

小鼠 frataxin 抗体的制备及应用

郝双影, 许芳霞, 李宽钰

南京大学医学院 江苏省医学分子技术重点实验室, 江苏 南京 210093

郝双影, 许芳霞, 李宽钰. 小鼠 frataxin 抗体的制备及应用. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1313-1322.

Hao SY, Xu FX, Li KY. Production and application of polyclonal antibody against mouse frataxin. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1313-1322.

摘 要: 弗里德赖希共济失调 (Friedreich ataxia, FRDA) 是一种常染色体隐性遗传性疾病, 由 frataxin (FXN) 第一个内含子中 GAA 重复扩增导致其表达量减少所致。FXN 是一种线粒体蛋白, 可以调节细胞中铁的代谢, 参与铁硫簇和血红素的合成, 去除氧化应激等。前期研究发现 FRDA 病人受累组织有特异性表达的 FXN 亚型蛋白。为了检测小鼠不同组织中 Fxn 亚型蛋白的表达, 首先要获得具有高度特异性和灵敏性的小鼠 Fxn 抗体。利用 PCR 技术扩增小鼠 *Fxn* 基因, 通过酶切、连接、转化等常规分子克隆方法构建重组原核表达质粒 pET24(+)-mFxn, 经转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 表达可溶性含有 his₆ 标记的融合蛋白。该蛋白不含 Fxn 氨基端 77 个氨基酸的信号肽, 含有 130 个氨基酸, 理论分子量为 14.38 kDa。表达的蛋白经 Ni-NTA 柱和连续梯度离心纯化, 获得目的蛋白作为抗原; 免疫新西兰大白兔制备抗血清并用硫酸铵沉淀初步纯化得到多克隆抗体。经 Western blotting 和免疫荧光分析测试, 所获得的抗体能够特异性识别细胞内源 Fxn, 也可应用于组织的免疫沉淀和免疫荧光。这是首次报道利用鼠源 Fxn 作为免疫原制备的具有高度特异性和灵敏性的 Fxn 抗体, 为深入研究小鼠 frataxin 亚型蛋白的存在和功能奠定了基础。

关键词: 弗里德赖希氏共济失调, frataxin, 蛋白表达纯化, 多克隆抗体

Received: January 23, 2013; **Accepted:** February 22, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31071085), Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology (No. ZZYJ-SN-201006).

Corresponding author: Kuanyu Li. Tel: +86-25-83594765; E-mail: likuanyu@nju.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31071085), 国家留学回国人员启动基金, 医药生物技术国家重点实验室 (No. ZZYJ-SN-201006) 资助。

网络出版时间: 2013-03-22

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130322.1442.003.html>

Production and application of polyclonal antibody against mouse frataxin

Shuangying Hao, Fangxia Xu, and Kuanyu Li

Jiangsu Key Laboratory for Molecular Medicine, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu, China

Abstract: Friedreich ataxia (FRDA) is an autosomal recessive neurodegenerative disease caused by reduced expression levels of the frataxin gene (*FXN*) due to expansion of triplet nucleotide GAA repeats in the first intron of *FXN*. *FXN* is a mitochondrial protein which plays an important role in the regulation of intracellular iron trafficking, biogenesis of iron-sulfur cluster and heme, and removal of reactive oxygen species. Our previous work showed that tissue-specific expression of *FXN* in cerebellum and heart generates two novel isoforms. In order to find the isoforms in mouse tissues, we tried to obtain a polyclonal antibody against mouse Fxn with high specificity and sensitivity. Thus, the recombinant plasmid pET24(+)-mFxn was constructed to express his-tagged Fxn in BL21(DE3) cells. The expressed protein is a mature form with 130 amino acids (aa, 14.38 kDa) without the N-terminal signal peptide (77 aa), purified on Ni-NTA column and further dialyzed with Centrifugal Filtration Device. The polyclonal antibody against Fxn was produced by immunizing rabbits with highly purified protein. The collected antisera were preliminarily purified by precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Western blotting analysis and cell immunofluorescence showed that the obtained antibody was able to detect both purified and endogenous Fxn. It also worked well in immunoprecipitation with mouse tissues. This is the first time, to our knowledge, to report that mouse Fxn was used as immunogen to generate antibody with high specificity and sensitivity. This work provides a powerful tool for our further research on mouse Fxn isoforms.

