

水稻 NADP- 苹果酸酶的原核表达、纯化和抗体制备

程玉祥*, 柳参奎

东北林业大学盐碱地生物资源环境研究中心, 哈尔滨 150040

摘要: 构建了水稻 *NADP-ME₂* 基因 cDNA 的原核表达载体 pQE30, 并诱导表达出有生物学功能的融合蛋白。用 Ni-NTA 琼脂糖亲和层析纯化出 NADP-ME₂ 融合蛋白, 并测定了融合蛋白酶学特性 (V_{max} , K_m , K_{cat} , 底物特异性)。用纯化的 NADP-ME₂ 融合蛋白免疫家兔, 制备出抗水稻 NADP-ME 特异性抗体。全蛋白双向电泳后 Western 印迹表明水稻中至少有 4 个 NADP-ME 家族蛋白质成员。

关键词: 水稻; NADP-ME₂; 原核表达; 酶学特性; 抗体

Prokaryotic Expression, Purification and Antibody Production of Rice (*Oryza sativa* L.) NADP-Malic Enzyme

CHENG Yu-Xiang*, LIU Shen-Kui

Alkali Soil Natural Environmental Science Center, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Rice *NADP-ME₂* cDNA was constructed into prokaryotic expression vector (pQE30), and its biologically active fusion protein was expressed. NADP-ME₂ fusion protein was purified by Ni-NTA agarose affinity chromatography, and its enzyme properties such as V_{max} , K_m , K_{cat} , and substrate specificity were detected. Purified NADP-ME₂ fusion protein was used to immunize rabbit. Anti-rice NADP-ME specific antibody was obtained. Four members of NADP-ME family protein had been detected by Western blot from rice total proteins after two-dimensional gel electrophoresis.

Key words: rice (*Oryza sativa*); NADP-ME₂; prokaryotic expression; enzyme property; antibody

苹果酸酶(malic enzyme, ME)是生物体内苹果酸代谢中的关键酶之一。在二价金属离子存在下, ME 催化苹果酸氧化脱羧生成丙酮酸、CO₂ 和 NAD(P)H (Chang 和 Tong 2003)。根据结合辅酶因子的不同, ME 分为 NAD- 苹果酸酶(NAD-ME, EC1.1.1.39)和 NADP- 苹果酸酶(NADP-ME, EC1.1.1.40)。编码 NADP-ME 的是多基因家族, Wheeler 等(2005)认为拟南芥基因组中有 4 个 NADP-ME 基因。植物体内 NADP-ME 参与不同代谢途径(Drincovich 等 2001), 根据行使功能的不同将 NADP-ME 分为光合型与非光合型。位于 C₄ 植物维管束鞘细胞叶绿体(bundle sheath chloroplast)中的 NADP-ME 催化苹果酸氧化脱羧, 生成的 CO₂ 用于 Rubisco 酶的光合碳固定(Rothemel 和 Nelson 1989; Edwards 和 Andreo 1992), 景天酸代谢(crassulacean acid metabolism, CAM)的植物细胞质中 NADP-ME 也参与光合作用(Honda 等 2000)。最近的一些研究报道, C₃ 植物 NADP-ME 与植物防御反应或逆境响应(plant defense reactions/stress

responses)相关(Pinto 等 1999; Casati 等 1999b)。但 NADP-ME 参与植物防御反应或逆境响应的具体机制还不清楚。

C₃ 植物水稻 NADP-ME 也是多基因编码的。1994 年 Fushimi 等分离出水稻质体型 *NADP-ME*。最近, 我们分离了盐碱逆境下的水稻 *NADP-ME₂*, 过量表达 *NADP-ME₂* 的拟南芥, 其抗盐和耐渗透胁迫能力明显提高(Liu 等 2007)。另外, 过量表达水稻细胞质 *NADP-ME* 的拟南芥抗盐性也明显增强(Cheng 和 Long 2007)。Chi 等(2004)的研究表明, 水稻 *NADP-ME* 家族基因各自的 mRNA 表达模式存在明显差异。本文中我们将水稻的 *NADP-ME₂* (GenBank accession No. AB053295) cDNA 片段插入到 pQE30 载体, 并在 M15 大肠杆菌中进

