

果蝇心脏发育标记基因 *Lbe* 抗体的制备与应用

赵梦婧, 覃彬, 陈宇, 吴秀山, 江志钢*, 万永奇*

(湖南师范大学生命科学学院心脏发育研究中心, 长沙 410081)

摘要: 黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 的心脏发育调控基因与人类的相关基因具有高度同源性。*Lbe* 基因是果蝇心脏发育的重要调控基因。为了深入研究 *Lbe* 基因在心脏发育中的调控功能, 采用 DNA 免疫技术制备了抗果蝇 *Lbe* 蛋白的多克隆抗体。通过 PCR 扩增 *Lbe* 基因序列, 将该序列与真核表达载体 pCAGGS-P7 同源重组, 以该同源重组载体免疫 4 周龄小鼠, 获得含有抗 *Lbe* 多克隆抗体的血清。蛋白质印迹 (Western blot) 和胚胎抗体染色结果表明, 该抗体的特异性较好。该抗体为随后的 *Lbe* 功能的研究奠定了基础。

关键词: 果蝇; 心脏发育; *Lbe*; DNA 免疫; 多克隆抗体

中图分类号: Q78

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1007-7146.2021.04.006

Preparation and Application of the Antibody for *Drosophila* Heart Development Marker Gene *Lbe*

ZHAO Mengjing, QIN Bin, CHEN Yu, WU Xiushan, JIANG Zhigang*, WAN Yongqi*

(The Center for Heart Development, the College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The heart development genes of *Drosophila melanogaster* are highly conserved with human heart development genes. *Lbe* (*Ladybird early*) is one of the important genes involved in *Drosophila* heart development. In order to further understand the regulatory role of *Lbe* gene in heart development, the anti-*Lbe* antibody is prepared with DNA immunization technique. The *Lbe* coding sequence was amplified with PCR, and then it was homologously recombined with the eukaryotic expression vector pCAGGS-P7. This homologous recombinant vector was used as antigen to immunize four weeks old mice to obtain the serum containing anti-*Lbe* polyclonal antibody. Western blot and embryo antibody staining results showed that the specificity of the antibody was good. The antibody provides a foundation for the subsequent study of function of *Lbe*.

Key words: *Drosophila*; heart development; *Ladybird early*; DNA immunization; polyclonal antibody

(*Acta Laser Biology Sinica*, 2021, 30(4): 333-338)

黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 是一种应用广泛的模式生物, 拥有许多独特的优点, 如体型小、便于饲养管理、繁殖力强、性状易于观察等^[1]。果蝇的大多数发育相关基因与人类基因高度保守, 近年来其在人类发育与疾病研究领域也发挥着重要作用^[2]。数据表明, 预计到 2030 年, 全球死于心血

管疾病的人数将达到 2 300 万, 占据非传染性疾病致死人数的 44%, 是死于癌症人数的 2 倍^[3-4]。而果蝇心脏发育过程与人类的心脏发育过程高度相似, 研究果蝇心脏发育的调控机制将能为人类心脏疾病的治疗提供重要的线索^[5-7]。

Lbe 基因是果蝇同源框基因的成员之一, 也是

收稿日期: 2021-02-02; 修回日期: 2021-04-05。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81700338, 81470449, 81670290), 湖南省教育厅优秀青年项目 (19B342)。

作者简介: 赵梦婧, 硕士研究生。

* 通信作者: 江志钢, 高级实验师, 主要从事心脏发育研究, E-mail: 270212729@qq.com; 万永奇, 副教授, 主要从事果蝇发育遗传学相关研究, E-mail: 954906876@qq.com。

果蝇心脏发育的重要标记基因。它参与了果蝇的心源性途径,并在果蝇胚胎早期的成心细胞和心脏前体细胞中均有表达,与中胚层 *Tinman* 基因、*Wg* 基因和神经基因等共同调控果蝇的心脏发育^[8-10]。有研究表明,特异性干扰 *Lbe* 将会扰乱心脏中胚层内特定细胞类型的基因表达空间模式,从而导致心脏祖细胞分化与定位紊乱,如 *Lbe* 过表达将导致心脏前体细胞的异常增多,而 *Lbe* 基因失活将导致心脏循环异常等^[10-13]。这表明 *Lbe* 的调控对于心脏的正常发育过程是必不可少的。因此,制备针对 *Lbe* 的抗体可以更清楚地了解该基因的表达状况,为研究其在心脏发育过程中的具体功能奠定基础。

