



木薯 14-3-3 蛋白家族成员 *MeGRF3* 基因的原核表达及多克隆抗体制备

常丽丽¹, 王 丹¹, 彭存智¹, 徐兵强^{1,2}, 仝 征^{1*}

(1 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101; 2 中国热带农业科学院海口实验站, 海口 571101)

摘 要: 14-3-3 蛋白是植物体内重要的信号转导调节分子, 在碳代谢、逆境胁迫响应、生长发育等过程中发挥重要调控作用。为了深入解析 14-3-3 蛋白家族在木薯中的生物学功能, 该研究采用酶切连接方法构建木薯 14-3-3 蛋白家族成员 *MeGRF3* 的原核表达载体, 用热激法转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 株系, 诱导表达带有 *MeGRF3* 的融合蛋白; 使用纯化后的 *MeGRF3* 融合蛋白免疫新西兰公兔制备多克隆抗体, 并检测抗体的效价和特异性。结果显示: (1) 成功构建了木薯 *MeGRF3* 的原核表达载体 pET-30a-*MeGRF3*, 并诱导表达得到带有 *MeGRF3* 和 6 个 His 标签的融合蛋白。(2) *MeGRF3* 融合蛋白主要以包涵体的形式存在, 相对分子质量约为 33 kD。(3) 间接酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 测定的抗体效价为 1 024 000。(4) Western blot 分析显示, 木薯叶片、茎尖、茎皮和块根中均检测到与 *MeGRF3* 蛋白大小一致的条带, 说明 *MeGRF3* 在这 4 个组织器官中均表达, 但主要是在茎尖和块根中大量积累, 表明该研究成功制备的 *MeGRF3* 多克隆抗体的特异性较好。

关键词: 木薯; 14-3-3 蛋白家族; 原核表达; 多克隆抗体; Western blot

中图分类号: Q786; Q789 **文献标志码:** A

Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of Cassava 14-3-3 Protein Family Member *MeGRF3* Gene

CHANG Lili¹, WANG Dan¹, PENG Cunzhi¹, XU Bingqiang^{1,2}, TONG Zheng^{1*}

(1 Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2 Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: 14-3-3 protein is an important signal transduction regulator in plants and plays significant roles in carbon metabolism, stress response, growth and development, etc. In order to in-depth analysis the biological function of 14-3-3 protein family in cassava, we constructed the prokaryotic expression vector pET-30a-*MeGRF3* of *MeGRF3*, a member of cassava 14-3-3 protein family, via enzymes digestion and ligation, and then transformed it into *Escherichia coli* Rosetta (DE3) strain by heat shock method to induce the expression of *MeGRF3* fusion protein. The purified *MeGRF3* fusion protein was used to immunize the New Zealand male rabbits to prepare the polyclonal antibody, and then the titer and specificity of polyclonal antibody were detected. The results showed that: (1) the prokaryotic expression vector pET-30a-*MeGRF3* of cassava *MeGRF3* was successfully constructed, and the fusion protein with *MeGRF3* and six His tags was induced and expressed. (2) The *MeGRF3* fusion protein was mainly in the form of inclusion body, and its

收稿日期: 2019-12-27; 修改稿收到日期: 2020-03-26

基金项目: 海南省自然科学基金 (319MS092); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项-中国热带农业科学院院级创新团队项目 (1630052017008)

作者简介: 常丽丽 (1984—), 女, 助理研究员, 主要从事植物蛋白质组学与分子生物学研究。E-mail: tychang493875@126.com

* 通信作者: 仝 征, 博士, 助理研究员, 主要从事植物蛋白质组学与分子生物学研究。E-mail: tongzheng@foxmail.com

molecular weight was about 33 kDa. (3) The antibody titer determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was 1 024 000. (4) The bands with the same molecular weight of MeGRF3 were detected in leaves, stems, barks and roots of cassava via Western blot, indicating that MeGRF3 was expressed in all of the four tissues, but mainly accumulated in the stems and roots. The results showed that the MeGRF3 polyclonal antibody successfully prepared in this study had good specificity.

