

小麦类脱水素的表达、纯化及多克隆抗体的制备*

杨颖 张林生** 张晓娟 山 仑

(西北农林科技大学生命科学院, 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室, 杨凌 712100)

摘要 脱水素在胚胎发育后期累积, 外源脱落酸(ABA)、低温、干旱和其他一些环境条件下能诱导脱水素的产生, 尽管植物在脱水条件下脱水素广泛存在于细胞中, 但其生化功能仍不清楚. 为研究小麦在不同时期脱水素基因的表达情况和生物学功能及抗体制备, 以小麦幼芽为材料, 经干旱胁迫处理后, 提取总 RNA, 通过 RT-PCR 得到小麦类脱水素基因片段(WZY1-1), 再连接至克隆载体 PUC_{MT}, 并成功构建重组表达质粒 PET-32a(+)-wzy1-1, 将阳性重组质粒转化于受体菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 经 IPTG 诱导表达, 进行表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测. 结果表明, 表达蛋白位于 37 ku 处, 小麦类脱水素基因获得高效表达. 表达蛋白经 Ni²⁺ 琼脂糖凝胶亲和层析和透析袋电洗脱法纯化后, 对兔子进行免疫, 制备的抗血清通过 ELISA 检测到较高的多克隆抗体效价. 蛋白质印迹结果显示, 利用纯化的蛋白质制备的兔抗血清可以很好地和所表达的蛋白质带特异性结合, 且郑引 1 号小麦幼苗进行干旱处理, 提取粗蛋白, SDS-PAGE, 蛋白质印迹检测显示, 在分子量 28 ku 处出现特异的蛋白质条带, 这说明所制备的抗血清可以与小麦叶片所表达的 dehydrin 蛋白特异性结合, 证明其具有良好的免疫原性.

关键词 脱水素蛋白, 原核表达, 多克隆抗体制备

学科分类号 Q78

干旱是限制农业生产的一个重要环境因素, 干旱影响植物生长发育, 造成作物的严重减产. 现在有关干旱的研究主要集中在生理方面, 如一些指标的测定, 而从分子水平方面对抗旱基因的研究比较少. 人们通过对种子不同发育阶段的研究发现, 随种子发育后期产生一些小分子特异多肽, 即胚胎发育后期丰富蛋白 (late embryogenesis abundant protein, LEA 蛋白), 伴随种子成熟过程而形成的一类与干旱密切相关基因, 受植物的发育阶段、脱落酸 (ABA) 和脱水信号等调节, 在植物许多组织器官都有表达^[1~4].

脱水素最早发现于 20 世纪 80 年代, 属于 LEA II 家族, 分子量从 9~200 ku 不等, 大多数脱水素富含甘氨酸和赖氨酸, 缺少半胱氨酸和色氨酸, 且具有很高的亲水性和热稳定性, 即使在煮沸情况下也能保持水溶状态^[5,6], 植物遭受干旱主要是细胞组成成分的晶体化, 破坏细胞的有序结构, 由于脱水素蛋白家族具有特殊的共有结构及其偏性氨基酸的组成^[3,7], 使得其具有高度的亲水性, 能将足够的水分捕获到细胞内, 以保护细胞免受干旱的损伤^[7~9].

本研究在利用基因工程手段获得了小麦类脱水素基因, 将该基因连接到构建的融合表达载体上, 在大肠杆菌中表达, 利用纯化的重组蛋白免疫兔子, 制备了小麦类 dehydrin 的多克隆抗体, 利用此抗体对水分胁迫下小麦表达的类脱水素进行检测, 从分子水平为研究小麦耐旱机理奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂. 引物合成由上海 Sagon 公司完成; 弗氏完全佐剂购自 Sigma 公司; 碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔抗体为北京中杉公司产品; BCIP/NBT 显色试剂盒购自北京天为时代公司; 低分子量蛋白质标准购自中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所.

*国家自然科学基金资助项目(30671253, 39970436), 黄土高原土壤侵蚀与旱地农业国家重点实验室基金项目(10501-140).

