

## 拟南芥 DREB 1A 转录因子的原核表达和多克隆抗体制备

范玉清<sup>1,2</sup>, 刘恒<sup>1,3</sup>, 任伟<sup>1</sup>, 夏光敏<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 山东大学生命科学院细胞工程遗传研究所, 济南 250100; <sup>2</sup> 山西长治学院生物化学系, 山西长治 046011; <sup>3</sup> 山东中医药大学基础医学院分子生物学实验室, 济南 250014

### Prokaryotic Expression of *Arabidopsis thaliana* DREB 1A Transcripotor and Preparation of Its Polyclonal Antibody

FAN Yu-Qing<sup>1,2</sup>, LIU Heng<sup>1,3</sup>, REN Wei<sup>1</sup>, XIA Guang-Min<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Plant Cell Engineering and Genetic Institute, School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China; <sup>2</sup>Biology and Chemistry Department of Changzhi College, Changzhi, Shanxi 046011, China; <sup>3</sup>Molecular Biology Laboratory, College of Basic Medicine, Shandong Traditional Chinese Medicine University, Jinan 250014, China

摘要: 采用 PCR 技术, 从质粒 pCAMBIA 1301/DREB 1A 中扩增拟南芥 DREB 1A 转录因子的编码序列, 并将其插入原核表达载体 pGEX-4T-1 中诱导表达, 获得分子量约 50.4 kDa 的融合蛋白, 经融合蛋白纯化酶切后免疫家兔获得 DREB 1A 转录因子特异性的多克隆抗体, 经酶联免疫吸附测定表明, 所制备的多克隆抗体的稀释倍数为 25 600 时, 显色仍清晰可见。

关键词: 拟南芥 DREB 1A 转录因子; 原核表达; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附测定

运用现代分子生物学技术, 阐明植物抗逆机制, 获得抗逆性状优良的品种十分重要。脱水应答元件结合蛋白(dehydration responsive element binding protein, DREB)的发现是近年来植物抗逆研究中最具突破性的进展(王少峡等 2004)。植物转录因子 DREB 在干旱、高盐及低温胁迫信号传递中起重要作用, 它能与脱水应答元件(dehydration responsive element, DRE)特异结合(Gilmour 等 1998), 在低温、干旱、高盐胁迫条件下调控有关的功能基因的表达, 且表达不依赖 ABA 信号转导途径。DREB 转录因子的基因陆续从各种植物中得到克隆, 在 GenBank 中公布的就达 70 多个, DREB 基因家族得以不断丰富和完善。在 DREB 转基因植物中, DREB 转录因子基因的过量表达可以激活靶基因的表达, 提高植物对低温、干旱等逆境的忍耐力(Liu 等 1998; Dubouzet 等 2003; Qin 等 2004; Seki 等 2003)。转录因子能特异结合 DRE/CRT 顺式作用元件, 调控启动子中含有 DRE/CRT 元件的一类逆境应答基因的表达, 增强植物对多种逆境的抵抗和适应能力, 这对从整体上增强植物的抗逆性, 提高其稳产性, 有巨大的应用前景。因此采用转录因子改良植物抗逆性, 可能会获得较为理想的综合效果。

现已从拟南芥中克隆及鉴定的 DREB 基因有 2 大类, 即 DREB 1 类和 DREB 2 类, 1 类分别命名为 DREB 1A、DREB 1B 和 DREB 1C; 2 类分别命名为 DREB 2A 和 DREB 2B (Liu 等 1998)。本文中使用的 DREB 1A 基因来自拟南芥。用特异性引物从质粒 pCAMBIA 1301/DREB 1A 上 PCR 扩增 DREB 1A 转录因子的编码序列, 构建了 DREB 1A 原核表达载体。纯化制备蛋白免疫家兔获得多克隆抗体, 酶联免疫吸附测定(ELISA)检测表明其具有多抗的效价。

### 材料与方法

#### 1 材料与试剂

质粒 pCAMBIA 1301/DREB 1A 由清华大学刘强先生惠赠, pCAMBIA 1301 质粒是 Ti 质粒(tumor-inducing plasmid, 瘤诱导质粒), 因此它具有卡那霉素抗性(Kan<sup>R</sup>)和潮霉素抗性(Hyg<sup>R</sup>)。原核表达载体 pGEX-4T-1 为融合载体, 其主要特征

