

O-GlcNAcase 抗原片段的选择、优化表达和多克隆抗体的制备

林霖^{1*}, 李国超^{1*}, 李中华¹, 徐奕¹, 田高飞¹, 李静¹, 刘艳玲²

1 南开大学药学院 元素有机化学国家重点实验室, 天津 300071

2 莱芜职业技术学院信息工程系, 莱芜 271100

摘要: 为了探讨 *O*-GlcNAc 修饰的生物学作用和相关疾病的发病机理, 需制备高效、专一的 *O*-GlcNAcase (OGA) 抗体。通过对人源 OGA 蛋白进行序列分析发现, 氨基端 1~350 aa 片段 (sOGA) 抗原性和亲水性较强, 将该片段构建至原核表达载体 pET-28a, 并在大肠杆菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中进行诱导表达, 通过优化 IPTG 浓度 (0.05 mmol/L) 和诱导时间 (10 h) 获得了高可溶性表达的重组蛋白酶。采用 Ni-NTA 亲和层析和分子筛层析对重组蛋白进行了纯化, SDS-PAGE 检测分子量的大小 (45 kDa) 和纯度 (95% 以上)。以 4-MU-*O*-GlcNAc 为荧光底物, 检测到 sOGA 的糖苷酶活性为 106 nmol/(min·mg), 表明该片段是 OGA 糖苷酶的活性区域。以此片段作为抗原免疫新西兰大白兔, 以 CNBr 活化 Sepharose 4B 微珠纯化抗血清制备 OGA 特异性多克隆抗体。Western blotting 和 ELISA 检测表明, 该抗体可以特异识别含有 OGA 糖苷酶活性区域的多克隆抗体, 检测灵敏度为 0.11 ng/mL (效价为 1 : 80 000), 可应用于 *O*-GlcNAcase 生物功能研究。

关键词: *O*-GlcNAcase, 表达, 生物活性, 多克隆抗体, 亲和纯化

Antigen selection, optimized expression and polyclonal antibody preparation of *O*-GlcNAcase

Lin Lin^{1*}, Guochao Li^{1*}, Zhonghua Li¹, Yan Xu¹, Gaofei Tian¹, Jing Li¹, and Yanling Liu²

1 College of Pharmacy and State Key Laboratory of Element-Organic Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China

2 Department of Information Engineering, Laiwu Vocational and Technology College, Laiwu 271100, China

Abstract: In order to probe the biological function of *O*-GlcNAc and the pathogenesis of associated diseases, it is essential to prepare a potent and specific *O*-GlcNAcase (OGA) antibody. Based on protein sequence analysis, we found N terminal

Received: January 19, 2011; **Accepted:** April 6, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31000371, 91013013), Fundamental Research Funds for the Central University (No. 65011091).

Corresponding author: Jing Li. Tel/Fax: +86-22-23507880; E-mail: jinglink@nankai.edu.cn
Yanling Liu. E-mail: lyling9030@163.com

*These authors contributed equally to this study.

国家自然科学基金 (Nos. 31000371, 91013013), 中央高校基本科研业务费 (No. 65011091) 资助。

1–350 amino acids of OGA (sOGA) has high antigenicity and hydrophilicity and then constructed it into plasmid pET28a vector. First, we optimized the expression of sOGA in *Escherichia coli* BL21(DE3) (0.05 mmol/L IPTG, 10 hours) and purified it with the Ni-NTA affinity chromatography and size exclusion chromatography respectively. SDS-PAGE verified the molecular weight (45 kDa) and the purity (>95%) of sOGA and the purified protein was subjected to immunize New Zealand rabbits. Finally, we obtained OGA polyclonal antibody by affinity purifying the antiserum with CNBr-activated Sepharose 4B beads. Western blotting and ELISA assay showed that this antibody could recognize three OGA isoforms with high specificity and the sensitivity was 0.11 ng/mL (the titer was 1:80 000). These results indicated the prepared polyclonal antibody of OGA can be used for the biological function study of OGA.

