

家蚕新基因 *Bmbzj* 的表达、抗体制备及亚细胞定位

高 珍¹, 卜远虹¹, 金邦泽¹, 于 威¹, 刘 悦², 陈 健¹, 张耀洲¹

(1. 浙江理工大学生物化学研究所 杭州, 310018; 2. 浙江经贸职业技术学院应用工程系 杭州, 310018)

摘 要: 在自建的家蚕蛹cDNA文库中发现了一条新基因序列, GenBank 登录号为 DY231426。该基因是一个同源性很低的基因, 未发现保守结构域, 将其命名为 *Bmbzj*。*Bmbzj* 基因全长 661 bp, 由 99 bp 的 5'端非翻译区序列(5'UTR)、486 bp 的开放读码框(ORF)和 76 bp 的 3'端非翻译区序列(3'UTR)组成。生物信息学分析结果表明蛋白 *Bmbzj* 可能存在跨膜区和信号肽。将该基因插入到载体 pGEX-4T-3 中, 构建了该基因编码的重组质粒 pGEX-4T-3-*Bmbzj*, 转化大肠杆菌 Rosetta 后, IPTG 诱导表达了该融合蛋白, 并利用亲和层析的方法纯化该重组蛋白, 免疫新西兰兔制备多克隆抗体。亚细胞定位实验结果表明该蛋白只存在于细胞质中。

关键词: 家蚕; *Bmbzj* 基因; 原核表达; 纯化; 亚细胞定位

中图分类号: Q74 **文献标识码:** A

0 引 言

因家蚕在基础生命体系、物质代谢、能量代谢和遗传方式上与人类有很多相似性之处, 且遗传资源丰富、遗传背景清楚, 其在克隆人类疾病控制新基因、研究疾病机理和开发新药等方面将发挥重大作用。目前国际上对于家蚕作为模式生物的研究竞争激烈。自 2003 年我国率先完成家蚕基因组“框架图”后, 目前在家蚕功能基因组研究和应用研究中已发现了 18 510 个家蚕基因, 其中大部分是新发现的, 且生物学功能尚不清楚^[1-2]。因此, 对新基因功能的研究工作迫在眉睫。我们在自建的家蚕蛹cDNA文库中发现一条新序列, 在 NCBI 上对此序列进行同源性比对分析, 发现此序列和已报道的序列同源性极低, 推测该序列编码可能是一条新基因。在本研究中, 通过生物信息学分析方法, 预测了该基因及对应的蛋白序列的性质和功能^[3-4], 并将这序列克隆到 pGEX-4T-3 载体上, 并在大肠杆菌中诱导表达, 以纯化的重组蛋白为抗原免疫雄性新西兰兔, 制备了该重组蛋白的多克隆抗体, ELISA 检测该抗血清的效价, Western blot 检测抗体的特异性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

家蚕培养细胞系 Bm5、*E. coli* TG1、Rosetta 菌株、表达载体 PGEX-4T-3 由本实验室保存; 雄性新西兰兔(约 3 kg)购自杭州师范大学实验动物中心。琼脂糖 Agarose MP、电泳级 SDS、EB 固体、RNase A、溶菌酶、丙烯酰胺购自 Boehringer Mannheim 公司; Taq 酶及相应 PCR 反应有关试剂购自上海博亚(Biosia)生物技术有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H I、*Xho*I 购自 Promega 公司; 无水 CaCl_2 、AP、imidazole、Tris 碱、IPTG、Ampicillin 购自 Sigma 公司; 蛋白胨、酵母提取物购自英国 Oxoid 公司; 胶回收试剂盒购自北京鼎国生物技术公司; 低分子量蛋白 Marker 购自 TaKaRa 公司; TEMED(N, N, N', N'-四甲基乙二胺)为瑞典 LKB BROMMA 公司产品; N, N'-甲叉双丙烯酰胺为瑞士 Fluka Chemie AG 公司产品; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增目的基因片段

