

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01239

# 果蝇 *spen* 蛋白的抗体制备、组织特异性表达及功能分析

金丽华, 齐卓

东北林业大学生命科学院, 哈尔滨 150040

**摘要:** *Spn* 家族蛋白参与多种生物学过程, 包括神经元细胞的命运、神经元突起延伸的调节、细胞周期调控等, 并且是联系 Notch 信号途径和生长因子受体途径的关键分子。最近的研究表明 *spen* 基因在果蝇的眼睛、翅膀和腿组织中参与 Wnt 信号转导。但该基因在果蝇中的功能还有很多不明确之处。文章采用基因克隆、原核表达及亲和层析等方法制备并纯化了黑腹果蝇 *spen* 的 C 端 6×His-*spen* 融合蛋白, 以纯化的融合蛋白免疫大鼠获得了抗 *spen* 的多克隆抗体。利用制备的抗体进行免疫染色结果显示 *spen* 蛋白定位于细胞核内, 并且在脑、脂肪体、血细胞、肠和唾液腺等组织中表达量较高。分析野生型和突变体果蝇血细胞的噬菌作用, 发现 *spen* 蛋白低表达的突变体吞噬外来异物明显低于野生型, 结果表明 *spen* 蛋白能够调节血细胞的吞噬功能。

**关键词:** 果蝇; *spen* 蛋白; 多克隆抗体; 组织特异性表达; 噬菌作用

## *Drosophila spen* protein: generation of polyclonal antibodies, functional analysis and tissue-specific expression

JIN Li-Hua, QI Zhuo

College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** The *spen* family of proteins participates in various biological processes. It is involved in neuronal cell fate, survival and axon guidance, and cell cycle regulation. Recent studies showed the *Drosophila spen* gene was required for Wnt-dependent signaling in the eye, wing and leg. However, the genetic role and biological function in *Drosophila* remain largely unclear. A *Drosophila* C-terminal fragment of *spen* was cloned and expressed in *E. coli*. The purified 6×His-*spen* protein was injected into SD rat to generate polyclonal antibodies. Subcellular localization and tissue-specific expression of *spen* protein were analysed by immunostaining and histoimmunochemistry. The results indicated that *spen* protein was localized in the nucleus and expressed at high levels in brain, fat body, hemocyte, gut and salivary gland. To assay the function of mutant hemocytes *in vivo*, wild-type and *spen* mutant larvae were infected with fluorescent microspheres. Wild-type hemocytes showed a strong fluorescence signal from the phagocytosed microspheres; however, *spen* mutant had a weak fluorescence signal, indicating that the mutant hemocytes were defective in the uptake of the microspheres.

**Keywords:** *Drosophila*; *spen*; polyclonal antibodies; tissue-specific expression; phagocytosis

*Spn* 家族蛋白调节神经元细胞的命运、神经元突起延伸和细胞周期等<sup>[1~4]</sup>。*Spn* 家族蛋白大小相差

较大, 从 90~600 kDa 不等, 但在 N 末端都特征性包含数个 RRM (RNA recognition motifs) 结构域, 在 C

收稿日期: 2011-03-29; 修回日期: 2011-05-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (编号: 30940063, 31070775) 资助

作者简介: 金丽华, 博士, 教授, 专业方向: 分子免疫学。Tel: 0451-82191755; E-mail: lhjin2000@hotmail.com

网络出版时间: 2011-7-28 17:21:30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110728.1721.003.html>

末端包含一个保守的SPOC(Spen paralog and ortholog C-terminal domain)结构域<sup>[2,5]</sup>。蛋白结构分析显示, spen蛋白家族成员都通过N末端的RRM结构域和C末端的抑制结构域与RNA的共激活因子SRA和HDAC相互作用<sup>[6,7]</sup>。而且spen是联系Notch信号途径和生长因子受体途径的关键分子, 小鼠同源物MINT与Notch的胞内区竞争结合Notch信号途径中的关键转录激活因子RBP-J, 进而募集SMAT/NCOR形成HDAC共抑制复合物, 使组蛋白去乙酰化, 进行染色质重塑, 发挥转录抑制作用<sup>[2,8]</sup>。最近的研究表明spen基因在果蝇的眼睛、翅膀和腿组织中参与Wnt信号转导<sup>[9-11]</sup>, 但是该基因在果蝇中的功能和作用机制还有很多不明确之处。本研究采用基因克隆、原核表达及亲和层析等方法制备并纯化黑腹果蝇spen的C端 6×His-spen融合蛋白, 以纯化的融合蛋白免疫大鼠得到抗spen的多克隆抗体。利用免疫染色研究spen蛋白定位及在果蝇各组织中的表达, 而且分析了spen基因突变体的噬菌作用。此结果将为进一步研究spen蛋白质的功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

