

黄瓜 *CsERECTA* 基因的原核表达 及其多克隆抗体制备

王琪琦¹, 李玉红^{1*}, 胡亮亮¹, 秦亚光¹, 赵子瑶¹, 陈 鹏²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西杨陵 712100; 2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西杨陵 712100)

摘 要: *ERECTA* 基因编码一个富含亮氨酸重复序列结构的丝/苏氨酸类受体蛋白激酶, 参与调控植物器官的形态建成, 在株型控制及抗逆方面也有重要作用。该研究通过构建带有 maltose binding protein (MBP) 标签的 pET21a-*CsERECTA* 融合蛋白原核表达载体, 实现了在大肠杆菌 (*E. coli*) BL21(DE3) 中的高效表达, 并对诱导表达的温度、时间和 IPTG 浓度进行了优化。利用镍离子螯合层析纯化得到 MBP-*CsERECTA* 融合蛋白, 再用 rTEV 蛋白酶对其进行酶切, 得到 *CsERECTA* 蛋白并制备了该蛋白的多克隆抗体。结果表明, 黄瓜 *CsERECTA* 蛋白以可溶和包涵体 2 种形式表达, 低温有助于蛋白以可溶性形式大量存在。最佳诱导温度为 23 ℃, 诱导时间为 6 h, IPTG 浓度为 0.5 mmol · L⁻¹。通过 Western blot 可检测到黄瓜内源的 *CsERECTA* 蛋白, 说明制备的多克隆抗体具有较好的特异性。多克隆抗体的成功制备为进一步研究 *CsERECTA* 的功能奠定了基础。

关键词: 黄瓜; *CsERECTA* 基因; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

文章编号:

Prokaryotic Expression of Cucumber *CsERECTA* Gene and Preparation of Its Polyclonal Antibody

WANG Qiqi¹, LI Yuhong^{1*}, HU Liangliang¹, QIN Yaguang¹, ZHAO Ziyao¹, CHEN Peng²

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China; 2 College of Life Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: *ERECTA* gene encodes a leucine-rich repeat receptor-like Ser/Thr kinase. It participates in regulating morphogenesis of plant organs and plays an important role in the change of plant type and resistance to adversity. In the present study, pET21a-*CsERECTA*, a prokaryotic expression vector with maltose binding protein tags was constructed and successfully expressed in *E. coli* BL21(DE3). Expression conditions were optimized in the optimal temperature, induction duration, and IPTG concentration. The fusion protein MBP-*CsERECTA* was purified by nickel chelating chromatography and enzyme digestion was conducted by rTEV protease. The *CsERECTA* protein was obtained and it was used to prepare polyclonal antibody. The results showed that *CsERECTA* was expressed in the form of soluble and inclusion bodies in *E. coli* BL21(DE3), and a large number of proteins were soluble at low temperature. The optimal temperature, induction duration and IPTG concentration were 23 ℃, 6 h and 0.5 mmol · L⁻¹, respectively. Western blot showed that the polyclonal antibody of *CsERECTA* has good specificity, because endogenous

收稿日期: 2016-03-01; 修改稿收到日期: 2016-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(31071791); 高校基本科研业务费专项资金(YQ2013003); 西北农林科技大学国际科技合作基金项目

作者简介: 王琪琦(1989—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事蔬菜育种与生物技术的研究。E-mail: wangqiqi@qq1989@163.com

* 通信作者: 李玉红, 教授, 博士, 主要从事黄瓜的种质资源与生物技术的研究。E-mail: liyuhong73@126.com

CsERECTA was detected. The successfully prepared polyclonal antibody can be used for further investigation, which establish the foundation for investigating the function of the CsERECTA gene in cucumber.

Key words: cucumber; CsERECTA gene; prokaryotic expression; polyclonal antibodies

ERECTA 是一个编码富含亮氨酸重复序列的类受体蛋白激酶基因^[1]。植物 *ERECTA* 基因控制着植株生长发育的多个方面,比如地上部分器官的伸长、叶的生长、花序的发育和表皮的分化等^[2]。由于 *ERECTA* 突变体是在 Landsberg 背景的拟南芥中发现的,其具有矮生的特性,便于培养和操作,因此目前常用作突变体分析和自然变异分析的背景材料^[1]。拟南芥中的研究表明,*ERETCA* 基因与植株分生组织的细胞分裂周期的调控有关^[3,4],从而控制拟南芥植株的矮化性状。*ERETCA* 基因也与花药的正常发育有关,突变体的花药发育受阻甚至出现雄性不育,在花药发育过程中是细胞增殖和分化的重要调控因子^[5]。*ERETCA* 基因还与植株抗逆性密切相关,能够提高植株对细菌性萎蔫病原菌^[6]、坏死性真菌^[7] 的抗病性及对高温干旱的耐受性^[8,9]。此外,*ERETCA* 基因还影响金属元素在拟南芥植株中的积累^[10]。目前对 *ERECTA* 基因的功能研究主要集中在模式植物拟南芥上,其他农作物和园艺作物的研究罕见报道。

本课题组前期的工作表明,CsERECTA 控制矮化黄瓜 WI7201 的节间长度,使其节间极度短缩,是造成植株矮化的候选基因。为了验证该基因在黄瓜中的功能,本研究对截短的 CsERECTA 基因在 *E. coli* BL21(DE3)菌株中实现了高效表达,并获得了目的蛋白,用于制备多克隆抗体,为进一步研究该基因在黄瓜中的功能奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

