

草胺膦抗性基因 *bar* 的原核表达与蛋白质纯化

薄慧杰^{1,2}, 卢长明², 吴刚², 武玉花², 肖玲², 白延红³, 陈耀锋¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100;

2 中国农业科学院 油料作物研究所, 湖北 武汉 430062;

3 杨凌职业技术学院 生物工程系, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 通过PCR扩增, 从pCambia 1300-*bar*质粒中获得*bar*基因编码区全长, 经酶切鉴定和测序后证实, *bar*基因分离成功。用*Bam*H I和*Hind*III酶切, 将*bar*基因与原核表达载体pET28a(+)连接, 构建重组质粒pET28-*bar*。将重组质粒pET28-*bar*转化大肠杆菌菌株BL21(DE3)后, 获得高效表达。SDS-PAGE电泳分析显示, 目的蛋白主要以包涵体形式存在, 蛋白质分子量约为27 ku。将包涵体离心、洗涤和纯化后, 得到高纯度的目的蛋白。该蛋白可以替代植物外源蛋白进行转*bar*基因产品的食用安全性检测, 也可用于转*bar*基因产品ELISA检测的抗体制备。

[关键词] 抗除草剂基因 *bar*; 原核表达; 蛋白纯化; 转基因产品检测

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0083-05

Prokaryotic expression and purification of glufosinate resistant gene (*bar*)

BO Hui-jie^{1,2}, LU Chang-ming², WU Gang², WU Yu-hua²,

XIAO Ling², BAI Yan-hong³, CHEN Yao-feng¹

(1 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan, Hubei 430062, China;

3 Department of Biological Engineering, Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Glufosinate resistant gene (*bar*) has been extensively applied in the development of transgenic herbicide resistant crops. This study is designated to express the gene *bar* in *E. coli* by means of DNA recombinant technology and to produce purified foreign protein PAT for the use in food biosafety assessment and ELISA detection. The complete sequence of the gene *bar* was amplified by PCR from the plasmid pCambia 1300-*bar* and cloned into the recombinant expression recombinant pET28a(+) at the *Bam*H I and *Hind*III. The recombinant vector pET28-*bar* was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and expressed in high efficiency. SDS-PAGE analysis revealed that the expressed protein was in a form of inclusion bodies with the molecular weight 27 ku. After the inclusion bodies were centrifuged, washed and purified, foreign protein was obtained in high purity. This protein can be used for food safety assessment detection of genetically modified products with *bar* gene and for production of anti-*bar* antibody for ELISA detection.

Key words: herbicide resistant *bar* gene; prokaryotic expression; protein purification; GMO detection

草胺膦是高效广谱性有机磷除草剂, 其杀草机理是通过破坏植物谷氨酰合成酶的生物合成导致植

· [收稿日期] 2006-01-10

[基金项目] 农业部948项目“农业转基因生物及其产品安全检测技术、关键设备及相关材料的引进”(200522); 国家社会公益事业专项“转基因油菜转化特异性检测方法研究”(2005)

[作者简介] 薄慧杰(1982-), 女, 河南周口人, 在读硕士, 主要从事转基因作物安全与检测研究。

[通讯作者] 卢长明(1959-), 男, 江西鄱阳人, 研究员, 博士生导师, 主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: cm lu@oilcrops.cn

物死亡。从潮湿链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus*)中分离得到的 bar 基因编码PPT(phosphinothricin)乙酰转移酶(PAT),通过催化乙酰辅酶A与草胺磷游离氨基结合,使草胺磷失去活性^[1]。目前,应用生物技术将 bar 基因导入小麦^[2]、玉米、油菜^[3]和水稻^[4]等作物,已经获得抗草胺磷的转基因品种,其中一些品种已大面积使用。但随着转基因产品的商业化,转基因食品的安全性问题日益受到人们关注,转基因产品检测、监测与安全评价已成为转基因产品安全管理的重要组成部分。在进行转基因植物外源蛋白的安全性评价时,往往需要提供大量外源蛋白质,而转基因植物产生的外源蛋白一般含量很低,而且难以富集和纯化,无法满足试验需要。因此,建立一种大量产生外源蛋白的方法势在必行。

