生物工程学报
journals.im.ac.cn
cjb@im.ac.cn

Chin J Biotech 2008, September 25; 24(9): 1649-1652
Chinese Journal of Biotechnology ISSN 1000-3061
© 2008 *Institute of Microbiology, CAS & CSM*, All rights reserved

研究简报

雪莲类 *PEBP* 基因在大肠杆菌中的表达及鉴定

王志方[1], 张学军[2], 王博[1], 周小云[3], 艾秀莲[1]

1 新疆农科院微生物应用研究所, 乌鲁木齐 830091
2 新疆农科院哈密瓜研究中心, 乌鲁木齐 830091
3 新疆农科院核技术生物技术研究所, 乌鲁木齐 830091

摘　要: 本实验旨在构建雪莲类 *PEBP* 基因原核表达载体, 在大肠杆菌中表达并纯化类 *PEBP* 基因所编码的蛋白, 为进一步研究奠定基础。将雪莲类 *PEBP* 基因开放阅读框序列克隆到原核表达载体 pET30(+)上, 转化感受态表达菌株 BL21(DE3), 低浓度 IPTG 低温诱导融合蛋白的表达, 纯化产物, Western blotting 鉴定目的蛋白。IPTG 低温诱导 *PEBP*, 经 SDS-PAGE 分析, 其相对分子量约为 28 kD, 与预期相符, 表达量约占菌体蛋白的 26.8%, 并且通过亲和层析纯化了重组融合蛋白, Western blotting 鉴定为阳性。成功构建了原核表达载体 pET-PEBP, 获得了高效表达产物, 并为进一步研究雪莲类 *PEBP* 基因的抗冻功能打下基础。

关键词: 磷脂酰乙醇胺结合蛋白, 原核表达, 低温诱导, 雪莲

Expression and Identification of *PEBP*-like Gene from *Saussurea involucrate Kar.er kir* in *Escherichia coli*

Wang Zhifang [1], Zhang Xuejun [1], Wang Bo [1], Zhou Xiaoyun [3], and Ai Xiulian [1]

1 *Institute of Microbiology*, *Xinjiang Academy of Agricultural Sciences*, *Urumqi* 830091, *China*
2 *Melon Research Center*, *Xinjiang Academy of Agricultural Sciences*, *Urumqi* 830091, *China*
3 *Institute of Nuclear and Biological Technology*, *Xinjiang Academy of Agricultural Sciences*, *Urumqi* 830091, *China*

Abstract: This assay was designed to construct the prokaryotic expression vector, investigate the expression of *PEBP*-like in *Escherichia coli* and purify its product. The *PEBP* gene was inserted into the vector pET30a (+). The recombinant vector was transferred into *E. coli* BL21 (DE3)and induced the expression of protein by low concentration of IPTG and low temperature overnight. After purification, the supernatants were analyzed by SDS-PAGE and the results were identified by Western blotting. After IPTG induction, a new anticipating fusion protein of 28 kD appeared as an expected size, and its product was 26.8% in total protein, the fusion protein was positive by Western blotting. The prokaryotic expression system of *PEBP*-like is successfully constructed. It lays the foundation for the further application study on the antifreeze characters of the *PEBP*.

Keywords: *PEBP*, prokaryotic expression, cold-induced, *Saussurea involucrate Kar.er kir*

低温诱导蛋白是植物在低温作用下由于基因表达的改变而诱发合成的蛋白质[1]。自 1970 年提出低温诱导能调节基因表达而合成新的蛋白质的观点以来, 有关植物的抗冷(冻)性与低温诱导蛋白或抗冻

Received: December 7, 2007; **Accepted:** February 27, 2008
Supported by: the Xinjing Province Program for High Technology Research and Development (No. 200511103).
Corresponding author: Xiulian Ai. Tel: +86-991-4533304; E-mail: aixiulian@yahoo.com
国家自然科学基金和自治区高技术项目(No.30160039 和 200511103)资助。

蛋白方面的研究非常活跃[2]。所涉及的植物种类繁杂, 至今已在苜蓿、拟南芥、雀麦草、菠菜、油菜、马铃薯、番茄、小麦、大麦、黑麦、玉米、水稻、黄瓜、香蕉、油梨、桃树、杨树、柑桔等 30 多种植物的低温诱导中观察到特异蛋白的合成[3−7]。1992 年首次在冬黑麦中发现内源性抗冻蛋白[8], 表现出明显的抗冻活性, 之后从欧白英冬季枝条[9]、胡萝卜[10]等植物体内分离到具有独特抗冻机制的抗冻蛋白。