黄瓜蔓生种质‘长春密刺’(CCMC)种植于光照培养箱,待两叶一心期时采集茎尖,液氮速冻后于-80℃保存。大肠杆菌菌株 BL21(DE3)和原核表达载体 pET21a-HMT 由本实验室保存;大肠杆菌感受态细胞 TOP10 购于北京天根生化科技公司。

HiProof 高保真 DNA 聚合酶购于杨凌杰一生物技术有限公司;限制性内切酶 *Bam* HI、*Xho* I、*Taq* DNA 聚合酶、反转录试剂盒(PrimeScript™ RT-PCR Kit)、T4 酶连接试剂盒(DNA Ligation Kit Ver2.1)、核酸 marker(DL2000)和蛋白 marker(＃SM0431)均购自大连 TaKaRa 公司;高纯度质粒

小提中量试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、ECL 显色试剂盒购自北京天根生化科技公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购于西安沃尔森生物技术公司;rTEV 蛋白酶购于上海翊圣生物科技有限公司;Ni²⁺亲和层析柱(德国 Novagen 公司);卡那霉素、β-D-异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺(Acrylamide)及甲叉双丙烯酰胺(Bis-acrylamide)购自 Sigma 公司;尿素、咪唑等其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 CsERECTA 蛋白的结构预测 在 NCBI 数据库中查找 GenBank 收录的 CsERECTA 基因(GenBank 登录号 NC_026658.1)氨基酸序列。对 CCMC 的 CsERECTA 蛋白分别利用蛋白质在线预测工具 SignalP 4.1Server 中的神经网络法(Neural Network,NN)预测信号肽区域;TMHMM Server v. 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)预测跨膜区;PlantsP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125063>)预测 LRR 区与激酶区。

1.2.2 引物设计及对应片段的克隆 在 CsERECTA 蛋白的结构预测基础上,根据其结构域和氨基酸的亲水性原则,选择了编码胞外区 317~517 位氨基酸,设计引物 CsERECTA-L(5'-TGAGGGATCCGAAGTTGTACCTGCATAGTAATAAGC-3',下划线处为 *Bam* HI 酶切位点)和 CsERECTA-R(5'-GGC-CGCTCGAGGTTGTTGTTCTCAAGTCTCAGG-GAG-3',下划线处为 *Xho* I 酶切位点),引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成。

以 CCMC 为试材,提取总 RNA,利用反转录试剂盒,合成 cDNA。再以 cDNA 为模板, CsERECTA-L 和 CsERECTA-R 为引物进行目的基因扩增,PCR 扩增采用 HiProof 高保真 DNA 聚合酶进行扩增和延伸,PCR 反应体系(25 μL)为:上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 1 μL、dNTP(10 mmol·L⁻¹) 0.5 μL、5×Q buffer 5 μL、HiProof DNA Polymerase(5 U·μL⁻¹) 0.2 μL、模板 DNA 1 μL,ddH₂O 补齐至 25 μL。PCR 扩增程序如下:96℃预变性 1 min;96℃变性 10 s,54℃退火 20 s,72℃30 s,循环扩增 32 次;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用 DNA 胶回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.2.3 CsERECTA 基因原核表达载体的构建 纯化的 CsERECTA 基因片段经 *Bam* HI 和 *Xho* I 双酶切后,与经同样双酶切的 pET21a-HMT 表达载体相连接,获得重组表达载体 pET21a-HMT-CsERECTA,转化入大肠杆菌感受态细胞 TOP10,经菌落 PCR 及质粒 PCR 检测后,测序验证该表达载体中的基因序列及读码框的正确性。序列分析软件为 DNASTAR 和 NCBI-BLASTn。

1.2.4 CsERECTA 融合蛋白的诱导表达与可溶性分析 取测序正确的菌液,制备 pET21a-HMT-CsERECTA 质粒,将重组质粒通过冻融法转化入 BL21(DE3)后进行诱导表达。挑取单菌落接种到含 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素(Amp)的液体 LB 培养基中,37 ℃、220 rpm 振荡培养过夜。次日以 1:100 扩大培养,37 ℃ 振荡培养至 OD₆₀₀ 值约为 0.6 时加入 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导蛋白表达。菌液经超声波破碎(工作时间 3 s,间歇时间 7 s,破碎 40 min)后,离心收集上清和沉淀,分别制样并进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.5 融合蛋白表达条件的优化 (1)诱导温度的优化 取阳性克隆的菌液等量接种于 3 个含有 Amp 抗生素的 5 mL 液体 LB 培养基中,分别于 37 ℃、28 ℃ 和 23 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 值为 0.6 时,加入 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 6 h。分别取 500 μL 菌液,离心收集菌体后,加入 100 μL 1×上样缓冲液,沸水浴 10 min 后取上清进行 SDS-PAGE 电泳检测。

(2)诱导时间的优化 23 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6 左右,加入终浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG,23 ℃ 恒温培养,分别在 0、4、6、8、10 h 时取样进行 SDS-PAGE 电泳检测。

(3)IPTG 诱导浓度的优化 于 23 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 值达 0.6 时,分别加入终浓度为 0、0.25、0.5、0.75 和 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG,23 ℃ 恒温培养 6 h 后分别取样进行电泳检测。

