

籼稻姊妹染色单体粘着蛋白 *OsRad21 - i* 基因的原核表达载体构建与表达

康海岐^{1,2}, 申国安³, 杨金水³, 程在全¹

(1. 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204;

2. 四川省农业科学院作物研究所, 四川 成都 610066;

3. 复旦大学遗传研究所, 上海 200433)

摘要: 以杂交水稻汕优 63 的根组织 cDNA 为模板, 采用引物设计引入酶切位点和 RT-PCR 方法, 扩增出了籼稻姊妹染色单体粘着基因 *OsRad21 - i* (AY318757) 开放阅读框 (ORF), 命名为 Eqfr, 两端分别带有 *Bam*H 和 *Sal*I 限制性位点。然后克隆到 pGEM - T 载体, 将重组克隆载体 pGEM - T - Eqfr 与表达载体 pQE30 分别同时进行 *Bam*H 和 *Sal*I 双酶切, 连接酶切后的 Eqfr 和 pQE30, 并转化 DH5 感受态细胞, 获得了 DH5 [pQE30 - Eqfr] 重组克隆。再以其重组质粒转化 M15 [pREP - 4] 感受态细胞, 筛选出 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 重组克隆。通过诱导表达, 检测到了相对分子质量约为 116 000 的重组蛋白表达, 在诱导后的 1~3 h 里表达量较高, 之后表达量开始下降。用实验证实了理论推测 ORF 的正确性, 所获得的表达蛋白及其表达体系为下一步的蛋白质实验奠定了基础。

关键词: 杂交籼稻; 姊妹染色单体粘着蛋白; *OsRad21 - i*; 原核表达; 载体构建

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2009) 01 - 0062 - 05

Vector Construction and Prokaryotic Expressing of *OsRad21 - i*, a Novel Gene Coding Sister Chromatid Protein of Hybrid Indica Rice (*Oryza Sativa* ssp. *indica*)

KANG Haiqi^{1,2}, SHEN Guoan³, YANG Jinshu³, CHENG Zaiquan¹

(1. Kunming Institute of Botany, The Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China;

2. Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;

3. Genetics Research Institute, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: *OsRad21 - i* (GeneBank accession number AY318757) was cloned from the root of Shanyou 63, the famous hybrid rice variety (*Oryza sativa* ssp. *indica*). It belongs to cohesin-like family, which mediates rice sister chromatid cohesion during mitosis and meiosis. The complete ORF of *OsRad21 - i*, containing the restriction sites of *Bam*HI and *Sal*I introduced by primers, was named Eqfr and cloned into pGEM - T vector. The recombinant clone, DH5 [pGEM-T-Eqfr], was screened and identified using PCR. The plasmids of pGEM-T-Eqfr and pQE30 were respectively digested with *Bam*HI and *Sal*I at the same time. After the segregation of electrophoresis, the linear pQE30 vector and digested Eqfr were ligated by T4 DNA ligase at 4 °C overnight. The competent cell of M15 [pREP - 4] was transformed by the diluted ligation product. The recombinant clones of M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] were identified. All of the plasmids in these recombinant clones were respectively extracted and digested with both endo-

收稿日期: 2008 - 04 - 30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30660090); 四川省财政育种专项资助项目 (2006YZGG04 - 009); 四川省农科院青年基金资助项目

作者简介: 康海岐 (1974年生), 男, 博士; E-mail: kanghaiqi@126.com

nucleases BamHI and SalI The restriction pattern was in agreement with the predicted pattern. It showed that the target clone containing pQE30 - *Eqfr* was obtained. In addition, the target clones were cultivated and induced to express the desired protein by IPTG. The molecular mass of expressed protein was about 116 000. The expression quantity was high in the first to third hour after induction, but declined after the third hour. This revealed that the ORF of *OsRad21 - i* theoretically deducted at before was right. The expressed protein and system would be beneficial to next step experiment.

