

· 基础论著 ·

## 免疫调控相关基因C12orf28在免疫组织中的分布特征

任慧 李红敏 乔雍 刘燃 郝晓花 魏红山

**【摘要】目的** 制备抗人C12orf28多克隆抗体,明确C12orf28编码蛋白在免疫组织中的分布特征。**方法** 选取免疫原性高、特异性强的羧基端257个氨基酸作为目的片段,以人外周血单个核细胞(PBMC) cDNA为模板,采用PCR获得目的基因C12orf28C257;构建其原核表达载体pET32a(+)-C12orf28C257,转入大肠埃希菌BL21(DE3),异丙基β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导表达重组蛋白;将重组蛋白免疫大耳白大白兔制备兔源性多克隆抗体,采用ELISA和Western blot分析检测多克隆抗体效价和特异性,采用Western blot明确C12orf28的组织分布特征。**结果** PCR扩增得到C12orf28C257目的基因片段,诱导表达重组蛋白并制备了其多克隆抗体。ELISA分析结果显示,多克隆抗体效价 $> 1:1.28 \times 10^6$ , Western blot分析鉴定得出多克隆抗体具有较高的特异性。**结论** 未知功能基因C12orf28在胎儿肠、淋巴、胸腺和心肌等组织中均有不同程度的表达。

**【关键词】** C12orf28; 基因表达; 重组蛋白; 多克隆抗体; 肝炎, 乙型

**Expression features of a novel immune-related gene C12orf28 in immunologic tissues** REN Hui, LI Hong-min, QIAO Yong, LIU Ran, HAO Xiao-hua, WEI Hong-shan. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University; Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China

Corresponding author: WEI Hong-shan, Email: drwei@ccmu.edu.cn

**【Abstract】Objective** To prepare the polyclonal antibody of C12orf28 and observe the expression features of C12orf28 in immunologic tissues. **Methods** The peptide sequence with high immunogenicity and specificity that contains 257 amino acids of the carboxy-terminal was selected and amplified by reverse transcription PCR. The DNA fragment C12orf28C257 was inserted into pET32a(+) plasmid and transformed into *Escherichia coli* BL21. The protein expression was induced with IPTG in vitro. Anti-C12orf28 was prepared by immunizing the big ears rabbit and was analyzed by Western blot and ELISA. The distribution of C12orf28 in tissues was detected by Western blot. **Results** The DNA fragment C12orf28C257 was cloned and its recombinant protein was successfully induced. The antibody titer was more than  $1:1.28 \times 10^6$  by ELISA and the high specificity of the polyclonal antibody was detected by Western blot. **Conclusion** The new gene C12orf28 is expressed in the fetal tissues such as intestine, lymph node, thymus and myocardium, etc.

**【Key words】** C12orf28; Gene expression; Recombinant protein; Polyclonal antibody; Hepatitis B

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是导致慢性肝炎的主要因素,已成为世界性的卫生问题。据世界卫生组织报告,全球约有1/3的人群暴露于病毒性肝炎之中,慢性感染者约为3.5亿。我国慢性HBV感染者约9300万例,慢性乙型肝炎患者

约为2000万<sup>[1-2]</sup>。目前普遍认为HBV在肝细胞中增殖不会直接导致肝损伤,病毒感染宿主后引起的免疫应答是肝细胞损伤的决定性因素,但其具体发病机制尚未明确<sup>[3-4]</sup>。本课题组前期通过基因芯片研究发现,HBV感染者的外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)与健康人群相比,有些基因表达量显著增加,其中包括人类未知功能基因C12orf28。本研究主要目的在于体外克隆表达C12orf28C257,制备其多克隆抗体,并利用制得抗

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.001

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81071411; No. 81271901)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所; 新发突发传染病研究北京市重点实验室

通讯作者: 魏红山, Email: drwei@ccmu.edu.cn

体检测C12orf28在不同组织的分布特征, 以期为该基因的功能研究奠定基础。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 主要试剂: *Taq*酶、T4 DNA连接酶、限制性核酸内切酶均购自Promega公司; DNA回收试剂盒购自上海鼎国生物技术有限公司; 质粒小量提取试剂盒购自威格拉斯公司; 琼脂糖购自上海Yito公司; 弗氏不完全佐剂、弗氏完全佐剂购自Sigma公司; 兔抗His单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG、羊抗兔IgG购自Santa Cruz公司; 辣根过氧化物酶底物A、B购自北京热景生物公司。

