

• 基础实验研究论著 •

去乙酰化酶 SIRT5 的原核表达及多克隆抗体的制备

徐忠玉¹, 林雅宁¹, 许艺玲²

(中国人民解放军第一七五医院/厦门大学附属东南医院: 1. 检验科, 2. 细胞生物治疗中心, 福建漳州 363000)

摘要:目的 克隆小鼠的 Sirt5 基因, 及制备 SIRT5 多克隆抗体。方法 提取小鼠肝细胞总 RNA 进行 RT-PCR, PCR 法扩增 Sirt5 基因, 将此基因克隆至 pET-28a 载体, 转化 E. coli BL21(DE3), 经异丙- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导表达后, 利用 Ni^{2+} -NTA 亲和层析柱纯化; 纯化的目的蛋白免疫 Bal/c 小鼠后, 收获血清并鉴定。结果 成功构建了 Sirt5 原核表达载体, 并在宿主菌 E. coli BL21(DE3) 中高效表达; 利用纯化的蛋白制备了理想的多克隆抗体。结论 利用分子克隆技术, 获得了高纯度的 SIRT5 蛋白并制备了多克隆抗体, 为进一步研究奠定了基础。

关键词: SIRT5 原核表达; 克隆; 多克隆抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)18-2358-02

Prokaryotic expression of SIRT5 and preparation of its polyclonal antibody

Xu Zhongyu¹, Lin Yaning¹, Xu Yiling²

(1. Department of Clinical Laboratory; 2. Center of Cell Biotherapy, the 175th Hospital of PLA/Affiliated Dongnan Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

Abstract: **Objective** To construct prokaryotic expression vector of SIRT5 and prepare its polyclonal antibody. **Methods** Total RNA isolated from mice liver cell was RT-PCR. Sirt5 was amplified by RT-PCR and cloned into pET-28a plasmid, and the recombinant plasmid was transformed into E. coli BL21(DE3). After induction by IPTG, the fusion protein of SIRT5 was produced, the protein was purified by Ni^{2+} -NTA affinity chromatography. Bal/c mice were immuned with the purified protein of SIRT5, and mice serum was collected for identification. **Results** SIRT5 was successfully constructed and highly expressed in E. coli BL21(DE3). The purified protein was used to prepare polyclonal antibody. **Conclusion** Using molecular cloning technology, purified SIRT5 protein can be obtained and prepared its polyclonal antibody, which may provide an foundation for further investigation.

Key words: SIRT5 prokaryotic expression; cloned; polyclonal antibody

Sirtuins 是近年来发现的第Ⅲ类去乙酰化酶, 其中 Sirtuins 家族包括 Sirtuins 1-7(SIRT1-7), 与细胞衰老、凋亡、代谢和增殖分化密切相关^[1-3]。同时 Sirtuins 的持续研究也许将给癌症的彻底治愈带来可能^[4-5]。SIRT5 定位于线粒体基质中, 其去乙酰化酶活性相当低^[6]。SIRT5 可以调节 CSP1 的去乙酰化, 在小鼠耐饿或者长时间高热量摄取实验中, SIRT5 活性增强, SIRT5 活性的改变可能与细胞增殖以及肿瘤发生有一定关系^[7-8], 但是其在肿瘤细胞研究中的具体生物学功能和特性并不明确。研究者克隆了小鼠 Sirt5 的原核表达载体, 并制备了高效价、特异性的多克隆抗体, 为下一步构建真核表达载体, 及鉴定该基因在肿瘤细胞增殖分化过程中的表达情况奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 用于克隆、表达的质粒 pET-28a, 大肠杆菌(Escherichia coli)菌株 E. coli BL21(DE3)由本实验室保存。

1.1.2 工具酶和试剂 DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、BSA(牛血清清蛋白)均为 Takara 公司产品。琼脂糖、琼脂粉、卡那霉素、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺均为 Biolin 公司产品。蛋白胨、酵母提取物购自 OXOID。IPTG(异丙基硫代- β -D 半乳糖苷)购自 MERCK 公司。蛋白质浓度测定试剂盒为 Bio-Rad 公司产品。寡核苷酸引物由上海生工公司合成。PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒为 Omega 公司产品。 Ni^{2+} -NTA 树脂购自 Novagen

