

长型肌球蛋白轻链激酶 4Ig 结构域的表达 及单克隆抗体的制备

吕 宁^{1,2}, 朱春花¹, 张文程², 朱敏生², 陈华群¹

(1 南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210046)

(2 南京大学模式动物研究所, 江苏 南京 210061)

[摘要] 长型肌球蛋白轻链激酶 (long myosin light chain kinase, L-MLCK) 及其分子内结构域的功能还不清楚. 在研究其功能时, 特异性抗体是一基本工具, 但目前国际上还没有制备成功特异性较好的抗体. 为此, 我们首先在大肠杆菌 *E. coli* BL21 中重组表达了鸡 L-MLCK 的 4Ig 蛋白片段 (MLCK4Ig), 蛋白经纯化后作为抗原免疫小鼠. 在小鼠血清中检测到特异性抗体的基础上, 建立了 2 株杂交瘤细胞株, 获得抗鸡 MLCK4Ig 的单克隆抗体. 该抗体可以特异与鸡 L-MLCK 和鸡 MLCK4Ig 反应. 本文并对该抗体的特性及应用进行了讨论. 结果表明, 我们部分解决了 L-MLCK 的抗体缺乏问题, 为研究 L-MLCK 及 MLCK4Ig 片段的功能提供了重要工具.

[关键词] MLCK 4Ig 蛋白表达, 单克隆抗体

[中图分类号] Q 341 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2008)04-0124-05

Expression and Monoclonal Antibody Preparation of 4Ig Fragment of Long Myosin Light Chain Kinase

L Ning^{1,2}, Zhu Chunhua¹, Zhang Wencheng², Zhu Minsheng², Chen Huaqun¹

(1 The Key Laboratory of Molecular and Medical Biotechnology of Jiangsu Province School of Life Sciences
Nanjing Normal University Nanjing 210046 China)

(2 Model Animal Research Center Nanjing University, Nanjing 210061, China)

Abstract The functions of long myosin light chain kinase (MLCK) and the multiple domains within the molecule were poorly understood. To our knowledge, there is no specific antibody against L-MLCK so far, which is essential for the study of L-MLCK. In this report, the 4Ig fragment of chicken L-MLCK (MLCK4Ig) was expressed by using of *E. coli* BL21 system, the purified protein was used as antigen to induce antibody. Specific antibody was detected in the sera of mouse injected with chicken MLCK4Ig. We further established two hybridoma cell lines producing monoclonal antibody, which specifically reacted with chicken MLCK4Ig or chicken L-MLCK. The characteristic and usefulness of the antibody were also discussed. The results showed that our work partially solved the problem of L-MLCK antibody deficiency, which provides an important tool for the functional investigation of L-MLCK and MLCK4Ig fragment.

Key words L-MLCK, MLCK 4Ig protein expression, monoclonal antibody

肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 是由 Ca^{2+} /CaM 激活, 对肌球蛋白 II 的轻链 (regulatory light chain, RLC) 进行磷酸化的一种底物专一性磷酸化酶, 能够将肌球蛋白轻链氨基端的特异位点 Ser¹⁸、Thr¹⁹ 磷酸化^[1]. RLC 的磷酸化可提高肌球蛋白 ATPase 活性, 从而启动肌肉收缩. 研究表明, MLCK 的功能不仅与肌肉收缩有关, 还与细胞运动、损伤修复、细胞凋亡、轴突生长锥伸长、胞质分裂、张力纤维的形成、血小板形态改变、分泌作用、上皮细胞通透性改变、细胞骨架改变等过程有关^[2].

在脊椎动物中, MLCK 主要分两种: 横纹肌 MLCK (skMLCK) 和平滑肌 MLCK (smooth muscle MLCK, smMLCK)^[3]. smMLCK 有两个大小不同的异构体, 相对分子质量为 150 000 的称为短 MLCK (S-MLCK),

收稿日期: 2008-03-12

基金项目: 国家自然科学基金 (30470852)、江苏高校自然科学研究计划 (2006104TSJ0104) 资助项目.

