

棉花纤维素生物合成相关蛋白的抗体制备

范建¹, 刘绪¹, 范春芬¹, 黄江锋¹, 罗兵², 彭良才¹, 夏涛^{1*}

(1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室 / 生物质与生物能源研究中心 / 植物科学技术学院 / 生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 常熟理工学院, 江苏常熟 215500)

摘要: 棉花纤维细胞生长过程中, 有多种蛋白质参与纤维素的合成, 为了深入研究这些蛋白质的功能, 制备它们的抗体具有重要意义。本研究分别用化学合成多肽和原核表达蛋白制备的可溶性蛋白、可复性包涵体以及包涵体颗粒作为抗原, 制备了棉花纤维素合酶 CESA1、CESA2 和 SUSY1、 β -1,4-glucanase、 β -1,3-glucanase 和 Callose synthase 的抗体。结果表明, 化学合成多肽和原核表达蛋白均可用于抗体制备, 制得的抗体可用于棉花纤维素合成相关蛋白的检测。

关键词: 棉花; 纤维素合酶; 抗体

中图分类号: S562.035.3 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2012)02-0106-08

Antibody Preparation of Proteins Involved in Cellulose Biosynthesis in Cotton Fibers

FAN Jian¹, LIU Xu¹, FAN Chun-fen¹, HUANG Jiang-feng¹, LUO Bing², PENG Liang-cai¹, XIA Tao^{1*}

(1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and National Centre of Plant Gene Research / Biomass and Bioenergy Research Centre / College of Plant Science and Technology / College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Biology and Food Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China)

Abstract: Cotton fibers are single-celled seeds almost entirely constructed of cellulose, thus serving as model plants for cellulose synthesis. Previous research has reported that CESA1, CESA2, CESA3, SUSY1, β -1,4-glucanase, β -1,3-glucanase, callose synthase and other proteins have very important functions during cellulose synthesis. In order to validate the mechanisms by which these proteins act, antibody preparation is necessary. Here we prepared the CESA2 and CESA3 antigens by chemical synthesis, and the other antigens by prokaryotic expression. The CESA1 antigen is a soluble recombinant protein; the SUSY1 antigen is a recombinant and refolded inclusion body; β -1,4-glucanase, β -1,3-glucanase, and callose synthase antigens are fold inclusion bodies. All the antibodies were detected by Western blotting, and the results suggest that all the antibodies, with the exception of CESA3, can be used to check the target protein. This study finds that the inclusion bodies can be directly used as the antigen for antibody preparation.

Key words: cotton; cellulose synthase; antibody

植物纤维素是由原生质膜上纤维素合酶复合体合成的, 复合体以多种纤维素合酶(Cellulose synthase, CES)为核心, 结合其它各种纤维素合成相关蛋白。目前棉花中已经发现的纤维素合酶有 CESA1、CESA2 和 CESA3, 其中 CESA1 和 CESA2 主要参与棉花纤维次生细胞壁纤维素的合成^[1], CESA3 主要参与初生细胞壁纤维素的合成。蔗糖合酶(Sucrose synthase, SUSY)催化 UDP 与蔗糖反应, 生成果糖和 UDP-葡萄糖(UDP-G),

UDP-G 是纤维素合成的底物, SUSY 的主要功能是将蔗糖转化成 UDP-G, 用于纤维素合成^[2]。 β -1,4-葡聚糖酶(β -1,4-glucanase)基因突变会引起植物纤维素合成量减少, 细胞延伸缓慢, 下胚轴缩短; β -1,4-glucanase mRNA 在棉花纤维细胞次生壁纤维素合成时期表达量显著升高, 可能加速非结晶纤维素的降解, 维持纤维素合成引物固醇糖苷(Sterol glycosidase, SG)的循环利用^[3-4]。 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase)水解胍胍质, 下调 β -1,

收稿日期: 2011-08-05

作者简介: 范建, (1985-), 男, 硕士研究生, fanjian123456@163.com; * 通讯作者: xiatao@mail.hzau.edu.cn

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2010CB134401)

3-glucanase 的表达可以增强植物抗病和抗机械损伤能力^[5];此外,在棉花纤维发育中后期, β -1,3-glucanase 表达量显著升高,此酶可能在棉花纤维成熟期参与将胼胝质转化为纤维素的过程^[6]。胼胝质合酶(Callose synthase)催化 UDP-G 合成胼胝质,胼胝质的合成与纤维素的合成密切相关,胼胝质还参与细胞液的流动、细胞间物质交换与运输和抵御病虫害的侵染^[7-8]。这些蛋白质都与棉花纤维素合成相关,分别制备它们的抗体,有助于深入研究这些蛋白质在棉花纤维素合成中的功能。

