

徐金龙, 梁爽, 郁飞, 等. 拟南芥细胞周期基因 *AtCDC5* 的功能研究及抗体制备[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(1): 26-32.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2019.01.004

拟南芥细胞周期基因 *AtCDC5* 的功能研究及抗体制备

徐金龙, 梁爽, 郁飞

(西北农林科技大学生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

摘要: MYB 相关 CDC5 (Cell division cycle 5) 蛋白对于细胞周期 G2 期的正常进行是必须的, 但是在植物中对这种蛋白质的研究还较少涉及。本试验测量比较野生型拟南芥 (Col-0 生态型) 和 *AtCDC5* T-DNA 插入缺失突变体 (GK_278B09) 的主根生长速度和长度, 利用瞬时表达 *AtCDC5-GFP* 研究 *AtCDC5* 在拟南芥叶片叶肉细胞中的定位, 同时利用 *AtCDC5* N 端 144 个氨基酸在大肠杆菌中进行原核表达和纯化, 免疫家兔获得针对 *AtCDC5* 的多克隆特异性抗体, 从表型、细胞和蛋白质水平研究 *AtCDC5* 基因的功能。结果表明, GK_278B09 的主根因发育受到抑制而生长速度缓慢; *AtCDC5-GFP* 融合蛋白主要定位于细胞核中; 经过分离得到的 *AtCDC5* 蛋白抗血清能够有效地检测出 10 ng 原核表达的 *AtCDC5*₁₋₁₄₄ 抗原, 并在原生质体 *AtCDC5* 过表达体系中检测出 1 条分子量约为 120 000 的条带, 此条带与 *AtCDC5-GFP* 大小相近。本研究成功制备出 *AtCDC5* 蛋白的多克隆抗体, 为进一步研究 *AtCDC5* 蛋白影响细胞周期从而影响植物生长发育提供了研究基础。

关键词: 细胞周期基因 *CDC5*; 亚细胞定位; 原核表达; 抗体制备;

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)01-0026-07

Functional research and antibody preparation of *Arabidopsis thaliana* cell cycle gene *AtCDC5*

XU Jin-long, LIANG Shuang, YU Fei

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: MYB related protein cell division cycle 5 (CDC5) is essential for the G2 phase of cell cycle, but the research about CDC5 in plant is few. In the present study, the main root length and growth rate of wild-type *Arabidopsis thaliana* (Col-0 ecotype) and *AtCDC5* T-DNA insertion deletion mutant (GK_278B09) were compared, and the subcellular localization of the *AtCDC5* protein was studied by transient expressed *AtCDC5-GFP*. Moreover, prokaryotic expression and were applied using 144 amino acids at the N-terminus of *AtCDC5* in *Escherichia coli*. The polyclonal antibody against *AtCDC5* was obtained by immunizing rabbits. The function of *AtCDC5* was researched at levels of phenotype, cell and protein. The results showed that the main root development of GK_278B09 was inhibited so that the rate of growth was lower than Col. The *AtCDC5-GFP* fusion protein was located in the nuclei. The separated serum of *AtCDC5* could test 10 ng of *AtCDC5* antigen, and a band with themolecular weight of 120 000 was detected in the protoplast system. Furthermore, the size of the band was similar to that of *AtCDC5-GFP*. The polyclonal antibody against *AtCDC5* provides resource for the research on the function of *AtCDC5* in plant growth.

Key words: cell division cycle 5; subcellular localization; prokaryotic expression; antibody preparation

收稿日期: 2018-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31741010)

作者简介: 徐金龙 (1992-), 男, 山东德州人, 硕士研究生, 主要从事拟南芥突变体的筛选研究。 (E-mail) xujinlongxy@163.com

通讯作者: 郁飞, (E-mail) flyfeiyu@gmail.com

细胞周期作为细胞生命活动的基本过程, 在生物体生长发育进程中发挥着极其重要的功能。目前已发现与细胞周期调控有关的分子主要包括三大类: 期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 以及细胞周期

蛋白依赖性激酶抑制剂 (CKI)。这三类因子相互作用,共同维护细胞周期的顺利进行^[1]。在拟南芥中, *AtCDC5* 属于一种细胞周期蛋白,它是生物体进行正常生命活动的根本保证。*AtCDC5* 表达主要在具有较高分裂活性的组织中,并且贯穿于整个胚胎形成过程。*AtCDC5* 对于拟南芥 G2/M 期的转换至关重要, *AtCDC5* 功能缺失突变体表现为胚胎致死,该致死表型也限制了对 *AtCDC5* 功能的研究^[2]。

