

DOI:10.13350/j.cjpb.230708

• 论著 •

白纹伊蚊自噬基因 ATG8 蛋白多克隆抗体的制备及应用*

何珊^{1,2}, 肖秋秋^{2,3}, 石梦婷⁴, 李威仪^{1,2}, 彭哲慧^{2,3}, 程金芝^{2,3}, 吴家红^{2,3**}

(1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州贵阳 550025;

2. 贵州医科大学基础医学院现代病原生物学特色重点实验室; 3. 贵州医科大学基础医学院人体寄生虫学教研室;

4. 安顺市人民医院检验科)

【摘要】 目的 通过原核表达系统制备白纹伊蚊(*Aedes albopictus*, Aa) ATG8, 免疫 BALB/c 小鼠获得多克隆抗体, 并验证抗体的实用性。方法 从白纹伊蚊 Aa23 细胞中提取 cDNA, 通过 PCR 扩增 AaATG8 基因片段, 然后与载体 pET30a 连接, 构建原核表达载体 pET30a-AaATG8 并转化至大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取单克隆进行 PCR 鉴定, 提取质粒进行测序鉴定。再将重组质粒转化到大肠埃希菌 BL21 感受态细胞, 用异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导表达重组蛋白 rAa-ATG8, 纯化透析后免疫 Balb/c 小鼠, 制备多克隆抗体, 采用 ELISA 检测抗体效价, 并以该抗体为一抗采用 Western blot 检测不同物种 ATG8 蛋白的表达。结果 成功构建原核表达载体 PET30a-AaATG8 并在大肠埃希菌中诱导表达目的蛋白。重组蛋白纯化后免疫 BALB/c 小鼠, ELISA 检测其血清抗体效价为 1 : 640 000; Western blot 显示 rAa-ATG8 多克隆抗体可用于检测埃及伊蚊、中华按蚊、骚扰阿蚊、三带喙库蚊、家蝇 ATG8 蛋白, 反应条带位于 18, 16 或 14 ku 处。结论 成功获得高效价的 rAa-ATG8 多克隆抗体, 该抗体不仅可用于检测白纹伊蚊 ATG8 蛋白, 还可用于检测埃及伊蚊、中华按蚊、骚扰阿蚊、三带喙库蚊、家蝇 ATG8 蛋白, 为研究自噬在蚊虫以及其他物种中的作用奠定了基础。

【关键词】 白纹伊蚊; 自噬相关蛋白 8/ATG8; 原核表达; 抗体制备

【中图分类号】 R384.1

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)07-0787-06

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Jul;18(7):787-792.]

Preparation and application of polyclonal antibody against autophagy gene ATG8 in *Aedes albopictus*

HE Shan^{1,2}, XIAO Qiuqiu^{2,3}, SHI Mengting⁴, LI Weiyi^{1,2}, PENG Zhehui^{2,3}, CHENG Jinzhi^{2,3}, WU Jiahong^{2,3} (1. School of Public Health, the key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Gui zhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025 China; 2. Key Laboratory of Modern Pathogen Biology and Characteristics, Basic Medical College, Guizhou Medical University; 3. Department of Human Parasitology, Basic Medical College, Guizhou Medical University; 4. Department of Clinical Laboratory, the People's Hospital of Anshun) ***

【Abstract】 **Objective** ATG8 of *Aedes albopictus* (Aa) was prepared by prokaryotic expression system, and the polyclonal antibody was obtained by immunizing BALB/c mice, which verified the practicality of the antibody. **Methods** The cDNA was extracted from *A. albopictus* Aa23 cells, the AaATG8 gene fragment was amplified by PCR, and then connected with the vector pET30a to construct the prokaryotic expression vector pET30a-AaATG8, which was transformed into *Escherichia coli* DH5 α competent cells. single clones were picked for PCR identification, and the plasmids were extracted for sequencing identification. Then the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 receptive cells, and the recombinant protein rAa-ATG8 was induced by isopropyl thiogalactoside (IPTG). After purification and dialysis, Balb/c mice were immunized to prepare polyclonal antibody, The expression of ATG8 protein in different species was detected by Western blot using this antibody as primary antibody. **Results** The prokaryotic expression vector PET30a-AaATG8 was successfully constructed and the target protein was induced to express in *Escherichia coli*. BALB/c mice were immunized with purified recombinant protein, and the serum antibody titer was 1 : 640 000 by ELISA. Western blot showed that the rAa-ATG8 polyclonal antibody could be used to detect the ATG8 protein of *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, *Armigeres subalbatus*, *Culex tritaeniorhynchus* and *Musca domestica*. The reaction bands were located at 18, 16 or 14 ku. **Conclusion** Successfully obtained a high-titer AaATG8 polyclonal antibody, which can be used to detect not only *Aedes albopictus*, but also the expression of ATG8 protein in *Aedes aegypti*, *Anopheles sinensis*, *Armigeres*

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81760374)。

** **【通讯作者】** 吴家红, E-mail: jiahong@gmc.edu.cn

【作者简介】 何珊(1998-), 女, 贵州遵义人, 在读硕士, 检验师, 主要从事虫媒病与媒介生物防控。E-mail: 1759645947@qq.com

subalbatus, *Culex tritaeniorhynchus* and *Musca domestica*, laying a foundation for studying the role of autophagy in mosquitoes and other species.

