

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

董彬¹, 吴松¹, 程荣强¹, 孟德梅^{1,2}, 樊振川^{*1,2}

(1. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 教育部食品营养与安全重点实验室, 天津 300457; 2. 天津科技大学 新农村发展研究院, 天津 300457)

摘要: BBSome 蛋白复合物是纤毛蛋白组分之一, BBSome 组装或纤毛运输缺陷可导致巴-比二氏综合征。其中, BBSome 组分 BBS2 缺失已被临床证明是导致 BBS 的病因之一。莱茵衣藻是研究 BBSome 组装和纤毛运输的一种很好的模式生物。为深入研究 BBS2 的致病机制, 需要特异性识别其 BBS2 蛋白的抗体。本文将莱茵衣藻 BBS2 基因 5' 端 399 bp 的 cDNA 序列克隆到原核表达载体 pET28a-bbs2, 转入大肠杆菌 BL21(DE3) 细胞进行诱导表达。在 8 mol/L 尿素存在的情况下对该融合蛋白进行镍柱亲和纯化, 并将纯化后的融合蛋白免疫新西兰大白兔。SDS-PAGE 电泳结果表明: 分子量为 15 kDa 的重组 6×His-BBS2 融合蛋白为水不溶性蛋白。5 次免疫后的抗莱茵衣藻 BBS2 抗血清效价高达 1:256 000。经 Protein A 琼脂糖 CL-4B 亲和纯化后的抗血清不仅在 Western blotting 分析中能特异性识别莱茵衣藻 BBS2, 而且在免疫荧光染色分析中能精确定位 BBS2 于基体和纤毛内。这一多克隆抗体的成功制备为深入开展 BBS2 在 BBSome 组装和纤毛运输中的分子作用机制提供了基础。

关键词: 莱茵衣藻, 纤毛, BBS2, 原核表达, 蛋白纯化, 多克隆抗体

中图分类号: Q 786 文章编号: 1673-1689(2019)02-0145-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.02.021

Prokaryotic Expression, Purification, Polyclonal Antibody Preparation and Identification of the *Chlamydomonas reinhardtii* BBSome Protein BBS2

DONG Bin¹, WU Song¹, CHENG Rongqiang¹, MENG Demei^{1,2}, FAN Zhenchuan^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Science and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China; 2. New Rural Development Research Institute, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: BBS2 is a BBSome subunit and its loss causes Bardet-Biedl syndrome. *Chlamydomonas reinhardtii* is a model organism used for studying the Bardet-Biedl syndrome. To investigate the role of BBS2 in causing Bardet-Biedl syndrome, a prokaryotic expression vector, pET28a-bbs2 is

收稿日期: 2016-06-03

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划(13JCYBJC41900); 天津科技大学引进人才科研启动费(20130420)。

* 通信作者: 樊振川(1974—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事营养代谢病机理研究。E-mail: fanzhen@tust.edu.cn

引用本文: 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(02): 145-152.

constructed by inserting the 5' 399 bp fragment of the *bbs2* gene into the pET28a plasmid. The recombinant vector is then transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) to induce the 6 × His-BBS2 fusion protein expression. SDS- PAGE electrophoresis shows that this fusion protein is insoluble and expressed with a molecular weight of approximately 15 kDa as expected. In the presence of 8 mol/L urea, the fusion protein is purified by Ni-affinity purification and used to immunize New Zealand white rabbits. After the 5th immunization, the antisera are determined to have a titer of as high as 256 000. The antisera are then purified using protein A sepharose CL-4B. The polyclonal antibody prepared can specifically bind the *C. reinhardtii* BBS2 as shown in Western blotting assay and identified BBS2 in the basal bodies and in the flagellum as determined by immunofluorescent microscopy. The availability of this antibody will strengthen the research to investigate the role of BBS2 in causing Bardet-Biedl syndrome.

Keywords: *Chlamydomonas reinhardtii*, flagella, BBS2, prokaryotic expression, protein affinity purification, polyclonal antibody