野生型果蝇 $W^{1118}$ 和spen基因突变体购自美国印第安纳大学的布鲁明顿果蝇库存中心, 原核表达载体pRSETA和大肠杆菌BL21(DE3)由本实验室保存, SD大鼠(雄性)购自哈尔滨医科大学第二附属医院实验动物中心。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 重组表达质粒的构建

根据NCBI基因库中spen编码区序列设计了上下游特异性引物, F: 5'-ATAGGATCCGTGACTGCA TCCAGGG-3'(下划线处为BamH 酶切位点); R: 5'-ATAGAATTCCCTGCTGTTGTTGAACGACA-3'(下划线处为EcoR 酶切位点)。以野生型果蝇 $W^{1118}$ 的RNA反转录产物为模板进行PCR扩增, 具体反应条件如下: 95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 28 循环; 72℃延伸 5 min。扩增片段酶切后插入pRSETA载体的BamH 和EcoR 位点之间。重组质粒经BamH 和EcoR (Promega)双酶切后, 阳性克隆由北京六合华大基因科技股份有限

公司测序鉴定。

#### 1.2.2 融合蛋白的表达和纯化

表达载体pRSETA-spen转化大肠杆菌BL21(DE3)菌株, 挑取单菌落在含 100 mg/L氨苄青霉素的LB培养基中于 37℃培养过夜。然后按 1%转种并在 37℃培养至 $OD_{600nm}=0.5 \sim 0.6$ 后加入IPTG至最终浓度为 0.5 mmol/L, 在 30℃诱导 6 h, 不加IPTG作为对照。诱导结束后离心收集菌体, 用 1/20 培养基体积的缓冲液悬浮细菌, 经超声波破碎后, 于 4℃以 13 000 r/min离心 20 min, 收集上清, 上清液通过镍亲和层析柱(Qiagen)纯化融合蛋白。将纯化得到的蛋白质进一步通过SDS-PAGE分离纯化, 切胶回收spen特异性的蛋白条带。再经溶解、透析浓缩后用Bredford方法测定蛋白质浓度, 用于抗体制备。

#### 1.2.3 Western blotting 检测

6×His-spen 融合蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白电转(20 V, 45 min)到硝酸纤维素膜(NC)上, 然后将 NC 膜在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h 后, 加入抗 6×His-Tag(1:1000)或已制备的 spen (1 500)抗体室温结合 1 h, 用 TBST 完全洗去未结合的一抗, 再加入碱性磷酸酶标记山羊抗大鼠 IgG(1 1000)室温结合 1 h, TBST 完全洗去未结合的二抗, 用 NBT/BCIP 显色。

#### 1.2.4 抗体的制备

取 SD 大鼠 3 只, 120 μg 融合蛋白作为抗原与弗氏完全佐剂(Sigma)按 1 1(V/V)比例完全混合, 经乳化后在腹部及腹股沟进行多点注射。以后每隔 3 周, 取 120 μg 的抗原和弗氏不完全佐剂按 1 1(V/V)比例完全混合, 用同样方法加强免疫 2 次。第 3 次免疫 10 d 后心脏取血, 离心取上清。

#### 1.2.5 抗 spen 抗体的提纯

用溴化氰活化琼脂糖凝胶 4B 偶联提纯的 spen 融合蛋白, 做成亲和纯化柱, 将血清通过 spen 融合蛋白亲和柱, 洗脱结合在 spen 融合蛋白亲和柱上的 spen 特异性抗体, 结果利用 SDS-PAGE 鉴定, Bredford 方法检测抗体浓度。

#### 1.2.6 免疫染色及免疫组织化学检测

果蝇三龄幼虫的脂肪体、肠和组织切片分别粘

附于涂有粘附剂的载玻片。利用 4% 的多聚甲醛室温作用 30 min 固定细胞, 加入 0.3% TritonX-100 和 5% 羊血清透化并封闭 30 min 后, 用制备的抗 *spen* (1:200) 抗体 4℃ 作用过夜, 再加入 FITC 标记山羊抗大鼠 IgG(1:200)、DAPI 室温染色。最后加入封片剂, Zeiss Axioplan 2 显微镜(Zeiss)下观察并拍照。