新疆雪莲(*Saussurea involucrate Kar.er kir*)属菊科凤毛菊属,有着极强的生命力, 耐寒能力很强, 是天山上植物分布最高线上的唯一大型高等植物。长年在极端环境下生长, 决定了其具有许多特殊未知基因, 特别是抗寒相关基因, 本实验室利用低温诱导已经从新疆雪莲成功分离出一种新的蛋白基因, 共有 510 个核苷酸, 网上进行 BLAST 对比, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的磷脂酰乙醇胺结合蛋白基因同源性达 64%[11]。本研究用已经分离的雪莲类 *PEBP* 基因, 构建原核表达载体, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)成功得到大量的表达, 融合蛋白的相对分子量大约是 28 kD, Western blotting 检测类 *PEBP* 基因在大肠杆菌中表达,为进一步研究雪莲磷脂酰乙醇胺结合蛋白在现实中的应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 BL21(DE3)、质粒 pET-30a(+)、pGEM-T Easy 载体(中国农科院生物技术所伍宁丰研究员惠赠); 含有类 *PEBP* 基因的 pGEM-T Easy 载体(本实验室构建并保存)。

1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 *Eco*R I、*Nco* I (TaKaRa 公司); 2×Pfu PCR Master Mix(北京天为时代生物技术公司); PCR 产物和酶切产物回收试剂盒和凝胶回收试剂盒(安徽优晶生物工程有限公司); MagneHis^{TM}Protein Purification System 及小量质粒提取试剂盒(Promaga 公司); 第一抗体: His·Tag Monoclonal Antibody 购于 Novagen 公司; 第二抗体: 辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG(H+L)购自碧云天生物技术研究所。

1.3 仪器

PCR 仪、恒温水浴箱、自动恒温摇床、电泳仪、凝胶自动成像仪、离心机。

1.4 雪莲类 *PEBP* 基因的克隆

根据类 *PEBP* 基因序列, 设计合成特异性的引物(P_1 和 P_2), 并在 5′ 端加 *Nco* I 位点, 3′ 端加 *Eco*R I 位点。

P1(5′-3′): CATG*CCATGG*ATGAAGTGTGACAGT

P2(5′-3′): CG*GAATTC*CATTCATCACATGTCATG TATAGA

以 Teasy-PEBP 质粒为模板, PCR 反应体系如下: 2×pfu PCR 预混液 25 μL、模板 DNA1.0 μL、P1 和 P2 各 2.0 μL, 加 ddH_2O 至总体积为 50 μL。反应条件: (1)94°C 预变性 3 min; (2)94°C 30 s, 56°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; (3)72°C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收、纯化后用 *Eco*R I 和 *Nco* I 双酶切。

1.5 重组表达载体的构建

重组表达载体的构建具体操作详见文献[12]。把经 *Eco*R I 和 *Nco* I 双酶切后纯化的 PCR 产物插入到 pET-30a(+)相应位点, 构建成重组表达载体 pET-PEBP。

1.6 重组子 pET-PEBP 的筛选和鉴定

将转化成功的菌落随机挑取, 提取质粒进行 PCR 和双酶切鉴定, 筛选阳性克隆送往上海基康公司测序。

1.7 重组蛋白的表达及纯化

将阳性重组质粒 pET-PEBP 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取单克隆接种于含 50 mg/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 37°C 过夜培养, 取上述过夜培养物以 1/50 的比例接种于新鲜含 50 mg/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 37°C 振荡 2~3 h 至 OD_{600} 为 0.6~0.8, 加入 IPTG(使终浓度为 1 mmol/L)30°C 诱导培养 4 h, 每隔 1 h 取培养液, 测 OD_{600} 值, 离心收集菌体, 蛋白电泳分析。表达蛋白的纯化参照 Promaga 公司的 MagneHis^{TM}Protein Purification System 说明书进行。

1.8 重组蛋白的 Western blotting 检测

将已表达的融合蛋白 PEBP 样品经 SDS-PAGE 分离后电转至硝酸纤维素膜上。用封闭液封闭 2 h, 之后滴加一抗(在侧摆摇床上缓慢摇动 2 h, 再用洗涤液洗 3 次)及二抗(在侧摆摇床上缓慢摇动 1 h, 再用洗涤液洗 3 次), 最后使用 BeyoECL,荧光检测试剂来检测蛋白。压片采用专用的压片暗盒进行, 洗片时使用 X 光片自动洗片机。

2 结果与分析

2.1 PEBP 基因的 PCR 扩增

扩增时所用的上游引物和下游引物分别引入了 *Nco* I 和 *Eco*R I 的酶切位点, 可使 PCR 扩增片段插入到 pET-30a(+)载体的相应酶切位点。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳可以看出在 500 bp 左右有 1 条明显的带, 这与 *PEBP* 基因开放阅读框 510 bp 的理论值是相符的, 初步判断已经扩增出 *PEBP* 基因。

