

银鲫卵母细胞特异表达凝集素的抗体制备及其定位分析

王红莹^{1,2} 周 莉¹ 桂建芳¹

(1. 中国科学院水生生物研究所,淡水生态和生物技术国家重点实验室,武汉 430072;2. 中国科学院研究生院,北京 100049)

摘要:银鲫卵母细胞特异的凝集素(Gibel carp oocyte-specific lectin, COL)是经差减杂交筛选出来的。本研究采用原核表达方法,利用 Pinpoint-T 载体表达了该凝集素的部分肽段(从 22 到 214 个氨基酸),并经纯化用来免疫家兔制备多克隆抗体。采用免疫荧光共定位方法,证明该凝集素是卵母细胞中皮质颗粒的成分之一。

关键词: 银鲫;卵母细胞;凝集素;皮质颗粒

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)03-0295-06

凝集素是一种能够专一识别碳水化合物并可结合于细胞表面的糖蛋白^[1,2]。鱼类卵母细胞中含有丰富的多种类型的凝集素^[3]。依据先前对无脊椎动物和脊椎动物中凝集素的研究结果,Tateno, *et al.* 认为鱼类卵母细胞中的凝集素可能具有一系列的生物学功能,如阻止多精受精、调控碳水化合物代谢、与糖蛋白结合后参与受精壳的形成、识别病原并具有抗菌效应^[2]。因此,凝集素是鱼类卵母细胞中的重要组分,并且在鱼类卵母细胞中扮演重要角色。最近,一系列的不同类型的鱼类卵母细胞中的凝集素被纯化和鉴定出来,如鲤鱼(*Cyprinus carpio*)中的结合 N-乙酰葡萄糖胺的凝集素 FEL,银鲫(*Carassius auratus gibelio*)中的结合甘露糖的 C 型凝集素 GCOL 和长体油胡瓜鱼(*Osmerus lanceolatus*)中的 C 型凝集素 OLABL^[4-6]。

近年来,我们实验室运用抑制性差减 cDNA 文库的方法,构建了一系列的银鲫和彩鲫的不同组织和不同发育阶段的抑制性差减 cDNA 文库并筛选了一系列的差异表达的基因^[7-12]。CB102 是我们在银鲫和彩鲫卵母细胞的抑制性差减 cDNA 文库中筛选得到的基因,其氨基酸序列在银鲫和彩鲫中完全一样,且组织特异性 RT-PCR 检测发现 CB102 只在卵巢中转录^[13]。进一步通过同源比对和性质分析,表明 CB102 所编码的蛋白是在银鲫卵母细胞中特异的一种凝集素(Gibel carp oocyte-specific lectin, COL)。

本文在原来的基础上,采用原核表达 COL 部分肽段,制备了多克隆抗体,对 COL 蛋白在银鲫卵母细胞中的位置采用免疫组织化学的方法进行了定位分析,以期以后了解 COL 在鱼类卵母细胞中的功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 鱼类样品采集 银鲫(*Carassius auratus gibelio*)取自中国科学院水生生物研究所关桥试验基地。

1.2 GOL 的原核表达和纯化 从 GOL 基因的第 22 到 214 个氨基酸,设计了一对引物用于扩增该片段,5'引物(5'-GGGAATTCATATGAACTGTAACGTGGTGAAC-3')中含有 Nde 酶切位点和起始密码 ATG,3'引物(5'-TAGTTACAGGATCCTCACCGAGTGACACCAAT-3')含有 BamH 酶切位点和终止密码 TGA,两个引物的酶切位点之外均有 8 个保护碱基。将基因片段双酶切消化后,连接到同样双酶切消化的 pET15b 载体中,测序验证表达阅读框是否正确。用 Nco 和 BamH 双酶切重组的载体,切出的片段除了有 COL 的第 22 到 214 个氨基酸外,在 5'上游还有 pET15b 的长度为 20 个氨基酸的组氨酸标签。将此片段用 Taq 酶处理,补平粘端并在 DNA 双链的 3'末端各加上一个腺苷酸,连接到 PinPoint T 载体中,检测表达。然后采用亲和素-生物素亲和层析方法纯化 PinPoint T 载体表达的蛋白,免疫日本大耳白兔,制备出针对该蛋白的多克隆抗体。