通讯联系人: 陈华群, 副教授, 研究方向: 细胞生物学. E-mail: chenhuqun@njnu.edu.cn

相对分子质量为 210 000 的称为长 MLCK (L-MLCK),二者来自于同一个基因的不同转录本. L-MLCK 蛋白除 N 端多一段约 60 000 的部分外,其余氨基酸序列与 S-MLCK 完全相同. S-MLCK 含有一个催化活性中心,一个 CaM 结合区,三个 DFRxxL 位点 (F-actin 结合位点),一个 PEVK 重复序列和一个 F_n 结合位点.除了含有与 S-MLCK 完全相同的中段和 C-端结构外, L-MLCK 的 N 端还含有两个 DFRxxL 位点、6 个 Ig 样结构,能独立与微丝结合^[4]. S-MLCK 可分布于绝大部分组织, L-MLCK 常与 S-MLCK 共表达,但主要分布于胚胎组织、多种肌肉组织、内皮细胞、肺组织及部分体外培养细胞等^[5].

研究发现, L-MLCK 和 S-MLCK 除了分布有差异,功能也有不同.如 L-MLCK 可以被 Caspase3 酶切成多个片段,酶切后的 MLCK 活性不依赖于 CaM^[6].目前对于 L-MLCK 分子及 L-MLCK 分子中各部分功能的研究受限于没有特异的抗体.现在研究中使用的 MLCK 抗体主要有 K36 和 D119. K36 是以 S-MLCK 为抗原制备的多克隆抗体,与 L-MLCK 和 S-MLCK 均可发生反应,而为了研究蛋白质在组织细胞中的功能,通常还需要用免疫组织化学的方法进行特定蛋白的分布研究, K36 由于其不能区别 L-MLCK 和 S-MLCK,无法用于这类研究. D119 是以 L-MLCK 的 N-端 1-170 氨基酸残基为抗原制备的多克隆抗体,可以与细胞中的 L-MLCK 和其它蛋白质发生交叉反应,特异性较差^[5,7].阐明 L-MLCK 及其各特有结构域的功能,是 MLCK 研究的重要方面.本文克隆、表达并纯化了鸡 MLCK 4Ig 蛋白片段,并以此蛋白为抗原免疫小鼠,得到了特异性识别鸡 L-MLCK 的抗体,进一步建立杂交瘤细胞株,成功制备了高滴度抗 MLCK 4Ig 抗体,该抗体可以特异性识别 L-MLCK 和 MLCK 4Ig 为进一步的 L-MLCK 研究提供了重要工具.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

宿主菌 BL21(DE3)和表达载体 pET28a(+)为美国 Novagen 公司产品,宿主菌 XL1-blue 为本实验室保存菌种, pMD18T 为 Takara 公司产品.

1.1.2 试剂

限制性内切酶 *Bam*H I、*Nde* I 以及 T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品,割胶回收试剂盒为 Invitrogen 公司产品, His-tag 亲和层析 Ni-NTA 系统为美国 Novagen 公司产品, HAT 和 PEG4000 为 Sigma 公司产品, BCA 试剂盒为 Pierce 公司产品, ECL 试剂盒为 Perkin Elmer 公司产品,引物由上海 Invitrogen 公司合成.

1.1.3 动物

8-12 周龄 Balb/c 雌鼠, SPF 级,购自南京大学模式动物研究所.

1.1.4 细胞

SP2/0 细胞以含 10% 胎牛血清 (GIBCO 公司)的 RPMI1640 培养基培养, HeLa 细胞以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基培养.

1.2 方法

1.2.1 MLCK 4Ig 片段表达载体的构建

根据鸡 L-MLCK 重组质粒 pEGFP-MLCK210^[4]的序列设计 MLCK 4Ig 片段扩增引物.正向引物 P1: 5'-CATATGGGAATTCCTCCCCAGTTTGAG-3', 5'端引入 *Nde* I 酶切位点;反向引物 P2: 5'-GGATCCT-TACAGAGACCTGGCAGCTG-3', 5'端引入 *Bam*H I 酶切位点. PCR 产物连接至 pMD18T,转化 XL1-Blue 感受态细胞,筛选阳性菌落提取质粒, *Bam*H I 和 *Nde* I 双酶切和测序证实,所获目的片段为正确的 MLCK 4Ig 基因编码序列.

