

苹果属小金海棠 *MxIrt1* 基因特异性片段的原核表达及多克隆抗体的制备

孙春玉^{1,2}, 王 忆¹, 孔 瑾¹, 许雪峰¹, 李天忠¹, 韩振海^{1*}

(¹中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100193; ²吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118)

摘 要: *MxIrt1* 是从苹果属植物小金海棠中克隆出的二价阳离子转运膜蛋白基因。为进一步研究该基因的功能, 利用 *MxIrt1* 基因位于第 3 和第 4 跨膜区之间的 162 bp 片段, 构建了原核表达载体 pGEX-MxIrt1, 经原核表达、亲和层析、获得 GST-MxRT1 融合蛋白, 以融合蛋白为抗原, 制备多克隆抗体, ELISA 方法检测抗体效价阳性, 蛋白质印迹检测植物体内总蛋白, 获得与预期大小一致的特异性条带。上述结果表明, 表达的目的蛋白可用于免疫组织化学、蛋白质印迹检测。

关键词: 苹果属; 小金海棠; *MxIrt1* 基因; 特异片段; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S 661.1; Q 786 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 10-1411-06

Prokaryotic Expression of *MxIrt1* Genes Segment and the Preparation of Its Polyclonal Antibody

SUN Chun-yu^{1,2}, WANG Yi¹, KONG Jin¹, XU Xue-feng¹, LI Tian-zhong¹, and HAN Zhen-hai^{1*}

(¹ Institute of Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ² College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: *MxIrt1* is a iron transport protein gene from *Malus xiaojinensis*. To study the functional characteristic of *MxIrt1*, the recombinant plasmid pGEX-MxIrt1 was constructed with 162 bp segments between 3rd and 4th TMR (Transmembrane region), following the expression in *E. coli* with high efficiency, purification using Glutathione Sepharose 4B, the recombinant GST-MxRT1 protein was obtained. ELISA assay detected the reactivity of the polyclonal antibody and Western blot shows that specific band was corresponding to the expectation. The recombinant GST-MxRT1 protein can also be used for immunohistochemistry.

Key words: *Malus*; *Malus xiaojinensis*; *MxIrt1*; specific segment; prokaryotic expression; polyclonal antibody

铁是植物体生长发育必须的元素, 在植物体的光合作用、呼吸作用、氮的固定、蛋白质和核酸的合成等诸多生理代谢过程的电子传递链或酶促反应中发挥着极为重要的作用 (Welch, 1995; Thoirion et al, 1997)。果树在土壤钙化的情况下易发生缺铁黄叶病。虽然外部供应铁源可以矫正缺铁失绿症, 但通过养分投入的方式不能从根本上解决问题, 而“生物学路线”已成为研究解决果树铁素营养失调问题的根本途径 (韩振海和许雪峰, 1995)。

研究表明, *Irt1* 基因对于拟南芥从土壤中吸收铁是必需的。Vert 等 (2002) 采用基因插入法使拟南芥中 *Irt1* 基因失活, 获得了 *Irt1* 基因不表达的突变体植株, 在缺铁诱导时发现, *Irt1* 功能缺失的突变株表现为严重的缺铁黄化现象, 证明 *Irt1* 基因是维持拟南芥体内铁代谢平衡最主要的铁载体基因。

收稿日期: 2009 - 03 - 02; 修回日期: 2009 - 08 - 29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671441, 30700545); 北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: rschan@cau.edu.cn)

MxIrt1 基因是从铁高效植物小金海棠缺铁处理的根系 cDNA 文库中克隆出来的二价铁转运蛋白基因 (GenBank 登录号 AY193886), 推测其在抗缺铁胁迫高效利用铁方面起主要作用, 具有 “ZIP 基因家族” (Fox & Guerin, 1998) 的功能保守区域, 在第 3 与第 4 个跨膜螺旋之间有一富含组氨酸的区域 (HGHFHAHNNH), 而该区域被认为是金属离子的结合位点 (戚金亮等, 2004; 曹冬梅等, 2006; 王忆等, 2007; 张玉刚等, 2007)。

