

牛朊蛋白和酵母朊毒体结构域融合蛋白的原核表达及其单克隆抗体的制备

李炎鑫^{1,2}, 马贵平^{2*}, 杨汉春^{1*}, 刘全国², 史喜菊², 李冰玲²

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100193; 2. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026)

摘要: 利用 DNA 重组技术将酵母 Ure2p 朊蛋白结构域(UPD)基因插入牛朊蛋白(BPrP)表达质粒 pET-PrP 中, 构建原核表达载体 pET-PrP-UPD。阳性质粒转化宿主菌 BL21(DE3), 在 IPTG 诱导下获得高效表达。Western blot 检测表明表达的重组蛋白与单克隆抗体 6H4 呈现特异性反应, 且纯化的 PrP-UPD 融合蛋白在体外具有聚集成淀粉样纤维、抵抗蛋白酶 K 消化等朊毒体的结构特点。利用纯化的 PrP-UPD 免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与 SP2/0 细胞融合, 经克隆和筛选, 获得 3 株稳定分泌抗重组 PrP 单抗的杂交瘤细胞, 分别命名为 1G3、3A4、4D1, 其中 1G3 分泌的单抗能识别细胞型牛朊蛋白, 其 Ig 亚类为 IgG2b, 腹水 ELISA 效价为 1×10^5 , Western blot 表明该单抗具有较强的特异性。

关键词: 牛朊蛋白; 酵母 Ure2p 朊毒体结构域; 构象转变; 单克隆抗体

中图分类号: S852.659.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2012)01-0105-07

Expression of a Chimera of Bovine Prion Protein and Yeast Ure2p Prion Domain in *Escherichia coli* and Preparation of Monoclonal Antibodies Against Prion Protein

LI Yan-xin^{1,2}, MA Gui-ping^{2*}, YANG Han-chun^{1*}, LIU Quan-guo², SHI Xi-ju², LI Bing-ling²

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Beijing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

Abstract: The recombinant expression plasmids pET-PrP-UPD was constructed by inserting Ure2p prion domain (UPD) gene into the recombinant vector pET-PrP. The target gene was successfully expressed in the host cell BL21 (DE3) when induced with IPTG. Specific reaction was found between expressed protein and monoclonal antibody 6H4 by Western blot assay. The purified PrP-UPD fusion protein was polymerized into amyloid fibrils, and exhibited partial resistance to proteinase K, which similar to the structural characteristics of prion. The BALB/c mice were immunized with purified recombinant PrP-UPD fusion protein. Immunized splenocytes were collected and fused with SP2/0 myeloma cell line. Hybridoma culture supernatant was screened by ELISA. Three hybridoma cell lines designated 1G3, 3A4 and 4D1, secreting monoclonal antibodies (mAbs) against recombinant bovine prion protein, were obtained. 1G3 could secrete mAbs against bovine cellular prion protein and its immunoglobulin subclasses were IgG2a. The ELISA titers of the ascites fluid were 1:10 000. The specificity of the mAb 1G3 was confirmed with Western blot.

Key words: bovine prion protein; yeast Ure2p prion domain; conformational conversion; monoclonal antibodies

收稿日期: 2011-05-06

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD06A13)

作者简介: 李炎鑫(1976-), 男, 高级兽医师, 博士, 主要从事动物检验检疫技术研究

* 通讯作者: 马贵平, E-mail: magp@bjciq.gov.cn; 杨汉春, E-mail: yanghanchun1@cau.edu.cn

牛海绵状脑病(Bovine spongiform encephalopathy, BSE)是牛的一种渐进性、致死性的中枢神经系统疾病。该病属于传播性海绵状脑病(Transmissible spongiform encephalopathies, TSE),又称朊毒体病(Prion diseases),其病因目前认为是由宿主的一种细胞型朊蛋白(Cellular isoform of the prion protein, PrP^c)构象发生改变形成致病型朊蛋白(Disease associated isoform of PrP, PrP^{Sc})所致^[1]。制备抗朊蛋白(Prion protein, PrP)的特异性抗体,并在此基础上建立准确、灵敏、快速检测 PrP^{Sc}的方法一直是朊毒体诊断研究的热点。同时,由于 PrP 在所有哺乳动物细胞中都表达,且氨基酸同源性高达 90%以上,所以抗 PrP 抗体的制备受免疫耐受的制约^[2-3]。国外已有多种商品化的牛 PrP 单克隆抗体,但价格昂贵,我们急需具有自主知识产权的疯牛病诊断技术,尤其是国产牛 PrP 单克隆抗体,以用于 BSE 的诊断。

