

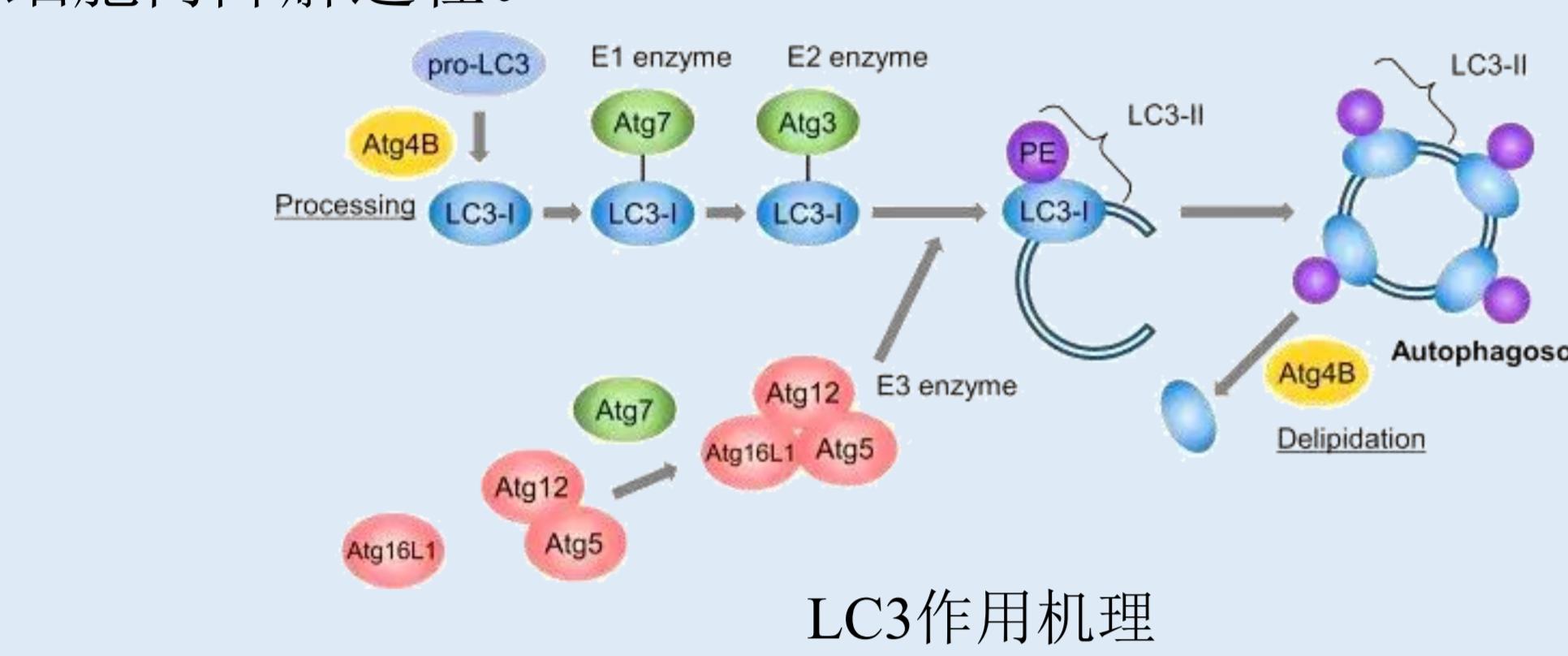
荧光一抗定量免疫印迹检测自噬通量

Development of Fluorescent Primary Antibodies to Quantify Autophagic Flux

指导老师: 赵玉婷
成员: 许岩松 习妍 罗心璐 霍含月

研究背景与意义

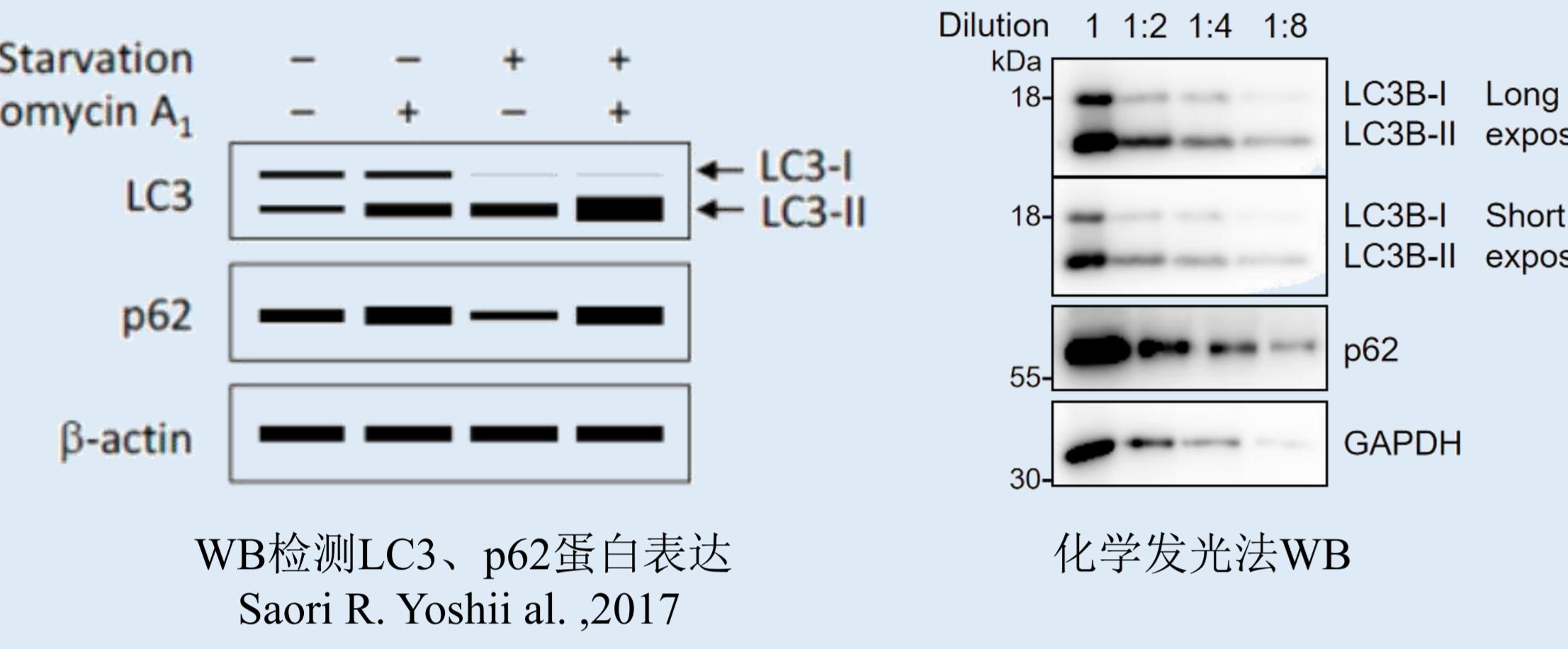
自噬是一种从酵母到哺乳动物都存在的进化上保守的生物学过程, 是一种通过清除受损的细胞器、病原体、蛋白聚集体等, 维持细胞内稳态的细胞内降解途径。



