

短篇论著

文章编号:1000-5404(2014)20-2145-03

Znf230 多克隆抗体的制备及其在小鼠组织中的表达

宋红霞¹,张思仲² (404000 重庆,重庆三峡医药高等专科学校药理教研室¹;610041 成都,四川大学华西医院医学遗传研究室,生物治疗国家重点实验室疾病基因组学研究室²)

[摘要] 目的 通过获得小鼠 Znf230 多克隆抗体,对 Znf230 在小鼠组织中的表达及定位进行研究。方法 扩增小鼠 Znf230 基因与原核表达载体 pGEX-5X-3 重组,诱导得到 GST-Znf230 融合蛋白,纯化的融合蛋白免疫家兔制备多克隆抗体,通过 Western blot 和免疫组织化学方法研究 Znf230 在小鼠组织中的表达及定位情况。结果 Znf230 多克隆抗体具有较高的特异性,Znf230 在小鼠多种组织中均有表达,在脾脏和脑组织中表达量较高,该蛋白在肝细胞、脾细胞、肺支气管上皮细胞细胞核中表达,在肾小管上皮细胞的细胞质中表达,在睾丸组织精子细胞的顶体系统表达。结论 成功获得小鼠 Znf230 多克隆抗体,证实 Znf230 在小鼠多种组织中表达,它可在肝细胞、脾细胞、肺支气管上皮细胞核及肾小管上皮细胞质中表达,也可在精子细胞的顶体系统表达。

[关键词] Znf230;表达;定位;多克隆抗体

[中图分类号] R392.33;R392.11;R967

[文献标志码] A

锌指蛋白基因家族为哺乳动物最大的基因家族之一,环指蛋白为该基因家族的一个亚类,具有特征性的 C3HC4 型或 C3H2C3 结构域^[1]。迄今为止,已有 200 多种环指蛋白参与了细胞周期、信号转导、RNA 转运、转录调控、肿瘤生成和其他的发育过程^[2-3]。

ZNF230 是我室 2001 年克隆的一个可能与人类精子发生相关的基因,小鼠同源基因 Znf230 与人 ZNF230 核苷酸和蛋白序列的同源性分别为 92%、98%,锌指结构域完全相同^[4-5]。ZNF230/Znf230 属于 C3HC4 型锌指蛋白,大多数的 C3HC4 型锌指蛋白均为核内转录因子^[6]。先前研究表明,ZNF230/Znf230 可以在 Cos7 细胞核中表达^[7],ZNF230 能够在 HepG2 细胞核中表达,是具有 DNA 结合能力的蛋白因子,提示该基因在生精调控中具有转录因子的某些特性^[8]。ZNF230/Znf230 上游序列具有启动子功能,5'上游 CpG 岛非甲基化对该基因表达是必要的^[9-10]。ZNF230 基因不但与无精症相关,而且可能与血清 FSH 水平有相关性^[11]。另有研究表明,ZNF230 与 HIV/HCV 合并感染及 HCV 感染可能存在一定相关性^[12]。

尽管得到以上结论,但是 Znf230 表达的细胞定位尚未阐明,直观展示 Znf230 在组织中的表达及亚细胞定位有利于进一步研究该基因的正常功能及其在生精

过程中的作用。因此本实验我们首先制备小鼠 Znf230 多克隆抗体,并且观察该基因在小鼠组织中的表达及定位情况,为进一步研究该基因的功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

Trizol 试剂、逆转录酶和 RIPA 为北京百泰克公司产品;HRP 羊抗兔 IgG 和免疫组化染色试剂盒购自北京中杉生物技术公司;ECL 增强化学发光试剂盒、Glutathione Sepharose 4B 亲和层析介质购于 PIERCE 公司;限制性内切酶(*Bam*H I、*Not* I)为 TaKaRa 公司产品;ELISA 试剂盒为 KPL 公司产品;PVDF 膜购于 Millipore 公司;载体、大肠杆菌由本实验室保存。家兔和小鼠由四川大学实验动物中心提供。

1.2 pGEX-Znf230 质粒构建

从成年小鼠睾丸组织提取总 RNA,反转录合成 cDNA。通过上下游引物 5'-CGGGATCCCCATGGGACAGCAAATTTTCGGAT-3'(含有 *Bam*H I 酶切位点),5'-ATAAGAATGCGGCCGCA-CAGAAA-GTCTTCCCAAGTCA-3'(含有 *Not* I 酶切位点)对 Znf230 进行 PCR 扩增。扩增产物与 T 载体连接,进行酶切鉴定并测序,测序正确后,与表达载体 pGEX-5X-3 进行连接。所得质粒命名为 pGEX-Znf230。

