

果蝇中 Ecp 蛋白的表达、纯化与抗体制备

汪道涌 刘 莉 谢 维*

(东南大学遗传与发育生物学系,遗传学研究中心,南京 210009)

摘 要 获得特异性抗 Ecp 多克隆抗体,为进一步研究 *ecp* 的功能奠定基础。利用特异引物,通过 RT-PCR 扩增出编码 Ecp 蛋白的全长 cDNA,克隆至谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白表达载体 pGEX-4T-1(His)₆C 中,转染大肠杆菌 DH 5 α 经诱导表达后,利用谷胱甘肽琼脂糖珠从细胞裂解物中特异吸附融合蛋白,经凝血酶裂解,释放出 Ecp 蛋白,再经 Ni-NTA 亲和层析,最终获得高纯度的 Ecp 蛋白。用纯化的 Ecp 蛋白免疫新西兰家兔,亲和层析纯化抗 Ecp 抗体。利用该抗体进行的 Western Blot 结果表明:Ecp 蛋白在野生型黑腹果蝇胚胎、三龄幼虫神经系统、成虫、成虫头部组织中均有明显表达,提示 *ecp* 可能是一个重要的管家基因。

关键词 *ecp*, 克隆, 表达, 抗体制备, 黑腹果蝇

中图分类号 Q71 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)03-0291-03

我们从野生型黑腹果蝇胚胎 cDNA 文库中筛选得到一个新的未知功能基因,命名为 *ecp*(eIF₅C containing protein, GenBank 登陆号:AF325529)。该基因 cDNA 全长 1572bp,含有一个 1269bp 的开放阅读框,编码 422 个氨基酸的蛋白质。Blast 结果表明:Ecp 蛋白与 BZAP45、Bdm2 及 HSPC028 蛋白氨基酸序列高度同源。这些蛋白在 N-端有一个亮氨酸拉链结构域,C-端有一个核苷酸(ATP 或 GTP)结合结构域。BZAP45 能强烈地激活组蛋白 H4 的表达,推测它是 G1/S 转换过程中的调节因子,在细胞周期调控中具有重要作用^[1]。*bdm2* 则可能是一个与神经细胞的增殖和分化有关的基因^[2]。根据同源性比较的结果,我们初步推测:Ecp 可能是一个与细胞生长增殖调控有关的基因,在果蝇的生长发育中具有重要的意义,其具体功能有待深入研究。本文涉及的工作主要包括:在大肠杆菌中表达并纯化 Ecp 蛋白,免疫家兔,纯化了高滴度、高特异性的抗 Ecp 抗体,并用该抗体初步检测了 Ecp 在果蝇中的表达情况。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物 新西兰家兔购自本校动物房。

1.1.2 菌株和质粒:宿主菌 *E. coli* DH 5 α 、质粒 pGEX-4T-1(His)₆C 由本室保存。

1.1.3 试剂和工具酶类:本实验中所使用的限制酶、DNase I、DNA 连接酶、PCR 扩增试剂盒等均为 Promega 公司产品,凝血酶、IPTG 为 Sigma 公司产品, Sepharose 4B-GSH、Ni-NTA agrose 为 Pharmacia 公司产品,其他常用试剂为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方 法

1.2.1 PCR:按照我们发表的 *ecp* cDNA 序列(Genbank 登录号 AF325529)设计一对引物如下:

P1: CGGGATCCATGAGTCAAAAACTAGACCAG (画线部分为 *Bam*H I 位点)

P2: GGAGCTCCTCGCCATTCTTTTGTTCGTCC(画线部分为 *Xho* I 位点)

在 P1 和 P2 引物中分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点。以 *ecp* cDNA 链为模板,用引物 P1 及 P2 进行 PCR 扩增 *ecp* 全长 cDNA。

