

李钰华,李 爽,盖 颖. 毛白杨木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶 *PtoXTH35* 原核可溶性表达方法研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(8):33-36.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.08.007

# 毛白杨木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶 *PtoXTH35* 原核可溶性表达方法研究

李钰华,李 爽,盖 颖

(北京林业大学生物科学与技术学院/林木育种国家工程实验室,北京 100083)

**摘要:**从毛白杨中克隆得到木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶 *PtoXTH35* 基因,根据 SignalIP 在线软件预测蛋白信号肽,并分别构建至 pET28a、pET32a、pGEX-4t-1、pMAL-c5e、pET 43.1a 等 5 种原核表达载体,经双酶切和测序验证后转化至 BL21(DE3)感受态,使用终浓度为 0.4 mmol/L 的异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导其表达目的蛋白。经 SDS-PAGE 检测,结果表明 5 种载体均可表达目的蛋白,pET28a、pET32a、pGEX-4t-1 等 3 种载体所表达蛋白均以包涵体的形式存在,而 pMAL-c5e 和 pET 43.1a 载体携带蛋白表达量高并且所表达蛋白 50% 为可溶性蛋白,实现了毛白杨 *PtoXTH35* 在原核表达系统中的高效可溶性表达,该试验为后续进一步研究毛白杨 *PtoXTH35* 的体外功能奠定了基础。

**关键词:**毛白杨;木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶;原核表达;包涵体;可溶性蛋白

**中图分类号:** S792.117.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)08-0033-04

在植物的生长发育以及抵御生物和非生物胁迫过程中,细胞壁发挥着不可忽视的作用。在双子叶植物的初生细胞壁中,木葡聚糖以非共价键的形式与纤维素相连,从而形成了初生细胞壁当中主要的张力承载结构,木葡聚糖水解酶(xyloglucan endohydrolase, XEH)可以快速催化木葡聚糖的水解从而实现细胞壁的膨胀<sup>[1]</sup>。Albersheim 等做出假设认为在植物细胞生长过程中还存在一种糖苷内部转移酶,将多糖链

的一部分转移至自身的其他位置<sup>[2]</sup>。随后 Fry 等率先发现了一种蛋白可以在快速生长的植物细胞当中催化木葡聚糖链的断裂以及重连,并命名为木葡聚糖内转糖苷酶(xyloglucan endotransglycosylase, XET)<sup>[3]</sup>,XET 和 XEH 共同组成了木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶(xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase, XTH)家族,被认为是一种细胞壁松弛酶,在植物生长过程中以及抵御外界胁迫过程中参与了细胞壁重构。XTH 是一类庞大的多基因家族,属于碳水化合物活性酶家族数据库(CAZy)中的糖苷水解家族 GH16。在毛果杨、拟南芥中已经发现了该基因家族中分别含有 41、33 个成员<sup>[4]</sup>,根据 XTH 蛋白编码的氨基酸序列以及蛋白质的结构可以将它们分为 I、II、III 等 3 类,其中 I 和 II 类具有糖基转移酶活性,III 类具有糖苷水解酶活性<sup>[5]</sup>。

目前对于 XTH 的研究主要集中在对该基因家族成员的

收稿日期:2018-01-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31300498)。

作者简介:李钰华(1992—),女,山西临汾人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:liyuhua921216@163.com。

通信作者:盖 颖,博士,副教授,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:gaiying@bjfu.edu.cn。

freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*: separation of the associated virions and characterization of MrNV as a new type of nodavirus[J]. Journal of Fish Diseases, 2005, 28(1): 23-31.

[67] Bonami J R, Widada J S. Viral diseases of the giant fresh water prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a review [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2010, 106(1): 131-142.

[68] 姜 兰, 邓国成, 石存斌, 等. 罗氏沼虾肌肉白浊病原研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 477-482.