1.3 多克隆抗体的制备及特异性鉴定^[13]

pGEX-Znf230 转化大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达。超声破碎菌体,离心,收集沉淀和上清分别进行 SDS-PAGE 电泳。用 Glutathione Sepharose 4B 亲和纯化裂解液上清中的融合蛋白,融合蛋白进行透析和浓缩后,与弗氏佐剂乳化后皮下注射家兔,每隔 2 周加强 1 次免疫,共加强 4 次,从第 3 次免疫后 1 周 ELISA 法测定血清抗体效价,末次免疫后 2 周进行心脏采血,分离血清,-70℃保存。纯化的融合蛋白电泳转膜,加入

[基金项目] 国家自然科学基金(30470960);国家重点基础研究发展计划(973 计划,2004CB518805)

[通信作者] 宋红霞,E-mail:xdhx163@163.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1458.026.html>(2014-08-21)

1:5 000 稀释的抗血清(免疫前血清作为阴性对照),室温孵育 2 h 后加入 1:7 500 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h, ECL 显色后曝光。

1.4 Western blot 检测小鼠不同脏器组织 Znf230 的表达

取成年小鼠不同脏器组织(心、肝、脾、肺、肾、脑、肌肉、睾丸),液氮研磨,RIPA 裂解,提取总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度。分别取各组织裂解液 20 μg 蛋白上样,进行电泳转膜,用 1:5 000 稀释的抗血清与膜上的蛋白进行孵育,1:7 500 稀释的 HRP 标记的羊抗兔 IgG 进行检测,用 ECL 化学发光检测试剂盒显影,最后在暗室中用 X 线片感光 1~5 min。以 β -actin 作为内参照,实验重复 3 次。

1.5 免疫组织化学检测 Znf230 的亚细胞定位

成年小鼠肝、脾、肺、肾和睾丸组织经 10% 中性甲醛固定后石蜡包埋,切片,组织切片脱蜡与水化,枸橼酸钠缓冲液抗原修复;3% 双氧水除去内源性过氧化物酶;正常山羊血清封闭;加 1:500 稀释的兔多克隆抗血清孵育过夜;加生物素化二抗工作液;洗涤后加辣根酶标记链霉卵白素工作液;DAB 显色,苏木精复染,中性树脂封片,显微镜观察拍照,阳性染色为棕黄色。以兔免疫前血清作为阴性对照,重复实验 3 次。

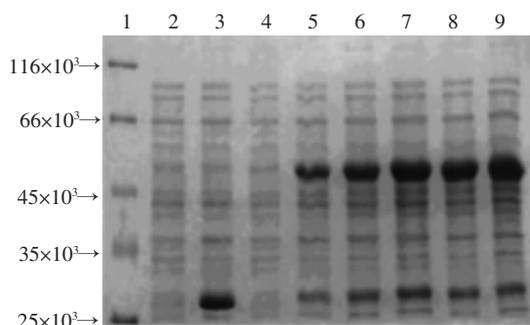
1.6 小鼠睾丸组织 PAS(过碘酸-雪夫)染色

成年小鼠睾丸组织切片脱蜡至水,过碘酸溶液染色 10 min,充分水洗,雪夫试剂浸染 10 min,流水洗 10 min,迈耶苏木精染核 2 min,95% 乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封片,阳性染色为紫红色。

2 结果

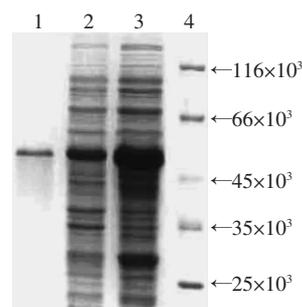
2.1 多克隆抗体的制备及特异性鉴定

pGEX-Znf230 重组质粒经测序证实与理论序列完全一致,pGEX-Znf230 转化大肠杆菌 BL21(DE3),经 IPTG 诱导后表达,诱导 4 h 时,重组蛋白表达量最大(图 1),在菌体裂解液上清中表达量相对较多,纯化后得到了高纯度的重组蛋白(图 2)。家兔加强免疫 4 次后,ELISA 方法测得抗体效价为 1:128 000。Western blot 法检测抗血清与纯化的 pGEX-Znf230 融合蛋白反应可以特异性结合(图 3)。