根据 *Bmbzj* 基因的 ORF 设计引物, 上、下游引物分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点, 由上海博

亚生物技术有限公司合成,引物序列如下:

P1:5'-CGCGGATCCATGGCCTCGAAC-3',
P2: 5'-CCGCTCGAGTCAAGAAATGTTCT-TGTAC-3' (下划线表示酶切位点)。

以 pHelix-*Bmbzj* 质粒为模板,以设计的引物扩增目的基因的 ORF,PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 30 个循环,72℃ 延伸 10 min。

1.2.2 目的基因片段的克隆

将上述的 PCR 产物纯化后用 *Bam*H I、*Xho* I 进行双酶切,然后将其连接到 pGEX-4T-3 载体相应的酶切位点中,转化大肠杆菌 Rosetta。在含有氨苄青霉素抗性的培养基中挑取单克隆菌落,用 PCR 和双酶切进行阳性克隆的筛选,再通过 DNA 测序确定克隆的正确性。

1.2.3 GST 融合蛋白的表达与纯化

将经测序鉴定成功的重组菌进行大量培养,至菌液 OD₆₀₀ 约为 1 时,加入 IPTG 溶液至终浓度为 1 mM,继续培养 4 h 以充分表达目的蛋白。菌体经 6 000 r/ min 离心收集后,用 PBS 重悬,按 1 mg/ mL 重悬液的比例加入溶菌酶,冰上搅拌裂解 30 min。将裂解液置于冰上,用超声波破碎仪以 50% 的功率作用 5 min,4℃,12 000 r/min 离心 15 min,取上清进行 GST 亲和层析,用 10 mm 还原性谷胱甘肽洗脱、纯化 GST 融合蛋白。

1.2.4 多克隆抗体的制备及其效价的测定

参考 Chen 等^[5]的方法免疫新西兰兔,制备多克隆抗体。首次免疫时,取纯化的 GST 融合蛋白 1 mg 稀释至 500 μL,与等体积的弗氏完全佐剂混合,充分乳化后,采用背部皮下多点注射免疫新西兰兔。以后每隔 10 d 加强免疫 1 次,抗原量减半,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂制备抗原乳化液,共加强免疫 3 次。第 4 次免疫后 10 d,将兔子禁食 24 h,颈动脉插管取血获得抗血清。

将获得的抗血清用间接 ELISA 法进行抗体效价的测定,参考 Chen 等^[5]的方法。将 *Bmbzj* 抗原稀释至 1.0 mg/ L 包被酶标板,每孔 100 μL,4℃ 过夜;1% BSA 37℃ 封闭 2 h;洗涤 3 次后,以倍比稀释的抗血清作为一抗,免疫前兔血清作为阴性对照,每孔 100 μL,37℃ 孵育 1 h;洗涤 3 次后每孔加入 1 : 1 000 稀释的 HRP-羊抗兔 IgG 100 μL,37℃ 孵育 1 h;洗涤 6 次,OPD 显色,用酶标仪测定 490 nm 的吸光度值(A₄₉₀)。

1.2.5 Western blot 检测

将未诱导的重组菌总蛋白与纯化的 GST 融合

蛋白样品经 12% SDS-PAGE 分离后转移至 PVDF 膜上,用 1% BSA 封闭 2 h,以 1 : 100 稀释度的多克隆抗体 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜后按 1 : 1 000 稀释度加 HRP-羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 1 h,TBST 洗膜后,将膜转入 DAB 显色液中,室温下暗处显色 5 ~ 10 min,待有明显的显色条带时,用去离子水漂洗终止反应。

