

杨旭颖,安丽君. 拟南芥细胞周期调控因子 KRP2 的原核表达及蛋白纯化[J]. 江苏农业科学,2019,47(12):63-65.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.012

# 拟南芥细胞周期调控因子 KRP2 的原核表达及蛋白纯化

杨旭颖,安丽君

(旱区逆境生物学国家重点实验室/西北农林科技大学生命科学院,陕西杨凌 712100)

**摘要:**表皮毛是由高等植物地上部组织表皮细胞发育而来的一种特殊结构,细胞周期调控因子在植物表皮毛细胞形态的建成过程中发挥着重要作用。利用原核表达系统,构建 pET-28a-KRP2-FLAG 融合表达载体,在大肠杆菌中对拟南芥细胞周期依赖激酶抑制因子 KRP2 进行了体外表达,并利用蛋白标签 FLAG 和 His 对目的蛋白进行纯化。结果表明,在大肠杆菌系统中成功对 KRP2-FLAG 进行了体外表达并得到了纯化的蛋白,蛋白量为 0.87 mg。为进一步研究 KRP2 在表皮毛细胞发育过程中的作用奠定了基础。

**关键词:**表皮毛;细胞周期调控因子;KRP2;原核表达;FLAG 标签;His 标签;蛋白纯化;拟南芥;基因克隆;重组蛋白

**中图分类号:** Q78;S188<sup>+</sup>.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)12-0063-03

植物表皮毛是植物地上组织表皮细胞形成的一种特化结构,与表皮铺板细胞持续进行有丝分裂不同,表皮毛细胞在命运决定之后将退出有丝分裂周期转而进入核内复制。在模式植物拟南芥中,成熟的叶片表皮毛细胞需要经历 4 次核内复制,从而使其核内 DNA 含量达到 32C,进而形成特定的形态<sup>[1]</sup>。细胞周期调控因子在细胞由有丝分裂向核内复制转换的过程中发挥着关键的调节作用,其中细胞周期素依赖性激酶(CDK)是植物细胞周期的中心调控因子,细胞周期的一些进程是通过调节 CDKs 活性进行的<sup>[2]</sup>。与细胞周期素相对的是 CDK 抑制因子,它通过与 CDKs 直接结合负调控 CDKs 活性<sup>[3]</sup>。植物中第 1 种 CDK 抑制因子是由 7 种基因共同编码的 kip 相关蛋白家族(KRP):ICK1/KRP1、ICK2/KRP2、KRP3、KRP4、KRP5、KRP6、KRP7。ICK1/KRP1、ICK2/KRP2、KRP6 过表达强烈抑制生长并且影响器官形态建成。KRPs 是一类带有 C 末端区域(CTD)的小蛋白,它是结合 CDK 或细胞周期蛋白并执行 KRPs 抑制功能所必需的一类因子<sup>[4]</sup>。而 CDK 活性在 G1/M 期和 G2/M 期转换时会升高并且与蛋白磷酸化、起始 DNA 复制、有丝分裂相关;转录水平调控、蛋白互作、转录后修饰或蛋白降解都能改变 CDK 活性,最终调控细胞周期进程<sup>[5]</sup>。酵母双杂体系中除了 KRP5,其他 KRPs 都与 CDKA;1(A 类 CDK 激酶)互作而不与 CDKB1;1 互作,并且所有的 KRPs 可以与 D 型细胞周期素互作,表明 KRPs 抑制 CYCD-CDKA 复合物活性<sup>[6]</sup>。

CDKA;1 和其特异性抑制因子 KRP2 调控拟南芥叶片发

育过程中有丝分裂向核内复制的转换。在有丝分裂活性组织中,调节 KRP2 过表达可降低 CDKA;1 活性,而在核内复制的组织中它的活性不会降低,反而促进核内复制。CDKA;1 的弱表达导致了 CDK 有丝分裂活性的特异性抑制,从而诱导核内周期。CDKB1;1 通过使 KRP2 磷酸化调控蛋白酶体降解;CDKB1;1 的 mRNA 和蛋白水平在有丝分裂组织中要高于核内复制组织,表明 CDKB1;1 促进 KRP2 降解并且通过维持 CDKA;1 活性来抑制有丝分裂进入核内周期<sup>[7]</sup>。KRP2 蛋白可以通过 CDK 磷酸化和蛋白酶体降解机制调节转录后翻译<sup>[8]</sup>,不同 CDK 蛋白之间的互作可以控制不同时期特异的 CDK 活性。

