

# 大豆 *GmGBP1* 基因的原核表达及重组蛋白纯化

张彦威, 刘丽雪, 赵琳, 谷月娇, 卢清瑶, 宋仙萍, 李文滨

(东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室, 东北农业大学农业部大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 将大豆中已克隆的一个新的 *SKIP* 基因 (*GmGBP1*) 构建到原核表达载体 pGEX-6p-1 上, 导入大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 对其进行 IPTG 诱导。结果表明: 在 IPTG 浓度为  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 诱导时间为 8 h, 诱导温度为  $37^\circ\text{C}$  时, 重组蛋白得到表达, 分子量大约为 95 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 GST 柱纯化, 得到较好的纯化效果。

**关键词:** 大豆; *SKIP*; 原核表达; 包涵体; 纯化

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)06-0874-04

## Prokaryotic Expression and Protein Purification of Soybean *GmGBP1* Gene

ZHANG Yan-wei, LIU Li-xue, ZHAO Lin, GU Yue-jiao, LU Qing-yao, SONG Xian-ping, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** A new *SKIP* homolog in soybean was constructed into prokaryotic expression vector pGEX-6p-1 and then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) to get the expression protein for further study. The result indicated that an 95 kDa recombinant protein was expressed with the treatment of  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  IPTG for 8 h at  $37^\circ\text{C}$ , the recombinant protein was confirmed to mainly existed in inclusion body form by SDS-PAGE. The high-quality recombinant protein was obtained through GST column purification after the inclusion body was dissolved with  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  urea.

**Key words:** Soybean; *SKIP*; Prokaryotic expression; Inclusion body; Purification

干旱、盐碱、高温等逆境严重制约着作物的产量水平, 因此培育耐逆品种是扩大作物生长区域, 维持作物稳产、高产的重要手段。细胞活力被认为是植物在逆境中生存的一个重要指标。很多研究表明植物激素脱落酸 (ABA, Absciscic acid) 在植物的逆境胁迫反应中起着重要的作用。*SKIP* (*Ski*-interacting protein) 是真核生物中的转录共激活子, 在转录和剪切中发挥保守的共激活作用<sup>[1]</sup>。*SKIP* 基因在真核生物中能够调节细胞活力<sup>[2-8]</sup>, 响应植物的 ABA 信号并改善植物的抗逆水平<sup>[4,9]</sup>, 并且相关研究也表明大豆该基因能改善大豆对高温和干旱的耐性。因此, 研究大豆 *SKIP* 基因 (GenBank 登陆号: DQ112540) 对大豆抗逆性状的改良具有重要的理论和实际意义。

本实验室从大豆中克隆得到一个编码 *SKIP* 蛋白的基因, 命名为 *GmGBP1*。为更好的在蛋白水平上研究 *GmGBP1* 的功能, 将其构建到原核表达载体 pGEX-6p-1 上, 对其进行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。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

大豆品种东农 42、原核表达载体 pGEX-6p-1、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株、大肠杆菌 BL21 (DE3) 菌株均由东北农业大学大豆研究所提供。pMD18-T、各种限制性内切酶和 T<sub>4</sub> 连接酶均购自 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; 低分子量蛋白 Marker 购自 Solarbio 公司; DNA Marker 购自 Transgen 公司; GST 融合蛋白纯化试剂盒 (内含 GSH Sepharose 4B 50% 悬液、 $1 \times$  PBS 和还原型 GSH 溶液) 购自中科晨宇公司; 其它药品或试剂均购自伊事达公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 *GmGBP1* 基因的扩增** 根据 *GmGBP1* 基因序列设计引物, 并在其上下游引入酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I, 引物序列如下:

*GmGBP1*-F: 5'-GAATTCATGGCCACTCTGAAAGAGCT-TCTTC-3';

*GmGBP1*-R: 5'-GCGGCCGCCTAATGCCCTCTTTCAAATC-

收稿日期: 2012-09-29

基金项目: 国家自然科学基金 (31101169, 30671318, 31271748); 转基因生物新品种培育重大专项 (2011ZX08004-005); 黑龙江省教育厅大豆分子设计团队项目; 黑龙江省教育厅省高校青年学术骨干项目; 东北农业大学博士基金。

第一作者简介: 张彦威 (1987-), 男, 在读博士, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: zywei-1987@163.com。