收稿 2007-03-29 修定 2007-05-28

资助 国家转基因专项基金(2003/5250322)和国家基础研究发展计划(973 计划)(2006CB100100)。

\* 通讯作者(E-mail: xiagm@sdu.edu.cn; Tel: 0531-86333679)。

是: IPTG 诱导的强启动子、谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione *S*-transferase, GST) 基因、凝血酶 (thrombin) 切割序列、氨苄青霉素抗性 (Amp<sup>R</sup>)、*lacI*<sup>q</sup> 等位基因、胞质表达 GST- 融合蛋白、直接进行 5' pGEX 或 / 和 3' pGEX 测序。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 表达菌株 BL21 (DE3) (由我们实验室保存) 是一种表达菌株, 其染色体上带有阻断 DE3 区中 *T7 1* 基因转录的 *lacI* 基因, 具有氯霉素抗性 (CmI<sup>R</sup>)。实验兔为纯种新西兰雄性兔 (体重 2.0~2.5 kg), 购自山东省农业科学院。主要试剂购自大连宝生物公司和上海生工公司。

## 2 pGEX-4T-1/DREB 1A 原核表达载体的构建

从含 pCAMBIA 1301/DREB 1A 的大肠杆菌中提取质粒, 用上游引物 5' TAGGATCCATGAACTCATTCTCTGCTT 3' (划线处为 *Bam*HI 位点) 和下游引物 5' GCGAATTCCTAATAACTCCATAACG 3' (划线处为 *Eco*RI 位点) 进行 PCR 扩增, 得到 667 bp 的 *DREB 1A* 基因编码序列; *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用凝胶回收试剂盒 (购自大连宝生物) 纯化回收, 定向插入原核表达载体 pGEX-4T-1, 构建 GST-DREB1A 融合蛋白表达重组载体 pGEX-4T-1/DREB 1A, 用重组载体转化感受态菌株 BL21 (DE3), 提取质粒后酶切鉴定重组体, 并 DNA 测序验证。

## 3 融合蛋白的原核表达

挑取经鉴定的阳性单菌落, 接种至含 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  氨苄青霉素和 170  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  氯霉素的 LB 培养液, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡培养过夜。次日, 以 1:100 的体积比接种于另一新鲜的含抗生素的 LB 液体培养基, 继续培养至 OD<sub>600</sub> 约为 0.6, 用终浓度为 1  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 IPTG 于 37  $^{\circ}\text{C}$  下诱导 8 h 后, 以 12 000 $\times$ g 离心 1 min 收集菌体。沉淀悬于 100  $\mu\text{L}$  1 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 [50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris·HCl (pH 6.8)、100  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT、2% SDS、0.1% 溴酚蓝、10% 甘油], 100  $^{\circ}\text{C}$  下加热 3 min, 室温下以 12 000 $\times$ g 离心 1 min。用 SDS-PAGE 电泳检测, 分离胶浓度为 12%。

## 4 融合蛋白状态的确定

离心诱导菌液, 以 PBS (0.14  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl、0.0027  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl、0.01  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.0018  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.3) 重悬菌体 [50

$\mu\text{L}\cdot\text{mL}$  (菌液)]。于冰水上以超声波 (500 W; 5 s 间歇, 5 s 超声波, 共 10 min) 裂解菌体, 离心后分别收集上清液和沉淀, 进行 SDS-PAGE 电泳, 证实融合蛋白是否以包涵体形式存在。

## 5 包涵体的纯化

裂解菌体后, 包涵体纯化参照 Saito 等 (1987) 和 Bartholomé-De Belder 等 (1998) 文中的方法进行。纯化后的包涵体经脲变性, Tris 碱缓冲液透析, 冷冻干燥后存于 -20  $^{\circ}\text{C}$  备用。

## 6 多克隆抗体的制备

根据谷胱甘肽琼脂糖凝胶 (Glutathione Sepharose)<sup>TM</sup> 4B (Amersham-Pharmacia Biotech) 说明书, 于 23  $^{\circ}\text{C}$  凝血酶消化 GST/DREB 1A 融合蛋白 3 h, 消化产物经 SDS-PAGE 电泳分离回收 DREB 1A 蛋白。纯化的 DREB 1A 蛋白 (200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 加入 1.5 倍体积的磷酸盐缓冲生理盐水和弗氏完全佐剂, 研磨使其相互融合达到油包水状态。采用多点皮内注射免疫健康新西兰兔, 14 d 后加强免疫 (佐剂为弗氏不完全佐剂) 1 次, 以后每隔 9 d 加强免疫 (佐剂为弗氏不完全佐剂) 5 次。10 d 后, 从耳静脉取血。

