

# 牙鲆甲状腺激素受体 TR $\alpha$ A 的原核表达和多克隆抗体的制备及应用

贾亮, 施志仪, 张俊玲

上海海洋大学生物技术研究中心, 上海 201306

**摘要:** 为研究牙鲆甲状腺激素受体 TR $\alpha$ A 在牙鲆变态发育过程中的调控作用, 将 TR $\alpha$ A 基因克隆插入融合表达载体 pET30a, 并在大肠杆菌 *Escherichia coli* DE3(BL21)中进行诱导表达。表达菌株经 1 mmol/L 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)诱导 4 h 后, 重组蛋白 TR $\alpha$ A 表达并形成包涵体。SDS-PAGE 和 Western blotting 检测鉴定表达产物。包涵体经变性后在 His-Bind 树脂进行亲和层析纯化, 柱上复性法对重组蛋白复性, 获得纯度较高的目的蛋白, 蛋白复性的效果良好。用纯化后的目的蛋白免疫新西兰家兔制备多克隆抗体。Dot blotting 检测抗体效价达 1:200 000, 检测证明抗体特异性良好。此外, 通过染色质免疫沉淀技术鉴定了在活体细胞中多克隆抗体与 TR $\alpha$ A 的特异性结合, 表明了甲状腺激素通过其受体在体内参与碱性磷酸酶(ALP)基因的转录调控。

**关键词:** 牙鲆, 甲状腺激素受体 TR $\alpha$ A, 原核表达, 抗体制备, 染色质免疫沉淀

## Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of TR $\alpha$ A in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

Liang Jia, Zhiyi Shi, and Junling Zhang

Biotechnology Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

**Abstract:** To study the role of the thyroid hormone receptor TR $\alpha$ A involved in the process of the metamorphic development of Japanese flounder, we firstly cloned the TR $\alpha$ A gene, then ligated into the fusion expression vector pET30a and expressed in *Escherichia coli* DE3 (BL21) host cells. After induced for 4 h with 1 mmol/L Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactoside, the target fusion protein was successfully expressed and identified in inclusion bodies by SDS-PAGE and Western blotting. The recombinant protein was denatured and purified by His-Bind resin, then renatured through gradient washing on His-bind resin column. After that, polyclonal antibody was prepared by immunizing New Zealand rabbits with purified protein. Dot blotting analysis showed the antibody with the titer of 1:200 000 reacted specifically to the expressed recombinant protein. Furthermore, a chromatin immunoprecipitation assay was performed to identify the specific binding between the antibody and TR $\alpha$ A in living cells of Japanese flounder. The result showed that thyroid hormone was involved in the alkaline phosphatase (ALP) gene transcriptional regulation through TR $\alpha$ A *in vivo*.

**Keywords:** Japanese flounder, thyroid hormone receptor TR $\alpha$ A, prokaryotic expression, antibody preparation, chromatin

**Received:** November 19, 2008; **Accepted:** April 15, 2009

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 30271017), Doctoral Programs Foundation of Ministry of Education of China (No. 20040264001), Key Research Foundation of Education Bureau of Shanghai (No. 052252).

**Corresponding author:** Zhiyi Shi. Tel: +86-21-61900051; E-mail: zyshi@shou.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30271017), 国家教育部博士项目基金(No. 20040264001), 上海市教委重点科研项目(No. 052252)资助。

immunoprecipitation

牙鲆(*Paralichthys olivaceus*), 隶属于鲽形目(Pleuronctiforms), 是一种冷温性底栖鱼类, 其在生长过程中经历一个从仔鱼向稚鱼的剧烈变态, 包括右眼移位至左侧、骨骼、消化道等形态和功能的变化<sup>[1]</sup>。自从1985年日本学者Inui等发现在牙鲆变态中甲状腺素( $T_4$ )水平急剧升高以来, 国内外众多学者围绕甲状腺激素在牙鲆变态发育中的作用展开了大量的研究。众多证据表明甲状腺激素( $T_3$ 、 $T_4$ )对正常细胞的生长、发育以及新陈代谢起着调控作用, 其调控是通过甲状腺激素受体(TR)介导的<sup>[2]</sup>。甲状腺激素受体为配体依赖型核激素受体超家族成员, 属于DNA结合转录因子, 分子中含有A~F 6个区, 组成3个功能域, 具有应答分子开关的作用, 其能与启动子邻近区域和配体结合位点结合, 激活或者抑制基因的转录<sup>[3-5]</sup>, 而目前对这些调控基因及其转录调控的机制尚未报道。有研究表明, 在牙鲆变态中 *TR $\alpha$ A* 基因在形态结构和生理功能变化最明显的骨骼肌和胃柱状上皮中表达强烈, 说明 *TR $\alpha$ A* 与牙鲆变态相关, 其发挥调节组织特异性发育的作用。Madhu等<sup>[6]</sup>研究表明碱性磷酸酶(*ALP*)是甲状腺激素受体的下游靶基因, 甲状腺激素  $T_3$  正向调控 *ALP* 的表达。施志仪等<sup>[7]</sup>通过基因组步移的方法扩增出一段924 bp的牙鲆 *ALP* 基因5'调控区序列, 同时软件预测在牙鲆 *ALP* 基因5'调控区-105~-81处(TTTTCAGTCACTGGTCATAAATTTG)可能是一个RARE(Retinoic acid responsive element, 视黄酸应答元件)/TRE(Thyroid hormone responsive element, 甲状腺素应答元件)。本实验构建原核表达载体 pET30a-*TR $\alpha$ A*, 在大肠杆菌 *E. coli* DE3(BL21)中进行诱导表达, 并对重组表达的 *TR $\alpha$ A* 蛋白进行了纯化及复性, 制备了高效价的多克隆抗体, 通过染色质免疫沉淀技术鉴定了在活体细胞中多克隆抗体与 *TR $\alpha$ A* 的特异性结合, 表明甲状腺激素通过其受体在体内参与 *ALP* 基因的转录调控。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料和试剂

