

# 青花菜 *BoPGIP1* 基因的原核表达及其重组大肠杆菌的抗逆性分析

张 骏

(青岛农业大学 生命科学学院,山东省高校植物生物技术重点实验室,山东 青岛 266109)

**摘要:**为进一步验证青花菜 *BoPGIP1* 基因的功能,通过 RT-PCR 方法克隆得到青花菜 *BoPGIP1* 基因完整的编码区序列,将其克隆到原核表达载体 pET28a(+)上,转化大肠杆菌 BL21(DE3),获得高效表达 *BoPGIP1* 基因的重组大肠杆菌 BL21(pET28a-*BoPGIP1*),重组菌经 IPTG 诱导表达以及 SDS-PAGE 电泳检测,结果表明,在 37 kDa 处有一条特异表达的蛋白质条带,与预期的目的产物大小一致;同时对重组大肠杆菌 BL21(pET28a-*BoPGIP1*)的抗逆性进行分析,结果表明,BL21(pET28a-*BoPGIP1*)对 NaCl(0.4 mol/L)、NaHCO<sub>3</sub>(0.2 mol/L)和 PEG6000(20%)的抗性明显高于对照菌株 BL21(pET28a),该抗性的证明为 *BoPGIP1* 基因在植物抗逆基因工程中的应用提供了理论依据。

**关键词:**青花菜;*BoPGIP1*;原核表达;抗性分析

中图分类号:Q78;S634.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)01-0024-05

doi:10.7668/hbnxb.2015.01.005

## Prokaryotic Expression of *BoPGIP1* Gene from Broccoli and Stress Tolerance of *E. coli* BL21 Expressing *BoPGIP1* Gene

ZHANG Tao

(Life Science College, Qingdao Agricultural University, Key Lab of Plant Biotechnology  
in Universities of Shandong Province, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** In order to further verify the broccoli *BopGIP1* genes function, the complete coding sequence of *BoPGIP1* (993 bp) for protein expression was amplified by RT-PCR with gene specific primers designed according to multiple clone sites in prokaryotic expression vector pET28a(+) and *BoPGIP1* which was obtained in author's previous experiment. The gene was cloned into pET28a(+) vector, and transferred into *E. coli* strain BL21 (DE3) for heterologous expression after induced by IPTG. SDS-PAGE was used to analyze expression of the target protein. The result showed that there was a specific band at about 37 kDa in size, which was identical with the expected molecular weight of the recombinant protein. Meanwhile, stress tolerance of *E. coli* BL21 expressing *BoPGIP1* gene was analyzed. The results indicated that *E. coli* line BL21 (pET28a-*BoPGIP1*) had more obvious tolerance to salt, alkali and dry stress than *E. coli* BL21 (pET28a), these provide preliminary information for the application of *BoPGIP1* gene in plant gene engineering.

**Key words:** Broccoli; *BoPGIP1*; Prokaryotic expression; Stress resistance

多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白 (Polygalacturonase-inhibitory proteins, PGIPs) 是近年来研究较多的一种植物防御蛋白,其在植物防卫反应、生长发育、感受环境胁迫等方面发挥着重要的作用。PGIPs 富含亮氨酸重复序列 (LRRs), 通过 LRR 基序中暴露

于外表面的氨基酸残基与多聚半乳糖醛酸酶 (Endopolygalacturonases, endo-PGs) 活性位点的氨基酸残基相互作用,形成一种高亲复合物,从而抑制病原菌 endo-PG 的活性,抑制真菌对植物细胞壁的降解,维持植物细胞壁的完整性;此外,两者相互作用导致植

收稿日期:2014-11-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31101556)

作者简介:张 骏(1975-),女,黑龙江双鸭山人,副教授,博士,主要从事园艺植物重要性状的分子调控研究。

物体内寡聚半乳糖醛酸累积,该物质的积累进一步激发植物自身的防卫反应,增强植物抗性<sup>[1-3]</sup>。在植物抗病育种中,PGIP 已成为关注的焦点和研究的热点之一。自从 1992 年 Toubart 等首次从菜豆中克隆到 2 个 PGIPs 基因以来,国内外已先后从 25 个属 45 种植物中克隆到了 PGIP 基因或片段<sup>[4-15]</sup>。这些丰富的基因资源为植物抗性品种的选育提供了保障。

