

ORP4L 多克隆抗体的制备及其在蛋白质组学研究中的应用 *

韦坤德 闫道广[△]

(暨南大学生命科学技术学院 广东 广州 510632)

摘要 目的 原核表达并纯化人氧化固醇结合蛋白相关蛋白 4(ORP4L)肽段,制备兔抗人 ORP4L 多克隆抗体,并利用其进行蛋白质组学研究。方法 应用 PCR 技术扩增人 ORP4L 382-485 氨基酸(ORP4Lm)的基因序列并插入到 PGEX-4T-1 载体中,在大肠杆菌 RosettaTM(DE3)中表达融合蛋白 GST-ORP4Lm。利用所表达的融合蛋白中含有的 GST 标签进行亲和纯化。用所获得的纯化蛋白免疫新西兰大白兔,获得兔抗人 ORP4L 多克隆抗体。用 Western blotting 检测抗体免疫特异性。将亲和纯化后的抗体偶联到 CNBr-activated sepharose beads 上,利用免疫沉淀的方法,通过质谱仪分析鉴定可能与 ORP4L 存在相互作用的蛋白质。通过 Western blotting 进一步确证特异性的相互作用蛋白。结果 在大肠杆菌中表达并纯化了 GST-ORP4Lm 重组蛋白,用其免疫新西兰大白兔,成功制备了相应兔源多克隆抗体,Western blotting 证实该抗体可以特异识别内源性 & 外源性的 ORP4L 蛋白。质谱分析和 Western blotting 的结果表明所制备的多克隆抗体可以用于蛋白质组学研究。结论 利用重组的 GST-ORP4Lm 融合蛋白成功制备了有良好特异性的 ORP4L 多克隆抗体,并可将其用于 ORP4L 的蛋白质组学研究。

关键词 ORP4L 蛋白表达纯化 多克隆抗体 蛋白质组学

中图分类号 Q548.1,Q78 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)21-4006-05

Preparation and Application in Proteomics Approach of Polyclonal Antibody against Human ORP4L*

WEI Kun-de, YAN Dao-guang[△]

(College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou, 510632, China)

ABSTRACT Objective: To prepare polyclonal ORP4L antibody and utilize it for ORP4L proteomics resolution. **Methods:** The cDNA of ORP4L 382-485 amino acids residues (ORP4Lm) amplified by the polymerase chain reaction (PCR) was inserted into the PGEX-4T-1 vector. The plasmid was transformed into RosettaTM (DE3) and the recombinant fusion protein GST-ORP4Lm was expressed and purified. New Zealand rabbits were immunized by using the purified GST-ORP4Lm protein, polyclonal antibody against ORP4L was obtained and further confirmed by Western blotting. The antibody was then conjugated to sepharose beads and the cell lysis of stable expression ORP4L was flowed through the beads. The potential interacting proteins with ORP4L were collected and analyzed by mass spectrometry. The result of the mass spectrometry was assessed by Western blotting. **Results:** The rabbit anti-ORP4L antibody was prepared. The antibody was able to detect both endogenous and exogenous ORP4L. ORP4L proteomics was carried out successfully. **Conclusion:** The rabbit anti-ORP4L polyclonal antibody with high specificity has been prepared, and it could be applied for ORP4L proteomics resolution.

Key words: ORP4L; Protein expression and purification; Polyclonal antibody; Proteomics

Chinese Library Classification (CLC): Q548.1,Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)21-4006-05

前言

氧化固醇是一类二十七碳的胆固醇衍生物,可以通过酶氧化胆固醇形成,也可以通过非酶自氧化过程形成。氧化固醇是合成胆汁酸和类固醇激素的中间体,但也可以充当信号脂类,影响细胞生物学的各个方面包括脂质代谢、信号传导、免疫功能、细胞毒性等,而这些功能由特定的氧化固醇感受蛋白介导,这些蛋白包括肝脏 X 受体(LXR)、固醇调节元件结合蛋白(Insig)、氧化固醇结合蛋白(OSBP)和氧化固醇结合蛋白相关蛋白(OSBP-Related protein family,ORPS)等^[1-3]。

氧化固醇结合蛋白是一类成员还在更新的新的超家族,它的第一个蛋白在 1984 年被发现^[2],这个结合氧化固醇的蛋白被称为氧化固醇结合蛋白(oxysterol binding protein, OSBP),一组显示与 OSBP 具有同源性固醇结合域的蛋白已经陆续被发现,该组蛋白被定义为 OSBP-related protein family,简称 ORPs。在人类,这个家族包括 12 个成员^[4]。这些蛋白在总体上都是胞液蛋白(cytosolic proteins),但部分带着原生质膜结合域^[3],目前发现 ORPs 可能与细胞内小泡运输、细胞分化、增殖、极化、粘附、迁移和生存/死亡调控之间有着功能上的联系^[5]。

ORP4 是 ORPs 家族重要的一员,在哺乳动物中 ORP4 有

* 基金项目 科技部重大基础研究 "973"(2012CB517502) 国家自然科学基金(30971104)

