

蓖麻肌动蛋白基因的克隆、抗体制备和表达分析

王芳¹, 汤璧蔚¹, 董乐¹, 刘宝^{1,2}, 黄慧¹, 黄莘莘¹, 张立群¹, 栾芙蓉¹

(1. 泉州师范学院 海洋与食品学院, 福建 泉州 362000; 2. 东北师范大学 分子表观遗传学教育部重点实验室, 吉林 长春 130024)

摘要:为探讨蓖麻肌动蛋白(Actin)基因(*RcActin*)是否可作为蓖麻基因表达研究中的内参基因。以蓖麻生长根为试验材料,根据 GenBank 中公布的 *RcActin* 全长 cDNA 序列(登录号:XM_002522148.3)设计合成特异性引物,经 PCR 扩增获得 *RcActin* 的编码序列(CDS),并将其插入原核表达载体 pET32a(+)中。重组表达载体 pET32a(+)-*RcActin* 转化大肠杆菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达融合 6 个组氨酸标签的目的蛋白,表达蛋白经钴离子螯合磁珠纯化后,采用 Western Blot 验证,结果表明,pET32a(+)-*RcActin* 可诱导表达分子量约为 61.46 ku 的融合蛋白 His-*RcActin*。用纯化的 His-*RcActin* 免疫 BALB/c 小鼠,经细胞融合及筛选获得 9 株能分泌抗蓖麻 *RcActin* 蛋白质单克隆抗体(Monoclonal antibody, McAb)的杂交瘤细胞株。利用阳性杂交瘤细胞株刺激小鼠,取腹水,采用间接 ELISA 方法测定,结果表明,5 株阳性单克隆细胞株腹水效价达到 1:1 000 000 及以上。用蛋白 A/G 亲和层析法纯化 His-*RcActin* McAb;采用间接 ELISA 方法对纯化 McAb 的特异性进行测定,3 株阳性细胞株能分泌针对 *RcActin* 的特异性 McAb;通过抗体亚类鉴定试剂盒鉴定纯化 McAb 的亚型,结果表明,3 株阳性细胞株分泌的 McAb 亚类均为 IgG1。采用间接 ELISA 方法对 3 株阳性细胞株分泌 McAb 的稳定性进行鉴定,获得 1 株在体外传 19 代或液氮冻存 4 个月后,能稳定分泌 McAb 的阳性细胞株。采用 Western Blot 和间接 ELISA 方法对从该细胞株中纯化的 McAb 的特异性、效价进行验证,结果表明,获得的 McAb 具有针对 *RcActin* 的特异性且效价为 1:512 000。以制备的 McAb 为一抗,利用 Western Blot 方法分析 *RcActin* 在正常水肥管理且时空一致条件下的蓖麻 8 个组织中的表达量,结果表明,蓖麻不同组织中 *RcActin* 的含量存在显著性差异($P < 0.05$)。RT-qPCR 分析结果表明,蓖麻不同组织中 *RcActin* mRNA 也存在显著性差异($P < 0.05$)。通过 Western Blot 方法分析 *RcActin* 在不同浓度 NaCl 胁迫下盆栽蓖麻根系中的表达量;通过 RT-qPCR 对不同组织中 *RcActin* mRNA 表达量进行分析,结果表明,蓖麻不同组织中 *RcActin* 蛋白质和 *RcActin* mRNA 的表达量均存在显著性差异($P < 0.05$)。*RcActin* 表达研究为蓖麻功能基因表达分析中内参基因的筛选提供了一定的理论依据。

关键词:蓖麻;肌动蛋白;基因克隆;单克隆抗体;组织表达

中图分类号:Q786;S563.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2020)03-0012-12

doi:10.7668/hbxb.20190221



Cloning, Monoclonal Antibody Preparation and Expression Analysis of *Actin* Gene in Castor

WANG Fang¹, TANG Biwei¹, DONG Le¹, LIU Bao^{1,2}, HUANG Hui¹,
HUANG Pingping¹, ZHANG Liqun¹, LUAN Furong¹

(1. College of Oceanology and Food Science, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China;

2. Key Laboratory of Molecular Epigenetics of the Ministry of Education, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

Abstract: In order to know whether the actin gene can be used as the internal reference gene in castor gene expression, the expression patterns of *RcActin* were investigated in transcriptional and post-transcriptional levels. Specific primers were designed and synthesized according to the full-length cDNA of *RcActin* published in GenBank (Accession number: XM_002522148.3). The coding sequence (CDS) sequence of *RcActin* was isolated by RT-PCR using the growing roots of castor as the experimental material. The obtained gene was inserted into prokaryotic expression vector pET32a(+) with His-tag, then the recombinant expression vector pET32a(+)-*RcActin* was es-

收稿日期:2019-12-01

基金项目:国家自然科学基金项目(31270370);2012年福建省大学生创新基金项目(2012CXSY省06)

作者简介:王芳(1969-),女,辽宁瓦房店人,教授,博士,硕士生导师,主要从事植物分子生物学研究。

通讯作者:董乐(1966-),男,河北丰南人,教授,硕士,硕士生导师,主要从事植物分子生物学研究。

established. pET32a(+)-*RcActin* was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) cells, and the target protein by fusing 6 histidine tag was expressed induced by IPTG in the bacteria. The fusion protein purified with cobalt-coated magnetic agarose beads were verified by Western Blot analysis. The results showed that a molecular mass of fusion protein His-RcActin close to 61.46 ku was produced. BALB/c mice were immunized with purified His-RcActin, and 9 hybridoma cell strains with the ability to secrete monoclonal antibody (McAb) against His-RcActin (anti-His-RcActin monoclonal antibody, anti-His-RcActin McAb) was obtained after cell fusion and being screened. The titers of anti-His-RcActin McAb from ascitics of mice were tested with indirect ELISA, which were stimulated separately with positive hybridoma cells. The results showed that the antibody titer of ascites stimulated with 5 positive hybridoma cell strains were higher than 1:1 000 000. Anti-His-RcActin McAbs were purified by protein A/G affinity chromatography from 5 ascitics and the specificity of purified McAbs was verified with indirect ELISA. The results showed that 3 positive hybridoma cell strains of them which could secrete specific McAbs against RcActin (anti-RcActin McAbs) were prepared. The Ig subtype of 3 specific anti-RcActin McAbs was identified by mouse monoclonal antibody isotyping kit. The results showed that 3 specific McAbs were classified as IgG1. Indirect ELISA results of the stability of 3 positive strains with secreting anti-RcActin McAbs showed that 1 positive cell strain, which were *in vitro* after 19 generations or 4 months of liquid nitrogen cryopreservation, could secrete anti-RcActin McAbs as normal. Western Blot and indirect ELISA were used to verify the specificity and titer of anti-RcActin McAbs from this stable strain. The results showed that the secreted could specifically react with RcActin protein from castor and its titer was 1:512 000. Taking anti-RcActin McAbs as the primary antibody, Western Blot was used to analyze the expression levels of RcActin protein in eight tissues of the castor plants at the same spatio-temporal scales growing normally under normal water and nitrogen management. The results showed that there were significant differences ($P < 0.05$) in the expression of RcActin protein in different tissues of castor. Real-time quantitative RT-PCR (RT-qPCR) was used to detect the expression of *RcActin* mRNA in the above-mentioned tissues of the castor plants. The results showed that there were significant differences ($P < 0.05$) in the expression of *RcActin* mRNA in the detected castor tissues. Western Blot was used to analyze the expression levels of RcActin protein in the roots of the potted castor plants under NaCl stress at different concentrations. The relative expression levels of *RcActin* mRNA in different tissues were analyzed by RT-qPCR. The results showed that there were significant differences ($P < 0.05$) in the expression of RcActin protein and *RcActin* mRNA in the detected castor tissue. The study on *RcActin* expression provides reference for the screening of internal marker genes in the analysis of functional genes expression from castor.

