

水稻 L-半乳糖内酯脱氢酶基因的克隆和 原核表达及抗体的制备

俞乐^{1,2}, 刘拥海², 彭新湘¹

(1.华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2.肇庆学院 生命科学学院, 广东 肇庆 526061)

摘要: 应用 RT-PCR 技术从水稻叶片中克隆了水稻 L-半乳糖内酯脱氢酶(GLDH)的全长基因。序列分析表明, 水稻 GLDH 基因全长 1 752 bp, 亚克隆其部分成熟蛋白编码基因(789 bp) 利用基因重组技术构建了 *E.coli*/ pET30a-GLDHe, 经酶切鉴定, DNA 测序, 证实重组质粒构建正确; 将重组质粒转化大肠杆菌 Rosseta, IPTG 诱导表达, SDS-PAGE 分析证实表达出相对分子质量约为 36 000 的蛋白。用原核表达蛋白作为抗原免疫家兔制备抗体, 用 Western blot 检测抗体的特异性及效价, 结果表明, 抗体血清效价为 1 : 1 000, 在加 IPTG 诱导后的菌液中可以检测到相应的蛋白条带(相对分子质量为 36 000), 在水稻叶片样品中能检测到 1 条相对分子质量为 36 000 的蛋白条带。

关键词: 水稻; L-半乳糖内酯脱氢酶; 原核表达; 抗体

中图分类号: Q785 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0381-04

Cloning, prokaryotic expression of rice L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase gene and preparation of anti-GLDH antibodies

YU Le^{1,2}, LIU Yong-hai², PENG Xin-xiang¹

(1.College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. College of Life Sciences, Zhaoqing University, Zhaoqing, Guangdong 526061, China)

Abstract: The full length of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) gene was amplified by RT-PCR from rice leaves and sequenced. The amplified gene was about 1 752 bp. The coding region for part of mature protein (789 bp) was subcloned into pET-30a(+). The recombinant plasmid pET30a-GLDHe was identified by enzyme digestion and DNA sequencing. Data of SDS-PAGE indicated that a 36 000 (relative molecular mass) protein was expressed. The antiserum against GLDH was generated by immunizing rabbits with the prokaryotic expressed protein. The polyclonal antibody was analyzed by Western blot for its specificity and titer. The antibody could recognize GLDH protein specifically and its titer was about 1 : 1 000.

Key words: rice; L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase; prokaryotic expression; antibodies

抗坏血酸(AsA)对植物自身的抗氧化、光保护以及调节生长发育等都有重要作用^[1-3]。L-半乳糖途径是公认的植物AsA的主要合成途径^[4], 在该途径中, L-半乳糖内酯脱氢酶(L-galactono-1,4-lactone

dehydrogenase, GLDH, EC1.3.2.3)直接氧化L-半乳糖内酯(L-galactono-1,4-lactone, Gal)生成AsA, 是植物AsA生物合成途径中最后一步的关键酶^[5-7]。

GLDH最早从豌豆中得以鉴定^[8], 此酶定位于

收稿日期: 2009-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(30870184)

作者简介: 俞乐(1974—), 女, 广西玉林人, 博士, 讲师, 从事植物逆境生理与分子生物学研究, yule@zgu.edu.cn

植物细胞线粒体内膜上,专一地以细胞色素C(Cytc)作为酶反应的电子受体,催化还原Cytc,同时氧化Gal生成AsA^[9].已从花椰菜^[6]和甘薯^[9]中纯化得到GLDH,它们由相对分子质量为56000的单一多肽组成,都含有对酶活性起重要作用的半胱氨酸残基.GLDH的cDNA已从花椰菜^[6]、甘薯^[9]、烟草^[10]、拟南芥^[11]、甜瓜^[12]及番茄^[13]等植物中获得克隆,来源于不同植物的GLDH基因具有相似的结构,它们编码具有较高相似性的581~610个氨基酸.

