

刘希,李远凤,齐亚飞,等.拟南芥自噬蛋白 ATG8e 的原核表达及多克隆抗体制备[J].江苏农业科学,2018,46(18):47-51.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.012

# 拟南芥自噬蛋白 ATG8e 的原核表达及多克隆抗体制备

刘希,李远凤,齐亚飞,郁飞

(旱区逆境生物学国家重点实验室/西北农林科技大学生命科学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:**构建拟南芥自噬相关基因 *ATG8e* 的原核表达载体 pGEX-4T-1-*ATG8e*,转化大肠杆菌 BL21 (*DE3*) 菌株,并用异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导得到融合蛋白 GST-*ATG8e*。GST-*ATG8e* 蛋白首先用谷胱甘肽琼脂糖凝胶树脂亲和纯化,然后用凝血酶酶切去除谷胱甘肽 S 移换酶 (glutathione S-transferase, 简称 GST) 标签,最后十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 SDS-PAGE) 凝胶纯化,用纯化后 14 ku 的 *ATG8e* 蛋白免疫家兔 4 次得到抗血清,纯化抗血清制备高效 *ATG8e* 多克隆抗体。提取野生型拟南芥和 *ATG8e* 超表达植株叶片总蛋白做免疫印迹检测,结果在 2 种基因型植物叶片蛋白样品中均能检测到与 *ATG8e* 分子量大小一致的条带,且 *ATG8e* 超表达植物中 *ATG8e* 积累量明显高于野生型。成功制备了拟南芥 *ATG8e* 蛋白多克隆抗体,为研究 *ATG8e* 在自噬中的作用奠定了试验基础。

**关键词:**自噬蛋白; *ATG8e*; 蛋白纯化; 多克隆抗体制备; 免疫印迹

**中图分类号:** Q943 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0047-04

自噬 (autophagy) 是真核生物中进化保守的、对细胞内物质如蛋白质或细胞器进行降解、促进物质循环利用的重要过程<sup>[1-2]</sup>。在自噬发生的过程中,生物体先形成 1 个自噬吞噬泡 (phagophore), 将细胞质物质包裹起来,吞噬泡逐渐形成 1 个双层膜自噬体 (autophagosome), 其外膜会与液泡膜融合, 内膜及其包裹物 (autophagic body) 进入到液泡腔被水解酶分解<sup>[3]</sup>。研究表明,一系列自噬基因 (*autophagy-related genes*, 简称 ATG) 会组成功能单元参与自噬进程,如其中参与成膜过程的 2 个类泛素化系统——ATG8 耦合系统<sup>[4]</sup>和 ATG12 耦合系统<sup>[5-6]</sup>。ATG8 蛋白在自噬中发挥作用是一个类泛素化的过程,ATG8 蛋白前体的 C 端被 ATG4 剪切,使其 C 端甘氨酸残基暴露,接着被剪切后的 ATG8 会在 ATG7 (E1 类似酶) 催化下结合 ATG3 (E2 类似酶), 然后在 ATG12-ATG5·ATG16 (“-”代表共价结合,“·”代表非共价结合) 复合物 (E3 类似酶) 作用下,ATG8 可以与磷脂酰乙醇胺 (PE) 连接组成 ATG8-PE<sup>[4]</sup>。ATG8-PE 锚定于自噬体膜上,参与自噬体膜的形成<sup>[7]</sup>。因此可根据 ATG8-PE 的积累量来衡量植物的自噬程度,从而比较不同基因型植物之间自噬发生的差异,筛选能参与自噬调控途径的新基因,对于揭示植物自噬的分子途径具有重要意义。

自噬在植物的生长发育和胁迫响应中发挥重要作用。研究表明,拟南芥中至少有 36 个基因与酵母 *ATG* 基因同源且具有相似作用,参与植物的免疫反应<sup>[8]</sup>、叶片衰老及环境胁迫应答等<sup>[9]</sup>。为了研究植物自噬,以 *ATG8* 家族 9 个成员

(*ATG8a*~*ATG8i*)<sup>[10]</sup> 之一的 *ATG8e* 作为切入点,构建 *ATG8e* 基因的原核表达载体,转化大肠杆菌 BL21 (*DE3*),用异丙基硫代半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside, 简称 IPTG) 诱导产生融合蛋白 GST-*ATG8e*,最后用切去谷胱甘肽 S 移换酶 (glutathione S-transferase, 简称 GST) 标签并纯化过的 *ATG8e* 免疫家兔,心脏采血后收集血清,制备多克隆抗体。为证明制备的多克隆抗体的有效性,构建重组质粒 pBI111L-*ATG8e*,利用花序侵染法<sup>[11]</sup> 转化野生型拟南芥,得到 *ATG8e* 超表达植物,提取野生型拟南芥和 *ATG8e* 超表达植物叶片总蛋白,用于免疫印迹检测。