作者通过表达融合蛋白制备多克隆抗体, 为进一步研究该基因的功能提供有用的蛋白探针, 以期能够深入研究果树抗缺铁胁迫的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2006 年 7 月至 2007 年 3 月在北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室进行。原核表达质粒 pGEX-4T-1 由中国农业大学植物生理生化国家重点实验室王学臣教授惠赠; 大肠杆菌 BL21 及小金海棠组培苗由北京市果树逆境生理与分子生物学重点实验室保存, Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱料为 Amersham-Pharmacia Biotech 公司产品。

1.2 原核表达载体 pGEX-Irt 的构建

以 pGEM-Irt 为模板设计特异性引物, 利用 PCR 技术扩增 *MxIrt1* 基因位于第 3 和第 4 跨膜区之间的非保守区 162 bp 片段。

上游引物为: 5'-GGCGAATTC TGTA GAACTGGAGTTA TCCCA-3', 下游引物为: 5'-GACTCGAGAA-CACGATAACGGGACAGC-3' (下划线分别为 *EcoR* 和 *Xho* 酶切位点)。

PCR 反应条件: 94 变性 3 min, 94 变性 30 s, 65 复性 50 s, 72 延伸 50 s, 35 个循环, 72 延伸 10 min。

回收 PCR 产物; 取 5 μ g pGEX-4T-1 质粒及 PCR 产物分别用 *EcoR* 和 *Xho* 在 37 双酶切 2 h, 回收酶切产物, 在 T₄DNA 连接酶的作用下连接过夜得到重组质粒 pGEX4TMxIrt1 K。用 *EcoR* 和 *Xho* 酶切重组质粒 pGEX4TMxIrt1 K, 得到预期大小的目的条带后进行 DNA 序列测定。

1.3 融合蛋白的诱导表达及检测

将构建好的原核表达载体转化 *E. coli* BL21 感受态细胞, 涂布于 LB 固体平板, 37 培养过夜, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆。挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中 (含 100 mg \cdot L⁻¹ Amp), 37 200 r \cdot min⁻¹ 摇菌培养过夜。按 1:100 的比例接种到新鲜液体 LB 培养基中 (含 100 mg \cdot L⁻¹ Amp), 37 200 r \cdot min⁻¹ 至 OD₆₀₀ 达到 0.5~1.0, 分别在 22、25、28、30 条件下, 使用不同 IPTG 浓度 (0.1、0.2、0.5、0.8 和 1.0 mol \cdot L⁻¹) 进行诱导表达。

在诱导不同时间 (1、2、3、4 和 5 h) 后取 1 mL 菌液样, SDS-PAGE 检测表达情况, 确定最佳表达条件。

1.4 融合蛋白的纯化

使用最佳的诱导条件进行大量诱导表达, 5 000 r \cdot min⁻¹ 离心 15 min 收集培养物, 1 L 培养物重悬于 50 mL PBS (137 mmol \cdot L⁻¹ NaCl; 2.7 mmol \cdot L⁻¹ KCl; 10 mmol \cdot L⁻¹ Na₂ HPO₄; 2 mmol \cdot L⁻¹ KH₂ PO₄, pH 7.4), 含 5 mmol \cdot L⁻¹ DTT。在冰浴条件下超声破碎菌体细胞, 收集超声后液体, 4 , 20 000 r \cdot min⁻¹ 离心 20 min, 取上清液, 4 保存。用 Glutathion Sepharose 4B 亲和层析柱料 (已溶胀) 4 进行蛋白质的纯化, 然后用 50 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0 (含 10 mmol \cdot L⁻¹ 的还原型谷胱甘肽) 进行洗脱, 用截留分子量 5 000 的超滤装置对洗脱蛋白超滤浓缩, 根据 Bradford (1976) 的测定方法以牛血清白蛋白标准液为对照测定蛋白浓度。少许留样进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 抗 GST-MxIRT融合蛋白抗体的制备

以浓缩后的蛋白为抗原免疫新西兰兔, 用量为每次每只 1 mg。首免 纯化的融合蛋白与福氏完全佐剂按 1:1 混合乳化, 背部多点皮内注射, 注射卡介苗 50 μ L; 二免与三免: 纯化的融合蛋白与福氏完全佐剂按 1:1 混合乳化, 背部多点皮内注射; 四免后小量采血, 用 ELISA 方法测定血清效价, 若效价合格, 四免后取全血 (颈部动脉取血)。

