

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 果胶酸裂解酶 P56 在大肠杆菌中的重组表达

赵庆新^{1,2**}, 王鑫^{1**}, 张宇玲¹, 袁生^{1*}

(1. 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 南京 210046; 2. 盐城师范学院生命科学与技术学院, 江苏盐城 224002)

摘要: 果胶酸裂解酶 P56 在番茄花粉管伸长过程中起着重要的作用, 为了制备番茄 P56 蛋白的抗体, 进行番茄花粉管萌发过程中 P56 蛋白的免疫组织化学研究, 对 P56 基因在大肠杆菌系统的重组表达进行了研究。先采用 Overlap-PCR 的方法, 从番茄基因组 DNA 中克隆了成熟 P56 蛋白的 cDNA 序列 (LAT56), 再构建重组表达质粒 pET28a(+)-LAT56, 转化大肠杆菌 BL21-CodonPlus (DE3)-RIL, 得到了重组表达工程菌 pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodonPlus (DE3)-RIL。在 0.5 mmol/L IPTG、15℃ 和 180 r/min 条件下, 经过 60 h 的诱导培养, 重组蛋白表达量为细胞总蛋白的 30% 左右, 主要以包涵体形式存在, 重组蛋白经 Ni^{2+} -nitrilotriacetate-agarose 亲和柱层析, 得到了 SDS-PAGE 显示为单一蛋白带的纯化蛋白。

关键词: 番茄; 果胶酸裂解酶 (P56); 大肠杆菌; 表达

中图分类号: Q942.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2007)06-0539-05

Expression of P56 Pectate Lyase from *Solanum lycopersicum* in *Escherichia coli*

ZHAO Qing-Xin^{1,2**}, WANG Xin^{1**}, ZHANG Yu-Ling¹, YUAN Sheng^{1*}

(1. Key Lab for Microbial Technology in the College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China;

2. College of Life Science and Biotechnology, Yancheng Teachers College, Yancheng, Jiangsu 224002, China)

Abstract: P56 pectate lyase play an important role during the extension of pollen tube. In order to obtain the antibody of P56 for the study of action mechanism and distribution of P56 along pollen tube, the recombinant expression of P56 was carried out in *Escherichia coli*. The cDNA coding mature P56 without signal peptide was amplified from *Solanum lycopersicum* by Overlap-PCR. The amplified fragment was ligated to pET-28a(+) expression vector, then transformed into *Escherichia coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL. The expression of P56 was applied at 0.5 mmol/L IPTG, 15℃ and 180 r/min for 60 h. The recombinant protein reached about 30% of total cell proteins and existed as inclusion body in pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodonPlus (DE3)-RIL cell. Through Ni^{2+} -nitrilotriacetate-agarose affinity chromatography, the recombinant P56 was purified to homology based on SDS-PAGE.

Key words: *Solanum lycopersicum*; Pectate lyase (P56); *Escherichia coli*; Expression

果胶裂解酶含果胶酸裂解酶 (pectate lyase, EC 4.2.2.2) 和果胶酸酯裂解酶 (pectin lyase, EC 4.2.2.10) 两类, 植物来源的果胶裂解酶为果胶酸裂解酶^[1-8]。

1989 年, 来自植物的果胶酸裂解酶类似序列 P56 首次在番茄 (*Solanum lycopersicum*) 花粉中被发现^[7], 自那以后, 很多类似序列在其它植物的花粉、花粉管、花柱道等组织中不断被发现^[2,9]。在植物

花粉管萌发和延伸过程中, 果胶酶在促进花粉萌发、降解花柱道细胞壁展、促进花粉管延伸方面具有重要的意义^[9-11]。Parre 和 Geitmann 报道外源的微生物果胶酶在适当的浓度下对番茄的花粉管伸长具有显著的促进作用^[12]。为了进一步研究果胶酶和果胶在花粉管伸长过程中的作用机理, 前人对花粉管和花柱道中的果胶分布进行了免疫组织化学研究^[13], 但对果胶酸裂解酶等果胶酶的免疫组织化学

