

密级：

论文编号：

中国农业科学院

硕士学位论文

交链孢菌激活蛋白抗体制备及免疫检测

**Antibody Preparation and Immunological Screening of
Activator Protein from *Alternaria* sp.**

研 究 生：董健伸

指 导 教 师：邱德文

申请学位类别：理学硕士

专 业：微生物学

研 究 方 向：药物工程

培 养 单 位：植物保护研究所

农科院研究生院

提交日期 2006 年 6 月

Secrecy:

No.

CHINESE ACADEMY OF AGRICULTURAL SCIENCES

Master Dissertation

Antibody Preparation and Immunological Screening of Activator Protein from *Alternaria* sp.

Candidate: Dong Jianshen

Advisor: Qiu Dwen

Major: Microbiology

Specialty: Biopesticide Engineering

Institute of Plant Protection
Chinese Academy of Agricultural Sciences

May 2006

基金来源声明

本学位论文是国家“863”计划（项目编号：2003AA241130）
和国家“973”计划（项目编号：2003CB114204）的部分内容。

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

论文作者签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

论文评阅人、答辩委员名单

论文题目	交链孢菌激活蛋白抗体制备及免疫检测				
论文作者	董健伸	指导教师	邱德文	培养单位	植物保护研究所

	姓名	职称职务	导师类别	单位	专业
评阅人	简恒	教授	博导	中国农业大学	生物防治
	裘季燕	研究员	硕导	北京市农林科学院植保环保所	植物病理学
答辩主席	成卓敏	研究员	博导	中国农业科学院植物保护研究所	生物技术
答辩委员	谭华荣	研究员	博导	中国科学院微生物研究所	微生物
	简恒	教授	博导	中国农业大学	植病生防
	杨怀文	研究员	博导	中国农业科学院植物保护研究所	害虫生防
	朱昌雄	研究员	博导	中国农业科学院农业环境与可持续发展研究所	微生物
答辩时间、地点		2006-6-16 中国农科院中日楼 301 室			
记 录		杨秀芬			

摘 要

从真菌中提取的植物激活蛋白是一类热稳定蛋白，具有诱导植物抗性和促进植物生长的作用。本研究进行了交链孢菌 (*Alternaria.sp.*) 激活蛋白 (简称 ActP) 的双向电泳鉴定、抗体制备，通过筛选 cDNA 表达文库，获得 ActP 蛋白基因，纯化了该基因的表达蛋白，为深入研究激活蛋白结构和作用机理奠定了基础。

首次进行了交链孢菌激活蛋白的双向分离。通过比较不同蛋白提取缓冲液，选用 2mM EDTA 溶液成功提取交链孢菌激活蛋白；对此蛋白进行等电聚焦和双向电泳，确定其 pI 为 4。

特异性 ActP35 抗体的制备。电泳分离获得分子量为 35kD 交链孢菌激活蛋白 (简称 ActP35)，以此为抗原免疫动物，制备兔多抗血清。本研究对斑点固相亲和纯化方法进行了改进，消除抗体和大肠杆菌之间的交叉反应，成功制备了大量高特异性 ActP35 抗体。

利用获得的抗体免疫筛选交链孢菌 cDNA 表达文库。用纯化的 ActP35 蛋白抗体，从交链孢菌 cDNA 表达文库中筛选获得 9 个阳性克隆，测序结果与激活蛋白 ActP35 质谱鉴定肽段序列比较，获得一个相似性较高的克隆。将此克隆所含基因 (简称 *actd-2*) 进行表达，利用螯合有镍离子的亲和层析柱成功分离、纯化表达蛋白。

首次利用抗体免疫杂交技术研究交链孢菌激活蛋白和植物蛋白的互作蛋白。用 Far Western、抗体亲和纯化的方法研究发现，证明 ActP35 蛋白的抗体能够特异性识别拟南芥中 1,5-二磷酸核酮糖羧化氧化酶，表明两蛋白可能有相同或相似的氨基酸序列。为激活蛋白作用机理研究提供证据。

关键词：激活蛋白，多克隆抗体，亲和纯化，免疫筛选，双向电泳，Far Western

Abstract

Plant activator protein from *Alternaria* sp., which is short for ActP, is a kind of thermostable protein, which can promote plant growth. In this study, we identified the activator protein from *Alternaria* sp., made antibodies against ActP, screened of the expression library of *Alternaria* sp. by immunological methods, obtained the gene of ActP and purified the expression protein.

The activator protein from *Alternaria* sp. was separated by 2D-PAGE. Using 2mM EDTA solution separated the ActP protein with different method of isoelectricfocusing (IEF) and two-dimensional gel electrophoresis. The protein was separated by 2D-PAGE, and confirms its pI as 4.

Specificity of the antibodies against the 35kD ActP35 protein was purified successfully. The antigen protein was the 35kD activator protein ActP, which is short for ActP35. The antiserum was obtained from the rabbit blood. But the antisera strongly cross react to *E.coli*, so it is unable to use for screening the expression library directly. In this study, the method of blot-affinity purification was improved and specific antibodies which didn't react to *E.coli* were obtained. It is a new way to obtain specific antibodies simply.

The expression library of *Alternaria* sp. was screened perfectly using the antibodies against Actp35. 9 positive clones were obtained and sequenced. Comparing with the amino acid coding of activator ActP35, and make sure that one of them is right clone, which is short for *actd-2*. The *actd-2* gene was expressed in *E.coli* and the fusion protein was purifird by metal-ion affinity chromatography.

The interact protein in the *Arabidopsis thalian* of ActP35 was detected by far Western、immunoaffinity chromatography. We find a kind of antibody which could specifically react with ActP35 and the Rubisco of *Arabidopsis thaliana*, the two proteins may have the same sequence. Maybe it is the evidence for the fact that the follow-up study plant activator protein and promotes the plant photosynthesis.

Keywords: Activator protein , Polyclonal antibodies, affinity chromatography, immunoscreening, two-dimensional electrophoresis, Far Western

目 录

英文缩略表	VI
第一章 引言	1
1.1 微生物蛋白农药研究进展	1
1.1.1 过敏蛋白 Harpin	1
1.1.2 隐地蛋白 Elicitins	3
1.1.3 植物激活蛋白	4
1.2 抗体亲和纯化技术	5
1.2.1 单克隆抗体和多克隆抗体的不同纯化策略	6
1.2.2 蛋白 A, G 和 L 作为亲和层析的配体	6
1.2.3 抗原作为亲和层析的配体	7
1.2.4 寡聚蛋白作为亲和层析的配体	8
1.2.5 分离抗体 Fab 片段	8
1.2.6 固定抗原	9
1.2.7 洗脱抗体和增加抗体产量的方法	10
1.3 研究的目的是和意义	11
第二章 交链孢菌激活蛋白的理化分析	12
2.1 材料和仪器	12
2.1.1 材料	12
2.1.2 试验仪器	12
2.1.3 试剂	12
2.2 实验方法	13
2.2.1 样品制备方法	13
2.2.2 激活蛋白 ActP 的双向电泳	13
2.3 结果与分析	15
2.3.1 不同提取方法比较	15
2.3.2 水平等电聚焦	16
2.3.3 双向电泳	16
2.4 讨论	18
第三章 交链孢菌激活蛋白多克隆抗体的制备及特异性纯化	20
3.1 材料和仪器	20
3.1.1 材料	20
3.1.2 仪器	20
3.1.3 试剂	20
3.2 实验方法	20
3.2.1 抗体制备	20
3.2.2 抗体的特异性纯化	22

3.2.3 抗体特异性检测.....	22
3.2.4 间接 ELISA 测定抗体	23
3.3 结果及分析	24
3.3.1 抗体制备结果.....	24
3.3.2 特异性纯化抗体.....	25
3.4 讨论.....	27
第四章 交链孢菌 cDNA 文库免疫筛选和目的基因蛋白的纯化	29
4.1 材料和仪器	29
4.1.1 材料	29
4.1.2 仪器	29
4.1.3 试剂	29
4.2 实验方法	30
4.2.1 <i>Alternaria</i> sp. 菌 cDNA 表达文库免疫筛选	30
4.2.2 表达蛋白的亲和层析纯化.....	31
4.3 结果与分析	32
4.3.1 免疫筛选 <i>Alternaria</i> sp. 菌 cDNA 表达文库	32
4.3.2 基因表达蛋白的纯化.....	33
4.4 讨论	34
第五章 利用抗体免疫杂交技术研究交链孢菌激活蛋白与植物蛋白的互 作	36
5.1 材料和仪器	36
5.1.1 材料	36
5.1.2 仪器	36
5.1.3 试剂	36
5.2 实验方法	36
5.2.1 拟南芥叶片蛋白提取.....	36
5.2.2 Far Western Blotting 检测	37
5.2.3 拟南芥结合抗体的分离.....	37
5.2.4 抗体鉴定	37
5.3 结果及分析	37
5.3.1 拟南芥叶片蛋白提取.....	37
5.3.2 Far Western Blotting 检测	38
5.3.3 质谱鉴定杂交条带.....	39
5.3.4 拟南芥蛋白纯化抗体的鉴定.....	40
5.4 讨论	41
第六章 结论	42
参考文献	43
附录	49

致谢	52
作者简介	53

英文缩略表

英文缩写	英文全称	中文名称
APS	Ammonium persulfate	过硫酸铵
bp	base pairs	碱基对
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
2DE	two-dimensional electrophoresis	二维凝胶电泳
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
cDNA	complementary DNA	互补 DNA
ddH ₂ O	double distilled water	重蒸水
goat anti-rabbit IgG AP	goat anti-rabbit immunoglobulin G alkaline phosphatase	碱性磷酸酶标的羊抗兔
IEF	isoelectric focusing	等电聚焦
Kb	kilobase	千碱基
kD	kilodalton	千道尔顿
NBT	nitroblue tetrazolium	氮蓝四唑
NCR	non-coding region	非编码区
NP-40	nonidet P-40	乙基苯基聚乙二醇
OD	absorbance	吸光值
PBS	phosphate sodium buffer	磷酸钠缓冲液
PNPP	Para-nitrophenyl phosphate	对硝基苯磷酸酯
PVP	polyvinyl pyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
TEMED	tetramethylethylenediamine	N, N, N, N'-四甲基乙二胺
Tris	hydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷

第一章 引言

1.1 微生物蛋白农药研究进展

微生物农药是指用细菌、真菌、病毒等微生物有机体及其代谢产物制成的防治作物病害、虫害、杂草的制剂，也包括保护生物活体的保护剂、辅助剂和增效剂，以及模拟某些杀虫毒素和抗生素的人工合成的制剂（喻子牛 et al., 2000）。生物农药多为直接作用于目标生物，起到杀虫防病效果。除此以外，人们还发现一些小分子物质，如：水杨酸、脱落酸等和一些来自细菌、真菌中的蛋白可以诱导植物产生抗病性，这为植物病害的防治提供了新的思路。

微生物蛋白农药是对多种农作物具有很强生物活性的一类蛋白质药物。主要包括 Bt 杀虫晶体蛋白(*Insecticidal crystal protein*, ICP)和蛋白激发子类物质，蛋白激发子与一般生物农药最大的区别在于其不直接杀灭害虫和病原物，而是激发植物自身的抗病防虫基因表达，促进植物生长。其中具代表性的有过敏蛋白(Harpin)、隐地蛋白(Elicitins)和植物激活蛋白(Plant Activator Protein)。

表 1.1 几类新型微生物蛋白农药的对比

Table: Compare with three kind of Microbial protein pesticides

类型	来源	专利情况	过敏反应 (在烟草上)
过敏蛋白 (Harpin)	细菌 (<i>Erwinia</i>)	美国专利 1992 年	有
隐地蛋白 (Elicitin)	卵菌 (<i>Phytophthora</i>)	法国专业 1985 年	有
植物激活蛋白 (Activator)	真菌 (<i>Alternaria</i>)	中国专利 2000 年	无

1.1.1 过敏蛋白 Harpin

过敏性反应(Hypersensitive Response, HR)是植物基本的抗病反应，指植物受病原侵染后，病原侵染点周围细胞迅速坏死的一种现象，是在植物—病原互作系统中认识到的一种最强的抗病反应(Goodman et al., 1994)。过敏性反应现象最早在 Ward(1902)研究的雀麦冠锈病(*Puccinia dispersa*)中就已发现。二十世纪三十至五十年代，人们在研究病毒鉴别寄主和研究专性寄生菌致病性分化的鉴别品种上发现有枯斑反应(necrosis response)。1964 年，Klement 等人发现革兰氏阴性植物病原细菌在非寄主植物上有过敏性反应。1970-1980 年间，Kuc 等人提出 ISR(Induced systemic resistance)，现称为系统获得抗性(Systemic acquired resistance, SAR)。

寄主植物感染病原物后，引起感染部位组织坏死，限制病原物的扩展(Greenberg J.T., 1996)。其表现形式可从单细胞坏死到明显的组织大面积死亡(Holub E.B. et al., 1994)，这主要

取决于植物—病原互作系统,有时也受环境条件的影响。过敏性反应(Hypersensitive Response, HR)引起植物组织细胞的死亡类似于动物程序性细胞死亡(Programmed cell death, PCD)(Greenberg J.T., 1996; Hayat El-Maaroufa *et al.*, 2001)。HR 的抗病作用不仅仅是表现在对病原菌扩展的限制,而且能诱导植物的系统获得抗性,抵抗多种病原的侵染(李汝刚 *et al.*, 1998)。HR 的特点是病原菌感染部位附近的细胞快速坏死,紧接着聚集植物抗毒素以及其它因子(章元寿, 1996)。

1992年,美国 Cornell 大学韦忠民(Wei Z.M.)博士等人报道了植物病原欧氏杆菌 hrp 基因,从梨火疫病的病原细菌中分离到一种由 hrp 基因编码的约 44KD、能激发 HR 的蛋白类激发子 Harpin(常用 HarpinEa 表示),并首次提出 Harpin 激发植物 HR 与抗病性的关系,文章提出了过敏蛋白具有诱导抗病性功能,从而促进了新型微生物蛋白农药的研究(Wei Z.M. *et al.*, 1992)。Harpin 是诱导 HR 的细菌激发子范例,这一发现促进了寄主病原物相互作用的研究(王金生, 1999; 梁元存 *et al.*, 2001; Wei Z.M. *et al.*, 1992)。

从现有分离到的 Harpin 蛋白来看,均具有亲水性,富含甘氨酸,缺少半胱氨酸,无四级结构,热稳定性, Harpin 分子经 100℃处理 10 min,诱导非寄主产生 HR 的能力不会丧失,但对蛋白酶及紫外线敏感(Wei Z.M. *et al.*, 1992; Bauer D.W. *et al.*, 1995; He S. Y. *et al.*, 1993; Nakada H. *et al.*, 1999; Fumiko TAGUCHI. *et al.*, 2001)。同一属的病原细菌产生的 Harpin 蛋白在核酸和蛋白质序列上具有一定的同源性,如 HarpinEcc 与 HarpinEch 具 72.1%的相似性、51.4%的同一性, HarpinEcc 和 Harpin Ea 具有 66.6%的相似性和 50.8%的同一性,特别是靠近 C 端约 50%的部分,具有 90%以上的相似性和同一性(Bauer *et al.*, 1995)。

Harpin 蛋白并不直接作用于靶标作物,而是刺激作物产生自然的免疫机制,使得植物能抵抗一系列的细菌、真菌和病毒病害。其作用机理是激发子与受体识别后,通过构型变化激活胞内有关酶的活性和蛋白质磷酸化,形成第二信使,信号得到放大,最终通过对特殊基因的调节而激发植物产生防卫反应(梁元存 *et al.*, 2001)。

2001年美国 Cornell 大学和 EDEN 生物科技公司基于过敏蛋白研究共同开发和研制成功了具有抗病防虫功能的广谱性无公害微生物蛋白农药 MessengerTM。MessengerTM是含 HarpinEa 蛋白的可湿性颗粒制剂。HarpinEa 蛋白是通过将 *E. amylovora* 编码 Harpin 蛋白的 DNA 片段转入 *E. coli* K-12 中表达进行商业化生产而获得的。该产品是 2001 年生物农药中最具代表性的新产品之一,也是当前国际上利用高技术手段开发生物农药最成功的例子。在多种大田作物、经济作物上应用后,有促进作物生长与发育、增加作物生物量、增加净光合效率以及激活多途径的防卫反应等作用。抗病增产效果十分显著,对多种病虫害防治效果达 50-80%,增产效果 10-20%,化学农药用量可减少 71%(谭放军 *et al.*, 2003)。Harpin 蛋白对植物病原不具有直接的抑制或毒杀效果,不存在促进有害生物种群抗性发展的选择压(谭放军 *et al.*, 2003)。

在国内,赵立平博士等进行了 Harpin 的结构与功能关系和产 Harpin 的成团泛菌工程菌的构建等方面的研究(赵立平 *et al.*, 1999);李艳琴等完成了 Harpin 的固氮工程菌的构建(李

艳琴 et al., 2000); 李汝刚、范云六等人进行了表达 Harpin 蛋白的转基因马铃薯降低晚疫病斑生长率方面的研究(李汝刚 et al., 1999)。

闻伟刚等对水稻黄单胞菌的 hrp 基因簇进行了全序列测定,发现其中含有 23 个 hrp 调节基因和 hrp 基因簇(24 个基因);从水稻黄单胞条斑病菌(*X. o. pv. oryzae*)的 III 型分泌系统突变体 M51 中分离、纯化到激发烟草过敏性反应的活性蛋白;对来源于水稻白叶枯病菌中编码植物 HR 反应激发子 HarpinXoo 蛋白的基因 hrpXoo 进行了功能域分析,已从水稻中克隆到了 12 种信号调控基因;并进行了水稻黄单胞菌两个致病变种(Xoo 和 Xoo^c)中 Harpin 蛋白的比较遗传学研究,发掘出编码 HarpinX 的功能基因,并通过转基因手段实现了基因在植物中的高效表达,具有显著的防病效果(闻伟刚 et al., 2001, 2003)。

1.1.2 隐地蛋白 Elicitins

Elicitins 是疫霉属(*Phytophthora*)和腐霉属(*Pythium*)产生的、在烟草上引起过敏反应(HR)和系统获得抗病性(SAR)的一类胞外蛋白类激发子的总称。虽然这类激发子在化学性质上不同,但是都具有引发植物防卫反应的特性(Ebel J. et al., 1994)。自 1977 年观察到(*P. cryptogea*)的菌体提取物和培养滤液能引起烟草叶片坏死性反应以来,从 *P. cryptogea*、*P. cinnamomi* 和 *P. capsici* 中已纯化了分子量约 10KD 的多种蛋白类激发子(Ricci P. et al., 1989)。其中最具有代表性的是由隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea*)所分泌的隐地蛋白(cryptogein, Cry)。

