



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170077

数字出版日期: 2018-06-26; 数字出版网址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1355.N.20180626.1443.008.html>

## 苜蓿中华根瘤菌烯酯酰 ACP 还原酶 FABI2 的 原核表达纯化以及多克隆抗体的制备

张亚璇<sup>1</sup>, 王海洪<sup>2</sup>, 樊振川<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学大健康生物技术研究所, 天津市大健康生物技术国际联合研究中心,  
天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457;  
2. 华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

**摘要:** 烯酯酰 ACP 还原酶基因 *fabI* 是脂肪酸合成途径中的关键基因, 苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 基因组中有这一基因的同源基因 *fabI1* 和 *fabI2*, 为了对中华苜蓿根瘤菌烯酯酰 ACP 还原酶基因 *fabI2* 的功能进行深入研究, 本实验进行该基因多克隆抗体的制备. 从已有的 pET-28b-FABI2 质粒中扩增出目的片段, 构建了带有 GST 标签的原核表达载体 pGEX-2T-FABI2, 将两个标签的表达载体转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 后, 在 0.1 mmol/L IPTG、20 °C、185 r/min 条件下诱导 6 h, 分别获得相对分子质量约为  $2.8 \times 10^4$ 、 $5.4 \times 10^4$  表达 *fabI2* 的重组蛋白, 且均在上清液中以可溶性蛋白的形式存在. 将经 Ni 柱亲和纯化的  $6 \times \text{His}$ -FABI2 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 4 次免疫后测效价达 256 000. 进一步将抗血清经过 Protein A 纯化获得了高特异性和灵敏度的多克隆抗体. 以得到的抗体为一抗, 另一个标签的抗原上样进行免疫印迹 (Western blot) 检测, 为单一条带, 说明制备的多克隆抗体能够很好地识别 FABI2 蛋白, 并且排除了标签所产生的抗体对 Western blot 结果的影响.

**关键词:** 苜蓿中华根瘤菌; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2018)05-0020-05

## Prokaryotic Expression and Purification of Allyl Acyl ACP Reductase in *Sinorhizobium meliloti* and Preparation of Polyclonal Antibody

ZHANG Yaxuan<sup>1</sup>, WANG Haihong<sup>2</sup>, FAN Zhenchuan<sup>1</sup>

(1. Institute of Health Biotechnology, International Collaborative Research Center for Health Biotechnology,  
College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;  
2. College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Allyl acyl ACP reductase gene *fabI* is the key gene in the synthesis of fatty acid, and *fabI1* and *fabI2* are its homologous genes in *Sinorhizobium meliloti* genome. In order to further study the function of the allyl acyl ACP reductase gene *fabI* in *Sinorhizobium meliloti*, polyclonal antibody was prepared. Target fragments were amplified out from pET-28b-FABI2 plasmid, and a GST-tagged prokaryotic expression vector of *fabI2* gene from *Sinorhizobium meliloti* was constructed. The fusion protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Under the conditions of 0.1 mmol/L IPTG, 20 °C, 185 r/min and induced for 6 hours, the molecular weight of the fusion proteins was  $2.8 \times 10^4$  and  $5.4 \times 10^4$ , and could exist in supernatant in the form of soluble protein. New Zealand white rabbits were immunized with the Ni-column affinity purified  $6 \times \text{His}$ -FABI2 fusion protein. After four immunizations, their titer reached 256 000. The antiserum was further purified with Protein A to obtain highly specific and sensitive polyclonal antibodies. The prepared antibody was used as primary antibody, and GST-tagged expressed protein as a sample, the results of Western blot showed that the polyclonal anti-

收稿日期: 2017-03-27; 修回日期: 2017-06-05

基金项目: 国际遗传工程与生物技术中心 (ICGEB) 研究资助项目 (CRP/CHN15-01)

作者简介: 张亚璇 (1993—), 女, 山东人, 硕士研究生; 通信作者: 樊振川, 教授, fanzhen@tust.edu.cn

body was very good at recognizing the FABI2 protein in *Sinorhizobium meliloti*, and the effect of the antibodies produced by labels on the results of Western blot was excluded.

