



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目： 莱茵衣藻小 G 蛋白 ARL1 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备
作者： 陶冶, 鲍冬雪, 刘雁霞, 樊振川
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20230193
收稿日期: 2023-10-17
网络首发日期: 2024-04-18
引用格式: 陶冶, 鲍冬雪, 刘雁霞, 樊振川. 莱茵衣藻小 G 蛋白 ARL1 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20230193>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20230193

莱茵衣藻小 G 蛋白 ARL1 的原核表达、纯化及多克隆 抗体制备

陶冶^{1,2}, 鲍冬雪^{1,2}, 刘雁霞², 樊振川^{1,2}

- 天津科技大学食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457;
- 天津科技大学大健康生物技术国家国际科技合作基地, 天津 300457)

摘要: 为研究小 G 蛋白 ARL1 在纤毛生成和纤毛信号转导过程中的作用, 特制得一支特异性较强的莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) ARL1 多克隆抗体。构建 6×His 标签的原核表达载体 pET-28a(+)-arl1, 并在大肠杆菌 (*E. coli*) DH5α/C+感受态中诱导表达融合蛋白 6×His-ARL1, 经纯化后免疫新西兰雄性大白兔。3 次免疫后取耳动脉血清, 以间接 ELISA 法测试效价后取血。通过 Protein A 和抗原抗体亲和纯化后获得了灵敏度高、特异性强的 ARL1 抗体。通过免疫荧光和免疫印迹 (Western blot) 检测, 发现大量 ARL1 定位于细胞质、细胞基体和纤毛, 为后续研究 ARL1 在莱茵衣藻纤毛生成和信号转导中的功能奠定了基础。
关键词: ARL1; 原核表达; 多克隆抗体; 莱茵衣藻

中图分类号: Q933 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510 (0000)00-0000-00

Prokaryotic Expression, Purification and Polyclonal Antibody

Preparation of Small G Protein ARL1 of *Chlamydomonas reinhardtii*

TAO Ye^{1,2}, BAO Dongxue^{1,2}, LIU Yanxia², FAN Zhenchuan^{1,2}

- State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457;
- National International Science and Technology Cooperation Base for Big Health Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457)

Abstract: In order to study the role of small G protein ARL1 in ciliary formation and ciliary signal transduction, a highly specific polyclonal antibody against ARL1 of *Chlamydomonas reinhardtii* was prepared. First, 6×His labeled prokaryotic expression vector pET-28a(+)-arl1 was constructed, and the fusion protein 6×His-ARL1 was induced in *E. coli* DH5α/C+, and then purified and immunized New Zealand male white rabbits. After 3 times of immunization, the serum of auricular artery was taken, and the titer was tested by indirect ELISA. ARL1 antibody with high sensitivity and specificity was obtained by affinity purification of Protein A and antigenic antibody. By immunofluorescence and Western blot detection, ARL1 was found to be localized in cytoplasm, basal body and cilia, which has laid a foundation for further study on the function of ARL1 in cilia generation and signal transduction of *C. reinhardtii*.

Key words: ARL1; prokaryotic expression; polyclonal antibody; *Chlamydomonas reinhardtii*

收稿日期: 2023-10-17; 修回日期: 2024-01-27

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32070698); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (32200558)

作者简介: 陶冶(1999—), 男, 宁夏银川人, 硕士研究生; 通信作者: 樊振川, 教授, fanzhen@tust.edu.cn

纤毛是存在于细胞表面,由轴丝组成的披膜细胞器,其在细胞分裂、组织分化和器官形成等生命活动过程中具有重要作用^[1],因此,纤毛又被称为真核生物细胞的“信号天线”。纤毛能够利用其膜上的G蛋白耦联受体(GPCRs)、离子通道以及其他蛋白激酶等信号分子感受光、声、味、机械力以及化学分子如激素和神经介质等刺激,并将这些胞外信号传导到胞内进行应答。纤毛缺失或者信号转导功能异常导致的一系列遗传性疾病,统称为纤毛病,如巴德-毕得氏综合征(BBS)和朱伯特综合征(JBTS),因此研究纤毛生成和纤毛信号转导的分子机理对于了解、预防和治疗相关纤毛病具有重要科学指导意义。

