

# 裂殖酵母 Hsp90 多克隆抗体的制备与鉴定

李文珠<sup>1</sup>, 李晓彤<sup>2</sup>, 张连茹<sup>1</sup>, 靳全文<sup>1</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建厦门, 361005; 2. 厦门大学生命科学学院杂交瘤与抗体中心, 福建厦门, 361005)

**摘要:** 为制备兔抗裂殖酵母Hsp90多克隆抗体, 在通过PCR获得了裂殖酵母Hsp90(Swo1)基因后, 构建了pMALc2x-Swo1表达载体, 可用于表达编码正确氨基酸序列的目的基因。转化大肠杆菌BL21(DE3), IPTG诱导表达, Amylose Resin柱纯化。目的蛋白表达量占菌体总蛋白的30%以上。纯化后, 蛋白纯度达95%以上。纯化后的MBP-Swo1融合蛋白抗原加福氏完全佐剂背部皮内注射首次免疫新西兰大白兔, 第28天用MBP-Swo1融合抗原加福氏不完全佐剂同样剂量加强免疫, 第35天时再次免疫。第49天心脏采血。收集血清后, 用免疫印迹(western blot)检测Swo1多克隆抗体的特异性。免疫印迹检测结果显示该抗体能够特异性识别内源性的裂殖酵母Hsp90/Swo1蛋白, 但并不识别人类细胞中的Hsp90 $\alpha/\beta$ 。

**关键词:** 裂殖酵母; Hsp90/Swo1; 多克隆抗体

中图分类号: Q291

文献标志码: A

文章编号: 1673-7180(2011)12-0911-5

## Preparation and identification of polyclonal antibody raised against heat shock protein 90 of fission yeast

Li Wenzhu<sup>1</sup>, Li Xiaotong<sup>2</sup>, Zhang Lianru<sup>1</sup>, Jin Quanwen<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China;

2. Hybridoma and Antibody Center, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China)

**Abstract:** To prepare the polyclonal antibody of Hsp90 (Swo1) of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the encoding gene *swo1*<sup>+</sup> was amplified from the yeast genome and then inserted into expression vector pMALc2x. The resulted plasmid pMALc2x-Swo1 was transformed and expressed in *E. coli* BL21(DE3). The expressed fusion protein was purified through Amylose Resin column. The proteins were expressed mainly as secretion with the yield of more than 30% of total bacterial proteins. After purification, the purity of the proteins was about 95%. The New Zealand white rabbits were immunized with Freund's complete adjuvant plus purified MBP-Swo1 fusion antigen through the back skin intradermal injection for the first time. The same dose of Freund's incomplete adjuvant plus MBP-Swo1 was injected to strengthen the immunity after 28 and the 35 days respectively. After 49 days, blood sample was collected from heart, and antisera were extracted. The specificity of Swo1 polyclonal antibody was examined by Western blot. It showed that the antibody obtained had a high specificity to detect endogeneous Swo1 from fission yeast, but it could not recognize Hsp90 $\alpha/\beta$  in human cells.

**Key words:** fission yeast; Hsp90/Swo1; polyclonal antibody

收稿日期: 2011-09-01

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20100121110003); 国家自然科学基金资助项目(30871376); 教育部科学技术研究重点项目(108076)

作者简介: 李文珠(1983-), 女, 博士研究生, 主要研究方向: 细胞生物学

通信联系人: 靳全文, 教授, 主要研究方向: 细胞周期调控及表观遗传学, [jinquanwen@xmu.edu.cn](mailto:jinquanwen@xmu.edu.cn)

热激蛋白(heat shock protein, Hsp)又名应激蛋白(stress protein, Sp),是细胞在高温、缺氧和重金属中毒等应激状态下产生的一类具有重要生理功能、高度保守的多肽类蛋白质分子家族。生理状态时,热激蛋白可协助多肽或蛋白质的正确转运、折叠与装配,起“分子伴侣”的作用<sup>[1]</sup>。根据其相对分子质量的大小分为6个家族:Hsp100、Hsp90、Hsp70、Hsp60、Hsp40和小分子Hsp<sup>[2-3]</sup>。

