

研究简报 ·

重组自噬标志分子 LC3 的抗血清制备

赵振东^{*}, 曾庆江, 陈丽娜, 宋泉声, 陈英玉

(北京大学医学部免疫学系, 北京 100083)

摘要 自噬 (autophagy) 是胞内蛋白等大分子或细胞器直接或间接与溶酶体结合, 从而得以降解的过程。微管相关蛋白 1 轻链 3⁻ (microtubule-associated protein 1 light chain 3⁻, MAP1LC3⁻, 简称 LC3) 是在高等真核细胞中发现的第一种自噬体膜蛋白, 可以作为自噬的标志分子用于检测自噬活动。为深入研究自噬的发生过程及其与健康及疾病的关系, 通过构建 pET28a(+)-LC3 原核表达系统, 应用多聚组氨酸结合树脂分离和纯化了重组 LC3 蛋白, 以该蛋白为免疫原制备了抗 LC3 的抗血清, 并利用 HeLa 细胞自噬模型采用 Western 印迹方法对该抗血清的特性进行了鉴定。结果显示, 兔抗 LC3 抗血清可以同时识别 LC3 的 2 个亚型 LC3⁻ 和 LC3⁻, 且可清晰检测到自噬发生时 LC3⁻ 向 LC3⁻ 的转化, 表明该血清可以用于自噬的检测。

关键词 自噬; 微管相关蛋白 1 轻链 3; 抗血清

中图分类号 R392; Q78

Prokaryotic Expression of Recombinant LC3, a Molecular Marker of Autophagy, and Development of Its Antiserum

ZHAO Zhen-Dong^{*}, ZENG Qing-Jiang, CHEN Li-Na, SONG Quan-Sheng, CHEN Ying-Yu

(Department of Immunology, Peking University Health Science Center, Beijing 100083, China)

细胞的新陈代谢过程存在着蛋白质等大分子的合成与降解以及细胞器的更新。降解细胞内物质的途径有两条, 一个是通过蛋白酶体 (proteasome), 一个就是自噬^[1]。自噬是指胞内蛋白等大分子或细胞器直接或间接与溶酶体结合, 从而得以降解的过程^[1,2]。根据胞内物质到达溶酶体的途径不同, 自噬分为 3 种形式^[3]: 大自噬 (macroautophagy)、小自噬 (microautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)。大自噬发生过程中, 来源不明的单层膜凹陷形成杯状双层膜的结构, 这种“杯子”包裹待降解的细胞器和胞质大分子形成双层膜的自噬体, 随后自噬体与溶酶体融合, 其中的内容物被溶酶体内的各种酶消化、降解。通常所说的自噬实际上指的是大自噬。小自噬是指溶酶体的膜直接包裹一部分胞质, 使其进入溶酶体内消化。分子伴侣介导的自噬是胞浆蛋白质结合到分子伴侣如 HSP70 上, 再与溶酶体膜表面的特异性识别受体结合后, 转运到溶酶体腔内消化, 降解后的氨基酸可以被细胞重新利用。尽管在基础状态时自噬被认为是细胞维持存活 (survival) 的一种机制, 但在某一特定状态, 过

度的自噬过程的发生可引起非细胞凋亡的细胞程序性死亡, 现在已被称作 II 型细胞程序性死亡, 也叫自噬性程序性细胞死亡 (autophagic programmed cell death)^[4~8]。研究表明, 自噬既可促进机体健康, 又可与各种疾病状态相联系, 如肿瘤、神经退行性疾病、肌病、发育和衰老^[9,10]。最近的研究表明, 自噬可以通过影响 MHC 抗原递呈, 和诱导干扰素的产生参与获得性免疫应答, 又可通过影响细胞内细菌和病毒的存活参与天然免疫应答^[11~13]。因此, 深入研究自噬的发生机制及其与疾病发生发展的重要联系具有重要的生物学意义, 方便、快捷、特异的自噬检

收稿日期: 2006-12-18; 接受日期: 2007-03-15

国家自然科学基金 (No. 30371306) 和新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-04-0033) 资助

^{*}联系人 Tel: (010) 82801694; Fax: (010) 82801156

E-mail: zhaoz@bjmu.edu.cn

Received: December 18, 2006; Accepted: March 15, 2007

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30371306) and New Century Excellent Talent Supporting Program (No. NCET-04-0033)

