

昆虫病原细菌 Cip 蛋白多克隆抗体的制备

游娟¹, 黄建林², 曹莉³, 韩日畴^{3*}

(1. 广东药学院 生物化学与分子生物学系, 广东 广州 510006; 2. 广州计量检测技术研究院, 广东 广州 510030; 3. 广东省昆虫研究所, 广东 广州 510260)

摘要: 昆虫病原发光杆菌属(*Photorhabdus*)细菌产生 2 种胞内晶体蛋白 CipA 和 CipB, 为其共生线虫的生长发育提供营养。基于 Cip 蛋白已在大肠杆菌原核表达系统中得到稳定且高水平表达, 以纯化的重组 Cip 蛋白为抗原, 免疫新西兰大耳兔制备多克隆抗体, ELISA 测定 2 种蛋白抗血清效价, 均可达到 1 : 6 400。Western blot 分析显示, 制备的抗体均可特异识别发光杆菌的胞内晶体蛋白。Cip 蛋白多克隆抗体的制备为建立该类蛋白的免疫学检测方法奠定了基础。

关键词: 昆虫病原细菌; 发光杆菌属; 胞内晶体蛋白; 多克隆抗体; 制备

中图分类号: S476⁺. 11 文献标志码: A 文章编号: 1004 - 3268(2013)08 - 0062 - 05

Preparation of Polyclonal Antibody against Crystalline Inclusion Protein of Entomopathogenic Bacterium

YOU Juan¹, HUANG Jian-lin², CAO Li³, HAN Ri-chou^{3*}

(1. Department of Biochemistry & Molecular Biology, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 2. Guangzhou Institute of Metrology & Testing Technology, Guangzhou 510030, China; 3. Guangdong Entomological Institute, Guangzhou 510260, China)

Abstract: Entomopathogenic *Photorhabdus* bacteria produce two types of intracellular crystalline inclusion proteins, CipA and CipB, as the nutrient resource for the symbiotic nematode. Based on constructed high-level prokaryotic expression system, recombinant Cip proteins were purified with a warm extract method and used as the antigens to immune New Zealand rabbits, respectively. The polyclonal antibodies with the titers of 1 : 6 400 were raised and monitored by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blot assay confirmed that the antibodies could specifically recognize the inclusion proteins in *Photorhabdus* bacteria. Preparation of Cip polyclonal antibodies will be helpful to develop the immunological assay method of these proteins.

Key words: entomopathogenic bacterium; *Photorhabdus*; crystalline inclusion protein; polyclonal antibody; preparation

昆虫病原线虫是一类在世界范围被广泛认可的高效安全的生物农药^[1-2]。昆虫病原发光杆菌属(*Photorhabdus*)细菌定殖于异小杆线虫属(*Heterorhabditis*)线虫肠道, 与线虫互惠共生。细菌产生丰富的代谢产物, 实现对昆虫的毒性, 并为线虫的生长繁殖提供营养^[3]。Cip 蛋白(crystalline inclusion proteins), 包括 CipA 和 CipB, 分子量分别为 11.6 kD、11.3 kD, 是 *Photorhabdus* 细菌胞内产生的 2 种

晶体蛋白^[4-5]。该类蛋白富含疏水氨基酸, 且其氨基酸含量和组成与共生线虫的营养需求一致。在富含 Cip 蛋白的环境中, 线虫的死亡率较低, 大多能完成世代发育并得到具有高感染力的感染期线虫(infective juvenile, IJ)^[6-7], 而感染期线虫的得率是衡量这种生物农药产品质量的指标之一。因此, 对 Cip 蛋白的研究, 有助于阐明“线虫—细菌”的共生机制, 并促进这种生物农药的产业化。

收稿日期: 2013 - 02 - 18

基金项目: 广东省自然科学基金项目(036692)

作者简介: 游娟(1978 -), 女, 湖北洪湖人, 讲师, 博士, 主要从事蛋白质与多肽的生物化学研究。E-mail: youjuan1010@163.com