2. 实验动物: 雄性2.5 kg大耳白大白兔购自北京大学医学部实验动物中心, 动物许可证号为SCXK(京)2001-0008。

3. 实验仪器: PCR扩增仪(PE9600, PE2400)购自美国PE公司; 高速台式离心机(5417R)购自美国IEC公司; 凝胶成像系统(2000D)购自台湾ALPHA公司; 紫外光栅分光光度计(DU640)购自美国Beckman公司; 低温高速离心机(21R)购自美国Beckman公司。

### 二、方法

1. C12orf28基因片段的扩增和质粒构建: Trizol法提取人外周血单个核细胞PBMC总RNA, RT-PCR反转录为cDNA。采用Primer 5.0软件根据C12orf28编码区3'-端771个碱基基因序列设计引物。上游引物P<sub>1</sub>: 5'-GGATCCGACCGACGTGTCCCAAAT-3'; 下游引物P<sub>2</sub>: 5'-CTCGAGGGGCACAGCGTCGATAGAG-3'。引物两端引入*Bam* H I 和*Xho* I 酶切位点。PCR扩增目的片段, 反应条件: 预变性95 °C 5 min, 95 °C变性40 s, 61 °C退火40 s, 延伸72 °C 1 min, 2~4步循环30次, 72 °C 10 min, 4 °C保存。DNA纯化回收试剂盒纯化回收PCR产物, 连接T载体, 转化入大肠埃希菌DH5 $\alpha$ , 挑取阳性单克隆菌落扩大培养后提取质粒, 双酶切鉴定并测序。测序正确的质粒经双酶切后回收目的DNA片段, 连接pET32a(+), 转化入大肠埃希菌DH5 $\alpha$ , 挑取单个菌落LB培养基培养后提取质粒, 获得重组质粒pET32a(+)-C12orf28C257, 双酶切及测序鉴定目的基因。

2. 重组蛋白的诱导表达及His标签鉴定: 将构

建好的重组质粒转化入大肠埃希菌BL21中, 挑取单克隆菌落于5 ml含氨苄西林的LB培养基摇菌12 h。1:100扩大培养, 37 °C摇床培养至菌液吸光度A<sub>600</sub>为0.6~0.8。加入IPTG至终浓1 mmol/L, 30 °C继续培养4 h, 离心收菌。超声法碎菌, 离心后所得上清为A液, 沉淀用洗涤液和ddH<sub>2</sub>O洗涤3次, 离心留取上清分别为B液和C液。溶包涵体A液过夜溶解沉淀, 离心取上清, 所得液体为D液, 即得到包涵体形式的重组蛋白。透析方法使重组蛋白复性, 于-80 °C冰箱保存。

将所得蛋白样品SDS-PAGE电泳后220 mA转膜45 min, 牛奶封闭2 h。行常规Western blot检测, 一抗按1:1000稀释兔抗His单克隆抗体室温孵育PVDF膜3 h, 二抗羊抗兔IgG-HRP按1:2000稀释孵育PVDF膜1 h, 化学发光显影曝光。

3. 兔抗重组蛋白多克隆抗体的制备及效价特异性分析: 雄性大耳白大白兔, 体重2.5 kg。初次免疫皮下注射给予1 mg弗氏完全佐剂乳化的重组蛋白, 2周后给予弗氏不完全佐剂乳化的重组蛋白0.5 mg, 隔1周后再次免疫1次, 方法同前。每次免疫前耳缘静脉取血1 ml, 离心收集上清。腹主动脉插管取血, 蛋白A琼脂糖层析柱纯化多克隆抗体。

