

# 稻瘟菌 MoHYR1 蛋白的原核表达与纯化

钱恒伟<sup>1</sup>, 迟梦宇<sup>1</sup>, 赵颖<sup>1</sup>, 梁文星<sup>1,2</sup>, 黄金光<sup>1,2\*</sup>, 李宝筠<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>青岛农业大学植物医学学院, 青岛 266109; <sup>2</sup>山东省植物病虫害综合防控重点实验室, 青岛 266109)

Prokaryotic expression and purification of MoHYR1 protein from *Magnaporthe oryzae* QIAN Heng-wei<sup>1</sup>, CHI Meng-yu<sup>1</sup>, ZHAO Ying<sup>1</sup>, LIANG Wen-xing<sup>1,2</sup>, HUANG Jin-guang<sup>1,2</sup>, LI Bao-du<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup>College of Plant Health and Medicine, Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China; <sup>2</sup>Key Lab of Integrated Crop Disease and Pest Management of Shandong province, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** The gene *MoHYR1* is important for full virulence and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *MoHYR1* was obtained by PCR with the template of *M. oryzae* cDNA and cloned into a prokaryotic expression vector pHAT2. The protein MoHYR1 was successfully expressed in strain *Escherichia coli* BL21 (DE3) with an estimated molecular mass of 20 kDa. The protein was then purified by affinity chromatography and gel filtration. Finally, high purity of MoHYR1 was obtained, which contributes to further study on its structure and function.

**Key words:** *Magnaporthe oryzae*; *MoHYR1*; prokaryotic expression; affinity chromatography; gel filtration

中图分类号: S432.44

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2018)01-0141-04

稻瘟菌 (*Magnaporthe oryzae*) 是高等丝状子囊真菌, 由其侵染水稻引发的稻瘟病是水稻第一大病害, 生产上造成了巨大的经济损失。在植物与病原菌的互作过程中, 植物会产生防御应答反应, 其中包括活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS)。ROS 在植物抵御病原菌的侵入以及病原菌在识别寄主后的过敏反应中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。稻瘟菌在侵染水稻早期能够通过 *MoHYR1* (MGG\_07460) 基因感知和调控 ROS 反应, 确保病原菌成功侵染<sup>[2]</sup>, *MoHYR1* 基因编码一种谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GSH-Px), GSH-Px 能催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 变为氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione), 促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的分解, 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 从而保护细胞膜的结构和功能不受损害, 该酶是机体内广泛存

在的过氧化物分解酶。目前, 在丝状真菌中该蛋白的三维结构未见报道, 为进一步探究该蛋白的生化功能及蛋白质结构, 本研究通过构建稻瘟菌 *MoHYR1* 基因的表达载体, 利用大肠杆菌表达系统对蛋白进行高效表达, 并优化纯化流程, 获得了足量且纯度较高的目标蛋白, 为利用结构生物学的方法解析 *MoHYR1* 三维结构及分析其生化功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

稻瘟菌野生型菌株 P131 由中国农业大学彭友良教授惠赠; 表达载体 pHAT2 由中国农业大学刘俊峰教授惠赠; *Pfu* DNA 聚合酶购自北京艾德莱

收稿日期: 2017-03-01; 修回日期: 2017-04-23; 网络出版时间: 2017-04-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.S.20170426.1801.002.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31471735); 山东省“泰山学者”建设工程专项经费(6631115038)

通讯作者: 黄金光, 博士, 教授, 主要从事蛋白结构生物学、分子植物病理学研究; E-mail: jghuang@qau.edu.cn

第一作者: 钱恒伟, 硕士研究生, 研究方向为分子植物病理学; E-mail: qianhengweiqau@126.com。

生物科技有限公司; pMD18-T, *LA Taq* DNA 聚合酶, 限制性内切酶 (*Nco*I, *Xho*I), T4 DNA 连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 片段回收试剂盒, 质粒提取试剂盒, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 (DE3) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

