

水稻乙醇酸氧化酶基因 *OsGLO1* 的原核表达及多克隆抗体制备

张建军¹, 胥华伟², 周晓垂¹, 王玉琪¹, 彭新湘¹

(1 华南农业大学 生命科学学院, 分子植物生理研究室, 广东 广州 510642;

2 河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

摘要:乙醇酸氧化酶是光呼吸代谢的关键酶. 以水稻 *Oryza sativa* 叶片 cDNA 为模板, 利用 RT-PCR 扩增水稻乙醇酸氧化酶基因 (*OsGLO1*), 并构建了该基因的原核表达载体 pET23d-*OsGLO1*, 转化 *E. coli* BL21 (DE3), 经 IPTG 诱导表达融合蛋白. 以纯化的 *OsGLO1* 融合蛋白为抗原免疫新西兰白兔, 制备兔抗 *OsGLO1* 的多克隆抗体. Western-blot 分析表明, 制备的多克隆抗体能有效地检测水稻、菜心 *Brassica campestris*、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 和菠菜 *Spinacia oleracea* 中乙醇酸氧化酶的表达, 为进一步深入研究乙醇酸氧化酶在调控光呼吸及抗逆性等方面的作用奠定了基础.

关键词:水稻; 乙醇酸氧化酶; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号:Q945.11

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2010)03-0113-03

Prokaryotic Expression and Preparation of Polyclonal Antibody of Glycolate Oxidase Gene *OsGLO1* from Rice

ZHANG Jian-jun¹, XU Hua-wei², ZHOU Xiao-chui¹, WNAG Yu-qi¹, PENG Xin-xiang¹

(1 Laboratory of Molecular Plant Physiology, College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2 College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, China)

Abstract: Glycolate oxidase (GLO) is a key enzyme in photorespiratory metabolism. *OsGLO1* was amplified by RT-PCR from rice leaf cDNA and cloned into a prokaryotic expression vector pET23d. The recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and the expression of recombinant protein was induced by IPTG. After purification, it was used as the antigen to immune a rabbit and then polyclonal antibody was obtained. Western-blot analysis confirmed that the polyclonal antibody was able to recognize the GLO proteins from different plant species, such as rice, cabbage, arabidopsis and spinach. This work laid a foundation for functional studies of GLO in regulating photosynthesis under stresses.

Key words: rice; glycolate oxidase; prokaryotic expression; polyclonal antibody

乙醇酸氧化酶 (Glycolate oxidase, GLO) 是光呼吸代谢的关键酶^[1-3], GLO 催化乙醇酸氧化生成乙醛酸, 也可以催化乙醛酸氧化生成草酸^[1]. 自 1948 年苏联学者首次报道 GLO 以来, 对 GLO 的研究主要集中在其分子结构和催化特性方面^[4-5]. 光呼吸途径中通过 GLO 反应产生大量 H₂O₂, H₂O₂ 在植物信号转导及诱导抗逆性等方面都具有重要作用^[6]; 生物信息学的分析表明, 水稻中存在着多个可能编码 GLO

的基因, 华南农业大学分子植物生理实验室利用诱导反义 RNA 技术研究了水稻乙醇酸氧化酶基因 (*OsGLO1*) 的表达, 发现 GLO 活性的下调会导致光合速率的下降, 且二者呈明显的线性关系^[7], 说明 *OsGLO1* 是调控 GLO 的关键基因之一. 为了深入研究 GLO 的功能, 本研究构建了 *OsGLO1* 的原核表达载体, 在大肠杆菌中表达并纯化后免疫新西兰白兔, 制备相应的多克隆抗体, 以水稻 *Oryza sativa*、拟南芥

收稿日期: 2009-12-21

作者简介: 张建军 (1976—), 男, 助理研究员, 博士; 通信作者: 王玉琪 (1976—), 男, 副教授, 博士, E-mail: wyq@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30700052); 广东省自然科学基金博士启动项目 (0700680); 华南农业大学校长基金 (4600-K06332)

