

小鼠 TRIM59 蛋白多克隆抗体的制备、鉴定与初步应用

姜 飞^{1,2}, 刘小林¹, 李喜莲¹, Jim W Xuan²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 西安大略大学 生理与药理学系, 伦敦, 安大略 N6A5C1 加拿大)

[摘要] **【目的】**制备兔抗鼠三结构域蛋白 59(Tripartite motif-containing 59, TRIM59)多克隆抗体。**【方法】**利用 PCR 方法得到小鼠 TRIM59 基因片段, 将其克隆至 pGEX-2T 原核表达载体中, 转入大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达 GST-TRIM59 融合蛋白。GST-TRIM59 融合蛋白经亲和层析纯化浓缩后免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体, 通过 ELISA 测定兔抗鼠 TRIM59 多克隆抗体效价, 用 Western blot 测定其特异性。用免疫组织化学方法检测 TRIM59 在小鼠前列腺癌组织中的表达。**【结果】**成功构建了 pGEX-2T-TRIM59 原核表达重组质粒, 并诱导表达出 GST-TRIM59 融合蛋白, 免疫新西兰大白兔 5 周后获得多克隆抗体。ELISA 测定结果表明, TRIM59 多克隆抗体效价为 $1:10^6$ 以上; Western blot 分析表明, TRIM59 多克隆抗体具有良好的特异性。免疫组织化学检测发现, TRIM59 在小鼠前列腺癌组织细胞中高表达。**【结论】**成功地制备了特异性良好的兔抗鼠 TRIM59 多克隆抗体, 其具有良好的免疫学活性, 能够用于相关研究。

[关键词] TRIM59 基因; 多克隆抗体; 小鼠; 肿瘤

[中图分类号] Q785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)12-0011-06

Preparation, characterization and preliminary application of polyclonal antibodies against mouse TRIM59

JIANG Fei^{1,2}, LIU Xiao-lin¹, LI Xi-lian¹, JIM W Xuan²

(1 College of Animal Science and Technology, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Department of Physiology and Pharmacology,

the University of Western Ontario, London, Ontario N6A5C1, Canada)

Abstract: **【Objective】**The research prepared the high titer and specific rabbit anti-mouse antibody of TRIM59 (Tripartite motif-containing 59). **【Method】**The mouse TRIM59 gene was amplified by PCR. The target fragment digested by the enzyme was cloned into pGEX-2T, taking pGEX-2T-TRIM59 into BL21 for expression induced by IPTG. The expression product of TRIM59 was collected and purified. New Zealand's White rabbits were used to produce antiserum against GST-TRIM59 recombinant proteins. The titer and specificity of the anti-mouse TRIM59 polyclonal antibodies were detected by ELISA and Western blot. **【Result】**GST-TRIM59 fusion protein had been expressed successfully. 5 weeks after first injection, we got antiserum against GST-TRIM59 recombinant proteins from rabbit. The titer of the anti-serum was above $1:10^6$ by ELISA, this antibody specific detected TRIM59 protein by Western blot. TRIM59 expression

* [收稿日期] 2009-03-31

[基金项目] 国家高技术研究发展计划“863”项目(2008AA10Z144); 加拿大卫生研究院基金项目(CIHR MOP77684); 西北农林科技大学博士基金项目

[作者简介] 姜 飞(1981—), 男, 北京人, 在读博士, 主要从事转基因动物研究。E-mail: mar0ram@gmail.com

[通信作者] 刘小林(1961—), 男, 陕西城固人, 教授, 博士生导师, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

E-mail: liuxiaolin@nwsuaf.edu.cn

was high in prostate cancer cells by immunohistochemistry. 【Conclusion】 The rabbit anti-mouse TRIM59 polyclonal antibody is characterized with high titer and specificity, which is the foundation to study the characters and function of TRIM59.