MYB 蛋白家族是生物体中最大的一类转录因子亚家族,它们在植物发育进程和防御反应中发挥着重要功能。科学家已经从拟南芥全基因组序列中鉴定出 MYB 超家族的 198 个基因,其中包括 126 个 *R2R3-MYB*, 5 个 *R1R2R3-MYB*, 64 个 MYB 相关基因和 3 个非典型 MYB 基因^[3]。*AtCDC5* 属于 MYB 相关蛋白质,该蛋白质拥有一个特殊的 DNA 绑定结构域 (CTCAGCG), C 末端在酵母中具有转录激活活性。*AtCDC5* 基因主要在根尖和芽尖分生区等细胞分裂活跃区域中表达^[4]。Lin 等^[5] 观察 GFP-*AtCDC5* 融合蛋白在拟南芥根尖分生区细胞中的定位,发现 *AtCDC5* 主要定位在根尖分生区细胞的细胞核上,这与 *AtCDC5* 调控细胞周期的功能相对应。*AtCDC5* 的突变导致细胞分裂无法正常进行,在宏观上的体现就是植物发育受到抑制。

植物抵抗病原体入侵的固有免疫在多细胞组织中是一个进化上相对保守的进程, Monaghan 等^[6] 利用自身免疫缺陷突变体 *snc1* 筛选到一个分离蛋白复合物,其至少含有 3 种成员: MOS4 (Modifier of *snc1* 4), *AtCDC5*, PRL1 (Pleiotropic regulatory locus 1), 它们对植物固有免疫至关重要。此后, Palma 等纯化出拟南芥 MOS4 相关复合物 (MOS4-associated complex, MAC), 它是一个与剪切体相关且高度保守的核蛋白复合物,并通过质谱分析鉴定出它的潜在组分,最后发现 MAC 复合物中至少存在 5 种植物防御反应所必需的核心组分,包括 MAC3A 和 MAC3B^[7]。鉴于 *AtCDC5* 在植物发育和防御反应中的重要作用,我们制备 *AtCDC5* 多克隆抗体,为进一步研究 *AtCDC5* 功能以及其他与 *AtCDC5* 相互作用的蛋白功能提供支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植株、细菌和载体 野生型拟南芥 (Col-0 生

态型)、*AtCDC5* T-DNA 插入缺失突变体 GK_278B09、*AtCDC5-GFP* 瞬时表达载体由本实验室保存,大肠杆菌 TOP10 和 BL21 (DE3) 菌株由本实验室保存, pTF486 载体和原核表达载体 pET-28a 由本实验室保存。

1.1.2 主要工具酶与试剂 T4 DNA 连接酶、*Nco* I 和 *Xho* I 限制性内切酶以及 *Taq* DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根生化科技有限公司, His 标签蛋白纯化柱填料 Ni Sepharose 6 Fast Flow 和 0.2 μ m 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜购自 GE Healthcare Life Science, 蛋白免疫印迹化学发光试剂盒购自 Bio-Rad; 弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自 Sigma 公司, HRP 标记的羊抗鼠抗体 IgG 购自 Bio-Rad 公司; 6xHis 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 拟南芥主根长度的测量 将 Col-0、GK_278B09 种子表面消毒后种植在含 0.5% Sigma Agar 的 1/2 MS 固体培养基中。在温度为 20 $^{\circ}$ C, 光照度为 100 μ mol/($m^2 \cdot s$), 24 h 光照条件下竖直生长 8 d。每天定时使用 Canon G12 数码相机对植物主根进行拍照,并利用 ImageJ 软件测量 Col 和 GK_278B09 的主根长度。

1.2.2 细胞周期蛋白 *AtCDC5* 的亚细胞定位 将 *AtCDC5-GFP* 瞬时表达载体利用聚乙二醇 (Polyethylene glycol, PEG) 诱导法转化拟南芥 Col-0 叶片叶肉细胞原生质体^[8]。原生质体先在黑暗条件过夜培养,然后在激光 488 nm 下用转盘式激光共聚焦显微镜观察 GFP 荧光信号位置。将 *AtCDC5-GFP* 和 NLS *M-Cherry* 共同转化野生型拟南芥叶肉细胞原生质体,转化后,在 488 nm 和 561 nm 下观察 *AtCDC5-GFP* 和 *M-Cherry* 荧光信号位置。

