

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.33.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 33-0013-06

人睾丸特异表达基因 PIAS-NY 原核表达 和多克隆抗体的制备*

王海燕¹, 曾凡强¹, 王玉兰¹, 郑英², 戚大石³

(1. 徐州医科大学 人体解剖学教研室, 江苏 徐州 221004; 2. 扬州大学 组胚教研室, 江苏 扬州 225001; 3. 徐州医科大学 遗传学教研室, 江苏 徐州 221004)

摘要: 目的 构建 PIAS-NY-pET30a 原核表达载体, 并诱导其成功表达, 经纯化后获得高浓度的可溶性融合蛋白 His-PIAS-NY, 免疫小鼠获得鼠源性 PIAS-NY 多克隆抗体。**方法** 以人精原 cDNA 文库为模板, 通过聚合酶链反应 (PCR) 扩增 PIAS-NY 开放阅读框, 克隆到 pET30a 表达载体中, 酶切、PCR 鉴定构建重组质粒。测序完全正确后将质粒 PIAS-NY-pET30a 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行大量扩增, 异丙基-β-D- 硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。超声、离心、His-Ni 柱亲和层析纯化包涵体蛋白, 依次经过不同浓度尿素进行蛋白质复性, 获得高浓度的可溶性 His-PIAS-NY 融合蛋白。分 6 次 BalB/C 小鼠腹腔注射乳化纯化蛋白。2 个月小鼠眼球取血, 收集血清。**结果** 成功构建原核表达质粒 PIAS-NY-pET30a; 利用终浓度 1 mmol/L IPTG 37℃ 诱导 4 h, 大肠杆菌 BL21 大量表达融合蛋白 His-PIAS-NY, 并以包涵体形式存在于菌体中; 尿素变性后 His-Ni 柱纯化融合蛋白, 复性后获得高浓度的可溶性蛋白 His-PIAS-NY; 6 次免疫后收获存活小鼠抗血清; 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 抗血清滴度达到 1 : 100 000; 免疫印迹和免疫共沉淀证实 PIAS-NY 抗血清能特异性识别 293T 细胞和 GC2 细胞中 PIAS-NY 蛋白。**结论** 成功获得 PIAS-NY 多克隆抗体, 而且具有高反应性和高特异性, PIAS-NY 在 GC2 细胞和 293T 细胞中表达, 并且能够与 RUVBL2 蛋白发生相互作用。

关键词: 精子发生; PIAS-NY; 原核表达载体; 蛋白纯化; 多克隆抗体制备

中图分类号: R34

文献标识码: A

Prokaryotic expression of human testis-specific PIAS-NY and preparation of polyclonal antibody*

Hai-yan Wang¹, Fan-qiang Zeng¹, Yu-lan Wang¹, YingZheng², Da-shi Qi³

(1. Department of Anatomy, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China;
2. Department of Histology and Embryology, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225001, China;
3. Department of Genetics, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

Abstract: Objective To construct a recombinant prokaryotic vector inducibly expressing human PIAS-NY, and prepare mouse polyclonal antibody against His-PIAS-NY. **Methods** PIAS-NY gene was amplified by PCR with human spermatogonial cDNA library as a templation. PCR products were inserted into PET-30a vector. The recombinant plasmid was successively verified by PCR, enzyme digestion and DNA sequencing analysis. The Escherichia coli BL21 (DE3) containing recombinant vector PIAS-NY-pET30a was induced to express fusion protein by IPTG. After denaturation, protein was purified with Imidazole elution by affinity chromatography followed by protein refolding. Mice were immunized by peritoneal injection of recombinant PIAS-NY protein for six times.

收稿日期: 2018-06-17

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81500977)

Polyclonal antibody was obtained by harvesting mouse serum, bioactivity of which was examined by ELISA.