目前研究朊蛋白构象转变的良好模型为酵母朊毒体 Ure2p 或 5up35p,发现酵母表型[URE3]和[PSI]分别是由酵母正常朊蛋白 Ure2p 和 Sup35p 空间结构异常变化引起的^[4]。Ure2p 是一种氮代谢调节蛋白,由 354 个氨基酸残基组成,包括 N 端和 C 端 2 个结构域。N 端 1—65 位氨基酸残基区域被称为 Ure2p 的朊毒体结构域(Ure2p prion domain, UPD),足以诱导朊毒体的产生。重组表达的 Ure2p 朊毒体结构域在体外达到一定浓度时,会自发聚集,形成电镜下可见的纤维状结构,并具有类似 PrP^{Sc} 的理化性质,包括对蛋白酶 K 消化抵抗能力增加^[5]。且酵母朊毒体结构域对构象的改变能力可传递到其融合分子上^[6-7]。本研究中将酵母朊毒体结构域和牛 PrP 蛋白融合表达,利用纯化的 PrP-UPD 融合蛋白在体外具有朊毒体的结构特点,研制牛 PrP 单克隆抗体,为建立 BSE 的快速检测方法及致病机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株和细胞 大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 、BL21(DE3)、pGEM-T 载体、原核表达载体 pET30a、SP2/0 骨髓瘤细胞为本室保存;阳性重组质粒 pGEM-T-bPrP^c 为本研究室构建并保存。

1.1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、限制性内

切酶 *Eco*R I、*Nde* I、*Bam*H I、*Xho* I 和 T4 DNA 连接酶均购自大连宝生物工程公司;蛋白酶 K 购自 Merker 公司;DNA 快速回收试剂盒购自博大泰克生物科技公司;Ni 柱购自 Qiagen 公司;PVDF 膜购自 Millipore 公司;HRP 标记的羊抗鼠 IgG 购自中杉生物公司;HAT、HT 选择培养基购自 GIBCO BRL 公司;DMEM 高糖培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司;PrP 单克隆抗体 6H4、重组 PrP 蛋白购自瑞士 Prionics 公司。

1.1.3 实验动物 BALB/c 小鼠购自中国科学院遗传发育所。

1.2 方法

1.2.1 牛朊蛋白与酵母朊蛋白融合蛋白基因原核表达载体的构建及重组菌的诱导表达 以克隆质粒 pGEM-T-bPrP^c 为模板通过聚合酶链式反应(PCR)克隆牛朊蛋白成熟基因片段 bPrP(25-242),引物 1: 5'-GGCATATG AAGAAGCGACCAAAACCTG-3';引物 2: 5'-GGGAATTC TATTAAGTTC-CCCTCGTTGGTA-3'。末端人为引入 *Nde* I 和 *Eco*R I 2 个酶切位点,扩增参数:94 °C 变性 3 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 1 min,共 30 循环;72 °C 10 min。将扩增到的基因片段双酶切后与 pET30a 载体连接,转化 BL21(DE3)感受态细胞,*Nde* I / *Eco*R I 双酶切鉴定为阳性的菌液测序,正确的重组质粒命名为 pET-PrP。从具有[URE3]表型的酵母 3687 中提取总 DNA,用下列引物克隆 Ure2p₁₋₆₅ 基因,引物 3: 5'-GGGAATTC AATAACAACGGCAACC-3';引物 4: 5'-GGCTCGAGTTA GCGGCCGCTGTTATTG-3',末端人为引入 *Eco*R I 和 *Xho* I 2 个酶切位点。将获得的基因片段双酶切后与 pGEM-T 载体连接,转化,筛选阳性质粒命名为 pGEM-T-UPD,酶切鉴定,测序。用 *Xho* I / *Eco*R I 将 UPD 基因从 pGEM-T-UPD 切出,与 pET-PrP 表达质粒连接,筛选阳性质粒,命名为 pET-PrP-UPD。将重组载体 pET-PrP-UPD 转化 BL21(DE3)感受态细胞,挑取表达菌的单菌落 37 °C 培养至其 OD_{600 nm} 值为 0.6 时,用终浓度为 1 mmol · L⁻¹ 的 IPTG 连续诱导培养 8 h,分别于诱导前和诱导后每隔 1 h 取样电泳鉴定。