Hsp90是细胞内最活跃的分子伴侣之一,广泛参与细胞的信号转导、激素应答及转录调控过程,对细胞生理、病理及应激条件下的生存发挥了重要作用<sup>[4]</sup>。Hsp90是相对分子质量为90 000的疏水性蛋白质,其在生物进化过程中高度保守,在多种生物体细胞中呈高组成性表达,通常以同二聚体形式存在,约占胞质蛋白的1%~2%。在高等真核生物体内,Hsp90由Hsp90 $\alpha$ 和Hsp90 $\beta$ 单体聚合而成,两种单体的区别在于是否含有丰富的谷氨酰胺片段<sup>[5]</sup>。Hsp90的作用底物与多种信号转导通路密切相关<sup>[6-8]</sup>,近年来引起了人们更多的关注。在裂殖酵母中Hsp90蛋白由 $swo1^+$ 基因编码。

本研究在成功构建裂殖酵母Hsp90(Swo1)表达载体、细菌诱导表达裂殖酵母Hsp90后,进一步制备了抗Swo1多克隆抗体,并鉴定了其特异性。

## 1 实验

### 1.1 材料

限制性内切酶以及工具酶Taq DNA Polymerase, RNase A和T4 DNA Ligase购自Fermentas公司。Pfu DNA Polymerase购自天根公司。质粒提取及胶回收试剂盒购自上海生工有限公司。引物由英潍捷基贸易有限公司合成。Anti-GFP多克隆抗体由本实验室制备。鼠抗Hsp90 $\alpha/\beta$  mAb购自Santa Cruz公司。所使用的裂殖酵母菌株均为本实验室保存菌株:JY#1(*h-leu1-32 ura4-D18 ade6-210*)和JY#493(*h<sup>-</sup> swo1-GFP::ura4<sup>+</sup> ura4-D18 leu1-32*)。

### 1.2 酵母基因组DNA的制备

接种一定量的酵母细胞到10 mL YE5S液体培养基中,30 °C培养过夜。3 000 r/min离心5 min,收集菌体。加入500  $\mu$ L山梨醇溶液重悬,再加入20  $\mu$ L 25 mg/mL酵母裂解酶、1  $\mu$ L  $\beta$ -巯基乙醇及49  $\mu$ L二次蒸馏水,混匀,37 °C处理2~3 h。显微镜下观察到大部分细胞变圆时,3 000 r/min离心5 min收菌,加入500  $\mu$ L三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸缓冲液小心重悬。加入50  $\mu$ L 10%十二烷基硫酸钠,混匀,65 °C放置30 min。加入150  $\mu$ L 5 mol/L醋酸钾混匀,冰上放置10 min,10 000

r/min离心10 min。将上清转移入新的离心管中,加入900  $\mu$ L无水乙醇(-20 °C预冷),混匀,室温放置30 min,10 000 r/min离心5 min,弃上清。200  $\mu$ L体积分数75%乙醇(-20 °C预冷)冲洗1次,10 000 r/min离心1 min,弃上清。室温干燥,加入50  $\mu$ L TE和1  $\mu$ L RNase A溶解沉淀。凝胶电泳检测提取的基因组DNA。

### 1.3 引物设计

从Sanger Center Pombe Genome Database数据库上查得酵母 $swo1^+$ 基因的全序列,设计PCR引物#139:CGCGGATCCATGTCTGAACACAGAAAC和#140:CCAATGCATTGGCTGCAGTTAATCGACTTCCTCCATC,由上海英潍捷基有限公司合成,下划线处分别为BamHI和Pst I酶切位点。

### 1.4 $swo1^+$ 基因的PCR扩增

以提取的酵母基因组为模板,利用引物#139和#140,常规PCR扩增酵母 $swo1^+$ 基因。反应条件为:95 °C预变性4 min $\rightarrow$ 95 °C变性50 s,55 °C退火1 min,72 °C延伸2 min;循环数30 $\rightarrow$ 72 °C延伸10 min $\rightarrow$ 4 °C保存。