LC3作用机理

Agrotis et al., 2019

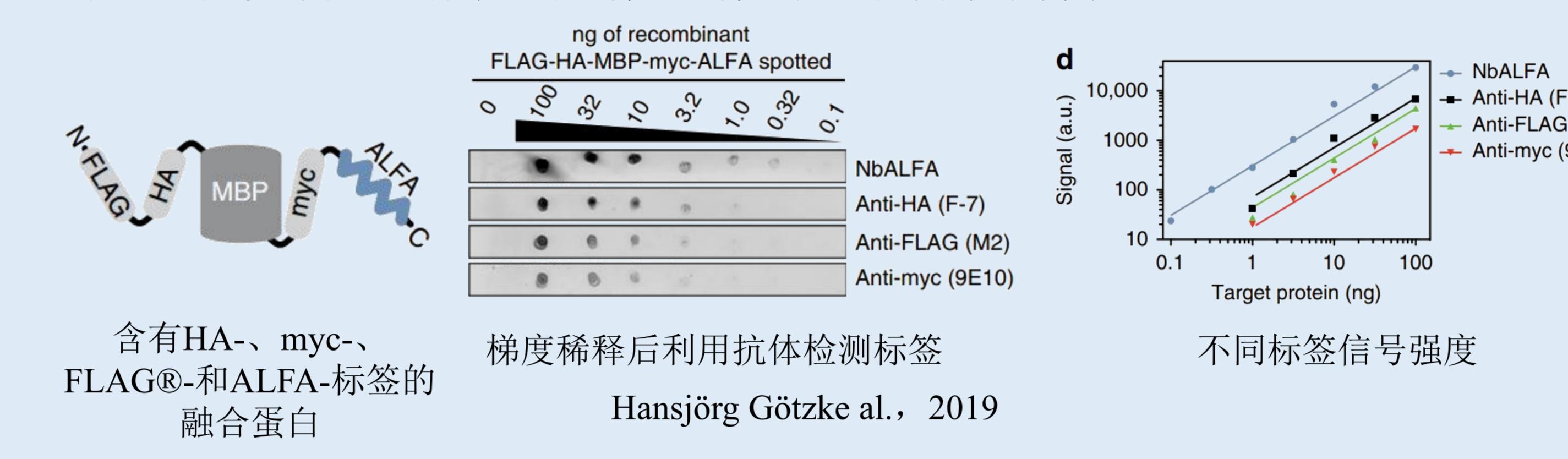
化学发光法WB, 信号强度与蛋白浓度之间的线性度差, 由此测量的LC3B-II/I比值比较不可靠。



WB检测LC3、p62蛋白表达

Saori R. Yoshii et al., 2017

ALFA是新兴的亲和标签。由15个氨基酸组成, 亲水性, 在生理pH下不带电, 倾向形成稳定α-螺旋, 即使暴露于苛刻的化学处理后也能自发地重新折叠。ALFA与其纳米抗体ALFAnb结合的解离常数为26 pM, 亲和力高, 并且ALFA对目的蛋白的影响较小, 可以设计在目的蛋白的N端或C端, 甚至在两个结构域之间。



含有HA-、myc-、FLAG®-和ALFA-标签的融合蛋白
梯度稀释后利用抗体检测标签
Hansjörg Götzke et al., 2019

HiBiT是NanoLuc荧光素酶的一部分, 与NanoLuc的另一部分LgBiT可以重建完整、有酶活性的荧光素酶, 因此可在重组LgBiT蛋白、NanoLuc底物存在的情况下, 利用生物发光法对HiBiT标签蛋白进行定量检测, 信噪比非常高。HiBiT长度为11个氨基酸, 与LgBiT结合的解离常数为700 pM, 亲和力较高。



