

长喙田菁 *SrPCS1* 的原核表达 及多抗血清的制备

李安明, 邓青云, 李德华

(孝感学院 生命科学技术学院 湖北 孝感 432000)

摘要:以原核表达载体 pGEX-4T-1 为基础, 通过 PCR、酶切与连接构建了含长喙田菁 (*Sesbania rostrata*) 植物螯合肽合成酶 *SrPCS1* cDNA 开放阅读框序列的 GST-SrPCS1 原核表达载体 pAM34, 并将其转化表达菌株 BL21(DE3), 在 28 °C 用 0.1 mmol/L IPTG 诱导融合蛋白的表达, 通过 Western blotting 鉴定融合蛋白, 将 SDS-PAGE 分离得到的融合蛋白质免疫新西兰白兔, 通过 Western 点杂交对免疫血清的效价进行检测。研究结果表明: 通过大肠杆菌表达出 GST-SrPCS1 融合蛋白, 免疫血清的效价为 1:2 000, 制备的血清有较高的活性与特异性。

关键词:植物螯合肽合成酶; 原核表达; 融合蛋白; 抗血清

中图分类号: Q943.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)04-0812-05

Prokaryotic Expression of the Recombinant *SrPCS1* and Preparation of Polyclonal Anti-serum Against *SrPCS1*

LI An-ming, DENG Qing-yun, LI De-hua

(School of Life Sciences and Biotechnology, Xiaogan University, Xiaogan 432000, China)

Abstract: The prokaryotic expressing vector pAM34 containing *Sesbania rostrata* phytochelatin synthase1 open reading frame was constructed on the base of pGEX-4T-1 and transferred into *E. coli* BL21 (DE3), then the fused protein GST-SrPCS1 was induced by 0.1 mmol/L at 28 °C, identified by western blotting and the rabbit was immunized with the purified protein. The results suggested that the fusion protein GST-SrPCS1 was expressed and the titer of the anti-serum was about 1:2 000, indicating that the polyclonal anti-AtPCS1-His serum has high activity and speciality.

Key words: phytochelatin synthase; prokaryotic expression; fusing protein; anti-serum

重金属污染是全球性环境问题, 植物能够产生许多半胱氨酸含量丰富的蛋白质如谷胱甘肽 (GSH)、植物螯合肽 (PCS) 以及金属硫蛋白 (MT), 它们在解除重金属的毒害作用与维持植物体内重金属的稳定方面具有重要作用^[1-2]。PCS 是一类由酶催化合成的小肽, 具有 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ 的结构, 其中 $n = 2 \sim 11$ ^[3], 能够与重金属形成稳定的复合物, 然后将其从细胞质运输到液泡中^[4]。通过基因工程的方法在植物中表达与 PC 合成途径相关酶的基因, 包括 γ ECS、GS、CGS、APS 及 *TaPCS1* 提高了 PC 的含量, 而且提高了植物对重金属的抗性 with 累积量^[1-2]。已经克隆分离了许多 PCS 基因, 自从克隆到 PCS 以后, 通过在原核生物以及酵母中表达该基因与通过转基因植物研究其功能就开始了。在细菌和

收稿日期: 2011-04-25 修回日期: 2011-05-26

基金项目: 湖北省自然科学基金项目 (2005ABA083) 和湖北省重点(培育)学科: 农业资源利用 (0903)

作者简介: 李安明 (1968—), 男, 讲师, 博士, 主要从事基因工程研究, E-mail: Lsahmp68@yahoo.com.cn。

酵母中表达 PCS 提高了它们对重金属的抗性^[5-7],但是目前通过转基因植物研究 PCS 的功能得到的结论却不一致^[8-10]。

长喙田菁(*Sesbania rostrata*)是一种源于非洲热带的豆科植物,生长迅速,生物量高,能够耐受高浓度的 Zn、Pb、Cu、Cd 等多种重金属^[11]。本课题组前期已克隆了来自于长喙田菁的植物螯合肽合成酶基因(*SrPCS1*),并实现了该基因在酵母中的活性表达,并对该酶在重金属抗性中的作用进行了研究^[12]。本研究通过构建含有 *SrPCS1* cDNA 的大肠杆菌表达载体,进而制备 *SrPCS1* 的抗血清,获得特异的多克隆抗体,为进一步获得可用于重金属污染土壤植物修复的转基因植物做准备。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌菌株:大肠杆菌(*E. coli*) DH_{5α}, BL21(DE3) 作为大肠杆菌的表达宿主菌由本实验室保存。新西兰白兔及喂养饲料购自广州市实验动物中心。

