



猫源 *C11orf96* 基因表达及其在细胞中的定位分析

杨洪早¹, 朱杰², 郭宏元², 汤傲星², 陈少宇¹, 刘春草², 张达², 袁莉刚^{1*}, 刘光清^{2*}

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 兰州 730070; 2. 中国农业科学院上海兽医研究所, 上海 200241)

摘要: 本研究旨在通过克隆猫源 *C11orf96* (*Felis catus C11orf96*, f*C11orf96*) 基因, 并制备其多克隆抗体分析该基因在细胞中的定位。以猫肾细胞 cDNA 为模板克隆 f*C11orf96* 基因, 并利用无缝重组连接成功构建重组质粒 pET-32a(+)-f*C11orf96*-Fe。随后将重组质粒转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞, 经 IPTG 诱导后成功表达 f*C11orf96*-Fe 重组蛋白, 并利用该重组蛋白制备多克隆抗体。最后利用 Western blot 及间接免疫荧光试验分析多克隆抗体的有效性及其细胞定位。结果表明, 成功获得猫 *C11orf96* 基因 CDS 序列, 全长 372 bp, 可编码 124 个氨基酸, 表达的 f*C11orf96*-Fe 蛋白主要以包涵体形式存在, 蛋白大小约 49 ku。由该重组蛋白制备的多克隆抗体能够识别细胞内源性 f*C11orf96* 蛋白和外源真核表达蛋白, 并且发现 f*C11orf96* 蛋白定位于细胞质。本研究成功克隆得到猫 *C11orf96* 基因, 并且 f*C11orf96* 蛋白定位于细胞质, 为后续研究 *C11orf96* 的生物学功能奠定了基础。

关键词: *C11orf96*; 基因克隆; 多克隆抗体; 亚细胞定位

中图分类号: S858.293; S855.3

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2022)07-2390-06

Expression and Subcellular Localization Analysis of *Felis catus C11orf96*

YANG Hongzao¹, ZHU Jie², GUO Hongyuan², TANG Aoxing², CHEN Shaoyu¹, LIU Chuncao², ZHANG Da², YUAN Ligang^{1*}, LIU Guangqing^{2*}

(1. College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 200241, China)

Abstract: The aim of this study was to construct of *Felis catus C11orf96* (f*C11orf96*) gene, prepare polyclonal antibody with good reactivity to the protein and in order to analyze the localization of the *C11orf96* gene in cells. Firstly, the f*C11orf96* gene cloned by using Crandell Reese Feline Kidney cells (CRFK) cDNA as the template, the recombinant plasmid pET-32a (+)-f*C11orf96*-Fe was successfully constructed by seamless recombination. Then, the recombinant expression vector was transformed into BL21(DE3), and the recombinant protein f*C11orf96*-Fe was successfully expressed after IPTG induction. The f*C11orf96*-Fe protein was used to immunize rabbits to prepare polyclonal antibody. Finally, Western blot and indirect immunofluorescence assay (IFA) were used to analyze the validity and subcellular localization of polyclonal antibody. The results showed that the CDS sequence of the f*C11orf96* gene was 372 bp, encoding 124 amino acids. The recombinant protein f*C11orf96*-Fe exists mainly in inclusion bodies, and the protein size was 49 ku. The polyclonal antibody prepared from the recombinant protein could identify endogenous

收稿日期: 2021-10-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(32000109); 上海市扬帆计划项目(20YF1457700)

作者简介: 杨洪早(1992-), 男, 云南凤庆人, 博士生, 主要从事小动物病毒分子机制研究, E-mail: yhz03008@163.com

*通信作者: 袁莉刚, 主要从事动物生殖生理学研究, E-mail: yuan2918@126.com; 刘光清, 主要从事病毒分子生物学研究, E-mail: liugq@sh-

fC11orf96 protein and eukaryotic expressed foreign protein. And we found that fC11orf96 protein was localized in the cytoplasm. In this study, the fC11orf96 gene was successfully cloned and localized in the cytoplasm, which laid a foundation for further research on the biological functions of the C11orf96 protein.

