



# 荧光一抗定量免疫印迹检测自噬通量

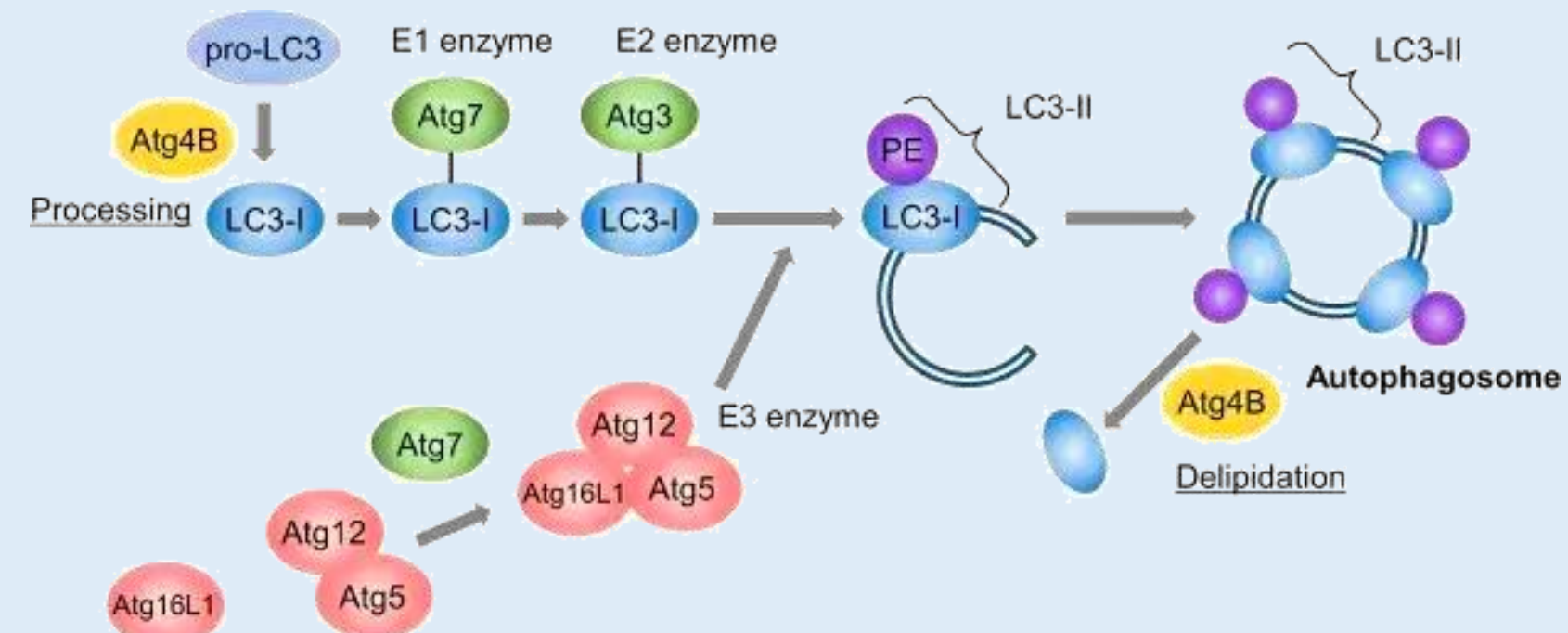
## Development of Fluorescent Primary Antibodies to Quantify Autophagic Flux