表达载体 pGEX-4T-1(Amersham),硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司;抗体纯化用的填料 Protein A CL-4B 购自 Pierce 公司, SIGMA 公司产品:弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂等。GST 单克隆抗体,羊抗鼠 IgG 购自 Invitrogen 公司,各种限制性内切酶和连接酶均购自大连宝公司(TaKaRa)。

1.2 GST-SrPCS1 融合蛋白表达载体的构建

1.2.1 引物设计 为了构建 GST-SrPCS1 融合蛋白表达载体,在 *SrPCS1* 的起始密码子前面与终止密码子的后面设计了一对引物,并在起始密码子前引入 *Bam*HI 酶切位点,终止密码子后引入 *Xho*I 酶切位点,斜体表示酶切位点,由上海生工合成。引物序列如下:正向引物:F1:5' GGATCCATGGCGATGCGGGGTTGTA 3' 反向引物:T1:5' GCTCGAGGGAGATGCTAAGAAAAGG 3'。

1.2.2 表达载体的构建 用引物 F1 与 T1,以克隆有 *SrPCS1* 的质粒 pBY1 作为模板进行 PCR 反应,PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,用回收试剂盒(QIAGEN 公司)回收含有 *SrPCS1* 目的片段克隆到 pGEM-Teasy 碱裂解法提取重组质粒酶切鉴定后测序。再用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切经测序确认的质粒,回收含有 *SrPCS1* 目的片段与同样经 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后回收的 pGEX-4T-1 大片段,等比例混合,加入 T4DNA 连接酶(Promega 公司),16 °C 连接过夜,连接产物转化 *E. coli*. BL21 感受态细胞,提取重组质粒,用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定。

1.3 融合蛋白的表达

将鉴定正确过夜培养的菌液按体积分数为 1% 的比例转接到 10 mL 新鲜的 2 × YT 液体培养基(含 100 μg/mL Amp)中,于 30 °C 200 r/min 培养 3 h,加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,于 28 °C 下诱导表达。5 000 × g 离心 10 min 收菌。用 9 倍体积的 PBS 重悬菌体。经超声破碎离心取上清与沉淀 SDS-PAGE 电泳检测。

1.4 大肠杆菌重组蛋白的 Western 印迹

SDS-PAGE 电泳后,通过电转装置将表达蛋白质转至 NC 膜,用封闭液室温下封闭 1 h。倾去封闭液,用一抗稀释缓冲液稀释好 GST 单克隆抗体,放入膜,4 °C 慢摇过夜后,洗膜 3 次,每次 5 min。用封闭缓冲液配制含辣根过氧化物酶(hrp)-二抗(1:2 000)和辣根过氧化物酶(hrp)-抗体素抗体(1:1 000),放入膜,室温慢摇 2 h,洗膜 3 次,每次 5 min。荧光显色检测。

1.5 SrPCS1 抗体的制备、纯化与效价检测

1.5.1 抗血清的制备 将经过洗涤的包涵体进行 SDS-PAGE 胶电泳,切下目标蛋白条带并切碎于研钵中研碎,加入 3 mL PBS,研磨混匀后,再加入 3 mL 弗氏完全佐剂,用注射器反复吸打,充分混匀。在禁食 12 h 后,从兔耳的静脉近末端处抽血,每只兔取 5 mL 于 37 °C 放置 1 h,4 °C 过夜。5 000 × g 离心 10 min,吸出血清入一新灭菌的离心管中,-80 °C 冻存,留作对照。在每只兔的背部取 10 个点进行皮下注射抗原-佐剂混合物,每个点 100 ~ 200 μL 样液。初次免疫 4 个星期后,取初次免疫抗原用量的 1/5,与弗氏非完全佐剂混匀,进行第 1 次加强免疫注射。在加强免疫后第 10 天,如上取血并取血清。通过与表达的上清进行反应以检验效价和免疫特异性。以后每隔两星期加强 1 次,当效价达到所要求时,正式取血,并如上取血清。

