

拟南芥纤维素合酶的抗体制备与检测

陶章生^{1,2,3} 徐雯^{1,2,3} 张苗苗^{1,2,3} 彭良才^{1,2,3,4} 丰胜求^{2,4}

1. 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070;

2. 华中农业大学生物质与生物能源研究中心, 武汉 430070;

3. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070;

4. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 将拟南芥 *CesA* 家族基因的高变区克隆到融合表达载体 pGEX-4T-3 中, 构建重组质粒 pGEX-*AtCesAs*, 在大肠杆菌 JM109 中经 IPTG 诱导表达谷胱甘肽巯基转移酶融合蛋白 (GST-*AtCesAs*)。采用 GST 亲和层析法纯化 GST-*AtCesAs* 并制备了多克隆抗体。Western-blotting 检测表明, 抗体 Anti-CESA4 和 Anti-CESA7 存在明显的交叉反应, Anti-CESA1、Anti-CESA3、Anti-CESA6、Anti-CESA2、Anti-CESA5、Anti-CESA8 均能在拟南芥原生质膜上检测到特异免疫条带, 这为进一步深入研究拟南芥纤维素合成机制提供了有利条件。

关键词 纤维素合酶; 多克隆抗体; 交叉反应; 拟南芥; Western-blotting

中图分类号 Q 754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0171-07

纤维素是原生质膜上纤维素合酶复合体 (cellulose synthesis complex, CSC) 催化合成的无分支长链, 直径约 3 nm, 分子质量为 50~2 500 ku, 可以形成松散的非晶体结构或高强度的晶体结构^[1]。纤维素在抵制外部压力和内部的渗透压的变化、控制细胞生长、物质运输、信息传递等方面都有重要作用^[2]。1998 年, Peng 等^[3] 研究拟南芥射线膨大突变体 (radial swelling 1, *rsw1*) 发现, 突变基因与棉花中已发现的可以编码纤维素合酶 (*GhCesA1*, *GhCesA2*) 的 cDNAs 高度同源, 从而克隆了第 1 个拟南芥纤维素合酶基因^[4]。Richmond 等^[5] 用棉花 *CesA* 基因序列对数据库进行检索, 找到 10 个拟南芥纤维素合酶基因, 随后又发现了水稻的 10 个纤维素合酶基因。

拟南芥纤维素合酶由 985~1 088 个氨基酸组成, 序列同源率为 53%~98%。纤维素合酶由锌指结构域、2 个高变区、催化活性位点 (D, D, D, Q/RxxRW) 和 8 个跨膜结构域组成, 且催化活性位点分为 A、B 两区 (A 区是底物结合位点, B 区是酶活性位点)^[6]; 除高变区外, 其他三部分同源性极高。拟南芥纤维素合酶复合体 (CSC) 是花环状六聚体形

状, 直径 25~30 nm。CSC 由 6 个亚单位组成, 每个亚单位又由 6 个亚基组成^[7-8], 且每个 *CesAs* 亚基都能同时合成 β -1, 4-糖苷链, 糖苷链通过氢键相互作用形成微纤丝, 因此微纤丝是由 36 条 β -1, 4-糖苷链组成的晶体状结构^[9]。研究表明, 每个有功能的 CSC 至少含有 3 种不同的 *CesAs* 亚基, 且组成初生壁和次生壁纤维素合酶复合体的亚基不同。在拟南芥中, *CESA1*、*CESA3*、*CESA6* 是初生壁纤维素合酶必需的^[10-13], 而 *CESA4*、*CESA7* 和 *CESA8* 是次生壁纤维素合酶必需的^[9-13]; *CESA2*、*CESA5* 在拟南芥的所有器官中都有表达^[14], 但具体功能还不清楚。

由于纤维素合酶家族的高度同源, 研究纤维素生物合成中的纤维素合酶功能、调节机制等都遇到很多困难。为此, 制备高度特异的纤维素合酶抗体对探讨纤维素合酶在细胞初生壁和次生壁形成过程中的作用以及纤维素生物合成机制等都具有重要意义。笔者选择 *CesAs* 高变区 I 作为抗原, 表达融合蛋白 GST-*AtCesAs* (*CESA1*、*CESA3*、*CESA6*、*CESA4*、*CESA7*、*CESA8*), 同时人工合成 *CESA2*、*CESA5* 多肽, 用纯化的融合蛋白和合成多肽制备高度