Keywords: Friedreich ataxia, frataxin, protein expression and purification, polyclonal antibody

弗里德赖希共济失调 (Friedreich ataxia, FRDA) 是一种常染色体单基因突变引起的神经退行性疾病, 96% 的病人是由于第 9 号染色体上 frataxin (*FXN*) 基因的第一个内含子中有 GAA 序列大量重复扩增^[1-2], 造成 *FXN* 蛋白表达减少, 引起 FRDA 的线粒体疾病。FRDA 病人的主要临床表现为进行性姿势和步态的共济失调, 上运动神经元功能障碍, 如构音障碍、腱反射消失、深感觉丧失、心肌病、糖尿病及继发性骨骼畸形等^[3-4]。早期的研究结果显示 FRDA 病人包括 3 个主要的生化特点和病理生理学特征: 细胞内铁的沉积^[5]; 线粒体内含有铁硫簇的酶缺陷^[6]; 在血液和尿液中存在氧化损伤的标记^[7]。研究发现全身敲除 *Fxn* 的小鼠模型是胚胎致死; 而分别

在肌肉和神经组织突变后的小鼠模型则 FRDA 症状加重。在 knock-in (*fxn*-GAA)₂₃₀ 小鼠模型中 *Fxn* 的表达量降低了 25%^[8], 在 knock-in-knock-out 小鼠中 *Fxn* 的表达量是野生型的 25%~35%, 但这些模型小鼠并没有表现出明显的病理特征。将小鼠内源性的 *Fxn* 敲除, 转入第一个内含子中 GAA 重复扩增的全长人源 *FXN* 的 YAC 转基因小鼠 YG8R 则轻微地出现了顺乌头酸酶活性降低、抗氧化能力降低, 并伴有神经退行性病变、心肌炎、协调能力降低、运动能力下降等症状^[9]。因此, 现存的几种小鼠模型都无法完全模拟 FRDA 病人的病情。在病人中 *FXN* 突变首先在神经系统表现出病变和损伤, 而在其表达量较高、线粒体功能也很活跃的肝脏和肾脏等

器官却无明显病症^[10]。目前有研究发现人 FXN 含有 3 种亚型蛋白,它们的表达具有组织特异性,该亚型蛋白的表达可能与 FRDA 病人的组织特异性病变机制有关^[11]。为成功建立小鼠 FRDA 疾病模型,我们首先需要确定小鼠体内 Fxn 亚型蛋白是否存在及其相应的功能。因此高度敏感和特异性的小鼠 Fxn 的抗体制备是我们首先要解决的问题。

本研究通过 PCR 扩增、酶切、连接、转化等常规分子克隆方法构建带有 his₆ 标签的鼠源 Fxn 融合蛋白表达质粒,在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中诱导表达,经过 Ni-NTA 柱子纯化和透析得到的纯化蛋白作为抗原免疫新西兰大白兔,制备了能够特异性识别内源 Fxn 的多克隆抗体。高度特异和灵敏的 Fxn 抗体的获得为我们深入研究小鼠 Fxn 亚型蛋白的存在及其功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

纯种雌性新西兰大白兔购于青龙山兔场。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 及哺乳动物细胞系 N₂a 和 HEK293 为本实验室保存。T4 DNA 连接酶试剂盒、限制性内切酶购自 Fermentas 公司; 2 \times pfu Mix 购自南京博尔迪公司; DNA 回收试剂盒、DNA 抽提试剂盒购自天恩泽公司; 丽春红储存液 (10 \times) 购于博士德公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 购自中杉金桥公司。亚甲基双丙烯酰胺 (N,N-methylene diacrylamide, Bis)、过硫酸铵 (Ammonium persulfat)、四甲基乙二胺 (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine, TEMED) 和十二烷基磺酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 购自 Amresco (USA)。预染蛋白质

分子量标准 (Prestained seeBlue Plus 2) 购自 Invitrogen (USA)。底物发光试剂盒购自 Pierce (USA)。

1.2 方法

1.2.1 重组表达载体的构建

根据小鼠 *Fxn* mRNA 序列设计并合成引物,引入 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切位点 (用下划线表示)。正向引物为: F (5'-CCGAATTCATGGGCTTGGG GACATTGGACA-3'); 反向引物为 R (5'-CCGCT CGAGTGAAGTGCCTTTTCCAGAATA-3')。以小鼠 *Fxn* cDNA 为模板进行 PCR 反应,用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对扩增出的 DNA 片段和含有 his₆ 标签的质粒 pET24(+) 同时进行双酶切,然后用连接试剂盒进行连接反应。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 并涂板,挑选单菌落,在 LB 液体培养基中 37 °C 摇晃过夜,抽提质粒 DNA,用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对质粒 DNA 进行双酶切鉴定,筛选出已插入正确基因片段的重组质粒。经序列检测 (上海美吉生物医药科技有限公司),成功获得含正确 m*Fxn* 序列的重组质粒 pET24(+)-m*Fxn*。该质粒将在大肠杆菌中表达没有氨基端信号肽的 130 个氨基酸的蛋白,理论分子量为 14.38 kDa。

