

文昌鱼 BRA 蛋白的原核表达 及多克隆抗体制备

袁亮^{①②} 李光^① 王义权^{①*}

① 厦门大学生命科学学院 厦门 361102; ② 新疆师范大学生命科学学院 乌鲁木齐 830054

摘要: *Brachyury* 编码的转录调控因子 BRA 参与脊索动物脊索的分化形成, 文昌鱼是最早具有真正脊索的后生动物类群, 因此开展文昌鱼 *Brachyury* 基因功能研究, 将有助于揭示脊索的起源与进化。文昌鱼具有 2 个 *Brachyury* 基因: *Bra1* 和 *Bra2*, 二者编码的蛋白序列相似度高达 93%, 缺少有效区分二者的特异抗原表位, 转录组数据分析表明 *Bra2* 表达量显著高于 *Bra1*, 进一步对 BRA2 蛋白序列特征分析发现其 N 端拥有丰富的潜在抗原决定簇, 因此本研究选择了 *Bra2* N 端 696 bp 基因序列所编码的蛋白片段作为制备抗体的抗原蛋白。将该段基因序列克隆重组入 pET28a 原核表达质粒, 经诱导表达获分子量约 31 ku 的可溶性重组蛋白。通过 Ni²⁺亲和和层析柱纯化, 得到 1.3 g/L 高纯度抗原蛋白, 用 3 只 ICR 小鼠 (*Mus musculus*) 经 4 轮重组蛋白免疫 [剂量 50 μg/(只·次)] 后获得最高效价 (1:256 000) 的多克隆抗体。Western 印迹结果显示, 本研究制备的鼠抗文昌鱼 BRA 多克隆抗体不仅可特异识别重组抗原蛋白, 也可高效识别文昌鱼胚胎总蛋白中的 BRA1 和 BRA2, 为后续深入研究文昌鱼 BRA 在脊索发育调控中的作用提供了有力的分子工具。

关键词: 文昌鱼; *Brachyury*; 克隆; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q939.91, Q344+.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2017) 03-431-10

Prokaryotic Expression of Amphioxus BRA Protein and Preparation of the Polyclonal Antibody

YUAN Liang^{①②} LI Guang^① WANG Yi-Quan^{①*}

① School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361102; ② School of Life Science, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, China

Abstract: Homologues of the T-box gene *Brachyury* play an essential role in notochord specification of early embryo development of chordates. Amphioxuses, also called cephalochordates, represent the most basally divergent lineage of chordates, being the sister group of urochordates and vertebrates. It is now generally agreed that amphioxus is the first animal group to evolve a real sense of notochord in all metazoans, hence studying *Brachyury* in amphioxus would shed important insights into the origin and evolution of notochord.

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31372188, 31471986);

* 通讯作者, E-mail: wangyq@xmu.edu.cn;

第一作者介绍 袁亮, 男, 博士研究生; 研究方向: 动物发育遗传与分子进化; E-mail: yuanliang_314@163.com。

收稿日期: 2016-09-09, 修回日期: 2017-01-20 DOI: 10.13859/j.cjz.201703009

In order to explore the function of *Brachyury* in the developmental regulation network of amphioxus, we generated a mouse anti-amphioxus BRA polyclonal antibody. Amphioxus possesses two *Brachyury* homologues genes: *Bra1* and *Bra2*, encoding two proteins with a sequence similarity of 93% (Fig. 1a). It is very hard to distinguish specific epitopes between them. The transcriptome data showed that the expression level of *Bra2* was much higher than that of *Bra1* (Fig. 1b). Further analysis of BRA2 sequence feature indicated that ideal presume antigenic determinants located in the N-terminal of BRA2 (Fig. 1c). Therefore, a 696 bp gene segment was amplified by PCR from *Bra2* N-terminal (Fig. 2a) and inserted into prokaryotic expression vector pET28a (Fig. 2b). The recombinant plasmid pET28a-*Bra2*-N was transformed into *Escherichia coli* BL21 and induced to express the tagged protein (Fig. 3a). We obtained a huge amount of soluble recombinant protein with an expected size (31 ku) (Fig. 3b) and purified the tagged protein using Ni²⁺ affinity chromatography (Fig. 3c). Three ICR mice were immunized to generate polyclonal antibodies against amphioxus BRA2 with purified recombinant protein (1.3 g/L). The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) showed that the titer of mouse anti-amphioxus BRA2 antibody was 1 : 256 000, with a high sensitivity (Fig. 4a). Western blot experiments showed that the polyclonal antibody could not only effectively identify recombinant protein (Fig. 4b) but also recognized amphioxus BRA1 and BRA2 (Fig. 4c, Fig. 5a, b). In conclusion, we successfully generated the mouse anti-amphioxus BRA polyclonal antibody that would be a powerful molecular tool for further investigating the function of *Brachyury* in amphioxus.

Key words: Amphioxus; *Brachyury*; Cloning; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody

Brachyury 基因是 T-box 转录因子家族成员, 也称 *T* 基因。Herrmann 等于 1990 年首次从小鼠 (*Mus musculus*) 中克隆到该基因 (Wilkinson et al. 1990), 随后在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) (Smith et al. 1991, Hayata et al. 1999)、斑马鱼 (*Danio rerio*) (Schulte-Merker et al. 1992, 1994)、鸡 (*Gallus gallus*) (Kispert et al. 1995)、人 (*Homo sapiens*) (Edwards et al. 1996)、七鳃鳗 (*Lampetra fluviatilis*) (Sauka-Spengler et al. 2003) 等其他脊椎动物中相继报道了该基因, 此外该基因还在果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (Kispert et al. 1994)、水螅 (*Hydra vulgaris*) (Technau et al. 1999) 及非常低等的扁盘动物丝盘虫 (*Trichoplax adhaerens*) (Martinelli et al. 2003) 中被发现, 表明 *Brachyury* 是一个几乎存在于所有后生动物中的古老保守基因。

