

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)05-0511-04

## TRPM2 蛋白在大肠杆菌的表达纯化和多克隆抗体制备

孙宏卫, 罗海华, 王 妮, 欧小利, 温晓梨, 姜 勇\*, 梅柱中\*

(南方医科大学病理生理教研室, 广东省蛋白质组学重点实验室, 广东 广州 510515)

**[摘要]** 目的 获得人瞬时受体电位 M2 (TRPM2) 离子通道蛋白 N 末端的原核表达融合蛋白, 制备兔抗人 TRPM2 多克隆抗体。方法 采用 PCR 扩增编码人 TRPM2 蛋白 N 末端 1~334 位氨基酸残基(在人与小鼠中高度保守)的 cDNA 序列, 将其克隆至谷胱甘肽硫转移酶(GST)融合蛋白表达质粒 pGEX-4T-3 上。将原核表达重组质粒转化 BL21 (DE3) 感受态细胞, IPTG 诱导 GST-TRPM2N 融合蛋白的表达, 并纯化获得相对分子质量( $M_r$ )约 70 000 的 GST-TRPM2 融合蛋白。将此融合蛋白与弗氏完全佐剂混合后采用经典的 4 次免疫法免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, 用 Western blot 法对该抗体进行鉴定。结果 通过 PCR 扩增获得编码 TRPM2 蛋白 N 末端的 cDNA 片段并将其定向克隆至原核表达载体 pGEX-4T3 中, 采用 IPTG 诱导、蛋白质的变性与复性纯化获得融合蛋白 GST-TRPM2N, 将纯化的融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备获得特异性抗 TRPM2 蛋白的多克隆抗体。结论 成功制备了特异性抗人 TRPM2 蛋白的多克隆抗体。

**[关键词]** TRPM2; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体

**[中图分类号]** Q786, R392.11 **[文献标志码]** A

## The expression and purification of TRPM2 protein in *E. coli* and preparation of its polyclonal antibody

SUN Hongwei, LUO Haihua, WANG Ni, OU Xiaoli, WEN Xiaoli, JIANG Yong\*, MEI Zhuzhong\*

Key Laboratory of Functional Proteomics of Guangdong Province, Department of Pathophysiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

**[Abstract]** **Objective** To purify the prokaryotically expressed GST-TRPM2N fusion protein and prepare specific polyclonal antibody against human transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) protein. **Methods** The DNA fragment encoding evolutionarily conserved N-terminus (1-334 amino acids) of TRPM2 was amplified by PCR. The amplicon was then subcloned into prokaryotic expression plasmid pGEX-4T-3 and the recombinant plasmid was transformed into BL21 (DE3) cells. The expression of GST-TRPM2N fusion protein with a molecular weight about 70 000 Da was induced with 1 mmol/L IPTG and purified by GST affinity chromatography. The purified protein was mixed with complete Freund's adjuvant and used to immunize the New Zealand white rabbits with classical 4-injection protocol to generate specific anti-TRPM2 polyclonal antibody. The specificity and titer of the anti-TRPM2 antibody was analyzed by Western blotting. **Results** The cDNA fragment encoding N-terminus of human TRPM2 was amplified by PCR and directionally subcloned into pGEX-4T3 plasmid. Under the induction of IPTG, we observed the expression of GST-TRPM2N fusion protein. Polyclonal antibody against human TRPM2 protein was successfully prepared in the rabbits immunized with the purified GST-TRPM2N fusion protein. And the preliminary analysis showed that the anti-TRPM2 antibody could specifically identify transiently expressed TRPM2-EE in HEK293 cells. **Conclusion** The specific polyclonal antibody against human TRPM2 protein has been successfully prepared, which facilitates our future research on the function of TRPM2 channel.

