

网络出版时间:2020-01-14 17:04 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2020.07.016
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200114.1125.032.html

拟南芥乙烯应答基因 *HLS1* 的原核表达及多克隆抗体制备

郭佳, 郁品泽, 贾敏, 郁飞

(西北农林科技大学 生命科学学院/旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】制备乙烯应答基因 *HLS1* 多克隆抗体, 在过表达植物中检测 *HLS1* 的积累, 为深入研究 *HLS1* 响应乙烯信号通路的分子机制奠定基础。【方法】构建 pET28a-*HLS1c* 原核表达载体, 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导获得重组蛋白 *HLS1c*-His; 镍柱亲和和纯化重组蛋白后免疫家兔获得抗 *HLS1* 血清, 利用抗原亲和和纯化抗血清获得高纯度的 *HLS1* 多克隆抗体; 用 *HLS1* 抗体和 GFP 抗体, 检测原生质体瞬时转化体系中 GFP-*HLS1c* 融合蛋白的表达; 用农杆菌蘸花法获得过表达 GFP-*HLS1g* 的转基因植物, 用 *HLS1* 抗体和 GFP 抗体检测 GFP-*HLS1g* 融合蛋白的表达。【结果】成功构建了原核表达载体 pET28a-*HLS1c*, 并在大肠杆菌系统中诱导获得重组蛋白 *HLS1c*-His, 且多以包涵体形式存在。纯化的 *HLS1c*-His 多克隆抗体, 能清晰检测到约 80 ng 原核表达的 *HLS1* 抗原。纯化的 *HLS1* 抗体不仅能检测到原生质体中瞬时表达的 GFP-*HLS1c* 融合蛋白, 也能检测到过表达转基因植物株系中的 GFP-*HLS1g* 融合蛋白, 并且与标签蛋白 GFP 对应抗体所检测到的特异性条带大小一致。【结论】成功制备了拟南芥 *HLS1* 蛋白多克隆抗体, 为 *HLS1* 蛋白在植物发育中的功能研究奠定了基础。

[关键词] 乙烯应答基因; 拟南芥; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体

[中图分类号] Q943.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2020)07-0141-07

Prokaryotic expression and polyclonal antibodies preparation of ethylene response gene *HLS1* in *Arabidopsis*

GUO Jia, YU Pinze, JIA Min, YU Fei

(State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The *HLS1* polyclonal antibodies were prepared and the accumulation of *HLS1* in *HLS1* overexpression plants was detected to understand the molecular mechanism of *HLS1* in response to ethylene signaling pathway. 【Method】The prokaryotic expression vector pET28a-*HLS1c* was constructed, followed by transformation into BL21 (DE3) *E. coli*. After IPTG induction, *HLS1c*-His was purified via Nickel affinity chromatography. *HLS1c*-His antiserum was obtained by immunization of rabbits. After affinity purification of antibody, the accumulation of *HLS1* was identified by *HLS1* antibody in transgenic plants. The expression of fusion protein GFP-*HLS1c* was detected using *HLS1* antibody and GFP antibody through protoplast transient transformation system. 【Result】The prokaryotic expression vector pET28a-*HLS1c* was constructed successfully and the induced recombinant protein *HLS1c*-His was obtained in *E. coli* system mostly as inclusion body. Purified *HLS1* antibody clearly detected about 80 ng prokaryotic expressed *HLS1* antigen. Purified *HLS1* antibody did not only detect the expression of GFP-*HLS1c* in protoplast sys-

[收稿日期] 2019-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31300988)

[作者简介] 郭佳(1993-), 女, 山西忻州人, 硕士, 主要从事植物分子遗传学研究。E-mail: 550769120@qq.com

[通信作者] 郁飞(1975-), 男, 江苏太仓人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物分子遗传学研究。E-mail: flyfeiyu@gmail.com

tem, but detected GFP-HLS1g in transgenic lines, and the same specific bands were detected by GFP antibody. 【Conclusion】 The specific antibody against HLS1 protein was prepared successfully in *Arabidopsis*.

Key words: gene responding to ethylene; *Arabidopsis*; prokaryotic expression; protein purification; polyclonal antibody

植物生长过程中需要通过改变自身的生长状况来应对环境的改变,尤其在幼苗时期会对光照、重力和外在的胁迫做出响应^[1]。植物在黑暗中萌发时,下胚轴会形成顶端弯钩来保护植物子叶和顶尖脆弱的分生组织冲破土壤,这是由于下胚轴内外侧细胞生长速率不同形成的^[2]。植物激素生长素和乙烯在豌豆顶端弯钩形成过程中起重要协调作用,但生长素和乙烯合成前体在顶端弯钩结构中的分布并不均匀^[3]。生长素可以刺激细胞生长和下胚轴伸长,生长素或乙烯信号通路受到抑制的拟南芥突变体呈现出顶端弯钩生长发育迟缓的现象,相反,施加外源乙烯或激发乙烯信号通路会导致顶端弯钩结构发生过度弯曲现象^[4]。*HLS1* 基因是一个乙烯应答基因,其编码蛋白与植物 N-乙酰转移酶序列相似。乙烯通过激活转录因子 EIN3/EIN1 (ethylene-insensitive3/1) 来促进 *HLS1* 在转录和蛋白水平的表达,最终促进顶端弯钩的形成^[5]。即使在施加外源乙烯的条件下,*HLS1* 功能缺失突变体 *hls1* 也不能形成顶端弯钩结构^[6],过表达 *HLS1* 植物顶端弯钩加剧,表明 *HLS1* 在顶端弯钩发育的调控网络中具有至关重要的地位。

