

拟南芥抗病相关基因 *T1N6_22* 的原核表达分析

蒋琛茜¹, 瓮巧云², 樊锦涛¹, 王冠宇¹, 董丽萍¹, 邢继红¹, 董金皋¹

(1. 河北农业大学, 真菌毒素与植物分子病理学实验室, 河北 保定 071001; 2. 河北北方学院 农林科技学院, 河北 张家口 075000)

摘要: 为构建拟南芥抗病相关 *T1N6_22* 基因的原核表达载体并进行高效表达, 获得纯化的 *T1N6_22* 蛋白, 以拟南芥 Col-0 的 cDNA 为模板, 扩增获得了 *T1N6_22* 基因 CDS, 对其进行克隆、测序后与含有 GST 标签蛋白的 pGEX4T-1 载体相连, 构建 *T1N6_22* 的原核表达载体 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST。经酶切和测序鉴定正确后, 将构建好的载体及空载体转化大肠杆菌 BL21。结果表明, 在大肠杆菌 BL21 菌株中成功表达了与标签蛋白融合的 *T1N6_22* 蛋白, 大小约 57 kDa。SDS-PAGE 分析表明, 高效表达的诱导条件为 0.1 mmol/L IPTG 诱导培养 3 h。研究结果为进一步 *T1N6_22* 互作蛋白的筛选及其调控拟南芥抗病分子机制的研究奠定了基础。

关键词: 拟南芥; *T1N6_22*; 原核表达; 纯化

中图分类号: S432.1; Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2015)01-0073-04

doi: 10.7668/hbxb.2015.01.012

Prokaryotic Expression Analysis of Resistance-related Gene *T1N6_22* from *Arabidopsis thaliana*

JIANG Chen-xi¹, WENG Qiao-yun², FAN Jin-tao¹, WANG Guan-yu¹,
DONG Li-ping¹, XING Ji-hong¹, DONG Jin-gao¹

(1. Mycotoxin and Molecular Plant Pathology Laboratory, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;
2. College of Agriculture and Forestry Science and Technology, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

Abstract: This study was aimed to construct prokaryotic expression vector of resistance-related gene *T1N6_22* from *Arabidopsis thaliana* and obtain the purified protein *T1N6_22* with high-efficiency expression. The CDS of *T1N6_22* was amplified by RT-PCR technology using the cDNA of the *Arabidopsis* Col-0 and was fused into a prokaryotic expression vector pGEX4T-1. Restriction enzyme digestion and sequencing showed that the recombinant vector pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST was successfully constructed and transformed into *E. coli* BL21 cells. The results indicated that the pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST with the predicted molecular weight of about 57 kDa was successfully expressed in *E. coli* BL21 strain. SDS-PAGE indicated that the best expression quantity was induced with 0.1 mmol/L IPTG treatment for 3 h. These results would provide basis for screening interacting proteins of *T1N6_22* and the regulation mechanism in *Arabidopsis* resistance.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *T1N6_22*; Prokaryotic expression; Purification

病原菌是影响植物正常生长, 使作物减产的最重要的因素之一, 常给农业生产造成重大的经济损失。分离植物抗病相关基因, 研究其抗病分子机制, 为植物抗病信号通路的完善奠定基础, 进而培育抗病新品种是防治病害的有效途径。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 是研究植物与病原菌互作的典型模

式植物, 近年来, 所获得的大部分植物抗病基因及抗性相关基因均是从拟南芥中获得的, 如 *RPS2*^[1]、*RPS4*^[2]、*RPP8*^[3]、*RPP13*^[4]、*RAC1*^[5]、*RPW8*^[6] 等。*R2R3MYB*^[7] 家族中的转录因子 *BOS1*^[8], 该基因功能缺失使植物对灰霉病菌更加敏感, 对丁香假单胞杆菌抗性增强。*MYB30*^[9-10] 是植物过敏反应的正