收稿日期: 2007-04-11, 修回日期: 2007-07-27。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30170005); 江苏省自然科学基金项目 (BK2005136); 江苏省教育厅高校自然科学研究项目 (07KJD180237)。

作者简介: 赵庆新 (1966 -), 男, 博士, 副教授, 从事分子酶学和酶工程研究; 王鑫 (1982 -), 男, 硕士, 研究方向为酶工程。

* 通讯作者 (E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn)。

** 同为第一作者。

的研究尚未见报道。

笔者构建了P56原核重组表达工程菌,对其在原核细胞中的表达进行了研究,可为植物来源的果胶酸裂解酶的表达积累一定的资料,也可用组织免疫学方法研究植物果胶酸裂解酶的定位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄(*Solanum lycopersicum*)品系为‘苏粉一号’,购于江苏红太阳种业(南京)。

1.2 菌株与质粒

大肠杆菌DH5 α 作为基因克隆的宿主菌,BL21-CodenPlus(DE3)-RIL(Novagen)用作LAT56基因表达的宿主菌;pMD 18-T Vector(TaKaRa)作为克隆载体,pET-28a(+)(Novagen)用作表达载体。

1.3 番茄基因组DNA的提取

均匀播种番茄种子于湿纱布上,无光条件下,30℃静置培养4 d。用CTAB法提取番茄基因组DNA^[14]。

1.4 LAT56基因的克隆与表达

1.4.1 LAT56克隆的引物设计

由于LAT56(NCBI accession number: X15500)基因在花粉管萌发时表达,材料难以获得,故采用Overlap-PCR方法获得基因,根据NCBI(national center for biotechnology information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库,得到目的基因的3个外元的序列,使用Gene Runner软件(Spruyt, Michael spruyt at DGIBT.COM)并参照Seffan N Ho等^[15]的方法设计6个引物,P2与P3有16 bp序列的重叠,P4与P5有20 bp序列的重叠,以利于片断的延伸。序列如下:

P1:5'-CAT ATG ATA AAC GCT CCG AGG AGG AAA CTA ACT AAG-3'(与去除信号肽后的exon1的5'序列相同,划线部分为引入的Nde I酶切位点);

P2:5'-GCA TCA CCT TCA TCT GCG CCC CTT AG-3'(19 bp与exon1的3'端序列互补,7 bp与exon2的5'端序列互补);

P3:5'-CAG ATG AAG GTG ATG CCA TCA GTA TCT TCA ATT C-3'(9 bp与exon1的3'端序列相同,25 bp与exon2的5'端序列相同);

P4:5'-AAT AGC GTA TCT TTC CCA ATG AGT GTA ATC A-3'(21 bp与exon2的3'端序列互补,10 bp与exon3的5'序列端互补);

P5:5'-ATT GGG AAA GAT ACG CTA TTG GAG GAA GCA G-3'(10 bp与exon2的3'端序列相同,21 bp与exon3的5'端序列相同);

P6:5'-CGA TCC TTA ACA TGG GCG TCG AAT CTT G-3'(与exon3的3'序列互补,划线部分为引入的BamH I酶切位点)。

1.4.2 LAT56克隆与表达

使用高保真的PfuUltra™ DNA聚合酶(stratagene),以基因组DNA为模板,分别以P1和P2、P3和P4、P5和P6为特异引物通过扩增得到不含信号肽的LAT56 exon1, exon2和exon3片断;然后用P3和P6为引物,以exon2和exon3片断为模板,通过第一次Overlap-PCR,得到LAT56 cDNA中的exon2 + exon3片断;最后用P1和P6为引物,以exon2 + exon3和exon1片断为模板,通过第二次Overlap-PCR,得到LAT56 cDNA中的成熟蛋白的编码片断,连接到pMD 18-T载体,转化DH5 α 细胞,以便基因的克隆和保存。用限制性内切酶Nde I和BamH I将不含信号肽的LAT56 cDNA片断从pMD 18-T-LAT56上切下,连接到pET-28a(+)(Novagen)表达载体上,转化E. coli BL21-CodenPlus(DE3)-RIL细胞(Novagen),得到pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL阳性转化子。

