

摘 要

PHF5A(plant homology domain finger protein 5A)转录起始因子, 它的分布十分广泛, 从酵母到人类几乎所有真核生物中都发现了该蛋白, 但至今在原核生物中尚未发现此蛋白。它编码110个氨基酸, 属于一种高度保守的小转录因子或协因子, 缺少了PHF5A, 会产生剪接不完全的pre-mRNA。另外PHF5A还与细胞周期密切相关, 缺少了PHF5A, 有丝分裂终止在G₂/M期。我们在对家蚕蛹cDNA文库测序过程中获得了一个类似PHF5A的基因序列, 此基因由三个外显子和两个内含子组成, 编码110个氨基酸。序列分析发现此基因编码的氨基酸序列与果蝇、人、小鼠、家鼠等物种的PHF5A蛋白同源性都超过了90%, 因此我们将此蛋白命名为BmPHF5A。推测的蛋白分子量、等电点分别为12.47 kDa和8.4, 这也与已知的PHF5A蛋白相似。

将BmPHF5A基因ORF克隆到pGEM-T载体上, 构建了重组质粒, 经*EcoR* I和*Xho* I双酶切后, 插入表达载体pET-28a(+)的相应酶切位点中, 成功构建了表达质粒, 并转化感受态大肠杆菌BL21(DE3), 经PCR、酶切鉴定以及测序分析重组正确。IPTG诱导表达后裂解菌作SDS-PAGE分析, 在16kD处有一条特别浓的条带, 与预期值相符, 表达量可达菌体总蛋白的40%左右。融合蛋白以不溶性的包涵体形式存在, 超声波裂解菌体分离包涵体并离心、洗涤; 对包涵体进行溶解和梯度透析复性; 采用亲和层析纯化融合蛋白His-BmPHF5A。以该融合蛋白为抗原免疫雄性新西兰兔制作了该重组蛋白的多克隆抗体, ELISA检测该抗体血清的效价可达到1: 32000。Western印迹实验进一步验证了目的蛋白的表达。在亚细胞定位中, 发现该蛋白主要存在于在细胞核中。RNAi显示Bm5细胞在G₂/M期的数目增加。

关键词: PHF5A; 家蚕; 锌指蛋白; 亚细胞定位; 细胞周期

Abstract

Transcription activator factor PHF5A is found in many different species ranging from yeast to human, but no homologous sequence was identified in a BLAST search of the prokaryotic database. It belongs to a small transcription factor or cofactor which encodes 110 acids. If PHF5A deleted, pre-mRNA spliced uncompleted was found and cell cycle was depleted to G₂/M. According to the large-scale sequencing of silkworm pupae, a unique *bombyx mori* cDNA was identified which contains three exon and two intron. The PHF5A protein consists of 110 aas. Homogeneous analysis showed that BmPHF5A shared 90% of identity with that in both *Drosophila* and vertebrate such as *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*. According to the sequencing data, the molecular weights, and isoelectric points were estimated as 12.47 kDa and 8.4 for BmPHF5A similar to other PHF5A proteins identified.

In this part, a PHF5A gene was found in the cDNA library of this laboratory. The ORF of the gene was subcloned into pGEM-T vector, after being digested with *EcoR* I and *Xho* I, the DNA fragment was inserted into the fusion expression vector pET-28a(+). The recombinant plasmid was transformed into *E.coli* BL21(DE3). The result of PCR and digestion with *EcoR* I / *Xho* I showed that the designed fragment was inserted correctly. The recombinant plasmid was sequenced and the sequence map indicated that a recombinant expression plasmid was constructed successfully. Recombinant protein was expressed successfully in *E.coli* BL21(DE3) induced by IPTG. The analysis of SDS-PAGE showed that the fusion protein His-BmPHF5A was expressed highly in BL21, which accounted up to 40% of germ proteins. The most recombinant protein was insoluble inclusion body and only little fraction of recombinant protein of His-BmPHF5A was soluble. In order to obtain abundant soluble recombinant protein, the insoluble inclusion body was solubilized, refolded and purified. By Ni²⁺ Trap affPHF5A ty chromatography, protein His-BmPHF5A was obtained. Immunization of rabbits with fusion protein generated high titer (1:32000) polyclonal antibodies, measuring by ELISA. Western blotting analysis showed that the antibody could bind the expression His-BmPHF5A specifically. PHF5A was

found in nucleus by Subcellular localization.

Keywords: PHF5A; *Bombyx mori*; zinc finger protein; subcellular localization; cell cycle

浙江理工大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：刘玉生

日期：2007年3月18日

浙江理工大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权浙江理工大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 在_____年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密

学位论文作者签名：刘玉生

指导教师签名：孙凯明

日期：2007年3月18日

日期：2007年3月24日

第一章 综述

植物同源域蛋白 (plant homeodomain finger protein, PHD) 亦称白血病关联蛋白^[1] (Leukemia associated protein, LAP)。是在1993年由Schindler^[1]在研究拟南芥同源域蛋白 (Homeodomain) HAT3蛋白时发现的。它含有一类特征为 Cys4-His-Cys3的锌指蛋白结构域 (plant homeodomain finger, PHD-finger) 长约50个氨基酸, 大小及氨基酸的排列方式均与RING-finger (Cys3-His-Cys4)和LIM结构域 (Cys2-His-Cys5) 相似^[2]。经研究证明PHD-finger除了在植物中, 它也广泛存在于酵母、线虫与哺乳动物中^[3,4]。PHD-finger主要存在于转录调节蛋白, 和染色质调节复合物 (chromatin modulating complexes) 中, 它可能是蛋白质与蛋白质、蛋白质与DNA或蛋白质与RNA 相互作用区^[2]。

转录起始因子是在基因表达中具有转录起始作用的一类蛋白质的统称。PHF5A(plant homeodomain finger protein 5A)^[5]亦称Ini (Ini=initiation)^[6]也是一种含有PHD-finger的蛋白质, 属于一种高度保守的小转录因子或协因子^[5], 并在pre-RNA剪接^[7], 细胞周期及DNA损伤修复中具有重要的作用。

1 PHF5A 的发现

Ini是在研究受雌激素诱导的子宫肌层间隙连接蛋白Cx43时发现的, 并因其具有转录起始因子的作用而命名^[5]。

受雌激素诱导的子宫肌层间隙连接蛋白Cx43属于connexin家族^[8], 它是一种跨膜蛋白, 在胎儿发育早期表达^[9], 在成体中的许多组织中都有发现。它在心肌中表达量最高, 并且是组成型表达^[10]。在子宫中, Cx43在调节肌肉同步收缩中是相当必要的^[11], 与心肌的组成型表达不同, Cx43在子宫中的表达受到固醇类激素调控^[12, 13]。为了研究雌激素在子宫肌层中的诱导机制, 陈等^[14]提出在家鼠TATA框上游12bp处有激活蛋白 (activator protein) 1位点, 转录激活因子家族*c-jun*和*c-fos*通过结合在激活蛋白1位点而间接发挥作用。但是人们发现如果突变AP-1位点从而使*c-jun*和*c-fos*不能与AP-1位点结合并不能消除*cx43*基因对雌激素的反应^[7]。通过分析表明, 临近*cx43*启动子的区域对于*cx43*基因对雌激素的反应也是非常重要的。此区域可以与含110个氨基酸的蛋白质结合, 人们通过扫描受雌激

素诱导的鼠子宫肌层表达文库而鉴定出这是一个新的保守性相当高的锌指蛋白^[5]，它属于一种高度保守的小转录因子或协因子^[7]，能增强cx43对雌激素的应答^[7]。因为这种蛋白具有转录起始因子的作用，取起始（Ini=initiation）前三个字母命名之，即Ini^[5]，后来有人在鼠的基因组中分选出了这种蛋白质，因其含有PHD-finger结构域就将其命名为PHF5a^[6]，目前关于这种蛋白质还没有统一的名称，本文中以PHF5A命名。

2 PHF5A 的特征

PHF5A是一种高度保守且广泛存在的蛋白质，分布在从酵母到人类的真核生物中，但迄今为止在原核生物中没有发现PHF5A的存在^[7]。Northern blot分析表明，PHF5A在不同的组织中，如：脑、心脏、卵巢、子宫、骨骼肌、睾丸中都具有单一的转录本，长约1.2 kb^[7]。

2.1 PHF5A 的保守性

PHF5A只有短短的110个氨基酸^[5]，但它在进化上是极度保守的。在蛋白质水平上，在NCBI上进行BLAST时发现（如图1.1所示），PHF5A在脊椎动物中的同源性和为100%，在多细胞生物中，PHF5A的同源性要超过80%，即使在同源性最低的啤酒酵母中PHF5A的同源性也超过了50%^[8]。在核酸水平上，PHF5A也是相当保守的，在NCBI上进行BLAST时发现，鼠和人的同源性超过了90%。在用法蚕进行BLAST时发现，家蚕与人、鼠等脊椎动物及果蝇、冈比亚按蚊的同源性都超过了90%，但是家蚕与果蝇、冈比亚按蚊的同源性低于人、鼠等脊椎动物等的同源性，相差的部分来自于羧基端的NLS序列。



图1.1 PHF5A在不同物种中的同源性比对^[8]

Fig1.1 Analysis of PHF5A homology in different species, Identical residues are boxed in black. Conserved residues are boxed in gray

2.2 PHF5A 的分布

从酵母到人类的真核生物中都发现了PHF5A，但在原核生物中尚没有发现^[7]。在挪威鼠中的Northern blot分析表明，PHF5A在不同的组织中，如：脑、心脏、卵巢、子宫、骨骼肌、睾丸中都只有单一的转录本^[7]。而在对家鼠进行染色体定位时发现，PHF5A存在假基因，并且PHF5A与假基因分别位于不同的染色体上^[6]。用融合了GFP的重组GFP-PHF5A进行亚细胞定位发现PHF5A位于细胞核内，并在核仁中没有发现PHF5A的存在^[7]。目前，所有的研究都集中在脊椎动物中的人、鼠及无脊椎动物的酵母、线虫中，在昆虫中尚没有报道。

2.3 PHF5A 的结构特征

对PHF5A进行二级结构预测发现PHF5A从N端到C端依次为：三个锌指结构、一个亮氨酸拉链、一个核定位信号（NLS）^[7]（如图1.2所示）。在此结构中，最N端的锌指结构含有较多的碱性氨基酸，体外EMSA实验发现，当切除此区域发现PHF5A不能结合到DNA上，而切除后两个锌指结构并不妨碍PHF5A结合到DNA，说明最N端的锌指结构是结合DNA所必须的。虽然切除后两个锌指结构并不妨碍PHF5A结合到DNA，但是PHF5A并不具备转录因子或协因子的功能。C端NLS序列在PHF5A的转运过程中发挥着重要的作用，人们发现^[6]，如果切除NLS序列PHF5A将不能进入细胞核内，而是富集在细胞质中。

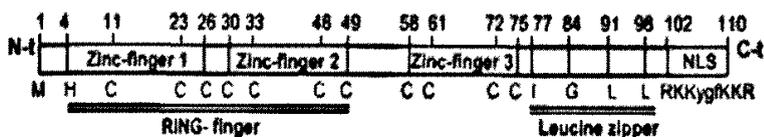


图1.2 PHF5A序列分析^[8]

Fig1.2 Analysis of the PHF5A sequence

3. PHF5A 的功能特点

3.1 PHF5A 在基因表达时的调节作用

3.1.1 作用特点

PHF5A 作为转录因子或协因子结合到基因的启动子-75~-34 附近的区域启动或促进基因的转录^[5]; PHF5A 在不同的细胞或组织中对雌激素的反应可能是不同的^[7, 16], 例如, 在非洲绿猴肾纤维原细胞中 PHF5A 的表达量随雌激素的浓度的升高而增加^[7], 而在人肝癌上皮细胞 PHF5A 的表达量与雌激素的浓度没有关系^[7]; 在生物发育的不同时期具有不同的作用^[17], 如在线虫的幼虫中 PHF5A 是必需的, 缺失了它将造成幼虫的死亡, 但是缺失了 PHF5A 的成体不会死亡。

3.1.2 PHF5A 在 *cx43* 表达时的作用

Cx43 作为一种跨膜蛋白聚合在一起在细胞表面形成间隙连接通道^[18], 有利于细胞间的物质和能量的交流。另外 Cx43 能够调节细胞的电势差^[19], 在信号转导途径中发挥重要的作用, 比如, Cx43 能够调节心肌细胞有节律的跳动^[19]。*cx43* 基因在表达过程中受雌激素受体调节^[7, 20, 21]。

Oltra 等人^[5]在研究中发现, 在 *cx43* 表达过程中需要 PHF5A 的参与。PHF5A 作为转录因子或协因子能够特异结合在 *cx43* 基因启动子-75~-34 附近的区域增强 *cx43* 基因对雌激素的反应^[7]。PHF5A 结合到 *cx43* 启动子上时, 促进了雌激素受体转录激活作用 1^[22, 23](activating function 1), 而不是转录激活作用 2^[7](activating function 2)。用重组质粒 pcDNA-FLAG-PHF5A 转染 HeLa 细胞发现^[7], PHF5A 的过量表达以剂量效应的方式增强 *cx43* 的表达。在研究 PHF5A 对 *cx43* 表达调节作用是发现了一个十分奇特的现象, Oltra 等人^[7]将 PHF5A 与雌激素一同处理小鼠, Northern blot 分析表明, PHF5A 的 mRNA 含量提高了, 似乎表明 PHF5A 的表达与受雌激素相关。

