

## 大豆 *GmDRR* 与互作基因 *GmDIP1* 的亚细胞定位及原核表达

杨蕊<sup>1</sup>, 禹国龙<sup>1</sup>, 沈岩茹<sup>1</sup>, 刘春燕<sup>3</sup>, 傅永福<sup>2</sup>, 辛大伟<sup>1</sup>, 陈庆山<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 农学院 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所 北京 海淀 100000; 3. 黑龙江省农垦科研育种中心, 黑龙江 哈尔滨 150050)

**摘要:** 本实验室通过疫霉菌诱导大豆绥农 10 号后, 获得差异表达蛋白点, 通过序列拼接比对和分析, 获得一个新的大豆 *GmDRR* 基因, 并通过酵母双杂筛选文库的方式获得其互作基因 *GmDIP1*。为进一步明确两个基因关系, 对两个基因分别进行亚细胞定位和原核表达以及重组蛋白的纯化。*GmDRR* 蛋白为外分泌蛋白, 定位于细胞膜与细胞质中, *GmDIP1* 基因定位于线粒体膜上, 二者都成功进行了原核表达, 从而获得了有表达功能和生物学活性的蛋白。

**关键词:** 大豆; *GmDRR*; *GmDIP1*; 亚细胞定位; 原核表达

中图分类号: S565.1 文献标识码: A DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0557

## Subcellular Localization and Prokaryotic Expression of *GmDRR* and Its Interaction *GmDIP1* Gene in Soybean

YANG Rui<sup>1</sup>, YU Guo-long<sup>1</sup>, SHEN Yan-ru<sup>1</sup>, LIU Chun-yan<sup>3</sup>, FU Yong-fu<sup>2</sup>, XIN Da-wei<sup>1</sup>, CHEN Qing-shan<sup>1</sup>

(1. College Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100000, China; 3. Land Reclamation Research and Breeding Centre of Heilongjiang, Harbin 150050, China)

**Abstract:** A differentially expressed protein was separated from soybean Suinong 10 induced by *Phytophthora sojae* in the previous work of our lab. A new gene *GmDRR* was obtained by sequence alignment, comparison and analysis. Then its interaction gene *GmDIP1* was screened from cDNA library by yeast two-hybrid. To make sure the interaction relationship, subcellular localization and prokaryotic expression of the two genes were designed and the recombinant proteins were purified. *GmDRR* is an exocrine protein, positioning in the cell membrane and cytoplasm. *GmDIP1* locates on the mitochondrial membrane. Both genes successfully expressed in prokaryotic, thus the proteins with expression function and biological activity were obtained.

**Keywords:** Soybean; *GmDRR*; *GmDIP1*; Subcellular localization; Prokaryotic expression

大豆疫霉根腐病是由大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 引起的一种严重危害大豆生产的世界性土传病害。在当今大豆疫霉根腐病的研究中, 新抗疫霉根腐病基因的挖掘显得至关重要。抗性基因的分离鉴定及功能分析对从分子水平上了解大豆抗疫霉根腐病的分子机理具有重要的意义。本实验室在双向电泳分离病原菌诱导后蛋白质表达谱的基础上, 重新搜索数据库注释多肽序列。对差异表达显著的蛋白多肽进行 Blast 的同源比对及 EST 拼接获得了 *GmDRR* 基因<sup>[1-3]</sup>, *GmDRR* 基因经预测发现其有植物疾病抗性反应结构域即 Dirigent 蛋白结构域, Dirigent 蛋白调控植物聚合酚以产生细胞壁聚合物木质素和木酚素, 抵抗病原菌或昆虫的入侵, 增强植物的防御能力<sup>[4-7]</sup>。因此 *GmDRR* 基因是很重要的抗病候选基因。众多其它物种的相关基因研究结果都表明其与植物抗病相关<sup>[8-10]</sup>, 但目前在大豆中还没有相关研究的报道。本实验室通过酵母