DNA 免疫是利用基因重组技术将目的基因与合适的表达载体相连作为抗原,直接免疫机体以表达相应抗体的新技术^[14]。与传统的抗体制备方法相比,DNA 免疫具有许多优势^[15-16],如 DNA 免疫不需要在体外合成蛋白质作为抗原,体内表达的蛋白质可以最大程度地维持天然构象和翻译后修饰形成的独特结构,从而有助于针对天然构象抗原的高亲和力抗体的产生。基于以上优点,本文选择通过 DNA 免疫来制备 *Lbe* 抗体。

1 材料与方法

1.1 试验试剂及材料

试验所用的大肠杆菌菌株 DH5 α 由本实验室保种;哺乳动物表达载体 pCAGGS-P7 由本实验室提供;限制性内切酶 *Kpn* I、*Xho* I 以及 2 \times MIX Taq 酶购买自 sigma 公司;蛋白胨、酵母提取物、氯化钠、丙烯酰胺、通用胚胎固定液、含有 0.5% 牛血清蛋白的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline with 0.5% bovine serum albumin, PBSBT) 购买自生工公司;组织快速裂解液 (radio-immunoprecipitation assay lysis buffer, RIPA) 和蛋白上样缓冲液购买自康为试剂公司;RNA 试剂盒购买自上海飞捷生物技术有限公司;反转录试剂盒购买自 Takara 公司;无内毒质粒提取试剂盒 (离心柱型) 购自康为试剂公司;昆明白小鼠由本动物实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成

在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中找到果蝇的 *Lbe* 基因序列,并找出抗原性最佳的片段,随后利用 Primer5.0 软件设计产物长度约为

440 bp 的聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物。正义引物: 5' CTATAGGGCGAATTGGG TACCATGCTCTGCCCTCCAACCAT 3' (划线部分是 *Kpn* I 同源臂); 反义引物: 5' ATCGATACCGTTCGACC TCGAGCGCTGCTTCTCCGAGTGACC 3' (划线部分是 *Xho* I 同源臂)。引物由北京擎科生物公司合成。*Lbe* 蛋白的分子量大小约为 51 kD。

1.2.2 基因克隆及载体构建

选取 w1118 野生型果蝇发育后期 (10 h) 胚胎 50 枚,使用 RNA 提取试剂盒提取其 RNA,再进行反转录,构建 cDNA 文库;随后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,设计梯度为 53、56、59、62 及 65 $^{\circ}$ C 的退火温度,得到扩增长度为 440 bp 的片段。经纯化后将片段与哺乳动物载体 pCAGGS-P7 连接并转化至 DH5 α 大肠杆菌中,挑取单克隆进行菌液扩大培养和测序分析。

1.2.3 重组质粒的提取

将测序正确的单克隆扩大培养后,用无内毒素质粒试剂盒进行质粒提取。质粒提取后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.4 多克隆抗体的制备

将重组质粒 pCAGGS-P7-*Lbe* 免疫 4 周龄小鼠。分别对体型相似、性别一致的 3 只小鼠其后肢股四头肌注射质量浓度为 500 ng/ μ L 的重组质粒 DNA 40 μ L,注射完毕后立即在注射部位两侧 5 mm 处用细胞融合转基因仪两端电极电击 3 次,让质粒 DNA 尽快扩散均匀。分别在注射 7、14、21 d 后,按上述方法给这 3 只小鼠注射同种相同剂量质粒 DNA 用于加强免疫。于 35 d 后取血收集血清,将血清分装后加入等体积浓度为 0.05% 的叠氮化钠,于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 多克隆抗体的效价评价

收集的血清用于后续的蛋白质印迹 (Western blot) 试验检测效价。取发育后期 (10 h) 的 w1118 野生型果蝇胚胎 100 枚研磨,加入 RIPA 组织裂解液后静置 10 min,待溶液澄清后加入蛋白上样缓冲液约 100 μ L,上下混匀后煮沸 10 min,即得到蛋白样本。使用前先 12 000 r/min 离心 1 min,取用上清。将 *Lbe* 血清抗体稀释为 1:200、1:500 后,采用 Western blot 试验检测多克隆抗体的特异性。相同条件下,用免疫前的小鼠血清作为对照。在果蝇发育不同时期的试验中,不同发育时间的胚胎均取用 100 枚,幼

