

# 斑马鱼 *cdk7* 和 *cyclin H* 基因的原核表达及多克隆抗体的制备与鉴定

储琳<sup>1,2</sup> 刘清云<sup>1</sup> 钱旻<sup>2</sup> 严缘昌<sup>1,3</sup> 李逸平<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; <sup>2</sup>华东师范大学生命科学院, 上海 200062; <sup>3</sup>上海高校模式生物 E- 研究院, 上海 200031)

**摘要** 构建了两个表达斑马鱼 *cdk7*(基因片段)和 *cyclin H*(基因全长)的重组质粒, 分别转化大肠杆菌 BL21 进行原核表达, 所得的 CDK7 和 *cyclin H* 两个融合蛋白均以包涵体形式存在。经 SDS-PAGE 分离, 切下含有目的蛋白条带的凝胶冻成干粉, 分别免疫新西兰大耳兔, 制备并纯化了分别抗 CDK7 和抗 *cyclin H* 的两个多克隆抗体。经酶联免疫吸附测定、蛋白质印迹分析检测, 确定获得了两种具有高效价的特异性多克隆抗体。免疫荧光组织化学结果显示, CDK7 和 *cyclin H* 这两个蛋白质均普遍存在于斑马鱼胚胎动物极的各个细胞中。

**关键词** 斑马鱼; CDK7; *cyclin H*; 原核表达; 抗血清

斑马鱼是一种常见的热带鱼, 由于个体小, 养殖花费少, 能大规模繁育, 且具有许多其他优点, 受到众多研究者的关注。斑马鱼的细胞标记技术、组织移植技术、突变技术、单倍体育种技术、转基因技术、基因活性抑制技术等已经成熟, 且有数以千计的斑马鱼胚胎突变体, 是研究胚胎发育分子机制的优良资源, 有的还可作为人类疾病模型<sup>[1]</sup>。作为模式动物, 斑马鱼为研究脊椎动物发育提供了良好的模型, 并被运用于其他学科。

细胞周期蛋白依赖性激酶活化激酶(CAK)是一 CDK7-cyclin H-MAT1 三元复合物, 它不仅能磷酸化细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs), 还可以磷酸化 RNA 聚合酶 II(RNAP II)大亚基的羧基末端结构域(CTD), 因此在细胞周期和发育过程中具有十分重要的作用, 受到广泛的关注和深入的研究。

当斑马鱼进入中囊胚转换(midblastula transition, MBT), 细胞周期延长, 出现 G<sub>1</sub> 期, 这与 CDK-cyclins 复合物的调控有关, 而这些复合物大多受 CAK 磷酸化而被激活。在斑马鱼中, MBT 是否与 CAK 有关, 目前还不清楚。鉴于 CAK 在细胞周期以及转录过程中扮演的重要角色, 研究 CDK7 和 *cyclin H* 在斑马鱼早期胚胎发育过程中的作用还是很有意义的, 可以为今后研究脊椎动物形态发生的分子机制提供良好的依据。

但是, 目前 CDK7 和 *cyclin H* 在斑马鱼中的研

究还处于起始阶段。我们实验室通过已公布的其他模式动物 *cdk7* 和 *cyclin H* 基因序列结合斑马鱼 EST 序列, 首次克隆了这两个基因的全长序列(GenBank 号分别为: DQ294347 和 DQ294346)。通过分别构建原核表达质粒, 得到了两个高效表达的重组菌, 以原核表达的融合蛋白分别免疫新西兰大耳兔, 制备了两个多克隆抗体, 并对这两个抗体进行了纯化和鉴定, 为进一步研究斑马鱼 CDK7 和 *cyclin H* 在胚胎发育过程中的作用提供了工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

美国 AB 系斑马鱼(*Danio rerio*)、*E.coli* DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3)及载体 pET-32a(+), 均由本实验室保存。TRIzol 试剂购于 Invitrogen 公司; 逆转录酶 M-MLV 和 pGEM-T 载体购于 Promega 公司; 蛋白质纯化系统采用 Novagen 公司的 Bugbuster 和 Qiagen 公司的 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖产品; 链霉菌蛋白酶(pronase)购于 Roche 公司。其他化学试剂购自上海申能博彩生物科技有限公司或上海化学试剂公司。

