

## 拟南芥*abi5*基因的分子克隆及其在原核细胞中的表达和纯化

马燕林, 马建忠\*, 王永刚

兰州理工大学生命科学与工程学院, 兰州730050

**摘要:** 拟南芥*abi5*基因编码了一个碱性亮氨酸拉链类转录因子, 它在ABA信号转导过程中发挥着关键调控作用。本文以拟南芥为材料, 通过RT-PCR扩增、克隆了包含*abi5*基因编码区的片段。核苷酸序列分析表明, 所克隆的基因与NCBI数据库收录的*abi5*基因(GenBank登录号NM\_129185.3)有99.0%的一致性; 氨基酸序列存在4个残基差异。所克隆的*abi5*基因被进一步亚克隆至pET-32a表达载体。序列测定核实构建正确的重组质粒(pET32a-ABI5)转化入大肠杆菌BL21 Star (DE3)中诱导表达。表达产物经Ni-NTA亲和层析柱分离纯化、SDS-PAGE分析和质谱鉴定。结果表明, 重组*abi5*基因在大肠杆菌表达的较适宜条件为: 异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)终浓度为0.3 mmol·L<sup>-1</sup>、30 °C下诱导4 h, 可达到细菌裂解液上清蛋白的29.1%。经Ni-NTA亲和层析柱纯化后的ABI5融合蛋白在SDS-PAGE电泳分析时呈现一条蛋白带。该条带经串联质谱分析证明为重组ABI5融合蛋白。

**关键词:** 拟南芥; *abi5*; 分子克隆; 原核表达; 纯化; 质谱

## Molecular Cloning, Prokaryotic Expression and Purification of *abi5* Gene from *Arabidopsis thaliana* L.

MA Yan-Lin, MA Jian-Zhong\*, WANG Yong-Gang

School of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China

**Abstract:** The *abi5* gene from *Arabidopsis* encodes a basic leucine zipper transcription factor, which plays a key regulatory role in ABA signal transduction. In this paper, the coding region of the *abi5* gene of *Arabidopsis thaliana* Columbia was amplified by RT-PCR and then cloned into a T-vector, pMD<sup>®</sup>19-T. The nucleotide sequencing showed that the cloned gene had a 99.0% identity with the *abi5* gene sequence (GenBank No. NM\_129185.3). The amino acid sequence of the cloned fragment exists four different residues. The *abi5* gene was further subcloned into an expression vector, pET-32a. The recombinant plasmid construct (pET32a-ABI5) was verified by nucleotide sequencing, and transformed into *Escherichia coli* BL21 Star (DE3). The expression of the ABI5-fused protein was induced with 0.3 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG, at 30 °C for 4 h. Under this condition, the content of the fusion protein could reach 29.1% of the total supernatant proteins of bacteria lysate. After Ni-NTA affinity chromatography purification, a single band was observed in the SDS-PAGE gel, with an 86.1% purity. The band was excised for MS/MS assay. The results of tandem mass spectrometry proved that the band contained the ABI5-fused recombinant protein.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; *abi5*; molecular cloning; prokaryotic expression; purification; mass

脱落酸(abscisic acid, ABA)作为一种重要的植物激素调节着植物生长发育过程中的诸多环节, 比如种子和芽的休眠、气孔关闭、生物与非生物性胁迫的响应、以及拮抗其它植物生长调节物质的作用等(Finkelstein 2010)。拟南芥的ABI5 (abscisic acid-insensitive 5)蛋白是一个响应ABA信号的碱性亮氨酸拉链类(basic leucine zipper, bZIP)转录因子, 其突变体对ABA的响应具有多效缺陷性, 包括对ABA抑制种子发芽的敏感性降低、一些ABA调控基因的表达发生改变等(Finkelstein和

Lynch 2000)。进一步的研究表明, 不仅ABI5蛋白的表达受ABA的诱导, ABI5也结合于许多下游基因启动子对ABA响应的区域(Finkelstein和Lynch 2000; Kim等2002)。除了bZIP区域外, ABI5家族的蛋白质至少有6个保守的区域。其中, 保守区II含有22个氨基酸残基, 并可在酵母细胞中表现出转

