

中华绒螯蟹组蛋白 H3 基因保守序列的克隆、表达及抗体制备

康现江 吴江立 穆淑梅 张朝晖

河北大学生命科学学院 保定 071002

摘要: 为了研究组蛋白 H3 在中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 精子发生中的动态特征, 采用 PCR 技术扩增中华绒螯蟹 H3 基因编码区的 DNA 片段, 将其重组至含有 6 个 His 标签序列的原核表达质粒 pET-30a (+) 上, 转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rosetta (DE3) 感受态细胞中, 以 0.2 mmol/L 的异丙基 β -D 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导产生 pET-30a-H3 重组蛋白。SDS-PAGE 表明, 重组菌成功表达出了分子量约为 21 ku 的目标蛋白质, 融合蛋白以上清和包涵体的形式存在。采用镍柱亲和层析的方法纯化目的蛋白, 免疫新西兰大白兔 (*Oryctolagus cuniculus*), 制备兔抗血清。Western blot 结果表明, 制备的多克隆抗体具有较好的特异性。至此, 成功地克隆了中华绒螯蟹 H3 编码区基因并制备了多克隆抗体, 为进一步研究其在精子发生中的动态特征提供了基础。

关键词: 中华绒螯蟹; 组蛋白 H3; 基因克隆; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q781 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2014)02-223-10

Cloning, Expression and Polyclonal Antibody Preparation of Histone H3 Gene Conservative Sequence From *Eriocheir sinensis*

KANG Xian-Jiang WU Jiang-Li MU Shu-Mei ZHANG Zhao-Hui

College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China

Abstract: During spermatogenesis of most animals, the basic proteins associated with DNA are continuously changing; somatic-typed histones are partly replaced by spermatozoa-specific histones, which are then replaced by transition proteins, which in turn are finally replaced by protamines. With replacement of sperm basic nuclear proteins (SBNP), nuclei progressively undergo condensation. The nuclei of spermatozoa in Chinese crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda, Crustacea) are found to be uncondensed. However, the mechanism of nuclear uncondensation is not clear. To study histone H3 dynamics during *E. sinensis* spermatogenesis, H3 coding sequence of *E. sinensis* was amplified by PCR and cloned into prokaryotic expression vector pET-30a (+), which was then transferred into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) and induced to express the recombinant His/H3 protein by 0.2 mmol/L isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG). Meanwhile, the recombinant protein was purified through Ni-NTA Agarose affinity chromatography and purified protein was used as antigen to inoculate *Oryctolagus cuniculus* to produce antiserum. The polyclonal antibody was tested using western blotting method. Finally, H3 gene coding region from *E. sinensis* was cloned, prokaryotic expression vector pET-30a-

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31272309, 31202000), 河北省自然科学基金项目 (No. C2011201028);

第一作者介绍 康现江, 男, 教授; 研究方向: 生殖生物学; E-mail: xjkang@hbu.edu.cn。

收稿日期: 2013-10-21, **修回日期:** 2014-01-04

H3 was constructed. SDS-PAGE showed that a 21 ku protein was expressed successfully in Rosetta (DE3), and the recombinant protein existed in the form of supernatant and inclusion body, and recombinant protein was purified well through Ni-NTA Agarose affinity chromatography. Western blot showed that the polyclonal antibody had high specificity. In summary, coding sequence of histone H3 in *E. sinensis* was successfully cloned, prokaryotic expression vector pET-30a-H3 was constructed and recombinant protein was purified. The polyclonal antibody with high specificity was produced, which might provide fundamental basis for further study of histone H3 dynamic changes during *E. sinensis* spermatogenesis.

Key words: *Eriocheir sinensis*; Histone H3; Gene clone; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody

组蛋白 (histones) 是构成真核生物染色体的基本结构蛋白, 富含带正电荷的精氨酸 (Arg) 和赖氨酸 (Lys) 等碱性氨基酸, 等电点一般在 pH 10.0 以上, 属于碱性蛋白质, 可以和酸性的 DNA 紧密结合, 而且一般不要求特殊的核苷酸序列, 在所有处于分裂状态的细胞中表达。组蛋白主要分为 3 种类型, 占主要的是复制依赖型 (H1、H2A、H2B、H3、H4), 只在细胞分裂的 S 期表达。复制依赖型组蛋白没有内含子, 其转录产物没有 polyA 尾, 3' 端有一个茎环结构 (Birnstiel et al. 1985, Schumperli 1986, Liu et al. 1989, Osley 1991)。其次是不依赖于复制型, 即独立型组蛋白, 也称作替换或基础的组蛋白变体, 在整个细胞周期中表达, 不依赖于 DNA 的复制, 如 H1⁰、H2A.X、H2B.Z、H2A.2、H3.3、H3.3A、H3.3B、H3L 等, 这种蛋白的转录产物具有 polyA 尾, 3' 端无茎环结构 (Kress et al. 1986, Molgaard et al. 1980, Thatcher et al. 1994)。再次为组织特异性组蛋白, 只在几种哺乳动物的睾丸中表达, 如睾丸特异性的 H1.t (Lu et al. 2008)。

在动物的精子发生过程中, 大部分动物的精子有微观结构和蛋白组分的变化, 遗传物质由染色质到染色体再到进一步形成浓缩核, 与 DNA 结合的碱性蛋白则由体细胞组蛋白到精子特异的组蛋白, 再到过渡蛋白, 最后是替代过渡蛋白的鱼精蛋白 (Oliva et al. 1991, Hazzouri et al. 2000, 吴南等 2006)。这些蛋白的碱性越来越强, 为实现与 DNA 替代结合提供了保障。随着这些精子核碱性蛋白的逐步替代, 精子核的浓缩进一步加强。但是十足目甲