Key words: cassava; 14-3-3 protein family; prokaryotic expression; polyclonal antibody; Western blot

14-3-3 蛋白是真核生物中普遍存在且高度保守的一类调节蛋白,在植物体内主要以同源或异源二聚体形式存在^[1],易于与具有磷酸化的丝氨酸和苏氨酸残基的靶蛋白相互作用,通过结合靶蛋白来发挥其调控功能^[2]。14-3-3 蛋白首先在人脑中被发现,共有 7 个家族成员^[3],而植物中通常具有更多的 14-3-3 蛋白家族成员,例如拟南芥^[4-5]、水稻^[6]、橡胶树^[7]、玉米^[8]和小麦^[9]等物种中分别含有 15、8、10、12 和 20 个家族成员,参与调控植物的碳水化合物代谢、逆境胁迫响应、生长发育等过程^[1-2,10]。大量研究证明,14-3-3 蛋白家族成员可与淀粉代谢途径相关的酶类互作,如淀粉合成酶、ADP-葡萄糖焦磷酸化酶和淀粉分支酶等,调控小麦^[9]、拟南芥^[11]和大麦^[12]等植物的淀粉合成过程。在植物中,14-3-3 蛋白还参与了对干旱、盐和寒冷等胁迫环境的响应,如 14-3-3 蛋白通过结合 SOS (salt overly sensitive) 途径的关键蛋白 SOS2 和 SOS2-like protein kinase5 (PKS5)^[13],以及谷氨酸受体样蛋白 (glutamate receptor-like proteins, GLRs)^[14]来调控其活性,进而参与钙信号传导途径来响应盐胁迫过程。迄今为止,14-3-3 蛋白家族在木薯中的生物学功能鲜少报道。

木薯是一种重要的热带经济作物,其块根内淀粉含量可高达 30%,被誉为‘淀粉之王’、‘地下粮仓’和‘能源作物’,用途十分广泛^[15]。本团队前期通过不同发育时期木薯块根的差异蛋白质组学研究发现,木薯 14-3-3 蛋白家族成员可能在淀粉代谢途径中起到重要的调控作用^[16];随后对木薯 14-3-3 基因家族进行了鉴定和生物信息学分析,并选择将家族成员 *MeGRF3* 基因在拟南芥中进行过量表达,结果显示过量表达 *MeGRF3* 降低了拟南芥根部的淀粉含量,但提高了拟南芥植株的耐盐性^[17]。因此,为了深入揭示 *MeGRF3* 在木薯中的生物学功能,本研究通过构建 *MeGRF3* 基因的原核表达载体,在大肠杆菌中实现高效表达,并纯化融合蛋白,免疫新西兰公兔制备出高效的多克隆抗体,以期为鉴定木薯中 *MeGRF3* 的互作蛋白奠定实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

‘华南 8 号’木薯种茎由中国热带农业科学院热带生物技术研究所转基因生物安全课题组提供,并种植于中国热带农业科学院热带生物技术研究所的文昌实验基地。原核表达载体 pET30a 为本实验室保存;大肠杆菌菌株 DH 5 α 和 Rosetta (DE3) 购于上海唯地生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建 根据 *MeGRF3* 基因序列 (NCBI 登录号: XM_021747355.1) 设计含有 *Nde* I 和 *Kpn* I 酶切位点的特异性引物 YMeGRF3F (5'-GGAATTCCATATGTCACCTTC-AGAACCTTCAC-3') 和 YMeGRF3R (5'-CGGGG-TACCACCTGTTGCGGCTGCCCTCACC-3')。

取木薯块根作为实验材料,参照植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。以 1 μ g 总 RNA 为模板, Oligo (dT) 18 为引物,使用反转录试剂盒获得 cDNA。以该 cDNA 为模板, YMeGRF3F/R 为引物进行 PCR 扩增,反应体系为: Prime STAR Max Premix 12.5 μ L, cDNA 1 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L; 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。利用 *Nde* I 和 *Kpn* I 对 PCR 产物和 pET-30a 原核表达载体分别进行双酶切, 经 T₄ DNA 连接酶连接后转化大肠杆菌 DH 5 α , 筛选阳性克隆进行 PCR 检测, 并提取质粒进行双酶切和测序验证。

1.2.2 融合蛋白的诱导表达 取测序正确的 pET-30a-*MeGRF3* 重组质粒转化大肠杆菌 Rosetta (DE3) 菌株, 挑选单克隆接种到含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜。按 1:100 接种量转接到新鲜的 LB 液体培养基中, 待菌液的 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 30 $^{\circ}$ C 进行诱导表达。收集未加 IPTG 诱导的菌液, 以及诱导 1、3、5 和 7 h 的菌液各

1 mL,12 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,加入 200 μ L 蒸馏水和 50 μ L 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液煮沸裂解菌体,取 25 μ L 上述混合液进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,检测融合蛋白的诱导表达情况。

取诱导表达 7 h 的菌液,收集菌体后,用 0.01 mol/L 磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS, pH 7.8)重悬菌体,超声破碎(240 W,超声 5 s,间隔 5 s,共 10 min)分离上清液和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的可溶性。