收稿 2013-10-16 修定 2013-12-31  
资助 国家自然科学基金地区科学基金(31060041)和甘肃省自然科学基金B类(1212RJYA008)。

\* 通讯作者(E-mail: majz@lut.cn; Tel: 0931-2976707)。

录激活活性。保守区II周边的磷酸化位点对其转录激活活性有抑制作用(Kim和Thomas 1998)。响应ABA并与ABI5相互作用的蛋白AFPs突变会导致拟南芥幼苗对干旱和盐胁迫更为敏感(Garcia等2008)。近来的研究表明,植物光敏素结合磷酸酶的突变可致ABA诱导的种子萌发和幼苗生长表现出超敏性。这一过程已被证明由ABI5介导(Dai等2013)。ABI5作为ABA信号转导过程中的关键转录因子之一介导了许多重要的植物生理过程,比如胚胎晚期发育和逆境胁迫反应(Garcia等2008; Kim等2002; Finkelstein 2010)。因此,克隆该蛋白的编码基因、体外表达、纯化该蛋白质,进一步研究该蛋白质发挥作用的分子机制则十分必要。

本文以拟南芥为实验材料,通过RT-PCR扩增并克隆了*abi5*基因的编码区,进一步实现了在大肠杆菌细胞中的表达、表达蛋白的纯化和质谱鉴定。以此获得重组ABI5蛋白用于后续ABI5抗体的制备、免疫沉降和免疫印迹等深入分析工作。

## 材料与方法

### 1 材料

拟南芥哥伦比亚生态型(*Arabidopsis thaliana* L. Columbia)种子(保存于冰箱4 °C)播种于营养土(丹麦品氏基质5号, pH 5.5)表面,至于植物光照培养箱(光照强度250  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 22 °C, 16 h光照, 8 h黑暗, 60%湿度)中培养。2周后取莲座叶片用于总RNA的提取。

大肠杆菌*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ 菌株、*Escherichia coli* BL21 Star (DE3)菌株、pUC19质粒和pET-32a质粒为兰州理工大学生命科学与工程学院马建忠研究员实验室保存。

pMD<sup>®</sup>19-T载体、*Pfu* DNA聚合酶、所有限制性内切酶、RNase A、*Taq* DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、蛋白质分子量标准(低)、DNA凝胶回收试剂盒、Trizol总RNA抽提试剂盒等购自宝生物工程(大连)有限公司。SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒、SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒、SDS、IPTG、苯甲基磺酰氟(PMSF)、X-gal、DNA分子量标志、氯霉素、氨基青霉素、琼脂糖、溴化乙锭、丙烯酰胺、胰蛋白胍和酵母提取物等购自生工生物工程(上海)有限公司。Ni-NTA-

Agarose购自Qiagen公司。其他常用试剂均为国产分析纯。

### 2 方法

下述实验方法和操作中若未注明所参考的文献,则均按萨姆布鲁克等(1998)一书中所述方法和操作执行。

#### 2.1 拟南芥总RNA的制备及*abi5*基因编码区的扩增

剪取2周龄拟南芥幼苗莲座叶片约1 mg,按宝生物工程(大连)有限公司的Trizol总RNA抽提试剂盒的操作说明书提取总RNA。紫外分光光度计测定所提取总RNA的浓度。取约2  $\mu\text{g}$ 总RNA上样于经DEPC处理的1%琼脂糖凝胶,电泳后紫外灯观察并拍照。cDNA链的合成反应为: 5 $\times$ PrimeScript缓冲液2  $\mu\text{L}$ 、PrimeScript反转录酶混合液I 0.5  $\mu\text{L}$ 、100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 六聚随机引物0.5  $\mu\text{L}$ 、总RNA 0.5  $\mu\text{g}$ ,加DEPC处理的无菌水至10  $\mu\text{L}$ 。42 °C温育1 h, 70 °C终止反应10 min,于冰浴中冷却后置-20 °C保存。