虫与成蝇均取用1只。

1.2.6 果蝇胚胎固定

收集胚胎后,用毛笔轻轻扫下胚胎于30%的次氯酸钠溶液中脱壳,约5 min后可在显微镜下观察到胚胎触角消失;此时用逆渗透(reverses osmosis, RO)水冲洗3~4遍,再将胚胎转入到含有胚胎固定液(4 mL 正庚烷、3 mL 通用胚胎固定液、1 mL 甲醛)的带盖玻璃瓶中;震荡30 min后,将下层吸弃,并用RO水清洗2遍,再将胚胎吸入到装有1 mL 甲醛的EP管中。

1.2.7 果蝇胚胎抗体染色

将固定好的胚胎加入到1 mL PBSBT中,摇洗1 min后,除去废液。加入1 mL PBSBT,摇洗10 min,再吸出废液。加入1 mL PBSBT,在室温摇洗1 h,进行封闭。封闭完成后,吸弃液体,加入200 μL PBSBT与1 μL 一抗,室温孵育2 h。回收一抗后,加入PBSBT摇洗30 min,随后按200:1的体积比混合PBSBT与荧光二抗,避光孵育2 h。最后PBSBT摇洗30 min后即可在显微镜下进行观察。

1.2.8 胚胎染色观察与图像处理

果蝇胚胎染色制片后使用蔡司(ZEISS)正置智能显微镜 Axio Imager M2 进行观察拍摄,拍摄所得图片使用Photoshop CS6 软件进行标注编辑。

2 结果与分析

2.1 目的片段的克隆及重组载体鉴定

利用添加同源臂后设计的引物进行PCR。为了找到最适PCR退火温度,本研究设计了53、56、

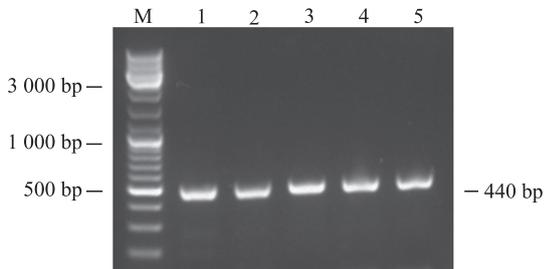


图1 *Lbe* 基因 PCR 扩增的电泳结果

Fig. 1 PCR amplification and electrophoresis result of *Lbe* gene
M: DNA marker; 1: 53 °C 退火温度时 PCR 扩增条带; 2: 56 °C 退火温度时 PCR 扩增条带; 3: 59 °C 退火温度时 PCR 扩增条带; 4: 62 °C 退火温度时 PCR 扩增条带; 5: 65 °C 退火温度时 PCR 扩增条带。

M: DNA Marker; 1: PCR amplification band at 53 °C annealing temperature; 2: PCR amplification band at 56 °C annealing temperature; 3: PCR amplification band at 59 °C annealing temperature; 4: PCR amplification band at 62 °C annealing temperature; 5: PCR amplification band at 65 °C annealing temperature.

59、62 及 65 °C 5 个温度梯度。PCR 结果如图1所示。PCR 扩增条带均一旦位置符合预期,表明目的片段成功扩增。将目的片段纯化后与 pCAGGS-P7 质粒同源重组,构建如图2所示的 pCAGGS-P7-*Lbe* 重组载体。使用 *Kpn* I 和 *Xho* I 对重组质粒进行双酶切,电泳结果显示,所得条带大小分别与载体和目的片段一致(图3)。对单克隆菌液进行扩大培养后测序,序列比对结果表明 pCAGGS-P7-*Lbe* 载体构建成功(图4)。序列比对发现重组载体中有3处点突变,分别位于171、371和431 bp处,但3处突变均为同义突变(CCG-CCA-脯氨酸; GTT-GTC-缬氨酸),不