### 1.5 pMALc2X-Swo1表达质粒的构建

PCR产物及pMALc2X载体分别用限制性内切酶BamHI和Pst I进行双酶切,并且分别胶回收。用T4 DNA连接酶将 $swo1^+$ 基因克隆至载体pMALc2X中,构建表达质粒pMALc2X-Swo1,并转化入*E. coli* BL21(DE3)。提取重组子质粒进行酶切鉴定,阳性克隆送上海英潍捷基公司测序。

### 1.6 细菌中融合蛋白的表达和纯化

挑选转化了测序正确的重组质粒pMALc2X-Swo1的*E. coli* BL21(DE3)单菌落,37 °C振荡培养过夜,按1:100(体积比)稀释到LB培养液中,37 °C振荡培养至 $A_{600}$  0.6时,加入终浓度为0.5 mmol/L的异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷诱导表达5 h。将收集的100 mL菌体完全重悬于10 mL细菌裂解液(pH 8.0,三羟甲基氨基甲烷-盐酸50 mmol/L,氯化钠1 mol/L,乙二胺四乙酸5 mmol/L,体积分数10%的甘油)里,在冰上超声破碎5 min至菌液澄清;破碎产物于4 °C、12 000 r/min离心10 min。将上清液加至Amylose Resin层析柱中,4 °C孵育2 h。然后加入40 mL缓冲溶液(pH 8.0,三羟甲基氨基甲烷-盐酸50 mmol/L,氯化钠500 mmol/L,乙二胺四乙酸5 mmol/L,10%甘油, $\beta$ -巯基乙醇5 mmol/L)洗柱,用含20 mmol/L麦芽糖的缓冲溶液(pH 8.0,三羟甲基氨基甲烷-盐酸50 mmol/L,氯化钠500 mmol/L,乙二胺四乙酸5 mmol/L,10%甘油)洗脱融合蛋白,收集洗脱液。

### 1.7 抗体的制备

按照文献[9]中的步骤制备抗体。

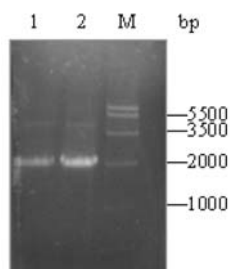
### 1.8 免疫印迹检测(Western blot)

根据蛋白大小配置一定浓度的胶,待其凝固后,加入样品及其对照。接通电源,按照浓缩胶电压 100 V,分离胶电压 120 V,进行 SDS-PAGE 分析。然后用湿法转膜仪 100 V 恒压转膜 1~3 h,可根据蛋白的大小调节转膜时间;之后用含 5% BSA 的 TBS 溶液室温封闭 2 h,接着用一抗工作液(TBS+一抗)4 °C 摇床过夜,TBS-T 冲洗 4 次,每次 5 min;二抗工作液(TBS+二抗)室温孵育 1 h,TBS-T 冲洗 4 次,每次 10 min;在暗室条件下用 ECL 工作液孵育 PVDF 膜 20 s~10 min。暗室显影,定影,观察实验结果。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *swoI*<sup>+</sup>基因的 PCR 扩增结果

设计的引物理论上经 PCR 扩增后所得的基因全长应为 2 144 bp。以提取的酵母基因组 DNA 为模板,利用引物#139 和#140,通过常规 PCR 扩增 *swoI*<sup>+</sup>全长基因。图 1 的 1、2 泳道中,可见 2 000 bp 左右的产物带,与理论计算的大小一致。



1, 2—*swoI*<sup>+</sup> PCR 扩增产物; M—DNA marker

图 1 *swoI*<sup>+</sup>基因的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Analysis of PCR product of *swoI*<sup>+</sup> by agarose gel electrophoresis

### 2.2 原核表达质粒 pMALc2x-*swoI*<sup>+</sup>的构建

用 *Bam*H I 和 *Pst* I 分别对载体 pMALc2x 和目的基因的扩增产物进行双酶切。目的基因酶切产物经纯化回收后,在 T4 DNA 连接酶的催化下,将其克隆至质粒 pMALc2x 中,构建表达质粒 pMALc2x-*SwoI*。提取的重组子质粒经 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切后,琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到约 2 000 bp 和 6 600 bp 的条带(图 2),与 *swoI*<sup>+</sup>(2 115 bp)和 pMALc2x(6 646 bp)的大小相符。