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)属于单细胞真核生物,是研究纤毛生成与纤毛信号转导的良好模式生物。莱茵衣藻纤毛结构与哺乳动物和人类大部分纤毛结构类似,均由纤毛膜、纤毛基质和纤毛轴丝组成,且大量纤毛蛋白具有高度保守性。此外莱茵衣藻纤毛易于分离,可采用生化或单分子成像方式研究纤毛内特异性蛋白的性质与功能,因此可用莱茵衣藻研究纤毛蛋白的深层分子作用机制。研究^[2-3]表明小G蛋白在纤毛信号转导过程中发挥重要调控作用,如莱茵衣藻小G蛋白RABL5/IFT22和ARL6/BBS3协同招募BBSome进入基体,从而提供BBSome与顺行鞭毛内运送体偶联以进入纤毛,此发现为理解BBS综合征的分子成因奠定了重要基础。信号蛋白PLD通过调控框BBS3-ARL13-BBSome和RABL2-ARL3-BBSome介导逆向纤毛内运输扩散输出纤毛过渡区,这些发现解释了BBS和JBTS存在交叉症状的分子成因。除此之外,莱茵衣藻纤毛内仍有大量小G蛋白存在,其在纤毛内的定位及功能尚不清楚。

ARL1属于ARL(Arf like)亚家族小G蛋白,该家族小G蛋白通常参与囊泡和脂质运输^[4],如ARL13能够招募BBSome复合物至纤毛膜^[5]。研究表明,ARL1在功能结构上与ARL家族高度保守,ARL1能够影响结合和水解GTP^[6-7],且在布氏锥虫和哺乳动物细胞中,ARL1均不影响纤毛生成^[8-9]。然而,对纤毛内的ARL1是否影响纤毛生成以及在纤毛内的调控功能研究甚少。因此,本实验室拟制备一支特异性强的ARL1多克隆抗体,对小G蛋白ARL1在纤毛内运输过程中的调控机制进行进一步研究。

1 材料与方

1.1 菌株、质粒与动物

大肠杆菌(*E. coli*)DH5 α /C+感受态细胞、原核表达载体pET-28a(+),野生型莱茵衣藻藻种CC-125均为本实验室保存。

新西兰雄性大白兔,4月龄,2.0 kg,购自北京市昌扬西山养殖场,批准号为scxk(京)2021-0008。本实验经过实验动物伦理委员会审核,符合动物保护、动物福利和伦理原则,符合国家实验动物福利伦理的相关规定。

1.2 实验试剂

T4连接酶、限制性内切酶、*Pfu* DNA聚合酶、DNA Marker,北京全式金生物技术有限公司;Easpep Super总RNA提取试剂盒,普洛麦格(北京)生物技术有限公司;蛋白Marker,加拿大Ferments公司;质粒小提试剂盒,北京天根生化科技有限公司;BIOWEST琼脂糖凝胶、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;Protein A SepharoseTM CL-4B和Ni SepharoseTM 6 FF,美国GE Healthcare公司;硝酸纤维素膜,北京Solarbio公司;荧光标记的羊抗兔二抗,美国Sigma公司;HRP标记的羊抗兔抗体,美国Jackson公司;ECL显色液,德国Millipore公司;其余试剂均为国产分析纯试剂;引物合成和基因测序由苏州安升达生物科技有限公司完成。

1.3 实验方法

1.3.1 构建重组质粒pET-28a(+)-*arl1*

莱茵衣藻总RNA提取方法参照文献^[10],利用Trizol法提取莱茵衣藻总RNA,并将其反转录为cDNA。以cDNA为模板,使用SnapGene对其序列进行分析,*arl1*基因大小为546 bp,在cDNA序列两端分别添加*Bam*HI与*Hind*III酶切位点。引物序列:ARL1-FOR 为5'-GGATCCATGGGACTTTGGATATCTAA-3',ARL1-REV 为5'-AAGCTTTCATTTCCGGCGCGTC-3'。*arl1*引物由安升达生物科技公司合成。PCR条件为:95℃ 5 min;95℃ 45 s,53℃ 45 s,72℃ 1 min,30个循环;72℃ 10 min;4℃ 。将pET-28a(+)表达载体及*arl1*目的片段分别使用*Bam*HI、*Hind*III进行双酶切,切胶回收酶切处理后的目的基因和载体,将目的基因和载体按照摩尔质量比3:1用T4连接酶室温连接15 min,同时将目的基因用ddH₂O替代用作阴性对照组;转化至*E. coli* DH5 α ,37℃培养12~16 h,挑取单克隆提取质粒进行双酶切验证,并测序测证^[11]。

