

水稻 *rab5B* 基因在大肠杆菌中的表达、纯化和 GTP 结合分析*

林慧贤¹⁾ 刘筱斌²⁾ 梁承邳²⁾ 刘良式¹⁾**

(¹⁾中山大学生物工程研究中心, 基因工程教育部重点实验室, 广州 510275; ²⁾中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 Rab5B 类蛋白因为其编码产物的 N 端具有特殊结构而被认为是一类特殊的蛋白质. 水稻 *rab5B* 基因 *Osrab5B* 是这类蛋白质基因在单子叶植物中的首例发现. 将 *Osrab5B* 基因的编码序列按正确读码框重组到具有谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 融合标签的 pGEX-4T1 表达载体中, 转化大肠杆菌, 获得了稳定表达目标融合蛋白的菌株, 经 GSTrapTM 柱纯化, 获得了纯化的目标融合蛋白. GTP 结合试验表明, 在原核细胞中表达出的 GST-OsRab5B 融合蛋白具有体外结合 GTP 的能力.

关键词 *Osrab5B*, 小 GTP 蛋白, GTP 结合试验

学科分类号 Q51

植物小 GTP 结合蛋白 (small GTP-binding protein) 是一个庞大的蛋白质家族, 一般可划分为 Ras、Rab、Arf/Sar、Rho 和 Ran 等几类^[1]. 其中 Rab 类又是迄今为止发现的植物小 G 蛋白中的最大一类. 研究表明, Rab 类蛋白在细胞中起着调节细胞内囊泡的运输作用^[2~4], 据 Schiene^[5] 统计, 从植物中已分离得到基因序列的 Rab 蛋白至少有 150 种. 其中有些经过了一定的功能验证^[6,7], 但大部分基因的功能仍属于推测. 植物 Rab5B 蛋白有着别的小 GTP 结合蛋白的共有的结合与水解 GTP 的基序 (motif); 但是, 和别的 Rab 蛋白和哺乳动物的 Rab5B 蛋白相比, 植物 Rab5B 蛋白又有它的特殊性: 它的 C 端没有异戊二烯化基序 (XC、CX、CCX 或 CXC), 却在 N 端有一个豆蔻酰化基序 (GCXXS). 研究表明, 这两个脂肪酰化的基序和 Rab 蛋白附在细胞内的膜区室 (membrane compartment) 的功能有关, 因此, 植物 Rab5B 蛋白很可能有着和别的 Rab 蛋白不同的附膜机制^[8~11]. 目前, 已经得到较多研究的植物 *rab5B* 基因有三个, 分别来自龙船海棠属的 *Mesembryanthemum crystallinum*、百脉根属的 *Lotus japonicus* 和拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[9~11], *Osrab5B* 基因是我们在水稻 (*Oryza sativa* L.) 中克隆到的一个新 *rab5B* 基因 (登录号为 AF323991). 由于已经发表的 3 个 *rab5B* 基因都来自双子叶植物, 因此, *Osrab5B* 是这类基因在单子叶植物中的首例发现. 本研究通过设计引物, 将 *Osrab5B* 基因的编码序列按正确读码框在原核中表达出谷胱甘肽

硫转移酶 (GST) 和 OsRab 蛋白的融合蛋白, GTP 结合实验表明, OsRab5B 蛋白具有 GTP 结合功能.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种: 大肠杆菌 BL21 (DE3)、质粒载体 pGEX-4T1 (Amersham Pharmacia 公司产品)、含有 *Osrab5B* 全部编码框的重组质粒 pMD-5B13 均由本实验保存.

1.1.2 试剂: 限制性核酸内切酶、T4DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司、DNA 分子质量标准、蛋白质低分子量标准购自华美公司、硝酸纤维素膜购自 Schleicher & Schuell 公司, GSTrapTM 纯化柱购自 Amersham Pharmacia 公司, DNA 柱式胶回收试剂盒购自上海华顺生公司, (α -³²P) GTP 购自北京亚辉公司, 寡核苷酸由上海基康公司合成.

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pG-5BE 的构建与鉴定: 根据 *Osrab5B* 的序列及酶切位点, 在起始密码子和终止子附近设计引物并带上 *Eco*RI 和 *Xho*I 接头的引物 5BE1 (5'-CGGAATTCATGGTTGCTCC-TCCCTCCGTG-3') 和 5BE2 (5'-CCGCTCGAGTT-CAACAAACACCGAAGG-3'), PCR 扩增 pMD-

* 国家高技术“863”计划资助项目 (BH-01-02-03); 中国科学院华南植物研究所所长基金资助项目 (10-00-312).

