水稻OsSH3P2短肽多克隆抗体的制备和鉴定

王昱澎^{1,2,3}, 谢云杰^{1,2,3}, 余想珍^{1,2,3}, 林悦龙^{1,2,3}, 罗曦^{1,3}, 肖晏嘉^{1,3}, 蔡秋华^{1,3}, 谢华安^{1,2,3}, 张建福^{1,2,3*}

1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350019;

2. 福建农林大学闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002;

3. 水稻国家工程实验室/杂交水稻国家重点实验室华南研究基地/福建省作物种质创新与分子育种省部共建国家重点实验室培育基地/国家水稻改良中心福州分中心/农业农村部华南杂交水稻种质创新与分子育种重点实验室/福建省作物分子育种工程实验室/福建省水稻分子育种重点实验室, 福州 350003

* 联系人, E-mail: jianfzhang@163.com

2021-10-29 收稿, 2021-12-05 修回, 2021-12-06 接受, 2021-12-07 网络版发表

国家水稻产业技术体系项目(CARS-01)、福建省人民政府-中国农业科学院农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目(XTCXGC2021001)、福建省科技重大专项(2020NZ08016)和福建省省属公益类科研专项(2020R1023008)资助

摘要 特异性抗体的成功制备是研究蛋白功能的重要环节, 目前短肽抗体制备技术在动物中的应用日益成熟, 然而该项技术在植物中的应用甚少. 本研究通过分析水稻OsSH3P2蛋白的抗原表位、亲水性以及同源蛋白氨基酸序列, 同时利用RoseTTAFold系统进行蛋白模型预测. 选取了3条序列特异、亲水性高、具有抗原表位和不同肽链结构的氨基酸序列, 通过人工合成短肽抗原、偶联KLH载体蛋白后, 免疫新西兰大白兔制备得到相应多克隆抗体. 经酶联免疫吸附测定检测获得了3份Anti-OsSH3P2-1#、Anti-OsSH3P2-2#、Anti-OsSH3P2-3#高效价短肽多克隆抗体血清. 用免疫印迹(Western blotting)方法对OsSH3P2原核重组蛋白和植株内源的OsSH3P2蛋白进行检测, 以进一步确定短肽抗体的特异性. 结果显示, 由不含 α -螺旋和 β -折叠结构的肽段作为抗原, 免疫制得的Anti-OsSH3P2-1#短肽多克隆抗体能有效识别OsSH3P2蛋白, 且不受同源蛋白干扰, 说明该抗体具有较高的免疫特异性. OsSH3P2短肽多克隆抗体的成功制备, 为进一步挖掘OsSH3P2生物学功能奠定基础, 且为植物短肽抗体制备提供新的思路.

关键词 短肽, 多克隆抗体, OsSH3P2, 肽链结构

抗体是医学研究和基础科学研究的重要工具, 广泛应用于疾病的预防、诊断和治疗等临床工作^[1], 并在免疫印迹(Western blotting, WB)、免疫沉淀(immunoprecipitation, IP)、酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、定量免疫荧光(quantitative immunofluorescence, QIF)和免疫组化(immunohistochemistry, IHC)等试验中起到检测或定量特定蛋白的作用^[2]. 根据抗体制备的原理和方法, 可分为单克隆抗体、多克隆抗体及基因工程抗体. 其中, 由于多克隆抗体具备实验周期短、价格低、制备技术较为简单、反

应强度较高等优势, 被广泛应用于动植物蛋白研究领域^[3]. 随着分子生物学的不断发展, 对抗体制备的要求越来越高, 选择合适的抗原成为制备高效价抗体的关键.

几十年来, 在动植物蛋白的功能研究中, 通常将原核表达的重组蛋白作为抗原制备多克隆抗体^[4-6]. 王中亮等人^[7]将pET-30a(+)-HNF4 α 重组蛋白经Ni-NTA琼脂糖亲和层析柱纯化后免疫新西兰大白兔, 制备鸡HNF4 α 的特异性抗体, 利用该抗体得到鸡各组织蛋白的表达谱. 余国武等人^[8]将pGEX-6p-1-SSIb-C重组蛋

引用格式: 王昱澎, 谢云杰, 余想珍, 等. 水稻OsSH3P2短肽多克隆抗体的制备和鉴定. 科学通报, 2022, 67: 1449–1458

Wang Y P, Xie Y J, Yu X Z, et al. Preparation and identification of short peptides of rice Src homology-3 domain-containing protein 2 for polyclonal antibody production (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 1449–1458, doi: [10.1360/TB-2021-0988](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0988)

白作为抗原制备抗体,发现所得抗体不但能识别SSIIb-C抗原,而且能识别玉米不同发育阶段胚乳中SSIIb蛋白.这种传统的原核表达方法虽然运用普遍,但当目标蛋白与其他蛋白的序列同源性较高,或不易于表达和纯化时,则无法免疫获得特异性抗体.面对这一难题,短肽抗体制备技术应运而生,将P2X7受体蛋白胞外功能区域的短肽作为抗原,成功制备得到短肽抗体,避免了其高度保守的N端序列对其抗体特异性的影响^[9].人工合成的C⁵aR多肽作为抗原,制备得到人C⁵aR短肽抗体,可为深入研究C⁵a受体-C⁵aR相互作用机制奠定基础^[10].BTV蓝舌病病毒(bluetongue virus, BTV)是迄今为止发现的分子量最大的RNA病毒,VP2序列的变异与BTV血清型之间有着密切联系,将VP2蛋白的短肽序列作为抗原制得的短肽抗体,便于进一步研究其在生理机制的作用及在医学辅助诊断中的应用^[11].由此可见,该技术目前已广泛应用于动物研究领域,但在植物中的运用少有报道.

