



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109825601 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910139786.8

(22)申请日 2019.02.25

(71)申请人 南京林业大学

地址 210037 江苏省南京市玄武区龙蟠路
159号

(72)发明人 吴小芹 刘红斌 叶建仁 冯亚颀
芮琳

(74)专利代理机构 南京申云知识产权代理事务
所(普通合伙) 32274

代理人 邱兴天

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6888(2018.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

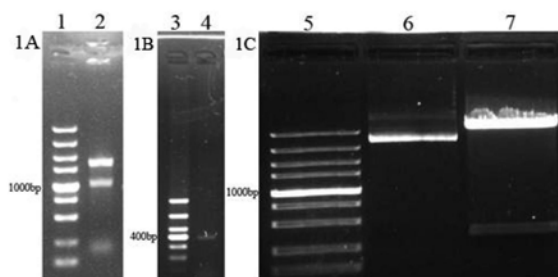
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种定量检测松材线虫自噬活性的方法

(57)摘要

本发明公开了一种定量检测松材线虫自噬活性的方法,先构建松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的原核表达载体pET-28a(+)-BxATG8,然后进行表达和纯化重组蛋白BxATG8,并将其免疫新西兰大白兔,制备出特异性多克隆抗体anti-BxATG8;采用特异性多克隆抗体anti-BxATG8同时特异性识别松材线虫自噬蛋白BxATG8-I和BxATG8-II,对BxATG8-I和BxATG8-II的表达进行均一化和定量分析,获得BxATG8-II/BxATG8-I表达量比值。本发明通过定量检测松材线虫自噬活性方法的建立,对研究自噬在松材线虫防御机制中的作用至关重要,有助于为松材线虫病的防控提供理论基础,所制备的特异性多克隆抗体anti-BxATG8可以同时特异性识别松材线虫自噬蛋白BxATG8-I和BxATG8-II,其效价高达1:512,000。为以后深入研究自噬在松材线虫中的作用提供关键的科研手段和技术支持。



1. 一种定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,采用均一化和定量分析的方法分别获得松材线虫的BxATG8-I和BxATG8-II蛋白的表达量,处理后获得BxATG8-II/BxATG8-I的表达量比值,即获得松材线虫自噬活性大小。

2. 根据权利要求1所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,先构建松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的原核表达载体pET-28a(+)-BxATG8,然后进行表达和纯化重组蛋白BxATG8,并将其免疫新西兰大白兔,制备出特异性多克隆抗体anti-BxATG8;采用特异性多克隆抗体anti-BxATG8同时特异性识别松材线虫自噬蛋白BxATG8-I和BxATG8-II,对BxATG8-I和BxATG8-II的表达进行均一化和定量分析,获得BxATG8-II/BxATG8-I表达量比值。

3. 根据权利要求1或2所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,步骤如下:

(1) 提取松材线虫的总RNA,反转录得到cDNA;以cDNA为模板,PCR扩增得到松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的CDS并纯化;纯化后产物与载体pET-28a(+)进行同源重组,转化获得重组质粒pET-28a(+)-BxATG8;

(2) 利用重组质粒pET-28a(+)-BxATG8大量诱导表达重组蛋白并纯化;

(3) 取纯化后的BxATG8蛋白与弗氏完全佐剂乳化,对新西兰大白兔进行免疫注射,制备得到松材线虫自噬标志蛋白BxATG8多克隆抗体;

(4) 先对松材线虫进行处理,然后提取松材线虫总蛋白,利用BxATG8多克隆抗体对松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的表达进行均一化和定量分析,测定获得BxATG8-II/BxATG8-I比值。

4. 根据权利要求3所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,步骤(1)中,采用Trizol抽提法提取松材线虫总RNA。

5. 根据权利要求3所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,步骤(1)中,特异性引物序列如下:

E-BxATG8-F: 5'-CGCGGATCCGAATTCATGAAGTGGACTTACAAAG-3',

E-BxATG8-R: 5'-TGCGGCCGCAAGCTTCTCTTCGGCGGCCATA-3',

M13F(-47): 5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3',

M13R(-48): 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'。

6. 根据权利要求3所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,步骤(2)中,蛋白纯化步骤为:酒精过Ni柱,3~5倍Ni体积的Binding buffer过柱,蛋白样品过柱,5~10倍Ni体积的Binding buffer过柱,最后多次用Elution过柱洗下目的蛋白。

7. 根据权利要求3所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,步骤(2)中,大量诱导条件为20℃、180rpm诱导12h。

8. 根据权利要求3所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,步骤(3)中,BxATG8蛋白抗原与弗氏完全佐剂乳化按体积比1:1混合,背部皮下多点注射免疫;14d后,背部皮下再次多点注射免疫;之后每隔15~20d加强免疫1次,共2次;最后1次免疫后8d于心脏采血收集血清,并制备BxATG8抗体亲和柱纯化抗血清以得到BxATG8特异性抗体,将其经聚乙二醇浓缩后于PBS中透析除盐,-20℃保存备用。

9. 根据权利要求3所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,其特征在于,步骤(4)中,

松材线虫的处理为：取松材线虫分别在ddH₂O和3-Ma中浸泡，洗净后液氮速冻于-80℃保存备用；挑取线虫转移到灰葡萄孢PDA培养基中并分别置于15℃，25℃和35℃下培养；每天拍摄线虫的取食区域，在菌丝被吃完后，使用贝尔曼漏斗法分离线虫并洗涤，经液氮速冻后于-80℃保存备用。