* 通讯作者: 韩日畴(1963 -), 男, 海南文昌人, 研究员, 博士, 主要从事功能基因及生物农药基因工程研究。

本研究在成功建立Cip原核表达体系的基础上^[7-8],获得了稳定表达的重组Cip蛋白,纯化后分别制备CipA及CipB的多克隆抗体,为Cip蛋白免疫学检测方法的建立奠定基础,并为这类蛋白的进一步研究提供工具。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及试验动物 重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)/pET-15b-cipA及BL21(DE3)/pET-15b-cipB由广东省昆虫研究所构建并保存。新西兰大耳兔,雄性,2 kg左右,购自广东省医学实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 胰蛋白胨(bacto-tryptone)、酵母浸出粉(bacto-yeast extract),英国OXOID公司生产;羧苄青霉素(carbenicillin disodium, Car)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG,美国Sigma公司生产;BugBuster Ni-NTA His Bind Purification Kit,德国Merck公司生产;IPTG(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside),MD生物公司生产;蛋白质宽分子量标准(10~225 kD),美国Promega公司生产;辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG,北京中衫金桥生物技术公司生产;TMB(3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine),华美生物工程公司进口分装;NBT、BCIP、Tween-20,AMRESO公司生产;牛血清白蛋白(BSA),广州博理生物公司进口分装。

1.1.3 主要仪器 Universal 32型台式冷冻离心机,德国Hettich公司生产;Alpha Imager 2200型凝胶图像分析系统,Alpha Innotech公司生产;DEM-III型自动酶标洗板机,北京拓普分析仪器有限公司生产;Model 550型酶标仪,美国BioRad公司生产。

1.2 方法

1.2.1 重组蛋白的诱导表达 在LB(10 g/L胰蛋白胨,5 g/L酵母膏,10 g/L NaCl)抗性平板(含50 μ g/mL Car)上挑取单菌落,接种于3 mL LB(含50 μ g/mL Car)培养基中,37℃活化培养2.5 h,按3%接种量转接并摇瓶培养至对数生长期,加入终浓度为1 mmol/L的IPTG溶液诱导培养8 h。

1.2.2 目的蛋白的提取及纯化 离心菌液,收获的菌体经PBS缓冲液洗涤2次后,重悬于适量PBS中,超声破碎。离心(4℃,10 000 g,10 min),每克沉淀加入4 mL BugBuster试剂充分重悬,加入适量Benzonase核酸酶、rLysozyme稀释液,室温下温和振荡培养20 min。离心(4℃,16 000 g,20 min),将沉淀充分悬浮于等体积的BugBuster试剂中,加入

1 kU/mL rLysozyme溶液,温和振摇10 min,加入6倍体积的BugBuster稀释液,温和振摇3 min,离心(4℃,5 000 g,15 min),沉淀用BugBuster稀释液洗涤2次,离心(4℃,16 000 g,15 min)后将沉淀冻存于-20℃。

取上述提取的目的蛋白粗品,进行15%SDS-PAGE电泳分析,用Gel-Pro(Media Cybernetics)软件分析目的蛋白表达水平。凝胶经蒸馏水洗涤数次,浸泡在4℃、0.25 mol/L的KCl溶液中,待显色后用洁净的手术刀割取目的蛋白条带,剪碎,匀浆器研磨,无菌PBS缓冲液调整凝胶悬液体积,分装后冻存于-20℃。

1.2.3 动物的免疫 采用Bradford法测定蛋白质含量,以无菌PBS缓冲液调整抗原悬液体积,使蛋白质质量浓度为2 mg/mL。将抗原与等量弗氏完全佐剂混合,在无菌研磨器中充分研磨直至完全乳化(一滴乳剂滴入水中呈现稳定不分散的球形)。利用乳化好的抗原溶液在兔背部进行多点注射,每处约0.1 mL,共注射约20处。每隔1周,用弗氏不完全佐剂乳化的抗原加强免疫一次,剂量与初次免疫相同。每次注射完毕,轻轻按摩兔背以帮助吸收。免疫期间,采用间接ELISA法监测抗血清效价上升情况。最后一次免疫在大腿肌肉处两点注射,每点1 mL。免疫后1周,心脏采血,将收集的血液于室温静置2 h,而后4℃静置过夜,使血清自然析出,离心(4℃,5 000 r/min,10 min),将上清分装后于-50℃冻存。