用NCBI网站的Blast和RGP网站的Analysis tools对搜索结果进行分析,发现在水稻基因组中共有2个GLDH基因的相似序列,分别位于第11和12染色体上,其cDNA全长分别为2152bp和2135bp(GenBank登录号为AK102697、AK241565),相似性达98%,ORF均为1752bp,编码583个氨基酸,所注释的编码产物均为GLDH.笔者以NCBI上推测的水稻GLDH的cDNA(AK241565)为模板设计引物,克隆得到水稻GLDH的cDNA,构建原核表达载体,并在*E.coli* Rosetta中进行表达.进一步免疫家兔,制备了水稻GLDH的抗体,以期研究水稻GLDH的特点以及与AsA的关系奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

水稻粳稻品种中花11、pYL载体、原核表达载体pET-30a(+)、*E.coli*/DH5 α 、Rosetta均为华南农业大学生命科学学院分子植物生理研究室种植保存.限制酶HindIII、SacI、T₄DNA连接酶购自TaKaRa公司,山羊抗兔IgG购自Sigma公司,其他试剂均为分析纯.

1.2 方法

1.2.1 水稻GLDH基因的克隆

提取分蘖期水稻叶片总RNA,根据NCBI上已报道的水稻GLDH全长cDNA序列设计引物GF1、GR1,通过RT-PCR扩增获得目的片段,PCR扩增反应参数为:94℃,25s;55.5℃,30s;72℃,2min;28个循环.片段连接pYL载体后,转化*E.coli* DH5 α ,酶切检测法鉴定重组子,挑选阳性克隆测序鉴定.引物GF1、GR1由上海生工生物工程技术服务有限

公司合成,序列如下:GF1:5'-GCTAGAGCTCGGAAAACCCCATTTTCGATC-3',引入酶切位点SacI;GR1:5'-CGGCAAGCTTCAATCAGCACAACCTTAC-3',引入酶切位点HindIII.

1.2.2 原核表达载体pET30a-GLDHe的构建

用已测序的pYL-GLDH质粒作为模板设计引物,克隆原核表达片段GLDHe,引物序列如下:GF2:5'-GCGCGAGCTCAAGTTTACCTCAAA-3',引入酶切位点SacI;GR2:5'-CGGCAAGCTTCAATCAGCACAACCTTAC-3',引入酶切位点HindIII.

PCR扩增反应参数为:94℃,30s;55.5℃,40s;72℃,1min;25个循环.回收PCR产物,用HindIII和SacI双酶切后与同样酶切的pET-30a(+)连接,转化*E.coli* DH5 α ,用酶切检测法鉴定重组子,挑选阳性克隆测序鉴定,用测序正确的质粒转化*E.coli* Rosetta.

1.2.3 pET30a-GLDHe的原核表达

挑含有pET30a-GLDHe的单菌落至含相应抗生素的LB液体培养基中振荡培养,37℃、200r/min培养至OD_{600nm}为0.4~0.6,加入IPTG至终浓度为1mmol/L,分别于诱导前,诱导后1、3、4、5、6h取样,进行SDS-PAGE电泳分析.

1.2.4 抗体制备和Western blot分析

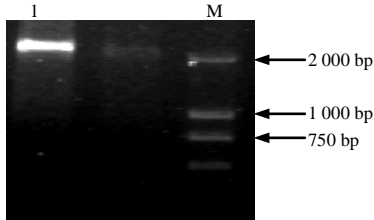
将诱导后的菌液离心后去掉上清,重悬细菌后进行超声破碎处理,离心回收沉淀,SDS-PAGE电泳分离目的蛋白,目的蛋白凝胶条带和无菌水以及弗氏完全佐剂匀浆,充分乳化.第1次注射免疫家兔时使用弗氏完全佐剂,随后的几次注射均采用弗氏不完全佐剂.第2次注射在10d后进行,第2次注射7~10d后进行第3次注射,第3次注射10~15d后采血.

称取水稻叶片,用SDS-PAGE样品缓冲液匀浆,离心后取适量上清用于电泳.同时取诱导前后菌液加SDS-PAGE上样缓冲液点样进行电泳.将蛋白质电转至NC膜,用5%脱脂奶封后按1:1000的稀释比例加入第一抗体,37℃孵育1h,经洗涤后,按1:20000的稀释比例加入第二抗体(山羊抗兔IgG),37℃孵育1h.最后用底物氮蓝四唑(NBT)和5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸二钠盐(BCIP)显色,观察结果.

2 结果与分析

2.1 水稻 GLDH 基因的扩增与鉴定

用特异引物 GF1/GR1 扩增水稻 GLDH 基因，经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，可见约 1 800 bp 的产物(图 1)。

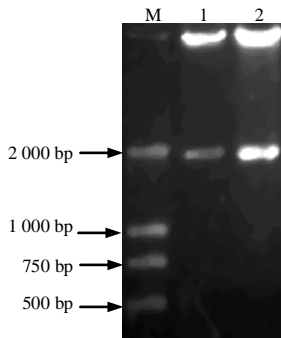


M DNA marker DL2000 ; 1 PCR 产物.