指导老师：赵玉婷

成员：许岩松 习妍 罗心璐 霍含月

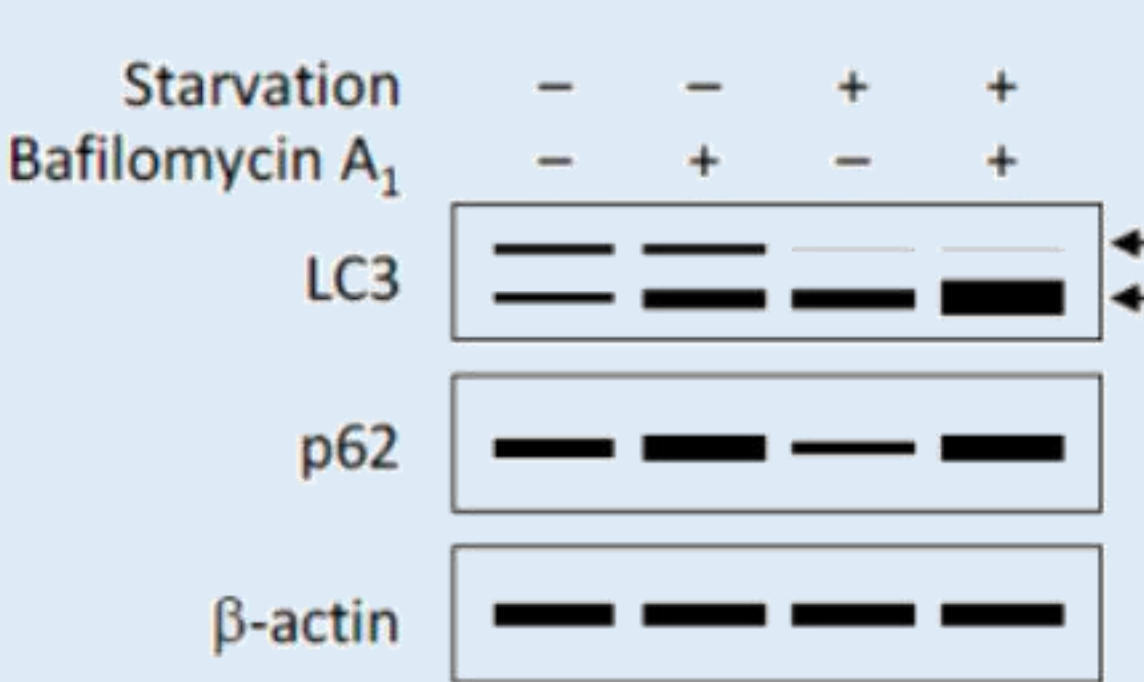
### 研究背景与意义

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。

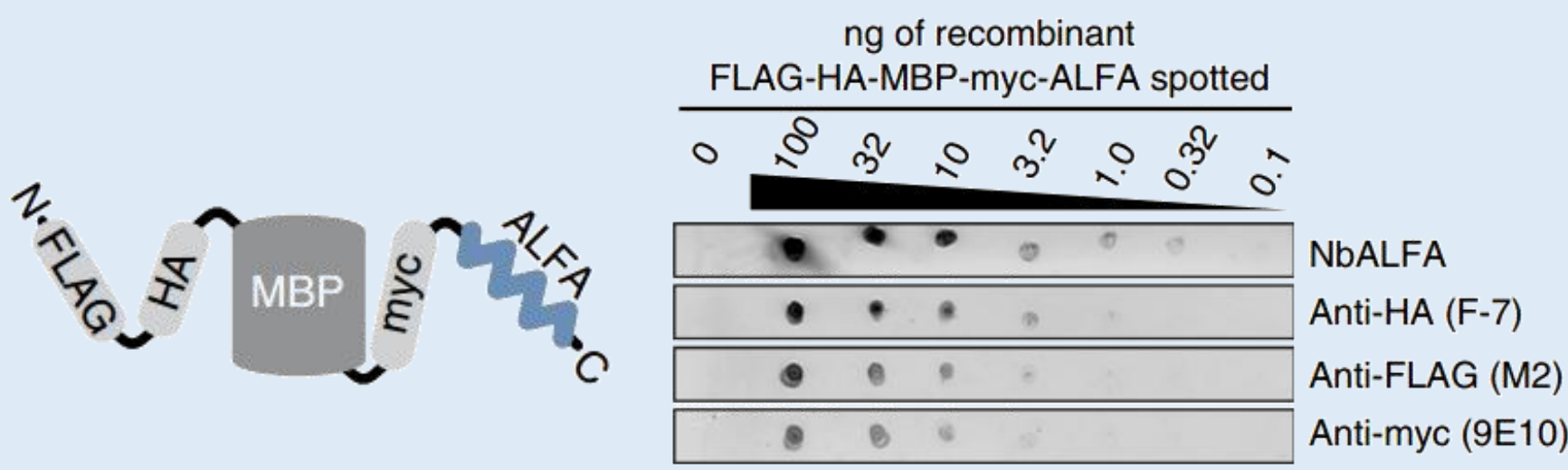


WB检测LC3、p62蛋白表达  
Saori R. Yoshii al., 2017

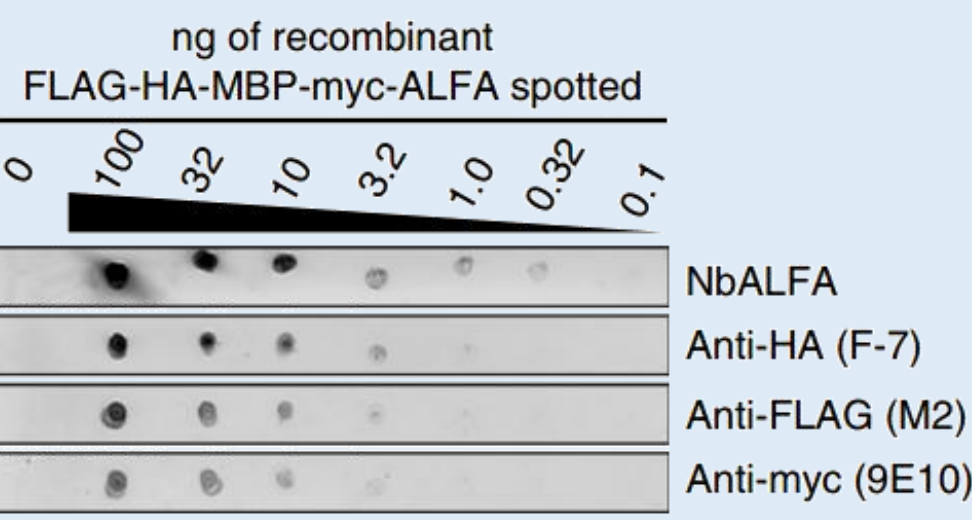


化学发光法WB

ALFA是新兴的亲标签。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 $\alpha$ -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。