1.2.6 融合蛋白的纯化及酶切 (1)融合蛋白的纯化 参照李蒙等^[11]的方法进行,利用镍离子螯合层析柱纯化融合蛋白。

(2)融合蛋白的酶切 将 200 μg 的融合蛋白和 30 μL 的 rTEV 蛋白酶($1.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)、75 μL 的 rTEV buffer 1(20×)和 15 μL 的 rTEV buffer 2(100×)混合,组成 1.5 mL 的反应体系,于室温

(30 ℃)过夜(14 h)反应。

1.2.7 重组蛋白的多克隆抗体制备 将酶切后的产物进行 SDS-PAGE (20 cm×20 cm)电泳,切取目标条带送至武汉三鹰生物技术有限公司进行兔抗 CsERECTA 的多克隆抗体制备。

1.2.8 黄瓜茎尖 CsERECTA 蛋白的提取 CsERECTA 蛋白的提取分别采用了 3 种方法,取样量和取样部位均相同。方法 1 为超速离心法提取膜蛋白,参照 Qian 等^[12]方法进行。取 3 g 两叶一心时期的 CCMC 茎尖部位组织样品,液氮速冻后研磨成粉末状,加入 6 mL 预冷的膜蛋白提取缓冲液($250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 山梨醇, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0),置于冰上 1 h 后,4 ℃ 5,000 g 离心 5 min,取上清于 10 000 g 离心 10 min,最后取上清于 100 000 g 离心 30 min,将沉淀溶解于 60 μL 膜蛋白溶解液($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂PO₄, $330 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl, pH 7.8)中。方法 2 为醋酸钠沉淀法提取黄瓜的总蛋白,参照毛双双等^[13]方法进行。方法 3 为 Triton X-100 去污剂法提取黄瓜的膜蛋白,参照 Shpak 等^[3]方法进行。

1.2.9 CsERECTA 蛋白的 Western blot 分析 Western blot 分析参照李玉萍等^[14]方法进行。样品蛋白 SDS-PAGE 电泳后,经半干电转仪(20 mA, 2 h)转移到 0.45 μm 孔径的 PVDF 膜上。加入制备的多克隆抗体(1:2 000)孵育 2 h,再加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 1 gG(1:10 000)室温孵育 1 h 后,用 ECL 显色试剂盒进行显色,用化学发光成像仪拍照。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 CsERECTA 蛋白质序列分析

利用 SignalP 4.1 Server 预测 CCMC 中 CsERECTA 蛋白质的信号肽区,发现第 32 位氨基酸是最可能的剪切位点,表明信号肽很可能存在于前 32 个氨基酸中。通过 TMHMM v2.0 预测黄瓜 CsERECTA 蛋白的跨膜区和胞内、外区,结果发现氨基酸 7~29 位点之间和氨基酸位点 600 附近有 2 个跨膜区。通过 PlantsP 中的 Pfscan 预测 CsERECTA 蛋白质中的 LRR 区和激酶区(图 1),结果表明,CCMC 的 CsERECTA 蛋白质 LRR 区在 107~513 氨基酸之间,激酶区在 657~929 氨基酸之间。所以根据其结构域和氨基酸的亲水性原则,选择了去掉信号肽和跨膜区之后的编码胞外区 317

~517 个氨基酸的片段设计了 1 对引物(图 1 中箭头所示)。

黄瓜 *CsERECTA* 基因编码一个跨膜的一类受体蛋白激酶,成熟的 *CsERECTA* 蛋白由 991 个氨基酸残基构成,理论上的分子量大小约为 109 kD。在上述蛋白结构预测的基础上,设计引物扩增到胞外区片段的全长为 603 bp,编码 201 个氨基酸残基,该截短的 *CsERECTA* 蛋白分子量约为 22.8 kD,属于酸性蛋白质。

2.2 目的片段的克隆和原核表达载体构建

pET21a-HMT (pET21a-His-MBP-TEV) 载体是在 pET21a 的基础上改造后的一个表达载体,其多克隆位点中依次包含了 His-tag、MBP 和 TEV 酶切位点的相应序列。将截短的 *CsERECTA* 基因连接该载体后,其表达的融合蛋白(下文中称为 *CsERECTA* 融合蛋白)带有 His 和 MBP 标签,通过蛋白质序列计算该融合蛋白大小约为 65 kD。*CsERECTA* 融合蛋白中有 TEV 蛋白酶酶切位点,经过 rTEV 蛋白酶酶切之后,能得到约为 42 kD 的麦芽糖结合蛋白(MBP)和 22.8 kD 的截短的

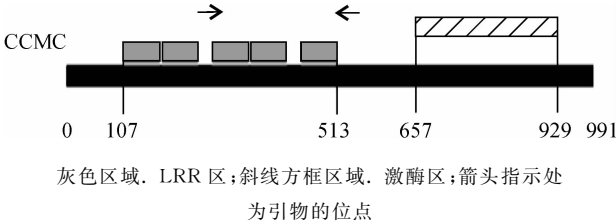


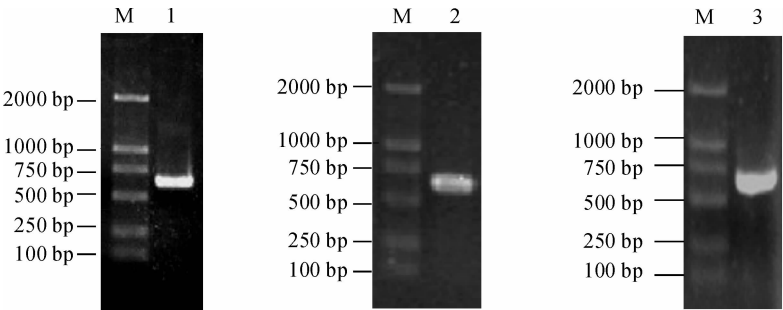
图 1 CCMC 的 *CsERECTA* 蛋白质 LRR 区及激酶区预测
Gray area: LRR region; Diagonal block area: kinase region;
The position of the primers are indicated by the arrow
Fig. 1 LRR region and kinase region prediction of *CsERECTA* protein in CCMC

