

邱爽,何佳琦,李铭杨,等. 大豆 *GmGolS* 基因的原核表达及抗旱性分析[J]. 江苏农业科学,2020,48(14):61–65.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2020.14.010

大豆 *GmGolS* 基因的原核表达及抗旱性分析

邱爽,何佳琦,李铭杨,翟莹

(齐齐哈尔大学生命科学与农林学院,黑龙江齐齐哈尔 161006)

摘要:肌醇半乳糖苷合成酶(galactinol synthase,简称 GolS)是棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides,简称 RFOs)生物合成途径中的关键酶,在植物应对非生物胁迫的过程中发挥着重要作用。通过逆转录(RT)-PCR 从大豆叶片 cDNA 中扩增得到编码肌醇半乳糖苷合成酶的基因 *GmGolS*,再将 *GmGolS* 基因构建到原核表达载体 pET28 上,然后将载体导入大肠杆菌 Rosetta(DE3)中,对其进行异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside,简称 IPTG)诱导。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis,简称 SDS-PAGE)结果表明,在诱导时间为 3 h、IPTG 浓度为 0.1 mmol/L 的条件下,可以获得大量重组蛋白,分子量约为 40 ku。对表达 *GmGolS* 蛋白的大肠杆菌进行抗旱性分析的结果显示,*GmGolS* 基因在大肠杆菌中的过表达降低了重组菌的生活力,使其对于旱胁迫更加敏感。

关键词:大豆;肌醇半乳糖苷合成酶;原核表达;抗旱性

中图分类号:S565.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2020)14–0061–04

植物在遭受不良环境条件胁迫后,可以诱导自身合成大量渗透调节物质来增加植物细胞的渗透压,提高其抵抗胁迫的能力,从而维持其自身的代谢和生长发育。棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides,简称 RFOs)就是这些渗透调节物质的典型代表,它们是高等植物中含量仅次于蔗糖的一类可溶性糖。肌醇半乳糖苷合成酶(galactinol synthase,简称 GolS)是 RFOs 生物合成途径中的关键酶^[1]。目前已有大量关于 *GolS* 基因受逆境胁迫诱导表达的报道,且超量或异源表达该基因可以不同程度地提高转基因植物的抗逆性。拟南芥中含有 7 种 *GolS* 基因,其中 *AtGolS1*、*AtGolS2* 基因可以被干旱、高盐胁迫诱导上调表达,*AtGolS3* 基因可以被低温胁迫诱导上调表达^[2]。在 *AtGolS1*、*AtGolS2* 基因过表达转基因植株中,肌醇半乳糖苷、棉子糖含

量均增加,使得植物对氧化胁迫的耐受能力增强^[3]。小麦 *TaGolS3* 基因的表达受到外源脱落酸(abscisic acid,简称 ABA)、低温、盐胁迫诱导,同时还能被 ZnCl_2 、 CuCl_2 诱导,通过对活性氧的调控,转基因植株能够表现出对锌胁迫的耐受性^[4]。*GolS* 基因的抑制表达则使植物对胁迫更加敏感。例如 *AtGolS1* 基因的 T-DNA 插入突变体植株与野生型植株相比,抗热性明显降低^[5]。*GolS* 基因表达的调控机制较为复杂,目前已经发现多种植物转录因子可以调控其表达,如 HSF、DREB 和 WRKY 等^[6–8]。

大豆(*Glycine max* L.)是世界范围内广泛种植的经济作物之一,不仅是人类获取蛋白质和脂类的主要来源,同时也是重要的牲畜饲料。大豆中 *GolS* 基因的功能鉴定对于大豆棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides,简称 RFOs)代谢途径及大豆抗逆机制的研究都具有重要意义。但到目前为止,有关大豆中肌醇半乳糖苷合成酶的研究非常少。本研究将大豆中 1 个编码肌醇半乳糖苷合成酶的基因 *GmGolS* 转化大肠杆菌并进行诱导表达条件的优化与抗旱性分析,以期为该基因的功能研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本试验于 2018 年 10 月在黑龙江省齐齐哈尔市齐齐哈尔大学植物分子育种研究室进行。大豆品

收稿日期:2019–11–06

基金项目:黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(编号:UNPYSCT–2017153);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(植物性食品加工技术特色学科专项)(编号:YSTSXK201878);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(编号:135209264)。

