

李晓君,周文吉,周启武,等. *ShSAP1* 的原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 江苏农业科学,2015,43(3):43-45.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.03.014

ShSAP1 的原核表达及多克隆抗体的制备

李晓君¹,周文吉¹,周启武¹,王文荣²

(1. 临沧师范高等专科学校农学系,云南临沧 677000; 2. 云南省临沧市甘蔗技术推广站,云南临沧 677000)

摘要:将 *ShSAP1* 的阅读框连接到原核表达载体 pET32a(+) 中,构建成 *ShSAP1* 原核表达载体 PET-*ShSAP1*,然后将其转入宿主菌 BL21,经 IPTG 诱导后,宿主菌表达出与预期分子量大小相符的 35 ku 的融合蛋白;将纯化后的融合蛋白免疫家兔,获得了 *ShSAP1* 的特异性抗血清;以融合蛋白作抗原,用间接 ELISA 法测定其抗血清效价为 1:25 000。

关键词:甘蔗;*ShSAP1*;锌指蛋白;原核表达;多克隆抗体

中图分类号: Q331 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)03-0043-03

逆境相关蛋白(stress associated protein,SAP)是植物中一类含有 A20 与 AN1 锌指结构的蛋白,该蛋白家族与植物的非生物胁迫应答密切相关。*SAP* 基因的表达能够被 1 种或多种非生物胁迫诱导,转基因研究发现 *SAP* 家族基因可以增强转基因植物的对 1 种或多种胁迫的抗性^[1]。目前关于 *SAP* 的作用机制还不是很清楚,研究发现 *SAP* 可能通过泛素蛋白酶途径、蛋白相互作用或作为氧化还原感受器参与植物的逆境应答过程^[2-4]。*ShSAP1* (GenBank 登录号 HM991960.1)是由

甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)中克隆到的 *SAP* 家族基因,研究发现该基因的表达具有逆境应答特性^[5],目前正在开展 *ShSAP1* 的转基因功能分析。本研究构建了 *ShSAP1* 的原核表达载体,通过大肠杆菌原核表达系统进行 *ShSAP1* 的蛋白表达与纯化,并通过免疫家兔获得了抗血清,为 *ShSAP1* 蛋白功能研究及的后续的转基因检测打下了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

原核表达载体 pET32a(+) 由中国热带农业科学院热带生物技术研究所刘志昕实验室惠赠,大肠杆菌菌株 DH5 α 和 BL21(DE3)感受态细胞感受态购自天根生化科技有限公司。*rTaq* 酶购自大连宝生物工程有限公司,限制性内切酶, *T₄* 连接酶购自 Fermentas 公司,PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒及质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司,蛋白 Marker、蛋白纯

收稿日期:2014-05-06

基金项目:现代农业产业技术体系(甘蔗)建设专项资金(编号:CARs-20-6-14);临沧师范高等专科学校校级课题(编号:LCSZL2013001)。

作者简介:李晓君(1985—),女,云南临沧人,博士,讲师,主要从事植物生物技术与种质创新方面研究。E-mail:lxj-148@163.com。

通信作者:王文荣。E-mail:lcgks@163.com。

活率奠定了基础,也为以后大规模种植提供了依据。

此外,多年来用于研究脱毒的材料均为二倍体,而本研究以多倍体不定根为外植体,将川贝母植物的脱毒苗培育技术与多倍体诱导技术进行有机结合,培育出品质优良、生长速度快、有效组分含量高和抗性强的川贝母多倍体脱毒苗,不仅缩短了川贝母的生长周期,还大大提高了川贝母的生产质量,对于今后研究资源较为匮乏的药用植物具有重要的意义。

参考文献:

- [1]王强,兰利琼,傅华龙.秋水仙素诱导川贝母(*Fritillaria cirrhosa* D. Don)愈伤组织多倍体的研究[J].武汉植物学研究,2002,20(6):449-452.
- [2]赵高琼,任波,董小萍,等.川贝母研究现状[J].中药与临床,2012,3(6):59-64.
- [3]阎博华,丁红,丰芬,等.不同基源川贝母研究进展[J].四川中医,2010,28(5):48-50.
- [4]闫秋洁,杨琼.秋水仙素对蚕豆胚根生长的影响及多倍体诱导效应分析[J].广西植物,2012,32(3):385-391.
- [5]段英姿,客绍英,曹静,等.秋水仙碱诱导南丹参多倍体的研究[J].中国中药杂志,2006,31(6):445-448.
- [6]张海凤,郑辉,陈新华,等.药用植物多倍体研究进展[J].河

- 北林果研究,2008,23(2):169-172,175.
- [7]周春娥,路淑霞,周延清,等.药用植物人工诱导多倍体育种的研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(33):14600-14601,14646.
- [8]崔德才,徐培文.植物组织培养与工厂化育苗[M].北京:化学工业出版社,2003:133-135.
- [9]符国芳,李青.植物组织培养脱毒方法综述[J].福建林业科技,2007,34(3):255-258.
- [10]葛胜娟.植物组织培养中的快繁与脱毒技术及其应用[J].中国农学通报,2005,21(5):104-107.
- [11]苏艳,马双喜,瞿素萍,等.黄柏(*Phellodendron amurense* Rupr.)枝条组培快繁技术研究[J].西南农业学报,2008,21(6):1679-1681.
- [12]刘健.草莓热处理结合茎尖脱毒繁育体系的建立[D].杭州:浙江大学,2008.
- [13]陆文樑,白书农,张宪省.外源激素对风信子再生花芽发育的控制[J].植物学报,2000,42(10):996-1002.
- [14]戴云新,张健,李敏,等.NAA 和 IBA 对非洲菊组培苗生根的影响[J].安徽农业科学,2009,37(19):8845-8847.
- [15]Campanoni P, Nick P. Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways[J]. Plant Physiology,2005,137(3):939-948.

化试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, Goat Anti - Rabbit IgG - AP 与 BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司, 其他试剂为国产分析纯。本试验所用的引物序列如下, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

PETZP1: TGGGATCCATGGAGCACAAGGAGACTGG
BamH I ;

PETZP2: GCAAGCTTCTAGATCTTGTCTGAGCTTGTCCGC
HindIII。

1.2 ShSAP1 原核表达载体的构建

由甘蔗 cDNA 扩增 *ShSAP1* 基因阅读框, 所用引物为 PETZP1 和 PTEZP2, PCR 反应条件为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。纯化 PCR 产物, 用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Hind*III 对纯化后 PCR 产物和 pET32a(+) 质粒进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳后回收 PCR 产物酶切片段和 pET32a(+) 大片段, 用 T4 连接酶连接转化 DH5 α , 重组质粒进行酶切验证后送往上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 获得原核表达载体 pET - *ShSAP1*。

1.3 融合蛋白的小量表达

将 pET32a(+) 与测序验证后的原核表达载体 pET - *ShSAP1* 转化 BL21(DE3), 挑取阳性单菌落接种于 10 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 37 ℃、200 r/min 培养。培养至 $D = 0.6 \sim 0.8$, 各取 1 mL 分装于灭菌的 1.5 mL EP 管中, 加等体积 35% 甘油, 混匀, -70 ℃ 保存。试管中剩余菌液用加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG 诱导, 37 ℃、200 r/min 培养 3~4 h。超声波破碎菌体, 取 1.5 mL 的 EP 管, 分别取 1 mL 破碎后的菌液, 12 000 r/min 离心 1 min。沉淀用 100 μ L 的无菌水吹散。分别取 10 μ L 上清和 10 μ L 沉淀悬浮液进行 SDS - PAGE 分析, 考马斯亮蓝 R - 250 染色 30 min 后进行脱色, 鉴定表达产物的存在形式及表达量。