通讯作者: 李文滨 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

CAATG-3'。

**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 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,并将 pGEX-6p-1 同时用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后,回收目的片段,通过  $T_4$  连接酶将酶切片段定向连接到载体上,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,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 BL21,经菌落验证后挑取阳性克隆保存菌种备用。

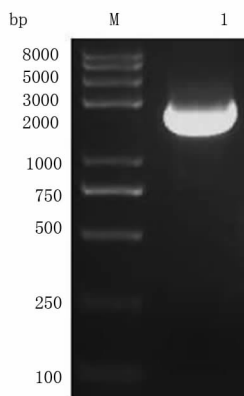
**1.2.3 重组蛋白的表达** 含有重组子的 *E. coli* BL21 (DE3) 菌株于 50 mL LB 液体培养基中(含 100 mg·L<sup>-1</sup> 氨苄青霉素),37℃ 下培养至  $A_{600}$  为 0.6 ~ 0.8。加 IPTG 至 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 诱导表达,28℃ 和 37℃ 下培养 5 h、8 h 后,分别取菌液。以同样方法于 28℃ 和 37℃ 下诱导含空质粒 pGEX-6p-1 的 *E. coli* BL21 (DE3) 作对照。将诱导各时间收获的菌液  $A_{600}$  均稀释调整至 0.7,取菌液 1.5 mL 离心收集菌体,100℃ 水浴 10 min 后进行 12% SDS-PAGE 电泳,考马斯亮蓝 R250 染色并脱色,观察结果。

**1.2.4 重组蛋白的纯化** 收集诱导后的菌体,液氮多次冻融后离心收集沉淀,利用 8 mol·L<sup>-1</sup> 的尿素结合缓冲液溶解包涵体后使用 GST 融合蛋白纯化试剂盒对其进行纯化。

## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因编码框的 PCR 扩增及亚克隆

通过 PCR 方法扩增到 *GmGBP1* 的编码框全长,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见一条约 1.8 kb 的 DNA 片段,该片段与预期 PCR 产物长度一致。切下该条带并纯化,纯化后的 PCR 产物与 pMD18-T vector 连接,构建重组质粒 pMD18-*GmG*-



M: DNA Marker; 1: *GmGBP1* 的 PCR 产物

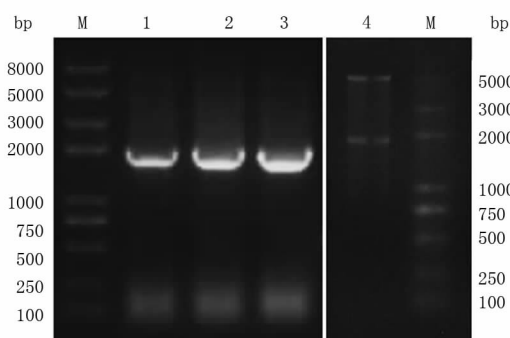
M: DNA Marker; 1: PCR product of *GmGBP1*

图1 PCR 扩增产物 *GmGBP1* 的凝胶电泳  
Fig. 1 Electrophoresis of *GmGBP1* amplified with PCR

*BP1*, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  并对重组子进行测序鉴定。

### 2.2 原核表达质粒的构建及重组子的鉴定

经 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切并纯化后的 pMD18-*GmGBP1* 和 pGEX-6p-1 质粒,在  $T_4$  DNA 连接酶的作用下连接,构建重组子 pGEX-6p-*GmGBP1*,重组子使用酶切和 PCR 分析方法进行鉴定。经双酶切得到约 4.9 kb 的 pGEX-6p-1 的线性片段和约 1.8 kb 的插入片段;PCR 检测得到同样为 1.8 kb 左右的条带。测序结果显示 *GmGBP1* 的开放阅读框与 pGEX-6p-1 的蛋白阅读框完全吻合,没有移码,并且与本实验室克隆得到的 *GmGBP1* 全长 cDNA 序列的同源性为 100%。检测结果表明已经成功构建出 *GmGBP1* 的原核表达载体。



M: DNA Marker; 1~3: pGEX-6p-*GmGBP1* 的 PCR 产物;  
4: *EcoR* I / *Not* I 酶切 pGEX-6p-*GmGBP1* 产物

M: DNA marker; Lane 1-3: PCR products of pGEX-6p-*GmG*-*BP1*; Lane 4: Products of pGEX-6p-*GmGBP1* digested with *EcoR* I / *Not* I

