

小麦种子过氧化物酶 *WP1* 基因的原核表达、纯化及多克隆抗体制备

单丽伟¹, 唐如春¹, 刘三阳¹, 范三红^{1,2}, 郭蔼光^{1,2}

1 西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100

2 陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

摘要: *WP1* 是小麦种子中最主要的阳离子过氧化物酶, 该酶不仅参与种子的发育过程, 而且影响面粉的加工品质。首先构建了 *WP1* 基因原核表达载体 pET28a-*WP1*, 并将其转化到 T7 Expression 大肠杆菌菌株中诱导表达。His-tag 融合的 *WP1* 主要以包涵体形式存在, 使用 Ni-NTA 亲和层析柱在变性条件下进行纯化, 获得纯度大于 98% 的重组蛋白。重组 *WP1* 经尿素梯度透析复性溶解后免疫新西兰大白兔, 最终获得 *WP1* 多克隆抗体。ELISA 分析结果显示制备的 *WP1* 兔抗血清的效价大于 1:625 000; Western blotting 结果证明制备的多克隆抗体对 *WP1* 具有很好的专一性。

关键词: 小麦, 种子过氧化物酶, *WP1*, 表达纯化, 抗体制备

Prokaryotic expression, purification and preparation of polyclonal antibody for wheat grain peroxidase *WP1* gene

Liwei Shan¹, Ruchun Tang¹, Sanyang Liu¹, Sanhong Fan^{1,2}, and Aiguang Guo^{1,2}

1 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

2 Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology in Shaanxi Province, Yangling 712100, China

Abstract: Wheat peroxidases 1 (*WP1*) is the major cationic peroxidase of wheat (*Triticum aestivum*) grain, which is involved in the development of seeds and an important factor to affect the final processing quality of flour. We constructed a prokaryotic expression vector pET28a-*WP1*, and transformed it into *E. coli* host strain T7 Expression. His-tag fused *WP1* existed as inclusion body, and the recombinant protein was purified by Ni-NTA resin affinity chromatography under denatured condition. The purity of target protein reached 98%. The recombinant *WP1* was refolded by gradient urea dialysis, then used as antigen to immune rabbit to prepare polyclonal antibody. The result of ELISA showed that the titer of rabbit anti-*WP1* antiserum was higher than 1:625 000. The result of Western blotting demonstrated that the prepared *WP1* polyclonal antibody could be used to detect *WP1* with high specificity.

Received: March 16, 2010; **Accepted:** May 20, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30300222).

Corresponding author: Sanhong Fan. Tel/Fax: +86-29-87092262; E-mail: sanhong.fan@gmail.com

Aiguang Guo. Tel/Fax: +86-29-87092262; E-mail: guoai guang@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 30300222) 资助。

Keywords: *Triticum aestivum*, grain peroxidase, WPI, expression and purification, antibody preparation

过氧化物酶同工酶广泛存在于各种植物中, 它们参与了植物体内许多重要的生理过程, 如木质化和栓化、激素代谢、细胞壁蛋白质交联、病原防御、耐盐及抗氧化等^[1]。植物过氧化物酶不仅在植物的生长发育和环境响应过程中发挥重要作用, 而且作为重要的商品酶应用于生物催化、临床检测和生物技术研究等领域。如高分子材料的生产、有毒芳香化合物废水的处理、基于 ELISA 的疾病诊断等^[2-3]。

面粉是众多食品加工的主要原料, 如何改善面粉的加工性能是当前小麦育种和食品加工领域的研究热点。育种研究者希望通过改变面粉中各种组分的含量改变面粉的加工性能, 而食品加工研究者则希望通过在面粉中添加外源添加剂改变面粉的性质。已有研究结果显示, 面粉中谷蛋白和醇溶蛋白的组成和含量、过氧化物酶活性、脂过氧化物酶活性、二硫键异构酶活性、谷胱甘肽含量等均会不同程度影响面团的特性, 添加化学氧化剂、添加外源过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、木聚糖酶等均能改变面团的功能特征^[4-6]。