Key words: TRIM59 gene; polyclonal antibody; mouse; tumor

三结构域蛋白(Tripartite motif, TRIM)家族是具有 3 个相似结构域(Tripartite motif)^[1]、家族成员众多的一类蛋白质。这 3 个相似结构域从 N 端到 C 端依次是锌指结构域(RING finger)、1 或 2 个 B-box、1 个卷曲螺旋(coiled-coil)结构域。在已经发现的 65 个人类 TRIM 家族基因和 64 个小鼠 TRIM 家族基因中^[2], TRIM 家族蛋白结构保守、进化快速,与细胞增殖、分化、发育等机体多种生理功能有关,如 RFP、TIF1 α 基因是原癌基因^[1,3], MID1 基因的突变会导致先天性的 Opitz 综合征^[4]等。

TRIM59 (Tripartite motif-containing 59)属于 TRIM 家族成员^[5],位于小鼠 3 号染色体。它具有典型的三结构域特征^[6]。近年来报道,TRIM 家族的成员在调节细胞凋亡、细胞周期及阻止病毒感染中起重要作用^[7-8],尤其是作为泛素化连接酶参与肿瘤的发生发展,成为 TRIM 家族蛋白功能研究的热点^[2,9-12]。在之前的研究中,加拿大西安大略大学泌尿外科实验室在利用基因芯片检测小鼠前列腺肿瘤中基因差异表达时发现,TRIM59 在转录水平高表达于前列腺肿瘤细胞中。目前,国内外尚未见有关 TRIM59 蛋白功能的研究报道。为了进一步研究 TRIM59 的作用机制,获得抗 TRIM59 特异性抗体无疑将为该蛋白的功能研究提供重要的试验基础。基于此,本研究对 TRIM59 蛋白进行原核表达、纯化,制备其多克隆抗体,并利用该抗体检测 TRIM59 在小鼠前列腺肿瘤组织中的表达,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、细胞和质粒 *E. coli* DH5 α 、BL21 菌株及质粒 pGEX-2T、pCMV-Myc、pCMV-Myc-TRIM59,细胞株 NIH3T3、293T,均由加拿大西安大略大学泌尿外科实验室保存。

1.1.2 试剂 *Taq* DNA 聚合酶, *Bam*H I、*Eco*R I 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Roche 公司。质粒提取试剂盒、弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司。Glutathione-Sepharose 4B 小颗粒和 Protein A Sepharose 购自 GE 公

司。Lipofectamine2000 购自 Invitrogene 公司。其他试剂均购自 CALBIOCHEM 公司。

1.1.3 试验动物 KIMAP 转基因前列腺癌模型小鼠^[13-15],由加拿大西安大略大学泌尿外科实验室构建;雄性新西兰大耳白兔(体质量 2.5~3.0 kg),由加拿大西安大略大学动物中心提供(ACVS, UWO, CA)。

1.2 重组质粒的构建

1.2.1 引物设计与合成 由于 TRIM 蛋白的结构相似性,为了获得特异性针对 TRIM59 有反应原性的抗体,本研究特别选取了 TRIM59 编码第 277~403 位的 C 末端 126 位氨基酸(cDNA 序列的 961~1 338 位碱基)作为抗原区设计引物:

P1 (5'-GGGTTGGATCCCCTCGAGTAAGC-AATGTA-3'),

P2 (5'-GGGAAGGATCCTCAACGAGAAA-CTATTTTC-3')。

引物由 Invitrogene 公司合成。

1.2.2 TRIM59 基因片段的 PCR 扩增 以 TRIM59 cDNA (Invitrogene cDNA clone MGC: 29290)为模板,以 P1、P2 为引物扩增 TRIM59 的 961~1 338 位碱基的基因片断,反应体系 50 μ L, PCR 扩增所用酶为 *Taq* DNA 聚合酶。克隆所用 PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 次循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 重组质粒 pGEX-2T-TRIM59 的构建 将经 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的 PCR 产物,插入到同样用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切的 pGEX-2T 载体中,即得重组质粒 pGEX-2T-TRIM59(图 1)。重组质粒经载体上的通用引物测序。

1.3 谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)融合蛋白的诱导表达及纯化

将重组质粒 pGEX-2T-TRIM59 转化到 *E. coli* BL21 中,37 $^{\circ}$ C 振荡过夜,再按体积分数 2%接种量转接,30 $^{\circ}$ C 培养 6 h 后,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,20 $^{\circ}$ C 诱导培养过夜(12 h)。收集上述诱导菌,用 Glutathione-Sepharose 4B 小颗粒纯化 GST 融合蛋白,按 GE 公司提供的方法进行:按体积比 10:1

加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、0.3 mmol/L DTT、10 mL/L NP-40 及蛋白酶抑制剂),超声破碎,10 000 g/min 离心收集上清液,加入适量 Glutathione-Sepharose 4B 小颗粒,结合 3 h。再收集 Glutathione-Sepharose 4B 小颗粒,用细胞裂解液充分洗去未结合蛋白质后,即得到结合有 GST-TRIM59 融合蛋白的 Glutathione-Sepharose 4B 小颗粒。

