

## 技术与方法 Techniques and Methods

## NtDREB2-PDI 融合蛋白的纯化及与 DRE 元件结合能力的检测

冯锋, 刘卫群\*

河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002

摘要: 将从普通烟草(*Nicotiana tabacum*) 'K326' 中克隆得到的转录因子基因 *NtDREB2*, 采用 PCR 去除 *NtDREB2* 基因的终止密码子, 酶切后构建入 *PDI/pET28a* 融合表达载体。取测序正确的重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导, SDS-PAGE 检测表达后, 用 Ni-NTA 纯化融合蛋白, 获得了高效表达的可溶性目的蛋白。凝胶滞留(EMSA, electrophoresis mobility shift assay)实验表明融合蛋白具有结合 DRE (dehydration-responsive element) 元件的能力。

关键词: *NtDREB2*; 蛋白质二硫键异构酶; 融合蛋白; 诱导表达; 纯化; 凝胶滞留

## Purification of NtDREB2-PDI Fusion Protein and Function Analysis of Binding to DRE Element

FENG Feng, LIU Wei-Qun\*

College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

**Abstract:** The transcription factor gene *NtDREB2* is cloned from tobacco (*Nicotiana tabacum*) 'K326'. The stop codon of the *NtDREB2* gene is deleted with PCR, and we construct the gene into the *PDI/pET28a* fusion expression vector after enzyme digestion. The *E. coli* BL21 (DE3) is transformed with the recombinant plasmid whose sequence is verified, then induced with IPTG. After SDS-PAGE detection of the expression we acquire the high-expressing soluble protein with the Ni-NTA purification method. EMSA experiment suggests that the fusion protein is capable of binding to the DRE element.

**Key words:** *NtDREB2*; protein disulfide isomerase; fusion protein; induce expression; purification; EMSA

脱水应答元件结合蛋白(dehydration-responsive element binding protein, DREB)转录因子对提高植物抗干旱、高盐和低温等非生物胁迫的耐受性起着关键的作用(Liu 等 1998)。有关这方面的研究主要集中于 DREB 信号通路所介导的转录调控机制(Thomashow 等 2001; Zhao 等 2006), 而对于 DREB 蛋白质性质及其与其他蛋白质相互作用的报道较少。在此项研究中, 如何纯化并获取大量可溶性 DREB 蛋白至关重要。

然而, 在用大肠杆菌重组表达外源蛋白时, 往往会由于一些蛋白质的不正确折叠而形成包涵体。目前已有很多方法用于避免或减少包涵体的形成, 如低温诱导, 降低 IPTG 浓度, 与 GST 融合表达或是选择合适的真核表达系统, 但这些方法往往导致蛋白表达量下降或提取成本增大, 即使如此, 仍不能彻底消除包涵体的存在(Liu 等 2005; Georgiou 和 Valax 1996; Chalmers 等 1990)。Liu 等(2005)和 Kajino 等(2000)发现, 采用人蛋白

二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)与目的蛋白融合, 在短芽孢杆菌和大肠杆菌中表达, 可以有效避免包涵体, 提高目的蛋白的可溶性和产量。PDI 是一个多功能蛋白, 它能够催化二硫键的形成、还原和异构化的限速反应; 还可以分子伴侣的形式帮助多肽链的折叠, 减少包涵体的形成(Freedman 等 2002)。

本文将普通烟草 'K326' 中克隆的转录因子基因 *NtDREB2* 构建到 PDI 融合表达系统中, 得到高表达量的融合蛋白, 并用 Ni-NTA 分离纯化了此融合蛋白, 再通过凝胶滞留实验进一步证明此融合蛋白中的 *NtDREB2* 仍然具有结合 WDRE 元件的能力, 说明 PDI 融合表达系统是有效的。

