



His标记的小鼠线粒体转录因子A的克隆和表达纯化及其多克隆抗体的制备

随着对线粒体DNA复制和转录机制认识的发展,几种必需的核基因组编码的产物已经得到鉴定。其中之一为小鼠线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A, mtTFA)。mtTFA是HMG蛋白家族的成员,目前已知除了可以调控线粒体DNA的拷贝数和转录活性、参与细胞调亡外,还可对人的寿命和疾病产生影响,如甲状腺功能减退性肌病和线粒体脑病等。近来研究还发现mtTFA也可在细胞核内发挥作用,提示核及线粒体基因表达调控的机制上存在偶联或协同作用[1][2][3]。为了进一步研究mtTFA的功能和相关机制,我们利用RT-PCR方法从小鼠肝脏中扩增mtTFA基因,构建了其原核表达载体,诱导表达并纯化得到高表达、高纯度的目的蛋白,并制备出高滴度特异性的mtTFA兔抗血清。

1 材料和方法

1.1 主要仪器

凝胶图像分析仪(法国Vilber Lourmat公司)、高速离心机(美国Beckman公司)、ABI 310全自动DNA测序仪(美国Perkin-Elmer公司)、Mini VE垂直电泳系统(Amersham Pharmacia 公司)。Kodak Image Station 2000R数码凝胶成像系统购自柯达公司。

1.2 主要试剂

质粒小提试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒为U-gene生物公司产品;限制性内切酶购自TaKaRa公司;引物由北京奥科生物公司合成;总RNA纯化试剂盒购自Promega公司;T₄连接酶购自TOYOB0公司;RT-PCR一步法试剂盒购自Qiagen公司;Ni₂₊-NTA His·Bind Resin购自Qiagen公司;Bradford蛋白定量试剂盒购自Merck公司;福氏佐剂购自Sigma公司;Anti-Rabbit IgG-HRP购自Santa Cruze公司。

1.3 质粒载体和实验动物

在Nde I和BamH I位点之间插入了Apa I, Kpn I, Xho I, Not I, Sma I多克隆位点的pET14bMCS大肠杆菌表达载体由我室构建;BL21(DE3)大肠杆菌菌株由本室保存;BALB/c小鼠和SPF级雄性新西兰大白兔均购自南方医科大学动物所。

1.4 pET14b/His-mtTFA融合蛋白表达载体的构建

1.4.1 BALB/c小鼠肝脏组织总RNA的提取及RT-PCR扩增mtTFA BALB/c小鼠断颈处死后,迅速取出肝组织,液氮速冻下研磨。按Promega总RNA制备试剂盒操作方法提取总RNA。以制备的总RNA为模板,按照Qiagen RT-PCR一步法试剂盒操作说明行RT-PCR反应。引物分别为:上游引物:5'-GCA GGTACCTCCAGCATGGGTAGCTATCCA-3',下游引物:5'-CGGGATCCTTAATGCTCAGAGATGTCTC CG-3'。下划线部分分别为Kpn I和BamH I酶切位点。1%琼脂糖凝胶电泳PCR产物。

1.4.2 重组表达质粒pET14b/His-mtTFA的构建 RT-PCR产物行1%琼脂糖凝胶电泳,切胶回收目的DNA片段,pET14b和回收的片段分别做Kpn I和BamH I双酶切,切胶回收酶切产物,T₄连接酶16℃连接12h。全量连接产物转化DH5 α 感受态细胞,氨苄青霉素平板筛选。挑取阳性克隆,摇菌过夜,提取质粒,用Kpn I和