壳动物, 如中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 其精子核为非浓缩核 (堵南山等 1987, 1988, 王艺磊等 1988), 也就是说, 它们的遗传物质是相对松散的。早期研究认为, 这类精子的核内没有碱性蛋白, 没有组蛋白、过渡蛋白和鱼精蛋白, 因此核是非浓缩的。但是最近的研究发现, 普通黄道蟹 (*Cancer pagurus*)、首长黄道蟹 (*C. magister*) (Kurtz et al. 2008)、蜘蛛蟹 (*Maja brachydactyla*) (Kurtz et al. 2009) 和远海梭子蟹 (*Portunus pelagicus*) (Stewart et al. 2010) 等甲壳动物的精子核中终身存在全部或部分组蛋白, 且在含量上相对减少。那么除了以上几种蟹, 中华绒螯蟹精核中是否存在组蛋白? 如果该蛋白存在, 其在精子发生过程中的作用如何? 为解决上述问题, 我们克隆了中华绒螯蟹组蛋白 H3 的编码区基因, 并将其构建到原核表达载体上, 表达、纯化并制备其多克隆抗体, 为研究中华绒螯蟹组蛋白在精子发生中的动态特征提供了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和菌株

限制性内切酶 *EcoR* I、*Xho* I、T4 DNA 连接酶、pMD19-T Vector、DNA 提取试剂盒, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 2 × Es *Taq* MasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司; 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、Rosetta (DE3) 感受态细胞购自北京博迈德科技发展有限公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自中科瑞泰 (北京) 生物科技有限公司; 普通质粒小提试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; pET-30a (+) 表达载体为

本实验室保存;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 sigma 公司;预染蛋白质 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;PVDF 膜购自 Bio-Rad 公司;Ni-琼脂糖凝胶 FF 购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司, SuperECL Plus 超敏发光试剂盒购自北京博奥拓达公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体购自北京索莱宝科技有限公司, 体重 2.5 kg 的雄性新西兰大白兔 (*Oryctolagus cuniculus*) 由河北大学实验中心提供。

1.2 方法

1.2.1 中华绒螯蟹组蛋白 H3 保守序列的基因克隆

1.2.1.1 中华绒螯蟹肌肉 DNA 的提取及 PCR

用 DNA 提取试剂盒进行了中华绒螯蟹肌肉基因组 DNA 的提取, 之后比较 GenBank 上几种模式生物, 人 (*Homo sapiens*, 序列号 AAN10053.1) 和小鼠 (*Mus musculus*, 序列号 AAA37811.1) H3 全长序列以及方蟹科 3 种蟹的部分序列, 包括厚纹蟹 (*Pachygrapsus transversus*, 序列号 CBA13078.1)、红石蟹 (*Grapsus grapsus*, 序列号 CBA13077.1)、云斑厚纹蟹 (*P. marmoratus*, 序列号 AAZ39265.1)。经过比对发现, 人和小鼠的 H3 氨基酸序列完全一样, 而同属于方蟹科的这 3 种蟹的氨基酸序列位于人和小鼠 H3 全长的氨基酸序列之内, 且序列完全相同。由于 H3 高度保守, 因此推测中华绒螯蟹的 H3 氨基酸序列与人和小鼠的极有可能完全一样。再依据中华绒螯蟹的密码子偏好性, 设计一对引物, F1: 5'-ATGGCCCGCACCAAACA-3', R1: 5'-GGCGCGCTCGCCGCG-3'。

以提取的 DNA 为模板, 进行一个 Touch down PCR, 94℃ 预变性 5 min, 随后 94℃ 变性 30 s, 67℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 30 次, 每次循环降低 0.5℃, 之后再 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 循环 15 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。产物预期为 408 bp, 将产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.1.2 克隆测序与序列分析 将 PCR 产物

用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 连接到 pMD-19T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 并将转化菌涂布于含有氨苄青霉素的 LB 平板, 37℃ 培养 16 h。挑取单菌落培养, 进行菌液 PCR 验证, 得到的阳性克隆送上海生物工程股份有限公司测序, 并保种, 记做 pMD-19T-H3。

1.2.2 表达质粒的构建

根据中华绒螯蟹 H3 的测序结果以及三联体密码子规则设计表达引物, 上游引物 BDF: 5'-CCG GAATTCATGGCCCGCACCAAACAGA-3', 下游引物 BDR: 5'-CCG CTCGAGTTAGGCGCGCTCGCCGCG-3', 其中上游引物引入了 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC(下划线表示), 下游引物引入了 *Xho* I 酶切位点 CTCGAG(下划线表示)以及终止密码子 ATT。从测序正确的 DH5 α 中提取质粒 pMD-19T-H3, 以其为模板进行 PCR, 将产物切胶回收、连接、转化、测序、并保种记做 pMD-19T-H3(BD)。

从测序正确的 DH5 α 中提取质粒 pMD-19T-H3(BD), 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 酶切体系为: *EcoR* I (15 U/ μ l) 1 μ l, *Xho* I (10 U/ μ l) 1 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, 质粒 (0.2 μ g/ μ l) 3 μ l, 无菌去离子水补充至 20 μ l, 37℃ 酶切 6 h, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收目的基因片段。

将带有空载体 pET-30a 质粒的大肠杆菌 DH5 α 进行转接, 收集菌液, 使用质粒提取试剂盒进行质粒提取, 产物即为空载体 pET-30a 质粒, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 酶切体系为 *EcoR* I (15 U/ μ l) 1 μ l, *Xho* I (10 U/ μ l) 1 μ l, 10 \times buffer 2 μ l, 质粒 (0.3 μ g/ μ l) 3 μ l, 无菌去离子水补充至 20 μ l, 37℃ 酶切 6 h, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收 pET-30a 酶切片段。

