

毛冠鹿 AIF-1 原核载体的构建及表达

周楠楠, 杨 振, 罗丽芸, 宋 菲, 白 敏, 曹祥荣

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 江苏 南京 210023)

[摘要] 从毛冠鹿睾丸 cDNA 文库中筛选出毛冠鹿 AIF-1 基因, 对其进行生物信息学分析, 设计引物克隆毛冠鹿 AIF-1 cDNA, 连入 pMD19-T 载体, 测序正确后酶切, 与表达载体 pET-28a(+) 连接, 转化 *E. coli* BL21(DE3), IPTG 诱导表达, 将诱导表达重组蛋白的菌体超声破碎后, 进行可溶性分析, 并对可溶性蛋白进行纯化, SDS-PAGE 电泳, Western Blot 分析以及鉴定重组蛋白. 结果表明, 毛冠鹿 AIF-1(TdAIF-1) 含有 1 个 438bp 的开放阅读框, 编码 145 个氨基酸, 经测序和酶切鉴定后, 成功构建重组质粒 pET-28a(+)-TdAIF-1, 表达大小约 20 kD 的重组蛋白, 主要以可溶形式存在, 提高洗脱缓冲液中咪唑浓度至 50 mmol/L、100 mmol/L 能够得到较纯的蛋白. 成功构建毛冠鹿 AIF-1 原核表达体系, 获得重组蛋白, 为研究 AIF-1 蛋白的生物学功能奠定了基础.

[关键词] 毛冠鹿, AIF-1, 原核表达

[中图分类号] Q28 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2014)02-0085-06

Prokaryotic Expression System Construction of the Tufted Deer(*Elaphodus cephalophus*) AIF-1

Zhou Nannan, Yang Zhen, Luo Liyun, Song Fei, Bai Min, Cao Xiangrong

(School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210023, China)

Abstract: The TdAIF-1 cDNA was cloned from the testis cDNA library of the Tufted deer(*Elaphodus cephalophus*) and analyzed by bioinformatic methods. Primers were designed according to cDNA sequence to clone the gene. The gene was cloned into pMD19-T vector for sequencing. The right sequence was digested by restriction enzyme and subcloned into the expression vector pET-28a(+). After transformed into *E. coli* BL21(DE3), the recombinant plasmid was induced to express by IPTG. The *E. coli* BL21(DE3) expressed recombinant protein was broken by ultrasonic to show whether the recombinant protein was soluble or not. Lastly, the soluble protein was purified. The recombinant protein was analyzed and identified by SDS-PAGE electrophoresis and Western blot. Analysis of sequence showed that the TdAIF-1 cDNA contained a 438 bp open reading frame encoding 145 amino acids. The recombinant plasmid was correctly constructed according to sequencing and restriction enzyme analysis. The recombinant protein was about 20 kD and soluble mainly. When the recombinant protein was purified, using elution buffer containing 50 mmol/L or 100 mmol/L imidazole could get purified protein. The TdAIF-1 Prokaryotic Expression System was constructed successfully and recombinant protein was obtained, which was helpful for the future study of its biological function.

Key words: Tufted deer(*Elaphodus cephalophus*), AIF-1, prokaryotic expression

同种异体移植炎症因子(Allograft inflammatory factor 1, AIF-1), 又称离子钙结合适配器分子(Ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1), 最初克隆自发生慢性排斥反应的大鼠心脏移植植物^[1], 参与调节巨噬细胞的活化及功能. AIF-1 是亲水蛋白, 蛋白质分子量大小为 17 kD, 可被 γ 干扰素(IFN- γ) 诱导表达, 含有可结合 Ca^{2+} 的 EF-hand 结构域^[2]. 到目前为止, 许多不同物种的 AIF-1 或 AIF-1 类似基因被克隆出来, 其中包括无脊椎动物如海绵^[3]、盘鲍^[4], 鱼类如鲤鱼^[5], 哺乳类如小鼠^[6] 和人^[7] 等. AIF-1 能够绑定并交联肌动蛋白成束, 在调节巨噬细胞/小胶质细胞肌动蛋白骨架的重组中发挥非常重要的作用^[8-10]. AIF-1

收稿日期: 2013-11-25.

基金项目: 国家自然科学基金(30771172)、国家基础科学人才培养基金(J1103507、J1210025).