CsERECTA 蛋白。
以从黄瓜叶片中提取的 RNA 反转录成的 cDNA 为模板,PCR 扩增出单 1 条带,其大小为 603 bp,与预期相符(图 2,泳道 1)。PCR 产物回收后克隆到 pET21a-HMT 载体,转化 TOP10,挑单克隆后做菌落 PCR 检测(图 2,泳道 2)和质粒 PCR 检测(图 2,泳道 3),挑选阳性菌株将其菌液送去测序。序列测定结果显示表明获得的重组克隆载体包含目标基因,所扩增到的基因片段大小为 603 bp,与预期的片段大小相同,核苷酸序列也一致,表明 *CsERECTA* 基因的原核表达载体 pET21a-HMT-*CsERECTA* 构建成功。

2.3 *CsERECTA* 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及表达形式的确定

将构建成功的表达载体 pET21a-HMT-*CsERECTA* 导入 *E. coli* BL21(DE3)中,至对数生长期(OD_{600} 值约为 0.6)时加 $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 6 h 后,收集菌体,并以未加 IPTG 诱导的菌为对照,进行 SDS-PAGE 检测。结果与对照(图 3,泳道 3)相比,含重组质粒的菌液在大约 65 kD 左右处(图 3,泳道 1 和 2)出现 1 条较高浓度的特异条带,与预期的 *CsERECTA* 融合蛋白分子量相当,表明 *CsERECTA* 基因已经在大肠杆菌 BL21(DE3)中融合表达。

对 *CsERECTA* 融合蛋白进行表达形式的检测,结果如图 3 所示,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,重组表达菌体裂解的上清液中融合蛋白(泳道 2)的表达量明显少于沉淀(泳道 1)中的表达量,在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,重组表达菌体裂解的上清液中融合蛋白(泳道 5)的表达量有所增加,而在 $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,重组表达菌体裂解的上清液中融



M, DL2000; 1. *CsERECTA* 基因的 PCR 扩增; 2. 重组质粒 pET21a-HMT-*CsERECTA* 的菌落 PCR 鉴定;
3. 重组质粒 pET21a-HMT-*CsERECTA* 的质粒 PCR 鉴定

图 2 黄瓜 *CsERECTA* 基因重组质粒 pET21a-HMT-*CsERECTA* 的鉴定
M, DL2000; 1, Amplified by PCR of *CsERECTA* gene; 2, Colony PCR of recombinant vector of pET21a-HMT-*CsERECTA*;
3, Recombinant plasmid of pET21a-HMT-*CsERECTA* identified by PCR amplification
Fig. 2 Identification of *CsERECTA* gene with recombinant vector of pET21a-HMT-*CsERECTA*

合蛋白(泳道 7)的表达量明显高于沉淀(泳道 6)中的表达量,上清中 65 kD 处有明亮的蛋白条带,几乎大部分的融合蛋白都以可溶的形式存在。这说明 *CsERECTA* 融合蛋白以可溶和包涵体两种形式存在,且 23 ℃ 低温诱导有利于该蛋白以可溶的形式表达。因此,适量降低诱导温度是促进蛋白可溶性表达的有效方法之一,诱导 *CsERECTA* 融合蛋白表达的最适温度为 23 ℃。

2.4 CsERECTA 融合蛋白表达条件的优化

在对合适诱导温度进行探索后,本研究又对 *CsERECTA* 融合蛋白进行了适宜诱导时间和诱导

剂浓度的优化。经 SDS-PAGE 分析表明(图 4),重组菌在最适温度 23 ℃ 条件下,融合蛋白表达量随着诱导时间的延长而增加,诱导 6 h 表达量最大,随后表达量一直维持在一定水平无明显变化。重组菌在 23 ℃ 条件下,加入 IPTG 分别至终浓度为 0.25、0.5、0.75 和 1.0 mmol · L⁻¹,诱导培养 6 h 后,经 SDS-PAGE 电泳分析,表明融合蛋白的表达量在 IPTG 0.5 mmol · L⁻¹ 融合蛋白表达量最大,随后表达量无明显变化。由此可见,*CsERECTA* 融合蛋白的最适表达条件为:23 ℃ 条件下 0.5 mmol · L⁻¹ 的 IPTG 诱导 6 h。