包被缓冲液稀释C12orf28C257重组蛋白至终浓度为0.002  $\mu$ g/ $\mu$ l, 每孔100  $\mu$ l常规包被96孔板, 设置空白对照组, 4 °C冰箱孵育过夜。次日将96孔板置于37 °C孵育1 h, 磷酸盐吐温缓冲液(PBST)洗板3次。5% BSA封闭2 h, 洗板3次。加入PBST稀释留取的兔血清(稀释浓度分别为1:2.5  $\times 10^3$ , 1:2  $\times 10^4$ , 1:8  $\times 10^4$ , 1:1.6  $\times 10^5$ , 1:3.2  $\times 10^5$ , 1:6.4  $\times 10^5$ 和1:1.28  $\times 10^6$ ) 100  $\mu$ l, 每个浓度设一个复孔, 37 °C孵育2 h。PBST洗板3次, 加入100  $\mu$ l的1:1000稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG, 37 °C孵育1 h。PBST洗板3次, 分别加入50  $\mu$ l的A、B显色液37 °C显色15 min, 终止液终止反应, 490 nm单波长紫外光酶标仪检测。

重组蛋白20  $\mu$ l常规SDS-PAGE凝胶电泳, 行Western blot检测, 220 mA转膜45 min, 分别以体积比1:5  $\times 10^3$ , 1:1  $\times 10^4$ , 1:2  $\times 10^4$ , 1:4  $\times 10^4$ , 1:8  $\times 10^4$ , 1:1.6  $\times 10^5$ 的比例稀释多克隆抗体作为一抗, 二抗为1:2000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG-HRP。ECL发光液暗室显影曝光。

4. Western blot检测C12orf28在各组织的表达状况: 取-80 °C保存的胃、肠、肝、淋巴、胸腺、皮

肤、心肌和肺各组织(组织来自于妇产科引产的死胎,本部分研究经过首都医科大学附属北京地坛医院伦理委员会批准),切取重量约为0.1 mg的组织团块放入研钵,加入少量液氮,迅速研磨。加入预冷的组织裂解液1.5 ml和PMSF 10  $\mu$ l继续用匀浆器在冰上磨碎组织。将磨碎好的组织匀浆冰浴30 min,离心留取上清。BCA试剂盒测定组织蛋白浓度。以体积比1:4加入5倍浓度SDS-PAGE Loading buffer, 99  $^{\circ}$ C煮沸10 min。

以GAPDH为内参,总蛋白终浓度约为6  $\mu$ g加样,SDS-PAGE凝胶电泳。36 W转膜75 min,一抗重组蛋白多克隆抗体1:1000稀释,4  $^{\circ}$ C过夜孵育。PBST洗膜3遍,每遍20 min。二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG-HRP 1:3000孵育50 min, PBST洗膜,方法同上。ECL发光液暗室显影曝光,观察结果。

## 结 果

### 一、C12orf28 C257重组蛋白具有较高的纯度

以人外周血单个核细胞(PBMC) cDNA为模板,PCR获得预期大小771 bp的目的基因片段(见图1A)。经过内切酶*Bam* H I/*Xho* I双酶切和测序结果表明,C12orf28C257已正确插入原核表达载体pET32a (+)中。重组质粒pET32a (+)-C12orf28C257构建成功(见图1B)。

SDS-PAGE电泳结果显示,未诱导BL21菌株无明显目的蛋白表达,诱导组有大量蛋白表达,且4 h即可达到较大表达量(见图2A)。大量诱导的重组蛋白形成包涵体,溶于D液后可得到较纯目的蛋白(见图2B)。Western blot鉴定诱导表达的重组蛋白His标签阳性,且大量表达,非诱导组重组