[69] Arockiaraj J, Vanaraja P, Easwaran S, et al. Gene profiling and characterization of arginine kinase-1 (MrAK-1) from freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2011, 10(1): 31-33.

[70] Yoganandhan K, Leartvibhas M, Sriwongpuk S A. White tail disease of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* in Thailand [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2006, 69(2/3): 255-258.

[71] 钱 冬, 杨国梁, 刘 问, 等. 罗氏沼虾肌肉白浊病原的初

步研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(5): 472-476.

[72] 钱 冬, 刘 问, 潘晓艺, 等. 罗氏沼虾诺达病毒 TAS-ELISA 检测法的建立及应用研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2006, 32(4): 377-382.

[73] Rao R, Bhassu S, Bing R Z, et al. A transcriptome study on *Macrobrachium rosenbergii* hepatopancreas experimentally challenged with white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 136(5): 10-22.

[74] 安振华, 孙龙生, 陈佳毅. 罗氏沼虾“铁壳”现象出现原因探究[J]. 科学养鱼, 2014(1): 56-58.

[75] 王 磊. 罗氏沼虾养殖常见疾病防治技术[J]. 水产养殖, 2011, 32(2): 48-50.

[76] 张水波. 罗氏沼虾常见疾病及防治[J]. 渔业致富指南, 2002(18): 39-40.

[77] 张晓双, 傅玲琳, 吕振明, 等. 国内外循环式工厂化水产养殖模式研究进展[J]. 饲料工业, 2017, 38(6): 61-64.

功能鉴定及其在植物生长发育和抵御外界胁迫过程中发挥作用的机制,而要对基因家族中的成员进行体外功能验证则必须要实现蛋白的体外可溶性表达。目前文献中多采用酵母表达方法获得 XTH 可溶性蛋白,只有极少数文献报道通过原核表达以及包涵体变复性的方法获得可溶性蛋白,这可能是受限于 XTH 在原核系统中多以包涵体的形式表达<sup>[6-10]</sup>。因此,本研究拟通过更换携带有不同可溶性标签的载体以实现毛白杨 *PtoXTH35* (*Populus tomentosa* xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 35) 蛋白在原核中的高效可溶性表达,以期后续功能验证等相关试验奠定基础。

1 材料与方法

试验于 2016 年 10 月至 2017 年 3 月在北京市海淀区北京林业大学进行。

1.1 质粒和菌株

pET28a、pET32a、pGEX-4t-1、pMAL-c5e、pET 43.1a 质粒载体以及大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21(DE3)、JM109 菌株均由笔者所在实验室保留。

1.2 试剂

胰蛋白胨、酵母粉均购自 Oxoid 公司;Taq 酶、T<sub>4</sub> 连接酶、限制性内切酶、2 ku DNA Maker、10 ku DNA Maker,均购自宝生物工程(大连)有限公司;蛋白质分子量标准,购自中国科学院上海生物化学研究所;其他化学试剂均购自北京蓝弋化工产品有限责任公司。

1.3 主要仪器

POWER PAC 300 电泳仪(美国 BIO-RED 公司),Universal Hood II 型凝胶成像仪(美国 BIO-RED 公司),ABI Veriti FAST 梯度 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司),DNA Engine 连接仪(美国 BIO-RED 公司),SHK-02-I 台式空气恒温摇床(北京北方同正生物科技发展有限公司),JY92-II 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所)。

1.4 试验方法

1.4.1 毛白杨 *PtoXTH35* 基因克隆与序列分析 通过在 NCBI 上查找得到毛果杨 *PtrXTH35* 基因序列信息,利用 DNAMAN 设计正向引物 5'-ATGGCTGTTTCAGTCTTAAG-3'和反向引物 5'-CTAGTGCTGGCGGTGGCT-3'。以毛白杨的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应程序为 95℃ 5 min,95℃ 45 s,55℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 10 min。对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并利用 DNA 纯化回收试剂盒进行胶回收并送至北京睿博兴科生物技术有限公司测序,将测序所得序列与毛果杨 *PtrXTH35* 序列进行比对。

