

水稻基因 *ST1* 的克隆及原核表达

覃永华 沙干明 金丁烨

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

摘要 指出了基因 *ST1* 是决定水稻柱头和花柱形成的关键基因, 属于水稻中的 *XHS* 基因家族. 将 *ST1* 的全长 cDNA 序列构建到原核表达载体 pET-28a 中, 并转化了表达菌株大肠杆菌 BL21. 经 Western blot 验证表明: 所表达 80 kD 蛋白即为目的蛋白, 为后续蛋白功能等研究提供了实验基础.

关键词 水稻; *ST1* 基因; 原核表达; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 蛋白免疫印记

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2017)02-0035-03

Cloning and Prokaryotic Expression of Rice Gene *ST1*

Qin Yonghua, Sha Gan Ming, Jin Ding Ye

(Hubei Province Key Laboratory for the Plant Germplasm Conservation and Utilization of Wuling Mountainous Area, Key Laboratory for Biotechnology of National Commission for Nationalities, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

Abstract Rice gene *ST1*, a member of *XHS* family, is a key gene in development of rice stigma and style. In this paper, prokaryotic expression vector pET-28a with full-length cDNA of gene *ST1* was constructed and transformed into expression strain *E. coli* BL21. One 80 kD protein was expressed in *E. coli* and identified to be *ST1* protein by Western blot with GST antibody. The results provide important preparation for *ST1* antibody and further research for molecular mechanism of *ST1* in development of rice stigma and style in protein level.

Keywords rice; *ST1* gene; prokaryotic expression; SDS-PAGE; Western blot

XHS 基因是植物中特有的基因^[1], 在其他的物种中尚未发现. 目前仅从大豆、拟南芥及水稻 3 种植物中完整地分离出 *XHS* 基因^[2]. 逆境胁迫后组织表达谱分析发现, 多数水稻 *OXHS* 基因在受干旱、盐、冷、ABA 等多种胁迫后显著诱导^[3], 并在幼穗各发育时期和雄蕊、雌蕊等花器官中表达最强, 表明 *OXHS* 基因在水稻幼穗发育和逆境中具有重要的功能.

ST1 蛋白属于水稻 *OXHS* 家族, 是一个典型的 *XHS* 蛋白, 编码 700 个氨基酸, 含有保守的 XH、XS、Zf-XS 以及 Coiled-Coil 4 个结构域^[2]. 前期研究发现水稻 *ST1* 蛋白在水稻雌蕊发育中发挥着重要作用, 缺失 *ST1* 导致水稻雌蕊发育严重退化.

本实验通过构建 *ST1* 的原核表达载体并转化大肠杆菌 BL21 菌株, 诱导表达 *ST1* 蛋白为后续 *ST1*

的抗体制备以及深入研究 *ST1* 的调控网络提供重要基础.

1 材料与方法

1.1 材料

日本晴水稻幼苗、大肠杆菌 DH5 α 、大肠杆菌 BL21、原核表达载体 pET-28a.

1.2 试剂

ReverTra Ace- α 高效反转录试剂盒、及凝胶回收试剂盒(Axygen)、rTaq 酶、Not I 和 Sal I 限制性内切酶以及 T4 连接酶(Takara).

1.3 *ST1* 全长 cDNA 序列的扩增

1.3.1 水稻幼叶总 RNA 提取和 cDNA 合成

使用 Trizol 试剂盒(Thermo Scientific 公司)提

收稿日期 2017-03-31

作者简介 覃永华(1979-) 男, 副教授, 博士, 研究方向: 水稻逆境分子生物学, E-mail: qinyonghua@mail.scuec.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金青年基金资助项目(31201091), 中央高校专项重点项目(CZZ17005)

取水稻幼叶总 RNA. 取 3 μg 总 RNA, 利用反转录试剂盒 ReverTra Ace- α (TOYOBO 公司) 得到水稻幼叶 cDNA.

1.3.2 *STI* 的全长 cDNA 序列的扩增

利用特异引物 F: 5' SalI taaGTCGAC TGAGTTACAAGAGGCCAGA3' /R: 5' NotI taaGCGGCCGC ATACCTAGCACCAATACCCA3', 以水稻幼叶 cDNA 为模板, PCR 扩增目的片段. PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min; 循环程序 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min. 纯化回收 PCR 产物, 连入中间载体 pGEM-T, 测序验证鉴定^[4].

1.4 构建重组表达载体

利用 Sal I 和 Not I 酶切载体 pET28a, 电泳检测后切胶回收对应大小的载体片段, 使用 T4 DNA 连接酶连接外源片段与载体, 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接. 重组质粒热激转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆提取质粒, 使用 PCR 和酶切法检测重组载体^[5-6].