收稿日期:2006-10-17;修订日期:2007-06-29

基金项目:国家重大基础研究计划 973 项目(2004CB117401)资助

作者简介:王红莹(1976—),女,河北保定市人;博士研究生;研究方向为鱼类发育遗传学。E-mail:hy_wang0806@yahoo.com.cn

通讯作者:桂建芳,E-mail:jfgui@ihb.ac.cn

1.3 冰冻切片的抗体荧光原位杂交 银鲫 期分 拣卵于 - 50 新鲜速冻包埋,或者经过如下步骤处 理:首先以 PBS (pH 7.0) 配制的 4 % 多聚甲醛 (Paraformaldehyde ,PFA) 固定过夜,然后换成 PBS (pH 7.0) ,4 储藏待用。切片前用 30 %蔗糖溶液渗透 3h,然后包埋于 O. C. T. 包埋剂 (Sakura) 中,冻实以 后,在冰冻切片机 (Leica) 上以 6 μ m 的厚度进行冰冻 切片。切片贴于多聚赖氨酸处理过的玻片上,做好 标记,在专用染缸中进行如下处理:首先以 PBS (pH 7.0) 配制的 4 % PFA 固定 30min ,3 \times PBS 洗涤三次 各 10min ,接着 1 \times PBS 洗涤两次各 10min ,然后以 30 %、50 %、75 %、95 %和两次 100 %乙醇逐级脱水 , 顺次放置于玻片盒中, - 80 存放。作杂交时,先在 4 下以 PBS 覆盖玻片 30min 来复水,用滤纸擦干 后,以含有 5 %脱脂奶粉的 PBS 封阻 1h,再与一抗杂 交液(含有稀释 1 %脱脂奶粉和 1/250 抗 GOL 兔血 清的 PBS 孵育 1h,在染缸中用 PBST 洗涤五次各 10min ,然后 PBS 洗涤两次各 5min ,接着以含有 10 % 正常羊血清的 PBS 封阻 1h,避光条件下再与二抗杂 交液 (PBS 1/100 稀释 FITC 标记的羊抗兔 IgG 二抗 孵育 1h ,PBS 洗涤五次各 10min ,在 Leica 激光共聚焦 显微镜下观察 FITC 的激发荧光分布并用 CCD 摄像 头拍照。

1.4 免疫荧光共定位 同上方法制备银鲫卵母细 胞的冰冻切片,所有的方法与冰冻切片的抗体荧光 原位杂交相似,不同在于一抗杂交液中加入终浓 度为 0.05 μ g/ mL 的生物素 (Biotin) 标记的特异性结 合皮质颗粒的凝集素 Lentil (Sigma) ,而二抗杂交液 中加入终浓度为 1/50 的能特异性结合生物素的 Cy3 标记链亲和素 avidin (Sigma) ,以使皮质颗粒带上红 色荧光。观察时,以蓝色激发光观察 FITC 的绿色荧 光,以绿色激发光观察 Cy3 的红色荧光。每次实验 中取相邻的切片做阴性对照。

2 结 果

2.1 GOL 部分肽段的表达及纯化

表达的融合蛋白 N 端应该是转羧基酶的肽段 (140 个氨基酸) ,紧接着是 20 个氨基酸的组氨酸标 签,之后是 GOL 的第 22 到第 214 个氨基酸,总共有 352 个氨基酸。如图 1A 所示,在 1、3、4、5 号克隆中 IPTG 诱导表达出一个大小约为 40kD 的蛋白,大小 与预期的相符。图 1B 是用碱性磷酸酶标记的亲 和素 (Av-AP) 检测,说明该融合蛋白上有生物素结 合,是 PinPoint T 载体表达出的蛋白。图 1C 是用 Av-AP 检测宿主菌经超声波破壁后的上清和沉淀,结果表 明该融合蛋白不可溶。

