

梅花鹿重组 Galectin-1 的表达及多克隆抗体的制备与鉴定

汪珍¹ 王大涛² 于威^{1*} 李春义^{2,3*}

(1 浙江理工大学生命科学学院 杭州, 310018) (2 中国农业科学院特产研究所 长春 130112)

(3 长春科技学院 长春 130600)

摘要: 半乳糖凝集素-1 (Galectin-1) 是最先被报道的哺乳动物半乳糖凝集素, 存在于多种组织和细胞内, 参与细胞的粘附、增殖、凋亡和炎症反应等多种生理病理过程, 并且与免疫系统的调节和肿瘤的发生发展密切相关。鹿茸是哺乳动物中罕见的能够周期性的脱落和再生的附属器官, 作为研究哺乳动物器官再生的新模型受到关注。鹿茸再生是一个基于干细胞的过程, 定位于角柄骨膜的干细胞是鹿茸再生的基础, Galectin-1 在角柄骨膜细胞 (pedicle periosteum cell, PPC) 中高度表达, 提示其在鹿茸再生中发挥着重要作用。由于尚没有商用的鹿 Galectin-1 蛋白及其抗体, 为进一步研究 Galectin-1 在鹿茸再生中的生物学功能, 需要制备相应的蛋白和抗体, 本实验将梅花鹿 Galectin-1 基因与 pET28a 连接, 并将重组质粒 pET28a-Galectin-1 转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3) 中诱导表达。用 Ni-NTA Agarose 亲和层析纯化融合蛋白, 免疫兔制备多克隆抗体。酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测抗体效价, Western blot 检测抗体特异性、细胞免疫荧光检测 Galectin-1 在角柄骨膜细胞中的表达情况。结果表明, 本实验成功诱导重组原核表达载体 pET28a-Galectin-1 在 BL21 (DE3) 中表达, 通过 Ni 纯化获得融合蛋白, ELISA 结果显示, 抗体效价达到 1:64000, Western blot 结果表明该抗体特异性良好, 细胞免疫荧光显示 Galectin-1 在 PPC 全细胞中表达。本实验获得了纯化的鹿 Galectin-1 蛋白和特异性较好的多克隆抗体, 为揭示 Galectin-1 在鹿茸再生调控中的作用提供了重要的实验材料。

关键词: 梅花鹿; 鹿茸; 半乳糖凝集素-1; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q344.13

文献标识码: A

文章编号: 1000-1050 (2019) 02-0182-09

Generation and validation of a polyclonal antibody against recombinant Galectin-1 in sika deer (*Cervus nippon*)

WANG Zhen¹, WANG Datao², YU Wei^{1*}, LI Chunyi^{2,3*}

(1 College of Life Science, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

(2 Institute of Special Wild Economic Animal and Plant Science, the Chinese Academy of Agricultural Science, Changchun 130112, China)

(3 Changchun Sci-Tech University, Changchun 130600, China)

Abstract: Galectin-1, a mammalian galectoside lectin is present in many cells and tissues. It is involved in many physiological processes, such as cell adhesion, proliferation, apoptosis, and inflammation. Galectin-1 is a member of the β -galactoside binding family, which are involved in the regulation of the immune system and development of tumors. Antler is a rare accessory organ that can periodically shed and regenerate from its pedicle in deer and has attracted attention as a new model for studying mammalian organ regeneration. Deer antlers offer a unique opportunity to explore how nature has devised a system of epimorphic regeneration in mammals. Antler regeneration is a stem cell-based process derived from antler stem cells that are located in the pedicle periosteum (PP). Elevated expression of Galectin-1 in antler stem cells suggest that this molecule may play an important role in antler regeneration. To study the biological function of Galectin-1 in antler regeneration, it is necessary to generate a polyclonal antibody. In this study, the Galectin-1 gene of Sika deer (*Cervus nippon*) was inserted into the pET28a vector to obtain the recombinant plasmid, pET28a-Galectin-1. This recombinant

基金项目: 中国科学院 A 类战略性先导科技专项 (XDA16010105)

作者简介: 汪珍 (1995-), 女, 在读硕士研究生, 主要从事鹿茸生物学研究。

收稿日期: 2018-05-08; 修回日期: 2018-09-26

通讯作者: Corresponding authors, E-mail: yuwei@zstu.edu.cn; lichunyi1959@163.com

plasmid was then transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) for induction and expression. The target protein was purified by using a Ni - NTA agarose affinity column. The purified protein was used to immunize rabbits to obtain the polyclonal antibody. Antibody titer was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for Galectin - 1. The specificity of antibody was confirmed by western blot analysis and the expression of Galectin - 1 in the antler stem cells was detected by an immunofluorescence assay. The results showed that the titer of the antibody was 1:64000 with high specificity and that Galectin - 1 was expressed in almost all of the antler PP cells. We have generated a specific polyclonal antibody of deer Galectin - 1, which will serve as an important tool for the study of the regulation of Galectin - 1 in antler regeneration.

Key words: Sika deer; Antler; Galectin - 1; Prokaryotic expression; Polyclonal antibody

