

DOI:10.11937/bfyy.201522029

# 苦瓜谷氨酰胺合成酶基因(*McGS1*) 原核表达载体的构建及表达分析

申龙斌, 牛 玉, 刘子记, 刘昭华, 扬 衍

(中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 海南 儋州 571737)

**摘 要:**以“热研3号”苦瓜为试材,根据苦瓜谷氨酰胺合成酶基因(*McGS1*)全长序列信息设计引物,提取“热研3号”苦瓜总RNA并反转录成cDNA作为模板,通过PCR扩增、产物测序、酶切等方法与pET-30a(+)原核表达载体相连,构建苦瓜*McGS1*基因原核表达载体,并在大肠杆菌BL21(DE3)中进行表达分析,研究不同IPTG浓度及诱导时间对苦瓜*McGS1*基因蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中表达的影响。结果表明:该研究成功构建了苦瓜*McGS1*基因的原核表达载体,37℃、0.2 μmol/L IPTG诱导4 h 苦瓜*McGS1*基因蛋白在大肠杆菌BL21(DE3)中可高效表达,表达的蛋白质分子量约为35 kDa。

**关键词:**苦瓜;谷氨酰胺合成酶;原核表达

**中图分类号:**S 642.503.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)22-0110-04

氮(N)素是植物吸收和利用的必需营养元素之一,是植物生命活动中不可缺少的重要组成成分,植物细胞中的蛋白质、核酸、酶类等需要氮元素,因此,氮元素能直接影响到植物的生长发育。作物中的N元素主要从土壤中获取,土壤中氮素的多少直接影响到作物的生长发育、产量形成与品质的好坏<sup>[1-2]</sup>。自然环境中土壤的氮元素含量较少,无法满足作物生产的需要,含N肥料的开发和利用大大地提高了作物的产量和品质。来自

联合国粮农组织的数据表明,发展中国家粮食的主要增产因素是因为化肥的大量使用,其中含氮肥料的使用又起着关键的作用,我国目前每年使用在农作物上的氮肥超过2 000万t,是世界上氮肥使用最多的国家之一。氮肥的大量使用给农作物带来高产、稳产的同时也带来一系列的环境问题,目前世界氮肥的平均利用率约为40%~60%,而我国仅为30%左右。氮肥利用效率低不仅带来了极大的资源浪费,还造成了环境的污染<sup>[3]</sup>。因此,研究合理地施用氮肥,在减少氮素损失的同时又能提高作物对氮素的利用率来增加作物的产量和改善作物的品质,已成为大家共同关注的问题。

谷氨酰胺合成酶是植物体内参与氮素同化的关键性酶之一,它依靠ATP功能催化谷氨酸生成谷氨酰胺,完成无机氮向有机氮转化的第一步。因此谷氨酰胺合成酶在植物N素同化和利用效率方面起着极为重要的

**第一作者简介:**申龙斌(1984-),男,博士,助理研究员,研究方向为瓜菜遗传育种。E-mail:sjylnong@163.com。

**责任作者:**扬衍(1971-),男,博士,研究员,硕士生导师,现主要从事瓜菜遗传育种等研究工作。E-mail:yzq@126.com。

**基金项目:**中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(1630032013007,1630032015015)。

**收稿日期:**2015-07-27

**Abstract:** To select the suitable method for total RNA extraction from oriental plum (*Prunus salicina* Lindl.) fruit, the performances of three extraction methods, trizol, plant total RNA extraction kit and modified CTAB were compared. Trizol and RNA plant extraction kit were determined to hardly extract integrate RNA. Modified CTAB was capable of efficiently removing polysaccharides. The lightness of 28S rRNA of the RNA isolated by modified CTAB was 1.5—2.0 times as much as that of 18S rRNA, with the OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> value ranging from 1.8 to 2.1. The RNA productivities from 5 samples of fruit tissue were 770.96—1 029.04 ng/μL, respectively. The specific RNA bands obtained by RT-PCR indicate that the RNA extracted by modified CTAB was of high-quality and good-integrity at a higher productivity, thus completely suitable for further molecular biological research.

