

Pax6 variant 新基因的原核表达 蛋白纯化和多克隆抗体制备

李 杰¹ 高 岚² 宋德满³

(¹ 济宁医学院精神卫生学院, 山东 济宁 272067; ² 兰州大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730000; ³ 兰州大学第一人民医院, 兰州 730000)

摘 要 **目的** 构建花背蟾蜍(*Bufo raddei* Strauch)转录因子 Pax6 variant 的原核表达载体, 纯化融合蛋白 His-Pax6 variant 并以其为抗原免疫家兔, 制备花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant 多克隆抗体。**方法** RT-PCR 扩增得到花背蟾蜍胚胎组织的 Pax6 variant 基因, 并将此片段与原核表达载体 pET-28a-c 连接, 构建重组表达质粒 pET-Pax6 variant 并转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)菌株, 诱导融合蛋白 His-Pax6 variant 表达; 所获得的可溶性蛋白经亲和层析纯化, SDS-PAGE 电泳鉴定后, 免疫家兔制备抗血清, 分别采用 ELISA、Western blot 检测抗体效价和特异性。**结果** 从花背蟾蜍胚胎组织中克隆了 Pax6 variant 基因, 并成功构建了其原核表达质粒; SDS-PAGE 结果证实获得 Mr 为 43 300 的 His-Pax6 融合蛋白且为可溶性蛋白; 经过 His 亲和层析有效纯化; 以该融合蛋白免疫家兔制备得到的抗血清经 Western blot 检测证实能与目的蛋白发生特异性结合, ELISA 检测为阳性。**结论** 获得了花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant 蛋白及特异性多克隆抗体, 对进一步研究花背蟾蜍 Pax6 variant 在发育过程中功能奠定基础。

关键词 花背蟾蜍; Pax6 variant; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q954.4 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)12-381-05

Prokaryotic expression, affinity protein purification and polyclonal antibody preparation of a Novel Gene Pax6 variant

LI Jie, GAO Lan, SONG De-xiao

(School of mental health, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: Objective To construct the prokaryotic plasmid expressing the transcription factor Pax6 variant of *Bufo raddei* Strauch, purify His-Pax6 variant fusion protein produced by the expression system, and prepare its antiserum. **Methods** The transcription factor Pax6 variant was amplified by RT-PCR from the embryo of *Bufo raddei* Strauch and cloned into prokaryotic expression vector pET-28a-c, and then expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) in which His-Pax6 fusion protein was induced by IPTG. After the soluble protein was purified by His affinity chromatography and identified by SDS-PAGE, the rabbits were immunized with the fusion protein and the antiserum was obtained. And the sensitivity and specificity of the antibodies were evaluated by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot analysis. **Results** The transcription factor Pax6 of *Bufo raddei* Strauch was cloned and sequenced. Its recombinant protein was obtained and polyclonal antibody was prepared. **Conclusion** Pax6 protein and its specific polyclonal antibody have been prepared, which provides a basis for the establishment of immunoassays of *Bufo raddei* Strauch Pax6.

Key words: *Bufo raddei* Strauch, Pax6 variant, Prokaryotic expression, polyclonal antibody

Pax6, 作为 Pax 基因家族中的一员, 是后口动物中一类重要的转录因子。Pax6 能够影响细胞命运、细胞增殖以及发育模式^[1], 在眼等器官的发育过程中起关键作用。敲除果蝇和小鼠基因组中的 Pax6 都可导致眼的缺损^[2], 人眼中 Pax6 杂合突变则导致一系列的视觉异常, 蝇类胚胎中 Pax6 过表达则可形成异位眼(ectopic eyes), 因此 Pax6 被认为是眼睛发育的主导基因(master gene)。人、小

鼠、斑马鱼等多种动物的 Pax6 基因已被成功克隆。典型的 Pax6 蛋白包含 2 条 DNA 结合区: paired domain (PD) 和 paired-like homeodomain (HD), 中间由一段 glycine-rich domain 连接。C 端的 proline-, serine- and threonine-rich (PST) domain 是基因表达的激活物。PD 和 HD 序列高度保守, 决定 DNA 结合的特异性。Pax6 有 4 个转录启动子 P0、P1、 α 和 CE1。在哺乳动物和鸟类的 5'