收稿 2007-06-26 修定 2007-08-28

资助 国家高科技研究发展计划(2002AA241111)和东北林业大学校立科研基金。

* E-mail: chengyuxiang111@sina.com.cn; Tel: 0451-82191402

行了表达,同时对其进行了纯化,得到NADP-ME₂融合蛋白;随后分析了所纯化融合蛋白的酶学特性并制备出特异性的NADP-ME多克隆抗体。用此种NADP-ME抗体进行分析的结果表明水稻中至少有4个NADP-ME蛋白质成员。现报道如下。

材料与方 法

构建水稻NADP-ME₂原核表达载体的引物(P1、P2)为5'-GGTACCATGGAGAGCACCATGAAGGG-3'和5'-CTGCAGTCACCGGTAGT-TGCGGTA AAA-3',以本实验室保存的已插入了水稻NADP-ME₂全长cDNA重组质粒pMD18-T-NADP-ME₂为模板,PCR扩增出目的片段,并插入到表达载体pQE30(QIAGEN公司)。经DNA测序得到重组质粒pQE30-NADP-ME₂,重组质粒DNA转化M15菌株(QIAGEN公司)。挑取阳性克隆,用于融合NADP-ME₂原核表达和纯化。

阳性克隆于LB培养基37℃过夜培养,次日按1:100比例接种到新鲜LB培养基中,继续培养至OD₆₀₀值约为0.6,加诱导物异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)终浓度至1 mmol·L⁻¹,诱导表达NADP-ME₂融合蛋白。为获得NADP-ME₂融合蛋白的最佳可溶性表达条件,实验进行了不同培养温度(20~37℃)、IPTG浓度(0.01~1 mmol·L⁻¹)及诱导时间(3~16 h)的优化。

融合蛋白纯化过程为:用1.5 L细菌培养物离心后收集的菌体重悬于溶液A(50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 15 mmol·L⁻¹ 咪唑, 0.5% Triton X-100, 1 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟, pH 8.0)中,加入溶菌酶终浓度至1 mmol·L⁻¹,混匀、冰置45 min后于4℃下以35 000×g离心30 min,取出的上清液粗蛋白用Ni-NTA琼脂糖层析柱(1.5 cm×5 cm)分离,得到的融合蛋白以Ni-NTA琼脂糖亲和;加100 mL溶液B(30 mmol·L⁻¹ 咪唑,其余成分与溶液A相同)冲洗层析柱、去除杂蛋白;用1.5 mL溶液C(50 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 300 mmol·L⁻¹ NaCl, 300 mmol·L⁻¹ 咪唑, pH 8.0)竞争洗脱融合蛋白。融合蛋白于4℃下以溶液D(10 mmol·L⁻¹ NaH₂PO₄, 100 mmol·L⁻¹ NaCl, 1 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟, pH 8.0)透析16 h。收集纯化的融合蛋白,用于SDS-PAGE、酶学特性分析及抗体

制备。

蛋白质含量测定参照Bradford(1976)的方法。

NADP-ME酶活测定参照Cheng等(2006)的方法。

NADP-ME抗体制备和检测效价时,以纯化的水稻融合蛋白NADP-ME₂作为抗原,与1 mL弗氏完全佐剂混匀,按常规程序免疫家兔,共免疫4次。取血,于4℃下析出血清,分离出的血清加入0.02%叠氮钠,进行ELISA效价检测。

提取植物总蛋白和水稻全蛋白双向电泳时,水稻种子于温室中正常发芽、生长至14 d,幼苗总蛋白的提取及其双向电泳方法参照Yan等(2005)文中的方法。另外,取水稻、小麦、玉米、高粱和芦荟(*Aloe vera* L.)幼苗组织1 g液氮研磨、加入提取缓冲液(75 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5; 0.1% Triton X-100; 1 mmol·L⁻¹ EDTA; 1 mmol·L⁻¹ DTT; 1 mmol·L⁻¹ 苯甲基磺酰氟)悬浮,于4℃下以13 000×g离心15 min,得到的上清液直接用于SDS-PAGE。

