

拟南芥叶绿体血红素加氧酶 AtHO1 基因的克隆和多克隆抗血清制备

曾海洋 罗美中

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为研究叶绿体血红素加氧酶 HO1 的生物学功能和分子作用机制, 构建了拟南芥血红素加氧酶基因 *AtHO1* 的重组融合蛋白表达载体 pET28a-*AtHO1*, 质粒转化到 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中诱导表达重组蛋白。经 SDS-PAGE 电泳检测, *AtHO1* 的重组融合蛋白获得了高效表达, 分子质量为 28~36 ku, 且为可溶蛋白。重组蛋白经 Ni-NTA 亲和层析法纯化后, 得到纯度较高的蛋白。纯化产物免疫新西兰大耳兔获得了专一识别重组蛋白 6×His-*AtHO1* 的抗血清, 进一步提取拟南芥和水稻叶片总蛋白, 蛋白质印迹检测显示, 在分子质量 28~36 ku 之间出现特异性条带, 证明用重组蛋白 6×His-*AtHO1* 制备的多克隆抗血清可以与拟南芥和水稻 HO1 蛋白特异性结合, 说明拟南芥 HO1 的抗血清能够用于水稻 HO1 的功能分析和应用研究。

关键词 拟南芥; 水稻; 叶绿体血红素加氧酶; 原核表达; 蛋白质印迹

中图分类号 Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0281-06

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是 Tenhunen 等^[1]首先在动物肝脏微粒体中发现的, 是催化血红素降解的起始酶和限速酶, 且在烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)提供电子的情况下催化血红素降解为 1 个分子的胆绿素、1 个分子一氧化碳和自由态的铁。HO 在动物和人的肝脏等组织中有 3 种同工酶, HO1、HO2 和 HO3, 其中 HO1 是诱导酶, 而 HO2 和 HO3 是组成酶^[2-3]。随后的研究^[4]还表明, HO 在动物细胞内不仅具有抗氧化、抗炎、凋亡和增生功能, 而且在免疫、细胞调节和信号转导方面起着重要作用。

HO 在植物中研究较少, 直到 1993 年, Susek 等^[5]从 EMS 诱变的拟南芥突变体库中筛选出 5 个叶绿体反向信号(即叶绿体产生的调控编码叶绿体蛋白的一类细胞核基因表达的信号)被切断的突变体, *gun*(genome uncoupled)突变体(*gun1*~5), 其中 *gun2* 编码叶绿体中血红素代谢途径的血红素加氧酶 HO。随后, Maramoto 等^[6]克隆了拟南芥的 *HY1* 即 *HO1* 基因, 并且原核表达得到的 *E. coli* 粗提物具有血红素加氧酶的活性; 拟南芥 *HO1* 基因编码的叶绿体血红素加氧酶, *AtHO1*(*Arabidopsis*

heme oxygenase-1), 参与植物光敏色素的生物合成, *AtHO1* 与血红素形成 1:1 复合物, 且在铁氧还原蛋白作为电子供体情况下将血红素转变为胆绿素(BV-IXa)和 CO, 于是提出“尽管不同物种的 HO1 功能、亚细胞定位和辅助因子有很大差异, 但是血红素的裂解机制基本保守”^[7]; 拟南芥 HO 家族共有 4 个成员(HO1, HO2-4), 其中 HO1 负责大部分 BV 的合成, HO3 和 HO4 也具有合成 BV 的功能, 尤其是在 HO1 缺失的情况下^[8]。拟南芥 HO 分为 2 个亚族; HO1、HO3 和 HO4 属于同一个亚族, HO2 是单独的 1 个亚族^[9], HO1、HO3 和 HO4 都是活性单体, 能够把 HO 降解为 BV, 即具有血红素加氧酶的功能; HO2 不能结合和降解 HO, 而对原卟啉 IX 具有很强的亲和力^[10]。有研究表明, HO1 和血红素及 HO1 催化血红素裂解的产物(BV-IXa 和 CO)在植物根的发育、氧化损害和非生物逆境应答等方面起着重要的作用^[11-17]。这些研究为植物抗氧化防御系统的作用机制提供了新的视角。

水稻不仅是一种重要的粮食作物, 也是研究单子叶植物遗传、代谢及发育等重要生物学问题的模式生物, 水稻中已报道存在 2 个 *HO* 基因^[8], 但目前

收稿日期: 2011-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971748)