为进一步研究 KRP2 在高等植物细胞周期中的生物学功能,本研究对拟南芥 KRP2 基因 CDS 序列进行克隆,并在其 3' 端添加编码 FLAG 标签的核苷酸序列,构建了 pET-28a-KRP2-FLAG 融合表达载体;通过在大肠杆菌 BL21(DE3)中体外表达,利用镍柱亲和层析纯化,成功获得了 His-KRP2-FLAG 重组蛋白。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料、菌株和载体 拟南芥 Columbia(Col-0)生态型野生型种子、大肠杆菌 TOP10 和 BL21(DE3)、原核表达载体 pET-28a,均由西北农林科技大学生命科学院分子遗传实验室保存。

1.1.2 试剂 试验中用到的限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶 Prime Star、T4 连接酶、牛小肠碱性磷酸酶(CIAP)、反转录酶等购自 Takara 公司;His 标签蛋白纯化柱填料 Ni Sepharose 6 Fast Flow、硝酸纤维素膜(0.45 μm),购自通用电气医疗集团生命科学部;6xHis 抗体购自 Abcam 公司,FLAG 抗体购自 Sigma 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 拟南芥 KRP2 基因片段克隆 提取野生型拟南芥总

收稿日期:2018-03-26

基金项目:国家自然科学基金(编号:31470290);中央高校基本科研业务费项目(编号:2014YB036、Z109021537)。

作者简介:杨旭颖(1992—),女,陕西西安人,硕士研究生,主要从事拟南芥表皮毛分化发育调控机理研究。E-mail:804698629@qq.com。

通信作者:安丽君,副教授,硕士研究生导师,主要从事植物分子遗传与发育生物学研究。E-mail:lijunan@nwsuaf.edu.cn。

RNA, 反转录获得 cDNA; 以此为模板用带 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的引物进行 PCR 扩增; 引物序列 F: 5'-CATGGATCCATGCGCGCGTTAGGAGAAG-3'; R: 5'-CATCTCGAGTCACTTATCATCATCATCTTTATAATCTGGATTCAATTTAATCCC-3' (下划线分别表示 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点), 引物由北京六合华大基因有限公司合成。用 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切扩增片段和 pET-28a 载体, 连接酶切产物并转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 对阳性重组质粒 pET-28a-KRP2-FLAG 进行测序鉴定<sup>[9]</sup>。

**1.2.2 重组蛋白的诱导表达** 将测序正确的重组质粒转化至大肠杆菌 BL21(DE3) 表达菌株中, 过夜培养后挑取阳性单克隆接种到 50 mL LB 液体培养基中, 37 ℃、220 r/min 小规模培养, 待菌液  $D_{600\text{ nm}}$  达到 0.5~1.0 时, 加入终浓度为 0.2 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG), 于 37 ℃ 诱导表达。分别收集诱导前和诱导后菌液, 4 000 g 离心 10 min, 收集菌体并用裂解缓冲液 Lysis Buffer [50 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 值 8.0), 300 mmol/L NaCl, 10 mmol/L 咪唑] 重悬, 冰浴, 进行超声破碎 (25 W, 工作 5 s, 间歇 5 s, 15 min), 结束后 4 ℃、1 000 g 离心 30 min, 分别收集上清和沉淀。以诱导前菌液为对照, 用 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳检测重组蛋白的表达情况, 之后利用 BIO-RAD 凝胶成像软件分析诱导出的蛋白量, 以不同梯度 (0.125, 0.250, 0.500, 1.000 mg/mL) 牛血清白蛋白 BSA 质量浓度为标准对照<sup>[10-11]</sup>。