Results The recombinant prokaryotic expression vector was successfully constructed. Expression of fusion protein was induced by IPTG induction at 37°C for 4 hours in the form of inclusion bodies in *Escherichia coli* (BL21). Highly-purified soluble recombinant protein His-PIAS-NY was obtained after denaturation, purification and dilution renaturation. Serum levels of specific anti-PIAS-NY polyclonal antibody obtained from mouse serum was detected by ELISA at titer above 1: 100000. Western blot and co-immunoprecipitation assay confirmed its high specificity. **Conclusions** The polyclonal antibody against human *PIAS-NY* is obtained; it can recognize the protein within GC2 and 293T cells, which will be helpful for further study in spermatogenesis.

Keywords: spermatogenesis; *PIAS-NY*; prokaryotic expression vector; chromatography purification; preparation of the polyclonal antibody

睾丸特异表达基因的转录调控是精子发生过程中最基本的调节因素^[1], 具有进化上高度保守、生精细胞特异表达或高表达及阶段特异性表达的特征^[2-3]。因此筛选并研究这些差异表达的基因有望发现与精子发生相关的新基因, 或发现已知基因的新功能, 研究结果对于揭示人睾丸发育/精子发生的分子机制、建立男性不育在分子水平的诊断方法、发现精子发生障碍的基因治疗手段和寻找男性避孕的新方法均具有重要意义。活化型信号转导及转录激活蛋白抑制蛋白 (protein inhibitor of activated STAT, PIAS) 家族属于这类蛋白。目前, 真核哺乳动物中发现的 PIAS 家族成员主要包括 PIAS1、PIAS2、PIAS3 和 PIASy^[4-6]。PIAS 蛋白家族在人睾丸组织中存在着多种调节机制, 同时在睾丸功能中发挥调节作用^[7]。

PIAS2 包括 PIASx α 、PIASx β 和 PIAS-NY 3 个成员^[1]。序列分析发现, PIAS-NY 是 PIASx 的一个新的不同剪接体^[7]。PIAS-NY mRNA 在成人睾丸中高表达, 在胚胎睾丸中低表达, 而且成人睾丸中的表达水平是胚胎期的 14 倍; PIAS-NY mRNA 特异表达于人睾丸及胰腺中, 而在其他器官中未见表达^[6]。提示 PIAS-NY 主要在精子发生过程中发挥重要作用。

PIAS-NY 作为一种新发现的睾丸特异表达基因, 同其他家族成员一样, 具有典型的 N 端的 SAP 结构域、PINIT 氨基酸基序及 RLD 结构域。目前, PIAS-NY 相关研究非常少, 为了阐述其在精子发生过程中具体作用机制, 本研究构建 PIAS-NY 原核表达质粒, 通过诱导大肠杆菌 BL21 (DE3) 表达融合蛋白, 纯化后获得高纯度的可溶性原核表达蛋白, 多次免疫 BalB/C 小鼠并制备 PIAS-NY 多克隆抗体。本研究获得 PIAS-NY 全长开放阅读框, 包含 PIAS-NY 全部结构域, 有利于全面开展作用蛋白的深入研究。

