

棉花 *GhCOMT3* 基因的原核表达、纯化及鉴定

李 波,倪志勇,范 玲

(新疆农业科学院 核技术生物技术研究所,新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 为了深入研究 *GhCOMT3* 基因的功能,将 *GhCOMT3* 基因构建到原核表达载体 pET-28a 中,并转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中。用 0.2 mmol/L IPTG 诱导融合蛋白表达,结果发现,16℃ 诱导 12 h、30℃ 诱导 3 h 和 37℃ 诱导 3 h 后融合蛋白均以包涵体的形式表达;30℃ 诱导的蛋白表达量最大,之后对包涵体进行变性溶解,进行 SDS-PAGE 检测,再经过蛋白标记亲和层析柱(His TrapTM HP) 纯化得到变性的 pET-28a-*GhCOMT3* 融合蛋白,用 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测纯化效果,鉴定表达产物,目的蛋白相对分子量约为 39.119 kDa,检测结果与预期一致。结果表明, pET-28a-*GhCOMT3* 蛋白在大肠杆菌中获得了高效表达产物,为在蛋白水平上研究 *GhCOMT3* 基因功能奠定了基础。

关键词: *GhCOMT3*; 原核表达; 蛋白纯化; Western blotting

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)增刊-0012-05

Prokaryotic Expression, Purification and Identification of Caffeic acid-3-O-methyltransferase Gene from *Gossypium hirsutum* L.

LI Bo, NI Zhi-yong, FAN Ling

(Institute of Nuclear and Biological Technologies, Xinjiang Academy of Agriculture Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: To investigate the function of the *GhCOMT3* gene, the *GhCOMT3* gene was inserted into the pET-28a vector to construct fusion vector pET-28a-*GhCOMT3*, and transformed into *E. coli* BL21(DE3) cells. The fusion protein could be induced to express by 0.2 mmol/L IPTG, in the form of inclusion body at 16℃ for 4 h, 30℃ for 3 h or 37℃ for 3 h. The most high expression quantity was induced at 30℃ for 4 h. Then to dissolve inclusion body, the supernatants were analyzed by SDS-PAGE and the results were identified with expecting. Then the protein was purified using His TrapTM HP to get degenerated protein. SDS-PAGE and Western blotting were then employed to identify target protein, the results were identified with expecting. The prokaryotic expression system of pET-28a-*COMT3* is successfully constructed in this experiment. The fusion protein was positive by Western blotting. So we can say that pET-28a-*GhCOMT3* protein was expressed in *E. coli*. It can be used for further investigation on the function of the *GhCOMT3* gene in protein level.

Key words: *GhCOMT3*; Prokaryotic expression; Protein purification; Western blotting

咖啡酸-O-甲基转移酶(Caffeic acid O-methyltransferase, COMT) 是木质素代谢途径中的一个甲基化酶,可催化咖啡酸 5-羟基松柏醛和 5-羟基松柏醇甲基化分别生成阿魏酸、芥子醛和芥子醇,参与 S-木质素的合成^[1]。它在调控木质素的含量和组分中发挥着重要的作用,目前已经从烟草^[2]、杨树^[3]、苜蓿^[4]、玉米^[5]等不同植物中分离出 *COMT* 基因并通过转基因的方法对基因的功能进行了研究。前人

研究发现,在抑制 COMT 活性的转基因银合欢中, S-木质素的含量明显下降^[6]。Magalie 等^[7]通过反义抑制玉米中 COMT 活性表达, S-木质素含量也明显下降。在 COMT 活性几乎被全部抑制(活性残留不足 3%) 的转基因杨树中发现木质素含量降低^[8]。在转基因高羊茅中抑制 COMT 的活性,明显发现总木质素的含量降低。这些研究结果表明抑制 COMT 活性可以改变木质素的含量及组分。因此,在不同植物中深