10. 根据权利要求3所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法，其特征在于，步骤(4)中，用高速组织研磨器将液氮冷冻的松材线虫样品研磨、成粉末状，加入新配置的裂解液充分混匀，离心取上清即为线虫全蛋白，用BCA法测定蛋白浓度并将各样品蛋白浓度调成一致；取等量不同处理的松材线虫全蛋白进行SDS-PAGE电泳，待11kDa的蛋白Marker刚好跑出胶板，停止电泳；使用湿转法将蛋白转移至PVDF膜；转膜结束后，通过REVERT Total Protein Stain Kit进行总蛋白的染色，并在Odyssey FC近红外双色激光和化学发光双功能成像系统下成像，用于后期的均一化处理；脱色后将膜放到溶于PBS的脱脂奶粉中封闭；使用PBS-T稀释BxATG8抗体，作为一抗，将封闭好的膜置于一抗中孵育过夜；用PBS-T清洗膜，用IRDye 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody孵育膜；PBS-T清洗膜，再用PBS清洗膜，将膜置于Odyssey FC 700nm通道下成像，并通过Image Studio软件对结果进行相对定量分析，获得BxATG8-II/BxATG8-I比值。

一种定量检测松材线虫自噬活性的方法

技术领域

[0001] 本发明属于松材线虫病防治技术领域,具体涉及一种定量检测松材线虫自噬活性的方法。

背景技术

[0002] 松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)是国际上公认的重要检疫性有害生物,它引起的松树萎蔫病(Pine Wilt Disease)是一种毁灭性森林病害,目前在亚洲和欧洲的许多地区,尤其在中国,造成了重大的经济损失和生态威胁。多年来关于其致病机理的研究有很多,但关于松材线虫如何度过不良环境和抵抗松树防御反应的研究很少,其防御机制尚不清楚,这限制了对松材线虫病的防控。

[0003] 细胞自噬是真核细胞为了应对环境应激而作出的一种应答反应,是真核细胞在其生长、发育过程中进化出的一种用于清除自身多余的生物大分子和受损细胞器,以维持代谢平衡和内环境稳定的保护性机制,在细胞废物清除、结构重建、生长发育等过程中均起着非常重要的作用。在一些病原菌和有害昆虫中,如稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)和大麦虫(*Tenebrio molitor*),自噬对它们的发育、繁殖和致病性都有着重要的影响。但自噬在松材线虫中的作用少见报道。深入研究自噬在松材线虫生长发育和致病过程中所扮演的角色,对阐明松材线虫的防御机制和有效防控松材线虫病具有重要的意义。

[0004] 检测细胞自噬的活性对研究自噬必不可少。通过透射电镜可以观察到自噬的特征性变化即自噬泡、自噬溶酶体等形成的全过程,Deng等通过透射电镜观察到了饥饿状态下松材线虫自噬的发生过程,但该方法不能判断自噬活性的大小,因此也无法清楚地揭示自噬在松材线虫中的作用。在秀丽隐杆线虫和哺乳动物细胞中,已经建立起了较为成熟的自噬活性检测体系,主要包括荧光标记自噬标志蛋白LGG-1/LC3和检测蛋白LGG-1-I/LC3-I与LGG-1-II/LC3-II的表达变化。秀丽隐杆线虫中的LGG-1和哺乳动物中的LC3都是酵母中自噬标志蛋白ATG8的同源物。当自噬被诱发时,胞质可溶性形式LC3(LC3-I)与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine,PE)结合形成脂质化LC3(LC3-II),LC3-II定位于自噬体膜上,所以LC3-II量的变化与自噬体数量的变化紧密相关,LC3-II成为检测自噬体的标志蛋白。随着这个自噬过程也被证明发生在秀丽隐杆线虫中,荧光标记LGG-1来可视化自噬体已经成为一种被广泛应用的方法。到目前为止,通过蛋白质免疫印迹分析比较LGG-1-I/LC3-I与LGG-1-II/LC3-II量的变化是检测自噬活性最直接有效的方法,但是该方法在松材线虫的研究中尚未见报道。

发明内容

[0005] 发明目的:针对现有技术中存在的问题,本发明的目的在于提供一种定量检测松材线虫自噬活性的方法,对研究自噬在松材线虫防御机制中的作用至关重要,有助于为松材线虫病的防控提供理论基础。

[0006] 技术方案:为了解决上述问题,本发明所采用的技术方案如下:

[0007] 一种定量检测松材线虫自噬活性的方法,采用均一化和定量分析的方法分别获得松材线虫的BxATG8-I和BxATG8-II蛋白的表达量,处理后获得BxATG8-II/BxATG8-I的表达量比值,即获得松材线虫自噬活性大小。

[0008] 所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,先构建松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的原核表达载体pET-28a(+)-BxATG8,然后进行表达和纯化重组蛋白BxATG8,并将其免疫新西兰大白兔,制备出特异性多克隆抗体anti-BxATG8;采用特异性多克隆抗体anti-BxATG8同时特异性识别松材线虫自噬蛋白BxATG8-I和BxATG8-II,对BxATG8-I和BxATG8-II的表达进行均一化和定量分析,获得BxATG8-II/BxATG8-I表达量比值。

[0009] 所述的定量检测松材线虫自噬活性的方法,步骤如下:

[0010] (1) 提取松材线虫的总RNA,反转录得到cDNA;利用加上同源臂的特异性引物,以cDNA为模板,PCR扩增得到松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的CDS并纯化;纯化后产物测序验证正确的目的片段,与经限制性内切酶EcoRI与HindIII双酶切线性化后的载体pET-28a(+)进行同源重组,转化后提取阳性克隆的质粒进行双酶切和测序的验证,得到了序列正确的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8;