双杂筛选文库的方法, 获得了与 *GmDRR* 互作的基因 *GmDIP1*。钙离子结合蛋白质如钙调蛋白, 可以调节细胞内  $Ca^{2+}$  的浓度, 参与  $Ca^{2+}$  信号的调控而调节细胞的生理功能, 在植物的防御反应中有重要的作用, 有研究报道, 水稻类钙调磷酸酶亚基 B 蛋白在叶片生长和白叶枯病抗性反应中都有表达<sup>[11]</sup>。经分析 *GmDIP1* 可能是大豆的一类钙调蛋白, 其参与  $Ca^{2+}$  信号的调控。一个基因的亚细胞定位很大程度上影响着它的功能, 因此, 确切地了解一个基因的亚细胞定位是探究这个基因作用机制的首要工作。为了在蛋白水平上探究它们的作用机制, 现对这两个蛋白分别进行原核表达以及重组蛋白的纯化, 为下一步蛋白活性的分析, 抑菌实验, 抗体的制备, Pull-Down 互作验证奠定基础, 进一步验证和揭示 *GmDRR* 基因抗疫霉根腐病的分子机制, 为抗病育种提供理论基础。

收稿日期: 2015-11-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31271747, 31471516); 国家高技术研究发展计划“863 计划” (2013AA102602); 东北农业大学博士启动基金。

第一作者简介: 杨蕊 (1990-), 女, 硕士, 主要从事大豆抗病分子遗传育种研究。E-mail: 704142172@qq.com。

通讯作者: 陈庆山 (1973-), 男, 博士, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: qshchen@126.com;

辛大伟 (1981-), 男, 博士, 副研究员, 主要从事大豆结瘤机制研究。E-mail: xdawei@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

拟南芥种子 (Ecotype Columbia 0), 亚细胞定位入门载体 Fu28, Fu76, 表达载体 Fu39-2, 原核表达载体 pCold-TF, 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ , BL21 均由中国农业科学院傅永福研究员馈赠。各种内切酶, T4 连接酶均购自 NEB 公司, LR Clonase<sup>TM</sup> 购自 Invitrogen 公司, DNA 胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, 引物合成由华大基因完成, 测序由诺赛生物有限公司完成。

### 1.2 方法

1.2.1 亚细胞定位的预测 *GmDRR* 与 *GmDIP1* 的亚细胞定位采用 <https://www.predictprotein.org/home> 在线预测。

1.2.2 亚细胞定位载体的构建 根据 *GmDRR* 与 *GmDIP1* 的基因序列设计引物, 在引物两端分别加 *Xba* I 和 *Sal* I 酶切位点, 引物序列如下:

*GmDRR*-F-*Xba* I: AGATCTATGGATGGAGACGAGGAGC  
*GmDRR*-R-*Sal* I: CTCGACCTAAGGATGAGAAACACTGACA

*GmDIP1*-F-*Xba* I: AGATCTATGGCAGCGGCGGC

*GmDIP1*-R-*Sal* I: CTCGACCGTTCAGTTCCAGTAATTTTCTTC

对目的片段成功扩增后, 进行胶回收, 将回收的目的片段、载体 Fu28 分别用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 进行 37℃ 酶切反应 3 h, 将酶切产物 65℃ 酶失活, SolutionI 连接酶 16℃ 过夜连接。将连接产物转化 DH5 $\alpha$ , 于带抗性的 LB 培养基过夜培养, 挑取阳性克隆, RCR 检测后送测序。将 Fu76-2  $\times$  35S, 测序正确的 Fu28-*GmDRR* (Fu28-*GmDIP1*), Fu39-2 于试管中在 1  $\mu$ L LR 酶的作用下 25℃ 进行 LR 反应 5 h, 将反应产物转化 DH5 $\alpha$ , 于带抗性的 LB 培养基过夜培养, 挑取阳性克隆, RCR 检测后送测序, 测序正确的克隆用于后续试验。

