

拟南芥 SEPALLATA3 蛋白质原核表达与纯化

周佳平, 林新春, 徐英武

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: *SEPALLATA3* (*SEP3*) 属于花器官建成 ABCE 模型中的 E 类基因, 为了揭示 *SEP3* 蛋白是如何形成多聚体的, 以及多聚体与其生物学功能之间的联系, 开展了拟南芥 *Arabidopsis thaliana* *AtSEP3* 蛋白质体外可溶性表达实验, 构建了原核表达载体, 并在大肠埃希菌 *Escherichia coli* 细胞中进行重组蛋白的诱导表达。从蛋白不同的结构域、诱导时间和诱导温度等方面对蛋白的可溶性表达进行了分析。最后以 pET-15b 为表达载体, 大肠埃希菌表达菌株 *E. coli* ‘Rosetta’ 为宿主菌株, 22 ℃ 诱导表达 15 h, 获得不同片段的 *AtSEP3* 可溶性蛋白。通过镍柱及分子层析色谱柱分离纯化, 表明 *AtSEP3* 蛋白以四聚体形式存在。图 4 参 13

关键词: 植物学; *SEP3* 蛋白; 原核表达; 蛋白纯化; 多聚体

中图分类号: S601; S718.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2014)01-0014-05

Arabidopsis thaliana SEPALLATA3 protein in a prokaryotic system

ZHOU Jiaping, LIN Xinchun, XU Yingwu

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: The transcription factor of *SEPALLATA3* (*SEP3*) belongs to the E class gene of the ABCE model of flower development. *SEP3* has been shown to mediate complex formation and, therefore, a special attention was paid to its structure-function relationship. To determine how *SEPALLATA3* protein oligomers were formed, the oligomeric status was studied by obtaining soluble protein expression in vitro. The *SEP* gene (*AtSEP3*) was constructed as a fusion protein and expressed in prokaryotic cells. After determining an optimal expression strategy, nickel chelating resin was used to purify the protein which was displayed as a tetramer in size exclusion chromatography (SEC). To get the high efficiency of soluble protein, different structural domains and expression conditions were screened, and 0.1% IPTG inducing at 22 ℃ for 15 h produced an optimal expression strategy. These preliminarily results provided an important basis for further study of the structure-function relationship. Overall, these results indicate that the *SEP3* ‘glue’ protein in mediating multimerization is based on homomeric interactions. [Ch, 4 fig. 13 ref.]

Key words: botany; *SEP3* protein; prokaryotic system; protein purification; polymer

花器官的研究一直以来是植物发育学研究中的一大热点。1991 年 Coen 等^[1] 在拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和金鱼草 *Antirrhinum majus* 的花器官同源异型突变体的遗传学研究基础上, 首先提出了“ABC”模型, 随后 Theißen 等^[2] 又陆续提出了有关植物花发育的新模型, 即“ABCD”模型、“ABCDE”模型及四元体模型。目前, 对于酵母 MCMI-拟南芥 AG-金鱼草 DEFA-动物血清应激因子 SRF(MADS)转录因子的研

收稿日期: 2012-12-21; 修回日期: 2013-04-01

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973” 计划) 项目 (2011CB111500); 国家自然科学基金资助项目 (31270715, 31000295); 浙江农林大学科学研究发展基金资助项目 (2010FR072)

作者简介: 周佳平, 从事植物分子生物学研究。E-mail: zhoujiaping100@163.com。通信作者: 徐英武, 教授, 博士, 从事生物物理学等研究。E-mail: yxu@zafu.edu.cn

