

## 茯苓免疫调节蛋白-1 抗体的制备及分析

李洪波, 杨瑞雪, 陈 静, 李亚颖, 胡 兴\*

怀化学院 生命科学系, 民族药用植物资源研究与利用湖南省重点实验室, 湖南 怀化 418008

**摘要:** 目的 制备重组茯苓免疫调节蛋白-1 (WCFIP1) 及其抗体。方法 合成 WCFIP1 基因、构建表达载体并转化大肠杆菌, 表达并纯化重组蛋白, 免疫小鼠、制备抗血清、纯化抗体并验证。结果 纯化得到重组 WCFIP1 蛋白并制备特异性抗体。结论 实现了重组 WCFIP1 蛋白的表达, 纯化并制备了特异性较好的抗体。

**关键词:** 茯苓; 免疫调节蛋白; 茯苓免疫调节蛋白-1; 亲和色谱; 蛋白质-G 柱; 抗体

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2912-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.008

## Preparation and analysis of antibody against *Poria cocos* immunomodulatory protein-1

LI Hong-bo, YANG Rui-xue, CHEN Jing, LI Ya-ying, HU Xing

Key Laboratory of Research and Utilization of Ethnomedicinal Plant Resources of Hunan Province, Department of Life Sciences, Huaihua College, Huaihua 418008, China

**Abstract: Objective** To prepare the recombinant *Poria cocos* immunomodulatory protein-1 (WCFIP1) and its antibody. **Methods** The cDNA of WCFIP1 was synthesized, cloned into plasmid and transformed into *Escherichia coli* expression strain. The recombinant protein of WCFIP1 was expressed, purified, and injected into mice to prepare antiserum. The antibody against WCFIP1 was purified by protein-G column and the specificity was determined by Western blotting. **Results** The recombinant protein of WCFIP1 and the specific antibody were prepared. **Conclusion** The recombinant protein of WCFIP1 is expressed and purified from *E. coli*, and the specificity of the prepared antibody is determined.

**Key words:** *Poria cocos* (Schw.) Wolf.; immunomodulatory protein; *Poria cocos* immunomodulatory protein 1; affinity chromatography; protein-G column; antibody

真菌免疫调节蛋白是从高等担子菌子实体中提取的与植物凝集素和免疫球蛋白在结构和功能上相似的一类小分子蛋白<sup>[1-2]</sup>。目前, 已从赤灵芝、松杉灵芝、金针菇、樟芝和草菇等真菌中分离到近 10 种真菌免疫调节蛋白<sup>[3-6]</sup>。这些蛋白具有活化免疫细胞、促使肿瘤细胞凋亡等生物活性。其中主要有 Kino 等<sup>[3]</sup>从赤灵芝子实体中分离提取出第一种真菌免疫调节蛋白 (LZ-8); Ko 等<sup>[4]</sup>从金针菇中分离出一种具有免疫调节和细胞凝集活性的“朴菇素”蛋

白; Hsu 等<sup>[5]</sup>从草菇中提取到一种真菌免疫调节蛋白 (fungal immunomodulatory protein, FIP); Maiti 等<sup>[6]</sup>从平菇和草菇等食用菌中也提取出了免疫调节蛋白。

茯苓活性成分研究主要集中在次生代谢产物上, 研究得最多的是茯苓多糖, 其衍生物羧甲基茯苓糖已被证明具免疫促进及抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>, 而 U-茯苓多糖和羟乙基茯苓多糖可抑制小鼠肉瘤细胞生长和调节免疫; 其次是茯苓的三萜类化合物具有抗炎、

收稿日期: 2014-05-26

基金项目: 湖南省科技计划项目 (2013FJ3024); 湖南省高校创新平台开放基金项目 (3K111); 湖南省高校科技创新团队支持计划 (2010212); 湖南省重点学科建设项目 (2011042)

