

斑马鱼 ISL1 蛋白多克隆抗体的制备

任 恋,唐 超,刘宪楚,李 容,戴 悦,彭佩莹,莫小阳

(湖南师范大学蛋白质化学及鱼类发育生物学教育部重点实验室

心脏发育研究中心,湖南 长沙 410081)

摘 要: **目的** 为了进一步研究 ISL1 作为第二生心区心脏前体细胞的分子标志在心脏发育中的功能,需要获得 ISL1 蛋白并制备其抗体。 **方法** 根据已报道的 ISL1 基因序列,以斑马鱼 mRNA 为模板进行 PCR 扩增得到 ISL1 部分编码区序列,然后将其连接到 pET-28a 载体上获得原核表达载体。将重组质粒进行酶切测序鉴定,然后利用大肠杆菌 E. coli BL21 对该重组质粒进行表达。经过 IPTG 诱导,采用 Ni-IDA 凝胶柱亲和纯化,将纯化的 his-ISL1 融合蛋白免疫新西兰大白兔制备 ISL1 多克隆抗体,并用 Western Blot 检测抗体效价。 **结果** 获得了 ISL1 原核表达重组融合蛋白及高效价的特异性抗 ISL1 多克隆抗体。 **结论** 本实验为 ISL1 在斑马鱼心脏发育中的新功能的研究奠定了基础。

关键词: ISL1; 斑马鱼; 融合蛋白; 多克隆抗体

中图分类号: Q7 **文献标识码:** A

The Expression, Purification of ISL1 Zebrafish Protein and Preparation of Its Polyclonal Antibody

REN Lian, TANG Chao, LIU Xianchu, et al

(The Center for Heart Development, Key Lab of MOE for Development Biology and Protein Chemistry, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410081, China)

Abstract: **Objective** ISL1 is a molecular marker of precursor cells in Second Heart Field. In order to further study the function of ISL1 in heart development, we need to get the ISL1 protein and its antibody. **Methods and Results** According to the reported ISL1 gene sequences, using the zebrafish mRNA as the template for PCR amplification, we got part of the coding sequence of ISL1. After that, we connected the fragment to pET-28a vector to construct a prokaryotic expression vector and identified it with restriction enzyme digestion and sequencing identification, then using the E. coli BL21 to express the recombinant plasmid. In the end, after the IPTG induction and Ni-IDA affinity gel column purification, we have finally got the prokaryotic expression recombinant fusion protein of ISL1 and its polyclonal antibody of high potency and specificity against rabbit by using the purified fusion protein to immune the New Zealand white rabbit and testing the valence of antibody with Western Blot detection. **Conclusion** This research lays a solid foundation for further study on the function of ISL1.

Key words: ISL1; Zebrafish; fusion protein; polyclonal antibody

胰岛素因子 1, 亦称胰岛素增强子结合蛋白 (in-

sulin gene enhancer binding protein 1, ISL1), 于 1990 年由瑞典的 Karlsson 等^[1]在大鼠胰岛素瘤细胞系 RIN 的 cDNA 文库中发现, 并克隆测序。Isl1 基因具有高度的种属保守性, 在人、大鼠和仓鼠中编码的氨基酸序列完全一致^[2]。Isl1 属于 LIM 同源框蛋白家族, 具有 3 个高度保守的结构域、两个串联 LIM 结构域和一个同源结构域。LIM 结构域介导蛋白质与

收稿日期: 2012-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31172044), 湖南省杰出青年科学基金(10JJ1006), 湖南省教育厅优秀青年科技计划项目(11B079)。

作者简介: 任恋, 硕士研究生, 研究方向: 分子发育遗传学, E-mail: renlian8765@126.com. 通讯作者莫小阳, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 生物化学和分子生物学, E-mail: moxiaoyang@yahoo.com.cn.