本研究对拟南芥 *HLS1* 基因的 cDNA 序列全长进行克隆和原核表达,获得重组蛋白 *HLS1c*-His,制备拟南芥 *HLS1* 多克隆抗体,检测 *HLS1* 蛋白在下胚轴顶端弯钩形成过程中的表达以及不同激素和环境胁迫对 *HLS1* 蛋白稳定性的影响,以期对 *HLS1* 的生物学功能研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

1.1.1 植物、菌株和载体 拟南芥野生型植株 *Columbia* (Col)、*hls1-1*、原核表达载体 pET28a、pUC18-GFP、pBI-GFP 和大肠杆菌 Top10 以及 BL21(DE3) 均由西北农林科技大学旱区作物逆境生物学国家重点实验室保存。

1.1.2 主要试剂 高保真 DNA 聚合酶 Prime Star、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、GFP 抗体等,均购自 TaKaRa 公司;DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒,购自天根生化科技公司;大提质粒试剂

盒,购自 ZYMO Research;弗氏不完全佐剂和弗氏完全佐剂,购自 Sigma 公司;蛋白免疫印迹化学发光试剂盒,购自 Bio-Rad 公司;His 标签蛋白纯化填充柱 Ni Sepharose 6 Fast Flow、0.45 μm 硝酸纤维素膜,购自 GE Healthcare Life Science;HRP 标记的羊抗兔抗体 IgG,购自北京康为世纪生物科技公司;Trizol 试剂,购自 Invitrogen;反转录试剂盒,购自 NEB;1/2 MS 培养基,购自 PhytoTechnology Laboratories。

1.2 原核表达载体 pET28a-HLS1c 的构建

1.2.1 拟南芥 *HLS1* 基因 CDS 的扩增 从拟南芥官方网站 TAIR (The Arabidopsis Information Resource) 获得拟南芥 *HLS1* 基因序列,设计引物 *HLS1* Nco I F (CATCCATGGGCATGACGGTGGTTAGAGAGTAC) 和 *HLS1* Xho I R (CATCTCGAGAAATTCTCTAGGGTCTACAAA);用 Trizol 法提取 1 周龄野生型拟南芥叶片总 RNA,经反转录得到 cDNA,再以 cDNA 为模板,利用高保真 DNA 聚合酶 Prime Star 进行 PCR 扩增得到 *HLS1* 基因的 CDS 全长序列 (*HLS1c*),琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并割胶纯化回收目的片段。

1.2.2 重组质粒 pET28a-HLS1c 的构建 用 *Nco* I 和 *Xho* I 将 *HLS1c* 和原核表达载体 pET28a 水浴酶切后,回收片段与载体;片段与载体以 3:1 的比例连接,将片段、载体、T4 DNA 连接酶以及 T4 连接酶反应液混合均匀进行连接反应;将连接后产物通过热激法转入大肠杆菌 Top10,利用含卡那霉素的培养基筛选出阳性单克隆菌落,提取质粒并酶切鉴定。测序正确后,获得原核表达载体 pET28a-HLS1c。

1.3 重组蛋白 *HLS1c*-His 的表达与纯化

1.3.1 *HLS1c*-His 蛋白的诱导 将原核表达载体 pET28a-HLS1c 转化入大肠杆菌 BL21(DE3),挑取阳性克隆菌株接种到含 50 mg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基上,培养至菌生长至对数期,加入终浓度为 1 mmol/L 的诱导剂异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG),于 37 °C 诱导表达 4 h 后收集菌液并离心,用裂解缓冲液 Lysis Buffer (50 mmol/L NaH₂PO₄, pH 8.0; 300 mmol/L NaCl; 10 mmol/L 咪唑) 重悬