【Key words】 *Aedes albopictus*; autophagy related protein 8/ATG8; prokaryotic expression; Antibody preparation

自噬是真核生物中保守的细胞分解代谢过程。真核细胞利用巨自噬/自噬来促进溶酶体(动物)或液泡(酵母和植物)中不需要的细胞质内容物、异常蛋白质聚集体或功能失调的细胞器进行降解和回收^[1]。在黑腹果蝇,自噬对其中肠程序性细胞死亡以及早期卵子形成过程中的细胞死亡至关重要^[2-3]。在家蚕自幼虫到蛹的变态发育过程中,自噬对丝腺的分化和退化起着非常重要的作用^[4-5]。自噬的发生依赖于多种自噬相关(Autophagy-related ATG)基因的参与^[6]。在众多的 ATG 基因表达蛋白中,ATG8 至关重要,该蛋白参与自噬小体的形成、延伸和融合,在哺乳动物中也称为微管相关蛋白 1 轻链 3(MAP1LC3/LC3)^[7-9]。自噬激活后,ATG8 以共价方式修饰自噬泡和自噬体的内外膜并与磷脂酰乙醇胺(PE)结合^[10]。随后,脂化的 ATG8 蛋白进一步募集大量受体和接头蛋白来调节自噬小体的起始、扩张和成熟,并最终调节自噬体与溶酶体的融合^[11-14]。因此,ATG8 被广泛用作自噬研究中监测自噬小体和自噬活性的标志物^[15]。

蚊媒病毒引起的蚊媒传染病可对人类和社会造成严重危害,据统计,由白纹伊蚊和埃及伊蚊传播的 DENV 每年导致全球 3.9 亿人感染,其中 9 600 万人表现出明显的临床症状^[16]。然而,到目前为止由蚊虫传播病毒所引起的疾病尚无有效的疫苗或治疗方法。据报道,程序性自噬是维持埃及伊蚊卵发育周期所必需的^[17]。并且,DENV 感染后显著上调埃及伊蚊体内 ATG 蛋白的表达^[18],表明病毒感染中存在自噬。白纹伊蚊作为传播多种虫媒病毒的媒介,现已发现其有 13 种 ATG 基因;其中,ATG8 在白纹伊蚊的不同组织以及整个发育阶段皆有表达^[15,19,20],说明自噬对白纹伊蚊的生长发育至关重要。然而,目前对于自噬在白纹伊蚊其它方面的研究知之甚少。本实验通过原核表达系统构建 pET30-AaATG8,制备 AaATG8 多克隆抗体,为进一步研究自噬 ATG8 蛋白在白纹伊蚊中的作用奠定基础。

材料和方法

1 材料

1.1 实验动物和蚊虫 实验用 WB 株埃及伊蚊由广州威佰昆生物科技有限公司提供。安顺株白纹伊蚊幼虫及成蚊均在本实验室常规饲养。饲养温度(25±1)℃,湿度(75±5)%,光照周期(L:D)=14 h:10 h。幼蚊喂食专用幼蚊饲料(购于广州威佰昆生物科技有

限公司)。成蚊按实验要求给予相应饮食。三带喙库蚊、骚扰阿蚊以及中华按蚊均为本地株。BALB/c 小鼠购自贵州医科大学实验动物中心(动物许可证号为 2019-0008)。

1.2 质粒和菌株 大肠埃希菌 DH5α 和 BL21 感受态细胞以及原核表达载体 pET30a,均为本实验室保存。

1.3 主要试剂和仪器 总 RNA 提取 Trizol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒 Prime-Script™ RT Kit,DNA Marker,EcoRI 和 Hind III 限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司;弗氏佐剂购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒购自北京天根生化科技中心;TMB 显色液 ELISA 终止液购自中国 Solarbio 公司;PageRuler Prestained Protein Ladder 购自美国 Thermo 公司;鼠抗多组氨酸标签(His-tag)抗体购自美国 Cell 公司;辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)标记山羊抗鼠 IgG 抗体(HRP-IgG)购自上海 Abmart 医药科技有限公司,

