

文章编号:1001-1498(2014)01-0082-04

白蜡虫脂酰辅酶 A 还原酶多克隆抗体的制备

胡艳红^{1,2}, 杨 璞², 陈晓鸣^{2*}, 徐冬丽²

(1. 南京林业大学, 江苏 南京 210037; 2. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224)

摘要:白蜡虫脂酰辅酶 A 还原酶(FAR1)参与了体表蜡泌物的形成过程,为了进一步研究 FAR1 的功能,通过预测分析基因 *far1* 编码的蛋白结构,选取亲水性强、特异性好的一段合成多肽作为抗原肽,免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体,并以 BCA 蛋白浓度试剂盒测定抗体浓度,通过 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色观察纯化抗体的纯度,以 ELISA 检测抗体效价。结果表明,纯化所得的多克隆抗体纯度高,抗体浓度 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,抗体效价为 1:512 000,为后续 FAR 基因功能的研究奠定基础。

关键词:白蜡虫; 脂酰辅酶 A 还原酶(FAR1); 多克隆抗体

中图分类号:S899.1

文献标识码:A

Preparation of Polyclonal Antibody against *Ericerus pela* FAR1 Peptide

HU Yan-hong^{1,2}, YANG Pu², CHEN Xiao-ming², XU Dong-li²

(1. College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China;

2. Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Fatty acyl-CoA reductase(FAR1) plays a key role in the white wax secretion of *Ericerus pela*. In present study, the artificially synthesized polypeptide of *E. pela* FAR1 was used as antigen for the generation of polyclonal antibody. The obtained antibodies were purified by using activated sepharose and analyzed by SDS-PAGE. The concentration and titer of the polyclonal antibody were determined by BCA KIT and ELISA respectively. The results indicated that the titer (1:512000) and the concentration ($0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) of anti-FAR1 polyclonal antibody could meet the requirements for later experiments, and the polyclonal antibody could be used to further study the location of FAR1 protein in the later research.

Key words: *Ericerus pela*; fatty acyl-CoA reductase(FAR1); polyclonal antibody

白蜡虫(*Ericerus pela* Chavannes)是我国特有的传统养殖昆虫,以分泌性质优异的虫白蜡而倍受关注。虫白蜡是以高级饱和一元酸和高级饱和一元醇为主要成分的脂类物质,广泛应用于医药、食品、工业等行业^[1]。生物中蜡酯的合成主要通过酰基还原途径^[2-6],即脂酰辅酶 A(fatty acyl-CoA)在脂酰辅酶 A 还原酶(fatty acyl-CoA reductase, FAR)的作用下还原成脂肪醇,脂肪醇和脂酰辅酶 A 在蜡酯合酶(wax synthase, WS)的作用下生成酯。目前,关于参

与蜡酯合成的基因主要在小鼠(*Mus musculus* L.)、加州西蒙得木(*Simmondsia chinensis* (Link) C. K. Schneid.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)等动植物的皮脂、角质层蜡中有所研究^[2,5-7],但在昆虫中无相关报道。这些已报道的参与蜡酯合成的关键基因脂酰辅酶 A 还原酶基因 *far*,主要是通过基因克隆、生物信息学技术分析基因序列结构,推测基因编码的蛋白结构以及系统发育;利用 RT-PCR 法分析相关基因 mRNA 转录情况;利用

收稿日期:2013-08-29

基金项目:林业公益性行业科研专项经费项目(201204602)

作者简介:胡艳红(1975—),女,山西交城人,讲师,主要从事昆虫学研究。E-mail:hyh1226mm@163.com

* 通讯作者

特定分子标签通过 Western blotting 技术、基因与分子标签融合表达技术研究基因编码的蛋白表达量或组织或亚细胞定位等;在植物拟南芥等中利用基因突变技术反向研究相关基因的功能^[8];少数研究通过测定相关基因编码的蛋白质的生化特征说明其功能^[3,9],而此类基因研究中对于特异性抗体技术的利用非常有限,仅 Cheng 等人利用序列中插入表达标签从而特异识别该标签的方法将研究基因进行了体内定位^[2]。