建立和完善快捷的转基因产品检测方法是实施转基因产品安全管理的重要环节。免疫测定技术是利用抗原抗体反应检测外源蛋白质的一种理想方法,该法可在靶蛋白已知的情况下从成分复杂的原料中检测出靶蛋白。利用免疫测定技术检测外源蛋白,首先必须制备外源蛋白的特异性抗体,而获得纯化的目的蛋白是制备特异性抗体的关键步骤。

本研究利用基因工程技术构建重组质粒pET28 bar ,并在原核表达系统中使 bar 基因获得高效率成功表达,表达产物经过提取和纯化,最终获得高纯度的目的蛋白,为转 bar 基因抗除草剂品种的安全评价与检测提供了有效的方法和手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 TOP 10 菌株购自 Invitrogen 公司, BL 21 (DE3) 菌株和高效融合原核表达载体 pET28a (+) 购自 Novagen 公司, 质粒 pCambia 1300- bar 由中国农科院油料作物研究所基因工程与转基因安全评价研究室保存。pCambia 1300 是由澳大利亚 Cambia 实验室提供的 1 个空载体, 质粒 pCambia 1300- bar 是在 pCambia 1300 基础上增加草胺磷抗性基因 bar 而产生的。

1.1.2 酶与主要试剂 *Taq* DNA 聚合酶购自 Fementas 公司, KOD Plus 高保真酶购自 Toyobo 公司, *T4* DNA 连接酶和 *Bam* H I、*Hind* III 限制性内切酶均购自 New England Biolabs 公司; 其他化学试剂购自 Amresco 公司; PCR Clean-up Kit 和 Rapid plasmid DNA Daily Mini-prep Kit 购自 V-gene 公

司, His·Bind Resin Kits 购自 Novagen 公司。

扩增引物的合成和核苷酸测序均委托北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

1.2 引物设计与目的基因扩增

根据 GenBank 上 bar 基因 (Accession NO. AY582737) 的编码区设计引物:

上游引物 P_1 为 ATC GGA TCC ATG AGC CCA GAA CGA CGC CC;

下游引物 P_2 为 ATC AAG CTT CAG ATT TCG GTG ACG GGC A。

P_1 引入了一个 *Bam* H I 酶切位点, P_2 引入了一个 *Hind* III 酶切位点, 方框处为引入的酶切位点位置。以 P_1 和 P_2 为引物, 质粒 pCambia 1300- bar 为模板进行 PCR 扩增。扩增反应体系为: 模板 pCambia 1300- bar 1 ng, 1 × Buffer, dNTPs 0.2 mmol/L, MgSO₄ 2.0 mmol/L, P_1 0.10 μmol/L, P_2 0.10 μmol/L, 1 U KOD Plus 高保真酶, 加 ddH₂O 至 50 μL。反应条件为: 94 2 min, 1 个循环; 94 30 s, 64 30 s (每个循环降低 0.5 °C), 68 45 s, 8 个循环; 94 30 s, 60 30 s, 68 45 s, 20 个循环; 68 2 min, 1 个循环。

1.3 原核表达载体的构建和鉴定

所获得的 PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳鉴定, 并用 PCR 回收纯化试剂盒回收纯化。纯化后的 PCR 产物和原核表达载体 pET28a (+) 分别用 *Bam* H I 和 *Hind* III 酶切处理, PCR 回收纯化试剂盒纯化后, 用 *T4* DNA 连接酶在 16 °C 连接过夜。重组质粒 pET28 bar 的构建如图 1 所示。

