

紫贻贝LC3B蛋白的原核表达及抗血清制备

余振兴, 朱倩, 姚翠鸾*

(集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要: LC3B是检测自噬程度的标志性分子, 但是在低等动物体内缺少特异性强的LC3B抗体。为研究贝类的自噬性细胞死亡, 本研究通过将紫贻贝的LC3B编码序列克隆到pET-32a原核表达载体中构建重组表达载体, 进而对IPTG诱导浓度、诱导表达时间进行摸索; 采用亲和层析对重组蛋白进行纯化, 并采用SDS-PAGE检测及Western blot进行验证; 利用获得的重组蛋白免疫新西兰兔, 制备其多克隆抗体。结果显示, 在20℃, 转速为150 r/min条件下, 当IPTG浓度为0.6 mmol/L, 诱导表达10 h后, 可以得到高表达量、可溶性的重组MgLC3B-His融合蛋白, 亲和层析纯化后, 获得单一条带的MgLC3B-His可溶性重组蛋白; 采用纯化后的MgLC3B-His融合蛋白对新西兰兔进行多次免疫, 采集分离兔抗血清并利用protein A纯化, 获得紫贻贝的LC3B多克隆抗体, 效价为25 600。紫贻贝LC3B多克隆抗体的成功制备, 为今后深入开展紫贻贝及相近物种的细胞自噬研究奠定了基础。

关键词: 紫贻贝; LC3B; 重组表达; 细胞自噬; 多克隆抗体

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

细胞自噬是细胞死亡的重要调控方式之一。细胞通过形成自噬体降解胞内多余或者受损蛋白及细胞器, 在调控机体的生理及病理状态过程中发挥重要作用。当机体处于营养缺乏、饥饿等胁迫状态下, 细胞自噬可以将机体内非基本生命活动必须的物质降解回收用来维持细胞生命活动^[1]; 另外, 细胞自噬还可以通过清除体内功能受损、老化的蛋白分子和细胞器, 在机体的多种生命活动中发挥重要作用^[2]。研究表明, 从单细胞生物酵母到高等哺乳动物中都存在细胞自噬及相关的调控机制^[3], 这提示细胞自噬在不同类型的生物中, 可能都具有重要的作用。以往学者及本实验团队前期研究发现, 贝类及对虾等海洋无脊椎动物中也存在细胞自噬及相关的调控^[4-5], 但是生理作用及调控机制还需深入研究。

目前在模式生物中鉴定出的自噬相关基因

(autophagy-related genes, Atgs)共有40余个^[6], 根据功能不同, 可将其分为5类: Atg1亚家族(包括Atg1, Atg13, Atg17, Atg29与Atg31), 主要负责在自噬体形成起始位点PAS(phagophore assembly site)引发自噬体的形成; Atg9亚家族(包括Atg23, Atg27, Atg2与Atg18), 负责将构成初始自噬体膜的膜碎片传递给Atg1复合物; 磷脂酰肌醇—激酶(PtdIns3K)亚家族(包括Vps34, Atg6, Vps15, Atg14与Atg38), 负责招募PtdIns3K结合蛋白向自噬起始位点聚集; Atg12-Atg5亚家族(包括Atg5, Atg7, Atg10, Atg12与Atg16), 主要参与前自噬体外膜的延伸; Atg8亚家族(包括Atg3, Atg4, Atg7与Atg8), 主要参与自噬体膜的形成。前期研究已经在贻贝中鉴定出多种Atgs, 并发现在机体受到胁迫后, 相关基因表达水平发生显著改变。

LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3)是Atg8亚家族的一个重要成员, 包括

收稿日期: 2016-06-21 修回日期: 2016-10-27

资助项目: 国家自然科学基金(41276178, 41076076)

通信作者: 姚翠鸾, E-mail: clyao@jmu.edu.cn

LC3A、LC3B、LC3C 3个基因^[7-8]。在细胞自噬过程中, LC3B前体蛋白proLC3B在胞浆中被Atg4蛋白酶切割, 暴露出羧基末端的甘氨酸残基, 形成可溶性的LC3B-I, 分子量为16 ku; 随后, LC3B-I蛋白被E1样酶Atg7活化后传递给E2样酶Atg3, 在Atg3的作用下通过泛素样修饰与磷脂酰乙醇胺(PE)结合形成脂溶性的LC3B-II^[9], LC3B因而被认为在自噬体膜形成过程中发挥重要作用。由于LC3B-II的含量与自噬程度呈正比, 因此, LC3-I和LC3-II比例的变化已经被用来作为检测细胞自噬程度的一个分子标志^[10-11]。