^{*}Corresponding author Tel: (010) 82801694; Fax: (010) 82801156

E-mail: zhaoz@bjmu.edu.cn

测无疑对推动自噬的研究至关重要。目前,检测自噬的方法主要有3种,分别是形态学方法、生物化学方法和自噬标志分子检测^[14]。形态学方法包括电镜下观察和MDC染色;生物化学方法包括长寿命蛋白质的大量降解和运输到溶酶体的特殊胞质成分;自噬标志分子检测主要是LC3-蛋白的检测。迄今为止,电子显微镜仍然是检测自噬的金标准,但电镜检测首先需要昂贵的仪器,其次单纯用电镜区分细胞内的泡状结构-尤其是将吞饮泡与自噬体区分-比较困难,因此使用起来并不方便。而MDC染色和生物化学方法在检测真核细胞自噬时存在着特异性不够的问题。在一种鼠源性自噬相关基因(atophagy-related gene, Atg) 5 (-/-) 细胞系中,因为没有Atg5蛋白表达,所以没有自噬体的存在。但是,用MDC染色后,仍然有MDC斑点出现。一般认为,大多数组成细胞的长寿命蛋白质和细胞器主要由自噬体形式在溶酶体中被消化^[15]。现在,MDC染色和生物化学方法已经不再使用,经常使用的是自噬标志分子检测和电镜检测结合。参与自噬体形成过程的20多种Atg蛋白主要是在酵母中发现的,在哺乳动物中,Atg8的哺乳动物同源物LC3已被明确参与自噬过程,LC3蛋白有3种亚型:pre-LC3、LC3⁻、LC3⁺。其中LC3⁻是胞浆蛋白。新合成的pre-LC3经过剪切修饰(C末端剪去22个氨基酸等)变成LC3⁻胞浆蛋白,接着LC3⁻转变为LC3⁺,并在Atg5的帮助下定位在自噬体前体的膜上,在自噬体形成后依然存在^[16]。因此,LC3⁻被认为是自噬标志分子。但是,到目前为止,还没有高质量的商业销售的抗LC3的抗体,在很大程度上限制了对自噬的深入研究,我们通过将质粒pET28a(+)中导入大鼠的LC3 cDNA序列,构建原核表达系统,表达和纯化了LC3蛋白,并制备了LC3的兔抗血清。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和细胞 感受态大肠杆菌DH5和BL21(DE3)购自Tiangen公司;重组真核载体pEGFP-C1-LC3为本室构建,原核表达质粒pET28a(+)购自Novagen公司;人宫颈癌细胞系HeLa常规培养于含10%胎牛血清、青霉素(100 U/ml)、链霉素(100 μg/ml)、左旋谷氨酸(2×10^{-3} mol/L)的DMEM培养基中,细胞生长于含5% CO₂的37℃孵箱中,由本室常规传代培养。

1.1.2 酶与试剂 Taq DNA聚合酶购自Tiangen公

司;限制性内切酶Hind (10 U/μl)和BamH (10 U/μl)以及T4 DNA连接酶(3 U/μl)为Promega公司产品;DNA提取及纯化试剂盒为Qiagen公司产品;转化试剂A购自博大泰克公司;His-Bind Resin购自Novagen公司;DNA Marker购自Tiangen公司;蛋白质低分子量Marker和蛋白质预染Marker为Fermentas公司产品;抗多聚组氨酸单克隆抗体购自BD公司;HRP标记山羊抗鼠IgG(0.8 mg/ml)购自中衫金桥公司。卡那霉素硫酸盐(25 mg/ml)和IPTG(0.2 mol/L/ml)购自Sigma-Aldrich。

1.1.3 引物设计与合成 根据GenBank中编码大鼠LC3的cDNA序列,设计一对特异性引物。LC3上游引物:5'-CGGATCCCGTCCGAGAA GACCTTCAA-3(划线部分为BamH酶切位点),下游引物:5'-CCCAA GCTTTTAAACA GCCAGTCTGTGCC-3(划线部分为Hind酶切位点),引物由赛百胜公司合成。