** 通讯联系人.

Tel: 029-87092379-8401, E-mail: linszhang@yahoo.com.cn

收稿日期: 2007-02-28, 接受日期: 2007-03-20

1.1.2 载体与菌株. PUC_M-T 克隆载体、PET-32a(+) 表达载体、*E. coli* DH5 α 工程菌、BL21(DE3)工程菌均由本室保存。

1.1.3 实验动物. 成年雄性兔 3 kg, 5 只。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒构建与鉴定. 用 *Hind*III 和 *Eco*R I 酶切已克隆载体 PUC_M-T-WZY1-1, 回收插入的脱水素 WZY1-1 片段, 连接至经同样酶切的 PET-32a(+) 表达载体, 构建重组表达质粒 PET-32a(+)-WZY1-1, 转化至 BL21(DE3)工程菌. 提取质粒酶切, 对插入片段大小进行电泳鉴定, 同时进行菌落 PCR. 引物 W41035(sense): 5' CAAGAT GGA GCA CGG CCA GG 3', W42495(anti-sense) 5' GC TCA GTG CTG TCC GGG CAG 3'.

1.2.2 脱水素在大肠杆菌中的诱导表达. 将原核重组表达质粒 PET-32a(+)-WZY1-1 转化于 BL21(DE3)感受态细胞, 37℃ 培养过夜. 挑取单克隆接种于 5 ml LB 液体培养基 (含 50 mg/L 的 Amp), 进行摇菌, 37℃, 180 r/min 12 h, 再按 1:100 的比例转接于含 50 mg/L Amp 的大三角瓶中, 37℃ 摇床培养至吸光度在 0.4~0.6 之间, 加异丙基硫代半乳糖(IPTG)至终浓度 1 mmol/L, 37℃ 诱导表达 3 h, 收集菌体。

1.2.3 表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 检测. 取 1 ml 诱导菌液及未诱导菌和空载体诱导物, 10 000 r/min 离心, 弃上清. 向沉淀中加入 100 μ l 上样缓冲液, 混匀, 沸水浴加热 3~5 min, 15% 分离胶电泳检测。

1.2.4 Ni²⁺ 琼脂糖凝胶亲和层析分离. 将收集的菌体用 50 mmol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液 (0.5 mol/L NaH₂PO₄, 0.5 mol/L Na₂HPO₄, 0.5 mol/L NaCl) 重悬, 加热破碎, 细胞破碎液以 0.45 μ m 的滤膜过滤, 上样, 流速为 1 ml/min. 用此 PBS 缓冲液平衡 Ni²⁺ 柱, 2~5 个床体积, 流速为 2 ml/min, 再用分别含 10、20、50、100、200、300、400 mmol/L 咪唑的 50 mmol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液进行阶段洗脱, 流速为 1 ml/min, 收集各阶段洗脱峰, 用 SDS-PAGE 检测融合蛋白的分子质量大小和纯度, 以确定最佳洗脱液浓度, 并分次收集洗脱峰。

1.2.5 电洗脱法纯化表达蛋白. 将数次收集的洗脱峰用 15% SDS-PAGE 进行分离, 将电泳后的凝胶用蒸馏水淋洗干净, 再浸泡在预冷的 0.25 mol/L KCl 中染色, 因 KCl 可以与 SDS 结合发生沉淀反应, 2~5 min 后即可显色, 显色后对照未诱导蛋白

质条带, 从凝胶上切下目的带, -20℃ 保存, 收集一定量后, 将蛋白质条带置于 (截留分子质量 10~50 ku) 透析袋中, 在透析袋中加入适量电泳缓冲液, 水平电泳槽中恒流 30 mA 电泳, 蛋白质逐渐从胶中电泳至缓冲液, 4 h 左右蛋白质条带变为无色透明, 再反转电泳 1 min. 用 PEG 覆盖于透析袋表面, 4℃ 浓缩 2~3 h, 将浓缩液转入离心管内, 按 1:5 (体积比) 的比例加入预冷丙酮, 4℃ 静置 1 h. 10 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清, 沉淀真空冷冻干燥, 制得的干粉于 -20℃ 存放. 取少量溶于 100 μ l 上样缓冲液中, 用 15% 的分离胶检测其分离产物纯度。

