

拟南芥胱硫醚- γ -合成酶(D-AtCGS)抗血清制备及对D-AtCGS转基因大豆的检测

王义鹏^{1,3}, 于洋², 孙石², 许艳丽¹, 侯文胜²

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081; 3. 东北林业大学 生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:构建了N端缺失拟南芥CGS基因(*D-AtCGS*)的原核表达载体, 对其进行了原核表达、蛋白纯化和抗血清制备, 并利用获得的抗血清对国家大豆改良中心北京分中心获得的组成型表达、种子特异性表达的*D-AtCGS*转基因大豆及转全长*AtCGS*(*F-AtCGS*)和*D-ATCGS*的豆科模式植物百脉根进行了Western blot检测, 结果表明: 各供试转基因材料的检测信号明显高于野生型对照, 最终成功建立了*AtCGS*转基因大豆的Western blot检测方法, 该研究可为*AtCGS*的表达分析和转基因植物检测提供良好的技术支持。

关键词: D-AtCGS; 原核表达; 抗血清制备; 转基因大豆检测

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0537-04

Preparation of Polyclonal Antibody against D-AtCGS and Detection of D-AtCGS in Transgenic Soybean Plants

WANG Yi-peng^{1,3}, YU Yang², SUN Shi², XU Yan-li¹, HOU Wen-sheng²

(1. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150040, Heilongjiang; 2. National Key Facility for Crop Resources and Genetic Improvement, Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081; 3. College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China)

Abstract: Methionine (Met) has very important physiological functions as an essential sulfur-containing-amino acid. Cystathionine- γ -synthase (CGS) is the key enzyme in Met synthesis. In this study, prokaryotic expression vector of *Arabidopsis D-AtCGS* gene was constructed, and D-AtCGS protein was purified to prepare polyclonal antibody against D-AtCGS. Then transgenic soybean constitutive expressing or seeds specific expressing *D-AtCGS* and *Lotus corniculatus* transgenic plants with *F-AtCGS* or *D-AtCGS* obtained by Beijing Branch Center of National Center for Soybean Improvement were detected by Western blot method using polyclonal antibody we prepared. Results showed that detection signal of transgenic plants were all much stronger than wild type. At last, Western blot method for detection of transgenic soybean plants with *AtCGS* gene was successfully established. This work provides technology methods for analysis of CGS expression and detection of CGS transgenic plants.

Key words: D-AtCGS; Prokaryotic expression; Preparation of polyclonal antibody; Detection of transgenic plants

蛋氨酸作为含硫必需氨基酸, 具有重要的生理功能^[1]。它不仅是蛋白质的构成成分, 还是mRNA翻译的起始氨基酸^[2]。其下游产物硫腺苷甲硫氨酸是生物体内最重要的甲基供体, 同时还具有转硫、转氨丙基的作用^[3]; 其衍生物硫甲基甲硫氨酸是重要的硫转运分子, 与生物硫代谢密切相关^[2]。人和非反刍类动物不能自身合成蛋氨酸, 只能依靠日常膳食摄取, 但目前主要作物的蛋氨酸含量普遍较低, 大豆作为优质蛋白来源, 蛋氨酸含量仅占种子总蛋白的1.1%~1.6%^[4-5]。现有大豆品种资源蛋氨酸含量遗传变异相当有限, 给通过常规育种方

法培育高蛋氨酸品种带来了很大限制^[6], 转基因技术的出现, 为该问题的解决提供了新的途径。

胱硫醚- γ -合成酶(Cystathionine- γ -synthase, CGS)是蛋氨酸合成的关键酶, 它与苏氨酸合成酶(Threonine, TS)竞争共同底物O-磷酸高丝氨酸(O-phospho-L-homoserine, OPH), 催化其形成胱硫醚, 胱硫醚在胱硫醚- β -裂合酶、甲硫氨酸合成酶和S-腺苷甲硫氨酸合成酶的作用下, 最终生成蛋氨酸。对拟南芥CGS的研究表明, 其N端99~128位的30个氨基酸与催化作用无关, 将其删除后反馈抑制作用明显减弱, 过量表达这种N端删除的CGS基因更利