曾海洋, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: xiaomazhazi1017@yahoo.com

通讯作者: 罗美中, 博士, 教授, 研究方向: 植物基因组和叶绿体功能。E-mail: mzluo@mail.hzau.edu.cn

关于水稻 *HO* 的研究还很少。目前,我们发现水稻 *HO1* 的原核表达存在问题(未发表),无法制备抗体进行下一步研究。拟南芥 *HO1* 与水稻的 *HO1* 含有相同的保守结构域,同源性很高,本研究拟克隆、表达拟南芥 *HO1* 基因,制备多克隆抗体,以期对水稻 *HO1* 基因的功能研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

限制性内切酶、 T_4 连接酶及蛋白分子质量标准均为 Fermentas 公司产品;DNA 胶回收试剂盒购自 Gene Tech 公司;高保真 DNA 聚合酶 KOD FX 和反转录试剂盒 ReverTra Ace- α 为日本 TOYOBO 公司产品;重组蛋白纯化介质 Ni-NTA 购买于德国 QIAGEN 公司;弗氏佐剂和弗氏不完全佐剂、X-gal、IPTG、Ampicillin (Amp)、Kanamycin (Kan) 为美国 Sigma 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗及 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate 购买于 Pierce 公司;超滤管(30 000 ku MWCO)为 Millipore 公司产品。

pGEM-T Easy T/A 克隆载体购买于 Promega 公司,pET28a 表达载体为 Novagen 公司产品,大肠杆菌菌株 DH10B 用于普通基因克隆及保存,BL21 (DE3)用于蛋白的原核表达。

新西兰大耳白兔,购自华中农业大学实验动物中心;拟南芥 Columbia、水稻 Nipponbare 为笔者所在实验室保存。

1.2 引物设计和合成

根据 GenBank 中 *AtHO1* (NM_128224.2) 开放阅读框序列,设计带有酶切位点的如下引物:

AtHO1-ex-F: 5'-GAATTCGTGGTTGCGGC-TACTACTGC-3' (下划线表示 *EcoR* I 位点)

AtHO1-ex-R: 5'-GCGGCCGCCTGCGCAC-CAAATCAGGACA-3' (下划线表示 *Not* I 位点)

1.3 TRIZol 法提取总 RNA

将 100 mg 新鲜的拟南芥幼嫩叶片用液氮冷冻研磨后,迅速转到加有 1 mL TRIZol 的离心管中,快速上下颠倒,使组织与提取液混匀;室温静置 5 min。加入 200 μ L 的氯仿颠倒混匀,室温静置 5 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min,把上清液转移至新的离心管中,加入 0.7 倍的异丙醇混匀后,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 15 min,向沉淀中加入 1 mL 的 75% 乙醇(DEPC ddH₂O 配置)清洗沉淀,4 $^{\circ}$ C 7 000 r/min

离心 5 min,弃上清,自然风干,溶解于适量的 DEPC 水中,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 RT-PCR

首先是 cDNA 第 1 链合成。于 20 μ L 反应体系中加入 5 μ L RNA (<5 μ g) 溶液、1 μ L Oligo(dT) (50 μ mol/L)、2 μ L dNTP,65 $^{\circ}$ C 反应 5 min,迅速放冰上冷却 2 min 后短暂离心。再加入 4 μ L buffer、2 μ L DTT、1 μ L RNase inhibitor,37 $^{\circ}$ C 反应 2 min 后加入 1 μ L 逆转录酶,37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。70 $^{\circ}$ C 反应 15 min 终止反应,得到 cDNA 第 1 条链。之后于 25 μ L 反应体系中加入 1 μ L cDNA、5 μ L dNTP、12.5 μ L 2 \times buffer、上下游引物各 0.75 μ L (10 mmol/L)、4.5 μ L ddH₂O 和 0.5 μ L KOD FX。程序如下:94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,70 $^{\circ}$ C 1 min,30 个循环;70 $^{\circ}$ C 7 min。所获 PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后切胶回收。

1.5 重组质粒构建与鉴定

纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。次日将连接产物转化 DH10B 感受态细胞,经质粒酶切检测,阳性克隆送公司测序,并命名为 pGEM-T Easy-*AtHO1*。序列比对正确后,*EcoR* I / *Not* I 双酶切载体 pET28a 和 pGEM-T Easy-*AtHO1* 重组质粒,回收线性载体与目标片段,连接并转化 DH10B,酶切检测重组质粒 pET28a-*AtHO1*,并转化 *E. coli* BL21(DE3),菌液 PCR 与质粒酶切检测。

