



水稻 Argonaute 2 蛋白的原核表达与多克隆抗体制备

程小玲,杨加伟*

(遵义医学院 细胞生物学与遗传学教研室,生物化学教研室,贵州遵义 563000)

摘要:为了制备水稻 Argonaute 2(AGO2)的多克隆抗体,该研究采用 RT-PCR 扩增 OsAGO2 蛋白 165~401 aa 片段和 440~570 aa 片段的编码序列,并构建了 2 个原核表达载体。诱导表达重组蛋白后注射家兔,制备了相应的多克隆抗体,最后利用 Western blot 初步分析水稻 AGO2 蛋白的表达模式。结果表明:成功构建 2 个表达载体,通过诱导获得了分子量约为 30 kD 和 23 kD 的重组蛋白。其中,以 440~570 aa 片段为抗原所制备的多克隆抗体免疫印迹效果较好。Western blot 表明在水稻花药、愈伤组织及小穗中检测到 OsAGO2 表达。该研究为进一步深入探讨水稻 OsAGO2 基因的特性与功能奠定了基础。

关键词:OsAGO2;原核表达;多克隆抗体;水稻

中图分类号:Q786 文献标志码:A

Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of Argonaute 2 in Rice (*Oryza sativa L.*)

CHENG Xiaoling, YANG Jiawei*

(Department of Cell Biology and Genetics, Department of Biochemistry in South China, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China)

Abstract: To prepare the polyclonal antibody of rice Argonaute 2 (OsAGO2), the coding regions of 165~401 aa and 440~570 aa of this protein was amplified by RT-PCR in this study, followed by cloned into the prokaryotic expression vector pET-23d. Afterwards, the recombinant OsAGO2 proteins were expressed and used as antigen to immune rabbits. The expression pattern of OsAGO2 was detected by Western blot analysis using antibodies prepared. The results demonstrated that two prokaryotic expression vectors were obtained, and the 30 kD and 25 kD of recombinant proteins were expressed successfully. The antibody prepared by 440~570 aa region of OsAGO2 showed higher specificity tested by immunoblotting. Western blot analysis showed that the OsAGO2 was expressed in tissues of anther, callus and spikelets. This work would contribute to study the properties and function of OsAGO2 in rice.

Key words:AGO2;prokaryotic expression;polyclonal antibody;rice (*Oryza sativa L.*)

Argonaute(AGO)蛋白是一类高度保守的蛋白家族,为 RNA 诱导的沉默复合体(RNA induced silencing complex, RISC)的核心元件^[1-2]。AGO 蛋白既能与小 RNAs 形成沉默复合体参与转录后基因沉默,又能够参与 RNA 指导的 DNA 甲基化,有

着多样的生物学功能。AGO 家族蛋白的分子量约为 100 kD,其成员均为强碱性蛋白且均含有 2 个标志性保守结构域:PAZ 和 PIWI 结构域^[3]。其中,位于 AGO 蛋白 N 端的 PAZ 结构域含有约 130 个氨基酸,普遍认为其功能是与 RNA 单链的 3'末端相

收稿日期:2014-05-04;修改稿收到日期:2014-08-31

基金项目:遵义医学院硕士启动基金(F-637)

作者简介:程小玲(1987—),女,讲师,主要从事植物分子生物学方面研究。E-mail:cxlppmm1987@21cn.com

*通信作者:杨加伟,博士,副教授,主要从事分子生物学方面研究。E-mail:990106-yjw@163.com

互作用,促进 siRNA、靶 mRNA 和 RISC 的特异结合^[4-5]。位于 AGO 蛋白 C 端的 PIWI 结构域含有约 300 个氨基酸,推测其功能与 RNaseH 相似,在 siRNA 与靶 mRNA 配对后切割靶 mRNA,从而导致转录后基因沉默^[6]。通过对突变体的研究发现,AGO 蛋白在植物分生组织的维持、生长时相转换的控制,以及动物干细胞的维持、肿瘤发生等过程中均起重要作用^[7-10]。