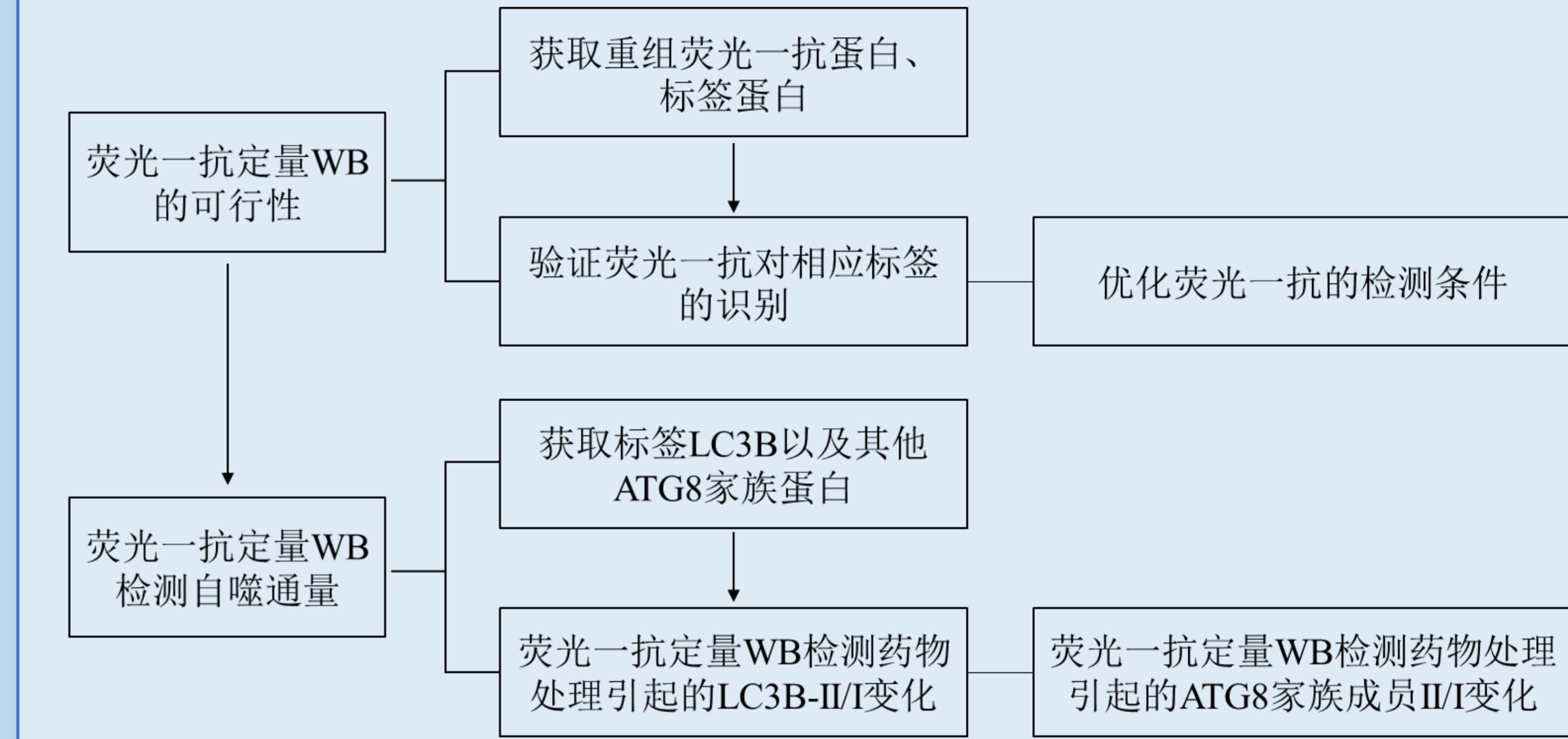
HiBiT标签蛋白作用机理
Arakawa M et al., 2023

研究目的与技术路线

1. 研究目的

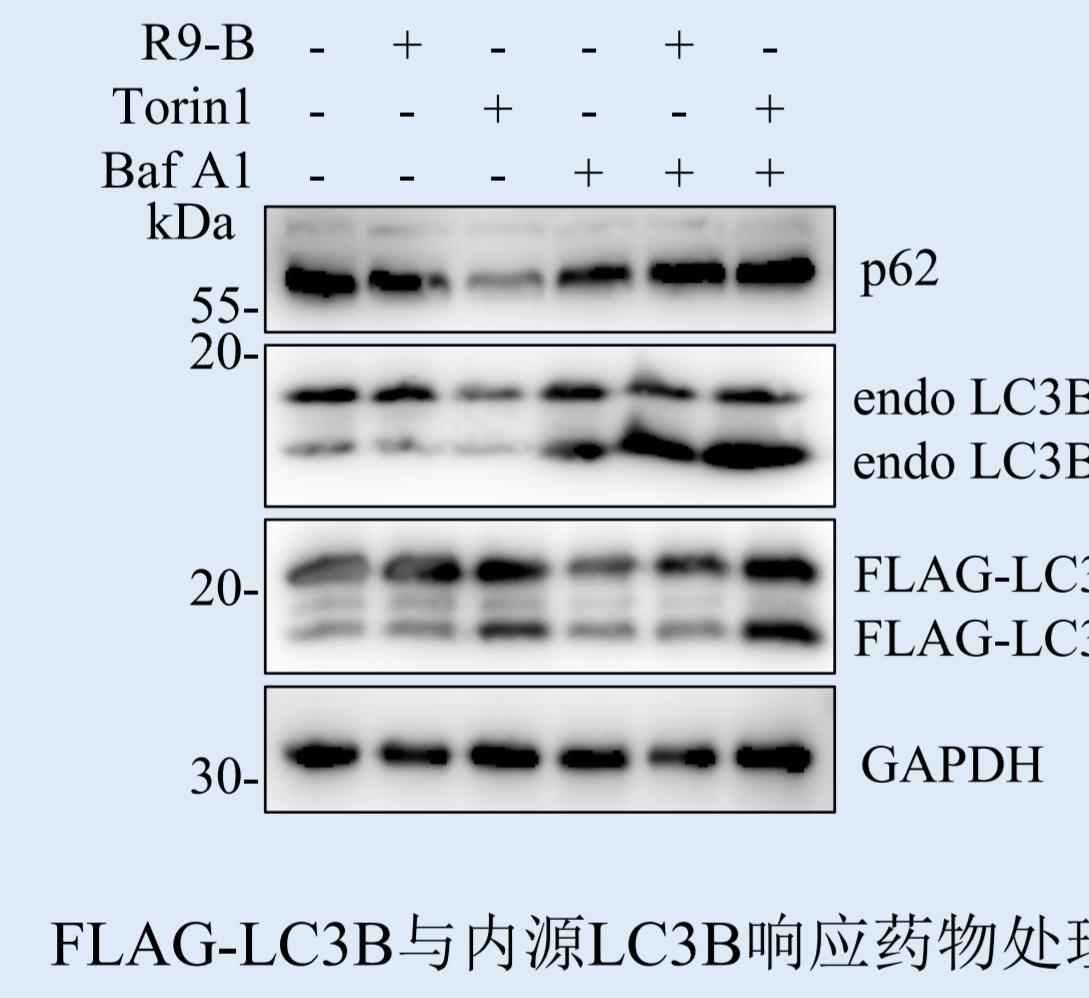
本研究选取两对高亲和力的标签和对应抗体(受体), HiBiT和LgBiT、ALFA和ALFA纳米抗体(下文简称ALFAnb), 利用原核表达的荧光LgBiT、ALFAnb蛋白, 建立荧光WB检测相应标签的方法, 进而对不同刺激条件下细胞中的HiBiT、ALFA标签的LC3B及其他ATG8家族蛋白进行定量, 以期获得可靠的自噬通量定量检测方法。

