

大鼠 *RVLG* cDNA 的克隆、原核表达和小鼠抗 *RVLG* 蛋白多克隆抗体的制备

张平, 邢万金, 包晓红, 刘志达, 王连庆, 李舜尧, 乌日嘎

内蒙古大学生命科学学院生物系, 呼和浩特 010021

摘要: 为了识别大鼠卵巢中的生殖细胞, 在原核系统中表达和纯化 *RVLG* 蛋白并制备了多克隆抗体。采用 RT-PCR 方法从大鼠睾丸组织中扩增获得 *RVLG* cDNA 片段, 然后克隆到 pMD19-T 载体上进行测序, 经双酶切回收目的基因片段后, 将其插入到原核表达载体 pGEX-4T-1 上, 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 中诱导表达。纯化后的 GST-*RVLG* 融合蛋白免疫昆明(KM)小鼠, 最后给小鼠腹腔注射 S180 细胞制备抗 *RVLG* 腹水多克隆抗体。用 Western blotting 及免疫组织化学法鉴定 *RVLG* 腹水多克隆抗体的特异性, 间接 ELISA 法测定该抗体的效价。序列分析表明, 所克隆的 *RVLG* cDNA 片段比 GenBank 中报道的大鼠 *RVLG* cDNA(NM_001077647)多 60 bp, 原因是由于 *RVLG* 的可变剪切方式造成的。本研究成功构建了重组表达质粒 pGEX-*RVLG*, 且 GST-*RVLG* 融合蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3) 中高效表达, 表达的目的蛋白占菌体总蛋白的 10% 以上。制备的抗体可特异性识别 *RVLG* 蛋白, 其效价达 1:20 000。获得的高效价、高特异性的鼠抗 *RVLG* 蛋白腹水多克隆抗体为下阶段研究 *RVLG* 的特异性表达奠定了基础。

关键词: *RVLG*, 原核表达, 多克隆抗体

Cloning, Prokaryotic Expression of Rat *RVLG* and Preparation of Mouse Anti-*RVLG* Polyclonal Antibody

Ping Zhang, Wanjin Xing, Xiaohong Bao, Zhida Liu, Lianqing Wang, Shun Yao Li, and Riga Wu

Department of Biology, School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China

Abstract: In order to identify rat ovarian germ cells, we expressed and purified rat *RVLG* protein in *Escherichia coli* cells and prepared a mouse anti-rat *RVLG* polyclonal antibody. The rat *RVLG* cDNA was obtained from rat testicle tissue by RT-PCR and was cloned into the vector pMD19-T. Sequence analysis proves that the cloned *RVLG* cDNA fragment was 60 bp longer than that released in the GenBank (NM_001077647), resulting from an alternative splicing of the *RVLG* pre-mRNA. The *RVLG* cDNA was double digested with the restriction endonucleases *Bam*H I and *Eco*R I, and then was extracted from gel and inserted into the prokaryotic expression vector pGEX-4T-1. The recombinant expression plasmid pGEX-*RVLG* was verified for successful construction and then was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3) for induction to express the GST-*RVLG* fusion protein by IPTG. The GST-*RVLG* fusion protein was expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) at a high level which accounts for more than 10% of the total bacterial cellular protein. The purified *RVLG* protein was used as an antigen to immunize KM mouse for the production of polyclonal antibody in ascetic fluid followed by celiacly injecting the mouse with S180 cells. The mouse anti-rat *RVLG* antibody was analyzed

Received: May 20, 2008; **Accepted:** September 2, 2008

Supported by: Higher Education Research Program of Inner Mongolia (No. NJ05026).

Corresponding author: Wanjin Xing. Tel: +86-471-4992944; E-mail: xwanjin@163.com

内蒙古自治区高等学校科学研究项目(No. NJ05026)资助。

by ELISA, Western blotting and immunohistochemistry for its specificity and titer. The antibody could recognize RVLG protein specifically and its titer was about 1:20 000. These results confirm that the mouse anti-rat RVLG polyclonal antibody with high affinity and specificity has been prepared successfully, and lay a foundation for our ongoing research on the specific expression of RVLG in rat ovary.