随着后生动物由低等向高等的不断演化, *Brachyury* 基因功能也在不断拓展和丰富。在两侧对称的非脊索动物中 *Brachyury* 表达在原肠

胚的胚孔处, 诱导胚孔边缘细胞内陷形成中胚层, 随后在后肠原基表达, 参与后肠形成 (Kispert et al. 1994); 在脊索动物中, 除保留在胚孔处的泛中胚层 (pan-mesoderm) 表达 (Isaacs et al. 1994) 外, 还在胚胎的尾芽和脊索处表达, 参与胚胎后部的生长延伸和脊索的分化 (Martin et al. 2008)。*Brachyury* 编码的转录因子以直接或间接的方式调节下游靶基因的活性, 在早期胚胎的胚孔、尾芽和脊索等关键部位表达, 形成一个由 *Brachyury* 介导的发育调控网络。近年来, 在海鞘 (Kubo et al. 2010)、斑马鱼 (Morley et al. 2009)、爪蟾 (Gentsch et al. 2013)、小鼠拟胚体 (Evans et al. 2012, Lolas et al. 2014) 和人胚胎干细胞 (具中内胚层性质的细胞团) (Faial et al. 2015, Tsankov et al. 2015) 中进行了 *Brachyury* 下游靶基因的大规模筛查, 同时结合该基因敲低的转录差异数据和功能验证实验, 为我们大致勾勒出了脊索动物主要类群的 *Brachyury* 发育调控谱, 然而这些数据中缺少来自进化上位于脊索动物门最基

部的头索动物 (Blair et al. 2005, Putnam et al. 2008) 信息。文昌鱼是现生头索动物的总称, 是一类开始具有真正脊索并保留大量脊索动物祖先原始特征的类群 (Yu et al. 2009)。Brachyury 参与脊索分化的新功能也正是由原始后口动物进化到脊索动物时出现的。因此, 研究文昌鱼 Brachyury 基因对于揭示脊索起源及以脊索为中轴介导的发育调控网络形成都具有重要意义。

文昌鱼具有 2 个序列高度相似的 Brachyury 基因: Bra1 和 Bra2, 系统进化分析显示这 2 个基因是头索动物支系独自倍增的产物 (Holland et al. 1995, Terazawa et al. 1995, 1997)。为深入阐明文昌鱼 Brachyury 基因功能, 本课题组正基于 TALEN 基因编辑技术分别构建 Bra1、Bra2 和双基因敲除的突变系, 而后续蛋白水平验证及蛋白互作和定位等都需要高质量抗体工具。由于目前没有专门针对文昌鱼 BRA 蛋白的商品化抗体, 为此我们开展本项工作, 以期获得针对文昌鱼 BRA 蛋白的抗体。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 文昌鱼饲养及胚胎收集 佛罗里达文昌鱼 (*Branchiostoma floridae*) 引种自台湾中央研究院细胞与个体生物学研究所游智凯博士实验室, 依据已报道文昌鱼人工繁殖技术 (张秋金等 2009) 完成实验室建群。将待产雌雄成体文昌鱼按 Li 等 (2015) 方法进行人工诱导后产卵、受精, 受精卵置于 28℃ 培养箱中孵育, 待发育至实验所需胚胎阶段时收集。

1.1.2 试剂和材料 总 RNA 提取采用 Qiagen RNeasy Mini 试剂盒; RNA 反转录试剂盒、ELISA 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、限制性内切酶、HS Taq DNA 聚合酶、dNTPs、PCR buffer 和 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司; PCR 产物纯化和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; 蛋白纯化使用 GE 公司的 Ni SepharoseTM 6 Fast Flow;

弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自 Sigma 公司; 鼠 β-actin 单克隆抗体购自 Proteintech 公司; 硝酸纤维素膜为 Millipore 公司产品; RIPA 裂解液购自碧云天生物技术公司; Western 显色剂为 Advansta 产品; 体外 mRNA 合成采用 Ambion 公司的 mMESSAGE mMACHINE T7 试剂盒; 蛋白酶抑制剂混合片购自 Roche 公司; PSMF、大肠杆菌 DH5α 和 BL21 感受态细胞均购自全式金生物技术有限公司; pET28a 原核表达质粒、体外合成 mRNA 的 pXT7 质粒均为本实验室保存质粒; 其他化学试剂均为国产分析纯级; 引物合成和 DNA 测序均由厦门闽博生物技术有限公司完成。

1.2 实验方法

1.2.1 抗原蛋白序列分析及基因序列克隆 应用 LaserGene 7.0 软件分析文昌鱼 Brachyury 基因的蛋白序列, 预测蛋白的疏水性、抗原指数和抗原簇表面分布, 以确定抗原表位。收集文昌鱼神经板期胚胎 50 枚, 提取总 RNA 后反转录合成第一链 cDNA。根据 NCBI 公布的佛罗里达文昌鱼 Brachyury 基因序列设计引物, BfBra2-N-Termi-F1: 5'-CGG AAT TCA TGA AGC AGA CCC GGA CCA-3' (下划线部分为 EcoR I 酶切位点), BfBra2-N-Termi-R1: 5'-CCG CTC GAG CTG GTC AGT CAA GTC GTC ATG T-3' (下划线部分为 XhoI I 酶切位点), BfBra2-CDS-R1: 5'-CCG CTC GAG TTA CAT GGA CGG CAT GGT CAT-3' (下划线部分为 XhoI I 酶切位点), BfBra1-CDS-F1: 5'-CGG AAT TCA TGA GTT CTG CGG AAA CGA TGA AG-3' (下划线部分为 EcoR I 酶切位点), BfBra1-CDS-R1: 5'-GGA CTA GTT TAG AGC GAT GGT GGA GTC ATA GG-3' (下划线部分为 Spe I 酶切位点)。PCR 反应体系: 10 × PCR buffer 5 μl, dNTPs (2.5 mmol/L) 5 μl, 上、下游引物 (10 μmol/L) 各 2 μl, HS Taq DNA 聚合酶 0.5 μl (5 U/μl), cDNA 模板 1 μl (50 ng/μl), ddH₂O 34.5 μl, 总体积 50 μl。PCR 反应程序:

95℃预变性 5 min; 95℃变性 30 s, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 60 s (或 90 s), 35 个循环; 72℃延伸 5 min; 4℃保存。为排除污染引起的假阳性可能, PCR 扩增过程设不加模板的阴性对照组。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 原核表达重组质粒构建及抗原蛋白诱导表达 纯化后的 PCR 产物与原核表达质粒 pET28a 分别经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切, 然后将二者用 T4 DNA 连接酶 16℃连接过夜, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂板筛选阳性重组子, 阳性克隆分别经双酶切和测序验证, 正确的重组质粒再转化到 BL21 感受态细胞, 涂板后分别挑取 3 个单菌落至 5 ml 自诱导培养基 (ZYM-5052) 试管中, 用 Studier 自诱导法 (Studier 2005) 诱导重组蛋白表达, 先于 37℃ 250 r/min 培养 6 h, 无需添加诱导剂 IPTG, 后直接改为 18℃ 180 r/min 低温诱导培养 10 h, 取诱导前后菌液进行 SDS-PAGE 分析, 鉴定目的蛋白是否表达。小体积诱导成功后再按最适条件进行目的蛋白大体积诱导表达。

1.2.3 抗原蛋白纯化及多克隆抗体的制备 将大体积诱导菌液分装至 50 ml 离心管, 4 000 g 离心 10 min, 弃培养液, 管底菌体用 PBS 缓冲液清洗 2 次。用 10 ml 结合缓冲液 (含溶菌酶 1 g/L, PMSF 100 mg/L) 重悬菌体, 4℃放置 30 min, 加入终浓度 1% Triton X-100, 冰上超声破碎, 4℃ 12 000 g 离心 20 min, 取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 分析, 鉴定重组蛋白可溶性。确定蛋白性质后, 按照 GE 公司 Ni SepharoseTM 6 Fast Flow 试剂盒提供方法, 纯化回收蛋白, SDS-PAGE 检测, BCA 法定量。按 50 μ g/(次·只) 抗原蛋白剂量, 分别对 3 只 6 ~ 8 周龄 ICR 小鼠进行免疫。初次免疫时, 将纯化蛋白与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后背部皮下多点注射, 之后每 14 d 加强免疫一次, 佐剂换成弗氏不完全佐剂。4 次免疫后, 心脏采血, 分离血清, 分装后置 -80℃冻存。初次免疫前每只小鼠眼眶采血, 收集血清作为阴性对照。

1.2.4 抗体效价和特异性检测 ELISA 法检测

抗体效价。按每孔 10 ng 的量, 将重组蛋白接种至酶标板包被过夜, 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液室温封闭 1 h, 依次加入以 500 倍稀释度为起始, 连续倍比稀释 10 次的抗血清 (免疫前阴性血清作对照), 室温孵育 2 h。TBST 溶液清洗 4 次后, 加入 1 : 5 000 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 室温避光孵育 2 h, 经四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 为底物显色后, 1 mol/L H₂SO₄ 终止反应, 酶标仪以 450 nm 波长读取吸光值。

将纯化的重组蛋白、文昌鱼胚胎总蛋白用于 SDS-PAGE 电泳, 转移蛋白至硝酸纤维素膜上。多克隆抗体按 1 : 1 000 稀释, 鼠 β -actin 单克隆抗体按 1 : 2 000 稀释 (作内参), 二抗辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 按 1 : 5 000 稀释, Western 印迹检测抗体特异性。

1.2.5 体外 mRNA 合成和胚胎总蛋白提取 克隆完整的文昌鱼 *Bra1* 和 *Bra2* 的蛋白编码序列, 正向插入 pXT7 质粒。提取鉴定正确的重组质粒, 在 3'端线性化后, 借助 T7 启动子体外合成 5'“带帽”和 3'“加尾”的 mRNA 模板, 用于注射胚胎; 收集不同发育期的胚胎, 低速离心后弃上层海水, 置于冰上加 RIPA 裂解液 (含罗氏蛋白酶抑制剂, PMSF 1 mmol/L), 经反复吹打至胚胎完全裂解, 4℃ 12 000 g 离心 5 min 后, 取上清进行 BCA 法定量, -80℃保存备用。

2 结果

2.1 文昌鱼 *Bra1* 和 *Bra2* 的表达量及蛋白序列分析

对比分析佛罗里达文昌鱼 BRA1 和 BRA2 蛋白序列, 发现二者相似度达 93%, 但总体表现为 N 端差异大于 C 端 (图 1a)。由于 2 个蛋白的相似性极高, 因而无法有效区分二者各自的特异抗原表位, 采用多克隆抗体制备策略无法获得分别特异抗 2 个蛋白的抗体, 即选用其中任一蛋白作抗原, 所获得的抗体都能同时与 2 个蛋白发生抗原抗体反应。此外通过对本课题组已建立的文昌鱼胚胎连续发育转录组数