收稿日期: 2014-11-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200203); 河北省自然科学基金项目(C2012204032; C2014405010); 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20121302120007)

作者简介: 蒋琛茜(1988-), 男, 河北石家庄人, 在读硕士, 主要从事植物抗病研究。蒋琛茜、瓮巧云为同等贡献作者。

通讯作者: 邢继红(1977-), 女, 河北东光人, 教授, 博士, 主要从事植物与病原物互作研究。

董金皋(1963-), 男, 河北邢台人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物病理学研究。

调控因子,过表达 *MYB30* 的烟草和拟南芥对丁香假单胞杆菌的抗性增强,*MYB30* 引起的过敏反应需要 SA 的积累但不依赖 *NPR1*^[11-12] 基因。乙烯响应因子(ERF)家族中 *ERF5*、*ERF6*^[13] 可以正调控拟南芥对灰葡萄孢的抗性。河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室前期获得了拟南芥抗病相关基因 *T1N6_22*,明确了该基因主要通过 SA 和 JA 信号途径正调控拟南芥抗灰葡萄孢过程,负调控拟南芥抗丁香假单胞杆菌过程^[14],但 *T1N6_22* 基因抗病的分子机制尚不明确。本试验通过对 *T1N6_22* 基因进行原核表达,获得纯化的 *T1N6_22* 蛋白,为进一步 *T1N6_22* 互作蛋白的筛选及其调控拟南芥抗病分子机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

拟南芥 Col-0 由美国 ABRC 购得;大肠杆菌 DH5 α 、BL21 由本实验室保存;原核表达载体 pGEX4T-1 由 Pharmacia Biotech 公司购得;RNA 提取试剂、反转录试剂盒由北京全式金公司购得;PCR 所用试剂、限制性内切酶、连接酶、相对分子量标准由大连宝生物公司购得;引物合成、基因测序由上海生工生物公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 *T1N6_22* 基因 CDS 序列的克隆 从 4 周龄拟南芥叶片中提取总 RNA,反转录获得其 cDNA。根据拟南芥数据库 TAIR 提供的 *T1N6_22* 序列设计基因特异性引物,*T1N6_22*-F(5'-CGGAATTCATGGCAGACCCAAGAGTT-3')、*T1N6_22*-R(5'-CCGCTCGAGTCAAAAAGTTGGAGACATT-3'),下划线部分为酶切位点 *EcoR* I 和 *Xho* I。将扩增产物连接克隆载体 pMD19-T,对 *T1N6_22* 基因进行测序。

1.2.2 *T1N6_22* 基因原核表达载体的构建与鉴定 测序正确的 pMD19-T-*T1N6_22* 和空载体 pGEX4T-1 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 进行双酶切,回收其目的条带,并用 T4 DNA 连接酶进行连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,挑取克隆进行酶切鉴定,构建重组载体 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST,将其与空载体 pGEX4T-1 分别转化大肠杆菌 BL21,对阳性克隆验证正确后进行诱导表达。

1.2.3 IPTG 不同诱导浓度对 *T1N6_22* 蛋白表达的影响 将转入重组载体 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 和空载体 pGEX4T-1 的 BL21 大肠杆菌在 LB 液体培养基中培养过夜,按 1:50 比例转接到 30 mL LB 液体培养基中,培养至 OD₆₀₀ 约 0.7 左右,分别加入不同

浓度的 IPTG 至终浓度为 0.1,0.2,0.4,0.8 mmol/L,37 °C 诱导 4 h,收集菌体,弃去上清,用 4 \times 上样缓冲液和水重悬菌体沉淀,沸水浴 15 min,离心后取上清进行 SDS-PAGE(5% 浓缩胶、12% 分离胶)检测目的蛋白表达情况,从而确定诱导表达的最适 IPTG 浓度。

