

大肠杆菌 FtsZ 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定

陈云雨¹, 牛夏忆¹, 李森¹, 李霓², 刘晓平¹

1 皖南医学院 药物筛选与评价研究所, 安徽 芜湖 241002

2 中国医学科学院-北京协和医学院 药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

陈云雨, 牛夏忆, 李森, 等. 大肠杆菌 FtsZ 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定. 生物工程学报, 2019, 35(6): 1117-1125.
Chen YY, Niu XY, Li M, et al. Bacterial expression, preparation and identification of polyclonal antibody against *Escherichia coli* FtsZ. Chin J Biotech, 2019, 35(6): 1117-1125.

摘 要: 为制备特异性抗大肠杆菌丝状热敏蛋白 Z (*Escherichia coli* filamentous thermosensitive protein Z, Ec-FtsZ) 多克隆抗体, 将 *Ec-FtsZ* 基因进行化学合成后连接 pET-22b(+) 表达载体, 构建重组质粒 Ec-FtsZ-pET-22b(+). 将重组质粒转化到大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 中进行 Ec-FtsZ 原核表达与表达条件优化, 以 HisTrap 层析柱进行 Ec-FtsZ 的分离纯化, 再以孔雀绿法进行 Ec-FtsZ GTPase (Guanosine triphosphatase) 活性测定。使用纯化的 Ec-FtsZ 为抗原免疫大鼠制备多克隆抗体, 经酶联免疫吸附测定实验 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、Western blotting 实验和免疫荧光实验鉴定, 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体效价可达 1:256 000 且具有良好的抗原特异性。抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体的成功制备为 Ec-FtsZ 生物学功能研究和生化检测奠定了实验基础。

关键词: 大肠杆菌 FtsZ 蛋白, 原核表达, 孔雀绿法, 免疫荧光, 多克隆抗体

Bacterial expression, preparation and identification of polyclonal antibody against *Escherichia coli* FtsZ

Yunyu Chen¹, Xiayi Niu¹, Miao Li¹, Ni Li², and Xiaoping Liu¹

1 Research Institute for Pharmaceutical Screening & Evaluation, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Bioactive Substances and Function of Natural Medicine, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: To prepare polyclonal antibody (PcAb) against *Escherichia coli* filamentous thermosensitive protein Z (Ec-FtsZ), the artificially synthesized gene fragment coding Ec-FtsZ was subcloned into pET-22b(+) plasmid, and Ec-FtsZ protein was

Received: January 6, 2019; **Accepted:** March 11, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 81503065, 81703546), Anhui Provincial Natural Science Foundation (No. 1808085QH265), Jilin Scientific and Technological Development Program (No. 20160520045JH), The Doctoral Starting-up Fund of Wannan Medical College (No. RCQD201617), College Student Innovation Fund of Wannan Medical College (No. WK2018S54).

Corresponding authors: Xiaoping Liu. Tel: +86-553-3932601; Fax: +86-553-3932622; E-mail: liuxiaoping@wnmc.edu.cn
Ni Li. Tel: +86-10-83162728; Fax: +86-10-63180604; E-mail: linineon@126.com

国家自然科学基金 (Nos. 81503065, 81703546), 安徽省自然科学基金 (No. 1808085QH265), 吉林省科技发展计划 (No. 20160520045JH), 皖南医学院博士科研启动基金 (No. RCQD201617), 皖南医学院大学生科研资助金 (No. WK2018S54) 资助。

网络出版时间: 2019-03-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20190318.1733.004.html>

expressed in *E. coli* BL21(DE3) cell under an optimal bacterial expression condition. Then Ec-FtsZ protein was purified by HisTrap affinity chromatography, and the GTPase (Guanosine triphosphatase) activity of purified Ec-FtsZ protein was further analyzed by malachite green assay. Subsequently, the purified Ec-FtsZ protein was used to immunize rat subcutaneously for preparation of anti-Ec-FtsZ PcAb. The results of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Western blotting analysis and immunofluorescence assay showed that the titer of PcAb was 1:256 000, and PcAb exhibited a perfect antigenic specificity against purified and endogenous Ec-FtsZ protein. All these data indicated that the anti-Ec-FtsZ PcAb is successfully prepared, which can be used for further cellular function study and biochemical analysis of Ec-FtsZ protein *in vivo*.

Keywords: *Escherichia coli* FtsZ protein, bacterial expression, malachite green assay, immunofluorescence assay, polyclonal antibody

大肠杆菌细胞骨架蛋白 FtsZ (*Escherichia coli* filamentous thermosensitive protein Z, Ec-FtsZ) 是细菌细胞分裂所必需的调控蛋白, 其生物学功能与微管蛋白极其相似, 被认为是微管蛋白的同源蛋白^[1-2]。Ec-FtsZ 具有 GTPase (Guanosine triphosphatase) 活性, 在 GTP 存在条件下, Ec-FtsZ 可在细菌内膜中心聚集形成多聚体, 进而形成可收缩的 Z 环 (Z ring)。Z 环形成后, 其他分裂调控蛋白陆续结合到 Z 环骨架上形成分裂体。分裂体通过提供细菌细胞缢缩力和酶活力使 Z 环缩小以形成隔膜, 完成细菌细胞的二分裂过程^[3-7]。由于 FtsZ 在大多数致病细菌细胞分裂过程中发挥高度保守的调控作用, 细菌的 FtsZ 与真核生物微管蛋白结构差异较大且不易突变, 其已成为抗感染药物开发的理想靶标之一^[4,7-8]。因此, 深入研究 Ec-FtsZ 在大肠杆菌 Z 环形成和定位中的调控功能对新型抗耐药菌药物研发具有重要意义。

