

# 丹参病程相关蛋白基因 *PR10* 的克隆与表达分析

赵 乐<sup>1</sup>, 马利刚<sup>1</sup>, 王志霜<sup>2</sup>, 申 业<sup>2</sup>, 郑晓珂<sup>1</sup>

(1 河南中医学院 药学院, 郑州 450046; 2 中国中医科学院 中药资源中心, 北京 100700)

**摘 要:** 病程相关蛋白(PR)的产生与积累是植物体应对生物或非生物胁迫的主要特征之一。该研究以人工培养的丹参幼苗为材料,通过分析丹参转录组数据,根据丹参病程相关蛋白基因 *PR10* 的序列设计特异性引物,采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从丹参中获得 *PR10* 基因的开放阅读框(ORF),命名为 *SmPR10-1* (GenBank 注册号 KF877034),并进行原核表达和纯化。结果表明:(1)*SmPR10-1* 基因 ORF 为 477 bp,编码 158 个氨基酸,其蛋白质分子质量为 17.38 kD。(2)通过蛋白结构预测、序列多重比对和构建进化树等生物信息学分析,发现 *SmPR10-1* 基因具有保守序列(G-X-G-G-X-G)和(K-A-X-E-X-Y),其编码蛋白与葡萄等双子叶植物中的 *PR10* 蛋白同源性较高。(3)经异丙基  $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导,含有表达载体 pET32a-*SmPR10-1* 的大肠杆菌(*Escherichia coli* BL21)可诱导表达融合蛋白;对影响蛋白表达的 4 个因素优化结果表明,*SmPR10-1* 蛋白的最佳表达条件为: IPTG 终浓度 0.4 mmol/L、起始宿主菌密度  $A_{600}$  为 0.8、诱导温度 30 °C、诱导时间 8 h,并得到纯化的 *SmPR10-1* 蛋白。该结果为进一步研究 *SmPR10-1* 基因在丹参抗病方面的生物学功能和培育丹参抗病品种奠定了基础。

**关键词:** 丹参; 病程相关蛋白; 生物信息学分析; 原核表达; 条件优化

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

## Cloning and Expression Analysis of Pathogenesis-related Protein 10 Gene of *Salvia miltiorrhiza*

ZHAO Le<sup>1</sup>, MA Ligang<sup>1</sup>, WANG Zhishuang<sup>2</sup>, SHEN Ye<sup>2</sup>, ZHENG Xiaoke<sup>1</sup>

(1 School of Pharmacy, Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2 National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**Abstract:** The synthesis of pathogenesis-related proteins (PR) is one prominent feature of plant defense responses on abiotic or non-abiotic stress situations. According to the transcriptome data of *Salvia miltiorrhiza*, designing specific primers and using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), we isolated an open reading frame of pathogenesis-related protein 10 (PR10) from *S. miltiorrhiza* and named as *SmPR10-1* (GenBank Accession No. KF877034). The results indicated that: (1) *SmPR10-1* has an open reading frame (ORF) of 477 bp, which encoded a protein of 158 amino acid residues, with a predicted molecular mass of 17.38 kD. (2) Bioinformatic analysis indicated that *SmPR10-1* protein showed the highest homology, 69% identity, with PR10 protein from *Vitis vinifera* with the same conserved sequence (G-X-G-G-X-G) and (K-A-X-E-X-Y). (3) *Escherichia coli* BL21 cells were transformed with the expression vector pET32a-*SmPR10-1* and used for prokaryotic expression. Meanwhile, the four factors, inducing IPTG concentrations, initial density of host bacterium ( $A_{600}$ ), inducing temperature and inducing time, which influenced protein expression, were optimized. The optimum expression conditions of *SmPR10-1* were final IPTG concentration of 0.4 mmol/L,  $A_{600}$  of 0.8, and the inducing time of 8 h at 30 °C. Finally, the recombi-

收稿日期: 2015-02-03; 修改稿收到日期: 2015-04-17

基金项目: 国家自然科学基金(81173490, 8130070); 河南中医学院博士科研基金(BSJJ2011-07)

作者简介: 赵 乐(1983-), 男, 博士, 讲师, 主要从事药用植物分子生物学研究。E-mail: zhaole1983@126.com

nant SmPR10-1 protein was purified through Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography. The results of this study provided not only the first and fundamental information about SmPR10-1 gene, but also a candidate gene for future genetic engineering of Chinese medical herbs, *S. miltiorrhiza*, against pathogen attack.