3.1.3 PHF5A 对 ER α 调节作用

雌激素受体(ER α)是配体依赖的转录调节因子^[24, 25], 属核受体超家族成员。维持雌性性征、卵泡发育、排卵等生理活动^[25, 26], 并在子宫成熟和胚胎附植过程中起着重要作用^[27]。

在研究 PHF5A 对 *cx43* 调节作用时, Oltra 等人^[7]将带荧光素酶的重组质粒 HE15-PHF5A 转染到 HeLa 细胞中, 此质粒只表达 ER α 的转录激活作用 1(AF-1) 结构域, 在与只带有荧光素酶而没有 ER α 的重组质粒 HE15 比较发现, 荧光素水平有明显提高, 暗示 PHF5A 能够增强 ER α 的活性, 并且能够激活 AF-1^[7, 28]。随后他们又构建了重组质粒 HEO-PHF5A, 此质粒中可表达的 ER α 的 AF-1 和转

录激活作用 2(AF-2)双结构域^[7, 28, 29], 出现了同样的结果。但是当用只表达 AF-2 的载体 HE19 构建重组质粒 HE19-PHF5A, 转染 HeLa 细胞时发现, 荧光素水平并没有明显变化。这说明 PHF5A 能够特异地与 AF-1 结构域作用。

3.2 PHF5A 在 pre-mRNA 剪接中的作用

RNA剪接(RNA splicing)是tRNA、rRNA, 特别是mRNA 加工与成熟的重要生物学过程, 也是蛋白质分子多样性产生的关键机制之一^[30, 31]。RNA 剪接是一个多步骤、形成多种中间状态复合物的复杂过程。RNA 剪接需要多种因子参与, 包括杂性核RNA (heterogeneous nuclear RNA, hnRNA) 结合蛋白 hnRN (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)、小核RNA (small nuclear RNA, snRNA) 结合蛋白snRNP (small nuclear ribonucleoprotein) 等^[32, 33, 34]。

PHF5A是一种与pre-mRNA剪接相关的蛋白质, 2002年, Ohi等人对*S. cerevisiae*和*S. pombe*.中纯化的复合物U2/U5/U6 snRNP进行光谱分析时发现了 PHF5A^[35], 同时如果阻断了PHF5A的表达, 会产生剪接不完全的pre-mRNA^[6, 15]。通过RT-PCR检测正常细胞的pre-mRNA与剔除了PHF5A的细胞的pre-mRNA, 发现在突变体中pre-mRNA累积^[6], 这些pre-mRNA是*cdc25*, *cdc28*, *prp12*, 它们编码的蛋白在细胞周期中具有重要的作用。在剔除了PHF5A的细胞中除了有pre-mRNA外, 人们还发现细胞周期被阻滞在G2期^[6], 似乎表明在pre-mRNA的剪接中PHF5A是必要的, 同时一些有丝分裂必需因子mRNA的形成也需要PHF5A。

3.3 PHF5A 在细胞周期中的作用

有丝分裂时从G2期到M期的转换由Cdc2-有丝分裂周期蛋白的活性控制^[36]。有丝分裂中, Cdc2/Cdc13二聚体中的Cdc2亚基处于活性状态, 其Thr-15没有磷酸化, 而Thr-161被磷酸化。在起始点后, Cdc2/Cdc13二聚体的活性被Thr-15上增加的磷酸基团抑制^[36-38]。因此, 该抑制性磷酸基团的去除是激活有丝分裂的关键。*cdc25*编码酪氨酸磷酸酶, 该酶对Cdc2/Cdc13二聚体中 Cdc2的去磷酸化是必需的^[39-41]。

在通常情况下, 细胞分裂周期与细胞大小有关。*wee1* 基因通常抑制细胞进入有丝分裂直到系细胞体积足够大^[42]。*wee1*编码异常类型的激酶: 它可以磷酸

化Ser/Thr和Tyr，它通过磷酸化Thr-15抑制Cdc2^[43,44]。

*wee1*产物与*cdc25*的产物有拮抗作用。*wee1*的激酶活性作用在Thr-15上抑制Cdc2的功能^[45]。*cdc25*的磷酸化活性作用在同一个位点上激活Cdc2。*cdc25*过量表达的突变与*wee1*的缺失突变有相同的表型。因此，Cdc2活性的调控对决定酵母细胞何时允许自身进入分裂循环很重要；被*wee1*抑制和被Cdc25激活允许细胞依赖环境或其它信号来控制这些调控因子。

2003年，Werner等人^[15]构建*PHF5A*缺失体，发现细胞变长，失去有丝分裂能力。而当他们将构建重组质粒pJK-Rep81-PHF5A1(载体Rep81含有硫胺素抑制启动子*nmt81*)转染到*PHF5A*缺失体中，记为 Δ *PHF5A1*，发现细胞恢复有丝分裂能力，当用硫胺素处理 Δ *PHF5A1*时发现，细胞表型与*PHF5A*缺失体相同。

为了检测Wee1在 Δ *PHF5A1*中是否起作用，Werner等人^[15]剔除了*wee1*基因，然后构建了*wee1-50* Δ *PHF5A1*双突变体。此双突变体含有硫胺素抑制启动子*nmt81*，又受温度控制，在25℃激酶Wee1表达，而在36℃就不会表达。经过比较发现，如果在25℃加入硫胺素，细胞仍会生长，但如果在36℃下，细胞数目就会增多，出现异常有丝分裂，但8小时后细胞会大量死亡。而在*PHF5A*缺失体中细胞延长，但不会死亡。这大概可能是因为Wee1在*PHF5A*缺失体起保护作用。

3.4 在细胞DNA损伤中的作用

DNA破坏检验点(DNA damage checkpoints)是指DNA损伤引发的能使细胞周期延迟或阻滞的生化调控途径^[46]，它指在进入细胞周期的下一时相前对DNA的完整性进行检测的一些特殊时点^[47]。如果DNA损伤，会引发一系列细胞反应，包括：(1)激活DNA修复系统，修复受损的DNA，使DNA复制继续进行；(2)激活DNA破坏检验点，使细胞周期阻滞，以便细胞有充分的时间进行修复，避免该损伤遗传至后代细胞；(3)使一些损伤严重、修复无望的细胞发生凋亡；(4)转录某些特定的基因，以利于细胞的生存^[48-51]。

Rad3与属于PI3K激酶家族^[52]，在DNA损伤检验点的活化中起着重要的作用^[53-55]，是作用于DNA破坏检验点早期的一种重要蛋白。

Oltra等人构建了酵母PHF5A的缺失菌株观测DNA受损后细胞的反应，他们检测了*S. pombe*中的检验点激酶Rad3。研究发现Rad3并没有什么变化，细胞也没有出现修复的迹象^[15]，同时细胞仍然不能分裂，这似乎表明PHF5A引起的细胞分裂中止现象是细胞本身不可修复的。他们随后构建了重组质粒Rep3x-PHF5A转染到缺失菌中，发现细胞又能进行有丝分裂。

但是，Trapp等人在线虫中进行相同的实验时发现^[17]，在胚胎期和幼虫期缺失了PHF5A会引发线虫的死亡，而在成虫中缺失了PHF5A不会诱发细胞的死亡。

4. 展望

综上所述，PHF5A在基因表达、细胞周期、pre-mRNA剪接等过程中发挥着重要的作用。但是作为一种上世纪90年代后期才发现的蛋白质，相关研究还不是很多，蛋白质的功能还不是很明确。比如：人们在pre-mRNA剪接复合体中发现了PHF5A^[35]，可PHF5A是参与pre-mRNA剪接复合体的形成，还是作为剪接复合体的一部分参与pre-mRNA的剪接；PHF5A作为转录因子或协因子存在^[7]，那么它调控哪些基因的表达，具体调控机制又是怎样的？另外，人们发现PHF5A在幼体中是必不可少的，而在成体的缺失体又不是致死的^[17]，这又是为什么？在DNA损伤时会引发多种细胞反应，但是当PHF5A缺失时，细胞既没有激活修复系统，也没使这些无法修复的细胞发生凋亡，那么在细胞中应该有一种代偿机制，此机制虽然无法使细胞继续分裂，但却能够使细胞生存，此机制到底是什么，又是怎样发挥作用的？PHF5A的保守性相当高，但是它的分布又具有局限性，那么PHF5A是如何进化而来得，为什么只在真核生物中表达，原核生物中到底有没有这种蛋白质，在真核生物中它最基本的功能到底是什么？它能否作为进化的标尺？鉴于PHF5A的高保守性，我们有理由相信它在生物体的发育过程中扮演非常重要的角色。相信在不远的未来，PHF5A的功能及其保守原因都会更清楚。

第二章 BmPHF5A 的生物信息学分析

1 生物信息学工具

用BLAST软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)在GenBank中对获得的家蚕新基因的氨基酸序列进行同源性比较,之后使用生物软件网在线BLAST工具(<http://www.bio-soft.net/>)寻找ORF框,并预测其氨基酸序列及基本性质,再用此氨基酸序列在NCBI进行BLAST比对,查找同源蛋白质,根据同源蛋白质的性质预测其功能。并用BioEdit软件对序列进行比对。并在线工具Protscale、TMHMM、SignalP对PHF5A进行疏水性分析,跨膜结构预测及信号肽预测。

2 生物信息学分析

2.1 BmPHF5A 的基因分析结果

2.1.1 BmPHF5A 的基因分析

将本实验室的 cDNA 序列在家蚕基因组比对确定后,用在线软件分析 ORF,在 NCBI 上比对后,推测为 PHF5A,下表两方框内的部分即为 PHF5A 的 ORF,按 5' 端到 3' 的方向,依次为起始密码子与终止密码子。此基因编码 110 个氨基酸,在基因的 3' UTR 处有三个加尾信号。

```

1      GTTTGATAATAACAATCAAAGAACATTCGCCAGCAGACCAGACCTAACTAAAAACATGCGC
                                         M A
61     AAAGCATCATCCAGATTTAATTTTCTGCAGGAAACAGCCCGGAGTCGCTATTGGACGTTT
      K H H P D L I F C R K Q P G V A I G R L
121    ATGTGAGAAATGTGACGGAAAATGTGTGATTGGCGATTCTTATGTGCGTCCGTGCACGTT
      C E K C D G K C V I C D S Y V R P C T L
181    GGTTCGTATTTGTGACGAGTGCAACTATGGCTCGTATCAGGGGCGATGTGTGATTTGCCG
      V R I C D E C N Y G S Y Q G R C V I C G
241    CGGGCCTGGAGTATCTGATGCTTATTATTTGTAAGGAGTGCACGATACAGGAGAAGGATAG
      G P G V S D A Y Y C K E C T I Q E K D R
301    AGATGGCTGTCCAAAGATTGTCAATTTGGGAAGCTCTAAAACAGATCTGTCTACGAGAG
      D G C P K I V N L G S S K T D L F Y E R
361    AAAGAAATATGGGTTTAGGAGACACTAGCATTAGGTTTCTTTTATGTTTTTAAATATTAA
      K K Y G F R R H *
421    TTTCTGCAAAGTTTCTGTTATTTAAAATAATAAAAACAGAGGTTTTTCTCAACTAAAGTT
481    TGATGAAATACAAGTTTGTFTTTATCAACTACTTTGTTGTTGACTTTTTAAAGCCAACG
541    GCTATATGATCAAGTATGGTTTTTCAATGTCTAAAGAGTTGCAGCTCGGGTCCAAGAGAA

```

```

601   ATTCACATATATTTTTTTTAAATTCATTCATTTATACAATTGGATTGTTGTTATCGATGAT
661   ATCTGTTATTTTTTTTACAATTTTTTTTATCCTTTGTTTATTCAATGCAGATTAGTTTTCA
721   TTTTCCAAGTAGAAAAGAAAATACTTGAAAATACATTTAGTTTTTGCATTTAAATTATTA
781   AGATTCATTTTTATTTTTTATTTTTCTACTAAATGTCAATAAAGATATTTTGGACTACC
841   ATGTGCTCTGTAAAACACAGACAATATGTTAGCAATATTCATGTATGTAATGAGAGTGA
901   TTGTAAGTGTGAATGTTGCTGTGCATATTTGAAAACATGTTTCTAGTGTGTACTTAC
961   ATTAAGACATTATGTAATTATTAATAAATGCATTGGTATTACAC

```

2.1.1 *BmPHF5A* 基因的结构分析

我们将 *BmPHF5A* 的 cDNA 在家蚕基因组中比对时发现, *mPHF5A* 基因由三个外显子和两个内含子组成, 结果如图 2.1, 其中最两端的用白色方框表示的部分从左至右依次为 5' UTR 和 3' UTR, 黑色方框表示 ORF, 黑色方框内的线段表示内含子, 各部分下面的数字表示各部分的碱基数。另外, 如图所示, 5' UTR 和 3' UTR 分别与 ORF 的 5' 端和 3' 端相连。