研究表明,拟南芥Src homology-3 domain-containing protein 2(AtSH3P2)影响植物生长发育^[12],参与网格蛋白介导的囊泡运输、介导体内泛素化蛋白降解等多种植物代谢过程^[13],然而水稻OsSH3P2蛋白的功能尚未被报道.本研究通过对水稻OsSH3P2氨基酸序列进行系统地分析,并结合RoseTTAFold系统预测蛋白模型^[14],综合选取候选短肽序列.最终,获得了高纯度、高效价且能特异性识别水稻的内源OsSH3P2抗体,研究结果为揭示OsSH3P2蛋白功能和分子机理奠定了良好的基础,并为高效制备植物抗体提供了新思路.

1 材料与方法

1.1 供试材料

pMAL-c5x原核表达载体、粳稻品种云引以及过表达和敲除*OsSH3P2*转基因植株均由福建省农业科学院水稻国家工程实验室提供.大肠杆菌*Transl*-T1购自北京全式金公司,大肠杆菌*Rosetta*(DE3)感受态细胞购自北京博迈德生物技术有限公司,所用的动物材料为雄性新西兰大白兔.

1.2 试验方法

(1) 系统发育进化树的构建与保守基序、结构域的分析.参照NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)和RiceData(<https://www.ricedata.cn/>

<http://plants.ensembl.org/index.html>)数据库数据,以水稻OsSH3P2氨基酸序列为模板,在Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>)数据库中检索水稻(籼稻、粳稻亚种)、拟南芥中与OsSH3P2同源性较高的蛋白,序列比对后,删除重复序列蛋白.用MEGAX软件的极大似然估计法(maximum likelihood)bootstrap replications参数为1000,模型为JTT+G,构建籼、粳稻和拟南芥中SH3Ps蛋白家族系统发育树,用MEME(<http://meme.nbcr.net/meme/intro.html>)在线工具分析得到各蛋白的保守基序.在NCBI数据库中预测得到各蛋白的保守结构域,用TBtools软件对SH3Ps蛋白家族结构、保守结构域可视化,并将上述分析结果合并为一张图.

(2) 序列比对与抗原表位、亲水性分析和蛋白模型预测.将水稻中OsSH3P2同源序列在Clustal Omega网站中比对(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>),在NCBI数据库中,得到OsSH3P2蛋白保守结构域位置.应用DNASTar Protean软件中的抗原指数分析模块Jameson-Wolf方法对OsSH3P2蛋白的抗原表位进行预测分析,使用蛋白DNASTar Protean软件中的Kyte-Doolittle方法对OsSH3P2蛋白的亲水性进行预测分析.利用RoseTTAFold人工智能软件系统(<https://robetta.bakerlab.org/>)在线工具预测蛋白模型.综合蛋白序列、抗原表位、亲水性和蛋白结构分析预测结果,从中选取3条短肽序列作为OsSH3P2蛋白抗原序列.

(3) 抗原的制备.3段短肽序列经Tetras多通道多肽合成仪合成短肽序列,用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对3条短肽的蛋白质纯度进行检测.将纯化后的3条短肽分别与血蓝蛋白KLH(Keyhole limpet hemocyanin)偶联,与完全弗氏佐剂混匀乳化后,刺激新西兰大白兔局部免疫反应.之后,用弗氏不完全佐剂替代完全弗氏佐剂加强免疫.每隔1周免疫1次,共免疫3~4次.设置免疫前血清为阴性对照,通过间接酶联免疫吸附法进行血清效价检测,直至获得满意的抗体效价,获得相应的兔抗血清.

(4) 重组表达载体pMAL-MBP-OsSH3P2的构建.在粳稻品种云引中扩增得到的*OsSH3P2*基因片段,通过同源重组的方法将回收片段插入到原核表达载体pMAL-c5x中,将重组载体pMAL-MBP-OsSH3P2转化大肠杆菌*Transl*-T1感受态.检测得到阳性单菌落,挑取单菌落于LB(含Amp^r)液体培养基中扩繁后,提取质粒并转化原核表达大肠杆菌*Rosetta*(DE3)感受态中.

(5) pMAL-MBP-OsSH3P2蛋白的诱导表达和Wes-

tern blotting检测. 挑取阳性克隆于10 mL LB(含Amp⁺)液体培养基中扩繁, 同时pMAL-c5x空载菌液作为对照. 当菌液 $A_{600\text{ nm}}=0.6$ 时, 加入诱导剂IPTG至终浓度为1 mmol/L, 21°C过夜诱导. 经超声破碎后, 取100 μL 蛋白上清, 加入25 μL 5 $\times$ SDS缓冲液, 100°C沸水煮5 min获得上样样品, 通过加入了蛋白质变性剂SDS的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离蛋白质, 使用考马斯亮蓝染色液染色进行观察, 得到初步结果. 之后通过Western blotting方法验证所得初步结果. 蛋白样品经SDS-PAGE电泳结束后转膜, 然后把PVDF膜浸泡在封闭液(5%脱脂奶粉的PBS缓冲液)中室温封闭1 h. 一抗(MBP抗体稀释度为1:5000, 自制多克隆抗体稀释度为1:5000)室温孵育2 h, 后用PBST洗涤3次. 二抗(稀释度1:10000)室温孵育1 h, PBST洗涤2次, PBS洗涤1次, 在成像系统中拍照检测.