1.2.6 *Bmbzj* 亚细胞定位

将处于对数生长期的家蚕 Bm5 细胞接种于铺有盖玻片的培养皿中,12 h 后,用 PBS 轻洗细胞 2 次,再用 3.7% 的甲醛 25℃ 固定细胞 10 min;0.2% 的 Triton X-100 于 25℃ 处理细胞 10 min。3% BSA 封闭 2 h 后加入纯化后的抗血清 1 : 200,4℃ 孵育过夜,以未免疫兔血清作阴性对照;PBST (PBS + 0.5% Tween20)洗 3 次,再加入 Cy3 标记的羊抗兔 IgG 抗体,激光共聚焦显微镜观察。

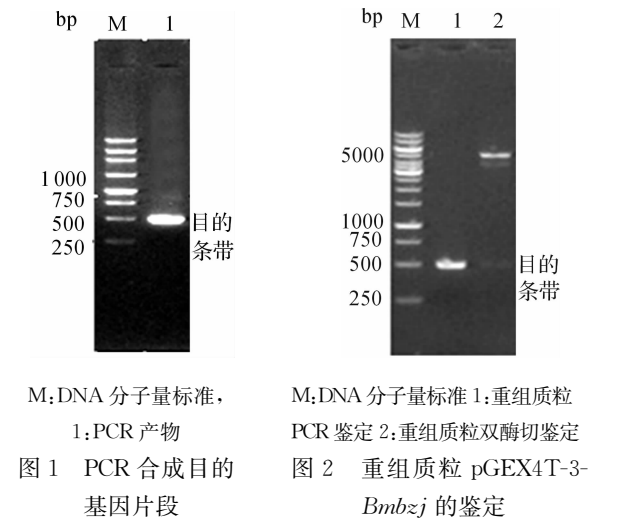
2 结 果

2.1 目的基因片段的 PCR 合成

利用 P1、P2 两条引物的 3' 端的核苷酸序列互补,通过 PCR 合成目的基因片段,片段长度为 486 bp。图 1 中,在 500 bp 附近显示出一条特异性条带即为目的片段。将该片段回收后用于 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切,继而将其连接到 pGEX-4T-3 载体的相应位点中。

2.2 重组质粒 pGEX-4T-3-*Bmbzj* 的酶切鉴定

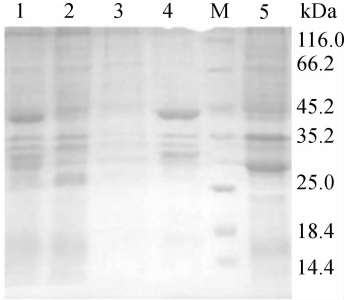
碱裂解法小量抽提重组质粒,经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pGEX-4T-3-*Bmbzj*,电泳出现大小两条带,与预期结果一致;以此质粒为模板,用上下游引物进行 PCR 扩增鉴定,结果也得到单一的与预期大小一致的目的条带(图 2),然后再将阳性



克隆进行 DNA 测序,结果与原序列完全一致,表明已获得正确的重组表达克隆菌株。测序图谱略。

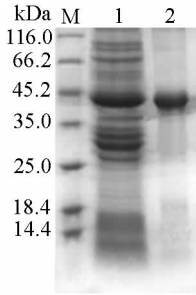
2.3 GST 融合多肽的表达与纯化

将重组质粒转入 Rosetta 感受态细胞中,用终浓度为 1 mM 的 IPTG 进行诱导表达。收集菌体裂解后,用 GST 亲和层析柱进行纯化,经过 12% SDS-PAGE 电泳,发现在 45 kDa 附近有单一的目的条带,即为 GST-Bmbzj(图 3、图 4)。



1:诱导表达的重组菌体蛋白 2:未诱导表达的重组菌体蛋白
3:诱导重组菌超声后的上清 4:诱导重组菌超声后的沉淀
M:蛋白低分子量标准 5:诱导表达的空载菌体蛋白