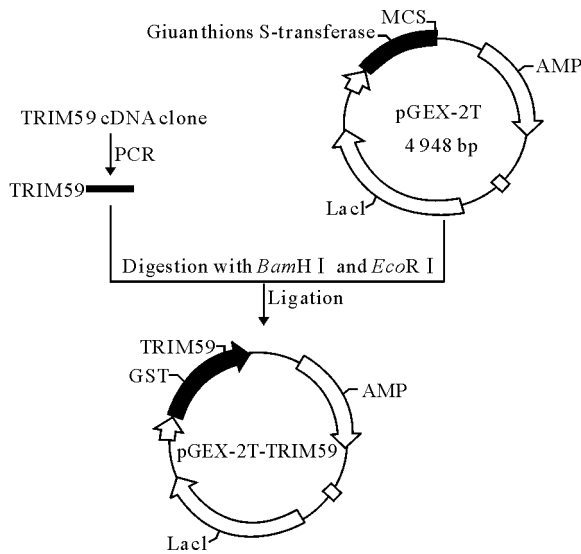


图 1 重组质粒 pGEX-2T-TRIM59 构建示意图

Fig.1 Schematic representation of the expression plasmid pGEX-2T-TRIM59

1.4 TRIM59 多克隆抗体的制备

将纯化后的融合蛋白 GST-TRIM59 与弗氏完全佐剂按体积比 1 : 1 混匀后,皮下多点注射新西兰大耳白兔。初次免疫后,每 10 d 使用弗氏不完全佐剂加强免疫 1 次,共 3 次。末次免疫后第 10 天采血,分离血清,−70 °C 保存。

1.5 TRIM59 抗血清的纯化

在 3 mL 兔血清中加入 300 mL 的 1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)进行稀释,与 1 mL Protein A Sepharose(10 mmol/L 的 pH8.0 Tris-HCl 平衡)结合 1 h,然后利用 10 mL 的 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0)进行洗涤,洗涤后用 2 mL 的 50 mmol/L Gly-HCl(pH3.0)洗脱。洗脱下来的样品再用 1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)中和,调 pH 值至 7.4。将中和后的洗脱样品用 Millipore 蛋白纯化柱进行离心除盐并浓缩,最后−70 °C 保存。

1.6 TRIM59 抗血清效价的检测

将纯化后的 GST-TRIM59 融合蛋白(100

ng/孔)包被酶联板,分别以不同稀释倍数的免疫前兔血清和免疫后兔血清作为一抗,用间接 ELISA 法测定多克隆抗体的效价。

1.7 TRIM59 多克隆抗体特异性的检测^[16]

在 24 孔细胞培养板中,用 Lipofectamine 2000 转染真核表达质粒 pCMV-Myc-TRIM59 0.8 μg 至 293T 细胞,瞬时表达融合蛋白 Myc-TRIM59。分别用纯化的 TRIM59 抗体(体积比 1 : 2 000)和 Myc 标签单抗(体积比 1 : 5 000)进行 Western blot 检测。以转染了空载体的细胞为阴性对照。

1.8 小鼠成纤维细胞中 TRIM59 表达的检测

收集生长良好的 1×10^7 的 NIH3T3 细胞,裂解(150 mmol/L NaCl,10 mmol/L NP40,10 mmol/L PMSF,10 mmol/L Cocktail),10 000 g、4 °C 离心 30 min 后,取上清。SDS 电泳进行 Western blot 检测。抗体为纯化后的兔抗鼠 TRIM59 抗体(体积比 1 : 2 000)。

1.9 小鼠前列腺组织中 TRIM59 表达的检测

选择经病理证实的 KIMAP 小鼠前列腺癌组织标本和正常的小鼠前列腺组织样本,利用纯化后的兔抗鼠 TRIM59 抗体(体积比 1 : 1 000)作为一抗,ABC 法免疫组织化学检测。

