

陈萌萌, 潘渊婷, 范志宇, 等. 兔源抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达、抗体的制备及初步应用[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1397-1401.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.018

## 兔源抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达、抗体的制备及初步应用

陈萌萌, 潘渊婷, 范志宇, 胡波, 宋艳华, 魏后军, 仇汝龙, 朱伟峰, 徐为中, 王芳

(江苏省农业科学院兽医研究所/农业部动物疫病诊断与免疫重点开放实验室/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏南京 210014)

**摘要:** 为了原核表达兔源抗凋亡蛋白 Bcl-2, 并诱导表达纯化该蛋白后制备多抗, 采用 RT-PCR 扩增 *Bcl-2* 编码序列, 并将该序列克隆至 pET-32a(+) 载体, 获得重组 pET-32a-*Bcl-2* 质粒转化 BL21(DE3), 筛选最佳表达条件, 通过亲和层析纯化目的蛋白质, 最后经 Western blot 鉴定后免疫小鼠。结果显示, 成功扩增 *Bcl-2* 编码序列并构建了 pET-32a-*Bcl-2* 表达载体; SDS-PAGE 结果显示, 在 16 ℃, 5 h, 0.5 mmol/L IPTG 的表达条件下, 重组蛋白 Bcl-2 能够高效可溶性表达; Western blot 结果表明纯化后的表达产物为高纯度的 Bcl-2 重组蛋白, 将该蛋白质免疫小鼠后获得了特异性抗体, 该抗体能够特异性识别重组 Bcl-2 蛋白, 并应用该抗体鉴定 RK13-B 细胞中 Bcl-2 蛋白的过表达。

**关键词:** 兔源抗凋亡蛋白 Bcl-2; 原核表达; 亲和层析; 多抗制备

**中图分类号:** S858.291 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)06-1397-05

## Prokaryotic expression, polyclonal antibody preparation and preliminary application of rabbit anti-apoptotic protein Bcl-2

CHEN Meng-meng, PAN Yuan-ting, FAN Zhi-yu, HU Bo, SONG Yan-hua, WEI Hou-jun, QIU Ru-long, ZHU Wei-feng, XU Wei-zhong, WANG Fang

(Institute of Veterinary Medicine, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Veterinary Biological Engineering and Technology, Ministry of Agriculture/National Center for Engineering Research of Veterinary Bio-products, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** In order to construct the prokaryotic expression system of Bcl-2, induce expression of Bcl-2 fusion protein, prepare polyclonal antibodies and conduct preliminary application, the coding sequence of *Bcl-2* was amplified by RT-PCR and cloned into the pET-32a(+) vector. The pET-32a-*Bcl-2* was transformed to BL21(DE3), and the optimal expression conditions were determined. The target protein was purified by affinity chromatography and identified by Western blot. The results showed that *Bcl-2* coding sequence was successfully amplified, and its expression vector was constructed. The results of SDS-PAGE showed that the recombinant protein Bcl-2 was highly soluble under optimization condition (16 ℃, 5 h, 0.5 mmol/L IPTG). The results of Western blot indicated that the purified product was recombinant protein Bcl-2

with higher purity, and the specific antibody from mice immunized with recombinant protein Bcl-2. In addition, the antibody could specifically recognize the recombinant protein Bcl-2, and identify the overexpression of Bcl-2 protein in RK13-B cells.

**Key words:** rabbit anti-apoptotic protein Bcl-2; prokaryotic expression; affinity chromatography; preparation of polyclonal antibodies

收稿日期: 2019-05-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(31702274); 现代农业产业技术体系建设专项基金项目(CARS-43-C-1)

作者简介: 陈萌萌(1987-), 女, 江苏连云港人, 博士, 助理研究员, 主要从事家兔疾病防治与兽医生物技术研究。(E-mail) moonchen2010@yeah.net