作者简介:邱爽(1995–),男,山东济宁人,硕士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:qs187143@163.com。

通信作者:翟莹,博士,副教授,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:fairy39809079@126.com。

种北豆 9 号、原核表达载体 pET28 及大肠杆菌 DH5 α 菌株、Rosetta (DE3) 菌株均由齐齐哈尔大学植物分子育种研究室提供。克隆载体 pMD18-T、各种限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA marker DL 2000、Ex Taq、RNAiso Plus 购自 TaKaRa 公司;低分子量蛋白 marker、cDNA 反转录试剂盒购自 Novoprotein 公司;质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆叶片总 RNA 的提取及 cDNA 反转录 使用 RNAiso Plus 提取 0.1 g 大豆叶片总 RNA,具体操作参照说明书。用琼脂糖凝胶电泳和 $D_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 检测提取的 RNA 质量。使用 cDNA 反转录试剂盒合成第一链 cDNA。

1.2.2 目的基因的扩增 在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,简称 NCBI)数据库中搜索编码大豆 *GolS* 基因的序列。利用 Primer 5 软件,根据 *GmGolS* 基因的编码序列设计引物。上游引物序列为 5'-GGAATTCATGGCTCCTAATATCACCCTG-3',下游引物序列为 5'-TGCGGCTCGACTTAAGCAGCAGATGGGGC-3',上游、下游引物序列中的下划线部分分别代表 *EcoR* I、*Sal* I 酶切位点。以合成的第一链 cDNA 作为模板,PCR 扩增 *GmGolS* 基因(退火温度为 56 $^{\circ}\text{C}$)。将扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的基因片段并连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经质粒双酶切鉴定,挑取阳性克隆送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.3 原核表达载体的构建 将测序正确的含有目的基因的克隆载体扩繁并提取质粒,用 *EcoR* I、*Sal* I 进行双酶切,同时将载体 pET28 用 *EcoR* I、*Sal* I 进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段,通过 DNA 连接酶将酶切片段定向连接到 pET28 载体上,再用该载体转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞,经菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定后,挑取阳性克隆,保存菌种备用。

1.2.4 重组蛋白的诱导表达 挑取 pET28 - *GmGolS* 阳性克隆和 pET28 空载体克隆至添加 50 mg/L 卡那霉素和 15 mg/L 氯霉素的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养过夜。按 1 : 100 的体积比转接至 20 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续振荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.4 左右时,加入终浓度为 0.1 mmol/L 的异丙基 - β - *D* - 硫代半乳糖苷(isopropyl - beta -

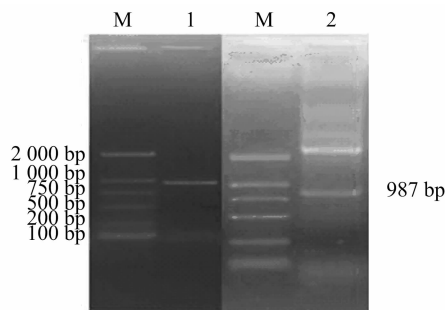
D - thiogalacto pyranoside,简称 IPTG),分别诱导培养 1、2、3、4、5、6 h 后,取样并进行十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis,简称 SDS - PAGE),确定最佳诱导时间。使用同样的方法,分别加入终浓度为 0.1、0.2、0.3 mmol/L 的 IPTG 进行诱导培养,以确定最佳 IPTG 诱导浓度。

1.2.5 表达 *GmGolS* 蛋白的大肠杆菌干旱胁迫分析 将 pET28 - *GmGolS* 重组大肠杆菌及含有 pET28 空载体的大肠杆菌按照优化后的最优条件(诱导时间为 3 h、IPTG 诱导浓度为 0.1 mmol/L)进行诱导表达。将诱导后的菌液均稀释至同一浓度($D_{600\text{ nm}}=0.8$),各取 10 μL ,稀释 10 000 倍,取 100 μL 分别涂布到不含 PEG - 8000 和含 1% PEG - 8000 的固体 LB 培养基上(含有 50 mg/L 卡那霉素、15 mg/L 氯霉素),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 ~ 16 h,观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 *GmGolS* 基因的克隆

