

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00713

中华绒螯蟹和罗氏沼虾 cyclin B 蛋白的原核表达、 抗体制备及其鉴定

冯海洋, 邱高峰

上海海洋大学 农业部水产种质资源与利用重点开放实验室; 上海高校水产养殖学 E-研究院, 上海 201306

摘要: 从中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)卵巢 cDNA 中克隆了 cyclin B 基因的开放阅读框, 分别连接到 pGEX-2T 和 pET-32a 表达载体, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导表达重组蛋白 GST-EsCB 和 Trx-MrCB。通过优化培养温度、IPTG 浓度以及诱导时间, 得出重组蛋白的最佳表达条件分别为: 0.1 mmol/L IPTG、37℃、4 h 和 0.1 mmol/L IPTG、30℃、6 h。重组蛋白主要以包涵体形式存在。亲和层析纯化重组蛋白, 作为抗原免疫家兔, 制备 GST-EsCB 和 Trx-MrCB 多克隆抗体。ELISA 检测抗体效价均高达 1 80 000, Western blot 鉴定该抗体能特异性识别重组蛋白, 而且均能够从卵巢总蛋白中检测到 cyclin B 蛋白。在中华绒螯蟹未成熟卵巢中 cyclin B 蛋白出现 2 种亚型, 在罗氏沼虾未成熟卵巢中只有 1 种亚型, 推测虾和蟹 cyclin B 蛋白调控卵母细胞成熟的分子机制不同。本研究制备了 cyclin B 抗体, 旨在蛋白水平研究 cyclin B 在卵母细胞成熟过程中的作用机制提供基础条件。

关键词: 中华绒螯蟹; 罗氏沼虾; cyclin B 多克隆抗体; 原核表达; 卵母细胞成熟

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0713-07

成熟促进因子(maturation-promoting factor, MPF), 又名细胞分裂中期促进因子(M-phase-promoting factor), 是动物卵母细胞最终成熟的关键调控因素。MPF 由催化亚基 Cdc2 和调控亚基 cyclin B 组成, 它在真核生物细胞周期的 G2/M 期转变过程中发挥着广泛的调控作用, 其中, 调控亚基 cyclin B 是 Cdc2 活化并发挥其激酶活性所必须的^[1-2]。

在两栖动物、鱼类和哺乳动物卵母细胞成熟过程中, MPF 形成和活化的分子机制呈现一定程度的种属特异性^[3]。爪蟾(*Xenopus laevis*)未成熟的卵母细胞含有充足的无活性 cyclin B-Cdc2 复合物(pre-MPF), pre-MPF 的活化对于启动卵母细胞减数分裂成熟、促使生发泡破裂是必须的, 无须合

成其他蛋白质^[4-5]。在海星(*Asterina pectinifera*)^[6]、老鼠(*Mus musculus*)^[7]和牛(*Bos taurus*)^[8]的未成熟卵母细胞中也存在 pre-MPF。相反, 金鱼(*Carassius auratus*)未成熟的卵母细胞中仅含有 Cdc2 单体, 不存在 cyclin B 蛋白。只有在卵母细胞成熟时, 由于 17 α , 20 β -羟孕酮的诱导, 存储在卵母细胞中的 cyclin B mRNA 开始翻译成 cyclin B 蛋白, 后者与已经存在的 Cdc2 结合, 形成活化的 MPF, 促使生发泡破裂^[9]。相似的机制在青蛙(*Rana japonica*)^[10]和斑马鱼(*Danio rerio*)^[11]中也有报道。在甲壳动物卵母细胞成熟过程中, cyclin B 是如何发挥其调控作用的至今尚不清楚。

本研究组之前克隆了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenber-*

收稿日期: 2010-06-10; 修订日期: 2010-08-11。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972242); 上海市科委重点科研项目(09391911100); 上海市教育委员会海洋生物学重点学科建设项目(J50701)。