1.3.2 融合蛋白的诱导、表达及纯化

将重组质粒 pET-28a(+)-arl1 转至感受态 *E. coli* DH5 α /C+ 中, 挑取单克隆至含有质量浓度为 100 μ g/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜; 次日扩大培养至 $A_{600}=0.8\sim 1.0$ 时, 加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 0.2 mmol/L, 25 $^{\circ}$ C 诱导 6~10 h, 表达重组蛋白 6 \times His-ARL1^[12], 对照组不加 IPTG^[13]; 诱导完毕后 4 $^{\circ}$ C、8000 g 离心 5 min 收集菌体, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 加入裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl、500 mmol/L NaCl, pH 7.4) 高压破碎菌体细胞获得全蛋白, 经 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液和沉淀, 采用分离胶为 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测蛋白质^[14]。

6 \times His-ARL1 蛋白表达在上清液, 将上清液加入 Ni SepharoseTM 6 Fast Flow 重力纯化柱中, 室温下摇床结合 2 h; 结合完毕后, 使用 Tris-HCl 缓冲液 (50 m mol/L Tris-HCl, 150 m mol/L NaCl, pH 8.0) 漂洗柱子后用含 500 m mol/L 咪唑的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, 将洗脱蛋白置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。对纯化蛋白检测和纯度分析^[15], 选择纯度高且水溶性好的蛋白质进行免疫。

1.3.3 动物免疫

经过严格的蛋白质纯化流程, 得到质量浓度高于 500 μ g/mL 的蛋白质并将其交给北京华大蛋白公司进行动物免疫实验。选用新西兰雄性大白兔 2.0 kg 作为免疫动物。阴性血清取自免疫前的耳静脉。在进行初次免疫时, 选择 400 μ g 纯化 6 \times His-ARL1 融合蛋白的抗原, 并与等量的弗氏佐剂混合, 确保混合均匀后, 采用皮下注射的方式, 使动物体内形成免疫反应。为了加强免疫效果, 2 周后使用弗氏不完全佐剂进行加强免疫, 每 2 周进行一次, 共进行 4 次。免疫剂量及方法与首次免疫相同。最后一次免疫后, 从耳动脉中采集 100 μ L 血清, 并通过间接 ELISA 法测定抗血清效价。若结果显示效价高于 1:51200, 将在动物颈动脉取血, 离心从血样中分离出抗血清, 备用^[16]; 如果效价结果不符合要求, 则需要再次进行免疫处理, 直至达到预期效价为止。将经过血清分离的家兔从股动脉采血, 并将其冻存在 -80 $^{\circ}$ C 环境中

1.3.4 多克隆抗体效价的测定

采用间接 ELISA 法测定抗体效价^[17], 用包被液将 6 \times His-ARL1 融合蛋白稀释至 10 μ g/mL, 酶标板每孔加入 100 μ L 包被抗原, 确保抗原与孔壁充分结合用 5% 的脱脂牛奶对抗原在室温下进行 1 h 封闭孵育处理后弃去, 用 PBST 缓冲液洗板 3 次, 加入用

PBS 稀释后的抗血清为一抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 孵育后, 再次进行 3~5 次洗板, 用 HRP 标记的羊抗兔抗体为二抗, 室温孵育 1 h 以检测特定的目标抗原。最后加入 (TMB3',3',5',5'-四甲基联苯胺) 显色溶液, 每孔加 100 μ L 随后在室温下进行避光显色 20 min^[18]。最后加入 0.5 mol/L H₂SO₄ 50 μ L 终止液终止反应。利用酶标仪测定抗血清处进行吸光度, 以 PBS 稀释液作空白对照进行调零并依次读取各孔 OD 值^[19]。若实验组抗血清 A₄₅₀/阴性对照组抗血清 A₄₅₀ ≥ 2.1 判为阳性, 则其最高稀释度便为抗血清的效价。结合该数据可计算并获得最终的效价^[20]。