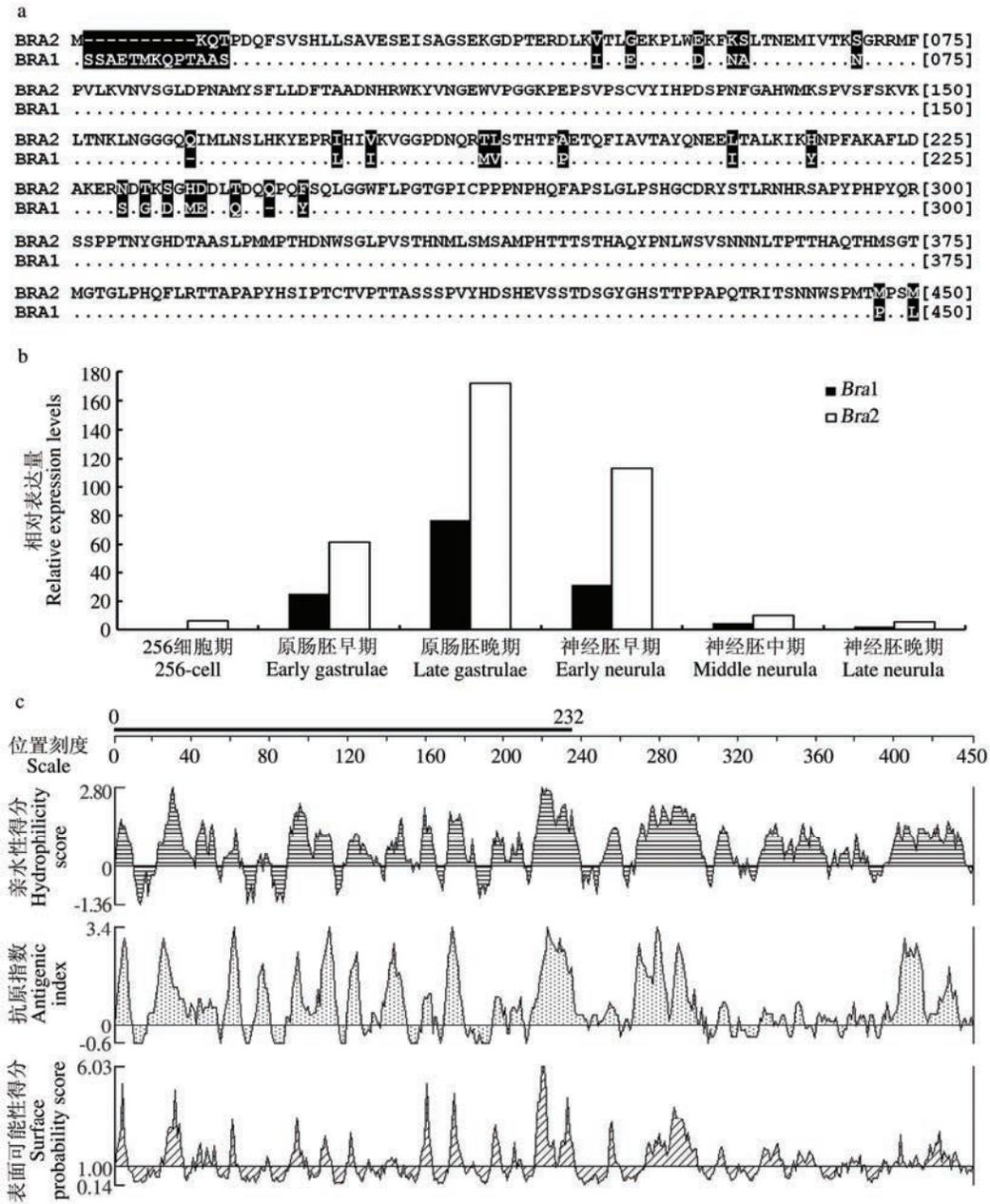


图 1 佛罗里达文昌鱼 BRA1 和 BRA2 蛋白序列比对 (a)、相对表达量分析 (b) 及 BRA2 蛋白序列特征分析 (c)

Fig. 1 Protein sequence alignment (a) and relative expression levels (b) of BRA1 and BRA2, and analysis for protein sequence characters of BRA2 (c)

a: 圆点代表相同氨基酸, 黑底白色字母代表二者差异氨基酸, 短横线代表缺失氨基酸; c: 长横线代表本研究用于制备抗体的抗原蛋白序列。

a: The dots represent the same amino acid; White letters with black background represent different amino acids between BRA1 and BRA2; White dashes represent the missing amino acids; c: Long dashes represent antigen protein sequences.

据库 (数据未发表) 的检索分析, 发现 *Bra2* 表达量显著高于 *Bra1* 表达量 (图 1b)。综合

上述因素,我们决定利用 BRA2 作为抗原蛋白,进一步用 Lasergene 7.0 软件对 BRA2 蛋白序列进行分析,发现较低抗原指数区出现在 C 端第 315 至第 392 氨基酸之间,而 N 端则含有一些亲水性、抗原指数和抗原簇表面分布可能性较高的序列(图 1c),这些序列都有可能是免疫细胞识别位点,因此可以作为潜在抗原引起试验动物产生免疫反应。

2.2 pET28a-Bra2-N 表达载体构建

我们选择 2 个蛋白序列差异相对较大,且具有较高抗原特性的 BRA2 蛋白 N 端进行基因序列克隆(核酸序列 696 bp),构建原核表达载体。以文昌鱼 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增获得了 700 bp 左右的预期分子量大小条带(图 2a),将其重组入 pET28a 原核表达载体中,命名为 pET28a-Bra2-N,提取重组质粒双酶切(EcoR I 和 Xoh I)鉴定,获得 5 341 bp 载体片段和 700 bp 左右的目的片段,两个片段分子量大小均符合预期(图 2b)。pET28a-Bra2-N 的测序结果与 Bra2 基因 CDS 序列一致,保持