作者简介: 李洪波 (1980—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为生物化学与分子生物学。Tel: 15115147025 E-mail: lihongbo8007@163.com

\*通信作者 胡 兴 (1971—), 男, 博士, 教授, 研究方向为生物化学。E-mail: huxing98@126.com

抗肿瘤细胞生成及诱导集落刺激因子等作用<sup>[8-11]</sup>。占茯苓干质量 1.5% 的茯苓蛋白研究几乎没有报道。最近,研究者从茯苓中发现一种与樟芝免疫调节蛋白(Aca1) 同源性很高的蛋白,即茯苓免疫调节蛋白-1(WCFIP1),但还尚未对其生物功能进行研究<sup>[12]</sup>。本实验利用大肠杆菌表达,研究重组 WCFIP1 蛋白的表达、纯化并制备其特异性抗体,为该蛋白的功能研究奠定基础。

## 1 材料

WCFIP1 基因由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。表达菌株 BL21 (DE3)、表达载体 pET28a (+) 购自 Invitrogen 公司。镍亲和色谱树脂购自 Qiagen, HiTrap<sup>TM</sup> 蛋白质-G HP (1 mL) 柱购自 GE 公司, Biologic DuoFlow 蛋白纯化系统(美国 Bio-Rad 公司); HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 购自 CST 公司,各种工具酶为 Takara 公司产品,一般化学试剂为 Sigma 公司分析纯。免疫用昆明小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号 SCXK (湘) 2009-0009, 5 周龄,雄性,体质量 (24±4) g。

## 2 方法

### 2.1 载体构建及表达产物确定

设计上游引物 PF: 5'-GCGGATCCGTCACG-TGACCTACGAC-3', 下游引物 PR: 5'-GCAAGCT-TCAAACCACAGACTGAAG-3', 以合成基因为模板、PCR 扩增目标基因,连接至 pET-28a (+) 质粒,测序验证的重组表达质粒转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株。随机挑取 4 个转化子单菌落,分别接种至 20 mL 含 70 mg/L Kan LB 液体培养基中,37 °C、250 r/min 培养至  $A_{600}$  为 0.6~0.8,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.5 mmol/L,诱导 5 h。取 1 mL 菌液,离心得菌体,向菌体中加入 80  $\mu$ L 菌体裂解缓冲液 [40 mmol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.5), 2 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA), 1% Triton X-100, 100 mg/L 溶菌酶], -20 °C 反复冻融、离心分别取上清和沉淀,加入十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 上样缓冲液,煮沸变性后 SDS-PAGE 分析。

### 2.2 扩大表达及纯化

200 mL 液体 LB 培养基扩大表达,同上培养至  $A_{600}$  为 0.6,加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IPTG, 37 °C 诱导 5 h,离心取菌体。参照《精编分子生物学实验指南》利用 8 mol/L 尿素溶解包涵体蛋白,不同浓度的咪唑洗脱并纯化包涵体蛋白<sup>[13]</sup>。取含不同浓度

咪唑的 8 mol/L 尿素洗脱液,加入 SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸变性后 15% SDS-PAGE 分析。

### 2.3 抗血清滴度测定及纯化

抗体制备参照文献方法<sup>[13]</sup>进行。纯化蛋白经 15% SDS-PAGE 电泳分离后, PAGE 胶于 ddH<sub>2</sub>O 中漂洗 10 min,将相对分子质量在 15 000 左右的凝胶用手术刀片切下,加入适量生理盐水,于研钵中充分研磨至糊状,每只小鼠免疫注射 200  $\mu$ L (约 50  $\mu$ g 蛋白)。每隔 2 周加强免疫 1 次,于第 2 次加强免疫后的第 7 天剪尾取血,用 10 mg/L 纯化蛋白包被 96 孔酶标板,间接酶联免疫吸附测定(ELISA)法测定抗体滴度,详细步骤参考文献方法<sup>[12]</sup>。将抗血清用 pH 5.0 的 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液稀释,过蛋白质-G 柱后用乙酸钠缓冲液漂洗柱子,最后用 pH 2.5 的 0.1 mol/L 甘氨酸缓冲液洗脱抗体, PBS (pH 7.4) 透析后, 15% SDS-PAGE 分析。