作者简介: 冯海洋(1984-), 男, 硕士, 主要从事虾蟹分子遗传与繁殖生物学研究。E-mail: hyfeng@live.cn

通讯作者: 邱高峰, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 水产动物分子遗传与繁殖、基因组学。E-mail: gfqiu@shou.edu.cn

gii)cyclin B 基因全长 cDNA 序列^[12-13], 并在 mRNA 水平分析了 cyclin B 基因在卵子发生过程中的表达情况, 表明了 cyclin B 基因可能与卵原细胞增殖和卵母细胞减数分裂成熟存在密切关系。本研究在此基础上构建了 cyclin B 蛋白原核表达质粒, 并在大肠杆菌中得到高效表达, 纯化获得了大量目的蛋白并制备了兔抗 cyclin B 抗体, 为研究甲壳动物卵母细胞最终成熟的分子机制提供了条件。

1 材料与方法

1.1 材料

中华绒螯蟹和罗氏沼虾购自当地的水产市场。大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 DH5 α 、BL21(DE3)购自上海天根生化科技公司。原核表达载体 pGEX-2T 和 pET32a 购自北京鼎国生物技

术公司。新西兰大白兔, 体质量 2.5 kg 左右, 购自第二军医大学实验动物中心。鼠源 antiHis 单抗和辣根酶标记羊抗鼠/羊抗兔 IgG 二抗购自武汉博士德生物工程公司。其他常规生化试剂均购自 Takara。

1.2 方法

1.2.1 cyclin B 基因的扩增和原核表达载体的构建

使用 Trizol Reagent(Invitrogen)提取中华绒螯蟹和罗氏沼虾卵巢总 RNA, 经 DNase 处理后, 按照 Takara first strand cDNA synthesis kit 说明书进行反转录, 获取的 cDNA 作为模板, 扩增 cyclin B 基因。根据本实验室已克隆到的中华绒螯蟹和罗氏沼虾 cyclin B 基因全长 cDNA 序列, 利用 Primer 5 软件设计特异性引物(表 1), 扩增中华绒螯蟹 cyclin B(EsCB)ORF 的 C 端和罗氏沼虾 cyclin B(MrCB)ORF 的全长。

表 1 用于原核表达载体构建的引物序列
Tab. 1 Primers used for construction of prokaryotic expression vectors

引物名称 primer	引物序列(5'—3') sequence(5'—3')
EsCB F	CGGGATCCATGCGTGCCATCCTTGTCGAC
EsCB R	CGCGAATTCTCA ATGGTGATGGTGATGATG CGAGAAAGAGGCGCTTCT
MrCB F	CGGGATCCATGGCAACTCGGACATCTACT
MrCB R	CGCGAATTCT TTATTATGTCAGAGAGCCCTTCTC

注: *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点用下划线标出, 下游引物的终止密码子用粗体字标出, 6 $\times$ His-tag 用方框标出。
Note: *Bam*H I and *Eco*R I restriction sites are marked by underline; the stop codon is in bold, and 6 $\times$ His-tag is in box.

反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s、58 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 cycle-pure kit(OMEGA)纯化后, 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切处理。酶切片段分别与线性化质粒 pGEX-2T 和 pET32a 连接并转化 *E. coli* 感受态细胞 DH5 α 。使用菌落 PCR 方法筛选阳性克隆, 并使用 GenEluteTM plasmid Miniprep Kit(Sigma)提取重组质粒。重组质粒经双酶切和测序鉴定, 确定插入序列正确。

1.2.2 工程菌的诱导表达及表达条件优化 重组质粒转化 *E. coli* 感受态细胞 BL21, 涂布 LB 固体平板(含氨苄青霉素 60 μ g/mL), 挑取单个菌落, 接种于 5 mL LB 液体培养基(含氨苄青霉素 60 μ g/mL)中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。次日按 1 : 100 的比例扩

大培养, 至 OD₆₀₀ 介于 0.4~0.6, 加入 IPTG 诱导表达, 同时设置未诱导的工程菌作为阴性对照。

IPTG 诱导浓度设计 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 4 个梯度, 在 30 $^{\circ}$ C 和 37 $^{\circ}$ C 下诱导, 于 2~6 h 收集菌体检测, 确定最佳诱导剂浓度、诱导温度和诱导时间。大量诱导表达的菌体经离心收集(5 000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min), 1 $\times$ PBS 重悬菌体后在冰浴中超声破碎(超声时间 4 s, 间歇时间 4 s, 保护温度 24 $^{\circ}$ C, 总时间 60 次)。12 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min, 分别取等量的上清和含 8 mol/L 尿素的 1 $\times$ PBS 重悬后溶解的沉淀进行 SDS-PAGE 分析(5%浓缩胶, 12%分离胶), 经考马斯亮蓝 R250 染色 1~2 h, 过夜脱色后观察结果。