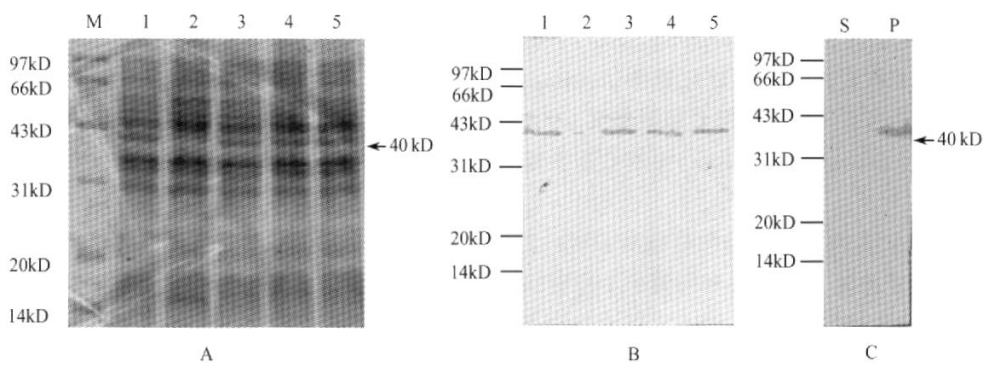


图 1 用 PinPoint T 载体表达 GOL 基因片段

Fig. 1 Expression of GOL fragment using PinPoint T vector

(A) 和 (B) 为分别用 SDS 蛋白电泳和 Av-AP 检测 1—5 号克隆是否有表达,箭头所指为表达出的 40kD 融合蛋白。(C) 将 1 号克隆的菌体破壁 后,用 Av-AP 检测融合蛋白不在上清 (S) 而是在沉淀 (P) 中

Expression detection of clones 1—5 was performed by SDS-PAGE electrophoresis (A) and by Av-AP assay (B). The arrow indicates the expressed fusion protein of about 40kD. (C) After disrupting the cell of clone 1, the supernatant (S) and pellet (P) were detected whether to have the fusion protein by Av-AP assay

于是在变性条件下 (6mol/L 盐酸胍) 用金属离子 亲和层析纯化该融合蛋白,将各管蛋白洗脱液透析到 8mol/L 尿素中,用 SDS 蛋白电泳和 Av-AP 检测 (图 2)。在电泳胶上除了 40kD 的融合蛋白外还有一些杂

带,而 Av-AP 检测结果表明只有 40kD 的融合蛋白上 结合了生物素。切胶纯化,得到的融合蛋白进行 PAGE 电泳检测纯度较好 (图 3A) ,然后免疫日本大白 兔制备抗 GOL 的多抗。经过 Western 印迹检测,可以