Key words: C11orf96; gene cloning; polyclonal antibody; subcellular localization

* Corresponding authors: YUAN Ligang, E-mail: yuan2918@126.com; LIU Guangqing, E-mail: liugq@shvri.ac.cn

本实验室前期研究发现, C11orf96 在猫杯状病毒(feline calicivirus, FCV)感染猫后显著上调。C11orf96 为 11 号染色体上的第 96 个开放阅读框所编码的蛋白,该基因虽有文献报道,但该蛋白功能未被鉴定^[1]。在 C11orf96 的研究中,基因的克隆与表达是分子生物学研究的重要组成部分,而且特异性抗体也是一项重要的研究工具,这些均有助于挖掘蛋白质的生物学功能^[2-3]。

基于此,本实验室克隆了猫源 C11orf96 基因,并以 pET-32a(+)载体为基础,结合本团队已制备的羊口疮病毒 F1L 融合 Fe 蛋白多克隆抗体的基础^[4],构建了融合铁蛋白的原核表达质粒 pET-32a(+) -fC11orf96-Fe,并进行转化得到重组蛋白 fC11orf96-Fe,然后用它来免疫新西兰大白兔制备 fC11orf96-Fe 的多克隆抗体,为其后续研究 C11orf96 蛋白的生物学功能提供重要工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和菌株 pET-32a(+)、pCMV-HA、pCMV-Myc、猫肾细胞(Crandell Reese Feline Kidney cells, CRFK), Fe 基因质粒由中国农业科学院上海兽医研究所伴侣动物生物安全风险预警及防控技术团队保存。

1.1.2 主要试剂 pEASY®-Blunt Zero Cloning Kit vector 购自北京全式金生物技术有限公司,Lipofectamine™3000 脂质体转染试剂盒购自 Invitrogen 公司,ClonExpress® Ultra One Step Cloning Kit 与 ClonExpress® MultiS One Step Cloning Kit 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,BamH I、HindIII、EcoR I 和 Bgl II 限制性内切酶购自 NEB 公司,文中使用的抗体均购自 Cell Signaling Technology(CST)生物技术有限公司,其余试剂均为分析纯。

1.1.3 实验动物 6 周龄新西兰大白兔购自上

海杰思捷实验动物有限公司[许可证号码:SCXX(沪)2020-0123]。

1.2 方法

1.2.1 基因及载体构建 根据 NCBI 提供猫 C11orf96 的基因预测序列,利用 Primer 6.0 软件设计特异性引物用于扩增猫 C11orf96 基因以及构建相应的原核表达和真核表达载体,引物序列(由苏州金唯智生物科技有限公司合成)见表 1。

首先用 CRFK 的 cDNA 扩增猫源 C11orf96 基因 CDS 区片段,经胶回收-连接-转化-培养-摇菌-并送测序,将测序结果正确的菌液进行小提质粒即得猫源 C11orf96 基因,并命名为 *Felis catus-C11orf96*,简写为 fC11orf96。

以 fC11orf96 质粒为模板,扩增 fC11orf96 基因真核表达与原核表达目的基因片段;以 Fe 质粒为模板,扩增得到含 pET-32a(+)载体同源臂与 C11orf96 同源臂的 Fe 基因;用内切酶双酶切 pET-32a(+)、pCMV-HA、pCMV-Myc 质粒,经胶回收-连接-转化-培养-摇菌-并送测序,将测序结果正确的菌液小提质粒即得重组原核表达质粒和真核表达质粒,并分别命名为 pET-32a(+) -fC11orf96-Fe、pHA-fC11orf96 和 pMYC-fC11orf96。