Elicitins 氨基酸序列高度相似和保守,蛋白质前体含 19 或 20 个氨基酸的信号肽,成熟蛋白质一般含 98 个氨基酸,分子量一般为 10 kD,少数 Elicitins 略有不同。迄今已发现 17 种疫霉菌中存在 Elicitin 活性蛋白,根据等电点和对烟草的激活反应可分为 α -elicitin (酸性) pI 为 3-5 和 β -elicitin (碱性) pI 为 7-9 两类。多数卵菌产生的 elicittins 只有 α 或 β 一种类型,但致病疫霉(*Phytophthora infestans*)等 7 种卵菌分别产生 α 与 β 两种类型的 Elicitins。除了致病疫霉产生的两种 Elicitins α 与 β 型诱导 HR 的能力相同,其他所有 β 型 Elicitins 的生物活性都高于 α 型。

cryptogein 在极低浓度(100 pmol/ml)下就能诱导烟草产生 HR,并使植株获得广谱抗病性,同时产生与防卫反应相关的物质如乙稀、植保素(PA)、病程相关蛋白(Pathogenesis Related Proteins, PR)等(Bourque S. et al., 1999)。Kamoun 等用 cryptogein 和 parasiticein 处理烟草、番茄、莴苣、甘蓝、黄瓜、茄子、辣椒和拟南芥等 61 种植物,结果发现两种 Elicitins 在烟草、萝卜和芜菁植物上产生 HR,而在其它植物上则不能,表明 Elicitins 是一种特异性激发子(Kamoun S. et al., 1993)。研究证明, Elicitin 是通过水杨酸介导抗病信号途径,激发植物获得对真菌、细菌等病原物的系统抗性(SAR),同时产生活性氧自由基、脂过氧化物、植保素(PA)、病程相关蛋白(PR)等防御反应相关物质(Dong H. et al., 1999)。

国内对 Elicitin 的研究主要集中在基因的克隆和表达上。谢丙炎等在 1998 年系统研究了苎麻疫霉诱抗激发蛋白(Boeckhemiaein)的理化特性、功能,并进行了基因结构的分析,发现

该蛋白能诱导辣椒对疫病产生抗性，并首次发现Elicitin基因存在断裂现象。用低浓度的隐地蛋白处理茄科、十字花科等多种非寄主植物可诱导产生HR，并使植物获得对病原物的系统抗病性（谢丙炎et al., 1999）。2000年蒋冬花等研究还发现，隐地蛋白13位上的赖氨酸在诱导细胞死亡中起着关键的作用（蒋冬花et al., 2002）。将克隆的隐地蛋白(cryptogein)基因转化烟草后表现抗黑胫病作用（蒋冬花et al., 2002）。

张宏明从疫霉菌(*Phytophthora palmivora*)Butler的培养滤液中分离出分子量为10.6 KD的不含糖基的耐热蛋白。这种10.6 KD蛋白能诱导烟草(*Nicotiana tabacum*)叶片发生过敏性坏死反应。用该蛋白处理烟草叶肉、表皮和保卫细胞，以及悬浮培养细胞在产生过敏性坏死反应之前，均有H₂O₂的大量生成，推测这种10.6 KD蛋白也属于Elicitin类激发子（张宏明et al., 1999）

1.1.3 植物激活蛋白

植物激活蛋白是从葡萄孢菌(*Botrytis*)、交链孢菌(*Alternaria*)、黄曲霉菌(*Aspergillus*)、稻瘟菌(*Pyricularia*)、青霉菌(*Penicillium*)、纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、木霉菌(*Trichoderma*)、镰刀菌(*Fusarium*)等多种真菌中筛选、分离、纯化出的蛋白激发子。该蛋白不激发烟草植株的过敏反应，这与Harpin和Elicitin的生物活性均基于植物的过敏反应不同（刘萍萍 et al., 2005）。激活蛋白诱导处理种子能够加快黄瓜种子的萌发，促进幼根的生长；处理多种瓜果蔬菜均能提高其座果率，如处理西瓜和番茄可使瓜果数和果重显著提高，分别达到77.4%和45.7%；对灰霉病害的防效达76.92%，用激活蛋白可湿性粉剂处理桃子与西红柿，可减少桃子与西红柿灰霉病的发病率和烂果率，对桃子与西红柿具有保鲜作用。同时，还发现该蛋白制剂能够以特定的作用方式成倍的提高Bt对鳞翅目害虫的防治效果，增效达18.5倍。研究表明交链孢菌激活蛋白处理后，水稻幼苗增强了对稻瘟菌的抗性，几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶活性提高，且酶活性的变化趋势与稻瘟菌抗性的变化趋势相仿，它们可能介入了交链孢菌激活蛋白诱导的水稻幼苗对稻瘟菌抗性的提高（赵利辉 et al., 2005）。

植物激活蛋白主要通过激活植物体内分子免疫系统，提高植物自身免疫力；通过激发植物体内的一系列代谢调控，促进植物根茎叶生长和叶绿素含量提高，从而达到提高作物产量的目的。由此可见该种激活蛋白具有广泛的应用前景。

植物激活蛋白研究起步较晚，为了得到激活蛋白的核酸序列，成功地构建了*Alternaria*菌cDNA表达文库，希望从中筛选到植物激活蛋白的cDNA序列。在现有的技术条件下，通常采用的一种策略是，以一个已知的分子作为探针，通过检测在特定条件下文库中与探针发生相互作用的基因序列或其编码的表达产物，从而分离出目的基因。目前常用的探针可分为两类：核酸探针和抗体探针，抗体探针又称蛋白质探针可以直接用于分离产生目的蛋白质的重组克隆，是获得未知基因的基本途径，这是因为往往很多具有功能的蛋白质的基因结构及氨基酸序列均是未知的，所以不能采用核酸探针筛选目的基因，但可采用能与表达产物发生特异性结合的抗体筛选基因。

1.2 抗体亲和纯化技术

抗体应用于生物领域已经有很久的历史,自上个世纪末以免疫动物获得抗血清以来,这一途径一直是获得抗体的经典方法。1975 年 Kohler (Kohler *et al.*, 1975) 及 Milstein 建立了 B 淋巴细胞杂交瘤技术,这是抗体产生的重大技术革命。该技术使人类通过细胞工程可以在体外定向地制备各种单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)。20 世纪 80 年代中期人们开始尝试以基因工程方法改造鼠源性 McAb,亦即所谓 McAb 的“人源化”。然而真正以基因操作的方式制备抗体,却始于 1989 年底英国剑桥 Winter 小组与 Scripps 研究所 Lerner 小组的创造性工作。他们利用 PCR 技术克隆机体全部的抗体基因,并重组于原核表达载体中,用标记抗原就可筛选到相应抗体,当时称为组合抗体库技术。20 世纪 90 年代初期,这一技术有了进一步发展,即将抗体基因与单链噬菌体(M13, Fd 等)的外壳蛋白融合并表达于噬菌体表面,以固相化的抗原吸附相对应的噬菌体抗体,经多次“吸附—洗脱—扩增”即可获得所需抗体。噬菌体抗体库技术为制备人源化抗体开辟了新途径。由多克隆抗体到单克隆抗体,直到基因工程抗体,是抗体产生技术的 3 个时代,从一个侧面反映了生命科学由整体水平、细胞水平到基因水平的进展,同时也为抗体作为生物技术产业的一个重要支柱奠定了基础(陈京 *et al.*, 1997)。

抗体的应用离不开抗体纯化技术的发展。抗体可以通过盐析、离子交换层析等方法实现免疫球蛋白和其它组分分离,同时还可以通过亲和纯化的方法一步完成抗体的分离和特异性的纯化,从而得到高质量的抗体。

抗原和抗体间可以发生牢固而特异性的结合,利用这一特性人们可以通过多种途径固定抗原或抗体来亲和纯化对应抗体或抗原(Jack 1994; Subramanian 2002)。在 1924 年,Engelhardt 最早提出可以利用固定的抗体来捕获溶液中游离的抗原。但是缺乏合适的材料和可行的固定方法,直到二十世纪五十年代, Campbell 等才成功利用固定在叠氮纤维滤纸上的抗原进行抗体纯化(Campbell, Luescher *et al.* 1951)。此后的很多年里,这一方法推广应用于多种不同抗原和抗体片段(Hirata *et al.*, 1965; Terman *et al.* 1977; Wang *et al.* 1980; Kennel 1982)。二十世纪七十年代,单克隆抗体技术极大地推动了亲和层析技术的发展。在最近的二、三十年中,随着层析材料和固定方法的不断发展,免疫亲和层析技术已经成为生命科学领域中的重要研究工具。()

近年来,越来越多的抗体被用于疾病的诊断与治疗(Song S. P. 2004),已占据生物药品市场的 20%(Newcombe A. R., 2005)。随着生物科技的迅速发展,抗体的来源也越来越广泛(Stoger E., 2002; Houdebine L.M., 2002),包括天然抗体,单克隆抗体及通过基因工程方法制备的抗体。在有些情况下,未经纯化的抗血清或只经简单的盐析提纯就可以直接使用。但在很多应用中,如免疫诊断,混杂的抗体需要进行分离纯化。毋庸置疑,免疫诊断方法得益于使用高纯度的抗体。制备抗体酶(abzymes)需要高选择性的纯化抗体和它的 Fab 片段(Tawfik *et al.* 1990; Barbas Iii *et al.* 1993; Smith *et al.* 1994)。目前发展最快的生物芯片领域,同样需要纯化的抗体。

(Askari et al. 2001; Stokes et al. 2001; Banerjee et al. 2002; Rosty et al. 2002)通常使用固定的抗原来亲和纯化抗血清中特异性的多克隆抗体, 使用一些免疫球蛋白片段来纯化单克隆抗体。

1.2.1 单克隆抗体和多克隆抗体的不同纯化策略

利用亲和层析从抗原上分离单克隆抗体和多克隆抗体的方法是不同的。纯化单克隆抗体主要是抗体与非免疫球蛋白分离的过程, 如腹水和培养基上清中的白蛋白。采用固定的抗原和 A 蛋白、G 蛋白、L 蛋白都很容易完成它们的分离。葡萄球菌的胞壁蛋白使用起来很方便, 因为不需要每次都固定特定的抗原(Goding 1978; Werner et al.1978)。因此, 只有当葡萄球菌胞壁蛋白亲和力不够时, 分离单克隆抗体才需要使用固定化的抗原(Richman et al. 1982; Ljungberg et al. 1993; Scott et al. 1997)。

分离多克隆抗体时不仅要免疫球蛋白片段与其它蛋白分离开, 还需要将不同的特异性的抗体分开。首先用 A 蛋白亲和层析纯化抗体 (IgG), 但是还要使用固定抗原来完成最终的纯化。它不仅可以将特异性的抗体从其他蛋白和非特异性抗体中分离出来, 还可以根据特异性抗体的亲和力不同将它们分开。它们可以通过不同 pH 值和盐梯度的缓冲液从柱上分步洗脱或者梯度洗脱出来。溶液的 pH 值在 3.5-4.5 之间, 可以洗脱亲和力小的抗体; 溶液的 pH 值在 2.0-2.2 之间, 将洗脱亲和力大的抗体。其他抗体可以用碱性的溶液(pH 10.5-11.0)洗脱。有些时候, 即使这样做还是会有一些抗体吸附在柱上, 只能用去污剂来洗脱, 通常不使用去污剂, 因为它将引起抗体变性, 但是用它清洗可以使免疫吸附剂完全再生。由于固定可以保护抗原的结构, 尿素或者极端 pH 值都不会改变吸附剂结合抗体的特性。因此可以从同一种的抗血清中分离得到与抗原亲和力不同的抗体。这些抗体可以用于不同用途。此外, 使用不同的分级分离, 不同的抗原固定形式, 不同的固定化抗原, 可以实现从多克隆抗血清中分离相同类型不同特性的抗体。(Muronetz, V.I.,2003)

1.2.2 蛋白 A, G 和 L 作为亲和层析的配体

生物在进化过程中, 机体必须具备防御有害病原体入侵的防御机制才能得以生存繁衍, 因而在长期进化过程中形成了巧妙而又复杂的免疫系统。普遍认为高等生物有机体在受到病原体入侵时, 首先起作用的是先天性免疫机制, 其次才是T细胞与B细胞等免疫细胞的获得性免疫机能发挥作用, 二者共同抵挡病原体的侵染。葡萄球菌蛋白A (蛋白A) 和G群链球菌的细胞壁蛋白G (蛋白G) 能与多种动物的Fc段结合。蛋白质L是从消化链球菌表面分离出的蛋白。固定的蛋白A、G或L可以特异性的结合IgG1-4, 利用这一特性它们用来从腹水或悬浮细胞培养液中分离纯化单抗(Akerstrom et al. 1985; Phillips et al. 1985; De Chateau et al. 1993; Brown, Bottomley et al. 1998)。蛋白A还可和IgM、IgE特异性的结合, (Phillips et al. 1985; Scott et al. 1997)蛋白L与带有 κ -轻链的抗体特异性结合, (De Chateau et al. 1993)而蛋白G可和IgG、IgM发生结合。(Akerstrom et al. 1986; Zatta 1996)葡萄球菌细胞壁蛋白对免疫球蛋白具有很高

的特异性,但是他们能够结合多种不同种类哺乳动物的免疫球蛋白。例如,蛋白A可以特异性的结合人IgG3和鼠IgG1。(Scott et al. 1997)蛋白A和不同的抗体结合强度不同,利用这一特性可以进行抗体的分级分离。(Goudswaard et al. 1978; Sasso, et al. 1989)IgM中可以和蛋白A发生反应的片段已经完成鉴定。(Vidal et al. 1981)蛋白质A具有四个结合位点,其中的两个与免疫球蛋白的Fc段结合,解离常数为 10^{-7} ,另外两个结合位点与亲和层析的基质结合,因此蛋白质A易于与载体相连。蛋白质A稳定性较好,它在很宽的pH(2-9)范围内保持稳定,可以耐受0.5 mol/L NaOH溶液,而且在被脲及胍盐变性后,还可以重新复性,可以多次进行吸附-洗脱操作。由于蛋白质A具有上述的诸多特点,以它作为配体的亲和层析已广泛用于多种免疫球蛋白的分离、纯化。(孙维敏, 2005)

在层析中,固定恰当的葡萄球菌胞壁蛋白可以实现一步分离相似的单克隆抗体。因为多克隆抗体含有很多种不同的免疫球蛋白,所以这些蛋白通常不能有效地用于纯化多克隆抗体。固定的葡萄球菌蛋白广泛用于分析研究,如研究血清中抗体的组成等。(Goding 1978)

1.2.3 抗原作为亲和层析的配体

固定抗原的亲和层析法主要应用于从多种免疫球蛋白的混合物中,如从免疫的动物血清中,提取某一特定的组分。Tu等(Tu Y., 2001)用牛乳铁传递蛋白(LF)作为抗原免疫兔和鸡,并将抗原LF固载于溴化氰活化的琼脂糖凝胶上,制备了LF-琼脂糖层析柱。用此层析柱从兔的血清中提取了IgG,鸡卵黄中提取了IgY。结果表明,该免疫亲和层析柱可以有效地与血清中的IgG或鸡卵黄中的IgY结合。对IgY的吸附容量远远高于对IgG的吸附容量。前者可达到后者的17倍。从色谱柱上洗脱时发现,IgY的解离常数大于IgG的解离常数,这表明,较之于动物血清,从鸡卵黄中更易于提取LF的抗体。此外,用免疫亲和色谱法从鸡卵黄中提取IgY的研究报道还有很多,如外抗原为HIF-1 α 片段(Tini M, 2002)、 α -半乳糖(Cook C., 2001)、TKI C-端的合成肽段(Wu C., 2003)等产生的抗体的纯化。

用固定的抗原纯化抗体包括以下三步:(1)抗体结合到固定的抗原上 (2)漂洗去除非特异结合的蛋白 (3)洗脱特异性的抗体。亲和层析柱在上样前需要用中性缓冲液平衡,通常采用含有0.15 M NaCl的pH 7.6的磷酸盐缓冲液。抗血清的用量多是根据经验来确定的。最大上样量是由抗血清的量决定的。需要指出,由于抗原分子表面存在多种抗原决定簇,因此固定的抗原能和多抗血清中不止一种抗体分子发生结合。常用方法是,用样品缓冲液平衡柱子去除非特异连接的蛋白。为了更好的去除柱上非特异性结合蛋白和低亲和力的抗体,需要使用更强的缓冲液来平衡层析柱子,如pH5.5的弱酸或pH8.5弱碱缓冲液。

通常使用pH2.0-2.2的缓冲液来洗脱结合在柱上的抗体。低pH的缓冲液能够洗脱绝大部分吸附在柱上的抗体。为了保持抗体的天然构象,洗脱溶液需要马上加入1 M pH7.0的磷酸盐缓冲液,将其pH调至中性。洗脱后要将凝胶中的pH恢复至中性。由于凝胶中含有很多缓冲液,同时要调整的pH跨度也很大,因此平衡层析柱需要使用大量的低浓度缓冲液。

可通过修改以上方法来实现更高效的纯化抗体。可以小心的改变平衡条件来洗脱柱上非特异结合的蛋白，同时还可调整溶液的 pH、盐浓度或添加有机物。能够使制备的抗体最小程度变性的洗脱条件就是最佳的洗脱条件。在准备亲和吸附填料时，要考虑将抗体和抗原的结合强度调整到最佳值。这些工作是很困难的，这也就导致亲和层析工作变的复杂而艰巨。

1.2.4 寡聚蛋白作为亲和层析的配体

以固定的寡聚蛋白作为抗原纯化抗体会使纯化过程特别是洗脱步骤变得复杂。众所周知寡聚蛋白中亚单位之间的相互作用是不牢固的，即使在相当温和的条件也有可能受到破坏，如改变介质的pH或离子强度，降低或升高温度。寡聚体-单体的平衡常数 K_d 值很少低于 10^{-7} M，通常为 10^{-6} M，而抗原-抗体复合物的 K_d 值一般在 10^{-9} - 10^{-11} M。在只通过一个亚基来固定整个寡聚蛋白的情况下，寡聚蛋白会在抗原-抗体复合物解离前被裂解成亚基。因此只用单一的亚单位固定的寡聚蛋白不适于进行免疫吸附试验。通常不采用亚单位用交联剂连接的寡聚蛋白进行共价连接，因为这会破坏抗原表位。最安全的办法是使用含有高浓度活性基团的支持物，它可以通过多点连接的方式连接寡聚蛋白的多个亚单位，从而固定寡聚蛋白。尽管在这样的条件下酶可能丧失活性，但它们通常会保留结合抗体的能力，同时这一过程甚至可能使抗体洗脱变得容易 (Muronetz. V.I., 2003)。

1.2.5 分离抗体 Fab 片段

Fab 片段由重链(H 链)V 区及 CH1 与一条完整的轻链(L 链)组成，二者通过一个链间二硫键连接，形成异二聚体，是完整抗体的 1/3，仅一个抗原结合位点。(孙维敏, 2005)Porter 采用木瓜蛋白酶切割抗体再用离子交换层析分离得到 Fab 片段，这是经典的分离单价和双价 Fab 片段的方法。后来改进了从反应混合物中分离 Fab 片段的层析方法。已有报道使用亲和层析的方法，(Scott et al. 1997)固定蛋白水解酶、固定蛋白 A (用来分离 Fc 片段)、甚至使用抗木瓜蛋白酶的抗体(Kurkijarvi, 1989)来去除蛋白水解酶中的污染物。利用基因工程手段生产存在的问题包括缺少最初的表达蛋白和肽段的重组。当可以获得正确的 Fab 片段后，就可以利用常规的亲和层析方法将其纯化。

利用抗体来生产 Fab 片段存在的主要问题是设计蛋白酶切位点时即要保证将 Fab 片段和 Fc 片段完全分开又要保证 Fab 片段的完整性。采用水解的策略需要时间和材料。通过胶层析可以很容易地从反应混合物中分离没有被水解的抗体与 Fab、Fc 片段，但不幸的是 Fab 和 Fc 片段的分子量类似，它们不能被分开。虽然最终的 Fab 产物是单功能的，其中不再包含 Fc 片段，但是它不能用于常规的免疫分析，在进行竞争 ELISA 时需要这样的 Fab 片段。