2.2 重组表达载体 pET-PEBP 的构建及鉴定

利用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 把经 *Eco*R I 和 *Nco* I 双酶切纯化后的 PEBP 基因, 插入到 pET-30a(+)相应位点, 得到重组表达载体 pET-PEBP, 转化大肠杆菌 BL21(DE3), 提取质粒, 以 *Eco*R I 和 *Nco* I 进行酶切鉴定; 同时以 pET-30a(+)空质粒为阴性对照, 用原引物 P1 和 P2 及原条件对 pET-PEBP 进行 PCR 鉴定, 琼脂糖凝胶电泳分析均得到预期大小的条带, 说明表达载体构建成功, 重组质粒的测序结果也与 *PEBP* 基因相符, 未发生碱基突变, 证明 *PEBP* 基因正确插入到 pET-30a(+)的多克隆位点。

2.3 重组 PEBP 质粒在大肠杆菌中的表达及纯化 Western blotting 分析

接种含有重组质粒 pET-PEBP 的大肠杆菌 BL21(DE3)于 LB 培养基, 加入终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导表达, 诱导 4 h 后 *OD* 值不在升高, 离心收集菌体, 加入 25 μL 的 PBS 缓冲液(pH 7.2)重悬菌体沉淀, 然后加入等体积的 2×SDS 凝胶加样缓冲液, 混合后 100°C 煮沸 5 min, 离心取 15 μL 进行蛋白电泳(12%), 考马斯亮蓝 G-250 染色(图 1)。结果表明, 重组蛋白的相对分子量约为 28 kD, 与理论计算值相符, 诱导 4 h 重组蛋白表达量最大, TOTAL LAB2.0 软件分析: 表达量占菌体总蛋白的 26.8%。同时参照 Promaga 公司的 MagneHis™Protein Purification System 说明书对所表达蛋白进行纯化, 得到比较纯的融合抗冻蛋白条带(图 2), 纯化蛋白的浓度约为 0.8 μg/μL。

目的蛋白在 pET-30a(+)中是以融合蛋白的形式表达, 载体 pET-30a(+)含有 S・Tag™融合标签, 融合标签用于检测和纯化目的蛋白, 很方便用 Western blotting 检测。对重组蛋白进行 Western blotting 分析, 电转后没有发现任何条带, 说明电转非常完全。压片定影显影后有明显的条带(图 2), 进一步验证雪莲类 *PEBP* 基因在大肠杆菌中正确表达。

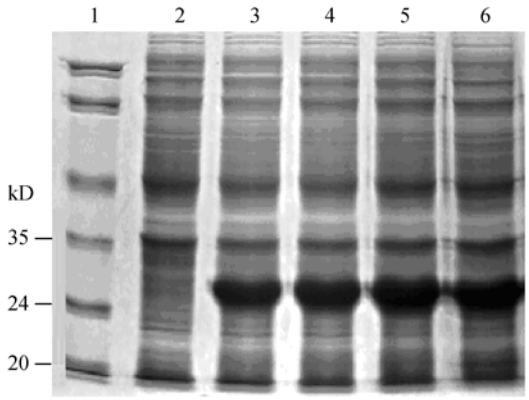

图 1 SDS-PAGE 分析重组子的表达产物

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombination product

1: protein marker; 2: induced pET-30with 3 h; 3: induced pET-PEBP with 1 h; 4: induced pET-PEBP with 2 h; 5: induced pET-PEBP with 3 h; 6: induced pET-PEBP with 4 h

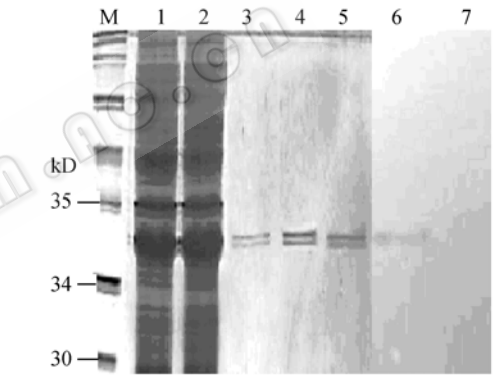

图 2 重组蛋白的纯化及 Western blotting 分析

Fig. 2 Purification recombination protein and Western blotting analysis on expression of PEBP-like gene

M: protein marker; 1, 2: bacterial with recombination vector; 3~5: purification recombination protein; 6: Western blotting of recombination bacterial; 7: Western blotting of CK

