



# 乌桕 SsSAD 基因的原核表达与纯化研究

周 波<sup>1,2,3</sup>,彭 丹<sup>1,2,3</sup>,张 琳<sup>2,3</sup>,谭晓风<sup>2,3\*</sup>,刘选明<sup>4</sup>

(1 中南林业科技大学 生命科学与技术学院,长沙 410004;2 中南林业科技大学 经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室,长沙 410004;3 中南林业科技大学 经济林培育与利用湖南省协同创新中心,长沙 410004;4 湖南大学 植物功能基因组学与发育调控湖南省重点实验室,长沙 410082)

**摘要:**乌桕是一种重要的木本油料树种。SAD(stearoyl-acyl ACP desaturase)是油料植物中将饱和脂肪酸转变成不饱和脂肪酸的一种关键脱氢酶。为了进一步揭示乌桕 SsSAD 的功能,该研究在大肠杆菌中表达了该蛋白。结果表明:(1)通过 RT-PCR 的方法从乌桕种子中克隆出了 SsSAD 基因编码区全长序列,并将其克隆到低温诱导的原核表达载体 pCold TF 上,构建原核重组表达载体 pCold TF/SsSAD,转化大肠杆菌 BL 21 star (DE3)并获得原核表达工程菌株。(2)通过 IPTG 法低温诱导表达融合蛋白。该重组质粒在大肠杆菌中得到了高效表达,融合蛋白分子质量约为 101 kD,且在上清液和包涵体中均有表达,可溶性部分经亲和层析纯化和 Western blotting 检测证实获得了重组蛋白,上述结果为进一步研究乌桕 SsSAD 的结构和功能奠定了基础。

**关键词:**SsSAD 基因;pCold TF;原核表达;融合蛋白;纯化

中图分类号:Q785;Q786 文献标志码:A

## Prokaryotic Expression and Purification of SsSAD Gene from *Sapium sebiferum*

ZHOU Bo<sup>1,2,3</sup>,PENG Dan<sup>1,2,3</sup>,ZHANG Lin<sup>2,3</sup>,TAN Xiaofeng<sup>2,3\*</sup>,LIU Xuanming<sup>4</sup>

(1 College of Bioscience and Biotechnology,Center South University of Forestry and Technology,Changsha 41004,China;2 Key Laboratory of Cultivation and Protection for Non-Wood Forest Tree,Central South University of Forestry and Technology,Changsha 41004,China;3 Collaborative Innovation Center of Cultivation and Utilization for Non-Wood Forest Tree of Hunan Province, South University of Forestry and Technology,Changsha 410004,China;4 Hunan Province Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Developmental and Regulation,Hunan University,Changsha 410082,China)

**Abstract:***Sapium sebiferum* is one of the most important oil trees. SAD(stearoyl-acyl ACP desaturase) protein is a dehydrogenase,which is a key factor for transforming saturated fatty acid to unsaturated fatty acid in oil plant. We expressed and purified SsSAD from *Sapium sebiferum* in *E. coli* to investigate its function. The result suggested that:(1)The full length cDNA encoding SsSAD was amplified by RT-PCR from *Sapium sebiferum* and cloned into cold shock inducible expression vector pCold TF. The recombinant prokaryotic expression plasmid was transformed into *E. coli* BL 21 star (DE3) strain for gaining of the genetic engineering strain. (2) The transformed strain was induced with IPTG(isopropylthio-D-galactoside) for expressing fusion protein at low temperature. Results showed that the recombinant protein with a molecular mass 101 kD was highly expressed in *E. coli* and present both in the supernatant and the pellet part of *E. coli* lysates. The supernatant was further purified by affinity chromatography and detected by Western blotting,which demonstrated that high quality recombinant protein was obtained and laid the founda-

收稿日期:2013-11-21;修改稿收到日期:2014-01-24

基金项目:中南林业科技大学青年基金(QJ2011046B);中南林业科技大学人才引进项目(104-0182);国家自然科学基金青年基金(31200516);湖南省教育厅优秀青年基金(13B150)