pET30a 原核表达载体、His-Bind Purification Kit、Bugbuster 蛋白抽提试剂、Benzonase Nuclease、

His-Tag 单克隆抗体、碱性磷酸酶酶标山羊抗小鼠二抗、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 为美国 Novagen 公司产品; PCR 引物由上海生工合成; 纯种新西兰家兔购自第二军医大学实验动物中心; 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、Bradford 蛋白定量试剂盒、大肠杆菌菌株感受态 DH5 $\alpha$ 、DE3(BL21)、低分子量 marker、SDS-PAGE 试剂盒购自北京天根生化公司; rLysozyme 溶菌酶、LB 培养基购自上海生工; ChIP 试剂盒、Trizol 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、Pyrobest DNA Polymersae、pMD18-T 载体试剂盒、加 A 反应液、*EcoR* I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、Sepharese-4B-His 亲和纯化柱购自美国 Sigma 公司; 硝酸纤维素膜、0.45  $\mu$ m 针头过滤器购自美国 Millipore 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

用手术刀准确切取仔鱼头部组织, 生理盐水洗净后用 Trizol 法提取总 RNA, 紫外分光光度计测定其 OD 值, 将  $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$  的 RNA 按 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA。

#### 1.2.2 原核表达载体的构建及鉴定

根据 GenBank 中检索到牙鲆甲状腺激素受体 *TR $\alpha$ A* 基因全长 cDNA 序列(Accession No. gi 303725), 设计一对特异性引物, 上游引物为: 5'-TAT GAATTC ATG GAG CCA ATG TCC-3'(下划线表示 *EcoR* I 酶切位点); 下游引物为: 5'-ATT AAGCTT TCA GCT GTC TGG GTC-3'(下划线表示 *Hind* III 酶切位点)。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。将纯化的 *TR $\alpha$ A* 基因克隆到 pMD18-T 载体, 转化感受态 DH5 $\alpha$ , 挑取阳性克隆, 进行菌液 PCR, 送上海生工测序。

将 T 载体及 pET30a 载体分别经 *EcoR* I 和 *Hind* III 限制性内切酶进行双酶切(37 $^{\circ}$ C 酶切 12 h), 凝胶纯化回收目的片段, 按照 DNA: vector 摩尔比为 8:1 的比例进行混合连接。转化大肠杆菌菌株感受态 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆进行菌液 PCR 鉴定, 对 PCR 鉴定阳性克隆再进行质粒双酶切鉴定。送上海生工测序检查是否出现错配、缺失或移位。

### 1.2.3 牙鲈甲状腺激素受体 TR $\alpha$ A 的诱导表达及 SDS-PAGE 分析

将质粒 pET30a-TR $\alpha$ A 转化大肠杆菌菌株感受态 DE3(BL21), 挑取阳性单克隆接种到含 50  $\mu$ L/mg 卡那霉素的 LB 培养基中, 37°C、200 r/min 活化过夜, 次日按 1:100 的比例接种于 5 mL 含 50  $\mu$ L/mg 卡那霉素的新鲜 LB 培养基中, 37°C、200 r/min 至  $OD_{600}\approx 0.6$  时, 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 37°C 诱导表达 4 h, 同时用载有空质粒 pET30a 的大肠杆菌 DE3(BL21)和未诱导的重组质粒 pET30a-TR $\alpha$ A 作空白对照。离心收集 1 mL 菌体上样进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳。

### 1.2.4 重组蛋白 TR $\alpha$ A 的可溶性分析

将诱导表达的菌体 4°C、16 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体沉淀, 称菌体湿重, 按每克菌体 5 mL Bugbuster 蛋白抽提试剂重悬菌体沉淀, 每毫升 Bugbuster 蛋白抽提试剂中加入 1  $\mu$ L(25 U) Benzonase Nuclease 及 1 kU rLysozyme 溶菌酶, 室温温和振荡 20 min, 4°C、16 000 r/min 离心 20 min, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

### 1.2.5 重组蛋白 TR $\alpha$ A 包涵体的提纯

按 1.2.3 所述方法大量培养 1 L 菌液, 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后离心收集菌体沉淀, 用 PBS 洗涤 2 次后称量菌体湿重(2 g), 加入 10 mL Bugbuster 蛋白抽提试剂重悬菌体沉淀和 10  $\mu$ L Benzonase Nuclease, 室温温和振荡 20 min, 4°C、16 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀(上清备用)。将沉淀重悬于 60 mL Bugbuster 蛋白抽提试剂中, 加入 60 kU rLysozyme 溶菌酶, 轻微振荡 5 min, 4°C、16 000 r/min 离心 20 min 收集沉淀。重悬沉淀于 100 mL Bugbuster 蛋白抽提试剂(1:10 稀释), 振荡 1 min, 4°C、5000 r/min 离心 15 min 收集沉淀。重复 2 次洗涤包含体沉淀。沉淀重悬于 100 mL 蛋白抽提试剂(1:10 稀释), 振荡混合, 4°C、16 000 r/min 离心 30 min 收集沉淀, -70°C 保存。

