

赭纤虫 RNA 聚合酶 II 锌指基因片段的表达、纯化及多克隆抗体的制备

宋 莉 柴宝峰 王 伟 梁爱华

(山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要:以一种进化较为原始的单细胞真核生物日本赭纤虫 (*Blepharisma japonicum*) 大核基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到了 RNA 聚合酶 II 锌指基因片段, 并构建重组表达质粒 pGEX-6p1-ZFbl, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行表达, SDS-PAGE 和 Western blot 分析证明目的蛋白得到了可溶性融合表达。用纯化的蛋白免疫新西兰兔, 制备多克隆抗体。Western 印迹和 ELISA 鉴定结果表明抗体特异性较高, 效价高达 1:15000。

关键词: 赭纤虫; RNA 聚合酶 II; 锌指; 多克隆抗体; 进化

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2005)05-0533-05

锌指是 Miller 等人最初在爪蟾转录因子 TF-III A 中发现的一种特殊结构^[1], 一般由大约 30 个氨基酸组成, 整个肽段通过锌离子与半胱氨酸和/或组氨酸螯合配位形成稳定的“指头”样高级结构, 含有这种高级结构的蛋白称为锌指蛋白。目前在生物体内发现的基因转录调控结构主要有四种结构形式: 螺旋-转角-螺旋 (Helix-turn-helix)、亮氨酸拉链 (Leucine zipper)、锌指蛋白 (Zinc finger) 和 β 带 (β ribbon), 其中锌指蛋白是种类最多, 存在最广的一类核酸结合蛋白, 它不仅可结合 DNA 和 RNA^[2], 还能与 DNA-RNA 杂交体^[3] 和其他锌指蛋白^[4] 结合, 控制生物体中蛋白质的转录和翻译过程。

赭纤虫 (*Blepharisma*) 是进化上较为原始的真核生物。研究发现这种纤毛虫具有体核 (大核) 和生殖核 (小核) 隔代发生的生殖现象^[5], 而这种现象在其他纤毛虫中从未见报道。RNA 聚合酶 II 作为一种反式作用因子, 在基因的转录中起着及其重要的作用, 其中锌指结构域是 RNA 聚合酶结合启动子必不可少的元件。目前人们主要是通过结晶^[6] 和突变^[7] 来进行锌指与核酸的结合特性研究, 但遗憾的是, 对大部分锌指蛋白与 DNA 的结合体还无法获得单晶, 同时, 一种固定的结合模式也无法考察锌指蛋白中某些氨基酸对其与 DNA 结合的影响, 因此人们很多是通过定点突变技术进行研究。本实验以日本赭纤

虫 (*B. japonicum*), 这种进化上较为原始且遗传方面比较独特的生物为研究材料, 从其 RNA 聚合酶 II 基因中克隆得到单锌指核酸序列, 将其在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中进行表达, 得到可溶性融合单锌指蛋白, 并制备多克隆抗体, 为以后单锌指的基因突变及探讨低等真核生物纤毛虫基因转录调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 基因组 DNA 的提取 实验动物日本赭纤虫 (*B. japonicum*) 大量培养于 SMB 培养液 (1.5 mmol/L NaCl, 0.05 mmol/L KCl, 0.4 mmol/L CaCl₂, 0.05 mmol/L MgCl₂, 0.05 mmol/L MgSO₄, 2 mmol/L NaH₂PO₄, 0.2 mmol/L NH₄NO₃ pH 6.8) 中, 以一种细菌 *Enterobacter aerogenes* 为食物, 离心收集赭纤虫, 加入 20 mL NDS [50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 0.5 mol/L EDTA, 1% SDS], 放置于 65℃ 48 h 破碎细胞, 用苯酚/氯仿 (1:1) 抽提去除蛋白质, 经透析后 DNA 用乙醇沉淀。

1.2 锌指基因片段的扩增和重组表达质粒的构建 用聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 扩增得到单锌指结构基因。根据 RNA 聚合酶 II [基因登录号: AF387737] 的锌指基因片段设计特异性引物, 其中 5' 上游引物含有 *Bam*H I 酶切位点, 3' 下游引物含有 *Xho* I 酶切位点和终止密码子 TAA。所用引物为: 正向引物: 5'-GTA TG G GAT CCG GAG AAA

收稿日期: 2004-04-10; 修订日期: 2005-04-30

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30270204, 30300038); 山西省留学基金资助