1.2.2 fC11orf96-Fe 蛋白的诱导表达及纯化

将上述提取得到的重组质粒 pET-32a(+) -fC11orf96-Fe 转化于感受态细胞 BL21(DE3) 中,经 LB 平板培养后,挑菌于 LB 培养基培养至 OD_{600 nm} 值为 0.6~0.8 时,加入终浓度为 1 mmol·L⁻¹(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)于 37 °C、220 r·min⁻¹ 诱导 6 h,取菌液离心,沉淀加 PBS 重悬,反复冻融 3 次,超声裂解,然后离心,SDS-PAGE 电泳分析沉淀和上清液。结果表明, fC11orf96-Fe 蛋白主要以包涵体的形式存在,因此采用包涵体粗纯化的方式进行纯化,最后获得目的重组蛋白。

1.2.3 兔源 fC11orf96-Fe 多克隆抗体的制备与鉴定 以 fC11orf96-Fe 重组蛋白为免疫原乳化完

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Sequences of primers used in this study

引物名称 Primers	引物序列 (5'→3') Primer sequence	用途 Usage
C11orf96-F	ATGGCGGCCGCCAAGCCCGGCGAGCTG	克隆猫源 C11orf96 基因
C11orf96-R	TTACAGGGCCGAGTCGGAGTCGCT	
C11orf96-Myc/HA-F	ATGGAGGCCGAATTCGGATGGCGGCCAAGCCCGGCGAGCTG	构建猫源 C11orf96
C11orf96-Myc/HA-R	GTACCTCGAGAGATCTTACAGGGCCGAGTCGGAGTCGCT	真核表达质粒
C11orf96-32a-F	GGCTGATATCGGATCCATGGCGGCCAAGCCCGGCGAGCTG	构建猫源 C11orf96 融合
C11orf96-R	CAGGGCCGAGTCGGAGTCGCT	Fe 蛋白原核表达质粒
C11orf96-Fe-F	TCCGACTCGGCCCTG <u>TCCGGTGGCGACATCATCAAGCTG</u>	
32a-Fe-R	GTGCGGCCGCAAGCTTGTAGCTCTTGCAGGACTTGGCGAT	

下划线部分为 linker 蛋白(SGG)的柔性肽核苷酸序列

The underlined part is a flexible peptide nucleotide sequence of linker protein (SGG)

全后免疫 6 周龄新西兰大白兔,背部皮下多点注射进行 4 次免疫,7 d·次⁻¹,第 4 次免疫后从心取血收集抗血清,即得 fC11orf96-Fe 兔源多克隆抗体,分装后,置-80 °C 冻存。

将构建的真核表达质粒分别转染至 CRFK 细胞内,24 h 后收取细胞,并用 RIPA 裂解液进行裂解收取细胞蛋白样,然后进行 Western blot 试验,用制备的 fC11orf96-Fe 抗血清作为一抗(稀释比 1:350)37 °C 孵育 3 h;鼠源 β-actin 抗体(稀释比 1:1 000)为内参对照,分别以 HA 和 Myc 标签抗体作为阳性对照一抗,4 °C 孵育过夜。然后分别对应添加山羊抗兔 IgG 二抗(稀释比 1:10 000)与山羊抗鼠 IgG 二抗(稀释比 1:10 000)室温孵育 1 h。最后进行曝光和显影。

1.2.4 fC11orf96 蛋白亚细胞定位 转染前 1 d,将 CRFK 细胞接种于放有细胞爬片的 12 孔培养板中,待细胞长至汇合度为 70%~90% 时利用转染试剂进行质粒转染,均设阳性对照、阴性对照组等,37 °C、5% CO₂ 培养约 24 h。收取细胞进行间接免疫荧光(indirect immunofluorescence assay, IFA)试验,用 5% BSA 稀释一抗(抗体 HA, 1:1 000; fC11orf96 多克隆抗体, 1:200)在 4 °C 下孵育 10~12 h;然后用 5% BSA 稀释二抗[Alexa Fluor 488 山羊抗兔 IgG(H+L)],避光孵育 1 h 后,再用 PBS 稀释 4',6-二氨基-2-苯林多尔(DAPI, 1:5 000)染色 4~5 min。最后进行封片于激光共聚焦显微镜下获取图像,拍照并分析结果。