1.2.4 抗血清效价的测定 将CipA及CipB抗原溶于碳酸盐包被液(0.1 mol/L Na_2CO_3 ,0.1 mol/L NaHCO_3 ,pH值9.6)中,终质量浓度分别为0.5 μ g/mL、2.5 μ g/mL。向酶联板每孔加入100 μ L抗原包被液,37℃潮湿孵育2 h,而后4℃过夜。次日,在洗板机上用含有0.1% Tween-20的PBS(PBST)洗涤3次,每次3 min。以PBST溶解BSA,使其含量为5%,每孔加入150 μ L封闭,置于37℃孵育1 h,弃去封闭液,PBST洗涤3次。用PBST分别将CipA、CipB抗血清做倍比稀释(1:100、1:200、1:400、1:800、1:1 600、1:3 200、1:6 400、1:12 800),每孔加入100 μ L。免疫前血清为阴性对照,PBST为空白对照。37℃孵育1 h,PBST洗涤4次;每孔加入100 μ L羊抗兔IgG-HRP二抗(1:10 000稀释),37℃孵育1 h,充分洗涤;配制TMB底物溶液,每孔加入50 μ L,37℃显色15~30 min;每个反应孔中加入50 μ L 2 mol/L H_2SO_4 终止反应;酶标仪上测定OD₄₅₀值。以(待测孔OD₄₅₀值-空白对照OD₄₅₀值)/(阴性对照OD₄₅₀值)

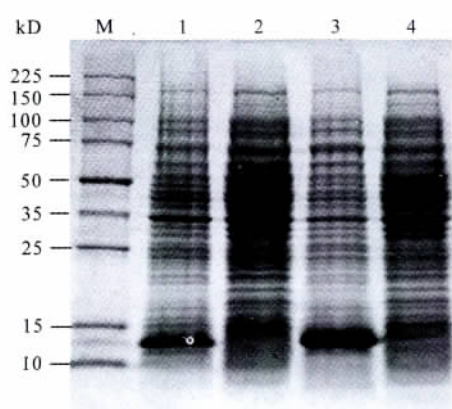
值-空白对照 OD_{450} 值) ≥ 2.1 ($P/N \geq 2.1$), 判为阳性。

1.2.5 Western blot 免疫印迹分析 取 0.2~0.5 mL 重组菌 BL21(DE3)/pET-15b-cipA、BL21(DE3)/pET-15b-cipB 及发光杆菌 (*P. luminescens*) H06 菌株培养液, 离心得菌体, 加入 50 μ L 水与 50 μ L 2 \times SDS-PAGE 上样缓冲液等体积混合, 沸水浴 2 min, 进行菌体总蛋白的 15% SDS-PAGE 电泳。电泳后, 将胶上蛋白质电转移至 PVDF 膜上(250 mA 恒流转膜, 2~4 h)。转印后的膜在甲醇中活化后, 浸入封闭液(TBST, 含 5% BSA)中 4 $^{\circ}$ C 过夜; 弃封闭液, TBS(0.05 mol/L Tris, 0.15 mol/L NaCl, pH 值 7.5)洗膜 4 次, 每次 10 min; 以制备的 CipA 或 CipB 抗血清为一抗, 用 TBST(TBS, 含 0.1% Tween-20)稀释至适当的浓度(按 1:1 000~1:10 000 梯度稀释), 浸入膜, 室温缓摇孵育 2 h; 弃一抗, TBS 洗膜 4 次, 每次 10 min; 将膜浸入 1:30 000 稀释的酶标二抗(碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG)中, 室温缓摇孵育 1 h; 弃二抗, TBS 洗膜 4 次, 每次 10 min。配制底物显色液: 100 μ L NBT/BCIP 溶于 10 mL 缓冲液(100 mmol/L NaCl, 5 mmol/L $MgCl_2$, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 值 9.5), 现配现用。加入适量的显色液使膜显色。