目前常用的抗原有化学合成多肽和原核表达的蛋白质。用化学合成多肽作为抗原具有合成时间短、纯度高、抗体特异性强等优点,但是由于抗原表位通常是用软件预测的,抗原区段短且单一,在制备抗体时有可能无法获得特异的抗体,导致抗体制备失败。原核表达的蛋白质作为抗原具有蛋白质合成产量大、抗原表位多、抗体效价高等优点^[9]。原核表达的蛋白质容易形成包涵体,使得后续的抗原纯化工作困难。虽然有些包涵体可以复性成可溶蛋白,然后进行纯化;但是,有些包涵体无法复性,很难进一步纯化获得高纯度的抗原。

本文在制备棉花纤维素合成相关蛋白的抗体时,分别用到了上述几种形式的抗原。CESA2 和 CESA3 用化学合成多肽作为抗原;原核表达的 CESA1 是可溶蛋白;原核表达的 SUSY1 是可复性包涵体;而原核表达的 β -1,4-glucanase、 β -1,3-glucanase 和 Callose synthase 都是不能复性的包涵体。

1 材料和方法

1.1 材料

棉花材料用陆地棉华棉 99,常规大田种植^[10],取开花后(Day past anthesis, DPA)不同天数的棉花纤维,原核表达载体用 pGEX-4T-3(Amersham Biosciences),大肠杆菌分别用 DH5 α 和 JM109 菌株。

1.2 试剂

Easy-Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自 Transgen 公司;KOD-Plus DNA 聚合酶购自 TOYOBO

公司;DNA 回收试剂盒购自北京道普生物科技有限公司;限制性内切酶和连接酶分别从 New England Biolabs 和 TaKaRa 购买;NC 膜为 Pall 公司产品,PVDF 膜为 Millipore 公司产品;蛋白质 Marker 购自 Genscript 公司,预染蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司;L-Glutathione 和 Mops 购自 Biosharp 公司,PMSF 和 GST 树脂购自 Sigma 公司;引物和测序由北京奥科生物公司完成。

1.3 方法

1.3.1 RNA 提取和反转录。用改良的异硫氰酸胍法提取棉花纤维总 RNA^[11]。取 1.0 g 样品加液氮磨碎,转入离心管,加 10 mL 预冷提取液和 100 μ L β -巯基乙醇,混匀后加 1.0 mL 3.0 mol·L⁻¹ 乙酸钠,混匀后加等体积氯仿-异戊醇(24:1),振荡 2 min,置冰浴 10 min;12000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液,加等体积-20 $^{\circ}$ C 预冷的异丙醇,-20 $^{\circ}$ C 静置 30 min;12000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,弃上清液,用 1/3 体积的提取液溶解沉淀,加等体积的酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),振荡 2 min;12000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液,加等体积氯仿-异戊醇(24:1),混匀,冰浴 10 min;12000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清液加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 静置 1 h;12000 \times g,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,弃上清液,沉淀用 75%乙醇洗 3 次,室温干燥,用 200 μ L DEPC 处理过的水溶解;取 10 μ L 检测 RNA 浓度和质量,其余部分放在-80 $^{\circ}$ C 保存。用 Oligo dT 引物,按照 Promega 反转录酶说明书中的方法合成 cDNA。

1.3.2 GhCesAs 基因表达分析。棉花开花至花后 9 d 主要为棉纤维初生细胞壁发育期,至花后 14 d 次生壁发育起始,开花后 19~29 d 为次生壁发育时期。在棉花开花当天进行挂牌并注明日期,花后 9 d,14 d,19 d,24 d 和 29 d 分别取样,并以液氮速冻后于-80 $^{\circ}$ C 保存。通过 primer 5.0 设计不同 CesA 特异性引物(表 3),并以泛素^[12-13](UBQ7)为内参进行其表达模式分析。

1.3.3 抗原区段选择。用 TMHMM 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 分析蛋白质跨膜区;Vector NTI 7.0 软件分析蛋白质序列,选取非跨膜区的特异区段;BepiPred 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>) 软件预测蛋白

质的抗原表位。

1.3.4 表达载体构建。用 cDNA 作模板,PCR 扩增目标区段,回收 PCR 产物,分别双酶切 PCR 产物和表达载体 pGEX-4T-3,用 T4 连接酶连接后转化 DH5 α ,用 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素平板筛选,PCR 鉴定阳性克隆,送北京奥科公司测序。将序列正确的重组质粒转入表达菌株 JM109。

1.3.5 蛋白的表达。挑取单菌落接种于 LB 培养基(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 活化 12 h;以 1:50 比例接种于 LB 培养基(含氨苄青霉素 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 扩大培养,菌液的 OD₆₀₀ 在 0.6~1.0 之间,加入 IPTG 至浓度 0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 3 h;5000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,收集菌体;加入预冷的 PBS(137 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 2.7 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl,10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na₂HPO₄,2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ KH₂PO₄,pH 8.5,1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ PMSF)悬浮菌体,4 $^{\circ}\text{C}$ 超声波破碎 15 min,8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,分别收集上清液和沉淀。