凝集素 (Lectin) 是一类能与糖专一性、非共价地可逆结合, 且不同于免疫球蛋白的蛋白质或糖蛋白, 具有凝集细胞和沉淀聚糖或糖复合物的作用。根据其来源可分为植物凝集素、动物凝集素与微生物凝集素 (牛耀辉等, 2006)。半乳糖凝集素 (Galectins) 是动物凝集素家族中的一员 (Vasta, 2012), 在进化上具有高度的保守性, 结构上包含有一段长约 130 个氨基酸的糖类识别区 (Carbohydrate recognition domain, CRD), 对 β -半乳糖苷具有特殊亲和力 (Barondes *et al.*, 1994)。现已有 15 个哺乳动物半乳糖凝集素家族成员被发现, Galectin - 1 是最先被报道的哺乳动物半乳糖凝集素, 广泛分布于肌肉、脾脏、胸腺、感觉和运动神经系统等组织, 属于原型半乳糖凝集素 (Cooper *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1991; Puche *et al.*, 1996)。Galectin - 1 在细胞的粘附、生长、肿瘤的迁移、T 细胞的成熟、T 细胞和胸腺细胞的诱导凋亡及神经再生等多种生物过程中发挥着重要作用 (Baum *et al.*, 1995; Blaser *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2001; Camby *et al.*, 2002)。人类的 Galectin - 1 由定位在染色体 22q12 - q13 的基因 LGALS1 编码, 相对分子量约为 14.5 kD, 常以单体或同源二聚体形式存在 (Ion *et al.*, 2005)。Galectin - 1 是典型的胞浆蛋白, N 末端乙酰化、无糖基化修饰 (Clerch *et al.*, 1988)。虽然缺少信号肽识别序列, 不能通过经典的内质网 - 高尔基体通路分泌到胞外, 但在各种正常和肿瘤组织细胞膜外及细胞外基质中均能发现 Galectin - 1 的存在 (Camby *et al.*, 2002)。有研究表明, Galectin - 1 的分泌机制与成纤维细胞生长因子 - 2 (FGF - 2) 类似, 即利用尚未确证的膜结合蛋白从胞质中细胞因子直接将其转运至细胞膜外侧 (Nickl, 2005)。并且其分泌和表达依赖于细胞类型, 但具体机制还不明确 (Rabinovich *et al.*, 2002)。Galectin - 1 在某些肿瘤组织中表达

上调 (Danguy *et al.*, 2002), 其可作为多种癌症的诊断指标 (Gaudet *et al.*, 2009)。

梅花鹿 (*Cervus mandchuricus*) 鹿茸是在雄性激素的调控下于雄鹿额骨顶部长出的附属器官 (孟星宇等, 2012)。鹿茸每年从角柄残桩上完全再生, 是目前发现的唯一能够完全周期性再生的哺乳动物器官, 是研究自然界哺乳动物肢体/附属器官完全再生问题的理想模型 (李春义, 2007)。研究显示, 鹿茸完全来源于角柄骨膜细胞 (pedicle periosteum cell, PPC) 的增殖与分化。角柄骨膜细胞可以表达多种胚胎干细胞标记物并且能够在离体情况下被诱导分化成多种体细胞, 角柄骨膜是由生茸区骨膜 (anterogenic periosteum, AP) 分化而来 (Li *et al.*, 2012), PPC 和生茸区骨膜细胞 (anterogenic periosteum cell, APC) 都具有干细胞的特性, 所以被称为鹿茸干细胞。研究证实 PP 是鹿茸内部组织再生的基础, AP 是鹿茸发生的关键组织。Li 等 (2012) 通过 2D 电泳与 IPA (ingenuity pathway analysis) 信号通路分析的方式第一次研究了 PP 与鹿脸部骨膜 (facial periosteum, FP) 间差异蛋白的表达情况, 结果发现, Galectin - 1 上调 20 倍, 在 AP 中 Galectin - 1 的表达是 FP 细胞中的 15 倍。通过 IPA 分析发现在 PP 细胞中 Galectin - 1 与 Nanog、MYC、MYCN 相互作用。由于 Galectin - 1 在鹿茸再生过程中高度表达, 推测 Galectin - 1 参与鹿茸的再生过程且发挥着重要的作用。为了进一步研究 Galectin - 1 在鹿茸再生过程中的功能, 迫切需要鹿的 Galectin - 1 蛋白和抗体, 本实验就是表达纯化梅花鹿 Galectin - 1 蛋白并制备其抗体。为了制备抗体, 我们从梅花鹿 PP 细胞总 RNA 反转录得到 cDNA, 通过 PCR 扩增 Galectin - 1 基因, 构建了 pET - 28a - Galectin - 1 重组载体, 利用 BL21 (DE3) 表达重组蛋白, 免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体, 为 Galectin - 1 在鹿茸再生中的研究提

供重要的实验材料。

1 研究方法

1.1 原核表达载体 pET-28a-Galectin-1 的构建

由于 Galectin-1 具有高度保守性, 本实验依据白尾鹿 (*Odocoileus virginianus*) Galectin-1 基因设计引物。利用 Oligo7 软件, 根据表达载体 pET28a 的图谱, 在白尾鹿 Galectin-1 基因 (XM_020896502.1) 编码区 5' 和 3' 端引入 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切位点 (下划线标出) 设计引物:

F: CGCGGATCCATGGCTTGTGGTCTGGTCGCC (BamHI 酶切位点)

R: CCGCTCGAGTCACTCAAAGGCCACACACTT (XhoI 酶切位点)

以保存由反转录获得的梅花鹿 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 Galectin-1 基因目的片段, 扩增体系如下 (50 μ L 体系): 34 μ L ddH₂O, 5 μ L 10 $\times$ buffer, 4 μ L dNTP, 3 μ L MgCl₂, 1 μ L 模板, 1 μ L 上游引物, 1 μ L 下游引物, 1 μ L KOD Plus Neo (TOYOBO)。

PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环。凝胶回收 (AxyPrepTM DNA Gel Extraction Kit (AxyGen)) 的 PCR 产物经 BamHI (Thermo Scientific) 和 XhoI (Thermo Scientific) 双酶切后与同样双酶切的 pET28a 载体 (实验室保存) 连接构建重组质粒, 转化感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α (北京全式金生物技术有限公司), 菌液 PCR 及双酶切鉴定正确后送上海生工公司测序鉴定。

1.2 Galectin-1 重组蛋白的表达及鉴定

把测序正确的 pET28a-Galectin-1 重组质粒转至感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 BL21 (DE3) (北京全式金生物技术有限公司), 以含有空载体 pET28a 的菌落为阴性对照, 分别接种单克隆到添加有 100 μ g/mL 卡那霉素 (Kan) 的 LB 液体培养基中, 27 $^{\circ}$ C、2201 r/min 过夜培养。过夜培养的菌液以 1% 的比例接种到新的 LB 培养基中并扩大培养。至菌液 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG) (Amresco), 使其终浓度为 0.1 mmol/L, 继续培养 4 h。离心收集菌体, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) pH =