** 通讯联系人.

Tel: 020-84112392, E-mail: ls10@zsu.edu.cn

收稿日期: 2001-10-12, 接受日期: 2001-12-03

5B13 得到 *Osrab5B* 基因的全部编码框序列的片段, 按常规方法将载体 pGEX-4T1 和 PCP 产物进行酶切、回收、连接. 将连接产物转化 BL21 (DE3) 菌株. 重组质粒经酶切并电泳鉴定.

1.2.2 序列测定: 序列测定在 ABI PRIME™ 377 序列仪上完成.

1.2.3 融合蛋白的诱导: 挑取已转化有目标质粒菌株的单菌落至 3 ml 新鲜的 2×YTA 液体培养基 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 中, 于 37℃, 200 r/min 培养过夜, 次日按 1% 的比例转接到 80 ml 新鲜的 2×YTA 液体培养基 (含 100 mg/L 氨苄青霉素) 中, 于 30℃, 200 r/min 培养 2 h, 加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L, 继续于 30℃, 200 r/min 培养 3 h. 然后, 收菌, 留取一小份进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE, Laemmli 系统) 检测, 其余于 -70℃ 保存.

1.2.4 SDS-PAGE 电泳: 按 Laemmli 非梯度变性凝胶系统进行^[12]. 本实验所用的凝胶浓度为 12%.

1.2.5 GST 融合蛋白的纯化: 经 SDS-PAGE 检测后, 取表达量较高的一份培养样品加 20 ml 1×PBS, 加 0.5 ml 20 g/L 的溶菌酶, 混匀, 冰浴 20 min, 加 DTT 和 PMSF 至终浓度分别为 5 mmol/L 和 1 mmol/L, 冰浴中超声处理 (参数为 1 mm 探头, 工作 4 s、间隙 4 s, 进行 80 次), 然后 14 000×g, 4℃ 离心 30 min, 再经 0.45 μm 滤膜过滤, 得到待上柱的蛋白质样品. 纯化柱采用 Amersham Pharmacia 公司的 GSTrap™ 柱, 柱子的预处理、上样、平衡、洗脱和保存按说明书操作并稍作改动: 预处理时保证脱气较彻底, 柱子在约 0.8 ml 洗脱液 (50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 10 mmol/L GSH) 于 4℃ 静止 30 min, 再继续加洗脱液洗脱并收集洗脱液, SDS-PAGE 检测洗脱液成分.

1.2.6 GTP 结合实验: 将检测有目标融合蛋白的细菌总蛋白及其纯化蛋白经 SDS-PAGE 分离, 然后按常规蛋白质印迹的方法^[13] 转移到硝酸纤维素膜上 (转移参数为 15 V、4~8℃ 过夜). 印迹膜晾干后, 用 30 ml 缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L MgCl₂; 5 mmol/L DTT; 0.3% Tween 20) 于 30℃ 温育印迹膜 10 min, 然后换 30 ml 添加了 0.3% BSA 和 5 μl (α-³²P) GTP (1.11 × 10¹⁷ Bq/mol) 的缓冲液 A, 30℃ 温育 30 min. 将膜用缓冲液 A 洗 3 次, 每次 5 min, 晾干后放射自

显影^[14].

2 结 果

2.1 原核表达载体的构建

以 pGEX-4T1 为载体构建表达 GST 融合蛋白表达载体的路线如图 1 所示, 简述如下: 以重组质粒 pMD-5B13 的质粒 DNA 为模板, 以寡核苷酸 5BE1 和 5BE2 为引物, 在 60℃ 的复性温度下 PCR 扩增含有 *Osrab5B* 基因的全部编码框序列 (该基

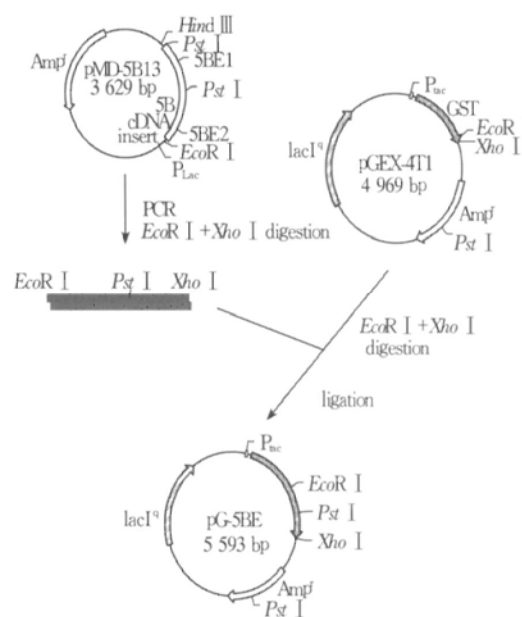


Fig. 1 Flow chart of construction of expression vector pG-5BE. 5BE1 and 5BE2 indicated the position of primer 5BE1 and 5BE2 respectively