Key words hybrid indica rice; sister chromatid cohesion protein; *OsRad21 - i*; prokaryotic expressing; expression vector construction

早期曾经从杂交水稻品种汕优 63 的根叶抑制消减杂交 (SSH) 结果中鉴定出了一个 EST 序列, 与 Cohensin 基因家族同源性较高, 通过 GeneBank 查询与序列拼接, 设计特异性引物, 克隆出了一个长达 3 230 bp 的 cDNA 片段, 测序后通过序列比对和理论预测, 发现该序列酷似水稻姊妹染色单体粘着蛋白, 命名为 *OsRad21 - i* 基因。其中包含一个开放阅读框 ORF (3 166 bp), 编码 1 055 个氨基酸; 起始密码子之前有 67 bp 的 5' UTR 区, 终止密码子之后有一段 94 bp 的 3' UTR 区。该基因由 14 个外显子组成, 位于水稻第 1 号染色体上 154.6 ~ 154.9 cM 之间, 存在于水稻基因组 AP003349 和 AP003418 两个 PAC 克隆上。*OsRAD21 - i* 蛋白的理论相对分子质量约为 115 300, 等电点 4.41。因此在 GenBank 首次登录了属于 *Rad21*、*Rec8/Sccl* 基因家族的第一个水稻基因序列, 登录号为 AY318757。

进一步理论分析表明, *OsRad21 - i* 的 ORF 序列中具有两个保守区: N-端 1-120 位氨基酸序列, 含有 KOG1213 和 pfam04825 功能域, 属于姊妹染色单体粘着复合物 Cohesin 亚基 RAD21/SCC1 部分, 为细胞分裂和染色体配对等细胞学过程中的关键成份之一。C 端 997-1050 位的氨基酸序列, 含有 pfam04824 功能域。pfam04825 和 pfam04824 功能域均是 RAD21/REC8 类蛋白标志性功能域, 代表了真核生物粘着蛋白 RAD21/REC8/SCC1 家族特征性保守区。其主要作用在于有丝分裂和减数分裂中介导姊妹染色单体的粘着, 是粘着复合物的一部分^[3-6]。文献报道了粳稻中同类基因的序列信息, 但未从实验方面进行验证^[7]。

为了验证上述理论推测和下一步的蛋白质实验及功能研究, 本文以克隆载体 pGEM - T 和原核表达载体 pQE30 及大肠杆菌 M15 菌株, 进行了 *OsRad21 - i* 的原核表达尝试。由于理论预测的 *OsRAD21 - i* 蛋白相对分子质量较大 (大于 100 000), 因此构建有效的表达载体将是表达目的基

因之前提条件, 同时也是影响表达水平及蛋白活性的重要因素。本实验通过中间载体 pGEM - T, 最终构建出了该基因的重组表达载体, 并在 M15 中诱导表达出了重组蛋白 *OsRAD21 - i*, 与预期结果相符, 也为表达大分子蛋白积累了重要经验。

1 材料与方法

1.1 材料

LA *Taq* DNA 聚合酶和普通 *Taq* DNA 聚合酶购自 Takara 公司。反转录酶、DNA 限制性内切酶 *BamH* 和 *SalI*, 及 T4 DNA 连接酶等购自 NEB 公司 (New England Biolabs Ltd, UK)。RNA 提取试剂盒、DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司 (Watson, Shanghai)。DNA Marker (DL2000, *Hind* 等)、蛋白质 Marker 购自大连宝生物工程公司。PCR 引物由上海生工生物工程公司合成。卡那霉素、氨苄青霉素、IPTG、X-gal 等贮存液的配制和保存, 质粒抽提试剂配制, LB、LM、SOB 和 SOC 等大肠杆菌培养基的配制均参考文献^[1]进行, 其余试剂均为国产或进口分析纯。

