

苹果 *MxIrt1* 基因的克隆与原核表达

王 忆, 戚金亮, 许雪峰, 李天忠, 孔 瑾, 韩振海*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京市果树逆境生理与分子生物学实验室, 北京 100094)

摘 要: 根据植物 RT (Iron Regulated Transporter) 家族的功能保守区设计引物, 通过 RACE法从缺铁胁迫处理的小金海棠根系 cDNA 文库中克隆得到了 Fe^{2+} 转运蛋白基因 cDNA 全长, 将其命名为 *MxIrt1* (*Malus xiaojinensis* Iron regulated transporter 1)。将 *MxIrt1* cDNA 片段与 pET30a 构建原核表达载体 pEIrt, 转化大肠杆菌 BL21。SDS - PAGE 电泳检测结果表明, 以 30 、 0.5 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导该基因表达效果最好, 诱导产物为一个 40 kD 的蛋白。为进一步纯化和鉴定目的蛋白提供了试验基础。

关键词: 苹果; 小金海棠; Fe^{2+} 转运蛋白; 基因克隆; 原核表达

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 04-0999-04

Cloning and Prokaryotic Expression of Apple *MxIrt1* Gene

WANG Yi, QI Jin-liang, XU Xue-feng, LI Tian-zhong, KONG Jin, and HAN Zhen-hai*

(Fruit Stress Physiology and Molecular Biology Laboratory of Fruit Tree, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: A Full length cDNA of *MxIrt1* gene from the iron-stressed root cDNA library of *Malus xiaojinensis* Chent et Jiang was cloned using the RACE method with primers designed based on the conserved domain sequences of plant RT gene families. The recombinant prokaryotic expression vector pEIrt was constructed using vector pET30a. Restriction endonuclease analysis, PCR amplifying and sequencing confirmed that the construction was correct and had no base mutant. The prokaryotic expression analysis was carried out through transformation of *E. coli* (BL21). The SDS - PAGE electrophoresis analysis showed that the best expression was induced by 30 and 0.5 mmol · L⁻¹ IPTG, under which a 40 kD recombinant protein was produced. These results will provide a foundation for further purifying and identifying objective protein.

Key words: Apple; *Malus xiaojinensis*; Fe^{2+} -transporter; Gene cloning; Prokaryotic expression

1986年 Romheld 和 Marschner 首先提出高等植物在长期适应缺铁胁迫过程中逐渐形成两种适应性机理。在缺铁胁迫的条件下, 机理 I 型植物可通过激活 H^+ -ATPase 使土壤酸化 (Guerinot & Yi, 1994), 并通过特异的根部还原酶将 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 之后通过 Fe^{2+} 转运蛋白 (transporter) 跨膜转运入植物根部。

人们首先从拟南芥中克隆到 Fe^{2+} 转运蛋白基因 (Eide et al, 1996), 之后又陆续在番茄、水稻等植物中克隆到同源基因 (Mori, 1997; Eckhardt et al, 2001)。果树, 由于其生长周期长, 遗传背景复杂等原因, 使得在基因研究方面相对滞后。小金海棠是苹果属植物中的一种铁高效基因型 (Han et al, 1994)。本研究的目的是克隆小金海棠 Fe^{2+} 转运蛋白基因, 为研究果树铁转运机理以及应用功能基因奠定基础。

收稿日期: 2006 - 11 - 15; 修回日期: 2007 - 03 - 22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671441); 国家转基因植物专项项目 (JY04-B-02)

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

1 材料与方

所用材料为苹果砧木小金海棠 (*Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang), 经组织培养生根后, 在营养液中生长。工程菌 *E. coli*, DH5⁺, BL21及质粒 pET-30a (+) 由本实验室保存。克隆载体 pGEM-T、回收试剂盒及各种限制性内切酶、DNA 聚合酶、IPTG、X-gal等均为大连宝生物公司产品。引物合成及测序均由上海生工生物工程技术有限公司提供。

