

拟南芥生长素结合蛋白 ABP1 的原核表达及蛋白纯化*

刘 智 黄志刚 吴尚虹 彭 琼 于 峰

(湖南农业大学植物激素与生长发育湖南省重点实验室 湖南长沙 410128)

摘要 目的 鉴于生长素结合蛋白(Auxin Binding Protein, ABP)能与生长素特异性结合,因而探讨研究其直接用于生长素信号转导机理和生物传感器的可能性与可行性。**方法** 通过 RT-PCR 获得拟南芥生长素结合蛋白 1 (Auxin binding protein 1, ABP1) 的全长 CDS, 将其克隆到原核表达载体 pGEX4T-1 中, 成功构建 pGEX4T-1-ABP1 重组表达载体。经酶切、PCR 及 DNA 测序鉴定后, 将阳性质粒转化表达受体菌 BL21(DE3)。加入异丙基- β -D- 硫代半乳糖苷(IPTG)进行诱导后, 取样进行 SDS-PAGE 分析。**结果** 成功表达出一个分子量约为 43 kD 的可溶性融合蛋白, 并利用 GST 亲和柱纯化方式得到了 ABP1。**结论** 通过原核表达并经 GST 柱纯化后获得 ABP1, 为生长素生物传感器的研制开辟新的途径。同时为进一步研究 ABP1 与生长素的信号转导机制和生长素在生物传感测定技术中的研究和应用奠定基础。

关键词 拟南芥; 生长素结合蛋白; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号 Q78, Q946-3 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2012) 26-5049-04

Prokaryotic Expression and Protein Purification of the Auxin Binding Protein 1 in Arabidopsis*

LIU Zhi, HUANG Zhi-gang, WU Shang-hong, PENG Qiong, YU Feng

(Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development,

Hunan Agricultural University, Changsha Hunan 410128 China)

ABSTRACT Objective: Auxin-binding protein can bind an auxins specifically, and can be used to study the mechanism of the signal transduction of auxin and bio-sensors. **Methods:** An auxin-binding protein gene (Auxin binding protein 1, ABP1) was obtained by RT-PCR from arabidopsis, and was cloned into the prokaryotic expression vector pGEX4T-1 (pGEX4T-1-ABP1). Identified by digestion, PCR and DNA sequencing, the recombinant plasmid was transformed into the foreign bacteria BL21 (DE3). The ABP1 protein was induced by IPTG and detected by SDS-PAGE. **Results:** The soluble fusion protein was expressed successfully with a molecular weight of 43 kDa. The protein was purified with GST affinity column. **Conclusion:** The prokaryotic expression and purity of GST-ABP1 protein show a way to development new auxin biosensor and also laid a foundation for the further study of auxin signal transduction and biosensor research.

Key words: Arabidopsis; Auxin Binding Protein; Prokaryotic Expression; Protein Purification

Chinese Library Classification (CLC): Q78, Q946-3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 26-5049-04

前言

生长素是较早被发现的植物激素之一,其非对称分布调控了植物的胚胎建成,形态发生,器官建成和生殖过程^[1,2]。生长素在细胞水平调控细胞分裂,生长和分化^[3,4]。自 1991 年 Tai^[5]提出燕麦胚芽鞘弯曲角度以来,生长素量的测定一直是生长素研究领域的热点问题。

生长结合体蛋白 1 (ABP1) 是一个在所有绿色植物中都存在的 22-kDa 糖蛋白^[6,7]。大约四十年前,它最先在玉米胚芽鞘中被发现^[8],目前被认为是一个生长素的受体蛋白^[7,9-15]。ABP1 在很多生长素调控的过程中都起到重要作用,包括细胞分裂和伸长,生长素响应基因的表达和细胞膜上生长素的快速反应^[7]。尽管一系列的生化实验已经证实了 ABP1 与生长素的结合能力,但是其具体的信号转导机制 30 年来都进展甚微^[16-19]。ABP1 的 C 端含有 KDEL 蛋白序列,暗示其很可能是经过了内质网的修

