

Zhangfei 融合蛋白的纯化及其免疫效果

张 鸯¹, 史 薇¹, 靳亚平¹, 路保通², 翁伟平¹, 郭廷伟¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 农业部家畜生殖内分泌与胚胎工程重点开放实验室, 陕西 杨凌 712100;

2 宝鸡市畜牧兽医中心, 陕西 宝鸡 721001)

[摘 要] **【目的】**纯化 Zhangfei 融合蛋白并检测其免疫原性, 为研究其在生殖内分泌调节中的作用提供理论依据。**【方法】**通过大肠杆菌原核表达系统进行 Zhangfei 融合蛋白的表达, 筛选出最佳诱导表达条件, 采用 SDS-PAGE 凝胶检测 Zhangfei 融合蛋白的表达情况, 比较谷胱甘肽琼脂糖凝胶和电洗脱 2 种纯化 Zhangfei 融合蛋白的方法, 并测定纯化的 Zhangfei 融合蛋白免疫 Balb/c 小鼠和家兔的效果。**【结果】**成功筛选出了表达 Zhangfei 融合蛋白的最佳诱导条件为 IPTG 终浓度 3 mmol/L, 诱导时间 7 h; 应用电洗脱方法可得到纯度较高的 Zhangfei 融合蛋白, 其质量浓度为 1.269 mg/mL, 免疫小鼠的血清抗体效价达 $1:5\times10^3$ 以上, 免疫兔的血清抗体效价高达 $1:3\times10^6$ 。**【结论】**电洗脱纯化 Zhangfei 融合蛋白的方法优于谷胱甘肽琼脂糖凝胶纯化法, Zhangfei 融合蛋白具有良好的免疫原性。

[关键词] Zhangfei; 融合蛋白; 诱导表达; 电洗脱; 谷胱甘肽琼脂糖凝胶; 抗体效价

[中图分类号] S852.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)10-0007-07

Purification and immunifaction of Zhangfei Fusion Protein

ZHANG Yang¹, SHI Wei¹, JIN Ya-ping¹, LU Bao-tong²,
WENG Wei-ping¹, GUO Ting-wei¹

(1 Key Laboratory of Animal Reproductive Endocrinology and Embryo Biotechnology, Ministry of Agriculture,

College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Animal Husbandry and Veterinary Center, Baoji, Shaanxi 721001, China)

Abstract: **【Objective】** The study purified Zhangfei Fusion Protein and detected the immunogenicity of Zhangfei Fusion Protein to offer theoretical basis for researching its regulations in geno-endocrine secretion. **【Method】** Zhangfei Fusion Protein was expressed in the prokaryotic expression in *E. coli* to find the best way of expressing Zhangfei Fusion Protein. SDS-PAGE was used to detect Zhangfei Fusion Protein expression. The protein was separated by Glutathione Sepharose 4B and electroeluting and its immunifaction was detected. **【Result】** The best way of expressing Zhangfei Fusion Protein in *E. coli* BL21: the final concentration of IPTG was 3 mmol/L, the time 7 h. Highly pure Zhangfei Fusion Protein was obtained by electroeluting. Valence of antibody in mouse and rabbit reached up to $1:5\times10^3$ and $1:3\times10^6$. **【Conclusion】** Electroeluting to depurate Zhangfei Fusion Protein was better than Glutathione Sepharose 4B. Zhangfei Fusion Protein had a better immunogenicity.

Key words: Zhangfei; Fusion Protein; induced expression; electroeluting; Glutathione Sepharose 4B; valence of antibody

* [收稿日期] 2007-10-22
[基金项目] 国家自然科学基金项目(39970544); 西北农林科技大学青年骨干教师支持计划项目(01140305)
[作者简介] 张 鸯(1982—), 女, 河南开封人, 在读硕士, 主要从事兽医产科病理研究。E-mail: yuanyanglulu99@yahoo. com. cn
[通讯作者] 靳亚平(1966—), 男, 陕西宝鸡人, 教授, 博士生导师, 主要从事家畜生殖内分泌研究。E-mail: yapingjin@163. com