公司。辣根过氧化物(HRP)标羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司, ECL 显色剂购自 Thermo 公司。本研究所用其他化学试剂均系分析纯试剂, 实验中所用水均为 Milli-Q 超纯水。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 RT-PCR 取小鼠肝脏, 液氮研磨后使用 Trizol 试剂, 按照说明书提取总 RNA, 测定纯度并进行琼脂糖凝胶电泳分析。根据逆转录试剂盒说明书进行 RT-PCR。

1.2.2 Sirt5 基因的 PCR 扩增和克隆 以 cDNA 为模板, 使用 Primer 5.0 软件设计引物扩增, 其中 Sirt5 基因号 gi | 118130585: 46-978, 上游引物 Sir5-up-EcoRI: 5' TGC GAA TTC ATG CGA CCT CTC CT'3 和下游引物 Sir5-down-HindIII: 5' CGG CAA GCT TAA GAA GTC CTT TCA GTT '3, PCR 扩增 Sirt5 编码区 cDNA。在上下游引物中分别引入酶切位点 EcoRI 和 HindIII。58 ℃退火进行 30 个 PCR 循环反应, 目的产物用 EcoRI /HindIII 双酶切后与经同样双酶切的载体 pET-28a 进行连接并转化 E. coli BL21(DE3), 挑选阳性克隆, 经双酶切和 PCR 验证后测序鉴定。

1.2.3 诱导表达和纯化 挑取含鉴定正确的重组质粒的表达菌株 E. coli BL21(DE3)/pET-28a-Sirt5 单克隆于 5 mL LB 试管培养基中, 加入相应的抗菌药物, 于 37 ℃恒温、200 r/min 振荡培养过夜。次日, 按 1%接种量转接种后, 继续培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5; 加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 24 ℃诱导, 6 h。收集菌体, 缓冲液 A(10 mmol/L imidazole, 0.5 mol/L NaCl,

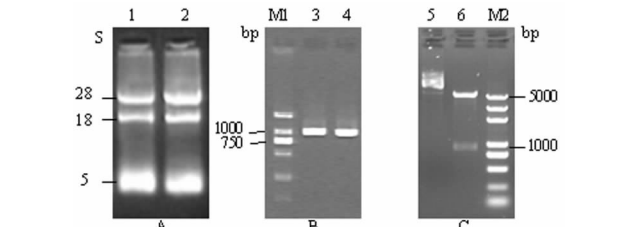
20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.9)清洗菌体 1 次,然后重悬超声破碎后,上清上样于经缓冲液 A 平衡的 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱,然后用不同浓度 imidazole(30 mmol/L,60 mmol/L,100 mmol/L,250 mmol/L)依次洗脱。根据紫外检测仪的读数收集对应的洗脱物,SDS-PAGE 电泳检验纯度后进行透析,再用 PEG20000 浓缩,用 Bio-Rad 公司生产的蛋白质浓度测定试剂盒测定蛋白质的浓度,最后分成小份保存于-20 ℃或-80 ℃。

1.2.4 小鼠多抗的制备和检测 20 μg 纯化的重组蛋白与弗氏佐剂等体积乳化皮下免疫 6 周龄雌性 Bal/c 小鼠,2 周/次,首次免疫与弗氏完全佐剂充分乳化。免疫 4~6 次后采血 ELISA 测定血清效价,最后一次腹腔注射后 5 d 眼球采血分离血清。

1.2.5 Western Blot 鉴定抗体的特异性 利用制备的血清,对 SIRT5 的原核表达产物进行 Western Blot 监测。将诱导表达的重组菌裂解物上清进行 12% 的 SDS-PAGE 电泳分离,150mA 电泳转 PVDF 膜 1.5 h,用 5% 脱脂奶粉封闭过夜,TBS 和 TBST 交替洗涤,制备的多抗血清 1:500 稀释,二抗羊抗鼠 IgG(1:10 000),以 ECL 显色。