收稿 2007-11-05 修订 2008-02-21

资助 河南省科技攻关项目(0624050012)。

\* 通讯作者(E-mail: liuweiqun2004@126.com; Tel: 0371-63558722)。

## 材料与方法

### 1 材料与试剂

含有从普通烟草(*Nicotiana tabacum*)品种‘K326’中克隆的转录因子基因(*NtDREB2*)的质粒 *NtDREB2*/pBluescript II SK<sup>+</sup>、大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$  和表达菌株 BL21 (DE3)以及融合有人 *PDI* 基因的原核表达载体 *PDI*/pET28a 均来自清华大学分子酶学实验室。

*Pfu* DNA 聚合酶、DNA Marker (D2000)和 DNA 回收试剂盒购自北京天根公司; *Bam*HI 和 *Hind*III 限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; T4-DNA 连接酶购自 Promega 公司; 卡那霉素、IPTG 等购自北京经科公司; Ni-NTA agarose 购自 QIAGEN 公司; Ultrafree-15 浓缩离心管来自 Millipore 公司; 其他试剂均为国产分析纯。

### 2 引物设计

根据 *NtDREB2* 基因序列设计引物, 去除基因编码区最后一位的终止密码子 TAA, 并分别在上下游引物中加入 *Bam*HI 和 *Hind*III 位点(下划线表示), 引物斜体部分为保护碱基。For: 5'-CCGC-GGATCCATGGAAATGTGTCGAAGCTATTA-3'; Rev: 5'-TATCAAGCTTAATAGAATAACTCCA-CAAAGG-3'。

根据报道的野生型脱水应答元件(wide-type dehydration-responsive element, WDRE)和突变型脱水应答元件(mutated dehydration-responsive element, MDRE)序列, 合成双链元件 WDRE: 5'-AGC-TACCGACATAAGGC-3' 和 MDRE: 5'-AGC-TATTTTCATAAGGC-3', 以上所有引物均由上海生工生物技术有限公司合成。

### 3 *NtDREB2*融合表达载体的构建

由于要将 *NtDREB2* 基因与 *PDI* 基因融合表达, 因此必须去除 *NtDREB2* 的终止密码子 TAA。以构建好的 *NtDREB2*/SK<sup>+</sup> 质粒为模板, 用引物 *NtDREB2*-For 和 *NtDREB2*-Rev 进行 PCR 扩增, 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳回收后用 *Bam*HI/*Hind*III 酶切。同时, 将融合有人 *PDI* 基因的原核表达载体 *PDI*/pET28a 也用 *Bam*HI/*Hind*III 进行酶切, 电泳回收大片断。将酶切处理的载体和 PCR 产物用 T4-DNA 连接酶连接, 这样目的基因就处于 *PDI* 的 5' 端, 得到重组质粒 *NtDREB2*-*PDI*/pET28a。融合基因的构建见图 1。

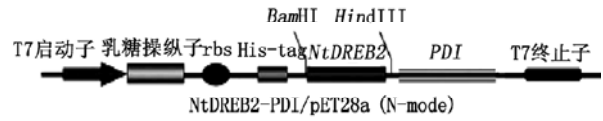


图1 *NtDREB2*-*PDI*/pET28a 融合表达载体的构建

Fig.1 The construction of *NtDREB2*-*PDI*/pET28a fusion expression vector

连接产物分别转化新鲜制备的 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 随机挑取单克隆培养后提取质粒, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切鉴定筛选阳性克隆, 送上海英骏生物技术有限公司测序。

### 4 *NtDREB2*融合蛋白的诱导表达

将测序正确的重组质粒转化大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 挑取阳性单菌落于 3 mL 含卡那霉素(50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$  下培养过夜至稳定期, 按 1:100 转移至上述相同培养基中, 相同条件培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8, 取出 100  $\mu\text{L}$  培养物于 4 $^{\circ}\text{C}$  中保存, 作为诱导前样品; 剩余培养物加入 IPTG (终浓度为 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 继续培养 3~4 h, 再取出 100  $\mu\text{L}$  培养物作为诱导后样品。分别取诱导前与诱导后样品 20  $\mu\text{L}$ , 各加入 5  $\mu\text{L}$  5 $\times$  蛋白样品处理液(0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 0.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  巯基乙醇, 40% 蔗糖, 0.1% 溴酚蓝), 置于沸水浴中 10 min, 后取 15  $\mu\text{L}$  上样, 用 SDS-PAGE 检测表达产物(180 V 稳压, 电泳 1 h)。