1.2.2 将 *ecp* cDNA 亚克隆至 pGEX-4T-1(His)₆C: PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后,进行 *Bam*H I / *Xho* I 双切,并与经同样酶切的表达质粒 pGEX-4T-1(His)₆C 进行连接,转化 *E. coli* DH5 α 菌株。次日挑取若干在 Amp 平板中能生长的抗性菌

收稿日期:2002-11-18,修回日期:2003-02-24。

基金项目:教育部高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划基金资助(No.2001/182)。

* 通讯作者。Tel:86-25-3272510;E-mail:wei.xie@seu.edu.cn

落,液体培养后用常规碱裂解法提取质粒 DNA,用 *Bam*H I / *Xho* I 进行酶谱分析,对阳性克隆再通过测序鉴定。

1.2.3 Ecp 蛋白的诱导表达和鉴定 挑取若干鉴定过的克隆,液体培养 3h,用 1mmol/L IPTG 诱导 2h,取 1mL 菌液离心收获菌体,裂解细菌,取总蛋白行 SDS-PAGE 分析,筛选表达融合蛋白的克隆,用于进一步扩大培养,提取蛋白。

1.2.4 DNA 的连接、酶切、细菌的转化、SDS-PAGE 等 按文献 [3] 的方法进行。

1.2.5 Ecp 蛋白的纯化 将 500mL 经 IPTG 诱导菌液经离心收获菌体,重悬于裂解液(含 50mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 100mmol/L NaCl, 1mmol/L EDTA 和 1% Triton X-100)中冰浴超声破菌,离心收集上清,与谷胱甘肽 Sepharose 4B 珠混合装柱,4℃ 放置 3h,用 PBS 洗涤 10 个柱体积后,按 20u/mL 的量加入凝血酶,4℃ 酶切过夜,次日用 PBS 洗脱,收集洗脱液,加咪唑至终浓度 10mmol/L,再上样于预先平衡的 Ni-NTA 柱,4℃ 放置 3h,用 20mmol/L 咪唑/PBS 洗涤 10 个柱体积,最后用 100mmol/L 咪唑/PBS 进行洗脱, A_{280} 监测洗脱情况,收集蛋白峰。

1.2.6 动物免疫及抗体纯化 用纯化得到的 Ecp 蛋白溶液按常规免疫新西兰家兔。3 次增强免疫后静脉取血,分离血清。另外,将约 5mg 纯化的 Ecp 蛋白偶连到经 CNBr 活化的 Sepharose 4B 上(方法参照商家说明书),做成纯化抗 Ecp 抗体的亲和层析柱。再将约 1mL 抗血清与 3mL PBS 混合后加到柱上,4℃ 放置过夜,用 PBS、2mol/L NaCl/PBS 及 PBS(pH 4.5) 溶液洗柱各约 10 个柱床体积后,用 0.1mol/L 甘氨酸(pH 2.8) 进行洗脱, A_{280} 监测洗脱情况,收集蛋白峰(1mL/管),每管加 50 μ L 1mol/L Tris-HCl(pH 9.5) 进行中和。

1.2.7 Western blot 分析 Ecp 蛋白在果蝇中的表达 取野生型黑腹果蝇胚胎、三龄幼虫神经系统、成虫、成虫头部组织,匀浆后制备蛋白质样品,经 SDS-PAGE 电泳、转膜后,用一、二抗孵育(一抗为制备的抗 Ecp 抗体,1:1000 稀释,二抗为 HRP 标记的抗兔抗体),化学发光底物显色, X 光片感光。

2 结 果

2.1 *ecp* cDNA 克隆至 pGEX-4T-1(His)₆ C

以 *ecp* cDNA 为模板, P1 和 P2 为引物,扩增得到约 1.3kb 大小的特异片段,与理论值 1277bp 相符,PCR 产物纯度高,无明显非特异条带。PCR 产物