Nde I 和 *Bam*H I 双酶切以上阳性质粒,与相同酶切的 pET28a 质粒连接,转化受体菌 XL1-Blue *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切鉴定得到 MLCK 4Ig 片段表达质粒 pET28a-MLCK 4Ig 的阳性菌.

1.2.2 MLCK 4Ig 片段的表达及纯化

pET28a-MLCK 4Ig 质粒转化 BL21 菌, IPTG (终浓度 0.2 mmol/L) 20℃ 诱导表达 24 h,离心 (6 000 r/min, 4℃, 8 min),收集细菌沉淀,加入 20 mL 含 0.5 mg/mL 溶菌酶的结合缓冲液 (结合缓冲液: 0.5 mol/L

NaCl 20 mmol/L Tris• HCl 5 mmol/L imidazole pH 7.9), 超声破碎, 离心, 上清液以 Ni-NTA 柱层析纯化, 纯化蛋白经 SDS-PAGE 电泳鉴定.

1.2.3 MLCK 4Ig 抗原的制备及小鼠的免疫

以上 Ni-NTA 柱层析纯化后的 MLCK 4Ig 片段蛋白透析除盐 (透析液: 20 mmol/L Tris• HCl pH 8.3, 1 mmol/L EDTA), BCA 测定蛋白浓度. 样品按照文献处理 (65℃ 孵育 15 min), 进行 SDS-PAGE 电泳^[8,9], 电泳结束后凝胶用水清洗 10 min, 以 0.25 mol/L KC1 染色, 直到 MLCK 4Ig 片段蛋白条带清晰可见. 切下蛋白条带, 用水清洗 2 次, 每次 3 min, 加少量生理盐水将胶研磨成胶体状, 腋下注射免疫 5 只 Balb/c 小鼠, 每只注射样品中含 50 μg MLCK 4Ig 片段蛋白. 2 周之后, 加强免疫同样量的蛋白. 1 周后, 鼠尾采血测定抗体的效价. 2~3 周后, 选择效价高的小鼠再次加强免疫, 3 d 后进行细胞融合.

1.2.4 杂交瘤细胞株的建立及抗 MLCK 4Ig 单克隆抗体的制备

取以上小鼠脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞融合, 融合剂用 PEG4000 在 1~2 周后, 间接 ELISA 法筛选分泌特异性 MLCK 4Ig 抗体的阳性克隆. 细胞培养上清阳性的克隆, 以 HAT 选择培养基、连续 3 次有限稀释, 并继续用间接 ELISA 法筛选得到阳性杂交瘤细胞.

选择分泌抗体滴度高的阳性杂交瘤细胞扩大培养, 收集细胞调整浓度为 10⁷ 个/mL 将 0.5 mL 细胞悬液注射到用无菌石蜡油处理 1 周的 Balb/c 小鼠腹腔, 7~10 d 后, 收集腹水. 用 ELISA 法和 Western Blotting 鉴定单克隆抗体并测定其效价.

1.2.5 ELISA 测定

用 100 ng MLCK 4Ig 抗原包被 96 孔板, 4℃ 过夜. 抗体按不同稀释度稀释后加入, 37℃ 孵育 2 h PBS 洗 3 次, 二抗孵育 0.5 h PBS 洗后加入底物和终止液, 测 490 nm 吸光值.

1.2.6 病毒感染 HeLa 细胞及蛋白的提取

为进一步鉴定我们制备的单克隆抗体, 用本实验室制备的表达鸡 MLCK 的腺病毒 (Adv-MLCK) 和表达鸡 MLCK 4Ig 的腺病毒 (Adv-4Ig) 分别感染 HeLa 细胞, 48 h 后, 收集细胞, 重悬于细胞裂解液 (0.5% NP-40 50 mmol/L Tris 0.1 mmol/L EDTA, 150 mmol/L NaCl 100 μmol/L Na₃VO₄, 1 mmol/L 二硫苏糖醇, 0.4 mmol/L 苯甲磺酰氟, 3 μg/mL 胰蛋白酶抑制剂, 2 μg/mL pepstatin, 1 μg/mL leupeptin), 置冰上裂解细胞 30 min 4℃, 12 000 r/min, 离心 10 min 上清用于 Western Blot 分析.