[0011] (2) 将测序正确的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8转入表达感受态细胞大肠杆菌Transetta,筛选出表达宿主菌并接种于LB液体培养基过夜培养,培养完成后进行诱导;扩大培养体系对重组蛋白进行大量诱导表达并纯化;

[0012] (3) 取纯化后的BxATG8蛋白与弗氏完全佐剂乳化,对新西兰大白兔进行免疫注射,制备得到松材线虫自噬标志蛋白BxATG8多克隆抗体;

[0013] (4) 先对松材线虫的处理,然后提取松材线虫总蛋白,利用BxATG8多克隆抗体对松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的表达进行均一化和定量分析,测定获得BxATG8-II/BxATG8-I比值。

[0014] 步骤(1)中,采用Trizol抽提法提取松材线虫总RNA。

[0015] 步骤(1)中,特异性引物序列如下:

[0016] E-BxATG8-F:5'-CGCGGATCCGAATTCATGAAGTGACTTACAAAG-3',

[0017] E-BxATG8-R:5'-TGCGGCCGCAAGCTTCTCTTCGGCGGCCATA-3',

[0018] M13F(-47):5'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC-3',

[0019] M13R(-48):5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'。

[0020] 步骤(2)中,蛋白纯化步骤为:30%乙醇过Ni柱,3~5倍Ni体积的Binding buffer过柱,蛋白样品过柱,5~10倍Ni体积的Binding buffer过柱,最后多次用500μL Elution过柱洗下目的蛋白,测定每管的A280,其值大于1的蛋白液经透析处理后进行SDS-PAGE检测并通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白的浓度。

[0021] 步骤(2)中,大量诱导条件为20℃、180rpm诱导12h。

[0022] 步骤(3)中,取纯化后的BxATG8蛋白抗原1mL与1mL弗氏完全佐剂乳化,背部皮下多点注射免疫;14d后,BxATG8蛋白抗原1mL与1mL弗氏不完全佐剂乳化,背部皮下多点注射免疫;之后每隔15~20d加强免疫1次,共2次;最后1次免疫后8d于心脏采血收集血清,并制备BxATG8抗体亲和柱纯化抗血清以得到BxATG8特异性抗体,将其经聚乙二醇浓缩后于PBS中透析除盐,测定抗体的A280nm,所得OD值除以1.35即为所测抗体的浓度,-20℃保存备用。

[0023] 步骤(4)中,松材线虫的处理为:取10000条松材线虫分别在100μL ddH₂O和50mM自

噬抑制剂3-Ma中浸泡3h,洗净后液氮速冻于-80℃保存备用;挑取5000条线虫转移到灰葡萄孢PDA培养基中并分别置于15℃,25℃和35℃下培养;每天拍摄线虫的取食区域,在菌丝被吃完后,使用贝尔曼漏斗法分离线虫并洗涤,经液氮速冻后于-80℃保存备用。

[0024] 步骤(4)中,在1mL裂解液中加入磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和PMSF各10μL,混匀置于冰上备用;用高速组织研磨器将液氮冷冻的松材线虫样品研磨、成粉末状,加入40μL新配置的裂解液充分混匀,4℃12000g离心30min取上清即为线虫全蛋白,用BCA法测定蛋白浓度并将各样品蛋白浓度调成一致;制备15%的SDS-PAGE蛋白电泳凝胶,取等量不同处理的松材线虫全蛋白进行SDS-PAGE电泳,待11kDa的蛋白Marker刚好跑出胶板,停止电泳;使用湿转法将蛋白转移至孔径大小为0.22μm的PVDF膜,150mA恒流2h;转膜结束后,通过REVERT Total Protein Stain Kit进行总蛋白的染色,并在Odyssey FC近红外双色激光和化学发光双功能成像系统下成像,用于后期的均一化处理;脱色后将膜放到溶于PBS的5%脱脂奶粉中封闭1h;使用PBS-T以1:1000的比例稀释BxATG8抗体,作为一抗,将封闭好的膜置于一抗中4℃孵育过夜;用PBS-T清洗膜3次,每次5min,用1:20000稀释的IRDye 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody孵育膜1h;PBS-T清洗膜3次,每次5min,再用PBS清洗膜5min,将膜置于Odyssey FC 700m通道下成像,并通过Image Studio软件对结果进行相对定量分析,获得BxATG8-II/BxATG8-I比值。

[0025] 有益效果:与现有的技术相比,本发明的优点包括:

[0026] (1)本发明通过定量检测松材线虫自噬活性方法的建立与应用,对研究自噬在松材线虫防御机制中的作用至关重要,有助于为松材线虫病的防控提供理论基础。

[0027] (2)本发明制备的可以同时特异性识别松材线虫自噬蛋白BxATG8-I和BxATG8-II的特异性多克隆抗体anti-BxATG8,其效价高达1:512,000。

[0028] (3)本发明结合总蛋白染色的均一化处理和荧光二抗的使用,使定量结果更加准确,为以后深入研究自噬在松材线虫中的作用提供了关键的科研手段和技术支持。

[0029] (4)本发明研究表明松材线虫可通过调节自噬活性来维持自身生理平衡以适应环境温度的变化。

附图说明

[0030] 图1为松材线虫自噬标志蛋白BxATG8原核表达载体的构建,其中,图1A为松材线虫总RNA琼脂糖凝胶电泳图,图1B为PCR扩增松材线虫自噬标志基因BxATG8的CDS图,图1C为重质粒pET-28a(+)-BxATG8的双酶切验证图;1,5:DL5,000TM DNA Marker;2:松材线虫总RNA;3:DL1,000TM DNA Marker;4:松材线虫BxATG8的CDS;6:重组质粒pET-28a(+)-BxATG8;7:重组质粒pET-28a(+)-BxATG8的双酶切产物;