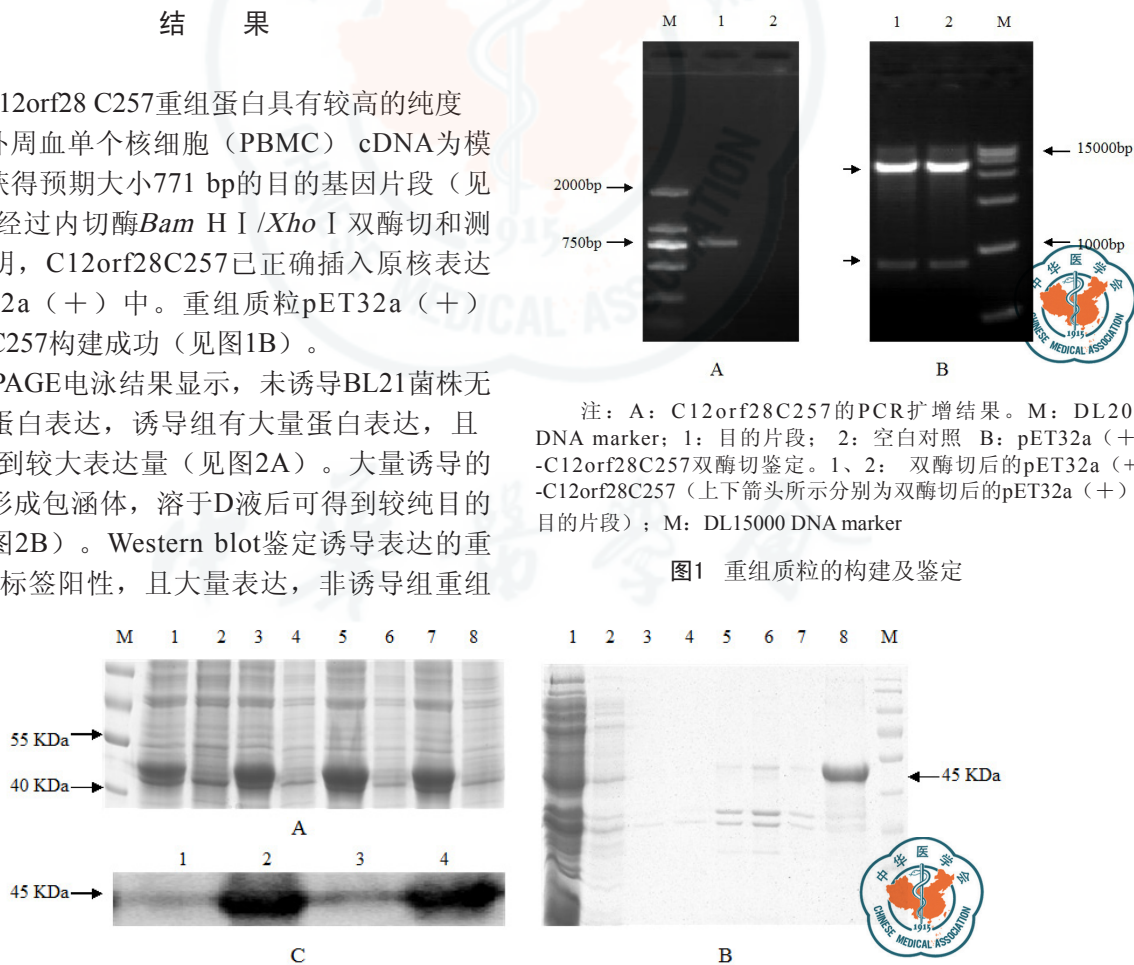
蛋白表达极少(见图2C)。

二、所制备的多克隆抗体具有较高的效价及特异性

ELISA分析结果显示,免疫后抗体效价均值与免疫前相比大于1:2,证明抗体具有较高的效价,效价 $> 1:1.28 \times 10^6$ (见表1)。SDS-PAGE电泳结果显示,抗体纯化后条带清晰,浓度较高,杂带较少(见图3A)。Western blot结果显示多克隆抗体具有较高的特异性,经1:1.6  $\times 10^5$ 稀释后仍显示出清晰的目的条带(见图3B)。