饰^[20]。同时有实验证实,有少部分 ABP1 蛋白定位于细胞膜上,这很可能是 ABP1 结合生长素信号的主要场所^[10,20-21]。如果其作为一个生长素受体,那么这些细胞膜定位的 ABP1 蛋白应该具有感受细胞内生长素的变化并导致下游细胞传递的功能,由于生长素缺少跨膜结构域,故其信号要传导进入细胞内部,必须由一些其他蛋白加以辅助,但是多年来一直无法对该问题有所突破^[7]。

生物传感器的研究始于 20 世纪 60 年代初期。近年来,生物传感器迅速发展成为一种新型的检测形式,其具有信号产生与信号测量一体化,结构紧凑,灵敏度高,可微型化,使用方便等特点,并已经在环境监控,临床检测,药物分析等方面得到广泛应用^[22-24]。在以往的生长素生物传感器研制中常使用抗体,特别是单克隆抗体作为识别分子,而 ABP1 作为生长素的结合蛋白,能够特异性结合生长素。因而有可能作为新型的识别分子用于生长素生物传感器的研制。

* 基金项目 湖南农业大学科学人才科学基金项目 (08YJ04)

作者简介 刘智(1985-),男,硕士研究生,研究方向 植物学,E-mail: 254750589@qq.com

(收稿日期 2012-03-15 接受日期 2012-04-10)

本研究拟克隆拟南芥 ABPI 基因的开放阅读框,构建其原核表达载体 pGEX4T-1-ABPI 后转化表达受体菌 BL21(DE3),经 SDS-PAGE 进行表达检测与鉴定后,进一步纯化获得 ABPI,为进一步研究 ABPI 与生长素的信号转导机制和生长素在生物传感测定技术中的研究和应用奠定基础。

1 材料

1.1 植物材料

拟南芥及拟南芥总 cDNA 材料由本实验室种植并获得。

1.2 质粒和原核表达菌株

大肠杆菌克隆菌株 Top10、蛋白质原核表达菌株 BL21(DE3)及原核表达载体质粒 pGEX4T-1 均由本实验室保存。

1.3 工具酶和试剂

Taq DNA 聚合酶、La Taq DNA 聚合酶、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*R I, pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;溶菌酶、IPTG 等试剂均购自北京全式金公司;TIANScrip cDNA 第一链合成试剂盒购自 TIANGEN 公司;GST 融合蛋白纯化试剂购自 Pierce。

1.4 方法

1.4.1 ABPI cDNA 的扩增与纯化 根据 TAIR 数据库中获得拟南芥 ABPI 的 cDNA 序列(登录号为 AT4G02980)及质粒 pGEX4T-1 载体图谱设计 PCR 引物,上游引物引入 *Bam*HI 酶切位点 ABPI-GSTF 5'-GCATGGATCCATCGTACTTTCTGTTGGT-TCC-3',下游引物引入 *Eco*R I 酶切位点 ABPI-GSTR 5'-GCA-GAATTCGTGATTCTTGAATGCATTGC-3',划线部分为引入的酶切位点。取拟南芥叶片组织约 100 mg,提取总 RNA。采用 TIANScrip cDNA 第一链合成试剂盒合成 cDNA。以拟南芥总 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,反应程序 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 40 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 50 s, 共 29 个循环,最后再 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶回收纯化后,与 pMD18-T 载体连接,转入大肠杆菌 Top10 感受态细胞,挑取单菌落 PCR 扩增鉴定重组转化子,将鉴定正确的转化子送北京华大基因生物技术有限公司测序确认。

1.4.2 原核表达载体的构建 将阳性克隆和载体 pGEX4T-1 质粒分别用 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切后,回收相应的酶切产物,在 T4 连接酶的作用下将 pMD18-T-ABPI 酶切片段和 pGEX4T-1 酶切产物 16℃ 连接过夜,转入 Top10 感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素(Amp)抗性的 LB 平板上,37℃ 培养过夜,挑单菌落培养,提取质粒进行 PCR, *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切鉴定,重组质粒命名为 pGEX4T-1-ABPI。