(6) 植物总蛋白的提取. 取水稻各株系叶片0.5 g, 在研钵中研磨成粉末, 加入1.5 mL的蛋白抽提液(0.5 mol/L PBS pH 8.0, 1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 5 mol/L NaCl, 0.1% Tween-20, 0.1% NP-40, 0.1%巯基乙醇, 0.1% PMSF)磨成匀浆, 涡旋仪涡旋使其充分裂解, 4°C静止15 min后离心(4°C, 12000 g)20 min, 吸取上清液在液氮中速冻20 s, 待慢慢融化后离心20 min, 取100 μL 上清作为检测样品, 其余转移到离心管中, 在-80°C冷冻保存.

2 结果与分析

2.1 系统发育树的构建与保守基序、结构域的分析

包含SH3结构域蛋白(SH3 domain-containing proteins, SH3Ps)保守地存在于植物中, 各物种之间的系统进化关系已被研究得较为深入^[15]. 研究表明, AtSH3P2在拟南芥中发挥着重要功能^[12,13,16~18], 水稻作为重要的单子叶模式植物, 关于其OsSH3P2的研究尚未见报道. 为探究OsSH3P2与AtSH3P2之间的关系, 以OsSH3P2氨基酸序列为参考, 从Ensembl Plants中筛选到共11个水稻(粳稻、籼稻)、拟南芥SH3Ps序列, 其中粳稻亚种4个, 籼稻亚种4个, 拟南芥3个. 将这11个蛋白进行分类, 构建了水稻和拟南芥SH3Ps系统发育树, 运用MEME软件和NCBI网站预测, 得到SH3Ps包含10个保守基序和BAR、SH3两个保守结构域, 同时利用TBtools软件实现SH3Ps蛋白结构、保守结构域的可视化(图1).

根据系统发育树分析, 可将水稻和拟南芥SH3Ps划分为3组(Group I~III). Group I包括粳稻品种Os10g0512700(OsSH3P2)、Os04g0539800(OsSH3P4), 籼稻品种BGIOGA014635(OsSH3P4)、BGIOGA031563(OsSH3P2)、拟南芥At4g34660(AtSH3P2). Group II包括粳稻品种Os03g0266700(OsSH3P1), 籼稻品种BGIOGA012294(OsSH3P1)和拟南芥At1g31440(AtSH3P1). Group III包括粳稻品种Os07g0508300(OsSH3P3)、籼稻品种BGIOGA024244(OsSH3P3)和拟

图1 水稻和拟南芥SH3Ps系统发育树、保守基序和保守结构域. (a) 系统发育树; (b) 蛋白基序结构特征; (c) 蛋白保守结构域
Figure 1 The phylogenetic relationships, conserved motifs and conserved domains of SH3Ps in rice and *Arabidopsis thaliana*. (a) Phylogenetic tree; (b) motif pattern; (c) conserved domains

南芥At4g18060(AtSH3P3)。这3组是在早期进化时被分开,之后每个组垂直传递。因此,Group I~III之间属旁系同源,在序列上可能相似,功能上可能相似或不相似。在同一组中,水稻和拟南芥的同源蛋白因物种的形成而被分开,属于直系同源,在功能上高度相似。同时植物SH3Ps家族的进化过程较为保守,同一组中各个蛋白基序及结构域的个数和结构也大致相同。均只含有BAR和SH3两个保守结构域,Group I均含有10个保守基序,Group II和Group III中均含有9个保守基序。综上表明,水稻OsSH3P2与拟南芥AtSH3P2同源性高、亲缘关系较近,结构大致相同,属于直系同源,在功能上可能高度相似。因此,推测OsSH3P2在水稻中可能扮演AtSH3P2在拟南芥中的角色。并且OsSH3P2包含该家族的全部基序和结构域,研究该基因可为水稻SH3Ps的研究奠定良好的基础,并为各物种SH3Ps功能研究提供思路。

2.2 短肽的筛选与合成

通过对OsSH3P2的抗原表位、亲水性分析,及氨基酸序列比对和蛋白模型预测,筛选出最佳短肽序列。抗原决定簇(表位)和蛋白亲水性是决定抗体质量的重要因素^[19]。分别对OsSH3P2抗原表位和亲水性进行预测,结果显示,OsSH3P2存在多个潜在的抗原表位,可能的蛋白抗原表位区域包括(图2(a)): 1-23 aa、26-51 aa、75-106 aa、113-126 aa、170-205 aa、235-242 aa、250-285 aa、291-294 aa、310-362 aa、330-349 aa、351-364 aa。此外,OsSH3P2也具有较高的亲水性,其中高亲水性区域包括(图2(b)): 1-23 aa、39-53 aa、84-100 aa、146-190 aa、236-245 aa、249-285 aa、308-325 aa、352-363 aa。对抗原表位及亲水性进行综合分析,从中得到5条亲水性高的抗原表位短肽序列: 7-21 aa(Peptide-1)、85-99 aa(Peptide-2)、172-186 aa(Peptide-3)、260-274 aa(Peptide-4)、311-325 aa(Peptide-5)。为排除同源基因的干扰,保证OsSH3P2抗体的特异性,利用Clustal程序对水稻中4个SH3蛋白家族成员氨基酸序列进行比对,并在序列中标注5条短肽位置,结果显示OsSH3P1、OsSH3P2、OsSH3P3和OsSH3P4有多个保守区段,同源性较高。在NCBI网站中得到OsSH3P2中BAR和SH3两个保守结构域序列(灰色突出显示),虽然水稻SH3蛋白家族4个成员均包含BAR和SH3两个保守结构域,但5条短肽氨基酸序列与其他同源区段氨基酸序列均有较大差异(图2(c))。同时,用RoseTTAFold人工智能系统对OsSH3P2蛋