收稿日期: 2011-02-27

基金项目: 国家重大科技专项资助项目(2008ZX08010-004, 2008ZX08004-003)。

第一作者简介: 王义鹏(1985-), 男, 在读硕士, 研究方向为基因的原核表达。E-mail: wyp100@21cn.com。

通讯作者: 侯文胜(1969-), 男, 博士, 研究员, 主要从事大豆基因工程研究。E-mail: houwsh@caas.net.cn。

于培育蛋氨酸含量提高的转基因植物^[7]。国家大豆改良中心北京分中心利用这种 N 端删除的 *AtCGS* 基因(*D-AtCGS*)转化大豆及豆科模式植物百脉根,进行蛋氨酸合成调控研究及高蛋氨酸大豆的分子育种,目前已成功获得了多个转基因株系,因此,一种便捷可靠的转基因植株检测及外源基因表达分析的工具与方法便成为了必要。该试验以 *D-AtCGS* 为目的基因,构建原核表达载体,对其进行原核表达与抗血清制备,并利用制备的抗血清对该试验获得的多种转 *At-DCGS* 基因大豆材料和豆科模式植物百脉根进行了 Western blot 检测,为植物 *CGS* 表达调控研究及 *D-AtCGS* 转基因大豆及其它作物的检测提供理想的技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂与菌株 原核表达载体 PET28a 为实验室保藏;PUC118-*D-AtCGS* 克隆载体为实验室构建;DH5 α 、BL21 大肠杆菌感受态细胞购自天根生物有限公司;*BamH* I 与 *Hind* III 限制性内切酶为 NEB 产品;蛋白低分子量蛋白标准为 Fermentas 产品;T4 DNA 连接酶购自大连 TAKARA;DNA marker 购自 GENESTAR;IPTG 购自北京 BIODDEE 生物;质粒提取试剂盒与凝胶回收试剂盒为 NEW INDUSTRY 产品;His 标签抗体购自北京天根生物;Bradford 蛋白定量试剂盒、羊抗兔二抗,DAB 显色试剂盒购自北京康为世纪生物公司;His 亲和层析柱购自 NOVA-GEN;PCR 引物由上海生工合成。

1.1.2 植物材料 供试植物材料分别为 *D-AtCGS* 组成型表达的转基因大豆(受体为自贡冬豆)、*D-AtCGS* 种子特异性表达转基因大豆(受体为吉林小粒 1 号)、*AtCGS* 全长(*F-AtCGS*)和 *D-AtCGS* 组成型表达的转基因百脉根(受体为 *Superroot*)及各受体对照。

1.2 试验方法

1.2.1 PET28a-*D-AtCGS* 原核表达载体的构建 用 *BamH* I、*Hind* III 从 PUC118-*D-AtCGS* 上切取 *D-AtCGS* 片段,同时双酶切 PET28a,回收目的片段,连接后转化 DH5 α 菌株,菌落 PCR 筛选阳性克隆送上海生工测序。PCR 检测引物根据 *D-AtCGS* 序列设计,上游引物:AGTCATCCGTGCTTCTAC;下游引物:AGG-GAGAAGATAGGTAGTGT。反应程序为:94℃ 5 min、94℃ 30 s、54℃ 30 s、72℃ 1 min,30 个循环。

1.2.2 *D-AtCGS* 的诱导表达 将鉴定正确的 PET28a-*D-AtCGS* 载体转入 BL21 菌株,菌落 PCR 筛选阳性菌株 37℃ 培养,OD₆₀₀ 达到 0.5 时加入 IPTG (终浓度为 1 mmol · L⁻¹) 诱导表达,5 h 后收集菌体,PBS 重悬后超声裂解细胞^[8],超声功率 250 W,

裂解时间 15 min,随后离心分取上清和沉淀进行表达形式检测。

为了检测表达的蛋白是否为目的蛋白,对菌体蛋白进行了 His 标签的 Western 杂交,转膜后用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h;His 标签抗稀释比为 1:1 000,室温孵育 2 h;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗稀释比为 1:2 000,室温孵育 1 h;杂交完毕后,参照 DAB 显色试剂盒说明书对杂交膜进行显色,观察是否有条带出现及条带的位置。

1.2.3 *D-AtCGS* 的亲纯化与抗血清制备 取重组菌,以 1:100 的接种量接入 500 mL LB,过夜诱导培养,离心收集菌体超声裂解物沉淀,包涵体洗涤液(50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 7.9,0.1 mol · L⁻¹ NaCl,0.5% Triton)^[9] 洗涤 3 次后用 8 mol · L⁻¹ 尿素溶解,加入预装的镍亲和纯化柱纯化,500 mmol · L⁻¹ 咪唑洗脱,PBS 过夜透析。利用 BandScan5.0 软件(www.biosoft.net)对蛋白的纯度进行检测^[9],Bradford 法^[10]测定蛋白的浓度。

将纯度和浓度达到抗体制备要求的蛋白送北京博尔迈生物技术公司制备抗体,实验动物为 SPF 级新西兰兔,将弗氏不完全佐剂与蛋白样品 1:1 混合免疫动物,每次抗原蛋白接种量为 1 mg,每周免疫 1 次,5 次免疫后采全血收集血清。