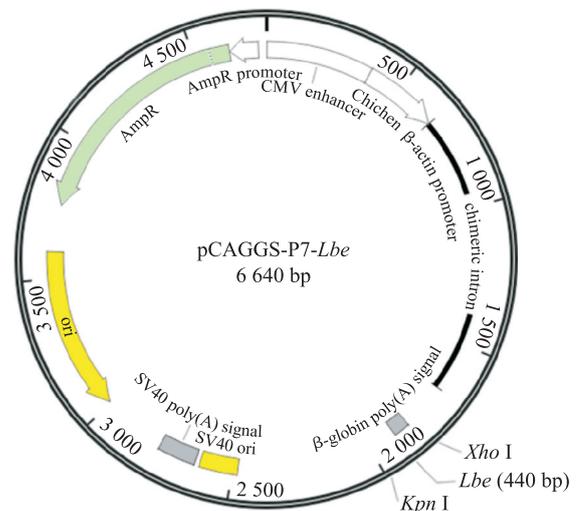


图2 pCAGGS-P7-*Lbe* 质粒的模式图

Fig. 2 Schematic diagram of pCAGGS-P7-*Lbe* recombinant plasmid

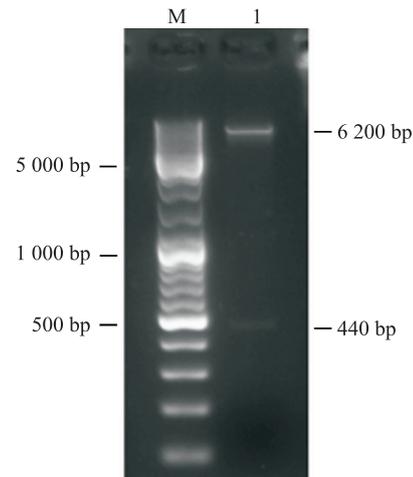


图3 pCAGGS-P7-*Lbe* 重组质粒 *Kpn* I 和 *Xho* I 双酶切的电泳结果

Fig. 3 Double digested with *Kpn* I and *Xho* I and electrophoresis result of pCAGGS-P7-*Lbe* recombinant plasmid

M: DNA Marker; 1: The recombinant plasmid pCAGGS-P7-*Lbe* was double digested with *Kpn* I and *Xho* I.