图2 PCR 产物和 pGEX-6p-*GmGBP1* 的限制性酶切分析

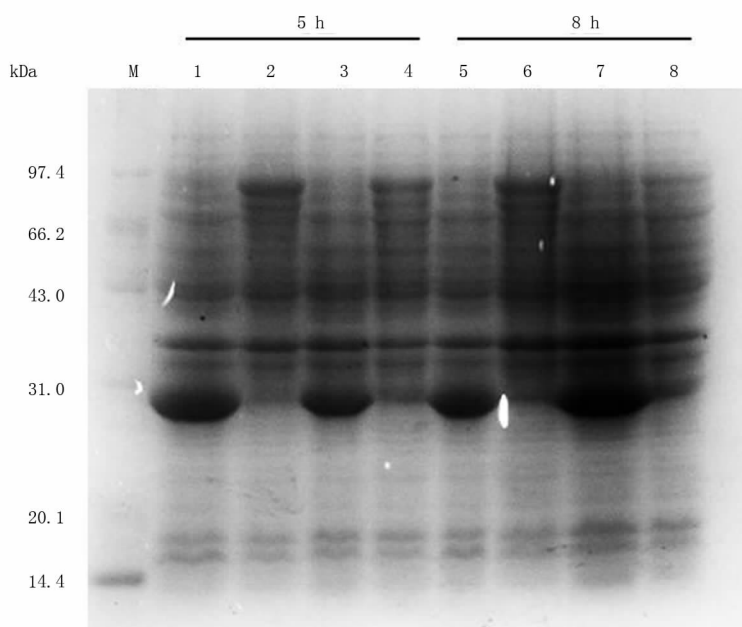
Fig. 2 PCR product and restriction analysis map of pGEX-6p-*GmGBP1*

### 2.3 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

具有重组质粒 pGEX-6p-*GmGBP1* 的 *E. coli* BL21 加入 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 后于 37℃ 和 28℃ 分别诱导 5 h 和 8 h,重组蛋白表达情况如图 3 所示。在不同诱导条件下,与转入空载体 pGEX-6p-1 的对照菌株相比,含有 pGEX-6p-*GmGBP1* 重组质粒的宿主菌株沉淀部分有一分子量约为 95 kDa 的条带,这与 *GmGBP1* 重组蛋白理论值 95 kDa( *GmGBP1* 分子量 69.1 kDa, GST 标签蛋白分子量 26 kDa) 相吻合,而空载体的对照菌株的沉淀部分有一分子量约为 29 kDa 的蛋白条带,这与空载体表达的 GST 蛋白标签的大小相一致。表明 *GmGBP1* 基因在诱导条件下得到了表达。

### 2.4 重组蛋白的纯化

将诱导后的菌体经液氮多次冻融破碎并离心,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。结果表明,

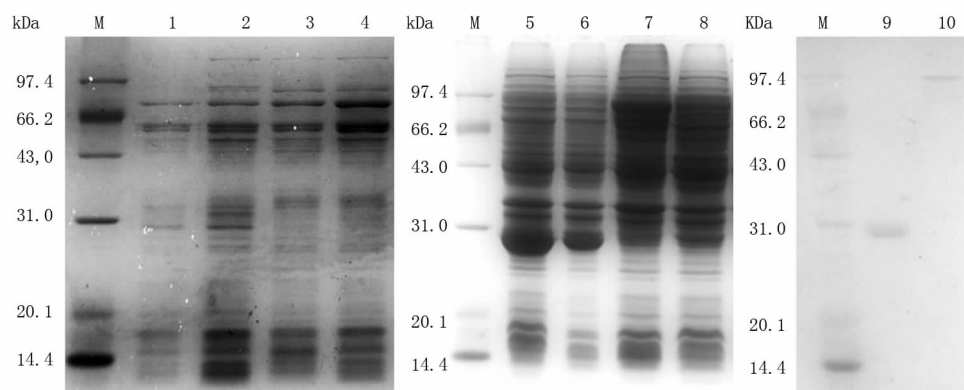


M: 蛋白 Marker; 1: pGEX-6p-1 菌体 37℃ 诱导 5 h; 2: pGEX-6p-*GmGBP1* 菌体 37℃ 诱导 5 h; 3: pGEX-6p-1 菌体 28℃ 诱导 5 h; 4: pGEX-6p-*GmGBP1* 菌体 28℃ 诱导 5 h; 5: pGEX-6p-1 菌体 37℃ 诱导 8 h; 6: pGEX-6p-*GmGBP1* 菌体 37℃ 诱导 8 h; 7: pGEX-6p-1 菌体 28℃ 诱导 8 h; 8: pGEX-6p-*GmGBP1* 菌体 28℃ 诱导 8 h。