作者简介:韦坤德(1985-),男,硕士研究生,研究方向 脂质生物学,电话 020-85223087

[△]通讯作者 闫道广 E-mail: tydg@jnu.edu.cn

(收稿日期 2012-03-12 接受日期 2012-04-20)

两种存在形式:长链和短链。这是由于剪切方式的不同而形成,基因剪切后只含有 ORD 结构则被称为"短 ORP4",如果带有 PH 结构域称为"长 ORP4",即 ORP4S 和 ORP4L 两种形式。

RP4S 定位在 filament vimentin 中间,过表达 ORP4S 能导致 filaments 的坍塌和聚集。Vimentin 的功能并不完全清楚,但它似乎是为细胞内的蛋白提供网络支架,来调节细胞内的信号传递、代谢以及泡囊的运输^[6]。ORP4L 与 OSBP 同源性最接近,像 OSBP 一样,它能结合 25-羟基胆固醇。ORP4L 的表达被认为是肿瘤转移和较差愈后的潜在标志,并且该蛋白只表达于白血病患者外周血白细胞中^[7-10],最近的研究发现 OSBP 与 ORP4L 存在相互作用^[5],并且都是 OSW-1 在细胞内蛋白受体^[11]。

但详尽的 ORP4 的功能及其发挥功能的机制还有待进一步探索。本研究根据蛋白的特异性和亲水性选用了 ORP4L 382-485 氨基酸片段作为抗原,制备了 ORP4L 多克隆抗体,并将之应用于 ORP4L 的蛋白质组学研究,以期揭示 ORP4L 的功能及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 DH5 α 、RosettaTM (DE3)、pcDNA4HismaxC-ORP4 质粒、各种用于构建表达载体的质粒和哺乳动物细胞系 Hela 细胞株为本实验室保存;限制性内切酶、连接酶购自大连 Takara 公司;PCR 清洁试剂盒、胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;GST-bind resin 购自 Novagen 公司;Protein G sepharose 4 fast flow 购自 Invitrogen 公司;CNBr-activated sepharose beads 购自 GE Health;一抗 Anti ORP4 抗体购自 Sigma 公司;二抗 Goat anti rabbit-HRP 抗体和 Goat anti mouse-HRP 抗体购自 Bio-rad 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;DMEM 购自 Gibco 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 和抗生素 zeocin 购自 Invitrogen 公司;引物由 Invitrogen 公司合成;弗氏完全佐剂(CFA)和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司;新西兰大白兔购自广东省实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 质粒构建 pGEX-4T-1-ORP4Lm(ORP4Lm, ORP4L 382-485 氨基酸片段):上游引物 5'-att gaattc AGTCGGAATG-GCAGCG-3'(下划线处为 EcoRI 酶切位点)下游引物:5'-att gtc-gac CACGGAAGTGTCCCGGT-3'(下划线处为 SalI 酶切位点)通过 PCR 扩增得到 ORP4Lm 序列,PCR 产物经 PCR 产物试剂盒清洁及双酶切处理后,回收 ORP4Lm 片段与 EcoRI/SalI 双酶切处理过的 pGEX-4T-1 载体进行连接并转化 DH5 α ,挑选单克隆进行 PCR、双酶切鉴定后送公司测序。

pcDNA4HismaxC-ORP4L:上游引物 5'-atttctagAAT-GGGGAAAGCGGCGGCT-3'(下划线处为 XbaI 酶切位点)下游引物 5'- atttctag AGTGGCGCTCAGAAGATGTTGGGGCA-CATATGCCA-3'(下划线处为 XbaI 酶切位点)通过 PCR 扩增得到 ORP4L 序列,PCR 产物经 PCR 产物试剂盒清洁及单酶切处理后,克隆到 pcDNA4HismaxC 载体上,转化至 DH5 α ,挑选单克隆进行 PCR、双酶切鉴定后送公司测序。

1.2.2 ORP4Lm-GST 融合蛋白的表达和纯化 测序正确的 pGEX-4T-1-ORP4Lm 转化大肠杆菌 RosettaTM(DE3),37℃培

养至 O.D.600 达到 0.5~1.0,加入 IPTG 至终浓度 0.1 mM,20℃低温诱导 16~18 h,5000 rpm 离心 5 min 收集菌体进行超声破碎,10000 rpm 低温离心 10 min 留上清。菌体上清转至已经平衡好的 1 mL GST-bind resin,4℃摇动孵育过夜。次日 500g 离心 5 min,去上清,加入洗脱液进行蛋白洗脱(洗脱液:10 mM Reduced glutathione,50 mM Tris-Cl, pH 8.0),将洗脱得到的样品置于 PBS 中透析除盐。分别取适量诱导后的菌体、裂解后的上清和洗脱后的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.3 抗血清的制备 取 2~3 kg 新西兰大白兔 2 只,将纯化好的 GST-ORO4Lm 融合蛋白与弗氏完全佐剂(CFA)等体积混合,经乳化后背部皮下多点注射,1 mg/只。1 周后用弗氏不完全佐剂等体积乳化抗原后加强免疫,剂量减半。第 28 天进行第三次免疫,5~7 天后耳部取血,离心取上清,ELISA 方法检测检测免疫效果。效价达到要求的随即可进行颈动脉取血,分离血清,Western blotting 分析抗血清的特异性。