巴-比二氏综合征 (Bardet-Biedl Syndrome, BBS) 是一种由细胞纤毛功能障碍所引起的一类遗传病^[1], 其主要症状包括肥胖症^[2], 视网膜病变^[3]及肾囊肿^[4]等病症, 因此是一类“纤毛病”。目前, 在人体中鉴定出的与 BBS 有关的基因有 12 个 (*bbs1*–*12*)^[5], 其中由 *bbs1/2/4/5/7/8/9* 编码的蛋白与 BBIP10 蛋白形成一个蛋白复合体称为 BBSome^[6]。研究表明 BBSome 在纤毛信号传导中起着重要作用, 但与纤毛组装和维持并无关联。因此, 阐明 BBSome 组装、纤毛运输和信号传导机理是攻克 BBS 的前提。由于纤毛在物种间高度保守, 因此具纤毛单细胞微藻—莱茵衣藻很早以来就已被用作一种模式生物用于研究纤毛组装、维持和信号传导。多项研究表明, 莱茵衣藻 BBSome 定位于细胞基体和纤毛内, 是由 7 个 BBSome 蛋白亚体包括 BBS1, 2, 4, 5, 6, 8 和 9 组成的蛋白复合物, 其进入纤毛严格依赖于纤毛内运送系统 (Intra Flagellar Transport, IFT) 的完整^[7–8], 在这一运输过程中, BBSome 作为一个纤毛货物蛋白和 IFT 相偶联^[9]。除此之外, 由于缺少莱茵衣藻 BBSome 突变体及其相对应的抗体, 使得对这些基因及其蛋白产物在 BBSome 组装和纤毛运输中的功能研究难以继续。

BBS2 是 BBSome 众多蛋白亚体中非常保守的一个组分, 其突变可导致视网膜病变, 摄食增多型的肥胖及肾囊肿的形成^[10]。目前, 莱茵衣藻 BBS1、BBS4 和 BBS7 突变体已经被鉴定, 缺少这些蛋白亚体均可导致 BBSome 解聚, 使得纤毛信号传导蛋白

在纤毛内过度聚集^[6]。因此人们推测这就是导致 BBS 的原因。利用莱茵衣藻来研究 *bbs2* 在纤毛信号传导中的功能, 将会对完全阐明人类 *bbs2* 的功能提供基础, 对 BBS 病因的探索具有重要的理论意义。

由于国际上目前还没有针对莱茵衣藻 BBS2 蛋白的抗体可用, 因此制备高特异性和灵敏性的莱茵衣藻 BBS2 抗体就成为了阐明 BBS2 在 BBSome 组装和纤毛信号传导中的功能的关键因素之一。本文作者采用了简单经济的原核表达方法第一次制备了高纯度的莱茵衣藻 BBS2 部分蛋白抗原, 利用高浓度尿素溶解法对其进行了可融化处理, 进而利用新西兰大白兔为免疫动物制备出了抗莱茵衣藻 BBS2 的多克隆抗体。利用 Western blotting 和免疫荧光染色等方法进行的检测鉴定表明该多克隆抗体能特异性识别莱茵衣藻 BBS2 蛋白, 从而为全面鉴定 BBS2 在 BBSome 组装和纤毛信号传导中的功能和最终理解 BBS 致病分子机理提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-blue 和 BL21(DE3) 菌株以及重组质粒 pMAL-c2x-*bbs2* 和 pET28a 为本实验室保存。莱茵衣藻藻种 CC-125 购自美国莱茵衣藻中心 (www.chlamy.org)。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I、*pfu* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和蛋白 Marker

等均购自美国 Thermo 公司;1 Kb DNA Marker 购自北京全式金公司;质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA 产物纯化试剂盒、卡那霉素、IPTG 购自北京索莱宝生物科技有限公司;Ni Sepharose™ 6 Fast Flow 蛋白纯化介质和 Protein A Sepharose™ CL-4B 抗体纯化介质均购自美国 GE Healthcare 公司;NC 膜购自美国 PALL 公司;弗式完全佐剂和不完全佐剂均购自美国 Sigma 公司;过氧根辣酶 (HRP) 标记的羊抗兔抗体购自美国 Jackson immunoresearch 公司;ECL 显色试剂购自美国 Millipore 公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 实验动物 新西兰雄性大白兔 2 只,体重 1.5~2.0 kg,由天津欧阳实验种兔场提供。

1.2 方法

1.2.1 pET28A-bbs2 原核表达载体构建 以 pMAL-c2x-bbs2 为模板和 5'-AGGGATCCATGCTCGTGGCCGCCCTTC-3' (5'-引入 *Bam*H I 酶切位点) 和 5'-AGAAGCTTCTGTATTGAGCAGTTCCCG-3' (5'-端引入 *Hind* III 酶切位点) 为引物扩增 BBS2 基因 5' 端 399 bp 的 cDNA 序列。所得 DNA 片段用 DNA 产物回收试剂盒回收后进行 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切。酶切产物用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收后与 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切的载体 pET28a 进行连接。将连接产物转入 *E. coli* XL1-blue 感受态细胞,将转化细胞涂布于 LB 平板 (含 100 μ g/mL 卡那霉素) 过夜培养以进行抗性菌落筛选,挑取抗性菌落于 LB 液体培养基中过夜培养,提取质粒并对其进行酶切和核酸测序进行验证,验证正确的重组质粒命名为 pET28a-bbs2。PCR 扩增反应条件为:95 $^{\circ}$ C 1 min;95 $^{\circ}$ C 30 s;57 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 40 s,30 个循环。尔后取 2 μ L PCR 产物在 0.8% 的琼脂糖凝胶中进行电泳分析。