白蜡虫 *far1* 基因是与泌蜡密切相关的基因之一^[10]。本课题组经过大量的前期研究,已经克隆得到了 *far1* 全长基因。为了进一步研究该基因的功能,根据蛋白序列软件预测结果,考虑其结构及亲水性等特点,拟选取该基因部分序列合成多肽作为抗原肽,免疫新西兰大白兔获得特异性强的多克隆抗体,为研究该基因的蛋白表达动态和表达产物定位等研究提供必要的基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

SDS-PAGE 蛋白质分子质量标准(购自 Takara 公司),IPTG、Tris、Bis、Arc(购自 Sigma 公司),SDS(购自 Amresco 公司),TEMED(购自 BIO-RAD 公司),0.22 μm 无菌滤器和透析袋(购自 Millipore 公司),考马斯亮蓝 R-250、冰醋酸、乙腈等试剂均为国产分析纯或色谱纯。

1.2 试验方法

1.2.1 多肽合成与纯度测定 应用 ProtParam(<http://expasy.org/tools/protparam.htm>)、PeptideMass(<http://expasy.org/tools/peptide-mass.html>)、ProtScale(<http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>)等多种蛋白质结构功能分析软件,综合考虑蛋白质的二级结构、抗原性、亲疏水性、可及性及柔韧性等指标选择一段特异性强的多肽序列(第 55-69 个氨基酸)作为抗原区用于抗体制备,送南京钟鼎生物技术公司合成该多肽作为抗原肽,合成的多肽以 HPLC 和 MS 分析其纯度与分子量。HPLC 分析所用色谱柱为 Kromasil 100-5C18,4.6 mm × 250 mm,5 micron,进样速度为 1 mL · min⁻¹,样品进样量为 10 μL,检测波长 220 nm,保留时间为 30 min,流动相为乙腈(含 0.1% 三氟乙酸 TFA),流速为 1.0 mL · min⁻¹,记录检测峰面积。以电子喷雾电离质谱测量法(electrospray ionization mass spectrometry, ESI-

MS)分析合成多肽的质量,流动相为乙腈(含 0.1% 甲酸),流速为 0.2 mL · min⁻¹,进样量为 10 μL,质谱仪以正离子状态采样。

1.2.2 动物免疫 合成的多肽 P013 偶联匙孔血蓝蛋白(KLH)。将偶联产物 P013-KLH 免疫成年健康的新西兰大白兔(体重约 2.5 kg)。每次取 500 μg 的 P013-KLH 与等量弗氏完全佐剂乳化后,多点注射白兔背部皮下,2~3 周免疫 1 次,共免疫 4 次,最后 1 次免疫后 7 d 采血,低温离心分离血清,通过间接 ELISA 方法确定抗血清的效价,待效价大于 1:50 000 时进行采血,低温离心分离制备抗血清,保存于 -80℃ 备用。

1.2.3 抗体纯化 将合成的多肽与溴化氢活化的琼脂糖介质偶联制备成抗原亲和纯化层析柱,将所得抗血清与 PBS(pH 7.4)等量混合后缓慢过柱,待抗原抗体结合后用甘氨酸洗脱缓冲液洗脱,即得到所需纯化抗体,立即在 PBS 中进行 4℃ 透析过夜,利用 SDS-PAGE 检测所得纯化抗体的纯度。

1.2.4 抗体效价与浓度测定 通过 ELISA 检测纯化抗体的效价,用合成的抗原肽作为检测抗原,以免疫前血清为阴性对照,按常规间接 ELISA 操作步骤,采用方阵滴度法确定抗原最佳包被浓度,试验重复 3 次,建立用于抗 FAR1 蛋白的多克隆抗体效价检测的间接 ELISA 方法。以 pH7.4 的磷酸盐缓冲液倍比稀释抗原,TMB 底物显色。在 450 nm 下测定各孔 OD 值,以样品 OD 值与阴性对照 OD 值的比值不小于 2.1 作为判断为阳性或确定效价的临界点。