在 NCBI 数据库中检索获得编码大豆 *GolS* 基因的序列 *GmGolS*,其 GenBank 登录号为 NM001251098。以大豆叶片 cDNA 为模板,扩增得到 987 bp 的 *GmGolS* 基因全序列(图 1),经测序与原序列一致。预测结果显示,*GmGolS* 基因编码含有 328 个氨基酸的蛋白质,分子量大小为 38.03 ku。



M—DL2000; 1—*GmGolS* 基因的 PCR 扩增条带;
2—*EcoR* I、*Sal* I 双酶切质粒 pMD18-T-*GmGolS*

图1 *GmGolS* 基因的 PCR 扩增结果

2.2 *GmGolS* 基因原核表达载体的构建

通过酶切位点将 *GmGolS* 基因构建到原核表达载体 pET28 上,质粒双酶切和菌液 PCR 结果见图 2,可见 *GmGolS* 基因已成功连接至 pET28 载体上并获得了含有重组质粒的 Rosetta (DE3) 菌株。

2.3 重组蛋白的诱导表达

为了大量获得 *GmGolS* 重组蛋白,对 IPTG 诱导

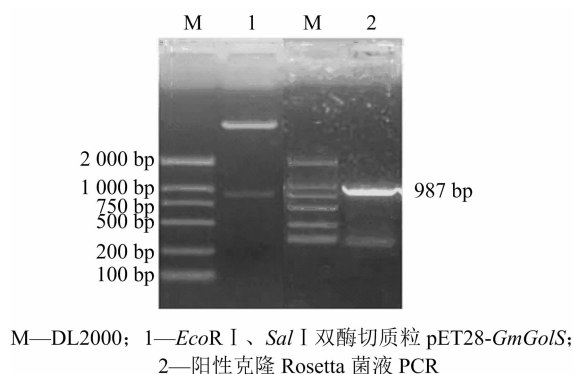
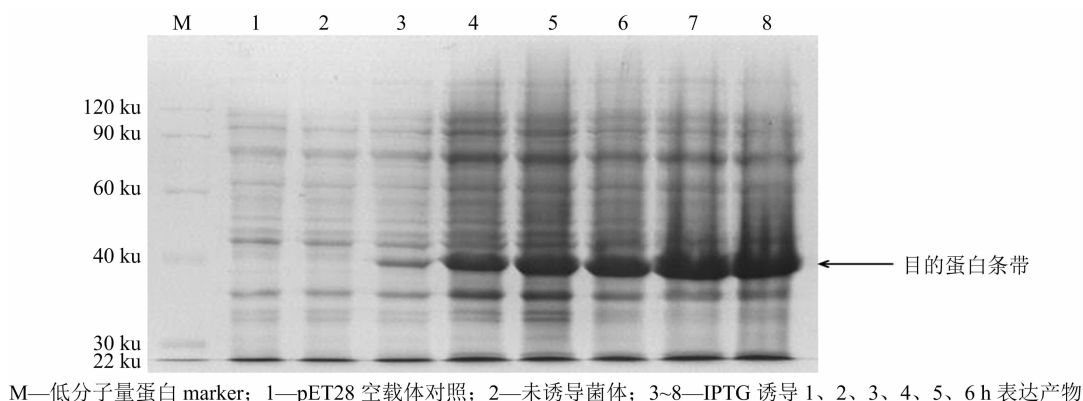
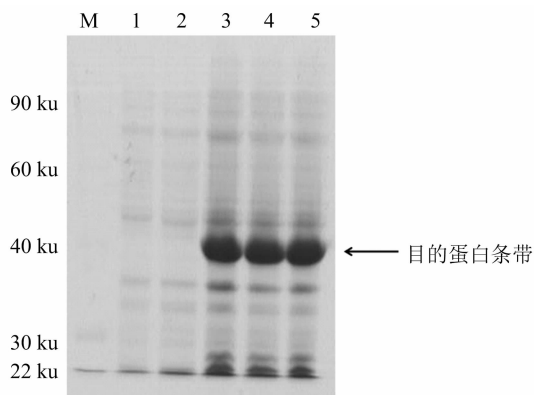
图2 pET28-*GmGolS* 原核表达载体的构建图3 *GmGolS* 基因原核表达诱导时间的优化(IPTG 法)