1.2.3 MeGRF3 融合表达蛋白的纯化 取含有 pET-30a-MeGRF3 重组质粒的 Rosetta (DE3) 菌株,接种于 LB 液体培养基中进行扩大培养,离心收集菌体,用 ddH₂O 洗涤菌体 2 次后,用 PBS 缓冲液重悬菌体。通过上述实验确定融合蛋白以包涵体形式表达,按上述条件进行超声破碎菌体后,12 000 r/min 离心 15 min,收集沉淀。参照 His 标签蛋白纯化试剂盒说明书,进行包涵体蛋白的纯化,用 SDS-PAGE 电泳检测融合表达蛋白的纯化效果。

1.2.4 MeGRF3 多克隆抗体的制备及纯化 取纯化的 MeGRF3 融合蛋白(浓度约为 0.5 mg/mL)免疫新西兰公兔,第 1 次和第 2 次免疫间隔 2 周,第 2 次至第 5 次免疫每次间隔 1 周。免疫前取兔耳静脉血作为阴性对照血清,第 1 次免疫时,将纯化的 MeGRF3 融合蛋白与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后注射;第 2~5 次免疫使用弗氏不完全佐剂。每次免疫均采用皮下多点注射,每次每只免疫剂量为 0.5 mg 蛋白。最后一次免疫 7 d 后,颈部取血,先室温放置 2 h,再 4 $^{\circ}$ C 静置过夜,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,收集血清,用 0.22 μ m 滤膜过滤后收集滤液。参照 Protein A+G Agarose(抗体纯化)试剂盒说明书纯化 MeGRF3 抗体,-80 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.5 MeGRF3 多克隆抗体的效价分析 利用间接 Elisa 法测定多克隆抗体的效价^[18],以免疫前的兔血清作为阴性对照。用包被液(0.05 mol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液)稀释纯化后的 MeGRF3 融合蛋白至 1 μ g/mL,取 100 μ L 上述稀释液至酶标板中,4 $^{\circ}$ C 包被过夜;弃包被液后,用洗涤液[0.01 mol/L PBS pH7.4, 0.05% Tween 20 (V/V)]洗涤 3 次,每次 5 min;之后用封闭液[5%脱脂奶粉(W/V)溶解于 PBS 中]37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h;用含 1%牛血清蛋白(BSA)的 PBST 缓冲液将 MeGRF3 多克隆抗体和兔阴性血清进行稀释,分别取稀释后的抗体和阴性血清 100 μ L 加入酶标板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗涤方法同上;随后加入 100 μ L HRP 标记的羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗

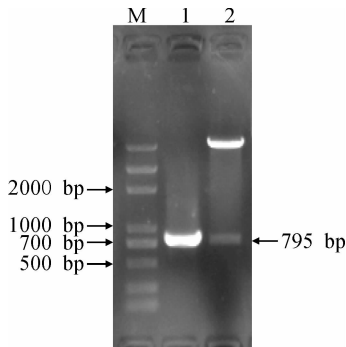
涤方法同上;之后加入 200 μ L TMB 显色液,室温避光孵育 30 min;最后加入 50 μ L 终止液(2 mol/L H₂SO₄)终止反应。测定 450 nm 波长处的吸光度,若 $OD_{\text{阳性}}/OD_{\text{阴性}} > 2.0$,则判定为阳性。

1.2.6 MeGRF3 多克隆抗体特异性检测 利用本实验室改进的 BPP(Borax/PVPP/Phenol)蛋白提取法提取木薯叶片、茎尖、茎皮和块根总蛋白^[19],分别取 30 μ g 组织蛋白,以及添加 IPTG 诱导(阳性对照)和未加 IPTG 诱导的菌体蛋白(阴性对照)进行 SDS-PAGE 蛋白电泳。将 SDS-PAGE 凝胶中的蛋白电转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上,然后用封闭缓冲液[5% (W/V)脱脂奶粉,0.15 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mL/L Tween 20]封闭过夜。弃封闭液,于 37 $^{\circ}$ C 一抗孵育 1.5 h,然后用 TBST[0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 0.5 mL/L Tween 20]清洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min。清洗后的膜于 37 $^{\circ}$ C 进行二抗孵育 1.5 h,然后用 TBST 清洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min。最后,用超敏 ECL 化学发光试剂盒进行显色,超灵敏化学发光成像仪(GE, ImageQuant LAS4000mini)进行拍照。

2 结果与分析

2.1 pET-30a-MeGRF3 原核表达载体的构建

PCR 扩增得到大小约 800 bp 目的片段(图 1),将其双酶切后连接原核表达载体 pET-30a 中。随后,提取阳性单菌落的质粒进行双酶切,可产生两条清晰的 DNA 条带,其中一条带约 800 bp,另一条带为 pET-30a 载体(图 1)。进一步的测序结果表明,