抗体浓度的测定参照 BCA 蛋白浓度测定方法略有修改。主要操作流程有:以 PBS(pH7.2)缓冲液稀释 BSA 至 0.5 mg · mL⁻¹作为蛋白标准品,将标准品按 0、2、4、8、16 加到 96 孔板的标准品孔中,以 PBS 溶液补足至 20 μL;各孔加入 200 μL BCA 工作液,室温放置 60 min;酶标仪测定 A₅₆₂ 处的吸光值,绘制标准直线。

2 结果与分析

2.1 合成多肽

根据软件预测结果,选取可及性强,亲水性好的部分序列 TREKKGKDPKERFKC 合成多肽,以 HPLC 检测多肽纯度。由图 1 显示,色谱峰单一,基线平稳,按照面积归一法计算所测物质纯度,合成的多肽纯度大于 85%。在设定的色谱条件下,噪声低,基

线稳定。梯度洗脱结果表明,不同保留时间内,各峰面积约分别占 1.8%、0.4%、1.6%、94.6%、1.6%,样品保留时间约为 13.772 min 时,峰面积达 3 371 855(图 1)。MS 分析表明,多肽的相对分子量为 1 850.18,与所选氨基酸序列的理论分子量一致(图 2)。

2.2 抗体纯度鉴定

经抗原亲和纯化层析柱纯化后的抗体于 PBS 中低温过夜透析后,进行 SDS-PAGE,考马斯亮蓝染色,多次更换脱色液至背景清晰。抗体纯化后纯度

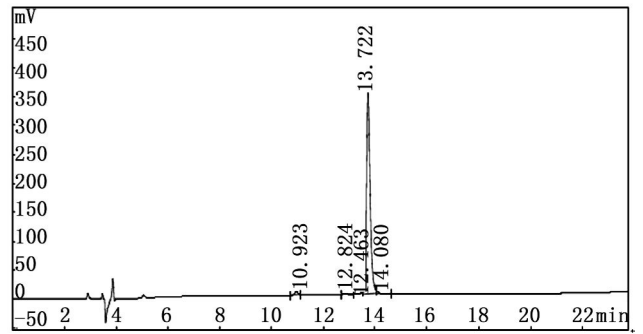


图1 HPLC 分析合成的多肽

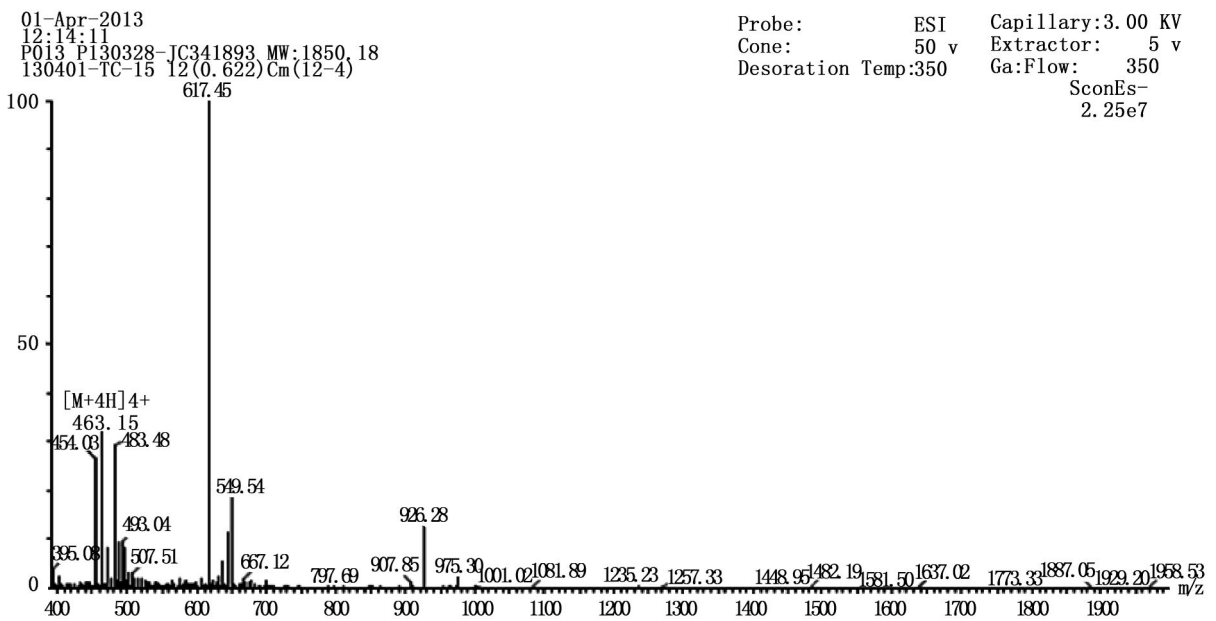


图2 MS 分析合成的多肽

高,在约 50 kDa 和 25 kDa 处可见清晰的条带,分别与预期的抗体重链、轻链大小相符(图 3)。

蛋白浓度测定结果显示抗体浓度达 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

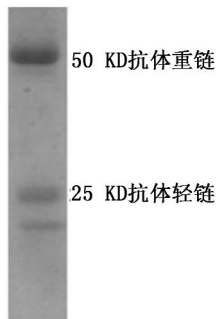


图3 SDS-PAGE 检测纯化的抗体纯度

表1 *far1* 多克隆抗体效价测定

稀释倍数	OD ₄₅₀	样品 OD/对照 OD
500	2.789	18.593