2 结果与分析

2.1 目的蛋白的表达及纯化检测

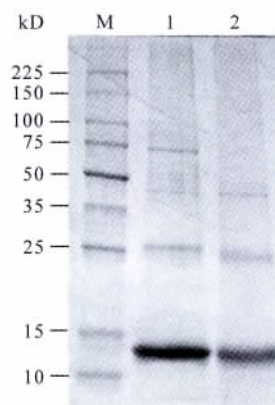
以 pET-15b 为表达载体, *E. coli* BL21(DE3) 为宿主菌, 在 LB 培养基中培养至对数生长期, 用 1 mmol/L IPTG 诱导 8 h, CipA 和 CipB 的表达量可达 30% 以上(CipA, 30%; CipB, 33%)(图 1), CipA 和 CipB 蛋白的表达条件没有明显差异。



M. 蛋白质宽分子量标准;
1. 诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipA 重组菌;
2. 未诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipA 重组菌;
3. 诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipB 重组菌;
4. 未诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipB 重组菌

图 1 重组 Cip 蛋白的诱导表达结果

细菌的破壁效率直接影响到胞内蛋白质的得率。采用传统的超声波破碎结合 BugBuster 试剂抽提的方式对大肠杆菌重组蛋白进行分离纯化, 取得了较好的效果(图 2)。采用 Gel-Pro 软件分析表明: 纯化后目的蛋白 CipA、CipB 分别占纯化产物的 80% 左右。为了获得更高纯度的蛋白用于免疫动物, 将纯化产物进行 15% SDS-PAGE 电泳, 切下目的蛋白对应的条带, 用于动物免疫试验。



M. 蛋白质宽分子量标准; 1. 重组 CipB 蛋白纯化产物;
2. 重组 CipA 蛋白纯化产物

图 2 BugBuster 试剂纯化后的 Cip 蛋白

2.2 多克隆抗体的制备和效价测定结果

动物免疫期间, 间接 ELISA 监测抗血清发现: 随着免疫次数的增加, 动物体内抗体水平持续上升。最后一次加强免疫后 7 d, 心脏穿刺采血, 每只动物获得抗血清 50~60 mL。间接 ELISA 法测得 CipA、CipB 抗血清效价均为 1:6 400(图 3)。

2.3 Western blot 分析结果

将重组菌 BL21(DE3)/pET-15b-cipA、BL21(DE3)/pET-15b-cipB 及发光杆菌 *P. luminescens* H06 菌体总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 之后将胶上的蛋白质电转移至 PVDF 膜, 进行 Western blot 免疫印迹分析。结果发现: 含有重组 CipA 蛋白表达产物的重组菌及 H06 菌株的菌体裂解物均对 CipA 抗血清显示有特异反应信号。说明所制备的 CipA 抗血清能特异识别重组及天然形成的 CipA 蛋白。同样, CipB 抗血清与 H06 胞内晶体蛋白及重组 CipB 蛋白有特异性结合(图 4)。H06 菌株的胞内晶体蛋白是由 CipA、CipB 蛋白构成的混合物, 因而与 2 种抗血清都能产生结合作用。Western blot 分析说明: 所制备的 CipA、CipB 抗血清对 CipA、CipB 蛋白识别分别具有很强的特异性。