根据 GenBank中公布的 Fe^{2+} 转运蛋白基因家族的功能保守区域设计一对常规 PCR 引物 P1: CAGCTTCCTCCGTATCGTGT和 P2: AACTTCAAGCCCATTTAGCC, 以提取的小金海棠缺铁胁迫处理的根系 cDNA文库的 DNA为模板进行扩增、测序后, 根据 cDNA片段序列, 分别设计 3和 5端引物 P3: TTGAAGTTCGGGTAAA TCGG, P4: ACACGATAACGGAGAA GCA G; 并设计载体上的筛选扩增引物 P5: ATACGACTCACTATAGGGCCAA TT, P6: CTCGGGAAGCGCGCCATTGTGT。使用 P3、P5及 P4、P6分别对扩增条带进行 3和 5端的 RACE扩增, 拼读出 cDNA全长并进行常规 PCR扩增得到小金海棠 Fe^{2+} 转运蛋白基因全长 cDNA。PCR产物回收后与 pGEM-T连接转化 DH5⁺, 得到重组子并进行质粒测序。

挑取阳性克隆, 利用引物 P7: GCGCGGATCCA TGGCTGCCACCAAGTCAC和 P8: GCGACTCGAGGCCCACTTTGCCAATAC扩增并引入 *Bam*H 及 *Xho* 位点。双酶切扩增片段及载体 pET-30a后进行连接, 得到重组子, 命名为 pEIr_t。将其与 pET-30a (+) 分别并转化 BL21菌株, 对转化子进行测序。挑取 pEIr_t阳性克隆及 pET-30a (+) 接种于 LB液体培养基中 ($\text{Km } 50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37℃振荡培养过夜。以 1:100的比例接种于 20 mL LB液体培养基中, 30℃及 37℃分别培养至 OD_{600} 为 0.5时加入 IPTG浓度至 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。诱导 0~7 h, 每小时取 1 mL菌液进行离心收集。沉淀用 $100 \mu\text{L } 1 \times \text{SDS}$ 加样缓冲液重悬后煮沸 5 min, 经 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 1 min, 取 $25 \mu\text{L}$ 上清液进行 SDS-PAGE电泳检测。凝胶用考马斯亮蓝 R-250染色并脱色至背景清晰。

2 结果与分析

2.1 *MxIrt1* 基因的克隆与序列比较

以提取的小金海棠缺铁胁迫处理的根系 cDNA文库的 DNA为模板, 扩增出 490 bp 的单一特异性条带 (图 1)。

回收纯化 PCR产物后经测序并进行序列同源性比较表明, 该 cDNA片段与番茄和豌豆的该家族基因分别具有 86%和 84%的氨基酸序列同源性, 证明该扩增产物是 Fe^{2+} 转运蛋白家族基因片段, 为进一步通过 RACE法克隆其 cDNA全长序列提供了前提条件 (图 2)。

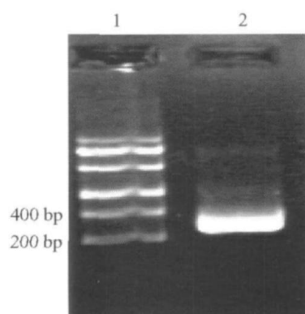


图 1 *MxIrt1* 基因片段的常规 PCR 扩增结果
Fig. 1 The PCR amplification result of *MxIrt1*

1. DNA marker; 2. Products of PCR.

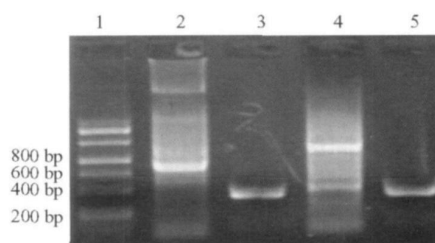


图 2 3'RACE、5'RACE 及产物的常规 PCR 鉴定
Fig. 2 The PCR amplification and identification results of 3'RACE and 5'RACE

1. DNA marker; 2. Products of 3'RACE; 3. Products of PCR for identifying 3'RACE; 4. Products of 5'RACE; 5. Products of PCR for identifying 5'RACE.