Western印迹分析时,将SDS-胶中蛋白电转移至硝酸纤维膜(NC)上,膜用含3%脱脂奶粉TBS封闭2 h,用TBS(含0.05% Tween-20)洗膜4次,每次5 min。以1:5 000比例加入一抗,于30℃下轻摇1 h,用TBS(含0.05% Tween-20)洗膜4次,每次5 min。以1:2 000比例加入二抗(碱性磷酸酶标记羊抗兔),30℃下轻摇1 h,用含0.05% Tween-20的TBS洗膜4次,每次5 min,加BCIP/NBT显色。

结果与讨论

1 水稻NADP-ME₂融合表达质粒的构建

PCR扩增的水稻NADP-ME₂开放阅读框(open read frame, ORF) cDNA片段,其长度约为1.8 kb(图1),与预期片段长度相符。双酶切后装入pQE30载体,DNA测序表明融合的NADP-ME₂开放阅读框序列完全正确。重组表达质粒pQE30-NADP-ME₂转化入M15菌株,挑取阳性克隆用于NADP-ME₂融合蛋白表达与纯化。

2 水稻NADP-ME₂融合蛋白表达与纯化

37℃下IPTG终浓度为1 mmol·L⁻¹诱导1 h和3 h后,以SDS-PAGE分析的结果表明:M15高

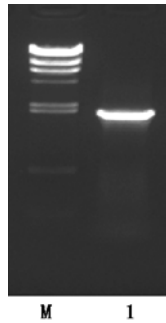
图1 水稻 $NADP-ME_2$ 开放阅读框 cDNA 的扩增

Fig.1 Amplification of rice $NADP-ME_2$ cDNA ORF fragment

M: DNA maker (*Hind*III 酶切 λ DNA); 1: PCR 产物。

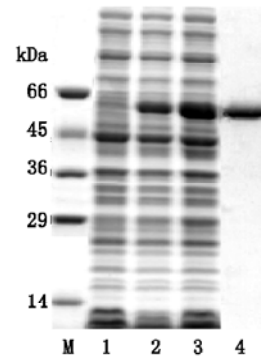
图2 水稻 $NADP-ME_2$ 融合蛋白的表达和纯化

Fig.2 Expression and purification of rice $NADP-ME_2$ fusion protein

1: 未诱导重组菌体总蛋白; 2: 诱导 1 h 重组菌体总蛋白; 3: 诱导 3 h 重组菌体总蛋白; 4: 纯化的 His- $NADP-ME_2$; M: 标准蛋白的分子量。

水平地表达了分子量约为 62 kDa 的融合蛋白(图 2), 与预期的 $6\times$ His- $NADP-ME_2$ 融合蛋白分子量一致。但在此种条件下纯化得到的融合蛋白大部分以不溶性方式存在。因此, 又分别作了不同温度(20~37 $^{\circ}$ C)、IPTG 诱导物浓度(0.01~1 mmol \cdot L $^{-1}$)和诱导时间(3~16 h)的实验, 确定优化的融合蛋白诱导表达条件为: 28 $^{\circ}$ C、0.15 mmol \cdot L $^{-1}$ IPTG 及 6 h 的诱导时间(资料未列出)。在此种优化的诱导表达条件下, 诱导融合蛋白大量表达, 并以亲和层析法对 $6\times$ His- $NADP-ME_2$ 融合蛋白进行纯化。SDS-PAGE 表明纯化的融合蛋白纯度达到电泳纯(图 2)。

3 水稻 $NADP-ME_2$ 融合蛋白的酶学特性

对纯化的 $NADP-ME_2$ 融合蛋白进行了其酶学特性分析测定。酶活性检测的结果表明, 融合蛋白 $NADP-ME_2$ 具有较高的 $NADP-ME$ 特异活性。 $NADP-ME_2$ 融合蛋白的最适 pH 值约为 7.3 (资料未列出)。体外 20~35 $^{\circ}$ C 下 $NADP-ME_2$ 融合蛋白的酶活性能够保持稳定 7 h 以上, 并且酶活性差别不显著, 4 $^{\circ}$ C 下其酶活性在一周内下降不明显(资料未列出)。进一步分析 $NADP-ME_2$ 融合蛋白的酶促