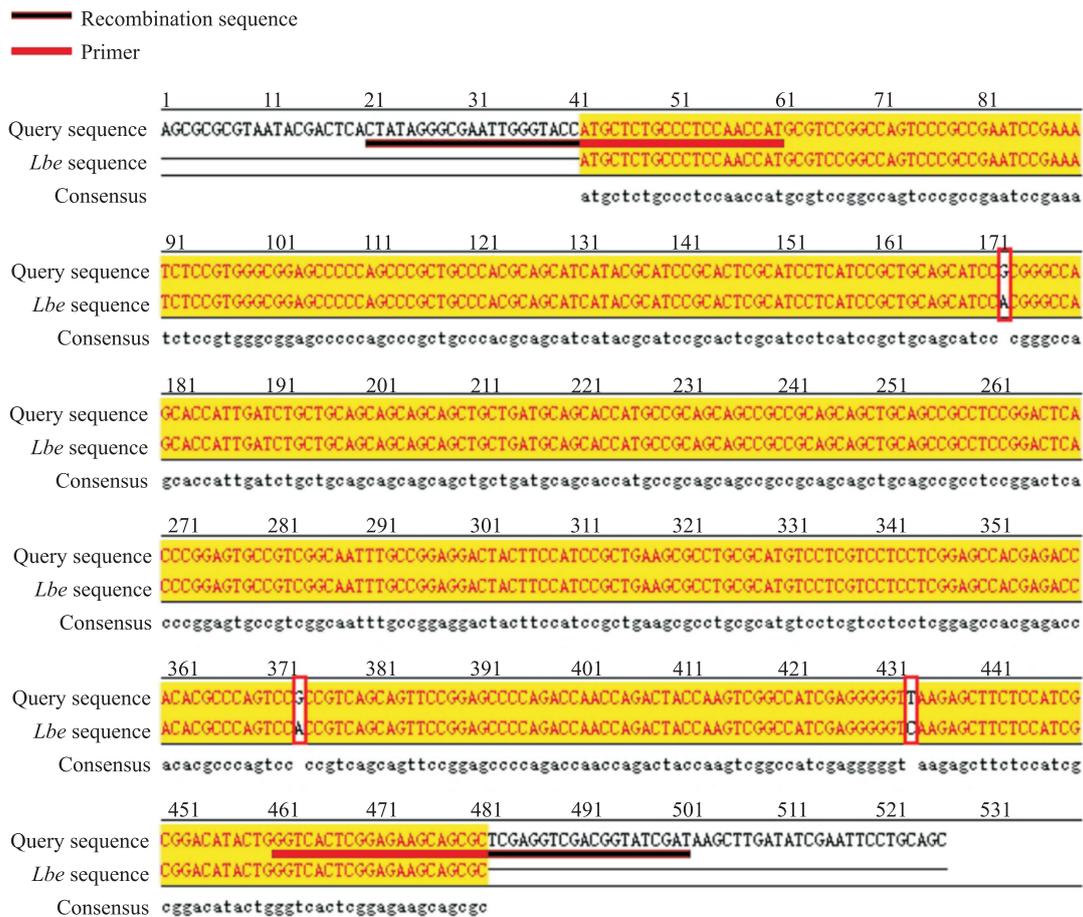


图4 pCAGGS-P7-Lbe 重组质粒测序的比对结果

Fig. 4 Sequencing comparison result of recombinant plasmid pCAGGS-P7-Lbe

红色方框内为3处同义突变 (CCG-CCA-脯氨酸; GTT-GTC-缬氨酸)。

Three synonymous mutations were identified in the red box (CCG-CCA-proline; GTT-GTC-valine).

影响氨基酸序列。

2.2 Lbe 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

将免疫后小鼠血清作为一抗针对野生型果蝇胚胎全蛋白进行 Western blot 试验, 结果显示, 该血清的全蛋白检测中只出现了一条蛋白带 (图 5a), 且大小与预计的 Lbe 蛋白大小接近, 表明该血清的特异性较好, 无交叉反应。随后, 对该血清使用的最佳稀释比例进行摸索, 分别以 1:200、1:500 两种稀释比例进行 Western blot 试验 (图 5b、5c), 结果显示当稀释比例为 1:200 时, 条带清晰且背景干净 (图 5b), 表明 1:200 为该抗血清的适宜稀释比例。所有 Western blot 试验均以 β -actin 作为内参 (图 5d)。

2.3 Lbe 蛋白在果蝇不同发育阶段的表达状况

为了深入了解 Lbe 蛋白在果蝇不同发育阶段的表达情况, 我们利用制备的抗体检测了 w1118 果蝇不同时期的胚胎中 Lbe 蛋白的表达水平。结果显

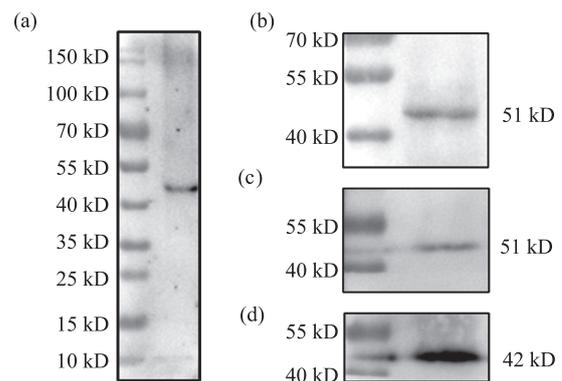


图5 抗 Lbe 血清特异性与适宜稀释比例检测结果

Fig. 5 Specificity and appropriate dilution ratio detection results of anti-Lbe serum

(a) 抗 Lbe 血清的全蛋白检测结果; (b) 血清稀释比例为 1:200 时的 Western blot 结果; (c) 血清稀释比例为 1:500 时的 Western blot 结果; (d) β -actin 抗体稀释比例为 1:1 000 时的 Western blot 结果。

(a) Whole protein detection result of anti-Lbe serum; (b) Western blot result when the dilution ratio of serum is 1:200; (c) Western blot result when the dilution ratio of serum is 1:500; (d) Western blot result when the dilution ratio of anti- β -actin is 1:1 000.