通讯联系人: 曹祥荣, 教授, 博导, 研究方向: 肿瘤发生与基因治疗分子机制. E-mail: caoxiangrong@njnu.edu.cn

蛋白特异性表达于大鼠睾丸长形精子细胞的胞质中,暗示 AIF-1 可能参与精子形成的最后阶段^[11]. 在动脉损伤或炎症刺激下的血管平滑肌细胞(VSMCs)中,AIF-1 也可被诱导产生^[12],并能促进 VSMCs 的增殖与迁移^[13,14]. 此外,研究还发现,AIF-1 与自身免疫性疾病、中枢神经系统疾病、动脉粥样硬化、移植排斥反应等疾病密切相关.

毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)属鹿科(Cervidae)、鹿亚科(Muntiacinae)、毛冠鹿属(*Elaphodus*),是我国二类保护动物,主要分布于东南和西南各省. 鹿亚科动物的细胞遗传学研究一直备受关注,主要集中在染色体多态、性别鉴定、分子进化^[15]、cDNA 文库构建^[16]等方面. 关于毛冠鹿 AIF-1 基因的研究,国内外尚未见报道. 本研究首次克隆毛冠鹿 AIF-1 基因,对序列进行生物信息学分析,构建原核表达体系,获得重组蛋白,分析表明毛冠鹿 AIF-1 基因与人类 AIF-1 基因高度同源,为研究其蛋白质特性和制备检测抗体,以及人类疾病的检测和治疗奠定了前期基础.

1 材料与方法

1.1 材料

毛冠鹿睾丸组织 cDNA 文库由本实验室构建,质粒和菌种由本实验室保存;原核表达载体 pET-28a(+)购自 Novagen 公司;大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)感受态细胞由本实验室制作并保存. rTaq 酶、pMD19-T 载体、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DL2 000 Marker、DL15 000 Marker 均购自 TaKaRa 公司;质粒小量提取试剂盒、胶回收试剂盒购自 Biomiga 公司;X-gal、IPTG、氨苄青霉素钠、卡那霉素购自南京生兴生物技术有限公司;Ni²⁺亲和层析柱(HisTrap HP)购自 GE Healthcare 公司. 引物由生工(上海)股份有限公司合成.

1.2 试验方法

1.2.1 毛冠鹿 AIF-1 序列比对及分析

毛冠鹿睾丸 cDNA 文库测序结果在 NCBI 网站进行 ORF 分析并进行 BLAST 比对. DNAMAN 软件分析蛋白分子量、等电点. Signal P3.0 和 NLS 预测程序用于预测信号肽和核定位信号. PROSITE 数据库预测蛋白结构域.

1.2.2 原核表达载体的构建

根据原核表达载体 pET-28a(+)的克隆位点,选择酶切位点 *Nde* I 和 *Bam*H I 来设计引物,上游引物 P1(包含酶切位点 *Nde* I):5'-CCGAATTCATATGGCTTCTTCTGATATCCAG-3',下游引物 P2(包含酶切位点 *Bam*H I):5'-AATGGATCCTTAGTCGGCTTCAGTCTCATC-3',以 pTriplEx2 重组质粒为模板扩增毛冠鹿 AIF-1 cDNA 序列. 割胶回收 PCR 产物,在 T4 连接酶的作用下,与 PMD19-T 载体 16 ℃ 连接 1h,连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,接种于含 Amp、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上进行蓝白斑筛选,37 ℃ 倒置培养过夜后挑取白色菌落,进行 PCR 及 *Nde* I + *Bam*H I 质粒双酶切鉴定,进一步确认目的片段插入载体中,菌样送生工(上海)有限公司测序. 将测序正确的质粒和 pET-28a(+)同时进行 *Nde* I + *Bam*H I 双酶切,酶切产物经割胶回收纯化后,在 T4 连接酶的作用下 16 ℃ 连接过夜,连接产物转化 DH5 α 感受态细菌,接种于 Kan 抗性平板,37 ℃ 倒置培养过夜后挑取单克隆菌落,经 PCR 及 *Nde* I + *Bam*H I 质粒双酶切鉴定后,确定阳性重组质粒,命名为 pET-28a(+)-TdAIF-1.

1.2.3 重组质粒原核表达、鉴定

分别将空载质粒 pET-28a(+)和重组质粒 pET-28a(+)-TdAIF-1 转化大肠杆菌 BL21(DE3),接种于 Kan 抗性的平板上,37 ℃ 倒置培养过夜,挑取阳性克隆在 LB 培养基中 37 ℃ 振荡培养,按 1:100 的比例接种于 Kan 抗性的 LB 液体培养基中,摇菌至 OD₆₀₀ 值为 0.6~0.7 时,分别加入终浓度 1.0 mmol/L IPTG,对照组不加,诱导表达 4 h,各取 2×2 mL 菌液,离心收集菌体,200 μ L 缓冲液重悬,然后加入 50 μ L 5×SDS 上样缓冲液,吹匀,99 ℃ 煮沸 5 min,用于 SDS-PAGE 电泳. 目的蛋白用 SDS-PAGE 电泳和 Western Blot 进行鉴定,蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳后,考马斯亮蓝 R250 染色 20 min,脱色液中脱色至出现明显条带,凝胶成像仪中拍照,Western Blot 所用一抗为山羊来源的抗 AIF-1 单克隆抗体,与 HRP 标记的抗山羊二抗结合后,加入 TMB 显色液,室温避光显色,拍照.