1.3.6 可溶蛋白的纯化。将 GST 树脂装柱,用 10 mL PBS 缓冲液平衡柱子,加入 5~10 mL 样品过柱,用 30 mL PBS 缓冲液洗去杂蛋白,加入 5 mL 洗脱液(含 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 还原型 GST),收集目的蛋白。

1.3.7 包涵体复性与纯化。包涵体复性采用高浓度尿素溶解和梯度稀释缓慢复性的方法。用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的洗涤液(2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris(pH 8.5),0.5% Triton X-100,0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl,10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT)清洗包涵体 30 min,离心后将沉淀溶解于 6.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素溶解液(用 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris,pH 8.5 缓冲液配制),离心后的上清液依次用 4.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、2.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素和 PBS 缓冲液透析,复性后的蛋白质用 GST 柱纯化,步骤同 1.3.5。

1.3.8 包涵体直接纯化。用 6.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素溶液溶解包涵体,离心后上清液转入透析袋中,用 PBS 液透析 4~5 h;每隔 1 h 更换 1 次透析液,将透析袋内液体转到离心管中,8000 \times g 离心 10 min,收集上清液,SDS-PAGE 检测目的蛋白。

1.3.9 蛋白质浓缩和检测。过柱纯化后的蛋白溶液置于透析袋中,在透析袋外表面均匀撒上 PEG 20000,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min,将浓缩后的蛋白质溶液

分装,每管 200 μL 。取 1 管用 Bradford 法测定蛋白质浓度,其余各管冷冻干燥后于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.10 抗体纯化。用 Protein A-Agarose 亲和层析柱纯化兔 IgG。兔血清离心后取上清液 5 mL,加等体积的 2 \times TBS (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 7.4); 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.05% Sodium azide),过 Protein A-Agarose 亲和层析柱,用 20 mL TBS 洗去杂蛋白,加 4.5 mL 洗脱液 (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Glycine-HCl(pH 2.7)),收集目的蛋白,在洗脱液中加入 0.5 mL 中和液 (1.0 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 8.0); 1.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, 0.5% Sodium azide),分装后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.11 凝血酶裂解融合蛋白。分别用水溶解冻干的融合蛋白,在 1 \times PBS 缓冲液中加入凝血酶 22 $^{\circ}\text{C}$ 下酶切 4 h,使 GST 和抗原裂解。

1.3.12 Western-blotting 分析。凝血酶裂解后的样品经 SDS-PAGE 电泳后,将凝胶在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下转膜 12 h;用 5.0% (W/V) 脱脂奶粉封闭 NC 膜 1 h,用 pH 8.0 的 TTBS (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl buffer, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, 0.05% Tween-20) 洗膜 3 次,每次 3 min;加入用 TTBS 配制的一抗(稀释度 1:2000) 孵育 1 h;去除一抗,再用 TTBS 洗膜 3 次,每次 5 min;加入用 TTBS 配制的 HRP 羊抗兔二抗 (1:1000 稀释) 孵育 1 h;TTBS 洗膜 3 次每次 5 min, pH 8.0 TBS (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, 150 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl) 洗膜 1 次,5 min;倒去 TBS 后加入显色液 (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.5), 0.8 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ DAB, 0.4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ NiCl₂, 0.09% H₂O₂), 显色约 3 min, 用水漂洗 NC 膜,干燥保存。

2 结果与分析

2.1 抗原区段选择和引物设计

用 TMHMM 2.0、Vector NTI 7.0 和 BepiPred 1.0 软件分析陆地棉 CESA1 (U58283)、CESA2 (U58284)、CESA3 (AF150630)、SUSY1 (FJ713478.1)、 β -1,4-glucanase (AF511408.1)、 β -1,3-glucanase (Z68154.1) 和 Callose synthase (AF085717.1) 的跨膜结构、同源区段和抗原表位。

CESA1、CESA2、CESA3 和 Callose synthase 都含有多个跨膜区,其中 CESA1、CESA2、CESA3 均含有 8 个跨膜结构域,在 N 端锌指结构与第 1

个跨膜结构域间有一个长约 200 个氨基酸的非跨膜区段,且同源性相对较低^[14-15],本研究选择此区段作为 CESA1、CESA2 和 CESA3 的抗原区段。此外,为避免可能出现的交叉反应,CESA1 抗原区段选在 Gly55-Ser155,而 CESA2 和 CESA3

抗原采用化学合成多肽,分别选在 Phe106-Cys119 和 Arg195-Cys208。其余 4 个蛋白的抗原区段见表 1,预测的抗原表位见表 2。根据选定的抗原区段,用 Primer 5.0 设计构建原核表达载体的引物,结果见表 3。