**[Key words]** TRPM2; prokaryotic expression; protein purification; polyclonal antibody

瞬时受体电位 M2 (transient receptor potential melastatin 2, TRPM2) 蛋白属于瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 离子通道蛋白超家族中的 TRPM 亚家族, 是一种非选择性阳离子通道蛋白, 被

收稿日期: 2012-12-12; 接受日期: 2013-01-09

基金项目: 国家自然科学基金(81070955)

作者简介: 孙宏卫(1987-), 男, 湖北通山人, 硕士

Tel: 15521281441; E-mail: shw1552128@163.com

\*Corresponding authors, 梅柱中, E-mail: mzhuong@foxmail.com; 姜 勇, E-mail: jiang48231@163.com



激活后可以介导  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Na}^{+}$  与  $\text{K}^{+}$  等阳离子进入细胞内<sup>[1-2]</sup>。Lange 等<sup>[3]</sup>在研究中发现, TRPM2 不仅可以定位在细胞膜上, 还可以定位到溶酶体中, 提示其在细胞中可能参与介导了溶酶体  $\text{Ca}^{2+}$  的释放。TRPM2 蛋白可以被 ADP 核糖(ADP ribose, ADPR)、 $\text{H}_2\text{O}_2$  以及 A $\beta$ 1-42 多肽等多种氧化因子激活, 被认为是机体内重要的氧化应激感受分子<sup>[1-2, 4-5]</sup>。TRPM2 离子通道蛋白还参与机体先天性免疫应答反应的调控<sup>[6-8]</sup>, 但调控机制的诸多细节目前尚不清楚。本研究通过 PCR 扩增获得人 TRPM2 蛋白 N 末端的部分 DNA 序列<sup>[9]</sup>(编码 1~334 位的氨基酸残基, 在小鼠与人中高度保守), 将其克隆到原核表达载体中, 在大肠杆菌中实现了 TRPM2 蛋白 N 末端的高表达, 并制备了抗 TRPM2 蛋白的多克隆抗体, 为进一步研究 TRPM2 蛋白的功能提供了有用的工具。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 编码 GST 标签的 pGEX-4T-3 原核表达载体、含有人 TRPM2 全长基因的 pcDNA3.1-TRPM2-EE 真核表达载体、大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3) 和 HEK293T 细胞株均为本实验室保存。弗氏完全佐剂为 Sigma 公司产品, GST-beads 为 Novagen 公司产品, DMEM 细胞培养液和胎牛血清为 Invitrogen 公司产品; DNA ladder、KOD Plus DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品, 质粒提取试剂盒及胶回收试剂盒为 Promega 公司产品, 兔抗 Glu-Glu(anti-EE) 标签多克隆抗体为 Bethyl 公司产品。引物合成及 DNA 序列分析由英骏广州分公司完成。新西兰兔购自南方医科大学实验动物中心。

### 1.2 方法

**1.2.1 pGEX-TRPM2N 重组质粒构建** 以 pcDNA3.1-TRPM2-EE 载体为模板, 采用 PCR 扩增了编码人 TRPM2 蛋白 N 末端 1~334 位的氨基酸残基的 DNA 序列。其中上游引物序列为: TATGGAGCCCTCAGCCCTGAG(下划线标识的为起始密码子), 下游引物为: CTCTCGAGGGCCGCTCCAGCACAC(下划线部分为 *Xho*I 酶切位点), 扩增条件为: 98 $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$  10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 68 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共扩增 25 个循环, 最后 68 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物纯化后采用 *Xho*I 内切酶处理, 经琼脂糖凝胶电泳分离后克隆至预先采用 *Bam*H I 内切酶完全切割并采用 DNA 聚合酶 Klenow 大片段处理(由黏性末端变为平末端)后, 经琼脂糖凝胶纯化后再采用 *Xho*I 进行酶切的 pGEX-4T-3 质粒中。将连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 采用菌苔 PCR 进行筛选, 选取扩增阳性的细菌克隆进行培养, 提取质粒并进行 DNA 序列分析。