1.4.3 重组蛋白的诱导表达 将鉴定为阳性的重组质粒 pGEX4T-1-ABPI 转化表达菌株 BL21(DE3),接种于含氨苄青霉素(Amp)抗性的 LB 平板上,37℃ 过夜培养。次日挑取阳性克隆,接种于 5 mL YTA 液体培养基(含 Amp),37℃ 振荡培养过夜。次日以 1:100 的比例接种于新鲜的 YTA 液体培养基中,37℃ 振荡培养至 OD600 为 0.7 时,加 IPTG 至终浓度 0.8 mM, 25℃ 下诱导 10 h 取样。将所取样品离心收集菌体,进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。

1.4.4 ABPI 蛋白的纯化 取最优表达条件,25℃, 0.8 mM IPTG 诱导 10 h 的菌液 50 mL, 6000 rpm 离心 20 min,将沉淀重悬于

5 mL PBS 缓冲液中,加入溶菌酶、蛋白酶抑制剂冰上处理 30 min,冰浴超声破碎 30 min, 6000 rpm 于 4℃ 离心 20 min,收集上清,用 Immobilized Glutathione 纯化 ABPI 蛋白(按 Pierce 公司操作手册进行),收集洗脱液,12% SDS-PAGE 电泳分析和鉴定目的蛋白质。

2 结果

2.1 ABPI CDS 的扩增

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,得到一条长度约 541 bp 的 DNA 片段(图 1),该片段与预期片段大小基本相同。将扩增产物克隆入 pMD18-T 载体后,经 PCR 扩增和 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切鉴定后,挑选阳性克隆用于测序。测序结果显示扩增得到的 cDNA 序列长为 541 bp,包含了完整的开放阅读框,与 TAIR 数据库中公布的序列一致。

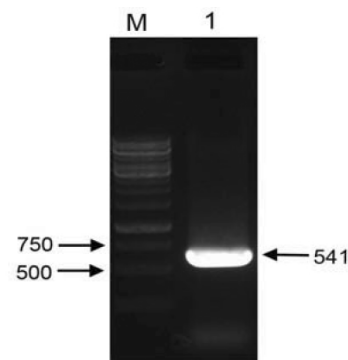


图 1 ABPI 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Agarose gel electrophoretic patterns of PCR products

注 M DNA 分子量标准, 1 RT-PCR 产物。

Note: M DNA Marker, 1 The product of RT-PCR.

2.2 ABPI 原核表达载体的构建

重组质粒 pMD18-T-ABPI 用 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切后,回收目的片段,与经同样酶切的 pGEX4T-1 载体连接,转化 Top10 感受态细胞,经 PCR 扩增和双酶切鉴定(图 2)均可见 541 bp 的目的片段,表明成功地构建了 pGEX4T-1-ABPI 原核表达载体。

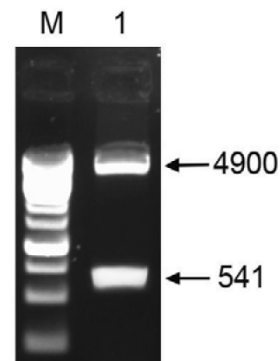


图 2 重组质粒 pGEX4T-1-ABPI 酶切分析

Fig.2 Enzymatic digestion of recombinant plasmid pGEX4T-1-ABPI

注 M DNA 分子量标准, 1 重组质粒 pGEX4T-1-ABPI 的 *Bam*HI 和 *Eco*R I 双酶切

Note: M DNA Marker, 1 Recombinant plasmid pGEX4T-1-ABPI digested by *Bam*HI and *Eco*R I