2 结果与分析

2.1 小鼠 TRIM59 基因片段的克隆和重组质粒 pGEX-2T-TRIM59 的构建

以 P1、P2 为引物,PCR 扩增获得 1 条约 380 bp 的条带(图 2),与目的片段长度相近。PCR 产物插入 pGEX-2T 载体,转化菌质粒用 BamHI 和 EcoRI 酶切下约 380 bp 的片段(图 2)。DNA 序列分析表明,质粒为 TRIM59 基因的克隆,序列与 GenBank 报道的小鼠 TRIM59 序列完全一致。

2.2 GST-TRIM59 融合蛋白在大肠杆菌中的表达与纯化

将重组质粒 pGEX-2T-TRIM59 转化到 *E. coli* BL21 中,转化菌经 IPTG 诱导后进行聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,结果(图 3)表明,与阴性对照 BL21 相比,转化 pGEX-2T-TRIM59 的 BL21 特异地表达了分子质量约为 45 ku 的预期蛋白,说明 GST-TRIM59 融合蛋白表达获得成功。*E. coli* 经低温诱导表达后,获得了大量的可溶性 GST-TRIM59 融合蛋白(图 3)。这些可溶性蛋白经 Glutathione-Sepharose 4B 小颗粒亲和层析后,GST-TRIM59 融合蛋白为单一的蛋白条带。

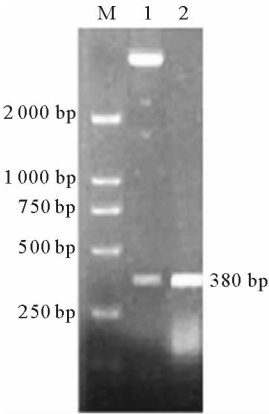


图 2 TRIM59 PCR 产物和重组质粒 pGEX-2T-TRIM59 的酶切鉴定
M. DNA 分子量标样;1. 酶切后的重组质粒;
2. TRIM59 PCR 产物

Fig. 2 Digestion analysis of the recombinant plasmid pGEX-2T-TRIM59, PCR product of TRIM59
M. DNA Marker;1. Digest fragment of the recombinant plasmid;2. PCR product of TRIM59

2.3 TRIM59 多克隆抗体的检测

2.3.1 GST-TRIM59 融合蛋白血清抗体效价的评价
将重组蛋白 GST-TRIM59 作为抗原,用间接 ELISA 法测定多抗效价。结果(图 4)表明,TRIM59 多克隆抗体的效价在 $1:10^6$ 以上($P/N \geq 2.1$ 为有效, P 为免疫血清的 OD_{490} 值, N 为阴性对照的 OD_{490} 值)。

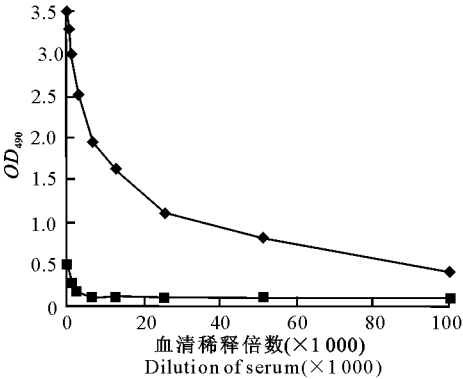


图 4 GST-TRIM59 融合蛋白血清抗体效价的间接 ELISA 法检测结果
—■—. 阴性对照;—◆—. 免疫血清

Fig. 4 Determination of GST-TRIM59 fusion protein antibody titer by ELISA
—■—. Negative control;—◆—. The immune serum

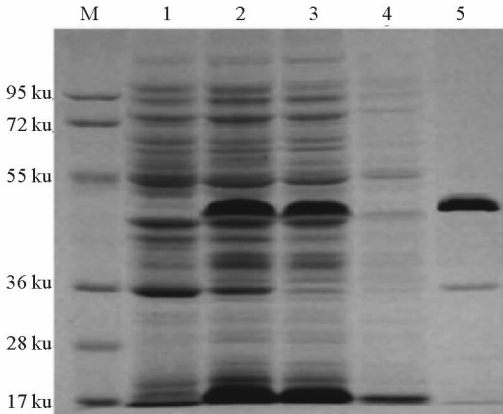


图 3 融合蛋白 GST-TRIM59 的 SDS-PAGE 分析
M. 蛋白分子量标样;1. BL21 空菌;2. 经 IPTG 诱导转化 pGEX-2T-TRIM59 的 BL21 表达的总蛋白;3. 低温诱导表达的可溶性蛋白;4. 未与 Glutathione-Sepharose 4B 结合的蛋白;5. 纯化的 GST-TRIM59 融合蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE of GST-TRIM59 fusion protein
M. Protein Marker;1. BL21(—);2. pGEX-2T-TRIM59 in BL21 with IPTG induction;3. Soluble protein extracts with low temperature;4. Protein uncombined with Glutathione-Sepharose 4B;5. Purified GST-TRIM59