## 7 抗体效价的鉴定

以酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测抗体效价, 抗原 DREB 1A 用包被液 (0.05  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  碳酸盐缓冲液, pH 9.6) 稀释至 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 每凹孔加 100  $\mu\text{L}$ , 包被反应孔以 2% BSA 封闭, 免疫前的兔抗血清为阴性对照, 免疫后的兔抗血清依 2 倍稀释分别加入包被的反应孔中, 二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体 (1:2 000), 用 NBT/BCIP 染色试剂盒 (华美生物工程公司) 显色。整个反应的洗涤液为 0.01  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  0.05% PBS-Tween-20 (pH 7.4)。

## 实验结果

### 1 pGEX-4T-1/DREB 1A 原核表达载体的构建和鉴定

以 pCAMBIA 1301/DREB 1A 质粒为模板, 用设计的特异引物 PCR 扩增出约 667 bp 的 DNA 片段 (图 1), 与预期的片段长度相符。回收产物后, 用引物引入的 *Bam*HI 和 *Eco*RI 位点, 将其插入原核表达载体 pGEX-4T-1 相应的酶切位点, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)。酶切鉴定出阳性克隆 (图 2),

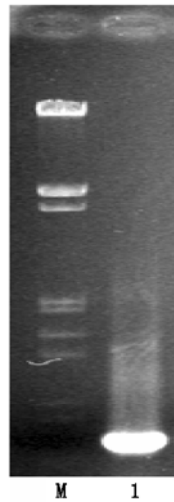


图1 *DREB 1A*的PCR扩增

M:  $\lambda$ DNA *Hind*III/*Eco*RI 双酶切DNA标准; 1: PCR扩增产物。

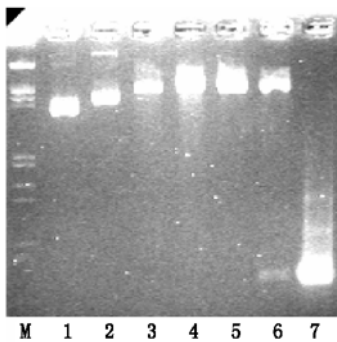


图2 pGEX-4T-1/*DREB 1A*的酶切鉴定

M:  $\lambda$ DNA *Hind*III/*Eco*RI 双酶切DNA标准; 1: pGEX-4T-1; 2: 阳性克隆质粒; 3: *Eco*RI 酶切pGEX-4T-1; 4: *Eco*RI 酶切阳性克隆质粒; 5: *Bam*HI 酶切阳性克隆质粒; 6: *Bam*HI/*Eco*RI 酶切阳性克隆质粒; 7: *DREB 1A*的PCR产物。

结果表明, 构建的重组质粒pGEX-4T-1/*DREB 1A*阅读框正确。

## 2 融合蛋白GST-*DREB 1A*的诱导表达

IPTG诱导后的大肠杆菌BL21 (DE3)的细胞粗提物进行SDS-PAGE的结果(图3)显示, 对照菌株(BL21/pGEX-4T-1)表达了26.2 kDa的GST特异条带, 而重组菌株(pGEX-4T-1/*DREB 1A*)呈现出一条新蛋白条带, 其大小与融合蛋白(GST-*DREB 1A*)的大小(50.4 kDa = 26.2 kDa+24.2 kDa)相一致, 表明插入的外源基因片段已经成功地在大肠杆菌中表达, 并与GST形成融合蛋白。

## 3 融合蛋白GST-*DREB 1A*的纯化

诱导后的菌体进行超声波破碎、离心后, 沉淀和上清液分别进行SDS-PAGE, 融合蛋白主要存在于沉淀中, 说明融合蛋白是以包涵体形式存在于细胞中的(图4), 因此必须纯化。SDS-PAGE分析表明, 包涵体经纯化后, 考马斯亮蓝染色仅显示出GST-*DREB 1A*融合蛋白一条带, 没有其它蛋白条带(图5)。

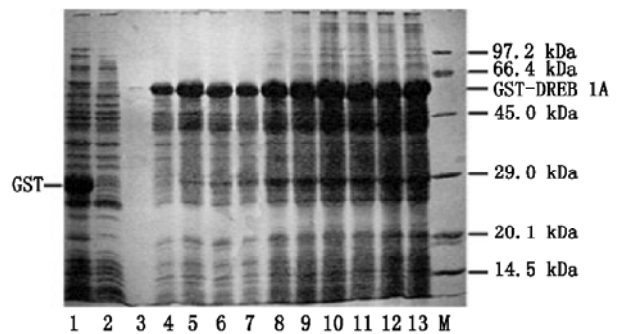


图3 IPTG诱导后融合蛋白的SDS-PAGE

M: 低分子量蛋白标准; 1: IPTG诱导4 h的BL21/pGEX-4T-1菌体蛋白; 2: IPTG诱导前的pGEX-4T-1/*DREB 1A*菌体蛋白; 3~13: IPTG诱导1~11 h的pGEX-4T-1/*DREB 1A*菌体蛋白。