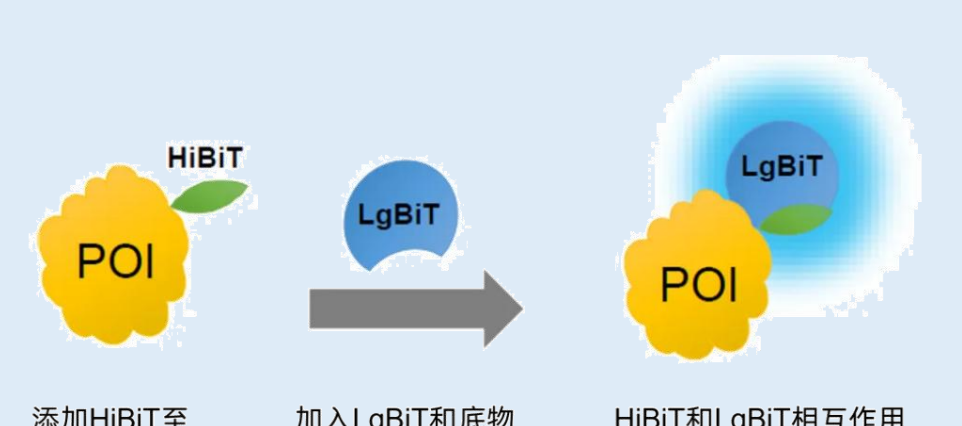


含有HA-、myc-、FLAG®-和ALFA-标签的融合蛋白

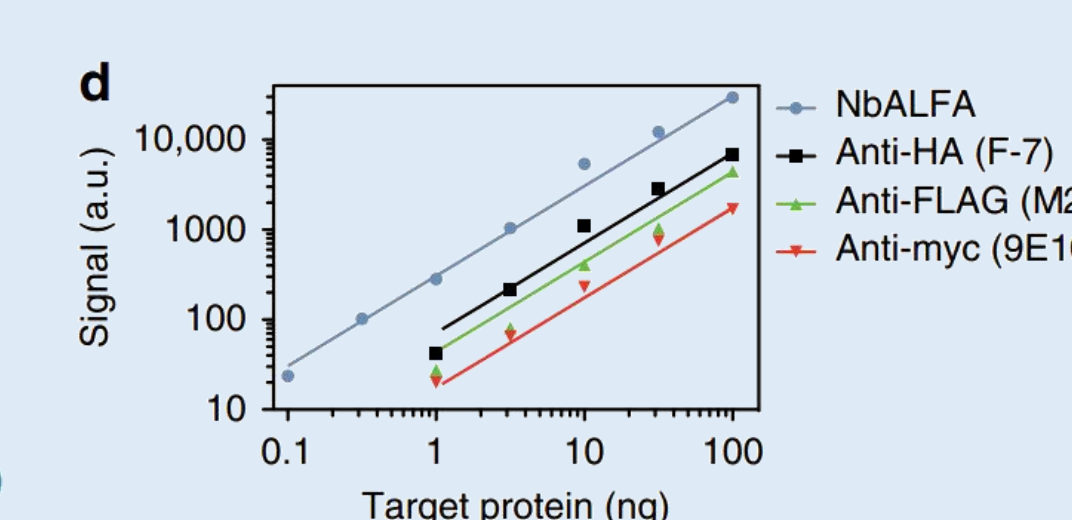


梯度稀释后利用抗体检测标签  
Hansjörg Götzke al., 2019

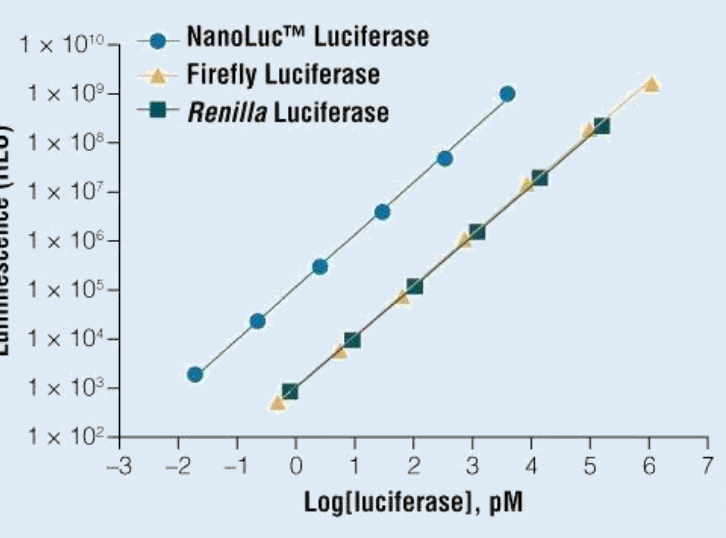
HiBiT是NanoLuc荧光素酶的一部分，与NanoLuc的另一部分LgBiT可以重建完整、有酶活性的荧光素酶，因此可在重组LgBiT蛋白、NanoLuc底物存在的情况下，利用生物发光法对HiBiT标签蛋白进行定量检测，信噪比非常高。HiBiT长度为11个氨基酸，与LgBiT结合的解离常数为700 pM，亲和力较高。