根据本实验室已公布的斑马鱼 *cdk7* 和 *cyclin H* 基因序列设计特异性引物。*cdk7* 上游引物序列为:

收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-08-17

上海教育委员会 E- 研究院建设计划项目资助(No.E03003)

\* 通讯作。Tel: 021-54921395, E-mail: ypli@sibs.ac.cn

5'-GAGAGAATTTCGATCAGCTGACGAAG-3', 下游引物序列为: 5'-GAGACTCGAGAAACACCAGCTTCTT-3', 基因片段长为 390 bp; *cyclin H* 上游引物序列为: 5'-GAATTCATGTATCACAACAGCTCA-3', 下游引物序列为: 5'-CTCGAGCAATGCATCCAAATCATC-3', 基因片段长为 969 bp。其中在两个上游引物中均加入限制性内切酶 *EcoRI* 的酶切位点, 在下游引物中也均加入限制性内切酶 *XhoI* 的酶切位点。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因克隆和载体构建

用 TRIzol 试剂提取 4 hpf(hour post-fertilization) 斑马鱼胚胎总 RNA, 以 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物, 用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA 第一链, 分别用 *cdk7* 和 *cyclin H* 的引物进行 PCR 扩增目的 DNA 片段。扩增 *cdk7* 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 60 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s; 30 个循环后, 72 °C 再延伸 10 min。扩增 *cyclin H* 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 60 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s; 30 个循环后, 72 °C 再延伸 10 min。

将扩增出来的两个 PCR 产物经纯化后分别连接到 pGEM-T 中得到 pGEM-T-*cdk7* 和 pGEM-T-*cyclin H* 质粒(图 1A)。通过蓝白斑筛选, 挑取阳性克隆, 抽提质粒 DNA, 进行双酶切、PCR 及测序鉴定。将 pGEM-T-*cdk7* 和 pGEM-T-*cyclin H* 及原核表达载体 pET-32a(+) 分别进行 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切, 回收 *cdk7* 和 *cyclin H* 片段, 并与酶切后的 pET-32a(+) 载

体连接, 分别得到 pET-32a(+)-*cdk7* 和 pET-32a(+)-*cyclin H* 两个原核表达质粒(图 1B)。利用 *EcoRI* 和 *XhoI* 对它们分别进行双酶切、PCR 和测序鉴定。

### 1.2.2 诱导表达及融合蛋白纯化

将 pET-32a(+)-*cdk7* 和 pET-32a(+)-*cyclin H* 质粒分别转化原核表达菌株 BL21(DE3)。挑取单菌落, 在 LB 液体培养基(含氨苄青霉素 60 μg/ml) 中置于摇床上 37 °C, 300 r/min 振荡培养至光密度值 A<sub>600</sub> 为 0.6 左右。加入异丙基硫代半乳糖(IPTG)至终浓度为 1 mmol/L, 继续于 37 °C 培养 3 h。在 IPTG 诱导前和诱导后分别取样, 用作 SDS-PAGE 分析。

用 BugBuster 蛋白抽提试剂将细菌裂解液分为细胞质可溶部分和细胞质不溶部分, SDS-PAGE 分析发现 CDK7 和 *cyclin H* 这两个原核表达的融合蛋白均以包涵体的形式存在, 因此按照纯化包涵体的步骤用 Bugbuster 试剂纯化这两个融合蛋白(具体步骤参考 Bugbuster 使用说明)。将纯化后的 CDK7 和 *cyclin H* 包涵体分别溶解在含尿素的裂解液(100 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, pH 8.0) 中, 分别测定这两个蛋白质的浓度, 并进行 SDS-PAGE, 分别切下目的蛋白条带, 冻干成粉末, 于 -70 °C 保存, 作为抗原。