1.2.2 表达产物的检测、纯化和复性 将按照上述条件诱导表达基因工程菌,冰浴中超声波破碎,离心,将含有 PrP-UPD 的包涵体沉淀依次用分别含有 0.5% (v/v) Triton X-100, 2 mol · L⁻¹ NaCl 和 2

mol · L⁻¹ 尿素的缓冲液 B(50 mmol · L⁻¹ Tris · HCl、150 mmol · L⁻¹ NaCl、10 mmol · L⁻¹ EDTA, pH 7.4) 进行洗涤,洗涤后的包涵体沉淀用缓冲液 C(10 mmol · L⁻¹ Tris · HCl、pH 8.0, 100 mmol · L⁻¹ Na₂HPO₄, 6 mmol · L⁻¹ GdnHCl、0.5% (v/v) TritonX-100、10 mmol · L⁻¹ β 巯基乙醇) 室温放置过夜溶解,离心,上清与 2 mL 镍螯合填料(用缓冲液 C 平衡)混合摇动 30 min,移到层析柱中。首先用 20 mL 缓冲液 C 洗涤层析柱(流速 0.5 mL · min⁻¹),然后用缓冲液 C 和缓冲液 D(10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, 100 mmol · L⁻¹ Na₂HPO₄) 配成一系列的 16 mL 的混合液依次洗涤层析柱,其中 GdnHCl 的浓度依次为 5、4、3、2、1 mol · L⁻¹。最后用 20 mL 缓冲液 D 洗涤层析柱。柱上复性好的 PrP-UPD 蛋白被缓冲液 E(20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 4.0, 150 mmol · L⁻¹ NaCl) 洗脱下来。收集样品,SDS-PAGE 分析纯化效果。

1.2.3 Western blot 鉴定 将表达的重组蛋白进行 SDS-PAGE 后,转印凝胶上的蛋白质到 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂奶粉溶液将 PVDF 膜封闭 2 h,然后室温下与 PrP 单克隆抗体 6H4 溶液孵育 1 h,再用 PBST 洗涤 2 次,接着放入用 5% 的脱脂奶粉溶液稀释的辣根过氧化物酶羊抗鼠 IgG 溶液中孵育 1 h,最后用 PBST 洗涤 3 次,再加入 ECL 加强发光反应,最后在 X 光片上曝光,显影、定影。

1.2.4 淀粉样纤维的形成与电子显微镜观察 参照文献方法将纯化得到的 PrP-UPD 重组蛋白溶于缓冲液(20 mmol · L⁻¹ NaAc, 150 mmol · L⁻¹ NaCl, pH 5.5) 中^[8],放置于室温。当 PrP-UPD 蛋白浓度高于 1 mg · mL⁻¹ 时,室温过夜后可出现肉眼可见的沉淀。取 5 μL PrP-UPD 融合变构体,滴于喷过碳的铜网上,用去离子水洗 2 次,2% 乙酸铀染色 30 s,再用去离子洗 2 次,空气干燥,在日立 H600A 电子显微镜下观察聚合物的形态。

1.2.5 蛋白酶 K 消化试验 用缓冲液(20 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol · L⁻¹ NaCl, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, pH 8.0) 将 PrP-UPD 融合蛋白的蛋白浓度调整为 1 mg · mL⁻¹,分为 6 份,分别加入蛋白酶 K,使蛋白酶 K 终浓度分别为 20、10、5、3、2、1、0 μg · mL⁻¹,在 37 °C 反应 1 h,立即加入含 5 mmol · L⁻¹ 苯甲基磺酰氟(PMSF)的上样缓冲液,置于沸水中 3~5 min,用 SDS-PAGE 检测消化情况。

1.2.6 重组 PrP-UPD 单克隆抗体的制备

1.2.6.1 免疫方案:纯化的重组融合蛋白经变构处理后作为免疫原,选用 7~8 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行免疫,100 μg · 只⁻¹,皮下多点注射。首次免疫用等量弗氏完全佐剂乳化免疫原,间隔 2 周后,采用等量弗氏不完全佐剂乳化,进行第 2、3、4 次免疫,最后加强免疫,直接用免疫原腹腔注射。

1.2.6.2 杂交瘤细胞的筛选与克隆:以重组牛朊蛋白为包被抗原、以牛朊蛋白和酵母朊蛋白融合蛋白高免小鼠血清为阳性对照、以非免疫小鼠血清为阴性对照的间接 ELISA 方法进行杂交瘤细胞筛选,采用方阵法确定抗原最佳包被浓度为 0.1 μg · 只⁻¹,阳性血清最佳稀释度为 1:5 000,酶联免疫检测仪测定 OD_{490 nm} 值, P/N ≥ 2.1 并接近阳性对照的杂交瘤细胞为阳性孔,阳性孔细胞以有限稀释法进行克隆化^[8],并用按上述方法建立的脑组织匀浆(正常细胞性 PrP)间接 ELISA 方法对重组牛朊蛋白间接 ELISA 方法筛选出的阳性上清进行再次检测。