## 1 材料与与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物、细菌和载体 野生型拟南芥 *Columbia* (Col)、大肠杆菌 TOP10 菌株、大肠杆菌 BL21 (*DE3*) 菌株、野生型拟南芥 cDNA、农杆菌 *GV3101* 菌株、二元载体 pBI111L<sup>[12]</sup>、原核表达载体 pGEX-4T-1 均由笔者所在实验室留存。

1.1.2 试剂 高保真 DNA 聚合酶 (PrimeSTAR<sup>®</sup> HS DNA Polymerase), *Bam*H I 和 *Eco*R I 内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司; DNA 纯化回收试剂盒 (Universal DNA Purification Kit)、质粒小提试剂盒 (TIANprep Mini Plasmid Kit) 购于天根生化科技(北京)有限公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、弗氏完全佐剂 (Freund's adjuvant complete) 和弗氏不完全佐剂 (Freund's adjuvant incomplete) 购于 Sigma 公司; GST 标签蛋白纯化柱填料 protein Glutathione Sepharose 4 Fast Flow、凝血酶 (Thrombin)、表面活性剂 (SILWET<sup>®</sup> L-77)、0.45  $\mu$ m 硝酸纤维素 (Nitro Cellulose) 膜购于 GE Healthcare Life Science; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, 简称 IgG) 购于北京康为世纪生物科技有限公司; 尿素购于 Amresco 公司; ECL 工作液 (Detection reagent 1, Detection reagent 2) 购于 Bio-

收稿日期:2017-03-26

基金项目:陕西省自然科学基金(编号:2015JM3081)。

作者简介:刘希(1991—),女,陕西汉中,人,硕士,主要从事植物分子遗传学研究。E-mail:1468538509@qq.com。

通信作者:郁飞,博士,教授,博士生导师,主要从事植物分子遗传学研究。E-mail:flyfeiyu@gmail.com。

Rad 公司;特异性引物由上海立菲生物技术有限公司合成。

## 1.2 试验方法

1.2.1 原核表达载体 pGEX-4T-1-ATG8e 的构建 根据拟南芥官方网站 TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) 公布的 ATG8e 基因序列,设计引物:

F:5' - CATGGATCCATGAATAAAGGAAGCATCTTT - 3';  
R:5' - CATGGATCCTTATGATGAAGAAGCACCGAA - 3'。

F 和 R 中下划线的碱基序列为 BamH I 的酶切位点。以野生型拟南芥 cDNA 为模板,以 F 和 R 为上下游引物扩增 ATG8e 片段。PCR 程序:94 °C 2 min;98 °C 10 s,53 °C 15 s,72 °C 30 s,40 个循环;72 °C 2 min。将 PCR 扩增产物 ATG8e 用 BamH I 酶切后连至原核表达载体 pGEX-4T-1,用转化 CaCl<sub>2</sub> 法制备大肠杆菌感受态细胞 TOP10,挑取生长正常的单菌落摇菌,提质粒进行酶切验证,将鉴定结果正确的质粒送华大基因测序。

1.2.2 融合蛋白 GST-ATG8e 的诱导表达和纯化 将测序正确的重组质粒 pGEX-4T-1-ATG8e 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),挑取生长正常的单克隆于含有 100 μg/mL 氨苄青霉素的 2 × YT (16 g/L 胰蛋白胨,10 g/L 酵母提取物,15 g/L NaCl) 液体培养基中,37 °C、220 r/min 培养至菌液 D<sub>600nm</sub> 约为 0.8 时,加诱导剂 IPTG,使其在菌液中的终浓度为 1 mmol/L,20 °C、220 r/min 诱导表达约 20 h;4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收菌,菌体沉淀用磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, 简称 PBS) (140 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, 10 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 1.8 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 值 7.3) 重悬;超声破菌后,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,分别收集上清液和沉淀,后者用 PBS 重悬。取诱导前菌液、诱导后菌液、破菌后上清液、破菌后沉淀各 50 μL,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis, 简称 SDS - PAGE) 检测融合蛋白 GST-ATG8e 的表达情况。电泳结束后,用半干转膜仪将蛋白样品转到 0.45 μm NC 膜上并用丽春红对膜瞬时染色,之后用 TBST 缓冲液 (20 mmol/L Tris - HCl, pH 值 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween - 20) 洗去浮色,室温条件下用封闭液 (含 0.05 g/mL 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液) 封闭 1 h,加入用封闭液稀释的 Anti - GST (1 : 5 000) 4 °C 过夜孵育,次日用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min,加入用封闭液稀释的羊抗兔 IgG (1 : 10 000) 室温孵育 1 h,用 TBST 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min,加入 ECL 显色液用化学发光凝胶成像系统成像。