内质网(endoplasmic reticulum, ER)是哺乳细胞中一种重要的亚细胞器,也是真核细胞中蛋白质翻译合成和细胞内钙离子的储存场所,对细胞应激反应起调节作用。在正常情况下,ER 有极强的内稳态体系,但仍然有很多因素可导致其功能的内稳态失衡,形成内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)^[1]。ERS 是指由于某种原因使细胞内质网生理功能发生紊乱的一种亚细胞器病理过程,其可由多种原因引起,如缺氧、饥饿、钙离子平衡失调、自由基侵袭及药物等。这些刺激引起从内质网到胞浆和胞核的信号传导,最终导致对细胞存活的适应或凋亡。许多疾病的发病机制都与 ERS 引起的凋亡有关,一般是用未折叠蛋白来提示内质网发生了应激反应。蛋白在内质网腔形成空间结构由许多分子伴侣蛋白协助,非折叠蛋白在内质网沉积,信号通过内质网膜传入胞核和胞浆,效应蛋白上调编码 Bip/Grp78 和 Grp94 等内质网伴侣蛋白基因转录,并广泛减少蛋白翻译,以利于内质网蛋白折叠形成,减少非折叠蛋白在内质网的沉积和聚集,使细胞能够耐受及生存,这一针对内质网应激的反应称为非折叠蛋白反应(unfolded protein reaction, UPR)。一些肿瘤细胞中也存在 UPR^[2]。近年来的研究表明,UPR 在胚胎发育、人类疾病等生理和病理过程中具有重要意义^[3]。

Zhangfei、Luman 等亮氨酸拉链蛋白家族成员也参与内质网应激。Zhangfei 蛋白是在 ERS 和 UPR 过程中参与调节的转录因子之一,其分子质量为 28.9 ku,是一种碱性亮氨酸拉链蛋白。Gregory 等^[4]研究表明,Zhangfei 蛋白是激活转录因子 4(activating transcription factor-4, ATF4)的一种新型细胞结合伴侣,其通过碱性亮氨酸区域与 ATF4 结合形成 ATF4-ZF 聚合物,还可增强 ATF4 与 cAMP(Cyclic Adenosine onophosphate)应答元件的结合;研究还证实,Zhangfei 与 ATF4 是通过它们的碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)C-端区域相互作用的。另有研究表明^[5-6],Zhangfei 蛋白能特异地抑制宿主细胞因子(Host cell factor, HCF)与转录因子 Luman 的结合,HCF 在单纯疱疹病毒的即刻早期基因(Immediate-early gene, IEG)转录激活中是必需的;在病毒感染的细胞中,尽管 Zhangfei 蛋白不能阻断单纯疱疹病毒 IEG 启动子的转录激活,但能阻断单纯疱疹病毒的几个位点表达;突变的 Zhangfei 蛋白不能与宿主细胞因子结合,且不能阻止病毒 IEG 蛋白的表达^[7]。由此推

断,Zhangfei 蛋白对其他蛋白的合成调节有影响。Zhangfei 是否通过对应激的调节而参与内分泌的调节,其对激素的合成分泌是否有影响,尚未见相关研究报道。

目前,国内对 Zhangfei 蛋白的研究很少,对其结构功能尚不十分清楚,国外主要在分子水平上研究 Zhangfei 转录因子和其他转录因子之间的作用^[8],在生殖内分泌领域对 Zhangfei 蛋白的研究很少,目前也未见有关研究报道。为此,本研究对 Zhangfei 蛋白进行了诱导表达、纯化,并对其免疫原性进行了检测,以期研究 Zhangfei 蛋白在生殖内分泌调节中的作用提供基础理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 分子质量为 28 ku 的标签蛋白 GST, *E. coli*-BL21(以下记为 BL21),已转化表达 Zhangfei 蛋白基因(含表达标签蛋白 GST 的基因)的 *E. coli*-BL21(以下记为 ZF-BL21),均由加拿大 Guelph 大学细胞与分子生物学实验室 RayLU 教授提供。

1.1.2 试验动物 6~8 周龄健康 Balb/c 小鼠,购自第四军医大学实验动物中心;健康家兔,购自陕西杨凌区养殖户。

1.1.3 主要试剂 标准蛋白分子量、谷胱甘肽琼脂糖凝胶、溶菌酶、丙烯酰胺、Tris、十二烷基硫酸钠、IPTG(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, 异丙基- β -D 硫代半乳糖苷)、酵母、DDT(Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane, 二氯二苯三氯乙)、考马斯亮蓝 G-250、标准牛血清白蛋白等,均购自北京鼎国生物技术有限责任公司。