图 2.1 *BmPHF5A* 基因的结构示意图

Fig 2.1 The schematic structure of *BmPHF5A*

2.2 保守性分析

经过BLAST比对确认该基因编码110个氨基酸。所预测的蛋白质分子量大约为12.47 kDa, 等电点约为8.4。对该蛋白进行同源性分析时, 发现该蛋白是相当保守的, 家蚕PHF5A与人、果蝇、线虫等的同源性超过了90%, 暗示了该蛋白在真核生物中的功能可能具有极大的保守性。

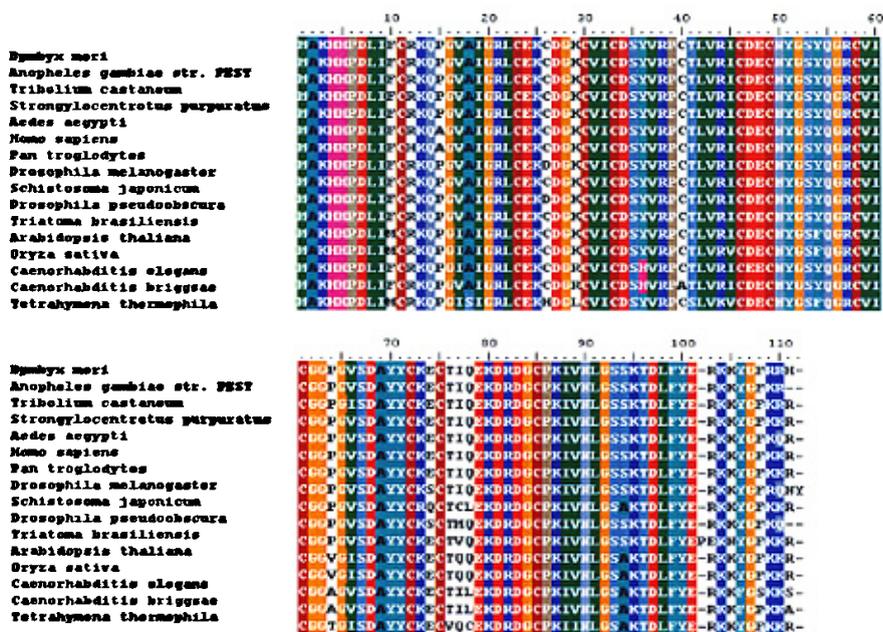


图2.2 PHF5A的同源性比较

Fig 2.2 Alignment of deduced amino acid sequence of BmPHF5A with homologous proteins from others

2.3 疏水性分析

疏水性是每种氨基酸所固有的特性,这种特性和其它的一些因素决定了一个蛋白质最终折叠成的三维构象。ProtScale 程序预测家蚕 PHF5A 蛋白质疏水性最大值为 1.678,最小值是-2.633,在 61 区域的氨基酸具有很强的疏水性,在 80 区域和 90 区域到羧基末端都具有非常强的亲水性(如图 2.3 所示)。在 20 到 30 区域亲水性较强可能是 DNA 结合区。在 61 区的疏水性较强,在 77、84、97、98 位分别为 Ile、Gly、Leu、Leu,符合亮氨酸拉链模体,可能与亮氨酸拉链形成有关。

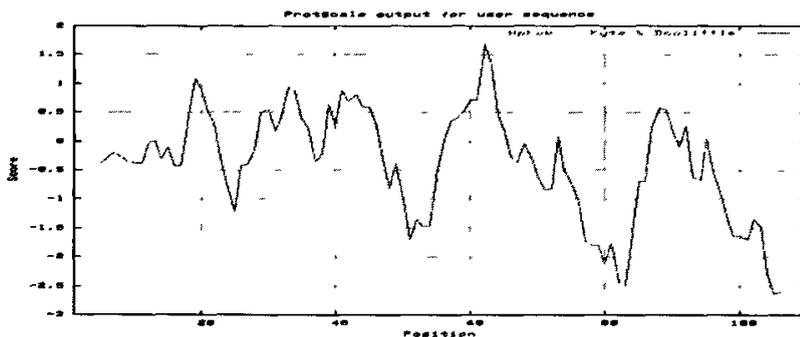


图 2.3 疏水性分析
Fig 2.3 The analysis of hydrophobicity

2.4 跨膜分析

在目前的基因组数据中，有大约 20%~30% 的基因产物被预测为膜蛋白，这种比例显示了跨膜蛋白在生物体中的重要性，它们在生物体中担负着多种功能。因此有效、准确地预测跨膜区和跨膜方向可以指导跨膜蛋白的结构和功能的研究具有相当重要的意义。通过 TMHMM 服务器对家蚕 PHF5A 蛋白进行跨膜分析，获得了比较直观的结果，预测结果显示不大可能存在跨膜区（如图 2.4 所示）。

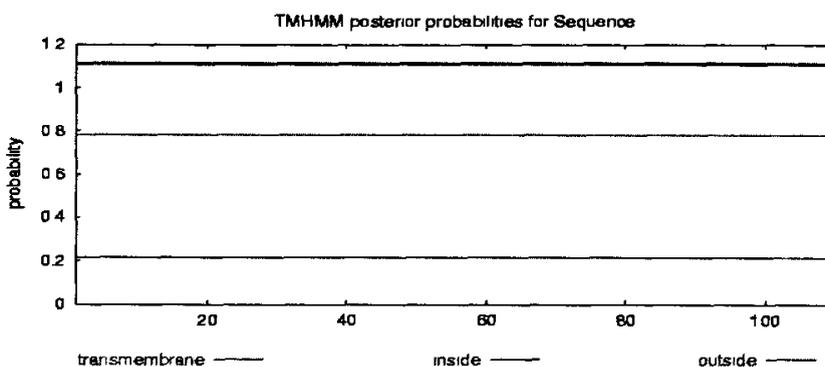


图 2.4 跨膜分析
Fig 2.4 The analysis of transmembrane region

2.5 信号肽分析

在对 BmPHF5A 的 BLAST 分析中，发现该蛋白具有一个核定位信号 NLS，因此该蛋白应该是定位在细胞核内而不大可能存在信号肽，而用 SignalP 信号肽预测工具预测也显示了同样的结果，用 SignalP 预测工具还发现这一 BmPHF5A 蛋白为非分泌型蛋白，锚定蛋白概率都为 0.000，最大分隔位点概率是都为 0.000（如

图 2.5 示)。

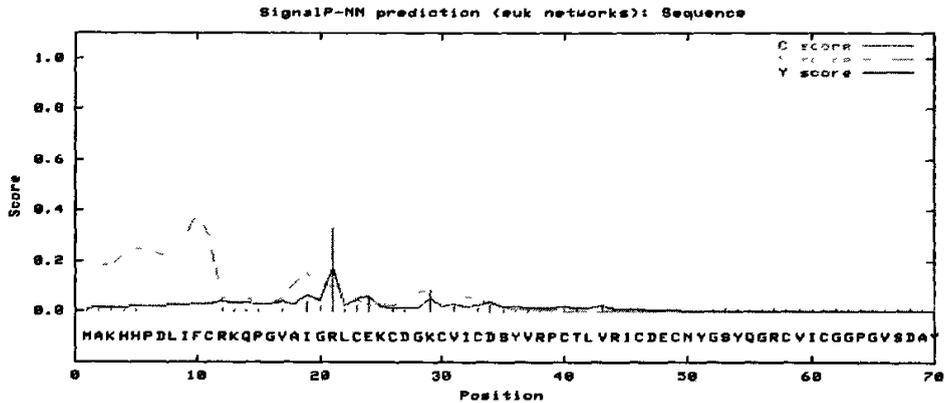


图 2.5 信号肽分析

Fig 2.5 The analysis of signal peptide

3. 讨论

通过生物信息学分析，发现该基因具有非常高的同源性。鉴于 PHF5A 的高保守性，它们在功能上可能具有相似性。在对小鼠与酵母的研究中发现^[8, 14]，PHF5A 不但能作为转录因子或辅因子与 DNA 结合，且在 pre-mRNA 的剪接体中同样发现了该基因，说明 PHF5A 在 pre-mRNA 的剪接中也发挥着作用，另外还发现在细胞周期中该基因也发挥着重要的作用。那么在家蚕中，它与小鼠或酵母的作用是否相似？它的功能又是怎样的？对 PHF5A 的疏水性分析发现，该蛋白在 61 区域具有非常强的疏水性，预测该区域可能在蛋白质的三维结构中具有重要作用；在 80 区域和 100 区域到羧基末端都具有非常强的亲水性，在 80 位是碱性氨基酸与酸性氨基酸含量都非常多，并交替出现，可能与 61 区域一起形成亮氨酸拉链，在 90 区域到羧基末端是核定位信号，并且该区域含有大量的碱性氨基酸残基，暗示了 PHF5A 蛋白进入细胞核需要特殊的配体。

第三章 实验设计

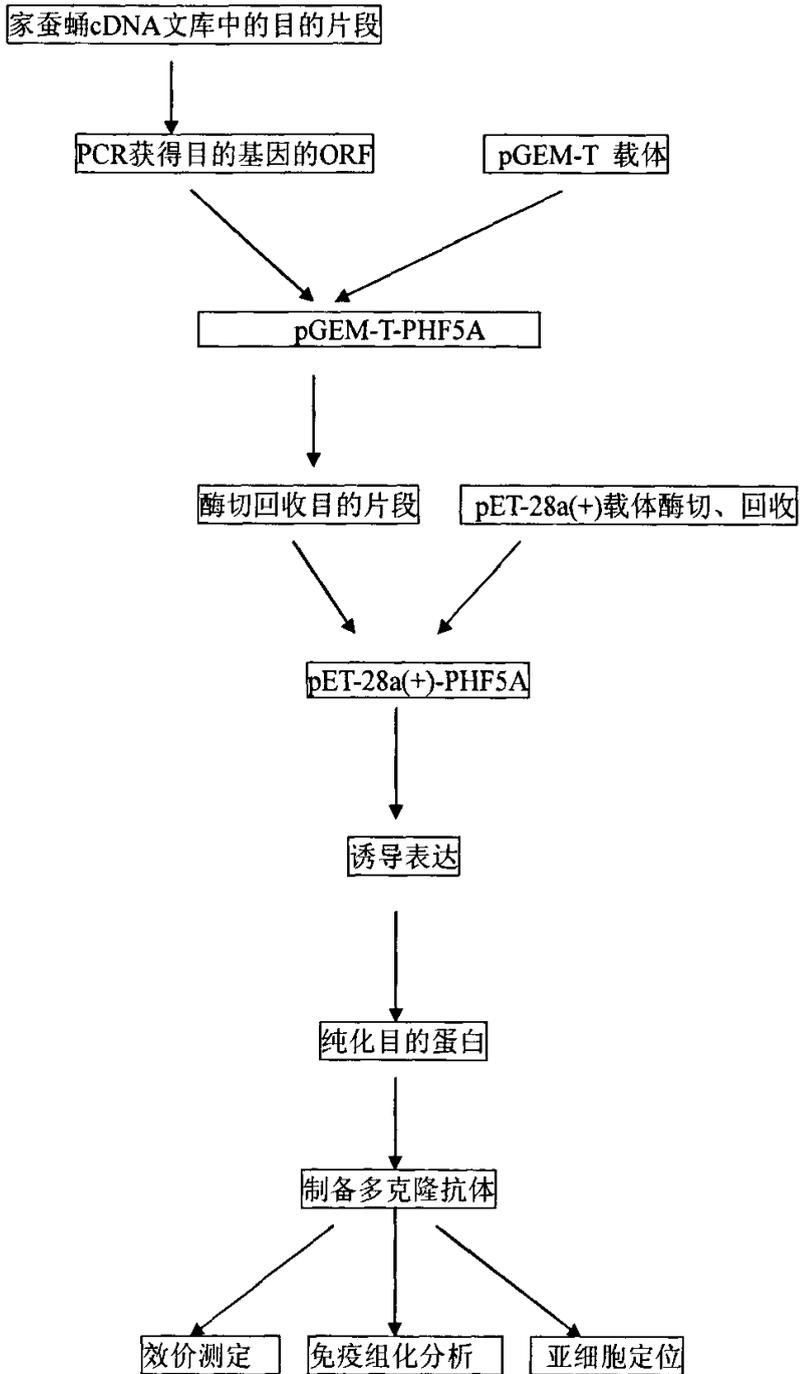
1 实验目的和意义

本文以家蚕蛹 cDNA 文库测序过程中发现的一个新的编码家蚕锌带蛋白基因的 EST 序列为信息探针, BLAST 检索 GenBank 的家蚕 EST 数据库, 经同源性分析初步命名为 BmPHF5A 基因。本实验的目的是构建重组原核表达质粒 pET-28a(+)-BmPHF5A, 并在大肠杆菌中表达该重组融合蛋白, 将其纯化后免疫新西兰兔制备多克隆抗体。利用制备多克隆抗体对蚕蛹进行免疫组化试验, 进行免疫组化和亚细胞定位。