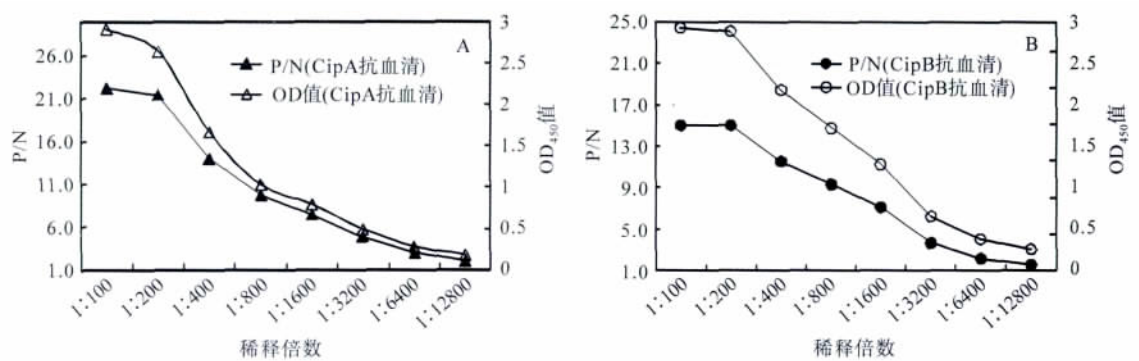
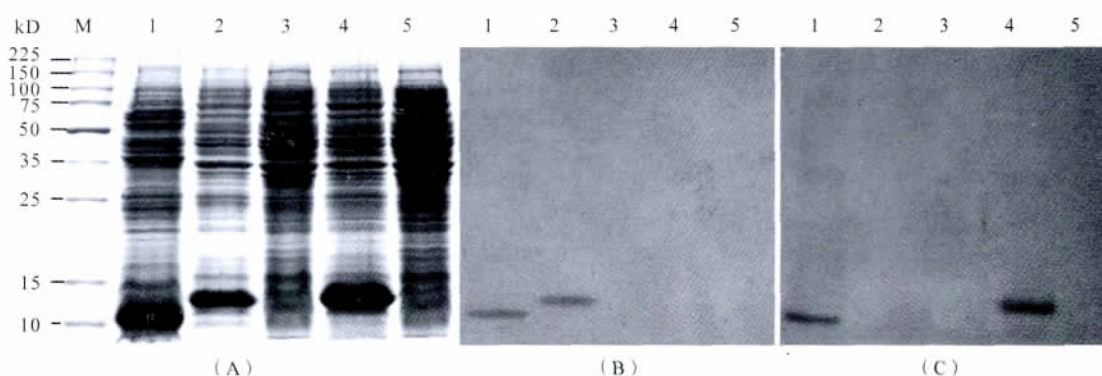


图 3 ELISA 测定 CipA 抗血清(A)及 CipB 抗血清(B)效价结果



(A) 各菌株菌体蛋白的 SDS-PAGE 分析; (B) 以 CipA 抗血清为一抗的 Western blot 分析;

(C) 以 CipB 抗血清为一抗的 Western blot 分析

M. 宽分子量蛋白质标准; 1. *P. luminescens* H06 菌株; 2. 诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipA 重组菌;

3. 未诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipA 重组菌; 4. 诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipB 重组菌;

5. 未诱导的 BL21(DE3)/pET-15b-cipB 重组菌

图 4 Cip 蛋白的免疫印迹分析

3 讨论

发光杆菌 *Photorhabdus* 产生的天然状态的胞内晶体蛋白, 表达量十分可观, 最多可占胞内总蛋白的 40%^[5], 然而由于该蛋白为 CipA 和 CipB 的混合物, 难以分离得到单一的 Cip 蛋白纯品用于制备特异性强的抗体。考虑到已成功构建了高水平表达 Cip 蛋白的原核表达体系, 因此, 采用分离纯化重组的 CipA 及 CipB, 分别作为抗原免疫动物的方法来获得相应的抗体是比较合适和可行的。

纯化胞内蛋白最关键的步骤在于细胞的破壁效率及杂蛋白质的去除方法。在前期的研究中发现, 采用传统的超声波破碎结合 BugBuster 试剂非机械抽提的方法, 裂解效率高, 而且目的蛋白的得率也很高。将收获的菌体细胞充分重悬于 BugBuster 试剂中, 后者含有的非离子和两性去污剂的协同作用使细胞壁温和穿孔, 同时, 一些不溶的膜蛋白会转化为可溶状态。rLysozyme 试剂的加入进一步提高了破壁效率。细菌裂解液一般较黏

稠, 影响后续纯化步骤的流速及得率。经过 Benzonase 裂解酶短时间的消化作用, 可使裂解液的黏度降低。重组的 CipA 及 CipB 蛋白以包涵体的形式位于低黏度的不溶组分中, 离心时可与可溶性组分分开, 通过对不溶组分的反复洗涤, 可以得到初步纯化的包涵体蛋白。

