

乔慧聪,任向波,吴秀丽,等.烟草新驱动蛋白基因 *NtTKR* 原核表达载体的构建、诱导表达及蛋白纯化[J].江苏农业科学,2017,45(14):24-26.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.007

# 烟草新驱动蛋白基因 *NtTKR* 原核表达载体的构建、诱导表达及蛋白纯化

乔慧聪,任向波,吴秀丽,李 芬

(河南师范大学生命科学学院/资源微生物与功能分子河南省高校重点实验室培育基地,河南新乡 453007)

**摘要:**通过对烟草驱动蛋白家族新成员 *NtTkr* 尾部的酵母双杂交筛选,得到多个与 *NtTkr* 互作的候选蛋白。为进一步验证 *NtTkr* 与候选蛋白之间的相互作用,以 pGBKT7 - *NtTkr* 质粒为模板,PCR 扩增烟草 *NtTKR* 全长,将其克隆入原核表达载体 pMXB10,重组质粒 pMXB10 - *NtTkr* - 3582 经生物公司测序,结果正确。将其转化为 BL21 (DE3),IPTG 诱导其表达目的蛋白,经几丁质纯化及 SDS - PAGE 检测,结果表明笔者得到了高纯度的目的蛋白。该试验为进一步运用 Pull Down 确定 *NtTkr* 与候选蛋白之间的体外互作及深入研究该蛋白的其他生物学功能奠定了基础。

**关键词:**烟草;新驱动蛋白;*NtTkr*;诱导表达;纯化

**中图分类号:** S572.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0024-03

通过 cDNA 文库差异筛选方法,成功分离出了一个新基因 *NtTKR* (*Nicotiana tabacum* kinesin related protein),该基因是驱动蛋白超家族中的一员。*NtTkr* 与现已知的广泛表达的多数植物的驱动蛋白不同<sup>[1-3]</sup>,该基因仅在植物的叶和各发育时期的胚中优势表达。这一特异表达模式说明它可能在胚胎发生及叶组织分化过程中具有独特的功能<sup>[4-5]</sup>。众所周知,多数蛋白质需与其他蛋白质互作才能发挥其自身的作用。因此,为了解 *NtTkr* 这一新发现的蛋白的功能,通过对 *NtTkr* 尾部的酵母双杂交筛选,得到多个与 *NtTkr* 互作的候选蛋白。

为进一步运用 Pull - Down 试验验证 *NtTkr* 与筛选的各候选蛋白之间能否相互作用,以含 *NtTKR* 全长的 pGBKT7 - *NtTkr* 质粒为模板,PCR 扩增烟草 *NtTKR* 全长,并将其克隆入 IMPACT 原核表达载体系统新成员 pMXB10 载体,得到重组质粒 pMXB10 - *NtTkr* - 3582,将其转化为 BL21 (DE3),再经 IPTG 诱导表达、几丁质纯化及 SDS - PAGE 检测,结果显示了与预期相符的单一蛋白条带,说明得到了高纯度的纯化 *NtTkr* 蛋白。该试验为进一步运用 Pull - Down 确定 *NtTkr* 与候选蛋白之间的体外互作及深入研究该蛋白的其他生物学功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒 DH5 $\alpha$ 、BL21 (DE3) 菌株、原核表达载体 pMXB10 及含 *NtTKR* 全长的 pGBKT7 - *NtTkr* 质粒由笔者所在实验室保存。