图 1 水稻 GLDH 基因的 RT-PCR 扩增

Fig.1 RT-PCR amplification of GLDH gene in rice

产物用限制性内切酶 *Hind*III 和 *Sac*I 酶切，连接到 pYL 载体上，经酶切(图 2)及测序验证结果正确，无碱基错配，重组质粒命名为 pYL-GLDH.



M DNA marker DL2000 ; 1、2 重组质粒双酶切.

图 2 质粒 pYL-GLDH 的酶切鉴定

Fig.2 Identification of pYL-GLDH

2.2 GLDH 蛋白的抗原表面分析

利用 DNASTAR 中的 Protean 程序分析水稻 GLDH 蛋白，再用 Jameson-wolf 方法分析 GLDH 蛋白的抗原表位，由图 3 可见，GLDH 全蛋白的抗原决定簇具体分布位置，横坐标代表氨基酸序列，纵坐标代表抗原表位。水稻 GLDH 蛋白的抗原决定簇分布主要集中在第 322 到 583 位氨基酸。试验最初选用整个 ORF 进行原核表达，但发现未加 IPTG 前菌液的 OD 值始终只能维持在 0.3，不能逐步升高达到 0.5，判断可能是转入了 GLDH 蛋白的信号肽和跨膜片段造成菌体死亡，所以改选用不包括信号

肽位点与跨膜区域的片段做原核表达，共表达 263 个氨基酸，蛋白相对分子质量为 30 000，加上 His 标签后相对分子质量为 36 000.

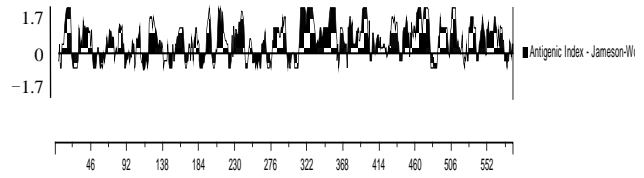
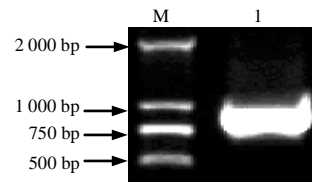


图 3 水稻 GLDH 蛋白的抗原决定簇分析

Fig. 3 Antigenic determinants of rice GLDH

2.3 原核表达基因片段的扩增与鉴定

以已测序的质粒 GLDH-pYL 为模板，用引物 GF2/GR2 扩增原核表达片段 GLDHe，经电泳检测可见约 800 bp 的产物(图 4)。

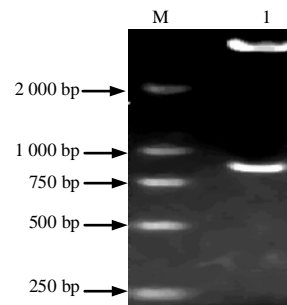


M DNA marker DL2000 ; 1 PCR 产物.

图 4 原核表达目的片段 GLDHe 的 PCR 扩增

Fig.4 Amplification of GLDHe

用限制性内切酶 *Hind*III 和 *Sac*I 酶切，连接到 pET-30a 载体上，经酶切(图 5)和测序验证结果正确，无碱基错配，重组质粒命名为 pET30a-GLDHe.



M DNA marker DL2000 ; 1 重组质粒双酶切.

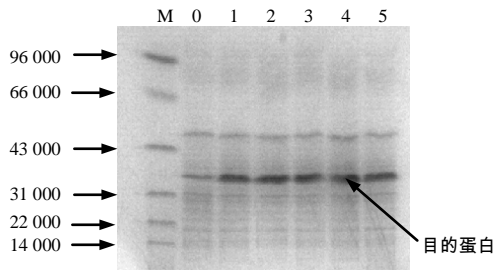
图 5 质粒 pET30a-GLDHe 的酶切检测

Fig.5 Identification of pET30a-GLDHe

2.4 重组质粒 pET30a-GLDHe 的诱导表达

菌液培养到 OD_{600 nm} 为 0.5 时加入 IPTG，诱导效果如图 6。未加入 IPTG 的菌液中有一蛋白条带与

目的蛋白条带位置接近,加诱导剂后3h,目的蛋白被大量诱导表达.取经诱导3h的菌液进行目的蛋白分离用于免疫家兔,电泳时注意相近蛋白条带的充分分离.