2 方法

2.1 AaATG8 与其他物种同源蛋白的氨基酸序列比对 从 NCBI 官网 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 下载白纹伊蚊和其他物种的 ATG8 氨基酸序列(表 1),通过 esript3.0(<https://esript.ibcp.fr/ESPript/cgi-bin/ESPript.cgi>)进行比对分析。

表 1 多个物种 ATG8 氨基酸序列信息
Table 1 Amino acid sequence information of several species ATG8

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession No.	序列长度(bp) Sequence length
白纹伊蚊	MH243747.1	118
埃及伊蚊	XP_001652571.1	118
致倦库蚊	EDS36925.1	118
淡色库蚊	QHW11793.1	118
中华按蚊	ASIC020999 *	122
斯氏按蚊	XP_035896098.1	128
黑腹果蝇	NP_727447.1	121
家蝇	MDOA007273 *	119
家蚕	NP_001040244.1	117
人类	NP_009209.1	117
酿酒酵母	NP_009475.1	117

注: * 该序列来源于 vector base.

2.2 AaATG8 基因引物的设计和 PCR 扩增 根据 AaATG8 基因编码区序列设计带有酶切位点 EcoRI 和 Hind III 的引物。上游引物 ATG8-F: 5'-AC-GAAGCTTATGAAATTTCAATACAAGGAAG-3'

(下划线部分为 Hind III 酶切位点);下游引物 ATG8-R: 5'-ACG GAATTC CTTGTTTCCATACACAT-TCTCATCG-3'(下划线部分为 EcoR I 酶切位点)。利用 Trizol 法提取白纹伊蚊 Aa23 细胞总 RNA,再反转录合成 cDNA,PCR 扩增 AaATG8 基因。PCR 反应体系:rTaq 聚合酶 25 μ L,cDNA 4 μ L,上、下游引物各 1 μ L,ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,52.3 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。取 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳分析。

2.3 AaATG8 基因克隆及原核表达载体的构建 利用 EcoR I、HindIII 分别对 AaATG8 基因片段与载体 pET30a 进行双酶切,酶切目的片段于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接体系:载体 pET30a 2 μ L,T4 连接酶 1 μ L,T4 buffer 1 μ L,酶切 AaATG8 基因片段 2 μ L,ddH₂O 4 μ L。将连接产物 pET30-AaATG8 转化到大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞中进行培养,挑单克隆进行 PCR 鉴定。取阳性克隆接种至含终浓度为 50 μ g/mL 卡那霉素的 5 mL LB 培养基中,置 37 $^{\circ}$ C 摇床(250 r/min)培养 16 h,提取质粒,委托生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果与原序列比对无突变,重组质粒构建正确,命名为 pET30-AaATG8。

2.4 rAa-ATG8 蛋白的表达、纯化与鉴定 将重组质粒 pET30a-AaATG8 转化到大肠埃希菌 BL21 感受态细胞中进行培养。挑取阳性克隆接种至含有卡那霉素(终浓度为 50 μ g/mL)的 LB 培养基中,置 37 $^{\circ}$ C 摇床(250 r/min)培养至 A₆₀₀ 值为 0.6~0.8 时取 5 mL 菌液作为未诱对照,剩余菌液加入 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L)于 28 $^{\circ}$ C、250 r/min 诱导 12 h。诱导结束后取 2 mL 菌液,采用 SDS-PAGE 检测表达蛋白。剩余菌液离心,收集沉淀,用 PBS 重悬菌体后超声破碎(功率:200 V;时间:15 min;次数:开 5 s,关 5 s),收集上清进行 SDS-PAGE 分析。菌体沉淀用适量 PBS 重悬,SDA-PAGE 电泳后进行纯化。纯化过程:菌体沉淀用 1 \times IB wash buffer 重悬(根据沉淀的量加入适量 wash buffer),加溶菌酶至终浓度为 100 μ g/mL,于 30 $^{\circ}$ C 消化 30 min,冰水浴超声破碎 15 min;加蛋白酶抑制剂 PMSF(100 ng/mL),再次冰水浴超声破碎后离心,弃上清;收集包涵体,用 1 \times IB wash buffer 重悬后冰水浴超声破碎,离心,弃上清,倒扣吸干残液;加入 10 \times IB wash solubilization buffer 3.5 mL,3%十二烷基肌胺醇钠 3.5 mL,1 mol/L DTT 35 μ L,H₂O 28 mL,置室温水平摇床 15 min 后离心,取上清,于 1 \times Dialysis buffer +0.1m DTT 混合液中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,1 \times Dialysis buffer 透析 8 h,蔗糖透析 1 h 30 min,得到纯化的 rAa-ATG8 蛋白。纯化的 rAa-ATG8 蛋白