HiBiT标签蛋白作用机理



不同标签信号强度



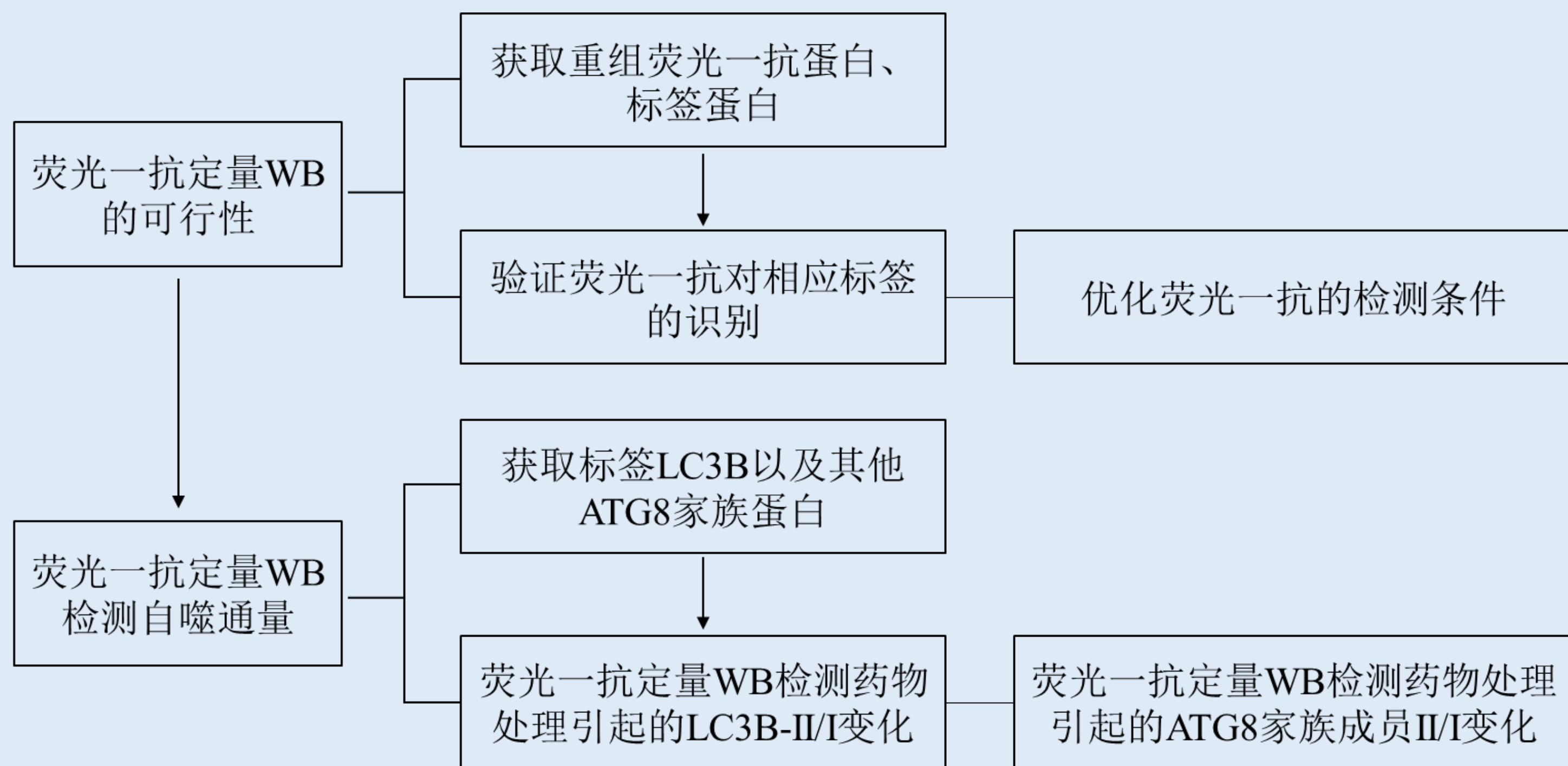
三种荧光酶比较  
Arakawa M al., 2023

### 研究目的与技术路线

#### 1. 研究目的

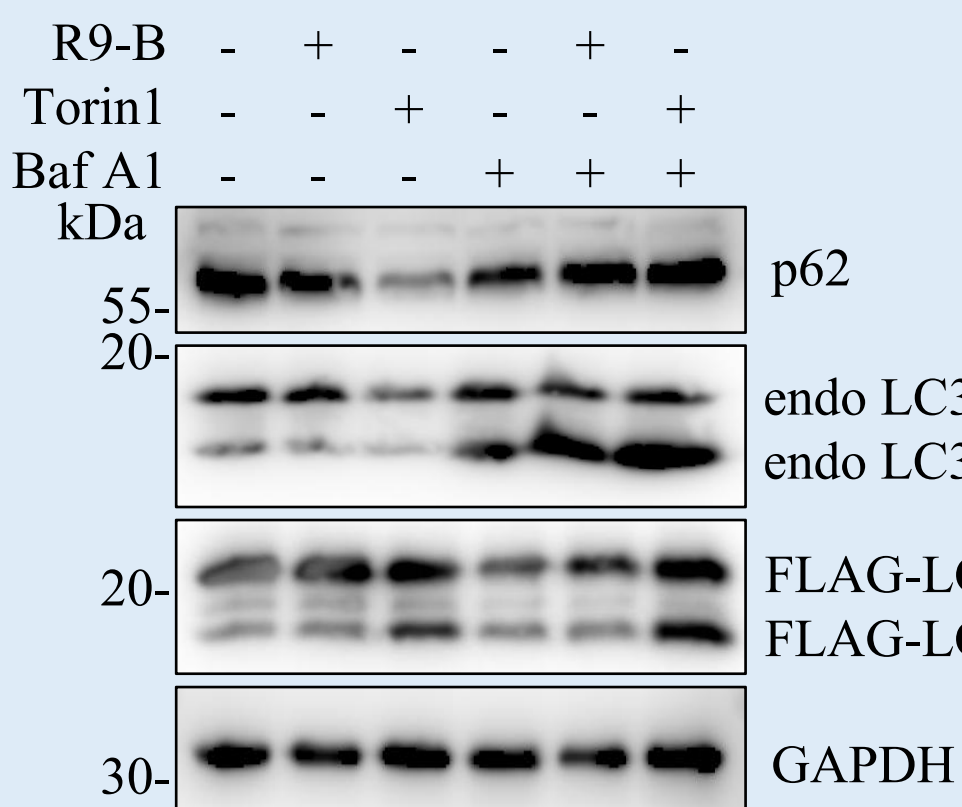
本研究选取两对高亲和力的标签和对应抗体（受体），HiBiT和LgBiT、ALFA和ALFA纳米抗体（下文简称ALFAnb），利用原核表达的荧光LgBiT、ALFAnb蛋白，建立荧光WB检测相应标签的方法，进而对不同刺激条件下细胞中的HiBiT、ALFA标签的LC3B及其他ATG8家族蛋白进行定量，以期获得可靠的自噬通量定量检测方法。

