

水稻 HL-CMS 中 orf216 蛋白的原核表达和多克隆抗体制备*

胡婧 程钢 谭艳平 王春台 刘学群**

中南民族大学生命科学院/生物技术国家民委重点实验室, 武汉 430074

摘要 以常规基因重组技术,将 *orf216* 基因克隆入含有内含肽标签的原核表达载体 pTYB1 中,得到重组质粒 pTYB1-*orf216*,经鉴定正确后,转化至大肠杆菌 ER2566 感受态细胞,15 °C 下 0.8 mmol/L IPTG 诱导 15 h 后,SDS-PAGE 检测到大小约 85 ku 的特异性蛋白条带,融合蛋白以可溶组分形式存在。融合蛋白经亲和纯化后制备多克隆抗体,Western blot 分析表明多克隆抗体具有较高的特异性,可与免疫原特异结合。

关键词 水稻;原核表达;亲和纯化;抗体

中图分类号 S 511.035.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)03-0257-05

植物细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility, CMS)是一种不能产生有活力花粉的遗传性状^[1],在高等植物中,是一种常见的生物学现象。CMS 通常是指核质互作型雄性不育,其雄性不育基因是由细胞质基因和细胞核基因互作共同控制的,具有正、反交遗传效应,表现母性遗传特点。自 Rhoades 等^[2]第一次在玉米中观察到细胞质雄性不育后,细胞质雄性不育成为研究植物母性遗传现象的最好材料之一。

细胞质雄性不育表现母性遗传特点,是通过细胞质遗传的,因此早期人们认为 CMS 是由线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 或叶绿体 (chloroplast DNA, cpDNA) 所决定的。由于越来越多的植物细胞质雄性不育相关基因被克隆,发现 mtDNA 与 CMS 直接相关^[3]。在 T-CMS 玉米中,存在编码一个 13 ku 蛋白的 T-*urf13* 基因^[4-5],这个 T-*urf13* 蛋白定位于线粒体内膜上^[6]。在甜菜不育系 Owen CMS 中,存在一个 ATP 合酶亚基编码基因 *atp6* 的 5' 前导序列编码的 35 ku 的蛋白,这个蛋白以五聚体或六聚体形式定位于线粒体内膜上^[7]。

根据恢、保关系,水稻 CMS 则可分为野败 (wild abortive, WA) 型、包台 (Chinsurah Boro II,

BT) 型和红莲 (Honglian, HL) 型等主要类型^[8]。刘学群等^[9]克隆了一个与 HL-CMS 相关的基因片段 *HL-sp1*。李丕顺^[10]通过 TAIL-PCR 获得 *HL-sp1* 侧翼序列,并预测其下游有一个编码 216 个氨基酸的开放阅读框 *orf216*。陈为等^[11]通过遗传转化将 *orf216* 转入 HL-CMS 保持系 YTB 中,发现 *orf216* 的表达能导致花粉的败育。本研究根据 *orf216* 的序列设计特异性引物,通过 PCR 扩增目的基因,将其克隆入原核表达载体进行高效表达,蛋白纯化后进行多克隆抗体制备,为进一步研究 *orf216* 蛋白的表达、定位和定量等奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 试验材料。含有载体 pTYB1 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) ER2566 感受态细胞的原核表达 IMPACT-CN 蛋白纯化系统购自 NEB 公司,携带 *orf216* 基因的菌株由中南民族大学生物技术国家民委重点实验室提供。

2) 主要试剂。限制性内切酶 *Nde* I 和 *Sap* I、*rTaq* 酶、DNA 连接酶和 DNA 分子质量 Marker 购自 TaKaRa(大连)公司;NC 膜为 Whatman 公司产品;蛋白分子质量 Marker 和预染蛋白 Marker 购自

收稿日期:2010-01-04;修回日期:2010-05-07

* 国家“863”专题(2008AA10Z118)和国家自然科学基金项目(30771163)资助

** 通讯作者。E-mail: xqliuw@yahoo.com.cn

胡婧,女,1986年生,硕士研究生。研究方向:生化与分子生物学。E-mail: carrot451@163.com

Fermentas 公司;ECL Western Blot System 购自碧云天(上海)公司。

1.2 试验方法

1)pTYB1-*orf216* 原核表达载体的构建。设计引物通过 PCR 扩增得到目的基因片段,用 *Nde* I 和 *Sap* I 双酶切回收目的基因片段,与同样用 *Nde* I 和 *Sap* I 双酶切后回收的表达质粒 pTYB1 定向连接,用 CaCl_2 化学法通过热击转化 *E. coli* ER2566 菌株,涂板后挑取单菌落于 Luria-Bertani(LB)液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)中 37 $^\circ\text{C}$ 培养过夜,碱裂解法提取质粒,进行 PCR 验证。