1.1.4 主要仪器 超声波细胞破碎仪,购自美国 Sonics & Material Inc;紫外分析仪,购自上海精科实业有限公司。

1.1.5 主要溶液的配制 细胞裂解液:50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),0.5 mol/L NaCl,10 mmol/L EDTA,1% Triton X-100;洗涤液 I:0.5% Triton X-100,10 mmol/L EDTA(pH8.0)溶于细胞裂解液;缓冲液 I:0.1 mmol/L PMSF(Phenylmethanesulfonyl fluoride, 苯甲基磺酰氟),8 mol/L 尿素,10 mmol/L DTT 溶于细胞裂解液;谷胱甘肽洗脱液:10 mmol/L 还原性谷胱甘肽,50 mmol/L Tris-HCl(pH8.0)。

1.2 Zhangfei 融合蛋白表达条件的筛选

1.2.1 诱导时间和诱导浓度的筛选 将 ZF-BL21

在 LB/Amp 平板上培养过夜,挑出单个菌落,接种于 20 mL LB/Amp 培养基上,37 ℃ 摇床培养过夜。分别取培养过夜的菌液 5 mL 接种于 4 组 50 mL 的 LB/Amp 培养液中,37 ℃ 摇床培养,在 OD₆₀₀ 值达到 0.5~0.8 时,其中 3 组分别加入 IPTG,使其终浓度分别为 1,2 和 3 mmol/L,剩余 1 组不加诱导剂,作为对照。同时设 BL21 阴性对照,分诱导和不诱导 2 组,继续于 37 ℃ 摇床培养。加入诱导剂后 2,3,4,5,6,7,8,9 h 分别取样 1.5 mL。样品于 4 ℃、4 000 r/min 离心 10 min,在沉淀细菌中分别加入 100 μL 冷的细胞裂解液和 40 μL 冷的溶菌酶(25 mg/mL),冰浴 30~60 min,再分别加入 140 μL 2×SDS 上样缓冲液,100 ℃ 水浴 5~10 min,迅速放置于 4 ℃ 冷水中降温,12 000 r/min 离心 15 min,进行 SDS-PAGE 凝胶检测,筛选出最佳的诱导时间和诱导浓度^[9-11]。

1.2.2 SDS-PAGE 凝胶检测方法 采用垂直式电泳槽装置,不连续缓冲系统进行电泳分析。按常规方法灌胶、处理样品、上样,上样量均为 20 μL,80~160 V 电泳 2~3 h。取胶,考马斯亮蓝染色后观察,照相^[12]。

1.3 Zhangfei 融合蛋白的纯化

1.3.1 谷胱甘肽琼脂糖凝胶纯化 按照上述筛选的最佳诱导条件培养 600 mL 菌液,4 000 r/min 离心 10 min,收集菌体,−80 ℃ 和常温反复冻融 5 次,在 60 脉冲间歇 3 s 条件下,对菌体超声破碎 10 min,12 000 r/min 离心 15 min,收集上清和沉淀。用 9 倍体积的洗涤液 I 悬浮沉淀,室温放置 5 min 后,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min。用缓冲液 I 溶解沉淀(约 0.1 g 湿菌裂解后的沉淀中加入 0.1 mL 缓冲液 I),室温放置 1 h;将溶解的液体装入透析袋中,分别在含尿素 7,6,5,4,3,2,1 mol/L 的缓冲液 I 和 PBS 中分步透析,将透析过的液体与适量的 50% 谷胱甘肽琼脂糖凝胶混匀,室温轻摇 30 min,去上清,用适量的冷 PBS 洗去未结合蛋白,沉淀中加入适量的谷胱甘肽洗脱液,室温轻摇 1 h,收集上清^[13-14]。以上过程中每一步均留样进行 SDS-PSGE 凝胶检查。

1.3.2 电洗脱纯化 按照 1.3.1 的方法处理菌体,沉淀直接进行 SDS-PAGE 电泳,凝胶染色脱色后,切取凝胶中的目的蛋白带放入透析袋,置于不含 SDS 的电泳缓冲液中,60~100 V 电泳 6~8 h,再反向电泳 2~4 h。收集透析袋中的液体,装入新的透析袋,在 PBS 中透析 48 h,PEG(8000)浓缩 12~24

h,取样进行 SDS-PAGE 凝胶检测,其余样品分装,−80 ℃ 保存^[15]。

1.4 Zhangfei 融合蛋白质量浓度的测定

1.4.1 标准曲线的制作 按照参考文献[16],采用考马斯亮蓝法测定蛋白质含量。以标准牛血清白蛋白为标准蛋白,用 0.15 mol/L NaCl 稀释为 10,20,30,40,50,60 μg/mL 6 个梯度,以不含标准牛血清白蛋白的 0.15 mol/L NaCl 为空白对照,依次加入考马斯亮蓝试剂 5 mL,摇匀,0.5 h 内在 595 nm 处比色,测 A_{595 nm} 值。以标准蛋白含量为横坐标,以 A_{595 nm} 为纵坐标,用生物统计学方法得出回归线性方程。