2.3.2 GST-TRIM59 融合蛋白抗体的特异性 结果显示,与 Myc 标签抗体相同,利用纯化后 TRIM59 多克隆抗体同样可以在 Myc-TRIM59 蛋白处检测到特异条带(图 5),表明获得的 TRIM59 多抗特异性较好。

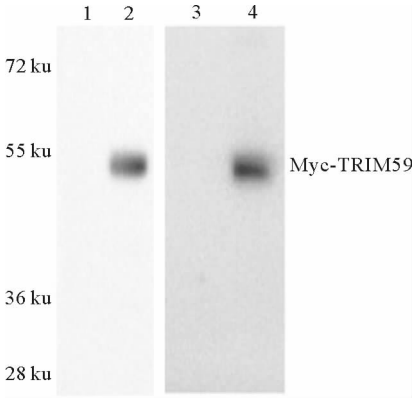


图 5 TRIM59 抗体特异性的 Western blot 检测结果
1,3. 转染 pCMV-Myc 空载体的 293T 细胞;2,4. 转染 pCMV-Myc-TRIM59 的 293T 细胞;1,2. 一抗为 Myc 抗体;
3,4. 一抗为 TRIM59 抗体

Fig. 5 High-specificity of TRIM59 polyclonal antibody by Western blot

1,3. pCMV-Myc transiently expressed in 293T cells(—);
2,4. pCMV-Myc-TRIM59 transiently expressed in 293T cells(+);1,2. Myc antibody for first antibody;
3,4. TRIM59 antibody for first antibody

2.4 TRIM59 在小鼠成纤维细胞中的表达

为了进一步检测 TRIM59 抗体的特异性,提取小鼠 NIH3T3 细胞总蛋白,进行 SDS-PAGE,纯化后的 TRIM59 抗体进行 Western blot 检测分析,结果表明,在分子质量为 55 ku 左右的位置出现了预期的特异性条带,其他位置未出现杂带(图 6),说明制备的 TRIM59 多克隆抗体特异性良好,未与其他鼠内源性蛋白发生交叉反应。

2.5 TRIM59 在小鼠前列腺癌组织中的表达

免疫组织化学检测结果显示,在正常的小鼠前列腺组织细胞中几乎未见到 TRIM59 的表达(图 7 A),但是在前列腺癌组织细胞中 TRIM59 表达量非常高(图 7 B 小鼠前列腺癌组织)。

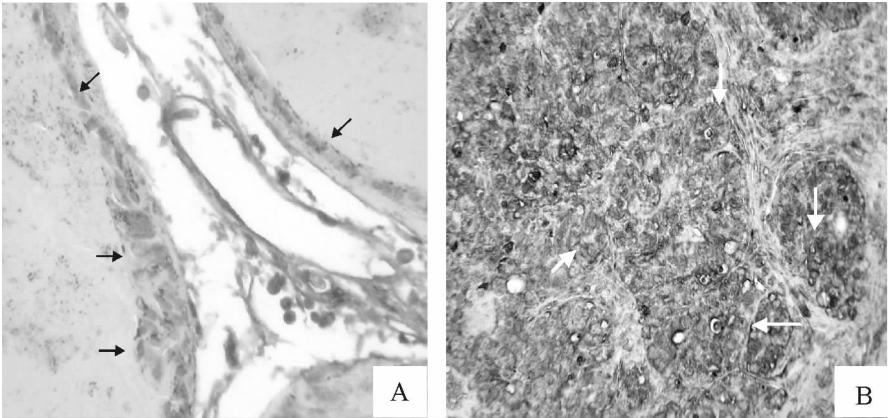


图 7 TRIM59 在小鼠前列腺癌组织中的表达
A. 正常小鼠前列腺组织,→示正常前列腺细胞;B. 小鼠前列腺癌组织,→示前列腺癌细胞
Fig. 7 Expression of TRIM59 in mouse prostate cancer tissue