Keywords: O-GlcNAcase, expression, biological activity, polyclonal antibody, affinity purification

N-乙酰葡萄糖胺 (*O*-GlcNAc) 糖基化是近年来发现的一种通过 *O*-糖苷键将单个 *N*-乙酰氨基葡萄糖 (GlcNAc) 连接到蛋白质丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 羟基上的蛋白质翻译后修饰^[1]。该修饰主要发生于细胞核和细胞质中, 是一种动态、可诱导、可调控的修饰方式, 这一特性与蛋白质的磷酸化相似^[2]。它广泛存在于真核细胞及能感染真核生物的病毒中, 现已发现 1 000 多种 *O*-GlcNAc 修饰的蛋白, 如微管相关蛋白 Tau、抑瘤因子 p53、胰岛素受体底物蛋白 IRS-1 等, 从而在基因转录、蛋白翻译、信号传导、细胞周期调控和应激反应中起着重要的作用^[2-3], 因此 *O*-GlcNAc 代谢的失衡将导致神经退行性疾病、II 型糖尿病、癌症等许多重大疾病的发生^[4]。

O-GlcNAcase (OGA) (EC 3.2.1.52) 是一种存在于细胞质、细胞核中的己糖胺酶, 在哺乳动物的各种组织中均有存在, 但是在脑、胎盘、胰腺中的丰度最高^[5]。1994 年, Dong 等在大鼠脾脏中提取纯化出该种酶, 并被命名为氨基己糖苷酶 C (Hexosaminidase C, HEXC)^[6]; 2001 年 Gao 等在牛脑和人脑中克隆出其基因序列^[5]。一级序列分析显

示, *OGA* 基因与 1998 年发现的脑膜瘤表达抗原 *MGEA5* 基因序列完全相同, 定位于人 10 号染色体 (10q24.1~q24.3), 而这一区域与 Alzheimer 疾病密切相关, 另外也有证据表明 *MGEA5* 基因的单核苷酸多态性与墨西哥人群 II 型糖尿病的发生相关^[5]。将线虫 *OGA* 编码基因敲除以后, 线虫的核孔蛋白和大量胞质蛋白的 *O*-GlcNAc 水平增加, 糖原合成酶激酶 3- β (Glycogen synthase kinase 3- β , GSK 3- β) 的表达增加, 糖原和海藻糖的积累增加, 脂类储存下降, 体内代谢和信号传递呈现非胰岛素依赖的 II 型糖尿病模式^[7]。*OGA* 的基因定位及基因敲除线虫的表型表明, *OGA* 与 Alzheimer 疾病及 II 型糖尿病密切相关, 该酶的调节可能涉及二者的发病机理^[8]。

本课题组 Li 等对人源 OGA 存在的变体进行了研究, 包括全长 OGA (fOGA, full-length OGA)、变体 OGA (vOGA, spliced variant OGA) 和小片段 OGA (sOGA, shortest OGA), 它们都存在一共有保守糖苷酶区域, 另外, fOGA 的 C 端与乙酰基转移酶有较高的同源性 (图 1)^[9]。然而针对各变体的定位、调控及对目标蛋白识别机制的研究报道较少。

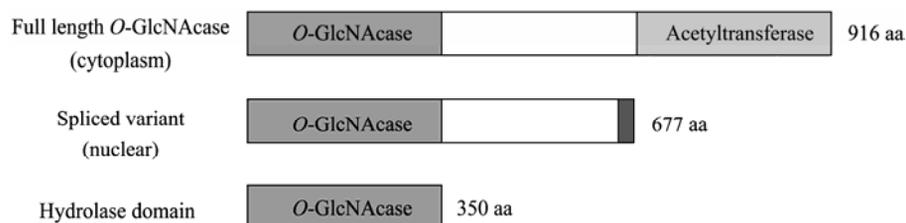


图 1 人 OGA 的三种变体^[9]

Fig. 1 Three isoforms of human OGA^[9].