1.6 重组蛋白在大肠杆菌中的表达与检测

挑取 BL21 阳性单克隆摇菌,37 $^{\circ}$ C 250 r/min 培养过夜。按 1:100 的体积比转接新鲜 2 \times YT 培养基(50 ng/ μ L 的 Kan),250 r/min,37 $^{\circ}$ C 摇床培养至吸光度在 0.6~0.8 之间,取 1 mL 未诱导菌液后加异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度 0.4 mmol/L,25 $^{\circ}$ C 诱导表达,分别于 1、3、6、10 h 收集 1 mL 菌体。收集的菌体 16 000 r/min 离心 1 min,弃上清,向沉淀中加入 100 μ L 裂解缓冲液(50 mmol/L NaH₂PO₄,300 mmol/L NaCl,10 mmol/L 咪唑,pH 8.0)超声破碎细胞,然后于 4 $^{\circ}$ C 16 000 r/min 离心 20 min,分离上清和沉淀,沉淀用 100 μ L 裂解缓冲液重悬,分别取 30 μ L 的上清和沉淀悬浮液,加入 5 μ L 的 6 \times 上样 buffer,沸水浴 5 min,短暂离心后 10% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R250 染色检测。

1.7 重组蛋白的纯化、浓缩和质量浓度测定

根据确立的最佳诱导条件大量诱导融合蛋白, 收集菌体后用 4 mL 裂解缓冲液重悬菌体(100 mL 菌液), 超声破碎细胞, 然后 16 000 r/min 离心 20 min, 弃沉淀。与 Ni-NTA 孵育 1 h 后, 收集 FT, 用清洗液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 咪唑, pH 8.0)清洗 2~3 次, 之后用洗脱液(50 mmol/L NaH₂PO₄, 300 mmol/L NaCl, 250 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱 3 次, 分别收集, 经 SDS-PAGE 检测纯度。纯化的蛋白溶液首先用 Millipore 超滤管(30 000 MWCO)浓缩, 3 000 r/min 离心 30 min, 然后用 PBS 稀释浓缩的蛋白, 再 3 000 r/min 离心 30 min, 反复 4 次。脱盐、浓缩后的蛋白加入终质量分数为 10% 甘油保存于 -80 °C, 同时取 1 μL, 经过 10% SDS-PAGE 检测浓度。以上所有操作均于 4 °C 进行。

1.8 多克隆抗体的制备

将纯化好的重组蛋白与弗氏完全佐剂混合乳化, 作为免疫原, 按 480 μg 剂量, 背部脊柱和腹股沟注射, 之后采用弗氏不完全佐剂加强免疫(相同剂量)2 次, 每次间隔 14 d, 第 3 次免疫后进行试血, 然

后再加强免疫 1 次后第 8 天颈动脉收集全血, 分离血清, 加甘油至 10%, 保存于 -80 °C。

1.9 拟南芥和水稻叶片总蛋白的提取

用液氮研磨拟南芥和水稻嫩叶片至粉末, 取约 0.1 g 于 500 μL 的提取液(50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF)中颠倒混匀, 于 4 °C 12 000 r/min 离心 15 min, 上清即为总蛋白。

1.10 Western blot 检测多克隆抗体

纯化的重组蛋白、拟南芥和水稻叶片总蛋白 SDS-PAGE 分离后, 转至 PVDF 膜上(50 V, 60 min), 利用上述制备的免疫血清为一抗(1:2 500), 用辣根过氧化物酶标记(HRP)的羊抗兔为二抗(1:5 000), 进行蛋白质印迹检测。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 HO1(*AtHO1*)和水稻(*OsHO1*)的序列比较

从 *AtHO1* 和 *OsHO1* 的序列比对(图 1), 可以看出 *AtHO1* 和 *OsHO1* 都属于 HO 家族, 它们序列的同源性很高, 达到 86%, 结构域也很保守。

