

番茄 ACC 合酶(LeACS2)在大肠杆菌中的可溶性表达^{*}

李剑峰¹, 周 惠¹, 徐增富¹, 李 凝², 屈良鹄¹

(1. 中山大学生命科学学院//基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275;

2. 香港科技大学生物系, 香港特别行政区)

摘 要: 植物激素乙烯参与了植物生长发育等一系列生理过程, 通过控制乙烯的合成进而控制经济作物的衰老和果实的成熟, 给农业带来深远影响。ACC 合酶是高等植物乙烯生物合成的限速酶。通过 RT-PCR 将番茄 ACC 合酶(*LeACS2*) cDNA 克隆至大肠杆菌表达载体 pET30a 中并使之与 GST 编码序列进行融合而构建了重组表达质粒 pET-LeACS2-GST。转化获得含有该重组表达质粒的大肠杆菌 BL21 starTM (DE3) pLysS 细胞, 在 IPTG 的诱导下成功表达出含有 LeACS2 的大小约 83 000 的融合蛋白。该融合蛋白具有较好的可溶性。通过 GST 亲和层析和 MonoQ 阴离子交换两步纯化后的 LeACS2 能够催化其底物 SAM 生成 ACC。

关键词: 番茄; ACC 合酶; GST 融合表达; 可溶性; 纯化; 酶活

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 06-0071-05

植物激素乙烯参与了高等植物生长发育多方面的调节^[1]。乙烯曾应用于打破种子休眠, 控制性别分化, 提早蔬菜瓜果的成熟和增加早期产量。但同时, 由于乙烯促进植物衰老, 在农业上每年给水果和蔬菜的生产造成巨大损失^[2]。因此, 能够控制和调节植物体内的乙烯水平, 无疑将对农业产生深远影响。ACC 合酶是高等植物乙烯生物合成的重要限速酶, 对其结构和功能的研究往往需要毫克级以上的纯酶。然而, 植物体内产生的 ACC 合酶是极其微量的, 如苹果中的 ACC 合酶仅占其果实细胞总蛋白的 0.002%^[3]。另一方面, ACC 合酶的半衰期较短, 在成熟番茄果实中最长亦不超过 114 min^[4], 且在纯化过程中易降解, 因而很难从植物体内纯化得到大量的 ACC 合酶。近年来, 利用大肠杆菌异源表达系统虽然能够获取大量的 ACC 合酶, 但该方法面临的主要问题是表达产生的 ACC 合酶可溶性非常差^[5,6], 后续的包涵体溶解、复性及纯化过程繁琐^[3]。本研究尝试在 ACC 合酶基因下游连接谷胱甘肽巯基转移酶(GST)基因进行融合表达, 结果发现表达产物的溶解性大为改善, 且易于纯化并保持了较好的酶活性。

1 材料和方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 α 菌株由本实验室保存; 大肠杆

菌 BL21 starTM (DE3) pLysS 菌株购自 Novagen 公司; 表达载体质粒 pET30a 和 pGEX-3X 由本实验室保存。

1.2 试剂和试剂盒

各种限制性内切酶、Ex Taq 酶、DNA Marker DL15 000 购自 Takara 公司; IPTG、BSA、SAM 和 ACC 购自 Sigma 公司; GST 抗体购自 Cell Signaling technology 公司; 羊抗兔 IgG 抗体及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士得生物工程公司; 蛋白定量用 Dye Reagent 购自 Bio-Rad 公司; 其他试剂均为国产分析纯产品; 质粒小量提取试剂盒和凝胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司; GST bind resin 和 Benzonase 核酸酶购自 Novagen 公司。

1.3 全长 *LeACS2* 基因和 *GST* 编码序列的克隆

提取成熟番茄果实总 RNA, 以 Oligo dT 为引物进行逆转录反应, 进而以 P1、P2 为引物进行 PCR 反应以扩增全长的 *LeACS2* 基因。P1: 5'-CGCATATGGGAT TTGAGATGCAAAG 3' (划线部分为 *Nde* I 酶切位点), P2: 5'-AAGGATCCACG AACTAATGGTGAGGGAGGA 3' (划线部分为 *Bam*HI 酶切位点); 以 P3、P4 为引物、质粒 pGEX-3X 为模板进行 PCR 反应以扩增 *GST* 编码序列。P3: 5'-TGGATCCATCGAAGGTCGTATGTCCCTATACTAGG TTATT 3' (划线部分为 *Bam*HI 酶切位点, 粗体部分编码蛋白酶 Factor Xa 切割位点), P4: 5'-

* 收稿日期: 2004-12-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30129001)