fOGA 由 916 个氨基酸组成,在大肠杆菌中表达后,大部分以包涵体的形式存在,使用切胶回收后的蛋白作为抗原,步骤繁琐,且成功率较低^[10]。而使用多肽偶联载体蛋白的方法制备的抗体特异性较差^[11]。因此,至今未有商业化 OGA 抗体的出现,限制了 OGA 代谢调控及相关生物学研究。为了更好研究 OGA 的生物学作用,本实验对 OGA 进行抗原性和亲水性分析,选择 N 端 1~350 aa (sOGA) 作为抗原,在大肠杆菌中进行表达;经过多种条件优化,我们获得了大量可溶性好、纯度高的 sOGA;并以此免疫新西兰大耳白兔制备 OGA 的多克隆抗体。抗体的 ELISA 和 Western blotting 检测结果表明该抗体可以有效、特异识别 OGA 的多种变体,可以应用于 OGA 的生物学研究中。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pET-28a 和大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)均为本实验室保存。人源 OGA cDNA (GenBank Accession No. AB014579) 重组质粒 pET32a-fOGA 由美国 Johns Hopkins 大学 G.W.Hart 教授惠赠。DNA 限制性内切酶 *Not* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司。Ex Taq DNA 聚合酶、Agarose Gel DNA Purification Kit、MiniBEST Plasmid Purification Kit 购自 TIANGEN 公司。1 kb DNA Ladder Marker 购自 Fermentas 公司。宽范围蛋白 Marker 购自 NEB 公司。酵母提取物 (Yeast extract) 和胰化蛋白胨 (Tryptone) 购自 Oxoid 公司。HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自 CWBIO 公司,弗氏完全及不完全佐剂为 Pierce 公司产品。CnBr 活化的 Sepharose 4B Ni-NTA 亲和柱及 Superdex75 分子筛柱为 GE Healthcare 公司产品。PVDF 薄膜为 Osmonics 公司产品,PCR 引物及重组质粒测序由华大基因完成。其余试剂均为国产分析纯。试验动物新西兰大耳白兔 2 只,体重约 2.0 kg,购于北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂。

1.2 引物的设计和 sOGA 片段的扩增

根据人 OGA 基因全长 cDNA 序列,设计 N 端 1~350 aa (sOGA) 原核表达引物,序列如表 1 所示。以质粒 pET32a-fOGA 为模板进行 PCR 扩增,产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收目的片段。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward	CGCGCGGCCCGCGTGCAGAAGGAGAGTCAA
Reverse	GCGCTCGAGTTAATCTTCACTGTCAGTCATC

1.3 重组表达载体的构建

用限制性内切酶 *Not* I 和 *Xho* I 酶切验证回收后的 PCR 产物和质粒 pET-28a,将 sOGA 片段和 pET-28a 酶切产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收后,分别取 4 μ L sOGA 基因与 2 μ L 载体 pET-28a,用 T4 DNA 连接酶于 16 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接后的产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,接种于含 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 平板上培养,次日挑取单克隆菌扩大培养后,试剂盒提取质粒 DNA,利用双酶切和 PCR 鉴定重组质粒 pET-28a-sOGA,酶切和 PCR 扩增后的产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行分析^[12]。

1.4 抗原片段的优化表达和纯化

将阳性克隆接种于 5 mL 含有 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜培养。次日,吸取 100 μ L 培养物加入到 10 mL 的新鲜培养基中。37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养至 $OD_{600}=0.6\sim 0.8$ 左右,添加 IPTG 至终浓度为 0.01~0.05 mmol/L,13 $^{\circ}$ C、110 r/min 继续培养 5~15 h,离心收集菌体,超声波破碎后采用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白表达情况^[12]。

利用优化好的 IPTG 浓度和诱导时间,进行大量培养。诱导后的菌液在 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 20 min,收集菌体。按照每克湿菌体加入 10 mL PBS (pH 7.4) 柱平衡缓冲液,量充分悬浮菌体,在冰浴条件下超声破碎菌体 (160 W,工作 4 s,间歇 7 s,共 99 次),然后 4 $^{\circ}$ C、16 000 r/min 离心 30 min,收

集上清液。将上清液加至预先用平衡缓冲液充分平衡好的 Ni-NTA 亲和层析柱 (1 mL), 并用平衡缓冲液淋洗 10 个柱体积, 然后换用含不同浓度咪唑的平衡缓冲液洗脱 sOGA 蛋白, 收集各组分。采用超滤法 (Millipore, 截留分子量 10 000 kDa) 对纯化后的蛋白更换缓冲液至低盐 PBS (pH 7.4) 进行浓缩后, 使用 FPLC purifier 系统将蛋白样品上样至 superdex75 (120 mL) 柱进行分子筛层析纯化。各组分取样进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。蛋白浓度采用 BCA 法测定。

