

技术与方法

莱茵衣藻IFT22蛋白的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备

薛斌^{1,2,3,4} 王高飞¹ 潘强¹ 李淑婷¹ 王昊¹ 李晓瑾¹ 樊振川^{1,2,3,4*}

(¹天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457; ²天津科技大学大健康生物技术研究所, 天津 300457; ³天津市大健康生物技术国际联合研究中心, 天津 300457; ⁴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 纤毛内运输蛋白IFT22是IFT复合物B中(IFT-B)的一个重要组分, 但对其功能研究存在很大的争议, 为深入研究IFT22功能, 制备一支特异性好的IFT22抗体是必不可少的。该研究首先用纯度为93%的6×His标签IFT22抗原免疫新西兰大白兔, 采集3次免疫后血清, 间接ELISA法测定效价为1:64 000。抗血清经Protein A和抗原抗体纯化后, Western blot检测结果表明, 以*Chlamydomonas reinhardtii* CC125全细胞为抗原时, 孵育IFT22抗体后, 只有一条带出现, 说明anti-IFT22特异性非常好, 是研究IFT22蛋白功能的绝佳材料。

关键词 莱茵衣藻; 纤毛; IFT22; 抗原; 抗体

Prokaryotic Expression, Purification and Polyclonal Antibody Preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT22 Protein

Xue Bin^{1,2,3,4}, Wang Gaofei¹, Pan Qiang¹, Li Shuting¹, Wang Hao¹, Li Xiaojin¹, Fan Zhenchuan^{1,2,3,4*}

(¹College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; ²Institute of Health Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China; ³International Collaborative Research Center for Health Biotechnology, Tianjin 300457, China; ⁴China International Science and Technology Cooperation Base for Health Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract Intraflagellar transport protein IFT22 is an important component of the IFT-B, but its function is controversial. It is indispensable to create a specific anti-IFT22 for its function research. Here, bacterial-expressed N-terminal His-tagged full length IFT22 recombinant protein was used as the antigen to immunize the New Zealand white rabbits. After the third immunization, the titer was determined to be 64 000 by an indirect ELISA. The antiserum was purified by Protein A and antigen, and the Western blot test showed only one band appeared when antigen was whole cell of *Chlamydomonas reinhardtii* CC125. The result showed the anti-IFT22 had a great specificity, which was an excellent material of studying function of IFT22.

Keywords *Chlamydomonas reinhardtii*; cilia; IFT22; antigen; antibody

莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)是研究真核生物纤毛功能的主要模式生物之一^[1]。纤毛(cilium)又叫鞭毛(flagellum), 是突起于真核细胞表面的一类细胞器, 有9+2型(motile cilia, 运动型纤毛)

收稿日期: 2018-06-11

接受日期: 2018-09-25

*通讯作者。Tel: 022-60912419, E-mail: fanzhen@tust.edu.cn

Received: June 11, 2018

Accepted: September 25, 2018

*Corresponding author. Tel: +86-22-60912419, E-mail: fanzhen@tust.edu.cn

网络出版时间: 2018-10-26 17:43:15

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20181026.1743.030.html>

或者9+0型(primary cilia, 原发型纤毛)。纤毛没有蛋白质合成所需要的细胞器如核糖体等, 所以纤毛生物生成所需蛋白分子进出纤毛均是由纤毛内运载体(intraflagellar transport, IFT)颗粒进行运送的^[2]。纤毛组装缺陷或者功能紊乱会引发称为“纤毛病”的遗传性疾病, 如Bardet-Biedl综合征、Joubert综合征和Alstrom综合征等^[3-5]。因此, 研究IFT蛋白的功能对了解纤毛病的发病机理和预防该疾病的发生具有重大意义, 而对应的抗体是研究蛋白功能所需的首要材料。