表 1 抗原
Table 1 Antigens

抗原 Antigen	抗原区段(氨基酸数量) Region of antigen(Amount of amino acid)	融合蛋白 Fusion Protein	抗原类型 Type of antigen
CESA1	Gly55-Ser155(101)	GST	可溶蛋白(solute protein)
CESA2	Phe106-Cys119(14)	KLH	化学合成(chemical synthesis)
CESA3	Arg195-Cys208(14)	KLH	化学合成(chemical synthesis)
SUSY1	Leu21-Lys167(147)	GST	可复性包涵体(refold inclusion bodies)
β -1,4-glucanase	Asn425-Gly575(151)	GST	包涵体(fold inclusion bodies)
β -1,3-glucanase	Ala162-Met312(161)	GST	包涵体(fold inclusion bodies)
callose synthase	Met141-Gln286(146)	GST	包涵体(fold inclusion bodies)

表 2 抗原表位
Table 2 Epitopes of antigens

抗原 Antigen	编号 Number	抗原表位 Epitope of antigen
CESA1	1	DVGIHARHISSVSTL
	2	LDDVEKA
	3	MAAHLNKS
CESA2	1	FQIKNRKDDSHPOH
CESA3	1	RVDGWKMKQEKNV
SUSY1	1	FFEVLKASQEAIVLPPWVALAVRPRPGVWEYIRVNVHALVVEELTVAEYLHFKEELVDG
	2	GILQHHQIILEFE
	3	GNGVEFLNRHL
β -1,4-glucanase	1	RPQPLQYVVNAAFLAALYSDYLDA
	2	NHYPKHVHHRG
	3	PNTLVGAMVAG
β -1,3-glucanase	1	LDPEYQKLLGQVIT
	2	QAPLLVNTYPYFSH
	3	GDPEHVPLDYALFTAPSAVVQDGSLLQYQYLF
callose synthase	1	VFGTLRVLGMVLE
	3	DLIAYNIIPFLDA
	3	ITNAIVSFPEVRAAVSALKHYRSLPKLPSDF

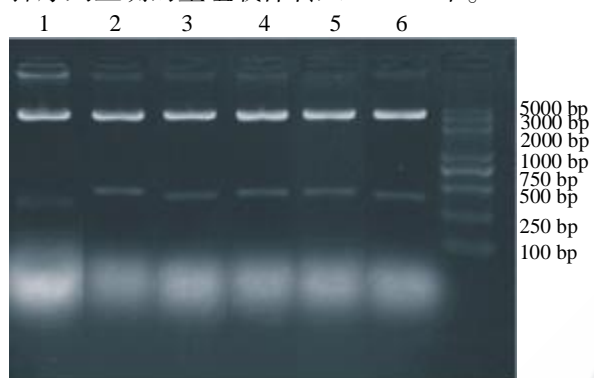
表 3 引物
Table 3 Primers

引物 Primer	序列 Sequence
CESA1-F	5'gaaGGATCCGGTAGTCCATATGATGAAAACCTGTT3'
CESA1-R	5'gaaGTCGACAGCATCCGGTGCCGGTTTATC3'
SUSY1-F	5'cgcGGATCCCTTGCCACAGGAACGAGAT3'
SUSY1-R	5'ccgCTCGAGTTTTGCCGAAAGGTGACGATTTAG3'
β -1,4-glucanase-F	5'gaaGAATTCcAATAGAACAAAAGGAGGTTTGATTGAG3
β -1,4-glucanase-R	5' gaaGTCGACGCCTGCTAGAGTTGGCTCCGT3'
β -1,3-glucanase-F	5'gaaGAATTCcGCTATTGATAAATCATCTTTCCCT3'
β -1,3-glucanase-R	5'gaaGTCGACCATCGCAAACAGGTAAGCTACTA3'
callose synthase-F	5'gaaGAATTCcGCTATTGATAAATCATCTTTCCCT3'
callose synthase-R	5'gaaGTCGACCATCGCAAACAGGTAAGCTACTA3'
CESA1RT-F	5'CCTCAACAAAGGGTACGAAGC3'
CESA1RT-R	5'CAACACTGACCAAAGGACAACA3'
CESA2RT-F	5'GTAGACACCAACTTCACCGTAACA3'
CESA2RT-R	5'GCCACGACTCCGACCATGT3'
UBQ7RT-F	5'GAAGGCATTCCACCTGACCAAC3'
UBQ7RT-R	5'CTTGACCTTCTTCTTCTGTGCTTG3'

化学合成多肽抗原 CESA2 和 CESA3 由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 纯度均大于 85%, 分别与 1-白蛋白(KLH)偶联。

2.2 表达载体构建

用 cDNA 模板扩增抗原区段对应的 DNA 序列, 产物纯化后用 *Bam*HI 和 *Sal*I, 或 *Eco*RI 和 *Sal*I 双酶切, 连接到表达载体 pGEX4T-3 上, 取阳性克隆的质粒, 用双酶切鉴定(图 1), 测序后选择序列正确的重组载体转入 JM109 中。



1: pGEX4T-3-CESA1, 2: pGEX4T-3-SUSY1, 3: pGEX4T-3-β-1,4-glucanase, 4: pGEX4T-3-β-1,3-glucanase, 5: pGEX4T-3-callose synthase.