1 材料与方法

1.1 材料

LA-Taq DNA 聚合酶购自日本 TaKaRa 公司, 小剂量质粒抽提试剂盒和琼脂糖凝胶切胶纯化试剂盒购于北京 BioTeke 公司, T4 连接酶及质粒 pET30a 购自美国 Promega 公司, 限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, Freund 完全佐剂和不完全佐剂购自美国 Sigma 公司, His-Binding-Resin 购自上海悦克生物科技有限公司, 透析袋购自美国 Solarbio 公司, 改良 Eagle 培养基 (Dulbecco's modification of Eagle's medium Dulbecco, DMEM) 购自美国 Hyclone 公司, 新生胎牛血清购自美国 Gibco 公司, 兔抗鼠 RUVBL2 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 和辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥有限公司, RIPA 裂解液购自武汉博士德生物公司, 免疫共沉淀试剂盒购自瑞士 Roche 公司, 超敏化学发光 (Enhanced Chemiluminescence, ECL) 试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。人精原 cDNA 文库、GC2 细胞和 293T 细胞均由扬州大学郑英教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的获得 PIAS-NY 扩增引物根据 Gen Bank 基因序列, 用 Primer 5.0 软件设计, PIAS-NY 基因正向引物 5'-GGGGAATTCGGATGCGGATTTCC AAGAGTTG-3' (划线部分为 *EcoR* I 酶切位点), 反向引物 5'-GGGCTCGAGTTACCCATCTAATATTAGACTTTTC-3' (划线部分为 *Xho* I 酶切位点)。50 μ l PCR 反应体系: 10 \times LA Tap Buffer 5 μ l, dNTP (10 mmol/L) 1 μ l, Primer F 2 μ l, Primer R 2 μ l, 模板 2 μ l, 高保真 Taq 酶 0.5 μ l, H₂O 37.5 μ l, 反应条件: 95°C 预热 5 min, 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 60 s, 72°C 延伸 90 s,

35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 恒温 16 h。1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 45 min, 割胶回收 PIAS-NY 片段, 大小为 1 275 bp。

1.2.2 PIAS-NY-pET30a 原核蛋白的诱导表达 将 0.5 μ l PIAS-NY-pET30a 质粒 DNA 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中, 37℃ LB/Kan+ 固体平板上培养过夜。次日, 挑选单克隆菌落于 10 ml LB 液体 /Kan+, 225 r/min, 37℃, 过夜。用过夜菌液将 250 ml LB 液体 /Kan+OD 调至 0.3 左右, 225 r/min, 37℃ 3 h, 测得光密度 (optical density, OD) 值为 0.5 左右, 取出 1 ml 菌液作为空白对照, 剩余菌液中加入终浓度 1 mmol/L 异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷 (isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG), 两者同时 225 r/min, 37℃ 4 h, 分别取出 10 μ l 菌液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), 确定 BL21 菌株是否表达融合蛋白。阳性菌液 3 500 r/min, 4℃ 20 min, 去除上清液, 置入 -20℃ 冰箱冷冻保存。向沉淀中加入 15 ml Binding Buffer A [20 mmol/L Tris-Cl (pH 7.9), 0.5 mol/L NaCl, 10% 甘油] 重悬, 冰上间断超声裂解菌体 (功率 25%、超声 5 s、间歇 5 s, 总工作时间 600 s), 3 500 r/min、4℃、10 min, 分别收集上清液和沉淀, 向沉淀中加入 15 ml Binding Buffer B (破菌缓冲液 B: 破菌缓冲液 A 加入 8 mol/L 尿素), 继续超声悬浮液 (功率 25%、超声 5 s、间歇 5 s, 总工作时间 600 s), 3 500 r/min、4℃、10 min, 分别收集蛋白上清液和沉淀。SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色, 确定 PIAS-NY-pET30a 原核表达融合蛋白以哪种形式存在于大肠杆菌中。

1.2.3 透析袋预处理 将透析管裁剪成 30 cm 小段, 将 2% (m/V) 碳酸氢钠和 1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) (pH=8.0) 溶液煮沸, 透析袋浸泡其中煮沸 10 min; 用蒸馏水彻底漂洗; 1 mmol/L EDTA (pH=8.0) 溶液煮沸, 透析袋浸泡煮沸 10 min; 室温冷却, 蒸馏水彻底漂洗, 4℃ 蒸馏水完全浸泡保存。整个过程全部带手套操作, 使用前必须仔细检查, 不漏方可使用。

1.2.4 融合蛋白纯化及复性 用 His-Binding-Resin 对收集融合蛋白进行纯化, 以下整个过程均在 4℃ 完成。安装好 His-Ni 柱, 先用 10 ml Binding Buffer B 平衡去除穿透液体。将 3 ml 融合蛋白上清液加入纯化柱中, 收集穿透液, 以观察吸附效果。加入蛋白样品,