图3 融合蛋白 GST-Bmbzj 在 *E. coli* Rosetta 中 IPTG 诱导表达检测



M:蛋白低分子量标准 1:诱导表达的重组菌体蛋白
2:纯化的重组蛋白

图4 纯化蛋白 GST-Bmbzj 的 SDS-PAGE

2.4 融合多肽的多抗特异性检测

用间接 ELISA 方法对获得的抗血清进行抗体效价的测定,结果发现该抗体的效价约为 1 : 12 800 (图 5)。将纯化的融合多肽 GST-Bmbzj 免疫新西兰

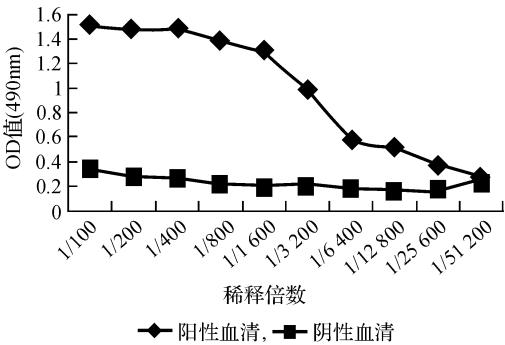
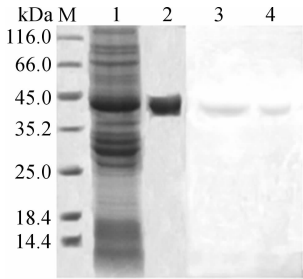


图5 抗体效价检测

兔获得多克隆抗体,并进行抗体与抗原的免疫印迹检测。用 Western blotting 检测了表达的 GST 融合蛋白的细菌总蛋白样品和纯化的 GST 融合蛋白与自制抗体反应的特异性(图 6)。由图 6 中可以看出,制备的抗体虽然是多克隆抗体,但仍然有较高的特异性。



M:低分子量标准蛋白质 1:3 诱导后重组菌
2:4 纯化的重组蛋白

图6 Western blotting 分析

2.5 Bmbzj 的亚细胞定位

一抗为制备的 *Bmbzj* 多克隆抗体,阴性一抗为未免疫阴性兔血清。Cy3 标记的二抗在 550 nm 波长激发产生红色荧光,细胞核经 DAPI 染色后在 353 nm 波长激发产生蓝色荧光。在激光共聚焦扫描显微镜下观察到 *Bmbzj* 主要存在于胞质(图 7)。

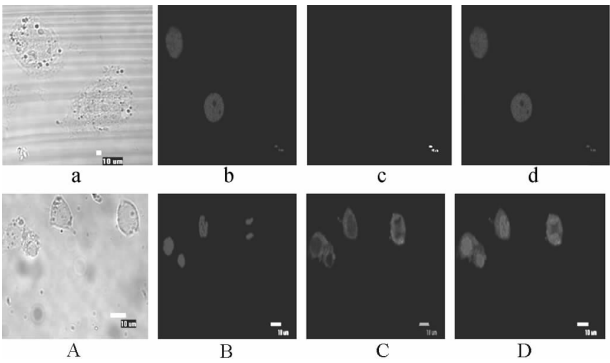


图7 *Bmbzj* 的亚细胞定位

a、b、c、d 为阴性对照;A、B、C、D 为阳性;a、A:可见光下的细胞;b、B:353 nm 激发下 DAPI 显示蓝色荧光,为细胞核;c、C: Cy3 标记的二抗染色的胞内 *Bmbzj*,图片显示,荧光位于细胞质当中,且分布均匀;d、D:叠加图。图中白色标尺的长度为 10 μ m。

3 讨论

在自建的家蚕蛹 cDNA 文库中,筛选到一家蚕未知功能基因,通过对其 cDNA 序列进行生物信息学分析,表明该基因为有信号肽的碱性蛋白质。同源比对结果表明该基因同源性低,而且也没有保守结构域。为了发现编码蛋白中古老的保守结构域 (ACRs),把人、线虫和酵母的一系列新基因序列进