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica*)属十字花科芸薹属甘蓝中能形成花球的一个变种,营养成分齐全且含量高,位居甘蓝类蔬菜之首。近年来因消费需求增加和农业产业结构调整,种植面积逐年增加,随着种植年限的增加,各种病害也日益明显,有效地防治病害已成为青花菜生产上的一个重要课题。在前期的工作中,笔者已从青花菜中获得一个新的 PGIP 基因 *BoPGIP1* (JF325879),Blast 结果表明,该基因与甘蓝型油菜 PGIP (AF531456)在氨基酸水平的相似达 89.9%,同时含有典型的 LRR 序列,属于 PGIP 基因家族新成员<sup>[16]</sup>。为了进一步验证该基因的功能,本研究在此基础上将青花菜 *BoPGIP1* 基因构建到原核表达载体 pET28a(+)上,利用 IPTG 诱导其在大肠杆菌 BL21(DE3)中高效表达,同时对重组大肠杆菌 BL21(pET28a-*BoPGIP1*)进行了抗逆性分析,以期为该基因在青花菜抗病抗逆育种中的应用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

供试材料为优质早熟青花菜品种绿峰 70,种子播种于装有蛭石和珍珠岩的苗钵中,玻璃温室中生长,常规管理。在开花期选取健康饱满的花蕾,75% 的酒精擦洗干净,做好标记,立即投入液氮中固定,-80℃低温冰箱保存,用于 RNA 的提取。

### 1.2 主要试剂

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , BL21(DE3)感受态细胞与 pET-28a(+)载体由青岛农业大学植物分子与细胞生物学实验室保存提供;限制性内切酶, pMD18-T vector 和反转录试剂盒购于 TaKaRa(大连)公司;植物总 RNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒购于北京天根生物科技有限公司;DNA 聚合酶、IPTG、Kan 和 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳试剂盒等购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。

### 1.3 RNA 提取和 cDNA 合成

参照植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根)说明书提取青花菜花蕾总 RNA,1.2% 琼脂糖凝胶电泳

检测 RNA 的提取质量;利用 Oligo dT 引物逆转录合成第一链,具体步骤按照宝生物工程(大连)有限公司 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行。

### 1.4 青花菜 *BoPGIP1* 基因 ORF 全长序列的克隆

根据已克隆的青花菜 *BoPGIP1* (JF325879)基因的 DNA 全长序列和 pET28a(+)载体的 MCS 位点,设计合成基因特异引物, *FNde* I: 5'-CGCCATATGATGGATAAGATAACGACACTGCTC-3'; *RXho* I: 5'-GAATTCTCACTTGCAACTCTGAAGAGGT-3';下划线部分为酶切位点。以合成的一链 cDNA 为模板, *FNde* I/*RXho* I 为引物对,用 *Taq* + *Pfu* DNA 高保真聚合酶对青花菜 *BoPGIP1* 基因的 ORF 序列进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94℃ 5 min 预变性;94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 5 min。PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳鉴定回收后,克隆到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 感受态细胞,菌落 PCR 筛选阳性克隆,重组质粒命名为 pMD18T-*BoPGIP1*,进行测序验证。

### 1.5 青花菜 *BoPGIP1* 基因原核表达载体的构建及鉴定

用 *Nde* I 和 *Xho* I 从 pMD18T-*BoPGIP1* 上双酶切切下 *BoPGIP1* 基因 ORF 片段,同样用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切原核表达载体 pET-28a(+),*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,37℃培养过夜后,在 Kan(50  $\mu$ g/mL)抗性的 LB 平板上挑取单菌落,进行菌落 PCR 检测,阳性克隆用于测序验证,将构建的重组质粒命名为 pET28a-*BoPGIP1*。