1.2.2 6xHis-BBS2 融合蛋白的诱导表达及鉴定 将 pET28a-bbs2 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行铺板培养,挑取新鲜单菌落于 LB 液体培养基中 (含 100 μ g/mL 卡那霉素) 过夜培养,再以 1:20 的比例放大进行培养,直至其 OD 值位于 0.6~0.8 区间,尔后加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 在 28 $^{\circ}$ C 温度条件下诱导 6 h 使重组蛋白 6xHis-BBS2 大量表达,同时设置不加 IPTG 诱导的对照组。最后,离心收集菌体并用超声波对其进行裂解以获得全蛋白。对全蛋白经离心 (12 000 r/min, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) 收集上

清和沉淀。最后分别取全蛋白、上清和沉淀与 2x 蛋白上样缓冲液进行混合,尔后在 12% 的 SDS-PAGE 中对其进行电泳检测。

1.2.3 6xHis-BBS2 融合蛋白的纯化 将离心回收后的沉淀用 2 mol/L 尿素溶液漂洗 3 次,然后高速离心回收沉淀 (12 000 r/min, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) 并使之溶解于 8 mol/L 尿素溶液中。用 0.45 μ m 滤膜过滤溶液后加入用含有 8 mol/L 尿素平衡液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4) 预平衡好的 Ni Sepharose High Performance 纯化柱,并于室温使其结合 1 h。尔后使样品流经纯化柱,并用含有 8 mol/L 尿素平衡液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, pH 7.4) 作为洗涤缓冲液漂洗五次以去除杂蛋白,最后用含有 8 mol/L 尿素的洗脱缓冲液 (50 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 500 mmol/L imidazole, pH 7.4) 洗脱并收集目的蛋白并将洗脱出的目的蛋白进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析^[12-13]。对于纯化得到的 6xHis-BBS2 不进行溶液置换或透析,直接将其以含有 8 mol/L 尿素的变性蛋白形式进行免疫,利用微量蛋白测定仪测定蛋白浓度,并稀释其到终浓度为 1 mg/mL 准备免疫。

1.2.4 多克隆抗体的制备 每个抗原免疫两只兔子,实验所用兔子为 3 月龄、体重在 1.5~2 kg 的雄性新西兰大白兔,在本实验室动物房适应 1 周后进行第 1 次免疫,采用皮下多点注射的方式免疫,每只兔子每次免疫 1 mg 抗原,初次免疫前耳部取血^[14]作为后期实验阴性对照,取 2 mL 纯化后的 6xHis-BBS2 融合蛋白 (1 mg/mL) 与 2 mL 弗氏佐剂等体积混合后乳化完全,免疫新西兰大白兔,采用颈背部多点注射法。其后每 10 d 依照此剂量进行一次加强免疫,但乳化剂改为弗氏不完全佐剂,一共加强免疫 4 次,第 5 次免疫后抽取耳动脉血,测定抗血清的效价。效价合格后,采用心脏穿刺法收集全血,4 $^{\circ}$ C 静置过夜后在 4 000 r/min 的条件下离心 30 min,去除沉淀血浆从而收集抗血清,按每毫升分装冻存于 -80 $^{\circ}$ C。

1.2.5 多克隆抗体效价的检测 采用间接 ELISA 法测定抗血清的效价,以纯化后的 6xHis-BBS2 融合蛋白作为包被抗原,用 5% 的脱脂牛奶 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h,随后,加入经 PBS 溶液 (pH 7.5) 梯度稀释的兔血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h;加入经 PBS 溶液 (pH 7.5) 稀释 20 000 倍的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,

37 ℃孵育 30 min; 然后加入 TMB(3', 3', 5', 5', -四甲基联苯胺)显色液, 室温避光显色 30 min, 最后加入 0.5 mol/L H₂SO₄ 终止液, 终止反应。利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 处的吸光值, 并计算出抗血清的效价, 实验组血清 OD₄₅₀ 阴性对照血清 OD₄₅₀ ≥ 2.0 为阳性, 其最高稀释度即为抗血清的效价^[15-16]。