Keywords: RVLG, prokaryotic expression, polyclonal antibody

DEAD(Asp-Glu-Ala-Asp)-box 家族的蛋白在细胞 RNA 代谢中具有重要作用, 涉及转录调控、pre-mRNA 剪接、核糖体组装、RNA 运输、翻译的起始调控、细胞器基因表达以及 RNA 降解等^[1]。*vasa* 是 DEAD-box 基因家族的重要成员之一, 首先在果蝇中被发现^[2], 后来陆续在爪蟾、小鼠、水螅、家蚕、蝗虫、牡蛎、鸡和人中克隆了 *vasa* 的同源基因并鉴定了 *vasa* 同源物。在黄鳝、金鱼、银鲫、斑马鱼、罗非鱼等鱼类动物中也报道了关于 *vasa* 基因的表达分析研究。大鼠的 *vasa* 同源基因 RVLG (Rat *vasa*-like gene) 是 Komiya 和 Tanigawa^[3]1995 年报道的。*vasa* 基因只在生殖系细胞中特异表达, 其蛋白具有 ATP 依赖的 RNA 解旋酶活性^[4], 是生殖细胞形成的关键基因^[5,6]。缺失 *vasa* 蛋白将导致果蝇和线虫卵子发生受阻。*vasa* 基因敲除的小鼠, 其精子发生受抑^[7,8]。由于其表达的组织特异性, *vasa* 常被作为研究生殖细胞的一个标记物。近来关于出生后哺乳动物的卵巢是否还具有卵子再生能力和再生现象, 引起了生殖生物学界的激烈争论^[9-12]。为了在大鼠卵巢中进一步检验哺乳动物出生后卵巢中卵泡是否持续发生, 本试验先克隆了 RVLG(大鼠 *vasa* 基因)并进行原核表达, 制备多克隆抗体, 为识别大鼠的生殖细胞奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

低分子量蛋白 Marker(中科院上海生化研究所); RNAiso Reagent、RNA PCR Kit(AMV)、*rTaq* 聚合酶、pMD19-T、dNTPs 及限制性内切酶均购自大连宝生物公司; DNA marker、抗 GST 单克隆抗体(mAb)、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 和增强型 HRP-DAB 底物显色试剂盒均购自北京 TIANGEN; Ultrasensitive S-P 试剂盒(KIT-9701)和 AEC 显色试剂盒为迈新公司产品; DNA 凝胶回收试剂盒为 AXYprep™ DNA Gel Extraction Kit(AXYGEN, USA); GST Purification

Kit(Clontech); 弗氏佐剂(BBI); PVDF 膜(Solarbio)、预染蛋白分子量标记(Fermentas); TMB(Sigma); 其他化学试剂为国产分析纯。大肠杆菌 BL21(DE3)由生物化学实验室侯鑫博士惠赠; 原核表达载体 pGEX-4T-1 和大肠杆菌 DH5 α 由本实验室保存。S180 细胞由内蒙古大学哺乳动物繁殖生物学与生物技术教育部重点实验室吴应积教授惠赠。Wistar 大鼠及昆明小鼠均购自内蒙古大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计合成与 PCR 扩增

1) 引物的设计合成: 根据 GenBank 上登录号为 NM_001077647 的序列, 用 Oligo6 软件设计克隆 RVLG cDNA 5'端约 627 bp 的一对引物。上游引物为 5'-GGATCCATGGGAGATGAAGATTGGGAG-3'; 下游引物为 5'-GAATTCCTTCCAGAGCCTGTTA CTAC-3'。两引物 5'端分别加入了 *Bam*HI 和 *Eco*R I 酶切位点(划线部分)。预计扩增片段长度 639 bp。引物由 TaKaRa 公司合成。2) RT-PCR 扩增: 用断颈法处死 53 d Wistar 雄性大鼠, 迅速摘取其睾丸。使用 TaKaRa RNAiso Reagent 试剂盒提取大鼠睾丸组织的总 RNA, 然后用 TaKaRa 反转录试剂盒, 以提取的总 RNA 为模板进行反转录, 反转录体系为 10 μ L: 模板 RNA 2 μ L, AMV Reverse Transcriptase 0.5 μ L, Oligo dT-Adaptor primer 0.5 μ L, 5 \times RT Buffer 2 μ L, MgCl₂ 2 μ L, dNTPs Mixture 1 μ L, RNase Inhibitor 0.25 μ L, RNase Free H₂O 1.75 μ L。反转录反应条件: 42 $^{\circ}$ C 1 h, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 反应体系为 25 μ L: cDNA 2 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, *rTaq* 酶 0.125 μ L, 上、下游引物各 10 μ mol/L, dNTPs Mixture 2 μ L, 灭菌超纯水 16.375 μ L。PCR 反应最佳条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 再用 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 重组克隆载体的构建及测序

将 RVLG cDNA 的 PCR 产物与 pMD19-T 克隆载

体连接(参照 TaKaRa 公司 pMD19-T 载体系统说明书), 然后转化 DH5 α 感受态菌。氨苄青霉素平板筛选抗性菌落, 摇菌提取质粒, 经质粒 PCR 初步筛选为阳性克隆后, 再用限制性内切酶 *Hind* III 单酶切、*Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切鉴定。至少选定 3 个阳性克隆送菌液到 TaKaRa 公司测序, 正确的克隆命名为 pMD-RVLG。