在抗体免疫吸附纯化过程中，水解切割抗体可以保护抗体活性位点免遭破坏。用木瓜蛋白酶切割固定在琼脂糖上的抗体和结合到固定抗原上的抗体，Fab 包含在产物中可溶的部分里。在特殊的情况下，矩阵式固定的抗体水解效率不如其在溶液状态。可能是因为矩阵式排列在某些方面限制了扩散，因此减慢了水解进程。这样生产的 Fab 片段的活力还不是很

因为在洗柱的过程中会损失近一半的 Fab 片段。

非化学计量多聚电解质复合物 (NPECs) 结合的抗原可用来制备 Fab 片段。(Dainiak et al. 1998)使用 NPECs 结合的抗原来纯化 Fab 片段, 可以解决 Fab 片段生产中存在的三个主要问题: (1) 在蛋白水解时保护了 Fab 的连接位点; (2) 从反应混合物中亲和纯化出 Fab 片段; (3) 只选择性地分离那些可和抗原结合的 Fab 片段, 因此分离得到 Fab 片段后不用再鉴定其是否和抗原亲和有活性。这种方法产生的抗体-抗原-聚阳离子便于共扼配对。通过共价连接使抗原和多聚阳离子化合物结合, 多聚阳离子化合物是包含 7% 羟乙基的溴化聚 (N-乙烷-4 乙烯基吡啶)。水解的单克隆抗体连接到共扼复合物上之后, 向溶液中加入聚阴离子复合物 (聚甲基丙烯酸) 同时调整溶液的 pH 值从 7.5 至 6.5, 接着在 pH3.0 的条件下进行洗脱, 这样可以得到 90% 具有免疫特异性的 Fab 片段。抗体-聚阳离子共价结合单抗不但可以保护其连接位点在水解过程中免遭破坏, 而且使酶可以更好地接近抗体, 促进了酶切反应。与在溶液中水解抗体再通过层析方法分离 Fab 片段的方法相比, 上述方法在保护抗体连接位点和酶切效率方面更具优势。

1.2.6 固定抗原

亲和纯化的优势在于抗体可以和固定在支持物上的抗原发生特异的免疫吸附反应。目前有很多种支持物和固定方法可供选择。通常会选择大孔亲水性载体, 它可以使溶液顺利通过。当抗原决定簇保持天然状态同时抗体可以不受空间位阻容易接近抗原表位时, 抗原和抗体可以发生高效的免疫吸附。琼脂糖具有以上特点, 它是目前最常用载体。(Wlad et al. 2001)要进行大规模纯化时, 还要考虑包括经济因素在内的其它因素。

一般强度的固定方法会使抗原更好的保持其天然结构。蛋白质表面存在氨基、羧基和巯基, 这些基团相互连接稳定蛋白质的空间结构。如果固定反应破坏了保持蛋白结构必须的二硫键, 就会带来很严重的后果, 此时就需要使用那些非蛋白类抗原、半抗原或特殊的化学物质。

亲和层析中, 抗原的固定强度是可以调整的, 调整固定强度将影响抗原、抗体的连接能力和连接强度。系统的研究了, 使用 CNBr 活化的琼脂糖来固定蛋白类抗原, 其固定强度对以上方面的影响。连接蛋白的程度增加至活化每毫升琼脂糖含有将近 100 mg CNBr, 进一步增加琼脂糖的活化程度, 其能够连接的蛋白质总量不再发生变化。通常当抗体和抗原的结合太牢固时, 就需要很极端的条件来进行洗脱使其分离, 这样纯化的蛋白多半是没有活性的。值得注意, 如果琼脂糖活化程度从 70 mg 增加到 150-200 mg/mL 时, 就可以使用较温和的条件洗脱抗体。(Cherednikova et al. 1981; Muronets et al. 1981; Desai et al. 1990)假定通过多点固定一个抗原分子, 就会改变抗原结构从而导致抗原和抗体活性位点结合能力减弱。不幸的是, 商品化的 CNBr 活化好的琼脂糖其标准活化程度大约是每毫升凝胶含 70 mg CNBr。因此有时需要自己来进行琼脂糖的活化。有时更希望保留生物活性而不是生物亲和性, 而在固定过程中生物活性会丧失, 此时就需要选择其它温和的方法, 如过巯基来进行固定。可以通过简单

的化学反应使乙醛和琼脂糖交联。蛋白可以连接到乙醛处理过的琼脂糖上,在这一过程中可以使用也可不使用硼酸盐,如果不使用,一部分连接到柱上的蛋白会慢慢减少。(Kurkijarvi et al,1989)环氧树脂活化的琼脂糖因为其低离子强度的特点,在有些情况下使用效果会优于 CNBr 活化的琼脂糖。

近来报道一种新方法,可以实现高浓度的抗原(碱性磷酸酶)连接到羟基水杨酸修饰的琼脂糖支持物上。(Wiley et al. 2001)还可使用非化学计量多聚电解质复合物吸附抗原用于抗体分离。(Dainiak et al. 1998)首先,将抗原-聚阳离子复合物加入到含有抗体的溶液中。通过共价连接使抗原和多聚阳离子化合物结合,多聚阳离子化合物是包含 7%羟乙基的溴化聚(N-乙烷-4 乙烯基吡啶)。在抗体-抗原-多聚阳离子复合物形成后,向溶液中加入聚阴离子复合物(聚甲基丙烯酸)同时调整溶液的 pH 值 7.5 至 6.5,这样就产生了沉淀。抗体在 pH3.0 时可以从沉淀中洗脱出来。

斑点固相亲和层析技术是 1981 年由 Olmsted J.B.提出,Smith, D.E 1984 年进行完善的特异纯化抗体的方法。此方法是将混杂的抗原蛋白通过电泳进行分离,再将其转移到 NC 或 PVDF 膜上,加入抗体后,剪取特定位置的膜,进行洗脱,收获高特异性的抗体。此方法可自由控制反应时间,反应温度等相关条件,同时可以有针对性地选择所需抗体,因此回收到的抗体特异性要高于一般的亲和柱层析,但是回收的抗体的量相对较低,只可用于一些分析性实验。(Olmsted J.B.,1981; Smith D.E et al., 1984)

1.2.7 洗脱抗体和增加抗体产量的方法

抗体和抗原之间的高亲和性使得吸附步骤变得容易,但是这将导致需要使用极端的条件来进行洗脱,甚至导致无法纯化。洗脱剂通常使用极端 pH、去污剂、离液盐或综合使用这些条件。应该注意如果抗原是一个大的蛋白,亲和材料可能在洗脱过程中也遭到破坏。

几乎没有现成的方法使洗脱过程变得容易。改变抗原决定簇的结构可以降低其和抗体的结合强度。通过改变固定材料和方法可以降低采用多点固定的抗原的亲和性。洗脱条件的改变同样会影响抗原或抗体。

多克隆抗体能够在温和的条件下从柱上洗脱,但是洗脱的这些抗体可能只包含低亲和的抗体,而高亲和抗体还挂在柱上。低亲和力的抗体除了在亲和层析纯化相应的抗原试验中可以使用,在很多实验中都不能使用。

通常会选用 pH11.0 的碱性和 pH2.5 的酸性缓冲液(Wiley et al. 2001),高离子强度的溶液或使用去污剂来洗脱抗体。在有些情况下,一些特殊的相互作用会破坏抗原-抗体的结合,但并不改变它们的结构。例如 0.1 M 的 3,5-二碘酸锂会引起抗体变性从而破坏是抗原抗体发生解离,但是去除变性剂后,它们的天然结构也得到恢复。通过使用可溶的抗原类似物或使用一些物质竞争结合抗体在抗原上的结合位点,来实现洗脱抗体的目的。例如抗 TEM-1 型 β -

内酰胺酶的单克隆抗体会与青霉素和头孢菌素竞争结合酶上的结合位点。因此在低强度的缓冲液中加入青霉素和它的衍生物可以实现温和洗脱这类抗体。这种方法的缺点是加入的成分也会引起抗体变性，它们需要从最终的产品中除去。

1.3 研究的目的是和意义

交链孢菌激活蛋白是从真菌中分离纯化的蛋白质农药，该蛋白不激发烟草植株的过敏反应，这与 Harpin 和 Elicitin 的生物活性均是基于植物的过敏反应不同。交链孢菌激活蛋白可以提高多种植物的防虫抗病能力，同时可以提高植物耐盐、耐旱能力，提高植物的产量。研究交链孢菌激活蛋白不仅有助于深入了解植物抗逆机理，而且具有广泛的经济效益和社会效益。激活蛋白作研究起步晚，遗传背景较少，用常规分子生物学手段难以获得编码激活蛋白的核酸序列。本研究通过制备激活蛋白抗血清，纯化特异性抗体，并用抗体作为探针筛选交链孢菌 cDNA 表达文库，以期获得激活蛋白基因，为工程菌株的构建利用以及工程菌株的规模化生产奠定了基础。同时利用双向电泳技术，研究了激活蛋白分离纯化技术，利用抗体免疫杂交技术初步探讨研究植物激活蛋白与植物互作机理，对激活蛋白的作用机理研究具有重要的参考价值。

第二章 交链孢菌激活蛋白的理化分析

双向电泳是目前分析蛋白质最常用的检测技术之一。本研究采用双向电泳检测从交链孢菌 (*Alternaria* sp.) 菌中提取的激活蛋白 (简称 ActP 蛋白), 通过改进样品制备条件, 较好的实现了 ActP 蛋白的分离, 确定了 ActP 蛋白的等电点, 为该蛋白进一步的层析分离提供技术参考。

2.1 材料和仪器

2.1.1 材料

交链孢菌 (*Alternaria* sp.J strain) 由中国农业科学院植物保护研究所药物工程实验室保存。

2.1.2 试验仪器

高速冷冻离心机(Biofuge stratas Heraeus 公司)
冷冻干燥仪 (Biofuge stratas Heraeus 公司)
Mini Protean III 电泳槽 (Bio-Rad 公司)
PROTEANII xi Cell (Bio-Rad 公司)
DYCP-37B 型 等电聚焦多用途电泳槽 (六一公司)
酶标仪 (GF-M2000)
Mini-ProteanII 2-D Cell (Bio-Rad 公司)
HZQ-Q 全温振荡器(哈尔滨东联公司)
超声波破碎仪(SONics Vibro cell)
脱色摇床 Ts-800(中国科工卫仪器仪表公司)
UV2550 岛津紫外分光光度计
85-I 恒温磁力搅拌器 (上海青浦泸西仪器厂)
Amicon Ultra 10KD 超滤管 (北京欣经科公司)

2.1.3 试剂

10×Tris-甘氨酸变性电泳缓冲液, 10×Tris-甘氨酸非变性电泳缓冲液, 丙烯酰胺胶储液, 10%过硫酸铵, TEMED, 1.0M Tris-HCl (pH=6.8), 1.5 M Tris-HCl (pH=8.8), 10%SDS 缓冲液, 5×变性样品缓冲液, PBS-T, PBS, 蛋白胶负染平衡液和显色液, 等电聚焦凝胶固定液, 等电聚焦凝胶染色液和脱色液, 普通 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色液和脱色液, 甲醛固定液, 0.2 g/L 硫代硫酸钠, 0.1%硝酸银, 硫代硫酸盐显影液, 2.3 mol/L 柠檬酸

2.2 实验方法

2.2.1 样品制备方法

分别用磷酸缓冲液、2 mM EDTA 溶液提取 AtcP 蛋白，将提取物进行凝胶电泳，对比提取效果。

- (1) 制胶：按照12%分离胶的配方配置，TEMED最后加入，一旦加入立即混匀，然后用注射器将配好的胶加入事先装配好的电泳槽二块玻璃板中，上面轻轻覆盖一层去离子水以隔绝空气。待分离胶完全聚合后，去掉上层覆盖的水，用滤纸吸去残留的水，将加入TEMED后迅速混匀的5%浓缩胶加在分离胶的上面，至满，小心插入梳子，避免产生气泡。待浓缩胶聚合后，慢慢拔出梳子，将电泳液加入到电泳槽中，用注射器吸取电泳槽中的缓冲液冲洗加样孔，去掉未聚合的胶。
- (2) 用pH7.4的磷酸缓冲液提取的AtcP蛋白和2 mM EDTA的水溶液提取的蛋白液分别加入5×上样缓冲液，100℃水浴5 min，每孔上样量为20 μL。
- (3) 进行恒压电泳，室温条件浓缩胶80V，时间10 min，分离胶160 V，时间60-80 min。
- (4) 电泳后将胶放于洁净容器中加入足量的考马斯亮兰染色液，室温下振荡20 min，将脱色液弃去，用蒸馏水冲掉残存的染色液，加入大量脱色液，微波适当加热，室温下振荡约1 h，可基本脱净背景。

2.2.2 激活蛋白 ActP 的双向电泳

2.2.2.1 水平等电聚焦

使用国内六一公司的 DYCP-37B 型 等电聚焦多用途电泳槽，进行水平等电聚焦（汪家政 et al., 2000）。

- (1) 采用Bio-Rad公司的Mini Protean III电泳槽配套的玻板和灌胶架来制胶（胶的规格为8 cm × 7 cm × 0.75 mm），胶配方见附录，含2.4%、3.5到10的两性电解质，将尿素、水、丙稀酰氨储液和载体两性电解质均匀混合，不要剧烈振荡，可适当加热温度不超过37℃。
- (2) 加入过硫酸铵和TEMED，迅速混匀，此时胶开始凝聚，迅速灌胶。
- (3) 静置2h 以上，确认胶完全凝聚后，去掉外层薄玻璃板，将胶保留在厚玻璃板上，这样可便于操作。
- (4) 电泳槽的冷却板事先接在低温循环器上预冷，温度设为10℃，在冷却芯上涂上一层液体石蜡，这样可以使之与支撑凝胶的玻璃板更充分的接触，利于散热。将凝胶和玻璃板置于冷却芯上，注意不要产生气泡。
- (5) 剪取两片适当大小的Whatman GF/C型玻璃纤维滤纸，分别蘸取1 M NaOH（阴极）和1 M

H₃PO₄ (阳极) 放于凝胶的两端, 用保鲜膜覆盖凝胶, 防止聚焦过程中胶中水分挥发, 造成烧胶。

- (6) 调整电极丝的位置, 使其压在滤纸上, 但并不和凝胶接触。
- (7) 在上样前进行预电泳, 100 V恒压30 min, 将剪好的滤纸片放于凝胶中部, AtcP蛋白与样品缓冲液1:1混合, 每片滤纸加10 μ L样品液, 200 V, 1 h, 400 V, 1 h, 600 V恒流4 h以上至电流稳定在较低值。
- (8) 取下凝胶立即放于固定液中固定过夜, 然后使用含有乙醇的考马斯亮兰染色液染色1 h, 脱色液中也含有乙醇, 脱色至背景清晰 (郭尧君, 1999)。

2.2.2.2 双向电泳

第一向电泳分别使用了 18 cm 的管状胶和 Mini 管状胶进行等电聚焦, 再将其转移到相应的 SDS-PAGE 上进行第二向分离。

2.2.2.2.1 标准体系的双向电泳

- (1) 使用PROTEANII xi Cell进行等电聚焦。在聚焦专用管(内径1.5 mm, 外径6 mm, 长180 mm) 14 cm处进行标记。未加过硫酸铵和TEMED的等电聚溶液(含2.4% 3.5到10的两性电解质)超声脱气30 min, 加入硫酸铵和TEMED后搅动8-10下, 聚焦专用管水平放在试验台上, 用注射器将胶液推入管内到达14 cm标记处停止, 此过程中缓慢均用力, 防止产生气泡, 室温下静置2 h, 待胶完全凝聚后, 擦去口上多余凝胶。
- (2) 胶管套上橡胶垫圈, 安装到支架上, 把组装好的支架安放到冷凝芯上。
- (3) 蛋白样品: 等电聚焦样品缓冲液=1: 1 (V:V), 混匀后室温静置20 min, 1000rpm离心15 min 除去杂质, 每管上样50 μ L。相同条件下, 使用3-10的等电点标准进行聚焦。
- (4) 上槽加入350 ml上槽缓冲液, 下槽加入约4.5 L下槽缓冲液。采用恒压电泳, 第一步200 V, 2 h, 第二步500 V, 2 h, 第三步800 V, 16 h。
- (5) 聚焦结束后, 取下玻璃管用超纯水清洗管两端, 用长针头把管两端的胶从玻璃管上剥离, 然后用5 ml注射器相管中推入超纯水, 当胶条部分滑出管外, 注意控制速度防止胶条过快滑出。
- (6) 取出部分含蛋白样品的胶条和含等电点标准的胶条立即放入固定液中固定30 min, 弃去脱色液, 将凝胶放入60℃的染色液中10 min。弃去染色液, 用脱色液洗胶, 多次更换脱色液, 直到凝胶背景完全脱去蓝色为止。
- (7) 其它胶条取出后放入平衡缓冲液 I 中在水平摇床上缓慢震荡15 min, 彻底倒掉或吸掉样品水化盘中的胶条平衡缓冲液 I, 接着加入平衡缓冲液 II 继续在水平摇床上缓慢震荡15 min。
- (8) 配制10%的丙烯酰胺凝胶, 将溶液分别注入玻璃板夹层中, 上部留1 cm的空间, 用超纯水, 保持胶面平整。聚合30 min。一般凝胶与上方液体分层后, 表明凝胶已基本聚合。
- (9) 待凝胶凝固后, 倒去分离胶表面的超纯水, 用超纯水冲洗。用滤纸吸去SDS-PAGE聚丙烯

酰胺凝胶上方玻璃板间多余的液体。将处理好的第二向凝胶放入，注意不要在胶条下方产生任何气泡。

- (10) 用琼脂糖封胶液进行封胶，放置5 min，使之彻底凝固。
- (11) 选用恒流条件进行电泳，开始低电流进样10 mA/gel，待样品在浓缩胶部分浓缩成一条线后，再加大电流到20-30 mA/gel直至电泳完成。

a) 染色脱色

- (12) 电泳结束，取出凝胶用超纯水冲洗后，放入适量的考马斯亮蓝染色液染色1小时，加入脱色液脱色过夜，中间可多次更换脱色液以加快脱色速度。
- (13) 待凝胶彻底脱色后弃去脱色液，用超纯水清洗几次，加入适量甲醛固定液，缓慢摇动10min，倾去固定液，用水洗两次，每次5 min，缓慢摇动。(F. 奥斯伯et al, 2001)
- (14) 倾去水，将凝胶浸于0.2 g/L硫代硫酸钠溶液中1 min，缓慢摇动，倾去硫代硫酸钠溶液，水洗两次，每次20 sec。
- (15) 倾去水，将凝胶浸泡在0.1%硝酸银溶液中10 min，缓慢摇动，倾去硝酸银溶液，用水洗两次。
- (16) 将凝胶浸泡在50 mL新配的硫代硫酸盐显影液中，直至获得足够的条带显色强度（约1 min），加入2.5 mL 2.3 mol/L柠檬酸来终止显色，倾去液体，并用大量的水清洗凝胶。

2.2.2.2.2 Mini体系的双向电泳

- (1) 用封口膜将制胶专用管一端封好，取至少十根Mini聚焦胶专用管垂直放入管中。
- (2) 配置5 mL胶，配方、方法同上，用注射器吸取胶液，沿管壁缓慢加入制胶专用管中，当液面上升到恰当高度，停止加胶。
- (3) 垂直静置2h以上，检测管内胶全部凝好后，去掉底部封口膜，小心取出胶管，擦净管壁外的凝胶，将其安装到电泳槽内，加好上、下槽缓冲液，选择恒压下预电泳200 V，10 min；300 V，15 min；400 V，15 min。
- (4) 预电泳后，弃去上槽缓冲液，吸净每个管上层的溶液。
- (5) 样品处理同上，每管上样10 μ L，每管再加入5 μ L覆盖缓冲液，恒压电泳，500 V，10 min；750 V，4 h。
- (6) 由于胶条很细，取胶时应当更加小心，防止胶条粘连。
- (7) 平衡、转第二向SDS-PAGE及银染方法与2.2.2.2.1中（5）-（16）步相同。