非翻译区和开放阅读框中存在数个可替换性剪切位点,可形成多种 Pax6 蛋白亚型,如缺少 PD 的短 Pax6 蛋白(Pax6 Δ PD)及 PD 内插入 14 个氨基酸的 Pax6(5a),推测不同的亚型调控不同的发育过程。Pax6 和 Pax6(5a)在体内的表达及功能研究较多,关于其他可替换性剪切产生 Pax6 亚型蛋白的表达、定位、功能还存在疑问^[1-2]。本研究通过构建 pET-Pax6 variant 的原核表达载体,获得 His-Pax6 variant 融合蛋白并进行纯化,由此得到花背蟾蜍 Pax6 variant 的特异性多克隆抗体,为进一步研究两栖类 Pax6 variant 的定位、功能及其与家族其他成员的差异打下了良好的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pET-28a-c、大肠杆菌 DH5 α 、Rosetta(DE3)为本实验室保存。2 kg 左右雄性新西兰大白兔购自兰州生物制品所。RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,pMD18-T 载体、限制性内切酶、修饰酶、T4DNA 连接酶、DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;小量质粒提取试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒均为博大泰克公司产品;硝酸纤维素膜为德国 Whatman 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 为北京中杉生物公司产品;His Bind Column 购自 Novagen 公司;其他常规试剂为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计及合成 根据 GenBank(FJ175151)中花背蟾蜍 Pax6 variant 基因 cDNA 序列,克隆其 ORF 序列,设计合成一对引物(上游引物 5'-TGTCCATGGATGCAGAACAGTCA-CAGTG-3',下游引物 5'-TGTAAGCTTA-AAATACTGCTGAACATCC-3',上下游引物分别引入 NcoI 和 Hind III 核酸酶作用位点),引物由上海生工公司合成。

1.2.2 花背蟾蜍 Pax6 variant 基因克隆和序列测定 取花背蟾蜍胚胎期蝌蚪 10 只,液氮研磨,提取组织总 RNA^[3]。取组织总 RNA 为模板进行 RT-PCR。对 PCR 产物进行琼脂糖电泳分析,并用 DNA 试剂盒回收。

1.2.3 重组质粒 pET-Pax6 variant 的构建 将 Pax6 variant 基因片段克隆到 pMD18-T 载体中,构建重组质粒 pMD-Pax6 variant,克隆方法参照 TaKaRa 公司的 pMD18-T 载体使用说明,并由上海生工公司对重组质粒 pMD-Pax6 variant 进行核

苷酸序列分析。

用 NcoI 和 Hind III 对重组质粒 pMD-Pax6 variant 和原核表达载体 pET-28a-c 分别进行双酶切,凝胶电泳纯化回收酶切片段,连接,构建 pET-Pax6 variant 表达载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选阳性克隆并提取质粒,进行双酶切分析。提取 pET-Pax6 variant 阳性质粒,转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)感受态细胞,获得重组表达菌株大肠杆菌 Rosetta(DE3)/pET-Pax6 variant。

1.2.4 花背蟾蜍 Pax6 基因在大肠杆菌中的大量诱导表达和纯化 将含重组质粒 pET-Pax6 variant 的 E. coli Rosetta(DE3)接种于 500 ml TB 液体培养基(含 50 μ g/L 卡那霉素和 34 μ g/L 氯霉素)中,待菌液的 A600 值达 1 时加入 1 mmol/L IPTG,20 $^{\circ}$ C 12h 诱导表达,离心收集细菌,用 SDS-PAGE 鉴定蛋白。

将诱导表达的 500 ml 菌体培养液 4 $^{\circ}$ C,10000 g,10 min 离心收集菌体,弃上清,加 His Buffer A 吹打混悬。经超声破碎仪裂解细菌,裂解后离心收集上清进行纯化,具体操作步骤按 His Bind Column(Novagen)说明书进行。将纯化的融合蛋白-80 $^{\circ}$ C 储存备用。