通讯作者: 王芳, (E-mail) rwangfang@126.com

细胞凋亡是机体细胞为了维持内环境的稳定,由基因调控的自主程序性死亡,是宿主抵御各种外界刺激的固有自我防御。细胞凋亡过度则会造成机体紊乱,导致各种疾病的发生。机体线粒体细胞凋亡通路(内源性)受多种保守分子的严密掌控,其中 Bcl-2 家族发挥着主要作用,该家族包含抗凋亡分子(Bcl-2 和 Bcl-xL 等)及促凋亡分子(Bak 和 Bax 等)2 大类<sup>[1]</sup>。Bcl-2 属于抗凋亡分子,主要在机体促凋亡基因发动细胞凋亡时发挥抑制作用。随着对各类病毒感染研究的不断推进,研究人员逐渐发现细胞凋亡在病毒性疾病的发病中起着重要作用,这暗示着研究病毒与细胞凋亡之间的关系或许对揭示疾病的发生发展及转归机制起着至关重要的作用。长期进化中病毒与宿主相互作用,病毒产生了多种多样的调控细胞策略<sup>[2-4]</sup>,病毒在侵入机体后可以通过编码各种蛋白质或模仿凋亡相关成分来干扰细胞凋亡途径,如通过调节 Bcl-2 蛋白的转录或表达水平来达到调控细胞凋亡的目的<sup>[5-7]</sup>。总的来说动物病毒诱导细胞凋亡有两重作用,一方面可以增强病毒的致病性,另一方面也会产生抑制效果<sup>[8]</sup>。近来,本实验室研究结果表明,由兔出血症病毒(RHDV)感染引发的兔病毒性出血症可以上调 Bcl-2 基因的表达,但 RHDV 感染家兔诱导细胞凋亡的具体机制仍不清楚。本试验利用 PCR 方法扩增欧洲兔的全长 Bcl-2 基因,将正确的 Bcl-2 基因序列克隆至 pET-32a (+) 中,并将获得的重组 pET-Bcl-2 质粒转化 BL21 进行原核表达,改进表达条件,纯化鉴定表达产物,最后将鉴定的蛋白质免疫小鼠,制备小鼠抗 Bcl-2 蛋白的多克隆抗体,为研究 Bcl-2 蛋白的生物学功能提供工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

健康新西兰成年兔购自南京金陵种兔场。TrizolRNAiso plus、反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、T4-DNA 连接酶、限制性内切酶、胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司,pMD18- T vector 和大肠杆菌 BL21、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、质粒 pET32a(+)、SDS-PAGE 蛋白胶试剂盒购自南京基天生物公司,His 蛋白纯化柱购自 GE Healthcare 公司。应用慢病毒包装技术构建的稳定过表达 Bcl-2 的 RK13 细胞系(RK13-B)由本实验室制备。

### 1.2 PCR 扩增和载体构建

采用 Trizol 法提取健康家兔肝脏的总 RNA,利用反转录试剂盒反转录,以获得的 cDNA 为模板进行目的条带扩增。根据 GenBank 中 Bcl-2 mRNA 序列中的编码序列(NM\_001082135.1),设计合成 Bcl-2 基因的 PCR 扩增引物(表 1),引入酶切位点 EcoR I 和 Hind III。

表 1 Bcl-2 基因引物序列

Table 1 Primer sequences of Bcl-2 gene

引物名称	序列(5'→3')
Bcl-2-Fwd(EcoR I)	GCGGAATTCATGCTCTCAGCAACCG
Bcl-2-Rev(Hind III)	GCGAAGCTTTCATTTCCGACTGAAGAGG

以制备的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。50  $\mu$ l 的 PCR 反应体系:2 $\times$  Tag Mastermix 25  $\mu$ l,上、下游引物各 2  $\mu$ l,模板 cDNA 1  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 20  $\mu$ l。PCR 反应条件:96  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 55  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。胶回收目的条带,将目的基因连接 T/A 克隆载体,获得 T-Bcl-2 阳性质粒,送测序公司测序。双酶切 T-Bcl-2 和 pET-32a(+) 质粒,回收酶切产物,将酶切的目的基因连接到 pET-32a(+) 载体中,利用双酶切鉴定 PCR 筛选的阳性克隆,挑选阳性质粒测序,鉴定正确的质粒并命名为 pET-Bcl-2。