将 H3 酶切产物 7 μ l, pET-30a Vector 1.5 μ l, 42℃ 变性 10 min, 之后冰上急冷, 加入 10 \times buffer 1 μ l, T4 DNA 酶 (350 U/ μ l) 0.5 μ l, 16℃ 连接过夜, 之后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 在 Kana 抗性 LB 固体培养基上 37℃ 倒置培养 12 ~ 16 h, 挑取单克隆接种到 Kana

抗性 LB 液体培养基中进行培养, 将摇好的菌液进行 PCR 验证, 有目的条带的送生工生物工程(上海)有限公司测序, 并保种, 将连有目的基因的表达载体命名为 pET-30a-H3。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达 将上述构建的表达融合蛋白的重组质粒转化到大肠杆菌 Rosetta 中, 挑取单克隆菌落接种至 Kana 抗性的 LB 液体培养基, 37℃ 200 r/min 培养至 A_{600} 为 0.6 ~ 0.8 时, 加入 IPTG 至其终浓度为 0.2 mmol/L, 18℃ 180 r/min 过夜诱导。并且在诱导 4 h、7 h、17 h 时, 分别取 1.5 ml 全菌液, 12 000 r/min 离心 5 min, 用 PBS 悬浮沉淀, 超声破碎, 将破碎后的菌液离心, 上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 进行重组蛋白的可溶性分析。

1.2.4 重组蛋白的纯化 取诱导过夜的菌液 140 ml, 9 000 r/min 4℃ 离心 6 min, 之后收集菌体, 用 7 ml 含 8 mol/L 尿素的 Buffer B 悬浮, 之后在冰浴中进行超声破碎, 破碎 15 min, 工作 3 s 停 3 s, 将破碎好的菌液 12 000 r/min 4℃ 离心 20 min, 取上清用镍柱进行纯化。

1.2.5 多克隆抗体的制备 用镍柱纯化的融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳检测其纯化效果。新西兰大白兔买回来之后暂养一周, 使其适应环境, 注射蛋白之前, 先耳缘静脉取血作为免疫前对照血清, 将纯化好的蛋白与弗氏佐剂等体积混合, 在震荡器上使抗原充分乳化, 在兔脊柱两旁多点皮下注射。每次注射 2.0 ~ 2.5 mg, 首次免疫用弗式完全佐剂, 以后都用弗式不完全佐剂, 每次免疫间隔 7 ~ 10 d, 第 4 次免疫 5 d 后耳缘静脉取血检测抗体的效价和特异性, 之后再加强免疫一次, 7 d 之后心穿刺采血收集兔血清, 将所取血液敞口室温放置 2 h, 之后将其密封 4℃ 过夜, 使血清析出, 第二天将其取出, 4 000 r/min 4℃ 离心 15 min, 取其血清分装后保存于 -80℃ 冰箱中备用。

1.2.6 Western blot 检测抗体特异性 取一定量的诱导后的菌体总蛋白和纯化的蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳结束后将胶上蛋白质以湿转方式电转移 (20 V, 25 min) 至 PVDF

膜上。电转后的 PVDF 膜经 TBST 洗涤后, 浸入 20 ml 5% 的脱脂奶粉中室温封闭 2 h, 以制备的 H3 多克隆抗体为一抗, 4℃ 孵育过夜, 后用 TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 孵育 1.5 h, 用 TBST 充分洗涤后, 用化学发光试剂 ECL 孵育膜 3 min, 在凝胶成像系统 Chemi Doc™ XRS + (Bio-Rad) 上进行曝光和采集图像。对照组用免疫之前的血清作为一抗, 其余条件相同。

2 结果

2.1 中华绒螯蟹 H3 基因的获得 PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 出现了一条大约 408 bp 的条带 (图 1)。

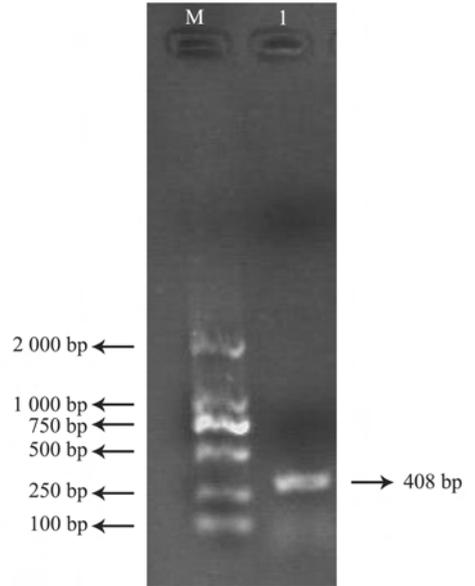


图 1 PCR 产物电泳结果

Fig. 1 The result of PCR product

M. DNA 分子量标准 DM2000; 1. PCR 产物。

M. DM2000 DNA marker; 1. PCR product.

将此条带切胶回收后与 pMD19-T 载体连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆送去测序, 测序结果采用 Chromas 软件对原始序列进行分析, 去掉载体序列后得到 408 bp 的核苷酸序列, 推导其编码 136 个氨基酸 (图 2)。