1995 年 Converso 等从小麦种子中纯化到 3 种阳离子过氧化物酶组分, 其中 2 种组分的理化性质和催化特性接近, 而第 3 种与前两者差异较大^[7]; 2001 年 Caruso 等从面粉中纯化到一种阳离子过氧化物酶, 将其命名为 WPI, 并证明其具有抗真菌活性^[8]; 2002 年 Yamashita 等从面粉中纯化到一种 36 kDa 阳离子过氧化物酶^[9], 分析了其 N-末端序列, 发现该蛋白存在糖基化现象, 糖基主要为甘露糖和岩藻糖。本研究组从面粉中纯化到一种阳离子过氧化物酶 (WPI)^[10], 并克隆了该酶对应的基因, 质谱分析结果显示其与大麦种子过氧化物酶 BP1 高度同源, 并对其理化性质进行了系统分析。结合前人和我们的实验结果可知, 小麦种子中存在非常强的过氧化物酶活力, WPI 是小麦种子中最主要的阳离子过氧化物酶; 应该参与种子的成熟过程, 存在于面粉中的

WPI 应该对面团形成具有显著影响, 但是 WPI 参与种子的成熟和面团形成的机制目前尚不清楚。

本研究将小麦 *WPI* 基因克隆到原核表达载体 pET28a, 利用大肠杆菌系统表达并纯化获得重组 WPI。使用重组蛋白免疫兔子, 制备获得小麦 WPI 多克隆抗体, 并对多克隆抗体的效价和专一性进行了分析。为 WPI 的组织 and 细胞定位、在种子形成过程中的功能及其对面粉加工性能的影响等研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、2-log DNA ladder、蛋白 marker 等为 NEB 公司产品; Ni-NTA Superflow agarose 纯化介质为 Qiagen 公司产品; PVDF (聚偏二氟乙烯膜) 转印膜为 GE 公司产品; 完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂为 Pierce 公司产品; HRP 标记的羊抗兔抗体购自北京康为世纪生物科技有限公司; HRP-DAB 显色试剂盒购自北京 Tiangen 公司; 其他常规试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.1.2 菌株与载体

大肠杆菌 DH5 α 和表达菌株 T7 Expression 为 NEB 公司产品; pET28a 表达载体为 Novagen 公司产品; 含有 *WPI* 基因 cDNA 的 pPCR-WPI 质粒为本实验室保存。

1.1.3 实验动物

2 只新西兰大耳白兔, 体重约 2 kg。

1.2 方法

1.2.1 表达载体构建

以含有 *WPI* 基因 cDNA 的质粒 pPCR-WPI 为模板, P1、P2 为引物, 通过 PCR 扩增获得目的片段, 回收的 PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后连入 pET28a 表达载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得的

重组质粒经双酶切和 PCR 鉴定后, 送上海生工生物工程股份有限公司测序。所用引物序列如下: P1: 5'-ATGGAATTCGCGGAGCCTCCGGTGGCGCGC-3', P2: 5'-ATGAAGCTTCTAGCCAAGCCTTCTGCAGC-3'。

1.2.2 融合蛋白的表达

将表达载体 pET28a-WP1 导入大肠杆菌 T7 Expression 表达菌株, 在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素平板上筛选, 挑取单菌落, 在含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素 LB 液体培养基中 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至对数生长期, 加入异丙基硫代半乳糖苷 IPTG (终浓度为 0.5 mmol/L) 诱导。4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 \times g 离心 5 min 收集菌体, 5 mL 菌液沉淀用 1 mL 裂解缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 8.0, 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑) 重悬, 经超声破碎, 分别取裂解菌液及离心后上清液, 利用 15% SDS-PAGE 进行分离检测。

1.2.3 融合蛋白的亲纯化

收集 100 mL 诱导表达后的菌体, 加入 10 mL 裂解缓冲液重悬后超声破碎, 离心收集沉淀。用裂解缓冲液洗涤沉淀 3 次去除可溶性蛋白, 然后再用含 0.1% Triton X-100 的裂解缓冲液洗涤 3 次去除膜蛋白。用含有 8 mol/L 尿素的裂解缓冲液溶解获得的包涵体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 \times g 离心 20 min, 将上清载入 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析柱, 用 5 倍柱体积的漂洗缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, pH 6.3) 洗柱以除去杂蛋白, 最后用 3 倍柱体积的洗脱缓冲液 (100 mmol/L NaH_2PO_4 , 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, pH 5.9) 洗脱目的蛋白。收集洗脱组分, 利用 15% SDS-PAGE 进行分离检测。使用 Bio-Rad 公司的 Quantity one 软件分析目的蛋白的相对量。