经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min;加入鼠抗 His-tag 抗体(1:4000),孵育后洗涤;加入羊抗鼠 HRP-IgG 抗体(1:4000),孵育后用 TBST 洗涤,经增强型化学发光试剂显色后观察结果。

2.5 AaATG8 多克隆抗体的制备、效价检测与鉴定

取纯化的 rAa-ATG8 蛋白经皮下注射免疫 BALB/c 小鼠,50 μ g/只。首次免疫将等量蛋白与弗氏完全佐剂混合,间隔 10 d 进行二次免疫,二次免疫采用弗氏不完全佐剂,16 d 后取血,分离血清,采用 ELISA 检测抗体效价。rAa-ATG8 蛋白包被浓度为 2 μ g/mL,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,5%脱脂奶粉封闭 2 h。多抗血清作倍比稀释,HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 稀释度为 1:4 000。加入显色液显色后终止反应,于酶标仪上读取 450 nm 处的吸光度 A 值,计算抗体效价。

另以纯化的 rAa-ATG8 蛋白为抗原对抗 AaATG8 多克隆抗体进行 Western blot 鉴定,多克隆抗体稀释度为 1:640 000。

2.6 抗 AaATG8 多克隆抗体 Western blot 检测多物种 ATG8 蛋白的表达

挑选 10 只不同种类雌蚊及 1 只家蝇,分别置于 1.5 mL 离心管中,加入蛋白裂解液(300 μ L RIPA 组织裂解液+3 μ L PMSF),电动匀浆器充分研磨,冰水浴超声破碎 10 min,4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 10 min,取上清;加入 5 \times loading buffer,混匀后置 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min,离心,取上清,采用 Western blot 检测 ATG8 蛋白的表达。

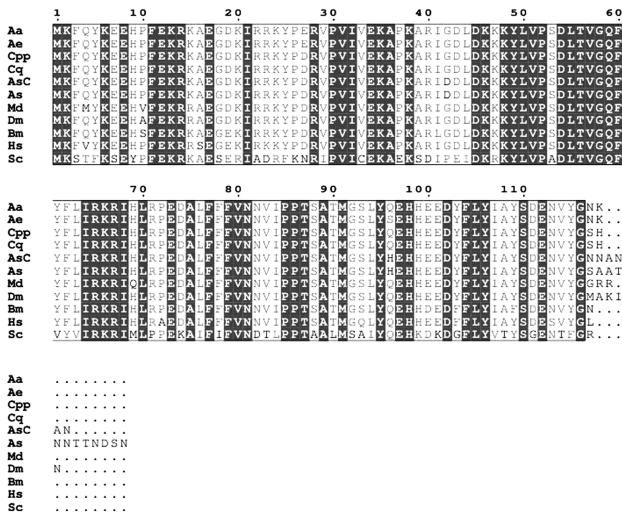
结 果

1 ATG8 氨基酸序列分析

序列比对显示,AaATG8 氨基酸序列同埃及伊蚊、致倦库蚊、淡色库蚊、中华按蚊、黑腹果蝇、斯氏按蚊、家蝇、家蚕、人类、酿酒酵母 ATG8 氨基酸序列相似性分别为 99.15%、98.29%、98.29%、97.44%、97.41%、96.58%、94.07%、94.02%、91.38% 和 57.76%(图 1)。

2 AaATG8 基因的扩增及重组质粒 pET30a-AaATG8 的构建与鉴定

以白纹伊蚊总 RNA 反转录后的 cDNA 为模板 PCR 扩增 AaATG8 基因,扩增片段为 357 bp,大小与预期相符(图 2A),目的基因扩增成功。使用限制性内切酶 EcoRI 和 Hind III 将载体 pET30a 和扩增的目的基因片段进行双酶切,酶切目的片段于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转化到 DH5 α 感受态细胞中进行培养,挑单克隆进行 PCR 鉴定,目的片段大小与预期相符(图 2B)。提质粒后测序,测序结果与 NCBI 数据库中的 AaATG8 氨基酸序列比对,相似性为 100%。

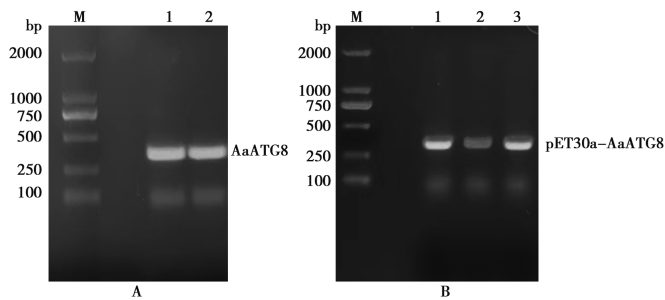


Aa 白纹伊蚊 Ae 埃及伊蚊 Cpp 淡色库蚊 Cq 致倦库蚊
AsC 中华按蚊 As 斯氏按蚊 Md 家蝇 Dm 黑腹果蝇 Bm 家蚕
Hs 人类 Sc 酿酒酵母

图 1 多个物种 ATG8 氨基酸序列比对

Aa *Ae. albopictus*; Ae *Ae. aegypti*; Cpp *Cx. pipiens pallens*; Cq *Cx. quinquefasciatus*; AsC *An. sinensis*; As *Anopheles stephensi*; Md *Mu. domestica aabys*; Dm *Dr. melanogaster*; Bm *Bo. mori*; Hs *Homo sapiens*; Sc *Sa. Cerevisiae*.

