

单克隆抗体在植物研究中的应用

李晓屿, 李玉花, 蓝兴国*

东北林业大学生命科学学院, 发育生物学研究室, 哈尔滨150040

摘要: 单克隆抗体是现代生命科学研究的重要工具。随着分子生物学的发展, 单克隆抗体在植物研究中发挥着越来越重要的作用。本文综述了单克隆抗体在蛋白表达、蛋白定位、蛋白相互作用、植物成分的定性与定量、植物成分纯化、植物病害检测、标签抗体等方面研究中的应用。

关键词: 植物; 单克隆抗体; 蛋白表达; 蛋白定位; 蛋白质相互作用; 标签抗体

Application of Monoclonal Antibody in Plants

LI Xiao-Yu, LI Yu-Hua, LAN Xing-Guo*

Department of Developmental Biology, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Monoclonal antibody is an important tool in modern life science. With major developments in molecular biology, monoclonal antibody has wide application in plants. Here, the monoclonal antibody's application in protein expression, protein localization, protein-protein interaction, determine the nature and ration of plant component, purification of plant component, detection of Plant disease and tag antibody are introduced.

Key words: plant; monoclonal antibody technique; protein expression; protein localization; protein-protein interaction; tag antibody

单克隆抗体是只针对一种抗原决定簇的免疫球蛋白, 具有特异性强、灵敏度高、无交叉反应等优点。随着单克隆抗体技术与分子生物学的发展, 单克隆抗体在植物研究中发挥着越来越重要的作用。单克隆抗体在植物研究中尤其是对植物蛋白质的研究具有重要的应用价值。本文就单克隆抗体在植物研究中的应用进行综述。

1 研究植物蛋白的表达

研究蛋白质在植物的不同组织和不同发育时期的表达情况, 一直是植物学研究的重要内容。利用植物蛋白的单克隆抗体可通过免疫印迹技术直接检测植物组织总蛋白的表达, 方法准确、可靠。单克隆抗体具有特异性强、灵敏度高、无交叉反应等优点, 因此在研究植物蛋白表达时人们越来越倾向于利用单克隆抗体。

植物生长素结合蛋白(auxin binding protein, ABP1)是一种在植物中广泛存在的低丰度糖蛋白, 参与生长素信号传递。Braun等(2008)利用ABP1单克隆抗体, 证实了野生型拟南芥表达ABP1, 而反义植株则不表达ABP1。水溶性叶绿素结合蛋白(water soluble chlorophyll-binding protein, WSCP)

与植物叶片的衰老、叶绿素起源、胁迫应答等有着非常密切的关系。Damaraju等(2011)利用WSCP的单克隆抗体检测白花菜叶片中WSCP的表达情况, 发现该蛋白在幼嫩的叶片中表达量很高, 随着叶片的衰老, 表达量逐渐减少。微管蛋白(tubulin)是一种细胞骨架蛋白, 其蛋白水平通常不会改变, 因此被广泛用于免疫印迹上样量是否一致的参照即内参。利用tubulin的单克隆抗体可以方便的对其进行检测(Ishikawa等2011; Shin等2011; Amara等2013; Medzihradsky等2013)。目前已有许多公司出售成品化的内参抗体如tubulin单克隆抗体, 以方便科研人员使用。

2 研究植物蛋白细胞定位

蛋白质在细胞内的定位问题, 是细胞生物学研究的中心问题, 同时也是分子生物学研究的热门话题。研究蛋白质的细胞定位对揭示其功能具

收稿 2013-06-17 修定 2013-08-22

资助 中央高校基本科研业务费专项基金(DL13CA13)和国家自然科学基金(30900115和31070275)。

* 通讯作者(E-mail: lanxingguo@126.com; Tel: 0451-82191783)。

有重要意义。免疫组织化学定位技术是较常用方法之一, 是利用植物蛋白特异性抗体检测植物细胞切片的目的蛋白, 借助光学显微镜检测抗体与抗原的结合部位, 从而确定目的蛋白在细胞中的位置。Xu等(2010)以拟南芥为研究对象, 利用anti-PIN1与免疫组织化学定位技术对PIN1进行细胞定位, 发现PIN1蛋白主要存在与拟南芥叶片表皮细胞的波瓣区, 该结果与用绿色荧光蛋白定位技术的结果相同。MDP25是一种新发现的钙调蛋白, 在拟南芥中可通过响应细胞质中的钙浓度来调节胚轴细胞的伸长。Li等(2011)利用anti-MDP25和免疫荧光技术对MDP25进行细胞定位, 发现其主要分布在微管。