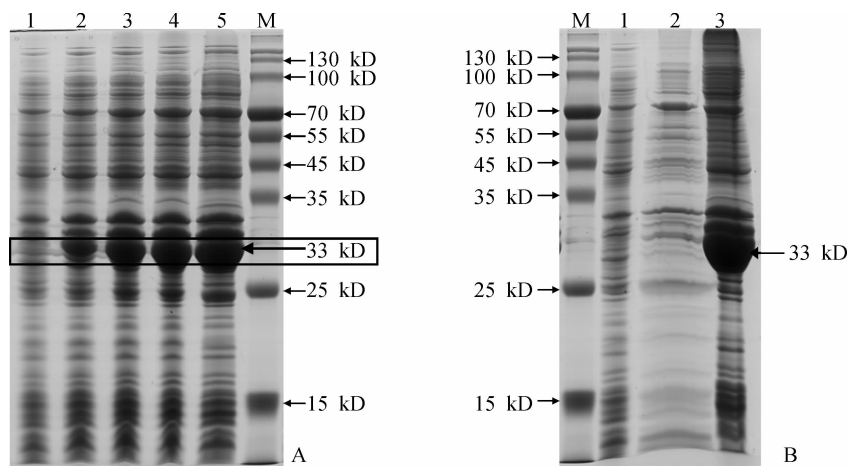


M. DL2000;1. MeGRF3 PCR 产物;2. pET-30a-MeGRF3 质粒双酶切

图 1 MeGRF3 基因的 PCR 扩增及重组质粒的双酶切验证

M. DL2000; 1. PCR products of MeGRF3; 2. Restriction enzyme digestion of pET-30a-MeGRF3 plasmid

Fig. 1 PCR amplification of MeGRF3 and recombinant plasmid verification by restriction enzyme digestion



M. 蛋白分子量标准;A. MeGRF3 融合蛋白的诱导表达;1. pET-30a-MeGRF3 未诱导;2~5. 0.5 mmol/L IPTG 在 30 ℃条件下分别诱导 1、3、5 和 7 h. B. 融合蛋白的可溶性检测;1. pET-30a-MeGRF3 未诱导;2. 超声波破碎后的上清;3. 超声波破碎后的沉淀

图 2 MeGRF3 融合蛋白的诱导表达(A)和可溶性分析(B)

M. Protein molecular weight marker; A. The induced expression of MeGRF3 recombinant protein; 1. Un-induced control of pET-30a-MeGRF3; 2~5. pET-30a-MeGRF3 induced by IPTG of 0.5 mmol/L at 30 ℃ for 1, 3, 5 and 7 h. B. The soluble analysis of MeGRF3 recombinant protein; 1. Un-induced control of pET-30a-MeGRF3; 2. Supernatant after ultrasonic breakage; 3. Precipitate after ultrasonic breakage

Fig. 2 The induced expression (A) and soluble analysis (B) of MeGRF3 recombinant protein

pET-30a 载体中连入的 *MeGRF3* 基因序列正确,片段大小为 795 bp,由此证明 pET-30a-MeGRF3 原核表达载体构建成功。

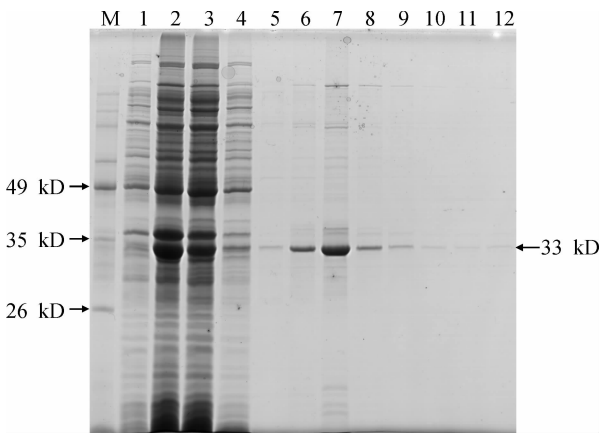
2.2 MeGRF3 融合蛋白的诱导表达

将测序正确的重组质粒 pET-30a-MeGRF3 转化大肠杆菌表达菌株 Rosetta (DE3),在 30 ℃ 0.5 mmol/L IPTG 条件下进行诱导表达,分别取诱导不同时间的菌体进行 SDS-PAGE 电泳检测(图 2,A)。结果显示,以未经诱导的重组质粒 pET-30a-MeGRF3 菌体作为对照,重组质粒经 IPTG 诱导后产生了 1 条分子量约 33 kD 的特异性蛋白条带;由于 pET-30a 载体中携带的 His 表达标签分子量为 4 kD,故所诱导的目标蛋白实际大小约为 29 kD,与 MeGRF3 预测的蛋白大小(29.81 kD)一致;表明木薯 14-3-3 家族成员 *MeGRF3* 基因在大肠杆菌中成功诱导表达。随着诱导时间的延长,融合蛋白的表达量逐渐增加,且在诱导 7 h 后蛋白表达量达到最高。