Fig. 1 Amino acid sequences alignment of ATG8 in multiple species



A AaATG8 基因 PCR 扩增 M DNA 标志物(DL2000) 1,2 AaATG8 基因 PCR 产物 B 重组质粒 pET30-AaATG8 PCR 扩增 M DNA 标志物(DL2000) 1~3 pET30-AaATG8 PCR 产物

图 2 目的基因和重组质粒的 PCR 鉴定

A The PCR product of AaATG8 gene M DL2000 DNA marker 1,2 Gene AaATG8 B The PCR product of recombinant plasmid pET30-AaATG8 M DL2000 DNA marker 1-3 pET30-AaATG8

Fig. 2 The PCR identification of target gene and recombinant plasmid

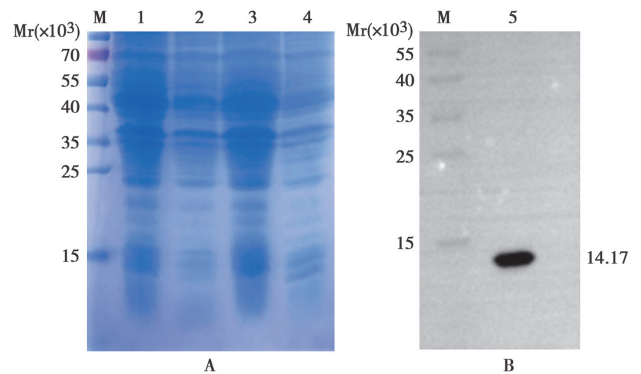
3 rAa-ATG8 蛋白的原核表达及纯化

将重组质粒 pET30-AaATG8 转化入大肠埃希菌 BL21 感受态细胞中。挑取阳性克隆接种于含有卡那霉素(终浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 培养基中诱导表达、纯化后进行 SDA-PAG 分析, rAa-ATG8 蛋白主要以包涵体的形式存在(图 3A); Western blot 检测显示, 纯化的 rAa-ATG8 蛋白能被鼠抗 His-tag 抗体识别(图 3B), 即具有反应原性。

4 rAa-ATG8 多克隆抗体的制备、效价检测及特异性鉴定

用纯化的重组蛋白通过皮下注射的方法免疫

BALB/c 小鼠, 二次免疫 16 d 后采用 ELISA 法检测血清抗体效价为 1 : 640 000(图 4A)。Western blot 检测显示免疫鼠血清能识别重组蛋白 rAa-ATG8(图 4B)。

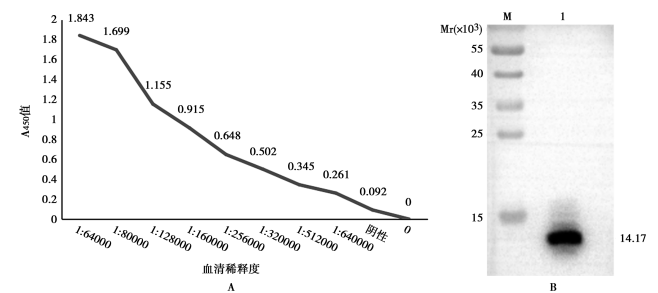


M 蛋白分子质量标准 1 重组菌 IPTG 诱导后全蛋白 2 未诱导重组菌全蛋白 3 IPTG 诱导重组菌超声破碎沉淀 4 IPTG 诱导重组菌超声破碎上清 5 纯化 rAa-ATG8 蛋白与鼠抗 His-tag 抗体反应条带

图 3 重组蛋白 rAa-ATG8 SDS-PAGE(A) 和 Western blot(B) 分析

M Protein marker 1 IPTG induced protein 2 Uninduced protein 3 Sediments of lysate induced 4 Supernatants of lysate induced 5 Purified rAa-ATG8

Fig. 3 Identification of recombinant protein rAa-ATG8 by SDS-PAGE(A) and Western blot(B)



A ELISA 检测 AaATG8 血清抗体效价 B 多克隆抗体活性 Western blot 验证 M 蛋白分子质量标准 1 抗 AaATG8 多克隆抗体与纯化 rAa-ATG8 蛋白反应条带