1.2.4 抗血清的亲纯化 取抗血清 2 mL,13000 rpm 离心 10 min,取上清,加 PBS 稀释至 10 mL,转移至已用 PBS 平衡的偶联有 GST 蛋白的 CNBr-activated sepharose 4B 中进行预吸附;冰上轻摇 4 h,1700 rpm 离心 3 min,上清转移至偶联有 ORP4Lm 蛋白的 CNBr-activated sepharose 4B 中,冰上轻摇过夜。次日,离心去上清,用 10 mL PBS+0.5 M NaCl 洗树脂三次。吸干上清,用 5 mL 0.2 M Gly, pH 2.8 进行洗脱,洗脱液立即加入 1 M Tris-Cl, pH 8.5 调节 pH 至 7.0,转移至透析袋中,用 PBS 4℃透析过夜。次日,将透析后的 5 mL 抗体超滤至 100 μ L 左右,测其蛋白浓度,加入 50% glycerol 保存于 -20℃。

1.2.5 多克隆抗体特异性的鉴定 细胞瞬时转染:质粒 pcDNA4HismaxC-ORP4L 用 Lipofectamine 2000 转染 Hela 细胞。转染 24 小时后用细胞裂解液(50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.5 mM MgCl₂, 0.5% TritonX-100, pH 8.0,使用前添加蛋白酶抑制剂)冰上裂解 30 min,10000 Xg 离心 15 min 收集上清。取 30 μ L 上清,加入 10 μ L 4 $\times$ 蛋白电泳上样缓冲液,98℃变性 5 min,将获得的样品与未转入的 Hela 细胞裂解液进行 10% SDS-PAGE 蛋白电泳;分别用纯化后的 ORP4L 多克隆抗体和购自 Sigma 的 ORP4L 抗体检测 ORP4L 的过表达和内源性表达。

免疫沉淀(IP) 细胞裂解 Jurkat 细胞冰上 PBS 洗两次,加入 1 mL 细胞裂解液冰上裂解 30 min,10000 g 离心 15 min 收集上清。留样 60 μ L,加入 20 μ L 4 $\times$ SDS 蛋白电泳上样缓冲液,98℃变性 5 min,4℃保存。预吸附:上清加入 30 μ L Protein G sepharose 4 fast flow 预吸附 1 h,500 Xg 离心 5 min 收集上清。

抗体结合:上清均分为三部分,分别加入 1 μ g 纯化后的 ORP4L 多克隆抗体、ORP4L 抗体(购自 Sigma)和 control rabbit IgG,4℃摇动孵育过夜。树脂结合:分别加入 30 μ L 树脂,4℃摇动孵育 3 h。低速离心得上清,留样 60 μ L,加入 20 μ L 4 $\times$ 蛋白电泳上样缓冲液,98℃变性 5 min,4℃保存。用细胞裂解液洗涤树脂 5 次。加入 30 μ L 2 $\times$ SDS loading buffer,98℃变性 5 min,进行 SDS-PAGE。用 ORP4L 抗体(购自 Sigma)进行 Western blotting 检测免疫沉淀(IP)的效率。

1.2.6 抗体偶联柱的制备 0.1 g sepharose beads 于 1 mM HCl 中

膨胀约 15min, 1mM HCl 洗两次, 用 5mL 的 coupling buffer (0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, pH9.0) 洗一次。用剪了头的枪头各取 200μL 于新的 1.5mL EP 管中, 分别加入 0.8mg 的 ORP4L 多克隆抗体和对照 IgG, 室温下轻柔摇动管子约 2h。2000rpm 离心 3min, 去上清, 用 coupling buffer 洗三次, 然后加入 block buffer (0.1M NaHCO₃, 0.5M NaCl, 1M Tris-Base, pH9.0) 室温孵育 2h。用 low pH buffer (0.1M CH₃COOH, 0.5M NaCl) 和 coupling buffer 各洗两次, 交替洗。加入已过滤的 PBS-Na₃ 4℃ 储存。

1.2.7 稳定细胞系的构建 质粒 pcDNA4HismaxC-ORP4L 和 pcDNAHismaxC 用 Lipofectamine 2000 分别转染 HeLa 细胞, 4~6h 后更换培养基。36h 后加入 200 μg/mL zeocin 进行筛选, 两周左右进行单克隆挑选, 待单克隆细胞长满 6 孔板后, 转移至 60mm 培养皿中培养, 并取部分细胞进行 Western blotting, 检测其 ORP4L 的表达。

1.2.8 免疫共沉淀分析 ORP4L 相互作用蛋白质组 细胞裂解: 稳定过表达 ORP4L 的 HeLa 细胞用预冷 PBS 洗涤两次, 用细胞裂解液 (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1.0% Triton X-100, pH 8.0, 使用前添加蛋白酶抑制剂) 裂解, 冰上摇动 30 min, 12000 rpm 离心 15min, 取上清。