### 1.2.7 血细胞的噬菌作用

利用 Picospritzer III 微量注射仪将荧光标记的微球(Invitrogen, 直径 1.0  $\mu\text{m}$ )注入果蝇三龄幼虫 1 h 后, 分离出血细胞接种于粘附性载玻片上, 加入 4% 的多聚甲醛室温固定 30 min, PBS 充分冲洗, 用 4% 台盼蓝溶液盖住细胞外的荧光, Zeiss Axioplan 2 显微镜(Zeiss)下拍摄进入细胞内的荧光微球。荧光微球数量分别从 30~40 个血细胞求平均值和标准偏差, 重复 2 次实验。

## 2 结果与分析

### 2.1 表达载体的构建

使用 *spen* 特异性引物以果蝇总 RNA 逆转录 cDNA 为模板进行 PCR 扩增后, 琼脂糖凝胶电泳可得到 490 bp 的目的片段(图 1A)。PCR 产物和 pRSETA 质粒用 *Bam*H 和 *Eco*R 酶切后连接, 构建重组表达载体经 *Bam*H 和 *Eco*R 双酶切, 可见 3 000 bp 的载体和 490 bp 的目的 DNA 片段(图 1A)。测序结果证明, 所得阳性克隆插入片段方向及阅读框均正确。测序鉴定结果正确的重组质粒命名为 pRSETA-*spen*(图 1B)。

### 2.2 重组质粒的表达与纯化

将重组质粒 pRSETA-*spen* 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 加入 IPTG 诱导 *spen* 融合蛋白。经 SDS-

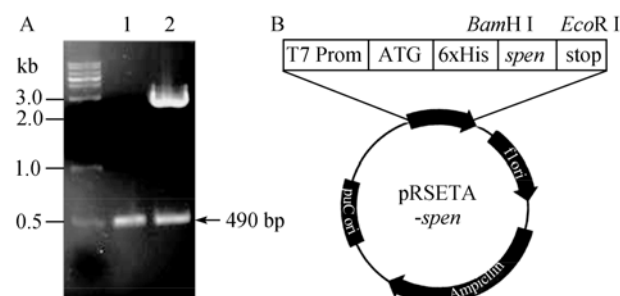


图 1 *spen* 基因的克隆和表达载体 pRSETA-*spen* 的构建  
A: *spen* 基因的克隆。1: PCR 产物; 2: pRSETA-*spen* 经 *Bam*H 和 *Eco*R 双酶切。B: 重组表达质粒 pRSETA-*spen*。

PAGE 电泳后, 在约 27 kDa 的标准分子量下方有一明显的融合蛋白表达条带, 而未加入 IPTG 诱导的阴性对照未发现这一条带, 表明目的基因得到表达(图 2A)。为了获得大量的融合蛋白, 扩大培养含重组质粒 pRSETA-*spen* 的菌液经 0.5 mmol/L IPTG 在 30℃ 诱导 6 h 后收集细菌, 经超声波破碎、离心分离上清和沉淀。将收集的裂解液用 Ni-NTA 树脂亲和层析法和切胶法纯化融合蛋白, 纯化产物经 SDS-PAGE 检测, 呈现单一蛋白质带(图 2A)。用抗 His 标签单抗以 Western blotting 方法检测纯化的融合蛋白, 在 24 kDa 的位置呈现一条蛋白带, 其结果证明提纯的蛋白为 6×His-*spen* 融合蛋白(图 2B)。

### 2.3 Western blotting 鉴定抗 *spen* 多克隆抗体及提纯

提纯的 6×His-*spen* 融合蛋白 100 ng、300 ng 进行 SDS-PAGE 电泳后将蛋白电转到硝酸纤维素膜(NC)上, 用所制备的抗 *spen* 血清按 1:500 倍稀释, 以 Western blotting 方法分别检测 3 只大鼠的抗体特异性, 结果见图 3。

