

小麦 TaMBD2 原核表达载体的构建和诱导表达

孟凡荣¹, 司志飞¹, 刘昊英¹, 张问¹, 李永春², 尹钧^{2,*}

河南农业大学¹ 生命科学学院, ² 国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002

摘要: 构建了小麦甲基结合域蛋白基因 *TaMBD2* 的原核表达载体 pGEX-TaMBD2, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 工程菌株中优化了融合蛋白 GST-TaMBD2 的诱导表达条件。结果表明, 用 0.3、0.5 和 1.0 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导后, 融合蛋白 GST-TaMBD2 均能有效表达, 以 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导的效果最好; 从诱导表达的时间来看, 3 种浓度 IPTG 诱导 1 h 后融合蛋白均开始表达, 且表达量随着诱导时间的延长而逐渐增加, 但在诱导 6 h 后的表达量增加幅度不大, 因此确定诱导融合蛋白 GST-TaMBD2 表达的最佳 IPTG 浓度为 1.0 mmol·L⁻¹, 诱导时间为 6 h。

关键词: 小麦; *TaMBD2*; 原核表达

Construction of Prokaryotic Expression Vector for TaMBD2 and Its Induced Expression

MENG Fan-Rong¹, SI Zhi-Fei¹, LIU Hao-Ying¹, ZHANG Wen¹, LI Yong-Chun², YIN Jun^{2,*}

¹College of Life Sciences, ²National Engineering Research Centre for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: A prokaryotic expression vector pGEX-TaMBD2 for the wheat MBD (methyl-binding domain protein) gene *TaMBD2* was constructed and the induced expression conditions for the fusion protein GST-TaMBD2 were optimized in the engineered *Escherichia coli* BL21 (DE3). The results showed that the fused GST-TaMBD2 protein could be effectively expressed under different concentrations of IPTG, including 0.3, 0.5 and 1.0 mmol·L⁻¹, and the most suitable concentration of IPTG was 1.0 mmol·L⁻¹. As to the induction time, the fusion protein began to express after 1 h of induction under the 3 different IPTG concentrations, its expression abundance was obviously increased along with the induction time and reached to the highest point at the 6 h of induction; in general, the most suitable induction condition for the fusion protein was 6 h induction under 1.0 mmol·L⁻¹ IPTG.

Key words: wheat; *TaMBD2*; prokaryotic expression

甲基结合蛋白(methyl-binding domain protein, MBD)是与甲基化DNA特异结合的反式作用因子, 在基因表达调控和维持生物体正常生长发育中起作用。脊椎动物中共分离到5个编码MBD蛋白的基因, 其中MBD1、MBD2、MBD3和MeCP2直接参与DNA甲基化的转录抑制(Nan等1998; Ng等1999, 2000; Jørgensen和Bird 2002)。近年来, 关于植物MBD的相关研究也取得了新的进展。研究表明, 在拟南芥、水稻、玉米基因组中分别编码13、16和16个MBD蛋白(Zemach和Grafi 2003; Springer和Kaeppler 2005; Grafi等2007)。我们实验室在前期的研究工作中, 克隆了6个小麦的MBD基因(*TaMBD1-6*), 并初步分析了它们的时空表达特性(Li等2008)。

目前植物MBD蛋白参与的基因表达调控机制

研究已成为表观遗传学研究领域的热点之一。已有研究表明, 拟南芥的AtMBD5、AtMBD6、AtMBD7和AtMBD11能与对称性甲基化的DNA序列(CpG)结合, 其中AtMBD5和AtMBD6可以与DDM1和组蛋白脱乙酰化酶(HDAC)形成复合体结合到甲基化的DNA位点(Ito等2003; Scebbba等2003; Zemach和Grafi 2003; Zemach等2005)。关于小麦MBD蛋白功能的研究还未见报道。本文在前期克隆小麦MBD基因*TaMBD2*的基础上, 构建了TaMBD2的原核表达载体, 并优化了融合蛋白GST-TaMBD2在大肠杆菌BL21 (DE3)中的诱导表