[0031] 图2为松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的诱导表达与纯化图;其中,图2A为重组质粒pET-28a(+)-BxATG8的诱导表达图,图2B为大量表达重组蛋白pET-28a(+)-BxATG8的诱导条件筛选图,图2C为重组蛋白pET-28a(+)-BxATG8的纯化图;1、6、13:180kDa Protein Marker,2:未诱导空载体pET-28a(+),3:37℃诱导4h空载体pET-28a(+),4:未诱导重组质粒pET-28a(+)-BxATG8,5:37℃诱导4h重组质粒pET-28a(+)-BxATG8,7:37℃诱导4h的空载体pET-28a(+)超声破碎后的上清,8:37℃诱导4h的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8超声破碎后的上清,9、14:20℃诱导12h的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8超声破碎后的上清,10:37℃诱

导4h的空载体pET-28a(+) 超声破碎后的沉淀,11:37℃诱导4h的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8超声破碎后的沉淀,12:20℃诱导12h的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8超声破碎后的沉淀,15:纯化后的重组蛋白pET-28a(+)-BxATG8;

[0032] 图3为松材线虫自噬标志蛋白BxATG8多克隆抗体的蛋白质免疫印记分析图,其中,图3A为BxATG8抗体对BxATG8蛋白的识别;M:120kDa Protein Marker,Loading:1,3,4:100ng纯化的BxATG8蛋白,2:50ng纯化的BxATG8蛋白;一抗:1、2:BxATG8抗体,浓度为1 μ g/mL;3:免疫前血清(1:200);4:PBS;二抗:GoatAnti-Rabbit IgG(H&L) Antibody [IRDye800CW],浓度为0.125 μ g/mL;图3B为提取用ddH₂O和自噬抑制剂3-Ma处理的松材线虫的总蛋白图;图3C为松材线虫自噬活性的相对定量图;

[0033] 图4为温度对松材线虫取食和自噬活性的影响图,其中,图4A为15℃、25℃和35℃下松材线虫在灰葡萄孢培养基上的取食图,图4B为不同温度下的松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的表达图,图4C为松材线虫自噬活性的相对定量图。

具体实施方式

[0034] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。

[0035] 实施例1

[0036] (1) 松材线虫培养

[0037] 松材线虫的最适生长温度为25℃,通过马铃薯葡萄糖琼脂(Potato Dextrose Agar,PDA)平板在25℃无光照条件下培养灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*) 5d,菌丝长满PDA后接入供试松材线虫,相同的条件下培养5d。待灰葡萄孢菌丝被吃光后采用贝尔曼漏斗法收集松材线虫备用,即在已灭菌的漏斗中放上二层面巾纸,将PDA连同松材线虫一起划入漏斗中,1h后用15mL离心管从漏斗中接出线虫。将收集的松材线虫悬浮液在4000r/min条件下离心3min,弃去上清液;再用ddH₂O(双蒸水)清洗3次,在4000r/min条件下离心,每次离心3min。

[0038] (2) 松材线虫总RNA的提取和cDNA的合成

[0039] 取10000条松材线虫于1.5mL离心管中,液氮速冻后采用Trizol抽提法提取松材线虫的总RNA,提取过程中所用的器材如离心管、枪头等均用0.1%的DEPC处理并灭菌。通过高速组织研磨器将液氮冷冻的松材线虫样品研磨成粉末状,加入Trizol,振荡混匀后静置,通过氯仿和异丙醇的萃取后,用75%乙醇DEPC液洗净并干燥。将提取的总RNA加入适量的DEPC水在50℃下溶解2min,用浓度为1%的琼脂糖凝胶电泳检测提取的松材线虫总RNA质量,并用nanodrop系列超微量分光光度计测定松材线虫总RNA浓度和纯度。

[0040] 通过Trizol法提取松材线虫总RNA,检测RNA的A260/A280均在2.0~2.1之间,1%琼脂糖凝胶电泳检测发现RNA琼脂糖电泳有完整的三条带,如图1A所示,上面两条带最亮,分别代表28S和18S RNA,且28S条带亮度为18S的2倍左右,第三条带为5S,条带最淡,说明提取的RNA质量较好,可以进行后续实验。

[0041] 参照全式金生物公司的EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix反转录试剂盒说明书,配制反应液于PCR仪中进行反应,程序为:42℃,30min;85℃,5s,将反转录的eDNA浓度稀释到100ng/ μ L左右,置于4℃或-20℃保存备用。