2.3 ABPI 融合蛋白的诱导表达

重组质粒 pGEX4T-1-ABPI 转化大肠杆菌 BL21(DE3)后, 在 25℃ 条件下, 0.8 mM 的 IPTG 诱导其表达。结果发现, 加了 IPTG 诱导的重组质粒能够较多的表达一条约 43 kD 的特异蛋白, 而未加 IPTG 诱导的重组质粒表达的 43 kD 的特异蛋白表达量微弱 (图 3), 初步表明 ABPI 蛋白的表达获得成功。

2.4 ABPI 融合蛋白的纯化及检测

将超声破碎后的细菌裂解液离心, 取上清于 GST 亲和柱结合。为了更好的去除杂蛋白影响, 先用 PBS 缓冲液进行 3 次漂洗, 再用洗脱缓冲液洗脱目的蛋白。图 3 是蛋白的 SDS-PAGE 检测结果, 从图中可看出, 在优化的表达条件下能有效的纯化获得 ABPI 融合蛋白。

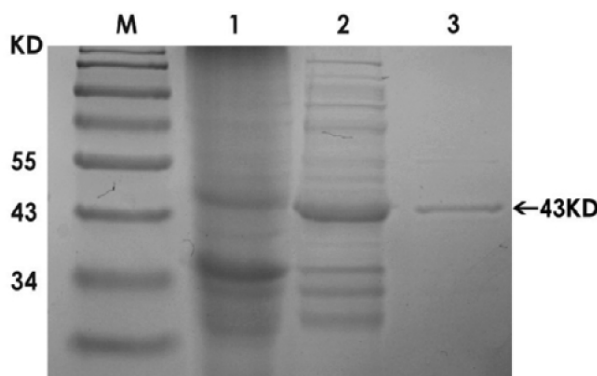


图 3 分析 ABPI 融合蛋白的诱导表达形式及蛋白的纯化过程(12% SDS-PAGE)

注: M 蛋白分子量标准, 1 IPTG 未诱导, 2 IPTG 诱导, 3 洗脱液洗脱的蛋白液。

Fig.3 Analysis of expression pattern of ABPI protein and purified process (12%SDS-PAGE)

Note: M Protein Marker; 1 Uninduced with IPTG, 2 Induce with IPTG, 3 Eluted protein products with eluent.

3 讨论

本研究中将 pGEX4T-1-ABPI 转化受体菌 BL21(DE3), 经 25℃, 0.8 mM IPTG 诱导后表达出一个分子量约为 43 kD 左右的蛋白质, 与推测的 ABPI 蛋白产物大小基本一致。实验最初选用 37℃, 1 mM IPTG 诱导, 但目的蛋白大部分都以不可溶的形式表达。原因是原核生物缺乏蛋白的后修饰系统, 诱导外源基因在大肠杆菌内表达过程中目的蛋白往往会以包涵体的形式表达, 通过降低诱导温度或减少 IPTG 的用量可以减慢外源蛋白的合成速度, 提高目的蛋白的可溶性。将超声破碎后的细菌裂解液离心, 取上清于 GST 珠子结合纯化。为了更好的得到较纯的目的蛋白, 先用细菌裂解缓冲液 PBS 平衡珠子, 然后又用 BPS 液洗脱杂蛋白和没结合的蛋白。实验结果表明, 诱导上清中含有 ABPI 蛋白的量比最后纯化得到 ABPI 蛋白的量要多一倍多。原因可能是: (1) 目的蛋白在 PBS 洗脱杂蛋白的同时有少部分与杂蛋白一起被洗脱掉; (2) 在人工条件下纯化得到的目的蛋白中有少部分蛋白的 GST 标签未能充分暴露出来而导致与 GST 珠子结合不紧密; (3) GST 珠子用量过少, 未能让所有的目的蛋白都与珠子结合。因此, 回收杂蛋白洗脱液再