IFT22是一个非典型的小G蛋白, 缺少小G蛋白应有的G4域。对于IFT22功能的研究, 人们利用不同的模式生物得出不同的结论。2006年, Schafer等^[6]以线虫为模式生物的研究表明, IFTA-2(IFT22在线虫中同源蛋白)不是纤毛形成蛋白, 而是与信号传导有关。2008年, Adhiambo等^[7]以锥虫为模式生物的研究表明, Rab-like 5(IFT22在锥虫中同源蛋白)参与纤毛形成。2012年, Qin等^[8]以莱茵衣藻为模式生物的研究表明, IFT22不直接参与鞭毛组装, 但是决定参与鞭毛组装IFT颗粒的量。莱茵衣藻具有易于培养、生长周期短和纤毛可分离等优点, 是研究纤毛功能的理想模式生物。本研究利用原核表达系统表达IFT22蛋白, 经蛋白纯化、免疫和抗原抗体蛋白纯化后, 制备了一支特异性高的anti-IFT22抗体, 为后续IFT22功能的研究提供了理想的材料。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 大肠杆菌(*Escherichia coli*)XL1-blue、BL21(DE3)感受态细胞、pMal-c2x和pET-30a质粒为本实验室保存; 莱茵衣藻CC125藻种购自美国莱茵衣藻中心(www.chlamy.org); 免疫用雄性大白兔购自北京市昌扬西山养殖场。动物实验已通过北京市科学技术伦理委员会审批。

1.1.2 试剂 质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒购自OMEGA公司; 氨苄青霉素、卡那霉素和IPTG购自北京索莱宝生物科技有限公司; 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、*pfu* DNA聚合酶和蛋白Marker购自加拿大Fermentas公司; DNA Marker购自北京全式金生物技术有限公司; 抗体纯化介质(Protein A Sepharose™ CL-4B)及亲和纯化介质(Ni Sepharose™

6 Fast Flow)购自美国GE Healthcare公司; 硝酸纤维素膜(NC膜)购自美国PALL公司; 弗氏完全佐剂及弗氏不完全佐剂购自美国Sigma公司; HRP标记的羊抗兔/鼠抗体购自美国Jackson公司; 荧光标记的羊抗兔二抗、羊抗小鼠二抗购自美国Sigma公司; ECL化学发光显色液购自德国Millipore公司; 其他药品试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 表达载体pET-30a-*ift22*的构建 *ift22*基因被送至苏州金唯智生物科技有限公司合成, 两端酶切位点为*EcoR* I和*Xho* I, 将经过双酶切的*ift22*基因克隆至表达载体pET-30a上。

1.2.2 蛋白质诱导表达及纯化 实验方法参考文献[9], 将构建好的表达载体转入*E. coli* BL21中, 挑取单克隆接种至种子培养基中, 37 °C、220 r/min培养过夜。以5%的接种量接种至发酵培养基中, 当 $D_{600}=0.8\sim 1.0$ 时, 加入0.2 mmol/L IPTG, 20 °C、200 r/min过夜培养。将收集的菌体用PBS洗3次, 超声破碎后, 取上清和沉淀进行SDS-PAGE分析。确定目标蛋白在上清或者沉淀后, 将蛋白结合到预先平衡好的镍柱中, 室温结合1 h, 而后漂洗、洗脱, 最后进行SDS-PAGE电泳检测, 并进行纯度分析。

1.2.3 动物免疫 实验方法参考文献[10], 免疫用兔子为2.0 kg左右的新西兰大白兔, 免疫之前耳静脉取阴性血清。取400 μg免疫原, 用生理盐水稀释到200~500 μL, 再加入等体积弗氏佐剂(初次免疫用弗氏完全佐剂, 加强免疫用弗氏不完全佐剂); 用混匀仪器将溶液和佐剂混匀, 形成油包水。将混匀好的免疫原进行背部皮下注射免疫, 打8~10个点。