收稿日期: 2011-03-22

基金项目: 国家“973”前期项目 (2010CB134401)

陶章生, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: taozhangshen34@163.com

通讯作者: 丰胜求, 博士, 副教授, 研究方向: 植物细胞壁合成相关基因的功能研究, E-mail: fengsq@mail.hzau.edu.cn

特异性的多克隆抗体,以期为从蛋白质水平上研究纤维素合酶功能奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

1)载体与宿主菌。载体 pGEX-4T-3,表达菌株 *E. coli* DH5α,JM109 由笔者所在实验室保存。

2)主要试剂。逆转录试剂盒(RT Kit)、*Taq* 酶、KOD Plus、限制性内切酶 *EcoR* I、*Sal* I、*Xho* I 为 TOYOBO 公司产品;DNA 连接酶和 DNA 分子质量 Marker 购自 TaKaRa(大连)公司;酵母提取物及胰蛋白胨为 Oxid 公司产品;层析柱为 Novagen 公司产品;NC 膜为 Pall 公司产品;PVDF 膜为 Millipore 公司产品;glutathione sepharose 4 fast flow、蛋白分子质量 Marker 购自 Gen-script 公司;预染蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司;还原型谷胱甘肽(reduced *L*-glutathione)、Mops 为 Biosharp 公司产品;苯甲基磺酰氟化物(PMSF)、

蛋白酶抑制剂(pepstatin A、leupeptin)、琼脂糖蛋白 A (protein A-agarose)、洋地黄皂苷(digitonin)为 Sigma 公司产品。

1.2 试验方法

1)抗原表位分析。利用在线软件(<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)预测高变区抗原表位,选择融合表达蛋白区段,设计人工合成多肽。

2)引物设计。根据选择的抗原表位区的 cDNA 序列,设计相应的上下游引物(表 1),引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

3)表达载体的构建与鉴定。用 RT-PCR 获得目的基因,胶回收试剂盒纯化扩增产物。双酶切 pGEX-4T-3 载体和 PCR 纯化产物,然后进行定向连接。重组质粒转化到大肠杆菌 DH5α 中,提取质粒,双酶切鉴定。阳性菌株送到北京华大基因公司测序,最后将重组质粒转化到表达菌株 JM109 中。

表 1 纤维素合酶 AtCESAs 抗原引物

Table 1 Antigen primers

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5′-3′)	限制性内切酶 Restriction enzyme	片段长度/bp Fragment length
AtA1-F	aaaGAATTCAGAGTTCAATTACGCCCAGGG	<i>EcoR</i> I	258
AtA1-R	aaaGTCGACGACGGGTCCACGATTCTTACA	<i>Sal</i> I	
AtA3-F	aaaGAATTCAGGTACTGTTGAGTTCAACTA	<i>EcoR</i> I	249
AtA3-R	aaaGTCGACGACATCTGATGAATAGGGAA	<i>Sal</i> I	
AtA6-F	aaaGAATTCAGAGTTTGAGTATGGAAATAA	<i>EcoR</i> I	273
AtA6-R	aaaGTCGACACCATAGGCCTTGGATGTG	<i>Sal</i> I	
AtA4-F	aaaGAATTCAGAAAACAATGGTCCTGATGA	<i>EcoR</i> I	345
AtA4-R	aaaGTCGACGAGAGGTTGTCTTGCTTCAG	<i>Sal</i> I	
AtA7-F	aaaGAATTCAGAGGATGATGAGAATGGGAGAT	<i>EcoR</i> I	282
AtA7-R	aaaGTCGACGCTTGAGGCAATGGGAACTT	<i>Sal</i> I	
AtA8-F	aaaGAATTCCGGAATCCTTACGATGAGAATGTG	<i>EcoR</i> I	300
AtA8-R	aaaCTCGAGCATGTGCTGTTGGGTAGGAATCTG	<i>Xho</i> I	

