

# 重组拟南芥细胞色素 P450 707A3 在大肠杆菌中的原核表达

吴云华, 肖 虔

(中南民族大学 生命科学学院, 生物技术国家民委重点实验室 武汉 430074)

**摘 要** 拟南芥细胞色素 P450 707a 基因是编辑脱落酸 8-羟化酶的基因, 克隆其中的 *cyp707a3* 基因并构建表达载体 pCWori(+)-*cyp707a3*, 在 *E. coli* Rosseta 菌株中原核表达并得到了具有活性的酶蛋白. 结果显示: 大部分酶蛋白定位于大肠杆菌细胞膜.

**关键词** 拟南芥细胞色素 P450 707A3; 原核表达; 重组大肠杆菌; 膜蛋白

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)01-0028-04

## Studies on the Expression of *Arabidopsis Thaliana* Cytochrome P450 707A3 in *Escherichia coli*

Wu Yunhua, Xiao Qian

(Key Laboratory for Biotechnology of National Commission for Nationalities, College of Life Science, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** ABA 8-hydroxylase, the metabolic enzyme of abscisic acid, are encoded by cytochrome P450 707a3 (*cyp707a3*) in *Arabidopsis Thaliana*. *Cyp707a3* gene was cloned from the cDNA library, and then the expression vector of pCWori-*Cyp707a3* was constructed. The prokaryotic expression of CYP707A3 protein was successfully achieved in *E. coli* Rosseta, and active enzyme protein CYP707A3 was obtained. The experimental results showed that most of the enzyme protein was located on the membrane of *E. coli*.

**Keywords** *Arabidopsis Thaliana* cytochrome P450 707A3; abscisic acid; prokaryotic expression; membrane protein

植物激素的检测是目前植物激素作用机理研究中的瓶颈问题之一<sup>[1]</sup>. 已经有文献报道了利用生物传感器来检测植物激素的方法<sup>[2,3]</sup>, 同时文献报道了利用细胞色素 P450 酶蛋白作为材料制作生物传感器以检测其底物的技术<sup>[4]</sup>. 细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP) 是植物中最大的酶蛋白家族, 在植物体内担当着重要的功能<sup>[5]</sup>. 拟南芥 *cyp707a* 是编辑脱落酸代谢过程关键酶 8'-羟化酶 (ABA 8'-hydroxylase) 的基因. 该基因一共有 4 个家族成员<sup>[6-8]</sup>, 对于种子的萌发起到了重要作用. *Cyp707a3* 是该家族中的重要一员, 其研究还较少.

本研究探索拟南芥细胞色素 CYP707A3 酶在大

肠杆菌中的表达并优化表达条件<sup>[9]</sup>, 为后续研究酶蛋白对脱落酸等植物激素的催化检测提供可能的实验基础.

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

表达载体 pCWori(+) 由美国 Vanderbilt 大学医学中心提供, 拟南芥 (*Arabidopsis Thaliana*) 的种子、大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  和 *E. coli* Rosseta 均由中南民族大学武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室提供.

收稿日期 2017-02-02

作者简介 吴云华(1971-), 女, 教授, 博士, 研究方向: 生化分析与生物传感, Email: wuyunhua@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(31670372)

T4 DNA 连接酶和限制性内切酶 *Nde* I、*Hind* III (Takara), Trizol Reagent (Ambion), Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo scientific), KOD-plus (Toyobo), DNA 凝胶回收试剂盒、DNA 清洁回收试剂盒 (Axygen 公司), 氨苄青霉素 (Amp) 和氯霉素 (上海生工公司), 异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG)、 $\delta$ -氨基- $\gamma$ -酮戊酸 (ALA) 及二硫苏糖醇 (DTT) (Alfa Aesar), 苯甲基硫酰氟 (PMSF) (Beyotime Biotechnology), 引物合成与基因测序 (武汉擎科生物有限公司), 其他试剂均为天津市广成化学试剂有限公司和国药集团化学分析级试剂。

2 × TSE Buffer (200 mL): 称取 34.22 g 蔗糖和 0.0372 g EDTA · 2Na 于 1 L 烧杯中, 加入 20 mL 1 mol/L 的 Tris Buffer (pH 7.6), 用 ddH<sub>2</sub>O 定容至 200 mL, 过滤除菌。

Spheroplast buffer (100 mL): 称取 0.1286 g 乙酸镁于烧杯中加少许水溶解; 加 20 mL 甘油; 再加 1 mol/L 的 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 1 mol/L 的 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 共 10 mL, 调 pH 为 7.6, 定容至 100 mL。使用前加入 DTT 至 1 mmol/L。