收稿日期:2016-03-10

基金项目:教育部留学回国人员启动基金;河南省高校科技创新团队支持计划(编号:13IRTSTHN009)。

作者简介:乔慧聪(1992—),女,河南鹤壁人,硕士研究生,研究方向为分子细胞生物学。E-mail:2472331362@qq.com。

通信作者:李 芬,博士,教授,研究方向为分子细胞生物学。E-mail:187027909@qq.com。

1.1.2 工具酶及试剂 PCR 所用的 KOD - plus 高保真酶、10  $\times$  KOD - 缓冲液、dNTPs(浓度均为 2 mmol/L)、25 mmol/L MgSO<sub>4</sub>,均购自 ToYoBo 公司;在 TIANGEN 公司购买 PCR 产物纯化和 DNA 凝胶回收试剂盒;于 TaKaRa 公司购买 T4 DNA 连接酶、DNA 标准分子量 Marker 和限制性内切酶;几丁质亲和柱购自 NEB 公司;于 Fermentas 公司购买蛋白分子量标准;其余试剂购于生工生物工程(上海)股份有限公司或 Sigma 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 质粒制备与 SDS - PAGE 主要参照 Sambrook 的方法<sup>[6]</sup>。采用碱裂解法制备质粒,CaCl<sub>2</sub> 法进行转化。SDS - PAGE:各蛋白样品与等体积 2  $\times$  上样缓冲液(100 mmol/L Tris - HCl,200 mmol/L DTT,4% SDS,20% 甘油,0.12% 溴酚蓝,pH 值为 6.8)混合,煮沸 5 ~ 10 min 后,13 000 r/min 离心 5 min,取上清液进行 SDS - PAGE。

1.2.2 PCR 扩增及扩增产物的克隆和鉴定 由北京三博远志生物工程公司合成引物,引物序列:正向 KNs,5' - NNNNNNCATATGTCAGAGAACAGATTTC - 3',反向 Kca,5' - NNNNNNNNGCGGCCGCNTATGCGTTCTCGGTAAATGGC - 3',以含 *NtTKR* 全长的 pGBKT7 - *NtTkr* 质粒为模板进行 PCR 扩增,产物经电泳检测,结果正确后,用引物两端引入的 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切 PCR 产物,电泳回收 *NtTKR* 片段。

1.2.3 原核表达载体构建与鉴定 pMXB10 经 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切,凝胶回收片段,于 16  $^{\circ}$ C 下用 T4 DNA 连接酶连接该载体片段与 *NtTKR* 片段,16 h 后得到连接产物。将该产物转化 DH5 $\alpha$  超感细胞,经筛选得到成功转化重组质粒的 DH5 $\alpha$ ,扩大培养该细胞,然后提取质粒,酶切鉴定质粒,鉴定结果无误后,将该重组质粒 PMXB10 - *NtTkr* - 3582 送往北京三博远志生物工程公司进行测序。

1.2.4 目的蛋白的诱导表达及 SDS - PAGE 检测 将测序无误的 PMXB10 - *NtTkr* - 3582 质粒转化为 BL21 (DE3) 感受态细胞,转化液涂布在 LB + 50 mg/mL 氨苄青霉素(Amp)培

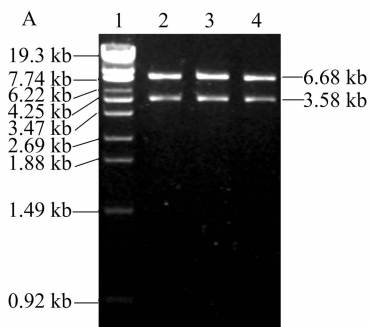
培养基上进行筛选,然后挑取单克隆至液体 LB + Amp 培养基中于 37 ℃、180 r/min 下过夜培养,次日按 1 : 100 稀释菌液,37 ℃ 下培养 4 h 左右至其  $D_{600\text{nm}}$  为 0.8 时,分别经 0、0.06、0.1、0.6 mmol/L IPTG 于 37 ℃ 诱导 4 h,取 2 mL 菌液,于 4 ℃、1 000 r/min 离心 1 min,弃上清收集菌体。然后,分别加入 100  $\mu\text{L}$  去离子水和还原型 2 $\times$ SDS 上样缓冲液悬浮菌体,三者混匀后煮沸 10 min,取 15  $\mu\text{L}$  样品进行 SDS-PAGE 鉴定<sup>[6]</sup>。

**1.2.5 目的蛋白的纯化** 目的蛋白的纯化参照李芬等的方法<sup>[7-8]</sup>,主要步骤如下:(1)细胞粗提物的制备;(2)几丁质柱的平衡;(3)上样;(4)洗柱;(5)内含肽的自我裂解活性的诱导;(6)目的蛋白的洗脱释放;(7)几丁质树脂的再生。于 -70 ℃ 保存纯化的目的蛋白。