根据GenBank中提供的*abi5*基因序列(GenBank登录号NM\_129185.3)设计了1对特异性引物。上游引物的核苷酸序列为: 5' CCGGAATTCACTAGAGAAGTTGACGT 3',下游引物核苷酸序列为: 5' CGGAATTCCTAGAGTGGACAACCTCGGGT 3'。2个引物的5'端均引入了*Eco*RI酶切位点和2~3个保护碱基。引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。*abi5*基因编码区的PCR扩增反应为: 10 $\times$ PCR缓冲液5.0  $\mu\text{L}$ 、dNTP (2.5 mmol $\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ 、上述cDNA合成反应液1.0  $\mu\text{L}$ 、*Pfu* DNA聚合酶(2.5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ 、上游引物(10 pmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ 、下游引物(10 pmol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ ,加无菌水至50  $\mu\text{L}$ 。PCR扩增反应程序为: 94 °C预变性2 min,然后进入3步骤循环(98 °C变性10 s、60 °C退火15 s、72 °C延伸1 min 50 s, 30个循环);之后72 °C延伸10 min。PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳分离后切胶,按SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒的操作说明回收PCR产物。回收的PCR产物由*Taq* DNA聚合酶处理在其3'末端加A。加A反应为: dATP (2.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ ) 3  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA聚合酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、10 $\times$ *Taq* DNA聚合酶缓冲液2  $\mu\text{L}$ 、回收的PCR产物14  $\mu\text{L}$ ,加无菌水至20  $\mu\text{L}$ 。72 °C反应30 min。反应完成后,用等体积的Tris饱和酚氯仿(pH 8.0)抽提1次,乙醇沉淀、干燥后溶于10  $\mu\text{L}$ 无菌水

中。加A后的PCR产物与pMD<sup>®</sup>19-T载体的连接反应: 2×DNA连接预混液(mighty mix) 5 μL、PCR产物1 μL、pMD<sup>®</sup>19-T DNA (50 ng·μL<sup>-1</sup>) 2 μL, 加无菌水至10 μL。16 °C连接过夜。10 μL连接反应液全部用于大肠杆菌DH5α的转化。挑取转化后的单菌落制备质粒, 限制酶切鉴定并送测序。测序正确的重组质粒命名为pUC19-ABI5。

## 2.2 拟南芥*abi5*基因原核表达载体的构建

按SanPrep柱式质粒DNA小量抽提试剂盒制备pUC19-ABI5质粒和pET-32a质粒DNA。用*Eco*RI酶切2种质粒。酶切反应为: 10×*Eco*RI缓冲液2 μL、质粒DNA 10 μL、*Eco*RI内切酶1.5 μL, 加无菌水至20 μL。37 °C保温1 h。磷酸酶(CIAP)处理线性化的pET-32a质粒DNA末端。1%的琼脂糖凝胶电泳分离后回收*abi5*目的片段和线性化的pET-32a载体片段。之后, 建立*abi5* DNA回收片段与pET-32a质粒DNA片段的连接反应: 凝胶回收的*abi5*基因片段4.5 μL、去磷酸化处理的pET-32a载体DNA片段3.5 μL、10×连接酶缓冲液1.0 μL、T4 DNA连接酶(350 U·μL<sup>-1</sup>) 1.0 μL, 加无菌水至10 μL。16 °C连接过夜后转化大肠杆菌DH5α感受态细胞。提取重组质粒以*Eco*RI和*Nco*I酶切鉴定。酶切鉴定正确的重组质粒进一步测序。测序正确的重组质粒命名为pET32a-ABI5。

## 2.3 拟南芥*abi5*基因的原核表达

碱法制备pET32a-ABI5质粒DNA, 转化大肠杆菌BL21 Star (DE3)感受态细胞。挑取单菌落接种5 mL LB培养基(含氨苄青霉素50 μg·mL<sup>-1</sup>), 37 °C、200 r·min<sup>-1</sup>培养过夜。次日以1%的接种量接种新鲜100 mL LB培养基, 37 °C振荡培养至对数生长期(OD<sub>600</sub>=0.50~0.60)。吸取1 mL菌液留做SDS-PAGE分析。随后加入IPTG至终浓度0.3 mmol·L<sup>-1</sup>, 30 °C诱导培养, 并分别于1、2、4、6和8 h吸取1 mL菌液, 6 000 r·min<sup>-1</sup>离心收集菌体。10% SDS-PAGE电泳分析目的蛋白的表达情况。