1.2.7 Western Blot 分析

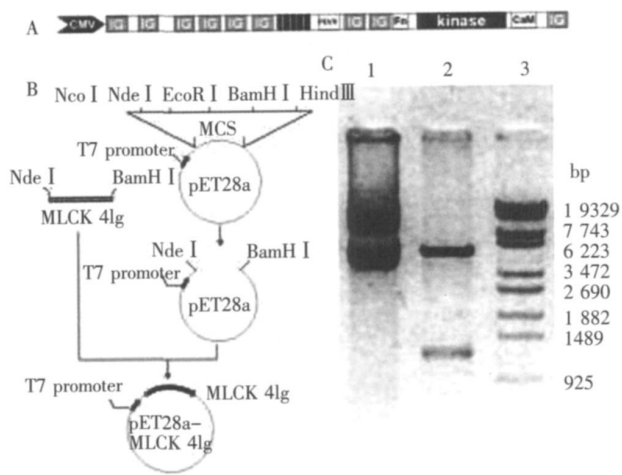
蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜, 用以上制备的抗 MLCK 4Ig 单克隆抗体进行 Western Blot 分析, 以 ECL 试剂检测, 并曝光, 暗室显影.

2 结果

2.1 MLCK 4Ig 片段蛋白的表达与纯化

以 P1 和 P2 为引物, pEGFP-MLCK210 为模版, PCR 扩增得到 1 197 bp 产物, 经测序证实为正确的鸡 MLCK 4Ig 编码序列, 重组 pET28a-MLCK 4Ig 质粒并经 BamH I 和 Nde I 双酶切鉴定证实 (图 1).

应用 SDS-PAGE, 检测到 MLCK 4Ig 片段蛋白的表达. pET28a-MLCK 4Ig 质粒重组的 BL21 (BL21pET4 Ig) 经 IPTG 诱导后, 在相对分子质量略大于 45 000 的位置, 与 BL21 相比多 1 条带, 与 MLCK 4Ig 片段的相对分子质量预测值相同. MLCK 4Ig 片段蛋白主要在细菌裂解上清中, 表达量不高. 细菌裂解上清经 His-tag 亲和纯化后, 纯度为电泳 1 条可见蛋白条带 (图 2).



pET28a-MLCK 4Ig 表达质粒的建立. C: 酶切鉴定 pET28a-MLCK 4Ig 质粒. 1: pET28a-MLCK 4Ig, 2: BamH I 和 Nde I 酶切的片段, 3: Marker

图 1 pET28a MLCK 4Ig 质粒的构建及鉴定
Fig.1 Construction and identification of pET28a MLCK 4Ig expression plasmid

2.2 抗 MLCK 4Ig单克隆抗体杂交瘤细胞株的建

以上纯化得到的 MLCK 4Ig片段蛋白免疫小鼠, 在血清中检测到特异性抗体, 选择阳性强效价高的小鼠加强免疫 1 次, 3 d 后进行细胞融合. 对阳性克隆经 3 次连续有限稀释, 得到分泌抗 MLCK 4Ig单克隆抗体的杂交瘤细胞株, 其中 2 株分泌高效价抗体的杂交瘤分别命名为 B3和 E9, 细胞培养上清间接 ELISA 法测定抗体滴度均 > 10⁴. 以 B3 细胞注射小鼠腹腔, 收集腹水, 效价 > 10⁶. 分别以 BL21 菌和 MLCK 4Ig 重组 BL21 菌的总蛋白及 MLCK 4Ig 纯化蛋白进行 SDS- PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜上, 以 MLCK 4Ig 单克隆抗体作为一抗检测. 结果可见, 此抗体与 BL21 的蛋白没有非特异反应, 对 MLCK 4Ig 具有高度特异性 (图 3).

