

S100A16 基因的原核表达和多克隆抗体制备

薛 一, 孙 静, 刘梦兰, 黄 琼, 杜新丽, 张日华, 刘 云*

(南京医科大学第一附属医院老年医学内分泌科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建 S100A16 原核表达载体, 制备 S100A16 蛋白多克隆抗体并初步鉴定。方法: RT-PCR 扩增得到小鼠肝脏组织的 S100A16 基因, 将此片段克隆到带有 His 标签的原核表达载体 pET-28a 多克隆位点, 并转化大肠杆菌 BL21(DE3)。IPTG 诱导融合蛋白表达, 以亲和层析的方法纯化 His-S100A16 融合蛋白。纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定后, 免疫新西兰白兔制备抗血清。分别采用 ELISA 和 Western blot 方法检测抗体效价和特异性。结果: 经双酶切和核酸序列分析证实成功构建 pET-28a-S100A16 原核表达质粒。考马斯亮兰染色结果证实 IPTG 可有效诱导融合蛋白表达。用纯化融合蛋白免疫新西兰白兔得到的 S100A16 抗体血清, 经 ELISA 和 Western blot 检测结果显示该抗体效价高, 特异性好。结论: 构建带有 His 标签的 S100A16 原核表达载体, 并获得高纯度 His-S100A16 融合蛋白及其多克隆抗体, 为进一步研究 S100A16 生物学功能奠定基础。

[关键词] S100A16; 原核表达; 多克隆抗体

[中图分类号] R329.28

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)10-1376-05

Prokaryotic expression of S100A16 and preparation of its polyclonal antibody

XUE Yi, SUN Jing, LIU Meng-lan, HUANG Qiong, DU Xin-li, ZHANG Ri-hua, LIU Yun*

(Department of Geriatrics Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To construct the prokaryotic plasmid expressing the S100A16 and prepare the rabbit polyclonal antibody against S100A16. **Methods:** S100A16 gene was amplified by RT-PCR and cloned into the expression vector pET-28a, then the recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced to express recombinant protein with IPTG. The fusion protein was further purified by affinity chromatography and identified by SDS-PAGE. The rabbit was immunized with fusion protein to produce polyclonal antibody, and the sensitivity and specificity of the antibody was evaluated by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot. **Results:** The recombinant expression plasmid has been successfully constructed, which was confirmed by the restriction enzyme digestion and DNA sequencing analysis. The recombinant protein could be expressed effectively, and the antibody was specific and effective. **Conclusion:** The S100A16 prokaryotic expression plasmid was constructed, and polyclonal antibody directed against this protein has been successfully prepared, which will provide a useful tool for the further research of S100A16.

[Key words] S100A16; prokaryotic expression; polyclonal antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(10): 1376-1380]

S100A16 是钙结合蛋白 S100 家族成员之一。S100 蛋白家族是最大的钙离子结合蛋白亚群, 具有 21 个成员^[1]。S100 蛋白通过与靶蛋白相互作用, 参与多种细胞内外的活动, 在钙离子稳态, 细胞运动、增殖、分化、凋亡、分泌和细胞周期等过程中起重要

作用^[1]。前期研究发现, S100 基因的表达与心肌病、神经退行性疾病和炎症等人类疾病相关^[2]。此外, S100 蛋白在多种肿瘤组织中过表达, 提示其与肿瘤的发生发展密切相关, 并已作为肿瘤相关的生物标志物应用于临床诊断治疗^[3-6]。S100A16 作为 S100 家族的新成员, 广泛表达于人类各个组织中, 具有高度保守性。有研究报道, S100A16 在多种肿瘤组织中表达上调, 提示与肿瘤的进展恶变密切相关^[6]。最新研究发现, S100A16 参与脂肪细胞分化, 是一种新的促脂肪细胞形成因子, 并能够降低胰岛素敏感性^[7]。

[基金项目] 江苏省科技支撑项目(BE2011802); 南京医科大学第一附属医院创新团队工程; 上海市糖尿病重点实验室开放课题(SHKLD-KF-1105)