Ec-FtsZ 虽是组成细菌分裂体的核心蛋白, 但目前对 Ec-FtsZ 如何调控其他分裂调控蛋白募集到 Z 环形成细菌分裂体的调控机制研究还不甚深入, 尤其是 Z 环在细菌内膜精准定位的分子机制尚未明确。为了进一步探讨 Ec-FtsZ 上述生物学功能, 本研究利用 DNA 重组技术原核表达和分离纯化了高活性的 Ec-FtsZ, 并制备了高效价和特异性的大鼠抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体 (Polyclonal antibody, PcAb), 为 Ec-FtsZ 生物学功能研究和生化检测奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

pET-22b(+) 质粒由北京师范大学化学学院化学生物学系郑积敏教授惠赠; 大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* Rosetta(DE3)、*E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3) pLysS、*Nde* I、*Xho* I、Trans 2K[®] DNA Marker 和 ProteinRuler[®] II 购自北京全式金生物技术有限公司; 酵母粉、琼脂粉、胰蛋白胨购自 Oxoid 公司; 二辛可宁酸 (Bicinchoninic acid, BCA) 蛋白浓度测定试剂盒购自 Thermo 公司; 异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、GTP (Guanosine triphosphate)、氨苄西林、Freund 完全佐剂和 Freund 不完全佐剂购自 Sigma 公司; 小鼠抗组氨酸 (Histidine, His) 标签单克隆抗体、辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗小鼠 IgG、HRP-山羊抗大鼠 IgG、异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗大鼠 IgG 购自 Boster 公司; Tanon[™] 化学发光液购自上海天能科技有限公司; 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA)、四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 溶液购自北京索莱宝科技有限公司; 半底 96 孔透明板、96 孔酶标板购自 Corning 公司; HisTrap 层析柱购自 GE 公司; BIOMOL[®] GREEN 购自 Enzo Biochem 公司; Wistar 大鼠购自维通利华公司; 其他生化试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 Ec-FtsZ 原核表达质粒的构建与鉴定

在NCBI数据库中检索大肠杆菌 *Ec-FtsZ* 全长基因序列 (GenBank 登录号: CP023258.1), 在该基因序列两端分别设计 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切位点后进行全基因合成。将合成的基因片段插入 pET-22b(+) 表达载体, 构建重组质粒 *Ec-FtsZ*-pET-22b(+), 以双酶切法进行鉴定。基因片段合成和测序由 General Biosystems 公司完成。

1.2.2 Ec-FtsZ 原核表达

将重组质粒 *Ec-FtsZ*-pET-22b(+) 转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞, 涂布于 LB 固体培养基 (含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄西林), 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养过夜。随机挑取 6 个单菌落接种至含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄西林的 LB 液体培养基中, 以 1 mmol/L IPTG 为诱导剂, 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 10 h, 诱导 *Ec-FtsZ* 表达。以 10% SDS-PAGE 检测 *Ec-FtsZ* 原核表达情况。

1.2.3 Ec-FtsZ 最适诱导时间的确定

将上述工程菌接种至含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄西林的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至菌体 $OD_{600}=0.8$ 时, 加入 1.0 mmol/L IPTG, 诱导温度分别设置为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 *Ec-FtsZ* 表达, 在 2、4、6、8、10 和 12 h 时间点等量收集菌体, 以 10% SDS-PAGE 检测 *Ec-FtsZ* 表达情况, 利用 Clinx Image Analysis 软件分析 *Ec-FtsZ* 表达量。

1.2.4 Ec-FtsZ 最适诱导温度的确定

等量收集 20 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 和 30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导培养 6 h 的菌体, 收集的菌体用 TBS (50 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl, pH8.0) 溶液重悬, 以超声波破碎菌体, 离心收集裂解后的上清液和沉淀, 以 10% SDS-PAGE 检测 *Ec-FtsZ* 的可溶性表达情况。

1.2.5 Ec-FtsZ 最适 IPTG 诱导浓度的确定

工程菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $OD_{600}=0.8$ 时, 加入不同浓度的 IPTG 分别于 25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 6 h, IPTG 浓度设置为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L。等量收

集菌体, 以 10% SDS-PAGE 检测不同 IPTG 诱导浓度对 *Ec-FtsZ* 表达的影响。

1.2.6 Ec-FtsZ 分离纯化与鉴定

诱导后的工程菌经超声波破碎后取上清液, 以 25% 饱和硫酸铵溶液沉淀制备粗提液。按照文献所述方法进行 *Ec-FtsZ* 的分离纯化^[4]。纯化的 *Ec-FtsZ* 以 TBS 溶液透析, 再以 BCA 法测定蛋白浓度。

纯化的 *Ec-FtsZ* 经 10% SDS-PAGE 后转膜, 一抗为小鼠抗 His 标签单抗 (1:2 000), 二抗为 HRP-羊抗小鼠 IgG (1:4 000), 以 TanonTM 化学发光液成像。

