

大豆 *GmERF6* 基因的原核表达及重组蛋白纯化

翟莹, 雷婷婷, 闫帆, 李艳杰, 李晓薇, 王英, 李景文, 王庆钰

(吉林大学植物科学学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 将大豆中已克隆的一个新的 ERF 转录因子基因 (*GmERF6*) 构建到原核表达载体 pET28 上, 导入大肠杆菌 Rosetta (DE3) 中, 对其进行 IPTG 诱导。结果表明: 在 IPTG 浓度为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导时间为 3 h 时, 重组蛋白得到表达, 分子量大约为 30 kDa。SDS-PAGE 电泳结果表明重组蛋白主要以包涵体形式存在。用 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素对其进行溶解后经 Ni 柱纯化, 得到较好的纯化效果, Bradford 法测定其蛋白浓度为 $0.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

关键词: 大豆; *GmERF6*; 载体构建; 原核表达; 纯化

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)06-0906-04

Prokaryotic Expression and Protein Purification of *GmERF6* Gene

ZHAI Ying, LEI Ting-ting, YAN Fan, LI Yan-jie, LI Xiao-wei, WANG Ying, LI Jing-wen, WANG Qing-yu

(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin, China)

Abstract: Ethylene-responsive factors (ERFs) belong to a large family of transcription factors that are specific to plants, ERFs are extensively involved in the responses to biotic and abiotic stresses. A new ERF transcription factor-*GmERF6* in soybean was subcloned into prokaryotic expression vector pET28 to get the expression protein for further study. The constructed vector pET28-*GmERF6* was transformed into Rosetta (DE3) to get the recombinant protein by IPTG induction. The result indicated that an 30 kDa recombinant protein was expressed when the concentration and induction time of IPTG were $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ and 3 h, respectively, the recombinant protein was mainly existed in inclusion body form through SDS-PAGE analysis. After the inclusion body was dissolved with $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ urea, the high quality recombinant protein was obtained through Ni column purification and its concentration was $0.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ after determined by Bradford method.

Key words: Soybean; *GmERF6*; Construction of vector; Prokaryotic expression; Purification

植物可以通过调节体内一系列基因的表达或合成大量相关胁迫蛋白来适应环境^[1]。其中, 转录因子由于可以调节多个基因的表达而在植物的胁迫响应中发挥重要作用, 逐渐成为人们的研究热点^[2]。乙烯响应因子 (Ethylene-responsive factor, ERF) 分属于植物中特有的 AP2/ERF 转录因子大家族中 ERF 亚家族, 最初从烟草中分离得到^[3]。它们表达的蛋白共同含有 1 个保守的由 58 或 59 个氨基酸组成的 ERF 结合域, 此结合域由 3 个 β 折叠和 1 个 α 螺旋组成, 可以特异的结合 GCC 和 DRE/CRT 元件, 而这些元件通常位于植物的病程相关蛋白基因和干旱、冷诱导相关基因的启动子中^[3-5]。ERF 正是通过调节这些基因的表达从而参与到植物的生物胁迫和非生物胁迫中去。目前, 已从拟南

芥^[6]、烟草^[7]、番茄^[8]、辣椒^[9]、水稻^[6]、小麦^[10]、棉花^[11]等不同植物中克隆到大量 ERF 基因, 但在大豆中仅报道过 3 个 ERF 转录因子的功能^[12-14]。单子叶植物和双子叶植物中均可能存在大量的 ERF 转录因子, 鉴于 ERF 转录因子在植物应对逆境中发挥的重要作用, 因此, 对大豆 ERF 家族中其它的成员作进一步的鉴定十分必要。

吉林大学植物种质资源与利用研究室从大豆中克隆到 1 个新的编码 ERF 蛋白的基因, 命名为 *GmERF6*。为更好的在蛋白水平上研究 *GmERF6* 的功能, 将其构建到原核表达载体 pET28 上, 对其进行 IPTG 诱导并对重组蛋白进行纯化, 为下一步蛋白的活性分析、抗体的制备、蛋白与特定元件的结合鉴定等试验奠定基础。

收稿日期: 2011-08-13

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项资助项目 (2008ZX08004-003); 国家自然科学基金面上资助项目 (30971808); 吉林省科技发展规划重点资助项目 (20080204); 长春市科技局国际科技合作资助项目 (08GH 10); “211 工程”三期重点学科建设资助项目。