### 1.2.3 抗血清的制备和纯化

抗血清制备方法参考文献[2]的方法, 具体步骤如下: 第一天, 取 1.5 ml 未免疫新西兰大耳兔耳静脉血制备血清作为阴性对照。然后将 200 μg CDK7 冻干粉和 200 μg *cyclin H* 冻干粉分别溶于 0.5 ml PBS 中, 各自加入 0.5 ml 完全福氏佐剂, 通过超声形成油包水的状态, 分 5 点对 2 只新西兰大耳兔背部进行皮下注射; 第三天, 以同样的方法对新西兰大耳兔进行加强免疫。第 28 天, 用不完全福氏佐剂代替完全福氏佐剂以相同的剂量对新西兰大耳兔进行免疫; 第 35 天取兔颈动脉血。

将 pET32a(+) 空载体, pET-32a(+)-*cdk7* 和 pET-32a(+)-*cyclin H* 的原核表达蛋白和 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖浆液温育, 利用 pET32a(+) 载体上表达的多聚组氨酸与 Ni<sup>2+</sup>-NTA 的特异性结合制备三种抗原柱。充分洗涤以除去非特异性结合的蛋白质。分别将 2 ml 抗 CDK7 和抗 *cyclin H* 的未纯化的抗血清流过空载体抗原柱, 以去除抗血清中针对空载体表达产物的抗体。收集过流液, 然后分别流过 CDK7 和 *cyclin H* 两根抗原柱, 使相应的抗体与抗原形成复合物结合在柱上。用平衡液(2 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-

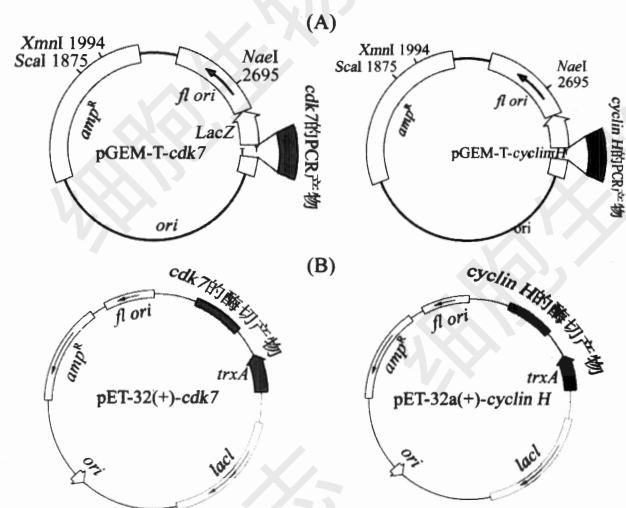


图 1 质粒构建示意图

A: pGEM-T-*cdk7* 和 pGEM-T-*cyclin H* 载体构建示意图; B: pET-32a(+)-*cdk7* 和 pET-32a(+)-*cyclin H* 载体构建示意图。

HCl, pH 7.4)洗涤柱上的抗原抗体复合物后, 再用 4 mol/L  $MgCl_2$  溶液将抗体从抗原柱上洗脱下来, 抗原仍结合在柱上。最后将溶于 4 mol/L  $MgCl_2$  溶液的抗体用 PBS 4 °C 透析过夜<sup>[3]</sup>, 从而获得抗 CDK7 和抗 *cyclin H* 两种特异性抗体。

**1.2.4 斑马鱼胚胎蛋白质提取** 斑马鱼胚胎蛋白的提取参考文献[4]的方法, 并做了一些优化。首先将斑马鱼胚胎转移至胚胎培养基(10% Hank's 液, pH 7.2)中, 加入链霉蛋白酶使终浓度为 1 mg/ml, 缓慢摇晃。各个发育时期的胚胎链霉蛋白酶作用时间不同。用吸管轻微吹打以去除卵壳膜。用预冷的林格液清洗 3 次, 以去除脱落的卵壳膜。将胚胎转移到预冷的林格液中, 加入 EDTA 和 PMSF, 以终止链霉蛋白酶的作用。再用预冷的林格液将胚胎清洗 2 次。将胚胎转移到离心管中, 尽量去除多余的水份。加入胚胎裂解液(1% NP-40, 50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 10% 甘油, 50  $\mu$ g PMSF, 100 mmol/L NaF), 用移液器上下吹打使细胞裂解, 置于冰上 15 min 以充分裂解。加入氟利昂, 上下颠倒混匀, 使蛋白质和脂质分层。以 12 000 g 于 4 °C 离心 15 min, 收集蛋白质所在的上清液。

