

# 苹果 AFS 基因的克隆与原核表达

李 萌<sup>1,2</sup> 隋 娜<sup>2</sup> 张元湖<sup>2\*</sup> 孟庆伟<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 山东省农业科学院, 济南 250100; <sup>2</sup> 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018)

**摘 要:** 通过 RT-PCR 扩增到苹果  $\gamma$ -法尼烯合成酶 ( $\gamma$ -Farnesene Synthase, AFS) 基因的编码区全长, 将其克隆到 pET-30a (+) 上, 构建了该基因的原核表达载体 pET-AFS, 转化大肠杆菌 BL21。SDS-PAGE 检测结果表明, 此基因表达了 1 个约 66 kD 的蛋白, 1 mmol/L 异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导该基因高效表达, 6 h 表达量最高, 诱导产物以包涵体形式存在。

**关键词:** 苹果;  $\gamma$ -法尼烯; 原核表达; SDS-PAGE

**中图分类号:** S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 01-0122-03

## Cloning and Prokaryotic Expression of Apple AFS Gene

Li Meng<sup>1,2</sup>, Sui Na<sup>2</sup>, Zhang Yuanhu<sup>2\*</sup>, and Meng Qingwei<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China; <sup>2</sup> College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China)

**Abstract:**  $\gamma$ -farnesene synthase (AFS) gene from apple peel tissue was amplified by RT-PCR, and cloned into pET-30a (+) vector to construct recombinant prokaryotic expression vector pET-AFS. After transformation of *E. coli* and induced by 1 mmol/L isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), recombinant protein with 66 kD was expressed in pET-AFS system and separated by SDS-PAGE electrophoresis. The maximum of protein was expressed when induced with IPTG for 6 h. The recombinant protein expressed as inclusion bodies.

**Key words:** Apple;  $\gamma$ -farnesene; Prokaryotic expression; SDS-PAGE

### 1 目的、材料与方法

众多试验证实  $\gamma$ -法尼烯与苹果贮藏中的生理病害虎皮病的发生有关。 $\gamma$ -法尼烯的合成受到多个酶的调控, 其中  $\gamma$ -法尼烯合成酶 (AFS) 是最直接的限速酶。AFS 基因已经得到克隆, 研究发现它对苹果低温贮藏前 8 周的  $\gamma$ -法尼烯的释放起重要调控作用<sup>[1]</sup>。作者也已经成功得到 AFS 基因的 cDNA, 并研究了其在苹果冷藏出库后一段时间的表达与  $\gamma$ -法尼烯释放量的关系, 并根据此序列设计特异引物, 通过 RT-PCR 获得其编码区全长, 将其克隆入原核表达载体, 成功地在大肠杆菌中表达了该蛋白。

所用材料为‘青香蕉’ (White Peamain) 苹果, 采自泰安市郊区果园。在 0℃ 冷库中贮藏 8 周, 用于提取果皮 RNA, 此时 AFS 表达量最大<sup>[1]</sup>。工程菌 *E. coli* DH5<sup>+</sup>, BL21 及质粒 pET-30a (+) 由山东农业大学生命科学学院保存, 克隆载体 pMD18-T Vector 购于大连宝生物公司, 回收试剂盒为上海博雅公司产品, 各种 DNA 聚合酶、限制性内切酶、IPTG、X-gal 均为大连宝生物公司产品。

用 LCl 沉淀法提取苹果果皮中的总 RNA<sup>[2]</sup>。用 M-MLV 反转录酶 (Promega 公司) 合成 cDNA, 操作步骤根据说明书进行。根据已知序列 (注册号 AY563622) 设计特异引物, 由上海生工生物工程公司合成。引物 P1 的 5' 端引入 *Nco* 酶切位点, P2 的 5' 端引入 *Xho* 酶切位点, 在酶切位点外侧各加入 3 个保护碱基。P1: AGCCCATGGCTATGGAATTCAGAGTT, P2: GCGGAGCTCACTAGTTTACAA

收稿日期: 2005 - 01 - 17; 修回日期: 2005 - 04 - 19

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yyhzhang@sdau.edu.cn)

GAGG<sub>6</sub> 用上述引物进行 PCR 扩增: 94 预变 5 min, 94 变性 1 min, 55 退火 1 min, 72 伸 1 min 15 s, 循环 35 次, 72 延伸 10 min。10  $\mu$ L 反应液, 在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, Gel-Pro Analyzer 成像系统中观察并存储照片。PCR 产物回收后与 pMD18-T Vector 连接, 转化 *coli* DH5, 得到重组子。提取含目的片段的质粒在上海生工生物工程公司测序。