将得到的pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL转化子放入LB培养基(10 g蛋白胨,5 g酵母膏,10 g NaCl,1000 mL水)中培养,LB中分别加入葡萄糖1%(W/V)和有关抗生素,在37℃、220 r/min条件下培养,当OD₆₀₀达到0.8左右时,加入0.05 mol/L IPTG,在170 r/min、15℃条件下表达60 h。

1.5 蛋白的亲和层析

诱导表达结束后,在5000 g、4℃条件下离心10 min,收集菌体,用5 mL 0.01 mol/L Tris-HCl溶液(pH 7.0)洗涤菌体,重复1次,然后将菌体在-80℃条件下冻存6 h以上,之后用25 mL含100 μ g/mL lysozyme和0.001 mol/L PMSF的0.01 mol/L Tris-HCl溶液(pH 7.5)重新悬浮细胞,在0℃条件下,超声破碎细胞,离心得包涵体,用含1% triton、0.05 mol/L Tris-HCl溶液(pH 7.0)清洗包涵体,然后用含8 mol/L尿素的0.05 mol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.0)溶解,进一步用Ni²⁺-nitrilotriacetate-agarose柱进行亲和层析(用于层析各级溶液中含8 mol/L的尿素),层析后的样品在0.05 mol/L Tris-HCl缓冲溶液(pH 7.0)中透析。

1.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和蛋白浓度的测定

为了检测重组菌表达的 P56 重组蛋白产物,采用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测,浓缩胶浓度为 3.5%,分离胶浓度为 11.0%,用考马斯亮蓝 R-250 染色。蛋白浓度的测定参照 Bradford 的方法采用考马斯亮蓝 G-250 法进行可溶性蛋白含量测定^[16]。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,配制标准溶液,制作标准曲线。

1.7 DNA 序列比对

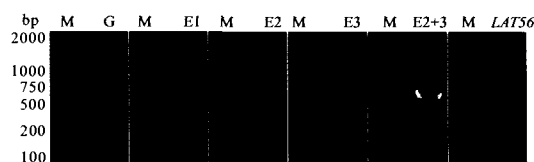
用 DNAMAN 软件(Lynnon BioSoft, Quebec)进行 DNA 序列比对。

2 实验结果

2.1 PCR 与 Overlap-PCR

使用 Ultra-Pfu DNA 聚合酶,以常规 PCR 的方法从基因组 DNA 中分别克隆出 3 个外显子后,装入 PMD18-T Vector 克隆测序。参照 Seffan N Ho 等的方法^[15]将各断外显子通过 Overlap-PCR 连接起来,再次装入 PMD18-T Vector 克隆测序,最终克隆到目的基因完整的 cDNA(LAT56)(图 1),保存于 DH5 α 中。实验重复了 3 次,所得到的序列均一致。

利用 DNAMAN 软件,进行 *Solanum lycopersicum* LAT56 cDNA(X15500 in NCBI)和 *Solanum lycopersicum*(‘苏粉一号’)LAT56 cDNA 核苷酸序列比对,从两者比对的结果来看(图 2),我们克隆到的蛋白 P56 的 cDNA 序列与报道序列有两个碱基的差异,分别在 192 和 195 两个位置,但从密码子简并性分



M:DNA marker; G; Tomato genomic DNA; E1; exon1 (499 bp); E2; exon2 (301 bp); E2 + 3; exon2 + exon3 (617 bp); LAT56: exon1 + exon2 + exon3 (1116 bp)