### 5 *NtDREB2*融合蛋白的提取纯化

根据 SDS-PAGE 的结果, 将 IPTG 诱导的菌液于 4 $^{\circ}\text{C}$  下, 以 8 500 $\times g$  离心 5 min 后, 收集菌体。按照 QIAGEN 公司的“QIAexpressionist-A handbook for high-level expression and purification of 6 $\times$ His-tagged proteins”手册提取 *NtDREB2*-*PDI* 融合蛋白。收集的菌体按照培养菌液量的 1/10 体积加入裂解缓冲液(50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaCl}$ , 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  咪唑, pH 8.0), 将菌体沉淀充分悬浮并混匀后加入溶菌酶至终浓度为 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 置于冰上搅拌 30 min 后, 超声(60 W, 5 s 间歇, 5 s 超声, 共超 10 min)以破碎细胞, 于 4 $^{\circ}\text{C}$  下, 以 12 000 $\times g$  离心 20 min, 上清液转移至新的离心管中, 加入 1 mL 镍离子-氨三乙酸(Ni-NTA)琼脂糖树脂, 放于 4 $^{\circ}\text{C}$  中振荡过夜后取离心管中的混合物转入 20 mL 空玻璃管中,

用裂解缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑, pH 8.0)洗脱去除未结合的蛋白,用GE公司Pharmacia UV-1紫外检测仪检测,直至基线走平。使用冲洗缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 20 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑, pH 8.0)冲洗除去杂蛋白,最后用洗脱缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, 250 mmol·L<sup>-1</sup> 咪唑, pH 8.0)进行洗脱,收集流出液。对上述提取纯化每一步骤所得到的溶液进行SDS-PAGE检测。同时将最终收集的洗脱液置于30 mmol·L<sup>-1</sup>的Tris-HCl缓冲液(pH 8.0)透析后,采用Millipore的50 mL浓缩离心管浓缩蛋白,浓缩的蛋白吹打均匀后转移至新的1.5 mL的离心管中,置于-80 °C中保存。蛋白浓度用考马斯亮蓝法测定(Bradford 1976)。

## 6 凝胶滞留检测融合蛋白的活性

在原来的实验中(未发表资料),我们采用酵母单杂交已经证明NtDREB2能够与WDRE元件结合,为了鉴定体外融合表达的蛋白NtDREB2-PDI是否还具有与WDRE元件结合的能力,我们又做了凝胶滞留实验。即取0.5 μg的WDRE和MDRE元件分别与15 μg的NtDREB2-PDI融合蛋白混匀后,于室温下放置20 min,反应达到平衡后,加入4 μL 6×上样缓冲液(0.25% 溴酚蓝, 40% 蔗糖),取15 μL点样,用0.5×Tris-硼酸-EDTA、8%的非变性PAGE电泳。稳压40 V,待指示剂跑至距点样孔3/4处,停止电泳,用溴化乙啶(EB)染色,并照相记录。

## 实验结果

### 1 NtDREB2融合表达载体的鉴定

对阳性克隆NtDREB2-PDI/pET28a测序结果表明,NtDREB2基因终止密码子已被去除,目的基因处于PDI的5'端并与PDI基因处于同一读码框。将得到的重组质粒NtDREB2-PDI/pET28a,采用BamHI/HindIII酶切后进行琼脂糖凝胶电泳检测,在电泳图谱上也显示有一650 bp左右的片段(图2),与NtDREB2基因大小一致,表明NtDREB2已正确连接在PDI/pET28a原核表达载体上,融合表达载体构建成功。