**1.2.5 抗血清的检测** 采用间接 ELISA 法测定 CDK7 和 *cyclin H* 两种抗血清的效价, 步骤如下: 用纯化后的 CDK7 和 *cyclin H* 原核表达产物作为抗原, 分别包被两个反应板(抗原浓度为 1  $\mu$ g/ $\mu$ l, 每抗原孔加 100  $\mu$ l)。3%BSA 封闭后以未免疫的兔血清作为阴性对照, 免疫后的抗血清作为一抗; 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 作为二抗; 经 TMB 显色后用  $H_2SO_4$  终止反应, 用酶标仪在 450 nm 处读取数值<sup>[5]</sup>。

通过蛋白质印迹分析(Western 印迹)鉴定这两种抗体的特异性, 步骤如下: 经纯化的 CDK7 和 *cyclin H* 原核表达产物及斑马鱼胚胎蛋白提取物经 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜, 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h; 纯化后的抗体作为一抗(稀释 1 : 5000), 4 °C 结合过夜。以免疫前的血清、CDK7 抗原吸附后的 CDK7 抗体和 *cyclin H* 抗原吸附后的 *cyclin H* 抗体作为阴性对照。TBST 室温洗 3 次, 每次 10 min; 以辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 作为二抗(稀释度 1 : 2 500)37 °C 处理 1 h, TBST 室温洗 3 次, 每次 10 min; 经 ECL 显色后, 用 X 光片曝光。

用免疫荧光组织化学分析 CDK7 和 *cyclin H* 这两个蛋白质在胚胎中的定位, 步骤如下: 取 7 hpf 斑

马鱼胚胎用 4% 多聚甲醛 4 °C 固定过夜, 经 PBS 洗涤后用 30% 蔗糖溶液脱水, 再用 PBS 洗涤后; 胚胎用 OCT 包埋, 进行冰冻切片, 厚度为 5  $\mu$ m; 胚胎切片再用 4% 多聚甲醛固定 10 min 后, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 然后用 0.5% Triton-X100 处理 10 min, PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 3% BSA 37 °C 封闭 1 h; 分别以纯化后的抗 CDK7 和抗 *cyclin H* 的抗血清为一抗(稀释 1 : 500), 以免疫前的血清和不加一抗作为阴性对照 37 °C 温育 2 h, 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 以偶连 FITC 的羊抗兔 IgG 为二抗(稀释 1 : 400)37 °C 温育 1 h, 然后用 PBS 洗 3 次, 每次 10 min; 最后用 Hoechst33258 对细胞核进行荧光染色, 室温蔽光反应 15 min 后用 PBS 洗涤, 封片, 荧光显微镜下进行观察。

## 2 结果

### 2.1 *cdk7* 和 *cyclin H* 的基因克隆和重组载体的鉴定

以斑马鱼胚胎总 RNA 为模板, 用特异性引物进行 RT-PCR 扩增, PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果分别得到 400 bp 左右(*cdk7*)和 1 000 bp 左右(*cyclin H*)的条带(图 2)。*cdk7* 和 *cyclin H* 特异性 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接后, 序列测定结果证实, 核苷酸序列与预计的一致。

通过 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切, 将 *cdk7* 和 *cyclin H* cDNA 从重组质粒 pGEM-T-*cdk7* 和 pGEM-T-*cyclin H* 亚克隆至原核表达载体 pET-32a(+)中。重组质粒 pET-32a(+)-*cdk7* 和 pET-32a(+)-*cyclin H* 经 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定, 分别得到 400 bp 左右(*cdk7*)和 1 000 bp 左右(*cyclin H*)的条带(图 3)。

