

研究报告

OC-IAD86 (*Oryzacystatin-IAD86*)基因的原核表达及活性分析

霍雨猛¹, 何启伟², 赵双宜³, 徐苑芳⁴

1. 山东农业大学园艺科学与工程学院, 泰安 271018
2. 山东省农业科学院蔬菜研究所, 济南 250100
3. 山东大学生命科学院, 济南 250100
4. 济南北方农艺科学研究所, 济南 250100

摘要: 根据 *OC-IAD86* 基因序列, 设计合成了 7 条寡核苷酸片段, 通过重叠延伸 PCR 技术合成了 *OC-IAD86* 基因, 利用设计好的 *Bam*H I / *Xho* I 酶切位点将 *OC-IAD86* 基因克隆到原核表达载体 pet21b 中, 在 1 mmol/L 的 IPTG 诱导后 5 h, *OC-IAD86* 融合基因在大肠杆菌中得到表达, 表达产物处于可溶状态, 其表达量占总蛋白的 11.4%, 可溶性蛋白的 16.4%; 利用 Ni-NTA 系统纯化该蛋白并经 PEG20000 浓缩后, 活性分析表明该蛋白酶抑制剂在体外表现出对木瓜蛋白酶明显的抑制作用。这为转 *OC-IAD86* 基因的抗根结线虫植物基因工程抗体制备, 以及进一步体内的抗根结线虫研究奠定了基础。

关键词: *OC-IAD86*, 重叠延伸 PCR, 抑制剂, 纯化

Prokaryotic Expression of *OC-IAD86* (*Oryzacystatin-IAD86*) Gene and Analysis of Its Activity

Yumeng Huo¹, Qiwei He², Shuangyi Zhao³, and Yuanfang Xu⁴

- 1 College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China
- 2 Institute of Vegetable, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China
- 3 School of Life Sciences, Shandong University, Ji'nan 250100, China
- 4 Jinan North Institute of Agronomy, Ji'nan 250100, China

Abstract: According to the amino acids sequence of *OC-IAD86* gene and *Escherichia coli* codon usage, we synthesized this gene by overlap extension PCR method with 7 oligonucleotides DNA fragments. The PCR fragment was inserted into pGEM-T-easy vector and the recombinant plasmid was named pGEM-T-*OC-IAD86*. Two oligonucleotides into which the *Bam*H I and *Xho* I sites were introduced were designed and synthesized based on pGEM-T-*OC-IAD86* and pet21b, and the PCR fragment into which the *Bam*H I and *Xho* I sites were introduced was obtained. After digesting it with *Bam*H I and *Xho* I, *OC-IAD86* gene was cloned into the corresponding sites of pet21b and obtained prokaryotic expression vector pet21b-*OC-IAD86*. *OC-IAD86* gene was expressed in *E. coli* (BL21(DE3)plysS) after IPTG(*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*) inducement for 5 hours. The fusion protein of *OC-IAD86*:6His gene accounted for 11.4% of total protein and 16.4% of soluble protein, which had been successfully purified by Ni-NTA and concentrated by PEG20000. This protein can effectively inhibit papain activity *in vitro* and may be used in anti-nematode research *in vivo*.

Received: October 30, 2007; **Accepted:** January 10, 2008

Supported by: Shandong Agricultural Improved Variety Project.

Corresponding author: Qiwei He. Tel: +86-531-83179275; Fax: +86-531-88960357; E-mail: hqw1215@sohu.com