收稿日期: 2010-03-15

基金项目: 国家“863”项目(2006AA10Z184); 农业部转基因重大专项课题(2009ZX08005-011B); 新疆自治区高技术研究发展计划项目(200611101); 国家自然科学基金项目(30660088)

作者简介: 李 波(1987-),男,天津人,硕士,主要从事作物分子生物学研究。

倪志勇(1981-),男,黑龙江人,助理研究员,硕士,主要从事作物分子生物学研究。

通讯作者: 范 玲(1958-),女,山西人,研究员,博士,主要从事棉花纤维品质分子机理和分子改良研究。

入研究 *COMT* 基因的功能,对调控植物木质素含量和组分具有重要的实际意义。

本实验室已经从棉花纤维中克隆出了 *COMT* 基因^[9],为了在蛋白水平上研究 *GhCOMT3* 基因功能,本研究构建 *GhCOMT3* 基因的原核表达载体 pET-28a-*GhCOMT3*,并转化到大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中,进行蛋白诱导。诱导后得到的目的蛋白呈包涵体形式存在,对包涵体进行变性溶解之后过 His-Tag 亲和层析柱纯化,获得纯化的目的蛋白,为进一步研究 *GhCOMT3* 基因的功能奠定了试验基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Sac* I、*T*₄-DNA 连接酶购于 Promega 公司, DNA Marker、质粒提取试剂盒购于北京百泰克公司,凝胶回收试剂盒购于大连 TaKaRa 公司,大肠杆菌 DH5 α 、BL21 (DE3) 感受态购于天根公司, pET-28a 表达载体、质粒 pMD-*GhCOMT3* 均由本实验室保存。Western 发光检测试剂盒,鼠抗血清和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购于 Sigma 公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *GhCOMT3* 基因的原核表达载体构建及鉴定

根据 *GhCOMT3* 基因的 cDNA 序列 (GenBank 登录

号为 FJ848869) 设计一对特异引物 (上游引物: 5'-ATAGGATCCATGGCAACCCAAATTGATTGTAA-3', 下游引物: 5'-TTAGAGCTCCAATTACTTAAAGAACTCATGATCCAGT-3') 扩增 *GhCOMT3* 基因序列,在两条引物上分别添加 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点。按照质粒提取试剂盒说明书,提取含 *GhCOMT3* 全长 cDNA 的 pMD-*GhCOMT3* 质粒,以 pMD-*GhCOMT3* 质粒为模板,扩增 *GhCOMT3* 基因序列。50 μ L 体系^[10]中含质粒 DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, 10 \times LA-PCR Buffer 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 2 μ L, 引物 (25 μ mol/L) 1 μ L, LA-Taq 0.5 μ L 和 ddH₂O。PCR 程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物置于 1% 琼脂糖中电泳,用紫外凝胶成像仪 (Bio-Rad) 观察结果,获得 PCR 产物,凝胶回收后用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切,在 *T*₄ DNA 连接酶作用下连接到以相同酶切后回收的 pET-28a 载体上,16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物热激转入 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,通过 PCR、酶切筛选阳性克隆,并对阳性克隆送上海美季公司测序验证。pET-28a-*GhCOMT3* 原核表达载体构建流程如图 1。利用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切测序正确的质粒,转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中^[11]。