1.5.2 Western 点杂交 将尼龙膜切成 16 mm × 6 mm 小块,用铅笔划好网格,每块标 3 个点样。将膜块成 45°角浸入到 TBS 中 5 min,取出置于滤纸上晾干 5 min。将 1 μL 抗原或 BSA 轻轻地点在膜的网点上。待膜上液滴充分晾干后,将膜块成 45°角浸入到封闭液中,室温下置于水平摇床上缓缓振荡 1 h。倒掉封闭液,加入 1 mL TTBS,室温下摇 5 ~ 10 min 洗膜,按上面 Western 印迹的方法进行印迹与显色反应。

1.5.3 抗体的纯化 Protein A 亲和柱的装填:先将凝胶浆和所有的缓冲液平衡至室温。垂直安装层析柱,加入约 1/3 体积结合缓冲液 I,排除柱底气泡,当柱内还余有 1 cm 高的缓冲液时,封闭柱的出水口。吸取 2 mL 凝胶浆,沿柱壁缓缓加入层析柱中。用结合缓冲液 I 将挂在枪头上的凝胶洗入层析柱中。打开柱底出口,待其缓缓流出。流干后加入 2 mL 结合缓冲液 I,封闭柱底,将柱子垂直固定于一烧杯中,抽气 30 min × 2。抽气结束后,打开柱底出口,当液体流干时,加入结合缓冲液 I 平衡柱。

亲和层析的上样与洗脱:将血清用等体积 0.3 × PBS 稀释并混匀。10 000 × g 离心 20 min 取上清,过 0.22 μm 滤膜。将处理好的样品装入柱中,用 3 × 5 mL 亲和平衡缓冲液洗柱。加入 6 mL 洗脱缓冲液 I 洗脱,按 0.5 mL/管收集在预装了 100 μL 中和缓冲液的 Ep 管中。抗体样品分装后于 -80 °C 保存。

1.6 抗体蛋白浓度的测定

参考 Bradford 的方法略加修改^[13],以梯度浓度的 BSA 为标准品,作成标准曲线。测定时,样品和作业液按 1:1 混合,室温放置 10 min,595 nm 处测吸光值,再根据标准曲线计算样品的蛋白含量。

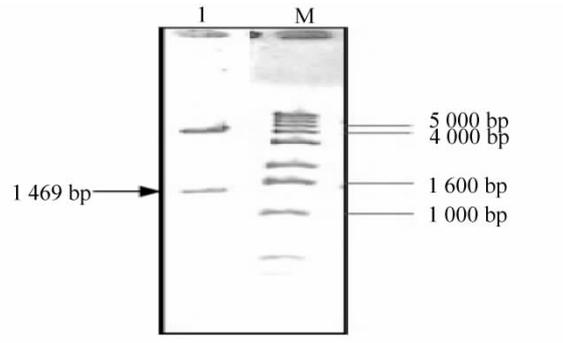
2 结果与分析

2.1 大肠杆菌 GST - SrPCS1 融合表达载体的构建及鉴定

将构建好的 pAM34 转化 BL21,提取抗性平板上生长良好菌落的质粒用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切鉴定,得到图 1 所示的结果,酶切所得到的片段大小是 1 469 bp,符合 *SrPCS1* cDNA 的大小,证明载体的构建是成功的,并且已经成功地导入了 BL21。