以克隆载体 pGEM - T vector 作为中间载体, 其宿主菌为 Dh5; pQE30 为表达载体, 其宿主菌为 M15。M15 本身含有一种低拷贝抑制质粒 pREP - 4, 来源于 pACYC 质粒, 能与所有质粒相容, 赋予宿主菌 kan^r 抗性, 在 25 μg/mL 卡那霉素的选择压下则保持在 *E. coli* 菌株中。

取杂交水稻汕优 63 的根组织, 提取总 RNA, 反转录为 cDNA, 用于目的基因克隆。

1.2 实验方法

1.2.1 引物设计 在 *OsRad21 - i* 的完整 ORF 两端设计了一对引物, 上游引物 Qef 中引入了 *BamH* 酶切位点, 下游引物 Qer 中引入了 *SalI* 酶切位点, 引物序列如下:

Qef: 5' - CGGATCCA TGTTCTACTCGCAGT-TCA TCTTGG - 3'

Qer: 5' - ATCCGTCGACCTA GAAA TCTGACT-

TCAGGAGCTT - 3

1.2.2 *OsRad21* - i完整 ORF的扩增 以汕优 63 根组织的 cDNA 为模板, 以 Qef 和 Qer 为引物, 按如下程序进行 PCR 扩增: 94 5 min; 94 45 s, 64 30 s, 72 3 min, 循环 5 次; 94 45 s, 62 30 s, 72 3 min, 循环 35 次; 72 10 min. 扩增出的片段命名为 Eqfr.

1.2.3 表达载体构建 利用 T4 DNA Ligase 将 Eqfr 和 pGEM - T vector 于 4 下进行连接, 取 1 μ L 连接产物, 稀释 10 倍, 然后转化 DH5 感受态细胞, 采用蓝白斑法初筛, 再进行菌落 PCR 筛选, 确定重组子 DH5 [pGEM - T - Eqfr]. 提取重组克隆载体 pGEM - T - Eqfr, 与表达载体 pQE30 分别同时进行 *Bam*H 和 *Sal* 双酶切, 电泳分离酶切后的 Eqfr 和线性化 pQE30.

在 4 下按 10 μ L 体系进行 16 h 酶切产物连接反应, 取连接产物稀释 10 倍, 然后转化 M15 感受态细胞, 涂布于含 Amp^r 和 Kan^r 两种抗性的 LB 平板上, 于 37 培养过夜. 通过菌落 PCR 筛选目标重组子 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4], 然后提取该重组子质粒, 以 *Bam*H buffer 作为酶切 buffer, 通过 *Bam*H 和 *Sal* 双酶切方式进行限制性消化, 酶切鉴定可表达 *OsRad21* - i 基因的重组子.

1.2.4 *OsRad21* - i 基因在 *E. coli* M15 中的诱导表达及 SDS - PAGE 电泳检测 挑取含重组表达质粒 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 的单菌落和阳性对照 M15 [pQE30, pREP - 4] 单菌落, 分别接种于 50 mL LB 液体培养基 (含 100 μ g/mL Amp 和 25 μ g/mL Kan); 再将一个阴性对照 M15 [pREP - 4] 单菌落接种于 50 mL LB 液体培养基 (仅含 25 μ g/mL Kan); 于 37 恒温摇床以 240 r/min 的速度振荡培养至 A_{600} 达到 0.3 ~ 0.6 左右, 一般约 30 min; 但诱导表达时间和温度可根据实际情况 (可溶性, 稳定性和表达量) 进行调整.

从以上 3 种培养液中各取 1 mL 保存于 4 冰箱, 然后加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 37 诱导表达 2 ~ 6 h, 在不同时间段分别各取 1 mL 培养液保存于 4 冰箱.

样品取完后, 以 6 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体. 加 50 μ L 双蒸水和 50 μ L 2 \times 样品缓冲液 (100 mmol/L Tris \cdot HCl, pH8.0, 100 mmol/L DTT, $w = 4\%$ SDS, $w = 0.2\%$ 溴酚蓝, $w = 20\%$ 甘油) 重悬菌体, 沸水中煮 5 min 后进行 SDS - PAGE 电泳.

