

小麦种子过氧化物酶基因 *wp1* 的克隆及在大肠杆菌中的表达

单丽伟^{a,b}, 罗海霞^b, 范三红^{b,c}, 郭蔼光^{b,c}

(西北农林科技大学 a. 理学院, b. 生命科学学院, c. 陕西省农业分子重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】克隆小麦种子过氧化物酶基因 *wp1*, 并利用原核系统表达纯化。【方法】通过 RT-PCR 从小麦未成熟种子中扩增 *wp1* 基因 cDNA, 构建 His-tag 和 MBP 融合表达载体, 并在大肠杆菌中进行表达。使用直链淀粉亲和和层析获得 MBP-WP1 融合蛋白, 并以 ABTS 为底物检测酶活性。【结果】获得的 *wp1* 基因 cDNA 编码一种 358 个氨基酸残基的蛋白产物, 其序列与大麦 BP1 相似性高达 89%; 空间结构预测结果表明, 小麦 WP1 属于第三类过氧化物酶, 具有该家族成员典型的血红素和钙离子结合位点; His-Tag 融合的 WP1 主要以包涵体形式存在, 而 MBP 融合的 WP1 主要以可溶形式存在, 表达量分别达到总蛋白的 18.2% 和 34.6%; 纯化获得的 MBP-WP1 融合蛋白可检测到过氧化物酶活性。【结论】使用原核系统可高效表达出可溶性的、具有部分活性的 WP1 蛋白。

[关键词] 小麦; 种子过氧化物酶; 高 GC 含量; 基因克隆; 基因表达

[中图分类号] Q785; Q789

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)03-0213-06

Cloning and expression of wheat peroxidase 1 (*wp1*) in *E. coli*

SHAN Li-wei^{a,b}, LUO Hai-xia^b, FAN San-hong^{b,c}, GUO Ai-guang^{b,c}

(a. College of Science, b. College of Life Sciences, c. Key Laboratory of Agricultural Molecular Biology in Shaanxi Province, Northwest A&F University, Yingling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】The study cloned the gene of wheat seeds peroxidase *wp1* and obtained this enzyme by expression it in prokaryotic system. 【Method】The cDNA of Wheat peroxidase 1 (*wp1*) was amplified from immature seeds by RT-PCR. His-tag and MBP fusion expression vectors were constructed respectively, and fusion proteins were expressed in *E. coli* strain T7 Expression. The MBP-WP1 fusion protein was purified by amylose affinity chromatography and its peroxidase activity was detected using ABTS as substrate. 【Result】The cDNA of *wp1* codes a protein of 358 amino acids, having a high sequence similarity (89%) with barley peroxidase 1 (BP1). Predicted structure indicates that WP1 belonged to class III peroxidase and it had their typical heme binding site and Ca²⁺ binding sites. His-tag fused WP1 existed as inclusion body and most of MBP-WP1 were soluble. The percentage of fusion protein was up to 18.2% and 34.6% respectively. The peroxidase activity of MBP-WP1 was detectable. 【Conclusion】Soluble and partial active WP1 can be expressed in prokaryotic system efficiently.

Key words: wheat; seed peroxidase; high GC content; gene cloning; gene expression

过氧化物酶广泛存在于植物界, 同一个植物中通常存在多种过氧化物酶同工酶, 不同同工酶的表达模式随组织、发育阶段和环境因素的改变而不同。

植物过氧化物酶(EC 1. 11. 1. 7)参与多种不同的生

* [收稿日期] 2008-08-07

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30300222)

[作者简介] 单丽伟(1976—), 女, 陕西渭南人, 讲师, 博士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

[通信作者] 郭蔼光(1942—), 女, 陕西西安人, 教授, 博士生导师, 主要从事分子生物学研究。

理过程,如机体内毒性过氧化物的清除、生长素和细胞壁的合成、耐受和对抗各种生物胁迫和非生物胁迫等^[1-2]。植物中研究最为透彻的是辣根过氧化物酶(Horsedimaf peroxidase, HRP),其空间结构已经解析,催化特点也已阐明^[3]。