根据 3 和 5 RACE 测序结果拼读出的小金海棠 Fe^{2+} 转运蛋白基因的 cDNA 全长序列为 1 398 bp, 命名该基因为 *MxIrt1* (GenBank 登陆号: 193886)。

对该序列进行分析表明, 该序列含有一个编码 364 个氨基酸的完整阅读框架, 且起始密码子上游有一终止密码。由此证明 5 RACE 扩增产物序列是完整的 5 末端序列, 也由此证明拼读出的序列就是小金海棠 Fe^{2+} 转运蛋白基因的 cDNA 全长序列。

根据 3 和 5 RACE 序列拼读出的全长序列, 设计引物并扩增出 *MxIrt1* cDNA 完整编码区构建入克隆载体 pGEM-T。

2.2 *MxIrt1* 基因原核表达载体 pEirt 的构建

PCR 扩增 *MxIrt1* cDNA 后, 得到约 1 100 bp 包含启动子及去除 TAA 终止子的基因片段。将其与 pET-30a (+) 质粒分别用 *Bam*H 和 *Xho* I 双酶切, T4 连接酶连接, 构建重组质粒 pEirt (图 3)。

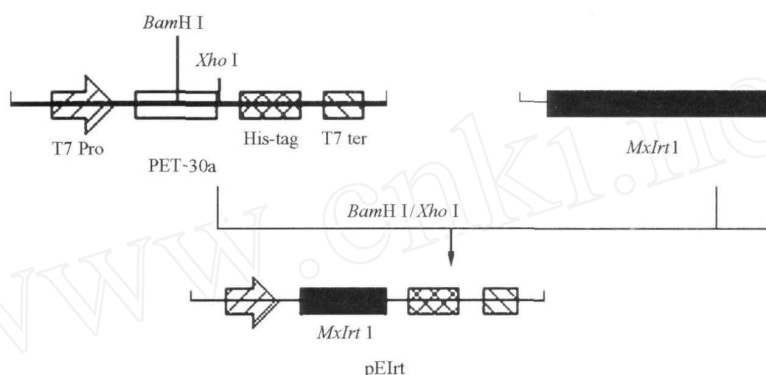


图 3 pEirt 质粒的构建策略

Fig 3 Construction of plasmid pEirt

对其进行酶切鉴定和测序 (图 4), 证实重组质粒的外源基因插入正确, 并与其后载体上 6 个 His-Tag 正确融合。

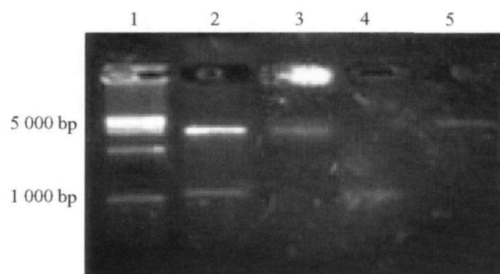


图 4 pEirt 酶切鉴定

Fig 4 Restriction enzyme identification of pEirt

1. DNA marker; 2. pEirt/*Bam*H + *Xho* I; 3. pET/*Bam*H + *Xho* I; 4. *MxIrt1* PCR; 5. pEirt plasmid

2.3 *MxIrt1* 基因的原核表达与 SDS-PAGE 分析

对 pEirt 进行原核表达发现, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 进行诱导时, 37 诱导 6 h 以上均未出现特异条带。改变诱导温度, 30 诱导 6 h 可以看到目的蛋白大小处 (约 40 kD) 出现微弱蛋白表达量的增加。改变诱导物 IPTG 浓度至 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 30 下, 1 h 后即可见到相应蛋白条带大量表达 (图 5), 随着诱导时间的增加, 表达产物条带愈加明显。菌液上清液中未见到有目的蛋白表达。