4)融合蛋白诱导表达。挑取 1 个单菌落接种于 3 mL LB 液体培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),37 ℃,200 r/min 活化过夜;再按 1:100 体积比扩大培养至 LB 液体培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),37 ℃ 扩繁 3 h(*D*_{600 nm} 为 0.5~0.8);加入异丙基硫代 β-*D*-半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.5 mmol/L,37 ℃ 诱导 3 h;8 000 r/min 离心收集菌体。

5)融合蛋白表达和可溶性检测。未诱导和诱导菌液各 2 mL,12 000 r/min 离心收集菌体,加入 1× 上样缓冲液,沸水浴加热 10 min,SDS-PAGE 检测

融合蛋白是否表达。收集 100 mL 诱导 3 h 后的菌体;用 PBS 缓冲液(137 mmol/L NaCl,2.7 mmol/L KCl,10 mmol/L Na₂HPO₄,2 mmol/L KH₂PO₄,pH 8.5)重悬;冰上超声波(400 W,2 s 超声,2 s 间歇)破碎;4 ℃,12 000 r/min 离心 10 min;分别取上清和沉淀加入上样缓冲液,混匀,沸水浴加热 10 min,SDS-PAGE 检测融合蛋白的可溶性。

6)融合蛋白的纯化。诱导 3 h 的菌体裂解液离心后,上清用 0.45 μm 滤膜过滤。采用 GST 纯化系统纯化蛋白:4 ℃ 上样(15 mL/次),4 ℃,30 个柱床体积的 PBS 缓冲液洗柱(流速 1.0 mL/min),冰

上 5 mL 洗脱液(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 7.4;10 mmol/L 还原型谷胱甘肽)洗脱,SDS-PAGE 检测。

7)抗体制备。纯化的融合蛋白用 PBS 缓冲液透析 4 h,PEG-20000 浓缩 2 h,真空冷冻干燥机抽干。干粉由金思特科技(南京)有限公司制备多克隆抗体。

8)抗体纯化。用 protein A-agarose 纯化兔 IgG。血清离心去沉淀,用等体积 2×TBS(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 7.4;150 mmol/L NaCl,0.05%叠氮化钠)稀释。4℃上样(8 mL/次),4℃1×TBS 洗柱(流速 1.0 mL/min),直至流出液蛋白质量浓度小于 80 μg/mL;冰上 5 mL 洗脱缓冲液(50 mmol/L glycine-HCl,pH 2.7)洗脱,每 10 滴收集 1 管(约 0.5 mL),每收集 1 管立即加入 100 μL 中和缓冲液(1 mol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 8.0;1.5 mol/L NaCl,1 mmol/L EDTA,0.5%叠氮化钠)中和,SDS-PAGE 检测。

9)融合蛋白的凝血酶切割。将凝血酶(10 U/mg)加至已纯化的融合蛋白中,22℃,1×PBS 缓冲液,酶切 4 h。

10)拟南芥原生质膜提取。拟南芥鲜样^[15](1/2MS培养基中培养 10 d 的野生型全植株)−80℃保存,液氮中磨碎,加入 4℃预冷的提取缓冲溶液(50 mmol/L Mops/NaOH 缓冲液,pH 7.5;0.25 mol/L sucrose,1 mmol/L PMSF,1 μmol/L pepstatin A,1 μmol/L leupeptin),充分混匀;冰浴超声波处理 20 min;4℃12 000 r/min 离心 10 min,取上清,4℃150 000 r/min 离心 50 min;沉淀加提取缓冲溶液(含 0.05% digitonin)重悬匀浆;4℃60 r/min 溶解 30 min;4℃100 000 r/min 离心 30 min;上清加 5×上样缓冲液,沸水浴加热 10 min。

11) Western-blotting 分析。蛋白样品 SDS-PAGE 后,使用半干式转移电泳槽装置将蛋白从凝胶电转移至硝酸纤维素膜(4℃,70 V,60 mA,12 h)。用 5%的脱脂牛奶封闭 1 h;TTBS(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 8.0;150 mmol/L NaCl;0.05%Tween-20)洗膜 2 次(3 min/次);加入用 TTBS 配制的 AtCESAs 一抗(稀释度 1/2 000)室温孵育 1 h;用 TTBS 洗膜 3 次(5 min/次);加入用 TTBS 配制的 HRP 羊抗兔二抗(稀释度

