

小麦 *ATG8* 的原核表达及其抗血清制备

吴洪波, 刘 刚, 张路路, 王冬梅

(河北农业大学 生命科学学院 植物逆境生理研究室 河北 保定 071001)

摘要: 提取小麦品种 L10 的总 RNA, 进行反转录, 其产物用于探究自噬基因 *ATG8* 的生物学功能。用 PCR 方法克隆 *ATG8*, 将克隆的 *ATG8* 亚克隆至表达载体 PMD19-T, 酶切后切胶回收, 然后把产物测序鉴定, 转化宿主菌 *E. coli* Rosetta-gami B(DE3) 构建原核表达系统, 将融合蛋白纯化后制备其兔抗血清, 然后利用 Western Blotting 技术对兔抗血清进行检测, 鉴定了该抗血清的结合特异性。*ATG8* 抗体的成功制备, 为小麦中 *ATG8* 基因和自噬功能的研究奠定了基础。

关键词: *ATG8*; 免疫印迹; 抗血清; 融合蛋白; 原核表达

中图分类号: Q942 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2013)01-0101-05

Cloning and Prokaryotic Expression of *ATG8* (a Molecular Marker of Autophagy) Gene from Wheat and Preparation of Antiserum

WU Hong-bo, LIU Gang, ZHANG Lu-lu, WANG Dong-mei

(Plant Stress Physiology Laboratory, College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Total RNA was isolated from wheat variety L10 and reverse transcription by using the anchored primers in this paper to further understand the biological function of the autophagy gene *ATG8* from wheat. And then the *ATG8* were amplified by PCR and then cloned into the PMD19-T vector, one of which was subcloned into the expression vector. The recombinant plasmid was identified by sequencing and digestion of restriction enzymes. The recombinant expression vector was constructed and transformed into *E. coli* strain Rosetta(DE3) subsequently, then through IPTG-induction in host bacteria *E. coli* Rosetta-gami B(DE3) and detected by SDS-PAGE. The rabbit anti-*ATG8* antibody was prepared and was detected by Western Blotting analysis. The *ATG8* were obtained partly and successfully expressed in the prokaryotic expression system. The experiment offered foundation to the studying of autophagy and function of *ATG8* gene in wheat.

Key words: *ATG8*; Western Blotting; Anti-serum; Fusion protein; Prokaryotic expression

自噬(Autophagy) 指细胞在营养缺乏或应激条件下, 通过降解细胞内衰老的长寿命蛋白质、受损伤的细胞结构和细胞器, 为细胞的重建、再生和修复提供必需原料, 实现细胞的再循环和再利用, 是生物体内一种重要的防御和保护机制, 是真核生物中高度保守的一类亚细胞降解途径^[1-2], 在维持细胞内生理平衡的过程中发挥重要作用。在植物中, 自噬主要发生在液泡中, 首先细胞浆中出现大量包裹着细胞浆和细胞器的双层膜空泡结构, 然后溶酶体对空

泡内成分进行降解。最近有对拟南芥基因组进行的分析表明, 至少有 36 个基因和酵母的 AuTophagy (*ATG*) 基因有同源性。并且有研究发现, 细胞自噬在参与饥饿反应的同时, 还在生物体生长发育、免疫防御、细胞程序性死亡、肿瘤抑制、预防神经退行性疾病等方面有非常重要的作用^[3-7]。*ATG8* 定位于自噬体的内膜, 随同自噬体一同进入液泡而被降解, 常常作为研究自噬功能时被检测的有效靶点^[8], 其中最普遍的方法就是通过 Western Blotting 技术半

收稿日期: 2012-10-22

基金项目: 国家自然科学基金(30671244; 31171472); 河北省应用基础研究计划重点基础研究项目(08965505D); 河北省自然科学基金(C2007000515; C2010000787)

作者简介: 吴洪波(1987-), 女, 河北涞水人, 在读硕士, 主要从事植物抗逆研究。

通讯作者: 王冬梅(1963-), 女, 河北景县人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物抗逆分子细胞生物学研究。

