

盐地碱蓬液泡膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆转运蛋白 SsCAX1 N末端原核表达和多克隆抗体的制备

韩宁^{1,2} 邵群¹ 王宝山^{1,*}

¹ 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; ² 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 济南 250100

Prokaryotic Expression of the Vacuolar $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Antiporter SsCAX1 N-terminal and Its Polyclonal Antibody Preparation of *Suaeda salsa* L.

HAN Ning^{1,2}, SHAO Qun¹, WANG Bao-Shan^{1,*}

¹ College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; ² College of Food and Biologic Engineering, Shandong Institute of Light Industry, Jinan 250100, China

提要 采用PCR技术, 从盐地碱蓬液泡膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆转运蛋白 SsCAX1 的 cDNA 中扩增了其N末端亲水区段(1~210 bp), 并将其插入到原核表达载体 pGEX-6p-3 中进行诱导表达。获得分子量约 33.5 kDa 的可溶性融合蛋白, 经纯化后从免疫家兔中得到了 SsCAX1 的特异性抗体。

关键词 盐地碱蓬; 液泡膜 SsCAX1; 原核表达; 多克隆抗体制备

Ca^{2+} 是植物维持正常生命活动的必需元素之一。自然界中很多胁迫因子如干旱、盐渍、低温等都能引起植物胞质中游离 Ca^{2+} 浓度的升高(章文华等 2000)。胞质游离 Ca^{2+} 是重要的信号转导分子, 通过胞质中自身浓度的变化进行信号转导, 从而使细胞做出相应的反应(Sanders 等 1999)。为了不影响细胞正常的代谢, 维持刺激时和刺激后胞质中游离 Ca^{2+} 浓度的稳态是非常重要的。液泡约占成熟植物细胞体积的 90%, 是细胞内储存 Ca^{2+} 的主要场所。液泡对胞质中 Ca^{2+} 浓度变化和稳态的维持有重要作用。外界刺激作用细胞后, 液泡膜上的 Ca^{2+} 通道能将 Ca^{2+} 运出液泡, 增加胞质中 Ca^{2+} 浓度, 而 Ca^{2+} -ATPase 和 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运体能将 Ca^{2+} 运入液泡, 从而将胞质中增多的 Ca^{2+} 迅速区隔到液泡中以维持胞质中 Ca^{2+} 的稳态, 而保护细胞的正常代谢(Sanders 等 1999)。而且有些研究者认为, 液泡 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆转运蛋白对胞质中突然增多的 Ca^{2+} 的迅速区隔化更有效(Hirschi 2001)。

目前, 从拟南芥、玉米等非盐生植物中已克隆到 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运体(antiporter)基因 CAX (cation exchanger), 并初步分析了 CAX 与植物抗盐性的关系(Hirschi 1999)。最近, 我们实验室从真盐生植物盐地碱蓬(*Suaeda salsa* L.) 中也克隆到与拟南芥 CAX1 有同源性的基因 SsCAX1 (GenBank

注册号为 AY 518204), 并对其基因表达特性做了分析(另文发表)。我们在 SsCAX1 的 N 末端 ($\Delta 1\sim 70$) 设计了一对特异引物, 采用 PCR 技术克隆了 SsCAX1 cDNA 开放阅读框 5' 端 210 bp 片段。构建了 SsCAX1 原核表达载体, 并以表达的融合蛋白为抗原制备了 SsCAX1 的多克隆抗体。这些结果为进一步研究 SsCAX1 蛋白亚细胞定位、功能分析及其在植物抗逆中的作用奠定了基础。

材料与方法

1 材料

原核表达载体为 pGEX-6p-3, 感受态菌株 BL21 (DE3)。盐地碱蓬(*Suaeda salsa* L.) SsCAX1 蛋白的 cDNA 由本实验室克隆、保存。实验兔为纯种新西兰雄性兔, 购自山东省农业科学院。

2 引物设计与合成

在 SsCAX1 cDNA 的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运蛋白 N 末端 1~70 氨基酸处设计了一对引物: P1 (上游引物), 5' GTAGGATCCGAGTCGTGTAGTAGA 3' (划线处为 BamHI 位点); P2 (下游引物), 5' GCA-

收稿 2006-02-28 修定 2006-05-08
资助 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20050445003) 和山东省自然科学基金重点项目(Z2004D03)。
通讯作者(E-mail: bswang@sdsu.edu.cn, Tel: 0531-86180197)。