1991年,Rebmann等^[4]首次从小麦叶片中克隆到病原诱导的过氧化物酶基因。1995年,Baga等^[5]通过PCR从小麦基因组中克隆到3种小麦过氧化物酶基因(*pox1*、*pox2*和*pox4*)全长序列,以及另外一种过氧化物酶基因(*pox3*)部分序列,RNA分析结果表明,其主要在根组织中表达,其中*pox2*受白粉病菌诱导在叶片中高丰度表达^[5]。自大规模EST测序以来,UniGene数据库中已有31种小麦类过氧化物酶UniGene,其中仅Ta. 5385就对应了278个表达序列。1995年,Converso等^[6]从小麦胚中纯化到3种过氧化物酶组分,并对其催化特征进行了初步分析;2001年,Caruso等^[1]从面粉中纯化到一种阳离子过氧化物酶(WP1),并证明其具有抗真菌活性;2002年,Yamashita等^[7]从面粉中纯化到36 ku阳离子过氧化物酶,其N-末端序列分析与大麦种子过氧化物酶(BP1)高度同源;2007年,本课题组从面粉中纯化到一种阳离子过氧化物酶,并对其催化特点、热稳定性等进行了系统分析,质谱分析表明,该蛋白为小麦种子过氧化物酶WP1^[8]。然而,关于WP1基因的克隆和原核表达研究尚未见报道。因此,本研究以小麦过氧化物酶表达序列为依据设计特异引物,通过RT-PCR克隆到小麦*wp1*,并试图通过原核表达获得WP1,为进一步阐明WP1在种子发育中的作用,以及对面粉加工性能的影响奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 从大田采集小麦品种“中国春”开花后12 d的籽粒,冻存于液氮中待用。

1.1.2 菌株、质粒及主要试剂 RNeasy Plant Mini Kit购自QIAGEN公司;M-MLV Reverse Transcriptase、PrimeSTAR HS DNA Polymerase购自Takara公司;大肠杆菌菌株T7 Expression和NEB Turbo,限制性内切酶、T4连接酶、amylose resin, DNA Marker和蛋白Marker,均为NEB公司产品;载体pPCR-Script Amp、pMal-c2x、pET-21a、pET-28a,由陕西省农业分子重点实验室保存;ABTS(2,2-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸))购自Sigma公司。

1.1.3 引物 参考本课题组对纯化到的WP1的质谱分析结果,以及GenBank中该基因对应的表达序列标签AL814870和CD915537,设计特异引物:

P1:5'-GAG GAG ATG GCT CGT GCT CCT CTG CTA GCA-3';

P2:5'-ATG GAA TTC GCG GAG CCT CCG GTG GCG CGC-3';

P3:5'-ATG AAG CTT CTA GCC AAG CCT TTC TGC AGC-3'。

下划线部分为EcoR I和Hind III的酶切位点,其中P1/P3用于RT-PCR扩增*wp1* cDNA(包含完整CDS),P2/P3用于亚克隆*wp1*成熟肽编码区。

1.2 RNA的提取及RT-PCR

RNA提取参考RNeasy Plant Mini Kit说明书进行,提取的总RNA经10 g/L琼脂糖凝胶电泳及分光光度计法确认RNA的完整性和质量。cDNA第一链合成参考M-MLV Reverse Transcriptase说明书进行。PCR扩增体系为20 μ L,包括ddH₂O 5 μ L,5 \times PrimeSTAR Buffer 4.0 μ L,2 mmol/L dNTP 2 μ L,二甲基亚砜(DMSO)1.6 μ L,5 mol/L甜菜碱 4 μ L,PrimeSTAR HS DNA Polymerase(5 U/ μ L) 0.5 μ L,P1、P3(10 μ mol/L)各0.5 μ L,cDNA第一链0.5 μ L。PCR扩增条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5 min;95 $^{\circ}$ C变性60 s,65 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸90 s,循环33次;72 $^{\circ}$ C延伸10 min。用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.3 *wp1*基因的克隆及序列分析