定量 *ATG8* 基因的表达。但是,迄今为止还没有市售的高质量高特异性的抗植物中 *ATG8* 的抗体,这就限制了对自噬功能的深入研究,所以制备特异性的抗体具有重要的生物学意义。本试验利用 PCR 方法从小麦品种 L10 中克隆自噬相关基因 *ATG8*, 导入到宿主质粒 pET28b(+) 中,利用构建的原核表达载体,实现了对 *ATG8* 的特异性表达,纯化 *ATG8* 蛋白后,制备 *ATG8* 的兔抗血清并进行 Western Blot 检测。植物自噬相关蛋白 *ATG8* 兔抗血清的制备,为利用 Western Blotting 方法半定量 *ATG8* 基因的表达、利用免疫荧光和免疫电镜技术观察自噬组织的形成及分布提供了有效工具,为进一步开展小麦中 *ATG8* 基因功能的研究以及自噬生理机制的研究奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料及主要试剂 供试小麦(*Triticum aestivum* L.) 品种选用洛夫林 10(Lovrin10 或 L10); 主要试剂包括大肠杆菌 DH5 α 、DNA 凝胶回收纯化试剂盒、DNA Marker、PMD19-T 克隆载体、Ex Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Sal* I 和 *Xho* I 及 T4 DNA 连接酶、HRP 标记羊抗兔 IgG、卡那霉素硫酸盐等。

1.1.2 引物的制备 依据 GenBank 公布的小麦 *ATG8* 蛋白编码基因 cDNA 全长序列(FJ750848), 结合 *ATG8* 的抗原表位以及载体 pET-28b(+) 质粒的序列分析结果,应用 Oligo 6.67 及 DNASTar 软件设计 1 对 PCR 引物。*ATG8*-F: 5'-GCGTCGACATGCCCAAGACTTGCTTC-3'; *ATG8*-R: 5'-CCGCTCGAGACACTTTCGGCTCTGCC-3',引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 小麦 cDNA 的制备 选取小麦洛夫林 10 幼苗 7 日龄时(第 1 片真叶完全展开时)的叶片,参照 Trizol 试剂盒(购自 TaKaRa 公司)说明书提取 RNA。提取的总 RNA 用核酸蛋白检测仪检测浓度和纯度,用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,用反转录试剂盒(TaKaRa)进行 cDNA 的合成。

1.2.2 扩增目的基因片段 以上述合成的 cDNA 为模板,以设计的特异引物 *ATG8*-F1/R1 进行 PCR 扩增。PCR 采用 25 μ L 反应体系: 10 \times PCR Buffer 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, Forward Primer (10 μ mol/L) 1 μ L, Reverse Primer (10 μ mol/L) 1 μ L, Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, ssDNA (20

ng/ μ L) 1 μ L,用灭菌双蒸水补足至 25 μ L,混匀后,轻离心。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物长度为 360 bp,于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 重组质粒的制备 取 5 μ L PCR 产物加入 1 μ L 6 \times 样品缓冲液,上样于 1.2% 的琼脂糖凝胶样品槽中,80 V 电泳 30 min,紫外灯下观察带型。然后按照 TIANGEN 公司琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的方法回收目的片段。然后,用宝生物公司 TaKaRa 的 PMD19-T 载体对回收片段进行连接,将连接产物加入到感受态细胞中。对重组质粒进行蓝白斑筛选,利用菌落 PCR 进行验证。验证为阳性克隆的菌落送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.4 原核表达载体的构建与鉴定 将重组质粒和表达载体 pET-28b(+) 质粒(Novagen 公司)利用 *Sal* I 和 *Xho* I 进行双酶切,经回收并纯化后连接 *ATG8* 的序列,将携带 *ATG8* 的 pET-28b(+) 质粒转化到表达菌株大肠杆菌 BL21 中,得到重组表达载体。质粒 DNA 的提取转化以及大肠杆菌 DH5 α 的感受态制备等技术参照文献[14]进行。