2 结 果

2.1 fC11orf96-Fe 蛋白以包涵体方式存在

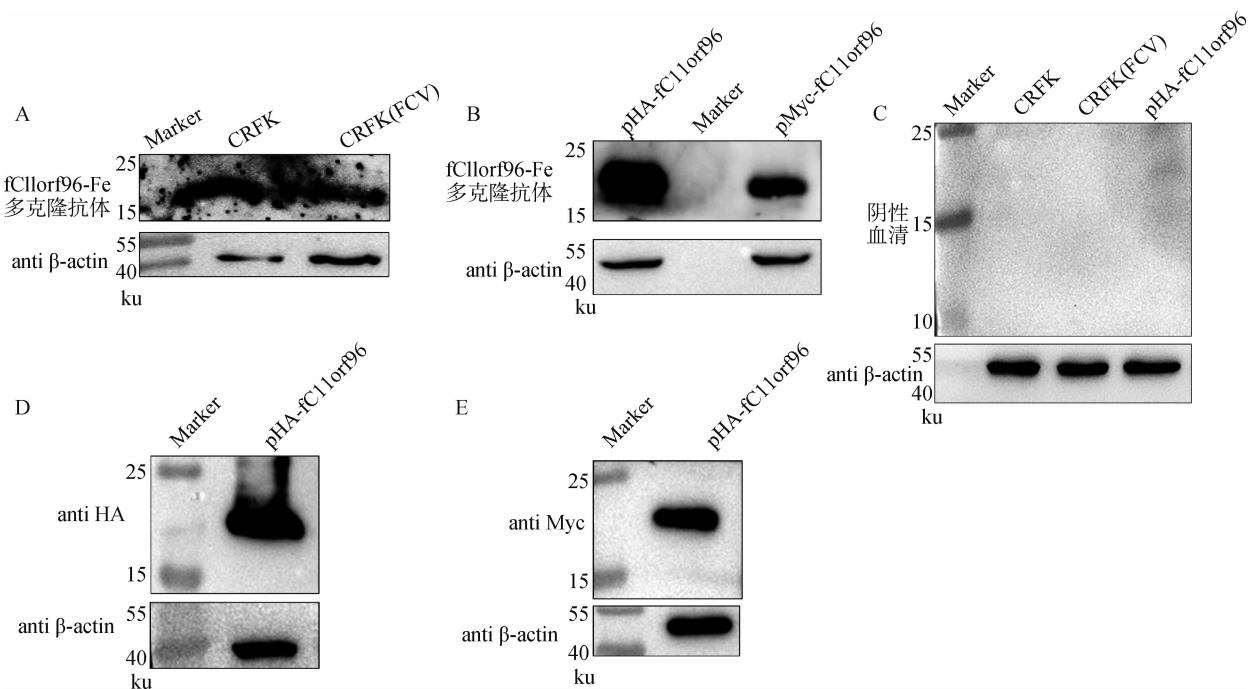
结果表明,表达质粒 pET-32a(+) -fC11orf96-Fe 经 IPTG 诱导后出现了特异性蛋白条带,相对分子质量大小约 49 ku(Fe 蛋白大小约 19 ku, fC11orf96 蛋白大小约 14 ku, pET-32a(+) 蛋白大小约为 17 ku),与预期相符合,而且 fC11orf96-Fe 蛋白主要出现在沉淀中,说明重组 fC11orf96-Fe 蛋白主要以包涵体的方式存在,因此使用尿素纯化该包涵体蛋白。

2.2 fC11orf96-Fe 多克隆抗体具有反应性和特异性

Western blot 检测结果显示,该多克隆抗体对 CRFK 细胞内源性 fC11orf96 蛋白(17 ku, 位于 15~25 ku)具有反应性(图 1A);同样对转染了该蛋白的真核表达质粒的细胞裂解液也具有良好的反应性(图 1B),而且与分别使用 HA 和 Myc 标签抗体孵育真核表达质粒的细胞裂解液蛋白大小均一致(图 1D 和 1E);以阴性血清作为阴性对照,未见条带(图 1C)。鉴定结果表明,获得的 fC11orf96-Fe 蛋白兔源多克隆抗体能够与 fC11orf96 内源性蛋白和外源蛋白表达发生特异性反应,而且特异性条带大小正确,证明抗体有较好的反应性和特异性,可以用于后续的试验研究。