滴完后用 2.5 ml Binding Buffer B 洗柱 1 遍, 尽量去除非特异性吸附的杂蛋白。依次用 2 ml Eluting buffer 洗脱 (破菌缓冲液 B 中加入不同终浓度咪唑, 浓度依次为 5、25、50、100 及 200 mmol/L), 控制滴速 2 ~ 3 ml/h, 分段收集洗脱液。用 5 ml Binding Buffer B 过柱, 将上述收集的咪唑洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳鉴定。发现 100 和 200 mmol/L 洗脱液中含有较高浓度目的蛋白, 将 100 和 200 mmol/L 洗脱液混合液装入激活的透析袋中, 4℃ 依次经过 7、6、5、4、3 及 2 mol/L 尿素缓冲液进行透析复性, 各梯度浓度分别复性 24 h, 最后收集蛋白液体。用 Bradford 法测定蛋白浓度。以 200 μ l/ 管进行蛋白分装, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。

1.2.5 免疫小鼠制备抗体 用苦味酸对 20 只 20 g BalB/C 小鼠进行随机标记, 从 1 连续到 20, 随机挑选出 3 只作为阴性对照。取 2 管蛋白液体融化, 分别加入等体积的 Freund 完全佐剂充分混合乳化后, 按照 100 μ g/ 只蛋白剂量进行 BalB/C 小鼠腹腔注射, 对照组注射等体积 1 \times PBS 缓冲液和 Freund 完全佐剂。2 周后, 取 2 管蛋白液体加等体积 Freund 不完全佐剂充分混合, 按 100 μ g/ 只小鼠 BalB/C 小鼠腹腔注射。每隔 2 周加强 1 次, 共 4 次。2 个月后, 将免疫好的小鼠眼球取血, 收集血清。分装后作好标记, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。

1.2.6 酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 抗血清滴度 将纯化 PIAS-NY 蛋白用包被液稀释至所需浓度 5 μ g/ml, 96 孔板中每孔加入 100 μ l, 将 96 孔板放入湿盒, 4℃ 过夜; 次日, 去除包被液, 用 PBS-T 洗涤 3 次, 5 min/ 次; 加入含 0.1% 脱脂奶粉 PBS-T, 每孔 150 μ l, 37℃ 封闭 1 h; 去除封闭液, PBS-T 洗涤 3 次, 5 min/ 次; 按比例稀释 PIAS-NY 抗血清 (1 : 100、1 : 1 000、1 : 104、1 : 105 及 1 : 106), 每孔加入 100 μ l, 同时以 BalB/C 小鼠血清为阴性对照, 37℃ 孵育 70 min; PBS-T 洗涤 3 次, 5 min/ 次; 二抗孵育: 山羊抗小鼠 IgG (1 : 1 000 倍稀释于 PBS-T), 每孔加入 100 μ l, 37℃ 孵育 60 min, PBS-T 洗涤 3 次, 5 min/ 次, 加显色液 100 μ l, 室温避光保存 10 min, 加入 2 滴终止液, 终止反应, 酶标仪读数 (A490)。

1.2.7 免疫共沉淀 293T 细胞铺 6 孔板, 4℃ 预冷 PBS 轻轻洗涤细胞表面 3 次, 每孔加入 Roche 免疫共沉淀试剂盒中的 lysis buffer 180 μ l, 冰上 5 ~ 10 min, 用刮棒将每孔内细胞裂解物刮干净, 吸出于一 EP 管