1.4.2 样品蛋白质含量的测定 取电洗脱纯化的融合蛋白浓缩液 0.05 mL,用 0.15 mol/L NaCl 稀释 20 倍后,加入考马斯亮蓝试剂 5 mL,摇匀,0.5 h 内在 595 nm 处比色,测其 A_{595 nm},利用回归方程求出样品蛋白质含量。

1.5 Zhangfei 融合蛋白免疫原性的测定

1.5.1 Balb/c 小鼠的免疫 取 6~8 周龄健康 Balb/c 小鼠 5 只,用电洗脱纯化的 Zhangfei 融合蛋白免疫,具体程序如下:1.5 mL 抗原(含 150 μg Zhangfei 融合蛋白)与等量福氏完全佐剂用微量混匀器充分搅拌混匀,使混合液呈乳化状态,每只 Balb/c 小鼠经背部或腹部多点皮下注射抗原 0.5 mL(含 25 μg Zhangfei 融合蛋白),2 周后改用福氏不完全佐剂,按照以上步骤进行加强免疫,共加强免疫 4 次,每次加强免疫后 1 周左右,断尾或眼眶采血,用间接 ELISA 法测定抗体效价^[17-18];另取 1 只小鼠不做任何处理,作为阴性对照,以酶标版空白孔进行调零。将被检血清 OD₄₅₀ 与阴性血清 OD₄₅₀ 之比大于 2(P/N>2)、且被检血清 OD₄₅₀>0.2、阴性血清 OD₄₅₀<0.2 的样品判为阳性。

1.5.2 家兔的免疫 取家兔 2 只,用电洗脱纯化的 Zhangfei 融合蛋白免疫,程序同 1.5.1,首免剂量为 200 μg/只,加强免疫剂量为 200 μg/只,共加强免疫 4 次。每次加强免疫后 1 周左右,股静脉采血,用间接 ELISA 法测定抗体效价。另取 1 只家兔不做任何处理,为阴性对照,以酶标版空白孔进行调零。判定方法同 1.5.1。

2 结果与分析

2.1 Zhangfei 融合蛋白最佳表达条件的确定

由图 1 可知,诱导的 ZF-BL21 在 56.9 ku 处有 1 条明显的蛋白条带,其分子质量与 Zhangfei 融合

蛋白分子质量相当,为 Zhangfei 融合蛋白;未诱导的 ZF-BL21 无明显的 Zhangfei 融合蛋白条带。诱导和未诱导的 BL21 在 56.9 ku 处均无明显的蛋白条带。

由图 2 可知,Zhangfei 融合蛋白在诱导 7 h 时表达量相对最高,图 1 显示,Zhangfei 融合蛋白在 IPTG 终浓度为 3 mmol/L 时表达量相对最高。表明在 37 ℃摇床培养条件下,Zhangfei 融合蛋白的最佳表达条件为:IPTG 终浓度为 3 mmol/L,诱导时间为 7 h。

2.2 Zhangfei 融合蛋白的纯化

2.2.1 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 由图 3 可见,谷胱甘肽琼脂糖凝胶纯化的目的蛋白条带的分子质量,与 Zhangfei 融合蛋白的分子质量相差很大,泳道中没有目的蛋白条带。