## 1.2 *MoHYR1* 基因克隆与表达载体构建

根据 *MoHYR1* cDNA 序列, 设计引物 F2: 5'-ATGGCTTCCGCTACGACAAT-3' 和 R1: 5'-TTA-GATGGACGGCTTGGGA-3', 以稻瘟菌 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增 *MoHYR1* 基因片段, 琼脂糖电泳检测并回收目标片段; 片段连接 pMD18-T 载体, 连接产物转化 DH5 $\alpha$  感受态, 利用菌液 PCR 鉴定阳性克隆, 提取质粒 pMD18-T-HYR1 并测序。以测序正确的质粒 pMD18-T-HYR1 为模板, 克隆采用 Sticky-end PCR 方法<sup>[3]</sup>, 利用两对引物 F1/R1: 5'-CATGATGGCTTCCGCTACGACAAT-3' 和 F2/R2: 5'-TCGATTAGATGGACGGCTTGGGA-3' 分别进行扩增, 回收纯化目标片段, 将两种 PCR 产物按照摩尔比 1:1 混合进行变复性, 94 °C 变性 5 min, 65 °C 复性 15 min, 16 °C 冷却 30 s, 获得粘性末端的 *MoHYR1* 片段, 将片段连接到经 *Nco* I 与 *Xho* I 双酶切的 pHAT2 载体, 热激转化, PCR 筛选正确克隆, 提取重组质粒 pHAT2-HYR1。

## 1.3 重组蛋白 MoHYR1 的诱导表达

将重组质粒 pHAT2-HYR1 转化到 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 菌株, 0.4 mM IPTG 诱导表达。收集菌体重悬于 20  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O 中, 加入等体积的 2  $\times$  Loading buffer 煮沸 10 min, 12 000 rpm 离心 10 min, 沉淀菌体碎片。取对照组和诱导组处理液的上清 8  $\mu$ L, 12% SDS-PAGE 胶电泳检测目标蛋白的诱导情况, 与对照组相比, 若处理组在目标大小的位置上出现明显的诱导条带, 则选取该菌株进行下一步的大量诱导。

## 1.4 重组蛋白 MoHYR1 亲和层析与分子筛纯化

1.4.1 亲和层析 离心收集大量诱导表达的 1 L 菌体, 重悬于 40 mL 蛋白缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, 1 mM DTT), 菌体于冰浴中进行超声破碎 10 min (超声破碎参数: 2 s 开, 4 s 关, 功率 400 w; 超声破碎仪型号: SCIENTZ-650E)。超声破碎后的菌液于 4 °C,

14 000 rpm 离心 40 min, 收集上清。使用 5~10 倍柱体积的蛋白缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM 咪唑, 1 mM DTT) 平衡柱子, 将上清倒入 2 mL 镍柱 (Ni sepharose<sup>TM</sup> 6 Fast Flow, GE), 收集穿出液。先用 10 倍柱体积的蛋白缓冲液清洗镍柱; 再用 10 倍柱体积的 40 mM 咪唑的蛋白缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 40 mM 咪唑, 1 mM DTT) 清洗镍柱; 后用 5 倍柱体积的含较高且不同咪唑浓度的洗脱缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 咪唑: 60、100、200、300 和 500 mM) 洗脱蛋白, 收集各洗脱液, SDS-PAGE 检测各洗脱液。

1.4.2 分子筛 2 倍柱体积缓冲液 (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT) 平衡分子筛层析柱 (Superdex 200 10/300 GL, GE), 将蛋白样品用浓缩管 (10 kDa, Millipore) 离心浓缩至 0.5 mL, 使用注射器将蛋白注入上样环, 使用 1.5 倍柱体积洗脱缓冲液洗脱分离目标蛋白, SDS-PAGE 检测出现峰时收集的样品。

## 2 结果与分析

### 2.1 *MoHYR1* 蛋白的诱导表达

将 *MoHYR1* cDNA 片段 (图 1-A) 连接到 pHAT2 表达载体上, 然后将测序正确的重组质粒 pHAT2-HYR1 转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 挑取单菌落进行小量诱导。经 IPTG 诱导后, SDS-PAGE 检测结果显示约 20 kDa 处出现一条过量表达条带 (图 1-B), 与预期蛋白大小一致, 说明重组蛋白 *MoHYR1* 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中成功表达。

