

分类号: Q344

单位代码: 10422

密 级:

学 号: 200911590



山东大学

硕士学位论文

论文题目: 青岛文昌鱼 ERK5, p38 抗体的制备及体内蛋白表达的
初步研究

Preparation of Amphi-ERK5, Amphi-p38 antibodies and
preliminary study on the expression of the two proteins
in amphioxus

作者姓名 刘召民

学院名称 生命科学学院

专业名称 发育生物学

指导教师 陈忠科 副教授

合作导师 _____

2012 年 5 月 20 日



原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

论文作者签名：刘召民 日期：2012.5.20

关于学位论文使用授权的声明

本人同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的印刷件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权山东大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

(保密论文在解密后应遵守此规定)

论文作者签名：刘召民 导师签名：陈忠祥 日期：2012.5.31

目录

目录	1
摘要	1
Abstract	3
符号说明	5
第一部分 综述	9
1.1 文昌鱼概述	9
1.2 MAPK 家族成员研究进展	12
1.2.1 MAPK 概述	12
1.2.2 MAPK 家族主要成员研究进展	15
1.2.2.1 ERK5	15
1.2.2.2 ERK1/2	18
1.2.2.3 JNK	20
1.2.2.4 p38	21
参考文献	28
第二部分 <i>Amphi</i> -ERK5 抗体的制备及体内蛋白表达的初步研究	43
2.1 前言	43
2.2 材料和试剂	43
2.2.1 青岛文昌鱼的来源和养殖	43
2.2.2 主要试剂	44
2.2.3 主要仪器	44
2.2.4 主要溶液的配制	45
2.2.4.1 常用溶液配制	45
2.2.4.2 Western blotting 相关溶液的配制	47
2.2.4.3 免疫组织化学相关溶液的配制	49
2.3 实验方法	50
2.3.1 青岛文昌鱼总 RNA 的提取	50
2.3.1.1 实验前准备	50
2.3.1.2 总 RNA 提取	51
2.3.2 第一链总 cDNA 的合成	51
2.3.3 <i>Amphi</i> -ERK5 多克隆抗体的制备	53
2.3.3.1 <i>Amphi</i> -ERK5 氨基酸特异序列的选择	53
2.3.3.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体	53
2.3.3.3 目的蛋白的表达和纯化	60
2.3.3.4 <i>Amphi</i> -ERK5 抗体制备与鉴定	63
2.3.4 <i>Amphi</i> -ERK5 蛋白的免疫组织化学检测	65
2.3.4.1 石蜡包埋和切片制备	65
2.3.4.2 免疫组织化学检测	65
2.4 实验结果	66
2.4.1 青岛文昌鱼总 RNA 的提取	66

2.4.2 第一链总 cDNA 的合成.....	67
2.4.3 Amphi-ERK5 多克隆抗体制备.....	67
2.4.3.1 Amphi-ERK5 氨基酸特异序列选择.....	67
2.4.3.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体.....	70
2.4.3.3 目的蛋白表达和纯化.....	73
2.4.3.4 Amphi-ERK5 抗体的制备与鉴定.....	75
2.4.4 Amphi-ERK5 免疫组织化学结果.....	76
2.5 讨论.....	77
参考文献.....	82
第三部分 Amphi-p38 多克隆抗体的制备及体内蛋白表达研究.....	85
3.1 前言.....	85
3.2 材料和试剂.....	86
3.2.1 主要材料、试剂和仪器.....	86
3.2.2 主要溶液的配制.....	86
3.3 实验方法.....	86
3.3.1 Amphi-p38 多克隆抗体的制备.....	86
3.3.1.1 Amphi-p38 氨基酸特异序列的选择.....	86
3.3.1.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体.....	87
3.3.1.3 目的蛋白的表达和纯化.....	88
3.3.1.4 Amphi-p38 抗体制备与鉴定.....	90
3.3.2 Amphi-p38 蛋白的免疫组织化学检测.....	90
3.3.2.1 石蜡包埋和切片制备.....	90
3.3.2.2 免疫组织化学染色.....	91
3.4 结果.....	91
3.4.1 Amphi-p38 多克隆抗体制备结果.....	91
3.4.1.1 Amphi-p38 氨基酸特异序列选择.....	91
3.4.1.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体.....	94
3.4.1.3 目的蛋白表达和纯化.....	96
3.4.1.4 Amphi-p38 抗体的制备与鉴定.....	98
3.4.2 Amphi-p38 免疫组织化学结果.....	99
3.5 讨论.....	100
参考文献.....	103
本论文的创新之处.....	105
本论文的不足之处.....	105
致 谢.....	107

青岛文昌鱼 ERK5, p38 抗体的制备及体内蛋白表达的初步研究

摘要

ERK5、p38 是 MAPK 家族中的重要成员, 在生物体各项生命活动具有重要作用。MAPK 家族成员是一类在细胞内具有生物进化的高度保守性, 并可以被多种细胞外信号所激活的丝/苏氨酸蛋白激酶。MAPKs 除参与了胚胎发育、细胞分化、增殖和细胞死亡的过程外, 还和肿瘤、炎症等疾病有关, 同时 MAPKs 也是先天性免疫系统的重要组成部分。

本实验室前期已经获得了文昌鱼 ERK5 (Amphi-ERK5)、p38 (Amphi-p38) 基因序列。本文利用生物信息学方法分析并选择性克隆了部分抗原性较好的基因片段, 插入载体制备蛋白表达载体, 并利用表达的蛋白肽段诱导小鼠制备多克隆抗体; 通过免疫组织化学方法对成体文昌鱼组织中的 Amphi-ERK5、Amphi-p38 蛋白表达情况进行了检测; 与此同时, 为了验证本实验室制备的 Amphi-ERK5、Amphi-p38 抗体免疫组化结果的可信度, 利用购买的 ERK5、p38 异源性抗体对成体文昌鱼组织中的 Amphi-ERK5、Amphi-p38 蛋白表达进行了检测。本研究为进一步研究 Amphi-ERK5、Amphi-p38 蛋白的功能提供了一系列实验依据。

本研究构建的 Amphi-ERK5、Amphi-p38 表达载体, 是利用 pet-29b(+) 为表达载体, BL21(DE3) 为表达菌株, 通过原核表达的方法获得目的蛋白。

鼠抗文昌鱼多克隆抗体的制备分别以两种方法:

- 1) 制备 Amphi-ERK5 抗体, 采用切胶纯化后的文昌鱼 ERK5 原核表达蛋白肽段为免疫原, 免疫小鼠, 利用 Amphi-ERK5 原核表达蛋白肽段做 Western blotting, 检测证明多克隆抗体制备成功后, 获取抗血清。
- 2) 制备 Amphi-p38 抗体, 采用过柱纯化并经透析复性的文昌鱼 p38 原核表达蛋白肽段为免疫原, 免疫小鼠, 利用 Amphi-p38 原核表达蛋白肽段做 Western blotting, 检测证明多克隆抗体制备成功后, 获取抗血清。

利用自制的 Amphi-ERK5 抗体进行免疫组织化学检测发现, Amphi-ERK5 在成体文昌鱼的表皮、肠、生殖腺、肝盲囊、咽鳃区有强烈的表达信号, 而在脊索、肌肉中未见表达信号。利用羊抗人 ERK5 抗体重复上述实验, 也出现相一致的结果。利用自制的 Amphi-p38 抗体进行免疫组织化学检测发现, Amphi-p38 在成体

文昌鱼的表皮、肠、生殖腺、肝盲囊、咽鳃区均有强烈的表达信号，在肌肉中有较弱的表达信号，在脊索中未见表达信号。利用鼠抗人 p38 抗体对文昌鱼组织进行免疫组化检测，显示组织中 p38 蛋白表达结果与上述结果一致。

关键词：青岛文昌鱼；Amphi-ERK5；Amphi-p38；多克隆抗体；免疫组织化学

Preparation of Amphi-ERK5, Amphi-p38 antibodies and preliminary study on the expression of the two proteins in amphioxus

Abstract

ERK5, p38 are important members of MAPKs, they both play an important role in biological activities. MAPK family is a highly conserved family of serine/threonine protein kinases in evolutionarily, and it can be activated by several extracellular signals. MAPK family plays an important role in embryonic development, cellular differentiation, proliferation and apoptosis. In addition, MAPKs have been shown to be extremely relevant in tumor and inflammation and MAPKs are important parts of innate immune system.

Our lab has acquired ERK5 gene of amphioxus (Amphi-ERK5), p38 gene of amphioxus (Amphi-p38) before. In this paper, some fragments that had better antigenicity were analyzed by bioinformatics methods and selectively cloned, inserted into vectors to get protein expression vectors and the peptide fragments expressed were used to prepare polyclonal antibodies. Expression of Amphi-ERK5, Amphi-p38 proteins in adult amphioxus were detected by immunohistochemistry. At the same time, expression of Amphi-ERK5, Amphi-p38 proteins in adult amphioxus were detected by immunohistochemistry using the ERK5, p38 heterologous antibodies bought, to validate the credibility of the immunohistochemistry results obtained by using the Amphi-ERK-5, Amphi-p38 antibodies prepared by our own lab. This research will be the foundation of the further study of the functions of Amphi-ERK5, Amphi-p38.

In this study, Amphi-ERK5, Amphi-p38 protein expression vectors were constructed by using pet-29b(+) as protein expression vector, BL21(DE3) as expression strain and the prokaryotic expression method was used to get the target proteins.

Two methods were used to prepare the mouse anti-amphioxus polyclonal antibodies:

- 1) To prepare the Amphi-ERK5 antibody, some mice were immuned with amphioxus ERK5 protein fragments purified by Gel Slices. Western blotting was carried out using Amphi-ERK5 protein fragments to test if the antibody was prepared successfully and the antiserum was then obtained.
- 2) To prepare the Amphi-p38 antibody, some mice were immuned with amphioxus p38 protein fragments that got through Ni-sepharose purification and dialysis renaturation. Western blotting was carried out using Amphi-p38 protein fragments to test if the antibody was prepared successfully and the antiserum was obtained.

The results which used homemade Amphi-ERK5 antibody to carry the immunohistochemistry out showed that Amphi-ERK5 expression was a large number of columns in the expression of skin, gill filaments, hepatic caeca, intestine and gonad, little in muscle and notochord. When Polyclonal Goat Anti-human p-ERK5 antibody was used to repeat the above experiments, the consistent results were obtained. The results which used homemade Amphi-p38 antibody to carry the immunohistochemistry out showed that Amphi-p38 expression was a large number of columns in the expression of skin, gill filaments, hepatic caeca, intestine and gonad, a small amount of expression in muscle and endostyle, little in notochord. When Polyclonal Mouse Anti-human p38 antibody was used to repeat the above experiments, the consistent results were obtained.

Keywords: Brachiostoma belcheri tsingtauense, Amphi-ERK5, Amphi-p38, polyclonal antibody, Immunohistochemistry

符号说明

缩写	英文全名	中文名称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base pair	碱基对
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
dNTP	Deoxyribonucleosidetriphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
NBT	Nitro-blue tetrazolium	硝基四氮唑盐
BSA	Bovine serum album	牛血清白蛋白
cm	centimeter	厘米
kDa	Kilodalton	千道尔顿
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦炭酸二乙酯
DIG	digoxigenin	地高辛
DTT	dithiotheitol	二硫苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	大肠杆菌
EDTA	Ethylene diametetraacetic acide	乙二胺四乙酸
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
EST	Expressed sequence tag	表达序列标签
Gly	glycine	甘氨酸
IMMS	Immunohistochemistry	免疫组织化学
ISH	In situ hybridization	原位杂交
MHC	Macrophage inhibitor factor	主要组织相容性复合物
h	hour	小时
min	Minute	分钟
s	second	秒
mL	milliliter	毫升
PBS	Phosphate buffered saline	磷酸缓冲盐溶液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应

RT-PCR	Reverse transcriptase-PCR	逆转录酶-多聚酶链式反应
Rpm	Revolutions per minute	每分钟转速
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	三(羟甲基)氨基甲烷
SDS	Sodium dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
TAE	Tris-Acetate-EDTA	Tris-乙酸电泳缓冲液
TBE	Tris-Borate-EDTA	Tris-硼酸电泳缓冲液
V	Voltage	电压
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚半乳糖苷
IPTG	Isopropyl beta-D-Thiogalactopyranoside	异丙基- β -D-硫代半乳糖苷
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis	SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳
PVDF	Poly(vinylidene fluoride)	聚(偏二氟乙烯)
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes	细胞毒性 T 淋巴细胞
TNF	Tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
VCBPs	Variable domain-containing chitin-binding proteins	可变区结合蛋白
MHC	Major histocompatibility complex	主要组织相容性复合体
EBF-1	Early B-cell factor1	早期 B 细胞因子-1
RAG	Recombination activating gene	重组激活基因
PKC	Protein kinase C	蛋白激酶 C
uPA	Urokinase-type plasminogen activator	尿激酶型纤溶酶原激活剂
COX	Cytochrome c oxidase	细胞色素 C 氧化酶
IL	Interleukin	白介素
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate	佛波醇-12-肉豆蔻酯-13-乙酯
ASK	Apoptosis signal regulating kinase	凋亡信号调节激酶
DLK	Dual leucine zipper kinase	双亮氨酸拉链激酶
MLK	Mixed lineage kinase	混合谱系激酶
TAK	Thylakoid assoiated kinase	类囊体膜蛋白激酶
Tpl2	Tumor progression locus 2	肿瘤进展位点 2

Paks	p21-activated protein kinases	p21 活性蛋白激酶
ATF2	Activating transcription factor 2	活化转录因子-2
TCR	T cell receptor	T 细胞抗原受体
iNOS	Inducible nitric oxide synthase	诱导型一氧化氮合成酶
MMPs	Matrix metalloproteinases	基质金属蛋白酶
PDGF	Platelet derived growth Factor	血小板衍生生长因子
LCK	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase	淋巴细胞特异蛋白质酪氨酸激酶
JIP-1	(JNK)-interacting protein 1	(JNK) -相互作用蛋白-1
AICD	Activation induced cell death	激活诱导的细胞死亡
ZBP-89	Zinc-finger binding protein-89	锌指结合蛋白 89
NLS	Nuclear localization signal	核定位信号
cAMP	Cyclic Adenosine monophosphate	腺苷-3'-5'-环化-磷酸

第一部分 综述

1.1 文昌鱼概述

文昌鱼 (amphioxus 或 lancelet) 属头索动物亚门 (Cephalochordata), 与尾索动物亚门和脊椎动物亚门共同组成了脊索动物门 (Chordata), 它们都是由生活于距今约 5.5 亿年的前寒武纪共同祖先演化而来的。文昌鱼代表了无脊椎动物向脊椎动物进化过程中一个重要的过渡阶段, 被认为是脊椎动物的“姐妹群”, 是现存的与脊椎动物亲缘关系最近的物种 (Stach T, 2008)。从 Pallas 最早记述文昌鱼 (Pallas, 1774) 至今, 各国学者对文昌鱼的生态、生理、组织和胚胎发育等方面的问题进行了广泛的研究, 随着分子生物学技术的发展, 特别是 Holland 等人发表了第一篇关于文昌鱼发育分子遗传方面的论文后, 文昌鱼在现代分子生物学研究中一直作为研究脊椎动物原型的重要模式生物 (Holland et al., 1992)。

文昌鱼的身体细长, 左右侧扁, 两头尖而细, 没有头的分化, 骤然一看很难分辨身体的前后端, 所以西欧人叫它为两尖鱼, 或称之为“海矛”。文昌鱼身体呈白色半透明状, 肌节明显, 形似小鱼而不是鱼。文昌鱼具有脊索动物门 (Chordata) 的三大典型特征: 背神经管、脊索和咽鳃裂 (王义权和方少华, 2005)。文昌鱼的脊索纵贯全身, 并且越过神经管向前一直延伸到身体的最前端, 故称头索动物; 神经管前端略微膨大, 形成脑泡 (brain vesicle), 是脑的雏形。文昌鱼没有真正的头和脑, 所以又有无头类 (Acrania) 之称。

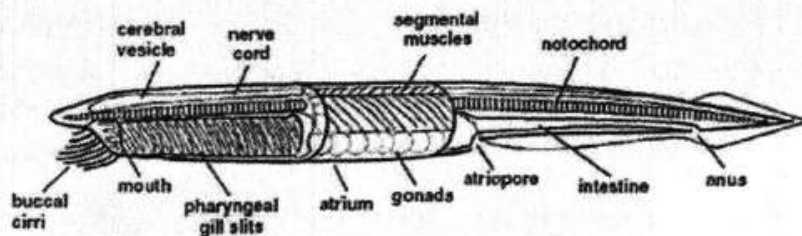


图 1. 文昌鱼结构图 (Holland and Yu, 2004)

buccal cirri 口笠触须; cerebral vesicle 脑泡; nerve cord 神经管; notochord 脊索; segmental muscles 肌节; pharyngeal gill slits 咽鳃裂; atrium 围鳃腔; gonads 生殖腺; atripore 围鳃腔孔; intestine 肠; anus 肛门

文昌鱼形态结构如图 1 所示。现将各部分结构和功能简要介绍如下:

1) 皮肤:

薄而半透明, 由表皮 (epidermis) 和真皮 (dermis) 两部分构成, 表皮位于身体最外层, 为单层上皮, 其外覆有一层角质层。表皮外在幼体期生有纤毛, 成长后则消失。现已通过电子显微镜的观察, 发现文昌鱼 24 h 幼虫上皮细胞具有内吞作用 (Mao et al., 1997)。真皮则是位于表皮之下的非常薄的一层冻胶状结缔组织。

2) 呼吸系统:

文昌鱼通过咽 (pharynx) 行使呼吸作用。咽位于口的后方, 呈长椭圆形, 非常发达。在咽的两侧有垂直的鳃裂 (branchial slit), 彼此以鳃条分开, 文昌鱼胚胎仅具有鳃裂 8 对, 直接开口于体表, 成体增加到 180 对, 并被皮肤和肌肉包裹, 形成围鳃腔。鳃裂内壁上有纤毛上皮细胞和血管。当水流入口和咽时, 凭借纤毛上皮细胞的纤毛运动通过鳃裂, 并使之与血管内的血液进行气体交换, 最后, 水再通过围鳃腔, 经由咽部鳃裂的总出水口——腹孔 (atriopore) 排出体外。有人认为文昌鱼纤薄的皮肤也具有直接从水中摄取氧气的的能力。

3) 消化系统:

文昌鱼的口腔外有漏斗状的口笠 (oral hood), 其边缘有数十条流苏状的触毛, 能够滤去一些体积较大难以消化的颗粒。口笠的内腔底部有数条向内伸出的指状突起, 称为轮器 (wheel organ), 文昌鱼通过轮器和咽部纤毛的摆动, 使带有食物微粒的水流经口入咽, 食物被滤在咽内, 而水则通过咽壁的鳃裂至围鳃腔, 由腹孔排出。鳃作为文昌鱼与外界直接接触的器官, 是防止细菌侵入的重要防线。

文昌鱼腹中线处有一凹沟, 为内柱 (endostyle), 内柱能够使碘富集, 与脊椎动物的甲状腺有同源关系 (Venkatesh, 1999; Kozmik, 1999)。内柱可产生分泌物, 将咽内的食物微粒粘结成团, 然后再通过纤毛运动而从后向前流动, 经围咽沟转到咽上沟, 一直向后推送入肠 (Gilmour, 1996)。

肠 (intestine) 位于咽的后部, 为一直管, 尚未进一步分化。它可以与摄入的水、食物以及外源微生物直接接触。肠一直都被认为是文昌鱼一个重要的免疫器官, 它在保护正常的食物消化和吸收功能的同时, 还可以有效地控制微生物的入侵, 防止机体被外源刺激感染。文昌鱼的肠上皮已经被证明在抵御 LPS 刺激方面起着重要作用 (Liu et al., 2009)。

在肠管起始处的腹面向前伸出一中空盲突进入咽的右侧, 称为肝盲囊

(hepatic cecum)，肝盲囊的内壁是腺细胞，能分泌消化液，是文昌鱼唯一的消化腺。肝盲囊长久以来被认为是脊椎动物肝脏的前体 (Muller 1844; Hammar, 1898; Welsch 1975; Ruppert 1997)。有研究发现，脊椎动物中主要在肝脏中合成的三种急性时相反应蛋白：前白蛋白、抗凝血酶 III 和血浆纤连蛋白也存在于文昌鱼的肝盲囊中。因此肝盲囊也被认为是文昌鱼重要的免疫器官之一 (Liang et al., 2006a; Liang et al., 2006b)，能行使脊椎动物肝脏的部分功能。

腹面前部两侧有由皮肤下垂形成成对的腹褶 (metapleural fold)。围鳃腔和腹褶的交界处有围鳃腔孔，称腹孔。在腹孔后面有臀鳍 (anal fin) 和尾鳍 (caudal fin)，它们的交界处有肛门 (anus)，身体开口在左侧。

4) 运动系统:

文昌鱼尚未形成骨质的骨骼，主要是以纵贯全身的脊索 (notochord) 为支持全身的支架。脊索外围有脊索鞘膜，并与背神经管的外膜、肌节之间的肌隔 (myocomma) 等相连接。脊索细胞呈扁盘状，其超显微结构与双壳类软体动物的肌细胞比较相似，收缩时可增加脊索的硬度。文昌鱼的身体两侧具有交错排列的肌节 (myomere)，共有 60 多对，游泳时产生一种从一侧至另一侧的运动。文昌鱼没有浮力器官，当其停止游动时即沉落水底。

文昌鱼背部有背鳍 (dorsal fin)，后端有尾鳍、肛鳍，这些鳍只是一层皮膜物，没有骨质的鳍条。

5) 循环系统:

文昌鱼循环系统属于闭管式，即血液完全在血管内流动，这种情形与脊椎动物基本相同。血液沿腹侧向前流，沿背侧向后流，无明显的心脏。血液无色，没有血细胞和呼吸色素，动脉中的血液通过组织间隙进入静脉。

6) 神经系统:

文昌鱼的中枢神经是一条纵行于脊索背面的背神经管 (nerve cord)，神经管的前端略为膨大形成脑泡。神经管的背面未完全愈合，尚留有一条裂隙，称为背裂 (dorsal fissure)。文昌鱼感觉器官很不发达，这与其少动的生活方式有关。神经管两侧有许多能够感光的黑色小点，称为脑眼 (ocelli)。每个脑眼由一个感光细胞和一个色素细胞构成。神经管的前端有单个大于脑眼的色素点，称眼点 (eye

spot), 无视觉作用。此外, 全身皮肤中还散布着零星的感觉细胞, 主要分布在口笠、触须和缘膜触手等处。

7) 生殖系统:

文昌鱼的生殖系统是由生殖腺 (gonad) 组成的。生殖腺沿体壁排列, 突入围鳃腔, 位于肌节腹面围鳃的两侧。文昌鱼为雌雄异体生物, 性成熟时精巢呈乳白色, 卵巢呈黄色, 无生殖导管, 精卵释放时通过围鳃腔经腹孔排出体外, 在海水中完成受精。

1.2 MAPK 家族成员研究进展

1.2.1 MAPK 概述

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs), 又被称为促分裂原活化激酶, 是一类可以被不同的胞外信号或刺激 (如炎性细胞因子、生长因子、神经递质、激素等) 所激活的丝/苏氨酸蛋白激酶 (Duffesne, 2001)。它最早是由 Ray 和 Sturgill 从 3T32L1 脂肪母细胞中纯化出来的 (Ray and Sturgill, 1988), 起初它只被认为是动物促丝裂原 (mitogen) 的传递体, 后来才发现其与酿酒酵母中的蛋白激酶 Fus3、Kss1 具有很高的同源性, 从而揭示了单细胞酵母中 MAPK 途径的存在。MAPKs 信号转导通路在细胞内具有生物进化的高度保守性, 在低等原核细胞和高等哺乳类细胞内, 目前均已发现存在着多条并行的 MAPKs 信号通路 (蔡琪等, 1999)。因发现 MAPK 还参与激素调节、环境胁迫和细胞分化等多种生物活动的信号传递, 所以 MAPK 也被称为胞外调节激酶 (extracellular regulating kinase, ERK) (Wilsbacher et al., 1999)。

研究发现, MAPKs 能够参与调节胚胎发育、细胞的分化、增殖和凋亡的过程 (Cowan et al., 2003; Troemel et al., 2006)。除此之外, MAPK 在败血性休克 (septic shock)、全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory responses syndrome, SIRS) 等疾病的发生和进展中起重要作用, 特定的 MAPK 通路的阻断能使这些疾病症状得到缓解 (Obata et al., 2000)。近年来, 还发现 MAPK 在细胞恶性转化和肿瘤细胞浸润转移等病理过程中起重要作用 (Liu et al., 2001)。MAPKs 也是

先天性免疫系统的重要组成部分, An 等在人类黑色素瘤细胞 A3752S2 凋亡的实验中,发现 PKC 能够激活 JNK 和 p38MAPK, 促进人类黑色素瘤细胞的凋亡(An et al., 2005),另有体内和体外的实验证实 p38MAPK 能够影响 CD4 T 细胞的功能,抑制 p38MAPK 可能对人类自身免疫性疾病产生出人意料的影响 (Dodeller et al., 2006)。MAPKs 通路的激活对正常的免疫和炎症反应至关重要,可以说 MAPKs 信号通路是细胞信号转导网络的核心。

科研人员对 MAPK 家族的研究开始于 1982 年,Cooper 发现血小板源性生长因子 PDGF 和上皮生长因子 EGF 的刺激,可使细胞内一种蛋白质(相对分子质量 42×10^3)的酪氨酸残基磷酸化,后来在佛波酯刺激的细胞中和病毒转化的细胞中,也发现了这种蛋白质 (Cooper et al.,1982)。Ray 和 Sturgill 在由胰岛素刺激的 3T3-L1 细胞中也分离出了一种相对分子质量为 42×10^3 且苏氨酸和酪氨酸残基均被磷酸化的蛋白激酶,并将其命名为 MAPKs (Ray and Sturgill, 1988)。Rossomando 等发现这种由生长因子和佛波酯等刺激引起的酪氨酸残基磷酸化的蛋白质与由胰岛素刺激引起的苏氨酸/酪氨酸残基磷酸化的蛋白质其实是同一种物质;后来证实苏氨酸/酪氨酸残基双磷酸化是这种蛋白质激活的必要条件 (Rossomando et al., 1989)。Boulton 于 1990 年首先克隆出编码 MAPKs 的 cDNA (Boulton et al., 1990), Crews 在 1993 年用生化及分子克隆技术在哺乳动物细胞内鉴定出 MAPKs 的上游激酶 (MKKKs 和 MKKs),并定义了一种保守的三级激酶激活模式 (Crews et al., 1993)。