1—pMALc2x-*SwoI*; 2—*Bam*H I 和 *Pst* I 酶切的 pMALc2x-*SwoI*; M—DNA marker

图 2 重组 pMALc2x-*SwoI* 质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Restriction analysis of the recombinant pMALc2x-*SwoI*

将候选的克隆子送往上海英潍捷基公司进行测序。用 DNAssist 软件将测序结果翻译后和 *SwoI* 蛋白序列(Sequence 3)进行比较分析。如图 3 所示,用引物 MBP F primer 作为测序引物,Sequence 5 为测序结果(全长 708aa),其中 1-4aa 为 *Bam*H I 酶切位点,5-708aa 为 *SwoI* 氨基酸序列。结果说明克隆至 pMALc2x 载体上的 *swoI*<sup>+</sup> 基因序列正确,起始密码子、翻译框架与预先设计一致。

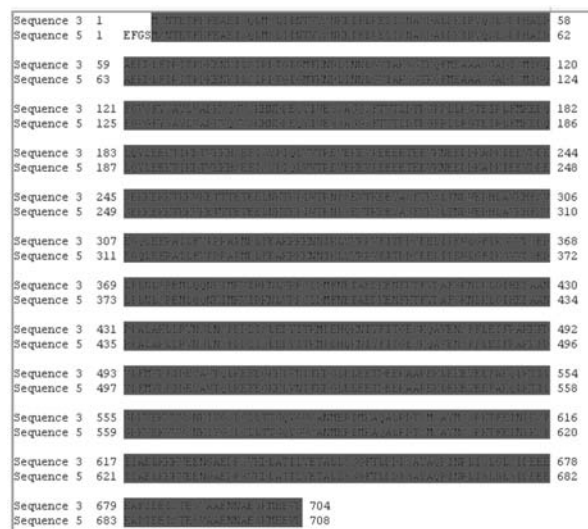


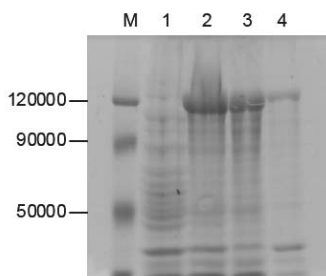
图 3 *SwoI* 的序列分析与比对结果

Fig. 3 Amino acid sequence alignment of *SwoI* (Sequence 3) and recombinant pMALc2x-*SwoI* (Sequence 5)

### 2.3 MBP-*SwoI* 融合蛋白的表达

按 1.6 节方法所示,将重组表达质粒 pMALc2x-*SwoI* 转入大肠杆菌 BL21 后,经 IPTG 诱导,将收集的菌体超声破碎后的上清和沉淀悬液分别进行 SDS-

PAGE 检测。结果显示,目的蛋白主要存在于上清中,表达量占菌体总蛋白的 30%以上。图 4 中可以在接近 120 000 位置可见 Swo1 的表达蛋白,与理论推算值一致,扫描分析显示其纯度达 95%以上。纯化后融合蛋白约 3 mg,按照 1.7 节方法进行抗体的制备。



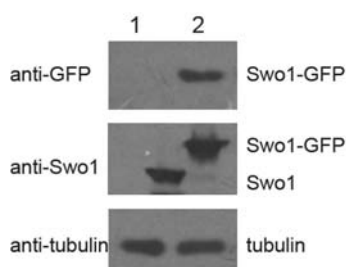
M—Protein marker; 1—未经 IPTG 诱导; 2—IPTG 诱导后总蛋白; 3—IPTG 诱导后可溶性蛋白; 4—IPTG 诱导后非溶性蛋白

图 4 重组子超声波破碎后上清产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of the supernatants by SDS-PAGE