行相互比对,并且把这些序列和一系列的大肠杆菌基因进行比对。几乎所有被发现的 ACRs 都能够在蛋白数据库中发现序列同源性,这表明当今已知的蛋白可能包括大多数典型的 ACRs,也表明与任何其他数据库序列没有相似性的新序列不太可能包含 ACRs。初步分析表明,与偶尔表达的基因相比,经常表达的基因更可能包含 ACRs^[7]。所以,一般没有保守结构域的基因可能属于奢侈基因,这也说明 *Bmbzj* 基因可能属于奢侈基因。

因 *Bmbzj* 基因是真核生物基因,故将构建成功的重组质粒 pGEX-4T-3-*Bmbzj* 转化 *E. coli* Rosetta 菌株,得到重组菌。将重组菌诱导超声后发现 pGEX-4T-3-*Bmbzj* 融合蛋白以包涵体的形式存在,将纯化后得到的融合蛋白免疫新西兰纯种大白兔,获得效价 1 : 12 800 的多克隆抗体。亚细胞定位试验表明 *Bmbzj* 可能存在于细胞质中。

对新基因的功能了解极少,所以首先借助于生物信息学来推测其功能,但其生物学功能需经进一步的试验证明,该研究作为 *Bmbzj* 基因的功能研究打下了基础。

参考文献:

[1] Xia Q Y, Zhou Z Y, Lu C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm [J]. Science, 2004, 306(10): 1937-1940.

[2] Adams M D, Kelley J M, Gocayne J D, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project[J]. Science 1991, 252: 1651-1656.

[3] 冯浩咏, 苗向阳, 罗绪刚, 等. 生物信息学在发现新基因方面的应用[J]. 生物技术通报, 2007(5): 1-5.

[4] 唐雪芳, 贺修胜. 生物信息学策略鉴定新基因[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(7): 1358-1360.

[5] Chen J, Chen J, Gai Q, et al. Molecular characterization and immunohistochemical localization of a novel troponin C during silkworm development [J]. Cell Tissue Res, 2008, 331(3): 725-738.

[6] Liu S, Huang C Q, Li D W, et al. Molecular cloning and expression analysis of a new gene for short chain dehydrogenase/reductase 9[J]. Acta Biochimica Polonica, 2007, 54(1): 213-218.

[7] Green P, Lipman D, Hillier L, et al. Ancient conserved regions in new gene sequences and the protein databases [J]. Science, 1993, 259(5102): 1711-1716.

Cloning, Expression and Subcellular Localization of a Novel Gene *Bmbzj* from Silkworm Pupae (*Bombyx mori*)

GAO Zhen¹, BU Yuan-hong¹, JIN Bang-ze¹, YU Wei¹, LIU Yue², CHEN Jian¹, ZHANG Yao-zhou¹

(1. Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China;

2. School of Applied Technology, Zhejiang Economic & Trade Polytechnic, Hangzhou 310018, China)

Abstract: A novel gene is identified in the process of analyzing the cDNA sequences from the *Bombyx mori* pupa cDNA library constructed by our laboratory (GenBank Accession: DY231426) . The gene shares low homologous with other genes and has no conserved sequence, it is named as *Bmbzj*. The full length of gene *Bmbzj* is 661 bp, which contains 5'UTR (99 bp), ORF (486 bp) and 3'UTR (76 bp). The gene *Bmbzj* is subcloned from *Bombyx mori* pupa cDNA library and inserted into prokaryotic expression vector pGEX4T-3, *Escherichia coli* Rosetta are transformed with the recombinant plasmid, the recombinant protein expression is induced with IPTG. The recombinant fusion protein GST-*Bmbzj* is purified using GST Trap FF column chromatography. Purified GST-*Bmbzj* is used to produce anti-*Bmbzj* polyclonal antibody. The subcellular immunofluorescence localization results indicate that the *Bmbzj* is distributed in cytoplasm.

Key words: *Bombyx mori*; *Bmbzj*; prokaryotic expression; purification; subcellular localization
(责任编辑: 许惠儿)