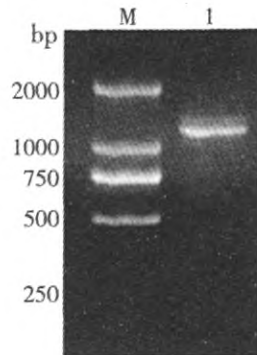
1.2.5 多克隆抗体的制备 按常规方法免疫家兔。首次免疫,按每只 1 mg 的剂量,将纯化得到的 His-Pax6 variant(终浓度为 1 g/L)中,加入等体积的弗氏完全佐剂,充分乳化后背部皮下及腹股沟多点注射;每点 $\leq$ 100 μ l 乳化抗原。加强免疫,抗原用量同初次免疫,加弗氏不完全佐剂,于前次免疫后的 2 周进行。最后 1 次加强免疫后的 10d 后放血,后分离血清于-20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.6 多克隆抗体鉴定 Western blot 鉴定:将 Rosetta(DE3)表达产物经 SDS-PAGE 电泳后,采用电转移(200mA,2 h)将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜上,TBST 洗涤 1 次,然后用 50g/L 脱脂奶粉封闭 1 h,TBST 洗涤 3 次,加入的兔抗 Pax6 variant 多克隆抗体 4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗涤 3 次,然后加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗室温温育 1h,TBST 洗涤 3 次,ECL 显色。ELISA 检测:用本实验室表达纯化的花背蟾蜍 Pax6 融合蛋白包板,一抗为 1000、2000、4000 等倍比稀释的兔血清,二抗为 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(稀释至 1/10 000),显色底物为邻苯二胺(OPD)。显色结果用酶标仪在波长 490 nm 处进行测定。

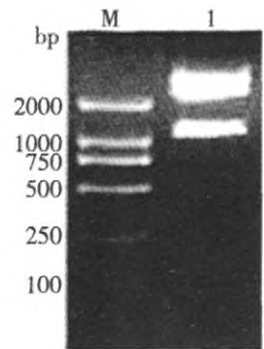
2 结果

2.1 花背蟾蜍 Pax6 基因克隆

以花背蟾蜍总 RNA 为模板,利用扩增 Pax6 variant 的上下游引物,应用 RT-PCR 技术扩增得到了特异目的片段,琼脂糖电泳分析表明扩增的片段与预期大小一致(图 1)。将扩增的基因片段克隆到 pMD18-T 载体中,双酶切鉴定分析正确(图 2)。序列分析表明扩增的基因片段序列及读码框正确,基因片段长度为 1182bp。



1;DNA Marker DL2000;2:Pax6 variant 的 RT-PCR 产物
 图 1 RT-PCR 扩增花背蟾蜍 Pax6 variant 基因



M;DNA Marker DL2000;1;pMD-Pax6 variant 酶解产物
 图 2 质粒 pMD-Pax6 variant 的双酶解图谱

2.2 序列分析

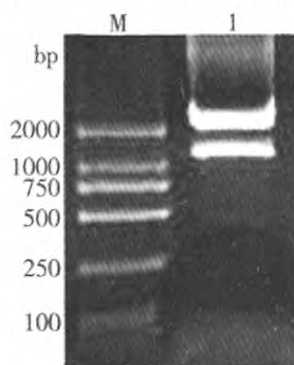
花背蟾蜍 Pax6 variant 全长 393 个氨基酸,与预期模板序列一致。与花背蟾蜍 Pax6 氨基酸序列相比,有几处不同,主要是 Pax6 variant 在 Pax6 345-394 AA 处缺失 50 个氨基酸,Pax6 variant 在末端比 Pax6 多 21 个氨基酸,如图 3。