#### 2.4 兔抗裂殖酵母 Swo1 多克隆抗体的鉴定

分别制备野生型(JY#1)和带有 GFP 标记的 Swo1(JY#493)的裂殖酵母菌株总蛋白细胞裂解液,采用 Western blot 检测免疫兔子后获得的 Swo1 多克隆抗体的特异性。结果发现,实验室制备的 anti-GFP 多克隆抗体能够特异性识别 GFP 标记的 Swo1 蛋白。与此相对应,anti-Swo1 多克隆抗体也能够特异性识别 GFP 标记的 Swo1 以及野生型菌株中内源性的 Swo1 蛋白(图 5)。

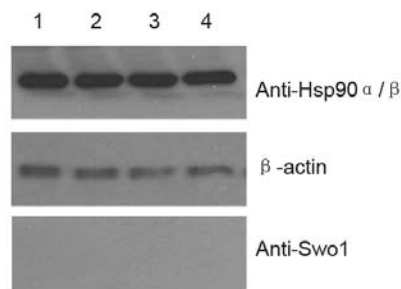


1—野生型(JY#1)裂殖酵母菌株总蛋白细胞裂解液;  
2—带有 GFP 标记的 Swo1(JY#493)的裂殖酵母菌株总蛋白细胞裂解液

图 5 蛋白质印迹分析兔抗裂殖酵母 Swo1 多克隆抗体的特异性

Fig. 5 Western blot analysis of rabbit anti-Swo1 serum against fission yeast Swo1 protein

为了进一步验证获得的兔 anti-Swo1 多克隆抗体的特异性,使用这一抗体尝试检测人类细胞中的 Hsp90(图 6)。Western blot 结果表明,裂殖酵母 anti-Swo1 多克隆抗体不能识别人类肿瘤细胞 SGC7901(胃腺癌)、HT29(大肠癌)、SW480(结肠癌)、BEL7402(肝癌)中的 Hsp90,而 anti-Hsp90 $\alpha/\beta$  mAb 可以特异地检测到这些肿瘤细胞中的 Hsp90 $\alpha/\beta$ ,这就进一步表明所制备的裂殖酵母 anti-Swo1 多克隆抗体具有很高的物种特异性。



1—SGC7901(胃腺癌); 2—HT29(大肠癌); 3—SW480(结肠癌); 4—BEL7402(肝癌)

图 6 蛋白质印迹分析兔抗裂殖酵母 Swo1 多克隆抗体对 于人肿瘤细胞中 Hsp90 的识别

Fig. 6 Western blot analysis of rabbit anti-Swo1 serum against Hsp90 protein in human tumors

#### 2.5 讨论

在细胞内 Hsp90 具有广泛的生物学功能<sup>[10]</sup>。近年发现 Hsp90 与肿瘤的发生、发展关系比较密切。Hsp90 $\alpha$  可通过调节细胞周期促进细胞增殖, Hsp90 $\beta$  则能够抑制细胞分化<sup>[11]</sup>。在裂殖酵母中,最初发现当 Swo1(Hsp90)突变后,能够抑制由 Wee1 激酶过量表达所带来的 G<sub>2</sub> 期阻断现象<sup>[12]</sup>。Mishra 等<sup>[13]</sup>发现 Swo1 会影响肌球蛋白的功能,以及胞质分裂时肌动蛋白环的装配。研究还表明 Swo1 还很有可能参与葡萄糖/cAMP 信号通路的调控<sup>[14]</sup>。

为了进一步了解 Swo1 蛋白在裂殖酵母中的功能及其机制,笔者成功地用 PCR 方法扩增出全长 *swo1*<sup>+</sup> 基因片段,并连接至 pMALc2X 表达载体上,构建出重组质粒。pMALc2X 表达载体带有能改善溶解度的 MBP 融合蛋白,避免 Swo1 蛋白形成聚集物,可增加蛋白的可溶性。获得的融合蛋白能利用其中的 MBP 对麦芽糖的亲和性达到用 Amylose Resin 柱一步亲和纯化,并且采用麦芽糖温和洗脱的蛋白无去污剂或变性剂对蛋白活性的影响。