7.4 重悬后置于冰水浴中超声破碎, 4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 15 min 收集破碎后的上清和沉淀。进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 考马斯亮蓝染色, 观察重组蛋白表达情况。以兔源 Anti-His tag 多抗 (1:5000) 作为一抗, 羊抗兔 HRP-labeled goat anti-rabbit IgG (Abcam) (1:5000) 作为二抗。利用 Western blot 鉴定表达的重组 Galectin-1 蛋白是否带有组氨酸标签。

1.3 重组蛋白的纯化

确定重组蛋白为可溶性蛋白且具有组氨酸标签后, 进行大量培养。诱导, 并离心收集菌体, 用 PBS (pH = 7.4) 洗涤 2 次后, 进行超声破碎。4 $^{\circ}$ C 12000 r/min 离心 15 min, 取上清于 Ni-NTA Agarose (QIAGEN) 亲和层析柱中, 置于冰上并于摇床上孵育 2 h。低温孵育完成后, 收集流穿液, 并分别用 washing buffer (NaH₂PO₄ $\cdot$ 2H₂O 50 mmol/L, NaCl 300 mmol/L imidazole 20 mmol/L)、50 mmol/L 咪唑 (NaH₂PO₄ $\cdot$ 2H₂O 50 mmol/L NaCl 300 mmol/L imidazole 50 mmol/L)、100 mmol/L 咪唑、200 mmol/L 咪唑、300 mmol/L 咪唑洗脱, 收集洗脱液。然后对洗脱液进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色。根据 50~300 mmol/L 咪唑的洗脱液对蛋白的洗脱效果, 选择合适咪唑浓度的洗脱液用 TGE buffer (50 mmol/L Tris pH7.9, 0.5 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl 5% glycerol) 透析 (34 mm 普通型透析袋 (3500)), 透析的蛋白利用 BCA 法 (PierceTM BCA Protein Assay Kit) (Thermo Scientific) 检测浓度, 并放 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 重组蛋白多克隆抗体的制备

纯化的 Galectin-1 重组蛋白和弗氏完全佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) (Thermo Scientific) 充分混合并乳化为油包水状态, 皮下多点注射 6 月龄新西兰大白兔 (购自吉林大学动物实验中心), 每只 600 μ g; 第 15 天, 将重组蛋白与弗氏不完全佐剂 (incomplete freund's adjuvant, IFA) (Thermo Scientific) 充分混合并乳化为油包水状态进行二免, 每只 500 μ g; 第 30 天, 将重组蛋白与弗氏不完全佐剂混合进行第 3 次免疫, 每只免疫蛋白量为 500 μ g; 第 40 天, 于腿部采集少量血液, 酶联免疫吸附 (enzyme-linked immunosorbent assay,

ELISA) 法检测血清效价, 评估效果, 当血清效价达到实验要求, 可于末次免疫后心脏采血。本实验第 41 天使用不加佐剂的重组蛋白进行末次免疫, 每只注射 500 μg 蛋白, 并于第 47 天心脏采集全血。血液置于室温 30 min, 接着在 4 $^{\circ}\text{C}$ 中放置 2 h, 4000 r/min 离心 5 min 收集血清并放 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.5 多抗效价检测

采用 ELISA 法检测免疫血清的效价。用包被液 (Na_2CO_3 1.6 mg/L, NaHCO_3 2.9 mg/mL, pH9.6) 稀释抗原, 酶标板每孔包被 50 μg 抗原, 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h, 加入含 10% 牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 的 PBS 后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 1 h, 将免疫血清依照预先设置的比例梯度用 PBS 稀释后加入酶标板中, 以同样比例稀释的免疫前的兔血清作阴性对照, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, HRP-labeled goat anti-rabbit IgG (Abcam) (1:5000) 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min, 加 TMB (碧云天) 底物室温避光孵育 20 min, 随后加入 2 mol/L 的硫酸溶液彻底终止反应, 在酶标仪 (TECAN, 美国) 上读取 OD₄₅₀ 的值, 以阳性 OD/阴性 OD 大于 2 为抗体效价。

1.6 Western-blot 检测多克隆抗体的特异性

提取不同株 PP 细胞的总蛋白, 进行 SDS-PAGE, 然后采用 80 V 恒压 120 min 将蛋白转至 0.22 μm 的聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜 (Merck, 德国) 上。5% 的脱脂奶粉室温封闭 2 h, 洗膜缓冲液 (Tris buffer saline tween, TBST) 洗涤 3 次, 每次 10 min; 将免疫前的血清以 1:500 的比例用 PBS 稀释, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 将 HRP-labeled goat anti-rabbit IgG (Abcam) (1:1000) 作二抗, 于室温孵育 1 h, 用 TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 最后加入适量化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色液 (Thermo Scientific) 反应 1 min 进行显色, 利用化学发光成像仪 (天能, 北京) 扫描并采集图像。

1.7 细胞免疫荧光

将 PP 细胞铺于 24 孔板中, 每孔 3×10^4 个细胞, 过夜培养。第二天弃去培养液, 用 PBS 洗涤, 4% 的多聚甲醛固定 20 min; 弃去多聚甲醛, 用 PBS 洗涤后, 加入封闭液 (含 3% BSA, 0.3% Triton X-100 的 PBS) 封闭 30 min; PBS 洗涤 3 次, 将免疫后的兔血清按 1:50 的比例用 PBS 稀释作为

一抗, 每孔加入 200 μL , 室温孵育 1 h, 以免之前的兔血清作对照。Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor488) (Abcam) (1:1000) 作为二抗, 每孔加入 200 μL , 室温避光孵育 1 h, 最后用 4',6-二脒基-2-2' 苯基吲哚 (4,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (碧云天) 复染 5 min, 在倒置荧光显微镜 (EVOS, 美国) 下观察并采集图像。

2 结果

2.1 重组原核表达载体 pET28a-Galectin-1 的构建

以梅花鹿 cDNA 为模板, PCR 反应扩增 Galectin-1 基因序列, 电泳可见约 400 bp 目的条带, 与预期大小 408 bp 相符 (图 1)。对提取的重组质粒进行 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切, 并对阳性结果的质粒测序显示, 序列与已知的白尾鹿 Galectin1 基因编码区存在少数碱基的差异, 但编码区片段大小相同, 且编码的氨基酸序列完全一致。由此表明 Galectin1 基因片段正确连到 pET28a 载体上。