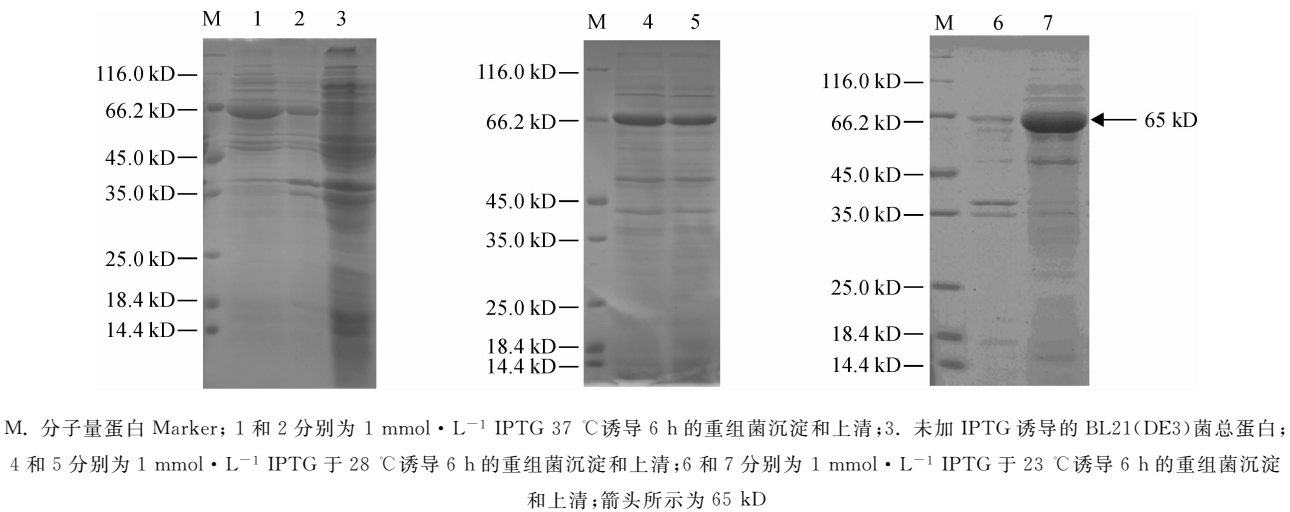


图 3 CsERECTA 基因重组表达的 SDS-PAGE 图谱

M. Protein marker;1 and 2. The sediment and the supernatant of the recombinant sample for 6 h with 1 mmol · L⁻¹ IPTG induced in 37 ℃, respectively;3. The total protein of the control without IPTG induced;4 and 5. The sediment and the supernatant of the recombinant sample for 6 h with 1 mmol · L⁻¹ IPTG induced in 28 ℃, respectively;6 and 7. The sediment and the supernatant of the recombinant sample for 6 h with 1 mmol · L⁻¹ IPTG induced in 23 ℃, respectively;The arrow indicated 65 kD

Fig. 3 SDS-PAGE of fusion protein expression of *CsERECTA* gene

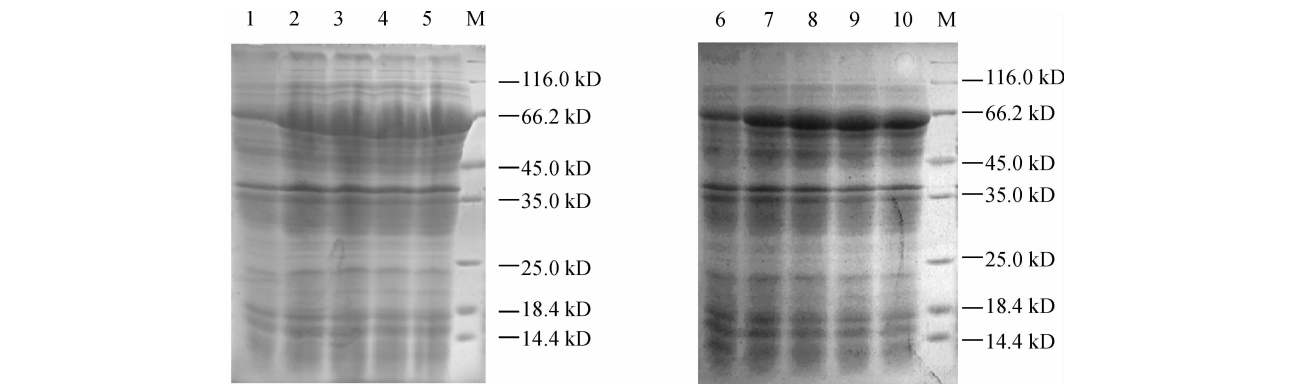


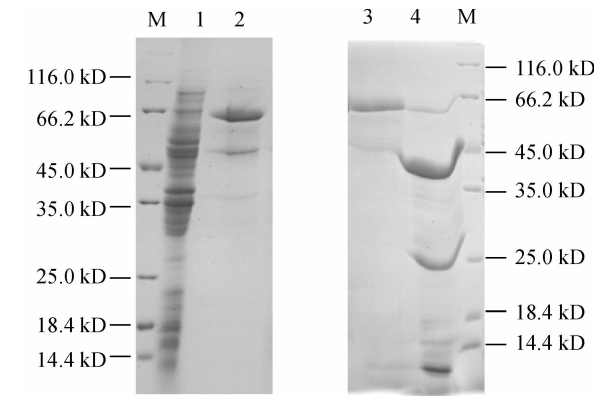
图 4 不同 IPTG 浓度及诱导时间对 *CsERECTA* 融合蛋白表达的影响