1.2.4 不同诱导时间对 *T1N6_22* 蛋白表达的影响

按上述方法,以最适的 IPTG 诱导浓度,37 °C 诱导重组载体 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 和空载体 pGEX4T-1 的表达,分别在 0.5,1,2,3,4 h 收集菌体,提取总蛋白,进行 SDS-PAGE 检测目的蛋白表达情况,从而确定诱导表达的最佳时间。

1.2.5 *T1N6_22* 蛋白的提取及纯化 以确定的最适 IPTG 浓度和最佳诱导表达时间,在 37 °C 进行诱导表达,收集菌体,弃去上清,用 pH 值 8.3 的 Tris-HCl 缓冲液重悬菌体,通过超声波细胞破碎仪破碎菌体,超声波功率 100 W、工作 5 s、间隙 10 s、50 次循环,至菌液变为澄清,离心收集上清液,以上操作均在低温进行,上清于 4 °C 保存备用。

使用 GST 亲和的纯化基质对收集的上清液进行目的蛋白的纯化,吸取 300 μ L 纯化基质于 2 mL 离心管中,用冰上预冷的 Tris-HCl 缓冲液洗涤 2 次。在离心管中加入 1.5 mL 上清液,颠倒混匀,90 r/min 冰浴摇动 1 h,使上清液中带 GST 标签的 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 目的蛋白与纯化基质充分结合。12 000 r/min 离心,弃去上清,保留基质,用 1 mL Tris-HCl 缓冲液洗涤 3 次,除去不能与基质结合的杂蛋白。洗脱液使用 5 mL 0.1 mol/L Tris、0.061 4 g 谷胱甘肽还原型、0.1 mol/L HCl 调 pH 值至 8.3,加水至 10 mL。Tris-HCl 洗涤后的纯化基质,用 1 mL 洗脱液、90 r/min 冰浴摇动 1 h,使与基质结合的目的蛋白脱离,收集洗脱液,进行 SDS-PAGE(5% 浓缩胶、12% 分离胶)检测目的蛋白的纯化情况,洗脱液 4 °C 保存。

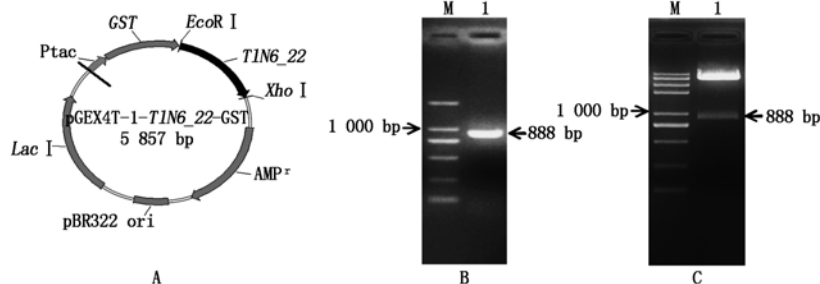
2 结果与分析

2.1 *T1N6_22* 基因的扩增及原核表达载体的构建

T1N6_22 基因原核表达载体 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 的构建如图所示(图 1-A)。使用基因特异性引物扩增 *T1N6_22* 基因的 CDS,得到大小约 888 bp 的条带(图 1-B),与预期大小一致。回收目的条带,连接克隆载体 pMD19-T 并转化大肠杆菌 DH5 α ,对阳性克隆测序鉴定,序列与 TAIR 数据库提供的序列一致。使用 *EcoR* I 和 *Xho* I 对 pMD19-T-*T1N6_22* 载体和空载体 pGEX4T-1 进行双酶切,回

收相应条带并连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取克隆进行酶切鉴定,获得了目的条带(图 1-C),

表明 *T1N6_22* 基因的原核表达载体构建成功。



A. pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 载体图谱; B. *T1N6_22* 基因的扩增; C. pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 载体的酶切鉴定。

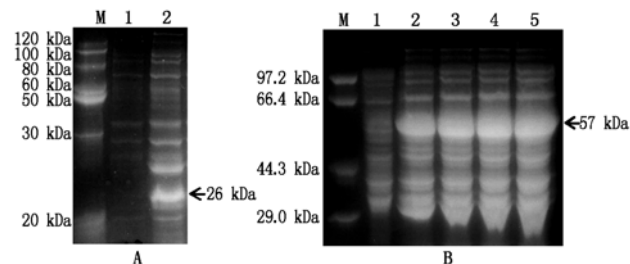
A. Map of pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST; B. PCR amplification of *T1N6_22*; C. Identification of pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST by restriction enzyme digestion.