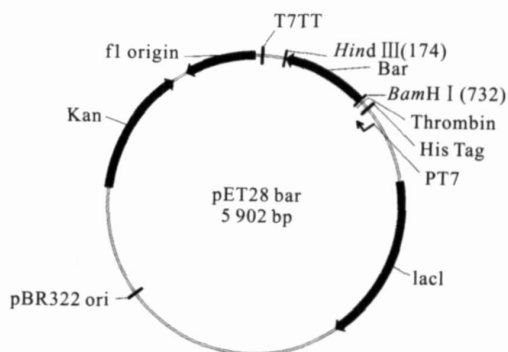


图1 重组质粒pET28 bar 的构建示意图

Fig 1 Construction of vector pET28 bar

连接产物用化学方法 (CaCl₂ 法) 转化至大肠杆菌 TOP 10 中。将转化后的大肠杆菌 TOP 10 在 37 °C 培养过夜, 挑取阳性克隆, 少量提取质粒, 用 *Bam* H

I 和 *Hind*III 酶切验证。质粒送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。测序结果与已知的 *bar* 编码区序列进行比较分析。

1.4 pET28 *bar* 在大肠杆菌 BL 21 (DE3) 中的表达

将重组质粒 pET28 *bar* 转化大肠杆菌 BL 21 (DE3), 在含 Kan 的 LB 平板上挑取含重组质粒的单个菌落, 接种于含 50 mg/L Kan 的 5 mL LB 液体培养基中, 37 °C 培养过夜。将得到的菌液按体积比 1:100 接种于含 50 mg/L Kan 的 200 mL LB 培养基中, 37 °C 摇床培养至对数生长期 ($OD_{600\text{ nm}}$ 值达 0.5~0.8), 加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG (异丙基- β -D-硫代半乳糖苷) 诱导剂, 37 °C 诱导表达 4 h。

1.5 重组蛋白的提取与纯化

将诱导表达 4 h 后的菌液在室温下以 9 000 r/min 离心 8 min, 收集菌体。沉淀的菌体用 1/10 体积的 PBS (4 °C 存放) 悬浮后进行超声波处理, 裂解细胞。取 2 mL 裂解的细胞悬液, 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清和沉淀。分别取适量上清和沉淀, 进行 12% SDS-PAGE 电泳分析, 经考马斯亮蓝染色、脱色液脱色后观察表达产物。将剩余裂解物在 5 000 r/min 离心 15 min, 收集沉淀, 分别用 20 mL 1% 脱氧胆酸钠和 1% triton-100 洗涤包涵体沉淀, 再用 1×Binding Buffer (0.5 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris-HCl, 5 mmol/L imidazole, 6 mol/L guanidine hydrochloride, pH 7.9) 悬浮沉淀, 置于冰上 1 h 至完全溶解。4 °C、13 000 r/min 离心 35 min, 收集上清, 用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后, 按 His·Bind Resin Kits 蛋白纯化试剂盒操作步骤进一步纯化目的蛋白。将洗脱的目的蛋白溶液装入截留分子量为 3 ku 的透析袋中, 在 ddH₂O 中透析过夜脱盐。从透析袋中取适量蛋白质液体, 加等量的 2×蛋白 Loading Buffer 混匀, 在 100 °C 煮沸 3 min, 变性后进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。最后将剩余的蛋白质液体冷冻干燥离心, 收集目标蛋白粉末, 置 -20 °C 保存。

2 结果与分析

2.1 *bar* 基因的 PCR 扩增

以质粒 pCAMBIA 1300-*bar* 为模板进行 PCR 扩增, 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳分析。结果(图2)表明, *bar* 基因 PCR 扩增产物在 500~750 bp 有 1 条特异性带, 大小约为 550 bp, 与目的基因片段的大小(552 bp)相吻合。

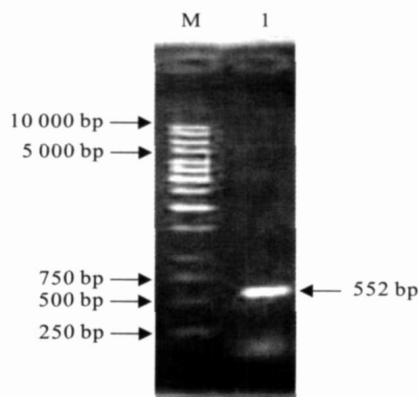


图2 *bar* 全长编码区片段的 PCR 扩增结果
M. DNA 标准分子量; 1 *bar* 基因 PCR 扩增产物

Fig 2 Electrophoresis of *bar* gene amplified with PCR
M. DNA Marker/DL 10000; 1 PCR product of *bar*