完整读码框,酶切位点插入正确,表明 Bra2-N 序列已正确插入 pET28a 表达载体,原核表达重组质粒构建成功。

2.3 文昌鱼 BRA2-N 融合蛋白表达及纯化

Bra2-N 基因序列无终止密码子,需载体上的终止密码子终止转录,因此其融合蛋白 N 端和 C 端均含有来自载体的 6 × His 多肽标签,加上 BRA2-N 含有 232 个氨基酸,预测分子量约为 31 ku。将表达载体转化大肠杆菌 BL21,经自诱导后菌总蛋白通过 12%的 SDS-PAGE 胶检测。由 pET28a-Bra2-N 质粒转化 BL21 的 3 个单菌落中有 2 个在 31 ku 附近出现一条明显的蛋白增强条带(图 3a),与 BRA2-N 融合蛋白预测的分子量相近,初步说明该融合蛋白诱导表达成功。进一步对诱导出的 BRA2-N 重组蛋白进行可溶性分析,发现可溶性蛋白和包涵体各占 50%(图 3b)。为获得更多的可溶性蛋白,选择菌落 1 进行 1 L 大体积培养,将所获菌体进行超声破碎,离心后取上清液,其中含有大量表达的可溶性目的蛋白。用组氨酸标签亲和层析柱对上清液中的可溶性目的蛋白进行富集,多次洗涤除去多余杂蛋白,最后用 200 mmol/L 咪唑洗脱液对目的蛋白洗脱收集,经 12%的 SDS-PAGE 胶电泳检测,在 31 ku 附近获得一条明显条带,其分子量大小与理论值相符,同时洗脱液中蛋白所含杂带较少,说明获得纯度较高的目的蛋白(图 3c)。将目的蛋白经超滤管离心从咪唑洗脱液置换至 PBS 缓冲液后,BCA 法测定其浓度达 1.3 g/L,作为免疫动物的抗原。

2.4 多克隆抗体效价及特异性检测

3 只 ICR 小鼠经纯化重组蛋白免疫 4 次后,用 ELISA 测定免疫后小鼠血清效价,同时以免疫前血清为阴性对照。以 $A_{阳}/A_{阴} > 2.1$ 为标准,3 只小鼠产生的抗血清效价分别为 1:32 000 (1 号),1:128 000 (2 号)和 1:256 000 (3 号),说明均获得较高效价的多抗血清,其中 3 号效价最高(图 4a)。进一步通过 Western 印迹检测多抗血清的特异性。抗原抗体

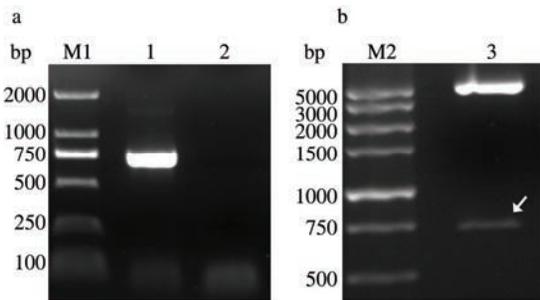


图 2 Bra2-N 片段扩增(a)及 pET28a-Bra2-N 重组质粒双酶切鉴定(b)

Fig. 2 Amplification of Bra2 N terminal fragment from *B. floridae* (a) and identification of recombinant vector pET28a-Bra2-N by double digestion (b)

1. 阳性扩增; 2. 阴性对照; 3. 双酶切后的 pET28a-Bra2-N 质粒; M1. DL2000 DNA 分子量标准; M2. DL5000 DNA 分子量标准; 白色箭头示目的基因片段。

1. Positive amplification; 2. negative control; 3. double digested pET28a-Bra2-N plasmid; M1. DNA marker DL2000; M2. DNA marker DL5000; White arrow represents the objective gene fragment.

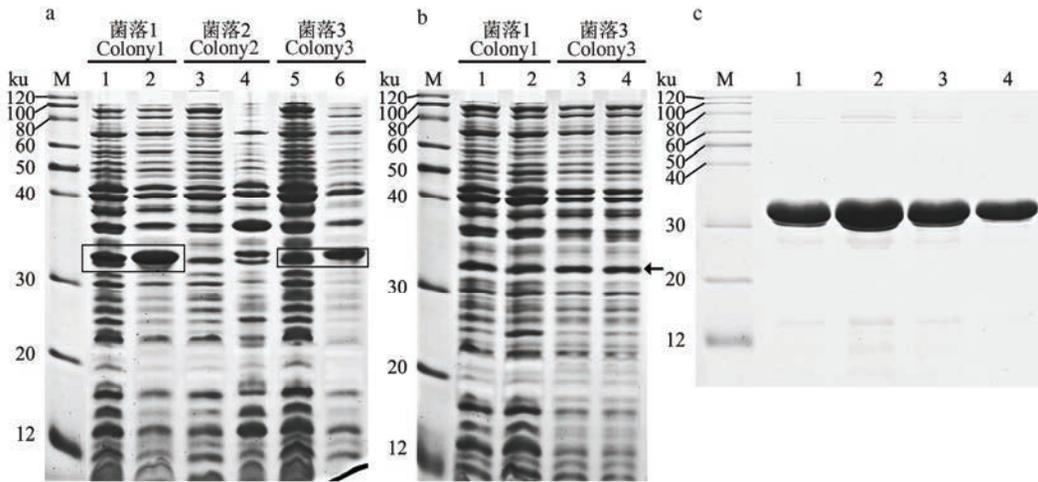


图3 重组蛋白的诱导表达检测 (a)、可溶性检测 (b) 及纯化后检测 (c)

Fig. 3 Induced expression (a), dissolubility (b), and purification of recombinant protein (c)

a: 1、3、5. 诱导前全菌蛋白, 2、4、6. 诱导后全菌蛋白; b: 1、3. 诱导后超声破碎上清, 2、4. 诱导后超声破碎沉淀; c: 1、2、3、4. 纯化重组蛋白的洗脱液; M. 蛋白分子质量标准; 黑色框和黑色箭头示重组蛋白表达条带。
a: 1, 3, 5. Whole protein of bacteria solution without induction; 2, 4, 6. Whole protein of bacteria solution induced with auto-induction method; b: a, c. Soluble lysates from induced bacteria solution; b, d. Insoluble lysates from induced bacteria solution; 1, 2, 3, 4. The eluate of purified recombinant protein; M. Protein molecular weight marker; Black boxes and the black arrow represent the bands of recombinant protein expression.