图 1 *T1N6_22* 基因原核表达载体的构建

Fig. 1 Construction of prokaryotic expression vector pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST of *T1N6_22* gene

2.2 IPTG 不同诱导浓度对 *T1N6_22* 蛋白表达的影响

为确定诱导表达使用的最佳 IPTG 浓度,接种后分别用 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导表达 4 h, 收集菌体, 以未诱导的菌体作为对照, 进行 SDS-PAGE 检测。结果发现, 带有 pGEX4T-1 空载体的菌株可以诱导表达出大小约为 26 kDa 的 GST 蛋白, 带有 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 载体的菌株均可以诱导表达出大小约为 57 kDa 的蛋白, 与融合蛋白的大小相符 (GST 蛋白为 26 kDa, *T1N6_22* 蛋白为 31 kDa)。IPTG 浓度为 0.1 ~ 0.8 mmol/L 时, 融合蛋白的表达水平没有明显的变化(图 2), 由此确定 IPTG 的工作浓度为 0.1 mmol/L。



A. pGEX4T-1 空载体的诱导表达; M. 蛋白分子量标准; 1. IPTG 未诱导; 2. IPTG 诱导 GST 蛋白; B. pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 的诱导表达; M. 蛋白分子量标准; 1. IPTG 未诱导; 2 ~ 5. IPTG 诱导浓度分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/L。

A. Expression of pGEX4T-1 with IPTG induction; M. Protein Marker; 1. Expression without IPTG induction; 2. Expression of GST with IPTG induction; B. Expression of pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST with IPTG induction; M. Protein Marker; 1. Expression without IPTG induction; 2 ~ 5. Expression with 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/L IPTG.

图 2 不同 IPTG 浓度与 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 表达量的关系

Fig. 2 Relationship between different concentration of IPTG and pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST

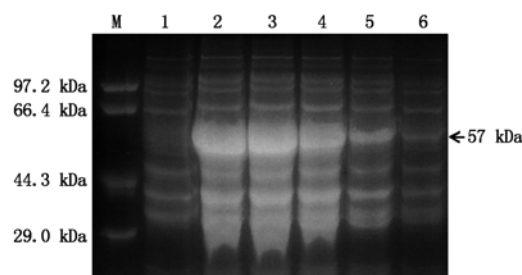
2.3 不同诱导时间对 *T1N6_22* 蛋白表达的影响

将带有 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 载体的菌株接种 LB 液体培养基, 使用 0.1 mmol/L 的 IPTG 浓度, 37 °C 诱导表达, 分别在诱导 0.5, 1, 2, 3, 4 h 时收集菌液, 以未诱导的菌体作为对照, 进行 SDS-PAGE 检

测。结果发现, 在不同诱导时间下均可以诱导表达出大小约为 57 kDa 的融合蛋白; 在诱导时间 0.5 ~ 3 h 内, 随诱导时间的延长诱导表达的蛋白含量逐渐增高; 诱导 3, 4 h, 融合蛋白的表达量没有明显的变化(图 3)。由此确定, 融合蛋白的诱导时间为 3 h。

2.4 *T1N6_22* 蛋白的纯化

以确定的诱导表达最适条件, 对 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 蛋白进行诱导表达, 超声波破碎菌体, 离心后取上清使用 GST 亲和的纯化基质进行