作者简介:周 波(1980—),男,博士,讲师,主要从事林业生物技术方面的教学与科研工作。E-mail:zhoubo6409@163.com

\*通信作者:谭晓风,教授,博士生导师,主要从事林业生物技术研究,E-mail:383559530@qq.com

tion for investigation on the structure and function of SsSAD。

**Key words:** SsSAD(*Sapium sebiferum* stearoyl-ACP desaturase) gene; pCold TF; prokaryotic expression; fusion protein; purification

乌柏(*Sapium sebiferum*)属大戟科乌柏属多年生高大落叶乔木,与油茶、油桐、核桃合称为中国四大木本油料树种。其果仁含油率高达 65.76%<sup>[1]</sup>。乌柏梓油中富含油酸、亚油酸和亚麻酸等不饱和脂肪酸,含量在 90% 左右<sup>[2]</sup>,是制造生物柴油的理想原料<sup>[3]</sup>。因此,乌柏曾被日本科学家誉为“绿色原子弹”。

前人研究结果表明:硬脂酰 ACP 脱氢酶 SAD 是高等植物中脂肪酸合成代谢的关键酶。它催化硬脂酰 ACP 在 C9 和 C10 之间引进一个双键形成油酰-ACP。硬脂酰 ACP 脱氢酶在植物脂肪酸从头合成途径的最后一步发挥作用,它的脱氢产物是形成许多不饱和脂肪酸的前体。SAD 基因在农作物的土豆<sup>[4]</sup>、水稻<sup>[5]</sup>、油菜<sup>[6]</sup>、芝麻<sup>[7]</sup>、大豆<sup>[8]</sup>和花生<sup>[9]</sup>等植物中都已经被克隆,有了较深入的功能研究;在木本植物蓖麻<sup>[10]</sup>、油棕<sup>[11]</sup>、麻疯树<sup>[12]</sup>、油茶<sup>[13]</sup>、油樟<sup>[14]</sup>、油桐<sup>[15]</sup>和银杏<sup>[16]</sup>中都已经有 SAD 基因克隆和初步功能分析。对于乌柏,在分子水平上的研究相对甚少,在 NCBI 中可以检索到的乌柏基因序列总共只有 32 条,但乌柏的 SsSAD 基因已经被四川大学陈放教授课题组克隆。乌柏果仁中不饱和脂肪酸含量高达 90% 左右的原因以及 SAD 的蛋白表达模式与不饱和脂肪酸积累存在何种关系至今还未见相关报道。为了搞清楚 SAD 蛋白的表达模式与不饱和脂肪酸积累之间的关系,本实验采用 RT-PCR 方法克隆乌柏 SsSAD 基因,构建了该基因的原核表达载体并在大肠杆菌中表达了该蛋白,通过镍柱纯化了该蛋白,本研究结果为乌柏 SsSAD 的抗体制备和蛋白表达模式研究奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

乌柏种子于 2012 年 10 月采自湖南怀化;大肠杆菌菌株 DH5α 和 BL 21 star (DE3)、原核表达载体均为本实验室保存。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 SsSAD 基因的克隆** 从 NCBI 中检索到乌柏 SsSAD 基因的 CDS 全长序列,共 1 091 bp。采用 Primer 5.0 引物设计软件设计出扩增 SsSAD 全长CDS的引物序列:F:5'-CCGCTCGAGATGGCT-