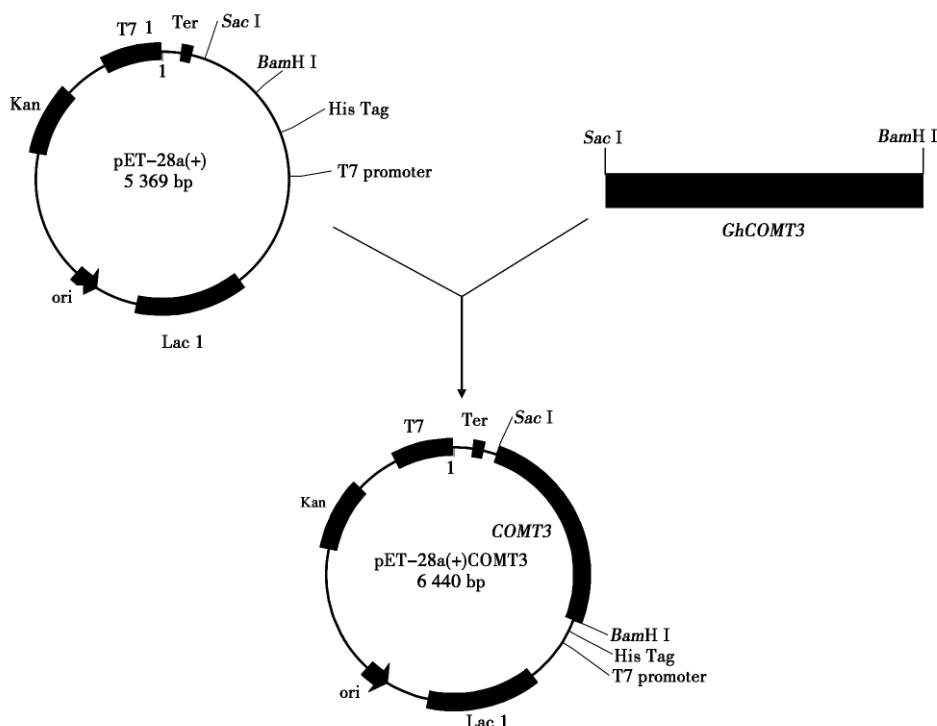


图 1 融合蛋白表达载体 pET-28a-*GhCOMT3* 的构建过程

Fig. 1 Sketch map of construction of fusion protein expression vector pET-28a-*GhCOMT3*

1.2.2 不同诱导温度对融合蛋白表达的影响及 SDS-PAGE 分析 接种含有重组质粒 pET-28a-Gh-

COMT3 的大肠杆菌 BL21(DE3) 在 LB 液体培养基 (含 50 mg/L Kan) 中培养 ,37℃ 下培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8。加 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L 进行诱导表达 ,分别用 30℃ 和 37℃ 诱导 3 h 后收集菌液 ,16℃ 诱导 12 h 后收集菌液 ,未加 IPTG 诱导的 pET-28a-GhCOMT3 菌液 3 h 后收集作为阴性对照。用 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌液并用 Binding Buffer 按照 1:10 的比例对离心沉淀进行稀释。取 5 mL 稀释后的菌液进行超声波破碎 ,然后以 10 000 r/min 的转速离心 10 min 分离上清和沉淀 ,上清和沉淀样品中分别加入 100 μ L ddH₂O 和 100 μ L 2 \times SDS 上样缓冲液 ,沸水浴 10 min ,取 10 μ L 上样进行 SDS-PAGE(5% 浓缩胶 ,12% 分离胶) ,然后分析蛋白表达结果。

1.2.3 融合蛋白的包涵体破碎 由于收集的蛋白属于难溶性蛋白 ,因此用 8 mol/L 尿素溶液对包涵体进行变性溶解。将超声波破碎后的沉淀按照 1:10 的比例加入 8 mol/L 的尿素溶液 ,将其置于 4℃ 条件下变性 8 h ,每隔 1 h 搅拌一次 ,使其充分溶解。然后用 0.22 μ m 的滤器进行过滤 ,收集滤液后进行纯化。

1.2.4 融合蛋白的纯化 将收集到的滤液用蛋白标记亲和层析柱进行纯化 ,依次分别用 20 mL Binding Buffer、10 mL ddH₂O、20 mL Charging Buffer 洗柱后 ,再加入 20 mL Binding Buffer(含 8 mol/L 尿素) 平衡柱子 ,加入 20 mL 滤液使目的蛋白吸附在层析柱上 ,用 10 mL 的 50 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱大肠杆菌自身表达的蛋白 ,再用 5 mL 的 200 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱目的蛋白 pET-28a-GhCOMT3 并收集^[12]。