2.2 重组质粒 pET28 *bar* 的双酶切鉴定

将 *bar* 基因的 PCR 纯化产物与原核表达载体 pET28a(+) 连接后, 导入感受态大肠杆菌 TOP 10 中, 在 37 °C 培养过夜, 以对目的片段进行大量扩增。提取阳性克隆表达质粒, 用 *Bam*H I 和 *Hind*III 酶切后, 在酶切产物中发现 *bar* 基因片段(图3), 而原核表达载体 pET28a(+) 中没有此片段, 表明 *bar* 基因已正确插入原核表达载体 pET28a(+) 中。重组质粒 pET28 *bar* 构建成功。

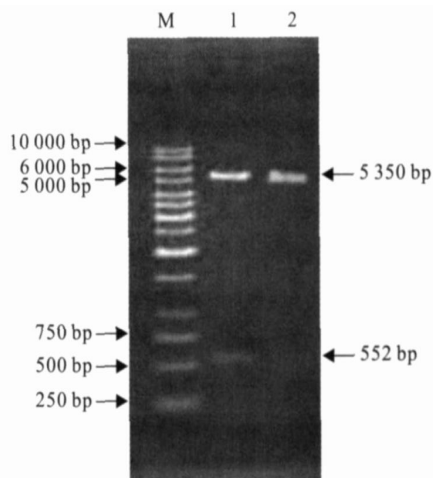


图3 重组质粒 pET28 *bar* 与原核表达载体 pET28a(+) 的 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切鉴定结果

M. DNA 标准分子量; 1 重组质粒 pET28 *bar*;
2 原核表达载体 pET28a(+)

Fig 3 Product of the plasmid pET28 *bar* and pET28a(+) digested with *Bam*H I and *Hind*III
M. DNA Marker; 1 Product of pET28 *bar*;
2 Product of pET28a(+)

2.3 重组质粒pET28 bar 的序列分析

将鉴定为阳性的质粒进行测序后,与 GenBank 上发表的 *bar* 基因序列(A ccession NO. A Y582737)

对比发现,除1个碱基外,其他序列完全相同,编码的氨基酸序列完全一致(图4),蛋白质性质没有差异。

```

AY582737 (13256)  AACC-----ATGAGCCCAGAACGACGCCCCGGCCGACATCCGCCGTGCCACCGAGGCGGACA
bar (1)    ---ATC GGA TCCATGAGCCCAGAACGACGCCCCGGCCGACATCCGCCGTGCCACCGAGGCGGACA

AY582737 (13313)  TGCCGGCGGTCTGCACCATCGTCAACCACTACATCGAGACAAGCACGGTCAACTTCCGTACCGA
bar (53)      TGCCGGCGGTCTGCACCATCGTCAACCACTACATCGAGACAAGCACGGTCAACTTCCGTACCGA

AY582737 (13377)  GCCGCAGGAACCGCAGGAGTGGACGGACGACCTCGTCCGTCTGCGGGAGCGCTATCCCTGGCTC
bar (117)     GCCGCAGGAACCGCAGGAGTGGACGGACGACCTCGTCCGTCTGCGGGAGCGCTATCCCTGGCTC

AY582737 (13441)  GTCGCCGAGGTGGACGGCGAGGTGCGCCGGCATCGCCTACGCGGGCCCTGGAAGGCACGCAACG
bar (181)     GTCGCCGAGGTGGACGGCGAGGTGCGCCGGCATCGCCTACGCGGGCCCTGGAAGGCACGCAACG

AY582737 (13505)  CCTACGACTGGACGGCCGAGTCGACCGTGTACGTCTCCCCCGCCACCAGCGGACGGGACTGGG
bar (245)     CCTACGACTGGACGGCCGAGTCGACCGTGTACGTCTCCCCCGCCACCAGCGGACGGGACTGGG

AY582737 (13569)  CTCCACGCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCCTGGAGGCACAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCT
bar (309)     CTCCACGCTCTACACCCACCTGCTGAAGTCCCTGGAGGCACAGGGCTTCAAGAGCGTGGTCGCT

AY582737 (13633)  GTCATCGGGCTGCCCAACGACCCGAGCGTGCGCATGCACGAGGCGCTCGGATATGCCCCCGCG
bar (373)     GTCATCGGGCTGCCCAACGACCCGAGCGTGCGCATGCACGAGGCGCTCGGATATGCCCCCGCG

AY582737 (13697)  GCATGCTGCGGGCGGCCGGCTTCAAGCACGGGAACTGGCATGACGTGGGTTTCTGGCAGCTGGA
bar (437)     GCATGCTGCGGGCGGCCGGCTTCAAGCACGGGAACTGGCATGACGTGGGTTTCTGGCAGCTGGA

AY582737 (13761)  CTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCCGTCCGGTCCTGCCCGTCACCGAGATCTG-----
Bar (501)     CTTCAGCCTGCCGGTACCGCCCCGTCCGGTCCTGCCCGTCACCGAAATCTGAAG CTT ATC
  