2 研究内容

- 电子克隆获得全长 BmPHF5A 基因;
- 生物信息学方法分析 cDNA 序列的基因特征及所编码的氨基酸序列特征;
- PCR 获得 BmPHF5A 基因的 cDNA 片段;
- 构建重组克隆质粒 pGEM-T-BmPHF5A;
- 构建重组表达质粒 pET-28a(+)-BmPHF5A;
- 重组表达载体在大肠杆菌中的表达分析;
- 包涵体的变性与复性;
- 表达产物的纯化;
- 多克隆抗体的制备与效价测定;
- 免疫组化分析 BmPHF5A 基因在蚕蛹中的组织及亚细胞定位分析
BmPHF5A 在蛋白质在细胞中的分布;

3 实验流程图



第四章 家蚕 BmPHF5A 基因的克隆

1 试剂与材料

1.1 材料

大肠杆菌 TG1 由本实验室保存；pGEM-T Vector 为 Promega 公司产品；各种限制性内切酶购自 Promega 公司；无水 CaCl₂、Tris 碱为 Sigma 产品。X-gal、IPTG、Ampicilline 为 Promega 公司产品。琼脂糖 Agrose MP 及低熔点琼脂糖 Agrose LP, 电泳级 SDS、无水 CaCl₂、EB 固体、RNase A 购自 Boehringer Mannheim 公司。蛋白胨 (Tryptone)、酵母提取物 (Yeast Extract) 为英国 Oxoid 公司产品。

1.2 试剂的配制

试验中所有试剂，如LB (Luria-Bertani) 液体、固体培养基，氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp)母液，碱裂解法提取质粒DNA用溶液，核酸电泳所用溶液，制备感受态细胞所用的75 mM CaCl₂溶液及挑斑所用试剂，X-gal贮存液，IPTG贮存液的配制方法见《分子克隆实验指南》^[56]。

2 方法

2.1 活化菌株

将本实验室保存得pHelix-BmPHF5A甘油菌重新接种活化24 h，再接菌40 μl于4 ml的LB培养基中，于37 °C 摇床中培养7 h提质粒。

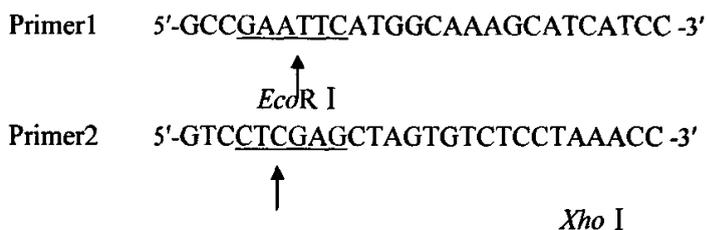
2.2 质粒的小量制备

- 具体方法见《分子克隆实验指南》^[56]。

2.3 PCR 扩增目的片段

以 pHelix-BmPHF5A 质粒为模板，用 PrimerPrimer5.0 软件设计引物并命名为 Primer1 和 Primer2，引入的酶切位点分别为：EcoR I 和 Xho I，将此引物扩

增特异片段，如下所示：



PCR 反应体系为：

ddH ₂ O	36 μl
10×PCR buffer	5 μl
20mM MgCl ₂	2 μl
10mM 4dNTP	2 μl
Primer1	2 μl
Primer2	2 μl
模板	0.2 μl
Taq 酶	1 μl
Total	50 μl

PCR 的反应程序为：

94°C	预变性	5 min	
94°C	变性	30 s	}
61°C	复性	30 s	
72°C	延伸	30 s	
72°C	延伸	10 min	
最后保存于 4°C			

2.4 PCR 产物的纯化

- 具体方法见分子克隆实验指南^[56]。

2.5 连接反应

将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Vector 连接，反应条件如下：

10×Ligase Buffer	1 μ l
回收的 PCR 产物	7 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
pGEM -T Vector	1 μ l
<hr/>	
Total	10 μ l

16 $^{\circ}$ C 连接 12 h。

2.6 *E.coli* TG1 感受态细胞的制备

- 具体方法见分子克隆实验指南^[56]

2.7 连接产物的转化

- 具体方法见分子克隆实验指南^[56]

2.8 重组克隆的筛选与鉴定

2.8.1 挑斑

用无菌牙签从转化平板上挑取 8 个白色单菌落，分别接种于含 Amp 50 μ g/ml 的 5 ml LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C，220 rpm 振荡培养 8-10 h。

2.8.2 PCR 鉴定

提取质粒作为模板，进行 PCR 鉴定。

PCR 反应体系为：

ddH ₂ O	14.5 μ l
10×PCR buffer	2.0 μ l
25mM MgCl ₂	1.0 μ l
25mM 4dNTP	1.0 μ l
Primer1	0.5 μ l

Primer2	0.5 μ l
Taq 酶	0.1 μ l
模板	0.5 μ l
Total	20 μ l

PCR 的反应程序为：

94°C	预变性	5 min	} 30 cycles
94°C	变性	30 s	
60°C	复性	30 s	
72°C	延伸	30 s	
72°C	延伸	10 min	
最后保存于 4°C			

2.8.3 双酶切鉴定

经 PCR 鉴定为阳性的质粒，进一步用双酶切的方法来鉴定。

在无菌的 Eppendorf 管中，依次加：

ddH ₂ O	7 μ l
10×Buffer	2 μ l
重组质粒(pGEM-T-BmPHF5A)	10 μ l
<i>Xho</i> I	0.5 μ l
<i>EcoR</i> I	0.5 μ l
Total	20 μ l

37 °C 温育 3 h 后，用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测酶切结果。

2.8.4 序列测定

序列测定采用同时双向测序 (Simultaneous Bi-directional Sequencing, SBS) 技术，由本实验室测序组完成。

3 重组质粒的鉴定与测序结果

3.1 重组质粒 pGEM-T- BmPHF5A 的 PCR 扩增和双酶切鉴定

以提取的重组质粒为模板，分别用 Primer 1 和 Primer 2 为引物进行 PCR 鉴定(图 2.1)，结果有与预期大小一致的条带，阴性对照无条带；重组质粒用 *Xho* I 和 *Eco*R I 进行双酶切并电泳鉴定，结果质粒切出约 330 bp 的 DNA 片段和 3 kb 的 pGEM-T Vector 片段(图 2.1)，与预期大小一致。

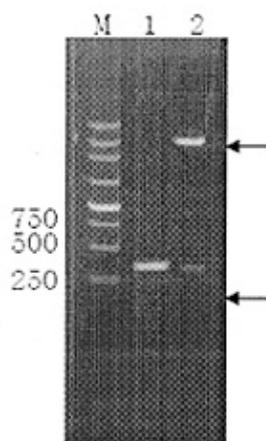


图4.1 重组质粒鉴定

Fig.4.1 The identification of recombinant plasmid

1.PCR产物 2. *Xho* I / *Eco*R I 酶切重组质粒 M.250bp DNA marker

1. PCR product 2. Recombinant plasmid DNA digested with *Xho* I / *Eco*R I M. 250bp DNA ladder marker

3.2 序列测定

序列测定结果表明：重组质粒 pGEM-T-BmPHF5A 与电子克隆得到的碱基顺序完全一致。测序图略。

4 讨论

通过 PCR 克隆得到了 BmPHF5A 的基因，经过纯化后克隆到 pGEM-T 载体上，得到重组质粒，利用载体系统上的多克隆位点，可以更方便的切换目的基因的上下游酶切位点，从而为下一步构建重组表达质粒提供便捷条件。经过双酶切鉴定、测序等方法证明重组质粒 pGEM-T- BmPHF5A 的正确性，为后续实验打下了基础。

第五章 重组表达质粒的构建及在大肠杆菌中诱导表达

1 材料与试剂

1.1 材料与试剂

表达载体 pET-28a(+), 大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)由浙江理工大学生物化学研究所保存。标准低分子量蛋白 Marker 购自 TaKaRa 公司。TEMED (N, N, N', N'-四甲基乙二胺) 为瑞典 LKB BROMMA 公司产品。电泳级 SDS、Tris 碱、丙烯酰胺均购自 Boehringer Mannheim 公司。N, N'-甲叉双丙烯酰胺为瑞士 Fluka Chemie AG 公司产品。其余试剂为国产分析纯。

1.2 试剂配制

SDS-PAGE 所用所有试剂见《蛋白质技术手册》^[57]。

2 方法

2.1 pGEM-T- BmPHF5A 重组质粒与表达载体 pET-28a(+)双酶切

pGEM-T-BmPHF5A 重组质粒与表达载体 pET-28a(+)分别用 *Xho* I 和 *EcoR* I 双酶切。反应条件如下:

A:

pGEM-T-BmPHF5A	31 μ l
<i>Xho</i> I	2 μ l
<i>EcoR</i> I	2 μ l
10 \times Buffer	5 μ l
ddH ₂ O	10 μ l
<hr/>	
Total	50 μ l

B:

pET-28a(+)	61 μ l
<i>Xho</i> I	2 μ l

<i>EcoR</i> I	2 μ l
10 \times Buffer	10 μ l
ddH ₂ O	26 μ l
Total	100 μ l

分别混匀，37℃作用 3-4 h。

2.2 酶切产物处理及回收

2.2.1 酶切产物处理

双酶切后的反应体系，70℃水浴 10 min 灭活限制性内切酶。

2.2.2 酶切后割胶回收相应 DNA 片段

1%凝胶电泳，分别割胶回收 pGEM-T-BmPHF5A 酶切后的小片段以及 pET-28a(+)载体大片段。利用低熔点胶法分别纯化回收，方法步骤同第三章 2.1。

2.3 连接反应

连接体系如下：

回收的载体大片断	1.5 μ l
回收的 PCR 产物	6.5 μ l
T4DNA Ligase	1 μ l
10 \times T4 Ligase Buffer	1 μ l
总体积	10 μ l

混匀，16℃反应 12 h。

2.4 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞的制备

LB 平板挑取新活化的大肠杆菌 BL21(DE3)单菌落，接种培养，制备 *E.coli* BL21(DE3)感受态细胞，方法与第三章 3.3 制备 *E.coli* TG1 感受态细胞相同。

2.5 重组表达质粒的转化及鉴定

方法同第二章。

2.6 融合蛋白在大肠杆菌中的表达

- 在5 ml含100 mg/L卡那霉素的LB液体培养基中加50 μ l BL21-pET-28a(+)-BmPHF5A菌液，37 $^{\circ}$ C震荡培养至 $A_{610}=0.5$ ；
- 加入IPTG至终浓度0.5 mM，37 $^{\circ}$ C诱导表达；
- 收集菌液1 ml，12000 rpm离心备用；
- 选择合适的诱导时间，用凝胶成像系统和软件分析测定重组蛋白占菌体总蛋白的百分比；
- 把诱导后的重组菌用超声波破碎后，12000 rpm离心 10 min，分别取上清和沉淀，电泳检测表达产物的存在形式。

2.7 SDS-PAGE 电泳分析

具体配制方法见汪家政的《蛋白质技术手册》^[57]。

2.8 融合蛋白表达量的确定

经凝胶成像系统和软件分析电泳条带，可以得到表达的目的蛋白占菌体总蛋白的百分含量。

3 结果

3.1 重组表达质粒的鉴定结果

碱法小量抽提重组质粒，经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切，电泳出现大小两条带（约 330 bp 和 5.3 kb），与预期的一致；以此质粒为模板，用 Primer1、Primer2 为引物进行 PCR 扩增鉴定，结果也得到单一的与预期大小一致的 330 bp 的产物条带（图 5.1）；序列测定结果与原序列完全一致。表明已获得正确的重组表达克隆。

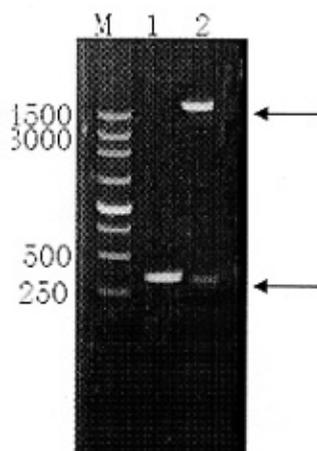


图 5.1 重组质粒的鉴定

Fig 5.1 The identification of recombinant plasmid

1. pET-28a(+)-a-BmPHF5A PCR 结果 2. pET-28a(+)-BmPHF5A 双酶切结果 M. DL3000 DNA 分子量标准
 1.PCR Identification 2. Recombinant plasmid pET-28a(+)-BmPHF5A digested with *Xho* I / *Eco*R I M.DL3000 DNA ladder marker

3.2 BL21-pET-28a(+)-BmPHF5A 的诱导表达

将 pET-28a(+)-BmPHF5A 重组菌经过 IPTG 诱导后，收集菌体进行 SDS-PAGE，结果与阴性对照相比浓集的融合蛋白表达条带，分子量大约为 16 kDa，与理论值相符。经凝胶呈像系统和软件分析显示，表达的蛋白约占菌体总蛋白的 40%。