2.3 结果与分析

2.3.1 不同提取方法比较

分别用磷酸和2mM EDTA提取AtcP蛋白，进行SDS-PAGE电泳分离，结果如图2-1由图可见，用2 mM EDTA的水溶液提取AtcP蛋白与用磷酸缓冲液的提取效果相比，得到的蛋白带形和位置无明显变化。因此可以使用2 mM EDTA的水溶液代替磷酸缓冲液提取AtcP蛋白。

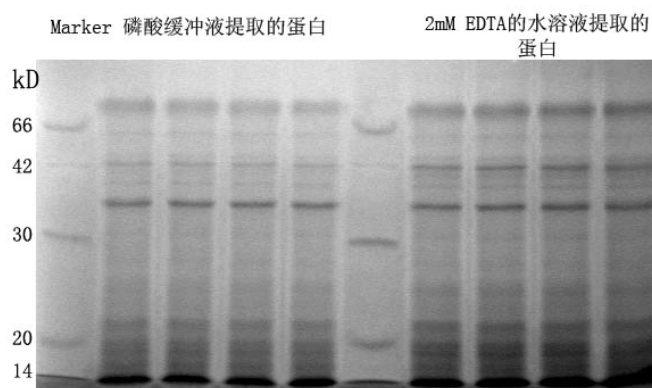


图2-1两种溶液提取的激活蛋白SDS-PAGE电泳图

Fig2-1 SDS-PAGE analysis of Activator ActP drawn by two kind of solutions

2.3.2 水平等电聚焦

用水平等电聚焦仪对AtcP蛋白进行等电聚焦,结果如图2-2,从图中可以看出,蛋白条带大都集中在阳极区pH3.5-5的范围内,因此可以推测激活蛋白主要组成的pI值偏酸性,在阴极区也有几条带,其所在位置在与上样滤纸的位置十分接近,可能是上样滤纸的影响。



图2-2 AtcP蛋白pH3.5到10范围内的等电聚焦

Fig. 2-2 Separate the activator ActP by isoelectric focusing (IEF, pH3.5-10)

2.3.3 双向电泳

分别采用18cm的管状胶和Mini管状胶对AtcP蛋白进行等电聚焦分离,随后进行第二向分离,如图2-3、2-4、2-5所示,蛋白质点主要集中在pH3.5-5的范围内,通过对比等电点Marker确定胶上最多的蛋白点集中在pH4.0的区域,且这些蛋白质点分布在两条很近的垂直带上。如图3-3采用标准体系的等电聚焦来分离激活蛋白ActP,蛋白质可以很好的分离,但是由于所上样品中的总蛋白量较低,因此在第二向分离后得到的蛋白质点较少。图2-5所示,采用Mini体系的双向电泳来分离ActP蛋白在第一向的聚焦水平、第二向电泳后的染色效果和蛋白质的分离情况等方面,均优于标准体系的双向电泳。因为等电聚焦时采用的体系很小,聚焦时间得到缩短,样品的聚焦过程起到了浓缩作用,第二向电泳时由于样品相对浓度较高,染色效果明显得到改善。

如图2-4双向电泳的凝胶使用考马斯亮兰染色,只能看到个别浓度很高的蛋白点,经过脱色后,再使用银染,如图3-5得到的蛋白点数增多。考染使用方便,操作步骤简单,适于对大量高浓度的蛋白进行染色。银染灵敏度比考染高将近10倍,但操作繁琐,用时较长。使用先考染再快速银染的方法,对比单一的银染,能够进一步提高染色的灵敏度,有些蛋白银染法不能将其染色,但考

染可以使其显色，两种染色方法相结合，扩大了蛋白质的检出范围。因此两种染色方法结合使用非常适于双向电泳凝胶的染色。

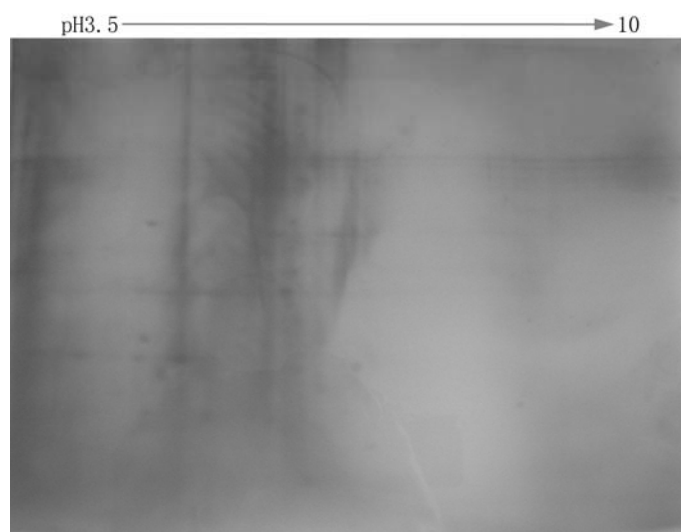


图2-3标准体系双向电泳分离AtcP蛋白

Fig2-3 Separate the activator ActP by normal 2D-PAGE

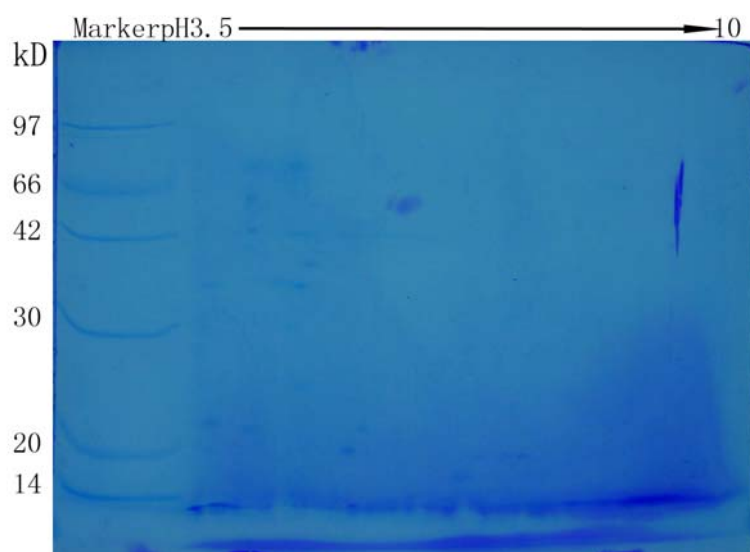


图2-4 Mini体系双向电泳分离AtcP蛋白（考马斯亮兰染色）

Fig2-4 Separate the activator ActP by Mini 2D-PAGE(dyed by Coomassie Brilliant Blue)

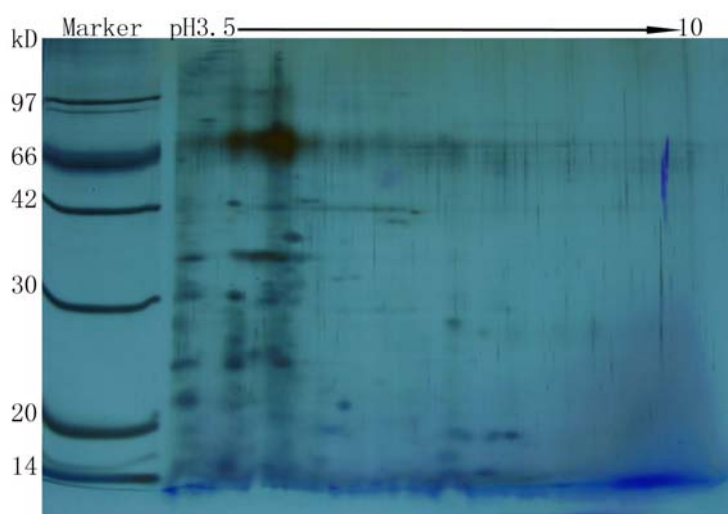


图2-5 Mini体系双向电泳分离AtcP蛋白（银染）

Fig2-4 Separate the activator ActP by Mini 2D-PAGE(dyed by Sliver-staining)

2.4 讨论

双向电泳是目前进行蛋白质分析的分辨率较高的电泳技术，在进行蛋白质组学研究时第一向等电聚焦主要是采用IPG固化胶条，但当样品成分相对简单，使用低成本的管状胶进行双向电泳也可以较好的分离样品。双向电泳主要包括样品制备、电泳、凝胶染色。

在双向电泳中，样品准备是最关键的步骤，样品应溶解在双蒸水中，因为很低浓度的盐离子也会破坏pH梯度，使聚焦结果形成波浪形，并且由于这些离子的影响产生高电流，如磷酸缓冲液对等电聚焦影响很大。ActP蛋白亲水性很强，几乎可以完全溶解于水。

ActP蛋白制备过程中，在水溶液中加入低浓度的EDTA，可以防止蛋白酶降解蛋白，对激活蛋白起到一定的保护作用，但是由于没有盐分的存在，制备的蛋白溶液不适于长期保存，通常采用新鲜制备的蛋白进行双向电泳。由于制备的激活蛋白中没有盐分，不需要在双向电泳前进行透析或过脱盐柱除盐等样品前处理步骤，减少了样品损失，保证了样品的浓度，为双向电泳分析样品奠定了基础。

在双向电泳中，第一向等电聚焦的好坏决定了样品分离的程度，本实验尝试了水平等电聚焦和两种体系的管状胶对AtcP蛋白的分离。由于水平等电聚焦过程中，只能使用最高600V的电压，虽经改进方法，但过长时间的电泳仍会导致干胶，甚至烧胶，这就造成聚焦的总伏时数偏低，蛋白质聚焦不彻底，从图2-2 上可以看出蛋白带都比较弥散，如果要想用此胶再进行第二向电泳，需要手工切胶，这样很难保证所切的胶边缘平齐，因此水平等电聚焦不适于作为双向电泳中的第一向电泳。但是水平等电聚焦方法，仪器简单，便于操作，电泳结果条带便于观察，很适合用于实验初期摸索凝胶配方，样品制备条件，上样浓度，两性电解质选择等条件。

标准体系的双向电泳由于其聚焦时间长、胶条长等特点，可以实现蛋白质更好的分离，当样品中含有多种不同的蛋白质时，如分离植物、动物、细菌的全蛋白时，应当选用此种方法。但是其操作繁琐，制胶重现性较差，第一向等电聚焦需要20h，第二向电泳需要将近6h，完成一次至少需要两天，同时需要大量高浓度的样品。Mini体系的双向电泳可以一次制备大量的Mini管状胶，

节约凝胶，重现性好，两向电泳的时间都很短，可以在一天之内完成一次双向电泳过程。因此，使用Mini体系的双向电泳分离AtcP蛋白的效果优于标准体系双向电泳。

AtcP蛋白大部分集中在pH4左右区域，因此在用离子交换层析分离激活蛋白时可以考虑选用pH4 左右的缓冲液来分离纯化激活蛋白。由于AtcP蛋白中不同分子量的蛋白的等电点很近，因此期望只使用离子交换层析就得到高纯度的蛋白相当困难，可以考虑结合疏水层析或分子筛等层析方法来得到高纯度的激活蛋白。AtcP蛋白物理特性相似，所包含的相同分子量的蛋白等电点都十分接近，由此推测可能是天然状态下或者提取过程中发生了蛋白修饰的结果，有待进一步通过实验来验证。

第三章 交链孢菌激活蛋白多克隆抗体的制备及特异性纯化

本实验首先制备了交链孢菌激活蛋白的抗体，经检测发现所制备的抗血清与大肠杆菌有很强的交叉反应，因此需要对抗体进一步纯化。本实验使用改进的斑点固相亲和层析技术进行了特异性抗体纯化，基本消除了抗体与大肠杆菌的交叉反应，得到了高特异性的抗体。

3.1 材料和仪器

3.1.1 材料

健康雌性兔（新西兰大白兔），2~3 kg，购自中国药监局实验动物养殖中心，寄养于中国计划生育委员会实验动物养殖中心。

Sequi-Blot PVDF（Bio-Rad 公司），加厚型滤纸（Bio-Rad 公司）

3.1.2 仪器

高速冷冻离心机(Biofuge stratas Heraeus公司)

Mini Protean III电泳槽（Bio-Rad公司）

PROTEANII xi Cell（Bio-Rad公司）

半干转膜仪（Bio-Rad Trans-Blot® SD cell）

酶标仪（GF-M2000）

超声波破碎仪(SONics Vibro cell)

UV2550岛津紫外分光光度计

3.1.3 试剂

蛋白胶负染平衡液和显色液，完全弗氏佐剂，不完全弗氏佐剂（购自中国兽医药品监察所），TNT缓冲液，PBS-T缓冲液，CAPS缓冲液，蛋白变性缓冲液，牛奶封闭液，甘氨酸-盐酸洗脱缓冲液，1 M Na₃PO₄，TBS-T洗脱缓冲液，羊抗兔抗体稀释缓冲液，Zymed公司碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体（购自友谊中联公司），NBT/BCPIP（购自经科宏达公司），NBT/BCPIP底物缓冲液，BSA封闭液，包被液，p-NPP底物缓冲液，ELISA反应终止液

3.2 实验方法

3.2.1 抗体制备

- （1） 制备交链孢菌激活蛋白（简称 ActP），经检测其中总蛋白浓度约为 0.8 mg/mL。

- (2) 12%的SDS-PAGE凝胶电泳分离激活蛋白，恒流进行电泳，浓缩胶25 mA/gel, 30min，分离胶35 mA/gel, 5 h。电泳后将胶放于洁净容器中进行负染，先在超纯水中漂洗两次，用平衡缓冲液平衡10-15分钟，倾去平衡液，加入适量显色液反应30-40秒（不应超过45秒），倾去显色液，可见清晰的蛋白条带。
- (3) 凝胶负染切取 35 kD 蛋白条带(此蛋白简称为 ActP35)，胶条放入 Ependof 管中储存于 -80℃ 冰箱中备用。(Carlos Fernandez-Patron, 2002)
- (4) 取出胶条在研钵中液氮研磨，充分磨碎后，加入佐剂，首次免疫选用完全弗氏佐剂，以后两次注射均使用不完全弗氏佐剂，充分研磨。乳化程度的检测：将乳化后的液体滴于盛水的容器中，在水面上不扩散，成为油滴完整地停留在落下的部位为乳化完全。最终注射液中蛋白质含量约为 0.5 mg/mL。
- (5) 初次免疫：将兔保定于实验台上，用一只手抓住兔子的颈背部皮毛，另一只手托住兔的后腿及臀部，将兔仰卧束紧固定，使其后肢不能伸张，用 75%乙醇对兔大腿内侧进行消毒，在后肢大腿肌肉内进针大约 1 cm 深，将乳化好的蛋白液注射于兔大腿内侧肌肉，每条腿注射 0.5 ml。注：在注射前从准备实验的兔子耳部静脉采少量的血，分离血清作为后续实验的阴性对照。
- (6) 第二次免疫在初次免疫 1-2 周后进行，注射用蛋白液制备方法同（4），只是佐剂选用不完全弗氏佐剂。将兔俯卧保定于实验台上，将兔背部脊柱一侧皮毛捏起，使其与皮下肌肉之间产生一定的空隙，用注射针头全程穿刺，进入皮下，小心不要刺入肌肉组织中，注入乳化好的蛋白液，一般在兔背部脊柱两侧选取六个点，每个点注射 0.5 mL。(林清华, 1999)
- (7) 第三次免疫在第二次后 2 周进行，方法同（6）。
- (8) 末次注射 1 周后，从兔子耳部静脉采少量的血，分离血清检测效价，Western 检测抗血清效价，抗血清稀释倍数为 400x、800 x、1600 x、2400 x，设立阴性血清对照，酶标羊抗兔稀释 2500x；同时用 1600x 稀释的抗血清和大肠杆菌蛋白进行 Western 杂交。方法同 3.2.3.2。检测效价合格后，可以大量采血。
- (9) 首先采用耳静脉取血，如果所得血量较少则再进行心脏取血，每只兔子可得到 100-150mL 血液。
 - a) 耳静脉取血：将兔固定在固定架上，使其耳伸出，用凡士林涂抹一侧耳朵，用 75%乙醇清洁消毒此侧耳朵，然后将兔耳置于热灯之下，用手指轻轻的拍打兔耳，1~2 min 后待兔耳上的血管充分的充盈，从兔耳血管的前端开始取血，用一消过毒的解剖刀的锋尖迅速划一长约 0.5 cm 的小口，收集兔血于 50 mL 的塑料离心管中，至伤口不再流血为止，在距此伤口向后 1 cm 处再次划一小口，方法同上。使兔血直接落入管中，以避免发生溶血。
 - b) 心脏取血：将耳静脉取血后的兔仰卧固定于手术台上，剪去左胸心脏部位的兔毛。用碘酒棉球和酒精棉球消毒局部皮肤，用手触摸由下向上数第 3~4 肋间，选择心跳最明显处进针，进针部位一般为第三肋间腔，胸骨左缘 3 mm 处。针头接近心脏感觉其心跳，此时针头向里插入少许即进入心室。刺入心脏后血液会因心博的力量自然进入注射器，徐徐抽取血液。取血完毕，取下针头，将血轻轻注入 50 mL 塑料离心管中，避免发生溶血。

- (10) 分离抗血清：将盛有血清的离心管室温静置 2-3h，待血液完全凝固后，4℃，3000 rpm 离心 30min，小心吸取上清，分装保存，留少量血清在 4℃备用，其余血清储存于-20℃。

3.2.2 抗体的特异性纯化

斑点固相亲和层析技术是 Olmsted J.B. 1981 年提出的特异纯化抗体的方法，可一步完成制备、高特异纯化抗体。本实验结合常规亲和层析技术，改进方法，完成了抗血清的特异性的纯化。

- (1) 膜的准备：剪取 4×4 cm²的PVDF膜，完全浸入 100%的甲醇中 15 sec，赶走膜中的所有的气泡。将膜转入超纯水中漂洗 2 min，接着将膜放入PBS-T缓冲液中平衡 15 min，取出膜置于一个干净的 9 cm培养皿中，待其表面溶液挥发掉后可以进行下一步实验，注意只是膜表面没有溶液，膜本身还是湿润的，并且在整个操作过程中始终要保持膜的湿润。
- (2) 将制备好的 ActP 蛋白溶液，浓度约为 0.8 mg/mL，加入 1/10 体积的蛋白变性缓冲液，混匀后加热 5 min，待其冷却到室温，将 300 μL 处理好的蛋白液均匀涂布到膜上，待其表面变干，将膜翻转，用相同方法涂上蛋白液。
- (3) 将膜放入足量的新鲜配置的牛奶封闭液中，室温下缓慢摇动 15 min，放入 4℃冰箱中，封闭 2 h 以上。
- (4) 将膜取出，转入 20%的抗 ActP35 蛋白的抗血清稀释液（用牛奶封闭液稀释），室温下缓慢摇动 30 min，放入 4℃冰箱中，反应过夜。
- (5) 将膜放入干净的培养皿中，用 PBS-T 缓冲液漂洗 4 次，在室温下摇动，每次 20 min。
- (6) 取出膜，将其剪碎，装入离心管中，加入 1 mL 甘氨酸-盐酸洗脱缓冲液，剧烈振摇 1 min，吸出缓冲液，立刻加入 52 μL 的 1 M Na₃PO₄溶液。再重复用甘氨酸-盐酸缓冲液洗两次。
- (7) 再用 TBS-T 洗脱缓冲液，漂洗三次，每次使用 1 mL 缓冲液，1 min/次。