1.2.6 多克隆抗体的纯化 使用 Protein A Sepharose™ CL-4B 亲和纯化专一性吸附抗血清中的 IgG, 去除 IgG 之外的其他抗体分子, 纯化条件为: 结合缓冲液 (12 mmol/L Na₂HPO₄, 8 mmol/L NaH₂PO₄, pH 7.0), 洗脱缓冲液 (0.1 mol/L 甘氨酸, pH 2.7), 流速 0.5 mL/min。收集吸收峰对应的洗脱液, 用 1 mol/L Tris-HCl(pH=9.0)将洗脱液 pH 值调至中性, 经 Western blotting 检测多克隆抗体的特异性^[17]。

1.2.7 免疫印迹法检测多克隆抗体的特异性 取 1 mL 培养至对数期 (2×10⁶ cell/mL) 的 CC-125 细胞藻液, 在 2 500 r/min 条件下于室温离心 2 min, 移除上清, 加入 60 μL Buffer A (0.1 mol/L Na₂CO₃, 0.1 mol/L DTT), 随后加入 40 μL Buffer B (5% SDS, 30% Sucrose)。样品随后于 4 ℃在恒温振荡仪中震荡 45 min (2 000 r/min), 以使细胞充分裂解。细胞裂解液随后于 4 ℃和 12 000 r/min 离心条件下离心 5 min, 尔后移取上清至新的 EP 管待定量和上样。蛋白定量按照 Amido black 的传统方法^[19]进行。取 20 μg 细胞全蛋白, 加入 5×Loading Buffer, 沸水浴 5 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 上样, 进行 SDS-PAGE 电泳 (150 V, 1.5 h), 结束后进行湿法转膜 (50 V, 45 min), 然后, 用 5% 的脱脂奶粉封闭; 多克隆抗体稀释度 1:5 000, 二抗辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG (Jackson, Cat. No. 111-035-003), 稀释度为 1:100 00, 之后在暗室向膜上加入 ECL 显色液^[18] (Millipore, Cat. No. WBKLS0500), 反应 3 min 后, 使用暗盒压片 (压片时间为 1 min), 显影, 定影, 晾干拍照。

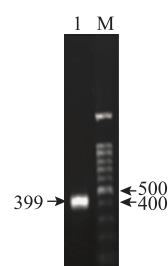
1.2.8 免疫荧光法检测多克隆抗体的特异性 取 30~50 μL 培养至对数期 (2×10⁶ cell/mL) 的衣藻 CC-125 细胞藻液, 对细胞进行计数, 2 500 r/min 离心丢弃上清, 用新鲜培养基重悬。取 50 μL 的细胞, 加入等体积的 4% PFA, 室温固定 5 min。2 500 r/min 离心 1 min, 离心丢弃上清, 加入 100 μL PBS 缓冲液重悬。取 50 μL 细胞滴在干净的载玻片中,

室温放置 5 min。吸干上层液体, 将玻片放入 -20 ℃的甲醇中固定 1 min。取出玻片晾干, 加入 PBS 缓冲液处理 5 min, 使细胞水化。吸走缓冲液, 向玻片滴加 25 μL 5% BSA 进行封闭, 4 ℃封闭 1 h。加入稀释的一抗 (1:50), 25 μL, 4 ℃, 2 h, 用 PBS (含有 0.2% Tween-20) 洗 3 次, 每次 5 min, 加入稀释的荧光标记的羊抗兔二抗 (1:400, Invitrogen, Alexa Fluor 594 dye), 4 ℃反应 2 h。用 PBS (含有 0.2% Tween-20) 洗 3 次, 每次 5 min, 最后用超纯水洗一次去除盐分。在载玻片上滴加抗荧光淬灭封片剂 (索来宝, 抗荧光衰减封片剂), 盖上洗干净的盖玻片, 用指甲油把盖玻片四周固定, 黑暗中干燥 2 h 以上, 使其凝固, 用荧光显微镜拍照^[20]。