动力学常数显示, $NADP-ME$ 酶促反应为双底物: L -苹果酸和 $NADP$, 改变其中一个底物的浓度测定 K_m 、 V_{max} , 其他底物和辅助因子浓度处于饱和状态, 测定单位时间内生成 $NADPH$ 量的结果表明, L -苹果酸底物浓度变化范围为 0.01~5 mmol \cdot L $^{-1}$, $NADP$ 底物浓度变化范围为 1~400 μ mol \cdot L $^{-1}$ 。 $NADP-ME_2$ 融合蛋白的酶促动力学常数 K_m 、 V_{max} 、 K_{cat} 及 K_{cat}/K_m 数值见表 1。另外, 实验还表明 Mg^{2+} 是 $NADP-ME_2$ 融合蛋白保持酶活性的辅助因子; NAD 代替 $NADP$ 用作底物时, 未检测到 $NADP-ME_2$ 融合蛋白酶活性(表 1), 这也表明它是 $NADP-ME$ 型。

不同光合类型的 C_4 植物玉米(Drincovich 等 1991)和盐木属植物(*Haloxylon persicum*) (Casati 等 1999a)、 C_3 植物小麦(Casati 等 1997)、CAM 植物冰花(*Mesembryanthemum crystallinum*) (Saitou 等 1992)和露草(*Aptenia cordifolia*) (Ferreira 等 2003)中, $NADP-ME$ 的分离纯化已有所报道。从 C_4 、CAM 及 C_3 不同光合类型植物中纯化的 $NADP-ME$

表 1 水稻 $NADP-ME_2$ 融合蛋白的酶促动力学特性Table 1 Enzymatic kinetic property of rice $NADP-ME_2$ fusion protein

$V_{max}/\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{nmol}^{-1}$		$K_m/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$		K_{cat}/s^{-1}		$K_{cat}/K_m/\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$		底物特异性	
苹果酸	$NADP$	苹果酸	$NADP$	苹果酸	$NADP$	苹果酸	$NADP$	Mg^{2+}	NAD
5.7	5.5	2 300	85	95.0	91.7	4.1×10^4	1.1×10^6	是	不是

表中数值是在 pH 7.3 (最适 pH)下测定的。

酶活性、最适 pH、酶动力学常数(K_m 、 V_{max} 、 K_{cat})有明显差别(Drincovich等2001)。但水稻的NADP-ME蛋白质特性尚未见报道。我们在原核生物大肠杆菌中表达并纯化了水稻NADP-ME₂融合蛋白,酶促动力学特性分析表明,水稻的NADP-ME₂特性与C₃植物的细胞质型NADP-ME类似,但与C₄植物及CAM植物的NADP-ME不同。

4 抗体的制备和特异性分析

家兔以NADP-ME₂融合蛋白4次免疫后采血,制备抗血清。ELISA检测的结果表明,免疫前的血清基本上没有抗血清效价,而融合蛋白免疫后的抗血清效价高达1:12 500(图3)。

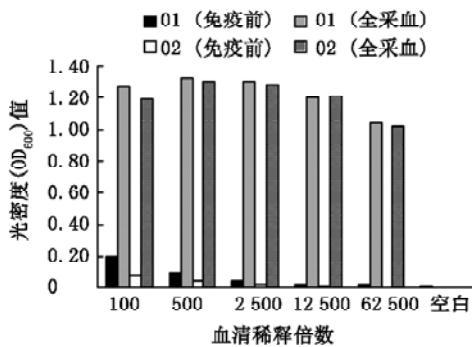


图3 水稻NADP-ME₂融合蛋白抗血清的ELISA检测

Fig.3 ELISA analysis of rice NADP-ME₂ fusion protein antiserum

01、02为两个平行的家兔,采血分为免疫前及免疫后。

为检验所制备的水稻NADP-ME₂融合蛋白抗体的特异性,将以10% SDS-PAGE分离的水稻、小麦、玉米、高粱和芦荟的总蛋白转移至NC膜上,并与抗体探针杂交。免疫前的血清在保温后不出现特异性条带(资料未列出),而以抗血清保温的则出现多条特异性条带(图4),这表明制备的抗NADP-ME₂多克隆抗体是特异性的。水稻NADP-ME抗体的获得对进一步研究水稻NADP-ME家族蛋白各成员个体功能及其之间功能差异可能很有帮助。另外,用NADP-ME₂抗体杂交后水稻出现3条特异性带(图4),这一结果表明水稻的NADP-ME是个家族蛋白,至少有3个成员。