作者简介: 宋 莉 (1980—), 女, 山西临汾人; 博士研究生; 研究方向: 生物化学与分子生物学

通讯作者: 梁爱华, Tel: 0351-7018731; E-mail: aliang@sxu.edu.cn

TGG AAA GGG-3'; 反向引物: 5'-CAG T CT CGAGTT AAG CCT TGG TGC AAT ATG-3' 阴影部分为酶切位点, 下划线部分为终止密码子。

PCR 扩增后的产物胶回收(上海华舜胶回收试剂盒), 回收产物经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后, 回收目的片段, 克隆到用同样两种限制酶切的 pGEX-6P1(Amersham 公司产品)表达载体中, 得到重组表达质粒 pGEX-6p1-ZFbl。

1.3 GST 融合蛋白的表达、纯化和 Western blot 分析 筛选阳性克隆, 挑单菌落接种至 5mL LB 液体培养基中, 37℃ 条件下, 150r/min 震荡培养过夜, 再按 2% 的比例接种到 100mL LB 液体培养基中, 以同样条件培养 2—5h 至 $OD_{600} = 0.3-0.5$, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2mmol/L, 25℃, 150r/min 诱导培养 4—6h。诱导后的细菌培养物 12000r/min 离心收集菌体, 重悬, 超声破碎菌体, 离心收集上清。上清用 Sepharose 4B 亲和柱亲和层析, 用 PBS 缓冲液洗柱, 还原型谷胱甘肽洗脱液洗脱。

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后, 采用电转移将蛋白条带转移到硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 然后用 5% 脱脂奶粉封闭, 封闭后加入 GST 抗体(Amersham 公司产品)温和振荡, 使其与膜上的特异蛋白结合, 结合后加入洗液洗膜, 然后加入显色液显色。

1.4 多克隆抗体的制备 首先纯化包含体, 采用切胶回收包含体, 然后取包含体 1mg 经福氏完全佐剂乳化后, 皮下多点注射免疫新西兰大白兔(2.0kg/只), 初次免疫后在第 4、7 周分别以等量抗原与不完全佐剂乳化后加强免疫, 末次免疫后 7d 耳缘静脉取血, 进行酶联免疫分析(ELISA), 如效价很高, 10d 颈动脉放血, 免疫血清加 NaN_3 终浓度 0.02%, -80℃ 冻存。

1.5 酶联免疫分析(ELISA)和 Western 印迹 ELISA 分析是用包被液(0.2mol/L $NaHCO_3$)将 GST-ZFbl 配置成 5 μ g/mL 的抗原溶液, 加到聚苯乙烯反应(PVC)板上, 4℃ 过夜, 洗净拍干, 再以牛血清蛋白配置的封闭液封闭板上的空白位点, 加入待鉴定的抗体, 37℃, 1h 后, 加入羊抗兔酶标二抗(中山试剂) 37℃, 1h 后, 加入底物 ABTS, 闭光反应 15min, 加入 2mol/L 的 H_2SO_4 终止反应, 以酶标免疫分析仪测定 405nm 的光吸收值。Western 印迹方法同上。

1.6 锌指蛋白的序列及进化分析 通过 DNASTAR 中 MegAlign 软件, 应用其中 Jotun Hein 的比对方法^[8], 对 9 种 RNA 聚合酶 II 锌指蛋白序列进行比

对, 然后构建进化树。

2 结果

2.1 锌指基因片段的扩增与重组表达质粒的构建

以赭纤虫基因组 DNA 为模板, 用特异性引物进行 PCR 扩增, 在约 260bp 处有一条带, 经测序确认扩增产物为目的基因。将 PCR 扩增产物纯化后克隆到表达载体 pGEX-6p1, 得到重组表达质粒 pGEX-6p1-ZFbl。

重组表达质粒 PCR 及酶切鉴定结果见图 1, 泳道 1 在大约 260bp 处有一明显扩增条带, 泳道 2 在大约 260bp 和 4900bp 处各有一明显条带, 表明重组表达质粒已成功构建。

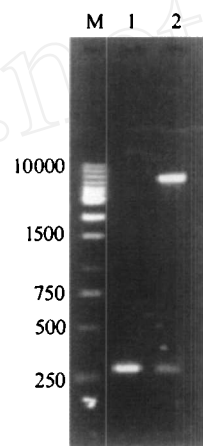


图 1 重组表达质粒 PCR 及酶切鉴定结果

Fig. 1 Agarose of electrophoresis of PCR product and restriction enzyme analysis of recombinant expression plasmids. M. 1Kb DNA marker; 1. PCR product of pGEX-6p1-ZFbl; 2. Recombinant expression plasmids digested by *Bam*H I and *Xho* I