#### 2. 技术路线



### 阶段性成果

#### 1. 验证标签LC3B检测自噬的可行性



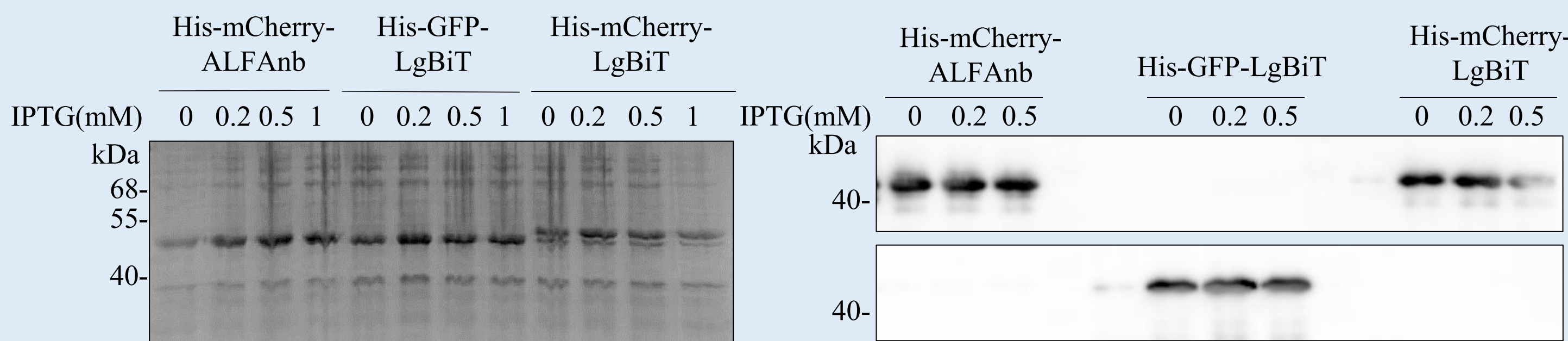
FLAG-LC3B与内源LC3B响应药物处理

#### 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: cgggatccATGCCCTCAGACCGG R: cgggaattcTCAGAAGCCGAAGGT	382	BamHI/EcoRI
2	ALFA-hLC3B	Human LC3B	F: CGGGATCCATGCCGTCGGAG R: CGGAATCTTACACTGACAA	394	BamHI/EcoRI
3	ALFA-hLC3C	Human LC3C	F: cgggatccATGCCGCTCCACAG R: cgggaattcCTAGAGAGGATTGCA	460	BamHI/EcoRI
4	ALFA-hGABARAP	Human GABARAP	F: cgggatccATGAAGTTCGTGTAC R: ttgcggcgcTCACAGACCGTAGAC	372	BamHI/NotI
5	ALFA-hGABARAPL1	Human GABARAPL1	F: cgggatccATGAAGTTCAGTAC R: cgggaattcTCATTCCCATAGAC	370	BamHI/EcoRI
6	ALFA-hGABARAPL2	Human GABARAPL2	F: gaagatctATGAAGTGGATGTTTC R: cgggaattcTCAGAAGCCAAAGT	370	BglIII/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