1/1 000)室温孵育 1 h;用 TTBS 洗膜 3 次,TBS(50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液,pH 8.0;150 mmol/L NaCl)洗膜 1 次(5 min/次);二氨基联苯胺(DAB)显色。

2 结果与分析

2.1 AtCESAs 抗原表位预测

在线软件(<http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl>)预测 CESAs 抗原表位。依据预测结果,选定人工合成 CESA2、CESA5 多肽区段(表 2)和融合表达蛋白区段(CESA1 从 Asn111 到 Pro196,CESA3 从 Glu90 到 Val173,CESA6 从 Asn111 到 Val202,CESA4 从 Glu85 到 Leu200,CESA7 从 Pro138 到 Ser232,CESA8 从 Gly55 到 Met154)。对预测的抗原进行了比对,相互间同源性较低。

表 2 人工合成纤维素合酶(AtCESAs)多肽¹⁾

Table 2 Synthetic peptide sequences of AtCESAs				
蛋白 Protein	抗原起点 Origin	抗原终点 Destination	合成多肽序列 Synthetic peptide sequences	氨基酸数 Amino acid number
CESA2	259	274	RQPLSRKLP [—] IRSSR [—] C	15
CESA5	117	132	RSGLESETFSRRNS [—] C	15

1)“—”代表人工添加的氨基酸 “—”indicates artificial amino acid.

2.2 表达载体的构建

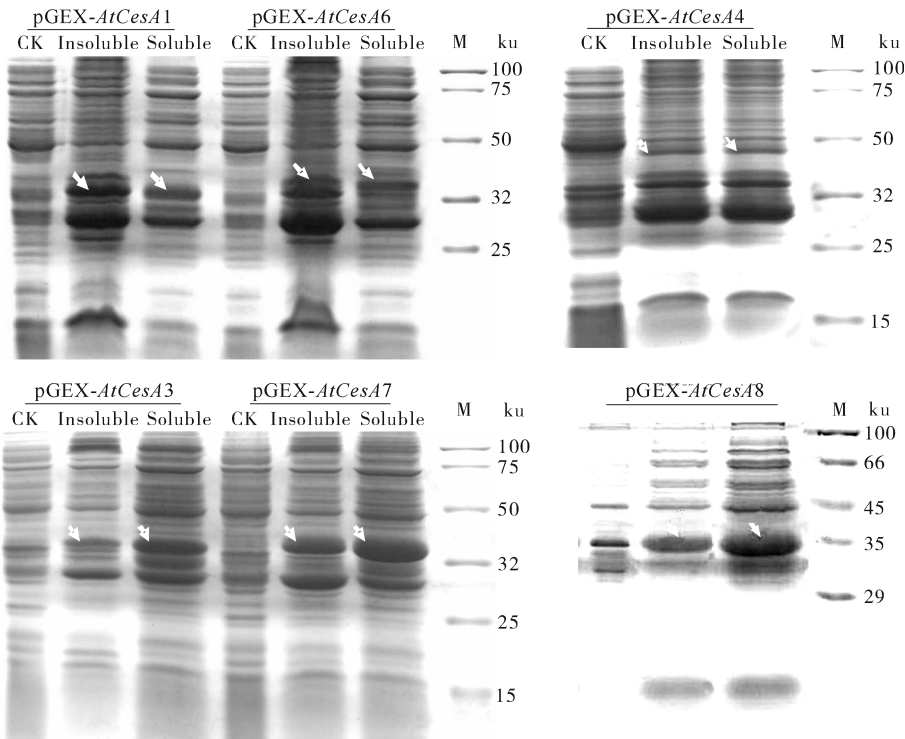
RT-PCR 获得 *CesAs* 基因的 cDNA 片段;*EcoR* I、*Sal* I(*Xho* I)双酶切后,插入融合表达载体 pGEX-4T-3 中。双酶切鉴定目的片段,测序结果表明重组质粒 pGEX-*AtCesAs* 中的 *CesAs* 序列正确。

2.3 融合蛋白表达和可溶性检测

pGEX-*AtCesAs* 菌株,37℃,0.5 mmol/L IPTG 诱导 3 h 后,相应大小的蛋白表达量显著增加。融合蛋白溶解性检测:分别将全菌(未诱导)、沉淀(诱导)、上清(诱导)进行 SDS-PAGE 检测,上清中含量较高(图 1)。

