

# 水稻纤维素合酶多克隆抗体的制备和鉴定

张苗苗<sup>1,2,3</sup> 陶章生<sup>1,2,3</sup> 陈婷婷<sup>1,2,3</sup> 夏涛<sup>2,3</sup> 彭良才<sup>1,2,3,4</sup> 丰胜求<sup>2,4</sup>

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** 纤维素合酶是参与纤维素 $\beta$ -1,4-葡聚糖链延伸的主要催化亚基,为进一步研究水稻中纤维素合酶的作用机理,采用DNA重组技术,将纤维素合酶基因*CesA1*、*CesA2*、*CesA3*克隆入表达载体pGEX-4T-3,构建重组质粒。在大肠杆菌JM109中,经异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导后在原核细胞中成功表达了3种纤维素合酶的融合蛋白,通过谷胱甘肽巯基转移酶(GST)纯化系统获得融合蛋白,以此作为抗原免疫家兔,制备出效价高、特异性强的多克隆抗体。

**关键词** 水稻; 纤维素合酶; 融合蛋白; 多克隆抗体

**中图分类号** Q 754 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)04-0393-05

纤维素合酶(cellulose synthase, *CesA*)是参与纤维素 $\beta$ -1,4-葡聚糖链延伸的主要催化亚基。1996年, Pear等<sup>[1]</sup>通过序列的同源性比对在棉花中发现了第1个纤维素合酶基因。纤维素合酶基因的大小范围为3.5~5.5 kb,有9~13个内含子,基因的差异主要在于内含子的多少<sup>[2]</sup>。所有纤维素合酶都有相似的结构, *CESA*蛋白的氨基端有1个锌指结构的氨基酸结构域,能促进蛋白质-蛋白质相互作用,在*CESA*蛋白聚合中发挥作用<sup>[3]</sup>;锌指结构域和N端跨膜结构域之间有1个蛋白序列的高变区I,在2个跨膜结构域之间是酶的中央结构域,其间有1个蛋白序列高变区II,高变区II两边各有1个保守基序, DxD和QxxRW,它们的功能主要与底物的结合和催化相关<sup>[4]</sup>。

纤维素合酶通常以复合体的形式存在于细胞膜上。1个纤维素合酶复合体可以合成由36条糖链组成的微纤丝<sup>[5-6]</sup>。遗传学的研究表明,每个花环至少由3种不同的*CESA*蛋白组成,在拟南芥中, *CESA4*、*CESA7*、*CESA8*为次生壁沉积所需<sup>[7-9]</sup>, *CESA1*、*CESA3*、*CESA6*为初生壁的生物合成所需<sup>[9-10]</sup>。在水稻中已证明*CESA4*、*CESA7*、*CESA9*为次生壁的生物合成所需<sup>[11]</sup>。

Arioli等<sup>[12]</sup>和Taylorn等<sup>[13]</sup>分别发现了温度敏感型突变体(*rsw1*)和不规则木质部突变体

(*irx3*),通过对突变基因的研究,证明了拟南芥纤维素合酶参与纤维素的合成。目前,纤维素合酶的作用机理仍不清楚。本文通过生物信息学分析,选取与其他已知蛋白同源性较低的片段,采用原核表达的方法表达水稻*CESA1*、*CESA2*和*CESA3*融合蛋白,免疫新西兰大白兔,制备出纤维素合酶的多克隆抗体,为研究水稻纤维素合酶的作用机制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1)质粒与宿主菌。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和JM109菌株、原核表达载体pGEX-4T-3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、高保真DNA聚合酶KOD plus、限制性内切酶*Bam*H I、*Eco*R I、*Sal* I、*Xho* I购自TOYOBO公司;T4 DNA连接酶和DNA分子质量Marker购自TaKaRa(大连)公司;硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, NC膜)购自Pall公司;亲和层析填料Glutathione sepharose 4 fast flow、蛋白分子质量Marker购自Genscript公司;预染蛋白Marker购自Fermentas公司;还原型谷胱甘肽(reduced L-glutathione)、Mops缓冲液购自Biosharp公司;弗式完全佐剂(FCA)、弗式不完全佐剂(FIA)、苯甲基