将1.2中PCR产物直接接入pPCR-Script Amp载体,转化到NEB Turbo感受态细胞,经蓝白斑筛选、菌落PCR和酶切鉴定后,送博尚生物技术公司测序确认。序列相似性分析通过NCBI blast完成;多序列比对通过DNASTAR的Megalign模块的clustalW算法完成,结果经GeneDOC软件编辑;三维结构的预测采用Swiss-Model完成(<http://swissmodel.expasy.org>),空间结构的可视化使用Discovery Studio Visualizer 2.0软件处理。

1.4 原核融合表达载体的构建及融合蛋白的表达与纯化

用引物P2/P3从pPCR-WP1载体中扩增获得WP1成熟肽编码区,扩增体系及PCR反应程序同1.2。用EcoR I和Hind III酶切后连入pET-21a和pET-28a表达载体,用Nde I和EcoR I从pMal-c2x将MBP(麦芽糖结合蛋白)编码区切出并连入pET-21a载体,最终获得融合表达载体pET-21a-

MBP-WP1 和 pET-28a-His6-WP1。分别将表达载体导入大肠杆菌 T7 Expression 菌株,37 °C 培养至对数生长期,加入 IPTG(终浓度为 0.5 mmol/L)诱导 6 h 后收集菌体。用低盐缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl(pH7.6)、50 mmol/L NaCl)重悬菌体,超声破碎细胞,4 °C、12 000 r/min 离心。将离心后的上清液载入 Amylose 亲和层析柱,依次用 5 倍柱体积低盐缓冲液、5 倍柱体积高盐缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl(pH7.6)、300 mmol/L NaCl)、5 倍柱体积低盐缓冲液洗柱,最后用洗脱缓冲液(含 5 g/L 麦芽糖)洗脱,获得 MBP-WP1 融合蛋白。使用 100~200 g/L SDS-PAGE 检测总蛋白和纯化后的蛋白,使用 Bio-Rad 公司的 quantity one 软件分析目的蛋白的表达量。

1.5 过氧化物酶活性的检测

用 ABTS 法检测融合蛋白的过氧化物酶活性^[9]。取 5 μ L(1 mg/mL)纯化的融合蛋白,加入到 100 μ L 反应缓冲液中,其中含有 2.5 mmol/L ABTS、2 mmol/L H₂O₂、5 mmol/L CaCl₂、50 mmol/L pH4.0 的 HAc-NaAc。用 SpectraMax M5 测定反应产物在 405 nm 的吸光度值(A₄₀₅)。

2 结果与分析

2.1 小麦 $\omega p1$ 的 cDNA 克隆

以“中国春”小麦开花后 12 d 的籽粒为材料,提取总 RNA,从总 RNA 的电泳结果中可以清晰地分辨出 28, 18 和 5.8 S rRNA 对应条带(图 1A);以 OligoT₁₈为引物进行反转录,获得 cDNA 第一链,然

后使用引物 P1/P3 进行 PCR 扩增,获得大小为 1 100 bp 左右的预期片段(图 1B)。测序结果表明,该片段与最初 EST 拼接结果一致,包含了小麦 $\omega p1$ 完整的开放阅读框,该阅读框编码 358 个氨基酸残基的前体蛋白,推导的蛋白序列与此前本实验室纯化获得的 WP1 质谱分析结果一致。

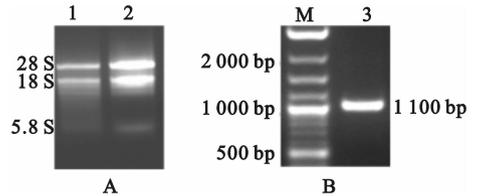


图 1 小麦 $\omega p1$ cDNA 的 RT-PCR 扩增结果
M. DNA Maker; 1~2. 小麦籽粒总 RNA; 3. 小麦 $\omega p1$ cDNA 片段
Fig. 1 Amplification of wheat $\omega p1$ cDNA by RT-PCR
M. DNA Maker; 1~2. RNA form wheat developing seeds;
3. Wheat $\omega p1$ cDNA fragment