1.2.3 原核表达载体的构建 *AtCDC5* 蛋白的 N 端是 DNA 结合结构域,该区域是 *AtCDC5* 成为转录因子的结构基础。我们选择 *AtCDC5* N 端 144 个氨基酸作为表达对象即抗原,然后将 *AtCDC5*¹⁻⁴³² 连接进入表达载体 pET28a 的多克隆位点。根据 TAIR (The arabidopsis information resource) 数据库发布的拟南芥 *AtCDC5* 基因序列 (AT1G09770) 以及 pET-28a 多克隆位点,设计特异性上游引物 P1 (5'-CATCCATGGGCATGAGGATTATGATTAAGGGAGG-3') 和下游引物 P2 (5'-CATCTCGAGGTCCATGTC-

TACCGGATCAGGAC-3'),下划线部分分别为 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切位点。以本实验室保存的 Col-0 cDNA 为模板,利用 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增 *AtCDC5¹⁻⁴³²* 片段。PCR 产物 *AtCDC5¹⁻⁴³²* 和 pET-28a 载体经 *Nco* I 和 *Xho* I 限制性内切酶 37 °C 酶切 30 min 后进行电泳,将目的条带切割后经琼脂糖凝胶回收试剂盒回收。回收后的 *AtCDC5¹⁻⁴³²* 和 pET-28a 载体经 T4 DNA 连接酶于 22 °C 下连接 1 h,连接产物经热激法转化大肠杆菌克隆菌株 TOP10。经卡那霉素筛选阳性克隆,并提取质粒进行酶切验证。将阳性克隆送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序,获得序列正确的原核表达重组质粒 pET28a-*AtCDC5¹⁻⁴³²*。

1.2.4 重组蛋白 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 的诱导表达 将序列正确的原核表达重组质粒 pET28a-*AtCDC5¹⁻⁴³²* 转化大肠杆菌表达菌株 BL21(DE3),挑取经卡那霉素筛选的阳性单克隆,接种到含有 50 μg/ml 卡那霉素 LB 液体培养基中,经 200 r/min、37 °C 培养至菌液 OD₆₀₀ 达到 0.8 左右时,加入终浓度 0.5 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)于 20 °C 诱导表达 20 h。分别取 1 ml 诱导前菌液和诱导后菌液,利用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳检测 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 的表达。

利用上述体系扩大培养 600 ml 菌液,然后 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,菌体沉淀用 Lysis buffer(300 mmol/L NaCl、50 mmol/L NaH₂PO₄·7H₂O、pH 8.5)重悬。将重悬的菌液置于冰中,经超声波细胞破碎仪裂解后,4 °C、10 000 g 离心 30 min,上清液转移至新的离心管中,沉淀用 Lysis buffer 重悬。取诱导前菌液、诱导后菌液、破菌后上清液,破菌后沉淀各 10 μl, SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 的表达,并利用 His_{x6} 标签抗体进行蛋白质免疫印迹检测(Western blot, WB)鉴定所诱导蛋白是否为 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄。将上清液与 1 ml Ni Sepharose 6 Fast Flow 填料孵育 30 min 后,转入 Bio-Rad 简易重力柱装置中。待上清液全部过柱后,利用 0 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L、200 mmol/L、400 mmol/L 咪唑洗脱液各 1 ml 依次进行洗脱,洗脱下来的液体收集在 1.5 ml 离心管中。10% SDS-PAGE 电泳确定重组蛋白浓度较高的咪唑洗脱液。

1.2.5 重组蛋白 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 的纯化 大肠杆菌菌液经诱导后产生一些除重组蛋白 His_{x6}-AtC-

DC5₁₋₁₄₄ 以外的杂蛋白,因此我们对诱导产生的总蛋白进行纯化。取重组蛋白含量较高的咪唑洗脱液 0.4 ml 和 0.1 ml SDS Loading Buffer 充分混合后进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后用 250 mmol/L KCl 进行染胶 5~10 min,此时目的条带呈现乳白色,用干净刀片对目的条带进行切割,置于已灭菌的研钵中进行研磨,研磨过程中分次加入总体积为 1 ml 的缓冲液(50.00 mmol/L Tris-HCl、0.10 mmol/L EDTA、0.15 mmol/L NaCl、1.00 mmol/L DTT、1% SDS),最后再用 1 ml 缓冲液将研磨物全部转移至 2 ml 离心管中,密封管口后置于水平摇床中 4 °C 过夜,次日将过夜摇晃的研磨液 14 000 r/min,离心 10 min,转移上清液至新离心管中即完成重组蛋白的纯化。利用 SDS-PAGE 及 BSA 浓度梯度确定纯化后 His_{x6}-AtCDC5 的纯度和浓度。

