

研究简报

COX-2 的基因克隆和多克隆抗体制备*

李改丽 王百忍 费玲玲 张萍 杨浩 鞠躬**

(第四军医大学神经科学研究所, 西安 710032)

摘要 环氧合酶-2 (COX-2) 是一种具有多种功能的神经调节物质, 它的许多功能细节仍不十分清楚, 还需要进一步深入研究. 用 PCR 技术从大鼠脑 cDNA 文库中, 扩增到正常成年大鼠 COX-2 的 cDNA 序列, 测序结果与已发表的序列一致. 通过 PCR 扩增和基因重组, 分别构建 COX-2 编码基因全长和羧基端部分编码序列的表达载体, 并导入大肠杆菌 DH5 α 中, 通过 IPTG 诱导表达重组融合蛋白, 结果导入全长编码基因表达载体的 DH5 α 无 COX-2 融合蛋白表达, 而羧基端部分基因编码的 COX-2 融合蛋白在 DH5 α 中以包涵体的形式进行表达. 经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 在相对分子质量 (M_r) 为 44 000 处有 1 条特异的蛋白质条带. 对以包涵体形式表达的蛋白质进行变性、重折叠及纯化后, 得到了高纯度融合蛋白. 以重组融合蛋白免疫新西兰种大白兔, 制作了抗 COX-2 多克隆抗体, 经酶联免疫吸附测定、蛋白质印迹和免疫细胞化学方法检测, 此抗体具有较高效价和特异性. COX-2 基因和多克隆抗体的获得, 为进一步研究 COX-2 的功能创造了条件.

关键词 COX-2, 克隆, 融合蛋白, 多克隆抗体

学科分类号 R392.1

环氧合酶 (COX) 是前列腺素生成的限速酶, 有两个异构体: 环氧合酶-1 (COX-1) 和环氧合酶-2 (COX-2). COX-2 具有重要的生物学作用, 由其催化生成的前列腺素是机体内重要的第二信使, 与神经免疫调节、突触可塑性^[1]以及痛觉敏感性^[2]有关, 并被作为抗炎治疗的靶标. 但目前关于 COX-2 的许多重要功能的细节还有待进一步阐明. COX-2 探针和抗体是 COX-2 研究中的重要工具. COX-2 基因的克隆已有报道^[3], 但在大肠杆菌中表达 COX-2 融合蛋白并制备其多克隆抗体尚未见报道. 本文通过 PCR 获得了 COX-2 的全长基因, 并且构建了其克隆载体, 可用于制备大量 COX-2 探针. 我们进而构建了 COX-2 的表达载体, 在大肠杆菌中实现了 COX-2 的高表达, 并制备了抗 COX-2 的多克隆抗体, 为进一步对 COX-2 的功能进行深入研究提供了有用的工具.

1 材料和方法

1.1 主要材料

Advantage 2 PCR kit (Clontech 公司), Agarose gel DNA extraction kit 和 high pure plasmid isolation kit (Roche 公司), 限制性内切酶与 T4 DNA 连接酶 (Promega 公司), Glutathione agarose (Sigma 公司). 所有引物由赛百盛公司合成.

1.2 方法

1.2.1 COX-2 全长基因的获得: 用高保真 PCR 试剂盒, 以引物 5'-ACCTCTGCGATGCTCTTGCAG-3' 和 5'-CAGCTCAGTTGAA-CGCCTTTTG-3', 从正常成年大鼠脑的 cDNA 文库中扩增 COX-2 全长基因, 反应体系 25 μ L. 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 1 min, 68 $^{\circ}$ C 2 min, 共循环 30 次; 最后在 68 $^{\circ}$ C 维持 7 min. 取 5 μ L 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定扩增产物. 回收相应大小的 PCR 产物.