蛋白质间的相互作用,所以 ISL1 能够介导蛋白质与 DNA 之间的相互作用。ISL1 是一种多效转录因子,在不同的时间、不同的组织细胞中作用于多种下游靶基因,产生不同的调控作用。在胚胎时期,ISL1 通过影响细胞的增殖、分化或迁移功能,对运动神经元的分化、心肌的发育及胰腺形成发挥重要作用^[3]。在出生后,ISL1 在神经系统、胰岛组织中继续发挥维持细胞表型的作用,而表达异常与糖尿病或神经系统疾病相关^[4]。

ISL1 对心脏发育具有重要的作用。利用小鼠基因敲除等实验证实,ISL1 是第二生心区心脏前体细胞的分子标志^[5],心脏中三分之二以上的各种类型细胞,包括心脏起搏细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和心肌细胞等均由 ISL1 心脏前体细胞产生^[6-8]。ISL1 的正常表达对心肌前体细胞的增殖、迁移和存活必不可少,ISL1 基因变异与患有先天性心脏病风险密切相关^[9]。

为了研究 ISL1 基因在斑马鱼心脏发育和生长中的生理功能,本研究在 NCBI 数据库中对 ISL1 基因进行生物信息学方法,进行亲水性和疏水性的分析,选取亲水性的一段核苷酸序列(65 ~ 365 bp)进行 PCR 扩增,构建在原核细胞中表达斑马鱼 ISL1 基因的重组质粒 PET-28a-ISL1,将诱导表达的 His-ISL1 融合蛋白对新西兰大白兔进行免疫,制备斑马鱼的多克隆抗体,并用 Western blotting 对免疫血清的特异性和效价进行了检测。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

大肠杆菌 *E. coli* DH5a, *E. coli* BL21 菌株,由本实验室保种;斑马鱼由本实验室提供;pMD18-T 克隆载体购自大连宝生物公司;pET28a 空表达载体菌种由本实验室提供。限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I, *Taq* DNA 聚合酶, 10 × Loading buffer; 连接酶; RNase; UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收纯化试剂盒;柱式 DNA 胶回收纯化试剂盒;质粒提取试剂盒(离心柱型);Ni-IDA 凝胶柱蛋白纯化试剂盒;蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷);弗氏佐剂。新西兰大白兔购自中南大学湘雅附一医院。

1.2 生物信息学分析

用 Primer Premier 5.0 软件设计根据酶切位点

的分析和 PCR 引物分析,对 ISL1 基因的序列设计引物,第一对引物:正义引物:5' - ACG TTG TCG CGG TGG CAC GTC G - 3',反义引物:5' - CAG TTG CGC CGC TGG GTA CA - 3',第二对为带有酶切位点的引物:正义引物:5' - ACG AAT TCA TGT CTT CCA CAT CGG CCT C - 3' *EcoR* I,反义引物:5' - TGT CGA CGA TGT TGC TGC TGC TGC TGT T - 3' *sall*,由上海生工公司合成。

1.3 基因扩增及载体构建

以斑马鱼卵为材料,置于液氮中冷冻 0.5 h,用 Trizol 法提取总 RNA^[10],并以之为模板进行反转录并进行 PCR 扩增,再将所得 PCR 产物(长 300 bp),经纯化后连入 pMD18-T 克隆载体,通过 DH5α 感受态细胞转入,经测序鉴定后,利用 *EcoR* I 和 *Sal* I 从 PMD18-T-ISL1 质粒上切下目的基因,连入带有相同粘性末端的线性化的 PET-28a 载体。转入 DH5α 菌株,筛选正确克隆,经 *EcoR* I 和 *Sal* I 双酶切鉴定后,得到重组表达质粒 PET-28a-ISL1。

1.4 融合蛋白 SLI1 的原核表达

将构建好的表达质粒 pET-28a-ISL1 转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞。挑取阳性克隆菌落接种于 50 mL 卡纳氯霉素的 LB 培养基中,在 37 °C 条件下摇荡培养 12 h,转接扩大培养至菌液 OD₆₀₀ ≈ 0.6 时,取 1 mL 菌液作为空白对照,加 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L IPTG 诱导,37 °C 和 25 °C 培养,分别诱导 0 h、3 h、5 h、6 h,各取 1 mL 菌液制备电泳样品,进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 ISL1 融合蛋白的纯化

通过各时段取样比较,选取 1 mmol/L IPTG 浓度诱导 5 h 的进行大量诱导。经液氮反复冻融 PBS 重悬后超声裂解,离心取上清。4 °C 下与经 Binding Buffer 漂洗活化后的 Ni-IDA 凝胶柱结合,分别用 Washing Buffer 洗去杂蛋白和 Elution Buffer 洗脱目的蛋白。纯化后的融合蛋白,在 - 80 °C 保存备用^[11]。

