



陆地棉 *GAI* 基因原核表达与多克隆抗体制备

郑银英^{1,2,3}, 崔百明^{2,3}, 祝建波³, 廖文斌², 张根发⁴, 彭明^{1,2,3*}

(1. 海南大学, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 海口 571101; 3. 石河子大学生命科学学院, 农业生物技术重点实验室, 石河子 832003; 4. 北京师范大学生命科学学院, 北京 100875)

摘要: DELLA 蛋白是 GA 信号响应的关键负调节因子, 本文采用基于 EST 的电子克隆方法, 从棉花中克隆了 DELLA 蛋白家族的一个成员 *GhGAI*。根据电子克隆序列, 从陆地棉花胚珠 cDNA 中扩增得到 *GhGAI* 全长基因片段。将其在原核中表达, 得到了分子量 (Mr) 为 62000 的蛋白质条带。表达蛋白经 His-Tag 亲和层析纯化后, 对兔子进行免疫, 制备的抗血清通过间接 ELISA 检测, 具有较高的效价和特异性。

关键词: 陆地棉; *GhGAI* 基因; 多克隆抗体; 蛋白质印迹检测

中图分类号: S562.035:Q785 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2009)06-0520-04

Expression of a *GAI* Gene of Cotton (*Gossypium hirsutum*) and Preparation of Its Antibody

ZHENG Yin-ying^{1,2,3}, CUI Bai-ming^{2,3}, ZHU Jian-bo³, LIAO Wen-bin², ZHANG Gen-fa⁴, PENG Ming^{1,2,3*}

(1. Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101, China; 3. Key Laboratory of Agriculture Biotechnology of Shihezi University, College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi 832003, China; 4. College of Life Sciences, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

Abstract: DELLA protein is the key negative regulator of GA signal response. In order to study the effect of GA on development of cotton fiber, we cloned *GhGAI* gene, a member of DELLA gene family from the upland cotton EST database by electronic cloning method based on EST. According to the electronic cloning sequence, an integrate coding region was amplified from cotton (*Gossypium hirsutum*) ovule cDNA. A protein band with molecular weight (Mr) of 62000 was obtained from the prokaryotic expression products by SDS-PAGE. The protein was then purified by His-tag affinity chromatography and used for mutiple-cloned antibody preparation by rabbit immunization. Indirect ELISA test and the Western blot analysis showed that the anti-serum was in high immunocompetence and high specificity.

Key words: *Gossypium hirsutum*; *GhGAI* gene; polyclonal antibody; Western blot

GA 是一类二萜类植物激素, 广泛存在于植物界, 对种子的发芽、叶片的扩展、茎的伸长、开花、性别分化及果实发育有着多方面的影响^[1]。DELLA 蛋白负调节 GA 响应基因的表达, 是 GA

收稿日期: 2008-06-05 作者简介: 郑银英 (1975-), 女, 博士, 副教授, zhengyinying@yahoo.com.cn; * 通讯作者, mmpeng-2000@yahoo.com

基金项目: 国家 973 计划资助项目 (2004CB117302), 国家自然科学基金资助项目 (30760099)

信号转导途径中的关键因子。单子叶植物如小麦 (*Triticum aestivum*) 和水稻 (*Oryza Sativa*) 只有一个 DELLA 基因, 而双子叶植物的 DELLA 蛋白由一个小的基因家族编码, 例如, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中该家族有 5 个成员, 即 GAI、RGA、RGL1、RGL2 和 RGL3^[2-3]。它们在功能上既相互冗余, 又各有侧重, 参与了拟南芥的种子萌发、茎叶生长和生殖发育等重要生理过程的调控^[4-7]。DELLA 蛋白除了在 GA 信号转导途径中起关键作用外, 生长素和乙烯对植物的生长调节也是通过降解 DELLA 蛋白进行的^[8]。最近发现, DELLA 也参与了环境胁迫对植物发育进程的调控过程, 盐胁迫导致 DELLA 蛋白积累, 进而抑制植物生长^[8-9]。因此, DELLA 蛋白是植物生长调控的核心和关键。