特异结合实验 (图 4b) 显示, 在 31 ku 附近出现一条明显特异条带, 与重组蛋白分子量相近, 说明制备的多抗血清能够与抗原蛋白特异结合; 多抗血清与胚胎总蛋白特异结合实验 (图 4c) 显示, 在 50 ku 附近出现一条明显的特异结合条带, 该条带与 BRA2 全蛋白分子量 (48.5 ku) 相近, 表明本研究制备的多抗血清能够与总蛋白中的 BRA2 蛋白特异结合。转录组数据显示, *Bra2* 基因在原肠早期开始启动表达, 在原肠中期升高, 到原肠晚期至神经胚早期达到高峰, Western 检测 (图 4c) 与转录组数据结果吻合。综上, 我们获得了高效、特异的鼠抗文昌鱼源 BRA2 的多克隆抗体。

2.5 文昌鱼 BRA2 抗体特异性分析

用体外合成的 *Bra2* mRNA 注射文昌鱼未受精卵, 通过注射外源 mRNA 方式引起 BRA2 蛋白的过表达, 收集发育至原肠早期和神经板期胚胎, 提取总蛋白, 用本研究制备的多抗血清进行检测, 未注射组作为阴性对照。在原肠早期和神经板期, 多抗血清均检测到注射组较

未注射组的 BRA2 蛋白量明显增强 (图 5a), 表明体外合成的 *Bra2* mRNA 在文昌鱼胚胎中过表达了 BRA2 蛋白, 并被本研究制备的多抗血清有效识别。由于 BRA1 与 BRA2 的相似性极高, 我们同样对 *Bra1* 进行过表达, 多抗血清同样能够检测到 BRA1 蛋白过表达 (图 5b)。因此, 本研究制备的多克隆抗体具有识别文昌鱼 BRA1 和 BRA2 蛋白的能力。

3 讨论

文昌鱼 *Brachyury* 基因具有与脊椎动物小鼠、爪蟾和斑马鱼中的同源基因有极为相似的表达谱, 参与中胚层诱导分化、胚胎后部延伸和脊索分化形成等重要发育事件。但与哺乳动物基因组仅含有 1 个 *Brachyury* 基因不同的是, 文昌鱼基因组中具有 2 个 DNA 序列高度相似的 *Brachyury* 基因 *Bra1* 和 *Bra2*, 转录组数据分析表明, 这 2 个基因均表达, 且 *Bra2* 的表达量要远远高于 *Bra1*, 暗示二者功能差异。文昌鱼位于脊索动物进化最基部, 被认为是最接近脊

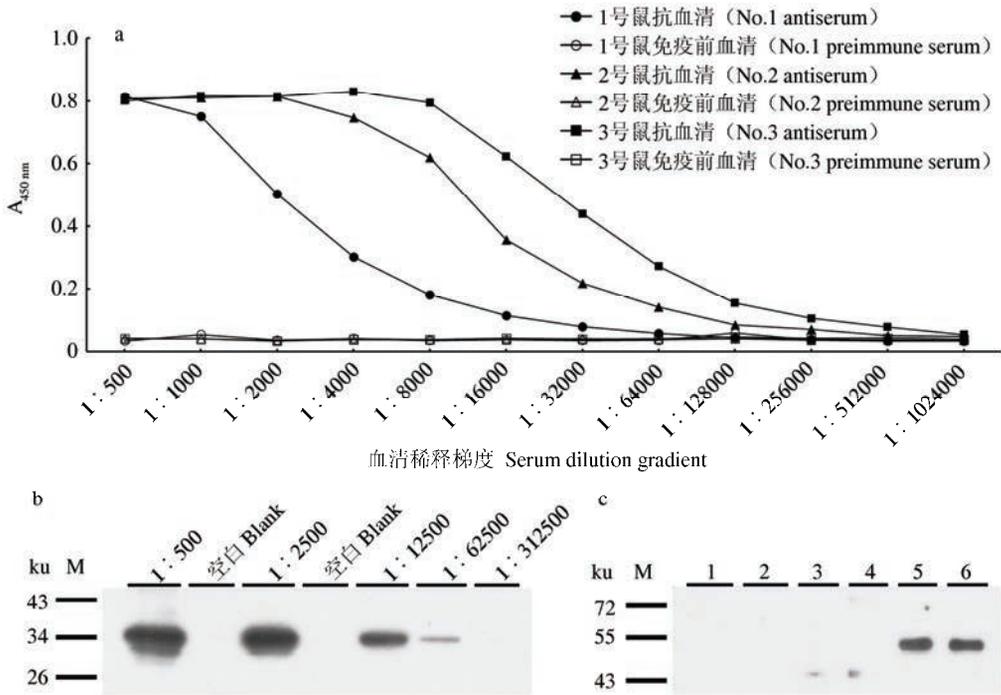


图 4 多抗血清效价检测 (a)、抗原抗体特异结合检测 (b) 及抗体对总蛋白特异结合检测 (c)

Fig. 4 Titers of polyclonal antibody (a), detection of antigen-antibody specificity (b), and detection of antibody against total protein specificity (c)

b: 每个泳道抗原蛋白上样量按 1 : 500 梯度稀释; c: 1. 未受精卵, 2. 4 细胞期, 3. 囊胚期, 4. 原肠早期, 5. 原肠晚期, 6. 神经早期, 每孔上样量均为 20 μg 总蛋白; M. 蛋白分子质量标准。

b: Sampling amount of each lane of antigen protein gradient dilution as 1 : 500; c: 20 μg embryo protein for each lane; 1. Unfertilized eggs; 2. 4-cell; 3. Blastula; 4. Early gastrula; 5. Late gastrula; 6. Early neurula; M. Protein molecular weight marker.