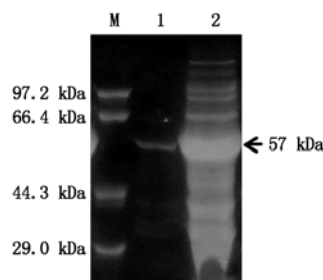


M. 蛋白分子量标准; 1. IPTG 未诱导; 2 ~ 6. IPTG 诱导时间分别为 4, 3, 2, 1, 0.5 h。

M. Protein Marker; 1. Expression without IPTG induction; 2 ~ 6. Expression of pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST with IPTG induction for 4, 3, 2, 1, 0.5 h.

图 3 不同诱导时间与蛋白表达量的关系

Fig. 3 Relationship between different time of induction and pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST



M. 蛋白分子量标准; 1. pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 蛋白; 2. 纯化前上清液。

M. Protein Marker; 1. Purified protein pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST; 2. Supernatant before purification.

图 4 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 蛋白的纯化

Fig. 4 Purification of protein pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST

pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 蛋白的纯化, SDS-PAGE 分析纯化后的蛋白, 获得了单一的融合蛋白条带(图4)。

3 讨论

外源基因在大肠杆菌体内中能否高效表达受到很多因素的影响和限制, 如大肠杆菌菌株类别、原核表达载体、诱导物浓度、诱导时间及诱导温度。一般诱导蛋白表达的温度控制在 16 ~ 37 °C, 诱导可以用温度诱导和药物诱导, 一般利用药物(如 IPTG)诱导较多^[15-17]。李波等^[18]将载体 pET-28a 质粒在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中表达, IPTG 浓度为 0.2 mmol/L, 在 30, 37 °C 诱导 3 h 和 16 °C 诱导 12 h 后收集菌体检测发现, 3 种条件下目的蛋白均可以表达, 但均以包涵体的形式存在。在诱导表达 pET-32a-MYB61 蛋白时, 随 IPTG 浓度的提高和诱导时间的延长, 目的蛋白的表达量均为上升趋势, 并在 1 mmol/L IPTG 诱导 2 h 时达到最大值^[19]。可见不同条件、不同基因所表达的蛋白形式不同, 因此, 对相应基因的表达条件的摸索十分必要。本研究使用 pGEX4T-1^[20]载体进行原核表达, 该载体具有 tac 启动子, 可以高效的表达目的蛋白。通过构建 pGEX4T-1-*T1N6_22*-GST 载体转入大肠杆菌 BL21 进行表达, 在 IPTG 浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mmol/L 时蛋白表达量基本一致, 说明 IPTG 浓度对目的蛋白表达的影响不大, 故试验选择了 0.1 mmol/L 作为后续试验的最适浓度, 以减少菌株的表达压力。超声波破碎菌体后使用 GST 亲和的琼脂糖微球进行目的蛋白的纯化, SDS-PAGE 检测发现纯化后的蛋白含量比超声波裂解后上清中的蛋白含量明显降低, 这说明纯化得到了单一的融合蛋白, 但纯化条件仍需要进一步进行优化, 以期获得更高含量的目的蛋白, 下一步试验将筛选 *T1N6_22* 的互作蛋白, 为明确 *T1N6_22* 基因调控拟南芥抗病的分子机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Belkhadir Y, Nimchuk Z, Hubert D A, *et al.* Arabidopsis RIN4 negatively regulates disease resistance mediated by RPS2 and RPM1 downstream or independent of the NDR1 signal modulator and is not required for the virulence functions of bacterial type III effectors AvrRpt2 or AvrRpm1 [J]. *Plant Cell*, 2004, 16(10): 2822 - 2835.
- [2] Gassmann W, Hinsch M E, Staskawicz B J. The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes [J]. *Plant Journal*, 1999, 20(3): 265 - 277.
- [3] Mohr T J, Mammarella N D, Hoff T, *et al.* The Arabidopsis downy mildew resistance gene *RPP8* is induced by pathogens and salicylic acid and is regulated by W box cis elements [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(10): 1303 - 1315.
- [4] Rose L E, Bittner-Eddy P D, Langley C H, *et al.* The maintenance of extreme amino acid diversity at the disease resistance gene, *RPPI3*, in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 2004, 166(3): 1517 - 1527.