**1.2.2 TRPM2 的原核表达** 取 GST 融合蛋白表达载体 pGEX-TRPM2N 转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 挑取单克隆菌落到含 5 mL LB 培养液的 50 mL 离心管中, 37 $^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜; 将过夜培养物转移到含 100 mL LB 培养基的 1 L 锥形瓶里, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、225 r/min 振荡培养 3~4 h; 检测  $A_{600} = 0.4 \sim 0.6$ ,

加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、60 r/min 诱导培养过夜。8 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$  离心 10 min 收集细菌, 将细菌沉淀置于 -80 $^{\circ}\text{C}$  速冻 20 min, 取出室温融解后迅速置于冰上; 加入 10 mL 细菌裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 100 mmol/L NaCl, 10 mL/L Triton X-100, 1 mmol/L PMSF, pH8.0)重悬细菌, 采用超声波细胞破碎仪在冰水混合物上操作, 防止液体中产生气泡。超声程序为每次超声 3 s, 2 次之间间隔 9 s, 而每 3 次后的间隔时间延长为 5 min。最后 18 000 g、4 $^{\circ}\text{C}$  离心 20 min, 留沉淀备用。

**1.2.3 TRPM2 N 末端蛋白的亲纯化** 全部操作在冰上进行。采用变性溶解缓冲液(50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300 mmol/L NaCl, 8 mol/L 尿素, pH8.0)重悬细菌沉淀, 同时加入 DTT 至终浓度为 5 mmol/L, 超声使细菌充分裂解(超声 9 s, 停 9 s, 每轮 5 min, 共 3 轮, 每轮间歇 5 min)。将超声后的液体分装到 1.5 mL Eppendorf 管中, 振荡混匀, 每隔 10 min 振荡 1 次, 直至溶液完全澄清。放在摇床上室温摇 2~3 h, 然后于 20 $^{\circ}\text{C}$  10 000 g 离心 30 min, 将上清转移至新的 Eppendorf 管中。20 $^{\circ}\text{C}$  10 000 g 离心 15 min, 将上清转移至 10 mL 离心管中, 加入 200  $\mu\text{L}$  洗涤后的 GST 琼脂糖凝胶, 孵育过夜, 用变性溶解缓冲液洗 10 遍, 洗去残留的杂蛋白; 最后 1 遍让其自然流下。用 1 mL 变性洗脱缓冲液洗脱, 洗脱液中加入 DTT 使其浓度达到 5 mmol/L, 重悬琼脂糖凝胶微珠, 静置 2 min, 打开盖子, 使洗脱液自然流下, 收集洗脱液到 1 个新的 Eppendorf 管中, 此洗脱液里含有已经纯化的 GST-TRPM2N 融合蛋白。采用 0.45  $\mu\text{m}$  孔径的透析袋透析除盐, 然后将透析后的蛋白采用 PEG12000 包埋进行浓缩, 分装后于 -80 $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

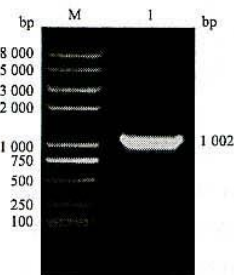
**1.2.4 多克隆抗体的制备** 取纯化的融合蛋白 GST-TRPM2N 1 mg 经弗氏完全佐剂乳化后, 皮下多点注射免疫新西兰大白兔(体质量约为 2.0 kg), 初次免疫后在 3、6、8 周分别以等量的抗原与完全弗氏佐剂乳化后加强免疫。从第 3 次免疫开始, 每次免疫前均抽取适量全血取血清进行抗体效价检测, 检测采用纯化的 GST-TRPM2N 抗原包被 ELISA 板, 用直接 ELISA 法测定抗体效价。第 4 次免疫后第 7 天动脉放血, 分享血清后于 -20 $^{\circ}\text{C}$  冻存。