1.2.4 *D-ATCGS* 抗血清的初步应用 自贡冬豆及以其为受体的转基因大豆取萌发 7 d 后的新鲜叶片、吉林小粒 1 号及以其为受体的转基因大豆取鼓粒后的豆荚、百脉根及以其为受体的转基因材料取全株,液氮研磨植物组织,取 100 mg 样品用 300 L 蛋白提取液(50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0,2 mmol · L⁻¹ DTT,15 mmol · L⁻¹ EDTA,1 mmol · L⁻¹ PMSF,0.1% Triton X-100)4℃ 浸泡过夜,离心取上清即为植物总蛋白。Bradford 法定量后 SDS-PAGE 电泳,转膜进行 Western blot 杂交,抗血清稀释比为 1:100,羊抗兔二抗稀释比为 1:200,杂交完毕后 DAB 法染色。

2 结果与分析

2.1 PET28a-*D-AtCGS* 表达载体的验证

对构建好的载体进行 *BamH* I、*Hind* III 双酶切验证,目的条带约为 2 600 bp,与 *D-AtCGS* 及终止子长度基本相符(图 1),测序结果显示 *D-AtCGS* 序列与阅读框正确,表明 PET28a-*D-AtCGS* 原核表达载体构建成功。

2.2 *D-AtCGS* 的诱导表达

对 IPTG 诱导的重组菌和大肠杆菌空菌进行 SDS-PAGE 电泳检测。与空菌对照相比,重组菌在 44.3~66.4 KD 之间有明显的蛋白积累(图 2);His 标签的 Western blot 检测显示有条带出现,且位置

与蛋白预期大小相符,这表明目的蛋白得到了表达(图3)。表达形式检测结果表明目的蛋白主要以不溶的包涵体形式存在。

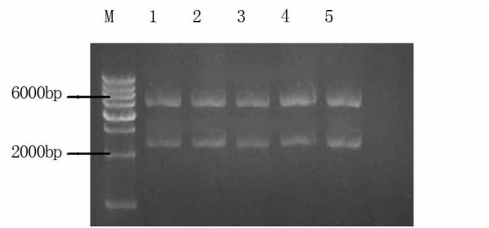
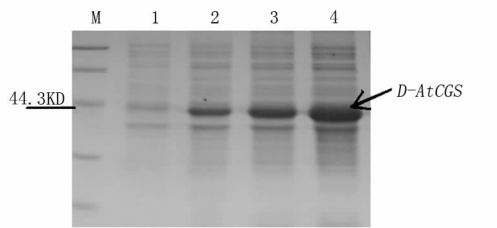
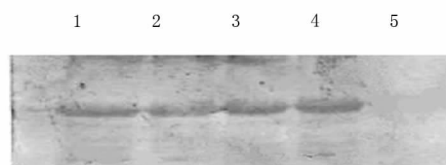


图1 PET28a-*D-AtCGS* 的双酶切验证
Fig.1 Identification of double digestion of PET28a-*D-AtCGS*



M:低分子量蛋白标准;1:BL21 空菌全菌蛋白;
2,3:PET28a-*D-AtCGS* 转化菌全菌蛋白。
M:Low molecular protein marker; 1: Total protein in BL21;
2,3:Total protein in BL21 with PET28a-*D-AtCGS*.

图2 PET28a-*D-AtCGS* 转化菌的
SDS-PAGE 电泳
Fig.2 SDS-PAGE analysis of BL21
with PET28-*D-AtCGS*



1~4:PET28-*D-AtCGS* 转化菌;5:BL21 空菌。
1-4:BL21 with PET28-*D-AtCGS*; 5:BL21.

图3 His 标签的 Western blot 检测
Fig.3 Western blot of His-tag in
recombinant protein

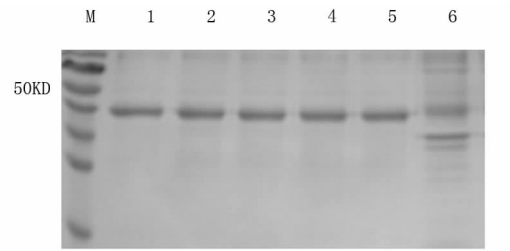
2.3 重组蛋白的纯化

对蛋白洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测,结果如图4;BandScan 5.0 软件分析表明蛋白纯度达到了92%,透析后 Bradford 法浓度检测结果为 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,蛋白的纯度和浓度均符合抗体制备的要求。