1.2.2 COX-2 基因重组与鉴定: 基因重组和鉴定依据 Sambrook 等^[4]的方法进行. 将回收的 PCR 产物和 PGEM-T easy 连接后转入大肠杆菌 DH5 α , 经 α 互补筛选后再经 EcoRI 酶切, 用电泳进行初步鉴定, 能切出目的基因片段的质粒即为目的质粒. 目的质粒转化大肠杆菌 DH5 α 后, 送上海基因公司测序.

1.2.3 表达载体的构建和筛选: 以测序后含 COX-2 全长基因的质粒为模板, 引物 5'-AGGT-CGACTCTTCCGAGCTGTGCTGC-3', 5'-GGTCG-

* 国家自然科学基金资助项目 (39830130).

** 通讯联系人.

Tel: 029-3374557, E-mail: jugong@fmmu.edu.cn

收稿日期: 2002-11-19, 接受日期: 2003-01-27

ACAGATGAGCAGAGAGATGA-3' (a) 分别和 5'-ATGCGGCCGCTCTTAAGTTGAACGCCT-3' (b) 配对, 扩增含有酶切位点的 COX-2 全长基因和羧基端基因的序列. 回收的两种 PCR 产物与 pGEX-4T-1, 以 *Sal* I 及 *Not* I 双酶切后进行连接重组, 连接体分别命名为 pGEX-4T-1-COX-2 (全长) 和 pGEX-4T-1-COX-2' (羧基端序列). 同时将 a 和 b 配对的 PCR 产物与 pCI-neo, 以 *Sal* I 及 *Not* I 双酶切后进行连接重组, 连接体命名为 pCI-neo-COX-2'. 3 种连接产物转入大肠杆菌 DH5 α , 经 *Sal* I / *Not* I 双酶切鉴定.

1.2.4 重组融合蛋白的原核表达、纯化与鉴定: 从含有 pGEX-4T-1-COX-2 和 pGEX-4T-1-COX-2' 的表达菌中, 每种挑取 2 个阳性菌落进行培养, 经 IPTG 诱导 1、2、3 和 4 h 后, 分别收集 1 ml 菌液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定. 收集 IPTG 诱导培养 4 h 后的菌体, 超声波破碎细胞后离心, 取上清及沉淀进行电泳. 采用朱厚础^[5]方法对沉淀中的融合蛋白进行变性复性, 然后融合蛋白过 glutathione agarose 柱纯化, 行 SDS-PAGE 鉴定.

1.2.5 COX-2 多抗的制备和鉴定

多抗的制备: 用原核表达的 COX-2 融合蛋白行 SDS-PAGE. 切出凝胶上含有 COX-2 的融合蛋白条带, 冻干后溶于生理盐水用作抗原. 取雄性新西兰大白兔 3 只 (每只体重为 2.5 kg), 按照常规方法进行免疫. 间隔 3 周免疫 1 次, 共免疫 4 次.

多抗的鉴定: a. 酶联免疫吸附测定法 (ELISA). 从第二次免疫开始, 每次免疫后 7 天采兔耳静脉血, 分离血清作为一抗, 用 1.2.4 中纯化的 COX-2 抗原包被 ELISA 板, 用直接 ELISA 测定抗体效价. 免疫 4 次后从兔颈动脉放血, 分离血清后 -20℃ 冻存. b. 蛋白质印迹法 (Western blot). 取正常成年 SD 大鼠脑组织匀浆行 SDS-PAGE, 印迹转染醋酸纤维素膜. 免疫兔血清 (1:200; 1:500; 1:1000; 1:5000) 作为一抗, 用 BM Chemiluminescence Western blot kit 检测免疫复合物. c. 重组融合蛋白的真核表达和细胞免疫荧光染色. 用脂质体 2000 将 pCI-neo-COX-2' 导入 COS-7 细胞. 转染后 48 h 用免疫兔血清 (1:200 和 1:500) 作为一抗, 免疫荧光染色观察 COX-2 蛋白在 COS-7 细胞中的表达. 同步培养正常和转空质粒 pCI-neo 的 COS-7 细胞行免疫荧光染色作为对照. d. 免疫组织化学染色. 选取正常成年雄性 SD 大鼠 2 只, 常规固定