1.2.3 RVLG 原核表达载体的构建

所选原核表达载体是 pGEX-4T-1, 此载体内有 GST 标签蛋白, 能与目的蛋白高效融合表达。使用 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切重组克隆载体 pMD-RVLG, 经琼脂糖凝胶电泳后用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收 RVLG 目的片段, 与用 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切后回收的 pGEX-4T-1 线性载体连接。将连接产物转化 DH5 α 感受态菌, 涂平板 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 选取几个单菌落, 摇菌提质粒, 进行酶切鉴定, 命名为 pGEX-RVLG, 然后送出测序。

1.2.4 pGEX-RVLG 在大肠杆菌 BL21(DE3) 中的表达及 SDS-PAGE 鉴定

将重组表达载体 pGEX-RVLG 转入 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态菌中, 涂板培养于含有 Amp 和葡萄糖的 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 10 h 后挑取单菌落接种于含 Amp(100 mg/L) 和葡萄糖(终浓度为 2 g/L) 的 LB 液体培养基中, 摇菌至 $A_{600}=0.513$ 后加入 IPTG 诱导表达。经时间梯度诱导后, 分别收集菌液, 通过可见光比色测定各组诱导样品的菌液浓度, 计算各组样品在 SDS-PAGE 电泳时的上样量, 以保证各泳道中的菌体量一致。超声波破碎、煮菌后离心收集上清液。配制 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶。分别用空 BL21(DE3) 菌、pGEX-4T-1 转化的 BL21(DE3) 菌、低分子量蛋白 marker 及未诱导的 pGEX-RVLG 转化菌作为对照, 与 IPTG 诱导的 pGEX-RVLG 转化菌同时电泳。考马斯亮蓝染色后脱色, 待脱色清晰后分析其在不同时间的表达情况。用 UVI Band 软件分析蛋白含量并确定目的蛋白的分子量。

1.2.5 GST-RVLG 融合蛋白的 Western blotting 鉴定

将 SDS-PAGE 胶电泳转膜至 PVDF 膜后用抗 GST mAb 为一抗, HRP 标记羊抗小鼠 IgG 为二抗进行 Western blotting 分析, DAB 染色, 确认具有 GST 标签的融合蛋白 GST-RVLG 表达。

1.2.6 GST-RVLG 蛋白的纯化

1) 初步纯化: IPTG 大量诱导菌体表达, 12 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C, 2 min 离心收集菌体(100 mg~500 mg), 加入 Extraction buffer(试剂盒中成分), 在冰上超声波破碎后, 用 GST 试剂盒进行纯化, 目的蛋白保存于 -80 $^{\circ}$ C。2) 目的蛋白的切胶回收(次级纯化): PEG-20000 浓缩收集到的纯化蛋白, SDS-PAGE 电泳。以预染蛋白 marker 为参照, 根据目的蛋白的分子量, 粗略切下蛋白条带, 浸入灭菌的 KCl 溶液(0.5 mol/L) 5 min, 待看到一条粗的乳白色条带后, 切下此带, 并切成小竖条状, 竖直放入透析袋内, 在盛有电泳洗脱缓冲液(pH 8.9 Tris-base 50 mmol/L, 甘氨酸 50 mmol/L, SDS 1000 mg/L) 的水平电泳槽中 60 V 稳压过夜(或 100 V 3 h)进行目的蛋白的洗脱。次日取出透析袋内胶条, 将扎好的透析带浸入 PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 缓冲液中 4 $^{\circ}$ C 透析 1 d, 期间每隔 4 h 换 1 次液。

1.2.7 RVLG 腹水多克隆抗体的制备

Bradford 法测定蛋白浓度。将纯化的 GST-RVLG 融合蛋白与等体积弗氏完全、不完全佐剂混合成油包水的乳剂, 腹部、背部皮下多点注射, 免疫昆明鼠, 剂量为每只每次 15~20 μ g, 间隔 10~15 d, 共免疫 5 次(第 5 次采用腹腔直接注射加强免疫)。最后一次免疫后 5 d 测定血清的抗体效价。然后腹腔注射 S180 细胞($1 \times 10^6/0.3$ mL), 待小鼠腹腔膨胀、皮毛无光泽时, 开始收集腹水。腹水经 4 $^{\circ}$ C、2000 r/min 离心 5 min, 吸上清分装, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.8 小鼠抗大鼠 RVLG 多克隆抗体的鉴定