三级激酶级联反应:

MAPKs 是一系列级联反应的成分,胞外多种刺激因素,从激素、生长因子到各种应激刺激如辐射伤害、渗透压变化等,都可以激活这个三酶级联反应,从而调节基本的细胞过程。MAPK 级联反应包括 3 种激酶: MAPK 激酶激酶 (MKKK)、MAPK 激酶(MKK)、MAPK,它们构成了一个连续的激活途径。

MAPK 激酶的激酶 (MKKK) 是一个 Ser/Thr 蛋白激酶,研究证明它既可以被 MKKK 激酶磷酸化后激活又可以被小 GTP 结合蛋白家族成员 Ras、Rho 及寡聚化、胞内位置的变化等激活。MKKK 激活后可 Ser/Thr 磷酸化激活下游激酶—MAPK 激酶 (MKK)。

MKK 被 Ser/Thr 磷酸化后激活,作为一个极具特色的 Tyr、Thr 双功能激酶

发挥作用。它能够识别并磷酸化下游 MAPK 分子中“Thr-X-Tyr”模序，使其活化，X 可以是真核生物中的任意一种氨基酸，将两种不同的氨基酸分别磷酸化后激活 MAPK。

MAPK 是一个双磷酸化激活的 Ser/Thr 蛋白激酶，是 MAPK 途径的核心，它的活性取决于该蛋白中仅有的一个氨基酸之隔的 Thr 和 Tyr 是否都被磷酸化。MAPK 磷酸化底物的位点是丝氨酸和苏氨酸残基。MAPK 作用的底物包括一些胞质蛋白激酶、磷脂酶、骨架蛋白，但绝大部分是核内转录因子。

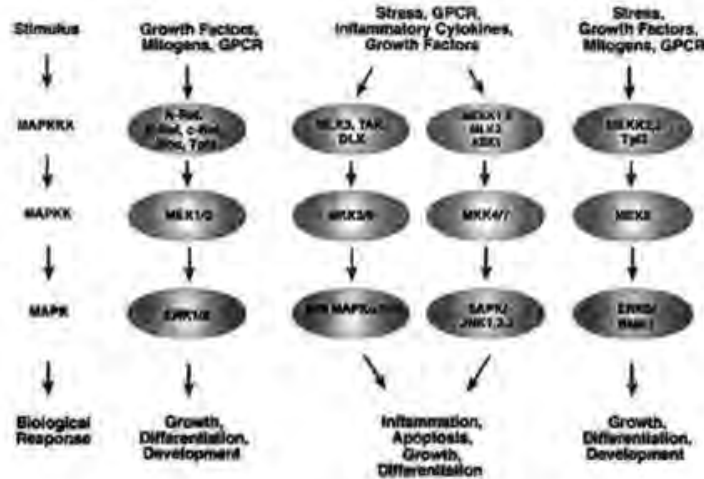


图 2. MAPK 信号通路 (来自 CellSignal)

MAPK 的失活则是通过一些特异性磷酸酶对“Thr-X-Tyr”模序的去磷酸化而调节。它们包括：丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1/2/3/4 (mitogen-activated protein kinase phosphatases, MKP1/2/3/4)、PAC1 VHR、B23、M3/6。不同种类的磷酸酶有较高的特异性。

在 MAPK 级联反应中，MAPKKK 使 MAPKK 的 Ser 和 Thr 发生双重磷酸化从而使其激活，转而使 MAPK 的 Thr 和 Tyr 发生双重磷酸化从而被激活。同时多个 MAPKK 和多个 MAPK 又相互交联，即一个 MAPK 可同时作为多个 MAPKK 的底物被激活，一个 MAPKK 又能够激活多个 MAPK，在 MAPKK 和 MAPKKK 之间也有样的关系，从而形成了一个复杂的网状 MAPK 级联途径 (Kazuya et al., 2002)，这样的激活途径，可使胞外信号被逐级放大并传导至细胞核内，使与膜受体结合的细胞外刺激物与细胞内的效应物相联系，最终形成一条完整的信号传导通路。

目前在哺乳动物中已发现六种不同的 MAPK 信号途径，包括：胞外信号调

节激酶 ERK1/2, ERK3/4, ERK5, ERK7/8, JNK (c-Jun 氨基末端激酶) 和 p38 (Abe et al., 1999, 2002; Bogoyevitch et al., 2004; Roux et al., 2004) ;此外,根据被 MAPK 激酶磷酸化和激活的能力, MAPK 家族进一步被分成传统型和非传统型的酶 (Coulombe et al., 2007) 。前者包括能被 MAPK 激酶磷酸化和激活的 ERK1/2, JNK, p38 (Johnson et al., 2002), 和 ERK5; 而后者包括不能被其激活的 ERK3/4 和 ERK7/8, 不过因目前后者上游成员及下游底物尚未明了, 其生物学作用的具体机制仍有待阐明, 此篇中, 我们将着重阐述前者即传统型的酶几个成员的结构与功能。

1.2.2 MAPK 家族主要成员研究进展

1.2.2.1 ERK5

1) ERK5 的发现及分布

细胞外信号调节激酶 5 (extracellular signal-regulated kinase 5, ERK5) 也称为大丝裂原活化蛋白激酶 1 (big mitogen activated protein kinase1, BMK1), 最早是在 1995 年由两个实验室分别发现的。Zhou 等通过简并 PCR 获得 MEK5 基因的 cDNA 后, 以 MEK5 为探针采用酵母双杂交筛选的方法发现了 ERK5, 并发现它只能被 MEK5 激活而不能被 MEK1 和 MEK2 激活(Zhou et al., 1995)。而 Lee 等则是通过采用变性 PCR 技术克隆得到一个新的 MAPK 家族基因, 因与之前发现的 ERK 激酶亚族有较大不同, 从而将其为 BMK1(Lee et al., 1995)。

ERK5 分子量较大, 为 115kD, 能够编码 816 个氨基酸。与 ERK1/2 有 53% 的同源性。Buschbeck 等发现 ERK5 几乎在所有细胞株中都有表达, 并且在细胞核和细胞质中都有定位(Buschbeck et al., 2005)。

2) ERK5 的结构特征

ERK5 具有与 ERK1/2 相似的“T-E-Y”三肽基序。ERK5 蛋白是由蛋白激酶区和转录激活区两部分构成的。激酶区高度保守的双磷酸化位点(Thr219, Tyr221) 位于 N 端, 丝氨酸和苏氨酸残基被上游激酶(MEK5)双磷酸化后导致 ERK5/BMK1 蛋白的激活。N 端还有细胞质定位区(氨基酸 1-77), MEK5 结合区(氨基酸 78-139), 低聚反应区(氨基酸 140-406) 使底物磷酸化。

此外, ERK5 蛋白组成中有一个唯一的羧基(-COOH)端和 12 环结构, ERK5

的-COOH 端部分是转录激活区，它包含有一个核定位信号（NLS）和脯氨酸富集区，NLS 有利于 ERK5 激活后核定位，脯氨酸富集区则是与带有 SH3 结合域的蛋白相结合的位点，转录激活区能够被自身 N 端激酶端活化后发挥转录活性，活化的转录激活区反过来又能够增强 N 端激酶区的活性。这两个结构决定了 ERK5 在 MAPK 家族中的独特性。

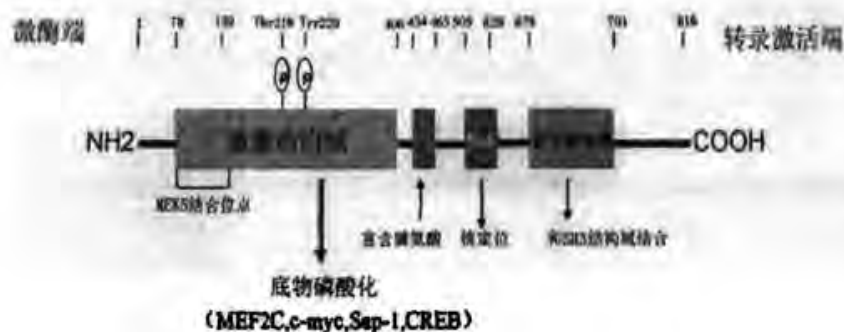


图 4. ERK5 的结构和功能(Roberts et al., 2009)

SH3, Src 同源区 3; MEF2C, 肌细胞增强因子 2C; CREB, cAMP 反应元件粘合蛋白; Sap-1, 受体酪氨酸激酶的一种

3) ERK5 的激活和抑制

ERK5 通路是一种非典型的 MAPK 通路，外界很多刺激因素如溶血磷脂酸、佛波酯和一些有丝分裂原如上皮生长因子(EGF)、神经生长因子(NGF)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、脑源性神经生长因子(BDNF)等(Kato et al., 1998; Kamakura et al., 1999; Kesavan et al., 2004; Girio et al., 2007)，以及一些细胞应激作用如氧化 (Pi et al., 2005)、紫外线照射和渗透压干扰等 (Suzaki et al., 2004)，都能够激活这条通路。ERK5 还可以通过自磷酸化作用激活 C 端的转录激活域来调节下游基因的表达 (Hiroko et al., 2007)。ERK5 通路在胚胎发育，保持血管完整性和细胞生长中起重要作用。

ERK1/2 抑制剂 PD98059 在高葡萄糖浓度下可以抑制 ERK5 的活性(Suzaki et al., 2004)。较高浓度的 MKK1 抑制剂 U0126 也可以阻断 ERK5 通路。研究发现，高浓度 PD184352 可以大部分阻断 MEK5-ERK5 通路，但是在其浓度低于 2mM 时则无法发挥此作用，2mM 浓度的 PD184352 可以延长 MEK5-ERK5 的激活时间 (Mody et al., 2001)。ERK5 的选择性抑制剂 BIX02188 和 BIX02189 (Tatake et al., 2008)，可以有效抑制 ERK5 磷酸化，而对于 MAPK 家族其他成员则无影响

(Wang et al., 2011)。

4) ERK5 激酶级联反应

ERK5 信号通路与经典的 MAPK 通路一致：胞外刺激——MAPKKK (MEKK2/3)——MAPKK (MEK5)——ERK5 激活，这就是 ERK5 通路的激酶级联反应。MEKK2/3 是 MAPKKK 家族的成员，它被 G-蛋白偶联受体激活后，能够激活 MEK5；MEK5 属于 MAPKK 家族的成员，免疫共沉淀法显示，MEK5 是 ERK5 唯一的并且是特异的上游激酶 (McCaw et al., 2005)，它对 ERK5 激酶呈高度特异性，即使 MEK5 过表达，也不能激活 MAPK 家族的其他成员。研究表明，MEKK2 和 MEKK3 的激活存在细胞特异性，如在 D10T 细胞中是 MEKK2 介导 ERK5 的激活，而在 COS7 及 HEK293 细胞中，则是 MEKK3 介导 EGF 刺激引起的 ERK5 活化 (Sun et al., 2001)。此外，蛋白激酶 C 和非受体型酪氨酸激酶也可位于上游激活 ERK5。

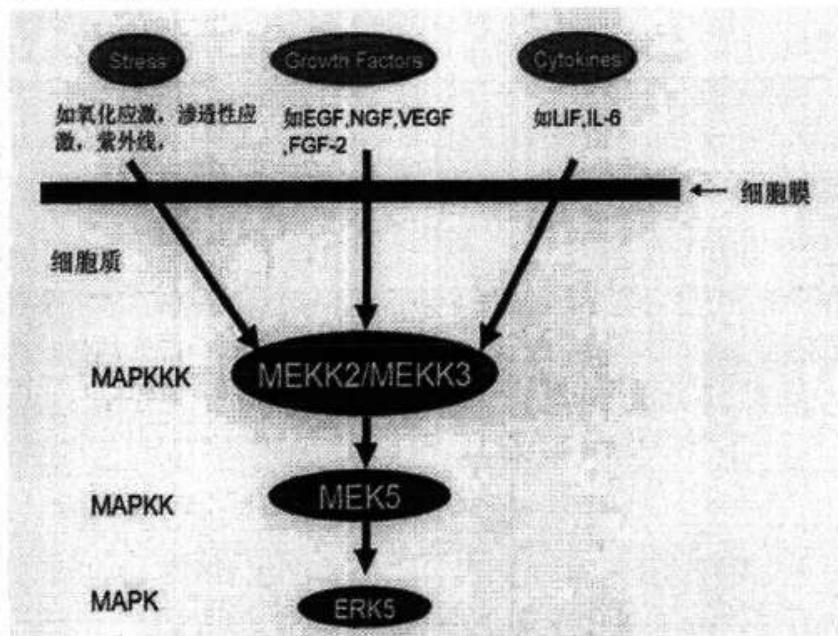


图 5. ERK5 级联反应示意图(Roberts et al., 2009)

EGF,表皮生长因子; NGF, 神经生长因子; VEGF, 血管内皮细胞生长因子; FGF-2, 成纤维细胞生长因子; LIF, 白血病抑制因子; IL-6, 白细胞介素-6

5) ERK5 的生物学功能

ERK5 通路参与机体的多种生物学效应，如细胞的增殖和凋亡、血管生成和侵袭、肿瘤的发生和发展及化疗抵抗等，很多功能与 ERK1/2 是相似的。

Kato 等提出, ERK5 可以促进细胞生存, 抑制凋亡, 这也是在正常情况下 ERK5 的主要生理功能。研究发现上皮生长因子 (EGF) 是 ERK5 强效激活剂, ERK5 负显性突变体可阻断 EGF 诱导的肿瘤细胞进入细胞周期 S 期, 阻止细胞增殖, 提示 ERK5 可能与肿瘤的发生、发展有关 (Kato et al., 1998)。Nishimoto 等人的实验证明 c-Jun 参与调控细胞周期, c-fos 则介导 ERK5 的抗凋亡作用 (Nishimoto et al., 2006)。Sohn 等报道对胸腺细胞发育成熟起关键作用的是 ERK5 而不是 ERK1/2, 从而表明了 ERK5 对 T 淋巴细胞分化的作用 (Sohn et al., 2008)。通过基因敲除鼠 ERK5 或者 ERK5 通路中的一些信号分子, 发现 ERK5 信号通路在血管生成、心脏发展、血管完整性维持中都有重要作用 (Hayashi et al., 2004)。另外在脊神经节, ERK5 信号通路的激活将导致持久的痛觉过敏的发生 (Xiao et al., 2008)。在肿瘤方面, 研究发现 ERK5 通路的激活与淋巴结转移有关 (Sticht et al., 2008), MEK5-ERK5 通路的抑制可能有助于提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性 (Weldon et al., 2002)。

ERK5 通路至今只发现一个亚型能被 TNF- α 、H₂O₂、细胞外高渗等刺激激活, 说明该通路可能也参与某些条件下的炎症反应调控 (English et al., 1998; Zhao et al., 2000)。

1.2.2.2 ERK1/2

细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal regulated kinase 1/2, ERK1/2) 是 ERK 家族的重要成员, 包括 2 个亚型, ERK1 (p44MAPK) 和 ERK2 (p42MAPK)。两者的同源性约为 85%, 结合底物的核心区同源性更高。ERK1/2 正常定位于胞浆区, 被激活后移位到胞核区, 作用于多种转录因子及核蛋白, 参与细胞的增殖、分化及细胞的迁移与凋亡等。ERK1/2 在受到细胞生长因子作用时被激活, 受其它细胞刺激, 如 T 细胞激活、佛波酯、血栓素等激活, 能够快速诱导 ERK1/2 苏氨酸/酪氨酸磷酸化。

ERK1/2 的双磷酸接受位点在活化环中被一个谷氨酸残基隔开, 形成 T-E-Y 序列。ERK1 和 ERK2 在体外有相同的作用底物, 暗示二者在功能上有重叠 (Whitmarsh et al., 1996)。

ERK1/2 通路主要通过以下 2 条途径被激活: ①受体酪氨酸激酶 Ras 的激活

②G 蛋白偶联受体对 ERK1/2 通路的激活, 其中 Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 为研究较多的经典途径。

细胞外刺激因素与细胞膜受体结合引起受体二聚化并使酪氨酸残基磷酸化, 进一步聚集 Grb2 (growthfactor receptor bound2, Grb2) 等接头蛋白, 接头蛋白 Grb2 的 SH3 结构域与 Ras 的鸟苷酸交换因子 SOS (Son of Sevenless) 结合, 使 Ras 发生 GDP/GTP 转换, Ras 活化后进一步激活 Raf 激酶, Raf 激酶可磷酸化激活 MEK, 诱导其下游 ERK1/2 苏氨酸/酪氨酸残基磷酸化, 被活化后的 ERK1/2 移位至胞核区, 调节核内基因的转录, 产生各种生物学效应 (Whitmarsh et al., 1996)。

PD98059 和 U0126 是 ERK1/2 信号通路的特异性抑制剂, 它们可以通过抑制 MEK1/2 的活性阻止 ERK1/2 的磷酸化, 从而阻断 ERK1/2 信号通路。

普遍认为, ERK1/2 通路激活后与细胞的增殖分化及调节密切相关, p-ERK 进入细胞核后, 启动一些原癌基因 (如 c-jun、c-fos、c-myc 等) 的表达, 促使细胞由 G1 期转向 S 期, 产生细胞恶性增殖; 此外 ERK1/2 还可以使细胞周期蛋白 E (E-cyclinE) 的表达上调, 灭活 P27KIP 细胞周期抑制蛋白, 从多个水平调节细胞凋亡。ERK1/2 也可通过拮抗 JNK 或者是抑制 p38 促细胞凋亡的活性以促进细胞的生存 (Pumiglia et al., 1998)。已有国外研究表明, ERK1/2 信号通路激活后能显著影响胸腺淋巴细胞的增殖与分化 (Mariathasan et al., 2000)。

ERK1/2 通路还参与应激刺激、细菌产物等引起的细胞反应, 通路的激活与炎症反应也密切相关 (Dziarske et al., 1996; Jiang et al., 1999; Zhang et al., 1999)。Xiao 等的研究发现, Fyn-ERK1/2 可参与老年大鼠创伤应激后免疫调节 (Xiao et al., 2009)。

此外, ERK1/2 还与肿瘤的复发与转移有关, 它能够增强肿瘤细胞的增殖、运动能力或上调基质金属蛋白酶 (MMP2, MMP9) 的表达, 促进细胞外基质的降解或肿瘤血管的生成 (Guruvayoorappan et al., 2008)。MEK1/2 和 ERK1/2 在恶性黑色素瘤中均有高表达, 表明该通路的激活与细胞增殖失控引起的肿瘤发生密切相关。MEK 的一种药理学抑制剂 PD98059 能够通过选择性抑制 MEK1/2 的激酶活性, 抑制 ERK1/2 信号通路的活化, 且能显著抑制急性骨髓性白血病细胞的增殖, 促进其凋亡进程 (Lunghi et al., 2003)。癌细胞株中 ERK1/2 能抑制 JNK 通

路上游的 MKK, 促进乳腺癌细胞生长(Fukazawa et al., 2002).

1.2.2.3 JNK

JNK 最早是在经环己亚胺处理的大鼠肝脏中被鉴定、纯化的, 它是一种细胞膜结合蛋白激酶。Hibi 等用紫外线照射细胞后, 发现它能够结合 c-Jun 的氨基端活化结构域, 并磷酸化其 Ser-63 和 Ser-73 位点, 故称之为 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) (Hibi et al., 1993)。目前已发现 3 种 JNK, 分别由 3 个基因编码(Gupta et al., 1996)。每个 JNK 基因都可以编码 46 和 54 kD 的蛋白产物。JNK1 和 JNK2 在组织中广泛表达, 而 JNK3 仅在脑、心和睾丸中表达(Liu et al., 2005)。3 个基因通过选择性剪切共产生了 10 种异构体, 这种选择性剪切, 改变了 JNK 与底物停泊位点相互作用的能力, 造成它的底物特异性。

JNK 信号通路能够被多种细胞外刺激因素激活, 如 LPS、生长因子(EGF)、细胞因子(TNF- α 、IL-1 等)、应激刺激(如紫外线、高渗、缺血/再灌注)及某些 G 蛋白偶联的受体等 (Dougherty et al., 2004), 广泛参与调节细胞生命过程。

与其它 MAPK 一样, JNK 在 VIII 区含有“Thr-Pro-Tyr(T-P-Y)”这一特征基序(Gupta et al., 1996)。MKK4 和 MKK7 通过磷酸化 TPY 序列的第 183 位苏氨酸残基 (Thr183) 和第 185 位酪氨酸残基 (Tyr185) 激活 JNK, 其中 MKK4 可同时激活 JNK1 和 p38, 而 MKK7/ JNKK2 则只能特异性地激活 JNK。在 JNK 信号通路中 Thr183 和 Tyr185 的功能不同, JNKK2 优先磷酸化 Thr183 位点 (Fleming et al., 2000; Tournier et al., 2001), 而 JNKK1 优先磷酸化 Tyr185 位点 (Lin et al., 1995; Fleming et al., 2000), 该反应在细胞核内和胞浆中均可进行。

JNK 信号通路的模式可大致总结为: 应激、紫外线等——生发中心激酶 (germinal center kinase, GCK)——MEKK——MEK4/7——JNK——细胞凋亡、增殖、分化等。JIP-1 作为 JNK 的抑制因子在鼠中被发现, 可以抑制 JNK 对转录因子的激活。通过鼠的基因敲除实验发现, MAPK 磷酸酶 (MKP) 在 JNK 信号通路中起负调节作用, 用反应性氧核素抑制 MKP 活性则可延长 JNK 的活化时间 (Kamata et al., 2005)。SP600125 等合成产物为 JNK 通路抑制剂。

JNK 信号通路可参与多种生理过程, 它能够调节胚胎发育、细胞的增殖、凋亡, 还能作用于一些分化细胞和免疫细胞。研究表明, JNK 的激活可诱导细胞

凋亡,但是有些细胞仅有 JNK 的激活不足以引起凋亡,如 IL-1 可显著激活 JNK,某些条件下也并不引起凋亡,这一现象表明刺激物和细胞的差异会引起 JNK 的激活强度和作用的不同 (Xia et al., 1995; Chen et al., 1996)。JNK 也是效应 T 细胞发挥作用所必需的 (Constant et al., 2000)。Dong 等发现 JNK1 能够抑制接受抗原刺激后的初始 CD4⁺T 细胞向 Th2 分化 (Dong et al., 1998), JNK2 可诱导其向 Th1 分化并能促进 Th1 细胞因子的分泌 (Yang et al., 1998)。Zhang 等研究发现 JNK 参与介导了小鼠脾脏 T 淋巴细胞的活化诱导的细胞凋亡(AICD)过程(Zhang et al., 2000)。

JNK 特异性抑制剂 SP60025 能够显著减少 HIV 病毒蛋白 R 诱导的外周血单个核细胞的凋亡,表明 JNK 通路可能参与调节这一凋亡过程 (Mishra et al., 2007)。Bai 等研究发现 JNK 通路还与 ZBP-89 诱导的人类胃肠道肿瘤细胞的凋亡有关 (Bai et al., 2004)。另有研究发现 JNK 能够促进细胞凋亡或能够影响 CD8⁺T 淋巴细胞免疫系统对肿瘤的监护作用,这可能是其能够抑制肿瘤形成的原因 (Gao et al., 2005)。

1.2.2.4 p38

1) p38 的发现及亚型分布

p38 是由几个实验研究共同发现的。早在 1992 年, Weinstein 等用脂多糖(LPS)刺激巨噬细胞后,发现有三种分子量分别为 39kD、41kD 和 44kD 的蛋白快速(4-5min)发生酪氨酸磷酸化,其中分子量较小的蛋白质当时并未得到鉴定 (Weinstein et al., 1992)。1993 年, Brewster 等人研究高渗透压对酵母的作用时,发现由 360 个氨基酸残基组成的相对分子质量为 38×10^3 的蛋白,与 JNK 同属 SAPK 的信号转导通路 (Brewster et al., 1993); 同年, Han 等发现 LPS、紫杉醇和蛋白激酶 C 的特异激活剂佛波酯 (PMA) 可以快速诱导转化 CD14 基因的小鼠前 B 淋巴细胞、小鼠巨噬细胞株 Raw264.7 及 C3He/FeJ 和小鼠腹腔巨噬细胞中一种分子量为 38kD 的蛋白激酶发生酪氨酸磷酸化 (Han et al., 1993); 用高渗和 LPS 刺激小鼠肝脏细胞,也发现此种现象,继而分离到这种蛋白激酶,命名为 p38。后来从肝细胞 cDNA 文库中筛选到了编码 p38 基因的克隆, Northern blot 表明 p38 mRNA 在小鼠巨噬细胞、T 细胞和 B 细胞中均有表达 (Han et al., 1994);

Lee 等人在筛选抑制炎症因子生成的化合物 (cytokine-suppressive anti-inflammatory drugs, CSAID) 时, 发现一族吡啶-异喹啉化合物能够明显抑制 IL-1 和 TNF- α 的生成, 因而 p38 又被称为细胞因子抑制性抗炎药物结合蛋白 (Cytokine-Suppressive Antiinflammatory Drug-Binding Protein, CSBP), 测序结果证明 CSBP1/2 与 p38 为同一基因 (Lee et al., 1994)。

Han 研究小组在发现和克隆了 p38 α 后, 又先后发现了另外三个 p38 亚型: p38 β 、p38 γ 和 p38 δ (Jiang et al., 1996; Li et al., 1996; Jiang et al., 1997)。它们与最早发现的 p38 α 分别具有 73%、63%和 62%的序列同源性 (龚小卫等, 2003)。p38 α 和 p38 β 各有两种剪接方式, 因此产生了整个 p38 亚族的 6 种亚型。它们在机体内的表达和分布具有组织特异性。在亚族中的 6 种异构体亚型中, p38 α 和 p38 β 分布广泛, 几乎在所有的组织中表达; p38 β 的异构体称为 p38 β_2 , 比 p38 β 缺少 8 个氨基酸, 主要存在于脑组织中; 而 p38 γ 主要存在于肌肉组织; p38 δ 主要在肺、肾、肠、睾丸及一些腺体如肾上腺中表达 (Morazzani et al., 2004)。研究发现, p38 在细胞核和细胞质中均有表达。p38 α 、p38 β 在未受刺激的单核细胞中, 主要分布于胞质中, 少量分布于胞核区, 受 LPS 刺激后移位至细胞核, 通过磷酸化激活各种转录因子调控相关基因的表达; p38 γ 位于胞质中, 受 LPS 刺激后无移位, 暗示 p38 γ 可能作用于胞质中的其他酶类; p38 δ 在静息细胞中主要分布于胞质中, 受 LPS 刺激后移位于胞膜区。这 6 种 p38 异构体亚型在 LPS 刺激后移位现象的差异可能与它们分布的特异性及作用途径有关。