1.2.3 拟南芥原生质体中的亚细胞定位 将生长 28 d 左右的拟南芥叶片酶解 4 h。用 200 目滤网将酶解好的原生质体过滤至离心管中, 用 W5 溶液 (2 mol·L<sup>-1</sup> NaCl, 1 mol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mol·L<sup>-1</sup> MES) 洗 2 次, 静置 30 min。MMg (甘露醇 0.15 mol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>) 溶液洗 2 次, 将洗好的原生质体与表达载体的质粒混合, 再加入 PEG/Ca<sup>2+</sup> 溶液, 放置 30 min。用 W5 洗 2 次, 将悬浮液倒入培养板中培养, 避光, 14 h 左右开始用激光共聚焦荧光显微镜观察。

1.2.4 原核表达载体的构建 引物设计及目的片段的扩增方法同 1.2.2。载体 pCold-TF 分别用限制性内切酶 *Xba* I 和 *Sal* I 进行 37℃ 酶切反应 3 h, 将酶切产物 65℃ 酶失活, SolutionI 连接酶 16℃ 过夜连

接。将连接产物转化 DH5 $\alpha$ , 于带抗性的 LB 培养基过夜培养, 挑取阳性克隆, RCR 检测后送测序。测序正确的单克隆进行质粒提取, 转化 BL21 于带抗性的 LB 培养基过夜培养, 挑取阳性克隆, RCR 检测后正确的克隆用于后续试验。

1.2.5 重组蛋白的原核表达 一级活化菌液至 OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.6, 二级活化 50 mL 菌液至 OD<sub>600</sub> = 0.4 ~ 0.6, 取出 1 mL 作为阴性对照, 向其余菌液中加 1 mol·L<sup>-1</sup> 的 IPTG 至终浓度为 1 mol·mL<sup>-1</sup>, 与 1 mL 阴性对照一起, 15℃ 180 r·min<sup>-1</sup> 诱导 15 h, 取出 4 mL 菌液离心弃上清, 其余菌液离心 -80℃ 保存。用 320  $\mu$ L 的 PBS 重悬。向重悬液中加入终浓度为 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶菌酶, 冰上放置 30 min, 超声, 直至菌液澄清, 离心, 吸上清 300  $\mu$ L, -80℃ 保存或吸出 80  $\mu$ L 加 20  $\mu$ L 的 SDS 上样缓冲液煮 5 min。用于 SDS-PAGE 以及蛋白质印记分析。

1.2.6 重组蛋白的纯化 用裂解缓冲液预洗磁珠, 将表达成功的蛋白上清与磁珠放入离心管中, 混匀, 4℃ 结合 90 min, 离心, 取 10  $\mu$ L 的上清作为对照, 100  $\mu$ L 的洗涤缓冲液洗磁珠 2 次, 每次上清都保留 20  $\mu$ L 洗脱缓冲液洗脱磁珠 3 次, 每次上清都保留, 将诱导前的对照、flow-through、2 次洗涤液、3 次洗脱液, 加 SDS 上样缓冲液 100℃ 煮 5 min, 用于 SDS-PAGE 分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 亚细胞定位的软件预测

在线预测显示, 在真核生物中, *GmDRR* 为外分泌蛋白, *GmDIP1* 定位在线粒体膜上。如图 1, 绿色部分为该基因亚细胞定位的预测部位。在线预测为接下来的亚细胞定位提供参考与依据, 对确定 *GmDRR* 和 *GmDIP1* 蛋白的定位更有目的性和明确性。



图 1 *GmDRR* 与 *GmDIP1* 亚细胞定位的预测

Fig. 1 Prediction of subcellular localization of *GmDRR* and *GmDIP1*

### 2.2 亚细胞定位

构建了 2  $\times$  35S 启动 *GmDRR* 融合 GFP 和 2  $\times$  35S 启动 *GmDIP1* 融合 GFP 的载体, 利用绿色荧光蛋白的信号来确定目标蛋白的定位。在拟南芥原生质体中, *GmDRR* 融合 GFP 在细胞膜和细胞质中均有

绿色荧光信号(图2), *GmDIP1* 融合 GFP 在线粒体膜上有绿色荧光信号(图3), 初步断定 *GmDRR* 定位在细胞膜和细胞质中, *GmDIP1* 定位在线粒体膜上。目的蛋白的定位影响着自身的功能。作为抗病候选基因, *GmDRR* 被定位为一种分布在细胞膜