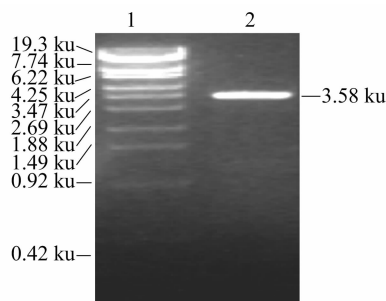
## 2 试验结果

### 2.1 烟草 *NiTkrr* 基因全长的克隆及酶切片段的回收

以 pGBKT7 - *NiTkrr* 质粒为 PCR 扩增模板进行 PCR 扩增,产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到与 *NiTKR* 基因全长大小相符的 3 582 bp 大小的扩增带(图 1)。*Nde* I 和 *Not* I 酶切引入引物两端的 PCR 产物,凝胶回收的 *NiTKR* 片段用于



1— $\lambda$ -Eco T14 Marker; 2—4—*Nde* I 和 *Not* I 双酶切后得到与预期大小相符的载体片段和 *NiTKR* 基因片段  
A. pMXB10-*NiTkrr*-3582 的酶切鉴定



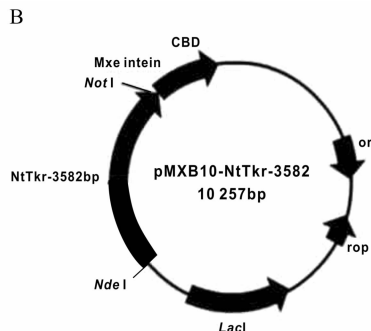
1— $\lambda$ -Eco T14 Marker; 2—3 582 bp 长的 *NiTKR* 片段

图1 烟草 *NiTKR* PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

连接反应。

### 2.2 原核表达载体 pMXB10 - *NiTkrr* - 3582 的构建与鉴定

凝胶回收 *Nde* I 和 *Not* I 双酶切后的 pMXB10 载体片段,该片段与“1.2.1”节同样双酶切的 *NiTKR* 片段在 T4 DNA 连接酶作用下进行连接,连接产物经转化并双酶切鉴定得到与预期相符的 6 675 bp 的载体片段和 3 582 pb 的 *NiTKR* 全长(图 2),且测序无突变,这表明笔者已成功获得正确的原核表达载体 pMXB10 - *NiTkrr* - 3582。



B. pMXB10-*NiTkrr*-3582 图谱, 显示 3 582 pb 的 *NiTKR* 全长插入 pMXB10 的酶切位点

图2 pMXB10-*NiTkrr*-3582 重组子的酶切鉴定

### 2.3 *NiTkrr* 的诱导表达

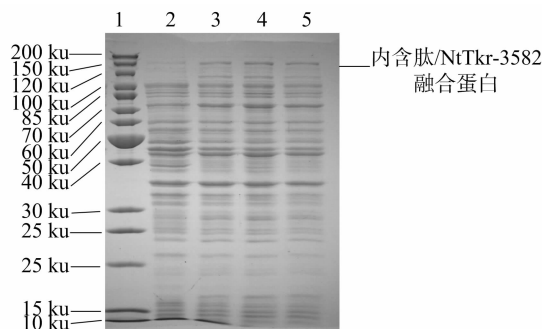
重组质粒 pMXB10 - *NiTkrr* - 3582 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态,转化子经 0、0.06、0.1、0.6 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h 后收集菌体,煮沸后经 12% SDS-PAGE 检测蛋白的表达。结果表明,上述 3 个浓度的 IPTG 都可诱导细胞表达分子量约 160 ku 的 *NiTkrr* 与内含肽的融合蛋白,其中 0.1 mmol/L IPTG 诱导物目的蛋白表达量最高(图 3)。

### 2.4 目的蛋白的纯化

由于目的蛋白 *NiTkrr* - 3582 与原核表达载体 pMXB10 上的内含肽形成融合蛋白,而 DTT 可通过诱导激活内含肽的肽键裂解活性使目标蛋白从几丁质介质上释放出来,而内含肽留在几丁质介质上,从而纯化目的蛋白。SDS-PAGE 分析结果显示,表达的 *NiTkrr* 全长经过几丁质柱纯化得到分子量约 132.5 ku 的目的蛋白单一条带(图 4),与预期蛋白大小相符。