图 1 番茄基因组 DNA 提取、外元 PCR 和 Overlap-PCR 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gelelectrophoresis of tomato genomic DNA, different exon PCR and Overlap-PCR

析该差异时发现其氨基酸序列并未发生突变。

2.2 P56 在 pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL 中的表达

P56在pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL中得到了表达,在 pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL 的细胞上清中可以检测到目的蛋白,细胞中的大部分 P56 以包涵体方式存在,细胞全蛋白电泳胶扫描分析显示,重组表达的 P56 蛋白占全蛋白 30% 以上(图 3)。其对应的分子量为 41.4 kD,表达后的 P56 包含了 6 个组氨酸的 Tag 和一段连接序列,理论上总的分子量为 43.56 kD。

重组表达后的细胞经过裂解和离心,可得到 P56包涵体,包涵体经过 triton 清洗、尿素的溶解、Ni²⁺-nitrilotriacetate-agrose 柱层析和在 0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲溶液(pH 7.0)中透析后,最终得到的样品经 SDS-PAGE 检测,为单一蛋白带的纯化蛋白(图 3),样品中的蛋白浓度可以达到 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

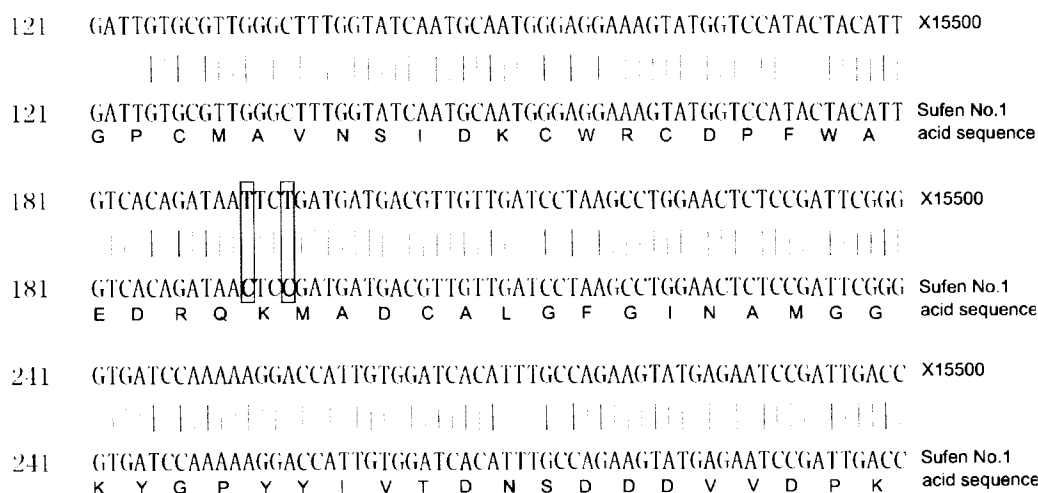
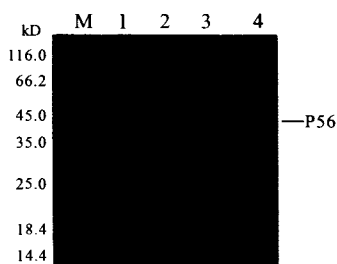


图 2 *Solanum lycopersicum* LAT56 cDNA (X15500 in NCBI)和 *Solanum lycopersicum* (‘苏粉一号’)LAT56 cDNA 核苷酸序列比对

Fig. 2 Alignment of *Solanum lycopersicum* LAT56 cDNA (X15500 in NCBI) (the first line) and *Solanum lycopersicum* ‘Sufen No. 1’ LAT56 cDNA (the second line). The third line; amino acid sequence of the corresponding LAT56 cDNA



M: Marker; 1: Soluble fraction of cell extract from pET-28a(+)-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL induced by 0.5 mmol/L IPTG, 15°C, 60 h; 2: Soluble fraction of cell extract from pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL induced by 0.5 mmol/L IPTG, 15°C, 60 h; 3: All cell proteins sample from pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL induced by 0.5 mmol/L IPTG, 15°C, 60 h; 4: Purified 6his-P56 inclusionbody