作者简介: 李剑峰 (1977 年生), 男, 博士; 通讯联系人: 屈良鹄; E-mail: lsbr04@zsu.edu.cn

AAGTCGACCAGA TCCGATTTTGGAGGATGCT 3' (划线部分为 *Sal*I 酶切位点)。

1.4 重组表达质粒 pET-LeACS2-GST 的构建

重组表达质粒 pET-LeACS2-GST 的构建过程如图 1 所示。全长 *LeACS2* 基因经 *Nde*I / *Bam*H I 双酶切之后插入表达载体质粒 pET30a 的 *Nde*I / *Bam*H I 酶切位点之间。同时, GST 编码序列经 *Bam*H I / *Sal*I 双酶切之后插入表达载体质粒 pET30a 的 *Bam*H I / *Sal*I 酶切位点之间构建成为重组表达质粒 pET-LeACS2-GST。

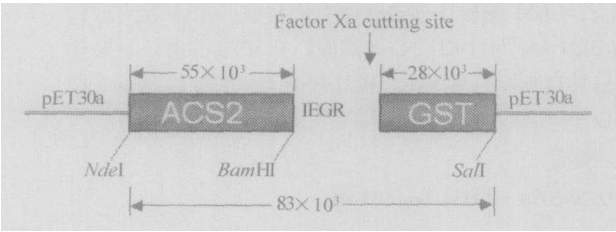


图 1 重组表达质粒 pET-LeACS2-GST 的构建示意图
Fig. 1 Schematic diagram of the recombinant expression plasmid pET-LeACS2-GST

1.5 番茄 LeACS2 的原核表达及纯化

将重组表达质粒 pET-LeACS2-GST 转化入大肠杆菌 BL21 starTM (DE3) pLysS 细胞。挑取单菌落接种于 3 mL 卡那霉素 (20 μg/mL) 和氯霉素 (35 μg/mL) 抗性的 2×YT 培养基内, 37 °C 摇动培养过夜。次日, 按 1:100 的比例用 300 mL 卡那霉素 (20 μg/mL) 抗性的 2×YT 培养基稀释该管菌液, 37 °C 继续培养 2.5~3 h 至菌液的 *A*₆₀₀ 约为 0.6。然后加入诱导物 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 30 °C 继续摇动培养 5 h。8 000×g 离心 5 min 收菌, 并用 20 mL 细胞裂解缓冲液 (40 mmol/L Tris HCl, 20 mmol/L NaCl, 5 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, pH 7.8) 重悬细胞, 然后再 8 000×g 离心 5 min 沉淀菌体。将菌体于 -80 °C 冷冻 10 min 后, 用 6 mL 细胞裂解缓冲液重悬细胞。将细胞悬液置于冰上进行间歇式超声波破碎。在细胞裂解液中加入 6 μL Benzonase 并于 37 °C 温浴 10 min, 然后于 4 °C 18 000×g 离心 20 min, 将上清用 0.22 μm 的滤器进行过滤。预先用 PBS 缓冲液平衡填充了 GST bind resin 的柱子, 将细胞裂解上清加入柱中。然后用 30 倍床体积的 PBS 缓冲液洗柱, 最后用 2 倍床体积的谷胱甘肽洗脱液 (10 mmol/L reduced glutathione, 50 mmol/L Tris HCl, pH 8.0) 洗脱 LeACS2-GST 融合蛋白。在蛋白酶酶切缓冲液 (20 mmol/L Tris HCl, pH 8.0, 100 mmol/L NaCl, 2 mmol/L CaCl₂, 5 μmol/L ZnCl₂) 中将 LeACS2-GST 融合蛋白与适量 (w=1%) 蛋白酶

Factor Xa 混匀, 于室温反应 12 h 后, 将反应液加入预先用 20 mmol/L Tris HCl (pH 8.4) 平衡的 FPLC MonoQ 阴离子交换柱中, 然后用 10 mL 20 mmol/L Tris HCl (pH 8.4) 洗柱, 最后用 0~100% 的洗脱缓冲液 (20 mmol/L HEPES, pH 7.4, 0.5 mol/L NaCl) 进行洗脱, 并按每管体积 2 mL 进行分管收集。每管样品取 20 μL 进行 SDS PAGE 分析以确定去除 GST 肽段的 LeACS2 蛋白所在的收集管。

1.6 SDS PAGE 和 Western blot 分析

SDS PAGE 和 Western blot 的具体操作参见《分子克隆》。Western blot 使用抗 GST 抗体作为一抗, 羊抗兔 IgG 抗体为二抗, 然后用 DAB 显色试剂盒进行显色。