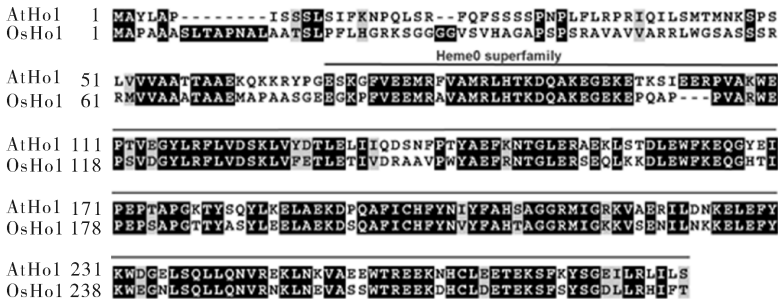


图 1 拟南芥和水稻 HO1 蛋白的序列比较

Fig.1 Comparison of HO1 proteins between *Arabidopsis* and rice

2.2 拟南芥 RNA 的提取, HO1 的 RT-PCR 扩增

从拟南芥叶片中提取总 RNA(图 2-A), 反转录后, 以 cDNA 为模板, 依据设定条件通过 PCR 扩增目的片段, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大小约为 705 bp 的单一一条带, 与预期目的片段大小相符(图 2-B)。

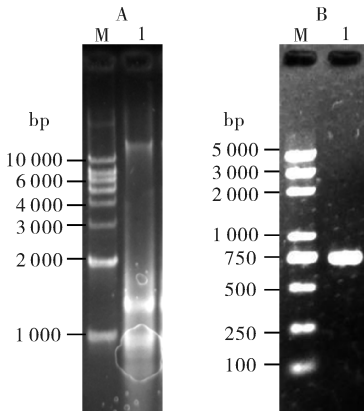
2.3 重组质粒构建与鉴定

纯化的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体连接, 转化 *E. coli* DH10B, 提取的质粒双酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 得到目的条带的大小与 PCR 产物大小相符(图 3-1)。测序结果也表明重组克隆载体

pGEM-T Easy-*AtHO1* 中 *HO1* 序列及阅读框正确, 无任何突变。阳性质粒 pGEM-T Easy-*AtHO1* 双酶切后回收的产物与同样双酶切回收的线性载体 pET28a 连接, 连接产物转化 *E. coli* DH10B 后提取质粒, 双酶切检测, 结果(图 3-2)显示目的片段(约 700 bp)已克隆至表达载体, 被命名为 pET28a-*AtHO1*。pET28a-*AtHO1* 质粒转化表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)后, 通过菌液 PCR 检测筛选阳性克隆。

2.4 重组蛋白在 *E. coli* BL21(DE3)中的表达

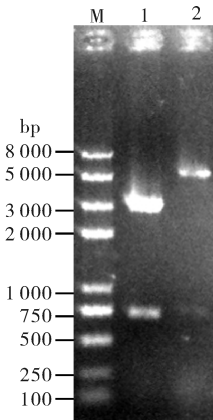
将带有 pET28a-*AtHO1* 的 BL21 阳性单克隆接种到 2×YT 培养基中, 培养至 $D_{600} = 0.6 \sim 0.8$



A: 拟南芥幼苗 RNA 的电泳图 Electrophoresis map of *Arabidopsis* seedlings' total RNA; M; 1 kb DNA ladder; 1: 拟南芥幼苗的 RNA *Arabidopsis* (ecotype Columbia) seedlings' RNA; B: *AtHO1* 的 RT-PCR 产物电泳图 Electrophoresis map of *AtHO1* amplification product by RT-PCR; M; DNA marker; 1: *AtHO1* 的 RT-PCR 产物 *AtHO1* RT-PCR product.

图 2 拟南芥总 RNA 的提取 (A) 和 *AtHO1* 的 RT-PCR 扩增 (B)

Fig. 2 Isolation of *Arabidopsis* total RNA (A) and amplification of *AtHO1* by RT-PCR (B)



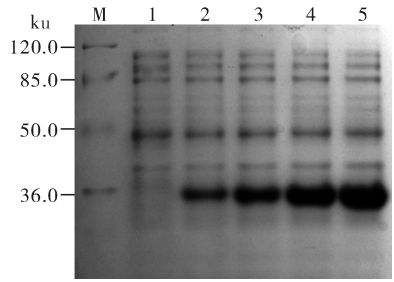
M; Trans 2K Plus II DNA Marker; 1: 载体 pGEM-T Easy-*AtHO1* 的 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切产物 Digested products of pGEM-T Easy-*AtHO1* by *EcoR* I and *Not* I; 2: 载体 pET28a-*AtHO1* 的 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切产物 Digested products of pET28a-*AtHO1* by *EcoR* I and *Not* I.