2.4 *D-AtCGS* 抗血清的初步应用

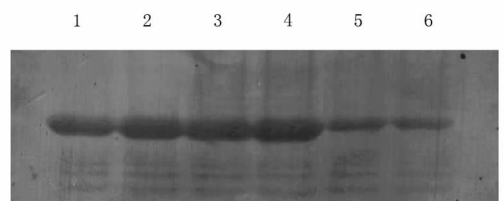
利用制备的抗血清对几种转基因材料进行 Western blot 检测,结果显示在预测的 D-ATCGS 蛋白分子量大小位置有明显的信号带出现。D-ATCGS 和大豆内源性 CGS 在氨基酸序列水平上相似度达75%,所以野生型对照也有条带出现,但转基因植物使用强启动子过量表达,其信号强度明显超过野生型植株(图5、6)。百脉根的 *D-AtCGS*、*F-*

AtCGS 转基因及野生型对照的 Western blot 结果显示 *D-AtCGS* 的表达量高于其它2种基因型(图7),这与在拟南芥 *CGS* 转基因实验中得到的结果相同。



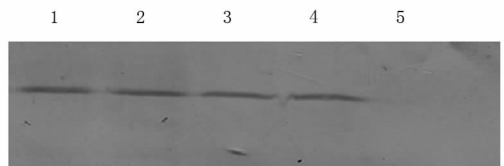
M:低分子量蛋白 ladder;1~5:纯化蛋白;6:菌体蛋白。
M:Low molecular protein ladder;1-5: Purified protein;6:
Total protein of BL21.

图4 纯化蛋白的 SDS-PAGE 检测
Fig.4 SDS-PAGE analysis of purified protein



1~5:自贡冬豆 *D-AtCGS* 转基因植株;5,6:野生型自贡冬豆。
1-5: *D-AtCGS* transgenic plants of soybean cv. Zigongdongdou;
5, 6: Wild type of soybean cv. Zigongdongdou.

图5 *D-AtCGS* 组成型表达自贡冬豆
转基因植株的 Western blot 检测
Fig.5 Western blot analysis of *D-AtCGS* constitutive
expression in Zigongdongdou transgenic plants



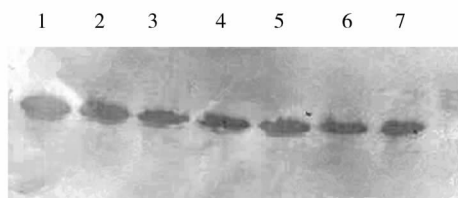
1~4:吉林小粒 *D-AtCGS* 转基因植株种子蛋白;
5:野生型对照。
1-4: Seed protein of *D-AtCGS* transgenic plant of soybean
cv. Jilinxiaoli; 5: Wild type.

图6 吉林小粒 *D-AtCGS* 转基因植株
的 Western blot 检测

Fig.6 Western blot analysis of soybean cv.
Jilinxiaoli transgenic plants

3 讨论

大豆是优良的植物蛋白来源,但蛋氨酸等含硫氨基酸的缺乏使其难以满足人和动物的全面营养需求,高蛋氨酸含量大豆育种具有重要的实际意义。自 Saalbach 等^[11]首次通过转基因技术进行提高植物蛋氨酸含量的研究以来,利用基因工程手段提高植物蛋氨酸含量的研究取得了很大进展。目前提高植物蛋氨酸含量的基因工程途径主要有2



1~6: *D-AtCGS* 转基因百脉根; 3~5: *F-AtCGS* 转基因百脉根;
6, 7: 野生型对照。

1-6: *D-AtCGS* transgenic plant of *Lotus corniculatus*; 3-5: *F-AtCGS* transgenic plant; 6, 7: Wild type.

图7 转基因百脉根的 Western blot 检测

Fig.7 Western blot analysis of *Lotus corniculatus* transgenic plant

个:一是在植物中插入并表达异源高蛋氨酸蛋白基因,主要应用的有玉米醇溶蛋白、2S 清蛋白等, Dinkins 等^[12]将玉米醇溶蛋白基因导入大豆,蛋氨酸含量提高了 22.5%,辛世文等^[13]利用巴西豆 2S 清蛋白基因对大豆品质进行改良,使大豆种子中蛋氨酸的含量提高了 15%~40%,但蛋氨酸的提高幅度仍未达到人和动物所需的营养水平;二是将蛋氨酸合成关键酶胱硫醚- γ -合成酶(*CGS*)转入植物中,使合成反应向着蛋氨酸合成的方向流动,这已在拟南芥^[14]、苜蓿^[15]、番茄^[16]等多种植物中获得了显著的效果,该方法可使蛋氨酸含量呈几倍甚至几十倍的幅度提高,但蛋氨酸的过量表达会引起其它氨基酸含量的降低和植株的发育异常, Amir 等^[17]将 *D-ATCGS* 和玉米 15 KD 玉米醇溶蛋白基因共同转化拟南芥,这样既提高了蛋氨酸含量,又为蛋氨酸提供了一个积累库,这为通过转基因技术提高作物蛋氨酸含量走向应用提供了很好的解决方法。