目前,在拟南芥中植物 AGO 蛋白家族的功能研究较多,但在单子叶模式植物水稻中的报道相对较少^[11]。现有研究表明,水稻含有 19 种 AGO 蛋白,它们可以分成 6 个分支:MEL1、AGO1、AGO4、AGO7、AGO17 和 AGO18。其中,本研究选择的 AGO2 蛋白属于 AGO7 分支^[12],该蛋白目前在水稻中的生物学功能尚不清楚。因此,本研究利用 PCR 技术扩增水稻 AGO2 (OsAGO2) 基因的部分 ORF (开放阅读框) 区域,构建其原核表达载体,获得重组蛋白并免疫家兔制备 OsAGO2 多克隆抗体,最后用 Western blot 验证抗体的免疫效果以及 OsAGO2 在水稻中的表达情况,为进一步研究 OsAGO2 蛋白在水稻中的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用材料为粳稻 (*Oryza sativa* L. spp. *japonica*) 品种‘中花 11’,由华南农业大学遗传工程室保存;所用家兔为广东省动物实验中心提供的雄性新西兰白兔;原核表达载体 pET-23d 与菌株 BL21(DE3) 由华南农业大学遗传工程室保存;主要试剂购自上海生工公司、大连宝生物工程有限公司、广州化学试剂厂等。

1.2 方法

1.2.1 OsAGO2 生物信息学分析 OsAGO2 蛋白抗原表位分析采用 DNASTar 软件的 Protean 程序。采用 Jameson-Wolf 法预测 OsAGO2 蛋白抗原指数,根据 Emini 原则分析 OsAGO2 表面可及性,按照 Kyke-Doolittle 的氨基酸亲水性标准预测 OsAGO2 的亲水性。

1.2.2 pET-23d-AGO2 原核表达载体的构建 参照 Trizol 试剂盒说明书提取水稻叶片 RNA,反转录得到 cDNA 第一链。用上游引物 OsAGO2-1F (5'-AAAA GGATCC AGCGCATTGCTTCTACTGA -GG-3', *Bam*H I 酶切) 和下游引物 OsAGO2-1R (5'-AAAA GTCGAC CACAGACTTCTGAACAAGA -

TC-3', *Sal* I 酶切),以及上游引物 OsAGO2-2F (5'-AAAAGGGATCCGAGGTTGACTGATAAACCT-GC-3', *Bam*H I 酶切) 和下游引物 OsAGO2-2R (5'-AAAAGTCGACGGTCCTACCAGTGACTTCCA-3', *Sal* I 酶切) 进行 RT-PCR 扩增 OsAGO2 基因编码区内 2 段不同序列。将纯化后的目的片段和质粒 pET-23d 分别用内切酶 *Bam*H I 和 *Sal* I 进行双酶切,酶切产物用 T₄ DNA 连接酶(TaKaRa)进行连接,构建原核表达载体 pET-23d-AGO2-1 和 pET-23d-AGO2-2,然后将重组质粒电击转化到大肠杆菌菌株 BL21(DE3) 中,提取质粒酶切鉴定重组载体,并进行 DNA 测序验证。

1.2.3 重组蛋白的诱导表达 重组蛋白的诱导方法参见文献[13,14]进行并适当改进,详细操作如下:分别挑取阳性单菌落和含空载体的菌株于 LB 液体培养基(含 100 μg/mL Amp) 中,37 °C 振荡培养过夜,次日以 1 : 10 的体积比接种于另一新鲜的含抗生素的 LB 液体培养基,37 °C、200 r/min 继续振荡培养至 OD₅₅₀ ≈ 0.5,取 1 mL 菌液作为对照备用。加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导蛋白表达,在加入 IPTG 后 1、2、3、4 和 5 h 取菌液 1 mL。菌液离心收集菌体后悬浮于 200 μL ddH₂O 中,超声波破碎后,取 20 μL 样品加入 2 × SDS 样品缓冲液,100 °C 加热 5 min,12 000 r/min 离心 5 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检验蛋白表达情况。

1.2.4 多克隆抗体的制备 大量诱导 OsAGO2 重组蛋白进行 10% SDS-PAGE 电泳后,切割目的条带,取约含 1 mg 重组蛋白 SDS-PAGE 凝胶带,液氮磨碎后,与等体积的弗氏完全佐剂进行乳化,乳化好的匀浆即用于多点注射雄性新西兰大白兔。以后的 2~3 次加强免疫注射蛋白量减半,且采用不完全佐剂乳化注射,各次免疫的时间间隔为 1 周,最后 1 次加强免疫注射 7~10 d 后采血,离心收集抗血清。