2.2 融合蛋白的表达纯化和 Western 印迹分析

将重组表达质粒转入大肠杆菌 BL21(DE3)宿主菌进行表达, 表达产物经 Sepharose 4B 亲和柱亲和层析, 其结果见图 2。泳道 3 为 *E. coli* BL21 宿主菌(含重组表达质粒)诱导后的结果, 可见在大约 35kDa 处有表达条带, 说明蛋白得到了表达, 泳道 4 为经 Sepharose 4B 亲和柱亲和层析后的结果, 可见在大约 26kDa, 35kDa 和 70kDa 处各有一条带, 它们可能分别为降解的 GST, GST-ZFbl 的单聚体和 GST-ZFbl 二聚体形式, 表明蛋白已得到了初步纯化。

用抗 GST 抗体对 GST-ZFbl 表达产物进行 Western 印迹分析, 结果见图 3, 可见在大约 26kDa, 35kDa 和 70kDa 处各有一条反应带, 进一步证明目的蛋白以融合蛋白的形式表达。

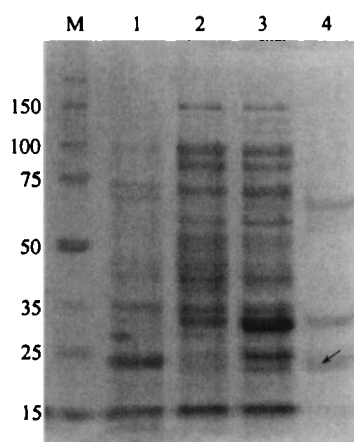


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expression products. M. protein marker; 1. *E. coli* BL21(pGEX-6p1) cell extract with IPTG induction; 2. *E. coli* BL21(pGEX-6p1-ZFbl) cell extract without induction; 3. *E. coli* BL21(pGEX-6p1-ZFbl) cell extract with IPTG induction; 4. purified expression product

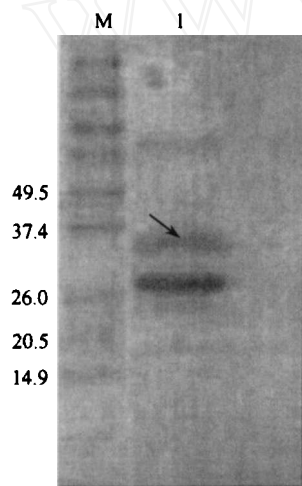


图 3 表达产物的 Western blot 分析

Fig.3 Western blot analysis. M. prestain protein marker; 1. purified fusion protein

2.3 GST-ZFbl 抗血清效价的检测及 Western 印迹

用纯化后的 GST-ZFbl 免疫新西兰大白兔制备抗 GST-ZFbl 血清。以免疫前的血清作为对照,血清稀释一定的倍数后,用 ELISA 检测抗体的效价,结果显示末次免疫后的抗血清效价达 1:15000 以上[以(标本 OD 值-空白对照 OD 值)/(阴性对照 OD 值-空白对照 OD 值) > 2.1 为阳性]。

用制备好的抗血清及对照血清对融合蛋白进行 Western 印迹,结果(图 4)显示的用制备好的抗血清对融合蛋白进行 Western 印迹中,35kDa 处有特异性条带,70kDa D 处也有一微弱条带,而对照血清所作的 Western

印迹中,并没有任何条带,这表明表达的融合蛋白有很好的免疫活性,制备的抗体有较好的特异性。

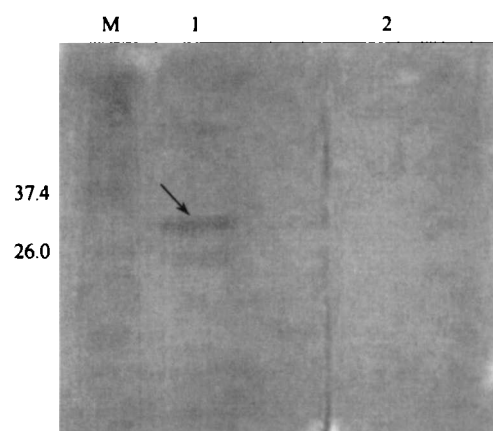


图 4 抗血清的 Western blot 分析

Fig.4 Western blot analysis of antiserum M. prestain protein marker; 1. using serum of immune rabbit proceeding western blot; 2. using serum of rabbit without immune proceeding western blot