后用冰冻切片机冠状切片, 脑片厚 50 μ m. 文献 [6] 报道正常成年大鼠脑内皮层等部位的神经元和个别血管内皮细胞组成性表达 COX-2 蛋白, 故选取 10 张皮层部位的切片进行免疫组织化学染色. 将切片常规漂洗和封闭后用免疫兔血清 (1:1000) 作为一抗, 采用 ABC 法进行免疫组织化学染色. 硫酸镍胺加强 DAB 蓝色反应呈色, 当阳性产物呈深蓝色而背景几乎无色时终止反应. 经脱水、透明和封片后, BX-60 显微镜镜检. 部分切片用做对照, 一抗用牛血清白蛋白稀释液替代, 二抗、ABC 复合物同上.

2 结 果

2.1 COX-2 克隆载体的构建

从正常成年大鼠脑 cDNA 文库扩增到 COX-2 (116~1935 位) 的编码基因, 大小为预期的 1.8 kb 左右 (图 1), 将其与 pGEM-T easy 连接后, 用 *Eco*R I 酶切鉴定 (图 2). 测序结果证实, 目的基因的序列与 GenBank 中大鼠 COX-2 基因的序列完全一致.

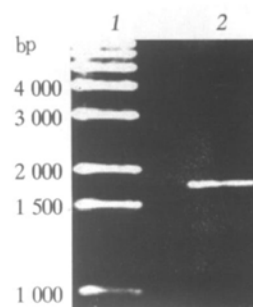


Fig. 1 Agarose gel electrophoretic analysis of PCR product of COX-2 gene

cDNA library was used as template. 1: DNA marker; 2: PCR product of COX-2 gene.

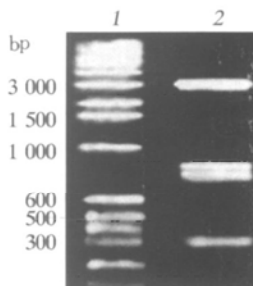


Fig. 2 Restrictive enzyme digestion analysis of gene vector

1: DNA marker; 2: pGEM-T easy-COX-2 cut by *Eco*R I.

2.2 COX-2 表达载体的构建

从 COX-2 质粒扩增到带有酶切位点的 COX-2 全长基因 (129~1932 位) 和羧基端基因 (1443

~ 1 932 位) 的编码序列, DNA 大小分别为 1.8 和 0.5 kb 左右 (图 3), 将其与 pGEX-4T-1 连接后, 用 *Sal* I 及 *Not* I 双酶切鉴定 (图 4); 羧基端基因的编码序列和 pCI-neo 连接后, 用 *Sal* I 及 *Not* I 双酶切鉴定 (图 5).

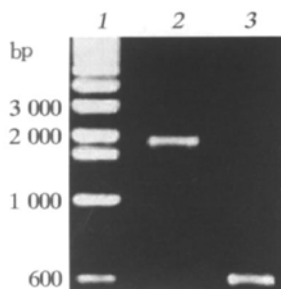


Fig. 3 Agarose gel electrophoretic analysis of PCR product of COX-2 gene

PGEM-T easy-COX-2 plasmid was used as template.

1: DNA marker; 2: PCR product of COX-2 gene;

3: PCR product of COX-2 carboxyl terminal gene.

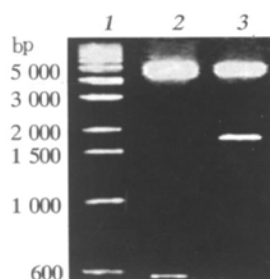


Fig. 4 Restrictive enzyme digestion analysis of expression vector in *E. coli*

1: DNA marker; 2: pGEX-4T-1-COX-2 cut by *Sal* I +

Not I; 3: pGEX-4T-1-COX-2 cut by *Sal* I + *Not* I.