1.2.7 Ec-FtsZ GTPase 活性测定

参考相关文献^[4,9-10], 首先将 0.1 mol/L GTP 溶液以反应液 (50 mmol/L Tris、5 mmol/L MgCl_2 , pH 8.0) 进行 2 倍倍比稀释, 共制备 7 个浓度梯度样品 (2–0.031 mmol/L)。上述 GTP 稀释液以 25 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 依次加入到含 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ *Ec-FtsZ* (25 $\mu\text{L}/\text{孔}$) 的半底 96 孔透明板中, 每个浓度设置 3 组复孔, 室温孵育 20 min。依次加入孔雀绿试剂 (50 $\mu\text{L}/\text{孔}$), 室温反应 5 min, 以多功能酶标仪检测 OD_{620} 值 (CytationTM 5, BioTek)。将 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ BSA 反应组设为阴性对照组。根据磷酸标准曲线计算酶促反应中自由磷酸 (Pi) 的释放量和 *Ec-FtsZ* GTPase 活性 (nmol/(min·mg *Ec-FtsZ*))。

1.2.8 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体的制备

改进文献所述方法免疫大鼠制备抗 *Ec-FtsZ* 多克隆抗体^[11-12]。首次免疫时, 将 *Ec-FtsZ* (200 $\mu\text{g}/(\text{次}\cdot\text{只})$) 与等体积 Freund 完全佐剂混合, 充分乳化后进行 Wistar 大鼠皮下多点注射。首次免疫 3 周后进行第 2 次免疫, 用 Freund 不完全佐剂充分乳化后的 *Ec-FtsZ* 进行皮下注射。第 2 次免疫后的第 7 天, 从大鼠尾尖部少量采血后分离血清, 以 ELISA 法进行效价测定。当抗血清效价达到 1:70 000, 则从全血中分离抗血清备用。

1.2.9 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体效价测定

按照文献所述方法进行抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体效价测定^[12]。首先将 Ec-FtsZ (10 $\mu\text{g/mL}$) 以 100 $\mu\text{L/孔}$ 包被至 96 孔酶标板, 酶标板经 10% BSA 封闭后, 依次加入以 2 倍倍比稀释法稀释的共 11 个浓度梯度的大鼠抗血清 (1:1 000–1:1 024 000; 100 $\mu\text{L/孔}$), 每组 3 个复孔, 以相同稀释倍数的大鼠免疫前血清作为阴性对照组, 室温孵育 1 h。酶标板经 HRP-羊抗大鼠 IgG (1:4 000) 孵育和 TMB 显色后, 以多功能酶标仪测定 OD_{450} 值。 $S/N = OD_{\text{稀释抗血清}} / OD_{\text{阴性对照组}}$, 判定 $S/N \geq 3.0$ 的样品为阳性样品。

1.2.10 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体抗原特异性鉴定

纯化的 Ec-FtsZ (1、2、4 μg) 经 10% SDS-PAGE 后转膜, 一抗为大鼠抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体 (1:10 000), 二抗为 HRP-羊抗大鼠 IgG (1:4 000), 以 TanonTM 化学发光液成像。

以煮沸法裂解大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3) pLysS 和 *E. coli* Rosetta (DE3) 细胞, 同法检测细胞裂解液中的内源 Ec-FtsZ。

1.2.11 免疫荧光实验分析 Ec-FtsZ 亚细胞定位

将大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3) 细胞以 2.5% 多聚甲醛和 0.04% 戊二醛固定后, 以含 0.3% Tween-20 的 PBS (Phosphate buffered saline) 溶液 (PBST) 洗涤 3 次。经 10% BSA 封闭 2 h 后, 依次加入大鼠抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体 (1:10 000) 和 FITC-山羊抗大鼠 IgG (1:100), 室温孵育 45 min, PBST 洗涤 3 次, 以荧光显微镜 (Life EVOS) 观察 Ec-FtsZ 的亚细胞定位。

2 结果与分析

2.1 Ec-FtsZ 原核表达质粒的鉴定

用 *Nde* I 和 *Xho* I 酶切构建的重组质粒 Ec-FtsZ-pET-22b(+), 得到了约 1 152 bp 的基因片段, 其大小与 Ec-FtsZ 基因片段理论值一致 (图 1), 表明成功构建了重组质粒 Ec-FtsZ-pET-22b(+).

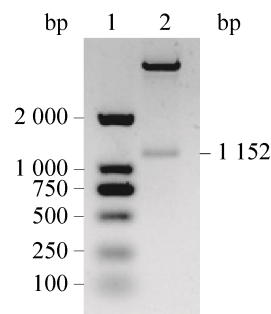


图 1 重组质粒 Ec-FtsZ-pET-22b(+) 的双酶切鉴定
Fig. 1 Dual-restriction enzyme digestion map for Ec-FtsZ-pET-22b(+) plasmid. 1: DNA marker; 2: Ec-FtsZ gene product.