1.2.4 重组蛋白表达的条件优化

于 37 ℃ 1.0 mmol/L IPTG 诱导不同时间(0、2、4、6、8、10)h,收集菌体,SDS-PAGE 电泳分析不同时间

诱导下蛋白表达的差异。

选取最佳诱导时间,在不同终浓度 IPTG(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0) mmol/L,37 ℃ 诱导表达相同时间,收集菌体,SDS-PAGE 电泳分析不同浓度 IPTG 诱导下蛋白表达的差异。

1.2.5 重组蛋白的可溶性分析及纯化

在优化条件下诱导并收集 2 mL 菌体,加入 200 μ L 缓冲液重悬,再加入 PMSF(终浓度为 1 mmol/L),冰水浴中超声破碎,程序为破碎 2 s,间隔 4 s,功率 40 W,持续 3 min~5 min。然后 4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,取上清和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析。蛋白纯化时,将 200 mL 诱导表达的菌体重悬于 20 mmol/L Tris-Cl(pH 8.0)中,加入 PMSF(终浓度 1mmol/L),150 W 超声破碎,4 ℃ 12 000 r/min 离心 15 min,转移上清,用 Ni^{2+} 亲和层析柱进行纯化(步骤参考说明书),纯化后的蛋白用于 SDS-PAGE 检测。

2 结果

2.1 毛冠鹿 AIF-1 序列分析

通过 ORF 及 BLAST 分析,筛选出一 cDNA 与小鼠、人的 AIF-1 (Allograft inflammatory factor 1)/Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1) 高度同源,命名为毛冠鹿 AIF-1 (Tufted deer's AIF-1, Td AIF-1),其 CDS 区为 438 bp,编码 145 个氨基酸(如图 1)。该 cDNA 序列已提交 GenBank(序列号:JX861371)。DNAMAN 预测蛋白质的分子量为 16 599.4 Da,理论等电点为 6.03。20 种氨基酸中含量最高的是赖氨酸 Lys(13.79%),以下依次是亮氨酸 Leu(13.10%)、谷氨酸 Glu(11.03%)、丝氨酸 Ser(8.28%)、甲硫氨酸 Met(6.90%)、甘氨酸 Gly(6.21%)、天冬氨酸 Asp(6.21%)、丙氨酸 Ala(4.83%)、谷氨酰胺 Gln(4.83%)、苯丙氨酸 Phe(4.14%)、异亮氨酸 Ile(4.14%)、脯氨酸 Pro(4.14%)、酪氨酸 Tyr(2.76%)、精氨酸 Arg(2.76%)、苏氨酸 Thr(2.76%)、天冬酰胺 Asn(2.07%)、缬氨酸 Val(1.38%)、组氨酸 His(0.69%)。经分析,毛冠鹿 AIF-1 氨基酸序列中不含半胱氨酸 Cys,所以在其蛋白质空间结构中不会形成二硫键,这对大肠杆菌表达重组蛋白具有重要影响。

```

1  ATGAGCCAAACCAGGGATTACAGGGAGGAAAAGCCTTTGGGCTGCTGAAGGCCAGCAG
1  M S Q T R D L Q G G K A F G L L K A Q Q
61  GAAGAGAGACTCAATGAAATCAACCAGCAATTCCTGGATGATCCCAATACAGCAGTGAC
21  E E R L N E I N Q Q F L D D P K Y S S D
121 GAGGACCTGCCCTCCAACTGGAAGCCTTTAAGAAGAAATACATGGAGTTTGACCTGAAT
41  E D L P S K L E A F K K K Y M E F D L N
181 GAAGACGGAGATATCATGTCCTGAAGCGAATGATGGAGAACTTGGGGTCCCAAGACC
61  E D G D I M S L K R M M E K L G V P K T
241 CACCTGGAGCTAAAGAAATTAATCATGGAGGTATCCAGTGGCTCTGGGAGACTTTCAGC
81  H L E L K K L I M E V S S G S G E T F S
301 TACTCTGACTTTCTCAAGATGATGTTGGCAAGAGATCTGCCATTCTAAAATGATCCTG
101 Y S D F L K M M L G K R S A I L K M I L
361 ATGTATGAAGAGAAAGCAAGAGAGAGAGCAACGGGTCTCCAGCCAAGAAAGCT
121 M Y E E K A K E Q E K P T G L P A K K A
421 ATCTGAGTTGCCTTGA
141 I S E L P *