次跑 SDS-PAGE 能确定在洗脱过程中目的蛋白的损失量; 对于 GST 珠子的用量问题还有待进一步研究, 也许能很好的提高纯化率。综上所述, 本实验只是获得了较纯的目的蛋白 ABPI, 但纯化效率有待完善, 这也是对实验材料和实验成本的节约。SDS-PAGE 电泳结果显示 纯化后的泳道上只有在分子量为 43 kD 处有一条显色带, 表明在优化后的条件下能有效获得目的蛋白 ABPI。

植物激素的免疫传感测定技术是一种结合了免疫技术与传感技术的新方法, 成本低, 灵敏度高。可望成为一种测定植物激素的新型技术体系。植物激素结合蛋白或受体能够特异性结合植物激素, 因而有可能代替抗体作为高特异性识别分子用于植物激素的生物传感测定。本研究通过原核表达并经 GST 柱纯化后获得 ABPI, 为生长素生物传感器的研制开辟新的途径。将纯化后的拟南芥 ABPI 蛋白做为免疫原制备抗体, 也可用于拟南芥生长素信号转导机理的研究。

参考文献 (References)

- [1] Leyser O. Dynamic integration of auxin transport and signaling[J]. Curr Biol, 2006, (16):424-433
- [2] Benjamins R, Scheres B. Auxin: the looping star in plant development [J]. Annu Rev Plant Biol, 2008, (59):443-465
- [3] Mockaitis K, Estelle M. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2008, (24):55-80
- [4] Chapman E J, Estelle M. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants[J]. Annu Rev Genet, 2009, (43):265-285
- [5] Lincoln T, Eduardo Z. Plant physiology[M]. Benjamin/Cummings Pub Co, 1991: 407-413
- [6] Diekmann W, Venis M A, Robinson D G. Auxins induce clustering of the auxin-binding protein at the surface of maize coleoptile protoplasts [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, (92):3425-3429
- [7] Tromas A, Paponov I, Perrot-Rechenmann C. AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects [J]. Trends Plant Sci, 2010, (15):436-446
- [8] Hertel R, Thomson K S, Russo V E A. In-vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles[J]. Planta, 1972, (107):325-340
- [9] Lobler M, Klambt D. Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (Zea mays L.) [J]. II Localization of a putative auxin receptor [J]. J Biol Chem, 1985, (260):9854-9859
- [10] Jones A M, Herman E M. KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall [J]. Plant Physiol, 1993, (101):595-606
- [11] Brown J C, Jones A M. Mapping the auxin-binding site of auxin-binding protein 1[J]. J Biol Chem, 1994, (269):21136-21140
- [12] Jones A M, et al. Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1[J]. Science, 1998, (282):1114-1117
- [13] Timppe C. Auxin binding protein: curiouser and curiouser [J]. Trends Plant Sci, 2001, (6):586-590
- [14] Napier R M, David K M, Perrot-Rechenmann C. A short history of auxin-binding proteins[J]. Plant Mol Biol, 2002, (49):339-348
- [15] Kramer E M. Auxin-regulated cell polarity: an inside job? [J]. Trends Plant Sci, 2009, (14):242-247
- [16] Venis M A, Napier R M, Barbier-Brygoo H, et al. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist

- activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A 1992, (89):7208-7212
- [17] Thiel G, Blatt M R, Fricker M D, et al. Modulation of K⁺ channels in Vicia stomatal guard cells by peptide homologs to the auxin-binding protein C terminus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993, (90):11493-11497
- [18] Leblanc N. A novel immunological approach establishes that the auxin-binding protein, Nt-abpl, is an element involved in auxin signaling at the plasmamembrane[J]. J Biol Chem, 1999, (274):28314-28320
- [19] Baully J M. Overexpression of auxin-binding protein enhances the sensitivity of guard cells to auxin[J]. Plant Physiol, 2000, (124):1229-1238
- [20] Tian H, Klamt D, Jones A M. Auxin-binding protein 1 does not bind auxin within the endoplasmic reticulum despite this being the predominant subcellular location for this hormone receptor[J]. J Biol Chem, 1995, (270):26962-26969
- [21] Henderson J. Retention of maize auxin-binding protein in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin[J]. Planta, 1997, (202):313-323
- [22] Li Jin, Wu Zhao-yang, Xiao Lang-tao, et al. A Novel Piezoelectric Biosensor for the Detection of Phytohormone β -Indole Acetic Acid [J]. Analytical Sciences, 2002, 18(1):1-5
- [23] Li Jin, Xiao Lang-tao, Zeng Guang-ming, et al. A Renewable Amperometric Immunosensor for Phytohormone β -indole Acetic Acid Assay [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 494(1):177-185
- [24] Wang Ruo-zhong, Xiao Lang-tao, Yang Ming-hui, et al. Amperometric Determination of Indole-3-acetic Acid Based on Platinum Nanowires and Carbon Nanotubes [J]. Chinese Chemical Letters, 2006, 17(12):1585-1588