2.2 Ec-FtsZ 的原核表达

6 株工程菌经 IPTG 诱导培养后, 收集的菌体经 10% SDS-PAGE 分析表明, 在 Ec-FtsZ 理论分子量位置 (42 kDa) 可见明显的蛋白表达条带 (图 2), 这说明成功进行了 Ec-FtsZ 原核表达。

2.3 Ec-FtsZ 最适诱导时间的确定

工程菌以不同的诱导时间培养后, 等量收集菌体, 以 10% SDS-PAGE 鉴定 Ec-FtsZ 表达情况。在诱导温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ (图 3A)、25 $^{\circ}\text{C}$ (图 3B) 和 20 $^{\circ}\text{C}$ (图 3C) 时, Ec-FtsZ 均明显表达。以上述诱导温度分别诱导工程菌 6 h, Ec-FtsZ 表达量均达 30%, 趋于蛋白表达量最高峰。因此确定 Ec-FtsZ 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 和 20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导时, 其最适诱导时间为 6 h。

2.4 Ec-FtsZ 最适诱导温度的确定

等量收集 30 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、20 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 6 h 的菌体,

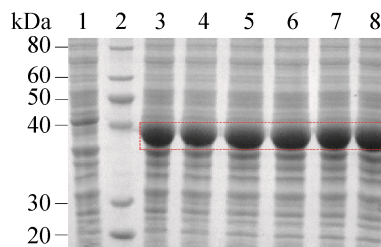


图 2 Ec-FtsZ 的原核表达
Fig. 2 Bacterial expression of Ec-FtsZ protein. 1: negative control; 2: protein marker; 3–8: positive clones after induction with 1 mmol/L IPTG at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 10 h.

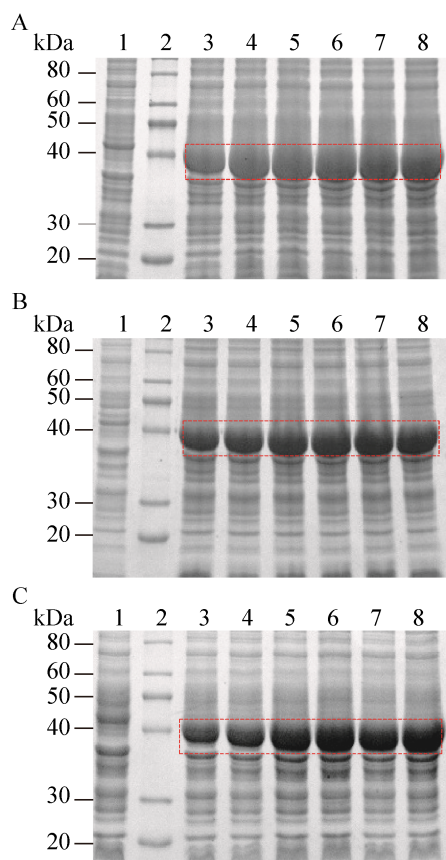


图 3 Ec-FtsZ 最适诱导时间的确定

Fig. 3 Determination of an optimal induction length for high yield of Ec-FtsZ protein. (A–C) SDS-PAGE profile of Ec-FtsZ protein expression at 30 °C (A), 25 °C (B) and 20 °C (C) for 2 h–12 h. 1: negative control; 2: protein marker; 3: total cell proteins (TCP), 2 h; 4: TCP, 4 h; 5: TCP, 6 h; 6: TCP, 8 h; 7: TCP, 10 h; 8: TCP, 12 h.

菌体裂解上清液和沉淀经 10% SDS-PAGE 分析表明, 与 30 °C 诱导 6 h 时相比, 25 °C 和 20 °C 诱导 6 h 时, Ec-FtsZ 包涵体量明显减少, 目的蛋白大部分在上清中呈可溶表达 (图 4)。因此确定 Ec-FtsZ 最适诱导温度为 25 °C。

2.5 Ec-FtsZ 最适 IPTG 诱导浓度的确定

SDS-PAGE 结果表明, IPTG 对 Ec-FtsZ 表达的诱导效率较高, 0.2 mmol/L IPTG 即可诱导 Ec-FtsZ 大量表达 (图 5)。

综上所述, 以 0.2 mmol/L IPTG 于 25 °C 诱导 6 h 作为 Ec-FtsZ 最适表达条件。

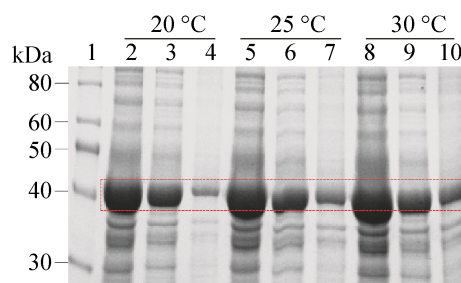


图 4 Ec-FtsZ 最适诱导温度的确定

Fig. 4 Determination of an optimal induction temperature for high yield of Ec-FtsZ protein. 1: protein marker; 2: TCP (20 °C); 3: supernatant (20 °C); 4: pellet (20 °C); 5: TCP (25 °C); 6: supernatant (25 °C); 7: pellet (25 °C); 8: TCP (30 °C); 9: supernatant (30 °C); 10: pellet (30 °C).

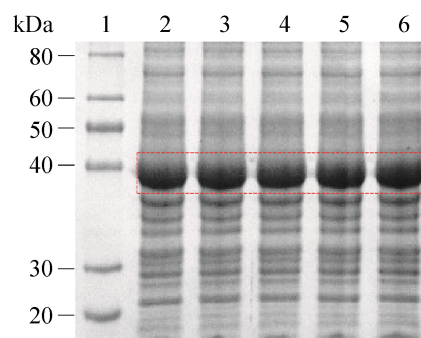


图 5 Ec-FtsZ 最适 IPTG 诱导浓度的确定

Fig. 5 Determination of an optimal IPTG concentration for high yield of Ec-FtsZ protein. 1: protein marker; 2: 0.2 mmol/L IPTG; 3: 0.4 mmol/L IPTG; 4: 0.6 mmol/L IPTG; 5: 0.8 mmol/L IPTG; 6: 1.0 mmol/L IPTG.