每次免疫间隔为 10 d, 免疫血清在 4 $^{\circ}$ C 下静置过夜, 5 000 \times g 离心 10 min, 将上清液用 HiTrapTM ProteinA 亲和层析, 将纯化后的抗体分装, -80 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 抗 GST-MxIRT融合蛋白抗体的检测

ELISA 方法检测血清效价: 将 GST-MxIRT1 融合蛋白溶于包被液 (50 mmol \cdot L⁻¹ 碳酸钠缓冲液, pH 9.6) 中稀释至终浓度为 1 μ g \cdot mL⁻¹, 在酶标板的反应孔内准确加入包被液各 100 μ L, 并将酶标板放于湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 下保温 2 h, 4 $^{\circ}$ C 冰箱静置 48 h。用 PBST (10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, 150 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, 0.05% Tween-20) 洗涤 3 次, 然后按照每孔 200 μ L 的量加入封闭液 (TBS + 3% BSA); 用 PBST 洗涤 3 次; 每孔分别加入 200 μ L 血清 (稀释不同倍数) 及稀释液 (0.01 mol \cdot L⁻¹, pH 7.4 磷酸盐缓冲液作为对照), 37 $^{\circ}$ C 下温育 2 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入辣根过氧化物酶标记的 HRP-山羊抗兔二抗 200 μ L, 37 $^{\circ}$ C 下温育 1 h; 弃上清液, PBST 洗涤 3 次; 加入邻苯二胺 (OPD) 200 μ L, 室温暗处显色 10 ~ 20 min, 每孔加入 50 μ L 2 mmol \cdot L⁻¹ H₂SO₄ 终止反应后, 在酶标仪上 490 nm 处测定其 OD 值。

蛋白质印迹鉴定抗体的特异性: 将重组蛋白 GST-MxIRT 进行 SDS-PAGE, 电泳后半干式转移将胶上的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 以 5% 的脱脂奶粉封闭, 先以荧光素标记的抗 GST 抗体为抗体对表达产物进行 Western blot 分析; 然后以纯化后的抗体为一抗, 以碱性磷酸酶标记的山羊抗兔抗体为二抗, 提取小金海棠叶片总蛋白进行 Western blot 检测。植物总蛋白的提取参照 Damerval 等 (1986) 的方法。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体 pGEX-Irt 的构建

通过 PCR 方法, 用特异引物从 pGEM-MxIrt1 中扩增出位于 *MxIrt1* 基因第 3 和第 4 跨膜区之间的 162 bp 片段 (图 1)。

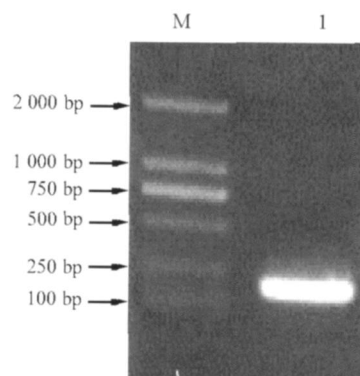


图 1 *MxIrt1* 基因 162 bp 中间片段 PCR 扩增结果

M. DNA2000 分子量标准; 1. PCR 扩增产物。

Fig. 1 Result of PCR amplification

M. DNA2000 ladder; 1. PCR products

将其回收、连接、转化后经过菌落 PCR 鉴定和提取重组质粒进行酶切鉴定后, 出现 160 bp 的目的条带 (图 2), 说明该目的片段已接到原核表达载体 pGEX-4T-1 上, 构建了原核表达载体 pGEX4T-MxIrtI K。序列测定结果表明构建质粒的序列完全正确, 未出现碱基突变及移码现象。

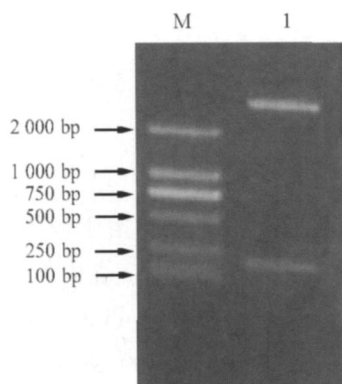


图 2 重组表达质粒 pGEX4T-MxIrtI K 的酶切鉴定图

M. DNA2000 分子量标准; 1. 转化子酶切后结果。

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pGEX4T-MxIrtI K by restriction digestion