收稿日期: 2011-03-21

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08009-119B)

张苗苗, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学. E-mail: zmm.850111@yahoo.com.cn

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

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) 和凝血酶购自 Sigma 公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

3) 试验动物。成年雄性新西兰大白兔购自华中农业大学动物实验中心。

## 1.2 试验方法

1) 原核融合表达载体的构建。根据 NCBI 提供的序列, 首先进行序列比对, 然后进行跨膜区的预测 (<http://aramemnon.botanik.uni-koeln.de/>), 在非跨膜区选择同源性低的区段。3 种抗原所选择的区段在 cDNA 上的位置分别为: *OsCesA1* 位于第 366~801 个碱基的位置; *OsCesA2* 位于第 276~780 个碱基的位置; *OsCesA3* 位于第 345~804 个碱基的位置。3 种抗原区段之间的同源性为 12%。利用 Primer5 设计引物, 上下游引物分别引入酶切位点及保护碱基, *OsCesA1* 引物上下游的酶切位点分别为 *Bam*H I 和 *Sal* I, *OsCesA2* 引物上下游的酶切位点分别为 *Eco*R I 和 *Sal* I, *OsCesA3* 引物上下游酶切位点分别为 *Eco*R I 和 *Xho* I。引物合成由奥科生物技术有限公司完成。*OsCesA1* 上游引物: 5'-AAAGGATCCAAAGGTCCAGAGTGGCAGAT-AC-3', 下游引物: 5'-AAAGTCGACCTGGTTT-GAAGGGATAGGCA-3'; *OsCesA2* 上游引物: 5'-AAAGAATTCAGGCAACCAGGACCATAAGC-3', 下游引物: 5'-AAAGTCGACAATTGGCACTTTTCTCGATAGA-3'; *OsCesA3* 上游引物: 5'-AAAGAATTC AAGGGACAGGAAT-GACTCGC-3', 下游引物: 5'-AAACTC-GAGGACTTTTCTGGACAATGGCTG-3', 划线部分为酶切位点。

将 PCR 扩增产物双酶切回收后连接到 pGEX-4T-3 的表达载体上, 经酶切鉴定后对所获得的阳性克隆进行测序验证。结果表明 3 个重组质粒读码框正确, 均无碱基突变, 可用于融合蛋白的表达。

2) 重组蛋白的诱导表达。将重组质粒转化大肠杆菌 JM109 的感受态细胞, 挑取双酶切为阳性的单菌落接种于 5 mL 的 LB 培养基中活化过夜, 次日以体积比 1:50 的比例将活化培养物转入 10 mL 的 LB 培养基中扩大培养, 菌液的 *D* 值达到 0.6 后, 取出 3 mL 作为对照, 其余加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L, 诱导 3 h 后离心收集菌体细胞并超声波破

碎, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测重组蛋白的表达量, 并分析蛋白的可溶性。

3) GST 亲和层析分离纯化重组蛋白。大量诱导重组蛋白, 超声波破碎收集上清。上清加入到 GST 纯化柱中, PBS buffer 洗脱出去非特异结合的杂蛋白, 然后加入 10 mmol/L 的还原性谷胱甘肽洗脱目的蛋白。分光光度计测量蛋白浓度, 保存读数大于 200 的样品。蛋白样品经 PBS buffer 透析, PEG 20000 浓缩后, 放入冷冻干燥机中冷冻抽干。

4) 兔抗血清的制备。将纯化好的蛋白与 FCA 充分乳化至终质量浓度为 1 mg/mL, 作为免疫原进行初次免疫, 按每只兔子 0.5 mL 的剂量进行背部脊柱两侧皮下注射。间隔 2 周, FIA 与纯化蛋白充分乳化作为免疫原进行加强免疫, 剂量为初次免疫的 50%, 共加强 2 次后进行心脏取血<sup>[14]</sup>。分离血清, 加入叠氮化钠, -80 °C 冷冻保存。