### 1.6 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达及检测

将 pET28a-*BoPGIP1* 和对照 pET28a(+)转入表达菌株 BL21(DE3)感受态细胞中,转化体铺于含 Kan(50  $\mu$ g/mL)的 LB 平板上,37℃过夜培养。挑取单菌落在含 Kan(50  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中振荡培养过夜,次日按 1:100 的比例,取 1 mL 的过夜培养物接入 100 mL 含 Kan(50  $\mu$ g/mL)的 LB 液体培养基中进行扩大培养,37℃振荡培养 3 h 以上,至 OD<sub>600</sub> 为 0.5~0.6。取出 1 mL 未经诱导的培养物作为阴性对照,在剩余培养物中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,30℃诱导培养 4 h。

配制 5% 浓缩胶,12% 分离胶。取 1 mL 诱导产物于微量离心管中,室温高速离心 1 min。沉淀悬于 100  $\mu$ L 2 $\times$ 样品缓冲液(10% SDS 2 mL, $\beta$ -巯基乙醇 0.5 mL、蔗糖 4 g、溴酚蓝 2 mg、0.05 mol/L Tris-HCl(pH 值 8.0)2 mL,dH<sub>2</sub>O 加至总体积 10 mL),沸

水浴变性 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳,检测蛋白表达情况。

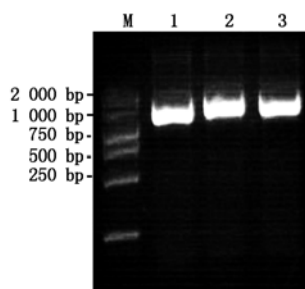
### 1.7 重组大肠杆菌的抗性分析

对重组大肠杆菌 BL21 (pET28a-*BoPGIP1*) 进行了抗性分析,分别取经 IPTG 诱导后的重组菌和非重组菌液 1 mL,按 1:100 比例稀释,加入到含 NaCl、NaHCO<sub>3</sub> 和 PEG6000 的 LB 液体培养基中,使其终浓度依次为 0.4 mol/L、0.2 mol/L 和 20%,37 ℃ 220 r/min 继续振荡培养,每隔 1 h 测定 OD<sub>600</sub> 值,每个处理设置 3 个重复,无胁迫处理的菌液作为对照。根据 OD 值测定结果分析抗性。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的片段的 PCR 扩增及产物克隆

提取青花菜花蕾总 RNA,反转录合成 cDNA 一链,以青花菜花蕾 cDNA 为模板,FNde I 和 RXho I 作为上下游的引物扩增青花菜 *BoPGIP1* 基因的 ORF 序列,扩增得到的产物经琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果表明(图 1),扩增得到了与预期目标片段一致的约 1 kb 左右的 DNA 片段。将目的基因克隆到 pMD18-T 载体上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,重组质粒命名为 pMD18T-*BoPGIP1*,委托上海生物工程有限公司进行测序。测序结果表明,PCR 扩增产物长度 993 bp,编码 330 个氨基酸序列,编码蛋白质的分子量为 37 kDa。



M. Marker;1~3. 扩增的电泳结果。  
M. Marker;1~3. The result of amplification.

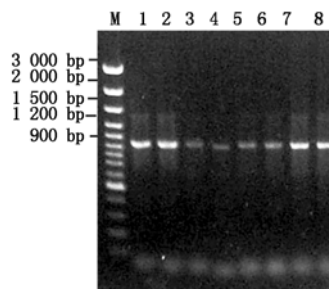
图 1 青花菜 *BoPGIP1* 基因 ORF 序列的扩增

Fig.1 ORF sequence amplification of *BoPGIP1*

### 2.2 原核表达载体 pET28a-*BoPGIP1* 的构建及验证

将重组质粒 pMD18T-*BoPGIP1* 用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切下目的片段,同样用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切原核表达载体 pET28a(+),在 T<sub>4</sub> DNA 连接酶作用下连接过夜,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,铺于含 Kan (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 平板。在平板上挑取单菌落,进行菌落 PCR 验证,结果(图 2)检测得到一条特异性条带,大小与 *BoPGIP1* 基因的 ORF 序列大小一致,测序结果证实构建的融合表达载体 pET28a-*BoPGIP1* 插入序列与目的序列完全吻合,说

明筛选的重组子为阳性克隆,可用于后续试验。



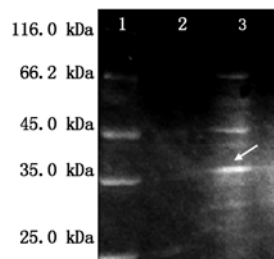
M. Marker;1~8. pET28a-*BoPGIP1* 的 PCR 扩增。  
M. Marker;1~8. The result of amplification.