1.2.6 兔抗血清制备. 将纯化的表达蛋白与 PBS 及弗氏完全佐剂混合乳化, 使目的蛋白浓度为 1 g/L, 作为免疫原, 按 2 ml/只 每次剂量免疫, 背部脊柱两侧 4 点以及腹股沟和腋窝两侧注射, 共 8 点, 首免皮内注射, 并注射有卡介苗, 以后皮下注射, 每次间隔 14 天, 每次剂量为上次的 1.5 倍, 与弗氏不完全佐剂混合乳化, 共加强免疫 5 次, 3 免后进行试血, 于第 5 次免疫后第 10 天颈动脉插管收集全血, 分离血清, -20℃ 冷冻. 并采用琼脂双扩散法及 ELISA 法测抗体效价。

1.2.7 小麦叶片蛋白提取. 在 PEG6000, 渗透势 -0.6 MPa 水溶液中的小麦, 取其叶片, 在液氮研磨下, 加入蛋白质提取液 (15 mmol/L Tris·HCl, pH 6.8; 1% 2-巯基乙醇; 1 mmol/L PMSF) 5 ml/g 研磨成匀浆, 倒入 5 ml 离心管中涡旋 2 min, 4℃ 10 000 r/min 离心 15 min, 上清于 80℃ 10 min, 再离心, 上清 4 倍体积丙酮 -20℃ 过夜沉淀, 按 200 μ l 上样缓冲液 / 1 ml 上清液, 存放于 -20℃。

1.2.8 蛋白质印迹检测. 将 PET-32a(+)-WZY1-1 BL21(DE3) 表达菌及所纯化的小麦 dehydrin 蛋白, 经上样处理后进行 SDS-PAGE, 通过半干电转仪转至硝酸纤维素膜上. 利用上述制备的兔血清 IgG 为一抗 (1:50), 用碱性磷酸酶标记 (AP) 的羊抗兔二抗 (1:2 000), 进行蛋白质印迹检测. 对干旱胁迫的小麦叶片提取蛋白质也作同样检测。

2 结 果

2.1 小麦脱水素基因原核表达载体的构建与鉴定

在已克隆的 PUC_M-T-WZY1-1 基础上, 构建小麦脱水素基因 *wzy1-1* 的原核表达载体 PET-32a(+)-WZY1-1, 通过阳性克隆筛选, 对其进行双酶切和菌落 PCR 的鉴定, 得到目的基因的重组克隆. 鉴定

结果如下: 图 1 表示连接至 PET-32a(+) 的重组片段经双酶切后, 得到约 640 bp 的条带, 此片段去除

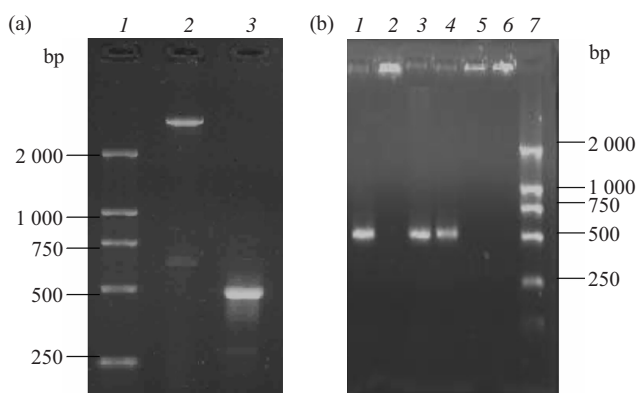


Fig. 1 Identification of PET-32a (+) -WZY1-1 by enzyme digest and colony PCR

(a) Restrictive enzyme digestion analysis of PET-32a (+)-WZY1-1. 1: Marker (DL2000); 2: PET-32a (+)-WZY1-1 digested with *EcoR* I - *Hind* III; 3: Plasmid was used as template, PCR product. (b) Identification of colony PCR. 1, 3, 4: Colony PCR; 2, 5, 6: CK; 7: Marker.