2) p38 的结构特征

p38 的 4 个亚型的氨基酸序列非常相近, 都包含有 T-G-Y 双位点磷酸化三肽基序。三肽基序位于蛋白激酶第 VII 和第 VIII 结构域之间的“T 环结构(T-loop)”内, 这一结构也被称作“L12 环状结构 (Loop-12 structure)”。T 环位于分子表面并临近激活位点, 因其部分残基形成唇状结构, 因此也被形象地称作“磷酸化唇”或“激活唇”, 是决定激酶活性的关键区域 (姜勇等, 1999; 龚小卫等, 2003)。T 环长度在控制激酶自主磷酸化过程中具有重要的作用 (姜勇等, 1999)。研究发现, 不同的 MAPK, T 环的长度有所不同。ERK1/2 的最长, 有 25 个氨基酸, p38 的最短, 仅含 19 个氨基酸, 从而使 p38T 环结构的灵活性降低, 构型难以发生变化, 其自主磷酸化的程度较 ERK1/2 高; T 环结构的修饰并不会造成每个

MAPKK 对 p38 的特异性选择作用发生变化(Jiang et al., 1997; Wang et al., 1997)。p38 关键性的结构还包括 ATP 结合位点、重金属结合位点、磷酸基团结合位点等。

3) p38 的激活和抑制

p38 信号通路可被多种应激原,如紫外线、脂多糖(LPS)、促炎细胞因子(如 TNF- α , IL-1)、应激刺激(如热休克、高渗、缺血/再灌注)等所激活,引起细胞内蛋白激酶的级联反应,进而影响细胞转录、蛋白合成和细胞表面受体表达等生物效应(季宇彬等, 2010)。而类似脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子(TNF)、血小板衍生因子(PDGF)和缺血/再灌注等炎性刺激,则能诱导内源性免疫细胞如单核细胞、内皮细胞和中性粒细胞内的 p38 激活。

p38 特异性抑制剂是一类吡啶异咪唑啉化合物,包括 SB203580、SB202190、SB220025、SB206718 等(Lee et al.,1994;1999)。目前,抑制 p38 生物活性使用最广泛的抑制剂是 SB203580。SB203580 抑制 p38 活性后可减少或阻断多种炎性介质,如 IL-6 以及某些和人类免疫缺陷病毒有关的细胞因子的产生(Lee et al., 1994)。p38 的 4 种异构体对抑制因子的敏感程度不同:p38 α 、p38 β 对 SB203580 的敏感程度高,p38 γ 和 p38 δ 则对 SB203580 有抗性(Eyers et al., 1999)。研究表明 SB203580 是作用于 p38ATP 结合活性位点 Thr106,导致 p38 不能与 ATP 结合从而失去激酶活性的,而不是通过阻断上游激酶对 p38 的激活(Morel et al., 2005)。Kook 等报道,在 C2C12 肌细胞分化过程中,细胞自身可分泌一种叫肌抑素(calpeptin)的抑制蛋白,通过抑制 p38 的磷酸化达到抑制骨骼肌细胞分化的目的(Kook et al., 2008)。

4) p38 激酶级联反应

MAPK 信号转导途径的激活途径相似,都是保守的三酶级联反应:MAPK 激酶激酶(MAPKKK)——MAPK 激酶(MAPKK)——MAPK,激活后都能作用于转录因子,调节特定的基因表达。p38 的磷酸化级联反应包括以下 3 种激酶:MAPKKK 类的(包括 MEKK5、MLK2/3、DLK、ASK1、TPL2 和 TAK1),MAPKK 类的(MEK3/4/6,又叫 MKK3/4/6)和 p38MAPK(ROUX et al., 2004),其中, TAK1 被 TAK 结合蛋白(TAB)激活,介导转化生长因子(TGF- β)的信号转导, TAK1 也可激活 MKK4,进而活化 p38。p38 激活后发生核移位,并对许多蛋白

激酶和转录因子具有磷酸化和激活的作用。其中 MKK3 和 MKK6 是 p38 通路中 MAPKK 的关键酶。细胞外信号与受体特异性结合后,通过磷酸化 PAK 和 MLK (主要为 MLK3),促进 MKK3/6 基因的表达,使其表达蛋白磷酸化,进而诱导 p38 的基因转录,构成一个连续的蛋白激酶反应链:MEKK5—MKK3/6—p38MAPK (Downey et al., 1998)。

有研究表明, MKK3 对炎症介质的表达起重要的作用。在中性粒细胞中, LPS 是通过 MKK3 而不是 MKK6 来激活通路的,而且 MKK3 能够选择性的激活 p38 α (Keesler et al., 1998)。

此外,不同亚型的 p38 可与不同的上游激酶偶联,激活不同的底物酶,如 MEK4 只激活 p38 α , MEK3 可激活 p38 α 、p38 γ 和 p38 δ ,不能激活 p38 β ,而 MEK6 可以激活 p38 所有类型。体外细胞转化实验表明, MEKK2、MEKK3 可通过激活 MKK4 同时激活 JNK 和 p38,而 MEKK3 通过激活 MEK3 特异性激活 p38。不同的异构体对底物的作用也具有选择性, p38 β_2 对 ATF2 的磷酸化作用显著强于 p38 α , p38 γ 可磷酸化 ATF2,却不能激活 MAPKAP-K2 和 MAPKAP-K3 (Li et al., 1996)。不同亚型的 p38 对同一刺激的反应也不相同,在 LPS 刺激的巨噬细胞内, p38 α 能够被强烈激活,而 p38 δ 只能被较低程度的激活 (Hale et al., 1999); IL-1 对 p38 α 的激活明显强于 p38 β ,而 TNF- α 使 p38 活性达到高峰的时间则明显短于使 p38 β 达到高峰的时间 (Jiang et al., 1996)。

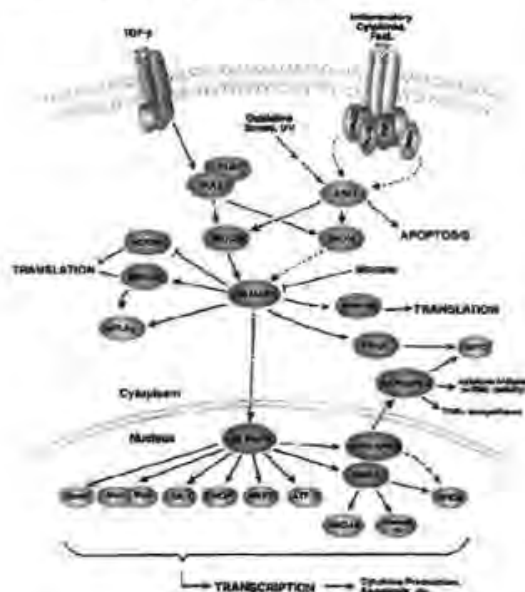


图 3. p38MAPK 信号通路 (来自 CellSignal)

5) p38 的生物学功能

p38 在激活一些转录因子和其它的蛋白酶后可导致许多生物学效应的发生。目前的研究认为, p38 信号通路在参与应激条件下细胞的免疫调节、炎症反应和细胞凋亡过程中起着重要的作用。

p38 的激活与机体发生炎症反应时白细胞的附壁、粘着、游出和趋化作用等阶段紧密相关(张频捷等, 2010), 研究显示, p38MAPK 可影响多种炎症相关基因如 TNF、uPA、COX-2 等的表达。大鼠巨噬细胞受到 LPS 的刺激时, 可导致细胞内 p38MAPK 的磷酸化, 抑制这一步磷酸化可减轻甚至完全阻断巨噬细胞内肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的产生, 说明炎性反应中 TNF- α 的产生与 p38MAPK 激活密切相关(郭慧等, 2008)。p38 途径还参与到早期 T 细胞 TCR 和 CD28 介导信号的整合过程中, 促进 T 细胞的激活(Zhang et al., 1999)。特异性抑制剂 SB203580 则可以通过阻断 p38 通路减轻炎症反应, 抑制 T 细胞中 IL-2 的产生, 进而抑制 IL-2、IL-7 诱导的细胞增殖(Crawley et al., 1997)。p38 激活后还可介导中性粒细胞中 IL-8 的合成、弹性蛋白酶的释放、前列腺素合成及 E-选择素的表达等。p38 也能够诱导产生能调控结缔组织病理性重构的 Cox-2 酶, 及与氧化损伤相关的细胞内酶类如一氧化氮合酶 iNOS 等(Badger et al., 1998; Da et al., 1997)。

p38MAPK 信号通路与细胞凋亡也有密切联系。除前面提到的几种刺激因素诱导的细胞凋亡均需要它的激活外, 死亡受体(Fas 和 TNF 受体)的连接也可激活 p38 通路, 在某些细胞系中它参与介导凋亡性细胞的死亡。p38MAPK 促细胞凋亡的最有力证据来自于体外实验, Saulsbury 等在研究中发现, 在毒死蜱诱导胎盘细胞凋亡过程中, p38MAPK 的激活可以保护胎盘细胞免受其损伤(Saulsbury et al., 2008); p38MAPK 通路的特异性抑制剂 SB203580 可以明显抑制慢性支气管炎大鼠肺泡巨噬细胞的凋亡(孟晓明等, 2008)。

p38MAPK 是一些疾病的主要诱导途径, 抑制这条通路可能对一些疾病的治疗有效。p38MAPK 可缓解肌肉萎缩。Shin 等报道 p38MAPK 可以通过诱导热休克蛋白 α 晶体蛋白表达来保护处于氧化应激状态的星状胶质细胞。另有资料显示, 感染 HIV 的淋巴细胞内 p38MAPK 活性增高, 利用反义 cDNA 或是特异性化学抑制剂阻断 p38 基因或蛋白的表达时, 能一定程度的抑制病毒的复制

(Cohen et al., 1997)。

p38 信号通路对于肿瘤细胞的发生、凋亡及转移具有综合性作用。与正常组织相比, p38 在结肠癌、食管癌、乳腺癌等许多人类肿瘤组织中呈持续的激活表达。研究发现, 在 H-Ras 诱导的细胞迁移和侵袭中, 抑制 p38 的活性可以减弱细胞运动的能力 (Kim et al., 2003); 乙肝病毒 X 蛋白可通过 p38MAPK 信号通路灭活 p53 基因, 促使原发性肝癌的发生 (Wang et al., 2008)。另外, p38MAPK 信号通路参与肿瘤细胞外基质的降解, 有研究表明 p38MAPK 信号通路在可以调控多种细胞外刺激诱导的基质金属蛋白酶 (MMPs) 中表达, MMP 是一类与肿瘤侵袭转移密切相关的蛋白水解酶, 此酶可使细胞外基质降解, 而细胞外基质的降解是恶性肿瘤侵袭和转移的关键环节 (魏小勇等, 2009)。p38MAPK 信号通路也能够参与肿瘤血管生成。在恶性肿瘤中, 能够促进毛细淋巴管内皮细胞分裂和增殖、毛细淋巴管的扩张和数目的增加的毛细淋巴管特异性生长因子 VEGF-C 的表达升高, 而 VEGF 主要是通过 p38 信号通路促使肝癌细胞转移的 (毛华等, 2000)。

许多研究证实, p38MAPK 途径还与组织缺血/再灌注损伤密切相关。再灌注所产生的氧化物可使 p38MAPK 得以激活, 进而使得细胞因子产生增多。李荣山等的大鼠实验发现, p38MAPK 特异性阻滞剂 SB203580 可显著减少肾缺血再灌注损伤诱导的 p38MAPK 通路的激活, 进而减少肾小管上皮细胞凋亡的发生 (李荣山等, 2004)。

在细胞内, 以 MAPK 信号通路为主干, 加上各种上游影响因子和下游作用底物, 构成了一个反应灵敏、功能多样的信号转导网络。MAPK 家族的主要成员在受到外界多种刺激时能够被激活, 从而在调控生物体的细胞分化、增殖, 炎症反应及肿瘤疾病发生和治疗方面具有重要作用。虽然各家族成员是被不同的刺激因素激活, 形成不同的转导通路, 激活各不相同的转录因子, 最终介导不同的生物学效应, 但这几条通路存在广泛的 cross talk, 能够通过相互协同或抑制来发挥生物效应, 如在单核细胞受到 LPS 刺激时, p38 和 JNK 可以协同作用使炎症相关基因表达增加 (Han et al., 1997); 而 p38 的直接激活也可以在空间上阻断 ERK1/2 发挥作用 (Zhang et al., 2001)。

实验室前期选取文昌鱼为研究对象, 对文昌鱼体内 MAPK 家族进行了初步

的研究，克隆到部分基因片段，证实文昌鱼体内确实有 MAPK 家族成员的存在，并对基因所演绎的蛋白进行了同源性和进化分析。因没有合适的抗体，未能从蛋白水平对文昌鱼体内的 MAPK 家族成员进行进一步的研究，因此，实验室自行制备文昌鱼特异性的抗体显得十分必要，这也是进一步研究 MAPK 家族成员在文昌鱼体内的表达分布并推测其可能发挥的功能的基础。

参考文献

- Abe MK, Kuo WL, Hershenson MB, Rosner MR, 1999. Extracellular signal-regulated kinase 7(ERK7), a novel ERK with a C-terminal domain that regulates its activity, its cellular localization, and cell growth. *Mol Cell Biol.* 19:1301-1312.
- Abe MK, Saelzler MP, Espinosa R, et al, 2002. ERK8, a new member of the mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem.* 277: 16733-16743.
- An WW, Wang MW, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T, 2005. Mitogen-activated protein kinase-dependent apoptosis in norcan-tharidin-treated A375-S2 cells is preceded by the activation of protein kinase C. *Chin Med J (Engl).* 118: 198-203.
- Badger AM, Cook MN, Lark MW, et al, 1998. SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J Immunol.*161: 1467-1473.
- Bai L, Yoon SO, King PD, Merchant JL, 2004. ZBP-89-induced apoptosis is p53-independent and requires JNK. *Cell Death and Differentiation.*11: 663-673.
- Bogoyevitch MA, Court NW, 2004. Counting on mitogen-activated protein kinases-ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal.*16: 1345-1354.
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, et al, 1990. An insulin-stimulated protein-kinase similar to yeast kinases involved in cell-cycle control. *Science.*249:64-67.
- Boulton TG, Cobb MH, 1991. Identification of multiple extracellular signal-regulated kinases (ERKs) with antipeptide antibodies. *Cell Regulation.*2: 357-371.
- Brewster JL, Valoir T, Dwyer N, et al, 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast[J]. *Science.*259(5102):1760-1763.
- Buschbeck M, Ullrich A, 2005. The unique c-terminal tail of the mitogen-activated

- protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem.* 280(4):2659-2667.
- Chen YR, Wan XP, Templeton D, et al, 1996. The role of c-Jun terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by Ultraviolet C and γ Radiation. *J Biol Chem.* 271(50):31929-31936.
- Cohen PS, Schmidtmerova H, Dennis J, et al, 1997. The critical role of p38 MAP kinase in T cell HIV21 replication. *Mol Med.* 3:339.
- Constant SL, Dong C, Yang DD, et al, 2000. JNK1 is required for T cell-mediated immunity against *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 165: 2671-2676.
- Cooper JA, Bowenpope DF, Rains E, et al, 1982. Similar effects of platelet-derived growth-factor and epidermal growth-factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular protein. *Cell.* 31 (1):263-273.
- Coulombe P, Meloche S, 2007. Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta.* 1773: 1376-1387.
- Cowan KJ, Storey KB, 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 206: 1107-1115.
- Crawley JB, Rawlinson L, Lali FV, et al, 1997. T Cell Proliferation in Response to Interleukins 2 and 7 requires p38MAPKinase Activation. *J Biol Chem.* 272: 15023-15027.
- Crews CM, Erikson RL, 1993. Extra-cellular signals and reversible protein phosphorylation: what to make of it all. *Cell.* 74: 215-217.
- Da Silva J, Pierrat B, Mary JL, Lesslauer W, 1997. Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem.* 272:28373-28380.
- Dérjard B, Hibi M, Wu IH, et al, 1994. JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain.

Cell.76:1025-1037.

- Dodeller F, Schulze-Koops H, 2006. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther.*8:205.
- Dong C, Yang DD, Wysk M, et al, 1998. Defective T cell differentiation in the absence of JNK1 [J]. *Science.*282 (5396):2092-2095.
- Dougherty CJ, Kubasiak LA, Frazier DP, et al, 2004. Mitochondrial signals initiate the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by hypoxia-reoxygenation. *FASEB J.*18: 1060-1070.
- Downey JS, Han J, 1998. Cellular activation mechanisms in septic shock. *Front Biosci.*3:d468-476.
- Dufresne SD, Biorbek C, E-haschimi K, 2001. Altered extracellular signal-regulated kinase signaling and glycogen metabolism in skeletal muscle from p90 ribosomal S6 kinase 2 knockout mice [J]. *Mol Cell Biol.*21(1): 81-87.
- Dziarske R, Jin YP, Gupta D, 1996. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase ERK1, ERK2, p38 and c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan. *J Infect Dis.*174 (4): 777-785.
- El-Remessy AB, Tang Y, Zhu G, Matragoon S, 2008. Protective effects of cannabidiol in endotoxin-induced uveitis: critical role of p38 MAPK activation. *Mol Vis.*4: 2190-2203.
- Elsea CR, Roberts DA, Druker BJ, Wood LJ, 2008. Inhibition of p38MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *Plos One.*3: e2355.
- English JM, Pearson G, Baer R, et al, 1998. Identification of substrates and regulators of the mitogen-activated protein kinase ERK5 using chimeric protein kinases. *J Biol Chem.* 273 (7): 3854-3860.
- Eyers PA, Van den Ijssel P, Quinlan RA, et al, 1999. Use of a drug-resistant mutant

- of stress-activated protein kinase 2 α /p38 to validate the in vivo specificity of SB 203580. *FEBS Lett.*451 (2):191-196.
- Fleming Y, Armstrong CG, Morrice N, et al, 2000. Synergistic activation of stress-activated protein kinase 1/c-Jun N-terminal kinase (SAPK1/JNK) isoforms by mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) and MKK7. *J Biol Chem.* 352 (Pt 1): 145-154.
- Fukazawa H, Noguchi K, Murakami Y, Uehara Y, 2002. Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated extracellular-regulated kinase (ERK) pathway. *Mol Cancer.*1 (5):303-309.
- Gao Y, Tao J, Li MO, et al, 2005. JNK1 is essential for CD8+ T cell-mediated tumor immune surveillance. *J Immunol.*175: 5783-5789.
- Gírio A, Montero JC, Pandiella A, et al, 2007. Erk5 is activated and acts as a survival factor in mitosis. *Cell Signal.*19 (9):1964-1972.
- Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, et al, 1996. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *EMBO J.*15:2760-2770.
- Guruvayoorappan C, Kuttan G, 2008. Amentoflavone inhibits experimental tumor metastasis through a regulatory mechanism involving MMP-2, MMP-9, prolyl hydroxylase, lysyl oxidase, VEGF, ERK-1, ERK-2, STAT-1, NM23 and cytokines in lung tissues of C57BL/6 mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol.* 30(4): 711-727.
- Hale KK, Trollinger D, Rihaneck M, et al, 1999. Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma and delta in inflammatory cell lineages. *J Immunol.*162 (7): 4246-4252.
- Hammar JA, 1898. Zur Kenntnis der Leberentwicklung bei Amphioxus. *Anat Anz.* 14:602-606.

- Han J, Lee JD, Tobias PS, et al, 1993. Endotoxin induces rapid protein tyrosine phosphorylation in 70Z/3 cells expressing CD14. *J Biol Chem.* 268(33):25009-25014.
- Han J, Lee JD, Bibbs L, et al, 1994. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science.*265 (5173): 808-811.
- Hayashi M, Lee JD. Role of the BMK1/ERK5 signaling pathway: lessons from knockout mice [J]. *J Mol Med.* 2004.82(12):800-808
- Hernandez PJ, Haire RN, Allaire M, et al, 2006. Ancient evolutionary origin of diversified variable regions demonstrated by crystal structures of an immune-type receptor in amphioxus. *Nat Immunol.*7:875-882.
- Hibi M, Lin A, Smeal T, et al, 1993. Identification of an oncoprotein and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.*7: 2135-2148.
- Hiroko Morimoto, Kunio Kondoh, Satoko Nishimoto, et al, 2007. Activation of C-Terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation [J]. *J Biol Chem.* 282(49):35449-35456.
- Holland PWH, Holland LZ, Williams NA, 1992. An amphioxus homeobox gene: sequence conservation, spatial expression during development and insights into vertebrate evolution. *Development.*116: 653-661
- Irving EA, Bamford M, 2002. Role of mitogen-and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab.*22: 631-647.
- Ji GP, Liu DX, LIU J, et al, 2010. p38 mitogen-activated protein kinase up-regulates NF- κ B transcriptional activation through RelA phosphorylation during stretch-induced myogenesis[J]. *Biochemicaland Biophysical Research Communications.*391:547-551
- Jiang Y, Chen C, Li Z, et al, 1996. Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38 β). *J Biol Chem.*271.17920-17926.

- Jiang Y, Gram H, Zhao M, et al, 1997. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group MAP kinase-p38 α . *J Biol Chem.*272 (48): 30122-30128.
- Jiang Y, Liu AH, Zhao KS, 1999. The signal transduction pathways of mitogen-activated protein kinase. *J First Mil Med Univ.* 19 (1): 59-62.
- Johnson GL, Lapadat R, 2002. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science.*298: 1911-1912.
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E, 1999. Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosine kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem.* 274, 26563-26571.
- Kamata H, Honda S, Maeda S, et al, 2005. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAPkinase phosphatases [J]. *Cell.*120 (5):649-661.
- Kato Y, Tapping RI, Huang S, et al, 1998. Bmk1/erk5 is required for cell proliferation induced by epidermal growth factor [J]. *Nature.*395 (6703):713-716.
- Kazuya Ichimura et al, 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature [J]. *Trends Plant Sci.*7 (7):301-308.
- Keesler GA, Bray J, Hunt J, et al, 1998. Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein Expr Purif.*14:221-228.
- Kesavan K, Lobel-Rice K, Sun W, et al, 2004. MEKK2 regulates the coordinate activation of ERK5 and JNK in response to FGF-2 in fibroblasts. *J Cell Physiol.*199: 140-148.
- Kim MS, Lee EJ, Kim HR, Moon A, 2003. p38 kinase is a key signaling molecule for H-Ras-induced cell motility and invasive phenotype in human breast epithelial cells. *Cancer Res.*63: 5454-5461.
- Kook SH, Choi KC, Son YO, et al, 2008. Involvement of p38 MAPK-mediated signaling in the calpeptin-mediated suppression of myogenic differentiation and

- fusion in C2C12 cells [J]. *Mol Cell Biol Chem.* 310: 85-92.
- Lee JC, Kassis S, Kumar S et al, 1999. p38 mitogen-activated protein kinase inhibitors-mechanisms and therapeutic potentials. *Pharmacol Ther.* 82 (23): 389-397.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, et al, 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.*372 (6508): 739-746.
- Lee JD, Ulevitch RJ, Han J, 1995. Primary structure of BMK1:a new mammalian map kinase. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* 213: 715-724.
- Lenmyr F, Karlsson S, Gerwins P, et al, 2002. Activation of mitogen-activated protein kinases in experimental cerebral ischemia. *Acta Neurol Scand.*106: 333-340.
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG, 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res.*74:49-139.
- Li H, Xu H, Zhou Y, et al, 2007. The phosphothreoninylase activity of a bacterial type III effector family. *Science* .315: 1000-1003.
- Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, et al, 1996. The primary structure of p38 γ : a new member of p38 group of MAP kinase. *Biochem Biophys Res Commun.*228 (2): 334-340.
- Liu AH, Jiang Y, 2001. Mitogen-activated protein kinases and tumors. *Natl J Chin Med.* 81(12):761-763.
- Lin A, Minden A, Martinetto H, et al, 1995. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* .268: 286-290.
- Liu J, Lin A*, 2005. Role of JNK activation in apoptosis: A double-edged sword. *Cell Research.*15:36-42.
- Liu Z, Sun Y, Liu N, et al, 2009. Characterization, expression and response to stress of p8 gene in amphioxus. *Fish&Shellfish Immunol.*27: 407-413.
- Lunghi P, Tabilio A, Dall'Aglio PP, et al, 2003. Downmodulation of ERK activity inhibits the proliferation and induces the apoptosis of primary acute

- myelogenous leukemia blasts. *Leukemia*.17:1783-1793.
- Mao BY, Sun XY, Zhang HW, et al, 1997. Morphological and functional studies on the epidermal cells of amphioxus (*Branchiostoma Belcheri Tsingtauense*) at different developmental stges. *Chin J Oceanol Limnol*.15: 236-241.
- Mariathanan S, Ho SS, Zakarian A, et al, 2000. Degree of ERK activation influences both positive and negative thymocyte selection. *Eur J Immunol*.30(4): 1060-1068.
- McCaw BJ, Chow SY, Wong ES, et al, 2005. Identification and characterization of mERK5-T, a novel ERK5/BMK1 splice variant. *Gene*. 345(2):183-190.
- Mishra S, Mishra JP, Kumar A, 2007. Activation of JNK-dependent pathway is required for HIV viral protein R-induced apoptosis in human monocytic cells: involvement of antiapoptotic BCL2 and c-IAP1 genes. *J Biol Chem*.282: 4288-4300.
- Mody N, Neitch J, Armstrong C, et al, 2001. Effects of MAP kinase cascade inhibitors on the MKK5/ERK5 pathway. *FEBS Lett*.502 (1-2):21-24.
- Moiler PC, Philpott CW, 1973. The circulatory system of *Amphioxus (Branchiostoma floridae)*.I.Morphology of the major vessels ofthe pharyngeal area. *J Morphol*.139 (4):389-406.
- Moiler PC, Philpott CW, 1973. The circulatory system of amphioxas (*Branchiostoma floridae*). II. Uptake of exogenous proteins by endothelial cells. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*.143(1):135-141.
- Morazzani M, de Carvalho DD, Kovacic H, et al, 2004. Monolayer versus aggregate balance in survival process for EGF-induced apoptosis in A431 carcinoma cells: Implication of ROS-P38 MAPK-integrin alpha2beta1 pathway. *Int J Cancer*.110: 788-799.
- Morel C, Ibarz G, Oiry C, et al, 2005. Cross-interactions of two p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase inhibitors and two cholecystokinin