*通讯作者, E-mail: liuyun@njmu.edu.cn

但是关于 S100A16 调节生理及病理作用的功能及分子机制尚不清楚,有待于深入研究。本研究通过构建 pET-28a-S100A16 原核表达载体,获得 His-S100A16 融合蛋白并进行纯化,由此得到 S100A16 蛋白的特异性多克隆抗体,为进一步研究 S100A16 的生物学功能及明确其在肥胖和肿瘤中的作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

pET-28a 质粒(Invitrogen 公司,美国);大肠杆菌 DH5 α , PrimeScriptTM RT reagent Kit, DNA Marker (TaKaRa 公司,日本);RNA 提取试剂 TRIzol(Invitrogen 公司,美国)。限制性内切酶、修饰酶、T4 DNA 连接酶、*Taq* DNA 聚合酶(New England Biolabs 公司,美国);小量质粒提取试剂盒和 DNA 纯化回收试剂盒(北京百泰克公司产品);新西兰大白兔(南京大学模式动物研究所);S100A16 过表达及 S100A16 全身敲除(*cre+*;S100A16 $loxP/+$)转基因小鼠为本课题组所构建;PVDF 膜(Bio-Rad 公司,美国);辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体(Santa Cruz 公司,美国);His TrapTM HP 亲和层析柱(GE Healthcare 公司,美国);其他常规试剂为国产分析试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成

根据 GenBank 中 S100A16 基因 cDNA 序列(67860),设计合成 1 对引物。上游引物 5'-CGGG-ATCCATGGCTGACTGCTATACAGAG-3';下游引物 5'-AATGCGGCCGCTAGCTGCTGCCCTGCTGGC-3',上下游引物分别引入 *Bam*H I 和 *Not* I 核酸内切酶作用位点,引物由上海 Invitrogen 公司合成。

1.2.2 S100A16 基因 RT-PCR 扩增

提取小鼠肝脏组织总 RNA,将其逆转录构建 cDNA。以产物 cDNA 为模板,按以下反应条件行 PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。将 PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后回收纯化。

1.2.3 重组表达质粒的构建

将纯化后 PCR 产物和 pET-28a 表达载体分别用 *Bam*H I 和 *Not* I 限制性内切酶双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳后再次回收纯化。用 T4 DNA 连接酶将回收纯化的目的片段和载体连接。将重组连接产物 pET-28a-S100A16 转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细

胞,涂布卡那霉素抗性的 LB 平板 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,次日挑选阳性克隆摇菌扩增,以菌液为模板行 PCR 初步鉴定,再将获取的阳性克隆抽提质粒行双酶切鉴定,同时送上海 Invitrogen 生物技术有限公司进行测序分析。

1.2.4 S100A16 基因在大肠杆菌中的表达和纯化

将 pET-28a 空载和测序正确的 pET-28a-S100A16 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),经卡那霉素筛选后,挑单个菌落接种于 5 ml LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日取 1 ml 接种于 100 ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中振荡培养,待菌液的 *D*(600 nm)值为 0.6 时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG,25 $^{\circ}$ C 过夜诱导目的蛋白的表达。4 $^{\circ}$ C,6 000 r/min,10 min 离心收集细菌,PBS 重悬后超声破碎,再次离心后分别收集上清、沉淀,取样进行 SDS-PAGE 分析。收集的上清液经 0.22 μ m 滤器过滤后,用亲和层析柱(His TrapTM HP)纯化回收,具体步骤按说明书进行。将纯化后的蛋白行 SDS-PAGE 电泳并进行考马斯亮蓝染色,-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存待用。

1.2.5 多克隆抗体的制备

采用 2.5 kg 新西兰大白兔作为免疫动物。按每 kg 体重 0.5 mg 抗原进行免疫,皮下多点注射。免疫前耳缘静脉采血,获取免疫前血清作为对照。首次免疫,将纯化得到的 His-S100A16 与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化,后续免疫将抗原与等体积的弗氏不完全佐剂混合免疫。免疫间隔为 2 周,共免疫 4 次。最后 1 次强化免疫后的 10 d 颈动脉采血,分离血清于-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.6 多克隆抗体的鉴定