1.2.5 蛋白免疫印迹(Western blotting) 分析 分别将目的蛋白及纯化蛋白经上样处理后进行 12% 的 SDS-PAGE 后 ,利用 Bio-Rad 半干转膜仪将电泳分离的蛋白胶转到 PVDF 膜上 ,5% 的脱脂奶粉封闭过夜 ,用 PBST 洗涤 ,加 2 000 倍稀释的鼠抗血清在杂交袋中杂交 1 h 后 ,PBST 洗涤 3 次 ,每次 5 min ,加入 5 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG ,室温杂交 1 h ,PBST 洗涤 3 次 ,每次 5 min ,然后在 PVDF 膜上加入 Western 发光检测液 A、B 各 50 μ L ,用保鲜膜封好放在暗匣内 ,再放入暗室里进行显影反应。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建及酶切鉴定

PCR 扩增 *GhCOMT3* 基因编码框 ,扩增产物大小约为 1 071 bp(图 2) ,与预期大小相符 ,且无非特异扩增带。将目的片段回收纯化后 ,用 *Bam*H I 和

Sac I 酶切 ,连接到相同酶切回收后的原核表达载体 pET-28a 上 ,热激转化 *E. coli* DH5 α ,获得 pET-28a-GhCOMT3 原核表达载体。对重组质粒进行双酶切鉴定 ,切出一条长约 1 071 bp 的条带(图 3) ,与预期大小一致 ,将阳性克隆测序 ,序列比对结果正确 ,表明 pET-28a-GhCOMT3 原核表达载体已构建成功。然后将酶切鉴定正确的阳性克隆质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE) 中 ,进行蛋白诱导。

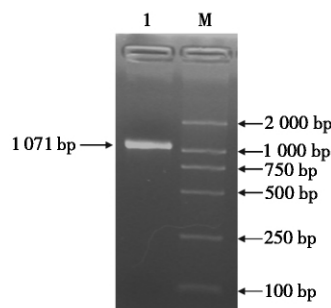
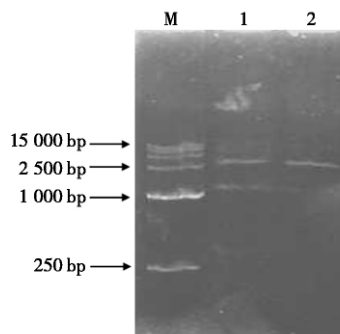


图 2 *GhCOMT3* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 The PCR amplification of *GhCOMT3* gene



M. DL15000 Maker; 1. *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 pET-28a-GhCOMT3;

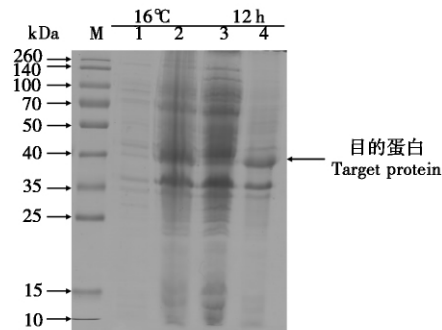
2. *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 pET-28a。