**Key words:** *Salvia miltiorrhiza*; pathogenesis-related protein; bioinformatic analysis; prokaryotic expression; optimization of expression condition

植物在受到真菌、细菌和病毒等病原微生物感染或受到非生物胁迫时会诱导表达并积累病程相关(pathogenesis-related, PR)蛋白,这类蛋白是植物防御体系的重要组成部分<sup>[1]</sup>。PR 蛋白为多基因编码,根据氨基酸序列的相似程度、血清学关系和生物学活性,目前分为 17 类<sup>[2]</sup>。它们在不同的植物中表现为几丁质酶、葡聚糖苷酶、蛋白酶抑制剂、内肽酶和过氧化物酶等,在植物自我防御机制中作为可被诱导的组分发挥作用。

随着对 PR 蛋白研究的深入,发现 PR 蛋白不仅在被侵染组织中诱导表达,而在整个植株中都有表达,与系统获得性抗性(systemic acquired resistance, SAR)有关,被认为是 SAR 的一个显著标志。PR10 类蛋白属于类核糖核酸酶,可以降解 RNA,有抗细菌和抗真菌的活性<sup>[3]</sup>,有关病毒<sup>[4-5]</sup>、细菌<sup>[6]</sup>、真菌<sup>[7-9]</sup>等病原菌诱导 PR10 蛋白表达的研究已有广泛报道,作为植物防御系统中的可诱导表达组分,PR10 蛋白受多种病原菌的诱导表达,同时 PR10 蛋白在不同组织、器官及发育时期都有表达,属于组成型表达。植物激素和防御相关的信号分子,包括茉莉酸<sup>[10]</sup>、脱落酸<sup>[11]</sup>、水杨酸<sup>[12]</sup>、赤霉素、茉莉酸甲酯、乙烯也能够调节 PR10 蛋白的表达。

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)为唇形科鼠尾草属多年生草本植物,以其干燥根及根茎入药,在临床上被广泛应用于心脑血管疾病以及各种炎症的治疗,是重要的大宗药材,也是栽培面积较大的药材之一。在人工栽培条件下,由于药田生态环境中生物群落多样性差、丰富度低,病虫害优势种群突出,常常发生严重的病虫害,导致药材产量下降,品质变劣,降低丹参药用品质,影响临床药效。近年来,有关丹参的研究多集中在二萜类化合物丹参酮合成途径关键基因的克隆上<sup>[13-14]</sup>,而对于丹参抗病基因的研究则少有报道。

在对课题组前期得到的大量丹参转录组数据的分析中,发现多个植物病程相关基因,本研究采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)从丹参中得到了植物病程相关蛋白基因 PR10 的 cDNA 全长,将其构建得到含有 SmPR10-1 的重组质粒 pET32a-SmPR10-1,导

入大肠杆菌 BL21(DE3)中,进行体外诱导表达,并对 IPTG 浓度、诱导时间、温度等培养条件进行优化,筛选 SmPR10-1 蛋白的最适表达条件,为进一步研究 SmPR10-1 基因在丹参抗病中的生物学功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)种子采自陕西商洛,种植于人工气候箱内,光照强度为 3 000 lx,光周期为光照 16 h/黑暗 8 h,温度 25 ℃。种子萌发,长出 4 片真叶后,移至培养罐中,每个培养罐 4 颗幼苗,每隔 3 d 换 1 次 Hoagland 营养液,培养 60 d 的丹参幼苗做为实验材料,取根、茎、叶,样品采集后液氮冷冻,保存于-80 ℃冰箱中。表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)及原核表达载体 pET-32a(+)为本实验室保存。

### 1.2 方法

**1.2.1 SmPR10-1 基因克隆与序列分析** 采用 Trizol 法从丹参根中提取总 RNA,用 NanoDrop 2000 进行含量测定,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以提取的 RNA 为模板,以 oligo(dT)<sub>18</sub> primer 为反转录引物,按照 RevertAid H Minus Reverse Transcriptase 试剂盒(Fermentas 公司)说明合成 cDNA。根据转录组数据中 PR10 基因的序列信息,利用 Primer 5 设计 PR10 基因编码区的特异引物,正向引物 SmPR-10-M1(5'-CGGAATTCATGGGTGTGATCA-3',下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点);反向引物 SmPR-10-M2(5'-CCGCTCGAGTG TAGTCGGGGTT-3',下划线部分为 *Xho* I 酶切位点),以反转录得到的丹参 cDNA 为模板,扩增 SmPR10-1 基因的 ORF,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,用琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根公司)回收目的片段,将回收的 PCR 产物与 pGEM-T Easy vector 连接,转化 DH5 $\alpha$  菌株,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上进行培养,挑取单克隆,经菌液 PCR 和电泳检测后,挑选阳性克隆送北京华大基因公司测序,将测序结果与转录组数据中的 PR10 基因序列进行比