### 1.2.6 重组蛋白 TR $\alpha$ A 的纯化

1 $\times$ Binding Buffer(含尿素 6 mol/L)在冰上孵育包涵体 1 h, 使其完全溶解, 4°C、16 000 r/min 离心 30 min 去除不溶性杂质, 0.45  $\mu$ m 针头过滤器过滤后准备上层析柱。因表达的牙鲈甲状腺激素受体 TR $\alpha$ A 重组蛋白含 6-His-tag, 因此用 Ni-NTA-His-Bind 树

脂对其进行纯化, 具体操作参照 His-Bind Purification Kit(Novagen)说明书。表达后未纯化蛋白和纯化蛋白进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定, 经考马斯亮蓝染色后观察结果。

### 1.2.7 纯化后重组蛋白 TR $\alpha$ A 的柱上复性

将 1.2.6 制备的变性蛋白提取液与柱子结合, 并用含 6 mol/L 尿素的 1 $\times$ Binding buffer 洗涤层析柱, 然后依次用 5 mL 的 1: 1、3: 1、5: 1、7: 1(V/V)的 1 $\times$ Wash buffer (20 mmol/L imidazole)/1 $\times$ Wash buffer(20 mmol/L imidazole、含 6 mol/L 尿素)洗涤层析柱, 最后用 1 $\times$ Elute buffer 洗脱目的蛋白, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定, 经考马斯亮蓝染色后观察结果。采用 Bradford 法测定纯化未复性和纯化复性的重组蛋白浓度。

### 1.2.8 重组蛋白的 Western blotting 检测

分别取诱导表达前后的细菌进行总菌体的 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳完毕后将蛋白转印至 PVDF 膜上, 取出 PVDF 膜置于封闭液(TBST: 含 5% 脱脂奶粉)中, 室温下封闭 2~3 h, 然后用 Anti-His-Tag 的鼠源一抗(1:5000)于 4°C 孵育过夜, 将 PVDF 膜用 TBST 洗涤 4 次后, 用碱性磷酸酶偶联的二抗(1:5000)室温孵育 2 h, TBST 洗涤 4 次后, 免疫反应条带用 NBT/BCIP 显色液 PVDF 膜上显带, 参照试剂盒说明书在暗室条件下显影。

### 1.2.9 多克隆抗体的制备

将纯化复性后的重组蛋白 TR $\alpha$ A 与弗氏完全佐剂等量混合超声乳化, 按每只新西兰家兔 500  $\mu$ g 重组蛋白的剂量, 分别免疫接种到 2 只新西兰家兔体内, 免疫前取血作为阴性血清对照, 接种方式为皮下多点注射。免疫周期为 0 d、14 d、35 d、56 d, 第 4 次免疫后一周后颈动脉取血, 37°C 静置 12 h 分离血清, 2000 $\times$ g 离心 10 min 去除血细胞, 收集血清。

### 1.2.10 多克隆抗体的纯化

首先溴化氰活化抗原交联柱 Sepharose-4B-His, 加入抗原至 Sepharose-4B-His 柱, 冰上摇过夜。PBS 洗涤平衡 Sepharose-4B-His 柱, 过血清样品, 100 mmol/L Tris(pH 8.0)洗脱杂蛋白, 50 mmol/L 甘氨酸(pH 3.0)洗脱抗体, 每次加入约 1/2 柱体积的缓冲液, 分次加入。用含 1/10 柱体积的 1 mol/L Tris(pH 8.0)的试管收集洗脱液, 将各管缓慢摇匀, 使其 pH 值恢复至中性。SDS-PAGE 电泳检测观察。

### 1.2.11 抗体 Dot blotting 检测及抗体效价的测定

剪取适当大小的硝酸纤维素膜, 分化成  $1\text{ cm}^2$  左右的小格, 各格内滴加抗原  $2\ \mu\text{L}$ , 室温干燥 1 h 后, 将膜浸于含 5% 脱脂奶粉, 0.1% 的 Tween20 的 PBS 中, 摇床封闭 30 min, 室温孵育抗体 2 h (分别按 1:10 000、1:50 000、1:100 000、1:200 000 稀释), 同时设免疫前血清做为阴性对照, 用含 0.1% 的 Tween20 的 PBS 洗涤 3 次, 加山羊抗兔的酶标抗体 (1:5000)  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 用含 0.1% 的 Tween20 的 PBS 的洗膜后, 加显色剂显影, 根据斑点显色的强弱观察结果。

### 1.2.12 染色质免疫沉淀技术的建立

靶蛋白与 DNA 的交联: 快速切下牙鲆脾脏组织, 置于预冷培养皿中, 加预冷 1% 甲醛-PBS 缓冲液, 迅速将脾脏切碎, 经组织匀浆后通过 21 号注射针头, 室温振动孵育固定 10 min, 加  $2.5\ \text{mol/L}$  甘氨酸(终浓度至  $0.125\ \text{mol/L}$ ) 终止固定反应, 室温振动孵育 5 min。