Key words: Castor; Actin; Gene cloning; Monoclonal antibody; Tissue expression

基因表达分析是功能基因组学研究的主要实验方法,可用于评价生物体复杂的基因调控网络,且理解基因表达模式还有望揭示与理想性状产生相关的新基因^[1]。基因表达是从 DNA 到蛋白质的过程,包括遗传信息的转录和翻译。基因表达受转录水平和转录后水平等不同层次的调控。因此,从转录水平和转录后水平等不同层次对基因表达进行分析,才能更全面系统地理解高等生物中基因的表达模式。目前,基因表达能力强弱的评价一般用 mRNA 相对表达量和/或蛋白质相对表达量作为指标。实时荧光定量 PCR (qPCR) 具有重现性、特异性、灵敏性、简单性、低成本和高通量的特点,因此,成为在 mRNA 水平对基因表达进行绝对和相对定量的最新工具^[2-3]。蛋白质印迹法 (Western Blot) 因具有高特异性、高精度度、高可靠性、高灵敏度的特点,成为

一种可以用来精确量化相对蛋白质水平的有效且必不可少的技术^[4]。qPCR 和 Western Blot 结果的准确性取决于对实验技术和策略运用的恰当与否^[4-5]。qPCR 结果的准确性受 RNA 的完整性、逆转录效率、扩增效率和 cDNA 的质量等因素影响^[6]。Western Blot 结果的准确性受样品制备是否恰当、和感兴趣样品相关的蛋白质染色与抗体之间的线性范围是否确定、第一抗体的质量是否可靠、信号是否过饱和及目标蛋白信号强度量化是否准确等因素的影响^[4]。准确评价目的基因的表达水平除需要一个标准化的程序外^[4,7],还需对数据进行标准化处理,以减小样品本身和实验系统对定量结果的影响。内参基因的使用是最有效并且可能是整个研究中最容易纠正错误的方法之一^[5]。

内参基因的选择应根据一些标准进行优化后确

定^[8],理想的内参基因应在所有的细胞中或在各种生理状态下均能稳定地表达^[9],不受实验过程的影响,或者不会随目标基因一同被调控^[10]。最常用的内参基因是管家基因(House-keeping genes, HKGs),因为不管是在正常的还是在病理生理条件下,它们均能够在生物体的所有细胞中表达^[11]。HKGs是维持诸如细胞分裂、生长发育、凋亡、生理过程(如糖酵解)及代谢等基本细胞功能所必需的组成型表达基因^[11]。最广泛和传统的作为内参基因的 HKGs 包括:甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)、延伸因子(Elongation factor-1 α , *EF-1 α*)、泛素蛋白基因(Polyubiquitin, *UBQ*)、肌动蛋白基因(*Actin*)、 α -微管蛋白基因(α -tubulin)、 β -微管蛋白基因(β -tubulin)、18S rRNA 基因(*18S rRNA*)、25S rRNA 基因(*25S rRNA*)、泛素结合酶基因 *E2*(Ubiquitin-conjugating enzyme, *UBC*)、真核起始因子基因(Eukaryotic initiation factor 1, *EIF1*)、真核转录因子基因(Eukaryotic transcription factors, ETF)等^[7]。除了 HKGs 之外,一些功能未知且与管家功能无关的基因也因其稳定表达的特性而被用于数据的标准化^[12]。

近来研究发现,内参基因表达的稳定性可能也会受到对细胞有作用的非生物、生物和发育因素的影响,即使使用相同的试验生物,一个试验所用的内参基因也可能不适合另一个试验^[11]。一些管家基因的表达量在同一植株的不同器官中也会呈现变化^[11]。因此,对于基因表达分析而言,确定内参基因的可靠性是至关重要的^[13]。

Actin 广泛存在于高等植物的各种组织细胞中,如花粉、茎韧皮部、叶表皮细胞、叶鞘细胞、根毛、卷须等,对维持高等植物正常的生长发育起着重要的作用^[14]。在基因表达研究中,无论是在生物的还是非生物的胁迫条件下,*Actin* 基因过去经常被用作内参基因^[11]。但新近研究表明,*Actin* 有时也会受到生理状态或者环境的调控而呈现出表达水平的差异^[15]。如在寒冷、干旱、盐害和氧化胁迫条件下,甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam) *Actin* 的表达量在不同品种中并不稳定^[16];棉花(*Gossypium hirsutum* L.) *Actin14* 在 NaCl 胁迫时仅在叶中稳定表达^[17]。因此,在采用 *Actin* 作为内参基因开展试验研究时,必须首先评价其在不同生长条件下在所研究物种中表达的稳定性。

蓖麻(*Ricinus communis* L.)系大戟科(Euphorbiaceae)蓖麻属(*Ricinus* L.),为世界十大油料作物之一。蓖麻 *Actin* 基因(*RcActin*)全长 cDNA 序列已被提

交 GenBank(登录号: XM_002522148. 3),但其组织表达模式在转录和翻译水平上的研究尚未见报道。

本研究采用 RT-PCR 技术克隆 *RcActin* 的编码序列(Coding sequence, CDS),构建原核表达载体 pET32a(+)-*RcActin* 并进行表达,产生融合蛋白 His-*RcActin*,用纯化的 His-*RcActin* 免疫 BALB/c 小鼠,制备抗 *RcActin* 的单克隆抗体(Anti-*RcActin* monoclonal antibody, anti-*RcActin* McAb),利用 anti-*RcActin* McAb,通过 RT-qPCR 和 Western Blot 方法,分析在不同浓度 NaCl 胁迫下 *RcActin* 在盆栽蓖麻生长根、一次分枝老叶、一次分枝新生叶、一次分枝雌花、一次分枝雄花、主茎、主茎果实和一次分枝果实共 8 种组织中的表达模式,以探讨 *RcActin* 基因在蓖麻功能基因表达研究中作为内参基因的可行性,为蓖麻的基因表达研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

蓖麻种子由内蒙古通辽市农业科学研究院惠赠。SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞由大连医科大学麻彤辉教授惠赠。BALB/c 雌性小鼠购自吴氏实验动物(福州)。

大肠杆菌(*E. coli*)感受态菌株 DH5 α 和 BL21(DE3)(天根生化科技有限公司,北京)、辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG(天根生化科技有限公司,北京)、MinuteTM Total Protein Extraction Kit(Invent Biotechnologies, 北京)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(Beyotime, 上海)、TRIzolTM Reagent(Invitrogen, 美国)、Taq DNA 聚合酶(Invitrogen, 美国)、Reverse Transcription System(Promega, 北京)、Oligotex[®] mRNA Mini Kit(Qiagen, 美国)、QIAquick[®] PCR Purification Kit(Qiagen, 美国)、QIAquick[®] Gel Extraction Kit(Qiagen, 美国)、QIAprep[®] Spin Miniprep Kit(Qiagen, 美国)、BeaverBeadsTM His-tag Protein Purification(BeaverBeads, 苏州)、NAbTM Protein A/G Spin Kit(Thermo Scientific, 美国)、SBA ClonotypingTM System/HRP 抗体亚类鉴定试剂盒(Southern Biotechnology, 美国)、鼠抗 His 单克隆抗体(Biomiga, 美国)、Western-BrightTM ECL(Advansta, 美国)、Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix(Agilent, 美国)、BamH I(Neb, 美国)、Xho I(Neb, 美国)、T₄ DNA 连接酶(Neb, 美国)、DNA 分子量标准(Neb, 美国)、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(Isopropyl β -d-1-thiogalactopyranoside, IPTG)(Promega, 北京)、蛋白

分子量标准 (Bio-Rad, 美国)、聚乙二醇 1450 (Polyethylene glycol 1450, PEG-1450) (Sigma, 美国)、弗氏完全佐剂 (Sigma, 美国)、弗氏不完全佐剂 (Sigma, 美国)、硫氧还原蛋白 (Thiooxygen-reducing protein, Trx)、组氨酸 (Histidine, His)、牛血清白蛋白 (Bovineserumalbumin, BSA) (Sigma, 美国)、杜尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) (Gibco, 美国)、胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) (Gibco, 美国)、胰酶 (Gibco, 美国)、低熔点琼脂糖 (UltraPure, 上海)、5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷 (5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -d-galactopyranoside, X-Gal)、氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp)、三羟甲基甲烷、甘氨酸、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、曲拉通 X-100、十二烷基硫酸钠 (Sodium dodecyl sulfate, SDS) 均购自厦门泰京生物技术有限公司, 其他试剂皆为国产分析纯。

1.2 试验设计与样品采集

2017 年 3 月, 选健康、无病虫害和籽粒饱满的蓖麻种子种植于泉州师范学院试验地, 进行正常的土壤管理、水肥管理、整形修剪和病虫害防治, 7 月采集蓖麻蓖麻生长根、一次分枝老叶、一次分枝新生叶、一次分枝雌花、一次分枝雄花、主茎、主茎果实和一次分枝果实, 分别用液氮冷冻。

2017 年 3 月, 选试验用花盆共 40 个, 花盆规格为上口径 18 cm、下口径 15 cm、高 18 cm, 分别装入土壤 500 g、尿素 0.125 g、磷铵 0.100 g 混匀, 定量浇水至水不会溢出土壤表层。选健康、无病虫害和籽粒饱满的蓖麻种子共 200 颗, 种植于花盆中, 每盆种子数为 5 颗, 置于日光温室内进行常规养护管理。视盆土干湿状况, 定期定量浇水, 以平衡蒸发量。出苗后, 每盆定植 1 株。待盆中幼苗长到 5~6 片叶时, 选取长势基本一致的幼苗 30 盆, 采用单因素随机区组试验设计, 随机分成 6 组, 每组 5 盆, 进行 NaCl 胁迫处理。NaCl 浓度分别为 0 (CK), 50, 100, 150, 200, 250 mmol/L。胁迫处理在 17:00 - 19:00 进行, 每盆 200 mL NaCl 溶液分 2 次透灌, 为避免蒸腾导致 NaCl 浓度的变化, 用塑料将花盆口封好, 以保持其浓度恒定。在处理第 5 天采集植株的根系, 分别用液氮冷冻。