1.2.5 融合蛋白的诱导表达与纯化 将鉴定后的阳性质粒 DNA 转化到大肠杆菌中,挑取单菌落接种于 1 mL 液体 LB 培养基中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜,以 1:30 接种量转接于 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5 ~ 1.0。菌液中加入 100 mmol/L IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 下诱导培养 2 ~ 4 h。取诱导不同时间的样品各 5 mL,5 000 g 离心 5 min,收集菌体可暂放 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。用 8 mL 10 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0 缓冲液重悬湿菌体,然后采用冰上超声破碎(5 S/10 S) 5 min,4 $^{\circ}$ C 13 000 g 离心 10 min,分离成上清和沉淀部分。在上述两部分中按 3:1 加入 4 \times SDS-PAGE Loading Buffer,然后沸水浴 5 min,采用 15% 分离胶,5% 浓缩胶进行 SDS 电泳。初电压为 90 V,溴酚兰进入分离胶后电压加大到 150 V。当溴酚蓝指示剂距分离胶前沿 1 cm 时停止电泳。考马斯亮蓝染色 45 min,脱色后观察并扫描。

采用亲和层析法将上清液中的目的蛋白质进行纯化。样品蛋白质含量测定选用考马斯亮蓝 G-250 法,获得的蛋白质分装后于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.6 兔抗 *ATG8* 抗血清制备 取适量上述获得的抗原蛋白质,加等量的完全弗氏佐剂密封振荡,混成乳化液,形成油包水即可。免疫前采血作为对

照血清。采用背部皮下多点注射,分5点分别注射到2只家兔背部。初次免疫10 d后进行加强免疫,随后20 d免疫一次,之后每周免疫一次。初次免疫选用完全弗氏佐剂,此后均用不完全弗氏佐剂与抗原混合。免疫1个月后,每次注射时先耳缘静脉取血2 mL做酶联免疫分析(ELISA),检测抗体效价。直到血清效价合格后,颈动脉取血,收集血清,分装后于-70℃冷冻保存。

1.2.7 抗血清鉴定 兔抗ATG8抗血清采用Western印迹进行鉴定:操作参照文献[16]。

2 结果与分析

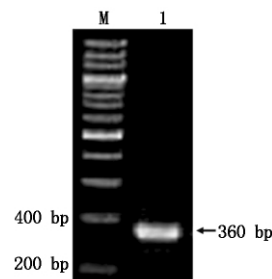
2.1 目的基因的PCR扩增及克隆

以小麦L10叶片总RNA为模板,RT-PCR扩增得到cDNA,以cDNA为模板进行PCR扩增(引物ATG8-F/R扩增条带为360 bp,此为全长),扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,可见有360 bp的清晰条带(图1)。将目的条带切胶回收并进行纯化,与PMD19-T载体连接,重组获得PMD19-ATG8质粒,将产物转化*E. coli* DH5 α ,经氨苄青霉素抗性和蓝白斑显色筛选,阳性克隆进行菌落PCR鉴定并测序,得到的结果和GenBank中公布的小麦ATG8蛋白编码基因cDNA序列相同。

2.2 原核表达载体的构建和重组子鉴定

分别提取PMD19-ATG8载体和表达载体pET-28b(+)-GST质粒,经*Sal*I和*Xho*I双酶切后,1%琼脂糖凝胶电泳回收。目的片段纯化后与酶切后的pET-28b(+)-GST连接,构建重组表达载体。将

重组的表达质粒转化宿主细胞*E. coli* DH5 α 。筛选阳性克隆并进行菌落PCR检测,扩增出一条360 bp左右片段,与目的片段大小相符;通过双酶切检验,证明外源片断已经连接到载体中,且重组质粒酶切出的外源片断的大小约为504 bp(图2箭头所指)。将重组质粒再次测序证明与克隆序列相同,表明成功构建了原核表达载体。