1 000	2.723	18.153
2 000	2.647	17.647
4 000	2.630	17.533
8 000	2.488	16.587
16 000	2.421	16.140
32 000	2.355	15.700
64 000	2.153	14.353
128 000	1.866	12.440
256 000	1.508	10.053
512 000	1.054	7.027
ck	0.150	

2.3 纯化抗体的效价与浓度测定

间接 ELISA 法所得结果表明,所得抗血清效价为 1:512 000(表 1),表明该抗体具有较高的免疫原性。

3 讨论

抗体是可与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白。人工合成的抗原所产生的抗体与抗原表位结合的特性可能不同于天然抗原,但制备方法简便等特点使其广泛应用于蛋白抗体的制备。马颖哲等人在研究蛋白抗体的制备比较时发现,制备的人 pICln 蛋白的肽段血清抗体具有高特异性的优点^[11]。朱峰利用大鼠 AT1A 肽段制备的抗 ATR12181 肽段抗体,免疫印迹结果与免疫荧光实验均显示肽段抗体能与 VSMC 细胞膜上的 AT1A 受体特异性结合^[12]。本研究利用生物信息学方法分析了 *far1* 基因编码的蛋白结构,人工合成抗原肽制备得到兔抗白蜡虫 FAR1 多克隆抗体。该实验策略有效地避开了较大的 FAR1 蛋白难于在大肠杆菌中高效表达的困境,可以在较短时间内获得抗原肽用于免疫动物。

在众多昆虫中,针对不同目的蛋白的单克隆抗体或多克隆抗体研究与应用已获得长足发展,利用抗体建立了相关免疫学检测方法^[13-19],成功应用于目的基因功能的研究。白蜡虫是重要的资源昆虫,雄性二龄幼虫分泌了大量性质优异的虫白蜡,但目前对于泌蜡机制尚缺乏深入的认识。本研究制备得到的多克隆抗体经 ELISA 测定结果表明效价高,SDS-PAGE 电泳结果表明抗体纯度较高。该抗体是否具有优良的特异性,能否用于研究白蜡虫 FAR1 蛋白表达的组织部位与表达量等信息,有待于在今后研究工作中逐步证实。

参考文献:

- [1] 陈晓鸣,冯颖.资源昆虫学概论[M].北京:科学出版社,2009
- [2] Cheng J B, Russell D W. Mammalian wax biosynthesis. II. Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyl-transferase enzyme family[J]. J Biol Chem, 2004,279(36): 37798-37807
- [3] Cheng J B, Russell D W. Mammalian wax biosynthesis. I. Identification of two fatty acyl-coenzyme A reductases with different substrate specificities and tissue distributions[J]. J Biol Chem 2004, 279(36): 37789-37797
- [4] Hellenbrand J, Biester E M, Gruber J, et al. Fatty acyl-CoA reductases of birds[J]. BMC Biochem, 2011, 12(64):1-12
- [5] Metz J G, Pollard M R, Anderson L, et al. Purification of a jojoba embryo fatty acyl-coenzyme A reductase and expression of its cDNA in high erucic acid rapeseed[J]. Plant Physiol, 2000,122: 635-644
- [6] Lardizabal K D, Metz J G, Sakamoto T, et al. Purification of a jojoba embryo wax synthase, cloning of its cDNA, and production of high levels of wax in seeds of transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2000, 122(3): 645-655
- [7] Klypina N, Hanson S F. *Arabidopsis thaliana* wax synthase gene homologues show diverse expression patterns that suggest a specialized role for these genes in reproductive organs[J]. Plant Sci, 2008,175: 312-320
- [8] Owen Rowland, Zheng H Q, Shelley R. Hepworth, Patricia Lam, Reinhard Jetter, and Ljerka Kunst, *CER4* Encodes an Alcohol-Forming Fatty Acyl-Coenzyme A Reductase Involved in Cuticular Wax Production in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2006,142(3):866-877
- [9] Teerawanichpan P, Robertson A J, Qiu X. A fatty acyl-CoA reductase highly expressed in the head of honey bee (*Apis mellifera*) involves biosynthesis of a wide range of aliphatic fatty alcohols[J]. Insect Biochem Molec, 2010, 40: 641-9
- [10] Yang P, Zhu J Y, Gong Z J, et al. Transcriptome analysis of the Chinese white wax scale *Ericerus pela* with focus on genes involved in wax biosynthesis[J]. PLoS ONE, 2012; 7(4): e35719
- [11] 马颖哲,程光惠,张桂荣,等. pICln 蛋白肽段血清抗体和单克隆抗体的制备[J]. 吉林大学学报,2005,3: 472-473
- [12] 朱峰.抗 AT₁ 受体胞外肽段抗体的效应与 AT₁ 受体降压疫苗研究[D]. 武汉:华中科技大学,2006:55-71
- [13] 张晴,汪晓纯,金丽华.果蝇 polycomblike 蛋白多克隆抗体的制备及纯化[J]. 免疫学杂志,2012,28(8):656-661
- [14] 郝阳光,张晴,金丽华.果蝇 jumeaux 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(12): 1038-1042
- [15] 马焕艳,韩凤丽,盛洁,等.家蚕 STAT 基因的克隆、表达及多克隆抗体制备与组织表达差异分析[J]. 中国蚕学会第六届青年学术研讨会论文集(1),2009:125-132
- [16] 李坚,刘强,王玉芹,等.棉铃虫核型多角体病毒 *orf86* 基因的原核表达、抗体制备与免疫印迹检测[J]. 微生物学通报, 2010,37(10):1447-1450
- [17] 董胜张,高秀云,程正贤,等.蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体的制备及其应用方法的建立[J]. 昆虫学报,2007,50(9):871-877
- [18] 徐利.棉铃虫核型多角体病毒 *orf80* 多克隆抗体的制备[J]. 西北农业学报,2012,21(4):193-196
- [19] 查宏贤,刘罡,张晨,等.家蚕丝氨酸蛋白酶抑制剂 4(*serpin-4*)的基因克隆、原核表达和多克隆抗体制备[J]. 昆虫学报,2011, 54(6): 642-647