2.3 fC11orf96 蛋白亚细胞定位于细胞质

从图 2 中结果显示,对照 pCMV-HA 空载体在



A. fC11orf96-Fe 多克隆抗体孵育 CRFK 与感染 FCV 的 CRFK 细胞裂解液显影结果; B. fC11orf96-Fe 多克隆抗体孵育真核表达质粒的细胞蛋白裂解液显影结果; C. 以阴性血清作为阴性对照孵育对应的细胞蛋白裂解液样品显影结果; D. HA 标签抗体孵育 pHA-fC11orf96 真核表达质粒的细胞裂解液显影结果; E. Myc 标签抗体孵育 pHA-fC11orf96 真核表达质粒的细胞裂解液显影结果

A. ECL results of fC11orf96-Fe polyclonal antibody incubates protein lysate about CRFK cells infected with FCV and uninfected samples; B. ECL results of fC11orf96-Fe polyclonal antibody incubates protein lysate about the constructed eukaryotic expression plasmid; C. ECL results of protein samples incubated with negative serum as negative control; D. ECL results of anti HA incubates protein lysate about pHA-fC11orf96; E. ECL results of anti Myc incubates protein lysate about pMyc-fC11orf96

图 1 Western blot 检测 fC11orf96-Fe 多克隆抗体特异性结果

Fig. 1 Specificity of fC11orf96-Fe polyclonal antibody detected by Western blot

CRFK 细胞内未见绿色荧光,只有瞬时表达 pHA-fC11orf96 质粒和未转染质粒的 CRFK 细胞在细胞质中能看到绿色荧光,未在细胞核(蓝色)内发现绿色荧光,表明 fC11orf96-Fe 蛋白多克隆抗体与转入真核表达 fC11orf96 质粒发生特异性反应,同时说明未转染质粒的 CRFK 细胞内看到的绿色荧光即为 fC11orf96 蛋白,进一步证明该蛋白不具有跨膜蛋白结构,严格定位在细胞质中。

3 讨 论

病毒作为最小的病原体,必须依靠活细胞内的物质进行增殖,而且其基因资源有限,因此病毒必须利用多种宿主细胞因子才能生存并产生新的病毒颗粒^[5]。病毒在感染细胞后,通过“劫持”细胞的翻译途径,从而进行自身蛋白质的翻译和合成,促进病毒的复制和增殖;宿主细胞的翻译系统则因此受到抑制,从而导致宿主细胞的翻译水平持续下降,而病毒

的复制和蛋白质的合成水平则能够持续上升^[6-8]。因此,鉴定调控病毒增殖的宿主蛋白,对阻断病毒感染,抑制病毒复制具有重要意义。本文所关注的宿主蛋白 C11orf96 在病毒感染后显著上调,推测其可能调控病毒复制,而该蛋白目前功能未知。因此,人们首先急需获得针对该蛋白的一种灵敏度高、特异性良好的抗体,为后续研究提供关键工具。

蛋白质分子量是蛋白质定性甚至定量的重要工具,在蛋白质研究领域发挥重要作用^[9-10]。蛋白质理论分子量和表观分子量不一致是很正常的^[11],本文的 fC11orf96 预测蛋白分子量约为 13.9 ku,但在使用 Western blot 检测 CRFK 内源性 C11orf96 以及构建的不同标签的真核质粒的细胞蛋白裂解液时,发现其 ECL 显影的特异性条带均位于 17 ku (15~25 ku) 左右,同时结合猫源 C11orf96 蛋白质结构预测结果,发现该蛋白很可能存在一定的蛋白翻译后修饰,但具体是何种修饰有待后续研究。