收集同样条件下用 IPTG 诱导的菌液 400 mL,4 °C、8 000 r/min 离心 10 min;菌体沉淀用 20 mL PBS 重悬;超声破菌后,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min,收集上清液并用 0.45 μm 滤膜过滤;将过滤后的上清液与 1 mL GST 标签蛋白纯化柱填料 protein Glutathione Sepharose 4 Fast Flow 于室温孵育 1 h,4 °C、3 000 r/min 离心 10 min;用 10 个柱体积的 PBS 洗脱柱上杂蛋白,4 °C、3 000 r/min 离心 10 min;加入 50 μL 凝血酶 (1 U/μL) 于 950 μL PBS 中,柱上切除标签蛋白 (室温 12 ~ 16 h),4 °C、3 000 r/min 离心 10 min 收集酶切后的蛋白;用 1 mL 还原型谷胱甘肽 (20 mmol/L) 洗脱液洗脱标签蛋白。收集每步样品 50 μL 进行 SDS - PAGE 鉴定<sup>[13]</sup>。为了得到更纯净的目的蛋白,后续对 ATG8e 进行 SDS - PAGE 割胶纯化,

并以牛血清白蛋白 (BSA, 质量浓度梯度依次为 1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL) 为对照,对其浓度进行分析评估<sup>[14]</sup>。

1.2.3 ATG8e 抗血清的制备及验证 购买 3 只饲养 2 个月的健康成年家兔,初免家兔的抗原是等体积 ATG8e 蛋白与弗氏完全佐剂的混合物,免疫剂量为 200 μg/只。第 14 天后进行第 2 次免疫,第 28、第 42 天分别进行第 3、第 4 次免疫,第 2、3、4 次加强免疫家兔所用抗原是等体积 ATG8e 蛋白与弗氏不完全佐剂的混合物<sup>[15]</sup>,免疫剂量为 100 μg/只。3 次加强免疫之后,对家兔心脏采血,将其血液于 37 °C 放置 1 h,4 °C 冰箱过夜,4 °C、14 000 r/min 离心 10 min,收集血清并分装,于 -80 °C 储存备用。

分别吸取 0.3、3、30 ng 纯化后的 ATG8e 蛋白进行 SDS - PAGE。以 ATG8e 兔抗血清 (1 : 1 000) 为一抗,羊抗兔 IgG (1 : 10 000) 为二抗,进行免疫印迹检测。

1.2.4 纯化 ATG8e 兔抗血清 取约 0.6 mg 纯化后的 ATG8e 进行 SDS - PAGE;电泳结束以后,用半干转膜仪将蛋白样品转到 0.45 μm NC 膜上;在室温条件下,用含 0.05 g/mL 脱脂奶粉的 TBS 缓冲液 (20 mmol/L Tris - HCl, pH 值 7.4, 500 mmol/L NaCl, 0.05% Tween - 20) 将抗原结合区域封闭 1 h;之后将膜切成约为 2 mm<sup>2</sup> 小方块,装入含有 ATG8e 抗血清的离心管中,4 °C 过夜孵育;次日用 TBS 缓冲液洗膜 3 次,每次 5 min;用 PBS (20 mmol/L Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 值 7.2, 150 mmol/L NaCl) 洗膜 3 次,每次 5 min;加入 500 μL 洗脱液 (100 mmol/L 甘氨酸, pH 值 2.5), 室温孵育 10 min;吸取洗脱液甘氨酸于新的 1.5 mL 离心管中,加入 50 μL 1 mol/L Tris - HCl (pH 值 8.0), 弹甩混匀,测浓度并分装后于 -80 °C 储存备用。

## 1.2.5 ATG8e 超表达植物的获得

1.2.5.1 构建 pBII11L-ATG8e 重组载体 用限制性内切酶 BamH I 从 pGEX-4T-1-ATG8e 上切下 ATG8e 基因片段,连接到同样用 BamH I 酶切的载体 pBII11L 上,用转化 CaCl<sub>2</sub> 法制备大肠杆菌感受态细胞 TOP10,挑取生长正常的单菌落摇菌,提质粒酶切验证。