1.2 PCR扩增大鼠LC3⁻及重组原核表达质粒pET28a(+)-LC3的构建及鉴定

以重组真核表达载体pEGFP-C1-LC3为模板,LC3特异性引物常规PCR扩增LC3;将PCR产物和pET28a(+)载体经BamH和Hind酶切后,分别用DNA回收试剂盒纯化,按常规条件16℃连接9h,将连接子转化至感受态大肠杆菌DH5,经蓝白斑筛选获得阳性重组子命名为pET28a(+)-LC3, BamH和Hind双酶切后,由奥科公司进行序列测定。序列正确阳性克隆通过常规碱裂解法提取质粒。

1.3 重组大鼠LC3⁻的表达和鉴定

将pET28a(+)-LC3克隆转化表达型大肠杆菌BL21(DE3),挑取转化阳性的单个菌落接种于10 ml含卡那霉素的LB培养液中,37℃振荡过夜;然后取培养的新鲜菌液,100倍转入到10 ml含卡那霉素的2×YT培养液中,37℃250 r/min 2 h,当菌液密度至A₆₀₀ = 0.8~1.0时开始加入IPTG(1×10^{-4} mol/L)诱导,在22℃250 r/min条件下培养3 h,离心收菌,超声破碎菌体至液体澄清,收集离心上清液,沉淀则用2/3体积的PBS重悬,作为离心沉淀液,聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。以所表达的目的蛋白上的His标签为标志,经Western印迹进行鉴定。

1.4 His-Bind树脂纯化重组LC3蛋白

将含重组LC3的表达菌在2×YT培养液中扩大培养,经IPTG诱导后离心收集细菌,超声破碎后离心收集上清,经0.4 μm滤膜过滤后注入His-Bind树脂柱中;控制流速为8~10滴/分,收集滤过液;待样品流尽,依次加入20倍柱体积1×结合缓冲液

(0.5 mol/L NaCl, 2×10^{-2} mol/L Tris-HCl, 5×10^{-3} mol/L 咪唑, pH 7.9) 和 20 倍柱体积 $1 \times$ 洗涤缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, 2×10^{-2} mol/L Tris-HCl, 4×10^{-2} mol/L 咪唑, pH 7.9), 分别收集滤过液, 最后以相同流速用 6 倍柱体积 $1 \times$ 洗脱缓冲液 (0.5 mol/L NaCl, 2×10^{-2} mol/L Tris-HCl, 0.2/0.5 mol/L 咪唑, pH 7.9) 洗脱柱结合蛋白. 用 PBS 调整蛋白浓度为 300 ~ 500 μ g/ml 后, 12 000 r/min, 15 min, 4 离心, 收集上清至透析袋中, 于 100 倍上清体积的 PBS 中 4 透析 24 h, 用 PEG8000 浓缩后以 Bradford 法测定上清液蛋白浓度, -70 保存.

1.5 兔抗 LC3 抗血清制备

以 100 μ g/kg 的重组 LC3 加等量佐剂乳化后于 6 月龄正常家兔颈部皮内多点注射, 每间隔 2 周, 以相同剂量在颈部另一块皮内多点注射加强免疫 3 次; 末次免疫后 10 d, 兔耳缘静脉放血 2 ml, 分离血清, 琼脂糖双扩散法滴定效价; 无菌条件下, 耳缘静脉放血收集兔血液, 分离血清后分装, 于 -70 保存.

1.6 Western 印迹检测自噬

纯化后的 LC3 蛋白或饥饿处理后的 HeLa 细胞裂解蛋白经 15% SDS-PAGE 后, 转至硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上; 以抗-His 单克隆抗体或兔抗 LC3 抗血清

为第一抗体, 常规化学发光成像方法检测 LC3 蛋白的特异性及内源性表达.

2 结果

2.1 LC3 的基因扩增、克隆和序列测定

利用设计的特异性引物从模板 pEGFP-C1-LC3 中成功地扩增出约 400 bp 的单一一条带, 与预期的 PCR 产物长度相符. 经酶切连接转化后, 将扩增产物重组入原核表达质粒 pET28a(+), 经酶切鉴定和测序验证, 得到了含有大鼠 LC3 cDNA 序列的原核表达质粒 pET28a(+)-LC3.