2.2 融合蛋白 GST - SrPCS1 的表达

将携有质粒 pAM34 及只有 pGEX - 4T - 1 质粒的 BL21 菌株经 0.1 mmol/L IPTG 诱导培养,不同时间离心收集菌体,提取总蛋白,为了检测表达蛋白的可溶性,将表达后的菌体经超声破碎,离心后分别取上清和沉淀进行 SDS - PAGE 电泳,如图 2。得到 50 kDa 大小的蛋白质与 GST - SrPCS1 预期大小一致,且在诱导 4 h 后表达量最高,但绝大部分都在沉淀中。

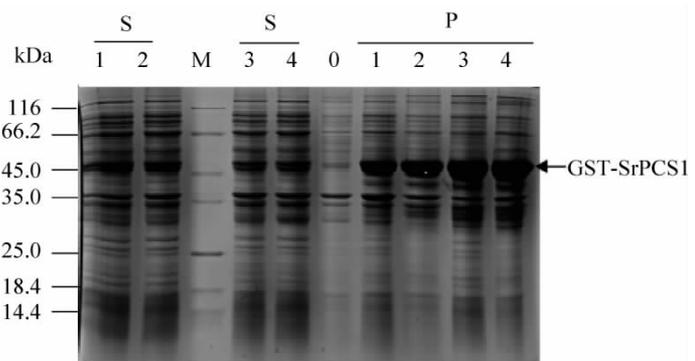


1: pAM34 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切; M: 1Kb DNA ladder。

1: pAM34 cleaved with *Bam*HI and *Xho*I; M: 1Kb DNA ladder。

图 1 表达载体 pAM34 酶切分析

Fig. 1 Restriction endonuclease analysis of expression vector pAM34



诱导温度: 28 °C; IPTG: 0.1 mmol/L; S: 可溶性蛋白; P: 包涵体蛋白; 0 - 4: 诱导时间/h; M: 蛋白分子量标准,左边的数字对应每条带的大小。

Induction temperature: 28 °C; IPTG: 0.1 mmol/L; S: soluble proteins; P: inclusion proteins; M: protein Marker; 0 - 4: induced hours; M: Protein molecular weight standard; The left number corresponding to each belt size.

图 2 GST - SrPCS1 融合蛋白的表达

Fig. 2 Expression of GST - SrPCS1 in *E. coli* BL21 induced with 0.1 mmol/L IPTG in different time at 28 °C

2.3 融合蛋白 GST - SrPCSI 的 Western - blot 检测

将融合蛋白 GST - SrPCSI 经 SDS - PAGE 电泳后,用电转仪将蛋白质转移到 NC 膜上,进行 Western - blot 检测(图 3)。经 IPTG 诱导后含重组质粒 pAM34 菌体包涵体在分子量 50 kDa 有一特异性条带,与预期蛋白大小一致,但上清没有杂交信号,显示的带位与 SDS - PAGE 染色结果一致说明插入表达载体 pGEX - 4T - 1 的 SrPCSI 基因经 IPTG 诱导后获得稳定表达,但表达的蛋白以包涵体的形式存在。

2.4 兔抗 SrPCSI 免疫血清的获得及其效价测定

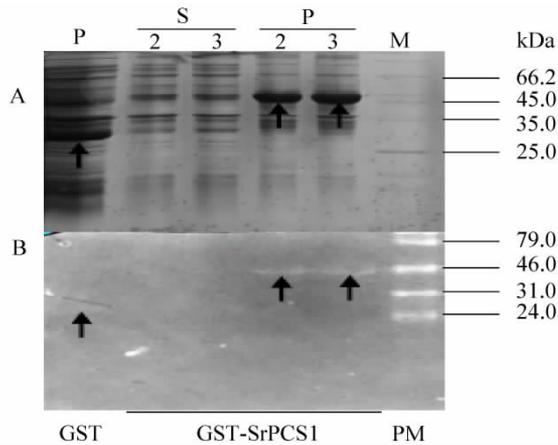
将经过洗涤的 GST - SrPCSI 包涵体进行 SDS - PAGE 电泳,然后切下目标蛋白(50 kDa)条带研碎,磨碎后用完全弗氏佐剂乳化,采用皮下注射的方法免疫新西兰白兔,每次加强免疫后取 3 ~ 5 mL 的血检测抗体效价,经过 3 次加强免疫后观大量取血,获得 20 mL 的免疫血清。为了获得最后血清样品的效价,以细菌表达的总蛋白为抗原,进行 Western 点杂交分析(图 4)。细菌总蛋白选用 3 种浓度梯度,取免疫血清和免疫前血清分别稀释成浓度梯度进行 Western 分析,以 1:1 000 稀释的免疫前血清作一抗时,看不到杂交信号,而免疫血清在 1:2 000 仍有较强的信号。