CTCAAGTTCAATCCTTCA-3'和R:5'-**TGCTC-TAGA-CAGTTCACTTGTCTATCGTAAATC-CAACT-3'**(下划线序列为酶切位点序列,加粗部分为保护碱基序列),送上海生工生物工程有限公司合成该引物。用 RNA 提取试剂盒(Invitrogen)提取乌柏种子的总 RNA,用逆转录试剂盒(Thermo)进行逆转录获得 cDNA,以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。PCR 反应体系为:5 × PS Buffer 40.0 μL, 2.5 mmol/L dNTPs(含 Mg<sup>2+</sup>)8.0 μL,引物 F 和 R 各 4.0 μL,5 U/μL DNA 聚合酶 Primer star 2.0 μL,cDNA 2.0 μL,总体积 200 μL。PCR 产物经胶回收后用 *Xho* I 和 *Xba* I 两种酶进行双酶切,同时将 pCold 载体用 *Xho* I 和 *Xba* I 两种酶进行双酶切。酶切后用磁珠回收试剂盒(TOYOBO)纯化,将纯化后得到的 pCold 和 PCR 产物用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶 4 ℃连接过夜,将连接产物通过热激的转化方法转化 DH5α 感受态细胞,将转化后的细胞加上 1 mL LB 培养基在 37 ℃振荡培养箱中 150 r/min 摆 40 min,6 000 r/min 离心 1 min 后,倒掉上清,取 200 μL 菌液涂在含 100 μg/mL 的 LB 固体培养基上,37 ℃ 培养过夜。

**1.2.2 SsSAD 原核表达工程菌的获得** 挑出阳性克隆菌斑,接种于含氨苄青霉素 100 mg/L 的 LB 液体培养基中,37 ℃ 振荡过夜培养。抽提质粒,将该质粒转化宿主菌 BL 21 star (DE3),涂布于含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 固体平板培养基上,37 ℃ 倒置过夜培养。随机挑取单菌落,进行菌落 PCR 鉴定,最后获得工程菌并命名为 pCold-SsSAD。

### 1.2.3 重组蛋白的原核表达及诱导表达条件优化

将阳性工程菌在含氨苄青霉素(Amp 100 mg/L)的 LB 液体培养基中培养至 OD<sub>600</sub> 值达 0.6 左右时,加入终浓度 1 mmol/L IPTG,在 15 ℃ 下诱导 24 h,超声处理后,分别收集上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳鉴定表达情况。

(1)IPTG 浓度的优化 选定诱导时间为 20 h,诱导温度为 15 ℃。加入终浓度分别为 0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mmol/L IPTG 诱导表达,SDS-PAGE 电泳鉴定表达情况。

(2)诱导时间的优化 选定诱导 IPTG 浓度为

0.8 mmol/L;诱导温度为15℃;诱导12、16、18和24 h后,进行SDS-PAGE电泳鉴定表达情况。

**1.2.4 融合蛋白的纯化** 根据Ni Sepharose 6 Fast Flow 纯化试剂盒(sigma)说明书进行目的蛋白的纯化,收集洗脱峰的蛋白溶液,SDS-PAGE分析鉴定。采用Bradford法对蛋白进行定量,保存于-80℃冰箱。

**1.2.5 Western blotting 鉴定** 先对纯化后的目的蛋白进行SDS-PAGE电泳,然后用ST-I型半干式转移电泳槽将目的蛋白转到NC膜上。用5%脱脂奶粉封闭1 h后,用辣根过氧化物酶(HRP)标记的小鼠单抗IgG(1:10 000)(sigma)37℃孵育1 h,洗膜后进行DAB显影。

## 2 结果与分析

### 2.1 SsSAD基因克隆与原核表达工程菌构建

提取乌桕种子的总RNA,以其反转录后的cDNA为模板,经PCR扩增和电泳检测,得到大小约为1 000 bp左右的特异性条带(图1,B)。采用酶切连接的方法将SsSAD基因构建在pCold-SsSAD载体上形成重组质粒(图1,A)。第2天将连接产物转化大肠杆菌感受态DH5 $\alpha$ ,涂布100 mg/mL氨苄青霉素的LB平板37℃培养过夜。对长出的菌斑进行菌落PCR鉴定,琼脂糖凝胶电泳检测发现,存在能够扩增出大小约为1 000 bp左右的目的基因片段的菌斑(图1,C),即为阳性克隆的菌斑。挑选3个阳性克隆送上海生工生物工程公司测序,测序结果与NCBI网站上提供的SsSAD的CDS序列完全匹配,说明已成功构建了pCold-SsSAD原核表达重组载体。对测序正确的菌株扩大培养,抽提质粒,转化大肠杆菌BL 21 star(DE3)菌株的感受态细胞,涂