Arabidopsis thaliana 等植物蛋白进行 Western-blot 检测,结果表明该抗体的特异性强,可真实反应植物体内 GLO 的表达情况.该特异性抗体的获得为进一步深入研究 GLO 在调控光呼吸及抗逆性等方面的作用奠定了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA Marker DL2000、低相对分子质量蛋白标准和 RNasin 为 TaKaRa 公司产品;逆转录酶 MMLV 和高保真 Taq 酶 KOD-PLUS 为 Toyobo 公司产品;弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、氨苄青霉素、IPTG、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗为 Sigma 公司产品;Gel Extraction Mini Kit 为上海生物工程有限公司产品;原核表达质粒 pET23d(+)及宿主菌 *Escherichia coli* BL21(DE3) 由本研究室保存.

1.2 引物设计与合成

根据预测的 *OsGLO1* 的序列(GenBank 登录号为 AF022740)设计引物, *OsGLO1*-F: 5'-GATAGAAT-TCCAGGGTTCACAAGGCAGGAG-3'(下划线处为 *EcoR* I 的酶切位点), *OsGLO1*-R: 5'-TCACCTCGAGGATTA-AGAGCATGAACGACC-3'(下划线处为 *Xho* I 的酶切位点),引物由上海生物工程有限公司合成.

1.3 原核表达载体的构建、鉴定及序列分析

以粳稻品种中花 11 叶片为材料,通过 RT-PCR 扩增目的片段,PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min; 94 ℃ 变性 30 s, 58 ℃ 退火 40 s, 68 ℃ 延伸 1.5 min, 28 个循环. PCR 产物和 pET23d(+) 分别以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切后连接并转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,经酶切筛选鉴定阳性菌落,含阳性重组质粒的菌液送交上海生物工程有限公司进行测序,构建的重组表达质粒命名为 pET23d-*OsGLO1*.

1.4 重组蛋白的诱导表达及重组蛋白的纯化

37 ℃ 条件下,将含有重组质粒 pET23d-*OsGLO1* 的 *E. coli* BL21(DE3) 培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 约为 0.5,加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 开始诱导目的蛋白的表达,于 30 ℃ 分别培养 1、2、4、6 和 12 h,分别取适量菌液于 6 000 r/min 下离心 15 min,收集菌体,重悬菌体并进行超声波破碎,然后 4 ℃ 条件下,12 000 r/min 离心 15 min 分别收集上清液和沉淀,各取少量进行 SDS-PAGE 分析.将超声波破碎后离心收集的沉淀进行 SDS-PAGE 电泳,切下目的条带并于电洗脱仪上低温洗脱后透析,最终得到纯化的重组蛋白.

1.5 抗体制备

用考马斯亮蓝 G-250^[8] 对纯化后的重组蛋白进行定量,然后加入等体积的 2 × SDS 上样缓冲液,100 ℃ 处理 5 min 后上样进行 SDS-PAGE. 将纯化回收的

目的蛋白与弗氏完全佐剂以体积比 1:1 混合,充分乳化后采用皮下多点注射进行初次免疫;然后每隔 7 d,将纯化的蛋白与弗氏不完全佐剂以体积比 1:1 混合,充分乳化后进行加强免疫,共免疫 4 次;免疫结束后 10 ~ 15 d 取血,分离出血清, -20 ℃ 保存备用.