山东省农业良种工程资助。

Keywords: *OC-IAD86*, overlap extension PCR, inhibitor, purification

半胱氨酸蛋白酶抑制剂对许多害虫的消化酶具有显著的抑制活性, *OC-I* 为水稻巯基蛋白酶抑制剂, *OC-IΔD86* 为该抑制剂的突变基因, Urwin 等人的研究发现, *OC-IΔD86* 对木瓜蛋白酶的抑制效果比 *OC-I* 本身高 13~14 倍, 在很多方面要优于丝氨酸蛋白酶抑制剂, 其田间应用可有效的降低根结线虫和胞囊线虫的数量, 具有较好的控制效果^[1], 是一种很有前途的抗线虫效应物^[2]。植物在受伤害或被虫食时均可诱导产生多种蛋白酶抑制剂, 人类的很多食品中均有半胱氨酸蛋白酶抑制剂(例如向日葵、大豆、玉米、水稻)^[3-6], 但人类的消化系统中并不存在半胱氨酸蛋白酶, 因此该酶的抑制剂应用于抗植物抗根结线虫和胞囊线虫的研究具有很高的生物安全性, 根据目前的田间试验和安全性试验研究结果, 半胱氨酸蛋白酶抑制剂并没有影响植物生长和产量^[7]; 也没有发现对哺乳动物有毒的证据^[8]。已有几例作物转基因的报道可以提高其对线虫的抗性^[9,10], 在番茄根毛中表达 *Oc-I* 和其基因突变体 *Oc-IΔD86* 可以抑制马铃薯胞囊线虫的发育(*Globodera pallida*), 在拟南芥菜中表达 *Oc-IΔD86* 可以十分有效的控制其胞囊线虫和根结线虫的大小和数量(*Heterodera schachtii* 和 *Meloidogyne incognita*), 单子叶植物植物水稻中的转基因研究也证明, 该抑制剂对线虫(*M. incognita*)的抗性同样有效。

本文根据 GenBank 已公布的 *OC-I* 基因序列, 参照文献中的突变序列和大肠杆菌对密码子的偏好性设计引物, 成功获得了 *OC-IΔD86* 基因, 构建了基于 pet21b 的原核表达载体, 并对其表达和活性进行了研究, 为转 *OC-IΔD86* 基因植物基因工程后期研究创造了条件。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和生化试剂

克隆载体 pGEM-T Easy Vector Systems 购自 Promega 公司; BL21(DE3)plysS 由天根公司购得; 限制性内切酶以及 Taq 酶(Hot Start Taq) 购自 TaKaRa 公司; 重结晶木瓜蛋白酶购自 Sigma 公司; 木瓜蛋白酶抑制剂(Antipain dihydrochloride, Ultra Pure Grade) 购自 Amresco 公司; 6×His 纯化柱购自北京韦氏博慧色谱科技有限公司; 高保真 Pfu(BBI)聚合酶和其他

试剂购自上海生工。

1.2 引物

参照 GenBank(AF435976)公布的 OCI 序列设计 7 条引物(表 1), 利用重叠 PCR 延伸技术, 构建 *OC-IΔD86* 突变基因。

表 1 化学合成 *Oc-IΔD86* 基因的寡核苷酸片段
Table 1 The oligonucleotides fragments for chemical synthesis of *Oc-IAD86* gene

No.	Sequence (5'→3')
O1	TAGGATCCAGAAGATGTCGAGCGACGGAGGGCCG GTGCTTGGCGGCGTCGAGCCGGTGG
O2	CGGCGAAGCGGGCGAGGTCGACGAGGTGGAGGTC GTTCTCGTTCCCCACCGGCTCGACG
O3	CGCCCGCTTCGCCGTCACCGAGCACACAAGAAG GCCAATTCTCTGCTGGAGTTCGAGA
O4	AGTACAAAGTGCCAGCGACAACCTGCTGCTTCACA CTCACAAGCTTCTCGAAGCTCCAGC
O5	TGGCACTTTGTACTATTTCACAATTGAGGTGAAGG AAGGGGATGCCAAGAAGCTCTATG
O6	CCTGGAGCTCCTTGAACATCCATGGTTTCTCCAG ACCTAGCTTCATAGAGCTTCTTG
O7	TAGGTACCTTAGGCATTTGCACTGGCATCGACAGG CTTGAACCTCTGGAGCTCCTTGA

1.3 *OC-IΔD86* 基因的合成和克隆

采用重叠延伸 PCR 技术^[11], 将所合成的各基因片段(O1, O2, O3, O4, O5, O6, O7)进行拼接(图 1)。各基因片段合成后稀释到 50 pmol/μL, 采用高保真 Pfu 聚合酶进行延伸和扩增。第一次延伸反应合成 O1-2、O3-4 及 O5-6 的三组反应中各引物均取 1 μL, 10 × PCR buffer 2.0 μL, dNTP 2.0 μL, pf u DNA 聚合酶 0.2 μL, 加水至 20 μL。第二组反应 O1-2 和 O3-4; O5-6 与 O7 的纯化产物后各取 1 μL, 按上述 20 μL 反应体系(不加引物)反应 3 个循环, 然后加上引物 O1 和 O4, 或 O5 和 O7, 继续进行 PCR 反应; 反应条件为: 94°C 2 min, [94°C 30s, 45°C 30 s, 72°C 45 s] 循环 30 次, 最后 72°C 延 10 min, 第三组 O1-4 和 O5-7 拼接为 O1234567 的反应同第二组, 最后进行加 A 反应(加 A 试剂盒)。