1.3 总 RNA 和总蛋白的提取

上述 1.2 中采集的蓖麻各组织用液氮分别研磨后, 各组织的总蛋白质提取及其浓度测定、各组织的总 RNA 提取分别按试剂盒说明书进行, 各组织的总 RNA 质量和浓度分别用 2% (m/V) 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度法检测。

1.4 mRNA 的纯化和 cDNA 的合成

从正常水肥管理蓖麻植株的生长根总 RNA 中纯化 mRNA, 并以 mRNA 为模板合成 cDNA 第一链, 分别按试剂盒说明书进行。分别从正常水肥管理和 NaCl 胁迫处理的蓖麻其他组织取 1 μ g 总 RNA, 用试剂盒中提供的 oligo-dT 和随机引物按试剂盒说明书分别合成 cDNA, 合成的 cDNA 用于后续 qPCR 试验时按 1:5 稀释。

1.5 *RcActin* CDS 的 PCR 扩增

根据 GenBank 中登录的蓖麻 *RcActin* (登录号为 XM_002522148.3) 的全长序列设计 1 对特异性引物: 5'引物: 5'-CGGGATCC (*Bam*H I 识别位点) ATG GCCGACGCCGAGG-3', 3'引物: 5'-CCGCTCGAG (*Xho* I 识别位点) GTTGCACTTCCTGTGGAC-3', 以此进行 PCR 扩增得到 *RcActin* CDS 序列, PCR 反应体系和反应条件分别见表 1, 2。

表 1 PCR 反应体系

试剂 Reagent	用量/ μ L Dosage
5 \times 缓冲液 5 \times Buffer	10
50 mmol/L 氯化镁 50 mmol/L MgCl ₂	4
10 μ mol/L 5'引物 10 μ mol/L 5'primer	0.5
10 μ mol/L 3'引物 10 μ mol/L 3'primer	0.5
50 mmol/L dNTP	2
cDNA 第一链 First strand of cDNA	5
5 U/ μ L <i>Taq</i>	0.5
ddH ₂ O	27.5

表 2 PCR 反应程序

程序 Procedure	反应阶段 Stage	温度/ $^{\circ}$ C Temperature	时间/s Time
1	预变性	95	300
2	25 个循环 25 cycles	变性	95
3		退火	56
4		延伸	72
5	延伸	72	420

1.6 *RcActin* 原核表达载体的构建

将 PCR 产物按试剂盒说明书纯化。纯化的 PCR 产物和 pET32a(+) 载体分别用 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切后, 进行琼脂糖凝胶电泳, 按试剂盒说明书分别回收酶切的 PCR 产物和 pET32a(+) 载体, 再把二者用 T₄ DNA 连接酶连接。并把连接产物转化到 *E. coli* 感受态细胞 BL21, 菌落在选择培养基上培养后, 挑选白色单克隆菌落分别培养, 按试剂盒说明书提质粒, 并通过 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切鉴定筛选阳性重组质粒 pET32a(+)-*RcActin*。经酶切鉴定的 pET32a(+)-*RcActin* 进行基因序列测定。

1.7 序列分析

用 DNAMAN 对 *RcActin* 的 CDS 序列、氨基酸编码序列进行分析。

1.8 pET32a(+)-*RcActin* 原核表达条件分析

将经测序鉴定的重组载体 pET32a(+)-*RcActin* 和空载体分别转化 *E. coli* 感受态细胞 BL21, 分别挑选单菌落进行活化及诱导培养, 用 SDS-PAGE 电泳检测表达产物, 方法按参考文献[18]。

通过预试验确定诱导 pET32a(+)-*RcActin* 表达量的基本条件为: 诱导温度 28 °C、诱导时间 6 h、IPTG 诱导浓度 1.2 mmol/L。通过固定其他条件只改变其中一个条件来分析各单因素对 pET32a(+)-*RcActin* 表达量的影响。设置诱导温度分别为 4, 16, 28, 37 °C, 诱导时间分别为 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 h, IPTG 诱导浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mmol/L。

1.9 His-*RcActin* 可溶性分析

按上述探索好的条件培养表达 pET32a(+)-*RcActin*, 收集诱导表达的菌体, 用 SDS-PAGE 分析 pET32a(+)-*RcActin* 的表达形式, 方法按参考文献[19]。

1.10 融合蛋白 His-*RcActin* 纯化及特异性分析

诱导表达 pET32a(+)-*RcActin*, 菌体沉淀用 8 mol/L 尿素变性增溶, 融合蛋白 His-*RcActin* 用 BeaverBeads™ 试剂盒纯化。纯化的融合蛋白 His-*RcActin* 按参考文献[18]进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色检测纯化效果, 采用 Western Blot 以稀释的抗 His 标签单克隆抗体检测融合蛋白 His-*RcActin* 的反应原性和特异性。以纯化的 His-*RcActin* 为抗原, 鼠抗 His 单克隆抗体作为一抗(1:10 000), HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗(1:5 000), 用 ECL 发光试剂盒曝光充分显色, 拍片保存。

1.11 Anti-*RcActin* McAb 制备

选取 3 只 6 周龄的雌性 BALB/c 小鼠, 取纯化的 His-*RcActin* 与一定量的完全弗氏佐剂按 1:1 的比例混合乳化后, 在小鼠后腿肌肉注射进行免疫。2 周后进行第 2 次免疫(不完全弗氏佐剂)。再 2 周后进行第 3 次加强免疫(不完全弗氏佐剂)。可在第 3 次免疫 1 周后从小鼠的尾静脉采血, 用间接 ELISA 法^[18]测定小鼠血清中的抗体效价, 选取效价高的小鼠进行增强免疫, 于 3 d 后进行细胞融合。

将超强免疫小鼠的脾细胞和 SP2/0 细胞以 1:10 的比例混合, 用 50% PEG 为融合剂, 将融合细胞加入 96 孔板中, 置于 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱内, 用 HAT 培养基筛选培养, 培养 8~14 d 后, 取细胞上清, 用间接 ELISA 法进行检测筛选阳性孔^[18], 阳性孔细胞用有限

稀释法克隆直至阳性单克隆率为 100%。

将阳性杂交瘤细胞以 2×10^5 个细胞/mL 的密度接种于 25 cm² 培养瓶培养。当细胞状态最佳时, 将细胞数量调至 2×10^6 个细胞/mL, 然后将其接种到预先 1 周注射液体石蜡的 BALB/c 小鼠的腹腔。待小鼠腹部增大, 观察腹水的产生情况。1~2 周后收集腹水, 5 000 r/min 离心 5 min 收集上清, 用 NAb™ Protein A/G Spin Kit, 从新采集的腹水中纯化出抗 His-*RcActin* 的 McAb, 具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.12 细胞上清、腹水和 McAb 效价测定

用间接 ELISA 法^[18]进行测定。以纯化的 His-*RcActin* 为抗原, 以梯度稀释的细胞上清、腹水和 McAb 为一抗, 测定 A_{450nm} 值。以分别与 His-*RcActin* 发生特异性反应的细胞上清、腹水和 McAb 的最大倍比稀释度为各自效价。以抗原包被液作为空白对照, 以正常小鼠血清作为阴性对照, 标本孔的吸收值与阴性标本孔的吸收值的比值(P/N) > 2.1 时判断为阳性。

1.13 Anti-*RcActin* McAb 亚类鉴定

用 SBA Clonotyping™ System/HRP 抗体亚类鉴定试剂盒鉴定出上述抗 anti-*RcActin* McAb 的亚类, 具体步骤按试剂盒说明书进行。

1.14 Anti-*RcActin* McAb 特异性鉴定

分别以 1 g/mL 载体 Trx、Trx、His、BSA、纯化的 His-*RcActin* 和蓖麻根总蛋白为抗原, 以制备的 anti-*RcActin* McAb 的 IgG 为一抗, 以 HRP-羊抗鼠 IgG 为二抗, 采用 ELISA 法检测 McAb 的特异性。

在此基础上, 分别以纯化的 His-*RcActin*、蓖麻根总蛋白为抗原, 用 Western Blot 验证 McAb 的特异性。以纯化的 His-*RcActin* 为抗原, 纯化的 anti-*RcActin* McAb 作为一抗(1:10 000), HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗(1:4 000); 以蓖麻根总蛋白为抗原, 纯化的 anti-*RcActin* McAb 作为一抗(1:10 000), HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗(1:4 000), 用 WesternBright™ ECL Kit 曝光充分显色, 拍片保存。试验中, 以抗原包被液作为空白对照, 以免疫前小鼠血清作为阴性对照。