白结构进行预测,得到蛋白模型图,并在蛋白模型中对该5条短肽进行匹配(图2(d))。

综合氨基酸序列比对,短肽位置及模型误差结果,在候选的5条短肽中选取3条位于不同区段和不同结构的最适短肽,并标注其主要结构: Peptide-3(β -转角, BAR结构域)、Peptide-4(α -螺旋, 非保守结构域)和Peptide-5(β -折叠, SH3结构域)。使用Tetras多通道多肽合成仪合成氨基酸序列,使用HPLC对3条短肽进行蛋白质纯度的检测。结果表明, Peptide-3、Peptide-4和Peptide-5的蛋白纯度分别为93.052%、93.590%、90.510%,均获得了较高的纯度。之后,与血蓝蛋白KLH偶联作为抗原进行免疫。

2.3 多克隆抗体制备及抗体效价检测

制备多克隆抗体是通过将抗原注射到动物(老鼠、兔子或山羊)体内进行免疫后产生。由于兔子具备响应抗原表位和对小分子产生免疫反应的能力,因此被广泛应用于开发各种单克隆和多克隆抗体^[20,21]。我们将得到的Peptide-3、Peptide-4和Peptide-5-KLH偶联物作为免疫原,分别免疫新西兰雄性大白兔,得到3份多克隆抗体血清。通过间接酶联免疫吸附法对制备的多克隆抗体进行血清效价检测。多克隆抗体的效价是OD阳性/OD阴性 ≥ 2.1 时,多克隆抗体的最高稀释度。结果显示,当稀释度达到1:512000时,制备的3份抗体血清仍高于免疫前血清的2.1倍以上(表1),说明3份多克隆抗体ELISA效价均大于1:512000,效价较高。3条短肽Peptide-3(β -转角, BAR结构域)、Peptide-4(α -螺旋, 非保守结构域)和Peptide-5(β -折叠, SH3结构域)分别对应的抗体编号为Anti-OsSH3P2-1#、Anti-OsSH3P2-2#、Anti-OsSH3P2-3#。

2.4 原核表达载体pMAL-MBP-OsSH3P2的构建及诱导表达

以粳稻品种日本晴OsSH3P2基因序列为参考,从粳稻品种云引cDNA中扩增OsSH3P2编码区全长(图3(a))。测序并比对后发现,日本晴和云引品种中该基因编码区(coding region, CDS)与氨基酸序列完全一致, CDS全长为1113 bp, 编码370个氨基酸。通过双酶切的方法将目的片段导入原核表达载体pMAL-c5x中获得重组质粒pMAL-MBP-OsSH3P2,并将重组质粒转化到大肠杆菌Rosetta(DE3)原核表达载体中表达。

经原核表达后,诱导得到pMAL-c5x-OsSH3P2蛋

图 2 OsSH3P2抗原表位、疏水性分析, 水稻SH3Ps序列比对和OsSH3P2蛋白模型预测. (a) OsSH3P2抗原表位分析. (b) OsSH3P2亲水性分析. (c) 水稻SH3Ps同源序列比对. (d) OsSH3P2蛋白模型预测. 深红色, α -螺旋; 黄色, β -折叠; 蓝色, β -转角; 白色, 残基. (e) OsSH3P2蛋白模型预测的埃误差

Figure 2 Analysis of antigenic index and hydrophilicity of OsSH3P2, sequence alignments of SH3Ps in rice, and prediction of protein model. (a) Analysis of antigenic index of OsSH3P2. (b) Analysis of hydrophilicity of OsSH3P2. (c) Sequence alignments of SH3Ps homologous protein in rice. (d) Prediction of protein model of OsSH3P2. Deep red, α -helix; yellow, β -fold; blue, β -turn; white, residue. (e) Angstroms error estimate of OsSH3P2 protein predicted model

白. 之后用10% SDS-PAGE电泳和考马斯亮蓝染色检测(图3(b)). 结果表明, 与对照pMAL-c5x空载蛋白相比, 经诱导表达的样品中有一条高丰度的蛋白质条带, 相对分子质量与预期大小一致. 之后用MBP标签抗体进行Western blotting检测(图3(c)), pMAL-c5x空载蛋白作为对照. 结果表明, MBP抗体能特异性地识别空载蛋白和

pMAL-MBP-OsSH3P2重组蛋白, MBP-OsSH3P2重组蛋白被成功诱导.