树脂孵育: 菌体裂解上清均分为两部分分别移至偶联了 ORP4L 抗体和对照抗体的 sepharose beads 中, 4℃ 摇动孵育过夜。次日离心, 去上清, 用细胞裂解液洗涤 3 次, 用超纯水洗一次, 吸干残余液体后用 0.1% 甲酸进行洗脱, 洗脱样品进行冻干浓缩。加入 30 μL 1× Sample Buffer, 98℃ 变性 5 min。取 5μL 洗脱样品和细胞裂解液上清, 结合后上清一起进行 Western blotting, 检测免疫沉淀的效率。取 20μL 洗脱样品进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色。将 PAGE 胶上的蛋白样品进行切胶酶解后, 经质谱仪 (LTQ-Orbitrap XL) 进行分析。取剩余的洗脱样品, 用 OSBP 抗体进行 Western blotting, 鉴定质谱结果。

2 结果

2.1 ORP4L 重组蛋白的表达与纯化

测序正确的 pGEX-4T-1-ORP4Lm 转化大肠杆菌 Rosetta™ (DE3), IPTG 终浓度 0.1 mM, 20℃ 低温诱导 16~18 h, 诱导产物进 SDS-PAGE 电泳, 结果显示: 与对照相比, 在相对分子质量大约为 40KD 处可见一明显蛋白条带, 与 GST-ORP4m 融合蛋白预期分子量 39KD (GST 蛋白 27KD, ORP4m 片段共 104 个氨基酸, 约 12KD) 大小相近, 且超声破碎后上清中含有较多重组蛋白, 用 GST-bind resin 亲和纯化后, 纯度可达 90% (图 1)。

2.2 多克隆抗体的特异性分析

抗血清的特异性分析: 用 HeLa 细胞裂解液和 Jurkat 细胞裂解液做为抗原, 用制备的抗血清以 1:100 稀释进行 Western blotting 检测, 结果显示在分子量 100KD 左右均检测到特异性的条带, 与 ORP4L 的分子量相近, 从而表明所制备的抗血清可能识别 ORP4L 蛋白 (图 2A)。

但抗血清的背景较高, 用于 Western blotting 效果不理想, 所以我们用纯化好的 GST-ORP4Lm 重组蛋白作为抗原, 对抗血清进行亲和纯化。为了进一步验证所制备的多克隆抗体的特异性, 我们用纯化后的 ORP4L 多克隆抗体和 Anti-ORP4L 抗体

(购自 Sigma) 分别进行 Western blotting, 检测瞬时转染了 pcDNA4HismaxC-ORP4L 的 HeLa 细胞和未转染的 HeLa 细胞中的 ORP4L 蛋白, 结果显示所制备的 ORP4L 多克隆抗体和 ORP4L 抗体 (购自 Sigma) 一样, 在 100KD 左右均检测到特异性的条带, 与 ORP4L 的分子量相近, 从而表明 ORP4L 多克隆抗体不仅可以检测过表达的 ORP4L 蛋白, 还可以检测内源性的 ORP4L 蛋白 (图 2)。

为了进一步的检测 ORP4L 多克隆抗体的特异性和其免疫沉淀的效率, 我们进行免疫沉淀 (IP) 实验。在 Jurkat 细胞中, 以 ORP4L 多克隆抗体、ORP4L 抗体 (购自 Sigma) 和对照的兔多克隆抗体进行免疫沉淀, Western blotting 结果显示用 ORP4L 多克隆抗体免疫沉淀后的样品中检测到分子量约为 100KD 的条带, 与 ORP4L 的分子量相近, 且与用 ORP4L 抗体 (购自 Sigma) 免疫沉淀后的样品中检测到的条带位置一致, 从而表明与 ORP4L 抗体 (购自 Sigma) 一样, ORP4L 多克隆抗体也能将内源性的 ORP4L 免疫沉淀 (图 3)。

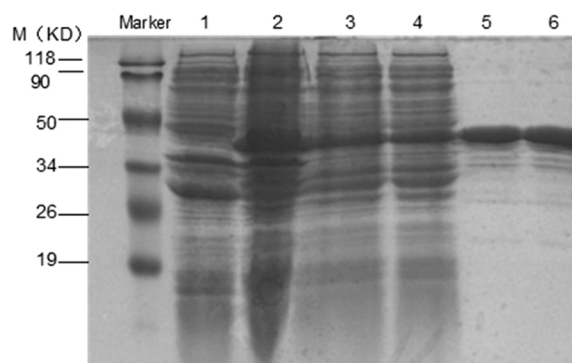


图 1 GST-ORP4Lm 融合蛋白的原核表达及纯化

Marker: 蛋白 Marker; 1: IPTG 诱导后的 pGEX-4T-1/Rosetta™(DE3); 2: IPTG 诱导后的 pGEX-4T-1-ORP4Lm/Rosetta™(DE3); 3-4: 诱导后的 pGEX-4T-1-ORP4Lm/Rosetta™(DE3) 裂解液上清; 4-5: 经过 GST-bind resin 纯化后的 GST-ORP4Lm 融合蛋白

Fig. 1 The expression and purity of the recombinant ORP4Lm protein
Marker: protein Marker; 1: pGEX-4T-1/Rosetta™(DE3) induced with IPTG; 2: pGEX-4T-1-ORP4Lm/Rosetta™(DE3) induced with IPTG; 3-4: supernatant of lysate after IPTG-induced; 5-6: GST-ORP4Lm protein purified by GST-bind resin