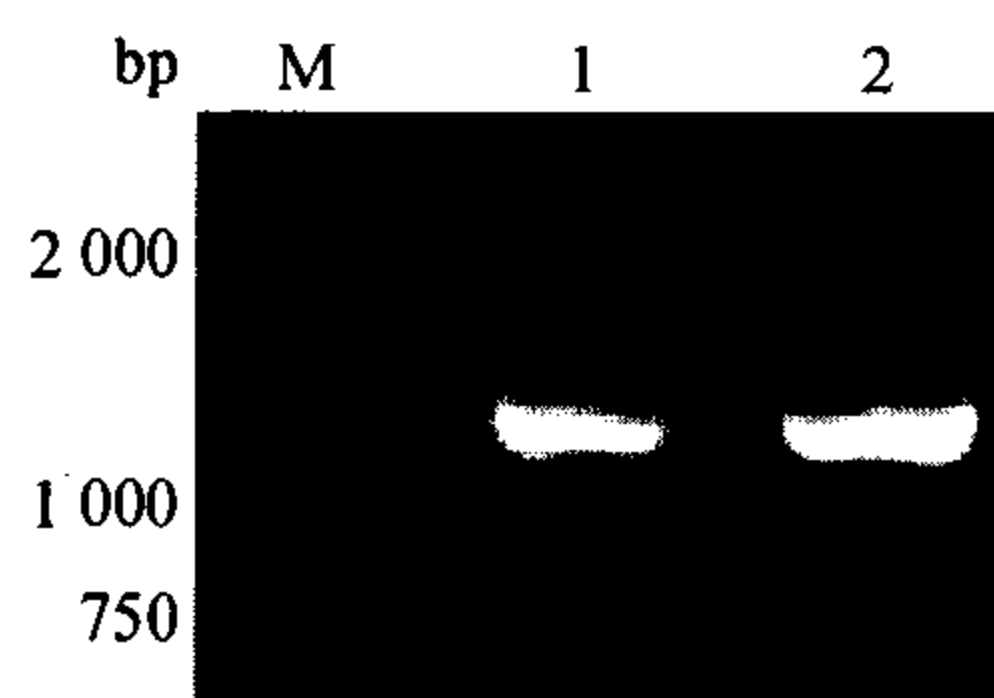
1.6 Western-blot 分析

分别称取水稻、菠菜 *Spinacia oleracea*、苋菜 *Amaranthus palmeri*、拟南芥和菜心 *Brassica campestris* 叶片 1 g,加入一定体积的提取缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, 25 mmol/L EDTA, pH7.5),匀浆后,12 000 r/min 离心 10 min,上清液中的蛋白先定量,然后取适当体积的蛋白样品与等体积的 2 × SDS 上样缓冲液混匀,100 ℃ 处理 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳.电泳结束后将蛋白电转移至硝酸纤维素膜(NC)上,并按照常规方法进行 Western-blot.