用 ClustalX 软件, 将中华绒螯蟹的 H3 氨

```

      10      20      30      40      50      60
1      ATGCCCCGCACCAAAACAGACTGCCAGGAAGTCCACCGGTGGCAAGGCGCCCCGCAAGCAG
1      M A R T K Q T A R K S T G G K A P R K Q

      70      80      90      100      110      120
61     CTGGCCACCAAGGCGCTCGCAAGTTCGGCCCCGGCCACCGGAGGAGTCAAGAAGCCTCAC
21     L A T K A A R K S A P A T G G V K K P H

      130     140     150     160     170     180
121    CGCTACAGGCCCGGGACCGTGGCCCTCCGTGAGATCCGCCCGCTACCAGAAGAGCACCGAG
41    R Y R P G T V A L R E I R R Y Q K S T E

      190     200     210     220     230     240
181    CTCCTCATCAGGAAGCTGCCCTTCCAGCGTCTGGTGC GCGAGATCGCCAGGATTTC AAG
61    L L I R K L P F Q R L V R E I A Q D F K

      250     260     270     280     290     300
241    ACCGATCTCCGCTTCCAGTCTCTGCCGTCATGGCTCTGCAGGAAGCCTCCGAGGCCCTAC
81    T D L R F Q S S A V M A L Q E A S E A Y

      310     320     330     340     350     360
301    CTCGTCGGTCTCTTCGAGGACACCAACCTCTGCGCCATCCACGCCAAGCGTGCACCATC
101   L V G L F E D T N L C A I H A K R V T I

      370     380     390     400
361    ATGCCAAAAGGACATCCAGCTGGCCCCGTCGCATTGCGGGCGAGCGCGCC
121   M P K D I Q L A R R I R G E R A

```

图 2 中华绒螯蟹组蛋白 H3 基因编码区的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and deduced amino acid sequences of coding region of

Eriocheir sinensis histone H3 gene

```

人 Homo sapiens      HARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGUUKKPHRYRPGTUALREIRRYQKSTE
小鼠 Mus musculus   HARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGUUKKPHRYRPGTUALREIRRYQKSTE
中华绒螯蟹 Eriocheir sinensis HARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGUUKKPHRYRPGTUALREIRRYQKSTE
果蝇 Drosophila simulans HARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGUUKKPHRYRPGTUALREIRRYQKSTE
非洲爪蟾 Xenopus laevis  HARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGUUKKPHRYRPGTUALREIRRYQKSTE
斑马鱼 Danio rerio   HARTKQTARKSTGGKAPRKQLATKAARKSAPATGGUUKKPHRYRPGTUALREIRRYQKSTE
酵母 Saccharomyces cerevisiae HARTKQTARKSTGGKAPRKQLASKAARKSAPS TGGUUKKPHRYKPGTUALREIRRFQKSTE
*****:****:*****:*****

人 Homo sapiens      LLIRKLPFQRLUREIAQDFKTDLRFQSSAUMALQEACEAYLUGLGFEDTNLCAIHAKRUTI
小鼠 Mus musculus   LLIRKLPFQRLUREIAQDFKTDLRFQSSAUMALQEACEAYLUGLGFEDTNLCAIHAKRUTI
中华绒螯蟹 Eriocheir sinensis LLIRKLPFQRLUREIAQDFKTDLRFQSSAUMALQEASEAYLUGLGFEDTNLCAIHAKRUTI
果蝇 Drosophila simulans LLIRKLPFQRLUREIAQDFKTDLRFQSSAUMALQEASEAYLUGLGFEDTNLCAIHAKRUTI
非洲爪蟾 Xenopus laevis  LLIRKLPFQRLUREIAQDFKTDLRFQSSAUMALQEASEAYLUGLGFEDTNLCAIHAKRUTI
斑马鱼 Danio rerio   LLIRKLPFQRLUREIAQDFKTDLRFQSSAUMALQESSEAYLUGLGFEDTNLCAIHAKRUTI
酵母 Saccharomyces cerevisiae LLIRKLPFQRLUREIAQDFKTDLRFQSSAIGALQESVEAYLUSLGFEDTNLCAIHAKRUTI
*****:****:*****:*****

人 Homo sapiens      MPKDIQLARRIRGERA
小鼠 Mus musculus   MPKDIQLARRIRGERA
中华绒螯蟹 Eriocheir sinensis MPKDIQLARRIRGERA
果蝇 Drosophila simulans MPKDIQLARRIRGERA
非洲爪蟾 Xenopus laevis  MPKDIQLARRIRGERA
斑马鱼 Danio rerio   MPKDIQLARRIRGERA
酵母 Saccharomyces cerevisiae QKKDIKLARRLRGE--
***:****:***

```

图 3 氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Multiple alignment of H3 amino acid sequences

“*”表示完全一致的氨基酸;“:”表示性质特别相近的氨基酸;“.”表示性质微弱相近的氨基酸。

“*” the same amino acid; “:” amino acid with strong similar property; “.” amino acid with week similar property.

氨基酸序列与 GenBank 上的几种模式生物,人、小鼠、果蝇 (*Drosophila simulans*, 序列号 BAA20144.1)、斑马鱼 (*Danio rerio*, 序列号 NP-001104686.1)、非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*, 序列号 AAA49765.1)、酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*, 序列号 AAS64349.1) 的 H3 的氨基

酸序列进行了对比(图 3),发现中华绒螯蟹的 H3 的氨基酸序列与非洲爪蟾 H3 氨基酸序列完全相同,与人、小鼠和斑马鱼的 H3 氨基酸序列分别有一个氨基酸的不同,证实了组蛋白 H3 进化上的保守性,同时也证明我们所获得的基因为中华绒螯蟹的 H3。

2.2 H3 基因表达重组质粒的构建 利用表达引物 BDF 和 BDR 扩增出的 PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到了一条约 408 bp 的条带(图 4), 将此条带切胶回收, 记作 H3。