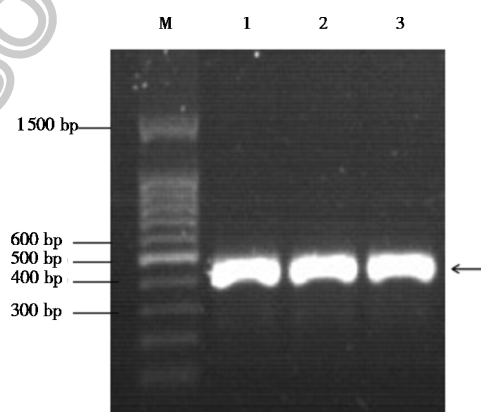


图1 梅花鹿 Galectin-1 基因扩增产物电泳图。M: 100bp DNA Ladder (Dye Plus) marker; 1、2、3: Galectin-1 基因 PCR 产物

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of Galectin-1 gene of sika deer PCR products. M: 100bp DNA Ladder (Dye Plus) marker; 1、2、3: Amplified fragments of Galectin-1 gene

2.2 Galectin-1 重组蛋白的表达及 Western blot 鉴定

蛋白电泳分析可见, 转入重组载体的菌体经过诱导后有大量表达的约 18 kD 的蛋白条带, 在超声破碎的上清和沉淀中均有分布 (图 2A)。利用兔源 Anti-His tag 多抗进行 Western-blot 鉴定, 显示转入重组载体后经过诱导的菌体在相应位置出现目的大小的条带, 且主要分布在超声破碎后的上清中, 此结果表明该重组蛋白为可溶性蛋白, 且具有 His

标签, 可用 Ni-NTA Agarose 亲和层析进行纯化 (图 2B)。

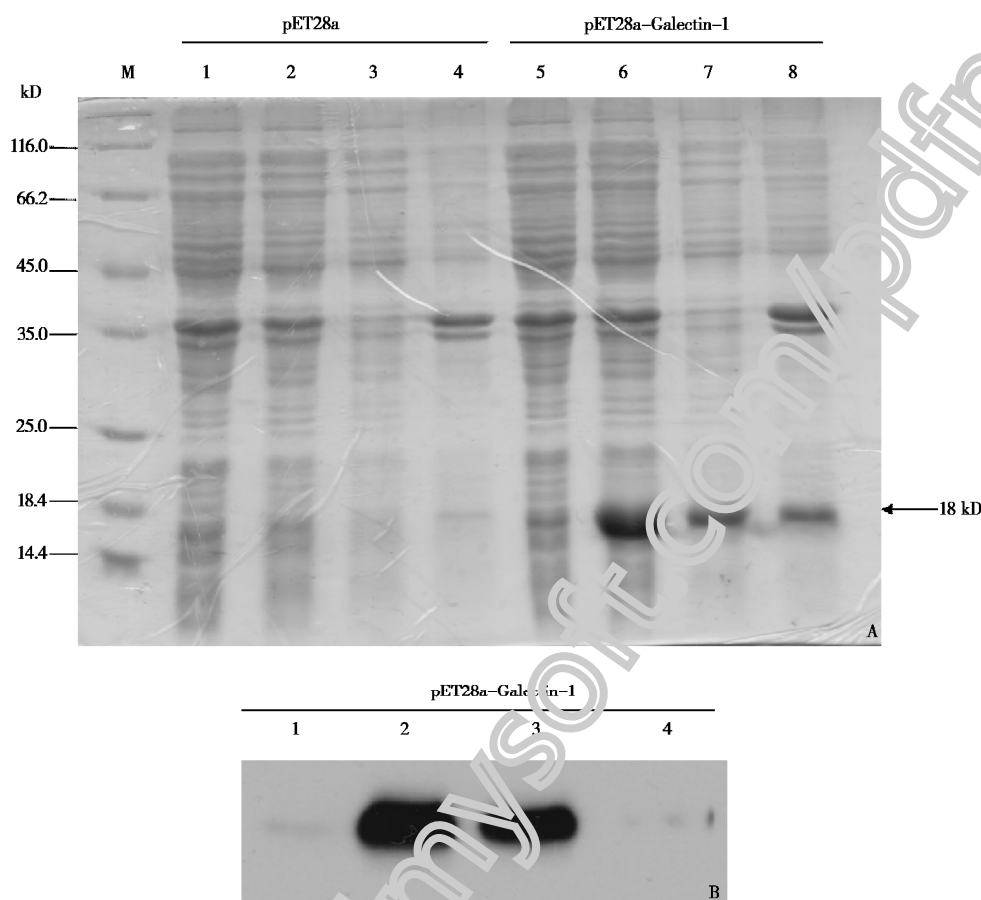


图 2 梅花鹿 Galectin-1 重组蛋白诱导表达的检测 (A) 及重组蛋白 His 标签的鉴定 (B)。A: 重组蛋白诱导表达检测的 SDS-PAGE 电泳图。M: Protein Marker; 1: 未诱导菌体蛋白; 2: 诱导菌体蛋白; 3: 诱导后超声破碎上清蛋白; 4: 诱导后超声破碎沉淀蛋白; 5: 未诱导菌体蛋白; 6: 诱导菌体蛋白; 7: 诱导后超声破碎上清蛋白; 8: 诱导后超声破碎沉淀蛋白。B: 重组蛋白 His 标签的 Western blot 鉴定结果。1: 未诱导菌体蛋白; 2: 诱导菌体蛋白; 3: 诱导后超声破碎上清蛋白; 4: 诱导后超声破碎沉淀蛋白

