

棉花 *GhPDP* 基因原核表达条件的优化

刘东, 兰艳平, 张丽, 赵岩, 渠云芳, 黄晋玲

(山西农业大学 农学院, 山西 太谷 030801)

摘要:丙酮酸脱氢酶磷酸酶 *GhPDP* 与棉花雄性不育能量调控方面密切相关。为了得到大量有活性的 *GhPDP* 蛋白, 试验将对目的蛋白原核表达条件进行优化。将编码 *GhPDP* 基因的 cDNA 序列插入 pET-22b 中构建重组表达载体 pET-22b-*GhPDP*, 转化到大肠杆菌 *Transtetta* (DE3) 进行 IPTG 诱导表达, 通过单因素试验和正交试验对诱导温度、诱导时间、IPTG 终浓度和 OD_{600} 进行优化, 利用 SDS-PAGE 和 GeneTools 凝胶分析软件分析目的蛋白的表达量, 以摸索目的蛋白可溶性表达的最佳条件。结果显示, 成功构建重组表达载体 pET-22b-*GhPDP*; 目的蛋白在 *Transtetta* (DE3) 菌株中表达, 表达形式多为包涵体; 单因素试验结果表明, 在诱导温度 20 °C、诱导时间为 5 h、IPTG 终浓度 0.10 mmol/L 和菌体密度 OD_{600} 为 0.8 条件下, 目的蛋白可溶性表达量最高; 通过正交分析得出, 影响目的蛋白可溶性表达的因素强度由高到低依次为诱导温度、IPTG 终浓度、诱导时间及菌体密度 OD_{600} 。综合单因素试验和正交试验结果, 确定诱导的最佳条件: 菌体密度 OD_{600} 为 0.8、诱导温度为 20 °C、诱导时间为 5 h、IPTG 终浓度为 0.10 mmol/L。

关键词:棉花; *GhPDP* 基因; 原核表达; 条件优化

中图分类号: S562.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2020)05-0055-07

doi: 10.7668/hbxb.20191119



Optimization of Prokaryotic Expression Conditions of Cotton *GhPDP* Gene

LIU Dong, LAN Yanping, ZHANG Li, ZHAO Yan, QU Yunfang, HUANG Jinling

(College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: Pyruvate dehydrogenase phosphatase *GhPDP* is closely related to the regulation of cotton male sterility energy. To obtain a large number of active *GhPDP* proteins, the prokaryotic expression conditions the target protein were optimized in this experiment. The cDNA sequence encoding the *GhPDP* gene was inserted into pET-22b to construct a recombinant expression vector pET-22b-*GhPDP*, which was transformed into *Escherichia coli* *Transtetta* (DE3) and induced expression by IPTG. Single factor test and orthogonal experiment were used to optimize the induction temperature, induction time, final IPTG concentration and bacterial cell density OD_{600} , using SDS-PAGE and GeneTools gel analysis software to analyze the expression of the target protein and explore the best conditions for soluble protein expression. The results showed that successfully constructed the recombinant expression vector pET-22b-*GhPDP*. The target protein was expressed in *Transtetta* (DE3) strain, mainly in the form of inclusion body. The results of single factor experiments showed that the soluble expression level of the target protein was the highest under the conditions of induction temperature of 20 °C, induction time of 5 h, IPTG final concentration of 0.10 mmol/L and cell density of OD_{600} of 0.8. Through orthogonal analysis, it was concluded that the intensity of the factors affecting the soluble expression of the target protein from high to low as induced temperature, final IPTG concentration, induction time, and bacterial cell density OD_{600} . Based on the results of single factor experiment and orthogonal experiment, the optimal induction conditions were determined to be a bacterial cell density of OD_{600} of 0.8, an induction temperature of 20 °C, an induction time of 5 h, and IPTG final concentration of 0.10 mmol/L.

Key words: Cotton; *GhPDP* genes; Prokaryotic expression; Condition optimization

收稿日期: 2020-06-28

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0100301)

作者简介: 刘东(1994-), 男, 山东潍坊人, 硕士, 主要从事作物杂种优势利用与基础研究。

通讯作者: 黄晋玲(1965-), 女, 山东邹城人, 教授, 博士, 主要从事棉花细胞遗传与染色体工程育种研究。

植物细胞质雄性不育是高等植物中不能产生有功能花粉的一种母性遗传性状,是雄蕊退化、花粉败育或功能不育等原因造成的雄蕊不能正常授粉而雌蕊功能正常的现象。利用雄性不育系育种是作物杂种优势利用的重要途径。

Capitani 等^[1]研究发现,植株的雄性不育系花药在发育过程中,有氧呼吸途径相关酶的活性普遍降低,认为植物雄性不育花药败育过程与能量代谢异常密切相关。关于能量代谢异常导致作物雄性不育在玉米、水稻、小麦等作物上均有研究报道。大量研究已表明,植物雄性不育的发生与植物体内能量的代谢异常有一定的相关性^[2-4]。