5) 抗血清效价检测。确定抗原与抗血清的最佳工作浓度。包被液稀释抗原至 10 μg/mL, 取 1 mL 加入酶标板的反应孔中, 抗血清稀释 8 × 10<sup>4</sup>、1.6 × 10<sup>5</sup>、3.2 × 10<sup>5</sup> 倍, 取 1 mL 加入反应孔中, 加入新鲜稀释的酶标二抗, 37 °C 孵育 1 h, 然后加入底物显色液 (四甲基联苯胺, TMB) 反应 20 min, 2 mol/L 硫酸终止反应。450 nm 的波长下测其 *D* 值。

6) 抗血清的纯化。兔血清稀释 1 倍后加入层析柱内 (柱床为琼脂糖蛋白 A), TBS 洗脱杂蛋白, 洗脱缓冲液 (50 mmol/L Gly-HCl, pH 2.7) 洗脱目的蛋白, 以中和缓冲液 (1 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5% 叠氮化钠) 中和目的蛋白, 测定蛋白浓度后分装保存。

7) Western-blotting 检测抗原与抗血清的特异性。凝血酶处理后切除 GST 的抗原进行 SDS-PAGE, 控制每个泳道约 5 μg 总蛋白, 通过电泳仪转至 NC 膜上, 利用制备的免疫血清为一抗 (1:500), 用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗进行 Western-blotting 检测。

8) 水稻原生质膜提取。水稻孕穗期茎秆 -80 °C 保存, 液氮中磨碎, 加入 4 °C 预冷的提取缓冲溶液 (50 mmol/L Mops/NaOH 缓冲液 pH 7.5; 0.25 mol/L 蔗糖, 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 °C, 12 000 r/min 离心 10 min; 取上清; 4 °C, 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 °C,

60 r/min 溶解 30 min;4 °C,20 000 r/mim 离心 30 min;上清加 5×上样缓冲液,沸水浴加热 10 min。

9)OsCESAs 抗体特异性分析。蛋白样品 SDS-PAGE 后,恒电流电印蛋白至 NC 膜(4 °C,70 V,60 mA,12 h)。用 5%的脱脂牛奶封闭 1 h;洗膜 3 次(3 min/次);加入 OsCESAs 一抗(稀释度 1/300)室温孵育 1 h;洗膜 3 次(5 min/次);加入 HRP 羊抗兔二抗(稀释度 1/1 000)室温孵 1 h;洗膜 3 次,TBS 洗膜 1 次(5 min/次);二氨基联苯胺(DAB)显色。

## 2 结果与分析

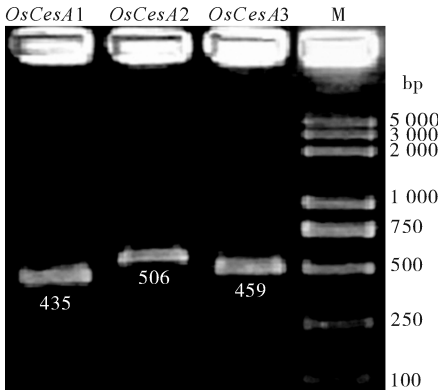
### 2.1 原核表达载体的构建及鉴定

提取分蘖期水稻茎秆的总 RNA,经 RT-PCR 得到 cDNA,高保真酶扩增目的片段(图 1),经胶回收试剂盒纯化回收得到 *OsCesA1*、*OsCesA2*、*OsCesA3*

的 DNA 片段。*OsCesA1*、*OsCesA2*、*OsCesA3* 的 PCR 扩增产物分别经 *Bam*HI/*Sal*I、*Eco*RI/*Sal*I、*Eco*RI/*Xho*I 双酶切,片段纯化回收后克隆到 pGEX-4T-3 的表达载体上,得到重组质粒 pGEX-*OsCesAs*,对双酶切鉴定片段大小正确的阳性克隆进行 DNA 测序,结果表明 pGEX-4T-3 载体中插入的基因片段序列及读码框完全正确(图 2)。

### 2.2 重组 OsCESAs 的诱导表达

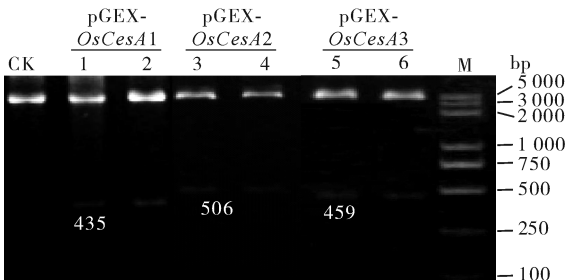
将 pGEX-*OsCesAs* 重组载体转化大肠杆菌 JM109 菌株,在 37 °C,0.5 mmol IPTG 诱导 3 h,蛋白量显著增加(图 3)。超声波破碎后离心,分别将全菌、上清、沉淀进行 SDS-PAGE(图 4)。发现 3 种



M:DNA 2000 plus marker.