1.4 融合蛋白的大量表达与纯化

将小量表达验证过的 pET32a(+) 和 pET - *ShSAP1* 菌液进行划线培养, 挑取阳性单菌落接种于 10 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 于 37 ℃ 活化培养 8 h 后, 以 1:100 稀释到 400 mL 含有 Amp 的 LB 液体培养基中, 振荡培养至 $D_{600\text{nm}}$ 值达到 0.6~0.8, 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG, 继续于 37 ℃ 培养 8 h 诱导蛋白表达。8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 弃上清, 加入 30 mL Binding Buffer (500 mmol/L NaCl、20 mmol/L imidazole、10 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.0) 重悬, 使用超声波破碎法在冰浴中对菌体进行破碎, 8 000 r/min 离心 10 min, 分离裂解液上清保存, 取 10 μ L 上清液进行 SDS - PAGE 分析。

蛋白纯化: 用 6 mL 灭菌水洗涤琼脂糖树脂 2 次后, 以 6 mL Binding Buffer 平衡亲和柱。取 6 mL 裂解液上清上柱, 用 6 mL Wash Buffer (500 mmol/L NaCl、20 mmol/L imidazole、20 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.0) 洗脱杂蛋白, 再分别以由低至高的咪唑浓度的 6 mL Elute Buffer (500 mmol/L NaCl、50、100、200、500 mmol/L imidazole、20 mmol/L Tris - HCl, pH 值 8.0) 洗脱融合蛋白, 取 10 μ L 洗脱液进行 SDS - PAGE 分析。同时, 将纯化蛋白送往北京华大基因测序中心进行质谱测序分析。选取浓度与纯度较好的洗脱液进行 1 \times PBS 透析, 透

析 3 次后进行蛋白浓度测定既可用于免疫兔子, 蛋白浓度 (mg/mL) = $1.45D_{280\text{nm}} - 0.74D_{260\text{nm}}$ [6]。

1.5 抗血清的制备和效价测定

将纯化并透析过的融合蛋白作为免疫原对普通成年大白兔进行免疫(注射总量为 1 800 μ g/只), 每次免疫加等体积弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射。每隔 8 d 进行 1 次免疫, 第 4 次免疫后第 5 天耳静脉采血, 分离血清, 以 *ShSAP1* 纯化融合蛋白 (2 μ g/mL) 为抗原进行 ID - ELISA 测定, 以免疫前家兔血清作为阴性对照, PBS 作为空白对照。效价检测合格后进行颈动脉采全血 50 mL, 血液处理如下: 37 ℃ 静置 1 h, 4 ℃ 静置过夜, 5 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清于 50 mL 离心管, 再次 5 000 r/min 离心, 15 min, 吸取上清, 留出近期使用量 2~8 ℃ 存放, 其余分装后置于 -70 ℃。

2 结果与分析

2.1 *ShSAP1* 的原核表达的构建

用引物 PETZP1 与 PETZP2 从甘蔗 cDNA 扩增得到带有 *Bam*H I / *Hind*III 酶切位点的 530 bp 目标产物(图 1 泳道 1), 将 PCR 产物纯化后和载体 pET32a(+) 分别进行 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切, 回收 PCR 酶切产物和 pET32a(+) 大片段进行连接转化 DH5 α , 对重组质粒进行 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切验证, 可以切下 530 bp 左右的目的条带(图 1 泳道 3) 载体经测序鉴定后, 结果正确, 构建成 *ShSAP1* 的原核表达载体 pET - *ShSAP1*。

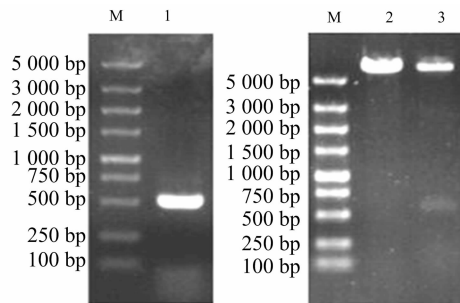


图1 *ShSAP1* 的扩增(泳道1)和 pET-*ShSAP1* 的酶切验证(泳道3)