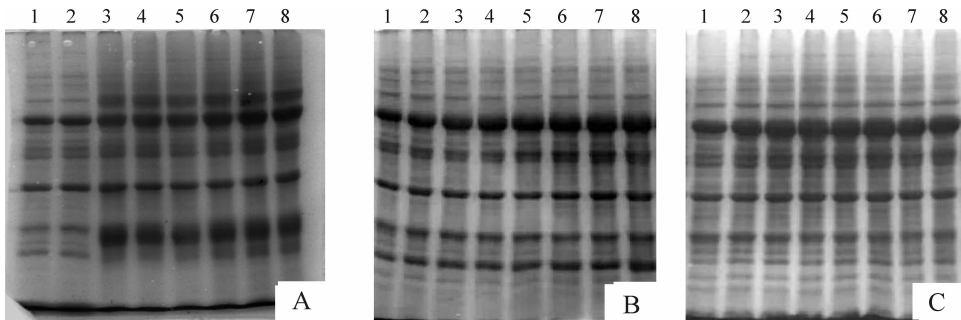


图 2 Zhangfei 融合蛋白在不同 IPTG 终浓度下的诱导表达结果

A. IPTG 终浓度为 1 mmol/L;B. IPTG 终浓度为 2 mmol/L;C. IPTG 终浓度为 3 mmol/L;1~8. 分别为诱导 2,3,4,5,6,7,8,9 h 的样品

Fig. 2 Expression of Zhangfei Fusion Protein in different final concentration of IPTG
A. Concentration of IPTG 1 mmol/L;B. Concentration of IPTG 2 mmol/L;C. Concentration of IPTG 3 mmol/L;
1—8. Sampling in 2,3,4,5,6,7,8,9 h after induced samples



图 3 谷胱甘肽琼脂糖凝胶纯化 Zhangfei 融合蛋白的 SDS-PAGE 结果

1. Zhangfei 融合蛋白;M. 标准蛋白分子量
Fig. 3 Purification of Zhangfei Fusion Protein by Glutathione Sepharose 4B in SDS-PAGE

1. Zhangfei Fusion Protein;M. St in Mol. Wt of Proteinum

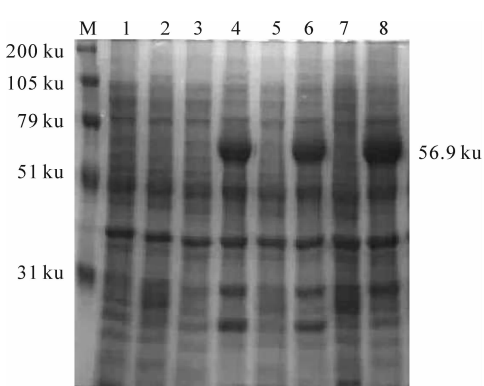


图 1 Zhangfei 融合蛋白的诱导表达结果

1. BL21 未诱导;2. BL21 诱导;3,5,7. ZF-BL21 未诱导;4,6,8. ZF-BL21 诱导 7 h(IPTG 分别为 1,2,3 mmol/L);M. 标准蛋白分子量

Fig. 1 Expression of Zhangfei Fusion Protein
1. Non-induced sample of BL21;2. Induced sample of BL21;
3,5,7. Non-induced sample of ZF-BL21;4,6,8. Induced sample of ZF-BL21(7 h,IPTG 1,2,3 mmol/L);M. St in Mol. Wt of proteinum

图 4 Zhangfei 融合蛋白电洗脱纯化的 SDS-PAGE 结果

1. 菌体处理后的沉淀;2. Zhangfei 融合蛋白;
3. 牛血清白蛋白;M. 标准蛋白分子量
Fig. 4 Purification of Zhangfei Fusion Protein by electroeluting in SDS-PAGE

1. Precipitation by treatment;2. Zhangfei Fusion Protein;
3. BSA;M. St in Mol. Wt of proteinum

2.2.2 电泳脱方法 由图 4 可以看出,在泳道 2 的 56.9 ku 处,有惟一的 1 条目的蛋白条带,该蛋白即为目的蛋白,用此方法可得到纯度较高的 Zhangfei 融合蛋白。

2.3 Zhangfei 融合蛋白质量浓度的测定结果

 Zhangfei 融合蛋白质量浓度测定结果见表 1。由生物统计学方法得出回归方程为:

$y=0.005\ 419\ x+0.033\ 667,$

表 1 Zhangfei 融合蛋白质量浓度的测定结果

Table 1 Result of concentration measurement of Zhangfei Fusion Protein

标准蛋白终质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) Final concentration of standardization of proteinum	0	10	20	30	40	50	60	样品 Sample
$A_{595\text{nm}}$	0	0.080 5	0.158 4	0.180 5	0.263 5	0.296 9	0.360 1	0.377 4

表 2 Zhangfei 融合蛋白免疫小鼠血清抗体效价的测定结果

Table 2 Result of determining valence of antibody in the mouse immuned by Zhangfei Fusion Protein

血清稀释倍数 Dilution of the serum	OD ₄₅₀					
	阴性对照 Negative control	1 号血样 Sample 1	2 号血样 Sample 2	3 号血样 Sample 3	4 号血样 Sample 4	5 号血样 Sample 5
1 : 10	0.143	0.552	0.485	0.532	0.762	0.855
1 : 1 000	0.098	0.558	0.590	0.567	0.677	0.811
1 : 3 000	0.093	0.356	0.341	0.258	0.430	0.547
1 : 5 000	0.106	0.265	0.322	0.301	0.352	0.455
1 : 5 000 时 P/N 值 Value of P/N at 1 : 5 000		2.524	3.067	2.867	3.352	4.333