1.2.6 AtCDC5₁₋₁₄₄ 多克隆抗体的制备与检测 用纯化后的 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 蛋白免疫 3 只成年家兔。首次免疫所用蛋白质按每只 200 μg 计算,首次免疫需要加入等体积弗氏完全佐剂充分混匀后进行背部多点皮下注射^[9],此后每 14 d 进行 1 次加强免疫,加强免疫按每只 100 μg 计算,需加入等体积的弗氏不完全佐剂,3 次加强免疫之后,抽取心脏血液置于 37 °C 凝集 1 h,4 °C 过夜后收集分离血清到新 50 ml 离心管中,利用蛋白质免疫印迹检测抗血清能否识别 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄。

将纯化后的 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 抗原进行梯度稀释,分别取 100 ng、10 ng 和 1 ng 进行 10% SDS-PAGE 电泳。蛋白质样品经半干法转移到 PVDF 膜上(0.2 μm)。PVDF 膜经封闭液(5% 脱脂牛奶/TBST)室温封闭 1 h 后,加入经 TBST 稀释的抗血清(1:5 000,体积比)室温孵育 1 h,用 TBST(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5、150 mmol/L NaCl、0.1% Tween 20)洗涤 3 次。HRP 标记的山羊抗鼠 IgG(1:10 000 稀释)室温孵育 1 h 后再经 TBST 洗涤 3 次;最后经 ECL 显色处理^[10]。

1.2.7 AtCDC5₁₋₁₄₄ 多克隆抗体的纯化 取约 0.4 ml 纯化后的 AtCDC5₁₋₁₄₄ 与 0.1 ml SDS Loading buffer 充分混合后进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束以后用半干转膜仪将蛋白质样品转到 0.2 μm PVDF 膜上,室温条件下,用含 0.05 g/ml 脱脂奶粉的 TBST(20 mmol/L Tris pH 7.4、500 mmol/L NaCl、0.05% Tween 20)将抗原结合区域封闭 1 h,之后将膜切成

约 2 mm^2 小方块,装入含有 *AtCDC5*₁₋₁₄₄ 抗血清的离心管中,4℃孵育过夜,次日 TBS 洗膜 3 次,每次 5 min, PBS (20 mmol/L Na_3PO_4 , pH 7.2, 150 mmol/L NaCl) 洗膜 3 次,每次 5 min,加入 500 μl Glycine (100 mmol/L Glycine, pH 2.5),室温孵育 10 min,吸取洗脱液 Glycine 于新的 1.5 ml 离心管中,加入 5 μl 的 1 mol/L Tris-HCl (pH 8.0),弹甩混匀,测浓度分装后于 -80°C 储存备用。

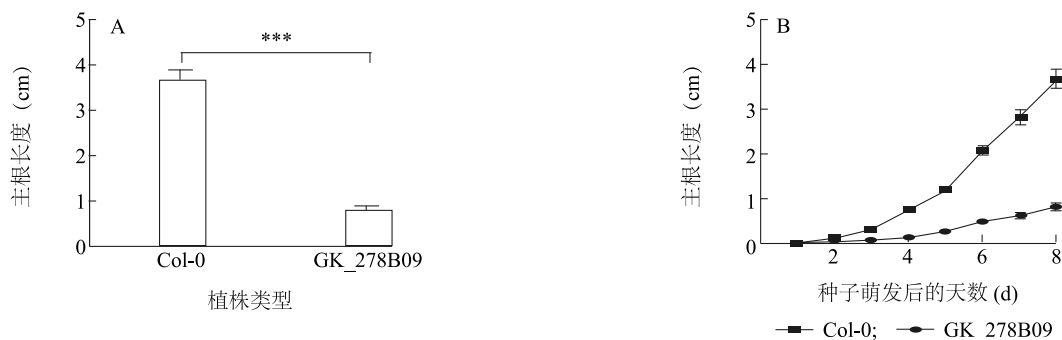
1.2.8 纯化后 *AtCDC5*₁₋₁₄₄ 多克隆抗体在 *AtCDC5* 原生质体过表达体系中的检测 将 *AtCDC5-GFP* 瞬时表达载体转入野生型叶肉细胞原生质体中进行瞬时表达,黑暗摇床培养 10 h 后收集细胞,加入 40 μl 蛋白质提取液 (0.125 mol/L Tris, 20% Glycerol, 4% SDS, pH 6.8) 以及 1% (体积比) 的 β -巯基乙醇 (β -Mercaptoethanol, β -ME),收集后立即将样品置于液