由于重组蛋白 N 端带有 His, C 端带有 FLAG 标签, 所以本试验同时用 Anti-His 和 Anti-FLAG 进行免疫印迹检测。将 2 份蛋白样品通过电转仪转移到硝酸纤维素膜上, 室温条件下用含 50 g/L 脱脂奶粉的 TBST [20 mmol/L Tris-HCl (pH 值 7.5), 体积分数 0.1% 的 Tween 20, 150 mmol/L NaCl] 封闭

1 h, 然后分别加入经封闭液稀释的 Anti-His (1:10 000, 体积比) 和 Anti-FLAG (1:1 000, 体积比) 4 ℃ 过夜孵育, 次日将 2 块膜用 1 × TBST 洗 3 次, 然后均加入鼠抗 G&M (1:10 000 体积比) 室温孵育 1 h, 1 × TBST 洗 3 次, 再用 TBS 洗膜 5 min, 加入 ECL 工作液进行显色。

**1.2.3 重组蛋白的纯化** 重组蛋白小规模原核表达成功后, 按照原条件进行目标蛋白扩大培养, 收集 400 mL IPTG 诱导后的菌液, 4 ℃、10 000 g 离心 10 min, 菌体用 Lysis Buffer 重悬, 因为后续试验需要有活性的蛋白, 故超声破碎后离心收集上清, 并将上清用 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜超滤, 然后和 600  $\mu\text{L}$  镍柱混合, 室温孵育 1 h, 转入简易重力柱装置中, 分别用 0.50、100、200、400 mmol/L 浓度的咪唑洗脱蛋白并检测<sup>[12-13]</sup>。

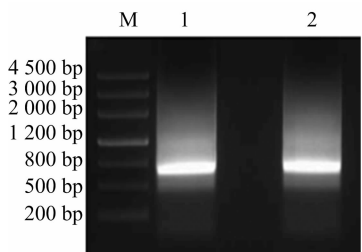
## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥 KRP2 目的基因片段克隆

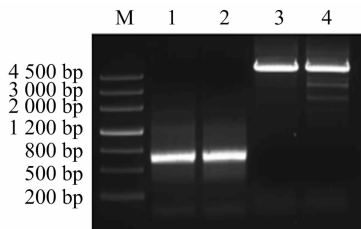
由拟南芥基因组数据库 (www.arabidopsis.org) 公布的基因序列可知, KRP2 基因的 CDS 长度为 666 bp。以野生型拟南芥 cDNA 为模板, 用带有 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点的引物扩增得到了与预期大小吻合的片段 (图 1); 用 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切目的片段与 pET-28a 载体 (图 2), 目的基因的条带约为 650 bp, 载体骨架的大小约为 5.3 ku。

### 2.2 原核表达载体 pET-28a-KRP2 的鉴定

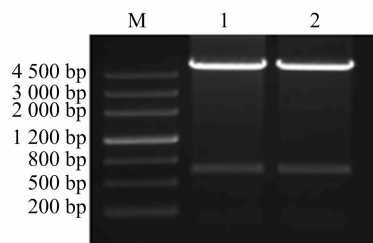
目的基因片段与载体连接, 连接产物转化大肠杆菌后选取阳性克隆并提取质粒 DNA 进行双酶切, 经电泳检测表明目的基因片段成功克隆到了 pET-28a 表达载体中 (图 3)。为了验证克隆到载体中的目的基因片段序列是否正确, 将 pET-28a-KRP2 重组质粒进行了测序, 结果表明克隆到的序列与数据库公布的序列完全一致, pET-28a-KRP2 重组质粒构建成功, 基因结构如图 4 所示。



M—DNA 分子质量标准; 1~2—PCR 得到的 KRP2 (129~758 bp) cDNA 片段  
图1 拟南芥 KRP2 基因 (129~758 bp) cDNA 片段的扩增



M—DNA 分子质量标准; 1~4—*Bam*H I 和 *Xho* I 酶切得到的 KRP2 基因和 pET-28a 载体片段  
图2 拟南芥 KRP2 基因和 pET-28a 载体 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切图