2.4.2 免疫兔血清抗体效价 由图 5 可以看出,第 4 次加强免疫 7 d 后,在血清稀释 3×10^6 倍时,1 号

将样品 $y=0.377\ 4$ 代入回归方程,得 $x=63.431\ \mu\text{g}/\text{mL}$,由稀释倍数求得待测样品中 Zhangfei 融合蛋白的质量浓度为 $1.269\ \text{mg}/\text{mL}$ 。

2.4 Zhangfei 融合蛋白免疫原性的测定结果

2.4.1 免疫小鼠血清抗体效价 表 2 表明,第 4 次加强免疫小鼠后 7 d,免疫小鼠的血清抗体效价均达到 $1:5\times10^3$ 以上。

免疫兔的 $\text{P}/\text{N}=2.92$,2 号免疫兔的 $\text{P}/\text{N}=3.04$ 。由此得出,免疫兔的血清抗体效价高达 $1:3\times10^6$ 。

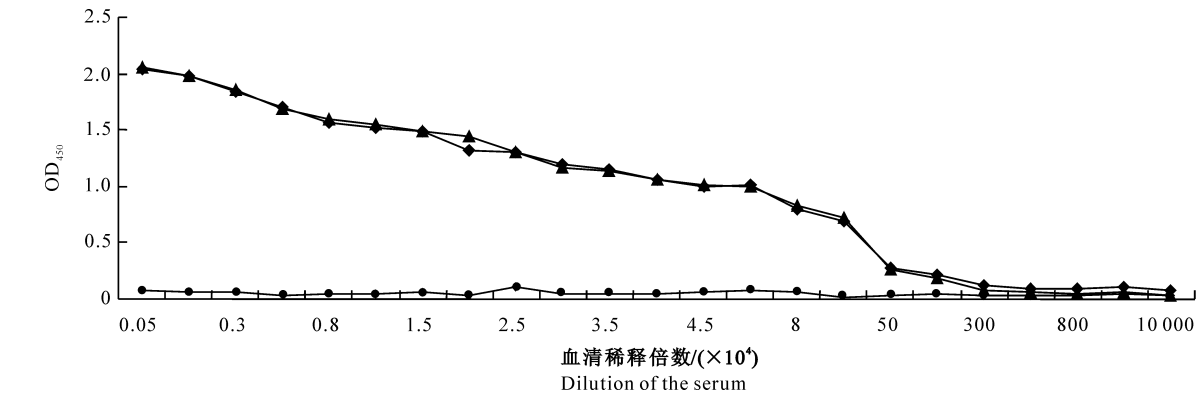


图 5 Zhangfei 融合蛋白免疫兔血清抗体效价的测定结果

Fig. 5 Result of determining valence of antibody in rabbit immuned by Zhangfei Fusion Protein

3 讨 论

3.1 Zhangfei 融合蛋白的原核表达

原核表达有 3 种方式:包涵体异源蛋白表达、分泌性表达和融合型异源蛋白表达,它在蛋白纯化、定位及功能分析等方面都有应用。大肠杆菌用于表达

重组蛋白有以下特点:易于生长和控制,用于细菌培养的材料不及哺乳动物细胞系统的昂贵。但是在大肠杆菌中表达的蛋白,由于缺少修饰和糖基化、磷酸化等翻译后加工,常形成包涵体,影响表达蛋白的生物学活性及构象^[19]。目前,多用降低培养温度再诱导的方法减少包涵体的形成。在 37 ℃ 培养条件