在生物体的正常代谢过程中,线粒体通过呼吸作用,为植物的正常发育提供能量。研究表明,在雄性不育花药中以呼吸底物降解的糖酵解-三羧酸循环(TCA)途径为主^[5]。线粒体中的糖经过糖酵解途径形成丙酮酸,丙酮酸再转化为乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环进行能量代谢,丙酮酸脱氢酶起到关键作用,其可以将丙酮酸脱羧氧化成乙酰辅酶 A,进而影响三羧酸循环。丙酮酸脱氢酶磷酸酶(Pyruvate dehydrogenase phosphatase, PDP)属于蛋白磷酸酶 M 家族(Protein phosphatase M, PPM),是位于线粒体上的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,是丙酮酸脱氢酶活性的正调控因子,在线粒体中通过水解 PDC-E1 α 亚基丝氨酸上的磷酸基团而恢复 PDC 活性,以保证代谢的正常进行。通过对棉花雄性不育系的丙酮酸脱氢酶磷酸酶的研究,可以揭示 CMS 机制,为更好地利用杂种优势提供可靠的理论依据和实践意义。

山西农业大学农学院棉花育种实验室前期已从棉花晋 A 不育系中克隆出 *GhPDP* 基因,并成功将

其构建到 pMD-19T 载体上^[6]。本研究以 pMD-19T-*GhPDP* 质粒为模板,PCR 扩增 *GhPDP* 基因的 cDNA 编码区,构建原核表达载体 pET-22b-*GhPDP*,诱导重组蛋白表达,并对表达条件进行单因素和正交试验优化,以提高 *GhPDP* 可溶性表达量,为进一步研究 *GhPDP* 在棉花雄性不育过程中能量调控方面的功能提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 *TransI-T1*、*Transetta* (DE3)均购自北京全式金生物技术有限公司;原核表达载体 pET-22b、pMD-19T-*GhPDP* 重组质粒均由山西农业大学农学院棉花育种实验室保存。

1.1.2 主要试剂 胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司;质粒提取试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司;引物由苏州金唯智公司合成;甘氨酸、SDS、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺、TEMED 购自美国 Amresco 公司;2 × Pfu PCR MasterMix 购自天根生化科技(北京)有限公司;PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 购自 TaKaRa 公司;Tris 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 重组表达载体的构建与鉴定 通过 Overlap PCR 将目的基因 *GhPDP* 连接到 pET-22b 载体上,引物序列列于表 1。使用 *PDP-F1/R1* 和 *PDP-F2/R2* 分别扩增基因和载体,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并回收;将回收的基因片段和载体片段按摩尔比 1:1 进行 PCR 扩增,用琼脂糖凝胶电泳检测其结果。

表 1 PCR 扩增引物序列

Tab. 1 PCR primer sequences

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
<i>PDP-F1</i>	GCCCAGCCGGCGATGGCCATGGCTATGATGTTACGGTCGCTGCG
<i>PDP-R1</i>	TCTCAGTGGTGGTGGTGGTGAGAACTGTTTGAAGTAAATCTCCTTCATATCC
<i>PDP-F2</i>	GGATATGAAGGAGATTTACTTCAAACAGTTTCTCACCACCACCACCACCCTGAGA
<i>PDP-R2</i>	GCGAGCGACCGTAACATCATAGCCATGGCCATCGCCGGCTGGGC

将 PCR 产物转化 *TransI-T1* 感受态细胞,筛选阳性克隆送至苏州金唯智公司进行测序,并提取其质粒转化大肠杆菌 *Transetta* (DE3)。

1.2.2 *GhPDP* 蛋白表达条件的优化 为获得较多可溶性目的蛋白,设计单因素试验和正交试验对目的蛋白进行优化表达,并采用 Bradford 方法^[7]进行蛋白定量,即不同诱导温度、时间、IPTG 终浓度和菌体密度 OD₆₀₀对目的蛋白表达量的影响。

1.2.2.1 诱导温度 将转化菌株接种于含 Amp 的 LB 液体培养基中,37 °C 过夜培养,第 2 天转接至新的培养基中,继续培养至 OD₆₀₀ 为 0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L,分别在 16, 20, 24 °C 诱导 5 h 后离心收集菌体,超声波破碎菌体,收集上清与沉淀,加入 4 × 蛋白上样缓冲液,沸水浴 10 min,离心后经 13% SDS-PAGE 鉴定。

1.2.2.2 诱导时间 细菌培养方法同 1.2.2.1,培养至

OD₆₀₀为0.8时加入 IPTG 至终浓度为0.1 mmol/L,在20 ℃分别培养3,5,7,10 h 后收集菌体,超声波破碎菌体,收集上清与沉淀,经13% SDS-PAGE 电泳。

1.2.2.3 IPTG 终浓度 细菌培养方法同1.2.2.1,培养至OD₆₀₀为0.8,分别加入终浓度为0.05,0.10,0.15 mmol/L 的 IPTG,在20 ℃诱导5 h 后收集菌体,超声波破碎菌体,收集上清与沉淀,经13% SDS-PAGE 电泳。