2)pTYB1-*orf216* 融合蛋白的诱导表达及表达条件的优化。挑取 1 个单菌落接种于 LB 液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)37 $^\circ\text{C}$ 过夜培养,再按 1:100 放大培养至 100 mL LB 液体培养基(含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素)中,到 D_{600} 为 0.5~0.8 时,加入异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导重组基因的表达。分别用 5 种不同 IPTG 浓度(0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L)、不同温度(15、28、37 $^\circ\text{C}$)和不同诱导时间(10、15、20 h)确定最适诱导表达条件。5 000 r/min 离心 15 min 收集菌体,用 4 mL 的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5; 500 mmol/L NaCl; 1 mmol/L EDTA)将菌体重悬,超声破碎细胞,使蛋白释放。12 000 r/min 离心 15 min,上清即为蛋白粗提物。取上清进行 10% SDS-PAGE(SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳)检测,考马斯亮蓝染色检测重组蛋白的表达。

3)重组 *orf216* 蛋白的纯化。采用 IMPACT-CN 蛋白纯化系统进行蛋白纯化,将 3 mL Chitin beads(约 2 mL 柱床体积)倒入柱中,10 个柱床体积的缓冲液 4 $^\circ\text{C}$ 进行柱平衡。将蛋白粗提物缓慢加入 Chitin 柱,流速约为 0.5~1.0 mL/min。用至少 20 倍柱床体积的缓冲液洗柱,再用 3 倍柱床体积的缓冲液(含 30~50 mmol/L DTT)洗柱,4 $^\circ\text{C}$ 放置过夜后,用 3 倍柱床体积的缓冲液将目的蛋白洗脱收集,10% SDS-PAGE 检测。将洗脱收集得到的目的蛋白样品用 PBS 缓冲液透析过夜。

4)抗体制备。得到的纯化蛋白由北京华大蛋白质研发中心有限公司制备多克隆抗体。

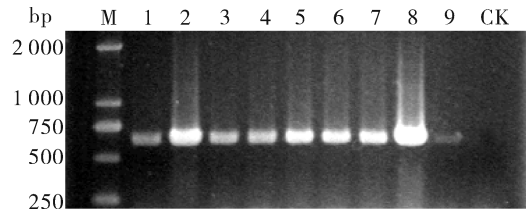
5)重组 *orf216* 蛋白的 Western blot 分析。进行 SDS-PAGE,使用半干式转移电泳槽装置将蛋白质从凝胶电转移到 NC 膜上。用 5% 的脱脂牛奶封

闭 1 h 后,加入用封闭液制备的 *orf216* 蛋白抗体(稀释度 1/2 000)4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,用 TBST 洗膜 2 次, TBS 洗膜 1 次,每次 10 min。加入用封闭液制备的羊抗兔 IgG(稀释度 1/1 000)室温孵育 1 h,用 TBST 洗膜 2 次,TBS 洗膜 1 次,每次 10 min。使用凝胶成像仪进行 ECL 曝光,根据条带的位置是否符合预期 *orf216* 的大小判断抗体的特异性。

2 结果与分析

2.1 pTYB1-*orf216* 原核表达载体的构建

以碱裂解法提取的 pTYB1-*orf216* 质粒为模板做 PCR 验证,获得条带大小约为 650 bp 左右的片段,与预期结果一致(图 1),并挑选几个阳性克隆进行 DNA 测序,DNA 测序结果表明,插入片段长度为 651 bp,说明原核表达载体构建成功,表达质粒结构是正确的。



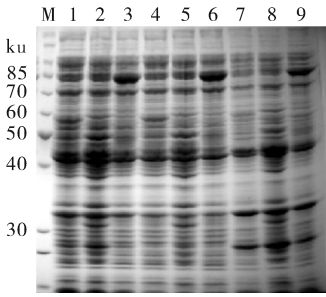
M. 蛋白质分子质量标准 DL 2 000 marker; CK. pTYB1 载体 pTYB1 vector; 1~9.9 个单克隆 Nine clones.