和细胞质中的外分泌蛋白, 进而识别外界信号参与抗病途径。线粒体在能量转化、储存钙离子等过程中起到至关重要的作用, 定位在线粒体膜上的 *GmDIP1* 蛋白, 也可能参与着与能量转化和钙离子储存相关的途径。

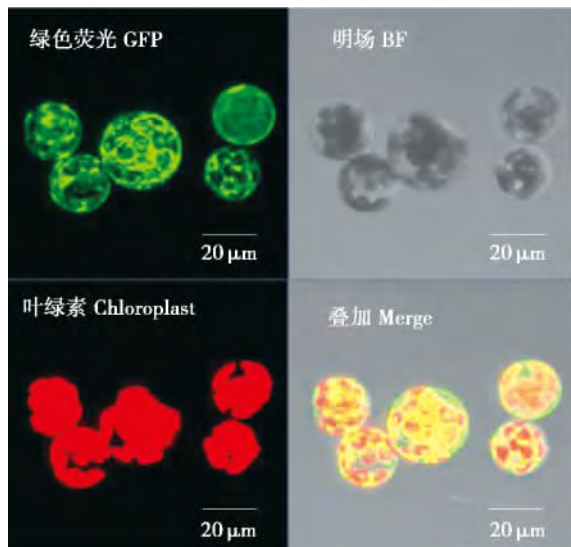


图2 *GmDRR* 亚细胞定位

Fig. 2 Subcellular localization of *GmDRR*

### 2.3 重组蛋白的原核表达

构建了 pCold-TF-*GmDRR*, pCold-TF-*GmDIP1*, 在蛋白 N 端融合一个 His 标签, *GmDRR* 重组蛋白大小为 85 kDa, *GmDIP1* 重组蛋白大小为 73 kDa。如图4(下), 在目标位置, 有大量的蛋白表达, 两种蛋白在上清和沉淀中均存在, 为了保证实验的正确性

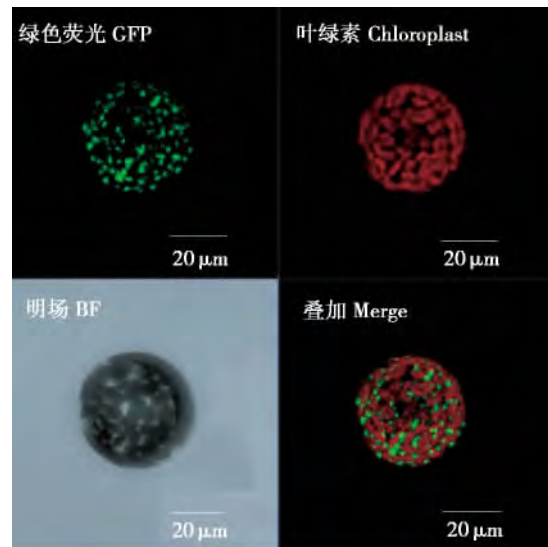


图3 *GmDIP1* 亚细胞定位

Fig. 3 Subcellular localization of *GmDIP1*

和严谨性, 对原核表达成功的蛋白用  $\alpha$ -His 进行蛋白质印记检测, 如图4(上), 在目的片段大小的位置检测到了 His 标签的信号。我们成功获取了有表达功能和生物活性的 *GmDRR* 蛋白和 *GmDIP1* 蛋白, 为接下来的体外生物学试验和目标蛋白蛋白质水平的研究做好了第一步的准备。