表2 正交试验设计

Tab.2 Orthogonal experiment design

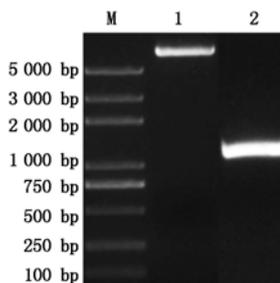
水平 Level	因素 Factor			
	诱导温度(A)/℃ Induction temperature	诱导时间(B)/h Induction time	IPTG 终浓度(C)/(mmol/L) IPTG final concentrations	OD ₆₀₀ 值(D) OD ₆₀₀ value
1	16	3	0.05	0.5
2	20	5	0.10	0.8
3	24	7	0.15	1.0

1.2.2.6 正交试验数据分析 按照已设计的正交试验进行目的蛋白的诱导表达,经13% SDS-PAGE 电泳,电泳结果经 GeneTools 凝胶分析软件进行目的蛋白定量,得出最佳诱导条件。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的鉴定

GhPDP 基因与 pET-22b 载体扩增后经1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图1 所示,扩增的基因片段和载体片段大小分别约为1 152,5 493 bp,与预期的理论大小相符,没有非特异扩增存在。将2 个片段切胶回收按摩尔比1:1 进行 *GhPDP* 基因与 pET-22b 载体的连接,结果如图2 所示,重组表达载体以多聚体的形式产生,同时因分子量过大而积存于琼脂糖凝胶的上样孔中。将多聚体通过热激转化 *TransI-T1* 感受态细胞,挑取单克隆进行菌液 PCR 验证,结果扩增出与理论基因大小相符合的片段(图3)。将阳性克隆测序,通过 DNAMAN 序列比对结果正确,表明 pET-22b-*GhPDP* 重组表达载体构建成功。



M. Trans2K Plus DNA Marker;1. pET-22b 载体的扩增结果;2. *GhPDP* 基因的扩增结果。

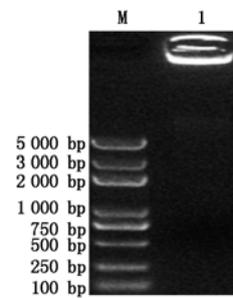
M. Trans2K Plus DNA Marker; 1. Amplification results of pET-22b vector; 2. Amplification results of *GhPDP* gene.

图1 基因与载体的扩增结果

Fig.1 Amplification results of genes and vectors results

1.2.2.4 菌体密度 OD₆₀₀ 细菌培养方法同1.2.2.1,继续培养至 OD₆₀₀ 分别为0.5,0.8,1.0 时,加入 IPTG 至终浓度为0.10 mmol/L,20 ℃诱导5 h,菌体经超声波破碎、离心,收集上清与沉淀,经13% SDS-PAGE 电泳。

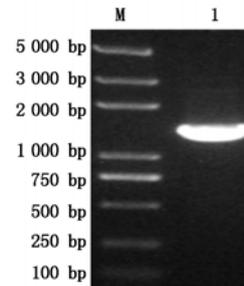
1.2.2.5 正交试验设计 在单因素试验的基础上设计4 因素3 水平的正交试验,具体组合列于表2。



M. Trans2K Plus DNA Marker;1. 多聚体。
M. Trans2K Plus DNA Marker; 1. Multimer.

图2 基因与载体的连接

Fig.2 Ligation of genes and vectors



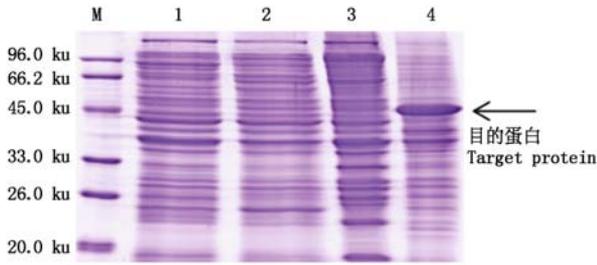
M. Trans2K Plus DNA Marker;1. PCR 验证结果。
M. Trans2K Plus DNA Marker; 1. PCR verification results.

图3 pET-22b-*GhPDP* 菌液 PCR 验证结果

Fig.3 PCR verification of pET-22b-*GhPDP* bacterial solution

2.2 目的蛋白表达形式的确定

将含重组质粒 pET-22b-*GhPDP* 的 *Transetta* (DE3) 接种在具有 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,通过 IPTG 诱导表达以及13% 的 SDS-PAGE 检测,结果显示,与空载转化菌相比,在48 ku 处有一条特异的蛋白表达条带,分子量与预期目的蛋白大小相当,表明目的蛋白在 *Transetta* (DE3) 中表达,其中,大部分以包涵体的形式存在于沉淀中,很少一部分形成可溶性蛋白(图4)。



M. 蛋白质分子量标准;1. 空载表达后的上清;2. 重组蛋白在 Transsetta (DE3) 中表达后的上清;3. 空载表达后的沉淀;4. 重组蛋白在 Transsetta (DE3) 中表达后的沉淀。

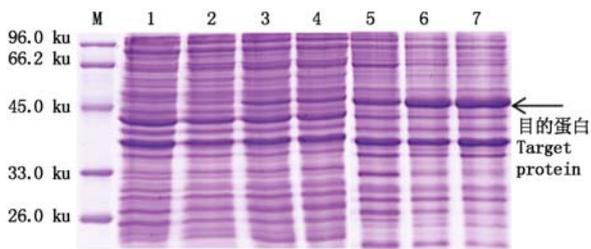
M. Protein molecular weight standard; 1. Supernatant after no-load expression; 2. Recombinant protein after expression in Transsetta(DE3) supernatant; 3. Precipitation after no-load expression; 4. Precipitation after expression of recombinant protein in Transsetta(DE3).