**Key words:** *Sinorhizobium meliloti*; prokaryotic expression; protein affinity purification; polyclonal antibody

脂肪酸合成代谢是生物细胞中的基础代谢之一,是细胞膜形成的第一步,对细菌生理有关键作用. 根据合成酶系统的差异,脂肪酸生物合成系统的酶被分为 I 型脂肪酸合成酶系 (FAS I) 和 II 型脂肪酸合成酶系 (FAS II)<sup>[1-2]</sup>. 烯酯酰 ACP 还原酶是 II 型脂肪酸合成途径中的关键酶之一,它催化延伸反应的最后一步,将反-2-烯酯酰 ACP 还原为饱和酯酰 ACP<sup>[3]</sup>. 最早被鉴定的烯酯酰 ACP 还原酶基因是大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中的 *fabI*, 随着基因组测序的完成,基因组信息揭示了苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 基因组中有这一基因的同源基因 *fabI1* 和 *fabI2*. 这两个基因都位于环状的染色体上, *fabI1* 由 smc00005 编码, *fabI2* 由 smc00326 编码<sup>[4-5]</sup>, 与脂肪酸合成基因 *fabBA* 相邻. 它们与大肠杆菌 FABI 蛋白的相似度为 51% 和 50%, 且 *fabI2* 的序列与 *fabI1* 有 66% 的一致性<sup>[6]</sup>, 但两个基因及相应酶存在差异.

苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*)<sup>[7-8]</sup> 是一类能与豆科苜蓿类植物共生形成根瘤的革兰氏阴性细菌. 目前对其研究主要集中在共生固氮机制和抗逆性两个方面<sup>[9]</sup>, 并证明了脂肪酸合成系统对苜蓿中华根瘤菌的共生固氮和抗逆性均有显著影响, 但对于基因 *fabI2* 功能研究还未深入. 本实验制备苜蓿中华根瘤菌烯酯酰 ACP 还原酶基因 *fabI2* 的抗体, 是顺利完成 FABI2 在蛋白水平表达模式以及 FABI2 与其他蛋白互作机制研究的重要前提, 有利于进一步对 *fabI2* 基因在脂肪酸合成中的功能进行深入研究.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-blue、BL21 (DE3) 感受态细胞为本实验室保存. pET-28b-FABI2 质粒为华南农业大学王海洪教授提供.

#### 1.1.2 试剂

实验所用的酶及相对应的缓冲液、DNA 相对分子质量 marker 和蛋白 marker, 美国 Thermo 公司; Ni Sepharose™ 6 Fast Flow、Glutathione Sepharose™ 4B 蛋白纯化填料和 Protein A Sepharose™ CL-4B 抗体纯化填料, 美国 GE Healthcare 公司; 弗式完全佐剂

和不完全佐剂, 美国 Sigma 公司; HRP 标记的羊抗兔抗体, 美国 Cell Signaling 公司; 其他试剂均为国产分析纯.

#### 1.1.3 试验动物

新西兰大白兔 2 只, 普通级, 体质量 1.5 ~ 2.0 kg, 由北京市海淀区兴隆实验动物养殖场提供, 许可证号为 SCXK(京)2016-0003.

## 1.2 方法

### 1.2.1 pGEX-2T-FABI2 原核表达载体的构建

设计带有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的引物从 pET-28b-FABI2 质粒中扩增目的片段, 引物设计为上游引物加入 *Bam*H I 酶切位点: 5'-ATGGATCCATG AACGGATTGATGAAC-3', 下游引物加入 *Hind* III 酶切位点: 5'-ATAAGCTTTTAATCCGCGTCTGCGAC-3'. 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s; 56 °C 30 s, 30 个循环; 72 °C 1 min; 72 °C 终延伸 15 min. 利用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收扩增产物后, 再用 *Bam*H I 和 *Hind* III 分别将回收的目的基因片段、pGEX-2T 载体进行酶切; 然后用 T4 DNA 连接酶连接后, 转入 *E. coli* XL1-blue 感受态细胞, 经 PCR、双酶切验证后, 筛选出符合要求的阳性克隆, 并进行测序鉴定.