3.2.3 抗体特异性检测

首先使用斑点免疫杂交检测是否得到目的抗体，接着用 Western-Blotting 检测纯化后抗体是否还与大肠杆菌蛋白发生交叉。

3.2.3.1 斑点免疫杂交检测抗体

- (1) 剪取适当大小 PVDF 膜，处理方法同 2.2 (1)。
- (2) 将抗 35 kD 未处理的抗血清和提纯之后的抗体溶液各取 1 μL 点到膜上，待溶液挥发后，将膜放入牛奶封闭液中封闭方法同 2.2 (3)。
- (3) 封闭后用 PBS-T 缓冲液漂洗 2 次，加入 2500×稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体溶液 10 mL，轻摇 15 min 后，室温下静置 45 min。
- (4) 用 PBS-T 缓冲液漂洗 3 次，每次 15 min，将膜放入底物缓冲液 20×稀释的 NBT/BCPIP 溶液中，轻轻摇动进行显色，显色完成后用大量的水冲洗膜终止反应。

3.2.3.2 Western-Blotting 检测抗体特异性

- (1) 制备大肠杆菌蛋白。取 1 mL 饱和的大肠杆菌培养液，13000 rpm 离心 2 min，弃上清，加入 24 μ L 超纯水重溶沉淀，加入 6 μ L 5 \times 变性样品缓冲液，充分混匀，100 $^{\circ}$ C 加热 5-10 min，12000 rpm 离心 10 min，取上清用于 SDS-PAGE 上样。
- (2) ActP 蛋白中加入 5 \times 变性样品缓冲液，100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min，每孔上样量为 25 μ L。
- (3) 制备 SDS-PAGE 胶进行电泳，方法同第二章
- (4) 电泳结束后取下凝胶，先用超纯水冲洗两次后，再放入 CAPS 缓冲液中平衡 15 min。
- (5) 用超纯水洗净半干转膜仪的正负电极，并将其晾干备用。
- (6) 取 2 张加厚型转膜专用滤纸（将滤纸剪为稍大于凝胶），放入 CAPS 缓冲液中浸泡，作为正负极滤纸。
- (7) 根据胶的大小剪取合适大小的 PVDF 膜，完全浸入 100% 的甲醇中 15 sec，将膜放入超纯水中漂洗 2 min，接着将膜放入 CAPS 缓冲液中平衡 15 min。
- (8) 将正极滤纸平放于电转仪正极的适当位置，用干净的玻璃棒在滤纸上轻滚除去滤纸内的气泡。平衡好的 PVDF 膜置于滤纸上合适的位置，除去膜与滤纸之间的气泡。将平衡后的胶置于 PVDF 膜上，除去胶与膜间的气泡。将负极滤纸平铺与胶上，除去气泡（存在气泡会使电流不均匀，影响转膜结果）。
- (9) 盖上电极盖，连接好电源，20 V 恒压 45 min，停 15 min，再进行 20 V 恒压 45 min。
- (10) 将 PVDF 膜置于含有封闭液的培养皿中，牛奶封闭液的用量以覆盖 PVDF 膜为宜，室温封闭 2 h。
- (11) 用 PBS-T 缓冲液漂洗膜两次，加 400 \times 稀释纯化的抗 ActP35 的抗体溶液（用牛奶封闭液稀释），室温下缓慢摇动 30 min，放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱中，反应过夜。
- (12) 用 PBS-T 缓冲液漂洗三次，每次 15 min，加入 2500 \times 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体溶液 10 mL，轻摇 15 min，室温下静置 45 min。
- (13) PBS-T 缓冲液漂洗三次，每次 15 min，将膜放入底物缓冲液 20 \times 稀释的 NBT/BCPIP 溶液中，轻轻摇动进行显色，显色完成后用大量的水冲洗膜终止反应，膜取出晾干保存。（E. 哈洛，2002）

3.2.4 间接 ELISA 测定抗体

- (1) 用包被液将 ActP 蛋白稀释至 50 μ g/mL，酶标板每孔加 150 μ L，用保鲜膜封板，置 4 $^{\circ}$ C 过夜，次日倾去孔内液体，用 PBS-T 缓冲液漂洗三次，每孔加入 250 μ L，每次 1.5 min，将酶标板倒扣在滤纸上，以除净液体。
- (2) 每孔加入 200 μ L BSA 封闭液，保鲜膜封板，置湿盒中，37 $^{\circ}$ C 恒温 60 min，倾去孔内液体，按上法洗涤 3 次。
- (3) 加入纯化的抗 ActP35 的抗体按倍比稀释法用 PBS-T 缓冲液稀释（1:100、1:200、1:400、1:600、1:800），PBS-T 缓冲液（阴性对照）将稀释好的溶液各 100 μ L 加入对应的孔中，保鲜膜封板，置湿盒中，37 $^{\circ}$ C 恒温箱 2 h，使抗体与固相抗原进行特异性结合，倾去孔内

- 液体，按（1）洗涤 4 次，每次 5 min。
- （4）稀释 2500× 的碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体溶液各 100 μ L，保鲜膜封板，置湿盒中，37℃ 恒温箱 1 h，倾去孔内液体，按（1）洗涤 4 次，每次 5 min。
- （5）加入新鲜配置的 p-NPP 反应液（用底物缓冲液溶解 p-NPP 终浓度为 1 mg/mL），每孔加入 150 μ L，保鲜膜封板，置湿盒中，37℃ 反应 30 min，取出后加入 100 μ L ELISA 反应终止液，终止反应。
- （6）酶标板放入酶标仪中进行检测，采用 405 nm 和 650 nm 双波法进行检测。

3.3 结果及分析

3.3.1 抗体制备结果

抗 ActP35 的抗血清对 ActP 蛋白进行 Western 检测，如图 3-1 所示，阴性血清和 ActP 没有发生杂交，而制备的抗 ActP35 的抗血清在稀释到 2400x 时仍能 and ActP 蛋白中的 Actp35 有明显的杂交带。说明已获得高效价的抗血清，为特异性纯化抗 ActP35 抗体提供了材料。

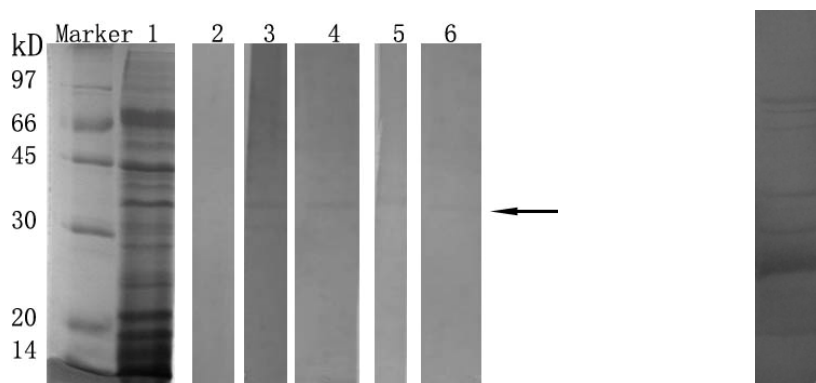


图 3-1 Western 检测抗血清效价

注：1 ActP 蛋白；2 阴性对照；3-6 为 400x，800x，1600x，2400x 稀释抗血清与 ActP 杂交

Fig.3-1 Western analysis of antisera

Note: 1 ActP; 2 negative antisera; 3-6 400x, 800x, 1600x, 2400x dilution antisera

图 3-2 抗血清和大肠杆菌蛋白 Western 杂交

Fig.3-2 Western analysis of the antisera and the protein of *E.coli*

用稀释 1600x 的 ActP35 蛋白抗血清直接和大肠杆菌蛋白进行杂交，如图 3-2，抗血清和大肠杆菌多个蛋白均有杂交，说明抗血清中含有抗大肠杆菌的抗体。交链孢菌 cDNA 表达文库使用的载体是大肠杆菌，如直接用抗血清进行免疫筛选，会造成背景过重，难于找到阳性克隆，因此要纯化抗血清，制备高特异性抗体。

3.3.2 特异性纯化抗体

3.3.2.1 斑点免疫杂交检测

兔抗血清和提纯后的抗体直接点到 PVDF 膜上, 使用酶标羊抗兔抗体来检测溶液中是否存在兔 IgG, 直观的显示了洗脱溶液中兔 IgG 的浓度, 反应了固相亲和纯化的效率。如图 3-1, 使用甘氨酸缓冲液, 得到较高浓度的抗体, 用 TBS-T 缓冲液也洗脱得到低浓度的抗体, 对比未纯化的抗血清, 其所含 IgG 浓度高于纯化后浓度, 使用 Gene tools 凝胶分析软件比较不同斑点颜色深度, 估测用甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱的抗体浓度平均约为抗血清的 10%, 用 TBS-T 缓冲液洗脱的抗体浓度约为原浓度的 2%。甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱得到的抗体浓度明显要高于 TBS-T 缓冲液, 低 pH 值缓冲液使抗原抗体发生较彻底的解离, 膜上抗原所吸附的抗体大部分被洗脱下来。使用 TBS-T 缓冲液只得到较低浓度的抗体, 可能是由于近中性的缓冲液不能促进抗体的解离, 只是起到漂洗的作用, 把那些已经解离, 非特异性吸附在膜上和管壁上的抗体漂洗了出来, 因此只得到了很低浓度的抗体。

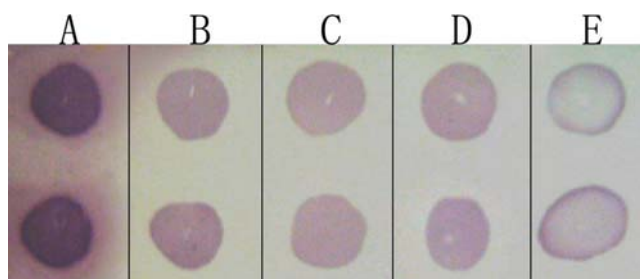


图 3-3 斑点杂交检测抗体

A: 未纯化的抗血清; B: 甘氨酸缓冲液第一次洗脱的抗体; C: 甘氨酸缓冲液第二次洗脱的抗体; D: 甘氨酸缓冲液第三次洗脱的抗体; E: TBS-T 缓冲液第一次洗脱的抗体

Fig.3-1 Dot-ELISA of antibodies purified

Note: A antiserum; B antibodies firstly harvest by glycine buffer; C antibodies secondly harvest by glycine buffer; D antibodies thirdly harvest by glycine buffer; E antibodies harvest by TBS-T

3.3.2.2 Western-Blotting 检测抗体特异性

电泳分离 ActP 蛋白和大肠杆菌蛋白, 将其转膜, 用纯化后的抗 ActP35 的抗体进行 Western 杂交, 结果如图 3-2, 纯化后的抗体和大肠杆菌蛋白没有任何杂交条带, 而和 ActP 蛋白只有一条杂交带在图上标注, 通过对比彩虹 Marker, 确定此蛋白为 ActP35。Western 杂交结果证明, 洗脱得到的抗体具有很高的特异性, 其不再和大肠杆菌存在交叉反应。证明这种纯化抗体的方法, 不但可以得到大量抗体, 而且保证了抗体的高特异性。

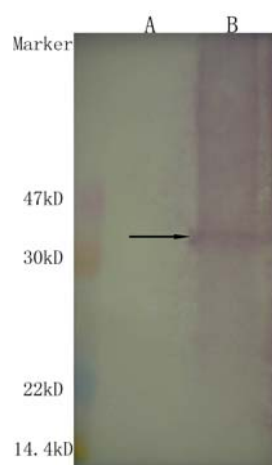


图 3-4 Western 检测纯化抗体特异性结果图

A: 大肠杆菌蛋白; B: 交链孢菌激活蛋白

Fig. 3-2 Western analysis of antibodies purified

Note: A the protein of *E.coli*. ;B activator from *Alternaria* sp.

3.3.2.3 间接 ELISA 测定抗体

特异性纯化抗体之后, 抗体效价有所降低, 因此抗体稀释倍数只选择了 1:100、1:200、1:400、1:600、1:800, 每个浓度重复 3 次, p-NPP 底物的特征吸光值为 405 nm, 选用 405 nm 和 650 nm 双波长来测定吸光值, 扣除由于酶标板等外界因素引起的误差。阴性对照 OD 值为 0.055, 表中数据均为扣除掉阴性对照后的数值。其中 1:100、1:200、1:400 三种稀释倍数差别不明显, 而当抗体稀释至 1:600、1:800 时吸光值降低明显。为了降低表达文库筛选时可能发生的抗体非特异性吸附, 因此选用阳性信号明显时的抗体最低稀释倍数 1:400。

表 3-1 间接 ELISA 测定纯化抗体效价

Table: Indirect ELISA analysis of antibodies

抗体稀释倍数	第一组	第二组	第三组	平均值
1:100	0.14	0.142	0.141	0.141
1:200	0.139	0.138	0.136	0.138
1:400	0.136	0.138	0.137	0.137
1:600	0.125	0.125	0.124	0.125
1:800	0.11	0.108	0.109	0.109

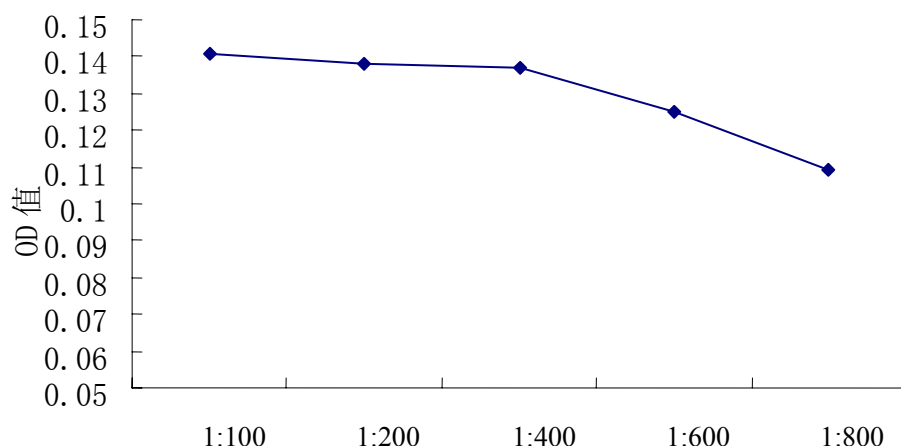


图 3-5 抗体效价曲线

Fig3-3 The curve of antibodies potency

3.4 讨论

由于普通实验兔体内存在大肠杆菌，因此制备的抗血清会和大肠杆菌发生严重的交叉反应，cDNA 表达文库采用大肠杆菌为宿主菌，直接用抗血清来进行文库筛选，背景信号过于强烈，很难区分阳性信号与背景信号。通常采用以下措施去除大肠杆菌背景信号：用饱和大肠杆菌破碎液与抗血清进行孵育，通过离心去除抗血清中抗大肠杆菌的抗体；筛选前先用长满空载体的膜与抗血清进行孵育，可以和大肠杆菌发生反应的抗体结合在膜上，用处理后的抗血清来进行免疫筛选文库；构建含有大肠杆菌蛋白的亲和层析柱，用抗血清过柱，得到只有针对目的抗原的抗体。前两种方法均进行了尝试，效果不明显，阳性信号与背景有一定差异但还是不能达到筛选的要求。

要得到高特异性抗体最好的方法是用抗原亲和纯化抗体。构建常规的亲和层析柱，需要大量高纯度的抗原蛋白。而在筛选 cDNA 表达文库时，人们通常没有大量高纯度的蛋白，因此进行这类实验较少选择此种抗体纯化策略。

斑点固相亲和层析技术是 Olmsted J.B. 1981 年提出，由 Smith DE 1984 年完善的纯化特异抗体的方法。此方法是将混杂的蛋白进行 SDS-PAGE 分离、转膜，用抗血清进行杂交，通过探针指示将含有目的蛋白膜剪下，用低 pH 的缓冲液把结合在目的蛋白上的抗体纯化出来，此方法不需要预先分离纯化特定的抗原，用混和的抗原和有交叉反应的抗血清，只通过一步就纯化出高特异性的抗体，缺点是由于电泳上样量限制和转膜效率问题，膜上结合的目的蛋白量很低，因此抗原接合的抗体总量受到限制，最终洗脱得到的特异性抗体的量也就很低，大大限制了此种方法的使用范围。由于进行表达文库的筛选不仅需要高特异性抗体，而且需要足够大量的抗体，本实验进一步改进方法，将未经进一步分离的 ActP 蛋白直接涂到高亲和力的 PVDF 膜上，大大提高膜上目的抗原的量，使其吸附更多的特异性抗体，用抗 ActP35 的抗血清与之反应，经过洗脱，纯化

出特异性抗体。经过检测大量获得了高特异性抗体，利于 cDNA 表达文库筛选工作顺利进行。

制备多克隆抗体时，通常人们会尽可能选用高纯度的抗原蛋白，因为从抗血清中分离特异性纯化抗体比较困难，但是如果具备从血清中分离抗体有效地方法，就可以使用两种或两种以上的抗原来免疫动物，一次性获得针对不同抗原的多种抗体。动物用超过两种抗原进行免疫，仍然能够产生针对每种抗原的高滴度的抗体。将其中一种蛋白涂到膜上，和混合的抗血清反应，就可以得到一定量的特异性抗体。这一方法使得通过一次动物实验，得到混杂的抗血清，它就像一个抗体库，可以通过特异性的纯化，迅速制备出高纯度的抗体，充分发挥了抗血清的价值，节约了大量的时间。

本实验同时还用未经进一步分离的 ActP 蛋白来免疫实验兔，得到了混合抗体，并使用纯化的 66 kD 的蛋白作为抗原，从抗 ActP 抗血清中纯化得到，高特异性的抗 66kD 蛋白的抗体。

第四章 交链孢菌 cDNA 文库免疫筛选和目的基因蛋白的纯化

交链孢菌激活蛋白核酸序列未知,因此用抗体探针筛选 cDNA 文库是获得目的基因的有效措施。本文以 ActP35 蛋白特异性抗体为探针,筛选 *Alternaria* sp.的 cDNA 表达文库,对疑似阳性克隆经多次复筛,最终获得 9 个阳性克隆。对其中确定的阳性克隆进行蛋白表达和纯化。为研究激活蛋白的生物活性,解析蛋白结构与功能奠定了基础。

4.1 材料和仪器

4.1.1 材料

Alternaria sp.的 cDNA 表达文库

抗 ActP35 蛋白特异性抗体

133 mm NC 膜

4.1.2 仪器

Amersham Biosciences AKTA -explore10 (GE 公司) 及 HiTrap Chelating HP, 1 ml 预装柱

半干转膜仪 (Bio-Red Trans-Blot® SD cell)

酶标仪 (GF-M2000)

高速冷冻离心机(Biofuge stratas Heraeus 公司)

冷冻干燥仪 (Biofuge stratas Heraeus 公司)

Mini Protean III 电泳槽 (Bio-Rad 公司)

HZQ-Q 全温振荡器(哈尔滨东联公司)

超声波破碎仪(SONics Vibro cell)

脱色摇床 Ts-800(中国科工卫仪器仪表公司)

85-I 恒温磁力搅拌器 (上海青浦泸西仪器厂)