菌体;超声破碎菌体并收集沉淀,用 Lysis Buffer 重悬沉淀;通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测重组蛋白 HLS1c-His 的表达形式,同时通过重组 HLS1c-His 蛋白 C 端的 His 标签进行蛋白免疫印迹检测;电泳结束后转 NitroCellulose(NC)膜,丽春红对膜瞬时染色,之后用 $1 \times$ TBST (20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 150 mmol/L NaCl; 体积分数 0.1% 的 Tween-20) 洗去颜色,牛奶封闭液 (含质量分数 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液) 封闭 1 h,加入封闭液稀释的一抗 Anti-His (1:5 000) 4°C 过夜孵育;次日,用 $1 \times$ TBST 洗膜 3 次,再加入用封闭液稀释的二抗 G&M (1:10 000),室温孵育 1 h 后再用 $1 \times$ TBST 洗膜 3 次, $1 \times$ TBS (20 mmol/L Tris, pH 7.4; 500 mmol/L NaCl; 体积分数 0.05% 的 Tween-20) 洗膜 1 次,最后加入显色液,利用化学发光显色成像系统成像^[7]。

1.3.2 HLS1c-His 蛋白的扩大表达和纯化 初步诱导 HLS1c-His 成功后,相同条件下扩大表达蛋白;将菌体超声破碎后的沉淀重悬到 50 mL 含 20 mmol/L 咪唑的 Buffer B (100 mmol/L NaH_2PO_4 ; 10 mmol/L Tris; 8 mol/L Urea, pH 8.0) 中,室温旋转裂解包涵体 1 h^[8],收集上清并用 $0.45 \mu\text{m}$ 滤膜过滤;过滤后的上清与镍柱混合,室温孵育 1 h;之后,将镍柱转移至重力柱,分别用 20 mL Buffer B (加 20 mmol/L 咪唑) 和 5 mL Buffer B (加 250 mmol/L 咪唑) 洗涤,之后收集蛋白进行 SDS-PAGE 割胶纯化,并以牛血清蛋白 BSA 为对照,质量浓度梯度设为 1.0, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL,估计纯化后蛋白的质量浓度。

1.4 HLS1 多克隆抗体的制备和纯化

1.4.1 抗体的制备 以纯化后的重组蛋白 HLS1c-His 为抗原,免疫 4 次家兔制备抗血清^[9];第 1 次免疫剂量为 200 μg /只,将重组蛋白与弗氏完全佐剂^[10]等体积混合,于背部皮下注射家兔;之后每隔 2 周加强免疫 1 次,免疫剂量为 100 μg /只,4 次免疫后采取家兔心脏血, 37°C 处理 1 h,凝血后放入 4°C 冰箱过夜;次日,离心收集血清于 -20°C 保存^[11]。

1.4.2 抗体的纯化 取 0.8 mg 纯化的 HLS1c-His 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后转膜,丽春红染色液瞬时染色后切下红色区域并用 TBST 洗膜至红色褪去;将膜用 Glycine 溶液洗脱后,牛奶封闭 1 h;之后将膜切成约 2 mm^2 的小方块,装入含有 HLS1c-His 抗血清的离心管中, 4°C 竖直摇床过夜孵育;次日, TBS 和 PBS 分别洗膜 3 次后加入 500 μL Glycine,振荡孵育 10 min,吸上清于离心管中并

加入 50 μL 1 mol/L Tris-HCl (pH = 8.0), 于 -20°C 保存。分别吸取 0.8, 8, 80 ng 纯化后的 HLS1c-His 蛋白,以纯化后抗体 Anti-HLS1 (1:1 000 和 1:5 000) 为一抗、G&R (1:1 0000) 为二抗进行蛋白质免疫印迹检测。

1.5 HLS1 多克隆抗体的特异性检测

1.5.1 HLS1 过表达植物株系的获得 (1) 构建二元表达载体 pBI-GFP-HLS1g。用 CTAB 方法提取 2 周龄野生型拟南芥 Col 叶片 gDNA,以提取的 gDNA 为模板,设计引物 *HLS1 Xho I F* (CATCTC-GAGAATGACGGTGGTTAGAGAGTAC) 和 *HLS1 Sac I R* (CATGAGCTCAACATCAAGTGGTTA-ATAGAG),方法同 1.2.2 节。先将 *HLS1* 基因的 gDNA (HLS1g) 片段连接至高拷贝载体 pUC18-GFP,测序成功后通过酶切法将目的片段连接到二元载体 pBI-GFP (含 35S 启动子和 NOS 终止子) 上,得到载体 pBI-GFP-HLS1g。

(2) 转基因植物的获得。将二元表达载体 pBI-GFP-HLS1g 电转入 GV3101 农杆菌感受态中,通过卡那霉素和庆大霉素筛选出阳性克隆。扩大培养后收集菌体悬浮到蘸花液 (50 g/L 蔗糖、体积分数 0.05% 的 Silwet L-77) 中,通过农杆菌蘸花法获得转基因植物的 T_1 代混合种子。之后利用卡那霉素抗性对其进行筛选,将能够正常生长的绿色植物转移至基质土上进行培养,单株植株收取 T_2 代种子。

(3) 转基因植物的鉴定。取 20 个不同的 T_2 代种子,在 1/2 MS 培养基上于黑暗环境中培养,依据弯钩表型挑选植物,找到分离比最低的株系移栽至基质土上进行培养。提取转基因植物总 RNA,以反转录得到的 cDNA 为模板,以 *HLS1 Seq F* (CGCT-TACGTCTTGGGCCTTC) 和 *HLS1 Xba I R* (CAT-TCTAGAGTTTTGGTTCTTTCAGAGTG) 为引物进行扩增,并进行半定量检测。