1.15 Anti-*RcActin* McAb 稳定性分析

对阳性细胞株分别进行体外传 19 代和液氮冻存 4 个月后再复苏处理, 按步骤 1.12 的方法检测培养上清中抗 anti-*RcActin* McAb 的效价。

1.16 *RcActin* 在蓖麻各组织表达分析

分别提取 1.2 中采集的蓖麻各组织的总蛋白, 蛋白质含量按试剂盒说明书进行。每个组织分别取 1 mg 蛋白质, 用 SDS-PAGE (12% 分离胶) 分析

RcActin 蛋白质的表达水平。RcActin 蛋白质在蓖麻各组织中的表达情况用 Western Blot 检测,一抗为 anti-RcActin McAb(稀释倍数为 1:10 000),二抗为 HRP-羊抗鼠 IgG(稀释倍数为 1:4 000),用 Western-Bright™ ECL Kit 曝光,拍片保存。每次试验设 3 次生物学重复,每个生物学重复至少进行 3 次技术重复^[20]。以根的表达水平作对照。差异显著性标准采用新复极差法(Duncan)。

分别提取 1.2 中采集的蓖麻各组织的总 RNA 并进行 RT-qPCR。引物序列如下,*qRcAct1*:5'-GTCAG GTTATCACCATTGG-3';*qRcAct2*:5'-TGTTACCATAAA GATCCTTC-3'。RT-qPCR 反应体系(总体积 10 μ L)为:0.2 μ L 50 \times SYBR Green Solution,5 μ L 2 \times Mix (dT),1 μ L cDNA(相当于 10 ng 总 RNA),和每种引

物分别为 0.4 μ L(200 nmol/L),RNase Free ddH₂O 补足至 10 μ L。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C,10 min;95 $^{\circ}$ C,1 min,60 $^{\circ}$ C,1 min,40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[21-22]计算 RcActin mRNA 相对表达水平,每个样品重复 3 次,以根的表达水平作对照。

1.17 引物合成和 DNA 测序

由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

2 结果与分析

2.1 pET32a(+)-RcActin 表达质粒构建及测序鉴定

以蓖麻根的 cDNA 为模板,用根据 RcActin 序列(GenBank 登录号为 XM_002522148.1)设计的引物进行 PCR 扩增,获得 1 131 bp 的 CDS 序列,与设计的片段长度相符(图 1-A)。把表达载体 pET32a(+)

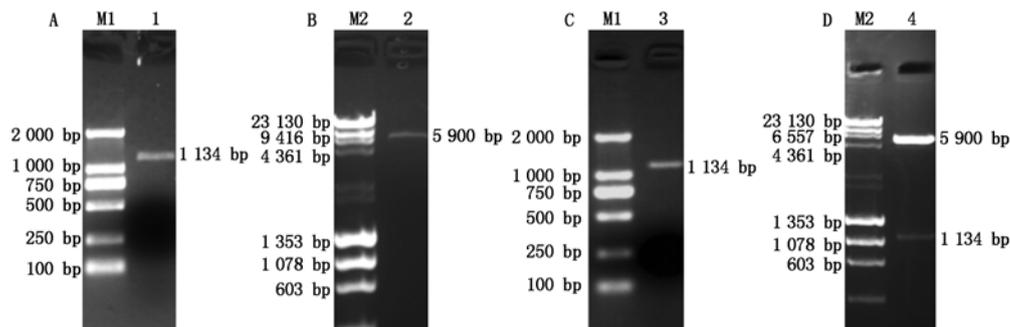


图 1 重组表达载体 pET32a(+)-RcActin 构建的琼脂糖电泳图谱
A. *RcActin* CDS PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图谱;M1. DL2000 DNA 分子量标准;1. *RcActin* CDS 产物。B. pET32a(+)-RcActin 酶切产物琼脂糖凝胶电泳图谱;M2. λ -Hind III + ϕ X174-Hae III DNA 分子量标准;2. pET32a(+)-RcActin 经 BamH I 和 Xho I 双酶切产物。C. *RcActin* 基因片段经 BamH I 和 Xho I 双酶切产物琼脂糖凝胶电泳图谱;M1. DL2000 DNA 分子量标准;3. *RcActin* 基因片段经 BamH I 和 Xho I 双酶切产物。D. pET32a(+)-RcActin 酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳图谱;M2. λ -Hind III + ϕ X174-Hae III DNA 分子量标准;4. pET32a(+)-RcActin 经 BamH I 和 Xho I 双酶切产物。
A. Agarose gel electrophoresis analysis of PCR product of *RcActin* CDS; M1. DL2000 DNA molecular weight standard; 1. PCR product of *RcActin* CDS. B. Agarose gel electrophoresis analysis of pET32a(+)-RcActin vector by restriction digestion; M2. λ -Hind III + ϕ X174-Hae III DNA molecular weight standard; 2. pET32a(+)-RcActin vector by BamH I and Xho I digestion. C. Agarose gel electrophoresis analysis of the target fragment *RcActin* by restriction digestion; M1. DL2000 DNA molecular weight standard; 3. The target fragment *RcActin* CDS by BamH I and Xho I digestion. D. Agarose gel electrophoresis analysis of recombinant expression plasmid pET32a(+)-RcActin by restriction digestion; M2. λ -Hind III + ϕ X174-Hae III DNA molecular weight standard; 4. The recombinant expression plasmid by BamH I and Xho I digestion.

图 1 重组表达载体 pET32a(+)-RcActin 构建的琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis analysis of expression vector construction of pET32a(+)-RcActin

```

1  ATGCCGACGCCGAGGATATTCAGCCCTGTGTTGCGACAATGGAAGCTGGAATGGTGAAGGCTGGGTTGCTGGTGATGCTCCAGGGCAGTGTCCCTAGT
1  M A D A E D I Q P L V C D N G T G M V K A G F A G D D A P R A V F P S
106 ATTGTTGGAAGACCCGACACTGGTGCATGGTGTGGTTCGAGAGGATGCCTATGTAGGTGATGAAGCACAATCAAAGAGGATATCTTACCTTGAAA
36  I V G R P R H T G V M V G M G Q K D A Y V G D E A Q S K R G I L T L K
211 TACCCATGAGCATGGTATTGTCAGCAACTGGGATGATATGAAAAGATCTGGCATCACACTTCTACAATGAGCTTCGTGTGCTCCTGAGGAGCATCCTGTG
71  Y P I E H G I V S N W D D M E K I W H H T F Y N E L R V A P E E H P V
316 CTTCCTACTGAGGCTCCTCAACCTAAGGCTAACAGAGAGAAGATGACTCAGATCATGTTGAGACCTCAATGTGCCTGCAATGTATGTCGCCATCCAGGCC
106 L L T E A P L N P K A N R E K M T Q I M F E T F N V P A M Y V A I Q A
421 GTTCTCTCTGTATGCCAGTGGTTCGTAACAATGGTATTGTGCTGATCTGGTGTGATGAGTACACTGTGCCAATTTATGAAGTTATGCTCTCCACAT
141 V L S L Y A S G R T T G I V L D S G D G V S H T V P I Y E G Y A L P H
526 GCCATCTACGTTTGACCTTGCTGGTTCGATCTGACCGATGCTTTGATGAAGATCTTACCAGAGAGGGTACATGTTCCACCACCTGCCAAGCGGAAATT
176 A I L R L D L A G R D L T D A L M K I L T E R G Y M F T T T A E R E I
631 GTCCGTGACATGAAGGAGAACTGCATATGTTGCCCTTGACTACGAGCAGGAACTTGAGACTGCCAAGAGCAGCTCCTCAGTTGAGAGAACTACGAGCTTCT
211 V R D M K E K L A Y V A L D Y E Q E L E T A K S S S S V E K N Y E L P
736 GATGGTCAGGTTATACCAITGGAGCTGAGAGATTCCGTTGCCAAGAGTACTTTCCAGCCATCTCTCATTGGAATGGAAGCTGCAGGAATCCACGAGACTACA
246 D G Q V I T I G A E R F R C P E V L F Q P S L I G M E A A G I H E T T
841 TACAACCTATCATGAAGTGTGATGTGGATATCAGGAAGGATCTTATGGTAACATTGTGCTCAGTGGTGTCCACTATGTTCCGTTATTCGACACCGTATG
281 Y N S I M K C D V D I R K D L Y G N I V L S G G S T M F P G I A D R M
946 AGCAAGGAGATCACCCTTGCTCCAGCAGTATGAAGATTAAGGTTGTGGCCACCAGAAAGTACAGTGTCTGGATTGGAGGATCTATCCTTGTCATC
316 S K E I T A L A P S S M K I K V V A P P E R K Y S V W I G G S I L A S
1 051 CTCAGTACGTTCCAGCAGATGTGGATTCCAAGGGCAGTATGACGAGTCTGGCCATCCATTGTCACAGGAAGTGCTTC
351 L S T F Q Q M W I S K G E Y D E S G P S I V H R K C F