## 2.4 ABI5融合蛋白的纯化与质谱分析

收集100 mL IPTG 诱导培养4 h的细菌培养液, 4 °C、6 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min。用4 mL的预冷的结合缓冲液(20 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.4)重悬菌体, 加入PMSF至1 mmol·L<sup>-1</sup>。于冰上混合30 min后超

声裂解细菌(JY92-II超声波细胞粉碎机, 参数: 功率320 W, 冰浴下超声7 s, 间隔10 s, 20个循环)。4 °C、10 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min, 上清液用于Ni-NTA亲和层析柱上样。上样前, 2 mL Ni-NTA层析柱以6倍柱体积的平衡缓冲液(20 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH 7.8)平衡。上样后, 用约40 mL洗涤缓冲液(20 mmol·L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、20 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、500 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, pH 6.0, 流速0.3 mL·min<sup>-1</sup>)洗涤层析柱, 直至流出液体的OD<sub>280</sub><0.01。之后依次用10 mL洗脱缓冲液(含10 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑)、10 mL洗脱缓冲液(含50 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑)、10 mL洗脱缓冲液(含100 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑)洗脱目的蛋白。分管收集洗脱液, 测定OD<sub>280</sub>, SDS-PAGE电泳鉴定蛋白纯度。从胶上切下目的条带送至生工生物工程(上海)有限公司进行串联质谱分析。

## 实验结果

### 1 拟南芥总RNA的提取与*abi5*基因的扩增、克隆

尽管*abi5*为ABA诱导表达基因, 但拟南芥叶片中微量存在的*abi5*转录本已足够通过RT-PCR扩增(Kim等2002)。通常, RNA分子极易降解。为防止RNA分子降解使扩增反应失败, RNA的提取与反转录反应应连续进行。按Trizol法提取总RNA, 50 mg二周龄的拟南芥幼苗叶片共得到10.8 μg总RNA(浓度为0.36 μg·μL<sup>-1</sup>)。取2 μg总RNA制备物做琼脂糖凝胶电泳, 结果如图1-A所示, 28S rRNA、18S rRNA和5S rRNA条带清晰可见, 且亮度依次递减。表明所制备的总RNA降解不严重, 质量较好。

考虑到*Taq* DNA聚合酶没有校读活性, DNA扩增时误差率较高, 所以我们选用了*Pfu* DNA聚合酶进行体外扩增反应。以0.5 μg上述总RNA制备物为模板, 用PrimeScript反转录酶催化cDNA链的合成。随后取1/10体积的cDNA反应液为扩增模板, 建立50 μL的PCR扩增反应。琼脂糖凝胶电泳检测PCR结果(图1-B), 得到了一片段长度大于1 kb的单一扩增产物。这一片段大小基本符合预期扩增片段的大小(1.3 kb)。

为便于T载体克隆, 上述*Pfu* DNA聚合酶的扩增产物用*Taq* DNA聚合酶进行了后处理, 以使其3'

末端含有一个突出的腺嘌呤核苷酸(A)残基。电泳纯化后,腺嘌呤化的PCR产物与T载体(pMD<sup>®</sup>19-T vector)进行了连接。经过转化、挑取阳性克隆进行培养、提取质粒、*EcoRI*酶切鉴定(图1-C),重组质粒pUC19-ABI5酶切后产生2个条带。其中,大片段为载体片段,小片段大小接近1.3 kb,确定扩增片段已插入克隆载体。

## 2 pUC19-ABI5的序列测定与分析

上述重组质粒pUC19-ABI5送生工生物工程技术服务(上海)有限公司进行序列测定。测序结果用CLC DNA Workbench 5.0软件拼接后与NCBI收录的拟南芥*abi5*基因的cDNA序列(登录号NM\_129185.3)进行了比对。比对结果显示二者的核苷酸序列一致性高达99.0%。扩增片段中包含一个1 323 bp的开放阅读框,编码一个440氨基酸残基的多肽(图2)。其氨基酸序列与NCBI数据库中ABI5(登录号NP\_565840.1)的相比,第1个氨基酸残基(T)与ABI5的第3个氨基酸残基相对应,也与引物的设计序列一致。随后的氨基酸序列中共有