1) Western blotting 法分别检测抗体对 GST-RVLG 融合蛋白和组织蛋白中 RVLG 的识别: 将冻存的雄性 Wistar 大鼠睾丸置于预冷研钵中, 加入适量液氮研磨组织至粉末状, 按 1:10(g/10 mL) 比例加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 沸水中煮 10 min。超声波破碎后, 4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min, 离心 10 min, 吸取上清, 用 Western blotting 检测 RVLG 腹水多抗对大鼠睾丸组织蛋白中 RVLG 的识别。2) 免疫组织化学检测: 取 60 d 雌性大鼠卵巢, 4% 多聚甲醛 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, 石蜡包埋, 5 μ m 连续切片。二次展片法展片, 贴片后于 60 $^{\circ}$ C 烘箱中烤片 2 h。切片经脱蜡、水化后, 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0) 中微波修复 15 min, 室温冷却后按照免疫组化试剂盒

(迈新)操作步骤依次加入内源性过氧化物酶阻断剂(试剂 A)灭活内源性过氧化物酶,正常山羊血清(试剂 B)封闭 20 min。滴加小鼠抗大鼠 RVLG 多抗(1:150)为一抗 4°C 孵育过夜。次日滴加生物素标记的羊抗小鼠 IgG(试剂 C)室温孵育 20 min,链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(试剂 D)室温孵育 10 min。AEC 显色剂显色,AEC 水溶性封片剂封片、镜检。同时设置以未免疫的小鼠腹水上清液为一抗的阴性对照。

1.2.9 小鼠抗大鼠 RVLG 多克隆抗体效价的测定

采用间接 ELISA 法测定抗体效价:纯化后 GST-RVLG 蛋白经包被液(pH 9.6, 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液)稀释至终浓度为 5 mg/L,以每孔 100 μ L 4°C 包被酶标板过夜。洗涤缓冲液(pH 7.4, 0.15 mmol/L PBS)洗涤,分别加滴 1:100~1:20 000 的 RVLG 腹水多抗 0.1 mL,同时用正常鼠腹水做阴性对照,37°C 孵育 1 h。洗涤后加 1:1500 的 HRP 标记羊抗鼠 IgG 0.1 mL,37°C 孵育 1 h,洗涤后 TMB 显色,2 mol/L 硫酸终止反应。ELISA 读数仪测 A_{450} 处吸光度。结果以检测样品 A 值(P)/阴性对照 A 值(N)>2.1 为阳性的最高腹水多抗稀释度为终点滴度^[13]。

2 结果

2.1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳鉴定

将大鼠 RVLG cDNA RT-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1 的第 2 泳道,在约 700 bp 处有 1 条明亮的带,比预期的 639 bp 片段大。

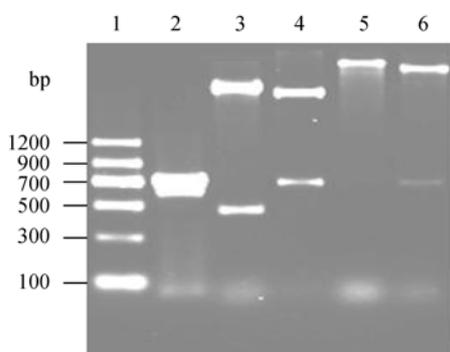


图 1 RT-PCR 产物和重组载体的限制性酶切结果

Fig. 1 RT-PCR product of RVLG and restriction enzyme digestion of the recombinant vector

- 1: DNA marker II; 2: RT-PCR product (699 bp);
3: pMD-RVLG/*Hind* III(452 bp); 4: pMD-RVLG/*Eco*R I+*Bam*H I (2.69 kb and 699 bp); 5: recombinant plasmid pGEX-RVLG/*Eco*R I (5589 bp); 6: recombinant plasmid pGEX-RVLG/*Eco*R I+*Bam*H I (4.89 kb and 699 bp)

2.2 重组克隆载体和重组表达载体的酶切鉴定及测序结果

预期扩增的 RVLG 片段的第 425 bp 处有 *Hind* III 酶切位点,而 PMD-19-T 载体上也有该酶切位点,因而可作为进一步鉴定克隆载体上目的片段的依据。构建好的 pMD-RVLG 重组载体用 *Hind* III 单酶切、*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切,结果见图 1 的 3、4 泳道,分别切出约分子量位于近 500 bp 和与 RT-PCR 产物相同的带,说明扩增的 RVLG 片段与 pMD-19T 成功连接。