1.5 OGA 糖苷酶酶活测定

酶活测定使用 Macauley 等^[13]的方法。在缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 ; 100 mmol/L NaCl 和 0.1% 牛血清白蛋白, pH 6.5) 中, 以 4-MU-GlcNAc 作为荧光底物进行酶活检测。添加 1~3 μL 酶的反应混合物, 在 37 $^\circ\text{C}$ 下孵育 4~30 min, 然后加入 150 μL 的 200 mmol/L 甘氨酸 (pH 10.75) 来终止酶促反应。使用 CARY Eclipse 型荧光分光光度计 96 孔板系统, 在激发波 368 nm, 发射波 450 nm 条件下进行检测, 测定不同稀释浓度 4-MU (4-methylumbelliferone) 的荧光值, 制作标准曲线, 将检测获得的酶促反应的荧光值以此为对照进行计算, 所有的实验都在相同条件下重复 3 次。

1.6 OGA 多克隆抗体血清的制备及效价测定

首次免疫将纯化后的 sOGA 溶液加等体积弗氏完全佐剂乳化后, 皮下多点注射。第 2 (第 21 天)、3 次 (第 35 天) 免疫目的蛋白与等体积弗氏不完全佐剂混合, 皮下多点注射。免疫 10 d 后, 每只兔子耳缘静脉取血 0.5~1 mL, 分离抗血清, 间接 ELISA 检测免疫后血清效价。

用纯化的重组 sOGA 包被酶标板 (0.2 $\mu\text{g}/\text{孔}$), 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜; PBST 洗涤 3 次 (每次振板 5 s); 5% 脱脂奶封闭 (300 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^\circ\text{C}$, 封闭 2 h); PBST 洗涤 3 次; 将待检测抗血清按设计稀释度 (1:1 000、1:3 000、1:9 000、1:27 000、1:81 000、1:243 000, 1:729 000) 稀释后加入酶标板中,

100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 1 h; 阴性对照为免疫前血清, 按 1:1 000 倍稀释, 空白对照为 PBS、PBST 洗涤; 将 HRP 标记的山羊抗兔 IgG (1:10 000) 稀释后加入酶标板, 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$, 37 $^\circ\text{C}$, 孵育 40 min, PBST 洗涤, TMB 显色, 酶标仪测 450 nm 波长的 OD 值。

效价达到指标后, 以心脏穿刺的方法采全血, 分离抗血清。

1.7 OGA 多克隆抗体的纯化及效价测定

抗原亲和柱制备: 用活化缓冲液将 CnBr Sepharose 4B 充分活化, 平衡活化的 CnBr 凝胶至基线平稳, 将抗原 sOGA 加入平衡好的凝胶中, 常温旋转反应 2 h, 加入封闭缓冲液常温旋转反应 1 h, 封闭剩余活化基团, 用洗脱缓冲液洗柱。

特异性抗体纯化: 用结合缓冲液平衡抗原亲和柱至基线平稳, 将抗血清负载上柱, 收集流穿液; 将流穿液再次上柱, 继续平衡至基线平稳, 加入洗脱缓冲液洗脱, 收集洗脱峰, SDS-PAGE 检测纯度。用 10 mmol/L PBS (pH 7.2) 透析收集的洗脱液, 浓缩透析后的抗体, 测定浓度。

效价测定: 用纯化的 sOGA 蛋白包被酶标板, 用间接 ELISA 技术 (同上) 测定抗体效价。

1.8 OGA 多克隆抗体的 Western blotting 分析

蛋白样品经 SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶 (溶于 TBST 中) 4 $^\circ\text{C}$ 封闭过夜, TBST 洗膜后加入抗 OGA 多克隆抗体 (1:5 000), 室温反应 1.5 h。TBST (25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 50 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20) 洗涤 3 次, 10 min/次, 1:3 000 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体, 室温孵育 1.5 h, TBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 洗涤后加 ECL 使 X 光胶片感光, 检测抗体的特异性^[12]。

2 结果与分析

2.1 人源 OGA 基因片段 (aa1-350, sOGA) 的获得和载体构建

以人源 OGA cDNA 为模板, 设计针对 N 端

1~350 aa 的引物进行 PCR 扩增, 经过 PCR 扩增后的产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析, PCR 扩增后的产物大小约为 1 050 bp (图 2), 与 *sOGA* 基因的理论大小相符合。