示,在胚胎中, *Lbe* 在 4 h 时开始表达,在 7 h 和 10 h 时表达不断增强,但在 13 h 和 16 h 时表达有所下降(图 6a)。我们认为这可能是由于 *Lbe* 基因在胚胎发育早期发挥了作用,在果蝇胚胎生殖带伸长时期便有表达,随后参与中胚层心脏前体细胞与神经系统的发育,故在此期间表达量不断增加,而在果蝇胚胎中线闭合后表达下降。为了验证上述猜想,我们选择了果蝇发育的 3 个不同时期,即胚胎、幼虫和成虫,检测这 3 个时期 *Lbe* 蛋白的表达水平。结果表明,在胚胎阶段, *Lbe* 蛋白的表达量较高,而在幼虫阶段表达明显减少,在成虫中基本检测不到 *Lbe* 的表达(图 6b)。这与我们的猜想相一致。上述结果提示, *Lbe* 基因在果蝇胚胎早期发育过程中发挥了重要作用,我们制备的抗体能够准确反映 *Lbe* 蛋白的表达水平。

2.4 胚胎抗体染色

为了检测抗体能否用于免疫染色,我们用血清对不同发育时期的果蝇胚胎进行免疫染色,发现在 stage 8 时期, *Lbe* 基因的表达集中在胚胎的肛板处(图 7b)。随着发育的进行,到 stage 10 时期, *Lbe* 基因的表达在胚胎内开始增加,主要集中在胚胎触角段、上下颌节段和唇部等部位,并且在胚胎边缘的神经母细胞中也能检测到 *Lbe* 的表达,肛板处的表达仍然强烈(图 7c)。stage 11 时期, *Lbe* 基因的表达相较上一时期有了明显回缩的趋势,集中在上下颌

节段中。值得注意的是,在位于表皮内侧的成心前体细胞中能检测到较强的 *Lbe* 表达信号(图 7d)。这表明 *Lbe* 基因确实参与了成心前体细胞的发育。而在胚胎发育末期,在节段边界肌形成细胞中与表皮内侧能检测到广泛的 *Lbe* 蛋白阳性信号,并且表达 *Lbe* 蛋白的表皮内侧细胞的宽度也有所增加(图 7e)。在 stage 15 时期,表达 *Lbe* 蛋白的成心前体细胞有向背中line迁移的趋势(图 7f)。这也证明了 *Lbe* 的正确表达与果蝇心管的形成密不可分。上述免疫染色结果中 *Lbe* 阳性信号与其发育规律高度符合,表明我们制备的抗体能够精确检测 *Lbe* 蛋白的表达定位,可用于胚胎抗体染色,且效果良好。

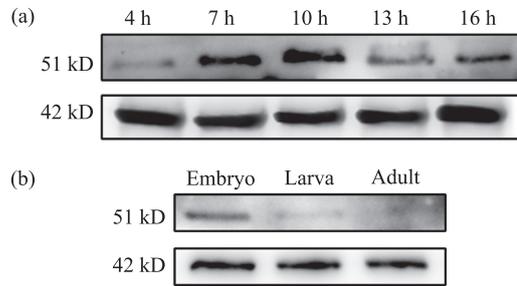


图 6 果蝇不同发育时期的 *Lbe* 蛋白表达情况
Fig. 6 Expression of *Lbe* protein in *Drosophila melanogaster* at different developmental stages

(a) 胚胎发育到 4、7、10、13 和 16 h 时 *Lbe* 的蛋白表达; (b) 果蝇胚胎、幼虫、成虫阶段的 *Lbe* 蛋白表达。
 (a) The expression level of *Lbe* protein in *Drosophila melanogaster* embryo at 4, 7, 10, 13 and 16 h; (b) The expression of *Lbe* protein in *Drosophila melanogaster* embryo, larva and adult stages.