收稿 2008-05-12 修订 2008-06-30

资助 国家自然科学基金(30300195)。

* 通讯作者(E-mail: junyin57@yahoo.com.cn; Tel: 0371-63558203)。

达条件,为今后大量表达、纯化 TaMBD2 蛋白和开展相关的功能研究奠定了基础。

材料与方法

载体构建以包含 *TaMBD2* 基因的质粒 pBS-TaMBD2a (本实验室保存)为基础(Li等2008),该载体中目标基因 *TaMBD2* 的两侧虽然包含有 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点,但它们的位置不能满足重组载体中保证目的基因具有正确的阅读框架。为此,根据 *TaMBD2* 基因序列设计特异引物并引入位置适当的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点。引入酶切位点的引物为 *TaMBD2*-F (5' CTT GCA GGA TCC ATG GAC A 3')和 *TaMBD2*-R (5' GGA GCA CTG AAT TCG TCA GA 3'),上述引物的下划线部分为引入的酶切位点;PCR 扩增体系为 40 μ L,包括质粒模板 50 ng DNA、4 μ L 10 \times PCR 缓冲液、1.6 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹的 dNTPs、引物 *TaMBD2*-F 和 *TaMBD2*-R 各 80 ng、Pfu DNA 聚合酶 2 U。扩增程序为:94 5 min;94 60 s,53 60 s,72 90 s,40个循环;72 后延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后采用北京天为时代公司的DNA凝胶回收试剂盒回收,将回收的目的片段与 pBS-T 载体连接,获得载体 pBS-TaMBD2b。重组载体经测序分析验证其正确性。

用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切载体 pBS-TaMBD2b 和 pGEX-4T-2,分别回收 *TaMBD2b* 基因片段和 pGEX-4T-2 载体片段,连接后获得重组载体 pGEX-TaMBD2。重组载体通过 PCR 扩增及酶切分析进行鉴定,用于 PCR 鉴定的引物为 pGEX-1 (5' CAA TGT GCC TGG ATG CGT 3')和 pGEX-2 (5' TGA CGG GCT TGT CTG CTC 3');根据序列分析,在 *TaMBD2b* 和载体上各出现一次 *Pst*I 识别位点,并用 *Pst*I 对重组载体进行酶切鉴定。

将重组质粒 pGEX-TaMBD2 导入大肠杆菌 BL21 (DE3)菌株,并用引物 pGEX-1 和 pGEX-2 对重组克隆进行 PCR 鉴定,阳性重组克隆于 5 mL 含 100 mg \cdot L⁻¹ 氨苄青霉素的液体 LB 培养基中,置于 37 培养过夜后,取 50 μ L 菌液加入 50 mL 含 100 μ g \cdot mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养至 OD₆₀₀ 值为 0.5,培养条件为 37 , 200 r \cdot min⁻¹。得到的培养物用于不同诱导处理的分析, IPTG 浓度分别为 0.3、0.5 和 1.0 mmol \cdot L⁻¹,诱导时间分别为 0、1、2、3、

4、6、8 和 10 h。分别提取这些处理的菌体总蛋白,以 15% SDS-PAGE 蛋白质电泳检测重组蛋白的表达。

实验结果

1 小麦 *TaMBD2* 基因的克隆

用引物 *TaMBD2*-F 和 *TaMBD2*-R,以质粒 pBS-TaMBD2a 为模板,通过 PCR 扩增获得了大小约为 972 bp 的 DNA 片段 *TaMBD2b*。目的片段回收后连接到 pBS-T 载体上获得 pBS-TaMBD2b。测序分析显示, pBS-TaMBD2b 载体中 *TaMBD2* 基因的上下游分别引入了 *Bam*HI 和 *Eco*RI 的限制性核酸内切酶位点,且序列内部无变异。这为 TaMBD2 的正确原核表达奠定了基础。

2 *TaMBD2* 原核表达载体的构建和鉴定

载体 pBS-TaMBD2b 和 pGEX-4T-2 分别用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 双酶切后获得基因片段和线性 pGEX-4T-2 载体片段,将上述 2 个片段连接后获得重组载体(图 1)。上述连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,并用引物 pGEX-1 和 pGEX-2 对重组克隆进行 PCR 鉴定的结果显示,所挑选的 3 个克隆均能扩增出约 1 292 bp 的片段(图 2),获得了含有重组载体的阳性克隆。从中挑选一个单克隆进行培养后提取重组质粒 pGEX-TaMBD2,经 *Pst*I 酶切后,获得大小约为 986 bp 和 4 933 bp 的 2 个片段(图 2),酶切鉴定结果进一步证实重组载体 pGEX-TaMBD2 是正确的。