1.5.2 拟南芥原生质体瞬时表达 HLS1 蛋白的检测 (1) pUC18-GFP-HLS1c 的构建。以 pET28a-HLS1c 为模板, *HLS1 Xho I F* 和 *HLS1 Sac I R* 为特异性引物进行 PCR 扩增,通过酶切法将扩增片段连接至载体,获得 pUC18-GFP-HLS1c。

(2) 原生质体瞬时转化 pUC18-GFP-HLS1c。选取 4~5 周龄野生型拟南芥植株叶片,切成细条状,加入到含有体积分数 1% Cellulase R10 和 0.2% Macerozyme R10 的酶解液 (20 mmol/L KCl, 20 mmol/L MES, 0.4 mol/L 甘露醇) 中, 22°C 黑暗酶解 3 h。加入 10 mL 预冷的 W5 溶液 (125 mmol/L

CaCl₂, 5 mmol/L KCl, 154 mmol/L NaCl, 2 mmol/L MES) 稀释酶解液, 用 75 μm 尼龙膜过滤至离心管中, 离心弃上清收集细胞并加入 MMg 溶液 (0.4 mol/L Mannitol, 4 mmol/L MES, 15 mmol/L MgCl₂), 使得细胞浓度约为 2 × 10⁵ mL⁻¹; 分别吸取 1 mL 原生质体于 3 个 15 mL 离心管中, 第 1 管为对照组不加质粒, 第 2 管和第 3 管分别加入 50 μL 高浓度质粒 pUC18-GFP、pUC18-GFP-HLS1c, 之后加入 PEG 溶液 (0.2 mmol/L Mannitol, 0.1 mmol/L CaCl₂, 质量分数 40% PEG4000), 室温反应 25 min。最后加入 4 mL W5 溶液终止反应, 充分混匀后离心, 弃上清; 加入 5 mL W5 溶液悬浮沉淀于培养皿中, 置摇床避光培养 9 h。

(3) 融合蛋白表达的 Anti-HLS1 和 Anti-GFP 检测。次日, 收集细胞后各加入 100 μL 蛋白提取液, 95 °C 加热 5 min。点样顺序为原生质体、GFP、GFP-HLS1c、GFP-HLS1c (重复), 上样量均为 10 μL, 进行蛋白免疫印迹检测, 一抗分别为 anti-GFP 和 anti-HLS1, 对应二抗分别为羊抗鼠 (G&M) 和羊抗兔 (G&R)。

1.5.3 转基因植物中 HLS1 蛋白的检测 取在 1/2 MS 培养基上光照生长 7 d 的野生型拟南芥 Col, *hls1-1* 和 *pBI-GFP-HLS1g* #1、#2 于 1.5 mL 离心管中, 提取植物总蛋白, 进行蛋白免疫印迹检测, 上样量为 20 μL, 所用抗体同 1.5.2 节。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *HLS1* 基因目的片段的扩增

Trizol 方法提取 2 周龄野生型拟南芥 Col 叶片总 RNA, 以 RNA 反转录的 cDNA 为模板, *HLS1* *Nco* I F 和 *HLS1* *Xho* I R 为引物, 扩增得到大小约 1 200 bp 的目的片段 *HLS1c* (图 1)。



M. DNA 分子量; 1, 2. PCR 扩增所得 *HLS1* CDS 片段
M. DNA ladder; 1, 2. Amplified *HLS1* CDS fragment

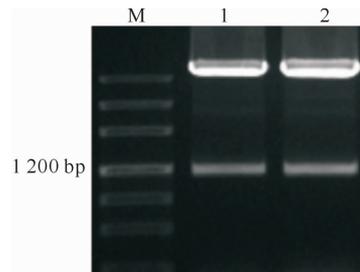
图 1 拟南芥 *HLS1* 基因 CDS 的扩增

Fig. 1 Amplification of *Arabidopsis HLS1* CDS

2.2 原核表达载体 pET28a-HLS1c 的鉴定

将目的片段 *HLS1c* 和原核表达载体 pET28a 经过 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切后进行连接, 提取阳性单克隆菌落的质粒, 经酶切验证发现有 1 200 bp 左右的目的片段和约 5 kb 的载体骨架, 对重组质粒

pET28a-HLS1c 进行测序, 测序结果与 TAIR 数据库中的 *HLS1* 编码框序列完全匹配, 表明原核表达载体 pET28a-HLS1c 构建成功 (图 2)。