[0042] (3) 松材线虫自噬标志蛋白BxATG8原核表达载体的构建

[0043] 根据松材线虫自噬标志基因BxATG8 (GenBank:KT835645.1) 的编码序列 (Coding sequence, CDS) 设计引物进行PCR扩增, 引物5'端加上同源臂, 序列见表1, 扩增程序为: 98℃, 2min; 98℃G, 10sec, 48℃, 15sec, 72℃, 15s, 30个循环; 72℃, 延伸5min。利用加上同源臂的特异性引物, 以步骤(2)的cDNA为模板, PCR扩增(扩增体系见表2)得到松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的CDS; 取5μL的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 并通过AxyPrep PCR清洁试剂盒纯化产物。参照TsingKe公司生产的pClone007Blunt Simple Vector Kit载体连接试剂盒说明书将产物连接到载体上并转化到大肠杆菌感受态细胞JM109中, 通过菌落PCR验证出阳性单克隆并送北京华大基因测序。使用诺唯赞的**ClonExpress®II One Step Cloning Kit**对测序验证正确的目的片段和经限制性内切酶EcoRI与HindIII双酶切后的表达载体pET-28a(+)进行同源重组, 反应液轻轻吹打混匀后于37℃保温30min, 然后立即冰水浴5min。将重组质粒pET-28a(+)-BxATG8转化到感受态细胞JM109中, 提取阳性单克隆中的重组质粒进行双酶切鉴定并送北京华大基因进行测序验证。

[0044] 表1本发明中所用的特异性引物

[0045]

引物名称	引物序列(5'-3')
E-BxATG8-F	CGCGGATCCGAATTCATGAAGTGGACTTACAAAG
E-BxATG8-R	TGCGGCCGCAAGCTTCTCTTCGGCGGCCGCGCCATA
M13F(-47)	CGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC
M13R(-48)	AGCGGATAACAATTCACACAGGA

[0046] 表2本发明中所用的PCR扩增体系

[0047]

Compnents (组分)	Volume (体积)
Golden Star T6Super PCR Mix	44μL
E-BxATG8-F	2μL
E-BxATG8-R	2μL
cDNA模板	2μL

[0048] 利用加上同源臂的特异性引物, 以松材线虫总RNA反转录合成的cDNA为模板, PCR扩增得到松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的CDS, 大小约400bp, 1%琼脂糖凝胶电泳检测如图1B所示。测序验证序列正确后将其与双酶切线性化后的载体pET-28a(+)进行同源重组, 转化后提取阳性克隆的质粒进行双酶切和测序的验证, 双酶切结果如图1C所示, 酶切产物大小与预期相符, 最终得到了序列正确的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8, 表明自噬标志蛋白BxATG8原核表达载体构建成功。

[0049] (4) 松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的诱导表达与纯化

[0050] 将测序正确的重组质粒pET-28a(+)-BxATG8转入表达感受态细胞大肠杆菌Transetta (DE3), 将筛选出的表达宿主菌接种于50mL LB液体培养基(含50μg/mL卡那霉素)中, 37℃、200rpm过夜培养; 按体积比1:100的比例转接于100mLLB液体培养基(含50μg/mL卡那霉素)中, 37℃培养约3h至菌液OD值(600nm)达到0.6左右; 加入终浓度0.5mmol/L的IPTG, 通过以下两种诱导条件分别诱导: 37℃200rpm诱导4h和20℃180rpm诱导12h; 收集菌体, 用

无菌水和PBS清洗后,加3~5mL PBS重悬浮,在冰浴中使用超声波细胞粉碎机破碎菌体(300W,超声2s,停3s,共20min)。将破碎后的液体离心,分别收集上清与沉淀,并对其进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。取上清中重组蛋白表达量较高的诱导条件,扩大培养体系进行重组蛋白的大量诱导表达,并通过Ni-NTA agarose纯化的方法对表达蛋白进行纯化,步骤如下:30%乙醇过Ni柱,3~5倍Ni体积的Binding buffer过柱,蛋白样品过柱,5~10倍Ni体积的Binding buffer过柱,最后多次用500 μ L Elution过柱洗下目的蛋白,测定每管的A280,其值大于1的蛋白液经透析处理后进行SDS-PAGE检测并通过BCA蛋白浓度测定试剂盒测定纯化蛋白的浓度。

[0051] 对重组质粒pET-28a(+)-BxATG8转入表达感受态细胞大肠杆菌Transtetta(DE3)中得到的阳性克隆进行诱导表达,收集菌体SDS-PAGE检测发现重组蛋白被成功表达,大小为20kD左右,与预期相符,如图2A所示。取菌体超声破碎后的上清与沉淀进行SDS-PAGE发现,在37 $^{\circ}$ C、220rpm诱导4h和20 $^{\circ}$ C、180rpm诱导12h的条件下,重组蛋白在上清和沉淀中均有表达,其中20 $^{\circ}$ C、180rpm诱导12h的条件使重组蛋白在上清中的表达量更高,如图2B所示,选用该条件大量表达重组蛋白,并进行纯化,得到5mL的纯蛋白,纯度较高,无杂蛋白如图2C所示,BCA法测定蛋白浓度达到5.2mg/mL,满足抗体制备的使用条件。

[0052] (5) 松材线虫自噬标志蛋白BxATG8抗体的制备

[0053] 选取成年健康新西兰大白兔(新西兰大白兔购于南京金斯瑞生物科技有限公司),耳缘静脉抽取约10mL血液(约5mL血清),制备免疫前正常血清,作为阴性对照。取纯化后的BxATG8蛋白抗原1mL(400 μ g)与1mL弗氏完全佐剂乳化,背部皮下多点注射免疫。14d后,BxATG8蛋白抗原1mL(100 μ g)与1mL弗氏不完全佐剂乳化,背部皮下多点注射免疫。之后每隔15~20d加强免疫1次,共2次。最后1次免疫后8d于心脏采血收集血清,并制备BxATG8抗体亲和柱纯化抗血清以得到BxATG8特异性抗体,将其经聚乙二醇浓缩后于PBS中透析除盐,测定抗体的A280nm,所得OD值除以1.35即为所测抗体的浓度,-20 $^{\circ}$ C保存备用。