取诱导表达 7 h 的菌体,经超声波破碎后,分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳(图 2,B),发现融合蛋白主要以不溶性的包涵体形式存在。

2.3 MeGRF3 融合蛋白的纯化及多克隆抗体制备

挑取含有重组质粒 pET-30a-MeGRF3 的 Rosetta (DE3)菌株的单克隆,进行扩大培养,在 30 ℃、0.5 mmol/L IPTG 条件下诱导 7 h 后收集菌体,



M. 蛋白分子量标准;1. pET-30a-MeGRF3 未诱导;2. 0.5 mmol/L IPTG 在 30 ℃条件下诱导 7 h 的菌体;3. 上样流穿液;4. 洗涤液;5~12. 洗脱液

图 3 MeGRF3 融合蛋白的纯化

M. Protein molecular weight marker; 1. Un-induced control of pET-30a-MeGRF3; 2. pET-30a-MeGRF3 induced by IPTG of 0.5 mmol/L at 30 ℃ for 7 h; 3. The flow through of MeGRF3 fusion protein; 4. The wash solution of MeGRF3 fusion protein; 5~12. The elution of MeGRF3 fusion protein

Fig. 3 Purification of MeGRF3 fusion protein

进行超声波破碎,取沉淀,利用 His 标签蛋白纯化试剂盒进行 MeGRF3 融合蛋白的纯化。结果如图 3 所示,在 33 kD 处检测到很亮的目的条带,且其他杂蛋白条带很淡,说明纯化出较纯的 MeGRF3 融合蛋白,适合进行后续的抗体制备。取纯化后的

MeGRF3 融合蛋白共约 2.5 mg,分 5 次免疫新西兰公兔,进行兔抗木薯 MeGRF3 的多克隆抗体制备。取免疫后的兔血清,利用 Protein A+G Agarose 进行抗体纯化。

2.4 MeGRF3 多克隆抗体的效价分析和特异性检测

获得 MeGRF3 多克隆抗体后,首先利用间接 Elisa 法测定其效价。根据预实验结果,将所制备的 MeGRF3 多克隆抗体和兔阴性血清从 1 : 8 000 开始稀释,然后依次按照 2 倍的倍比进行稀释直至 1 : 2 048 000,以 HRP 标记的羊抗兔 IgG(稀释 2 000 倍)为二抗,加入底物显色并终止反应后,测定 450 nm 波长处的吸光度。测定结果如表 1 所示,根据

$OD_{阳性}/OD_{阴性}>2.0$ 的标准,由此可以得出,制备的 MeGRF3 多克隆抗体的效价可达 1 : 1 024 000。

为了检测 MeGRF3 多克隆抗体的特异性,以制备的木薯 MeGRF3 多克隆抗体为一抗,以辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 为二抗,对原核表达的融合蛋白以及木薯组织样本进行 Western blot 分析。图 4 结果显示,未经 IPTG 诱导的重组质粒 pET-30a-MeGRF3(阴性对照)与木薯 MeGRF3 多克隆抗体未发生特异性反应;而诱导表达的重组质粒 pET-30a-MeGRF3(阳性对照)在 33 kD 处杂交出明显的特异性条带。同时,木薯叶片、茎尖、茎皮和块根中均能检测到特异性条带,说明 MeGRF3 在这 4 个组织器官中均表达,但主要是在茎尖和块根中大量积累。