第一作者简介: 翟莹 (1982-), 女, 在读博士, 研究方向为植物种质资源研究与利用。E-mail: fairy39809079@126.com。

通讯作者: 王庆钰 (1963-), 女, 教授, 博士, 主要从事作物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大豆品种吉林 32、带有目的基因的克隆载体 pMD18-T-*GmERF6*、原核表达载体 pET28、大肠杆菌 DH5 α 菌株、Rosetta (DE3) 菌株均由吉林大学植物种质资源与利用研究室提供。pMD18-T、各种限制性内切酶、2 \times 蛋白上样缓冲液、低分子量蛋白 Marker、DL 2000、Ex Taq 和 T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司;His 标记蛋白纯化套装(内含 Ni 柱、裂解液、结合缓冲液、洗脱缓冲液、PMSF)购自北京天恩泽公司;Bradford 蛋白定量试剂盒购自 TIANGEN 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自维特洁公司;其它试剂均购自鼎国公司。

1.2 试验方法

1.2.1 *GmERF6* 基因的扩增 根据 *GmERF6* 基因序列设计引物,并在其上、下游引物中分别引入 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切位点,引物序列如下:

GmERF6-F: 5'-GAGCTC ATGGCCCCAAGAGACAGC-3';

GmERF6-R: 5'-TTCGAATCAGGCAACCTCCGGGAG-3';

其中酶切位点用下划线标出。以 pMD18-T-*GmERF6* 质粒为模板,通过 PCR 扩增 *GmERF6* 基因,经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段,并连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,经菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定,挑取阳性克隆送华大基因测序。

1.2.2 融合表达载体的构建 将测序正确的克隆提取质粒,进行 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切,并将 pET28 同时用 *Sac* I 和 *Hind* III 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段,通过 T4 连接酶将酶切片段定向连接到 pET28 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α ,经菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定后,分别挑取阳性克隆并提取质粒,转化大肠杆菌 Rosetta (DE3),经菌落 PCR 验证后挑取阳性克隆保存菌种备用。

1.2.3 重组蛋白的表达 挑取 pET28-*GmERF6* 阳性克隆和 pET28 空载体克隆至 5 mL LB(附加 50 mg \cdot L $^{-1}$ 卡那霉素和 15 mg \cdot L $^{-1}$ 氯霉素)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 过夜培养后,按 1:100 的比例转接到 10 mL LB(附加 50 mg \cdot L $^{-1}$ 卡那霉素和 15 mg \cdot L $^{-1}$ 氯霉素)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 震荡培养至菌液 OD $_{600}$ 为 0.4 ~

0.6 时,加入终浓度为 0.3 mmol \cdot L $^{-1}$ 的 IPTG,37 $^{\circ}$ C 震荡培养 3 h 后,取 1 mL 菌液,12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 1 min,收集菌体,加入 20 μ L 无菌水和 20 μ L 2 \times 蛋白上样缓冲液,充分混匀,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min,取 10 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 电泳,分析蛋白表达结果。

1.2.4 重组蛋白的纯化 收集诱导后的菌体,使用 His 标记蛋白纯化套装对其进行纯化。每 100 mg 菌体加入 3 mL 细菌裂解液,超声裂解菌体;离心,弃上清,将沉淀重悬于结合缓冲液中,并加入 1 mmol \cdot L $^{-1}$ PMSF,进行超声处理;离心,弃上清,将沉淀重悬于含 8 mol \cdot L $^{-1}$ 尿素的结合缓冲液中,冰浴 1 h;12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 30 min,将上清液上柱,使用 15 倍体积的结合缓冲液(含 8 mol \cdot L $^{-1}$ 尿素)冲洗柱子,收集流穿峰;使用 5 倍体积的洗脱缓冲液(含 8 mol \cdot L $^{-1}$)洗脱,收集洗脱峰;将各样品与 2 \times 蛋白上样缓冲液充分混匀,100 $^{\circ}$ C 加热 5 min,12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 10 min,取 10 μ L 上清液进行 SDS-PAGE 电泳,检测重组蛋白纯化情况。参照 Bradford 蛋白定量试剂盒使用方法测定回收液中的蛋白含量。