Fig. 2 Induced expression of recombinant Galectin-1 protein of sika deer (A) and the His tag of the recombinant protein (B). A: Induced expression of recombinant protein detected by SDS-PAGE electrophoresis. M: Protein Marker; 1: The mycoprotein without induction; 2: The mycoprotein with induction; 3: The protein in the supernatant with induction after ultrasonication; 4: The protein in the precipitate with induction after ultrasonication; 5: The mycoprotein without induction; 6: The mycoprotein of with induction; 7: The protein in the supernatant with induction after ultrasonication; 8: The protein in the precipitate with induction after ultrasonication. B: The His tag of recombinant protein detected by Western blot. 1: The mycoprotein without induction; 2: The mycoprotein with induction; 3: The protein in the supernatant with induction after ultrasonication; 4: The protein in the precipitate with induction after ultrasonication

2.3 重组蛋白的纯化

转化重组载体 pET28a-Galectin-1 的 BL21 (DE3) 在 37℃、加入 IPTG 终浓度为 0.1 mmol/L、诱导时间为 4 h 时有大量目的蛋白表达, 重组菌经过超声破碎后主要得到可溶性重组蛋白, 使用 Ni-NTA Agarose 亲和层析纯化上清中的重组蛋白, 把含 100 mmol/L 咪唑和 200 mmol/L 咪唑的蛋白洗脱

液用 TGE buffer 透析。SDS-PAGE 检测结果显示 8、9 泳道透析的目的蛋白纯度较高, 且用 BCA 法测得蛋白终浓度在 1.2 mg/mL 左右 (图 3)。

2.4 多抗效价与 Western blot 检测

收集免疫后的兔血液, 分离血清, 使用 ELISA 方法检测的结果显示效价达 1:64000 (图 4), 免疫效果良好。用免疫后的血清对不同株 PP 细胞总

蛋白进行 Western blot 检测, 图 5 显示, 在重组 Galectin-1 相应位置 (约 18 kD) 可见特异性条带, 且没有杂带, 而阴性兔血清相应位置没有条带出现, 表明制备的多克隆抗体有良好的特异性。

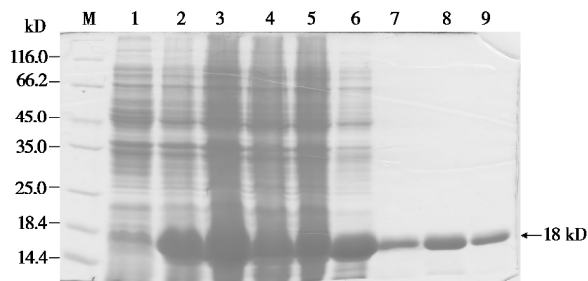


图3 梅花鹿 Galectin-1 重组蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳结果. M: protein marker; 1: pET28a-Galectin-1 未诱导菌体蛋白; 2: pET28a-Galectin-1 诱导菌体蛋白; 3: pET28a-Galectin-1 诱导后超声破碎上清蛋白; 4、5: 流穿液; 6、7: washing buffer 洗脱液; 8、9: 目的蛋白洗脱液

Fig. 3 purification of solubilized recombinant Galectin-1 protein of sika deer detected by SDS-PAGE electrophoresis. M: protein marker; 1: The mycoprotein of pET28a-Galectin-1 without induction; 2: The mycoprotein of pET28a-Galectin-1 with induction; 3: The protein at the supernatant of pET28a-Galectin-1 with induction after ultrasonication; 4、5: Flow-through; 6、7: The elution of protein by washing buffer; 8、9: The elution of target protein

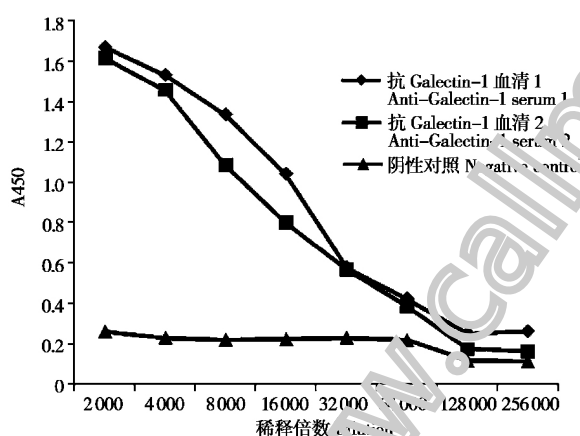


图4 ELISA 测定梅花鹿 Galectin-1 多克隆抗体的效价

Fig. 4 Titer of polyclonal antibody of recombinant Galectin-1 protein of sika deer detected by ELISA



图5 Western blot 检测梅花鹿 Galectin-1 多克隆抗体的特异性. 1、2、3、4: 不同株 PP 细胞

Fig. 5 Specificity of polyclonal antibody of Galectin-1 of sika deer detected by Western blot. 1, 2, 3, 4: Different PP cell lines

2.5 细胞免疫荧光检测

把免疫后的兔血清用 PBS 以 1:50 的比例稀释作为一抗, 对 PP 细胞进行免疫荧光检测。把以同样比例稀释的免疫前的兔血清作为阴性对照。结果显示, 孵育免疫血清的 PP 细胞中检测到较强的荧光信号, 而孵育阴性血清的细胞基本没有检测到荧光信号, 表明该多抗具有明显的特异性 (图 6)。根据以往报道 (McGraw *et al.*, 2005), Galectin-1 表达于细胞膜、细胞质及细胞核。从图 6 可看出, Galectin-1 几乎表达于 PP 细胞的全细胞中, 且表达量很高。

3 讨论

Galectin-1 表达于多种类型细胞中, 如胸腺上皮细胞、内皮细胞、树突状细胞、巨噬细胞、纤维母细胞和骨髓基质细胞等, 在多个生物过程, 包括糖类识别、细胞黏附、细胞增殖、细胞凋亡等发挥关键调控作用 (Marsich *et al.*, 2008)。在多种肿瘤组织中表达上调, Galectin-1 表达的改变与肿瘤的转移及获得转移表型密切相关 (Danguy *et al.*, 2002)。鹿茸是哺乳动物中唯一一种能够完全再生出附属器官, 且每年周期性再生能保持生长速度而不癌变 (Li *et al.*, 2007), 梅花鹿鹿茸的生长速度可以达到 12.5 mm/d (Gao and Li, 1988), 马鹿的甚至可以达到 27.5 mm/d (魏明立等, 2011)。人体内 Galectin-1 过表达一般会引发癌症, 鹿茸干细胞中 Galectin-1 高表达, 却并未引起鹿茸组织癌变 (秦欣欣等, 2012), 进一步探讨 Galectin-1 在鹿茸再生过程中的作用机制对揭示其在肿瘤中的作用具有指导意义。