氮中速冻,速冻后取出放入 95°C 中水浴 6 min。利用纯化的抗体进行蛋白质免疫印迹检测。

2 结果与分析

2.1 *AtCDC5* T-DNA 插入缺失突变体 GK_278B09 的表型分析

将 *AtCDC5* T-DNA 插入缺失突变体 GK_278B09 中, T-DNA 插入位置为 *AtCDC5* 的第 4 个外显子。在 1/2 MS 竖直板上生长 8 d 后,观察到 GK_278B09 的主根长度与 Col-0 相比明显变短,种子萌发 8 d 后 GK_278B09 的主根长度仅为 Col-0 的四分之一 (图 1A)。通过测定主根生长速率 ($R_{\text{Col-0}} = 0.5$, $R_{\text{GK_278B09}} = 0.1$),发现 GK_278B09 的主根生长速率显著低于野生型 (图 1B)。



A: 种子萌发 8 d 后植物主根长度,利用 Student's *t*-test 进行显著性分析 ($n = 60$, *** $P < 0.001$); B: Col-0 和 GK_278B09 突变体在萌发后根长度随时间的变化曲线。

图 1 GK_278B09 主根的生长

Fig.1 Main root growth of GK_278B09

2.2 细胞周期蛋白 *AtCDC5* 的亚细胞定位

植物中大部分蛋白质在核糖体中合成后经修饰转运到特定区域后才能发挥正常的生理功能。将 *AtCDC5-GFP* 融合蛋白表达载体转化拟南芥叶片叶肉细胞原生质体后,我们发现 *AtCDC5-GFP* 呈现出明显类似细胞核的分布,这与 *AtCDC5* 蛋白亚细胞定位预测结果相一致 (图 2A)。为了进一步确定 *AtCDC5* 的定位,我们将 *AtCDC5-GFP* 和 NLS *M-Cherry* 共同转化野生型拟南芥叶片叶肉细胞原生质体,结果显示, *AtCDC5-GFP* 的绿色荧光信号与细胞核定位的 *M-Cherry* 红色荧光信号位置发生重叠,因此进一步确定 *AtCDC5* 在细胞核中的定位 (图 2B)。

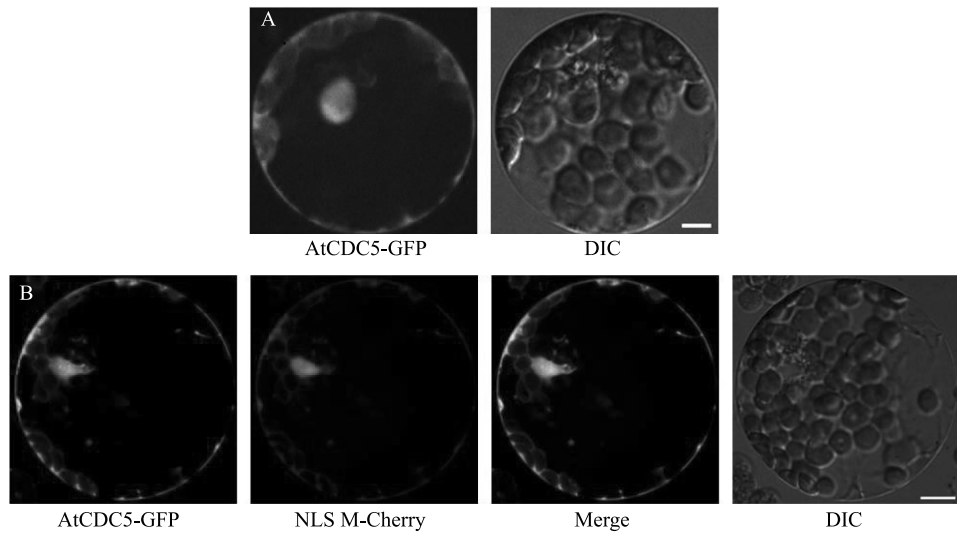
2.3 重组质粒 pET28a-*AtCDC5*¹⁻⁴³² 的构建与鉴定

以实验室保存的 Col-0 cDNA 为模板,进行 PCR

扩增。扩增条带经 *Nco* I 和 *Xho* I 酶切后构建至 pET-28a 的多克隆位点。阳性质粒经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切验证获得 4 500 bp 的质粒骨架和 500 bp 的插入片段 (图 3)。测序结果表明,酶切验证后的该阳性质粒中 *AtCDC5*¹⁻⁴³² 序列完全正确。