- (CCK) receptor antagonists with the CCK1 receptor and p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* 280(22):21384-21393.
- Müller J, 1844. Ueber den bau und die lebenserscheinungen des Branchiostoma lubricum Costa, amphioxus lanceolatus. *Yarrell Abh K Preuss Akad Wiss.* 1844: 79-116.
- Nishimoto S, Nishida E, 2006. Mapk signalling: Erk5 versus erk1/2 [J]. *EMBO Rep.* 7 (8):782-786.
- Obata T, Brown GE, Yaffe MB, 2000. MAP kinase pathways activated by stress: The p38 MAPK pathway. *Crit Care Med.* 28 (4 suppl):N67-77
- Pallas PS, 1774. Descriptio Limacis lanceolaris [A], in *Spicilegia Zoologica, quibus novae imprimis et obscurae animalium species iconibus, descriptionibus [M].* Gottlieb Augustus Lange, Berlin. (10): 19.
- Pi X, Garin G, Xie L, et al, 2005. BMK1/ERK5 is a novel regulator of angiogenesis by destabilizing hypoxia inducible factor 1alpha. *Circ Res.* 96(11):1145-1151.
- Pumiglia KM , Decker SJ , 1998. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94: 448-452.
- Ray LB and Sturgill TW, 1988. Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *PNAS.* 85: 3753-3757.
- Rhodes CP, Ratcliffe NA, Rowley AF, 1982. Presence of ecelomocytes in the primitive chordate amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Science.* 217: 263-265.
- Roberts OL, Holmes K, Müller J, et al, 2009. ERK5 and the regulation of endothelial cell function. *Biochem Soc Trans.* 37:1254-1259.
- Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, et al, 1989. Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activate serine threonine

- protein-kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*.86 (18): 6940-6943.
- Roux PP, Blenis J, 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases:a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*. 68(2):320-344.
- Ruppert EE, 1997. Cephalochordata (Acrania). In: Harrison FW, Ruppert EE (eds) . *Microscopic anatomy of invertebrates*, vol.15. Wiley, New York, pp 349-504.
- Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, Round D, 2008. Characterization of chlorpyrifos-induced apoptosis in placental cells[J]. *Toxicology*.244 (2-3): 98-110.
- Shin JH, Jeong JY, Jin Y, et al, 2011. p38 β MAPK affords cytoprotection against oxidative stress-induced astrocyte apoptosis via induction of α B-crystallin and its anti-apoptotic function[J]. *Neuroscience Letters*. 501(3):132-137.
- Sohn SJ, Lewis GM, Winoto A, 2008. Non-redundant function of the MEK5-ERK5 pathway in thymocyte apoptosis. *EMBO J*. 27(13):1896-1906.
- Song GY, Chung CS, Schwacha MG, Jarrar D, Chaudry IH, Ayala A, 1999. Splenic immune suppression in sepsis: a role for IL-10 induced changes in P38 MAPK signaling. *J Surg Res*.83:36-43.
- Stach T, 2008. Chordate phylogeny and evolution: a not so simple three-taxon problem. *J Zool*. 276(2): 117-141.
- Sticht C, Freier K, Knöpfle K, et al, 2008. Activation of MAP Kinase signaling through ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Neoplasia*.10 (5):462 -470.
- Sturgill TW, Ray LB, 1986. Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem biophys Res Commun*.134:565-571.
- Sun W, Kesavan K, Schaefer BC, et al, 2001. MEKK2 associates with the Lad/RIBP and regulates the MEK5-BMK1/ERK5 pathway. *J Biol Chem*.276:5093-5100.

- Suzaki Y, Yoshizumi M, Kagami S, et al, 2004. BMK1 is activated in glomeruli of diabetic rats and in mesangial cells by high glucose conditions. *Kidney Int.* 65(5):1749-1760.
- Tournier C, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, et al, 1997. Mitogen-activated protein kinase 7 is an activator of the c-Jun NH₂-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.*94 (14):7337-7342.
- Tournier C, Dong C, Turner TK, et al, 2001. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by proinflammatory cytokines. *Genes.*15: 1419-1426.
- Troemel ER, Chu SW, Reinke V, et al, 2006. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C.elegans*. *PLoS Genet.* 2: e183.
- Wang CG, Lu XF, Wei JQ, et al, 2011. Activation of the spinal extracellular signal-regulatedkinase 5 signaling pathway contributes to morphine physical dependence in rats. *Neurosci Lett.* 494(1):38-43.
- Wang WH, Hullinger RL, Andrisani OM, 2008. Hepatitis B virus X protein via the p38 MAPK pathway induces E2F1 release and ATR kinase activation mediating p53 apoptosis. *J Biol Chem.*283: 25455-25467.
- Wang Z, Harkins PC, Ulevitch RJ, et al, 1997. The structure of mitogen-activated protein kinase p38 at 2.1-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA.*94(6): 2327-2332.
- Weinstein SL, Sanghera JS, Lemke K, et al, 1992. Bacterial lipopolysaccharide induces tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinases in macrophages. *J Biol Chem* .267(21):14955-14962.
- Weldon CB, Scandurro AB, Rolfe KW, et al, 2002. Identification of mitogen-activated protein kinase kinase as a chemoresistant pathway in MCF-cells by using gene expression microarray[J]. *Surgery.*132 (2):293-301.

- Welsch U, 1975. The fine structure of the pharynx, cyrtopodocytes and digestive caecum of amphioxus (*Branchiostoma lanceolatum*). *Symp Zool Soc Lond.* 36:17-41.
- Whitmarsh AJ, Davis RJ, 1996. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway [J]. *Mol Med.* 74 (10): 589-607.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, et al, 1999. Mitogen activated protein kinase: conservation of a three kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79(1):143-180.
- Wilsbacher JL, Goldsmith EJ, Cobb MH, 1999. Phosphorylation of MAP kinases by MAP/ERK involves multiple regions of MAP kinases [J]. *J Biol Chem.* 74 (24):16988-16994
- Xia Z, Dickens M, Rainge and J, et al, 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science.* 270 (5240):1326-1331.
- Xiao C, Zhang L, Cheng Q, et al, 2008. The activation of extracellular signal regulated protein kinase 5 in spinal cord and dorsal root ganglia contributes to inflammatory pain. *Brain Res.* 18 (6): 76-86.
- Xiao S, Wang J, Jiang J, et al, 2009. Characterization of Fyn signaling on the age-dependent immunomodulation on traumatic rats. *Brain Res.* 19.1255:162-169.
- Yang DD, Conze D, Whitmarsh AJ, et al, 1998. Differentiation of CD4⁺T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2[J]. *Immunity.* 9 (4):575-585.
- Zhang H, Shi X, Hampong M, et al, 2001. Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* 276(10): 6905-6908.
- Zhang J, Salojin KV, Gao JX, et al, 1999. p38 mitogen-activated protein kinase mediates signal integration of TCR/CD28 costimulation in primary murine T

- cells. *J Immunol*.162 (7):3819-3829.
- Zhang J, Gao JX, Salojin K, et al, 2000. Regulation of fas ligand expression during activation-induced cell death in T cells by p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH2-terminal kinase. *J Exp Med*.191: 1017-1030.
- Zhang L, Jiang Y, Zhang L, et al, 1999. Progress of study on mitogen-activated protein kinase. *Foreign Med Sci: Section Pathophysiol Clin Med*.19 (2): 84-87.
- Zhang YL, Dong C, 2005. MAP kinases in immune responses. *Cell Mol Immunol*.2: 20-27.
- Zhao M, Liu YW, Liu AH, et al, 2000. Signal transduction in TNF- α induced c-jun gene expression. *Acta Biochim Biophys Sin*.32 (3): 59-65.
- Zhou G, Bao ZQ, Dixon JE, 1995. Components of a new human protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*.270:12665-12669.
- 蔡琪, 李晓玫, 1999. 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路研究进展. 肾脏病与透析肾移植杂志. 11(4):354-358.
- 郭慧, 吴欣怡, 2008. P38 MAPK 在角膜创伤愈合过程中的作用. 国际眼科杂志. 8(1):106-109.
- 龚小卫, 姜勇, 2003. 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 生物学功能的结构基础. 中国生物化学与分子生物学报. 19: 5-11.
- 季宇彬, 胡哲清, 邹翔, 2010. MAPK 信号通路及研究[J]. 中国药理学通讯. 27(2):17-18.
- 姜勇, 韩家淮, 1999. P38 MAPK 信号传导通路. 生命科学. 11: 102-106.
- 金德祥, 1958. 文昌鱼. 福建人民出版社. 1-56.
- 李荣山, 丁涛, 刘晓城, 2004. SB203580 对肾缺血再灌注损伤时细胞凋亡及 p38MAPK 影响的实验研究[J]. 山西医科大学学报. 35(4):317-21.
- 毛华, 袁爱力, 赵敏芳, 赖卓胜, 2000. 分裂原激活蛋白激酶 p38 信号传导通路在抑制血管内皮细胞生长因子诱导肝癌转移的实验研究. 中华消化杂志.

20: 14-16.

孟晓明, 黄艳, 李俊, 2008. 丝裂原活化蛋白激酶亚族 p38 信号转导通路 with 慢性支气管炎的关系. 中国药理学通报. 24(7):849-852.

王义权, 方少华, 2005. 文昌鱼分类学研究及展望. 动物学研究. 26: 666-672.

魏小勇, 黎才海, 饶荣生, 2009. P38 MAPK 信号通路 with 肿瘤的关系. 实用癌症杂志. 24: 101-103.

张频捷, 朱立新, 耿小平, 2010. p38MAPK 信号传导通路及其抑制剂的研究现状. 安徽医药. 14(5):596-598.

第二部分 Amphi-ERK5 抗体的制备及体内蛋白表达的初步研究

2.1 前言

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是一个多基因家族, 能被多种外界刺激激活, 参与多种生理反应。在真核细胞中, MAPK 包括四个亚族: p38、ERK1/2、ERK5/BMK1 和 JNK/SAPK, 其中 ERK5 通路是一种非典型的 MAPK 通路, 它在细胞的生存、增殖与分化起着十分重要的作用 (Abe et al., 1997; Kato et al., 1998), 除此之外, 研究发现 ERK5 对 T 淋巴细胞的分化、肿瘤的发生发展、炎症反应及多种疾病发生也有重要影响 (Zhao et al., 2000; Sohn et al., 2008; Sticht et al., 2008)。现在以小鼠, 人等为研究对象对 ERK5 通路研究较多, 在实验室前期工作中, 因没有同源性的抗体, 未能对青岛文昌鱼中 ERK5 在蛋白水平上进行研究。

本研究利用表达的 Amphi-ERK5 蛋白肽段诱导小鼠制备多克隆抗体; 通过免疫组织化学对成体文昌鱼组织中的 Amphi-ERK5 蛋白表达情况进行了检测; 与此同时, 为了验证本实验室制备的 Amphi-ERK5 抗体免疫组化可信度, 利用购买的 ERK5 异源性抗体对成体文昌鱼组织中的 Amphi-ERK5 蛋白表达进行了检测。为进一步研究 Amphi-ERK5 蛋白的功能提供了一系列实验依据。

实验室前期通过文昌鱼成体原位杂交技术, 获得的结果显示 Amphi-ERK5 基因在体表皮、肠、肝盲囊等组织中有表达信号, 为进一步研究文昌鱼体内 ERK5 的分布与功能, 利用 pet-29b(+) 为表达载体, BL21(DE3) 为表达菌株, 构建了 Amphi-ERK5 表达载体。通过原核表达的方法获得目的蛋白后, 采用切胶纯化后的文昌鱼 ERK5 原核表达蛋白肽段为免疫原, 免疫小鼠, 利用 Amphi-ERK5 原核表达蛋白肽段做 Western blotting, 检测证明多克隆抗体制备成功后, 获取抗血清。

2.2 材料和试剂

2.2.1 青岛文昌鱼的来源和养殖

青岛文昌鱼 (*Branchiostoma belcheri tsingtauense*) 性成熟个体于青岛

附近沙子口海域采回后,置底层铺有约 10cm 海沙的容器中饲养,盐度 31.4,水温 22-25℃, pH 8.0 左右,空气泵供氧。每天用单细胞海藻喂养,每周换水两次,定期清理容器中文昌鱼栖息的沙层,保持文昌鱼生活环境干净舒适。

2.2.2 主要试剂

Tris饱和酚溶液、TIANScript cDNA第一链合成试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒、质粒小提取试剂盒、大肠杆菌TOP10、增强型HRP-DAB底物显色试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;焦碳酸二乙酯(DEPC)、氨苄青霉素、卡那霉素、PMSF、考马斯亮蓝G250,R250、咪唑、半胱氨酸、Aprotimin、Leupeptin、TritonX-100、中性树胶购自济南朋远生物技术有限公司;核酸标准分子量Marker、6×loading buffer、限制性内切酶NdeI、XhoI购自宝生物工程(大连)有限公司;2×EasyTaq PCR SuperMix、T4 DNA Ligase、pEASY-T3 Cloning Kit、大肠杆菌BL21(DE3)、Blue Plus™ II Protein Marker购自北京全式金生物技术有限公司;多聚赖氨酸防脱磨砂玻片、PAP Pen免疫组化笔、封闭用正常绵羊/兔血清购自北京中杉金桥生物技术有限公司;鼠抗人β-actin(4)多克隆抗体(ProductNo.sc-47778)、羊抗人p-ERK5(Tyr220)多克隆抗体(ProductNo.sc-16564)购自Santa Cruz Biotechnology公司; Polyclonal Rabbit Anti-goat Immunoglobulins/HRP (Code No.GP016029)、Polyclonal Rabbit Anti-mouse Immunoglobulins/HRP (Code No.GP016129)购自基因工程(上海)有限公司; X-gal、异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)、弗氏完全佐剂购自美国Sigma公司; Biozol购自Bio Flux;溴化乙锭、琼脂糖购自BBI公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;胰蛋白酶、酵母粉、琼脂粉购自Oxoid公司;其他试剂均为国产分析纯

2.2.3 主要仪器

超净工作台	无锡县空气净化设备厂
电热恒温水浴锅	上海医疗器械厂产品
超纯水生成系统	美国 Milipore 公司
迴转式恒温调速摇瓶柜	哈尔滨东联电子技术开发有限公司
电子天平	北京赛多利斯仪器有限公司
LX-100 手掌型离心机	海门其林贝尔仪器制造有限公司

MWG Thermal Cycler PCR 仪	德国 MWG-Biotech
MyCycler Thermal Cycler PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
S1000 Thermal Cycler PCR 仪	美国 Bio-Rad 公司
可调微量移液器	法国 Gilson 公司
琼脂糖凝胶水平电泳系统	北京六一仪器厂
水平电泳系统	北京六一仪器厂
温控干燥箱	上海市实验仪器总厂
旋涡混合器	海门斯林格尔仪器厂
ZDX-35BI 型蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
pH 计	美国 Orion 公司
双层空气恒温振荡器	哈尔滨市东联电子公司
SPX-250 型生化培养箱	上海跃进医疗器械厂
台式高速冷冻离心机	德国 Eppendorf 公司
台式高速离心机	德国 Eppendorf 公司
UVP 凝胶成像仪	英国 UVP 有限公司
JY92-2D 超声波细胞粉碎仪	宁波新芝公司
DYCZ-24DN 迷你双垂直电泳仪	北京六一仪器厂
Elx 通用酶标仪	美国宝特 (BIO-TEK)
可拆 96 孔酶标板 (12 联排孔板)	北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司
DYCZ-40D 迷你转印电泳仪	北京六一仪器厂
RM2235 切片机	德国 Leica
TE2000-U 倒置显微镜	日本尼康

2.2.4 主要溶液的配制

2.2.4.1 常用溶液配制

氨苄青霉素 (100mg/mL) :

将 1.0g 氨苄青霉素用灭菌双蒸水溶解至 10mL 体积, 过滤灭菌后分装, -20℃保存备用。

卡那霉素 (50mg/mL):

将 0.5g 氨苄青霉素用灭菌双蒸水溶解至 10mL 体积, 过滤灭菌后分装, -20℃保存备用。

LB 液体培养基:

胰蛋白胨 10g、酵母粉 5g、氯化钠 10g, 加蒸馏水至 1000 mL, 溶解后用 NaOH 调 pH 至 7.2~7.4, 121℃高压灭菌。

LB 固体培养基:

胰蛋白胨 10g、酵母粉 5g、氯化钠 10g、琼脂 15g, 加蒸馏水至 1000 mL, 溶解后用 NaOH 调 pH 至 7.2~7.4, 121℃高压灭菌。

DEPC (焦磷脂二乙脂) 水:

每 1000mL 双蒸水中加入 1mL DEPC, 终浓度为 0.1%, 37℃恒温震荡过夜, 充分混匀后, 121℃高压灭菌。

溴化乙锭 (EB):

10mgEB 溶于 1mL 双蒸水中, 溶解后避光保存。

1.0%琼脂糖凝胶的配制:

称取适量琼脂糖 (RNA 专用), 溶于 1×TAE 缓冲液中, 加热至 100℃, 制备成浓度为 1.0%的琼脂糖凝胶。冷却至 60℃, 加入 EB 至终浓度为 0.5ug/mL, 充分混匀。倒入胶模, 冷却固化。

IPTG (异丙基硫代-β-D-半乳糖苷):

用双蒸水配制成 0.1M, 过滤除菌后分装, -20℃冷藏备用。

X-gal (40mg/mL):

在 8mL 二甲基甲酰胺中溶解 400 mg X-gal 后, 用去离子水定容至 10mL, 0.22μm 滤膜过滤除菌, 分装后-20℃避光保存备用。

50×TAE 电泳缓冲液:

Tris	242g
冰乙酸	57.1mL
0.5mol/L EDTA (pH 8.0)	100mL
加三蒸水定容至 1L	

2.2.4.2 Western blotting 相关溶液的配制

细菌裂解液	Tris(pH8.0)	25 mM
	NaCl	200mL
丙烯酰胺储备液 (A 液)	丙烯酰胺(分析纯)	29.2g
	甲叉双丙烯酰胺	0.8g
	加蒸馏水至 100mL, 用滤纸过滤后于棕色瓶中 4℃存放。	
分离胶缓冲液 (B 液)	Tris(分析纯)	18.15g
	用 1mol/L HCl 调节 pH 至 8.8, 加水至 100mL, 4℃存放。	
浓缩胶缓冲液 (C 液)	Tris(分析纯)	6g
	用 1mol/L HCl 调节 pH 至 6.8, 加水至 100mL, 4℃存放。	
Tris-甘氨酸电泳缓冲液	Tris(分析纯)	6g
	甘氨酸	28.8g
	SDS	2g
	调节 pH 至 8.3, 加水定容至 2L。	
10%SDS 溶液	SDS	10g
	加水定容至 100mL, 溶解后室温存放。	
10%过硫酸铵溶液	过硫酸铵(分析纯)	0.1g
	加 1mL 蒸馏水溶解(宜现配现用, 存放时间不得超过 1 周)	
5×样品缓冲液	1MTris-HCl 缓冲液(pH6.8)	0.6mL
	50%(V/V)甘油	5mL
	10%SDS	2mL
	β-巯基乙醇	0.5mL
	1% (w/v) 溴酚蓝	1 mL
	蒸馏水	0.9 mL
考马斯亮蓝染色液	考马斯亮蓝 R-250	1g

	甲 醇	450mL
	冰乙酸	100mL
	蒸馏水	450mL
	过滤后使用。	
考马斯亮蓝脱色液	甲醇	50 mL
	冰 乙 酸	50mL
	蒸馏水	400 mL
Bradford 储存液	95%乙醇	100 mL
	85%磷酸	200 mL
	考马斯亮蓝 G-250	350mg
	室温下长期保持稳定。	
Bradford 工作液	95%乙醇	15 mL
	85%磷酸	30 mL
	Bradford 储存液	30 mL
	蒸馏水	425mL
	过滤后室温保存于棕色瓶中，可使用数周，用前需再过滤。	
生理盐水	0.9g NaCl 加 100mL 蒸馏水，高压灭菌。	
组织裂解液	Aprotimin	10mg/mL (200×)
	Leupeptin	25mg/mL(500×)
	PMSF	100mM (100×)
	Tris-HCl(pH7.4)	150 mM
	NaCl	150 mM
	SDS	0.1%
	TritonX-100	1%
	甘油	10%
TBS	Tris-HCl(pH8.0)	10 mM
	NaCl	150 mM
TBST	Tris-HCl (pH8.0)	10 mM
	NaCl	150 mM

	Tween20	0.05%
封闭液	脱脂奶粉	8%
	用 TBST 定容至 100 mL。	
电转缓冲液	Tris (分析纯)	6g
	甘氨酸	28.8g
	SDS	2g
	甲醇	20%
	调节 pH 至 8.3, 加水定容至 2L。	
浸提液母液	Tris-HCl (pH7.9)	0.5mol/L
	EDTA	1.0mmol/L
	NaCl	1.5 mol/L
	SDS	1.0%
	将上述溶液各取 1mL 混匀, 加入 6mLddH ₂ O,混匀, 即为 10mL 浸提液。	

2.2.4.3 免疫组织化学相关溶液的配制

4%多聚甲醛 (PFA) :

称取 40gPFA 溶于装有 500mLDEPC 水的玻璃容器 (烧杯或烧瓶) 中, 持续加热。磁力搅拌至 60-65℃, 使成乳白色悬液。用 1.0mM 的 NaOH 调 pH 至 7.0 使呈清亮状 (滴加), 再加入约 500mL 2×PBS, 充分混匀 (在冰浴或冷水浴中)。可再检测一下 pH, 过滤后定容至 1000mL, 室温或 4℃ (保存备用)。

注意: 1. 配制时应在通风条件下操作, 并避免接触皮肤及吸入 (戴口罩及手套), 因PFA有较强的毒性, 对粘膜及皮肤有刺激作用。2. 加热时, 温度不可过高, 设定60-65℃。否则PFA降解失效。

0.01M PBS缓冲液	NaCl	1.9g
	KCl	0.2g
	Na ₂ HPO ₄	1.44g
	KH ₂ PO ₄	0.19g
	溶于800mL蒸馏水中, 调PH值至7.3。	

10×PBS	NaCl	80g
	KCl	2.0g
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	28.9g
	KH ₂ PO ₄	2.0g
	加水至 1000mL.	
封闭液	封闭用血清	1mL
	0.01MPBS 缓冲液	9mL
3%H ₂ O ₂	甲醇	45mL
	30%H ₂ O ₂	5mL

2.3 实验方法

2.3.1 青岛文昌鱼总 RNA 的提取

RNA 为单链分子，链内碱基容易配对形成二级结构。不同的 RNA 分子空间结构不同，未变性时，其相对分子质量与电泳移动距离没有严格的相关性。只有当 RNA 的空间结构被破坏后，在变性的条件下电泳时，RNA 移动距离才与其相对分子质量对数成正比。操作时必须保证环境中无 RNase，实验用品需要用 RNAase 抑制剂 0.1% 焦碳酸二乙酯 (DEPC) 的水溶液处理，且应戴手套操作，防止人为造成的外源 RNAase 的污染而引起的 RNA 降解。

2.3.1.1 实验前准备

- 1) 取材：选取若干条活力较强，个体较大（体长约 4-5cm）的未排精排卵的成体文昌鱼，置于灭菌的过滤海水中进行饲养，并于实验前 3d 停喂饵料，使其排空消化道内的食物残渣和粪便。
- 2) 金属工具：剪刀、药匙、镊子等金属工具用锡箔纸包好，并在 180℃ 烘烤 4h 以上。
- 3) 玻璃器皿：量筒、烧杯、玻璃棒、各种试剂瓶、三角瓶等玻璃器皿用 0.5M NaOH 漂洗，烘干后在 180℃ 烤箱中烘烤 4h 以上。
- 4) 塑料制品：各种型号的枪头、枪头盒、离心管、研磨棒等塑料制品用 0.1%

的 DEPC 水浸泡过夜或摇床摇动 3h 以上, 121℃ 高压灭菌后烘干。

- 5) 琼脂糖凝胶电泳槽的处理: 将洗干净的电泳槽、胶板、梳子在 3% 的过氧化氢中浸泡 30 min 以上, 用 DEPC 水彻底冲洗干净, 备用。

2.3.1.2 总 RNA 提取

- 1) 将新鲜的文昌鱼成体用无菌剪刀剪成两段, 分别放入 1.5mL 的 Eppendorf 管中, 并加入 600 μ l 冰浴的 Biozol, 先在冰上将组织剪碎, 后用研磨棒进行研磨直至组织完全破碎, 室温孵育 15 min。
- 2) 4℃, 12, 000 \times g 离心 5 min, 小心吸取上面的水相到一个新 Eppendorf 管中, 按 1: 5 (V/V) 氯仿: Biozol 的比例加入氯仿, 颠倒混匀, 冰上孵育 15min。
- 3) 4℃, 12, 000 \times g 离心 15min, 小心吸取上面的水相到一个新 Eppendorf 管中, 按 5: 1: 1 (Biozol: 氯仿: 饱和酚) 的比例加入氯仿和酚, 颠倒混匀 15s 后, 4℃, 12, 000 \times g 离心 15min。
- 4) 小心吸取上面的水相到一个新 Eppendorf 管中, 加入等体积异丙醇, 颠倒振荡混匀; -20℃ 孵育 20min 以上。
- 5) 4℃, 12, 000 \times g 离心 10min, RNA 沉淀通常形成片状沉淀附着于管壁或管底。
- 6) 弃上清。用冰浴的 75% 的乙醇 (按每 1mL 的 Biozol 至少加 1mL 的 75% 乙醇的比例加入 75% 乙醇) 洗涤 RNA 沉淀一次。颠倒洗涤离心管管壁, 并涡旋振荡样品, 尽可能让沉淀悬浮。
- 7) 4℃, 12, 000 \times g 离心 5min, 弃上清, 晾干沉淀。
- 8) 用 50~100 μ l DEPC 水溶解沉淀。
- 9) 电泳检测: 取 1 μ l RNA 溶液与上样缓冲液混匀, 进行点样。在电压为 10V/cm 的条件下电泳 15min 后结束电泳。电泳完毕后在紫外投射仪下观察结果。其余的 RNA 溶液于 -70℃ 保存备用。

