 多克隆抗体能特异性识别重组质粒 pFJ-K15P 转染 293T 细胞产生的 K15P-Flag 融合蛋白。见图 3。

3 讨论

KSHV 又名 Kaposi 肉瘤相关疱疹病毒,属于 γ 疱疹病毒亚科,为双链 DNA 病毒^[6]。研究^[7]表明 KS 有 4 种不同的类型,经典型 KS、地域型 KS、AIDS

相关型 KS 和移植型 KS。KSHV 通常在非洲、部分欧洲地区及地中海国家比较常见,但近些年来在美洲地区、台湾及韩国也出现卡波氏肉瘤病例^[8]。我国对 KSHV 的研究开展稍晚,有研究^[9]显示我国新疆地区典型 KS 发病率较高,而在其他区域或民族人群发病较罕见。

K15 基因存在至少 3 种等位基因, P、M 和 N, P 和 M 型之间存在 65% 的保守区域, N 型仅在非洲南部地区有发现, KS 病例中主要是 P 型^[10]。K15 基因由 8 个外显子构成,编码一个带有 12 个跨膜区域和一个 C 末端位于细胞质中,编码一个保守的 SH 2,能与肿瘤坏死因子受体相关因子和酪氨酸激酶 (Src) 相互作用^[11],进一步激活 NF- κ B、JNK 和 MAPK 等信号途径^[12]。

本研究通过 PCR 扩增目的基因,一步克隆法连接到表达载体 pQE-80L,构建重组质粒,转化、诱导表达出目的蛋白。有文献^[13]报道在 K15 基因的末端加上标签基因,作为 K15 蛋白的检测,这样容易使 K15 蛋白的空间结构发生改变,不能识别相应的蛋白。本实验通过选择该基因的一段序列作为模板,因此避免这样的问题。此外该蛋白虽然在包涵体中也有表达,但在破碎上清液的表达比例较高,所以纯化上清液得到可溶性蛋白。纯化得到的蛋白做为抗原免疫新西兰兔,制备出多克隆抗体,并且多抗的效价达到了 1 : 6 400,同时多抗也能特异性地识别 K15P-Flag 融合蛋白,因此本实验的成果为 K15

基因的功能和 KSHV 致病机制的研究提供了基础。

参考文献

- [1] Chang Y ,Cesarman E ,Pessin M S ,et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma [J]. *Science* ,1994; 266(5192) : 1865 -9.
- [2] Ouyang X X ,Fu B ,Li B ,et al. Establishment of an ELISA to detect Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus using recombinant ORF73 [J]. *Virology* 2010 25(3) : 168 -76.
- [3] Wang L , Pietrek M , Brinkmann M M , et al. Identification and functional characterization of a spliced rhesus rhadinovirus gene with homology to the K15 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *J Gen Virol* 2009 90(Pt5) : 1190 -201.
- [4] Choi J K , Lee B S , Shim S N , et al. Identification of the novel K15 gene at the rightmost end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome [J]. *J Virol* 2000 74(1) : 436 -46.
- [5] Sharp T V ,Wang H W ,Koumi A , et al. K15 protein of Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1 , a protein with antiapoptotic function [J]. *J Virol* 2002 , 76(2) : 802 -16.
- [6] 汪小五 ,曾宪聪 陈 伟 等. 卡波肉瘤相关疱疹病毒 ORFK12 蛋白初步研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2014 49(5) : 565 -4.
- [7] Chatlynne L G , Ablashi D V. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) [J]. *Semin Cancer Biol* , 1999 9(3) : 175 -85.
- [8] Zong J ,Ciuffo D M ,Viscidi R ,et al. Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns , novel variants and chimerism [J]. *J Clin Virol* 2002 23(3) : 119 -48.
- [9] 张 莹 ,曾宪聪 ,汪小五 等. 安徽蚌埠地区卡波氏肉瘤相关疱疹病毒的血清阳性率研究 [J]. *安徽医科大学学报* 2013 48(5) : 493 -5.
- [10] Wang L , Brinkmann M M , Pietrek M , et al. Functional characterization of the M-type K15-encoded membrane protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *J Gen Virol* , 2007 ,88(Pt 6) : 1698 -707
- [11] Brinkmann M M ,Pietrek M ,Dittrich-Breiholz O , et al. Modulation of host gene expression by the K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus [J]. *J Virol* 2007 81(1) : 42 -58.
- [12] Haas D A ,Bala K ,Büsch G ,et al. The inflammatory kinase MAP4K4 promotes reactivation of Kaposi's sarcoma herpesvirus and enhances the invasiveness of infected endothelial cells [J]. *PLoS Pathog* 2013 9(11) : e1003737.
- [13] Jeong K W , Jeong M C , Jin B ,et al. Relationship between structural flexibility and function in the C-terminal region of the heparin-binding domain of VEGF165 [J]. *Biochemistry* , 2013 ,52(49) : 8823 -32.

Generation of polyclonal antibody of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 and its preliminary identification

Chen Wei , Fang Yuan , Wang Xiaowu , et al

(*Dept of Microbiology , Anhui Medical University , Hefei 230032*)

Abstract Objective To generate rabbit polyclonal antibody against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) encoding peptides of K15 , identify the detection of K15P protein in cell. **Methods** After selecting the eighth exon (EX8) sequence of K15P gene as a template , the recombinant plasmid named pQE-80L-K15P_{ex8} was constructed. Recombinant protein was induced and expressed. New Zealand white rabbits were immunized with the K15P_{ex8} to generate polyclonal antibodies against K15P. Indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to characterize the titers of the polyclonal antibody. The two recombinant plasmids , pFJ and pFJ-K15P , were transfected HEK 293T cells to produce K15P-Flag fusion protein , which was identified by Western blot. **Results** The titer of the polyclonal antibody against K15P was more than 1 : 6 400 with indirect ELISA and could react specifically with the K15P-Flag fusion protein in 293T cells. **Conclusion** We preliminarily find K15P_{ex8} protein has immunoreactivity and the rabbit polyclonal antibody against K15P could react with the K15P-Flag fusion protein.

Key words Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus; K15P gene; polyclonal antibody