### 3 结论

笔者直接使用 MBP-Swo1 融合蛋白免疫新西兰白兔,采用心脏采血法收集抗血清,每只兔采血约 30 mL。免疫印迹检测结果显示抗体能够特异性地检测裂殖酵母 Swo1,而不能识别人类肿瘤细胞 SGC7901(胃腺癌)、HT29(大肠癌)、SW480(结肠癌)、BEL7402(肝癌)中的 Hsp90,说明制备的兔多克隆抗体具有物种特异性。anti-Swo1 多克隆抗体的成功制备,为进一步研究 Hsp90 在裂殖酵母中的功能和机制提供了有力工具。

**致谢:**感谢厦门大学医学院抗癌研究中心颜江华教授慷慨提供人类肿瘤细胞 SGC7901、HT29、SW480 和 BEL7402。感谢厦门大学生命科学学院萧淑燕同学对人类培养细胞中 Western blot 实验的帮助。

#### [参考文献](References)

[1] Stangl K, Gunther C, Frank T, et al. Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway induces differential heat-shock protein response in cardiomyocytes and renders early cardiac protection [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 291(3): 542-549.

[2] Pratt W B, Toft D O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery [J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2003, 228(2): 111-133.

[3] Morimoto R I, Kline M P, Bimston D N, et al. The heat-shock response: regulation and function of heat-shock proteins and molecular chaperones [J]. *Essays Biochem*, 1997, 32: 17-29.

[4] Rutherford S L, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution [J]. *Nature*, 1998, 396(6709): 336-342.

[5] Sreedhar A S, Kalmar E, Csermely P, et al. Hsp90 isoforms: functions,

expression and clinical importance [J]. *FEBS Lett*, 2004, 562(1/2/3): 11-15.

[6] Tikhomirov O, Carpenter G. Identification of ErbB-2 kinase domain motifs required for geldanamycin-induced degradation [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(1): 39-43.

[7] Elbi C, Walker D A, Romero G et al. Molecular chaperones function as steroid receptor nuclear mobility factors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(9): 2876-2881.

[8] Jascur T, Brickner H, Salles-Passador I, et al. Regulation of p21(WAF1/CIP1) stability by WISP39, a Hsp90 binding TPR protein [J]. *Mol Cell*, 2005, 17(2): 237-249.

[9] 方莉, 陈雪梅, 任秀花, 等. 增强型绿色荧光蛋白兔多克隆抗体的制备[J]. *郑州大学学报: 医学版*, 2010, 45(1): 87-89.

Fang Li, Chen Xuemei, Ren Xiuhua, et al. Preparation of rabbit polyclonal antibody of enhanced green fluorescent protein [J]. *Journal of Zhengzhou University: Medical Sciences*, 2010, 45(1): 87-89. (in Chinese)

[10] 李娟, 杨惠, 周元国. 热激蛋白 90 与热激应答[J]. *生命的化学*, 2008, 28(3): 299-301.

Li Juan, Yang Hui, Zhou Yuanguo. Heat shock protein 90 and heat shock response [J]. *Chemistry of Life*, 2008, 28(3): 299-301. (in Chinese)

[11] Yano M, Naito Z, Tanaka S, et al. Expression and roles of heat shock proteins in human breast cancer [J]. *Jpn J Cancer Res*, 1996, 87(9): 908-915.

[12] Aligue R, Akhavan-Niak H, Russell P. A role for Hsp90 in cell cycle control: Wee1 tyrosine kinase activity requires interaction with Hsp90 [J]. *Embo J*, 1994, 13(24): 6099-6106.

[13] Mishra M, D'Souza V M, Chang K C, et al. Hsp90 protein in fission yeast Swo1p and UCS protein Rng3p facilitate myosin II assembly and function [J]. *Eukaryot Cell*, 2005, 4(3): 567-576.

[14] Alaamery, M A, Hoffman C S. *Schizosaccharomyces pombe* Hsp90/Git10 is required for glucose/cAMP signaling [J]. *Genetics*, 2008, 178(4): 1927-1936.