1.2.3 重组蛋白的纯化及定量分析 使用 Magne

GST™ Protein Purification System(Promega)纯化重组蛋白 GST-EsCB, 使用 His-Select Spin Column (Sigma)纯化重组蛋白 Trx-MrCB。

使用 Quantity One(Bio-Rad)软件分析 SDS-PAGE 电泳条带, 使用 Bradford 定量试剂盒 (Biocolor)对纯化的重组蛋白进行定量分析。得出目的蛋白的相对浓度, 粗略计算出重组蛋白的产量。

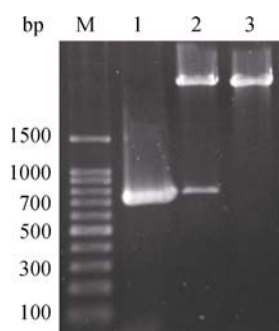


图1 重组质粒 pGEX-EsCB 双酶切鉴定

M: DNA marker; 1: EsCB 基因 PCR 产物; 2: pGEX-EsCB 双酶切; 3: pGEX-2T 双酶切。

Fig. 1 Identification of recombinant plasmid pGEX-EsCB by double-digestion

M: DNA marker; 1: PCR product of EsCB; 2: double-digested pGEX-EsCB; 3: double-digested pGEX-2T.

1.2.4 多克隆抗体的制备及检测 选取 3 只成年健康雄性新西兰大白兔, 耳缘静脉取血, 采集免疫前正常血清, 作为阴性对照。将纯化的重组蛋白约 0.3 mg 与等体积弗氏完全佐剂混匀成乳剂, 进行背部多点皮下注射。此后分别在第 12、28、44 天加强免疫, 加强免疫时采用等量的抗原和等体积弗氏不完全佐剂乳化。最后一次加强免疫 8 d 后, 处死采血, 分离血清。抗血清经 ELISA 分析以测定其效价, 经 Western blot 分析以检测其特异性。并使用抗血清检测内源 cyclin B 蛋白。

Western blot: 重组蛋白或卵巢总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 用 ATTO 半干转印槽将目的蛋白转移到 NC 膜(PALL)上。用含有 10%小牛血清的 TTBS 缓冲液室温封闭 1 h 后, 依次用 cyclin B 抗血清为一抗、HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 对其进行 western blot 分析, 使用 DAB 显色液或 ECL 法检测(Boster)。

2 结果与分析

2.1 目的基因的 PCR 扩增及原核表达载体的构建

以中华绒螯蟹和罗氏沼虾卵巢 cDNA 为模板, 使用特异性引物 PCR 扩增中华绒螯蟹 cyclin B (EsCB)ORF 的 C 端和罗氏沼虾 cyclin B (MrCB) ORF 的全长。其中 EsCB R 在终止密码子前面加入 6×His-tag, 方便了使用 His 标签抗体检测重组蛋白。PCR 产物在 720 bp (EsCB)和 1 230 bp (MrCB) 处有目的条带, 与预期结果相符。分别将其克隆至原核表达载体 pGEX-2T 和 pET32a 中, 构建重组质粒。经 *Bam*H 和 *Eco*R 双酶切鉴定, 结果显示在 720 bp 和 1 230 bp 处有目的条带(图 1, 图 2)。测序结果同预期的完全一致, 表明重组质粒构建成功。将重组质粒分别命名为 pGEX-EsCB 和 pET32a-MrCB。

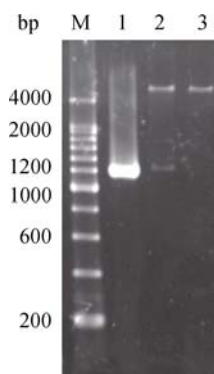


图2 重组质粒 pET32a-MrCB 双酶切鉴定

M: DNA marker; 1: MrCB 基因 PCR 产物; 2: pET32a-MrCB 双酶切; 3: pET32a 双酶切。

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pET32a-MrCB by double-digestion

M: DNA marker; 1: PCR product of MrCB; 2: double-digested pET32a-MrCB; 3: double-digested pET32a.