2.4 重组蛋白 His₆-*AtCDC5*₁₋₁₄₄ 的诱导表达与纯化

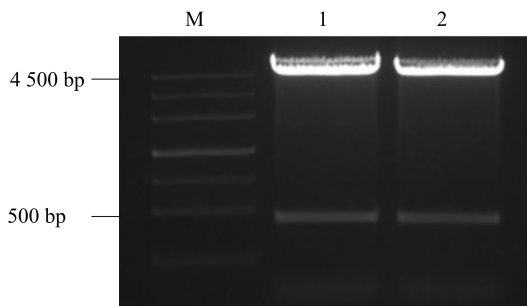
将 pET28a-*AtCDC5*¹⁻⁴³² 转入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3) 中,利用 0.5 mmol/L 的 IPTG 于 20°C 诱导表达 20 h。取诱导前后大肠杆菌进行 SDS-PAGE 电泳检测。对比诱导前和诱导后菌液 (泳道 1 和泳道 2),在诱导后泳道出现 1 条分子量介于 20 000 和 15 000 之间的诱导型蛋白质条带 (图 4)。为了进一步验证该诱导型蛋白质条带为 His₆-*AtCDC5*₁₋₁₄₄,采用 His₆ 标签抗体进行蛋白质免疫印迹检



A: 左图为 AtCDC5-GFP 的亚细胞定位, 右图为明场下观察到的原生质体细胞; B: 从左至右依次为 AtCDC5-GFP、NLS M-Cherry 的亚细胞定位以及两者亚细胞定位的重叠和明场下的原生质体细胞。

图 2 AtCDC5 的亚细胞定位

Fig.2 The subcellular localization of AtCDC5



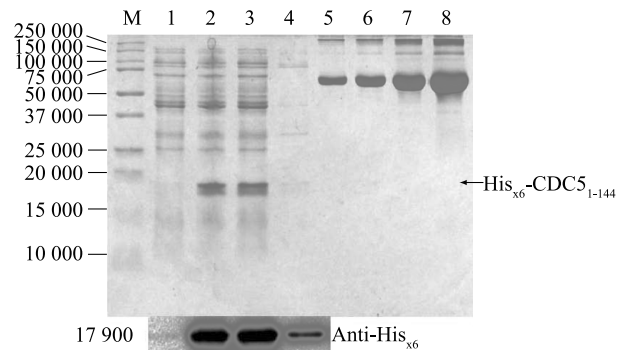
M: DNA marker; 1~2: pET28a-AtCDC5¹⁻¹⁴⁴ 质粒的 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切结果。

图 3 重组质粒酶切鉴定

Fig.3 Recombinant plasmid identified by enzyme digestion

测验证, 验证结果表明该诱导性蛋白质含有 His_{x6} 标签(图 4)。泳道 3 是诱导后菌液经离心的上清液部分, 泳道 4 为诱导后菌液经离心的沉淀部分, 根据泳道 3、泳道 4 中蛋白质含量可以看出, 诱导后 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 蛋白主要存在于菌液上清液中, 说明该蛋白质为可溶性。

鉴于 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 属于可溶性表达, 在表达的过程中引入杂质蛋白质, 因此我们采用割胶和电泳洗脱的方法对诱导表达蛋白质进行纯化, 并采用牛血清白蛋白质量浓度梯度 (0.125 mg/ml、0.250 mg/ml、0.500 mg/ml、1.000 mg/ml) 对纯化产物进行相对定量, 经计算, 纯化后 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组



M: 蛋白分子量标准; 1: 诱导前菌液; 2: 诱导后菌液; 3: 超声破碎后的上清; 4: 超声破碎后的沉淀; 5~8: 分别为 0.125 mg/ml、0.250 mg/ml、0.500 mg/ml、1.00 mg/ml 牛血清白蛋白。