2.2 小麦 WP1 的序列分析及三维结构预测

使用 NCBI 的 BlastP 进行序列相似性搜索,结果发现,小麦 WP1 与大麦种子特异表达过氧化物酶 BP1 及水稻类过氧化物酶 Os01g0963200 高度相似,序列的一致度分别为 89% 和 70%,它们同属植物过氧化物酶超家族成员。从多序列比对结果(图 2)可以看出,以上 3 种酶序列在 N-末端信号肽区保守度较低,但在血红素结合位点、钙离子结合位点及活性中心对应的氨基酸残基高度保守。图 3 为使用 Swiss-Model 预测的小麦 WP1 和大麦 BP1 空间结构(PDB ID:1BGP),从结构图上可以清楚地看到血红素结合位点和钙离子结合位点,以及 WP1 和 BP1 在空间结构上的高度保守性。

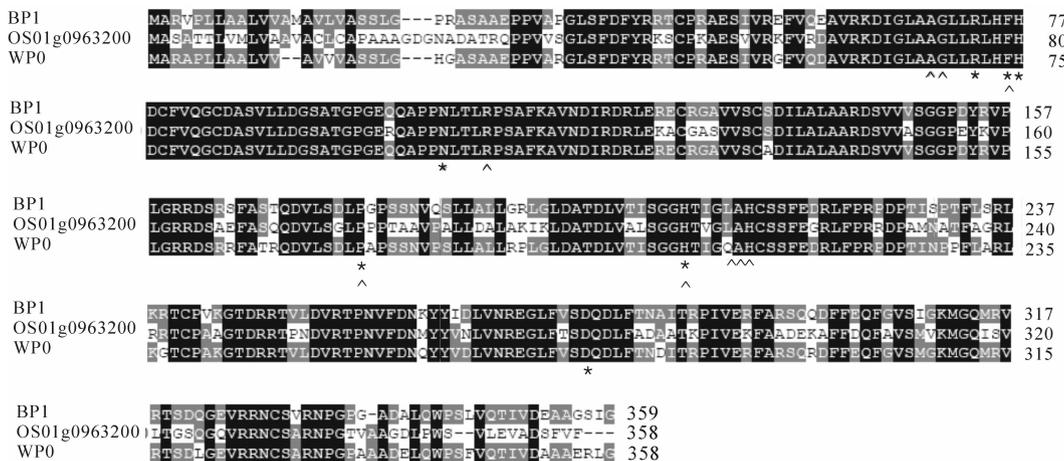


图 2 小麦 WP1 及其他相关谷物过氧化物酶序列的比对结果

*. 血红素结合位点; ^. 活性位点

Fig. 2 Multiple sequence alignment of wheat WP1 and other related cereal peroxidase

*. Heme binding site; ^. Active site

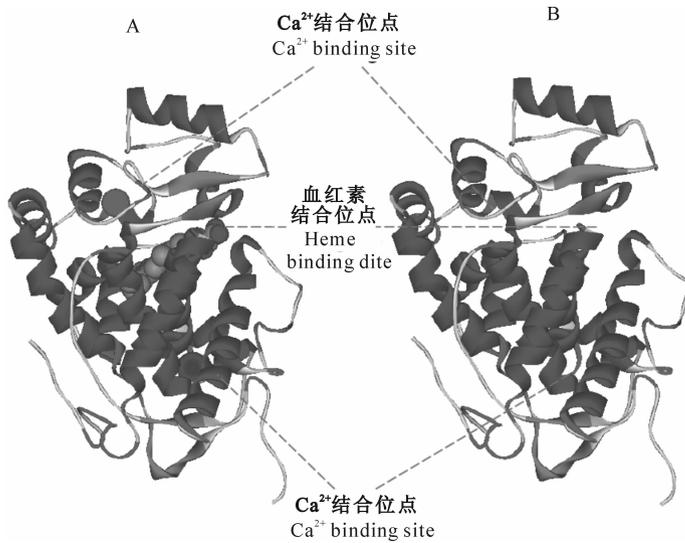


图 3 预测的小麦 WP1 和大麦 BP1 空间结构的比较

A. 大麦 BP1 空间结构; B. 预测的小麦 WP1 空间结构

Fig. 3 Comparison of the structure of barley BP1 and the predicted structure of wheat WP1