M. Protein marker;1-5. Cells containing pET21a-HMT-*CsERECTA* induced with 0,0.25,0.5,0.75 and 1.0 mmol · L⁻¹ IPTG , respectively; 6-10;Cells containing pET21a-HMT-*CsERECTA* induced for 0,4,6,8 and 10 hours, respectively

Fig. 4 Effect of time and IPTG concentration on the expression of recombinant *CsERECTA*

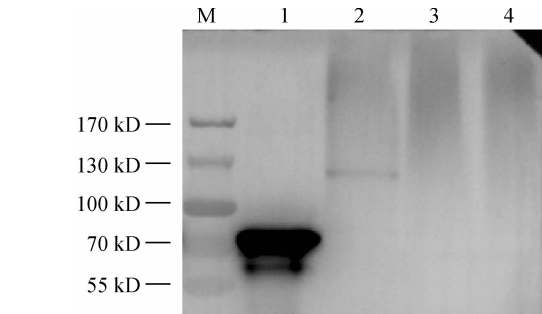
2.5 CsERECTA 融合蛋白的纯化及酶切

经 Ni²⁺ 亲和和层析柱分离纯化后,得到单一峰的收集液,经透析和浓缩后,SDS-PAGE 检测纯化效果,结果 65 kD 处(图 5,泳道 2 和 3)检测到了很亮的目的条带,表明已纯化得到融合 His 标签的 CsERECTA 融合蛋白,且纯化效果良好。CsEREC-



M. 蛋白 marker;1. 未加 IPTG 诱导的 BL21(DE3)菌总蛋白; 2 和 3:过镍柱纯化后的 CsERECTA 融合蛋白;4. 酶切后的产物
图 5 镍柱纯化的 CsERECTA 融合蛋白及融合蛋白酶切的 SDS-PAGE 检测

M. Protein marker; 1. Without IPTG induced the total protein of the control; 2 and 3. Recombinant CsERECTA purified by nickel resin; 4. The product after enzyme digestion
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of recombinant CsERECTA purified by nickel resin and enzyme digestion of fusion protein



M. 预染的蛋白 Marker;1. 含 pET21a- HMT-CsERECTA 的 BL21(DE3)菌株总蛋白;2. 超速离心法提取的膜蛋白;3. 醋酸钠沉淀法提取的总蛋白;4. Triton X-100 去污剂法提取的膜蛋白
图 6 CsERECTA 蛋白多克隆抗体的 Western-blot 检测
M. Prestained protein marker;1. The total protein of BL21(DE3) bacterial cells contained pET21a-HMT-CsERECTA;2. Extraction of membrane protein by ultracentrifugation method;3. Extraction of total protein by sodium acetate precipitation method; 4. Extraction of membrane protein by methods of Triton X-100 decontaminant

Fig. 6 Western blot analysis of polyclonal antiserum of the CsERECTA protein

TA 融合蛋白再经过 rTEV 蛋白酶酶切之后,分别得到了大小约为 42 kD 的麦芽糖结合蛋白(MBP)和大小为 22.8 kD 的截短的 CsERECTA 蛋白(泳道 4),和预期的结果相符。最后将目的条带切胶后送至武汉三鹰公司制备兔抗 CsERECTA 蛋白的多克隆抗体。

2.6 抗体的特异性检测

为了检测制备的多克隆抗体的特异性,以其为一抗,以 HRP 标记的羊抗兔 IgG 为二抗,对原核表达产物及黄瓜组织蛋白样品进行 Western blot 分析。结果表明, Anti-CsERECTA 能与 pET21a-HMT-CsERECTA 诱导菌总蛋白发生特异性反应,在 65 kD 处有明显的特异性条带(图 6,泳道 1),与预期相符,说明 MBP-CsERECTA 融合蛋白能被制备的多抗检测到;同时也能与黄瓜茎尖的膜蛋白发生特异性反应,在大约 125 kD 处有特异性条带(泳道 2),说明成熟的 CsERECTA 蛋白也能被制备的多抗特异性识别,但是信号较弱,一定程度上说明了 CsERECTA 蛋白在黄瓜中的表达丰度偏低。然而,用醋酸钠沉淀法这类提取植物总蛋白的方法(泳道 3),却很难检测到 Western blot 的特异信号,后来我们又尝试用 Triton X-100 去污剂提取植物跨膜蛋白的方法(泳道 4),但结果均不能有效提取到 CsERECTA 蛋白。最后用超速离心的方法(泳道 2)才能达到试验目的,一定程度上反映了大分子量的膜蛋白研究的难度。由此可见,提取疏水的跨膜蛋白,特别是像 CsERECTA 这类表达丰度很低的内源膜蛋白,用植物总蛋白的提取方法效果不好,因为总蛋白的提取方法更适合于提取亲水的蛋白质,而且,用 Triton X-100 等去污剂提取膜蛋白的方法也存在着局限性,提取某些大分子量的膜蛋白效果也不太理想。本研究表明,超速离心法是提取大分子量跨膜蛋白的有效方法之一。总之,制备的 Anti-CsERECTA 多克隆抗体具有较好的特异性且背景低,可用于后续的植物功能方面的试验研究。

3 讨论

迄今为止,对于 ERECTA 基因的研究工作主要集中在拟南芥上。拟南芥 ERECTA 基因家族有 3 个成员,分别为 ERECTA、ER-LIKE1(ERL1)和 ER-LIKE2(ERL2)。Shpak 等发现,只有在 3 个家族成员功能都缺失的情况下,植株才出现极度矮化,说明 ERECTA 基因家族在促进地上部位生长的功能上有冗余作用^[3,4]。拟南芥 ERECTA 基因在茎