1.6 ISL1 多克隆抗体的制备

选一只健康新西兰大白兔,制备免疫前正常血清,作阴性对照。将纯化得到的 His-ISL1 蛋白质 0.6 mg 按体积比 1:1 与弗氏完全佐剂(购自 Sigma 公司)混合后,对大白兔进行背部皮下多点免疫注射;注射速度尽量慢而均匀;在第 14 天、第 21 天、第 28 天再将溶于 0.15 mL 生理盐水中的 0.5 mg 抗原蛋白与弗氏不完全佐剂按体积比 1:1 在注射,背部

皮下多点注射。第 35 天主动脉放血。兔血放在 4℃ 冰箱静置 1 h, 随后离心, 取血清加入 0.01% NaN₃ 分装保存于 -80℃。

1.7 Western blotting 分析抗体特异性

将 PMD18-T-ISL1 重组子 BL21 菌株在 LB 培养液中扩大中扩大培养, 用 IPTG 诱导后, 跑 SDS-PAGE 胶, 用兔血清进行 Western bolt 检测, 设置的抗体浓度分别为 1:100、1:500、1:1 000、1:2 000。

2 结 果

2.1 ISL1 基因表达载体的构建与鉴定

提取斑马鱼 RNA 反转录为 cDNA, 通过 PCR 扩增纯化出 ISL1 基因片段, 连入一级载体 pMD18-T 中, 经测序鉴定后, 目的片段通过 EcoR1 和 Sal I 双酶切连入具有相同粘性末端的 PET-28a 载体后, 转入 DH5α 感受态细胞。EcoR I 与 sall 双酶切鉴定 (如图 1), 然后测序分析显示已成功构建了质粒 PET-28a-ISL1, 得到能够原核表达 ISL1 的载体。

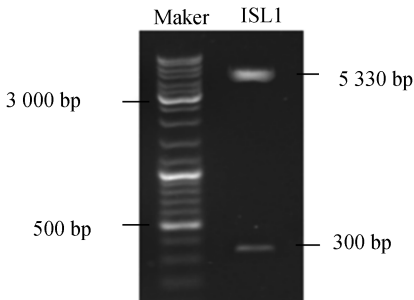


图 1 EcoR I /sallI 双酶切鉴定 PET-28a-ISL1 质粒

2.2 SL1 融合蛋白诱导表达

将重组质粒 pET28a-ISL1 转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞后, 以 0.1 mmol/L 和 1 mmol/L IPTG 浓度进行诱导表达, 并在 0 h、3 h、5 h、6 h 取样 1 mL, 分别在 37℃ 和 25℃ 对其表达产物进行 SDS-PAGE 电泳分析 (如图 2), 出现一条相对分子量约为 13 kDa 的特异蛋白条带, 与预期的 ISL1 融合蛋白相同。用 Ni-IDA 凝胶柱亲和纯化, 用 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色, 纯度为 80% 以上。载体在大肠杆菌中的成功转染, 诱导了 ISL1 蛋白的表达, 获得目的蛋白。

2.3 ISL1 多克隆抗体 Western Blot 检测效价

用免疫新西兰大白兔 3 次后, 获得的总蛋白作

为一抗进行 Western blot 检测^[11], 分别检测了 1:100、1:500、1:1 000、1:2 000 的效价, 在 His-ISL1 蛋白所在位置存在特异性条带 (如图 3), 以空白兔血清为阴性对照。结果显示在抗体稀释浓度为 1:100 时的特异信号最好。特异性良好的抗体为后面在蛋白水平研究 ISL1 基因在心脏发育中调控的功能提供的实验材料。