3 研究蛋白质的相互作用

蛋白质间的相互作用存在于生命体生长发育的各个环节, 在生物催化、物质转运、信号转导等生命过程中起到重要的作用。在玉米研究中, Zhang和Guy (2005)利用免疫共沉淀技术证实了Hsc70可以与一个100 kDa的蛋白在玉米幼苗中相互作用形成复合体, 通过质谱鉴定出该蛋白为Hsp101。Lee等(2008)利用免疫共沉淀技术验证拟南芥中DWD与DDB1的相互作用, 其结果与酵母双杂交结果一致。LRR-RLK是植物类受体蛋白激酶家族(RLK)中最大的亚家族, 该亚家族基因在调控植物体生长发育和抗逆性方面发挥重要作用, PAN1 (pangloss1)与PAN2 (pangloss2)均属于LRR-RLK家族。Zhang等(2012a)研究anti-PAN1和anti-PAN2, 利用免疫共沉淀技术检测PAN1与PAN2的相互作用情况, 发现PAN2不能与PAN1相互作用但是能与自身相互作用, 结果与酵母双杂交结果基本一致。

4 对植物成分定性与定量

在植物研究中, 往往需要对植物的某些成分进行定性与定量。利用传统的生物学检测方法需要材料经过复杂的分离、纯化后方可获得供检测的样品, 而且还需液相色谱、气相色谱等昂贵仪器才能完成检测。利用酶联免疫吸附分析方法(ELISA)可直接对微量样品进行测定, 方法快速、简单、准确。Wang等(2002)制备了水杨酸的单克隆抗体, 建立了ELISA方法检测植物组织中水杨酸的含量, 方法快速、灵敏, 线性范围在0.0195~20

nmol, 并且与高效液相色谱进行比较, 结果基本一致。 β 大豆伴侣的 α 亚基是在大豆中发现的主要致敏源, 能引起人和动物的过敏反应导致腹泻。Liu等(2012)建立了ELISA方法检测大豆或豆制品中 β 大豆伴侣的 α 亚基的含量, 线性范围0.65~29.84 ng·mL⁻¹。

利用单克隆抗体亦可判断中药中有效成分的有无及其含量。人参皂苷Rf是一种重要的人参单体皂苷, Nah等(2000)人制备了抗人参皂苷Rf的单克隆抗体, 建立了ELISA检测方法可以测定粗制总皂苷中的人参皂苷Rf的含量。Zhu等(2006)制备了抗柴胡皂苷a的单克隆抗体, 创建了ELISA的检测方法并与HPLC方法进行了比较, 发现ELISA法的灵敏度是HPLC法的50倍。甘草酸是甘草中主要的活性成分, 具有抗病毒、抗炎、抗过敏、抗肿瘤及免疫调节等作用。Xu等(2007)制备了甘草酸-人血清白蛋白的融合蛋白, 以此为抗原制备了抗甘草酸的单克隆抗体, 建立了以抗甘草酸单克隆抗体为基础的ELISA分析方法。该方法的优势在于可以快速、高敏感的检测中药或其他药物中甘草酸的含量。

5 植物成分纯化

植物有效成分的提取与纯化是植物研究中的重要内容, 往往也是研究的开端。单克隆抗体具有高亲和力和特异性的特点, 因此可将单克隆抗体用作免疫亲和柱中的亲和树脂, 用于实验室中植物成分的提取。Uto等(2012)制备了抗甘草酸的单克隆抗体, 利用免疫亲和柱对甘草酸粗提取物进行纯化, 可以方便、快捷地纯化甘草酸, 回收率可达99.82%。Seo等(2013)利用大豆花叶病毒(SMV)的单克隆抗体纯化大豆花叶病毒, 该方法具有快速、简单且所用组织材料少等优点。

6 植物病害检测

单克隆抗体可以应用于植物病原细菌的检测。利用抗体与抗原的特异性结合, 可以快速、精准地对植物病原细菌进行检测。检测方法主要有酶联免疫吸附法、免疫分离等技术、免疫荧光技术和免疫胶体金层析分析等。马铃薯Y病毒是危害马铃薯和烟草等作物的重要病毒, Ismail (1997)建立了ELISA方法可以快速检测作物中马铃薯Y病毒, 而且与马铃薯X病毒、马铃薯Y病