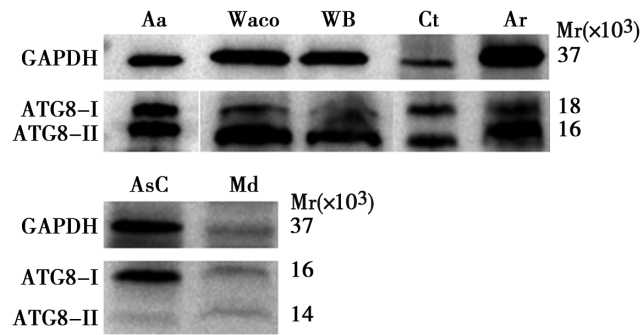
图 4 抗 AaATG8 多克隆抗体的 ELISA 和 Western blot 检测

A ELISA results of AaATG8 polyclonal antibodies B Verification of polyclonal antibody titer by Western blot M Protein marker 1 Purified rAa-ATG8 protein.

Fig. 4 The titer of polyclonal antibody was determined by ELISA and Western blot

5 抗 rAa-ATG8 多克隆抗体 Western blot 检测多物种 ATG8 蛋白的表达

以抗 rAa-ATG8 多克隆抗体为一抗采用 Western blot 检测不同物种 ATG8 蛋白的表达, 结果如图 5。其中白纹伊蚊、埃及伊蚊、三带喙库蚊、骚扰阿蚊的 ATG8-I 及 ATG8-II 蛋白反应条带位于 18 ku 和 16 ku 处, 中华按蚊和家蝇的 ATG8-I 以及 ATG8-II 蛋白反应条带位于 16 ku 和 14 ku 处。表明该多抗可用于上述物种 ATG8 蛋白的检测。



Aa 白纹伊蚊 Waco/WB 埃及伊蚊 Ct 三带喙库蚊 Ar 骚扰伊蚊 AsC 中华按蚊 Md 家蝇

图5 抗 rAa-ATG8 多克隆抗体 Western blot 检测多物种 ATG8 蛋白的表达

Aa *Ae. albopictus* Waco/WB *Ae. aegypti* Ct *Cu. tritaeniorhynchus* Ar *Ar. subalbatus* AsC *An. sinensis* Md *Mu. domestica*

Fig. 5 Expression of ATG8 proteins in different species

讨论

自噬作为一种高度保守的细胞过程,可用于去除多余的蛋白质和受损的细胞器,在维持细胞稳态和响应营养条件变化的过程中发挥重要作用^[21],还可作为一种细胞防御机制来对抗病原菌、寄生虫和病毒^[22-23]。自噬的一个决定性特征是 ATG8 的脂化,ATG8 是一个泛素样蛋白家族,包括哺乳动物 LC3A/B/B2/C 和 GABARAP/L1/L2^[24-25]。新生的 ATG8 首先被半胱氨酸蛋白酶-ATG4 触发,以暴露其 C 末端保守的芳香族甘氨酸基序^[26]。然后,由 ATG7、ATG3 和 ATG16L1/12/5 组成的泛素样结合系统,通过其头部基团的酰胺键驱动该甘氨酸与脂质磷脂酰乙醇胺(PE)的共价连接^[27-29]。经过这种独特的翻译修饰后把 ATG8 招募到自噬体膜上^[24-30]。自噬激活后,ATG8 Western blot 的定位从非脂化 ATG8-I 转移到脂化 ATG8-II^[31-32]。有研究发现自噬参与调控白纹伊蚊传播病毒的复制^[33],但由于缺乏特异性良好的 AaATG8 商品化抗体,导致对其功能研究进展相对缓慢。本研究通过原核表达系统成功构建原核表达载体 pET30-AaATG8,并在大肠埃希菌 BL21 感受态细胞中成功诱导表达 rAa-ATG8,SDS-PAGE 显示该蛋白主要以包涵体的形式存在。鉴于包涵体的不溶性,选择通过反复超声破碎以去除杂质,再溶解包涵体的方法进行纯化透析。该方法操作简单,获得的蛋白纯度高。用纯化的 rAa-ATG8 免疫 BALB/c 小鼠,制备的多克隆抗体血清 ELISA 效价高达 1 : 640 000。Western blot 检测显示该多克隆抗体可识别白纹伊蚊的 ATG8 蛋白。