### 2.4 抗体特异性分析

提取茯苓菌丝体可溶性蛋白<sup>[13]</sup>, 10%三氯乙酸(TCA)法沉淀浓缩蛋白,蛋白沉淀溶解于 8 mol/L 尿素中, 15% SDS-PAGE 分析蛋白。分别以包涵体蛋白、纯化的 WCFIP1 重组蛋白和取茯苓菌丝体可溶性蛋白为检测对象, Western blotting 分析抗体特异性,具体操作按照文献方法<sup>[13]</sup>进行。

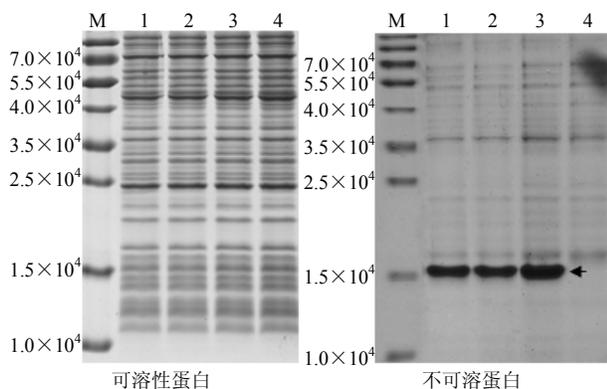
## 3 结果与分析

### 3.1 表达产物的确定

随机挑取 4 个 pET28/WCFIP 的 BL21 转化子单菌落, SDS-PAGE 分析结果如图 1 所示。从图 1 可以看出,在可溶性菌体总蛋白中,未经 IPTG 诱导的 BL21 转化子和 3 株经 IPTG 诱导的转化子在相对分子质量 15 000 左右目标位置没有蛋白特异表达;在不可溶蛋白中,未经 IPTG 诱导的 BL21 转化子在相对分子质量 15 000 左右的位置没有特异表达产物, 3 株经 IPTG 诱导的 BL21 转化子在相对分子质量 15 000 左右有目标蛋白表达,其相对分子质量大小与预期相对分子质量相符,说明经 IPTG 诱导实现了重组 WCFIP1 蛋白在大肠杆菌中的不可溶表达。

### 3.2 扩大表达及纯化

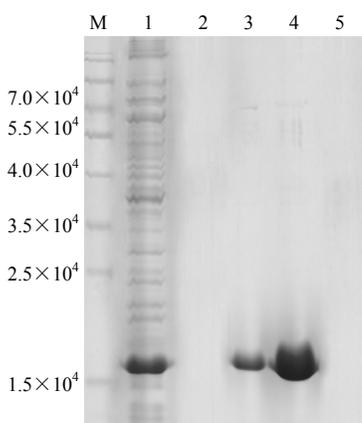
诱导表达的产物纯化结果如图 2 所示。从 SDS-PAGE 结果可以看出,提取所得包涵体蛋白中还有大量杂蛋白,在经 20 mmol/L 咪唑的 8 mol/L 尿素缓冲液漂洗后,利用 50、100、200、400 mmol/L 咪唑的 8 mol/L 尿素洗脱缓冲液对蛋白质进行洗脱,



M-Marker 1~3-经 IPTG 诱导的转化子 4-未经 IPTG 诱导的转化子, 目标蛋白 WCFIP1 如箭头所示

M-Marker 1—3-soluble protein induction with IPTG 4-soluble protein without IPTG induction, recombinant protein of WCFIP1 was marked with arrow

图 1 重组 WCFIP1 蛋白 SDS-PAGE 分析  
Fig. 1 SDS-PAGE analysis on expression of recombinant WCFIP1