```

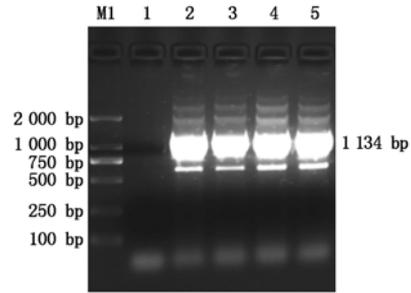
图 2 *RcActin* 的 cDNA 序列和推断的氨基酸序列

Fig. 2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *RcActin*

和目的基因片段分别用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切,酶切产物电泳(图 1-B、C)后分别进行回收,回收产物电泳估测浓度后,用 T_4 DNA 连接酶将二回收产物连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑取阳性单菌落培养,提质粒。质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切,可切出 1 134 bp 左右片段(图 1-D)。将经酶切验证后的重组载体 pET32a(+)-*RcActin* 进行测序。测序结果表明(图 2),pET32a(+)-*RcActin* 上的 *RcActin* 序列正确,未出现移码,证明成功构建出 pET32a(+)-*RcActin* 重组表达载体。

2.2 重组载体 pET32a-*RcActin* 原核表达及可溶性分析

将表达载体 pET32a(+)和重组载体 pET32a(+)-*RcActin* 分别转化 BL21(DE3),经菌落 PCR 检测(图 3)后,随机挑取阳性菌落诱导表达,由图 4 可见,二者可分别诱导表达分子量为 19.83,61.46 ku 左右的特异蛋白(箭头所指条带)。所表达的蛋白质分子量与预期的分子量大小相一致。转重组载体 pET32a(+)-*RcActin* 的 BL21(DE3)在 19.83 ku 处未见表达蛋白带,表明 pET32a(+)-*RcActin* 已成功地在大肠杆菌中表达,并形成了融合蛋白。



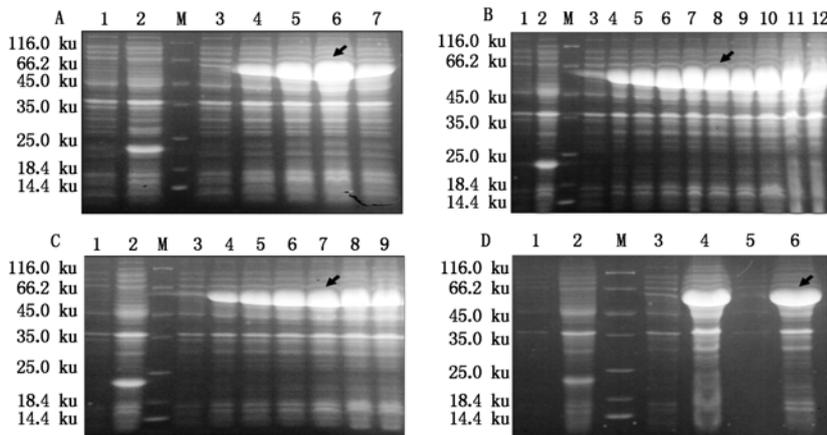
M. DL2000 DNA 分子量标准; 1-5. 菌落 PCR 产物。

M. DL2000 DNA molecular weight standard; 1-5. Product of colony PCR.

图 3 pET32a(+)-*RcActin* 原核表达菌落 PCR 图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoresis analysis of colony PCR product of pET32a(+)-*RcActin* prokaryotic expression

pET32a(+)-*RcActin* 原核表达条件的优化见图 4。结果表明,表达条件的诱导温度为 28 $^{\circ}$ C(图 4-A),诱导时间为 5 h(图 4-B),IPTG 诱导浓度为 0.4 mmol/L(图 4-C)。此条件下诱导表达的 BL21 重组菌经离心收集菌体,菌体经超声波裂解,用 SDS-PAGE 分析裂解后的上清和沉淀,pET32a(+)-*RcActin* 表达蛋白存在菌体裂解液沉淀中,即以包涵体形式表达,结果见图 4-D。



A. 诱导温度对 His-*RcActin* 表达量影响的 SDS-PAGE 图谱;M. 蛋白分子量标准; 1. pET32a(+)未诱导; 2. pET32a(+)诱导; 3. pET32a(+)-*RcActin* 未诱导; 4-7. pET32a(+)-*RcActin* 分别在 4, 18, 28, 37 $^{\circ}$ C 诱导时表达产物;白色箭头所示为目的蛋白条带(下同)。B. 诱导时间对 His-*RcActin* 表达量影响的 SDS-PAGE 图谱;M,1-3. 同 A; 4-12. pET32a(+)-*RcActin* 分别在 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 h 诱导时表达产物。C. IPTG 诱导浓度对 His-*RcActin* 表达量影响的 SDS-PAGE 图谱;M,1-3. 同 A; 4-9. pET32a(+)-*RcActin* 分别在 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mmol/L 诱导时表达产物。D. His-*RcActin* 可溶性分析 SDS-PAGE 图谱;M,1-3. 同 A; 4. pET32a(+)-*RcActin* 诱导菌体的裂解液; 5. pET32a(+)-*RcActin* 诱导菌体的裂解沉淀液; 6. pET32a(+)-*RcActin* 诱导菌体的裂解上清液。

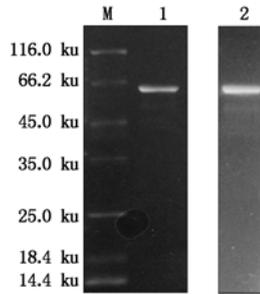
A. SDS-PAGE analysis of the influence of different induction temperature on the expression of His-*RcActin* in *E. coli*; M. Protein molecular weight standard; 1. pET32a(+) transformed bacterial cells before IPTG induction; 2. pET32a(+) transformed bacterial cells induced for 6 h by 1.2 mmol/L IPTG; 3. The recombinant plasmid pET32a(+)-*RcActin* transformed bacterial cells before IPTG induction; 4-7. The recombinant plasmid pET32a(+)-*RcActin* transformed bacterial cells induced by 1.2 mmol/L IPTG for 6 h at 4, 18, 28, 37 $^{\circ}$ C respectively; White arrow shows the recombinant His-*RcActin* (the same as following). B. SDS-PAGE analysis of the influence of different induction time on the expression amount of His-*RcActin* in *E. coli*; M, 1-3. The same as A; 4-12. The recombinant plasmid pET32a(+)-*RcActin* transformed bacterial cells induced by 1.2 mmol/L IPTG for 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 h, respectively. C. SDS-PAGE analysis of the influence of different IPTG concentration on the expression amount of His-*RcActin* in *E. coli*; M, 1-3. The same as A; 4-9. The recombinant plasmid pET32a(+)-*RcActin* transformed bacterial cells induced by 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 mmol/L IPTG, respectively. D. SDS-PAGE analysis of the His-*RcActin* protein solubility; M, 1-3. The same as A; 4. Lysate liquid of the recombinant plasmid pET32a(+)-*RcActin* transformed bacterial cells induced; 5. The precipitation of the recombinant plasmid pET32a(+)-*RcActin* transformed bacterial cells induced; 6. The supernatant of the recombinant plasmid pET32a(+)-*RcActin* transformed bacterial cells induced.

图 4 pET32a(+)-*RcActin* 原核表达条件优化的 SDS-PAGE 图谱

Fig.4 SDS-PAGE analysis of optimize expression condition of pET32a(+)-*RcActin* in *E. coli*

2.3 His-RcActin 融合蛋白纯化

pET32a(+)-RcActin 经诱导表达增溶后,用 Be-averBeads™ 试剂盒纯化,纯化产物 His-RcActin 经 SDS-PAGE 验证,在凝胶泳道上只显示与目的蛋白大小相符的单一一条带(图 4-D)。以抗 6X His 标签抗体为一抗,经 Western Blot 验证,结果显示在纯化蛋白的泳道上只出现一条接近 61.46 ku 的条带(图 5),可见 His-RcActin 能与抗 His 标签抗体发生特异性结合,说明 His-RcActin 表达成功,具有较好的免疫反应性和抗原性。



M. 蛋白分子量标准; 1. SDS-PAGE 图谱中 His-RcActin 纯化产物的条带; 2. Western Blot 中 His-RcActin 的纯化产物与抗 6 个组氨酸标签抗体特异性结合复合物的条带。

M. Protein molecular weight standard; 1. Bands of purified His-RcActin in SDS-PAGE; 2. Bands of the complex produced by the purified His-RcActin products specifically bound to anti-6X histidine tag antibodies in Western Blot.