1.2.6.3 单抗亚类鉴定:按照单克隆抗体亚类鉴定试剂盒说明书进行。

1.2.6.4 单抗腹水制备及效价测定:采用体内诱生法制备腹水^[9],用间接 ELISA 测定腹水中单抗的效价。

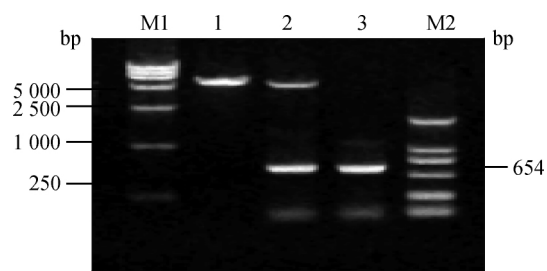
1.2.6.5 单克隆抗体特异性鉴定:10% 正常牛脑组织匀浆、蛋白酶 K 处理的正常牛脑组织匀浆和蛋白酶 K 处理的痒病 263K 感染仓鼠脑组织匀浆经 SDS-PAGE 后,转印 PVDF 膜上,以获得的单克隆抗体为一抗,进行 ECL 加强发光蛋白免疫印迹分析。

2 结 果

2.1 牛朊蛋白与酵母朊蛋白融合蛋白基因原核表达质粒的构建及重组菌的诱导表达

以克隆质粒 pGEM T-bPrP^c 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳出现 1 条约 654 bp 的单一一条带,产物大小与 GenBank 登录的序列(A54330)所推导的片段大小相符。经测序证明,该片段为 bPrP₂₅₋₂₄₂^c 基因。重组表达质粒 pET-PrP 经 Nde I 单酶切、Nde I 和 EcoR I 双酶切以及 PCR 鉴定,结果表明(图 1) Nde I 单酶切可以切除约 6 000 bp 大小的片段(pET-30a 载体 5422 bp + 654 bp),由 Nde I 和 EcoR I 双酶切可以切出约 5 400 bp 和 654 bp 的 DNA 片段,与预期相符,表明重组

质粒构建正确。以从具有[URE3]表型的酵母 3687 中提取的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分析可见约为 180 bp 的单一一条带,产物大小与 GenBank 登录的序列(AF525199)所推导的片段大小相符,PCR 产物通过与 pGEM-T 连接进行克隆,经测序证明,该片段为 Ure2_{p1-65} 基因。pET-PrP-UPD 重组菌分别于诱导前和诱导后不同时间取样进行 SDS-PAGE,结果表明重组菌在诱导后 1 h 即出现 1 条相对分子质量约为 31 ku 的重组融合蛋白条带,大小与预期融合蛋白基本一致(图 2)。重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加,在诱导后 4 h 表达量即达到高峰。经蛋白薄层扫描分析表明,蛋白表达量可占菌体蛋白的 25%。



M1, DL15000 DNA 相对分子质量标准; M2, DL2000 DNA 相对分子质量标准; 1. pETPrP 的 *Nde* I 单酶切; 2. pETPrP 的 *Nde* I 和 *Eco*RI 双酶切; 3. pETPrP 的 PCR 产物

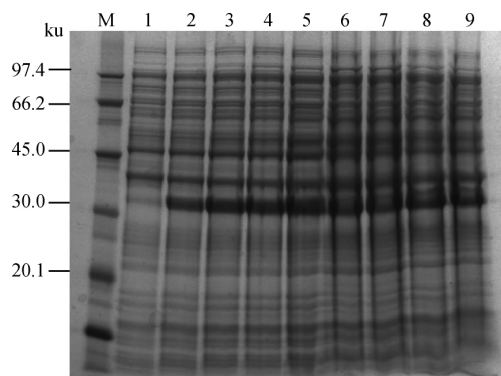
M1, DL15000 DNA marker; M2, DL2000 DNA marker; 1. Digestion of pET-PrP with *Nde* I; 2. Digestion of pET-PrP with *Nde* I and *Eco*RI; 3. PCR product of pET-PrP

图 1 重组表达质粒 pETPrP 的酶切及 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of pET-PrP by PCR and restriction enzyme digestion