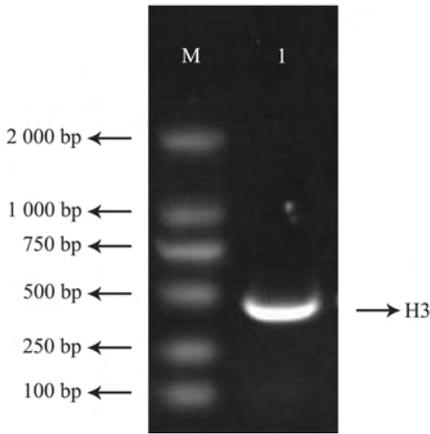


图 4 PCR 产物 H3 琼脂糖电泳图

Fig. 4 Electrophoretic result of PCR product H3

M. DNA 分子量标准 DM2000; 1. PCR 产物 H3。

M. DM2000 DNA marker;

1. PCR product of *Eriocheir sinensis* H3.

2.3 pMD-19T-H3 与 pET-30a 的双酶切 将带有 pMD-19T-H3 (BD) 质粒的保种菌 DH5 α 进行转接, 提取质粒, 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测约在 408 bp 处有目的条带(图 5)。

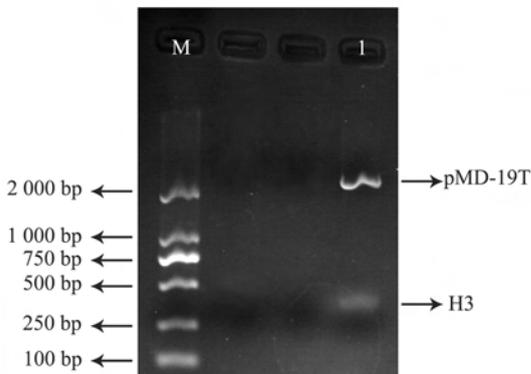


图 5 重组质粒 pMD-19T-H3 双酶切电泳结果

Fig. 5 Enzyme digestion result of pMD-19T-H3 recombinant plasmid

M. DNA 分子量标准 DM2000; 1. 酶切结果。

M. DM2000 DNA marker; 1. The result of enzyme digestion.

将空载体 pET-30a 用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 得到与目的基因具有相同粘性末端, 长度为 5 377 bp 左右的 pET-30a 片段(图 6), *EcoR* I 与 *Xho* I 两酶切位点在 pET-30a 表达载体上相距比较近(约 34 bp), 故 1% 琼脂糖凝胶电泳检测不出 34 bp 的片段。

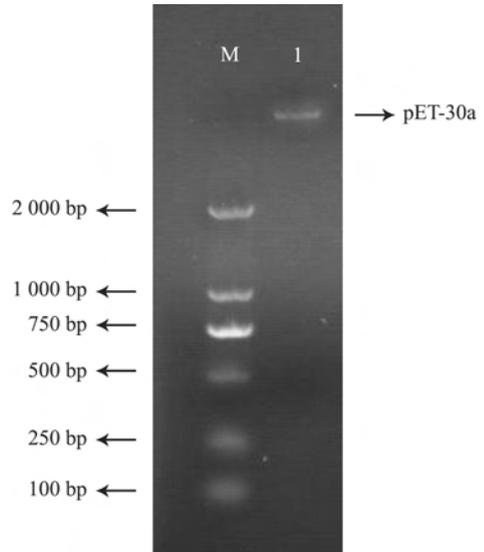


图 6 pET-30a 空载体双酶切电泳图

Fig. 6 Enzyme digestion result of pET-30a plasmid

M. DNA 分子量标准 DM2000; 1. 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后的 pET-30a。

M. DM2000 DNA marker; 1. pET-30a digested by *EcoR* I and *Xho* I.

2.4 重组质粒的测序 筛选阳性克隆测序, 测序结果证明插入的表达序列与目的片段序列一致, 去除起始密码子前以及末端终止密码子后面的酶切位点后, 此序列表达 188 个氨基酸残基(含起始密码子和 6 个组氨酸 His 标签)(图 7)。由此可知阳性克隆中目的片段已经正确的与 pET-30a 进行重组, 此质粒为 H3 肽段表达所需重组质粒 pET-30a-H3。

2.5 重组蛋白的表达及可溶性分析 将带有 pET-30a-H3 质粒的表达菌株 Rosetta 经 0.2 mmol/L IPTG, 18 $^{\circ}$ C 180 r/min 诱导, 分别在诱导 4 h、7 h 和 17 h 时取全菌液蛋白及超声破碎后的上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳(图 8)。加入 IPTG 诱导前, 在蛋白表达位置上并

```

      10      20      30      40      50      60
1  ATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGTTCTGGTGCACGGGTTCTGGTATGAAAGAA
1  M H H H H H H S S G L V P R G S G M K E

      70      80      90      100     110     120
61 ACCGCTGCTGCTAAATTTCGAACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGGTACCGACGAC
21 T A A A K F E R Q H M D S P D L G T D D

      130     140     150     160     170     180
121 GACGACAAGGCCATGGCTGATATCGGATCCGAATTCATGGCCCGCACCAAAACAGACTGCC
41 D D K A M A D I G S E F M A R T K Q T A

      190     200     210     220     230     240
181 AGGAAGTCCACCGGTGGCAAGGCGCCCGCAAGCAGCTGGCCACCAAGGCCGCTCGCAAG
61 R K S T G G K A P R K Q L A T K A A R K

      250     260     270     280     290     300
241 TCGGCCCGGCCACCGGAGTCAAGAAGCCTCACCGCTACAGGCCCGGACCGTGGCC
81 S A P A T G G V K K P H R Y R P G T V A

      310     320     330     340     350     360
301 CTCCGTGAGATCCGCCGCTACCAGAAAGACACCGAGCTCCTCATCAGGAAGCTGCCCTTC
101 L R E I R R Y Q K S T E L L I R K L P F

      370     380     390     400     410     420
361 CAGCGTCTGGTGC GCGAGATCGCCAGGATTTCAAGACCGATCTCCGTTCCAGTCTCT
121 Q R L V R E I A Q D F K T D L R F Q S S

      430     440     450     460     470     480
421 GCCGTATGGCTCTGCAGGAAGCCTCCGAGGCCCTACCTCGTCCGTCTCTTCGAGGACACC
141 A V M A L Q E A S E A Y L V G L F E D T

      490     500     510     520     530     540
481 AACCTCTGCGCCATCCACGCCAAGCGTGTACCATCATGCCAAAAGGACATCCAGCTGGCC
161 N L C A I H A K R V T I M P K D I Q L A

      550     560
541 CGTCGCATTGCGGCGAGCGCGCCTAA
181 R R I R G E R A *