4.1.3 试剂

TNT缓冲液, PBS-T缓冲液, CAPS缓冲液, 蛋白变性缓冲液, 牛奶封闭液, 甘氨酸-盐酸洗脱缓冲液, 1 M Na₃PO₄, 裂解液, TBS-T洗脱缓冲液, 羊抗兔抗体稀释缓冲液, Zymed公司碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体 (购自友谊中联公司), NBT/BCPIP (购自经科宏达公司), NBT/BCPIP 底物缓冲液, BSA封闭液, Binding Buffer, Elution Buffer

4.2 实验方法

4.2.1 *Alternaria* sp.菌 cDNA 表达文库免疫筛选

4.2.1.1 主板与膜的制备

- (1) 将硝酸纤维素滤膜(直径为 133 mm)用软铅笔编号, 用超纯水湿润后固定在两张 Bio-rad 3 MM 滤纸上之间, 高压灭菌;
- (2) 无菌平头镊子将灭菌硝酸纤维素滤膜放于含有 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin LB 平板上, 编号面朝下, 然后将滤膜移走, 倒转后重新放好, 编号朝上;
- (3) 取适量菌液, 稀释到 500 μl , 均匀涂在滤膜上, 尽量让边缘无菌落;
- (4) 37°C, 倒置培养 8-12 h, 直至出现极小的菌落(直径为 0.1 mm)。
- (5) 将一编号并已灭菌的滤膜与另一含有 Ampicillin LB 平板接触使之湿润;
- (6) 将第一张滤膜(长有菌落)转移到灭菌的 Bio-rad 3 MM 滤纸上, 菌落面朝上, 再将第二张膜对齐放在其上, 一经接触就不要移动滤膜, 再将另一灭菌的 Bio-rad 3 MM 滤纸放于滤膜上, 在滤纸上放空皿, 轻压, 使滤膜得到复印;
- (7) 当两张膜夹在一起时, 用针头做一系列有特定记号的定位孔; 将两张滤膜分别移到各自原来的 LB 平板上, 复印面朝上, 37°C, 倒置培养;
- (8) 重复 5-7 步直至所有的主滤膜复印完, 如有必要主膜可复印两次;
- (9) 主板培养 2-4 h, 4°C 保存, 复印板培养到菌落 0.5-1 mm 时, 移至含有 1 mmol/L IPTG、100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin LB 平板上, 28°C 诱导 4-10 h; 在化学通风橱中, 将诱导好的滤膜转移到密闭容器中, 用氯仿蒸 15 min;
- (10) 将滤膜转移至装有 20 ml 裂解液的平皿(直径 15 cm)中, 缓慢摇动(30-40 rpm), 室温裂解 12-16 h;
- (11) 滤膜转移到装有 TNT 缓冲液的平皿中, 室温缓慢摇动 20 min, 重复洗两次。

4.2.1.2 免疫生色法筛选目的基因(参考分子克隆)

- (1) 将滤膜移到装有 20 ml 牛奶封闭液的平皿中, 室温缓慢摇动 2 h;
- (2) 将滤膜移到装有 20 ml 400 \times 稀释纯化的 ActP35 蛋白抗体溶液(用牛奶封闭液稀释)的平皿中, 室温缓慢摇动 2 h;
- (3) 依次将滤膜放到下列每种缓冲液中洗涤 15 min,
 1. 20 ml 含 0.1%牛血清白蛋白的 TNT 缓冲液
 2. 20 ml 含 0.1%牛血清白蛋白和 0.1% NP-40(Nondidet P-40)的 TNT 缓冲液
 3. 20 ml 含 0.1%牛血清白蛋白的 TNT 缓冲液
- (4) 将滤膜放于用 10%小牛血清 TNT 缓冲液稀释 2500 \times 的二抗中室温缓慢摇动 90min;
- (5) 用 TNT 缓冲液洗 3 次, 每次 15 min;
- (6) 把 BCIP/NBT 用底物缓冲液稀释 20 \times , 取 20 ml 于平皿中, 将滤膜用纸巾轻轻吸干, 移至

- 其中，室温缓慢摇动，仔细观察直至滤膜中有紫色点出现，用蒸馏水清洗两遍作好记录；
- (7) 找出对应编号的主板，挑取紫色点所对应的菌落，即是阳性克隆。
 - (8) 将可疑阳性菌落用消毒牙签挑取，接种于液体LB培养基（AMP⁺）中，37℃ 250 rpm，振荡 3 h。将此菌落接种在LB平板（AMP⁺）上，37℃ 培养过夜。按以上方法继续筛选，直至得到一致的免疫阳性重组体。
 - (9) 提取筛选到的阳性克隆的质粒，PCR 和酶切检测，送上海生工测序，通过比对 ActP35 的氨基酸序列，确定一个阳性克隆。将此基因简称为 *actd-2*。

4.2.2 表达蛋白的亲层析纯化

用 Amersham Biosciences AKTA -explore10 蛋白纯化仪及其 HiTrap Chelating HP，1ml 预装柱进行纯化。

- (1) 将目的基因 *actd-2* 重组到 pET21 质粒载体上，重组质粒转化到感受态 BL21(DE3)中。
- (2) 重组菌接种于 Amp⁺ LB培养基中，28℃ 摇床培养(200 rpm)待OD600 为 0.6 左右时，加入 IPTG至终浓度为 0.5 mmol/L，28℃ 开始诱导，诱导 4 小时。
- (3) 离心收集菌体，并取培养液浓缩后待测，超声波裂解菌体，功率 300 W 超声 9.9 sec，间歇 9.9 sec，工作 30 次。750 g，30 min 离心去掉未破细菌，上清经 12000 g，30 min 高速离心后，分离上清和沉淀。表达蛋白在上清液中。
- (4) 将菌体超声破碎后的上清液 13,000 rpm 离心 10 min，取上清备用。注：所有缓冲液均须用 0.22 μm 孔径的滤膜真空抽滤。
- (5) 用 10 倍柱体积的超纯水，流速 1 mL/min，设置报警压力为 0.3 MPa，除去柱子中的酒精储存液。
- (6) 用 1 mL上样环上 1 mol/L NiSO₄溶液 1 mL，用超纯水作缓冲液，上样流速 0.5 mL/min。上样之后用水以 1 mL/min的流速除去柱内没结合的NiSO₄。
- (7) 用 10 倍柱体积的 Binding Buffer 平衡柱子，流速 1 mL/min，用上样柱上样，每次上样 1 mL，流速 0.8 mL/min，连续上样 5 次。
- (8) 用 80%的 Binding Buffer 与 20%的 Elution Buffer 的混合溶液，进行洗脱，流速 1mL/min，收集洗脱峰。
- (9) 等待紫外吸光值回到上样前的数值时，用 100%Elution Buffer 洗脱，流速 1 mL/min，待紫外吸收值稳定后，用 Binding Buffer 平衡柱子，此时可以进行下一次上样，也可用超纯水平衡后，使用 20%的无水乙醇来保存柱子。
- (10) Western-Blotting 检测纯化蛋白，用已知含有 6His 标签 72 kD 的融合蛋白作阳性对照，一抗使有天为时代公司的抗 6His 标签的鼠单抗（1500×稀释），二抗是购自鼎国公司的羊抗鼠（2000×），操作方法同第三章。

4.3 结果与分析

4.3.1 免疫筛选 *Alternaria* sp.菌 cDNA 表达文库

由于使用高特异性抗体进行免疫选，膜上的阳性克隆易于区分，非特异性大肠杆菌基本没有显色。图 4-1 为其中一张筛选结果，此张膜上只有两个阳性斑。筛选约 150000 个克隆，得到 180 个可疑阳性斑，经过多次复筛，最终得到 9 个阳性克隆。

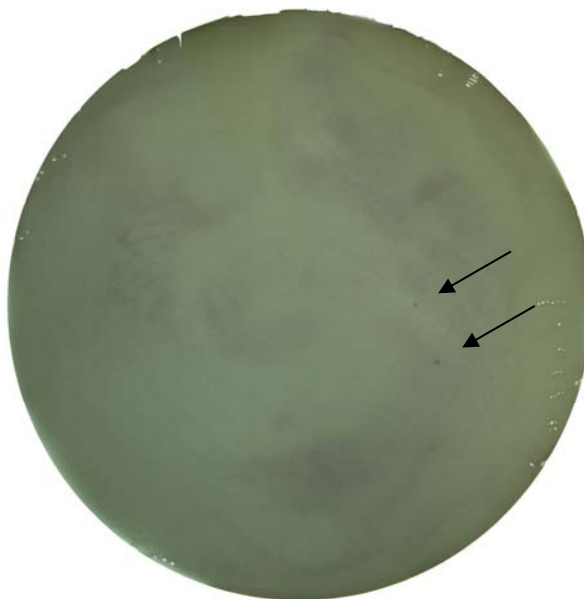


图 4-1 免疫生色反应筛选 cDNA 表达文库

Fig4-1 immunological screening of the cDNA expression library

对阳性克隆测序，翻译成蛋白质序列后与 AtcP35 蛋白经质谱鉴定所得肽段序列进行比较，有一个克隆序列与其有较高的同源性。将该克隆所含基因序列简称为 *actd-2*，含有 882bp，翻译成蛋白分子量约为 32kD，此序列为：

```
ATGCAAGTCGGGCGTTGTATACCTCACAAATCGACGGAGGAGCTCCCCGAGGAGGAGA
TGATCTACCTCCCCGTCACCCCAACACCACAACCTCCAATCCTTCGCCGTACCCATCCTCAAC
GTCACAGATTCCCGCGTAACAGCACCCCTGGTTCGGCCACTCCCGCAACGAGAAGAAGGCTC
GCAAGGCCATTGCAAATAAATGGGAAGCCATCATCCAGCCCGTCCAAGGTGGCGGCATACC
ACCGCAGCACGCCGAGCTAGACCTGGTCACCCTCCGCCGCCCCAAGAACATTCTCTTCGTC
ATTGTCATGGAGTTCAAGGAAGGCGGCGGTTGCGACTTCGCAAGCATATTCGAGCGGTTAAA
GGAGCGGTTACGGCAAGCTGTTGAGGTAGCGGTCTTCGGTGAGGCTAAGATTGAGCGGGAG
AGTGGTGGTGACATGGAAGATGGAAGCAGAGGCGTTGGCGGTGTCAACATGAACAACGTA
CACCTGGAAGACCTACCTGCATACGAGGAGAGCAGACAACACGCCAGAGTTCCAGAGCCT
CCTCTTAGCCCGCCGTTGGATGGTTCTGCATTTGGTACCGGCGGTCTGTTATTGCGGCACCC
```

ACGCCATCAAGCCCACAAGCATCCAGTCCGTTATCGAGCCCGCGAACACAACAGGAGCATT
TTGAGCCTCCGTCAGACCCACCGCCAGGATATGAGGAGGTTTCAGAGAGGTAGCATTGCAGA
CGAACTGGAGAGACAGGTGATGAATAATCCATGGCAGGAAGAGGAAAAGGACATCGAGGC
AAGGCGGGCCGAAGAATATTTTCATGATGAGAACGACAACGATATCGTCAACTCCATCATGT
AGATGGATGTGTTTGAGCAGGGCGTTTGA

4.3.2 基因表达蛋白的纯化

actd-2 基因的表达蛋白带有his标签, 可以用螯合有镍离子的亲和层析柱来进行纯化。如图 4-2 所示, 穿透峰中有多条杂带, 洗脱液中咪唑浓度达到 100 mmol/L, 可以将结合在柱上的表达蛋白洗脱出来。用抗 (His)₆ 单抗对纯化蛋白和穿透峰进行 Western 检测, 用已知 72 kD 含 (His)₆ 的融合蛋白作为阳性对照。如图 4-3, 洗脱峰中所含的蛋白含有 His 标签为表达蛋白, 穿透峰中的蛋白均没和抗体杂交, 阳性对照纯度不高, 且在 4℃ 储存时间较长发生部分降解, 因此除特异性的 72 kD 位置有杂交带外, 在泳道内还出现了多条杂交带。

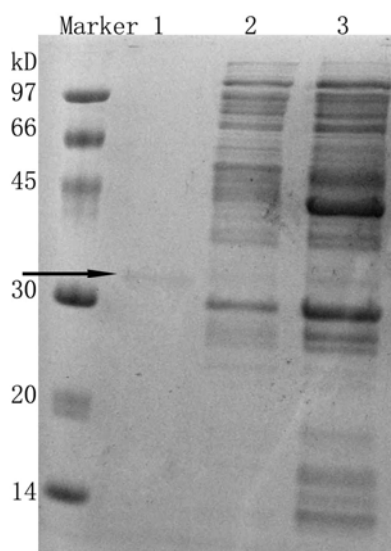


图 4-2 纯化表达蛋白结果图

注: 1 为 100mM 咪唑洗峰; 2 为穿透峰; 3 浓缩表达蛋白上清

Fig. 4-2 SDS-PAGE analysis of Actd-2 protein purified by affinity chromatography

Note: 1 wash Actd-2 protein with Elution buffer 100mM imidezole; 2 filtrate proteins through column;

3 concentrate dissoluble protein

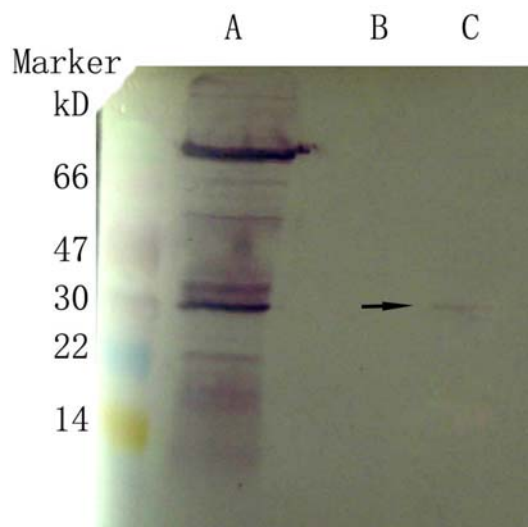


图 4-3 Western 检测纯化蛋白结果

注：A 为 72kD 带 His 标签的阳性对照蛋白；B 为穿透峰；C 为 100mM 咪唑洗峰

Fig. 4-3 Western blotting of purified proteins with His-tags.

Note: A .positive control-72kD protein with His-tag; B. filtrate proteins through column; C wash *actd-2* protein

4.4 讨论

为了得到激活蛋白的核酸序列，成功地构建了 *Alternaria* 菌 cDNA 表达文库，希望从中筛选到激活蛋白的 cDNA 序列。在现有的技术条件下，通常采用的一种策略是，以一个已知的分子作为探针，通过检测在特定条件下文库中与探针发生相互作用的基因序列或其编码的表达产物，从而分离出目的基因。常用的探针可分为两类：核酸探针和抗体探针。抗体探针是获得未知基因的基本途径，可以直接用于分离产生目的蛋白质的重组克隆。对于寻找蛋白基因结构及氨基酸序列未知的新基因，应采用能够与表达产物发生特异性结合的抗体筛选基因的方法。

多种因素会影响表达文库的筛选，如：蛋白质表达量、抗体特异性、NC 膜的选择、去污剂等。其中最为重要的就是抗体的特异性，这一因素将直接决定文库筛选的成功与否，在第三章中重点讨论了抗体纯化的方法，用此抗体进行免疫筛选，阳性信号强度很高，同时保证了很低的背景，对比常规方法处理的抗体，每张膜上阳性克隆数量明显要低。由于膜上菌落密集，为防止漏掉阳性克隆，将膜上阳性斑对应位置的多个克隆挑出共同进行复筛，经过多次复筛得到 9 个阳性克隆。其中一个克隆测序所得核酸序列翻译成氨基酸序列和已知的 ActP35 蛋白质谱测定所得肽段序列有较高相似性。因此选择该克隆进行表达纯化。

实验选用 pET21 质粒载体，在 BL21(DE3) 中表达 *actd-2* 基因。表达融合蛋白 C 端为载体本身所带的 His-tags 氨基酸，带有 (His)₆ 标签的表达蛋白通常采用螯合镍离子的亲和层析进行纯化。

蛋白质纯化方法中，亲和层析可以实现一步将目的蛋白纯度达到 90% 以上。以凝胶作为载体，通过偶联配基与二价金属离子螯合制成螯合吸附剂，用于分离纯化蛋白质，此方法称为金属螯合亲和层析。蛋白质中的组氨酸咪唑基和半胱氨酸巯基在接近中性的水溶液中可与锌、铜等离子形成较稳定的络合物，因此螯合有锌、铜离子的凝胶可以选择性吸附含咪唑和巯基的蛋白质（余瑞

元 et al., 2005)。蛋白质和凝胶结合的强度取决于蛋白质上含咪唑和巯基的氨基酸的数量和密度以及所选用金属离子的类型。

本实验用 AKTA -explore10 及其 HiTrap Chelating HP 预装柱纯化表达的蛋白。通过摸索发现在上样缓冲液中加入 10 mM 的咪唑，可以降低蛋白质和镍离子的结合效率。表达蛋白带有 6 个连续的 His，与镍离子的结合能力高于天然存在的蛋白。因此上样缓冲液中加入低浓度的咪唑，可以减少样品中非表达蛋白挂柱，提高了洗脱蛋白的纯度。溶液中咪唑可以和蛋白竞争结合镍离子，提高溶液中咪唑的浓度就可将表达蛋白从柱上洗脱下来。经过梯度洗脱发现，洗脱液咪唑浓度为 100 mM 可以将表达蛋白全部洗脱下来。

第五章 利用抗体免疫杂交技术研究交链孢菌激活蛋白与植物蛋白的互作

Far Western Blotting 是一种研究未知蛋白相互作用的方法。本文用交链孢菌激活蛋白与拟南芥蛋白进行 Far Western Blotting 检测技术, 分析激活蛋白与拟南芥的相互作用。为进一步研究激活蛋白的作用机理奠定了基础。

5.1 材料和仪器

5.1.1 材料

野生型拟南芥

交链孢菌激活蛋白抗体

5.1.2 仪器

高速冷冻离心机(Biofuge stratas Heraeus公司)

Mini Protean III电泳槽 (Bio-Rad公司)

PROTEANII xi Cell (Bio-Rad公司)

半干转膜仪 (Bio-Red Trans-Blot® SD cell)

5.1.3 试剂

PBS-T缓冲液, CAPS缓冲液, 蛋白变性缓冲液, 牛奶封闭液, 甘氨酸-盐酸洗脱缓冲液, 1 M Na_3PO_4 , PBS-T洗脱缓冲液, 羊抗兔抗体稀释缓冲液, Zymed公司碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体 (购自友谊中联公司), NBT/BCPIP (购自经科宏达公司), NBT/BCPIP底物缓冲液

5.2 实验方法

5.2.1 拟南芥叶片蛋白提取

- (1) 称取适量拟南芥叶片, 将提取缓冲液进行冰浴备用。
- (2) 将植物叶片放入研钵中加液氮进行研磨, 研磨后加入提取缓冲液, 每 1 g 加入 3.5 mL 提取缓冲液, 在冰上静置 3-4 h。
- (3) 用离心机 8000 rpm, 4℃离心 40 min。
- (4) 取上清分装-20℃保存。(Roger J.Fido et al., 2004)

5.2.2 Far Western Blotting 检测

- (1) SDS-PAGE 分离拟南芥蛋白，具体操作同第三章 2.3.2。
- (2) 半干转膜，封闭后，加入用封闭液稀释的 ActP 蛋白（终浓度约为 0.1 mg/mL），4℃反应过夜，设立阴性对照（只加封闭液）。
- (3) 漂洗后，加入 800×稀释的抗 ActP 蛋白的抗血清，4℃孵育 4 h 以上。
- (4) 二抗采用 2000×稀释的碱性磷酸酶标的羊抗兔，室温下反应 1 h。
- (5) 以 20×稀释的 NBT/BCPIP 为底物进行显色，大量水冲洗终止显色反应。
- (6) 从胶上切取显色带对应位置的蛋白，进行质谱鉴定。