M. DL15000 Maker; 1. pET-28a-GhCOMT3 digested by *Bam*H I and *Sac* I; 2. pET-28a digested by *Bam*H I and *Sac* I.

图 3 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切鉴定 pET-28a-GhCOMT3

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid

pET-28a-GhCOMT3 digested by *Bam*H I and *Sac* I



M. 蛋白分子量 Marker; 1. 阴性对照;

2. 诱导的总蛋白; 3. 上清液; 4. 沉淀。

M. Molecular marker of proteins; 1. Negative control;

2. The total protein; 3. Supernatant; 4. Deposit.

图 4 16℃ 诱导表达 12 h 的 pET-28a-GhCOMT3 表达蛋白

Fig. 4 Expression of pET-28a-GhCOMT3

protein for 12 h at 16℃

2.2 不同诱导温度对融合表达蛋白的影响

为了确定融合蛋白 pET-28a-*GhCOMT3* 诱导表达所需要的最佳温度,首先用终浓度为 0.2 mmol/L IPTG 在 30℃ 和 37℃ 诱导 3 h,16℃ 诱导 12 h 后收集菌液,进行 SDS-PAGE 检测。结果表明,在三个不同的温度条件下,融合蛋白均能被诱导(图 4 5 6),在 30℃ 条件下的表达量最多,但是都是以包涵体的形式存在于沉淀中,因此,在后续蛋白诱导试验的温度均采用 30℃,需要对包涵体进行变性破碎。

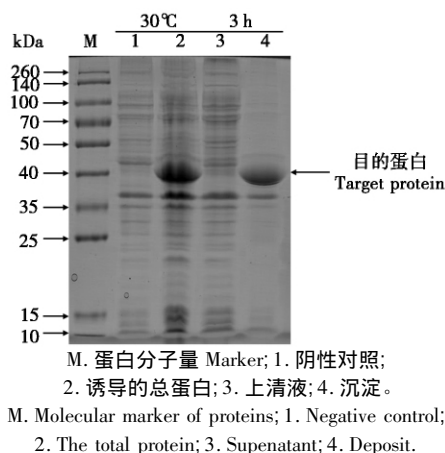


图 5 30℃诱导表达 3 h 的 pET-28a-*GhCOMT3* 表达蛋白

Fig. 5 Expression of pET-28a-*GhCOMT3* protein for 3 h at 30℃

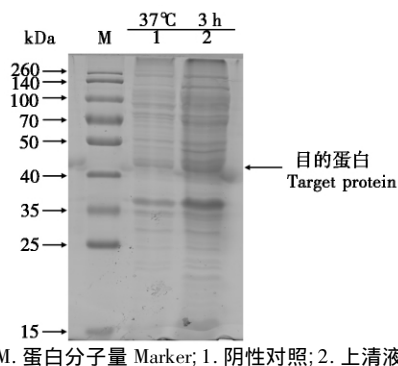


图 6 37℃诱导表达 3 h 的 pET-28a-*GhCOMT3* 表达蛋白

Fig. 6 Expression of pET-28a-*GhCOMT3* protein for 3 h at 37℃

2.3 融合蛋白的包涵体破碎及纯化

由于得到的融合蛋白是以包涵体的形式存在的,对包涵体进行超声破碎,并用 8 mol/L 尿素进行变性,进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 7),发现融合蛋白 pET-28a-*GhCOMT3* 以可溶性的形式表达。然后用组蛋白标记亲和层析柱对融合蛋白进行纯化,并进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果表明条带大小约为 39.119 kDa,没有出现杂带,目的蛋白纯度较高(图 8)。

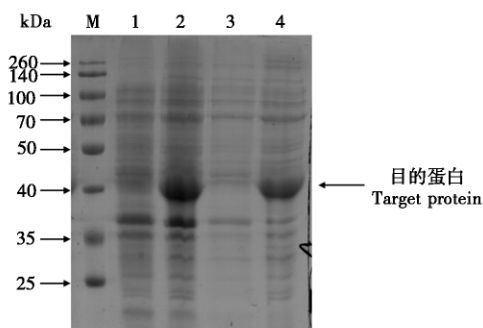


图 7 融合蛋白溶解性

Fig. 7 The character of fusion protein dissolving

2.4 Western 印迹

以鼠抗血清为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗进行 Western 印迹分析。结果表明,诱导表达的融合蛋白 pET-28a-*GhCOMT3* 与抗体发生特异性反应,压片定影显影后在底片上约 39.119 kDa 处有一明显条带(图 8),证明了该表达产物为预期产物。