### 1.3 原核表达与纯化鉴定

1.3.1 原核表达 pET-Bcl-2 转化 BL21(DE3)感受态细胞,用 0.5 mmol/L IPTG 分别在 16  $^{\circ}$ C 和 37  $^{\circ}$ C 下诱导表达 5 h,收集处理样品,然后进行 SDS-PAGE 分析。

1.3.2 纯化鉴定 诱导完成后离心弃上清液,沉淀用无菌 PBS 重悬。超声破碎菌液 20 min,4  $^{\circ}$ C、13 000 g 离心 10 min,收集上清液,沉淀与上清液用等体积的冰 PBS 重悬。变性后将上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 检测,分析表达形式。用 Western Blot 方法进行特异性鉴定。0.45  $\mu$ m 滤膜过滤上清液,his 柱纯化,进行 SDS-PAGE 和 Western blot 检测。

### 1.4 动物试验

取纯化的 Bcl-2 蛋白 100  $\mu$ g(稀释到 100  $\mu$ l),与 100  $\mu$ l 佐剂混合乳化,皮下多点注射小鼠,免疫 3 次(每隔 14 d 免疫 1 次)。第 1 次免疫选用弗氏完

全佐剂,第2、3次免疫选用弗氏不完全佐剂。第3次免疫后14 d,摘眼球采血,收集血清,-20℃保存。

### 1.5 多克隆抗体的特异性分析及初步应用

1.5.1 多克隆抗体的特异性分析 将表达产物进行 Western blot 试验,湿法转膜,320 mA 恒流转 1.5 h。一抗为制备的鼠抗 Bcl-2 蛋白多克隆抗体,正常小鼠血清(未被免疫);二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG,HRP 标记的兔抗羊 IgG。

1.5.2 多克隆抗体的初步应用 为了研究兔源抗凋亡蛋白 Bcl-2 在兔出血症病毒致病过程中发挥的作用,本实验室将 *Bcl-2* 序列同源重组克隆入 pLVX-mCherry 慢病毒表达载体,通过将重组质粒 pLVX-mCherry-*Bcl-2* 与慢病毒包装质粒共转染 293T 获得重组慢病毒,然后将该病毒感染 RK13 细胞,筛选出过表达 *Bcl-2* 的阳性细胞。本试验用制备的多克隆抗体检测过表达 *Bcl-2* 的 RK13 细胞(RK13-B)的 Bcl-2 蛋白表达量,同时,选取正常的 RK13 细胞为对照。用动物细胞裂解液处理相应细胞后,利用抗 Bcl-2 的多克隆抗体进行 Western blot 检测,同时孵育  $\beta$ -tubulin 的抗体,作为内参对照。最后用化学发光方法检测 *Bcl-2* 在细胞内的表达情况。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增 *Bcl-2* 基因和重组质粒的双酶切鉴定

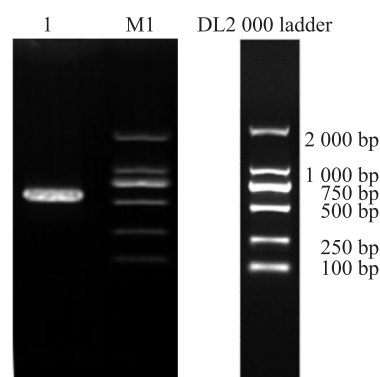
以制备的 cDNA 为模板,PCR 扩增得到 704 bp 的 *Bcl-2* 基因(图1)。将目的基因插入载体 pET32a(+),重组质粒 pET-*Bcl-2* 进行 *EcoR* I 及 *Hind* III 的双酶切鉴定。结果显示,出现的 704 bp 的条带与目的基因 *Bcl-2* 序列大小相一致(图2)。经测序证实该序列与 *Bcl-2* 编码序列一致,pET-*Bcl-2* 构建成功。