1.2.2 融合蛋白的表达

将已含 pET24(+)-m*Fxn* 重组质粒的 BL21 (DE3) 菌液 37 °C 培养,当 OD₆₀₀ 值达到 0.7~0.8 时加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导。分别于 0、1、2、3、4 h 取 1 mL 菌液,15 000 r/min、4 °C 离心 2 min,将沉淀悬浮于裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 中,加上样缓冲液后 100 °C 加热 5 min,上清上样用 15% SDS-PAGE 分离并用考马斯亮蓝染色。以实验所获得的最佳

诱导时间进行大规模的诱导表达。

1.2.3 融合蛋白的纯化

将 2 L 经大规模诱导表达的菌液离心, 沉淀悬浮于裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0) 中, 超声波粉碎后 15 000 r/min、4 °C 离心 15 min, 将上清加入已预先平衡过的 Ni-NTA 柱中, 过柱液收集备用。结合了 mFxn-his₆ 融合蛋白的 Ni-NTA 柱经漂洗 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0), 洗脱 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)。收集的裂解液、过柱液、漂洗液和洗脱液经 15% SDS-PAGE 分离后, 考马斯亮蓝染色分析。

1.2.4 融合蛋白的透析

为了防止洗脱液中高浓度的咪唑对免疫兔子后抗体产生的影响, 我们利用透析的方式将其去除。合并含有融合蛋白的洗脱液, 加入预平衡过的离心过滤装置 (4 mL 体系) 中, 3 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 于过滤器中加入过滤液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl) 补齐至 4 mL, 3 000 r/min、4 °C 离心 20 min, 收集离心管中的过滤液, 备用。重复上述步骤 9 次, 得到纯化的透析过的 mFxn 融合蛋白。过滤液以及浓缩后的蛋白经 15% SDS-PAGE 分离后, 考马斯亮蓝染色分析。

1.2.5 抗体的制备和纯化

纯化的蛋白 1 mg 与完全佐剂 (Sigma, USA) 按照 1 : 1 体积乳化后预免疫新西兰大白兔, 两周后, 再将纯化的蛋白 0.5 mg 不完全佐剂按照 1 : 1 体积乳化后进行第一次加强免疫, 每隔两周加强 1 次, 共经过 3 次加强免疫后收集血清。获

得的抗血清经硫酸铵沉淀, 得到初步纯化的抗体, 进行 Western blotting、免疫荧光和免疫沉淀分析。

1.2.6 抗体效价及特异性的测定

抗体的效价通过 ELISA 测定。将 Fxn 和带有 his₆ 标签的平行对照蛋白 ABCB10 用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释, 以相同浓度的蛋白包被反应板 (100 ng)。为了进一步检测抗体的灵敏度, 以不同浓度的蛋白包被反应板 (0.001~1 000 ng), 4 °C 过夜。弃去包被液, 将板拍干, 加入封闭液至满孔, 置 37 °C, 封闭 1 h, PBST 洗板 3 次, 将板拍干。纯化后的抗体及免疫前血清分别按 1 : 500, 1 : 2 500, 1 : 12 500, 1 : 62 500, 1 : 312 500, 1 : 1 562 500, 1 : 7 812 500 比例用稀释液 (5% 脱脂牛奶, 0.05% 吐温-20) 稀释, 同时对于不同浓度包被的反应孔, Fxn 抗体按照 1 : 5 000 用稀释液稀释, 免疫前血清 1 : 200 稀释作为阴性对照。将各溶液按每孔 100 μL 体积加入已包被和封闭的反应板中 (37 °C, 2 h), 用 PBST 洗板 5 次, 每次 1 min, 将板拍干。加入 1 : 10 000 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔酶标抗体稀释液 100 μL , 37 °C, 1 h, 再用 PBST 洗板 5 次, 每次 1 min, 将板拍干。加入 100 μL TMB 显色液, 于 37 °C 下避光显色 30 min。用 2 mol/L H_2SO_4 50 μL 终止反应。用酶标仪测定各孔 OD_{450} 值, 计算抗体效价和灵敏度。

通过 Western blotting 检测抗体的特异性。不同量的 mFxn 纯蛋白、N₂a 细胞和 HEK293 细胞裂解液以及小鼠组织抽提物经 15% SDS-PAGE 电泳分离, 转膜后用丽春红染色。脱色后, 以 1 : 500 稀释 Fxn 抗体进行 4 °C 孵育过夜, 以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗, 按照产品说明书, 用

HRP 化学发光试剂盒进行检测。

1.2.7 Fxn 抗体在免疫沉淀 (Immunoprecipitation, IP) 中的应用

为了检测 Fxn 抗体能否应用于各类生化试验中, 我们利用 protein G 琼脂糖珠进行 IP 检测。首先, 平衡过的琼脂糖珠预清洗细胞和组织的抽提物 (4 °C, 2 h), 去除非特异性蛋白; 同时抗体与琼脂糖珠孵育 (比例为 1 : 5, 4 °C, 2 h); 然后将预清洗过的细胞裂解液或抽提物与已经结合抗体的琼脂糖珠 4 °C 共同孵育 2 h。将预清洗的琼脂糖珠, IP 的过滤液 (Flowthrough) 以及 IP 后的样品进行 Western blotting 分析。