3 讨论

近年来, 随着生物工程技术的迅速发展, 人们对低温诱导蛋白的性质、结构、功能等方面做了大量研究, 取得了许多有益的进展。但目前真正被分离和纯化出来的低温诱导蛋白并不多, 并且它们在细胞中的定位、氨基酸序列、功能、作用方式及基因表达调控仍不清楚, 通过诱导冷调节基因生成低温诱导蛋白来提高植物抗冷力的技术还不成熟, 表明冷诱导蛋白的研究尚处于初步阶段[13]。

从雪莲中分离的类 PEBP 基因是一个与膜有关

的基因，可能有调控生物膜结构的功能，对膜的性质、结构和相变起着重要的作用。生物膜是植物细胞及细胞器与环境的一个界面结构，膜的流动性和稳定性是细胞乃至整个植物赖以生存的基础，各种逆境对细胞的影响首先作用于质膜。研究表明，低温胁迫引起膜结构的破坏是导致植物寒害损伤和死亡的根本原因[14]。Singh(1979)以及 Singh 和 Miller (1980, 1982)[15]的研究结果相继证明：植物细胞在致死性的低温冰冻胁迫下，膜的脂双层分子变成不可逆的无序的不定形结构。一般认为膜的流动性在很大程度上是由膜上的脂，特别是膜磷脂的脂肪酸所决定的。雪莲类 *PEBP* 基因的大量表达，为研究该蛋白的性质、结构、功能等方面提供了材料，最终深入研究此蛋白的信号诱导、表达调控、空间结构及空间结构与功能之间的关系等方面，以达到人为调控低温诱导蛋白表达，提高植物抗寒的目的。

REFERENCES

[1] Kacaoka T, Deda K. Heat-elableCOR (cold-Hegulated) proteins essociated with freezing tolerance in epinacb. *Plant Cell Physiol*, 1992, **33(8)**: 1007–1114.

[2] Weiser CJ. Cold resistance and injury in woody plants. *Science*, 1970, **169**: 1269–1278.

[3] Kang GZ, Wang ZX, Sun GC. Cold-regulated proteins in plant. *Chin Bull Bot*, 2002, **19**(2): 239–246.
康国章，王正询，孙谷畴. 植物的冷调节蛋白. 植物学通报, 2002, **19**(2): 239–246.

[4] Breton C, Vazquez-Tello A, Danyluk J, *et al*. Two novel intrinsic annexins accumulate in wheat membranes in response to low temperature. *Plant Cell Physiol*, 2000, **41**: 177–184.

[5] Pearce RS. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul*, 1999, **29**: 47–76.

[6] Thomashow MF. Plant cold acclimation,freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 571–599.

[7] Lin SZ, Zhang ZY. Research on low temperature-induced chilling-and-freezing tolerance of plants and strategies for improvement of Populus tomentosa freezing tolerance. *J Beijing For Univ*, 2000, **22**(6): 89–94.
林善枝，张志毅. 低温诱导植物抗寒冻性研究与毛白杨抗冻性遗传改良策略. 北京林业大学学报, 2000, **22**(6): 89–94.

[8] Griffith M, Ala P, Yang DSC. Antifreeze protein produced endogenously in winter rye leaves. *Plant physiol*, 1992, **100**: 593–596.

[9] Duman JG. Purification and characterization of a thermal hysteresis protein from a plant, the bittersweet nightshade. *Biochim Biophys Acto*, 1994, **1206**(1): 129–135.

[10] Worral D, Elias L. A carrot leucine-rich-repeat protein that inhibits ice recrystallization. *Science*, 1998, **202**: 115–117.

[11] Li P, Ai XL, Wang ZF, *et al*. Construction of plant expression vector pXLPBP. *Biotechnol*, 2006, **16**(2): 11–13.
李萍，艾秀莲，王志方. 雪莲 PBP 基因表达载体的构建. 生物技术, 2006, **16**(2): 11–13.

[12] Joseph Sambrook, David W.Russell. Molecular Cloning: a Laboratory Manual.3rd eds. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: 1–50.

[13] Lin SZ, Zhang ZY, Lin YZ. Antifreeze proteins and molecular genetic improvement in freezing resistance of plants. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2004, **30** (3): 251–260.
林善枝，张志毅，林元震. 植物抗冻蛋白及抗冻性分子改良. 植物生理与分子生物学学报, 2004, **30** (3): 251–260.

[14] Jian CL, Wu SX. Cold hardiness of the plant cytology-winter wheat in the process of changing the structure of cells. *Chin Bull Bot*, 1965, **13**: 1–15.
简令成，吴素萱. 植物抗寒性的细胞学研究——小麦越冬过程细胞结构形态的变化. 植物学通报, 1965, **13**: 1–15.

[15] Levitt J. Responses of Plant to Environmental Stresses: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses. 2nd eds. New York: Academic Press, 1980.