<i>Bufo raddei</i> Pax6	MQNSHSGVNQ LGGVFVNGRP LPDSTRQKIV ELAHSGARPC DISRILQVSN GCVSKILGRY	60
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	MQNSHSGVNQ LGGVFVNGRP LPDSTRQKIV ELAHSGARPC DISRILQVSN GCVSKILGRY	60
<i>Bufo raddei</i> Pax6	YETGSIRPRA IGGSKPRVAT PEVVS KIAQY KRECPSIFAW EIRDRL LL SEG VCTNDNIPSV	120
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	YETGSIRPRA IGGSKPRVAT PEVVS KIVQY KRECPSIFAW EIRDRL LL SEG VCTNDNIPSV	120
<i>Bufo raddei</i> Pax6	SSINRVLRNL ASEQQMGAD GMYDKLRMLN GQTGTWGTRP GWYPGTSVPG QPTQDGC P Q	180
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	SSINRVLRNL ASEQQMGAD GMYDKLRMLN GQTGTWGTRP GWYPGTSVPG QPTQDGC P Q	180
<i>Bufo raddei</i> Pax6	EGGAENTNSI SSNGEDSDEA QMRLQLKRKL QRNRTSFTQE QIEALEKEFE RTHYPDVFAR	240
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	EGGAENTNSI SSNGEDSDEA QMRLQLKRKL QRNRTSFTQE QIEALEKEFE RTHYPDVFAR	240
<i>Bufo raddei</i> Pax6	ERLAAKIDLP EARIQVWFSN RRAKWRREE K LRNQRRQASN TPSHIPISS FSTSVYQPIP	300
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	ERLAAKIDLP EARIQVWFSN RRAKWRREE K LRNQRRQASN TPSHIPISS FSTSVYQPIP	300
<i>Bufo raddei</i> Pax6	QPTTPVSSFT SG S MLGRTDT ALTNTYSALP PMP S FTMANN LPMQPLYPAR PPPTHACCPQ	360
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	QPTTPVSSFT SG S VLGRTDT ALTNTYSALP PMP S FTMANN LPMQ-----	344
<i>Bufo raddei</i> Pax6	VHLZMGGAMI HTHLPTCSHT ZTANQWAPLV QLLQVSFPLE CQSQYKYP AV NLTCFSTGQD	420
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	-----VSFPLE CQSQYKYP AV NLTC L STGQD	370
<i>Bufo raddei</i> Pax6	YS-----	422
<i>Bufo raddei</i> Pax6 variant	YSKNRVNLTN DFMENSWMFS SIL	393

PD 用下划线标出;HD 用黑框标出;PST 区用虚线标出
 图 3 花背蟾蜍 Pax6 和 Pax6 variant 氨基酸序列比对

2.3 花背蟾蜍 Pax6 variant 基因原核表达载体的构建与鉴定

将 NcoI 和 Hind III 双酶切重组质粒 pMD-Pax6 variant 获得的 Pax6 variant 基因片段克隆到 pET-28a-c 载体, 获得表达载体 pET-Pax6 variant 用 NcoI 和 Hind III 双酶切鉴定重组表达载体, 表明得到了与目的基因大小一致的片段(图 4)。

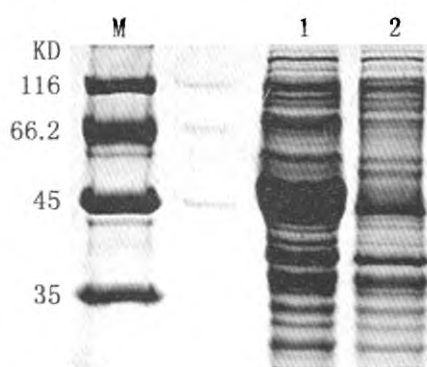


M: DNA Marker DL2000; 1: pET-Pax6 variant 酶解产物

图 4 质粒 pET-Pax6 variant 的双酶解图谱

2.4 花背蟾蜍 Pax6 variant 融合蛋白的原核表达和融合蛋白的纯化

将经 IPTG 诱导表达前、后取样的菌液经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳实验观察, 诱导、未诱导表达结果显示, 挑取的克隆经 IPTG 诱导表达后, 在相对分子质量 43 300 处有明显的特异蛋白表达条带, 与预期的 His-Pax6 variant 融合蛋白大小(图 5)一致。



M: 蛋白质标准; 1: 经 IPTG 诱导后的 pET-Pax6 variant;