该试验构建了 *PET28a-D-AtCGS* 的原核表达载体,实现了 *D-AtCGS* 的原核表达、纯化和抗血清制备,并检测了大豆和豆科模式植物百脉根的转基因植株。由于 *D-AtCGS* 与大豆内源性 *CGS* 存在较高的同源性,因此在野生型对照中也有条带出现,但其表达量远远低于转基因植株的表达量。对百脉根 *D-AtCGS*、*F-AtCGS* 转基因型及野生型植株的 Western blot 分析表明, *D-AtCGS* 转基因植株的表达量最高,这与 *CGS* 的表达受到底物的反馈抑制有关。该研究制备的抗血清对 *D-AtCGS*、*F-AtCGS* 转基因材料具有良好的检测效果,可进一步开发成检测试剂盒或试纸条,为 *CGS* 的表达研究和转基因植株的检测提供有效的技术支持。

参考文献

- [1] Kim J, Leustek T. Cloning and analysis of the gene for cystathionine- γ -synthase from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 1996, 32: 1117-1124.
- [2] Hesse H, Kreft O, Maimann S, et al. Current understanding of the regulation of methionine biosynthesis in plants [J]. Journal of Ex-

perimental Botany, 2004, 55: 1799-1808.

- [3] 余志良,杨晟,蔡谨,等. S-腺苷甲硫氨酸研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2003, 34(1): 49-52. (Yu Z L, Yang S, Cai J, et al. Development in S-Adenosyl-L-methionine [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2003, 34(1): 49-52.)
- [4] Burton J W, Purcell A E, Walter W M. Methionine concentration in soybean protein from populations selected for increased percent protein [J]. Crop Science, 1982, 22: 430-432.
- [5] George A A, Lumen B O. A novel methionine-rich protein in soybean seed; identification, amino acid composition, and N-terminal sequence [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(1): 224-227.
- [6] 葛瑛,柏锡,才华,等. 提高豆科植物蛋氨酸含量的基因工程途径 [J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(2): 127-133. (Ge Y, Bai X, Cai H, et al. Genetic engineering for enhancement of methionine in legume plants [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2009, 40(2): 127-133.)
- [7] Hacham Y, Avraham T, Amir R. The N-terminal region of Arabidopsis cystathionine- γ -synthase plays an important regulatory role in methionine metabolism [J]. Plant Physiology, 2002, 128: 454-462.
- [8] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2002: 1228-1232.
- [9] Zhuang R, Zhang Y, Zhang R, et al. Purification of GFP fusion proteins with high purity and yield by monoclonal antibody-coupled affinity column chromatography [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 59(1): 138-143.
- [10] Marion M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-254.
- [11] Saalbach G, Jung R, Saalbach I. Construction of storage protein genes with increased number of methionine codons and their use in transformation experiments [J]. Biochem and Physiologieder Pflanzen, 1988, 183(23): 211-218.
- [12] Dinkins R D, Reddy S, Meurer C A, et al. Increased sulfur amino acids in soybean plants over expressing the maize 15 kDa zein protein [J]. In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant, 2001, 37: 742-747.
- [13] Krishnan H B. Engineering soybean for enhanced sulfur amino acid content [J]. Crop Science, 2005, 45(2): 454-461.
- [14] Avraham T, Amir R. The expression level of threonine synthase and cystathionine- γ -synthase is influenced by the level of both threonine and methionine in *Arabidopsis plants* [J]. Transgenic Research, 2005, 14: 299-311.
- [15] Amira G, Ifat M, Tal A, et al. Soluble methionine enhanced the accumulation of 15 kDa zein, a methionine rich storage protein, in BY2 cells and in *alfalfa* transgenic plants but not in transgenic tobacco plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56: 2443-2452.
- [16] Yael S K, Galili G, Amir R. Regulatory role of cystathionine- γ -synthase and de novo synthesis of methionine in ethylene production during tomato fruit ripening [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 61: 255-268.
- [17] Amir R, Hacham Y, Galili G. Cystathionine- γ -synthase and threonine synthase operate in concert to regulate carbon flow towards methionine in plants [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(4): 153-156.