尖、茎、嫩叶和花等生长发育旺盛的组织内表达,而在根等成熟器官中不表达,且在植株早期发育中表达较弱,在营养生长向生殖生长过渡时期的表达较高^[15],这与 ERECTA 基因具有调控节间和叶柄的伸长、叶及花的发育与分化的功能相吻合。Chen 等通过对拟南芥胚胎发育时期的组织结构观察发现,ERECTA 基因家族是通过促进细胞增殖并抑制气孔分化从而促进子叶的伸长^[16]。由此可见,ERECTA 基因确实参与了调控植株矮化的生长过程,对该矮化基因进行挖掘和功能验证,能为研究植物株型调控机理及种质创新提供理论支撑。

在葫芦科作物中,对 ERECTA 蛋白的相关研究尚未见报道。本课题组前期的研究发现(文章未发表),来源于黄瓜的 CsERECTA 基因,参与调控黄瓜的株型,造成植株矮化且株型紧凑,为了在蛋白水平上研究黄瓜 CsERECTA 的表达情况,用原核表达的重组蛋白来制备相应抗体是开展研究工作的前提。

与拟南芥中发现的 ERECTA 家族基因类似,在大豆中发现并克隆了 *PvERECTA* 和 *PvERECTA-like* 基因^[17],水稻中也克隆了 *OsERECTA* 基因家族^[18],它们都是多拷贝。但是,本课题组在 NCBI 和黄瓜全基因组数据库中预测的 *CsERECTA* 基因家族成员只有 1 个且是单拷贝。*CsERECTA* 基因编码 991 个氨基酸,理论上成熟的蛋白质分子量大小为 109 kD,可是通过 Western blot 检测的结果显示成熟蛋白质的分子量在 125 kD 左右,此间造成的偏差可能与蛋白质的糖基化有关。Shpak 等^[3]发现,在拟南芥中内源的成熟 ERECTA 蛋白大小为 145 kD 左右,与预测的 105 kD 的理论值也有偏差,因为 ERECTA 蛋白的胞外域中有 12 个潜在的 N-糖基化位点^[1],蛋白质发生糖基化作用导致分子量比预期值偏大。Shen 等^[8]也在拟南芥中检测到了约 145 kD 的 ERECTA 蛋白。本研究检测

到的黄瓜 CsERECTA 蛋白的分子量与拟南芥略有不同,通过进化树分析可以发现(结果未显示),黄瓜与甜瓜的亲缘关系最近,而与拟南芥亲缘关系较远,所以 CsERECTA 蛋白与拟南芥 ERECTA 蛋白在结构和功能上有所差异,导致该蛋白在分子量大小上也有区别。

由于 CsERECTA 蛋白是一个疏水的跨膜蛋白,分子量较大,且内源的 ERECTA 蛋白表达量很低^[3],所以一定程度上增大了提取蛋白和 Western blot 验证的难度。本试验在提取膜蛋白方面尝试了多种方法,比如醋酸钠沉淀法提取黄瓜的总蛋白^[13],用 Triton X-100 去污剂法^[3]和 Triton X-114 去污剂法^[19](结果未显示)提取黄瓜中的膜蛋白,结果均不理想,都不能检测到 CsERECTA 蛋白的免疫反应信号。最后参考 Qian 等^[12]的超速离心法提取膜蛋白,才检测到黄瓜中 CsERECTA 的特异信号。Wang 等^[20]和 Yan 等^[21]也都是通过超速离心的方法提取到了大分子量的膜蛋白。程彦伟等^[22]研究水稻 OsRLK 蛋白发现,在总蛋白、微粒体粗膜蛋白和细胞质蛋白中均未检测到 OsRLK 蛋白的免疫反应信号,只在超速离心提取的质膜中检测到了相应信号,这说明,位于质膜上的某些低丰度的膜蛋白,由于表达量较低,通常需要通过质膜纯化富集的方法才能检测到蛋白的表达。本研究的结果表明,提取疏水的跨膜蛋白,用植物总蛋白的提取方法难度很大,而且,用 Triton X-100、Triton X-114 等去污剂提取膜蛋白的方法也存在着局限性,提取大分子量的膜蛋白效果还不太理想。所以,超速离心法是提取大分子量跨膜蛋白的有效方法之一。

在本研究中,首次对黄瓜内源的 CsERECTA 蛋白进行特异性检测,在成功获得对 CsERECTA 特异的多克隆抗体的基础上,可以后续研究在生物胁迫和非生物胁迫条件下该蛋白的时空表达特征,也可部分验证其在调控黄瓜矮化株型中的作用。

参考文献:

[1] TORII K U, MITSUKAWA N, OOSUMI T, *et al.* The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats[J]. *Plant Cell*, 1996, **8**(4): 735-746.

[2] SHPAK E D, MCABEE J M, PILLITTERI L J, *et al.* Stomatal patterning and differentiation by synergistic interactions of receptor kinases[J]. *Science*, 2005, **309**(5 732): 290-293.

[3] SHPAK E D, LAKEMAN M B, TORII K U. Dominant-negative receptor uncovers redundancy in the *Arabidopsis* ERECTA leucine-rich repeat receptor-like kinase signaling pathway that regulates organ shape[J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(5): 1 095-1 100.