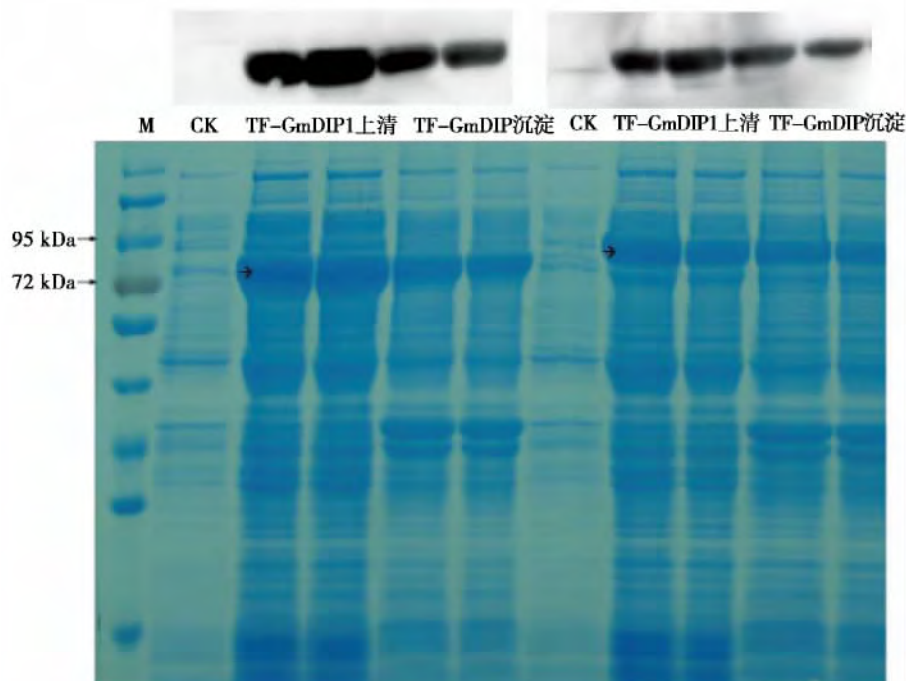


图4 *GmDRR* 重组蛋白与 *GmDIP1* 重组蛋白原核表达的

SDS-PAGE 分析(下)和蛋白质印记检测(上)

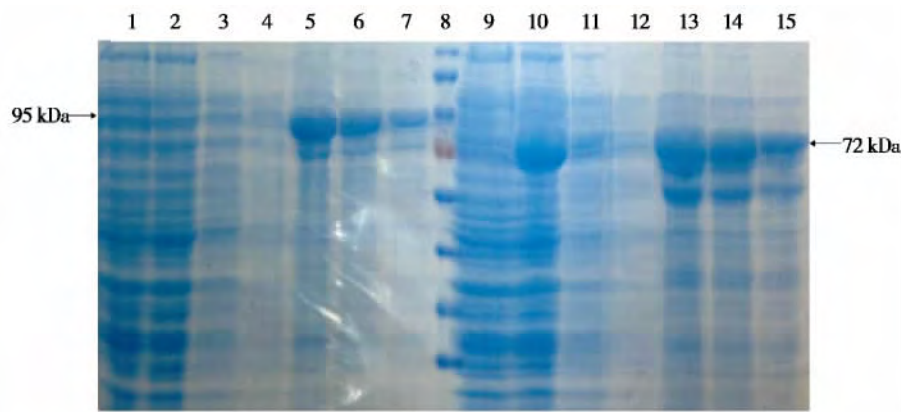
Fig. 4 SDS-PAGE analysis(down) and western blot detection(up) on prokaryotic expression of *GmDRR* recombinant proteins and *GmDIP1* recombinant proteins



## 2.4 重组蛋白的纯化

如图5,经过蛋白的纯化,洗涤掉了非特异结合的蛋白,将特异结合的蛋白进行洗脱,获得了与His磁珠特异结合的目标蛋白,在相应位置上检测到相

对单一的目标条带,这样获得的蛋白杂质更少,蛋白纯度更高,对接下来的试验因杂质造成的影响降到最低,保证了试验的准确性和严谨性。



1: *GmDRR* 诱导前的对照; 2: Flow-through; 3: 第一次洗涤; 4: 第二次洗涤; 5: 第一次洗脱; 6: 第二次洗脱; 7: 第三次洗脱; 8: Marker; 9: *GmDIP1* 诱导前的对照; 10: Flow-through; 11: 第一次洗涤; 12: 第二次洗涤; 13: 第一次洗脱; 14: 第二次洗脱; 15: 第三次洗脱。

1: The CK before *GmDRR* induced; 2: Flow-through; 3: First wash; 4: Second wash; 5: First eluate; 6: Second eluate; 7: Third eluate; 8: Marker; 9: The CK before *GmDIP1* induced; 10: Flow-through; 11: First wash; 12: Second wash; 13: First eluate; 14: Second eluate; 15: Third eluate.