图 3 pGEM-T Easy-*AtHO1* 和 pET28a-*AtHO1* 载体的限制性酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pGEM-T Easy-*AtHO1*

and pET28a-*AtHO1* by restriction enzyme digestion

时,加 IPTG 至终浓度 0.4 mmol/L,分别于 1、3、6 和 10 h 后取样,菌液裂解后经 SDS-PAGE 检测,与未诱导的大肠杆菌总蛋白相比,诱导 1 h 后,在 28~36 ku 即有目的蛋白条带的出现,随着诱导时间的延长,该蛋白质表达量逐步增加(图 4)。进一步小



M; Stained protein marker; 1: 未诱导的细菌总蛋白 Total bacterial proteins before IPTG added; 2~5: 诱导 1、3、6、10 h 时的总蛋白 Total bacterial proteins at 1 h, 3 h, 6 h and 10 h after IPTG added.

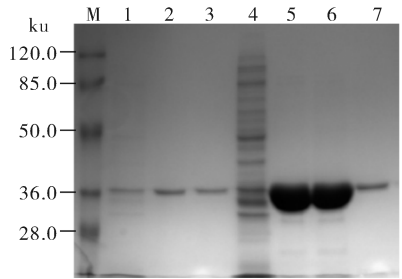
图 4 SDS-PAGE 检测分析重组蛋白在 BL21(DE3) 中的诱导表达

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of recombinant proteins in BL21(DE3)

量纯化蛋白,发现该蛋白为可溶蛋白。

2.5 重组蛋白的分离纯化和质量浓度测定

融合蛋白的纯化表达结果(图 5)显示:第 2 次清洗后几乎没有杂蛋白条带,说明已经基本将杂蛋白洗去;洗脱收集液中 6×His-*AtHO1* 融合蛋白在 28~36 ku 之间基本呈现单一条带;脱盐及浓缩后的 6×His-*AtHO1* 重组蛋白质量浓度大约为 6 μg/μL。



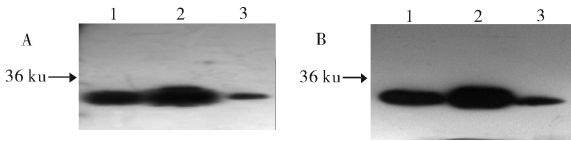
M; Stained protein marker; 1: 过柱后的收集液 Flow through; 2: 清洗液 1 Wash buffer 1; 3: 清洗液 2 Wash buffer 2; 4: 菌体沉淀 Bacterium pellet; 5: 洗脱液 1 Elution 1; 6: 洗脱液 2 Elution 2; 7: 洗脱液 3 Elution 3.

图 5 SDS-PAGE 检测重组蛋白 6×His-*AtHO1* 的纯化

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of purified recombinant protein 6×His-*AtHO1*

2.6 *AtHO1* 抗血清的免疫印记分析

纯化的重组蛋白 6×His-*AtHO1* 作为免疫原免疫新西兰兔,得到 *AtHO1* 的抗血清。为了检测抗血清识别抗原的特异性,对纯化的重组蛋白 6×His-*AtHO1*、拟南芥和水稻叶片总蛋白进行免疫印记分析(图 6),结果表明:重组蛋白、拟南芥和水稻总蛋白泳道在 28~36 ku 之间都呈现单一条带,且大小一致,表明 *AtHO1* 抗血清能够识别拟南芥和



A: 1: 6 μg 6 \times His-AtHO1 纯化重组蛋白 6 μg purified 6 \times His-AtHO1; 2: 60 μg 6 \times His-AtHO1 纯化重组蛋白 60 μg purified 6 \times His-AtHO1; 3: 100 μg 拟南芥嫩叶总蛋白 100 μg *Arabidopsis* seedling total proteins; B: 1: 6 μg 6 \times His-AtHO1 纯化重组蛋白 6 μg purified 6 \times His-AtHO1; 2: 60 μg 6 \times His-AtHO1 纯化重组蛋白 60 μg purified 6 \times His-AtHO1; 3: 100 μg 水稻嫩叶总蛋白 100 μg rice seedling total proteins.