布100 mg/mL的氨苄青霉素的LB平板,37℃培养过夜,对长出的菌斑进行菌落PCR检测,从图1,C中可看出PCR产物条带清晰,片段大小约为1 000 bp,说明pCold-SsSAD重组质粒已经成功转入了原核表达菌株BL 21 star(DE3)中。

### 2.2 SsSAD基因的原核表达

通过优化后确定了IPTG的最佳浓度为0.6 mmol/L,诱导温度为15℃,诱导时间为24 h。于是,将含有pCold-SsSAD的BL 21 star(DE3)工程菌在15℃条件下经过0.6 mmol/L的IPTG诱导后,收集菌体进行超声破碎细胞后进行SDS-PAGE电泳检测,结果显示,细胞破碎后的液体中含有大量的目的蛋白,与pCold空载体对照相比,沉淀中在分子质量约为100 kD的地方出现明显的蛋白富集区,图2中箭头标注的位置就是目的蛋白SsSAD。

### 2.3 原核表达蛋白的纯化和鉴定

根据Ni Sepharose 6 Fast Flow 试剂盒说明书进行目的蛋白的纯化,分别用200、400、600和800 mmol/L的咪唑逐步洗脱,收集洗脱液,测吸光度A<sub>595</sub>的值,结果显示400 mmol/L咪唑足以将目的蛋白洗脱。SsSAD蛋白分子量为45.27 kD,在N端有一个55.00 kD的分子伴侣TF,在N端加入的6个组氨酸标签的分子量为3.71 kD,因此融合蛋白的分子量为100.00 kD。SDS-PAGE显示:纯化后的目的蛋白分子量与预测分子量一致,目的蛋白已经得到了较好的纯化(图3)。用Bradford法测定蛋白浓度为0.82 g/L。

为了进一步检测纯化后的蛋白是否为目的蛋白,将转化pCold空载体的BL 21 star(DE3) strains的诱导物、pCold空载体的BL 21 star(DE3) strains的诱导物和含pCold-SsSAD质粒的BL 21 star(DE3)

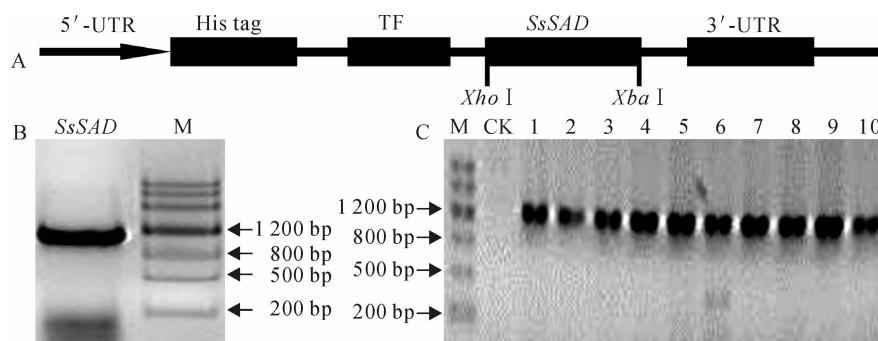


图1 pCold-SsSAD原核表达载体的构建

A. pCold-SsSAD原核表达载体结构示意图;B. SsSAD基因的克隆;M. Marker;C. 1~6为6个不同的单克隆;M. Marker;CK. 对照

Fig. 1 Constructed the prokaryotic expression vector of pCold-SsSAD

A. The map of pCold-SsSAD prokaryotic expression vector; B. Cloned the SsSAD gene;

M. Marker; C. 1~6, six different monoclonal; M. Marker; CK. Control

strains 菌株诱导物分别用含有 His 的柱子进行纯化,纯化后的结果如图 4, A 所示。纯化后的产物用 HRP 标记的 His 抗体进行 Western 杂交检测。用未转化 pCold 空载体的 BL 21 star(DE3) strains 的诱导且纯化后的蛋白做阴性对照,以转化了 pCold 空载体的 BL 21 star(DE3) strains 的诱导且纯化的