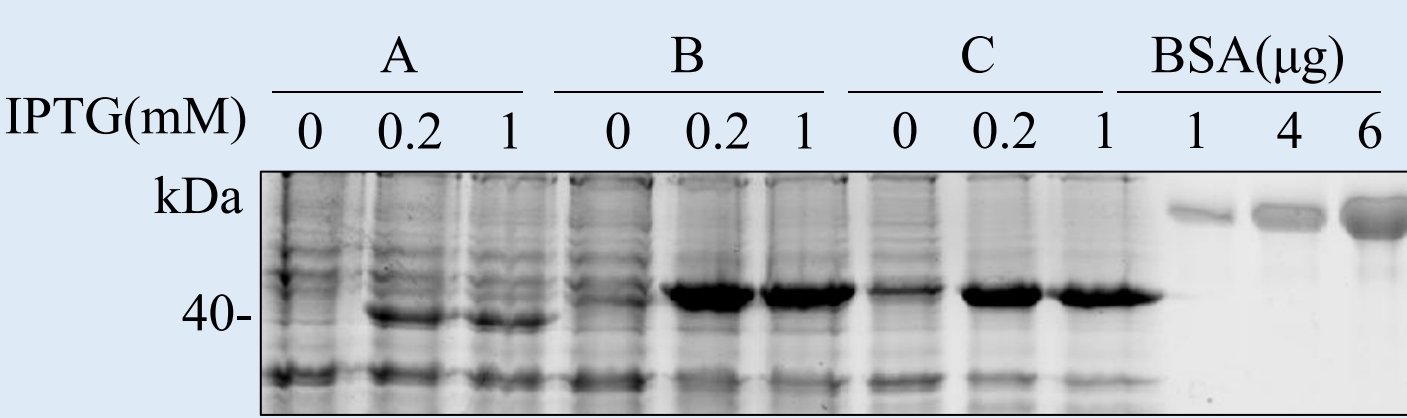
SDS-PAGE结果图

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



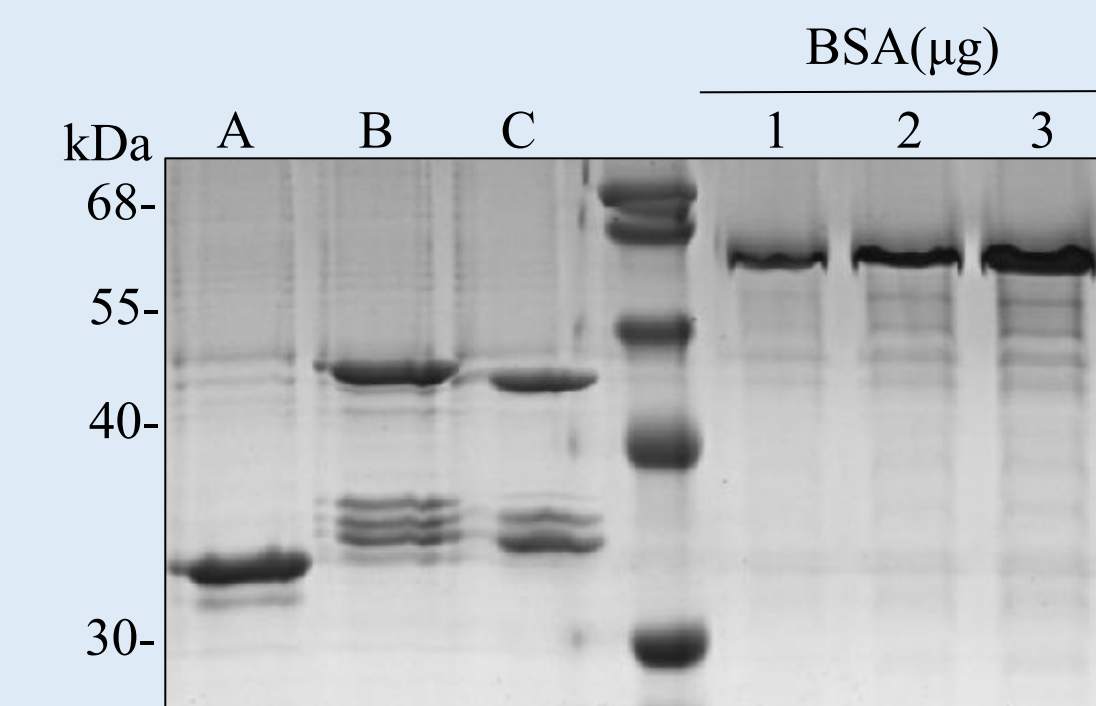
三种荧光ALFAnb蛋白

小量诱导并电泳

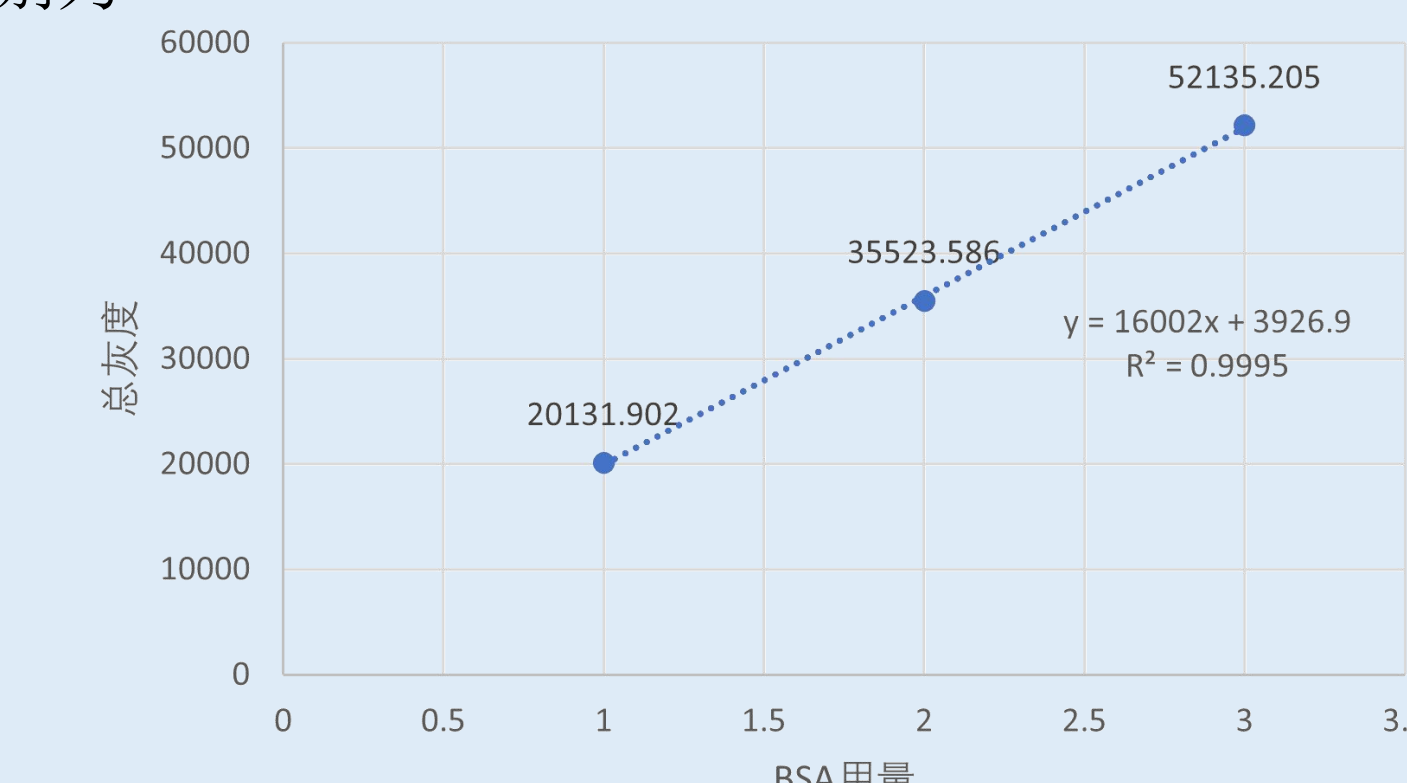
##### 4.2 蛋白SDS-PAGE及考马斯亮蓝染色，并进行回归分析

A: His-EGFP-ALFAnb  
B: His-mCherry-ALFAnb  
C: His-mYongHong-ALFAnb