2.3 利用蛋白质组学分析 ORP4L 相互作用蛋白质

随着生命科学进入后基因组时代, 蛋白质组学已经成为研究热点之一。实验表明, 我们所制备的多克隆抗体可以将 ORP4L 免疫沉淀, 因此我们通过蛋白质组学的方法, 利用所制备的 ORP4L 多克隆抗体来筛选 ORP4L 相互作用蛋白。首先, 我们构建了 HeLa-ORP4L 过表达的稳定细胞系, 通过 Western blotting 检测其 ORP4L 的表达, 结果显示与对照相比 ORP4L-HeLa 细胞系中的 ORP4L 表达量明显上升, 从而表明已成功构建稳定过表达 ORP4L 的 HeLa 细胞系 (图 4)。

为了筛选 ORP4L 相互作用的蛋白质, 我们将已纯化的 ORP4L 多克隆抗体偶联至 CNBr activated sepharose beads 上, 然后加入稳定过表达 ORP4L 的 HeLa 细胞裂解液进行免疫沉淀。取细胞裂解液上清、免疫沉淀后的上清和洗脱样品进行

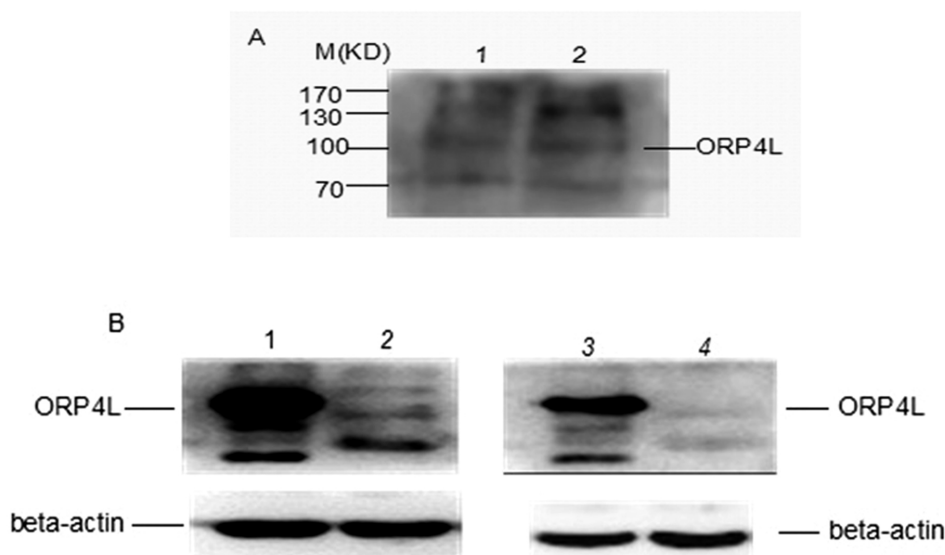


图2 western blotting 检测 ORP4L 多克隆抗体的特异性

(A)western blotting 检测抗血清的特异性 1 HeLa 细胞裂解液 2 Jurkat 细胞裂解液

(B)western blotting 检测亲和纯化后的 ORP4L 多克隆抗体的特异性 1 纯化后的 ORP4L 多克隆抗体检测 HeLa 细胞中 ORP4L 的过表达 ;2 纯化后的 ORP4L 多克隆抗体检测 HeLa 细胞中 ORP4L 的内源性表达 3 购自 Sigma 的 ORP4L 抗体检测 HeLa 细胞中 ORP4L 的过表达 4 购自 Sigma 的 ORP4L 抗体检测 HeLa 细胞中 ORP4L 的内源性表达

Fig. 2 Western blotting assay for the specificity of ORP4L polyclonal antibodies

(A) Western blotting assay for the specificity of serum 1: The lysate of HeLa cells; 2: The lysate of Jurkat cells

(B) Western blotting assay for the specificity of ORP4L polyclonal antibodies purified by GST-ORP4Lm/CNBr-activated sepharose 4B 1: ORP4L polyclonal antibodies detected ORP4L overexpression in HeLa; 2: ORP4L polyclonal antibodies detected ORP4L endogenous expression in HeLa cell; 3: ORP4L antibodies (purchased from Sigma) detected ORP4L overexpression in HeLa cell; 4: ORP4L antibodies(purchased from Sigma) detected ORP4L endogenous expression in HeLa cell

western blotting, 检测 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀的效果 结果显示与对照相比 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀后的上清中 ORP4L 明显减少, 并且在洗脱样品中存在 ORP4L, 从而表明通过 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 已成功将 ORP4L 免疫沉淀下来(图 5)。