图 1 pTYB1-*orf216* 重组质粒的 PCR 鉴定电泳图谱

Fig.1 Identification of plasmid pTYB1-*orf216* by PCR

2.2 pTYB1-*orf216* 融合蛋白的诱导表达

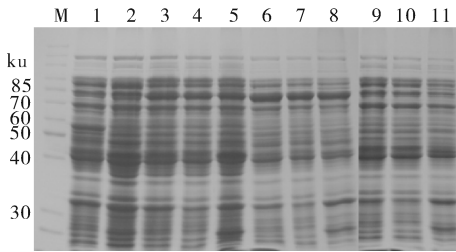
带有 pTYB1-*orf216* 质粒的 *E. coli* ER2566 菌株,在 IPTG 诱导后,分别将全菌、上清、沉淀进行 SDS-PAGE,结果如图 2。在约 85 ku 处的蛋白表达量显著增加,上清中表达量很高。在优化诱导表达条件时,首先是在 15 $^\circ\text{C}$ 下,分别采用浓度为 0.2、0.5、0.8、1.1 和 1.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 15 h,图 3 的结果表明,5 个不同的 IPTG 浓度对诱导没有明显差异,因此采用中间浓度 0.8 mmol/L 进行诱导。在确定 IPTG 浓度后,在 0.8 mmol/L IPTG 浓度下,分别采用 15、28 和 37 $^\circ\text{C}$ 进行诱导表达 15 h,结果表明,在 15 $^\circ\text{C}$ 下蛋白诱导效果较好(图 4)。在 0.8 mmol/L IPTG、15 $^\circ\text{C}$ 诱导条件下,分别诱导 10、15、20 h,图 5 的结果表明,诱导时间为 15 h 蛋白诱导效果较好。因此,最后采用 15 $^\circ\text{C}$ 下 0.8 mmol/L IPTG 诱导 15 h 为 pTYB1-*orf216* 融合蛋白表达的优选条件。



M. 蛋白 marker Protein marker; 1. 空载体细胞混合物 The whole cell protein(vector); 2. 细胞混合物(-IPTG) The whole cell protein not induced by IPTG; 3. 细胞混合物(+IPTG) The whole cell protein induced by IPTG; 4. 空载体上清 Soluble group(vector); 5. 上清(-IPTG) Soluble group not induced by IPTG; 6. 上清(+IPTG) Soluble group induced by IPTG; 7. 空载体沉淀 Insoluble group(vector); 8. 沉淀(-IPTG) Insoluble group not induced by IPTG; 9. 沉淀(+IPTG) Insoluble group induced by IPTG.

图 2 pTYB1-orf216 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 检测

Fig. 2 SDS-PAGE detection of prokaryotic expression products of pTYB1-orf216



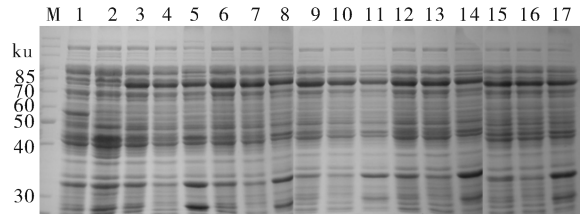
M. 蛋白 marker Protein marker; 1. 空载体细胞混合物 The whole cell protein(vector); 2. 细胞混合物(-IPTG) The whole cell protein not induced by IPTG; 3、6、9. 细胞混合物(28、15、37 °C) The whole cell protein induced by IPTG under 28, 15, 37 °C; 4、7、10. 上清(28、15、37 °C) Soluble group induced by IPTG under 28, 15, 37 °C; 5、8、11. 沉淀(28、15、37 °C) Insoluble group induced by IPTG under 28, 15, 37 °C.

图 4 不同温度下 pTYB1-orf216 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 检测

Fig. 4 SDS-PAGE detection of prokaryotic expression products of pTYB1-orf216 by different temperature

2.3 重组 orf216 蛋白的纯化

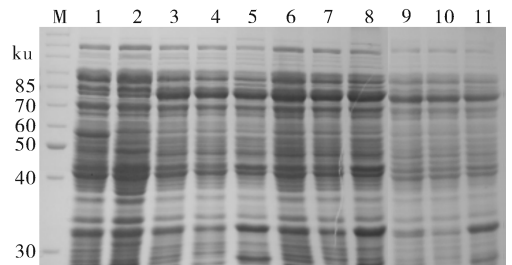
以上述优化诱导条件进行 pTYB1-orf216 融合蛋白的大量诱导表达,采用 IMPACT-CN 蛋白纯化系统进行蛋白纯化。取纯化产物进行 SDS-PAGE,从图 6 中可见,只有 1 条约 30 ku 的蛋白条带纯化效果很好,纯化蛋白由北京华大蛋白质研发中心有



M. 蛋白 marker Protein marker; 1. 空载体细胞混合物 The whole cell protein(vector); 2. 细胞混合物(-IPTG) The whole cell protein not induced by IPTG; 3、6、9、12、15. 细胞混合物(分别为 0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L IPTG) The whole cell protein induced by 0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L IPTG; 4、7、10、13、16. 上清(分别为 0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L IPTG) Soluble group induced by 0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L IPTG; 5、8、11、14、17. 沉淀(分别为 0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L IPTG) Insoluble group induced by 0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L IPTG.