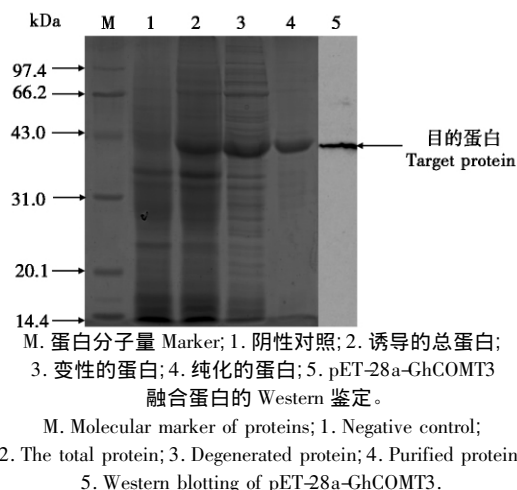


图 8 融合蛋白 pET-28a-*GhCOMT3* 纯化及 Western 鉴定

Fig. 8 Purification fusion protein and Western blotting analysis on expression of pET-28a-*GhCOMT3*

3 讨论

目前,实验室应用最广泛的表达系统为 pET 大肠杆菌表达系统,该系统具有操作方便、需时较短、表达量大等优点,而且能与 Tag 连接进行融合蛋白表达,目的蛋白易于纯化等优点^[13]。首先,pET 表达载体上的 T7 启动子能够与大肠杆菌 BL21(DE3)中噬菌体编码的 T7 RNA 聚合酶特异性结合,可以启动 T7 启动子下游的目标基因表达。T7 RNA 聚合酶活性很高,它转录合成 RNA 的速度要比大肠杆菌的 RNA 聚合酶快许多倍,同时又不会经常发生终

止转录^[14]。T7 RNA 聚合酶在 T7 启动子序列内启动目标基因的转录时的选择性很高,并且它不会启动大肠杆菌的其他基因的转录,因此能在大肠杆菌中得到高表达量的目的基因的产物^[15]。其次,pET 载体上含有 6~10 个组氨酸标签,能与目的蛋白的 N 末端或 C 末端形成融合蛋白,直接用 His-Tag 亲和层析法纯化目的蛋白^[16]。因此在本试验中选用了 pET-28a 表达载体来表达棉花 GhCOMT3 蛋白,在 GhCOMT3 基因上游引物的起始密码子 ATG 前引入了 BamH I 酶切位点,在下游引物的最后一个氨基酸密码子后引入 Sac I 酶切位点并且不含终止密码子,因此表达的目的蛋白的 C 端含有 6 个 His-Tag,由于组氨酸标签具有亲水性,不会对目的蛋白的结构和性质造成影响,因此不需要将其从目的蛋白中切除^[17]。

本研究发现用 0.2 mmol/L IPTG 浓度对 pET-28a-GhCOMT3 融合蛋白诱导表达 3 h 的效果最好,16℃ 和 30℃ 诱导时,His-COMT3 融合蛋白均以包涵体的形式表达,但 30℃ 诱导 3 h 比 16℃ 诱导 12 h 的表达量高,而 37℃ 诱导 3 h 后,融合蛋白的表达量很小。由于以重组蛋白以包涵体的形式存在,因此对包涵体进行变性处理使其溶解^[18]。包涵体采用 8 mol/L 尿素溶解,然后用 0.22 μm 的滤器进行过滤,可以把没有溶解的包涵体过滤掉,最后收集滤液进行纯化。之后采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 两种方法对纯化的目的蛋白进行鉴定,Western blot 试验过程中分别采用 5% 的 BSA 和 5% 的脱脂奶作为封闭液进行试验,结果表明用 5% BSA 试验条带虽然很清晰,但是封闭不够完整,出现杂带较多。用 5% 脱脂奶吸收比较完全,效果更好,因此最后选用 5% 脱脂奶作为封闭液,另外在 Western blot 时选用 Anti-His 抗体更容易鉴定得到的目的蛋白是否正确,从 SDS-PAGE 和 Western blot 的结果可以看出,目的蛋白的表达量很高,并且纯化效果很理想。