毒、烟草花叶病毒、番茄斑萎病毒等均无交叉反应。该方法的优点在于快速、廉价,在马铃薯Y病毒研究中具有重要应用价值。在农业生产中,疮病黄单胞杆菌严重限制了番茄和辣椒的产量, Tsuchiya和D'Ursel (2004)制备了3种抗疮病黄单胞杆菌的单克隆抗体,通过ELISA测定灵敏度可达 $10^3\sim 10^4$ cfu·mL⁻¹,可用作番茄和辣椒疮病黄单胞杆菌的检测,方法简单、准确,几个小时即可得出结果,有很强的实际应用价值。

7 标签抗体

标签抗体,别名为抗原表位,是抗原分子中决定抗原特异性的特殊区域或基团,是与抗体特异性结合的结构或序列。随着生物技术的发展,科研人员可以通过DNA重组技术,构建包含目的基因以及标签的融合蛋白,进而通过特异性标签抗体对其鉴定与纯化,以达到研究的需求。利用标签抗体亦可研究蛋白质的相互作用和鉴定转基因植株。

常见的标签抗体有anti-His、anti-GST、anti-GFP、anti-Flag、anti-HA、anti-Myc、anti-MBP、anti-V5等。Lee等(2011)在研究拟南芥RTNLB1与FLS2激酶域相互作用时使用了anti-V5与anti-Myc。Hua等(2012)在研究拟南芥GHR1与SLAC1、ABI1相互作用时,多次用到anti-FLAG与anti-Myc。*JAX1*基因编码合成的植物凝集素可能使烟草免遭病毒感染, Yamaji等(2012)将*JAX1*连接到35S载体中通过农杆菌转染烟草获得转基因植株,35S载体可使*JAX1*带有FLAG标签,利用anti-FLAG单克隆抗体对其检测可以辨别转基因是否成功。目前已有许多公司出售成品化的标签类单克隆抗体,这些标签类单克隆抗体在植物研究中发挥着越来越重要的作用。

8 在植物其他方面的应用

在揭示植物亚细胞结构方面, Luethy等(1993)曾利用玉米F1-ATP酶制备了9株单克隆抗体。利用这些单克隆抗体的交叉性和特异性,不但成功用于标记豌豆子叶线粒体内的蛋白质,而且还可用于揭示不同F1-ATP酶亚组的相似性。野生型拟南芥的重复序列会出现相当高比例的DNA甲基化,而突变体ddm1则不会出现。Baubec等(2010)利用鼠源anti-5-甲基胞嘧啶单克隆抗体和免疫荧光技

术,发现ddm1核区仅12%发生了DNA甲基化。Su等(2012)为了探索LI-FIM1在花粉管伸长中所起到的作用,将LI-FIM1特异性抗体显微注射入花粉管中,观察其生长情况,发现花粉管的生长受到抑制。利用单克隆抗体建立的ELISA方法,可方便、快速地对微量成分进行检测,如Xu等(2012)建立了直接竞争ELISA方法,该方法可有效地检测被有机磷污染的蔬菜或样品,优点是高通量、效率高、成本低,具有很强的实用性。Pei等(2013)制备了玉米烯酮(ZON)的单克隆抗体anti-ZON,建立了高通量筛选-酶联免疫分析方法(HTS-ELISA)可定量检测玉米中的玉米烯酮含量,最低检测线为0.1 ng·g⁻¹,在食品检测中有重要的应用价值。

9 研究展望

从单克隆抗体技术创立发展至今,其发展经历了鼠源性抗体、人鼠嵌合抗体和人源化抗体(Kellermann和Green 2002; Tsurushita等2004; Paschke 2006)。纵观其发展历程可以发现,单克隆抗体技术主要是应用于医学领域。由于鼠源性抗体自身也有免疫原性,医学研究中大多需要人源化抗体,而在植物研究中则无需考虑抗体的鼠源性问题,大大方便了学者对植物的研究。随着分子生物学的发展,植物蛋白的表达与纯化技术也日渐完善。利用原核或真核表达技术即可获得植物目的蛋白。纯化后的目的蛋白就可以用作抗原来制备单克隆抗体以进行更深入的研究。