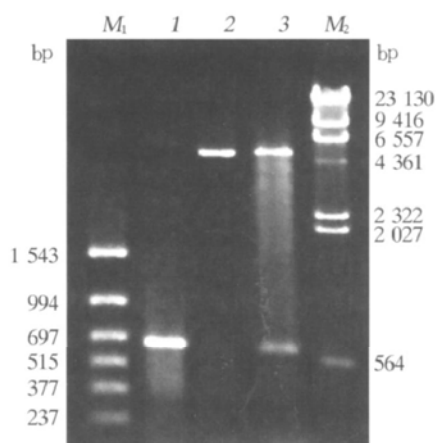


Fig. 2 Restriction endonuclease analysis of expression vector pG-5BE

M_1 and M_2 are DNA molecular mass standards, the numbers paralleled with each individual fragment indicate the size of them respectively; 1: PCR amplified target fragment containing complete CDS of *Osrab5B*; 2: linear pGEX-4T1; 3: digested products of plasmid pG-5BE with restricted endonuclease *EcoRI* and *XhoI*.

因在 DDBJ/EMBL/GenBank 的序列登录号为 AF323991)。将回收的 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切的目标片段连接到 pGEX-4T1 载体, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 阳性克隆命名为 pG-5BE (图 2)。序列测定表明编码蛋白的读框和读码无误。

2.2 融合蛋白 GST-OsRab5B 的表达

将含 pG-5BE 质粒的菌株以及只有 pGEX-4T1 和无外源质粒的 BL21 (DE3) 的对照菌株, 在同样条件下添加终浓度为 0.3 mmol 的 IPTG 诱导培养 3 h, 离心收集 500 μ l 培养液, 加 50 μ l STE 和 50 μ l 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液^[15], 沸水浴处理 3 min, 离心后点样, 进行 SDS-PAGE 检测, 结果表明 (图 3), 含重组质粒的菌株样品比无外源质粒的 BL21 (DE3) 菌株样品多出一条大于 40 ku 左右的带, 而只有 pGEX-4T1 载体的菌株样品比没有外源质粒的菌株样品多出一条稍小于 30 ku 的带。这初步表明获得了正确的 GST-OsRab5B 融合蛋白 (图 3 箭头所示)。

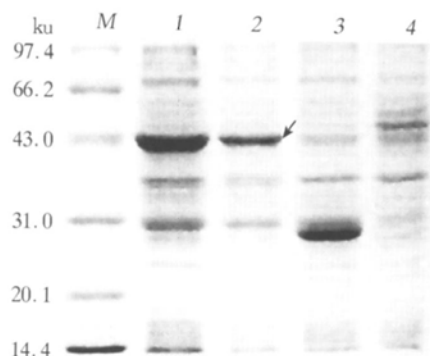


Fig. 3 SDS PAGE analysis of expression of pG-5BE

M: low-range protein molecular standard; both 1 and 2 are the induced total bacterial proteins with expression of pG-5BE compared with the control of bacterial strain with plasmid pGEX-4T1 (3) and without any expression plasmid (4). The arrow shows the target fusion protein, GST-OsRab5B.

2.3 融合蛋白 GST-OsRab5B 的纯化

操作按方法中所说明的进行。80 ml 培养液所获得的菌体经过超声波粉碎、离心过滤等处理后上样到 GSTrapTM 柱子进行纯化。洗脱时按每管 1 ml 的量分部收集洗脱液, 每份取 3 μ l 进行 SDS-PAGE, 结果只有第一份具有较高的浓度 (图 4a 泳道 3 所示), 且纯度较高。

2.4 融合蛋白 GST-OsRab5B 的 GTP 结合实验

纯化后的目标融合蛋白和只表达 GST 的对照样品经 SDS-PAGE 印迹后转移, 然后进行 GTP 结

合能力的检测, 结果表明只表达 GST 的对照无信号出现, 纯化后的目标蛋白有一条信号带, 而未纯化的含目标融合蛋白在目标带位置有一明显的信号带, 同时在分子质量稍小的位置也有两条较弱的信号带 (图 4)。