2.2 Cyclin B 重组蛋白在大肠杆菌中的表达及表达条件优化

收集的工程菌经超声破碎, 分离上清和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳分析。与未经诱导的工程菌相比, 经过 IPTG 诱导后, 菌体蛋白沉淀泳道分别在 50 kD 和 63 kD 处出现 1 条明显加粗的条带, 大小与预测的重组蛋白分子量相近($M_{rGST-EsCB} \approx 50$ kD, $M_{rTrx-MrCB} \approx 63$ kD), 而上清泳道则无相应的条带, 表明重组蛋白主要以包涵体形式存

在。含有空质粒的工程菌经过 IPTG 诱导后, 菌体蛋白上清泳道出现一条明显加粗的条带, 与表达质粒上的融合蛋白大小相近($M_{rGST} \approx 26.3$ kD, $M_{rTRX} \approx 20.4$ kD)详见图 3, 图 4。

在 30℃ 和 37℃ 条件下, 使用终浓度 1.0 mmol/L IPTG 诱导, 发现温度对重组蛋白的表达具有一定影响。GST-EsCB 重组蛋白在 37℃ 的表达量明显高于在 30℃ 的表达量(图 5a), Trx-MrCB 重组蛋白在 30℃ 的表达量略高于在 37℃ 的表达量(图 6a)。

在最佳培养温度的条件下, 使用终浓度 0.1 ~ 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 发现不同浓度的 IPTG

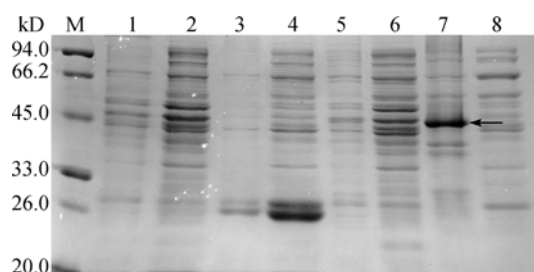


图 3 GST-EsCB 重组蛋白的表达分析

M: 蛋白分子量标准; 1-2: pGEX-2T 未诱导裂解后沉淀和上清; 3-4: pGEX-2T 诱导裂解后沉淀和上清; 5-6: pGEX-EsCB 未诱导裂解后沉淀和上清; 7-8: pGEX-EsCB 诱导裂解后沉淀和上清; 箭头示目的蛋白。

Fig. 3 Expression analysis of recombinant protein GST-EsCB
M: protein marker; 1-2: precipitation and supernatant of uninduced pGEX-2T; 3-4: precipitation and supernatant of induced pGEX-2T; 5-6: precipitation and supernatant of uninduced pGEX-EsCB; 7-8: precipitation and supernatant of induced pGEX-EsCB; arrow indicates target protein.

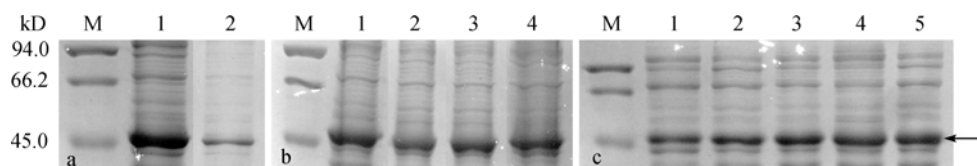


图 5 GST-EsCB 重组蛋白诱导表达条件优化

- a. 优化诱导温度(1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h); 1: 37℃; 2: 30℃.
b. 优化 IPTG 浓度(37℃诱导 4 h); 1: 0.1 mmol/L; 2: 0.2 mmol/L; 3: 0.5 mmol/L; 4: 1.0 mmol/L.
c. 优化诱导时间(37℃ 0.1 mmol/L IPTG); 1: 2 h; 2: 3 h; 3: 4 h; 4: 5 h; 5: 6 h. M: 蛋白分子量标准。

Fig. 5 Optimizing induction conditions of recombinant protein GST-EsCB

- a. Optimization of cultivation temperature (1.0 mmol/L IPTG 4 h); 1: 37℃; 2: 30℃.
b. Optimization of IPTG concentration (37℃ 4 h); 1: 0.1 mmol/L; 2: 0.2 mmol/L; 3: 0.5 mmol/L; 4: 1.0 mmol/L.
c. Time course expression of recombinant protein (37℃ 0.1 mmol/L IPTG); 1: 2 h; 2: 3 h; 3: 4 h; 4: 5 h; 5: 6 h. M: protein marker.