2.5 pMAL-MBP-OsSH3P2重组蛋白检测抗体的特异性

为探究3份短肽多克隆抗体的特异性, 首先用

表 1 Anti-OsSH3P2免疫前血清和纯化抗体的ELISA结果

Table 1 ELISA results of pre-immune serum and purified antibody of Anti-OsSH3P2

多克隆抗体	初始浓度(ng/mL)	阴性对照(NC)	1000	1.95	空白对照	
Anti-OsSH3P2-1#	稀释倍数	1:1000	1:1000	1:512000	空白对照	效价
	抗体信号	0.056	2.616	0.749	0.052	>1:512000
Anti-OsSH3P2-2#	稀释倍数	1:1000	1:1000	1:512000	空对照白	效价
	抗体信号	0.119	2.592	0.876	0.066	>1:512000
Anti-OsSH3P2-3#	稀释倍数	1:1000	1:1000	1:512000	空对照白	效价
	抗体信号	0.063	2.574	0.803	0.084	>1:512000

图 3 重组蛋白的构建、诱导和检测. (a) PCR扩增 $OsSH3P2$ 目的片段. M, DNA marker DL5000. (b) pMAL-MBP- $OsSH3P2$ 的诱导表达. M, 蛋白质marker; 1, pMAL-c5x; 2, pMAL-MBP- $OsSH3P2$. (c) Western blotting检测pMAL-MBP- $OsSH3P2$. M, 蛋白质marker; 1, pMAL-c5x; 2, pMAL-MBP- $OsSH3P2$

Figure 3 Construction, induction and detection of recombinant proteins. (a) PCR amplification of target $OsSH3P2$ fragment. M, DNA marker DL5000. (b) The expression results of the pMAL-MBP- $OsSH3P2$. M, protein marker; 1, pMAL-c5x; 2, pMAL-MBP- $OsSH3P2$. (c) Detection of the pMAL-MBP- $OsSH3P2$ by Western blotting. M, protein marker; 1, pMAL-c5x; 2, pMAL-MBP- $OsSH3P2$

pMAL-MBP- $OsSH3P2$ 重组蛋白进行初步的检测. 将诱导得到的pMAL-MBP- $OsSH3P2$ 重组蛋白分别与制备的3份短肽多克隆抗体进行Western blotting抗体结合实验检测(图4). 结果表明, Anti- $OsSH3P2$ -1#和Anti- $OsSH3P2$ -2#均能成功与重组蛋白pMAL-MBP- $OsSH3P2$ 结合, 其中Anti- $OsSH3P2$ -1#特异性最高, 而Anti- $OsSH3P2$ -3#不能与之结合.

2.6 转基因水稻植株验证抗体特异性

为检测3份多克隆抗体能否特异性识别植物内源 $OsSH3P2$ 蛋白, 分别提取粳稻品种云引野生型(wild type, WT)以及由本实验前期获得的该背景下过表达(over-expression, OE)和敲除(knock-out, KO) $OsSH3P2$ 转基因植株的叶片总蛋白, 并利用制备的抗体进行Western blotting检测. 首先选用一个克隆过表达转基因植株叶片的总蛋白, 对3份多克隆抗体进行检测. 结果显示, Anti- $OsSH3P2$ -1#能够特异性识别内源 $OsSH3P2$

蛋白, 而在Anti- $OsSH3P2$ -2#和Anti- $OsSH3P2$ -3#检测结果中未能观察到特异性条带(图5(a)). 之后用Anti- $OsSH3P2$ -1#对过表达株系进行检测, 在过表达和野生型植株中均能检测到与 $OsSH3P2$ 蛋白大小一致的目的条带, 过表达植株中目的蛋白丰度显著高于野生型植株, 并且在过表达不同株系之间蛋白表达丰度不同(图5(b)). 为了进一步探究 $OsSH3P2$ 同源蛋白是否影响Anti- $OsSH3P2$ -1#的特异性识别, 用Anti- $OsSH3P2$ -1#对3个不同克隆的敲除株系进行检测, 在野生型植株中能检测到 $OsSH3P2$ 蛋白, 而在敲除植株中未检测到条带, 表明Anti- $OsSH3P2$ -1#具有特异性(图5(c)). 综上所述, Anti- $OsSH3P2$ -1#多克隆抗体能够特异性识别水稻内源 $OsSH3P2$ 蛋白, 且不受其他同源蛋白的干扰.

3 讨论

本研究通过生物信息学分析表明, AtSH3P2与水稻 $OsSH3P2$ 同源性较高, 且在进化早期发生垂直进化, 这

图4 Western blotting检测OsSH3P2抗体的特异性。M, 蛋白质marker; 1, 重组蛋白pMAL-MBP-OsSH3P2

Figure 4 OsSH3P2 antibody specificity was analyzed by Western blotting. M, protein marker; 1, recombinant protein pMAL-MBP-OsSH3P2

图5 在植物中验证多克隆抗体的特异性。(a) 3份短肽多克隆抗体分别检测同一过表达株系中OsSH3P2的表达量。M, 蛋白marker; 1, 过表达株系总蛋白。(b) Anti-OsSH3P2-1#检测野生型和3个过表达株系中OsSH3P2的表达量。WT, 野生型株系; OE, 过表达株系。Rubisco作为上样内参。(c) Anti-OsSH3P2-1#检测野生型和3个敲除株系中OsSH3P2的表达量。WT, 野生型株系; KO, 敲除株系。Rubisco作为上样内参