图 1 载体构建

Fig. 1 Construction of vectors

2.3 蛋白质表达

将表达菌株扩大培养后, 加 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 37°C 下诱导 3 h, 超声波破碎后离心, 分别收集上清液和沉淀, 取 $10 \mu\text{L}$ 用 SDS-PAGE 检测目标蛋白的可溶性。结果表明, CESA1 主要在上清液中, 是可溶蛋白(图 2), 而 SUSY1、β-1,4-glucanase、β-1,3-glucanase 和 Callose synthase 均形成包涵体。经过多次改变诱导条件, 包括采用 18°C 低温诱导和 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 低浓度诱导, 上述 4 种蛋白仍然以包涵体形式存在。

2.4 蛋白质纯化

CESA1 是可溶蛋白, 用超声波破菌后离心, 上清液用 GST 柱纯化, 获得 CESA1。SUSY1 以包涵体形式存在, 经高浓度尿素溶解, 用梯度稀释缓慢复性的方法获得复性蛋白, 然后用 GST 柱纯化得到 SUSY1。β-1,4-glucanase、β-1,3-glucanase 和 Callose synthase 均是包涵体, 在尿素溶解后的逐级复性过程中无法复性, 不能用 GST 柱纯化, 用尿素溶解后透析的上清液蛋白作为抗



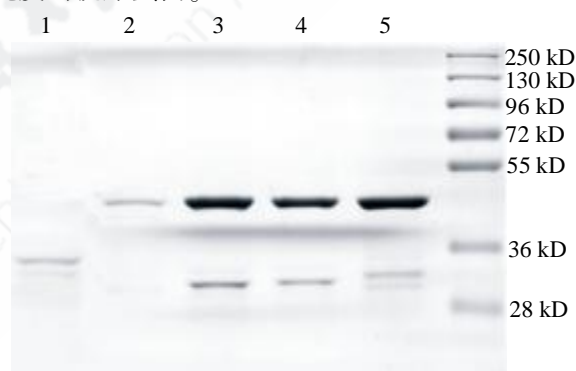
上清液: 1, 3, 5, 7, 9; 沉淀: 2, 4, 6, 8, 10。

Supernatant: 1, 3, 5, 7, 9; Pellet: 2, 4, 6, 8, 10.

图 2 蛋白质的表达

Fig. 2 Expression of proteins

原。对纯化后的抗体通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其纯度(图 3), 结果表明此几种策略均可制备高纯度的抗原蛋白。



1: CESA1, 2: SUSY1, 3: β-1,4-glucanase, 4: β-1,3-glucanase, 5: Callose synthase.

图 3 蛋白质的纯化

Fig. 3 Purification of proteins

2.5 抗体制备

冷冻干燥后的蛋白质送南京金斯瑞生物科技有限公司制备多克隆抗体, 经 4 次免疫后产生的抗体, 用 ELISA 检测, 效价可达到 $1:51.2$ 万。

2.6 抗体检测

分别取 CESA1、SUSY1、β-1,4-glucanase、β-1,3-glucanase 和 Callose synthase 融合蛋白(抗原) 约 $100 \mu\text{g}$, 用凝血酶在 22°C 下酶切 4 h, 使 GST 与特异抗原裂解, 用 Western Blotting 检测裂解前后的蛋白质条带。结果表明, 全部抗体都可分别与目标蛋白产生免疫反应, 且效果较好(图 4)。