**1.2.5 抗体特异性鉴定** Western blot 法检测抗体特异性, 转染前 24 h, 将 HEK293T 细胞铺于 6 cm 皿中, 用 DMEM 培养基加 100 mL/L FBS 在常规条件下进行培养, 待细胞汇合度达到 70% 时, 采用 jetPRIME 转染质粒 pcDNA3.1-TRPM2-EE, 具体操作参照其使用说明书。转染 24 h 后回收细胞, 经 RIPA(50 mmol/L Tris-HCl pH7.4, 150 mmol/L NaCl, 10 mL/L NP-40, 1 g/L SDS, 5 mL/L 去氧胆酸钠, 1 mmol/L EDTA)缓冲液裂解后采用 100 g/L SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 采用湿转法将蛋白电转移至 PVDF 膜上, 以 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液于室温封闭 1 h 后, 加入 1:500 稀释的兔抗 TRPM2N 血清于 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 室温洗膜 10 min  $\times$  3 次, 加入 1:5 000 稀释的 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h, 再经 TBST 洗膜 3 次后, 采用 SuperSignal West Pico Chemiluminescent 化学发光底物显影。



## 2 结果

**2.1 构建的 TRPM2 重组质粒的鉴定** 采用 PCR 从 pcDNA3.1-TRPM2-EE 载体扩增编码人 TRPM2 蛋白 N 末端编码第 1~334 位氨基酸残基的 DNA 序列, 全长为 1 002 bp(图 1), 将其克隆至 pGEX-4T-3 原核表达载体中, 重组质粒 pGEX-TRPM2N 转化入 *E. coli* DH5 $\alpha$  后, 采用菌苔 PCR 鉴定阳性克隆并提取质粒, 通过 DNA 序列分析验证融合蛋白读码框的正确性, 结果与设计完全一致(图 2 与图 3, 箭头标识 TRPM2 cDNA 与载体连接处)。



M: DNA marker; 1: PCR 扩增的 TRPM2 cDNA 片段。

图 1 PCR 扩增人 TRPM2 基因中编码第 1-334 位氨基酸残基的 DNA 序列

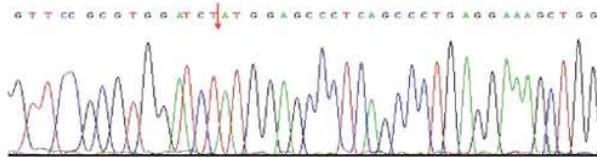


图 2 重组质粒 pGEX-TRPM2N 采用 pGEX-4T-5' 引物测序结果

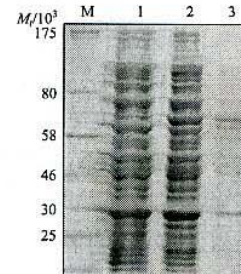


图 3 重组质粒 pGEX-TRPM2N 采用 pGEX-4T-3' 引物测序结果

**2.2 GST-TRPM2 融合蛋白表达及纯化** pGEX-TRPM2N 重组质粒转化 BL21 (DE3) 细菌, 挑取单克隆菌落进行培养并采用终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达融合蛋白 GST-TRPM2N, 亲和层析纯化后进行 SDS-PAGE 检测, 可见 1 条  $M_r$  约 70 000 的目的蛋白(箭头所示), 与预期的 GST-TRPM2N 融合蛋白大小相符(图 4)。

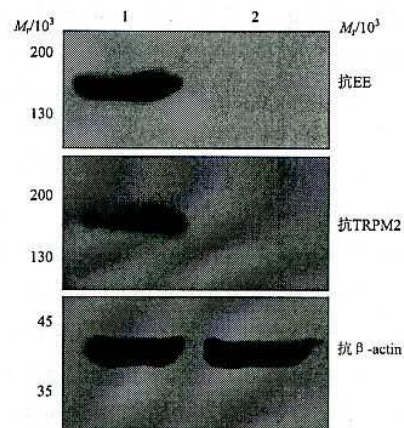
**2.3 抗 TRPM2 多克隆抗体的制备和鉴定** 抗原是 GST 融合蛋白, 免疫 4 次后, ELISA 检测血清抗 TRPM2 的滴度为 1:5 000, 抗 GST 滴度为 1:1 000, 处死