```

方框内为起始密码子 ATG,* 代表终止密码子 TGA。阴影代表预测的 EF-hand 结构

域,划线部分表示 Ca^{2+} 结合位点

图1 毛冠鹿 AIF-1 cDNA 编码区核酸序列及预测氨基酸序列(登录号:JX861371)

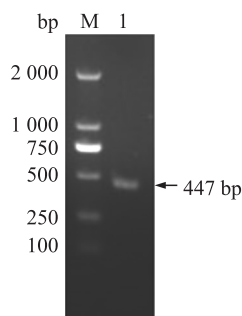
Fig.1 Td AIF-1 cDNA coding sequence and deduced amino acids
sequence(accession number:JX861371)

信号肽和核定位信号预测结果表明,毛冠鹿 AIF-1 蛋白没有潜在的信号肽和核定位信号。结构域分析发现氨基酸序列中 45~78 位是 Ca^{2+} 结合 EF-hand 结构域,58~67 位为 Ca^{2+} 结合位点,但是与完整的 EF-hand Ca^{2+} 结构域相比,毛冠鹿 AIF-1 蛋白在 65 位和 66 位氨基酸之间缺少 E(Glu)或 D(Asp)氨基酸,这可能导致其结合 Ca^{2+} 的能力减弱。

2.2 原核表达载体的构建及鉴定

毛冠鹿 AIF-1 扩增片段为 447bp(如图 2),经割胶纯化后连入 pMD19-T 载体,菌落 PCR 结果 1#~8# 均与目的条带大小相符合(如图 3),选取 1#~3#经测序证实读码框架正确。选取 3#重组 pMD19-T 质粒,与

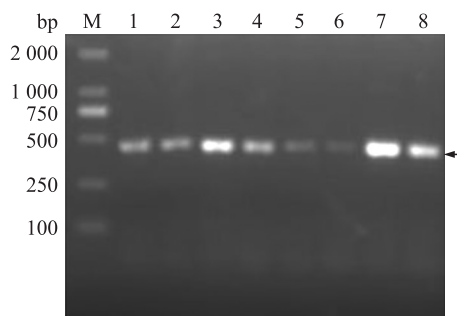
pET28a(+)同时经 *Nde* I + *Bam*H I 双酶切后,用 T4 连接酶连接,经 Kan 抗性筛选后,提取质粒酶切鉴定,重组质粒酶切片段大小与预期相符(如图 4),命名为 pET-28a(+)-TdAIF-1(如图 5)。



M:DL2000 DNA marker;1:PCR 产物

图 2 TdAIF-1 cDNA 扩增片段

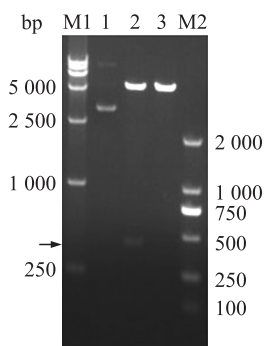
Fig. 2 PCR products of TdAIF-1 cDNA



M:DL2000 DNA marker;1-8:挑选的 pMD19-T-TdAIF-1 克隆

图 3 重组质粒 pMD19-T-TdAIF-1 的菌落 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pMD19-T-TdAIF-1 by colony PCR



M1:DL15000 DNA marker;1:pET-28a(+)-TdAIF-1;2:pET-28a(+)-TdAIF-1/
Nde I + *Bam*H I;3:pET-28a(+)-*Nde* I + *Bam*H I;M2:DL2000 DNA marker