对,保存序列一致的阳性克隆,准备构建原核表达载体。

通过 ExPASy 在线服务器的 Compute pI/Mw ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/)) 预测 *SmPR10-1* 基因编码蛋白质的相对分子量与理论等电点, TargetP 1.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) 预测该蛋白的亚细胞定位, SignalP 4.1 server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽分析, TMHMM server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 进行跨膜域分析, PredictProtein server (<http://www.predictprotein.org/>) 进行二级结构预测, SWISSMODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) 进行三维同源建模。用 DNAMAN 软件对序列进行多重比对,用 Clustal W 软件与其他植物 PR10 蛋白的氨基酸序列进行比较,采用 MEGA4 软件的相邻连接法(neighbor-joining)构建系统进化树,bootstrap 重复次数为 1 000 次。

### 1.2.2 *SmPR10-1* 原核表达载体的构建与鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别对原核表达载体 pET-32a(+) 和测序正确的 pGEM-T Easy-*SmPR10-1* 质粒进行双酶切,琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收载体片段和目的基因片段,  $T_4$  DNA 连接酶 16 °C 连接过夜。连接产物转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞,在含有氨苄青霉素的 LB 平板上培养过夜,挑取单克隆,经菌液 PCR 和双酶切鉴定,挑选阳性克隆送北京华大基因公司测序。

**1.2.3 *SmPR10-1* 的诱导表达** 挑取测序正确的阳性克隆,接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37 °C 培养过夜后,按照 1:100 比例稀释到含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,220 r/min 振荡培养至对数生长期( $A_{600}$  为 0.6),然后针对诱导温度(15、20、25、30、37 °C)、诱导时间(4、6、8、20 h)、IPTG 浓度(0.1、0.4、0.8、1.0 mmol/L),及  $A_{600}$  (即诱导起始宿主菌密度 0.4、0.6、0.8、1.0) 这 4 个影响原核表达产物积累的因素,当研究其中 1 种因素时,固定其他 3 个因素不变,分别分析了这 4 个因素对丹参 *SmPR10-1* 重组蛋白表达的影响。

**1.2.4 重组 *SmPR10-1* 蛋白的纯化** 根据优化的诱导表达条件,在大肠杆菌中大量表达重组 *SmPR10-1* 蛋白,获得菌体,超声破碎,破碎液在 4 °C,12 000 r/min 离心 30 min,取上清液经 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤,采用  $Ni^{2+}$  亲和层析方法,利用 Ni Sepharose 6 Fast Flow Purification System(GE Health-

care)树脂对滤液进行纯化,然后用不同浓度的咪唑梯度洗脱,SDS-PAGE 电泳检测洗脱样品,收集单一目的条带样品进行透析,透析后样品经超滤管浓缩,用 Bradford 方法对蛋白进行定量,冷冻干燥,-70 °C 保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 *SmPR10-1* 的基因克隆与序列分析

通过对课题组前期得到的丹参转录组数据进行分析,根据 PR10 基因 ORF 设计特异性引物,扩增得到 500 bp 左右的条带(图 1),与转录组数据中 PR10 基因开放阅读框(ORF)大小一致,测序结果表明 *SmPR10-1* 基因的 OFR 为 477 bp,编码 158 个氨基酸,分子量为 17.38 kD,等电点 pI 为 5.23。

SignalP 4.1 server 预测,*SmPR10-1* 蛋白不含信号肽,TargetP 1.1 server 预测,显示 *SmPR10-1* 蛋白定位于细胞质,TMHMM server 预测该蛋白不含跨膜域。用 PredictProtein 对 *SmPR10-1* 蛋白的二级结构进行预测,结果显示在该蛋白中  $\alpha$ -螺旋结构占 21.52%, $\beta$ -折叠占 34.81%,无规则卷曲占 43.67%(图 2,A)。用 SWISS-MODEL 以樱桃的 allergen Pru av 1 蛋白为模板(PDB ID:1e09),预测 *SmPR10-1* 蛋白的三维结构(图 2,B)。结果显示 *SmPR10-1* 蛋白包含一个 C 端由 28 个氨基酸组成的  $\alpha$  螺旋,7 个  $\beta$  折叠以及 N 端在  $\beta$ 1 和  $\beta$ 2 折叠之间的 1 个的短  $\alpha$  螺旋。保守的 P-loop 基序(G-X-G-G-X-G)位于  $\beta$ 2 和  $\beta$ 3 之间,C 端有(K-A-X-E-X-Y)的保守序列(图 2,A)。三级结构与已经报道的 PR10 家族蛋白的空间结构具有很高的相似性, $\beta$ -折叠在  $\alpha$ -螺旋间反向平行排列,构成紧凑的  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$  夹心结构,具有疏水作用和稳定的多重氢键,这个紧凑的结构可能决定了 PR 蛋白的高稳定性。