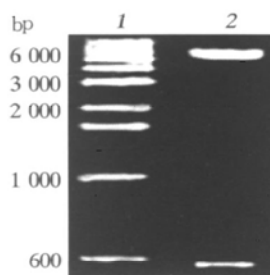


Fig. 5 Restrictive enzyme digestion analysis of expression vector in mammal

1: DNA marker; 2: pCI-neo-COX-2 cut by *Sal* I + *Not* I.

2.3 COX-2 蛋白的原核表达、纯化与鉴定

pGEX-4T-1-COX-2 经 IPTG 诱导后 1、2、3 和 4h 在大肠杆菌中均有表达, 以 4 h 表达量最高, SDS-PAGE 表明融合蛋白存在于细菌包涵体中, 对

其进行变性复性后过柱纯化, 纯化的谷胱甘肽转移酶 (GST) -COX-2 融合蛋白 M_r 为 44 000 (图 6). 但 pGEX-4T-1-COX-2 则 4 个时间点均无表达, 考虑可能是由于基因太长的缘故.

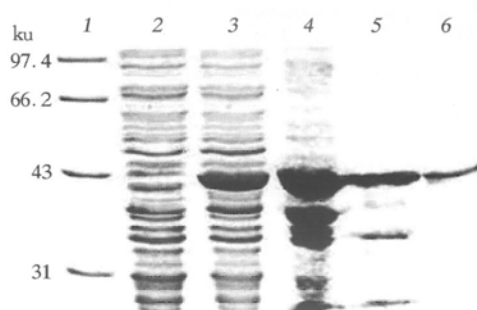


Fig. 6 Expression of pGEX-4T-1-COX-2 in *E. coli* and SDS PAGE analysis of purified fusion protein

1: protein marker; 2: before IPTG induction; 3: GST-COX-2 fusion

protein expressed in bacterium cell after IPTG induction; 4: GST-

COX-2 fusion protein expressed in the form of inclusion body after

IPTG induction; 5: fusion protein after dissolution and refolding; 6:

fusion protein purified through glutathione agarose column after dissolution and refolding.

2.4 多抗的制备和鉴定

抗原是 GST 融合蛋白, 免疫 4 次后, ELISA 检测血清抗 COX-2 滴度为 1:3 500, 抗 GST 滴度为 1:900, 处死动物分离血清. 为了去除抗 GST 部分, 取少量免疫血清用 GST 抗原中和, 直接 ELISA 法测定的结果表明, 中和后的抗血清基本不与 GST 反应, 而与 COX-2 仍有反应.

经蛋白质印迹检测, 免疫血清以 1:1 000 的滴度检测到正常成年大鼠脑组织内 COX-2 蛋白位于 M_r 约为 70 000 处, 未检测到其他蛋白质 (图 7).

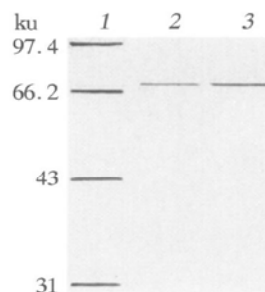


Fig. 7 Western blot analysis of anti-COX-2 serum

1: protein marker; 2, 3: COX-2 protein in normal adult rat brain.

转染 COS-7 细胞 48 h 后免疫荧光染色发现免疫血清以 1:200 的滴度检测到 pCI-neo-COX-2 组有

明显的阳性细胞, 正常和转空质粒 pCI-neo 的 COS-7 细胞则无阳性标记细胞 (图 8)。

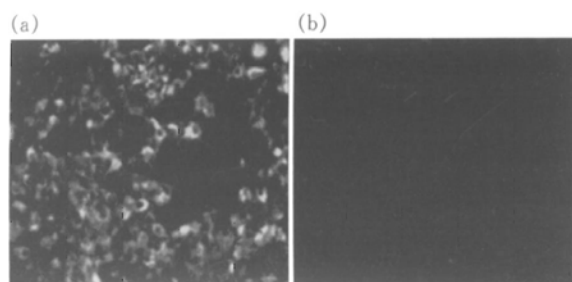


Fig. 8 Expression of COX-2 protein in COS-7 cell ($\times 140$)

(a) expression of COX-2 in COS-7 cell transformed with pCI-neo-COX-2; (b) expression of COX-2 in COS-7 cell transformed with pCI-neo.