BamH I 进行双酶切鉴定, T₇通用测序引物测序鉴定无误后, 再大量扩增。

1.5 融合蛋白的表达和纯化

依照高效感受态的制备方法, 氯化钙法制备大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞。依照质粒转化按标准程序操作, 热休克法将重组的融合表达载体转化感受态细菌, 待转化菌斑长出后, 挑取单菌落, 接种于5 ml LB培养液中, 37 °C振荡培养过夜, 然后按1:100稀释, 扩大培养至D600=0.6~0.8时, 加终浓度为1 mmol/L的IPTG, 37 °C继续振荡培养3 h。取1 ml培养液, 离心去上清, 在沉淀中加入蛋白上样缓冲液, 进行SDS-PAGE电泳, 检测mtTFA融合蛋白的表达。

依照His • Bind™ Buffer Kit操作说明, 离心(5 000 g/min, 4 °C, 5 min)收集上述经IPTG诱导培养的菌体, 将200 ml细菌培养液收集的细菌重悬于5 ml结合缓冲液(10 mmol/L咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl), 冰上超声裂解细菌细胞, 离心除去细胞沉淀(39 000 g/min, 4 °C, 20 min), 收集上清; 将上清转入加有Ni²⁺-NTA-Resin的层析柱中(每100 ml细菌培养液收集的菌体用0.2 ml Ni²⁺-NTA-Resin), 然后分别用10倍体积的结合缓冲液和6倍体积的冲洗缓冲液(20 mmol/L咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl)洗涤, 用1 ml洗脱缓冲液(250 mmol/L咪唑, 0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl)洗脱重组蛋白。SDS-PAGE电泳检测纯化的融合蛋白。洗脱缓冲液洗脱的融合蛋白用生物半透膜脱盐, 应用Bradford法进行蛋白定量。

1.6 多克隆抗体的制备

将透析定量后的His-TFAM融合蛋白与福氏完全佐剂等体积等量乳化, 使成为油包水的乳剂, 直到将一滴乳化液加到水中不扩散为止。采用脚掌和背部皮下多点注射免疫动物, 每点注射200 μl (共计注射1.5 mg蛋白)。3周后, 以上述2/3剂量的抗原加福氏不完全佐剂采用同样的方法加强免疫2次。1周后颈总动脉取血, 37 °C孵箱放置3 h, 4 °C冰箱过夜, 吸取血清, 4 000 r/min离心10 min。取上清加入1/2体积甘油-80 °C保存备用。

1.7 兔抗mtTFA多克隆抗体的ELISA检测和Western blot鉴定

将纯化的His-mtTFA融合蛋白以10 μg/ml每孔50 μl包被96孔酶标板, 以免疫前的兔血清作为阴性对照, 以同样方法纯化的其它His融合蛋白作为交叉反应对照, 将已纯化的免疫血清做不同稀释后, 行间接ELISA法检测抗体效价。取BL21 (DE3) 感受态空菌、转化了pET14b/His-mtTFA的BL21 (DE3) 在IPTG诱导前、诱导后的细菌和纯化的His-TFAM融合蛋白, 行SDS-PAGE凝胶电泳, 以兔抗融合蛋白血清为一抗, Anti-Rabbit IgG-HRP为二抗进行Western blotting测定抗体的特异性。

2 结果

2.1 RT-PCR结果

在约600 bp位置可见到一条特异性非常强的条带, 与预期大小一致, 电泳结果见图1A。

2.2 酶切及测序鉴定

用Kpn I 和BamH I 酶切pET14b/His-mtTFA, 可以切出约600 bp大小的条带, 电泳结果见图1B。T₇通用测序引物测序, 结果与预期的序列完全一致, 证实载体构建成功。

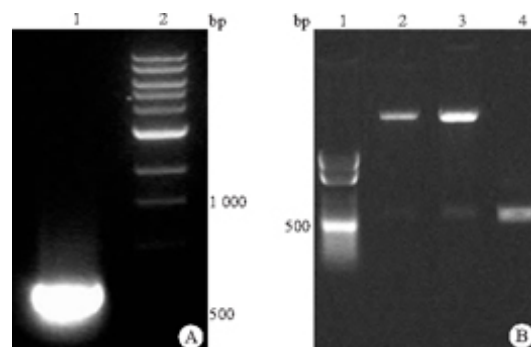


图1 pET14b/His-mtTFA载体的构建

Fig.1 Construction of pET14b/His-mtTFA

A: Lane 1: RT-PCR product of mtTFA; Lane 2: 1kb marker

B: Lane 1: 100 bp marker; Lane 2,3: Identification of pET14b/His-mtTFA clone digested with Kpn I and BamH I; Lane 4: RT-PCR product of mtTFA