3 诱导融合蛋白 GST-TaMBD2 的表达条件

SDS-PAGE 蛋白质电泳检测显示,在不同浓度 IPTG 的诱导下,融合蛋白 GST-TaMBD2 (分子量约为 61 kDa)均能有效表达,表达的起始时间为 1 h,之后融合蛋白的表达量随着诱导时间的进程而增加(图 3)。在 0.3 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 诱导下,融合蛋白在诱导 6 h 时的表达量最大,10 h 时的表达量明显下降(图 3-a);在 0.5 mmol \cdot L⁻¹ 和 1.0 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 诱导下,融合蛋白表达量随着诱导时间的进程而逐渐增加,但在总体上各个时间点的蛋白表达量均为 1.0 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 诱导的高于 0.5 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 诱导处理(图 3-b、c);在 1.0 mmol \cdot L⁻¹ IPTG 诱导下,虽然融合蛋白的表达量随着诱导时间的进程而不断增加,但在诱导 6 h 后增加的幅度较小,而非目标蛋白的表达量则迅速增加(图 3-c)。根据上述

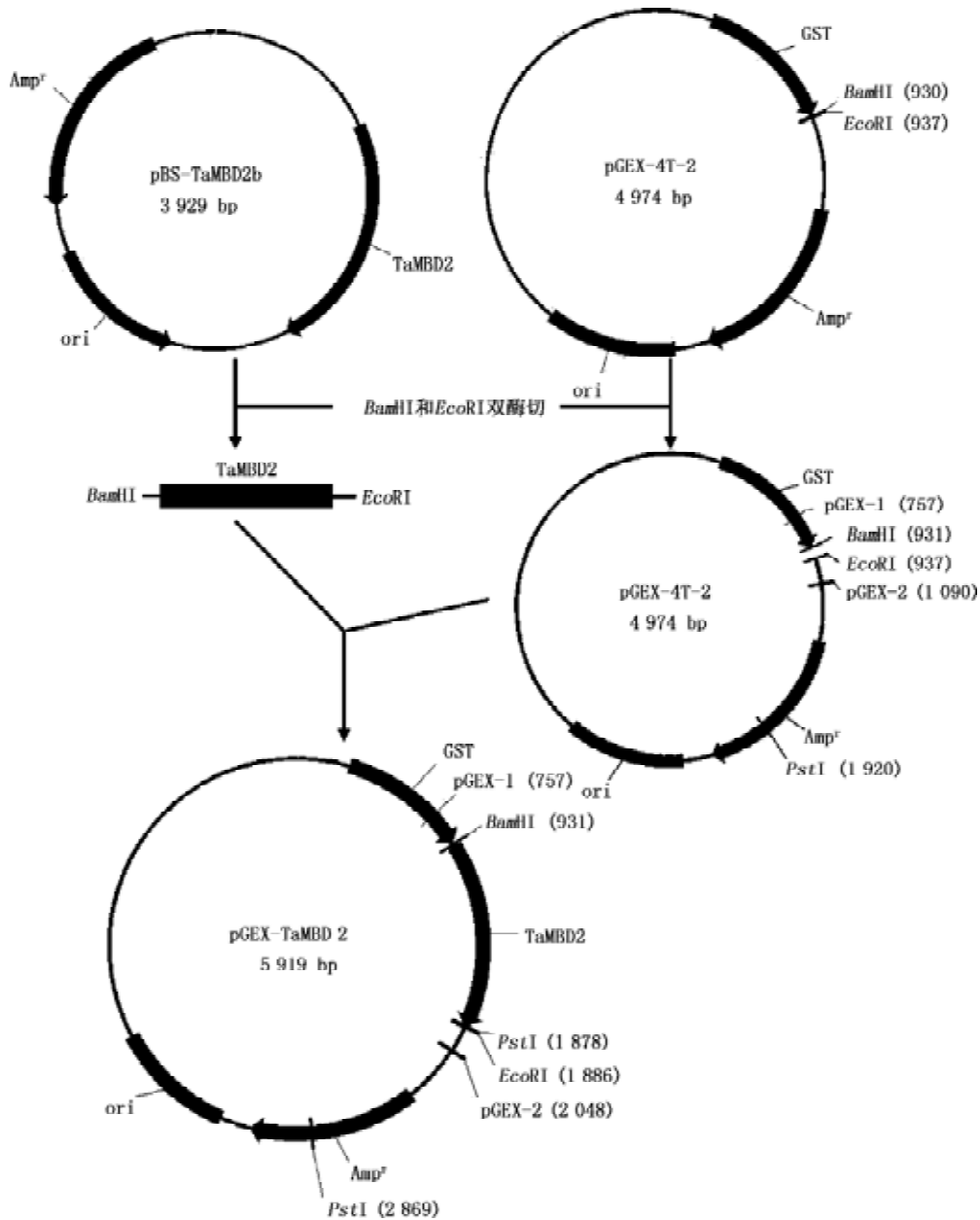


图1 重组载体 pGEX-TaMBD2 的构建示意图

Fig.1 Diagram of constructing the recombinant vector pGEX-TaMBD2

研究结果确定融合蛋白 GST-TaMBD2 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株中诱导表达的最佳 IPTG 浓度为 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导时间为 6 h。