识别融合表达的成熟蛋白,有高度的特异性和效价(图 3B)。随后采用此抗体对分离的卵巢中的卵母细

胞进行 Western 印迹检测,目的蛋白分子量为 28kD,大小与预测的 COL 的分子量基本一致(图 4B)。

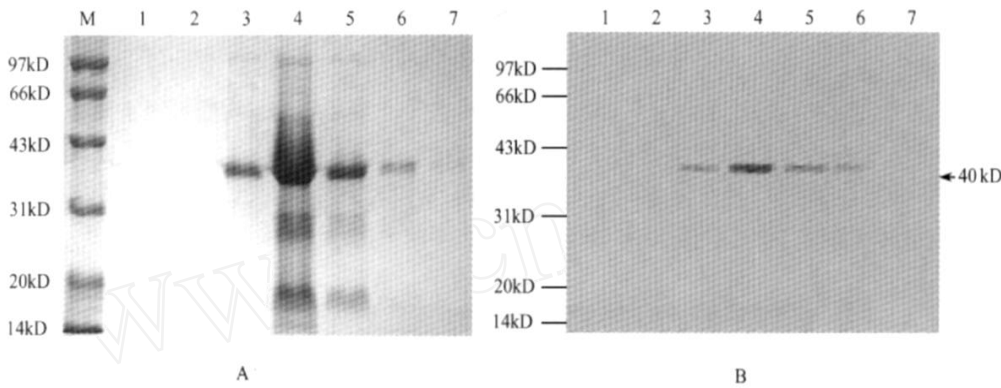


图 2 变性条件下纯化含有 COL 部分肽段的融合蛋白

Fig. 2 Purification of the COL fusion protein under denaturing conditions

(A) SDS 蛋白电泳检测第 1 至 7 管蛋白洗脱收集液;(B) Av-AP 检测第 1 至 7 管蛋白洗脱收集液。箭头所指的是表达出的 40kD 融合蛋白
The eluted proteins collected in the tubes 1 to 7 were detected by SDS-PAGE electrophoresis (A) and by Av-AP assay (B). The arrow indicates the expressed fusion protein of about 40kD

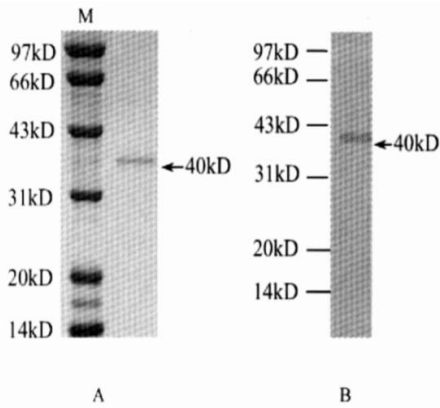


图 3 切胶纯化含有 COL 部分肽段的融合蛋白(A)和 Western blot 检测抗体特异性(B)

Fig. 3 Purification of the COL fusion protein (A) and detection of the antibody specificity by Western blot analysis (B)

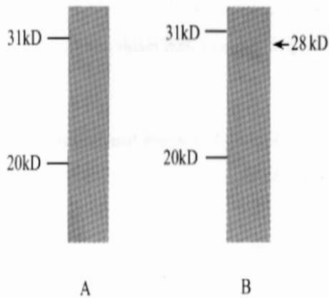


图 4 Western blot 检测 COL 在银鲫卵母细胞中的表达
Fig. 4 Detection of COL expression in gibel carp oocytes by Western blot analysis
A 为对照血清,B 为制备的抗 COL 的抗体血清
A :control sera ;B :anti- COL antibody

2.2 GOL 与皮质颗粒成分的共定位 采用生物素-Lentil/ Cy3-链亲合素和 COL 抗体/ FITC-羊抗兔抗体一起对银鲫卵母细胞进行免疫荧光共定位。如图 5 所示,生物素-Lentil/ CY3-链亲合素使银鲫卵母细胞中的皮质颗粒呈现红色荧光(图 5B);COL 抗体/ FITC-羊抗兔抗体使银鲫卵母细胞中的皮质颗粒呈现强烈的绿色荧光(图 5C);且 COL 定位的绿色荧光正好与皮质颗粒产生的红色荧光重叠形成黄色荧光(图 5D)。这种共定位结果揭示 COL 可能是皮质颗粒的一种成分。

3 讨 论

GOL 是我们在银鲫和彩鲫成熟卵母细胞的抑制性差减 cDNA 文库中筛选得到的基因,其氨基酸序列在银鲫和彩鲫中完全一样。GenBank 中进行同源搜索表明,银鲫和彩鲫中的 COL 和鲤鱼卵母细胞中特异的 FEL 凝集素有 85 % 同源性^[4]。接着经脱唾液酸胎球蛋白亲和层析并利用多种单糖洗脱纯化蛋白经过 N-末端氨基酸测序证明纯化的蛋白就是 COL 后,我们对 COL 进行了一系列的特征分析,包括对血细胞的凝集特性分析、单糖抑制分析和抗菌特性分析进一步证明 COL 就是银鲫卵母细胞中的一种凝集素。