[0054] (6) 松材线虫自噬标志蛋白BxATG8抗体的质量检测

[0055] 通过间接酶联免疫吸附剂测定(enzyme linkedimmunosorbent assay,ELISA)对松材线虫自噬标志蛋白BxATG8抗体进行效价的检测。取纯化的BxATG8蛋白进行SDS-PAGE电泳,用1:1000稀释的BxATG8抗体作为一抗进行Western blot验证,以免疫前血清为阴性对照,PBS为空白对照。

[0056] 从经最后一次免疫的新西兰大白兔中收集抗血清并纯化获得7.80mL浓度为1.041mg/mL的松材线虫自噬标志蛋白BxATG8抗体,通过间接ELISA检测得到BxATG8抗体效价达到1:512,000,如表2所示,以原核表达纯化的BxATG8蛋白为底物,制备的BxATG8抗体为一抗,免疫前血清为阴性对照,PBS为空白对照,山羊抗兔IgG为共同的二抗,Western blot检测显示制备的BxATG8抗体能够识别BxATG8蛋白,如图3A所示,表明松材线虫自噬标志蛋白BxATG8多克隆抗体制备成功。

[0057] (7) 松材线虫的处理

[0058] 取10000条松材线虫分别在100 μ L ddH₂O和50mM自噬抑制剂3-Methyladenine(3-Ma)中浸泡3h,洗净后液氮速冻于-80 $^{\circ}$ C保存备用。挑取5000条线虫转移到灰葡萄孢PDA培养基中并分别置于15 $^{\circ}$ C,25 $^{\circ}$ C和35 $^{\circ}$ C下培养。每天拍摄线虫的取食区域,在菌丝被吃完后,使用贝尔曼漏斗法分离线虫并洗涤,经液氮速冻后于-80 $^{\circ}$ C保存备用。

[0059] (8) 松材线虫自噬标志蛋白BxATG8表达的测定

[0060] 在1mL裂解液(Solarbio Life Science,北京)中加入磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂和PMSF各10 μ L,混匀置于冰上备用;用高速组织研磨器将液氮冷冻的松材线虫样品研磨、成粉末状,加入40 μ L新配置的裂解液充分混匀,4 $^{\circ}$ C、12000g离心30min取上清即为线虫全蛋白,用BCA法测定蛋白浓度并将各样品蛋白浓度调成一致。制备15%的SDS-PAGE蛋白电泳凝胶,取等量不同处理的松材线虫全蛋白进行SDS-PAGE电泳,待11kDa的蛋白Marker刚好跑出胶板,停止电泳;使用湿转法将蛋白转移至孔径大小为0.22 μ m的PVDF膜,150mA恒流2h;转膜结束后,通过REVERT Total Protein Stain Kit(购于LI-COR)进行总蛋白的染色,并在Odyssey FC近红外双色激光和化学发光双功能成像系统(购于LI-COR)下成像,用于后期的均一化处理;脱色后将膜放到溶于PBS的5%脱脂奶粉中封闭1h;使用PBS-T(0.1%Tween-20)以1:1000的比例稀释BxATG8抗体,作为一抗,将封闭好的膜置于一抗中4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用PBS-T清洗膜3次,每次5min,用1:20000稀释的IRDye 800CW Goat anti-Rabbit Secondary Antibody(购于LI-COR)孵育膜1h;PBS-T清洗膜3次,每次5min,再用PBS清洗膜5min,将膜置于Odyssey FC 700nm通道下成像,并通过Image Studio软件(Version 5.2,Li-Cor Biosciences)对结果进行相对定量分析。

[0061] (9) 数据分析

[0062] 所有试验均进行了三次重复,使用Microsoft Excel计算三次重复的平均值和标准差(standard deviations,SD)作为统计结果,显著性差异通过SPSS Statistics 17.0软件(IBM中国公司,北京)进行配对t检验分析,星号代表差异性显著(** $p < 0.01$, Student's t-test)。

[0063] 提取松材线虫总蛋白并通过Western blot分析BxATG8的表达,发现BxATG8抗体可以特异性识别松材线虫的BxATG8-I和BxATG8-II蛋白。线虫被自噬抑制剂3-Ma处理后,BxATG8-I的表达显著增加,BxATG8-II的表达明显减少,如图3B所示,对BxATG8-I和BxATG8-II的表达进行了均一化和定量分析,使用REVERT total protein stain对总蛋白进行染色并通过Image Studio软件获取700nm通道下总蛋白荧光信号值,均一化因子为总蛋白信号值与处理中最高总蛋白信号值的比值;在800nm通道下获取目标蛋白BxATG8-I和BxATG8-II的荧光信号值,其与均一化因子的比值即为两个目标蛋白均一化后的表达量,蛋白表达量比值BxATG8-II/BxATG8-I代表松材线虫的自噬活性,结果显示自噬抑制剂3-Ma确实大幅度降低了松材线虫的自噬活性,如图3C所示,数据为平均数 \pm 标准差,误差线代表标准差,星号指示显著性差异(** $p < 0.01$, Student's t-test),这表明本实施例成功建立了定量检测松材线虫自噬活性的方法。

[0064] 表2. 免疫前血清和纯化抗体的酶联免疫结果表

[0065]	浓度(ng/mL)	稀释比	抗体 OD450
--------	-----------	-----	----------

[0066]