1.2.8 Fxn 抗体在细胞免疫荧光 (Immunofluorescence) 中的应用

用终浓度为 125 nmol/L 的 mitotracker (Invitrogen, USA) 染色细胞 40 min, 1×PBS 洗两遍后用多聚甲醛溶液固定贴壁培养的 HEK293 细胞, 经 0.2% Triton X-100 部分裂解细胞, 用 Fxn 多克隆抗体为一抗, 在 5% BSA/PBS 中 4 °C 下过夜免疫染色内源 FXN, 1×PBS 漂洗 3 次, 以 Alexa-fluor 488 的羊抗兔 IgG (Invitrogen, USA) 在室温下黑暗处孵育 1 h, 激光共聚焦荧光显微镜下观察并用 OLYMPUS FLUOVIEW Ver.1.7a Viewer 软件中分析图像。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

构建的表达载体经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定, 切出的目的片段和载体片段与预期大小一致, 经测序分析, 发现与 NCBI 数据库中公布的 *mFxn* cDNA 序列一致 GenBank Accession No. NM_008044。由此表明我们成功获得了可表达带

his₆ 标签的重组质粒 pET24(+)-mFxn。

2.2 重组蛋白诱导表达

重组质粒 pET24(+)-mFxn 转化大肠杆菌 BL21 (DE3) 诱导表达融合蛋白。结果如图 1 所示, 随着诱导时间的增加蛋白的表达逐渐加强, 当诱导时间为 2 h 时已达到最高表达量 (图 1, 泳道 4)。后续蛋白的大量制备以此为依据。

2.3 重组蛋白纯化和抗原制备

将已成功转化重组质粒的 BL21 (DE3) 经 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导, 收集 2 L 菌液, 超声破碎, 经过 Ni-NTA 柱分离纯化, 洗脱产物经 15% SDS-PAGE 胶分析如图 2A 所示。被洗脱的蛋白峰主要集中在馏分 1~3, 随着馏分增加, 被洗脱的蛋白随之减少。

为了获得高纯度的 Fxn 蛋白, 将 Ni-NTA 柱纯化后含有蛋白馏分的洗脱液合并 (图 2A, 泳道 E1~3), 用离心过滤装置连续梯度透析, 所收集的洗脱馏分如图 2B 所示。目的蛋白被浓缩 (泳道 P), 得到纯化的 Fxn-his₆ 融合蛋白。

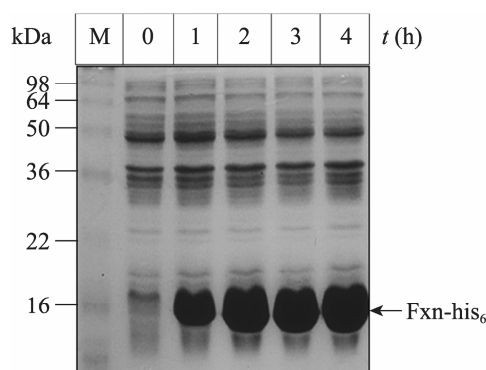


图 1 融合蛋白的诱导表达时相分析

Fig. 1 Time course of his-tagged mouse Fxn expression. M: protein marker; 0-4: Coomassie Blue staining for his-tagged mFxn induced with 0.2 mmol/L IPTG for 0, 1, 2, 3, 4 hours in *E. coli* strain BL21(DE3).