A. Structure of barley BP1; B. Predicted structure of wheat WP1

2.3 融合蛋白的诱导表达及纯化

将 WP1 成熟肽编码区与 MBP 和 His-Tag 编码序列融合, 构建了 pET-21a-MBP-WP1 和 pET-28a-His6-WP1 融合表达载体, 载体结构如图 4A 所示, 载体的酶切鉴定结果如图 4B 所示。将融合表达载体导入 T7 Expression 大肠杆菌菌株进行诱导

表达, 结果如图 5A 所示。从图 5A 可以看出, His-Tag 融合的 WP1 主要以包涵体形式存在, 而 MBP 融合的 WP1 主要以可溶形式存在, 表达量分别达到总蛋白的 18.2% 和 34.6%。采用 Amylose 柱对 MBP 融合的 WP1 进行纯化, 获得单点纯化的融合蛋白 MBP-WP1(图 5B)。

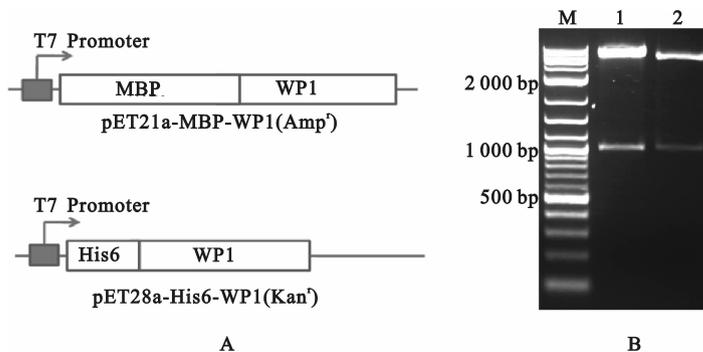


图 4 融合表达载体的构建及酶切鉴定结果

A. 融合表达载体示意图; B. 重组载体酶切鉴定结果; M. DNA marker; 1. pET-21a-MBP-WP1; 2. pET-28a-His6-WP1

Fig. 4 Construction and confirmation of recombination fusion expression vectors

A. Diagram of fusion expression vectors; B. Confirm construction by enzymatic digesting;

M. DNA marker; 1. pET-21a-MBP-WP1; 2. pET-28a-His6-WP1

2.4 融合蛋白 MBP-WP1 过氧化物酶活性的检测

以 ABTS 为底物检测 MBP-WP1 融合蛋白的过氧化物酶活性, 图 6 反映了不同反应条件下溶液在 405 nm 处吸光度的变化。从图 6 可以看出, 加入 Ca^{2+} 和不加入 Ca^{2+} 的对照样品的吸光度值基本一

致, 且变化幅度都非常小; 加入融合蛋白后吸光度值有小幅上升, 但同时加入 Ca^{2+} 和融合蛋白 WP1 后, 吸光度值有明显上升。因而 MBP 融合的 WP1 有微弱的过氧化物酶活性, 且 Ca^{2+} 对其有强的激活作用。