1.2.4 多克隆抗体效价测定 实验方法参考文献[11], 采用间接ELISA法测定抗血清的效价。以IFT22蛋白作为包被抗原, 用5%的脱脂乳粉为封闭液, 产生的抗血清为一抗, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔为二抗, 经TMB(3',3',5',5'-四甲基联苯胺)显色, 用酶标仪测定 D_{450} 处的吸光值, 效价为1/2最大 D 值所对应的稀释倍数。

1.2.5 Protein A纯化 实验方法参考文献[12], 将1 mL抗血清与10 mL结合缓冲液混合后, 加入预先平衡好的含有Protein A填料的结合柱中, 室温结合1 h后, 用结合缓冲液漂洗至G-250不变色为止, 最后用洗脱缓冲液洗脱(收集管中提前加入终止液), 加入甘油和叠氮化钠并于-20 °C保存。

1.2.6 CNBr-activated Sepharose 4B的抗原抗体纯化 称取一定量的CNBr-activated Sepharose 4B干粉, 溶胀于1 mmol/L HCl, 用pH8.3的coupling buffer洗至pH为8.3。将抗原溶于coupling buffer中, 与洗好的介质于4 °C结合过夜, 然后用0.1 mol/L Tris-HCl (pH8.0)室温结合2~4 h, 最后用100 mmol/L Tris-HCl、0.5 mol/L NaCl(pH8.5)和50 mmol/L Gly、1 mol/L NaCl(pH3.5)交替洗脱至少8次。

1.2.7 免疫荧光实验^[13] 取对数生长期的CC125细胞, 并固定到盖玻片上, 5% BSA室温固定1 h。固定后, 加入纯化好的Anti-IFT22抗体(1:50稀释) 孵育4 h, 1×PBST洗10次后, 加入荧光标记羊抗兔二抗, 室温孵育1 h, 封片后在荧光显微镜下拍照。

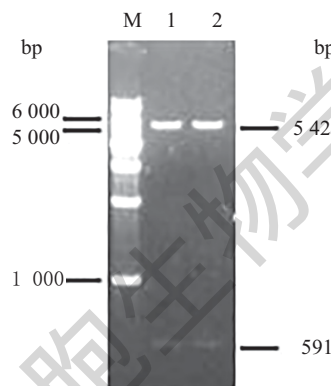
2 结果

2.1 表达载体的构建

*ift22*基因由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 并将其克隆至载体pET-30a-*ift22*, 两端酶切位点分别是*EcoR* I和*Xho* I。载体经双酶切验证, 结果如图1所示, 从图中可以看出, 经双酶切后, 分别得到与载体和目的基因大小一致的两条带, 载体验证正确。

2.2 IFT22蛋白诱导表达及纯化

将上述构建好的pET-30a-*ift22*载体转入*E. coli* BL21中进行诱导表达, 经镍柱亲和纯化后, 结果如图2所示。从图中可看出, 出IFT22蛋白大部分表达于上清中, 纯化后IFT22蛋白量占总蛋白量的93%, 是适合免疫大白兔的抗原。

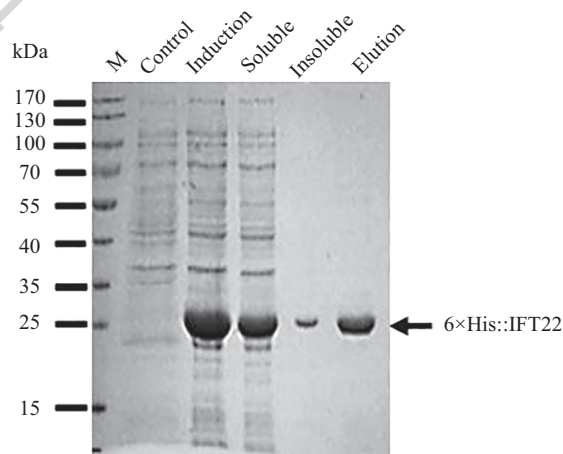


M: DNA marker; 1, 2: 两个转化子酶切验证, 酶切位点为*EcoR* I和*Xho* I。

M: DNA marker; 1,2: restriction digestion analysis of two transformants digested with *EcoR* I and *Xho* I.