1.3.5 IgG 亚型抗体富集及纯化

在 Protein A Beads 中加入结合缓冲液 (50 m mol/L MTris-HCl, pH 7.0) 10-15 mL, 平衡 Protein A Beads 5~10 min 后, 将 1 mL 抗血清和 9 mL 结合缓冲液混合均匀后加入平衡好的重力柱中, 在摇床上室温结合 2 h^[21]。结合完毕后用结合缓冲液 (12 mmol/L Na₂HPO₄·12H₂O、8 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, pH 7.0) 漂洗至考马斯亮蓝 G-250 不变色, 漂洗结束后用洗脱缓冲液 (0.1 mol/L 甘氨酸, pH 2.7) 对目的蛋白进行洗脱, 在事先加入了中和缓冲液的 EP 管中收集洗脱下来的抗体, 洗脱至 G-250 不变色, 纯化后的抗体于 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用^[22]。

1.3.6 莱茵衣藻全蛋白定量

取 1 mL 培养至对数期的莱茵衣藻藻液, 2500 r/min 室温条件下离心 3 min 收集沉淀。加入 108 μ L 蛋白提取液 A 与 12 μ L 1 mol/L 的二硫苏糖醇 (DTT), 涡旋振荡 20 min 后加入 80 μ L 蛋白提取液 B 再次涡旋振荡 25 min, 使细胞完全裂解。使用冷冻离心机在 4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min, 取 5 μ L 上清液进行蛋白定量实验, 剩余上清液加入 50 μ L 5 \times 上样缓冲液 (Loading buffer) 中, 沸水浴 5 min, 使蛋白质充分变性。上述 5 μ L 上清液中加入 195 μ L 去离子水、800 μ L 氨基黑蛋白定量液, 混匀后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。随后加入 0.8 mL 蛋白定量漂洗液充分振荡后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 反复漂洗 3 次; 加入 1 mL 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液振荡混匀后测定其 A₆₁₅ 值 (y), 以 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液作为空白对照; 代入公式 $y=0.0869x+0.0074$ 求出样品溶液浓度 x, 已知上样量为 20 μ g, 可求出上样体积。

1.3.7 免疫印迹法检测多克隆抗体特异性

为了检测纯化后的 anti-ARL1 的特异性, 需进行免疫印迹 (Western blot) 法进行分析。将培养至对数期的莱茵衣藻野生型 CC-125 藻种上清蛋白^[23]进

行蛋白质定量处理, 取 20 μ L 上清蛋白使其与 5 \times Loading Buffer 混匀, 沸水浴 5 min 使蛋白质变性, 随后 12 000 r/min 离心 5 min, 上样, 进行 SDS-PAGE。完成电泳后, 将分离蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 为了避免非特异性结合, 将硝酸纤维素膜放入盒中, 加入 10 mL 10%的脱脂乳, 室温条件下封闭 2 h。一抗以 1:500 的稀释比加入抗原抗体纯化后的 ARL1 抗体室温孵育 2 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 去除未结合的抗体。二抗采用 HRP 标记的羊抗兔抗体室温孵育 1 h, 稀释比为 1:10 000, 使用 TBST 3 次洗涤。最后加入 ECL 发光显色液进行显色曝光。

1.3.8 免疫荧光检测 ARL1 亚细胞定位

取适量对数期莱茵衣藻离心弃上清后, 加入 0.5 mol/L 乙二醇四乙酸 EGTA 重悬, 将细胞平铺至经 1% 聚醚酰亚胺(PEI)浸泡后的盖玻片上静置 2 min, 将盖玻片置于预冷的甲醇中浸泡 10 min 固定细胞, 重复浸泡 2 次后, 用 5% 牛血清白蛋白 (BSA) (含 0.3% Triton \times 100 和 5% 山羊血清) 覆盖盖玻片, 室温封闭 2 h。封闭完成后加入经抗原抗体纯化的 ARL1 抗体 (1:50 稀释) 室温孵育 2 h, 1 \times PBS 缓冲液清洗 10 次, 每次 3 min, 加入红色荧光标记的羊抗兔二抗, 室温孵育 1 h 后使用指甲油封闭盖玻片, 待晾干后置于倒置荧光显微镜观察。