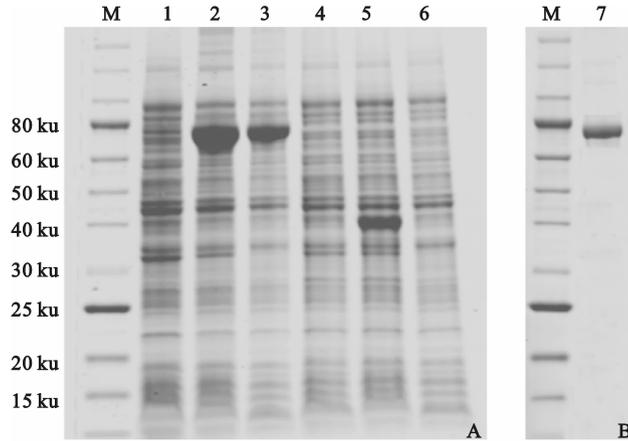


图5 His-Tag 和 MBP 融合的 WP1 表达的 SDS-PAGE 分析结果

A. 融合蛋白的可溶性分析;B. 亲和纯化后获得的 MBP-WP1 融合蛋白

M. 标准分子量;1~3. 含 pET-21a-MBP-WP1 重组质粒的菌株;4~6. 含 pET-28a-His6-WP1 重组质粒的菌株;

其中 1 和 4 为未诱导的对照,2 和 5 为诱导后的菌体总蛋白,3 和 6 为可溶性蛋白,7 为纯化的 MBP-WP1

Fig. 5 Analysis of the expression of His-Tag and MBP fused WP1 by SDS-PAGE

A. Analysis of the solubility of fusion protein;B. Analysis of MBP-WP1 purified by amylose column

M. Protein Marker;1-3. Samples extracted from *E. coli* strain with recombination plasmid pET-21a-MBP-WP1;4-6. Samples extracted from strain with pET-28a-His6-WP1;1&4. Un-induced control,2&5. Total protein after inducing, 3&6. Soluble protein after inducing, 7. Purified fusion protein MBP-WP1

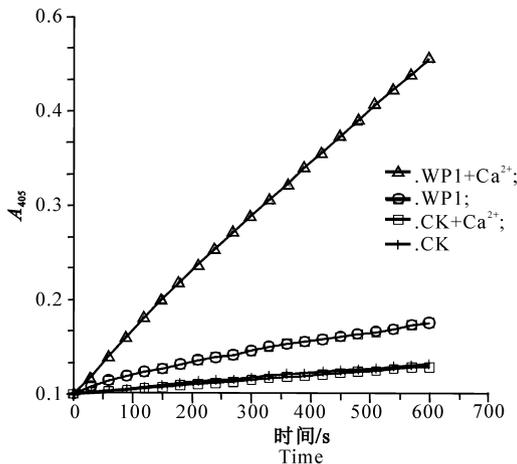


图6 MBP-WP1 融合蛋白过氧化物酶活性的测定

Fig. 6 Peroxidase activity assay of MBP-WP1 fusion protein

3 讨论

随着科学技术的进步,基因克隆已变得越来越容易,但对于某些特定基因,PCR 扩增仍然会遇到不小的难题,比如高 GC 含量基因和包含重复序列的区段。本研究初期曾使用过多种 DNA 聚合酶进行扩增,但均无结果,甚至从克隆载体中扩增不到条带;分析小麦 *wp1* 的 cDNA 序列后发现,该基因平均 GC 含量为 71%,局部区域 GC 含量在 76% 以上。参考文献[10]后,在 PCR 体系中加入终浓度 1

mol/L 的甜菜碱和 80 g/L 的 DMSO,结果获得了较好的扩增效果。DMSO 可有效降低模板的解链温度;甜菜碱有类似功效,且可抑制非特异扩增,增强片段扩张,保护聚合酶的催化活性。

利用大肠杆菌表达植物过氧化物酶的报道并不多见[2,11-12],使用大肠杆菌表达小麦过氧化物酶的研究未见报道。已有的几篇报道中,目的蛋白主要以包涵体形式存在,通过变性复性获得部分活性,然后使用各种方法将活性蛋白和非活性蛋白分开。在本研究中,关于 His-Tag 融合的 WP1 与前人研究结果类似,表达产物主要以包涵体形式存在;而 MBP 融合的 WP1 主要以可溶蛋白形式存在,降低温度,延长诱导时间,能提高可溶蛋白所占的比例。MBP 融合的 WP1 虽然以可溶形式存在,但只能检测到微弱活性,说明融合蛋白虽然可溶,但绝大部分仍未能正确折叠,在后续研究中可通过增加分子伴侣、二硫键异构、在培养基中添加外源血红素等措施,提高酶蛋白的正确折叠,提高酶的比活力。本研究中,融合蛋白 WP1 的活性受钙离子激活,这与 Converso 等[13]的研究结果一致。从本研究预测的空间结构可以看出,小麦 WP1 具有类似大麦 BP1 的两个钙离子结合位点,Ca²⁺ 对融合蛋白有激活作用,说明有少量融合蛋白能正确折叠成活性形式。