1.4.2 原核表达载体的构建 利用 DNAMAN 将测序得到的 *PtoXTH35* 的 DNA 序列翻译为氨基酸序列并上传至 SignalP 和 TMHMM 2.0 在线软件分析信号肽序列和跨膜区,以去除信号肽的序列为模板设计引物,利用 PCR 方法为目的基因两端加上酶切位点,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,切胶回收后用相应的限制性内切酶进行酶切并回收目的片段,同时用相应的限制性内切酶对质粒载体 pET28a、pET32a、pGEX-4t-1、pMAL-c5e、pET 43.1a 进行酶切回收,之后将酶切的载体和目的片段利用 T4 连接酶连接,将连接液经 CaCl<sub>2</sub> 法转化至 JM109 感受态,待长出单克隆后摇菌提取质

粒进行酶切鉴定。载体构建引物及酶切位点如表 1 所示。

表 1 载体构建过程中所设计引物

载体名称	引物名称	引物序列
pET28a	F1	5'-GGATCCGCTAAGTTTGACGAGCTC-3'
	R1	5'-CTCGAGGTGCTGCGGCTGGCT-3'
pET32a	F2	5'-GGATCCGCTAAGTTTGACGAGCTC-3'
	R2	5'-CTCGAGCTAGTGTGCGGCTGGCT-3'
pGEX-4t-1	F3	5'-GGATCCGCTAAGTTTGACGAGCTC-3'
	R3	5'-CTCGAGCTAGTGTGCGGCTGGCT-3'
pMAL-c5e	F4	5'-GGTACCGGCTAAGTTTGACGAGCTC-3'
	R4	5'-GGATCCCTAGTGTGCGGCTGGCT-3'
pET 43.1a	F5	5'-GGATCCGCTAAGTTTGACGAGCTC-3'
	R5	5'-CTCGAGCTAGTGTGCGGCTGGCT-3'

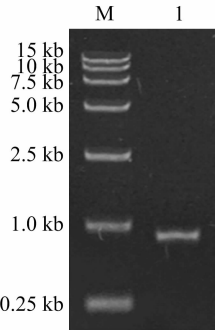
注:引物序列中下划线部分为酶切位点,GGATCC 为 *Bam*H I,CTCGAG 为 *Xho* I,GGTACC 为 *Kpn* I。

1.4.3 *PtoXTH35* 蛋白原核表达 将构建好的载体 pET28a-*PtoXTH35*、pET32a-*PtoXTH35*、pGEX-4t1-*PtoXTH35*、pMAL-c5e-*PtoXTH35*、pET 43.1a-*PtoXTH35* 转化至 *E. coli* BL21(DE3) 感受态并用抗生素筛选阳性菌株,挑取阳性单克隆接种于 5 mL 含相应抗生素的 LB 液体培养基中,37℃、200 r/min 振荡培养 12 h,之后将 5 mL 菌液接种于 100 mL 含相应抗生素的 LB 培养基中,37℃、200 r/min 振荡培养至  $D_{600\text{nm}}=0.4$  左右,加入异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 0.4 mmol/L。28℃ 诱导表达 4 h,6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,加入 4 倍体积 50 mmol/L Tris-HCl (pH 值为 8.0) 缓冲液重悬,经超声破碎后 12 000 r/min 离心,取上清和沉淀加入等体积蛋白上样缓冲液,沸水中煮 5 min 后离心取上清,采用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定蛋白表达。