图6 *AtHO1* 抗血清的蛋白印记分析

Fig. 6 Western blot analysis of anti-*AtHO1* antiserum 水稻内源的 *HO1* 蛋白。

3 讨论

本试验成功克隆了拟南芥 *HO1* 基因, 通过在大肠杆菌中表达 *HO1* 重组蛋白并利用镍离子亲和层析纯化得到 *HO1* 重组蛋白, 获得了兔抗 *AtHO1* 的抗血清。分别取拟南芥和水稻幼嫩叶片总蛋白以及纯化的拟南芥 *HO1* 重组蛋白作为检测样本, 用此抗血清作为 Western 一抗, 结果表明此抗血清能够成功识别纯化的拟南芥 *HO1* 重组蛋白, 并且在拟南芥和水稻幼嫩叶片总蛋白这 2 个待测样本中也观察到 1 条在 28~36 ku 之间的特异性信号条带。这说明此抗血清的免疫效果较好, 没有交叉反应。

目前发现在拟南芥中编码血红素加氧酶 *HO* 基因总共有 4 个, 分别为 *HO1* (HY1)、*HO2*、*HO3* 和 *HO4*, 其中 *HO1*、*HO3* 和 *HO4* 属于同一个亚族, *HO2* 是单独的一个亚族^[9]。它们氨基酸同源性分别为: *HO3* 与 *HO1* 相似性是 90%, *HO4* 与 *HO1* 相似性是 79%, 而 *HO2* 与 *HO1* 相似性是 55%。根据软件预测拟南芥血红素加氧酶 *HO* 全长蛋白质分子质量分别为: *HO1*, 32.7 ku; *HO3*, 32.4 ku; *HO4*, 32.9 ku 和 *HO2*, 41.2 ku, 去掉预测叶绿体信号肽后分子质量分别为: *HO1*, 26.7 ku; *HO3*, 30.3 ku; *HO4*, 29.8 ku 和 *HO2*, 31.5 ku。在水稻中发现存在 2 个 *HO* 基因^[8], 根据软件预测 *OsHO1* 和 *OsHO2* 蛋白质全长分子质量分别为 31.9、36.5 ku, 去掉预测叶绿体信号肽后分子质量分别为 25.6、31.6 ku, 它们氨基酸序列相似性是 73%。拟南芥 *HO1* 和水稻 *HO1* 氨基酸相似性是 86%, 具有相同的保守结构域(图 1), 在以 *AtHO1* 抗血清为一抗的 Western 实验中, 拟南芥和水稻叶片总蛋白中

呈现单一信号条带并且分子质量与拟南芥 *HO1* 重组蛋白相似(图 6), 笔者推测原因可能是: (1) 软件预测的叶绿体信号肽不够准确, 预测的叶绿体信号肽的长度比实际的长度要长, 所以纯化的拟南芥 *HO1* 重组蛋白加上表达载体标签上的分子质量才与拟南芥和水稻中内源蛋白相似; (2) 拟南芥和水稻中 *HO* 蛋白同源性都比较高而且分子质量差异很小, 本试验中分离蛋白用的是 10% 的 SDS-PAGE mini 分离胶, 分辨率不够, 几个 *HO* 蛋白在胶上很难分离开, 所以只杂交出单一条带; (3) 文献中报道拟南芥中 *HO3* 和 *HO4* 基因在转录水平上的表达量远低于 *HO1*^[8], 有可能是它们的杂交信号非常弱, 不能在胶片上显示出来。拟南芥 *HO2* 与 *HO1* 同源性较低, *HO1* 抗血清可能不能识别它。

综上所述, 笔者认为本试验制备的兔抗 *AtHO1* 抗血清能够识别拟南芥和水稻的 *HO1* 蛋白, 其免疫性和特异性都很好。研究表明 *HO1* 蛋白是光敏色素原合成途径中的重要蛋白, 而且最近的研究发现它还与植物在氧化逆境中的保护作用有关。Balestrasse 等^[13-14] 通过检测大豆经过重金属镉处理后节结和根中 *HO1* 和 *CAT* (过氧化氢酶基因) mRNA 和蛋白质水平的变化, 提出诱导的 *HO* 和 *CAT* 是植物组织应对氧化损害的一种细胞自我保护措施。Liu 等^[15] 通过研究发现外源的血色素和 CO 水溶液有利于高盐逆境下的水稻种子的发芽和幼苗生长。这些研究进展可为我们下一步的试验提供思路, 而且本研究制备的兔抗 *AtHO1* 抗血清为水稻和拟南芥这 2 种模式植物提供了联系的桥梁, 同时 *HO1* 基因在拟南芥中的研究进展^[6,8,10] 也可为笔者所在实验室后期对于 *HO1* 在水稻中的功能研究和应用研究提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] TENHUNEN R, MARVER H S, SCHMID R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1968, 61: 748-755.
- [2] MAINES M D, TRAKSHEL G M, KUTTY R K. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase: only one molecular species of the enzyme is inducible [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261: 411-419.
- [3] TRAKSHEL G M, MAINES M D. Multiplicity of heme oxygenase isozymes: *HO-1* and *HO-2* are different molecular species in rat and rabbit [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 1323-1328.
- [4] RYTER S W, OTTERBEIN L E, MORSE D, et al. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and