图1 重组质粒双酶切验证

Fig.1 Restriction digestion analysis of recombination plasmids

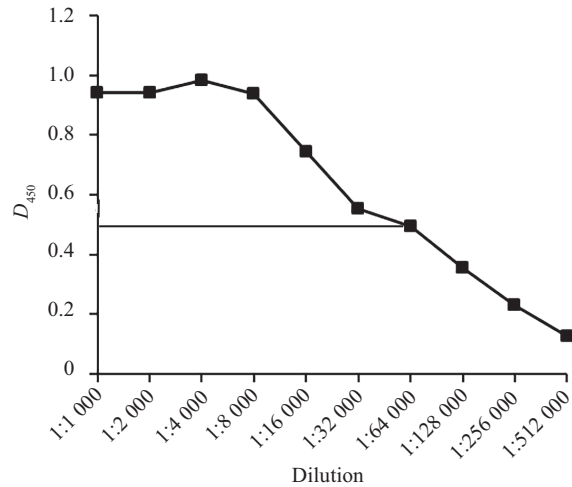


M: protein ladder; Control: 诱导前对照; Induction: 诱导后全细胞蛋白; Soluble: 诱导后上清液中蛋白; Insoluble: 诱导后包涵体蛋白; Elution: 亲和层析纯化后目的蛋白。

M: protein ladder; Control: the total protein lysates before induced; Induction: the total protein lysates after induced; Soluble: the supernatant lysates after induced; Insoluble: the sediment lysates after induced; Elution: recombinant protein after affinity purification.

图2 SDS-PAGE检测重组蛋白在*E. coli* BL21(DE3)中的表达及纯化

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the expression and affinity purification of recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3)

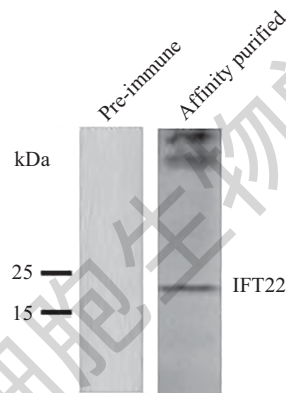


红色指示线为平台期一半所对应的 D 值, 相应的抗血清稀释比为抗血清的滴定度。

The red indicator line is the $1/2 D$ value, and the corresponding antiserum dilution ratio is the titration degree of antiserum.

图3 间接ELISA法测定抗血清效价

Fig.3 ELISA test of anti-IFT22 polyclonal antiserum



Pre-immune: 免疫前血清检测莱茵衣藻野生型藻种CC-125中IFT22蛋白; Affinity purified: Protein A纯化后血清检测莱茵衣藻野生型藻种CC-125中IFT22蛋白。

Pre-immune: IFT22 protein from the wide-type *C. reinhardtii* CC125 was probed with pre-immune serum; Affinity purified: IFT22 protein from the wide-type *C. reinhardtii* CC125 was probed with protein A purified anti-IFT22.

图4 免疫印迹法验证抗血清特异性

Fig.4 The antibody specificity detected by Western blot

2.3 抗体效价的测定

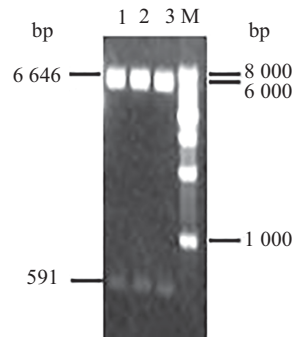
用纯化得到的IFT22蛋白免疫新西兰大白兔, 经3次免疫之后, 在耳缘静脉少量采血, 利用间接ELISA法测定抗血清的效价, 结果如图3所示。从图中可以看出, 抗血清效价达到1:64 000。