所选的 3 个 pMD-RVLG 克隆的测序结果均得到 687 bp 的片段(图 2)。与 GenBank 上公布的序列(NM_001077647)相比,内部多出 60 bp(方框中),其中 45 bp 位于报道序列的第 457 bp 之后,另 15 bp 位于第 583 bp 后。但其余序列除 3 个碱基不同外均与报道序列相同,且不引起氨基酸序列移码突变。pGEX-RVLG 重组载体用 *Eco*R I 单酶切、*Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切后的电泳结果见图 1 的 5~6 泳道,说明插入片段与 RT-PCR 产物相同,进一步测序结果说明 pGEX-RVLG 质粒中插入的 RVLG 与所克隆的 RVLG cDNA 片段序列一致,且与 GST 的 ORF 读码框一致。

把测序后 RVLG cDNA 序列与大鼠 2 号染色体基因组 DNA 全序列(ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/R_norvegicus/)进行比对,结果在基因组全序列中找到了测序结果多出的 60 bp(图 3)。经分析,在该区域对应的基因组 DNA 上具有 6 处剪切位点,若以 GT1-AG1、GT3-AG3 剪切,就是 NM_001077647 序列,若以 GT2-AG1、GT3-AG2 剪切,就会成为本实验所得到的序列。

2.3 RVLG 在大肠杆菌中的表达

在 BL21(DE3)菌株中诱导表达后,12% SDS-PAGE 鉴定结果见图 4。经 IPTG 诱导,融合表达载体 pGEX-RVLG 在 *E. coli* BL21(DE3)中有较高的表达。在 $A_{600}=0.513$ 后加入终浓度为 100 mg/L 的 IPTG,诱导 4 h 时可溶性融合蛋白含量最高(泳道 8),诱导到 5 h 时蛋白量不再增加(泳道 9)。经 UVI Band 软件分析表达的融合蛋白占细菌总蛋白的 13%。

2.4 Western blotting 鉴定重组融合蛋白

用 anti-GST 单克隆抗体作为一抗进行的 Western blotting 试验显示 pGEX-4T-1 空载体所表达

GGATCCATGGGAGATGAAGATTGGGAGGCAGAAATCCTCAAACCTCATGTGTCTTCCT
ACGTTCTGTATTTGAGAAGGATAAATATTCTTCTGGGGCAAATGGAGACACTTTTAAC
 AGGACTTCAGCTTCATCATCAGAAATGGAAGATGGACCTTCTGGAAGAGATCATTTCAT
 GAGAAGTGGATTTCTCTGGAAGAAATTTAGGAAACAGAGATATTGGCGAGTCTAGT
 AAAAGAGAGACTACATCTACAACCGGTGGCTTTGGAAGAGGAAAGGGTTTTGGAAAC
 AGAGGTTTTTAAATAACAAGTTTGAAGAAGGTGACAGCTCTGGTTTCTGGAAAGAGT
 CTACTAATGACTGTGAAGATACTCAGACTCGGAGCAGAGGGTTTTCCAAGCGAGGCGG
 CTATCCAGATGGGAATGATTGCGGAAGCTTCAGGCCCATTCAGAAGAGGTGGAAGAGG
TAGTTTCCGAGGTTGCCGCGGAGGATTTGGTCTAGGAAGACCAAATAGTGAATATGAC
 CAAGATCAGGGATCACAGCGTGGTGGTGGCCTTTTTGGTTCTAGGAAACCAGCAGCAA
 GTGATTGAGTGCATGTTTACAGGCAGTGGTGACACTTCCAGAGCAGAAGTGGGAA
 TGGCCGAGGTGGCTACAAAGGCTTAAATGAAGAAGTAGTAACAGGCTCTGGAAAGGA
ATTC

图 2 大鼠 *RVLG* ORF 5'端扩增产物的测序结果

Fig. 2 Sequence of rat *RVLG* fragment at 5' of ORF

Two primers were underlined. *Hind* III site was in bold form. Two excess fragments were boxed

.....TTCAGGCCCATTCAGAAGAGGTGGAAGAG**GT**AGTTTCCGAGGTTGCCGCGGAGG
 ATTTGGTCTAGGAAGACCAA**GT**TAGTAGTGGG.....TTCAAATA**AG**ATAGTGAATA
 TG.....TGATTGAG**GT**GAGAAATGAA.....AATGTGTTG**AG**TGCAATGTTTAC**AG**G
 CAGTGGTGACACTTCCAGAGCAGAAGTGGGAATGGCCGAG**GT**GAGCTC.....AATT
 TCTTTAAT**AG**GTGGC.....CTGGAAAG.....