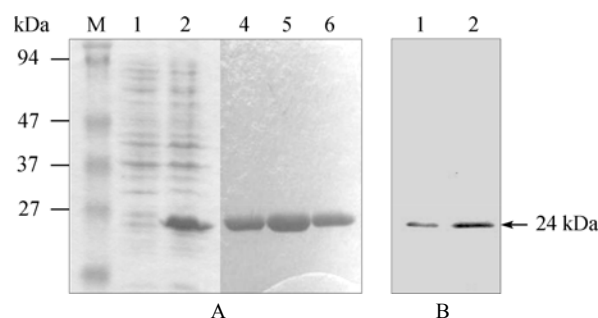


图 2 6×His-*spen* 融合蛋白的原核表达、纯化、鉴定  
A: 6×His-*spen* 融合蛋白的原核表达及纯化。M: 蛋白分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导大肠杆菌总蛋白; 2: 经 IPTG 诱导大肠杆菌总蛋白; 4-6: 纯化后的 6×His-*spen* 融合蛋白; B: 抗 His 标签单抗与原核表达重组蛋白的免疫印记。1: 100 ng; 2: 300 ng。

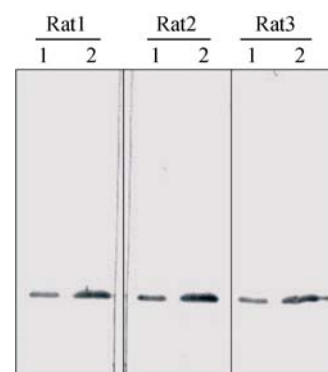


图 3 抗 *spen* 抗血清与原核表达重组蛋白的免疫印记  
1: *spen* 融合蛋白 100 ng; 2: *spen* 融合蛋白 300 ng。

根据 Western blotting 结果选择抗体效价较高的第二只大鼠的血清, 将血清通过偶联 6×His-spen 融合蛋白的溴化氰活化琼脂糖凝胶 4B 亲和纯柱, 得到分子量为约 55 kDa 和 28 kDa 的两条特异性条带, 分别是抗 spen 蛋白抗体的重链和轻链(图 4), 最高浓度为 0.24 μg/μL。

#### 2.4 免疫染色的方法检测 spen 蛋白在果蝇三龄幼虫中的表达

对野生型果蝇三龄幼虫的脂肪体和肠利用提纯的抗 spen 抗体进行免疫染色。结果显示, spen 蛋白定位于脂肪体和肠组织中的细胞核内, 而用免疫前血清做阴性对照没有观察到任何荧光, 结果说明制备的抗体具有结合天然抗原的能力(图 5)。为了分析

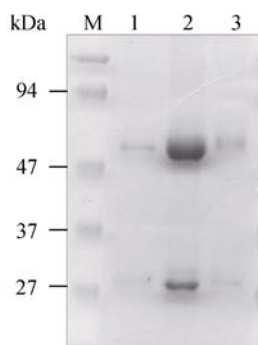


图 4 纯化后的抗 spen 特异性抗体  
M: 蛋白分子量标准; 1~3: 纯化的抗 spen 抗体。

spen 蛋白在果蝇不同组织中的表达特征, 以纯化的 spen 抗体, 用免疫组织化学检测了果蝇三龄幼虫的切片组织。结果显示 spen 蛋白在大脑、脂肪体和血细胞内表达量较高, 其次为肠和唾液腺, 而 spen 突变体及周围其他组织呈隐性(图 6)。

#### 2.5 spen 蛋白与血细胞的噬菌作用

果蝇在幼虫期含有几千个血细胞, 根据形态和功能分为 3 种: 浆细胞、晶细胞和薄层细胞。浆细胞占果蝇血细胞的 90%~95%, 其功能是吞噬清除病原微生物、死亡的细胞和外来异物, 类似于哺乳动物的巨噬细胞<sup>[12,13]</sup>。为了分析浆细胞的噬菌作用, 将荧光标记的微球注入果蝇三龄幼虫, 用以观测血细胞吞噬外来异物, 比较野生型果蝇和 spen 突变体浆细胞的噬菌能力。结果表明野生型果蝇单个浆细胞吞噬荧光微球数为 7~13 个, 而 spen 突变体只有 1~3 个, 平均噬菌能力只有野生型的 18.6%(图 7)。此结果可推测 spen 蛋白对外来异物的吞噬能力具有一定的调节作用。

### 3 讨论

Spen 作为核蛋白能够在不同的信号通路中调节关键转录因子的表达, 并参与神经元细胞的生存、轴突导向, 调控细胞周期等<sup>[2]</sup>。Spen 蛋白在果蝇的视网膜发育过程中抑制 Notch 信号, 而在神经发育