2 结果与分析

2.1 *GmERF6* 基因扩增及融合表达载体的构建

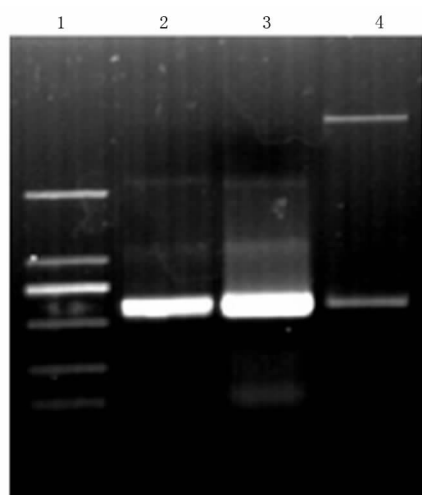
从 pMD18-T-*GmERF6* 载体质粒上 PCR 扩增出 *GmERF6* 全序列,目的片段大小为 582 bp(图 1),并在其两端分别加上 *Sac* I 和 *Hind* III 酶切位点(图 2),经测序扩增片段具有正确的编码框及酶切位点序列,可用于后续试验。将目的基因与表达载体连接后,经菌液 PCR 和双酶切验证(图 1),表明目的基因已定向连入表达载体 pET28 中。

2.2 *GmERF6* 重组蛋白在原核系统中的表达

重组质粒 pET28-*GmERF6* 转化大肠杆菌 Rosetta(DE3)后,用 0.3 mmol \cdot L $^{-1}$ IPTG 诱导表达 3 h,大约在 30 kDa 处有明显增粗的条带(图 3),*GmERF6* 蛋白分子量大小约为 21 kDa,加上表达标签,表达的重组蛋白大小与预期相符。而空载体对照与未诱导菌体在 30 kDa 处没有增粗的带,说明 *GmERF6* 融合蛋白经 IPTG 诱导后可以在 Rosetta (DE3)菌株中稳定有效地表达。

2.3 *GmERF6* 重组蛋白的纯化

将诱导后的菌体超声裂解并离心,取上清进行 SDS-PAGE,结果表明(图 4),在上清液中没有明显



1: 分子量标准 DL 2 000; 2: *GmERF6* 基因扩增条带; 3: 菌液 PCR 条带; 4: 质粒双酶切条带

1: Molecular marker DL 2 000; 2: Band of magnification of *GmERF6*; 3: Band of bacterial PCR; 4: Band of plasmid double digestion

图1 *GmERF6* 基因扩增、菌液 PCR 及双酶切验证

Fig. 1 Magnification of *GmERF6*, validation of bacterial PCR and double digestion

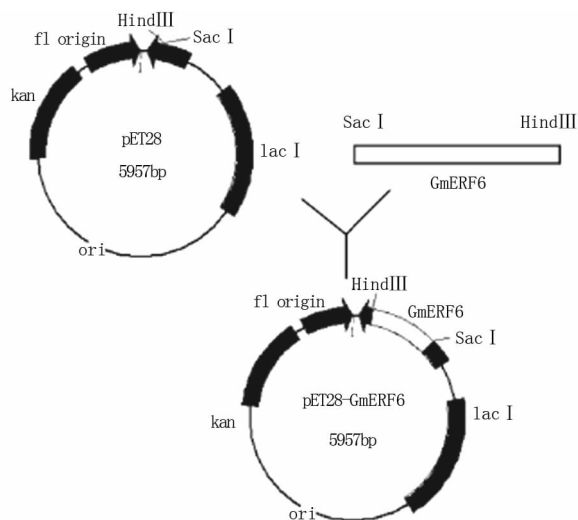
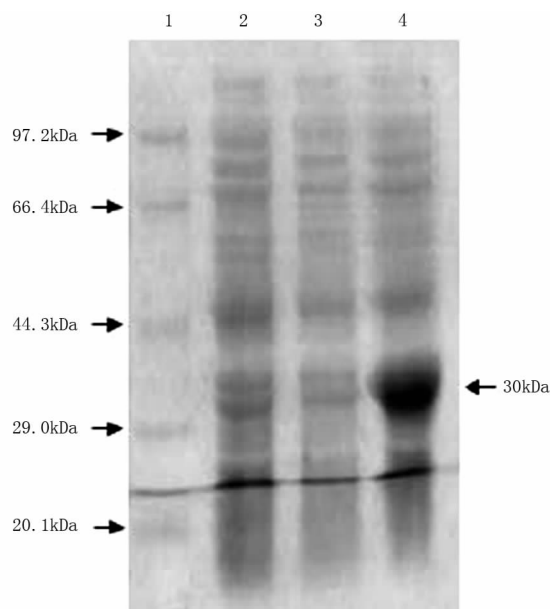