将回收后的 PCR 产物采用限制性内切酶 *Not* I 和 *Xho* I 酶切, 然后与经过 *Not* I 和 *Xho* I 酶切后的表达载体 pET-28a 连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 挑取单菌落提取质粒, 采用 *Not* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定 (图 2), 酶切后的质粒在相同位置也出现大小一致的片段, 说明目的基因片段与表达载体连接正确, 表达载体 pET-28a-*sOGA* 的构建是成功的。DNA 序列测定结果证实: 扩增序列与人源 *OGA* cDNA 序列一致。

2.2 *sOGA* 的优化表达和纯化

通过控制不同 IPTG 浓度、不同诱导时间等因素对 *sOGA* (1~350 aa) 片段进行诱导表达条件的优化, 使其在尽可能少形成包涵体的情况下有较高的可溶性表达。通过 SDS-PAGE 电泳 (图 3A) 分析, 发现诱导后的 *sOGA* 在 45 kDa 处出现一条带, 与预期大小一致。同时确定 *sOGA* 的最佳诱导表达条件分别为: 0.05 mmol/L IPTG, 13 $^{\circ}$ C, 110 r/min, 10 h。

按照优化后的诱导表达条件, 进行扩大培养。收集菌体后经过超声破碎、高速离心, 将上清液过 Ni

亲和层析柱和分子筛层析进行纯化, 经 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝染色检测, 结果表明实验获得了纯度较高的 His 标签融合 *sOGA* 蛋白 (纯度 > 95%), 产率达 8 g/L (图 3B)。

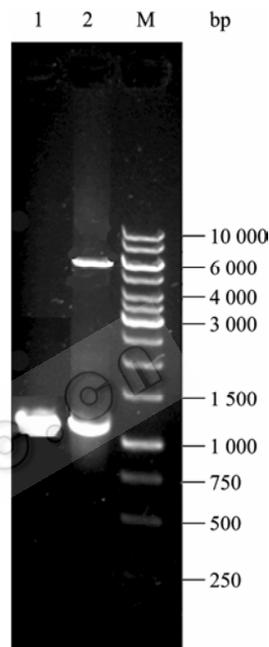


图 2 表达载体的构建及酶切鉴定

Fig. 2 Construction and digestion analysis of pET-28a-*sOGA* recombinant plasmid. 1: PCR result of *sOGA*; 2: pET-28a-*sOGA* digested with *Not* I and *Xho* I; 3: DNA marker (GeneRuler TM 100 bp).

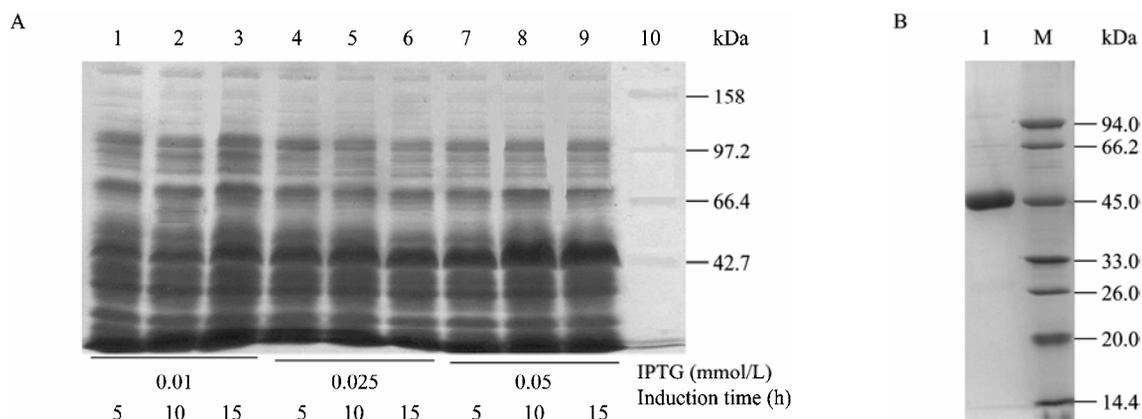


图 3 *sOGA* 的优化表达和纯化

Fig. 3 Optimized expression and purification of *sOGA*. (A) 1: 0.01 mol/L IPTG, 5 h; 2: 0.01 mmol/L IPTG, 10 h; 3: 0.01 mmol/L IPTG, 15 h; 4: 0.025 mmol/L IPTG, 5 h; 5: 0.025 mmol/L IPTG, 10 h; 6: 0.025 mmol/L IPTG, 15 h; 7: 0.05 mmol/L IPTG, 5 h; 8: 0.05 mmol/L IPTG, 10 h; 9: 0.05 mmol/L IPTG, 15 h; 10: protein marker. (B) 1: *sOGA*; 2: protein marker.