索动物祖先的现存动物, 是基因组未经加倍的原始代表, 这一观点已被诸如 *Hox* 基因簇 (Garcia-Fernández et al. 1994, Amemiya et al. 2008)、*Pax* 基因家族 (Short et al. 2008) 等比较基因组研究所证实, *Brachyury* 基因在文昌鱼支系独自进行基因倍增现象属于少数个例, 代表了文昌鱼从脊索动物祖先分离后的自身进化, 增加了文昌鱼 *Brachyury* 基因的复杂度, 这是否与其脊索发达, 终生保留并向前延伸至最身体最前端 (故称之为头索动物) 有关? 仍需进一步研究。

基因通过蛋白形式行使其功能, 因此相应抗体是基因功能研究不可或缺的工具, 制备高质量抗体需要获得较高抗原特性的目的蛋白。首先, 序列比对分析发现文昌鱼 BRA1 和 BRA2

蛋白相似度极高, 二者差异主要存在于 N 端 (N 端序列相似性 89%, C 端序列相似性 99%); 其次, 转录组数据分析表明 *Bra2* 的表达量要显著高于 *Bra1*; 此外, 蛋白序列特征分析反映 BRA2 N 端具有高于 C 端的抗原特征指数, 基于上述这三点考虑, 我们克隆了 *Bra2* N 端 696 bp 的基因序列, 重组至原核表达载体 pET28a 中, 在 BL21 菌株中进行表达, 为获得能引起试验动物产生免疫反应的抗原蛋白奠定了基础。

我们采用 Studier 等 (2005) 提出的自诱导方法诱导目的蛋白表达, 与传统上采用 LB 培养基, 后期用 IPTG 诱导的策略不同, 自诱导培养基中提前加入诱导剂乳糖, 但以甘油、葡萄糖为碳源, 铵盐为氮源, 以磷酸盐为缓冲体

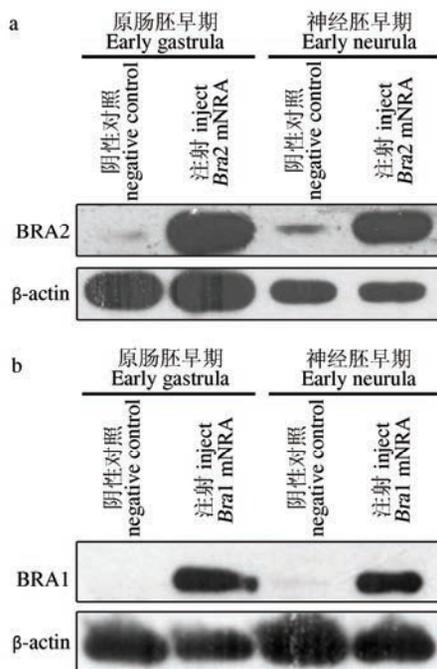


图5 *Bra2* (a) 和 *Bra1* (b) 过表达 western 检测
Fig. 5 Western blotting analysis of over-expressed *Bra2* (a) and *Bra1* (b)

系, 包括其他微量元素。当葡萄糖与乳糖同时存在于培养基中, 由于代谢物阻遏效应, 葡萄糖可以有效抑制目的蛋白诱导表达, 以葡萄糖为碳源支持大肠杆菌生长至饱和并消耗殆尽后, 乳糖开始发挥作用, 进而诱发目的蛋白表达 (Dubendorf et al. 1991)。与传统 IPTG 诱导方法相比, 自诱导法无需检测培养基混浊度, 37°C 培养 6 h 后即可转入低温诱导, 无需另外添加诱导剂, 且目的蛋白产量更高, 可溶性比例增大。本研究采用该方法获得了大量可溶性抗原蛋白。

由于 BRA1 和 BRA2 蛋白序列高度相似, 基于多克隆抗体制备策略将无法获得分别抗 2 个蛋白的抗体, 无论选择任一蛋白作抗原均会获得抗 2 个蛋白的抗体。经 Western 印迹检测, 我们制备的多克隆抗体既可特异结合原核表达的重组抗原蛋白, 也具有识别文昌鱼胚胎总蛋白中 BRA1 和 BRA2 的能力, 这一结果符合我们设计实验之初的预期, 为后续文昌鱼