2.6 Ec-FtsZ 的分离纯化与鉴定

工程菌菌体裂解上清液首先用 25% 饱和硫酸铵溶液沉淀后制备粗提液, 粗提液经过滤后再以 HisTrap 层析柱进行分离纯化。SDS-PAGE 结果显示, 在相对分子量 42 kDa 左右呈单一蛋白条带, 说明获得了具有较高纯度的 Ec-FtsZ (图 6A)。Western blotting 实验证实了 Ec-FtsZ 的正确表达 (图 6B)。BCA 法测定纯化的 Ec-FtsZ 浓度为 1.3 mg/mL。

2.7 Ec-FtsZ GTPase 活性测定

Ec-FtsZ 具有 GTPase 活性, 能够水解 GTP 为 GDP 和自由磷酸 (Pi)。孔雀绿试剂能与 Pi 结合形成绿色复合物, 且复合物量与 OD_{620} 值呈正相关,

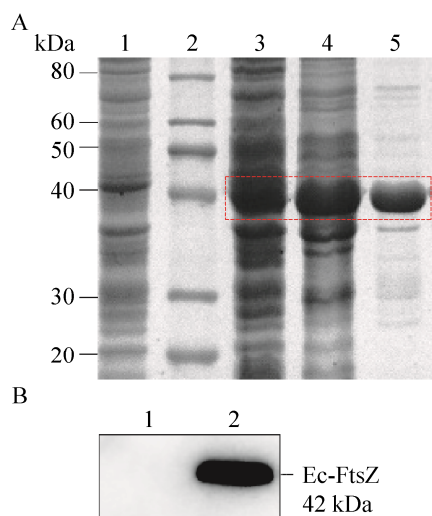


图6 Ec-FtsZ 的分离纯化与鉴定

Fig. 6 Purification and identification of Ec-FtsZ protein. (A) Purification of Ec-FtsZ protein. 1: negative control; 2: protein maker; 3: TCP; 4: precipitated Ec-FtsZ protein by 25% saturated ammonium sulfate solution; 5: purified Ec-FtsZ protein. (B) Identification of purified Ec-FtsZ protein by Western blotting analysis. 1: protein marker; 2: Ec-FtsZ band.

故此可以用反应体系 Pi 释放量反映 Ec-FtsZ GTPase 活性^[4,9]。孔雀绿法酶活性测定实验表明, 与 BSA 对照组相比, 随着 GTP 浓度的不断升高, Ec-FtsZ GTPase 活性越来越强, 最大酶活力可达 6 nmol/(min·mg Ec-FtsZ) (图 7)。

2.8 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体的制备与效价测定

以纯化的 Ec-FtsZ 为抗原免疫大鼠, 在第 2 次加强免疫后第 7 天抗体滴度基本达到峰值。当抗血清稀释至 256 000 倍时, S/N 值为 3.15, 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体效价可达 1:256 000 (图 8), 这表明纯化的 Ec-FtsZ 具有良好的免疫原性, 制备的抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体具有较高的滴度。

2.9 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体的抗原特异性鉴定

将抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体 (1:10 000) 作为一抗, 分别与纯化的 Ec-FtsZ 和大肠杆菌内源 Ec-FtsZ 反应, 以 Western blotting 实验检测其抗原特异性。结果显示, 纯化的 Ec-FtsZ 在相对分子量 42 kDa 左右显现特异条带, 条带亮度与

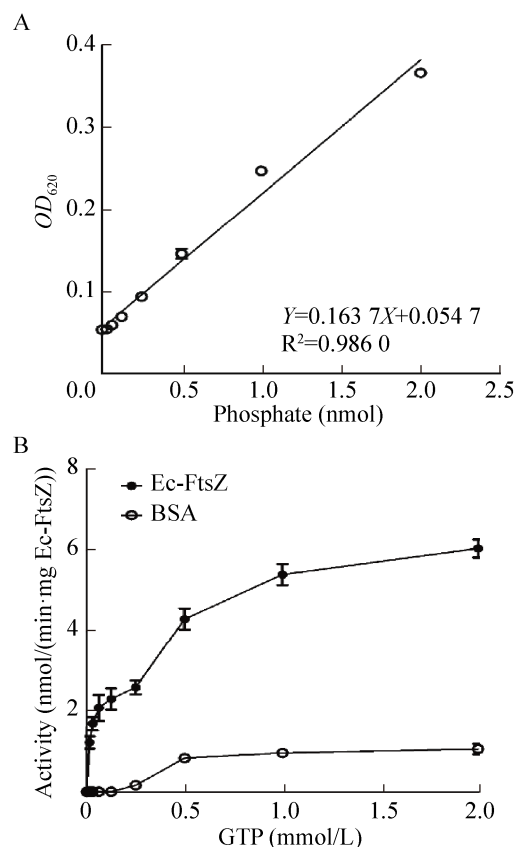


图7 Ec-FtsZ GTPase 活性测定

Fig. 7 Analysis of GTPase activity of purified Ec-FtsZ protein using malachite green assay. (A) Phosphate standard curve. (B) GTPase activity of purified Ec-FtsZ protein using malachite green assay.