目前, 细胞自噬的检测方法包括电子显微镜、单丹磺酰尸胺(dansylcadaverine, MDC)染色、泛素样结合蛋白p62表达水平、LC3B荧光融合蛋白的点状聚集实验以及LC3B I/II表达变化的检测^[12-15]。上述方法中, 电镜法因为对自噬体辨识困难, 容易造成主观臆断, 而且对硬件设备和操作技术要求较高等原因难以得到广泛应用; MDC及p62的检测因为自噬检测特异性不强而受到限制; LC3B-GFP荧光融合蛋白的点状聚集实验受到细胞系的局限, 难以在无成熟细胞系的动物中应用。因此, 对LC3B I/II比例变化的检测仍然是自噬研究中最常用的方法。但是, 由于机体内LC3表达丰度较低, 保守性不高, 市场上商品化的LC3B抗体主要针对人及小鼠等模式生物, 通用性不强, 对低等海洋动物的自噬性细胞死亡研究造成很大局限。

本研究在实验室前期获得紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)LC3B序列的基础上, 将其克隆连接到原核表达载体pET-32a, 通过摸索诱导表达条件得到较高表达量的MgLC3B-His重组蛋白, 经纯化获得单一条带的重组蛋白, 将得到的MgLC3B-His重组蛋白注射新西兰兔, 经过多次免疫然后采血得到效价较高的抗血清, 为紫贻贝及相近物种自噬性细胞死亡的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

载体与菌种 pMD-19T载体购于TaKaRa公司, pET-32a载体购于Novagen, BL21(DE3)和TOP10菌株为本实验室保存。

引物设计 根据实验室前期克隆得到的紫贻贝MgLC3B序列, 设计了一对带酶切位点的引

物用于MgLC3B全长ORF的扩增: 上游引物MgLC3Bexp-F: 5'-CATGCCATGGG TATGAAT-AAAATCAC-3'(斜体部分为保护碱基, 粗体加下划线部分为Nco I酶切位点); 下游引物MgLC3Bexp-R: 5'-CCGCTCGAGCCC-AAAAGTTTCT-3'(斜体部分为保护碱基, 粗体加下划线部分为Xho I酶切位点), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 实验方法

原核表达质粒构建 以实验室保存的pMD-19T-MgLC3B质粒为模板, 以MgLC3Bexp-F和MgLC3Bexp-R为引物, 在20 μL体系中进行PCR扩增。具体条件: 10×Buffer (含20 mmol/L的Mg²⁺) 2 μL, dNTPs(2.5 mmol/L) 1.6 μL, 引物(10 μmol/L) MgLC3Bexp-F和MgLC3Bexp-R各1 μL, Taq酶0.2 μL (5 U/μL), 无菌双蒸水13.2 μL。PCR反应条件: 预变性94 °C, 5 min; 变性94 °C, 30 s; 退火56 °C, 30 s; 延伸72 °C, 45 s; 共35个循环; 终延伸72 °C, 10 min。

用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离PCR产物, 切胶回收目的条带, 测定浓度, 进行酶切。MgLC3B酶切体系: 10×Tango Buffer 2 μL, Xho I酶1 μL, Nco I酶1 μL, 胶回收产物200 ng, 无菌dd H₂O补足至20 μL; 同时, 对原核表达载体pET-32a进行酶切, 空载体 800 ng, 其他体系同上; 37 °C酶切1 h, 85 °C灭活10 min。酶切结束后, 纯化酶切产物并测定浓度, 进行连接。连接体系: 10×T₄ Buffer 1 μL, T₄ DNA连接酶1 μL, MgLC3B与pET-32a酶切产物摩尔比为5:1(总体积为10 μL), 用水补足至10 μL, 16 °C连接过夜。

连接产物转化TOP10大肠杆菌感受态, 氨苄抗性平板筛选挑取单克隆摇菌, 菌液PCR鉴定阳性重组子pET32a-MgLC3B。扩大培养后, 提取质粒, 一部分进行酶切验证, 一部分转化表达菌BL21(DE3), 菌液PCR鉴定阳性重组子, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序验证。