图4是在不同IPTG诱导浓度下重组蛋白表达的SDS-PAGE结果。可以看出,当IPTG浓度为0.1 mmol/L时,重组蛋白的表达量已达到最大值,并且不同浓度间的差别不大。由此可知,不同IPTG浓度在诱导蛋白表达时差异不明显,IPTG诱导浓度选择0.1 mmol/L即可。

图4 *GmGolS* 基因原核表达 IPTG 诱导浓度的优化

2.4 表达 *GmGolS* 蛋白的大肠杆菌干旱胁迫分析

为了选择最佳诱导条件,设IPTG诱导浓度为0.1 mmol/L,对重组菌诱导3 h后进行抗旱性分析。如图5所示,在未添加PEG-8000的培养基上,与

时间和诱导浓度进行优化,结果(图3)表明,3~8泳道与对照(空载体及未诱导菌株)相比,在约40 ku处有目的蛋白的表达。*GmGolS* 蛋白分子量为38.03 ku,加上6个组氨酸标签,融合蛋白分子量约为40 ku,因此表达的重组蛋白大小与预期结果相符,但在对照中无此蛋白表达,表明*GmGolS* 基因已经在大肠杆菌中成功表达。由图3还可以看出,IPTG诱导1 h时已出现重组蛋白,随着诱导时间的延长,重组蛋白的表达量随之增加,到3 h时达到最大值,之后差别不大。因此,在后续试验中将诱导时间设为3 h。

转化空载体 pET28 的大肠杆菌相比,表达 *GmGolS* 蛋白的重组大肠杆菌的生长受到明显抑制。在含有1% PEG-8000的培养基上,表达 *GmGolS* 蛋白的大肠杆菌的生长继续受到抑制,虽然含有对照空载体的大肠杆菌生长也受到了抑制,但其活性仍明显高于表达 *GmGolS* 蛋白的大肠杆菌。由此可见,*GmGolS* 蛋白在大肠杆菌中的过表达降低了重组菌的生活力,使其对干旱胁迫更加敏感。

3 讨论

肌醇半乳糖苷合成酶(galactinol synthase,简称GolS)催化尿嘧啶二磷酸(uridine diphosphate,简称UDP)-半乳糖和肌醇合成肌醇半乳糖苷的反应,是棉子糖代谢通路中物质合成的第一步,也是棉子糖系列寡糖(raffinose family oligosaccharides,简称RFOs)合成的限速步骤^[1,9]。越来越多的研究结果表明,*GolS* 基因在植物的抗逆反应、光合产物转运和种子发育中发挥着重要作用^[10]。进一步研究*GolS* 基因的表达与GolS酶活性、RFOs的积累及植物抗逆性的关系,能够为植物抗逆新品种的培育提供更全面的理论基础。