2 结果与分析

2.1 毛白杨 *PtoXTH35* 基因克隆与序列分析

经 PCR 扩增得到如图 1 所示的 DNA 片段,测序获得毛白杨 *PtoXTH35* 核酸序列,与毛果杨 *PtrXTH35* 序列比对相似度高达 98.32% (图 2),证实该序列为毛白杨 *PtoXTH35* 基因片段,该序列全长 888 bp,由 269 个氨基酸组成,所翻译的蛋白质分子量为 33.69 ku,经 SignalP 和 TMHMM 2.0 在线软件分析该蛋白 N 端存在跨膜区可能为信号肽序列,且推测信号肽裂解位点位于第 25 和第 26 个氨基酸之间(图 3、图 4)。



M—DNA Maker; 1—毛白杨 *PtoXTH35* 基因 PCR 产物

图1 毛白杨 *PtoXTH35* 基因片段扩增结果

2.2 原核表达载体的构建

将5个载体的阳性质粒经双酶切进行验证,分别选用表

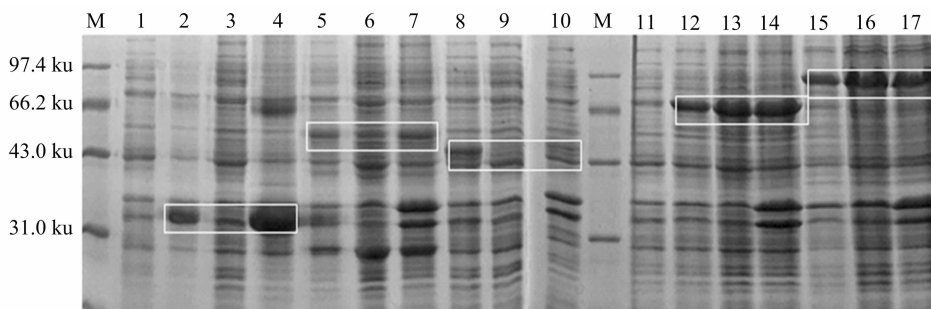


码和突变,可以用于下一步的诱导表达。

### 2.3 *PtoXTH35* 蛋白的原核诱导表达

将 5 种重组质粒分别转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态,经 0.4 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h 后收集菌体,取全菌以及经超声破碎后的沉淀和上清液煮沸后经 12% SDA-PAGE 检测蛋白表达,由于 5 种原核表达载体均携带了分子量不同的可溶性蛋白标签,因此所表达的融合蛋白分子量并不相同,根据计算获得融合蛋白分子量的理论值,pET28a 携带了 1 个 6×His 标签,融合蛋白分子量约为 32 ku;pET32a 携带了 1 个 19 ku 的硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx),融合蛋白分子量约为 51 ku;pGEX-4t-1 携带了 1 个 27 ku 的谷胱甘肽巯基转移酶 (glutathione S transferase, GST),融合蛋白分子量约为 59 ku;pMAL-c5e 携带了 1 个 40 ku 的麦芽糖结合蛋白

(maltose-binding protein, MBP),融合蛋白分子量约为 72 ku;pET 43.1a 携带了 1 个 60 ku 的转录终止抗终止因子 (N-utilization substance, Nus),融合蛋白分子量约为 92 ku。结果表明,经 IPTG 诱导,携带 5 种重组载体的大肠杆菌均成功表达了融合蛋白,并且分子量与理论分子量相符合 (图 6)。但五种原核表达载体所表达蛋白的表达量以及可溶性表达情况并不相同,其中 pET28a 蛋白表达量最高,但蛋白几乎全部以包涵体形式存在;pGEX-4t-1 和 pET32a 蛋白表达量较低,并且所表达蛋白同样以包涵体形式存在;而 pMAL-c5e 和 pET 43.1a 蛋白表达量较高,而可溶性蛋白含量与包涵体蛋白大致相同,因此可溶性蛋白达到了总表达蛋白的 50% 左右,实现了 *PtoXTH* 蛋白在原核表达系统中的高效可溶性表达。