重组蛋白的诱导表达 将测序正确的含pET32a-MgLC3B重组质粒的BL21(DE3)表达菌扩大培养, 待菌液浓度达到OD₆₀₀ 值为0.8~1.0, 加入不同浓度IPTG(0、0.2、0.4、0.6和0.8 mmol/L)摸索诱导条件。诱导时间设定为8 h, 温度为20 °C, 转速150 r/min。再根据获得的IPTG最适浓度, 摸索最适诱导时间(0、2、4、6、8和10 h)。

重组蛋白的纯化 于5000×g, 4 °C离心5 min收集菌体。菌体用4 °C预冷的10 mmol/L PBS洗涤3次, 每0.8 g菌体(湿重)对应加入10 mL洗脱缓冲液1(300 mmol/L KCl, 50 mmol/L KH₂PO₄, 5 mmol/L咪唑, pH 8.0), 冰浴超声破碎20 min(功率300 W, 超声3 s, 间隔5 s), 12 000×g, 4 °C离心20 min, 收集上清液, 用0.45 μm滤膜过滤。重组蛋白按照Bio-Rad Profinia蛋白质纯化系统进行纯化: 先以5个柱体积的平衡缓冲液进行平衡; 上样蛋白粗提液8 mL(蛋白浓度4.3 mg/mL); 分别用10个柱体积洗脱缓冲液1与洗脱缓冲液2(300 mmol/L KCl, 50 mmol/L KH₂PO₄, 10 mmol/L咪唑, pH 8.0)洗脱; 最后以2个柱体积洗脱缓冲液(300 mmol/L KCl, 50 mmol/L KH₂PO₄, 250 mmol/L咪唑, pH 8.0)进行洗脱, 收集洗脱液。

总蛋白浓度测定按照南京建成蛋白定量(BCA法)测试盒(A045-3)说明书进行。

SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)及Western blot对MgLC3B重组蛋白的检测及验证

MgLC3B重组蛋白的诱导表达采用SDS-PAGE进行检测^[16], 分离胶浓度为12%。

MgLC3B重组蛋白的验证采用Western blot法: 恒压80 V湿转40 min至PVDF膜, 封闭、洗脱按照标准方法进行, His标签抗体(上海生工, AB10002, 1:2000) 4 °C孵育过夜, 二抗(Transgen, 1:6000)室温孵育1 h。ECL显色液(Advansta, R-03025-C50)显色。

多克隆抗体的制备 免疫之前, SPF级新西兰兔耳缘静脉取血1.5 mL, 于37 °C恒温箱中放置1 h, 4 °C冰箱过夜, 3000×g离心15 min, 吸取上清血清作为阴性对照。第1次免疫: 将纯化获得单一条带的重组MgLC3B-His纯化蛋白1 mL(1 mg/mL)与1 mL弗氏佐剂混匀, 背部皮下多点注射; 每隔1周进行1次增强免疫注射, 注射方法同前, 总共4次。最后一次免疫后10 d耳缘静脉取血1.5 mL, 分离采集血清通过间接ELISA方法测定抗体效价, 达到要求后, 心脏取血, 按上述方法分离血清。

抗体的纯化 利用Transgen公司的Protein A进行多抗纯化。用10倍柱体积的平衡Buffer(20 mmol/L PB, 0.15 mol/L KCl, pH 7.0)进行平衡; 抗血清用0.45 μm滤膜过滤处理后, 轻轻转移至纯化介质中; 用10倍柱体积的平衡Buffer(20 mmol/L PBS, 0.15 mol/L KCl, pH 7.0)洗涤; 用10 mL的洗

脱缓冲液(20 mmol/L柠檬酸, pH 3.5)进行洗脱, 收集到的抗体立即用1 mol/L Tris-HCl中和。

抗体效价测定 纯化后多抗用间接ELISA法测定效价^[17]。蛋白包被后, 每孔分别加入按1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12 800、1:25 600稀释的多抗100 μL、免疫前血清1:100稀释100 μL作为阴性对照、不含血清的稀释液100 μL作为空白对照, 37 °C孵育1 h。洗板3次后每孔加入1:5000稀释的HRP标记羊抗兔二抗100 μL, 37 °C孵育1 h。洗板3次后每孔加入四甲基联苯胺TMB显色液100 μL, 避光静置反应10 min, 加入100 μL 2 mol/L H₂SO₄终止。酶标仪450 nm处测定吸光值, 并计算P/N值($\frac{\text{检测孔OD}-\text{空白孔OD}}{\text{阴性孔OD}-\text{空白孔OD}}$), P/N>2.1为阳性, 以出现阳性结果的最高稀释倍数作为待检测抗体效价。