- [5] Borhan M H, Holub E B, Beynon J L, *et al.* The Arabidopsis TIR-NB-LRR gene *RAC1* confers resistance to albugo candida (white rust) and is dependent on EDS1 but not PAD4 [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(7): 711 - 719.
- [6] Jorgensen T H, Emerson B C. RPW8 and resistance to powdery mildew pathogens in natural populations of *Arabidopsis lyrata* [J]. *New Phytologist*, 2009, 182(4): 984 - 993.
- [7] Mengiste T, Chen X, Salmeron J, *et al.* The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(11): 2551 - 2565.
- [8] Veronese P, Chen X, Bluhm B, *et al.* The BOS loci of Arabidopsis are required for resistance to *Botrytis cinerea* infection [J]. *Plant Journal*, 2004, 40(4): 558 - 574.
- [9] Canonne J, Marino D, Jauneau A, *et al.* The xanthomonas type III effector XopD targets the Arabidopsis transcription factor MYB30 to suppress plant defense [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(9): 3498 - 3511.
- [10] Li L, Yu X, Thompson A, *et al.* Arabidopsis MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression [J]. *Plant Journal*, 2009, 58(2): 275 - 286.
- [11] Canet J V, Dobon A, Roig A, *et al.* Structure-function analysis of npr1 alleles in Arabidopsis reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid [J]. *Plant Cell and Environment*, 2010, 33(11): 1911 - 1922.
- [12] 张红志, 蔡新忠. 病程相关基因非表达子 1 (NPR1): 植物抗病信号网络中的关键节点 [J]. *生物工程学报*, 2005, 21(4): 511 - 515.
- [13] Moffat C S, Ingle R A, Wathugala D L, *et al.* ERF5 and ERF6 play redundant roles as positive regulators of JA/Et-Mediated defense against *Botrytis cinerea* in Arabidopsis [J]. *PLOS One*, 2012, 7(4): e35995.
- [14] Xing J H, Weng Q Y, Hao C C, *et al.* *T1N6_22* gene is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis [J]. *Russian Journal of Genetics*, 2012, 48(12): 1191 - 1198.
- [15] Han X Q, Lin X M, Chen H J, *et al.* The prokaryotic expression and bioactivity of the recombinant red fire ant venom allergen soli 4 [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2009, 8(2): 182 - 187.
- [16] 邓毛子, 石春薇, 王芳, 等. 结核分枝杆菌 Ag85A 蛋白的原核表达、纯化和免疫反应性 [J]. *基础医学与临床*, 2010, 30(2): 117 - 121.
- [17] Rao C N, Reeder D J, Stack S M, *et al.* Prokaryotic expression, purification, and reconstitution of biological activities (antiprotease, antitumor, and heparin-binding) for tissue factor pathway inhibitor-2 [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000, 3(276): 1286 - 1293.
- [18] 李波, 倪志勇, 范玲. 棉花 *GhCOMT3* 基因的原核表达、纯化及鉴定 [J]. *华北农学报*, 2010, 25(z1): 12 - 16.
- [19] 杜李继, 顾菊, 陈光朗, 等. 拟南芥 AtMYB50 和 AtMYB61 蛋白的原核表达研究 [J]. *合肥工业大学学报: 自然科学版*, 2014, 37(1): 105 - 109.
- [20] Wu C, Wang Y Y, Zou M J, *et al.* Prokaryotic expression, purification, and production of polyclonal antibody against human polypeptide N-acetylgalactosaminyl transferase 14 [J]. *Protein Expression and Purification*, 2007, 56(1): 1 - 7.