4个位点发生了突变,分别是第115位的丙氨酸(原为缬氨酸)、第163位的酪氨酸(原为组氨酸)、第174位的天冬酰胺(原为丝氨酸)、第385位的脯氨酸(原为亮氨酸)。本实验中,*abi5*基因编码区的扩增采用了高保真的*Pfu* DNA聚合酶,因此,这些突变位点很可能是由于栽培品种不一致所造成。这些突变是否对ABI5蛋白功能有影响也有待于以后的进一步分析工作。

## 3 pET32a-ABI5表达载体的构建及鉴定

在单一限制切点插入外源DNA片段,不仅节省限制酶,也很容易进行单酶切鉴定重组子。但是,当构建外源DNA片段到表达载体的单酶切位点时,外源DNA片段会以不确定的方向插入克隆位点。这就需要在随后的重组子筛选过程中加以甄别。以限制性内切酶*EcoRI*分别消化重组质粒pUC19-ABI5和表达载体pET-32a(随后去磷酸化),电泳分离后回收进行连接,转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,挑取转化平板上的单菌落培养后提取重组质粒进行电泳鉴定。含外源插入片段的重组质粒明显大

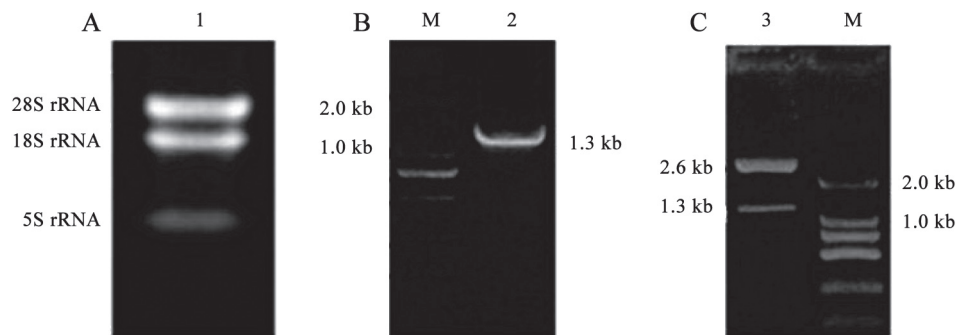


图1 拟南芥总RNA和*abi5*基因编码区扩增产物及其克隆的琼脂糖电泳结果

Fig.1 The electrophoresis results of the extracted total RNA, the amplified fragment, and the *EcoRI*-digested recombinant plasmid

A: 拟南芥总RNA; B: *abi5*基因编码区的PCR扩增产物; C: *EcoRI*酶切后的重组质(pUC19-ABI5)。1: 拟南芥总RNA; 2: *abi5*基因编码区的PCR扩增产物; 3: *EcoRI*酶切重组质粒pUC19-ABI5后的产物; M: DNA分子量标记。

```
TRETKLTSEREVESSMAQARHNGGGGGENHPFTSLGRQSSISLTLDEFQHALCENGKNGFSMNMDNFLVSIWNAEENNNNQ
QAAAAAGSHSVPANHNGFNNNNNNGGEGGVGAFSGGSRGNEDANNKRGIANESSLPQGSLLPAPLCRKTVDVWSEIYRG
GGSGNGGDNNGRSSSSNGQNNNAQNGGETAARQPTFGEMTLEDFLVKAGVVRHPTNPKPNPNQNPSSVIPAAAQQQLY
GVFQGTGDPSPFGQAMGVGDPSGYAKRTGGGGYQAPPVQAGVCYGGGVGFGAGGQQMGMVGPLSPVSSDGLGHGQVDNI
GGQYGVDMGGLRGRKRVDGPVEKVVERRQRRMIKNRESAARSARKQAYTVELEAEPNQLKEENAQLKHALAELERKRKQ
QYFESLKSRAQP KLPKSNGLRLTLMRNPSCPL
```

图2 *abi5*基因编码区扩增片段的氨基酸序列

Fig.2 The amino acid sequence of the amplified fragment containing the ABI5 coding region