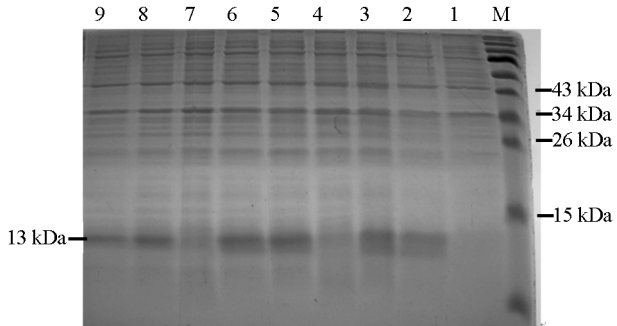


图 2 PET-28a-ISL1 蛋白的原核表达 1:PET-28a-ISL1 未诱导蛋白表达;2:0.1 mmol/L IPTG、37℃、3 h;3:1 mmol/L IPTG、37℃、3 h;4:1 mmol/L IPTG、25℃、3 h;5:0.1 mmol/L IPTG、37℃、5 h;6:1 mmol/L IPTG、37℃、5 h;7:1 mmol/L IPTG、25℃、5 h;8:0.1 mmol/L IPTG、37℃、6 h;9:1 mmol/L IPTG 37℃、6 h;M:maker

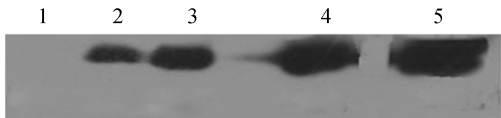


图 3 ISL1 多克隆抗体 Western-blotting 鉴定 1:免疫前空白对照;2:1:2 000;3:1:1 000;4:1:500;5:1:100

3 讨 论

从 Karlsson 首次在胰岛素细胞的 cDNA 文库中发现 Islet, 到现在已经有 20 年的历史, 这期间, 多项研究证实了 Isl1 在多种种属的不同组织中发挥重要的生物学功能。Isl1 在胚胎发育时期对运动神经元的分化, 心脏和胰腺的形成发挥重要的作用。

近期研究发现, 在鸡胚时期 ISL1 能够促使脊髓中的运动神经元轴突沿身体同侧导向^[12]; 而在鸡胚垂体前叶发育后期 ISL1 的表达上调^[13], 并伴有 BMP2 表达的下调, 提示 ISL1 可能参与垂体发育调控。在斑马鱼中, ISL1 通过维持 dpysl3 (dihydropyrimidinase-like 3) 表达, 促进 Rohon-Beard 初级感觉神经元的外周轴突生长^[14]。最近, Moretti 等^[15]又从

诱导多能干细胞中分离出 ISL1 的心血管前体细胞,并且可在体内诱导分化为心肌细胞、血管平滑肌细胞以及内皮细胞,而没有产生畸胎瘤。Watanabe 等^[16]通过定量 PCR 法检测,Islet1 在人肺癌细胞的 4 种病理亚型中,包括肺腺癌、鳞癌、大细胞癌、小细胞癌,均有显著的增高;通过对上述 4 种肺癌细胞亚型的基因表达谱主要成分分析 (principal component analysis, PCA) 和基因通路分析,认为 Islet1 与这 4 种肺癌亚型细胞的粘附、增殖和侵袭相关。另外,ISL1 能提高间充质干细胞及内皮细胞的增殖、迁移,进而促进组织中的血管新生和血管生成^[17]。

出生后,IsI1 标记一群具有增殖分化能力的神经元和心脏前体细胞。这些研究为将来的临床诊断和治疗提供理论依据和新的手段。制备高效的 IsI1 的抗体对斑马鱼心脏发育的未来进一步研究有意义。实验室目前常用的载体有 pMD 系列载体和 pET 系列载体。本研究采用的 PET-28a 载体与其他载体不同之处在于在载体的含有 His 标签、凝血酶基因及 T7 启动子标签序列,表达产物可在 BL21 菌株中高表达。表达蛋白以包涵体的形式存在,则可以通过优化条件来使可溶性蛋白最大表达,如改变诱导时间、温度和 IPTG 浓度,大大提高了抗体制备的质量。在制备的抗体中加入了 0.01% 的 NaN_3 ,它具有防霉、血清防腐的功效。因此可确保抗体保存的更长久。

Western blot 结果显示该抗体效价及特异性较好。为以后进一步研究该基因在斑马鱼心脏发育过程中的作用打下了基础,也为进一步研究斑马鱼心脏发育机制提供了材料。