### 2.2 *MoHYR1* 蛋白纯化

SDS-PAGE 电泳检测结果表明重组蛋白 *MoHYR1* 小量诱导表达比较明显, 蛋白表达量较高, 因而进行下一步的蛋白大量诱导表达。由于表达的重组蛋白带有 6 $\times$ His 标签, 故首先用 Ni<sup>2+</sup> 柱亲和层析纯化目标蛋白。亲和层析后, 将洗脱液进行 SDS-PAGE 电泳检测分析, 结果如图 2-A 所示。从 SDS-PAGE 电泳检测结果中可以看出目标蛋白从 20 mM 咪唑浓度下开始被洗脱, 随着咪唑浓度的升高, 洗脱量不断增加, 在 100 mM 咪唑浓度下出现最大洗脱量。重组蛋白 *MoHYR1* 主要以可溶状态存在于上清中并且表达量较高, 亲和层析纯化后

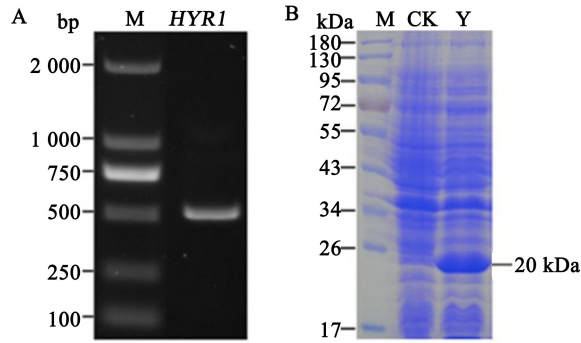


Fig. 1 Cloning of *MoHYR1* cDNA and prokaryotic expression of MoHYR1 protein

A: PCR product of *MoHYR1*, M indicated DL2000 DNA marker; B: Expression analysis of the recombinant protein pHAT2-HYR1, the M indicated protein marker, the CK indicated uninduced, the Y indicated induced by IPTG.