```

图 7 重组质粒 pET-30a-H3 的碱基序列及其表达的氨基酸

Fig. 7 The base sequence and amino acid of pET-30a-H3

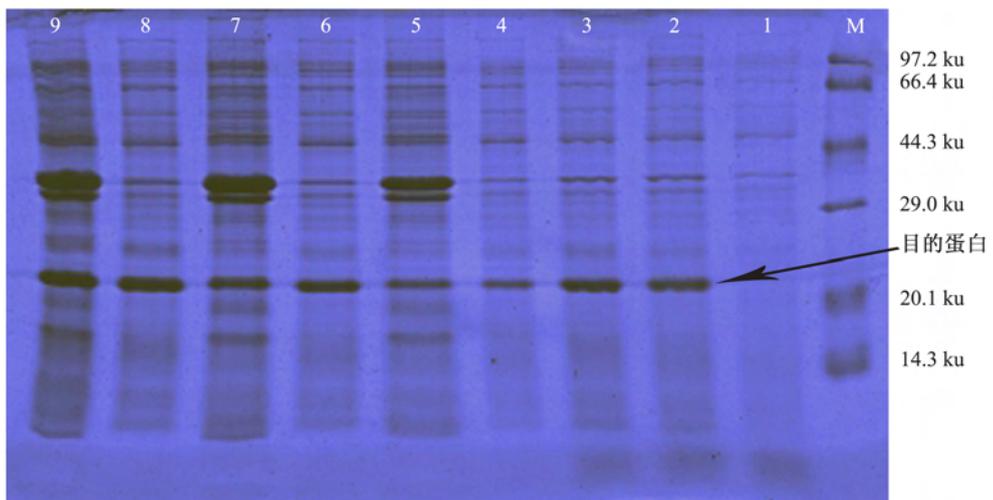


图 8 重组蛋白的 SDS-PAGE 电泳

Fig. 8 SDS-PAGE analysis of recombinant protein induced by IPTG

M. 蛋白分子量标准; 1. 未经 IPTG 诱导; 2. IPTG 诱导 7 h 的全菌液蛋白; 3. IPTG 诱导 17 h 的全菌液蛋白; 4. IPTG 诱导 4 h 后的上清; 5. 诱导 4 h 后的沉淀; 6. 诱导 7 h 后的上清; 7. 诱导 7 h 后的沉淀; 8. 诱导 17 h 后的上清; 9. 诱导 17 h 后的沉淀; 箭头所指为目的蛋白。

M. Protein marker; 1. pET-30a-H3/Rosetta (DE3) without IPTG induction; 2. Induced with IPTG for 7 h; 3. Induced with IPTG for 17 h; 4. The lysate supernatant (induced for 4 h); 5. The lysate precipitation (induced for 4 h); 6. The lysate supernatant (induced for 7 h); 7. The lysate precipitation (induced for 7 h); 8. The lysate supernatant (induced for 17 h); 9. The lysate precipitation (induced for 17 h); Arrow. Target protein.

无蛋白条带, 而加入 IPTG 诱导后蛋白开始表达, 随着诱导时间的延长, 蛋白的表达量逐渐增大, 在诱导 17 h 后蛋白的表达量最高。且融合蛋白在上清和包涵体均有表达, 随着诱导时间的延长, 在上清中的表达量逐渐增多, 诱导 17 h 后, 融合蛋白在上清和包涵体中的表达量几乎相当(图 8)。

2.6 重组蛋白的纯化 用 Ni-NTA Agarose 对 pET-30a-H3 融合蛋白进行纯化, 纯化后的产物用 SDS-PAGE 电泳进行检测, 经过镍柱纯化的融合蛋白比较纯, 呈现单一条带(图 9), 无杂蛋白, 可以用做后续的抗体制备。

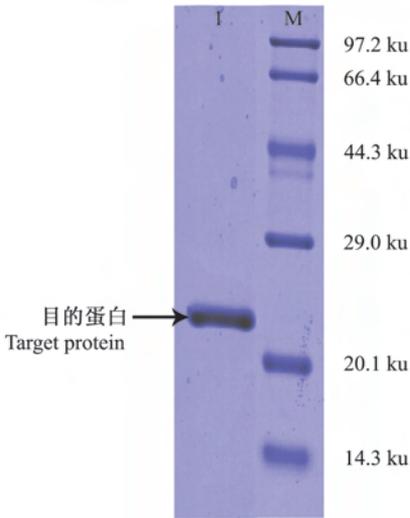


图 9 重组蛋白纯化产物 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 9 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant protein