图 1 *OC-IΔD86* 基因拼结示意图
Fig. 1 Assembly of the *OC-IAD86* gene

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳、片段回收(参照 TaKaRa 公司提供的用户手册)、与 pGEM-T Easy Vector 连接(参照 Promega 公司提供的用户手册),热激法转化大肠杆菌 DH10B 菌株,蓝白斑分离阳性克隆,其质粒经测序后命名为 pGEM-T-*OC-I ΔD86*。

1.4 原核表达与纯化

将 pGEM-T-*OC-I ΔD86* 质粒,用引物 p1: 5' TAGGATCCTATGTCT(g)AGCGACGGAGGGCC 3'; p2 5' GGTCTCGAGGGCATTGCACTGGCATC 3' 扩增并 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后与 pet21b 质粒 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切后的大片段连接,转化大肠杆菌 TOP10, 获得阳性克隆为 pet21b-*OC-I ΔD86*, 其质粒再转化 BL21(DE3)plysS 菌株,用 1mmol/L IPTG 进行诱导表达。对于表达的蛋白分别制备样品进行电泳分析,用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液(pH 6.0)悬浮菌体,超声波破碎后,上清液按照 6×His 纯化试剂盒的操作对所表达的蛋白进行纯化。

1.5 活性分析

在磷酸盐缓冲体系中,将不同表达量的 *OC-I ΔD86* 蛋白与一定量的木瓜蛋白酶混匀,同时设置严格的阴性(pet21b 表达蛋白)和阳性对照(Antipain dihydrochloride),于 37°C 保温 30 min, *OC-I ΔD86* 蛋白与木瓜蛋白酶结合,非竞争性的抑制木瓜蛋白酶的活性,加入底物 BAPA 后,未被抑制的木瓜蛋白酶可以水解 BAPA 并产生对硝基苯胺,从而导致 410 nm 处的吸光值增加^[12,13]。通过测定 410 nm 的 OD 值推断剩余木瓜蛋白酶的活性,进一步确定 *OC-I ΔD86* 抑制能力。

2 结果与分析

2.1 pGEM-T-*OC-I ΔD86* 鉴定

将利用重叠延伸技术获得的 PCR 产物,加 A 处理后与 pGEM-T Easy Vector 连接后转化至大肠杆菌 DH10B 菌株中,获得阳性克隆, *Eco*R I 酶切鉴定,对于菌斑 1、2 均切出了目的片段。序列测定结果与原初设计序列完全一致,与 *OC-I* 序列(AF435976)相比,恰好有 3 个碱基的缺失,即编码天冬氨酸的密码子 **GAC** 缺失。证明已经克隆到了 *OC-I ΔD86* 整个编码序列。

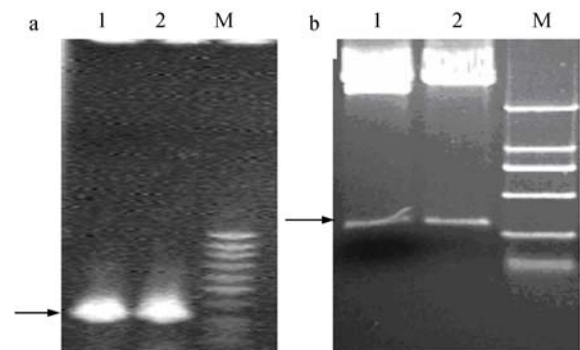


图 2 *OC-I-ΔD86* 的拼接(a)和酶切验证(b)

Fig. 2 *OC-I-ΔD86* gene assembly and identification (a) PCR result of *OC-I-ΔD86*. M: 100 bp ruler; 1, 2: *OC-IΔD86* gene (arrow 328 bp). (b) *Eco*R I digested of the pGEM-T-*OC-IΔD86*, M: DL2000; 1, 2: *OC-IΔD86* gene (arrow 348 bp)

2.2 pet21b-*OC-I ΔD86* 的鉴定

采用 *OC-I ΔD86* 特异性 PCR 引物(P1: 5' TAGGATCCTATGTCTAGCGACGGAGGGCC3', P2: 5' GGTCTCGAGGGCATTGCACTGGCATC3'),对 pet21b-*OC-I ΔD86* 进行扩增,获得一条 321 bp 的 PCR 条带,证明 *OC-I ΔD86* 已经插入 pet21b; *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切鉴定和测序分析进一步证明了已经构建成功了 pet21b-*OC-I ΔD86* 融合表达载体。