图 3 不同 IPTG 浓度下诱导表达 pTYB1-orf216 融合蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 SDS-PAGE detection of prokaryotic expression products of pTYB1-orf216 induced by different IPTG concentration



M. 蛋白 marker Protein marker; 1. 空载体细胞混合物 The whole cell protein(vector); 2. 细胞混合物(-IPTG) The whole cell protein not induced by IPTG; 3、6、9. 细胞混合物(20、15、10 h) The whole cell protein induced by IPTG under 20, 15, 10 h; 4、7、10. 上清(20、15、10 h) Soluble group induced by IPTG under 20, 15, 10 h; 5、8、11. 沉淀(20、15、10 h) Insoluble group induced by IPTG under 20, 15, 10 h.

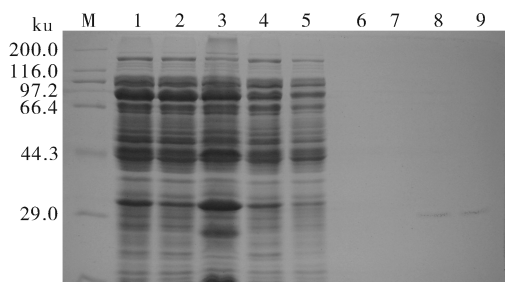
图 5 不同时间下 pTYB1-orf216 融合蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 检测

Fig. 5 SDS-PAGE detection of prokaryotic expression products of pTYB1-orf216 by different time

限公司制备多克隆抗体。

2.4 重组 orf216 蛋白的 Western blot 分析

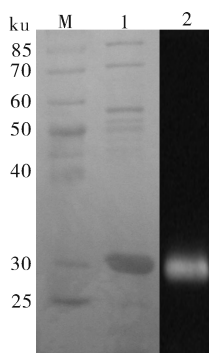
将纯化的重组 orf216 蛋白进行 SDS-PAGE,转到 NC 膜上,Western blot 分析结果表明,抗体能够与约 30 ku 处的 orf216 蛋白特异结合(图 7),证明所制备的多克隆抗体具有较高的特异性,可与免疫原特异结合。



M. 蛋白 marker Protein marker; 1. 细胞混合物 (+IPTG) The whole cell protein induced by IPTG; 2. 上清 (+IPTG) Soluble group induced by IPTG; 3. 沉淀 (+IPTG) Insoluble group induced by IPTG; 4. 蛋白过柱 Load; 5~7. 洗柱 Wash; 8~9. 洗脱蛋白 Elute.

图 6 纯化的重组 orf216 蛋白的 SDS-PAGE 图谱

Fig. 6 SDS-PAGE map of purified recombinant orf216 protein



M. 蛋白 marker Protein marker; 1. orf216 蛋白的 SDS-PAGE 分析 SDS-PAGE analysis of orf216 protein; 2. orf216 蛋白的 Western blot 分析 Western blot analysis of orf216 protein.

图 7 orf216 抗体的 Western blot 分析

Fig. 7 Western blot analysis of polyclonal antibody

3 讨论

本研究在最初进行重组菌诱导表达后,经 SDS-PAGE 分析,出现 1 条约 85 ku 大小的诱导带,这和预期的融合蛋白的大小一致,而且在上清中表达量较多,包涵体形式的蛋白较少。蛋白的可溶性表达使后续蛋白纯化无变性剂加入,过程相对温和,操作简单,纯化后的蛋白可以最大限度保持其空间构象与免疫原性。蛋白的表达量与诱导和表达条件相关,因此需要优化表达条件提高蛋白的表达量。尝试优化 IPTG 浓度、温度及时间 3 个因素,其中 IPTG 浓度采用了 0.2、0.5、0.8、1.1、1.5 mmol/L 5 个水平,温度采用了 15、28、37 °C 3 个水平,时间采用了 10、15、20 h 3 个水平。最后确定 15 °C 下 0.8 mmol/L IPTG 诱导 15 h 为 pTYB1-orf216 融合蛋白表达的首选条件。