2.3.2 第一链总 cDNA 的合成

在冰浴的处理后无核酸酶的 Eppendorf 管中按下表加入:

total RNA	1-5 μ g
-----------	-------------

Oligo(dT)15	2 μ l
dNTP(2.5mM each)	2 μ l
add RNase-free ddH ₂ O to total volume	14.5 μ l

70℃加热 5min 后迅速在冰上冷却 2min。简短离心收集反应液后，按下表加入：

5×First-Strand Buffer(含 DTT)	4 μ l
Rnasin	0.5 μ l

加 1 μ l (200U) TIANScript M-MLV，轻轻用移液器混匀。

- 1) 42℃温浴 50min。
- 2) 95℃加热 5min。
- 3) 为了检测反转录 cDNA 的质量，用 Primer premier 5 软件设计了跨内含子的 β -actin 基因引物进行检测，引物为：

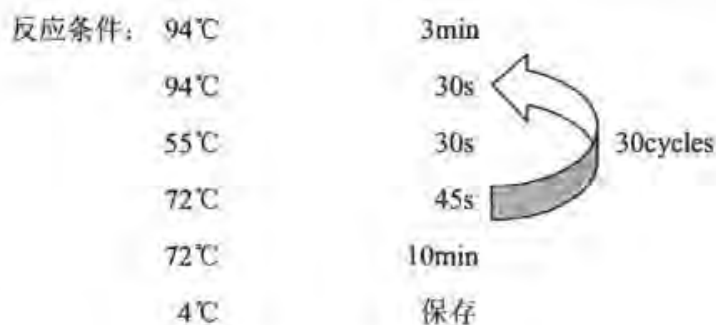
β -actin sense : 5'-CTCCGGTAIGTGCAAGGC-3' ;

β -actin antisense : 5'-GCTGGGCTGTTGAAGGTC-3'。

其扩增产物应为 354bp。引物的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

检测的反应体系为：

Reagent	Amount(μ l)
cDNA	0.5
sense primer	0.5
anti-sense primer	0.5
dNTP	2
10×buffer	2.5
rTaq DNA polymerase	0.125
add ddH ₂ O to total volume	25



2.3.3 Amphi-ERK5 多克隆抗体的制备

2.3.3.1 Amphi-ERK5 氨基酸特异序列的选择

- 1) Amphi-ERK5 基因经拼接后演绎的氨基酸序列采用 NCBI Conserved Domain 查找工具分析该氨基酸序列的保守区;
- 2) 利用 DNASTar 软件中的 Protean 软件提供的模块, 用 Kyte-Doolittle 法分析 Amphi-ERK5 的亲水性, 用 Karplus-Schulz 法分析 Amphi-ERK5 的柔性区域, 用 Emini 法分析 Amphi-ERK5 蛋白的表面可及性, 用 Jameson-Wolf 法分析鼠 Amphi-ERK5 蛋白的 B 细胞抗原表位;
- 3) 利用 <http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell> 提供的 Antibody Epitope Prediction 预测 Amphi-ERK5 的最优线性表位;
- 4) 利用 http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl 提供的 HNN 二级结构预测法, 预测 Amphi-ERK5 分子的二级结构;
- 5) 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services> 提供的 NetPhos 2.0 Server 预测蛋白的磷酸化位点。

2.3.3.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体

2.3.3.2.1 PCR 扩增目的片段

1) 基因特异性引物设计

利用 Primer premier 5 软件进行引物设计, 克隆编码 Amphi-ERK5 片段的 cDNA, 引物设计中分别引入 NdeI 和 XhoI 酶切位点 (下划线)。

引物序列:

Amphi-ERK5 sense: 5'-GGGTTTCATATGCTAAAAAAGCGAAGTCTG-3';


Amphi-ERK5 antisense: 5'-CCGCTCGAGTCAACTGGTAGCAACATA-3'。

其扩增产物为 585bp, 引物的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

2) 以反转录合成的 cDNA 为模板, Amphi-ERK5 sense 和 Amphi-ERK5 antisense 为引物进行 PCR。

反应体系为:

Reagent	Amount(μ l)
Template	2
sense primer	2
anti-sense primer	2
dNTP	4
10 \times buffer	5
rTaq DNA polymerase	1
add ddH ₂ O to total volume	50

反应条件:	94 $^{\circ}$ C	3min	
	94 $^{\circ}$ C	30s	
	T _m	30s	
	72 $^{\circ}$ C	45s	
	72 $^{\circ}$ C	10min	
	4 $^{\circ}$ C	保存	

3) 1.0%琼脂糖电泳检测。

反应结束后, 取 PCR 反应产物 5 μ l 加 1 μ l 上样缓冲液 (6 \times loadingbuffer) 在含有 EB 的 1.0%的琼脂糖凝胶上电泳检测。

2.3.3.2.2 PCR 产物的回收

常规方法制备 1.0%琼脂糖凝胶, 把 PCR 产物加入点样孔中, 100~120V 恒压电泳, 根据指示剂的位置和各 DNA 条带的大小, 待电泳到一定时间, 在紫外

灯下观察 DNA 带的位置，若各条带已分离，则用手术刀将目的 DNA 片段切下置于 1.5mL EP 管中。利用天根生物技术有限公司的普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒进行 PCR 产物切胶回收：

- 1) 柱平衡步骤：向吸附柱 CA2 中（吸附柱放入收集管中）加入 500 μ l 平衡液 BL，12,000 rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 2) 称取离心管中胶块的重置。
- 3) 向胶块中加入 3 倍体积溶胶液 PN，50 $^{\circ}$ C 水浴放置 10min，其间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。
- 4) 将上一步所得溶液加入一个吸附柱 CA2 中（吸附柱放入收集管中），室温放置 2min，12,000 rpm 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CA2 放入收集管中。
- 5) 向吸附柱 CA2 中加入 700 μ l 漂洗液 PW（已加入无水乙醇），12,000 rpm 离心 30-60s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CA2 放入收集管中。
- 6) 向吸附柱 CA2 中加入 500 μ l 漂洗液 PW，12,000 rpm 离心 30-60s，倒掉废液。
- 7) 将吸附柱 CA2 放回收集管中，12,000 rpm 离心 2min，尽量除尽漂洗液。将吸附柱 CA2 置于室温放置数分钟，彻底地晾干，以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。
- 8) 将吸附柱 CA2 放到一个干净离心管中，向吸附膜中间位置悬空滴加适量洗脱缓冲液 EB，室温放置 2min。12,000 rpm 离心 2min 收集 DNA 溶液。

2.3.3.2.3 PCR 产物与 pEASY-T3 载体连接

采用 TA 克隆的方法，载体为 pEASY-T3 Vector。利用 Taq 酶能够在 PCR 产物的 3'末端加上一个 3'A 突出端，而 T 载体是一种带有 3'T 突出端的载体，在连接酶作用下，可以把 PCR 产物直接插入到质粒载体的多克隆位点上，主要用于 PCR 产物的克隆和测序。

连接反应体系按照北京全式金生物技术有限公司产品说明书进行：

在 PCR 管中加入胶回收产物 4 μ l，pEASY-T3 Cloning Vector 1 μ l，轻轻混合，

室温(20-37℃)反应 10min。

2.3.3.2.4 连接产物的转化

利用北京天根生物技术有限责任公司产品大肠杆菌 TOP10 感受态细胞进行转化:

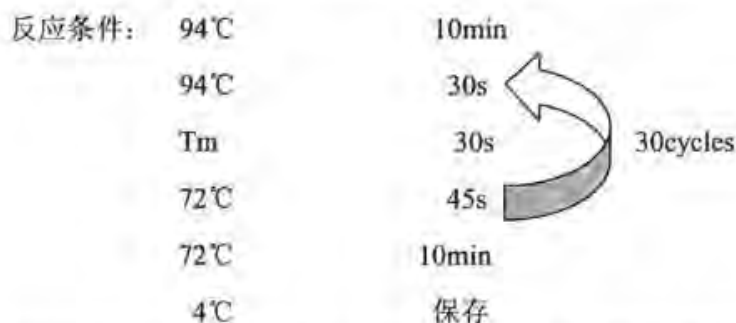
- 1) 将连接产物 5 μ l 加入在冰中融化好的 TOP10 感受态 50 μ l 中, 轻弹混匀, 冰浴 30 min。
- 2) 将感受态和连接产物混合物置于 42℃ 热激 90 s 后, 立即置于冰上 2-3 min, 期间不要晃动。
- 3) 在离心管中加入 800~1000 μ l 平衡至室温的 LB 液体培养基, 150~200r/min, 37℃ 振荡培养 1h。
- 4) 取 40 μ l 100mM IPTG, 30 μ l 40mg/mL X-gal 混匀, 涂布于准备好的平板上, 用报纸包好, 避光。
- 5) 将培养好的菌液 4000 rpm 离心 2 min 后, 弃上清至残留 200 μ l, 重悬沉淀, 涂布加氨苄青霉素的 LB 平板。
- 6) 37℃ 正置 1h, 倒置过夜。
- 7) 将长出菌落的平板 4℃ 放置数小时, 使蓝色充分显现。白色菌落为含有外源插入片段的重组子。

2.3.3.2.5 菌落 PCR 筛选阳性克隆

- 1) 用灭菌牙签从转化平板上挑取白色单菌落, 在含 Amp 的 LB 平板上划线保种后, 再将其置于含 10 μ l 无菌水的 PCR 管中, 涡旋混合。
- 2) 10 μ l 反应体系中取 1 μ l 混合液用作 PCR 反应的模板, 基因特异性引物进行 PCR 扩增。
- 3) 菌落 PCR 反应体系为:

Reagent	Amount(μ l)
菌液	1
sense primer	1
anti-sense primer	1

dNTP	2
10×buffer	2.5
rTaq DNA polymerase	0.25
add ddH ₂ O to total volume	25



- 4) 电泳检测 PCR 结果, 选择出合适大小 DNA 片段的阳性克隆, 提取质粒用于测序。

2.3.3.2.6 大肠杆菌质粒提取及测序

利用北京天根生物技术有限责任公司产品质粒小提取试剂盒进行质粒提取:

- 1) 柱平衡步骤: 向吸附柱 CP3 中 (吸附柱放入收集管中) 加入 500 μ l 的平衡液 BL, 12, 000 rpm 离心 1 min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放回收集管中。
- 2) 取 1-5mL 过夜培养的菌液, 加入离心管中, 使用常规台式离心机, 12, 000 rpm 离心 1 min, 尽量吸除上清。
- 3) 向留有菌体沉淀的离心管中加入 250 μ l 溶液 P1 (已加入 RNaseA), 用移液器或涡旋振荡器彻底悬浮细菌沉淀。
- 4) 向离心管中加入 250 μ l 溶液 P2, 温和地上下翻转 6-8 次使菌体充分裂解。
- 5) 向离心管中加入 350 μ l 溶液 P3, 立即温和地上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 12, 000 rpm 离心 10min。
- 6) 将上一步收集的上清液, 用移液器转移到吸附柱 CP3 中 (吸附柱放入收集管中), 注意尽量不要吸出沉淀。12, 000 rpm 离心 30-60s, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱 CP3 放入收集管中。

- 7) 将吸附柱 CA2 放回收集管中, 12, 000 rpm 离心 2min, 尽量除尽漂洗液。将吸附柱 CA2 置于室温放置数 min, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。
- 8) 将吸附柱 CA2 放到一个干净离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加适量置于 65-70℃ 水浴预热的洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 min。12, 000 rpm 离心 2 min 收集 DNA 溶液, -20℃ 保存。
- 9) 将菌液送至济南力戈科技有限公司进行测序。

2.3.3.2.7 菌种的保存

菌体的短期保存: 将培养好的大肠杆菌划平板 4℃ 冰箱保存数周。

大肠杆菌的长期保存: 以单个菌落接种 5-10mL 液体 LB 培养基, 37℃ 振荡培养。离心收集过夜培养的菌体, 无菌水洗涤 1-2 次, 悬浮于含 1mL 无菌 50% 甘油、0.85% NaCl 的 Eppendorf 管中, Parafilm 封口, 混合均匀, 置 -20℃ 冰箱中保藏 1-2 年, 置 -70℃ 冰箱中保藏 5 年以上。

2.3.3.2.8 PCR 产物和原核表达载体 pet-29b(+) 的酶切

取前述测序证实为阳性克隆的菌液及实验室保存的 pet-29b(+) 菌液分别取 50ul 接种于 50mL 含 Amp 及 Kan 的 LB 液体培养基中, 37℃ 震荡过夜后提取质粒, 方法见 2.3.3.2.6。

1) PCR 产物酶切反应体系如下:

Reagent	Amount(μl)
DNA	10
10×H Buffer	3
NdeI	2
XhoI	2
add ddH ₂ O to total volume	30

37℃ 水浴酶切 2h 后, 取 1μl 酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 检测是否酶切完

全。

2) pet-29b(+)酶切反应体系如下:

Reagent	Amount(μ l)
pet-29b(+)	15
10×H Buffer	3
NdeI	2
XhoI	2
add ddH ₂ O to total volume	30

37℃水浴酶切 2h 后, 取 1 μ l 酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 检测是否酶切完全。

2.3.3.2.9 酶切后的目的基因片段与线性化的 pet-29b(+)质粒片段连接

连接反应体系如下:

Reagent	Amount(μ l)
线性化质粒片段	1
酶切后目的基因片段	4
5×T4 DNA Ligase Buffer	2
T4 DNA Ligase	1
add ddH ₂ O to total volume	10

20-25℃连接 20min。

2.3.3.2.10 重组质粒的转化和测序

- 1) 将连接产物 5 μ l 加入在冰中融化好的 BL21(DE3) 感受态 50 μ l 中, 轻弹混匀, 冰浴 30 min。
- 2) 将感受态和连接产物混合物置于 42℃ 热激 90 s 后, 立即置于冰上 2-3 min, 期间不要晃动。

- 3) 在离心管中加入 800~1000 μ l 平衡至室温的 LB 液体培养基, 150~200r/min, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h.
- 4) 将培养好的菌液 4000 rpm 离心 2 min 后, 弃上清至残留 200 μ l, 重悬沉淀, 涂布加卡那霉素的 LB 平板。
- 5) 37 $^{\circ}$ C 正置 1h, 倒置过夜。
- 6) 将重组质粒送至济南力戈科技有限公司进行测序。

2.3.3.3 目的蛋白的表达和纯化

2.3.3.3.1 试表达

- 1) 将保存好的菌种接种于 6mL LB (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 中, 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 过夜培养。
- 2) 次日, 取 60 μ l 过夜培养液, 按 1: 100 比例转接到新的 6mL LB 培养液(含 50 μ g/mL 卡那霉素)里, 37 $^{\circ}$ C, 200rpm 培养 2h 左右至菌液浓度的 OD600 达到 0.5 左右时, 随机从一个样品中取出 500 μ l 菌液, 电泳检测时作为诱导前对照, 剩余部分加入终浓度为 0.5 mM 和 1mM 的 IPTG 诱导, 继续 37 $^{\circ}$ C 振荡培养诱导表达, 在 2h、4h、6h、8h 和 10h 分别取样。
- 3) 诱导表达完毕, 各取 500 μ l 菌液 (视表达细菌量而定), 5000rpm 离心 5min, 去上清; 用 100 μ l 蒸馏水重悬后加入 30 μ l 5 \times 样品缓冲液, 混匀后沸水浴 10min, 10, 000 rpm 离心 2 min。取上清进行 10%SDS-PAGE 电泳检测。将剩余菌液划线保存或加 1/10 甘油, -70 $^{\circ}$ C 保种。

SDS-PAGE 方法如下:

- 1) 按说明书要求安装好电泳槽和配制分离胶和浓缩胶 (TEMED, AP 灌胶前加入)。
- 2) 将分离胶灌入玻璃板间, 加至前玻璃板顶端约 2.5cm, 在分离胶溶液上以水覆盖, 封闭凝胶表面。30~60min 后观察分离胶与水之间若有清晰的分界面, 则已凝聚。
- 3) 吸尽覆盖在分离胶上的水, 将浓缩胶加至分离胶上面, 直至凝胶溶液到达前玻璃板顶端, 将上样梳子插入凝胶内, 直至梳子齿的底部与前玻璃板的顶端平齐, 且确保梳子齿部末端无气泡。

- 4) 等待约 30min 凝胶聚合后, 小心拔出梳子。
- 5) 将电泳缓冲液加入内外电泳槽中, 使凝胶上下端均能浸泡在缓冲液中。
- 6) 取 10 μ l 处理过的蛋白样品, 加入上样孔中。
- 7) 120V 恒压约 30min, 待溴酚蓝进入分离胶后, 180V 恒压电泳直至溴酚蓝到达凝胶底部。
- 8) 从电泳槽中取出凝胶玻璃板, 平放于桌上, 将上板的一角小心撬开, 小心剥离凝胶, 蒸馏水短暂清洗。
- 9) 将凝胶浸入考马斯亮蓝 G-250 染色液, 并置于摇床上室温缓慢震荡染色 1h 后, 回收染色液, 将凝胶置于超纯水中漂洗几次, 加入脱色液, 在摇床上震荡脱色, 至凝胶退至无色, 蛋白条带清晰时, 弃去脱色液, 用超纯水漂洗数次, 用凝胶成像系统拍照保存。

2.3.3.3.2 大规模表达

- 1) 挑取划线保存的单克隆菌株, 在 LB(含 50 μ g/mL 卡那霉素)液体培养基中 37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。
- 2) 次日, 按 1:100 接种于 500 mL LB 培养液(含 50 μ g/mL 卡那霉素), 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2h 至菌液浓度 OD₆₀₀ 达到 0.5~0.8 时, 取出 500 μ l 菌液做诱导前对照。
- 3) 加入 IPTG 使其终浓度为 0.5mM, 诱导培养 4h。

2.3.3.3.3 菌体破碎收集蛋白

- 1) 诱导培养完毕后, 取出 500 μ l 的菌液作为诱导后对照。
- 2) 4 $^{\circ}$ C, 5000 rpm 离心 10 min, 收集菌体。加入 30mL 预冷的细菌裂解液中重悬。
- 3) 加入 300 μ l 100mM 的 PMSF 后, 于冰浴中超声波破碎(超声 3s、间歇 3s, 全程 30-60 min), 30min 后重新加一次 PMSF。
- 4) 破碎好的菌液经 4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm 离心 30 min, 分别收集上清和沉淀。将上清和沉淀分别做 SDS-PAGE 电泳检测, 确定蛋白表达形式。

2.3.3.3.4 His-ERK5 重组蛋白的切胶纯化

纯化按以下方法进行：

- 1) 制作浓缩胶时，不插梳子（浓缩胶高度适当降低约 1cm）。水封。
- 2) 将包涵体用 0.01MPBS (pH7.4) 溶解，处理后，上样。SDS-PAGE 电泳。
- 3) 电泳结束后，除去浓缩胶。
- 4) 用预冷的 0.25M KCl 染色 5~10min，可见目的条带显示为白色。
- 5) 用干净的手术刀片切下目的条带，并移入另一干净平皿中。
- 6) 用蒸馏水浸泡 5~10min，至胶条变无色透明（目的是使 KCl 离开胶条）。
- 7) 将胶条移至一干净的小袋中碾碎。
- 8) 加入 3~5 倍体积的浸提液，4℃ 过夜，期间振摇 3~4 次。
- 9) 次日，用移液枪吸尽浸提液至 1.5mLEP 管中，4℃，10000 rpm 离心 10 min，留取上清。
- 10) SDS-PAGE 电泳检测
- 11) 酶标仪 Bradford 法测蛋白浓度

①分别取 0.1mg/mLBSA 溶液 0、5、10、15、20、25 μ l，再分别加入 Bradford 液至 500 μ l；切胶纯化后蛋白加 30 μ l，再加 Bradford 液至 500 μ l，涡旋混匀。

加样体系如下：

	0.1mg/mLBSA						Amphi-ERK5
加样量(μ l)	0	5	10	15	20	25	30
Bradford 液 (μ l)	500	495	490	485	480	475	470

②分别取混匀后的溶液 200 μ l 至酶标板板孔中。

③酶标仪测 OD595 值。

④以蛋白量为横坐标，OD595 值为纵坐标绘制标准曲线。

⑤根据 His-ERK5 重组蛋白的 OD595 值，在标准曲线上对应出其蛋白量

2.3.3.4 Amphi-ERK5 抗体制备与鉴定

2.3.3.4.1 阴性对照设置

取未免疫的正常小鼠血，作为阴性对照。

2.3.3.4.2 实验动物接种

- 1) 用生理盐水将抗原稀释至 2 倍最终浓度（按每针次 100 μ l 用量配制）。本实验使用抗原浓度为每针次 100 μ g。
- 2) 加等量弗氏完全佐剂充分乳化后（按每针次 100 μ l），于腹部、肘窝、腹股沟及颈部多点注射。
- 3) 8~10d 后，以每 200 μ l 生理盐水含 50 μ g 抗原的浓度，不加佐剂，腹腔注射小鼠。
- 4) 8~10d 后，以同样抗原浓度与体积于腹腔注射。
- 5) 7d 后尾部取血检测，随后取全血。

2.3.3.4.3 抗血清的收集

1) 尾部取血

大拇指和食指从背部抓住小鼠颈部皮肤，将小鼠头朝下，小鼠固定后将其尾巴置于 50 $^{\circ}$ C 热水中浸泡数分钟，使尾部血管充盈。擦干尾部，再用剪刀或刀片剪去尾尖 1~2mm，用 PCR 管接流出的血液，同时自尾根部向尾尖按摩。取血后用棉球压迫止血。每次采血量 0.1mL。

2) 小鼠眼球取血

左手抓住小鼠颈部皮肤，轻压在实验台上，取侧卧位，左手食指尽量将小鼠眼周皮肤往颈后压，使眼球突出；用眼科弯镊迅速夹去眼球，将鼠倒立，用 1.5 mL 离心管接住流出的血液；每次采血量 0.6~1.0mL。

3) 血清分离：

将所采血液置 37 $^{\circ}$ C 凝固约 2h，然后置 4 $^{\circ}$ C 过夜，使血块收缩，第二天将过夜的血块自试管壁分离，将血清全部吸入新的灭菌管，2500rpm 离心 10min，

收集上清，即完成血清的分离。

2.3.3.4.4 抗体的鉴定

2.3.3.4.4.1 重组蛋白 His-ERK5 的 Western blotting 检测

Western blotting 按以下方法进行：

- 1) 样品：原核表达的 His-ERK5 蛋白片段，经 SDS-PAGE 电泳。
- 2) 电转移：根据点样的情况，剪切适当大小的 PVDF 膜，放入甲醇中浸泡 15s，ddH₂O 洗净后与四块大小相同的滤纸及凝胶一起放入电转缓冲液中浸泡 5min。
- 3) 将电转槽用蒸馏水仔细清洗。按照顺序从负极到正极依次放上海棉垫→两张滤纸→凝胶→转移膜→两张滤纸→海棉垫，彻底清除凝胶与 PVDF 膜之间的气泡，盖上盖子。以 0.8~1mA/cm² 的恒定电流，转移 2.0h。
- 4) 电转结束后取出凝胶和 PVDF 膜。将凝胶放入考马斯亮蓝染液中染色 1h，然后放入脱色液中脱色以确认转移效果。
- 5) 抗体反应
 - ① 将 PVDF 膜用蒸馏水清洗后，放入封闭液中室温摇动 1h。
 - ② 将 PVDF 膜置于一抗溶液中，于 37℃ 摇床上结合 2h。
 - ③ 用 TBST 震荡清洗 PVDF 膜 3 次，每次 15min。
 - ④ 将 PVDF 膜取出，置于二抗溶液中，于摇床上室温结合 1h。
 - ⑤ 用 TBST 震荡清洗 PVDF 膜 3 次，每次 15min。
 - ⑥ DAB 显色。

2.3.3.4.4.2 Western blotting 检测文昌鱼体内 ERK5 蛋白的存在情况

1) 文昌鱼总蛋白提取

①取 3~4 条文昌鱼称重，约每 0.5g 加 500 μ l 裂解液，置冰上研碎后，冰浴 15min，4℃，12000rpm 离心 15min，取上清。

②SDS-PAGE 电泳。

- 2) 分别以鼠抗 Amphi-ERK5 血清与鼠抗人 p-EKR5 多克隆抗体为一抗，Western blotting 检测。

2.3.4 Amphi-ERK5 蛋白的免疫组织化学检测

2.3.4.1 石蜡包埋和切片制备

1) 文昌鱼组织的固定

饲养于灭菌的过滤海水中文昌鱼，在3d 内停喂饵料，使其排空消化道中的食物后，把每条文昌鱼用锋利刀片横向切成不大于1cm 长度的许多段，立即投入4%多聚甲醛溶液内（PBS新配制），室温下固定3-4h或4℃过夜。

2) 组织脱水

将固定好的组织依次转入 70%、80%系列梯度酒精脱水，每个梯度酒精中脱水 45min；后转入 95%、95%、100%、100%系列酒精梯度进行脱水，每个酒精梯度脱水 30min。

3) 二甲苯透明

将脱水后的组织块依次转入酒精：二甲苯（1:1）30min→酒精：二甲苯（1:2）30min→二甲苯 I 15min→二甲苯 II 15min。

4) 透蜡

将二甲苯透明后的组织块依次转入融化状态的二甲苯：石蜡（2:1）30min→二甲苯：石蜡（1:1）30min→石蜡I 30min→石蜡II 30min→石蜡III少许片刻。