GA 对棉纤维的起始发育也起着重要的调节作用^[10], DELLA 蛋白是否参与此过程尚不清楚。本研究采用电子克隆的方法, 以拟南芥 DELLA 蛋白的 cDNA 序列为信息探针, BLAST 检索 GenBank 中的棉花 (*Gossypium*) EST 数据库, 拼接有部分同源的 EST 序列, 获得棉花 DELLA 基因的 cDNA 序列。通过 RT-PCR 法克隆陆地棉 (*Gossypium hirsutum*) DELLA 基因-GhGAI, 构建原核表达载体, 并在大肠杆菌中实现高效表达, 进一步制备了多克隆抗体。GhGAI 基因的成功表达以及多克隆抗体的制备为进一步深入研究该基因在棉花纤维发育过程中的作用及其分子机制奠定了基础。

1 材料和方法

1 材料

1.1.1 载体与菌株。pGEM-T Easy Vector 克隆载体购自 Promega 公司。pET-22b 原核表达载体、*E. coli* DH5 α 工程菌、BL21(DE3)工程菌均由本实验室保存。

1.1.2 实验动物。成年雄性兔 3 kg, 2 只。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学数据库及生物软件。生物信息学数据库: 美国国家生物信息技术中心提供并维护的 BLAST 数据库中的 nr, EST 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), EST 片段的拼接、开放阅读框预测以及比对分析等均在软件 Vector NT 10.1.1 上完成。

1.2.2 陆地棉 GhGAI 基因的克隆。采-1DPA-

2DPA 陆地棉胚珠, 提取总 RNA。根据电子克隆 cDNA 序列, 设计 PCR 引物, 上游引物: 5'-ATGAAGAGAGATCATCAAGA-3', 下游引物: 5'-TCATTCACTCGTACATTCTG-3'。

1.2.3 原核表达载体的构建与鉴定。根据 Gh-GAI 基因的序列及表达载体 pET-22b 图谱, 设计上游引物加入 *Nco* I 酶切位点: 5'-CCA TGGGTCCTCGTATGAAGAGAGATCATCAAG-3', 下游引物加入 *Xho* I 酶切位点: 5'-GTGCTC GAGACTCAGCTCCTGAGTTAA-3', 下划线部分为酶切位点。

1.2.4 原核表达与表达蛋白纯化。将原核重组质粒 pET22b-GhGAI 转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 以空载体 pET22b 为对照, 37℃ 经 1 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导, 收集菌体。按照 Novagen 公司的 Ni NTA His-bind resin 亲和柱说明洗脱目的蛋白。

1.2.5 多克隆抗体制备与效价测定。将纯化、冻干后的 GhGAI 蛋白 (200 μ g · mL⁻¹) 溶于生理盐水和弗氏完全佐剂, 研磨使其相互融合达到油包水状态。按照常规方法免疫成年雄性兔 2 只, 免疫 4 次后取血, 分离血清, -20℃ 保存。用 Protein A Plus 纯化抗体, 以纯化的 GhGAI 蛋白为抗原, 采用间接 ELISA 法测定抗体效价。

1.2.6 棉花胚珠总蛋白 Western blot 检测。取 0.1 g 陆地棉胚珠, 用液氮研磨成粉末状, 加入 200 μ L 蛋白质提取液 (50 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 6.8 + 4.5% SDS + 2% 2-巯基乙醇 + 6 mmol · L⁻¹ 尿素) 充分混匀, 冰浴 30 min, 4℃ 10000 r · min⁻¹ 离心 20 min, 取上清, 进行蛋白质印迹检测。

2 结果与分析

2.1 陆地棉 GhGAI 基因的克隆

以拟南芥 GAI 基因 (Y15193) 编码序列为探针, 对棉花 EST 进行 TBLASX 检索, 获得与该序列部分相似的棉花 EST 片段 464 个, 用 VECTOR NTI 的 ASSEMBLE 工具可得到 48 个重叠群, 其中第 29 号重叠群包含 1644 bp 的 ORF, 编码 547aa, 具有 DELLA 蛋白典型基序“DELLA”和“LXXLL”。根据该序列设计 PCR 引物, 以陆地棉花胚 cDNA 为模板, 做 RT-PCR, 得到 1724 bp 扩增条带。回收目的片段, 克隆到 pGEM-T Easy (3015 bp) 载体上, 提取质粒, *Eco*RI 酶切鉴定, 获得阳性重组子 pGEM-GhGAI。测序结果表明, 扩增产物