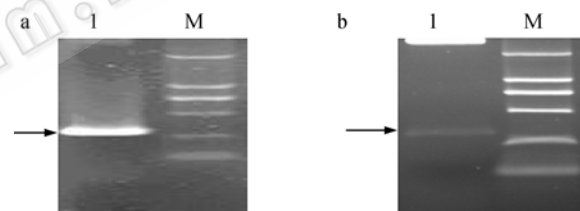


图 3 pet21b-*OC-I ΔD86* 的 PCR 和酶切验证

Fig. 3 PCR and restriction analysis of pet21b-*OC-IΔD86* (a) PCR result of *OC-I ΔD86*. M: DL2000; 1: PCR fragment (arrow 321 bp). (b) pet21b-*OC-IΔD86* digestion with *Bam*H I/*Xho* I (arrow 314 bp)

2.3 表达分析

将构建好的融合蛋白表达载体 pet21b-*OC-I ΔD86*, 转入 BL21(DE3)plysS, 按照 pet 载体原核表达操作手册的程序进行融合表达,并以 pet21b 空质粒以及重组质粒非诱导为对照。由图 4, 可以看出,泳道 5 为诱导 5 h 后,在 14 kD 处有一条诱导表达带,而空质粒(泳道 4、6)和非诱导质粒(泳道 3)均无此带,这一诱导结果与我们预期表达的融合蛋白分子量 13.707 kD 较为接近。从泳道 7、8、9 可以看出,所表达的蛋白处于可溶性状态,并未在沉淀中出现。光密度扫描分析表明,所表达的蛋白占细菌总蛋白的 11.4%,占可溶性蛋白的 16.4%。

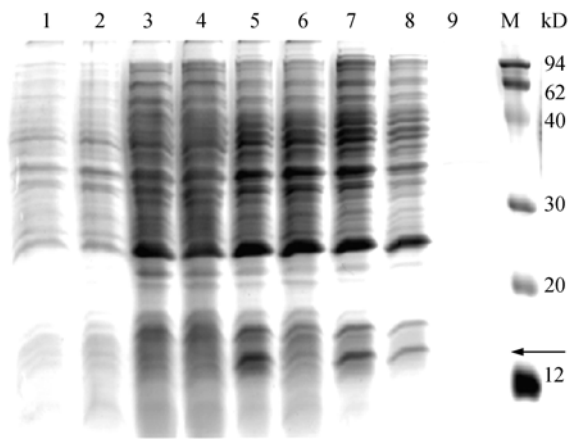


图4 pet21b-*OC-IAD86* 融合表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis for the expression of *OC-IAD86*

1: pre-induction for *E. coli* (BL21(DE3)plysS) containing pet21b-*OC-IAD86*; 2: pre-induction for *E. coli* (BL21(DE3)plysS) containing pet21b; 3: 5 hours of incubation of (BL21(DE3)plysS) containing pet21b-*OC-IAD86* at 37°C without induction; 4: 5 hours of incubation of (BL21(DE3)plysS) containing pet21b at 37°C without induction; 5,7: the total protein of 5 hours induction of BL21 (DE3) plysS containing pet21b-*OC-IAD86*; 6: the total protein of 5 hours induction of BL21 (DE3) plysS containing pet21b; 8: the soluble fraction of BL21 (DE3) plysS containing pet21b-*OC-IAD86* after 5 hours induction; 9: the insoluble fraction of BL21 (DE3) plysS containing pet21b-*OC-IAD86* after 5 hours induction; M: low molecular weight protein marker; Arrow: 13.7 kD

2.4 纯化

用 PBS 缓冲液洗脱 5 个床体积(图 5 lane 3), 20 mmol/L 咪唑分 3 次洗脱 5 个体积(图 5 lane 5,6,7), 400 mmol/L 咪唑洗下目的蛋白(图 5 lane 8); 蛋白纯化后用 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液进行透析除去咪唑, PEG20000 浓缩(图 5 lane 9)。