经免疫组织化学染色, 免疫血清以 1:1 000 的滴度检测到正常成年 SD 大鼠脑内皮层部位分布有 COX-2 免疫阳性细胞, 阳性细胞主要为神经元, 个别为血管内皮细胞 (图 9); 对照组则未见阳性结构。

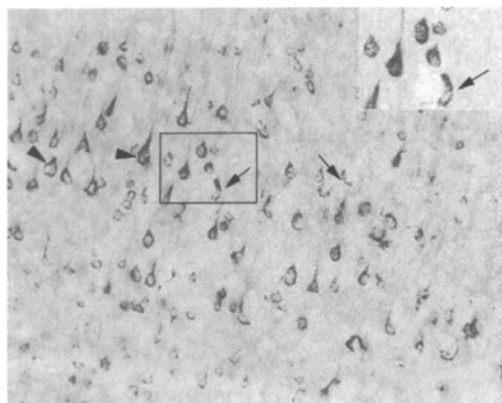


Fig. 9 Expression of COX-2 protein in normal adult SD rat brain ($\times 120$; top right corner: $\times 240$)

▲: COX-2 immunopositive neuron; ->: COX-2 immunopositive endothelial cell

3 讨 论

COX 催化游离的花生四稀酸生成前列腺素。正常状态下 COX-1 在全身许多器官均有低水平表达, COX-2 仅在个别器官如脑有低水平表达; 在病理状态下机体内 COX 水平明显升高, COX-2 尤为明显, 故称 COX-2 为诱导型环氧合酶^[3]。

机体内主要由谷氨酸盐和 IL-1 β 经不同的信号途径激活 COX-2, COX-2 作用于不同亚细胞结构 (如树突、棘突和核周部位等) 的底物, 进而激活

下游信号通路^[7, 8]。COX-2 水平在神经元突触活动中明显增高, 而且它也参与了突触可塑性与脑血流的相互作用^[1]。

COX-2 也参与中枢神经系统和免疫系统的相互作用。机体受到免疫刺激时, 外周免疫器官产生大量的细胞因子进入血液循环, 随血流进入各个靶器官。但细胞因子均不能通过血脑屏障, 他们通过脑血管内皮上的相应受体激活信号转导途径, 产生下游信号分子进一步引起脑内的反应, COX-2 是催化重要的下游信号分子前列腺素合成的关键酶。脑内表达 COX-2 mRNA 的绝大多数内皮细胞也表达 I 型 IL-1 β 受体, 提示在炎症反应时, 血液循环中水平增高的 IL-1 β 作用于脑血管内皮细胞上的相应受体, 进而引起 COX-2 的转录和合成, COX-2 催化生成前列腺素 PGE₂, PGE₂ 作用于脑实质内表达其受体的特异性核团引起脑内的反应^[8]。

但是 COX-2 是一种具有多种功能的神经调节物质, 它的许多功能仍不十分清楚, 需要大量深入的研究。本研究设计的 COX-2 引物, 用于扩增 COX-2 cDNA 起始密码子至终止密码子的全长编码序列和碳端部分序列, 因此可以方便地制备较长或较短的 COX-2 的 DNA 探针, 用于关于 COX-2 的原位分子杂交研究。