对多个物种 ATG8 的氨基酸序列进行比对分析,结果显示白纹伊蚊 ATG8 氨基酸序列同埃及伊蚊、致倦库蚊、淡色库蚊、斯氏按蚊、中华按蚊、黑腹果蝇、家

蝇、家蚕的相似性均在 94% 以上,因此推测它们存在共同抗原。以制备的抗 rAa-ATG8 多克隆抗体为一抗进行 Western blot,结果显示该多克隆抗体可识别埃及伊蚊、中华按蚊、家蝇体内的 ATG8-I 和 ATG8-II。依据检测结果确定伊蚊属的 ATG8-I 以及 ATG8-II 蛋白相对分子质量分别为 18×10^3 和 16×10^3 ,而中华按蚊和家蝇的 ATG8-I 以及 ATG8-II 蛋白相对分子质量分别为 16×10^3 和 14×10^3 。文献报道埃及伊蚊^[34]、大鼠^[9]等的 ATG8-I 以及 ATG8-II 蛋白相对分子质量分别为 18×10^3 和 16×10^3 ,家蚕的 ATG8-I 以及 ATG8-II 分别为 14×10^3 和 12×10^3 ^[35]。Wang 等^[19]报道白纹伊蚊 ATG8-I 以及 ATG8-II 的相对分子质量分别为 16×10^3 和 14×10^3 。因此推测 ATG8 蛋白的大小存在物种差异,也可能与使用的 SDS-PAGE 分离胶浓度大小有关,以及所使用的一抗有关。本研究制备的抗 rAa-ATG8 多克隆抗体不仅识别白纹伊蚊 ATG8 蛋白,还可识别伊蚊属、库蚊属、按蚊属蚊虫的 ATG8 蛋白以及家蝇的 ATG8 蛋白,说明该抗血清作为检测抗体使用范围较广泛。

本研究成功构建了原核表达载体 pET30-AaATG8,表达的 rAa-ATG8 具有抗原性,并制备了高效价的抗 rAa-ATG8 多克隆抗体血清。该抗血清不仅可用于检测白纹伊蚊的 ATG8 蛋白,还可用于检测家蝇和其它蚊虫的 ATG8 蛋白,为探究自噬在蚊虫以及其他物种中的作用奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Feng Y, He D, Yao Z, et al. The machinery of macroautophagy [J]. Cell Res, 2014, 24(1): 24-41.
- [2] Nezis IP, Lamark T, Velentzas AD, et al. Cell death during *Drosophila melanogaster* early oogenesis is mediated through autophagy [J]. Autophagy, 2009, 5(3): 298-302.
- [3] Denton D, Shrivage B, Simin R, et al. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila* [J]. Curr Biol, 2009, 19(20): 1741-1746.
- [4] Zhang X, Hu ZY, Li WF, et al. Systematic cloning and analysis of autophagy-related genes from the silkworm *Bombyx mori* [J]. BMC Mol Biol, 2009, 10: 50.
- [5] Nguyen HM, El Hajj H, El Hajj R, et al. Toxoplasma gondii autophagy-related protein ATG9 is crucial for the survival of parasites in their host [J]. Cell Microbiol, 2017, 19(6): e12712.
- [6] Li F, Vierstra RD. Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling [J]. Trends Plant Sci, 2012, 17(9): 526-537.
- [7] Nakatogawa H, Ichimura Y, Ohsumi Y. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion [J]. Cell, 2007, 130(1): 165-178.
- [8] Xie Z, Nair U, Klionsky DJ. Atg8 Controls phagophore expansion during autophagosome formation [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(8): 3290-3298.
- [9] Kabeya YMN, Uero T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.