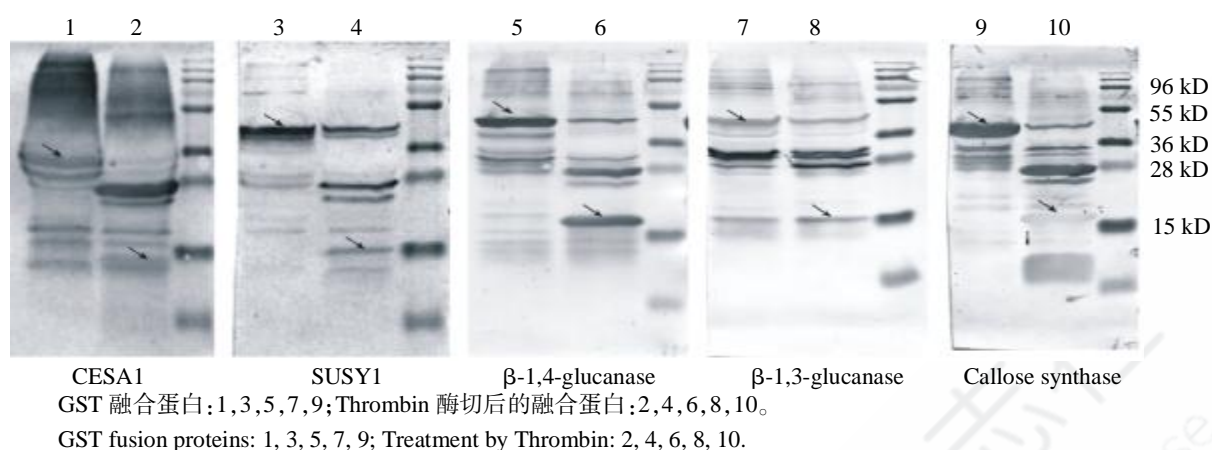


图 4 抗体检测

Fig. 4 Detection of antibodies

用 CESA1、CESA2 和 CESA3 抗体检测棉花 24 DPA 的膜蛋白, 结果发现 CESA1 和 CESA2 条带明显, 与棉花 CESA1 (10.9 kD)、CESA2 (11.8 kD) 蛋白的大小一致, 且特异性高(图 5)。但是, CESA3 抗体无法检测到目标条带, 改用 9, 14 和 19 DPA 的膜蛋白作为样本, 用 CESA3 抗体检测, 仍然无法检测到目的条带。根据文献报道, 棉花的 *CesA3* 基因是初生壁纤维素合成基因, 在棉花开花后 9~24 d 的纤维细胞中均有较大量的表达, 且我们的 RT-PCR 结果也证实该基因在 9-24 DPA 持续表达。因此, 化学合成的 CESA3 抗原制备的抗体, 尽管用 ELISA 检测效价很高, 但是可能不存在针对 CESA3 蛋白 Arg195-Cys208 肽段的抗体, 无法检测到棉花纤维细胞膜上的 CESA3 蛋白。

提取不同发育时期的棉纤维总蛋白, 并通过 Bradford 法测定其蛋白含量, 调节其至同一浓度,

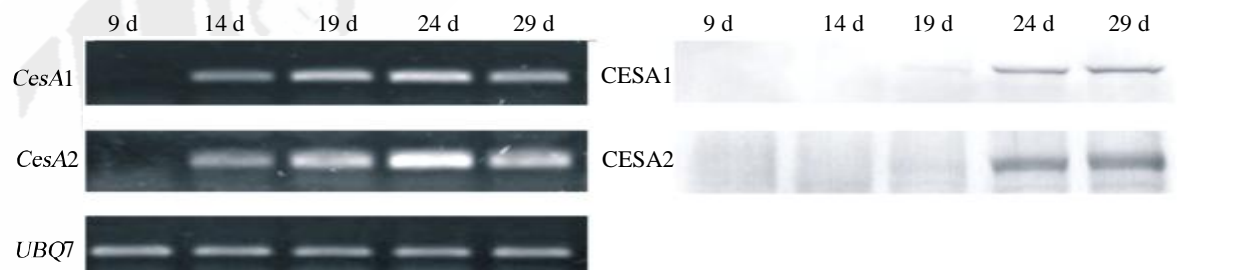


图 6 棉花纤维不同发育时期纤维素合酶的表达(RNA 和蛋白表达)

Fig. 6 *CesaA1* and *CesaA2* expression of the cotton fiber in different developing stages

3 讨论

在抗体制备过程中, 抗原区段的选择至关重要, 要避开蛋白质的跨膜区域, 要能够区分同一

家族中不同的蛋白质, 还要含有足够多的抗原表位。本研究的 7 个蛋白中大部分是跨膜蛋白, 且 CESA1、CESA2、CESA3 和 Callose synthase 的跨膜次数都大于 8, 非跨膜区较短。跨膜区含有大量

疏水氨基酸,免疫原性低,因此,应该选择非跨膜区作为抗原区段,本实验的全部抗原区段均选择在蛋白质的非跨膜区段。棉花纤维素合酶家族的 CESA1、CESA2 和 CESA3 同源性较高,如果抗原区段选择不当,则无法区分该家族的不同成员。为避免可能出现的交叉反应,将 CESA1、CESA2、CESA3 抗原区段选择在非跨膜的序列高变区,而且 CESA2 和 CESA3 抗原采用化学合成多肽。通常情况下,抗原区段越长,抗原表位越多,抗体制备的成功率越高;但是,肽段越长,越容易产生交叉反应,而且原核表达时越容易产生包涵体,给蛋白质纯化工作带来不利影响。本实验原核表达的肽段含有 100~150 个氨基酸,较大的抗原表位有 3~5 个,均可以满足抗体制备的要求。

化学合成多肽已广泛用于抗体制备^[16-18],用软件预测抗原表位,确定多肽序列,用化学方法合成多肽,与 KLH (Keyhole limpet hemocyanin) 偶联后免疫动物制备抗体。化学合成多肽抗原的序列较短,制备的抗体具有高度特异性,可以区分同一家族中同源性较高的各种蛋白质,且制备抗原的时间较短,纯度较高。但是,由于化学合成多肽抗原序列较短,偶联 KLH 后免疫原性可能不高,针对化学合成多肽的抗体效价不高,因此用化学合成多肽作为抗原,在制备抗体时可能会有失败的风险。本研究中的多肽抗原,由于既要考虑避开蛋白质的跨膜区段,又要考虑区分棉花纤维素合酶家族蛋白,因此在进行了大量的分析和比较后分别选取了 CESA2 和 CESA3 的 Phe106-Cys119 和 Arg195-Cys208 肽段作为抗原,但是只成功制备了 CESA2 的抗体,没有获得 CESA3 的抗体。