图 4 重组质粒 pET-28a(+)-TdAIF-1 的酶切鉴定

Fig. 4 Enzyme digestion of pET-28a(+)-TdAIF-1

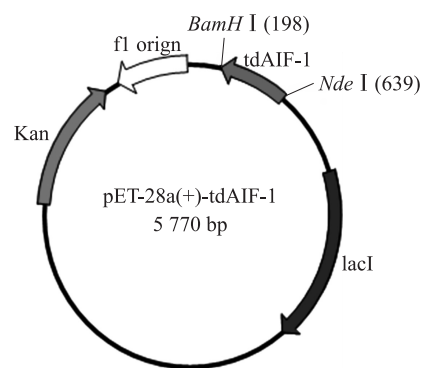
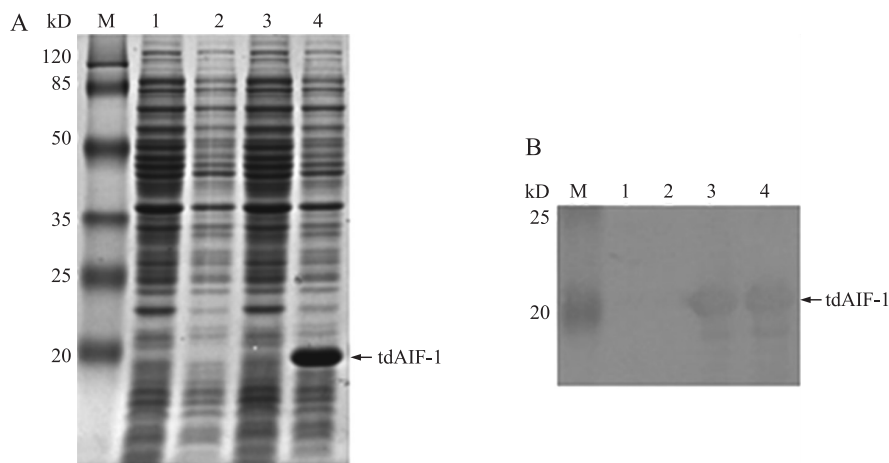


图 5 重组质粒 pET-28a(+)-TdAIF-1 图谱

Fig. 5 The map of pET-28a(+)-TdAIF-1 recombinant plasmid

2.3 重组蛋白的表达及鉴定

转化空载质粒 pET-28a(+)和重组质粒 pET-28a(+)-TdAIF-1 的大肠杆菌 BL21(DE3),摇菌培养至 OD_{600} 值为 0.6 时,加入 1 mmol/L IPTG 诱导表达 4 h,对照组不加,收集菌体,处理后进行 SDS-PAGE 电泳,结果如图 6A 所示,在约 20 kD 处有一明显蛋白条带,而对照组均没有.重组蛋白经 IPTG 诱导表达后,进行



(A)M:protein marker;1-2:pET-28a(+)-TdAIF-1 37 °C 0 mmol/L、1 mmol/L IPTG 诱导 4 h;3-4:pET-28a(+)-TdAIF-1 37 °C 0 mmol/L、1 mmol/L IPTG 诱导 4 h;(B)M:Protein marker;1-2:pET-28a(+)-TdAIF-1 37 °C 0 mmol/L IPTG 诱导 4 h;3-4:pET-28a(+)-TdAIF-1 37 °C 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h

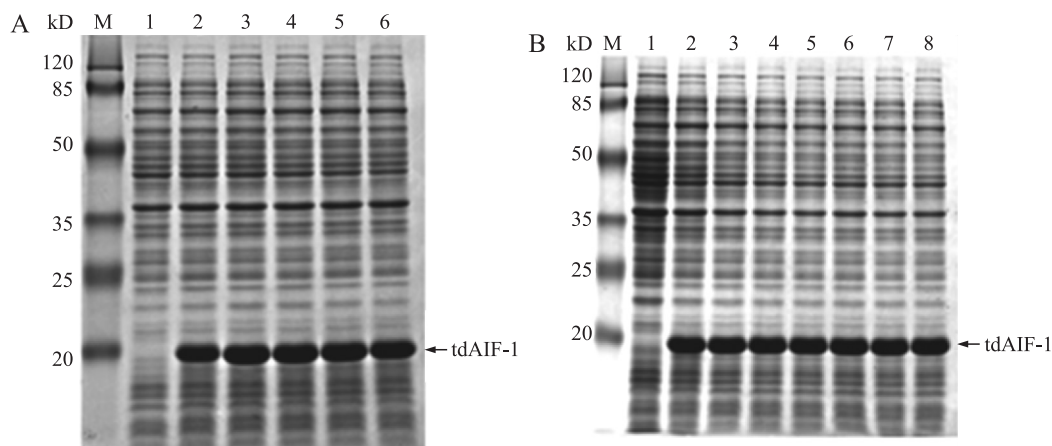
图 6 重组蛋白的表达分析(A)和 Western Blot 鉴定(B)

Fig. 6 Expression analysis of recombinant protein(A)and Western Blot identification(B)

SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜上,与山羊源抗 AIF-1 单克隆抗体结合,再结合 HRP 标记的抗山羊二抗后,TMB 避光显色,进行蛋白印记分析,结果显示,在约 20 kD 处有一明显的蛋白条带(如图 6B),从而证明毛冠鹿 AIF-1 重组蛋白表达成功.