2: 未诱导的 pET-Pax6 variant

图 5 融合蛋白 His-Pax6 variant 的表达

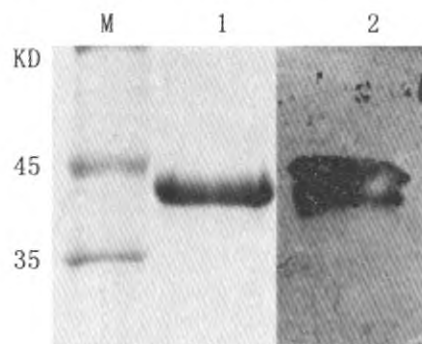
将纯化后收集到的蛋白上样, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, 结果显示, 纯度可达到 90%(图 6)。

2.5 多克隆抗体鉴定

2.5.1 ELISA 检测抗血清效价 以纯化的花背蟾蜍 Pax6 融合蛋白包板, 对所制得的多克隆抗体血清稀释进行 ELISA 检测, 第 5 次免疫后, 家兔的

血清效价可达到理想的 1 : 10 240。

2.5.2 Western blot 检测 将纯化的融合蛋白 His-Pax6 variant 电泳后转膜, 用制备的兔抗 Pax6 variant 多克隆抗体作为一抗进行 Western blot 鉴定, 结果如图 6 示。在 Mr 43 300 处都检验出条带, 应为 His-Pax6 variant 蛋白。



M: 蛋白质标准; 1: 纯化的融合蛋白 His-Pax6 variant;

2: 纯化 His-Pax6 variant 融合蛋白经 His-Pax6 variant 多抗的 Western Blot 检测结果

图 6 融合蛋白 His-Pax6 variant 的纯化和 Western blot

3 讨论

本实验中我们首先设计克隆花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant, 然后构建原核表达系统, 以期获得大量高效表达 Pax6 variant 融合蛋白, 从而初步探索花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant 的功能和生物学作用。序列分析表明, 花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant 与 GenBank 中提交的序列 (FJ175151) 完全一致。本实验选择的大肠杆菌是一种较常用的、成熟的原核表达系统。同时采用 pET 表达系统, 利用 T7 强启动子和高活性的 T7 RNA 聚合酶, 使得目的基因转录能达到很高的水平, 从而高效表达各种异源蛋白。尽管影响外源基因在大肠杆菌中表达的因素较多, 如载体、宿主菌、cDNA、mRNA 的结构、培养条件、营养状况等, 但本实验借鉴前人研究经验^[4], 结果较满意。纯化的花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant 融合蛋白加弗氏佐剂的方法免疫家兔, 可以获得高效价的抗血清, 制备了抗花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant 的多克隆抗体。利用 ELISA 对所获得的抗血清进行了检测, 其效价达到了 1 : 10000 以上。ELISA 间接法对于从抗血清中筛选特异性抗体是非常敏感的, 可以检测出 1 ng/ml 的蛋白质抗原, 其特点是灵敏度高, 步骤少, 操作简便和快速^[5]。进一步通过 Western blot 法检测证实多克隆(下转第 402 页)

大分子 GH, 则内分泌症状轻微或当瘤内出血、坏死或囊变时, 肢端肥大表现反而会自行缓解^[7]。至于内分泌血清学检查显示高分泌型激素却出现病理免疫组化该激素阴性的原因不是很明确, 可能的解释是高分泌的瘤细胞释放的激素绝大部分被吸收至血液中, 致使瘤组织内残留很少, 以至于免疫组化很难检测到而使结果阴性。

神经内镜在神经外科领域发挥着越来越广泛的作用, 其中内镜下经鼻蝶手术切除垂体腺瘤的技术在国外已经比较成熟^[8-9], 比传统的显微镜手术在微创和扩大视野上有明显优势。而这些又提升了手术的安全性, 与 MRI 和导航技术的结合, 使这一手术技术更加完善。

总之, 单鼻孔直达蝶窦垂体腺瘤切除术具有手术时间短、创伤小、并发症少、症状改善率高、住院时间短、治疗费用低等优点, 是目前最为理想的经蝶手术术式。

参考文献:

- [1] 李蕴潜, 赵刚, 洪新雨, 等. 单鼻孔经蝶窦入路显微手术治疗垂体腺瘤[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2007, 12(8): 377-378.
- [2] 李桂林, 王任直. 经蝶窦入路垂体腺瘤切除术的体会[J]. 中

华神经外科杂志, 2008, 24(12): 950-952.