电泳参照 Lammeli^[21] 的方法进行, 分离胶 w 为 12%, 浓缩胶 w 为 3.9%, 结束后用考马斯亮蓝 R

- 250 染色. 所用试剂包括: $w = 30\%$ 聚丙烯酰胺母液、 $w = 10\%$ SDS、 $w = 10\%$ 过硫酸铵、5 \times SDS 电泳缓冲液、5 \times SDS 样品缓冲液、1.5 mol/L Tris \cdot HCl (pH8.8)、裂解 buffer、染色液、脱色液等配制方法和实验步骤参考文献 [1].

2 实验结果

2.1 原核表达载体的构建与鉴定

2.1.1 *OsRad21* - i ORF 的克隆 以 Qef 和 Qer 为引物, 从汕优 63 根组织中扩增出了 *OsRad21* - i 的完整 ORF 片段, 命名为 Eqfr, 回收并检测其浓度约为 50 ng/ μ L. 将 Eqfr 与 pGEM - T 的连接液转化 *E. coli* DH5 感受态细胞, 筛选重组子, 将 11、14、32、33 号等克隆用于下一步实验.

2.1.2 载体 pGEM - T - Eqfr 和 pQE30 的酶切与回收 提取 14、32 和 33 号克隆的质粒, 分别命名为 p14、p32 和 p33, 用 *Bam*H 和 *Sal* 进行限制性酶切, 电泳分离后回收酶切片断, 酶切 p32 和 p33 质量浓度均约为 100 ng/ μ L. 而 p14 酶切不完全, 后续实验采用 p32 和 p33 作为目标表达基因的供体质粒. pQE30 被酶切成为线性化载体, 电泳检测其质量浓度约为 100 ng/ μ L.

2.1.3 目标片断与表达载体的连接 于 4 进行酶切产物连接反应 16 h, 体系构成如下.

1 μ L T4 DNA Ligase, 1 μ L 10 \times ligation buffer, 2 μ L 酶切 pQE30 [10² ng \cdot μ L⁻¹], 酶切 p32 [10² ng \cdot μ L⁻¹] 和酶切 p33 [10² ng \cdot μ L⁻¹] 分别各 6 μ L, 总体积 10 μ L. 含 p32 片段的克隆编号为 1n1 - 1n5, 含 p33 片段的克隆编号为 2n1 - 2n5.

2.1.4 含重组表达载体的克隆筛选 从 LB (Amp^r + Kan^r) 平板上获得了编号为: 1n1、1n2、1n3、1n4、1n5、2n1、2n2、2n3、2n4、2n5 的 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 重组克隆, 连同对照 M15 [pQE30, pREP - 4] 一起提取其质粒, PCR 进行鉴定 (图略). 选取编号为 1n1、1n4、2n2、2n3 的 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 菌株抽提质粒, 分别命名为: p1n1, p1n4, p2n2, p2n3 和 pQE30, 测其浓度分别约为: 20 ng/ μ L、100 ng/ μ L、80 ng/ μ L、50 ng/ μ L 和 30 ng/ μ L.

2.1.5 M15 [pQE30 - Eqfr] 菌株重组质粒的双酶切鉴定 将 p1n1、p1n4、p2n2、p2n3 以限制性内切酶 *Bam*H 和 *Sal* 于 37 水浴中酶切过夜, 结果如图 1. 预期分析对照质粒 ck (pQE30 + pREP - 4) 应该被 *Bam*H 和 *Sal* 切成 3 条带, 包括 3 461 bp (pQE30)、2 502 bp (pREP - 4) 和 1 238

bp (pREP - 4); 3 个重组质粒的转化子质粒应该被切成 4 条带, 即除了对照质粒的 3 条带外, 还应包括一个 3 166 bp (*OsRad21 - i*) 带。图 1a 中, p1n1 和 p2n3 被完全酶切, p2n2 的酶切带型符合预期, 电泳分离 p1n1 的酶切产物未完全分开; p1n4