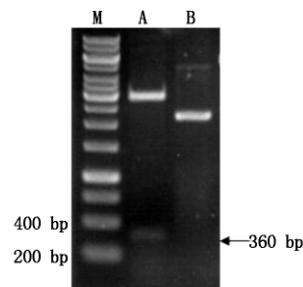


M. Marker; 1. ATG8 PCR 产物。

M. Represents DNA Marker; 1. PCR product of ATG8.

图1 PCR产物电泳分析

Fig.1 PCR amplified products separated on 1.5% agarose gel

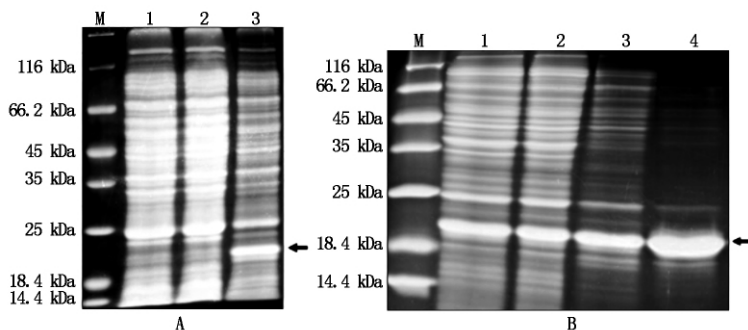


M. Marker; A. pET28b-ATG8 的酶切鉴定; B. pET28b-ATG8 质粒。

M. Represents DNA Marker; A. Enzyme digestion fractions of pET28b-ATG8; B. pET28b-ATG8 plasmid.

图2 ATG8与载体连接验证

Fig.2 Ligase detection of ATG8 and pET-28b(+)-GST



A: M. 低分子量蛋白标记; 1. IPTG 诱导前的 pET28b(+)-ATG8 的 BL21 的寄主细菌细胞的悬浮液; 2. IPTG 诱导 2 h 的 pET28b(+)-ATG8 的 BL21 的寄主细菌细胞的悬浮液; 3. IPTG 诱导 4 h 的 pET28b(+)-ATG8 的 BL21 的寄主细菌细胞的悬浮液; 以上进行 SDS 电泳并考马斯亮蓝染色(箭头显示为 ATG8 的表达产物); B: M. 低分子量蛋白标记; 1. 洗脱缓冲液 I; 2. 洗脱缓冲液 II; 3. 透析纯化产物。以上进行 SDS 电泳并考马斯亮蓝染色(箭头显示为 ATG8 的表达产物)。

A: M. Low molecular weight protein marker; 1. Supernatant of host bacterial cells of BL21 harboring pET28b(+)-ATG8 before IPTG induction; 2. Supernatant of host bacterial cells of BL21 harboring pET28b(+)-ATG8 induced by IPTG 2 h; 3. Supernatant of host bacterial cells of BL21 harboring pET28b(+)-ATG8 induced by IPTG 4 h. They were run on 12% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue(Arrow shows expression product of ATG8); B: M. Low molecular weight protein marker; 1. The washing buffer I; 2. Elution buffer II; 4. Purified product by dialysis. They were run on 12% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue(Arrow shows purified product of ATG8) .

图3 重组蛋白ATG8表达产物和纯化后的SDS-PAGE分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of recombinant ATG8 protein expressed and purified in *E. coli* BL21