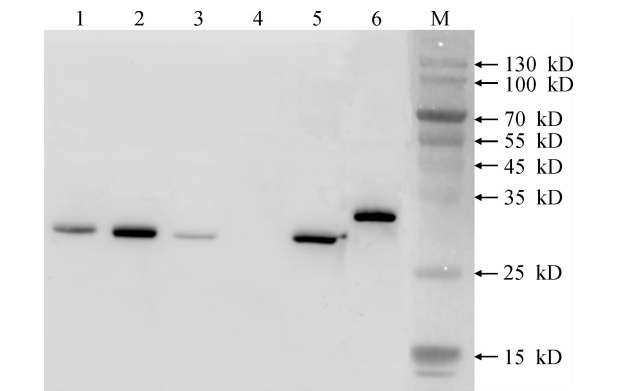
3 讨 论

木薯既是全球第六大粮食作物,更是热带地区最重要的经济作物,一般以茎秆进行无性繁殖,因其块根内淀粉含量可达 14%~40%,故被誉为‘淀粉之王’^[15]。木薯块根内积累的淀粉主要来自于叶片光合作用合成的蔗糖,蔗糖通过叶柄、茎秆韧皮部运输到块根中^[20],在蔗糖合成酶作用下分解为果糖和 UDP-葡萄糖,继而形成 6-磷酸葡萄糖或 1-磷酸葡萄糖;6-磷酸葡萄糖在 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶和淀粉合成酶以及分支酶作用下合成直链淀粉和支链淀粉,并在块根中积累^[21]。随着木薯淀粉需求量的不断攀升,培育高淀粉和专用型木薯品种成为解决供需矛盾的关键^[22],而揭示木薯块根淀粉积累的分子机制,可为通过转基因育种技术培育木薯新品种提供重要的基因资源。

已有研究表明,14-3-3 蛋白在植物碳水化合物代谢、生长发育、ATP 合成、过氧化物清除等过程中起到关键的调控作用^[1-2,10]。14-3-3 蛋白对植物碳水化合物代谢途径的调控主要是通过结合碳水化合物代谢过程中的一些关键酶类,并调节其活性来实现的。例如在马铃薯中抑制 14-3-3 蛋白的表达,可显著提高转基因株系的蔗糖磷酸合成酶(SPS)活性,表明 14-3-3 蛋白可直接下调 SPS 活性进而调控植物的糖代谢过程^[23]。在拟南芥中抑制淀粉粒结合的 14-3-3ε 型蛋白会导致叶片中淀粉含量积累量增加 2~4 倍,且淀粉合成酶Ⅲ基因家族是其潜在的互作蛋白^[11]。对小麦^[9,24]和大麦^[12]中 14-3-3 蛋白的互作蛋白鉴定结果发现,淀粉合成酶、淀粉分支酶、ADP 焦磷酸化酶等淀粉代谢途径中的关键酶类

表 1 间接 Elisa 法检测 MeGRF3 多克隆抗体的效价
Table 1 Detection of MeGRF3 polyclonal antibody titer by indirect Elisa

稀释倍数 Dilution	$OD_{阳性}$ $OD_{positive}$	$OD_{阴性}$ $OD_{negative}$	$OD_{阳性}/OD_{阴性}$ $OD_{positive}/OD_{negative}$
1 : 8 000	3.409±0.22	0.072±0.001	47.35
1 : 16 000	3.215±0.093	0.071±0.001	45.28
1 : 32 000	2.259±0.124	0.071±0.004	31.82
1 : 64 000	1.587±0.027	0.070±0.005	22.67
1 : 128 000	0.973±0.026	0.069±0.002	14.10
1 : 256 000	0.555±0.008	0.069±0.001	8.04
1 : 512 000	0.311±0.013	0.069±0.001	4.51
1 : 1 024 000	0.170±0.009	0.068±0.001	2.50
1 : 2 048 000	0.087±0.008	0.067±0.001	1.29



M. 蛋白质分子量标准;1. 叶片;2. 茎尖;3. 茎皮;4. pET-30a-MeGRF3 未诱导;5. 块根;6. pET-30a-MeGRF3 经 IPTG 诱导 7 h

图 4 Western blot 检测多克隆抗体的木薯组织特异性
M. Protein molecular weight marker; 1. Leaves; 2. Stem; 3. Bark; 4. Un-induced control of pET-30a-MeGRF3; 5. Roots; 6. pET-30a-MeGRF3 induced by IPTG for 7 hours
Fig. 4 Western blot analysis of the specificity of polyclonal antibody in cassava tissues

都能与 14-3-3 蛋白结合。本研究团队前期通过比较木薯块根不同发育时期的蛋白质组发现,14-3-3 蛋白在块根不同发育时期呈现显著性差异表达^[16],且在拟南芥中过量表达木薯 14-3-3 家族成员 *MeGRF3* 基因,可显著降低转基因株系根中的淀粉含量,但提高了转基因植株的耐盐性^[17],说明 14-3-3 蛋白可能在木薯块根的淀粉积累过程,以及木薯抗逆过程中起到重要的调控作用。

