

拟南芥 *CPK10* 双元 TAP 载体的构建及原生质体表达

梁 芸,魏凤菊

(河北农业大学 生命科学学院,河北省植物生理与分子病理学重点实验室,河北 保定 071001)

摘要:为了研究拟南芥 *CPK10* 发挥功能的分子机理,通过 PCR 扩增克隆了 *CPK10* 基因,将该基因连接到带有 FLAG 和 HA 标签的双元串联亲和层析载体上,构建成 pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* 植物表达载体,进而通过 PEG 介导转化拟南芥野生型原生质体,表达约 10 h,通过 Western Blotting 检测融合有 FLAG 和 HA 标签的 *CPK10* 蛋白的表达情况,结果显示,可以分别利用 FLAG 抗体和 HA 抗体特异检测到 *CPK10* 蛋白的条带。融合蛋白的成功表达,为进一步通过串联亲和纯化技术(TAP)筛选 *CPK10* 的互作蛋白奠定基础。

关键词:TAP;双元表达载体;*CPK10*;原生质体转化

中图分类号:Q78 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2015)04-0043-04

doi:10.7668/hbxb.2015.04.008

Construction of Binary Vector for TAP and Protoplast Expression of *CPK10* in *Arabidopsis*

LIANG Yun, WEI Feng-ju

(Hebei Province Key Laboratory of Plant Physiology and Molecular Pathology, College of Life Sciences,
Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: In order to study the molecular mechanism of *Arabidopsis CPK10*, the gene was amplified by PCR, and constructed into the binary vector with FLAG and HA tags for tandem affinity purification(TAP). Then the recombinant plasmid pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* was transformed into *Arabidopsis* wild-type protoplast mediated with PEG, about 10 hours expression, the *CPK10* fusion protein with FLAG and HA tags was detected by Western Blotting. Immunoblot analysis performed with FLAG and HA antibodies showed a distinct cross-reaction with fusion protein at expected molecular weight. The successful expression of fusion protein in *Arabidopsis* protoplast laid the foundation for screening *CPK10* interaction proteins through tandem affinity purification technique.

Key words: TAP; Binary expression vector; *CPK10*; Protoplast transformation

CDPKs(或 CPKs)即钙离子依赖的蛋白激酶,是一类重要的钙离子信号感受器,能够将钙信号向下游进一步级联与放大。已有研究报道显示,拟南芥 CDPK 家族成员可以通过磷酸化下游靶蛋白,参与植物的生长发育、响应逆境胁迫等过程。如 AtCPK11 能够磷酸化 AtCPK24,二者共同参与调节花粉管的伸长过程^[1]。AtCPK2 与 AtCPK20 能够与 SLAH3 相互作用并激活此阴离子通道^[2]。AtCPK11 能够与一种受干旱诱导的细胞核的锌指蛋白 AtDi19 相互作用^[3],同时还能与热激蛋白 HSP1 相互作用^[4]。*CPK10* 基因在干旱胁迫应答中发挥重要作用,它通过间接调节质膜内向钾离子通道参与对气

孔运动的调节^[5]。但是,*CPK10* 直接互作的下游靶蛋白至今尚未明确,这就限制了对该基因调控气孔运动分子机制的深入研究。

串联亲和纯化(Tandem affinity purification, TAP)^[6]是近年来迅速发展的一项筛选、发现相互作用蛋白质的主流技术,它具有高效、高纯度、高度模拟真实生理条件等优势。而截至目前,通过 TAP 技术从植物中纯化蛋白复合物的报道数量有限。本研究通过将 *CPK10* 基因连接到带有 FLAG 和 HA 标签的双元 TAP 载体上,构建成 pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* 质粒,转化拟南芥野生型原生质体进行瞬时表达,并通过 Western Blotting 检测融合有 FLAG 和

收稿日期:2015-04-22

基金项目:国家自然科学基金专项基金项目(31040052);国家自然科学基金青年基金项目(31101022);中国农业大学开放课题(SKLPBKF1504)