### 2.2 重组蛋白 Bcl-2 的表达纯化

为避免重组蛋白形成包涵体,采用 16℃ 低温诱导可溶性表达<sup>[9]</sup>。SDS-PAGE 结果显示,16℃ 诱导条件下蛋白质主要表达在上清液,大小与 Bcl-2 蛋白的46 000相符,而 37℃ 诱导条件下的蛋白质则主要以包涵体形式表达(图3)。Western blot 进一步鉴定结果与 SDS-PAGE 结果相一致(图4)。因此,确定采用 16℃ 低温诱导目的蛋白可溶性表达。

### 2.3 重组蛋白 Bcl-2 的纯化鉴定

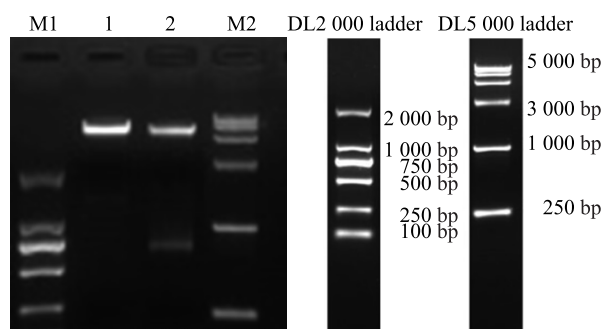
重组蛋白 Bcl-2 携带组氨酸残基,因此采用 His



M1;DL2000 ladder; 1;PCR 产物。

图1 *Bcl-2* 基因 PCR 产物鉴定

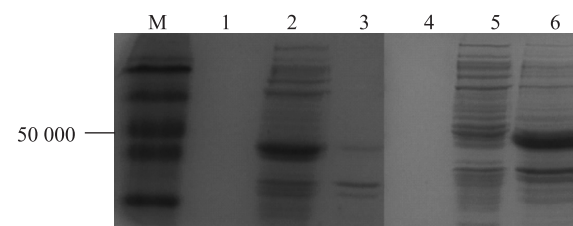
Fig.1 Identification of *Bcl-2* gene by PCR



M1;DL2000 ladder; M2: DL5000 ladder; 1: pET-*Bcl-2* 质粒; 2: 双酶切 pET-*Bcl-2* 质粒。

图2 重组载体 pET-*Bcl-2* 的双酶切鉴定

Fig.2 Identification by restriction enzyme analysis of the recombinant plasmid pET-*Bcl-2*

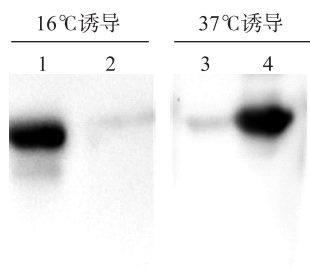


M:蛋白质相对分子质量标准;1:pET-*Bcl-2* 菌液上清液;2:16℃ 低温诱导菌体裂解上清液;3:16℃ 低温诱导菌体裂解沉淀;4:pET-*Bcl-2* 菌液上清液;5:37℃ 诱导菌体裂解上清液;6:37℃ 诱导菌体裂解沉淀。