关于 ISL1 多种作用的具体分子机制以及自身的表达调控规律有可能成为今后研究的重点,已经有研究表明斑马鱼中,ISL1 通过维持 dpysl3 (dihydropyrimidinase-like 3) 表达,促进 Rohon-Beard 初级感觉神经元的外周轴突生长,而在小鼠心脏中 ISL1 受到 WNT/ β -catenin, FGF8 信号通路的调节,能被 BMP4 和 BMP2 信号通路介导,从而在心肌细胞分化后期抑制 Islet1 和 Tbx1 等表达^[18],通过制备斑马鱼 IsI1 多克隆抗体,可以更好的对 IsI1 在斑马鱼心脏发育中的调控机制进行研究。

参考文献:

[1] Karlsson O, Thor S, Norberg T, et al. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of

proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain [J]. *Nature*, 1990, 344 (6269) : 879-882.

- [2] Wang M, Drucker DJ. The LIM domain homeobox gene *isl-1*: conservation of human, hamster, and rat complementary deoxyribonucleic acid sequences and expression in cell types of nonneuroendocrine lineage [J]. *Endocrinology*, 1994, 134 (3) : 1416-1422.
- [3] Pfaff SL, Mendelsohn M, Stewart CL, et al. Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation [J]. *Cell*, 1996, 84 (2) : 309-320.
- [4] <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ISL1&search=isl1>
- [5] Cai CL, Liang X, Shi Y, et al. *Isl1* identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart [J]. *Dev Cell*, 2003, 5 (6) : 877-889.
- [6] Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, et al. Postnatal *isl1* + cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages [J]. *Nature*, 2005, 433 (7026) : 647-653.
- [7] Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent embryonic *isl1* + progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification [J]. *Cell*, 2006, 127 (6) : 1151-1165.
- [8] Stevens KN, Hakonarson H, Kim CE, et al. Common variation in *ISL1* confers genetic susceptibility for human congenital heart disease [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5 (5) : e10855.
- [9] Sun Y, Liang X, Najafi N, et al. *Islet 1* is expressed in distinct cardiovascular lineages, including pacemaker and coronary vascular cells [J]. *Dev Biol*, 2007, 304 (1) : 286-296.
- [10] 刘红, 任笑蒙, 李君, 等. 果蝇组织总 RNA 的电泳谱型鉴定 [J]. *医学研究通讯*, 2004, 33 (4) : 48-49.
- [11] 朱婷, 黄文, 王跃群, 等. 斑马鱼 *hand2* 基因的克隆, 抗体制备及分析 [J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2010, 33 (1) : 108-113.
- [12] Avraham O, Hadas Y, Vald L, et al. Motor and dorsal root ganglion axons serve as choice points for the ipsilateral turning of dI3 axons [J]. *J Neurosci*, 2010, 30 (46) : 15546-15557.
- [13] Proszkowiec-Weglarz M, Higgins SE, Porter TE. Changes in gene expression during pituitary morphogenesis and organogenesis in the chick embryo [J]. *Endocrinology*, 2011, 24 (1) : 9-12.
- [14] Tanaka H, Nojima Y, Shoji W, et al. *Islet1* selectively promotes peripheral axon outgrowth in Rohon-Beard pri-

- mary sensory neurons [J]. Dev Dyn, 2011, 152 (3) : 989-1000.
- [15] Moretti A, Bellin M, Jung CB, et al. Mouse and human induced pluripotent stem cells as a source for multipotent Isl1 + cardiovascular progenitors [J]. FASEB J, 2010, 24 (3) : 700-711.
- [16] Watanabe T, Miura T, Degawa Y, et al. Comparison of lung cancer cell lines representing four histopathological subtypes with gene expression profiling using quantitative real-time PCR [J]. Cancer Cell Int, 2010, 10 : 2.
- [17] Barzelay A, Ben-Shoshan J, Entin-Meer M, et al. A potential role for islet-1 in post-natal angiogenesis and vasculogenesis [J]. Thromb Haemost, 2010, 103 (1) : 188-197.
- [18] Wang J, Greene SB, Bonilla-Claudio M, et al. Bmp signaling regulates myocardial differentiation from cardiac progenitors through a MicroRNA-mediated mechanism [J]. Dev Cell, 2010, 19 (6) : 903-912.

(此文编辑:朱雯霞)