下,Zhangfei 融合蛋白在大肠杆菌原核表达系统中的表达量很高,大部分以包涵体的形式存在,给其纯化带来难度。

3.2 Zhangfei 融合蛋白的纯化

包涵体是指细菌表达的蛋白在细胞内凝集,形成无活性的固体颗粒。这是由于在重组蛋白的表达过程中缺乏某些蛋白质折叠的辅助因子,或环境不适,无法形成正确的次级键等原因形成的。包涵体中的重组蛋白缺乏生物学活性,加上剧烈的处理条件,使蛋白的高级结构破坏,因此重组蛋白的复性特别必要。当前多通过缓慢去除变性剂使目标蛋白从变性的完全伸展状态恢复到正常的折叠结构,同时去除还原剂使二硫键正常形成。一般在尿素浓度 4 mol/L 左右时复性过程开始,到 2 mol/L 左右时结束。复性是一个非常复杂的过程,除与蛋白质复性的过程控制相关外,在很大程度上还与蛋白质本身的性质有关,有些蛋白非常容易复性,如牛胰 RNA 酶,而有些蛋白至今没有发现能够对其进行复性的方法^[20]。Zhangfei 融合蛋白以包涵体的形式存在,纯化蛋白过程中涉及包涵体的溶解和蛋白的复性,但其复性的条件到目前还未知。与正常情况下相比,该蛋白与琼脂糖凝胶的结合力很弱,洗脱液不能将已结合的 Zhangfei 融合蛋白充分地洗脱下来,导致洗脱得到的目的蛋白的量较正常情况下少很多。此方法得到的目的蛋白很少且纯度很低。电洗脱方法纯化的目的蛋白在 SDS-PAGE 凝胶中有惟一的 1 条目的条带,纯化蛋白的量较谷胱甘肽琼脂糖凝胶纯化的量多。该方法纯化目的蛋白的纯度较高,所得蛋白为变性蛋白,说明电洗脱方法获得的 Zhangfei 融合蛋白能满足随后的试验要求,因此本试验选用此方法纯化蛋白。

3.3 Zhangfei 融合蛋白的免疫效果

Zhangfei 蛋白是一种碱性亮氨酸拉链蛋白,分子量为 28.9 ku,为完全抗原,有足够的免疫原性,电洗脱纯化的 Zhangfei 融合蛋白为变性蛋白,其生理功能虽已被破坏,但保留了其免疫原性,避免了该蛋白生理功能对免疫动物产生影响。Zhangfei 融合蛋白免疫的 Balb/c 小鼠和家兔均健康成长且获得良好的免疫效果,表明 Zhangfei 融合蛋白具有较强的免疫原性,这为后续工作奠定了基础。

[参考文献]

[1] 李 姣,申宗侯.内质网驻留的分子伴侣与内质网应激的细胞内信号传导途径 [J]. 中国药物与临床,2005,5(4):245-249.

Li J,Shen Z H. In the cell which the endosarc net in which keeps the molecularcompanion and the endosarc net should stir up the signal conductionway [J]. Chinese Remedies&Clinics, 2005,5(4):245-249. (in Chinese)

[2] 李明辉,刘 箭.未折叠蛋白应答与疾病的关系 [J].生命的化学,2006,26(1):48-52.

Li M H,Liu J. Relations of reply of unfolded protein and disease [J]. Biochemistry and Medicine, 2006,26(1):48-52. (in Chinese)

[3] 苏荣健,陈誉华,宋今丹.非折叠蛋白质应答对人胚肾细胞 293A 迁移特性的影响 [J]. 细胞生物学杂志,2003,25(6):380-385.

Su R J,Chen Y H,Song J D. Influence of unfolded protein reply to the person embryo kidney cell 293A migration characteristic [J]. Cytobiology Magazine,2003,25(6):380-385. (in Chinese)

[4] Gregory P C,Melissa R H,Heather F B,et al. Identification and characterization of the DNA-binding properties of a Zhangfei homologue in Japanese pufferfish, Takifugu rubripes [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006,339:1238-1245.

[5] Lu R,Misra V. Zhangfei: a second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16 [J]. Nucleic Acids Res,2000,28:2446-2454.

[6] DenBoer L M,Hardy-Smith P W,Hogan M R,et al. Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,331:113-119.

[7] Misra V,Rapin N,Akhova O,et al. Zhangfei is a potent and specific inhibitor of the host cell factorbinding transcription factor Luman [J]. The Journal of Biologocal Chemistry, 2005,280:15257-15266.

[8] Omori Y,Imai T,Watanabe M,et al. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box B element with a liver-specific expression [J]. Nucleic Acids Res,2001,29:2154-2162.

[9] 刘进元,常智杰,赵广荣,等.分子生物学试验指导 [M]. 北京:清华大学出版社,2002.

Liu J Y,Chang Z J,Zhao G R,et al. Molecular biology experiment instruction [M]. Beijing: Qinghua University Publishing House,2002. (in Chinese)

[10] 周俊宜. 分子生物学基本技能和策略 [M]. 北京:科学出版社,2003.

Zhou J Y. Molecular biology basic skill and strategy [M]. Beijing:Scientific Publishing House,2003. (in Chinese)

[11] 吴士良,周迎会,黄新祥.医学生物化学与分子生物学 [M]. 北京:科学出版社,2005.