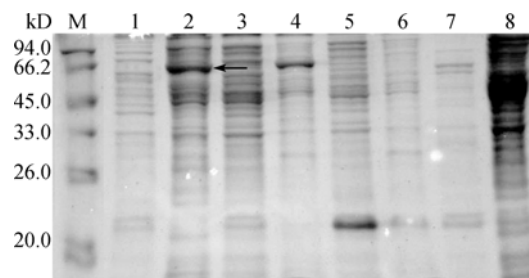


图 4 Trx-MrCB 重组蛋白的表达分析

M: 蛋白分子量标准; 1-2: pET32a-MrCB 诱导裂解后上清和沉淀; 3-4: pET32a-MrCB 未诱导裂解后上清和沉淀; 5-6: pET32a 诱导裂解后上清和沉淀; 7-8: pET32a 未诱导裂解后上清和沉淀; 箭头示目的蛋白。

Fig. 4 Expression analysis of recombinant protein Trx-MrCB
M: protein marker; 1-2: supernatant and precipitation of induced pET32a-MrCB; 3-4: supernatant and precipitation of uninduced pET32a-MrCB; 5-6: supernatant and precipitation of induced pET32a; 7-8: supernatant and precipitation of uninduced pET32a; arrow indicates target protein.

对于重组蛋白的表达量无显著影响(图 5b、图 6b)。考虑到高浓度的 IPTG 可能影响大肠杆菌的正常生长, 故选择 0.1 mmol/L IPTG 作为最佳诱导剂浓度。

使用最佳的培养温度和 IPTG 终浓度, 于 2~6 h 收集菌体检测, 发现重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加, 但当诱导时间超过 4 h(GST-EsCB)或 6 h(Trx-MrCB), 重组蛋白的表达量不再增加(图 5c, 图 6c)。鉴于此, GST-EsCB 重组蛋白的最佳诱导条件选择 37℃ 0.1 mmol/L IPTG 诱导 4 h, Trx-MrCB 重组蛋白的最佳诱导条件选择 30℃ 0.1 mmol/L IPTG 诱导 6 h。

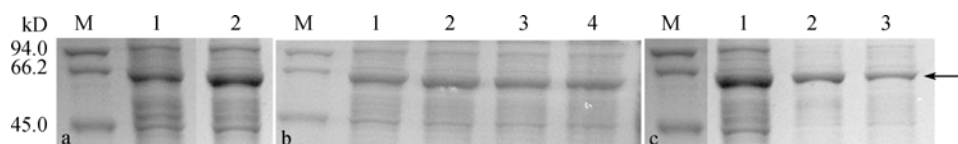


图 6 Trx-MrCB 重组蛋白诱导表达条件优化

a. 优化诱导温度(1.0 mmol/L IPTG 诱导 6 h); 1: 37℃; 2: 30℃. b. 优化 IPTG 浓度(30℃ 诱导 4 h); 1: 0.1 mmol/L; 2: 0.2 mmol/L; 3: 0.5 mmol/L; 4: 1.0 mmol/L. c. 优化诱导时间(30℃ 0.1 mmol/L IPTG); 1-6 h; 2-4 h; 3-2 h. M: 蛋白分子量标准.

Fig. 6 Optimizing induction conditions of recombinant protein Trx-MrCB

a. Optimization of cultivation temperature (1.0 mmol/L IPTG 6 h); 1: 37℃; 2: 30℃.

b. Optimization of IPTG concentration (30℃ 4 h); 1: 0.1 mmol/L; 2: 0.2 mmol/L; 3: 0.5 mmol/L; 4: 1.0 mmol/L.

c. Time course expression of recombinant protein (30℃ 0.1 mmol/L IPTG); 1-6 h; 2-4 h; 3-2 h. M: protein marker.