## 3 讨论

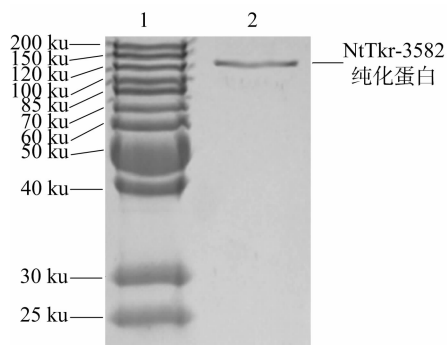
已知的植物驱动蛋白多在不同组织中广泛表达<sup>[1-3]</sup>,烟草新驱动蛋白 *NiTkrr* 却仅在叶和各发育时期的胚中优势表



1—蛋白分子量 Marker; 2—IPTG 诱导前 *NiTkrr* 的表达;  
3~5—0.06、0.1、0.6 mmol/L IPTG 诱导后 *NiTkrr* 蛋白的表达

图3 *NiTkrr* 的诱导表达

达<sup>[4-5]</sup>。这一组织特异性表达模式说明它可能在胚胎发生及叶组织分化过程中具有独特的功能。欲揭示一个未知蛋白的功能,筛选与之互作的蛋白质极其重要,因为生物体内几乎所有的生命活动即 DNA 的复制、基因的转录、蛋白的合成或信号的转导等,都离不开蛋白质与蛋白质之间的相互作用。通过对烟草幼叶 cDNA 文库的酵母双杂交筛选,得到多个与



1—蛋白分子量 Marker; 2—纯化的 NtTkr 蛋白  
图4 NtTkr 的纯化

NtTkr 互作的候选蛋白。由于酵母双杂交的局限性, 假阳性的存在不可避免<sup>[9-11]</sup>, 候选蛋白是否真的能够与目的蛋白发生作用必须通过 Pull-Down 及 CoIP 或免疫共定位进一步验证<sup>[12-14]</sup>。所以, 本试验以 pGBKT7-NtTkr 质粒为模板, PCR 扩增烟草 *NtTKR* 全长, 并将其克隆入原核表达载体 pMXB10, 转入 BL21(DE3), 诱导其成功表达, 为 Pull-Down 验证该蛋白与候选蛋白互作奠定基础。

pMXB10 是经过优化的 IMPACT 原核表达载体系统的新成员, 携带有大肠杆菌 *malE* 基因, 含有 1 个小的蛋白剪切元件, 即来自酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) *VMA1* 基因的内含肽 (*Sce VMA* 内含肽, 50 ku)<sup>[15-16]</sup>。内含肽标签中含有几丁质结合域, 可以与几丁质珠结合, 从而使融合有内含肽与几丁质标签的目的蛋白得到纯化。目前, 已有蛋白质工程的许多重要领域应用了这种新型的蛋白融合表达及纯化系统<sup>[7,17]</sup>, 有诸多优点, 可非常方便地纯化目的蛋白并获得较高纯度用于抗体制备的目的抗原<sup>[7-8]</sup>, 因此本试验按照经济实用的原则, 选用该系统的 PMXB10 用于 NtTkr 的表达和纯化, 以期获得足够的 NtTkr 蛋白用于体外确定其与候选蛋白是否存在真正的相互作用。

成功构建重组原核表达载体 PMXB10-NtTkr-3582 后, 将其转化并诱导其表达。因为目的蛋白的可溶性、稳定性和表达量因蛋白而异, 所以诱导表达条件须依实际情况进行调整。影响蛋白表达量的因素有培养时间、温度及合适的 IPTG 工作浓度。为使蛋白达到较大的表达量, 须找到合适的 IPTG 工作浓度。因此, 在相同温度和诱导时间条件下, 设置 4 个 IPTG 浓度, 蛋白电泳检测结果表明, IPTG 为 0.1 mmol/L 时的表达量比 0.06 mmol/L 时要大, 但却和 0.6 mmol/L 差别不大, 表明 IPTG 工作浓度应为 0.1 mmol/L。因为当 IPTG 工作浓度达到 0.1 mmol/L 时, 目的蛋白的表达量不会随着 IPTG 浓度的升高而升高, 而浓度低于 0.1 mmol/L, 表达量却会受到影响。