将 *SmPR10-1* 与 NCBI GenBank 中 20 种植物

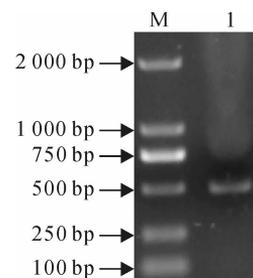


图 1 PCR 扩增 *SmPR10-1* 基因的开放阅读框

Fig. 1 PCR amplification of *SmPR10-1* gene open reading frame

M. DL2000; 1. *SmPR10-1* ORF

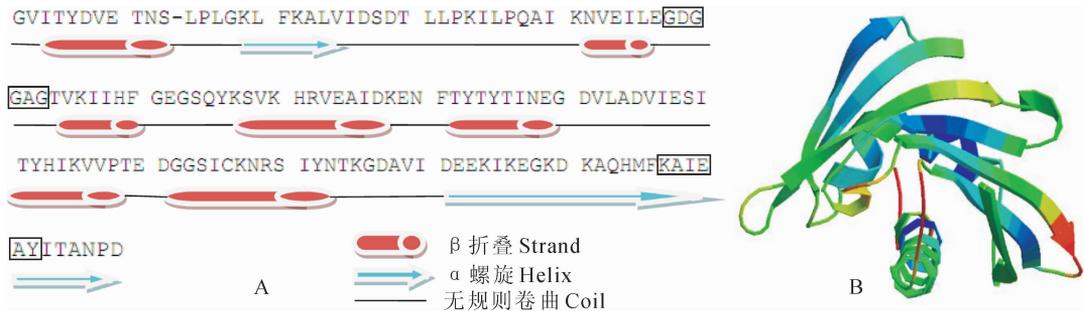


图 2 SmPR10-1 蛋白的结构预测  
A. 二级结构预测;B. 三维结构预测

Fig. 2 Prediction of SmPR10-1 protein structure

A. Secondary structure prediction;B. Prediction of three-dimensional structure

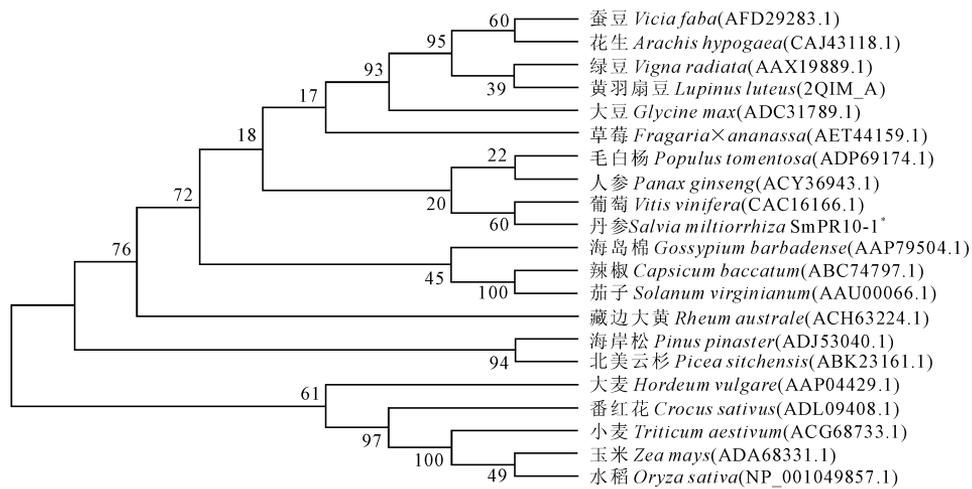


图 3 SmPR10-1 蛋白与其他物种 PR10 蛋白的系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of SmPR10-1 protein and PR10 proteins from other species

PR10 蛋白进行比对,采用 MEGA4 软件构建系统进化树,结果(图 3)显示,PR10 聚为两类,一类是单子叶植物 PR10,另一类是双子叶植物 PR10,SmPR10-1 归属于双子叶植物类,与葡萄、人参亲缘关系最近。

2.2 SmPR10-1 基因的原核表达载体构建与鉴定

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 分别对原核表达载体 pET-32a(+)和测序正确的 pGEM-T Easy-SmPR10-1 质粒进行双酶切,连接得到重组质粒 pET32a-SmPR10-1,然后转化 *E. coli* BL21 (DE3),挑取单克隆进行菌液 PCR 和双酶切鉴定,都有 500 bp 左右的目的条带(图 4),阳性克隆测序结果显示与目的基因 *SmPR10-1* 序列一致,未发生移码突变,表明已成功将 *SmPR10-1* 基因克隆到原核表达载体 pET-32a 上。