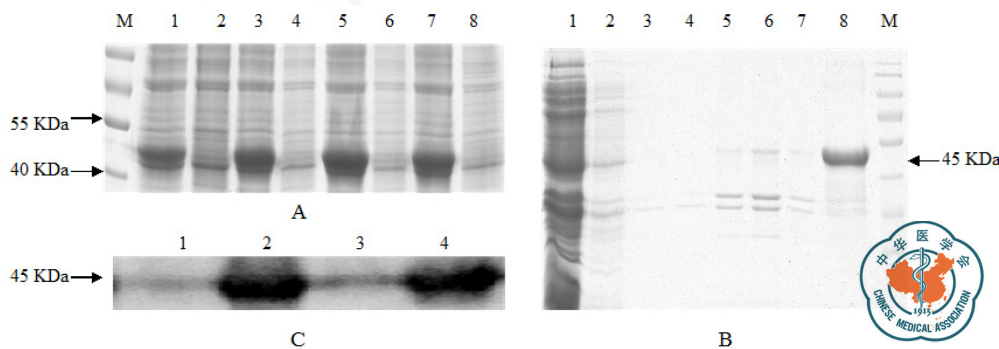
三、C12orf28在免疫相关组织中有不同程度的表达

利用制得的各组织蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳,以所制得的多克隆抗体作为一抗,GAPDH为内参,进行Western blot分析。结果显示,C12orf28可表达于胸腺、淋巴、肠、心脏等组织中,其中胸



注: A: C12orf28C257的PCR扩增结果。M: DL2000 DNA marker; 1: 目的片段; 2: 空白对照 B: pET32a (+)-C12orf28C257双酶切鉴定。1、2: 双酶切后的pET32a (+)-C12orf28C257(上下箭头所示分别为双酶切后的pET32a (+)和目的片段); M: DL15000 DNA marker

图1 重组质粒的构建及鉴定



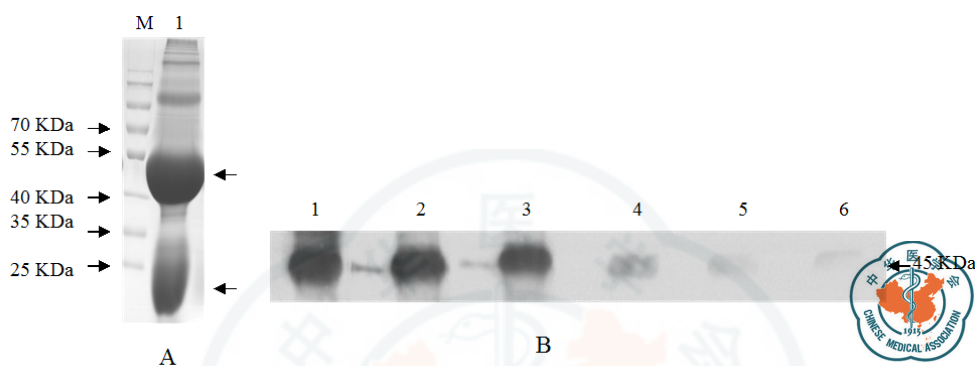
注: A: IPTG诱导与非诱导重组蛋白SDS-PAGE电泳。M: 蛋白marker; 1、3、5、7分别为IPTG诱导后2 h、4 h、6 h、8 h取样; 2、4、6、8分别为对照组培养2 h、4 h、6 h、8 h取样 B: C12orf28C257重组蛋白大量诱导SDS-PAGE电泳。1: A液; 2~4: B液; 5~7: C液; 8: D液(箭头所示为重组目的蛋白); M: 蛋白marker C: C12orf28C257重组蛋白Western blot His标签鉴定。1、3: 未诱导的重组蛋白; 2、4: 经IPTG诱导的重组蛋白