为深入揭示木薯 14-3-3 蛋白 *MeGRF3* 在木薯中生物学功能及其调控网络,本研究首次构建其原

核表达载体 pET-30a-*MeGRF3*,并成功在大肠杆菌表达菌株 Rosetta (DE3)中大量表达。通过融合蛋白携带的 His 标签进行纯化后,免疫新西兰公兔,获得了 *MeGRF3* 兔多克隆抗体。经间接 ELISA 法和 Western blot 检测后证实,制备的 *MeGRF3* 多克隆抗体效价高,特异性好,能与木薯组织器官中的 14-3-3 蛋白发生免疫反应。*MeGRF3* 多克隆抗体的成功制备,将为后续 14-3-3 蛋白的互作蛋白鉴定,以及在木薯不同组织器官的时空表达特性分析提供强有力的实验支持。

参考文献:

[1] 周 颖,李冰樱,李学宝. 14-3-3 蛋白对植物发育的调控作用[J]. 植物学报, 2012,**47**(1): 55-64.
ZHOU Y, LI B Y, LI X B. Roles of 14-3-3 proteins in regulating plant development[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2012, **47**(1): 55-64.

[2] 崔 娜,于志海,韩明利,等. 植物 14-3-3 蛋白研究进展[J]. 西北植物学报, 2012,**32**(4): 843-851.
CUI N, YU Z H, HAN M L, *et al.* Research advancement of 14-3-3 proteins in plants[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012,**32**(4): 843-851.

[3] IWATA N, YAMAMOTO H, SASAKI S, *et al.* Frequent hypermethylation of CpG Islands and loss of expression of the 14-3-3 σ gene in human hepatocellular carcinoma[J]. *Oncogene*, 2000,**19**(46): 5 298-5 302.

[4] WU K, ROONEY M F, FERL R J. The *Arabidopsis* 14-3-3 multigene family[J]. *Plant Physiology*, 1997,**114**(4): 1 421-1 431.

[5] ROSENQUIST M, ALSTERFJORD M, LARSSON C, *et al.* Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes[J]. *Plant Physiology*, 2001,**127**(1): 142-149.

[6] YAO Y, DU Y, JIANG L, *et al.* Interaction between ACC synthase 1 and 14-3-3 proteins in rice: a new insight[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2007,**72**(9): 1 003-1 007.

[7] YANG Z P, LI H L, GUO D, *et al.* Identification and characterization of the 14-3-3 gene family in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014,**80**: 121-127.

[8] LAI J, DEY N, KIM C S, *et al.* Characterization of the maize endosperm transcriptome and its comparison to the rice genome[J]. *Genome Research*, 2004,**14**(10a): 1 932-1 937.

[9] GUO J, DAI S, LI H S, *et al.* Identification and expression analysis of wheat *TaGF14* genes[J]. *Frontiers in Genetics*, 2018,**9**: 12.

[10] FULGOSI H, SOLL J, DE FARIA MARASCHIN S, *et al.* 14-3-3 proteins and plant development[J]. *Plant Molecular Biology*, 2002,**50**: 1 019-1 029.

[11] SEHNKE P C, CHUNG H J, WU K, *et al.* Regulation of starch accumulation by granule-associated plant 14-3-3 proteins[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001,**98**(2): 765-770.

[12] ALEXANDER R D, MORRIS P C. A proteomic analysis of 14-3-3 binding proteins from developing barley grains[J]. *Proteomics*, 2006,**6**(6): 1 886-1 896.

[13] YANG Z J, WANG C W, XUE Y, *et al.* Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance[J]. *Nature Communications*, 2019,**10**(1): 1 199.

[14] WANG P H, LEE C E, LIN Y S, *et al.* The glutamate receptor-like protein GLR3.7 interacts with 14-3-3 ω and participates in salt stress response in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019,**10**: 1169.

[15] 薛万伟,党选举,李 鑫. 木薯酒精发酵工艺的研究[J]. 酿酒, 2005,**32**(4): 39-40.
XUE W W, DANG X J, LI X. Study on the technology of cassava ethanol fermentation[J]. *Liquor-making*, 2005, **32**(4): 39-40.

[16] WANG X C, CHANG L L, TONG Z, *et al.* Proteomics profiling reveals carbohydrate metabolic enzymes and 14-3-3 proteins play important roles for starch accumulation during cassava root tuberization[J]. *Scientific Reports*, 2016, **6**: 19 643.

[17] CHANG L L, TONG Z, PENG C Z, *et al.* Genome-wide analysis and phosphorylation sites identification of the 14-3-3 gene family and functional characterization of *MeGRF3* in cassava [J]. *Physiologia Plantarum*, 2020, doi: 10. 1111/ppl. 13070.