图4 pET-22b-GhPDP 在大肠杆菌 *Transsetta* (DE3) 中的表达
Fig. 4 Expression of pET-22b-GhPDP in *Escherichia coli* Transsetta(DE3)

2.3 重组蛋白表达条件优化

2.3.1 不同诱导温度对目的蛋白表达量的影响

在 OD_{600} 为 0.8, IPTG 终浓度为 0.10 mmol/L 以及诱导温度分别为 16, 20, 24 °C 条件下, 诱导 5 h 离心收集菌体进行超声波破碎, 获得上清与沉淀, 经 13% 的 SDS-PAGE 检测, 结果显示, 随着温度的升高, 可溶性目的蛋白的表达量呈先增加后降低的趋势; 在诱导温度为 20 °C 的条件下, GhPDP 蛋白的可溶性表达量最高(图 5), 通过 GeneTools 凝胶分析软件测定, 其占上清总蛋白含量的 6.98%。



M. 蛋白质分子量标准; 1. pET-22b-GhPDP 未诱导; 2-4. 16, 20, 24 °C 条件下 IPTG 诱导 5 h 后的上清; 5-7. 16, 20, 24 °C 条件下 IPTG 诱导 5 h 后的沉淀。

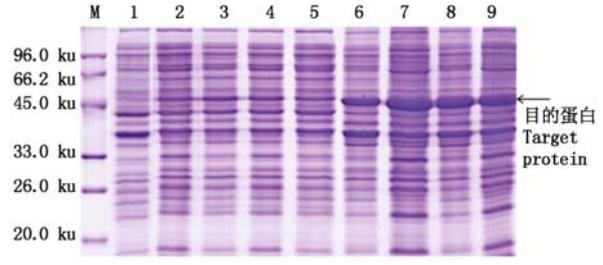
M. Protein molecular weight standard; 1. Uninduced of pET-22b-GhPDP; 2-4. Supernatant induced by IPTG at 16, 20, 24 °C for 5 h; 5-7. Precipitation induced by IPTG at 16, 20, 24 °C for 5 h.

图5 不同诱导温度对目的蛋白表达量的影响

Fig. 5 Effect of different induction temperatures on the expression of target protein

2.3.2 不同诱导时间对目的蛋白表达量的影响

在 OD_{600} 为 0.8、诱导温度为 20 °C、IPTG 终浓度为 0.10 mmol/L 条件下, 分别诱导 3, 5, 7, 10 h 进行超声波破碎, 经 13% SDS-PAGE 检测, 结果显示, 诱导 5 h 时, 目的蛋白可溶性表达量最高(图 6), 其占上清总蛋白含量的 6.65%。



M. 蛋白质分子量标准;1. pET-22b-GhPDP 未诱导; 2-5. 20 °C 条件下 IPTG 的诱导 3, 5, 7, 10 h 后的上清; 6-9. 20 °C 条件下 IPTG 分别诱导 3, 5, 7, 10 h 后的沉淀。

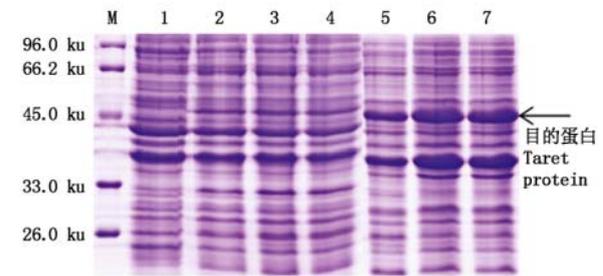
M. Protein molecular weight standard; 1. Uninduced of pET-22b-GhPDP; 2-5. Supernatant after IPTG induction at 20 °C for 3, 5, 7, 10 h; 6-9. Precipitation after IPTG induction at 20 °C for 3, 5, 7, 10 h.

图6 不同诱导时间对目的蛋白表达量的影响

Fig. 6 Effect of different induction time on the expression of target protein

2.3.3 不同 IPTG 终浓度对目的蛋白表达量的影响

在 OD_{600} 为 0.8、诱导温度为 20 °C 条件下, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0.05, 0.10, 0.15 mmol/L, 诱导 5 h, 离心收集菌体沉淀进行超声波破碎, 取上清与沉淀进行 13% 的 SDS-PAGE 检测, 结果如图 7 所示, 在 IPTG 终浓度为 0.10 mmol/L 时, 可溶性目的蛋白表达量最高, 其占上清总蛋白含量的 7.30%。



M. 蛋白质分子量标准; 1. pET-22b-GhPDP 未诱导; 2-4. 20 °C 条件下终浓度分别为 0.05, 0.10, 0.15 mmol/L IPTG 诱导 5 h 后的上清; 5-7. 20 °C 条件下终浓度分别为 0.05, 0.10, 0.15 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h 后的沉淀。

M. Protein molecular weight standard; 1. Uninduced of pET-22b-GhPDP; 2-4. Supernatant induced by 0.05, 0.10, 0.15 mmol/L IPTG at 20 °C for 5 h; 5-7. Precipitation induced by 0.05, 0.10, 0.15 mmol/L IPTG at 20 °C for 5 h.