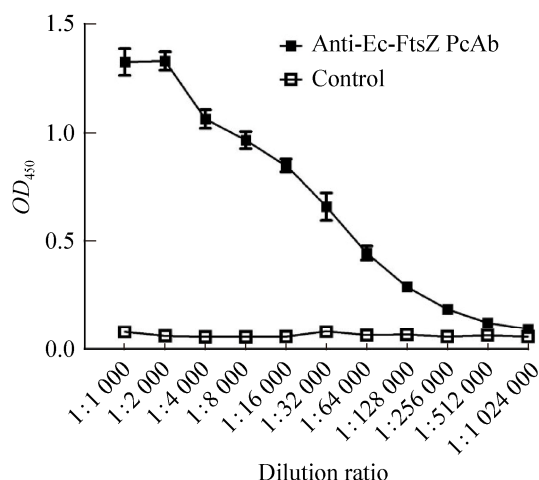


图8 ELISA 检测抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体效价

Fig. 8 Analysis of anti-Ec-FtsZ PcAb titer using ELISA.

Ec-FtsZ 剂量呈正相关 (图 9A)。另外, 在大肠杆菌 *E. coli* BL21(DE3)、*E. coli* BL21(DE3) pLysS 和 *E. coli* Rosetta (DE3) 细胞裂解液中也同样检测到了相同分子量的特异条带 (图 9B)。综上所述, 抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体不仅可以识别纯化的 Ec-FtsZ, 还可以特异性结合大肠杆菌内源 Ec-FtsZ, 其具有良好的抗原特异性。

2.10 大肠杆菌 Ec-FtsZ 的亚细胞定位

通过荧光显微镜观察, 使用大鼠抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体为一抗, 以免疫荧光实验分析大肠杆菌 Ec-FtsZ 亚细胞定位。结果表明, 绿色荧光 (Ec-FtsZ) 主要分布于大肠杆菌细胞内膜的中心, 这说明 Ec-FtsZ 主要定位于细菌细胞内膜中心即 Z 环位置, 参与大肠杆菌细胞分裂的调控 (图 10)。

3 讨论

大肠杆菌 FtsZ 是细菌分裂过程中重要的调控蛋白, 其通过 GTP 依赖的自组装形成多聚体, 促进细菌分裂体和 Z 环结构形成以调控细菌细胞分裂, FtsZ 相对保守的细菌分裂调控模式已成为新

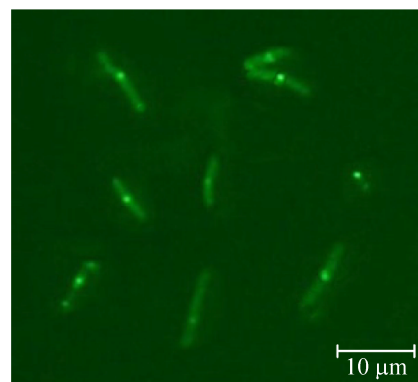


图 10 免疫荧光实验分析 Ec-FtsZ 的亚细胞定位 (×60)
Fig. 10 Analysis of endogenous Ec-FtsZ protein subcellular localization in *E. coli* BL21(DE3) cell using immunofluorescence assay. The scale bar is 10 μm.

型抗感染药物开发的理想靶标之一^[4,7-10,13-16]。深入研究 Ec-FtsZ 在大肠杆菌分裂过程中的调控功能, 尤其是调控细菌分裂体形成和 Z 环内膜定位的分子机制, 对未来新型抗耐药菌细胞分裂抑制剂研发具有重要意义。特异性抗体对研究蛋白质生物学功能和生化检测具有重要作用, 但目前还未有抗 Ec-FtsZ 抗体商品化销售, 因此制备特异性抗 Ec-FtsZ 抗体对 Ec-FtsZ 生物学功能深入研究和生化检测具有重要意义。

多克隆抗体虽特异性不如单克隆抗体, 但其生产过程简便、成本低廉且产量较大, 因此是抗体制备的重要选择之一。诸多研究者将大肠杆菌原核表达的重组蛋白作为抗原免疫实验动物 (如大鼠、小鼠、新西兰大白兔等), 成功制备了多种特异性多克隆抗体用于实验研究^[11-12,17-20]。本研究将 *Ec-FtsZ* 基因片段克隆至 pET-22b(+) 表达载体中, 构建了重组质粒 Ec-FtsZ-pET-22b(+). 利用 pET-22b(+) 的 His 标签羧基端融合表达策略, 成功进行了 Ec-FtsZ 原核表达与分离纯化。由于诱导时间、诱导温度与 IPTG 浓度是影响重组蛋白原核表达的重要因素^[21-24], 为了提高 Ec-FtsZ 表达量并节约实验成本, 笔者对其原核表达条件进行了系统优化。Ec-FtsZ 原核表达优化实验显示, 不同的诱导温度对其原核表达的影响较大。30 °C

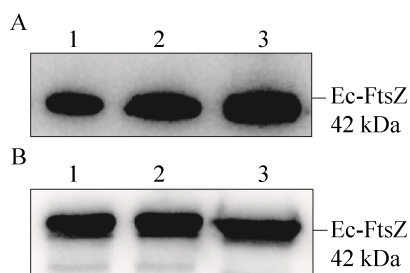


图 9 Western blotting 鉴定抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体的抗原特异性

Fig. 9 Analysis of the antigenic specificity of anti-Ec-FtsZ PcAb using Western blotting assay. (A) The antigenic specificity of anti-Ec-FtsZ PcAb against purified Ec-FtsZ protein by Western blotting analysis. 1: 1 μg Ec-FtsZ protein; 2: 2 μg Ec-FtsZ protein; 3: 4 μg Ec-FtsZ protein. (B) The antigenic specificity of anti-Ec-FtsZ PcAb against endogenous Ec-FtsZ protein in *Escherichia coli* cells by Western blotting analysis. 1: *E. coli* BL21(DE3) FtsZ; 2: *E. coli* BL21(DE3) pLysS FtsZ; 3: *E. coli* Rosetta(DE3) FtsZ.