2. 技术路线



阶段性成果

1. 验证标签LC3B检测自噬的可行性



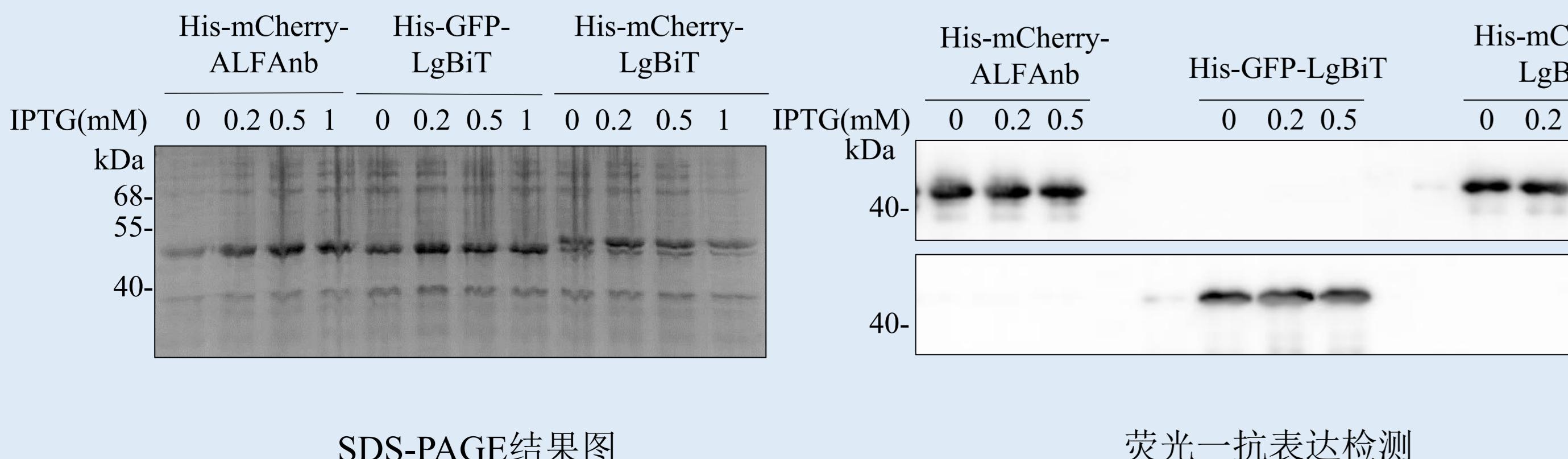
FLAG-LC3B与内源LC3B响应药物处理

2. 已完成的相关构建

编号	质粒名称	目的片段	PCR引物序列	PCR产物大小(bp)	限制性内切酶位点
1	ALFA-hLC3A	Human LC3A	F: cggatccATGCCCTAGACGGG R: cggatTCAGAAGCGAAGGT	382	BamHI/EcoRI
2	ALFA-hLC3B	Human LC3B	F: CGGGATTCATGCCGTCGGAG R: CGGAATTCTTACACTGACAA	394	BamHI/EcoRI
3	ALFA-hLC3C	Human LC3C	F: cggatccATGCCGCTCCACAG R: cggatTCAGAGGATTGCA	460	BamHI/EcoRI
4	ALFA-hGABARAP	Human GABARAP	F: cggatccATGAAGTTCAGTAC R: ttggccggTCACAGACCGTAG AC	372	BamHI/NotI
5	ALFA-hGABARAP1	Human GABARAP1	F: cggatccATGAAGTTCAGTAC R: cggatTCATTTCCCATAGAC	370	BamHI/EcoRI
6	ALFA-hGABARAP2	Human GABARAP2	F: gaagatccATGAAGTGGATGTT R: cggatTCAGAAGCCAAAGT	370	BglII/EcoRI
V(载体)	--	--	--	--	BamHI/EcoRI BamHI/NotI