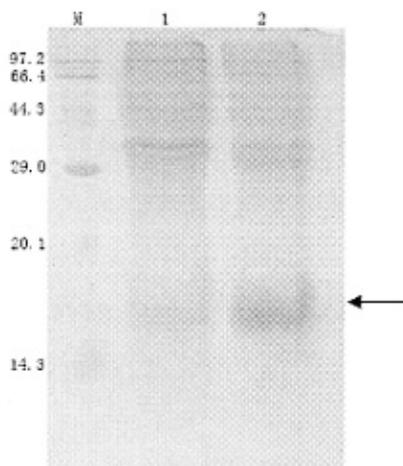


图 5.2 融合蛋白在 *E.coli* BL21 中的诱导表达

- Fig. 5.2 Expression of fusion protein in *E.coli* BL21
 M.低分子量标准蛋白 1.诱导后空载体 2.诱导后的重组菌

M.LMW protein marker 1.BL21-pET-28a(+) after inducing 2.BL21-pET-28a(+)-BmPHF5A after inducing

3.3 BL21-pET-28a(+)-BmPHF5A 表达形式的确定

超声裂解后的电泳结果显示：表达产物主要存在于沉淀中，说明 BmPHF5A 的原核表达产物主要以包涵体形式存在（图 3.4）。

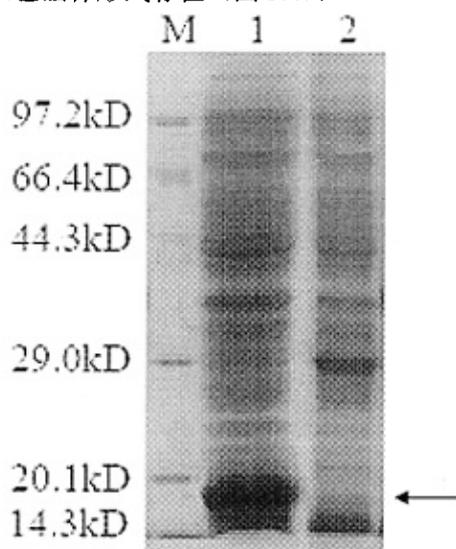


图 5.3 融合蛋白表达形式的确定

Fig. 5.3 The expression form of the fusion protein in BL21

1.超声波裂解后的沉淀 2.超声波裂解后的上清 M.低分子量蛋白质标准

1. the deposition of supersonic fragmentation 2. the supernate of supersonic fragmentation

M .protein molecular weight marker(low)

4 讨论

目前大肠杆菌表达系统是人们认识最清楚的，而且其操作简单、生长繁殖快、价格低廉。本课题选用大肠杆菌表达体系，宿主细胞为目前常用的基因工程菌 *E.coli*.BL21。表达载体为高效融合表达载体 pET-28a(+), 家蚕 BmPHF5A 阅读框架序列从 pGEM-T- BmPHF5A 克隆经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切插入到此载体中，成功构建了原核表达载体 pET-28a(+)-BmPHF5A，在强启动子 T7 的控制下，能够使外源基因在大肠杆菌中进行高效表达。在启动子与多克隆位点之间有一段 His 标签，既有利于通过亲和层析柱进行纯化，极大地方便了 His-BmPHF5A 融合蛋白的分离和纯化。因此，本研究中采用了 pET-28a(+)作为原核表达载体。

重组菌 BL21-pET-28a(+)-BmPHF5A 经 IPTG 诱导表达后, 超声破碎细菌, 取沉淀和上清液经 SDS-PAGE 检测后发现, 构建的原核表达载体 pET-28a(+)-BmPHF5A 能够在大肠杆菌中高效表达出重组 BmPHF5A 蛋白, 目的蛋白预测的分子量为 12.47 kDa, 加上融合了 His 标签后有 16.18 kDa, 从图 3.3 中可以看到表达的目的条带。在图 3.4 中 BmPHF5A 蛋白主要在沉淀中以包涵体形式存在。另外, 在配制培养基时, 改变培养基的 pH, 会造成表达量的变化, 在实验中选用 6.8 g Tryptone 和 3.2 g 的胃蛋白酶混合而成的培养基, 目的蛋白的表达量提高了接近 20%。

第六章 重组蛋白的纯化

1 试剂和材料

1.1 材料

溶菌酶购自 Boehringer Mannheim 公司; Ni²⁺-Sephadex™ G-25 Superfine 亲和层析柱(1 ml)购自 Amersham 公司。

1.2 试剂配制

1.2.1 重组蛋白复性用溶液

- 裂解缓冲液

称取 EDTA 0.47 g, Tris 1.51 g, NaCl 1.46 g 溶于 200 ml 水中, 调 pH 为 8.0, 加蒸馏水定容至 250 ml。

- TE 母液

5 mM EDTA, 20 mM Tris, 称取 EDTA 1.86 g, Tris 2.42 g 溶于 800 ml 水中, 用浓盐酸调 pH 为 8.0, 蒸馏水定容至 1L。

- 包涵体洗涤液 I (pH8.0)

5 mM EDTA, 20 mM Tris, 1%Trion X-100(v/v)

- 包涵体洗涤液 II (pH8.0)

5 mM EDTA, 20 mM Tris, 4 M 尿素

- 溶解液(pH8.0)

20 mM Tris, 5 mM EDTA, 8 M 尿素, 100 mM β-巯基乙醇, 50 μM ZnCl₂

- 复性液 I (pH8.0)

20 mM Tris, 5 mM EDTA, 4 M 尿素, 0.1 mM GSH, 1 mM GSSG, 50 μM ZnCl₂

- 复性液 II (pH8.0)

20 mM Tris, 5 mM EDTA, 2.5 M 尿素, 0.1 mM GSH, 1 mM GSSG, 50 μM ZnCl₂

- 复性液 III (pH8.0)

20 mM Tris, 5 mM EDTA, 1M 尿素, 0.1 mM GSH, 1 mM GSSG, 50 μ M ZnCl₂

- **复性液IV(pH8.0)**

20 mM Tris, 5 mM EDTA, 0.1 mM GSH, 1 mM GSSG, 50 μ M ZnCl₂

1.2.2 镍柱亲和层析纯化用试剂

- **Binding Buffer (pH 7.0)**

0.5 M NaCl、20 mM Tris·Cl、10 mM 咪唑 (pH 7.0)

- **Wash Buffer (pH 7.0)**

0.5 M NaCl、20 mM Tris·Cl、50 mM 咪唑 (pH 7.0)

- **Elution Buffer (pH 7.0)**

0.5 M NaCl、20 mM Tris·Cl、200 mM 咪唑 (pH 7.0)

1.2.3 Bradford 检测用试剂

配制方法见《蛋白质技术手册》^[57]

2 方法

2.1 包涵体的溶解与复性

- 具体方法见《蛋白质技术手册》^[57]

2.2 镍柱层析

- Ni²⁺-SephadexTM G-25 Superfine 柱用 10 ml binding Buffer 洗涤;
- 样品经 0.45 μ m 的滤膜过滤后上样;
- 用 5 倍柱体积 Binding Buffer 洗至 OD 值稳定或峰平;
- 用 wash Buffer 洗至 OD 值稳定或峰平, 收集洗脱液于离心管中;
- 用 Elution Buffer 洗至 OD 值稳定或峰平, 收集洗脱液于离心管中;
- 用 Binding Buffer 洗至 OD 值稳定或峰平, 准备重新上样;
- SDS-PAGE 检测纯化效果。

2.3 Bradford 检测方法

- 将蛋白溶液转移至离心管中（最大体积 100 μl ）；
- 补加实验用缓冲液至终体积 100 μl ；
- 加入 1 ml Bradford 工作液并振荡混匀；
- 在 2 min 后测 A_{615} 值，测量应在 1h 内完成。

3 表达产物的纯化结果

BmPHF5A 分子量为 12.47 kDa，在氨基端加入了序列为“MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSF”的组氨酸标签，其分子量为 3.71 kDa，因此融合蛋白的分子量为 16.18 kDa，纯化后的目的蛋白其分子量与预测分子量一致（如图 4.1）。

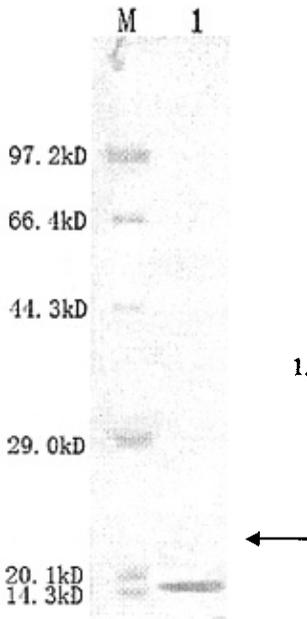


图 6.1 纯化蛋白的 SDS-PAGE
Fig.6.1 Purified PHF5A analysed by SDS-PAGE
 1.纯化的重组蛋白 M.蛋白质低分子量标准
 1. purified recombinant protein M. M.LMW protein marker

4 讨论

重组菌诱导后，经超声波破碎，SDS-PAGE检测发现，该蛋白以包涵体形式存在。而菌体的破碎对包涵体的提取有较大的影响，菌体未破碎完全或包涵体未完全溶解都会影响到最终所获纯化融合蛋白的产量。细菌破碎的方法很多，常用超声破碎、高压匀浆法或机械、化学和酶相结合的方法。超声处理法适合小至中

等数量的细菌破碎,不适宜大规模的细菌破碎,常用于实验室破碎细菌。溶菌酶可以溶解细菌细胞膜,有利于细菌的破碎。经过多次比较试验发现,将2种方法结合起来效果较好。在冰浴条件下,每1L菌液加入1 mg溶菌酶处理半小时。然后同样在冰浴条件下,间隔30s超声破碎5-6次,基本上可使菌体破碎。在超声破碎时,应避免产生气泡。待菌体悬液变得透明,就可停止超声。细菌破碎后,呈乳白色。

包涵体中除了目的蛋白外,还含有宿主菌蛋白质、核酸、脂质以及糖类等杂质。虽然这些杂质在复性时不会影响折叠的速率,但其中的一些物质却会显著影响聚集反应的速率,从而影响总的复性速率。因此,包涵体在纯化前一般不能直接用来进行复性,必须将其中的杂质在溶解和复性前降至最低水平。通常用中等浓度的变性剂如Triton X-100、脱氧胆酸钠(DOC)和尿素等缓冲液与包涵体作用几次后,可除去其中大部分外膜蛋白、脂质等。洗涤后的包涵体中主要成分为聚合态重组蛋白,仍处于不溶状态,可通过离心回收。

纯化后的重组蛋白在复性前一般都先溶于变性剂,如8mol/L尿素、6mol/L盐酸胍等中,并加入少量的还原剂,如 β 2巯基乙醇、DTT等,使其成为变性的还原态蛋白质,然后经过体外复性后才能成为可溶的具有生物活性的蛋白质。经Triton X-100和尿素洗涤后,应用8 M尿素作为变性剂溶解包涵体。结果显示,8 M尿素能较好的溶解包涵体,溶解后溶液清亮,离心后有少量沉淀,说明变性比较彻底。变性后的溶液,在加入复性液后,立即出现大量絮状沉淀,而采用逐步降低透析液中尿素浓度的方法进行透析,透析袋中絮状沉淀较少,回收效率较高。

包涵体溶解、复性以后,用 Ni^{2+} -SephadexTM G-25 Superfine柱纯化得到可溶性的纯化蛋白。经多次纯化冻干浓缩重组蛋白。用Bradford法定量重组蛋白后,最终用PBS溶解重组蛋白至5 mg/mL,用于免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体。

第七章 多克隆抗体制备及效价测定

1 试剂与材料

1.1 实验动物

雄性新西兰兔 1 只 (2.5kg), 购自浙江大学实验动物中心。

1.2 抗体制备用试剂

- 弗氏不完全佐剂(FIA)

按 1:3 的比例混合羊毛脂、液体石蜡, 高压灭菌 20 min, 4℃保存备用;

- 弗氏完全佐剂(FCA)

购自北京鼎国生物技术公司。

1.3 ELISA 用溶液

- 0.15 M pH 7.4 PBS

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KH_2PO_4 0.2 g, NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g

无菌去离子水定容至 1000 ml, 121℃灭菌 20 min;

- 包被液

Na_2CO_3 1.61 g, NaHCO_3 2.93 g

无菌去离子水定容至 1000 ml;

- 封闭液

BSA 溶于 PBS buffer 中至终浓度 1%;

- 底物缓冲液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.84 g, 柠檬酸 0.51 g

溶于 80 ml 无菌去离子水中, 定容至 100 ml;

- OPD 显色液

4 mg OPD 溶于 10ml 底物缓冲液, 加 15 μl 30 % H_2O_2 , 临用前配制;

- 洗涤液

含 0.5 % Tween-20 的 PBS

- 终止液
2 M H₂SO₄

2 方法

2.1 抗体制备

2.1.1 抗原制备

将纯化的融合蛋白取 10 μ l 进行 SDS-PAGE 检测其纯度并用 Brandford 法定量^[58]。冻干浓缩。

取蛋白质溶液 5 ml (含纯化重组 BmPHF5A 蛋白 5 mg) 与等体积的弗氏不完全佐剂混合, 在研钵中研磨乳化, 直至乳化液入水不散开, 说明乳化完全, 即可作为免疫用抗原, 4 $^{\circ}$ C 保存备用; 首次免疫用弗氏完全佐剂与 1ml 浓度为 1mg/ml 的重组蛋白混合, 研钵研磨乳化, 直至乳化液入水不扩散, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.1.2 免疫动物