图 2 pET28a-*BoPGIP1* 的菌液 PCR 检测结果

Fig.2 Amplification of pET28a-*BoPGIP1*

### 2.3 重组质粒 pET28a-*BoPGIP1* 的诱导表达和 SDS-PAGE 电泳检测

将重组质粒 pET28a-*BoPGIP1* 转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,在含 Kan (50  $\mu$ g/mL) 的 LB 新鲜培养基中加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,在 30 ℃ 条件下诱导表达 4 h,表达的 SDS-PAGE 电泳图谱结果显示(图 3),在 37 kDa 处有一条特异的蛋白质条带,与预期的目的产物大小一致,在空载体中没有出现相同的条带。



1. 标准蛋白;2. pET28a(+) 诱导表达;3. pET28a-*BoPGIP1* 诱导。  
1. Protein Marker;2. pET28a(+) with induction;3. pET28a-*BoPGIP1* with induction.

图 3 IPTG 诱导 pET28a-*BoPGIP1* 表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.3 SDS-PAGE analysis for expression of pET28a-*BoPGIP1* fusion protein with IPTG induction

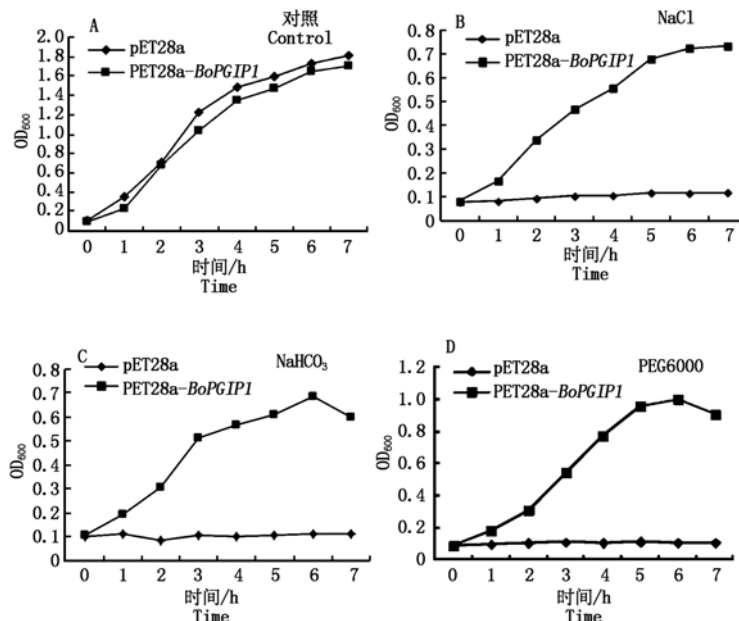
### 2.4 重组大肠杆菌 BL21 (pET28a-*BoPGIP1*) 的抗性分析

对经 IPTG 诱导 4 h 后的重组菌 BL21 (pET28a-*BoPGIP1*) 和对照菌 BL21 (pET28a) 在 NaCl (0.4 mol/L)、NaHCO<sub>3</sub> (0.2 mol/L) 和 PEG6000 (20%) 处理下的抗性进行了分析,以无胁迫处理的重组和非重组菌液作为对照。结果表明,在无胁迫处理条件下,2 个菌株的生长呈典型的“S”曲线,很快进入对数生长期,在静止生长期最大的 OD<sub>600</sub> 值都接近 2,说明 *BoPGIP1* 基因的表达几乎不影响大肠杆菌 BL21(DE3) 的正常生长(图 4-A)。

将 BL21 (pET28a-*BoPGIP1*) 和 BL21 (pET28a) 转接到含 NaCl (0.4 mol/L)、NaHCO<sub>3</sub> (0.2 mol/L)