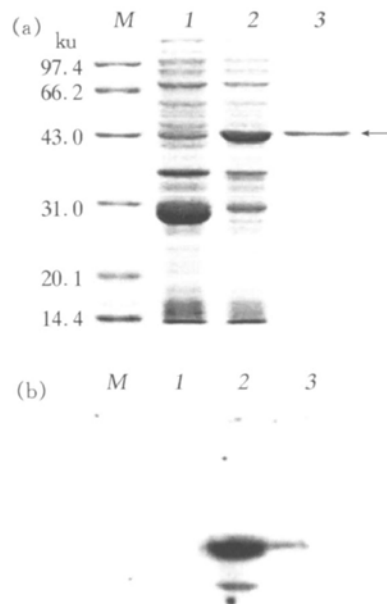


Fig. 4 SDS PAGE analysis and GTP-binding assay of fusion protein of GST-OsRab5B

(a) SDS-PAGE analysis of fusion protein of GST-OsRab5B. M: Low-range protein molecular standard; 1 and 2 are total bacterial protein with induced expression of pGEX-4T1 and pG-5BE respectively; 3: purified fusion protein of GST-OsRab5B marked by the arrow. (b) GTP-binding assay of fusion protein of GST-OsRab5B. The protein was blotted from the copy gel indicated by (a), so lane M, 1, 2 and 3 on (b) are the counterparts illustrated on (a).

3 讨 论

在小 G 蛋白的结构和功能研究中, 来自哺乳动物的证据显示, Rab5 蛋白在细胞内吞活动中起着重要作用: 它是同型内吞体 (endosome) 互相融合的限速因子^[16]。本文所研究的 *Osrab5B* 基因来自水稻。由该基因的编码序列所推导的氨基酸序列与来自植物的 Rab5B 家族的龙船海棠属 *McRab5B*、百脉根属 *LjRab5B* 和拟南芥 *Ara6* (DDBJ/EMBL/GenBank 的序列号分别为 CAA06922, CAA98167 和 BAB32953) 具有高度同源性, ID 值 (identity value) 分别是 79%、78% 和 77%。据报道, 上述三种双子叶植物的 Rab5B 蛋白和 *OsRab5B* 的 N 端都具有特殊的豆蔻酰化基序 GCXXS, 而这个基序是 Arf 类小 G 蛋白和异源三聚体 G 蛋白的 α 亚基

所具有的. 这种结构目前在酵母和脊椎动物 Ypt/Rab 都没有发现. 因此, Borg 等^[9]和 Bolte 等^[10]认为植物 Rab5B 蛋白应归为特殊一类的 Ypt/Rab 蛋白. 但是, 仅根据目前的证据还无法判断植物 Rab5B 蛋白在功能方面是否与酵母和哺乳动物有着什么样的差异. Ueda 等^[11]对拟南芥 Ara6 的亚细胞定位结果表明, Ara6 定位在细胞的内吞体表面, Bolte 等^[10]的证据表明, 龙船海棠属 *rab5B* 基因 (*Mcrab5B*) 的表达与适应盐胁迫正相关: 加盐培养一段时间后, 该基因的表达量明显增加. 因此, 对植物 Rab5B 蛋白的研究不但对于了解植物内吞活动和摄取营养具有重要的意义, 而且可能对于改良农作物的农艺性状具有一定的价值.

既然植物 Rab5B 蛋白由于具有特殊的 N 端结构而受到关注, 那么, 进一步鉴定该基因编码产物的功能, 鉴别它和其他 Rab 蛋白以及动物的 Rab5B 蛋白在功能方面的异同, 是一项比较重要的工作. 而蛋白质的表达和纯化以及 GTP 结合能力的鉴定是其中最基本的方面. 本研究获得了稳定表达 GST-OsRab5B 融合蛋白的菌株, 并对该融合蛋白进行了纯化和结合 GTP 能力的检测. 结果显示, 纯化后的目标蛋白只有一条 GTP 结合信号带, 而未纯化的含目标融合蛋白分子质量稍小位置也有两条较弱额外信号带 (图 4), 这一方面说明所表达的融合蛋白具有较强的 GTP 结合能力, 且对该融合蛋白的纯化获得了成功; 另一方面说明包含外源蛋白的细菌总蛋白中含有极少量异位表达的目标蛋白, 且这些蛋白质与还原型谷胱甘肽不结合或者结合力极弱 (包涵体形式的蛋白质在本纯化操作中绝大部分不被结合). 总之, 本文成功地得到了具有 GTP 结合活性的 GST 和 OsRab5B 的融合蛋白, 这对于进一步鉴定 OsRab5B 蛋白的 GTP 水解能力, 和研究它在细胞内与其他蛋白质的相互作用及其对细胞内的内吞体融合的影响作用打下了基础.