图 3 大鼠 2 号染色体 *RVLG* DNA 部分序列

Fig. 3 Partial sequence of rat *RVLG* DNA in chromosome 2

The introns were in bold form and splicing boundary sequences GT/AG were boxed. Two fragments underlined were the same as the excess 60 bp cloned in this paper. Dots represented nucleotides omitted

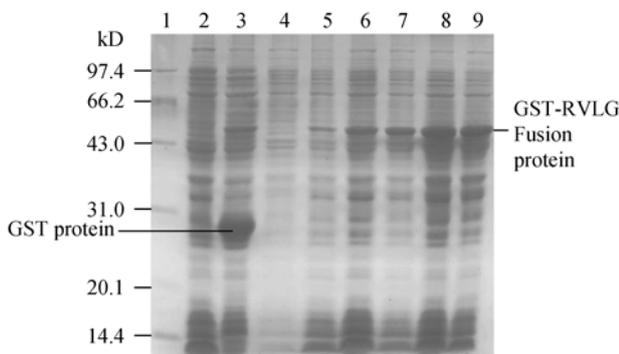


图 4 重组表达载体 pGEX-RVLG 在 *E. coli* BL21(DE3) 中的表达

Fig. 4 Expression of recombinant expression vector pGEX-RVLG in *E. coli* BL21(DE3)

1: low molecular weight protein marker; 2: supernatant of BL21 (DE3); 3: supernatant of BL21(DE3) transformed with pGEX-4T-1 induced by IPTG; 4-9: supernatant of BL21(DE3) transformed with pGEX-RVLG induced by IPTG for 0, 1, 2, 3, 4 and 5 h, respectively

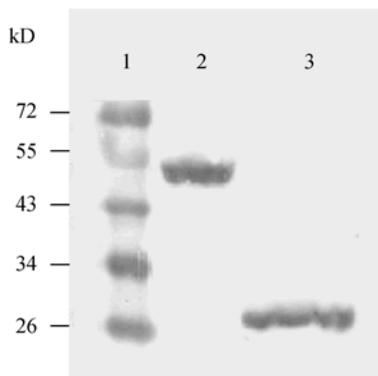


图 5 重组蛋白 GST-RVLG 的 Western blotting 检测
 Fig. 5 Western blotting analysis of recombinant protein using anti-GST monoclonal antibody

1: prestained protein marker; 2: total supernatant of BL21(DE3) transformed with pGEX-RVLG induced by IPTG; 3: total supernatant of BL21(DE3) transformed with pGEX-4T-1 induced by IPTG

的 GST 蛋白和 pGEX-RVLG 表达的重组蛋白都能被 anti-GST mAb 特异性结合(图 5 第 2、3 泳道), 证明诱导表达的重组蛋白确实是 GST 融合蛋白。

2.5 RVLG 蛋白的纯化鉴定

经 SDS-PAGE 分析, 过 GST 柱后的目的蛋白条带下方仍有少许杂带(图 6, 泳道 4), 于是我们切胶进行次级纯化, 结果基本去除了杂带(图 6, 泳道 5), 其纯度可达 85%以上, 可以用作免疫抗原。

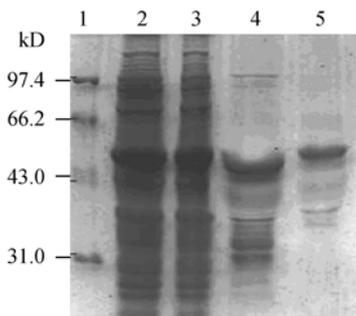


图 6 纯化后重组蛋白 GST-RVLG 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 6 Analysis of purified recombinant GST-RVLG protein by SDS-PAGE

1: protein molecular weight marker (low); 2: unpurified total protein of recombinant strain with induction by IPTG; 3: soluble fraction of recombinant strain with induction by IPTG; 4: first-step purified protein of GST-RVLG; 5: second-step purified protein of GST-RVLG

2.6 小鼠抗大鼠 RVLG 多克隆抗体的鉴定

Western blotting 结果显示小鼠抗大鼠 RVLG 多克隆抗体能与 GST-RVLG 蛋白结合(图 7, 泳道 2), 并且也可以识别 GST 标签蛋白(图 7, 泳道 3)。RVLG 蛋白只表达于生殖细胞内。利用该抗体对大鼠睾丸、肌肉、肝和肺组织的蛋白提取物进行 Western blotting 检测, 结果显示, 睾丸组织蛋白提取物在约 80 kD 处有明显的识别条带(图 8, 泳道 2), 而肌肉、肝和肺组织没有(图 8, 泳道 3、4、5), 表明小鼠抗大