1.2.5 Western blot 分析 称取 0.1 g 水稻材料于研钵,加入 1 mL 蛋白抽提液(50 mmol/L Tris-HCl,150 mmol/L NaCl,0.1% NP-40,4 mmol/L MgCl₂,5 mmol/L DTT, pH 7.5)^[15],磨成匀浆,12 000 r/min 离心 10 min,取上清于-70 °C 冷冻保存备用。取适量体积的蛋白样品于等体积 2 × SDS 样品处理缓冲液于 100 °C 煮沸 5 min 后即可上样。蛋白样品进行 10% SDS-PAGE 电泳,当溴酚蓝跑至胶底部时停止电泳。剪与凝胶大小相同的硝酸纤维素膜和 4 块滤纸,与电转仪方框同在转移缓冲液中浸泡 15 min。在电转缓冲液中按照从负极向正

极的顺序进行以下组装:海绵垫-滤纸-凝胶-硝酸纤维素膜-滤纸-海绵垫,注意赶走气泡,恒流 200 mA 电转移 2 h。将膜浸入 5% 脱脂奶粉中常温封闭 3 h(或 4 ℃ 封闭过夜)后用 1×TTBS 清洗 5 次,每次 5~10 min,在 5% 脱脂奶粉中按 1:2 000 的稀释比例加入一抗,膜浸入其中常温杂交 2 h。将杂交膜 1×TTBS 清洗 5 次,每次 5~10 min,在 5% 脱脂奶粉中按 1:10 000 的稀释比例加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG),膜浸入其中常温杂交 1 h。1×TTBS 清洗 5 次,每次 5~10 min,1×TBS 洗 1 次,15 min;将洗好的膜加入 CST 化学发光试剂进行发光,在暗室中压胶片,最后将胶片依次置于显影液和定影液中,胶片干燥后照相。

2 结果与分析

2.1 OsAGO2 蛋白抗原表位分析

搜索 NCBI 水稻基因数据库发现 1 个编码 AGO2 的基因序列(NCBI 序列号 NM_001060406),命名为 OsAGO2。进一步分析发现 OsAGO2 基因位于第 4 号染色体上,编码区全长 3 105 bp,相应的蛋白序列为 CAD41795,全长 1 034 氨基酸,预测其蛋白分子量为 111.4 kD。利用 DNASTar 软件 Protean 程序对该蛋白序列进行分析,利用 Jameson-Wolf 法预测 OsAGO2 蛋白抗原指数,结果显示 OsAGO2 蛋白从 N 端至 C 末端大部分区域抗原指数均较高,可能的抗原表位区多且分散,如:1~33 aa、180~300 aa、440~470 aa、508~529 aa 等(图 1)。根据 Emini 原则分析表面可及性,结果显示,OsAGO2 蛋白中表面可及性较

高的区域主要分布在 180~290 aa、428~437 aa、486~494 aa、508~537 aa 等区段(图 1);按照 Kyke-Doolittle 的氨基酸亲水性标准,得出 OsAGO2 蛋白具较高的亲水性,如:1~31 aa、42~138 aa、400~580 aa 等(图 1)。

2.2 OsAGO2 基因片段扩增与原核表达载体构建

综合分析 OsAGO2 蛋白抗原表位预测结果,本研究分别选取了该蛋白 2 段不同区域:抗原指数较高但表面可及性及亲水性稍差的 165~401 aa 片段(OsAGO2-1),和抗原指数、表面可及性指数以及亲水性指数均较高的 440~570 aa 片段(OsAGO2-2),分别作为抗原进行抗体制备和比较。对 OsAGO2-1 和 OsAGO2-2 与其它 OsAGO 蛋白进行同源分析,结果显示,这 2 段蛋白序列和其它 OsAGO 蛋白相应序列的一致性较低,和同一分支中的 OsAGO3 和 OsAGO7 蛋白的相应序列也仅有约 50% 和 30% 的序列一致性。接着,根据其相应的核酸序列设计引物,利用 RT-PCR 技术成功从水稻 cDNA 中扩增得到了大小约为 700 bp 和 400 bp 的片段(图 2,A)。回收目的片段后经过限制性内切酶酶切及体外连接等方法,将其连接到原核表达载体 pET-23d,利用酶切和测序确定载体构建正确。最终获得了这 2 个片段的原核表达载体(图 2,B,C)。