1.7 Bradford 法测定蛋白质浓度

根据 Bradford 的方法^[7] 进行蛋白浓度定量。将 5×Bio Rad Dye Reagent 用去离子水稀释至 1×。配制 0.1、0.2、0.5 和 1 mg/mL 的 BSA 标准品。将各个浓度的 BSA 标准品 (对照用去离子水) 用 1×Bio Rad Dye Reagent 稀释 50 倍后分别测定其 *A*₅₉₅ 值, 然后绘制浓度—*A*₅₉₅ 标准曲线。将适量蛋白样品用 1×Bio Rad Dye Reagent 稀释 50 倍后测定其 *A*₅₉₅ 值, 然后根据浓度—*A*₅₉₅ 标准曲线计算其蛋白浓度。

1.8 ACC 合酶活性测定

在 ACC 合酶反应缓冲液 (50 mmol/L EPPS, pH 8.5, 10 μmol/L PLP and 2 mmol/L DTT) 中加入 100 ng 经两步纯化的 LeACS2 及其底物 SAM 至终浓度为 50 mmol/L, 30 °C 反应 30 min。加入 10 μL 100 mmol/L 的 HgCl₂ 以终止反应。该反应生成的 ACC 按照 Lizada 和 Yang 的方法^[8] 进行定量。酶活测定反应平行进行 5 次后求取平均值。

2 结果与讨论

2.1 重组表达质粒 pET-LeACS2-GST 的构建

以成熟番茄果实总 RNA (如图 2A 所示) 为模板, RT-PCR 扩增得到一条长约 1 500 bp 的特异性产物 (如图 2B 所示), 以质粒 pGEX-3X 为模板, PCR 扩增得到一条长约 660 bp 的特异性产物 (如图 2C 所示), 均与预期的片断大小相符。将 *Nde*I / *Bam*H I 双酶切后的 LeACS2 基因及 *Bam*H I / *Sal*I 双酶切后的 GST 编码序列分别插入质粒 pET30a 的 *Nde*I / *Bam*H I 及 *Bam*H I / *Sal*I 酶切位点间构建成为重组表达质粒 pET-LeACS2-GST。 *Bam*H I 单酶切和 *Eco*R I / *Sal*I 双酶切鉴定表明该重组表达质粒构建正确 (如图 3 所示)。测序结果显示重组质粒 pET-LeACS2-GST 上 LeACS2 基因序列与预期一

致。GST 编码序列上发生两处突变，导致融合蛋白 T744A 错义突变和 G 747G 同义突变。后续研究表明融合蛋白 T744A 错义突变并未影响对其的 GST 亲和纯化及 Western blot 分析。

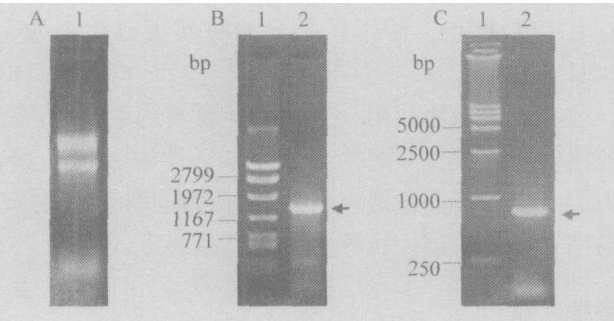


图 2 *LeACS2* 基因的 RT-PCR 扩增 (A、B) 及 GST 编码序列的 PCR 扩增 (C)

Fig. 2 The RT-PCR amplification of *LeACS2* cds (A and B) and PCR amplification of GST cds (C)
A1: 番茄总 RNA; B1: 2 kb DNA 标记; B2: RT-PCR 产物; C1: *DL* 15 000 DNA 标记; C2: PCR 产物

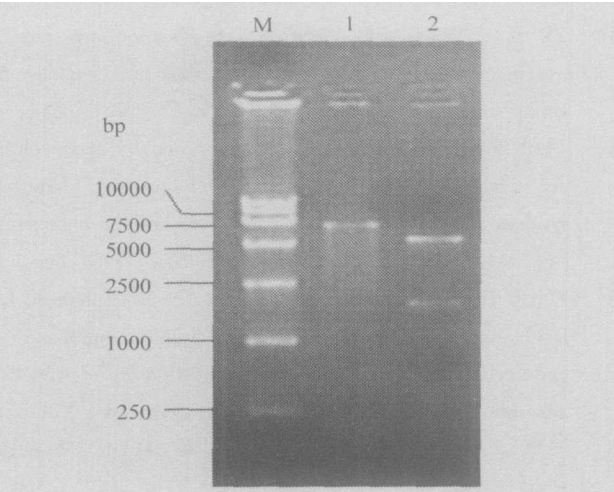


图 3 重组表达质粒 pET-*LeACS2*-GST 的酶切鉴定
Fig. 3 The endonuclease characterization of recombinant expression plasmid pET-*LeACS2*-GST