2.3 SmPR10-1 蛋白的原核表达条件的优化

2.3.1 IPTG 浓度对 SmPR10-1 表达的影响 保持诱导时间 8 h、诱导温度 30 °C 及起始 A<sub>600</sub> 为 0.6 不

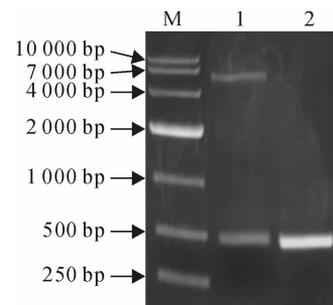


图 4 原核表达载体 pET32a-SmPR10-1 鉴定

M. DL10000;1. *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切 pET32a-SmPR10-1 载体;2. 阳性克隆的 PCR 产物

Fig. 4 The identification of prokaryotic expression vector pET32a-SmPR10-1

M. DL10000;1. pET32a-SmPR10-1 digested by *EcoR* I and *Xho* I ; 2. PCR product of positive clone

变,在 0.1、0.4、0.8、1.0 mmol/L 这 4 个 IPTG 浓度下,观察发现 IPTG 浓度在 0.1~1.0 mmol/L 对 SmPR10-1 表达量影响不明显(图 5)。

2.3.2 诱导温度对 SmPR10-1 表达的影响 保持

诱导时间 8 h、IPTG 浓度 0.4 mmol/L 及起始  $A_{600}$  为 0.6 不变,不同诱导温度(15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C)下,发现温度对 SmPR10-1 表达影响明显,20~30 °C 诱导均有利于可溶性蛋白的表达,而 15 °C 和 37 °C 时蛋白表达量减少(图 6)。

**2.3.3  $A_{600}$  对 SmPR10-1 表达的影响** 保持诱导时间 8 h、诱导温度 30 °C 及 IPTG 浓度 0.4 mmol/L 不变,观察到在不同起始菌密度( $A_{600}$  为 0.4、0.6、0.8、1.0)时加入诱导剂 IPTG 对 SmPR10-1 表达有

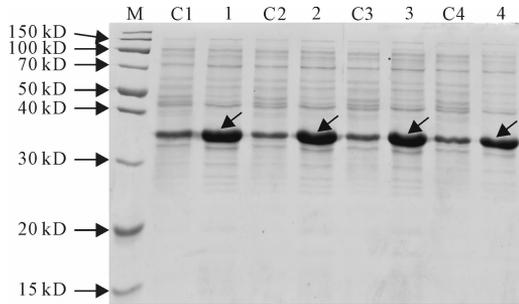


图 5 不同 IPTG 浓度对 SmPR10-1 蛋白表达的影响  
M. 蛋白分子量标准;C1~C4. 含 pET32a 空载体的 *E. coli* 菌株;  
1~4. 分别在 0.1、0.4、0.8、1.0 mmol/L IPTG 浓度诱导的含  
pET32a-SmPR10-1 质粒的 *E. coli* 菌株。

箭头显示为重组 SmPR10-1 蛋白

Fig. 5 Effect of different IPTG concentrations on the expression of SmPR10-1 protein

M. Protein marker; C1-C4. *E. coli* containing pET32a used as control; 1-4. *E. coli* contains pET32a-SmPR10-1 induced with 0.1, 0.4, 0.8 and 1.0 mmol/L IPTG, respectively. The arrows show the recombinant SmPR10-1 protein

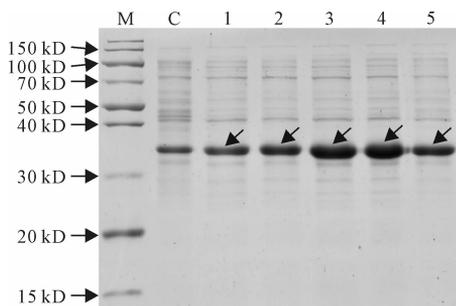


图 6 不同诱导温度对 SmPR10-1 蛋白表达的影响  
M. 蛋白分子量标准;C. 含 pET32a 空载体的 *E. coli* 菌株;  
1~5. 分别在 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C 诱导的含 pET32a-SmPR10-1 质粒的 *E. coli* 菌株。箭头显示为重组 SmPR10-1 蛋白

Fig. 6 Effect of different temperature on the expression of SmPR10-1 protein

M. Protein marker; C. *E. coli* containing pET32a used as control; 1-4. *E. coli* contains pET32a-SmPR10-1 induced at 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, respectively. The arrows show the recombinant SmPR10-1 protein