2.2 重组蛋白 LC3 的表达、纯化和鉴定

质粒 pET28a(+)-LC3 被转化至 BL21 表达菌中, 在经过室温 IPTG 诱导蛋白表达后, 菌体蛋白经 SDS-PAGE 分离, 考马斯亮蓝 (R-250) 染色. 与不加 IPTG 诱导的对照组 (Fig. 1A 泳道 1 和 2) 相比, 诱导表达组在 20 kD 左右位置出现与理论预测相符的蛋白条带 (Fig. 1A 泳道 3 至 8), 不同 IPTG 诱导浓度 (6×10^{-5} mol/L、 1×10^{-4} mol/L、 2×10^{-4} mol/L), LC3 蛋白表达量没有明显区别 (Fig. 1A 泳道 3 至 5), 且重组蛋白以可溶性形式出现在菌体破碎后的离心上清中 (Fig. 1A 泳道 6 至 8), 为进一步纯化重组 LC3 提供了便利条件.

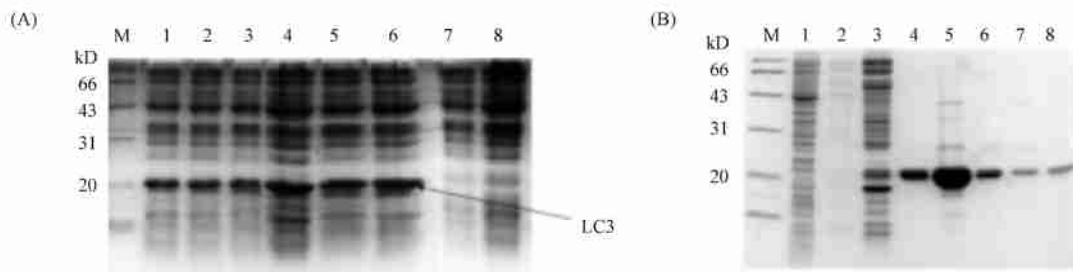


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant LC3 protein expressed and purified in *E. coli* BL21

(A) Total lysates (lanes 1 to 3), supernatant of the cell lysates (lanes 4 to 6) of host bacterial cells of BL21 harboring pET28a(+)-LC3 induced by IPTG at 6×10^{-5} , 1×10^{-4} and 2×10^{-4} mol/L respectively and total lysates of host bacterial cells of BL21 harboring pET28a(+)-LC3 before IPTG induction (lane 7) and without IPTG induction (lane 8) were run on 15% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue. M: low molecular weight protein marker.

(B) The flow-through (lane 1), binding buffer (lane 2), washing buffer (lane 3) and elution fractions (lanes 4 to 8) with different imidazole concentration (0.05 ~ 0.2 mol/L) were run on 15% SDS-PAGE and stained by Coomassie blue. M: low molecular weight protein marker

超声破碎大量扩增 pET28a(+)-LC3 转化后的 BL21 后的离心上清液过 His-bind 树脂柱, 分别收集各次的洗涤液和洗脱液, 进行 SDS-PAGE. 结果显示, 0.04 mol/L 咪唑的洗涤液可以将绝大部分杂蛋白洗去 (Fig. 1B 泳道 3); 0.05 mol/L 咪唑的洗脱液中, LC3 融合蛋白含量和纯度较高, 无明显可见杂蛋白; 0.08

mol/L 咪唑的洗脱液中可收集大量 LC3 蛋白, 其纯度经软件分析在 90% 以上, 0.1 mol/L 咪唑的洗脱液也有相当含量的 LC3 蛋白 (Fig. 1B 泳道 4 至 6). 将 0.05 ~ 0.1 mol/L 咪唑的洗脱液洗脱的蛋白收集, 透析和浓缩后通过 Bradford 法检测, 纯化的 LC3 蛋白浓度约为 1.5 mg/ml.

重组 LC3 蛋白带有 His 标签,因此,可以利用抗-His 抗体对其进行特异性鉴定. Western 印迹结果显示,抗体可有效结合带有 His 标签的重组蛋白 GST (阳性对照)和重组 LC3,但不结合 BSA (阴性对照) (Fig. 2),表明纯化所得的蛋白是 His-标签的 LC3 融合蛋白.