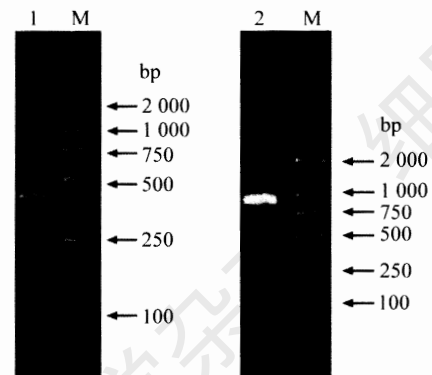


图 2 *cdk7* 和 *cyclin H* 的 PCR 产物电泳图谱

M: DNA 分子量标准; 1: *cdk7* 的 PCR 产物(390 bp); 2: *cyclin H* 的 PCR 产物(969 bp)。

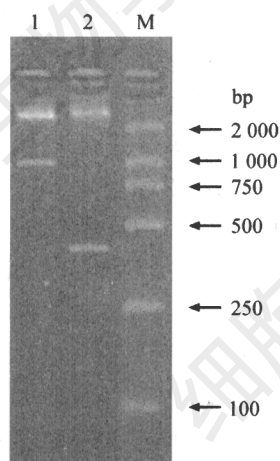


图3 重组质粒的 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切鉴定图谱

M: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒 pET-32a(+)-*cyclin H*;  
2: 重组质粒 pET-32a(+)-*cdk7*。

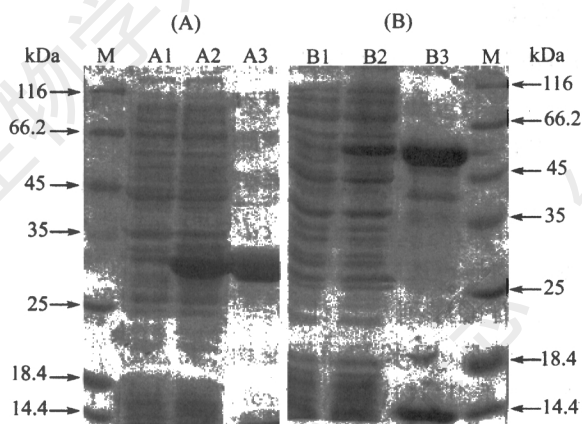


图4 原核表达蛋白 CDK7 和 *cyclin H* 的 SDS-PAGE 分析

A: 原核表达蛋白 CDK7 的 SDS-PAGE; B: 原核表达蛋白 *cyclin H* 的 SDS-PAGE。M: 蛋白质分子量标准; A1、B1: 未经 IPTG 诱导的重组质粒转化的 BL21 总蛋白; A2、B2: IPTG 诱导后的重组质粒转化的 BL21 总蛋白; A3、B3: 纯化的表达蛋白。

## 2.2 CDK7 和 *cyclin H* 融合蛋白的诱导表达、纯化及鉴定

将重组质粒 pET-32a(+)-*cdk7* 和 pET-32a(+)-*cyclin H* 分别转化 *E.coli* BL21(DE3), 用 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后, 离心收集菌体, 进行 12% SDS-PAGE。结果表明, 经诱导后含有重组质粒 pET-32a(+)-*cdk7* 的菌株大量表达了分子量为 34 kDa 的外源蛋白, 而含有重组质粒 pET-32a(+)-*cyclin H* 的菌株高表达了分子量为 57 kDa 的外源蛋白(图 4), 与预期的分子量一致。