M—DNA 分子质量标准; 1~2—pET-28a-KRP2-FLAG 质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切结果  
图3 pET-28a-KRP2-FLAG 质粒的 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定结果



图4 重组质粒 pET-28a-KRP2-FLAG 基因结构

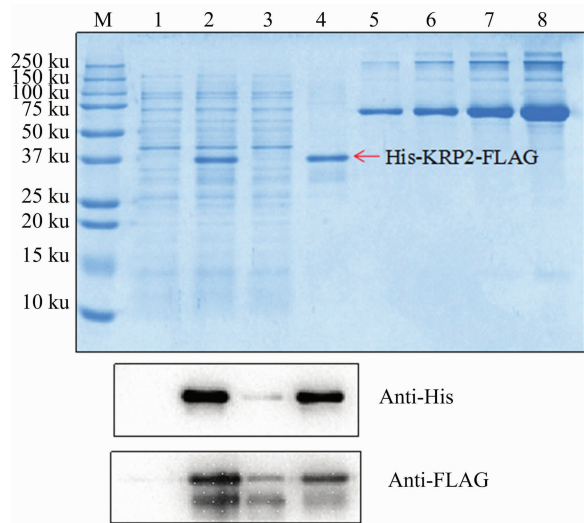
### 2.3 重组蛋白的诱导表达

将构建好的 pET-28a-KRP2 重组质粒转化大肠杆菌 BL21 感受态细胞, 建立重组蛋白的原核表达系统。37 ℃、0.2 mmol/L IPTG 诱导表达。取诱导前, 诱导后及超声波处理后的上清和沉淀检测诱导表达情况。结果显示, 诱导后的菌液相比于诱导前在 25~37 ku 出现了新的蛋白条带 (图 5), 与预测的 KRP2 蛋白分子量一致。为了进一步确认诱导

表达出的蛋白条带是目的 KRP2-FLAG 重组蛋白, 分别以 His 和 FLAG 蛋白标签的抗体对诱导出的蛋白进行免疫印迹检测, 结果表明诱导出的新蛋白条带能被 His 标签抗体和 FLAG 标签抗体识别, 证明本试验利用原核表达系统成功诱导出 KRP2-FLAG 蛋白, 且重组蛋白主要存在于沉淀, 上清中量较少, 表明得到的重组蛋白主要以包涵体形式存在。通过 Image Lab 软件灰度分析对目的蛋白浓度进行定量, 得到诱导后重组蛋白浓度约为 0.181 mg/mL。

### 2.4 KRP2-FLAG 重组蛋白的纯化

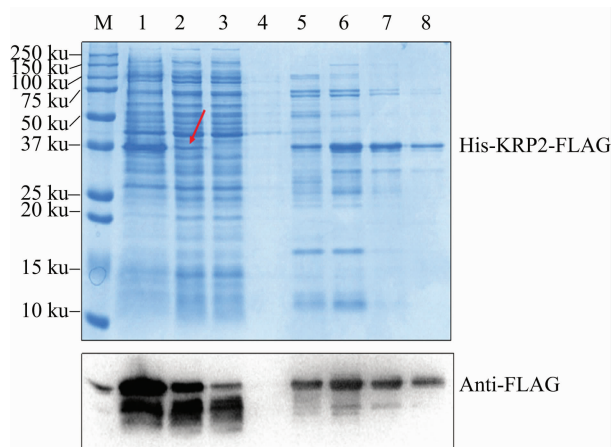
试验后续是研究 KRP2 与 CDKA;1、CDKB1;1 三者之间的互作效应, 需要具有活性的 KRP2 蛋白, 而沉淀中的 KRP2



M—蛋白分子量标准；1—诱导前菌液；2—诱导后菌液；3—超声破碎后的上清；4—超声破碎后的沉淀；5—8—分别为 0.125、0.250、0.500、1.000 mg/mL 牛血清蛋白