本实验利用 PCR 的方法从梅花鹿 cDNA 中克隆出了 Galectin-1 基因, 构建了 pET28a-Galectin-1 重组载体, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达了融合蛋白, 利用 Ni-NTA Agarose 亲和层析纯化出了重组蛋白, 并将纯化的蛋白免疫兔, 获得了特异性良好的多克隆抗体。本研究最初把纯化的蛋白用 PBS 透析, 但透析过程中出现了大量沉淀, 重组蛋白的理论 pI 值为 6.48, PBS pH 约为 7.24, 因此透析液 pH 优化为 8 左右, 为了增加蛋白的可溶性, 原来的缓冲液由磷酸盐换成了 Tris, 并加入了 EDTA 和 5% 的甘油。条件变化后透析蛋白, 虽然仍有沉淀产生, 但沉淀量减少, 经离心收集上清,

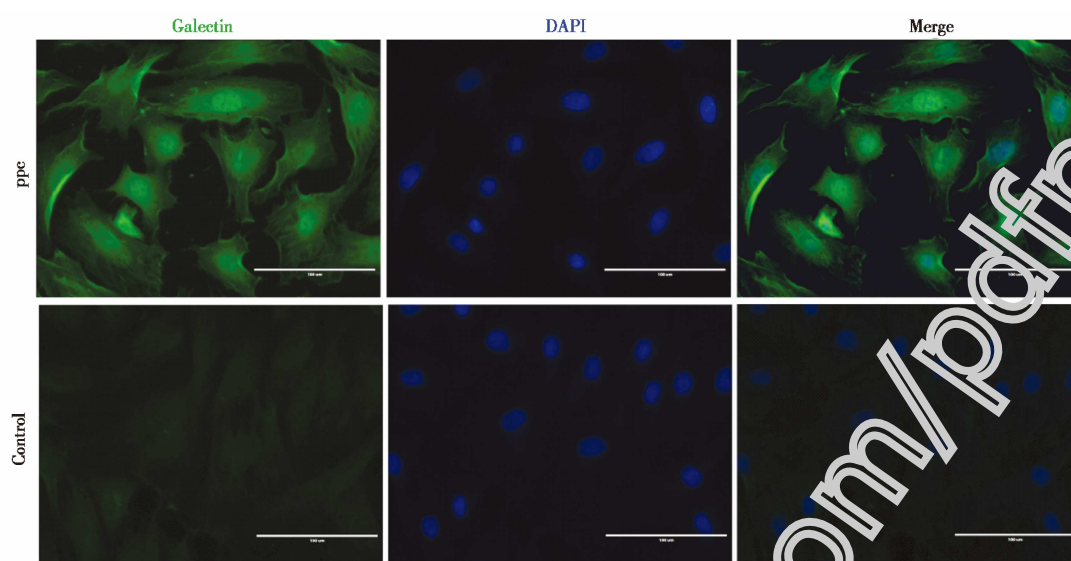


图6 制备的多克隆抗体免疫荧光检测梅花鹿PP细胞中Galectin-1的表达. 蓝色荧光: (DAPI): 细胞核; 绿色荧光: Galectin-1; Merge: Galectin-1与DAPI复合图, DAPI: 4, 6-二脒基-2-2-苯基吡啶; Control: 未加Galectin-1重组蛋白免疫的兔血清; Bar = 100 μm

Fig. 6 Detection of Galectin-1 expression on the PP cells of sika deer using self-made polyclonal antibody. Blue fluorescence (DAPI): cell nucleus; Green fluorescence: Galectin-1; Merge: Galectin-1 merged with DAPI; DAPI: 4, 6-diamidino-2-phenylindole; Control: The rabbit serum immunized without recombinant Galectin-1 protein; Bar = 100 μm

测得最终蛋白浓度在 1.2 mg/mL 左右。本实验选用的原核表达载体为 pET28a, 表达的重组蛋白所带 His 标签对 Galectin-1 蛋白的理化性质影响较小, 透析蛋白发生沉淀可能是因为重组 Galectin-1 蛋白具有凝集活性而易形成多聚体, 对此推测可以进一步用获得的纯化蛋白进行红细胞凝集实验或 MTT 实验, 检测其是否具有活性。从细胞免疫荧光结果来看, Galectin-1 几乎表达于 PP 细胞全细胞中, 且表达量很高, 由此提示, Galectin-1 有可能参与 PP 细胞重要的生理生长过程。随着基因编辑技术的成熟, 我们可以利用 CRISPR/Cas9 或 RNAi 技术过表达或沉默 Galectin-1 基因, 利用制备的抗体检测过表达或沉默的效果, 进一步研究 Galectin-1 在鹿茸再生中的作用。

Galectin-1 是一种促血管原因子, 在血管的生成中发挥着至关重要的作用 (李富新等, 2010)。Galectin-1 可通过增强促血管生成途径 (VEGF 信号) 或促进血管内皮细胞的活化和增殖调节肿瘤血管生成 (Thibissen *et al.*, 2010)。在快速生长的鹿茸组织中需要血管的大量再生, 利用 lacZ 在体内标记鹿茸干细胞, 发现新生的血管中含有标记细胞 (Li *et al.*, 2009), 鹿茸干细胞中高度表达的

Galectin-1 可能参与血管的再生。鹿茸的快速生长伴随着神经的大量、快速生长。研究发现, Galectin-1 在细胞和细胞间隙中有很多结构从属功能, 它的单体和二聚体形式可以促进多种神经组织的生长 (Fischer *et al.*, 2011)。氧化型的 Galectin-1 具有促进末梢和中枢神经轴突分枝的功能, 并在多种末梢神经损伤模型中已证明, 例如面部神经损伤 (McGraw *et al.*, 2004)、视觉神经损伤 (Okada *et al.*, 2005)、运动神经损伤 (Chang-Hong *et al.*, 2005); 还原型的 Galectin-1 通过其糖结合活性调节成熟的侧脑室下区的神经形成 (Ishibashi *et al.*, 2007)。鹿茸中 Galectin-1 的结构形式需要检测, 其功能也需要进一步验证。