ELISA 检测:用间接 ELISA 法检测 S100A16 抗血清效价。将本实验室表达纯化的 S100A16 融合蛋白以 5 μ g/ml 的浓度包被 96 孔板,一抗采用 1:10³、1:10⁴、1:10⁵、1:10⁶、1:10⁷、1:10⁸ 梯度稀释的兔血清,二抗采用 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(稀释为 1:5 000),显色底物为邻苯二胺(OPD)。显色结果用酶标仪在波长 450 nm 处进行测定。每块板同时设有空白对照和阴性对照孔,以待测孔的值大于或等于阴性对照孔的 2.1 倍者判为阳性,以判为阳性的最高稀释倍数为终点效价。

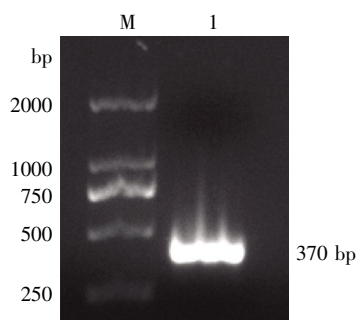
Western blot 鉴定:以免疫前正常血清为对照,将所制备的 S100A16 抗血清作为一抗,用免疫印迹法检测 S100A16 纯化蛋白;并进一步检测小鼠脂肪组织蛋白。取本实验室前期构建的 S100A16 过表达

转基因小鼠^[8]的脂肪组织、S100A16 全身敲除转基因小鼠 (cre+; S100A16loxp/+) 的脂肪组织, 用蛋白裂解液匀浆提取总蛋白, 以纯化的 S100A16 蛋白为阳性对照, S100A16 基因敲除小鼠组织蛋白为阴性对照, 进行 SDS-PAGE 电泳, 后采用电转移 (250 mA, 90 min) 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 加入纯化后兔抗 S100A16 抗血清 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 然后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, ECL 发光显色。

2 结果

2.1 RT-PCR 扩增 S100A16 基因

以小鼠肝脏组织总 RNA 为模板, RT-PCR 扩增目的片段, 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 可见约 370 bp 目的条带, 与 S100A16 基因片段大小一致 (图 1)。



M: DNA Marker LD 2000; 1: RT-PCR 扩增的 S100A16 基因片段。

图 1 RT-PCR 扩增 S100A16 基因

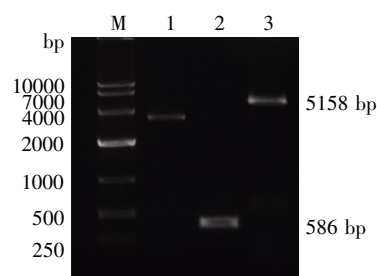
Figure 1 The amplification of S100A16 by RT-PCR

2.2 S100A16 重组表达质粒的构建与鉴定

以菌液为模板进行 PCR 筛选阳性克隆, 并进一步对阳性克隆进行酶切鉴定和测序验证。经菌液 PCR 鉴定, 重组质粒中含有大小为 375 bp 的目的片段; 同时提取质粒, 用 *Bgl* II 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定, 可见约 586 bp 的片段 (含目的片段) 和约 5 158 bp 的 pET-28a 载体片段 (图 2); 测序结果显示重组质粒 pET-28a-S100A 中插入片段与 GenBank 上 S100A16 编码区序列相符。

2.3 S100A16 重组表达载体在大肠杆菌中的表达与鉴定

含有重组质粒的 BL21 (DE3) 工程菌经过 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后, 可以高效表达目的蛋白 (图 3)。为了确定重组蛋白的最佳表达条件, 我们将 BL21 (DE3) 菌在不同 IPTG 浓度 (0.1、0.5、1.0 mmol/L) 下诱导不同时间 (4、6、8 h), 观察融合蛋白 His-