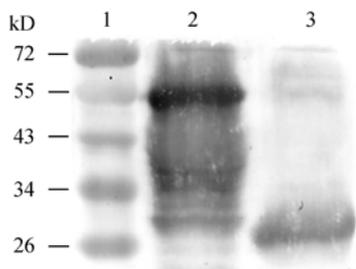


图 7 重组蛋白 GST-RVLG 的 Western blotting 结果

Fig. 7 Western blotting analysis of recombinant protein using polyclonal antibody against GST-RVLG

1: prestained protein marker; 2: purified protein of GST-RVLG; 3: total supernatant of BL21 (DE3) transformed with pGEX-4T-1 induced by IPTG

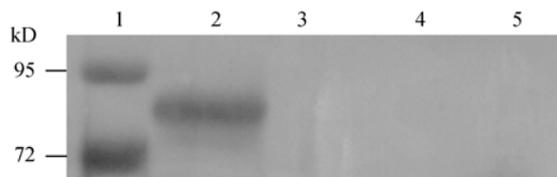


图 8 抗 RVLG 多克隆抗体的组织特异性鉴定

Fig. 8 High-specificity of RVLG polyclonal antibody

1: prestained protein marker; 2,3,4,5: total protein extracts of rat testis, muscle, liver and lung tissue, respectively

鼠 RVLG 腹水多克隆抗体具有较强的组织特异性识别能力。

经免疫组化实验证明, RVLG 多克隆抗体可与大鼠卵巢内卵母细胞中的 RVLG 蛋白结合(图 9 A 箭头所示), 胞质有明显的阳性着色, 而阴性对照(未经免疫的小鼠腹水上清液代替一抗)无明显阳性着色(图 9 B 箭头所示)。

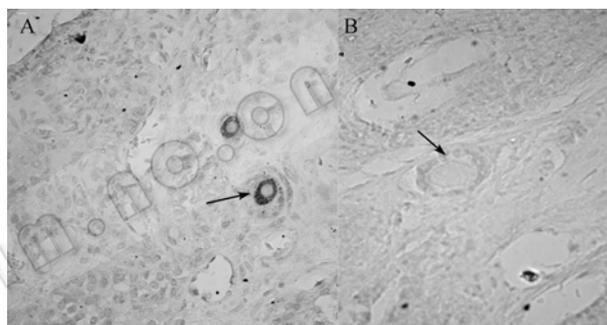


图 9 小鼠抗大鼠 RVLG 多克隆抗体的免疫组化定位分析(×400)

Fig. 9 Immunohistochemical analysis of mouse anti-RVLG polyclonal antibody (×400)

A: analysis of polyclonal antibody against RVLG in 60 days' rat ovary (×400); B: negative control of 60 days' rat ovary (×400)

2.7 RVLG 多克隆抗体效价的检测

间接 ELISA 法测定小鼠抗大鼠 RVLG 蛋白腹水多克隆抗体的结果表明从 1:100 到 1:20 000 的各个稀释度的抗体均与重组的 RVLG 蛋白有反应, 抗体效价达 1:20 000(表 1)。

表 1 间接 ELISA 测定 RVLG 腹水抗体效价

Table 1 Analysis of potency of polyclonal antibody against recombinant GST-RVLG by indirect ELISA

Antibody concentration						Negative control	Null
1:100	1:500	1:1000	1:5000	1:10000	1:20000	0.091	0.001
1.223	1.213	0.974	0.664	0.339	0.225		

3 讨论

大鼠 RVLG 位于 2 号染色体上, 其 cDNA 全长

为 3.1 kb, 编码 713 个氨基酸, 具有 DEAD 家族蛋白特征的 8 个保守框。与爪蟾的 *vasa* 基因(*XVLGI*) 氨基酸序列有 52% 的一致性和 85% 的相似性^[8]。从 GenBank 上获得 *RVLG* cDNA 全长序列(登录号: NM_001077647)后, 通过抗原表位分析, 氨基酸多肽 N 端具较高的抗原决定簇。据此设计引物, 应用 RT-PCR 技术, 从大鼠睾丸组织总 RNA 中克隆出 *RVLG* ORF 5' 端的 687 bp。测序结果比 NM_001077647 序列多 60 bp, 分别在所克隆片段的第 457 bp 处和 538 bp 处多出 45 bp 和 15 bp。与大鼠 2 号染色体基因组中 *RVLG* 进行序列比对后在 *RVLG* 内部发现了所多出的 60 bp, 出现本实验结果是由于大鼠 *RVLG* 的 pre-mRNA 在剪切时以真核生物通用剪切方式 GU-AG 进行可变剪切而造成的, 本实验发现的这一大鼠 *RVLG* mRNA 选择性剪切方式还尚未见报道, 目前正在进一步克隆 *RVLG* 的全长, 以检查睾丸中 *RVLG* mRNA 选择性剪切方式。本实验室克隆的 *RVLG* 片段中与 NM_001077647 有 3 处差异(同源性 99%), 造成 2 处氨基酸改变, 均为 Ala(A)变为 Gly(G), 不影响抗原性质, 可进一步制作多克隆抗体。