- [3] Zervas NT. Surgical result for pituitary adenomas; result or an international study. // Black PM, Aervas NT, et al. Secretory tumors of pituitary gland[J]. New York: Raven Press, 1984: 377-385.
- [4] Sheehan JM, Sheehan JP, Douds GL, et al. DDAVP use in pateints undergoing transsphenoidal surgery for pituitary adenomas[J]. Acta Neurochir(Wien), 2006, 148(3): 208-209.
- [5] 杨义, 任祖洲, 苏长保, 等. 经蝶窦入路垂体腺瘤切除术中脑脊液漏的影响因素和修补方法[J]. 中华神经外科杂志, 2009, 25(1): 8-11.
- [6] 杨众, 任祖洲, 苏长保, 等. 经蝶窦入路手术切除垂体腺瘤的严重并发症分析[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2008, 13(3): 107-109.
- [7] Zhao D, Tomono Y, Tsuboi K, et al. Immunohistochemical and ultrastructural study of clinically nonfunctioning pituitary adenomas[J]. Neurol Med Chir(Tokyo), 2000, 40(9): 453-456.
- [8] Tabae A, Anand VK, Barron Y, et al. Endoscopic pituitary surgery: a systematic review and meta-analysis[J]. J Neurosurg, 2009, 111, 545-554.
- [9] Dehdashi AR, Ganna A, Karabatsou K, et al. Pure endoscopic endonassal approach for pituitary adenomas: early surgical results in 200 patients and comparison with previous microsurgical series[J]. Neurosurgery, 2008, 62: 1006-1017.

(收稿日期 2011-10-11)

(上接第 384 页) 抗体的特异性良好, 所制备的多克隆抗体具有免疫学活性。花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant 融合蛋白多克隆抗体的获得, 为今后进一步研究该蛋白亚型的功能提供了有力的工具和实验材料。

花背蟾蜍 Pax6 variant 的相关研究较少。我们成功克隆了花背蟾蜍转录因子 Pax6 variant。与正常背蟾蜍转录因子 Pax6 比对发现, 二者的差异主要在 PST 区。PST 区是 Pax6 蛋白存在潜在转录激活功能的区域。无虹膜病人体内曾被发现含有几种 C 端 PST 区被截短的 Pax6 突变蛋白。这种突变的 Pax6 蛋白作为正常 Pax6 蛋白的显性转炉激活抑制因子与其竞争靶 DNA 结合位点。含有 PST 截短蛋白突变型 Pax6 可以通过 PD 和 HD 的靶基因结合位点抑制野生型 Pax6 的转录激活活性。关于两栖类中 Pax6 variant 和 Pax6 的功

能还需要进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] Jiha K and James DL. Analysis of Pax6 expression using a BAC transgene reveals the presence of a paired-less isoform of Pax6 in the eye and olfactory bulb[J]. Developmental Biology, 2006, 292: 486-505.
- [2] Dikla B, Tomer S, Gil BS, et al. A Complex Expression Pattern of Pax6 in the Pigeon Retina[J]. Investigative Ophthalmology and Visual Science, 2007, 48: 2503-2509.
- [3] 吴艳华, 李杰, 高茂, 等. 生物组织总 RNA 的高效提取[J]. 兰州大学学报(自然科学版), 2008, 44: 144-146.
- [4] 吕素芳, 刘峰, 郭广君, 等. 大肠杆菌中表达外源重组蛋白的研究[J]. 科学技术与工程, 2006, 6: 2872-2876.
- [5] Ausubel FM, Kingston RE, Seidman JG, et al. translation. Short protocols in molecular biology[M]. 4th edition. Beijing: Science Press, 2005: 476-708.

(收稿日期 2011-11-01)