究主要集中在它们的遗传学功能^[3]及其植物新陈代谢调控方面^[4]。通过对拟南芥突变体的研究, 证明 *SEPALLATA-like* 基因对于花粉的成熟及花粉管的形成有着重要作用^[5]。*SEP-like* 基因是编码 MADS 蛋白的转录因子, 在双子叶植物中基因的功能表现出不同程度的冗余性和亚功能化^[5], E 类开花基因的同源蛋白在花器官的发育形成方面比其他 A/B/C 类转录因子更重要^[6-7]。*SEP3* 属于 E 类的拟南芥 *AGL9* 型基因, 编码蛋白在 MADS box 家族形成四聚体复合物过程中起着重要作用^[6]。MADS 蛋白在开花过程中主要通过与其他蛋白互作^[8], 参与了许多调控开花过程^[9]。*SEP3* 蛋白是否只是在结合其他转录因子后形成异聚复合物^[10]时才发挥作用, 还是在形成同源多聚体后也有生物学功能, 目前尚不清楚。已有的研究证明: MADS 蛋白与特异的 DNA 结合形成同源多聚体并行使其功能^[11], 但 *SEP3* 蛋白同源多聚体形成的作用机制及其与功能之间的关系, 至今还没有明确的答案。本研究尝试通过体外表达纯化可溶性 *SEP3* 蛋白的途径加以分析, 将不同结构域的 *AtSEP3* 基因, 克隆到原核表达载体 pET-15b 上, 诱导表达后筛选获得可溶性表达, 纯化获得高质量的 *AtSEP3* 蛋白。这项工作为通过 *AtSEP3* 蛋白的结构功能解析来分析植物花形成分子机制提供了重要基础。

1 材料与方法

1.1 材料

哥伦比亚(Columbia, Col)野生型拟南芥由浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地实验室栽植。大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 表达菌株 *E. coli* ‘Rosetta’以及表达质粒 pET-15b 为浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地保存; RNA 提取试剂盒购自北京鼎国昌盛有限公司; DNA 聚合酶、各种 DNA 限制性内切酶及 DNA 购自宝生物工程(大连)有限公司; DNA 连接酶购自 New England 公司; DNA 纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 其余各试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 *AtSEP3* 原核表达载体的构建 用 Trizol 法提取拟南芥花芽组织 RNA, 反转录得到 cDNA。根据拟南芥的 *SEP3* 基因的 cDNA 保守序列设计 2 个不同结构域(包括 MIKC 域, IKC 部分)的引物, 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增后得到的产物连接到 pMD18-T 载体并转化到大肠埃希菌 DH5 α 后取样测序。将测序验证正确的菌株扩大提取质粒后, 用 *Nco* I 和 *Bam* H I 双酶切提取的质粒和 pET-15b 载体, DNA 胶回收试剂盒回收酶切产物后将片段和载体 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜连接后转化大肠埃希菌 DH5 α 并涂布氨苄抗性的 LB 平板上, 挑菌培养后菌液 PCR 检测, 并送菌样品测定碱基序列, 克隆得到不同结构域片段的 *AtSEP3* 原核表达载体。

1.2.2 重组 *AtSEP3* 蛋白的可溶性条件筛选 不同的诱导温度对于原核表达蛋白的可溶性有密切的关系, 高温条件下菌株快速表达目的蛋白容易使蛋白形成不正确的构象折叠最后以包涵体的形式存在, 不利于获得可溶性的蛋白。测序鉴定正确的重组质粒转化于表达宿主菌株 *E. coli* ‘Rosetta’中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 15.0 h, 挑取单菌落转接到 100.0 mL 的含 50.0 mg $\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 培养 3.0 h, 菌液浓度在吸光度 $D(\lambda)_{600}$ 为 0.4~0.6 时, 加入终浓度为 0.1 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), 分别在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5.0 h 和 22 $^{\circ}\text{C}$, 15.0 h 不同的温度及时间条件下诱导培养。确定适合诱导的培养温度。

1.2.3 *AtSEP3* 重组蛋白的多肽指纹图谱验证 上述纯化得到的重组蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离检测, 考马斯亮蓝染色后, 用手术刀小心切取目的条带, 置于 1.5 mL 离心管中(加入小量双蒸水 ddH $_2$ O), 由北京信科奥达科技有限公司做肽质量指纹图谱鉴定分析。