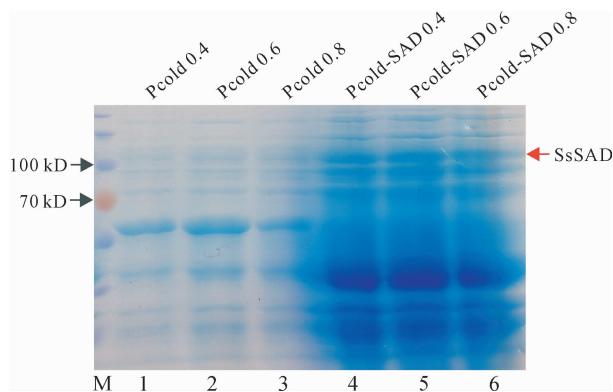


图 2 SsSAD 蛋白的诱导表达

M. Marker; 1~3. 不同浓度的 IPTG 诱导含 pCold 空载体的 BL 21 star(DE3) 菌株; 4~6. 不同浓度的 IPTG 含 pCold-SsSAD 载体的 BL 21 star(DE3) 菌株; 箭头所在的位置代表目的蛋白

Fig. 2 Expression of SsSAD protein

M. Marker; 1~3. The BL 21 star(DE3) strains contains the pCold empty vector induced by different contents of IPTG; 4~6. The BL 21 star(DE3) strain carried the pCold-SsSAD vector induced by different contents of IPTG; Red arrow indicated is on behalf of the target protein

蛋白做阳性对照。Western 杂交显示,含 pCold 空载体的菌株的诱导且纯化的蛋白和含 pCold-SsSAD 质粒的菌株诱导且纯化的蛋白都能杂交出一条很亮的带,条带大小分别在 55 kD 和 100 kD 左右。

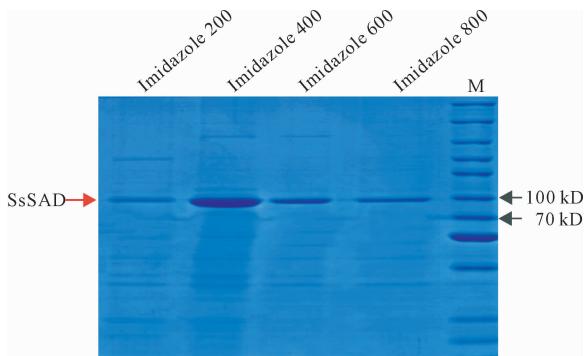


图 3 SDS-PAGE 电泳检测不同浓度梯度

imidazole 洗脱后的 SsSAD 蛋白的纯化结果

M. Marker; Imidazole 200, Imidazole 400, Imidazole 600, Imidazole 800 代表原核表达制备的总蛋白平行样品分别用 200、400、600 和 800 mmol/L 的咪唑洗脱后的 SDS-PAGE 电泳检测结果

Fig. 3 The Result of SDS-PAGE gel investigated the purified SsSAD protein which using different concentrations of imidazole gradient elution

M. Marker; The SDS-PAGE gel lanes which marked Imidazole 200, Imidazole 400, Imidazole 600 and Imidazole 800 represent the total prokaryotic expression protein produced of the parallel samples eluted by 200, 400, 600 and 800 mmol/L imidazole, respectively