1.2.5.2 花序侵染法转化野生型拟南芥植株 将重组质粒 pBII11L-ATG8e 电击转化农杆菌 GV3101 菌株,挑取单克隆于加入 50 μg/mL 庆大霉素、50 μg/mL 卡那霉素、25 μg/mL 利福平的 LB 液体培养基中,28 °C、220 r/min 培养,至 D<sub>600nm</sub> 约为 1.2 时收菌;菌体用 500 mL 渗透缓冲液 [5% 蔗糖 (质量浓度), 0.05% (体积分数) SILWET® L - 77] 重悬;将侧枝丰富的野生型拟南芥植株进行蘸花,时间约为 45 s;蘸花后植物上收取的种子为转基因 T<sub>1</sub> 代。

1.2.5.3 ATG8e 超表达 T<sub>3</sub> 代植物的获得 T<sub>1</sub> 代植株用含有 50 μg/mL 卡那霉素的 MS 培养基初筛,将挑出的绿色植物移栽到基质土上继续生长,待植物果实成熟后,单颗收取 T<sub>2</sub> 代种子;T<sub>2</sub> 代转基因植株的鉴定主要从蛋白水平上检测 ATG8e 的表达,挑选出 ATG8e 高表达植株单株收取 T<sub>3</sub> 代种子;对 T<sub>3</sub> 代植株分别从 ATG8e RNA 转录水平以及蛋白表达水平进行检测。

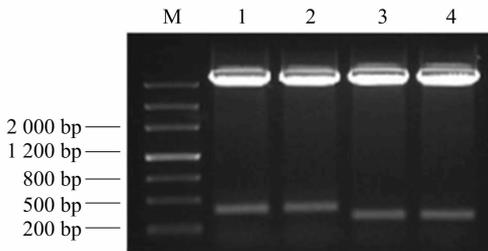
1.2.6 ATG8e 多克隆抗体特异性检测 取在基质土上生长 3 周龄的野生型拟南芥和 ATG8e 超表达 T<sub>3</sub> 代植株叶片于 1.5 mL 离心管内并称质量。将各组植物样品研磨成粉末,

1 mg 植物量加入 10  $\mu$ L 蛋白提取液 (125 mmol/L Tris - HCl, pH 值 6.8, 20% 甘油, 4% SDS, 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 65  $^{\circ}$ C 干浴处理 2 h, 14 000 r/min 离心 10 min, 吸上清液于新的 1.5 mL 离心管内, -80  $^{\circ}$ C 储存备用。取 10  $\mu$ L 植物蛋白样品进行尿素 - SDS - PAGE (6 mol/L 尿素), 用已制备的 ATG8e 多克隆抗体进行免疫印迹检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 鉴定 pGEX-4T-1-ATG8e 原核表达载体

将构建的原核表达载体 pGEX-4T-1-ATG8e 用 *Bam*H I 酶切鉴定插入, 得到 5 000 bp 的载体骨架和约为 370 bp 的目的片段 (图 1 的泳道 1 和泳道 2)。之后用 *Eco*R I 鉴定插入方向, 琼脂糖凝胶电泳呈现 5 000 bp 的载体骨架以及约为 300 bp 的片段插入 (图 1 的泳道 3 和泳道 4), 对插入方向为正向的 2 号重组质粒测序。测序结果完全准确, 表明成功构建了 pGEX-4T-1-ATG8e 载体。

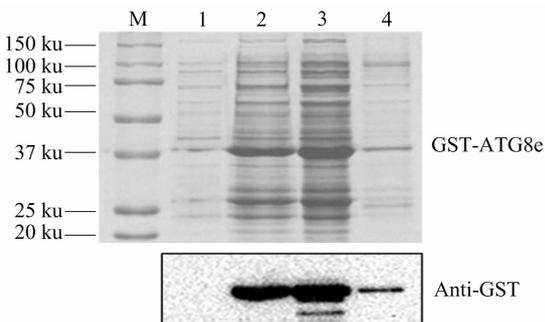


M—DNA marker; 1~2—1 #、2 # pGEX-4T-1-ATG8e 质粒 *Bam*H I 酶切结果; 3~4—1 #、2 # pGEX-4T-1-ATG8e 质粒 *Eco*R I 酶切结果