**Keywords:** plum (*Prunus salicina* Lindl.); fruit flesh; comparative; RNA; modified CTAB

作用<sup>[4]</sup>。谷氨酰胺合成酶根据其在植物不同组织的分布可以划分为胞液型谷氨酰胺合成酶(GS1)和叶绿体型谷氨酰胺合成酶(GS2),其中胞液型谷氨酰胺合成酶广泛分布于植物的根、茎、叶等组织中<sup>[5]</sup>。目前关于植物GS1的研究主要集中在不同形态氮素肥料及使用量对植物GS1活性的影响方面,而关于植物GS1基因调控植物氮素吸收和利用的分子机制方面的研究较少<sup>[5-6]</sup>。邓扬悟<sup>[1]</sup>从甜瓜中克隆了GS1基因,研究了不同形态氮营养对甜瓜GS1基因及GS2基因表达量的影响,同时构建了GS1基因的原核表达载体,纯化了重组蛋白,并进行了活性研究。冯卓等<sup>[5]</sup>从黄瓜中克隆了GS1基因,发现在低氮条件下,氮营养的增加能促进该基因的表达,高氮营养则抑制该基因的表达<sup>[5]</sup>。目前关于苦瓜GS1基因研究尚鲜见报道。

苦瓜(*Momordica charantia* L.)属葫芦科苦瓜属一年生草本植物,广泛种植于热带、亚热带和温带地区。苦瓜营养丰富,维生素C和维生素E含量尤其高,苦瓜中含有的活性成分还具有抗突变、降血糖、抗肿瘤和提高人体免疫力等功效。随着大众对苦瓜营养价值和药用价值的充分认识,我国苦瓜生产迅速发展,栽培面积逐年扩大,推动了苦瓜育种研究工作的深入开展<sup>[7]</sup>。目前对苦瓜GS1基因的研究报道较少,因此对该基因进行研究有助于揭示其调控苦瓜氮素吸收和利用的分子机制,以期为苦瓜的合理施用氮肥提供理论依据。苦瓜McGS1基因原核表达载体的成功构建和表达可为苦瓜谷氨酰胺合成酶的原核表达与纯化、定位及功能分析等方面的研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为课题组选育的苦瓜新杂交组合“热研3号”;原核表达载体pET-30a(+)-大肠杆菌DH5 $\alpha$ 和BL21(DE3)、PCR产物回收试剂盒、pMD19-T测序载体及酶试剂等购自上海生物工程有限公司, RNA提取试剂盒购自天根生物公司,反转录试剂盒购自TAKARA公司。

细菌培养基为LB培养基(1 L):蛋白胨10 g,酵母提取物5 g, NaCl 10 g, pH 7.0, 1 L液体培养基中加入12 g琼脂粉即配制成为固体培养基。

### 1.2 试验方法

1.2.1 苦瓜总RNA提取及cDNA合成 “热研3号”苦瓜总RNA提取及cDNA第一链的合成参照文献<sup>[10]</sup>中所述方法。使用天根生物公司生产的RNA提取试剂盒(编号DP437)对苦瓜总RNA进行提取,结合RNA吸附柱对提取程序进行改进,使用液氮将试验材料速冻后快速研磨成粉,取约1.0 g研磨好的材料置于2 mL无RNAase的离心管中进行提取,提取步骤按照参考文献中所述方

法进行,获得的苦瓜总RNA,取2  $\mu$ L进行电泳检测。对符合要求的RNA用于反转录合成cDNA第一链,使用TaKaRa的反转录试剂盒(编号RR047A)进行反转录,所得cDNA第一链放于-20℃冰箱,备用。

1.2.2 原核表达载体构建 根据课题组前期获得的苦瓜McGS1基因序列<sup>[10]</sup>信息设计引物,并引入EcoRI和XhoI酶切位点,引物序列如下:McGS-pET-30a(+)-F EcoRI: cgGAATTCATGTCCTCTGCTCTCAGATCTC; McGS-pET-30a(+)-R XhoI: CCCTCGAGTGGCTTC-CACAAGATGGTGG),引物由上海生工生物工程公司进行合成。以“热研3号”苦瓜cDNA第一链为模板进行PCR扩增。PCR产物使用浓度为1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测,对目的片段利用PCR产物回收试剂盒进行回收与纯化,与pMD19-T载体16℃连接过夜,将连接产物使用氯化钙冷冻法转化至大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,在含有100  $\mu$ g/mL Amp的平板上进行抗性筛选,挑取阳性克隆子,由上海生工生物工程公司进行测序分析。提取测序分析正确的菌株质粒和原核表达载体pET-30a(+)-并进行EcoRI和XhoI双酶切,回收目的片段,利用T4DNA连接酶在16℃恒温条件下连接过夜,并将连接产物转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中,进行抗性筛选,提取阳性克隆子的质粒并进行PCR、酶切和测序分析,将构建好的McGS1原核表达载体转入宿主细胞大肠杆菌BL21(DE3)中4℃冷藏备用。