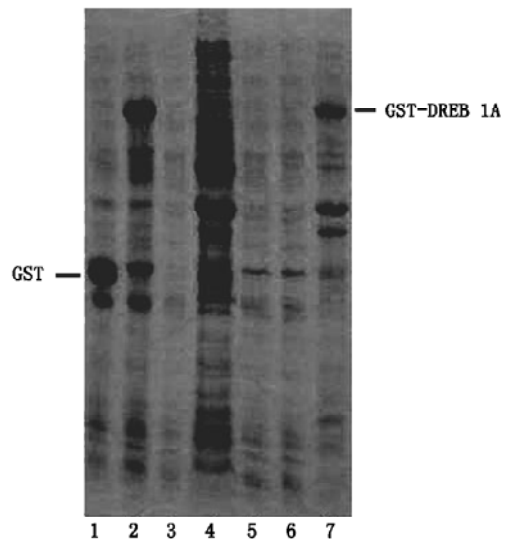


图4 诱导后破碎离心的pGEX-4T-1/*DREB 1A*的SDS-PAGE

1: 对照菌体(BL21/pGEX-4T-1)蛋白; 2: pGEX-4T-1/*DREB 1A*菌体蛋白; 3: BL21菌体上清液; 4: BL21菌体沉淀; 5、6: pGEX-4T-1/*DREB 1A*菌体上清液; 7: pGEX-4T-1/*DREB 1A*菌体沉淀。

#### 4 融合蛋白 GST-DREB 1A 的切割获得

用完整的 DREB 1A 蛋白作抗原, 需要提高融合蛋白配偶体, 即提高 GST 羧基端的牛凝血酶识别位点的切割效率。凝血酶切割融合蛋白的 SDS-PAGE 结果(图 6)表明: 酶切温度为 23 和酶切时间 3 h 的 GST 羧基端的凝血酶识别位点的切割效率最高, 可获得大量的全长 DREB 1A 蛋白。可直接从 SDS-PAGE 胶上切割靶蛋白 DREB 1A 用作抗原免疫家兔。

#### 5 抗体的特异性分析

经 DREB 1A 抗原免疫新西兰兔获得的抗血清, 以 ELISA 分析的结果(图 7)表明, ELISA 检测显色反应的信/噪比大, 效果好; 所制备的抗血清特

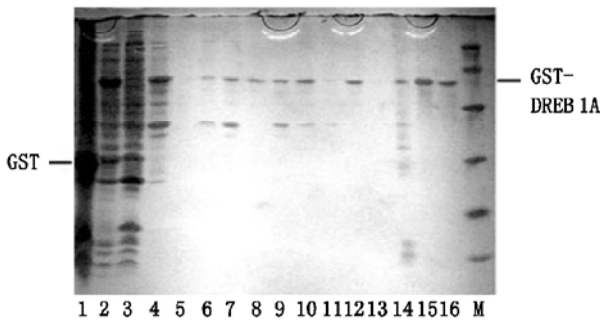


图 5 纯化后融合蛋白 GST-DREB 1A 的 SDS-PAGE

M: 低分子量蛋白标准; 1: IPTG 诱导 4 h 的 BL21/pGEX-4T-1 菌体蛋白; 2: IPTG 诱导 4 h 的重组菌体蛋白; 3: BL21 菌体蛋白; 4~6: 分别为第 1 次 27% 蔗糖溶液 12 000×g 离心后的蔗糖溶液、上清和沉淀; 7、8: 第 2 次 27% 蔗糖溶液 12 000×g 离心后的上清和沉淀; 9、10: 第 3 次 12 000×g 离心后的上清和沉淀; 11、12: 第 4 次 12 000×g 离心后的上清和沉淀; 13: 第 5 次 12 000×g 离心后的上清; 14: 8 mol·mL<sup>-1</sup> 的脲溶解包涵体后 20 000×g 离心后的沉淀; 15、16: 8 mol·mL<sup>-1</sup> 的脲溶解包涵体后 20 000×g 离心后的上清。