5) 包埋并标记

按常规石蜡包埋程序进行，将组织块按顺序摆好方位在包埋杯中进行包埋。

6) 切片

用德国Leica切片机将包埋块切成 7 μ m 薄片。

7) 展片

将切好的含有目的组织的蜡带按顺序粘附于多聚赖氨酸防脱磨砂玻片上，然后在烫片台或酒精灯上展片。

8) 烘片

将展好的组织切片，在37℃ 烘烤箱中烘烤24h以上。

2.3.4.2 免疫组织化学检测

1) 脱蜡：石蜡切片经二甲苯 I、二甲苯 II 脱蜡各 10min。

- 2) 水化: 然后放入 100%、95%、80%、70% 等各级酒精溶液中各 5min, 入蒸馏水 3min。
- 3) 放入 3% H_2O_2 中 10 min, 以除去内源性过氧化物酶活性;
- 4) 蒸馏水轻洗后, 在 0.01mol/L PBS(pH 7.2-7.4)中浸泡 5min;
- 5) 选用鼠抗 Amphi-ERK5 血清为第一抗体时, 滴加 1: 10 正常绵羊血清封闭液; 选用异源山羊抗人 p-ERK5 多抗为第一抗体时, 滴加 1: 10 正常兔血清封闭液室温下孵育 1h, 以减少非特异性染色;
- 6) 滴加第一抗体, 抗体以 1:200 比例稀释, 4℃孵育过夜(对照实验组采用 PBS 替代第一抗体进行同步孵育);
- 7) PBS 轻洗 5min×3, 鼠抗 Amphi-ERK5 血清为第一抗体孵育的切片, 滴加兔抗鼠二抗; 山羊抗人 p-ERK5 多抗为第一抗体孵育的切片, 滴加兔抗山羊二抗, 37℃孵育 1h;
- 8) PBS 清洗, 5min×3 次;
- 9) 3', 3'-二氨基联苯胺(DAB)显色 2-10min。显色到一定程度后, 放入 PBS 中停止显色, 并用 PBS 轻洗, 5min×3 次;
- 10) 切片入 70%、80%、95%、100%乙醇中各 5min, 入二甲苯-乙醇等量混合液 5min, 入二甲苯 I、二甲苯 II 透明各 10min;
- 11) 中性树胶封片, 用显微镜镜检, UVP 凝胶成像仪拍照。

2.4 实验结果

2.4.1 青岛文昌鱼总 RNA 的提取

总 RNA 抽提产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪下可见 3 条清晰条带(图 1), 分别为 28S、18S 和 5S, 且 28S 亮度明显强于 18S、5S, 提示 RNA 完整、未降解, 可以用于逆转录步骤。



图 1. 青岛文昌鱼总 RNA 凝胶电泳图

M:DL2000 DNA marker; 1, 2: 青岛文昌鱼 RNA 样品

2.4.2 第一链总 cDNA 的合成

以反转录后的 cDNA 为模板，以 β -actin 为引物，PCR 扩增后 1%琼脂糖凝胶电泳。电泳结果表明，样品 1, 2, 3 产物只有一条大小为 354bp 的带(图 2)，说明转录效果良好并且初步确定没有基因组污染，可用于后续实验。



图 2. 第一链总 cDNA 检测电泳图

M:DL2000 DNA marker; 1, 2, 3, 4: 反转录 cDNA 样品

2.4.3 Amphi-ERK5 多克隆抗体制备

2.4.3.1 Amphi-ERK5 氨基酸特异序列选择

- 1) Amphi-ERK5 基因经拼接后翻译成的氨基酸序列，运用 NCBI Conserved Domain 查找工具分析该氨基酸序列的保守区，结果发现其氨基酸序列在 30-322 具有脊椎动物 ERK5 的典型的保守结构域。

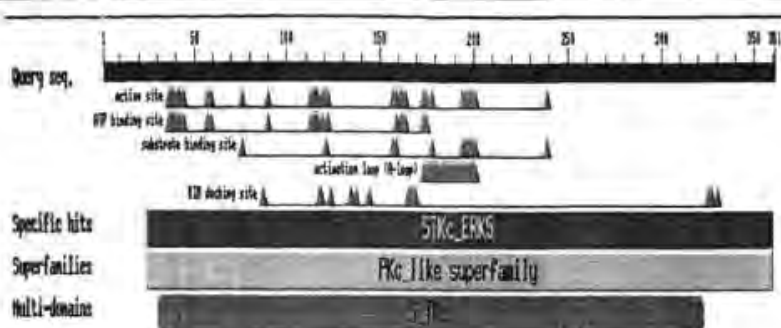


图 3. Amphi-ERK5 氨基酸序列保守区分析

- 2) 根据软件分析结果(图 4)可知, Amphi-ERK5 的亲水性氨基酸分别位于 4-16, 28-33, 50-57, 73-77, 101-106, 128-134, 185-191, 274-283, 287-293, 303-312, 325-330, 341-353 处; Amphi-ERK5 的柔性区域分别位于 4-19, 25-35, 49-55, 97-107, 126-132, 157-162, 181-189, 231-241, 275-281, 288-294, 306-311, 323-332, 343-353 处; Amphi-ERK5 蛋白的 B 细胞表位分别位于 2-21, 25-33, 47-64, 69-81, 85-90, 98-108, 126-136, 155-164, 182-191, 231-242, 255-260, 265-283, 289-296, 306-318, 324-333, 341-354 处; Amphi-ERK5 蛋白的表面可及性区域分别位于 6-19, 27-33, 48-54, 70-78, 99-106, 126-135, 185-190, 276-282, 288-294, 306-310, 321-331, 341-353。

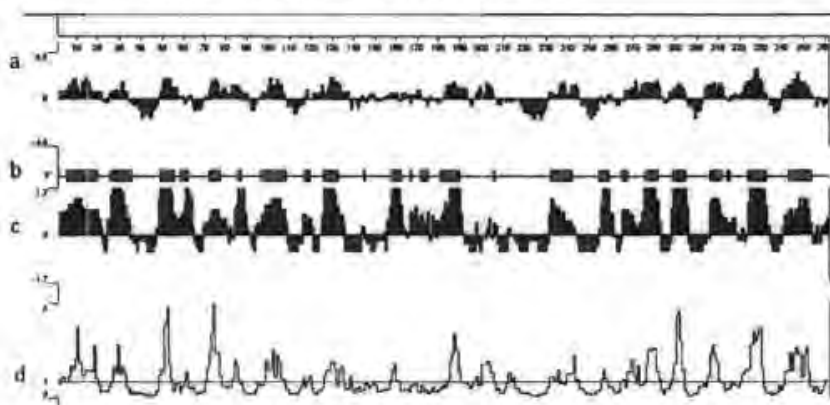


图 4. Amphi-ERK5 氨基酸序列亲水性, 柔性区, B 细胞表位及表面可及性分析

a. 亲水性分析; b. 柔性区分析; c. B 细胞抗原表位分析; d. 表面可及性分析

- 3) 根据 Amphi-ERK5 的最优线性表位的预测(图 5), 结果表明, 该序列最优线性表位区域分别位于 1-10, 27-35, 49-53, 97-106, 128-131, 236-237, 254-261, 276-283, 289-293, 308-312, 324-333, 345-350。

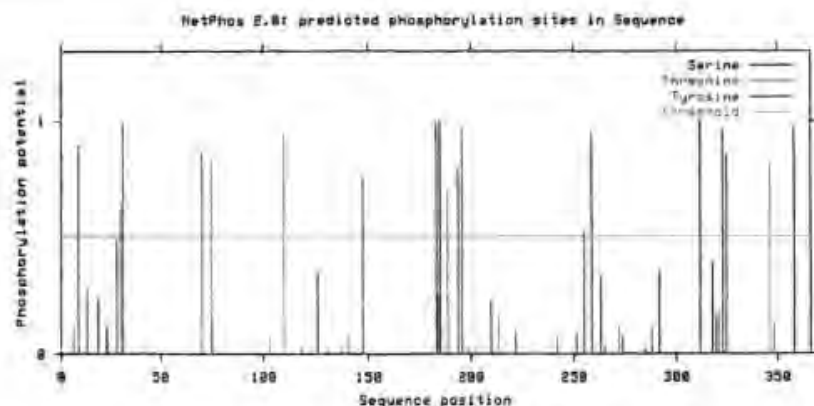


图 7. Amphi-ERK5 氨基酸序列磷酸化位点分析

根据抗原选择原则，综合考虑以上因素，最终选择亲水性、表面可及性、柔性区域、B 细胞表位、 β -转角、磷酸化位点比较集中的部分（划线部分 aa15-201）为抗原肽段制备鼠多克隆抗体。

MQGSETVESKNRSFLKKRSLDISFNVDISKYSPVENIGIGAYGVVCSAINK
KNGRKVAIKKIPNAFDVLM TAKRTYRELKILRHFKHDNVIGIHEVLRPADAKT
NDVKDVYVVF DLMESDLHIIHSDQDLTDEHIRYFLYQILRGLKYIHSANVLH
DLKPSNLLVNEN CELKIGDFGMARGVSSSPNDYKAFMTEYVATR WYRAPELM
 LSLNEYTFAIDVWSVGCIFAEM LGRKQLFPGKNYLNQLNLIMSVLGT PPD SIIQ
 SVTAERVRHYMSNIPKRRPVPWSVLYPQKSKDALCLLSKMLNFPKERISVED
 ALSHSYLSKYHDPDDEPICIPAFDFDFERQTMTRDQIKQAILSEID

2.4.3.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体

利用引入双酶切位点的 Amphi-ERK5 引物，以 52℃，53.1℃，54.3℃，56.0℃，58.4℃，61.3℃，62.6℃，65.0℃的退火温度进行 RT-PCR 反应，在 54.3℃的退火温度下在 500bp 附近得到一条最亮的带（图 8）。对目的带进行切胶回收，克隆、测序及序列比对后发现，该序列为我们所需要的 Amphi-ERK5 片段。



图 8. RT-PCR 产物电泳

M: DL2000 DNA Marker; 1: 585bp 的 ERK5 片段

pEASY-T3-ERK5 阳性克隆测序结果如下(下划线为引物序列):

GGGTTTCATATGCTAAAAAAGCGAAGTCTGGACATCAGCTTCAATGTGGAC
 AGCAAGTATTCCCCTGTCGAGAACATCGGAATCGGCGCTTACGGCGTTGTC
 TGTTCCGGCAATCAACAAGAAAAACGGCAGAAAAGTCGCCATCAAGAAAAT
 ACCAAGCGCTTTTGACGTGCTGATGACGGCCAAGAGGACGTACAGGGAGC
 TGAAGATACTGCGACATTTCAAGCACGACAACGTGATAGGGATCCACGAG
 GTTTTGCGCCCGGCTGATGCGAAGACAAACGACGTAAAGGACGTTTACGC
 TGTCTTTGACTTGATGGAAAGTGATCTGCACCACATCATTCACTCTGACCA
 AGATTTGACAGATGAACACATTTCGGTATTTCTCTACCAGATTCTCCGTGGC
 TTGAAGTACATCCATTCTGCCAATGTGCTGCACAGAGACTTAAAGCCAAGC
 AATCTCCTGGTTAACGAGAATTGCGAGCTTAAAATTGGTGATTTTGGCATGG
 CGAGGGGGGTGTCATCAAGCCCTAACGACTACAAAGCGTTCATGACGGAG
TATGTTGCTACCAGTTGACTCGAGCGG

将 pet-29b(+)进行 NdeI 和 XhoI 的双酶切线性化,同时对连接到 pEASY-T3 的目的片段 ERK5 进行同样的双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳检测,线性化的质粒在电泳中的迁移速率减慢,质粒线性化完全(如图 9 所示)。若线性化不完全可能会影响转化效率。



图 9. pEASY-T3-ERK5 及 pet-29b(+)质粒双酶切电泳图

1: 双酶切后的 pEASY-T3-ERK5 片段, 长度为 564bp; 2: 线性化的 pet-29b(+), 长度为 5233bp; M1: DL2, 000 DNA Marker; M2: Wide Range DNA Marker (500-12,000)

将线性化的载体和片段进行连接后, 构建成 pet-29b(+)-ERK5 表达质粒, 转化到表达菌株 BL21(DE3)后挑菌进行测序。

pet-29b(+)是具有 His-Tag 的原核表达载体, 将克隆的特异基因片段与 pet-29b(+)连接, 保持插入的片段与载体上的 ATG 和六个组氨酸同框, 从起始密码子 ATG 至 His-Tag 的碱基序列 (下划线显示出酶切位点, 大写字母表示载体序列) 及演绎出的氨基酸序列如下:

GAATTCCCCTCTAGAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATA
TGctaaaaagcgaagtctggacatcagcttcaatgtggacagcaagtattcccctgtcgagaacatcggaatcggcgct
 tacggcgtgtctgttcggcaatcaacaagaaaaacggcagaaaagtcgcatcaagaaaataccaagcgttttgacgtg
 ctgatgacggccaagaggacgtacagggagctgaagatactgcgacattcaagcacgacaacgtgataggatccacg
 aggttttgcggcgctgatcgaagacaaacgacgtaaaggacgttacgctgtctttgacttgatgaaagtgatctgca
 ccacatcattcactctgaccaagattgacagatgaacacattcggatttctctaccagattctccgtggctgaaagtacatc
 cattctgccaatgtgctgcacagagactaaagccaagcaalcctcggtaacgagaattgcgagcttaaaattggtgattt
 ggcattggcaggggggtgcatcaagccctaacgactacaagcgttcatgacggagtattgtctaccagttgaCTC
GAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCT

其氨基酸序列

MLKKRSLDISFNVDISKYSPVENIGIGAYGVVCSAINKKNGRKAIAIKKIPSAFD
 VLMTAKRTYRELKILRHFKHNDVIGIHEVLRPADAKTNDVKDVYAVFDLME

SDLHHIIHSDQDLTDEHIRYFLYQILRGLKYIHSANVLHRDLKPSNLLVNENCE
LKIGDFGMARGVSSSPNDYKAFMTEYVATS*LE

2.4.3.3 目的蛋白表达和纯化

选取含 *pet-29b(+)*-ERK5 重组质粒的 BL21(DE3)单克隆菌株, 用 IPTG 诱导表达外源蛋白肽段。分别取诱导前后以不同浓度 IPTG 诱导不同时间的菌液提取蛋白, 用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况 (图 10)。可以发现, 经 IPTG 诱导 2h 时工程菌株就已开始表达大量蛋白, 分子量与 His-ERK5 (191 个氨基酸, 分子量约为 21kD) 相一致。未经 IPTG 诱导的菌液提取液中不含该蛋白, 说明表达的外源蛋白肽段为 His-ERK5。另外诱导 4h 后表达量为最大值, 使用 0.5mM 浓度的 IPTG 和使用 1mM 浓度的 IPTG 诱导效果无明显差别。



图 10. 重组质粒 *pet-29b(+)*-ERK5 转化表达菌株 BL21(DE3)后重组表达结果

1: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 2h; 2: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 2h; 3: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 4h; 4: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 4h; 5: 重组质粒转化表达菌株诱导前 M:Blue Plus™ II Protein Marker(14kDa-100kDa);6: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 6h; 7: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 6h; 8: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 8h; 9: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 8h; 10: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 10h; 11: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 10h。

经试表达确定最佳诱导条件为 37℃, 0.5mMIPTG 诱导 4h。大量表达后离心菌体进行超声破碎收集上清与沉淀, SDS-PAGE 电泳检测 (图 11)。结果显示在目的蛋白肽段主要存在于沉淀中, 表明该蛋白肽段在菌体中主要以不溶性的包涵

体形式存在。

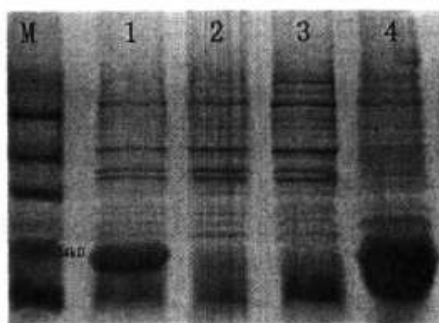


图 11. 重组质粒 pet-29b(+)-ERK5 扩大表达结果

M: Blue Plus™ II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: 0.5mMIPTG 诱导 4h 后菌液蛋白; 2: 诱导前菌液蛋白; 3: 诱导后超声破碎上清; 4: 诱导后超声破碎沉淀

His-ERK5 蛋白肽段包涵体采用切胶的方法纯化, SDS-PAGE 电泳检测 (图 12)。结果显示 His-ERK5 蛋白肽段纯化后得到较单一的目的条带。



图 12. His-ERK5 蛋白肽段切胶纯化结果

M: Blue Plus™ II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: 切胶纯化后的 His-ERK5 蛋白肽段

采用酶标仪 Bradford 法测定蛋白浓度, 绘制蛋白浓度标准曲线 (图 13), 根据测得 His-ERK5 蛋白肽段的 OD595 值 (0.717), 在曲线上对应其蛋白浓度为 0.269 mg/mL。

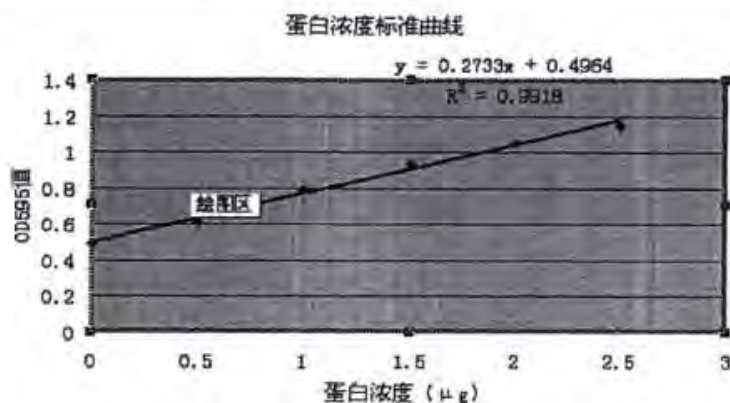


图 13. His-ERK5 蛋白浓度标准曲线

2.4.3.4 Amphi-ERK5 抗体的制备与鉴定

以切胶纯化后的 His-ERK5 蛋白肽段为抗原，弗氏完全佐剂为抗体制备佐剂制备多抗。采集抗血清后，以免疫前小鼠的血清为阴性对照，将免疫小鼠后获得抗 Amphi-ERK5 血清做 Western blotting 检测（图 14）。结果显示将抗血清浓度稀释至 1000 倍时，仍能与菌体表达的 His-ERK5 蛋白肽段特异性结合，说明抗体特异性和敏感度较高。



图 14. 鼠抗 Amphi-ERK5 血清与 His-ERK5 蛋白肽段的 Western blotting 结果

M: Blue Plus™ II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: 免疫前鼠血清(1:200); 2:免疫后鼠抗 Amphi-ERK5 血清(1:1000); 3:免疫后鼠抗 Amphi-ERK5 血清(1:200)

提取的文昌鱼总蛋白，SDS-PAGE 电泳检测（图 15）。可以用于下一步实验。

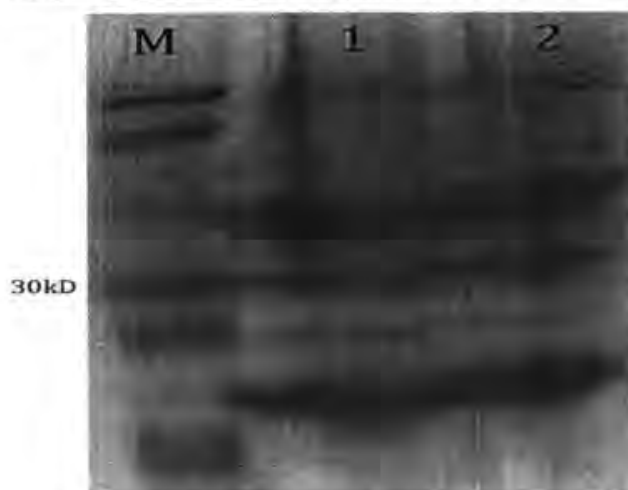


图 15. 文昌鱼全蛋白 SDS-PAGE 电泳结果

M: Blue PlusTM II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1, 2: 文昌鱼总蛋白样品

将抗 Amphi-ERK5 鼠血清 (1:100)、异源羊抗人 p-ERK5 多抗 (1:200) 与转移至膜上的文昌鱼全蛋白做 Western blotting 检测,以 β -actin 为阳性对照(图 16)。结果显示,除阳性对照有特异性条带外,另外两个样品都没有显示出特异条带。



图 16. 鼠抗 Amphi-ERK5 血清与文昌鱼全蛋白 Western blotting 结果

M: Blue PlusTM II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: actin(1:200); 2: 羊抗人 p-ERK5 多抗(1:200); 3: 抗 Amphi-ERK5 鼠血清(1:100)

2.4.4 Amphi-ERK5 免疫组织化学结果

利用制备的鼠抗 Amphi-ERK5 检测文昌鱼成体组织内 ERK5 蛋白的表达情况(图 17.)。成体组织切片免疫组织化学结果显示, Amphi-ERK5 在表皮(图 17.a)、肠(图 17.c)、肝盲囊(图 17.a、b)、性腺(图 17.a、d)、鳃裂(图 17.a、b)、神经管(图 17.a、e)中都检测到强烈的表达信号,在肌肉(图 17.a)、脊索(图 17.a、e)中则未检测到表达信号。



图 17. 鼠抗 Amphi-ERK5 多抗检测 ERK5 在青岛文昌鱼成体组织中的表达

ce:external epithelium 表皮 hc:hepatic caeca 肝盲囊 nc:neural cord 神经管 no:notochord 脊索 in:intestine 肠 mu:muscle 肌肉 bs:branchial slit 鳃裂 en:endostyle 内柱 go:gonad 生殖腺

利用异源性的羊抗人 p-ERK5 多克隆抗体检测文昌鱼成体组织内 ERK5 蛋白的表达情况 (图 18)。成体组织切片免疫组织化学结果显示, Amphi-ERK5 在表皮 (图 18. a)、肠 (图 18. a、e)、肝盲囊 (图 18. b)、性腺 (图 18. c)、鳃裂 (图 18. b、c)、神经管 (图 18. a、d) 中都检测到强烈的表达信号, 在肌肉 (图 18. a)、脊索 (图 18. a、d) 中则未检测到表达信号。



图 18. 羊抗人 p-ERK5 多抗检测 ERK5 在青岛文昌鱼成体组织中的表达

ce:external epithelium 表皮 hc:hepatic caeca 肝盲囊 nc:neural cord 神经管 no:notochord 脊索 in:intestine 肠 mu:muscle 肌肉 bs:branchial slit 鳃裂 en:endostyle 内柱 go:gonad 生殖腺

2.5 讨论

实验室前期工作中已经获得一个长度为 1087bp 的 Amphi-ERK5 基因片段, 在此基础上, 本研究将利用生物信息学方法对该蛋白的结构性质进行预测, 选择其中一段氨基酸序列作为抗原序列制备抗体。选择出来的 B 细胞的抗原表位, 应位于或易于移动到蛋白抗原表面, 有利于与 B 细胞抗原受体或抗体结合, 并

且还要具备一定的柔性,所以在选择抗原片段时应注意:1)选择抗原性强的部分;2)蛋白抗原氨基酸残基分为亲水性残基和疏水性残基两类。亲水性残基位于表面,疏水性氨基酸残基一般埋在蛋白内部,蛋白中平均亲水性峰值区域大多位于线性 B 细胞表位内或与之相连(Hopp et al.,1981),在亲水性残基构成的各个区域中,表面电荷及极性最大的区域通常为蛋白质抗原表位或抗原-抗体、配体-受体作用的位点(张顺川等,2010),因此应选择亲水性高的部分。3)蛋白抗原的多肽骨架有一定程度的活动性,这种局部的活动性与其部位的抗原性密切相关,活动性强即柔性大的氨基酸残基容易形成抗原表位(Janin, 1979; Zimmerman et al.,1968),因此应该选择柔性大的部分;4)对蛋白的可及性即抗原中氨基酸残基被溶剂分子接触的可能性参数和蛋白的电荷分布参数等研究发现,这些参数值均可作为预测某些蛋白抗原决定簇的重要参数(Jemmerson et al.,1985)。5)蛋白的二级结构也是预测抗原决定簇的重要信息(Chou et al.,1978; Krchnak et al., 1989),螺旋区段及折叠区段结构规则,有氢键维持结构,不易形变,主要起稳定结构的作用,常处于蛋白质的内部,难以与抗体嵌合;而转角区域和无规卷曲区域多位于蛋白分子表面,易于形变,结构突出,有利于与抗体结合,成为抗原表位的可能性比较大(孙涛等,2008)。6)磷酸化位点的预测表明该蛋白具有 19 个潜在的磷酸化位点,这些位点在蛋白质翻译后修饰对蛋白质成熟、结构和功能起着决定性的作用。总之,我们应该选择抗原性强,亲水性、表面可及性、柔性大,且 β 转角多的部分,综合分析最终选择 Amphi-ERK5 分子中 15-201 区为抗原氨基酸片段制备鼠多克隆抗体。

选择出特异性序列后,设计带有酶切位点的引物,克隆到目的片段,连接到 pEASY-T3 载体上,PCR 鉴定出阳性克隆,并进行测序验证为正确克隆。

pET 表达系统是目前最常用的、高效的大肠杆菌表达系统之一。其优点表现在:该系统的各种启动子及宿主为各类不同蛋白表达产量的最大化提供了重要的选择,通过这种载体,宿主菌之间重组的“协调”可以优化特异靶蛋白的表达构建的重组质粒。pet-29b(+)-ERK5 经 NdeI 和 XhoI 双酶切后,得到分别与原质粒及目的基因位置一致的条带,说明表达载体构建正确。IPTG 诱导后,SDS-PAGE 电泳显示 E.coli BL21/pet-29b(+)-ERK5 表达出一条新的蛋白条带,相对分子质量约 21kD,与预期蛋白肽段大小一致,则更加证实该原核表达载体构

建成功。

诱导的菌体超声裂解后,收集包涵体,考虑到成本问题,采用了切胶纯化的方法进行纯化,纯化后蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测显示目的蛋白肽段条带已经较为单一,说明蛋白纯化成功,此种方法的缺点是较难获得蛋白浓度较高的纯化蛋白,且蛋白为变性蛋白。

目前人工制备的特异性抗体分为三种类型,即多克隆抗体、单克隆抗体和基因工程抗体。由于单克隆抗体生产成本高、周期长,实验技术要求高,另外基因的多形性,糖基的异形性,或轻微变性造成的抗原结构改变,通常不会对多克隆抗体的结合能力产生重大影响,所以本研究采用制备多克隆抗体的方法。

制备高效价、高特异性的免疫血清需要有纯度较高的抗原并使用佐剂,佐剂可以增强抗原的免疫原性以及改变机体的免疫反应性,达到增强免疫力或提高抗体产生水平以及使抗原在体内维持时间明显延长等功效。