5.2.3 拟南芥结合抗体的分离

- (1) 拟南芥蛋白液中加入 1/10 体积的蛋白变性缓冲液，100℃加热 5 min。
- (2) 将其涂于处理好的 PVDF 膜上，并进行封闭，方法同第三章 2.2。
- (3) 用 20%浓度的 ActP 蛋白的抗血清，4℃孵育过夜。
- (4) 漂洗 4 次后，用甘氨酸-盐酸缓冲液洗脱抗体。

5.2.4 抗体鉴定

- (1) ActP 蛋白进行 SDS-PAGE 分离，转膜，封闭。
- (2) 一抗为 100×稀释的用拟南芥蛋白分离纯化的抗体，4℃孵育过夜。
- (3) 二抗采用 1500×稀释的碱性磷酸酶标的羊抗兔，室温下反应 1 h。
- (4) 以 20×稀释的 NBT/BCPIP 为底物进行显色，大量水冲洗终止显色反应。
- (5) 质谱鉴定显色带对应的蛋白带。

5.3 结果及分析

5.3.1 拟南芥叶片蛋白提取

如图 5-1 所示，SDS-PAGE 电泳分离拟南芥蛋白，条带清晰，样品中杂质少，没有脱尾等现象，样品符合要求可进行下一步分析。

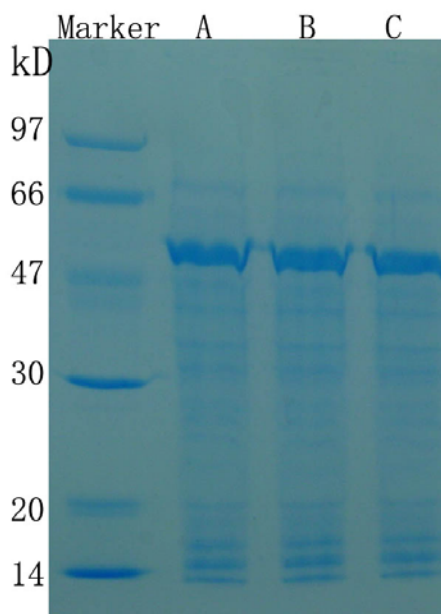


图 5-1 制备拟南芥蛋白电泳检测

Fig. SDS-PAGE analysis of obtain protein of *Arabidopsis thaliana*,

5.3.2 Far Western Blotting 检测

提取拟南芥叶片蛋白，电泳、转膜后，用 ActP 蛋白，与之反应，再用抗 ActP 蛋白的抗体来检测是否有蛋白与膜上的蛋白发生结合，如图 5-2，加入激活蛋白和阴性对照均出现杂交带，且显色时间和显色亮度均相似，其中拟南芥蛋白在 55 kD 和 60 kD 有两条杂交带，55 kD 位置上的杂交带很宽，而 60 kD 的杂交带很窄。经过长时间显色反应，杂交膜的其它位置未见显色。

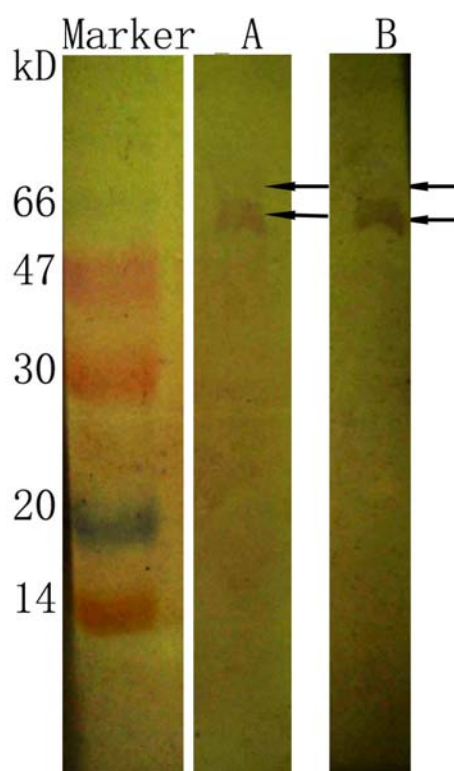


图 5-2 激活蛋白 ActP 和拟南芥蛋白 Far Western Blotting 检测结果

注：A 膜经过植物激活蛋白 ActP 孵育；B 所在膜未经激活蛋白 ActP 处理为阴性对照

Fig: Far Western Blotting analysis of activator ActP and the protein of *Arabidopsis thaliana*

Note: A: incubate with activator ActP ; B incubate with blocking buffer- negative control

处理组和阴性对照均出现杂交带，阴性对照与处理的杂交条带位置相同且亮度一致，因此基本可以确定结合条带不是植物激活蛋白 ActP 在植物上的受体蛋白。抗植物激活蛋白 ActP 抗体和拟南芥蛋白有两条杂交带，其中 55 kD 位置条带很宽，抗体在此位置结合可能是由于非特异性吸附，而 60 kD 左右的杂交带极为细小，抗体非特异性结合在此位置上的可能性极低。推测 ActP 蛋白抗体中含有某些可以特异性识别植物蛋白的抗体。

5.3.3 质谱鉴定杂交条带

从 SDS-PAGE 胶上切取于对应膜上 55 kD、60 kD 杂交带位置的蛋白条带经质谱鉴定，如图 5-3，两条带内的蛋白均为 1,5-二磷酸核酮糖羧化氧化酶（RuBPCase），此酶是植物光合作用的关键酶。

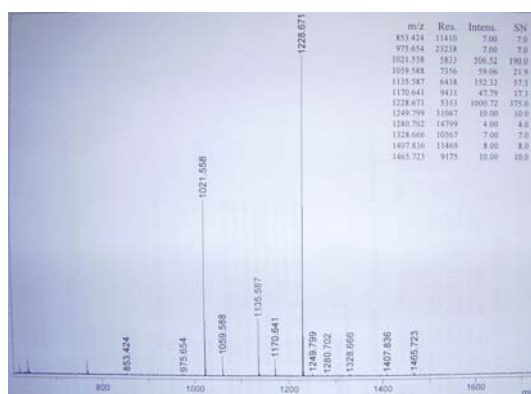


图 5-3 拟南芥中杂交带对应蛋白的肽指纹图谱

Fig.5-3 the Peptide mass fingerpringer of the protein of *Arabidopsis thaliana*,

5.3.4 拟南芥蛋白纯化抗体的鉴定

为了确定交链孢菌激活蛋白中哪个蛋白的抗体和 1,5-二磷酸核酮糖羧化氧化酶发生结合, 利用拟南芥蛋白亲和纯化出特异性的抗体, 用此抗体对 ActP 蛋白进行 Western 检测。如图 5-4, 只在 35 kD 位置发生反应, 质谱鉴定确认此蛋白为 ActP35, 杂交结果说明纯化的抗体中主要含有抗 ActP35 蛋白的抗体。抗体和抗原之间的结合有很高的特异性, 抗体可以特异识别抗原上约 5-7 个氨基酸的抗原决定簇, 因此认为 ActP35 蛋白含有与 1,5-二磷酸核酮糖羧化氧化酶相同或相似的抗原决定簇。

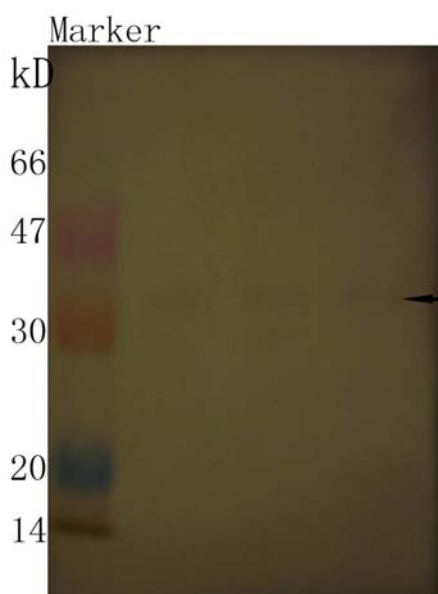


图 5-4 用拟南芥纯化抗体 Western 检测激活蛋白 ActP

Fig. the antibodies purified by *Arabidopsis thaliana*, and Western analysis of activator ActP using this antibodies

5.4 讨论

斑点叠加 (Blot overlay) 是研究蛋白质之间相互作用的常用方法 (Randy A. Hall, 2004)。这一技术包括蛋白质片段经 SDS-PAGE 分离, 转移到 NC 或 PVDF 膜上, 再用目的物与其进行孵育, 加入物质带有特异性探针。探针可以用同位素、素生物素标记的蛋白, 或者直接就是此蛋白的特异性抗体。使用特异性抗体进行检测, 此方法通常称为 Far western blot。很多蛋白质之间的相互作用有赖于蛋白的二级或三级结构, 在蛋白变性条件下, 这种相互作用将被破坏。但是又很多蛋白质之间的相互作用, 在其中一方蛋白变性、进行 SDS-PAGE 电泳或进行免疫印迹时依然存在。例如, Minoru Tamura 等利用 Far western blot 方法研究肌动蛋白在 NADPH 氧化酶上的连接位点 (Minoru Tamurae *et al.*, 2006)。

1,5-二磷酸核酮糖羧化氧化酶是植物光合作用中的关键酶, 其催化卡尔文循环中的第一步反应-CO₂的固定, 使RuBP与CO₂形成二分子 3-磷酸甘油酸; 该酶也同时催化光呼吸作用的第一步, 使 RuBP与O₂反应生成一分子磷酸甘油酸、一分子磷酸和一分子磷酸乙醇酸。因此, RuBP羧化氧化酶是处于光合碳还原和碳氧化二个方向相反但又相互连锁的循环交叉点上, 它对净光合率起着决定性的影响, 是光合碳同化的关键酶 (田秀英, 2000)。RuBP羧化氧化酶存在于叶绿体间质中, 它构成叶子 50% 以上总可溶性蛋白, 是地球上最为丰富的一种蛋白质, 也是地球上唯一可从空气中取得CO₂的酶。RuBP羧化氧化酶的分子量为 560 kD, 由 8 个大亚基 (56 kD) 和 8 个小亚基 (14 kD) 组成, 大亚基由叶绿体基因编码, 小亚基由细胞核基因编码, 大亚基起催化作用, 小亚基起调控酶活性作用 (向太和, 2005)。RuBP羧化氧化酶具有一定的耐热性, 不同植物纯化得到的RuBP羧化氧化酶耐热性存在差异, 菠菜RuBP羧化氧化酶氨甲酰化后, 在 60℃ 的 10 mmol/L DTT处理 1 h其活力还维持 50%。

同一种抗体即可以特异性识别 ActP35, 又可识别拟南芥中的 1,5-二磷酸核酮糖羧化氧化酶, 这种现象极有可能是由于两种蛋白具有相同或相似的抗原表面决定簇。此两种蛋白都有耐热性, 可能存在着相似的氨基酸序列或高级结构 (冯仁青 *et al.*, 2006)。植物激活蛋白可以引起植物体内的一系列代谢调控改变, 促进植物根茎叶生长和叶绿素含量提高, 从而提高作物产量。用交链孢菌激活蛋白处理黄瓜检测发现 RuBP 羧化氧化酶活性 4 天和 8 天时明显高于对照 (韩晓光, 2004)。同时用植物激活蛋白处理水稻, 经基因芯片检测, RuBP 羧化氧化酶的基因发生上调。植物激活蛋白对植物发挥作用和 RuBP 羧化氧化酶有着密切关系, 同时特异的抗体能够和这两种蛋白发生交叉反应, 因此推测两种蛋白存在相同或相似的氨基酸序列或空间结构, 激活蛋白作用于植物, 可能是以 RuBP 羧化氧化酶的类似物或结合物的形式作用于植物, 有待进一步验证。

第六章 结论

- 6.1 改进交链孢菌激活蛋白提取缓冲液，应用双向电泳成功分离 ActP 蛋白，测定其 pI 为 4，建立了双向电泳分离激活蛋白的方法，为分离纯化激活蛋白奠定了基础。
- 6.2 制备了 ActP35 蛋白抗血清，通过改进纯化方法，亲和纯化获得特异性抗体，为高效筛选 cDNA 表达文库，提供了保障。
- 6.3 以特异性抗体为探针，筛选 cDNA 表达文库，经过初筛和复筛得到 9 个阳性克隆。测序后通过与已有蛋白质氨基酸序列比对，获得一个阳性克隆。利用亲和层析柱，纯化得到表达蛋白。
- 6.4 利用 Far Western、抗体特异性纯化等方法，证明 ActP35 蛋白含有与 1,5-二磷酸核酮糖羧化氧化酶相同或相似的抗原决定簇。对进一步研究植物激活蛋白作用机理具有参考价值。

参考文献

1. E.哈洛,D.莱恩 抗体技术实验指南 (沈关心,龚非力译). 北京 科学出版社,2002:165-187
2. F. 奥斯伯 精编分子生物学实验指南 (颜子颖,王海林译).北京 科学出版社, 2001: 363-364
3. 冯仁青,郭振泉,宓捷波,现代抗体技术及应用.北京 北京大学出版社,2006: 42-43
4. 郭尧君,蛋白质电泳实验技术 北京 科学出版社 1999: 180-181
5. 韩晓光,一种真菌蛋白促进黄瓜生长研究初探 衡水师专学报 2004 (6) 2: 38-40
6. 李汝刚,范云六. R—Avr 基因互作介导的植物抗病性.生物技术通报.1998.000(1):10~15
7. 李汝刚,范云六. 表达 Harpin 蛋白的转基因马铃薯降低晚疫病斑生长率.中国科学:C 辑 生命科学.1999,029(001): 56~61
8. 李汝刚,时光春,范云六. Harpin 蛋白基因的克隆及序列分析. 植物病理学报, 1998.28(3):281~286
9. 梁元存,刘爱新,商明清.激发子诱导植物抗性的作用机制.植物生理学通讯, 2001 ,37(5) :442~446
10. 贾红武,张双全,戴祝英.家蚕抗菌肽对 K562 白血病细胞的杀伤作用及对细胞超微结构的影响.蚕业科学, 1996, 22(4): 224-228.
11. 李乃坚,袁四清,蒲汉丽,周会光,戴冕,陈俊标,罗战勇,崔植琳,黄自然,李传瑛,陈凤珍.抗菌肽 B 基因转化烟草及转基因植株抗青枯病的鉴定.农业生物技术学报, 1998, 6 (2): 178-184.
12. 李文楚,黄自然.昆虫抗菌肽及其基因工程、转基因动物.广州: 广东科学技术出版社, 1996, 118-128.
13. 李艳琴,赵春贵. 能产生植物抗诱导蛋白 harpin 的自生固氮工程菌的构建.高技术通讯.2000, 10(7): 20~23
14. 林清华 免疫学试验 武汉 武汉大学出版社 1999: 33-44
15. 刘萍萍, 闰艳春.微生物农药研究进展. 山东农业科学,2005,2:78-8
16. 邱德文. 植物用多功能真菌蛋白质. 中国专利: ZL01128666, 2003-3-17
17. 向太和. 水稻 RuBPCase 小亚基基因(rbcS)全长 cDNA 的克隆和分析 浙江大学学报(理学版) 2005 (32) 3: 314—319
18. 孙维敏, 抗体纯化中亲和色谱配体的研究进展, 离子交换与吸附, 2005, Vol.21 No.3 P.283-288
19. 谭放军,徐泽安,尹文雅,丁杏芝 Harpin 蛋白研究及其应用 湖南农业科学 2003,(6) :38~40
20. 田秀英. RuBP 羧化酶/加氧酶的研究进展 重庆师专学报 2000 ,19 (3): 77-79
21. 王金生.分子植物病理学.北京:中国农业出版社, 1999
22. 闻伟刚,王金生. 水稻白叶枯病菌 Harpin 基因的克隆与表达 植物病理学报,2001,31(4): 295-300

23. 闻伟刚, 邵敏, 陈功友, 王金生. 水稻白叶枯病菌蛋白质激发子 Harpin_(Xoo)诱导植物的防卫反应. 农业生物技术学报 2003,2
24. 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社. 2000: 124-134
25. 谢丙炎, 朱国仁, 罗宽, 李宗道. 菌物系统, 1999, 18(2): 154~158
26. 余瑞元, 袁明秀等. 生物化学试验原理和方法 (第二版). 北京: 北京大学出版社. 2005
27. 喻子牛, 柯云, 刘子铎等. 微生物农药在病虫害可持续控制中的应用及发展策略. 北京: 科学出版社. 2000
28. 喻子牛主编. 微生物农药及其产业化. 北京: 科学出版社, 2000, 1~12
29. 张宏明, 蔡以滢, 陈珈. *Phytophthora palmi*分泌的 10.6kD 蛋白激发烟草的过敏反应. 植物学报, 1999, 41(11): 1183~1186
30. 章元寿. 植物病理生理学. 南京: 江苏科学技术出版社. 1996, 264
31. 赵利辉, 邱德文, 刘峥, 等. 植物激活蛋白对水稻抗性相关基因转录水平的影响. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1358-1363
32. Arlat A., Gijsegem F., Vail J.C., Huet J.C., Pernollet J.C., and Boucher C.A. 1994, PopA1, a protein which induces a hypersensitivity-like response on specific petunia genotypes, is secreted via the *Hrp* pathway of *Pseudomonas solanacearum* EMBO J. 13: 543~553
33. Akerstrom, B. and L. Bjorck. A physicochemical study of protein G, a molecule with unique immunoglobulin G-binding properties. Journal of Biological Chemistry 1986, 261(22): 10240-10247.
34. Akerstrom, B., T. Brodin, et al. Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. Journal of Immunology 1985 135(4): 2589-2592.
35. Askari, M., J. P. Alarie, et al. Application of an antibody biochip for p53 detection and cancer diagnosis. Biotechnology Progress 2001, 17(3): 543-552.
36. Banerjee, A., N. S. Srilatha, et al. Real-time kinetic analysis of hCG-monoclonal antibody interaction using radiolabeled hCG probe: Presence of two forms of Ag-mAb complex as revealed by solid phase dissociation studies. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects 2002, 1569(1-3): 21-30.
37. Barbas Iii, C. F., J. S. Rosenblum, et al. Direct selection of antibodies that coordinate metals from semisynthetic combinatorial libraries. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1993, 90(14): 6385-6389.
38. Bauer D W, Wei Z M, Beer S V, et al. *Erwinia chrysanthemi* HarpinEch: an elicitor of the hypersensitive response that contributes to soft-rot pathogenesis. Mol. Plant Microbe Interact, 1995, 8(4): 484~491
39. Boissy G, De La Fortelle E, Kahn R, et al. Crystal structure of a fungal elicitor secreted by *Phytophthora cryptogea*, a member of a novel class of plant necrotic proteins. Structure, 1996, 4: 1429~1439
40. Bourque S, Binet M-N, Ponchet M, et al. Characterization of the cryptogein binding sites on plant plasma membranes. J Biol Chem, 1999, 274: 34699~34705