中, 冰上 30 min (每 5 min 上下颠倒混匀 1 次)。4℃ 13 000 r/min 15 min。将上清吸至另一 EP 管中, 置于冰上。取出 60 μ l 上清液, 剩余蛋白液体平均分为 2 份, 每份分别加入鼠 IgG 和 PIAS-NY 抗血清各 8 μ l (或者兔 IgG 和 RUVBL2 单克隆抗体各 8 μ l)。4℃ 冰箱, 滚筒上 2 h。取 80 μ l protein G 小珠子于一 EP 管中, 10 000 r/min 20 s 弃上清液, 加 500 μ l lysis buffer 1, 混匀, 10 000 r/min, 弃上清液。2 h 后将 2 份蛋白上清分别加入含小珠子的 EP 管中, 混匀。4℃ 滚筒上过夜。次日, 上下翻转, 4℃ 10 000 r/min 20 s, 弃上清。每管中加入 500 μ l lysis buffer 1 洗涤珠子, 上下翻转, 4℃ 10 000 r/min 10 s, 弃上清液。1 ml 的 wash buffer 2 洗涤珠子, 上下翻转, 4℃ 10 000 r/min 10 s, 弃上清液。1 ml 的 wash buffer 3 洗涤珠子, 上下翻转, 4℃ 10 000 r/min 10 s 弃上清液。加 35 μ l 的 1 \times loading buffer, 混匀, 煮沸 5 min, 上下翻转, 4℃ 10 000 r/min 5 min 收集上清液, 即为兴趣蛋白-目的蛋白混合物。SDS-PAGE 电泳后分别用兔源 RUVBL2 抗体免疫印迹检测。

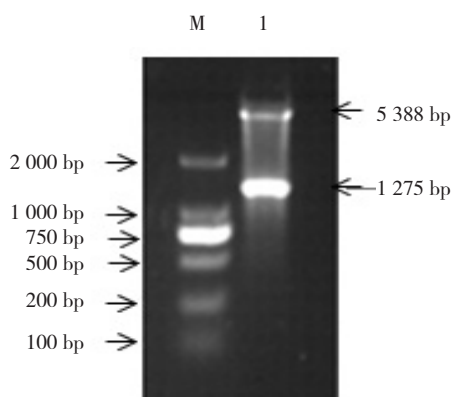
2 结果

2.1 PIAS-NY-pET30a 质粒的构建与鉴定结果

1.5% 琼脂糖凝胶电泳得到 5 388 和 1 275 bp 片段 (见图 1)。测序结果中插入片段序列与 PIAS-NY 基因开放阅读框序列完全一致, 因此原核表达载体 PIAS-NY-pET30a 已构建成功。

2.2 PIAS-NY 原核表达情况

与诱导前菌液和对照组比较, 诱导后大肠杆菌中均存在一分子量约为 43 kD 且表达量相当高的蛋白条带。与融合蛋白 His-PIAS-NY 45 kD 大小十分接近, 而且仅存在 2 个 IPTG 诱导实验组中。因此提示



M: DL 2 000 DNA Marker; 1: *EcoRI* 与 *XhoI* 双酶切产物

图 1 PIAS-NY-pET30a 重组质粒电泳图

PIAS-NY 原核表达成功。见图 2。

2.3 His-PIAS-NY-His 蛋白的纯化及复性

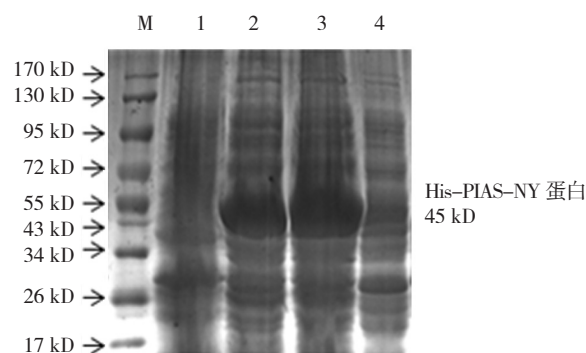
His-PIAS-NY-His 融合蛋白主要存在于沉淀中, 即以包涵体形式存在于大肠杆菌 BL21 中。100 mmol/L 咪唑洗脱液和 200 mmol/L 咪唑洗液脱液中含高纯度蛋白。见图 3。