- functional significance[J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234/235: 249-263.
- [5] SUSEK R E, AUSUBEL F M, CHORY J. Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development[J]. *Cell*, 1993, 74: 787-799.
- [6] MURAMOTO T, KOHCHI T, YOKOTA A, et al. The *Arabidopsis* photomorphogenic mutant hyl is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase[J]. *Plant Cell*, 1999, 11: 335-348.
- [7] MURAMOTO T, TSURUI N, TERRY M J, et al. Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis[J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1958-1966.
- [8] EMBORG T J, WALKER J M, NOH B, et al. Multiple heme oxygenase family members contribute to the biosynthesis of the phytochrome chromophore in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2006, 140: 856-868.
- [9] DAVIS S J, BHOOS H, DURSKI A M, et al. The heme-oxygenase family required for phytochrome chromophore biosynthesis is necessary for proper photomorphogenesis in higher plants[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126: 656-669.
- [10] GISK B, YASUI Y, KOHCHI T, et al. Characterization of the haem oxygenase protein family in *Arabidopsis thaliana* reveals a diversity of functions[J]. *Biochem J*, 2010, 425: 425-434.
- [11] XUAN W, ZHU F Y, XU S, et al. The heme oxygenase/carbon monoxide system is involved in the auxin-induced cucumber adventitious rooting process[J]. *Plant Physiol*, 2008, 148: 881-893.
- [12] GUO K, XIA K, YANG Z M. Regulation of tomato lateral root development by carbon monoxide and involvement in auxin and nitric oxide[J]. *J Exp Bot*, 2008, 59: 3443-3452.
- [13] BALESTRASSE K B, NORIEGA G O, BATTLE A, et al. Involvement of heme oxygenase as antioxidant defense in soybean nodules[J]. *Free Radic Res*, 2005, 39: 145-151.
- [14] BALESTRASSE K B, YANNARELLI G G, NORIEGA G O, et al. Heme oxygenase and catalase gene expression in nodules and roots of soybean plants subjected to cadmium stress[J]. *Biometals*, 2008, 21: 433-441.
- [15] LIU K, XU S, XUAN W, et al. Carbon monoxide counteracts the inhibition of seed germination and alleviates oxidative damage caused by salt stress in *Oryza sativa* [J]. *Plant Science*, 2007, 172: 544-555.
- [16] PLATT J L, NATH K A. Heme oxygenase: protective gene or Trojan horse[J]. *Nat Med*, 1998, 4: 1364-1365.
- [17] OTTERBEIN L E, SOARES M P, YAMASHITA K, et al. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24: 449-455.

Gene cloning and polyclonal antiserum preparation of the *Arabidopsis* chloroplast heme oxygenase *HO1*

ZENG Hai-yang LUO Mei-zhong

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract For further investigation of its biological functions and molecular mechanism of chloroplast heme oxygenase *HO1*, the recombinant protein expression vector pET28a-*AtHO1* was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to express the recombinant protein. AtHO1 fusion protein was highly expressed as a soluble protein of 28-36 ku. After purification with Ni-NTA affinity chromatography and desalting, the fusion protein was used as antigen to prepare polyclonal antiserum in New Zealand rabbits. Western blot analysis showed that the antiserum could recognize the recombinant protein 6 × His-AtHO1 specifically and a band between 28 ku and 36 ku of *Arabidopsis* and rice total proteins, indicating that the antiserum could react to the *Arabidopsis* and rice native protein specifically. Therefore, the polyclonal antiserum obtained by immunizing rabbits with the purified fusion protein 6 × His-AtHO1 can be used for functional analysis of HO1 in rice.

Key words *Arabidopsis*; rice; chloroplast heme oxygenase; prokaryotic expression; Western blot