2 结 果

2.1 Sirt5 基因的扩增和重组质粒的构建及鉴定 提取的小鼠肝脏总 RNA 测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.9,经琼脂糖凝胶电泳表明所提取的 RNA 是合格的。RT-PCR 后以 cDNA 为模板进行 PCR,扩增得到约 933 bp 的特异性条带,与预期结果相符,双酶切后连接到 pET-28a 质粒中,转入大肠杆菌 E. coli BL21 (DE3)细胞,经过酶切验证后进行全基因测序,将测序结果正确的克隆命名 pET-28a-Sirt5,见图 1。

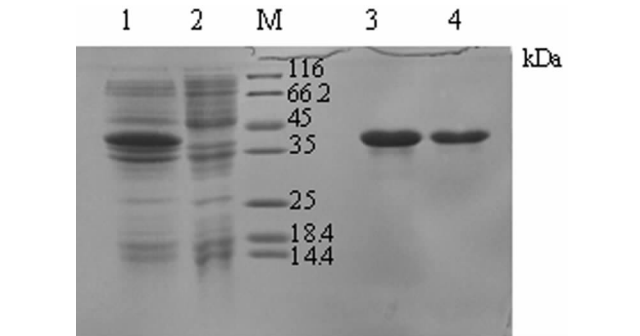


A:电泳分析小鼠肝脏总 RNA;B:PCR 扩增 Sirt5 基因;C:酶切重组质粒;M1:DL2000 marker;M2:DL2000 plus marker;泳道 1 和 2: RNA 条带;泳道 3 和 4:PCR 产物;泳道 5:重组质粒;泳道 6:重组质粒双酶切。

图 1 PCR 扩增包含 Sirt5 编码区的 cDNA 片段及 pET-28a-Sirt5 的菌落酶切鉴定

2.2 重组表达载体的诱导表达和纯化 将测序正确的 pET28a-Sirt5 重组子进行诱导表达,SDS-PAGE 电泳结果表明:0.5 mmol/L IPTG 诱导后大量表达相对分子质量 40×10³ 左右的蛋白,与预期的蛋白大小一致。将表达后的产物经过 Ni²⁺-NTA 亲和层析柱纯化,SDS-PAGE 电泳,见图 2。在 Ni²⁺-NTA 纯化时,目的蛋白主要在 250 mmol/L 咪唑浓度下被洗脱下来。

2.3 ELISA 测定血清效价 纯化的重组蛋白免疫小鼠 4 次后开始采血 ELISA 测定血清效价,免疫的小鼠血清稀释 64000 倍后的 OD 值与对照小鼠的 OD 值相比大于 2,表明小鼠效价高,可以用于制备多抗,见表 1,图 3(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。

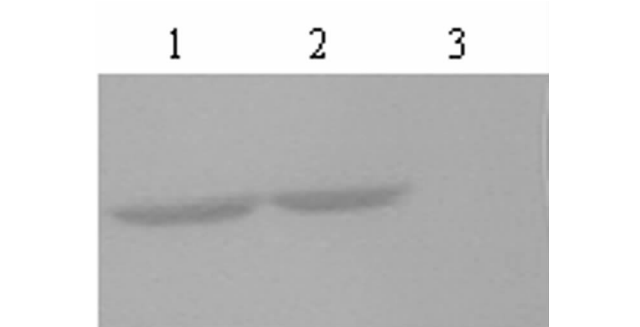


泳道 M: 蛋白 Marker;泳道 1: pET28a-Sirt5 重组子;泳道 2: pET28a 菌株对照;泳道 3 和 4:纯化的 SIRT5 蛋白。

图 2 重组蛋白的表达和纯化

表 1 血清效价测定								
编号	1	2	3	4	5	6	7	8
稀释倍数	500	1 000	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000	64 000
小鼠 a	1.455	1.444	1.154	0.904	0.897	0.828	0.779	0.351
小鼠 b	1.577	1.396	1.267	1.069	0.978	0.687	0.546	0.310
对照小鼠	0.083	0.081	0.076	0.073	0.068	0.084	0.086	0.064