2.4 Western blot 检测结果

与对照组相比所得抗体效价均达到 1 : 100 000。PIAS-NY 抗血清能够特异性识别 GC2 细胞和 293T 细胞中的 PIAS-NY 蛋白。见图 4。

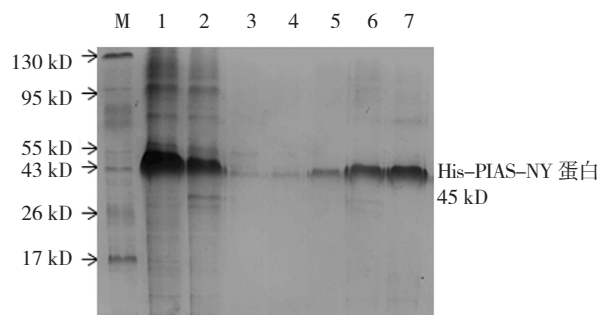
2.5 免疫共沉淀检测情况

293T 细胞总蛋白中 PIAS-NY 抗血清沉淀出的复合物中存在 RUVBL2 蛋白, 而且与 293T 细胞中的 RUVBL2 蛋白大小一致, 然而 BalB/C 小鼠血清沉淀复合物中并未发现 RUVBL2 蛋白。结果显示制备的多克隆抗体在分子水平对蛋白具有特异识别作用。见图 5。



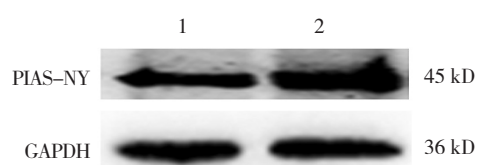
M: 预染 Marker; 1: 诱导前的菌液; 2: 0.5 mmol/L IPTG 诱导; 3: 1 mmol/L IPTG 诱导; 4: 与 2、3 实验组对照

图 2 诱导前后菌液 SDS-PAGE 电泳图



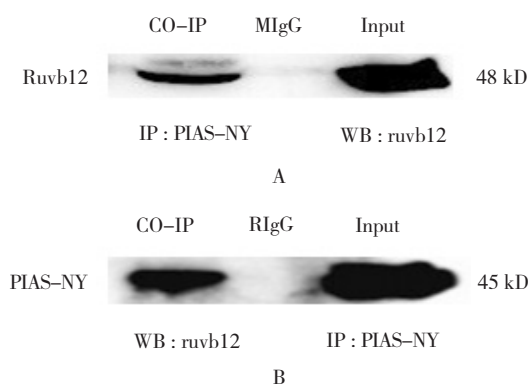
M: 预染蛋白 Marker; 1: 纯化前 8 mol/L 尿素溶解沉淀; 2: 穿透液; 3: 5 mmol/L 咪唑洗脱液; 4: 25 mmol/L 咪唑洗脱液; 5: 50 mmol/L 咪唑洗脱液; 6: 100 mmol/L 咪唑洗脱液; 7: 200 mmol/L 咪唑洗脱液

图 3 His-PIAS-NY 纯化 SDS-PAGE 电泳图



1: GC2 细胞总蛋白; 2: 293T 细胞总蛋白

图 4 PIAS-NY 多克隆抗体特异性



MIgG: BalB/C 小鼠血清; RIgG: 兔血清; Input: 293T 细胞总蛋白

图 5 PIAS-NY 多克隆抗体特异性

3 讨论

抗体的制备技术经历很长时间的发展。包括多克隆抗体阶段、单克隆抗体阶段和基因工程抗体阶段^[8]。目前实验过程中使用的抗体多为市场化的单克隆抗体,但对一些效果不太理想或者市场上没有的蛋白质抗体,实验室制备多克隆抗体满足一些实验需求。