小麦种子过氧化物酶 WP1 在种子发育过程中

表达,在成熟种子中有一定累积。对 WP1 具体的组织学定位及在种子发育过程中的具体功能尚不清楚;在面粉工业中,有研究者通过添加辣根过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、脂过氧化物酶等外源酶改变面粉加工性能,WP1 作为面粉中主要的内源过氧化物酶,其对面粉的加工性能有何影响,上述问题将是下一步研究的重点。

[参考文献]

- [1] Caruso C, Chilosì G, Leonardi L, et al. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity [J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(5): 743-750.
- [2] Whitwam R E, Gazarian I G, Tien M. Expression of fungal Mn peroxidase in *E. coli* and refolding to yield active enzyme [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 216(3): 1013-1017.
- [3] Henriksen A, Welinder K G, Gajhede M. Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-Å resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(4): 2241-2248.
- [4] Rebmann G, Hertig C, Bull J, et al. Cloning and sequencing of cDNAs encoding a pathogen-induced putative peroxidase of wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16(2): 329-331.
- [5] Baga M, Chibbar R N, Kartha K K. Molecular cloning and expression analysis of peroxidase genes from wheat [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 29(4): 647-662.
- [6] Converso D A, Fernandez M E. Peroxidase isozymes from wheat germ: purification and properties [J]. *Phytochemistry*, 1995, 40(5): 1341-1345.
- [7] Yamashita H, Nanba Y, Onishi M, et al. Identification of a wheat allergen, Tri a Bd 36K, as a peroxidase [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, 66(11): 2487-2490.
- [8] 罗龙海, 范三红, 张美祥, 等. 小麦种子过氧化物酶的纯化及其部分酶学性质 [J]. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 181-182. Luo L H, Fan S H, Zhang M X, et al. Purification and characterization of peroxidase from wheat seed [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16(1): 181-182. (in Chinese)
- [9] Dicko M H, Gruppen H, Hilhorst R, et al. Biochemical characterization of the major sorghum grain peroxidase [J]. *FEBS J*, 2006, 273(10): 2293-2307.
- [10] Sahdev S, Saini S, Tiwari P, et al. Amplification of GC-rich genes by following a combination strategy of primer design, enhancers and modified PCR cycle conditions [J]. *Mol Cell Probes*, 2007, 21(4): 303-307.
- [11] Smith A T, Santama N, Dacey S, et al. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and heme [J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(22): 13335-13343.
- [12] Hushpulia D M, Savitski P A, Rojkova A M, et al. Expression and refolding of tobacco anionic peroxidase from *E. coli* inclusion bodies [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2003, 68(11): 1189-1194.
- [13] Converso D A, Fernandez M E. Ca^{2+} activation of wheat peroxidase: a possible physiological mechanism of control [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1996, 333(1): 59-65.
- [13] 郑重谊, 谢达平, 谭周进, 等. 影响微生物原生质体融合技术的因素 [J]. *湖南农业科学*, 2006(4): 35-38. Zheng C Y, Xie D P, Tan Z J, et al. Influence factors of microbial protoplast fusion technology [J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2006(4): 35-38. (in Chinese)
- [14] 任涛, 黄青云, 欧守杼. 大肠杆菌 O2 (Norr, Chls), O78 (Chlr, Nors) 原生质体制备和再生的研究 [J]. *华南农业大学学报*, 1998, 19(1): 49-53. Ren T, Huang Q Y, Ou S Z. Study of protoplast preparation and regeneration of *Colon bacillus* O2 (Norr, Chls), O78 (Chlr, Nors) [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 1998, 19(1): 49-53. (in Chinese)
- [15] 刘勇, 张德咏, 谭新球, 等. 5 种光合细菌间原生质体融合及优良农质融合子的筛选鉴定 [J]. *生命科学研究*, 2004, 12: 343-350. Liu Y, Zhang D Y, Tan X Q, et al. Interspecific protoplast fusion of photosynthetic bacteria and identification of the fusants [J]. *Life Science Research*, 2004, 12: 343-350. (in Chinese)

(上接第 212 页)