2.4 Western Blot 分析多克隆抗体的特异性 空载体菌体蛋白无杂交条带,重组蛋白在纯化前后都出现一条杂交条带,表明多克隆抗体具有较高的特异性见图 4。



1:纯化后的蛋白;2:IPTG 诱导的重组菌体;3:空载体。
图 4 多克隆抗体 Western Blot 分析

3 讨 论

哺乳动物 SIRT5 定位于线粒体中,在脑、心脏、肝脏和肾脏中高表达,虽然 SIRT5 去乙酰化酶活性很低,但它在调控细胞代谢中是不可缺少的^[9-10]。近年来,对于 SIRT5 的研究越来越多,但它在肿瘤细胞的增殖中的表达情况、相关的生物化学活性和细胞功能目前还是不清楚的,具体相关机制有待于研究清楚。研究者利用健康小鼠肝脏组织,通过 RT-PCR 的方法成功获得了小鼠 Sirt5 的 cDNA,并成功克隆到原核表达载体 pET28a 中,并在表达宿主菌 E. coli BL21(DE3)中诱导表达,经纯化获得高纯度的 SIRT5 蛋白。纯化后的蛋白免疫小鼠 4 次后,获取小鼠血清,鉴定抗体的效价和特异性,结果证明了原核表达的 SIRT5 蛋白具有抗原性,并具有特异性。本研究用 pET28a 载体 SIRT5 蛋白表达量高,可溶性强,载体含有 2 个 His 标签,纯化蛋白纯度高。SIRT5 融合蛋白的成功表达、纯化和多克隆抗体的制备,为其进一步研究奠定了基础。

参考文献

[1] Villalba JM,Alcaín FJ. Sirtuin activators and(下转第 2361 页)

表 1 Hcy、叶酸测定结果及比较 ($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	Hcy($\mu\text{mol/L}$)	叶酸($\mu\text{g/L}$)
对照组	40	10.35 $\pm$ 1.32	9.98 $\pm$ 2.00
脑出血组	24	18.81 $\pm$ 6.64*	6.20 $\pm$ 3.85*
脑梗死组	39	18.35 $\pm$ 6.35*	6.25 $\pm$ 3.01*

* :*P*<0.05,与对照组比较。

2.2 脑血管病患者血液 Hcy 与叶酸的相关性 脑出血组与脑梗死组患者的血清叶酸的浓度随着血清 Hcy 的浓度的升高而下降,呈负相关关系,*r* 分别为-0.14 和-0.17。

3 讨 论

Hcy 又称高半胱氨酸,是一种含硫氨基酸,不属于组成蛋白质的 20 种氨基酸,体内不能合成,只能来源于蛋氨酸(甲硫氨酸)的分解代谢。健康人体内游离型 Hcy 很少,一般是以蛋白结合形式存在。脑出血是神经系统的常见病和多发病,许多原因可导致其发生,包括高血压、高脂血症、血液病等。有研究认为高 Hcy 水平,使内皮细胞肥大、受损,内皮下水肿、纤维组织聚集,血管弹性层断裂和紊乱,促使血管平滑肌细胞 DNA 合成并增殖肥大,使动脉在高血压的作用下更易被破坏而产生脑出血^[5]。另有报道认为高 Hcy 血症诱发脑梗死的机制主要与参与动脉粥样硬化及影响凝血系统等有关,可能机制如下:(1)当体内 Hcy 代谢紊乱,浓度升高,形成 Hcy 巯基内酯后与 LDL 形成复合物,随后被单核巨噬细胞吞噬而形成泡沫细胞,引起动脉粥样硬化;(2) Hcy 刺激血管平滑肌迅速增加,加快动脉粥样硬化;(3) Hcy 可降低血管内皮细胞 NO 合酶活性,使 NO 合成减少,引起血管痉挛,缺血缺氧,加速细胞变性坏死;(4) Hcy 可选择性抑制血栓调节素的表达,干扰内皮蛋白 C 调节,降低抗血栓形成因子Ⅵ和因子Ⅶ的活性,使血凝亢进,促进血栓形成^[6]。本研究显示的脑出血和脑梗死患者血液 Hcy 水平与对照组的比较,其差异均有统计学意义(*P*<0.05),与相关报道基本一致^[7-8]。可认为高 Hcy 血症可能是脑出血和脑梗死患者的危险因素之一,说明测定血清 Hcy 在脑血管疾病的诊断中具有重要的临床意义。