Galectin-1 是重要的免疫调节因子, 有研究发现 Galectin-1 能增强 TCR 诱导的 T 细胞杂交瘤和胸腺细胞的凋亡, 揭示 Galectin-1 可能是胸腺选择中的凋亡介导者之一 (Rabinovich *et al.*, 2002)。此外, Galectin-1 还可通过抑制 TNF- α 、IL-2 和 IFN- γ 的产生, 选择性地去除 ConA 活化的 T 细胞, 从而抑制 ConA 诱导的肝炎 (Rabinovich *et al.*, 2002)。我们通过鹿茸干细胞与淋巴细胞共培养发现, 鹿茸干细胞能够显著抑制 ConA 激

活的淋巴细胞的增殖 (未发表)。Li 和 Suttie (2003) 通过组织学与形态学研究发现, 角柄骨膜根据与皮肤接触的紧密程度有一个比较明显的分界, 角柄远心端约 1/3 部分骨膜与皮肤紧密相贴直接参与鹿茸再生; 而近心端约 2/3 部分骨膜与包裹皮肤比较疏松, 通过转录组、蛋白组分析远端近端角柄骨膜发现, 大量免疫有关因子富集到远端 (Dong *et al.*, 2016)。免疫系统对再生具有关键调控作用 (Aurora and Olson, 2014; 李清等, 2016)。鹿茸再生过程中免疫系统是否通过 Galectin-1 发挥调控作用还有待证实。

4 结论

本实验从梅花鹿 cDNA 中克隆得到 *Galectin-1* 基因, 构建了 pET28a-*Galectin-1* 重组载体, 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达并纯化 Galectin-1 重组蛋白, 利用 Galectin-1 重组蛋白免疫兔, 获得的抗鹿 Galectin-1 多克隆抗体, 效价达到 1:64000, 对梅花鹿的 Galectin-1 蛋白有较好的特异性, 因此为进一步研究该蛋白在鹿茸再生中的作用提供了重要的实验材料。

致谢: 感谢浙江理工大学生命科学学院“家蚕生物反应器和生物医药重点实验室”成员及中国农业科学院特产研究所“特种动物干细胞创新团队”成员, 在实验材料获取和实验过程中给予的支持与帮助。

参考文献:

- Allen H J, Gottstine S, Sharma A, DiCioccio P, Swank R T, Li H. 1991. Synthesis, isolation, and characterization of endogenous beta-galactoside-binding lectins in human leukocytes. *Biochemistry*, **30** (36): 8904-8910.
- Aurora A B, Olson E N. 2014. Immune modulation of stem cells and regeneration. *Cell Stem Cell*, **15** (1): 14-25.
- Barondes S H, Castronovo V, Cooper D N, Cummings R D, Drickamer K, Feizi T, Gitt M A, Hirabayashi J, Hughes C, Kasai K, *et al.* 1994. *Galectins*: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. *Cell*, **76** (4): 597-598.
- Baum L G, Pang M, Piccolo N L, Wu T, Delegeane A, Uittenbogaart C H, Fukuda M, Schamer J J. 1995. Human thymic epithelial cells express an endogenous lectin, Galectin-1, which binds to core 2 disaccharides on lymphocytes and T lymphoblastoid cells. *J Exp Med*, **181** (5): 867-887.
- Blaser G, Kaufmann M, Müller C, Zimmermann C, Wells V, Mallucci L, Pircher H. 1998. Beta-galactoside-binding protein secreted by activated T cells inhibits antigen-induced proliferation of T cells. *Eur J Immunol*, **28** (8): 2311-2319.
- Camby I, Belot N, Lefranc F, Sadeghi N, Launoit Y, Kalthoff H, Muesette S, Darro F, Danguy A, Salmon I, *et al.* 2002. Galectin-1 modulates human glioblastoma cell migration and invasion through modifications to the actin cytoskeleton and levels of expression of small GTPases. *J Neuropathol Exp Neurol*, **151** (3): 585-596.
- Chang-Hong R, Wada M, Koyama S, Kimura H, Kawakawa S, Kawamura T, Kurita K, Kadoya T, Aoki M, Itoyama Y, *et al.* 2005. Neuroprotective effect of oxidized Galectin-1 in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Experimental Neurology*, **194** (1): 203-211.
- Clerch L B, Whitney P, Haslam R W, Miller T, Werner R, Massaro D. 1988. Sequence of a full-length cDNA for rat lung beta-galactoside-binding protein: primary and secondary structure of the lectin. *Biochemistry*, **27** (2): 662-699.
- Cooper D N, Massaro S M, Barondes S H. 1991. Endogenous muscle lectin inhibits myoblast adhesion to laminin. *J Cell Biol*, **115** (5): 1437-1448.
- Danguy A, Camby I, Kiss R. 2002. *Galectins* and cancer. *Biochim Biophys Acta*, **1572** (2-3): 285-293.
- Dong Z, Pu H, Zhang W, Coates D, Li C. 2016. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis of the potentiated and dormant antler stem cells. *Int J Mol Sci*, **17** (11). pii: E1778.
- Escher I, Jeschke U, Frieske K, Daher S, Betz A G. 2011. The role of Galectin-1 in trophoblast differentiation and signal transduction. *Journal of Reproductive Immunology*, **90** (1): 35-40.
- Gao Z, Li C. 1988. The study on the relationship between antler's growth rate, relative bone mass and circulation testosterone, estradiol, AKP in sika deer. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*, **19** (30): 224-231.
- Gaudet A D, Leung M, Poirier F, Kadoya T, Horie H, Ramer M S. 2009. A role for Galectin-1 in the immune response to peripheral nerve injury. *Experimental Neurology*, **220** (2): 320-327.
- Ion G, Fajka-Boja R, Tóth G K, Caron M, Monostori E. 2005. Role of p56lck and ZAP70-mediated tyrosine phosphorylation in Galectin-1-induced cell death. *Cell Death and Differ*, **12** (8): 1145-1147.
- Ishibashi S, Kuroiwa T, Sakaguchi M, Sun L, Kadoya T, Okano H, Mizusawa H. 2007. Galectin-1 regulates neurogenesis in the subventricular zone and promotes functional recovery after stroke. *Experimental Neurology*, **207** (2): 302-313.
- Li C Y. 2017. Progress on the mechanism underlying full regeneration of mammalian organ deer antlers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, **25** (1): 1-10. (in Chinese)
- Li C, Harper A, Puddick J, Wang W, McMahon C. 2012. Proteomes and signaling pathways of antler stem cells. *PLoS ONE*, **7** (1): e30026.
- Li C, Mackintosh C G, Martin S K, Clark D E. 2007. Identification of key tissue type for antler regeneration through pedicle periosteum de-