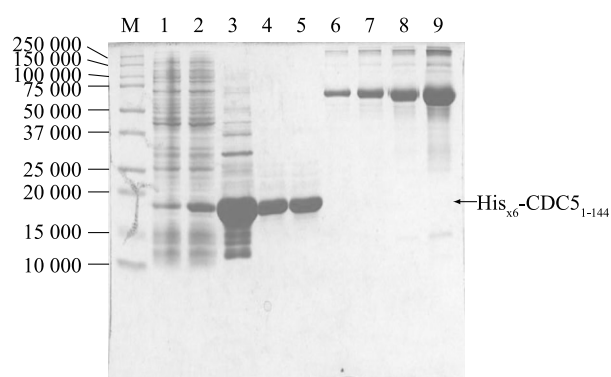
图 4 pET28a-AtCDC5₁₋₁₄₄ 的原核表达及鉴定

Fig.4 The prokaryotic expression and identification of pET28a-AtCDC5₁₋₁₄₄

蛋白的质量浓度约为 0.9 mg/ml(图 5)。

2.5 AtCDC5₁₋₁₄₄ 多克隆抗体的制备与检测

利用纯化得到的 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组蛋白进行家兔免疫, 收集免疫后血清进行蛋白质免疫印迹检测。泳道 1 为诱导前菌液, 作为 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组蛋白的负对照。与负对照相比, 经过 1:1000 比例稀释的 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 抗血清能够检测出低至 10 ng 的 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组蛋白(图 6)。该结

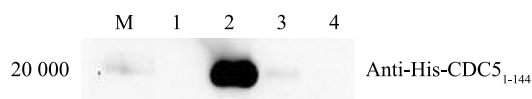


M: 蛋白分子量标准; 1: 诱导 1 h 后菌液; 2: 诱导 20 h 后菌液; 3: 200 mmol/L 咪唑洗脱液中的蛋白质; 4~5: 200 mmol/L 咪唑洗脱液纯化; 6~9: 分别为 0.125 mg/ml、0.250 mg/ml、0.500 mg/ml、1.000 mg/ml 牛血清白蛋白。

图 5 重组蛋白质的纯化与定量

Fig.5 Purification and quantification of the recombinant protein

果表明, 抗血清能成功检测 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组蛋白的信号。



M: 蛋白分子量标准; 1: 诱导前菌液; 2~4: 100 ng、10 ng、1 ng His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组蛋白。

图 6 AtCDC5₁₋₁₄₄ 多克隆抗体对 His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组蛋白的 Western Blot 检测

Fig.6 Western blot detection of His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ by AtCDC5₁₋₁₄₄ polyclonal antibodies

2.6 纯化后 AtCDC5₁₋₁₄₄ 多克隆抗体在 *AtCDC5* 原生质体过表达体系中的检测

为了去除免疫家兔产生的诸多非特异性抗体, 我们将抗血清进行纯化。并且, 我们构建了拟南芥原生质体体系来检测纯化后抗体的有效性。图 7 中泳道 1 和泳道 2 分别为未转质粒的原生质体和转入 pTF486-GFP 的原生质体, 共同作为转入 *AtCDC5*-GFP 原生质体的负对照。与负对照相比, 在转入 *AtCDC5*-GFP 的原生质体中检测到 1 条分子量约为 120 000 的条带, 该条带大小与 AtCDC5 (95 700) + GFP (21 000) 大小相近, 而负对照中并未出现此条带。因此在我们构建的原生质体体系中, 对抗体进行 1:1 000 的比例稀释后能够有效检测到 AtCDC5-GFP 的信号。



1: 空原生质体; 2: 转入 pTF486-GFP 的原生质体; 3: 转入 *AtCDC5*-GFP 的原生质体。

图 7 AtCDC5₁₋₁₄₄ 多克隆抗体对原生质体体系中 AtCDC5₁₋₁₄₄ 蛋白的 Western Blot 检测

Fig.7 Western blot detection of AtCDC5₁₋₁₄₄ in the protoplast system by AtCDC5₁₋₁₄₄ polyclonal antibodies