以融合蛋白作为抗原不仅使蛋白质的纯化变得容易, 而且使制备抗体时有较高的免疫原性。用 GST 抗原中和抗体后, 免疫血清基本与 GST 不反应, 而仍保持与 COX-2 的反应, 即有较好的抗 COX-2 特异性。蛋白质印迹结果表明: 免疫血清在较高稀释浓度下即可检测到大鼠脑内 COX-2 蛋白, 且无明显的非特异性条带, 证实了多克隆抗体的高效性和抗 COX-2 的特异性。转染 COS-7 细胞后的免疫荧光染色结果进一步证实了多抗的特异性。免疫组织化学染色结果表明: 正常成年大鼠脑内神经元和个别血管内皮细胞表达 COX-2 蛋白, 与文献 [6] 报道完全一致, 表明 COX-2 多克隆抗体的特异性, 同时也表明它与真核组织有较高的亲和力。因而, 我们制备的 COX-2 抗体为下一步关于 COX-2 的形态和机能研究奠定了良好的基础。

参 考 文 献

- 1 Kaufmann W E, Worley P F, Pegg J, *et al.* COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (6): 2317~ 2321
- 2 Woolf C J, Salter M W. Related articles neuronal plasticity:

- increasing the gain in pain. *Science*, 2000, **288** (5472): 1765~1769
- 3 Feng L, Sun W, Xia Y, *et al.* Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys*, 1993, **307** (2): 361~368
 - 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 883~1042
 - 5 朱厚础. 蛋白质纯化与鉴定实验指南. 北京: 科学出版社, 2000. 148~151
Zhu H C. *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*. Beijing: Science Press, 2000. 148~151
 - 6 Deininger M H, Schluesener H J. Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. *J Neuroimmunol*, 1999, **95** (1~2): 202~208
 - 7 Kozak K R, Rowlinson S W, Marnett L J. Oxygenation of the endocannabinoid, 2-arachidonylglycerol, to glyceryl prostaglandins by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem*, 2000, **275** (43): 33 744~33 749
 - 8 Ek M, Arias C, Sawchenko P, *et al.* Distribution of the EP3 prostaglandin E (2) receptor subtype in the rat brain: relationship to sites of interleukin-1-induced cellular responsiveness. *J Comp Neurol*, 2000, **428** (1): 5~20

Cloning of Coding Gene and Preparation of Polyclonal Antibody of COX-2*

LI Ga-Li, WANG Ba-Ren, FEI Ling-Ling, ZHANG Ping, YANG Hao, JU Gong**

(*Institute of Neurosciences, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*)

Abstract COX-2 is a multifunctional neuronal modulator, however, its many functions are still unclear and need to be investigated further. Normal adult rat COX-2 cDNA was amplified by PCR from rat brain cDNA library. Sequencing result showed that the cloned gene was identical with that having reported. Expression vectors of whole COX-2 coding gene and its partial coding sequence in carboxyl terminal were respectively constructed by PCR and gene recombination techniques and were transformed into *E. coli* DH5 α , for IPTG-induced expression. The results showed that there was no COX-2 fusion proteins expressed in *E. coli* DH5 α which were transformed with expression vectors of whole COX-2 coding gene, whereas in *E. coli* DH5 α which were transformed with expression vectors of partial coding gene in carboxyl terminal, COX-2 fusion protein was expressed in the form of inclusion body. A protein band of M_r being 44 000 appeared on SDS-PAGE gel. The protein expressed by carboxyl terminal coding sequence had a high purity after denaturation, refolding and purification. New Zealand rabbits were immunized with COX-2 fusion proteins to prepare a polyclonal antibody against COX-2. The COX-2 antiserum was obtained and characterized by ELISA, Western blot, immunohistochemistry and immunocytochemistry. Results showed that the antibody has high titer, affinity and specificity. The studies provide a favorable tool for further functional study of COX-2 in future.

Key words COX-2, cloning, fusion protein, polyclonal antibody

* This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39830130).

** Corresponding author. Tel: 86-29-3374557, E-mail: jugong@fmmu.edu.cn

Received: November 19, 2002 Accepted: January 27, 2003