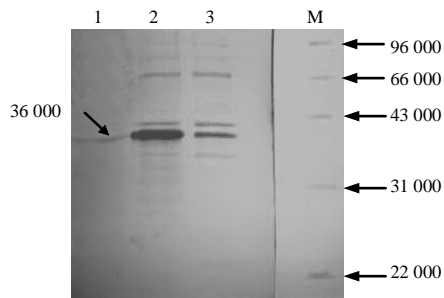


M 蛋白 marker ;0~5 IPTG 诱导 0、1、3、4、5、6 h 的 Rosseta/pET30a-GLDHe 样品.

图6 Rosseta/pET30a-GLDHe 的 SDS-PAGE 分析
Fig.6 SDS-PAGE analysis of Rosseta/pET30a-GLDHe

2.5 Western 杂交检测抗体的效价

Western 杂交结果(图7)显示,用稀释1000倍的抗体血清在加IPTG诱导后的菌液中可以检测到相应的蛋白条带(相对分子质量36000),而在水稻叶片样品中,在相对分子质量54000的位置未能发现预期蛋白条带,只能检测到1条小于预期蛋白的条带(相对分子质量为36000).



M 蛋白 marke ; 1 水稻叶片样品 ; 2 IPTG 诱导 3 h 的 Rosseta/pET30a-GLDHe 样品 ; 3 IPTG 诱导 0 h 的 Rosseta/pET30a-GLDHe 样品.

图7 GLDH 抗体效价检测
Fig.7 GLDH antibody titer assay

3 讨论

克隆的水稻GLDH全长基因与GenBank登录号为AK241565的水稻GLDH序列的相似性为100%,与其他已报道植物GLDH氨基酸序列的相似性均达到70%以上,说明该基因相对保守.Pateraki等^[12]对甜瓜、草莓、烟草、番茄、甘薯、花椰菜、拟南芥

的GLDH的氨基酸序列进行比对分析,发现它们在N端均存在有一段推测的线粒体定位结构域序列,并存在有信号肽的切割位点FR/YA.该信号肽的特点是相对富含Ala、Leu、Arg和Ser,而少含Asp、Glu、Val和Ile^[14].本研究曾采用原核表达载体pET-30a表达GLDH全长基因,但没有获得成功,将GLDH的信号肽以及跨膜片段缺失,结果在Rosseta/pET-30a中获得高效表达,这表明信号肽和跨膜片段在表达中起负作用,可能是信号肽和跨膜片段带有疏水蛋白,不利于外源基因在原核中的表达.

Bartoli等^[7]的Western杂交结果显示,在马铃薯叶中可检测到相对分子质量为56000的GLDH成熟蛋白条带和相对分子质量分别为30000、28000、26000的GLDH蛋白降解片段.Tabata等^[10]在烟草细胞中分别检测到相对分子质量为68000(带信号肽蛋白)、56000(无信号肽蛋白)和37000(降解片段蛋白)的条带.笔者制备GLDH兔抗后的Western杂交结果显示,在加IPTG诱导后的菌液中可以检测到相应的蛋白条带(相对分子质量为36000),说明GLDH部分片段的原核表达已获成功.另外,根据NCBI上提供的cDNA序列可推测水稻GLDH成熟蛋白的相对分子质量为54000,但在水稻叶片样品的Western杂交结果中始终未能发现相应的蛋白条带,而在相对分子质量为36000的位置出现1条明显的条带,推测此条带为水稻GLDH蛋白的降解片段,GLDH蛋白在水稻植株体内的存在形式是否不同于双子叶植物,值得进一步的探讨研究.

参考文献:

[1] Smirnoff N . The function and metabolism of ascorbic acid in plants[J] . Ann Bot , 1996 , 78 : 661-669 .
 [2] Davey M W , Van Monatgu M , Inze D , et al . Plant L-ascorbic acid : Chemistry , function , metabolism , bioavailability and effects of processing[J] . J Sci Food Agric , 2000 , 80 : 825-860 .
 [3] Pastori G M , Kiddle G , Antoniw J , et al . Leaf vitamin-C contents modulate plant defense transcripts and regulate genes that control development through hormone signalling[J] . Plant Cell , 2003 , 15 : 939-951 .
 (下转第 429 页)