M. 蛋白质分子量标准; 1. 纯化的重组蛋白。

M. Protein marker; 1. The purified recombinant protein.

2.7 Western blot 检测抗体的特异性 经 Western blot 鉴定, 在诱导后的全菌液蛋白粗提液和纯化的重组蛋白中均有单一阳性条带出现。全菌液蛋白中属于菌体的蛋白并没有发生免疫反应, 说明制备的抗体特异性很好。对照组以免疫前血清作为一抗, 没有阳性反应(图 10)。

3 讨论

组蛋白的基因非常保守。亲缘关系较远的

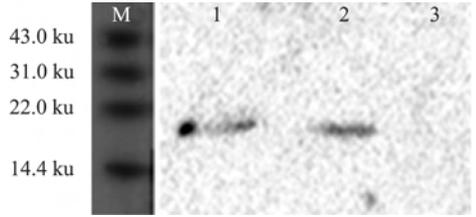


图 10 Western blot 检测结果

Fig. 10 The result of western blot

M. 蛋白质分子量标准; 1. 诱导后的全菌液蛋白;

2. 纯化的蛋白; 3. 对照组。

M. Protein marker; 1. The total protein of pET-30a-H3/Rosetta (DE3) induced by IPTG;

2. The purified recombinant protein; 3. Control.

种属中, 4 种组蛋白(H2A、H2B、H3、H4)氨基酸序列都非常相似, 如海胆(*Sea urchin*)组织 H3 的氨基酸序列与来自小牛(*Bos tarurs*)胸腺的 H3 的氨基酸序列只有一个氨基酸的差异, 小牛胸腺的 H3 的氨基酸序列与豌豆(*Pisum sativum*)的 H3 也只有 4 个氨基酸不同。本实验克隆得到的中华绒螯蟹的 H3 的氨基酸序列与非洲爪蟾的 H3 的氨基酸序列完全相同, 与人、小鼠和斑马鱼也仅有一个氨基酸的差异, 更加验证了组蛋白 H3 进化上的高度保守。本研究同时提取了中华绒螯蟹精子的 DNA, 进行 H3 的扩增, 结果显示, 肌肉和精子中 H3 的氨基酸序列完全相同(此部分结果未在本文中展示)。故本实验制备的 H3 抗体可以用来研究其在中华绒螯蟹精子发生中的动态特征。

pET 系统是由 Novagen 公司构建的高效原核表达系统, 目的基因被克隆到 pET-30a(+) 质粒上, 受到噬菌体 T7 强转录及 T7 RNA 聚合酶诱导, 高效表达 T7 启动子下游的外源基因。本研究中 pET-30a(+) His/H3 融合蛋白仅在诱导后表达, 并且在诱导菌株表达融合蛋白时进行了表达条件的摸索, 实验过程发现, 在 37℃ 菌液的 A_{600} 达到 0.6 ~ 0.8 时开始诱导, IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 18℃ 180 r/min 过夜诱导后, 融合蛋白的表达量达到最大, 且在上清和包涵体都有表达。

选择用 Ni-NTA 柱纯化重组蛋白, 重组蛋白带有 6 个组氨酸(His)标签, Ni^{2+} 能与带 His

标签的蛋白结合,也可以与咪唑结合。利用这个原理可以把带 His 标签的蛋白质吸附,之后再用含更高咪唑浓度的溶液洗脱目的蛋白。在实验中发现,用含 25 mmol/L 咪唑的溶液洗脱杂蛋白时,会把目的蛋白部分洗脱下来,因此尝试了 20 mmol/L 咪唑的溶液来洗脱,发现正好可以把杂蛋白洗脱干净而又不把目的蛋白洗脱下来。制备抗体所需抗原用上清和包涵体均可(黄培堂 2005),故本实验将上清和包涵体表达的蛋白一起收集,纯化之后作为免疫原进行免疫。

本实验采用雄性新西兰大白兔为免疫动物,较小鼠而言,用新西兰大白兔作为免疫动物获得的抗血清较多,但是所需抗原量较大,因此对融合蛋白的纯化要求比较高,需要得到较高浓度且较纯的抗原,抗原浓度不高即需要加大注射剂量,注射剂量加大会对免疫动物造成不同程度的伤害,因此抗原浓度不宜太低,本实验获得的免疫用抗原纯度较高,抗原注射浓度均在 1.5 g/L 左右。

精子核碱性蛋白主要是与 DNA 结合的一类低分子量蛋白,通常除了非特异的组蛋白外,还有精子特异的组蛋白、过渡蛋白和鱼精蛋白等,它们对精子核中遗传物质的形态结构和功能状态具有决定性的作用。它们在精子发生中会依次发生替代,体细胞组蛋白部分被精子特异的组蛋白替代,再经过过渡蛋白,最后被鱼精蛋白替代,随着精子核碱性蛋白的逐步替代,精子核的浓缩逐步增强。并且与精子 DNA 结合的碱性蛋白还会发生共价修饰如乙酰化、甲基化、磷酸化等,或者在数量上发生改变(Barzotti et al. 2006)。中华绒螯蟹作为非浓缩核精子的代表物种,其精子发生过程中组蛋白的变化,如是否有替代?是否有共价修饰?均值得研究探讨。本实验组蛋白 H3 基因的成功克隆以及多克隆抗体的制备,为研究其在中华绒螯蟹精子发生中的动态特征奠定了基础。同时,也为进一步研究中华绒螯蟹的非浓缩核成因以及组蛋白 H3 的结构、功能提供了基础数据。