PUC_M-T 插入位点 T 两端的序列 (约 150 bp 左右), 插入片段大小约为 490 bp. 为进一步证明目的片段是否连接到 PET-32a(+) 载体上, 如图 1b 所示, 用特异引物 W41035、W42495 进行菌落 PCR 鉴定.

2.2 小麦脱水素基因在大肠杆菌中的表达与纯化

将含有 PET-32a(+)-WZY1-1 重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3) 菌株, 接种于 LB 培养基后, 培养至对数生长期时加 IPTG 诱导 3 h 后, 进行 SDS-PAGE 检测, 以 PET32a(+) 空质粒转化 BL21 (DE3) 的受体菌作为空白对照, 如电泳图 2(a) 所示, 于 37 ku 处有目的蛋白条带出现.

通过 Ni²⁺ 琼脂糖凝胶柱的分离后, 得到一单一峰, 将收集液经 SDS-PAGE 后, 得到如图 2b 所示结果, 此峰含有大量的目标蛋白和少量杂蛋白, 为得到较纯的单一 37 ku, 将收集到的洗脱峰合并, 进行电洗脱, 结果如图 2b 所示, 用透析袋电洗脱纯化所得蛋白质, 经电泳检测其洗脱效果较好, 再进一步通过蛋白质印迹得到证实, 如图 2b、图 3 所示.

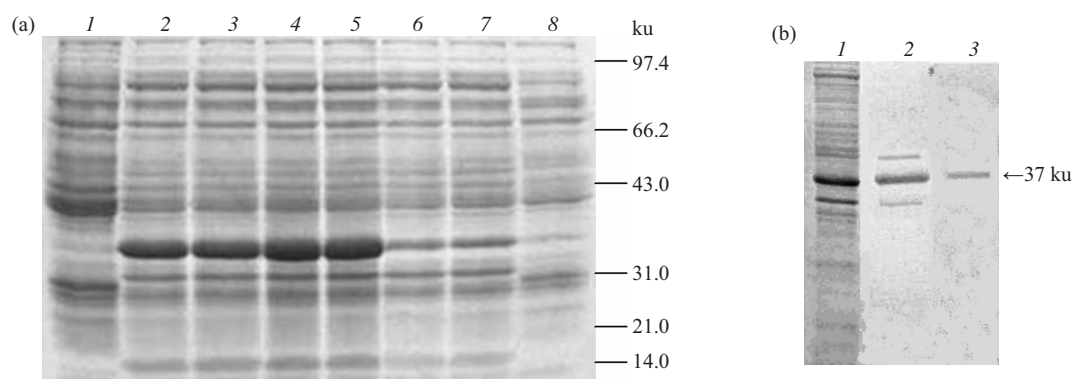


Fig. 2 Expression of PET-32a (+) -wzy1-1 in *E. coli* and SDS-PAGE analysis of purified fusion protein

(a) SDS-PAGE expressed analysis of recombinant proteins. 1: PET32a(+) uninduced; 2, 3, 4, 5: PET-32(+)-WZY1-1 induced 3 h; 6, 7: PET-32a(+)-WZY1-1 uninduced; 8: PET32a(+) induced. (b) SDS-PAGE analysis of purified protein and the supernatant of lysates of the bacteria BL21 / dehydrin. 1: The supernatant of the lysate of bacteria BL21 / dehydrin; 2: The purified protein after Ni²⁺-affinity chromatography; 3: The purified protein.

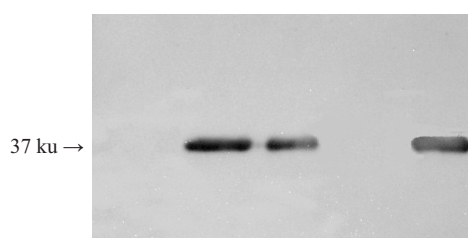


Fig. 3 Western blot analysis of antiserum

2.3 抗血清可识别小麦干旱胁迫后内源 dehydrin

为检测制备的 dehydrin 抗血清与受旱小麦组织内所表达的 dehydrin 的免疫反应, 采用郑引 1 号低抗旱品种进行发苗, 挑选生长类似的进行干旱处理, 提取粗蛋白, SDS-PAGE, 蛋白质印迹检测显示, 在分子质量 28 ku 处出现特异的蛋白质条带, 这说明所制备的抗血清可以与小麦叶片所表达的 dehydrin 蛋白特异性结合, 证明其具有良好的免疫

原性.小麦类脱水素蛋白的成功表达及其多克隆抗体的制备为进一步研究脱水素蛋白的功能奠定了基础.