图2 C12orf28C257重组蛋白表达及Western blot鉴定



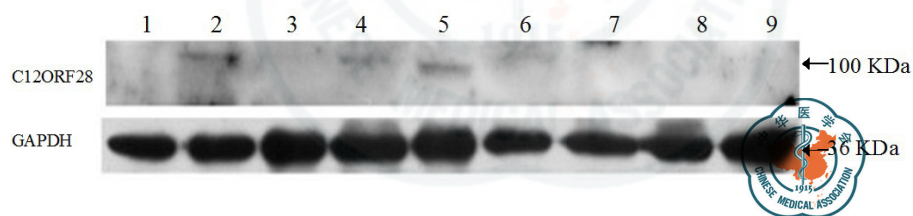
表1 重组蛋白多克隆抗体效价ELISA分析

组别	抗体滴度						
	阴性对照	1:2 × 10 <sup>4</sup>	1:8 × 10 <sup>4</sup>	1:1.6 × 10 <sup>5</sup>	1:3.2 × 10 <sup>5</sup>	1:6.4 × 10 <sup>5</sup>	1:1.28 × 10 <sup>6</sup>
免疫前1	0.133	0.563	0.190	0.146	0.172	0.156	0.128
免疫前2	0.167	0.475	0.177	0.163	0.171	0.132	0.157
第1次免疫1	0.197	4.309	3.572	2.948	1.632	0.891	0.557
第1次免疫2	0.151	3.485	3.623	2.923	1.622	1.145	0.566
第2次免疫1	0.122	3.689	4.039	4.258	4.004	3.301	2.112
第2次免疫2	0.106	4.436	4.226	4.093	4.052	3.312	2.204
第3次免疫1	0.066	5.176	4.095	4.084	4.203	3.745	2.272
第3次免疫2	0.121	5.124	3.840	4.150	3.944	3.851	2.783



注: A: 多克隆抗体SDS-PAGE凝胶电泳。M: 蛋白marker, 1: 重组蛋白多克隆抗体(上下箭头所示分别为多克隆抗体重链及轻链); B: 多克隆抗体Western blot特异性鉴定。1: 一抗稀释比例为1:5 × 10<sup>3</sup>; 2: 一抗稀释比例为1:1 × 10<sup>4</sup>; 3: 一抗稀释比例为1:2 × 10<sup>4</sup>; 4: 一抗稀释比例为1:4 × 10<sup>4</sup>; 5: 一抗稀释比例为1:8 × 10<sup>4</sup>; 6: 一抗稀释比例为1:1.6 × 10<sup>5</sup>

图3 重组蛋白多克隆抗体SDS-PAGE电泳及Western blot鉴定



注: 1: 胃组织; 2: 肠组织; 3: 肝组织; 4: 心肌组织; 5: 胸腺组织; 6: 淋巴组织; 7: 皮肤组织; 8: 肌肉组织; 9: 肺组织

图4 C12orf28在各组织的分布特点

腺组织、肠组织表达水平较高, 心肌组织表达水平较低, 淋巴组织痕量表达, 见图4。

## 讨 论

本研究成功制备了抗人C12orf28多克隆抗体, 该多克隆抗体具有较高的效价和特异性。利用制得的抗体对胚胎不同组织进行Western blot分析显示, C12orf28在免疫相关组织中有不同程度的表达, 其中胸腺组织、肠组织表达水平较高, 淋巴组织表达水平较低。

我国是病毒性肝炎流行主要地区, HBV感染引起的肝损伤的分子机制至今未能很好的阐述, 目前普遍认为其主要与机体的免疫平衡失调密切相关

[5]。淋巴细胞介导的肝损伤在发病过程中发挥重要作用[6-7]。既往研究发现, 感染HBV的动物模型中, 各种免疫相关基因表达量有不同程度的增加[8-9], 但对这些基因的研究尚不能完全阐述HBV感染肝损伤的机制, 新的未知功能相关基因迫切需要发现及研究。

本项目组前期研究发现, 与健康人相比, HBV感染者PBMC中C12orf28转录水平显著增加, Western blot分析显示, C12orf28主要表达于免疫相关组织中, 推测该基因的表达可能与HBV感染免疫调节相关。生物信息学分析显示, C12orf28位于人类第12号染色体q15区, 为编码910个氨基酸的单次跨膜蛋白。其中 628-648 aa为跨膜区, 142-405 aa为DNA结合区, 543-575 aa为卷曲螺旋结构。其所编码蛋白结构与髓鞘基因调节因子相似, 均为单次跨

膜蛋白,且DNA结合区与酵母转录因子Ndt80具有同源性<sup>[10-11]</sup>。因此,推测C12orf28可能与细胞的分化增殖相关。

抗原表位是蛋白质分子中位于分子表面的一段特定的序列。常用的制备蛋白质抗体的方法是预测分析该蛋白质的表位,选取免疫源性高、特异性强的片段构建表达重组蛋白,免疫动物纯化得到多克隆抗体<sup>[12]</sup>。分子质量小的多肽片段难以引发免疫应答,且产生的抗体容易发生交叉反应<sup>[13]</sup>。本研究首先利用BepiPred 1.0 Server分析预测C12orf28的表位,避开跨膜区域,最终选取了C12orf28羧基端257个氨基酸作为候选序列,诱导表达C12orf28C257重组蛋白。将重组蛋白免疫大耳白大白兔,纯化得到重组蛋白多克隆抗体。经ELISA检测和Western blot分析结果显示,所得抗体具有较高的效价和特异性。