M. DNA 分子量; 1, 2. pET28a-HLS1c 质粒 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切结果

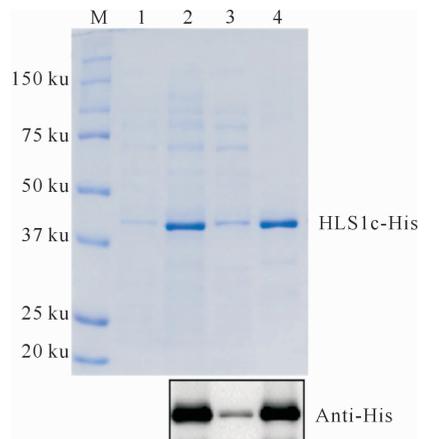
M. DNA ladder; 1, 2. pET28a-HLS1c digested by *Nco* I and *Xho* I

图 2 原核表达载体 pET28a-HLS1c 的鉴定

Fig. 2 Identification of pET28a-HLS1c

2.3 重组蛋白 *HLS1c*-His 的表达与纯化

将原核表达载体 pET28a-HLS1c 转入大肠杆菌表达菌株 BL21 (DE3), 图 3 显示, 与诱导前菌液相比, 诱导后菌液 37~50 ku 处有 1 条明显的蛋白条带。超声破碎诱导后菌液并进行 SDS-PAGE 检测, 发现该蛋白多存在于沉淀中, 表明该重组蛋白多以包涵体形式存在。经蛋白免疫印迹检测, 其可被 Anti-His 抗体识别, 表明重组蛋白 *HLS1c*-His 诱导表达成功。



M. 蛋白分子量; 1. BL21 (DE3)/pET28a-HLS1c 诱导前菌液;
2. BL21 (DE3)/pET28a-HLS1c 诱导后菌液; 3. 超声破碎后上清;
4. 超声破碎后沉淀

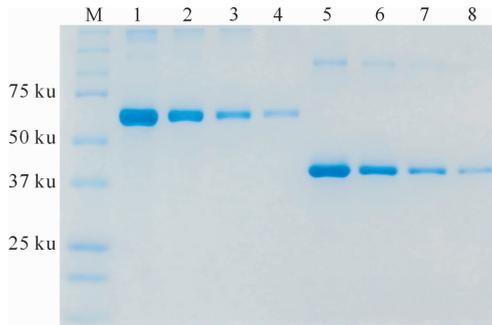
M. Protein Marker; 1. BL21 (DE3)/pET28a-HLS1c before induction;
2. BL21 (DE3)/pET28a-HLS1c after induction; 3. Supernatant after sonication; 4. Pellet after sonication

图 3 重组质粒 pET28a-HLS1c 的诱导表达

Fig. 3 Induced expression of pET28a-HLS1c

诱导蛋白扩大培养后进行 SDS-PAGE 割胶纯化, 并以质量浓度梯度分别 1.0, 0.5, 0.25, 0.125

mg/mL 的牛血清蛋白 BSA 为对照,估计所纯化 *HLS1* 蛋白的质量浓度为 0.8 mg/mL(图 4)。



M. 蛋白分子量;1~4. 1.0,0.5,0.25,0.125 mg/mL 牛血清白蛋白;
5~8. 10,5,2.5,1.25 μL 纯化后 *HLS1*

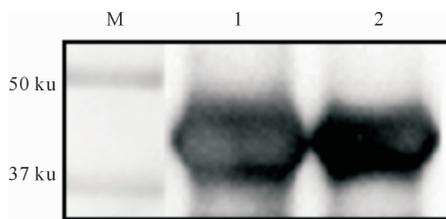
M. Protein Marker;1~4. 1.0,0.5,0.25,0.125 mg/mL BSA;
5~8. 10,5,2.5,1.25 μL purified *HLS1*

图 4 纯化 *HLS1* 蛋白的定量检测

Fig. 4 Quantification of purified *HLS1*

2.4 多克隆抗体 Anti-*HLS1* 的制备与验证

将纯化的重组蛋白 *HLS1c-His* 作为抗原 4 次免疫家兔制备抗血清,采取家兔心脏血,收集所制备血清于 -20 °C 保存。分别吸取 8 和 4 μg *HLS1c-His* 蛋白,以免抗血清(1:1 000)为一抗、G&R(1:10 000)为二抗进行蛋白免疫印迹检测,结果(图 5)显示,可以清晰检测到 *HLS1* 蛋白。



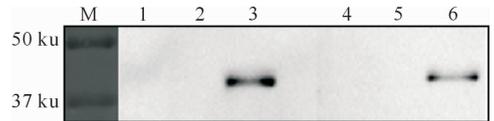
M. 蛋白分子量;1,2. 纯化后 *HLS1c-His* 抗原
M. Protein Marker;1,2. Purified *HLS1c-His* antigen