2.4 抗体特异性检测

2.4.1 抗血清Protein A纯化 抗血清中含有除抗体之外多余的杂蛋白, 因此需要进一步纯化。Protein A是来源于金黄色葡萄球菌细胞壁的一种表面蛋白, 可与哺乳动物IgG的Fc段结合。本实验首先对抗血清进行Protein A纯化, 结果如图4所示。从图中可以看出, 抗血清经Protein A纯化后, 仍然有非特异性条

带, 还需抗原抗体进一步纯化。

2.4.2 CNBr-activated Sepharose 4B的抗原抗体纯化 在免疫大白兔时, 使用6×His标签融合表达的IFT22蛋白; 而进行抗原抗体纯化时, 使用MBP标签的IFT22融合蛋白。pMal-c2x-ift22载体构建结果如图5所示。从图中可以看出, 转化子经过酶切验证后, 载体和目的基因大小都与预期一致, 载体构建成功。将构建好的新载体转入*E.coli* BL21, 经诱导表达和亲和纯化后, 结果如图6所示。从图中可以看出, 经纯化后得到纯度较高的目的蛋白。将纯化好的MBP-IFT22蛋白结合到CNBr-activated Sepharose 4B上, 将经过Protein A纯化的抗体再进行一次抗原抗体纯化, 检测结果如图7

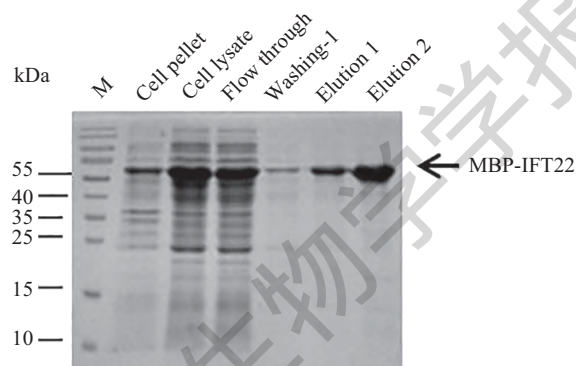


M: DNA marker; 1~3: 三个转化子酶切验证, 酶切位点为*EcoR* I和*Xho* I。

M: DNA marker; 1-3: restriction digestion analysis of three transformants digested with *EcoR* I and *Xho* I.

图5 重组质粒双酶切验证

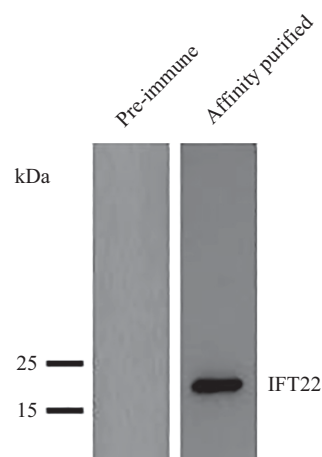
Fig.5 Restriction digestion analysis of recombination plasmids



M: protein ladder; Cell pellet: 诱导后沉淀蛋白; Cell lysate: 诱导后上清液中蛋白; Flow through: 流穿液; Washing-1: 漂洗液; Elution 1、2: 洗脱液。
M: protein ladder; Cell pellet: the sediment after induced; Cell lysate: the supernatant after induced; Flow through: flow through solution; Washing-1: washing solution; Elution 1,2: elution solution.

图6 SDS-PAGE检测重组蛋白在*E. coli* BL21(DE3)中的表达及纯化

Fig.6 SDS-PAGE analysis of the expression and affinity purification of recombinant protein in *E. coli* BL21 (DE3)