2 结果

2.1 MgLC3B-pET32a原核表达质粒的构建

本实验克隆获得特异性紫贻贝MgLC3B单一条带, 分子量约370 bp, 与预期大小相符。将克隆得到的带酶切位点的MgLC3B片段构建到pET32a载体上(图1), 双酶切验证获得与pET32a、MgLC3B预期大小相符的2个特异性条带。随后测序验证质粒序列及是否插入正确。

2.2 MgLC3B重组蛋白表达条件的摸索

在IPTG浓度为0~0.6 mmol/L时, 随着其浓度增加, MgLC3B-His重组蛋白表达量也逐渐增加, 当IPTG浓度达0.6 mmol/L以上, MgLC3B-His重组蛋白的表达量没有显著增加(图2), 因此, 确定IPTG诱导浓度为0.6 mmol/L。

根据摸索的IPTG浓度确定诱导时间, 结果表明在诱导10 h内, MgLC3B-His重组蛋白的表达量随诱导时间的延长而增加(图3)。在诱导超过10 h后, 表达量没有显著增加, 因此最终确定表达条件: 500 mL锥形瓶中加入200 mL无菌LB液体培养基(胰蛋白胨10 g/L, 酵母提取物5 g/L, NaCl 10 g/L), IPTG浓度为0.6 mmol/L, 诱导时间为10 h, 温度为20 °C, 转速为150 r/min。

2.3 MgLC3B-His重组蛋白的纯化及Western blot验证

经过扩大培养得到大量可溶性重组蛋白。

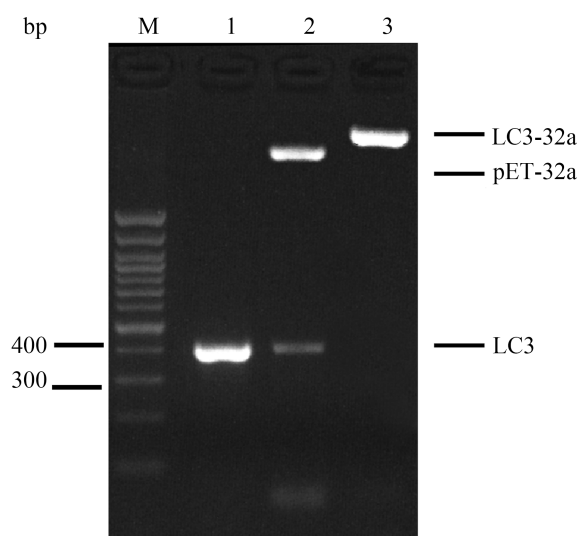


图1 *MgLC3B-pET32a*表达质粒的构建

M. 100 bp plus Marker; 1. 克隆的带酶切位点的*MgLC3B*; 2. *MgLC3B-pET32a*的双酶切验证, 经过酶切, 成功切分为2条带, 分别为*MgLC3B*和*pET32a*; 3. 完整的*MgLC3B-pET32a*表达载体

Fig. 1 Construction of *MgLC3B-pET32a* recombinant vector

M. 100 bp plus Marker; 1. agarose gel electrophoresis of *MgLC3B* with the restriction enzyme cutting site; 2. double enzyme digestion of *MgLC3B-pET32a*, *MgLC3B* and *pET32a* were shown on agarose gel electrophoresis, respectively; 3. *MgLC3B-pET32a* recombinant expression vector