2.4 融合蛋白的纯化

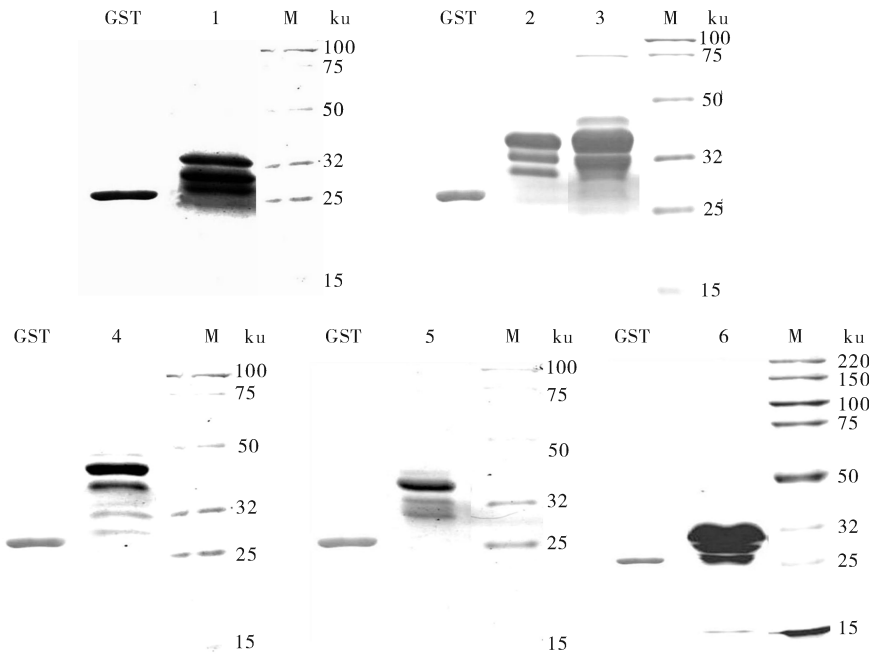
诱导 pGEX-*AtCesAs* 融合蛋白大量表达,采用 GST 蛋白纯化系统纯化蛋白,纯化产物 SDS-PAGE 检测(图 2)。纯化蛋白冷冻干燥机抽干后由金思特科技(南京)有限公司制备多克隆抗体。



M:Protein marker; CK:空载体(-IPTG) pGEX-AtCesAs without being induced by IPTG; “↘”显示融合蛋白 GST-AtCESAs “↘” denotes recombinant GST-AtCESAs protein.

图 1 GST-AtCESAs 可溶性 SDS-PAGE 检测

Fig.1 Solubility analysis of GST-AtCESAs with SDS-PAGE



M:Protein marker; 1:纯化的 GST-AtCESA1 Purified GST-AtCESA1; 2:纯化的 GST-AtCESA3 Purified GST-AtCESA3; 3:纯化的 GST-AtCESA6 Purified GST-AtCESA6; 4:纯化的 GST-AtCESA4 Purified GST-AtCESA4; 5:纯化的 GST-AtCESA7 Purified GST-AtCESA7; 6:纯化的 GST-AtCESA8 Purified GST-AtCESA8.