```

图4 克隆的 *bar* 基因与 GenBank 上发表的 *bar* 基因核苷酸序列的比对分析

下划线为引物序列,双划线为酶切位点,方框为不同的碱基序列

Fig 4 Comparison of alignment of nucleotide sequences of *bar* gene between the cloned vs the submitted in GenBank

The underlined are sequences of primers, the double lines are enzyme digestion sites, the boxed are different sequences

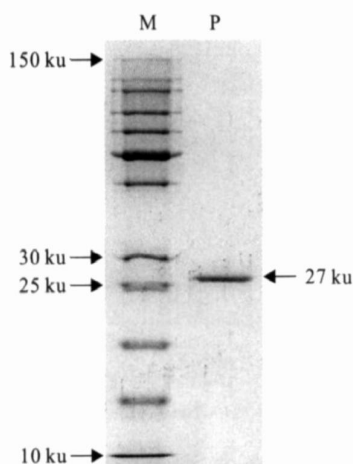


图5 纯化后蛋白的 SDS-PA GE 电泳分析

M. 蛋白质M marker; P. 纯化后的目的蛋白

Fig 5 SDS-PA GE analysis of purified *bar* protein

M. Protein Marker; P. Foreign protein purified by His · Bind Resin Kits purification kits

2.4 重组质粒的表达与产物纯化

将含有重组质粒的单菌落在LB 培养液中培养至 $OD_{600\text{ nm}} = 0.5 \sim 0.8$ 后,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的IPTG,在 37°C 诱导表达4 h,收集菌体,超声裂解后,取部分上清液和沉淀分别进行SDS-PA GE 电泳分析,经考马斯亮蓝染色、脱色液脱色后观察表达产物,结果发现,目的蛋白主要以包涵体的形式存在。将包涵体洗涤、溶解后,用His · Bind Resin Kits 蛋白纯化试剂盒纯化剩余裂解物中的目的蛋白,经SDS-PA GE 电泳分析发现,纯化后的目的蛋白在分子量约为27 ku 处有1条明晰的蛋白质带纹,与预期的PAT 蛋白大小相吻合(图5)。

3 讨论

本研究成功构建了pET28 bar 重组质粒,实现了外源蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中的诱导表达。

通过 SDS-PAGE 电泳分析表明, 该外源蛋白是 *bar* 基因的表达产物, 表达量高, 而且主要以包涵体的形式存在。将包涵体溶解后经过试剂盒纯化, 获得了高纯度的目的蛋白。

本研究选用的大肠杆菌原核表达系统在基因表达技术中发展最早、应用最广泛, 与其他系统相比具有遗传背景清楚、繁殖快、表达效率高及抗污染能力强等优点^[5]。本试验选用的 pET28a(+) 原核表达载体含有能被 T7 RNA 聚合酶特异性识别的 T7 强启动子^[6]。将外源基因置于 T7 启动子控制下, 经 IPTG 诱导后能够高效表达外源蛋白。此外, 该表达载体具有 His6 的编码序列, 使目的蛋白 N 端融合有 6 个 His 残基, 便于纯化, 尤其适合抗原蛋白的制作。