Figure 5 Detection of polyclonal antibody specificity in plants. (a) Detection of the expression of *OsSH3P2* in the same overexpressed plant by using three short peptide polyclonal antibodies. M, protein marker; 1, total protein of overexpressed transgenic plants. (b) Detection of the expression of *OsSH3P2* in wild-type and three overexpressed lines by using Anti-OsSH3P2-1#. WT, wild type; OE, overexpressed lines. Rubisco was used as loading control. (c) Detection of the expression of *OsSH3P2* in wild-type and three knockout lines by using Anti-OsSH3P2-1#. WT, wild type; KO, knockout lines. Rubisco was used as loading control

与Forero对多物种SH3Ps的进化关系分析相同^[15], 推测OsSH3P2同样在水稻体内的囊泡运输、泛素化降解以及生长发育等方面发挥重要功能。为进一步探究OsSH3P2的生物学功能, 制备高效价的特异性抗体变得非常重要。尽管抗体的使用无处不在, 但研究人员受到抗体性能限制的情况仍然并不少见^[22]。这种困难通常源于抗体与表位的结合较弱或缺失, 或是发生非特异性结合。抗原表位通常由6~8个氨基酸组成, 当免疫

原引起免疫反应时, 受体会产生大量的抗体来对抗这种抗原表位^[23]。多克隆抗体可以结合一个抗原上的多个表位, 被认为比单克隆抗体效率更高^[24,25], 所以本研究选择多克隆抗体制备技术来进行OsSH3P2抗体制备。

在抗原制备方面, 传统的原核表达系统具有一定的局限性, 大部分质膜蛋白不易于表达和纯化, 使得质膜蛋白抗体的制备一直是植物界的一个阻碍, 另一方面, *OsSH3P2*有3个同源基因, 且存在一定的同源性, 传

统的制备方法可能会识别到OsSH3P2同源基因,不利于蛋白功能的研究。而短肽抗体制备技术的出现,为OsSH3P2囊泡蛋白抗体的制备提供了可能。目前,短肽抗体的制备主要应用于动物、微生物、病毒等,如副溶血弧菌^[26]、鸡黑素皮质素受体-4(melanocortin-4 receptor, MC4R)^[27]、肝癌患者血清中的标志物嗜中性活性肽-2(73)^[28]等均通过生物信息学分析预测得到抗原性较高的多肽片段,与载体蛋白偶联后免疫新西兰大白兔,并加强免疫得到抗血清,通过间接ELISA方法测定血清效价,并利用Western blotting方法鉴定制备的多克隆抗体。本研究中OsSH3P2的短肽抗体的制备也采用了相同的方法,与之不同的是,本研究不仅结合生物信息学的一系列分析,还结合了RoseTTAFold系统蛋白模型的预测。该软件系统的内部网络能够同时优化蛋白序列的模式和蛋白中不同氨基酸之间的相互作用,以及蛋白质可能出现的3D结构。并且,RoseTTAFold系统在解析蛋白质3D结构方面具有突出优势^[14]。综合序列比对和蛋白预测模型的结果,并在通过亲水性及抗原表位预测得到的候选短肽中,选取了不同二级结构和结构域的3条肽段进行实验。有趣的是,3条短肽抗体的特异性有明显差异,由短肽Peptide-3(β -转角, BAR结构域)作为抗原制备的抗体Anti-OsSH3P2-1#,表现出了最强的结合能力和最高的特异性,能够特异性结合体外重组蛋白和植物内源目标蛋白;由短肽Peptide-4(α -

螺旋,非保守结构域)作为抗原制备的抗体Anti-OsSH3P2-2#,可以结合体外重组蛋白,但不能结合植物内源目标蛋白,且特异性较差;由短肽Peptide-5(β -折叠, SH3结构域)作为抗原制备的抗体Anti-OsSH3P2-3#,不能与目标蛋白特异性结合。推测该结果可能是由于肽段结构的不同所导致, β -转角结构的肽段为线性结构,肽段裸露在表面,亲水性较好,能够特异性结合目标蛋白。 α -螺旋结构的肽段受到自身结构的影响,降低了亲水性,干扰了抗原表位的识别,导致制得的抗体能够识别体外高浓度的重组蛋白,而当检测浓度较低的植物内源蛋白时,则较难识别,且在识别过程中,可能会结合包含部分短肽序列的蛋白质,表现出较低的抗体特异性。 β -折叠结构的肽段同时受到自身和相邻其他肽段的影响,显著地降低了肽链的亲水性和抗原表位的识别,进而影响抗体的特异性结合。因此,在短肽抗体抗原肽段的选择上,线性结构的肽段优于 α -螺旋结构且更优于 β -折叠结构。

综上所述,OsSH3P2短肽抗体的成功制备表明,此方法得到的多克隆抗体可特异性地结合目标蛋白,无论在短肽抗体的制备技术还是OsSH3P2蛋白功能的后续研究中都具有重要的意义。一方面可为后续其他蛋白抗体的制备、短肽抗原的选择提供思路,进而提高抗体制备效率。另一方面,对OsSH3P2在水稻中的生物学功能研究提供了有效的工具。