诱导时, Ec-FtsZ 易于形成包涵体; 25 °C 和 20 °C 低温诱导时, 大部分 Ec-FtsZ 以可溶形式表达, 这可能与低温状态下蛋白表达速度缓慢并促进其正确折叠有关^[24-25]。25 °C 诱导 6 h 时, Ec-FtsZ 表达量可达 30% 并趋于稳定, 故此以 25 °C 诱导 6 h 作为 Ec-FtsZ 最适表达条件。IPTG 作为原核表达的诱导剂, 其对 Ec-FtsZ 表达的诱导效率很高, 0.2 mmol/L IPTG 即可诱导 Ec-FtsZ 大量表达。

高活性的 Ec-FtsZ 制备对于多克隆抗体制备和体外生物学功能研究具有重要意义。孔雀绿法是 FtsZ GTPase 活性检测的经典方法^[4,9-10], 主要通过检测反应体系中自由磷酸浓度以反映酶的活性。该方法具有一步反应、操作简便、检测灵敏和成本低廉等诸多优点, 不仅可以用于酶活性检测, 还可以用于 Ec-FtsZ GTPase 抑制剂的高通量筛选。文中利用上述方法对 Ec-FtsZ GTPase 活性进行了测定, 证实了纯化的 Ec-FtsZ 具有良好的 GTPase 活性。

将纯化的 Ec-FtsZ 作为抗原免疫大鼠制备多克隆抗体, 以 ELISA 实验、Western blotting 实验和免疫荧光实验进行了抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体效价和抗原特异性鉴定。ELISA 实验表明抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体效价可达 1 : 256 000, 其具有较高的滴度。Western blotting 实验证实了抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体具有良好的抗原特异性, 不仅可以识别纯化的 Ec-FtsZ, 还可以特异性结合大肠杆菌内源 Ec-FtsZ。免疫荧光实验表明 Ec-FtsZ 主要分布于大肠杆菌细胞内膜中心并形成了 Z 环, 其亚细胞定位与文献报道基本一致^[5,13,26], 这也再次证实了抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体具有良好的抗原特异性。

目前, 笔者将制备的抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体成功应用于以 Ec-FtsZ/ZipA (FtsZ-interacting protein A, ZipA) 相互作用为靶标的 ELISA 高通量筛选模型中的 Ec-FtsZ 生化检测。通过应用建立的 ELISA 筛选模型对本室天然产物化合物库进行了高通量筛选, 已初步获得了若干新型苗头化合物。

综上所述, 文中成功进行了 Ec-FtsZ 原核表达和抗 Ec-FtsZ 多克隆抗体的制备与鉴定, 为进一步研究 Ec-FtsZ 生物学功能和生化检测奠定了实验基础。

致谢: 衷心感谢北京师范大学化学学院化学生物学系郑积敏教授、中国医学科学院药物研究所天然药物活性物质与功能国家重点实验室林媛副研究员和军事科学院军事医学研究院十一所基因工程全军重点实验室岳玉环研究员在 Ec-FtsZ 原核表达、活性测定和多抗制备技术方面给予的悉心指导和无私帮助!

REFERENCES

- [1] Zhang W, Yang ZJ, Chen DJ. The research progress of FtsZ inhibitor, a target for bacteria cell-division. *Chin Bull Life Sci*, 2012, 22(1): 94–101 (in Chinese).
张雯, 杨志钧, 陈代杰. 靶向 FtsZ 的细胞分裂抑制剂的研究进展. *生命科学*, 2012, 22(1): 94–101.
- [2] Krupka M, Margolin W. Unite to divide: oligomerization of tubulin and actin homologs regulates initiation of bacterial cell division. *F1000Res*, 2018, 7: 235.
- [3] Sang Y, Tao J, Yao YF. Regulation of the Z ring positioning in bacterial cell division-A review. *Acta Microbiol Sin*, 2013, 53(4): 321–327 (in Chinese).
桑昱, 陶晶, 姚玉峰. 细菌分裂 Z 环定位的调控方式. *微生物学报*, 2013, 53(4): 321–327.
- [4] Lin Y, Zhu NY, Jiang JD, et al. The establishment and application of a high-throughput screening (HTS) assay for inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* FtsZ. *Chin J Antibiot*, 2015, 40(3): 166–170, 212 (in Chinese).
林媛, 朱宁屿, 蒋建东, 等. 以 FtsZ 为靶点的抗结核药物筛选模型的建立及应用. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(3): 166–170, 212.
- [5] Erickson HP, Anderson DE, Osawa M. FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74(4): 504–528.
- [6] Ortiz C, Natale P, Cueto L, et al. The keepers of the ring: regulators of FtsZ assembly. *FEMS Microbiol Rev*, 2016, 40(1): 57–67.
- [7] Yang SY, Zhu J, Wu Y, et al. Purification and crystallization of MinC/FtsZ complex in *Escherichia coli*. *Chemistry*, 2017, 80(1): 89–93 (in Chinese).