### 1.2.2 融合蛋白的诱导表达及鉴定

采用化学转化的方法将 pET-28b-FABI2 和 pGEX-2T-FABI2 转入大肠杆菌 BL21 (DE3), 分别挑取单菌落至 5 mL LB 液体培养基 (分别含 100 μg/mL 卡那霉素和 120 μg/mL 氨苄青霉素), 37 °C 摇床过夜培养. 再以 1 : 50 的比例放大培养至  $A_{600}$  为 0.6 ~ 0.8 时, 加入 0.1 mmol/L IPTG 于 20 °C、185 r/min 条件下诱导 6 h 使蛋白大量表达. 4 °C、6 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体, 用 PBS 溶液漂洗两次后用细胞破碎仪超声裂解 30 min. 分别取诱导前、全蛋白、上清液和沉淀与 2 × 蛋白质上样缓冲液混合后进行 13% SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达<sup>[10-11]</sup>.

### 1.2.3 融合蛋白的纯化

6 × His-FABI2 融合蛋白诱导表达后, 将收集的菌体于裂解液 (20 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、200 mmol/L NaCl、20 mmol/L 咪唑) 中超声破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min. 取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤后加入到预先用裂解液平衡好的 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 纯化柱中, 室温结合 1 h 后, 分别用含有

50 mmol/L、100 mmol/L 咪唑的裂解液进行漂洗,除去结合不牢的蛋白.最后用含有 500 mmol/L 咪唑的裂解液进行洗脱,得到纯化后的目的蛋白.将上述收集的流出液组分、漂洗液组分以及洗脱液组分分别用 13% SDS-PAGE 检测蛋白纯度<sup>[12]</sup>.

pGEX-2T-FABI2 融合蛋白诱导表达后进行超声破碎,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min.取上清液过膜后加入到预先平衡好的 Glutathione Sepharose™ 4B 纯化柱中,室温结合 1 h 后,用 10 倍柱体积的裂解液(1 × PBS)进行漂洗,除去结合不牢的蛋白.最后用含有 20 mmol/L 还原型谷胱甘肽的裂解液洗脱目的蛋白,得到纯化后的目的蛋白.将上述收集的流出液组分、漂洗液及洗脱液组分分别用 13% SDS-PAGE 检测蛋白纯度.

#### 1.2.4 免疫

将纯化后的 6 × His-FABI2 融合蛋白稀释到 1 mg/L,取 2 mL 蛋白与等体积的弗氏佐剂混合后乳化完全,免疫新西兰大白兔.采用颈背部多点注射法,初次免疫使用弗氏完全佐剂且免疫前进行耳缘静脉采血<sup>[13]</sup>作为阴性对照血清.之后每 10 d 进行加强免疫,使用弗氏不完全佐剂,一共加强免疫 3 次.最后 1 次加强免疫后进行耳缘静脉采血,利用间接 ELISA 法测定抗血清的效价.效价合格后,股动脉采血,4 °C 静置过夜后收集血清,分装冻存.

#### 1.2.5 多克隆抗体效价的检测

采用 ELISA 法检测抗血清的效价,以 GST-FABI2 蛋白作为包被抗原,4 °C 包被过夜,用 PBST 洗 3 次以去掉结合不牢的蛋白.用 5% 的脱脂乳粉封闭 1 h 后,以所得的抗血清为一抗,一抗的稀释倍数分别为 1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000、1 : 8 000、1 : 16 000、1 : 32 000、1 : 64 000、128 000,HRP 标记的羊抗兔抗体为二抗,稀释倍数为 1 : 20 000,最后经过 TMB 显色,测定 450 nm 处的吸光度,并计算出抗血清的效价.以实验组血清  $A_{450}$  与阴性对照血清  $A_{450}$  的比值大于 2 即为阳性,其最高稀释度即为抗血清的效价.

#### 1.2.6 多克隆抗体的 Protein A 亲和纯化

由于 Protein A 专一性吸附 IgG,可以去除 IgG 之外的其他抗体分子,所以采用 Protein A 对抗血清进行亲和纯化.取 1 mL 抗血清加入 13 mL 结合液(20 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.0)平衡血清.将平衡后的血清经 0.45  $\mu\text{m}$  滤膜过滤后加入预先平衡好的纯化柱中,室温下与填料结合 30 min.结合完毕后放出流出液,用 0.1 mol/L 甘氨酸洗脱后得到纯化后的抗

体,经 1 mol/L Tris-HCl(pH 9.0)调节洗脱液至中性后于 -80 °C 保存.