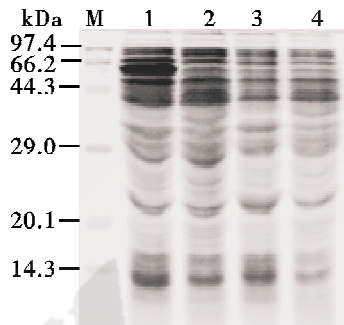
与电子克隆 cDNA 序列一致(GenBank 登录号为: DQ006269),且与番茄(*Lycopersicon esculentum*)的 DELLA 蛋白(GenBank 登录号为: AY269087)最相似,其核苷酸和推导编码氨基酸序列同源性分别为 66.9%和65.2%。

2.2 原核表达载体的构建与鉴定

将目的基因与原核表达载体连接,转化表达菌,提取质粒,经 *Nco* I 和 *Xho* I 双酶切鉴定,进一步的测序结果表明,原核表达重组子 pET22b-GhGAI 载体构建成功,并且目的基因阅读框与原核表达载体 pET22b 上的 His-Tag 阅读框正确融合。

2.3 GhGAI 基因的原核表达

将 pET22b-GhGAI 重组质粒转化表达菌 BL21(DE3)感受态细胞,37℃ 1 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导 4 h,收集菌体,加等体积上样缓冲液煮沸 5 min,经 SDS-PAGE 检测,与经同样诱导转化 pET22b 空质粒的菌样品总蛋白对比,重组表达菌在分子量约为 60.6 kDa 处出现 1 条特异表达条带,与预期目的蛋白大小一致,证明目的基因在该表达系统获得了正确表达(图 1)。



M. 低分子量蛋白质标准; 1. IPTG 诱导的含 pET22b-GhGAI IPTG 的 BL21 菌体; 2. 未诱导的含 pET22b-GhGAI IPTG 的 BL21 菌体; 3. IPTG 诱导的含 pET22b 的 BL21 菌体; 4. 未诱导的含 pET22b 的 BL21 菌体。

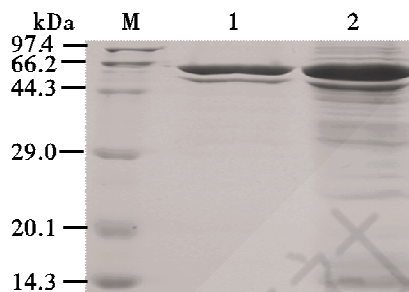
图 1 SDS-PAGE 分析 GhGAI 蛋白表达产物

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of products expressed with pET22b-GhGAI

2.4 表达蛋白纯化

将诱导表达后收集的菌体超声波破碎细胞,低温离心,分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 分析后,发现目的蛋白主要以包涵体形式表达。通过 His-Tag 亲和层析得到目的蛋白,用生理盐水透析,冷冻干燥。纯化目的蛋白经 SDS-PAGE 检测,结果显示目的蛋白的纯度可达 90% 以上,在

分子量约为 56 kDa 处有少量的蛋白,有可能是蛋白自身或宿主的酶降解产物(图 2)。



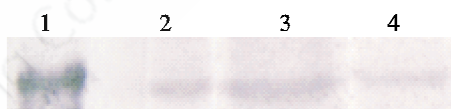
M. 低分子量蛋白质标准; 1. 纯化蛋白; 2. 诱导重组菌体裂解液沉淀。

图 2 SDS-PAGE 分析 His-Tag 亲和层析纯化蛋白

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the purified His-tagged GhGAI fusion protein

2.5 抗体制备及效价测定

成年雄性兔经过 4 次免疫,颈动脉插管放血,分离血清,以未免疫的正常兔血清为对照,以常规间接 ELISA 法测定抗体的效价为 1:2000,与纯化抗原(4~8 ng)有很强的特异反应,再进一步通过蛋白质印迹得到证实(图 3)。