作者简介:梁 芸(1990-),女,河北平山人,在读硕士,主要从事植物逆境研究。

通讯作者:魏凤菊(1979-),女,河北衡水人,讲师,博士,主要从事植物抵抗逆境分子机制研究。

HA 标签的 CPK10 蛋白的表达情况。融合蛋白的成功表达,为进一步通过串联亲和纯化技术(TAP)筛选 CPK10 的互作蛋白奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验用大肠杆菌感受态均为河北省植物生理与分子病理学重点实验室保存的 DH5 α , SP1300-CPK10 质粒、pCM1307-3FLAG-3HA 空载质粒由中国农业大学惠赠,PCR 反应所用试剂、限制性内切酶均购自大连 TaKaRa 生物有限公司,DNA 片段回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自上海生工生物公司,引物合成、基因测序均由上海生工生物公司完成,Western Blotting 用 FLAG 抗体和 HA 抗体购自 Sigma 公司,PVDF 膜购自 Milipore 公司,原生质体用酶购自日本 Yakult 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 PCR 扩增 CPK10 基因 根据拟南芥 CPK10 基因序列设计引物:F 5'-TTTCTAGAATGGGTAACGTAAACGCCTGT-3' 和 R5'-TTGGTACCTTAAACAGGAACAGTTTGTCCA-3'。从质粒 SP1300-CPK10 中扩增 CPK10 基因片段,反应体系为 50 μ L,含:dNTP MIX 3.2 μ L,Taq 酶 10 \times Buffer 4 μ L,正向引物 5 μ L,反向引物 5 μ L,Taq 酶 0.2 μ L,SP1300-CPK10 质粒 8 μ L,dH₂O 24.6 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min,(94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min) \times 30,72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.2.2 植物表达载体构建及酶切鉴定 胶回收 PCR 扩增产物 CPK10 基因,将回收产物与 pMD18-T 载体连接,连接体系为:回收产物 5 μ L,pMD18-T 1 μ L,Sloution I 4 μ L。反应条件:16 $^{\circ}$ C,30 min。将连接产物 10 μ L 全部转入大肠杆菌感受态细胞中,挑取克隆,经菌落 PCR 鉴定,Xba I 和 Kpn I 双酶切检测后,选取阳性克隆送生工生物公司测序。测序正确的克隆提取质粒,酶切并回收 CPK10 基因,酶切体系为:10 \times M Buffer 5 μ L,KpnI 2.5 μ L,Xba I 2.5 μ L,dH₂O 27.5 μ L,质粒 12.5 μ L。反应条件:37 $^{\circ}$ C,2 h。胶回收产物连接经 Xba I 和 Kpn I 双酶切胶回收后的 pCM1307-3FLAG-3HA 载体,连接体系为:回收产物 7 μ L,pCM1307-3FLAG-3HA 载体 1 μ L,T4 连接酶 1 μ L,T4 Buffer 1 μ L。反应条件:16 $^{\circ}$ C,连接过夜。将 10 μ L 连接产物全部转入大肠杆菌感受态细胞中,菌落 PCR,挑取阳性克隆,Xba I 和 Kpn I 双酶切鉴定。

1.2.3 野生型原生质体的制备 取生长 4 周的莲座叶的第 3,4 轮叶片作为试验材料,用手术刀切碎,

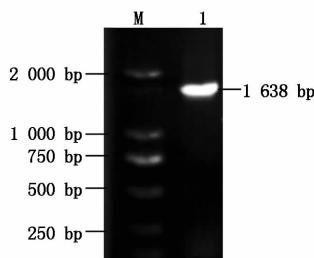
置于原生质体酶解液中,主要含:1.5% 纤维素酶(Cellulose R10),0.3% 离析酶(Macerozyme R10),0.4 mol/L 甘露醇(Mannitol),0.02 mol/L KCl,0.02 mol/L MES(pH 值 5.7),0.01 mol/L CaCl₂,0.1% BSA。110 r/min,22 $^{\circ}$ C,摇床振荡酶解 4~6 h。

1.2.4 原生质体转化验证蛋白表达 将游离到的原生质体用 75 μ m 滤膜过滤,2 000 r/min 离心,去上清,加 W5,主要含:NaCl 9 g/L,CaCl₂ 13.87 g/L,0.2 mol/L KCl,0.2 mol/L MES。洗 2 次,加入不少于 30 mL 的 W5 斜放于冰上 30 min,离心去上清,加 MMG,主要含:0.8 mol/L 甘露醇(Mannitol),0.2 mol/L MES,0.1 mol/L MgCl₂。悬浮原生质体,利用 PEG 介导的原生质体转化方法将高纯度、高浓度的 pCM1307-3FLAG-3HA-CPK10 质粒转入原生质体中,20 $^{\circ}$ C 过夜表达 10 h,Western Blotting 检测蛋白表达。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体 pCM1307-3FLAG-3HA-CPK10 的构建