1.2.4 重组 *AtSEP3* 蛋白的纯化 使用 Ni-TNA 树脂初步纯化后用凝胶过滤层析柱纯化可溶性的融合蛋白。具体步骤如下: 5 000 g 离心收集菌液沉淀, 加入 10.0 mL 0.5 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, 20.0 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCl)pH 8.0 的裂解液, 冰水下功率为 200 W, 5 s 开 8 s 关超声 10.0 min, 静置 30.0 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件 17 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 40.0 min。收集上清液, 平衡好 Ni-NTA 柱, 将上清液上柱, 在冰上用摇床缓慢结合 30.0 min 后, 收集未特异性结合 Ni-NTA 柱的杂蛋白, 分别用 10 个柱体积的不同咪唑浓度梯度的缓冲液(4/20/80 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, 0.2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, 20.0 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl pH 8.0)洗脱非特异性结合的杂蛋白, 最后用 10 倍体积的洗脱溶液(200.0 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑, 0.2 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ 氯化钠, 20.0

mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0) 冲洗收集目的蛋白。使用凝胶过滤层析柱纯化目的蛋白。将收集的洗脱液用超滤浓缩柱 4 000 g 离心浓缩至 500.0 μL 体积后上样, 以洗脱缓冲液(0.2 mol·L⁻¹ 氯化钠, 20.0 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0), 0.5 mL·min⁻¹ 流速分离纯化目的蛋白。取少量蛋白样品加入 2 倍蛋白上样缓冲液, 煮沸 10.0 min, 离心沉淀再次超声后取 10.0 μL 加入 10.0 μL 上样缓冲液煮沸 10.0 min 后点样体积分数为 15% SDS-PAGE 检测, 观察目的蛋白的表达纯化情况。

2 结果与分析

2.1 pET15-AtSEP3 原核表达载体的构建

测序验证得到 2 个不同结构域的 AtSEP3 结构域的序列, 构建不同大小结构域的载体(图 1)^[11]。转化成功的菌株提取质粒进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定均得到目的片段, 成功构建得到不同结构域的 pET15b-AtSEP3 原核表达载体。

2.2 重组 AtSEP3 蛋白的可溶性条件优化

将构建好的原核表达菌株扩大培养, 用裂解液溶解蛋白, SDS 电泳图中(图 2)箭头所指是目的蛋白, 检测发现 AtSEP3A(30 kDa)以包涵体形式表达, AtSEP3B(18 kDa)为可溶蛋白。实验表明, 包含部分 IKC 区的 AtSEP3B 以 pET-15b 为原核表达载体, 在 22 °C 条件下终浓度 0.1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 诱导表达 15.0 h, 得到高表达的可溶蛋白。

2.3 肽质量指纹图谱鉴定重组蛋白

为了检测原核表达蛋白, 对 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色后显示的目的蛋白进行肽质量指纹图谱鉴定。北京信科奥康科技有限公司提供的初始检索结果显示(检索程序是 Mascot: <http://www.matrixscience.com>, 数据库为 SwissProt): 目的蛋白与蛋白 NP_850953.1, 鉴定得分为 92

分, 检测结果中有 18 条肽段与目的蛋白序列相匹配(图 3A), 红色部分表示与目的蛋白所匹配的多肽片段, 匹配部分占目的蛋白的 42%。Mascot Score 直方图(图 3B), 蛋白得分大于 53 分具有显著性差异($P < 0.05$), 阴影区域为不可信任结果, 阴影外红色表示匹配的结果, 与数据库比对得到验证。Mascot Score 直方图所示如下, 左侧的小片段相匹配的肽段不具备显著性差异, 没有说明意义, 右侧红色柱状图表示与数据库蛋白相匹配的肽段, 且具有显著性差异, 说明纯化的融合蛋白是 AtSEP3 蛋白。

2.4 AtSEP3B 可溶蛋白的纯化

纯化各阶段产物的电泳结果如下图 4A 所示。作为标准的小牛血清蛋白(BSA)溶液以单体和二聚体形式存在, 大小分别是 67 kDa 和 134 kDa。黑色实线表示 AtSEP3B, 峰值位置接近 BSA 单体 67 kDa。图 4B 中 SDS-PAGE 检测蛋白凝胶过滤层析后样品纯度, 箭头所指为目的蛋白, 说明纯化得到了高纯度的 AtSEP3B 蛋白, 其单肽链为 18 kDa, 图 4A 中峰值大小靠近 67 kDa 左右, 表明纯化的 AtSEP3B 是以四聚体形式存在。