和 p2n2 有少量质粒未酶切完全外, 其酶切带型符合预期结果。因此表明这 4 个质粒的酶切带型基本符合预期结果, 但酶切体系需要进一步优化。

重新优化酶切体系 (表 1), 对质粒 p1n1, p1n4, p2n2 以及对照质粒 ck (pQE30 + pREP - 4) 进

表 1 质粒 p1n1、p1n4、p2n3、p2n4 以及 ck 的双酶切体系

Table 1 The components of digestion volume of plasmids p1n1, p1n4, p2n3, p2n4 and control

编号	p1n1 (20 ng μL^{-1})	p1n4 (100 ng μL^{-1})	p2n2/ (80 ng μL^{-1})	p2n3 (50 ng μL^{-1})	ck (30 g μL^{-1})	<i>Bam</i> H	<i>Bam</i> H buffer(10x)	<i>Sal</i> I	100x BSA	ddW ater
1	16 8 [2 5]					0.5	2	0.5	0.2	0 [14.3]
2		4 [2 5]				0.5	2	0.5	0.2	12.8 [14.3]
3			7 [2]			0.5	2	0.5	0.2	9.8 [14.8]
4				9		0.5	2	0.5	0.2	7.8
5					16 8 [8]	0.5	2	0.5	0.2	0 [8.8]

Total volume of every reaction was 20 μL . The digestion temperature was 37 °C. “[] ” indicates the optimized data

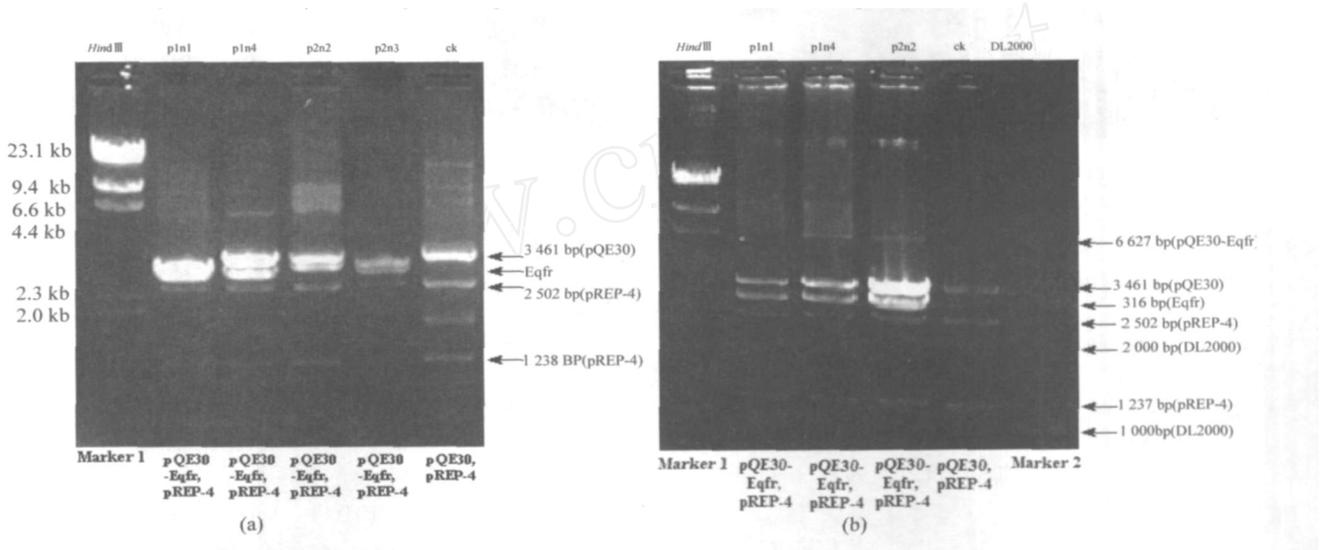


图 1 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 菌株 1n1、1n4、2n2 和 2n3 中双质粒双酶切及体系优化结果