2.5 抗体的初步纯化

用 Protein A 亲和柱将 IgG 抗体分离纯化出来,洗脱后分管收集,测定蛋白含量,结果如图 5,其中第 3 管的含量最高,为 1.5 mg/mL,得到约 1.2 mg 的抗体,分装后于 -80 °C 保存备用。

3 结论与讨论

通过构建原核表达载体,将目的蛋白在大肠杆菌内高效表达,从而获得大量、高纯度且具有生物活



S: 可溶性蛋白; P: 包涵体蛋白; 2 - 3: 诱导时间/h; M: 蛋白分子量标准; PM: 预染蛋白分子量标准,右边的数字对应它的每条的大小; 箭头表示 GST, GST - SrPCSI。

S: soluble proteins; P: inclusion proteins; 2 - 3: induced hours; M: protein Marker; PM: prestain protein marker; The right number corresponding to each belt size. The arrows show the target proteins GST, GST - SrPCSI.

图 3 融合蛋白 GST - SrPCSI 蛋白印迹分析

Fig. 3 Western blot analysis of GST - SrPCSI fusion protein

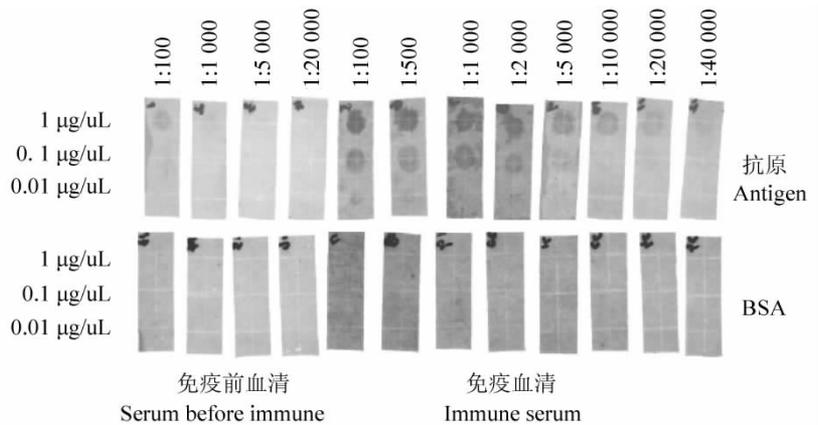


图 4 Western 点杂交印迹法检测抗血清的效价

Fig. 4 Efficiency of Immune - sera qualified by western dot blot analysis

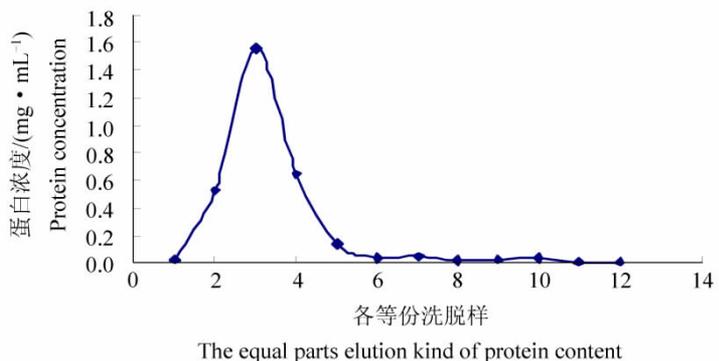


图 5 利用 Protein A 亲和柱纯化抗体的各等分洗脱样的蛋白含量

Fig. 5 Quantity of antibody after purified with protein A column

性的目的蛋白是体外研究酶活性的重要方法,但由于原核生物缺乏蛋白的修饰系统,诱导外源基因在大肠杆菌内表达过程中经常形成包涵体。本研究诱导的融合蛋白 GST-SrPCSI 主要以包涵体的形式存在。PCS 蛋白本身含有较多的 cys 残基, cys 残基上巯基间二硫键的错误形成也提高了蛋白本身错误折叠的机率^[14-15],要想得到大量的具有活性的目的蛋白,可能需要借助真核表达系统。

制备高效价的抗体是检测基因的表达和研究基因功能的首要前提^[16]。多克隆抗体的制备具有简单、快速和效果好的优点。即使用变性的抗原,只要具有蛋白的一级结构也是可以用于免疫动物制备抗体。本研究以免疫后兔子的血清直接进行实验,可获得效价高达 1:2 000 的多克隆抗体血清,表明直接从 PAGE 胶中纯化目的蛋白用于多克隆抗体的制备方案可行。

参考文献:

- [1] Zhu Y L, Pilon-Smits E A H, Tarun A S, et al. Cadmium tolerance and accumulation in Indian mustard is enhanced by overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase [J]. *Plant Physiol*, 1999, 121(4): 1169-1178.
- [2] Zhu Y L, Pilon-Smits E A H, Jouanin L, et al. Overexpression of glutathione synthetase in Indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(1): 73-79.
- [3] Rauser W E. Phytochelatin synthase [J]. *Annu Rev Biochem*, 1990, 59: 61-86.
- [4] Cobbett C S. A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species [J]. *Trends in Plant Science*, 1999, 4(9): 335-337.
- [5] Clemens S, Kim E J, Neumann D, et al. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast [J]. *EMBO J*, 1999, 18(12): 3325-3333.