于空载的pET-32a质粒(图3-A)。随后进行*EcoRI*酶切检查, 插入片段的大小在1.3 kb左右(图3-B)。由于该扩增片段为非定向插入pET-32a载体, 因此需要进一步鉴定目的基因片段是否以正确的方向插入于载体中。根据插入片段和pET-32a质粒的序列, 选用了*NcoI*切割来确定插入片段的方向。若目的基因片段正向插入于载体中, 经*NcoI*酶切后会产生一条约7 160 bp的大片段和一条69 bp的小片段; 若是反向插入则会产生一条约5 929 bp的大片段和一条1 300 bp的小片段。上述重组质粒经*NcoI*酶切后进行电泳检测(图3-C), 泳道5中的重组质粒应含有正向插入的*abi5*基因片段。选择正向插入扩增片段的重组质粒进一步进行核苷酸序列测定, 以核实各片段组成了一完整的阅读框。

#### 4 重组质粒pET32a-ABI5在大肠杆菌中的诱导表达

*abi5*基因来自高等真核植物, 其遗传表达系统与大肠杆菌差异较大。因此, 我们选择了较适合真核基因表达的改良大肠杆菌BL21 Star (DE3)菌株作为*abi5*基因表达的宿主细胞。*abi5*基因插入pET-32a载体的*EcoRI*位点后, 形成了一个编码607个氨基酸残基的阅读框(图4)。在*abi5*基因编码区

之前有Trx-Tag、His-Tag、Thrombin位点、S-Tag和Enterokinase位点。含*abi5*基因片段的完整阅读框可编码一理论分子量为64.6 kDa的多肽。

先期实验结果表明, 诱导剂IPTG的适宜浓度为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在上述IPTG浓度下诱导分别含pET32a和pET32a-ABI5质粒的大肠杆菌菌株0、1、2、4和6 h。之后收集并裂解菌体,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心后的上清加入等量 $2 \times \text{SDS}$ 上样缓冲液, 进行SDS-PAGE分析。结果表明, 含pET32a-ABI5质粒的菌株在IPTG诱导1 h后于67 kDa左右处出现了一条明显的蛋白条带(图5-B), 该条带随时间延长而增加, 至诱导4 h时达到最大。BandScan扫描结果显示, 1 h时该条带的蛋白含量占到细菌裂解上清液蛋白的5.4%, 2 h时为14.4%, 4 h时为29.1%, 6 h时为21.9%。相同条件下, 含空载pET32a质粒的菌株中则没有该条带(图5-A)。该诱导蛋白条带的分子量与我们预期的重组ABI5的理论分子量相差约3 kDa。由于SDS-PAGE并不是一个准确测量蛋白质分子量的方法, 所以, 上述诱导表达出的蛋白条带很可能是含ABI5的重组蛋白。当然, 这需要进一步的实验结果来确定。

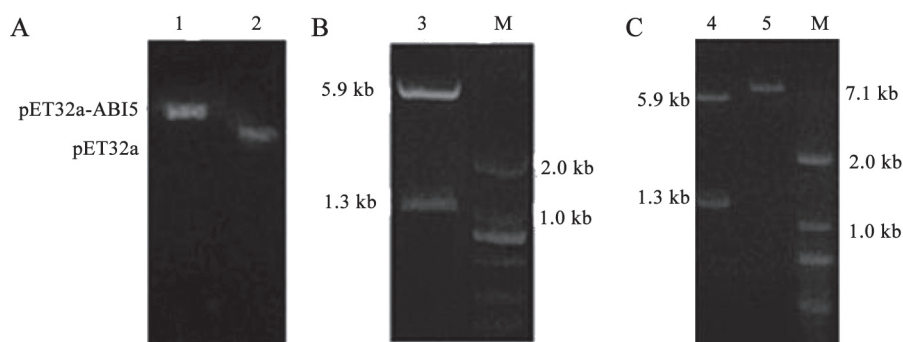


图3 pET32a-ABI5重组质粒的鉴定

Fig.3 Identification of the recombinant plasmid pET32a-ABI5

A: 1为挑取的重组质粒, 2为空载的pET32a质粒DNA; B: 3为*EcoRI*酶切的重组质粒(pET32a-ABI5); C: *NcoI*酶切的重组质粒结果; 4为反向插入, 5为正向插入。M为分子量标记。