1.2.3 目的蛋白诱导表达条件的优化 取50  $\mu$ L冷藏的重组子菌液,转入5 mL LB液体培养基中37℃震荡培养,待菌液浓度OD<sub>600</sub>值为0.6时,进行诱导培养。根据不同诱导时间(2、4、6、8 h)和不同浓度(0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L)诱导剂(IPTG)对目的蛋白表达的影响来优化目的蛋白诱导表达条件。离心收集诱导目的蛋白表达的菌体,利用超声波破碎法提取菌体蛋白进行SDS-PAGE凝胶电泳分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体构建

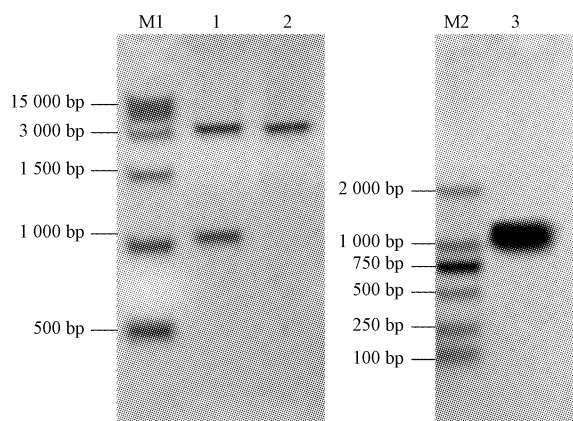
提取转化McGS-pET-30a(+)-重组子的大肠杆菌DH5 $\alpha$ 中的质粒,进行EcoRI和XhoI双酶切检测(图1),获得2条片段,1条与pET-30a(+)-原核表达载体双酶切获得的片段大小一致,另1条与重组子PCR检测的条带大小一致。对获得的McGS-pET-30a(+)-重组子进行测序分析发现,插入载体的序列与设计的目的序列信息一致(测序结果在这不作详细表述),以上结果表明McGS-pET-30a(+)-原核表达载体构建成功。

### 2.2 原核表达及条件优化

提取宿主细胞中的蛋白并进行SDS-PAGE凝胶电

泳分析发现(图2),在凝胶中有1条约35 kDa大小的条带,这与预测的McGS蛋白分子质量大小基本一致。通过不同诱导时间和不同浓度诱导剂对目的蛋白表达的影响分析发现:在诱导时间达到4 h时,蛋白的表达量最高,在6 h和8 h时目的蛋白的表达水平与4 h时基本一

致;在诱导剂浓度为0.2~0.6 mmol/L时目的蛋白的表达量最高(图3)。以上结果表明,McGS-pET-30a(+)原核表达载体在大肠杆菌BL21(DE3)中表达的最佳条件是:37℃条件下使用0.2 mmol/L的IPTG诱导4 h。

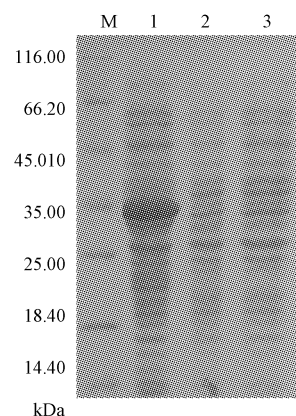


注:M1:DL 15 000 Marker;1:McGS-pET-30a(+);2:pET-30a(+);M2:DL 2 000 Marker;3:PCR产物。

Note:M1:DL 15 000 Marker;1:McGS-pET-30a(+);2:pET-30a(+);M2:DL 2 000 Marker;3:PCR product.

图1 McGS-pET-30a(+)重组子 *Eco*R I 和 *Xho* I 双酶切及 PCR 检测

Fig.1 Identification of recombinant McGS-pET-30a(+) using enzyme digestion and PCR methods

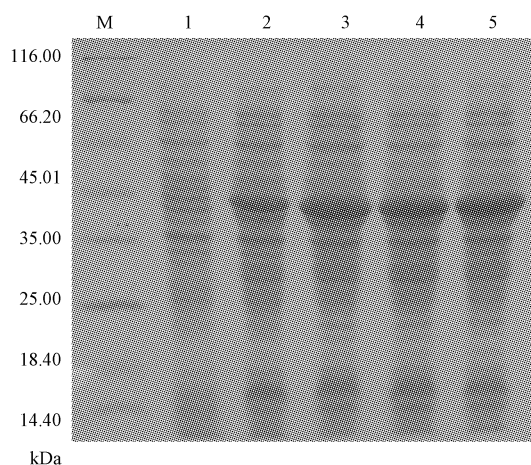


注:M,蛋白 Marker;1,转 McGS-pET-30a(+) BL21(DE3)菌液全蛋白(0.2 mmol/L IPTG,4 h);2,BL21(DE3)菌液全蛋白(0.2 mmol/L IPTG,4 h);3,转 pET-30a(+) BL21(DE3)全蛋白(0.2 mmol/L IPTG,4 h)。