2.4 重组蛋白表达的条件优化

转化重组质粒 pET-28a(+)-TdAIF-1 的大肠杆菌 BL21(DE3)经 1mmol/L IPTG 诱导不同时间(0、2、4、6、8、10)h,收菌进行 SDS-PAGE 电泳,发现 4 h 后重组蛋白表达量无明显变化(如图 7A),因此固定诱导时间 4 h,不同浓度 IPTG(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0)mmol/L 诱导蛋白表达,发现重组蛋白表达量没有显著差异(如图 7B).



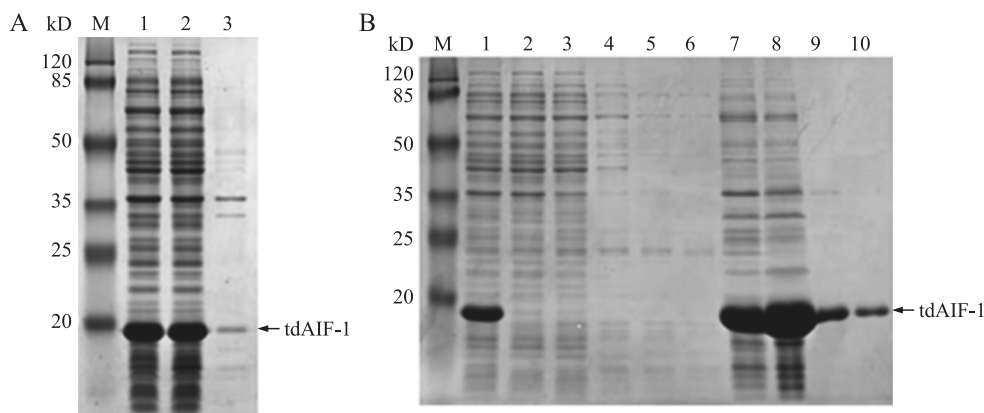
(A) M: protein marker; 1-6: 37 °C 1mmol/L IPTG 诱导 pET-28a(+)-TdAIF-1 表达(0、2、4、6、8、10)h; (B) M: protein marker; 1-8: pET-28a(+)-TdAIF-1 分别经(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、1.5、2.0)mmo/L IPTG 37 °C 诱导 4 h

图 7 不同时间 1 mmol/L IPTG 诱导重组蛋白的表达(A)和不同浓度 IPTG 诱导 4 h 后重组蛋白的表达(B)

Fig. 7 Expression of recombinant protein induced by 1 mmol/L IPTG at differernt time(A) and induced for 4 h in different concentration of IPTG(B)

2.5 重组蛋白的可溶性分析及纯化

根据条件优化,重组质粒在 37 °C 0.01mmol/L IPTG 诱导 4 h 后,超声破碎菌体,取上清和沉淀分别电泳,发现目的蛋白主要存在于上清中(图 8A). 经 Image J 软件分析,上清中目的蛋白约占目的蛋白总量的 91.4%. 在此条件下大量诱导,收集 200 mL 菌体,超声破碎,离心后取细胞破碎液上清,将其通过镍柱进行纯化. 按顺序依次加入样品流出液、结合缓冲液流出液、漂洗缓冲液流出液 W1-4 和洗脱缓冲液流出液 E1-4,并分别收集过柱后样品进行 SDS-PAGE 电泳. 在加入洗脱缓冲液之后的 E1、E2 的目的条带非常明显,但存在少许杂带,提高漂洗缓冲液中咪唑浓度至 50 mmol/L、100 mmol/L 能够除去部分杂带(图 8B).



(A) M: protein marker; 1: 37 °C 0.01mM IPTG 诱导 pET-28a(+)-TdAIF-1 4 h; 2: 超声破碎后上清; 3: 超声破碎后沉淀; (B) M: protein marker; 1: 上清总蛋白; 2: 样品流出液; 3-6: 加入漂洗缓冲液流出液①~④管; 7-10: 加入洗脱缓冲液流出液①~④管

图 8 重组蛋白的可溶性分析(A)和纯化(B)

Fig. 8 Soluble analysis of the recombinant protein(A) and purification(B)

3 讨论

通过对毛冠鹿 AIF-1 蛋白结构域的分析,发现关于其具有 Ca^{2+} 结合 EF-hand 结构域,但是其 Ca^{2+} 结构域并不完整,缺少重要的与 Ca^{2+} 结合的位点,导致其结合 Ca^{2+} 的能力减弱. 所以 AIF-1 蛋白功能是否依赖 Ca^{2+} 还存在争议,一种观点认为在胞膜边缘波动和吞噬过程中是必需的^[8],另一种观点则认为 AIF-1 的功能不依赖于 Ca^{2+} ^[10]. 尽管如此,AIF-1 能够聚合肌动蛋白成束,参与巨噬细胞/小胶质细胞胞吞及血管平滑肌细胞迁移中的 Rac 信号通路^[8,3,13,17],且与炎症、神经系统疾病,甚至生殖相关,具有重要的研究价值.