叶酸是 Hcy 代谢辅酶,它的水平与 Hcy 水平密切相关。有研究表明,在急性脑梗死的患者中,叶酸浓度的降低与 Hcy

水平有明显的负相关^[9]。也有研究表明,高 Hcy 血症和低叶酸状态均是深静脉血栓形成(DVT)发生的独立危险因素^[10]。本研究也显示:脑出血组与脑梗死组患者的血清叶酸的浓度随着血清 Hcy 浓度的升高而下降,呈负相关关系(*r* 分别为-0.14 和-0.17)。

总之,定期对脑血管疾病高危人群进行 Hcy 水平、叶酸水平进行检测,并结合临床进行综合分析,一旦发现 Hcy 增高即应尽早给予补充叶酸等治疗措施,使血清 Hcy 水平控制在正常范围内,可以有效降低脑血管疾病的发生,对改善及降低脑血管疾病高危人群的患病率有着重大的意义。

参考文献

[1] Gibson JB,Carson NA,Neill DW. Pathological findings in homocystinuria[J]. Clin Pathol,1964,17(4):427-437.
[2] McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis[J]. Am J Pathol,1969,56(1):111-128.
[3] Pufulete M, Al-Ghnam R, Khushal A., et al. Effect of folic acid supplementation on genomic DNA methylation in patients with colorectal adenoma[J]. Gut,2005,54(5):648-653.
[4] 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经精神科杂志,1996,29(6):379.
[5] 王洗. 同型半胱氨酸与脑出血关系探讨[J]. 天津医药,2010,52(6):495.
[6] 崔树明. 脑梗死患者血清同型半胱氨酸水平的变化[J]. 医学理论与实践,2011,24(6):698.
[7] 张玲,何小林,夏国斌,等. 血浆同型半胱氨酸含量与脑出血患者预后关系分析[J]. 浙江临床医学,2010,12(4):353-355.
[8] 刘伟,鲁广秀. 血浆同型半胱氨酸水平与复发性脑梗死关系的相关性研究[J]. 中国实用神经疾病杂志,2011,14(4):17-19.
[9] 丁钦慕. 急性脑梗死与血浆同型半胱氨酸关系的临床研究[J]. 中国实用神经疾病杂志,2010,13(3):39-40.
[10] 黄黎,杨天伦. 冠心病患者血浆同型半胱氨酸水平与血清叶酸维生素 B12 和维生素 B6 的关系及干预试验研究[J]. 现代医药卫生,2009,25(8):1158-1160.

(收稿日期:2013-03-12)

(上接第 2359 页)

inhibitors[J]. Biofactors,2012,38(5):349-359.
[2] Pirinen E,Lo Sasso G,Auwerx J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis[J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab,2012,26(6):759-770.
[3] Li X,Kazgan N. Mammalian Sirtuins and Energy Metabolism[J]. Int J Biol Sci,2011,7(5):575-587.
[4] Guarente L. Sirtuins as potential targets for metabolic syndrome[J]. Nature,2006,444(7121):868-874.
[5] Milne JC,Denu JM. The Sirtuin family: therapeutic targets to treat diseases of aging[J]. Curr Opin Chem Biol,2008,12(1):11-17.
[6] Schuetz A,Min J,Antoshenko T,Wang CL,et al. Structural Basis of Inhibition of the Human NAD⁺-Dependent deacetylase SIRT5 by suramin[J]. Structure,2007,15(3):377-389.
[7] Nakagawa T,Lomb DJ,Haigis MC,et al. SIRT5 deacetylates car-

bamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle[J]. Cell,2009,137(3):560-570.
[8] Ogura M,Nakamura Y,Tanaka D,et al. Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1[J]. Biochem Biophys Res Commun,2010,393(1):73-78.
[9] Schlicker C,Gertz M,Papatheodorou P,et al. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5[J]. J Mol Biol,2008,382(3):790-801.
[10] Lombard DB,Tishkoff DX,Bao J,et al. Mitochondrial sirtuins in the regulation of mitochondrial activity and metabolic adaptation[J]. Handb Exp Pharmacol[J]. Handb Exp Pharmacol,2011,206(1):163-188.

(收稿日期:2013-04-21)