5 水稻NADP-ME家族中蛋白质成员的鉴定

为了精确地了解水稻中NADP-ME家族蛋白质的数目,我们将提取的水稻的全蛋白、进行了

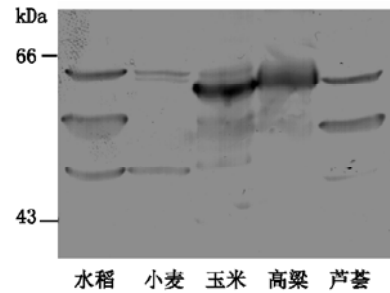


图4 水稻NADP-ME₂融合蛋白抗血清Western检测

Fig.4 Western analysis of rice NADP-ME₂ fusion protein antiserum
每泳道蛋白上样量为30 μg。

双向电泳分离(图5)。双向电泳分离后的水稻全蛋白转移到NC膜上,用抗水稻NADP-ME₂融合蛋白的多克隆抗体进行Western印迹分析的结果(图6)表明,水稻中至少有4个不同NADP-ME蛋白质,他们的分子量分别约为62、62、56和48 kDa,等电点分别约为6.7、6.3、5.8和5.5。这些结果表明水稻中至少有4个NADP-ME家族成员,这一结果尚未见报道。

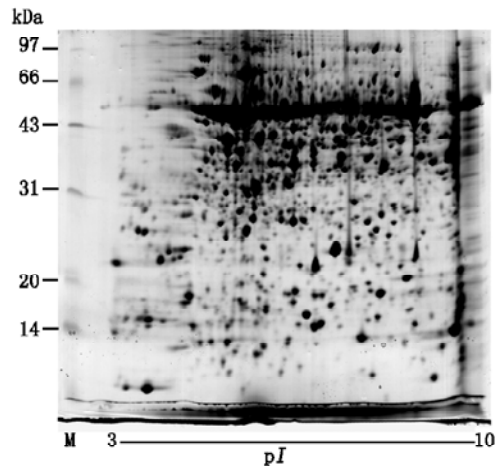


图5 水稻全蛋白的双向电泳

Fig.5 Two-dimensional gel electrophoresis of rice total proteins
M: 标准蛋白的分子量。

Tauata等(2002)用抗玉米62 kDa的NADP-ME抗体免疫杂交,在玉米不同的组织和器官中也曾检测到了3个不同NADP-ME蛋白。就已有报道的NADP-ME蛋白质而言,不同植物的NADP-ME家

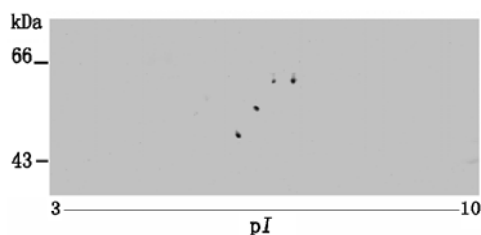


图6 水稻全蛋白中NADP-ME蛋白质 Western 分析
Fig.6 Western analysis of NADP-ME protein from rice total proteins

族成员个体其分子量(在 SDS-PAGE 胶上)是不同的,大小有从 62 kDa 到 72 kDa (62 kDa、64 或 65 或 67 kDa、72 kDa)不等,分子量小于 62 kDa 的 NADP-ME 个体尚未发现过。但我们用抗水稻 NADP-ME₂ 多克隆抗体 Western 印迹的结果揭示,水稻中 NADP-ME 家族成员中有 2 个个体的分子量小于 62 kDa,分别约为 56 kDa 和 48 kDa。