影响,发现起始宿主菌密度 ( $A_{600} = 0.8$ ) 时, SmPR10-1 表达量最高(图 7)。

**2.3.4 诱导时间对 SmPR10-1 表达的影响** 保持诱导温度 30 °C、IPTG 浓度 0.4 mmol/L 及起始  $A_{600}$  0.8 不变,研究诱导时间(4、6、8、20 h)对 SmPR10-1 表达的影响,观察到诱导时间对蛋白表达量有明显影响,随着诱导时间的延长,蛋白表达量有随之增加的趋势(图 8)。

**2.4 重组 SmPR10-1 蛋白的纯化**

根据优化的条件,IPTG 浓度 0.4 mmol/L、起

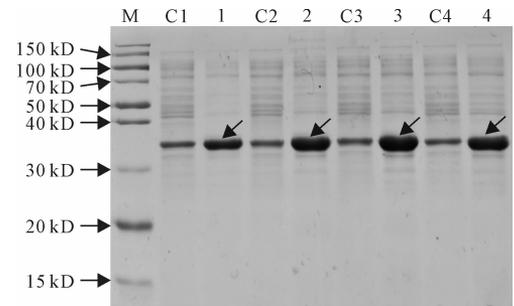


图 7 不同起始宿主菌密度( $A_{600}$ )对 SmPR10-1 蛋白表达的影响

M. 蛋白分子量标准;C1~C4. 含 pET32a 空载体的 *E. coli* 菌株;  
1~4. 分别在  $A_{600}$  为 0.4、0.6、0.8、1.0 条件下诱导的含 pET32a-SmPR10-1 质粒的 *E. coli* 菌株。箭头显示为重组 SmPR10-1 蛋白

Fig. 7 Effect of different initial density of host bacterium

( $A_{600}$ ) on the expression of SmPR10-1 protein

M. Protein marker; C1-C4. *E. coli* contains pET32a used as control; 1-4. *E. coli* containing pET32a-SmPR10-1 induced at 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0  $A_{600}$ , respectively. The arrows show the recombinant SmPR10-1 protein

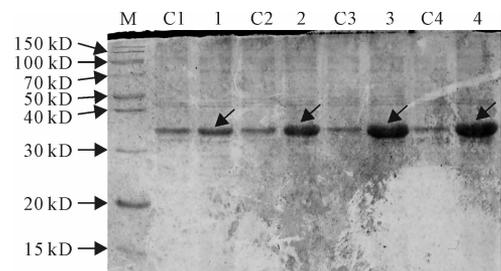


图 8 不同诱导时间对 SmPR10-1 蛋白表达的影响  
M. 蛋白分子量标准;C1~C4. 含 pET32a 空载体的 *E. coli* 菌株;  
1~4. 分别诱导 4、6、8、20 h 的含 pET32a-SmPR10-1 质粒的 *E. coli* 菌株。箭头显示为重组 SmPR10-1 蛋白

Fig. 8 Effect of different inducing time on the expression of SmPR10-1 protein

M. Protein marker; C1-C4. *E. coli* contains pET32a used as control; 1-4. *E. coli* containing pET32a-SmPR10-1 induced with 4, 6, 8, 20 h, respectively. The arrows show the recombinant SmPR10-1 protein

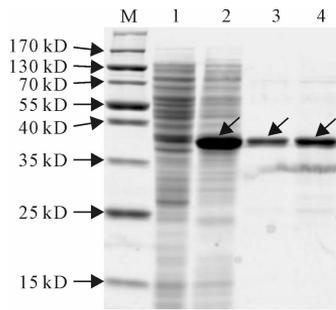


图9 重组 SmPR10-1 蛋白的纯化

M. 蛋白分子量标准;1. 含 pET32a 空载体的 *E. coli* 菌株作为对照;  
2. 优化条件下诱导的含 pET32a-SmPR10-1 质粒的 *E. coli*  
菌株;3,4. 纯化后的重组 SmPR10-1 蛋白(3 : 2  $\mu\text{g}$  上样;  
4 : 5  $\mu\text{g}$  上样)。箭头显示为重组 SmPR10-1 蛋白

Fig.9 Purification of recombinant SmPR10-1 protein

M. Protein marker;1. *E. coli* containing pET32a used as control;  
2. *E. coli* contains pET32a-SmPR10-1 induced under optimized  
conditions;3,4. The purified recombinant SmPR10-1 protein  
(3 : 2  $\mu\text{g}$ ); 4 : 5  $\mu\text{g}$ ). The arrows show the recombinant SmPR10-1 protein  
始  $A_{600}$  为 0.8、诱导温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、诱导时间 8 h,将重  
组 SmPR10-1 蛋白在大肠杆菌中大量表达,收集大  
肠杆菌菌体,超声破碎,破碎液经过离心取上清液,  
采用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析方法,利用 Ni Sepharose 6 Fast  
Flow Purification System(GE Healthcare)树脂进  
行纯化,得到目的蛋白 SmPR10-1(图 9),Bradford  
法测得纯化蛋白浓度为 1.02  $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 3 讨 论