2.3 sOGA 糖苷酶学特性检测

由于 Ni^{2+} 纯化洗脱液含有较多的咪唑，可能影响后期酶活测定结果。因此我们选用超滤管更换缓冲液，将酶更换至新缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.0) 中，然后利用系列浓度 (5 mmol/L, 2.5 mmol/L, 1.25 mmol/L, 0.625 mmol/L, 0.312 5 mmol/L, 0.156 25 mmol/L) 的底物 4-MU-O-GlcNAc, 测定 sOGA 片段的 Lineweaver-Burk 曲线 (如图 4), 经测定 sOGA 的 K_m 为 1.84 mmol/L, 催化活性为: 106 nmol/(min·mg)。表明 sOGA 片段是糖苷酶活性中心, 可以以此片段为抗原制备 OGA 抗体。

2.4 OGA 多克隆抗体的制备、纯化和效价检测

利用抗原活化了的 Sepharose 4B 微珠与抗体结合的特性, 从免疫后的兔血清中纯化 IgG, 取 10 μL 纯化后的 OGA 多克隆抗体, 进行 SDS-PAGE 电泳检测 (图 5), 考马斯亮蓝染色后发现有一条 50 kDa

的条带, 定量测定纯化后的抗体浓度为 3.75 mg/mL。

用间接 ELISA 方法对亲和纯化后的抗体进行了效价检测 (表 2), 鉴于 OD_{450} 值为阴性对照孔 OD_{450} 值的 2.1 倍以上即为阳性的原则, 认为 sOGA 抗原亲和纯化兔多克隆抗体的检测灵敏度 0.11 ng/mL, 抗血清的稀释度为 1:80 000。

表 2 ELISA 检测抗体效价

Table 2 ELISA analysis of the titer of OGA polyclonal antibody

Concentration (ng/mL)	OD_{450}
80	3.501
27	3.501
9	3.187
3	1.145
1	0.868
0.331	0.560
0.11	0.240
PBS	0.089

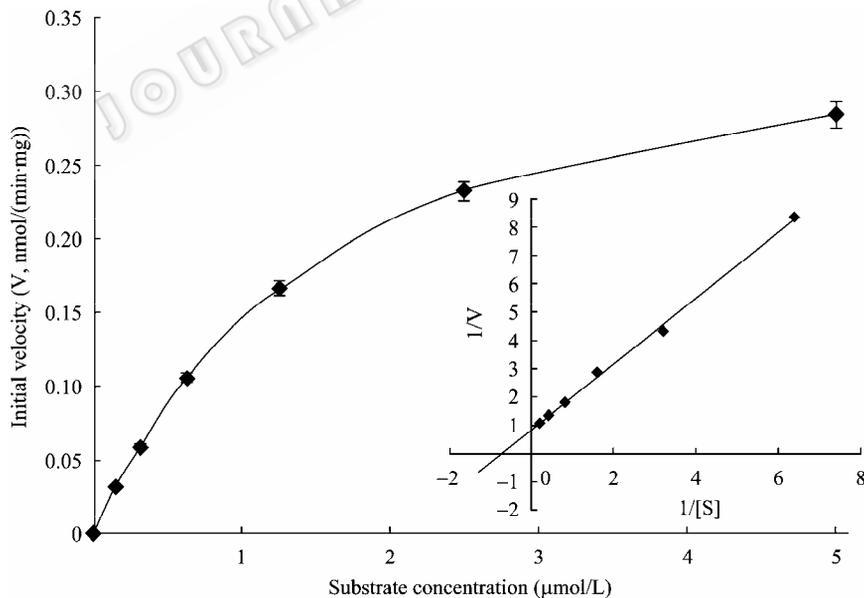


图 4 sOGA 的酶活测定和 Lineweaver-Burk 测定

Fig. 4 An activity curve and a Lineweaver-Burk plot were generated by varying concentrations of substrate (4-MU-GlcNAc).