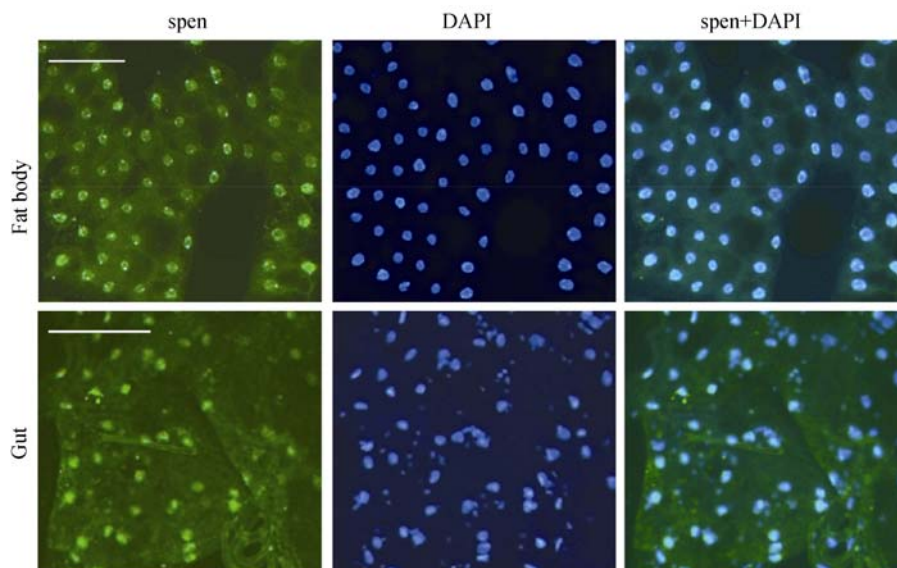


图 5 免疫染色的方法检测 spen 蛋白在果蝇脂肪体和肠内的表达与定位  
spen: spen 抗体染色; DAPI: 细胞核; spen+DAPI: spen 蛋白和细胞核叠加。比例尺, 100 μm。