2.2 重组蛋白的制备、纯化及复性处理

超声波破菌,得到的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,结果表明融合蛋白主要以包涵体的形式存在,破碎后的菌体沉淀经过 Triton X-100,低浓度尿素的充分洗涤,可有效除去包涵体中的大部分杂蛋白和其它成分(图 3)。然后包涵体在变性和还原条件下,被充分溶解,离心后上清加入镍柱进行亲和层析,并进行梯度洗涤使之在变性剂、还原剂、去污剂浓度逐渐降低的过程中完成纯化和复性过程。经过 Ni 柱亲和层析纯化和复性后得到大于 95%纯度的重组蛋白(图 4)。

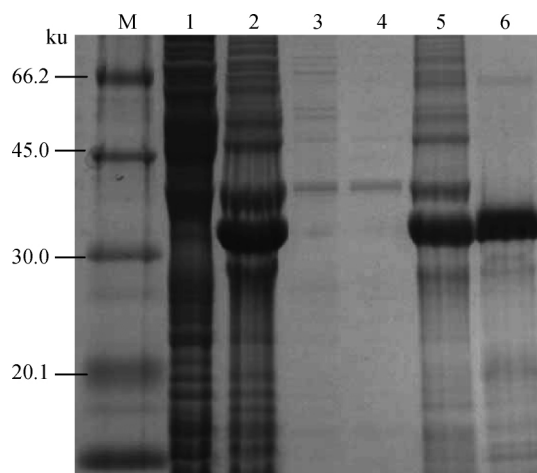


M. 蛋白质低相对分子质量标准; 1. 未诱导的 pET-PrP-UPD/BL21(DE3) 菌体蛋白; 2. 诱导后 1 h 的菌体蛋白; 3. 诱导后 2 h 的菌体蛋白; 4. 诱导后 3 h 的菌体蛋白; 5. 诱导后 4 h 的菌体蛋白; 6. 诱导后 5 h 的菌体蛋白; 7. 诱导后 6 h 的菌体蛋白; 8. 诱导后 7 h 的菌体蛋白; 9. 诱导后 8 h 的菌体蛋白

M. Low molecular weight protein marker; 1. Total bacterial extract before induction; 2-9. Total bacterial extracts 1-8 hours after IPTG induction, respectively

图 2 pET-PrP-UPD/BL21 的诱导表达

Fig. 2 The induced expression of pET-PrP-UPD/BL21 (DE3)

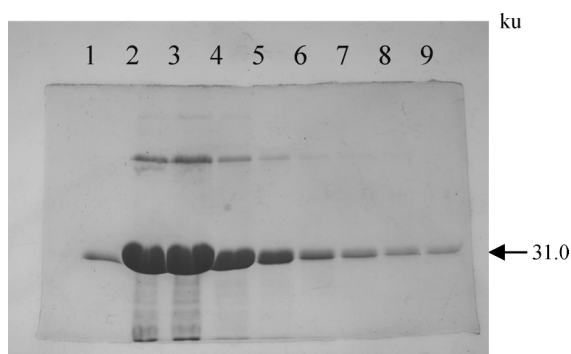


M. 蛋白质低相对分子质量标准; 1. 菌体裂解上清; 2. 菌体裂解沉淀; 3. 0.5% TritonX-100 洗涤上清; 4. 2 mol · L⁻¹ 尿素洗涤上清; 5. TritonX-100 洗涤沉淀; 6. 2 mol · L⁻¹ 尿素洗涤沉淀

M. Low molecular weight protein marker; 1. Supernatant of sonicated lysate; 2. Precipitate of sonicated lysate; 3-4. Supernatant of the inclusion body pellet washed by 0.5% TritonX-100, 2 mol · L⁻¹ urea respectively; 4-5. The inclusion body pellet washed by 0.5% TritonX-100, 2 mol · L⁻¹ urea respectively

图 3 重组融合蛋白 PrP-UPD 包涵体的分离和纯化

Fig. 3 Purification of inclusion bodies of recombinant fusion protein PrP-UPD



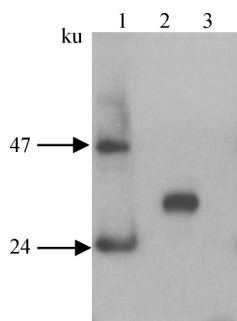
1~9. 依次接收从 Ni 柱洗脱下的 9 管蛋白质 ($1 \text{ mL} \cdot \text{管}^{-1}$), 第 2、3 管浓度最大, 以后逐渐减少
1-9. Nine tubes of protein fractions eluted from the Ni-affinity column