2.5 活性分析

由图 6 可以看出,无论是粗提的 pet21b-*OC-IAD86* 总蛋白、*OC-IAD86* 蛋白的 6×His 纯化蛋白还是商品化的木瓜蛋白酶抑制剂 (Antipain dihydrochloride)对木瓜蛋白酶均具有有效的抑制效果,而对照质粒(pet21b)的总蛋白不能抑制该酶活性。对于具有抑制效果的三种制品而言,其抑制效果随着浓度的增加而增加,具有相同的变化趋势,其剩余活力均逐渐降低;在三种制品中,阳性对照 (Antipain dihydrochloride)对于木瓜蛋白酶的抑制效果最好,其次是 *OC-IAD86* 蛋白的 6×His 纯化制品,抑制效果最差的是 pet21b-*OC-IAD86* 总蛋白。关于其原因我们将在讨论 3.1 中进行论述。

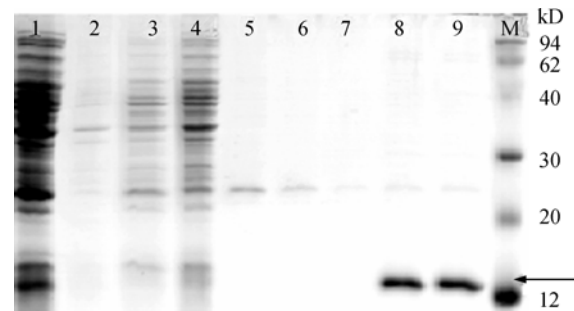


图5 pet21b-*OC-IAD86* 融合表达产物 SDS-PAGE 分析

Fig. 5 SDS-PAGE analysis for the purified of *OC-IAD86*

1: the total soluble protein of pet21b-*OC-IAD86*; 2: the total insoluble protein of pet21b-*OC-IAD86*; 3: PBS buffer eluate; 4: flow-through; 5: the first 20 mmol/L imidazole eluate; 6: the second 20 mmol/L imidazole eluate; 7: the third 20 mmol/L imidazole eluate; 8: the 400 mmol/L imidazole eluate; 9: concentrated by PEG20000; M: low molecular weight protein marker; Arrow: 13.7 kD

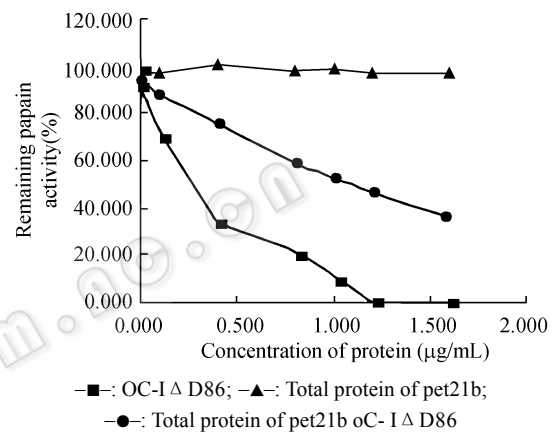


图6 *OC-IAD86* 对木瓜蛋白酶的抑制曲线

Fig. 6 Papain inhibitory curve by *OC-IAD86*

3 讨论

3.1 关于抗根结线虫效应物的评价及活性研究

根结线虫属于植物寄生性线虫活体寄生,离开了植物,根结线虫将很难取食而死亡;目前对转基因植物的抗根结线虫研究又受到许多植物遗传转化体系尚不成熟的制约。因此对抗线虫效应物的评价主要是对 *C. elegant* 进行活体试验和对木瓜蛋白酶进行活性测定试验; *C. elegant* 虽是线虫但不是植物寄生性根结线虫,木瓜蛋白酶属于半胱氨酸蛋白酶类,与根结线虫体内的消化酶属于同一酶类,用此酶作为抗根结线虫效应物的评价标准可以快捷、方便、省时的对抗根结线虫效应物作出评价。在前人的研究中,已有用此酶作为抗线虫效应物评价标准之一的报道,故我们采用了此酶做活性分析试验^[1]。

活性分析试验表明,阳性对照 Antipain

Dihydrochloride 对于木瓜蛋白酶的抑制效果高于我们制备并初步纯化的 *OC-IAD86* 蛋白,其原因可能为:(1) 抑制剂纯度上的差异,阳性对照木瓜蛋白酶抑制剂(Antipain dihydrochloride)为商品化的超纯制品,而 *OC-IAD86* 蛋白仅为初步纯化的蛋白,其纯度低于 Antipain dihydrochloride,精制后其抑制效果有望提高。(2) 抑制机理的差异,阳性对照木瓜蛋白酶抑制剂(Antipain dihydrochloride)为一种广谱性的蛋白酶抑制剂,不但可以抑制木瓜蛋白酶的活性,还可以抑制组蛋白 A、组蛋白 B、以及丝氨酸蛋白酶类的活性^[14,15];而 *OC-IAD86* 蛋白抑制半胱氨酸蛋白酶的活性,专一程度较高,靶标更明确,其抑制效果的差异可能与机理上存在的差异有关。