M—蛋白 Maker; 1 和 11 均为未诱导对照; 2~4 分别为 pET28a-*PtoXTH35* 诱导的全菌、上清、沉淀; 5~7 分别为 pGEX-4t1-*PtoXTH35* 诱导的全菌、上清、沉淀; 8~10 分别为 pET32a-*PtoXTH35* 诱导全菌、上清、沉淀; 12~14 分别为 pMAL-c5e-*PtoXTH35* 诱导的全菌、上清、沉淀; 15~17 分别为 pET 43.1a-*PtoXTH35* 诱导的全菌、上清、沉淀

图6 重组质粒诱导表达及上清沉淀分析

### 3 结论

*XTH* 基因广泛存在于植物中,在植物细胞壁修饰中发挥重要作用,其庞大的基因家族中存在众多还未明确得到功能验证的成员,因此迫切需要对该家族中成员进行体外和体内功能验证,包括活性测定以及体外蛋白互作研究则须要获得可溶性的目的蛋白。现有报道 *XTH* 的原核表达往往会形成包涵体,大部分文献中采用酵母表达的方法获得 *XTH* 蛋白,但酵母表达方法耗时较长,并且纯化步骤较为繁琐,对表达条件也更为敏感,本研究更换了 5 种携带有不同可溶性标签的原核表达载体,通过尝试发现携带有 MBP 蛋白的 pMAL-c5e 和携带有 Nus 因子的 pET 43.1a 均可实现 *PtoXTH35* 蛋白在原核表达系统中的高效可溶性表达,与大部分文献中<sup>[6-9]</sup> 通过酵母表达获得 *XTH* 蛋白的方法相比,缩短了试验周期,并且表达条件稳定,纯化步骤相较酵母表达也更为简单,这为后续深入研究毛白杨 *PtoXTH35* 的生物学功能奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Rose J K, Braam J, Fry S C, et al. The XTH family of enzymes involved in xyloglucan endotransglucosylation and endohydrolysis: current perspectives and a new unifying nomenclature[J]. Plant & Cell Physiology, 2002, 43 (12): 1421-1435.
- [2] Albersheim, P. Xyloglucans in the primary cell wall[M]. New York: Academic Press, 1976: 225-274.
- [3] Smith R C, Fry S C. Endotransglycosylation of xyloglucans in plant

- cell suspension cultures[J]. Biochemical Journal, 1991, 279 (Pt 2): 529-535.
- [4] Geisler - Lee J, Geisler M, Coutinho P M, et al. Poplar carbohydrate-active enzymes: Gene identification and expression analyses[J]. Plant Physiology, 2006, 140 (3): 946-962.
- [5] 杜丽萍, 沈 昕, 陈少良, 等. 细胞壁重构关键酶木葡聚糖内转糖苷酶/水解酶 (XTH) 的研究进展[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18 (3): 604-609.
- [6] Baumann M J, Eklof J M, Michel G, et al. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism[J]. Plant Cell, 2007, 19 (6): 1947-1963.
- [7] Johansson P, Brumer H, Baumann M J, et al. Crystal structures of a poplar xyloglucan endotransglycosylase reveal details of transglycosylation acceptor binding[J]. Plant Cell, 2004, 16 (4): 874-886.
- [8] Kallas A M, Piens K, Denman S E, et al. Enzymatic properties of native and deglycosylated hybrid aspen (*Populus tremula* × *tremuloides*) xyloglucan endotransglycosylase 16A expressed in *Pichia pastoris*[J]. Biochemical Journal, 2005, 390 (Pt1): 105-113.
- [9] Saura - Valls M, Faure R, Ragas S, et al. Kinetic analysis using low-molecular mass xyloglucan oligosaccharides defines the catalytic mechanism of a *Populus* xyloglucan endotransglycosylase [J]. Biochemical Journal, 2006, 395 (1): 99-106.
- [10] Han Y S, Wang W, Sun J, et al. *Populus euphratica* XTH overexpression enhances salinity tolerance by the development of leaf succulence in transgenic tobacco plants[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64 (14): 4225-4238.