图3 pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL 重组表达的 P56 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 Assay of P56 expressed in pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL by SDS-PAGE

3 讨论

Solanum lycopersicum LAT56 cDNA (X15500 in NCBI) 和 *Solanum lycopersicum* (‘苏粉一号’) LAT56 cDNA 核苷酸序列比对显示: *Solanum lycopersicum* LAT56 cDNA (X15500 in NCBI) 和 *Solanum lycopersicum* (‘苏粉一号’) P56 的 cDNA 序列有两个碱基的差异, 分别在 192 和 195 两个位置, 但从密码子简并性分析该差异时发现其氨基酸序列并未发生突变。由于 3 次重复实验得到的 *Solanum lycopersicum* (‘苏粉一号’) P56 的 cDNA 序列均一致, 所以, *Solanum lycopersicum* LAT56 cDNA (X15500 in NCBI) 和 *Solanum lycopersicum* (‘苏粉一号’) P56 的 cDNA 序列有两个碱基的差异不是实验引起的变异, 可能是不同番茄品种间的差异造成的。

BL21-CodenPlus(DE3)-RIL 能够很好地表达 P56 蛋白, 是由于 BL21-CodenPlus(DE3)-RIL 细胞内添加了 3 种稀有的 tRNA 基因, 恰好弥补了 P56 的翻译起始区 4 个大肠杆菌稀有密码子(1 个 CTA, 对应于 P56 第 1 个氨基酸; 2 个 AGG, 对应于 P56 第 5 个和第 6 个氨基酸; 1 个 ATA, 对应于 P56 第 8 个氨基酸), 所以 P56 在 BL21-CodenPlus(DE3)-RIL 表达效果显著, 细胞积累了大量的 P56 蛋白包涵体, 经过纯化后得到的纯化蛋白, 经电泳检测为单一蛋白, 浓度达到 50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 可以进一步用于免疫学方面的研究。

在构建 P56 原核表达的过程中, 本研究试用了多种质粒和表达宿主细胞, 表达的效果相互间有显

著的差异性。从蛋白表达量上分: 有不表达的表达式工程菌 [pET-28a(+)-LAT56-Turner plac I (DE3)], 有表达量高达占细胞总蛋白 30% ~ 70% 以上的表达式工程菌 [pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL、pET-32a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL、pET-43.1b(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL]; 根据表达蛋白的可溶性分: 有不溶的工程菌 [pET-28a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL], 也有可溶性较高的工程菌 [pET-32a(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL 和 pET-43.1b(+)-LAT56-BL21-CodenPlus(DE3)-RIL]。但不同的表达组合的共同特征是重组酶的活性很低(0.01 U/mL medium), 这可能是由于原核表达无法满足该蛋白在糖基化等方面的修饰要求, 而该酶的有关修饰对酶的活性又非常重要, 所以从酶活角度需要尝试其它表达系统。植物果胶酸裂解酶方面的重组表达是植物学相关研究领域的瓶颈问题, 目前国内外未有成功的报道, Domingo 报道 *Zinnia elegans* 果胶酸裂解酶在原核表达中有活性^[17], 但酶活只有 0.001 U/mL medium。

参考文献:

- [1] Tabata S, Kaneko T, Nakamura Y, et al. Sequence and analysis chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nature*, 2000, 408: 823 - 826.
- [2] Kulikauskas R, McCormick S. Identification of the tobacco and *Arabidopsis* homologues of the pollen-expressed LAT59 gene of tomato [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 34: 809 - 814.
- [3] Haas B J, Volfosky N, Town C D, Troukhan M, Alexandrov N, Feldmann K A, Flavell R B, White O, Salzberg S L. Full-length messenger RNA sequences greatly improve genome annotation [J]. *Genome Biol*, 2002, 3 (RESEARCH0029): 1 - 9.
- [4] Rogers H J, Harvey A, Lonsdale D M. Isolation and characterization of a tobacco gene with homology to pectate lyase which is specifically expressed during microsporogenesis [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 493 - 502.
- [5] Griffith I J, Pollock J, Klapper D G, Rogers B L, Nault A K. Sequence polymorphism of Amb a I and Amb a II, the major allergens in *Ambrosia artemisiifolia* (short ragweed) [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol/Lunol*, 1991, 96: 296 - 304.
- [6] Rafnar T, Griffith I J, Kuo M C, Bond J F, Rogers B L, Klapper D G. Cloning of Amb a I (antigen E), the major allergen family of short ragweed pollen [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 1229 - 1236.
- [7] Wing R A, Yamaguchi J, Larabell S K, Ursin V M, McCormick S. Molecular and genetic characterization of two pollen-expressed genes that have sequence similarity to pectate lyases of the plant pathogen *Erwinia* [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 14: 17 - 28.
- [8] Domingo C, Roberts K, Stacey N J, Connerton I, Ruiz-Teran F, McCann M C. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible [J]. *Plant J*, 1998, 13: 17 - 28.

- [9] Taniguchi Y, Ono A, Sawatani M, Nanba M, Kohno K, Usui M, Kurimoto M, Matuhasi T. Cry j I, a major allergen of Japanese cedar pollen, has a pectate lyase enzyme activity[J]. *Allergy*, 1995, 50:90-93.
- [10] Wu Y, Qiu X, Du S, Erickson L. PO149, a new member of pollen pectate lyase-like gene family from alfalfa[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32:1037-1042.
- [11] Mari-Rodríguez M C, Orchard J, Seymour G B. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening[J]. *J Exp Bot*, 2002, 53: 2115-2119.
- [12] Parre E, Geitmann A. Pectin and role of the physical properties of the wall in pollen tube growth[J]. *Planta*, 2005, 220:582-592.
- [13] Stepka M, Ciampolini F, Charzynska M, Cresti M. Localization of pectins in the pollen tube wall of *Ornithogalum virens* L. Does the pattern of pectin distribution depend on the growth rate of the pollen tube? [J]. *Planta*, 2000, 210:630-635.
- [14] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual[M]. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor, 1989.
- [15] Ho S N, Hunt H D, Horton R N. Site directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction [J]. *Gene*, 1989, 77:51-59.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [17] Domingo C, Roberts K, Stacey N J, Connerton I, Ruđz-Terań F, McCann M C. A pectate lyase from *Zinnia elegans* is auxin inducible[J]. *Plant J*, 1998, 13:17-28.

《武汉植物学研究》网站开通

为了适应当今科技期刊数字化、网络化发展的要求,进一步扩大期刊的影响,更好地服务于科研人员,本刊建立了在线投稿、稿件查询及审稿系统,并开通了《武汉植物学研究》网站(<http://www.whzwxyj.cn>),以为作者、读者和专家提供一个学术交流的网上平台。经过一年的试运行,本刊网站现已正式开通。网站将及时刊登本刊最新信息,方便读者及时了解本刊动态;并可通过网站投稿、审稿、查阅本刊过刊论文(数据正在逐步录入中)。欢迎广大读者、作者、专家登陆《武汉植物学研究》网站主页进行期刊查询、投稿、审稿,如果您在使用过程中遇到问题或有好的建议,请及时与编辑部联系(E-mail: editor@rose.whiob.ac.cn; 电话:027-87510755)。

希望网站的开通能够给您的学习和科研工作提供帮助。衷心地感谢广大读者、作者和专家多年来对本刊的帮助和厚爱!希望继续得到您的关注和支持!

欢迎您投稿! 欢迎刊登广告!

《武汉植物学研究》编辑部

2007年12月