图7 不同 IPTG 终浓度对目的蛋白表达量的影响

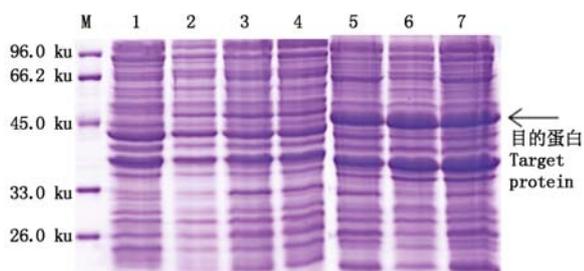
Fig. 7 Effect of different final IPTG concentrations on the expression of target protein

2.3.4 不同菌体密度 OD_{600} 对目的蛋白表达量的影响

分别在菌体密度 OD_{600} 为 0.5, 0.8, 1.0 时, 加入 0.10 mmol/L 的 IPTG, 20 °C 诱导 5 h, 取上清与沉淀进行 SDS-PAGE 检测, 结果显示, 随着菌体密度逐渐增加, 可溶性目的蛋白表达量呈现先增加后降低的趋势(图 8); 当 OD_{600} 达到 0.8 时, IPTG 诱导产生的可溶性目的蛋白含量最多, 其占上清总蛋白含量的 8.65%。

综合以上单因素试验可知, 可溶性目的蛋白表达的最优条件为: 在 20 °C 条件下, 当菌体密度 OD_{600}

达到 0.8 时,加入终浓度 0.10 mmol/L 的 IPTG 诱导 5 h。在此诱导条件下,可溶性目的蛋白表达量最高。



M. 蛋白质分子量标准; 1. pET-22b-*GhPDP* 未诱导; 2-4. 分别在 OD_{600} 为 0.5, 0.8, 1.0 开始诱导 5 h 后的上清; 5-7. 分别在 OD_{600} 为 0.5, 0.8, 1.0 开始诱导 5 h 后的沉淀。

M. Protein molecular weight standard; 1. Uninduced of pET-22b-*GhPDP*; 2-4. Supernatant after induction for 5 h at OD_{600} of 0.5, 0.8, 1.0, respectively; 5-7. Start to induce precipitation after 5 h at OD_{600} of 0.5, 0.8, 1.0.

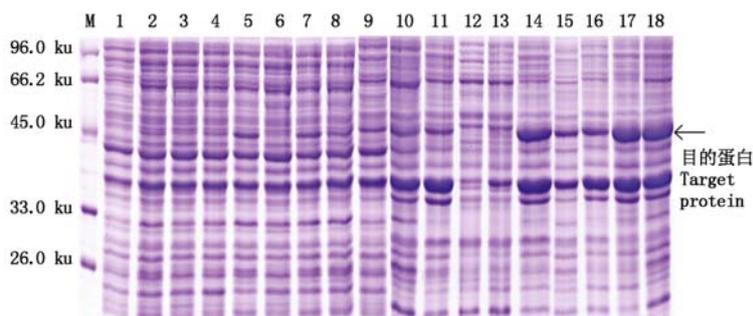
图 8 不同菌体密度 OD_{600} 对目的蛋白表达量的影响

Fig. 8 Effect of different cell density OD_{600} on the expression of target protein

2.3.5 *GhPDP* 蛋白诱导优化条件正交试验 按照

已设计的正交试验(表 2)进行目的蛋白诱导表达,经 13% SDS-PAGE 电泳(图 9),可以清晰地看出,*GhPDP* 基因在不同条件下的表达量有明显的差异。在上清的 SDS-PAGE 结果中发现泳道 5 的目的蛋白表达量最高。

2.3.6 正交试验数据分析 通过 GeneTools 凝胶分析软件定量可溶性目的蛋白浓度,对各因素数据进行极差分析,结果如表 3 所示,各因素极差大小分别为 3.44, 2.76, 3.21, 1.73, 通过 R 值确定诱导条件的各因素影响主次为诱导温度 > IPTG 终浓度 > 诱导时间 > OD_{600} , 正交试验最佳组合是,诱导温度为 20 °C、诱导剂 IPTG 终浓度为 0.15 mmol/L、诱导时间为 5 h、菌体密度 OD_{600} 为 0.5,在此诱导条件下,可溶性目的蛋白表达量最大,达到 8.96%。为进一步验证上述结果的可靠性和稳定性,按正交设计优化的最佳条件重复进行了 3 次诱导,结果发现,目的蛋白表达量均稳定地占上清总蛋白含量的 8.96% 左右。



M. 蛋白质分子量标准; 1-9. 对应表 3 各正交试验组的上清; 10-18. 对应表 3 各正交试验组的沉淀。

M. Protein molecular weight standard; 1-9. Corresponding to the supernatant of each orthogonal experimental group of Tab. 3; 10-18. Corresponding to the precipitation of each orthogonal experimental group of Tab. 3.