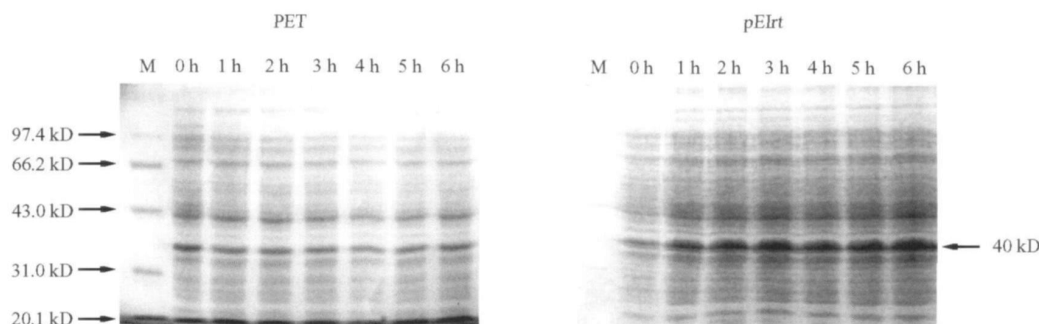


图 5 *MxIrt1* 基因原核表达 SDS - PAGE电泳

$0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG诱导。

Fig 5 SDS - PAGE analysis of the expression of *MxIrt1* gene in pET30a vector

Induced by $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG

原核表达选用的载体 pET-30a (+), 是一种适合植物基因在原核生物中高效表达的质粒载体, 外源基因在插入时确保读码框与载体读码框相一致, 并与载体中自带的 6 个 His-Tag 相融合。His-Tag 融合在 *MxIrt1* 的 C 端, 尽量避免由于外源蛋白的表达影响 *MxIrt1* 蛋白的结构。通过调整 IPTG 浓度及诱导时间、诱导温度, 预期分子量 40 kD 左右的蛋白条带深度有所增加。而用空质粒转化的 BL21 菌体和含有转化子但未经诱导的菌体在该蛋白条带处均未出现此条带, 因此可以基本确定这一蛋白条带为表达的融合蛋白。目前, 应用原核表达获得目的蛋白是比较常规的、大量获得蛋白的有效途径 (Baneyx, 1999)。但由于该蛋白推测为膜蛋白, 软件分析含有约 7 个跨膜结构域, 因此蛋白表达大多会以包涵体存在于沉淀当中, 对今后进一步纯化回收提出了更高要求。由于试验中已使 *MxIrt1* 基因与 His-Tag 标签融合, 就可以进一步采用亲和层析通过 Ni 柱的方法纯化得到蛋白, 制备抗血清, 极大方便了下一步工作的开展, 如直观地检测基因调控效果、表达情况等。

有报道表明, 在拟南芥中 RT 家族在调控铁吸收和转运过程中, 存在两级调控机制, 即转录水平和转录后水平, 尤其在 Zn、Cd 过量的情况下发现两者趋势并不相同 (Connolly et al, 2002)。因此, 在苹果中研究 *MxIrt1* 基因, 其蛋白的获得对于研究基因表达调控是必不可少的。当然, 对于蛋白提取难度大的问题, 也可以选取 *MxIrt1* 基因 3、4 跨膜结构之间的一段可变区, 约 50 个氨基酸直接进行原核表达, 利用这一段非跨膜区表达蛋白, 既可避免膜蛋白难提取的问题, 又因分子量小而易于操作, 且同样可以制备抗血清对 *MxIrt1* 进行进一步研究。

References

- Baneyx F. 1999. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotech*, 10: 411 - 421.
- Connolly E L, Fett J P, Gueriot M L. 2002. Expression of the RT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell*, 14 (6): 1347 - 1357.
- Eckhardt U, Mas Marques A, Buckhout T J. 2001. Two iron-regulated cation transporters from tomato complement metal uptake-deficient yeast mutants. *Plant Mol Biol*, 45 (4): 437 - 448.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Gueriot M L. 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Aca Sci (USA)*, 93: 5624 - 5628.
- Gueriot M L, Yi Y. 1994. Iron: Nutritious, noxious and not readily available. *Plant Physiol*, 104: 815 - 820.
- Han Z H, Shen T, Korcak R F, Baligar V C. 1994. Screening for iron-efficient species in the genus *Malus*. *J. Plant Nutri*, 17: 579 - 592.
- Mori S. 1997. Reevaluation of the genes induced by iron deficiency in barley roots. In: Ando Tadao eds. *Proceedings of the X international plant nutrition colloquium*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers: 249 - 254.
- Romheld V, Marschner H. 1986. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophore in roots of grasses. *Plant Physiol*, 80: 175 - 180.