M: Protein Marker; 1: Bacteria pGEX-6p-1 induced 5 h at 37℃; 2: Bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 5 h at 37℃; 3: Bacteria pGEX-6p-1 induced 5 h at 28℃; 4: Bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 5 h at 28℃; 5: Bacteria pGEX-6p-1 induced 8 h at 37℃; 6: Bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 8 h at 37℃; 7: Bacteria pGEX-6p-1 induced 8 h at 28℃; 8: Bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 8 h at 28℃.

图3 *GmGBP1* 重组蛋白的诱导表达

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of *GmGBP1* recombinant protein



M: 蛋白 Marker; 1: 37℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-1 总可溶性蛋白; 2: 28℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-1 总可溶性蛋白; 3: 37℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-*GmGBP1* 总可溶性蛋白; 4: 28℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-*GmGBP1* 总可溶性蛋白; 5: 37℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-1 不溶性蛋白; 6: 28℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-1 不溶性蛋白; 7: 37℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-*GmGBP1* 不溶性蛋白; 8: 28℃ 诱导 8 h 的 pGEX-6p-*GmGBP1* 不溶性蛋白; 9: 纯化的 GST 蛋白; 10: 纯化的 *GmGBP1* 重组蛋白。

M: Protein Marker; 1: Total soluble protein of bacteria pGEX-6p-1 induced 8 h at 37℃; 2: Total soluble protein of bacteria pGEX-6p-1 induced 8 h at 28℃; 3: Total soluble protein of bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 8 h at 37℃; 4: Total soluble protein of bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 8 h at 28℃; 5: Total dissoluble protein of bacteria pGEX-6p-1 induced 8 h at 37℃; 6: Total dissoluble protein of bacteria pGEX-6p-1 induced 8 h at 28℃; 7: Total dissoluble protein of bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 8 h at 37℃; 8: Total dissoluble protein of bacteria pGEX-6p-*GmGBP1* induced 8 h at 28℃; 9: Purified GST protein; 10: Purified *GmGBP1* recombinant protein.

图4 *GmGBP1* 重组蛋白的纯化

Fig. 4 Purification of *GmGBP1* recombinant protein

*GmGBP1* 重组蛋白以包涵体形式存在。用  $8 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的尿素对沉淀中的包涵体进行溶解,经 GST 柱纯化后进行 SDS-PAGE,得到了纯化的 *GmGBP1* 重组蛋白。

### 3 讨论

SKIP 是真核生物中的转录共激活子,在转录和

剪切中发挥保守的共激活的作用。同时,SKIP 还作为重要的转录因子调节植物抵抗逆境胁迫的能力。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。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 pGEX-6p-1 作为载体,其含有 GST 作为纯化标记,表达的重组蛋白经 GST 柱即可一步纯化回收,且能够回收得到的重组蛋白均是有活性的蛋白。前人研究中多会对 IPTG 的最佳诱导浓度、诱导时间<sup>[10-14]</sup>和诱导温度<sup>[15]</sup>进行确定,该研究对空载体的诱导证实了低温诱导可以提高可溶性诱导蛋白的表达水平。