图2 pET28-*GmERF6* 原核表达载体的构建

Fig. 2 Construction of pET28-*GmERF6* prokaryotic expression vector

的诱导条带,说明重组蛋白主要是以不溶形式的包涵体存在于沉淀中。于是用 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素对沉淀中的包涵体进行溶解,经 Ni 柱纯化后进行 SDS-PAGE,在洗脱液中得到了纯化的重组蛋白,并且纯化效果较好,没有杂带。经 Bradford 法测定洗脱液中的蛋白含量为 $0.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,得到了纯度较好 *GmERF6* 重组蛋白。

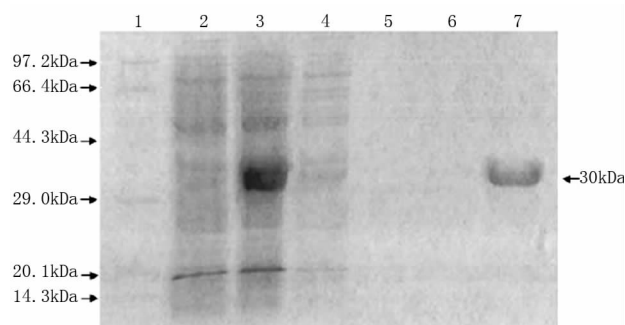


1: 低分子量蛋白 Marker; 2: pET28 对照; 3: 未诱导菌体; 4: 诱导菌体

1: Protein marker; 2: pET28 control; 3: No induced bacteria; 4: Induced bacteria

图3 *GmERF6* 重组蛋白的诱导表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of *GmERF6* recombinant protein



1: 低分子量蛋白 Marker; 2: 未诱导菌体; 3: 诱导菌体; 4: 菌体超声后上清; 5: 包涵体超声后上清; 6: 结合液; 7: 洗脱液。

1: Protein marker; 2: No induced bacteria; 3: Induced bacteria; 4: Supernatant of ultrasonic bacteria; 5: Supernatant of ultrasonic inclusion body; 6: Binding buffer; 7: Eluent.

图4 *GmERF6* 重组蛋白的纯化

Fig. 4 Purification of *GmERF6* recombinant protein

3 讨论

转录因子蛋白主要通过启动子中特定元件的结合来调控下游基因的表达,发挥其生物功能,目前多采用体外凝胶阻滞试验来鉴定蛋白与元件的作用情况^[15-17]。为了获得纯化的转录因子蛋白,最简单有效的方法就是通过原核表达系统在大肠杆菌中大量表达目的重组蛋白,再通过重组蛋白上

的表达序列标签对目的蛋白进行纯化。选择合适的表达载体和表达菌株是外源基因高效表达及纯化的关键。该试验选用 pET28 作为载体,其含有 $6 \times \text{His Tag}$ 作为纯化标记,表达的重组蛋白经 Ni 柱即可一步纯化回收,大大简化了蛋白纯化的操作步骤,并且融合标签蛋白分子量较小,不会改变蛋白的生物活性,对后续试验影响不大。对 *GmERF6* 的稀有密码子进行分析时发现,其含有 15 个稀有密码子,占密码子总数的 7.7%。为提高 *GmERF6* 在原核表达系统中的表达效率,该试验将目的基因在补充有稀有密码子的大肠杆菌 Rosetta(DE3) 中进行表达并得到了较好的试验结果。前人研究中多会对 IPTG 的最佳诱导浓度和时间进行确定^[18-19],该研究发现 IPTG 的诱导浓度和时间对 *GmERF6* 融合蛋白的表达量影响不大(资料未列出),所以在后续试验中选择了适中的诱导浓度和时间,分别为 $0.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 3 h。SDS-PAGE 电泳结果显示,表达出的重组蛋白主要以包涵体的形式存在,常丽等^[20]认为这是由于蛋白合成速度太快以至于来不及进行折叠及二硫键的配对,导致蛋白的非特异性结合而无法溶解。包涵体能溶于强变性剂,例如尿素和盐酸胍,因此,该试验在对重组蛋白进行纯化前采用 $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的尿素对其进行溶解,得到了很好的溶解效果。