图 5 纯化 His-RcActin 的 SDS-PAGE 图谱和 Western Blot 验证

Fig. 5 SDS-PAGE and Western Blot analysis of purified His-RcActin

2.4 Anti-RcActin McAb 制备及其性质分析

2.4.1 Anti-RcActin McAb 的制备及腹水效价分析

His-RcActin 免疫后的小鼠脾细胞与杂交瘤细胞进行成功融合后,经过 3 次的有限稀释克隆,获得 9 株分泌 anti-His-RcActin McAb 的细胞株(1B3E4、1B3G4、1F1F9、2A3B2、2A3B3、2F4G4、2G10D5、3B5F7、3C8E4),其中,5 株阳性单克隆细胞株体外诱导法制备的腹水效价达到 1 000 000 及以上(表 3)。

表 4 传代细胞上清中 anti-RcActin McAb 的效价

Tab. 4 Titer of anti-RcActin McAb in supernatant of cell passage

细胞株 Cell strain number	传代数 and 效价(×1 000) Passage number and titer(×1 000)																	
	0	1	2	3	4	5	6-8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1B3E4	2 048	2 048	1 024	1 024	512	512	256	128	64	32	16	8	8	4	4	2	2	1
	a	a	b	b	c	c	d	e	f	g	h	i	i	j	j	k	k	l
2G10D5	2 048	2 048	2 048	1 024	1 024	512	512	512	-	256	256	256	256	128	128	128	128	128
	a	a	a	b	b	c	d	d	-	e	e	e	e	f	f	f	f	f
3C8E4	1 024	1 024	512	512	256	256	128	64	64	32	32	16	16	8	4	4	2	1
	a	a	b	b	c	c	d	e	e	f	f	g	g	h	i	i	j	k

注:不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$);同一行数据中字母相同表示无显著性差异;- . 未测定。

Note: Different small letters indicate significant difference ($P < 0.05$); The same letters in the same line indicate no significant difference; - . No measurement data.

表 3 腹水效价的间接 ELISA 测定

Tab. 3 Indirect ELISA assay of the titers of ascitics

细胞株 Cell strain number	腹水效价 Titers of ascitics	细胞株 Cell strain number	腹水效价 Titers of ascitics
1B3E4	2 048 000	2F4G4	258 000
1B3G4	512 000	2G10D5	2 048 000
1F1F9	4 096 000	3B5F7	1 024 000
2A3B2	64 000	3C8E4	1 024 000
2A3B3	128 000		

2.4.2 Anti-RcActin McAb 纯化 分别新鲜采集利用 5 株高效价阳性单克隆细胞株制备的腹水,用 NAb™ Protein A/G Spin Kit 分别从腹水中纯化 anti-His-RcActin 的 McAbs, McAb 配制终浓度 1 mg/L。

2.4.3 Anti-RcActin McAb 特异性鉴定 纯化所得的 5 株 McAbs 均与 His、BSA 无交叉反应,1F1F9 株和 3B5F7 株与载体 Trx 有交叉反应,说明这 2 株细胞产生的抗体为标签蛋白特异性抗体,其余 3 株为 anti-RcActin 的特异性 McAbs。

2.4.4 Anti-RcActin McAb 亚型鉴定 3 株 anti-RcActin McAb 亚型均为 IgG1 类免疫球蛋白,见图 6。

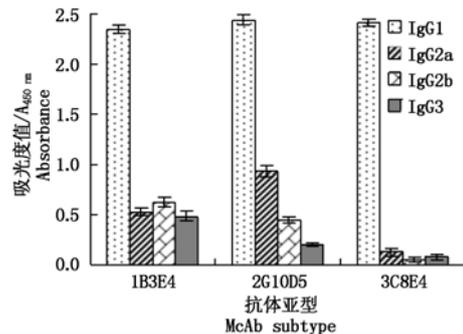


图 6 Anti-RcActin McAb 亚型鉴定

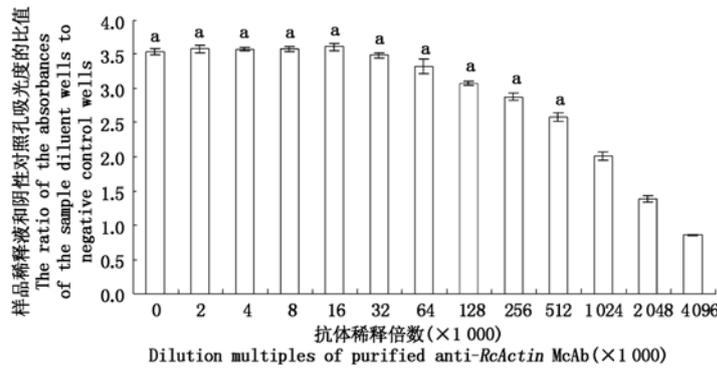
Fig. 6 Identification of the anti-RcActin McAb subtype

2.4.5 Anti-RcActin McAb 稳定性和效价分析 选获得的 1B3E4、2G10D5 和 3C8E4 细胞株体外传 19 代后,采用检测细胞上清中 McAb 的效价,从表 4 可

知,其中 1B3E4 和 3C8E4 细胞上清中 McAb 的效价随传代数增加而急剧下降,2G10D5 细胞上清中 McAb 的效价则相对稳定,传至第 19 代效价基本保持不变,仍然可以达到 1:128 000。将冻存于液氮中的 1B3E4、2G10D5 和 3C8E4 细胞分别复苏培养来生产 McAb,结果表明,冻存 4 个月后 2G10D5 细胞株 McAb 的效价也基本未变,可以达到 1:128 000,

说明 2G10D5 细胞株的稳定性好。

以纯化的 His-RcActin 为抗原,以小鼠免疫前血清作为阴性对照,将从 2G10D5 细胞株制备的腹水中纯化的 anti-RcActin McAb 进行等倍稀释,采用间接 ELISA 法检测。结果表明,anti-RcActin McAb 效价达到 1:512 000(图 7)。

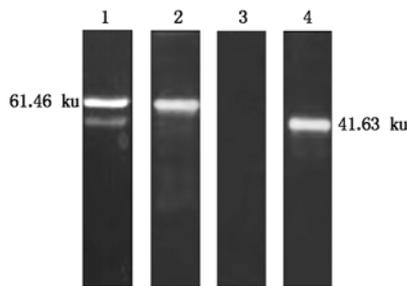


a. 表示不同稀释倍数对应样品孔的吸光度值/阴性对照孔的吸光度值 > 2.1。
a. The multiples of the absorbances of the sample wells corresponding to different dilution multiples to the absorbance value of the negative control wells is greater than 2.1.

图 7 纯化 anti-RcActin McAb 效价的间接 ELISA 检测

Fig. 7 Indirect ELISA assay of the titers of anti-RcActin McAb

2.4.6 Anti-RcActin McAb 特异性的 Western Blot 验证 当以纯化的 anti-RcActin McAb 作为一抗,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,抗原分别为原核表达纯化产物 His-RcActin 和蓖麻根总蛋白时,经 Western Blot 分析(图 8)表明,anti-RcActin McAb 不仅可与在大肠杆菌中表达并纯化的 anti-His-RcActin McAb 进行特异性反应,还可与蓖麻根总蛋白进行特异性反应。



M. 蛋白分子量标准; 1. 抗原为 His-RcActin 原核表达纯化产物,一抗为纯化的 anti-RcActin McAb; 2. 抗原为 His-RcActin 原核表达未纯化产物,一抗为纯化的 anti-RcActin McAb; 3. 抗原为蓖麻根总蛋白,一抗为纯化的 anti-RcActin McAb; 4. 抗原为蓖麻根总蛋白,一抗为正常小鼠的血清。
M. Protein molecular weight standard; 1. Purified product of His-RcActin prokaryotic expression as antigen, purified anti-RcActin McAb as primary antibody; 2. No-purified product of His-RcActin prokaryotic expression as antigen, purified anti-RcActin McAb as primary antibody; 3. The total protein in roots from *R. communis* as antigen, immune serum as primary antibody, purified anti-RcActin McAb as primary antibody; 4. The total protein in roots from *R. communis* as antigen, serum from normal mice as primary antibody.

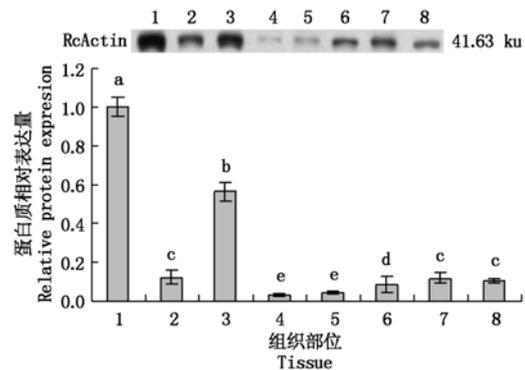
图 8 Anti-RcActin McAb 特异性的 Western Blot 分析

Fig. 8 Western Blot analysis of anti-RcActin McAb

2.5 RcActin 基因在蓖麻各组织表达

利用 Western Blot 方法检测蓖麻生长根、一次分枝老叶、一次分枝新生叶、一次分枝雌花、一次分

枝雄花、主茎、主茎果实和一次分枝果实在正常水肥管理且时空一致条件下 RcActin 的表达量,并进行分析,结果如图 9 所示。RcActin 在这些组织中均有表达,并且在各组织的含量存在显著性差异 ($P < 0.05$)。利用 qRT-PCR 方法分析 RcActin mRNA 在上述组织中的表达量,结果如图 10 所示。RcActin mRNA



1. 生长根; 2. 一次分枝老叶; 3. 一次分枝新生叶; 4. 一次分枝雌花; 5. 一次分枝雄花; 6. 主茎; 7. 主茎果实; 8. 一次分枝果实。图中小写字母相同表示差异不显著,字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。图 10-12 同。

1. Growing roots; 2. Old leaves of primary branches; 3. Young leaves of primary branches; 4. Female flowers of primary branches; 5. Male flowers of primary branches; 6. Main stems; 7. Fruits of main stems; 8. Fruits of primary branches. The same letters in the figure mean no significant difference, while different letters mean significant difference ($P < 0.05$). The same as Fig. 10-12.