图 4 重组蛋白 PrP-UPD 的镍亲和柱纯化和复性

Fig. 4 Purification and refolding of PrP-UPD using Ni-affinity column

2.3 Western blot 鉴定

用单克隆抗体 6H4 对 pET-PrP-UPD 重组菌诱导后的全菌体蛋白进行 Western blot 分析。结果表明 pET-PrP-UPD 重组菌诱导后的重组融合蛋白 PrP-UPD 在大小约 31 ku 处出现 1 条清晰的反应条带, 而诱导的 pET-30a/BL21(DE3) 无此条带(图 5), 说明表达的重组蛋白 PrP-UPD 可以被单抗 6H4 所识别, 具有良好的免疫反应性。



1. Prionics 公司重组 PrP 蛋白; 2. pET-PrP-UPD/BL21 诱导后菌体蛋白; 3. pET30a/BL21 诱导后菌体蛋白

1. Recombinant bovine PrP (Prionics); 2. Bacterial protein of pET-PrP-UPD/BL21 (DE3) after induction; 3. Bacterial protein of pET30a /BL21(DE3) after induction

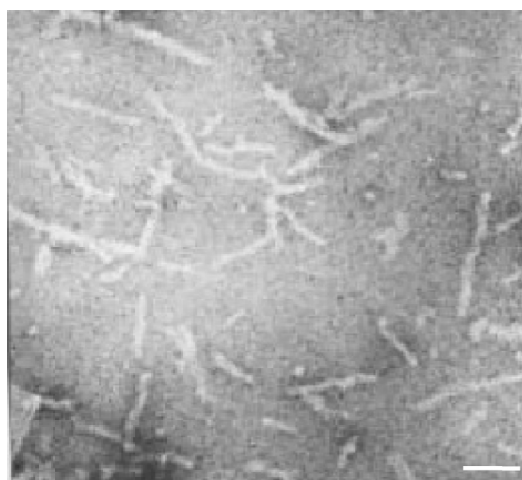
图 5 重组 PrP-UPD 蛋白的免疫印迹检测

Fig. 5 Western blot analysis of the recombinant fusion protein PrP-UPD

2.4 PrP-UPD 融合蛋白聚合物形态

在透射电子显微镜下观察, 这些负染色的 PrP-UPD 蛋白聚集体呈纤维杆状结构, 长度为 100~300 nm, 直径为 6~15 nm, 与致病型朊蛋白 (PrP^{Sc})

形成的纤维状结构相似。



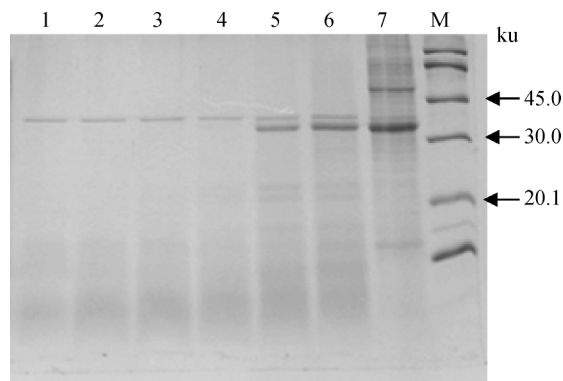
标尺为 100 nm Scale bar=100 nm

图 6 PrP-UPD 淀粉样纤维的电子显微镜观察结果

Fig. 6 Electron micrograph of PrP-UPD amyloid fibrils

2.5 蛋白酶 K 水解试验

在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PrP-UPD 纤维溶液里分别加入不同终浓度的蛋白酶 K, 在 37°C 反应 1 h, 经 Tricine/SDS-PAGE 结果显示 PrP-UPD 纤维在 $1, 2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K 浓度下仍能检测到, 说明 PrP-UPD 融合蛋白对蛋白酶 K 有较强的抵抗力。



M. 蛋白质低相对分子质量标准; 1~7. 蛋白酶 K 浓度分别为 20、10、5、3、2、1、0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$

M. Low molecular weight protein marker; 1-7. The concentration of proteinase K are 20, 10, 5, 3, 2, 1 and 0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively

图 7 PrP-UPD 融合蛋白的蛋白酶 K 抵抗能力

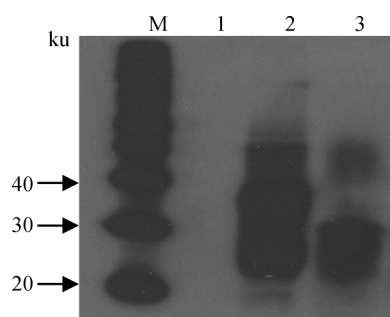
Fig. 7 Protease K digestion of PrP-UPD amyloid fibrils