图1 pGEX-4T-1-ATG8e 表达载体的鉴定

### 2.2 重组蛋白的诱导表达和纯化

对诱导前菌液、诱导后菌液、破菌后上清液、破菌后沉淀 4 个样品进行 SDS - PAGE (图 2)。在诱导后菌液和破菌后的上清液样品中均检测到高表达量的蛋白条带 (37 ~ 50 ku) (图 2 的泳道 2 和泳道 3), 说明该蛋白在试验条件下是可诱导的, 且大部分是以可溶性形式存在的。已知 GST - ATG8e 分子量理论值为 40 ku, 根据胶图结果推测极有可能成功诱导表达了融合蛋白 GST - ATG8e; 为进一步确定诱导高表达的为融合蛋白 GST - ATG8e, 用 Anti - GST 做免疫印迹, 检测到大小和融合蛋白 GST - ATG8e 分子量吻合的特异性条带, 说明融合蛋白 GST - ATG8e 在大肠杆菌中成功表达。



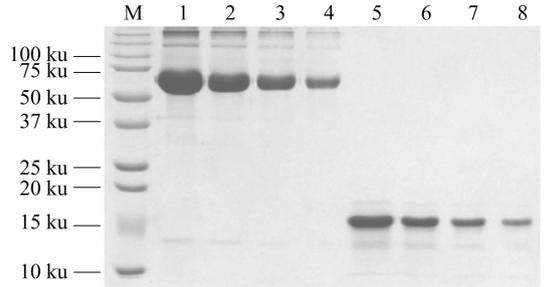
M—蛋白 marker; 1—BL21(DE3)/pGEX-4T-1-ATG8e 诱导前菌液; 2—BL21(DE3) pGEX-4T-1-ATG8e 诱导后菌液; 3—超声破菌后上清液; 4—超声破菌后沉淀

图2 重组质粒 pGEX-4T-1-ATG8e 的诱导表达

将融合蛋白 GST - ATG8e 经谷胱甘肽琼脂糖凝胶树脂亲和纯化, 用凝血酶酶切去除 GST 标签, 之后对 ATG8e 进行 SDS - PAGE 胶胶再纯化。用 BSA (质量浓度依次为 1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL) 定量, 测得 ATG8e 质量浓度约为 0.3 mg/mL (图 3)。

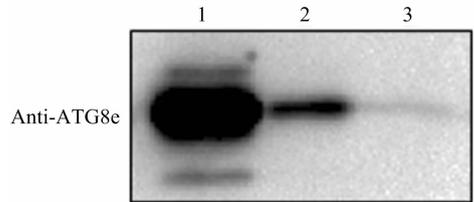
### 2.3 ATG8e 多克隆抗体的效价检测和制备

用分离纯化得到的 ATG8e 蛋白免疫家兔, 收集免疫 4 次后的兔抗血清做免疫印迹检测。结果显示, 1 : 1 000 稀释后的 ATG8e 兔抗血清能清晰检测到 3 ng ATG8e 蛋白 (图 4)。证明兔抗血清效价比较高, 后续可以纯化抗血清制备高质量的 ATG8e 多克隆抗体。



M 为蛋白 marker; 1~4 依次为: 1.0、0.5、0.25、0.125 mg/mL 牛血清白蛋白; 5~8 依次为: 10、5、2.5、1.25  $\mu$ L 纯化后的 ATG8e