裂解细胞:  $4^\circ\text{C}$ 、 $2000\ \text{r/min}$  离心 5 min, 弃上清液, 加预冷 PBS 重悬洗涤细胞,  $4^\circ\text{C}$ 、 $2000\ \text{r/min}$  离心 5 min, 弃上清液, 重复洗涤 1 次。加  $1\ \text{mL}$  预冷细胞裂解液(含  $5\ \mu\text{L}$  PIC 和  $5\ \mu\text{L}$  PMSF), 冰上孵育 30 min 后冰上再次匀浆,  $4^\circ\text{C}$ 、 $5000\ \text{r/min}$  离心 10 min, 弃上清, 沉淀细胞核。加  $1\ \text{mL}$  的细胞核裂解液(含  $5\ \mu\text{L}$  PIC、 $5\ \mu\text{L}$  PMSF) 和  $50\ \mu\text{L}$  的 Enzymatic Shearing Cocktail, 充分混合均匀,  $37^\circ\text{C}$  孵育时间分别为 10 min、15 min、20 min, 发现最佳酶切时间为 15 min, 加入  $20\ \mu\text{L}$  预冷的  $0.5\ \text{mol/L}$  EDTA 终止酶切反应, 冰上孵育 10 min,  $4^\circ\text{C}$ 、 $15\ 000\ \text{r/min}$  离心 10 min。

抗体沉淀蛋白质 DNA 交联复合物的制备: 往  $0.5\ \text{mL}$  离心管中分别加入  $25\ \mu\text{L}$  Protein G 磁珠、 $10\ \mu\text{L}$  ChIP Buffer1、酶切染色质  $60\ \mu\text{L}$ 、抗体  $2\ \mu\text{L}$ , 补足水至  $100\ \mu\text{L}$ , 混合均匀,  $4^\circ\text{C}$  振荡孵育过夜。磁条吸附磁珠, 弃上清液, 加  $800\ \mu\text{L}$  ChIP Buffer 1 洗涤磁珠, 再用  $800\ \mu\text{L}$  ChIP Buffer 2 洗涤磁珠 2 次, 磁条吸附磁珠弃上清液。加入  $50\ \mu\text{L}$  Elution Buffer AM2 悬浮磁珠, 室温振荡孵育 15 min, 加入  $50\ \mu\text{L}$  Reverse Cross Link Buffer, 立即用磁条吸附磁珠, 将上清转移至新离心管中,  $95^\circ\text{C}$  孵育 15 min, 放置至室温时加  $2\ \mu\text{L}$  蛋白酶 K, 混匀后  $37^\circ\text{C}$  孵育 1 h, 待至室温加入  $2\ \mu\text{L}$  蛋白酶 K 终止缓冲液终止反应。

PCR 扩增: 为特异性扩增 *ALP* 基因 5' 调控区的

RARE/TRE 结合位点, 根据其调控序列设计合成特异性引物(5'-TCCGTCCTTCCTAACAAATC-3'; 5'-CGAACCCAAACACGAGAC-3'), 产物约 165 bp。PCR 反应程序为:  $94^\circ\text{C}$  预变性 3 min;  $94^\circ\text{C}$  变性 30 s,  $50^\circ\text{C}$  退火 30 s,  $72^\circ\text{C}$  延伸 45 s, 35 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10 min。

## 2 实验结果

### 2.1 pET30a-TR $\alpha$ A 原核表达载体的构建及测序

从牙鲆仔鱼头部组织抽提总 RNA 后, 以逆转录出的 cDNA 为模板, PCR 扩增 *TR $\alpha$ A* 基因主要抗原表位序列区(831 bp)。双酶切鉴定得到 2 个片段, 质粒(5403 bp) 和所插入 *TR $\alpha$ A* 基因片段(831 bp)(图 1)。经测序证实所克隆的 *TR $\alpha$ A* 基因序列与 GenBank 检索到牙鲆甲状腺激素受体 *TR $\alpha$ A* 基因序列一致, 表明 pET30a-*TR $\alpha$ A* 原核表达载体构建成功。

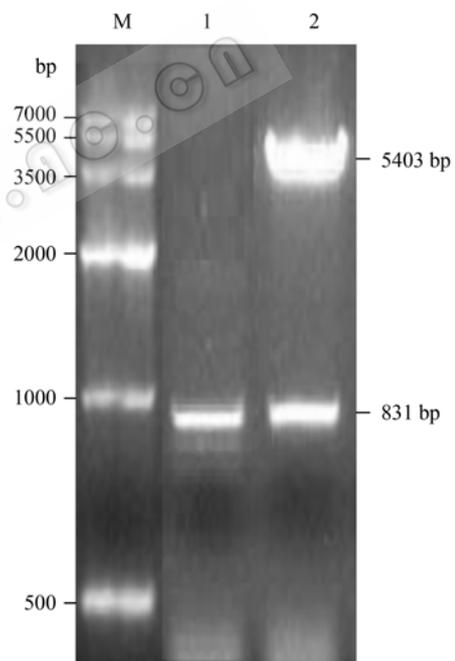


图 1 重组质粒 pET30a-*TR $\alpha$ A* 的双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant vector of pET30a-*TR $\alpha$ A* by restriction enzyme digestion. M: DNA marker IV; 1: PCR product of *TR $\alpha$ A* gene; 2: pET30a-*TR $\alpha$ A* digested with *EcoRI*/*HindIII*.