图 1 RT-PCR 扩增产物电泳图谱

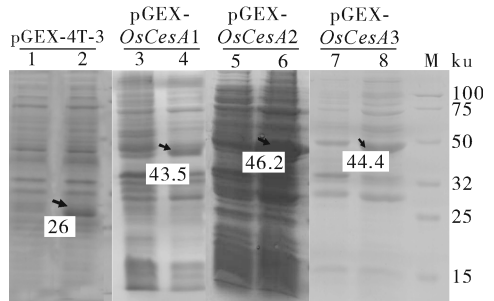
Fig.1 Electrophoresis of the products amplified by RT-PCR



M:2 000 plus DNA marker; CK:空载体 pGEX-4T-3 pGEX-4T-3 vector; 1,2:经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切的表达载体 pGEX-*OsCesA1* pGEX-*OsCesA1* digested with *Bam*H I and *Sal* I ; 3,4:经 *Eco*R I 和 *Sal* I 双酶切的表达载体 pGEX-*OsCesA2* pGEX-*OsCesA2* digested with *Eco*R I and *Sal* I ; 5,6:经 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切的表达载体 pGEX-*OsCesA3* pGEX-*OsCesA3* digested with *Eco*R I and *Xho* I .

图 2 重组质粒 pGEX-*OsCesAs* 双酶切鉴定

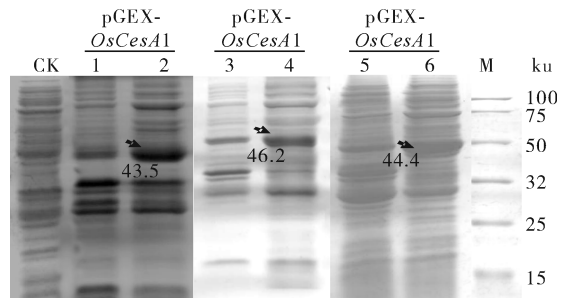
Fig.2 Restriction analysis of the pGEX-*OsCesAs* plasmids



M: 蛋白质标记 Protein marker; 1, 3, 5, 7: 细胞混合物 (-IPTG) The whole cell protein not induced by IPTG; 2,4,6,8: 细胞混合物(+ IPTG) The whole cell protein induced by IPTG; “\”显示的是融合蛋白 GST-*OsCesAs* “\”showed recombinant GST-*OsCesAs* protein.

图 3 GST-*OsCesAs* 诱导表达的 SDS-PAGE 检测

Fig.3 Identification of GST-*OsCesAs* prokaryotic expression by SDS-PAGE



M:蛋白质标记 Protein marker; CK:空载体(-IPTG) pGEX-*OsCesAs* not induced by IPTG; 1,3,5: 沉淀(+IPTG) Insoluble group induced by IPTG; 2,4,6: 上清(+IPTG) Soluble group induced by IPTG.

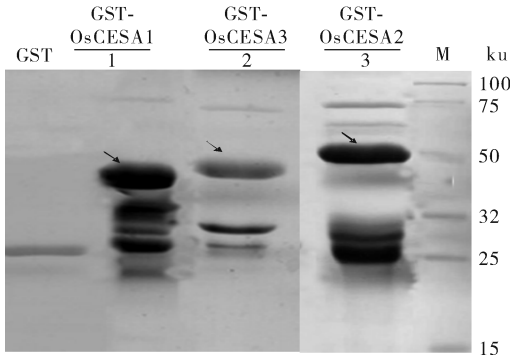
图 4 GST-*OsCesAs* 可溶性 SDS-PAGE 检测

Fig.4 SDS-PAGE detection of solubility of GST-*OsCesAs* identification of GST-*OsCesAs* prokaryotic expression by SDS-PAGE

pGEX-OsCESA 均在上清中表达,为可溶性蛋白。

### 2.3 重组蛋白的纯化

重组蛋白 IPTG 诱导后离心收集菌体,超声波破碎后收集上清。经亲和层析柱纯化后得到纯度较高的重组蛋白(图 5)。



M: 蛋白质标记 Protein marker; 1, 2, 3: 纯化产物 Purification; “↘”显示的是 OsCESAs “↘”showed OsCESAs.