图3 纯化后的 ATG8e 蛋白的定量



1~3 依次为 30、3、0.3 ng 的 ATG8e 抗原

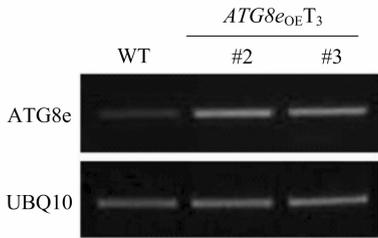
图4 ATG8e 抗血清对 ATG8e 蛋白的免疫印迹检测

### 2.4 ATG8e 多克隆抗体对拟南芥内源 ATG8e 蛋白的特异性检测

提取 3 周龄野生型拟南芥和 2 #、3 # *ATG8e<sub>OE</sub>* (*OE* 表示基因过表达) *T<sub>3</sub>* 代植株叶片 cDNA, 做半定量 PCR 检测 *ATG8e* 在 2 种基因型植株中的表达水平 (图 5), 以 *UBQ10* 作为内参。结果显示, 2 #、3 # *ATG8e<sub>OE</sub>* *T<sub>3</sub>* 代植株 *ATG8e* 的表达量相较于野生型拟南芥植株明显增多。之后提取野生型拟南芥和 2 #、3 # *ATG8e<sub>OE</sub>* *T<sub>3</sub>* 代植株叶片蛋白, 每孔上样 10  $\mu$ L 进行 Urea - SDS - PAGE (6 mol/L Urea) 电泳, Anti - ATG8e 多克隆抗体免疫印迹检测结果如图 6 所示。以野生型拟南芥为对照, 2 #、3 # *ATG8e<sub>OE</sub>* *T<sub>3</sub>* 代植株叶片蛋白样品中 ATG8e 和 ATG8e - PE 的积累量明显上调, 尽管 ATG8e - PE 分子量比 ATG8e 大, 但是由于 ATG8e - PE 疏水性极强, 其迁移率较 ATG8e 快<sup>[16]</sup>; 对应的是其考马斯亮蓝染液染胶结果, 表明样品上样量一致性很高。这说明制备的 ATG8e 多克隆抗体能够特异性识别拟南芥内源 ATG8e。

## 3 讨论与结论

已有报道表明, 自噬相关基因在真核生物进化中高度保守<sup>[10]</sup>, 说明自噬对于机体正常有序的生命活动具有重要意义。在动物中, 自噬与癌症、神经衰退型疾病、长寿有关<sup>[17]</sup>。



WT—野生型拟南芥植株；#2—#3 *ATG8e<sub>OE</sub> T<sub>3</sub>*代植物样品；  
#3—#3 *ATG8e<sub>OE</sub> T<sub>3</sub>*代植物样品

图5 *ATG8e* 超表达植株的鉴定

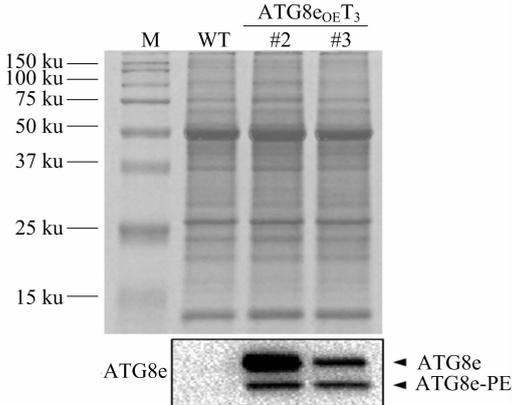


图6 *ATG8e* 多克隆抗体对拟南芥内源 *ATG8e* 蛋白的免疫印迹检测

在植物体中,自噬与胁迫响应<sup>[8]</sup>、病原体侵害<sup>[18]</sup>、衰老<sup>[19]</sup>相关。*ATG8* 基因在细胞自噬过程中发挥了重要作用,由于 *ATG8* 家族的 *ATG8e* 在细胞内主要以 *ATG8e* 和 *ATG8e-PE* 这 2 种形式存在,后者可以通过 PE 基团锚定在自噬体膜上,参与自噬体成膜过程<sup>[7]</sup>,*ATG8e-PE* 的积累量能够表征植物个体自噬发生的程度。通常检测植物体自噬的分子标记有 2 种,一是单丹磺酰尸胺染色<sup>[20]</sup>,它的缺点是可以使自噬体及所有酸性液泡都被染色,属于非特异性的,不是最佳自噬检测方法。二是 *ATG8* 蛋白的 N 端加绿色荧光蛋白 GFP<sup>[20-22]</sup>,可以在荧光显微镜下观察 *ATG8* 的定位,也可以利用 GFP 多克隆抗体做免疫印迹检测 GFP-*ATG8* 和剪切后游离的 GFP 积累量,间接估计自噬的程度,还可以用 *ATG8e* 蛋白多克隆抗体检测植物内源 *ATG8e* 和 *ATG8e-PE* 积累量,这对于研究自噬很有价值。另外,利用制备的 *ATG8e* 多克隆抗体做免疫印迹,可检测不同基因型拟南芥植株在非生物胁迫响应,如营养饥饿、氧胁迫、干旱等条件下,不同药物如刀豆素 A (concanamycin A)、E-64d、BTH 等处理时 *ATG8e* 和 *ATG8e-PE* 的积累量,从而表征植物自噬发生的程度,是研究植物体自噬的有效工具。