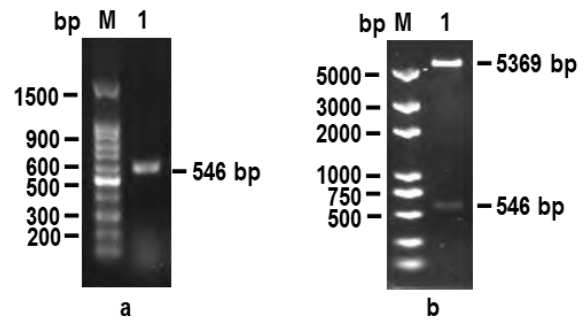
1.3.9 纤毛分离提取

取适量对数期细胞置于 5 L 液体 TAP 培养基中光照培养 3~4 d 后, 离心收集细胞重悬于 200 mL 液体 TAP 培养基中, 复苏培养 1 h, 快速加入 0.5 mol/L 冰乙酸将 pH 调至 4.5, 30 s 后使用 KOH 溶液将 pH 调至 7.4, 镜检纤毛是否完全脱落。600 g 低速离心藻液, 分离纤毛与胞体, 收集上清液, 8 000 r/min 离心收集沉淀中的纤毛。

2 结果与讨论

2.1 大肠杆菌 pET-28a(+)-arl1 原核表达载体的构建

将 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶分析, 结果如图 1 (a) 所示, 在 600 bp 处得到单一条带, 与 *arl1* 目的基因片段的大小相符。将双酶切产物进行 1% 琼脂糖凝胶分析, 结果如图 1 (b) 所示, 在 5000 bp 上方出现与载体片段大小相符的条带, 在 500 bp 和 750 bp 之间出现与目的基因条带大小相符的条带。将质粒测序后与莱茵衣藻库中 *arl1* cDNA 序列比对无误, 说明质粒构建成功, 将其命名为 pET-28a(+)-*arl1*。



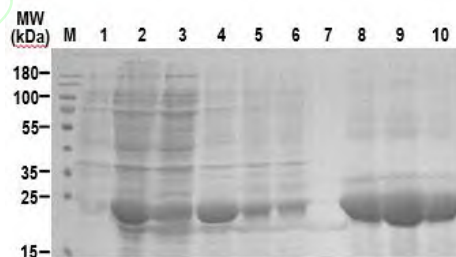
a: *arl1* PCR 产物; b: pET-28a(+)-*arl1* 双酶切验证

图 1 pET-28a(+)-*arl1* 原核表达载体构建

Fig. 1 Construction of prokaryotic expression vector of pET-28a(+)-*arl1*

2.2 6 \times His-ARL1 重组蛋白诱导、表达及纯化

经 SnapGene 软件预测分析后, ARL1 蛋白大小约为 2.1×10^4 , 将诱导破碎后的部分全蛋白、上清液、沉淀进行 SDS-PAGE 凝胶分析, 结果如图 2 所示, 在 2.5×10^4 大小处有明显的蛋白条带, 与预期的目的蛋白大小相符, 且 6 \times His-ARL1 在上清液和沉淀中都有表达。将上清液中的 6 \times His-ARL1 经镍柱亲和纯化后, 通过 SDS-PAGE 及 Image J 分析, 如图 2 所示, 其纯度大于 85%, 蛋白定量后其质量浓度为 3 mg/mL, 满足免疫要求。



M: 蛋白标准物; 1: 诱导前全蛋白; 2: 诱导后全蛋白; 3: 诱导后水溶性 (上清) 蛋白; 4: 诱导后水不溶 (沉淀) 蛋白; 5-7: 漂洗液; 8-10: 洗脱液

图 2 6 \times His-ARL1 融合蛋白的表达和纯化

Fig. 2 Expression and purification of the fusion protein 6 \times His-ARL1

本实验室常用的原核系统表达标签为 MBP、GST 和 6 \times His, 虽然 MBP 具有促融、促表达作用, 但其相对分子质量达 4×10^4 , GST 标签约为 2.6×10^4 , 相较于目的蛋白具有较强的免疫原性。6 \times His 标签相对分子质量较小, 不易引起免疫反应, 于是将该标签融合蛋白作为免疫原进行动物免疫。虽然 6 \times His 标签融合蛋白在上清液和沉淀中均有表达, 但由图 2 可见, 其表达量足够高, 尽管选择相对表达量较少的上清液作为蛋白源纯化仍可得大量纯度