动物分离血清。经蛋白质印迹检测, 免疫血清以 1:500 的稀释度可特异性地检测到在 HEK293T 细胞中表达的 TRPM2-EE 蛋白,  $M_r$  约为 170 000, 与采用抗 EE 抗体检测到的完全一致, 而未检测到其他蛋白质(图 5), 表明成功制备了抗人 TRPM2 蛋白的特异性多克隆抗体。



M: 蛋白  $M_r$  marker; 1: 未诱导的细菌裂解液上清; 2: 采用 IPTG 诱导的细菌裂解液上清; 3: 纯化的 GST-TRPM2N 融合蛋白。

图 4 SDS-PAGE 电泳分析原核表达的 GST-TRPM2N 融合蛋白



1: 瞬时表达 TRPM2-EE 的 HEK293 细胞裂解液上清; 2: 未转染的 HEK293 细胞裂解液上清。

图 5 Western blot 法分析制备的兔抗 TRPM2 多克隆抗体的特异性

## 3 讨论

作为细胞内重要的氧化应激感受分子, TRPM2 离子通道蛋白近年来因其在单核细胞、嗜中性粒细胞与小胶质细胞等多种免疫细胞中有较高水平的表达, 可通过多种机制参与调控机体的免疫应答反应而备受大家关注<sup>[6-8, 11-12]</sup>, 被认为是机体炎症反应的重要调控分子。2008 年, Yamamoto 等<sup>[6]</sup>通过对 TRPM2 基因敲除 (TRPM2<sup>-/-</sup>) 小鼠的研究发现, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 刺激诱导的单核细胞中趋化因子 CXCL2 的表达依赖于 TRPM2 蛋白, 在采用葡聚糖硫酸钠 (DSS) 诱导的小鼠结肠炎模型中, TRPM2<sup>-/-</sup> 小鼠结肠中嗜中



性粒细胞的浸润显著下降。而 Hagaguchi 等<sup>[11]</sup> 研究则表明, 依赖于 TRPM2 蛋白的 CXCL2 的释放与炎症反应引起的神经性疼痛密切相关。与正常对照小鼠相比, TRPM2<sup>-/-</sup> 小鼠在受到李斯特单核细胞增生菌 (*Listeria monocytogenes*) 感染时 IL-12 与 IFN- $\gamma$  释放减少, 致病率与死亡率也显著提高<sup>[7]</sup>。为了进一步研究 TRPM2 蛋白在细胞炎症反应中的功能, 本实验通过原核表达并纯化了含有 GST 标签的 TRPM2 蛋白 N 端部分序列的融合蛋白, 将其与弗氏完全佐剂完全乳化后采用经典的 4 次免疫程序免疫新西兰大白兔, 成功地制备了抗人 TRPM2 蛋白的特异性多克隆抗体, 为 TRPM2 蛋白功能的研究提供了有力的工具。