本研究构建重组质粒 pGEX-4T-1-*ATG8e*,在大肠杆菌系统下诱导表达融合蛋白 GST-*ATG8e*,但引进标签 GST 所占比例过大,可能会影响目的蛋白活性,决定用切除标签 GST 的 *ATG8e* 蛋白免疫健康成年兔制备多克隆抗体。本试验采用凝血酶酶切 40 ku 融合蛋白 GST-*ATG8e*,将其分为 14 ku 的 *ATG8e* 和 26 ku 的 GST 2 个部分,14 ku 的 *ATG8e* 因无 GST 结合位点,故从 GST 柱上流穿,而带有 26 ku GST 标签的融合蛋白会结合在柱子上,这样就可以将目的蛋白 *ATG8e*

与融合蛋白 GST-*ATG8e* 成功分离<sup>[23]</sup>。为了得到高效价的 *ATG8e* 蛋白,不仅先用 GST 柱亲和纯化,还将凝血酶处理的目的蛋白进行 SDS-PAGE 割胶再纯化。最后在检测植物内源 *ATG8e* 表达量时,不仅用了野生型拟南芥植株,还采用 *ATG8e* 过表达材料 *ATG8e<sub>OE</sub> T<sub>3</sub>* 代充分证实制备的 *ATG8e* 多克隆抗体有效。

#### 参考文献:

- [1] Xie Z, Klionsky D J. Autophagosome formation: core machinery and adaptations [J]. *Nature Cell Biology*, 2007, 9(10): 1102-1109.
- [2] Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, et al. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(7): 458-467.
- [3] Lamb C A, Yoshimori T, Tooze S A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2013, 14(12): 759-774.
- [4] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation [J]. *Nature*, 2000, 408(6811): 488-492.
- [5] Tanida I, Mizushima N, Kiyooka M, et al. Apg7p/Cvt2p: a novel protein-activating enzyme essential for autophagy [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 1999, 10(5): 1367-1379.
- [6] Mizushima N, Noda T, Ohsumi Y. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway [J]. *EMBO Journal*, 1999, 18(14): 3888-3896.
- [7] Xie Z P, Nair U, Klionsky D J. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(8): 3290-3298.
- [8] Bassham D C. Plant autophagy - more than a starvation response [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(6): 587-593.
- [9] Yoshimoto K, Jikumam Y, Kamiya Y, et al. Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(9): 2914-2927.
- [10] Liu Y, Bassham D C. Autophagy: pathways for self-eating in plant cells [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 215-237.
- [11] 董万春, 樊婷婷, 阳立波, 等. 拟南芥 *CDR6* 基因过表达载体构建及过量表达植株筛选鉴定 [J]. *安徽省农业科学*, 2015, 43(13): 63-64.
- [12] Yu F, Park S, Rodermel S R. The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes [J]. *Plant Journal*, 2004, 37(6): 864-876.
- [13] Arnau J, Lauritzen C, Petersen G E, et al. WITHDRAWN: Reprint of: Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins [J]. *Protein Expression and Purification*, 2006, 48(1): 1-13.
- [14] 王 玥, 梁 爽, 梁慧珂, 等. 拟南芥叶绿体发育必需蛋白 PAC 的原核表达及多克隆抗体制备 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(10): 171-175.
- [15] 单丽伟, 唐如春, 刘三阳, 等. 小麦种子过氧化物酶 *WPI* 基因的原核表达、纯化及多克隆抗体制备 [J]. *生物工程学报*, 2011, 27(1): 26-30.
- [16] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting [J]. *Autophagy*, 2007, 3(6): 542-545.

张世乔,王瑞峥,江洪,等. 中国水稻产量受水分胁迫影响的 Meta 分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(18):51-54.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.18.013

# 中国水稻产量受水分胁迫影响的 Meta 分析

张世乔,王瑞峥,江洪,张林静,张金梦

(江苏省地理信息技术重点实验室/南京大学国际地球系统科学研究所,江苏南京 210093)

**摘要:**运用整合分析(Meta-analysis)方法,定量研究大尺度空间和时间范围内不同程度水分胁迫对我国水稻产量与千粒质量的影响,同时定量研究水稻在不同生长阶段受到水分胁迫所造成的减产效果,用科学手段应对季节性干旱或突发性旱灾,从而在最大程度上避免水稻大量减产。通过检索并收集国内外主流期刊的共93篇文献的试验数据,完成水稻产量和水分胁迫数据库的建立,从而实现了运用 Meta-analysis 方法比较分析水分胁迫对中国水稻产量的影响。与常规灌溉相比,不同生长期水分胁迫对水稻产量均有不同程度的减产效果,且土壤水势越低,减产效果越明显。在营养生长阶段,水分胁迫造成水稻平均减产 19.11% (95% 置信区间减产 16.86% ~ 21.30%);在营养生长与生殖生长并进阶段,水稻平均减产 26.07% (95% 置信区间减产 24.73% ~ 27.38%);在生殖生长阶段,平均减产 13.71% (95% 置信区间减产 7.90% ~ 19.15%)。可以看出,营养生长与生殖生长并进阶段是影响水稻结实的关键时期,保证该阶段水稻供水充足是确保水稻产量的重要措施,避免水稻在该时期遭遇旱灾是降低水稻减产量的有效手段。

