

合成多肽制备的抗体用于蛋白质 免疫组织细胞化学定位研究*

邢立静¹⁾ 种 康^{1)**} 许智宏¹⁾ 王 锐²⁾ 谭克辉¹⁾

(¹⁾中国科学院植物研究所, 中国科学院光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093;

(²⁾兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘要 对本实验室克隆的小麦春化相关基因 VER2 编码蛋白的氨基酸序列进行软件分析, 确定了具有免疫原性的一段(204~215 位)含 12 个氨基酸的短肽, 用化学法合成了该短肽并将其与牛血清白蛋白(BSA)相偶联, 用偶联物作为抗原免疫家兔获得该 12 肽的抗体. 分别用 VER2 全蛋白抗体和该 12 肽抗体对 VER2 蛋白进行免疫细胞定位比较分析, 两者所得结果一致, 即二者在免疫组化检测蛋白质时的灵敏性和特异性方面具有一致的特性. 结果表明, 化学法合成短肽制备的抗体可用于蛋白质的免疫组织细胞化学分析, 该方法快捷灵敏, 且具有较高的特异性.

关键词 化学合成短肽, VER2 蛋白, 抗体纯化, 免疫组织细胞化学

学科分类号 Q2

植物体在响应外界环境以及自身生理过程的变化时, 除存在基因的转录水平调控外, 转录后以及翻译后水平的调控也起着重要的作用. 其中包括蛋白质在细胞内定位的变化以及蛋白质的基团修饰等. 许多调节因子正是通过在细胞内分布位置的改变而对环境因子做出应答, 或者在某一信号转导途径中发挥调控作用^[1]. 因此建立快速、灵敏的检测植物细胞中内源蛋白的细胞、亚细胞定位方法在理论上具有十分重要的意义.

本实验建立了将化学法合成短肽制备抗体与植物组织切片技术相结合的蛋白质免疫组织细胞化学定位方法, 并以冬小麦中的一个春化响应蛋白 VER2 为例, 研究了春化和脱春化处理的小麦胚芽中 VER2 的细胞定位, 并验证了所得结果与 VER2 全蛋白的抗体所得的免疫组化实验结果一致, 证明合成多肽制备的抗体可用于蛋白质的组织细胞化学定位研究, 该方法具有简便快捷和灵敏可靠的特点.

1 材料和方法

1.1 植物材料

京冬小麦种子消毒后, 分别进行春化和脱春化处理. 取材部位为包含生长点的胚芽部分.

1.2 制片

材料的固定以及制片参考余炳生^[2]和 Shiba 等^[3]的方法. 固定液为 4% 多聚甲醛和 2% 戊二醛(二甲砷酸钠缓冲液配制), 材料于 4℃ 固定 4 h, 之后经缓冲液清洗, 系列乙醇逐级脱水, 再经二甲

苯透明、浸蜡, 之后即可包埋. 包埋块经修块、粘台后用切片机(Leica)切取切片.

1.3 VER2 蛋白 12 肽的合成及纯化

根据 VER2 基因编码的氨基酸序列, 利用 DNASTar 软件分析获得表面抗原性最强的氨基酸序列信息, 选择其中第 204 位至第 215 位的 12 个氨基酸残基, 即 204-KRRTDSRGGGN-215, 用固相法化学合成, 纯化后冻干即得 VER2 蛋白(204~215) 12 肽.

1.4 VER2 蛋白 12 肽与 BSA 复合物的制备

参考李晓鹏等^[4]的方法, 将 2 mg VER2 蛋白 12 肽和 7.2 mg 牛血清白蛋白(BSA)溶于 1.6 ml PBS(0.1 mol/L NaH₂PO₄, 0.1 mol/L Na₂HPO₄, pH 7.2)中, 冰浴条件(0~4℃)缓慢地将 400 μl 0.2% 戊二醛的 PBS 与之混合. 室温下搅拌反应 1 h, 然后加入 500 μl 含 1 mol/L 甘氨酸的 PBS, 室温下继续搅拌反应 1 h 进行封闭, 对 PBS 充分透析后浓缩, 于 -20℃ 冰箱中保存备用.

1.5 多肽与 BSA 复合物抗体的制备

取蛋白质-肽偶联产物(约 2 mg), 与等体积完全福氏佐剂混合后充分乳化, 多点皮下注射家兔. 4 次免疫后的第 7 天耳静脉采血, 测定其效价达到要求后, 颈动脉放血, 分离血清.