### 2.2 重组蛋白 TR $\alpha$ A 的表达

重组质粒 pET30a-*TR $\alpha$ A* 经诱导表达后, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 发现诱导后的重组蛋白在 38 kD 处出现一条带, 其大小与所推测的融合蛋白相对分子量一致。根据 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, IPTG 的最佳诱导浓度在  $0.5\sim 1.0\ \text{mmol/L}$ , 最佳诱导

时间在 4 h, 再增加 IPTG 浓度和诱导时间对提高表达量没有作用。用 Bugbuster 蛋白抽提试剂裂解细菌, 离心后分别取上清液和沉淀悬浮液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 对重组蛋白进行可溶性分析。结果表明, 重组蛋白 TR $\alpha$ A 的表达产物主要以包涵体的形式存在(图 2), 上清液中的融合蛋白的表达量微乎其微(图 2)。

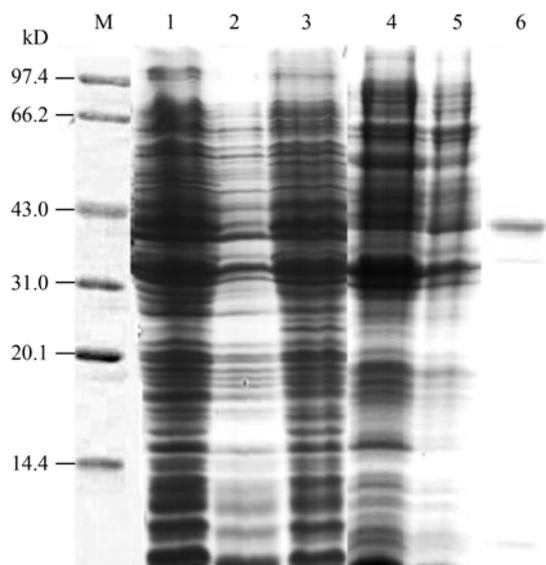


图 2 重组蛋白 TR $\alpha$ A 的溶解性分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of solubility of recombinant protein TR $\alpha$ A. M: protein marker; 1: pET30a/BL21, uninduced; 2: pET30a/BL21, induced; 3: pET30a-TR $\alpha$ A/BL21, uninduced; 4: pET30a-TR $\alpha$ A/BL21, induced; 5: supernatant of induced pET30a-TR $\alpha$ A/BL21 after Bugbuster extraction; 6: precipitate of induced pET30a-TR $\alpha$ A/BL21 after Bugbuster extraction.

### 2.3 重组蛋白 TR $\alpha$ A 的纯化及复性

诱导菌体用 Bugbuster 蛋白抽提试剂裂解, 离心后分别将上清液和包涵体按 His-Bind Purification Kit(Novagen)说明书进行纯化, 用含咪唑的 Elute Buffer 洗脱后, 洗脱液经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析发现上清液中存在微量的可溶性重组蛋白, 重组蛋白主要以包涵体的形式存在于沉淀中, 电泳分析可见在分子量 38 kD 处出现目的条带, 纯度在 95%左右(图 3)。柱上复性通过梯度降低 Wash Buffer 的尿素浓度, 洗涤亲和层析柱实现对目的蛋白的柱上复性, Elute Buffer 洗脱目的蛋白。SDS-PAGE 分析蛋白复性效果显示复性良好, 即恢复了重组融合蛋白 TR $\alpha$ A 的高级结构。采用 Bradford 法在 595 nm 波长处测定纯化重组蛋白的光吸收值, 根据标准曲线计

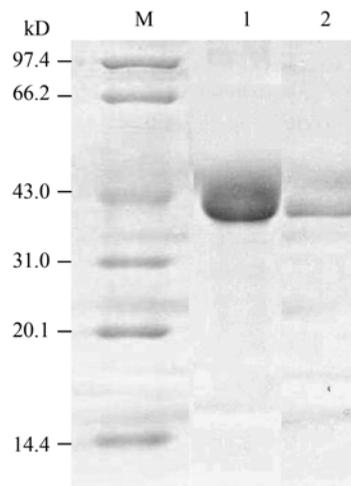


图 3 重组蛋白 TR $\alpha$ A 纯化与复性的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purification and refolded of recombinant protein TR $\alpha$ A. M: protein marker; 1: purified recombinant TR $\alpha$ A, denatured; 2: purified recombinant TR $\alpha$ A, renatured by gradient washing on His-Bind resin column.

算得到纯化未复性的蛋白浓度为 30 mg/L, 纯化复性的蛋白浓度为 7.83 mg/L。

### 2.4 Western blotting 检测

纯化的重组蛋白用 Anti-His-Tag 的鼠源一抗(1:5000)检测, Western blotting 分析显示, 诱导的含重组蛋白的菌体裂解物能与 Anti-His-Tag 的鼠源一抗发生特异性反应, 在约 38 kD 处呈现明显的杂交条带, 而经诱导的 pET30a 空载体和 DE3(BL21)菌体裂解物则无此反应, 说明了表达的融合蛋白的确是带 6 个 His 标签的融合蛋白(图 4)。

### 2.5 多克隆抗体的纯化

利用抗原活化了的 Sepharose-4B-His 柱可以和抗体结合的特性从免疫后的家兔血清中纯化出抗血清中的 IgG, SDS-PAGE 电泳结果显示, 纯化后的只

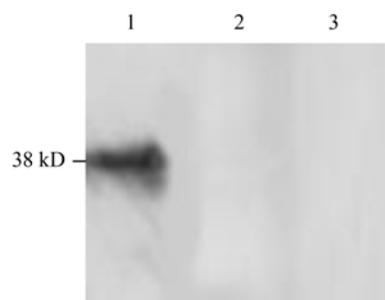


图 4 重组蛋白 TR $\alpha$ A 的免疫印迹分析

Fig. 4 Western blotting analysis of recombinant protein TR $\alpha$ A. 1: pET30a-TR $\alpha$  induced with 1 mmol/L IPTG for 4 h; 2: pET30a induced with 1 mmol/L IPTG for 4 h; 3: DE3 (BL21) induced with 1 mmol/L IPTG for 4 h.