3 讨论

虽然植物开花分子机制的研究在模式植物上已经取得了一定的进展, 但是随着研究的深入凸现了一

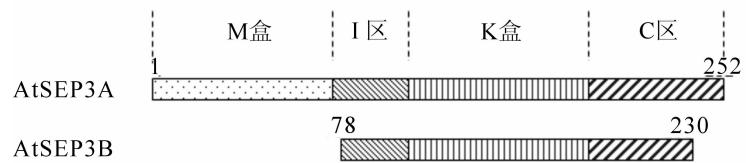
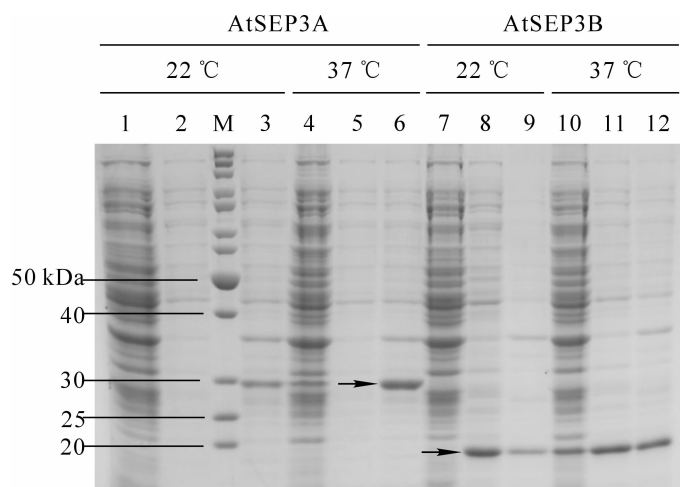


图 1 pET15b-AtSEP3 重组蛋白构建图

Figure 1 AtSEP3 protein domain construction



1, 4, 7, 10: 总蛋白; M: 蛋白标记; 2, 5, 8, 11: 上清样品; 3, 6, 9, 12: 沉淀样品。

图 2 AtSEP3 融合蛋白的可溶性表达筛选

Figure 2 Screening for soluble AtSEP3 protein expression

些新的问题，例如植物控制花器官形成过程中的分子机制，MADS 盒蛋白的结构及其功能机制均不明确。本研究以拟南芥成花过程中重要的调控基因 *SEP3* 为例，设计了不同结构域的载体片段，纯化得到了可溶的 AtSEP3 蛋白。

SEP3 基因以高级复合物的形成存在，在开花不同环节中都扮演着重要作用^[12]，在 ABCE 模型形成的各个阶段都不可缺少。*SEP3* 蛋白结合特异性的 DNA 片段后行使其转录因子的作用，还与其他特定的蛋白相互作用从而激活或抑制下游基因蛋白的功能^[13]。Immink 等^[9]在 2009 年提出的 *SEP3* 四元体模型，其中 MADS 盒的 M 结构域结