- [J]. Embo J, 2000, 19(21):5720-5728.
- [10] Yu ZQ, Ni T, Hong B, et al. Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy[J]. Autophagy, 2012, 8(6):883-892.
- [11] Birgisdottir AB, Lamark T, Johansen T. The LIR motif - crucial for selective autophagy[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 15):3237-3247.
- [12] Kriegenburg F, Ungermann C, Reggiori F. Coordination of autophagosome-lysosome fusion by Atg8 family members[J]. Curr Biol, 2018, 28(8):R512-R8.
- [13] Alemu EA, Lamark T, Torgersen KM, et al. ATG8 family proteins act as scaffolds for assembly of the ULK complex; sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs[J]. J Biol Chem, 2012, 287(47):39275-39290.
- [14] Birgisdottir AB, Moulleron S, Bhujabal Z, et al. Members of the autophagy class III phosphatidylinositol 3-kinase complex I interact with GABARAP and GABARAPL1 via LIR motifs[J]. Autophagy, 2019, 15(8):1333-1355.
- [15] Qiao J, Zhang D, Wang Y, et al. Identification of AaAtg8 as a marker of autophagy and a functional autophagy-related protein in *Aedes albopictus*[J]. PeerJ, 2018(6):e5988.
- [16] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue[J]. Nature, 2013, 496(7446):504-507.
- [17] Bryant B, Raikhel AS. Programmed autophagy in the fat body of *Aedes aegypti* is required to maintain egg maturation cycles[J]. PLoS One, 2011, 6(11):e25502.
- [18] Chen TY, Smartt CT. Activation of the autophagy pathway decreases dengue virus infection in *Aedes aegypti* cells[J]. Parasit Vectors, 2021, 14(1):551.
- [19] Wang Y, Qiao J, Zhang D, et al. Systematic identification of autophagy-related proteins in *Aedes albopictus*[J]. PLoS One, 2021, 16(1):e0245694.
- [20] Kim CE, Park KB, Ko HJ, et al. *Aedes albopictus* autophagy-related gene 8 (AaAtg8) is required to confer anti-bacterial gut immunity[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(8):2944.
- [21] Mizushima N. Autophagy: process and function[J]. Genes Dev, 2007, 21(22):2861-2873.
- [22] Kudchodkar S B, Levine B. Viruses and autophagy[J]. Rev Med Virol, 2009, 19(6):359-378.
- [23] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation[J]. Nature, 2011, 469(7330):323-335.
- [24] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy: ATG8 family proteins, LIR motifs and cargo receptors[J]. J Mol Biol, 2020, 432(1):80-103.
- [25] Mizushima N. The ATG conjugation systems in autophagy[J]. Curr Opin Cell Biol, 2020, 63:1-10.
- [26] Tanida I, Ueno T, Kominami E. Human light chain 3/ MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(46):47704-47710.
- [27] Ichimura YKT, Takao T, Satomi Y, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation[J]. Nature, 2000, 408(6811):488-492.
- [28] Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, et al. The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway[J]. J Cell Biol, 2000, 151(2):263-276.
- [29] Durgan J, Lystad AH, Sloan K, et al. Non-canonical autophagy drives alternative ATG8 conjugation to phosphatidylserine[J]. Molecular Cell, 2021, 81(9):2031-2040. e8.
- [30] Nguyen TN, Padman BS, Usher J, et al. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation[J]. J Cell Biol, 2016, 215(6):857-874.
- [31] Klionsky DJ, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)[J]. Autophagy, 2016, 12(1):1-222.
- [32] Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting[J]. Autophagy, 2007, 3(6):542-545.
- [33] Qiao J, Liu, QZ. Interplay between autophagy and Sindbis virus in cells derived from key arbovirus vectors: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* mosquitoes. [J]. Cellular Signalling, 2021(90):110204.
- [34] Brackney DE, Correa MA, Cozens DW. The impact of autophagy on arbovirus infection of mosquito cells[J]. PLoS Negl Trop Dis, 2020, 14(5):e0007754.
- [35] Franzetti E, Huang ZJ, Shi YX, et al. Autophagy precedes apoptosis during the remodeling of silkworm larval midgut[J]. Apoptosis, 2012, 17(3):305-324.

【收稿日期】 2023-01-11 【修回日期】 2023-04-01

~~~~~  
(上接 786 页)

- [10] Singh A, Varela C, Bhatt K, et al. Identification of a desaturase involved in mycolic acid biosynthesis in *Mycobacterium smegmatis*[J]. PLoS One, 2016, 11(10):e0164253.
- [11] 梁浩伟, 秦余, 廖海, 等. 新型冠状病毒 ORF7a 结构分析及虚拟药物筛选[J]. 中国药物化学杂志, 2022, 32(4):278-283.
- [12] 杨雨昕, 付玉荣, 伊正君. 结核分枝杆菌 PPE32 蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(2):131-136.
- [13] Jackson M, Portno D, Catheline D, et al. Mycobacterium tuberculosis Des protein: an immunodominant target for the humoral response of tuberculous patients[J]. Infect Immun. 1997, 65(7):2883-2889.
- [14] Potocnakova L, Bhide M, Pulzova LB. An introduction to B-cell epitope mapping and in silico epitope prediction[J]. J Immunol Res, 2016, 2016:6760830.
- [15] Sanchez-Trincado JL, Gomez-Perosanz M, Reche PA. Fundamentals and methods for T- and B-cell epitope prediction[J]. J Immunol Res, 2017, 2017:2680160.
- [16] Salina EG, Grigorov AS, Bychenko OS, et al. Resuscitation of dormant "Non-culturable" *Mycobacterium tuberculosis* is characterized by immediate transcriptional burst[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9:272.
- [17] Cooper C, Peterson EJR, Bailo R, et al. MadR mediates acyl CoA-dependent regulation of mycolic acid desaturation in mycobacteria[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2022, 119(8):e2111059119.
- [18] 陈瑞枫, 马枫茜, 李祥芳, 等. 鸟分枝杆菌 MAV\_2043 基因编码蛋白的生物信息学分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(08):907-911.

【收稿日期】 2023-02-26 【修回日期】 2023-05-15