1.5 融合蛋白的诱导表达

将 pET28a-*STI* 重组质粒转入大肠杆菌 BL21 中, 涂布 1:1000 的 Amp 抗性的 LB 固体培养基, 挑取单菌落至含有 2 mL LB 的试管内, 37 $^{\circ}\text{C}$, 180 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀ 到 0.6 左右, 加入 IPTG 至终浓度为 0.2 mmol/L, 在 15 $^{\circ}\text{C}$ 的培养温度下, 分别诱导培养 6、8、12、20 h 后, 收集菌体, 同时以 pET-30a 空载体作为阴性对照^[7-9].

1.6 融合蛋白的检测

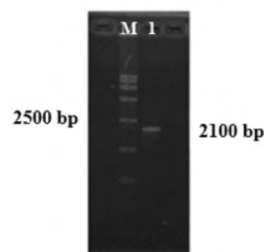
收集菌体, 弃上清. 使用 2 mL PBS 缓冲液重悬菌体细胞, 超声波破碎细胞. 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 r/min 离心 20 min, 分别收集蛋白质上清和沉淀, SDS-PAGE 电泳检测^[10].

电泳结束后, 将另一侧凝胶取出, 用半干法^[11]将蛋白样品转入 NC 膜中. 于 50 mL 封闭液中, 脱色摇床封闭 1 h. 转入杂交袋中, 加入 1:1000 的一抗杂交液, 脱色摇床 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用 TBST 洗膜 1 次, 再用 TBS 洗膜 2 次, 每次 10 min. 加入带有 His 标签的二抗, 25 $^{\circ}\text{C}$ 杂交箱中杂交 1 h, 用 TBST 洗膜 1 次, 再用 TBS 洗膜 2 次, 每次 10 min, 洗脱背景. 杂交结束后, 将滤膜置于凝胶成像仪内, 避光均匀滴加 1 mL ECLA 和 ECLB 的 1:1 混合液, 避光反应 2~3 min 后, 曝光检测化学发光信号^[12].

2 结果与分析

2.1 目的基因片段的获取

目的基因 *STI* 片段经电泳检测, 结果如图 1 所示, 片段长度约为 2100 bp, 与目的基因片段理论长度一致. 外源片段连入中间载体 pMD18-T, 经测序验证序列与目的基因 *STI* 完全一致.



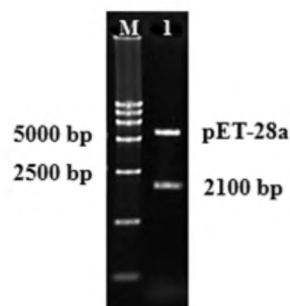
M) DL 15000; 1) 目的片段

图 1 目的片段 *STI* 的扩增

Fig. 1 Amplification of the target fragment *STI*

2.2 重组载体的构建

构建载体热激转化培养, 挑单克隆在 Kan 抗性的 LB 培养液中过夜培养, 提取质粒, 经酶切检测得到阳性质粒(图 2), 经测序验证序列与目的基因 *STI* 完全一致, 证明载体构建成功.



M) DL 15000; 1) 阳性质粒的酶切检测

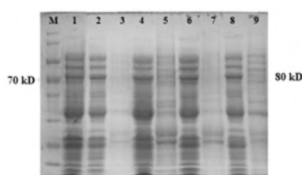
图 2 阳性质粒的酶切检测

Fig. 2 Detection of positive plasmids

2.3 *STI* 蛋白的诱导表达和鉴定

活化表达重组菌, 分别经过 0.2 mmol/L IPTG 的诱导 6、8、12、20 h 后, 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测发现(图 3) 相比对照, 各诱导表达 *STI* 蛋白的条带并没有观察到明显的目的条带, 无法判断 *STI* 蛋白是否表达. 进一步通过 His 标签抗体, 利用 Western blot 鉴定 *STI* 是否真实表达(图 4). 各诱导表达条件下在 80 kD 处均能观察到单一的条带, 与预期蛋白大小一致, 同时发现沉淀中融合蛋白比上清中的

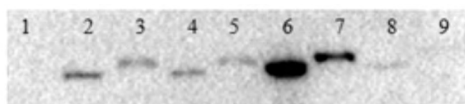
中的略大. 随着培养时间的增加, 融合蛋白的表达呈现先上升后下降, 在 12 h 时有最高的表达量. 实验结果表明目的蛋白在大肠杆菌中通过不同浓度的 IPTG 的诱导均能表达. 在 SDS-PAGE 胶观察不明显可能是由于 80 kD 处内源蛋白的干扰, 无法通过肉眼观察到.