2.1.1 目的基因的扩增及测序结果分析 以 sp1300-CPK10 质粒为模板,通过 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,可见约 1 638 bp 的清晰条带(图 1)。将目的条带切胶回收并纯化,连接 pMD18-T 载体,获得重组质粒 pMD18-CPK10。将重组质粒转入大肠杆菌感受态细胞 E. coli DH5 α 中,经氨苄青霉素抗性和蓝白斑显色筛选,阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定,菌落 PCR 确定为阳性的克隆经 Xba I 和 Kpn I 双酶切鉴定后,送生工生物公司测序。将测序结果用 TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) 网站中 Blast 进行比对,结果与网站公布 CPK10 基因 cDNA 序列一致、无突变,表明成功扩增到了 CPK10 基因。



M. Trans2K DNA Marker;1. PCR 扩增 CPK10 基因产物。

M. Trans2K DNA Marker;1. PCR product of CPK10.

图 1 CPK10 扩增产物电泳检测

Fig. 1 The result of amplified CPK10

2.1.2 TAP 用双元载体的构建及重组子鉴定 TAP 用双元表达载体 pCM1307-3FLAG-3HA 是在

pCM1307-3FLAG 基础上,经改造添加了串联 HA 序列,用于串联亲和和层析实验的质粒,其载体图谱如图 2-A。将 pMD18-*CPK10* 质粒和 pCM1307-3FLAG-3HA 载体质粒分别进行 *Xba* I 和 *Kpn* I 双酶切,琼脂糖凝胶电泳后,分别胶回收。将目的片段和线性化载体 pCM1307-3FLAG-3HA 连接,筛选阳性克隆经菌落 PCR 检测(图 2-B),能扩增出一条约 1 600 bp 的条带,与 *CPK10* 基因的片段基本相符;为进一步验证外源片段连接到载体中提取质粒,然后进行双酶切验证(图 2-C),经琼脂糖凝胶电泳检测,结果可见,切下清晰的目的基因和线性化的载体条带,表明 pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* 表达载体构建成功。

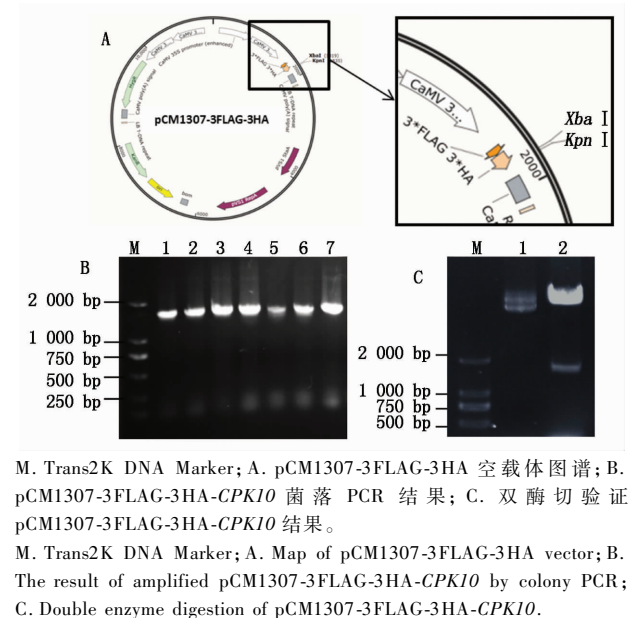


图 2 pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* 载体构建
Fig.2 Construction of pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* vector

2.2 原生质体转化及蛋白表达检测

2.2.1 原生质体的制备 将拟南芥哥伦比亚野生型生长 28~32 d 的第 3 轮伸展的幼嫩叶片,用手术刀切碎,置于原生质体酶解液中,22 ℃,110 r/min 振荡酶解 4~6 h,制备拟南芥野生型原生质体,显微镜下观察原生质体状态(图 3),细胞圆滑,可自由移动,叶绿体等内容物分布均匀,细胞边缘化不明显,无大量破碎状态的原生质体可用于进一步转化。

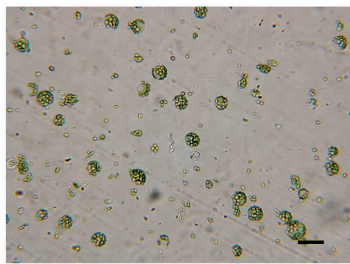
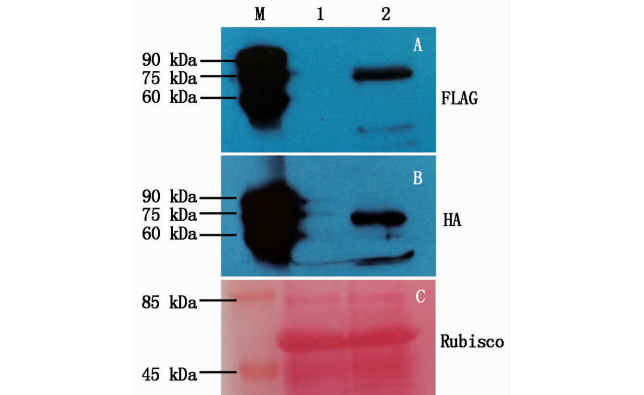