M. DNA2000 ladder; 1. Restriction digestion of recombination

2.2 融合蛋白的诱导表达及 Western blot 检测

将构建好的原核表达载体 pGEX4T-MxIrtI K 转化大肠杆菌后, 在酶切和基因测序的基础上, 证明外源基因已插入原核表达载体。

挑取单菌落, 在不同温度下以不同浓度的 IPTG 诱导, 经过不同时间取样检测, SDS-PAGE 电泳结果表明, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 4 h, 32 kD 的 GST-MxIrtI K 融合蛋白表达量最高, 而空载体和不加 IPTG 的表达质粒没有目的蛋白的表达。

以荧光素标记的抗 GST 抗体为抗体进行 Western blot 结果表明目的条带得到正确表达 (图 3)。

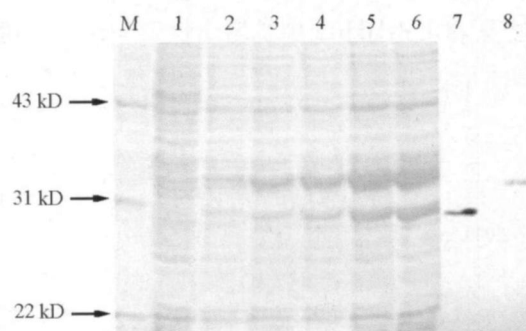


图 3 重组表达质粒 pGEX4T-MxIrtI K 表达产物的 SDS-PAGE 分析以及 Western blot 检测结果

M: 标准蛋白分子量; 1: 未经诱导的转化子表达的总蛋白;

2~6: 诱导 1~5 h 后转化子表达的总蛋白; 7: 转化 pGEX-4T-1 菌株经诱导后的 Western blot 分析;

8: 转化 pGEX4T-MxIrtI K 菌株经诱导后的 Western blot 分析。

Fig. 3 SDS-PAGE and Western blot analysis for the expression product of pGEX4T-MxIrtI K

M: Protein marker; 1: Total proteins of uninduced *E. coli* transformed with pGEX4T-MxIrtI K;

2-6: Total proteins of induced *E. coli* transformed with pGEX4T-MxIrtI K with different time;

7: Western blot analysis of expression products of pGEX-4T-1;

8: Western blot analysis of expression products of pGEX4T-MxIrtI K

2.3 融合蛋白制备多克隆抗体的鉴定

序列分析表明 *MxIrt1* 基因的 cDNA 全长为 1 398 bp, ORF 为 1 095 bp, 编码一个 364 个氨基酸的多肽, 是一具有 7 个跨膜螺旋的膜蛋白, 推测其分子量为 42 kD (戚金亮, 2003)。

若制备的抗体能够识别植物体内的抗原, 则应在相应蛋白质分子量处有特异条带的出现, 利用纯化的 GST-MxIrt1 融合蛋白免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体, 以常规间接 ELISA 法测定抗体的效价, 该抗血清的效价为阳性。

将抗血清用 HiTrapTM ProteinA 亲和层析纯化后, 以纯化后的抗体为一抗, 以碱性磷酸酶标记的山羊抗兔抗体为二抗, 提取小金海棠叶片总蛋白进行 Western blot。结果如图 4 所示, 在预期蛋白质分子量 40 kD 处有一特异性条带, 说明该抗体能够识别植物体内抗原, 进行特异性反应。

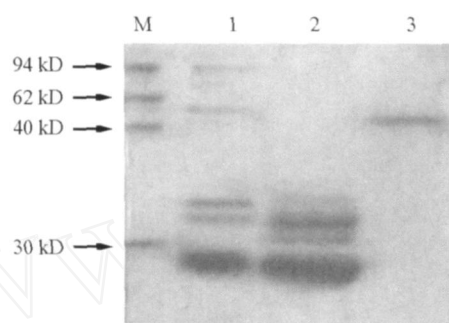


图 4 纯化抗体的 Western blot 分析

M: 预染 Marker; 1: 转化 pGEX-4T-1 菌株的 Western blot 结果;