另外考虑到免疫周期长短,我们选用了周期较短的小鼠作为免疫动物,免疫后产生的血清足以满足实验需要。初次免疫时采用弗氏完全佐剂,加强免疫时不采用佐剂,采用常规免疫方法,至少需要加强免疫 2-3 次。

免疫印迹 (immunoblotting) 又称蛋白质印迹 (Western blotting),它是根据抗原抗体的特异性结合检测复杂样品中的某种蛋白的方法,它结合了凝胶电泳的高分辨率和固相免疫测定的特异敏感等多种特点,可检测到低至 1.0~5.0ng 中等大小的靶蛋白,在检测蛋白表达水平,抗体的特异性等方面得到广泛应用。实验中即采用 Western blotting 检测制备的抗血清,结果显示 1:1000 浓度的抗血清可与作为抗原的目的蛋白肽段特异性结合,证明 Amphi-ERK5 抗体特异性和敏感性较高,但对文昌鱼体内 ERK5 蛋白进行 Western blotting 检测时则没有检测到特异性条带,可能是因为原核表达的 ERK5 蛋白肽段作为免疫原免疫小鼠之后,在机体内由好几种克隆来产生抗体,形成好几种单克隆抗体混合物,其产生的抗体的特异性等是不可控的;而提取的文昌鱼全蛋白经电泳后形原有的抗原表位可能被破坏,导致制备的抗体可能无法与其相结合,因而无法保证获得的抗体能得到 Western blotting 检测结果;而使用异源的羊抗人 p-ERK5 多抗作为一抗 Western blotting 检测文昌鱼体内 ERK5 蛋白没有出现杂交带,可能是因为这种异源抗体只能识别文昌鱼蛋白部分构象表位,而不能识别文昌鱼体内此种蛋白的线

性表位。

免疫组织化学技术是用显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应,通过抗原抗体反应及呈色反应,显示细胞或组织中的化学成分,在显微镜下可清晰看见细胞内发生的抗原抗体反应产物,从而能够在细胞或组织原位确定某些化学成分的分布、含量。

为分析文昌鱼成体组织中 ERK5 蛋白的表达情况,实验中选用制备的鼠抗 Amphi-ERK5 血清进行了免疫组织化学的检测,Amphi-ERK5 的成体组织切片免疫组织化学结果显示,Amphi-ERK5 在表皮、肠、肝盲囊、性腺、鳃裂、神经管中都检测到强烈的表达信号,在脊索、肌肉中则未检测到表达信号。

为了验证实验室自制的 Amphi-ERK5 抗体免疫组化结果的可信度,实验亦采用异源性的羊抗人 p-ERK5 多克隆抗体进行免疫组织化学实验,结果显示 Amphi-ERK5 在文昌鱼表皮、咽鳃区、肝盲囊、肠等组织中有较强烈的表达信号,这与自制 Amphi-ERK5 抗体免疫组化结果是一致的,说明自制的抗体实验结果是可信的,同时也反映了实验室购买的异源性的抗体是可用的。

文昌鱼的体表皮、肠和肝盲囊都是与外源物质或是外界环境直接接触的组织,在机体的免疫防御中起到非常重要的作用,是文昌鱼体抵抗外源病原体侵入的第一道防线,Amphi-ERK5 在这些组织中有强烈表达信号,推测 Amphi-ERK5 可能参与到免疫防御中;研究发现神经冲动和神经营养因子通过 ERK5 的重要底物——MEF2A 控制海马神经元突触形成 (Sohn et al.,2002),提示 ERK5 可能参与神经系统的重塑过程——学习记忆以及病理性疼痛的神经生理和神经化学基础。Obata 等已通过研究证实 ERK5 在脊髓和背根神经节 (dorsal root ganglia, DRG) 的活化参与了外周神经损伤引起的痛觉过敏的信号转导 (Obata et al.,2007)。而 Amphi-ERK5 蛋白在文昌鱼神经管中具有强烈表达信号,推测 ERK5 除参与基本的细胞代谢外,可能也参与了文昌鱼神经系统的形成及疼痛信号传导过程。

MAPKs 在性腺中高表达的现象也有报道。如在黄鳝的卵巢中,推测该基因在低等动物的性腺中高表达,可能参与了性腺的发育 (陈丽莉等, 2007)。也有研究表明 MAPK 的激活对于斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复具有调节作用 (李旭鹏等, 2010)。文昌鱼中 ERK5 在性腺中的高表达也可能是与其性腺发

育有关。

另外，目前文昌鱼蛋白研究中所需要的抗体多依赖进口，成本昂贵，且多为异源抗体，使其应用受到限制，而应用自己制备的抗体进行免疫组化等研究，能够为降低检测成本为进一步研究文昌鱼体内蛋白的功能检测提供有益的保障和支持。

参考文献

- Chou PY, Fasman GD, 1978. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 47:45-148.
- Cowan KJ, Storey KB, 2003. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.*206: 1107-1115.
- Di Agostino S, Rossi P, Geremia R, et al, 2002. The MAPK pathway triggers activation of Nek2 during chromosome condensation in mouse spermatocytes [J]. *Development.*129: 1715 -1727.
- Dodeller F, Schulze-Koops H, 2006. The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther.*8: 205.
- Elsa CR, Roberts DA, Druker BJ, Wood LJ, 2008. Inhibition of p38 MAPK suppresses inflammatory cytokine induction by etoposide, 5-fluorouracil, and doxorubicin without affecting tumoricidal activity. *Plos One.*3: e2355.
- Hopp TP, Woods KR, 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.*78 (6):3824-3828.
- Janin J, 1979. Surface and inside volumes in globular proteins. *Nature.*277 (5696):491-492.
- Jemmerson R, Paterson Y, 1985. Mobility and evolutionary variability factors in protein antigenicity. *Nature.* 317(6032):89-90.
- Krchnak V, Mach O, Maly A, 1989. Computer prediction of B-cell determinants from proteinamino acid sequences based on incidence of beta turns. *Methods Enzymol.*178:586-611.
- Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC et al, 1994. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.*372 (6508): 739-746
- Li H, Xu H, Zhou Y, et al, 2007. The phosphothreoninylase activity of a bacterial type III effector family. *Science.* 315: 1000-1003.
- Sticht C, Freier K, Knöpfle K, et al, 2008. Activation of MAP kinase signaling through

- ERK5 but not ERK1 expression is associated with lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Neoplasia*.10(5) : 462-470.
- Troemel ER, Chu SW, Reinke V, et al, 2006. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C.elegans*. *Plos Genet*. 2: e183.
- Zhao M, Liu YW, Liu AH, et al, 2000. Signal transduction in TNF- α induced c-jun gene expression. *Acta Biochim Biophys Sin*.32 (3): 59-65
- Zimmerman JM, Eliezer N, Simha R, 1968. The characterization of amino acid sequences in proteins by statistical methods. *J Theor Biol* .21(2):170-201.
- 陈丽莉, 肖亚梅, 刘文彬等, 2007. ERK/ JNK 在黄鳍鲷、雄发育阶段生殖腺中的表达和定位. *动物学报*. 53(2):325-331.
- 高慎阳, 查恩辉, 王 坤, 周铁忠, 李 慧, 2010. 一种 “高性价比” 切胶纯化原核表达蛋白的方法. *中国农学通报*. 26(22) :24-26.
- 李旭鹏, 吕 众, 魏 华等, 2010. 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 参与调节斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复. *动物学杂志*. 45(2) :19-26.
- 林菊生, 冯作化, 2004. 现代细胞分子生物学技术[M]. 北京科学出版社. 504-534.
- 马建洲, 贺翔鸽, 2007. 免疫系统与青光眼. *国际眼科杂志*. 7(5) :1379-1383.
- 马建洲, 贺翔鸽, 谢琳, 2007. 慢性高眼压青光眼动物模型的构建和鉴定. *国际眼科杂志*. 7(4) :951-955
- 张顺川, 向骏, 程安春, 2010. 鸭肠炎病毒 uL53 截段基因的序列特性、原核表达与其抗原性检测[J]. *中国农业科学*. 43(21):4521-4528.
- 孙涛, 程安春, 汪铭书, 2008. 鸭肠炎病毒 UL6 基因 B 细胞表位的预测及其主要抗原域的原核表达[J]. *中国兽医科学*. 38(11):939-945.
- 张锐, 孙美裕, 欧阳红生, 等, 2004. 真核基因在 pET 系统中表达出现的问题与拟解决的方案[J]. *生物技术*, 14(2):62-63.

第三部分 Amphi-p38 多克隆抗体的制备及体内蛋白表达研究

3.1 前言

p38 MAPK 信号通路为 MAPK 家族的重要成员,除参与细胞的存活、分化和凋亡等过程,在炎症、应激反应中也具有重要作用,被认为是细胞众多信号转导通路的中转站(张奇等,2005)。实验证明,这条通路和炎症反应、创伤愈合、肿瘤发生及缺血/再灌注损伤等有关(Zarubin et al.,2005)。现在以小鼠,人等为研究对象对 p38MAPK 通路研究较多,且实验室前期工作中,因没有合适的抗体,未能对青岛文昌鱼中 p38 在蛋白水平上进行研究。

本文通过制备抗文昌鱼 p38 蛋白肽段的特异性抗体,并通过免疫组织化学方法研究 p38 在文昌鱼组织中的表达情况,希望通过本实验的研究能够为文昌鱼体内 p38 的研究提供一些实验基础。

本研究利用表达的 Amphi-38 蛋白肽段诱导小鼠制备多克隆抗体;通过免疫组织化学对成体文昌鱼组织中的 Amphi-38 蛋白表达情况进行了检测;与此同时,为了验证本实验室制备的 Amphi-38 抗体免疫组化可信度,利用购买的 p38 异源性抗体对成体文昌鱼组织中的 Amphi-p38 蛋白表达进行了检测。为进一步研究 Amphi-p38 蛋白的功能提供了一系列实验依据。

实验室前期通过文昌鱼成体原位杂交技术,获得的结果显示 Amphi-p38 基因在体表皮、肠、肝盲囊等组织中有表达信号,为进一步研究文昌鱼体内 p38 的分布与功能,利用 pet-29b(+)为表达载体, BL21(DE3)为表达菌株,构建了 Amphi-p38 表达载体。实验中采用切胶纯化方法制备抗 Amphi-ERK5 的多抗时发现,因受实验仪器的限制,要获足够量的蛋白需要多次切胶,要花费较多时间,获得的蛋白浓度较低,且为变性蛋白,因此在此实验则通过 Ni-NTA 柱纯化并复性的文昌鱼 p38 原核表达蛋白肽段为免疫原,免疫小鼠。另外免疫时采用抗原用量少、免疫针次少获得抗体效价高的三周快速制备多抗佐剂,制备 Amphi-p38 多克隆抗体。利用 Amphi-38 原核表达蛋白肽段做 Western blotting,检测证明多克隆抗体制备成功后,获取抗血清。

3.2 材料和试剂

3.2.1 主要材料、试剂和仪器

Ni-NTA 购自美国 BIO-RAD 公司；D25mm 透析袋（8000-14000）购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司；QuickAntibody-Mouse3W 购自上海索莱宝公司；鼠抗人 p38(27) α/β 多克隆抗体（ProductNo.sc-136210）购自 Santa Cruz Biotechnology 公司；其他常用材料、试剂和仪器见第二部分 2.2.1、2.2.2、2.2.3。

3.2.2 主要溶液的配制

洗涤液 (Wash Buffer)	Tris(pH8.0)	25mM
	NaCl	150 mM
	咪唑	15 mM
	蒸馏水定容至 1L, 混匀, 保存于 4℃。	
洗脱液 (Elution Buffer)	Tris(pH8.0)	25mM
	NaCl	100 mM
	咪唑	250 mM
	蒸馏水定容至 1L, 混匀, 保存于 4℃。	
透析液 (Dialysis Buffer)	Tris(pH8.0)	0.1M
	EDTA	5 mM
	半胱氨酸	5 mM
	蒸馏水定容至 1L, 混匀, 保存于 4℃。	

其他常用溶液的配制见第二部分 2.2.4。

3.3 实验方法

3.3.1 Amphi-p38 多克隆抗体的制备

3.3.1.1 Amphi-p38 氨基酸特异序列的选择

氨基酸序列分析方法同第二部分 2.3.3.1

3.3.1.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体

3.3.1.2.1 PCR 扩增目的片段

1) 基因特异性引物设计

利用 Primer premier 5 软件进行引物设计,克隆编码 Amphi-p38 片段的 cDNA,引物设计中分别引入 NdeI 和 XhoI 酶切位点(下划线)。

引物序列:

Amphi-p38 sense: 5'-GGAATTCCATATGCCTACTCTGACC-3';

Amphi-p38 antisense: 5'-CCGCTCGAGGTCGTGGTACT-3'.

扩增片段大小为 688bp,引物的合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

2) 以反转录合成的 cDNA 为模板, Amphi-p38 sense 和 Amphi-p38 antisense 为引物进行 PCR。将产物进行 1.0%琼脂糖电泳检测后切胶回收。反应体系与方法步骤同 2.3.3.2.1、2.3.3.2.2。

3.3.1.2.2 PCR 产物与 pEASY-T3 载体连接

连接反应体系与步骤同 2.3.3.2.3。

3.3.1.2.3 连接产物的转化

利用北京天根生物技术有限责任公司产品大肠杆菌 TOP10 感受态细胞进行转化。转化方法同 2.3.3.2.4。

3.3.1.2.4 菌落 PCR 筛选阳性克隆与测序

方法步骤同 2.3.3.2.5、2.3.3.2.6。

3.3.1.2.5 菌种的保存

保存方法同 2.3.3.2.7。

3.3.1.2.6 PCR 产物和原核表达载体 pet-29b(+)的酶切

取前述测序证实为阳性克隆的菌液及实验室保存的 pet-29b(+) 菌液分别取 50ul 接种于 50mL 含 Amp、Kan 的 LB 液体培养基中, 37℃ 震荡过夜后提取质粒, 方法见 2.3.3.2.6。酶切反应体系与方法见 2.3.3.2.8。

3.3.1.2.7 酶切后的目的基因片段与线性化的 pet-29b(+) 质粒片段连接和重组质粒转化

连接反应体系与方法同 2.3.3.2.9, 转化方法同 2.3.3.2.10。

3.3.1.2.8 测序

将重组质粒送至济南力戈科技有限公司进行测序。

3.3.1.3 目的蛋白的表达和纯化

3.3.1.3.1 试表达

试表达及 SDS-PAGE 检测方法同 2.3.3.3.1。

3.3.1.3.2 大规模表达

方法同 2.3.3.3.2。

3.3.1.3.3 菌体破碎收集蛋白

方法同 2.3.3.3.3。

3.3.1.3.4 pet-29b(+)-Amphi-p38 重组蛋白纯化

重组表达 His-p38 蛋白中含有载体上的 His₆ (His-His-His-His-His-His) 标签, 6×His 较小且在生理 pH 条件下不带电荷, 所以基本上不影响蛋白的结构和功能, 这使其成为理想的重组蛋白标签, 纯化后蛋白可以直接进行下游操作。与 His 融合表达的蛋白可通过金属螯合层析纯化 His-Tag 融合蛋白。His-Tag/His-Bind 技

术是根据与 His-Tag 序列 (6~10 个连续的组氨酸残基) 和固定化金属离子 (通常为 Ni^{2+}) 的亲合力来进行纯化。金属离子被整合到固相支持物共价结合的反应性基团上。

过柱方法如下:

- 1) 将柱内溶液放干净, 塞好塞子之后向柱内加入 5mL 脲终浓度为 8M 的 Elution buffer, 并用枪尖悬起柱内基质, 混匀后将液面加至 20mL, 37℃温育 15min。
- 2) 拔下塞子, 放干净柱内液体, 重复两次。用脲终浓度为 8M 的重悬液洗涤两次, 即平衡好柱子。
- 3) 用脲终浓度为 8M 的重悬液 (10~20mL) 重悬包涵体, 37℃恒温摇床上 200rpm 快速震荡 1h。
- 4) 将溶解后的包涵体溶液 10000rpm, 离心 10min, 保留上清, 去除沉淀。
- 5) 离心后将上清过柱, 收集部分流出液。
- 6) 用脲终浓度为 8M 的 Wash Buffer 洗一遍柱子, 收集部分冲洗液。
- 7) 加 5mL 脲终浓度为 8M 的 Elution buffer, 收集全部洗脱液。
- 8) SDS-PAGE 电泳检测。

3.3.1.3.5 重组蛋白的透析复性

- 1) 将过柱纯化后的蛋白灌于透析袋中, 将透析袋没入盛有 50 倍体积的 Dialysis Buffer 中, 4℃透析 16h 以上。
- 2) 将透析袋置于 1L Resuspension Buffer 中, 4℃透析 16h 以上。
- 3) 4℃, 10000rpm, 离心 10min, 保留上清, 去沉淀。
- 4) SDS-PAGE 电泳检测。
- 5) 酶标仪 Bradford 法测蛋白浓度

方法见第二部分 2.3.3.3.4, 绘制蛋白浓度标准曲线, 根据 Amphi-p38 重组蛋白的 OD595 值, 在标准曲线上对应出其蛋白量。

3.3.1.4 Amphi-p38 抗体制备与鉴定

3.3.1.4.1 阴性对照设置

抽取未免疫的正常小鼠血，作为阴性对照。

3.3.1.4.2 实验动物接种

- 1) 用生理盐水将抗原稀释至 2 倍最终浓度（按每针次 50 μ l 用量配制）。本实验使用抗原浓度为每针次 10 μ g。
- 2) 充分混匀佐剂，无菌条件下取出需用量（按每针次 50 μ l）与抗原体积比 1: 1 迅速混匀。
- 3) 通过后腿小腿肌肉注射免疫小鼠，每只小鼠注射 100 μ l，注射 5 只。
- 4) 14d 后按同样方式加强免疫一针。
- 5) 7d 后采微量尾血检测，随后采全血。

3.3.1.4.3 抗血清的收集

血清收集方法同 2.3.3.3.5.3。

3.3.1.4.4 抗体的鉴定

3.3.1.4.4.1 重组蛋白 His-p38 的 Western blotting 检测

检测方法见第二部分 2.3.3.4.4.1。

3.3.1.4.4.1 Western blotting 检测文昌鱼体内 p38 蛋白的存在情况

检测方法见第二部分 2.3.3.4.4.2

3.3.2 Amphi-p38 蛋白的免疫组织化学检测

3.3.2.1 石蜡包埋和切片制备

方法同第二部分 2.3.4.1

3.3.2.2 免疫组织化学染色

- 1) 按第二部分 2.3.4.2 中的方法对切片进行脱蜡、水化、除过氧化物酶活性，蒸馏水轻洗后，在 0.01mol/L PBS (pH 7.2-7.4) 中浸泡 5min；
- 2) 滴加 1: 10 正常绵羊血清封闭液，室温下孵育 1h，以减少非特异性染色；
- 3) 分别滴加鼠抗 Amphi-p38 血清及鼠抗人 p38 多克隆抗体（稀释比例 1:200），4℃孵育过夜（对照实验组采用 PBS 替代第一抗体进行同步孵育）；
- 4) PBS 轻洗 5min×3，滴加兔抗鼠二抗（稀释比例 1:200），37℃孵育 1h；
- 5) 清洗、显色及封片方法同第二部分 2.3.4.2

3.4 结果

3.4.1 Amphi-p38 多克隆抗体制备结果

3.4.1.1 Amphi-p38 氨基酸特异序列选择

- 1) Amphi-p38 基因经拼接后翻译成的氨基酸序列，运用 NCBI Conserved Domain 查找工具分析该氨基酸序列的保守区（图 1），结果发现其氨基酸序列在 29-313 具有脊椎动物 p38 的典型的保守结构域。

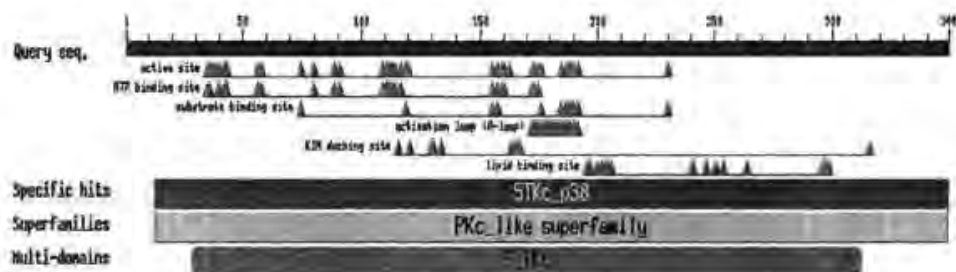


图 1. Amphi-p38 氨基酸序列保守区分析

- 2) 根据软件分析结果（图 2），Amphi-p38 的亲水性氨基酸分别位于 1-33, 61-87, 126-131, 151-170, 189-196, 203-210, 227-240, 245-277, 299-335, 340-347 处；Amphi-p38 的柔性区域分别位于 5-11, 25-28, 34-39, 59-67, 71-75, 125-130, 155-160, 222-233, 245-262, 265-276, 297-305, 317-324, 330-334；Amphi-p38 蛋白的抗原表位分别位于 1-14, 24-32, 59-66, 68-88, 123-132, 152-161, 163-172, 228-242, 245-277, 282-292, 297-305, 316-325, 327-339

处: Amphi-p38 蛋白的表面可及性区域分别位于 2-10, 25-31, 71-77, 82-85, 127-129, 155-158, 191-196, 203-208, 266-276, 298-304, 311-324。

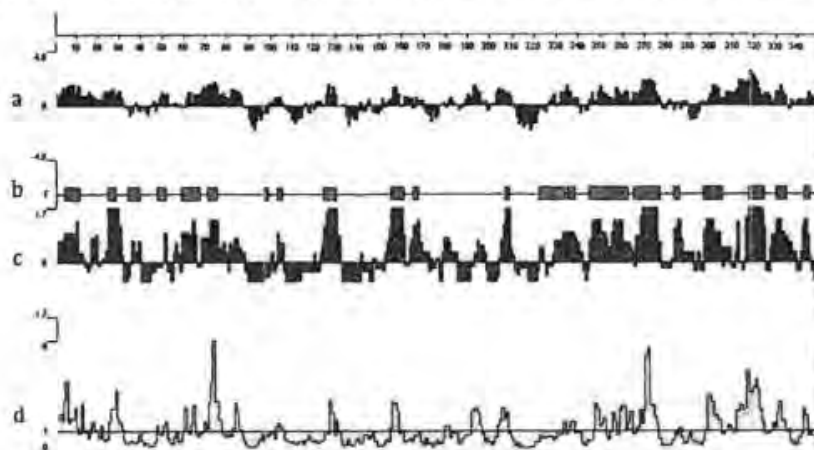


图 2. Amphi-p38 氨基酸序列亲水性, 柔性区, 抗原表位及表面可及性分析

a. 亲水性分析; b. 柔性区分析; c. 抗原性分析; d. 表面可及性分析

- 3) 根据 Amphi-p38 的最优线性表位的预测 (图 3), 结果表明, 该序列最优线性表位区域分别位于 1-9, 35-41, 69, 156-158, 160-164, 182-185, 227-229, 231-234, 245-252, 255-262, 268-274, 280-287, 301-303, 307-308, 315-332。

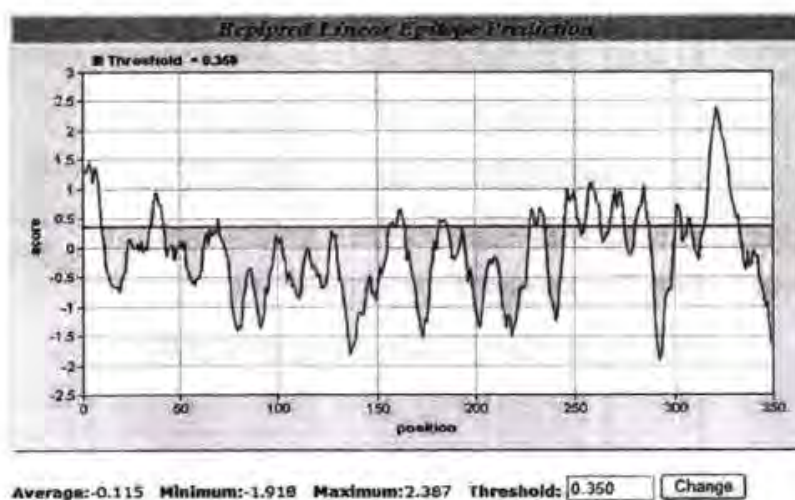


图 3. Amphi-p38 氨基酸序列最优线性表位分析

- 4) 通过对氨基酸序列进行二级结构预测, 结果显示该序列中。螺旋(H)占整个序列的 40.40%、 β 折叠(E)占整个序列的 16.62%以及无规则卷曲(C)占整个序列的 42.98% (图 4)。转角区域和无规则卷曲区域是非粘结性的柔性结构, 这些区域通常为 B 细胞抗原表位。

HDPTDEPTAAAYDDSF EKME LGVAEWR SKLIYH-

3.4.1.2 构建含 His-Tag 的原核表达载体

利用引入双酶切位点的 Amphi-38 引物, 以 52℃, 53.1℃, 54.3℃, 56.0℃, 58.4℃, 61.3℃, 62.6℃, 65.0℃ 的退火温度进行 RT-PCR 反应, 在 56.0℃ 的退火温度下在 750bp 附近可以得到一条亮带(图 6)。对目的带进行切胶回收, 克隆、测序及序列比对后发现, 该序列为我们所需要的 Amphi-38 片段。



图 6. RT-PCR 产物电泳

M: DL2000 DNA Marker; 1: 688bp 的 Amphi-p38 片段

pEASY-T3-p38 阳性克隆测序结果如下 (引物为下划线部分):