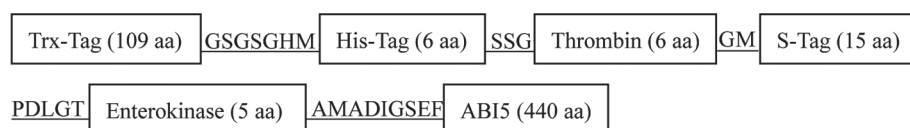


图4 包含ABI5的重组融合蛋白结构示意图

Fig.4 The open-reading frame of the ABI5-contain recombinant protein

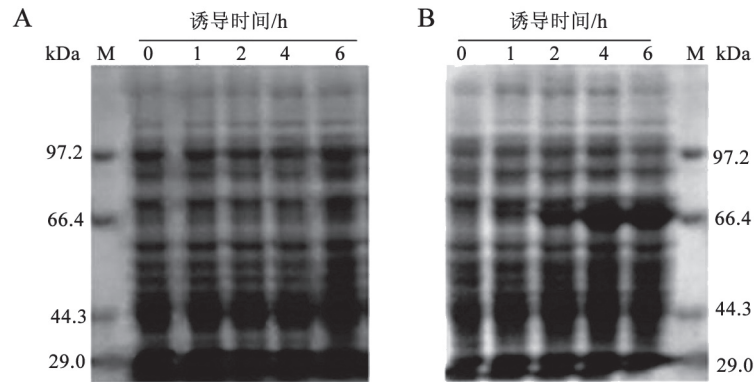


图5 ABI5融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

Fig.5 Induced expression of the ABI5-fused protein in *E. coli* Star BL21 (DE3)

A: 空载的pET-32a质粒; B: pET32a-ABI5质粒; M: 蛋白质分子量标记。

### 5 重组ABI5蛋白的亲和层析纯化和质谱鉴定

在上述诱导表达条件下培养100 mL菌液, 超声裂解后的上清液加载至Ni-NTA亲和层析柱, 洗涤之后以含不同咪唑浓度的洗脱缓冲液洗脱。诱导表达的蛋白条带在咪唑浓度为 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可被洗脱。SDS-PAGE结果显示, 经Ni-NTA亲和层析柱纯化后的蛋白为一条清晰的条带(图6)。BandScan扫描样品泳道后显示该条带的蛋白含量可占到上样成分的81.6%。

为进一步确定纯化后单一蛋白条带中蛋白质的性质, 该蛋白条带自SDS-PAGE凝胶上切下, 进行了串联质谱分析。质谱结果(图7)表明, 该条带蛋白中所含的7个肽段的氨基酸残基序列均与ABI5蛋白一致。由此证明, 在含pET32a-ABI5大肠

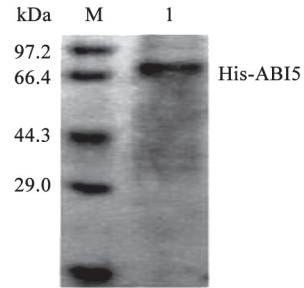


图6 Ni-NTA亲和层析柱纯化后的ABI5融合蛋白

Fig.6 ABI5-fused protein purified by Ni-NTA affinity chromatography

M: 蛋白质分子量标记; 1: 纯化的ABI5 融合蛋白。

杆菌菌株中诱导表达、分离纯化的蛋白条带正是重组的、包含ABI5的融合蛋白。

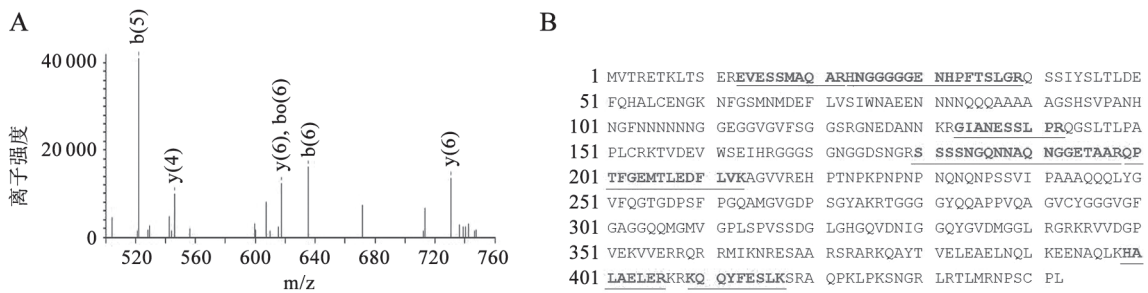


图7 ABI5融合蛋白质谱分析结果

Fig.7 Identification of the ABI5-fused protein by MS/MS

A: MS/MS测定的ABI5融合蛋白的各个肽段峰; B: ABI5蛋白全长氨基酸序列, 其中下划线部分为MS/MS分析出的、与NCBI数据库中收录的ABI5氨基酸序列完全匹配的肽段。