2 结果与分析

2.1 目的基因的克隆与原核表达载体 pET23d-*OsGLO1* 的构建

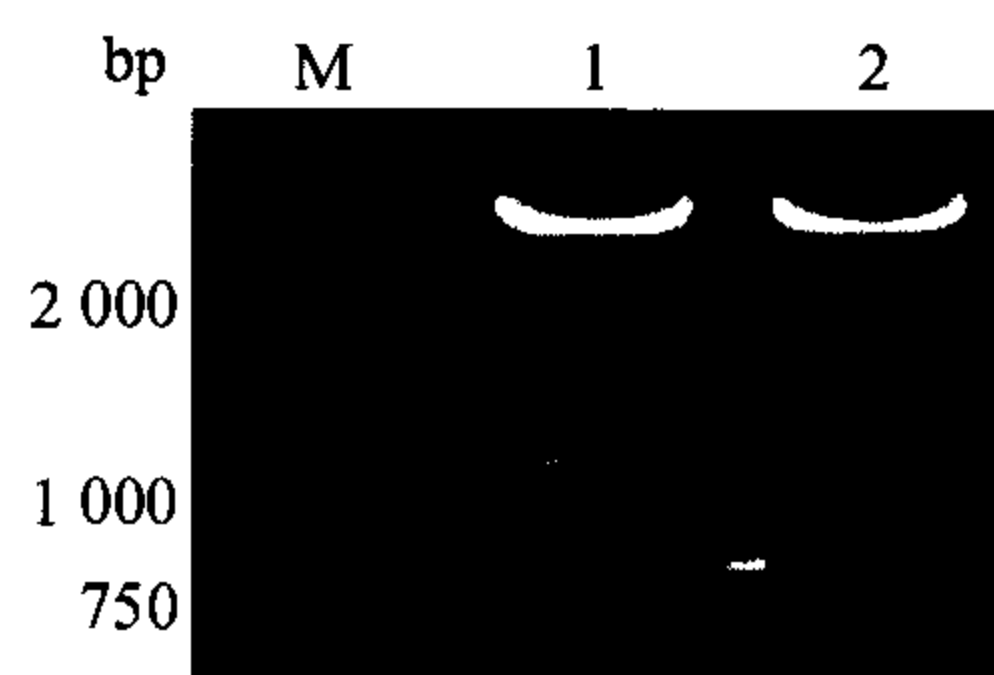
所扩增片段为 *OsGLO1* 的完整编码框,用 RT-PCR 方法扩增出长度约为 1 100 bp 的目的条带(图 1),与预测大小相符.将 PCR 产物回收后,以 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切目的片段和 pET23d 质粒,连接后转化 BL21 感受态细胞,构建重组表达载体 pET23d-*OsGLO1*.酶切鉴定(图 2)和测序结果表明,重组表达载体上的基因片段与已报道的 *OsGLO1* (GenBank 登录号为 AF022740) 的相似性为 100%,表明已成功构建 *OsGLO1* 的原核表达载体.



M: DNA Marker DL2000; 1 和 2: *OsGLO1* 的 PCR 产物.

图 1 RT-PCR 扩增 *OsGLO1* 产物的凝胶电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of *OsGLO1* amplified by RT-PCR



M: DNA Marker DL2000; 1 和 2: *EcoR* I / *Xho* I 酶切 pET23d-*OsGLO1* 的产物.

图 2 重组质粒 pET23d-*OsGLO1* 的限制性酶切分析

Fig. 2 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid pET23d-*OsGLO1*

2.2 水稻 *OsGLO1* 融合蛋白的诱导表达与纯化

含有重组表达载体的 *E. coli* BL21(DE3) 加入 0.5 mmol/L IPTG 诱导不同时间,收集菌体并进行超声波破碎后,分别收集上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 检测,结果显示沉淀中有明显的重组蛋白特异条带,而上清中则无此条带;IPTG 诱导 2 h 后即有目的蛋白被诱导(图 3);重组蛋白的理论相对分子质量约为 40 000(*OsGLO1* 相对分子质量 38 000, His 标签蛋白相对分子质量约为 1 500)。表明该 *OsGLO1* 基因在诱导条件下得到了表达,且以包涵体的形式存在。进而利用超声波破碎法反复破碎诱导的菌体,然后收集包涵体,利用 SDS-PAGE 纯化 *OsGLO1* 融合蛋白后进行透析,获得纯度较高的重组蛋白(图 3)。