2.4 锌指蛋白的序列及进化分析 对 9 种 RNA 聚合酶 II 锌指序列进行比较和聚类分析(图 5),基本分成了植物、低等单细胞原生动、真菌、高等多胞真核生物几个聚类群,这反映了各个物种之间的进化关系。

3 讨论

锌指蛋白是真核细胞中最普遍存在的一类 DNA 结合蛋白,从其结构与功能上来看,锌指蛋白通过多种方式来创造它们各不相同的核酸选择性的位点结合特性:用不同的配位方式(Cys_2His_2 , Cys_2His_2 , Cys_2Cys_2 ……),簇结构(finger, twist, ribbon, cluster),锌指聚合度(单个锌指,双聚锌指)以及锌指上 α 螺旋和 β 折叠的不同组合等来生成结合于不同用途、不同核酸的特异选择性^[9]。分析赭纤虫的 RNA 聚合酶 II 锌指结构域的序列(如图 5)表明,该锌指与其他物种的 RNA 聚合酶 II 锌指在结构上基本一致,属于 $ZnCys_4$ 型锌指,序列由 $CX_2CX_{14}CX_2C$ 组成,其中 C 为半胱氨酸, X 为其他氨基酸。利用 DNASTAR 中的 protean 软件,对 9 种 RNA 聚合酶 II 锌指序列进行二级结构比较如图 6 所示,发现其二级结构类型主要分成两类:一类是以游仆虫(*Euplotes octocarinatus*),疟原虫(*Plasmodium falciparum*)和人(*homo sapiens*)等为代表,其结构以 3 个 β 折叠组合而成的锌带,这种结构曾见报道^[10];另一类是以赭纤虫(*Blepharisma japonicum*)等为代表的以 α 螺旋组合而成的锌指,这种结构从未见报道。从这一结果可看出 RNA 聚合酶 II 锌指序列在二级结构上是以两个分支来进行进化

的, 精纤虫 (*Blepharisma japonicum*) 与游仆虫 (*Euplotes octocarinatus*)、疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 这三种低等单细胞原生动物的锌指序列在二级结构进化上分别处于不同的分支。这种二级结构的不同可能会导致

DNA 识别的不同。那么, 在低等的真核生物中, 由 RNA 聚合酶 II 介导的基因转录调控机制也许不止一种。这种以 α 螺旋组合而成的锌指又是如何识别 DNA 介导基因转录调控的呢?