图 9 正交试验 13% SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 9 Orthogonal test 13% SDS-PAGE electrophoresis results

表 3 正交试验设计及其结果

Tab. 3 Design table and results of orthogonal test

试验组 Test group	因素水平 Factor level				可溶性蛋白含量/% Soluble protein content
	A	B	C	D	
1	16	3	0.05	0.5	1.23
2	16	5	0.10	0.8	2.65
3	16	7	0.15	1.0	2.04
4	20	3	0.10	1.0	3.42
5	20	5	0.15	0.5	8.96
6	20	7	0.05	0.8	1.26
7	24	3	0.15	0.8	6.15
8	24	5	0.05	1.0	5.03
9	24	7	0.10	0.5	5.05
T1	5.92	10.80	7.52	15.24	
T2	13.64	16.64	11.12	10.06	
T3	16.23	8.35	17.15	10.49	
R	3.44	2.76	3.21	1.73	

3 结论与讨论

植物雄性不育的研究是杂种优势利用理论研究的重要内容,大量研究证明,能量代谢失衡与植物雄性不育存在一定关系^[1],而线粒体是为机体提供能量的动力工厂。细胞存亡与物质能量代谢调节契合于丙酮酸,糖类经过初步酵解后形成丙酮酸,丙酮酸被运输到线粒体内经过氧化脱羧形成乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环(TCA),最后经过氧化磷酸化形成大量的 ATP。线粒体丙酮酸脱氢酶复合体(mtPDC)调控丙酮酸进入 TCA 循环并且催化的反应不可逆,2 种调节酶 PDK/PDP 通过对 PDC-E1 α 亚基的磷酸化和去磷酸化使 PDC 失活或复活,PDP 作为 PDC 的调控酶,对能量代谢具有极其重要的作用。

3.1 GhPDP 原核表达载体的构建与表达

许多外源蛋白表达主要以无活性、不溶性的包涵体形式产生^[8]。其中,包涵体的形成原因很多,外源基因的快速高效表达是其中的原因之一^[9]。外源基因在大肠杆菌中能否高效表达受很多因素影响,如大肠杆菌菌株、诱导温度、诱导剂 IPTG 的终浓度和诱导时间^[10]。潘滨等^[11]在大肠杆菌 Rosetta (DE3)、BL21 (DE3) pLysS 和 Rs21 菌株诱导 Rep 蛋白表达,研究发现当选用表达菌株 BL21 (DE3) pLysS 和 Rs21 菌株时,Rep 蛋白表达量很低;当选用表达菌株 Rosetta (DE3) 时,Rep 蛋白表达明显,且在 IPTG 诱导后表达量显著增加。

本试验采用目前广泛应用的大肠杆菌表达系统表达外源蛋白棉花丙酮酸脱氢酶磷酸酶 GhPDP,选用表达载体为 pET-22b,其能够编码 6 个组氨酸残基,并与目的蛋白的 C 末端形成融合蛋白,可以直接用于后续目的蛋白的纯化^[12-14],且由于组氨酸标签非常小,对目的蛋白的结构和性质造成影响较小,因此,不需要将其从目的蛋白中切除;pET-22b 表达载体上的 T7 启动子在加入诱导剂 IPTG 时能与大肠杆菌 Transetta (DE3) 菌株内的 T7 RNA 聚合酶特异性结合,从而实现下游靶基因的表达。本试验成功构建 pET-22b-GhPDP 重组表达载体,并在大肠杆菌 Transetta (DE3) 内表达,表达形式多为包涵体,少量为可溶性蛋白。

3.2 诱导温度对目的蛋白表达量的影响

诱导温度是影响原核蛋白表达的重要因素之一^[15]。高温诱导时,大肠杆菌的生长速度快,表达蛋白的速度也随之加快,导致表达的目的蛋白没有足够的时间进行正确的折叠,从而容易形成包涵体。因此,降低温度有利于目的蛋白的可溶性表达。本试验中,目的蛋白在 16, 20, 24 °C 表达时均有包涵体形成,但在 20 °C 时目的蛋白可溶性表达量最高。

3.3 IPTG 浓度对目的蛋白表达量的影响

IPTG 终浓度对大肠杆菌生长和蛋白表达也有一定的影响^[16],IPTG 是一种十分有效的乳糖操纵子的诱导剂,合理的浓度可提高表达量,在缩短表达周期的同时可降低成本;而浓度过高会增加原核表达系统的负载,抑制细菌的生长,甚至对细胞具有一定的杀伤作用^[17]。因此,本试验采用低终浓度的 IPTG 进行诱导,当 IPTG 终浓度为 0.10 mmol/L 时,诱导的可溶性目的蛋白相对较多。

3.4 诱导时间对目的蛋白表达量的影响

不同的蛋白诱导时间也不同,有些蛋白对细胞有毒害作用^[18-20]。因此,需要对诱导时间进行优

化。在本试验中,随着诱导时间的增加,目的蛋白的可溶性表达量呈现先增加后降低的趋势;在 5 h 时可溶性蛋白表达相对较多,5 h 后达重组菌的生长平衡期,此时融合蛋白的表达量已无明显增加;若继续培养可则会由于菌体老化分解导致表达量反而下降。