SKIP 能与很多蛋白发生相互作用从而发挥不同的功能,目前研究表明 SKIP 在水稻,大麦,人类,果蝇,酵母和线虫中分别有 35,1,21,13,24 和 5 个互作蛋白<sup>[2-8,16-18]</sup>。通过原核表达获得具有生物活性的大豆 SKIP 同源蛋白 *GmGBP1*,为研究大豆 *GmGBP1* 的结构和功能奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Folk P, Puta F, Skrzynny M. Transcriptional coregulator SNW/SKIP: the concealed tie of dissimilar pathways[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2004, 61: 629-640.
- [2] Albers M, Diment A, Muraru M, et al. Identification and characterization of *Prp45p* and *Prp46p*, essential pre-mRNA splicing factors [J]. RNA, 2003, 9: 138-150.
- [3] Dahl R, Wani B, Hayman M J. The *Ski* oncoprotein interacts with *Skip*, the human homolog of *Drosophila* Bx42 [J]. Oncogene, 1998, 16: 1579-1586.
- [4] Hou X, Xie K, Yao J, et al. A homolog of human *ski*-interacting protein in rice positively regulates cell viability and stress tolerance [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106: 6410-6415.
- [5] Ivanov A I, Rovescalli A C, Pozzi P, et al. Genes required for *Drosophila* nervous system development identified by RNA interference [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101: 16216-16221.
- [6] Kostrouchova M, Housa D, Kostrouch Z, et al. *SKIP* is an indispensable factor for *Caenorhabditis elegans* development [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99: 9254-9259.
- [7] Martinkova K, Lebduska P, Skrzynny M, et al. Functional mapping of *Saccharomyces cerevisiae* *Prp45* identifies the SNW domain as essential for viability [J]. Journal of Biochemistry, 2002, 132: 557-563.
- [8] Negeri D, Eggert H, Gienapp R, et al. Inducible RNA interference uncovers the *Drosophila* protein Bx42 as an essential nuclear cofactor involved in Notch signal transduction [J]. Mechanisms of development, 2002, 117: 151-162.
- [9] Lim G H, Zhang X, Chung M S, et al. A putative novel transcription factor, *AtSKIP*, is involved in abscisic acid signalling and confers salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis* [J]. The New Phytologist, 2010, 185: 103-113.
- [10] 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.)
- [11] 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, 9 (3): 283-287.)
- [12] 刘晓庆, 翟喜艳, 丁志鑫, 等. 大豆 *rbcl* 基因克隆、序列分析及原核表达 [J]. 中国油料作物学报, 2011, 33 (3): 226-225. (Liu X Q, Zhai X Y, Ding Z X, et al. Cloning, sequence analysis and prokaryotic expression of *rbcl* gene from *Glycine max* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2011, 33 (3): 226-225.)
- [13] 王亚玲, 胡国富, 李群, 等. 水稻抗病调控因子 *OsSGT1* 原核表达载体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.)
- [14] 翟莹, 雷婷婷, 闫帆, 等. 大豆 *GmERF6* 基因的原核表达及重组蛋白纯化 [J]. 大豆科学, 2011, 30 (6): 906-904. (Zhai Y, Lei T T, Yan F, et al. Prokaryotic expression and protein purification of *GmERF6* gene [J]. Soybean Science, 2011, 30 (6): 906-904.)
- [15] Schein C H. Producing soluble recombinant RNases and assays to measure their interaction with interferon-gamma *in vitro* [J]. Methods in Molecular Biology, 2001, 160: 113-137.
- [16] Saumweber H, Frasch M, Korge G. Two puff-specific proteins bind within the 2.5 kb upstream region of the *Drosophila melanogaster* *Sgs-4* gene [J]. Chromosoma, 1990, 99: 52-60.
- [17] Wieland C, Mann S, von Besser H, et al. The *Drosophila* nuclear protein Bx42, which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged [J]. Chromosoma, 1992, 101: 517-525.
- [18] Woodger F J, Millar A, Murray F, et al. The role of *GAMYB* transcription factors in GA-regulated gene expression [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2003, 22: 176-184.

(上接第 873 页)

- [2] Cao D, Hussain A, Cheng H, et al. Loss of function of four *DELLA* genes leads to light and gibberellin-independent seed germination in *Arabidopsis* [J]. Planta, 2005, 223: 105-113.
- [3] Zhu L H, Li X Y, Welander M. Over expression of the *Arabidopsis* *GAI* gene in apple significantly reduces plant size [J]. Plant Cell Reports, 2008, 27: 289-296.
- [4] Petty L M, Harberd N P, Carre I A, et al. Expression of the *Arabidopsis* *GAI* gene under its own promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response [J]. Plant Science, 2003, 164: 175-182.
- [5] Fu X D, Sudhakar D, Peng J R, et al. Expression of *Arabidopsis* *GAI* in transgenic rice represses multiple gibberellin responses [J]. Plant Cell, 2001, 13: 1791-1802.
- [6] Busov V, Meilan R, Pearce D W, et al. Transgenic modification of *GAI orrg1* causes dwarfing and alters gibberellins, root growth, and metabolite profiles in *Populus* [J]. Planta, 2006, 224: 288-299.
- [7] Peng J, Carol P, Richards D E, et al. The *Arabidopsis* *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses [J]. Genes Development, 1997, 11: 3194-3205.
- [8] Peng J, Richards D E, Hartley N M, et al. "Green revolution" genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. Nature, 1999, 400: 256-261.