## 2.3 抗血清的效价测定及特异性分析

以未免疫的兔血清作为阴性对照, 分别将

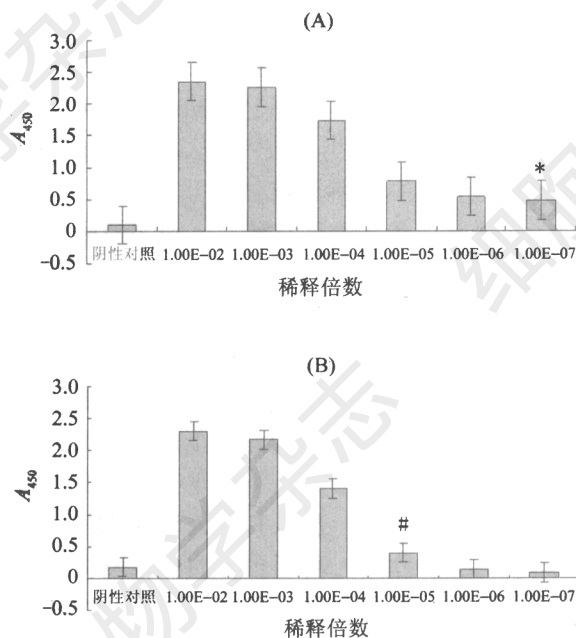


图5 抗 CDK7(A) 和 *cyclin H*(B) 两种抗血清的 ELISA 结果

\* 和 # 表示  $P/N > 2$ , 并有显著性差异  $P < 0.01$ 。

CDK7 和 *cyclin H* 免疫的两种兔抗血清做不同稀释后, 进行 ELISA 检测。标本孔的吸收值与阴性标本孔的吸收值的比值( $P/N$ )大于 2 时判断为阳性。结果显示, CDK7 和 *cyclin H* 的兔抗血清效价分别达到 1 : 1.00E+07 和 1 : 1.00E+05(图 5)。

Western 印迹结果显示, 未纯化的抗血清由于含有很多非特异性抗体, 所以有非特异性条带; 而用纯化的 CDK7 和 *cyclin H* 两种特异性的抗体(稀释 5 000 倍), 则无非特异性条带。Western 印迹检测到的 CDK7 和 *cyclin H* 原核表达蛋白质分子质量分别约为 34 kDa 和 57 kDa, 而在 30 hpf 斑马鱼胚胎总蛋白中检测到的天然 CDK7 和 *cyclin H* 分子质量分别约为 39 kDa 和 37 kDa(图 6)。分别用纯化后的 CDK7 和 *cyclin H* 抗原吸附 CDK7 和 *cyclin H* 抗体, 用吸附后的抗体来做 Western 印迹并不能识别各自表达的抗原或是体内的抗原(数据没有显示)。以上结果初步表明, 制备和纯化后的 CDK7 和 *cyclin H* 两种多克隆抗体特异性较强。

## 2.4 CDK7 和 *cyclin H* 在胚胎中的表达

对 7hpf 斑马鱼胚胎进行免疫荧光组织化学。用 Hoechst33258 来染色细胞核, 可以看出细胞主要分布在胚胎的动物极(图 7B, 图 7F, 图 7J); 抗 CDK7 和 *cyclin H* 两种抗体的染色结果也显示这两种蛋白质也只是在胚胎的动物极分布(图 7C, 图 7G, 图 7K); 两组照片的重叠结果也显示两种蛋白的标记分布一

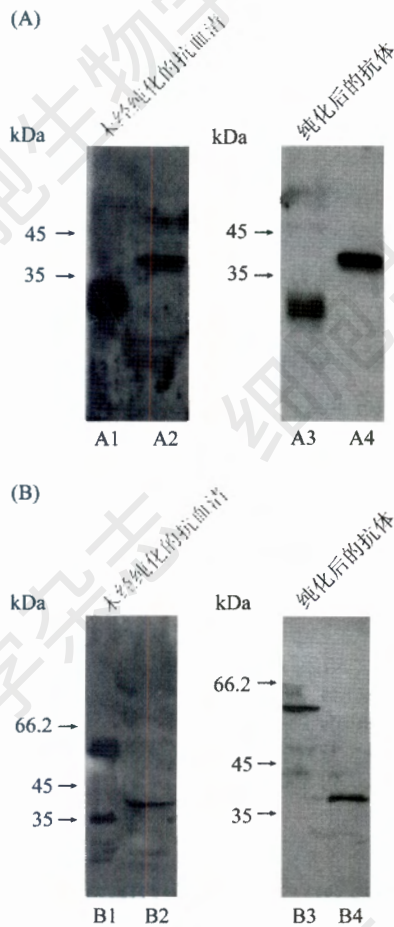


图6 原核表达蛋白和斑马鱼胚胎总蛋白的Western印迹分析  
A: CDK7 抗血清; B: cyclin H 抗血清; A1、A3: 纯化后的 CDK7 原核表达蛋白; B1、B3: 纯化后的 cyclin H 原核表达蛋白; A2、A4、B2、B4: 30 hpf 斑马鱼胚胎总蛋白。