* 国家自然科学基金资助项目(30170094)和中国科学院知识创新重大项目资助(KSCX2-SW-305).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62591431-6517, E-mail: chongk@ns.ibcas.ac.cn

收稿日期: 2003-06-30, 接受日期: 2003-08-28

1.6 BSA 与 Sepharose 4B 偶联

将牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 H_2O 中, 预冷至 $4^\circ C$, 用 pH 9.5 的 0.1 mol/L $NaHCO_3$ - Na_2CO_3 缓冲溶液透析平衡. 将溴化氰活化的 Sepharose 4B (Amersham-Pharmacia 公司) 加入 BSA 溶液中, $4^\circ C$ 下缓慢搅拌 6~10 h, 之后 $4^\circ C$ 过夜. 将过夜后的偶联物离心, 除去未偶联上的蛋白质, 用 2~3 倍体积的生理盐水洗涤凝胶. 将偶联有 BSA 的 Sepharose 4B 装柱, 分别用生理盐水及 0.1 mol/L pH 2.4 的 Gly-HCl 缓冲液充分洗涤, 至流出液的 A_{280} 小于 0.02, 再用 2~3 倍柱床体积的 7 mol/L 尿素溶液洗涤, 用蒸馏水冲洗至流出液无尿素为止, 最后用生理盐水平衡备用.

1.7 抗多肽抗体的纯化

将免疫家兔后所得的抗 12 肽抗血清经 Sepharose-BSA 柱进行亲和层析纯化, 除掉抗体中可以和 BSA 发生免疫交叉反应的抗体部分, 收集多肽特异性的抗体部分, 小管分装后, 于 $-70^\circ C$ 冰箱中保存备用.

1.8 蛋白质的免疫学定位

切片用 1% BSA (0.1 mol/L PBS pH 7.4) 于 $37^\circ C$ 封闭 0.5 h, 用 PBST (内含 0.05% Tween 20 的 PBS) 淋洗 5 min, 之后用一抗于 $37^\circ C$ 孵育 1 h, 用 PBST 清洗, 再用碱性磷酸酶标记的二抗于 $37^\circ C$ 孵育 1 h, PBST 清洗, 即可对切片用 NBT/BCIP 进行显色, 实验过程中用免疫之前的兔血清代替一抗作为阴性对照.

1.9 蛋白质电泳及蛋白质印迹分析

蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 参考 Laemmli^[5] 的方法. 电泳完成后将蛋白质条带电转移至硝酸纤维素膜, 用丽春红 S 检测电转移的效果, 之后用含 5% BSA 的 TBS (pH 7.4) 将滤膜于室温摇动温育 1 h 进行封闭, 封闭后的滤膜在室温下用一抗平缓摇动温育 2 h, 用 TBS 漂洗滤膜 3 次, 每次 10 min, 接着用碱性磷酸酶标记的二抗将滤膜在室温下温育 1 h, 再用 TBS 漂洗滤膜 3 次, 每次 10 min, 即可用 NBT/BCIP 对滤膜进行显色以检测特异条带.

2 结 果

2.1 多肽与 BSA 偶联复合物的电泳分析

将 12 肽与 BSA 的偶联复合物进行 SDS-PAGE 电泳, 以检测二者的偶联效果, 电泳结果显示偶联复合物的泳动距离明显滞后于 BSA 本身 (图 1),

即偶联物分子质量大于 BSA, 表明偶联成功, 复合物可用于免疫家兔, 制备抗体.

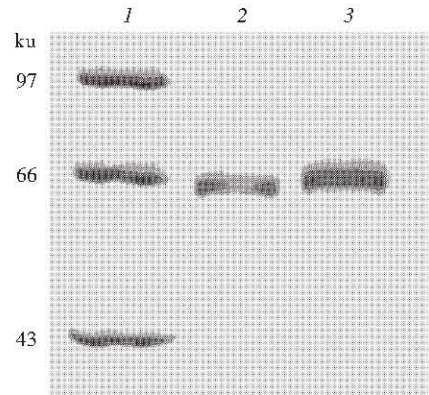


Fig. 1 Conjugation of BSA and peptide

1: low molecular mass marker; 2: BSA; 3: BSA-peptide.