2.3 OsAGO2 重组蛋白的原核表达

取 pET-23d 重组表达菌株划板,挑取单菌落摇菌并培养至 OD₅₅₀ 为 0.5~0.6,分别在加 IPTG 诱导前和诱导后 1、2、3、4 和 5 h 时取菌液 1 mL,超声波破碎后进行 SDS-PAGE 电泳检测。结果(图 3)

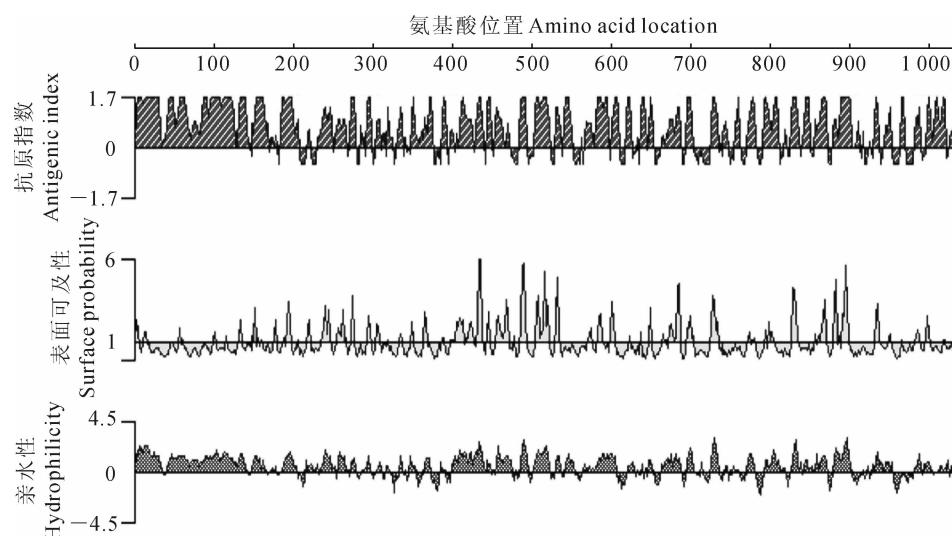


图 1 OsAGO2 蛋白抗原表位分析

Fig. 1 Antigenic index of OsAGO2

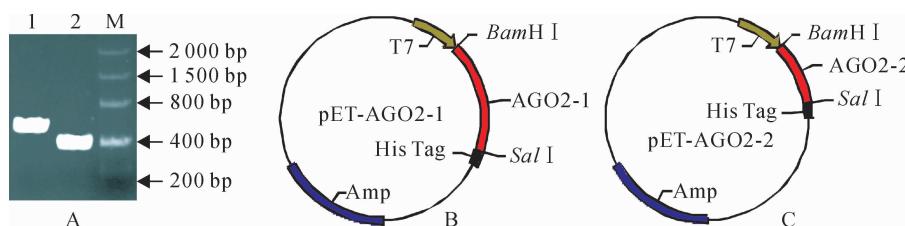
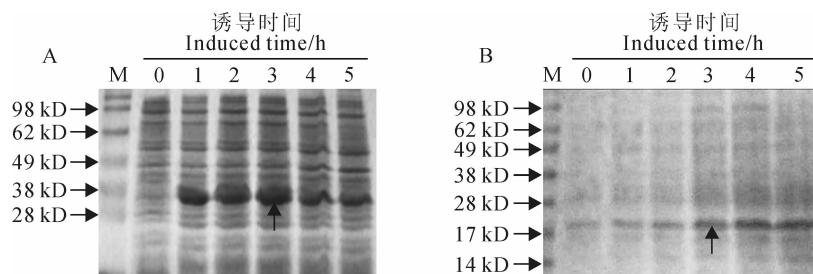


图2 基因扩增与原核表达载体示意图

A. *OsAGO2* 基因片段扩增结果; M. DNA marker; 1. *OsAGO2-1*; 2. *OsAGO2-2*;B.C. *OsAGO2-1*(B)和 *OsAGO2-2*(C)原核表达载体示意图

Fig. 2 Gene amplification and prokaryotic expression plasmids schematic presentations

A. Electrophoresis results of *OsAGO2* gene fragments; M. DNA marker; 1. *OsAGO2-1* fragment; 2. *OsAGO2-2* fragment; B,C. Schematic presentations of *OsAGO2-1*(B) and *OsAGO2-2*(C) prokaryotic expression plasmids图3 *OsAGO2-1*(A)和 *OsAGO2-2*(B)原核表达蛋白电泳图