CTCGAGTTAGACTTCTTGTAGGTT 3' (划线处为 *Xho*I 位点)。在 P1、P2 引物的 5' 端分别引入 *Bam*HI 和 *Xho*I 识别位点, 引物由上海博亚生物工程公司合成。

3 工具酶及试剂

EX Taq™、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标记均购自 Takara 公司; 还原型谷胱甘肽、IPTG、蛋白分子量标记、碱性磷酸酶标记的羊抗兔购自北京华美生物工程公司; 谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B (Glutathione Sepharose 4B) 购自 Pharmacia 公司; 弗氏佐剂购自上海生物工程公司。

4 PCR 扩增及表达载体构建及 DNA 测序等基因操作

按文献 (Sambrook 等 1989) 方法进行。

5 重组质粒在大肠杆菌中的表达

重组质粒 pGEX-SsCAX1_{Δ1~210} 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑取阳性单菌落, 37℃ 振荡培养过夜, 次日, 以 1:100 的体积比接种于另一新鲜的 LB 液体培养基中, 继续培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6, 用终浓度为 0.4 mmol·L⁻¹ IPTG 30℃ 诱导 3 h, 离心收集菌体。

6 菌体超声裂解液制备及 GST-SsCAX1_{Δ1~70} 融合蛋白的纯化

将离心收集的菌体重悬浮于预冷的磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.3), 冰浴下超声破碎细胞。离心后收集上清过谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 层析柱, 磷酸缓冲液 (pH 7.3) 充分洗脱至基线。然后用 5~10 倍柱床体积的还原型谷胱甘肽洗脱, 浓缩收集成分即为纯化的 GST-SsCAX1_{Δ1~70}。用 SDS-PAGE 电泳检测纯化产物, 分离胶浓度为 12%。

7 蛋白质含量测定

参照 Bradford (1976) 的方法。

8 GST-SsCAX1_{Δ1~70} 抗血清的制备及效价检测

参考 Catty (1988) 的方法。

9 碱蓬液泡膜的制备

参照 Wang 等 (2000) 的方法。

10 Western 印迹

参照 Fischer-Schliebs 等 (1997) 的方法。

实验结果

1 pGEX-SsCAX1_{Δ1~210} 表达质粒构建

用设计的 *SsCAX1* cDNA 阅读框 1~210 bp 的

5' 端及 3' 端引物, 从 *SsCAX1* cDNA 的 5' 末端扩增出约 210 bp 的 DNA 片段 (图 1), 与预期片段长度相符。产物回收后, 利用引物所引入的 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点, 将其装入原核表达载体 pGEX-6p-3 的 *Bam*HI 和 *Xho*I 位点, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), 挑选阳性克隆, 经测序鉴定, 构建的重组分子 pGEX-SsCAX1_{Δ1~210} 阅读框正确。

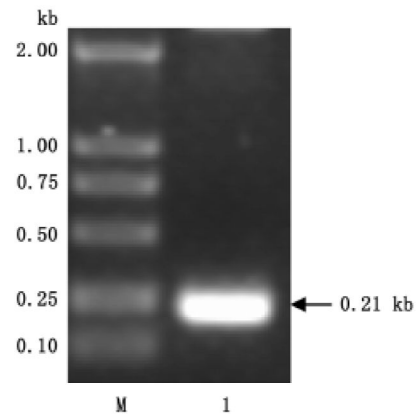


图1 盐地碱蓬 *SsCAX1* cDNA 5' 端片段的 PCR 扩增
1: *SsCAX1* cDNA 5' 端; M: DNA 标准分子量 DL2000。

2 融合蛋白的诱导表达

对 IPTG 诱导后的大肠杆菌 BL21 (DE3) 的细胞粗提物进行 SDS-PAGE 电泳检测的结果 (图 2) 可见, 大肠杆菌 BL21 (DE3) pGEX-SsCAX1_{Δ1~210} 在 33.5 kDa 附近出现高水平表达的蛋白条带, 与预

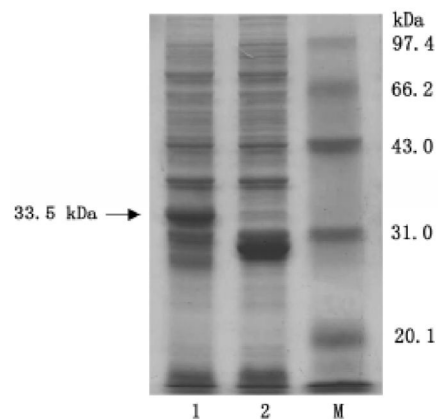


图2 GST-SsCAX1_{Δ1~70} 融合蛋白诱导产物的 SDS-PAGE
1: 大肠杆菌 BL21 (DE3) pGEX-SsCAX1_{Δ1~210} 的诱导全菌蛋白; 2: 大肠杆菌 BL21 (DE3) pGEX-6p-3 的诱导全菌蛋白; M: 蛋白质分子量标准。