1. 纯化蛋白; 2. -1 DPA; 3. 3 DPA; 4. 5 DPA。

图 3 棉花内源 GhGAI 蛋白免疫印迹

Fig. 3 Western blot analysis of GhGAI in cotton ovule

2.6 陆地棉花胚珠内源 GhGAI 蛋白的检测

为检测制备的兔抗血清与棉花胚珠内源所表达 GhGAI 的免疫反应,在陆地棉-1 DPA-5 DPA 提取粗蛋白。蛋白质印迹检测显示,在分子质量 60.6 kDa 处出现特异的蛋白质条带(图 3),说明所制备的抗血清可以与陆地棉花胚珠内源所表达的 GhGAI 蛋白特异性结合,证明其制备抗体具有良好的免疫原性。棉花胚珠内源所表达 GhGAI 蛋白的成功表达及其多克隆抗体的制备为进一步研究棉花 GhGAI 的蛋白定位奠定了基础。

3 讨论

我们利用棉花 DELLA 蛋白在不同物种间的高度保守性对棉花 EST 数据库进行同源检索、筛选和拼接,发现 4 个编码类 DELLA 蛋白的 cDNA,电子杂交显示,各基因的 EST 在不同的棉花 cDNA 文库中丰度不同,其中一个在棉花胚发育

起始阶段在胚中高表达,说明 DELLA 可能参与了棉纤维细胞的发育调控^[11-12]。

本研究采用 EST 数据库电子克隆和 PCR 技术,从陆地棉中分离了 1 个编码类 DELLA 蛋白的全长 GhGAI 基因。电子杂交显示,该基因的 EST 在棉花胚珠发育起始阶段在胚中高表达,并且编码的蛋白具有 DELLA 蛋白保守响应 GA 信号的结构域,即具有 DELLA 蛋白的典型基序“DELLA”和“LXXLL”。我们进而构建了 Gh-GAI 基因的原核表达载体,在大肠杆菌中实现了高效表达,制备了抗 GhGAI 的多克隆抗体。Gh-GAI 蛋白的成功表达及其多克隆抗体的制备,为深入研究其在棉花胚珠发育过程中亚细胞定位以及在模式植物拟南芥中该基因的功能鉴定奠定了基础。

参考文献:

- [1] SWAIN S M, Olszewski N E. Genetic analysis of gibberellin signal transduction [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112(1):11-17.
- [2] PENG Jin-rong, Harberd N P. Gibberellin deficiency and response mutations suppress the stem elongation phenotype of phytochrome-deficient mutants of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113 (4): 1051-1058.
- [3] SILVERTONE A L, Ciampaglio C N, Sun Tai-ping. The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway [J]. *Plant Cell*, 1998, 10(2):155-169.
- [4] SINGH D P, Jermakow A M, Swain S M. Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2002, 14 (12):3133-3147.
- [5] CAO Dong-ni, Hussain A, Cheng Hui, et al. Loss of function of four DELLA genes leads to light and gibberellin independent seed germination in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2002, 5(5):376-381.
- [6] YU Hao, Ito T, Zhao Yuan-xiang, et al. Floral homeotic genes are targets of gibberellin signaling in flower development [J]. *PNAS*, 2004, 101 (20): 7827-7832.
- [7] TYLER L, Thomas S G, Hu Jian-hong, et al. DELLA proteins and gibberellin-regulated seed germination and floral development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2002, 16(5):646-658.
- [8] FU Xiang-dong, Harberd N P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response [J]. *Nature*, 2003, 421:740-743.
- [9] 丁锦平,刘冬梅,周瑞阳,等. 2 种棉花叶片总蛋白质纯化方法比较研究 [J]. 河南师范大学学报:自然科学版, 2009, 37(5):103-107.
DING Jin-ping, Liu Dong-mei, Zhou Rui-yang, et al. Comparison of two purification methods of cotton leaf total protein [J]. *Journal of Henan Normal University: Natural Science*, 2009, 37(5):103-107.
- [10] BEASLEY C A, Ting I P. Effects of plant growth substances on *in vitro* fiber development from unfertilized cotton ovules [J]. *American Journal of Botany*, 1974, 61(2):188-194.
- [11] PENG Jin-rong, Richards D E, Hartley N, et al. 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators [J]. *Nature*, 1999, 400 (6741): 256-261.
- [12] 于晓玲,崔百明,卫海滨,等. 基因枪转化法在棉纤维细胞中瞬时表达外源基因的研究 [J]. 棉花学报, 2007, 19(6):419-423.
YU Xiao-ling, Cui Bai-ming, Wei Hai-bin, et al. Study on transient expression of target gene in the epidermal cells of cotton ovules via particle bombardment [J]. *Cotton Science*, 2007, 19 (6): 419-423.