Wu S L,Zhou Y H,Huang X X. Medicine biochemistry and molecular biology [M]. Beijing:Scientific Publishing House, 2003. (in Chinese)

[12] 周先碗,胡晓倩.生物化学仪器分析与试验技术 [M]. 北京:化学工业出版社,2003.

Zhou X W, Hu X Q. Biochemistry instrumental analysis and experimental technology [M]. Beijing: Chemical Industry Publishing House, 2003. (in Chinese)

[13] 郑 维. 汉英医学分子生物学试验方法 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2005.

Zheng W. Medicine molecular biology testing method in Chinese-English [M]. Beijing: Chinese Harmony Medical College Publishing House, 2005. (in Chinese)

[14] 黄培堂. 分子克隆试验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.

Huang P T. Cloning a laboratory manual [M]. 3th ed. Beijing: Scientific Publishing House, 2002. (in Chinese)

[15] 王镜岩, 朱圣庚. 生物化学 [M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 559-561.

Wang J Y, Zhu S G. Biochemistry [M]. 3 th ed. Beijing: Higher Education Press, 2002: 559-561. (in Chinese)

[16] 马学军. 精编分子生物学试验指南 [M]. 4 版. 北京: 科学出版社, 2005.

Ma X J. Molecular biology experiment guide in essence edits [M]. 4 th ed. Beijing: Scientific Publishing House, 2005. (in Chinese)

[17] 崔贞亮, 李红飞, 靳亚平, 等. LH 抗体间接 ELISA 检测方法的建立 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(3): 26-28.

Cui Z L, Li H F, Jin Y P, et al. Development of indirect ELISA for detecting LH antibody [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(3): 26-28. (in Chinese)

[18] 李 华, 俞建昆, 洪 超, 等. 残余牛血清蛋白 ELISA 检测方法的建立及其初步应用 [J]. 标记免疫分析与临床, 2005, 12(2): 107-109.

Li H, Yu J K, Hong C, et al. Development and primary application of ELISA method for detecting residual calf serum protein [J]. Labeled Immunoassays & Clin Med, 2005, 12(2): 107-109. (in Chinese)

[19] 王怀宇, 刘陕西, 郑 树, 等. 血小板生成素基因的克隆及在原核细胞的表达 [J]. 西安医科大学学报, 2000, 21(6): 509-511.

Wang H Y, Liu S X, Zheng S, et al. Cloning of human thrombopoietin and its expression in *E. coli* [J]. Journal of Xi'an Medical University, 2000, 21(6): 509-510. (in Chinese)

[20] 王中全, 逯 莉, 崔 晶, 等. 旋毛虫抗原基因 Ts21 的原核表达与重组蛋白鉴定 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2007, 25(6): 442-446.

Wang Z Q, Lu L, Cui J, et al. Prokaryotic expression of trichinella spiralis gene Ts21 and identification of the recombinant protein [J]. Chin J Parasitol Parasit Dis, 2007, 25(6): 442-446. (in Chinese)

欢迎订阅 2009 年《农产品加工·学刊》

《农产品加工·学刊》是由农业部农产品加工局重点支持的中国农产品加工业专业媒体,是中国科技核心期刊、中国期刊全文数据库全文收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计刊源期刊、中文科技期刊数据库收录期刊和科技部万方期刊数据库收录期刊。

《农产品加工·学刊》与中国技术市场协会、中国农学会农产品贮藏加工分会、中国农业工程学会农产品加工与贮藏分会、中国机械工程学会包装与食品工程分会、中国农业机械学会农副产品加工机械分会合办,以农产品加工的科研人员、大专院校教师、在读博士生和硕士生为主要读者群和作者群,以推进农产品加工业技术进步为己任,为从事农产品开发研究和推广应用的科研人员提供学术交流和成果转让平台。设有专题论述、试验研究、工艺探讨、分析测试、技术装备、应用推广、学科创新、行业资讯、互动平台等栏目。

《农产品加工·学刊》选材严谨,编排规范,出版及时,服务周到。欢迎从事农产品加工、食品加工及相关学科的科研、教学、情报和推广应用人员积极订阅,踊跃投稿。定价 8 元/册,全年 12 期共 96 元。邮发代号: 22-19,各地邮局均可订阅。

地址: 山西省太原市双塔东街 124 号闻汇大厦 B 座 2102 号
邮编: 030012
电话: 0351-4606085
E-mail: ncpjgxxk@163.com
联系人: 蒲晓鸥