A. Normal mouse prostate tissue,→normal prostate cell;B. Mouse prostate cancer tissue,→prostate cancer cell

3 讨 论

Meroni 等^[17]研究表明,TRIM 家族蛋白是一类锌指泛素连接酶 E3,其通过 B-box 和卷曲螺旋结构域与底物结合,由 RING 结构域招募 E2 结合酶与底物接近而发挥作用。Wei 等^[18]发现,TRIM59 可以与 IFT80 转录水平融合形成 IFT80 亚型(isoform)IFT80-L 复合物,而 IFT 蛋白作为一类 WD40 蛋白,对细胞的增殖分化有着重要的作用^[19-21]。

在抗原-抗体相互作用基础上发展起来的一系列技术,在蛋白质的检测和功能研究中都有着广泛的应用,制备高效价的抗体是研究基因表达和功能的重要工具。考虑到 TRIM 家族蛋白的 3 个相似结构域(Ring finger、B-box、coiled-coil)均集中在序列的 N 端^[12]。为了防止与家族内其他 TRIM 蛋白

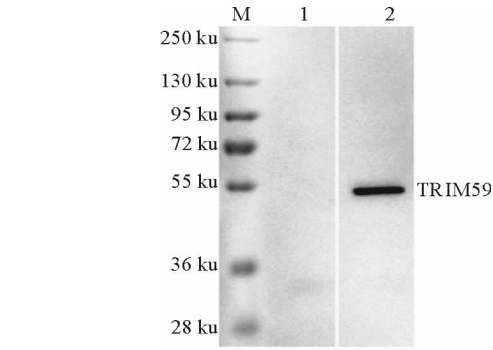


图 6 Western blot 检测 TRIM59 在 NIH3T3 细胞中的表达
M. 蛋白分子量标样;1. 一抗为免疫前血清;
2. 一抗为纯化的 TRIM59 抗体
Fig. 6 TRIM59 expression in NIH3T3 by Western blot
M. Protein Marker;1. Pre-immune serum for first antibody;
2. Purified TRIM59 antibody for first antibody

发生交叉反应,获得特异性针对 TRIM59 有反应原性的抗体,本研究特别选取了 TRIM59 编码第 277~403 位的 C 末端 126 位氨基酸(cDNA 序列的 961~1 338 位碱基)作为抗原区进行克隆。

制备高效价的多克隆抗体需要高纯度的抗原蛋白。通过原核表达重组蛋白可以很快得到大量的抗原蛋白,而且操作简便。本研究中采用大肠杆菌原核表达载体 pGEX-2T 进行表达,该表达载体带有分子质量约为 29 ku 的 GST 多肽序列标签,使融合蛋白便于检测和纯化,同时可防止表达蛋白被宿主菌降解;融合表达还可增大蛋白质分子量以增强免疫原性。细菌在表达外源性蛋白质的过程中,容易在细胞内凝集,形成包涵体。包涵体中的重组蛋白由于缺乏生物学活性,不能做为免疫原蛋白使用。包涵体的形成,大多数情况下是宿主菌短时间表达

外源性蛋白量过大造成的^[22]。在利用大肠杆菌原核表达 GST-TRIM59 融合蛋白的过程中,本试验特别将 IPTG 浓度由常规的 0.3 mmol/L 调整为 0.1 mmol/L,温度降低至 20 ℃,诱导时间延长至 12 h,这样可以保证宿主菌在表达外源蛋白时,单位时间内控制表达速度,防止出现包涵体,另外较低温度也可以防止表达后外源蛋白的降解。

为了确认所得抗体的特异性,本试验将已构建好的带有 Myc 标签的 TRIM59 真核表达载体(pC-MV-Myc-TRIM59)转染哺乳动物 293T 细胞,使其在哺乳动物细胞中表达,利用抗 Myc 抗体和自制的抗 TRIM59 抗体进行比较鉴定。Western blot 特异性检测结果表明,TRIM59 抗体对 TRIM59 蛋白具有良好的特异性。另外,Western blot 检测鼠成纤维细胞中 TRIM59 蛋白的表达,获得了单一蛋白条带,也进一步说明了本研究中获得的多克隆抗体可特异性识别 TRIM59 蛋白。将获得的 TRIM59 多克隆抗体用于免疫组织化学的研究发现,在小鼠前列腺癌组织中,TRIM59 明显呈阳性表达,细胞核与细胞质中均有大量分布,而在正常前列腺组织中未见到 TRIM59 阳性表达。结果揭示,TRIM59 与小鼠前列腺癌的发展进程有某种联系,可能参与肿瘤细胞的生长调控,但其机制还需进一步的研究来确认。