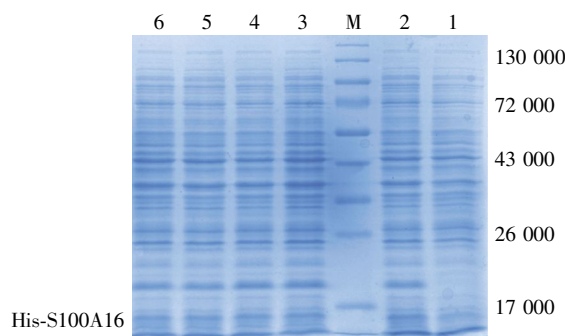


M: DNA Marker LD 10 000; 1: pET-28a 载体; 2: 菌液 PCR 鉴定, 显示插入序列; 3: pET-28a-S100A16 重组质粒双酶切图。

图 2 重组表达质粒 pET-28a-S100A16 的鉴定

Figure 2 The identification of recombinant plasmid pET-28a-S100A16

S100A16 的表达情况。12% SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示: 融合蛋白在 4、6、8 h 都能被诱导, 但在 4 h 后诱导表达量没有显著增高, 并且不同浓度的 IPTG 对融合蛋白表达量没有显著影响。因此, 诱导蛋白的最佳表达条件为 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h。



M: 蛋白 Marker; 1: 诱导前; 2: 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h; 3: 0.1 mmol/L IPTG 诱导 6 h; 4: 0.1 mmol/L IPTG 诱导 8 h; 5: 0.5 mmol/L IPTG 诱导 4 h; 6: 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h。

图 3 融合蛋白 His-S100A16 的诱导表达

Figure 3 The expression of fusion proteins His-S100A16

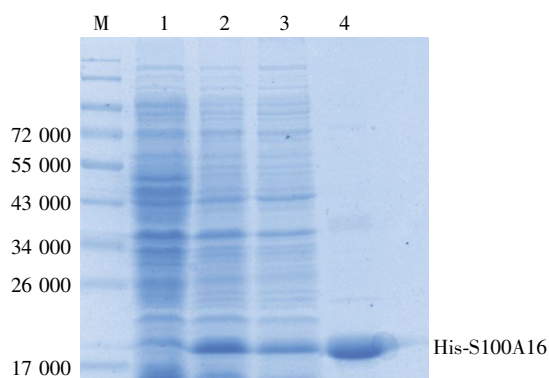
2.4 S100A16 融合蛋白的纯化

对目的蛋白进行可溶性分析, 超声裂解细菌后, 分离上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳分析, His-S100A16 蛋白主要以可溶性的方式存在上清液中。将分离的上清液用镍离子标记的组蛋白亲和层析柱 (His Trap™ HP) 纯化, SDS-PAGE 检测结果显示一条大小约 17 000 蛋白条带 (图 4)。无明显杂带出现, 提示纯度较高。测得纯化蛋白浓度约为 0.5 mg/ml。