41. Brown, N. L., S. P. Bottomley, et al. Affinity purification of human IgG using immobilised, mutated immunoglobulin-binding domains from protein A of *Staphylococcus aureus*. *Biochemical Society Transactions* 1998, 26(3).
42. Campbell, D. H., E. Luescher, et al. Immunologic adsorbents. I. Isolation of antibody by means of a cellulose-protein antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1951, 37: 575-578.
43. Carlos Fernandez-Patron Zinc-Reverse Staining Technique in: John M.Walker (eds) *The Protein Protocols Handbook* New Jersey Humana Press : 251-259
44. Cherednikova, T. V., V. I. Muronetz, et al. Evidence for the stabilizing effect of antibodies on the subunit association of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Molecular Immunology* 1981, 18(12): 1055-1064.
45. Cook C., *J. Biosci Bioeng.*, 2001, 91: 305~310
46. Dainiak, M. B., V. A. Izumrudov, et al. Conjugates of monoclonal antibodies with polyelectrolyte complexes - an attempt to make an artificial chaperone. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1998, 1381(3): 279-285.
47. De Chateau, M., B. H. K. Nilson, et al. On the interaction between protein L and immunoglobulins of various mammalian species. *Scandinavian Journal of Immunology* 1993, 37(4): 399-405.
48. Desai, M. A. and A. Lyddiatt Comparative studies of agarose and kieselguhr-agarose composites for the preparation and operation of immunoabsorbents. *Bioseparation* 1990, 1(1): 43-58.
49. Dong H., Delaney TP, Bauer DW. et al. Harpin induces disease resistance in *Arabidopsis* through the systemic acquired resistance pathway mediated by salicylic acid and the NIM1 gene. *Plant J.*, 1999, 20(2):207~215
50. Ebel J, Cosio E Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol* 1994, 148: 1~36
51. Fumiko TAGUCHI', Rui TANAKA', Sayuri KINOSHITA', Yuki CHINOSE*', Yoshiyuki IMURA', Salamah ANDI', Kazuhiro TOYODA', Tomonori SHIRAISHI' and Tetsuji YAMADA1. HarpinPSA from *Pseudomonas syringae* pv. *fabaci* Is Defective and Deficient in Its Expression and HR-inducing Activity *Gen. Plant Pathol.* 2001 , 67 : 116~123
52. Goding, J. W. Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent. *Journal of Immunological Methods* 1978, Vol.20: 241-253.
53. Goodman and Novacky, The Hypersensitive Reaction of Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon, St. Paul, MN: APS Press 1994, SA81:6024~6028
54. Goudswaard, J., J. A. Van Der Donk, et al. Protein A reactivity of various mammalian immunoglobulins. *Scandinavian Journal of Immunology* 1978, 8(1): 21-28.
55. Greenberg, J.T. Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 12094~12097
56. Hayat El-Maaroufa et al., Harpin, a hypersensitive response elicitor from *Erwinia amylovora*, regulates ion channel activities in *Arabidopsis thaliana* suspension cells *FEBS*

- 24867 FEBS Letters 497 (2001) 82~84
57. He S Y, Huang H C, Collmer A. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HarpinPss:a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants . Cell, 1993, 73(7) :1255~1266
58. Hirata, A. A. and D. H. Campbell The use of a specific antibody adsorbent for estimation of total antibody against bovine serum albumin. Immunochemistry 1965, 2(2): 195-205.
59. Holub E B et al., 1994.Mol.Plant-MicrobeInteract.,7:223~239
60. Houdebine L.M., Curr. Opin. Biotechnol 2002, 13(6): 625~629
61. Jack, G. W.). Immunoaffinity chromatography. Molecular biotechnology 1994, 1(1): 59-86.
62. Kamoun S, Young M, Glascock CB, et al. Extra-cellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. Mol Plant-Microbe Interact, 1993, 6:15~25
63. Kennel, S. J. Binding of monoclonal antibody to protein antigen in fluid phase or bound to solid supports. Journal of Immunological Methods 1982, 55(1): 1-12.
64. KohlerG, Milstein. Continuous cultures of fused cells secreting antibody predefined specificity. Nature, 1975, 256: 495.
65. Kurkijarvi, K. and T. Korpela Immobilization of aspartate aminotransferase on agarose. Biochimie 1989,71(4): 439-448.
66. Ljungberg, U. K., B. Jansson, et al. The interaction between different domains of staphylococcal protein A and human polyclonal IgG, IgA, IgM and F(ab')₂: Separation of affinity from specificity. Molecular Immunology 1993, 30(14): 1279-1285.
67. Minoru Tamura, Katsunori Itoh, Hiroshi Akita, Keiko Takano and Satoshi Oku, Identification of an actin-binding site in p47^{phox} an organizer protein of NADPH oxidase, FEBS Letters, 2006,580(1): 261-267
68. Muronets, V. I., T. V. Cherednikova, et al. Biochemistry (Moscow) 1981,46: 1731.
69. Muronetz, V.I., Korpela, T. Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2003,790 (1-2):. 53-66.
70. Newcombe A. R., J. Chromatogr. B, 2005, 814(2): 209~215
71. Olmsted J.B. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. J. Biol. Chem. 1981, 256:11955-11957.
72. Phillips, T. M., N. S. More, et al. Isolation and quantitation of serum IgE levels by high-performance immunoaffinity chromatography. Journal of Chromatography 1985,VOL. 327: 205-211.
73. Phillips, T. M., W. D. Queen, et al. Protein A-coated glass beads. Universal support medium for high-performance immunoaffinity chromatography. Journal of Chromatography 1985, VOL. 327: 213-219.

74. Randy A. Hall Studying Protein-Protein Interactions via Blot Overlay or Far Western Blot in: Haian Fu (eds) Protein-Protein Interactions Methods and Applications , New Jersey, Humana Press : 167-186
75. Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, MM Michel G, Pernollet JC. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. Eur J Biochem 1989, 183: 555~563
76. Richman, D. D., P. H. Cleveland, et al. The binding of staphylococcal protein A by the sera of different animal species. Journal of Immunology 1982, 128(5): 2300-2305.
77. Roger J.Fido et al., Protein Extraction From Plant Tissues in: Paul Cutlter(eds) Protein Purification Protocols, New Jersey, Humana Press : 2004
78. Sasso, E. H., G. J. Silverman, et al. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain V(H)III H chains. Journal of Immunology 1989, 142(8): 2778-2783.
79. Scott, M. A., J. M. Davis, et al. Staphylococcal protein A binding to canine IgG and IgM. Veterinary Immunology and Immunopathology 1997, 59(3-4): 205-212.
80. Smith, D.E. and Fisher, P.A. Identification, developmental regulation, and response to heat shock of two antigenically related forms of a major nuclear envelope protein in *Drosophila* embryos: Application of an improved method for affinity purification of antibodies using polypeptides immobilized on nitrocellulose blots. *J. Cell Biol.* 1984, 99: 20-28.
81. Smith, R. M., P. Yuan, et al. An approach to sequence-specific antibody proteases. The use of haptens mimicking both a transition state and a distorted ground state. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology 1994, 47(2-3): 329-342; discussion 342.
82. Song S. P., Li B., Hu J. et al., Anal. Chim. Acta, 2004, 510(2): 147~152.
83. Stoger E., Sack M., Fischer R., et al., Curr. Opin. Biotechnol. 2002, 13(2): 161-166
84. Stokes, D. L., G. D. Griffin, et al. Detection of *E. coli* using a microfluidics-based antibody biochip detection system. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry 2001, 369(1): 295-301.
85. Subramanian, A. Immunoaffinity chromatography. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology 2002, 20(1): 41-47.
86. Tawfik, D. S., R. R. Zemel, et al. Simple method for selecting catalytic monoclonal antibodies that exhibit turnover and specificity. Biochemistry 1990, 29(42): 9916-9921.
87. Terman, D. S., T. Tavel, et al. Specific removal of antibody by extracorporeal circulation over antigen immobilized in collodion charcoal. Clinical and Experimental Immunology 1977, 28(1): 180-188.
88. Tu Y., Chen C., Chang H., Food Research Inter. 2001,34 (9): 783~789
89. Tini M., Jewell U. R., Camenish G.,J. Comp. Biochem. Physiol. A , 2002, 131(3): 569~574
90. Vladimir I. Muronetz, Timo Korpela Isolation of antigens and antibodies by affinity chromatography Journal of Chromatography B,2003 ,790:53-66
91. Vidal, M. A. and F. P. Conde Human immunoglobulin m purification by affinity

- chromatography on protein A-sepharose. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1981, 4(3-4): 155-161.
92. Wang, R., B. Merrill, et al. A simplified solid-phase immunofluorescence assay for measurement of serum immunoglobulins. *Clinica Chimica Acta* 1980, 102(2-3): 169-177.
93. Wei ZM, Beer SV. Hrpl of *Erwinia amylovora* functions in secretion of Harpin and is a member of a new protein family. *J.Bacteriol.* 1993, 175:7958~7967
94. Wei Z M,Laby R J, Zumoff C H,et al. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, 1992,257(5066) :85~88
95. Werner, S. and W. Machleidt Isolation of precursors of cytochrome oxidase from *Neurospora crassa*: Application of subunit-specific antibodies and protein A from *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Biochemistry* 1978, 90(1): 99-105.
96. Wiley, J. P., K. A. Hughes, et al. Phenylboronic acid - Salicylhydroxamic acid bioconjugates. 2. Polyvalent immobilization of protein ligands for affinity chromatography. *Bioconjugate Chemistry* 2001, 12(2): 240-250.
97. Wlad, H., A. Ballagi, et al. Rapid two-step purification of a recombinant mouse Fab fragment expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* 2001, 22(2): 325-329.
98. Wu C., Yang R., Zhou J. et al., *J. Immuno Methods* , 2003, 277(1~2): 157~169
99. Zatta, P. F. A new bioluminescent assay for studies of protein G and protein A binding to IgG and IgM. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1996, 32(1): 7-13.

附录

部分溶液配方:

1 磷酸钠缓冲液的配制

- 1.1 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$: 31.202 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 加 1L蒸馏水
 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$: 71.628 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 加 1L蒸馏水
 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PBS (pH7.2)}$: 72.0 mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 加 28.0mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4$
 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PBS (pH 7.2)}$: 500 mL $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PBS (pH7.2)}$
 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PBS (pH 7.2)}$: 50mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PBS (pH 7.2)}$ 加 450 mL蒸馏水
 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ (pH 7.2)}$: 100mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PBS (pH 7.2)}$ 加 900 mL蒸馏水

1.2 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{PBS (pH 7.4)}$:

NaCl 8.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g, KCl 0.2 g, 用ddH₂O定容至 1L

2. 间接 ELISA 所需试剂

2.1 碳酸盐包被缓冲液 (pH 9.6)

Na_2CO_3 1.59 g, NaHCO_3 2.93 g, 用ddH₂O定容至 1L

2.2 TBS (pH 8.0) $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

NaCl 3.2 g, KCl 0.08g, Tris碱 0.6 g, 用HCl调整pH到 8.0, 加ddH₂O定容到 1 L

TBS-T: TBS 1L 加 0.5 mL Tween-20

2.3 底物缓冲液 (pH 9.5)

$100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$, $150 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaCl}$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$

3 SDS-PAGE 电泳试剂配制

3.1 10% SDS : 5 g SDS加 50mLH₂O

3.2 2×SDS 上样缓冲液

$1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl (pH8.0)}$ 1.0 mL, 10 % SDS 4.0 mL, 甘油 2.0 mL, 巯基乙醇 1.0 mL,
0.1%溴酚蓝 0.5 mL, 加ddH₂O定容至10mL

3.3 30%丙烯酰胺溶液

丙烯酰胺 29.2 g, N,N—甲叉双丙烯酰胺 0.80 g, 加入ddH₂O 60 mL, 溶解后过滤, 定容至 100 mL, 4℃下保存。

3.4 积层胶缓冲液($0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$, pH 6.8)

Tris 3.03 g加入ddH₂O 40 mL, 溶解后用 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$ 调至pH 6.8, 定容至 50 mL

3.5 分离胶缓冲液($1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$, pH 8.8)

Tris 18.16 g加入ddH₂O 80 mL, 溶解后用 $4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{HCl}$ 调至pH 8.9, 定容至 100 mL

3.6 12.5%.分离胶(15 mL)

H₂O 5.9 mL

30%丙烯酰胺溶液 6.25 mL

$1.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris (pH8.8)}$ 5.6mL

10%SDS 0.15 mL

- 10%过硫酸铵 0.15 mL
- TEMED 0.01 mL
- 3.7 5%浓缩胶(5mL)
 - H₂O 2.7 mL
 - 30%丙烯酰胺溶液 0.67 mL
 - 1.0 mol·L⁻¹ Tris(pH6.8) 0.5 mL
 - 10% SDS 0.04 mL
 - 10%过硫酸铵 0.04 mL
 - TEMED 0.004 mL
- 3.8 电泳缓冲液
 - Tris碱 3.0 g, 甘氨酸 14.4 g, SDS 1.0 g, 用ddH₂O定容至 1000mL
- 3.9 脱色液
 - 甲醇 450 mL,冰醋酸 50 mL ,加入ddH₂O 450 mL
- 3.10 考马斯亮蓝染色液
 - 脱色液 1000 mL 加入考马斯亮蓝 G-250 2.5 g, 过滤
- 4. Western Blotting 所需试剂
- 4.1 CAPS缓冲液 100 mmol·L⁻¹
 - CAPS 1.106 g加ddH₂O至 500 mL
- 4.2 封闭液
 - 用 TBS-T 缓冲液配置
 - 5 g 脱脂奶粉, 10 mL 小牛血清, 0.05 mL Tween-20, 加 TBS-T 至 100 mL
- 4.3 TBS 及 TBS-T
 - 配制方法同上
- 4 酶活性测定所需试剂
- 4.1 0.2 mol·L⁻¹ PBS (pH 6.8)
 - 0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄: 27.6 g NaH₂PO₄ · H₂O加蒸馏水至 1000mL
 - 0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄: 53.65 g Na₂HPO₄ · 7H₂O加蒸馏水至 1000 mL
 - 0.2 mol·L⁻¹ PBS (pH 6.8) : 0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 51mL加 0.2 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 49mL
- 5 快速银染所需试剂
- 5.1 甲醛固定液: 40%甲醇, 5% 37%的甲醛, 室温保存 1 个月
- 5.2 0.2g/L 硫代硫酸钠溶液
- 5.3 0.1%硝酸银溶液
- 5.4 显影液: 3% Na₂CO₃, 0.0004%Na₂S₂O₃, 3%的 37%甲醛 (甲醛溶液在临用前加入)
- 5.5 2.3mol/L 柠檬酸
- 6 双向电泳相关溶液
- 6.1 IEF 胶配方
 - 11g 尿素 (9.2M)
 - 3mL 30%丙稀酰胺储液

1 mL 两性电解质 pH3-10

1mL去污剂溶液 (0.3g CHAPS, 100 μ l Nonidet P-40, 900 μ l ddH₂O (NP-40))

加ddH₂O至 20mL

20 μ LTEMED

40 μ l 10% 过硫酸铵

样品缓冲液: 0.1gDTT, 0.4g CHAPS, 5.4g尿素, 500 μ l 两性电解质 3-10, 6mLddH₂O

等电聚焦上槽缓冲液: 20mM NaOH

等电聚焦下槽缓冲液: 10mM H₃PO₄

胶条平衡液: 40mL 0.5M Tris-HCL pH8.8, 80 mL 10% SDS, 8 mL 0.05% 溴酚兰, 150mLddH₂O

7 蛋白胶负染溶液

漂洗液: 0.2M 咪唑, 0.1% SDS

显色液: 0.3M 硫酸锌

8 甘氨酸-盐酸洗脱缓冲液: 50mM 甘氨酸-HCL, pH2.3, 500mM NaCl, 0.5% TWEEN 20, 100 μ g BSA

致谢

论文写作接近尾声，回首三年求学经历，思绪万千，心情久久不能平静。我要感谢向所有关心、支持和帮助过我的老师、同学、朋友表示衷心的感谢！

导师邱德文博士在本论文选题，资料收集，实验设计等方面，倾注了大量的心血和精力，初入实验室时，由于掌握的试验技能有限，工作开展缓慢，邱老师鼓励我放手尝试，使我掌握了解决科学问题的思路，同时实验水平也有了很大的提高。邱老师在为人处事方面宽于待人，严于律己，是我终生的学习榜样。邱老师在生活方面对我也十分关心，教会我如何处理好实验和个人生活之间的矛盾，在毕业找工作过程中，邱老师多方奔走，热心推荐，使我最终找到了满意的工作。在论文写作阶段，邱老师字斟句酌，保证了论文的完成。对邱老师的感激之情溢于言表，只能在此表示最深至的敬意和感谢！

实验室的刘峥老师，杨秀芬老师，袁京京老师，曾洪梅老师在实验操作，具体实验细节，试验结果分析等方面给予了很大的帮助，特别是最后论文写作阶段刘峥老师，杨秀芬老师牺牲休息时间，对本论文进行详细的修改，提出了建设性意见。感谢她们三年来对我的帮助和支持。

本论文完成还得到了在 508，509 实验室的兄弟姐妹们的支持，他们是：仲新华硕士，黄炜硕士，陈梅硕士，龙松化硕士，杨保军硕士，龙承祖硕士，张宁硕士，黄丽俊硕士，徐锋博士，赵丽辉博士，龚永兴博士，冯飞博士，刘文平硕士，赵明治硕士，武晓丽硕士，李承雷硕士，尚威硕士，金鑫硕士，郭广君硕士，顾成波博士，吕素芳硕士，孙柏欣硕士，姚庆硕士，杨勇硕士，谢馥娇硕士，毛建军博士，张志刚博士，何军，刘双清，许睿，周红运。

感谢曾凡荣老师，蒋伶活老师，刘四朝老师为我的实验工作提出宝贵的建议，使我拓宽了思路，加快了实验进度。

感谢同寝室的几位好友龙承祖，田子罡，宫春宇，生活上和睦相处，关系融洽，开心地度过了三年，感谢他们对我的宽容与忍耐。

特别感谢爱人王薇，她在生活上关心照顾，在我情绪低落时关心鼓励，使我能够振作起来重新面对挑战。

论文的顺利完成与家人、朋友的关怀和鼓励十分不开的，值此向所有指导、帮助和关心我的家人、朋友致以诚挚的谢意。

感谢我的父母给了我生命，养育之恩，终生难忘。谨以此文献给所有爱我的人，祝他们永远健康快乐。

董健伸

2006 年 6 月

作者简介

董健伸，男，1980 年生于河北保定市，共青团员，主要求学经历：

1999-2003：河北农业大学 生命科学院 生物技术 理学学士

2003-2006：中国农业科学院 植物保护研究所，药物工程实验室 微生物学硕士

在中国农科学院蛋白质药物工程实验室完成硕士论文试验工作，为了研究真菌源具有提高植物抗病性的蛋白，进行了以下实验：蛋白纯化，目的蛋白抗体制备，改进方法高特异纯化抗体，高效从文库中筛选目的基因及纯化其表达蛋白，同时还利用免疫学方法研究蛋白与植物互作方面进行了一定研究，为进一步解释蛋白作用机理打下基础。

在硕士期间掌握的实验技能包括：双向电泳鉴定蛋白质，纯化目的蛋白，针对目的蛋白制备多克隆抗体，纯化特异性抗体，从基因表达文库中克隆筛选目的基因，

相关的实验技术如下：

等电聚焦（水平板、垂直板、管状胶、固相干胶条）、蛋白质双向电泳、SDS-PAGE 电泳、非变性蛋白质电泳、蛋白质全胶回收、胶回收电泳、蛋白胶半干转膜、多种蛋白胶的染色技术（考染、银染、负染）；

亲和层析、凝胶过滤层析、透析和超滤技术、蛋白质定量测定；

制备抗原免疫试验动物（肌肉注射、皮下多点注射等）、抗血清的收集、硫酸铵沉淀法分离抗体、固相免疫亲和层析制备特异性抗体、酶联免疫实验、免疫印迹试验、斑点免疫结合实验。