大肠杆菌系统是表达许多外源蛋白的首选系统,其遗传背景清晰、容易培养、费用低廉,能够对外源蛋白进行高水平表达. 但是大肠杆菌不能够对蛋白进行糖基化修饰,其胞质是一个相对还原性的环境,不利于二硫键的形成,其中表达的蛋白大多没有折叠,易形成不溶解的包涵体,需要进行变复性处理. 同时影响蛋白表达速度的因素也会影响蛋白的折叠,如温度、诱导剂浓度和摇床转速等. pET-28a(+) 是一个相对成熟的大肠杆菌表达载体,含有 T7 强启动子,多克隆位点两端均含有一个 His 标签. 在 IPTG 诱导下能够表达 His 融合蛋白,通过镍柱亲和纯化. His-tag 分子量较小,融合于目的蛋白的 N 端或 C 端一般不会影响蛋白活性,因此纯化后大多不需要去除. His-tag 还可用于目的蛋白的检测. 氨基端的 His 标签在蛋白纯化后可以被凝血酶切除.

本研究将目的序列置于大肠杆菌表达载体 pET-28a(+) N 端 His-tag 下游,成功构建毛冠鹿 AIF-1 的原核表达载体并进行诱导表达. 优化表达条件发现 1 mmol/L IPTG 诱导 4 h 后,重组蛋白表达量趋于稳定,不同浓度的 IPTG 诱导 4 h 也没有发现重组蛋白的表达量有明显差异. 在任何系统中表达长度大于 100 个氨基酸残基的胞质蛋白都非常困难. 在大肠杆菌中,这些蛋白质常常不稳定或形成包涵体,在 0.01 mmol/L IPTG 少量诱导 4 h 后,菌体超声破碎发现重组蛋白主要存在于上清中(如图 8A),表明是可溶性的,没有形成包涵体. 毛冠鹿 AIF-1 蛋白缺少半胱氨酸,不会产生二硫键,所以在大肠杆菌中进行表达时,不会因为无法正确折叠形成二硫键而产生包涵体. 另外,AIF-1 蛋白含有的疏水性氨基酸较少(约占氨基酸总数的 38%),可能也有利于减少包涵体的形成. 大量诱导表达重组蛋白进行纯化,洗脱样品中大部分为重组蛋白. 提高漂洗缓冲液中咪唑浓度至 50 mmol/L、100 mmol/L 可以去除部分杂带,因此如要获得纯度更高的目的蛋白,可能需要优化漂洗缓冲液成分或者选择离子交换层析.

[参考文献]

- [1] Utans U, Arceci R J, Yamashita Y, et al. Cloning and characterization of allograft inflammatory factor-1: a novel macrophage factor identified in rat cardiac allografts with chronic rejection[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 95(6): 2 954–2 962.
- [2] Imai Y, Kohsaka S. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation; role of Iba1[J]. *Glia*, 2002, 40(2): 164–174.
- [3] Kruse M, Steffen R, Batel R, et al. Differential expression of allograft inflammatory factor 1 and of glutathione peroxidase during auto- and allograft response in marine sponges[J]. *Journal of Cell Science*, 1999, 112(23): 4 305–4 313.
- [4] De Zoysa M, Nikapitiya C, Kim Y, et al. Allograft inflammatory factor-1 in disk abalone (*Haliotis discus discus*): Molecular cloning, transcriptional regulation against immune challenge and tissue injury[J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2010, 29(2): 319–326.
- [5] Fujiki K, Shin D H, Nakao M, et al. Molecular cloning of carp (*Cyprinus carpio*) CC chemokine, CXC chemokine receptors, allograft inflammatory factor-1, and natural killer cell enhancing factor by use of suppression subtractive hybridization[J]. *Immunogenetics*, 1999, 49: 909–914.
- [6] Watano K, Iwabuchi K, Fujii S, et al. Allograft inflammatory factor-1 augments production of interleukin-6, -10 and -12 by a mouse macrophage line[J]. *Immunology*, 2001, 104(3): 307–316.
- [7] Utans U, Quist W C, McManus B M, et al. Allograft inflammatory factor-1: a cytokine-responsive macrophage molecule expressed in transplanted human hearts[J]. *Transplantation*, 1996, 61(9): 1 387–1 392.