图 2 亲和层析纯化 GST-AtCESAs 蛋白

Fig.2 Purification of GST-AtCESAs using affinity chromatography

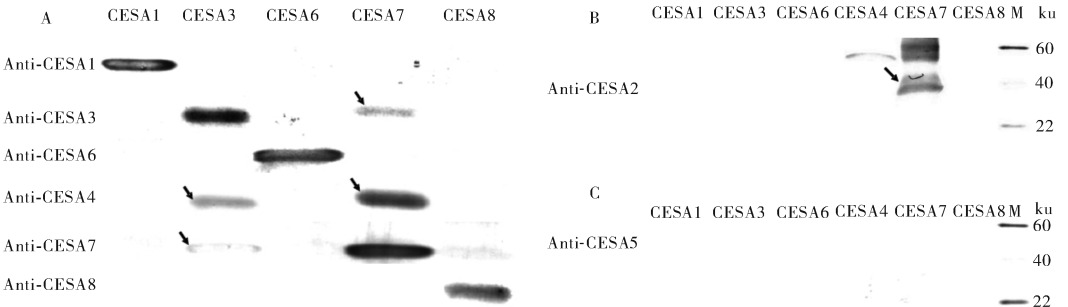
2.5 多克隆抗体 IgG 纯化

金思特科技(南京)有限公司制备的多克隆抗体 ELISA 检测:融合蛋白 GST-AtCESAs 经 4 次免疫后制备的抗体效价 $\geq 1:512\,000$;人工合成多肽经 4 次免疫后制备的抗体效价 $\geq 1:32\,000$ 。用 protein A-agarose 纯化兔 IgG,取纯化产物 SDS-PAGE 检测,只有 1 条约 55 ku 的蛋白条带,纯化结果很好。

2.6 GST-AtCESAs 抗体交叉反应检测

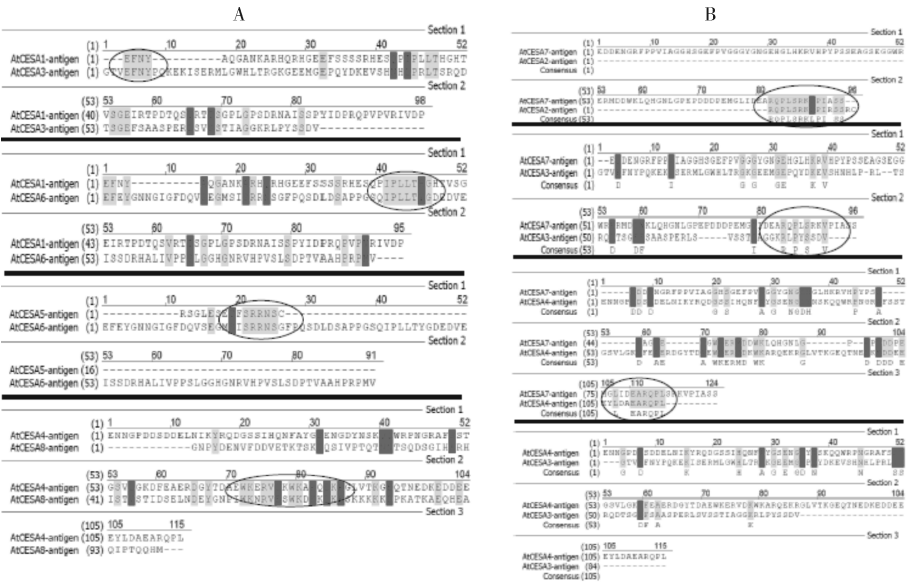
用凝血酶切割重组 GST-AtCESAs,分离 GST 和 CESAs,酶切样加 5×上样缓冲液,沸水浴加热

10 min。12% SDS-PAGE,控制每个泳道约 5 μ g 总蛋白,转到 NC 膜上,Western-blotting(图 3)。结果表明:CESA1、CESA3、CESA6、CESA5、CESA8 之间没有交叉反应,而 CESA7 与 CESA2、CESA3、CESA4、CESA4 与 CESA3 有交叉反应,且 CESA7 和 CESA4 之间的交叉反应较为严重。抗原序列比对发现 CESA7 对 CESA2、CESA3、CESA4 的非特异性可能是由于抗原 C 端氨基酸序列同源性过高引起的(图4),且同源区段重复出现了精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、赖氨酸(K)和谷氨酸(E)



A:5个特异抗原肽段分别与6个抗体相互免疫 Cross-reaction analysis between five CESA-derived peptides and six antibodies; B:6个 GST-AtCESAs 融合蛋白抗原与 AtCESA2 抗体免疫 Cross-reaction detection between Anti-CESA2 and six antigens of GST-AtCESAs; C:6个 GST-AtCESAs 融合蛋白抗原与 AtCESA5 抗体免疫 Cross-reaction detection between Anti-CESA5 and six antigens of GST-AtCESAs; “\”显示的是交叉反应 “\” denotes non-specific immunity.