图 5 *HLS1* 抗血清对 *HLS1* 蛋白的检测

Fig. 5 Detection of *HLS1* with its antisera

2.5 多克隆抗体 Anti-*HLS1* 的纯化

将 *HLS1c-His* 蛋白目的条带切下并用 TBST 洗膜至红色褪去,将膜剪成小块与 *HLS1c-His* 抗血清杂交孵育 16 h;次日,Glycine 洗脱得到较纯净的多克隆抗体 Anti-*HLS1*,分别吸取 0.8,8,80 ng 纯化后的 *HLS1c-His* 蛋白,将抗体分别稀释 1 000 倍和 5 000 倍并进行蛋白免疫印迹检测,结果(图 6)表明,5 000 倍稀释后的抗体仍能清晰检测到约 80 ng 的 *HLS1* 蛋白。



M. 蛋白分子量;1~3. 0.8,8,80 ng 的 *HLS1c-His* 抗原,

1:1 000 稀释后的 *HLS1* 抗体;4~6. 0.8,8,80 ng 的 *HLS1c-His* 抗原,1:5 000 稀释后的 *HLS1* 抗体

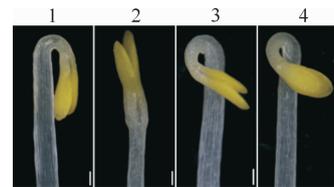
M. Protein Marker;1~3. 0.8,8,80 ng of *HLS1c-His* antigen,
1:1 000 dilution of *HLS1* antibody;4~6. 0.8,8,80 ng of
HLS1c-His antigen,1:5 000 dilution of *HLS1* antibody

图 6 *HLS1* 抗体对 *HLS1* 蛋白的检测

Fig. 6 Detection of *HLS1* with its antisera

2.6 *HLS1* 过表达拟南芥株系的获得

用农杆菌蘸花法获得过表达 *HLS1* 转基因植物株系 *pBI-GFP-HLS1g* #1 和 *pBI-GFP-HLS1g* #2。将 Col、*hls1-1* 和 *pBI-GFP-HLS1g* #1、#2 种植在 1/2MS 培养基上暗培养 3 d 后,由图 7 可知,与 Col 相比,*hls1-1* 顶端弯钩完全缺失,而转基因株系 *pBI-GFP-HLS1g* #1、#2 弯钩明显加重。



1. Col;2. *hls1-1*;3. *HLS1* 过表达植株 #1;

4. *HLS1* 过表达植株 #2

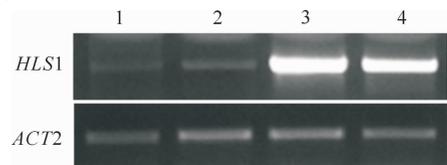
1. Col;2. *hls1-1*;3. *HLS1* overexpression line #1;

4. *HLS1* overexpression line #2

图 7 过表达 *HLS1* 拟南芥株系的顶端弯钩表型

Fig. 7 The apical hook phenotype of *HLS1* overexpression lines in *Arabidopsis*

提取以上植物的总 RNA,以反转得到的 cDNA 为模板进行半定量 RT-PCR 验证。验证结果(图 8)显示,与 Col 相比,转基因株系 *pBI-GFP-HLS1g* #1、#2 中,*HLS1* 在转录水平的表达量显著上调。



1. Col;2. *hls1-1*;3. *HLS1* 过表达植株 #1;

4. *HLS1* 过表达植株 #2

1. Col;2. *hls1-1*;3. *HLS1* overexpression line #1;

4. *HLS1* overexpression line #2

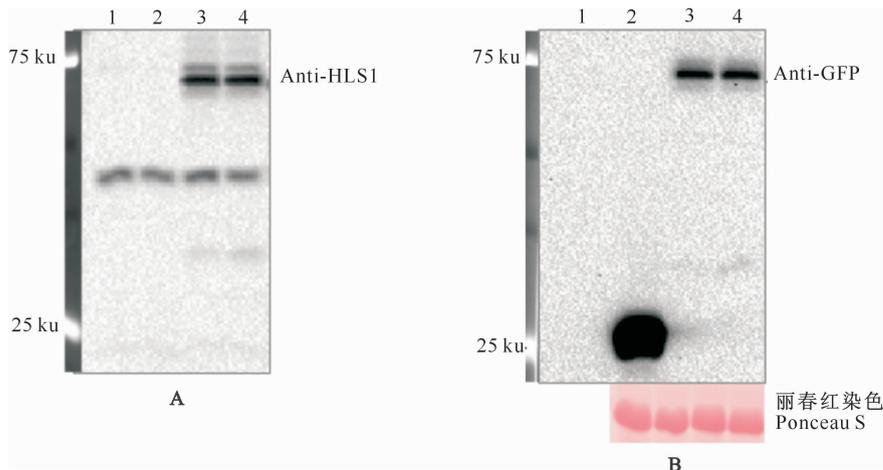
图 8 *HLS1* 表达的半定量 RT-PCR 检测

Fig. 8 Semi-quantitative RT-PCR for detection of *HLS1* expression

2.7 HLS1 多克隆抗体的特异性检测与验证

制备拟南芥野生型叶肉细胞原生质体,将 pUC18-GFP-HLS1c 重组质粒转化入原生质体中,过夜孵育后提取蛋白,分别用 HLS1 抗体和 GFP 抗体进行蛋白免疫印迹检测。图 9-A 显示,对照组无法检测到 GFP-HLS1c,过表达 GFP-HLS1c 融合蛋白的原生质体检测到 69 ku 的目的条带;GFP 抗体