3.2 重叠 PCR 技术的应用

我们采用重叠 PCR 技术^[11],按照大肠杆菌偏好的密码子,获得了预期的 *OC-IAD86* 编码基因,并且成功的引入了突变和酶切位点,为基因的克隆和表达提供了方便。在拼接过程中,由于可能出现错配,应尽量减少 PCR 的次数,并采用高保真的 Taq 酶,同时所合成 DNA 的长度应适中,这样可以减少拼接的次数和长 DNA 片段合成中可能出现的错误。因而更有利于寡核苷酸片段的正确组装。在重叠引物设计时,重叠区域一般应在 20 bp 左右,实验发现重叠 14 bp 也可以成功获得目的片段,对称拼接可更有效的实现基因的拼接。

3.3 关于 PET 载体构建策略

关于载体构建,开始表达采用了 pet21b 载体 *Nde I* 切点与目的基因相连,进行表达结果未得预期大小的蛋白,分析发现目的蛋白编码氨基酸序列存在大量的大肠杆菌稀有密码子,对于原核表达极为不利^[16],进行了密码子优化,将引物 O1 第二个密码子之(G)突变为 T,目的蛋白获得了有效表达,并具有很高的抑制活性。

致谢 pet21b 由刘春香博士后惠赠。

REFERENCES

- [1] Urwin PE, Atkinson HJ, Waller DA, *et al.* Engineered *oryzacystatin-I* expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *The Plant Journal*, 1995, **8** (1): 121-131.
- [2] Urwin PE, Lilley CJ, McPherson MJ, *et al.* Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *The Plant Journal*, 1997, **12** (2): 455-461.
- [3] Abe K, Emori Y, Kondo H, *et al.* Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (*oryzacystatin*). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, **262**(35): 16793-16797.
- [4] Kouzuma Y, Kawano K, Kimura M, *et al.* Purification, characterization, and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, sea and scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *Journal Biochem(Tokyo)*, 1996, **119**(6): 1106-1113.
- [5] Arai S, Matsumoto I, Emori Y, *et al.* Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, **50**(22): 6612-6617.
- [6] Fernandes KVS, Sabelli PA, Barratt DHP, *et al.* The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*, 1993, **23**(1): 215-219.
- [7] Urwin PE, Troth KM, Zubko EI, *et al.* Effective transgenic resistance to *Globodera pallida* in potato field trials. *Molecular Breeding*, 2001, **8**(1): 95-101.
- [8] Atkinson HJ, Grimwood S, Johnston K, *et al.* Prototype demonstration of transgenic resistance to the nematode *Radopholus similis* conferred on banana by a cystatin. *Transgenic Research*, 2004, **13** (2): 135-142.
- [9] Lilley CJ, Urwin PE, Johnston KA, *et al.* Preferential expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, **2** (1): 3-12.
- [10] Vain P, Worland B, Clarke MC, *et al.* Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin-I delta D86) for nematode resistance in transgenic rice plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, **96** (2): 266-271.
- [11] Donato AD, Nigris M, Russo N. A method for synthesizing genes and cDNAs by the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 1993, **212** (1): 291-293.
- [12] Barrett AJ. A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. *Analytical Biochemistry*, 1972, **47**(1): 280-293.
- [13] Zhou ZL, Zhu Z, Chen R, *et al.* Expression of *Orazacystatin*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1996, **12**(1): 17-22.
- [14] Umezawa S, Tatsuta K, Fujimoto K, *et al.* Structure of antipain, a new sakaguchi-positive product of streptomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 1972, **25**(4): 267-270.
- [15] Suda H, Aoyagi T, Hamada M, *et al.* Antipain, a new protease inhibitor isolated from aginomycetes. *The Journal of Antibiotics*, 1972, **25**(4): 263-265.
- [16] Chen GFT, Inouye M. Suppression of the negative effect of minor arginine codons on gene expression; preferential usage of minor codons within the first 25 codons of the *Escherichia coli* genes. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(6): 1465-1473.