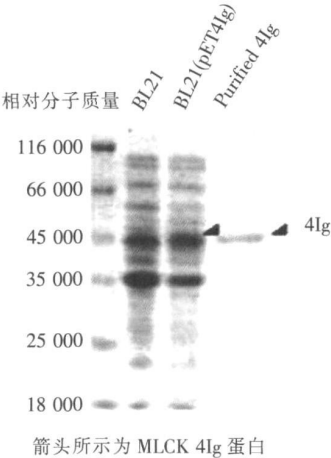


图 2 鸡 MLCK 4Ig 重组蛋白的表达、纯化

Fig.2 Expression and purification of chicken MLCK 4Ig recombinant protein. Arrows show the MLCK 4Ig protein

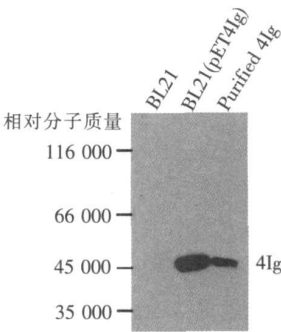


图 3 Western Blotting 检测单克隆抗体

Fig.3 Monoclonal antibody detected by Western blotting analysis

2.3 抗 MLCK 4Ig单克隆抗体的应用

为了进一步鉴定我们所制备单克隆抗体的有效性和特异性, 我们分别以 L- MLCK 和 MLCK 4Ig 腺病毒感染 HeLa 细胞, Western blotting 检测了 HeLa 细胞中表达的 MLCK 4Ig 蛋白片段和 L- MLCK 蛋白. 结果显示, HeLa 细胞对照 (CTL) 中没有条带 (图 4A), MLCK 4Ig 腺病毒感染细胞中只有单一条带. 同样, 在 L- MLCK 腺病毒感染细胞中也只有单一条带, 对于 HeLa 细胞中存在的人源性的 L- MLCK, MLCK 4Ig 单克隆抗体不能识别 (图 4B), 而 K36 抗体可以识别 HeLa 细胞中 MLCK 的表达 (图 4C). 结果表明, 我们得到的抗 MLCK 4Ig 单克隆抗体能够用于真核细胞表达的鸡 L- MLCK 和 MLCK 4Ig 特异性检测.

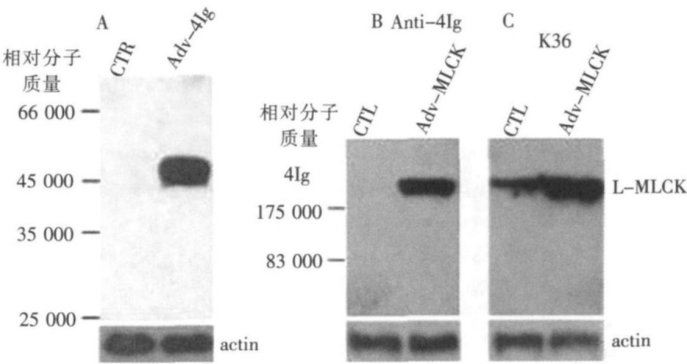


图 4. MLCK 4Ig 抗体特异性识别鸡 L-MLCK 和 MLCK 4Ig 蛋白

Fig.4 Anti-MLCK 4Ig antibody specifically recognized chicken L-MLCK and MLCK 4Ig

3 讨论

MLCK 4Ig 结构域在鸡、鼠、人中有很高的保守性, 一级结构同源性高达 70% 以上, 而且都是以 Ig 样结构存在, 空间结构非常相似, 所以制备高特异性的单克隆抗体难度较大. 我们曾尝试以小鼠 MLCK 4Ig 为抗原制备兔源或鼠源多克隆抗体, 但血清中未检测到抗体的产生 (未发表资料). 据我们所知, 其它实验室也未得到抗小鼠 L- MLCK 抗体 (如 Stull J 实验室, 私人交流), 原因尚不清楚. 本研究以鸡 L- MLCK 4Ig 为抗原, 免疫 B61/c 小鼠, 得到了特异性识别鸡 L- MLCK 和 MLCK 4Ig 的抗体. 为了得到性质稳定的抗