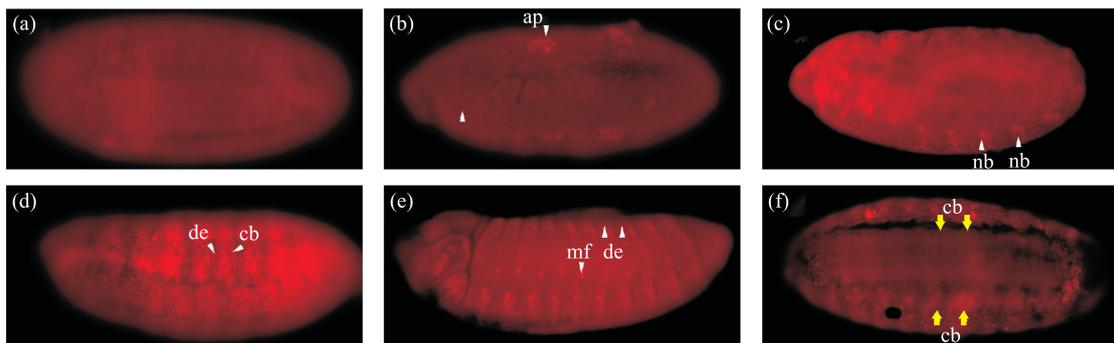


图 7 *Lbe* 多克隆抗体胚胎染色鉴定 (×200)

Fig. 7 Immunofluorescence identification of *Lbe* polyclonal antibody (×200)

(a) 空白血清对照组; (b) stage 8 时期的野生型果蝇胚胎(发育时间为 3 h 30 min); (c) stage 10 时期的野生型果蝇胚胎(发育时间为 4 h 20 min); (d) stage 11 时期的野生型果蝇胚胎(发育时间为 7 h); (e) stage 15 时期的野生型果蝇胚胎(发育时间为 13 h); (f) stage 13 时期的野生型果蝇胚胎(发育时间为 10 h)的背观图。图中的胚胎均按照头部向左,腹部向下的姿势摆放。ap: 肛板; nb: 神经母细胞; de: 表皮内侧; cb: 成心前体细胞; mf: 节段性边界肌形成细胞。黄色箭头所示均为细胞类型和特定细胞区域;白色箭头所示为细胞运动趋势。

(a) Blank serum control group; (b) Wild type *Drosophila* embryos at stage 8 (development time 3 h 30 min); (c) Wild type *Drosophila* embryos at stage 10 (development time 4 h 20 min); (d) Wild type *Drosophila* embryos at stage 11 (development time 7 h); (e) Wild type *Drosophila* embryos at stage 15 (development time 13 h); (f) Wild type *Drosophila* embryos at stage 13 (development time 10 h). All whole-mounts are oriented with the anterior to the left; (f) is the back view. ap: Analplate; nb: Mandibular segment; de: Dorsal epidermis; cb: Cardioblast precursors; mf: Segmental border muscle founder cells. yellow arrow shows cell type and specific cell area; white arrow shows cell movement tendency.

3 讨论

心脏作为身体内最重要的器官之一,从早期发育阶段就担负着全身循环的功能。在脊椎动物和无脊椎动物中,心脏起源于双侧中胚层的原基细胞,并且越来越多的证据表明,心脏谱系的分子控制机制在生物进化过程中是保守的。果蝇虽然在进化上离脊椎动物较远,但它的心管在形态上类似于脊椎动物心脏发育早期的线性管,其心管发育基因的同源物也在脊椎动物心脏发育中发挥重要调控功能。因此,本文选择果蝇为模式生物来研究心脏发育。*Lbe* 基因会在果蝇特定的成心细胞亚群中表达,并在心脏前体的多样化中发挥作用。已有研究表明,当*Lbe* 基因被敲除表达时,果蝇心脏前体细胞的数量会减少,而过度表达*Lbe* 将会导致果蝇表现出心脏结构缺陷,以及心律失常、心脏停搏等症状^[17-18]。*Lbe* 基因在进化上是保守的,在人类和小鼠中已经发现同源基因^[13]。