较高的目的蛋白,而上清液中的可溶性蛋白也保证了抗原具有较高的免疫原活性,有利于产生高特异性、高活性的抗体。

2.3 动物免疫及抗血清效价的检测

将纯化后的 6×His-ARL1 作为抗原免疫新西兰雄性大白兔,3 次免疫后采取间接 ELISA 法检测抗血清的效价,实验组血清与阴性对照 OD₄₅₀ 比值,最大值一半所对应的抗血清稀释倍数极为抗血清效价^[24-25],结果如图 3 所示,本次免疫所得的抗血清效价为 1:102400,达到取血标准^[26]。可对动物进行采血处理,获得 ARL1 血清。

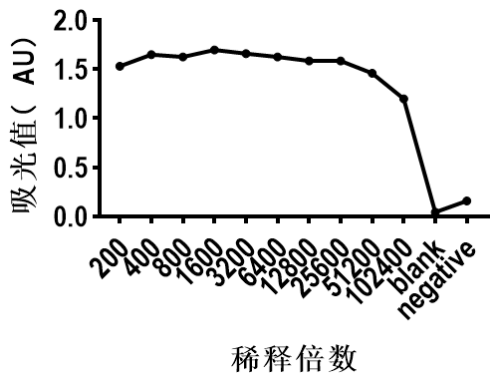


图 3 间接 ELISA 法测定抗血清效价

Fig. 3 Antiserum titer determination by indirect ELISA method

2.4 抗血清 Protein A 纯化及特异性检测

将免疫后得到的抗血清采用 protein A 亲和层析法纯化,提取莱茵衣藻野生型 CC-125 藻种全蛋白,用纯化后的 ARL1 抗体按照 1:1000 比例进行免疫印迹检测,结果如图 4 所示。Protein A 纯化后的 ARL1 抗体可以识别莱茵衣藻内源 ARL1 蛋白。但由于免疫抗原存在多个抗原识别位点,在 3.5×10^4 处存在明显的非特异性条带,因此需要进一步进行抗原抗体纯化。

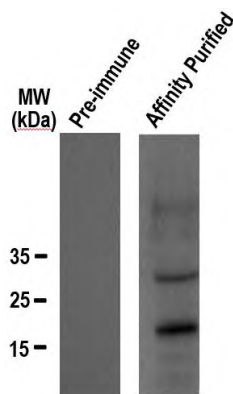


图 4 免疫印迹检测 Protein A 纯化后 ARL1 抗体特异性

Fig. 4 Detection of specificity of ARL1 antibody by western

blotting after protein A purification

2.5 抗原抗体亲和纯化

将 6×His-ARL1 作为抗原偶联至硝酸纤维素膜,并将膜剪碎,与经 Protein A 纯化后的 ARL1 抗血清结合,ARL1 的抗体可特异性结合 6×His-ARL1 抗原,而非特异性的抗体会被漂洗弃去以达到再一次纯化抗血清的目的。将抗原抗体亲和纯化后的抗血清再次通过免疫印迹检测后,其识别野生型莱茵衣藻中内源 ARL1 蛋白的特异性,由图 5 可见,在 2×10^4 处出现单一条带,表明 ARL1 抗体经抗原抗体纯化后具有较高的特异性,可以用于后续的实验且满足此后蛋白功能的分析要求。

借助于抗原抗体特异性结合的性质,通常采用另一标签的融合蛋白作为抗原纯化目的抗体。由于不同原核表达载体所表达的目的蛋白经纯化后,除目的蛋白外,标签和其他杂质蛋白均有所不同,仅目的蛋白能够特异性地与目的抗体结合,从而达到进一步纯化抗体的目的。而本研究中,鉴于前期表达结果,目的蛋白在沉淀中也能够大量表达,而上清液中的杂质蛋白与沉淀中的杂质蛋白并不相同,因此选择沉淀中的目的蛋白作为抗原进行抗原抗体纯化实验。常用的纯化方法有两种,一种是将目的抗原蛋白结合在经溴化氢活化的琼脂糖填料中,以填料作为载体结合抗体;另一种可将目的蛋白进行 SDS-PAGE 分离后转移至硝酸纤维素膜,将膜作为载体结合抗体。前者需要目的蛋白以可溶性蛋白溶解于上清液中,后者却对目的抗原的包容度较高,因此本研究选择沉淀蛋白作为抗原转移至硝酸纤维素膜,进行抗原抗体纯化。