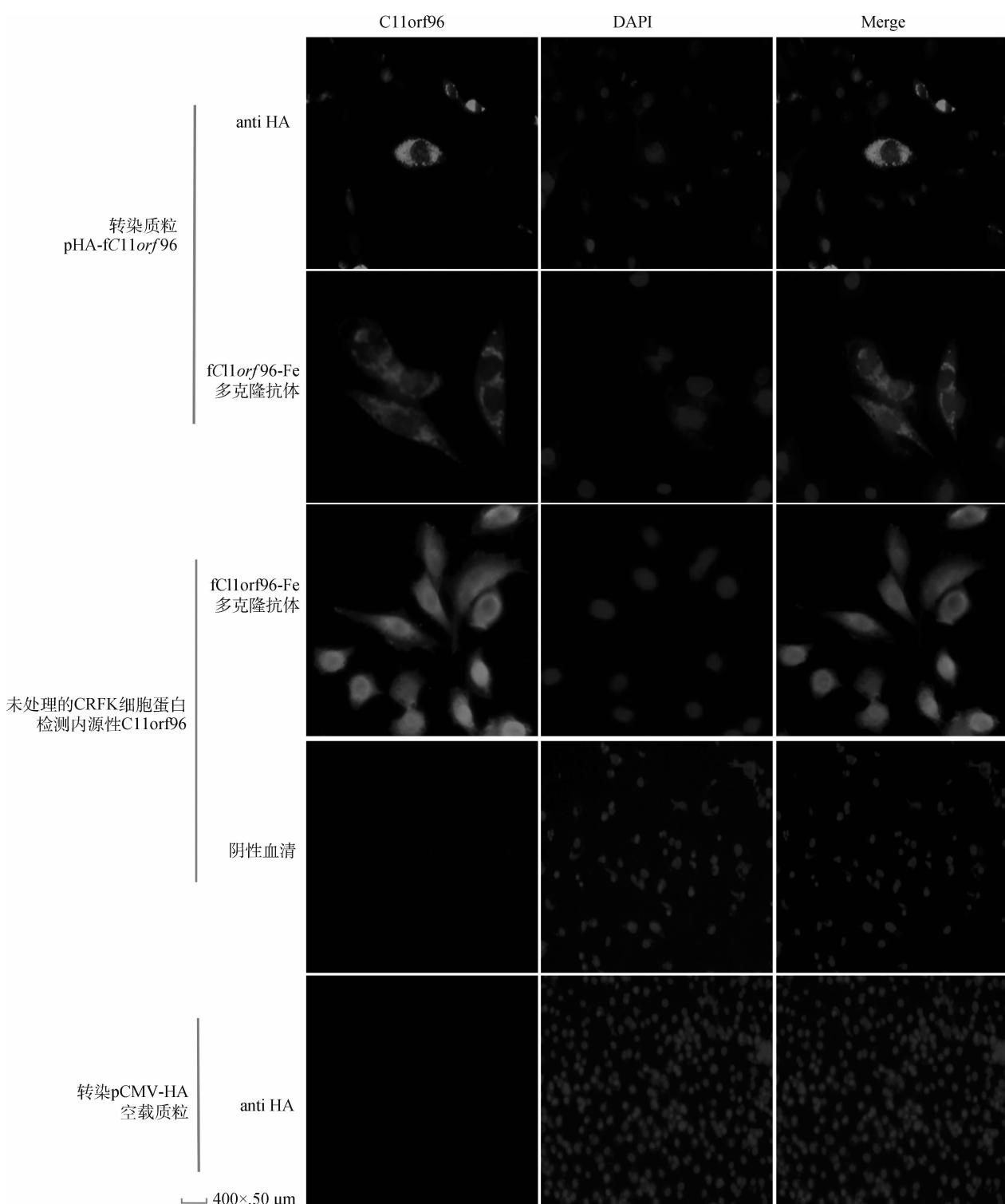


图 2 fC11orf96 蛋白亚细胞定位于细胞质

Fig. 2 Localization of fC11orf96 subcellular protein in cytoplasm

4 结 论

成功克隆得到猫源 C11orf96 基因 CDS 区, 通

过 WB 与 IFA 亚细胞定位于细胞质, 结果表明, 该抗体具有较高的反应性和特异性, 为后续研究不同种源 C11orf96 的生物学功能奠定基础。

参考文献(References):