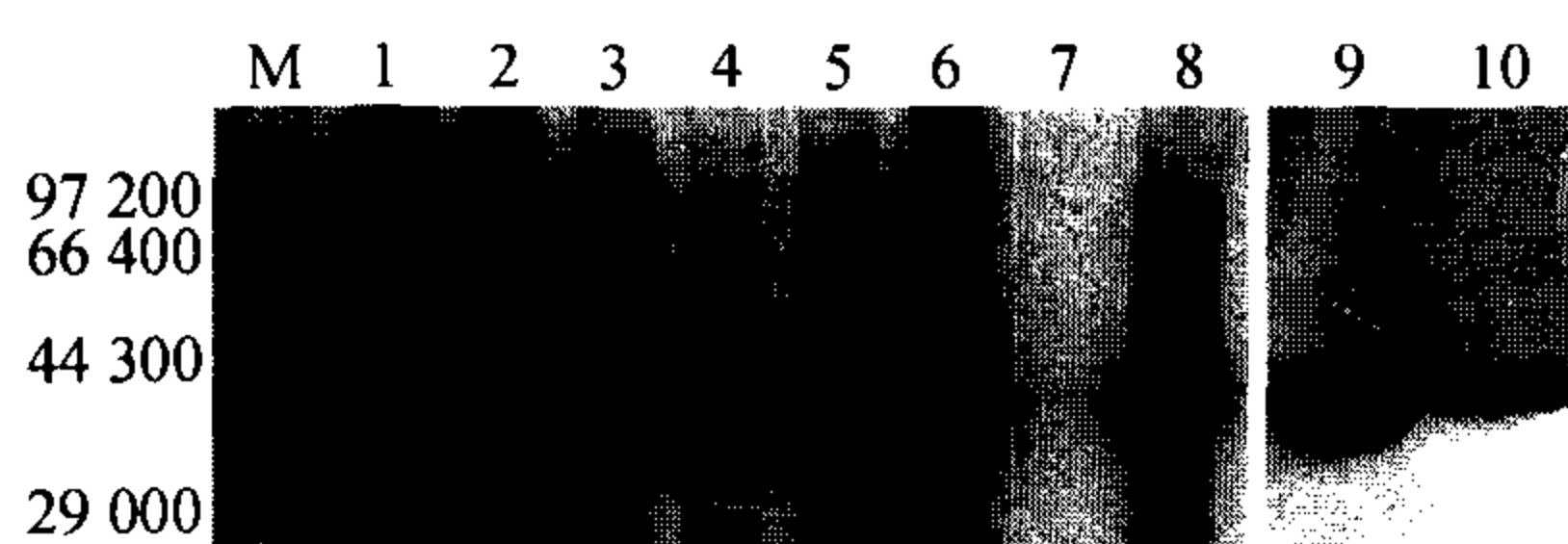


图 3 重组蛋白的诱导表达和纯化的 SDS-PAGE 分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of induced and purified recombinant proteins

2.3 *OsGLO1* 融合蛋白的多克隆抗体制备和特异性分析

以 *OsGLO1* 融合蛋白免疫新西兰白兔 4 次后采集血液,制备抗血清。Western-blot 检验 *OsGLO1* 融合蛋白多克隆抗体的特异性和效果,结果(图 4)表明未经 IPTG 诱导的菌体蛋白没有免疫印迹,而经 IPTG 诱导 12 h 的菌体蛋白,在相对分子质量约 39 000 的位置有一条明显的印迹,说明该抗体的特异性较强。用不同植物材料叶片蛋白进行的 Western-blot 结果显示 C_3 植物材料均有免疫印迹,并且相对分子质量大小吻合;在 C_4 植物苋菜中检测不到乙醇酸氧化酶蛋白,可能与 C_4 植物光呼吸较弱,乙醇酸氧化酶蛋白含量较低有关,进一步说明该抗体对乙醇酸氧化酶蛋白具有较强的特异性。乙醇酸氧化酶是光呼吸代谢的关键酶^[1-3]。目前对 GLO 生理功能的认识尚停留在“它是植物光呼吸代谢步骤中的一个关键酶,是光合组织中光促耗氧的主要酶”^[4-5]。此外,乙醇酸氧化酶可催化乙醇酸氧化生成乙醛酸,也可催化乙醛酸氧化生成草酸,这 2 步反应都伴随着 H_2O_2 的产生^[1]。有报道显示,光呼吸所产生的 H_2O_2 可占植物体中总 H_2O_2 含量的 70% 以上, H_2O_2 参与信号转导及诱导抗逆性已被广泛认同^[6],GLO 催化所产生的 H_2O_2 很可能在植物体内发挥着重要的作用^[9];并有