Fig. 1 The digestion results of p1n1, p1n4, p2n2 and p2n3 from M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] clones with *Bam*H and *Sal*I (a) before optimization (b) after optimization

行双酶切试验, 结果如图 1b。p1n1 已经基本酶切完全; 除少量未完全酶切外 (即 6.6 kb 带), p1n4 和 p2n2 大部分已经酶切完全; 3 个重组质粒和对照质粒的酶切带型与预期带型一致, 结果正确。表明 p1n1、p1n4、p2n2 中含有正确的重组 pQE30 - Eqfr 表达质粒, 而且保持了原 M15 菌株中的拟制质粒 pREP - 4。

2.2 *OsRad21 - i* 基因在 M15 中的表达

以 M15 [pREP - 4] 为阴性对照, 以 M15 [pQE30, pREP - 4] 为阳性对照, 对重组克隆 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 菌株进行 IPTG 诱导表达 4 h, 培养液中出现了相对分子质量约为 116 000 的

重组蛋白, 而阴性对照和阳性对照中均无相应蛋白出现 (图 2)。说明 *OsRad21 - i* 基因在 M15 中得到了异源表达。进一步观察该重组克隆在不同时间段的表达情况, 发现当加入 IPTG 后 0.5 h 就有重组蛋白出现, 但表达量较低, 而后 1 ~ 3 h 表达量较高, 4 h 后表达量开始下降 (图 3)。

3 讨论

3.1 *OsRad21 - i* 基因表达载体的酶切鉴定

本文构建的表达载体中, *OsRad21 - i* 基因 ORF 虽与载体大小相近, 均在 3 kb 以上, 但重组表达质粒在宿主细胞中可以稳定存在。对 p1n1、p1n4、

p2n2的 2 次双质粒双酶切试验表明,质粒质量数对酶切效果有较大影响,确定合适的量有利于完全酶切和结果确证。在 *Bam*H 和 *Sal* 各 0.5 μ L 的情况下(相当于各 10 个活力单位酶量),37 $^{\circ}$ C 酶切过夜(16 h)可完全消化 50 ng p1n1 和 120 ng ck 的质粒 DNA, 250 ng p1n4 和 160 ng p2n2 则未被完全消化。可见 50~100 ng 质粒在 37 $^{\circ}$ C、16 h 条件下可以被完全消化,若多于 100 ng,除酶切不完全外,还可能出现非特异性切割。

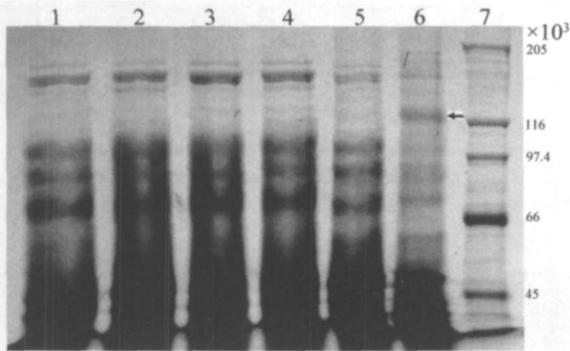


图 2 重组克隆 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 与对照 M15 [pREP - 4] 及 M15 [pQE30, pREP - 4] 的诱导表达
Fig. 2 SDS - PAGE analysis of total cell lysates of M15 [pREP - 4], M15 [pQE30, pREP - 4] and M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] before induction with IPTG and when induced 4 hours later

图中泳道 1 和 2 为阴性对照 M15 [pREP - 4] 诱导前后的表达蛋白,3 和 4 为阳性对照 M15 [pQE30, pREP - 4] 诱导前后的表达蛋白,5 和 6 为重组克隆 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 诱导前后的表达蛋白,7 为蛋白 Marker。箭头所指处为重组蛋白