#### 1.2.7 免疫印迹法检测多克隆抗体的特异性

对 4 次免疫后经 Protein A 纯化后的抗体进行免疫印迹检测多克隆抗体的特异性.样品为诱导表达的另一标签抗原 GST-FABI2,将诱导表达后的细胞超声破碎后离心取上清液,进行 13% SDS-PAGE,转膜后,用 5% 脱脂乳粉封闭 1 h.将纯化后的多克隆抗体按一定的比例稀释,稀释度分别为 1 : 300、1 : 600、1 : 1 000、1 : 1 200、1 : 2 400、1 : 4 800,室温摇床孵育 1 h, PBST 洗 3 次.将 AP 标记的羊抗兔抗体稀释 10 000 倍后,室温摇床孵育 1 h,最后进行 AP 显色.

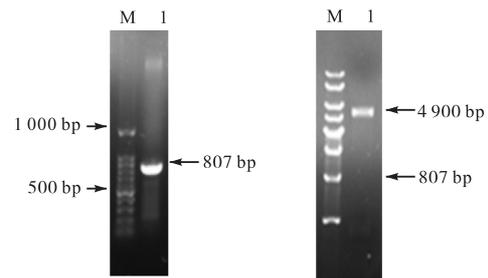
#### 1.3 数据统计分析

用 Excel 2010 软件分析数据,计算标准偏差并制图.

## 2 结果与分析

### 2.1 pGEX-2T-FABI2 原核表达载体的构建

为了获得 5'-末端携带 GST 标签的 FABI2 融合蛋白,构建了 pGEX-2T-FABI2 表达载体.以提取的 pGEX-2T-FABI2 质粒为模板,用之前设计好的 FABI2 引物进行 PCR 验证和双酶切验证,获得条带大小约为 807 bp 的片段.最后经测序验证序列完全正确,没有突变位点,表明表达载体构建成功(图 1).



(a) *fabI2* 的 PCR 验证 (b) *fabI2* 的双酶切验证  
M. 核酸 marker; (a) 1. PCR 扩增基因片段; (b) 1. *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切 pGEX-2T-FABI2

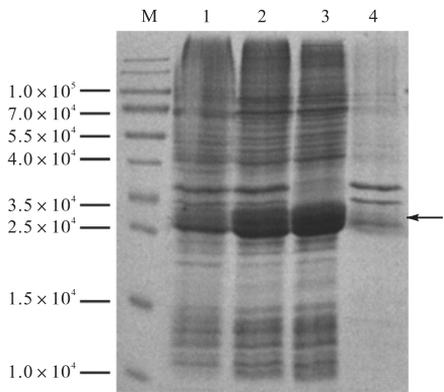
图 1 *fabI2* 的 PCR 验证和重组载体的双酶切验证

Fig. 1 PCR amplification of *fabI2* and restriction identification of recombinant expression plasmids

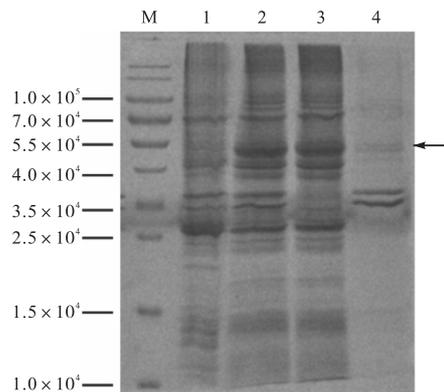
### 2.2 6 × His-FABI2 和 GST-FABI2 融合蛋白的诱导表达

SDS-PAGE 检测重组表达载体 pET-28b-FABI2 和 pGEX-2T-FABI2 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达,结果如图 2 所示.由图 2 可知,在 0.1 mmol/L IPTG、

20 ℃、185 r/min 条件下诱导 6 h 后,含有 pET-28b-FAB12 和 pGEX-2T-FAB12 质粒的大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株分别在约  $2.8 \times 10^4$  和  $5.4 \times 10^4$  处大量表达目的蛋白,且蛋白的表达主要集中在上清液。