虽然目前已有商品化 TRPM2 抗体<sup>[10]</sup>, 但是由于其是采用针对特定抗原表位的合成多肽免疫而来, 其特异性与灵敏性并不理想, Western blot 分析存在多条非特异性信号带。为了制备特异性的抗 TRPM2 蛋白的多克隆抗体, 采用原核表达的 GST-TRPM2 融合蛋白作为免疫抗原, 但 TRPM2 蛋白作为一种跨膜的离子通道蛋白,  $M_r$  为 175 000, 难于通过原核表达获得大量的可溶性蛋白。为此选择了其 N 末端保守的结构域, 该结构域在人、小鼠与大鼠中高度保守, 这样制备的抗体在理论上可同时用于检测来源于这三种物种的 TRPM2 蛋白。此外, 本实验的免疫抗原包含 TRPM2 蛋白氨基端 1~334 位的氨基酸残基, 理论上含有多个抗原表位, 制备的多克隆抗体具有更高的敏感性与特异性, 而初步实验的结果也证实了制备的抗体有较好的特异性, 在采用 Western blot 法分析瞬时表达 TRPM2-EE 的 HEK293 细胞上清时只检测到特异性的蛋白信号, 而未见明显的非特异性信号, 可以满足实验的需要。当然, 为了更好的实验结果, 可以采用 GST 抗原对抗 GST-TRPM2N 血清进行预吸附, 以排除 GST 的影响, 然后再采用纯化的 GST-TRPM2N 蛋白通过亲和层析进行纯化。但应该注意的是, 由于该抗体是针对 TRPM2 融合蛋白制备的多克隆抗体, 因此可能并不太适合用于细胞的免疫荧光分析, 尚有待以后的研究进一步验证。

#### 参考文献:

- [1] Perraud AL, Fleig A, Dunn CA, et al. ADP-ribose gating of the calcium-permeable LTRPC2 channel revealed by Nudix motif homology [J]. *Nature*, 2001, 411(6837): 595-599.
- [2] Sano Y, Imamura K, Miyake A, et al. Immunocyte  $Ca^{2+}$  influx system mediated by LTRPC2 [J]. *Science*, 2001, 293(5533): 1327-1330.
- [3] Lange I, Yamamoto S, Partida-Sanchez S, et al. TRPM2 functions as a lysosomal  $Ca^{2+}$  release channel in  $\beta$ -cells [J]. *Sci Signal*, 2009, 2(71): ra23.
- [4] Kolisek M, Beck A, Fleig A, et al. Cyclic ADP-ribose and hydrogen peroxide synergize with ADP-ribose in the activation of TRPM2 channels [J]. *Mol Cell*, 18(1): 61-69.
- [5] Fonfria E, Marshall ICB, Boyfield I, et al. Amyloid  $\beta$ -peptide(1-42) and hydrogen peroxide induced toxicity are mediated by TRPM2 in rat primary striatal cultures [J]. *J Neurochem*, 2005, 95(3): 715-723.
- [6] Yamamoto S, Shimizu S, Kiyonaka S, et al. TRPM2-mediated  $Ca^{2+}$  influx induces chemokine production in monocytes that aggravates inflammatory neutrophil infiltration [J]. *Nat Med*, 2008, 14(7): 738-747.
- [7] Knowles H, Heizer JW, Li Y, et al. Transient receptor potential melastatin 2 (TRPM2) ion channel is required for innate immunity against *Listeria monocytogenes* [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(28): 11578-11583.
- [8] Wehrhahn J, Kraft R, Harteneck C, et al. Transient receptor potential melastatin 2 is required for lipopolysaccharide induced cytokine production in human monocytes [J]. *J Immunol*, 2010, 184(5): 2386-2393.
- [9] Perraud AL, Schmitz C, Scharenberg AM. TRPM2  $Ca^{2+}$  permeable channels: from gene to biological function [J]. *Cell Calcium*, 2003, 33(5-6): 519-531.
- [10] Zhang W, Chu X, Tong Q, et al. A novel TRPM2 isoform inhibits calcium influx and susceptibility to cell death [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 16222-16229.
- [11] Hagaguchi K, Kawamoto A, Isami K, et al. TRPM2 contributes to inflammatory and neuropathic pain through the aggravation of pronociceptive inflammatory responses in mice [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(11): 3931-3941.
- [12] Magnone M, Bauer I, Poggi A, et al.  $NAD^+$  levels control  $Ca^{2+}$  store replenishment and mitogen-induced increase of cytosolic  $Ca^{2+}$  by Cyclic ADP-ribose-dependent TRPM2 channel gating in human T lymphocytes [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(25): 21067-21081.