1-纯化前的包涵体蛋白 2~5-分别利用 50、100、200、400 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白样品 M-Marker  
1-inclusion body 2—5-samples eluted with 50, 100, 200, and 400 mmol/L imidazole, respectively M-Marker

图 2 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis on purified recombinant protein

结果表明 50 mmol/L 咪唑不能将目标蛋白洗脱下来, 100、200 mmol/L 咪唑可以将目标蛋白洗脱, 且 200 mmol/L 咪唑的洗脱效果最好, 进一步用 400 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱, 几乎没有发现目标蛋白。因此, 用 100、200 mmol/L 咪唑的 8 mol/L 尿素洗脱缓冲液可纯化得到了 WCFIP1 的重组包涵体蛋白。

### 3.3 抗血清效价测定及纯化

昆明小鼠经 1 次初次免疫与 3 次加强免疫、断尾取血、采用 ELISA 法测定滴度, ELISA 结果见表

1。ELISA 结果表明, 滴度最高的 1 只小鼠抗血清在稀释 64 000 倍后仍能检测到纯化的融合蛋白。说明直接利用 SDS-PAGE 胶免疫注射小鼠可以得到高效价的抗血清, 表明成功制备了 WCFIP1 蛋白的抗血清。

表 1 抗血清的效价测定 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Analysis on antiserum titration against antigenic peptide ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

血清稀释倍数 ( $\times 10^3$ )	$A_{495}$		血清稀释倍数 ( $\times 10^3$ )	$A_{495}$	
	免疫前	免疫后		免疫前	免疫后
0.5	0.38	1.98**	8	0.13	0.82**
1	0.27	1.89**	16	0.11	0.51**
2	0.22	1.71**	32	0.11	0.33**
4	0.18	1.34**	64	0.09	0.26*

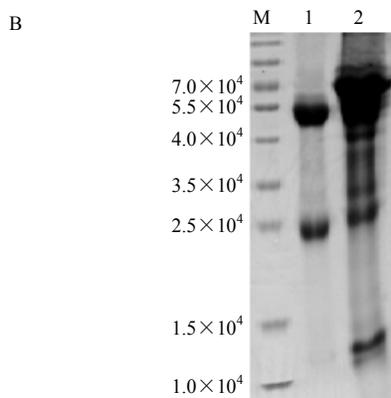
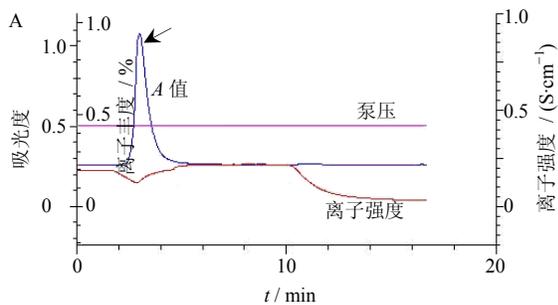
当血清稀释  $6.4 \times 10^4$  倍时,  $A_{495}$  免疫后 /  $A_{495}$  免疫前  $> 2.1$ , 表明抗血清的效价大于  $1 : 6.4 \times 10^4$ ; 与免疫前比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ ,  $t$  检验,  $n$  代表实验重复次数

When serum dilution was  $6.4 \times 10^4$  times,  $A_{495}$  post-immune /  $A_{495}$  pre-immune  $> 2.1$ , which suggested that the antiserum titer was greater than  $1 : 6.4 \times 10^4$ ; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs pre-immune, measured using Student's  $t$  test,  $n$  represents number of experiments

制备的抗血清利用蛋白质-G 柱纯化, 抗体的蛋白洗脱曲线如图 3-A 所示, 洗脱得到 1 个蛋白洗脱峰, 收集洗脱峰蛋白 (箭头所示)。纯化后的抗体 SDS-PAGE 分析结果如图 3-B 所示, 结果表明, 经蛋白质-G 柱的亲合吸附, 抗体得到了高效纯化, SDS-PAGE 中仅出现在相对分子质量 50 000 左右的重链和相对分子质量 25 000 左右的轻链蛋白条带, 而未经纯化的抗血清中有大量的杂蛋白。