采用 IMPACT-CN 系统表达的目的蛋白与蛋白自剪接元件(称为“内含肽”,)及几丁质结合蛋白形成融合蛋白,通过几丁质柱亲和纯化融合蛋白。然后诱导内含肽的肽键裂解活性,在几丁质介质上将目标蛋白释放出来,而内含肽与几丁质结合蛋白仍结合在几丁质介质上,达到单柱分离纯化蛋白的目的。而本试验中采用的 pTYB1 载体可让目的基因与内含肽的裂解位点直接相连,用 DTT 诱导内含肽的肽键裂解活性,使得最后纯化得到的天然蛋白不带有源自于载体的额外的蛋白残基。

通过原核表达获得大量的抗原蛋白,可用于特异性抗体制备、蛋白质性质与功能、蛋白质的相互作用和多种生化功能研究。通过亲和层析方法,纯化得到高纯度的融合蛋白,并制备出 orf216 蛋白的多克隆抗体,对进一步研究 orf216 蛋白在植物不同生长发育时期中的表达模式,及 orf216 转基因植株乃至 orf216 突变体的研究都具有重要意义,可进行直接的蛋白质组织学与细胞学定位和定量分析检测。

参 考 文 献

- [1] YOUNG E G, HANSON M R. A fused mitochondrial gene associated with cytoplasmic male sterility is developmentally regulated[J]. Cell, 1987, 50: 41-49.
- [2] RHOADES M M. Cytoplasmic inheritance of male sterility in *Zea mays* [J]. Science, 1931, 73: 340-341.
- [3] BUDAR F, TOUZET P, DE PAEPE R. The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited[J]. Genetica, 2003, 117: 3-16.
- [4] DEWEY R E, TIMOTHY D H, LEVINGS C S III. A mitochondrial protein associated with cytoplasmic male sterility in the T cytoplasm of maize [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84: 5374-5378.
- [5] DEWEY R E, SIEDOW J N, TIMOTHY D H, et al. A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *B. ipolaris maydis* toxin [J]. Science, 1988, 239: 293-295.
- [6] HACK E, LIN C, YANG H, et al. T-URF 13 protein from mitochondria of Texas male-sterile maize (*Zea mays* L.): its purification and submitochondrial localization, and immunogold labeling in anther tapetum during microsporogenesis [J]. Plant Physiol, 1991, 95: 861-870.
- [7] YAMAMOTO M P, KUBO T, MIKAMI T. The 5'-leader sequence of sugar beet mitochondrial atp6 encodes a novel polypeptide that is characteristic of Owen cytoplasmic male sterility [J]. Mol Gen Genom, 2005, 273: 342-349.
- [8] 朱英国. 水稻雄性不育生物学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社,

2000,111-112,115.

- [9] LIU X Q, XU X, WANG C T, et al. A mitochondrial nucleotide sequence is specific for gametophytic sterility of Hong-lian cytoplasmic male-sterile lines in indica (*Oryza sativa* L.); abstracts from Plant and Animal Genome XI, January 11-15, 2003[C]. San Diego:[s. n.], 2003.
- [10] 李丕顺. HL-CMS 不育候选基因 *orf216* 的克隆及稻瘟病抗病基因 *Pi36* 的功能研究[D]. 武汉:中南民族大学生命科学学院, 2008.
- [11] 陈为, 周杰, 谭艳平, 等. 水稻 HL-CMS 中 2 个雄性不育候选基因表达模式的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 394-397.

Protokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of orf216 Protein in Honglian Cytoplasmic Male Sterile Rice Line

HU Jing CHENG Gang TAN Yan-ping WANG Chun-tai LIU Xue-qun

College of Life Science/Key Lab for Biotechnology of the State Ethnic Affairs Commission, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract The recombinant prokaryotic expression vector pTYB1-*orf216* with the intein tag was constructed and transformed into *E. coli* ER2566. The optimized protein expression induction condition in *E. coli* was 0.8 mmol/L IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactoside) at 15 °C for 15 hours. A band with 85 ku of molecular weight was observed on SDS-PAGE, and the protein was mainly existing in the soluble composition. This protein was isolated and purified through affinity chromatography, and then polyclonal antibody was prepared. The results of Western blot indicated that the prepared polyclonal antibody was with high specificity.

Key words rice; protokaryotic expression; affinity purification; antibody

(责任编辑:杨锦莲)