从图 4a 上可以看出,随着 PEG 胁迫时间延长,电泳蛋白质条带逐渐加深,表明可溶性蛋白质

含量增加,复水之后蛋白质条带逐渐变浅,可溶性蛋白质含量降低,用制备的抗血清进行蛋白质印迹分析,如图 4b 在 28 ku 处(箭头所指)有抗脱水素蛋白带出现,说明该蛋白是小麦类脱水素蛋白.

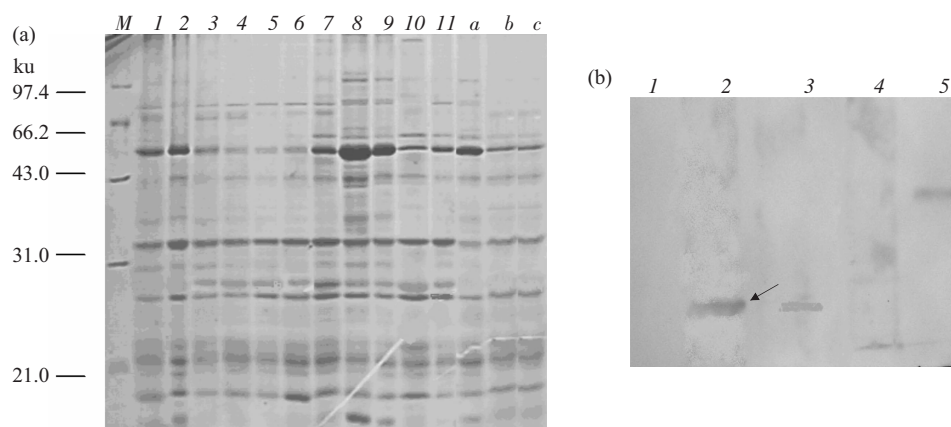


Fig. 4 SDS-PAGE and Western-blot analysis of zheng yin wheat leaf in water stress

(a) SDS-PAGE analysis of zheng yin wheat leaf in water stress. *M*: Protein marker; 1, 2: Unstressed; 3, 4: 12 h drought stressed; 5, 6: 24 h stressed; 7, 8: 36 h stressed; 9, 10, 11: 48 h stressed; *a*, *b*: 12 h recovery; *c*: 24 h recovery. (b) Western blot analysis of zheng yin wheat leaf in water stress. 1: ck; 2: 48 h drought stress; 3: 24 h drought stress; 4: 12 h drought stress; 5: Recombinant protein.

3 讨 论

脱水蛋白是植物对于干旱胁迫的一种适应性的保护反应^[10,11],目前对于有关脱水蛋白的存在结构和基因表达规律有了许多了解,但对于脱水蛋白基因表达的信号转导与基因的开关调控和脱水蛋白的功能仍需进一步的深入研究^[4].

利用基因工程方法获得的融合蛋白是目前分子生物学常用的一种手段,本文通过原核表达载体 PET32a(+)的构建,成功地将小麦 *dehydrin* 基因的原核表达质粒,转化到受体菌 BL21(DE3)后,经 IPTG 诱导,SDS-PAGE 获得约 37 ku 大小的表达条带,利用原核表达系统表达的小麦类脱水素融合蛋白,由于其特有的水溶性蛋白表达,所以为进一步的纯化提供了便捷.