有比较纯净的 IgG, 因为 IgG 重链和轻链间的二硫键被打开, 电泳中表现为 2 条蛋白条带(图 5)。定量测定纯化后的抗体浓度为 2.787 mg/mL。

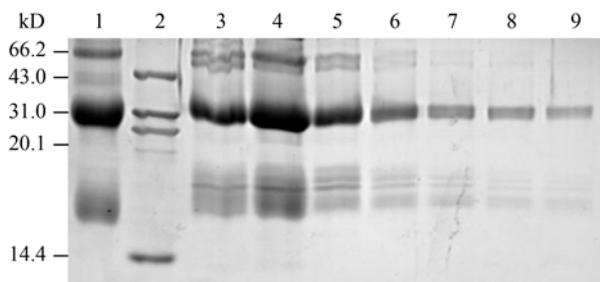


图 5 多克隆抗体的纯化  
Fig. 5 Purification of polyclonal antibody. 1: standard IgG; 2: protein marker; 3-9: purification of polyclonal antibody (5  $\mu$ L for each 2 mL fraction).

### 2.6 Dot blotting 印迹检测多克隆抗体的特异性及其效价

分别以制备的多克隆抗体及免疫前阴性对照血清作为一抗进行 Dot blotting 印迹检测。Dot blotting 印迹检测在抗体稀释度为 1:200 000 时仍出现阳性斑点着色, 而阴性对照血清未出现阳性斑点着色(图 6), 说明抗体的效价达到 1:200 000 以上, 表达的重组蛋白 TR $\alpha$ A 具有良好的免疫原性, 能够使新西兰家兔产生高效价的多克隆抗体。

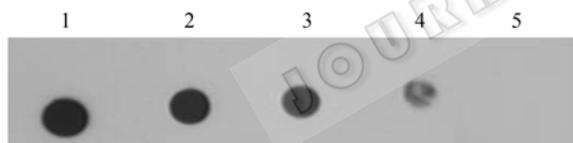


图 6 Dot blotting 印迹检测多克隆抗体的特异性及其效价  
Fig. 6 Dot blotting detects specificity of polyclonal antibody and titers. 1: polyclonal antibody 1:10 000 dilution; 2: polyclonal antibody 1:50 000 dilution; 3: polyclonal antibody 1:100 000 dilution; 4: polyclonal antibody 1:200 000 dilution; 5: negative control serum.

### 2.7 染色质免疫沉淀

用制备的多克隆抗体进行染色质免疫沉淀的同时选择 IgG 作阴性对照, 以确保反应中所用抗体的特异性有效性。结果显示: IgG 无阳性结合条带, 染色质免疫沉淀分离约 200 bp 大小的片段, 说明本实验制备的抗体与 TR $\alpha$ A 有很好的特异性结合(图 7)。

以抗 TR $\alpha$ A 抗体免疫沉淀分离的 DNA 为模板, PCR 扩增 ALP 基因启动子区-105~-81 bp 之间的 RARE/TRE 结合位点, 结果如图 8 所示。

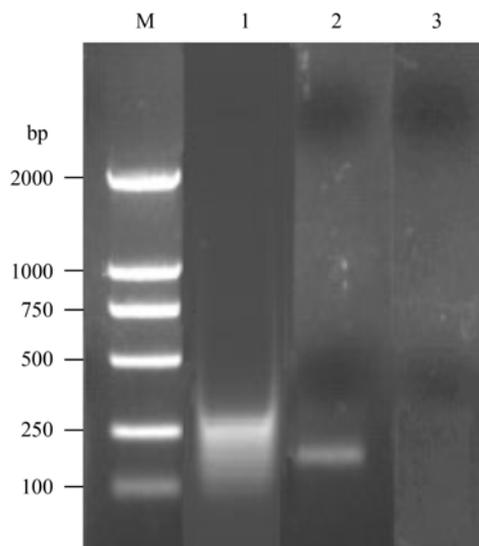


图 7 抗 TR $\alpha$ A 抗体特异性的鉴定  
Fig. 7 Specificity identification of anti-TR $\alpha$ A polyclonal antibody. M: DNA marker; 1: input DNA; 2: chromatin immunoprecipitation DNA fragment; 3: IgG negative control serum.

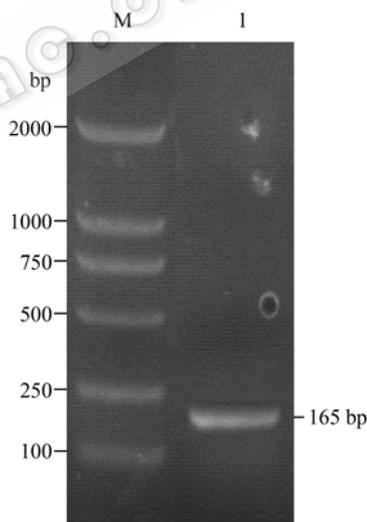


图 8 RARE/TRE 结合位点的 PCR 扩增  
Fig. 8 PCR amplification of RARE/TRE binding site. M: DNA marker; 1: PCR product of RARE/TRE binding site.