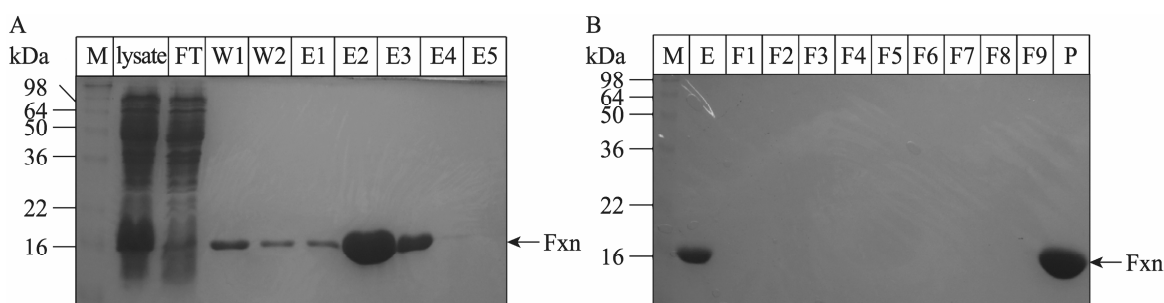


图2 带 his₆ 标签的小鼠 Fxn 融合蛋白的纯化、透析和浓缩

Fig. 2 Purification, dialysis, and concentrate of recombinant his-tagged mouse Fxn. (A) Purification of recombinant his-tagged mFxn protein on Ni-NTA beads and detection with Coomassie Blue stained 15% SDS-PAGE. Lysate: the lysates; FT: flow-through; W: wash; elution fractions (E1–5) were analyzed on 15% SDS-PAGE. M: protein marker. (B) Dialysis and concentrate of his-tagged mFxn and detection with Coomassie Blue stain on 15% SDS-PAGE gel. M: protein marker; E: eluate; F1–9: filter-device flow-through; P: purified, dialysed, and concentrated protein.

2.4 抗体制备及纯化

纯化的 Fxn 蛋白经浓缩后与弗氏佐剂混合乳化并免疫 14~16 周龄健康的雌性新西兰大白兔, 再经过 3 次加强免疫, 采取兔子心脏血获得抗血清, 经硫酸铵沉淀, 得到初步纯化的 Fxn 抗体 (见抗体应用部分)。

2.5 抗体特异性和灵敏度鉴定

为了测定该抗体的效价, 我们利用 ELISA 的方法, 以一定浓度的抗原 (100 ng) 包被 ELISA 板, 以 500~7 812 500 倍稀释的抗体与之结合, 平行对照蛋白为相同浓度的在大肠杆菌中表达的带 his₆ 标记的 ABCB10。ELISA 数据结果表明 Fxn 抗体效价达 1.5×10^6 以上 (图 3A)。

进一步特异性检测试验, 以不同浓度的抗原 Fxn (0.001~1 000 ng) 包被 ELISA 板, 对照抗原仍为 ABCB10, 使用浓度与 Fxn 相同, 以 1 : 5 000 的稀释倍数的抗体与之结合。结果表明, Fxn 抗体的特异性很高, 相对亲和力达 1×10^{-5} g/L, 抗原浓度为 1×10^{-8} g/L 时还可检出 (图 3B)。

为了验证所制备抗体的质量, 排除 his₆-tag 可能产生的影响, 应用所获得的多克隆抗体按照 1 : 500 稀释作为一抗, 以辣根过氧化物酶标记 (HRP) 羊抗兔 IgG 作为二抗, Western blotting 检测抗体识别不同量的纯蛋白和细胞或小鼠组织内源 Fxn 的表达量。如图 4A 所示, Fxn 抗体检测不到平行对照蛋白 ABCB10-his₆, 但可轻易检测到 4 ng 的 Fxn 蛋白, 而相同浓度稀释的 his₆ 抗体两种蛋白 Fxn 和 ABCB10 都检测不到, 当蛋白浓度增加到 μ g 级, his₆ 标记的 Fxn 和 ABCB10 均被检出。图 4B 显示随着 Fxn 纯蛋白量的不断减少, Western blotting 检测到的条带由强变弱, 当蛋白量减少到 0.16 ng 时 (图 4B, 泳道 4), 仍能够检测到 Fxn 蛋白的存在。

本实验制备的抗体不仅可识别体外表达的免疫原纯蛋白, 而且也能识别小鼠细胞系 (N2a, 图 4B 泳道 5) 和小鼠组织 (心脏, 图 4B 泳道 7) 的内源性 Fxn。该抗体还可以特异性地识别人源细胞系 HEK293 的内源性 FXN (图 4B, 泳道 6)。

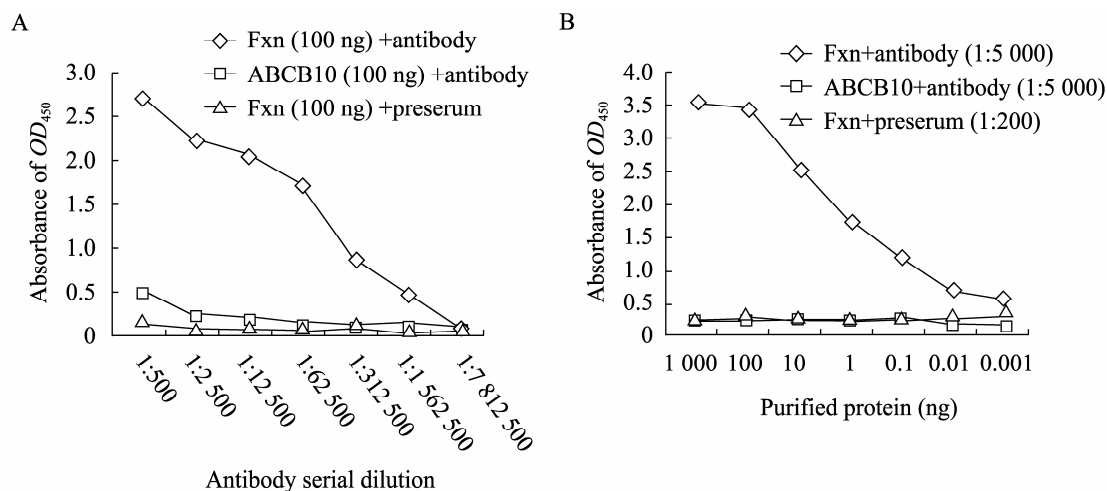


图3 ELISA 检测 Fxn 抗体的效价和特异性

Fig. 3 Titration (A) and specificity (B) of Fxn antibody detected by ELISA.