克隆至表达载体 pGEX-4T, 转化 *E. coli* DH5 α 菌株,挑取若干抗性菌落,提取质粒,用 *Bam*H I / *Xho* I 进行酶谱分析,经鉴定挑取的 8 个克隆酶切后均释放出一个约 1.3kb 的插入片段,其大小与 *ecp* cDNA 长度相符,表明 *ecp* cDNA 已被克隆至 pGEX-4T,形成重组质粒 pGEX-4T-*ecp*。

2.2 Ecp 蛋白的表达与纯化

从鉴定过的 8 个克隆中取 1~7 号进行 GST-Ecp 的诱导表达,用细菌总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。其中 1~3, 5, 7 号克隆经诱导后,有明显的 75kD GST-Ecp 融合蛋白表达(Ecp 约 49kD, GST 约 26kD)。用 7 号克隆进行大量培养,纯化 Ecp 蛋白。细菌超声裂解液中含有的 75kD GST-Ecp 融合蛋白经谷胱甘肽 Sepharose 4B 柱纯化后,用凝血酶裂解,用 Ni-NTA 柱去除 GST,由图 1 可见,我们的纯化过程是非常成功的。

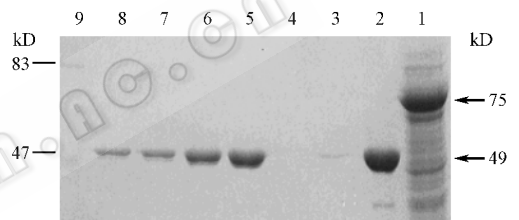


图 1 Ecp 蛋白纯化过程的 SDS-PAGE 跟踪分析

Fig. 1 Purification of Ecp protein

1. Crude extract 2. Supernatant 1 3. Flow through of Ni-NTA column 4. Flow through washed with PBS containing 20mmol/L imidazole 5~7. Eluate tubes no. 1~3 8. Protein remaining on the Ni-NTA beads after the elution 9. Protein marker

2.3 抗 Ecp 抗体的制备

将纯化得到的 Ecp 蛋白常规免疫新西兰家兔,3 次增强免疫后静脉采血,分离血清,亲和层析纯化抗 Ecp 抗体。用该血清与经转化带有 pGEX-4T-*ecp*, 并经 IPTG 诱导能表达 GST-Ecp 融合蛋白的 *E. coli* DH5 α 菌体裂解液进行 Western blot,能出现约 75kD 的 GST-Ecp 融合蛋白特异条带;纯化的 Ecp 蛋白能出现 49kD 的特异条带。用纯化的抗体进行 Western blot,一抗采用 1:3000 稀释,亦能出现约 75kD 的 GST-Ecp 融合蛋白特异条带(结果未显示)。上述结果表明,我们纯化的抗体特异性和效价都很高。

2.4 Western blot 观察 Ecp 在果蝇中的表达

取野生型黑腹果蝇胚胎、三龄幼虫神经系统、成虫、成虫头部组织,匀浆后制备组织总蛋白样品,以本文纯化的抗体为一抗,进行 Western blot。由图 2 可见,在一抗用 1:1000 稀释的情况下,野生型黑腹果蝇胚胎、三龄幼虫神经系统、成虫、成虫头部组织

中均可见 49kD 的特异条带,表明在上述组织中均有 Ecp 蛋白的明显表达。

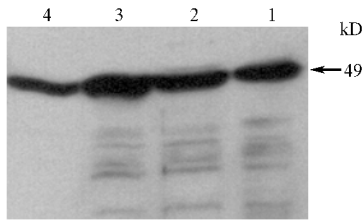


图 2 Ecp 在果蝇中的表达

Fig. 2 Expression of Ecp

Ecp expression in the following material: 1. Head of the adult; 2. Embryo; 3. Adult; 4. Central nervous system of the third instar larvae