3.5 菌体密度 OD₆₀₀ 对目的蛋白表达量的影响

原核表达中诱导时机也很重要,诱导时机过早会导致目的蛋白产量降低;而诱导时机过晚会影响工程菌的稳定性和活性,进而影响目的蛋白的表达量。在本试验中,随着菌体密度逐渐增加,可溶性目的蛋白的量呈现先增加后降低的趋势,在菌体密度 OD₆₀₀ 为 0.8 时,可溶性目的蛋白相对较多,重组菌进入对数生长期初期,重组质粒拷贝数大量扩增,细菌浓度较低,加入 IPTG 诱导后外源营养物质将主要用于融合蛋白表达,而外源蛋白合成将和细菌自身的生长繁殖竞争营养物质,从而抑制重组菌的生长。

3.6 原核表达的最佳诱导条件

正交试验充分考虑交互作用和全面性,选取部分具有代表性的试验点,对试验因素及条件进行优化组合,从而使试验效率提高^[21]。本试验通过对诱导温度、诱导时间、IPTG 终浓度和菌体浓度 OD₆₀₀ 进行正交试验,对其结果分析得出,诱导条件的各因素影响主次为诱导温度 > IPTG 终浓度 > 诱导时间 > OD₆₀₀;综合所有因素得出诱导最佳条件:菌体密度 OD₆₀₀ 为 0.8、诱导温度为 20 °C、IPTG 终浓度为 0.10 mmol/L、诱导时间为 5 h,此条件下,可溶性目的蛋白可达 8.96%。

参考文献:

- [1] Capitani G, Hohenester E, Feng L, Storici P, Kirsch J F, Jansonius J N. Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in the biosynthesis of the plant hormone ethylene[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 294(3): 745 - 756. doi:10.1006/jmbi.1999.3255.
- [2] 王俊生,袁蕾,张明珠,张改生,牛娜,马守才,李红霞. 化学杂交剂 SQ-1 诱导小麦泛素/26S 蛋白酶途径的表达[J]. *农业生物技术学报*, 2010, 18(4): 695 - 701. doi:10.3969/j.issn.1674-7968.2010.04.011.
Wang J S, Yuan L, Zhang M Z, Zhang G S, Niu N, Ma S C, Li H X. Expression of Ubiquitin-26S proteasome pathway in physiological male sterility of wheat induced by chemical hybrid agents SQ-1[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2010, 18(4): 695 - 701.
- [3] 马蓉丽,成妍,吴海涛,焦彦生,乔宁. 洋葱 T 型细胞质雄性不育与花蕾 ATP 含量的关系[J]. *中国蔬菜*, 2016(2): 32 - 35. doi:10.3969/j.issn.1000-6346.2016.02.007.
Ma R L, Cheng Y, Wu H T, Jiao Y S, Qiao N. Relationship between ATP contents of buds and T-type cytoplasm