图3 SDS-PAGE 分析 *Bcl-2* 重组蛋白的表达形式

Fig.3 The expression of recombinant protein *Bcl-2* analyzed by SDS-PAGE

柱进行纯化,用咪唑洗脱结合的目的蛋白质。SDS-

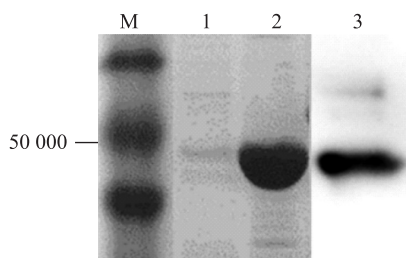


1:16℃低温诱导菌体裂解上清液;2:16℃低温诱导菌体裂解沉淀;3:37℃诱导菌体裂解上清液;4:37℃诱导菌体裂解沉淀。

图4 Western blot 分析重组蛋白 Bcl-2 的表达形式

Fig.4 The expression of recombinant protein Bcl-2 analyzed by Western blot

PAGE 结果显示纯化后的重组蛋白质纯度较高。Western blot 方法进一步鉴定结果表明获得的纯化蛋白质是表达的重组蛋白 Bcl-2(图 5)。



M:蛋白质相对分子质量标准;1:50 mmol/L 咪唑洗脱液;2:500 mmol/L 咪唑洗脱液;3:Western blot 鉴定纯化蛋白。

图5 Bcl-2 蛋白的纯化以及 Western blot 鉴定

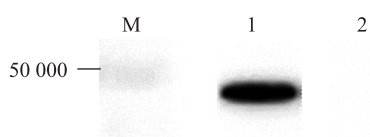
Fig.5 Purification and Western blot identification of Bcl-2 protein

## 2.4 抗 Bcl-2 多克隆抗体的特异性

将纯化得到的 Bcl-2 蛋白作为免疫原,以每只 100 μg 剂量通过皮下多点注射 ICR 小鼠,用 Western blot 方法鉴定 Bcl-2 抗血清对原核表达系统中获得的重组长 Bcl-2 蛋白识别的特异性。结果表明抗血清均能特异性识别大小约 46 kb 的重组蛋白 Bcl-2,并且与正常小鼠血清无特异性反应(图 6)。

## 2.5 抗 Bcl-2 多克隆抗体的应用

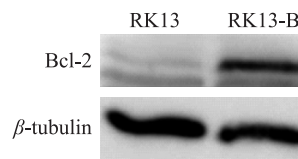
利用抗 Bcl-2 的多克隆抗体检测过表达 Bcl-2 的 RK13 细胞(RK13-B)的 Bcl-2 蛋白表达量。Western blot 结果表明,抗 Bcl-2 多克隆抗体能特异性识别细胞系中 Bcl-2 蛋白(图 7),同时,与对照组 RK13 细胞相比,Bcl-2 蛋白在 RK13-B 中的表达量明显较高。



M:蛋白质相对分子质量标准;1:重组蛋白 Bcl-2 与多克隆抗体的特异性结果;2:重组蛋白 Bcl-2 与正常小鼠血清的特异性结果。

图6 Western blot 鉴定抗 Bcl-2 多克隆抗体的特异性

Fig.6 Specificity of polyclonal antibody against Bcl-2 identified by Western blot



RK13-B:过表达 Bcl-2 的 RK13 细胞;RK13:对照。

图7 Western blot 检测 RK13-B 细胞中 Bcl-2 的表达情况

Fig.7 The expression of Bcl-2 in RK13-B cells identified by Western blot

## 3 讨论

细胞凋亡是机体抵御外界各种刺激的一种有效的固有防御,是由基因调控的细胞自我破坏(自主程序性死亡)。Bcl-2 家族蛋白是调控细胞凋亡信号通路所涉及的重要蛋白质分子之一。Bcl-2 家族可以分为具有抗凋亡作用的分子(Bcl-2、Bcl-xL、Bcl-W、Mcl-1 等)和促凋亡作用的分子(Bax、Bak、Bad、Bik、Bid 等)。Czabotar 等指出采用小分子或多肽调节 Bcl-2 家族的蛋白质活性来治疗平衡失调性疾病,如癌症、自身免疫疾病<sup>[10]</sup>。病毒的复制和致病性与细胞凋亡之间有着密切关系<sup>[11]</sup>。Reshi 等的研究表明,过表达抗凋亡基因 Bcl-2 和 Bcl-xL 能够阻碍 caspase-9 和 caspase-3 的激活,抑制虹彩病毒诱导的 GF-1 细胞死亡<sup>[12]</sup>。抗凋亡基因 Bcl-2 的表达量以及与凋亡基因之间的表达比例对细胞存活与否十分关键<sup>[13]</sup>。研究发现 Bcl-2 在高表达状态下凋亡率下降,而当 Bcl-2 低表达或不表达时凋亡率上升<sup>[14]</sup>。