挑取阳性克隆, 提取质粒用 *Nco* 和 *Xho* 行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳检测后用回收试剂回收。挑取含 pET-30a (+) 空载体的克隆, 取质粒进行双酶切 (步骤同上)。将回收片段酶切后 pET-30a (+) 空载体连接, 得到重组质粒 pET-AFS (图 1), 转化大肠杆菌 BL21 受态细胞, 筛选阳性克隆在上海生工生物工程公司测序, 鉴定所插入的序列及其读码框是否正确。

挑取阳性克隆, 接种 LB 液体培养基 (含那霉素 50 mg/mL), 37 震荡培养过夜, 按 100 的比例接种于相同的 LB 培养基上, 37 培至 OD<sub>600</sub> 约为 0.5, 加入 IPTG 1 mmol/L 诱导 0、2、4、6 h, 离心并收集菌液, 4 , 12 000 g 离心

1 min, 弃上清液, 沉淀用 100  $\mu$ L 1  $\times$  SDS 凝胶加样缓冲液 (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 6.8; SDS 2%; 二硫苏糖醇 100 mmol/L; 溴酚蓝 0.1%; 甘油 10%) 重悬, 煮沸 3 min, 12 000 g 离心 1 min, 取 20  $\mu$ L 上清液进行 SDS-PAGE 检测。用考马斯亮蓝 R-250 染色 (染色液: 0.1% 考马斯亮蓝 R-250, 40% 甲醇, 10% 冰乙酸), 脱色 (脱色液: 25% 甲醇, 6% 冰乙酸) 至背景清晰为止。

## 2 结果与分析

### 2.1 苹果 AFS 基因的克隆与序列比较

RT-PCR 扩增得到含 AFS 编码区全长的序列, 电泳检测到 1 条约 1 700 bp 的电泳带 (图 2, A), 与已知序列大小相符。将其克隆到 pMD18-T vector 上, 转化大肠杆菌 DH5, 筛选阳性克隆, 酶切鉴定 (图 2, B)。序列比较发现, 与注册序列 (AY563622) 完全相同, 证明得到的 AFS 基因的编码区序列真实。与另一注册的苹果 AFS-1 (注册号 AY182241) 的 cDNA 序列的同源性高达 99.71%, 与在梨中克隆得到的 - 法尼烯合成酶基因 (注册号 AY566286) 的同源性为 97.40%。

### 2.2 苹果 AFS 基因原核表达载体 pET-AFS 的构建

重组质粒 pMD-AFS 和 pET-30a (+) 质粒分别都用 *Nco* 和 *Xho* 双酶切, 电泳回收约 1 700 bp

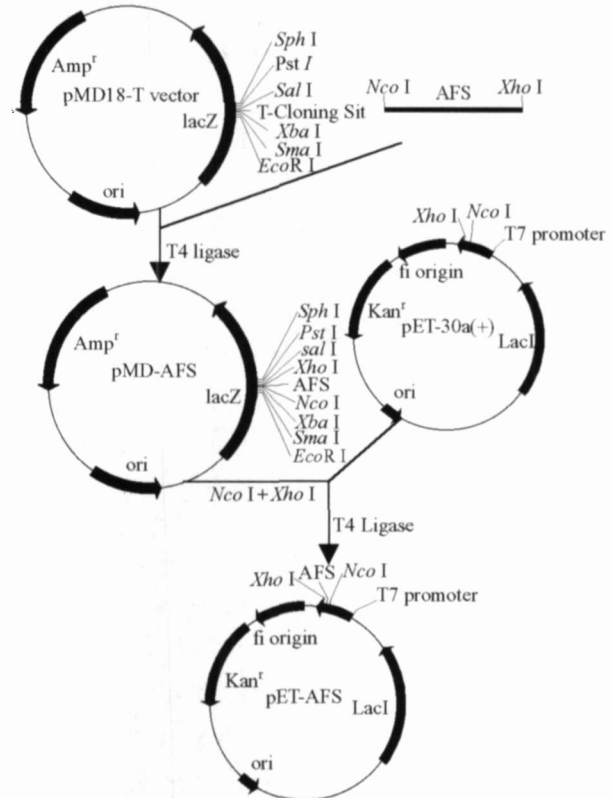


图 1 pET-AFS 的构建策略

Fig 1 Construction of pET-AFS

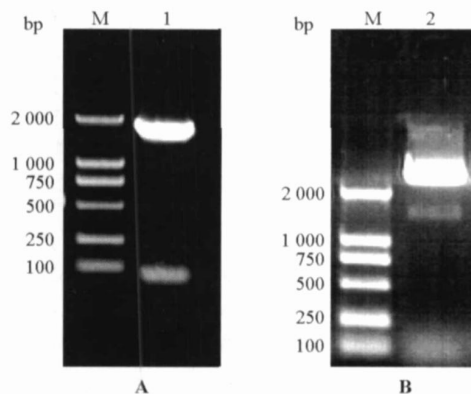


图 2 RT-PCR 扩增 AFS 基因 (A) 及 pMD-AFS 酶切鉴定 (B)