**关键词:**干旱;水分胁迫;水稻;产量;整合分析

**中图分类号:** S11<sup>+</sup>4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)18-0051-04

粮食是人类生存的物质基础,也是一个国家社会稳定、经济发展的重要组成部分。7 000 多年前水稻便开始在我国长江流域被人们种植,目前,世界上近一半人口以大米为主食。作为水稻的原产区,我国水稻主产区主要是东北地区、长江流域、珠江流域等。21 世纪以来,随着人类活动的加剧,全球环境发生了巨大的变化,环境的巨大变化影响并改变了全球生态系统的结构组成和服务功能,同时也影响了水稻的生长和发育。水稻喜高温、多湿、短日照,其耐旱性介于旱生植物和水生植物之间,它们对水分胁迫的感应较为敏感。因此,有必要研究一定程度的水分胁迫对我国主要水稻产区中水稻种植的影响,从而为评估干旱对水稻产量的影响以及如何进行精细农业耕作和预防干旱提供科学理论依据。

生态试验的目的在于验证某一类或者某个特定的假说,其试验结果往往局限于某一特定时间、地点、环境和试验对象,事实上,通过单个试验无法验证一类假说的正确与否<sup>[1]</sup>。在生态学中,绝对重复试验是无法实现的,但是利用大量独立试验得出一般结论是十分必要的。Meta 分析方法是一种对同一主题下大量独立试验结果进行综合归纳的统计方法<sup>[2]</sup>,简单来说,Meta-analysis 是运用统计学原理,通过收集、整理与分析之前学者、专家针对某个主题所作的众多研究数据,从而找出需要研究的问题或所关注的变量之间的明确关系模式。Meta 分析的雏形可以追溯到 1904 年英国统计学家 Pearson 用统计的方法分析 11 份有关伤寒疫苗效果的研究,他期望用此方法归纳出明确的结论<sup>[3]</sup>,1976 年,美国教育学家 Gene Glass (是 Meta-analysis 这个名词的首创者)创造了效应值(effect size)这一指标来代表通过统计分析去整合与分析众多相同主题的实证研究,以期获得最有代表性的结论的过程与方法<sup>[4]</sup>,同时,他也是真正意义上的最早提出 Meta 分析的科学家。Meta 分析方法在 90 年代才开始被生态学家应用于生态学领域,第一部生态学 Meta 分析专著是 Gurevitch 于 1993 年出版的<sup>[5]</sup>,并同时发行了第一版 MetaWin 软件包。

收稿日期:2017-04-05

基金项目:国家科技基础条件平台中心项目(编号:2005DKA32306)。

作者简介:张世乔(1992-),男,江西景德镇人,硕士研究生,研究方向为大数据与粮食安全。E-mail:zhangshiqiao3039@163.com。

通信作者:江洪,博士,教授,主要从事全球变化、生态模拟、大气遥感、碳氮循环、生态水文等方面的研究。E-mail:jianghong\_china@hotmail.com。

[17] Yang Z, Klionsky D J. Eaten alive: a history of macroautophagy[J]. Nature Cell Biology, 2010, 12(9): 814-822.

[18] Bassham D C. Function and regulation of macroautophagy in plants[J]. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2009, 1793(9): 1397-1403.

[19] Hayward A P, Dinesh-Kumar S P. What can plant autophagy do for an innate immune response[J]. Annual Review of Phytopathology, 2010, 49: 557-576.

[20] Contento A L, Xiong Y, Bassham D C. Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein[J]. Plant Journal, 2005, 42(4):

598-608.

[21] Thompson A R, Doelling J H, Suttangkakul A, et al. Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways[J]. Plant Physiology, 2005, 138(4): 2097-2110.

[22] Yoshimoto K, Hanaoka H, Sato S, et al. Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy[J]. Plant Cell, 2004, 16(11): 2967-2983.

[23] Queiroz J A, Tomaz C T, Cabral J M S. Hydrophobic interaction chromatography of proteins[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 87(2): 143-159.