1.2.4 兔抗 WP1 血清的制备

依次用含 4、2、1、0.5、0.2 mol/L 尿素的 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液透析复性, 然后与等体积弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混合乳化后皮下多点注射, 分 4 次进行免疫。首次按 800 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量免疫, 皮下 6

点注射; 第 21、35、49 天分别按 400 $\mu\text{g}/\text{只}$ 剂量免疫, 皮下 4 点注射。每次免疫 10 d 后, 每只兔子耳缘静脉取血 0.5~1 mL, 分离抗血清, 间接 ELISA 检测免疫后血清效价。第 60 天时采全血, 分离抗血清, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, ELISA 检测血清效价。

1.2.5 Western blotting 检测

取开花后 15 d 的小麦籽粒 2 g, 液氮中研磨后加入 5 mL 蛋白质提取液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH 6.8, 1% 2-巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF), 充分研磨匀浆, 10 000 \times g 离心 15 min 后取上清, 加蛋白上样缓冲液, 利用 15% SDS-PAGE 进行分离, 再通过电转印仪转印至 Hybond-P PVDF 膜上。以方法 1.2.4 中制备的兔抗血清为一抗 (1:50), 用辣根过氧化物酶标记 (HRP) 的羊抗兔抗体为二抗 (1:2 000), 进行 Western blotting 检测。

2 结果与分析

2.1 pET28a-WP1 表达载体的构建

以质粒 pPCR-WP1 为模板, 通过 PCR 扩增 WP1 基因编码区 (不包含信号肽区, 共 996 bp), 将其重组入表达载体 pET28a。图 1 为重组质粒 PCR 和 *EcoR* I、*Hind* III 双酶切鉴定结果, 第 1 和 2 泳道均出现约 1 000 bp 的预期片段。将酶切鉴定正确的质粒进行测序, 序列正确的重组质粒命名为 pET28a-WP1。

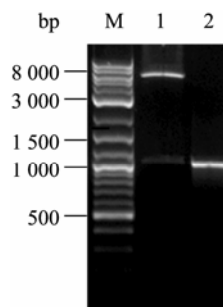


图 1 重组质粒 pET28a-WP1 的双酶切和 PCR 鉴定

Fig. 1 Identification of recombinant vector pET28a-WP1 by double digestion and PCR. M: DNA marker; 1: pET28a-WP1 digested with *EcoR* I and *Hind* III; 2: identification of pET28a-WP1 by PCR.

2.2 *WPI* 融合蛋白的表达与纯化

将构建的表达载体 pET28a-*WPI* 转化大肠杆菌 T7 Expression 菌株, 挑取单菌落接种于 LB 培养基, 培养至对数生长期时加 IPTG 诱导, 分别收集诱导 2、4、6 h 后样品, 使用 15% SDS-PAGE 分析表达量随时间变化, 结果如图 2A 所示。与对照泳道相比, 泳道 2、3、4 都出现与预期大小一致的 37 kDa 条带, 且其表达量随诱导时间而增加; 诱导 4 h 后, *WPI* 即达到最大表达量。可溶性分析结果显示, 重组蛋白主要以不溶性的包涵体形式存在。将包涵体溶解于 8 mol/L 尿素溶液中, 通过 Ni-NTA 琼脂糖亲和柱分离, 最终获得用于抗体制备的重组 *WPI*。泳道灰度扫描分析结果显示, 重组蛋白纯度大于 98%, 如图 2B 所示。