- 免疫接种前, 每只兔耳静脉取血 1 ml 作为对照;
- 首次免疫, 兔背部皮下多点注射 1 ml 抗原, 总抗原量 1mg;
- 以后每隔 10 天加强免疫一次, 背部皮下多点注射, 抗原量减半, 用弗氏不完全佐剂, 共加强免疫 3 次;
- 第四次免疫后 10 天, 将兔子禁食 24h, 以防止血脂过高, 颈动脉放血, 获得抗血清。

2.1.3 多克隆抗血清制备

- 将兔子固定在兔板上, 乙醚麻醉;
- 兔子仰面固定, 头部放低, 剪去颈部兔毛, 75%酒精消毒后, 在颈外侧做皮肤切口, 拉开皮肤后可见斜行的胸锁乳突肌, 将此肌钝性分离并推向后方, 即可见颈总动脉;
- 将此动脉轻轻分开, 套入两根丝线, 一根在近心端, 一根在远心端。先用一

根将远心端结扎，近心端在丝线外侧用止血钳夹住；

- 用一接着毛细管的特大号针头沿向心方向插入动脉，并用丝线扎牢，以免针头从动脉中滑落；
- 慢慢打开止血钳，动脉血立即顺毛细管流入瓶中。采集血液至血流慢点滴而出为止；
- 将收集血液的离心管，37 °C斜置 1-2 h，再 4 °C斜置 3-4 h 后，将析出的血清移到新离心管中，凝血块以 3000 rpm，4 °C，离心 10 min，小心吸取上清，合并两次血清，4 °C，3000 rpm 离心 10 min，小心吸取上清转至 500 μ l 离心管中，用于效价测定和 Western Blotting 检测；小量分装，防止反复冻融，贮存于-20 °C；长期保存血清加入 50%甘油，贮存在-80 °C。

2.2 抗体的效价测定 (ELISA)^[59]

- 抗原包被：纯化的融合蛋白用包被液稀释至10 μ g/ml，按100 μ l/孔加至酶标板孔中，以包被液为空白对照，37 °C温育2-3 h；
- 洗涤：倾去孔内液体，300 μ l/孔加入洗涤液，轻晃，3 min后倒去，拍干，连续洗3次
- 封闭：每孔加入100 μ l封闭液，37 °C，2 h；
- 洗涤：弃封闭液，每孔用洗涤液洗3次，每次均在洁净滤纸拍干；
- 加待测样品（一抗）：将血清在另一块板上用PBS连续稀释，稀释倍比从 1: 100至1: 51200，每孔加入100 μ l稀释的抗体，免疫前兔血清为阴性对照，37 °C，2 h；
- 洗涤：弃抗体稀释液，洗涤液洗3次，每次均在洁净滤纸上拍干；
- 加酶标抗体（二抗）：每孔加入100 μ l羊抗兔二抗（1:1000稀释，鼎国生物），37 °C，1 h；
- 洗涤：洗涤液洗3-5次，每次均在洁净滤纸上拍干；
- 显色：加100 μ l新鲜配置的OPD底物显色液，室温暗处反应显色5-30min；
- 终止反应：待有明显的颜色时加终止液50 μ l/孔，终止反应；
- 比色：酶标仪测492 nm处各孔光吸收值，阳性反应的最大稀释度为待测样品效价。

- 结果测定:

比例法以阳性血清与阴性血清的吸光值之比 (P/N) 表示:

$P/N \geq 2.1$	阳性
$1.5 \leq P/N < 2.1$	可疑
$P/N < 1.5$	阴性

2.3 融合蛋白的 Western blot 鉴定

- 按第二部分第二章的方法进行表达, SDS-PAGE;
- 剪下所需大小的 PVDF 膜, 浸入甲醇中 15-20 s, 将 PVDF 膜转入去离子水中 5 min, 然后将膜转入转移缓冲液中至少 5 min;
- 剪 8 层与胶大小一致的 Whatman 3mm 滤纸, 在转移缓冲液中浸湿后, 铺在转印板上, 用转移缓冲液湿润的玻璃棒赶去气泡;
- 从电泳板中取出已完成电泳的凝胶片, 一半染色另一半转入转移缓冲液中至少 5 min;
- 在滤纸上覆盖处理好的 PVDF 膜, 做好方位标记, 电泳凝胶覆盖在 PVDF 膜上, 其上放 8 层转移缓冲液浸湿的 Whatman 3mm 滤纸, 用电转缓冲液湿润的玻璃棒赶去气泡, 绝对避免各层之间留有气泡, 将电转仪的盖子合上;
- 计算电流大小= $2\text{mA} \times \text{凝胶面积}(\text{cm}^2)$, 通电转印 1.5h;
- 取出转印好的 PVDF 膜, 放入 PBS 中轻轻摇动洗膜 10 min, 凝胶用考马斯亮蓝染色以检测转移效果;
- 去除 PBS, 加封闭液室温轻摇 1 h;
- 将膜浸入含 BmPHF5A 抗体 (1:1000) 的封闭液中, 轻摇 1 h;
- 将膜放入洗涤液中轻轻摇动洗膜 3 次, 每次 10min;
- 将膜转入含羊抗兔二抗 (1:1000) 的封闭液中, 室温轻摇 1 h;
- 将膜放入洗涤液中轻轻摇动洗膜 3 次, 每次 10min;
- 将膜转入 PBS 中, 轻摇洗膜 2 次, 每次 5 min;

将膜转入 DAB 显色液中, 室温下暗处显色 5-10 min, 待有明显的显色条带时, 用去离子水漂洗终止反应。

3 结果

3.1 抗体的效价测定结果

纯化的抗体用 PBS 稀释不同倍数 1000、2000、4000、8000、16100、32000 作一抗，纯化的融合蛋白作包被抗原，ELISA 测抗体滴度，未免血清、空白作对照（图 6.1）。从 P/N 值来看，自制的抗体在蛋白浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时抗体的效价可达 1: 32000 以上。

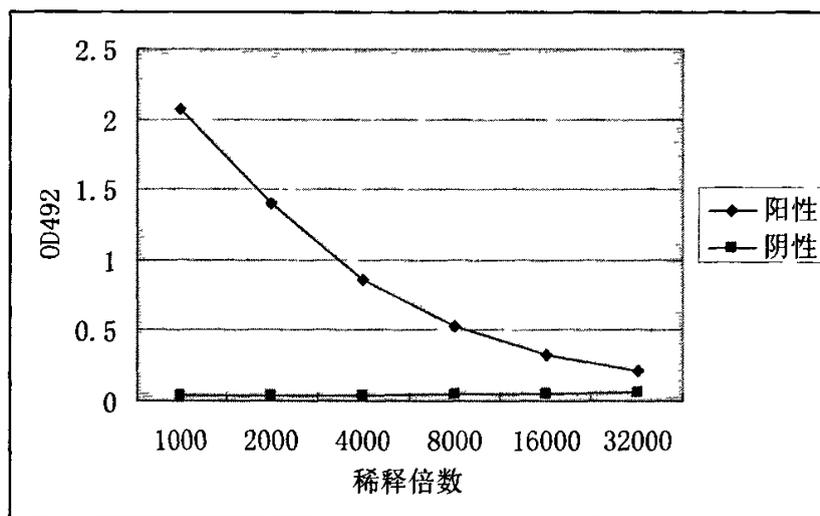


图 7.1 自制抗体效价检测

Fig. 7.1 Determine of antibody titer

3.2 Western blotting 分析

将制备的多克隆抗体以 1:1000 稀释后进行 Western blotting 实验，结果证实 BmPHF5A 16 kDa 附近有一条特异条带出现（图 6.2）。由图中可以看出，制备的抗体虽然是多克隆抗体，但仍然有较高的特异性。

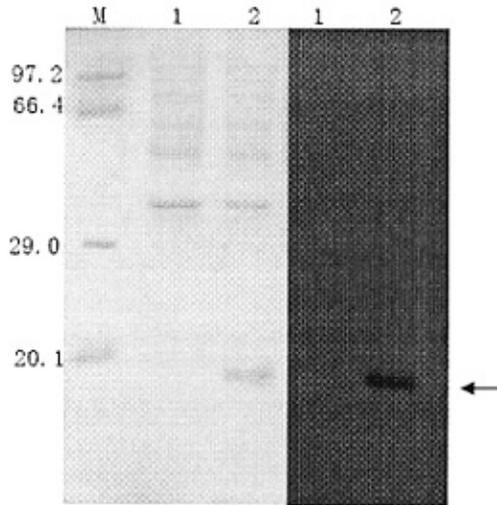


图 7.2 重组蛋白的 Western 分析

Fig 7.2 Western-blotting analysis of recombinant protein

M. 低分子量蛋白标准 1. pET-28a (+) 空载体 2. pET-28a (+) -BmPHF5A 重组表达菌
M. protein molecular weight marker (low) 1. plasmid of pET-28a (+)
2. pET-28a (+) -PHF5A induced with IPTG

4 讨论

实验结果证明，获得的纯化抗体间接酶联免疫吸附试(ELISA)测得抗体效价约为 1: 32000，而阴性对照和空白对照没有显色。

Western blot 显示，与阴性对照相比，该抗体确可与表达菌中分子量为 16.18 kDa 的重组蛋白发生特异性反应。这证明了制备的抗体虽为多克隆抗体，但是仍具有较高的特异性。证明了制备的抗体虽然为多克隆抗体，但是仍然具有较高的特异性，而且表明所表达的融合蛋白具有原蛋白质的免疫原性。因此，制备的抗体可用于下一步的研究。

第八章 BmPHF5A 的亚细胞定位

1 试剂与材料

1.1 材料

BmN 细胞由本实验室保存；羊抗兔二抗 Cy3 标记的羊抗兔二抗是美国 Proteintech 公司的；TC-100 无血清培养基购自 Sigma 公司；含有 10%胎牛血清 (FCS, Gibco BRL)的 TC-100 培养基；激光扫描共聚焦显微镜专用培养皿购自 Bio-Line Instruments 公司；Nikon ECLIPSE TE2000-E 激光扫描共聚焦显微镜是 Nikon 公司的产品，图像分析软件为 EZ-C1。

1.2 试剂的配制

- 固定液
含 10%甲醛的 PBS
- 封闭液
含 3% BSA 的 PBS
- PBST 洗涤液
PBS+0.05%Tween-20
- Cy3 标记的羊抗兔二抗
Cy3 都用 PBS 按 1: 200 稀释
- DAPI 的稀释
DAPI 用 PBS 按 1: 1000 稀释

2 方法

2.1 亚细胞定位^[61]

- 事先在激光共聚焦显微镜专用培养皿中放入无菌的盖玻片，然后向皿中传入 Bm5 细胞并培养过夜；
- 倒掉培养基，用 PBS 轻轻洗涤 2 次；

- 室温下，加入固定液以固定细胞 10 min;
- PBS 洗二次，用封闭液室温封闭 1 h;
- PBS 洗二次，取抗血清按 1: 200 稀释的自制的多克隆抗体，4 °C 过夜
- PBST 洗三次，每次 5 min;
- 再加入 1: 200 稀释的 Cy3 羊抗兔二抗，37 °C 孵育 2 h;
- PBST 洗三次，每次 5 min;
- 加入稀释好的 DAPI，染色十分钟;
- PBST 洗 5 min;
- 蒸馏水漂洗 1 次，小心取出盖玻片放于一干净的载玻片上，在共聚焦显微镜下观察结果并拍照。

3 结果

3.2 亚细胞定位

在亚细胞定位中，选用了用 DAPI 和羊抗兔二抗 Cy3 荧光标记，其中蓝色为 DAPI 显色结果，用来标记细胞核，而红色为 Cy3 显色。使用共聚焦显微镜观察，发现在细胞核中含有 PHF5A，并在细胞核中呈区域性分布（图 8.1 F）。同时，在细胞质中也有少量的荧光。

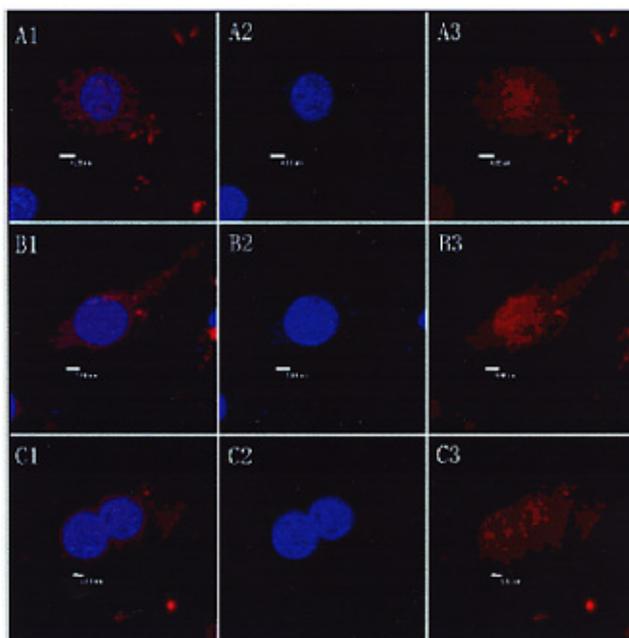


图 8.1 亚细胞定位

Fig. 8.1 Subcellular localization

图 A、B、C 为在共聚焦显微镜下拍的阳性结果 其中 1 为红色荧光和蓝色荧光叠加的照片 2 为蓝色荧光下的的结果 3 为红色荧光下的照片

Positive results in Fig A, B, C using confocal Photo with red and blue fluorescence in Fig 1
Photo with blue fluorescence in Fig 2 Photo with red fluorescence in Fig3