M: *DL* 15 000 DNA 标记; 1, pET-*LeACS2*-GST/*Bam*HI; 2 pET-*LeACS2*-GST/*Eco*RI+*Sal*I

2.2 番茄 *LeACS2* 的原核表达与纯化

预实验表明诱导物 IPTG 的终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导温度为 30℃可优化表达产物 *LeACS2*-GST 的溶解性。在此条件下诱导培养大肠杆菌 BL21 star™ (DE3) pLysS 细胞 5 h 后收菌, 其超声波裂解上清液 (可溶性总蛋白部分) 经过 GST 亲和纯化在 SDS PAGE 凝胶上呈现出一条相对分子质量约 83 000 的蛋白带 (如图 4 中 Lane A2 所示) 且该条带在用 GST 抗体进行 Western blot 分析时亦呈现阳性结果 (如图 4B 所示), 其大小也与根据 *LeACS2*-

GST 氨基酸序列推算的相对分子质量一致。
LeACS2-GST 融合蛋白经蛋白酶 Factor Xa 水解后在 SDS PAGE 凝胶上呈现为相对分子质量约 54 000 和 28 000 的两条蛋白带 (如图 4 中 Lane A3 所示), 与预期水解产物的相对分子质量十分接近。该水解产物经 FPLC MonoQ 阴离子交换柱进一步纯化, 去除 GST 肽段的 *LeACS2* 蛋白被富集于 0.15 ~ 0.2 mol/L NaCl 浓度梯度的洗脱液中 (如图 4 中 Lane A4 所示)。

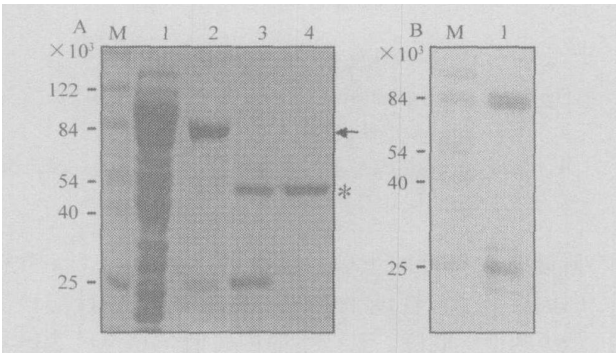


图 4 两步纯化的 *LeACS2* 的 SDS PAGE (A) 和 Western blot (B) 分析

Fig. 4 SDS-PAGE (A) and Western blot (B) analysis of the purified *LeACS2* enzyme
M: 蛋白相对分子质量标记; A1: 细胞可溶性总蛋白; A2: A1 的 GST 亲和纯化产物; A3: Factor Xa 水解 A2 的产物; A4: A3 经 MonoQ 阴离子交换纯化的产物; B1: GST 亲和纯化产物的免疫印迹

2.3 番茄 *LeACS2* 的酶活测定

按照 Lizada 和 Yang 的方法使用不同浓度的 ACC 标准品建粒 ACC 浓度-乙烯峰面积标准曲线, 根据曲线计算出 ACC 浓度 = (乙烯峰面积 + 16.5) / 35486 ($\mu\text{mol/L}$)。在 0.5 mL 反应体系内, 将底物 SAM 浓度定量为 50 mmol/L, 此时加入 0.1 μg *LeACS2* 在 30℃反应 30 min。该反应生成的 ACC 经饱和 NaOH 和漂白水混合物 (体积比为 2:1) 氧化成乙烯。5 次重复实验在气相色谱仪上得到的乙烯峰面积分别为 240 630.5, 260 467.8, 181 218.4, 212 006.2 和 154 645.5, 其平均值为 209 793.7。根据上述标准曲线计算出相应的 ACC 浓度为 5.915 $\mu\text{mol/L}$ 。据此计算出在上述反应条件下每小时每毫克 *LeACS2* 的酶活性约为 59 $\mu\text{mol/L}$ (如图 5 所示), 与过去发表的 SAM 浓度为 50 mmol/L 时 *LeACS2* 的每小时每毫克酶活性基本相同 (约 55 $\mu\text{mol/L}$)^[9]。该结果表明本研究所表达和纯化的 *LeACS2* 保持了较好的酶活性。