2.2 *ShSAP1* 的小量表达与表达模式的确定

将 pET32a(+) 与 pET - *ShSAP1* 重组子质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 筛选出阳性克隆, 小量培养至 D 值为 0.7 左右, 加 IPTG 诱导 3 h, 收集菌体进行超声波破碎细胞后, 离心分出上清与沉淀, 分别取 10 μ L 上清和 10 μ L 沉淀悬浮液进行 SDS - PAGE 电泳(图 2), pET - *ShSAP1* 菌体裂解液上清在约 35 ku 处出现 1 条蛋白带, 而对照 pET32a(+) 上清无此带。*ShSAP1* 基因编码 171 个氨基酸, 预测蛋白分子量约为 18.3 ku, 融合蛋白的氨基酸总数为 332 个左右, 表达出的融合蛋白 *ShSAP1* - His 大小约为 35 ku, 大小与 SDS - PAGE 所测大小相符, 初步表明 *ShSAP1* 在大肠杆菌中表达成功。*ShSAP1* 在 (<http://www.expasy.ch/tools>) 疏水性分析结果表明, *ShSAP1* 编码的氨基酸序列中, 具有多个明显的亲水区域, 大部分的氨基酸属于亲水性氨基酸, 推测 *ShSAP1* 属于亲水性蛋白; 由 pET - *ShSAP1* 的菌体裂解液沉淀悬浮液的电泳结果可以说, *ShSAP1* - His 融合蛋白主要存在于上清中, 确定 *ShSAP1* 为可溶性蛋白。

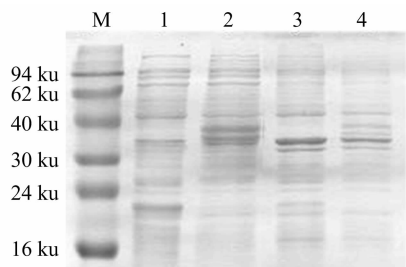
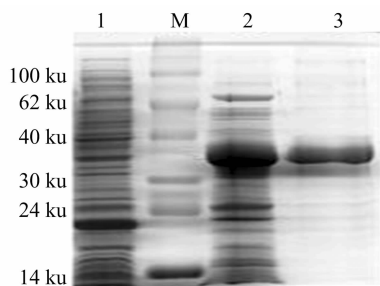


图2 PET-ShSAP1菌小量诱导总蛋白上清(泳道2)和沉淀(泳道4)的SDS-PAGE检测(1和3分别为PET-32诱导总蛋白的上清和沉淀)

2.3 *ShSAP1* 的大量表达及纯化

经过大量诱导, PET-ShSAP1 菌表达出了丰度较高的目标融合蛋白(图3泳道2)。将 ShSAP1 的粗蛋白上清用 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖亲和层析柱进行纯化, 其中 Elute Buffer 的 imidazole 浓度为 100 mmol/L 时洗脱纯度和浓度较好, 以该浓度下的洗脱产物进行电泳(图3泳道3), 测定纯化后的表达产物浓度为 0.805 mg/mL。将纯化蛋白条带切下送往华大基因测序, 质谱所得部分氨基酸序列经比对后发现与甘蔗 *ShSAP1* 推导蛋白氨基酸序列具有一致性, 说明 ShSAP1 在大肠杆菌中得到了正确的表达。



M—Marker; 1—IPTG 诱导PET-32(a) 菌总蛋白;
2—IPTG 大量诱导 PET-ShSAP1菌总蛋白;
3—ShSAP1-His 融合蛋白的纯化产物

图3 ShSAP1 融合蛋白大量表达产物与纯化产物的SDS-PAGE 检测

2.4 *ShSAP1* 抗血清的效价测定

将纯化后并经过透析的融合蛋白(0.673 mg/mL)作为免疫原, 采用肌肉与皮下注射相结合免疫家兔, 4 次注射后进行抗血清的效价测定。以蛋白溶液(2 $\mu\text{g/mL}$)为抗原进行 ID-ELISA 测定(图4), 以表达的 ShSAP1 融合蛋白作抗原, 抗血清稀释 125 000 倍后仍明显地呈阳性反应。效价判断标准为大于最大 $D_{405 \text{ nm}}$ 的一半的最小 $D_{405 \text{ nm}}$ 所对应的稀释度, 即为 1:25 000。