期的融合蛋白 GST-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 分子量一致, 而大肠杆菌 BL21 (DE3) (pGEX-6p-3) 在相同分子量部位没有相应的蛋白条带, 只在 26.0 kDa 的位置出现了 GST 蛋白的特异条带, 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 形成了融合蛋白。

3 GST-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 融合蛋白的纯化

将 BL21 (DE3) pGEX-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 诱导后的菌体进行超声波破碎、离心。沉淀和上清液分别进行 SDS-PAGE, 见到融合蛋白主要存在于上清液中, 说明融合蛋白以可溶蛋白的形式存在于细胞中(图3)。菌体超声裂解液经谷胱甘肽琼脂糖凝胶 4B 层析柱纯化后, 得到高纯度的 GST-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 表达蛋白(图4)。

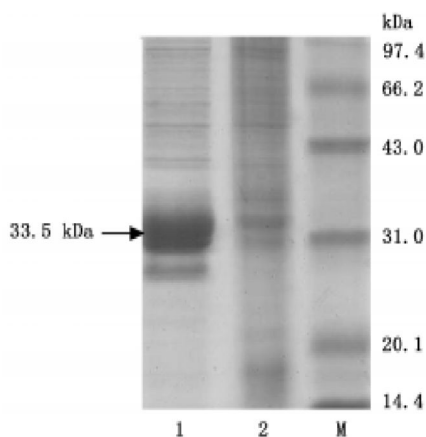


图3 大肠杆菌 BL21 (DE3) pGEX-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 诱导后的菌体经超声波破碎的上清液和沉淀的 SDS-PAGE 分析
1: 上清液; 2: 沉淀; M: 蛋白质分子量标准。

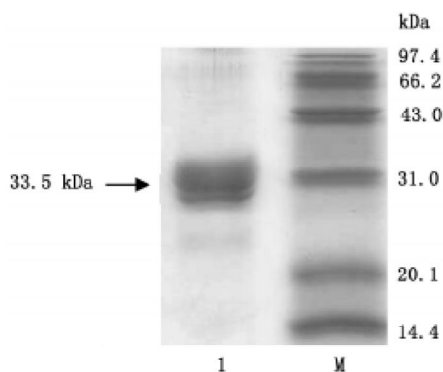


图4 纯化的 GST-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 融合蛋白 SDS-PAGE 分析
1: 纯化的 GST-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 融合蛋白; M: 蛋白质分子量标准。

4 抗体的特异性分析

以亲和纯化的 GST-SsCAX1 $\Delta_{1\sim 70}$ 为抗原制备的盐地碱蓬 SsCAX1 抗血清, 其效价达 1:500 (结果未列出)。Western 印迹实验表明, 制备的抗体与盐地碱蓬液泡膜微囊中 48~50 kDa 的蛋白杂交, 而盐地碱蓬质膜微囊中蛋白质无杂交印迹(图5), 与推测的 SsCAX1 的分子量相当(48.8 kDa)。