- mic male sterility in onion [J]. *Chinese Vegetables*, 2016 (2): 32 - 35.
- [4] 陈蕊红, 叶景秀, 张改生, 王俊生, 牛娜, 马守才, 赵继新, 朱建楚. 小麦质核互作型雄性不育系及其保持系花药差异蛋白质组学分析 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2009, 36 (4): 431 - 440. doi: 10. 3724/SP. J. 1206. 2008. 00515.
Chen R H, Ye J X, Zhang G S, Wang J S, Niu N, Ma S C, Zhao J X, Zhu J C. Differential proteomic analysis of anther proteins between cytoplasmic-nuclear male sterility line and its maintainer in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36 (4): 431 - 440.
- [5] 田长恩, 段俊, 梁承邺. 乙烯对水稻 CMS 系及其保持系蛋白质、核酸和活性氧代谢的影响 [J]. 中国农业科学, 1999, 32 (5): 36 - 42. doi: 10. 3321/j. issn: 0578-1752. 1999. 05. 006.
Tian C E, Duan J, Liang C Y. Effects of ethylene on metabolism of protein, RNA, DNA and activated oxygen in the panicles of CMS and its maintainer [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32 (5): 36 - 42.
- [6] 康娜娜. 棉花 *GhPDC-E1 α* 克隆及调控基因表达模式研究 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2018.
Kang N N. *GhPDC-E1 α* Cloning and regulation of gene expression patterns in cotton [D]. Taiyu: Shanxi Agricultural University, 2018.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Biochem*, 1976, 72 (1 - 2): 248 - 258. doi: 10. 1016/0003-2697 (76) 90527-90523.
- [8] 张付凯, 乔亚奇, 王磊, 兰丽平, 潘家荣. 抗硫磷基因工程四价抗体在大肠杆菌中高效表达与鉴定 [J]. 核农学报, 2012, 26 (1): 118 - 122, 175. doi: 10. 11869/hnxb. 2012. 01. 0118.
Zhang F K, Qiao Y Q, Wang L, Lan L P, Pan J R. High level expression of genetically engineered tetravalent antibodies against parathion in *E. coli* and its identification [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2012, 26 (1): 118 - 122, 175.
- [9] 张军杰, 周会, 胡育峰, 田孟良, 刘汉梅, 黄玉碧. 玉米基因 *sbe1* cDNA 的克隆与原核表达 [J]. 核农学报, 2009, 23 (1): 70 - 74.
Zhang J J, Zhou H, Hu Y F, Tian M L, Liu H M, Huang Y B. Cloning and expression of *sbe1* cDNA from maize in *E. coli* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2009, 23 (1): 70 - 74.
- [10] 倪志勇, 李波, 范玲. 棉花肉桂醇脱氢酶基因 *GhCAD3* 的克隆及原核表达 [J]. 核农学报, 2010, 24 (5): 910 - 916, 921.
Ni Z Y, Li B, Fan L. Cloning and prokaryotic expression of *GhCAD3* gene from *Gossypium hirsutum* [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24 (5): 910 - 916, 921.
- [11] 潘滨, 吴建祥, 李桂新, 周雪平. 烟草曲茎病毒复制相关蛋白基因原核表达条件优化 [J]. 浙江大学学报 (农业与生命科学版), 2007, 33 (1): 24 - 28. doi: 10. 3321/j. issn: 1008-9209. 2007. 01. 005.
Pan B, Wu J X, Li G X, Zhou X P. Optimization of prokaryotic expression conditions of *Tobacco curly virus* replication-associated protein gene [J]. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 2007, 33 (1): 24 - 28.
- [12] Bonner G, Lafer E M, Sousa R. Characterization of a set of T7 RNA polymerase active site mutants [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269 (40): 25120-25128.
- [13] Chamberlin M, Mcgrath J, Waskell L. New RNA polymerase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7 [J]. *Nature*, 1970, 228: 227 - 231. doi: 10. 1038/228227a0.
- [14] Dyke M W V, Sirito M, Sawadogo M. Single-step purification of bacterially expressed polypeptides containing an oligo-histidine domain [J]. *Gene*, 1992, 111 (1): 99 - 104. doi: 10. 1016/0378-1119 (92) 90608-R.
- [15] 黄传臻, 刘香利, 曹汝菲, 赵惠贤. 小麦 *CWI-B1* 的原核表达、纯化与多克隆抗体制备 [J]. 农业生物技术学报, 2017, 25 (7): 1102 - 1110. doi: 10. 3969/j. issn. 1674-7968. 2017. 07. 007.
Huang C Z, Liu X L, Cao R F, Zhao H X. Prokaryotic expression, purification and preparation of polyclonal antibody wheat (*Triticum aestivum*) *CWI-B1* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2017, 25 (7): 1102 - 1110.
- [16] 常国栋, 李壮林, 秦加阳, 马翠卿, 罗永章, 许平. 重组人血管内皮抑制素 (rh-Endostatin) 大肠杆菌表达体系发酵条件的优化 [J]. 生物工程学报, 2005, 21 (4): 662 - 666.
Chang G D, Li Z L, Qin J Y, Ma C Q, Luo Y Z, Xu P. Optimization of fermentation of recombinant human endostatin (rh-endostatin) expression in *Escherichia coli* [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, 21 (4): 662 - 666.
- [17] Xu Y C, Xue F S, Luo M P, Yang Q Y, Liao X, Liu Y, Zhang Y M. Median effective dose of remifentanyl for awake laryngoscopy and intubation [J]. *Chinese Medical Journal*, 2009, 122 (13): 1507 - 1512. doi: 10. 3760/cma. j. issn. 0366-6999. 2009. 13. 006.
- [18] Majumder A, Basak S, Raha T, Chowdhury S P, Chattopadhyay D, Roy S. Effect of osmolytes and chaperone-like action of P-protein on folding of nucleocapsid protein of *Chandipura virus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276 (33): 30948 - 30955. doi: 10. 1074/jbc. M011705200.
- [19] 赵思婷, 王贵华, 张瑞华, 金梅林, 陈焕春. 鸭源 H9N2 亚型流感病毒 NS 基因的克隆及表达 [J]. 中国兽医科技, 2004, 34 (5): 23 - 26. doi: 10. 16656/j. issn. 1673-4696. 2004. 05. 007.
Zhao S T, Wang G H, Zhang R H, Jin M L, Chen H C. Cloning and expression of NS gene of *Avian influenza virus* type H9N2 from ducks [J]. *China Journal of Veterinary Science and Technology*, 2004, 34 (5): 23 - 26.
- [20] 杨婉华, 汪蕊, 陈睿, 马湘一, 王世宣, 卢运萍, 马丁. 可溶性 VEGF 受体-3 原核表达载体的构建与蛋白表达 [J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15 (23): 3547 - 3550. doi: 10. 3969/j. issn. 1005-8982. 2005. 23. 007.
Yang W H, Wang R, Chen R, Ma X Y, Wang S X, Lu Y P, Ma D. Gene cloning of soluble VEGF receptor-3 and expression in prokaryotic system [J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2005, 15 (23): 3547 - 3550.
- [21] Bungler M K, Cargile B J, Sevinsky J R, Deyanova E, Yates N A, Hendrickson R C, Stephenson J L. Detection and validation of non-synonymous coding SNPs from orthogonal analysis of shotgun proteomics data [J]. *Journal of Proteome Research*, 2007, 6 (6): 2331 - 2340. doi: 10. 1021/pr0700908.