图 3 显微镜观察拟南芥原生质体状态 (bar = 50 μm)
Fig.3 *Arabidopsis* protoplast state by microscope

2.2.2 Western Blotting 验证蛋白表达 利用 PEG 介导的原生质体转化方法,将高纯度、高浓度的 pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* 表达载体转入拟南芥哥伦比亚野生型原生质体中,20 ℃过夜表达 10 h,收集转化的原生质体,制备蛋白提取液,分别利用 FLAG 和 HA 抗体对目的蛋白进行检测。显影后,在 70 kDa 附近出现清晰的条带,且特异性较强(图 4),表明融合标签的目的基因在原生质体中成功表达。



A. FLAG 抗体杂交;B. HA 抗体杂交显影;C. 丽春红染膜标记上样量。
M. *EasySee*TM Western Marker; 1. 野生型; 2. 转化 pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* 质粒的细胞裂解液(注:图中丽春红染膜上样量标记图 Marker 和 Western Blotting 显影后 Marker 均为全式金 *EasySee*TM Western Marker, 2 种效果下 Marker 条带位置不一样)。
A. Western blot analysis was performed using FLAG tag antibody; B. Western blot analysis was performed using HA tag antibody; C. Loading quantity of protein sample was quantitative analysis with Ponceaux. M. *EasySee*TM Western Marker; 1. Wild type; 2. Lysis solution of the cell transformed pCM1307-3FLAG-3HA-*CPK10* plasmid. (*EasySee*TM Western Marker displayed 40 kDa and 85 kDa protein bands on cellulose membrane and 60, 75, 90 kDa protein bands after chemiluminescence detection.)

图 4 Western Blotting 验证目的蛋白在原生质体中的表达
Fig.4 Analysis of protein expression in protoplast by Western Blotting

3 讨论与结论

TAP 技术已成为研究蛋白互作的重要方法之一。TAP 本身兼顾亲和纯化和免疫共沉淀 2 种生化方法的优点,这就保证了该项技术的独特优势:分离蛋白复合物具有高度特异性,两步洗脱纯化条件温和,保持蛋白复合物的自然修饰和结合状态^[7-8]。该技术与质谱技术(Mass spectrometry, MS)联用(TAP-MS),能大规模地研究细胞内蛋白质分子之间的相互作用网络。报道显示,利用 TAP 技术已成功分析大肠杆菌^[9-10]、酵母^[6, 11-12]、哺乳动物^[13]、植物等多种生物的 PPIs(Protein-protein interactions, PPIs)。其中,利用该技术对于植物蛋白互作的研究起步晚,近些年,陆续有关于 TAP 技术成功应用于拟南芥蛋白质复合体提纯的报道。Zhao 等^[14]利用 TAP-MS,成功筛选出了拟南芥中 WPP2 的互作蛋白。Chang 等^[15]利用 TAP 技术鉴定拟南芥 14-3-3

蛋白质复合体,共得到 121 个与其互作的蛋白质。TAP-MS 已成为生物大分子相互作用领域中一种高效、实用的方法。

利用 TAP 技术从植物中纯化蛋白复合物,标签的选择应根据自身研究对象来确定。已报道的用于植物的 TAP 标签有:经典的酵母 TAP 标签或其对应的植物改良 TAP 标签(Improved TAP tag,TAPi)^[16]、替代的 TAP 标签(Alternative TAP tag,TAPa)^[17] 以及改良的多种标签。本研究在进行载体选择时,优先选择了带有 FLAG 和 HA 亲和标签组合系统。首先,FLAG 和 HA 均属于短肽标签,有效地降低了 TAP 标签在与目的蛋白连接时对靶蛋白结构和功能的干扰;其次,这 2 个标签与抗体属于高特异性亲和;再者,纯化过程中不使用蛋白酶消化,不需要 EGTA 作螯合剂^[18],以上几点优势是成功筛选互作蛋白或蛋白复合体的前提。