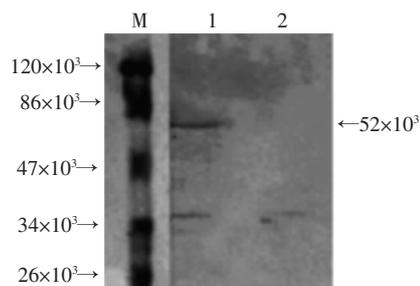
1:蛋白标准;2:诱导前 pGEX-5X-3 表达;3:诱导后 pGEX-5X-3 表达;4:诱导前 pGEX-Znf230 表达;5~9:分别诱导 2、3、4、5、6 h 的 pGEX-Znf230 表达

图 1 GST-Znf230 融合蛋白在大肠杆菌中诱导表达的 SDS-PAGE 分析



1:纯化的融合蛋白;2:菌体裂解液沉淀;3:菌体裂解液上清;4:蛋白标准

图 2 GST-Znf230 融合蛋白的纯化和可溶性鉴定

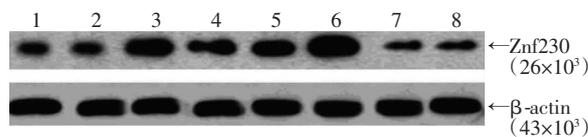


M:蛋白标准;1:Znf230 多克隆抗血清;2:兔免疫前血清

图 3 多克隆抗体的特异性鉴定

2.2 Western blot 检测小鼠不同脏器组织 Znf230 的表达

Western blot 法检测成年小鼠不同脏器组织 Znf230 的表达情况,结果表明 Znf230 在小鼠心、肝、脾、肺、肾、脑、骨骼肌和睾丸组织中均有表达(图 4),其中在脾脏和脑组织中的表达量较高。

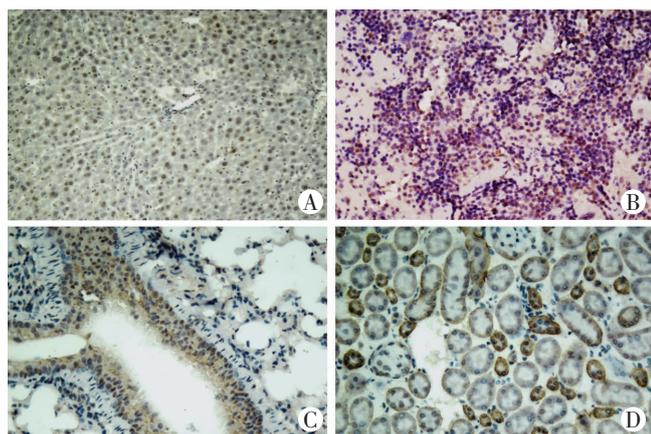


1:心;2:肝;3:脾;4:肺;5:肾;6:脑;7:骨骼肌;8:睾丸

图 4 Western blot 检测 Znf230 在小鼠不同组织中的表达情况

2.3 免疫组织化学检测 Znf230 的亚细胞定位

运用制备的多克隆抗血清,对成年小鼠肝、脾、肺、肾、睾丸组织进行免疫组织化学分析。免疫组织化学结果显示,成年小鼠肝、脾、肺、肾、睾丸组织均可表达 Znf230,该蛋白在肝细胞、脾细胞、肺支气管黏膜上皮细胞的细胞核中表达,在肾小管上皮细胞的细胞质中表达(图 5),在睾丸组织圆形和延长精子细胞的顶体系统表达(图 6)。该基因在顶体表达主要有 3 种不同的形态:在早期的圆形精子细胞中,主要在顶体系统的 Golgi 阶段表达,定位在核上的一个非常小的区域,看上去就像核上的一个点(图 6D);随着圆形精子细胞的发育,阳性区域看上去像一个帽子结构,覆盖了大约核的一半(图 6E);Znf230 同时也出现在延长精子的头部,阳性染色为对应顶体的一个延长的区域(图 6F),通过 PAS 染色(图 6A),确定 Znf230 定位于顶体系统。



A: 肝; B: 脾; C: 肺; D: 肾

图5 免疫组织化学检测 Znf230 的亚细胞定位 (S-P ×400)

3 讨论

ZNF230 基因是我室通过对无精症患者与可育成人睾丸组织 mRNA 差异显示分离克隆出的可能与人类精子发生相关的新基因。随后获得了小鼠 Znf230 基因,它编码一个 230 个氨基酸的 C3HC4 型锌指蛋白。小鼠 Znf230 基因是人 ZNF230 基因的同源基因^[4-5]。鉴于直接研究人类 ZNF230 蛋白的表达取材比较困难,本研究首先对小鼠组织中 Znf230 基因的表达进行研究,以期对人类 ZNF230 基因的深入研究提供线索。