已完成构建质粒

3. 证明荧光一抗正确大量表达



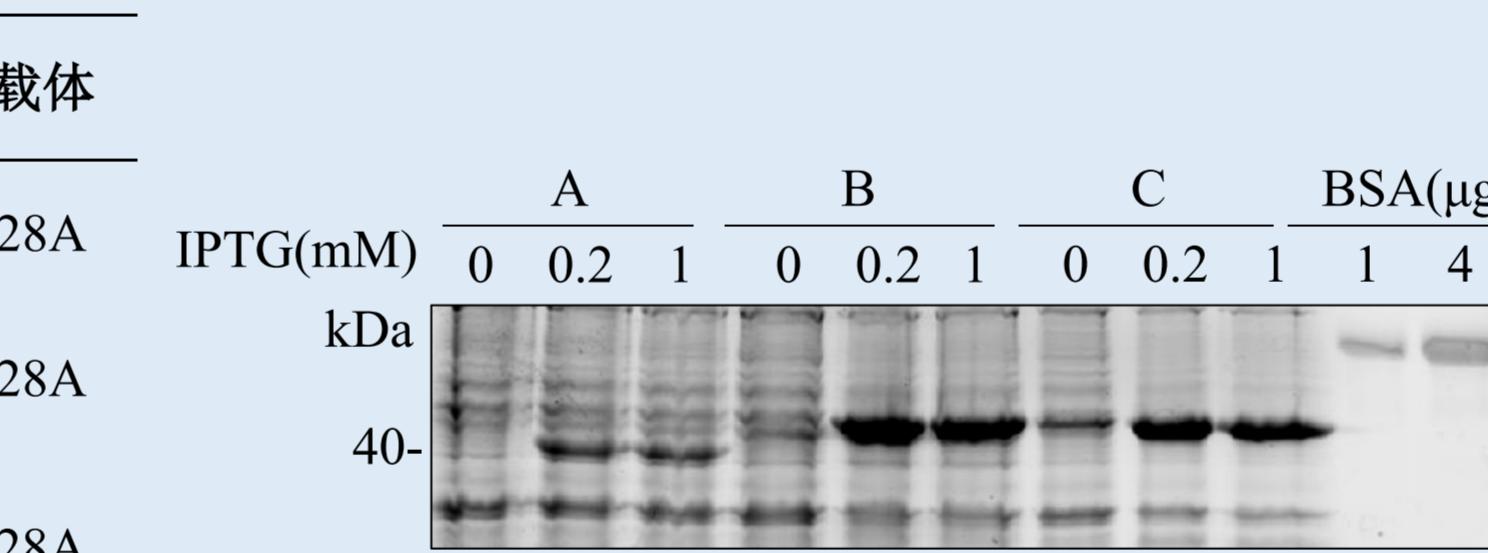
SDS-PAGE结果图

荧光一抗表达检测

4. 荧光ALFAnb蛋白的纯化

4.1 小量诱导并电泳

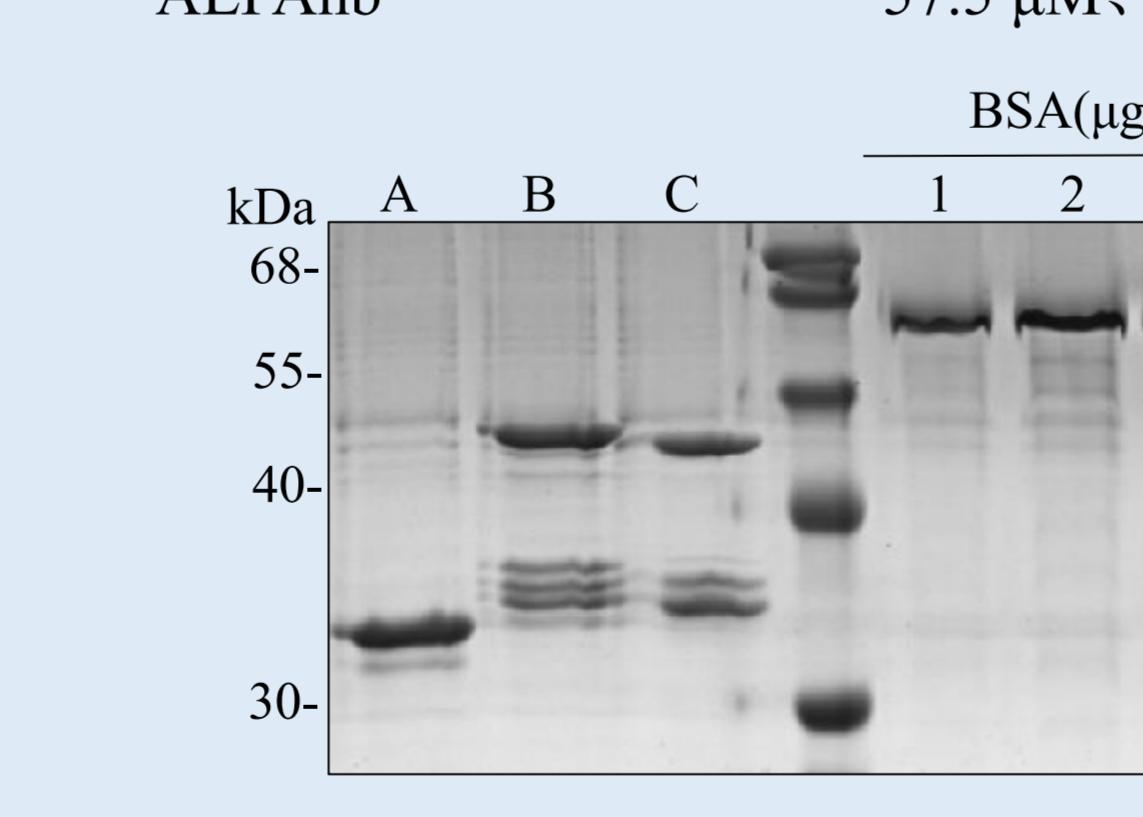
质粒	目的蛋白	预计大小(kDa)	基于载体
A	His-EGFP-ALFAnb	43.7	pET 28A
B	His-mCherry-ALFAnb	43.5	pET 28A
C	His-mYongHong-ALFAnb	41.8	pET 28A



三种荧光ALFAnb蛋白

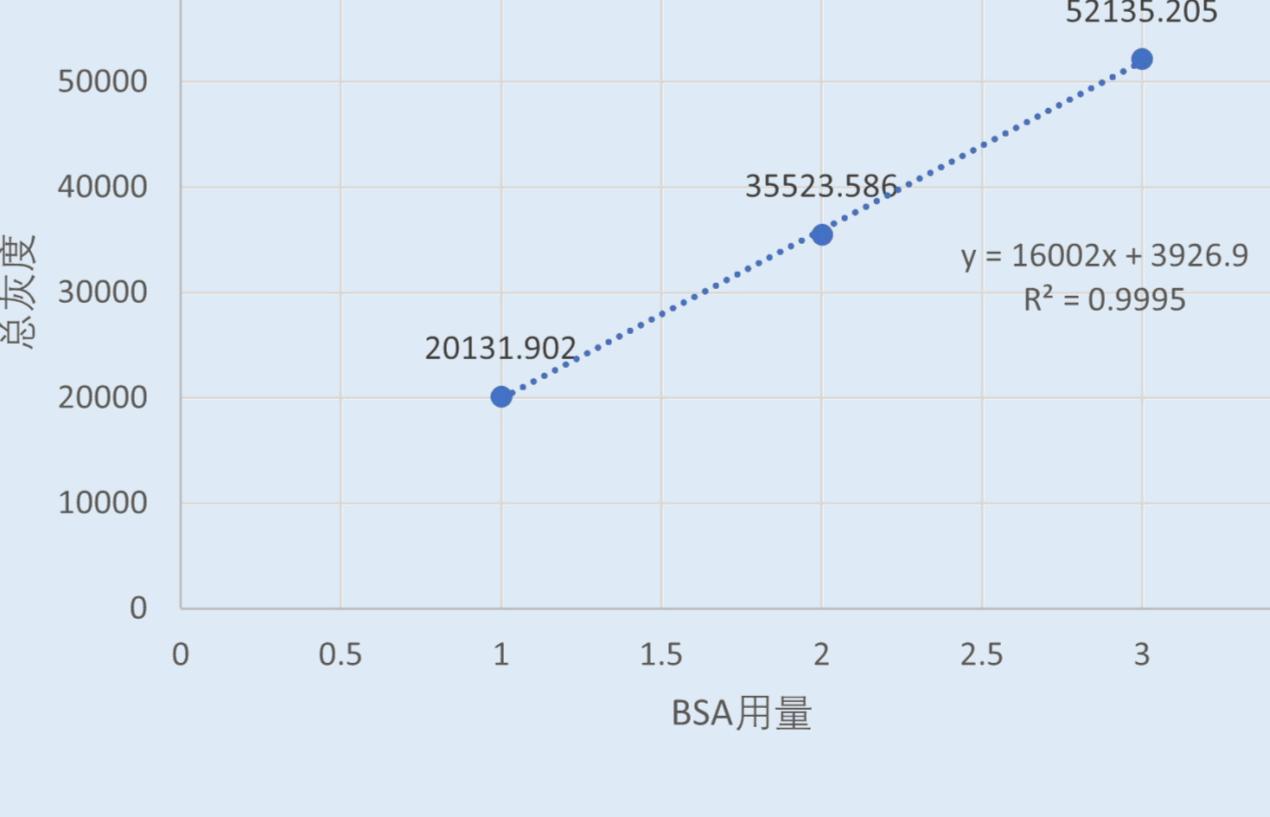
4.2 蛋白SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色, 并进行回归分析