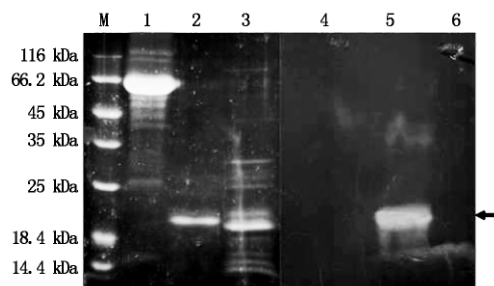
2.3 ATG8 的原核表达和纯化

将鉴定后的 pET28b(+) -GST-ATG8 阳性质粒 DNA 转化到 BL21 表达菌中培养表达。在 IPTG 诱导后不同时间收集菌体, 菌体超声破碎裂解后离心分成上清和沉淀两部分, 采用亲和层析法纯化目的蛋白质。上述两部分分别进行 SDS 电泳, 考马斯亮蓝(R-250) 染色。与不加 IPTG 诱导(图 3-A, 泳道 1) 的对照组相比, 诱导表达组在诱导后 2 h 上清中未见明显表达的条带(图 3-A, 泳道 2), 而诱导后 4 h 的上清中在 18.7 kDa 位置出现与理论相符的目的条带(图 3-A, 泳道 3), 此蛋白在沉淀中没有表达。尝试不同 IPTG 诱导浓度 (1×10^{-5} , 1×10^{-4} , 1×10^{-3} mol/L)、不同诱导温度 (26, 27, 38 °C)、不同诱导时间 (2, 4, 8, 12, 24 h) 及转数 (150, 200 r/min), 此蛋白表达量在上清中没有明显区别。

将含有融合蛋白的上清液经亲和柱层析纯化后, SDS-PAGE 分析, 融合蛋白含量和纯度较高, 无明显可见杂蛋白(图 3-B, 泳道 4)。

2.4 小麦 ATG8 兔抗血清的制备和鉴定

为了进一步获得 ATG8 蛋白特异的抗血清, 以纯化的 ATG8 融合蛋白为抗原免疫家兔, 采用间接 ELISA 方法测定抗血清的效价高于 16 后, 耳缘静脉放血, 制备成抗血清。通过 Western 印迹检测该血清可以识别带有 His 标签的 ATG8(图 4, 泳道 5), 但不识别 BSA(图 4, 泳道 4) 和带有 His 标签的重组蛋白 His-CaM(图 4, 泳道 6), 表明该血清对 ATG8 具有结合特异性, 可以用于自噬的检测。



M. 预染分子蛋白标记; 1. BSA; 2. 带有 His 标签的 ATG8 重组体; 3. 带有 His 标签的 CaM 重组体(以上进行 SDS 电泳并考马斯亮蓝染色); 4. BSA; 5. 带有 His 标签的 ATG8 重组体(箭头指示); 6. 带有 His 标签的 CaM 重组体(以上进行 SDS 电泳并用抗带有 His 标签的 ATG8 的单克隆抗体做探针检测)。

M. Prestained molecular protein marker; 1. BSA; 2. Recombinant ATG8 with His-tag; 3. Recombinant CaM with His-tag; they were run on 12% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue; 4. BSA; 5. Recombinant ATG8 with His-tag (Arrow shows); 6. Recombinant CaM with His-tag; they were run on 12% SDS-PAGE and probed by anti-His-ATG8 monoclonal antibody (1:5 000).

图 4 重组蛋白 ATG8 的 SDS-PAGE 和 Western Blotting 分析

Fig. 4 SDS-PAGE and Western Blot analysis of recombinant ATG8

3 讨论

细胞自噬是真核生物中高度保守的一类亚细胞降解途径, 它通过降解细胞内组分维持细胞内生理平衡并帮助细胞度过逆境, 在维持细胞内生理平衡的过程中起着关键作用。细胞自噬在生物体生长发育、免疫防御、细胞程序性死亡、肿瘤抑制、预防神经退行性病变等方面有非常重要的作用。研究表明, 细胞自噬的缺陷与人类多种疾病密切相关, 暗示细胞自噬有可能成为治疗疾病的一个新的靶点, 各种有重要生理意义的选择性细胞自噬途径的发现更加强化了人们对细胞自噬的兴趣。酵母是目前细胞自噬研究最充分的模式生物, 其中自噬的分子机制及其他方面的研究成果对整个真核生物细胞自噬的研究有很大促进作用。以酵母为模式生物开展的分子遗传学研究, 为揭示细胞自噬的奥秘提供了开启第一扇大门的钥匙。在酵母中发现的分子机制大多可以应用到包括哺乳动物在内的多细胞生物中, 这说明从酵母到哺乳动物, 其自噬的分子机制及功能非常类似, 但是也存在着少许差异。植物中的细胞自噬几乎都与植物的衰老、发育以及一些抗逆反应相关, 对其分子机制的研究有着重要的生物学意义。随着对自噬功能和机制研究的不断扩展和深入, 对其鉴定和监测的方法也要求越来越成熟, 但至今仍未有仅用一种技术就能准确鉴定自噬现象的方法^[11-13]。