GGAATTCCATATGCCTACTCTGACCTTCGAGGATTTCCAGGACGTGTACCTA
GTGACGCCCTGATGGGTGCAGACCTGAACAACATCGTGAAGTGTACAGAA
GTTGACAGATGACCACGTGCAGTTCCTGGTCTACCAGGTGATCAGAGGACT
CAAGTATATCCACTCTGCTGGGATCATTACAGAGATTTGAAGCCCAGTAAC
ATCGCTGTAAACGAGGATTGTGAGTTGAAGATTTTGGACTTCGGTCTGGCC
AGGATGGCGGACGATGCGATGACGGGCTACGTAGCGACAAGATGGTACCG
GGCGCCAGAAATCATGCTAAACTGGATGCACTACAACAAAACAGTTGACAT
CTGGTTCGGTGGGGTGCATCATGGCGGAACTGCTGACGGGCAGAACTCTCT
TCCCCGAACTGATCACATTGATCAGTTGAAGAGAATTATGGAGCTCGTTG
GAACGCCTGACGAAGAATTCCTGGAAAAATCAGCCCCGAGTCCGCGCGA
ACCTACGTGAAGTCGCTCCCCAAGCACTCGAAGAAGGACTTCTCGGGCTA
CTTCTGCGGAGCGAATCCGGATGCTGTTGACCTGTTGGAAAAAATGCTGAT

ACTGGACACAGACAAGCGTCTGACGGCAGAGCAGGCCCTGGAGCACCCGT
 ACTTGCGCCAGTACCACGACCTCGAGCGG

将 pet-29b(+)进行 NdeI 和 XhoI 的双酶切线性化,同时对连接到 pEASY-T3 的目的片段 p38 进行同样的双酶切,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,线性化的质粒在电泳中的迁移速率减慢,质粒线性化完全(图7)。若线性化不完全可能会影响转化效率。

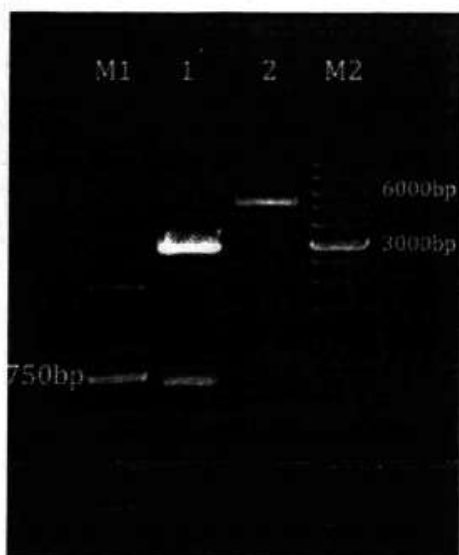


图7. pEASY-T3-p38 及 pet-29b(+)质粒双酶切电泳图

1: 双酶切后的 pEASY-T3-p38 片段,长度为 666bp; 2: 线性化的 pet-29b(+),长度为 5233bp; M1: DL2,000 DNA Marker; M2: Wide Range DNA Marker (500-12,000)

将线性化的载体和片段进行连接后,构建成 pet-29b(+)-p38 表达质粒,转化到表达菌株 BL21(DE3)后挑菌进行测序。

pet-29b(+)是具有 His-Tag 的原核表达载体,将克隆的特异基因片段与 pet-29b(+)连接,保持插入的片段与载体上的 ATG 和六个组氨酸同框,从起始密码子 ATG 至 His-Tag 的碱基序列(下划线显示出酶切位点,大写字母表示载体序列)及演绎出的氨基酸序列如下:

GGAGATATACCATATGcctactctgaccttcgaggattccaggacgtgtacctagtacgcccctgatgggt
 gcagacctgaacaacatcgtgaagtgacagaagttgacagatgaccacgtgcagttcctggctaccaggtgatcagagga
 ctcaagtatatccactctgctgggatcattcacagagattgaagcccagtaacatcgtgttaacgaggattgtgagttgaag
 atttggacttcggtctggccaggatggcggacgatgcgatgacgggctacgtagcgacaagatggtaccgggcgccag

aaatcatgctaaactggatgcactacaacaaaacagttgacatctggtcgggggcatcatggcggaactgctgacgg
gcagaacictctctccccggaactgatcacattgatcagttgaagagaattatggagctcgttgaacgcctgacgaagaatt
cctggaaaaaatcagccccgagtcgcggaacctacgtgaagtcgctcccaagcactcgaagaaggacttctcgggc
tacttctcgggagcgaatccggatgctgttgacctgttgaaaaatgctgatactggacacagacaagcgtctgacggca
gagcaggccctggagcaccgtacttgcgccagtaccacgacCTCGAGCACCACCACCACCA
CTGAGATCCGGCT

其氨基酸序列

MPTLTFEDFQDVYLVTPLMGADLNNIVKCQKLTDDHVQFLVYQVIRGLKYIHSAGII
HRDLKPSNIAVNEDCELKILDFGLARMADDAMTGYVATRWRAPRPEIMLNWMHYNKTVD
IWSVGCIMAELLTGRTLFPGTDHIDQLKRIMELVGTPEEFLEKISPESARTYVKSLPKHSK
KDFSGYFCGANPDVLDLLEKMLILDTKRLTAEQALEHPYLRQYHDLE

3.4.1.3 目的蛋白表达和纯化

选取含 *pet-29b(+)-p38* 重组质粒的 BL21(DE3)单克隆菌株, 用 IPTG 诱导表达外源蛋白肽段。分别取诱导前后以不同浓度 IPTG 诱导不同时间的菌液提取蛋白, 用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况 (图 8)。可以发现, 经 IPTG 诱导 2h 时工程菌株就已开始表达大量蛋白, 分子量与 His-p38 (225 个氨基酸, 分子量约为 24.8kD) 相一致。未经 IPTG 诱导的菌液提取液中不含该蛋白, 说明表达的外源蛋白肽段为 His-p38。另外诱导 4h 后表达量为最大值, 使用 0.5mM 浓度的 IPTG 和使用 1mM 浓度的 IPTG 诱导效果无明显差别。

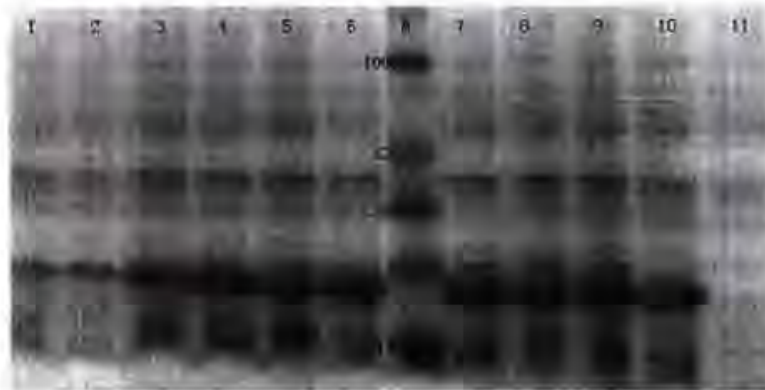


图 8. 重组质粒 *pet-29b(+)-p38* 转化表达菌株 BL21(DE3)后重组表达结果

1: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 2h; 2: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 2h; 3: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 4h; 4: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 4h; 5: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 6h; 6: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 6h; M: Blue Plus™ II Protein Marker (14kDa-100kDa); 7: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 8h; 8: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 8h; 9: 重组质粒转化表达菌株 0.5mMIPTG 诱导 10h; 10: 重组质粒转化表达菌株 1.0mMIPTG 诱导 10h; 11: 重组质粒转化表达菌株诱导前

经试表达确定最佳诱导条件为 37℃, 0.5mMIPTG 诱导 4h。大量表达后离心菌体进行超声破碎收集上清与沉淀, SDS-PAGE 电泳检测 (图 9)。在沉淀中可见大量目的蛋白, 而上清中则没有, 说明蛋白肽段是以包涵体形式表达的。



图 9. 重组质粒 *pet-29b(+)-p38* 扩大表达结果

M: Blue Plus™ II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: 诱导前菌液蛋白; 2: 0.5mMIPTG 诱导 4h 后菌液蛋白; 3: 诱导后超声破碎上清; 4: 诱导后超声破碎沉淀

His-p38 蛋白包涵体使用 Ni-NTA 层析柱纯化, SDS-PAGE 电泳检测 (图 10)。结果显示 His-p38 蛋白肽段纯化得到单一的目的条带。将纯化后蛋白肽段置于透析袋内透析复性后离心得上清, 即为复性后蛋白, SDS-PAGE 电泳检测, 最终得到复性后的目的蛋白肽段。



图 10. His-p38 蛋白肽段纯化后复性结果

M: Blue Plus™ II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: 纯化后的 His-p38 蛋白; 2: 复性后的 His-p38 蛋白
 采用酶标仪 Bradford 法测定蛋白浓度, 绘制蛋白浓度标准曲线 (图 11), 根据复性后的 His-p38 蛋白肽段的 OD595 值 (0.887), 对应其蛋白浓度为 0.466mg/mL。

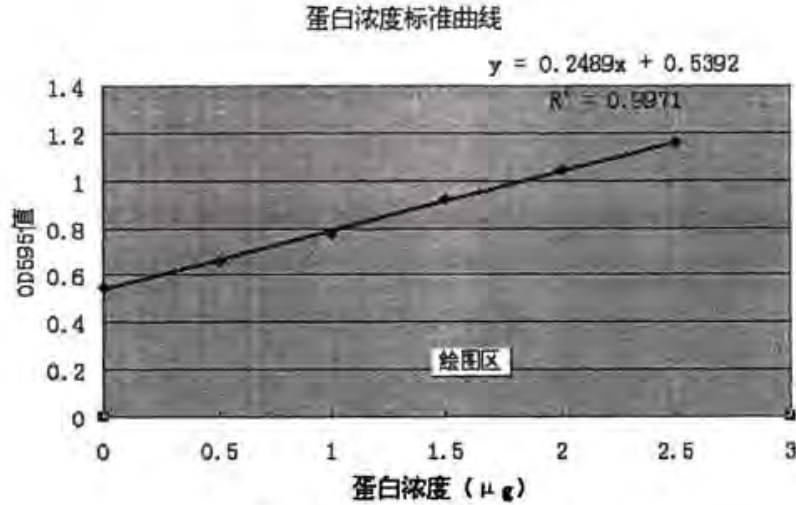


图 11. His-p38 蛋白浓度标准曲线

3.4.1.4 Amphi-p38 抗体的制备与鉴定

纯化的 His-p38 蛋白肽段为鼠免疫原, 三周快速小鼠多抗制备佐剂为抗体制备佐剂制备了鼠抗文昌鱼 His-p38 多抗血清, 它与工程菌表达的 His-p38 重组蛋白肽段进行 Western blotting 实验 (图 12)。结果显示将抗血清浓度稀释至 1000 倍时, 仍能菌体表达的 His-p38 肽段较好的特异性结合, 说明抗体特异性和敏感性较高。

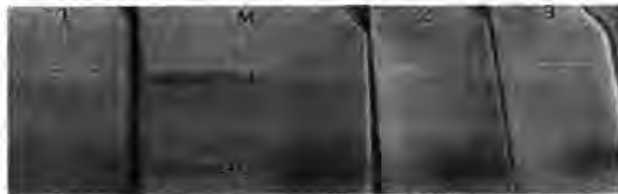


图 12. 鼠抗 Amphi-p38 血清与 His-p38 蛋白肽段的 Western blotting 结果

M: Blue Plus™ II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: 免疫前鼠血清(1:200); 2: 免疫后鼠抗 Amphi-p38 血清(1:200); 3: 免疫后鼠抗 Amphi-p38 血清(1:500); 4: 免疫后鼠抗 Amphi-p38 血清(1:1000)

将抗 Amphi-p38 鼠血清 (1: 200)、异源鼠抗人 p38 多克隆抗体 (1: 200)

与文昌鱼全蛋白做 Western blotting 杂交 (图 13)。结果显示, 抗 Amphi-p38 血清在 40kD 附近出现特异的杂交带, 而异源性抗体没有显示出杂交带。



图 13. 鼠抗 Amphi-p38 鼠血清与文昌鱼全蛋白 Western blotting 结果

M: Blue PlusTM II Protein Marker(14kDa-100kDa); 1: 鼠抗 Amphi-p38 血清 (1: 200); 2: 鼠抗人 p38 多抗(1:200)

3.4.2 Amphi-p38 免疫组织化学结果

利用制备的鼠抗 Amphi-p38 检测文昌鱼成体组织内 p38 蛋白的表达情况(图 14)。结果显示, Amphi-p38 在表皮 (图 14. a、b)、肠 (图 14.a、d)、肝盲囊 (图 14.c)、鳃裂 (图 14. b、c)、性腺 (图 14.c、e)、神经管 (图 14.a) 中都检测到强烈的表达信号, 在肌肉 (图 14.a) 中检测到相对弱一点的表达信号, 在脊索 (图 14.a) 未检测到表达信号。



图 14. 鼠抗 Amphi-p38 多抗检测 p38 在青岛文昌鱼成体组织中的表达

ee:external epithelium 表皮 hc:hepatic caeca 肝盲囊 nc:neural cord 神经管 no:notochord 脊索 in:intestine 肠 mu:muscle 肌肉 bs:branchial slit 鳃裂 en:endostyle 内柱 go:gonad 生殖腺 mf:metapleural fold 腹褶

利用异源鼠抗人 p38 多克隆抗体检测文昌鱼成体组织内 p38 蛋白的表达情况 (图 15.)。结果显示, Amphi-p38 在表皮 (图 15. a)、肠 (图 15.b)、肝盲囊 (图 15. a、e)、鳃裂 (图 15. a、c、e)、性腺 (图 15. e)、神经管 (图 15. a、d) 中都检测到强烈的表达信号, 在肌肉 (图 15.a) 中检测到相对弱一点的表达信号, 在脊索 (图 15. a) 中未检测到表达信号。

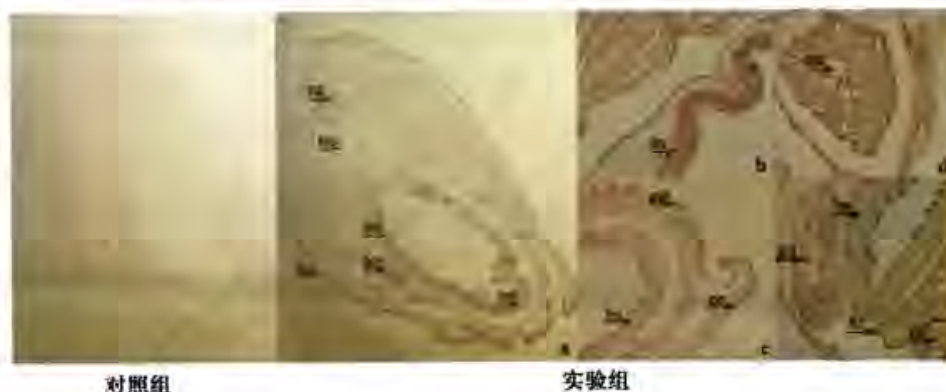


图 15. 鼠抗人 p38 多抗检测 p38 在青岛文昌鱼成体组织中的表达
 ce:external epithelium 表皮 hc:hepatic caeca 肝盲囊 nc:neural cord 神经管 no:notochord 脊索 in:intestine
 肠 mu:muscle 肌肉 bs:branchial slit 鳃裂 en:endostyle 内柱 go:gonad 生殖腺 mf:metapleural fold 腹褶

3.5 讨论

实验室已经获得长度为 1050bp, 含有完整开放阅读框的 Amphi-p38 基因序列标签, 在此基础上, 本研究将利用生物信息学方法对该蛋白的结构性质进行预测, 选择其中一段氨基酸序列作为抗原序列制备抗体。根据第二部分 2.5 提到的抗原选择原则, 需要选择抗原性强, 亲水性、表面可及性、柔性大, 且 β 转角多的部分, 综合分析最终选择 Amphi-p38 分子中最为特异的部分 (氨基酸 97-318) 为抗原肽段制备鼠多克隆抗体。

选择出特异性序列后, 设计带有酶切位点的引物, 克隆到目的片段, 连接到 pEASY-T3 载体上, PCR 鉴定出阳性克隆, 并进行测序验证为正确克隆。

pet-29b(+)-p38 经 NdeI 和 XhoI 双酶切后, 得到与原质粒及目的基因位置一致的条带, 说明表达载体构建正确。IPTG 诱导后, SDS-PAGE 电泳显示 E.coli BL21/pet-29b(+)-p38 表达出一条新的蛋白条带, 相对分子质量约 24kD, 与预期蛋白肽段大小一致, 则更加证实该原核表达载体构建成功。

诱导的菌体超声裂解后, 收集包涵体, 溶解后经 Ni 柱亲和层析, 纯化蛋白的 SDS-PAGE 电泳显示单一条带, 位置与目的蛋白相同, 说明蛋白纯化成功。纯化后的蛋白通过透析复性方法透析后, 测其浓度, 达到 0.4mg/mL, 可以用作抗原。过柱纯化并透析纯化获得抗原的方法与切胶纯化的优点是一次即可获得免疫全过程需要的蛋白抗原且蛋白浓度高, 经复性后的蛋白具有一定的活性。在小鼠免疫时采用三周快速小鼠多抗制备佐剂制备多抗, 通过三周两针的方法快速制

备小鼠多克隆抗体,此佐剂与弗氏佐剂相比,具有免疫针次少、抗原用量低、抗体产生快等优点。尾部试血后,可采全血进行下一步检测。

实验中采用 Western blotting 检测制备的抗血清,结果显示 1:1000 浓度的抗血清可与作为抗原的目的蛋白特异性结合,证明 Amphi-p38 抗体特异性和敏感性较高,对文昌鱼体内 p38 蛋白进行检测时在目的蛋白位置也检测到特异性条带,说明制备的多抗能识别文昌鱼体内的蛋白。而使用异源的鼠抗人 p38 多抗作为一抗 Western blotting 检测文昌鱼体内 p38 蛋白时则没有出现杂交带,可能是因为这种异源抗体只能识别文昌鱼体内 p38 蛋白的构象表位,而不能识别文昌鱼体内此种蛋白的线性表位。

利用制备的抗 Amphi-p38 多抗血清进行成体组织切片免疫组织化学检测,结果显示,Amphi-p38 在表皮、肠、肝盲囊、鳃柱、性腺、神经管中都检测到强烈的表达信号,在肌肉中检测到相对弱一点的表达信号,在脊索中则未检测到表达信号;实验室前期的成体组织切片原位杂交结果显示,Amphi-p38 主要在表皮、肠、肝盲囊、性腺、神经管中有强烈的表达信号,在内柱、咽鳃区中表达信号较弱,在脊索、肌肉中则未检测到表达信号。

免疫组化结果与原位杂交结果出现不一致的原因可能是因为:p38MAPK 已经被证明在肌肉发生中起重要作用(Terzis G et al,2010; Shin J H et al,2011; Keren A et al,2005),在运动时可被激活与维持肌细胞生长分化有关,通过免疫组化显示出 Amphi-p38 在肌肉中也有弱表达。另外,在原位杂交实验中,蛋白含量丰富的组织中,mRNA 的含量就相对较低,导致 Amphi-p38 在内柱和咽鳃区中的表达信号较弱。

为了验证实验室自制的 Amphi-p38 抗体免疫组化结果的可信度,实验亦采用异源性的鼠抗人 p38 多克隆抗体进行免疫组织化学实验,结果显示 Amphi-p38 在文昌鱼表皮、咽鳃区、肝盲囊、肠等组织中有较强烈的表达信号,这与自制 Amphi-p38 抗体免疫组化结果是一致的,说明自制的抗体实验结果是可信的,同时也反映了实验室购买的异源性的抗体是可用的。

文昌鱼的体表皮、肠和肝盲囊都是与外源物质或是外界环境直接接触的组织,在机体的免疫防御中起到非常重要的作用,是文昌鱼体抵抗外源病原体侵入的第一道防线,Amphi-p38 在这些组织中有强烈表达信号,推测 Amphi-p38 可能

参与到免疫防御中；研究发现，p38 可由 MKK3/MMK6 上游激酶激活，不仅在炎症痛而且在神经病理性痛信号传导中起关键作用（张颜波等，2009）。而 Amphi-38 蛋白在文昌鱼神经管中具有强烈表达信号，推测 Amphi-38 除参与基本的细胞代谢外，可能也参与了文昌鱼神经系统的形成及疼痛信号传导过程。

MAPKs 在性腺中高表达的现象也有报道。如在黄鳝的卵巢中，推测该基因在低等动物的性腺中高表达，可能参与了性腺的发育（陈丽莉等，2007）。也有研究表明 MAPK 的激活对于斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复具有调节作用（李旭鹏等，2010）。文昌鱼中 p38 在性腺中的高表达也可能是与其性腺发育有关。

本文中通过原核表达系统制备目的蛋白，进而继续制备其抗体，有费用低廉，效果明显等优势。目前文昌鱼蛋白研究中所需要的抗体多依赖进口，成本昂贵，使其应用受到限制，且多为异源抗体，而应用制备抗体进行免疫组化等研究，能够为降低检测成本为进一步研究文昌鱼体内蛋白的功能检测提供有益的保障和支持。

参考文献

- Hansen T, J rgensen J, 2007. Cloning and characterisation of p38 MAP kinase from Atlantic salmon: A kinase important for regulating salmon TNF-2 and IL-1 [beta] expression. *Mol Immunol*.44: 3137-3146.
- Keren A, Bengal E, Frank D, 2005. p38 MAP kinase regulates the expression of XMyf5 and affects distinct myogenic programs during *Xenopus* development[J]. *Developmental Biology*.288: 73-86.
- Shin JH, Jeong JY, Jin Y, et al, 2011. p38 β MAPK affords cytoprotection against oxidative stress-induced astrocyte apoptosis via induction of α Bcrystalline and its anti-apoptotic function [J]. *Neuroscience Letters*.501 (3):132-137.
- Terzis G, Spengos K, Mascher H, et al, 2010. The degree of p70 S6k and S6 p phosphorylation in human skeletal muscle in response to resistance exercise depends on the train in gvolume[J].*European Journal of Applied Physiology*. 110: 835-843.
- Zarubin T, Han J, 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res*.15 (1):11-18.
- Lee JC, Young PR, 1996. Role of CSBP/p38/RK stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanisms. *J Leukoc Biol*. 59(2):152-157.
- 陈丽莉, 肖亚梅, 刘文彬等, 2007. ERK/JNK 在黄鳝雌、雄发育阶段生殖腺中的表达和定位. *动物学报*. 53(2): 325-331.
- 李旭鹏, 吕 众, 魏 华等, 2010. 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 参与调节斑马鱼卵母细胞第一次减数分裂的恢复. *动物学杂志*. 45 (2) :19-26.
- 王素华, 张励才, 曾因明, 秦承伟, 2007. 大鼠脑内远位触液神经元 p38 丝裂原活化蛋白激酶的分布及在噪声应激时的表达. *中国应用生理学杂志*. 23(04):419-422.
- 王进堂, 尹岭, 田淑君, 张笑明, 2009. 冷热应激对大鼠脊髓和脊神经节 p38 信号转导的影响. *中国康复理论与实践*. 15(02):103-105.
- 张颜波, 袁慧, 牛敬忠, 孙保亮, 2009. 丝裂原活化的蛋白激酶激活通路在病理

性痛觉调制中的作用研究进展. 中国疼痛医学杂志. 15(6):368-371

本论文的创新之处

- 1) 首次原核表达并纯化了 Amphi-ERK5 蛋白肽段, 并以切胶纯化后的蛋白肽段作为抗原, 免疫小鼠获得抗血清, Western blotting 检测其能够识别 His-ERK5 重组蛋白肽段。
- 2) 首次原核表达并纯化了 Amphi-p38 蛋白肽段, 并以过柱纯化后的蛋白肽段作为抗原, 免疫小鼠获得抗血清, Western blotting 检测其不仅能够识别 His-p38 重组蛋白肽段, 还能够识别文昌鱼全蛋白中的 p38 蛋白。
- 3) 采用制备的鼠抗 Amphi-ERK5 多抗血清为一抗, 通过免疫组织化学方法对 Amphi-ERK5 在文昌鱼组织中的蛋白表达情况进行了初步研究, 发现 ERK5 蛋白在表皮、肠、肝盲囊、咽鳃区检测到强烈的表达信号, 在肌肉, 脊索未检测到表达信号, 同时采用异源性抗体亦得到一致结果, 说明制备的多抗可以用于后续实验的研究。
- 4) 采用制备的鼠抗 Amphi-p38 多抗血清为一抗, 通过免疫组织化学方法对 Amphi-p38 在文昌鱼组织中的蛋白表达情况进行了初步研究, 发现 p38 蛋白在表皮、肠、肝盲囊、咽鳃区有强烈的表达信号, 在肌肉中检测到较弱的表达信号, 在脊索中未检测到表达信号, 同时采用异源性抗体亦得到一致结果, 说明制备的多抗可以用于后续实验的研究。

本论文的不足之处

由于材料及时间所限, 对文昌鱼体内的 Amphi-ERK5、Amphi-p38 蛋白表达进行研究时, 未能选择不同发育时期的文昌鱼进行蛋白表达研究。

致 谢

本论文是在导师陈忠科副教授的悉心指导下完成的。在整个研究生阶段，陈老师在生活与学习上都给予我很大的帮助，其渊博的学识和严谨的治学态度都让我受益匪浅，从论文的选题、方案设计、实验实施至论文修改与完稿都凝聚了陈老师大量的心血和汗水，在此，我谨向陈老师表示诚挚的感谢和崇高的敬意！

感谢张红卫教授、孔维华教授、张艳君教授等在这方面给予我的帮助、支持与鼓励。感谢林浴霜老师、邵明老师、刘昌彬老师在实验过程中给我的指导与帮助，感谢闫杰师姐、毕佳师姐、曹建萌师兄以及所有给予我帮助的同学，感谢本实验室苗志刚、付强，正是由于大家的互相帮助和团结协作，创造了一个良好舒适的科研环境，才使得实验能够有条不紊的进行。

感谢我的父母兄长为我提供的物质帮助和精神鼓励，从而使我能够安心的学习生活，顺利的完成学业，感谢朋友们对我的关心与鼓励，感谢你们带给我的前进的动力和战胜困难的勇气，我会继续用我的努力与去回报你们！

感谢海洋 863 项目（海洋文昌鱼繁育与免疫基因功能解析关键技术研究之三：海洋模式生物文昌鱼免疫防御的关键基因研究 2008AA0926039）对本课题的部分资助。

最后，再次感谢三年来给予我关心与帮助的老师同学亲人朋友，谢谢你们！

学位论文评阅及答辩情况表

论文评阅人	姓名	专业技术职务	所在单位	对论文总体评价*	
答辩委员会成员	姓名	专业技术职务	所在单位	备注	
	主席				
	委 员				
答辩委员会对论文的 总体评价*			答辩秘 书		
答辩日期					
备注					

* 优秀为“A”；良好为“B”；合格为“C”；不合格为“D”。