2: 纯化的融合蛋白的 Western blot 结果; 3: 提取小金海棠叶片总蛋白 Western blot 结果。

Fig. 4 Western blot analysis of purified antibody

M: Protein marker; 1: Western blot with pGEX-4T-1;

2: Western blot with purified protein; 3: Western blot with total protein of *Malus xiaojinensis* leaf

3 讨论

膜蛋白具有较强疏水性, 很难用原核细胞表达完整蛋白。有的研究将目的蛋白的 C 端进行原核表达 (胡锐颖 等, 2007; 钟英成 等, 2007), 制备的多克隆抗体可成功用于免疫组织化学、蛋白质印迹检测等方面; 有的研究将基因的各个抗原结构域分别进行原核表达, 不仅缩短了表达片段的长度, 更获得了可溶性目的蛋白 (徐璐 等, 2006); 也有用真核表达系统进行膜蛋白的表达, 但表达量较低, 不能满足进一步研究的需要。*MxIrt1* 是从苹果属植物小金海棠缺铁处理的根系 cDNA 文库中克隆出的二价阳离子转运膜蛋白基因 (王忆 等, 2007)。通过对不同种属植物 *Irt1* 基因的序列分析发现, 在跨膜结构域 3 和 4 之间, 只有 2 个氨基酸残基完全相同, 且该区富含 His, 对于金属离子的结合与跨膜转运十分重要, 改变其内的某些氨基酸残基可改变其对二价金属离子结合的特性 (渠慎春 等, 2004)。本试验中尝试将 *MxIrt1* 基因位于第 3 和第 4 跨膜区之间的非保守区 162 bp 构建到原核表达载体 pGEX-4T-1 中, 相对于表达该基因的全长来说, 一方面能够克服膜蛋白较难表达的问题, 同时有利于得到更为特异的抗体。进一步的试验表明所制备的抗体能够与植物体内相应的抗原发生特异反应, 从而为进一步研究该基因的功能奠定了基础, 同时也为膜蛋白原核表达摸索了新的途径。

References

- Bradford Marion M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248 - 254.
- Cao Dong-mei, Xu Xue-feng, Han Zhen-hai. 2006. Identification and prokaryotic expression of transcription factor *MxMYB1* gene in *Malus xiao-*