凝集素已被证明是脊椎动物皮质颗粒的主要成分^[14-16]。比如爪蟾的皮质颗粒主要由葡萄糖胺酶和一种分子量为 43kD 的依赖于钙离子并与半

乳糖特异性结合的凝集素 XL-35 组成,其含量占到皮质颗粒所含蛋白的 70 %^[16,17]。并且在人、小鼠、七鳃鳗和虹鳟中也发现了其同源序列,所有与爪蟾皮质颗粒蛋白-XL-35 同源的蛋白被称为 X-lectin 家族^[18]。当精子进入卵子时,皮层颗粒会与卵膜发生结合,同时皮质颗粒内物质被释放到卵周隙。皮质颗粒中参与受精膜形成的重要成分为黏多糖。黏多糖可以产生渗透性梯度使水进入卵周隙,从而使卵壳向外隆起,形成受精膜,以阻止多

精受精。通过分别标记 COL 和皮质颗粒,采用共定位的实验方法,证明银鲫中的 COL 为皮质颗粒的成分之一。皮质颗粒在卵子受精过程中起重要作用,它参与阻止多精入卵和卵壳的硬化过程,皮质颗粒中的成分或多或少都与这两个方面的功能有关^[19]。卵子中的皮质颗粒很重要的一个功能就是在受精过程中参与受精膜的形成以阻止多精受精,所以对于 COL 是否参与了受精膜的形成以阻止多精受精无疑需要进一步研究。

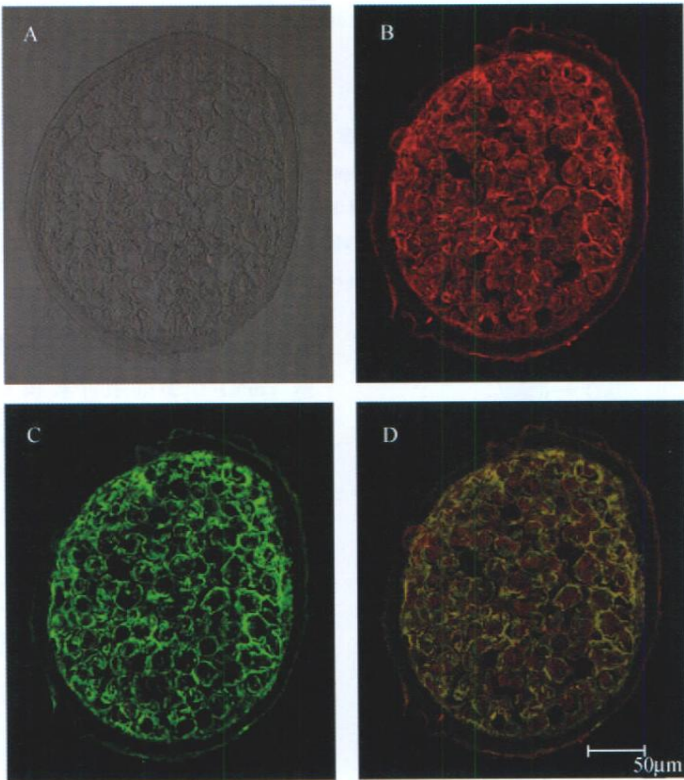


图5 银鲫 期卵子中 COL 和皮质颗粒的免疫荧光双标记检测

Fig. 5 Double fluorescence labeling of COL and cortical granule in eggs of gibel carp

(A) 是白光结果;(B) 是 100 倍显微镜下 Cy3 标记的皮质颗粒结果;(C) 是 100 倍显微镜下 FITC 标记的 COL 结果;(D) 是两种荧光染色重叠结果
(A) is the stained result with white light , (B) is the result of immunofluorescence localization of cortical granule under 100 ×microscope and (C) is the result of immunofluorescence localization of COL under 100 ×microscope. (D) Overlap of COL and cortical granule labeling