A: His-EGFP-ALFAnb
B: His-mCherry-ALFAnb
C: His-mYongHong-ALFAnb
F: cggatccATGCCGCTCCACAG
R: ttggccggTCACAGACCGTAG
AC



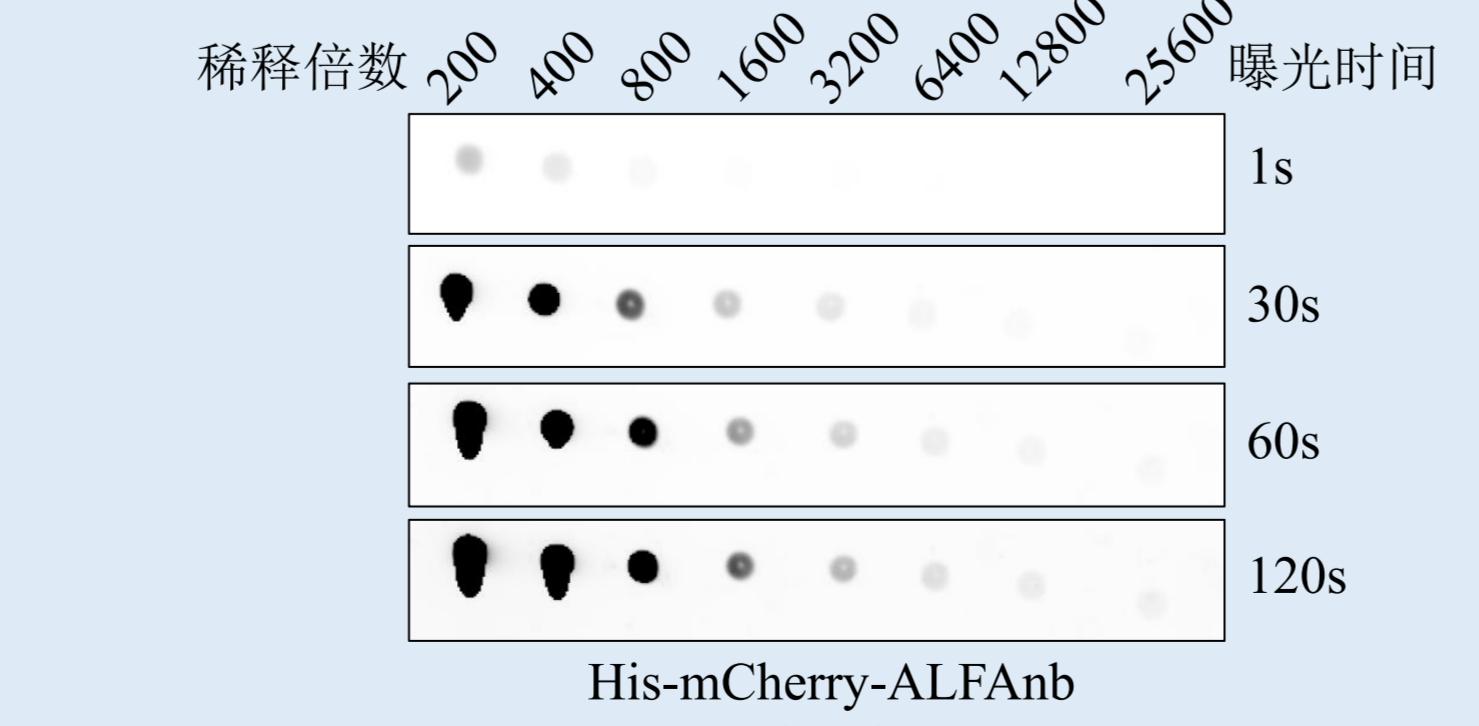
SDS-PAGE后考马斯亮蓝染色

小量诱导并电泳

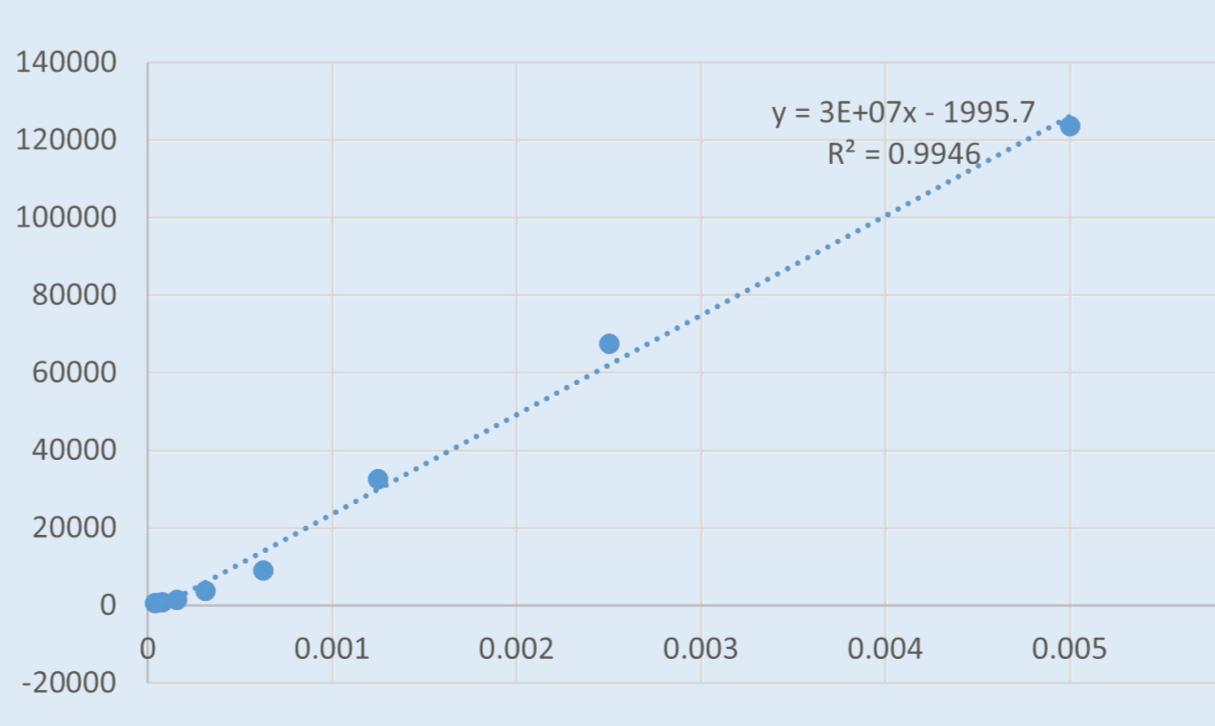


根据BSA量对荧光ALFAnb进行定量

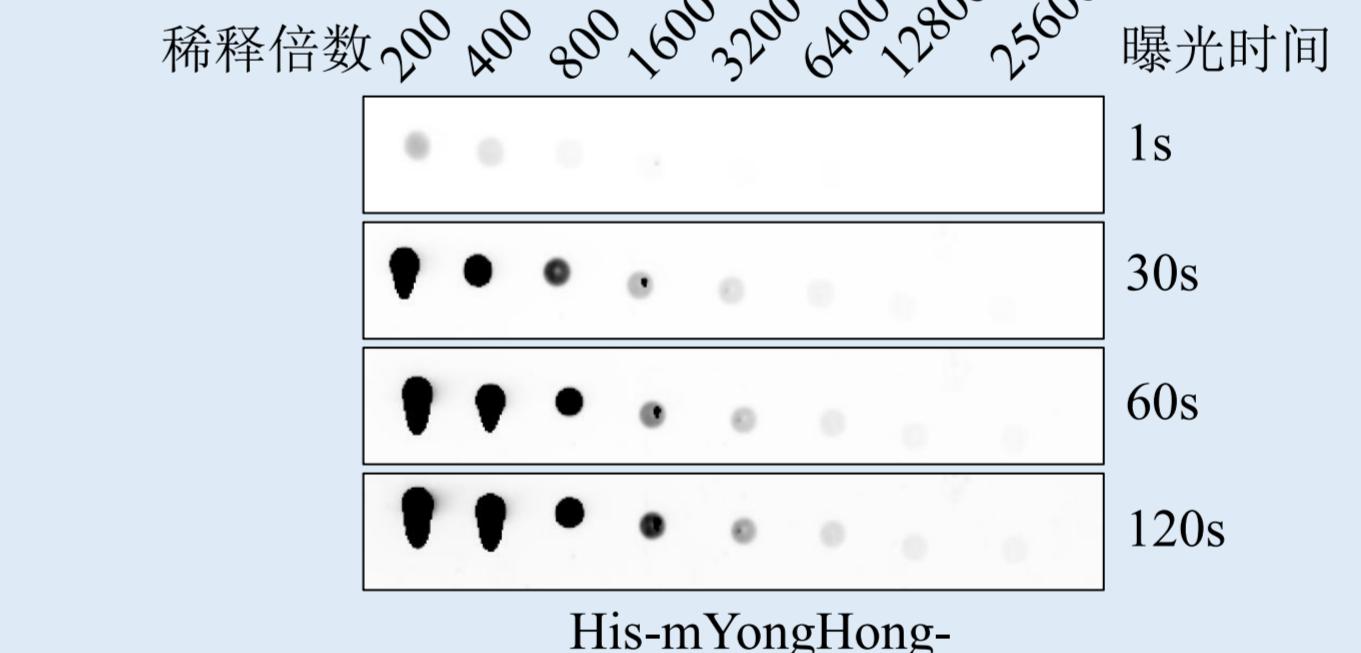
5. 荧光ALFAnb蛋白的活性检测