- jinensis Acta Horticulturae Sinica, 33 (4): 833 - 835. (in Chinese)
- 曹冬梅, 许雪峰, 韩振海. 2006. 苹果属小金海棠转录因子 *MxMYB1* 基因的克隆及其原核表达. 园艺学报, 33 (4): 833 - 835.
- Damerval C, de Vienne D, Zivy M, Thielllement H. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. Electrophoresis, 7 (1): 52 - 54.
- Fox T C, Guerino M L. 1998. The molecular biology of cation transport in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 49: 669 - 696.
- Han Zhen-hai, Xu Xue-feng. 1995. Current status and perspectives of different Fe-efficient fruit species. Horticulture Review (D). Beijing: Science Press: 1 - 12. (in Chinese)
- 韩振海, 许雪峰. 1995. 不同铁效率果树基因型研究的现状和前景. 园艺学年评 (D). 北京: 科学出版社: 1 - 12.
- Hu Rui-ying, Xu Peng, Chen Yue-lei, Lou Xin, Ding Xiao-yan. 2007. Preparation and characterization of polyclonal antibody against xenopus PAPC. Progress in Biochemistry and Biophysics, 34 (2): 222 - 228. (in Chinese)
- 胡锐颖, 徐 鹏, 陈跃磊, 娄 鑫, 丁小燕. 2007. 非洲爪蟾 PAPC多克隆抗体的制备及其特异性鉴定. 生物化学与生物物理进展, 34 (2): 222 - 228.
- Qi Jin-liang. 2003. Biotechnology research of iron-efficient genotype in the genus *Malus*-cloning of *MxNramp1* and *MxNr1* [Ph. D. Dissertation]. Beijing: China Agricultural University. (in Chinese)
- 戚金亮. 2003. 苹果铁高效基因型生物技术研究——*MxNramp1* 和 *MxNr1* 基因的克隆 [博士论文]. 北京: 中国农业大学.
- Qi Jin-liang, Han Zhen-hai, Yin Lip-ing, Xu Xue-feng, Zhang Lian-zhong. 2004. Cloning of *Nramp* gene fragment being relating to resistance of iron deficiency stress from *Malus xiaojinensis*. Acta Horticulturae Sinica, 31 (3): 360 - 362. (in Chinese)
- 戚金亮, 韩振海, 印莉萍, 许雪峰, 张连忠. 2004. 小金海棠抗缺铁相关基因——*Nramp*基因片段的克隆. 园艺学报, 31 (3): 360 - 362.
- Qu Shen-chun, Zhang Zhen, Qiao Yu-shan. 2004. Advance of ZIP gene family related to iron transporter in plant. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 24 (7): 1348 - 1354. (in Chinese)
- 渠慎春, 章 镇, 乔玉山. 2004. 植物 ZIP基因家族铁载体蛋白基因研究进展. 西北植物学报, 24 (7): 1348 - 1354.
- Thoirion S, Pascal N, Briat J F. 1997. Impact of iron deficiency and iron Fe-supply during the early stages of vegetative development in maize (*Zea mays* L.). Plant Cell and Environment, 20: 1051 - 1060.
- Vert G, Grütz N, Dedaldecham F. 2002. RT1, an *Arabidopsis* transporter essential for iron uptake from the soil and plant growth. Plant Cell, 14 (6): 1223 - 1233.
- Wang Yi, Qi Jin-liang, Xu Xue-feng, Li Tian-zhong, Kong Jin, Han Zhen-hai. 2007. Cloning and prokaryotic expression of apple *MxNr1* gene. Acta Horticulturae Sinica, 34 (4): 999 - 1002. (in Chinese)
- 王 忆, 戚金亮, 许雪峰, 李天忠, 孔 瑾, 韩振海. 2007. 苹果 *MxNr1* 基因的克隆与原核表达. 园艺学报, 34 (4): 999 - 1002.
- Welch R M. 1995. Micronutrient nutrition of plants. Crit Rev Plant Sci, 14: 49 - 82.
- Xu Lu, Fan Xue-zheng, Wang Qin, Jiang Chun-yan, Ning Yi-bao, Wang Tai-jian. 2006. Study on the construction and expression of SM strain of classical swine fever virus E2 gene in *E. coli*. Scientia Agricultura Sinica, 39 (4): 814 - 818. (in Chinese)
- 徐 璐, 范学政, 王 琴, 蒋春燕, 宁宜宝, 王泰健. 2006. 猪瘟病毒石门株 E2 基因 4 个抗原结构域的原核表达. 中国农业科学, 39 (4): 814 - 818.
- Zhang Yu-gang, Xu Xue-feng, Li Tian-zhong, Wang Yi, Kong Jin, Han Zhen-hai. 2007. Isolation of Fe deficiency-induced genes by suppression subtractive hybridization in *Malus xiaojinensis*. Acta Horticulturae Sinica, 34 (3): 555 - 560. (in Chinese)
- 张玉刚, 许雪峰, 李天忠, 王 忆, 孔 瑾, 韩振海. 2007. 抑制性消减杂交分离苹果缺铁诱导的相关基因. 园艺学报, 34 (3): 555 - 560.
- Zhong Ying-cheng, Shi Shuang, Zhang Ying-mei, Mo Xiao-ning, Liu Da-zhen, Song Quan-sheng, Han Wen-ling, Wang Ying. 2007. Expression, purification and identification of a novel human cytokine C-terminal 51 amino protein of CKLFSF2 in *E. coli*. Progress in Biochemistry and Biophysics, 34 (1): 93 - 99. (in Chinese)
- 钟英成, 石 爽, 张颖妹, 莫晓宁, 刘大振, 宋泉声, 韩文玲, 王 应. 2007. 人类新细胞因子 CKLFSF2 羧基端蛋白在大肠杆菌中的表达纯化、抗体制备与鉴定. 生物化学与生物物理进展, 34 (1): 93 - 99.