## 讨 论

虽然*abi5*基因属于ABA诱导表达基因, 但在

本实验中, *abi5*基因从ABA未处理的拟南芥叶片中也扩增了出来, 证明该基因的转录本在ABA未处理的叶片中也存在。在早先的实验中, pET32-

ABI5难以在大肠杆菌BL21 (DE3)中表达(结果未在本文列出)。最后换到了改良后的大肠杆菌菌种BL21 Star (DE3)中, ABI5融合蛋白被顺利诱导表达。大肠杆菌BL21 Star (DE3)菌株含有一突变的*rne*基因, 可使真核的mRNA更加稳定。因其不含*lon*和*ompT*基因编码的蛋白酶, 增加了外源基因表达蛋白的稳定性。而其携带的质粒补充了大肠杆菌缺乏的7种稀有密码子(AUA、AGG、AGA、CUA、CCC、GGA及CGG)和对应的tRNA, 可提高外源基因、尤其是真核基因在原核系统中的表达水平及可溶性(Jain和Belasco 1995)。在本研究中, 超声波破碎后的菌体经SDS-PAGE检测发现, ABI5融合蛋白的绝大部分都是以可溶性形式存在于裂解液的上清中(本文未列出)。从本文的结果来看, 大肠杆菌的原遗传表达系统确实存在着不适合高等真核基因表达的因素。

除了上述遗传因素外, 外源目的基因的表达量也受细菌生长状态、诱导培养的温度和时间、诱导剂的浓度等因素的影响(LaVallie和McCoy 1995)。拟南芥*abi5*基因在IPTG终浓度为0.3 mmol·L<sup>-1</sup>时, ABI5融合蛋白的表达量在诱导4 h后达到最高, 占细菌裂解液上清(可溶性蛋白)的29.0%。

Ni-NTA亲和层析柱纯化的ABI5融合蛋白经SDS-PAGE分析时只有一条明显的蛋白带, 但用BandScan软件扫描时发现该条带蛋白含量只占到总量的81.6%。究其原因, 虽然只有一条明显的蛋白条带, 但该泳道的背景较深, 尤其是在蛋白条带

的下方。尚难确定的是由于ABI5融合蛋白降解所致抑或是其它少量杂蛋白引起。这些都需要更进一步的研究来阐释。

### 参考文献

- 萨姆布鲁克J, 费里奇EF, 曼尼阿蒂斯T (1998). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社
- Dai M, Xue Q, McCray T, Margavage K, Chen F, Lee JH, Nezames CD, Guo L, Terzaghi W, Wan J et al (2013). The PP6 phosphatase regulates ABI5 phosphorylation and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 25 (2): 517~534
- Finkelstein R (2010). Abscisic acid: a seed maturation and stress-response hormone. In: Taiz L, Zeiger E (eds). *Plant Physiology*. 5th ed. Sunderland: Sinauer Associates Press, 573~698
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12 (4): 599~609
- Garcia ME, Lynch T, Peeters J, Snowden C, Finkelstein R (2008). A small plant-specific protein family of ABI five binding proteins (AFPs) regulates stress response in germinating *Arabidopsis* seeds and seedlings. *Plant Mol Biol*, 67 (6): 643~658
- Jain C, Belasco JG (1995). RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. *Genes Dev*, 9: 84~96
- Kim SY, Ma J, Perret P, Li Z, Thomas TL (2002). *Arabidopsis* ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiol*, 130 (2): 688~697
- Kim SY, Thomas TL (1998). A family of basic leucine zipper proteins bind to seed-specification elements in the carrot *Dc3* gene promoter. *Plant Physiol*, 152: 607~613
- LaVallie ER, McCoy JM (1995). Gene fusion expression systems in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*, 6 (5): 501~506