### 1.2 CYP450 707A3 原核表达载体的构建

对 CYP707A3 进行生物信息学分析, 发现其为 N 端疏水的可溶性蛋白, 推测其为 N 端单次跨膜的膜蛋白。

拟南芥于光照培养箱中培养, 取新鲜叶片用 Trizol 法提取总 RNA。用寡核苷酸引物进行逆转录, 所得到的拟南芥 cDNA 文库用 *GAPDH* 检测。设计引物 F (5'-GGAATCCATATGGCTTCTCCGGTTTGT TTCTC-3') 和引物 R (5'-CCCAAGCTTTTACTGATGG TGATGGTGATGGTTTTCGTTCCAAGGCAAT-3'), 从拟南芥 cDNA 文库中扩增出 *cyp707a3* 目的基因片段。用 *Nde* I 和 *Hind* III 分别酶切目的片段和 pCWori(+) 载体, 然后连接载体和片段, 转化 DH5 $\alpha$  菌株。

### 1.3 CYP450 707A3 蛋白诱导表达

将 pCWori(+) 空载体质粒和重组表达质粒 pCW-*cyp707a3* 转化到表达菌株 *E. coli* Rosseta 中。于平板上挑取长势良好的单菌落接种到 2 mL LB 液体培养基, 37 °C 培养过夜。然后取 1 mL 菌液加入至 50 mL 的新鲜且含 50 ng/L Amp、20 ng/L 氯霉素、1 mmol/L VB<sub>1</sub> 和 12.5  $\mu$ L 微量元素改良的 TB 培养基中, 37 °C 培养约 3 h, 使其 OD<sub>600</sub> 值达到 0.7 ~ 1.0 范围。加入 IPTG, 同时加入终浓度为 1 mmol/L 的 ALA, 诱导表达。

IPTG 终浓度选择了 0.7, 1, 1.5 mmol/L 3 个梯度; 表达温度选择了 23, 26, 29 °C 3 个梯度; 表达时间选择了 20, 24, 28 h 3 个梯度<sup>[9]</sup>。最终发现, 1 mmol/L IPTG、26 °C、24 h 为最佳表达条件。

### 1.4 CYP450 707A3 膜蛋白的提取

将 50 mL 培养菌液转至 100 mL 的离心管, 冰上放置 30 min 以停止表达。2800 r/min 于 4 °C 离心 15 min, 弃上清, 沉淀的菌体可 -70 °C 冻存数小时; 沉淀用 3 mL 2 × TSE Buffer 加等体积无菌水打散重悬, 加入约 3 mg 的溶菌酶, 冰上轻摇 40 ~ 90 min 至悬浊液变得较为粘稠, 2800 r/min 于 4 °C 离心 25 min; 弃粘稠的上清, 菌体沉淀加入 4 mL 冰冷的 spheroplast buffer 重悬 (已加入 DTT 至 1 mmol/L), 置 -70 °C 冻存数小时; 冻存样品经流动水融化后加入 PMSF, 于冰浴中超声破碎, 每破碎约 0.5 s 间隔 1.5 s。总破碎时间视前一步溶菌酶溶菌程度而定, 一般不应少于 90 s。破碎后的混合液于 4 °C、1.2 × 10<sup>4</sup> r/min 的转速离心 12 min, 结果分为上清层、中间浑浊层、沉淀; 沉淀用 2 mL spheroplast buffer 重悬。

用 SDS-PAGE 检测上清层、中间层的蛋白; 用 CO 差示光谱法测量上清层、中间浑浊层、沉淀中 CYP 的含量。然后将上清层和中间层一起在 4 °C 下 1.0 × 10<sup>5</sup> r/min 的转速超速离心 90 min, 使得溶液中的膜组分沉淀下来; 膜沉淀用 3 mL spheroplast buffer 重悬并用 Triton X-100 溶解处理<sup>[10]</sup>。

### 1.5 CYP450 707A3 的 CO 差示光谱测定

CYP6A1 含量按 Omura 和 Sato 分光光度法测定<sup>[11]</sup>。在石英比色皿中加入 1.5 mL P450 测定液和 50  $\mu$ L 连二亚硫酸钠, 混匀, 1 min 后紫外分光光度仪上扫描基线。加入待测样品 60 ~ 300  $\mu$ L 后混匀, 通入 CO 约 2 min, 稳定 1 min 后于 400 ~ 500 nm 内扫描, 得还原型细胞色素 P450-CO 复合物的吸收光谱图。记录 450 nm 和 490 nm 处吸收值, 按以下公式计算 P450 含量。

$$m_{P450}(\text{nmol/g}) = \frac{(\Delta A_{450\text{nm}} - \Delta A_{490\text{nm}}) \times 1000}{91 \times \text{蛋白质浓度}(\text{mg/mL})}$$