Fig 2 Amplification of cDNA of AFS gene (A) and restrictive enzyme digestion analysis of pMD-AFS (B)

M: DNA marker; 1: AFS gene; 2: pMD-AFS *Nco*I + *Xho*I

的片段及切开的空载体, 两者用 T4 DNA 连接酶连接, 构建重组质粒 pET-AFS, 转化大肠杆菌 BL21。筛选阳性克隆, *Nco*I 和 *Xho*I 双酶切及 PCR 验证 (图 3), 测序证实重组质粒的外源基因插入正确。

### 2.3 苹果 AFS 基因的原核表达与 SDS-PAGE 分析

重组质粒 pET-AFS 转入大肠杆菌 BL21 后用 IPTG 诱导其表达。结果发现, 重组质粒能够表达 1 条约 66 kD 的特异蛋白带, 而 pET-30 (+) 质粒表达的蛋白中没有这条带。而不用 IPTG 诱导的重组质粒也没有重组蛋白的表达。IPTG 诱导 6 h 后重组蛋白的表达量最高 (图 4), 重组蛋白以包涵体的形式存在, 在上清液中没有发现目的蛋白的表达。

Rupasinghe 等<sup>[3]</sup>纯化了  $\delta$ -法尼烯合成酶对其特性进行研究。AFS 表达的变化是引起果皮中  $\delta$ -法尼烯的含量变化的重要因素<sup>[1]</sup>。但是以上的研究均是以 AFS mRNA 的变化为依据进行, 而在蛋白水平上的变化则能更准确地反映 AFS 对  $\delta$ -法尼烯的含量和虎皮病发生的影响。利用普通的纯化方法已经很难得到纯度更高的 AFS 蛋白, 通过原核表达 AFS 蛋白制备抗体后利用免疫学的方法对其进行研究将是下一步的重点。

本研究将 AFS 的编码区序列导入 pET-30a (+) 载体中, 构建了原核表达载体 pET-AFS, 经 IPTG 诱导, 在大肠杆菌中表达了含 His-tag 的重组蛋白, SDS-PAGE 检测发现表达蛋白约为 66 kD, 与预计大小相符。表达蛋白以包涵体形式存在, 可有效地防止细菌蛋白酶的降解。pET-30a (+) 载体含有的组氨酸标记物序列编码的组氨酸标记融合尾比通常所用的标记物相对分子量小, 免疫性低, 亲和性好, 便于分离纯化。这为进一步研究 AFS 在蛋白水平上与  $\delta$ -法尼烯释放和虎皮病发生的影响奠定了基础。

### 参考文献:

- 1 Pechous SW, Whitaker B D. Cloning and functional expression of an (E, E)- $\delta$ -farnesene cDNA from peel tissue of apple fruit. *Planta*, 2004, 219 (1): 84~94
- 2 王关林, 方洪筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998. 609~610  
Wang GL, Fang H J. The technology and principle of plant genetic engineering. Beijing: Science Press, 1998. 609~610 (in Chinese)
- 3 Rupasinghe H P V, Paligath G, Muri D P. Sesquiterpene synthase: partial purification, characterization, and activity in relation to superficial scald development in apples. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 2000, 125: 111~119

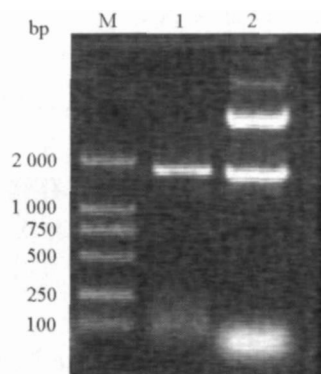


图 3 pET-AFS 的酶切与 PCR 鉴定

Fig. 3 Restrictive enzyme digestion and PCR analysis of pET-AFS  
M: DNA marker; 1: pET-AFS *Nco*I + *Xho*I; 2: PCR analysis of pET-AFS

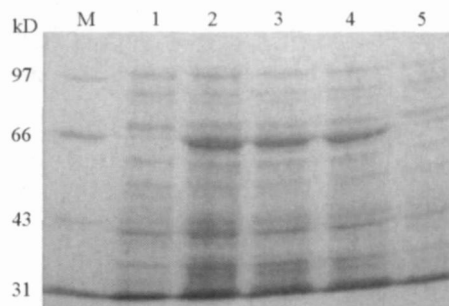


图 4 pET-AFS 在大肠杆菌 BL21 中表达的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of expression of pET-AFS in BL21  
M: Protein marker; 1: IPTG induced 6 h/pET-30a (+);  
2-5: IPTG induced 6, 4, 2, 0 h