检测结果(图 9-B)显示,原生质体对照组空白,GFP 蛋白泳道检测到大小为 27 ku 的 GFP 蛋白,过表达 GFP-HLS1c 融合蛋白的泳道检测到大小为 69 ku 的目的条带,且与图 9-A 中的特异性条带相同。丽春红染色结果表明,其蛋白上样量一致。以上结果证明制备的 HLS1 抗体特异性非常高,能够特异性识别植物中表达的 HLS1 蛋白。



1. 原生质体;2. GFP 蛋白;3,4. GFP-HLS1c 融合蛋白

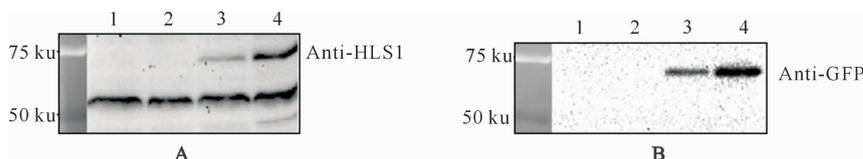
1. Protoplast;2. Protein of GFP;3,4. GFP-HLS1c fusion protein

图 9 基于多克隆抗体的拟南芥叶肉细胞原生质体中 HLS1 (A)、GFP (B) 蛋白的检测

Fig. 9 Detection of HLS1 (A),GFP (B) protein expression in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts based on the polyclonal antibody

提取在 1/2 MS 培养基上光照生长 7 d 的野生型拟南芥、*hls1-1* 突变体和过表达 T3 代植物总蛋白,分别用 HLS1 抗体和 GFP 抗体进行蛋白免疫印迹检测。结果(图 10)显示,在 50~75 ku 处有明显

的蛋白条带,而融合蛋白 GFP-HLS1g 约为 69 ku,说明 HLS1 多克隆抗体可以特异性识别拟南芥 HLS1 蛋白。



1. Col;2. *hls1-1*;3. HLS1 过表达植株 #1;4. HLS1 过表达植株 #2

1. Col;2. *hls1-1*;3. HLS1 overexpressing line #1;4. HLS1 overexpressing line #2

图 10 基于多克隆抗体的拟南芥植物体中 HLS1 (A)、GFP (B) 蛋白的检测

Fig. 10 Detection of HLS1 (A),GFP(B) protein expression in *Arabidopsis* based on the polyclonal antibody

3 讨论

1990 年,Guzman 和 Ecker^[12]通过施加乙烯第一次筛选得到不能形成顶端弯钩的 *hls1* 突变体,之后 Joseph 又陆续筛选得到其他 33 个表型强弱不同的等位基因突变体,并在 1996 年对其进行克隆鉴定得到 HLS1 基因,其编码的蛋白和 N-乙酰转移酶序列保守^[2]。研究证明,HLS1 基因参与调控下胚轴中生长素介导的基因表达、细胞伸长和顶端弯钩发育,另外乙烯能够诱导 HLS1 的表达^[2]。HLS1 是

顶端弯钩发育过程中必不可少的调控因子,参与整合乙烯、生长素、赤霉素、茉莉酸以及光等多个信号转导途径,但对其如何发挥功能尚不清楚。

利用组成型启动子 35S 过表达马铃薯 HLS1 基因能够恢复拟南芥 *hls1* 突变体顶端弯钩缺失的表型^[13],这表明 HLS1 蛋白在高等植物中功能保守。本研究利用酶切克隆的经典分子手段构建重组质粒 pET28a-HLS1c,经过 IPTG 诱导,用 SDS-PAGE 检测到以包涵体形式主要分布在沉淀中的目的蛋白 HLS1c-His,通过尿素完全变性包涵体的方

法纯化得到 *HLS1c*-His 重组蛋白^[14],免疫家兔制备抗 *HLS1* 的血清,因血清中杂质较多,通过抗原亲和纯化抗血清制备得到特异性高的 *HLS1* 多克隆抗体。

原生质体瞬时转化体系的优点是能够快速地表 达大量蛋白。在对 *HLS1* 抗体进行植物体内的特异性检测时,未转化质粒的原生质体样品中不能检测到植物内源的 *HLS1* 蛋白,可能是因为 *HLS1* 蛋白在叶肉细胞中表达量很低。而转化 pUC18-GFP-*HLS1c* 后能够检测到积累量较多的 GFP-*HLS1c* 融合蛋白。另外,利用标签 GFP 抗体也可以检测到相同分子量的融合蛋白。这些结果表明,本研究制作的 *HLS1* 多克隆抗体能够特异性识别植物体内表达的 GFP-*HLS1c* 蛋白。与此同时,还构建了过表达融合 GFP 标签的 *HLS1* 基因组 DNA 的转基因株系,转基因植物在黑暗中呈现出弯钩加剧的表型;利用 *HLS1* 抗体也检测到了转基因株系中的 GFP-*HLS1g* 融合蛋白,但未能检测到植物内源的 *HLS1* 蛋白,可能是因为 *HLS1* 的表达量较低,所以需弄清楚 *HLS1* 的定位,将蛋白富集后再进行免疫印迹检测。