(a) 6 × His-FAB12 融合蛋白的表达



(b) GST-FAB12 融合蛋白的表达

M. 蛋白 marker; 1. 诱导前全蛋白; 2. 诱导后全蛋白; 3. 诱导后上清液; 4. 诱导后沉淀

图 2 SDS-PAGE 检测重组表达载体 pET-28b-FAB12 和 pGEX-2T-FAB12 在 *E. coli* BL21 (DE3) 中的表达

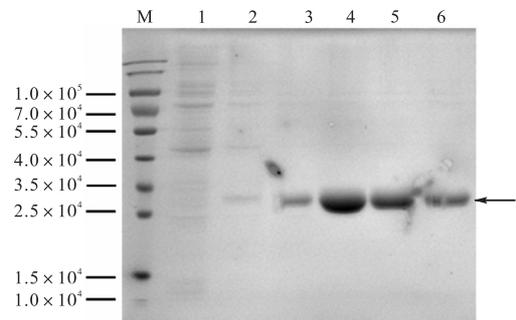
Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant vectors pET-28b-FAB12 and pGEX-2T-FAB12 in *E. coli* BL21 (DE3)

### 2.3 6 × His-FAB12 和 GST-FAB12 融合蛋白的纯化

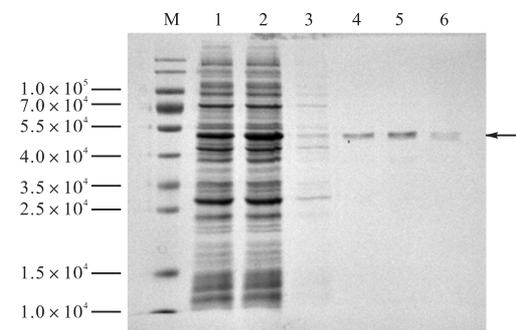
选用 6 × His-FAB12 融合蛋白作为免疫用抗原。将 6 × His-FAB12 融合蛋白破碎离心后取上清液,加入含有 Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 填料的重力柱中室温结合 1 h 或者 4 ℃ 过夜。由于融合蛋白的 His 标签特异性与上述填料结合,最后经过洗涤、洗脱等步骤可得到纯度较高的目的蛋白,纯度达 95% 以上(图 3(a)),作为免疫动物所用抗原。

GST-FAB12 融合蛋白用于效价的测定和免疫印迹。将破碎后的 GST-FAB12 融合蛋白离心后取上清液,加入含有 Glutathione Sepharose™ 4B 填料的纯化

柱中进行亲和纯化,经 20 mmol/L 还原型谷胱甘肽洗脱后得到目的蛋白(图 3(b))。



(a) 6 × His-FAB12 融合蛋白的纯化



(b) GST-FAB12 融合蛋白的纯化

M. 蛋白 marker; 1. 流出液; 2—3. 漂洗液; 4—6. 洗脱液

图 3 pET-28b-FAB12 重组蛋白和 pGEX-2T-FAB12 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant proteins pET-28b-FAB12 and pGEX-2T-FAB12

### 2.4 抗血清效价的检测

用纯化得到的 6 × His-FAB12 蛋白免疫新西兰大白兔,4 次免疫后从耳缘静脉处取少量血,室温静置 2 h 或 4 ℃ 过夜后获得析出血清,通过 ELISA 法测定抗血清的效价,利用酶标仪测定  $A_{450}$  后计算抗血清的效价,结果如图 4 所示。由图 4 可知 1 号兔抗血清的效价大于 128 000,2 号兔抗血清效价大于 256 000。

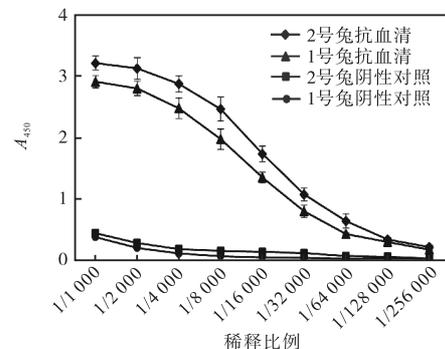
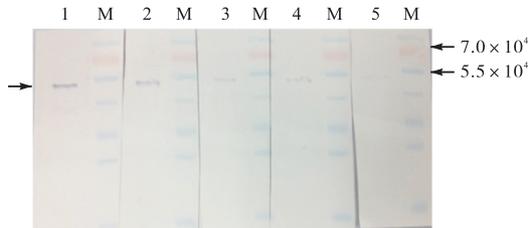