## 2 结果及分析

### 2.1 cDNA 文库的构建

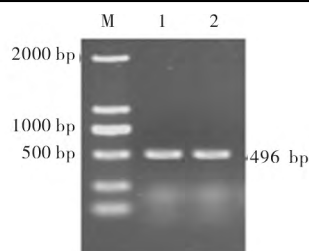
Trizol 法提取得到 2 管总 RNA 样品, 利用微量分光光度计测定其浓度和纯度, 结果如表 1。提取的样品 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.7 ~ 2.0 范围内, 说明其纯度

较高,230 nm、260 nm 和 280 nm 吸光值的比值接近 1:2:1. RNA 反转录扩增得到 cDNA 作为模板,用内参 3-磷酸甘油醛脱氢酶 *GAPDH* 引物扩增检测(图 1),500 bp 处的条带即为 *GAPDH*,表明所得 cDNA 可用于后续实验.

表 1 RNA 浓度的测定

Tab.1 The concentration of RNA

样品	浓度/(ng/ $\mu$ L)	$A_{260}$	$A_{280}$	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
1	750.5	18.762	8.594	2.18	2.04
2	487.7	12.192	5.593	1.82	1.82

M) DL2000 marker; 1 2) 内参 *GAPDH* PCR 扩增检测结果图 1 内参 *GAPDH* 检测 cDNA 质量Fig. 1 Identification of cDNA by *GAPDH* PCR

## 2.2 pCW-*cyp707a3* 载体构建

构建的 pCW-*cyp707a3* 载体用引物 F 和 R 做 PCR 鉴定,然后用 *Nde* I 内切酶和 *Hind* III 内切酶做双酶切鉴定(图 2),其中 *Hind* III 为部分酶切.*cyp707a3* 基因为 1392 bp. 测序结果经比对显示正确无突变.

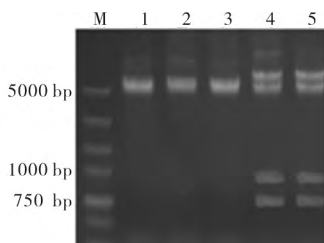
M) DL5000; 1~3) 为 PCW 空载体双酶切; 4~5) pCW-*cyp707a3* 重组质粒双酶切鉴定图

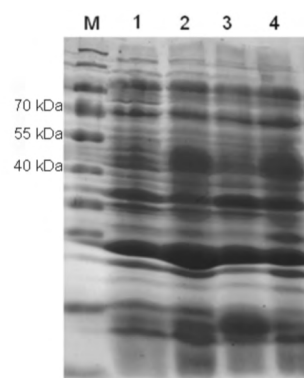
图 2 重组质粒鉴定图

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid

## 2.3 原核蛋白诱导表达

在 1 mmol/L IPTG、26  $^{\circ}$ C、24 h 条件下诱导蛋白 CYP707A3 的表达,通过 SDS-PAGE 电泳检测,转基因大肠杆菌表达的蛋白与对照组(空载体)蛋白相比,可明显看到目的蛋白 CYP707A3 的表达.与目的蛋白理论预测 52 kDa 大小相符(图 3).

用 CO 差异光谱法测定 CYP707A3 蛋白含量(图 4).在 400~500 nm 扫描其最大吸收波长.空载体的差示光谱存在  $OD_{416}$  的吸收峰,这是大肠杆菌内源蛋白 cytochrome - O 蛋白;变性后的 CYP 吸



M) 蛋白质 marker; 1) 重组菌沉淀; 2) 重组菌中间浑浊层;

3) 空载体菌体破碎上清; 4) 重组菌上清层

图 3 诱导表达蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 Characterization of the expression of recombinant P450 707A3 by SDS-PAGE

收峰会移至  $OD_{420}$ ,且完全遮蔽  $OD_{416}$  峰<sup>[12]</sup>.由图 4 可见,目的蛋白多数定位于中间浑浊层,即大肠杆菌膜结构区.通过计算可知,每 1 L 培养基可以得到 0.427 nmol 的 CYP707A3,且其中 82.3% 即 0.352 nmol 的蛋白位于膜结构区(表 2).