(下转第 95 页)

- [7] Graff J R, Konicek B W, Carter J H, et al. Targeting the eukaryotic translation initiation factor 4E for cancer therapy[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(3): 631–634.
- [8] Thumma S C, Kratzke R A. Translational control: a target for cancer therapy[J]. *Cancer Letters*, 2007, 258(1): 1–8.
- [9] Ma Z, Zhu L, Luo X, et al. Perifosine enhances mTORC1-targeted cancer therapy by activation of GSK3 β in NSCLC cells[J]. *Cancer Biology and Therapy*, 2012, 13(11): 1 009–1 017.
- [10] Mathis J M, Williams B J, Sibley D A, et al. Cancer-specific targeting of an adenovirus-delivered herpes simplex virus thymidine kinase suicide gene using translational control[J]. *The Journal of Gene Medicine*, 2006, 8(9): 1 105–1 120.
- [11] Nowak D E, Tian B, Jamaluddin M, et al. RelA Ser276 phosphorylation is required for activation of a subset of NF- κ B-dependent genes by recruiting cyclin-dependent kinase 9/cyclin T1 complexes[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 28(11): 3 623–3 638.
- [12] Zhou B B S, Peyton M, He B, et al. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2006, 10(1): 39–50.
- [13] Pao W, Miller V A, Politi K A, et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain[J]. *PLoS Medicine*, 2005, 2(3): e73.
- [14] Chen G, Kronenberger P, Teugels E, et al. Effect of siRNAs targeting the EGFR T790M mutation in a non-small cell lung cancer cell line resistant to EGFR tyrosine kinase inhibitors and combination with various agents[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2013, 431(3): 623–629.
- [15] Maheswaran S, Sequist L V, Nagrath S, et al. Detection of mutations in EGFR in circulating lung-cancer cells[J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359(4): 366–377.
- [16] Kobayashi S, Boggon T J, Dayaram T, et al. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib[J]. *New England Journal of Medicine*, 2005, 352(8): 786–792.
- [17] Rosenwald I B. The role of translation in neoplastic transformation from a pathologist's point of view[J]. *Oncogene*, 2004, 23(18): 3 230–3 247.
- [18] Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control[J]. *Gene*, 2002, 299(1): 35–55.
- [19] Inaba T, Matsushime H, Valentine M, et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes[J]. *Genomics*, 1992, 13(3): 565–574.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第 90 页)

- [8] Ohsawa K, Imai Y, Kanazawa H, et al. Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia[J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(17): 3 073–3 084.
- [9] Sasaki Y, Ohsawa K, Kanazawa H, et al. Iba1 is an actin-cross-linking protein in macrophages/microglia[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 286: 292–297.
- [10] Schulze J O, Quedenau C, Roske Y, et al. Structural and functional characterization of human Iba proteins[J]. *FEBS Journal*, 2008, 275(18): 4 627–4 640.
- [11] Iida H, Doiguchi M, Yamashita H, et al. Spermatid-specific expression of Iba1, an ionized calcium binding adapter molecule-1, in rat testis[J]. *Biology of Reproduction*, 2001, 64(4): 1 138–1 146.
- [12] Autieri M V, Carbone C, Mu A. Expression of allograft inflammatory factor-1 is a marker of activated human vascular smooth muscle cells and arterial injury[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000, 20: 1 737–1 744.
- [13] Autieri M V, Kelemen S E, Wendt K W. AIF-1 is an actin-polymerizing and Rac1-activating protein that promotes vascular smooth muscle cell migration[J]. *Circulation Research*, 2003, 92(10): 1 107–1 114.
- [14] Chen X, Kelemen S E, Autieri M V. AIF-1 expression modulates proliferation of human vascular smooth muscle cells by autocrine expression of G-CSF[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2004, 24: 1 217–1 222.
- [15] 曹祥荣, 束峰钰, 张锡然, 等. 毛冠鹿与 3 种鹿属动物的线粒体细胞色素 b 的系统进化分析[J]. *动物学报*, 2002, 48(1): 44–49.
- [16] 张文, 汤文文, 庞宏, 等. 毛冠鹿睾丸组织 cDNA 文库的构建及 P1 精蛋白基因的克隆[J]. *兽类学报*, 2006, 26(2): 164–170.
- [17] Tian Y, Autieri M V. Cytokine expression and AIF-1-mediated activation of Rac2 in vascular smooth muscle cells: a role for Rac2 in VSMC activation[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2007, 292(2): 841–849.

[责任编辑:黄 敏]