原核表达蛋白是制备抗原的重要途径^[19-21],根据蛋白的溶解性分为可溶蛋白和包涵体蛋白。可溶蛋白容易用亲和层析分离纯化,获得纯度高的抗原,如本文中的 CESA1 蛋白。包涵体是空间结构异常的蛋白质聚集体,主要含有目标蛋白以及少量杂蛋白。在原核表达蛋白时,由于表达量过高、蛋白质中含硫氨基酸过多、胞内 pH 接近蛋白等电点以及缺乏翻译后修饰酶类等原因^[22-23],难免形成包涵体。通常可以用降低温度、降低 IPTG 浓度、缩短诱导时间以及更换表达宿主等

方法避免包涵体的产生。但是,优化表达条件后仍以包涵体形式存在的蛋白,可以用复性的方法将目的蛋白转变为具有活性的可溶蛋白^[24-25],然后进行纯化,如本文中的 SUSY1。而对于无法复性的包涵体蛋白,只能在变性后用透析方法纯化,得到较高纯度的目的蛋白,用于抗体制备,如本文中的 β -1,4-glucanase、 β -1,3-glucanase 和 Callose synthase。

本研究根据纤维素合酶相关蛋白的序列特征和原核表达蛋白的特点,分别用化学合成多肽、原核表达的可溶性蛋白、可复性的包涵体蛋白和不可复性的包涵体蛋白作为抗原,成功制备了棉花纤维素合酶相关蛋白的抗体,为深入研究棉花纤维素合酶复合体组成、纤维素合酶相关蛋白的功能以及纤维素合成机理奠定了基础。

致谢:

感谢国家重点基础研究发展计划(2010CB134401)、高等学校科技创新引智计划(B08032)和转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-119B)的资助,感谢华中农业大学植物科学技术学院杨国正老师提供棉花种子。

参考文献:

- [1] PEAR J, Kawagoe Y, Schreckengost W, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(22): 12637-12642.
- [2] SATOSHI F, Takahisa H, Koichi M. Sucrose synthase is an integral component of the cellulose synthesis machinery[J]. Plant Cell Physiol, 2010, 51(2): 294-301.
- [3] PENG L, Kawagoe Y, Hogan P, et al. Sitosterol- β -1,4-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants[J]. Science, 2002, 295: 147-150.
- [4] MOLHOJ M, Pagant S, Hofte H. Towards understanding the role of membrane-bound endo-beta-1,4-glucanases in cellulose biosynthesis[J]. Plant Cell Physiology, 2002, 43: 1399-1406.
- [5] COLLINGE D B, Kragh K M, Mikkelsen J D, et al. Plant chitinases[J]. Plant Journal, 1993, 3(1): 31-40.
- [6] WAN Ling-lin, Zha Wen-jun, Cheng Xiao-yan, et al. A rice-1, 3-glucanase gene *Osg1* is required for callose degradation in pollen development[J]. Planta, 2010, 233(2): 309-323.
- [7] HONGLIE Z, Ashton J D, Desh P S. A cell plate-specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin[J]. Plant Cell, 2001, 13: 755-768.