表 2 每升培养基中 CYP707A3 的产量

Tab.2 The yield of CYP707A3 harvested from medium

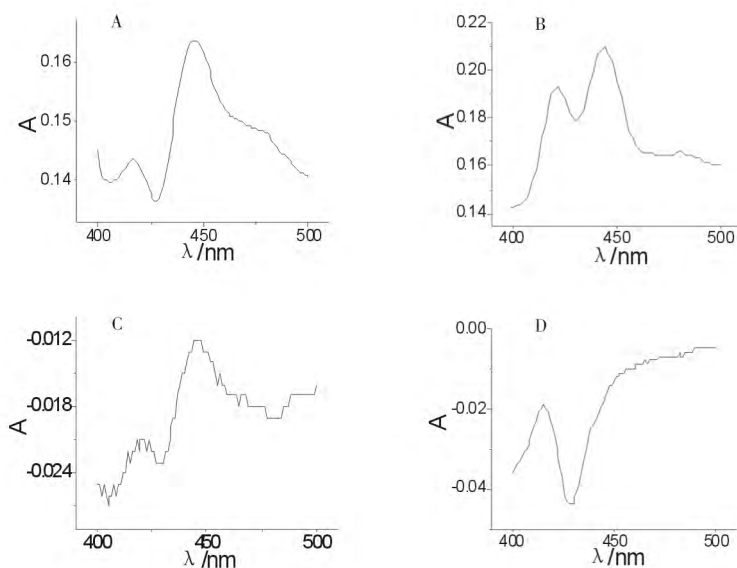
样品来源	$\Delta A$	总蛋白中 CYP 含量 (nmol/g)	产量 (nmol/L)
上清层	0.021	0.140491	0.051282
中间浑浊层	0.048	0.25996	0.351648
沉淀重悬液	0.005	0.04139	0.02442

## 3 结语

本实验成功将拟南芥叶片提取得到的 *cyp707a3* 基因转入到大肠杆菌 Rosseta 菌株并大量表达 CYP707A3 蛋白.实验结果表明,目的蛋白成功地进行了原核表达并得到了有活性的酶蛋白.本实验发现 CYP707A3 蛋白非常容易变性或降解,因而其表达对于温度的要求非常高. CYP707A3 蛋白变性在 CO 差示光谱上显示为峰从  $OD_{446}$  移至  $OD_{420}$ ,使用 DTT/ $\beta$ -ME/半胱氨酸等进行复性确实会使  $OD_{420}$  有所下降<sup>[12]</sup>,但  $OD_{446}$  几乎没有上升.生物信息学分析表明此蛋白本身定位于拟南芥膜结构上;去除 N 端 25 个氨基酸会导致蛋白破碎上清和沉淀中均无法检测到细胞色素 P450 成分,因而可以判断 N 端信号肽序列和膜结构对于该蛋白的表达是必须的,其具体机制还有待探索.

本实验所得到的 CYP707A3 蛋白将来可以用于

制作生物传感器以用于检测脱落酸.



A) 重组菌上清; B) 重组菌中间浑浊层; C) 重组菌沉淀; D) 空载上清

图4 重组菌表达的 CYP707A3 CO 差示光谱图

Fig.4 CO-difference spectra of CYP707A3 in recombinant *E. coli* cells

#### 参 考 文 献

- [1] 白玉,杜甫佑,刘虎威. 植物激素检测技术研究进展[J]. 生命科学, 2010(1): 36-44.
- [2] 李巍,莫瑾,萧浪涛. 生物传感器在植物激素测定中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(8): 24-28.
- [3] 穆琳瑛,王满苹,王顺,等. 光学表面等离子共振生物传感器检测脱落酸的试验研究[J]. 河南农业大学学报, 2014(1): 75-79.
- [4] Wu Y, Liu X, Zhang L, et al. An amperometric biosensor based on rat cytochrome p450 1A1 for benzo [a] pyrene determination [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2011, 26(5): 2177-82.
- [5] 贺丽虹,赵淑娟,胡之璧. 植物细胞色素 P450 基因与功能研究进展[J]. 药物生物技术, 2008, 15(2): 142-147.
- [6] Ohigashi H. Arabidopsis CYP707As Encode (+)-Abscisic Acid 8'-Hydroxylase, a Key Enzyme in the Oxidative Catabolism of Abscisic Acid [J]. Plant Physiology, 2004, 134(134): 1439-1449.
- [7] Zheng Y, Huang Y, Xian W, et al. Identification and expression analysis of the Glycine max CYP707A gene family in response to drought and salt stresses [J]. Annals of Botany, 2012, 110(3): 743-756.
- [8] 李茜茜,汪晓峰. ABA 分解代谢及其代谢关键酶-8-羟化酶[J]. 广西植物, 2009, 29(3): 353-359.
- [9] 吴云华,杨帆. 重组家蝇细胞色素 P450 6A1 的大肠杆菌对艾氏剂的生物降解作用[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2012, 31(2): 29-32.
- [10] Phillips I R, Shephard E A, Montellano P R O D. Cytochrome P450 Protocols [M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2013.
- [11] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature [J]. Journal of Biological Chemistry, 1964, 239(7): 2370-2378.
- [12] Yu C, Gunsalus I C, Katagiri M, et al. Cytochrome P-450cam [J]. Journal of Biological Chemistry, 1974, 249(2): 94-101.