参考文献:

[1] Lis H, Sharon N. Lectins :carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition[J]. *Chemical Review* ,1998 ,**98** :637 —674

[2] Tateno H, Sancyoshi A, Muramoto K, *et al.* Isolation and characterization of rhamnose-binding lectins from eggs of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) homologous to low density lipoprotein receptor superfamily[J]. *Journal of Biological Chemistry* ,1998 ,**273** :19190 —19197

[3] Jung W, Park P, Kim S. Purification and characterization of a new lectin from the hard roe of skipjack tuna , *Katsuwonus pelamis*[J]. *International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* ,2003 ,**35** :255 —265

[4] Galliano M, Minchiotti L, Campagnoli M, *et al.* Structural and biochemical characterization of a new type of lectin isolated from carp eggs [J]. *Biochemical Journal* ,2003 ,**376** :433 —440

[5] Dong C, Yang S, Yang Z, *et al.* A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish [J]. *Developmental Biology* ,2004 ,**265** :341 —354

[6] Hsomo M, Sugawara S, Ogawa Y, *et al.* Purification ,characterization , cDNA cloning, and expression of asialofetuin-binding C-type lectin

- from eggs of shishamo smelt (*Osmerus [Spirinchus] lanceolatus*) [J]. *Biochemical et Biophysical Acta*, 2005, **1725**:160—173
- [7] Shi Y H, Liu J, Gui J F. Cloning and characterization of three myosin light chain cDNA from silver crucian carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(3):308—313 [石耀华, 刘军, 桂建芳. 银鲫 3 个肌球蛋白轻链基因 cDNA 的克隆与特征分析. 水生生物学报, 2003, **27**(3):308—313]
- [8] Liu J, Shi Y H, Yin J, et al. Cloning and characterization of full length cDNA of two genes related to protein biosynthesis in gynogenetic gibel carp [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27**(5):512—520 [刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 银鲫两个蛋白合成相关基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析. 水生生物学报, 2003, **27**(5):512—520]
- [9] Liu J, Shi Y H, Yin J, et al. Cloning and characterization of four full length cDNAs of hatching enzyme genes in gynogenetic gibel carp [J]. *High Technology Letters*, 2003, **13**(7):38—45 [刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 雌核发育银鲫四种孵化酶基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析. 高技术通讯, 2003, **13**(7):38—45]
- [10] Shi Y H, Liu J, Xia J H, et al. Cloning and expressional characterization of creatine kinase M32CK in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2003, **49**(5):637—645 [石耀华, 刘军, 夏建红, 等. 银鲫肌酸激酶 M3-CK cDNA 的克隆及其表达特征. 动物学报, 2003, **49**(5):637—645]
- [11] Liu J, Shi Y H, Yin J, et al. Screen of differentially expressed genes between gastrula embryos and tail bud embryos in gynogenetic gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, **32**(3):253—263 [刘军, 石耀华, 尹隽, 等. 雌核发育银鲫原肠期胚胎和尾芽期胚胎差异表达基因的呈现. 遗传学报, 2005, **32**(3):253—263]
- [12] Liu J X, Shi Y H, Gui J F. Screening of differentially expressed genes at gastrula stage during embryogenesis of *carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, **29**(4):359—365 [刘静霞, 石耀华, 桂建芳. 银鲫原肠胚差异表达基因的筛选. 水生生物学报, 2005, **29**(4):359—365]
- [13] Xie J, Wen J, Chen B, et al. Differential gene expression in fully-grown oocytes between gynogenetic and gonochoristic crucian carps [J]. *Gene*, 2001, **271**:109—116
- [14] Wyrick R, Nishihara T, Hedrick J. Agglutination of jelly coat and cortical granule components and the block of polyspermy in the amphibian *Xenopus laevis* [J]. *Proceedings National Academy of Science, USA*, 1974, **71**:2067—2071
- [15] Krajhanzl K. Egg lectins of invertebrates and lower vertebrates: properties and biological function [J]. *Advances of Lectin Research*, 1990, **3**:83—131
- [16] Quill T, Hedrick J. The fertilization layer mediated block to polyspermy in *Xenopus laevis*: isolation of the cortical granule lectin ligand [J]. *Archive of Biochemistry and Biophysics*, 1996, **333**:326—332
- [17] Grey R, Wolf D, Hedrick J. Formation and structure of the fertilization envelope in *Xenopus laevis* [J]. *Developmental Biology*, 1974, **36**:44—61
- [18] Lee J, Baum L, Moremen K, et al. The X-lectins: A new family with homology to the *Xenopus laevis* oocyte lectin XL-35 [J]. *Glycoconjugate Journal*, 2004, **21**:443—450
- [19] Wessel G, Brooks J, Green E, et al. The biology of cortical granules [J]. *International Reviews of Cytology*, 2001, **209**:117—206