2.3 His-mtTFA融合蛋白的表达和纯化

对诱导前后的表达产物进行SDS-PAGE和考马斯亮蓝染色，可见诱导表达的His-mtTFA融合蛋白在27 kD左右，与预期的结果一致(图2A)。纯化后可得大量高纯度的目的蛋白(图2B)，图中箭头所示为目的蛋白。透析后Bradford法蛋白定量为：2 mg/ml。

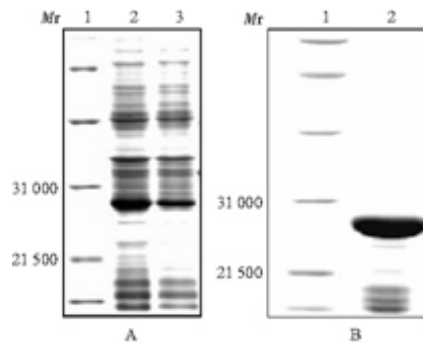


图2 融合蛋白His-mtTFA的诱导表达和纯化

Fig.2 Expression and purification of His-mtTFA fusion protein

A: Lane 1: Protein marker; Lane 2: IPTG induction for 3 h; Lane 3: Without IPTG induction

B: Lane 1: Protein marker; Lane 2: Purified fusion protein of His-mtTFA

2.4 兔抗mtTFA多克隆抗体的鉴定

ELIAS实验检测结果表明，本实验所制备的抗血清的滴度可以达到1:12 800，且无交叉反应。Western blot分析可见，IPTG诱导前、后的BL21(DE3)细菌裂解液可检测到同纯化的His-mtTFA融合蛋白大小相一致的特异性条带(图3)，诱导前也有条带，说明存在“渗漏”表达，同纯化时结果一致，而空菌裂解液则无可见条带，说明本实验所制备的兔抗血清能够同mtTFA发生特异性反应。



图3 兔抗mtTFA血清的Western blot鉴定

Fig.3 Western blotting of rabbit anti-mtTFA serum

Lane 1: Cell lysate of BL21(DE3) ; Lane 2: Cell lysate of BL21(DE3) transformed with pET14b/His-mtTFA without IPTG induction; Lane 3: Cell lysate of BL21(DE3) transformed with pET14b/His-mtTFA with IPTG induction for 3 h; Lane 4: Purified fusion protein of His-mtTFA

3 讨论

线粒体转录因子A(mtTFA)是由核染色体编码的相对分子质量约为25 kD的蛋白，其被运送到线粒体后，

作为线粒体DNA(mtDNA)转录和复制的关键调节因子发挥作用[4][5][6]。mtTFA敲除小鼠表现为mtDNA缺失和氧化磷酸化不足,并在胚胎发育期死亡。在mtTFA基因破坏的胚胎和伴心脏严重呼吸链障碍的组织特异性敲除mtTFA的动物中研究凋亡,发现在mtTFA敲除的胚胎,在发育第9.5天达到最大凋亡,并且在组织特异性mtTFA敲除的心脏凋亡明显增加,说明mtTFA参与细胞和组织的调控过程。此外,还有很多研究发现mtTFA通过参与对线粒体转录的调控而对人寿命和疾病产生影响。在获得性甲状腺功能减退症中,mtTFA一直被认为是甲状腺激素作用的目标。在霍夫曼综合征(甲状腺功能减退性肌病)的病人中发现有mtTFA的减少和线粒体功能障碍[7][8]。对老年人骨骼肌活检样本的研究发现,老年样本显示mtTFA蛋白和mRNA水平比年青人分别增加2.6和11倍。在对线粒体脑病人骨骼肌细胞的研究中也发现mtTFA处于异常水平[3]。