### 2 NtDREB2融合蛋白的原核表达

经SDS-PAGE检测诱导前后NtDREB2-PDI融

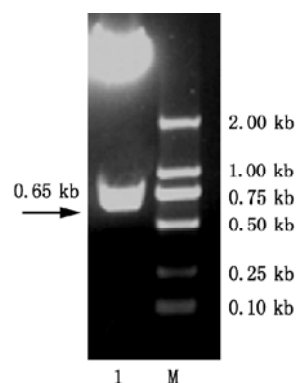


图2 重组质粒的酶切鉴定图谱

Fig.2 The restriction endonuclease analysis of the recombinant plasmid

1: BamHI和HindIII双酶切重组质粒; M: D2000 DNA标准。

合蛋白表达图谱显示:诱导后有一相对分子量约为80 kDa的特异性蛋白质表达带(图3),与NtDREB2-PDI融合蛋白的理论值相符(PDI大小为57 kDa, NtDREB2大小23 kDa),表明融合蛋白可以在大肠杆菌中完整表达。

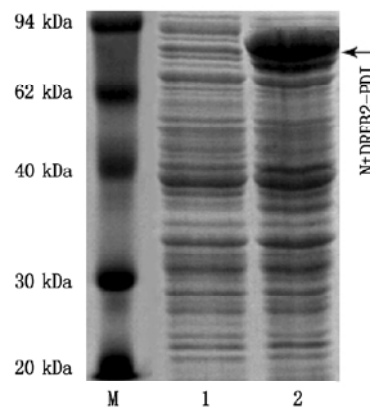


图3 NtDRB2-PDI融合蛋白的IPTG诱导表达

Fig.3 The fusion protein NtDREB2-PDI was induced expression by IPTG

M: 低分子量蛋白标准; 1: 诱导前; 2: 诱导后。

### 3 NtDREB2融合蛋白的亲合纯化

对上述提取纯化每一步骤所得溶液经8%的SDS-PAGE分析,电泳图谱结果(图4)显示:NtDREB2-PDI主要以可溶性表达存在于超声破细胞后离心的上清中,沉淀中没有明显的包涵体存在,经过3个分离纯化步骤后,杂蛋白已被大量去除,因而得到的是纯化的NtDREB2-PDI融合蛋白。表明NtDREB2-PDI/pET28a原核表达系统基

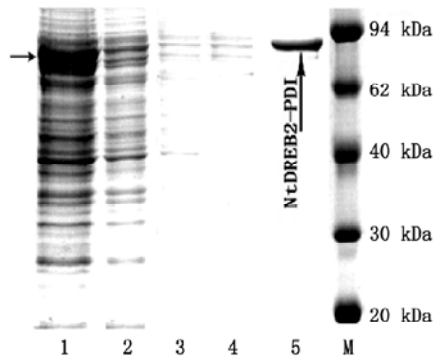


图4 NtDREB2-PDI的提取纯化

Fig.4 Identification and purification of the fusion protein

#### NtDREB2-PDI

1: IPTG 诱导后细胞进行超声离心后的上清; 2: 超声离心后的沉淀; 3: 裂解缓冲液洗脱液; 4: 冲洗缓冲液洗脱液; 5: 洗脱缓冲液洗脱液; M: 低分子量蛋白标准。

本上可避免包涵体的形成, 并且也说明预设优化的纯化方案是正确的。

#### 4 NtDREB2融合蛋白的活性检测

为了验证所获得的融合蛋白是否能与WDRE顺式作用元件结合, 我们采用体外凝胶滞留实验检测了融合蛋白与WDRE顺式作用元件结合的能力。结果(图5)显示, NtDREB2-PDI融合蛋白能够与WDRE元件特异性结合(泳道2), 但PDI既不能结合WDRE元件(泳道4), 也不与MDRE元件结合(泳道3), 表明融合蛋白中的NtDREB2转录因子的DNA结合域不受PDI的影响, 可以正常地与DRE顺式作用元件结合。

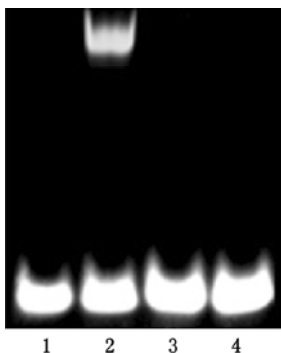


图5 EMSA 分析NtDREB2-PDI的转录因子活性

Fig.5 EMSA analysis of the transcription factor activity of fusion protein NtDREB2-PDI