M. 蛋白质 marker;箭头所示为目标蛋白条带

Fig. 3 Prokaryotic expression of *OsAGO2-1*(A) and *OsAGO2-2*(B)

M. Protein marker; Arrows show the recombinant proteins

显示,2种载体和诱导前相比,含有重组质粒的菌株在诱导1 h时都能看到明显的重组蛋白条带,大小分别约为30 kD(*OsAGO2-1*)和23 kD(*OsAGO2-2*),与理论预测值相符。2个重组蛋白均在诱导3 h时表达量达到峰值,且*OsAGO2-1*重组蛋白诱导表达超过3 h后,其表达量反而随着诱导时间的延长而降低。因此,本研究后续以IPTG诱导3 h来获得2个重组蛋白,切割目的片段备用。

2.4 *OsAGO2* 多克隆抗体制备与 Western blot 检测

将乳化后的2种蛋白分别免疫家兔制备抗体,在第3次注射家兔1周后,小量取血并收集抗血清,用Western blot验证多克隆抗体是否制备成功。分别将水稻花药、愈伤组织、小穗的总蛋白进行SDS-PAGE电泳后转膜,抗血清按1:2 000稀释比例进行Western blot分析。结果(图4)显示,以440~570 aa片段为抗原所获得的多克隆抗体在花药、愈伤组织、小穗蛋白中均检测到了约110 kD大小的*OsAGO2*蛋白条带,且免疫印迹条带清晰,表明抗体制备成功,也说明*OsAGO2*蛋白在水稻花药、小穗及愈伤组织均具有表达。此外,以165~401 aa片段为抗原所获得的多克隆抗体在110 kD处未出现特异性条带,暗示重组表达的*OsAGO2-1*制备抗体

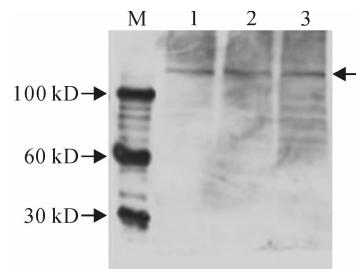


图4 Western blot 检测水稻不同组织中的

OsAGO2 表达情况

M. 蛋白质 Marker; 1. 花药; 2. 愈伤组织; 3. 小穗; 箭头示目标条带

Fig. 4 Western blot analysis of *OsAGO2* in different tissues of rice

M. Protein marker; 1. Anther; 2. Callus; 3. Spikelets;

Arrow shows the *OsAGO2* proteins

未获成功。证明本研究以440~570 aa片段为抗原所获得的多克隆抗体成功获得了*OsAGO2*的抗体。

3 讨 论

AGO蛋白是RNA诱导的沉默复合体中必不可少的成分之一。随着对RNA沉默现象的深入研究,越来越多的证据表明,这类在生物界非常保守的蛋白家族与RNA介导的基因沉默机制密切相关^[11]。水稻是单子叶植物研究的模式植物,但其19

个AGO蛋白基因家族成员中仅少数的功能被揭示,且相关作用机制尚未认识清楚^[16-18]。制备水稻AGO2抗体,为深入探讨AGO蛋白的生物学功能及其在RNAi途径中的作用,从分子水平揭示其作用机理奠定了基础。

抗体的制备是研究目的基因在翻译水平的表达特性、蛋白之间互作以及蛋白质功能的基础。目前,利用重组蛋白免疫家兔制备多克隆抗体由于方法成熟、过程简单、制备周期短,因此得到了广泛的应用^[13-14,19]。抗体制备成功的关键在于选择合适的抗原区域,抗原区域的选择主要以亲水性、可及性、抗原性、可塑性、二级结构预测和电荷分布等为参考,而亲水性和可及性是形成抗原表位的首要条件。此外抗原性的有无还与序列中特定氨基酸的出现、片段的活动性及二、三级结构的构象有关^[20]。本研究根据AGO2蛋白抗原指数、可及性、亲水性,选取了抗原指数较高但表面可及性及亲水性稍差的165~401 aa片段(OsAGO2-1),和抗原指数、表面可及性指数以及亲水性指数均较高的440~570 aa片段(OsAGO2-2)分别作为抗原,构建了原核表达载体