2.6 重组 bPrP-UPD 单克隆抗体的制备

2.6.1 单克隆抗体的生物学特性测定 经 3 次融合, 得到 3 株能稳定分泌抗重组 PrP 蛋白抗体的杂交瘤细胞株 1G3、3A4 和 4D1, 其中仅 1G3 能特

异性识别正常细胞性牛朊蛋白,经单克隆抗体亚类试剂盒 Southern Biotech 测定,杂交瘤细胞 1G3 为 IgG2b 亚类,轻链为 κ 链。杂交瘤细胞上清间接 ELISA 效价为 1×10^4 ,腹水间接 ELISA 效价为 1×10^5 。

2.6.2 Western blot 分析 图 8 所示 1G3 株腹水与正常牛脑组织和痒病 263K 感染仓鼠脑组织的反应结果。从图 8 中看出,1G3 株单抗腹水与正常牛脑组织中相对分子质量 25~35 ku 处蛋白质结合,并与痒病 263K 感染仓鼠脑组织中 27~30 ku 处蛋白质反应。



M. 蛋白质相对分子质量标准;1. 蛋白酶 K 处理的牛脑组织匀浆;2. 牛脑组织匀浆;3 羊痒病 263K 感染仓鼠脑组织

M. Molecular weight protein marker; 1. Normal cattle brain homogenate after proteinase K treatment; 2. Normal cattle brain homogenate; 3. 263K scrapie strain infected hamster brain homogenate after proteinase K treatment

图 8 单抗 1G3 Western blot 分析

Fig. 8 Western blot analysis of 1G3 to PrP protein

3 讨论

由于抗 PrP 抗体的制备受免疫耐受制约,大多数抗 PrP 的单抗是用基因敲除小鼠($\text{PrP}^{0/0}$)制备的,抗原来自痒病相关纤维蛋白、重组 PrP 蛋白、合成 PrP 多肽^[10]。国内王志亮等以原核表达的重组牛 PrP 蛋白免疫引自瑞士的 PrP 基因敲除小鼠制备了 3 株抗重组牛 PrP 蛋白的杂交瘤细胞系,其中单抗 4C11 通过免疫组织化学能检测出 BSE 阳性切片^[11-12]。已研制成的抗鼠、羊、牛或人 PrP 的单抗绝大多数是能与 PrP^c 结合的单抗,如 3F4、6H4 和 FH11 等,这些单抗对人、牛、鼠及羊 PrP 有交叉反应^[13],迄今为止仅单抗 15B3 能区别 PrP^c 和 PrP^{sc} ^[14],但未见后续应用性报道。

酵母朊蛋白是研究朊蛋白构象变化的重要模

型,酵母 Ure2p 朊蛋白结构域(UPD)类似朊蛋白能自发聚集成规则的淀粉样聚集物,且 UPD 能引起与其融合的其他蛋白的构象发生变化^[15]。在本研究中,作者利用大肠杆菌高效表达了 PrP-UPD 融合蛋白,并确定其表达产物以包涵体形式存在。利用 Triton X-100 的 PBS 以及含 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素的 PBS 依次清洗包涵体,除去了大部分的可溶性蛋白和脂蛋白,纯度已达 80% 以上。朊蛋白具有八肽重复区这一特殊结构域,八肽重复区含较多的组氨酸残基,对二价金属镍离子具有一定的亲和力^[16]。作者利用上述性质,建立了对重组朊蛋白的镍亲和层析纯化和复性方法,降解的 bPrP 蛋白和其它杂蛋白在洗柱的过程中会被除去。通过电子显微镜观察,纯化的 PrP-UPD 形成了纤维样的聚合物, $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 PrP-UPD 在 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶 K 浓度下消化 1 h 仍能检测到,这些结果表明纯化的 PrP-UPD 重组蛋白在体外具有朊蛋白的结构特点,与以往的研究结果是一致的^[5,7]。最近的研究表明这种类似朊蛋白的蛋白并没有感染性,朊蛋白的感染性还需 RNA 等因子参与^[17-18]。