致, 均位于胚胎动物极的各个细胞中(图 7D, 图 7H, 图 7L)。

### 3 讨论

在抗原设计上我们采取了两种方式。内源的 CDK7 分子量为 39 kDa, 在构建原核表达载体时, 我们采用基因特异性片段, 即 *cdk7* 在斑马鱼中与其他物种同源性低的核苷酸序列, 由这段序列表达出来的蛋白质分子量约为 14 kDa, 插入到 pET-32a(+) 载体中表达的融合蛋白分子量约为 34 kDa。cyclin H 则采用的是基因全长, 分子量为 37 kDa, 插入到 pET-32a(+) 载体中表达的融合蛋白分子量约为 57 kDa。pET-32a(+) 原核表达载体在内部和 C 端均含有 His-Tag, 并在 N 端含有 Trx-Tag。由于该载体为高表达载体, 所以融合蛋白的表达量很高, 这里我们表达的两个蛋白质均以不溶性包涵体形式存在。所以我们采用包涵体作为抗原制备多克隆抗体。结果证明这两种方法在制备多克隆抗体时都是可行的。

我们对抗血清进行了必要的纯化。未纯化的抗血清含有多种非特异性抗体。pET-32a(+) 载体虽然是高效表达的载体, 但 N 端含有的 Trx-Tag 分子量很大, 足够产生免疫原性, 因此在多克隆抗体的制备过程中会产生针对 Trx 的抗体。所以在抗体纯化过程中, 第一步先去除针对 Trx 的抗体。其次, 用纯化的 CDK7 和 cyclin H 抗原共价结合于 Ni<sup>2+</sup>-NTA 琼脂糖柱上, 多克隆混合抗血清中的那些对该抗原

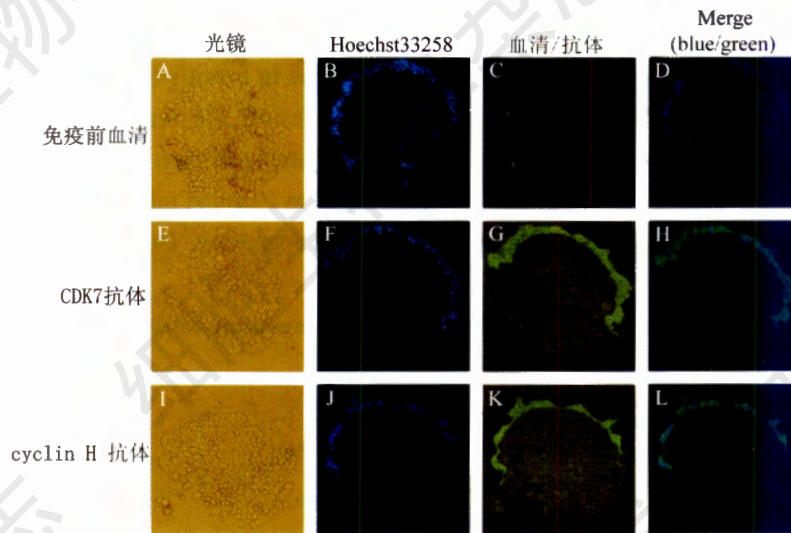


图7 斑马鱼 7 hpf 胚胎 CDK7 和 cyclin H 抗体的免疫组织荧光

A,E,I: 斑马鱼 7 hpf 胚胎切片光镜照片; B,F,G: 用 Hoechst33258 来标示细胞核, 蓝色荧光显示动物极细胞所在位置; C,G,K: 免疫荧光组织化学染色, 绿色荧光显示组织抗原阳性的部位; D,H,L: 分别是 B-C, F-G, 和 J-K 的重叠。