图 9 RcActin 在正常水肥管理且时空一致条件下蓖麻不同组织中的表达量

Fig. 9 Protein expression of RcActin in different tissues from *R. communis* plants growing normally under normal water and nitrogen management

在各组织的表达量存在显著性差异 ($P < 0.05$) (图 10), 在生长根、一次分枝新生叶、主茎果实和一次分枝果实等幼嫩和迅速生长的组织中 *RcActin* mRNA 的表达量较高, 显著高于在一次分枝雌花、一次分枝雄花和主茎中的表达量, 并且生长根和一次分枝新生叶的表达量显著高于主茎果实和一次分枝果实。

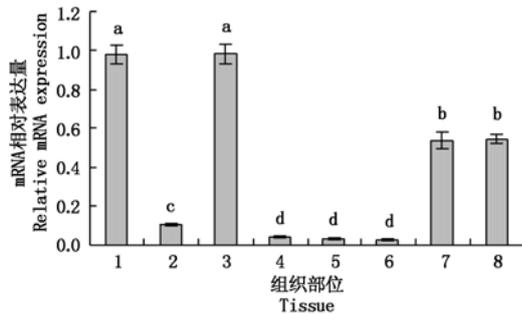


图 10 *RcActin* mRNA 在正常水肥管理且时空条件一致条件下的蓖麻不同组织中的表达量

Fig. 10 mRNA expression of *RcActin* in different tissues from *R. communis* plants growing normally under normal water and nitrogen management

通过 Western Blot 方法分析 *RcActin* 蛋白质在不同浓度 NaCl 胁迫下盆栽蓖麻根系中的表达量, 结果如图 11 所示。与对照相比, *RcActin* 蛋白质的表达量随胁迫浓度的增强呈先上升后下降的趋势。50 ~ 100 mmol/L NaCl 胁迫下, *RcActin* 蛋白质表达量无显著性变化 ($P > 0.05$); 100 ~ 200 mmol/L NaCl 胁迫下, 其表达量显著上升 ($P < 0.05$); 而 200 ~ 250 mmol/L NaCl 胁迫下, 其表达量显著下降 ($P < 0.05$)。利用 qRT-PCR 方法分析 *RcActin* mRNA 在上述组织中的表达量, 结果如图 12 所示。*RcActin* mRNA 与其蛋白质的变化模式不同。50 ~ 100 mmol/L NaCl 胁迫下, *RcActin* mRNA

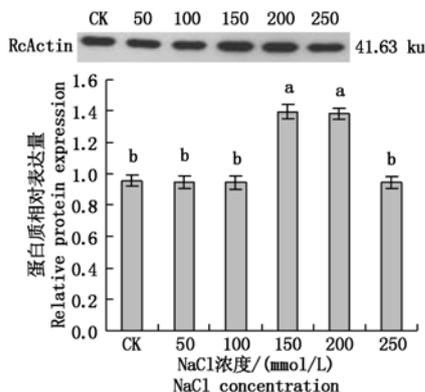


图 11 *RcActin* 在不同浓度 NaCl 胁迫下盆栽蓖麻根系中的表达量

Fig. 11 Protein expression of *RcActin* in the roots from *R. communis* plants potting under NaCl stress at different concentrations

的表达量无显著变化; 但 100 ~ 250 mmol/L NaCl 胁迫下, 其表达量均显著上升 ($P < 0.05$)。

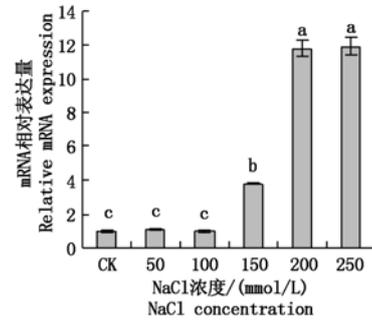


图 12 *RcActin* mRNA 在不同浓度 NaCl 胁迫下盆栽蓖麻根系中的表达量

Fig. 12 mRNA expression of *RcActin* in the roots from *R. communis* plants potting under NaCl stress at different concentrations

3 讨论与结论

在利用 RT-qPCR 和 Western Blot 进行目的基因表达的研究时, 选择一个稳定表达的基因作为参考基因至关重要^[23]。目前已有关于植物不同组织和非生物胁迫下内参基因筛选的研究报道。*Actin* 基因具有高度的保守性和表达稳定性, 常用作植物基因表达分析中的内参之一^[24]。高等植物 *Actin* 基因同动物 *Actin* 基因一样, 属于多基因家族, 其基因是多拷贝的^[25], *Actin* 基因存在异构体, *Actin* 基因的异构体在一级结构上的同源性很高, 但时空表达调控方式不同, 表达具有组织特异性^[26-27], 并非所有的植物 *Actin* 基因均稳定表达。Czechowski 等^[12] 研究表明, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 的 *Actin2* (AT3G18780) 和 *Actin7* (At5g09810) 的表达在不同的发育阶段不稳定, 并且 *Actin2* 的表达在 NaCl 胁迫处理下稳定性差; Vashisth 等^[28] 筛选高丛蓝莓 (*Vaccinium corymbosum* L.) 中稳定的内参基因时发现, *Actin7* (CF811156) 的表达在不同组织中不稳定; 割手密 (*Saccharum spontaneum* L.) β -*Actin* (CA148161) 的表达在 NaCl 胁迫处理下不稳定^[29]。本研究结果表明, 蓖麻 *RcActin* mRNA 在不同的组织中和 NaCl 胁迫处理下均不稳定, 这与前人研究结果一致。

目前, 内参基因的筛选主要是利用 RT-qPCR 技术从 mRNA 水平进行研究^[1-13, 28-29]。某基因即便于一定的生理条件下在转录水平上稳定表达, 但由于基因表达的复杂网络调控系统的变化, 也可能导致其在翻译过程中存在显著差异。因此, 基因表达分析时所用的参考基因应该是特定物种在特定处理中 mRNA 水平和/或翻译水平都相对稳定表达的基因^[30]。本研究不仅从 mRNA 水平, 也从蛋白质水平

对蓖麻 *RcActin* 在不同组织中和 NaCl 胁迫处理下的表达进行了分析。大量研究表明,不同试验条件下最适候选内参基因存在差异^[31],因此,蓖麻 *RcActin* 能否作为或在什么样的试验条件下可作为参考基因,还需通过分析不同时空条件下和不同试验条件下该基因详细的 mRNA 和蛋白质表达模式来进行综合评价。

本研究采用 RT-PCR 技术克隆蓖麻的 *RcActin* 的 CDS,构建原核表达载体 pET32a(+)-*RcActin*,表达并纯化获得 61.46 ku 的融合蛋白 His-RcActin,并以此作为抗原制备抗蓖麻 *RcActin* 蛋白质 McAb。以制备的 McAb 为一抗,利用 Western Blot 方法分析 *RcActin* 蛋白质在正常水肥管理且时空一致条件下的蓖麻不同组织中和在 NaCl 胁迫条件下在根中的表达水平;RT-qPCR 分析蓖麻 *RcActin* mRNA 在上述各组织中的表达水平,结果表明,蓖麻各组织中 *RcActin* 蛋白质和 *RcActin* mRNA 的表达量均有显著差异;蓖麻根中 *RcActin* 蛋白质和 *RcActin* mRNA 的表达量在 NaCl 胁迫条件下不稳定。*RcActin* 表达研究为蓖麻基因表达分析中内参基因的筛选提供了一定的理论依据。

参考文献:

- [1] Obrero Á, Die J V, Román B, Gómez P, Nadal S, González-Verdejo C I. Selection of reference genes for gene expression studies in zucchini (*Cucurbita pepo*) using qPCR[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(10): 5402 - 5411. doi:10.1021/jf200689r.
- [2] Jacob F, Guertler R, Naim S, Nixdorf S, Fedier A, Hacker N F, Heinzelmann-Schwarz V. Careful selection of reference genes is required for reliable performance of RT-qPCR in human normal and cancer cell lines[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e59180. doi:10.1371/journal.pone.0059180.t001.
- [3] Ginzinger D G. Gene quantification using Real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream[J]. *Experimental Hematology*, 2002, 30(6): 503 - 512. doi:10.1016/S0301-472X(02)00806-8.
- [4] Ghosh R, Gilda J E, Gomes A V. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of Western Blots[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2014, 11(5): 549 - 560. doi:10.1586/14789450.2014.939635.
- [5] Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations [J]. *Genes and Immunity*, 2005, 6(4): 279 - 284. doi:10.1038/sj.gene.6364190.
- [6] Janská A, Hodek J, Svoboda P, Zámečník J, Prášil I T, Vlasáková E, Milella L, Ovesná J. The choice of reference gene set for assessing gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) under low temperature and drought stress [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2013, 288(11): 639 - 649. doi:10.1007/s00438-013-0774-4.
- [7] Kozera B, Rapacz M. Reference genes in Real-time PCR [J]. *Journal of Applied Genetics*, 2013, 54(4): 391 - 406. doi:10.1007/s13353-013-0173-x.
- [8] Chervoneva I, Li Y Y, Schulz S, Croker S, Wilson C, Waldman S A, Hyslop T. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT-PCR[J]. *BMC Bioinformatics*, 2010, 11(1): 253 - 268. doi:10.1186/1471-2105-11-253.
- [9] Bustin S A. Quantification of mRNA using Real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems [J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2002, 29(1): 23 - 39. doi:10.1677/jme.0.0290023.
- [10] Radonić A, Thulke S, Mackay I M, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative Real-time PCR [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2004, 313(4): 856 - 862. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.177.
- [11] Joseph J T, Poolakkalody N J, Shah J M. Plant reference genes for development and stress response studies [J]. *Journal of Biosciences*, 2018, 43(1): 173 - 187. doi:10.1007/s12038-017-9728-z.
- [12] Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi M K, Scheible W R. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2005, 139(1): 5 - 17. doi:10.1104/pp.105.063743.
- [13] Gao X K, Zhang S, Luo J Y, Wang C Y, Lü L M, Zhang L J, Zhu X Z, Wang L, Lu H, Cui J J. Comprehensive evaluation of candidate reference genes for gene expression studies in *Lysiphlebia japonica* (Hymenoptera: Aphidiidae) using RT-qPCR [J]. *Gene*, 2017, 637: 211 - 218. doi:10.1016/j.gene.2017.09.057.
- [14] 王卓, 张少斌, 马镛, 马冠宇. 植物肌动蛋白研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(10): 2860, 2863. doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2007.10.017. Wang Z, Zhang S B, Ma D, Ma G Y. Advances in plant actin [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2007, 35(10): 2860, 2863.
- [15] Xiang Y, Huang X, Wang T, Zhang Y, Liu Q W, Hussey P J, Ren H Y. Actin binding protein29 from *Lilium* pollen plays an important role in dynamic actin remodeling [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(6): 1930 - 1946. doi:10.1105/tpc.106.048413.
- [16] Park S C, Kim Y H, Ji C Y, Park S, Jeong J C, Lee H S, Kwak S S. Stable internal reference genes for the normalization of Real-time PCR in different sweetpotato cultivars subjected to abiotic stress conditions [J]. *PLoS One*, 2007, 7(12): e51502. doi:10.1371/journal.pone.0051502.
- [17] Wang M, Wang Q L, Zhang B H. Evaluation and selection of reliable reference genes for gene expression under abiotic stress in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Gene*, 2013, 530(1): 44 - 50. doi:10.1016/j.gene.2013.07.084.
- [18] 董乐, 姚丽梅, 戴聪杰, 张乐, 黄莘莘, 王建颖. 大黄鱼 β -actin 抗体的制备与组织表达谱分析 [J]. *海洋科学*, 2014, 38(12): 22 - 28. doi:10.11759/hyxx20140223003. Dong L, Yao L M, Dai C J, Zhang L, Huang P P,

- Wang J Y. Expression and purification of β -actin antibody from *Larimichthys crocea* [J]. *Marine Sciences*, 2014, 38(12): 22 – 28.
- [19] 王芳, 陈巧红, 董乐, 王云, 朱国立, 许珊珊, 黄苹苹, 王建颖, 林娟. 蓖麻 3-磷酸甘油醛脱氢酶的基因克隆及表达分析[J]. *分子植物育种*, 2018, 16(24): 7965 – 7974. doi:10.13271/j. mpb. 016. 007965.
- Wang F, Chen Q H, Dong L, Wang Y, Zhu G L, Xu S S, Huang P P, Wang J Y, Lin J. Cloning and expression analysis of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from castor (*Ricinus communis* L.) [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2018, 16(24): 7965 – 7974.
- [20] 李振波, 王琢玉, 刘学群, 覃瑞, 黄军艳, 董彩华, 刘胜毅. 甘蓝型油菜 *Bn19070* 的表达与同源基因 *At2g19070* 的 amiRNAi 研究[J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(3): 197 – 202, 209.
- Li Z B, Wang Z Y, Liu X Q, Qin R, Huang J Y, Dong C H, Liu S Y. Expression of *Brassica napus* gene *Bn19070* and amiRNA interference of homologous gene *At2g19070* [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2011, 33(3): 197 – 202, 209.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402 – 408. doi:10.1006/meth.2001.1262.
- [22] 阳永学, 李振波, 童超波, 黄军艳, 于景印, 董彩华, 刘胜毅. 甘蓝型油菜半胱氨酸蛋白酶基因 *BnCP51* 及其启动子的克隆与表达[J]. *中国油料作物学报*, 2016, 38(4): 406 – 414. doi:10.7505/j. issn. 1007-9084.2016.04.002.
- Yang Y X, Li Z B, Tong C B, Huan J Y, Yu J Y, Dong C H, Liu S Y. Cloning and expression of cysteine proteinase *BnCP51* and its promoter from *Brassica napus* L. [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2016, 38(4): 406 – 414.
- [23] Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 487 – 493. doi:10.1093/jxb/em.305.
- [24] 敖特根白音, 高立杰, 张树华, 云锦凤, 郎明林, 杨学举. 蒙古冰草肌动蛋白基因 (*MwACT2*) 克隆与表达分析[J]. *草地学报*, 2016, 24(1): 129 – 136. doi:10.11733/j. issn. 1007-0435.2016.01.018.
- Ao T G B Y, Gao L J, Zhang S H, Yun J F, Lang M L, Yang X J. Cloning and expression analysis of actin (*MwACT2*) in *Agropyron mongolicum* Keng [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2016, 24(1): 129 – 136.
- [25] Firtel R A. Multigene families encoding actin and tubulin [J]. *Cell*, 1981, 24(1): 6 – 7. doi:10.1016/0092-8674(81)90494-3.
- [26] Kandasamy M K, Gilliland L U, McKinney E C, Meagher R B. One plant actin isovariant, ACT7, is induced by auxin and required for normal callus formation [J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(7): 1541 – 1554. doi:10.2307/3871385.
- [27] Jiang Y Q, Zhao W L. Expression and phylogenetic analysis of pea actin isoforms [J]. *Acta Botanica Sinica (Chinese Edition)*, 2002, 44(12): 1456 – 1461. doi:10.1127/0340-269X/2002/0032-0677.
- [28] Vashisth T, Johnson L K, Malladi A. An efficient RNA isolation procedure and identification of reference genes for normalization of gene expression in blueberry [J]. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(12): 2167 – 2176. doi:10.1007/s00299-011-1121-z.
- [29] Ling H, Wu Q B, Guo J L, Xu L P, Que Y X. Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by Real time quantitative RT-PCR [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97469. doi:10.1371/journal.pone.0097469.
- [30] 王芳, 董美玲, 董乐, 王云, 朱国立, 许珊珊, 吕冬雪, 王建颖. 蓖麻延伸因子基因的克隆与表达分析 [J]. *核农学报*, 2019, 33(3): 464 – 472. doi:10.11869/j. issn. 1000-8551.2019.03.0464.
- Wang F, Dong M L, Dong L, Wang Y, Zhu G L, Xu S S, Lü D X, Wang J Y. Cloning and expression analysis of elongation factor-1 α from *Ricinus communis* L. [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(3): 464 – 472.
- [31] 叶新如, 朱海生, 林琿, 刘建汀, 王彬, 陈敏敏, 温庆放. 冬瓜实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选与评价 [J]. *核农学报*, 2019, 33(3): 473 – 481. doi:10.11869/j. issn. 100-8551.2019.03.0473.
- Ye X R, Zhu H S, Lin H, Liu J T, Wang B, Chen M D, Wen Q F. Screening and evaluation of reference genes for RT-qPCR in wax gourd (*Benincasa hispida* Cogn.) [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2019, 33(3): 473 – 481.