[4] SHPAK E D, BERTHIAUME C T, Hill E J, *et al.* Synergistic interaction of three ERECTA-family receptor-like kinases controls *Arabidopsis* organ growth and flower development by

promoting cell proliferation[J]. *Development*, 2004, **131**(7): 1 491-1 501.

[5] HORD C L H, SUN Y J, PILLITTERI L J, *et al.* Regulation of *Arabidopsis* early anther development by the mitogen-activated protein kinases, MPK3 and MPK6, and the *ERECTA* and related receptor-like kinases[J]. *Molecular Plant*, 2008, **1**(4): 645-658.

[6] FRANCISCO L, CARLOS A B, CLARA S R, *et al.* *ERECTA* receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerelia cucumerina* [J]. *Plant Journal*, 2005, **43** (2): 165-180.

[7] ADIE B A, PEREZPEREZ P J, PEREZPEREZ M M, *et al.* ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2007, **19**(5): 1 665-1 681.

[8] SHEN H, ZHONG X B, ZHAO F F, *et al.* Overexpression of receptor-like kinase *ERECTA* improves thermotolerance in rice and tomato[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, **33** (9): 996-1 003.

[9] PATEL D, BASU M, HAYES S, *et al.* Temperature-dependent shade avoidance involves the receptor-like kinase *ERECTA* [J]. *Plant Journal*, 2013, **73**(6): 980-992.

[10] GHANDILYAN A, ILK N, HANHART C, *et al.* A strong effect of growth medium and organ type on the identification of QTLs for phytate and mineral concentrations in three *Arabidopsis* RIL populations[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, **60**(5): 1 409-1 425.

[11] 李 蒙,陈芳霞,吕 宁,等. 苦荞二氢黄酮醇 4-还原酶的原核表达与多克隆抗体制备[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(5): 884-889.

LI M, CHEN F X, LÜ N, *et al.* Prokaryotic expression of tartary buckwheat flavanone-4 hydrox-ylase and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2015, **35**(5): 884-889.

[12] QIAN Z J, SONG J J, CHAUMONT F, *et al.* Differential responses of plasma membrane aquaporins in mediating water transport of cucumber seedlings under osmotic and salt stresses[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2015, **38**(3): 461-473.

[13] 毛双双,李玉红,周 旋,等. 黄瓜过敏性诱导反应蛋白基因 (*CsHIR1*)原核表达及其多克隆抗体制备[J]. 西北植物学报, 2014, **34**(5): 884-889.

MAO S S, LI Y H, ZHOU X, *et al.* Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of cucumber *CsHIR1* gene[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2014, **34**(5): 884-889.

[14] 李玉萍,邓丹丹,张海纳,等. 苦荞黄酮-3-羟化酶截短体的原核表达与多克隆抗体制备[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(4): 672-677.

LI Y P, DENG D D, ZHANG H N, *et al.* Prokaryotic expression of truncated tartary buckwheat flavanone-3 hydrox-ylase and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, **33**(4): 672-677.

[15] YOKOYAMA R, TAKAHASHI T, KATO A, *et al.* The *Arabidopsis ERECTA* gene is expressed in the shoot apical meristem and organ primordia[J]. *Plant Journal*, 1998, **15** (3): 301-310.

[16] CHEN M K, SHPAK E D. *ERECTA* family genes regulate development of cotyledons during embryogenesis[J]. *FEBS Letters*, 2014, **588**(21): 3 912-3 917.

[17] MATTHEW W B, ANDRES J C, DOMINIQUE T. Identification of an *ERECTA* gene and its drought adaptation associations with wild and cultivated common bean[J]. *Plant Science*, 2016, 242:250-259.

[18] 韩同凯,王盈盈,林红珍,等. 水稻 *ERECTA* 基因组 DNA 的克隆及植物表达载体构建[J]. 山东农业科学, 2013, **45**(6): 4-10.

HAN T K, WANG Y Y, LIN H Z, *et al.* Cloning of rice *ERECTA* genomic DNA and construction of plant expression vector[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2013, **45**(6): 4-10.

[19] 孙萍萍,林旭媛,李立伟,等. 感染单核细胞 THP-1 前后钩端螺旋体外膜蛋白抗原表达差异性[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2012, **32**(3): 224-231.

SUN P P, LIN X Y, LI L W, *et al.* Diversity of outer membrane protein expression of *Leptospira interrogans* during infection of human THP-1 monocytes[J]. *Department of Medical Microbiology and Parasitology*, 2012, **32**(3): 224-231.

[20] WANG X F, MICHAEL B G, ERIK J S, *et al.* Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase[J]. *Plant Cell*, 2005, 17: 1 685-1 703.

[21] YAN F, ZHU Y Y, MULLER C, *et al.* Adaptation of H⁺-pumping and plasma membrane H⁺ ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129:50-63.

[22] 程彦伟,李 亮,沈 嵘,等. 水稻 LRR 型类受体蛋白激酶胞外区的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 生物化学与生物物理进展, 2008, **35**(9): 1 077-1 083.

CHENG Y W, LI L, SHEN R, *et al.* Prokaryotic expression of rice LRR receptor like protein kinase extracellular domain and preparation of its polyclonal antibody[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, **35**(9): 1 077-1 083.

(编辑:宋亚珍)