参考文献

- [1] Xiong L, Ishitani M, Zhu J K. Interaction of osmotic stress, temperature and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(1): 205-211.
- [2] Singh K B, Foley R C, Oñate-Sánchez L. Transcription factors in plant defense and stress responses [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(5): 430-436.
- [3] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. *The Plant Cell*, 1995, 7(2): 173-182.
- [4] Hao D, Ohme-Takagi M, Sarai A. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor(ERF domain) in plants [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(41): 26857-26861.
- [5] Park J M, Park C J, Lee S B, et al. Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stressing tobacco [J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(5): 1035-1046.
- [6] Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, et al. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(2): 411-432.
- [7] Ohta M, Ohme-Takagi M, Shinshi H. Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions [J]. *The Plant Journal*, 2000, 22(1): 29-38.
- [8] Gu Y Q, Yang C, Thara V K, et al. Tomato transcription factor Pti4, Pti5, and Pti6 activate defence responses when expressed in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(4): 771-785.
- [9] Yi S Y, Kim J H, Joung Y H, et al. The pepper transcription factor CaPfl confers pathogen and freezing tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2004, 136(1): 2862-2874.
- [10] Xu Z S, Xia L Q, Chen M, et al. Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(6): 719-732.
- [11] Zuo K J, Qin J, Zhao J Y, et al. Over-expression GbERF2 transcription factor in tobacco enhances brown spots disease resistance by activating expression of downstream genes [J]. *Gene*, 2007, 391(1): 80-90.
- [12] Mazarei M, Puthoff D P, Hart J K, et al. Identification and characterization of a soybean ethylene-responsive element binding protein gene whose mRNA expression changes, during soybean cyst nematode infection [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(6): 577-586.
- [13] Zhang G Y, Chen M, Li L C, et al. Overexpression of the soybean *GmERF3* gene, an AP2/ERF type transcription factor for increased tolerances to salt, drought, and diseases in transgenic tobacco [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(13): 3781-3796.
- [14] Zhang G Y, Chen M, Chen X P, et al. Isolation and characterization of a novel EAR-motif-containing gene *GmERF4* from soybean (*Glycine max* L.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(2): 809-818.
- [15] Lee J H, Hong J P, Oh S K, et al. The ethylene-responsive factor like protein 1 (CaERFLP1) of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) interacts in vitro with both GCC and DRE/CRT sequences with different binding affinities: Possible biological roles of CaERFLP1 in response to pathogen infection and high salinity conditions in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(1): 61-81.
- [16] Meng X P, Li F G, Liu C L, et al. Isolation and characterization of an ERF transcription factor gene from cotton (*Gossypium barbadense* L.) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2010, 28(1): 176-183.
- [17] Xu Z S, Xia L Q, Chen M, et al. Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 65(6): 719-732.
- [18] 董娜, 张增艳, 辛志勇. 病原诱导的小麦 ERF 转录因子 TaERF1b 的原核表达及纯化 [J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(3): 283-287. (Dong N, Zhang Z Y, Xin Z Y. Expression and purification of pathogen-induced wheat ERF transcription factor TaERF1b in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2008, 9(3): 283-287.)
- [19] 王亚玲, 胡国富, 李群, 等. 水稻抗病调控因子 OsSGT1 原核表达载体的构建和表达蛋白纯化 [J]. *东北农业大学学报*, 2004, 35(3): 285-289. (Wang Y L, Hu G F, Li Q, et al. Construction of OsSGT1 prokaryotic expression vector and purification of the chimeric protein [J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2004, 35(3): 285-289.)
- [20] 常丽, 赵小英, 郭明, 等. *GA2ox1* 氧化酶基因的克隆及原核表达 [J]. *西北植物学报*, 2010, 30(6): 1099-1104. (Chang L, Zhao X Y, Guo M, et al. Cloning and prokaryotic expression of *GA2ox1* gene [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(6): 1099-1104.)