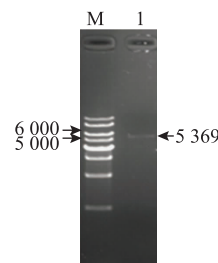
2 结果与分析

2.1 pET28a-bbs2 原核表达载体的构建

以 pMAL-c2x-bbs2 为模板, 利用 PCR 扩增获得 bbs2 基因 5'端大小为 399 bp 的 cDNA 片段 (编码 133 个氨基酸) (见图 1 (a))。将空表达载体 pET28a 用 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切, 回收片段并进行电泳验证 (见图 1(b))。进行连接反应获得重组表达质粒 pET28a-bbs2 后对其进行双酶切鉴定 (见图 1(c)), 可获得条带大小为 399 bp 的目的片段和 5 kb 的载体片段, 该质粒经测序验证其插入序列完全正确, 说明表达载体构建成功。



泳道1: bbs2基因的PCR扩增产物; M: 100 bp marker
(a) bbs2基因的PCR验证



泳道1: 使用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 对 pET28a-bbs2 载体进行酶切; M: 1 kb marker
(b) pET28a-bbs2 载体的酶切分析



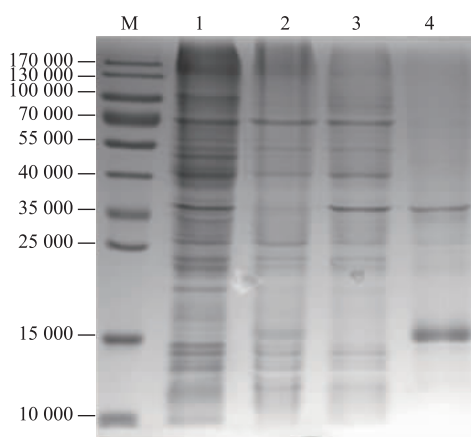
泳道1: bbs2 基因的PCR扩增产物; M: 100 bp marker
(c)PCR鉴定重组质粒pET28a-bbs2

图1 bbs2 的 PCR 扩增和重组表达质粒的验证

Fig. 1 PCR amplification of bbs2 and identification of recombinant expression plasmid by restriction digestion

2.2 6×His-BBS2 融合蛋白的诱导表达鉴定

在 IPTG 的诱导下, 含有 pET28a-bbs2 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3)菌株会大量表达目的蛋白, 菌体经超声破碎后获得全蛋白, 所得全蛋白经低温高速离心分离上清和沉淀, 然后经电泳、染色、脱色后分别在约 15 kDa 处可以看到目的蛋白大量表达, 且蛋白的表达主要以包涵体的形式存在。其表达结果如图 2 所示。



M: 蛋白分子量 Marker; 泳道 1: 未加 IPTG 诱导全蛋白; 泳道 2: 加 IPTG 诱导后全蛋白; 泳道 3: 加 IPTG 诱导细胞破碎后上清; 泳道 4: 加 IPTG 诱导细胞破碎后沉淀。

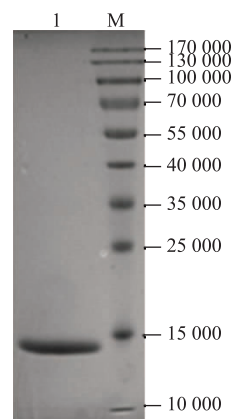
图2 SDS-PAGE 检测重组蛋白 6×His-BBS 在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of recombinant protein 6×His-BBS in *E. coli* BL21(DE3)

2.3 6×His-BBS2 融合蛋白的纯化

由上述可知 6×His-BBS2 融合蛋白的表达主要在沉淀中, 因此将诱导表达后的菌体经超声破碎以

及高速离心后取沉淀, 溶解于 8 mol/L 尿素于 Ni Sepharose High Performance 纯化柱中进行亲和纯化, 由于融合蛋白所含有的 6×His 标签能够特异性与上述填料结合, 因此经过洗涤、洗脱等步骤, 即得到比较单一的目的蛋白(如图 3 所示), 可作为免疫动物所用抗原。



泳道 1: 洗脱后蛋白组分; M: 蛋白 Marker。

图3 SDS-PAGE 检测亲和纯化后 6×His-BBS2 重组蛋白
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the purified 6×His-BBS2 recombinant protein by affinity adsorption purification

2.4 抗血清效价的检测

用纯化得到的 6×His-BBS2 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 经耳缘静脉少量采血, 室温静置 2 h 或 4℃过夜后获得析出血清, 以间接 ELISA 法测定抗血清的效价, 利用酶标仪测定 OD₄₅₀ 处的吸光值后计算出抗血清的效价, 结果见图 4。