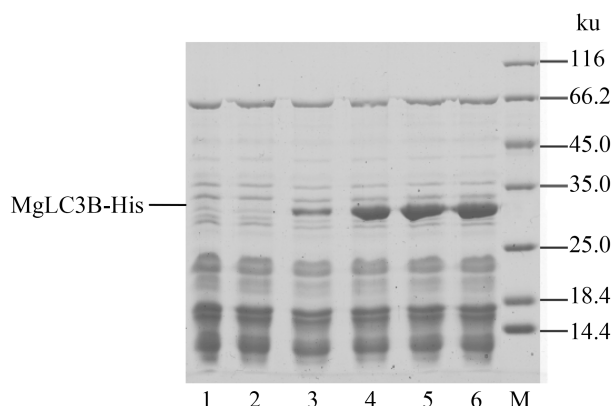


图2 IPTG浓度对*MgLC3B-His*重组蛋白表达的影响

1. 空载*pET-32a*; 2. 重组未诱导; 3. IPTG浓度0.2 mmol/L; 4. IPTG浓度0.4 mmol/L; 5. IPTG浓度0.6 mmol/L; 6. IPTG浓度0.8 mmol/L; M. 蛋白标准分子量

Fig. 2 Effect of IPTG concentration on the production of recombinant *MgLC3B-His*

1. empty vector *pET-32a*; 2. 0 mmol/L IPTG; 3. 0.2 mmol/L IPTG; 4. 0.4 mmol/L IPTG; 5. 0.6 mmol/L IPTG; 5. 0.8 mmol/L IPTG; M. standard protein molecular weight marker

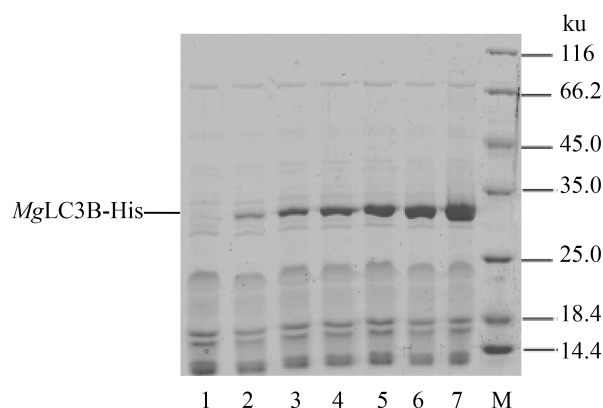


图3 诱导时间对*MgLC3B-His*重组蛋白表达的影响

1. 空载*pET-32a*; 2. 诱导时间0 h; 3. 诱导时间2 h; 4. 诱导时间4 h; 5. 诱导时间6 h; 6. 诱导时间8 h; 7. 诱导时间10 h; M为蛋白标准分子量

Fig. 3 Effect of induction time on the production of recombinant *MgLC3B-His*

1. empty vector; 2. induction for 0 h; 3. induction for 2 h; 4. induction for 4 h; 5. induction for 6 h; 5. induction for 8 h; induction for 10 h; M. standard protein molecular weight marker

利用Bio-Rad Profinia蛋白质纯化系统进行纯化, 经分离胶浓度为12%的SDS-PAGE检测, 得到纯化的重组蛋白单一条带(图4)。利用His标签抗体对重组蛋白进行检测, 在预期大小位置得到单一条带(图5), 说明得到的蛋白为*MgLC3B-His*重组蛋白。

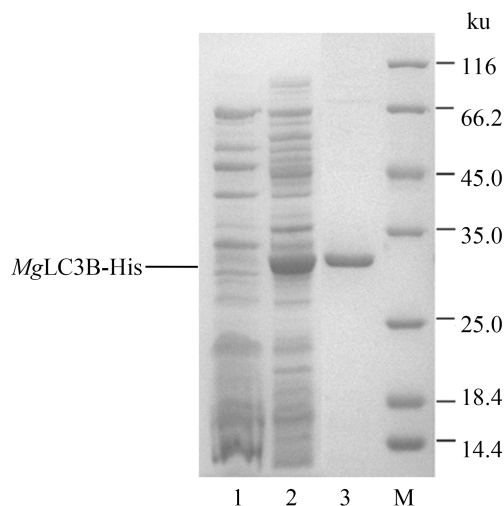


图4 *MgLC3B-His*重组蛋白的纯化

1. 重组未诱导; 2. 重组诱导; 3. 纯化蛋白; M. 蛋白标准分子量

Fig. 4 Purification of recombinant *MgLC3B-His*

1. before induction; 2. recombinant protein expression after induction; 3. purified recombinant protein; M. standard protein molecular weight marker