- 杨少媛, 朱嘉, 吴彦, 等. 大肠杆菌 MinC/FtsZ 蛋白复合物的纯化和结晶. 化学通报, 2017, 80(1): 89–93.
- [8] Kapoor S, Panda D. Targeting FtsZ for antibacterial therapy: a promising avenue. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(9): 1037–1051.
- [9] Lin Y, Zhu NY, Han YX, et al. Identification of anti-tuberculosis agents that target the cell-division protein FtsZ. J Antibiot (Tokyo), 2014, 67(9): 671–676.
- [10] Lin Y, Zhang HJ, Zhu NY, et al. Identification of TB-E12 as a novel FtsZ inhibitor with anti-tuberculosis activity. Tuberculosis, 2018, 110: 79–85.
- [11] Zhang QS, Yuan RL, Jing SR. Expression and purification of Norovirus capsid protein VP1 and preparation of the polyclonal antibodies. Chin J Microecol, 2017, 29(8): 896–899, 905 (in Chinese).
- 仇秋实, 苑荣亮, 井申荣. 诺如病毒 NV 衣壳蛋白 VP1 表达纯化及多克隆抗体的制备. 中国微生态学杂志, 2017, 29(8): 896–899, 905.
- [12] Chen YY, Niu XY, Lin Y, et al. Prokaryotic expression, purification and preparation of rat polyclonal antibody against *Escherichia coli* ZipA. Chin J Cell Mol Immunol, 2018, 34(10): 942–948 (in Chinese).
- 陈云雨, 牛夏忆, 林媛, 等. 大肠杆菌丝状热敏蛋白 Z 相互作用蛋白 A (Ec-ZipA) 原核表达、纯化与小鼠多克隆抗体的制备. 细胞与分子免疫学杂志, 2018, 34(10): 942–948.
- [13] Ray S, Jindal B, Kunal K, et al. BT-benzo-29 inhibits bacterial cell proliferation by perturbing FtsZ assembly. FEBS J, 2015, 282(20): 4015–4033.
- [14] Artola M, Ruiz-Avila LB, Vergoñós A, et al. Effective GTP-replacing FtsZ inhibitors and antibacterial mechanism of action. ACS Chem Biol, 2015, 10(3): 834–843.
- [15] Xiao J, Goley ED. Redefining the roles of the FtsZ-ring in bacterial cytokinesis. Curr Opin Microbiol, 2016, 34: 90–96.
- [16] Panda D, Bhattacharya D, Gao QH, et al. Identification of agents targeting FtsZ assembly. Future Med Chem, 2016, 8(10): 1111–1132.
- [17] Wu FF, Cao ZG, Wang Q, et al. Prokaryotic expression of Zaire Ebola virus GP and the preparation of polyclonal antibody. Chin J Vet Sci, 2018, 38(3): 496–501 (in Chinese).
- 吴芳芳, 曹增国, 王琪, 等. 扎伊尔型埃博拉病毒糖蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备. 中国兽医学报, 2018, 38(3): 496–501.
- [18] Sun T, Yang GW, Zhang JY, et al. Prokaryotic expression of Hepatitis C Virus (HCV) NS3 protein and preparation of polyclonal antibody. Chin J Biotech, 2015, 31(5): 711–721 (in Chinese).
- 孙涛, 杨光文, 张金阳, 等. 丙型肝炎病毒 NS3 蛋白的原核表达及多克隆抗体制备. 生物工程学报, 2015, 31(5): 711–721.
- [19] Wang H, Yang B, Zhao KS, et al. Preparation and identification of polyclonal antibodies against *Moraxella catarrhalis* UspA1. Chin J Biotech, 2018, 34(1): 102–109 (in Chinese).
- 王辉, 杨波, 赵可胜, 等. 卡他莫拉菌 UspA1 蛋白多克隆抗体的制备及鉴定. 生物工程学报, 2018, 34(1): 102–109.
- [20] Qin YJ, Zhang TH, Ye X. Preparation and detection of anti-influenza A virus polymerase basic protein 1 polyclonal antibody. Chin J Biotech, 2016, 32(1): 105–113 (in Chinese).
- 秦玉洁, 张廷虹, 叶昕. 抗 A 型流感病毒聚合酶碱性蛋白 1 多克隆抗体的制备和鉴定. 生物工程学报, 2016, 32(1): 105–113.
- [21] Hayat SMG, Farahani N, Golichenari B, et al. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): What we need to know. Curr Pharm Des, 2018, 24(6): 718–725.
- [22] Baeshen MN, Al-Hejin AM, Bora RS, et al. Production of biopharmaceuticals in *E. coli*: Current scenario and future perspectives. J Microbiol Biotechnol, 2015, 25(7): 953–962.
- [23] Papanephytous CP, Kontopidis G. Statistical approaches to maximize recombinant protein expression in *Escherichia coli*: A general review. Protein Expr Purif, 2014, 94: 22–32.
- [24] Su P, Gong GL. Research progress on optimizing the expression of exogenous proteins in *Escherichia coli*. Biotechnol Bull, 2017, 33(2): 16–23 (in Chinese).
- 苏鹏, 龚国利. 优化大肠杆菌表达外源蛋白的研究进展. 生物技术通报, 2017, 33(2): 16–23.
- [25] Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discov Today, 2014, 19(5): 590–601.
- [26] Haranahalli K, Tong S, Ojima I. Recent advances in the discovery and development of antibacterial agents targeting the cell-division protein FtsZ. Bioorg Med Chem, 2016, 24(24): 6354–6369.

(本文责编 陈宏宇)