和 PEG6000 (20%) 培养基时, 目测以及  $OD_{600}$  值测定结果表明 (图 4-B、C、D), 在 3 种胁迫处理下, 随着时间的延长, 重组菌 BL21 (pET28a-*BoPGIP1*) 均有不同程度的持续生长,  $OD_{600}$  值呈上升趋势, 而对

照组 BL21 (pET28a) 几乎不能生长,  $OD_{600}$  值无明显变化, 从结果可以看出, 重组菌对盐、碱和干旱的抗性明显高于对照菌, 即 *BoPGIP1* 基因的表达提高了重组菌的抗逆性。



A. 无胁迫处理下的  $OD_{600}$  值测定结果; B. NaCl 处理下  $OD_{600}$  值测定结果;  
C.  $NaHCO_3$  处理下  $OD_{600}$  值测定结果; D. PEG6000 处理下  $OD_{600}$  值测定结果。  
A. Detection of  $OD_{600}$  value of control; B. Detection of  $OD_{600}$  value of NaCl stress;  
C. Detection of  $OD_{600}$  value of  $NaHCO_3$  stress; D. Detection of  $OD_{600}$  value of PEG6000 stress.

图 4 重组大肠杆菌和对照菌株在不同胁迫处理下的  $OD_{600}$  测定结果

Fig. 4 Detection of  $OD_{600}$  value of recombinant strain and control strain in different stresses

### 3 讨论

PGIP 是一种特异性结合和抑制病原物分泌的内切 PG 活性的细胞壁结合蛋白<sup>[17]</sup>, 阻止病原物的侵入和发展; PGIPs 富含亮氨酸重复 (LRR) 序列, 具有 LRR 单元的 PGIP 属于 LRR 蛋白超家族。在植物中, LRR 蛋白在信号传导、发育和防御方面起到重要作用。自从 1971 年 Albersheim 和 Anderson<sup>[18]</sup> 在蚕豆和西红柿的细胞壁中首先发现 PGIP 以来, 至今已在 20 多个属的多种植物中发现这类蛋白<sup>[19-21]</sup>。所克隆的 PGIP 基因一部分与抗病基因相关, 一部分是与植物发育相关的类受体蛋白, 根据其核苷酸序列推导氨基酸序列, 发现它们都含有 LRR 结构, 表明它们可能涉及蛋白质间的相互作用和信号传导。

大肠杆菌表达系统是外源基因表达技术中发现最早、应用最广泛的原核表达系统。与其他表达系统相比, 该系统具有很多的优点, 例如遗传背景和生化特性非常清楚、操作简便、成本低、周期短、表达蛋白可大量生产, 且易于纯化等。随着分子生物学的发展, 目前所报道的抗病蛋白基因日益增多。为了

尽快明确这些抗病蛋白在植物基因工程育种上的应用潜力, 一般可将抗病蛋白基因克隆出来, 使其在大肠杆菌中高效表达, 再把表达的抗真菌蛋白分离、纯化出来, 进而研究这些抗真菌蛋白的抑菌活性。

本研究通过 RT-PCR 方法已成功克隆了青花菜 *BoPGIP1* 基因的 ORF 序列, 序列全长 993 bp, 推测完整的开放阅读框编码的蛋白由 330 个氨基酸残基组成, 分子量大约为 37 kDa; 同时为进一步了解 PGIP 蛋白在青花菜中具体的生物化学与分子生物学功能, 为从蛋白质水平上进行深入研究, 本研究在此基础上将完整的编码区序列连接至原核表达载体 pET28a(+) 中, 成功构建了原核表达载体 pET28a-*BoPGIP1*, 诱导其在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中实现表达, 同时对重组菌 BL21 (pET28a-*BoPGIP1*) 的抗逆性进行了分析, 结果表明, *BoPGIP1* 基因在大肠杆菌中表达后能够赋予菌株良好的抗性, 该抗性的证明为 *BoPGIP1* 基因在植物抗逆基因工程的应用提供了资料, 为下一步研究该基因的功能提供了依据。