在 37℃ 下, 以最适浓度的 IPTG 大量诱导细胞, 4 h 后收集细胞, 用 DTT 释放目的蛋白, 经 SDS-PAGE 检测, 得到了与预期大小相符的 NtTkr 单一条带, 该高纯度的目的蛋白利于以后的 Pull-Down 试验的进行。

本试验成功构建了烟草新驱动蛋白 *NtTKR* 基因全长和 *PMXB10* 载体大片段连接的融合表达载体并成功地诱导其高效表达, 目的蛋白的成功表达和纯化为进一步研究 NtTkr 与候选蛋白之间的体外互作及深入研究该蛋白的其他生物学功能奠定了坚实的试验基础。

## 参考文献:

- [1] Sablin E P, Kull F J, Cooke R, et al. Crystal structure of the motor domain of the kinesin-related motor ncd[J]. *Nature*, 1996, 380(6574): 555-559.
- [2] Asbury C L, Fehr A N, Block S M. Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism[J]. *Science*, 2003, 302(5653): 2130-2134.
- [3] Yildiz A, Tomishige M, Vale R D, et al. Kinesin walks hand-over-hand[J]. *Science*, 2004, 303(5658): 676-678.
- [4] 李 芬, 吴秀丽, 郭君丽. 新基因 *NtTKR* 及其同源物 *LeTKR* 的生物信息学分析[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(5): 110-115, 124.
- [5] 李 芬, 任向波, 腾 飞, 等. 烟草新驱动蛋白 NtTKR 过表达对酵母生长的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(6): 97-102.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T E. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 880-885.
- [7] 李 芬, 田树娟, 张 帅, 等. 酵母组蛋白乙酰转移酶 E1p3 多克隆抗体的制备、鉴定及应用[J]. *生物工程学报*, 2009, 25(8): 1261-1266.
- [8] 李 芬, 田树娟, 许 森, 等. 抗人 E1p3 的 N 末端抗体制备及在染色质免疫沉淀中的应用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(10): 919-925.
- [9] Fields S, Song S O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions[J]. *Nature*, 1989, 340(6230): 245-246.
- [10] Bendixen C, Gangloff S, Rothstein R. A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions[J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(9): 1778-1779.
- [11] Hubsman M, Yudkovsky G, Aronheim A. A novel approach for the identification of protein-protein interaction with integral membrane proteins[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(4): E18.
- [12] Khazak V, Golenis E A, Weber L. Development of a yeast two-hybrid screen for selection of human Ras-Raf protein interaction inhibitors[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2005(310): 253-271.
- [13] Singh R, Lee M O, Lee J E, et al. Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system[J]. *Plant Physiology*, 2012, 160(1): 477-487.
- [14] Zheng Y, Tan X Y, Pyczek J, et al. Generation and characterization of yeast two-hybrid cDNA libraries derived from two distinct mouse pluripotent cell types[J]. *Molecular Biotechnology*, 2013, 54(2): 228-237.
- [15] Watanabe T, Ito Y, Yamada T, et al. The roles of the C-terminal domain and type III domains of chitinase A1 from *Bacillus circulans* WL-12 in chitin degradation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(15): 4465-4472.
- [16] Chong S, Mersha F B, Comb D G, et al. Single-column purification of free recombinant proteins using a self-cleavable affinity tag derived from a protein splicing element[J]. *Gene*, 1997, 192(2): 271-281.
- [17] Zhao B, Lu W, Yang L, et al. Cloning and characterization of the genes for biosynthesis of the compatible solute ectoine in the moderately halophilic bacterium *Halobacillus dabanensis* D-8(T)[J]. *Current Microbiology*, 2006, 53(3): 183-188.