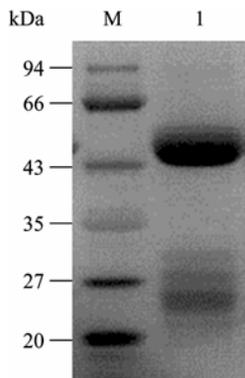


图5 亲和纯化后的 OGA 多克隆抗体

Fig. 5 Purified Anti-sOGA polyclone antibody. M: protein marker; 1: anti-sOGA polyclone antibody.

2.5 OGA 多克隆抗体特异性检测

为检测纯化后 OGA 多克隆抗体的特异性, 分别取过表达不同人源 OGA 变体蛋白 fOGA (1~916 aa), vOGA (1~677 aa), sOGA (1~350 aa) 的大肠杆菌细胞裂解液 50 μ g 上样, 进行 SDS-PAGE (10%) 分离, 用制得的抗体进行免疫印迹检测 (图 6)。结果发现, 不同 OGA 变体在相应大小 (150 kDa, 98 kDa, 45 kDa) 处均检测到特异性条带, 而转化空质粒的大肠杆菌细胞裂解液未有明显的杂交带, 表明抗体具有很好的特异性, 并能识别不同变体的 OGA, 可以应用于 OGA 的细胞生物学研究。

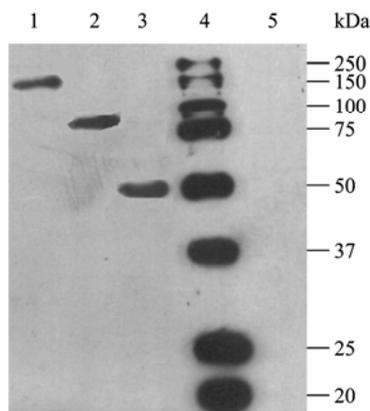


图6 抗 OGA 多克隆抗体的特异性检测

Fig. 6 Identification of the specificity of OGA polyclonal antibody. 1: fOGA; 2: vOGA; 3: sOGA; 4: protein marker; 5: control.

3 讨论

人源 *O*-GlcNAcase 在细胞中存在 2 种不同大小的变体, 全长 (fOGA) 含有 916 个氨基酸, 存在 2 个结构域: 氨基端约 (1~350 aa) 具有 β -N-乙酰葡萄糖苷酶活性, 羧基端 (活性中心约为 592~916 aa) 被推测可能具有组蛋白乙酰基转移酶 (HAT) 活性; 而变体 (vOGA) 由于剪切机制不同, 只含有 N 端 677 个氨基酸, 缺少 HAT 结构域。sOGA 是含有 350 个氨基酸的最小糖苷酶活性中心。由于缺少有效的 OGA 抗体, 3 种变体 OGA 的调控及相关疾病机理的研究受到较大的限制。

我们先前的研究表明, fOGA 的 N 端 1~350 aa (sOGA), 在大肠杆菌中易于表达纯化, 并且软件预测发现该片段具有较好的免疫原性和亲水性。因此, 我们选取 sOGA 作为抗原。首先将其构建到 N 端含有 6 个 His 标签的原核表达载体 pET-28a 中; 设立不同的诱导条件优化 pET-28a-sOGA 的表达; 然后选择可溶性表达最好的条件进行大量表达; Ni 柱亲和纯化和分子筛层析后, 获得了大量高纯度的 sOGA 蛋白; 通过测定 sOGA 的糖苷酶活, 确定该片段是糖苷酶活性中心, 可以用来制备 OGA 变体的抗体。最后以其作为抗原免疫兔子制备得到了 OGA 多克隆抗体。抗体经亲和纯化后, ELISA 法测定抗体效价较高 (1:80 000); Western blotting 方法检测到, 不同大肠杆菌表达的重组 OGA 变体 (fOGA、vOGA 和 sOGA), 均可以与制备抗体产生预期杂交特异带。实验结果表明, 以 sOGA 为抗原制备的抗体, 可以高效、特异地识别 OGA 变体。