大肠杆菌表达系统是目前应用最为广泛的原

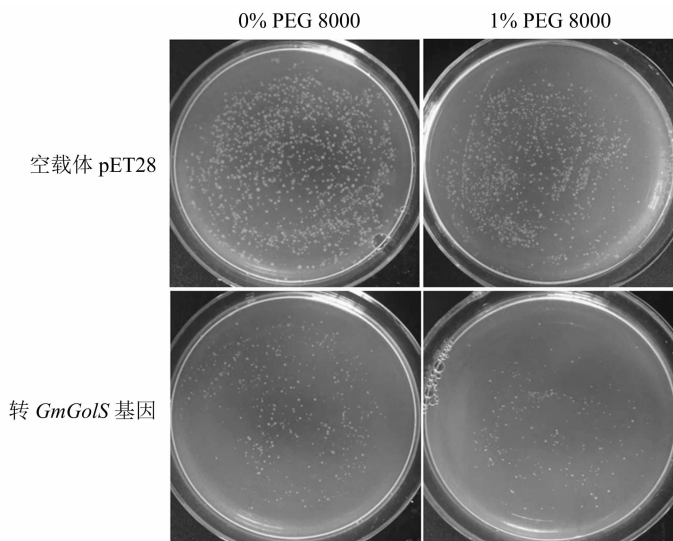


图5 转*GmGolS*基因与空载体 pET28 的大肠杆菌在干旱胁迫下的生长情况

核表达系统,融合蛋白在该系统中的表达结果可受多种因素影响,如诱导温度、诱导剂浓度、诱导时间等^[11-12]。本试验将大豆肌醇半乳糖苷合成酶基因*GmGolS*构建到原核表达载体上并转入大肠杆菌中,经IPTG诱导及条件优化(IPTG诱导浓度和诱导时间的优化),结果显示,该基因能够在大肠杆菌中表达,融合蛋白分子量大小约为40 ku。但是本研究结果显示,IPTG诱导浓度对重组蛋白表达量的影响不大,这与前人的某些试验结果相似^[13-14]。笔者也尝试对*GmGolS*重组蛋白进行纯化回收,但表达的重组蛋白主要以包涵体的形式存在(结果未列出)。推测出现这种情况的原因可能是温度过高等,使蛋白合成速度过快,导致蛋白质来不及进行折叠及二硫键的配对,或是由于蛋白质的非特异性结合而使重组蛋白无法达到足够的溶解度^[15-16]。前人曾将木薯、沙冬青的*GolS*基因在大肠杆菌中进行抗性鉴定,结果表明,*GolS*基因过表达的大肠杆菌分别获得了耐旱性及耐寒性^[17-18]。但在本试验中,*GmGolS*基因过表达的大肠杆菌干旱胁迫结果与范洁等的研究结果^[17]不一致,推测可能由于*GmGolS*重组蛋白在大肠杆菌中的超量表达破坏了大肠杆菌的生理及代谢平衡,导致其对干旱胁迫更加敏感。说明由于表达系统不同,导致部分真核生物的基因不能在原核生物中进行功能鉴定。本研究结果为进一步的*GmGolS*蛋白理化性质及基因功能研究打下了理论基础。

4 结论

本研究采用RT-PCR方法,从大豆叶片cDNA

中扩增得到编码肌醇半乳糖苷合成酶的基因*GmGolS*。再将*GmGolS*基因构建到原核表达载体pET28上,随后将该载体导入大肠杆菌Rosetta(DE3)中,对其进行IPTG诱导。在诱导时间为3 h、IPTG浓度为0.1 mmol/L的条件下,可获得大量重组蛋白,相对分子量约为40 ku。对表达*GmGolS*蛋白的大肠杆菌进行抗旱性分析,结果显示,*GmGolS*基因在大肠杆菌中的过表达降低了重组菌的生活力,使其对干旱胁迫更加敏感。

参考文献:

- [1] El Sayed A I, Rafudeen M S, Colldack D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress[J]. *Plant Biology*, 2014, 16(1): 1-8.
- [2] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2002, 29(4): 417-426.
- [3] Nishizawa Y A, Yabuta Y, Shigeoka S. The contribution of carbohydrates including raffinose family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage[J]. *Plant Signal Behavior*, 2008, 3(11): 1016-1018.
- [4] Wang Y, Liu H, Wang S, et al. Overexpression of a common wheat gene *GALACTINOL SYNTHASE3* enhances tolerance to zinc in *Arabidopsis* and rice through the modulation of reactive oxygen species production[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, 34(4): 794-806.
- [5] Peterbauer T, Lahuta L B, Blochl A, et al. Analysis of the raffinose family oligosaccharide pathway in pea seeds with contrasting carbohydrate composition [J]. *Plant Physiology*, 2001, 127(4): 1764-1772.
- [6] Panikulangara T J, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, et al.

王 玲, 刘晓伟, 江 纳, 等. 蔓花生 *AP2* 基因家族的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(14): 65–77.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.14.011

蔓花生 *AP2* 基因家族的生物信息学分析

王 玲^{1,2}, 刘晓伟^{1,2}, 江 纳³, 付 春^{1,2}

(1. 乐山师范学院竹类病虫害防控与资源开发四川省重点实验室, 四川乐山 614000; 2. 乐山师范学院生命科学院, 四川乐山 614000;
3. 乐山师范学院数学与信息科学学院, 四川乐山 614000)