B、C两蛋白的质量浓度分别为2.5 mg/ml、1 mg/ml，摩尔浓度分别为57.5 μM、24.0 μM。

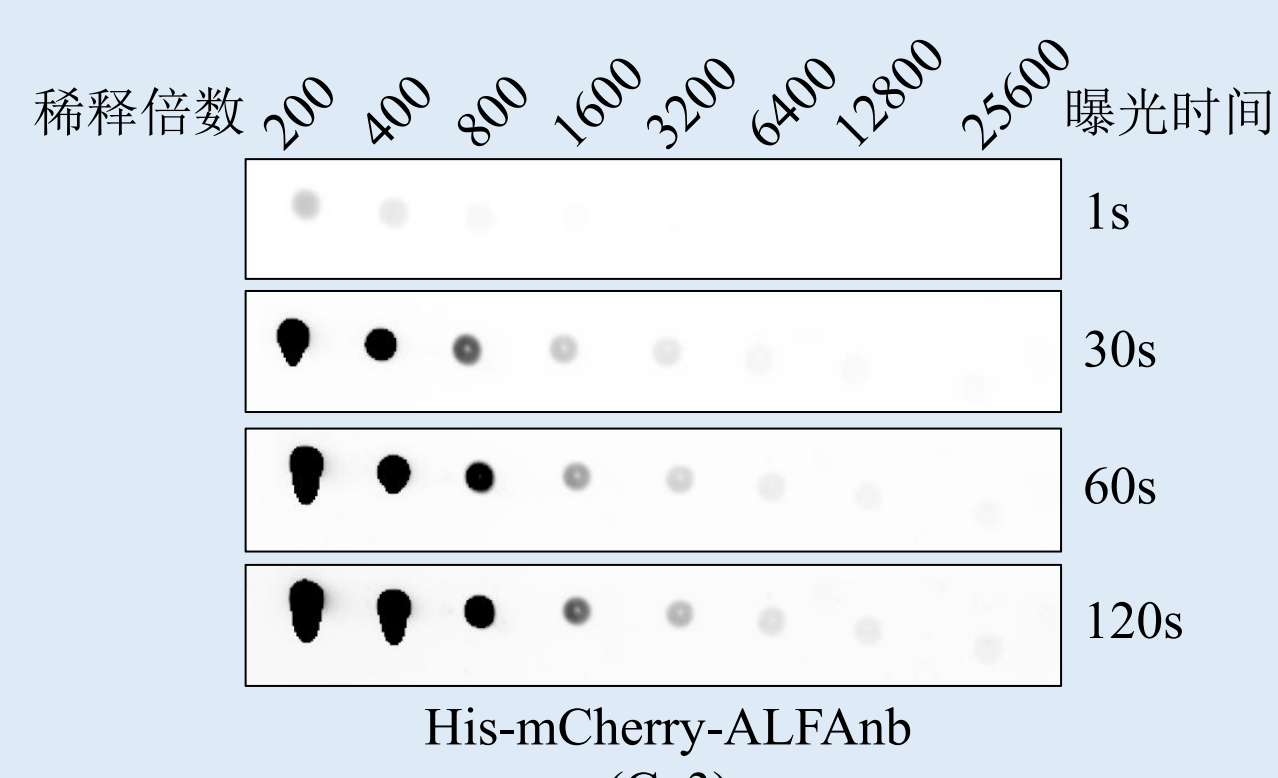


SDS-PAGE后考马斯亮蓝染色

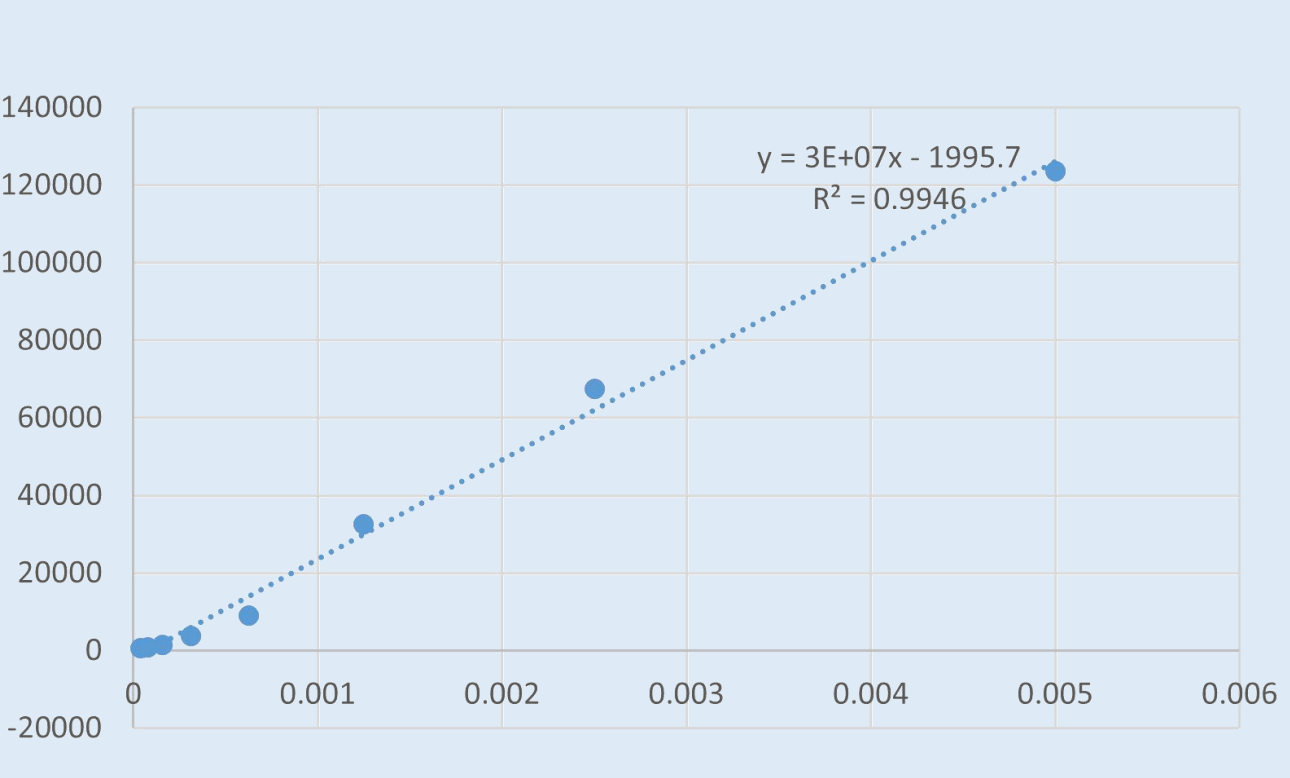


根据BSA量对荧光ALFAnb进行定量

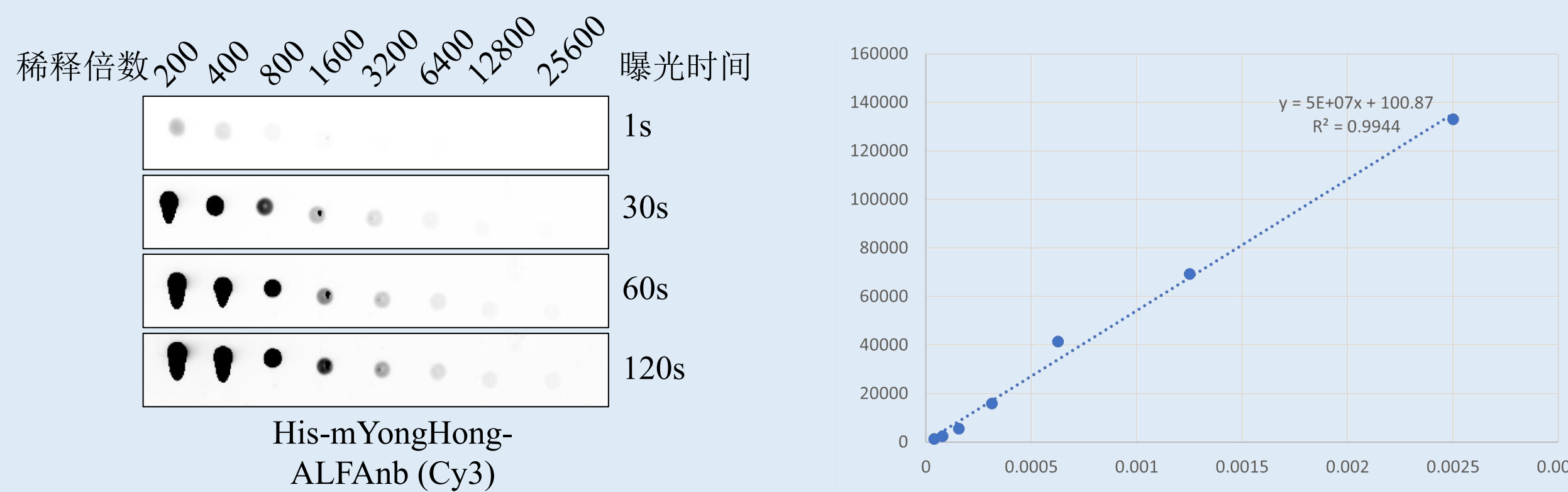
#### 5. 荧光ALFAnb蛋白的活性检测



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



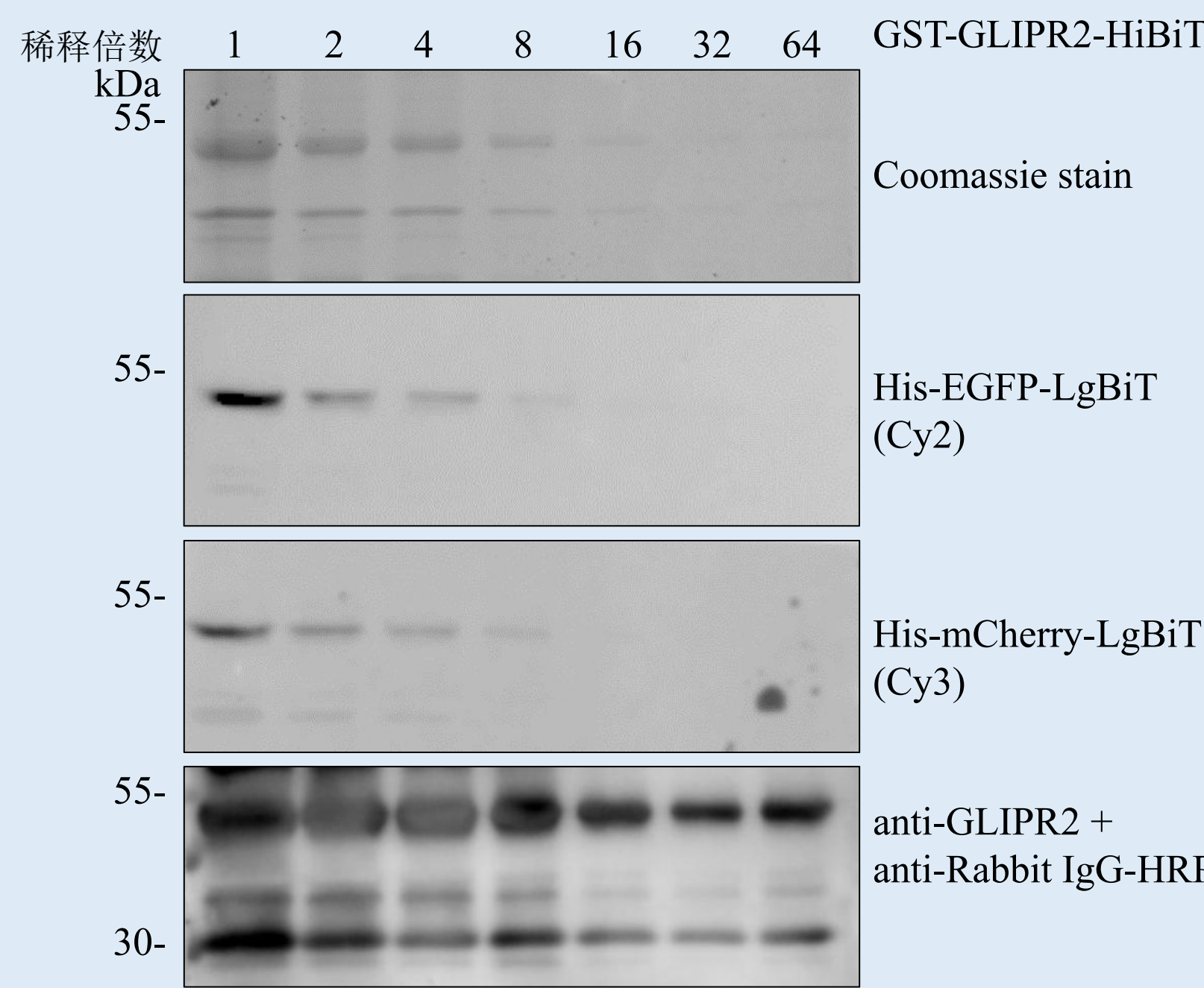
曝光30 s时His-mCherry-ALFAnb线性拟合图



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120s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-GLIPER2-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	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$	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