1) 空载体 pET-28a; 2) 6 h 上清; 3) 6 h 沉淀; 4) 8 h 上清;
5) 8 h 沉淀; 6) 12 h 上清; 7) 12 h 沉淀; 8) 20 h 上清; 9) 20 h 沉淀

图3 蛋白 *ST1* 在大肠杆菌中的诱导表达

Fig. 3 Inducible expression of protein *ST1* in *E. coli*



1) 空载体 pET-28a; 2) 6 h 上清; 3) 6 h 沉淀; 4) 8 h 上清;
5) 8 h 沉淀; 6) 12 h 上清; 7) 12 h 沉淀; 8) 20 h 上清; 9) 20 h 沉淀

图4 Western blot 鉴定结果图

Fig. 4 Results of Western blot identification

3 讨论

ST1 基因是水稻 *XHS* 家族的典型保守成员, 生物信息学分析显示 *ST1* 蛋白是一个核蛋白. 前期研究发现 *ST1* 是参与水稻雌蕊发育的关键调控因子, 但其具体作用机制仍不太清楚.

本实验发现在 15 °C、12 h、IPTG 浓度为 0.2 mmol/L 的条件下, *ST1* 蛋白在重组菌的表达量最高. 且上清液中蛋白的表达量高于沉淀的表达量, 由此可以推测 *ST1* 蛋白为可溶性蛋白质^[13].

值得关注的是, Western blot 检测结果发现上清和沉淀中表达的目的融合蛋白分子量大小存在差异, 沉淀中表达蛋白的分子量比上清中的蛋白分子量要大, 推测其原因应该是由蛋白表达定位不同, 在细胞内不同区域的蛋白由于在翻译的过程中处于不同的环境, 所以表达的产物会有不同的修饰过程, 或特定的氨基酸序列的剪切, 导致最终表达蛋白大小存在差异^[14].

本次实验成功表达出所需的蛋白 *ST1*, 为后续大量表达与纯化、抗体的制备, 以及蛋白的功能研究提供了实验基础.

参 考 文 献

- [1] 陈红梅. 大豆 *XHS* 基因家族生物信息学分析 [J]. 大豆科学, 2015, 34(3): 384-388.
- [2] Qin Y, Ye H, Ning T, et al. Systematic identification of X1-homologous genes reveals a family involved in stress responses in rice [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 71(4): 483-496.
- [3] Zhang Z, Chen Y, Zhao D, et al. X1-homologous genes family as central components in biotic and abiotic stresses response in maize (*Zea mays* L.) [J]. Functional & Integrative Genomics, 2014, 14(1): 101-110.
- [4] 王宁, 谷守芹, 范永山, 等. 玉米大斑病菌 *STK1* 原核表达载体的构建及其表达 [J]. 中国农业科学, 2010, 34(18): 3876-3881.
- [5] 姚国新, 卢磊. 水稻粒重基因定位克隆研究 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(27): 8468-8478.
- [6] 丁勇, 常玮, 刘小焯. 甘蓝型油菜 *BnClol* 基因克隆、表达载体的构建及原核表达 [J]. 中国农业科学, 2010, 34(2): 10-15.
- [7] 周佳平. 绿竹及拟南芥 *SEP3* 蛋白原核表达、纯化及寡聚体分析 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2013.
- [8] 张国辉, 仵均祥. 梨小食心虫普通气味结合蛋白 2 (*GmolGoBP2*) cDNA 的克隆与原核表达 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(6): 111-115.
- [9] 郑丽洁, 林军, 黄先忠. 小拟南芥双键还原酶基因 *OPDBR* 的克隆及表达分析 [J]. 石河子大学学报(自然科学版) 2015(2): 251-258.
- [10] 邵吉民, 郑树, 耿礼仪. 大肠癌相关基因 *ST13* 的原核表达及鉴定 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2001, 30(6): 252-255.
- [11] 戈林泉, 周国鑫, 王祺, 等. 水稻 β -石竹烯合成酶基因 *OsCAS* 的克隆鉴定、原核表达及其遗传转化 [J]. 浙江大学学报(自然科学版), 2009, 35(4): 365-371.
- [12] 吴云华, 肖虔. 重组拟南芥细胞色素 P450 707A3 在大肠杆菌中的原核表达 [J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2017(1): 28-31.
- [13] 刘新琼, 徐玮玉, 刘早利, 等. 水稻 *OsAAA1* 蛋白的原核表达载体构建及其可溶性表达研究 [J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2015(2): 18-22.
- [14] 李双红, 谌鑫, 程钢, 等. 水稻可溶性 *OsVDAC5* 蛋白的外源表达及鉴定 [J]. 湖北农业科学, 2016(11): 2921-2925.