Note:M,protein Marker;1,total protein of BL21(DE3) transformed McGS-pET-30a(+)(0.2 mmol/L IPTG,4 h);2,total protein of BL21(DE3)(0.2 mmol/L IPTG,4 h);3,total protein of BL21(DE3) transformed pET-30a(+)(0.2 mmol/L IPTG,4 h).

图2 McGS-pET-30a(+),pET-30a(+)原核表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of McGS-pET-30a(+),pET-30a(+)

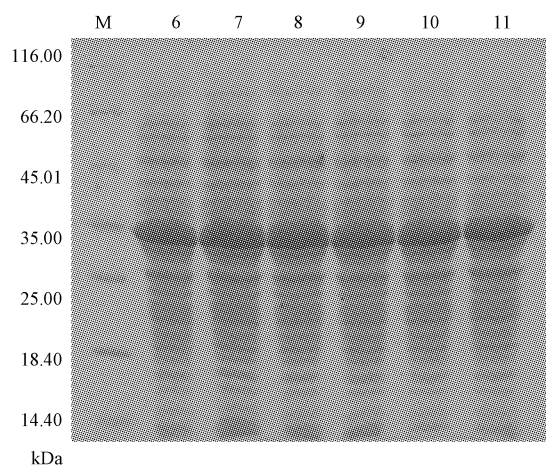


注:M,蛋白 Marker;1~5,转 McGS-pET-30a(+) BL21(DE3)菌液全蛋白(0.2 mmol/L IPTG,分别诱导0、2、4、6、8 h);6~11,转 McGS-pET-30a(+) BL21(DE3)菌液全蛋白(分别添加0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L IPTG,诱导4 h)。

Note:M,protein Marker;1~5,total protein of BL21(DE3) transformed McGS-pET-30a(+)(0.2 mmol/L IPTG,2 h,4 h,6 h,8 h, respectively);6~11,total protein of BL21(DE3) transformed McGS-pET-30a(+)(0.1,0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 mmol/L IPTG, respectively,4 h).

图3 重组子原核表达条件优化

Fig.3 Optimization conditions for prokaryotic induce expression of recombinant plasmid





### 3 讨论与结论

氮素是影响植物生长和发育的最重要的营养元素之一,氮肥的施用在整个农业生产中扮演着极为重要的角色。作物对氮素的吸收利用能力是植物生长发育重要的限制因素之一,影响作物产量和品质。有研究表明  $\text{NO}_3^-$ -N 和  $\text{NH}_4^+$ -N 虽然同是植物可以吸收利用的无机态氮素形态,但是植物对二者的吸收、运输、贮藏和同化等方面存在很大差异,不同形态氮素对植物的生长发育和产量等方面的影响具有较大差异<sup>[8-9]</sup>。谷氨酰胺合成酶是植物体内参与氮素同化的关键性酶之一,它依靠 ATP 功能催化谷氨酸生成谷氨酰胺,完成无机氮向有机氮转化的第一步。因此谷氨酰胺合成酶对植物 N 素吸收、同化和利用效率有着极为重要的影响,目前谷氨酰胺合成酶已成为国内外调节作物无机氮同化、提高氮素利用率研究的焦点。目前对苦瓜 GS1 基因进行研究的报道较少,因此对该基因进行研究有助于揭示其调控苦瓜氮素吸收和利用的分子机制,为苦瓜的合理施用氮肥提供理论依据。

课题组在前期的工作中,对苦瓜 *McGS1* 基因进行了克隆并对其结构进行了预测,生物信息学分析表明,苦瓜 *McGS1* 基因全长 1 302 bp,其中 CDS 序列长度为 1 071 bp,编码 356 个氨基酸,其不存在跨膜区和信号肽,是一个非分泌蛋白;同源性比对发现苦瓜 *McGS1* 蛋白与甜瓜和黄瓜中的 GS1 蛋白亲缘关系最近,相似度分别达到了 94.66% 和 95.22%,说明从苦瓜中成功克隆了 GS1 基因<sup>[10]</sup>。该研究在前期工作的基础上构建苦瓜 *McGS1* 基因的原核表达载体并在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行表达。有研究表明 IPTG 及诱导时间能明显的影响到重组蛋白在宿主细胞中的表达<sup>[11]</sup>,该试验设计不同浓度 IPTG 及诱导时间对苦瓜 *McGS1* 蛋白在宿主细胞大肠