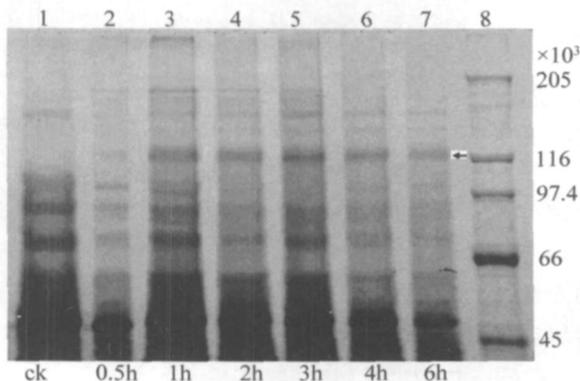


图 3 重组克隆 M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] 在不同时间段的表达

Fig. 3 SDS - PAGE analysis of total cell lysate of M15 [pQE30 - Eqfr, pREP - 4] induced at different time intervals
图中泳道 1 为诱导前的表达蛋白,2~7 分别为 IPTG 诱导 0.5, 1, 2, 3, 4, 6 h 后的表达蛋白,8 为蛋白 Marker。箭头所指处为重组蛋白

3.2 重组 *O*sRAD21 - i 蛋白的原核表达

本文结果表明, *O*sRad21 - i 基因能够以 pQE30 载体在大肠杆菌 M15 菌株中异源表达。预测 *O*sRAD21 - i 的蛋白相对分子质量为 115 300, 加上 6 \times His 的相对分子质量约 600, 与实验检测的重组蛋白相对分子质量基本一致。另外, 该基因在 M15 中的表达具有时效性特点, 在 1~3 h 里表达量较高, 4 h 后重组蛋白表达量开始下降。这可能是目的基因在宿主细胞体内过分表达对宿主造成了显著影响, 引起了相关的细胞应答反应以致影响重组蛋白的稳定性, 导致了重组蛋白开始被降解。因此, 后续实验需要对该表达体系进行优化。可以考虑对目的蛋白进行修饰, 转变为胞内不溶性蛋白质, 如包涵体, 或选用带有温度敏感型突变菌体作为宿主菌, 或者借助于融合(标签)表达、亚细胞靶向定位等来提高表达有效性、可溶性和稳定性等问题。另外, 也可以考虑发酵条件优化, 比如诱导物浓度、诱导温度、时间及 A_{600} 值等, 培养基类型及其组分, 培养温度和时间等。

参考文献:

- [1] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 等, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd ed. Translated by JN Dongyan, et al. Beijing: Science Press, 1998.
- [3] LAEMMLI U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227: 680 - 685.
- [4] MIYAYAMA Y, SUGIMOTO A, YAMAMOTO M. Distinct developmental function of two *Caenorhabditis elegans* homologs of the cohesin subunit Scc1/Rad21 [J]. Mol Biol Cell, 2003, 14 (6): 2399 - 2409.
- [5] PATID, ZHANG N, PLON S E. Linking sister chromatid cohesion and apoptosis: role of Rad21 [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22 (23): 8267 - 8277.
- [6] SONODA E, MATSUSAKA T, MORRISON C. Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells [J]. Dev Cell, 2001, 1 (6): 759 - 770.
- [7] WANG S W, READ R L, NORBURY C J. Fission yeast Pds5 is required for accurate chromosome segregation and for survival after DNA damage or metaphase arrest [J]. J Cell Sci, 2002, 115 (Pt 3): 587 - 98.
- [8] ZHANG L R, TAO J Y, WANG T. Molecular characterization of *O*sRAD21 - i, a rice homologue of yeast RAD21 essential for mitotic chromosome cohesion [J]. J Exp Bot, 2004, 55 (399): 1149 - 52.