## 3 讨论

1986 年由美、法两个研究小组分别意外地发现 *v-erbA* 原癌基因的表达产物具有与 T<sub>3</sub> 高亲和力结合的特性, 才对 TR 的分子结构与功能有了深入的了解。Yamano 等研究表明, 施用外源性 T<sub>4</sub> 能诱导仔鱼骨骼肌细胞形态发生改变, 使肌钙蛋白和肌球蛋白轻链提早转变为成体型, 以适应仔鱼从浮游性

生活向底栖性生活转变<sup>[8-10]</sup>。Yamano 等克隆了牙鲆甲状腺激素受体(TR $\alpha$ 和 TR $\beta$ ) 基因,发现该基因序列与哺乳类和两栖类动物的甲状腺激素受体基因具有高度同源性<sup>[11]</sup>。Yamano 和 Miwa 又通过 RT-PCR 和原位杂交实验,发现 TR 亚型在牙鲆变态期间,(TR $\alpha$ A、TR $\alpha$ B 和 TR $\beta$ 1、TR $\beta$ 2) 基因表达具有组织特异性和时间特异性<sup>[12]</sup>。施志仪等发现硫脲因抑制甲状腺激素的合成可能致使变态期间的牙鲆甲状腺激素缺乏,从而引起变态期牙鲆头部 TR $\alpha$ A 基因表达的增加,而甲状腺激素 T<sub>4</sub> 对变态期牙鲆 TR $\alpha$ A 基因表达也可能有下降调节作用,所以出现甲状腺激素浸泡组 TR $\alpha$ A 表达降低,而在硫脲浸泡组中 TR $\alpha$ A 表达增高<sup>[13]</sup>。Miwa 等研究发现,在仔鱼变态过程中,T<sub>4</sub> 能使体内血红细胞从幼体型转变为成体型<sup>[14]</sup>。Miwa 等还发现,甲状腺激素能促进胃上皮细胞的增殖和分化,进而提前分泌胃蛋白酶原<sup>[15]</sup>。DeJesus 等报道,甲状腺激素诱使变态过程中仔鱼冠状幼鳍缩短,而且 T<sub>3</sub> 较之 T<sub>4</sub> 具有更强的生物活性<sup>[16,17]</sup>。Okada 等认为甲状腺激素在牙鲆右眼移位中也起着重要的作用<sup>[18]</sup>。

本实验在 IPTG(1 mmol/L)诱导重组菌 4 h 左右即使表达量达到最大,约占菌体总蛋白的 20%~30%。诱导表达菌经 SDS-PAGE 分析,出现一条 38 kD 左右大小的一条诱导带,这和预期的融合蛋白的大小一致。经 SDS-PAGE 进行诱导表达可溶性分析,发现重组蛋白主要是包涵体表达,上清裂解液中只有微量的可溶性重组蛋白。在尝试降低培养温度、IPTG 诱导浓度、诱导时间等方法,可溶性重组蛋白表达量未有明显提高。SDS-PAGE 分析纯化和复性的蛋白都显示了浓度小于纯化前的表达带,这是由于包涵体除了目的蛋白之外,还有细菌膜蛋白、RNA 聚合酶亚基、脂多糖、肽聚糖及脂质等成分,一般在变性纯化之前,会用 Bugbuster 蛋白抽提试剂洗涤包涵体沉淀 3 次,包涵体蛋白会随着杂质蛋白的明显减少而丢失一部分,但融合蛋白会明显纯化。本实验采用了层析柱上复性,克服了稀释复性、透析复性会降低蛋白浓度、超滤复性受仪器限制等缺点,缓慢去除高浓度尿素,使变性的重组蛋白从完全伸展的状态恢复或部分恢复到正常的高级折叠结构。本研究建立的 ChIP 技术将染色质酶切成 300 bp 大小的片段,可很好地分析染色质 DNA 序

列上蛋白质与 DNA 之间的相互作用,因此酶切的有效性非常重要。检测免疫沉淀的有效性是该方法的关键,本研究使用 IgG 作为阴性对照,结果证实制备的多克隆抗体与 TR $\alpha$ A 有特异性结合。本研究根据牙鲆 ALP 基因 5' 调控区序列设计了特异性引物,用 PCR 扩增制备抗体与 TR $\alpha$ A 有特异性结合的染色质片段,电泳结果显示约 165 bp DNA 条带,表明 TR $\alpha$ A 结合于 ALP 基因 5' 调控区-105~-81 bp 区域,结果提供了甲状腺激素通过其受体在体内参与 ALP 基因的转录调控的依据,证实了陈晓武等<sup>[19]</sup>关于牙鲆 ALP 基因功能研究的分析。

甲状腺激素在牙鲆胚胎发育、仔鱼生长、变态及其存活等方面起着重要作用,有证据表明甲状腺激素是通过甲状腺素受体,作用于其众多的靶基因,产生特定的生理学效应。但是关于甲状腺激素通过其受体调控牙鲆变态的具体运行机制,目前仍不十分清楚,有待进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Power DM, Llewellyn L, Faustino M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Com Biochem Phys*, 2001, **130**: 447-459.
- [2] Lee HJ, Yen PM. Recent advances in understanding thyroid hormone receptor co-regulators. *J Biomed Sci*, 1999, **6**: 71-78.
- [3] Zhang JL, Shi ZY. Metamorphosis and mechanism during early development of Japanese flounder. *J Shanghai Fish Univ*, 2003, **12**(4): 348-352.  
张俊玲, 施志仪. 牙鲆早期阶段的变态发育及其机制. *上海水产大学学报*, 2003, **12**(4): 348-352.
- [4] Zhang J, Lazar MA. The mechanism of action of thyroid hormones. *Ann Rev Physiol*, 2000, **62**: 439-466.
- [5] Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*, 2001, **81**: 1097-1142.
- [6] Malo MS, Zhang W, Alkhoury F, et al. Thyroid hormone positively regulates the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase gene via an atypical response element. *Mol Endocrinol*, 2004, **18**: 1941-1962.
- [7] Shi ZY, Gu YF, Chen XW, et al. Cloning and function detection of 5' regulation region of alkaline phosphatase from Japanese flounder. *Biotechnol Bull*, 2008, **2**: 207-213.  
施志仪, 顾一峰, 陈晓武, 等. 牙鲆碱性磷酸酶基因 5' 调控区的克隆及其功能检测. *生物技术通报*, 2008, **2**: 207-213.
- [8] Yamano K, Miwa S, Obinata T, et al. Thyroid hormone regulates developmental changes in muscle during

flounder metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol*, 1991a, **81**: 464–472.