2.4 MgLC3B-His抗血清的制备、纯化及效价测定

将纯化后的重组MgLC3B-His蛋白注射新西兰兔，经过多次注射加强免疫，采集分离得到血清；经Protein A纯化后，利用ELISA间接法测定效价，稀释倍数1:100~1:25 600的P/N值分别为12.56、11.74、9.82、7.66、6.38、5.20、4.45、3.12、2.21。因此，制备的紫贻贝MgLC3B-His多克隆抗体效价为25 600(图6)。

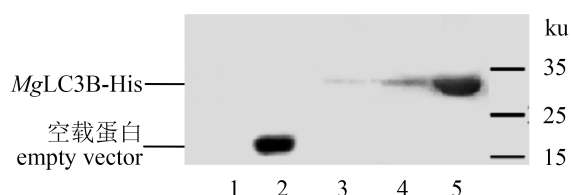


图5 MgLC3B-His重组蛋白His标签抗体Western blot检测

1. 空载未诱导；2. 空载诱导；3. 重组未诱导；4. 重组诱导；5. 纯化蛋白

Fig. 5 Western-blot analysis of recombinant MgLC3B-His with anti-His antibody

1. empty vector before induction; 2. empty vector after induction; 3. recombinant vector before induction; 4. recombinant vector after induction; 5. purified recombinant protein

3 讨论

细胞凋亡和自噬在机体的生理及病理调控中具有重要作用，是细胞死亡领域的研究热点之一。以往的研究发现坏死、细胞凋亡及相关调控在贻贝应对温度胁迫中发挥重要作用^[18-21]，细胞自噬作为细胞死亡的重要方式，已经引起广泛关注。随着自噬研究的增多，细胞自噬电子显微镜、荧光染色定位、自噬降解底物、自噬体膜上LC3B-II/LC3B-I的比例等多种自噬检测方法也逐渐建立。其中，LC3B-II/LC3B-I的比例的检测方法由于特异性强、准确性高，得到广泛使用。但是，LC3B的商业化抗体目前主要针

对人及小鼠开发，而贻贝的LC3B序列与其他物种的LC3B相似性较低，大约只有60%~70%，在低等动物自噬研究中通用性较差^[22]，采用多个公司的商业化LC3B抗体，均不能在贻贝中检测到特异性强的目的条带。

吴洪波等^[23]将小麦(*Triticum aestivum*)的Atg8基因构建到pET-28b原核表达载体上；赵振东等^[24]将大鼠(*Rattus norvegicus*)的LC3B构建到pET-28a原核表达载体上，都获得了可溶性表达重组蛋白。但是pET-28原核表达载体带的标签只有4 ku左右，MgLC3B蛋白包含120个氨基酸，分子量预测为14.3 ku，分子量较小，免疫原性较低，经过pET-32a重组表达后加上载体上的标签，大小约为30 ku，重组蛋白的免疫原性较高，有助于得到效价较高的抗体。因此，本实验将紫贻贝的MgLC3B基因克隆构建到pET-32a原核表达载体上。pET系列载体含有强启动子，在重组表达的过程中容易产生包涵体蛋白，但是pET-32a载体含有Trx标签，有助于提高重组蛋白的可溶性和产量。由于可溶性蛋白对天然蛋白的不连续性表位有较好的展示，刺激实验动物产生的多克隆抗体的抗原性特异性较高。因此在本实验中为了得到更多的可溶性蛋白，在较低温度及较低转速下，对IPTG的诱导浓度和诱导时间进行摸索优化，确保在保持重组蛋白可溶性的情况下得到较高表达量的重组蛋白。

在重组蛋白的诱导表达过程中，IPTG浓度与重组蛋白的表达量密切相关。倪志华等^[25]选用IPTG浓度为1 mmol/L，37 °C诱导6 h，发现大鼠的LC3重组蛋白主要以包涵体形式存在。包涵体蛋白是因为在表达菌株中蛋白大量表达，来不及折叠形成的蛋白质聚集体^[26]。已有研究证明，诱导表达的时候，低的培养温度和培养转速有助于减缓蛋白表达，有助于蛋白折叠^[27]。本研究在诱导MgLC3B-His重组蛋白表达的过程中，为了获得更多的可溶性蛋白，根据实验室前期经