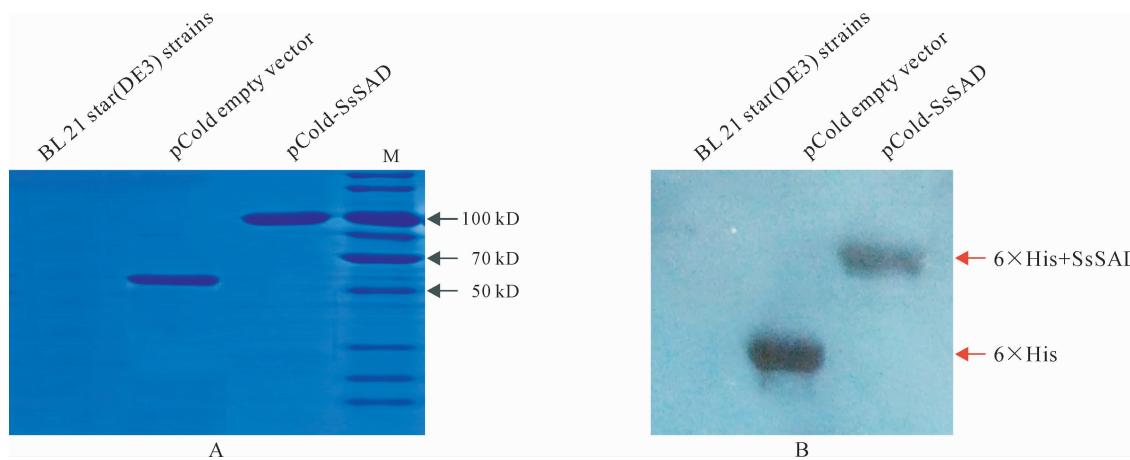


图 4 Western blotting 鉴定目的蛋白

A. 用含有 His 的柱子分别纯化由 BL 21 star(DE3) strains、pCold 空载体的 BL 21 star(DE3) strains 和含 pCold-SsSAD 质粒的 BL 21 star(DE3) strains 菌株所表达的蛋白; M. Marker; B. 6×His 的抗体检测 His 柱子纯化后的 BL 21 star(DE3) strains、pCold 空载体的 BL 21 star(DE3) strains 和含 pCold-SsSAD 质粒的 BL 21 star(DE3) strains 菌株的蛋白

Fig. 4 Western blotting identification of the target protein

A. Purified protein which induced by BL 21 star(DE3) strains, pCold empty vector in BL 21 star(DE3) strains and the BL 21 star(DE3) strains contain the plasmid pCold-SsSAD by His tag, respectively; M. Marker; B. Investigated the target protein which purified by BL 21 star(DE3) strains, pCold empty vector in BL 21 star(DE3) strains and the BL 21 star(DE3) strains by Western blotting

右,与预期相符,而阴性对照则无条带显示(图 4, B)。该实验结果表明该蛋白为 SsSAD 融合蛋白。

### 3 讨 论

本试验通过原核表达的方法在大肠杆菌中表达了该蛋白,该蛋白的分子质量为 45.27 kD。目的蛋白在宿主细胞中的表达量受到多种因素的影响,为确保外源基因得到最佳的表达,我们对目的蛋白的表达条件进行了优化。实验结果表明 SsSAD 在大肠杆菌中的表达,大量的是可溶性蛋白,少量的是以包涵体的形式存在。与 Biotech 推测该表达蛋白 95.0% 是不可溶的理论不完全一致。出现此情况的主要原因是:SsSAD 蛋白是一真核蛋白,但是在原核生物大肠杆菌中异源表达,由于缺乏真核生物中翻译后修饰所需酶类,致使有中间体的积累,形成了包涵体沉淀。为了尽量避免包涵体的形成,选择 pCold 表达载体,在这个载体上有一段 TF 的共表达分子伴侣,可以增加可溶蛋白的比例,从而使可溶

性的目的蛋白含量增加<sup>[17]</sup>。

实验结果表明不同浓度的 IPTG 诱导对目标蛋白的表达影响较明显,本实验最佳 IPTG 诱导浓度为 0.6 mmol/L。

将表达出的含有 6×His 标签的融合蛋白与金属镍螯合琼脂糖凝胶(Ni Sepharose)结合,利用组氨酸和咪唑竞争性地与 Ni<sup>2+</sup> 特异性结合的原理,用不同梯度的咪唑缓冲液洗脱,通过亲和层析的方法最终获得目的蛋白。实验结果表明该蛋白纯化的最佳咪唑浓度为 400 mmol/L。对纯化过程中各个组分进行 SDS-PAGE 电泳分析,结果表明纯化的目的蛋白没有产生非特异性条带,纯化效果良好。Bradford 法测定了纯化蛋白的含量,浓度为 0.82 g/L。Western blotting 进一步鉴定纯化的蛋白为我们所表达的目的蛋白。纯化后的蛋白可用于 SsSAD 的抗体的制备和蛋白的表达模式研究,为 SsSAD 的功能研究奠定基础。