参 考 文 献

- Barzotti R, Pelliccia F, Rocchi A. 2006. DNA methylation, histone H3 methylation, and histone H4 acetylation in the genome of a crustacean. *Genome*, 49(1): 87–90.
- Birnstiel M L A, Busslinger M, Strub K. 1985. Transcription termination and 3' processing: The end is in site!. *Cell*, 41(2): 349–359.
- Hazzouri M, Pivot-Pajot C, Faure A K, et al. 2000. Regulated hyperacetylation of core histones during mouse spermatogenesis: involvement of histone-deacetylases. *European Journal of Cell Biology*, 79(12): 950–960.
- Kress H, Tönjes R, Doenecke D. 1986. Butyrate induced accumulation of a 2.3 kb polyadenylated H1⁰ histone mRNA in HeLa cells. *Nucleic Acids Research*, 14(18): 7189–7197.
- Kurtz K, Ausió J, Chiva M. 2009. Preliminary study of sperm chromatin characteristics of the brachyuran crab *Maja brachydactyla*. Histones and nucleosome-like structures in decapod crustacean sperm nuclei previously described without SNBPs. *Tissue and Cell*, 41(5): 334–344.
- Kurtz K, Martínez-Soler F, Ausió J, et al. 2008. Histones and nucleosomes in *Cancer* sperm (Decapod: Crustacea) previously described as lacking basic DNA-associated proteins: a new model of sperm chromatin. *Journal of Cellular Biochemistry*, 105(2): 574–584.
- Liu T J, Levine B J, Skoultchi A I, et al. 1989. The efficiency of 3'-end formation contributes to the relative levels of different histone mRNAs. *Molecular and Cellular Biology*, 9(8): 3499–3508.
- Lu S M, Bao Z M, Wang X L, et al. 2008. Cloning and characterization of histone H3 and replacement histone H3.3 encoding genes of Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Indian Journal of Biotechnology*, 7(4): 456–464.
- Stewart M J, Praphaporn S, Nantawan S, et al. 2010. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue and Cell*, 42(3): 137–150.
- Molgaard H V, Perucho M, Ruiz-Carrillo A. 1980. Histone H5 messenger RNA is polyadenylated. *Nature*, 283(5746): 502–504.
- Oliva R, Dixon G H. 1991. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 40: 25–94.
- Osley M A. 1991. The regulation of histone synthesis in the cell cycle. *Annual Review of Biochemistry*, 60(1): 827–861.
- Schümperli D. 1986. Cell-cycle regulation of histone gene expression. *Cell*, 45(4): 471–472.
- Thatcher T H, MacGaffey J, Bowen J, et al. 1994. Independent evolutionary origin of histone H3.3 variants of animals and Tetrahymena. *Nucleic Acids Research*, 22(2): 180–186.
- 堵南山, 赖伟, 薛鲁征. 1987. 中华绒螯蟹精子的研究 I 精子的形态及超微结构. *海洋与湖沼*, 18(2): 119–126.

堵南山, 薛鲁征, 赖伟. 1988. 中华绒螯蟹精子的研究 II 精子发生. 海洋与湖沼, 19(1): 71-78.

黄培堂. 2005. 分子克隆实验指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 1218-1219.

王艺磊, 张子平, 李少菁. 1998. 甲壳动物精子学研究概况 II

精子发生与精子的生化组成. 动物学杂志, 33(4): 52-57.

吴南, 桂建芳. 2006. 组蛋白变体及组蛋白替换. 遗传, 28(4): 493-500.

海南东寨港发现斑胸滨鹬

Calidris melanotos Observed at Dongzhaigang, Hainan

2013 年 11 月 15 日上午, 在海南省海口市东寨港国家级自然保护区周边一片农田 (19°53'51.80"N, 116°37'01.78"E) 观察到 1 只斑胸滨鹬 (*Calidris melanotos*) (图 1), 该片农田用作种植蔬菜和饲养水蚤。发现斑胸滨鹬的同时, 也记录到林鹬 (*Tringa glareola*)、泽鹬 (*T. stagnatilis*)、白腰草鹬 (*T. ochropus*)、黑尾塍鹬 (*Limosa limosa*)、青脚滨鹬 (*C. temminckii*) 及铁嘴沙鸻 (*Charadrius leschenaultii*) 等。

观察到的斑胸滨鹬, 背部具杂色斑; 嘴略微下弯, 前一半黑色, 后一半黄色; 胸部黑色纵纹密布但突然中止于腹部。与同属相似种尖尾滨鹬 (*C. acuminata*) 区别于胸部黑色纵纹没有延伸到腹部, 形成明显的分界线。

斑胸滨鹬繁殖于俄罗斯、西伯利亚和北美洲, 在南美洲、澳大利亚及新西兰过冬 (约翰·马敬能等 2000)。综合文献 (约翰·马敬能等 2000, Carey et al. 2001, 王凤琴等 2007, 郑光美 2011) 和《中国鸟类观察》收集的观鸟者记录, 斑胸滨鹬是中国的罕见过境鸟, 在上海、香港、河南、河北、江苏、辽宁、台湾、广东、北京、天津和山东有零星记录。海南此前尚无斑胸滨鹬分布记录, 这次观察是海南的首次记录。



图 1 斑胸滨鹬 *Calidris melanotos*

卢刚^① 林江^② 李飞^① 李灏^① 吴昭榆^① 陈辈乐^① 宋亦希^{①*}

① 嘉道理农场暨植物园 嘉道理中国保育 香港特别行政区;

② 东寨港红树林国家级自然保护区管理局 海口 571129

* 通讯作者, E-mail: yhsung@kfbg.org;

第一作者介绍 卢刚, 男, 保育主任; 研究方向: 生物多样性保护, 保护区管理, 鸟类生态; E-mail: lugang@kfbg.org.

收稿日期: 2014-01-13, 修回日期: 2014-02-13