体,我们建立了分泌抗 MLCK 4Ig 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 2 株,并获得效价为 10^6 的小鼠腹水,纯化的单克隆抗体滴度高于 10^4 . 本文结果还显示,我们制备的单克隆抗体可用于 Western Blot 法检测鸡 L-MLCK 和 MLCK 4Ig 蛋白质分子,还不清楚此抗体是否能用于免疫组织化学的研究.

MLCK 4Ig 抗体的成功制备为后续的研究工作提供了有力的工具. 如: 为了研究平滑肌细胞中 MLCK 的功能,我们建立了平滑肌细胞特异性敲除小鼠. 在 MLCK 的拯救实验中,以重组鸡 MLCK 腺病毒感染小鼠,成功地应用本文制备的单克隆抗体进行了平滑肌细胞 MLCK 表达的检测^[10].

生物信息学分析发现,MLCK 4Ig 结构中含有发生蛋白质聚集的保守氨基酸残基序列,我们的研究也证实,真核细胞表达的 MLCK 4Ig 片段发生聚集^[11]. 聚集的蛋白质作为抗原,可能会把其抗原决定簇包埋在聚集体内部,减弱其抗原性,导致抗体制备的失败. 本研究采用诱导表达可溶性的鸡 MLCK 4Ig 为抗原,成功地制备了高特异性、高效价的抗体. 包涵体形式表达的蛋白是变性的蛋白,虽然可以经过复性过程的处理恢复生物学活性,但是,经过体外复性的蛋白可能仍与体内的活性蛋白的空间结构有所不同. 表达的可溶性蛋白,经纯化后,再进行如方法中介绍的 SDS-PAGE,较好地保持了蛋白的生物学活性和构象,有利于抗体的制备.

[参考文献]

- [1] Kamm K E, Stull J T. The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985, 25: 593-620.
- [2] Kamm K E, Stull J T. Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276 (7): 4527-4530.
- [3] Stull J T, Lin P J, Kueger J K, et al. Myosin light chain kinase functional domains and structural motifs[J]. *Acta Physiol Scand* 1998, 164(4): 471-482.
- [4] Yang C X, Chen H Q, Chen C, et al. Microfilament-binding properties of N-terminal extension of the isoform of smooth muscle long myosin light chain kinase[J]. *Cell Res*, 2006, 16 (4): 367-376.
- [5] Blue E K, Goeckeler Z M, Jin Y, et al. 220- and 130-kDa MLCKs have distinct tissue distributions and intracellular localization patterns[J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002, 282: C451-C460.
- [6] Petrache I, Binkov K, Zaiman A L, et al. Caspase-dependent cleavage of myosin light chain kinase (MLCK) is involved in TNF- α -mediated bovine pulmonary endothelial cell apoptosis[J]. *FASEB J* 2003, 17(3): 407-416.
- [7] Verin A D, Lazar V, Torry R J, et al. Expression of a novel high molecular weight myosin light chain kinase in endothelium[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998, 19: 758-766.
- [8] Hager D A, Burgess R R. Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels: removal of sodium dodecyl sulfate and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes[J]. *Anal Biochem*, 1980, 109(1): 76-86.
- [9] Hunkapiller M W, Lujan E, Ostrander E, et al. Isolation of microgram quantities of proteins from polyacrylamide gels for amino acid sequence analysis[J]. *Methods Enzymol* 1983, 91: 227-236.
- [10] He W Q, Peng Y J, Zhang W C, et al. Myosin light chain kinase is central to smooth muscle contraction and required for gastrointestinal motility[J]. *Gastroenterology* 2008, 135(2): 610-620.
- [11] Zhang W C, Peng Y J, He W Q, et al. Identification and functional characterization of an aggregation domain in long myosin light chain kinase[J]. *FEBS J* 2008, 275(10): 2489-2500.

[责任编辑: 孙德泉]