免疫印迹、免疫荧光技术和免疫共沉淀是经常用到的生物学分析方法,是研究植物蛋白的表达、定位、相互作用的常规技术。抗体芯片技术被广泛应用于临床诊断、蛋白质组学、药理学等研究领域,尤其在蛋白质筛选、蛋白相互作用、差异蛋白检测及蛋白功能研究等方面拥有较强优势(Borrebaeck和Wingien 2009; Zhang和Pelech 2012)。但由于植物种类繁多,植物蛋白更是数不胜数,因此当今技术还很难大量、全面地制备植物抗体,只是有针对性地去制备植物蛋白的抗体,难以满足抗体芯片技术对抗体的需求。植物成分的定性与定量是植物研究的一项重要内容,其中ELISA技术得到了广泛的应用。与以往的技术相比,化学发光免疫分析技术(chemiluminescence immunoassay, CLIA)在灵敏度、特异性、重复

性、线性等方面都具有显著的优势(Zhang等2012b; Aita等2013),但是在植物学研究中却鲜有报道。相信随着单克隆抗体技术与分子生物学的发展,单克隆抗体会在植物研究中发挥越来越大的作用。

参 考 文 献

- Aita A, Rossi E, Basso D, Guariso G, Bozzato D, Pelloso M, Pescarin M, Zambon CF, Navaglia F, Greco E et al (2013). Chemiluminescence and ELISA-based serum assays for diagnosing and monitoring celiac disease in children: a comparative study. *Clin Chin Acta*, 421: 202~207
- Amara I, Capllades M, Ludevid MD, Pagès M, Goday A (2013). Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing *LEA Rab28* gene. *J Plant Physiol*, 170 (9): 864~873
- Baubec T, Dinh HQ, Pecinka A, Rakic B, Rozhon W, Wohlrab B, Haeseler A, Scheid OM (2010). Cooperation of multiple chromatin modifications can generate unanticipated stability of epigenetic states in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22 (1): 34~47
- Borrebaeck CA, Wingren C (2009). Design of high-density antibody microarrays for disease proteomics: key technological issues. *J Proteomics*, 72 (6): 928~935
- Braun N, Wyrzykowska J, Muller P, David K, Couch D, Perrot-Rechenmann C, Fleming AJ (2008). Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Cell*, 20 (10): 2746~2762
- Damaraju S, Schleder S, Eckhardt U, Loksteinb H, Grimm B (2011). Functions of the water soluble chlorophyll-binding protein in plants. *J Plant Physiol*, 168 (12): 1444~1451
- Hua D, Wang C, He J, Liao H, Duan Y, Zhu Z, Guo Y, Chen Z, Gong Z (2012). A plasma membrane receptor kinase, GHRI, mediates abscisic acid- and hydrogen peroxide-regulated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24 (6): 2546~2561
- Ishikawa M, Murata T, Sato Y, Nishiyama T, Hiwatashi Y, Imai A, Kimura M, Sugimoto N, Akita A, Oguti Y et al (2011). *Physcomitrella* cyclin-dependent kinase A Links cell cycle reactivation to other cellular changes during reprogramming of leaf cells. *Plant Cell*, 23 (8): 2924~2938
- Ismail MH (1997). The use of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for quantitative detection of potato virus Y in potato and other test plants. *Microbial Res*, 152: 307~313
- Kellermann SA, Green LL (2002). Antibody discovery: the use of transgenic mice to generate human monoclonal antibodies for therapeutics. *Curr Opin Biotechnol*, 13 (6): 593~597
- Lee HY, Bowen CH, Popescu GV, Kang HG, Kato N, Ma S, Dinesh-Kumar S, Snyder M, Popescu SC (2011). *Arabidopsis* RTNLBL1 and RTNLBL2 Reticulon-Like proteins regulate intracellular trafficking and activity of the FLS2 immune receptor. *Plant Cell*, 23 (9): 3374~3391
- Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW (2008). Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell*, 20 (1): 152~167
- Li J, Wang X, Qin T, Zhang Y, Liu X, Sun J, Zhou Y, Zhu L, Zhang Z, Yuan M et al (2011). MDP25, a novel calcium regulatory protein, mediates hypocotyl cell elongation by destabilizing cortical microtubules in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23 (12): 4411~4427
- Liu B, Teng D, Yang Y, Wang X, Wang J (2012). Development of a competitive ELISA for the detection of soybean α subunit of β -conglycinin. *Process Biochem*, 47 (2): 280~287
- Luethy MH, Horak A, Elthon TE (1993). Monoclonal antibodies to the α - and β -subunits of the plant mitochondrial F1-ATPase. *Plant Physiol*, 101 (3): 931~937
- Medzihradzsky M, Bindics J, Ádám É, Viczián A, Klement É, Lorrain S, Gyula P, Mérai Z, Fankhauser C, Medzihradzsky KF et al (2013). Phosphorylation of phytochrome B inhibits lighe-induced signaling via accelerated dark reversion in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25 (2): 535~544
- Nah JJ, Song JY, Choi S, Kim SC, Rhim HW, Oh TH, Lee SM, Nah SY (2000). Preparation of monoclonal antibody against ginsenoside Rf and its enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull*, 23 (5): 523~526
- Paschke M (2006). Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70: 2~11
- Pei S, Lee W, Zhang G, Hu X, Eremin SA, Zhang L (2013). Development of anti-zearalenone monoclonal antibody and detection of zearalenone in corn products from China by ELISA. *Food Control*, 31: 65~70
- Seo JK, Kang M, Vo Phan MS, Kim KH (2013). Rapid purification of *Soybean mosaic virus* from small quantities of tissue by immunoprecipitation. *J Virol Methods*, 191 (1): 31~32
- Shin LJ, Huang HE, Chang H, Lin YH, Ger MJ (2011). Ectopic ferredoxin I protein promotes root hair growth through induction of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 168 (5): 434~440
- Su H, Zhu J, Cai C, Pei W, Wang J, Dong H, Ren H (2012). FIMBRIN1 Is involved in Lily pollen tube growth by stabilizing the actin fringe. *Plant Cell*, 24 (11): 4539~4554
- Tsuchiya K, D'Ursel CCM (2004). Development of a sensitive ELISA using three monoclonal antibodies against lipopolysaccharides to detect *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, the causal agent of bacterial spot of tomato and pepper. *General Plant Pathol*, 70 (1): 21~26
- Tsurushita N, Park M, Pakabunto K, Ong K, Avdalovic A, Fu H, Jia A, Vásquez M, Kumar S (2004). Humanization of a chicken anti-IL-12 monoclonal antibody. *J Immunol Methods*, 295 (1-2): 9~19
- Uto T, Morinaga O, Tanaka H, Shoyama Y (2012). Analysis of the synergistic effect of glycyrrhizin and other constituents in licorice extract on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production using knock-out extract. *Biochem Biophys Res Commun*, 417 (1): 473~478
- Wang S, Xu L, Li G, Chen P, Xia K, Zhou X (2002). An ELISA for the determination of salicylic acid in plants using a monoclonal