[18] 孟璐璐,于春蕾,练 森,等. 苹果树腐烂病菌木聚糖酶 *VmXyl1* 基因的原核表达及多克隆抗体制备[J]. 农业生物技术学报, 2019, **27**(2): 315-322.
MENG L L, YU C L, LIAN S, *et al.* Prokaryotic expression of xylanase *VmXyl1* gene in *Valsa mali* and preparation of polyclonal antibody[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, **27**(2): 315-322.

[19] WANG X C, SHI M J, LU X L, *et al.* A method for protein extraction from different subcellular fractions of laticifer latex in *Hevea brasiliensis* compatible with 2-DE and MS[J]. *Proteome Science*, 2010,**8**: 35.

[20] 吴炫柯,李杨瑞,李永健. 木薯不同部位光同化产物分配

的研究[J]. 中国农学通报, 2009, **25**(18): 216-218.

WU X K, LI Y R, LI Y J. Studies on distribution of assimilation product in different position of cassava varieties[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, **25**(18): 216-218.

[21] 夏志强, 邹枚伶, 曾长英, 等. 木薯块根淀粉积累分子机制综述[J]. 安徽农学通报, 2008, **14**(8): 78-81, 71.

XIA Z Q, ZOU M L, ZENG C Y, *et al.* Molecular mechanism of cassava root starch accumulation[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2008, **14**(8): 78-81, 71.

[22] 严华兵, 叶剑秋, 李开绵. 中国木薯育种研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, **31**(15): 63-70.

YAN H B, YE J Q, LI K M. Progress of cassava breeding in China[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, **31**(15): 63-70.

[23] ZUK M, WEBER R, SZOPA J. 14-3-3 protein down-regulates key enzyme activities of nitrate and carbohydrate metabolism in potato plants[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, **53**(9): 3 454-3 460.

[24] 宋健民, 戴 双, 李豪圣, 等. 小麦胚乳 14-3-3 蛋白的表达及其与淀粉体淀粉合成酶的互作[J]. 作物学报, 2009, **35**(8): 1 445-1 450.

SONG J M, DAI S, LI H S, *et al.* Expression of a wheat endosperm 14-3-3 protein and its interactions with starch biosynthetic enzymes in amyloplasts[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, **35**(8): 1 445-1 450.

(编辑:宋亚珍)

封面植物介绍——印度蛇菰

印度蛇菰[*Balanophora indica* (Arn.) Griff.]隶属于蛇菰科蛇菰属,是一种寄生植物。根状茎黄橙色到棕色,表面粗糙并具有星状疣;分枝近球形,直径 0.5~5.6 cm,很少圆筒状。雄花序红色,卵球形椭圆形,(5~10) cm×(2~6) cm。雄花:略带红色,辐射对称,每朵被一个粗壮的截形苞片包围。花被裂片 4~6,椭圆形披针形,(3~7) mm×(1~2.5) mm,聚药雄蕊椭圆形卵形,长 2.5~5 mm,具柄;花药 4 或 5,U 形,纵向开裂。雌花序球状,直径 3~5 cm。花期 10~12 月。

印度蛇菰广布于东南亚国家,在中国仅见于云南、广西和海南,由于其寄生特性,只有开花时才能一睹真容。

(图文由西双版纳热带植物园朱仁斌博士提供)

Introduction of the Plant Front Cover: *Balanophora indica*

Balanophora indica (Arn.) Griff. belongs to Balanophoraceae. Plants dioecious. Rhizome yellowish orange to brown, surface coarsely tessellated and with stellate warts; branches subglobose, 0.5–5.6 cm in diam, rarely cylindric. Scapes yellow, 7.2–20 cm. Male inflorescences red, ovoid-ellipsoid, (5–10) cm × (2–6) cm. Male flowers: reddish, actinomorphic, each subtended by a single stout and truncate bract. Perianth lobes 4–6, elliptic-lanceolate, (3–7) mm × (1–2.5) mm. Synandria elliptic-ovate, 2.5–5 mm, stalked; anthers 4 or 5, U-shaped, longitudinally dehiscent. Female inflorescences globose, 3–5 cm in diam. Spadicles subclavate, to 2 mm, apical 1/2 to 2/3 ellipsoid-obovoid; cuticular ridges of apical cells short but distinct and congested all over. Female flowers: basally on spadicles and main axis of inflorescence. Flowering October to December.

B. indica is widely distributed in Southeast Asian countries, but in China, it is only found in Yunnan, Guangxi and Hainan. Because of its parasitic characteristics, it can only be seen when flowering.

(Photographed and introduced by Dr ZHU Renbin)