(上接第 5056 页)

- [10] Ozturk SS, Palsson BO. Physiological changes during the adaption of hybridoma cells [J]. Biochemical and Biotechnology, 1991, 37: 35-46
- [11] 黄志宏, 方积乾. 数理统计方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 258-259
- Huang Zhi-hong, Fang Ji-qian. Mathematical Statistics [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993: 258-259
- [12] 汪东海. 重组人促红细胞生成素中唾液酸含量对体内生物活性的影响 [J]. 中国生物制品杂志, 1999, 12(4): 227-228
- Wang Dong-hai. Recombinant human erythropoietin erythropoietin hormone in sialic acid content on the in vivo biological activity [J]. Chinese Journal of Biological Products, 1999, 12(4): 227-228
- [13] 郑立恒, 李恒, 宋桂芹, 等. CHO 无血清培养基研究 [J]. 四川生理科学杂志. 2007, 29(1): 3-5
- Zheng Li-heng, Li Heng, Song Gui-qin, et al. CHO serum-free medium for research [J]. Journal of Physiological Sciences, 2007, 29(1): 3-5
- [14] 陈昭烈, 肖成祖. 动物细胞无血清培养基及其应用 [J]. 生物工程进展, 1994, 14(5): 23-27
- Chen Zhao-lie, Xiao Cheng-zu. Serum-free medium be using culture Animal cells and its application[J]. Advances in bioengineering, 1994, 14(5): 23-27
- [15] 申烨华, 耿信笃. CHO 细胞表达系统研究新进展 [J]. 生物工程进展. 2000, 20(4): 23-25
- Shen Ye-hua, Geng Xin-du. CHO cell expression system progress [J]. Advances in bioengineering, 2000, 20(4): 23-25
- [16] Keen MJ, Rapson NT. Development of a serum free culture media for the large scale production of recombinant protein from a Chinese hamster ovary cell line [J]. cytotechnology, 1995, 17: 153-163
- [17] Glassy MC, Tharakan JP, Chao PC. Serum free media in hybridoma culture and monoclonal antibody production [J]. Biochemical and Biotechnology, 1988, 32: 1015-1028
- [18] 余泽华, 刘冬连, 陈曲侯. 昆虫细胞无血清培养基的研究进展 [J]. 生物工程进展, 1996, 16(1): 45-49
- Yu Ze-hua, Liu Dong-lian, Chen Qu-hou. Insect cell research progress in serum-free medium [J]. Biological Engineering Progress, 1996, 16(1): 45-49
- [19] 王智宇, 王佳凤. 进口与国产 DMEM 在 CHO 细胞培养中的应用 [J]. 中国临床医学实践论坛. 长春: 吉林科学技术出版社, 2003: 19-20
- Wang Zhi-yu, Wang Jia-feng. Import and domestic DMEM in CHO cell culture [J]. Chinese Clinical Practice Forum. Changchun: Ji Lin Science and Technology Press, 2003: 19-20
- [20] 熊宗贵. 生物技术制药 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 156-160
- Xiong Zong-gui. Biotechnology pharmaceutical [M]. Higher Education Press Of Beijing, 1999: 156-160