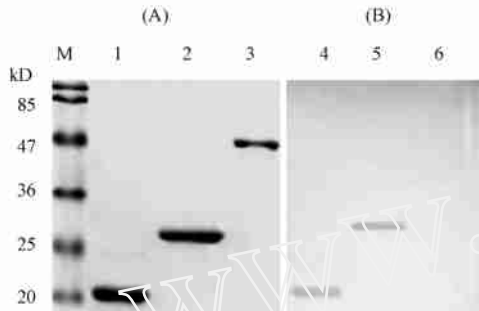


Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant LC3

(A) Recombinant LC3 with His-tag (lane 1), recombinant GFP with His-tag (lane 2) and BSA (lane 3) were run on 15% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue. M: Prestained molecular protein marker.

(B) Recombinant LC3 with His-tag (lane 4), recombinant GFP with His-tag (lane 5) and BSA (lane 6) were run on 15% SDS-PAGE and probed by anti-His monoclonal antibody (1:5000)

2.3 LC3 兔抗血清的制备和特异性鉴定

用重组 LC3 免疫家兔,琼脂糖双扩散法滴定效价高于 16 后,耳缘静脉放血并制备了抗血清. 通过 Western 印迹检测该血清可以识别带有 His 标签的 LC3,但不识别 BSA 和带有 His 标签的重组蛋白 GFP (结果未给出). 为进一步检测该抗血清的 LC3 识别特异性,通过 Western 印迹方法在经饥饿处理的 HeLa 细胞上对其进行了验证. 结果显示,我们制备的兔抗 LC3 抗血清同时可以识别 LC3^I 和 LC3^{II},且在 HeLa 细胞自噬模型中可清晰检测到随着饥饿时间的延长 LC3^I 向 LC3^{II} 的转化 (Fig. 3),表明该血清可以用于自噬的检测.

3 讨论

自噬是广泛存在于真核细胞中的生命现象,它对蛋白质和细胞器的降解作用对于维持细胞内环境的稳定、促进生物体正常发育及对某些环境的积极响应极为关键. 自噬在进化过程中高度保守,从酵母、果蝇到脊椎动物和人都可以找到参与自噬的同源基因. 目前至少已经鉴定出 27 种参与酵母自噬的特异性基因,另外还有 50 多种相关基因,现已被统一命名为自噬相关基因 Atg[1]. 随着研究的深入,许

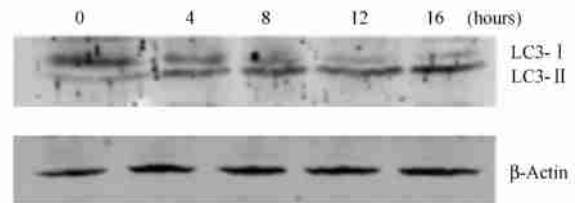


Fig. 3 Western blot analysis of LC3 expression in starved HeLa cells

Lysates of HeLa cells starved at different time points indicated in the figure were run on 15% SDS-PAGE, transferred onto the nitrocellulose membrane and probed with antiserum against LC3 (1:500). β -Actin probed on the same membrane served as the internal control