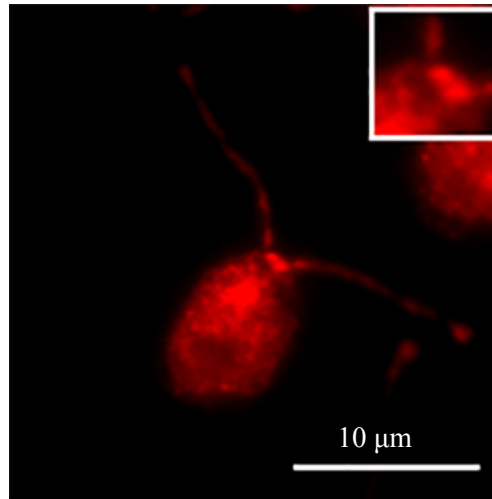


Pre-immune: 免疫前血清检测莱茵衣藻野生型藻种CC-125中IFT22蛋白; Affinity purified: 抗原抗体纯化后血清检测莱茵衣藻野生型藻种CC-125中IFT22蛋白。

Pre-immune: IFT22 protein from the wide-type *C. reinhardtii* CC125 was probed with pre-immune serum; Affinity purified: IFT22 protein from the wide-type *C. reinhardtii* CC125 was probed with antigen-antibody purified anti-IFT22.

图7 免疫印迹法验证抗血清特异性

Fig.7 The antibody specificity detected by Western blot



IFT22多克隆抗体在莱茵衣藻野生型藻种内进行免疫荧光分析, IFT22蛋白在基体内有聚集, 在纤毛内延纤毛呈点状分布。
The polyclonal antibody of IFT22 as the primary antibody, it showed that IFT22 is localized in the base and along the flagella as punctuated dots.

图8 免疫荧光检测IFT22蛋白在莱茵衣藻中的定位

Fig.8 Immunofluorescence analysis the localization of IFT22 in *C. reinhardtii*

所示。从结果中可以看到, 抗体经过抗原抗体纯化后, 只有一条特异性条带, 无其他杂带, 抗体制备成功。

2.5 IFT22蛋白在莱茵衣藻中的定位

利用免疫荧光技术可以直接观察到蛋白质在体内的分布, 从而为其生物学功能的确认提供理论依据。本实验采用免疫荧光技术来研究IFT22在莱茵衣藻中的定位, 结果如图8所示。从图中可以看出, anti-IFT22能够与莱茵衣藻IFT22蛋白特异性结合, 在细胞基体(白色框内)和鞭毛处都有分布, 与报道的其他IFT-B复合物(IFT46)^[14]一致。

3 讨论

要制备特异性好的抗体, 免疫前抗原的纯度是关键。本研究利用将纯度为93%的6×His标签IFT22抗原免疫新西兰大白兔, 采血并经Protein A纯化后, 仍然检测到非特异性条带, 用该抗体进行后续功能研究可能出现假阳性。大多数研究者选择膜纯化来进一步获得特异性更好的抗体, 但是这样会浪费较多的抗体, 并且得率较低。本研究选择MBP标签的IFT22抗原, 将其结合到CNBr-activated Sepharose 4B介质上, 利用抗原抗体纯化, 不仅能得到特异性高的抗体, 而且结合了抗原的CNBr-activated Sepharose 4B介质可以反复利用, 很大程度上提高了抗体制备的效率和得率。

目前, 对IFT22功能的研究存在很大的争议, 不

同的模式生物得出不同的结论。通过蛋白序列比对可知, IFT22是一个Rab-like 5非典型的小G蛋白。小G蛋白在体内具有GTP-locked和GDP-locked两种状态。Schafer等^[6]的研究表明, 在线虫中, GTP-locked的IFTA-2进入纤毛, 而GDP-locked的IFTA-2不进入纤毛。但是, Qin等^[8]在以莱茵衣藻为模式生物进行研究时, 没有对IFT22蛋白功能进行研究, 尚未得知在莱茵衣藻中IFT22蛋白进出纤毛是否受其GTP-和GDP-bound状态控制。与其他模式生物相比, 莱茵衣藻最大的优势是可以将鞭毛与细胞体分开, 这样可以更加明确地研究纤毛内运输蛋白的功能。本研究制备的anti-IFT22多克隆抗体, 是研究该部分内容的前提材料。研究IFT蛋白在纤毛中的定位也是功能研究中的重要组成部分, 免疫荧光是研究蛋白定位的主要技术手段, 一支特异性好的抗体能避免假阳性的出现。