图 5 亲和层析纯化 GST-OsCESAs 蛋白  
Fig. 5 Purification of GST-OsCESAs by affinity chromatography

### 2.4 OsCESAs 抗体的制备与效价检测

用纯化的重组蛋白免疫新西兰大白兔,获得兔抗血清。抗血清进行 ELISA 效价检测,底物为四甲基联苯胺(TMB),在分光光度计在波长 450 nm 下测定  $D$  值。计算样本  $D$  值与对照  $D$  值的比值。比值大于 2.1 为阳性。试验结果表明 OsCESA1, OsCESA2, OsCESA3 抗体的效价分别为  $1:3.2 \times 10^5$ ,  $1:3.2 \times 10^5$ ,  $1:8 \times 10^4$ 。

### 2.5 OsCESAs 抗体的 Western-blotting 分析

用凝血酶切割重组 GST-OsCESAs,分离 GST 和 OsCESAs, 12% SDS-PAGE, 控制每个泳道约 5  $\mu$ g 总蛋白;转到 NC 膜上;Western-blotting(图 6)结果表明:OsCESA1、OsCESA2、OsCESA3 可与抗原特异结合。

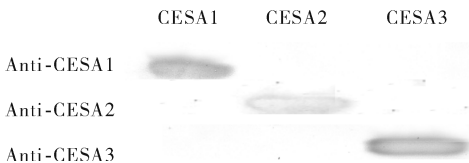


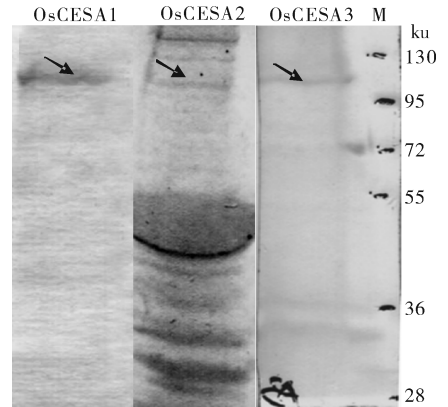
图 6 抗体特异性检测

Fig. 6 Specificity detection of antibodies

### 2.6 OsCESAs 抗体特异性检测

提取水稻孕穗期茎秆的原生质膜,加  $5 \times$  上样缓冲液,沸水浴加热 10 min。10% SDS-PAGE,转到聚偏氟乙烯膜上,Western-blotting(图 7)结果表

明 OsCESA1、OsCESA3 抗体都是特异的,而 OsCESA2 的抗体出现了非特异性条带。



M: 蛋白质标记 Protein marker; “↘”显示的是 OsCESAs “↘”showed OsCESAs.

图 7 抗体特异性分析

Fig. 7 Specific analysis of OsCESA antibodies

## 3 讨论

为了制备高质量的免疫血清,在抗原引物设计、免疫动物选择、佐剂使用、免疫剂量等方面进行控制。首先通过植物膜蛋白质数据库对纤维素合酶进行分析,选取蛋白的非跨膜区,然后通过 Blast 比对选择基因的特异区段,综合 2 个区段设计引物,保证了抗原的特异性和高效表达。免疫动物选择新西兰家兔,其对抗原的反应性好、产生的抗体亲和力高、价格低廉、易于采血。进行免疫注射时,加入了弗式佐剂,可以改变抗原的物理状态而延长其在体内的滞留时间,使抗原缓慢释放,同时非特异性的促进局部吞噬细胞反应来增强动物的免疫效果。对于抗原的免疫剂量,在首次免疫时选择 1 mg/mL,加强免疫时剂量减半,因为在一定范围内(0.5~2.0 mg/mL)剂量越大产生的免疫应答越强,一方面引起机体强烈的特异性免疫应答,另外还可以避免机体产生免疫抑制。