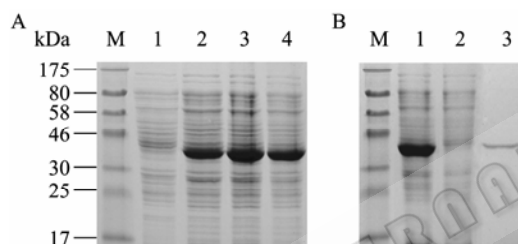


图 2 *WPI* 在大肠杆菌中不同时间的表达情况及其分离纯化的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of *WPI* in different time and purification through Ni-NTA agarose affinity chromatography. (A) M: prestained protein marker; 1: un-induced control; 2-4: the expression of *WPI* after 2, 4, 6 h induction respectively. (B) M: prestained protein marker; 1: total protein; 2: soluble protein after inducing; 3: the purified *WPI*.

2.3 间接 ELISA 法检测抗血清效价

使用 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 *WPI* 抗原包被酶标板, 5% 脱脂奶粉封闭, 将抗血清或免疫前血清按稀释度 1 : 1 000、1 : 5 000、1 : 25 000、1 : 125 000、1 : 625 000 稀释后加入酶标板中孵育, 洗涤后加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗, 最后以四甲基联苯胺 (TMB) 为底物进行显色, 用酶标仪测 450 nm 波长的光吸收值。每个稀释度重复 3 次, 测定结果如图 3 所示, 每一点的标准差用垂直短线表示。以 $OD_{450}/OD_{450} > 2.1$ 为标准, 制备的 *WPI* 兔抗血清效价在 1 : 625 000 以上。

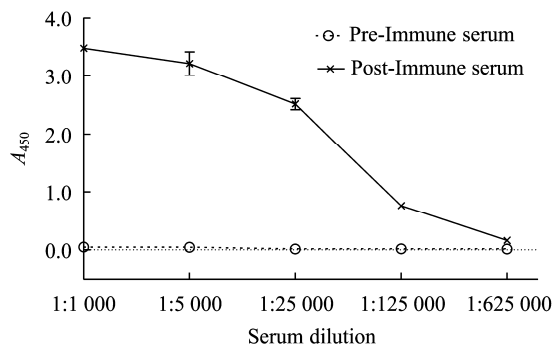


图 3 ELISA 测定 *WPI* 兔抗血清效价

Fig. 3 Titer of rabbit anti-*WPI* antiserum was detected by ELISA.

2.4 Western blotting 检测

为了检测制备的 *WPI* 抗血清的特异性, 提取小麦籽粒中的可溶性蛋白, 利用 15% SDS-PAGE 分离, 蛋白印迹后依次用 *WPI* 抗血清 (一抗) 和 HRP 山羊抗兔抗体 (二抗) 杂交, 以二氨基联苯胺 (DAB) 为底物进行显色, 结果如图 4 所示。图 4A 为蛋白电泳结果, 图 4B 为 Western blotting 结果。图 4A 中, 第 1 泳道为重组的 *WPI*, 第 2、3 泳道分别为从“陕 225”和“郑农 16”小麦种子中提取到的可溶性蛋白; 图 4B 中, 每个泳道中均出现一条约 37 kDa 的特异条带, 说明 *WPI* 抗血清不仅能与重组 *WPI* 特异结合, 而且可以很好地识别小麦籽粒中的 *WPI*。已有研究显示小麦种子中的可溶蛋白中包含多种过氧化物同工酶, 而 *WPI* 抗血清与种子总蛋白杂交时仅出现一条带, 证明其对 *WPI* 具有良好的专一性。

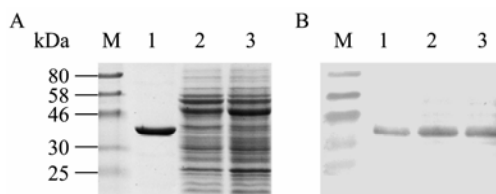


图 4 Western blotting 检测抗血清的特异性

Fig. 4 Western blotting analysis the specificity of antiserum. (A) SDS-PAGE analysis. (B) Western blotting analysis. M: prestained protein marker; 1: the purified *WPI* protein; 2, 3: the total soluble protein from wheat grain of Shan 225 and Zheng Nong16.