本实验室前期研究发现兔病毒性出血症病毒感染可以引发家兔抗凋亡基因 Bcl-2 显著上调<sup>[15]</sup>。由此可见,Bcl-2 在家兔病毒病发生发展过程中发挥着重要的作用。为了解析 Bcl-2 在疾病发生中的具体



作用,本试验首先通过 PCR 获取了家兔的全部模板 cDNA,设计包含双酶切位点的引物,并通过大量扩增获得了 *Bcl-2* 目的基因,之后利用载体重组技术构建了完备的原核表达系统,确定了最佳的诱导表达条件。对表达产物进行纯化鉴定,制备重组 Bcl-2 蛋白的多克隆抗体并鉴定其特异性。初步应用抗 Bcl-2 的多克隆抗体检测过表达 *Bcl-2* 的 RK13 细胞 (RK13-B) 中 Bcl-2 蛋白表达量,证实了构建的 RK13-B 细胞系 Bcl-2 蛋白表达量明显较高,为深入研究 Bcl-2 蛋白在家兔病毒性疾病的发生发展中的作用奠定了基础。通过表达与纯化成功获得了 Bcl-2 重组蛋白,纯化鉴定后采用常规方法对小鼠进行免疫,最终获得了 Bcl-2 抗血清,为研究 Bcl-2 在家兔病毒病发病进程中作用,寻找疾病治疗靶点提供了基础。

#### 参考文献:

- [1] OLA MS, NAWAZ M, AHSAN H, et al. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 351: 41-58.
- [2] BARBER G N. Host defense, viruses and apoptosis [J]. Cell Death and Differentiation, 2001, 8(2): 113.
- [3] YI E, OH J, KANG H R, et al. BST2 inhibits infection of influenza A virus by promoting apoptosis of infected cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 509(2): 414-420.
- [4] OHMER M, WEBER A, SUTTER G, et al. Anti-apoptotic Bcl-XL but not Mcl-1 contributes to protection against virus-induced apoptosis [J]. Cell Death Dis, 2016, 7(8): e2340.
- [5] 涂梦雨,刘 菲,陈 舜,等.细小病毒非结构蛋白诱导细胞凋亡研究进展 [J]. 病毒学报, 2015, 31(6): 679-684.
- [6] 侯 宁. REV 感染对 SPF 雏鸡免疫器官细胞凋亡及 *Bcl-2*、*C-myc* 基因表达的影响 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [7] REED J C. Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies: history and future prospects [J]. Blood, 2008, 111: 3322-3330.
- [8] 单士刚,姚 青,彭建新,等.动物病毒诱导的细胞凋亡及其生理意义 [J]. 病毒学报, 2006, 22(3): 233-236.
- [9] 李娇阳,董 虎,郭慧琛,等.伪狂犬病病毒 gB 抗原的可溶性原核表达及纯化条件的优化 [J]. 中国兽医科学, 2018, 48(2): 175-181.
- [10] CZABOTAR P E, LESSENE G, STRASSER A, et al. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(1): 49-63.
- [11] BARBER G N. Host defense, viruses and apoptosis [J]. Cell Death and Differentiation, 2001, 8(2): 113.
- [12] RESHI L, WANG H V, HUI C F, et al. Anti-apoptotic genes Bcl-2 and Bcl-xL overexpression can block iridovirus serine/threonine kinase-induced Bax/mitochondria-mediated cell death in GF-1 cells [J]. Fish Shellfish Immunol, 2017, 61: 120-129.
- [13] FRANK E. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2018, 500(1): 26-34.
- [14] ALMAWI W Y, MELEMEDJIAN O K, JAOUDE M M. On the link between Bcl-2 family proteins and glucocorticoid-induced apoptosis [J]. J Leukoc Biol, 2004, 76(1): 7-14.
- [15] CHEN M, LIU X, HU B, et al. Rabbit hemorrhagic disease virus non-structural protein 6 induces apoptosis in rabbit kidney cells [J]. Front Microbiol, 2018, 9: 3308.

(责任编辑:张震林)