[9] Yamano K, Takano-Ohmuro H, Obinata T, *et al.* Effect of thyroid hormone on developmental transition of muosin light chains during flounder metamorphosis. *Gen Comp Endocrinol*, 1994, **93**: 321–326.

[10] Yamano K, Inui Y. cDNA cloning of thyroid hoemone receptor  $\beta$  for the Japanese flounder. *Develop Gen*, 1995, **99**: 197–203.

[11] Yamano K, Araki K, Seikawa K, *et al.* Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder. *Dev Genet*, 1994a, **15**: 378–382.

[12] Yamano K, Miwa S. Differential gene expression of thyroid hormone receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in fish development. *Gen Comp Endocrinol*, 1998, **109**: 75–85.

[13] Shi ZY, Liu H. Differential expression of thyroid hormone receptor alpha-A gene in metamorphosis of *Paralichthys olivaceus*. *J Shanghai Fish Univ*, 2005, **14**(4): 359–363.  
施志仪, 刘华. 甲状腺激素受体 *TR $\alpha$ A* 基因在牙鲆不同变态发育阶段中的表达差异. 上海水产大学学报, 2005, **14**(4): 359–363.

[14] Miwa S, Inui Y. Thyroid hormones stimulates the shift of erythrocyte populations during metamorphosis of the flounder. *J Exp Zool*, 1991, **259**: 222–228.

[15] Miwa S, Yamano K, Inui Y. Thyroid hormone stimulates gastric development in flounder larvae during metamorphosis. *J Exp Zool*, 1992, **261**: 424–430.

[16] De Jesus EG, Inui Y, Hirano T. Cortisol enhances the stimulating action if thyroid hormones on dorsal fin ray resorption of flounder larvae *in vitro*. *Gen Comp Endocrinol*, 1990, **79**: 167–173.

[17] De Jesus EG, Inui Y, Hirano T. Conadal steroids delay spontaneous flounder metamorphosis and inhibit Tsub (3)-induced fin ray shortening *in vitro*. *Zool Sci*, 1992, **9**(3): 633–638.

[18] Okada N, Takagi Y, Seikai T, *et al.* Asymmetrical development of bones and soft tissues during eye migration of metamorphosing Japanese flounder. *Cell Tissue Res*, 2001, **304**: 59–66.

[19] Chen XW, Shi ZY, Gu YF. The expression pattern and function of alkaline phosphatase during the metamorphosis of *Paralichthys olivaceus*. *J Ocean Univ China*, 2007, **37**(6): 894–898.  
陈晓武, 施志仪, 顾一峰. 牙鲆发育中 *ALP* 基因表达图式及功能分析. 中国海洋大学学报, 2007, **37**(6): 894–898.

### 2009 年《生物工程学报》栏目设置

栏目中文名称	栏目英文名称	具体涵盖内容
综述	Reviews	内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 必须包含作者自己的工作内容和见解
小综述	Mini-review	能尽快反映生物学领域的最新进展的小型综述
科学进展/名家论坛	Perspective	邀请生物领域专家对最新生物技术科研成果进行评述
动物及兽医生物技术	Animal and Veterinary Biotechnology	转基因动物; 动物生物反应器; 动物疾病控制、免疫生物技术
海洋生物技术	Marine Biotechnology	海洋生物资源; 海洋生物基因组学、蛋白质组学和代谢组学; 海水养殖生物技术; 藻类生物技术; 海洋天然产物; 海洋生物产品、生物材料和生物能源
环境生物技术	Environmental Biotechnology	微生物多样性; 分子生物学方法及应用; 环境过程的生物监测; 污染控制新工艺; 生物修复
工业生物技术	Industrial Biotechnology	工业酶和微生物; 代谢工程与应用; 生物催化剂与生物转化; 工业生物原料、生物燃料、生物能源和生物基化学品; 生物过程工程; 生物工程控制及优化
农业生物技术	Agricultural Biotechnology	农业功能基因组; 植物生物反应器; 转基因作物; 转基因产品的生物安全及转化; 农业重组微生物
食品生物技术	Food Biotechnology	食品微生物及功能性食品; 转基因食品; 食品安全及公众健康
系统生物技术	Systems Biotechnology	系统生物学理论在工业、医药、环境、农业生物技术领域的应用
医学与免疫生物技术	Medical and Immunological Biotechnology	基因治疗和干细胞治疗 RNAi 技术及应用; 生物标记与诊断; 单克隆抗体; 工程蛋白和疫苗
组织工程与细胞培养	Tissue Engineering and Cell Cultivation	细胞发育与生物材料; 干细胞工程; 细胞培养工程
生物技术与方法	Methods in Biotechnology	生物技术各个领域中的方法学