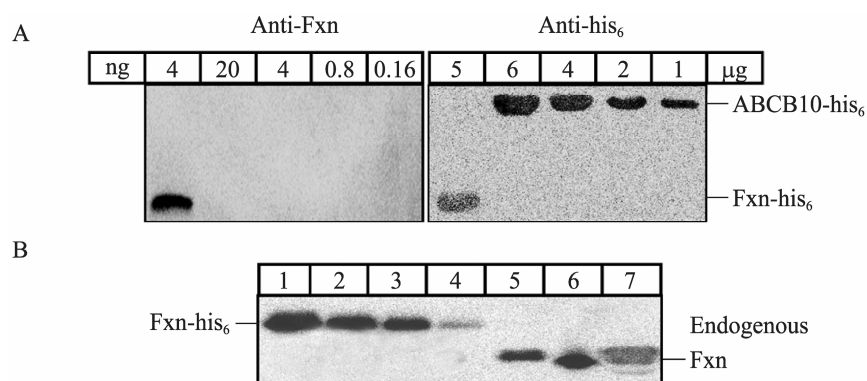


图4 Western blotting 检测 Fxn 抗体的滴度和特异性

Fig. 4 Titration and specificity detection of polyclonal antibody of Fxn by Western blotting. (A) Exclusion of immunogenicity of his₆ tag. Different amounts of purified protein are indicted. (B) The high sensitivity and specificity of purified antibody detected by Western blotting with different amount of purified Fxn protein and lysates from cell lines N₂a and HEK293 or from mouse tissue heart. 1-4: 20, 4, 0.8, 0.16 ng of purified mouse Fxn protein. 5-7: cell lines N₂a and HEK293, mouse tissue heart.

2.6 抗体的应用

为了进一步检验该抗体除 Western blotting 外是否可以用在其他研究工作中, 我们检测了该抗体在免疫沉淀和免疫荧光中的灵敏度与特异性。利用 protein G 琼脂糖珠结合 Fxn 抗体, 小

鼠细胞系和组织裂解液为目标蛋白来源。免疫沉淀结果表明 Fxn 抗体能有效地识别内源性的 Fxn 并能从细胞或组织裂解液中把 Fxn 分离出来 (图 5)。

FXN 是一种重要的线粒体蛋白, 作为铁的伴

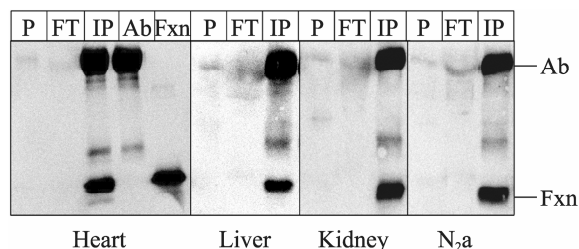


图5 利用免疫沉淀的方法 Fxn 抗体能有效分离内源性的小鼠 Fxn

Fig. 5 Isolation of endogenous mouse Fxn by Fxn polyclonal antibody with immunoprecipitation. Lysates extracted from cell line N₂a and mouse tissues were applied. P: preclean of the lysates with protein G-coupled agarose beads; FT: flowthrough after IP; IP: IP sample; Ab: antibody alone; Fxn: purified protein mouse Fxn.

侣分子,它可以调控线粒体内铁的动态平衡。为了从细胞水平证明自制的多克隆抗体的特异性和灵敏度 (*in vivo*),应用所获得的抗体,我们对内源 FXN 进行了细胞内的定位实验。通过免疫荧光方法,可以清楚地观察到 FXN 定位于线粒体内 (比较图 6A、6B 和 6C)。

3 讨论

本研究成功构建了表达带有 his₆ 标签的 Fxn

的载体,并在大肠杆菌中诱导表达。高度纯化的 Fxn 蛋白作为免疫原,免疫兔子得到抗 Fxn 的血清,纯化后得到了高敏感性和高特异性的 Fxn 抗体。和其他商业销售的抗体相比,其灵敏度要高出数量级以上 (数据未显示)。针对以前使用的 FXN 抗体只对人源样品免疫印迹效果较好,对鼠源 Fxn 敏感性差的问题,本抗体的制备为利用小鼠模型研究 FRDA 疾病创造了有利的条件。