参考文献

- Reichert J M. Antibodies to watch in 2016. *mAbs*, 2016, 8: 197–204
- Bordeaux J, Welsh A, Agarwal S, et al. Antibody validation. *Biotechniques*, 2010, 48: 197–209
- Jia H N, Luo H L. Progress in preparation of polyclonal antibodies (in Chinese). *China Herbiv Sci*, 2012, (S1): 66–69 [贾慧娜, 罗海玲. 多克隆抗体制备方法的研究进展. *中国草食动物科学*, 2012, (S1): 66–69]
- Sahdev S, Khattar S K, Saini K S. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: A review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem*, 2008, 307: 249–264
- Qiu S X, Yin X, Su S J, et al. Bioinformatics analysis of the extracellular region of NA protein in novel H7N9 avian influenza virus and preparation of polyclonal antibodies (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2019, 35: 85–93 [仇书兴, 殷星, 苏淑娟, 等. 新型H7N9禽流感病毒NA蛋白胞外区片段的生物信息学分析及其多克隆抗体制备. *生物技术通报*, 2019, 35: 85–93]
- Miao B S, Chen S B, Zhang X J, et al. Prokaryotic expression of porcine parvovirus NS gene and preparation of polyclonal antibody (in Chinese). *Prog Vet Med*, 2020, 41: 1–8 [苗碧琛, 陈松彪, 张秀娟, 等. 猪细小病毒NS基因原核表达与多克隆抗体制备. *动物医学进展*, 2020, 41: 1–8]
- Wang Z L, Hu Y, Yu J F, et al. Prokaryotic expression, purification and specific antibody preparation of chicken (*Gallus gallus*) HNF4 α protein (in Chinese). *J Agric Biotechnol*, 2019, 27: 927–935 [王中亮, 胡悦, 郁建锋, 等. 鸡HNF4 α 蛋白的原核表达、纯化及特异性抗体制备. *农业生物技术学报*, 2019, 27: 927–935]
- Yu G W, Qing Y, He S, et al. Preparation and application of polyclonal antibody against SSIIb protein from maize (in Chinese). *Acta Agron Sin*, 2022, 48: 1–7 [余国武, 青芸, 何珊, 等. 玉米SSIIb蛋白多克隆抗体的制备及其应用. *作物学报*, 2022, 48: 1–7]
- Tan C, Han L, Shen X J. The preparation and identification of P2X7 short peptide receptor monoclonal antibody (in Chinese). *Biotechnol Bull*, 2012, 12: 167–172 [谭超, 韩莉, 神谢静. P2X7受体短肽单克隆抗体的制备及鉴定. *生物技术通报*, 2012, 12: 167–172]

- 10 Lü F L, Zheng P, Zhu X H. Production and characterization of the monoclonal antibody against C5a anaphylatoxins receptor (CD88) (in Chinese). *Immunol J*, 2000, 4: 294–296 [吕凤林, 郑萍, 朱锡华. 小鼠抗人C5aR短肽(9~30)单克隆抗体制备及鉴定. *免疫学杂志*, 2000, 4: 294–296]
- 11 Zang M X, Li J X, Xie S Y, et al. Identification of epitope recognized by a monoclonal antibody against VP2 protein of bluetongue virus serotype 8 (in Chinese). *Chin J Biotechnol*, 2017, 33: 1244–1252 [臧明鑫, 李佳璇, 谢双羽, 等. 一株抗蓝舌病病毒8型VP2蛋白单克隆抗体识别的线性抗原表位的鉴定. *生物工程学报*, 2017, 33: 1244–1252]
- 12 Ahn G, Kim H, Kim D H, et al. SH3 domain-containing protein 2 plays a crucial role at the step of membrane tubulation during cell plate formation. *Plant Cell*, 2017, 29: 1388–1405
- 13 Nagel M K, Kalinowska K, Vogel K, et al. *Arabidopsis* SH3P2 is an ubiquitin-binding protein that functions together with ESCRT-I and the deubiquitylating enzyme AMSH3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E7197–E7204
- 14 Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 2021, 373: 871–876
- 15 Forero A B, Cvrčková F. SH3Ps—Evolution and diversity of a family of proteins engaged in plant cytokinesis. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 5623
- 16 Lam B C, Sage T L, Bianchi F, et al. Role of SH3 domain-containing proteins in clathrin-mediated vesicle trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2001, 13: 2499–2512
- 17 Zhuang X, Wang H, Lam S K, et al. A BAR-domain protein SH3P2, which binds to phosphatidylinositol 3-phosphate and ATG8, regulates autophagosome formation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2013, 25: 4596–4615
- 18 Zhuang X, Jiang L. Autophagosome biogenesis in plants. *Autophagy*, 2014, 10: 704–705
- 19 Newcombe C, Newcombe A R. Antibody production: Polyclonal-derived biotherapeutics. *J Chromatogr B*, 2007, 848: 2–7
- 20 Rief N, Waschow C, Nastainczyk W, et al. Production and characterization of a rabbit monoclonal antibody against human CDC25C phosphatase. *Hybridoma*, 1998, 17: 389–394
- 21 Liu N, Zhao Z, Tan Y, et al. Simultaneous raising of rabbit monoclonal antibodies to fluoroquinolones with diverse recognition functionalities via single mixture immunization. *Anal Chem*, 2016, 88: 1246–1252
- 22 Saethang T, Hodge K, Kimkong I, et al. AbDesigner3D: A structure-guided tool for peptide-based antibody production. *Bioinformatics*, 2018, 34: 2158–2160
- 23 Nelson P N, Reynolds G M, Waldron E E, et al. Demystified ...: Monoclonal antibodies. *Mol Pathol*, 2000, 53: 111–117
- 24 Newcombe A R, Cresswell C, Davies S, et al. Optimised affinity purification of polyclonal antibodies from hyper immunised ovine serum using a synthetic Protein A adsorbent, MAbsorbent® A2P. *J Chromatogr B*, 2005, 814: 209–215
- 25 Uma M, Rao P P, Nagalakshmi K, et al. Expression and purification of polioviral proteins in *E. coli*, and production of antisera as reagents for immunological assays. *Protein Expr Purif*, 2016, 128: 115–122
- 26 Xue T Y, Lian L L, Li W J, et al. Preparation and application of polyclonal antibodies against T3SS1 VscF protein of vibrio parahaemolyticus (in Chinese). *China Anim Health Inspect*, 2021, 38: 93–98 [薛婷月, 廉乐乐, 李婉君, 等. 副溶血弧菌T3SS1 VscF蛋白多肽抗体的制备与应用. *中国动物检疫*, 2021, 38: 93–98]
- 27 Lang B, Zhu H Y, Wang J M, et al. Preparation and identification of melanocortin-receptor peptide antibody (in Chinese). *Anim Husb Veter Med*, 2013, 45: 16–20 [郎斌, 朱弘焱, 王佳美, 等. 鸡黑素皮质素受体-4多肽抗体的制备与鉴定. *畜牧与兽医*, 2013, 45: 16–20]
- 28 Qin J, Zhang Z Y, He M, et al. Bioinformatics analysis of NAP-2(73) and the preparation of its polyclonal antibody (in Chinese). *Immunol J*, 2010, 26: 628–631 [覃健, 张志勇, 何敏, 等. NAP-2(73)的生物信息学分析及其多克隆抗体制备. *免疫学杂志*, 2010, 26: 628–631]