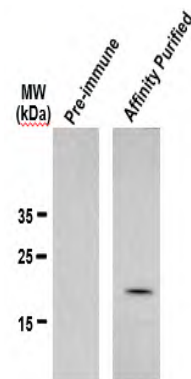


图 5 免疫印迹检测抗原抗体纯化后 ARL1 抗体特异性

Fig.5 Detection of specificity of purified ARL1 antibody by western blotting

2.6 ARL1 蛋白亚细胞定位

为了研究 ARL1 在莱茵衣藻细胞中的定位,利用纯化后的 ARL1 抗体对 CC-125 细胞进行免疫荧光

染色,结果如图6所示,ARL1抗体能够与莱茵衣藻细胞中的ARL1的蛋白特异性结合,在细胞质内有大量ARL1表达,且ARL1蛋白能够富集在细胞基体部位,少量能够定位于纤毛内。这为后续研究ARL1在纤毛内的功能提供了有力证据。

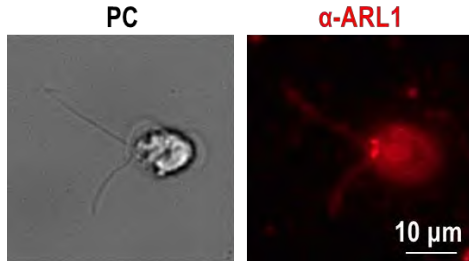


图6 免疫荧光检测 ARL1 亚细胞定位

Fig. 6 Detection of subcellular localization of ARL1 by Immunofluorescence

此外,提取莱茵衣藻纤毛蛋白,通过免疫印迹进一步验证ARL1是否存在于纤毛中,结果如图7所示,利用ARL1抗体检测发现,在 2.5×10^4 下方有单一条带检出,表明ARL1存在于纤毛内。



图7 免疫印迹检测 ARL1 纤毛定位

Fig. 7 Detection of localization of ARL1 by immunoblotting

纤毛是从细胞基体向外延伸的披膜细胞器,纤毛内大部分蛋白质均依赖于纤毛内运输从细胞基体运送到纤毛内,用于纤毛生长、组装和维持内稳态,因此可以认为细胞基体是一个纤毛蛋白池,当通过免疫荧光染色时,可见大量ARL1蛋白富集于细胞基体。进入纤毛的蛋白,一般通过纤毛内运输系统维持纤毛内稳态,当然也有例外,诸如ARL6/BBS3、ARL3、ARL13等ARL家族小G蛋白,通常通过N端酯化修饰与纤毛膜连接扩散进入纤毛,而本研究中的ARL1如何进入纤毛尚不清楚。而该抗体的产生可有助于后期转基因藻种的筛选,通过对转基因藻种进行单分子成像观察,可直观的分析ARL1的纤毛内运动方式。

3 结 语

本研究通过选用莱茵衣藻中的同源基因 $arl1$ 基因片段构建原核表达载体pET-28a(+)- $arl1$,表达纯化融合蛋白6×His-ARL1后免疫新西兰大白兔获得抗血清,经免疫后抗血清依次进行Protein A抗体富集和抗原抗体亲和纯化获得了特异性强的ARL1多克隆抗体,这是首次用莱茵衣藻ARL1全基因序列制备兔抗莱茵衣藻多克隆抗体。最终能够特异性的检测出莱茵衣藻内源表达的ARL1,说明制备的ARL1抗体具有较高的特异性,该抗体可用于后续研究ARL1在纤毛内的定位,在纤毛内的存在组分,以及在纤毛内运输中的作用与功能,为更深层次的阐明纤毛信号转导分子机理提供了研究材料。

参考文献:

- [1] SHIBA D, YOKOYAMA T. The ciliary transitional zone and nephrocystins[J]. Differentiation, 2012, 83(2): S91-S96.
- [2] XUE B, LIU Y X, DONG B, et al. Intraflagellar transport protein RABL5/IFT22 recruits the BBSome to the basal body through the GTPase ARL6/BBS3 [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2020, 117(5): 2496-2505.
- [3] JIN H, WHITE S R, SHIDA T, et al. The conserved bardet-biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia[J]. Cell, 2010, 141(7): 1208-1219.
- [4] DONALDSON J G, JACKSON C L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease[J]. Nature reviews molecular cell biology, 2011, 12(6): 362-375.
- [5] LIU Y X, LI W J, ZHANG R K, et al. Unraveling the intricate cargo-BBSome coupling mechanism at the ciliary tip [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 2023, 120(13): e2218819120.
- [6] LEE F J, HUANG C F, YU W L, et al. Characterization of an ADP-ribosylation factor-like 1 protein in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. The journal of biological chemistry, 1997, 272(49): 30998-31005.
- [7] TAMKUN J W, KAHN R A, KISSINGER M, et al. The arflike gene encodes an essential GTP-binding protein in