在制备单抗过程中作者采取复性过的重组牛 PrP 作为包被抗原建立 ELISA 方法筛选阳性克隆,这样可避免因酵母朊蛋白结构域引起的假阳性反应。同时,重组牛 PrP 蛋白毕竟不是 100% 复性,可能会漏掉某些天然空间构象的抗体,因此用正常牛细胞性朊蛋白间接 ELISA 方法进行再次筛选,从而挑选出真正分泌识别朊蛋白单抗的杂交瘤细胞。经过三次单抗制备,终于制备出了 1 株对细胞性的正常朊蛋白反应强的杂交瘤细胞 1G3。这对我们来说是一个很大的突破,因为此前多次尝试用重组的牛 PrP 制备单克隆抗体,但获得的单抗仅与重组牛 PrP 反应,而与细胞性的正常朊蛋白反应较弱。本试验利用纯化的 PrP-UPD 蛋白成功制备了牛 PrP 单克隆抗体,进一步说明酵母朊蛋白结构域改变了与其融合的牛 PrP 蛋白构象,相对分子质量的增大、立体构象的复杂性和颗粒性状态都能提高重组 PrP 的免疫原性。

1G3 株单抗与正常牛脑组织 25~35 ku 处蛋白发生了特异性反应,并与羊痒病 263K 仓鼠脑组织约 27~30 ku 处也发生特异性反应,进一步证实了 1G3 株单抗是针对 PrP 的特异性抗体,因此可以判断 1G3 株单抗就是针对牛 PrP 蛋白的特异性抗体。这一抗体在 TSE 诊断中的意义还需在对包括人类

克雅氏病和牛海绵状脑病脑组织的检测中进一步得到证实。

参考文献:

- [1] PRUSINER S B. Prions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:13363-13383.
- [2] KORTH C, STREIT P, OESCH B. Monoclonal antibodies specific for the native, disease-associated isoform of the prion protein[J]. *Methods Enzymol*, 1999, 309:106-122.
- [3] HEPPNER F L, ARRIGHI I, KALINKE U, et al. Immunity against prions? [J]. *Trends Mol Med*, 2001, 7:477-479.
- [4] WIEKER R B. [URE3] as an altered URE2 Protein; evidence for a Prion analog in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Science*, 1994, 264:566-569.
- [5] TAYLOR K L, CHENG N, WILLIAMS R W, et al. Prion domain initiation of amyloid formation *in vitro* from native Ure2p [J]. *Science*, 1999, 283:1339-1343.
- [6] TUIE M E. Yeast prions and their prion-forming domain[J]. *Cell*, 2000, 100:289-292.
- [7] LI Y M, RAO Z H, TIEN P. Conformational change of glutathione-S-transferase by its co-expression with prion domain of yeast Ure2p[J]. *Prog Nat Sci*, 2001, 11:754-759.
- [8] SWIETNICKI W, MORILLAS M, CHEN S G, et al. Aggregation and fibrillization of the recombinant human prion protein huPrP90-231[J]. *Biochemistry*, 2000, 39:424-431.
- [9] 刘秀梵. 单克隆抗体在农业上的应用[M]. 安徽:安徽科学技术出版社, 1994.
- [10] HARMEYER S, PFAFF E, GROSCHUP M H, et al. Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants[J]. *J Gen Virol*, 1998, 79:937-945.
- [11] 吴晓东, 王志亮. 中国黄牛重组 PrP^C 成熟蛋白单克隆抗体的研制[J]. 中国动物检疫, 2002, 19(4):24-25.
- [12] 王志亮, 吴晓东, 刘雨田, 等. 单抗介导牛海绵状脑病免疫组化检测方法的建立及其应用[J]. 中国农业科学, 2005, 38:634-638.
- [13] 马贵平. 几种不同的 PrP 抗体的痒病羊脑组织中 PrP^{Sc} 的敏感性比较[J]. 检验检疫科学, 2002, 12(2):8-10.
- [14] KORTH C, STIERLI B, STREIT P, et al. Prion (PrP^{Sc})-specific epitope defined by a monoclonal antibody[J]. *Nature*, 1997, 390:74-77.
- [15] SCHLUMBERGER M, WILLE H, BALWIN M A, et al. The prion domain of yeast Ure2p induces autocatalytic formation of amyloid fibers by a recombinant fusion protein[J]. *Protein Sci*, 2000, 9:440-451.
- [16] YIN S M, ZHENG Y, TIEN P. On-column purification and refolding of recombinant bovine prion protein: using its octarepeat sequences as a natural affinity tag[J]. *Protein Expression Purif*, 2003, 32:104-109.
- [17] SUPATTAPONE S. What makes prion infectious? [J]. *Science*, 2010, 327:1091-1092.
- [18] WANG F, WANG X, YUAN C G, et al. Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein[J]. *Science*, 2010, 327:1132-1135.

(编辑 白永平)