丹参为多年生草本植物,以根入药,在人工栽培条件下,易受到各种病虫害的危害,若长期大量使用农药,一方面易使病虫害产生抗药性,另一方面农药残留会降低丹参的药品品质,影响丹参临床药效。因此从丹参自身挖掘抗性相关基因,培育抗病品种,才是缓解丹参病虫害的根本途径。本研究从丹参中克隆得到病程相关蛋白 10 基因 *SmPR10-1*,对其核酸及其推测的氨基酸序列分析发现,*SmPR10-1* 基因编码蛋白的 N 端有典型的富含甘氨酸的 P-loop 基序(G-X-G-G-X-G),C 端有(K-A-X-E-X-Y)的保守序列,说明 SmPR10-1 蛋白是 PR10 蛋白家族中的成员(Van Loon<sup>[2]</sup>、Fernandes<sup>[15]</sup>)。SmPR10-1 蛋白不含信号肽,作为胞质蛋白发挥作用,这与其他 PR 家族蛋白不同,其它 PR 家族蛋白大多是位于胞外,具有信号肽序列,先是作为蛋白前体合成,然后在分泌过程中形成成熟蛋白<sup>[16]</sup>。

大肠杆菌是常用的外源蛋白质表达系统之一,

影响外源蛋白可溶性表达的因素有多方面,要增加可溶性蛋白的表达量,除了合理的选择酶切位点、表达载体、宿主菌、试剂外,还可以通过改变培养条件来提高外源蛋白的可溶性表达量,如改变 IPTG 浓度<sup>[17]</sup>、诱导温度<sup>[18]</sup>、诱导时宿主菌的密度( $A_{600}$ )<sup>[19]</sup>和诱导时间<sup>[18]</sup>等。本研究将目的基因 *SmPR10-1* 构建到表达载体 pET32a 上,形成重组质粒 pET32a-SmPR10-1,然后转化 *E. coli* BL21(DE3),进行蛋白表达。pET32a 载体是带有 N-端硫氧还蛋白(Trx·Tag) 编码序列的融合表达载体,当外源重组蛋白在 *E. coli* 中以不溶形式存在时,和 Trx·Tag 序列融合后,可增加重组蛋白的溶解性<sup>[20]</sup>;此外,表达宿主菌 BL21(DE3)可以增加存在于胞质中蛋白质的二硫键的形成,使得蛋白的可溶性更好,同时,利用 pET32a 载体表达的重组蛋白 N 端带有 6 个 His Tag 标签,方便后续重组蛋白的纯化<sup>[18]</sup>。

IPTG 浓度、温度、起始菌密度( $A_{600}$ )和诱导时间是影响原核表达的主要因素,本研究发现,IPTG 浓度在 0.1~1.0 mmol/L 对 SmPR10-1 蛋白表达量影响不明显,最终选择 IPTG 浓度为 0.4 mmol/L。温度对 SmPR10-1 表达量有明显影响,从 15~37  $^{\circ}\text{C}$  均能得到重组蛋白,但是 15  $^{\circ}\text{C}$  时温度过低,不利于蛋白表达,在 30  $^{\circ}\text{C}$  时表达量最高,虽然在 37  $^{\circ}\text{C}$  时也有蛋白表达,但是和 30  $^{\circ}\text{C}$  条件下相比,表达量却有所降低,这可能是 37  $^{\circ}\text{C}$  条件下大肠杆菌细胞各种代谢旺盛,生长加快,影响外源重组蛋白的表达,而且有可能使重组蛋白积累形成包涵体,而在 25~30  $^{\circ}\text{C}$  培养会形成可溶的、有活性的重组蛋白,最终选择诱导温度为 30  $^{\circ}\text{C}$ <sup>[21]</sup>。随着诱导时间的延长,SmPR10-1 的表达量也随之增加,4 h 时表达量最低,8 h 与 24 h 时表达量较高,但是诱导时间过长,重组蛋白的可溶性降低,可能形成包涵体,最终选择 8 h 作为最终诱导时间<sup>[22]</sup>。