2.3 重组蛋白的纯化及定量分析

根据 GST-EsCB 重组蛋白在 N 端融合了 GST (谷胱甘肽-S-转移酶), Trx-MrCB 重组蛋白在近 N 端融合了 6 个 His 标签, 利用亲和层析原理纯化重组蛋白。目的蛋白在 SDS-PAGE 中均呈现单一条带, 说明获得了高纯度的重组蛋白(图 7b)。

使用 His 标签抗体作为一抗检测重组蛋白, 在目的蛋白大小处检测到特异性条带, 证明表达的重组蛋白为目的蛋白(图 8a)。

重组蛋白定量分析表明, 在最适诱导条件下, 目的蛋白占包涵体总量分别为 39.6%(GST-EsCB)和 56.42%(Trx-MrCB), 纯化的重组蛋白浓度分别为 0.634 mg/mL(GST-EsCB)和 0.846 mg/mL(Trx-MrCB)。从而推算出重组蛋白的产量, 100 mL 培养物中重组蛋白的表达量分别为 3.17 mg(GST-EsCB)和 4.5 mg(Trx-MrCB)。

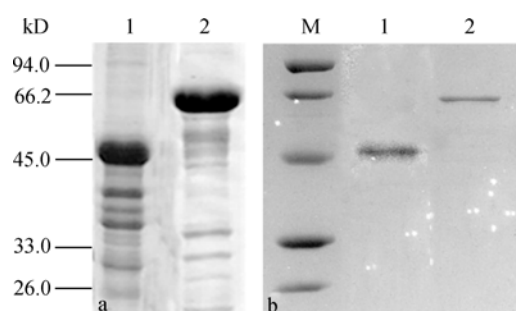


图 7 SDS-PAGE 分析洗涤后的包涵体和纯化后的重组蛋白

a. 包涵体总蛋白; b. 亲和层析纯化的重组蛋白.

M: 蛋白分子量标准; 1: GST-EsCB; 2: Trx-MrCB.

Fig. 7 SDS-PAGE analysis of inclusion body and purified recombinant protein

a. Inclusion body after washing; b. Purified recombinant protein by affinity chromatography.

M: protein marker; 1: GST-EsCB; 2: Trx-MrCB.

2.4 cyclin B 抗体的制备与检测

纯化的重组蛋白分 4 次免疫家兔, 制备 cyclin B 多克隆抗体。

GST-EsCB 抗血清: 针对 GST-EsCB 重组蛋白的效价大于 1 160 000, 针对 GST 标签蛋白的效价 1 80 000, GST-EsCB 抗血清针对重组蛋白的效价是针对 GST 的 4~8 倍, 所以制备的 GST-EsCB 抗血清主要是针对 GST-EsCB 重组蛋白的。

Trx-MrCB 抗血清: 针对 Trx-MrCB 重组蛋白的效价大于 1 80 000。

Western blot 结果显示, 1 20 000 稀释的 GST-EsCB 抗血清和 1 100 000 稀释的 Trx-MrCB 抗血清能够特异性识别重组蛋白, 说明了制备的抗血清特异性好(图 8b)。使用 1:5 000 稀释的 GST-EsCB 抗血清在中华绒螯蟹未成熟卵巢中检测到 41.2 kD 和 39.5 kD 两种形式的 cyclin B 蛋白(图 9a), 使用 1 5 000 稀释的 Trx-MrCB 抗血清

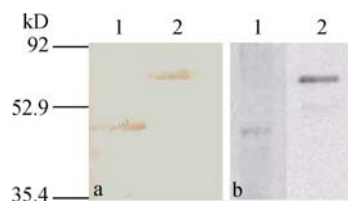


图 8 His 抗体和 Cyclin B 抗血清检测重组蛋白的 Western blot 分析

a. His 抗体检测重组蛋白; b. Cyclin B 抗血清检测重组蛋白.

1: GST-EsCB; 2: Trx-MrCB.

Fig. 8 Western blot analysis of recombinant protein with anti-His antibody and Cyclin B antiserum

a. anti-His antibody detecting recombinant protein; b. Cyclin B antiserum detecting recombinant protein.

1: GST-EsCB; 2: Trx-MrCB.

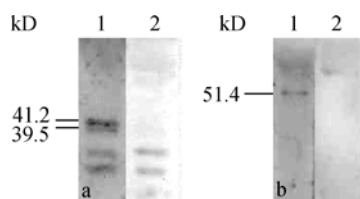


图 9 Cyclin B 抗血清检测卵巢总蛋白

a. anti-EsCB 抗血清检测中华绒螯蟹卵巢总蛋白;

b. anti-MrCB 抗血清检测罗氏沼虾卵巢总蛋白.