图 3 抗体特异性检测
Fig.3 Specificity analysis of antibodies



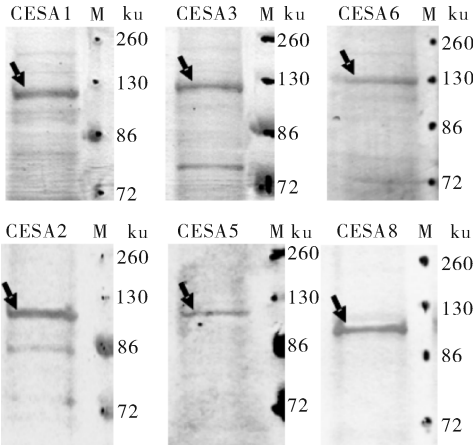
A:没有交叉反应的抗原比对 The alignment between non-interactive antigens;B:发生交叉反应的抗原比对 The alignment between cross-reacted antigens. “○”显示的是同源区段 “○” indicates homologs.

图 4 抗体非特异性分析
Fig.4 Non-specific analysis of antibodies

5 个极性氨基酸及脯氨酸(P)、亮氨酸(L)2 个非极性氨基酸。

2.7 GST-AtCESAs 抗体特异性检测

提取拟南芥原生质膜,加 5×上样缓冲液,沸水浴加热 10 min。10% SDS-PAGE,转到 PVDF 膜上,Western-blotting 结果表明(图 5),CESA1、CESA3、CESA6、CESA2、CESA5、CESA8 抗体都是特异的。



M:Protein marker. “↘”显示的是 CESAs “↘” indicates CESAs.
图 5 抗体特异性分析

Fig. 5 Specific analysis of antibodies

3 讨 论

纤维素合酶基因编码纤维素合酶的催化亚基。制备纤维素合酶高度特异性抗体,对进一步研究纤维素生物合成的调节机制、纤维素合酶亚基的功能等都具有重要意义。本研究同时采用在 N 端跨膜结构域之前的高变区 I 设计抗原和人工合成多肽这 2 种不同的方法制备抗原,结果表明,融合蛋白 GST-CESAs 经 4 次免疫后制备的抗体效价≥1:512 000,人工合成多肽经 4 次免疫后制备的抗体效价≥1:32 000。Western-blotting 显示,在拟南芥原生质膜中相关特异性抗体均有特异性免疫条带。虽然合成多肽片段较短,免疫原性较低,对免疫效价有一定的影响,但还是有较高的特异性,可用于 Western-blotting 分析^[16-17],也能用于免疫组化、免疫共沉淀^[18]等试验。因此,在抗原制备中,只要选择合适的区段,这 2 种方法都能制备出高度特异的抗体。

Western-blotting 检测抗体特异性表明,CESA7 与 CESA2、CESA3、CESA4,CESA4 与 CESA3 之间有交叉反应,且 CESA7 和 CESA4 之间的交叉反应较为严重。抗原序列比对发现,抗体间的

非特异性是由于抗原 C 端氨基酸同源性过高引起的,且同源区段重复出现了精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、丝氨酸(S)、赖氨酸(K)和谷氨酸(E)5 个极性氨基酸及脯氨酸(P)、亮氨酸(L)2 个非极性氨基酸。因此,在制备基因家族抗体时,应选择离保守区段较远的高变区设计抗原,抗原片段不宜太长(约 100 个氨基酸),尽量避免极性氨基酸的重复出现。试验中,我们观察到融合蛋白在亲和层析时出现了几条杂带,但在超声波破碎时加入蛋白酶抑制剂(1 mmol/L PMSF)后,发现杂带量明显减少,表明有降解现象。超声波破碎时菌液会快速升温,蛋白酶的活性也相应地有所增加,加入 PMSF(苯甲基磺酰氟)能有效抑制蛋白酶活性,减少融合蛋白的降解。通过生物信息学方法分析纤维素合酶家族的蛋白性质和结构,制备出高度特异多克隆抗体,为进一步研究纤维素合成过程中纤维素合酶的功能、调节机制等奠定了基础。

参 考 文 献

[1] YOUNGS H L, HAMANN T, OSBOME E, et al. The cellulose synthase superfamily[M]//BROWN R M, SAXENA I M. Cellulose: molecular and structural biology. Berlin: Springer Netherlands, 2007: 35-48.

[2] SHAH J, BROWN R M. Towards electronic paper displays made from microbial cellulose[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 66: 352-355.