并在大肠杆菌中进行高效表达。在获得浓度较高的重组AGO2蛋白后,以重组蛋白作为抗原免疫家兔,成功地制备了2种OsAGO2多克隆抗体。比较发现以抗原指数、表面可及性指数和亲水性指数均较高的440~570 aa片段为抗原所获得的多克隆抗体效果较好,效价高且特异性强,而抗原指数较高但表面可及性及亲水性稍差的165~401 aa片段为抗原所获得的多克隆抗体效果较差,说明抗体的制作效果优劣与抗原区域的选择有关。同时,这两段抗原序列和其它OsAGO蛋白相应序列的一致性较低,也在一定程度上保证了抗体的特异性。

本研究利用OsAGO2多克隆抗体从蛋白水平上分析得知该蛋白在水稻花药、愈伤组织、小穗中均有表达,暗示了OsAGO2可能与水稻的生殖发育有关,对下一步研究方向具有重要的指导意义。接下来本研究会利用相关植物基因工程技术,制备OsAGO2表达量上调或下调的转基因植株,研究和分析对水稻发育的影响。因此,OsAGO2多克隆抗体的制备,为进一步研究OsAGO2在水稻中的表达模式及其生物学功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] BAULCOMBE D. RNA silencing in plants[J]. *Nature*, 2004, **431**(7 006): 356—363.
- [2] HUTYAGNER G, SIMARD M J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008, **9**(1): 22—32.
- [3] CERUTTI L, MIAN N, BATEMAN A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, **25**(10): 481—482.
- [4] WANG Y, JURANEK S, LI H, et al. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex[J]. *Nature*, 2008, **456**(7 224): 921—926.
- [5] LINGEL A, SIMON B, IZAURRALDE E, et al. Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2004, **11**(6): 576—577.
- [6] VAUCHERET H. Plant ARGONAUTES[J]. *Trends in Plant Science*, 2008, **13**(7): 350—358.
- [7] LYNN K, FERNANDEZ A, AIDA M, et al. The PINHEAD/ZWILLE gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the ARGONAUTE1 gene[J]. *Development*, 1999, **126**(3): 469—481.
- [8] HAMMOND S M, BERNSTEINE, BEACH D, et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells[J]. *Nature*, 2000, **404**(6 775): 293—296.
- [9] RHOADES M W, REINHART B J, LIM L P, et al. Prediction of plant microRNA targets[J]. *Cell*, 2002, **110**(4): 513—520.
- [10] YEKTA S, SHIH I H, BARTEL D P. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA[J]. *Science*, 2004, **304**(5 670): 594—596.
- [11] NONOMURA K, MOROHOSHI A, NAKANO M, et al. A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice[J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(8): 2 583—2 594.
- [12] MALLORY A, VAUCHERET H. Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins[J]. *The Plant Cell*, 2010, **22**(9): 3 879—3 889.
- [13] LI Y P(李玉萍), DENG D D(邓丹丹), ZHANG H N(张海纳), et al. Prokaryotic expression of truncated tartary buckwheat flavanone-3-hydroxylase and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2013, **33**(4): 672—677(in Chinese).
- [14] LI P(李波), NI ZH Y(倪志勇), LI X D(李晓东), et al. Construction of prokaryotic expression vector, protein purification and identification of GhCOMT1 gene from *Gossypium hirsutum* L. [J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2012, **32**(10): 1 971—1 976(in Chinese).
- [15] QI Y, MI S. Purification of *Arabidopsis* argonaute complexes and associated small RNAs[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, **592**(2): 243—254.
- [16] NAGASAKI H, ITOH J, HAYASHI K, et al. The small interfering RNA production pathway is required for shoot meristem initiation in rice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, **104**(37): 14 867—14 871.
- [17] WU L, ZHANG Q, ZHOU H, et al. Rice microRNA effector complexes and targets[J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(11): 3 421—3 435.
- [18] KINDER C A, MARTIENSSEN R A. The role of ARGONAUTE1 (AGO1) in meristem formation and identity[J]. *Developmental Biology*, 2005, **280**(2): 504—517.
- [19] YANG J W(杨加伟), ZHOU L Y(周玲艳), ZHUANG CH X(庄楚雄). Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of Os ϵ -cop1 in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Genomics and Applied Biology*(基因组学与应用生物学), 2013, **13**(4): 497—502(in Chinese).
- [20] HU W L(胡文龙), TANG B H(唐博恒), REN R W(任瑞文), et al. Screening and identification of yellow fever virus-specific antigens [J]. *Chin. Prev. Med.* (中国预防医学杂志), 2013, (2): 114—117(in Chinese).