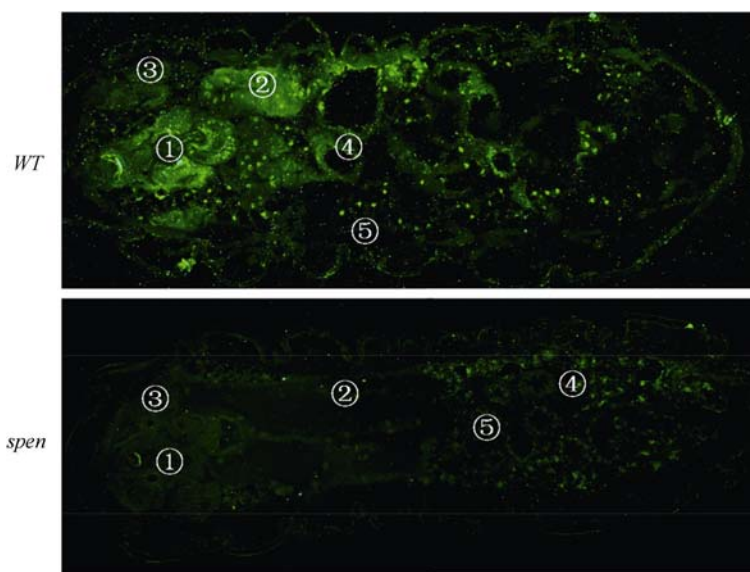


图 6 *spen* 蛋白在野生型果蝇 *WT* 和 *spen* 突变体三龄幼虫不同组织中的表达差异

① 大脑; ② 脂肪体; ③ 唾液腺; ④ 肠; ⑤ 血细胞; *WT*: 野生型; *spen*: *spen* 基因突变体。

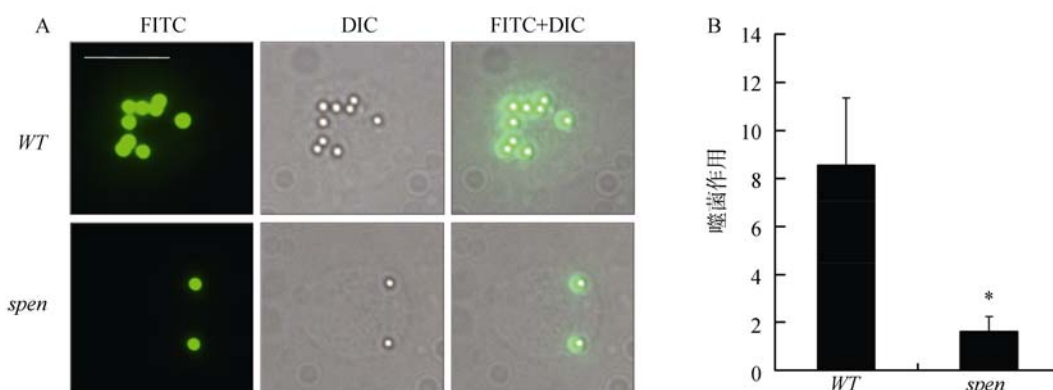


图 7 野生型果蝇 *WT* 和 *spen* 突变体血细胞的噬菌作用的比较分析

A: 野生型果蝇 *WT* 和 *spen* 突变体浆细胞的噬菌作用 (比例尺, 10  $\mu$ m)。FITC: 荧光标记微球; DIC: 自然光下的微球; FITC+DIC: 荧光和自然光叠加。B: 血细胞吞噬荧光微球数量, \* $P < 0.0001$ 。

过程中促进 EGFR 信号。Spen 蛋白家族可能是通过调节 Notch 信号通路对神经系统和造血系统起一定的调控作用, 反过来又被 Notch 信号所调控<sup>[11,14]</sup>。研究发现, 删除 MINT 蛋白的小鼠导致胚胎致死, 造血系统功能分析结果证明此现象和 B 细胞的发育缺陷相关<sup>[15]</sup>。Raffel 等<sup>[16]</sup>研究证实 spen 家族成员 Ott1 蛋白既能促进 B 淋巴球形成, 又能抑制骨髓细胞、巨核细胞、前体细胞的发育, 并且 Ott1 还能调控小鼠胎盘的血管分布及影响心脏和脾的胚胎发育<sup>[17]</sup>。

我们将 *spen* 的 C 端部分 cDNA 亚克隆入 pRSETA 载体中, 在大肠杆菌内高表达并利用 Ni-NTA 树脂亲和

层析法纯化了融合蛋白。由于此方法提纯的融合蛋白纯度不够高, 我们采用 SDS-PAGE 切胶的方法得到单一蛋白质带, 进一步提高了抗原的纯度, 以提高抗体的特异性。用提纯的融合蛋白免疫大鼠得到抗 *spen* 蛋白的多克隆抗体。利用 Western blotting 和免疫染色的方法检测了 *spen* 抗体的特异性。并利用制备的 *spen* 抗体, 对果蝇三龄幼虫进行免疫组织化学检测。结果显示 *spen* 蛋白在果蝇的大脑、脂肪体和血细胞中的表达量较高。Spen 蛋白在果蝇的大脑中高表达, 可能与 *spen* 家族蛋白具有决定神经元细胞命运和调节神经元突起延伸的作用相关。血细胞的

吞噬作用是动物一种基本的原始的防御机制,对体内不能产生抗体的无脊椎动物的免疫防御具有更为重要的意义<sup>[18,19]</sup>。*Spen*突变体血细胞的噬菌功能明显下降,表明spen蛋白可能是果蝇细胞免疫一个重要调节因子。另外,果蝇的脂肪体相当于哺乳动物的肝脏,其主要特点是机体受到病原微生物感染时,脂肪体细胞能快速合成大量的抗菌肽,抗菌肽分泌到血淋巴中杀死入侵的病原体<sup>[13,20]</sup>。Spen蛋白在脂肪体、唾液腺和肠等组织表达量较高,其中的功能和作用机制还不清楚,有待进一步研究。通过Western blotting和免疫组化的结果显示,我们制备的抗体特异性强、效价高,可用于进一步研究spen蛋白的功能及作用机制。