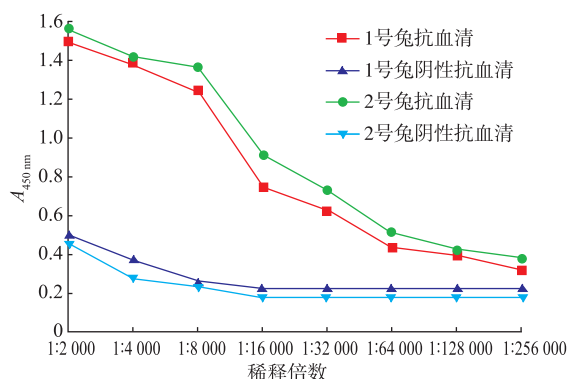


图4 间接 ELISA 法测定抗血清的效价

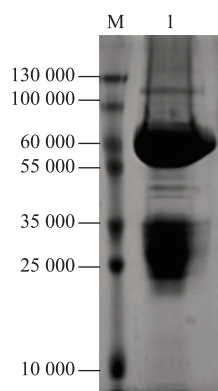
Fig. 4 Results of ELISA test of anti-BBS2 polyclonal antiserum

以实验组血清 OD₄₅₀ 与阴性对照血清 OD₄₅₀ 的

比值大于 2 即为阳性,其最高稀释度即为抗血清的效价,如图 4 可知 1 号兔抗血清的效价大于 128 000, 2 号兔抗血清效价大于 256 000,满足实验要求。

2.5 抗血清纯度和特异性检测

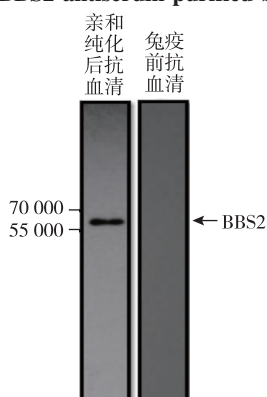
所得的抗血清由于含有多种抗体分子因此需要进行纯化,本研究进行 Protein A 纯化,以得到抗血清中的 IgG。对纯化得到的 IgG 进行电泳,在聚丙烯酰胺凝胶上 25 kDa 及 55 kDa 左右可见两条明显条带并且基本没有其它杂带,表明得到了纯度较高的 IgG,结果如图 5 所示。ECL 曝光法(图 6)显示,抗血清能够正确的与 56 kDa 大小的 BBS2 蛋白特异结合,证明所制备的多克隆抗体具有很好的特异性,可与免疫原专一性结合。



M: 蛋白 Marker; 泳道 1: 洗脱后的抗血清组分。

图 5 BBS2 的抗体经 Protein A 纯化

Fig. 5 Anti-BBS2 antiserum purified by Protein A



注: 使用纯化后的 BBS2 抗血清可以检测到野生型衣藻纤毛中的 BBS2 蛋白,使用免疫前的血清检测不到特异性信号。

图 6 Western blotting 验证抗体特异性-ECL 曝光法

Fig. 6 Antibody specificity detected by Western blotting through ECL method

2.6 免疫荧光法检测 BBS2 的定位及抗体的活性

免疫荧光实验检测的是细胞内没有发生变性

的活性蛋白,对抗体特异性的要求更高,本实验抗体制备所用免疫抗原为 8 mol/L 尿素处理后的变性蛋白,为了进一步确定其产生的抗体是否具有生物活性,特对其进行免疫荧光实验。结果如图 7 所示,可以看到 BBS2 的抗体能够与莱茵衣藻 BBS2 蛋白特异性结合,且结合处主要位于纤毛的基体,表明 BBS2 蛋白主要定位在纤毛基体,少部分沿纤毛呈点状分布,与 IFT 复合物的定位结果相一致。