制备高效价的多克隆抗体需要高纯度的抗原蛋白。通过原核表达重组蛋白可以很快得到大量的抗原蛋白, 而且操作简便。GST 基因融合表达系统广泛用于各种融合蛋白的表达, 该系统与其他系统相比具有表达效率高、目的蛋白可溶、操作简便等特点, 并可利用还原型谷胱甘肽柱进行纯化, 得到较纯的融合蛋白。还可将 GST 标签切除, 得到单一的目的蛋白。表达的蛋白质可用于制备抗体和在体外研究蛋白质的相互作用等。本研究选用 pGEX-4T-1 载体在大肠杆菌中成功地表达了可溶性 GST-*RVLG* 融合蛋白, 而且利用 GST 标签对 GST-*RVLG* 融合肽进行了纯化。

S180 细胞可以在鼠腹腔内迅速繁殖, 刺激机体产生大量腹水, 常用来制作多克隆抗体^[14]。本试验成功制备了小鼠抗大鼠 *RVLG* 的腹水多克隆抗体, 蛋白质印迹分析证实了抗体可特异性结合大鼠睾丸的 *RVLG* 蛋白, 表明了所制备抗体具有高的亲和性。免疫组织化学和 Western blotting 结果显示, 抗体能特异性识别卵母细胞和睾丸内的 *RVLG* 蛋白, 但不能识别大鼠卵巢组织中的其它细胞和其它组织, 这一结果与以前报道的小鼠 *VASA* 蛋白在生殖细胞系中特异性表达的结论相一致^[15]。本实验制作的抗体可用作下一步识别大鼠卵巢生殖细胞及出生后大鼠

卵巢内是否持续卵子再生的研究。

REFERENCES

- [1] Rocak S, Linder P. DEAD-box proteins: The driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, **5**(3): 232-241.
- [2] Schu P, Bach T, Wieschaus E. Maternal effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Rouxps Arch Dev Biol*, 1986, **195**(5): 302-317.
- [3] Komiya T, Tangawa Y. Cloning of a gene of the DEAD box protein family which is specifically expressed in germ cells in rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **207**(1): 405-410.
- [4] Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish *vasa* homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 1997, **124**(16): 3157-3165.
- [5] Liang L, Diehl-Jones W, Lasko P. Localization of *vasa* protein to the *Drosophila* pole plasm is independent of its RNA-binding and helicase activities. *Development*, 1994, **120**(5): 1201-1211.
- [6] Knaut H, Pelegri F, Bohmann K, et al. Zebrafish *vasa* RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *Cell Biol*, 2000, **149**(4): 875-888.
- [7] Raz E. The function and regulation of *vasa*-like genes in germ-cell development. *Genome Biol*, 2000, **1**(3): 1-6.
- [8] Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R. The mouse homolog of *Drosophila vasa* is required for the development of male germ cells. *Gene Dev*, 2000, **14**(7): 841-853.
- [9] Johnson J, Canning J, Kaneko T, et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 2004, **428**: 145-150.
- [10] Eggen K, Jurga S, Gosden R, et al. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*, 2006, **441**: 1109-1114.
- [11] Bukovsky A, Svetlikova M, Caudle MR. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproduc Biol Endocrinol*, 2005, **3**: 1-17.
- [12] Liu YF, Wu C, Lyu QF, et al. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol*, 2007, **306**: 112-120.
- [13] Yang CC, Zhang B, Wang JF, et al. Purification and identification of polyclonal antibodies against the recombinant Em18 antigen of *Echinococcus multilocularis*. *J Xin Jiang Med Univ*, 2007, **30**(4): 339-342.
杨晨晨, 张蓓, 王俊芳, 等. 抗泡球蚴重组 Em18 抗原多克隆抗体的纯化与鉴定. *新疆医科大学学报*, 2007, **30**(4): 339-342.
- [14] Deng RC, Zhang MW, Bai YX, et al. A new method for preparation of polyclonal antibodies. *Lett Biotech*, 2001, **12**(1): 34-35.
邓瑞春, 张明伟, 白云秀, 等. 一种新的制备多克隆抗体的方法. *生物技术通讯*, 2001, **12**(1): 34-35.
- [15] Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, et al. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Dev Biol*, 1994, **91**: 12258-12262.