HLS1 是一种乙烯应答基因,除了参与调控下胚轴细胞差异伸长外,还参与调节糖响应基因表达^[15]与植物免疫过程调控^[16]。本研究制备的多克隆抗体可为后续 *HLS1* 参与调控乙烯和生长素反应途径之间的联系以及二者的协同作用研究奠定基础。

[参考文献]

- [1] Li H, Johnson P, Stepanova A, et al. Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis* [J]. *Developmental Cell*, 2004, 7(2): 200-204.
- [2] Lehman A, Black R, Ecker J R. *HOOKLESS1*, an ethylene response gene, is required for differential cell elongation in the *Arabidopsis* hypocotyl [J]. *Cell*, 1996, 85(2): 183-194.
- [3] Du Q, Kende H. Expression of two *HOOKLESS* genes in peas (*Pisum sativum* L.) [J]. *Plant & Cell Physiology*, 2001, 42(4): 374-378.
- [4] Roman G, Ecker J R. Genetic analysis of a seedling stress response to ethylene in *Arabidopsis* [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1995, 350(1331): 75-81.
- [5] Zhang X, Zhu Z Q, An F, et al. Jasmonate-activated MYC2 represses ETHYLENE INSENSITIVE3 activity to antagonize ethylene-promoted apical hook formation in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2014, 26(3): 1105-1117.
- [6] Xing S, Li Y L, Ying P, et al. Activation of *HLS1* by mechanical stress via ethylene-stabilized EIN3 is crucial for seedling soil emergence [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016(7): 1571-1583.
- [7] Yu F, Park S S, Liu X, et al. SUPPRESSOR OF VARIEGATION4, a new var2 suppressor locus, encodes a pioneer protein that is required for chloroplast biogenesis [J]. *Mol Plant*, 2011, 4(2): 229-240.
- [8] 王增, 马会勤, 张文, 等. 包涵体蛋白的分离和色谱法体外复性纯化研究进展 [J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(7): 102-107.
Wang Z, Ma H Q, Zhang W, et al. The progress of inclusion body isolation and chromatographic refolding purification methods [J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(7): 102-107.
- [9] 李芳, 罗军, 许会芬, 等. 西农萨能羊 MAT 基因的原核表达及多克隆抗体制备 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2014, 42(12): 1-6, 12.
Li F, Luo J, Xu H F, et al. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of malonyl/acetyl transacylase gene of Xinong Saanengoat [J]. *Journal of Northwest A&F University(Natural Science Edition)*, 2014, 42(12): 1-6, 12.
- [10] 许君, 乔帅, 常岚, 等. 苦瓜核糖体失活蛋白 MAP30 的原核表达与抗体制备 [J]. *河南农业大学学报*, 2009, 43(5): 552-556.
Xu J, Qiao S, Chang L, et al. Prokaryotic expression and antibody preparation of ribosome inactivating protein MAP30 [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2009, 43(5): 552-556.
- [11] 张钰, 李亚会, 屠唯一, 等. 拟南芥 AtERF1 蛋白的原核可溶性表达及多克隆抗体的制备 [J]. *上海师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 42(4): 378-383.
Zhang Y, Li Y H, Tu W Y, et al. Prokaryotic expression of soluble *Arabidopsis* protein AtERF1 and preparation of its polyclonal antibodies [J]. *Journal of Shanghai Normal University(Natural Sciences)*, 2013, 42(4): 378-383.
- [12] Plinio G, Joseph R E. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants [J]. *The Plant Cell*, 1990, 2(6): 513-523.
- [13] Chaabouni S, Pirrello J, Liu M, et al. Identification and functional characterization of two *HOOKLESS* genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2016, 200: 76-81.
- [14] Shi T, Zhang L, Li Z, et al. Expression, purification and renaturation of truncated human integrin $\beta 1$ from inclusion bodies of *Escherichia coli* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2015, 107: 13-19.
- [15] Ohto M A, Hayashi S, Sawa S, et al. Involvement of *HLS1* in sugar and auxin signaling in *Arabidopsis* leaves [J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(12): 1603-1611.
- [16] Liao C J, Lai Z B, Lee S, et al. *Arabidopsis* *HOOKLESS1* regulates responses to pathogens and abscisic acid through interaction with MED18 and acetylation of *WRKY33* and *ABI5* chromatin [J]. *The Plant Cell*, 2016, 28(7): 1662-1681.