特异的抗体能和它结合, 经过冲洗, 将未结合的抗体除去, 然后再将特异性抗体洗脱。

在提取斑马鱼胚胎总蛋白时我们改进了实验方法。斑马鱼早期胚胎外面有一层卵鞘, 可以用链霉菌蛋白酶将卵鞘去除, 但作用的时间非常关键。作用时间不充分, 则卵鞘不能完全脱落; 如果作用时间过长, 则链霉菌蛋白酶会将细胞内的蛋白质消化。早期胚胎分为动物极和植物极, 动物极是由分裂的细胞所组成, 而植物极则提供胚胎发育过程中所需的营养物质, 主要成分是脂类。如果不将脂类去除, 则在后续的 SDS-PAGE 中, 蛋白质会在上样孔附近聚集, 不能正常迁移。因此, 去除植物极至关重要。国外有文献报道, 用吸管将植物极与动物极分离。但该机械分离方法操作效率低, 且容易将动物极细胞破坏。而用氟利昂将脂类去除, 效率高且得率高。

蛋白质印迹分析证实了抗体的特异性。用纯化后的抗体来检测 30 hpf 的斑马鱼胚胎中内源性 CDK7 和 cyclin H, 在较高稀释浓度下也可检测到目的条

带, 且无明显的非特异性, 证实了这两种抗体的高亲和性和各自结合 CDK7 和 cyclin H 的特异性, 为深入研究 CDK7 和 cyclin H 打下了基础。

从免疫组织荧光结果来看, CDK7 和 cyclin H 这两个蛋白质在斑马鱼 7 hpf 胚胎中的表达是一致的, 均位于胚胎动物极的细胞中, 不存在于植物极中。这可能是因为这两个蛋白质在体内以复合物的形式起作用。根据实验室先前的数据表明, *cdk7* 和 *cyclin H* 这两个基因普遍存在于斑马鱼胚胎发育的各个阶段和成鱼的各个组织器官。免疫荧光组织化学结果也显示, 这两个蛋白质均普遍表达于胚盾期 (shield stage) 胚胎的各个细胞中。

#### 参考文献 (References)

- [1] 徐振华等。生命的化学, 2002, 22: 376
- [2] Hu XY *et al.* *Cell Res*, 2002, 12: 157
- [3] Gu J *et al.* *BioTechniques*, 1994, 17: 257
- [4] Westerfield M. *Zebrafish Book: Molecular Methods*, University of Oregon Press, 1993
- [5] 朱立平等。免疫学常用实验方法, 第一版, 北京: 人民军医出版社, 2000, 352

## Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibodies Preparation of *cdk7* and *cyclin H* in Zebrafish

Lin Chu<sup>1,2</sup>, Qing-Yun Liu<sup>1</sup>, Min Qian<sup>2</sup>, Yuan-Chang Yan<sup>1,3</sup>, Yi-Ping Li<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; <sup>2</sup>School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

<sup>3</sup>Model Organism Division, E-Institutes of Shanghai Universities, Shanghai 200031, China )

**Abstract** Expression vectors of CDK7 and cyclin H gene in zebrafish were constructed and transformed into *E. coli* BL21 separately for IPTG induced expression. The results showed that both fusion protein were expressed in the form of inclusion body. Fusion proteins were isolated and then lyophilized to raise the polyclonal antisera against CDK7 and cyclin H respectively by immunizing New Zealand rabbits. The antisera were purified and characterized by ELISA, Western blotting and immunofluorescence-staining. The results showed that the antibodies had high titer, affinity and specificity.

**Key words** zebrafish; CDK7; cyclin H; prokaryotic expression; antiserum

Received: February 6, 2006 Accepted: August 17, 2006

This work was supported by the Shanghai Education Committee (No.E03003)

\*Corresponding author. Tel: 86-21-54921395, E-mail: ypli@sibs.ac.cn