### 参考文献:

- [1] De Lorenzo G, Ferrari S. Polygalacturonase-inhibiting pro-

- teins in defense against phytopathogenic fungi[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4): 295 – 299.
- [2] Federici L, Di Matteo A, Fernandez-Recio J, *et al.* Polygalacturonase inhibiting proteins: players in plant innate immunity[J]. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(2): 65 – 70.
- [3] Gomathi V, Gnanamanickam S S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence[J]. *Current Science*, 2004, 87(9): 1211 – 1217.
- [4] Cheng Q, Cao Y, Pan H, *et al.* Isolation and characterization of two genes encoding polygalacturonase-inhibiting protein from *Populus deltoides* [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35(10): 631 – 638.
- [5] Chimwamurombe P M, Botha A M, Wingfield M J, *et al.* Molecular relatedness of the polygalacturonase-inhibiting protein genes in Eucalyptus species [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102(4): 645 – 650.
- [6] D'ovidio R, Raiola A, Capodicasa C, *et al.* Characterization of the complex locus of bean encoding polygalacturonase-inhibiting proteins reveals subfunctionalization for defense against fungi and insects [J]. *Plant Physiology*, 2004, 135(4): 2424 – 2435.
- [7] Di C, Li M, Long F, *et al.* Molecular cloning, functional analysis and localization of a novel gene encoding polygalacturonase-inhibiting protein in *Chorisporea bungeana* [J]. *Planta*, 2009, 231(1): 169 – 178.
- [8] Faize M, Sugiyama T, Faize L, *et al.* Polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from Japanese pear: possible involvement in resistance against scab [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 63(6): 319 – 327.
- [9] Gotoh Y, Nalumpang S, Isshiki A, *et al.* A cDNA encoding polygalacturonase-inhibiting protein induced in citrus leaves by polygalacturonase of *Alternaria citri* [J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2002, 68(1): 57 – 61.
- [10] Haas B J, Volfovsky N, Town C D, *et al.* Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation [J]. *Genome Biology*, 2002, 3(6): Research 0029. 01 – 0029. 12.
- [11] Janni M, Sella L, Favaron F, *et al.* The expression of a bean PGIP in transgenic wheat confers increased resistance to the fungal pathogen *Bipolaris sorokiniana* [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI*, 2008, 21(2): 171 – 177.
- [12] Kemp G, Bergmann C W, Clay R, *et al.* Isolation of a polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from wheat [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI*, 2003, 16(11): 955 – 961.
- [13] Liang F S, Zhang K C H, ChJ Zhou, *et al.* Cloning, characterization and expression of the gene encoding polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) of peach (*Prunus persica* (L.) Batch) [J]. *Plant Sci*, 2005, 168: 481 – 486.
- [14] Nakamura N, Marutani M, Sanematsu S, *et al.* Phylogenetic classification of dof-type transcription factors in pea (*Pisum sativum*) [J]. *Plant Biotechnology*, 2003, 20: 247 – 253.
- [15] Spinelli F, Mariotti L, Mattei B, *et al.* Three aspartic acid residues of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) from *Phaseolus vulgaris* are critical for inhibition of *Fusarium phylophilum* PG [J]. *Plant Biology*, 2009, 11(5): 738 – 743.
- [16] 张 骏. 青花菜 *BoPGIP1* 基因的分子克隆及其生物学信息学分析 [J]. *华北农学报*, 2009, 24(4): 26 – 30.
- [17] Cervone F, De Lorenzo G, Darvill A. Can *Phaseolus* PGIP inhibit pectin enzymes from microbes and plants [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(2): 447 – 449.
- [18] Albersheim P, Anderson A J. Proteins from plant cell walls inhibit polygalacturonases secreted by plant pathogens [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1971, 68(8): 1815 – 1819.
- [19] Toubart P, Desiderio A, Salvi G, *et al.* Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L [J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 1992, 2(3): 367 – 373.
- [20] Johnson L A, Soltis D E. Phylogenetic inference in Saxifragaceae sensu stricto and Gilia (Polemoniaceae) using matK sequences [J]. *Annals of the Missouri Botanical Gardens*, 1995, 82(2): 149 – 175.
- [21] Stotz H U, Powell A L, Damon S E, *et al.* Molecular characterization of a polygalacturonase inhibitor from *Pyrus communis* L. cv Bartlett [J]. *Plant Physiology*, 1993, 102(1): 133 – 138.