由于本试验纯化的目的蛋白溶于变性剂,所以在后续试验中首先要对目的蛋白进行复性,经过亲和层析获得的融合蛋白可以用于后续试验,例如 ELISA、凝胶阻滞、酶活性测定等,总之,本研究为在蛋白水平上研究 COMT3 基因的功能奠定了一定的试验基础。

参考文献:

- [1] O' Malley D, Whetten R W, Bao W *et al.* The role of laccase in lignification [J]. Plant J, 1993, 4(5): 751 - 757.
- [2] Sewalt V J H, Ni W, Blount J W *et al.* Reduced lignin

- content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. Plant physiology, 1997, 115(1): 41 - 50.
- [3] Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M *et al.* Structural alterations of lignins in transgenic poplar with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid O-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping [J]. Plant Physiology, 1999, 119(1): 153 - 164.
- [4] Guo D, Chen F, Inoue K *et al.* Down-regulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin [J]. Plant Cell, 2001, 13: 73 - 88.
- [5] Vignols F, Rigau J, Torres M A *et al.* The brown midrib3 (bm3) mutation in maize occurs in the gene encoding caffeic acid O-methyltransferase [J]. Plant Cell, 1995, 7(4): 407 - 416.
- [6] Rastogi S, Dwivedi U N. Down-Regulation of Lignin Biosynthesis in Transgenic Leucaena leucocephala Harboring O-Methyltransferase Gene [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22(3): 609 - 616.
- [7] Magalie P, Caroline D, Denise G. Variation in lignin and cell wall digestibility in caffeic acid O-methyltransferase down-regulated maize half-sibprogenies in field experiments [J]. Molecular Breeding, 2006, 18(3): 253 - 261.
- [8] 李波,倪志勇,王娟,等. 木质素生物合成关键酶咖啡酸-O-甲基转移酶基因(COMT)的研究进展[J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 117 - 124.
- [9] 倪志勇,吕萌,李波,等. 棉花咖啡酸-O-甲基转移酶基因的克隆及特征分析[J]. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1117 - 1126.
- [10] 倪志勇,李波,吕萌,等. 棉花肉桂醇脱氢酶基因的克隆与分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(2): 23 - 29.
- [11] 倪志勇,马文静,吕萌,等. 棉花肉桂醇脱氢酶基因 GhCAD6 的克隆及正义、反义与 RNAi 干扰载体的构建[J]. 华北农学报, 2009, 24(6): 20 - 26.
- [12] Fan L, Shi W J, Hu W R *et al.* Molecular and biochemical evidence for phenylpropanoid synthesis and presence of wall-linked phenolics in cotton fibers [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2009, 51(7): 626 - 637.
- [13] 单黎然,杨振,安宁,等. 泛素样小蛋白 4 (SUMO4) 的克隆、原核表达、纯化及鉴定[J]. 西北农林科技大学学报, 2008, 36(9): 11 - 16.
- [14] Bonner G, Lafer E M, Sousa R. Characterization of a set of T7 RNA polymerase active site mutants [J]. J Biol Chem, 1994, 269(40): 25120 - 25128.
- [15] Chamderlin M, Mcgrath J. New RNA polymerase from Escherichia coli infected with bacteriophage T7 [J]. Nature, 1970, 228(5268): 227 - 231.
- [16] Van Dyke M W, Sirito M, Sawadogo M. Single-step purification of bacterially expressed polypeptides containing an oligohistidine domain [J]. Gene, 1992, 11(1): 99 - 104.
- [17] 张付云,白雪芳,杜昱光,等. 烟草 SKPI 基因 cDNA 的克隆分析及原核表达[J]. 作物学报, 2007, 33(4): 693 - 696.
- [18] 董娜,张增艳,辛志勇. 病原诱导的小麦 ERF 转录因子 TaERF1b 的原核表达及纯化[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(3): 283 - 287.