多酵母中自噬相关基因的同源物均已在哺乳动物中找到,并分离鉴定成功,这说明自噬发生的分子机制从酵母到哺乳动物十分相似. 哺乳动物自噬基因的命名与酵母相似,但也有个别差异,如酵母的 Atg8 在哺乳动物称为 LC3,酵母的 Atg6 在哺乳动物则称为 beclin 1. 哺乳动物细胞自噬的发生同 Atg12 结合和 LC3 修饰两条泛素样修饰过程密切相关,其中 Atg12 结合过程与前自噬泡 (preautophagosome) 的形成相关,而 LC3 修饰过程对自噬泡 (autophagosome) 的形成必不可少. Atg12 首先由 E1 样酶 Atg7 活化,之后转运至 E2 样酶 Atg10,最后与 Atg5 结合,形成自噬体前体 (autophagosomal precursor). LC3 前体 (PreLC3) 形成后,首先加工成胞浆可溶性形式 LC3^I,并暴露出其羧基末端的甘氨酸残基. 同样,LC3^I 也被 Atg7 活化,转运至第 2 种 E2 样酶 Atg3,并被修饰然后与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合成膜结合形式 LC3^{II}. LC3^{II} 定位于前自噬体和自噬体,使之成为自噬体的标志分子. 在自噬泡形成的早期阶段,由 Atg12-Atg5 形成的复合物即与其外膜结合,这种结合一方面促进了自噬泡的伸展扩张,使之由开始的小囊泡样、杯样结构逐渐发展为半环状、环状结构;另一方面,Atg5 复合物与自噬泡膜的结合还促进了 LC3 向自噬泡的募集. Atg5 复合物在膜上的定位决定膜的弯曲方向,膜向着背对 Atg5 复合物的方向延伸. 当双层膜结构的自噬泡即将形成环状闭合结构或刚刚闭合时,Atg5 复合物便从膜上脱离下来,只留下膜结合形式的 LC3^{II} 定位于自噬泡膜上. 因此,LC3^I 含量的多少与自噬泡数量的多少成正比. 当哺乳动物细胞发生自噬时,细胞内 LC3 的含量及 LC3^I 向 LC3^{II} 的转化均明显增加. 因此,通过检测细胞内 LC3^I 的含量变化,可以方便地判断细胞状态,判断自噬是被诱导还是被抑

制^[16-18]. 为此, 我们重组表达了与人高度同源的大鼠 LC3⁻, 以此为免疫原制备了 LC3 的抗血清. 用不含血清和氨基酸的 Earle's 平衡盐缓冲液取代正常的细胞培养基来培育 HeLa 细胞, 可以诱导 HeLa 细胞在饥饿状态时发生自噬, 这是研究自噬的常用体外模型^[19]. 我们的结果显示, 通过重组 LC3 制备的兔抗 LC3 抗血清, 同时可以识别 LC3⁻ 和 LC3⁺, 且在 HeLa 细胞自噬模型中可清晰检测到随着饥饿时间的延长 LC3⁻ 向 LC3⁺ 的转化 (Fig. 3), 表明该血清可以用于自噬的检测, 为进一步深入研究自噬的作用机制提供了有效的工具.

参考文献 (References)

- [1] Yorimitsu T, Klionsky D J. Autophagy: molecular machinery for self-eating [J]. *Cell Death Differ*, 2005, **12** Suppl 2: 1542-1552
- [2] Deretic V. Autophagy in innate and adaptive immunity[J]. *Trends Immunol*, 2005, **26**(10): 523-528
- [3] Crotzer V L, Blum J S. Autophagy and intracellular surveillance: Modulating MHC class II antigen presentation with stress [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(22): 7779-7780
- [4] Tsujimoto Y, Shimizu S. Another way to die: autophagic programmed cell death [J]. *Cell Death Differ*, 2005, **12** Suppl 2: 1528-1534
- [5] Yu L, Alva A, Su H, *et al.* Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 [J]. *Science*, 2004, **304**(5676): 1500-1502
- [6] Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, *et al.* Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes [J]. *Nat Cell Biol*, 2004, **6**(12): 1221-1228
- [7] Lum J J, Bauer DE, Kong M, *et al.* Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis [J]. *Cell*, 2005, **120**(2): 237-248
- [8] Boya P, Gonzalez-Polo R A, Casares N, *et al.* Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, **25**(3): 1025-1040
- [9] Shintani T, Klionsky D J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. *Science*, 2004, **306**(5689): 990-995
- [10] Cuervo A M. Autophagy: many paths to the same end [J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, **263**(1-2): 55-72
- [11] Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, *et al.* Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus* [J]. *Science*, 2004, **306**(5698): 1037-1040
- [12] Gutierrez M G, Master S S, Singh S B, *et al.* Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages [J]. *Cell*, 2004, **119**(6): 753-766
- [13] Paludan C, Schmid D, Landthaler M, *et al.* Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy [J]. *Science*, 2005, **307**(5709): 593-596
- [14] Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Inter J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**(12): 2491-2502
- [15] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, *et al.* Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells [J]. *J Cell Biol*, 2001, **152**(4): 657-667
- [16] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing [J]. *EMBO J*, 2000, **19**(21): 5720-5728
- [17] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, **36**(12): 2503-2518
- [18] Yoshimori T. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **313**(2): 453-458
- [19] 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