3 讨论

植物对逆境的适应主要依靠激活抗逆相关调控因子如 DREB、MYB/MYC、NAC、AREB 等转录因子^[7], 激活下游的抗逆效应基因, 这些基因可能是抗逆代谢途径中的关键酶如 SOD、POD^[8], 也可能是直接起作用的抗逆效应蛋白如热激蛋白等^[9]。有研究表明一些抗逆基因能够提高原核表达重组菌的抗胁迫能力^[10-12]。*ShSAP1* 的表达能被高盐诱导, 在进行 *ShSAP1* 融合蛋白抗血清制备的同时, 我们通过在培养基和培养平板中添加不同浓度的 NaCl 对 pET-ShSAP1 重组菌进行了抗盐性鉴定, 结果未发现该重组菌表现出抗盐特征, 说

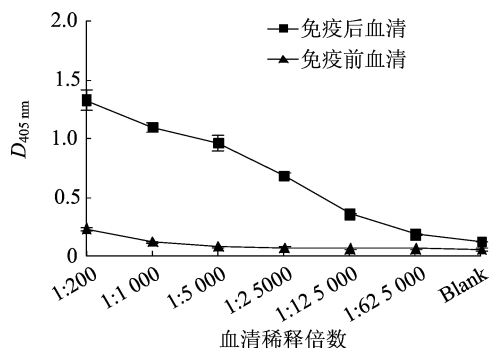


图4 ID-ELISA 测定 ShSAP1 兔抗血清效价结果

明 *ShSAP1* 在 BL21 原核系统中无增强宿主菌抗盐胁迫的能力, 可能是由 BL21 中没有与 ShSAP1 相互作用的抗逆应答因子所致。本研究对甘蔗 *ShSAP1* 进行了原核表达与蛋白纯化, 得到了与预期蛋白大小一致的融合蛋白, 并制备了 *ShSAP1* 的抗血清, 为今后转基因植株检测和蛋白质功能研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Giri J, Dansana P K, Kothari K S, et al. SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants[J]. Bioessays, 2013, 35(7): 639-648.
- [2] Giri J, Vij S, Dansana P K, et al. Rice a20/ANI zinc-finger containing stress-associated proteins (SAP1/11) and a receptor-like cytoplasmic kinase (OsRLCK253) interact via a20 zinc-finger and confer abiotic stress tolerance in transgenic arabidopsis plants[J]. New Phytologist, 2011, 191(3): 721-732.
- [3] Kang M, Fokar M, Abdelmageed H, et al. Arabidopsis SAP5 functions as a positive regulator of stress responses and exhibits E3 ubiquitin ligase activity[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(4/5): 451-466.
- [4] Ströher E, Wang X J, Roloff N, et al. Redox-dependent regulation of the stress-induced zinc-finger protein SAP12 in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular plant, 2009, 2(2): 357-367.
- [5] 李晓君, 蔡文伟, 张树珍, 等. 甘蔗锌指蛋白基因 *ShSAP1* 的克隆与表达模式[J]. 生物工程学报, 2011, 27(6): 868-875.
- [6] 吴育鹏, 王健华, 冯团诚, 等. 辣椒椒斑驳病毒 CP 基因的原核表达及其抗血清的制备[J]. 园艺学报, 2010, 37(10): 1598-1604.
- [7] Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in arabidopsis and grasses[J]. Plant Physiology, 2009, 149(1): 88-95.
- [8] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55: 373-399.
- [9] Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, et al. Role of plant heatshock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response[J]. Trends in Plant Science, 2004, 9: 244-252.
- [10] 臧洁, 余梅, 王先磊, 等. 盐角草 Cu/Zn-SOD 基因的克隆及耐盐性分析[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(7): 847-854.
- [11] 蔡丹, 郑易之, 兰英. 大豆 LEA 蛋白 *Em* 的表达可提高大肠杆菌和烟草耐盐性[J]. 深圳大学学报, 2006, 23(3): 230-236.
- [12] 郝梦雨, 郎明林, 杨学举. 印度芥菜 Bj10-2 基因原核表达载体构建及抗盐功能的鉴定[J]. 核农学报, 2011, 25(2): 247-252.