[3] PEAR J R, KAWAGOE Y, DELMER D P, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial celA genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase[J]. Plant Biology, 1996, 93 (22): 12637-12642.

[4] ARIOLI T, PERG L, BETZNER A S, et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in Arabidopsis[J]. Science, 1998, 279: 717-720.

[5] RICHMOND T A, SOMERVILLE C R. The cellulose synthase super-family[J]. Plant Physiology, 2000, 124: 495-498.

[6] SOMERVILLE C R. Cellulose synthesis in higher plants[J]. Cell and Developmental Biology, 2006, 22: 53-78.

[7] RICHMOND T A. Higher plant cellulose synthases[J]. Genome Biology, 2000, 3001: 1-6.

[8] LEROUXEL O, CAVALIER D M, LIEPMAN A H, et al. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process [J]. Plant Biology, 2006, 9: 621-630.

[9] BOWLING A J, BROWN R M. The cytoplasmic domain of the cellulose-synthesizing complex in vascular plants[J]. Protoplasma, 2008, 233: 115-127.

[10] TAYLOR N G, GARDINER J C, WHITEMAN R, et al. Cellu-

lose synthesis in the *Arabidopsis* secondary cell wall[J]. Cellulose, 2004, 11: 329-338.

[11] ROBERT S, MOUILLE G, HOFTE H. The mechanism and regulation of cellulose synthesis in primary walls; lessons from cellulose deficient *Arabidopsis* mutants[J]. Cellulose, 2004, 11: 351-364.

[12] DESPREZ T, VEMHETTES S, FAGARD M, et al. Resistance against herbicide isoxaben and cellulose deficiency caused by distinct mutations in same cellulose synthase isoform CESA6 [J]. Plant Physiology, 2002, 128: 482-490.

[13] MAREK M, SETH D, STAFFAN P. Cellulose synthesis: a complex complex[J]. Plant Biology, 2008, 11: 252-257.

[14] CHU Z Q, CHEN H, ZHANG H Y, et al. Knockout of the *AtCESA2* gene affects microtubule orientation and causes abnormal cell expansion in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 143: 213-214.

[15] WANG J, JANET E E, RICHARD E W. Features of the primary wall CESA complex in wild type and cellulose-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Experimental Botany, 2008, 59: 2627-2637.

[16] 张苗苗, 陶章生, 陈婷婷, 等. 水稻纤维素合酶多克隆抗体的制备和鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 393-397.

[17] 杨礼香, 王正询, 柯德森, 等. 拟南芥血红蛋白 1 (AtG LB 1) 超量表达载体和 RNAi 表达载体的构建及转化[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(4): 413-416.

[18] DAS P M, RAMACHANDRAN K, VANWERT J, et al. Chromatin immunoprecipitation assay [J]. Biotechniques, 2004, 37(6): 961-969.

Preparation and detection of antibodies of cellulose synthase (CESA) in *Arabidopsis*

TAO Zhang-sheng^{1,2,3} XU Wen^{1,2,3} ZHANG Miao-miao^{1,2,3}
PENG Liang-cai^{1,2,3,4} FENG Sheng-qiu^{2,4}

- 1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
- 2. Biomass and Bioenergy Research Centre, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
- 3. College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
- 4. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract TPCR was used to amplify the high-frequent variable regions of *AtCesA* family genes, and then the PCR products were cloned into vector pGEX-4T-3, respectively. The fusion proteins composed of *AtCESA*s proteins and glutathione S transferase (GST-*AtCESA*s) in *E. coli* JM109 were induced by IPTG. The GST-*AtCESA*s were purified using GST affinity chromatography, and polyclonal antibodies were prepared. Western-blotting analysis showed that specific bands of six antibodies Anti-CESA1, Anti-CESA3, Anti-CESA6, Anti-CESA2, Anti-CESA5 and Anti-CESA8 could be obviously detected in the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana*, whereas cross-reaction bands of antibodies Anti-CESA7 and Anti-CESA4 were occurred, suggesting that the two antibodies were failed for further research. Preparation of Anti-CESAs antibodies is good for future research on mechanism of cellulose synthesis.

Key words cellulose synthase; polyclonal antibody; cross-reaction; *Arabidopsis*; Western-blotting

(责任编辑:陆文昌)