图 4 间接 ELISA 法测定抗血清的效价

Fig. 4 ELISA test results of anti-FAB12 polyclonal antiserum

## 2.5 免疫印迹法检测抗血清灵敏度和特异性

本研究对4次免疫后经过 Protein A 纯化的抗血清进行免疫印迹,结果如图5所示,在  $5.4 \times 10^4$  处出现单一的特异性条带,证明抗血清与 FABI2 蛋白特异性结合良好。



M. 蛋白 marker; 1—5 分别表示 Protein A 纯化后稀释比为 1 : 300、1 : 600、1 : 1 200、1 : 2 400、1 : 4 800 的多克隆抗体

图5 免疫印迹法验证抗体特异性

Fig. 5 Antibody specificity detected by Western blot

## 3 结 语

设计带有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的引物,从实验室已有的 pET-28b-FABI2 质粒中扩增出目的片段后,构建带有 GST 标签的表达载体.通过摸索合适的诱导条件,发现在 0.1 mmol/L IPTG、20 °C、185 r/min 条件下诱导 6 h, pET-28b-FABI2 和 pGEX-2T-FABI2 质粒分别在  $2.8 \times 10^4$  和  $5.4 \times 10^4$  处大量表达蛋白,且集中在上清液中.由于表达的蛋白为水溶性,因此纯化得到的融合蛋白空间结构完好.除此之外,选择 6 × His-FABI2 融合蛋白作为免疫用抗原,由于其标签相对分子质量小,因此与 GST 标签相比而言,免疫动物产生的免疫反应更小.4 次免疫后测效价,合格后股动脉取血.最后对血清进行 Protein A 亲和纯化并进行特异性检验,发现血清可与 FABI2 蛋白特异性结合,标志着多克隆抗体制备成功.在进行免疫印迹法检测时,以所得的抗体为一抗,另一个标签的抗原进行上样,排除了 His 标签产生的抗体对标签的识别作用.后续将会采用免疫荧光技术对该抗体进行定位.

### 参考文献:

[1] Iram S H, Cronan J E. The beta-oxidation systems of

*Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are not functionally equivalent[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(2): 599–608.

[2] White S W, Zheng J, Zhang Y M. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2005, 74(1): 791–831.

[3] Bergler H, Fuchsbichler S, Högenauer G, et al. The enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (FabI) of *Escherichia coli*, which catalyzes a key regulatory step in fatty acid biosynthesis, accepts NADH and NADPH as cofactors and is inhibited by palmitoyl-CoA[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 242(3): 689–694.

[4] 姚振华, 田哲贤, 戴小密, 等. 异源 *nifA* 基因对苜蓿中华根瘤菌 *nifA* 突变体的互补分析[J]. *科学通报*, 2006, 51(19): 2258–2264.

[5] Davies B W, Walker G C. A highly conserved protein of unknown function is required by *Sinorhizobium meliloti* for symbiosis and environmental stress protection[J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(3): 1118–1123.

[6] 胡喆, 马金成, 蒋晶晶, 等. 苜蓿中华根瘤菌 *fabA* 和 *fabB* 基因功能的鉴定[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2013, 40(11): 1148–1159.

[7] Gilis P M V. Bioadhesive solid dosage form: US 6303147B1[P]. 2001–10–16.

[8] 张晓霞, 马晓彤, 姜瑞波. 根瘤菌分类研究进展及存在的争议[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(4): 601–606.

[9] 马金成, 周俊超, 吴楚云, 等. 苜蓿中华根瘤菌 *desA* 基因功能的鉴定[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2015, 42(8): 740–749.

[10] 田伟, 董彬, 李镇芳, 等. 莱茵衣藻 IFT139 蛋白抗原的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备[J]. *天津科技大学学报*, 2016, 31(6): 27–33.

[11] 任海月, 董彬, 樊振川, 等. 莱茵衣藻纤毛内运输蛋白 IFT46 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备[J]. *生物工程学报*, 2016, 32(8): 1124–1132.

[12] 董彬, 吴松, 王晶, 等. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白 IFT27 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. *生物技术*, 2016(6): 532–538.

[13] 赵巧辉, 刘孟洲. 实验动物采血方法[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2006(4): 4–6.

责任编辑: 郎婧