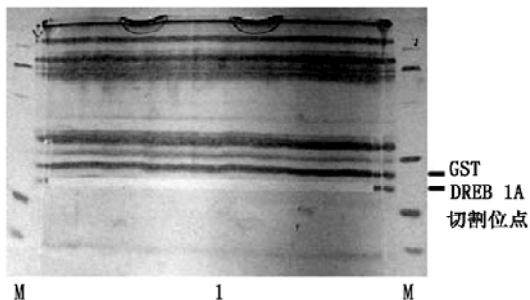


图 6 凝血酶切割融合蛋白的 SDS-PAGE

M: 低分子量蛋白标准; 1: 凝血酶切割融合蛋白 GST-DREB 1A。

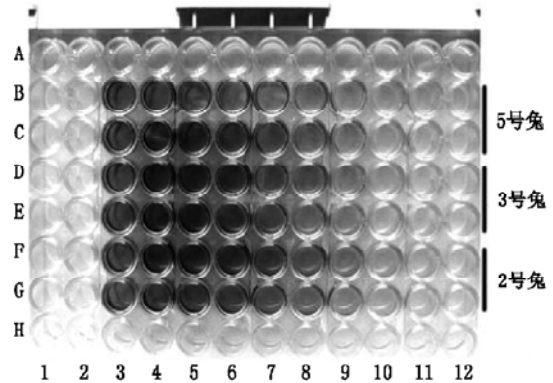


图 7 抗血清 ELISA 的结果

第 1 列 B 和 C、D 和 E、F 和 G 行每孔仅加 100 μL 包被液(无抗原), 分别加 5 号兔、3 号兔和 2 号兔抗血清(稀释倍数 800); 第 2 列 B 和 C、D 和 E、F 和 G 行每孔加 100 μL (50 μg·mL<sup>-1</sup>) 抗原, 分别加 5 号兔、3 号兔和 2 号兔免疫前血清(稀释倍数 200); 第 3~12 列 B 和 C、D 和 E、F 和 G 分别为 5 号兔、3 号兔和 2 号兔抗血清不同的稀释倍数, 3~12 的稀释倍数分别为 100、200、400、800、1 600、3 200、6 400、12 800、25 600、51 200。

异性强, 灵敏度高, 在稀释倍数为 25 600 时仍能看到显色信号, 说明达到了抗体制备的要求。

## 讨 论

通过基因工程手段构建的原核表达质粒 pGEX-4T-1/DREB 1A 结构正确, 未出现核苷酸的移码和突变。在 IPTG 诱导下 GST-DREB 1A 可稳定而高效表达并以包涵体形式存在于表达菌株的细胞中。如果表达靶蛋白的目的只是用于产生抗体, 则不需要获得活性蛋白, 包涵体的形成可使得目的蛋白易于纯化且成本下降。用凝血酶切割获得的靶蛋白 DREB 1A 用于免疫家兔获得效价高、特异性强的抗 DREB 1A 的多克隆抗体。在免疫家兔时, 为避免抗原产生副作用及对动物的损坏, 第一次免疫用弗氏完全佐剂, 随后的免疫均采用弗氏不完全佐剂。我们实验室制备的多抗比进口的造价低, 还可用于免疫荧光、石蜡切片等(Comijn 等 2001)。用本文方法制备的 DREB 1A 多克隆抗体我们正准备用于转基因小麦 DREB 1A 基因表达的 Western 印迹检测。

## 参考文献

王少峡, 王振英, 彭永康(2004). DREB 转录因子及其在植物抗逆中的作用. 植物生理学通讯, 40 (1): 7~13

- Bartholomé-De Belder J, Nguyen-Disteche M, Houba-herin N, Ghuysen JM, Maruyama IN, Hara H, Hirota Y, Inouye M (1998). Overexpression, solubilization and refolding of a genetically engineered derivative of the penicillin-binding protein 3 of *Escherichia coli* K12. *Mol Microbiol*, 2: 519~525
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell*, 7 (6): 1267~1278
- Dubouzet JG, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet EG, Miura S, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003). *Os-DREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 33 (4): 751~763
- Gilmour SJ, Zarka DG, Stockinger EJ, Salazar MP, Houghton JM, Thomashow MF (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced *COR* gene expression. *Plant J*, 16: 433~442
- 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: 1391~1406
- Qin F, Sakuma Y, Li J, Liu Q, Li YQ, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant Cell Physiol*, 45 (8): 1042~1052
- Saito Y, Yamada H, Niwa M, Ueda I (1987). Production and isolation of recombinant somatomedin C. *J Biochem*, 101: 123~134
- Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2003). Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. *Curr Opin Biotechnol*, 14: 194~199