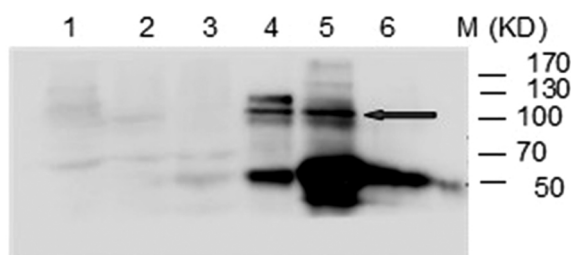


图3 ORP4L 抗体的免疫沉淀效率分析

M Marker; 1: 免疫沉淀前的 Jurkat 细胞裂解液 2: 用 ORP4L 抗体 (Sigma) 免疫沉淀后的上清 3: 用制备的 ORP4L 多克隆抗体免疫沉淀后的上清 4: 用 ORP4L 抗体 (Sigma) 免疫沉淀后的样品 5: 用制备的 ORP4L 多克隆抗体免疫沉淀后的样品 6: 用对照的兔多克隆抗体免疫沉淀后的样品

Fig. 3 IP efficiency analysis of ORP4 antibodies

M: Marker; 1: Jurkat Cell lysis before IP 2: The supernate after IP with ORP4L antibody (SIGMA); 3: The supernate after IP with ORP4L polyclonal antibodies; 4: IP samples with ORP4(SIGMA) antibody; 5: IP samples with ORP4L polyclonal antibodies; 6: IP samples with control antibody

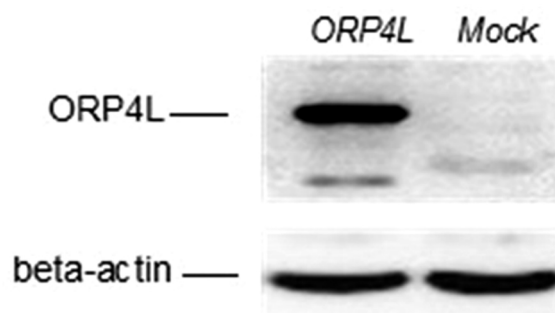


图4 Western blotting 检测稳定过表达 ORP4L-Hela 细胞系中 ORP4L 蛋白的表达

Fig. 4 The detection of ORP4L in the stable HeLa-ORP4L cell line by Western blotting

质谱分析: 将免疫沉淀洗脱下来的样品进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后可见胶上有特异性的蛋白条带, 且蛋白量大于 $0.1\mu\text{g}$, 可用于质谱分析(图 6)。对胶上的特异性蛋白进行切胶酶解, 质谱仪 LTQ-Orbitrap XL 分析鉴定。因为已有文献报道 ORP4L 与 OSBP 存在相互作用, 所以为了验证质谱的结果, 我们用 OSBP 抗体通过 western blotting 检测洗脱液, 结果证实免疫沉淀的洗脱液中存在 OSBP (图 7), 由此表明利用 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 可能免疫沉淀下来部分 ORP4L 相互作用蛋白。



图5 Western blotting 分析 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀的效率

1 稳定过表达 ORP4L 的 Hela 细胞裂解液 2 用 Control IgG-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀后的上清 3 用 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀后的上清 4 用 Control IgG-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀后的洗脱样品 5 用 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀后的洗脱样品

Fig.5 IP efficiency analysis of Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads

1 :The lysis of stable Hela-ORP4L cell line; 2: The supernate after IP with Control IgG-CNBr activated sepharose beads; 3: The supernate after IP with Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads; 4: The eluate after IP with Control IgG-CNBr activated sepharose beads; 5:The eluate after IP with Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads

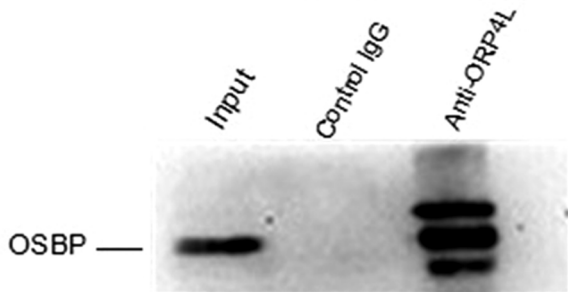


图7 Western blotting 检测洗脱液中的 OSBP

Fig.7 The detection of the OSBP in the eluate after IP by Western blotting

3 讨论

本实验研究选择了 ORP4L 的第 382-485 氨基酸片段进行原核表达,通过 GST-bind resin 进行亲和纯化,将获得的蛋白免疫新西兰大白兔成功制备了可识别外源性和内源性的人 ORP4L 蛋白的多克隆抗体。我们将亲和纯化后的 ORP4L 多克隆抗体应用于蛋白质组学研究,通过免疫沉淀和质谱分析,筛选了部分可能与 ORP4L 存在相互作用的蛋白质。

氧化固醇结合蛋白家族(ORPs)是一类可以特异性结合氧化固醇的蛋白家族,目前的研究认为,该家族蛋白广泛参与细胞生理功能,包括囊泡运输、脂质代谢、信号传导等。而 ORP4L 是 ORPs 家族重要的一员,ORP4L 的表达被认为是肿瘤转移和较差愈后的潜在标志,并且该蛋白只表达于白血病患者外周血白细胞中^[13]。有研究发现 ORP4L 是 OSW-1 的受体之一,而 OSW-1 是一种可以抑制某些癌细胞生长的物质,所以 Burgett Anthony W. G 等推测 ORP4L 可能与癌细胞的生长或者生存有关,但其作用机制还有待进一步研究^[11]。我们利用所制备的 ORP4L 多克隆抗体筛选了部分可能与 ORP4L 存在相互作用的蛋白质,虽然其与 ORP4L 的相互作用还需要用其它技术如双分子荧光互补技术或反向免疫共沉淀等进一步验证,但这些发现将有助于进一步了解 ORP4L 在体内的功能及其作用机制。