大肠杆菌表达系统产生的重组蛋白通常以包涵体与可溶性蛋白两种形式出现。一般 80% 的蛋白质在细菌中都是以包涵体形式表达的。以包涵体形式表达的重组蛋白容易通过简单的洗涤达到很高的纯度, 有利于进一步纯化。重组蛋白是以包涵体形式存在还是以可溶性蛋白形式存在, 主要取决于重组蛋白本身及载体的性质, 与外在的表达条件关系不大^[7]。包涵体形式一般表达量高, 相对成本较低, 往往具有比较完全的抗原性。

本实验表达的蛋白可以替代植物外源蛋白, 用

作转 *bar* 基因产品的食用安全性检测, 以及对生物多样性影响的评价, 也可用于转 *bar* 基因产品 ELISA 检测的抗体制备。

[参考文献]

- [1] Thompson C J, Movva N R, Tizard R. Characterization of the herbicide resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* [J]. EMBO J, 1987, 6: 2519-2523
- [2] Vaisl V, Castillo A M, Fromm M E. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plant obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus [J]. Biotechnology, 1992, 10: 667-674
- [3] Mariani C, De Beukeleer J M, Truettner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene [J]. Nature, 1990, 347: 731-741
- [4] Toki S, Susumu T, Chyuhei M. Expression of a maize ubiquitin gene promoter-*bar* chimeric gene in transgenic rice plants [J]. Plant Physiol, 1992, 100(3): 1503-1507
- [5] 李育阳. 基因表达技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1-13
- [6] 陈长征, 段治军, 杨新颖, 等. T7 启动子控制下的多功能大肠杆菌表达系统 [J]. 生物化学与生物物理学报, 1996, 28(5): 531-539
- [7] 陈孝平, 王 锋. 抗鞘翅目 Bt 杀虫基因 GFM cry3Bb 的人工合成、原核表达及植物转基因的研究 [D]. 湖北武汉: 华中农业大学, 2004

(上接第 82 页)

[参考文献]

- [1] 贾士荣. 农业高新技术论 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1992: 121-128
- [2] 吉前华, 任正隆. 小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种的组培特性和转基因受体选择 [J]. 作物学报, 2004, 30(9): 855-860
- [3] 舒理慧. 小麦不同发育时期的幼穗对离体培养的反应 [J]. 科学通报, 1982(14): 15-19
- [4] 郑企成, 朱门兰, 陈文华. 八倍体小黑麦单倍性胚性细胞无性系的建立 [J]. 植物学报, 1987, 9(4): 367-372
- [5] 陈梁鸿, 王新望, 张晓东, 等. 基因枪转化小麦不同受体的研究 [J]. 华北农学报, 1998, 13(1): 1-5
- [6] 林 刚, 何勇刚, 刘 勇, 等. 激素对小麦愈伤组织诱导和植株再生的影响 [J]. 华中科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(9): 111-113
- [7] 尹 钧, 任江萍, 宋 丽, 等. 小麦不同转基因受体材料的植株再生培养研究 [J]. 麦类作物学报, 2004, 24(2): 1-4
- [8] 肖梅林, 赵世绪. 影响小麦幼穗离体培养的几个重要因素的研究 [J]. 北京农业大学学报, 1989, 15(2): 147-152
- [9] 刘 淖, 张琼玉, 徐龙珠, 等. 不同品种小麦幼穗离体培养的研究 [J]. 河南师范大学学报, 1993(4): 65-68
- [10] 曾寒冰. 小麦幼穗离体培养的研究——不同基因型的反应 [J]. 东北农学院学报, 1989, 20(3): 205-209
- [11] 吉前华, 任正隆. 影响小麦幼穗组织培养特性基因的染色体定位 [J]. 麦类作物学报, 2004, 24(3): 14
- [12] Ozgen M, Turet M, Altinok S, et al. Efficient callus induction and plant regeneration from mature embryo culture of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes [J]. Plant Cell Rep, 1998, 18(3/4): 331-335