NC	1:1000	0.400
1,000.00	1:1000	3.001
500.00	1:2000	2.889
250.00	1:4000	2.765
125.00	1:8000	2.691
62.50	1:16,000	2.525
31.25	1:32,000	2.220
15.62	1:64,000	1.796
7.81	1:128,000	1.235
3.90	1:256,000	0.672
1.95	1:512,000	0.456
空白	空白	0.068

[0067] 注:S/B(信号/空白) ≥ 2.1 的最高稀释度代表效价,表格中的OD450值是三次技术重复的平均值,基于实际浓度计算1mg/ml的起始浓度和相应的稀释比,NC是阴性对照(免疫前血清)。

[0068] 实施例2

[0069] 在松材线虫的生活史中,环境温度会发生剧烈变化,为探究松材线虫克服度过这种逆境是否与其自噬相关,本实施例观察了在15℃低温和35℃高温的培养条件下松材线虫在灰葡萄孢培养基上的取食,并采用实施例1的方法检测了其自噬活性。结果表明15℃低温严重抑制了松材线虫的取食,而35℃高温明显增强了松材线虫的取食能力,如图4A所示。各个温度条件下PDA平板中的灰葡萄孢菌丝被吃完的时间分别为:15℃第15天;25℃第5天;35℃第3天。应用实施例1的检测松材线虫自噬活性的方法,分析了松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的表达,如图4B所示,定量后发现不同温度下松材线虫取食完灰葡萄孢后,其自噬活性显示出明显的差异,在15℃下显著增强,而在35℃下大幅度减弱,如图4C所示。

[0070] 以上结果表明,当15℃低温严重抑制了松材线虫的取食时,松材线虫会通过提高其自噬活性来产生更多的可循环利用的生物小分子物质以维持生存;当35℃高温提高了线虫的取食能力时,它会降低自噬活性来保证其生理的平衡。表明松材线虫通过可调节自噬活性来维持自身生理平衡以适应环境温度的变化。