随着人类基因组测序计划的完成,生命科学进入后基因组时代,研究重点从结构基因组转向功能基因组。蛋白质组学是

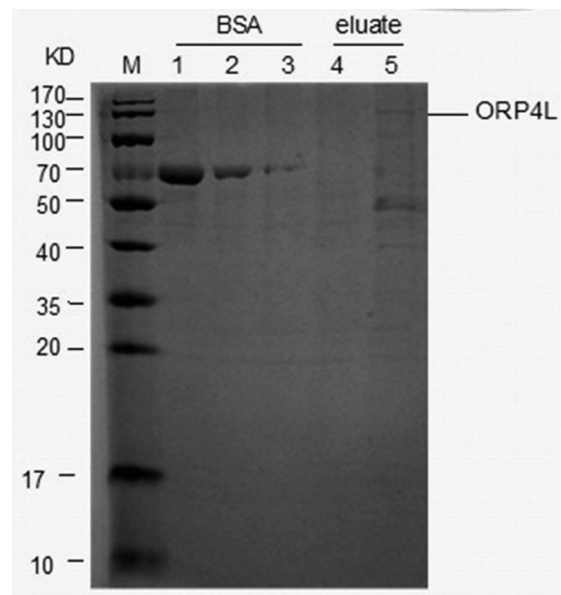


图6 免疫沉淀洗脱液的 SDS-PAGE 分析

M :Marker ;1-3 分别是 1.5μg、0.5μg 和 0.1μg BSA ;4 用 Control IgG-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀后的洗脱样品 ;5 用 Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads 免疫沉淀后的洗脱样品

Fig.6 The SDS-PAGE analysis of the eluate after IP

M :Marker ;1-3 :1.5μg, 0.5μg and 0.1μg BSA; 4: The eluate after IP with Control IgG-CNBr activated sepharose beads; 5:The eluate after IP with Anti-ORP4L-CNBr activated sepharose beads

功能基因组时代的支柱学科,是对一个基因组或一种细胞、组织、器官所表达的全部蛋白质成分进行综合分析,目前被认为是全景式研究蛋白质网络及其动态变化的一门新兴科学^[12]。本研究将所制备的 ORP4L 多克隆抗体应用于蛋白质组学研究,通过免疫沉淀的方法,对一种细胞的全部蛋白进行分析,从而筛选出了部分可能与 ORP4L 存在相互作用的蛋白,改善了常规的蛋白质组学研究专一性不强的特点,为从整体上更系统、透彻的研究 ORP4L 的生物学功能及其机制提供了有用的工具。

氧化固醇结合蛋白(OSBP)是 ORPs 蛋白家族的最早发现的成员,ORP4L 与 OSBP 同源性最接近。最近的研究发现 OSBP 与 ORP4L 存在相互作用^[5]。而我们通过蛋白质印迹实验证实,在用 ORP4L 多克隆抗体免疫沉淀下来的复合物中存在 OSBP,从而验证了 OSBP 与 ORP4L 存在相互作用这一发现,这也表明我们制备的 ORP4L 多克隆抗体已经被成功地应用于其蛋白质组学研究。

参考文献(References)

- [1] Bjorkhem I. Do oxysterols control cholesterol homeostasis [J]. J Clin Invest, 2002, 110(6):725-730
- [2] Wang PY, Weng J, Anderson RG, et al. OSBP is a cholesterol-regulated scaffolding protein in control of ERK 1/2 activation [J]. Science, 2005, 307:1472-1476
- [3] Johansson M, Bocher V, Lehto M, et al. The two variants of oxysterol binding protein-related protein-1 display different tissue expression patterns, have different intracellular localization, and are functionally distinct [J]. Mol Biol Cell, 2003, 14(3):903-915 (下转第 4018 页)