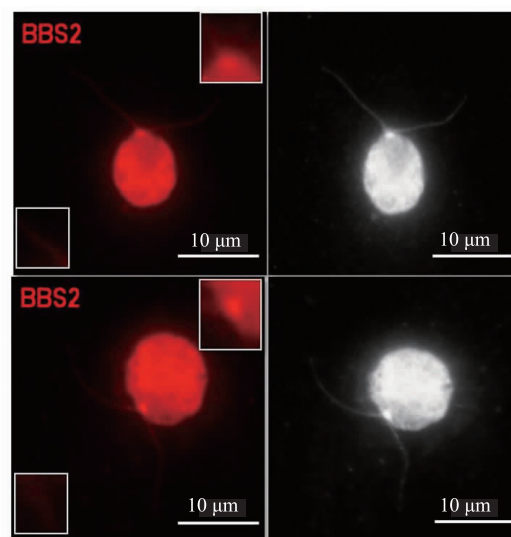


图 7 免疫荧光检测 BBS2 蛋白在莱茵衣藻纤毛中的定位

Fig. 7 Immun of luorescence analysis the flagella localization of BBS2

3 讨论

为了研究 BBsome 在纤毛中的装配机制,本文制备了在莱茵衣藻中的高特异性和高灵敏度的 BBS2 抗体。首先在大肠杆菌中经 IPTG 诱导大量表达 BBS2,然后用多步纯化获得高纯度的 6×His-BBS2 融合蛋白,并作为抗原免疫新西兰大白兔获得抗血清。虽然本研究使用的是 bbs2 基因的 N 端的 133 个氨基酸序列,且其在大肠杆菌中表达后主要以包涵体的形式存在,但使用尿素溶解进行纯化后能得到高纯度的蛋白,通过 ECL 曝光的方法检测了所制备多克隆抗体的特异性和灵敏度,获得的抗血清经过亲和纯化后所得抗体的特异性和灵敏度极高。在本实验中,使用 6×His 作为纯化标签是抗体特异性高的一个有利条件,由于其只有 6 个组氨酸构成,分子量较小,在动物机体中引起的免疫反应较一些分子量大的标签要小一些,产生的抗体特异

性也会更高一些。其次,抗原的好坏与抗原决定簇有关,大部分抗原决定簇是亲水性的,且许多已知的抗原决定簇是在自由活动区域的,因此,一般来说蛋白质的 N 端及 C 端是很好的抗原决定簇区域。使用 bbs2 基因 N 端的 133 个氨基酸序列,虽然其表达后呈水不溶性,但经序列分析后发现其亲水性相比较其它位置序列仍然较高。同时,水不溶性的抗原在纯化过程中一直处于高浓度尿素中,使其充分变性溶解才能进行后续的亲纯化,因而得到比较单一的纯化后蛋白作为免疫抗原进行后续实验,也是最终抗体制备成功的关键因素。此外,本实验所制备的 BBS2 抗体可以很好地用于免疫荧光实验,实验结果显示 BBS2 抗体能够专一性地与莱茵衣藻 BBS2 蛋白结合,且发现 BBS2 蛋白主要定位

在纤毛基体,极少部分沿纤毛呈点状分布,与文献[6]结果一致。该部分结果表明 BBS2 与 BBS4 在纤毛中的分布一致是 BBSome 的一个组分。该抗体对进一步研究 BBS2 蛋白在纤毛的形成、与其他 IFT 蛋白的相互作用及 BBS 等纤毛病的发病机理都具有重要的意义。目前,不可溶蛋白作为抗原进行多克隆抗体制备仍然没有固定的规律遵循,其因蛋白性质的不同而千差万别。

4 结 语

本研究成功制备出莱茵衣藻 BBS2 蛋白多克隆抗体,并具有较高的效价和强特异性,将对 BBS2 及 BBSome 蛋白复合物在纤毛装配及组装的研究奠定基础。

参考文献:

- [1] MYKYTYN K. Establishing a connection between cilia and Bardet-Biedl Syndrome [J]. **Trends in Molecular Medicine**, 2004,10(3):106-109.
- [2] MYKYTYN K, BRAUN T, CARMI R, et al. Identification of the gene that, when mutated, causes the human obesity syndrome BBS4[J]. **Nature Genetics**, 2001,28(2):188-191.
- [3] MYKYTYN K, NISHIMURA D Y, SEARBY C C, et al. Identification of the gene (BBS1) most commonly involved in Bardet-Biedl syndrome, a complex human obesity syndrome[J]. **Nature Genetics**, 2002,31(4):435-438.
- [4] SHEFFIELD V C. Use of isolated populations in the study of a human obesity syndrome, the Bardet-Biedl syndrome[J]. **Pediatric Research**, 2004,55(6):908-911.
- [5] NACHURY M V, LOKTEV A V, QIHONG Z, et al. A core complex of BBS proteins cooperates with the GTPase Rab8 to promote ciliary membrane biogenesis[J]. **Cell**, 2007,129(6):1201-1213.
- [6] KARL-FERDINAND L, JOHNSON E C, TSUYOSHI S, et al. The Chlamydomonas reinhardtii BBSome is an IFT cargo required for export of specific signaling proteins from flagella[J]. **Journal of Cell Biology**, 2009,187(7):1117-1132.
- [7] WEI Q, ZHANG Y, LI Y, et al. The BBSome controls IFT assembly and turnaround in cilia [J]. **Nature Cell Biology**, 2012,14(9):950-957.
- [8] ANSLEY S J, BADANO J L, BLACQUE O E, et al. Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet-Biedl syndrome[J]. **Nature**, 2003,425(6958):628-633.
- [9] ZHANG Q, SEO S, BUGGE K, et al. BBS proteins interact genetically with the IFT pathway to influence SHH-related phenotypes [J]. **Human Molecular Genetics**, 2012,21(9):1945-1953.
- [10] NISHIMURA D Y, MELISSA F, MULLINS R F, et al. Bbs2-null mice have neurosensory deficits, a defect in social dominance, and retinopathy associated with mislocalization of rhodopsin [J]. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2004,101(47):16588-16593.
- [11] WITMAN G B, WITMAN G B. Isolation of Chlamydomonas flagella and axonemes. Methods Enzymol [J]. **Methods Enzymol**, 1986,3(4):280-290.
- [12] DUPLAY P, HOFNUNG M. Two regions of mature periplasmic maltose-binding protein of *Escherichia coli* involved in secretion [J]. **Journal of Bacteriology**, 1988,170(10):4445-4450.
- [13] YAN L, WANG J, JING Y, et al. Recombinant expression, purification and characterization of antimicrobial peptide ORBK in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expression & Purification**, 2014,95(5):182-187.