本研究以开发多克隆抗体为起点, 后续将对IFT22在纤毛内运输的功能进行深入研究, 从而更加了解IFT22在莱茵衣藻中纤毛形成以及信号传导中的作用。

参考文献 (References)

- 1 Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O. The chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 2007; 318(5848): 245-50.
- 2 Prevo B, Mangeol P, Oswald F, Scholey J M, Peterman EJ. Functional differentiation of cooperating kinesin-2 motors

- orchestrates cargo import and transport in *C. elegans cilia*. *Nat Cell Biol* 2015; 17(12): 211-20.
- 3 Harris PC, Torres VE. Polycystic kidney disease. *Annu Rev Med* 2009; 60: 321-37.
- 4 Blacque OE, Leroux MR. Bardet-Biedl syndrome: an emerging pathomechanism of intracellular transport. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(18): 2145-61.
- 5 Kerry LT, Tamara C. *Cilia & nervous system development, function*. Germany: Springer Netherlands, 2013, 131-63.
- 6 Schafer JC, Winkelbauer ME, Williams CL, Haycraft CJ, Desmond RA, Yoder BK. Ifta-2 is a conserved cilia protein involved in pathways regulating longevity and dauer formation in *Caenorhabditis elegans*. *J Cell Sci* 2006; 119(19): 4088-100.
- 7 Adhiambo C, Blisnick T, Toutirais G, Delannoy E, Bastin P. A novel function for the atypical small G protein Rab-like 5 in the assembly of the trypanosome flagellum. *J Cell Sci* 2009; 122(Pt 6): 834-41.
- 8 Silva DA, Huang X, Behal RH, Cole DG, Qin H. The Rab15 homolog IFT22 regulates the cellular pool size and the amount of IFT particles partitioned to the flagellar compartment in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cytoskeleton* 2012; 69(1): 33-48.
- 9 董彬, 吴松, 王晶, 孟德梅, 樊振川. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白IFT27的原核表达、纯化及多克隆抗体制备. *生物技术* (Dong Bin, Wu Song, Wang Jing, Meng Demei, Fan Zhenchuan. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT27. *Biotechnology*) 2016; 26(6): 532-8.
- 10 田伟, 董彬, 李镇芳, 孟德梅, 樊振川. 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. *天津科技大学学报* (Tian Wei, Dong Bin, Li Zhenfang, Meng Demei, Fan Zhenchuan. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT139 protein antigen. *Journal of Tianjin University of Science & Technology*) 2016; 31(6): 27-33.
- 11 王晶, 樊振川. 小G蛋白BBS3b的原核表达纯化及其多克隆抗体制备. *生物技术* (Wang Jing, Fan Zhenchuan. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of small GTPase BBS3b. *Biotechnology*) 2017; 27(4): 364-9.
- 12 董彬, 王震, 刘雁霞, 孟德梅, 樊振川. 莱茵衣藻纤毛内运送蛋白IFT70的原核表达、纯化及其多克隆抗体的制备. *中国生物制品学杂志* (Dong Bin, Wang Zhen, Liu Yanxia, Meng Demei, Fan Zhenchuan. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT70. *Chinese Journal of Biologicals*) 2017; 30(9): 924-30.
- 13 刘雁霞, 樊振川. 莱茵衣藻LZTFL1蛋白的多克隆抗体制备及应用. *中国生物工程杂志* (Liu Yanxia, Fan Zhenchuan. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* LZTFL1. *China Biotechnology*) 2017; 37(11): 109-15.
- 14 任海月, 董彬, 樊振川, 孟德梅. 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. *生物工程学报* (Ren Haiyue, Dong Bin, Fan Zhenchuan, Meng Demei. Prokaryotic expression, purification and polyclonal antibody preparation of *Chlamydomonas reinhardtii* IFT46. *Chinese Journal of Biotechnology*) 2016; 32(8): 1124-32.