报道表明干旱和铝毒胁迫可提高 GLO 活性和诱导基因表达^[10-11]。因此,制备 *OsGLO1* 特异性抗体为进一步了解乙醇酸氧化酶在光呼吸中的生理功能以及在植物抗逆性中的作用打下坚实的基础。

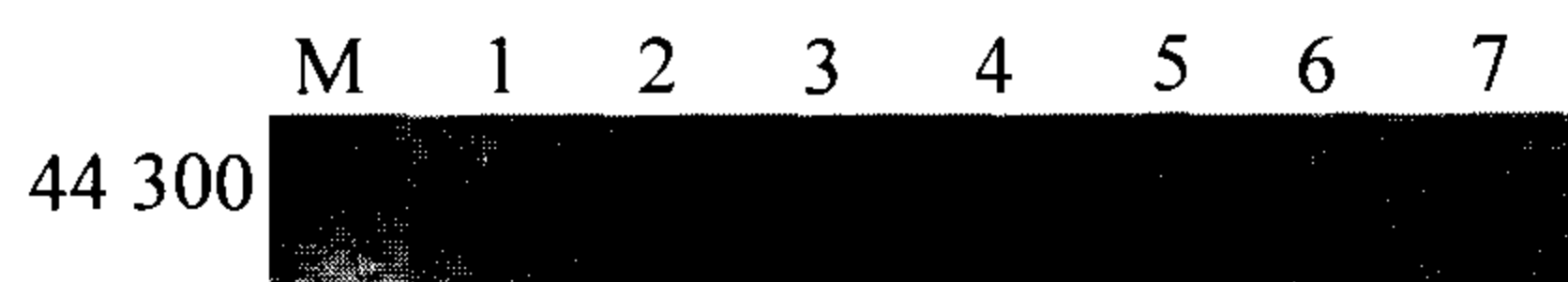


图 4 Western-blot 分析不同物种中 GLO 的表达
Fig. 4 GLO expression of different species analysed by Western-blot

参考文献:

- [1] RICHARDSON K E, TOLBERT N E. Oxidation of glyoxylic acid to oxalic acid by glycolic acid oxidase [J]. *J Biol Chem*, 1961, 236: 1280-1284.
- [2] MORAN J F, BECANA M, ITURBE-ORMAETXE I, et al. Drought induces oxidative stress in pea plants [J]. *Planta*, 1994, 194: 346-352.
- [3] ESQUIVEL M, FERREIRA R, TEIXEIRA A. Protein degradation in C_3 and C_4 plant with particular reference to ribulose biphosphate carboxylase and glycolate oxidase [J]. *J Exp Bot*, 1998, 49: 807-816.
- [4] 王炜军, 彭新湘, 李明启. 植物乙醇酸氧化酶研究进展 [J]. *华南农业大学学报*, 1999, 20(3): 117-122.
- [5] 徐杰. 乙醇酸氧化酶研究进展 [J]. *华南师范大学学报: 自然科学版*, 2002, 3: 106-111.
- [6] NEILL S, DESIKAN R, HANCOCK J. Hydrogen peroxide signalling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5: 388-395.
- [7] XU Hua-wei, ZHANG Jian-jun, ZENG Ji-wu, et al. Inducible antisense suppression of glycolate oxidase reveals its strong regulation over photosynthesis in rice [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60: 1799-1809.
- [8] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [9] NOCTOR G, VELJOVIC-JOVANOVIC S, DRISCOLL S, et al. Drought and oxidative load in the leaves of C_3 plants: A predominant role for photorespiration [J]. *Ann Bot*, 2002, 89: 841-850.
- [10] RIZHSKY L, LIANG H, MITTLER R. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1143-1151.
- [11] ZHANG Jian-jun, HE Zheng-hui, ZHU Guo-hui, et al. Identification of aluminum-responsive genes in rice cultivars with different aluminum sensitivities [J]. *J Exp Bot*, 2007, 58(8): 2269-2278.

【责任编辑 李晓卉】