4 讨论

应用自制的多克隆抗体对家蚕 BmN 细胞进行亚细胞定位, 结果表明内源性的 BmPHF5A 主要分布于细胞核, 且在核中的分布具有区域性(图 8.1)。我们对 PHF5A 进行了二级结构预测(图 2.2), 发现在 PHF5A C 末端含有 NLS 序列, 这提示 PHF5A 可能定位于细胞核中, 而本实验也证实了这一点。另外, 蛋白质的翻译过程在胞质中进行, 完成翻译后, 蛋白质再被转运到相应的细胞区位。翻译完成而又未及正确转运的蛋白质则会滞留于胞质, 所以在亚细胞定位时胞质中也出现荧光信号。Oltra 等人曾用 GFP 标记的重组质粒 GFP-PHF5A 转染 HeLa 细胞^[17, 19], 他们发现绿色荧光大多分布于细胞核, 且在核仁处无荧光信号, 而在细胞质中, 则有少量的荧光发出。与此相对应的是, Trappe 等人^[16]则利用融合 GFP 的无 NLS 序列的 PHF5A 的真核表达质粒去转染 NIH 3T3 细胞, 果然未在细胞核中发现荧光信号, 大量绿色荧光信号富集于细胞质中, 这也证明了 NLS 序列确实对 PHF5A 在细胞核中定位起着决定性作用。经过同源比对(图 2.1), 我们发现家蚕 PHF5A 与哺乳动物的同源性反而超过了与果蝇、非洲按蚊等昆虫的同源性, 而这一差异恰恰发生在 NLS 序列上——这是否意味着 PHF5A 的 NLS 序列除了具有核定位功能外, 还具有其他功能呢? 要解决这一问题还需要相关研究的不断深入。

第九章 PHF5A 的 RNAi 研究

1. 材料与试剂

1.1 材料

Bm5细胞由张志芳研究员馈赠；含有10%胎牛血清(FCS, Gibco BRL)的TC-100培养基；FACS Aria流式细胞仪为美国BD公司产品；脂质体Cellfectin Reagent购自Invitrogen公司。

1.2 试剂的配置：

PI 染液：

- 柠檬酸三钠 0.25g
- Triton-X 100 0.75mL
- PI 0.025g
- RNase 0.005g
- ddH₂O 250mL

2. 方法

2.1 dsRNA 的合成与定量

为了获得合成dsRNA的体外模板，需要目的基因ORF分别以正向和反向接在T7启动子之后。为达此为目的，合成了Pa, Pb两个引物，下划线区域则为T7启动子序列：

Pa: 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGATGGCAAAGCATCATCC 3'

Pb: 5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCTAGTGTCTCCTAAACC 3'

将Pa和Primer2设为第一对引物，再将Pb和Primer1设为第二对引物，随后分别以重组质粒pET-28a (+)-BmPHF5A为模板进行PCR。使用第一对引物PCR扩增的产物是体外转录ssRNA的正向模板，而后者则是体外转录ssRNA的反向模板。按试剂盒说明书合成dsRNA，用分光光度计测定dsRNA的浓度。

2.2 dsRNA 的转染及细胞形态观察

将 Bm5 细胞种入 6 孔板中，每孔细胞约为 10^6 个，培养过夜使之贴壁生长。次日，将 2 μL 的 dsRNA 和 4 μL 的脂质体溶于无血清培养基中，使其终体积达 200 μL 的，轻轻混匀后，在室温下放置 20 min。另外，在超净台上移去 6 孔板上的血清培养基。用 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 的无血清培养基轻轻地清洗两次，再将前述的 dsRNA-脂质体混合液加入孔中，最后每孔再补加无血清培养基 300 μL ，使孔中液体的终体积达 500 $\mu\text{L}/\text{well}$ 。将 6 孔板轻轻混匀，于 27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 h 后弃去原来的无血清培养基，换成 2 mL 血清培养基继续培育细胞。培养 72 h 后，观察细胞状态并提取细胞总蛋白，经 Bradford 定量^[58]后，再按等浓度包被酶标板，用 ELISA 法检测内源性 BmPHF5A 表达水平，以确定 RNAi 是否有效。

2.3 流式细胞仪检测

用流式细胞仪来记录经 RNAi 后的家蚕细胞状态。我们在干扰过后 72 h 收集细胞，预冷的 70%酒精固定 4 h 后，离心收集细胞，PBS 洗二次，加入 PI 染液重悬细胞，室温避光保存 1.5 h 后，上机检测。

3. 结果

3.1 dsRNA 合成图

将合成的 dsRNA 用 1 %的琼脂糖电泳进行检测，结果有与预期大小一致的条带。随后，将合成的 dsRNA 稀释 400 倍，在酶标仪上测定它的 OD260 和 OD280，由于 OD260 /OD280 处于 1.8 到 2.0 之间，所以合成的 dsRNA 纯度符合试验要求。

$$\text{dsRNA 浓度} = 40 \times 0.083 \times 1000 / 1000 \mu\text{g}/\mu\text{L} = 3.32 \mu\text{g}/\mu\text{L}.$$

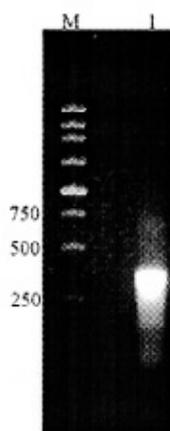


图 9.1 BmPHF5A 的 dsRNA 合成鉴定

Fig. 9.1 The identification of BmPHF5A dsRNA

1. dsRNA 产物 M. DNA 分子量标准

1. dsRNA product M. DNA ladder marker

3.2 ELISA 初步确定干扰情况

转染72 h后，提取阴性对照与干扰后的家蚕细胞总蛋白，使用ELISA法检测RNAi的情况，重复3次。结果表明，干扰后样品孔的OD值明显低于阴性对照孔，这说明在干扰后的Bm5细胞中，目标蛋白的表达量降低了（图9.2）。

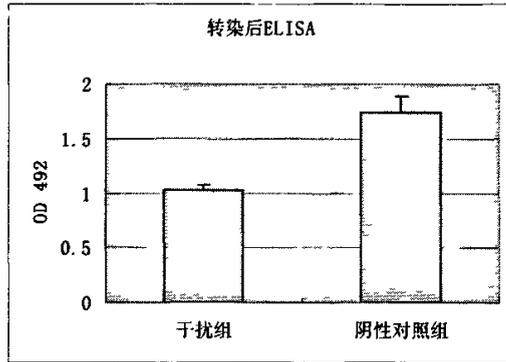


图 9.2 ELISA 检测干扰前后细胞总蛋白中目的蛋白情况

Fig. 9.2 The different of the content of BmPHF5A in cell after RNAi, P<0.05

3.4 流式分析

转染72 h后收集6孔板上细胞样品，用流式细胞仪检测，结果如图9.3所示。干扰后，处于G2/M期的细胞增加了，而处于G1的细胞百分数相对的减少。

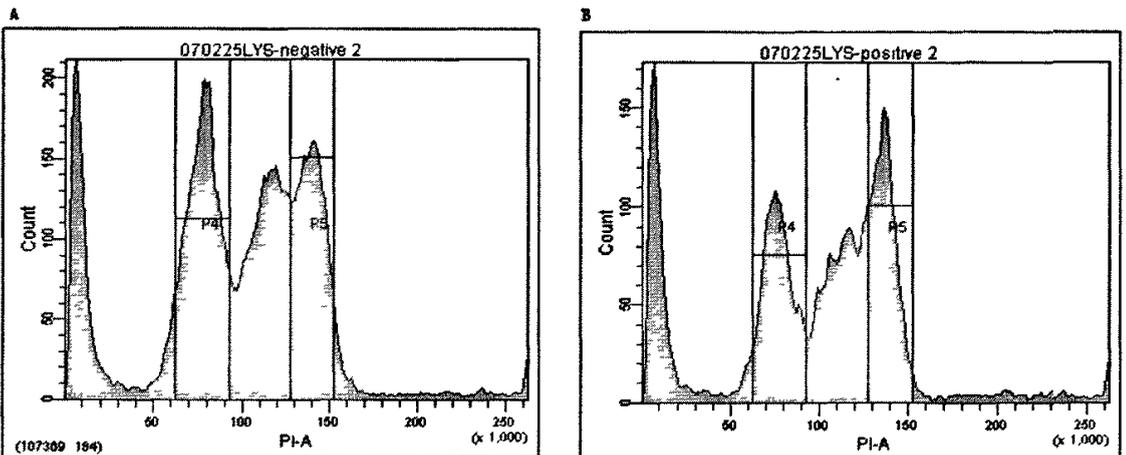


图 9.3 细胞仪检测结果

Fig.9.3 results from Flow cytometry

A 脂质体处理后 72 h 的阴性对照, B 转染后 72 h 收集的样品

A. Negative control B. a sample after 72 h of RNAi.

4. 讨论:

在本实验中,我们首次对 Bm5 细胞中的 BmPHF5A 进行了 RNAi。干扰 72 h 后的 ELISA 结果说明, dsRNA 的转染确实能造成了内源性 PHF5A 蛋白表达水平的下降。随后,应用流式细胞仪对干扰后的 Bm5 细胞进行了检测后发现,与阴性对照相比,干扰后的 Bm5 细胞中有部分被阻滞于 G2/M 期。综合以上数据,我们认为, BmPHF5A 基因的沉默可能使 Bm5 细胞被阻滞于 G2/M 期。

Oltra 等人^[5]用剔除了 PHF5A 基因的方法发现细胞的 DNA 含量增加了一倍,得出了相同的结论,这说明 PHF5A 在细胞有丝分裂中具有重要的作用,在有丝分裂中是必不可缺少的。

结 论

1. 通过对家蚕蛹 cDNA 文库的分析, 结合生物信息学的方法, 获得了家蚕 BmPHF5A 蛋白的 cDNA 序列。并通过生物信息学分析, 发现 BmPHF5A 蛋白与果蝇及脊椎动物的同源性超过了 90%。我们还对 BmPHF5A 蛋白可能的功能区、疏水区、跨膜区和信号肽进行了预测。
2. 将 PCR 得到的家蚕 BmPHF5A 基因开放阅读框克隆到 pGEM-T 载体中, 并进一步构建了重组表达质粒 pET-28a(+)-BmPHF5A。经 IPTG 诱导, 在大肠杆菌中成功高效地表达了重组蛋白 His-BmPHF5A, 经 SDS-PAGE 分析, 结果表明表达的融合蛋白的分子量为 16 kDa, 与预期的蛋白质分子量一致, 以包涵体形式存在。经溶菌酶酶解、超声波破碎、包涵体洗涤、尿素变性, 逐级复性等步骤后使用亲和层析法纯化了重组蛋白。
3. 免疫新西兰兔制备了多克隆抗体, 效价为 1: 32000。Western blot 证实了其特异性, 为进一步研究奠定了基础。
4. 亚细胞定位发现, BmPHF5A 主要分布在细胞核中。
5. dsNRA 干扰显示细胞终止 3 在 G2/M 期。

参 考 文 献

- [1]. hindler u, Beckmann H, Cashmore A R. HAT3, a novel Arabidopsis homeodomain protein contaPHF5Ang a conserved cysteine-rich region. *Plant J*, 1993, 4 (1): 137 ~150.
- [2] Aasland R, Gibson T J, Stewart A F. The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci*, 1995, 20: 59 ~ 61.
- [3]. Capili A D, Schultz D C, Rauscher III F J, Borden K L B. Solution structure of the PHD domain from the KAP-1 corepressor: structural determinants for PHD, RING and LIM zinc-binding domains. *EMBO J*, 2004 20: 165 ~177.
- [4]. Kalkhoven E, Teunissen H, Houweling A, Verrijze R C P, Zantema A. The PHD type zinc finger is an integral part of the CBP acetyltransferase domain[J]. *Mol Cell Biol*, 2003, 22 (7) : 1961 ~1970.
- [5]. Oltra E, Werner R. Cloning of a potential regulatory protein involved in connexin43 gene expression. *Gap junction*[J]. Amsterdam: IOS press, 1998, 321-325.
- [6]. R Trappe R, Ahmed M, Glaser B, Vogel C, Tascou S, Burfeind P, Engel W Identification and characterization of a novel murine multigene family containing a PHD-finger-like motif[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293: 816-826.
- [7]. Oltra, E., Pfeifer, I. and Werner R. Ini, a small nuclear protein that enhances the response of the connexin43 gene to estrogen[J]. *Endocrinology*, 2003, 144: 3148-3161.
- [8]. Schiavi A. Transcriptional and translational regulation of connexin43 expression by estrogen. Miami, FL: University of Miami; Dissertation, 2000
- [9]. Francesca D Houghton. Role of gap junctions during early embryo development[J]. *Society for reproduction and Fertility*, 2005, 129: 129-135.
- Auboeuf, D., Honig, A., Berget, S. M. and O'Malley, B. W. Coordinate regulation of transcription and splicing by steroid receptor coregulators[J]. *Science*, 2005, 298: 416-419.
- [10]. Winterhager E, Stutenkemper R, Ttaub O, Beyer E, Willecke K. Expression of