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: 248-254
- Casati P, Andreo CS, Edwards GE (1999a). Characterization of NADP-malic enzyme from two species of Chenopodiaceae: *Haloxylon persicum* (C₄) and *Chenopodium album* (C₃). *Phytochemistry*, 52: 985-992
- Casati P, Drincovich MF, Edwards GE, Andreo CS (1999b). Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth Res*, 61: 99-105
- Casati P, Spampinato CP, Andreo CS (1997). Characteristics and physiological function of NADP-malic enzyme from wheat. *Plant Cell Physiol*, 38: 928-934
- Chang GG, Tong L (2003). Structure and function of malic enzymes, a new class of oxidative decarboxylases. *Biochemistry*, 42: 12721-12733
- Cheng YX, Long M (2007). A cytosolic NADP-malic enzyme gene from rice (*Oryza sativa* L.) confers salt tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnol Lett*, 29: 1129-1134
- Cheng YX, Takano T, Zhang XX, Yu S, Liu DL, Liu SK (2006). Expression, purification, and characterization of two NADP-malic enzymes of rice (*Oryza sativa* L.) in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif*, 45: 200-205
- Chi W, Yang JH, Wu NH, Zhang F (2004). Four rice genes encoding NADP-ME exhibit distinct expression profiles. *Biosci Biotechnol Biochem*, 68: 1865-1874
- Drincovich MF, Casati P, Andreo CS (2001). NADP-malic enzyme from plants: a ubiquitous enzyme involved in different metabolic pathways. *FEBS Lett*, 490: 1-6
- Drincovich MF, Iglesias AA, Andreo CS (1991). Interaction of divalent metal ions with the NADP-malic enzyme from maize leaves. *Physiol Plant*, 81: 462-466
- Edwards GE, Andreo CS (1992). NADP-malic enzyme from plants. *Phytochemistry*, 31: 1845-1857
- Ferreira MLF, Andreo CS, Podesta FE (2003). Purification and physical and kinetic characterization of a photosynthetic NADP-dependent malic enzyme from the CAM plant *Aptenia cordifolia*. *Plant Sci*, 164: 95-102
- Fushimi T, Umeda M, Shimazaki T, Kato A, Toriyama K, Uchimiya H (1994). Nucleotide sequence of a rice cDNA similar to a maize NADP-dependent malic enzyme. *Plant Mol Biol*, 24: 965-967
- Honda H, Akagi H, Shimada H (2000). An isozyme of the NADP-malic enzyme of a CAM plant, *Aloe arborescens*, with variation on conservative amino acid residues. *Gene*, 243: 85-92
- Liu SK, Cheng YX, Zhang XX, Guan QJ, Nishiuchi S, Hase K, Takano T (2007). Expression of an NADP-malic enzyme gene in rice (*Oryza sativa* L.) is induced by environmental stresses; over-expression of the gene in *Arabidopsis* confers salt and osmotic stress tolerance. *Plant Mol Biol*, 64: 49-58
- Pinto ME, Casati P, Hsu TP, Ku MS, Edwards GE (1999). Effects of UV-B radiation on growth, photosynthesis, UV-B-absorbing compounds and NADP-malic enzyme in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under different nitrogen conditions. *J Photochem Photobiol B*, 48: 200-209
- Rothemel BA, Nelson T (1989). Primary structure of maize NADP-dependent malic enzyme. *J Biol Chem*, 264: 19587-19592
- Saitou K, Agata W, Asakura M, Kubota F (1992). Structural and kinetic properties of NADP-malic enzyme from the inducible crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Physiol*, 33: 595-600
- Tauata SL, Coyle HM, Rothermel B, Stiefel V, Nelson T (2002). Maize C₄ and non-C₄ NADP-dependent malic enzymes are encoded by distinct genes derived from a plastid-localized ancestor. *Plant Mol Biol*, 50: 635-652
- Wheeler MC, Tronconi MA, Drincovich MF, Andreo CS, Flugge U-I, Maurino VG (2005). A comprehensive analysis of the NADP-malic enzyme gene family of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139: 39-51
- Yan SP, Tang ZC, Su WA, Sun WN (2005). Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice roots. *Proteomics*, 5: 235-244