原核表达系统目前仍是获得重组蛋白的常用方法,但原核系统缺乏真核系统特有的翻译后加工修饰等过程,因此,表达的蛋白质与天然蛋白有所不同。随着科学技术的发展,原核表达技术不断完善,多种蛋白质的体外表达成为可能<sup>[14]</sup>,相关酶对原核基因的表达调控也在不断研究中<sup>[15]</sup>。

C12orf28为功能未知的基因,本研究结果初步显示,该基因编码蛋白高表达于胎儿胸腺和肠组织,在心肌组织中等程度的表达,在淋巴结中微量表达。提示该基因编码的膜蛋白可能与免疫功能调节有关。

## 参 考 文 献

- 1 Liang X, Bi S, Yang W, et al. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China--declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination. *Vaccine*,2009,27(47):6550-6557.
- 2 Lu FM, Zhuang H. Management of hepatitis B in China. *Chin Med J (Engl)*,2009,122(1):3-4.

- 3 Stross L, Gunther J, Gasteiger G, et al. Foxp3+ regulatory T cells protect the liver from immune damage and compromise virus control during acute experimental hepatitis B virus infection in mice. *Hepatology*,2012,56(3):873-883.
- 4 Fiscaro P, Valdatta C, Boni C, et al. Early kinetics of innate and adaptive immune responses during hepatitis B virus infection. *Gut*,2009,58(7):974-982.
- 5 Bertolotti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. *Gut*,2012,61(12):1754-1764.
- 6 Lou YF, Dong W, Ye B, et al. Changes in peripheral T-lymphocyte subsets in acute-on-chronic liver failure patients with artificial liver support system. *Hepatogastroenterology*,2012,59(115):814-817.
- 7 Elahi S, Horton H. Association of HLA-alleles with the immune regulation of chronic viral infections. *Int J Biochem Cell Biol*,2012,44(8):1361-1365.
- 8 Lutgehetmann M, Bornscheuer T, Volz T, et al. Hepatitis B virus limits response of human hepatocytes to interferon- $\alpha$  in chimeric Mice. *Gastroenterology*,2011,140(7):2074-2083.
- 9 Hu J, Gao DZ. Distinction immune genes of hepatitis-induced hepatocellular carcinoma. *Bioinformatics*,2012,28(24):3191-3194.
- 10 Koenning M, Jackson S, Hay CM, et al. Myelin gene regulatory factor is required for maintenance of myelin and mature oligodendrocyte identity in the adult CNS. *J Neurosci*,2012,32(36):12528-12542.
- 11 Winter E. The Sum1/Ndt80 transcriptional switch and commitment to meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*,2012,76(1): 1-15.
- 12 Dang S, Bu D, Hong T, et al. A polyclonal antibody against active C-terminal ADAMTS-18 fragment. *Hybridoma (Larchmt)*,2011,30(6):567-569.
- 13 Moretti L, Medeiros LJ, Kunkalla K, et al. N-terminal PAX8 polyclonal antibody shows cross-reactivity with N-terminal region of PAX5 and is responsible for reports of PAX8 positivity in malignant lymphomas. *Mod Pathol*,2012,25(2):231-236.
- 14 Vijayachandran LS, Viola C, Garzoni F, et al. Robots, pipelines, polypeptides: enabling multiprotein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *J Struct Biol*,2011,175(2):198-208.
- 15 Burnside K, Rajagopal L. Regulation of prokaryotic gene expression by eukaryotic-like enzymes. *Curr Opin Microbiol*,2012,15(2):125-131.

(收稿日期: 2013-05-08)

(本文编辑: 孙荣华)

任慧, 李红敏, 乔雍, 等. 免疫调控相关基因C12orf28在免疫组织中的分布特征[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(6): 792-796.