- [6] Osaki Y, Shirabe T, Tamura S, et al. A functional putative phytochelatin synthase from the primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008, 72(12): 3306-3309.
- [7] Singh S, Lee W, Dasilva N A, et al. Enhanced arsenic accumulation by engineered yeast cells expressing Arabidopsis thaliana phytochelatin synthase [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, 99(2): 333-340.
- [8] Pomponi M, Censi V, di Girolamo V, et al. Overexpression of Arabidopsis phytochelatin synthase in tobacco plants enhances Cd(2+) tolerance and accumulation but not translocation to the shoot [J]. *Planta*, 2006, 223(2): 180-190.
- [9] Gasic K, Korban S S. Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) plants expressing an Arabidopsis phytochelatin synthase (AtPCS1) exhibit enhanced As and Cd tolerance [J]. *Plant Mol Biol*, 2007, 64(4): 361-369.
- [10] Gasic K, Korban S S. Expression of Arabidopsis phytochelatin synthase in Indian mustard (*Brassica juncea*) plants enhances tolerance for Cd and Zn [J]. *Planta*, 2007, 225(5): 1277-1285.
- [11] Yang ZY, Chen F H, Yuan J G, et al. Responses of *Sesbania rostrata* and *S. cannabina* to Pb, Zn, Cu and Cd toxicities [J]. *J Environ Sci (China)*, 2004, 16(4): 670-673.
- [12] Li A M, Yu B Y, Chen F H, et al. Characterization of the *Sesbania rostrata* phytochelatin synthase gene: Alternative splicing and function of four isoforms [J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(8): 3269-3282.
- [13] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [14] Philip A R, Olena K V, Daniel J R. Weeds, worms, and more. Papain's long-lost cousin, phytochelatin synthase [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2463-2474.
- [15] Mitragli A, Fane B, Pettingell C H, et al. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation [J]. *Science*, 1991, 253(5015): 54-58.
- [16] Harlow E D, David J. *Antibodies, a laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998: 282-318.