参 考 文 献

- 1 Bischoff F, Molendijk A, Rajendrakumar V, *et al.* GTP-binding proteins in plants. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **55** (2): 233~ 256
- 2 Martinez O, Goud B. Rab proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1998, **1404** (1~ 2): 101~ 112
- 3 Armstrong J. How do Rab proteins function in membrane traffic. *Inter J Biochim Cell Biol*, 2000, **32** (3): 303~ 307
- 4 Bourne H R. Do GTPases Direct Membrane traffic in secretion?. *Cell*, 1988, **53** (5): 669~ 671
- 5 Schiene K, Puhler A, Niehaus K. Transgenic tobacco plants that express an antisense construct derived from a *Medicago sativa* cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration. *Mol Gen Genet*, 2000, **263** (5): 761~ 770
- 6 Sano H, Youssefian S. A novel ras-related *rgp1* gene encoding a GTP-binding protein has reduced expression in 5-azacytidine-induced dwarf rice. *Mol Gen Genet*, 1991, **228** (1~ 2): 227~ 232
- 7 O'Mahony P, Oliver M. Characterization of a desiccation-responsive small GTP-binding protein (Rab2) from the desiccation-tolerant grass *Sporobolus stapfianus*. *Plant Mol Biol*, 1999, **39** (4): 809~ 821
- 8 Youssefian S, Nakamura M, Sano H. Molecular characterization of *rgp2*, a gene encoding a small GTP-binding protein from rice. *Mol Gen Genet*, 1993, **237** (1~ 2): 187~ 192
- 9 Borg S, Brandstrup B, Jenssen T J, *et al.* Identification of new protein species among 33 different small GTP-binding proteins encoded by cDNAs from *Lotus japonicus*, and expression of corresponding mRNAs in developing root nodules. *Plant J*, 1997, **11** (2): 237~ 250
- 10 Bolte S, Schiene K, Dietz K J. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol Biol*, 2000, **42** (6): 923~ 936
- 11 Ueda T, Yamaguchi M, Uchimiya H, *et al.* Ara6, a plant-unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J*, 2001, **20** (17): 4730~ 4741
- 12 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*. 2. New York: John Wiley & Sons Inc., 1990. 10. 2. 4~ 10. 2. 9
- 13 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18. 60~ 18. 69
- 14 Nagano Y, Murai N, Matsuno R, *et al.* Isolation and characterization of cDNAs that encode eleven small GTP-binding proteins from *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiology*, 1993, **34** (3): 447~ 455
- 15 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18. 47~ 18. 59
- 16 Hoffenberg S, Liu X, Nicolova L, *et al.* A novel membrane-anchored Rab5 interacting protein required for homotypic endosome fusion. *J Biol Chem*, 2000, **275** (32): 24661~ 24669

Prokaryotic Expression , Purification and GTP-binding Assay of *rab5B* Gene From Rice (*Oryza sativa* L.) *

LIN Hui-Xian¹⁾, LIU Xiao-Bin²⁾, LIANG Cheng-Ye²⁾, LIU Liang-Shi¹⁾**

(¹⁾The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;

²⁾South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract Rab protein family belongs to the superfamily of ras-like GTP-binding protein. *Osrab5B*, designated for *rab5B* gene from rice, encodes a putative Rab protein. In order to investigate the physiological and biochemical functions of this protein OsRab5B, the complete coding sequence (CDS) of *Osrab5B* was amplified and inserted into a prokaryotic GluGST expression vector, pGEX-4T1, thus constructing the prokaryotic expression vector. The in-frame recombinant plasmid was confirmed by sequencing and was named pG-5BE. Then the vector pG-5BE was transformed into prokaryotic cell *E. coli* strain BL21 (DE3). The GST fusion protein expressed by this positive strain was purified with GSTrapTM column. The result from GTP-binding assay proved that the fusion protein has GTP-binding ability.

Key words *Osrab5B*, small GTP-binding protein, GTP-binding assay

* This research was supported by State 863 High Technology R&D Project of China (BH-01-02-03) and The Dean Foundation of South China Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences (10-00-312).

** Corresponding author. Tel: 86-20-84112392, E-mail: ls10@zsu.edu.cn

Received: October 12, 2001 Accepted: December 3, 2001