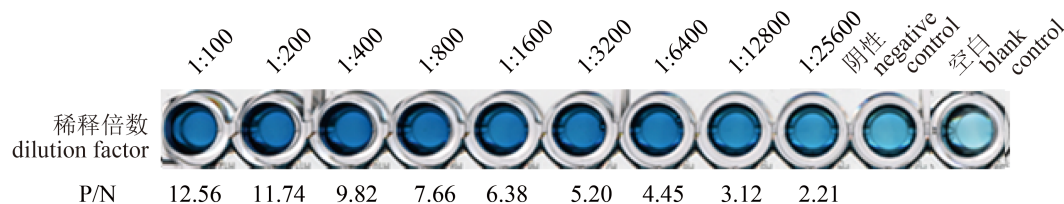


图6 MgLC3B-His多克隆抗体的效价测定

Fig. 6 Titer of the MgLC3B-His polyclonal antibody

验, 选用诱导温度为20 °C, 摇床转速为150 r/min。通过对不同IPTG浓度摸索, 发现当IPTG浓度为0.6 mmol/L时MgLC3B-His重组蛋白的诱导表达量最高, 但随着浓度增加, 并不能显著提升表达量。进而对诱导表达时间进行摸索, 发现在10 h内, 重组蛋白产量与诱导时间正相关, 因此确定诱导时间为10 h。

赵振东等^[24]利用His-bind树脂柱纯化LC3B重组蛋白, 40 mmol/L咪唑的洗脱液可以洗去大部分杂蛋白, 50 mmol/L咪唑的洗脱液洗脱的目的蛋白纯度最高, 80 mmol/L咪唑的洗脱液的目的蛋白洗脱量最大。本实验使用的是Bio-Rad Profinia蛋白纯化系统, 选用的平衡缓冲液咪唑浓度为5 mmol/L, 洗脱缓冲液咪唑浓度为5和10 mmol/L。降低流速, 延长洗脱时间, 有助于去除杂蛋白及非特异性结合蛋白。用250 mmol/L高浓度咪唑的洗脱缓冲液进行洗脱, 有助于目的蛋白的彻底洗脱。通过SDS-PAGE和Western blot检测可以得出纯化重组蛋白的含量和纯度都比较高(图4)。本研究在获得分子量约30 ku单一条带的MgLC3B-His重组蛋白的基础上, 免疫注射新西兰兔, 经过多次注射加强免疫, 采集分离血清, 得到效价为25 600的多克隆抗体(图6), 抗体效价较高, 为后续研究紫贻贝及相似物种的自噬性细胞死亡机理奠定基础。

参考文献:

- [1] Farré J C, Subramani S. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process[J]. Trends in Cell Biology, 2004, 14(9): 515-523.
- [2] Mizushima N. Autophagy: process and function[J]. Genes & Development, 2007, 21(22): 2861-2873.
- [3] Yamamoto H, Shima T, Yamaguchi M, *et al.* The thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* is a useful organism for structural and biochemical studies of autophagy[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(49): 29506-29518.
- [4] Moore M N, Allen J I, McVeigh A, *et al.* Lysosomal and autophagic reactions as predictive indicators of environmental impact in aquatic animals[J]. Autophagy, 2006, 2(3): 217-220.
- [5] Moore M N. Diet restriction induced autophagy: a lysosomal protective system against oxidative- and pollutant-stress and cell injury[J]. Marine Environmental Research, 2004, 58(2-5): 603-607.
- [6] Feng Y C, Yao Z Y, Klionsky D J. How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy[J]. Trends in Cell Biology, 2015, 25(6): 354-363.
- [7] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, *et al.* LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation[J]. Journal of Cell Science, 2004, 117(13): 2805-2812.
- [8] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing[J]. The EMBO Journal, 2000, 19(21): 5720-5728.
- [9] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [10] Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, *et al.* Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy[J]. Autophagy, 2005, 1(2): 84-91.
- [11] McLeland C B, Rodriguez J, Stern S T. Autophagy monitoring assay: qualitative analysis of MAP LC3-I to II conversion by immunoblot[M]//McNeil S E. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. New York: Humana Press, 2011: 199-206.
- [12] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, *et al.* Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells[J]. Methods in Enzymology, 2009, 452: 143-164.
- [13] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004, 36(12): 2491-2502.
- [14] Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death[J]. The Journal of Cell Biology, 2005, 171(4): 603-614.
- [15] Klionsky D J, Abdalla F C, Abeliovich H, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 445-544.
- [16] 萨姆布鲁克J, 拉塞尔D W. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002.
- Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. Huang P T, Trans. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese).