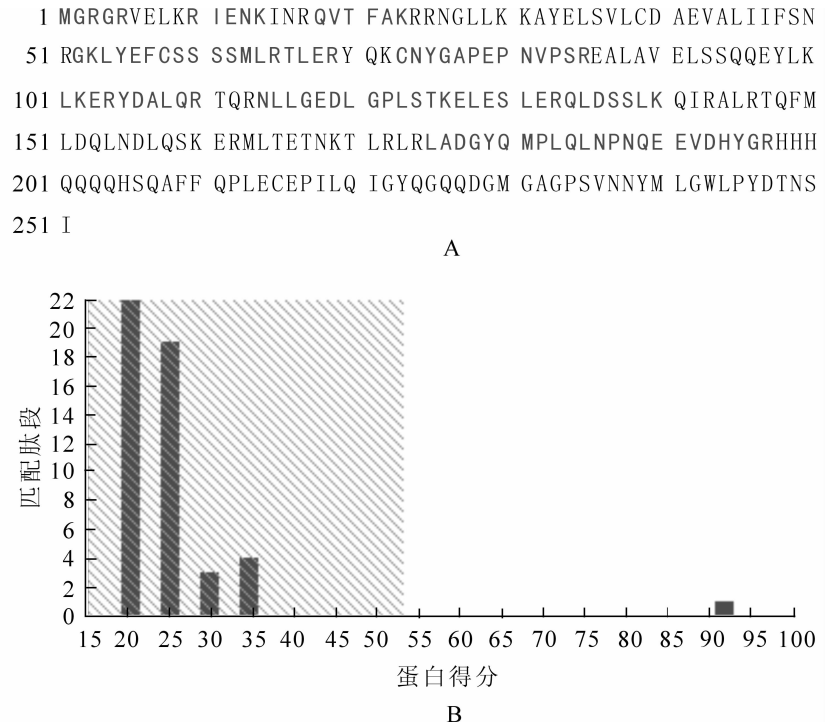
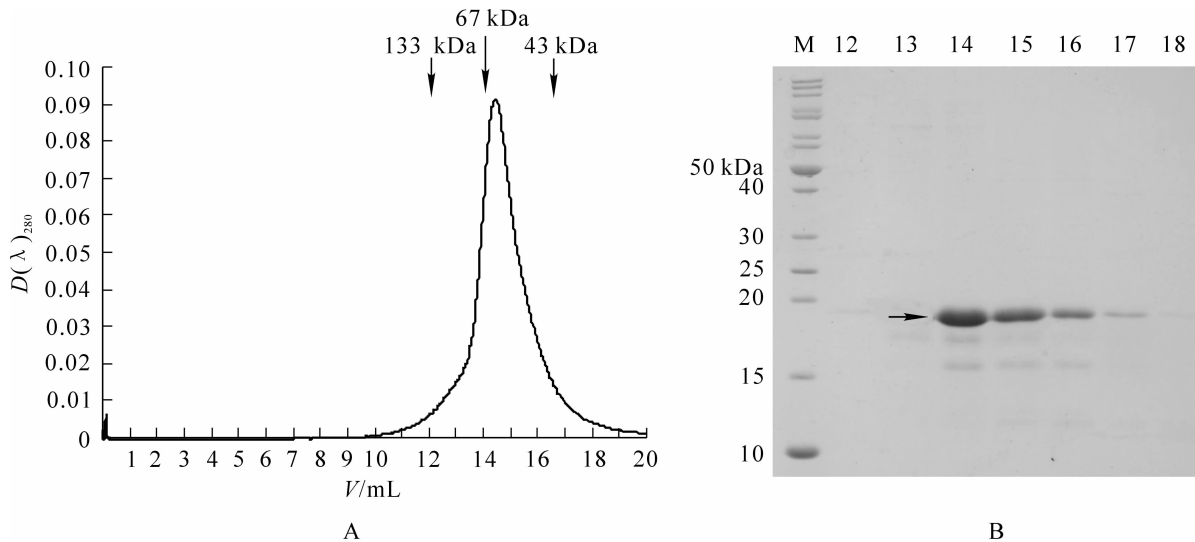


图 3 AtSEP3 蛋白质肽质量指纹图谱鉴定(A)及 Mascot Score 直方图(B)

Figure 3 Identification of AtSEP3 protein by mass spectrometry (A) and Mascot Score histogram of mass fingerprinting(B)



A: AtSEP3B蛋白的沉淀过程层析图，缓冲液[0.2 mL · L⁻¹氯化钠，20.0 mmol · L⁻¹三羟甲基氨基甲烷-盐酸(Tris-HCL)，pH 8.0]。B: AtSEP3B蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测，12~18分别代表与A相对应的体积数。

图 4 重组蛋白 AtSEP3B 的凝胶过滤层析柱图(A)及 SDS 检测(B)

Figure 4 Gel filtration of AtSEP3B proteins

合 DNA 并稳定四聚体。本研究通过对 AtSEP3 蛋白结构域的分析表明，*SEP3* 蛋白在形成四聚体时并不需要 M 结构域。换言之，结合 DNA 对四聚体的形成是不必要的。