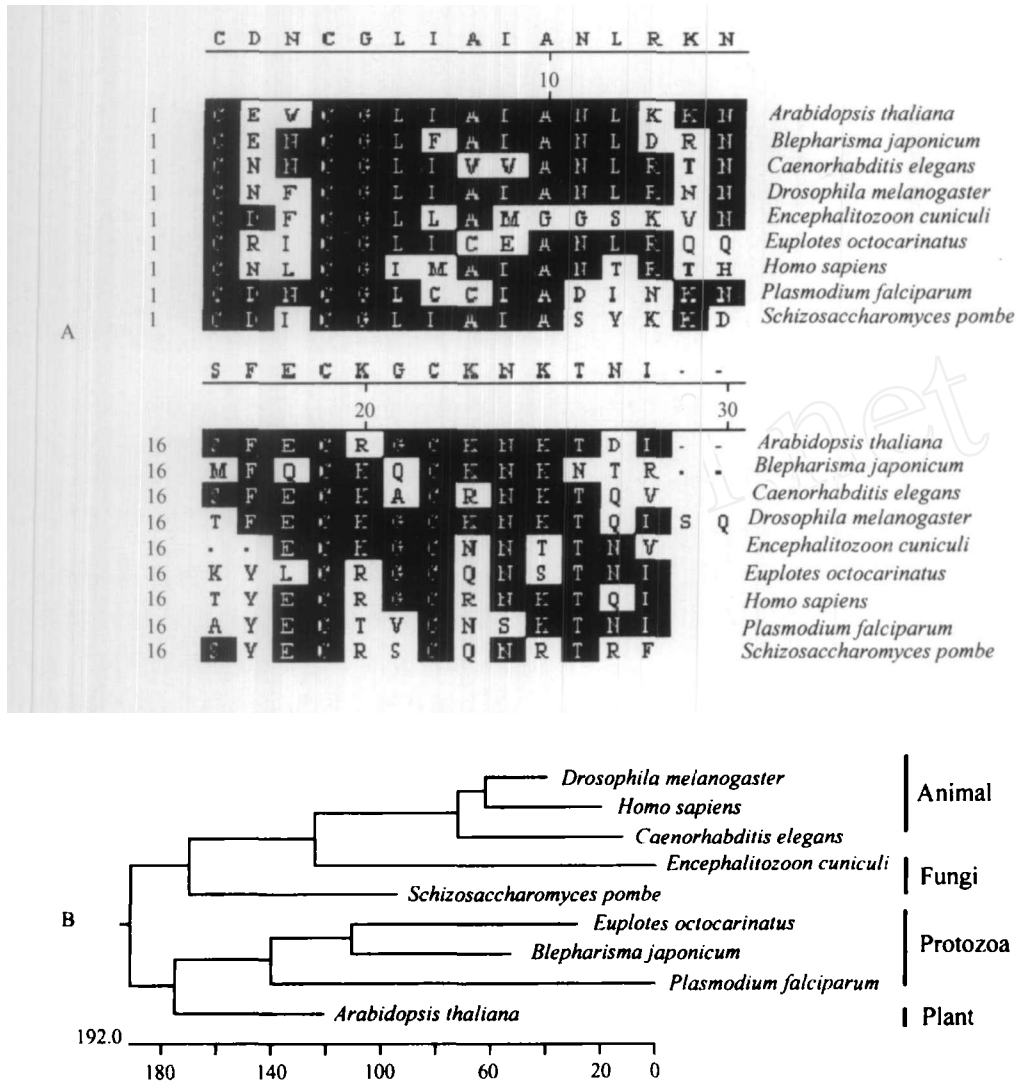


图 5 锌指序列(A)及进化分析(B)

Fig.5 analysis of the sequence and evolution about zinc finger

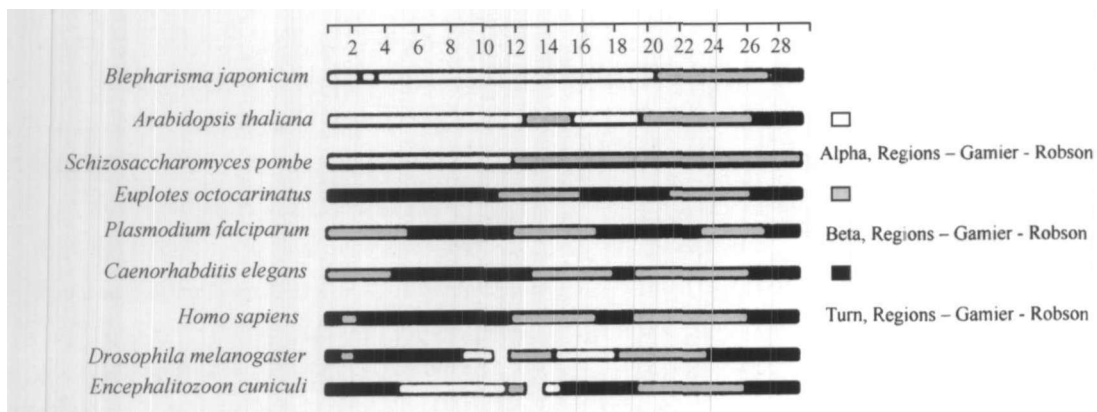


图 6 锌指序列的二级结构比较

Fig.6 analysis of the secondary structure about zinc finger

为研究上述问题,需要将赭纤虫 RNA 聚合酶 II 锌指结构基因进行体外表达并制备抗体。RNA 聚合酶 II 锌指结构域含有四个半胱氨酸,这使得它在表达时,极易形成错误的折叠,因此作者在设计实验时选用表达载体 pGEX-6p1,这个载体在多克隆位点前融合有 GST 基因序列,当目的基因表达时,与 GST 形成融合蛋白,从而帮助目的蛋白正确折叠。在实验中还发现,表达的 GST-ZFbl 融合蛋白形成了二聚体形式,这可能是由于两个 GST-ZFbl 单聚体的半胱氨酸之间形成二硫键导致的。不过该二聚体的形成并不影响本研究中抗体的制备,利用表达的 GST-ZFbl 融合蛋白最终获得了效价高,特异性好的多克隆抗体,这为进一步研究低等真核生物纤毛虫基因转录调控机制奠定基础。