2.5 S100A16 多克隆抗体的鉴定

2.5.1 ELISA 检测抗血清效价

第 4 次免疫 10 d 后, 颈动脉采血制备多克隆抗体血清, 梯度稀释进行 ELISA 检测 (图 5), 以免疫前



M: 蛋白 Marker; 1: 诱导前; 2: 0.1 mmol/L IPTG 诱导 6 h; 3: 诱导后上清液; 4: 纯化蛋白。

图 4 融合蛋白 His-S100A16 的纯化

Figure 4 The purification of fusion protein His-S100A16

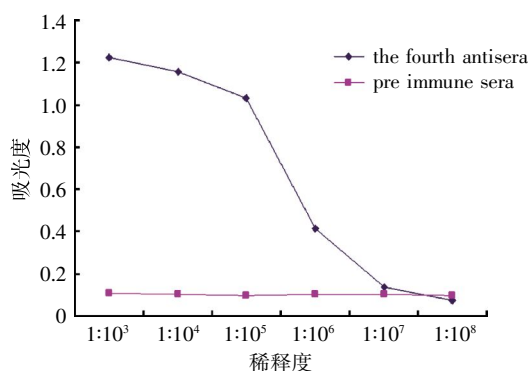


图 5 ELISA 检测抗血清效价

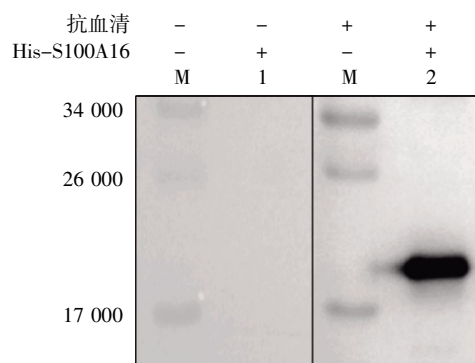
Figure 5 The titer of polyclonal antibody detected by ELISA

正常血清为阴性对照, 计算 P/N 值, 以其 ≥ 2.1 倍时的稀释度作为抗血清的效价。结果显示, 第 4 次免疫后, 家兔的血清效价可达到 $1:10^6$ 。

2.5.2 Western blot 检测

将制备的血清纯化, 并稀释作为一抗进行 Western blot 鉴定 (按 $1:3\ 000$ 稀释), 检测纯化的 His-S100A16 融合蛋白 (带有 His-tag)。以免疫前血清为对照, 结果显示所制备的多克隆抗血清与 His-S100A16 纯化蛋白在大约 17 000 的位置出现特异性的杂交条带, 而免疫前正常血清按同样稀释度在相同位置处无相应条带出现, 表明所制备的抗血清可以高效的检测到 S100A16 蛋白 (图 6)。

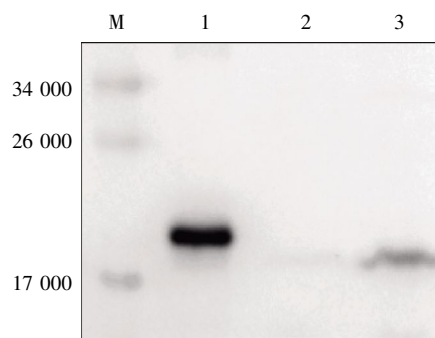
随后进一步用该抗体检测 S100A16 过表达转基因小鼠 (杂合子) 和 S100A16 全身敲除转基因小鼠 (杂合子) 脂肪组织样品, 以纯化的 His-S100A16 融合蛋白为阳性对照, 结果可见大小和预计相符的明显条带; 而 S100A16 敲除小鼠 (杂合子) 的脂肪组织中几乎检测不到该条带, 说明所制备的抗体具有较好的特异性 (图 7)。



M: 蛋白 Marker; 1, 2: S100A16 融合蛋白。

图 6 S100A16 抗血清的 Western blot 鉴定

Figure 6 Western blot analysis of anti-serum to fusion protein S100A16



M: 蛋白 Marker; 1: His-S100A16 融合蛋白 (阳性对照, 带有 His-tag); 2: S100A16 全身敲除小鼠 (杂合子) 脂肪组织; 3: S100A16 过表达小鼠 (杂合子) 脂肪组织。

图 7 Western blot 检测小鼠脂肪组织 S100A16 蛋白

Figure 7 Western blot showing expression of S100A16 in mouse adipose tissue

3 讨论

S100A16 是钙调蛋白 S100 家族的新成员, 在哺乳动物组织中广泛表达。小鼠 S100A16 蛋白由 124 个氨基酸组成, 而人类 S100A16 蛋白由 102 个氨基酸组成。S100A16 通过与钙离子结合而发挥多种生物学功能。研究发现, S100A16 在多种肿瘤组织中表达增加 (膀胱、肺、甲状腺、胰腺和卵巢), 提示 S100A16 与肿瘤的发生发展和转移恶变有关 [6]。S100A16 也是新发现的循环肿瘤细胞相关标志基因, 可在不同恶性转移癌患者末梢血中检测到, 对提示癌症进展和临床预后有重要意义 [9]。同时研究表明, S100A16 蛋白可能在核糖核蛋白复合体多过程、细胞分裂和基因沉默中发挥作用 [10]。细胞内 S100A16 的分布受到 Ca^{2+} 调节, 在 Ca^{2+} 的应答下, S100A16 与靶蛋白结合重新分布在不同细胞组分