- [17] 朱正美, 刘辉. 简明免疫学技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 168.
- Zhu Z M, Liu H. Concise immunology technology[M]. Beijing: Science Press, 2002: 168 (in Chinese).
- [18] Yao C L, Somero G N. Thermal stress and cellular signaling processes in hemocytes of native (*Mytilus californianus*) and invasive (*M. galloprovincialis*) mussels: cell cycle regulation and DNA repair[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology, 2013, 165(2): 159-168.
- [19] Yao C L, Somero G N. The impact of ocean warming on marine organisms[J]. Chinese Science Bulletin, 2014, 59(5-6): 468-479.
- [20] Yao C L, Somero G N. The impact of acute temperature stress on hemocytes of invasive and native mussels (*Mytilus galloprovincialis* and *Mytilus californianus*): DNA damage, membrane integrity, apoptosis and signaling pathways[J]. Journal of Experimental Biology, 2012, 215(24): 4267-4277.
- [21] Zhang D, Wang H W, Yao C L. Molecular and acute temperature stress response characterizations of caspase-8 gene in two mussels, *Mytilus coruscus* and *Mytilus galloprovincialis*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology-Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2014, 177-178: 10-20.
- [22] Ni H M, Bockus A, Wozniak A L, *et al.* Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome[J]. Autophagy, 2011, 7(2): 188-204.
- [23] 吴洪波, 刘刚, 张路路, 等. 小麦ATG8的原核表达及其抗血清制备[J]. 华北农学报, 2013, 28(1): 101-105.
- Wu H B, Liu G, Zhang L L, *et al.* Cloning and prokaryotic expression of ATG8 (a molecular marker of autophagy) gene from wheat and preparation of antiserum[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2013, 28(1): 101-105 (in Chinese).
- [24] 赵振东, 曾庆江, 陈丽娜, 等. 重组自噬标志分子LC3的抗血清制备[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2007, 23(6): 508-512.
- Zhao Z D, Zeng Q J, Chen L N, *et al.* Prokaryotic expression of recombinant LC3, a molecular marker of autophagy, and development of its antiserum[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2007, 23(6): 508-512 (in Chinese).
- [25] 倪志华, 张瑞英, 张玉明, 等. 大鼠LC3蛋白的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 中国医药工业杂志, 2011, 42(10): 739-741.
- Ni Z H, Zhang R Y, Zhang Y M, *et al.* Prokaryotic expression of rat LC3 protein and preparation of its polyclonal antibody[J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2011, 42(10): 739-741 (in Chinese).
- [26] Patra A K, Mukhopadhyay R, Mukhija R, *et al.* Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*[J]. Protein Expression and Purification, 2000, 18(2): 182-192.
- [27] Esposito D, Chatterjee D K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17(4): 353-358.

Recombinant expression and polyclonal antibody preparation of *Mytilus galloprovincialis* LC3B

YU Zhenxing, ZHU Qian, YAO Cuiluan *

(Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Autophagy is a cellular process for degradation of damaged proteins and organelles via forming autophagosome. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 B (LC3B) is a marker protein for autophagy detection. However, in many lower animals, autophagy detection is limited for a lack of available specific LC3B antibody. In the present study, the coding sequence of LC3B of *Mytilus galloprovincialis* was cloned and inserted into a pET-32a prokaryotic expression vector. To obtain a high-level and soluble expression of recombinant MgLC3B-His protein, the IPTG concentration and induction time were investigated. Then, the purification conditions of this recombinant protein were also studied. Our results showed that MgLC3B was inserted in the pET-32a prokaryotic expression vector successfully. The recombinant MgLC3B-His protein was induced at 20 °C, 150 r/min with IPTG concentration of 0.6 mmol/L after 10 h culture. A single-band recombinant protein was obtained after affinity purification. After immune injection, and the rabbit polyclonal antibody was also obtained, with a titer of 25 600. Therefore, our results will be helpful for the investigation of autophagy in mussels and similar species.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*; LC3B; recombinant expression; autophagy; polyclonal antibodies

Corresponding author: YAO Cuiluan. E-mail: clyao@jmu.edu.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41276178, 41076076)