讨 论

依赖于 DNA 甲基化的基因表达调控是维持植物正常生长发育的表观遗传学调控机制 (Cao 等 2000; Finnegan 等 1996, 2000; Takeda 和 Paszkowski 2006)。甲基结合域蛋白 (MBD) 是一类能特异识别

甲基化 DNA 的反式作用因子, 直接参与依赖于 DNA 甲基化的基因表达调控及 DNA 修复等生物学过程。因此, 分析 MBD 蛋白功能对探讨真核生物基因表达调控和个体发育机制都很重要。MBD 蛋白的原核表达和纯化是探讨 MBD 蛋白与甲基化 DNA 的结合及相关生物学功能的前提, 本文构建的小麦 TaMBD2 的原核表达载体和融合蛋白诱导表达条件的优化只是初步的研究, 这一基因的生物学功能分析尚待深入。

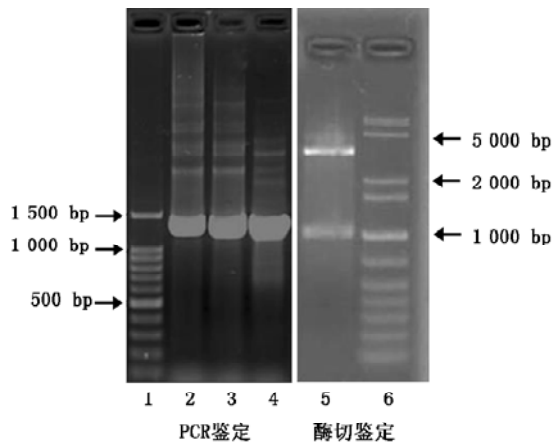


图2 重组载体 pGEX-TaMBD2 的鉴定

Fig.2 Identification of the recombinant vector pGEX-TaMBD2

1、6: DNA 分子量标准; 2~4: 重组克隆的 PCR 鉴定; 5: 重组载体的酶切鉴定。

本文中所用的原核表达载体包含有编码谷胱甘肽转移酶(GST)的标签序列, 极大地方便了原核表达融合蛋白的分离和纯化。Zemach 和 Grafi (2003)曾成功地用这一系统在大肠杆菌中高效大量的表达了拟南芥的7个MBD蛋白, 并分析了它们与甲基化DNA的结合特性。本文构建的原核表达载体pGEX-TaMBD2, 其融合蛋白GST-TaMBD2在宿主菌 BL21 (DE3)中已获得了稳定高效的表达。另外, 在融合蛋白的 GST 标签和 TaMBD2 多肽之间有一个可被凝血酶和 Xa 因子识别的蛋白酶切位点, 通过蛋白酶的切割可以产生天然的TaMBD2蛋白, 这为TaMBD2蛋白功能的进一步分析奠定了基础。