OGA 是 *O*-GlcNAc 糖基化修饰中的关键酶, 业已证明该酶的调控可能与 Alzheimer 疾病及 II 型糖尿病的发病机理相关^[15-17]。Tau 蛋白的异常过度磷酸化是 Alzheimer 疾病过程中的关键事件^[3], 然而最近研究发现 Tau 蛋白除被磷酸化修饰外, 也被 *O*-GlcNAc 糖基化修饰 (大约 12 个位点: Thr231、Ser262、Ser396、Ser422 等), 且这些位点的

O-GlcNAc 修饰与磷酸化存在竞争性的关系^[3], 因此 OGA 活性的降低或失调可能是导致该疾病的原因。

本实验制备的 OGA 多克隆抗体可以应用于 Alzheimer 疾病的生物学试验中, 为深入研究 OGA 的调控机制及功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes: evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*, 1984, 259(5): 3308–3317.
- [2] Wells L, Vosseller K, Hart GW. Glycosylation of nucleocytoplasmic proteins: signal transduction and *O*-GlcNAc. *Science*, 2001, 291(5512): 2376–2378.
- [3] Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked β -*N*-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*, 2007, 446(7139): 1017–1022.
- [4] Zeidan Q, Hart GW. The intersections between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation: implications for multiple signaling pathways. *J Cell Sci*, 2010, 123: 13–22.
- [5] Gao Y, Wells L, Comer FI, et al. Dynamic *O*-glycosylation of nuclear and cytosolic proteins: cloning and characterization of a neutral, cytosolic beta-*N*-acetylglucosaminidase from human brain. *J Biol Chem*, 2001, 276: 9838–9845.
- [6] Dong DL, Hart GW. Purification and characterization of an *O*-GlcNAc selective *N*-acetyl-beta-D-Glucosaminidase from rat spleen cytosol. *J Biol Chem*, 1994, 269(30): 19321–19330.
- [7] Forsythe ME, Love DC, Lazarus BD, et al. *Caenorhabditis elegans* ortholog of a diabetes susceptibility locus: *oga-1* (*O*-GlcNAcase) knockout impacts *O*-GlcNAc cycling, metabolism, and dauer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(32): 11952–11957.
- [8] Mondoux MA, Krause MW, Hanover JA. *C. elegans* genetic networks predict roles for *O*-GlcNAc cycling in key signaling pathways. *Curr Signal Transd Ther*, 2010, 5(1): 60–73.
- [9] Li J, Huang CL, Zhang LW, et al. Isoforms of human *O*-GlcNAcase show distinct catalytic efficiencies. *Biochemistry (Moscow)*, 2010, 75(7): 938–943.
- [10] Crawford GL, Hart GW, Whiteheart SW. Murine platelets are not regulated by O-linked β -*N*-acetylglucosamine. *Archives Biochem Biophys*, 2008, 474(1): 220–224.
- [11] Lee TN, Alborn WE, Knierman MD, et al. The diabetogenic antibiotic streptozotocin modifies the tryptic digest pattern for peptides of the enzyme *O*-GlcNAc-selective *N*-acetyl- β -D-gluco saminidase that contain amino acid residues essential for enzymatic activity. *Biochem Pharmacol*, 2006, 72(6): 710–718.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 19–20.
- [13] Macauley MS, Whitworth GE, Debowski AW, et al. *O*-GlcNAcase uses substrate-assisted catalysis Kinetic analysis and development of highly selective mechanism-inspired inhibitors. *J Biol Chem*, 2005, 280: 25313–25322.
- [14] Butkinaree C, Cheung WD, Park S, et al. Characterization of β -*N*-Acetylgluco saminidase cleavage by caspase-3 during apoptosis. *J Biol Chem*, 2008, 283(35): 23557–23566.
- [15] Brimble, S, Wollaston H, Edith ET, et al. The role of the *O*-GlcNAc modification in regulating eukaryotic gene expression. *Curr Signal Transduct*, 2010, 5(1): 12–24.
- [16] Dentin R, Hedrick S, Xie JX, et al. Hepatic glucose sensing via the CREB coactivator CRTC2. *Science*, 2008, 319(5868): 1402–1405.
- [17] Kang JG, Park SY, Ji S, et al. *O*-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem*, 2009, 284: 34777–34784.