果蝇与人体的心脏发育基因具有高度保守性,故研究果蝇心脏发育基因是探索人类心脏发育基因的一条有效途径。但由于市面上的果蝇心脏基因抗体难以购得,导致果蝇心脏发育基因研究缺少合适的工具。本文通过DNA免疫技术成功制备了可用于Western blot和胚胎染色的果蝇*Lbe* 基因的抗体。虽然与原核表达载体相比,血清抗体的效价略低,但DNA免疫的独特优点(如可以直接免疫小鼠、方法更加简便、耗时更少等)使其成为快速制备分子量较小的蛋白抗体的有效途径之一^[15-17]。Western blot和免疫染色结果表明,所制备抗体的特异性和敏感性都较好,这为将来运用免疫共沉淀等方法研究*Lbe* 基因调控果蝇心脏发育的分子机制奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] MILNER H, NOWAK S. Improved cardiac contraction imaging in live *Drosophila* embryos [J]. *MethodsX*, 2020, 5(7): 101-130.
- [2] CHENG L, BAONZA A, GRIFONI D. *Drosophila* models of human disease [J]. *Biomed Research International*, 2018, 2018(1): 1-2.
- [3] 《中国心血管健康与疾病报告2019》编写组.《中国心血管健康与疾病报告2019》要点解读 [J]. *中国心血管杂志*, 2020, 25(5): 401-410.
Editorial group of China cardiovascular health and disease report 2019. Interpretation of key points of China cardiovascular health and disease report 2019 [J]. *Chinese Journal of Cardiology*, 2020, 25(5): 401-410.
- [4] WONG C X, BROWN A, LAU D H, *et al.* Epidemiology of sudden cardiac death: global and regional perspectives [J]. *Heart, Lung and Circulation*, 2018, 28(1): 4-6.
- [5] ZHU S, HAN Z, LUO Y, *et al.* Molecular mechanisms of heart failure: insights from *Drosophila* [J]. *Heart Failure Reviews*, 2017, 1(22): 91-97.
- [6] AHMAD S M. Conserved signaling mechanisms in *Drosophila* heart development [J]. *Development Dynamics*, 2017, 246(9): 641-656.
- [7] GÓMEZ I M, RODRÍGUEZ M A, SANTALLA M, *et al.* Inhalation of marijuana affects *Drosophila* heart function [J]. *Biology Open*, 2019, 8(8): bio044081.
- [8] BALAKIREV E S, ANISIMOVA M, AYALA F J, *et al.* Complex interplay of evolutionary forces in the *ladybird* homeobox genes of *Drosophila melanogaster* [J]. *PLoS One*, 2017, 6(7): e22613.
- [9] JAGLA K, BELLARD M, FRASCH M. A cluster of *Drosophila* homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs [J]. *Bioessays*, 2001, 23(2): 125-133.
- [10] HAN Z, FUJIOKA M, SU M, *et al.* Transcriptional integration of competence modulated by mutual repression generates cell-type specificity within the cardiogenic mesoderm [J]. *Developmental Biology*, 2002, 252(2): 225-240.
- [11] LI Q, LIU J, BODMER R. Neuromancer *Tbx20*-related genes (*H15/midline*) promote cell fate specification and morphogenesis of the *Drosophila* heart. [J]. *Developmental Biology*, 2005, 279(2): 509-524.
- [12] ZMOJDZIAN M, JOUSSINEAU S D, PONTE J P D, *et al.* Distinct subsets of Eve-positive pericardial cells stabilise cardiac outflow and contribute to Hox gene-triggered heart morphogenesis in *Drosophila* [J]. *Development*, 2018, 145(2): 7-17.
- [13] JAGLA K, DOLLE P, MATTEI M G, *et al.* Mouse *Lbx1* and human *LBX1* define a novel mammalian homeobox gene family related to the *Drosophila* lady bird genes [J]. *Mechanisms of Development*, 1995; 53(3): 345-356.
- [14] 查浩浩, 胡敏, 李玉玲, 等. 利用DNA免疫技术制备SAX蛋白多克隆抗体 [J]. *激光生物学报*, 2019, 28(4): 368-373.
ZHA Haohao, HU Min, LI Yulin, *et al.* Preparation of polyclonal antibody against SAX protein by DNA immunoassay [J]. *Acta Laser Biology Sinica*, 2019, 28(4): 368-373.
- [15] LIU S, WANG S, LU S. Using DNA immunization to elicit monoclonal antibodies in mice, rabbits, and humans [J]. *Human Gene Therapy*, 2018, 29(9): 997-1003.
- [16] RODRÍGUEZ E G. Nonviral DNA vectors for immunization and therapy: design and methods for their obtention [J]. *Journal of Molecular Medicine*, 2004, 82(8): 500-509.
- [17] JAGLA T, BELLARD F, LUTZ Y, *et al.* Ladybird determines cell fate decisions during diversification of *Drosophila* somatic muscles [J]. *Development*, 1998, 125(8): 3699-3708.
- [18] GRAEVE F D, JAGLA T, DAPONTE J. The ladybird homeobox genes are essential for the specification of a subpopulation of neural cells [J]. *Developmental Biology*, 2004, 270(1): 122-134.