PIAS 蛋白家族最初是作为激活 STAT 转录活性的抑制蛋白被发现的^[9]。最近研究发现,PIAS 蛋白可以与 60 多种蛋白作用参与多种细胞活动^[10],涉及到胚胎发育、造血干细胞自我更新^[11]、先天性和后天适应性免疫反应^[12]、空间学习和长期记忆等多个方面^[13]。PIAS-NY 基因是 2004 年新发现,相关报道非常少。之前的研究主要集中在细胞 mRNA 水平,而蛋白水平未见报道。因此,制备抗体是继续深入开展蛋白水平研究的基础。本实验用到的全部分子生物学技术是研究生阶段时郑英教授课题组实验室的固有技术,现均已成熟掌握。原核蛋白表达、提取、纯化和复性等一系列美国国立卫生研究院的实验原理和方法能深刻理解和能成熟运用,之前所在实验室也已成功制备出人 NYD-SP28 多克隆抗体^[14]和 Setd8 多克隆抗体^[15]。

基于前期的工作,笔者制备 PIAS-NY 多克隆抗体。诱导的融合蛋白中包括了蛋白 PIAS-NY 全部氨基酸序

列,并且氨基端和羧基端均存在 His 标签,大大提高融合蛋白和 Ni 柱的亲水性,咪唑洗脱后获得高浓度可溶性融合蛋白。经过浓度梯度尿素稀释复性后,笔者获得具有一定空间构像的 PIAS-NY 免疫原。纯化蛋白经过充分乳化后,6 次腹腔注射 BalB/C 小鼠。虽然 BalB/C 小鼠广泛用于免疫学、生理学的动物实验,但由于小鼠本身存在免疫缺陷,因此在免疫过程中仍应注意小鼠的健康状态。实验组共 17 只小鼠,最终只有 13 只小鼠存活,眼球取血。

ELISA 检测所有存活小鼠的血清效价均在 1 : 100 000 以上;Western blot 也证实抗血清能够特异性识别 293T 细胞和 GC2 细胞的 PIAS-NY 蛋白;免疫共沉淀实验结果也说明抗血清能够识别并结合自然状态下 PIAS-NY 蛋白,同时也提示真核哺乳细胞中 PIAS-NY 与 RUVBL2 存在相互作用。而 RUVBL2 是进化上高度保守的 AAA+ 家族的成员之一,在睾丸中高表达,具有 ATP 酶活性,与同源蛋白 RUVBL1 形成多聚物参与到不同的细胞活动中^[16-17],如有丝分裂纺锤体的组装^[18-20]、端粒酶的形成^[21]、染色体重塑等^[22-25],但是具体的分子机制并不清楚。通过质谱对睾丸 RNA 结合蛋白组学进行了分析,包括 17 种蛋白质,在圆形精细胞中表达量均比长形精子中高 3 倍,而 RUVBL2 是其中之一^[26]。这也提示 PIAS-NY 和 RUVBL2 在精子发生中共同发挥重要作用。

综上所述,实验过程中已成功制备出 PIAS-NY 多克隆抗体,为下一步进行蛋白的功能和机制研究打下了一定的基础。

参考文献:

- [1] 郑英,贾筱琴,张露萍,等.应用酵母双杂交系统筛选小鼠相互作用蛋白[J].中华男科学杂志,2011,17(9):775-780.
- [2] RODRÍGUEZ-MAGADÁN H, RAMÍREZ L, SCHNABEL D, et al. Sexually dimorphic gene expression of the Zimp7 and Zimp10 genes in embryonic gonads[J]. AM J Hum Genet, 2010, 10(1): 16-23.
- [3] KIMMINS S, KOTAJA N, DAVIDSON I, et al. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation[J]. Reproduction, 2004, 128(1): 5-12.
- [4] ANDREA RABELLINO, CRISTINA ANDREANI, et al. The role of PIAS SUMO E3-ligases in cancer[J]. Cancer Res, 2017, 77(7): 1542-1547.
- [5] PALVIMO J J. PIAS proteins as regulators of small ubiquitin-related modifier (SUMO) modifications and transcription[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(6): 1405-1408.
- [6] YAN W, SANTTI H, JANNE O A, et al. Expression of the E3