#### 参考文献(References):

- [1] Chen FL, Rebay I. *split ends*, a new component of the *Drosophila* EGF receptor pathway, regulates development of midline glial cells. *Curr Biol*, 2000, 10(15): 943–946. DOI
- [2] Kuang B, Wu SC, Shin YA, Luo LQ, Kolodziej P. *split ends* encodes large nuclear proteins that regulate neuronal cell fate and axon extension in the *Drosophila* embryo. *Development*, 2000, 127(7): 1517–1529. DOI
- [3] Rebay I, Chen F, Hsiao F, Kolodziej PA, Kuang BH, Lavery T, Suh C, Voas M, Williams A, Rubin GM. A genetic screen for novel components of the Ras/Mitogen-activated protein kinase signaling pathway that interact with the *yan* gene of *Drosophila* identifies split ends, a new RNA recognition motif-containing protein. *Genetics*, 2000, 154(2): 695–712. DOI
- [4] Lane ME, Elend M, Heidmann D, Herr A, Marzodko S, Herzig A, Lehner CF. A screen for modifiers of *cyclin E* function in *Drosophila melanogaster* identifies *Cdk2* mutations, revealing the insignificance of putative phosphorylation sites in *Cdk2*. *Genetics*, 2000, 155(1): 233–244. DOI
- [5] Wlissette EL, Harding KW, Mace KA, Ronshaugen MR, Wang FY, McGinnis W. *spen* encodes an RNP motif protein that interacts with Hox pathways to repress the development of head-like sclerites in the *Drosophila* trunk. *Development*, 1999, 126(23): 5373–5385. DOI
- [6] Shi YH, Downes M, Xie W, Kao HY, Ordentlich P, Tsai CC, Hon M, Evans RM. Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation. *Genes Dev*, 2001, 15(9): 1140–1151. DOI
- [7] Oswald F, Kostezka U, Astrahantseff K, Bourteele S, Dillinger K, Zechner U, Ludwig L, Wilda M, Hameister H, Knöchel W, Liptay S, Schmid RM. SHARP is a novel component of the Notch/RBP-Jk signalling pathway. *EMBO J*, 2002, 21(20): 5417–5426. DOI
- [8] 周鹏, 李军锋, 秦红, 韩骅. MINT蛋白 (1-365 氨基酸) 相互作用分子的筛选. 第四军医大学学报, 2003, 24(20): 1828–1831. DOI
- [9] Lin HV, Doroquez DB, Cho S, Chen FL, Rebay I, Cadigan KM. Split ends is a tissue/promoter specific regulator of Wingless signaling. *Development*, 2003, 130(14): 3125–3135. DOI
- [10] Chang JL, Lin HV, Blauwkamp TA, Cadigan KM. Spenito and Split ends act redundantly to promote Wingless signaling. *Dev Biol*, 2008, 314(1): 100–111. DOI
- [11] Doroquez DB, Orr-Weaver TL, Rebay I. Split ends antagonizes the Notch and potentiates the EGFR signaling pathways during *Drosophila* eye development. *Mech Dev*, 2007, 124(9–10): 792–806. DOI
- [12] Evans IR, Wood W. *Drosophila* embryonic hemocytes. *Curr Biol*, 2011, 21(5): R173–R174. DOI
- [13] Lemaitre B, Hoffmann J. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol*, 2007, 25: 697–743. DOI
- [14] Jin LH, Choi JK, Kim B, Cho HS, Kim J, Kim-Ha J, Kim YJ. Requirement of Split ends for epigenetic regulation of Notch signal-dependent genes during infection-induced hemocyte differentiation. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(6): 1515–1525. DOI
- [15] Kuroda K, Han H, Tani S, Tanigaki K, Tun T, Furukawa T, Taniguchi Y, Kurooka H, Hamada Y, Toyokuni S, Honjo T. Regulation of marginal zone B cell development by MINT, a suppressor of Notch/RBP-J signaling pathway. *Immunity*, 2003, 18(2): 301–312. DOI
- [16] Raffel GD, Mercher T, Shigematsu H, Williams IR, Cullen DE, Akashi K, Bernard OA, Gilliland DG. *Ott1 (Rbm15)* has pleiotropic roles in hematopoietic development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(14): 6001–6006. DOI
- [17] Raffel GD, Chu GC, Jesneck JL, Cullen DE, Bronson RT, Bernard OA, Gilliland DG. *Ott1 (Rbm15)* is essential for placental vascular branching morphogenesis and embryonic development of the heart and spleen. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(2): 333–341. DOI
- [18] Williams MJ. *Drosophila* hemopoiesis and cellular immunity. *J Immunol*, 2007, 178(8): 4711–4716. DOI
- [19] Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007, 449(7164): 819–826. DOI
- [20] 耿华, 安春菊, 郝友进, 李德森, 杜荣骞. 家蝇攻击素

---

(Attacin) 基因的克隆与表达. 遗传学报, 2004, 31(12): 1344–1350. [DOI](#)