### 3.4 抗体的纯化及特异性分析

茯苓菌体可溶性蛋白、提纯的包涵体蛋白和纯化重组 WCFIP1 蛋白的 SDS-PAGE 结果比较如图 4-A 所示, 提取的茯苓菌体可溶性蛋白在相对分子质量 15 000 以上存在大量的蛋白条带、包涵体中除目标蛋白外同样存在较多杂蛋白而纯化重组 WCFIP1 蛋白蛋白仅有目标蛋白。将该 3 种蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 利用纯化的抗体对蛋白样品进行分析, 分析结果如图 4-B 所示。Western blotting 结果表明, 以纯化蛋白和包涵体蛋白为检测对象, 均仅在相对分子质量 15 000 处出现特异单一条带。以提取的茯苓菌丝体可溶性蛋白为检测对象, 在目标位置相对分子质量约 15 000 处也存在 1 条较明显的印迹条带(图 4-B, 泳道 1, 箭头所示), 此条带大小与天然 WCFIP1 的

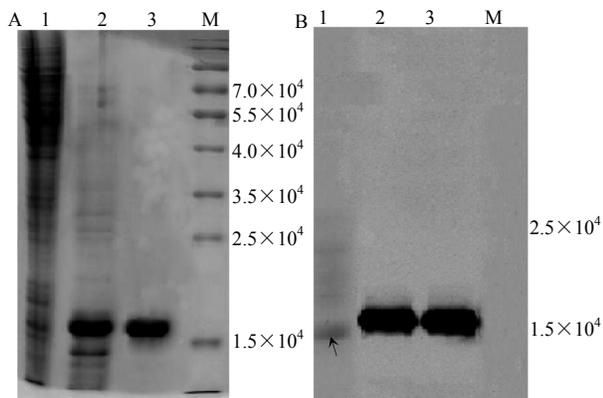


A-从蛋白质-G 柱洗脱的抗体蛋白洗脱曲线 B-纯化抗体蛋白的 SDS-PAGE 分析 M-Marker 1-纯化后的抗体蛋白 2-纯化前的抗血清

A-elution curves of antibody from protein G column B-SDS-PAGE analysis of the purified antibody and antiserum M-Marker 1-purified antibody 2-unpurified antiserum

图 3 抗体蛋白的纯化

Fig. 3 Purification of prepared antibody



A-蛋白 SDS-PAGE 结果 B-抗体特异性 Western blotting 分析 1-茯苓菌丝体可溶性总蛋白 2-WCFIP1 包涵体蛋白 3-纯化的 WCFIP1 蛋白 M-Marker

A-SDS-PAGE analysis of protein samples B-antibody specificity analysis by Western blotting 1-soluble total protein of *P. cocos* 2-inclusion body proteins 3-purified recombinant WCFIP1 protein M-Marker

图 4 抗体特异性蛋白质印迹分析

Fig. 4 Specificity analysis on specific antibody

相对分子质量大小基本吻合；除此之外，有相对分子质量在 25 000 左右的 3 条较弱的印迹条带，这些蛋白可能是与 WCFIP1 蛋白质存在同源区段的蛋白。总之，Western blotting 结果表明，本方法制备的多克隆抗血清在检测重组 WCFIP1 蛋白时具有较高的特异性，在检测茯苓菌丝体可溶性蛋白时也检测到了目标印迹条带。