Summary for “水稻OsSH3P2短肽多克隆抗体的制备和鉴定”

Preparation and identification of short peptides of rice Src homology-3 domain-containing protein 2 for polyclonal antibody production

Yupeng Wang^{1,2,3}, Yunjie Xie^{1,2,3}, Xiangzhen Yu^{1,2,3}, Yuelong Lin^{1,2,3}, Xi Luo^{1,3}, Yanjia Xiao^{1,3}, Qiuhua Cai^{1,3}, Hua'an Xie^{1,2,3} & Jianfu Zhang^{1,2,3*}¹ Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350019, China;² State Key Laboratory for Ecological Control of Crop Pests between Fujian and Taiwan, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;³ National Engineering Laboratory of Rice/South China Research Base of State Key Laboratory of Hybrid Rice/Incubating base of State Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Molecular Breeding between Fujian Province and Ministry of Science and Technology/Fuzhou Branch of National Rice Improvement Center/South China Key Laboratory of Hybrid Rice Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Ministry of Agriculture and Rural Areas/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding/Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding, Fuzhou 350003, China* Corresponding author, E-mail: jianfzhang@163.com

The successful preparation of specific antibodies is an important step in the study of the physiological and biochemical functions and molecular mechanisms of proteins in plants. In general, polyclonal antibodies are prepared using recombinant proteins expressed in prokaryotes as antigens. However, if the target protein has high sequence homology levels with other proteins, or is difficult to express or purify, specific antibodies cannot be obtained. To address these challenges, short peptide antibody preparation technology has emerged. This technology has gradually been adopted in animals, but it is rarely used in plants. In this study, we analyzed the antigenic epitopes and hydrophilic and homologous amino acid sequences of rice (*Oryza sativa*) SH3P2 and predicted the protein model using the RoseTTAFold system. Then, we selected three amino acid sequences, peptides 3, 4 and 5, having sequence specificity, high hydrophilicity, antigenic epitopes and different peptide chain structures as templates for the synthesis of short-peptide antigens. The short peptides were coupled with KLH and used independently as antigens to immunize New Zealand white rabbits to produce the antibodies Anti-OsSH3P2-1#, Anti-OsSH3P2-2# and Anti-OsSH3P2-3#, respectively. The serum titers of the polyclonal antibodies were detected using an ELISA, and the titers of the polyclonal antibodies were greater than 1:512000. Furthermore, we constructed the prokaryotic expression vector pMAL-MBP-OsSH3P2 and successfully induced protein production. To investigate the specificity of these three short-peptide polyclonal antibodies, we first detected their specificities to the recombinant protein pMAL-MBP-OsSH3P2. Anti-OsSH3P2-1# and Anti-OsSH3P2-2# successfully bound to the recombinant protein, with the former having the greatest specificity. Then, the plant endogenous OsSH3P2 protein was used to further detect the specificities of the three antibodies. Target bands were detected in OsSH3P2-over-expressing plants, which had significantly higher protein abundance levels, and wild-type plants. The bands indicated that Anti-OsSH3P2-1# specifically recognized endogenous OsSH3P2 without interference from other homologous proteins. In summary, the short peptide polyclonal antibodies of anti-OsSH3P2-1#, an antigen without α -helix and β -fold structures, recognized OsSH3P2 effectively, and OsSH3P2 homologous proteins did not interfere with the binding, indicating that the antibodies had high immunological specificities. The successful production of polyclonal antibodies against OsSH3P2 short peptides lays a foundation for OsSH3P2-related biological functional studies and shed lights on the production of short-peptide antibodies in plants.

short peptides, polyclonal antibody, OsSH3P2, peptide chain structuredoi: [10.1360/TB-2021-0988](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0988)