- [1] HAUPTMAN N, BOSTJANCIC E, LAJPAH M, et al. Bioinformatics analysis reveals most prominent gene candidates to distinguish colorectal adenoma from adenocarcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018:9416515.
- [2] NI N, JIA R L, GUO Y Q, et al. Expression and functional studies of INS-5, an insulinase-like protein in *Cryptosporidium parvum* [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11:719.
- [3] PASSOS V, ZILLINGER T, CASARTELLI N, et al. Characterization of endogenous SERINC5 protein as anti-HIV-1 factor [J]. *J Virol*, 2019, 93(24):e01221-19.
- [4] 邢雪, 王元红, 李传峰, 等. 羊口疮病毒 F1L 融合 Fe 蛋白的表达与鉴定[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(1):130-135.
XING X, WANG Y H, LI C F, et al. Expression and identification of orf virus F1L fused with Fe protein [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 36(1):130-135. (in Chinese)
- [5] 曾宗波, 马旭升, 罗志宽, 等. 程序性细胞死亡因子 10 抑制 I 型干扰素表达并促进 FMDV 复制[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(2):450-459.
ZENG Z B, MA X S, LUO Z K, et al. Programmed cell death factor 10 inhibits type I interferon expression and promotes the replication of foot-and-mouth disease virus [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2021, 52(2):450-459. (in Chinese)
- [6] 刘丹华, 郑世民, 刘晓静, 等. 禽网状内皮组织增生病病毒感染对 SPF 雏鸡血液和局部淋巴组织 CD4⁺/CD8⁺ 细胞及相关细胞因子表达的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2020, 51(6):1447-1454.
LIU D H, ZHENG S M, LIU X J, et al. Effects of avian reticuloendotheliosis virus infection on the
- CD4⁺/CD8⁺ ratio and the expression of related cytokines in SPF chicks [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2020, 51(6):1447-1454. (in Chinese)
- [7] 高泽乾, 朱学亮, 张志东, 等. 病毒感染激活炎症小体的分子机制[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(11):2167-2174.
GAO Z Q, ZHU X L, ZHANG Z D, et al. The mechanisms of inflammasomes activation by viral components [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2016, 47(11):2167-2174. (in Chinese)
- [8] 李永涛, 王川庆. 流感病毒逃避宿主天然免疫抗病毒应答研究进展[J]. 畜牧兽医学报, 2015, 46(4):526-533.
LI Y T, WANG C Q. Evasion of host innate immune antiviral responses by influenza viruses [J]. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, 2015, 46(4):526-533. (in Chinese)
- [9] CAO Y M, CHEN Z L, ZHANG M, et al. Maternal exposure to bisphenol A induces fetal growth restriction via upregulating the expression of estrogen receptors[J]. *Chemosphere*, 2022, 287:132244.
- [10] 李丽娟. 对一种蛋白质分子量计算方法的思考[J]. 考试周刊, 2017(74):116.
LI L J. Reflection on a method for calculating molecular weight of protein [J]. *Examination Weekly*, 2017(74):116. (in Chinese)
- [11] 李红卫, 袁志良, 夏斌. 扩散序谱(DOSY)实验测定缓冲体系中蛋白质表观分子量[J]. 波谱学杂志, 2018, 35(3):280-286.
LI H W, YUAN Z L, XIA B. Determination of apparent protein molecular weight in solution by diffusion ordered NMR spectroscopy [J]. *Chinese Journal of Magnetic Resonance*, 2018, 35(3):280-286. (in Chinese)

(编辑 白永平)