选用 pGEX-4T-3 作为载体构建了 3 个纤维素合酶的重组质粒,在大肠杆菌 JM109 中获得表达,并且表达产物以可溶形式存在。以亲和层析柱纯化后获得的蛋白为免疫原制备了融合抗体。经 ELISA 检测融合抗体的效价为大于  $1:160\,000$ ,可以用于试验研究。Western-blotting 表明融合抗体可特异性识别水稻中的纤维素合酶。至此,我们制备了 3 种纤维素合酶的抗体,这为进一步研究纤维素的合成机制奠定了基础。



## 参 考 文 献

- [1] PEAR J R, KAWAGOE Y, SCHRECKENGOST W E, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93:12637-12642.
- [2] RICHMOND T. Higher plant cellulose synthase[J]. Genome Biol, 2000, 1(4): reviews 3001. 1-3001. 6.
- [3] KUREK I, KAWAGOE Y, JACOB W D, et al. Dimerization of cotton fiber cellulose synthase catalytic subunits occurs via oxidation of the zinc-binding domains[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99:11109-11114.
- [4] RICHMOND T A, SOMERVILLE C R. The cellulose synthase superfamily[J]. Plant Physiol, 2000, 124:495-498.
- [5] LEROUXEL O, CAVALIER D M, LIEPMAN A H, et al. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides: a complex process [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(6): 621-630.
- [6] BOWLING A J, BROWN R M J R. The cytoplasmic domain of the cellulose-synthesizing complex in vascular plants [J]. Proto-plasma, 2008, 233: 115-127.
- [7] TAYLOR N G, GARDINER J C, WHITEMAN R, et al. Cellulose synthesis in the *Arabidopsis* secondary cell wall[J]. Cellulose, 2004, 11: 329-338.
- [8] SOMERVILLE C R. Cellulose synthesis in higher plants[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006, 22: 53-78.
- [9] MAREK M, SETH D, STAFFAN P. Cellulose synthesis: a complex complex[J]. Plant Biology, 2008, 11: 252-257.
- [10] ROBERTS A W, ROBERTS E, DELMER D P. Cellulose synthase (*CESA*) genes in the green alga *Mesotaenium caldarium* [J]. Eukaryotic Cell, 2002, 1: 847-855.
- [11] TANAKA K, MURATA K, YAMAZAKI M, et al. Three distinct rice cellulose synthase catalytic subunit genes required for cellulose synthesis in the secondary wall[J]. Plant Physiol, 2003, 133: 73-83.
- [12] ARIOLI T, PENG L, BETZNER A S, et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Science, 1998, 279: 717-720.
- [13] TAYLOR N G, SCHEIBLE W R, CUTLER S, et al. The irregular xylem3 locus of *Arabidopsis* encodes a cellulose synthase required for secondary cell wall synthesis[J]. Plant Cell, 1999, 11(5): 769-780.
- [14] 田斌, 张昌毅, 余群新, 等. 泉古菌 *Sulfolobus islandicus* PCNA1 的原核表达及其多克隆抗体的制备[J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(1): 59-62.

## Preparation and identification of polyclonal antibodies of cellulose synthase in rice

ZHANG Miao-miao<sup>1,2,3</sup> TAO Zhang-sheng<sup>1,2,3</sup> CHEN Ting-ting<sup>1,2,3</sup>  
XIA Tao<sup>2,3</sup> PENG Liang-cai<sup>1,2,3,4</sup> FENG Sheng-qiu<sup>2,4</sup>

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** Cellulose synthase is a critical catalytic subunit of the cellulose synthase complex. To study functions of *CesA* genes in rice, their antibodies were prepared. First, recombinant plasmids were constructed with cloning the cellulose synthase genes into the expression vector pGEX-4T-3. The recombinant plasmids were then transformed into *E. coli* JM109 and the recombinant proteins were obtained. The fusion proteins were purified with GST affinity chromatography system and injected to rabbit for generating polyclonal antibodies. Finally, all antibodies were identified by Western blotting analysis with specific bands and high activities.

**Key words** *Oryza sativa*; cellulose synthase; fusion proteins; polyclonal antibody