本研究用分子克隆方法得到丹参 *SmPR10-1* 基因,通过构建原核表达载体,在大肠杆菌中得到成功表达,在优化表达体系为 IPTG 浓度 0.4 mmol/L、起始宿主菌密度  $A_{600}$  为 0.8、诱导温度 30  $^{\circ}\text{C}$ 、诱导时间 8 h 的条件下,SmPR10-1 在大肠杆菌中能够得到很好的表达,采用  $\text{Ni}^{2+}$  亲和层析得到了纯化的目的蛋白,为进一步研究 SmPR10-1 蛋白的生物学活性,抗体制备和 *SmPR10-1* 基因在丹参抗病方面的生物学功能奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] WEN Y J(温韵洁), HE H W(何红卫), HUANG Q SH(黄群声), *et al.* Roles of pathogenesis-related protein 10 in plant defense response [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 2008, **44**(3): 585–592 (in Chinese).
- [2] VAN LOON L C, REP M, PIETERSE C M J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, **44**: 135–162.
- [3] EDREVA A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years [J]. *General and Applied Plant Physiology*, 2005, **31**(1–2): 105–124.
- [4] PÜHRINGER H, MOLL D, HOFFMANN-SOMMERGRUBER K, *et al.* The promoter of an apple *Ypr10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible [J]. *Plant Science*, 2000, **152**(1): 35–50.
- [5] PARK C J, KIM K J, SHIN R, *et al.* Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway [J]. *The Plant Journal*, 2004, **37**(2): 186–198.
- [6] ROBERT N, FERRAN J, BREDA C, *et al.* Molecular characterization of the incompatible interaction of *Vitis vinifera* leaves with *Pseudomonas syringae* pv. *psis*: Expression of genes coding for stilbene synthase and class 10 PR protein [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, **107**(2): 249–261.
- [7] JWA N S, KUMAR AGRAWAL G, RAKWAL R, *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel Jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, JIOsPR10, from rice (*Oryza sativa* L.) seedling leaves [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, **286**(5): 973–983.
- [8] LIU J J, EKRAMODDOULLAH A K, YU X. Differential expression of multiple PR10 proteins in western white pine following wounding, fungal infection and cold-hardening [J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, **119**(4): 544–553.
- [9] MCGEE J D, HAMER J E, HODGES T K. Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, **14**(7): 877–886.
- [10] RAKWAL R, AGRAWAL G K, YONEKURA M. Light-dependent induction of OsPR10 in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings by the global stress signaling molecule jasmonic acid and protein phosphatase 2A inhibitors [J]. *Plant Science*, 2001, **161**(3): 469–479.
- [11] WANG C S, HUANG J C, HU J H. Characterization of two subclasses of PR-10 transcripts in lily anthers and induction of their genes through separate signal transduction pathways [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, **40**(5): 807–814.
- [12] EKRAMODDOULLAH A K M, TAN Y, YU X, *et al.* Identification of a protein secreted by the blister rust fungus *Cronartium ribicola* in infected white pines and its cDNA cloning and characterization [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1999, **77**(6): 800–808.
- [13] GAO W, HILLWIG M L, HUANG L, *et al.* A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights [J]. *Organic Letters*, 2009, **11**(22): 5170–5173.
- [14] DAI Z, CUI G, ZHOU S F, *et al.* Cloning and characterization of a novel 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene from *Salvia miltiorrhiza* involved in diterpenoid tanshinone accumulation [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, **168**(2): 148–157.
- [15] FERNANDES H, MICHALSKA K, SIKORSKI M, *et al.* Structural and functional aspects of PR-10 proteins [J]. *FEBS Journal*, 2013, **280**(5): 1169–1199.
- [16] ZHANG Y (张玉), YANG A G (杨爱国), FENG Q F (冯全福), *et al.* Plant pathogenesis-related proteins and research progress in tobacco [J]. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), 2012, **5**: 20–24 (in Chinese).
- [17] BANEYX F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**(5): 411–421.
- [18] ROSANO G L, CECCARELLI E A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, **5**(4): 172.
- [19] CHOI J H, KEUM K C, Y LEE S. Production of recombinant proteins by high cell density culture of *Escherichia coli* [J]. *Chemical Engineering Science*, 2006, **61**(3): 876–885.
- [20] YASUKAWA T, KANEI-ISHII C, MAEKAWA T, *et al.* Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, **270**(43): 25328–25331.
- [21] SCHEIN C H, NOTEBORN M H. Formation of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli* is favored by lower growth temperature [J]. *Nature Biotechnology*, 1988, **6**(3): 291–294.
- [22] GALLOWAY C A, SOWDEN M P, SMITH H C. Increasing the yield of soluble recombinant protein expressed in *E. coli* by induction during late log phase [J]. *Biotechniques*, 2003, **34**(3): 524, 526, 528, 530.

(编辑: 宋亚珍)