经软件分析, 纯化后的包涵体中, CipA 和 CipB 含量可达 80%。为了进一步获得更高纯度的样品作为抗原, 将纯化的包涵体蛋白大量进行 SDS-PAGE 电泳, 分别割取 CipA 及 CipB 蛋白目的条带。目前发现, 许多金属盐溶液都能对 SDS-PAGE 凝胶进行染色^[9-10], 本试验选用 0.25 mol/L 的 KCl 溶液染色, 然后割胶。一方面, KCl 溶液染色快速, 分辨效果较好, 能减少常规考马斯亮蓝 R-250 染色所需的冗长时间, 也利于在需要的情况下, 后续对蛋白质进行电洗脱回收; 另一方面, 经过 KCl 溶液处理后, 仍可采用考马斯亮蓝继续染色。

抗血清的免疫效果除了与抗原的理化性质和

动物的选用有关外,还与免疫的抗原剂量、免疫途径、免疫次数以及免疫佐剂的选择等因素有关。制备抗血清时,选用常用的免疫动物——新西兰大耳兔,雄性,每种抗原用 2 只,避免个体差异。每次免疫的抗原剂量均约为 2 mg/只,采用皮内多点注射结合肌肉两点注射的方式。初次免疫,抗原以弗氏完全佐剂乳化,以增强机体对抗原产生的免疫应答,加强免疫时则采用弗氏不完全佐剂与抗原溶液等比例乳化。采用 ELISA 监测免疫期间抗血清效价上升情况,当血清中抗体水平上升至理想效价后,最后再加强免疫 1 次,而后获得相应抗血清,间接 ELISA 测定 2 种抗血清效价均达到 1:6 400。Western blot 结果显示:获得的抗血清不仅识别原核表达的重组蛋白,而且可以特异识别由昆虫病原细菌产生的天然蛋白,可见抗体有较强的特异性。CipA 及 CipB 多克隆抗体的制备有助于建立该类蛋白的免疫学检测方法,为昆虫病原 *Photorhabdus* 细菌胞内晶体蛋白及其相互作用蛋白的进一步研究提供了工具。

参考文献:

- [1] Bowen D, Rocheleau T A, Blackburn M, *et al.* Insecticidal toxins from the bacterium *Photorhabdus luminescens*[J]. Science, 1998, 280: 2129-2132.
- [2] Poinar G O Jr. Nematodes for biological control of insects[M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1979: 270.
- [3] Forst S, Clarke D. Nematode-bacterium symbiosis[M]// Gaugler R. Entomopathogenic nematology. London: CAB International, 2001: 57-77.
- [4] Bintrim S B, Ensign J C. Insertional inactivation of genes encoding the crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* results in mutants with pleiotropic phenotypes[J]. J Bacteriol, 1998, 180(5): 1261-1269.
- [5] Bowen D J, Ensign J C. Isolation and characterization of intracellular protein inclusion produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens* [J]. Appl Envir Microbiol, 2001, 67(10): 4834-4841.
- [6] Hussein M, Ehlers R U. Significance of the *Photorhabdus luminescens* inclusion protein for the development of Heterorhabditis bacteriophora[C]//COST 819 entomopathogenic nematodes——Virulence factors and secondary metabolites from symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes. Luxembourg: Office for Official Publications of the EC(EUR 19203 EN), 2001.
- [7] You J, Liang S, Cao L, *et al.* Nutritive significance of crystalline inclusion proteins of *Photorhabdus luminescens* in *Steinernema* nematodes[J]. FEMS Microbiol Ecol, 2006, 55(2): 178-185.
- [8] 游娟, 黄建林, 曹莉, 等. 昆虫病原细菌 Cip 蛋白基因工程菌发酵条件的优化[J]. 河南农业科学, 2012, 41(6): 92-96.
- [9] 康彬, 董哲. 一种有利于蛋白质回收的快速 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳染色方法[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 210-211.
- [10] 高慎阳, 查恩辉, 王坤, 等. 一种高性价比切胶纯化原核表达蛋白的方法[J]. 中国农学通报, 2010, 26(22): 24-26.