1: NtDREB2-PDI 融合蛋白和 MDRE 元件混合; 2: NtDREB2-PDI 融合蛋白和 WDRE 元件混合; 3: PDI 蛋白和 MDRE 元件混合; 4: PDI 蛋白和 WDRE 元件混合。

## 讨 论

在融合蛋白的纯化方法中, 一般常用 His-tag 和 GST 融合蛋白, 这是因为它们具有成熟的表达与纯化系统, 但 His-tag 仅作为纯化时的标记使用而不能改善目的蛋白的溶解性质, 致使此系统表达的重组蛋白在大肠杆菌体内往往形成不可溶的包涵体。而 GST 虽然有高度可溶性, 有助于目的蛋白的溶解, 但当目的蛋白具有大量二级结构或存在二硫键重排时, 此系统也不能帮助目的蛋白正确折叠(Fernando 等 1999)。

PDI 融合表达系统是通过 PDI 的分子伴侣性质来辅助目的蛋白折叠的, 具有广泛的适用性与稳定性, 可以减少或避免包涵体形成, 是一种改进的在大肠杆菌中表达外源蛋白方法(Liu 等 2005; Freedman 等 2002)。此外, 不同融合模式产生的 PDI 融合蛋白有不同的稳定性。如果目的蛋白被连接在 PDI 肽链的 C 末端, 产生的融合蛋白同样是不稳定的(Liu 等 2005)。这可能是由于置于 PDI 的 C 端目的蛋白影响了 PDI 折叠, 改变了 PDI 分子的构象。而使其失去分子伴侣的功能所致(Kajino 等 2000)。

本文将 NtDREB2 转录因子基因连接在 PDI 基因的 5' 端, 可形成融合表达系统。结果显示表达出的蛋白质可避免包涵体的形成, 采用 Ni-NTA 亲和纯化系统可以获得高纯度的 NtDREB-PDI 融合蛋白, EMSA 分析表明, 所提纯的 PDI 融合蛋白能够与 WDRE 元件结合。酵母单杂交实验也显示其具有转录激活调控功能(未发表资料)。表明 PDI 融合表达系统产生的融合蛋白具有与目的蛋白相似的活性和生物学特性。

## 参考文献

- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 (2): 248~254
- Chalmers JJ, Kim E, Telford JN, Wong EY, Tacon WC, Shuler ML, Wilson DB (1990). Effects of temperature on *Escherichia coli* overproducing beta-lactamase or human epidermal growth factor. *Appl Environ Microbiol*, 56 (1): 104 ~111
- Fernando GJ, Murray B, Zhou J, Frazer IH (1999). Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human

- papillomavirus type 16. *Clin Exp Immunol*, 115 (3): 397~403
- Freedman RB, Klappa P, Ruddock LW (2002). Protein disulfide isomerases exploit synergy between catalytic and specific binding domains. *EMBO Rep*, 3 (2): 136~140
- Georgiou G, Valax P (1996). Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 7 (2): 190~197
- Kajino T, Ohto C, Muramatsu M, Obata S, Udaka S, Yamada Y, Takahashi H (2000). A protein disulfide isomerase gene fusion expression system that increases the extracellular productivity of *Bacillus brevis*. *Appl Environ Microbiol*, 66 (2): 638~642
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10 (8): 1391~1406
- Liu Y, Zhao TJ, Yan YB, Zhou HM (2005). Increase of soluble expression in *Escherichia coli* cytoplasm by a protein disulfide isomerase gene fusion system. *Protein Express Purif*, 44 (2): 155~161
- Thomashow MF, Gilmour SJ, Stockinger EJ, Jaglo-Ottosen KR, Zarka DG (2001). Role of the *Arabidopsis* CBF transcriptional activators in cold acclimation. *Physiol Plant*, 112 (2): 171~175
- Zhao TJ, Sun S, Liu Y, Liu JM, Liu Q, Yan YB, Zhou HM (2006). Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*. *J Biol Chem*, 281 (16): 10752~10759