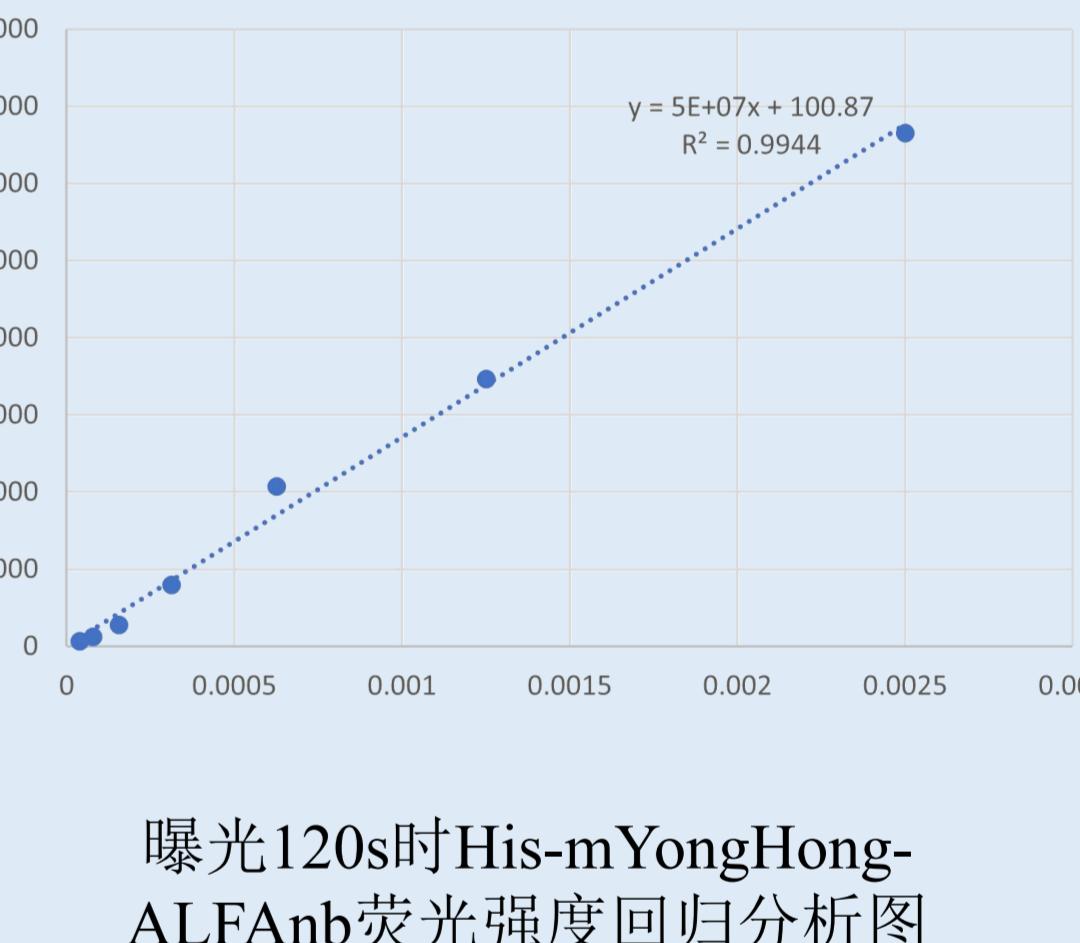
蛋白His-mCherry-ALFAnb在不同稀释倍数与曝光时间下的荧光强度



曝光30 s时His-mCherry-ALFAnb线性拟合图

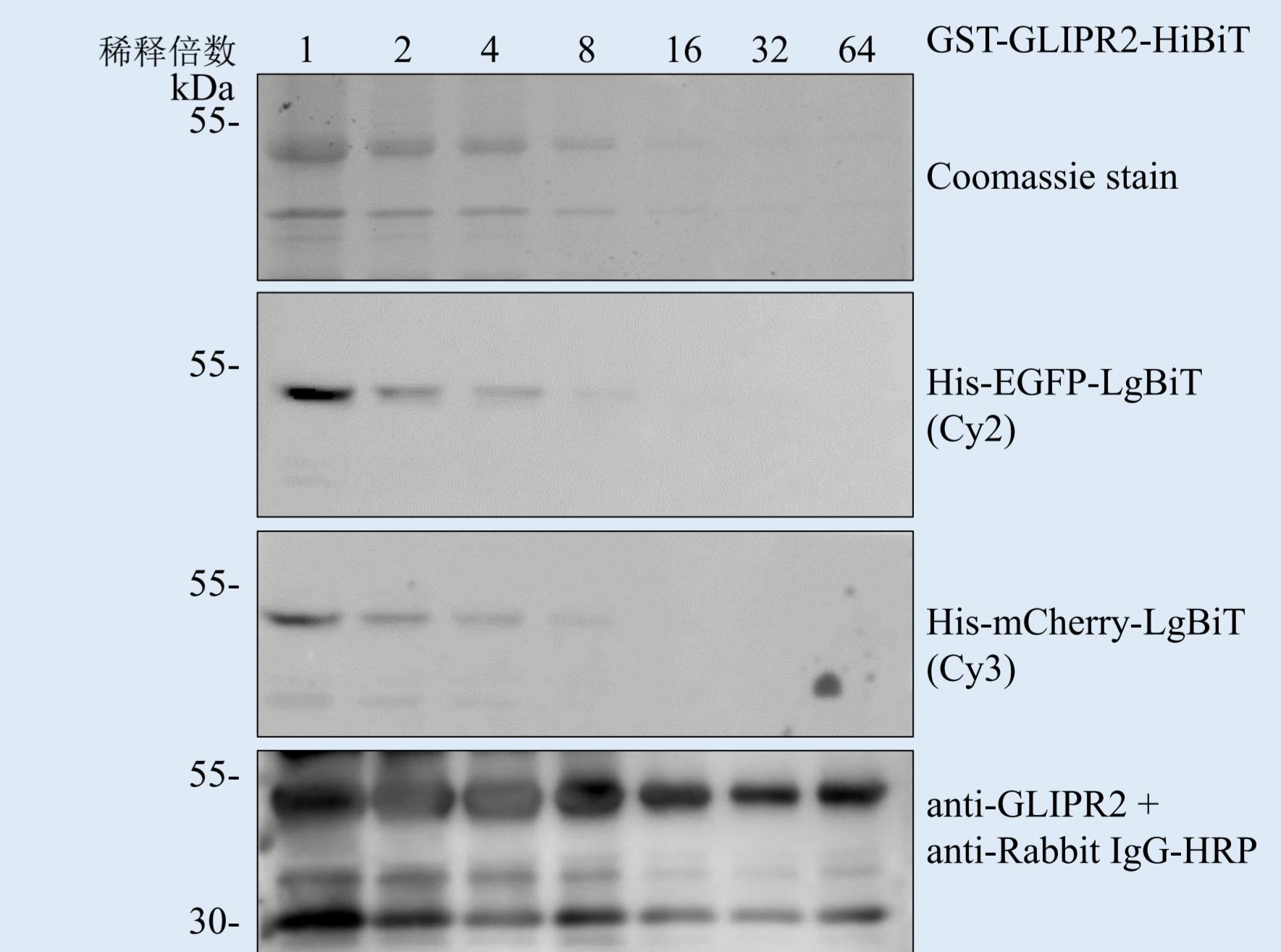


蛋白His-mYongHong-ALFAnb在不同稀释倍数与曝光时间下的荧光强度



曝光120 s时His-mYongHong-ALFAnb荧光强度回归分析图

6. 利用荧光LgBiT进行荧光WB检测



2倍梯度稀释后对GST-GLIPR2-HiBiT蛋白进行不同处理

7. 面临困难

His-EGFP-LgBiT和His-mCherry-LgBiT的检测灵敏度略低于考马斯亮蓝染色, 但远低于经一抗、HRP二抗孵育、ECL化学发光检测。目前所用荧光蛋白荧光强度相对较低, 可能影响实验结果判断。通过查阅资料, 选取了三种更优蛋白进行测试。

Name	λ_{ex}	λ_{em}	Brightness	Aggregation	kDa
AausFP1	504	510	164.9	d	25.72
vsfGFP-0	485	510	159.54	d	38.39
mScarlet3	569	592	78	m	25.85
EGFP	488	507	33.54	wd	26.94
mYongHong	551	592	18.48	m	25.86
mCherry	587	610	15.84	m	26.72