3 讨论

作为细胞周期调控子, MYB 相关蛋白 AtCDC5 对酵母和动物细胞周期中 G2 期的重要作用已经被报道, 但是它在植物中的功能却鲜为人知。有研究结果表明, AtCDC5 在植物固有免疫中发挥着重要的功能, 并且对细胞周期调控起着重要的作用。本研究通过观察统计 *AtCDC5* T-DNA 插入缺失突变体的表型, 对 *AtCDC5* 的功能作进一步的研究。结果显示, *AtCDC5* 突变在宏观上主要表现为植物主根发育受到抑制。在光下垂直生长 8 d, 这种差异已十分显著, 此时 GK_278B09 主根长度约为 Col-0 的四分之一, 因此 *AtCDC5* 在拟南芥主根伸长上起着十分重要的作用, *AtCDC5* 突变直接导致植物主根的生长减慢甚至停滞。细胞周期主要在细胞核中进行, 所以可以推测 AtCDC5 主要在细胞核中发挥作用, 而我们的亚细胞定位试验也证实了这一假设。另外, 在图 2 中可以观察到 AtCDC5 在细胞核之外的区域也有分布。通过查阅相关资料得知, 这些区域为叶绿体、剪接复合体。

含 pET28a-AtCDC5¹⁻⁴³² 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导 20 h 后, 产生一些 AtCDC5₁₋₁₄₄ 之外的杂蛋白质, 因此我们对诱导总蛋白质进行纯化。纯化的过程即将诱导总蛋白质转移到 10% PAGE 胶上, 选择 pET28a-AtCDC5₁₋₁₄₄ 条带进行切割, 通过缓冲液将其从 PAGE 胶中提取出来。纯化过程中由于割胶精准度、缓冲液提取效率等问题, His_{x6}-AtCDC5₁₋₁₄₄ 重组蛋白的量会有损失, 但是经纯化后的重组蛋白纯度有了很大的提升, 抗原的单一性大幅提高。

作为一种细胞周期基因, *AtCDC5* 表达受到植物生长时期的严格控制, 这就决定了 *AtCDC5* 只在特定组织即分裂旺盛的组织中表达。植物分裂旺盛的

组织包括根尖分生区和芽尖分生区,而这 2 个组织的含量相对于植物体来说小之又小,这就造成了获取该部分组织的难度。因此我们采用在拟南芥原生质体体系中过表达 *AtCDC5* 以积累过量 *AtCDC5* 来检测抗体的有效性。而在 *AtCDC5* 过表达原生质体体系下, Anti-*AtCDC5*₁₋₁₄₄ 抗体能够有效检测到 *AtCDC5*-GFP 的存在。

本研究比较了拟南芥野生型 Col-0 和 *AtCDC5* 突变体 GK_278B09 的生长发育状态,同时获得了较高特异性 *AtCDC5* N 端的原核表达蛋白质和抗体,为后续开展 *AtCDC5* 参与拟南芥细胞分裂的机理研究提供了基础。

参考文献:

- [1] 邹向阳,李连宏.细胞周期调控与肿瘤[J].国际遗传学杂志, 2006(29):70-73.
- [2] LIN Z Q, YIN K Q, ZHU D L, et al. *AtCDC5* regulates the G2 to M transition of the cell cycle and is critical for the function of Arabidopsis shoot apical meristem[J]. Cell Research, 2007, 17(9): 815-828.
- [3] CHEN Y H, YANG X Y, HE K, et al. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60:107-124.
- [4] HIRAYAMA T, SHINOZAKI K. A *cde5+* homolog of a higher plant, *Arabidopsis thaliana* [J]. PNAS, 1996, 93(23):13371-13376.
- [5] LIN Z Q, YIN K Q, WANG X X, et al. Virus induced gene silencing of *AtCDC5* results in accelerated cell death in Arabidopsis leaves[J]. Plant Physiol Biochem, 2007, 45(1):87-94.
- [6] MONAGHAN J, XU F, XU S H, et al. Two putative RNA-binding proteins function with unequal genetic redundancy in the MOS4-associated complex[J]. Plant Physiol, 2010, 154(4):1783-1793.
- [7] PALMA K, ZHAO Q G, CHENG Y T, et al. Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms[J]. Genes Dev, 2007, 21(12): 1484-1493.
- [8] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis [J]. Nat Protoc, 2007, 2(7):1565-1572.
- [9] 余璐璐,龚绒雪,吕林涛,等. 拟南芥氰丙氨酸合酶 *CYS-CI* 基因扩增及多克隆抗体制备[J].江苏农业学报,2017, 33(6): 1235-1241.
- [10] 杨雄,刘秀侠,南昊,等. HIV-1 可溶性单链抗体 b12-scFv 的表达与活性分析[J].西北农林科技大学学报, 2014, 42(5):205-210.

(责任编辑:陈海霞)