杆菌 BL21(DE3)中表达的条件进行优化,结果表明,在 37℃,0.2  $\mu\text{mol/L}$  IPTG 的环境中诱导 4 h,苦瓜 *McGS1* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中即可高效表达,获得的蛋白质分子量约为 35 kDa。同时发现不同浓度的 IPTG 对 *McGS1* 基因蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中的表达量的影响并不明显。该研究利用生物工程技术手段构建了苦瓜 *McGS1* 基因的原核表达载体并在大肠杆菌 BL21(DE3)中成功表达,可为苦瓜谷氨酰胺合成酶基因的原核表达与纯化、定位及功能分析等方面的研究奠定基础。

### 参考文献

- [1] 邓扬悟. 甜瓜谷氨酰胺合成酶基因的克隆和功能研究[D]. 上海:上海交通大学,2010.
- [2] PRINSI B, NEGRI A, PESARESI, et al. Evaluation of protein pattern changes in roots and leaves of *Zea mays* plants in response to nitrate availability by two-dimensional gel electrophoresis analysis[J]. BMC Plant Biology, 2009, 9:113.
- [3] 王小娟, 宋海星, 刘强, 等. 纳米剂包膜氮肥对早稻养分吸收和产量的影响[J]. 湖南农业科学, 2011(11):66-68.
- [4] 管闪青, 张屹东, 杨冬冬, 等. 甜瓜谷氨酰胺合成酶基因在不同氮素条件下的表达分析[J]. 上海交通大学学报, 2007, 25(1):24-29.
- [5] 冯卓, 秦智伟, 武涛, 等. 黄瓜细胞质型谷氨酰胺合成酶基因(GS1)的克隆及其在低氮条件下的表达[J]. 中国农业科学, 2012(15):3100-3107.
- [6] 吴永升. 玉米谷氨酰胺合成酶基因 *Gln1-3*、*Gln1-4*, 氮利用效率关联性分析[D]. 北京:中国农业科学院, 2009.
- [7] 刘子记, 詹园凤, 杨衍. 利用 SSR 标记鉴定热研二号油绿苦瓜杂交种纯度[J]. 生物技术通报, 2014(2):75-78.
- [8] 田霄鸿, 李生秀, 王朝辉. 冬小麦等 4 种作物对铵、硝态氮的吸收能力[J]. 西北植物学报, 2000, 20(1):29-37.
- [9] 张多英, 马凤鸣, 赵越, 等. 培养液  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  比对甜菜幼苗  $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$  吸收特性的影响[J]. 作物学报, 2006, 32(4):548-552.
- [10] 申龙斌, 申丹艳, 牛玉, 等. 苦瓜(*Momordica charantia* L.) *McGS1* 基因的克隆及结构预测[J]. 分子植物育种, 2015, 13(5):1079-1085.
- [11] 顾文亮, 夏启玉, 胡新文, 等. 重组马槟榔甜蛋白 *MabinlinII* 在大肠杆菌中的表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(3):439-444.

## Prokaryotic Expression and Analysis of *McGS1* Gene of Bitter Gourd

SHEN Longbin, NIU Yu, LIU Ziji, LIU Zhaohua, YANG Yan

(Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Danzhou, Hainan 571737)

**Abstract:** In this study, prokaryotic expression vector expressing bitter gourd *McGS1* gene was constructed and transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for its expression. A pair of primers was designed according to *McGS1* gene sequence. Total RNA of the 'Re Yan No. 3' bitter gourd was extracted, and then *McGS1* gene was amplified by RT-PCR. The recombinant expression vector was identified using enzyme digestion and PCR method. The expression of *McGS1* gene was optimized by different concentration of IPTG and induction time. The expression product of *McGS1* gene was analyzed by SDS-PAGE. The results showed that the optimal expression condition of *McGS1* protein was 37℃, 0.2  $\mu\text{mol/L}$  IPTG induction for four hours, and the molecular weight of protein product of *McGS1* gene was about 35 kDa.

**Keywords:** bitter gourd (*Momordica charantia* L.); glutamine synthetase; prokaryotic expression