- [2] 杨文华,王慧娟,杨向东,等.蝎毒多肽对白血病细胞黏附及侵袭特性的影响[J].中华血液学杂志,2009,30(6):424-425
Yang Wen-hua, Wang Hui-juan, Yang Xiang-dong, et al. Experimental study of effect of peptide extract from scorpion venom in interference in leukemic cell extramedullary infiltration [J]. Chinese Journal of Hematology, 2009,30(6):424-425
- [3] 杨文华,杨向东,史哲新,等.蝎毒多肽提取物对白血病小鼠 Bcl-2、SDF-1 α 与 TGF- β 1 表达的影响[J].中国肿瘤临床,2010,8:429-432
Yang Wen-hua, Yang Xiang-dong, Shi Zhe-xin, et al. Effect of Polypeptide Extract from Scorpion Venom on Bcl-2, SDF-1 α and TGF- β 1 Expression in Leukemia-NOD/SCID Mice[J]. Chinese Cancer Clinical, 2010, 8:429-432
- [4] Melo JV, Gordon DE, Cross NC, et al. The ABL-BCR fusion gene is expressed in chronic myeloid leukemia [J]. Blood, 1993, 81 (1): 158-165
- [5] Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, et al. Philadelphia chromosome-positive leukemias:from basic mechanisms to molecular Therapeutics[J]. Ann Intern Med, 2003,138:819-830
- [6] Kantarjian HM, Cortes JE, O'Brien S, et al. Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome positive chronic phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon α [J]. Blood, 2004, 104 (7) :1979
- [7] Hirano I, Nakamura S, Yokota D. Depletion of pleckstrin homology domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1 and 2 by Bcr/abl promotes chronic myelogenous leukemia cell proliferation through continuous phosphorylation of Akt isoforms [J]. J Biol Chem, 2009,284(33):22155-22165
- [8] Schwartz J, Pinilla-Barz J, Yuan RR, et al. Novel targeted and immunotherapeutic strategies in chronic myeloid leukemia [J]. Semin Hematol, 2003,40:87-96
- [9] Ritchie, E, Nichols, G. Mechanisms of resistance to imatinib in CML patients: a paradigm for the advantages and pitfalls of molecularly targeted therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2006, 6:645-657
- [10] Sale EM, Hodgkinson CP, Jones NP, et al. A new strategy for studying protein kinase B and its three isoforms Role of protein kinase-B in phosphorylating glycogen synthase kinase-3, tuberlin, WNK1, and ATP citrate lyase[J]. Biochemistry, 2006, 45(1):213-223
- [11] Zhang H, Bajraszewski N, Wu E, et al. PDGFRs are critical for PI3K/Akt activation and negatively regulated by mTOR[J]. J Clin Invest, 2007,117 :730-738
- [12] Mayo L D, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of mdm2 from the cytoplasm to the nucleus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (20): 11598-11603
- [13] Sawa H, Kobayashi T, Mukai K, et al. Bax overexpression enhances cytochrome c release from mitochondria and sensitizes KATO III gastric cancer cells to chemotherapeutic agent-induced apoptosis[J]. Int J Oncol, 2000,16:745-749
- [14] Peltier J, O'Neill A, Schaffer DV. PI3K/Akt and CREB regulate adult neural hippocampal progenitor proliferation and differentiation [J]. Developmental Neurobiology, 2007, 67 (10) :1348-1361
- [15] Aichberger KJ, Mayerhofer M, Krauth MT, et al. Low-level expression of proapoptotic Bcl-2-interacting mediator in leukemic cells in patients with chronic myeloid leukemia; role of BCR/ABL, characterization of underlying signaling pathways, and expression by novel pharmacologic compounds[J]. Cancer Res, 2005,65:9436-9444

(上接第 4010 页)

- [4] Lehto M, Tienari J, Lehtonen S, et al. Subfamily III of mammalian oxysterol-binding protein (OSBP) homologues: the expression and intracellular localization of ORP3, ORP6, and ORP7 [J]. Cell Tissue Res, 2004, 315(1):39-57
- [5] Terhi Vihervaara, Maurice Jansen, Riikka-Liisa Uronen, et al. Cytoplasmic oxysterol-binding proteins: sterol sensors or transporters [J]. Chem Phys Lipids, 2011, 164(6):443-450
- [6] Jessica P, Ryan J, Neale D. Characterization of the sterol-binding domain of oxysterol-binding protein (OSBP)-related protein 4 reveals a novel role in vimentin organization [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(7): 1426-1437
- [7] Marcia V. Fournier, Fernanda C. Guimaraes, Marcos E. M. Paschoal, et al. Identification of a gene encoding a human oxysterol-binding protein-homologue: a potential general molecular marker for blood dissemination of solid tumors [J]. Cancer Res, 1999, 59 (15): 3748-3753
- [8] Henriques Silva N, Vasconcellos Fournier M, Pimenta G, et al. HLM/OSBP2 is expressed in chronic myeloid leukemia [J]. Int J Mol Med, 2003, 12(4): 663-666
- [9] Zhou T, Li S, Zhong W, et al. OSBP-related protein 8 (ORP8) impacts lipid homeostasis in vitro and in vivo by modulating the quantity of nuclear SREBPs [J]. PLoS One, 2011, 6(6):e21078
- [10] Ngo MH, Colbourne TR, Ridgway ND. Functional implications of sterol transport by the oxysterol-binding protein gene family [J]. Biochem. J, 2010, 429(1):13-24
- [11] Burgett Anthony W. G, Poulsen Thomas B, Wangkanont Kittikhun, et al. Natural products reveal cancer cell dependence on oxysterol-binding proteins [J]. Nat Chem Biol, 2011, 7(9): 639-647
- [12] Zafar S, von Ahsen N, Oellerich M, et al. Proteomics approach to identify the interacting partners of cellular prion protein and characterization of Rab7a interaction in neuronal cells [J]. J Proteome Res, 2011, 10(7):3123-3135
- [13] Yan D, Olkkonen VM. Characteristics of oxysterol binding proteins [J]. Int Rev Cytol, 2008, 265:253-285