制备一种效价高、特异性好的抗体,对于研究基因的表达、定位等生物学功能是必不可少的。本实验通过 PCR 扩增获得小鼠 Znf230 基因并且与原核表达载体进行重组,将重组质粒转入大肠杆菌, IPTG 诱导 4 h 时,重组蛋白表达量最大,并且主要以可溶形式表达,纯化的融合蛋白免疫家兔,制备出高效价和高特异性的多克隆抗体。随后通过 Western blot 检测发现 Znf230 在成年小鼠不同组织中均有不同程度的表达,在脾脏和脑组织中表达量较高。免疫组织化学分析结果表明 Znf230 在肝细胞、脾细胞、肺支气管黏膜上皮细胞的细胞核中表达,在肾小管上皮细胞的细胞质中表达,在睾丸组织圆形精子细胞和延长精子细胞的顶体系统表达。虽然我们以前预测该蛋白核定位可能性为 60%^[5], ZNF230/Znf230 可在 Cos7 和 HepG2 细胞核中表达^[7-8],但是通过本实验,我们发现 Znf230 在不同组织表达的部位不同,可在细胞核或者细胞质中表达,另外, Znf230 在精子细胞的顶体系统表达提示该蛋白可能在小鼠精子的生成特别是精子顶体的形成、受精过程中起着重要的作用。

总之,本课题组克隆了小鼠 Znf230 基因,并制备了 Znf230 的多克隆抗体,抗体具有高度特异性,可用于 Western blot 和免疫组织化学检测,为进一步研究该基因的功能提供了抗体;同时初步研究了 Znf230 在小鼠组织中的表达及定位情况,对于深入研究其功能具有重要的提示意义。

参考文献:

- [1] Borden K L. RING domains: master builders of molecular scaffolds? [J]. *J Mol Biol*, 2000, 295(5): 1103 - 1112.
- [2] Kumar R, Manning J, Spendlove H E, et al. ZNF652, a novel zinc finger protein, interacts with the putative breast tumor suppressor CBF-FA2T3 to repress transcription [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(9): 655 - 665.
- [3] Li S, Lu M M, Zhou D, et al. GLP-1: a novel zinc finger protein required in somatic cells of the gonad for germ cell development [J]. *Dev Biol*, 2007, 301(1): 106 - 116.
- [4] Zhang S, Qiu W, Wu H, et al. The shorter zinc finger protein ZNF230 gene message is transcribed in fertile male testes and may be related to human spermatogenesis [J]. *Biochem J*, 2001, 359(Pt 3): 721 - 727.
- [5] Qiu W, Zhang S, Xiao C, et al. Molecular cloning and characterization of a mouse spermatogenesis-related ring finger gene Znf230 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306(2): 347 - 353.
- [6] Freemont P S. The ring finger. A novel protein sequence motif related to the zinc finger [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 684: 174 - 192.
- [7] 许文明, 张思仲, 邱为民, 等. ZNF230/荧光蛋白融合基因表达载体的构建及其在 Cos 细胞中的表达与定位 [J]. *遗传*, 2004, 26(4): 451 - 454.
- [8] 卢攀, 张思仲, 刘运强. 人睾丸特异表达蛋白 RNF141 与特定 DNA 序列结合的初步研究 [J]. *山东医药*, 2010, 50(13): 55 - 56.
- [9] 刘运强, 陶大昌, 张思仲, 等. 小鼠 Znf230 基因启动子与 LacZ 报告基因融合载体的构建及其在细胞中的表达 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2006, 43(2): 420 - 424.
- [10] Liu Y, Tao D, Yang Y, et al. Unmethylated state of 5' upstream CpG islands may be necessary but not sufficient for the testis-enriched expression of ZNF230/Znf230 [J]. *Genes Genomics*, 2014, 36(2): 163 - 169.
- [11] Dong J T, Zhang S Z, Ma Y X, et al. Screening for ZNF230 gene mutation and analysis of its correlation with azoospermia [J]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2005, 22(3): 258 - 260.
- [12] 赵锦, 赵广录, 周克恒, 等. 用 mRNA 差异显示方法筛选 HIV/HCV 合并感染者差异表达基因 [J]. *中国艾滋病性病*, 2008, 14(5): 442 - 445.
- [13] 郭晓妹, 李洪涛, 方海立, 等. 小鼠 IFIT1 多克隆抗体的制备 [J]. *第三军医大学学报*, 2007, 29(15): 1462 - 1464.

(收稿:2014-04-02;修回:2014-05-28)

(编辑 汪勤俭)