图5 *GmDRR* 重组蛋白和 *GmDIP1* 重组蛋白的纯化

Fig. 5 Purification of the expressed *GmDRR* recombinant proteins and *GmDIP1* recombinant proteins

## 3 结论与讨论

以双向电泳技术分离的抗病相关蛋白为基础,通过同源比对和拼接预测得到的基因 *GmDRR* 具有显著植物疾病抗性相应(plant disease resistance protein)即 Dirigent 的结构域。通过酵母双杂筛选文库的方法获得了可能与其互作的蛋白 *GmDIP1*,亚细胞定位很大程度上反映这一个蛋白的功能,通过亚细胞定位,了解到 *GmDRR* 为外分泌蛋白,外分泌蛋白质合成之后要分别运送到细胞中的不同部位,以保证细胞生命活动的正常进行。作为抗病候选基因编码产物, *GmDRR* 分布在细胞膜和细胞质中,其可能分泌到细胞外识别外界信号参与抗病途径。*GmDIP1* 是一个定位在线粒体膜上的蛋白,线粒体在能量转化,三羧酸循环,氧化磷酸化,储存钙离子的过程中起到至关重要的作用,线粒体可以储存钙离子,可以和内质网、细胞外基质等结构协同作用,从而控制细胞中的钙离子浓度的动态平衡。线粒体也参与细胞凋亡时的钙离子信号转导。 $\text{Ca}^{2+}$  在生物体响应外界胁迫中发挥重要作用,在植物的防御反应中钙调蛋白也有重要的作用,因此 *GmDIP1* 很可能参与钙离子的一系列调节,从而影响生物体对外界胁迫的响应以及植物的防御反应。此外,还通过原核表达,成功获得了具有表达功能和生物学

活性的大豆 *GmDRR* 蛋白和 *GmDIP1* 蛋白,纯化后的蛋白为下一步蛋白活性的分析、抑菌试验、抗体的制备以及 Pull-Down 交互验证等奠定基础。

## 参考文献

- [1] Patten A M, Davin L B, Lewis N G. Relationship of dirigent protein and 18S RNA transcript localization to heartwood formation in western red cedar [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69 (18): 3032-3037.
- [2] Kittur F S, Yu H Y, Bevan D R, et al. Deletion of the N-terminal dirigent domain in maize  $\beta$ -glucosidase aggregating factor and its homolog sorghum lectin dramatically alters the sugar-specificities of their lectin domains. [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2010, 48(8): 731-734.
- [3] Damaj M B, Kumpatla S P, Emani C, et al. Sugarcane DIRIGENT and O-methyltransferase promoters confer stem-regulated gene expression in diverse monocots [J]. *Planta*, 2010(231): 1439-1458.
- [4] Pickel B, Schaller A. Dirigent proteins: molecular characteristics and potential biotechnological applications [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2013, 97(19): 8427-8438.
- [5] Hosmani P S, Kamiya T, Danku J, et al. Dirigent domain-containing protein is part of the machinery required for formation of the lignin-based Casparian strip in the root [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(35): 14498-14503.
- [6] Arasan S K T, Park J I, Ahmed N U, et al. Characterization and