对 FRDA 的研究在铁代谢^[12-15]、心血管疾病^[13]、糖尿病^[16]和神经退行性疾病^[13,17-18]等领域引起了广泛的关注,其原因就是 FXN 在线粒体的功能维持方面起到了重要作用,但其具体的功能还不是很确定。目前普遍接受的观点是 FXN 作为铁伴侣分子,在铁硫簇的合成过程中提供铁,为线粒体电子传递链的正常进行提供必要的辅基^[6,19-21]。我们的前期研究结果也表明 FXN 可以和与铁硫簇合成相关的其他核心蛋白相互作用,有助于铁硫簇的合成^[11]。除了核心组分外,FXN 很可能还与其他因子共同作用^[22]。本抗体的产生将有助于鉴定新的与 FXN 相互作用蛋白,也有助于诠释 FXN 蛋白的功能。

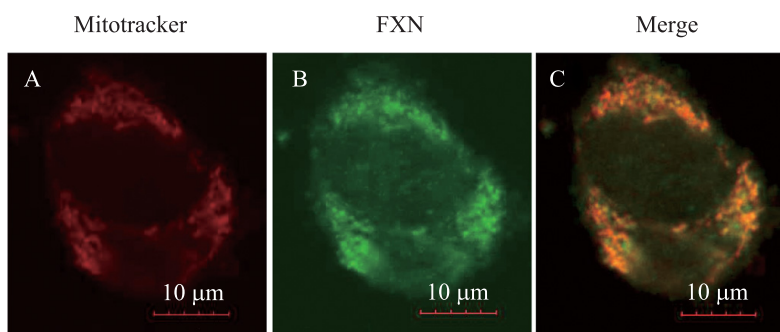


图6 利用免疫荧光 Fxn 抗体能检测位于线粒体中的内源性 FXN

Fig. 6 Mitochondrial localized FXN in HEK293 cells detected by immunofluorescence. HEK293 cells were co-stained with Mitotracker and Alexafluor488-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody against the primary antibody of Fxn. (A) Mitotracker for mitochondria (red). (B) Frataxin (green). (C) Merge for the colocalization of mitochondrial marker and FXN.

最近的 GAA 重复扩增介导的 Fxn 表达沉默的小鼠模型没有体现 FRDA 病人的典型特征,加之 GAA 重复扩增的不稳定性为 FRDA 疾病的研究带来了瓶颈^[23-25]。我们前期的研究结果发现两种新的 FXN 亚型蛋白 (Ⅱ和Ⅲ型)特异性表达在病人受损严重的小脑和心脏组织中,增加心脏特异性的亚型蛋白Ⅲ的表达可以明显增加线粒体顺乌头酸酶活性,增加小脑特异性的亚型蛋白Ⅱ的表达可以阻止细胞的氧化损伤^[11]。这就预示了亚型蛋白的表达可能与 FRDA 疾病的发病机制有关。该抗体的产生也将有助于小鼠体内亚型蛋白的鉴定及其功能的检测,为建立 Fxn 亚型蛋白缺失的 FRDA 小鼠模型奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Campuzano V, Montermini L, Lutz Y, et al. Frataxin is reduced in Friedreich ataxia patients and is associated with mitochondrial membranes. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(11): 1771-1780.
- [2] Campuzano V, Montermini L, Molto MD, et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, 1996, 271(5254): 1423-1427.
- [3] Durr A, Cossee M, Agid Y, et al. Clinical and genetic abnormalities in patients with Friedreich's ataxia. *N Engl J Med*, 1996, 335(16): 1169-1175.
- [4] Harding AE. Friedreich's ataxia: a clinical and genetic study of 90 families with an analysis of early diagnostic criteria and intrafamilial clustering of clinical features. *Brain*, 1981, 104(3): 589-620.
- [5] Lamarche JB, Cote M, Lemieux B. The cardiomyopathy of Friedreich's ataxia morphological observations in 3 cases. *Can J Neurol Sci*, 1980, 7(4): 389-396.
- [6] Rotig A, de Lonlay P, Chretien D, et al. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet*, 1997, 17(2): 215-217.
- [7] Emond M, Lepage G, Vanasse M, et al. Increased levels of plasma malondialdehyde in Friedreich ataxia. *Neurology*, 2000, 55(11): 1752-1753.
- [8] Rai M, Soragni E, Jenssen K, et al. HDAC inhibitors correct frataxin deficiency in a Friedreich ataxia mouse model. *PLoS ONE*, 2008, 3(4): e1958.
- [9] Al-Mahdawi S, Pinto RM, Ismail O, et al. The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum Mol Genet*, 2008, 17(5): 735-746.
- [10] Koeppen AH, Michael SC, Knutson MD, et al. The dentate nucleus in Friedreich's ataxia: the role of iron-responsive proteins. *Acta Neuropathol*, 2007, 114(2): 163-173.
- [11] Xia H, Cao Y, Dai X, et al. Novel frataxin isoforms may contribute to the pathological mechanism of friedreich ataxia. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e47847.
- [12] Cossee M, Puccio H, Gansmuller A, et al. Inactivation of the Friedreich ataxia mouse gene leads to early embryonic lethality without iron accumulation. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(8): 1219-1226.
- [13] Puccio H, Simon D, Cossee M, et al. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat Genet*, 2001, 27(2): 181-186.
- [14] Babcock M, de Silva D, Oaks R, et al. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1p, a putative homolog of frataxin. *Science*, 1997, 276(5319): 1709-1712.
- [15] Radisky DC, Babcock MC, Kaplan J. The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem*, 1999, 274(8): 4497-4499.
- [16] Ristow M, Mulder H, Pomplun D, et al. Frataxin deficiency in pancreatic islets causes diabetes due to loss of beta cell mass. *J Clin Invest*, 2003, 112(4): 527-534.
- [17] Simon D, Seznec H, Gansmuller A, et al. Friedreich ataxia mouse models with progressive cerebellar and sensory ataxia reveal autophagic neurodegeneration in dorsal root ganglia. *J Neurosci*, 2004, 24(8): 1987-1995.
- [18] Martelli A, Napierala M, Puccio H. Understanding the genetic and molecular pathogenesis of Friedreich's ataxia through animal and cellular models. *Dis Model Mech*, 2012, 5(2): 165-176.
- [19] Shan Y, Cortopassi G. HSC20 interacts with frataxin and is involved in iron-sulfur cluster biogenesis and iron homeostasis. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(7): 1311-1321.