#### 4 讨论

茯苓活性成分研究主要集中在多糖及萜类等次生代谢产物上，对茯苓活性蛋白的研究非常少。本研究以大肠杆菌为表达宿主菌，在 IPTG 诱导下表达蛋白是不可溶性的包涵体。以纯化的不可溶性重组蛋白为抗原，成功制备了抗血清，并经蛋白质 G 柱纯化到抗体 IgG。以纯化蛋白和包涵体蛋白为检测对象，均仅在相对分子质量 15 000 处出现特异单一条带，说明本方法制备的多克隆抗血清在检测重组 WCFIP1 蛋白时具有较高的特异性。吴宗勋等<sup>[13]</sup>利用制备的 Aca1 抗血清检测茯苓蛋白时在 WCFIP1 蛋白目位置处得到了蛋白印迹条带，并根据 EST 库推测 WCFIP1 可能是一种与 Aca1 具有相似功能的蛋白。

本研究在检测茯苓菌丝体可溶性总蛋白时除目标蛋白处检测到印迹条带外，在目标蛋白位置之外还存在其他条带，这可能与制备的是多克隆抗体而茯苓菌丝体可溶性总蛋白成分复杂有关，具有相同抗原决定簇的蛋白都可能检测到。下一步将制备可溶性重组蛋白，并对茯苓菌丝体蛋白中可能存在的 WCFIP1 蛋白进行纯化。在此基础上，对重组 WCFIP1 蛋白及天然蛋白的生物活性进行分析，验证 WCFIP1 是否具有免疫调节功能。

#### 参考文献

- [1] Moradali M F, Mostafavi H, Ghods S, *et al.* Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) [J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, 7(6): 701-724.
- [2] Chu K K, Ho S S, Chow A H. *Coriolus versicolor*: a medicinal mushroom with promising immunotherapeutic values [J]. *J Clin Pharmacol*, 2002, 42(9): 976-984.
- [3] Kino K, Yamashita A, Yamaoka A, *et al.* Isolation and characterization of a new immunomodulatory protein, Ling zhi 8 (LZ-8) from *Ganoderma lucidum* [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(1): 472-478.
- [4] Ko J L, Hsu C G, Lin R W, *et al.* A new fungal immunomodulatory protein, FIP-fve isolated from the

- edible mushroom, *Flammulina velutipes* and its complete amino acid sequence [J]. *Eur J Biochem*, 1995, 228(2): 244-249.
- [5] Hsu H C, Hsu C G, Lin R W, *et al.* Fip-vvo, a new fungal immunomodulatory protein isolated from *Volvariella volvacea* [J]. *Biochem J*, 1997, 323(pt2): 557-565.
- [6] Maitis B H, Utia S K, Mallick S K, *et al.* Antiproliferative and immunostimulatory protein fraction from edible mushrooms [J]. *Eur J Pharmacol Environ Toxicol Pharmacol*, 2008, 26(2): 187-191.
- [7] 张密霞, 李怡文, 张德生, 等. 茯苓多糖对 Lewis 肺癌小鼠自发肺转移的抑制作用及其机制研究 [J]. *现代药物与临床*, 2013, 28(6): 842-846.
- [8] 胡 斌, 杨益平, 叶 阳. 茯苓化学成分的研究 [J]. *中草药*, 2006, 37(5): 655-658.
- [9] Rios J L. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos* [J]. *Planta Med*, 2011, 77(7): 681-691.
- [10] Chen X, Zhang L, Cheung P C. Immunopotential and anti-tumor activity of carboxymethylated-sulfated beta-(1→3)-D-glucan from *Poria cocos* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(4): 398-405.
- [11] Chang H H, Yeh C H, Sheu F. A novel immunomodulatory protein from *Poria cocos* induces Toll-like receptor 4-dependent activation within mouse peritoneal macrophages [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(14): 6129-6139.
- [12] 吴宗勋, 孙智雯. 茯苓表现序列基因库之建构与分析 [J]. *生物学报*, 2007, 42(1): 47-53.
- [13] Frederick F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* 精编分子生物学实验指南 [M]. 第5版. 金由辛, 包慧中, 赵丽云, 等译. 北京: 科学出版社, 2008.