4 结 论

本研究利用原核表达体系表达了小鼠 GST-TRIM59 融合蛋白,成功地制备并获得了兔抗鼠 TRIM59 蛋白的多克隆抗体,经鉴定具有良好的免疫学活性,能够用于相关研究,为今后深入研究 TRIM59 的表达分布、细胞内定位及与其他蛋白质间相互作用奠定了良好的基础。

[参考文献]

- [1] Ledouarin B, Nielsen A L, Garnier J M, et al. A possible involvement of TIF1 alpha and TIF1 beta in the epigenetic control of transcription by nuclear receptors [J]. EMBO J, 1996, 15(23): 6701-6715.
- [2] Nisole S, Stoye J P, Saib A. Trim family proteins: Retroviral restriction and antiviral defence [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(10): 799-808.
- [3] Shimono Y, Murakami H, Hasegawa Y, et al. RET finger protein is a transcriptional repressor and interacts with enhancer of polycomb that has dual transcriptional functions [J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39411-39419.
- [4] Quaderi N A, Schweiger S, Gaudenz K, et al. Opitz G/BBB syn-

drome, a defect of midline development, is due to mutations in a new RING finger gene on Xp22 [J]. Nature Genetics, 1997, 17(3): 285-291.

- [5] Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, et al. The tripartite motif family identifies cell compartments [J]. EMBO J, 2001, 20(9): 2140-2151.
- [6] Ozato K, Shin D M, Chang T H, et al. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity [J]. Nature Reviews Immunology, 2008, 8(11): 849-860.
- [7] Stremlau M, Owens C M, Perron M J, et al. The cytoplasmic body component TRIM5 alpha restricts HIV-1 infection in old world monkeys [J]. Nature, 2004, 427(6977): 848-853.
- [8] Brass A L, Dykxhoorn D M, Benita Y, et al. Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen [J]. Science, 2008, 319(5865): 921-926.
- [9] Horn E J, Albor A, Liu Y G, et al. RING protein Trim32 associated with skin carcinogenesis has anti-apoptotic and E3-ubiquitin ligase properties [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(2): 157-167.
- [10] Urano T, Saito T, Tsukui T, et al. Efp targets 14-3-3 sigma for proteolysis and promotes breast tumour growth [J]. Nature, 2002, 417(6891): 871-875.
- [11] Dupont S, Zacchigna L, Cordenonsi M, et al. Germ-layer specification and control of cell growth by ectoderm, a Smad4 ubiquitin ligase [J]. Cell, 2005, 121(1): 87-99.
- [12] Sabile A, Meyer A M, Wirbelauer C, et al. Regulation of p27 degradation and S-phase progression by Ro52 RING finger protein [J]. Molecular and Cellular Biology, 2006, 26(16): 5994-6004.
- [13] Duan W M, Gabril M Y, Moussa M, et al. Knockin of SV40 Tag oncogene in a mouse adenocarcinoma of the prostate model demonstrates advantageous features over the transgenic model [J]. Oncogene, 2005, 24(9): 1510-1524.
- [14] Gabril M Y, Onita T, Ji P G, et al. Prostate targeting: PSP94 gene promoter/enhancer region directed prostate tissue-specific expression in a transgenic mouse prostate cancer model [J]. Gene Therapy, 2002, 9(23): 1589-1599.
- [15] Gabril M Y, Duan W, Wu G, et al. A novel knock-in prostate cancer model demonstrates biology similar to that of human prostate cancer and suitable for preclinical studies [J]. Molecular Therapy, 2005, 11(3): 348-362.
- [16] 张莹莹, 朱恒奇, 赵莉霞, 等. 小鼠泛素结合酶 UBE2W 的抗体制备及组织表达谱分析 [J]. 生物工程学报, 2008, 24(4): 547-552.
Zhang Y Y, Zhu H Q, Zhao L X, et al. Generation of mouse UBE2W antibody and analysis of UBE2W expression in mouse tissues [J]. Chin J Biotech, 2008, 24(4): 547-552. (in Chinese)
- [17] Meroni G, Diez-Roux G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases [J]. Bioessays, 2005, 27(11): 1147-1157.