1457–1469.

- [20] Schmucker S, Martelli A, Colin F, et al. Mammalian frataxin: an essential function for cellular viability through an interaction with a preformed ISCU/NFS1/ISD11 iron-sulfur assembly complex. PLoS ONE, 2011, 6(1): e16199.
- [21] Prischi F, Konarev PV, Iannuzzi C, et al. Structural bases for the interaction of frataxin with the central components of iron-sulphur cluster assembly. Nat Commun, 2010, 1: 95.
- [22] Gakh O, Bedekovics T, Duncan SF, et al. Normal and Friedreich ataxia cells express different isoforms of frataxin with complementary roles in iron-sulfur cluster assembly. J Biol Chem, 2010, 285(49):

38486–38501.

- [23] Pollard LM, Sharma R, Gomez M, et al. Replication-mediated instability of the GAA triplet repeat mutation in Friedreich ataxia. Nucleic Acids Res, 2004, 32(19): 5962–5971.
- [24] Chandok GS, Patel MP, Mirkin SM, et al. Effects of Friedreich's ataxia GAA repeats on DNA replication in mammalian cells. Nucleic Acids Res, 2012, 40(9): 3964–3974.
- [25] Pollard LM, Bourn RL, Bidichandani SI. Repair of DNA double-strand breaks within the (GAA*TTC)_n sequence results in frequent deletion of the triplet-repeat sequence. Nucleic Acids Res, 2008, 36(2): 489–500.

(本文责编 陈宏宇)

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

2012 工业生物技术发展报告



作者：中国科学院生命科学与生物技术局

ISBN：9787030356857

定价：98

开本：16 装帧：平装 页码：412

初版时间：2012-10-1

专业分类：生物技术

读者对象：《2012 工业生物技术发展报告》可供相关科研院所、高等院校和企业等从事工业生物技术研究 and 开发工作的科研管理人员、科研工作者和研发生产人员借鉴与参考。

内容介绍

《2012 工业生物技术发展报告》是基于工业生物技术知识环境出版的信息产品之一，主要报道了工业生物技术领域内的重大规划与政策、技术和产品的研发进展、产业发展等。为了能够全面了解工业生物技术发展的最新进展，本书设置了发展战略篇、研发进展篇、产业篇和青年人才篇。在选题上，着重突出了工业生物技术领域的热点和前沿。为了突出各领域的技术进展并使内容更有层次感，本书在研发进展篇采用主题的形式组织稿件，重点报道了合成生物学、工业微生物生理与代谢工程、生物炼制和生物发酵技术、工业蛋白质工程、生物过程工程、微藻生物能源等在工业生物技术领域中的研发进展等内容。为了扩大本报告的读者范围，使国外读者能了解中国工业生物技术的现状、产业情况，我们在形式上增加了英文题名、摘要以及英文作者简介。此外，我们通过对 2011 年国内外工业生物技术领域重要事件的回顾，与读者一起梳理过去一年本领域发展的整体脉络。