1: Cyclin B 抗血清; 2: 阴性兔血清.

Fig. 9 Western blot analysis of ovarian protein with Cyclin B antiserum

a. anti-EsCB antiserum detecting crab ovarian protein;

b. anti-MrCB antiserum detecting prawn ovarian protein.

1: Cyclin B antiserum; 2: negative rabbit serum.

在罗氏沼虾未成熟卵巢中检测到 51.4 kD 的 cyclin B 蛋白(图 9b), 与预期的内源 cyclin B 蛋白(约 45 kD)大小接近。

3 讨论

中华绒螯蟹 cyclin B 的 N 端含有较多的大肠杆菌稀有密码子, 可能影响其在大肠杆菌中正常表达^[14-15]。鉴于此, 本研究选择原核表达载体 pGEX-2T, 截短表达中华绒螯蟹 cyclin B 的 C 端 233 个氨基酸。为了获得大量的重组蛋白, 本实验从培养温度、诱导剂浓度和培养时间 3 个角度优化诱导表达条件。培养温度是影响大肠杆菌生长的主要因素, 37 °C 是大肠杆菌的最佳生长温度, 但不一定是表达重组蛋白的最适温度, 适当降低培养温度有利于增加外源蛋白的可溶性表达; 高浓度的 IPTG 可能影响大肠杆菌的正常生长, 所以选择低浓度的 IPTG; 随着诱导时间的增加, 重组蛋白的表达量均匀增加, 数小时后达到平台期。诱导前大肠杆菌菌体浓度也是需要考虑的因素, 起始 OD 值过高, 细菌生长过老而活力下降, 不利于诱导表达重组蛋白。OD₆₀₀ 在 0.4~0.6 时, 菌体处于对数生长期, 最适合起始诱导。

使用最佳诱导条件大量表达重组蛋白, 经亲和层析纯化, 作为抗原免疫家兔制备 cyclin B 多克隆抗体。使用间接 ELISA 方法测定 cyclin B 抗血清效价, 发现 GST-EsCB 抗血清中, 少量抗体是针对 GST 标签蛋白的, 大部分抗体是针对重组

蛋白的, 效价大于 1 : 160 000。Trx-MrCB 抗血清中针对重组蛋白的抗体效价大于 1 : 80 000。Western blot 分析检测抗血清的特异性, 使用更为灵敏的 ECL 检测手段, GST-EsCB 抗血清和 Trx-MrCB 抗血清都能够特异性识别重组蛋白, 而且均能够从卵巢总蛋白中检测到 cyclin B 蛋白。这说明了制备的 cyclin B 抗血清效价高, 特异性好, 可用于检测内源 cyclin B 蛋白。

与爪蟾等大多数动物卵母细胞成熟模式相似, 本研究在中华绒螯蟹和罗氏沼虾未成熟卵巢中都检测到 cyclin B 蛋白(图 9), 说明 cyclin B 蛋白在卵母细胞成熟前就已经存在。有趣的是, 在中华绒螯蟹未成熟卵巢中 cyclin B 蛋白出现 2 种亚型, 可能与 cyclin B 蛋白磷酸化修饰有关。在爪蟾^[4]、金鱼^[9]、海星^[16]和海胆^[17]卵母细胞成熟过程中, cyclin B 蛋白由于发生了磷酸化修饰也出现 2 种亚型。但是 cyclin B 蛋白在罗氏沼虾未成熟卵巢中只有 1 种亚型, 说明 cyclin B 蛋白在虾蟹类卵母细胞成熟过程中分子调控机制可能存在不同。本研究制备的 cyclin B 抗体为在蛋白水平进一步阐明 cyclin B 在虾蟹类卵母细胞成熟过程中的分子调控机制提供了条件。

参考文献:

- [1] Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase [J]. Nature, 1990, 344: 503-508.
- [2] Masui Y. Towards understanding the control of the division cycle in animal cells [J]. Biochem Cell Biol, 1992, 70: 920-945.
- [3] Nagahama Y, Yamashita M. Regulation of oocyte maturation in fish [J]. Dev Growth Differ, 2008, 50 (Suppl 1): S195-219.
- [4] Gautier J, Maller J L. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation [J]. EMBO J, 1991, 10: 177-182.
- [5] Minshull J, Murray A, Colman A, et al. *Xenopus* oocyte maturation does not require new cyclin synthesis [J]. J Cell Biol, 1991, 114: 767-772.
- [6] Miyake Y, Deshimaru S, Toraya T. Revised sequence and expression of cyclin B cDNA from the starfish *Asterina pectinifera* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2001, 65: 1119-1126.
- [7] Chesnel F, Eppig J J. Synthesis and accumulation of p34cdc2

- and cyclin B in mouse oocytes during acquisition of competence to resume meiosis [J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 40: 503–508.
- [8] Levesque J T, Sirard M A. Resumption of meiosis is initiated by the accumulation of cyclin B in bovine oocytes [J]. *Biol Reprod*, 1996, 55: 1427–1436.
- [9] Yamashita M, Kajiura H, Tanaka T, et al. Molecular mechanisms of the activation of maturation-promoting factor during goldfish oocyte maturation [J]. *Dev Biol*, 1995, 168: 62–75.
- [10] Ihara J, Yoshida N, Tanaka T, et al. Either cyclin B1 or B2 is necessary and sufficient for inducing germinal vesicle breakdown during frog (*Rana japonica*) oocyte maturation [J]. *Mol Reprod Dev*, 1998, 50: 499–509.
- [11] Kondo T, Yanagawa T, Yoshida N, et al. Introduction of cyclin B induces activation of the maturation-promoting factor and breakdown of germinal vesicle in growing zebrafish oocytes unresponsive to the maturation-inducing hormone [J]. *Dev Biol*, 1997, 190: 142–152.
- [12] Fang J J, Qiu G F. Molecular cloning of cyclin B transcript with an unusually long 3' untranslated region and its expression analysis during oogenesis in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36: 1521–1529.
- [13] 房君江. 中华绒螯蟹、罗氏沼虾 Cyclin B 基因 cDNA 克隆及其在卵子发生过程中表达分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2008.
- [14] Kane J F. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1995, 6: 494–500.
- [15] Kurland C, Gallant J. Errors of heterologous protein expression [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 1996, 7: 489–493.
- [16] Pondaven P, Meijer L, Beach D. Activation of M-phase-specific histone H1 kinase by modification of the phosphorylation of its p34cdc2 and cyclin components [J]. *Genes Dev*, 1990, 4: 9–17.
- [17] Meijer L, Arion D, Golsteyn R, et al. Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase [J]. *EMBO J*, 1989, 8: 2275–2282.

Prokaryotic expression, antibody preparation, and identification of a cyclin B protein in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* and Malaysian giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*

FENG Haiyang, QIU Gaofeng

Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Utilization Certificated by Ministry of Agriculture, E-Institute of Shanghai Universities (EISU), Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We amplified the open reading frames (ORFs) of the cyclin B gene from the ovarian cDNA of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* and the Malaysian giant prawn *Macrobrachium rosenbergii*. The ORFs from these two species were then ligated into the expression plasmids pGEX-2T and pET32a, respectively. Following transfer of the recombinant plasmids into a host bacteria, *Escherichia coli* BL21 (DE3), the recombinant proteins were expressed as inclusion bodies by induction with IPTG. The optimum concentration of IPTG was 0.1 mmol/L for 4 h at 37°C for GST-EsCB and 0.1 mmol/L PTG for 6 h at 30°C for Trx-MrCB. The recombinant proteins were subsequently purified by affinity chromatography. The cyclin B antibody was further refined by immunizing New Zealand white rabbits with the purified protein. The highest resulting antiserum titer was 1 : 80 000 (ELISA). We verified the specificity of the antibodies against the recombinant protein and ovarian cyclin B protein by western blot. We isolated two isoforms of the cyclin B protein from the immature crab ovaries, but only one form from the prawn ovaries. Thus, our data suggest that the role of cyclin B in the regulation of oocyte maturation may differ between crabs and prawns. The cyclin B antibody will be useful for further study of the role of cyclin B on MPF activation and oocyte maturation.

Key words: cyclin B; prokaryotic expression; polyclonal antibody; Chinese mitten crab; Malaysian giant prawn; oocyte maturation

Corresponding author: QIU Gaofeng. E-mail: gfqiu@shou.edu.cn