2.2 抗体纯化前后特异性分析

用 VER2 蛋白 12 肽与 BSA 复合物免疫家兔所获得的抗体进行蛋白质印迹检测. 结果表明抗体不经纯化时, 与 12 肽-BSA 复合物、BSA 以及纯化的 VER2-GST 融合蛋白均可发生免疫交叉反应 (图 2), 而抗体经 BSA-Sepharose 4B 纯化后则只与 12 肽-BSA 复合物及 VER2-GST 融合蛋白发生免疫交叉反应, 并不与 BSA 发生免疫交叉反应 (图 3). 这说明纯化后的抗体具有识别 12 肽或者 VER2 蛋白的特异性, 可用于免疫组织细胞化学实验.



Fig. 2 Western blot analysis using the antibody before being purified

1: BSA-peptide; 2: VER2-GST; 3: BSA.



Fig. 3 Western blot analysis using the purified antibody

1: BSA-peptide; 2: BSA; 3: VER2-GST.

2.3 VER2 的免疫细胞学定位

为了验证抗多肽抗体和抗全蛋白抗体在蛋白质免疫细胞学定位实验中的特异性,我们将两种抗原制备的抗体所得的免疫组化实验结果进行了比较,实验所用材料为春化以及脱春化处理的小麦胚芽材

料。结果使用两种方法制备的抗体都表明了一定时间的春化处理之后 VER2 蛋白在胚芽生长点和幼叶中的核定位特征,而材料经脱春化后,该蛋白质仅定位于细胞质中,核定位特征消失(图4)。

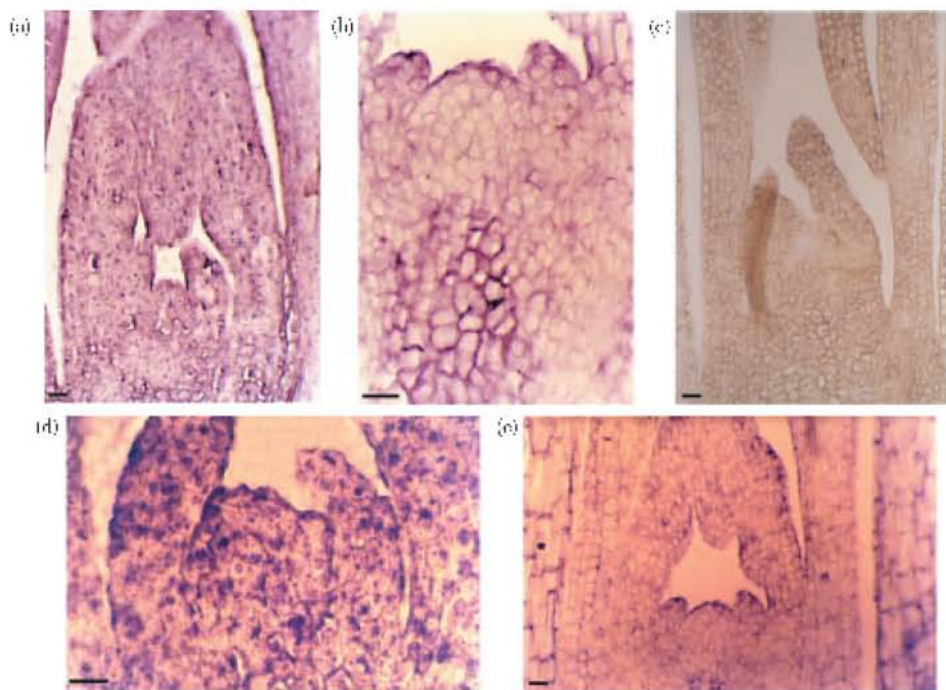


Fig. 4 Comparison of immunocytochemistry localization of VER2 using antibodies prepared from peptide and VER2 antibodies

(a), (d) Vernalization treatment. Showing the obvious nuclear localization of the VER2 protein in vernalized plumules using anti-peptide antibody (a) and VER2 antibody (d). (b), (e) Devernalization treatment. Showing the cytoplasm localization of the VER2 protein in plumules after devernalization treatment using anti-peptide antibody (b) and VER2 antibody (e). (c) Negative control, the primary antibody was replaced with preserum. bar: 30 μ m.