3 讨论

制备抗体首先需要获得高纯度的目的蛋白。本研究将小麦 *WP1* 基因通过 *EcoR* I 和 *Hind* III 切点整合入 pET28a 载体, 然后导入大肠杆菌 T7 Expression 菌株诱导表达。目的蛋白融合有 His 标签, 融合蛋白以包涵体形式存在。首先用裂解缓冲液反复洗涤除去可溶性蛋白, 然后用含 0.1% Triton X-100 的裂解缓冲液洗涤去除膜蛋白, 经过上述方法获得包涵体纯度可达 95% 以上。为了获得纯度更高的重组蛋白, 研究中使用尿素溶液溶解包涵体, 然后使用 Ni-NTA 琼脂糖亲和介质在变性条件下进一步纯化, 最后获得纯度高于 98% 的重组 *WP1*。蛋白质是否变性是影响最终抗血清效价的重要因素。本研究制备的重组蛋白以变性形式溶解于 8 mol/L 尿素中, 制备抗体时, 首先将其逐级透析去除尿素, 使目的蛋白最大程度复性, 与佐剂等体积混合后免疫兔子, 本研究获得的抗血清效价高达 1 : 625 000。

抗体对抗原蛋白的专一性对抗体应用非常重要。植物过氧化物酶是一个超家族, 一个物种中通常存在几十种到上百种过氧化物酶同工酶, 如拟南芥全基因组中共有 73 个过氧化物酶基因^[11], 水稻中共有 138 个过氧化物酶基因^[12]。确定 *WP1* 多克隆抗体是否只与 *WP1* 特异反应而不与其他过氧化物酶同工酶结合对 *WP1* 抗体的应用非常关键。本实验中提取了小麦种子可溶性总蛋白, 通过 Western blotting 检测 *WP1* 多克隆抗体的专一性, 结果只出现一条特异条带, 因而制备的 *WP1* 多克隆抗体具有非常好的特异性。这为利用该抗体进行 *WP1* 的组织 and 细胞定位、分析不同小麦品种中 *WP1* 含量和加工性能关系等研究奠定了基础。

REFERENCES

[1] Hiraga S, Sasaki K, Ito H, et al. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42(5):

462–468.

- [2] Wallace G, Fry SC. Action of diverse peroxidases and laccases on six cell wall-related phenolic compounds. *Phytochemistry*, 1999, 52(5): 769–773.
- [3] Regalado C, García Almedárez BE, Duarte-Vázquez MA, et al. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem Rev*, 2004, 3(1/2): 243–256.
- [4] Oudgenoeg G, Hilhorst R, Piersma SR, et al. Peroxidase-mediated cross-linking of a tyrosine containing peptide with ferulic acid. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(5): 2503–2510.
- [5] Joye IJ, Lagrain B, Delcour JA, et al. Endogenous redox agents and enzymes that affect protein network formation during breadmaking -A review. *J Cereal Sci*, 2009, 50(1): 1–10.
- [6] Joye IJ, Lagrain B, Delcour JA. Use of chemical redox agents and exogenous enzymes, to modify the protein network during breadmaking -A review. *J Cereal Sci*, 2009, 50(1): 11–21.
- [7] Converso DA, Fernández ME. Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties. *Phytochemistry*, 1995, 40(5): 1341–1345.
- [8] Caruso C, Chilosi G, Leonardi L, et al. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. *Phytochemistry*, 2001, 58(5): 743–750.
- [9] Yamashita H, Nanba Y, Onishi M, et al. Identification of a wheat allergen, Tri a Bd 36K, as a peroxidase. *Biosci Biotech Biochem*, 2002, 66(11): 2487–2490.
- [10] Luo LH, Fan SH, Zhang MX, et al. Purification and characterization of peroxidase from wheat seed. *J Agric Biotech*, 2008, 16(1): 181–182.
- 罗龙海, 范三红, 张美祥, 等. 小麦种子过氧化物酶的纯化及其部分酶学性质. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 181–182.
- [11] Tognolli M, Penel C, Greppin H, et al. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 2002, 288(1/2): 129–138.
- [12] Passardi F, Longet D, Penel C, et al. The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry*, 2004, 65(13): 1879–1893.