- [8] IGLESIAS V A, Meins F J. Movement of plant viruses is delayed in a β -1,3-glucanase deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition [J]. *Plant Journal*, 2000, 21(2): 157-66.
- [9] 吉 清,何凤田. 包涵体复性的研究进展[J]. *国外医学*, 2004, 25(6):516-518.
JI Qing, He Feng-tian. Progress in study on refolding and renaturation of inclusion bodies[J]. *Foreign Medical Sciences*, 2004, 25(6): 516-518.
- [10] 赵 强,周春江,张巨松,等. 化学打顶对新疆棉花农艺和经济性状的影响[J]. *棉花学报*, 2011, 23(4):329-333.
ZHAO Qiang, Zhou Chun-jiang, Zhang Ju-song, et al. Effect of chemical detopping on the canopy and yield of cotton(*Gossypium hirsutum*) in South Xinjiang[J]. *Cotton Science*, 2011, 23(4): 329-333.
- [11] 朱龙付,涂礼莉,曾范昌,等. 一种适合于 cDNA 文库构建的高质量棉花 RNA 的简单抽提法[J]. *作物学报*, 2005, 31(12):1657-1659.
ZHU Long-fu, Tu Li-li, Zeng Fan-chang, et al. An improved simple protocol for isolation of high quality RNA from *Gossypium* spp. suitable for cDNA library construction[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(12): 1657-1659.
- [12] 东 锐,阮海英,顾 超,等. 棉花 *GhFTL1* 基因的克隆及初步功能分析[J]. *棉花学报*, 2011, 23(6):515-521.
DONG Rui, Yuan Hai-ying, Gu Chao, et al. Cloning and primary analysis of the function of *GhFTL1* gene in cotton(*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Cotton Science*, 2011, 23(6): 515-521.
- [13] 徐大伟, 张雨良, 檀根甲. 棉花八氢番茄红素脱氢酶 *GhPDS1* 基因的克隆与表达谱分析[J]. *棉花学报*, 2011, 23(3): 200-204.
XU Da-wei, Zhang Yu-liang, Tan Gen-jia. Molecular cloning and expression analysis of *GhPDS1* gene in *Gossypium hirsutum*[J]. *Cotton Science*, 2011, 23(3): 200-204.
- [14] RICHMOND T, Somerville C. The cellulose synthase superfamily[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(2): 495-498.
- [15] DEBORA J W, Isaac K, Patrick H, et al. The cotton fiber zinc-binding domain of cellulose synthase A1 from *Gossypium hirsutum* displays rapid turnover *in vitro* and *in vivo*[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103(32): 12191-12196.
- [16] 高丽霞,张奉春,刘 斌. 人工合成 gp210 多肽抗原在愿发性胆汁性肝硬化中的应用[J]. *中华风湿病学杂志*, 2008, 12(10):677-680.
GAO Li-xia, Zhang Feng-chun, Liu Bin. The comparison of two different detection methods for anti-gp210 antibody[J]. *Chin J Rheumatol*, 2008, 12(10): 677-680.
- [17] 石理兰,窦晓光,冯 国,等. 丙型肝炎病毒 NS5a 高免疫原区人工合成多肽抗原性的研究[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2004, 18(4):344-347.
SHI Li-lan, Dou Xiao-guang, Feng Guo, et al. Immunoreactivity studies on synthetic peptides deriving from immunodominant region of hepatitis C virus NS5a gene[J]. *Chinese J Exp Clin Virol*, 2004, 18(4): 344-347.
- [18] 安丽萍,王笑英,韩 笑,等. 人 gACE 多肽抗原的设计及多克隆抗体的制备和鉴定[J]. *中国免疫学杂志*, 2009, 25(3): 260-262.
AN Li-ping, Wang Xiao-ying, Han Xiao, et al. Designation of gACE epitope and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Chinese immunological journal*, 2009, 25(3): 260-262.
- [19] 程彦伟,李 亮,沈 嵘,等. 水稻 LRR 型类受体蛋白激酶胞外区的原核表达及多克隆抗体制备[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(9):1077-1083.
CHENG Yan-wei, Li Liang, Shen Rong, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of the extracellular domain about rice LRR receptor-like protein kinase [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, 35(9): 1077-1083.
- [20] 徐小峰,田衍平,陈宗涛,等. 重组 Rab8 截短体蛋白的原核表达 纯化和抗体制备[J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(2):234-237.
XU Xiao-feng, Tian Yan-ping, Chen Zong-tao, et al. Prokaryotic expression and purification of truncated Rab8 recombinant protein and preparation of polyclonal antibody against Rab8[J]. *Immunological Journal*, 2008, 24(2): 234-237.
- [21] 俞 俞,邢卫锋,周 茜. 拟南芥转录因子 DYT1 的原核表达与多克隆抗体制备[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(2):261-266.
YU Yu, Xing Wei-feng, Zhou Qian. Prokaryotic expression of the *Arabidopsis* transcription factor DYT1 and preparation of its polyclonal antibodies [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2011, 31(2): 261-266.
- [22] 冯小黎. 重组包涵体蛋白质的折叠复性[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(4):482-485.
FENG Xiao-li. Refolding of recombinant inclusion body proteins[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2001, 28(4): 482-485.
- [23] 井明艳,孙建义. 蛋白质的折叠调控与包涵体的形成[J]. *浙江大学学报*, 2004, 30(6):690-696.
JING Ming-yan, Sun Jian-yi. Protein folding and the formation of inclusion bodies[J]. *Journal of Zhejiang University*, 2004, 30(6): 690-696.
- [24] 张婷婷,叶波平. 包涵体蛋白质的复性研究进展[J]. *药物生物技术*, 2007, 14(4):306-309.
ZHANG Ting-ting, Ye Bo-ping. Progress in study on refolding and renaturation of inclusion bodies[J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2007, 14(4): 306-309.
- [25] 纪剑飞,张成刚. 包涵体重组蛋白的纯化及复性[J]. *沈阳药科大学学报*, 1998, 15(4):235-239.
JI Jian-fei, Zhang Cheng-gang. Purification and refolding of recombinant protein as inclusion bodies[J]. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 1998, 15(4): 235-239. ●