细胞自噬已成为当前细胞生物学领域发展势头最快的研究方向之一, 逐渐成为细胞学研究的热点领域。随着近年来大量高水平的实验室进入这一领域, 关于细胞自噬的知识积累也呈现出爆炸性的增长^[14]。经过 20 多年的研究, 人们发明了丰富多样的针对细胞自噬的检测手段。在没有 ATG8 抗体之前, 一般在 ATG8 的 N 端连上标签蛋白, 如绿色荧光蛋白 GFP, 当自噬体与液泡融合后, 其内含物被释放进液泡被水解酶降解, 包括 GFP-ATG8, 由于 GFP 结构域的稳定性比较高, 会单独存在一段时间, 因而可以通过 Western Blotting 检测 GFP 条带的变化来衡量降解的 GFP-ATG8 的量, 间接检测细胞自噬发生水平的高低。此外, 用荧光蛋白作标签, 也可以通过荧光显微镜观察 ATG8 的定位^[10, 15-16]。所以 ATG8 的抗体制备对研究自噬功能及其作用机制极其重要。本研究利用原核表达了 ATG8 并通过免疫家兔制备了小麦品种 L10 的 ATG8 抗体, 这为运用 Western Blotting 方法测定 ATG8 的表达量变化、利用免疫组化技术等监测小麦中自噬的发生及其功能机制的研

究提供了有效工具。

4 结论

通过 RT-PCR 扩增从小麦 L10 中获得了 ATG8 基因,成功构建了含有目的基因的原核表达载体,并有效地表达、纯化了 ATG8 蛋白,以该蛋白为抗原制备了高效价的特异免疫血清。Western Blotting 检测结果显示,制备的兔抗血清对 ATG8 全蛋白质具有很高的特异性,表明该血清可以用于自噬基因的检测。为深入研究自噬功能及作用机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Xie Z, Klinsky D J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations [J]. *Nat Cell Biol* 2007, 9(10): 1102 – 1109.
- [2] Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10(7): 458 – 467.
- [3] Bassham D C, Laporte M, Marty F, et al. Autophagy in development and stress responses of plants [J]. *Autophagy*, 2006, 2(1): 2 – 11.
- [4] Bassham D C. Plant autophagy—more than a starvation response [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(6): 1 – 7.
- [5] Yoshimoto K, Jikumaru Y, Kamiya Y, et al. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis [J]. *The Plant Cell* 2009, 21(9): 2914 – 2927.
- [6] Hofius D, Mundy J, Petersen M. Self-consuming innate immunity in Arabidopsis [J]. *Autophagy*, 2009, 5(8): 1206 – 1207.
- [7] Hayward A P, Tsao J, Dinesh-Kumar S P. Autophagy and plant innate immunity: Defense through degradation [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2009, 20(9): 1041 – 1047.
- [8] Yue Z, Jin S, Yang C, et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100(25): 15077 – 15082.
- [9] Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of APG8 /Atg7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting Pathway [J]. *J Cell Biol*, 2000, 151(2): 263 – 276.
- [10] Liu W, Yan A H, Hou C Y, et al. Cloning and prokaryotic expression of TaCaM-2-3 in wheat and preparation of antiserum [J]. *Frontiers of Agriculture in China* 2010, 4(3): 317 – 322.
- [11] Klionsky D J, Cuervo A M, Seglen P O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human [J]. *Autophagy*, 2007, 3(3): 181 – 206.
- [12] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(12): 2491 – 2502.
- [13] Klionsky D J, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2): 151 – 175.
- [14] Klionsky D J. Autophagy: from Phenomenology to molecular understanding in less than a decade [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8(11): 931 – 937.
- [15] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. Ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. *Nature* 2000, 408(6811): 488 – 492.
- [16] Xie Z, Nair U, Klionsky D J. Atg9 controls phagophore expansion during autophagosome formation [J]. *Mol Biol Cell* 2008, 19(8): 3290 – 3298.