- expression analysis of dirigent family genes related to stresses in Brassica[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2013, 67(3): 144-153.
- [7] Pickel B, Schaller A. Dirigent proteins: Molecular characteristics and potential biotechnological applications[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2013, 97(19): 8427-8438.
- [8] Ralph S, Jancsik S, Bohlmann J. Dirigent proteins in conifer defense II: Extended gene discovery, phylogeny, and constitutive and stress-induced gene expression in spruce (*Picea* spp.) [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(14): 1975-1991.
- [9] Min S, Xu W, Yang X, et al. Association of jacalin-related lectins with wheat responses to stresses revealed by transcriptional profiling[J]. *Plant Molecular Biology*, 2014, 84(1-2): 95-110.
- [10] Seneviratne H K, Dalisay D S, Kim K W, et al. Non-host disease resistance response in pea (*Pisum sativum*) pods: Biochemical function of DRR206 and phytoalexin pathway localization [J]. *Phytochemistry*, 2015, 113: 140-148.
- [11] 刘雨萌, 兰金萍, 曹英豪, 等. 水稻类钙调磷酸酶亚基 B 蛋白在叶片生长和白叶枯病性反应中的表达 [J]. *植物学报*, 2012, 47(5): 27-23. (Liu Y M, Lan J P, Cao Y H, et al. Calci-neurin B-like protein of rice express in leaf growth and bacterial leaf blight resistance reaction [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, 47(5): 27-23.)
- [12] Jiang J F, Han Y, Xing L J, et al. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa* [J]. *Toxicon Official Journal of the International Society on Toxinology*, 2006, 47(1): 133-139.
- [13] Grunwald I, Heinig I, Thole H H, et al. Purification and characterisation of a jacalin-related, coleoptile specific lectin from *Hordeum vulgare* [J]. *Planta*, 2007, 226(1): 225-234.
- [14] Kittur F S, Mallikarjun L, Hyun Young Y, et al. Maize beta-glucosidase-aggregating factor is a polyspecific jacalin-related chimeric lectin, and its lectin domain is responsible for beta-glucosidase aggregation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(10): 7299-7311.
- [15] Liu J, Stipanovic R D, Bell A A, et al. Stereoselective coupling of hemigossypol to form (+)-gossypol in moco cotton is mediated by a dirigent protein [J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(18): 3038-3042.
- [16] Uzal E N, Gómez-Ros L V, Hernández J A, et al. Analysis of the soluble cell wall proteome of gymnosperms [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(8): 831-843.
- [17] Guillaumie S, Fouquet R, Kappel C, et al. Transcriptional analysis of late ripening stages of grapevine berry [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 165.
- [18] Wankhede D P, Biswas D K, Rajkumar S, et al. Expressed sequence tags and molecular cloning and characterization of gene encoding pinorensin/laricresin reductase from *Podophyllum hexandrum* [J]. *Protoplasma*, 2013, 250(6): 1239-1249.
- [19] Borges A F, Ferreira R B, Monteiro S. Transcriptomic changes following the compatible interaction *Vitis vinifera*-*Erysiphe necator*. Paving the way towards an enantioselective role in plant defence modulation [J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2013, 68: 71-80.
- [20] Esfandiari E, Jin Z, Abdeen A, et al. Identification and analysis of an outer-seed-coat-specific promoter from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2013, 81(1-2): 93-104.
- [21] Pariasca-Tanaka J, Chin J H, Nanimé K, et al. A novel allele of the P-starvation tolerance gene *OsPSTOL1* from African rice (*Oryza glaberrima* Steud) and its distribution in the genus *Oryza* [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2014, 127(6): 1387-1398.
- [22] Hideyuki F, Masaya S, Aya H, et al. Molecular basis of a shattering resistance boosting global dissemination of soybean [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(50): 17797-17802.
- [23] Behr M, Legay S, Hausman J F, et al. Analysis of cell wall-related genes in organs of *Medicago sativa* L. under different abiotic stresses [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16: 16104-16124.
- [24] Kye-Won K, Smith C A, Daily M D, et al. Trimeric structure of (+)-pinorensin-forming dirigent protein at 1.95 Å resolution with three isolated active sites \* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(3): 1308-1318.
- [25] Dalisay D S, Kim K W, Lee C, et al. Dirigent protein-mediated lignan and cyanogenic glucoside formation in flax seed: Integrative and MALDI mass spectrometry imaging [J]. *Journal of Natural Products*, 2015, 78(6): 1231-1242.