拟南芥 CPK10 通过 ABA 和 Ca^{2+} 介导的气孔运动,进而增强植物的抗旱能力^[5]。CPK10 属于钙依赖型蛋白激酶家族成员,该激酶的下流直接作用因子是什么,如何调节下游蛋白从而响应干旱,这成为研究关注的焦点。利用 TAP 的优势,借助原生质体表达系统,寻找生理条件下 CPK10 的作用因子,是进一步完善 CPK10 关于逆境抗旱方面的互作蛋白网络体系的前提。本研究通过构建 TAP 用的表达载体 pCM1307-3FLAG-3HA-CPK10,并瞬时转化拟南芥原生质体,成功表达融合蛋白,这为进一步利用 TAP-MS 筛选 CPK10 响应干旱过程中互作靶蛋白的筛选奠定了基础。

本试验通过 PCR 扩增了拟南芥 CPK10 基因,构建了串联亲和层析用表达载体 pCM1307-3FLAG-3HA-CPK10,进而以拟南芥哥伦比亚野生型为材料,游离原生质体,成功将构建好的载体转入拟南芥野生型原生质体中,并经 Western Blotting 检测到融合 FLAG 和 HA 标签的目的蛋白的特异性表达。

参考文献:

- [1] Zhao L N, Shen L K, Zhang W Z, *et al.* Ca^{2+} -dependent protein kinase11 and 24 modulate the activity of the inward rectifying K^{+} channels in *Arabidopsis* pollen tubes [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(2): 649 – 661.
- [2] Gutermuth T, Lassig R, Portes M T, *et al.* Pollen tube growth regulation by free anions depends on the interaction between the anion channel SLAH3 and calcium-dependent protein kinases CPK2 and CPK20 [J]. *Plant Cell*, 2013, 25(11): 4525 – 4543.
- [3] Rodriguez Milla M A, Uno Y, Chang I, *et al.* A novel yeast two-hybrid approach to identify CDPK substrates: Characterization of the interaction between AtCPK11 and At-

- Di19, a nuclear zinc finger protein1 [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580(3): 904 – 911.
- [4] Uno Y, Rodriguez Milla M A, Maher E, *et al.* Identification of proteins that interact with catalytically active calcium-dependent protein kinases from *Arabidopsis* [J]. *Molecular Genet Genomics*, 2009, 281(4): 375 – 390.
- [5] Zou J J, Wei F J, Wang C, *et al.* *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca^{2+} -mediated stomatal regulation in response to drought stress [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154(3): 1232 – 1243.
- [6] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, *et al.* A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(10): 1030 – 1032.
- [7] Li Y. Commonly used tag combinations for tandem affinity purification [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2010, 55(2): 73 – 83.
- [8] Volkel P, Le Faou P, Angrand P O. Interaction proteomics: characterization of protein complexes using tandem affinity purification-mass spectrometry [J]. *Biochem Soc Trans*, 2010, 38(4): 883 – 887.
- [9] Gully D, Moinier D, Loiseau L, *et al.* New partners of acyl carrier protein detected in *Escherichia coli* by tandem affinity purification [J]. *FEBS Lett*, 2003, 548(1–3): 90 – 96.
- [10] Butland G, Peregrin-Alvarez J M, Li J, *et al.* Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli* [J]. *Nature*, 2005, 433(7025): 531 – 537.
- [11] Krogan N J, Cagney G, Yu H, *et al.* Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Nature*, 2006, 440(7084): 637 – 643.
- [12] Gavin A C, Bosche M, Krause R, *et al.* Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes [J]. *Nature*, 2002, 415(6868): 141 – 147.
- [13] Burckstummer T, Bennett K L, Preradovic A, *et al.* An efficient tandem affinity purification procedure for interaction proteomics in mammalian cells [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(12): 1013 – 1019.
- [14] Zhao Q, Brkljacic J, Meier I. Two distinct interacting classes of nuclear envelope-associated coiled-coil proteins are required for the tissue-specific nuclear envelope targeting of *Arabidopsis* RanGAP [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(6): 1639 – 1651.
- [15] Chang I, Curran A, Woolsey R, *et al.* Proteomic profiling of tandem affinity purified 14-3-3 protein complexes in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Proteomics*, 2009, 9(11): 2967 – 2985.
- [16] Rohila J S, Chen M, Cerny R, *et al.* Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants [J]. *Plant J*, 2004, 38(1): 172 – 181.
- [17] Rubio V, Shen Y, Saijo Y, *et al.* An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation [J]. *Plant J*, 2005, 41(5): 767 – 778.
- [18] 张志飞, 赵志丽, 文昭竹. TAP 亲和标签选择及其在植物蛋白互作研究中的应用 [J]. *生物技术通报*, 2014(08): 23 – 27.