Brachyury 双敲除突变系的蛋白水平验证及其他功能研究奠定了基础。

参 考 文 献

- Amemiya C T, Prohaska S J, Hill-Force A, et al. 2008. The amphioxus *Hox* cluster: characterization, comparative genomics, and evolution. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 310(5): 465–477.
- Blair J E, Hedges S B. 2005. Molecular phylogeny and divergence times of deuterostome animals. *Molecular Biology and Evolution*, 22(11): 2275–2284.
- Dubendorf J W, Studier F W. 1991. Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with *lac* repressor. *Journal of Molecular Biology*, 219(1): 45–59.
- Edwards Y, Putt W, Lekoape K, et al. 1996. The human homolog *T* of the mouse *T* (*Brachyury*) gene; gene structure, cDNA sequence, and assignment to chromosome 6q27. *Genome Research*, 6(3): 226–233.
- Evans A L, Faial T, Gilchrist M J, et al. 2012. Genomic targets of *Brachyury* (*T*) in differentiating mouse embryonic stem cells. *PLoS One*, 7(3): e33346.
- Faial T, Bernardo A S, Mendjan S, et al. 2015. *Brachyury* and SMAD signalling collaboratively orchestrate distinct mesoderm and endoderm gene regulatory networks in differentiating human embryonic stem cells. *Development*, 142(12): 2121–2135.
- Garcia-Fernández J, Holland P W. 1994. Archetypal organization of the amphioxus *Hox* gene cluster. *Nature*, 370(6490): 563–566.
- Gentsch G E, Owens N D, Martin S R, et al. 2013. *In vivo* T-box transcription factor profiling reveals joint regulation of embryonic neuromesodermal bipotency. *Cell Reports*, 4(6): 1185–1196.
- Hayata T, Eisaki A, Kuroda H, et al. 1999. Expression of *Brachyury*-like T-box transcription factor, *Xbra3* in *Xenopus* embryo. *Development Genes and Evolution*, 209(9): 560–563.
- Holland P, Koschorz B, Holland L Z, et al. 1995. Conservation of *Brachyury* (*T*) genes in amphioxus and vertebrates: developmental and evolutionary implications. *Development*, 121(12): 4283–4291.

- Isaacs H, Pownall M, Slack J. 1994. eFGF regulates *Xbra* expression during *Xenopus* gastrulation. The European Molecular Biology Organization Journal, 13(19): 4469.
- Kispert A, Herrmann B G, Leptin M, et al. 1994. Homologs of the mouse *Brachyury* gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. Genes & Development, 8(18): 2137–2150.
- Kispert A, Ortner H, Cooke J, et al. 1995. The chick *Brachyury* gene: developmental expression pattern and response to axial induction by localized activin. Development Biology, 168(2): 406–415.
- Kubo A, Suzuki N, Yuan X, et al. 2010. Genomic cis-regulatory networks in the early *Ciona intestinalis* embryo. Development, 137(10): 1613–1623.
- Li G, Wang J, Yuan L, et al. 2015. A simple method for selecting spawning-ready individuals out from laboratorial cultured amphioxus population. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution, 324(7): 629–635.
- Lolas M, Valenzuela P D, Tjian R, et al. 2014. Charting *Brachyury*-mediated developmental pathways during early mouse embryogenesis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(12): 4478–4483.
- Martin B L, Kimelman D. 2008. Regulation of canonical Wnt signaling by *Brachyury* is essential for posterior mesoderm formation. Developmental Cell, 15(1): 121–133.
- Martinelli C, Spring J. 2003. Distinct expression patterns of the two T-box homologues *Brachyury* and *Tbx2/3* in the placozoan *Trichoplax adhaerens*. Development Genes and Evolution, 213(10): 492–499.
- Morley R H, Lachani K, Keefe D, et al. 2009. A gene regulatory network directed by zebrafish *No tail* accounts for its roles in mesoderm formation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(10): 3829–3834.
- Putnam N H, Butts T, Ferrier D E, et al. 2008. The amphioxus genome and the evolution of the chordate karyotype. Nature, 453(7198): 1064–1071.
- Sauka-Spengler T, Baratte B, Lepage M, et al. 2003. Characterization of *Brachyury* genes in the dogfish *S. canicula* and the lamprey *L. fluviatilis*. Insights into gastrulation in a chondrichthyan. Developmental Biology, 263(2): 296–307.
- Schulte-Merker S, Ho R, Herrmann B, et al. 1992. The protein product of the zebrafish homologue of the mouse *T* gene is expressed in nuclei of the germ ring and the notochord of the early embryo. Development, 116(4): 1021–1032.
- Schulte-Merker S, van Eeden F, Halpern M E, et al. 1994. *no tail (ntl)* is the zebrafish homologue of the mouse *T (Brachyury)* gene. Development, 120(4): 1009–1015.
- Short S, Holland L Z. 2008. The evolution of alternative splicing in the *Pax* family: the view from the Basal chordate amphioxus. Journal of Molecular Evolution, 66(6): 605–620.
- Smith J, Price B, Green J, et al. 1991. Expression of a *Xenopus* homolog of *Brachyury (T)* is an immediate-early response to mesoderm induction. Cell, 67(1): 79–87.
- Studier F W. 2005. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expression and Purification, 41(1): 207–234.
- Technau U, Bode H R. 1999. *HyBra1*, a *Brachyury* homologue, acts during head formation in *Hydra*. Development, 126(5): 999–1010.
- Terazawa K, Satoh N. 1995. Spatial expression of the amphioxus homologue of *Brachyury (T)* gene during early embryogenesis of *Branchiostoma belcheri*. Development, Growth & Differentiation, 37(4): 395–401.
- Terazawa K, Satoh N. 1997. Formation of the chordamesoderm in the amphioxus embryo: Analysis with *Brachyury* and *fork head/HNF-3* genes. Development Genes and Evolution, 207(1): 1–11.
- Tsankov A M, Gu H, Akopian V, et al. 2015. Transcription factor binding dynamics during human ES cell differentiation. Nature, 518(7539): 344–349.
- Wilkinson D G, Bhatt S, Herrmann B G. 1990. Expression pattern of the mouse *T gene* and its role in mesoderm formation. Nature, 343: 657–659.
- Yu J S, Holland L Z. 2009. Cephalochordates (amphioxus or lancelets): a model for understanding the evolution of chordate characters. Cold Spring Harbor Protocols, 4(9): 1084–1092.
- 张秋金, 陈路, 吕小梅, 等. 2009. 厦门 2 种文昌鱼的实验室饲养与繁殖. 水生生物学报, 33(2): 348–351.