3 讨 论

随着后基因组时代的到来,功能基因组学成为生命科学的主要研究课题。蛋白质是生命现象的主要体现者,是基因功能的具体执行者,蛋白质在响应某些生理过程以及信号转导过程中,存在亚细胞定位的改变以及蛋白质-蛋白质之间相互作用关系的变化。

蛋白质抗体的制备是研究蛋白质定位以及蛋白质间相互作用的重要环节。利用原核表达纯化目的蛋白质作为抗原以免疫动物是获得蛋白质抗体的常用方法,然而蛋白质在大肠杆菌中的高水平表达,常常导致包涵体的形成,或者有些蛋白质的表达量极低,都给蛋白质的纯化带来困难。对于那些难于

纯化的蛋白质,用合成多肽的办法最终获得目的蛋白的抗体不失为一种快捷而行之有效的方法。

以短肽抗体进行蛋白质免疫组织细胞定位分析时,应注意几个问题:材料的固定、清洗和脱水均应在4℃进行,以保持蛋白质的抗原活性;在选择合成短肽时,长度以12~15个氨基酸为宜;避免出现4个以上连续相邻的疏水性氨基酸残基,以便肽链能溶于水溶剂而易于与载体蛋白偶联。

合成多肽制备的抗体在蛋白质的免疫印迹检测以及免疫荧光定位研究中均有应用^[6,7]。本实验建立了用合成肽制备抗体结合石蜡制片技术研究蛋白质免疫细胞学定位的方法,实验证明可以获得与全蛋白抗体完全一致的结果,为研究某些生理过程中蛋白质在组织细胞的定位提供了有利的工具。

致谢 中国科学院遗传与发育生物学研究所杨维才研究员在多肽序列设计时提供宝贵建议, 在此表示谢意.

参 考 文 献

- 1 Itoh H, Ueguchi-Tanaka M, Sato Y, *et al.* The gibberellin signaling pathway is regulated by the appearance and disappearance of SLENDER RICE1 in nuclei. *Plant Cell*, 2002, **14** (1): 57 ~ 70
- 2 余炳生. 生物学显微技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1989. 3 ~ 46
Yu B S. Microtechnology of Biology. Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1989. 3 ~ 46
- 3 Shiba H, Takayama S, Iwano M, *et al.* A pollen coat protein, SP11/SCR, determines the pollen S-specificity in the self-

incompatibility of *Brassica* species. *Plant Physiology*, 2001, **125** (4): 2095 ~ 2103

- 4 李晓鹏, 杜林方, 梁厚果, 等. PS II 反应中心 D1 蛋白的小肽抗体的制备和鉴定. 生物化学与生物物理进展, 1997, **24** (3): 283 ~ 288
Li X P, Du L F, Liang H G, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 1997, **24** (3): 283 ~ 288
- 5 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680 ~ 685
- 6 Swain S M, Tseng T, Thornton T M, *et al.* SPINDLY is a nuclear-localized repressor of gibberellin signal transduction expressed throughout the plant. *Plant Physiology*, 2002, **129** (2): 605 ~ 615
- 7 Barker L, K hn C, Waise A, *et al.* SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell*, 2000, **12** (7): 1153 ~ 1164

Protein Immunocytochemistry Localization by Using Antibody Prepared With Synthesized Polypeptide *

XING Li-Jing¹⁾, ZHONG Kang¹⁾ **, XU Zhi-Hong¹⁾, WANG Rui²⁾, TAN Ke-Hui¹⁾

(¹⁾ Research Center for Molecular and Developmental Biology, Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

(²⁾ College of Life Science, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

Abstract The deduced amino acid sequence of the VER2 gene was analyzed in a computer. A peptide corresponding to 204 ~ 215 amino acids in VER2 sequence was synthesized by chemical method and purified using HPLC. The polypeptide was conjugated with BSA and the covalent complex was used as antigen to immunize rabbits. The antibody was then affinity purified before being used to probe VER2 protein in Paraplast sections. The immunolocalization results detected by the peptide antibody were consistent with that of the full length VER2 protein antibody. It is concluded that antibody prepared with synthetic peptide is credible and sensitive enough for immune labeling of proteins in paraplast sections. It is a sensitive and effective approach to combine preparation of antibody from synthetic peptide with paraplast section production for protein immunocytochemistry study.

Key words synthetic peptide, VER2 protein, antibody purification, immunocytochemistry

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (30170094), and The Innovation Project of The Chinese Academy of Sciences (KSCX2-SW-305).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62591431-6517, E-mail: chongk@ns.ibcas.ac.cn

Received: June 30, 2003 Accepted: August 28, 2003