- antibody. *Plant Sci*, 162: 529~535
- Xu J, Tanaka H, Shoyama Y (2007). One-step immunochromatographic separation and ELISA quantification of glycyrrhizin from traditional Chinese medicines. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 850 (1-2): 53~58
- Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen JG, Wu MJ, Perrot-Rechenmann C, Friml J, Jones AM, Yang Z (2010). Cell surface-and rho GTPase-base auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell*, 143 (1): 99~110
- Xu Z, Deng H, Deng X, Yang J, Jiang Y, Zeng D, Huang F, Shen Y, Lei H, Wang H et al (2012). Monitoring of organophosphorus pesticides in vegetables using monoclonal antibody-based direct competitive ELISA followed by HPLC-MS/MS. *Food Chem*, 131:1569~1576
- Yamaji Y, Maejima K, Ozeki J, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N et al (2012). Lectin-Mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell*, 24 (2): 778~793
- Zhang C, Guy CL (2005). Co-immunoprecipitation of Hsp101 with cytosolic Hsc70. *Plant Physiol Biochem*, 43 (1): 13~18
- Zhang H, Pelech S (2012). Using protein microarrays to study phosphorylation-mediated signal transduction. *Semin Cell Dev Biol*, 23 (8): 872~882
- Zhang QY, Chen H, Lin Z, Lin JM (2012b). Comparison of chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic microparticles with traditional colorimetric ELISA for the detection of serum α -fetoprotein. *J Pharmaceutic Analysis*, 2 (2): 130~135
- Zhang X, Facette M, Humphries JA, Shen Z, Park Y, Sutimantanapi D, Sylvester AW, Briggs SP, Smith LG (2012a). Identification of PAN2 by quantitative proteomics as a leucine-rich repeat-receptor-like kinase acting upstream of PAN1 to polarize cell division in maize. *Plant Cell*, 24 (11): 4577~4589
- Zhu S, Shimokawa S, Shoyama Y, Tanaka H (2006). A novel analytical ELISA-based methodology for pharmacologically active saikosaponins. *Fitoterapia*, 77 (2): 100~108