POLYCLONAL ANTIBODY PREPARATION AND IMMUNOFLOURESCENCE LOCALIZATION OF GIBEL CARP OOCYTE-SPECIFIC LECTIN

WANG Hong-Ying^{1,2}, ZHOU Li¹ and GUI Jian-Fang¹

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan Center for Developmental Biology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

Abstract Lectins were defined as proteins that recognize specific carbohydrate structures and agglutinate cells by binding to cell surface glycoproteins and glycoconjugates. Many kinds of different lectins have been purified from fish eggs. Lectins may have a variety of biological function in fish eggs, such as block of polyspermy, regulation of carbohydrates metabolism, participation in the formation of fertilization envelope after binding with glycoproteins, antibacterial effect and opsonization of pathogens. Therefore, lectins are important components in oocytes and play important roles. Cortical granules were as a kind of secretory vesicles that unique to oocyte. They are synthesized and accumulated during oogenesis, translocated to the cell surface before fertilization and exocytosed after fertilization. Cortical granule contents have diverse components, such as proteases and lectins, and play important roles in egg fertilization and early embryogenesis.

Gibel carp oocyte-specific lectin (GOL) had been previously screened from

subtractive hybridization cDNA libraries in fully-grown oocytes between gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) and color crucian carp (*Carassius auratus*). In this study, A pair of primers (5'-GGGAATTCATATGAACTGTACGTGGTGAAC-3' including *Nde* sites and start codon ATG, 5'-TAGTTACAGGATCCTCAGCGAGTGACACCAGT-3' including *Bam*H sites and stop codon TGA) were used to amplify the cDNA fragment encoding for 21—214 amino acids (193 aa) and the amplified product was subcloned between the *Nde* and *Bam*H sites of pET-15b vector. The recombinant vector was digested with *Nco* and *Bam*H. And then the digested fragment was blunted, added A by Taq polymerase, ligated into PinPoint T expression vector (Promega). An about 40 kDa fusion protein was expressed in BL21 (DE3). The fusion protein was purified, treated and used to prepare polyclonal antibody by immunizing white rabbit. Furthermore, cortical granules were labeled by *Lens culinaris* agglutinin biotin and Cy3-streptavidin fluorescence for co-location analysis with GOL. Double immunofluorescence localization indicated that the GOL localized in oocytes and fluorescence of GOL was overlapped with that of cortical granules. The data suggested that the lectin should be a component of cortical granules in fish oocytes. As the major components in vertebrate cortical granules, one of the major functions of the components in cortical granule is to construct or modify the existing oocyte extracellular matrix to serve barriers to block additional sperm into oocyte. Hence, in the future, it was worth to study whether CB102 involved in the formation of egg envelopment to block polyspermy.

Key words : *Carassius auratus gibelio* ; Oocyte ; Lectin ; Cortical granules