### 参考文献:

- [1] YANG ZH B(杨志斌), QI Y T(齐玉堂), WANG X G(王晓光), et al. Preliminary report on research of *Sapindus sebiferum* Roxb seed producing Bio-diesel[J]. *Hubei Forestry Science and Technology*(湖北林业科技), 2007, **148**(6): 32—34(in Chinese).
- [2] 陈文伟. 乌桕梓油制备生物柴油的研究[D]. 南昌:南昌大学, 2006.
- [3] JIN D J(金代钧), HUANG H K(黄惠坤), TANG R Q(唐润琴), et al. The investigation on the variety resources of *Sapindus sebiferum* in China[J]. *Guizhou Botany*(广西植物), 1997, **17**(4): 345—362(in Chinese).
- [4] TAYLOR M A, SMITH S B, DAVIES H V, et al. The primary structure of a cDNA clone of the stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from potato (*Solanum tuberosum* L.)[J]. *Plant Physiology*, 1992, **100**: 533—534.
- [5] AKAGI H, BABA T, SHIMADA H, et al. Nucleotide sequence of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase cDNA from developing seeds of rice[J]. *Plant Physiology*, 1995, **108**: 845—846.
- [6] SLOCOMBE S P, CUMMINS I, JARVIS R P, et al. Nucleotide sequence and temporal regulation of a seed-specific *Brassica napus* cDNA encoding a stearoyl-acyl carrier protein (ACP) desaturase[J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, **20**(1): 151—155.
- [7] YUKAWA Y, TAKAIWA F, SHOJI K, et al. Structure and expression of two seed-specific cDNA encoding stearoyl-acyl carrier protein desaturase from sesame, *Sesamum indicum* L[J]. *Plant Cell Physiology*, 1996, **37**(2): 201—205.
- [8] BYFIELD G E, XUE H, UPCHURCH R G. Two genes from soybean encoding soluble Δ9 Stearoyl-ACP desaturase[J]. *Crop Science*, 2006, **46**: 840—846.
- [9] 周丽侠. 控制花生籽粒油酸含量相关基因的鉴定与分析[D]. 济南:山东师范大学, 2008.
- [10] KNUTZON D S, SCHERER D E, SCHREEGONST W E. Nucleotide sequence of a complementary DNA clone encoding stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor bean, *Ricinus communis*[J]. *Plant Physiology*, 1991, **96**: 344—345.
- [11] SHAH F H, RASHID O, SAN C T. Temporal regulation of two isoforms of cDNA clones encoding delta 9-stearoyl-ACP desaturase from oil palm (*Elaeis guineensis*)[J]. *Plant Science*, 2000, **152**: 27—33.
- [12] 罗通. 麻疯树的抗冷性和 SAD 基因的克隆及表达研究[D]. 成都:四川大学, 2006.
- [13] ZHANG D Q(张党权), TAN X F(谭晓风), CHEN H P(陈鸿鹏), et al. Full-length cDNA cloning and bioinformatic analysis of *Camellia oleifera* SAD[J]. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2008, **44**(2): 155—159(in Chinese).
- [14] LUO T, DENG W, ZENG J, et al. Cloning and characterization of a stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene from *Cinnamomum longepaniculatum*[J]. *Plant Molecular Biology Report*, 2009, **27**: 13—19.
- [15] 龙洪旭. 油桐油体蛋白等基因的克隆及生物信息学分析[D]. 长沙:中南林业科技大学, 2010.
- [16] WANG H, CAO F, ZHANG W, et al. Cloning and expression of stearoyl-ACP desaturase and two oleate desaturases genes from *Ginkgo biloba* L.[J]. *Plant Molecular Biology Report*, 2013, **31**: 633—648.
- [17] REN Z L(任增亮), DU G CH(堵国成), CHEN J(陈坚), et al. Strategies for high level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*[J]. *China Biotechnology*(中国生物工程杂志), 2007, **27**(9): 103—109(in Chinese).