摘要: *AP2* 作为一类植物转录因子, 在花的发育和营养器官的形成过程中都起着非常重要的作用。旨在对蔓花生 (*Arachis duranensis*) *AP2* 蛋白的理化性质及分子进化关系等进行详细的生物信息学分析。结果表明, 蔓花生 *AP2* 基因家族成员编码蛋白亚细胞定位预测均在细胞核中, 有 11 个成员的理论等电点小于 7, 推测该家族蛋白多为酸性蛋白, 有 8 个成员存在 2 个保守结构域; 该家族成员均无信号肽; 除了 Aradu. SE6Q0 与 Aradu. 42K79 成员中存在跨膜现象外, 其他成员鲜少出现跨膜现象。亲疏水性预测结果表明, 蔓花生 *AP2* 基因家族编码蛋白的亲疏水性系数均小于 0, 推测其为亲水蛋白; 磷酸化位点主要集中在丝氨酸上; 其二级结构以无规则卷曲和 α -螺旋为主。研究还得出, 蔓花生 *AP2* 基因家族编码蛋白的主要保守基序是 Motif1、Motif2 和 Motif4; Motif3、Motif4 都含有 YRG 结构域, Motif5 含有 RAYD 结构域; 构建的系统发育树也有力地说明了 *AP2* 基因家族的进化程度。

关键词: 蔓花生; *AP2* 基因; 基因家族; 生物信息学

中图分类号: S541⁺.901 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)14-0065-13

蔓花生 (*Arachis duranensis*), 别称遍地黄金, 是

豆科蝶形花亚科蔓花生属的多年生宿根草本植物, 原产于亚洲热带及南美洲地区, 其根系发达, 抗逆性强, 病虫害少, 是动物的良好牧草^[1-6]。蔓花生有一定的耐热耐旱性、抗寒性、耐阴性、耐贫瘠性^[2-3, 7-13], 对有害气体有较强的抗性^[14-15]。*APETALA2* (*AP2*) 是一类植物转录因子, 其结构首次被发现于拟南芥中, 并证实在花的发育过程中和

收稿日期: 2019-09-15

基金项目: 四川省科技厅项目 (编号: 17ZZ019); 乐山师范学院人才启动项目 (编号: XJR17005)。

作者简介: 王 玲 (1999—), 女, 四川南充人, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: 1981887804@qq.com。

通信作者: 付 春, 博士, 讲师, 主要从事经济植物的生物信息学研究。E-mail: fuchun421@aliyun.com。

Galactinol synthase1, a novel heat shock factor target gene responsible for heat-induced synthesis of raffinose family oligosaccharides in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(2): 3148–3158.

[7] Maruyama K, Takeda M, Kidokoro S, et al. Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A [J]. *Plant Physiology*, 2009, 150: 1972–1980.

[8] Wang L, Shang H, Liu Y X, et al. A role for a cell wall localized glycine-rich protein in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Boea hygrometrica* [J]. *Plant Biology*, 2009, 11(6): 837–848.

[9] Liu J J, Krenz D C, Galvez A F, et al. Galactinol synthase (GolS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation [J]. *Plant Science*, 1998, 134(1): 11–20.

[10] Zhou T, Zhang R, Guo S D. Molecular cloning and characterization of *GhGolSI*, a novel gene encoding galactinol synthase from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2012, 30(3): 699–709.

[11] 王 宁, 陈 静, 高 飞, 等. 盐芥 *TsGPX3* 基因的克隆、亚细胞定位与原核表达 [J]. *生物技术通报*, 2016, 32(4): 110–115.

[12] 李秀娟. 盐藻 *DsRab* 基因的载体构建、原核表达及亚细胞定位分析 [D]. 大连: 大连海洋大学, 2014: 32–35.

[13] 杨泽伟, 王龙海, 朱 莉, 等. 高粱 *SbGABA-Ts* 基因的克隆、原核表达及纯化 [J]. *生物技术通报*, 2015, 31(5): 93–99.

[14] 廖小森, 何其光, 刘 耀, 等. 橡胶树炭疽菌 *CsPbs2* 基因的原核表达分析 [J]. *分子植物育种*, 2019, 17(7): 2126–2132.

[15] 常 丽, 赵小英, 郭 明, 等. *GA2ox1* 氧化酶基因的克隆及原核表达 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(6): 1099–1104.

[16] 许雨晨, 吕 哲, 陈保善, 等. 稻瘟病菌 *Dam1* 基因的克隆、原核表达及纯化 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(9): 2385–2389.

[17] 范 洁, 王雨晴, 李瑞梅, 等. 木薯中肌醇半乳糖苷合成酶基因在大肠杆菌中的表达 [J]. *分子植物育种*, 2015, 13(5): 1027–1032.

[18] 宋 健. 沙冬青耐寒基因 *AmGolS* 的克隆和遗传转化研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2007: 44–45.