图5 原核表达质粒 pET28a-KRP2-FLAG 的诱导表达

蛋白以不溶性包涵体形式存在,几乎没有活性,因而考虑通过扩大培养菌体,利用镍柱亲和和层析纯化上清中的活性重组蛋白。将诱导后的菌液经超声波破碎后离心收集上清,与镍柱室温孵育后,用不同浓度咪唑洗脱并收集 KRP2-FLAG 蛋白,SDS-PAGE 与免疫印迹检测洗脱液。本试验成功获得了纯度较高的重组蛋白,且利用 BSA 标准蛋白定量,最终共得到 0.87 mg 重组蛋白(图6)。



M—蛋白分子量标准；1—诱导后菌液；2—超声破碎后的上清；3—穿液；4—8—分别为 0、50、100、200、400 mmol/L 咪唑洗脱液

图6 KRP2-FLAG 重组蛋白的纯化

### 3 讨论与结论

植物中细胞分化调控已经取得了相当不错的进展,然而对高度可信的植物发育调控还没有一个较好的解释。目前研究证明了一些通过转录因子直接控制细胞周期的相关基因,发现与细胞周期调控有关的因子主要包括三大类:细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶及细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子,这 3 类因子相互作用,共同调控细胞周期<sup>[14]</sup>。

KRP2 作为 CDK 抑制因子之一,在 G1/S 转换期,被泛素酶体降解掉,CDK 被激活,进入 S 期。有丝分裂周期向核内周期的转换机制对揭示细胞分化和器官大小控制进程具有重要作用,为进一步研究 KRP2 在高等植物中如何控制细胞进程,本研究通过克隆拟南芥 KRP2 基因,以及原核表达并纯化出具有活性的重组 KRP2-FLAG 蛋白,以期后续研究有丝分裂向核内周期转换时 CDKA;1、KRP2 和 CDKB1;1 三者之间更为精确的互作效应奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 高英,郭建强,赵金凤. 拟南芥表皮毛发育的分子机制[J]. 植物学报,2011,46(1):119-127.
- [2] Menges M, Hennig L, Gruijssem W, et al. Cell cycle-regulated gene expression in Arabidopsis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(44):41987-42002.
- [3] Morgan D O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1997, 13:261-291.
- [4] de Veylder L, Beeckman T, Beemster G T, et al. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 2001, 13(7):1653-1668.
- [5] Zhou Y M, Wang H, Gilmer S, et al. Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in Arabidopsis thaliana[J]. Planta, 2003, 216(4):604-613.
- [6] de Clercq A, Inze D. Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals and plants: a functional comparison[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2006, 41:293-313.
- [7] Verkest A, Manes C L, Vercruysse S, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitors KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during Arabidopsis leaf development through inhibition of mitotic CDKA;1 kinase complexes[J]. Plant Cell, 2005, 17(6):1723-1736.
- [8] Soichi I, Masaaki U. Cell-cycle control and plant development[J]. International Review of Cell and Molecular Biology, 2011, 291:227-261.
- [9] 李芳,罗军,许会芬,等. 西农萨能羊 MAT 基因的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(12):1-6, 12.
- [10] 张钰,李亚会,屠唯一,等. 拟南芥 AtERF1 蛋白的原核可溶性表达及多克隆抗体的制备[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2013, 42(4):378-383.
- [11] 余璐璐,龚绒雪,吕林涛,等. 拟南芥氰丙氨酸合酶 CYS-CI 基因扩增及多克隆抗体制备[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6):1235-1241.
- [12] 许君,乔帅,常岚,等. 苦瓜核糖体失活蛋白 MAP30 的原核表达与抗体制备[J]. 河南农业大学学报, 2009, 43(5):552-556.
- [13] 单丽伟,唐如春,刘三阳. 小麦种子过氧化物酶 WPI 基因的原核表达、纯化及多克隆抗体制备[J]. 生物工程学报, 2011, 27(1):26-30.
- [14] 邹向阳,李连宏. 细胞周期调控与肿瘤[J]. 国际遗传学杂志, 2006, 29(1):70-73.