- [14] TIAN Shujuan, LI Fen, WU Yuguang. A new method of auricular arteriae blood sampling in rabbit for attaining immune serum of polyclonal antibodies[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2008, 27(5): 931. (in Chinese)
- [15] JIANG W, LIU X, WU D, et al. A simple, rapid one-step ELISA using antibody-antibody complex[J]. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, 2014, 62(1): 126-131.
- [16] LIMSUWANCHOTE S, WUNGSINTTAWEEKUL 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.
- [17] REUSCH D, HABERGER M, SELMAN M H J, et al. High-throughput work flow for IgG Fc-glycosylation analysis of biotechnological samples[J]. *Analytical Biochemistry*, 2013, 432(2): 82-89.
- [18] KIM T K, PARK J S, LEE M C, et al. Alternative splicing of type II procollagen gene in the dedifferentiation of rat epiphyseal chondrocytes serially cultured in monolayer[J]. *Connective Tissue Research*, 2002, 43(1): 56-62.
- [19] FAN Z C, BEHAL R H, STEFAN G, et al. *Chlamydomonas* IFT70/CrDYF-1 is a core component of IFT particle complex B and is required for flagellar assembly[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21(15): 2696-2706.
- [20] ZHANG Ping, XING Wanjin, BAO Xiaohong, et al. Cloning, prokaryotic expression of rat RVLG and preparation of mouse anti-RVLG polyclonal antibody[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(11): 1981-1987 (in Chinese).

会 议 消 息

会议名称: 第五届酶国际研讨会 (ICE 2019) The 5th Int'l Conference on Enzyme (ICE 2019)

大会时间: 2019 年 7 月 19-21 日 大会地点: 中国桂林

会议简介: ICE 2019 旨在为业内专家学者分享技术进步和业务经验, 聚焦酶的前沿研究, 提供一个交流的平台。会议将集聚来自世界各地的科研人员、工程师、学者及业界专家, 展示他们在酶领域的最新研究成果及活动进展。

在线投稿链接: <http://www.confjuly.org/RegistrationSubmission/default.aspx?>

邮箱投稿: intelconf@163.com 录用通知: 论文投稿后 1 周左右

联系人: 张老师 (Rolin) 邮箱: intelconf@163.com

QQ: 3025797047 电话: 13264702250

会议名称: 2019 年第五届食品与农业工程国际会议 (ICFAE 2019)

会议时间: 2019 年 5 月 27-29 日 会议网址: <http://www.icfae.org/>

会议简介: (ICFAE 2019) 第五届食品与农业工程国际会议将于 2019 年 5 月 27-29 日在印度尼西亚的巴厘岛隆重召开。择优发表的文章能被 Ulrich's Periodicals Directory, Google Scholar, Engineering & Technology Digital Library, Crossref 以及其它数据库检索。来自美国的顶级教授受邀参加会议并将为会议呈现学术前沿的大会报告和研究成果。他是来自美国肯塔基大学的 Youling L. Xiong 教授。2019 年 5 月 29 日在印度尼西亚的巴厘岛进行为期一日的观光。

投稿和联系方式:

投稿方式: <http://confsys.icnf.org/submission/icfae2019>

会议邮箱: icfae@cbees.net

联系电话: +852-3500-0137 (香港)/+1-206-456-6022 (美国)/+86-28-86528465 (中国)

会议专员: 蔺女士