中,因此有多种细胞内外功能。Ca²⁺调节的 S100A16 变构提示 S100A16 可能在复杂的细胞信号通路中起作用^[7]。

本课题组前期的研究发现,S100A16 在小鼠3T3-L1 前脂肪细胞形成过程中表达增加,S100A16 过表达可以促进前脂肪细胞增殖和脂肪细胞分化,并促使胰岛素敏感性下降^[7,11]。高钙饮食可以通过S100A16 介导的信号机制抑制脂肪形成并提高胰岛素敏感性^[12]。然而其作用的具体分子机制尚不清楚,为进一步阐明 S100A16 在脂肪细胞分化中及肿瘤发展中可能的作用机制,本研究克隆了小鼠 S100A16 基因,构建原核表达系统并采用 pET 表达系统,利用 T7 强启动子和高活性 T7 RNA 聚合酶,促使目的基因高效表达^[13]。通过对实验过程各个参数不断调整,S100A16 目的蛋白得以最优表达。纯化的 S100A16 融合蛋白通过常规方法免疫新西兰白兔,获得高效价抗血清,制备出多克隆抗体。利用 ELISA 对所获得的抗血清进行检测,其效价达到 1:10⁶ 以上。进一步通过 Western blot 证实该抗体效价高,特异性好。S100A16 抗体的获得,为进一步研究 S100A16 的生物学功能和具体作用机制奠定了有力的实验基础。

[参考文献]

- [1] Heizmann CW. The multifunctional S100 protein family [J]. *Methods Mol Biol*,2002,172:69-80
- [2] Heizmann CW,Fritz G,Schafer BW. S100 proteins: structure,functions and pathology [J]. *Front Biosci*,2002,7: d1356-1368
- [3] Taylor S,Herrington S,Prime W,et al. S100A4 (p9Ka) protein in colon carcinoma and liver metastases: association with carcinoma cells and T-lymphocytes [J]. *Br J Cancer*,2002,86(3):409-416
- [4] Rudland PS,Platt-Higgins A,Renshaw C,et al. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer[J]. *Cancer Res*,2000,60(6):1595-1603
- [5] Camby I,Nagy N,Lopes MB,et al. Supratentorial pilocytic astrocytomas,astrocytomas,anaplastic astrocytomas and glioblastomas are characterized by a differential expression of S100 proteins[J]. *Brain Pathol*,1999,9(1):1-19
- [6] Marenholz I,Heizmann CW. S100A16,a ubiquitously expressed EF-hand protein which is up-regulated in tumors [J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2004,313 (2):237-244
- [7] Liu Y,Zhang RH,Xin J,et al. Identification of S100A16 as a novel adipogenesis promoting factor in 3T3-L1 cells [J]. *Endocrinology*,2011,152(3):903-911
- [8] 杜新丽,薛一,张媛媛,等. S100A16 转基因小鼠的构建与鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2012,32(3):325-328
- [9] Smirnov DA,Zweitzig DR,Fouk BW,et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells [J]. *Cancer Res*,2005,65(12):4993-4997
- [10] Sturchler E,Cox JA,Durussel I,et al. S100A16,a novel calcium-binding protein of the EF-hand superfamily [J]. *J Biol Chem*,2006,281(50):38905-38917
- [11] 辛静,张日华,杜新丽. S100A16 基因 shRNA 真核表达质粒的构建及干扰效果的初步鉴定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2011,31(3):324-327
- [12] Zhang RH,Zhu WD,Du XL,et al. S100A16 mediation of weight gain attenuation induced by dietary calcium [J]. *Metabolism*,2012,61(2):157-163
- [13] Pan SH,Malcolm BA. Reduced background expression and improved plasmid stability with pet vectors in BL21 (DE3) [J]. *Biotechniques*,2000,29(6):1234-1238

[收稿日期] 2012-05-07