- Drosophila* [J]. Proceedings of the national academy of sciences, 1991, 88(8): 3120-3124.
- [8] PRICE H P, GOULDING D, SMITH D F. ARL1 has an essential role in *Trypanosoma brucei*[J]. Biochemical society transactions, 2005, 33(4): 643-645.
- [9] LOWE S L, WONG S H, HONG W. The mammalian ARF-like protein 1 (Arl1) is associated with the Golgi complex [J]. Journal of cell science, 1996, 109(1): 209-220.
- [10] 樊振川, 刘雁霞. 莱茵衣藻 LZTFL1 蛋白的多克隆抗体制备及应用[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(11): 109-115.
- [11] 田伟. 莱茵衣藻纤毛内蛋白 IFT139 的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备[D]. 天津:天津科技大学, 2016.
- [12] 薛斌, 王高飞, 潘强, 等. 莱茵衣藻 IFT22 蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(11): 1915-1921.
- [13] 任海月, 董彬, 樊振川, 等. 莱茵衣藻纤毛内运输蛋白 IFT46 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1124-1132.
- [14] 王晶. 小 G 蛋白 BBS3b 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备 [D]. 天津:天津科技大学, 2018.
- [15] 刘雁霞, 刘思佳, 王慧, 等. 莱茵衣藻 BBS1 蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体制备[J]. 天津科技大学学报, 2019, 34(6): 31-34.
- [16] AJMAL M, Khan M I, Neveling K, et al. Exome sequencing identifies a novel and a recurrent BBS1 mutation in Pakistani families with Bardet-Biedl syndrome [J]. Molecular vision, 2013, 19: 644-653.
- [17] 薛斌, 王高飞, 潘强, 等. 莱茵衣藻 IFT22 蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 中国细胞生物学学报, 2018, 40(11): 1915-1921.
- [18] 韩鹏飞, 闫珍, 樊振川. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白 IFT57 抗原的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备 [J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 108-114.
- [19] 董彬, 吴松, 程荣强, 等. 莱茵衣藻 BBSome 蛋白 BBS2 原核表达、纯化和多克隆抗体的制备及鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(2): 145-152.
- [20] BERNSTEIN M, BEECH P L, KATZ S G, et al. A new kinesin-like protein (Klp1) localized to a single microtubule of the *Chlamydomonas flagellum*[J]. Journal of molecular cell biology, 1994, 125(6): 1313-1326.
- [21] 王震, 董彬, 樊振川, 等. 莱茵衣藻 IFT25 的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(9): 903-908.
- [22] 李桂新, 孙长凯, 程桂芝, 等. 应用 Protein A 亲和层析法制备及纯化 R1 JHL 单克隆抗体[J]. 大连医科大学学报, 2008 (2): 188-190.
- [23] 李文娟, 贾航, 薛斌, 等. 莱茵衣藻 BBS8 蛋白的原核表达、纯化及多克隆抗体的制备 [J]. 水生生物学报, 2022, 46(9): 1319-24.
- [24] JIANG, W. , Liu, X. , Wu, D. , et al. A simple, rapid one-step ELISA using antibody-antibody complex[J]. Biotechnology and applied biochemistry, 2015, 62(1): 126-131.
- [25] LIMSUWANCHOTE S, WUNGSINTAWEEKUL J, YUSAKUL, G, et al. Preparation of a monoclonal antibody against notoginsenoside R1, a distinctive saponin from Panax notoginseng, and its application to indirect competitive ELISA [J]. Planta medica, 2014, 80(4): 337-342.
- [26] 任海月, 董彬, 樊振川, 等. 莱茵衣藻纤毛内运输蛋白 IFT46 的原核表达纯化及其多克隆抗体的制备[J]. 生物工程学报, 2016, 32(8): 1124-1132.