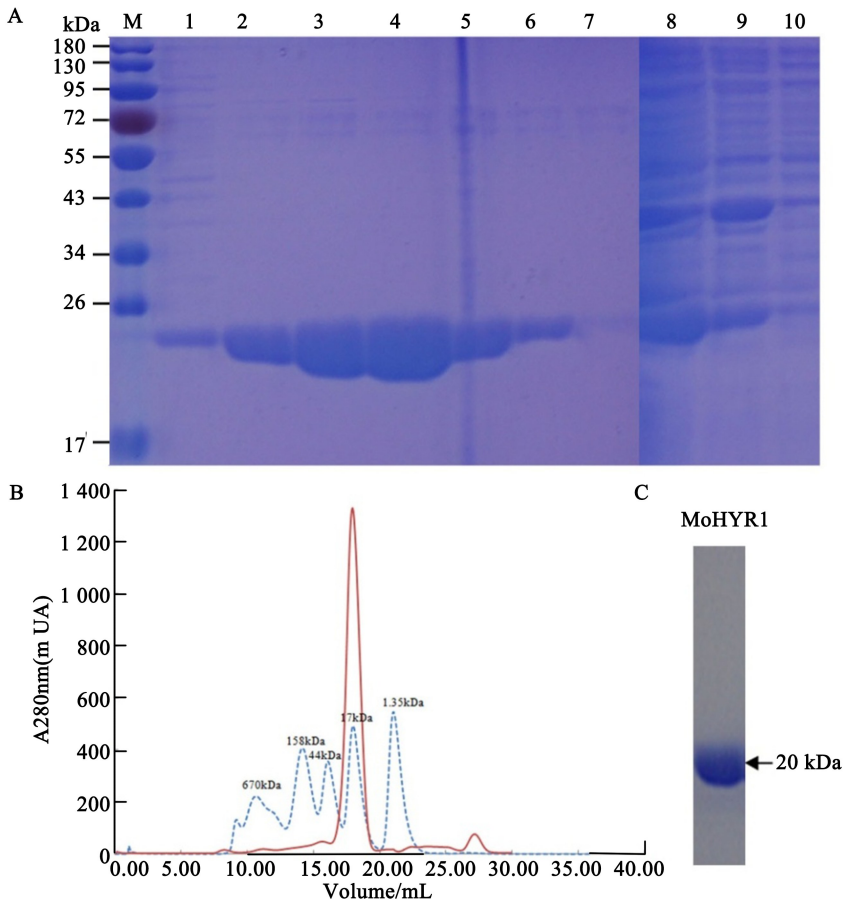


Fig. 2 Purification of MoHYR1 recombinant protein

A: SDS-PAGE analysis after affinity chromatography, lane 1-2 with buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) supplemented with 20 mM and 40 mM imidazole, lane 3-7 with buffer B (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl) supplemented with 60 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM and 500 mM imidazole, lane 8 represents supernatant after centrifugation, lane 9 represents pellets after sonication, lane 10 represents unbinding sample, the M indicated protein marker; B: Chromatogram of MoHYR1 recombinant protein by gel filtration chromatography, the blue broken line represents the protein markers; C: SDS-PAGE of MoHYR1 recombinant protein after purification.

蛋白纯度较高。

为了获得较高纯度并且均一的目标蛋白,对目标蛋白进行了分子筛层析。分子筛层析图显示(图 2-B)只有一个洗脱峰,说明目标蛋白具有高度均一性;SDS-PAGE 电泳结果显示蛋白大小约为 20 kDa(图 2-C);目标蛋白最高峰尖体积为 17.9 mL,与标准蛋白分子筛层析图对比可知,洗脱位置所示 Marker 蛋白大小与 SDS-PAGE 电泳检测结果一致,说明重组蛋白 MoHYR1 以单体的形式存在,且具有较高的纯度。

### 3 结论与讨论

为了目标蛋白的高效表达,本研究利用大肠杆菌表达系统,大肠杆菌表达系统应用最广泛,具有繁殖快、成本低、表达量高等优势<sup>[4]</sup>。通过 PCR 扩增出 *MoHYR1* 基因片段并克隆到原核表达载体 pHAT2 中,利用 BL21(DE3) 宿主菌在 IPTG 的诱导作用下表达。由于融合蛋白的 N 端带有 6×His 标签<sup>[5]</sup>,故首先采用金属离子( $\text{Ni}^{2+}$ )亲和层析纯化目的蛋白,结果表明,蛋白主要以可溶的形式存在,且产量高达  $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;为了获得高纯度且均一性较高的蛋白,对蛋白进一步进行凝胶层析,结果表明蛋白均一性较高,主要以单体的形式存在,蛋白在纯化的过程中较为稳定,后期的稳定性试验进一步验证了这一结果(图略)。该蛋白的成功表达与纯化为 MoHYR1 蛋白晶体的生长提供了条件。稻瘟菌 *MoHYR1* 基因对  $\text{H}_2\text{O}_2$  耐受力至关重要,这种耐受力与真菌致病性直接相关。而且在稻瘟菌乙

酰化蛋白组学研究中发现,MoHYR1 蛋白第 26 位赖氨酸被乙酰化修饰<sup>[6]</sup>。本研究为进一步阐释蛋白的三维结构、乙酰化修饰与其致病性机理的关系奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Levine A, Tenhaken R, Dixon R, *et al.*  $\text{H}_2\text{O}_2$  from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive response [J]. *Cell*, 1994, 79(4):583-593.
- [2] Huang K, Czymmek K J, Caplan J L, *et al.* HYR1-mediated detoxification of reactive oxygen species is required for full virulence in the rice blast fungus [J]. *Plos Pathogens*, 2011, 7(4):e1001335.
- [3] Zeng G. Sticky-end PCR: new method for subcloning [J]. *Biotechniques*, 1998, 25(2): 206-208.
- [4] Sørensen H P, Mortensen K K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115 (2): 113-128.
- [5] Ribas A V, Ho P L, Tanizaki M M, *et al.* High-level expression of tetanus toxin fragment C-thioredoxin fusion protein in *Escherichia coli* [J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2000, 31(2): 91-94.
- [6] Sun X M, Li Z G, Liu H, *et al.* Large-scale identification of lysine acetylated protein in vegetative hyphae of the rice blast fungus [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 15316. DOI:10.1038/s41598-017-15655-4.

责任编辑:曾晓葳