- letion. *Cell and Tissue Research*, **328** (1): 65–75.
- Li C, Suttie J M. 2003. Tissue collection methods for antler research. *Eur J Morphol*, **41** (1): 23–30.
- Li C, Yang F, Sheppard A. 2009. Adult stem cells and mammalian epimorphic regeneration—insights from studying annual renewal of deer antlers. *Curr Stem Cell Res Ther*, **4** (3): 237–251.
- Li F X, He X L, Fu Q, Wang P Z. 2010. Expression of Galectin-1 in gastric carcinoma and its role in tumor angiogenesis. *Shandong Medical Journal*, **50** (24): 15–17. (in Chinese)
- Li Q, Tang D, Wang Y, Shi Y F. 2016. The interplay between mesenchymal stem cells and immune responses: from basic research to clinical application. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, **8** (28): 933–940. (in Chinese)
- Marsich E, Mozetic P, Ortolani F, Contin M, Marchini M, Vetere A, Pacor S, Semeraro S, Vittur F, Paoletti S. 2008. Galectin-1 in cartilage: expression, influence on chondrocyte growth and interaction with ECM components. *Matrix Biology*, **27** (6): 513–525.
- McGraw J, McPhail L T, Oschipok L W, Horie H, Poirier F, Steeves J D, Ramer M S, Tetzlaff W. 2004. Galectin-1 in regenerating motoneurons. *European Journal of Neuroscience*, **20** (11): 2872–2880.
- McGraw J, Gaudet A D, Oschipok L W, Steeves J D, Poirier F, Tetzlaff W, Ramer M S. 2005. Altered primary afferent anatomy and reduced thermal sensitivity in mice lacking Galectin-1. *Pain*, **114** (1–2): 7–18.
- Meng X Y, Li T, Li M, Liu N, Tian Y H, Hu W. 2012. Expression and purification of IGF-1 from *Cervus nippon*. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, **40** (7): 7–13. (in Chinese)
- Nickel W. 2005. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. *Traffic*, **6** (6): 607–614.
- Niu Y H, Chen C Y, Zhao S L, Yang S, Tang J. 2006. Advances on the Research of anti-HIV Lectins. *Yunnan Chemical Technology*, **6** (33): 64–68. (in Chinese)
- Okada T, Ichikawa M, Tokita Y, Horie H, Saito K, Yoshida J, Watanabe M. 2005. Intravitreal macrophage activation enables cat retinal ganglion cells to regenerate injured axons into the mature optic nerve. *Experimental Neurology*, **196** (1): 155–163.
- Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, Giloni G, Kloog Y. 2001. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene*, **20** (51): 7486–7493.
- Puche A C, Poirier F, Hair M, Bartlett P F, Key B. 1996. Role of Galectin-1 in the developing mouse olfactory system. *Dev Biol*, **179** (1): 274–287.
- Qin X X, Sun H M, Zhao H P, Chu W H, Wang D T, Li C Y. 2012. Research Progress on Galectin-1 and its Biological Functions. *Chinese Academy of Agricultural Science*, **39** (6): 141–145. (in Chinese)
- Rabinovich G A, Baum L G, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu F T, Iacobelli S. 2002. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol*, **23** (6): 313–320.
- Rabinovich G A, Rubinstein N, Toscano M A. 2002. Role of Galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. *Biochim Biophys Acta*, **1572** (2–3): 276–284.
- Thijssen V L, Barkan B, Shen H, Aries I M, Mathieu V, Deltour L, Hackeng T M, Kisker C, Kloog Y, Poirier F, et al. 2010. Tumor cells secrete Galectin-1 to enhance endothelial cell activity. *Cancer Res*, **70** (15): 6215–6224.
- Vasta G R. 2012. Galectins as pattern recognition receptors: structure, function, and evolution. *Adv Exp Med Biol*, **946**: 21–36.
- Wei M L, Chu W H, Zhao H P, Li C Y. 2011. Antler stem cells and antler regeneration. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*, **7**: 47–51. (in Chinese)
- 王春义. 2017. 鹿茸完全再生机制研究进展. 农业生物技术学报, **25** (1): 1–10.
- 王富新, 何小玲, 付强, 王鹏志. 2010. Galectin-1 在胃癌组织中的表达及在胃癌血管生成中的作用. 山东医药, **50** (24): 15–17.
- 李清, 唐笛, 王莹, 时玉舫. 2016. 间充质干细胞与免疫的相互作用: 从基础研究到临床应用. 生命科学, **8** (28): 933–940.
- 孟星宇, 李婷, 李沐, 刘宁, 田玉华, 胡薇. 2012. 梅花鹿 IGF-1 的原核表达与纯化. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), **40** (7): 7–13.
- 牛耀辉, 陈朝银, 赵声兰, 杨苏, 唐嘉. 2006. 凝集素及其抗 HIV 研究进展. 云南化工, **6** (33): 64–68.
- 秦欣欣, 孙红梅, 赵海平, 褚文辉, 王大涛, 李春义. 2012. 半乳糖凝集素 1 蛋白及其生物学功能. 中国畜牧兽医, **39** (6): 141–145.
- 魏明立, 褚文辉, 赵海平, 李春义. 2011. 鹿茸干细胞与鹿茸再生. 特产研究, **2**: 47–51.