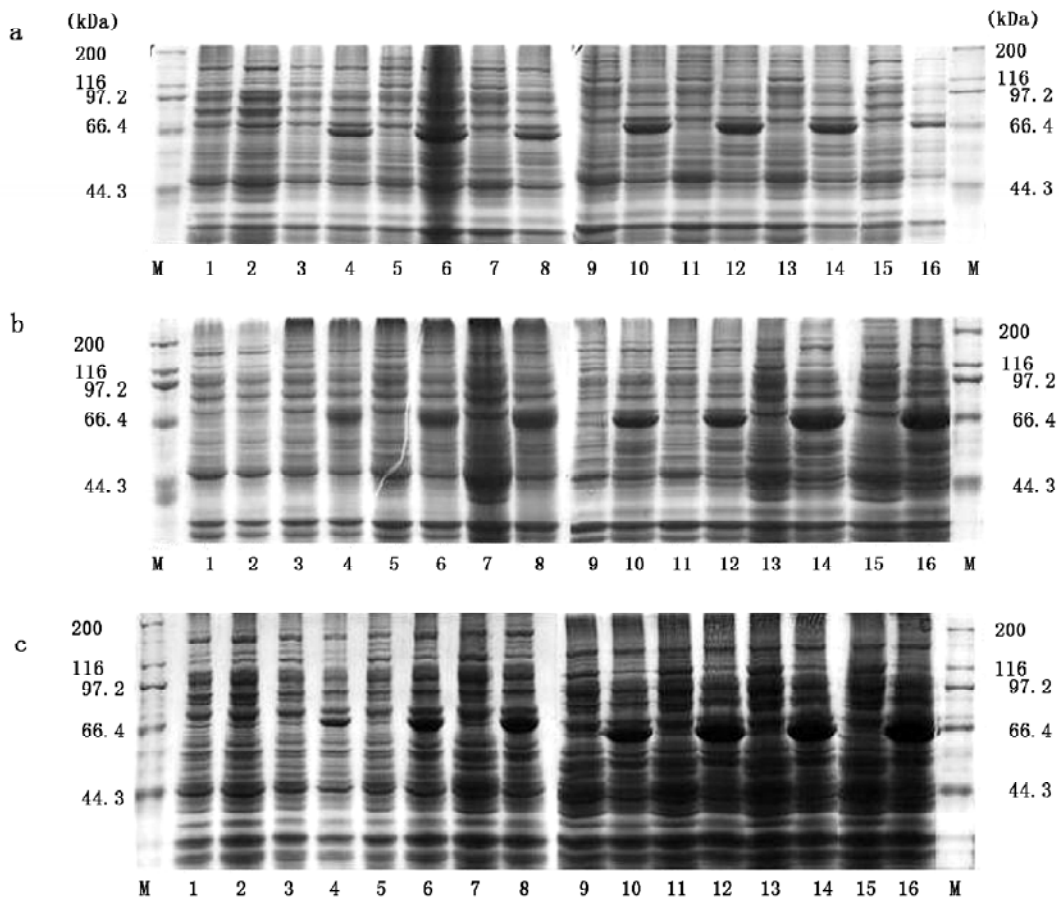


图3 不同浓度 IPTG 诱导的重组菌总蛋白的 SDS-PAGE 电泳结果

Fig.3 SDS-PAGE electrophoresis of total proteins in recombinant bacterium induced by different concentrations of IPTG

a、b 和 c 分别为 0.3、0.5 和 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 诱导。M: 标准蛋白分子量; 1~16: 偶数编号分别对应于诱导 0、1、2、3、4、6、8 和 10 h 的重组菌的总蛋白, 奇数编号分别为相应的非重组对照菌。

参考文献

- Cao XF, Springer NM, Muszynskii MG, Phillips RL, Kaeppler S, Jacobsen SE (2000). Conserved plant genes with similarity to mammalian *de novo* DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 (9): 4979~4984
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 8449~8454
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000). DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Curr Opin Gene Dev*, 10 (2): 217~223
- Grafi G, Zemach A, Pitto L (2007). Methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins in plants. *BBA-Gene Struct Expr*, 1769: 287~294
- Ito M, Koike A, Koizumi N, Sano H (2003). Methylated DNA-binding proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 133 (4): 1747~1754
- Jørgensen HF, Bird A (2002). MeCP2 and other methyl-CpG binding proteins. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, 8 (2): 87~93
- Li YC, Meng FR, Yin J, Liu HY, Si ZF, Ni ZF, Sun QX, Ren JP, Niu HB (2008). Isolation and comparative expression analysis of six MBD genes in wheat. *BBA-Gene Regul Mech*, 1779: 90~98
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393 (6683): 386~389
- Ng HH, Jeppesen P, Bird A (2000). Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol*, 20: 1394~1406
- Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, Johnson CA, Turner BM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D, Bird A (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet*, 23: 58~61
- Scebba F, Bernacchia G, Bastiani MD, Evangelista M, Cantoni RM, Cella R, Locci MT, Pitto L (2003). *Arabidopsis* MBD proteins show different binding specificities and nuclear localization. *Plant Mol Biol*, 53: 755~771
- Springer NM, Kaeppler SM (2005). Evolutionary divergence of monocot and dicot methyl-CpG-binding domain proteins. *Plant Physiol*, 138 (1): 92~104
- Takeda S, Paszkowski J (2006). DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Chromosoma*, 115 (1): 27~35
- Zemach A, Grafi G (2003). Characterization of *Arabidopsis thaliana* methyl-CpG-binding domain (MBD) proteins. *Plant J*, 34 (5): 565~572
- Zemach A, Li Y, Wayburn B, Ben-Meir H, Kiss V, Avivi Y, Kalchenko V, Jacobsen SE, Grafi G (2005). DDM1 binds *Arabidopsis* methyl-CpG binding domain proteins and affects their subnuclear localization. *Plant Cell*, 17: 1549~1558