大肠埃希菌原核表达系统适合多种原核基因和真核基因的蛋白表达。但外源蛋白的表达以及是否可溶与多种因素有关，包括表达温度、原核表达载体、结构域构建以及表达菌株。温度对于 *SEP3* 表达的可溶性有重要的影响。降低诱导温度，延长表达时间明显有利于 *SEP3* 外源蛋白的正确折叠和表达产量。可溶性与目的蛋白的性质也密切相关，极性的均一性影响着蛋白的可溶表达。生物信息学预测表明

SEP3 蛋白 M 区是亲水性, 其他 IKC 区是疏水性。本研究筛选了不同的片段和原核表达体系, 最终获得了 AtSEP3B 结构域片段的可溶性表达。这些结构域以四聚体形式存在, 疏水区域有可能构成单体相互作用界面, 稳定了四聚体, 其余部分构成四聚体亲水表面, 促进了蛋白可溶性。进一步通过结构生物学的方法分析 SEP3 蛋白四聚体形成以及空间结构与功能之间的关系正在进行中。

参考文献:

- [1] COEN E S, MEYEROWITZ E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development [J]. *Nature*, 1991, **353**: 31 – 37.
- [2] THEIßEN G. Development of floral organ identity: stories from the MADS house [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, **4** (1) : 75 – 85.
- [3] SOLTIS D E, LEEBENS-MACK J H, SOLTIS P S. *Developmental Genetics of the Flower: Advances in Botanical Research* 44 [M]. New York: Academic Press, 2006.
- [4] ACKERMAN C M, YU Qingyi, KIM S, *et al.* B-class MADS-box genes in trioecious papaya: two paleoAP3 paralogs, *CpTM6-1* and *CpTM6-2*, and a *PI* ortholog *CpPI* [J]. *Planta*, 2008, **227**: 741 – 753.
- [5] CUI Rongfeng, HAN Jiakun, ZHAO Suzhen, *et al.* Functional conservation and diversification of class E floral homeotic genes in rice (*Oryza sativa*) [J]. *Plant J*, 2010, **61**(5): 767 – 781.
- [6] MELZER R, VERELST W, THEIßEN G. The class E floral homeotic protein SEPALLATA3 is sufficient to loop DNA in 'floral quartet'-like complexes in vitro [J]. *Nucl Acids Res*, 2009, **37**(1): 144 – 157.
- [7] CASTILLEJO C, ROMERA-BRANCHAT M, PELAZ S. A new role of the *Arabidopsis* *SEPALLATA3* gene revealed by its constitutive expression [J]. *Plant J*, 2005, **43**(4): 586 – 596.
- [8] IMMINK R G H, KAUFMANN K, ANGENT G C. The 'ABC' of MADS domain protein behaviour and interactions [J]. *Sem Cell & Dev Biol*, 2010, **21**(1): 87 – 93.
- [9] IMMINK R GH, TONACO I AN, de FOLTER S, *et al.* SEPALLATA3: the 'glue' for MADS box transcription factor complex formation [J]. *Genome Biol*, 2009, **10**(2): R24. doi:10.1186/gb-2009-10-2-r24.
- [10] TSAFTARIS A, PASENTSIS K, MAKRI S, *et al.* The study of the E-class *SEPALLATA3-like* MADS-box genes in wild-type and mutant flowers of cultivated saffron crocus (*Crocus sativus* L.) and its putative progenitors [J]. *J Plant Physiol*, 2011, **168**(14): 1675 – 1684.
- [11] HUANG Hai, TUDOR M, SU T, *et al.* DNA binding properties of two *Arabidopsis* MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation [J]. *Plant Cell*, 1996, **8**: 81 – 94.
- [12] ADAMCZYK B J, FERNANDEZ D E. MIKC* MADS domain heterodimers are required for pollen maturation and tube growth in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2009, **149**(4): 1713 – 1723.
- [13] SMACZNAK C, IMMINK R G H, MUIÑO J M, *et al.* Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in *Arabidopsis* flower development [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2012, **109**(5): 1560 – 1565.