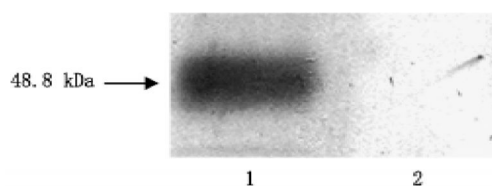


图5 盐地碱蓬液泡膜 SsCAX1 的 Western 印迹分析
1: 液泡膜蛋白; 2: 质膜蛋白。每泳道蛋白上样量为 30 μ g。

讨 论

在盐胁迫下, 植物液泡膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运蛋白在 Ca^{2+} 信号转导中起重要作用(Hirschi 2001), 它不仅负责维持胞质中 Ca^{2+} 的稳态, 而且它的活性大小还影响盐信号的有效转导。目前, $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运蛋白的研究主要来源于拟南芥和玉米等非盐生植物, 盐生植物中尚无报道。盐生植物能在高盐环境中生长发育并完成生活史, 而非盐生植物则不能。盐生植物和非盐生植物在 K^{+} 、 Na^{+} 的吸收、运输、区域化和外排及 Ca^{2+} 信号等方面的差别可能是它们抗盐性不同的关键(Munns 2005)。盐地碱蓬为石竹目藜科碱蓬属一年生草本植物, 属于我国特有的高耐盐真盐生植物, 主要分布在我国长江以北海滩和内陆重盐碱地地区, 在 NaCl 含量在 0.2%~4.5% 的土壤上正常开花结实。盐地碱蓬营养成分全, 鲜嫩茎叶富含蛋白质、维生素、铁、硒, 种子含亚油酸, 在食用、饲料、药用、生态保护等方面具有开发价值。我们曾报道盐胁迫下盐地碱蓬的液泡膜 V-H^{+} -ATPase 活性增加依赖于 Ca^{2+} (Han 等 2005)。因此, 盐生植物与非盐生植物液泡膜 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 逆向转运蛋白结构和活性的区别及其与抗盐的关系值得探讨。

SsCAX1 蛋白属于跨膜蛋白, 具有 11 个跨膜区, N 末端 $\Delta_{1\sim 70}$ 区段是亲水区且与其它植物的同源性较低(另文发表), 因此, 选择此区进行原

核表达以制备抗体是可行的。这比用人工合成肽段制备 CAX 类抗体的费用低 (Hirschi 等 2000; Ueoka-Nakanishi 等 1999)。

实验构建的表达质粒 pGEX-SsCAX1 $_{\Delta 1\sim 210}$ 结构正确, 未出现突变及移码现象。pGEX-SsCAX1 $_{\Delta 1\sim 210}$ 在 IPTG 诱导下可稳定、高效表达融合蛋白, 且以可溶性蛋白存在于大肠杆菌中。Western 印迹实验表明, 制备的抗体可以与盐地碱蓬液泡膜囊泡中 48~50 kDa 的蛋白杂交, 而质膜中无此带, 这与推测的盐地碱蓬液泡膜 SsCAX1 的分子量相当, 说明 SsCAX1 定位于液泡膜, 所制备的 SsCAX1 抗体具有较高特异性。

本文成功地从真盐生植物盐地碱蓬中制备了特异性较高的 SsCAX1 多克隆抗体, 为进一步研究 SsCAX1 蛋白的亚细胞定位、功能分析及其在植物抗逆中的作用奠定了基础。

参考文献

- 章文华, 陈亚华, 刘友良 (2000). 钙在植物细胞盐胁迫信号中的作用. 植物生理学通讯, 36: 146~153
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantitative of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Catty D (1988). Antibodies: A Practical Approach. Oxford, Washington DC: IRL Press
- Fischer-Schliebs E, Ball E, Berndt E, Besemfelder-Butz E, Binzel ML, Drobny M, Mühlenhoff D, Müller ML, Rakowski K, Ratajczak R (1997). Differential immunological cross-reactions with antisera against the V-ATPase of *Kalanchoë daigremontiana* reveal structural differences of V-ATPase subunits of different plant species. Biol Chem, 378: 1131~1139
- Han N, Shao Q, Lu CM, Wang BS (2005). The leaf tonoplast V-H⁺-ATPase activity of a C₃ halophyte *Suaeda salsa* is enhanced by salt stress in a Ca-dependent mode. J Plant Physiol, 162: 267~274
- Hirschi KD (1999). Expression of *Arabidopsis CAX1* in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. Plant Cell, 11: 2113~2122
- Hirschi KD (2001). Vacuolar H⁺/Ca²⁺ transport: who's directing the traffic? Trends Plant Sci, 6: 100~104
- Hirschi KD, Korenkov VD, Wilganowski NL, Wagner GJ (2000). Expression of *Arabidopsis CAX2* in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. Plant Physiol, 124: 125~134
- Munns R (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. New Phytol, 167: 645~663
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York, CSH: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF (1999). Communicating with calcium. Plant Cell, 11: 691~706
- Ueoka-Nakanishi H, Nakanishi Y, Tanaka Y, Maeshima M (1999). Properties and molecular cloning of Ca²⁺/H⁺ antiporter in the vacuolar membrane of mung bean. Eur J Biochem, 262: 417~425
- Wang BS, Ratajczak R, Zhang JH (2000). Activity, amount and subunit composition of vacuolar-type H⁺-ATPase and H⁺-PPase in wheat roots under severe NaCl stress. J Plant Physiol, 157: 109~116