- different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term[J]. *Eur J Cell Biol*, 1991, 55:131-142.
- [11]. Wu JJ, Geimonen E, Andersen J. Increased expression of estrogen receptor in human uterine smooth muscle at term. *Eur J Endocrinol*, 2000, 142:92-99.
- [12]. Li X, Onishi Y, Kuwabara K, Rho J, Wada-Kiyama Y, Sauma Y, Kiyama R. Ligand-dependent transcriptional enhancement by DNA curvature between two half motif of the estrogen element in the human estrogen receptor gene[J]. *Gene*, 2002, 294:279-290.
- [13]. Metzger D, Losson R, Bornert JM, Lemoine Y, Chambon P Promoter specificity of the two transcriptional activation functions of the human oestrogen receptor in yeast[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 20: 2813–2817.
- [14]. Chen ZQ, Lefebvre D, Bai XH, Reaume A, Rossant J, Lye SJ Identification of two regulatory elements within the promoter region of the mouse connexin 43 gene. *J Biol Chem*[J]. 1995, 270:3863–3868
- [15]. Elisa Oltra, Fulvia Verde, Rudolf Werner and Gennaro D’Urso. A novel RING-finger-like protein Ini1 is essential for cell cycle progression in fission yeast[J]. *Research Article*, 2004: 967-974.
- [16]. Zaino RJ, Clarke CL, Feil PD, Satyaswaroop PG Differential distribution of estrogen and progesterone receptors in rabbit uterus detected by dual immunofluorescence[J]. *Endocrinology*, 1999, 125: 2728–2734.
- [17]. R. Trappe, E. Schulze, T. Rzymiski, S. Frode and W.Engela. The *Caenorhabditis elegans* ortholog of human PHF5a shows a muscle-specific expression domain and is essential for Communication, 2004, 297:1049-1060.
- [18]. Jun Babaan Freanil, Naoki Isobe and Tohiniko Nakao. Expression of Gap Junction Protein Connexin 43 during Follicular Atresia in the Ovary of Swamp Buffaloes. *J.Reproduction and Development*, 200551(5):675-681.
- [19]. Trappe R, Ahmed M, Glaser B, Vogel C, Tascou S, Burfeind P, EngelW Identification and characterization of a novel murine multigene family containing a PHD-finger-like motif[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 293: 816–826.
- [20]. Miami, FL, Schiavi A Transcriptional and translational regulation of connexin43

- expression by estrogen. University of Miami[J]. Dissertation. 2000.
- Mitchell JA, Lye SJ Differential expression of activator protein-1 transcription factors in pregnant rat myometrium[J]. Biol Reprod, 2002, 67: 240–246.
- [21]. Yu W, Dahl G, Werner R The connexin43 gene is responsive to oestrogen[J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1994, 258: 125–132.
- [22]. Piersanti M, Lye SJ. Increase in messenger ribonucleic acid encoding the myometrial gap junction protein, connexin-43, requires protein synthesis and is associated with increased expression of the activator protein-1, c-fos. Endocrinology[J]. 2002, 136:3601–3608
- [23]. Mitchell JA, Lye SJ Differential expression of activator protein-1 transcription factors in pregnant rat myometrium. Biol Reprod[J]. 2002, 67:240–246
- [24]. Hertelendy, F. Zakar. Regulation of Myometrial smooth Muscle Function[J]. Current Pharmaceutical Design.2004, 10(20): 2449-2517.
- [25]. Crepieux, Pascale; Lecureuil, Charlotte; Marion, Sebastien; Kara, Elodie; Piketty, Vincent; Martinat, Nadine; Guillou, Floris.et.al. a Mechanistic Overview on Male infertility and Germ Cell Cancers[J]. Current Pharmaceutical Design.2004, 10(5):449-469.
- [26]. Hartmuth K, Urlaub H, Vornlocher H P, et al. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004 , 99(26) : 16719~16724.
- [27]. R. Trappe,a,1 E. Schulze,b,1 T. Rzymiski,a S. Frode,b and W. Engela. The Caenorhabditis elegans ortholog of human PHF5a shows a muscle-specific expression domain and is essential for C. elegans morphogenetic development[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, 297: 1049–1060.
- [28]. Zhou Z, Sim J, Griffith J, et al. Purification and electron microscopic visualization of functional human spliceosomes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 99 (19): 12203~12207.
- [29]. Ohi, M. D., Link, A. J., Ren, L., Jennings, J. L., McDonald, W. H. and Gould, K. L. Proteomics analysis reveals stable multiprotein complexes in both fission and budding yeasts containing Myb-related Cdc5p/Cef1p, novel pre-mRNA splicing

- factors and snRNAs[J]. *Mol. Cell Biol*, 2004, 22: 2011-2024.
- [30]. Goldstrohm, A. C., Greenleaf, A. L. and Garcia-Blanco, M. A. Cotranscriptional splicing of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative splicing[J]. *Gene*, 2001, 277: 31-47.
- [31]. Lundgren, K., Allan, S., Urushiyama, S., Tani, T., Ohshima, Y., Frendewey, D. and Beach, D. A connection between pre-mRNA splicing and the cell cycle in fission yeast: *cdc28+* is allelic with *prp8+* and encodes an RNA-dependent ATPase/helicase. *Mol. Biol[J]. Cell*, 1996, 7: 1083-1094.
- [32]. Nurse, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase[J]. *Nature* 1990, 344: 503-508.
- [33]. Hee-Don Chae, Jeanho Yun, Yung-Jue Bang and Deug Y Shin. Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions [J]. *Oncogene*, 2004, 23(23): 4084-4088.
- [34]. Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F. and Kirschner, M.W. *cdc25* is a specific tyrosine phosphatase that directly activates *p34cdc2*[J]. *Cell*, 1991, 67: 197-211.
- [35]. Kuo, Po-Lin., Hsu, Ya-Ling., Kuo, Yu-Chun., Chang, Cheng-Hsiung., Lin, Chun-Ching b. The anti-proliferative inhibition of ellipticine in human breast *mda-mb-231* cancer cells is through cell cycle arrest and apoptosis induction[J]. *Anti-Cancer Drugs*. 2005, 16(7): 789-795.
- [36]. Strausfeld, U., Labbé, J.-C., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Picard, A., Sadhu, K., Russell, P. and Dorée, M. Dephosphorylation and activation of a *p34cdc2/cyclin B* complex in vitro by human *CDC25* protein[J]. *Nature*, 1991, 351: 242-245.
- [37]. Russell, P. and Nurse, P. *cdc25+* functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast[J]. *Cell*, 1986, 45: 145-156
- [38]. David L Myer, El Mustapha Bahassi and Peter J Stambrook. The *Plk3-Cdc25* circuit[J]. *Oncogene*, 2005, 24: 299-305.
- [39]. Russell, P. and Nurse, P. Negative regulation of mitosis by *wee1+*, a gene encoding a protein kinase homolog[J]. *Cell*, 1987, 49: 589-597.

- [40]. Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M. and Beach, D. *mik1* and *wee1* cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of *cdc2*[J]. *Cell*, 1991, 64: 1111-1122.
- [41]. Jayashree Mitra and Greg H Enders. Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(19): 3361-3367.
- [42]. Parker, L. L. and Piwnica-Worms, H. Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase[J]. *Science*, 1992, 260: 1958-1960.
- [43]. Yohei Tominaga, Cuiling Li, Rui-Hong Wang, and Chu-Xia Deng. Murine Wee1 Plays a Critical Role in Cell Cycle Regulation and Pre-Implantation Stages of Embryonic Development [J]. *Int J Biol Sci.*, 2006, 2(4): 161-170.
- [44]. Raleigh, J. M. and O'Connell, M. J. The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25[J]. *J. Cell Sci*, 2000, 113: 1727-1736.
- [45]. Lundgren, K., Allan, S., Urushiyama, S., Tani, T., Ohshima, Y., Frenthewey, D. and Beach, D. A connection between pre-mRNA splicing and the cell cycle in fission yeast: *cdc28+* is allelic with *prp8+* and encodes an RNA-dependent ATPase/helicase[J]. *Mol. Biol. Cell*, 1996, 7: 1083-1094.
- [46]. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective[J]. *Nature*, 2000, 408 (23): 433-439.
- [47]. Nyberg KA, Michelson RJ, Putnam CW, et al. Toward maintenance of the genome : DNA damage and replication checkpoints[J] . *Ann Rev Genet*, 2002, 36 :617-659.
- [48]. Nicholas Ingolia. Cell Cycle: Bistability Is Needed for Robust Cycling[J]. *Current biology*, 2005, 15(23): 961-963.
- [49]. Bentley, N. J., Holtzman, D. A., Flagg, G., Keegan, K. S., DeMaggio, A., Ford, J. C., Hoekstra, M. and Carr, A. M. The *Schizosaccharomyces pombe rad3* checkpoint[J]. *gene. EMBO J*, 1996, 15: 6641-6651.
- [50]. Sanjay Kumar and Joel A. Huberman. On the Slowing of S Phase in Response to DNA Damage in Fission Yeast[J]. *J. Biol. Chem.*, 2004, 272(42): 43584-43590.
- [51]. Bakkenist CJ, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation[J]. *Nature*, 2003, 421 (30): 499-506.

- [52]. Toru M. Nakamura, Bettina A. Moser, Li-Lin Du, and Paul Russell. Cooperative Control of Crb2 by ATM Family and Cdc2 Kinases Is Essential for the DNA Damage Checkpoint in Fission Yeast[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2005, 25(24): 10721-10730.
- [53]. Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers[J]. *Nature*, 1998, 392: 300-303.
- [54]. CORTEZD, GUNTUKUS, QIN J, et al. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling [J]. *Science*, 2001, 294: 1713-1716.
- [55]. Pietro Pichierri and Filippo Rosselli. The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR–CHK1 and ATR–NBS1–FANCD2 pathways[J]. *The EMBO Journal*, 2004, 23: 1178–1187.
- [56]. J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔著; 黄培堂等译. 分子克隆实验指南(第三版) [M], 北京: 科学出版社. 2002
- [57]. 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [58]. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding[J]. *Anal. Biochem.*, 1976, 72(1-2): 248-257.
- [59]. F. 奥斯伯等著; 颜子颖, 王海林译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 590-596.
- [60]. 刘世新 主编. 实用生物组织学技术[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [61]. 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[M]. 世界图书出版公司, 1996, 201
- [62]. 张晓南, 陈苏民, 罗二平, 黄勇, 柴玉波, 李云峰, 陈南春. Red 蛋白抗血清的制备及亚细胞定位研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2005, 21(3): 305-308.

致 谢

两年半的研究生生涯即将结束，在本论文即将完成之际，我不由得想起在这期间给予我帮助和关怀的每一个人。正是在他们的关心与支持下，我才得以顺利度过美好的研究生时光，与他们相处是充实的也是愉快的，很高兴能够借此机会表达对他们的感激之情。

本文是在导师张耀洲教授的悉心指导下完成的。论文的选题、实验设计、实验方案的实施、结果的分析与讨论乃至撰写中的字斟句酌，无一不倾注了导师大量的心血和汗水。回首这两年半的求学时光，耳濡目染了导师严谨的治学态度和求学创新的科研精神，导师高尚的道德情操，诲人不倦的师长风范都使学生终生受益，特别是循循善诱的教导和不拘一格的思路给予我无尽的启迪。值此论文完成之际，弟子怀着深切的感佩之情谨向恩师致以最崇高的敬意和最诚挚的感谢。

本论文的工作是在浙江理工大学生物化学研究所完成的，感谢生化所这个大家庭给予我学业和生活上的关心和支持。感谢陈健老师、吕正兵老师、于威老师、聂作明老师、张文平老师对我实验上的帮助，他们对实验室的管理及日常运作付出了心血；感谢盛清老师、王丹老师、王江老师、樊拥军老师、沈红丹老师、贺平安老师、贾晓渊老师、蒋彩英老师、宋力老师、王雪冬实验员、陈芳实验员及其他实验室工作人员的热心帮助，他们对我实验方法及技术上的支持与帮助令我难以忘记。特此感谢徐江涛、吴鹏、徐元力、倪忠、钱家伟、王学健、舒特俊、应飞祥、张杰、陈剑清、郑青亮、叶嘉良等各位同窗对我生活上的帮助和支持；大家的帮助使我顺利完成了论文，在此表示衷心感谢。

在外求学的几年中，我的家人在各个方面给予我无私的支持和鼓励，他们对我的支持与理解使我终生难忘，再次感谢他们的养育之恩。

最后，谨向参加本论文评阅和答辩委员会的全体专家致以最诚挚的谢意！

刘玉生
2006-12