参考文献:

- [1] Miller J, Melachlan A D, Klug A. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor III A from *Xenopus oocytes* [J]. *EMBO J.* 1985, 4(6):1609—1614
- [2] Theunissen O, Rudt F, Guddat U, et al. RNA and DNA binding zinc fingers in *Xenopus* TF III A [J]. *Cell* 1992, 71:679—690
- [3] Shi Y, Berg J M. Specific DNA-RNA hybrid binding by zinc finger proteins [J]. *Science*, 1995, 268:282—284
- [4] Colgan J, Ashali H, Manley J L. Direct interactions between a glutamine-rich activator and the N-terminus of TF II B mediate transcriptional activation in vivo [J]. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15(4):2311—2320
- [5] Zhu W Y, Shi X B. The study on *B. japonicum* conjugation [J]. *Natural Science Journal of Harbin Normal University*, 1991, 1(7):72—79 [朱伟仪, 史新柏. 日本赭纤虫接合生殖的研究——一种体核和生殖核隔代发生的生殖现象的发现, 哈尔滨师范大学自然科学学报, 1991, 1(7):72—79]
- [6] Pavletich, Pabo. Zinc finger-DNA recognition: Crystal structure of a Zif 268-DNA complex at 2.1 Å [J]. *Science* 1991, 252: 809—817
- [7] Desjarlais J R, Berg J M. Toward rules relating zinc finger protein sequences and DNA binding site preferences [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992, 89:7345—7349
- [8] Hein J. Unified approach to alignments and phylogenies [J]. *Methods Enzymol* 1990, 183:625—645
- [9] Huang Z X, Gu W Q, Hu H Y. Gene Regulation Proteins Containing Zinc Finger Structure: New Developments on Bioinorganic Chemistry and Molecular Biology [J]. *Prog. Biochem. Biophys.* 1995, 23(3): 208—213 [黄仲贤, 顾伟强, 胡红雨. 锌指类基因调控蛋白——生物无机化学和分子生物学发展的新领域 生物化学与生物物理进展 1995, 23(3):208—213]
- [10] Qian X, Jeon C J, Yoon H S, et al. Structure of a new nucleic-acid-binding motif in eukaryotic transcriptional elongation factor TF II S [J]. *Nature* 1993, 365:277—279

THE EXPRESSION AND PURIFICATION OF RNA POLYMERASE II ZINC FINGER GENE FRAGMENT FROM *BLEPHARISMA JAPONICUM* AND PREPARATION OF POLYCLONAL ANTIBODY

SONG Li, CHAI Bao-Feng, WANG Wei and LIANG Ai-Hua

(Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan, 030006 china)

Abstract: Zinc finger protein is the largest and most diverse superfamily of nucleic acid binding proteins in eukaryotes. Zinc finger has a unique structure requiring a zinc ion in the core with several amino acid residues, which are cysteins or histidines in most cases. Zinc fingers are kinds of transcription factors. The role of zinc finger of RNA Polymerase II is binding special DNA sequence and activates transcription. *Blepharisma japonicum* is a lower unicellular eukaryote. The cell contains two nuclei, the transcriptionally quiescent micronucleus and the transcriptionally active macronucleus.

In order to study the mechanism of the transcription regulation in lower eukaryotes, zinc finger gene fragment of RNA polymerase II was amplified from the genomic DNA of *Blepharisma japonicum*. The PCR product digested by *Bam*H I and *Xho* I was cloned into expression vector pGEX-6p1 digested by the same enzymes. The recombinant plasmid pGEX-6p1-ZFbl was transformed to *E. coli* strain BL21(DE3) and the GST-ZFbl fusion protein was expressed. The GST-ZFbl fusion protein was detected by Western blotting with anti-GST antibodies. New Zealand rabbit was injected with purified GST-ZFbl protein to induce immunoreactions. The polyclonal antibody was detected by ELISA and Western blotting, which indicated that highly reactive and specific antiserum was obtained and antiserum titer reached to 1:15000.

Key words: *Blepharisma japonicum*; RNA polymerase II; Zinc finger; Polyclonal antibody; Evolution