[0071] 本实施例更进一步的证明定量检测松材线虫自噬活性方法的建立与应用对研究自噬在松材线虫防御机制中的作用至关重要,有助于为松材线虫病的防控提供理论基础。

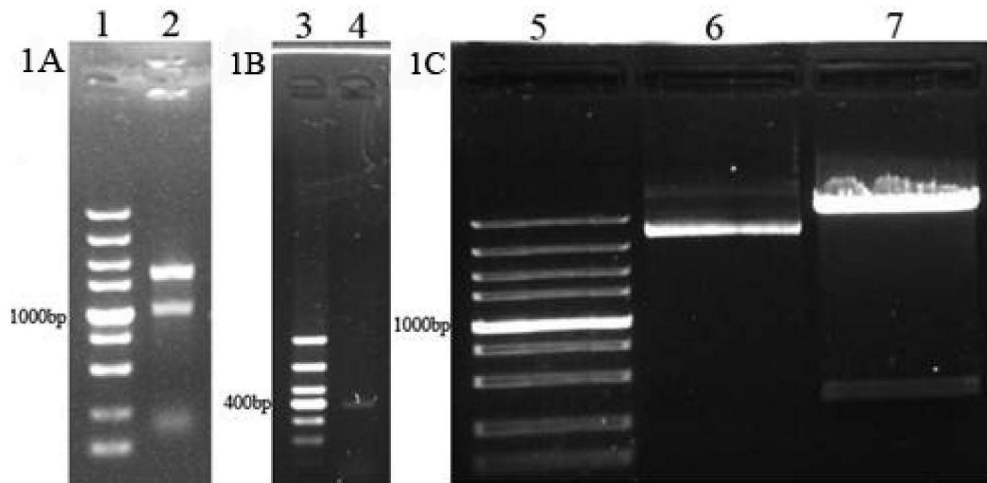


图1

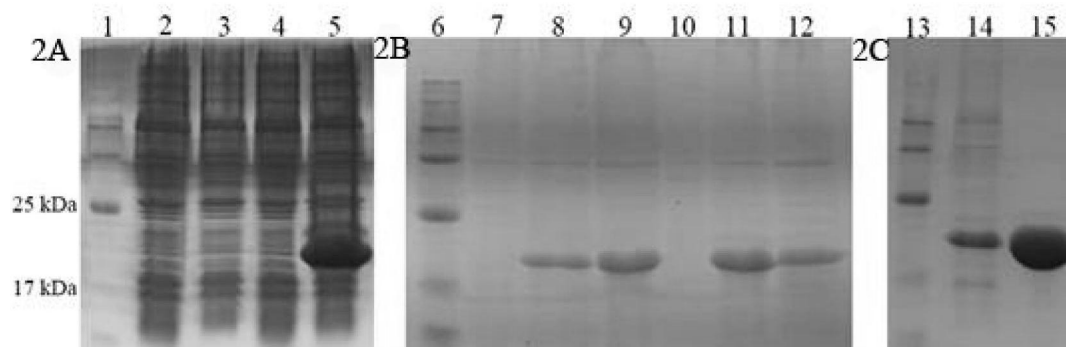


图2

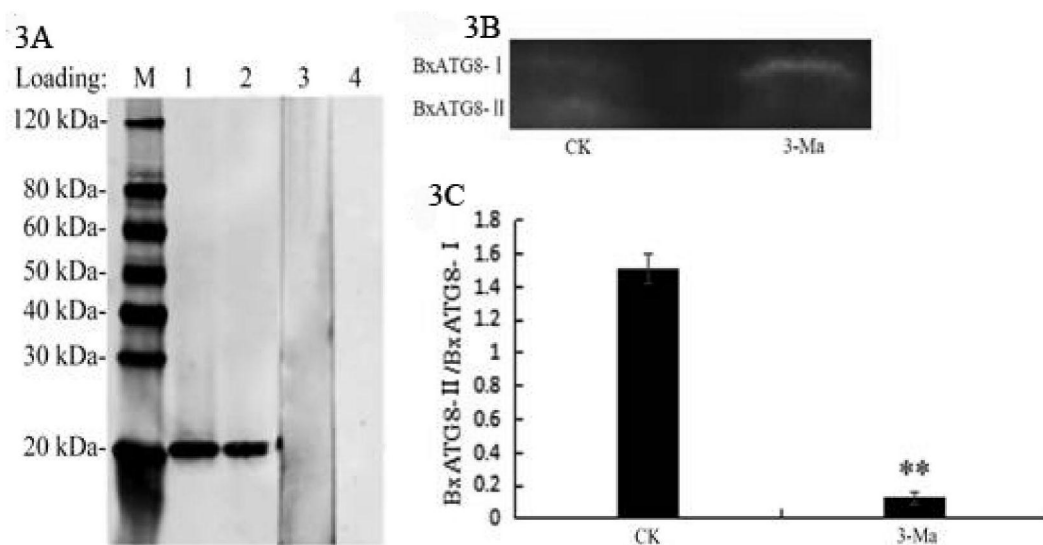


图3

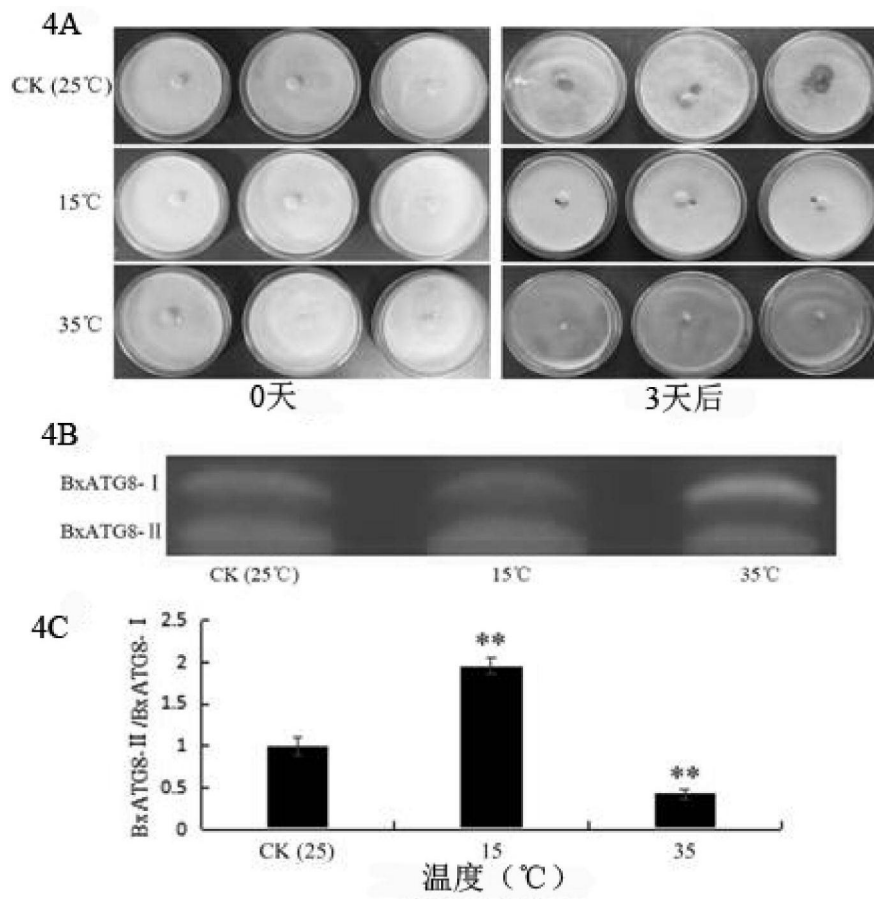


图4

专利名称(译)	一种定量检测松材线虫自噬活性的方法		
公开(公告)号	CN109825601A	公开(公告)日	2019-05-31
申请号	CN201910139786.8	申请日	2019-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	南京林业大学		
申请(专利权)人(译)	南京林业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京林业大学		
[标]发明人	吴小芹 刘红斌 叶建仁 芮琳		
发明人	吴小芹 刘红斌 叶建仁 冯亚颀 芮琳		
IPC分类号	C12Q1/6888 G01N33/53 G01N33/68		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种定量检测松材线虫自噬活性的方法，先构建松材线虫自噬标志蛋白BxATG8的原核表达载体pET-28a(+)-BxATG8，然后进行表达和纯化重组蛋白BxATG8，并将其免疫新西兰大白兔，制备出特异性多克隆抗体anti-BxATG8；采用特异性多克隆抗体anti-BxATG8同时特异性识别松材线虫自噬蛋白BxATG8-I和BxATG8-II，对BxATG8-I和BxATG8-II的表达进行均一化和定量分析，获得BxATG8-II/BxATG8-I表达量比值。本发明通过定量检测松材线虫自噬活性方法的建立，对研究自噬在松材线虫防御机制中的作用至关重要，有助于为松材线虫病的防控提供理论基础，所制备的特异性多克隆抗体anti-BxATG8可以同时特异性识别松材线虫自噬蛋白BxATG8-I和BxATG8-II，其效价高达1:512,000。为以后深入研究自噬在松材线虫中的作用提供关键的科研手段和技术支持。