- SUMO-1 ligases PIASx and PIAS1 during spermatogenesis in the rat[J]. *Gene Expr Patterns*, 2003, 3(3): 301-308.
- [7] ZHENG Y, ZHOU Z M, YIN L L, et al. Molecular cloning and characterization of a novel splicing variant of PIASx[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, 25(8): 1058-1064.
- [8] 曲艺, 李志勇, 缪朝玉. 抗体的发展过程及临床应用[J]. *药学实践杂志*, 2017, 35(4): 301-305.
- [9] SHARROCKS A D. PIAS proteins and transcriptional regulation—more than just SUMO E3 ligases[J]. *Gene Dev*, 2006, 20(7): 754-758.
- [10] RYTINKI M M, KAIKKONEN S, PEHKONEN P, et al. PIAS proteins: pleiotropic interactors associated with SUMO[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(18): 3029-3041.
- [11] LIU B, YEE K M, TAHK S, et al. PIAS1 SUMO ligase regulates the self-renewal and differentiation of hematopoietic stem cells[J]. *EMBO J*, 2014, 33(2): 101-113.
- [12] LIU B, TAHK S, YEE K M, et al. The ligase PIAS1 restricts natural regulatory T cell differentiation by epigenetic repression[J]. *Science*, 2010, 330(6003): 521-525.
- [13] CONSTANZO J D, DENG M, RINDHE S, et al. Pias1 is essential for erythroid and vascular development in the mouse embryo[J]. *Dev Biol*, 2016, 415(1): 98-110.
- [14] 郑英, 盛树东, 孙红亚, 等. 人 NYD-SP28 基因原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2012, 28(6): 626-628.
- [15] 马海涛, 郭佳倩, 夏静, 等. 兔抗小鼠含结构域赖氨酸甲基转移酶多克隆抗体制备和应用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2017, 33(2): 246-251.
- [16] JHA S, DUTTA A. RVB1/RVB2: running rings around molecular biology[J]. *Mol Cell*, 2009, 34(5): 521-533.
- [17] NANO N, HOURY W A. Chaperone-like activity of the AAA+proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2013, 368(1617): 20110399-02110408.
- [18] GARTNER W, ROSSBACHER J, ZIERHUT B, et al. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis[J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 2003, 56(2): 79-93.
- [19] SIGALA B, EDWARDS M, PURI T, et al. Relocalization of human chromatin remodeling cofactor TIP48 in mitosis[J]. *Exp Cell Res*, 2005, 310(2): 357-369.
- [20] DUCAT D, KAWAGUCHI S, LIU H, et al. Regulation of microtubule assembly and organization in mitosis by the AAA+ATPase Pontin[J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(7): 3097-3110.
- [21] VENTEICHER A S, MENG Z, MASON P J, et al. Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly[J]. *Cell*, 2008, 132(6): 945-957.
- [22] SHEN X, MIZUGUCHI G, HAMICHE A, et al. A chromatin remodelling complex involved in transcription and DNA processing[J]. *Nature*, 2000, 406(6795): 541-544.
- [23] JIN J, CAI Y, YAO T, et al. A mammalian chromatin remodeling complex with similarities to the yeast INO80 complex[J]. *Biol Chem*, 2005, 280(50): 41207-41212.
- [24] BAKSHI R, MEHTA A K, SHARMA R, et al. Characterization of a human SWI2/SNF2 like protein hINO80: demonstration of catalytic and DNA binding activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(1): 313-320.
- [25] CHOI J, HEO K, AN W, et al. Cooperative action of TIP48 and TIP49 in H2A.Z exchange catalyzed by acetylation of nucleosomal H2A[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(18): 5993-6007.
- [26] CHAPMAN K M, POWELL H M, CHAUDHARY J, et al. Linking spermatid ribonucleic acid (RNA) binding protein and retrogene diversity to reproductive success[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2013, 12(11): 3221-3236.

(王荣兵 编辑)