3 讨论

我们从野生型黑腹果蝇胚胎 cDNA 文库中克隆到一个新的未知功能基因 *ecp*, 与 BZAP45^[1] 及 *bdm2* 相似, Ecp 在 N-端有一个亮氨酸拉链结构域, C-端有一个核苷酸(ATP 或 GTP)结合结构域。通过 BLAST, 找到了多种同源序列, 分布于小鼠、大鼠和人当中, 且在这三者中均存在不只一种同源序列, 小鼠基因组中有 4 个同源序列, 在酵母和线虫基因组中未检出同源序列。我们初步推测: Ecp 与上述同源序列可能构成一个新的蛋白家族, 就该家族成员在生物体内的具体功能国内外尚无具体报道。*ecp* 可能也是一个与细胞生长增殖调控有关的基因, 在果蝇的生长发育中具有重要作用。进一步阐明其功能及其如何与其他基因协同作用, 对于理解复杂的真核生物基因表达调控规律及发育相关基因的作用机制, 无疑具有重要理论意义。

为进一步研究 Ecp 的功能, 我们首先在大肠杆菌中表达并纯化了 Ecp 蛋白, 并免疫家兔, 制备抗体。我们选用的是 pGEX-4T-1(His)₆ C 表达载体, 由于采用了两次亲和层析, 因而可以获得高纯度的 Ecp 蛋白。从 SDS-PAGE 对纯化过程的追踪来看, 我们对 Ecp 蛋白的纯化是非常成功的。得到纯化蛋白后, 我们一方面用它来免疫家兔, 分离抗血清并采用亲和层析纯化抗体。经检测, 该血清及纯化的抗体具有很高的特异性及效价。该抗体的成功制备, 为进一步研究 *ecp* 的功能奠定了良好的基础。采用本文纯化的抗体进行 Western blot, 结果表明, 在一抗以 1:1000 稀释的情况下, 野生型黑腹果蝇胚胎、三龄幼虫神经系统、成虫、成虫头部组织中均可见 49kD 的特异条带, 条带位置与预期结果吻合。表明: Ecp 蛋白在果蝇幼虫及成虫中均有明显表达, 提示 *ecp* 可能是一个重要的管家基因。有关该基因功能的进一步研究正在进行中。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Mitra P, Vaughan P S, Stein J L *et al.* Purification and functional analysis of a novel leucine-zipper/nucleotide-fold protein, BZAP45, stimulating cell cycle regulated histone H4 gene transcription. *Biochemistry*, 2001, **40**: 10693 - 10699
- [2] Nishinaka N, Hongo S, Zhou C J *et al.* Identification of the novel developmentally regulated gene, *Bdm2*, which is highly expressed in fetal rat brain. *Development Brain Research*, 2000, **120**: 57 - 64
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

Preparation of Antibodies Against a Novel Leucine-zipper Protein, Ecp

WANG Dao-Yong LIU Li XIE Wei*

(Genetics Research Center, Department of Genetics and Developmental Biology, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract The aim of this research is to prepare high quality polyclonal antibodies against Ecp, a recently identified leucine-zipper protein. The full length cDNA of *ecp* was amplified by PCR, cloned into pGEX-4T-1(His)₆ and transformed into *E. coli* DH 5 α . After induction with IPTG, the GST-Ecp fusion protein from the lysate was bound to glutathione-Sepharose 4B and digested with thrombin. The released Ecp protein was further purified through Ni-NTA affinity chromatography to homogeneity. A rabbit was immunized with the purified Ecp, and the antibody generated against Ecp was purified by affinity chromatography. The results of the Western blot showed that Ecp is present in various development stages of *Drosophila melanogaster*, from larvae to adult.

Key words Ecp, cloning, expression, antibody preparation, *Drosophila melanogaster*

Received: 11-18-2002

This work was supported by National Award for Excellent Research and Teaching from the Ministry of Education, P. R. China (No. 2001/182).

* Corresponding author. Tel: 86-25-3272510; E-mail: wei.xie@seu.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>