本文采用 Ni^{2+} 琼脂糖凝胶亲和层析和透析袋电洗脱法纯化表达蛋白,经 SDS-PAGE 检测到一条蛋白质条带,纯化效果较好,利用此重组蛋白制备的小麦类 *dehydrin* 抗血清可识别小麦种子在萌发若干天后,经干旱胁迫处理,组织中表达的类 *dehydrin*,同时显出良好的特异性,其多克隆抗体

的制备为下一步进行真核表达检测以及免疫定位奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydrin tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 1989, **12** (5): 475~486
- 2 Kermode A R. Regulatory mechanisms in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment. In: Kigel J, Galili G. eds. *Seed Development and Germination*. New York: Marcel Dekker Inc, 1995. 273~332
- 3 Kermode A R. Approaches to elucidate the basis of desiccation-tolerance in seeds. *Seed Sci Res*, 1997, **7**: 75~95
- 4 Chou P Y, Fasman G D. Prediction of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Advances in Enzymology*, 1978, **47**: 45~148
- 5 翟大勇, 沈黎明. 脱水蛋白研究进展. *生物化学与生物物理学进展*, 1998, **25** (2): 119~122
Zhai D Y, Shen L M. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1998, **25** (2): 119~122
- 6 Allagulova C R, Gimalov F R, Shakirova F M, et al. The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochemistry*, 2003, **68**: 945~951
- 7 Ingram J, Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1996, **47** (1): 377~403

- 8 孙歆, 雷韬, 袁澍, 等. 脱水素研究进展. 武汉植物学研究, 2005, **23** (3): 299~304
Sun A, Lei T, Yuan S, *et al.* Journal of Wuhan Botanical Research, 2005, **23** (3): 299~304
- 9 Close T J. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant*, 1997, **100** (2): 291~296
- 10 Berjak P, Pammenter N W. Progress in the understanding and manipulation of desiccation sensitive (recalcitrant) seeds. In: Ellis R H, Black M, Murdoch A J, eds. *Basic and Applied Aspects of Seed Biology*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1997. 689~703
- 11 Close T J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant*, 1996, **97** (4): 795~780

Expression and Purification of a Dehydrin Gene of Wheat and Preparation of Its Antibody*

YANG Ying, ZHANG Lin-Sheng**, ZHANG Xiao-Juan, SHAN Lun

(State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on The Loess Plateau,

College of Life Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, China)

Abstract Dehydrins accumulate during the late stages of embryo genesis or in response to ABA application, low temperature, drought, or any environmentally imposed dehydrative force. Despite the abundance and widespread occurrence in cell of dehydrins, the biochemical role of dehydrins remains elusive. In order to study the expression and functional characteristics of dehydrin gene during different growth, and make the polyclonal antibody, using wheat plumelet under the water deficit condition as experiment material, and its total RNA was extracted. The target dehydrin gene through RT-PCR was got, connect to the cloning vector PUC_M-T, recombination expression plasmid PET-32a(+)-wzy1-1 was constructed according to recombination of cloned vector PUC_M-T-WZY1-1 of wheat dehydrin gene in this experiment. Then the recombination was transformed into the host strain *E. coli* BL21 (DE3), was induced by IPTG and target protein was got. The expression production was detected by SDS-PAGE, and Western blot assays revealed that the fusion protein was expressed in soluble form with a relative molecular mass 37 ku, and the fusion protein was expressed at high level. After purification by Ni-NTA resin affinity chromatography and electroelution in bagfilter, the fusion protein was used to induce the production of polyclonal antibody in rabbits and ELISA detection showed the antigenicity of the fusion protein was satisfactory, Western blot showed the antiserum raised against the recombination dehydrin protein in rabbits could react to the protein expressed specifically, and the protein of zheng yin 1# wheat under drought stress was extracted, through the SDS-PAGE, Western blot assays revealed that there is a protein band with a relative molecular mass 28 ku, this revealed that antiserum could react to the dehydrin protein expressed in wheat leaf specifically and demonstrated its good antigenicity.

Key words dehydrin protein, prokaryotic expression, preparation of polyclonal antibody

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30671253, 39970436) and State Key Laboratory of Soil Erosion and Dryland Farming on the Loess Plateau (10501-140).

**Corresponding author. Tel: 86-29-87092379-8401, E-mail: linszhang@yahoo.com.cn

Received: February 28, 2007 Accepted: March 20, 2007