mtTFA的核起源为连接核和细胞器基因表达调节提供了一个重要的范例[10]。多项关于tTFA的研究已经加深了我们对其功能的认识,但仍存在很多未知的问题有待我们去研究解决。例如,mtTFA被发现存在于肝癌细胞的细胞核内,这种核mtTFA的功能是什么? mtTFA蛋白中存在HMG boxes表明它的可能作用是参与核的转录,但其确切的作用目前还没有得到证实。从小鼠睾丸中也发现一种核mtTFA(testis specific HMG, tsHMG)。这种tsHMG是mtTFA的不同剪切体,同正常的mtTFA相比,仅第一个外显子不同。尽管可能的作用是作为一种核的转录激活子或在精子发生中作为一种固缩核DNA的结构蛋白,但其生理功能仍不清楚。此外,在人和大鼠的睾丸中却没有检测到这种tsHMG的存在[1][9][10]。需要进一步研究大鼠肝癌细胞中这种核同功体的作用、睾丸特异性的核异构体tsHMG是否也存在于除小鼠外的其他脊椎动物中及其在精子发生中的作用,并进一步探讨mtTFA同疾病及细胞代谢活动相关的机制。

我们利用RT-PCR方法从小鼠肝脏中扩增mtTFA基因,获得了小鼠mtTFA无信号肽编码序列;构建了带His标记的mtTFA原核表达载体,纯化得到高纯度的目的蛋白,并制备出其特异性的多克隆抗体,这对进一步研究其生物学功能及参与调节细胞核同线粒体之间功能协同性的信号通路有重要意义。

(责任编辑:陈望忠)

参考文献:

- [1]Larsson NG, Oldfors A, Garman JD, et al. Down-regulation of mitochondrial transcription factor A during spermatogenesis in humans[J]. Hum Mol Genet, 1997, 6(2): 185-91.
- [2]Pierro P, Capaccio L, Gadaleta G. The 25 kDa protein recognizing the rat curved region upstream of the origin of the L-strand replication is the rat homologue of the human mitochondrial transcription factor A[J]. FEBS Lett, 1999, 457(3): 307-10.
- [3]Siciliano G, Mancuso M, Pasquali L, et al. Abnormal levels of human mitochondrial transcription factor A in skeletal muscle in mitochondrial encephalomyopathies[J]. Neurol Sci, 2000, 21(5 Suppl): 985-87.
- [4]Kain KH, Popov VL, Herzog NK. Alterations in mitochondria and mtTFA in response to LPS-induced differentiation of B-cells[J]. Biochem Biophys Acta, 2000, 1494(1-2): 91-103.
- [5]Ohno T, Umeda S, Hamasaki N, et al. Binding of human mitochondrial transcription factor A, an HMG box protein, to a four-way DNA junction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 271(2): 492-98.
- [6]Choi YS, Lee HK, Kim YP. Characterization of the 5'-flanking region of the rat gene for mitochondrial transcription factor A (Tfam)[J]. Biochem Biophys Acta, 2002, 1574(2): 200-4.
- [7]Reyesa A, Mezzinab M, Gadaletab G. Human mitochondrial transcription factor A (mtTFA): gene structure and characterization of related pseudogenes[J]. Gene, 2002, 291(1-2): 223-32.
- [8]Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, et al. p53 physically interacts with mitochondrial

transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3729-34.

[9]Matsushima Y, Matsumura K, Ishii S, et al. Functional domains of chicken mitochondrial transcription factor A for the maintenance of mitochondrial DNA copy number in lymphoma cell line DT40[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(33): 31149-58.

[10]Choi YS, Kim S, Lee HK, et al. In vitro methylation of nuclear respiratory factor-1 binding site suppresses the promoter activity of mitochondrial transcription factor A[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 314(1): 118-22.

[回结果列表](#)