2.4 讨论

在 GST 亲和纯化产物中出现了少量相对分子

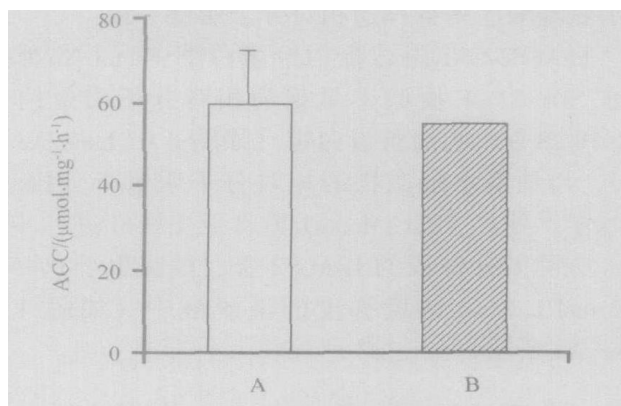


图 5 纯化的番茄 LeACS2 的酶活测定

Fig 5 The determination of enzymatic activity of LeACS2 enzyme purified in this study

A: 本研究中表达的可溶性 LeACS2 的酶活性; B: 过去研究中复性后的 LeACS2 的酶活性

质量约 25 000 的蛋白, 该蛋白在 Western blot 分析时同样显示阳性结果 (如图 4 所示), 估计应该为 GST 的衍生肽段。其产生原因可能是超声波裂解上清中 LeACS2 的 C 端受到大肠杆菌中蛋白酶的 attack 而水解所致^[4], 而 GST 肽段部分因为结构致密而不易被蛋白酶降解。

应用原核系统表达外源蛋白时往往得到不可溶的表达产物即包涵体, 这给表达产物的纯化以及获得有活性的产物等带来了很大困难。而在某些优化条件下获得的原核可溶性表达则可避免对包涵体进行复杂的变性、复性处理而直接获得有生物学活性的可溶性蛋白。本文在此成功实现了番茄 ACC 合酶 (LeACS2) 在大肠杆菌中的可溶性表达。此前, 植物 ACC 合酶在大肠杆菌中尚未获得明显的可溶性表达, 绝大多数是以包涵体的形式存在^[5,6], 推测其原因可能是由于 ACC 合酶在大肠杆菌中表达过快或缺乏正确折叠所需的辅助因子。本文能够改善表达产物溶解性的关键在于: ①运用了 GST 融合表达策略。GST 肽段往往可以帮助融合伴侣进行正确折叠而提高其溶解性。②优化了表达条件, 使用了较低的诱导物浓度 (0.1 mmol/L IPTG) 和较低的诱导温度 (30 °C) 以降低表达速度。③采用了大肠杆菌 BL21 starTM (DE3) pLysS 表达系统, 该系统由于缺失了降解 mRNA 所需的 RNaseE, 使得 mRNA 的半衰期得以延长, 外源蛋白则有机会进行缓慢而持久的表达。相信以上三点策略亦可推广到其它外源基因的原核表达。另外, 与 GST 肽段的融合表达还极大地简化了对表达产物的分离纯化,

而且可以使用 GST 抗体间接对外源蛋白的表达水平进行检测, 从而使那些尚未产生商品化抗体的外源蛋白的 Western blot 检测成为可能。本文考虑到 GST 肽段可能会对 LeACS2 的酶活测定产生潜在影响, 预先在 LeACS2 和 GST 肽段之间插入了蛋白酶 Factor Xa 的切割位点, 使得在必要的时候可以除去融合的 GST 肽段。

本文成功地利用大肠杆菌异源表达系统表达和纯化了具有较好可溶性和生物学活性的 ACC 合酶, 为下一步对其催化机理的研究进而阐明植物激素乙烯生物合成的调控机理奠定了基础。

参考文献:

- [1] YANG S F, HOFFMAN N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1984, 35: 155–89.
- [2] 姚泉洪, 黄晓敏, 刘宗镇, 等. 植物乙烯生物合成及抗衰老基因工程 [J]. *上海农业学报*, 1994, 10 (2): 89–96.
- [3] YIP W K, DONG J G, YANG S F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple fruits [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 251–257.
- [4] JAKUBOWICZ M. Structure, catalytic activity and evolutionary relationships of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme of ethylene synthesis in higher plants [J]. *Acta Biochim Pol*, 2002, 49: 757–774.
- [5] ZHOU H Q, HUXTABLE S, XIN H, et al. Enhanced high-level expression of soluble 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and rapid purification by expanded bed adsorption [J]. *Protein Express Purif*, 1998, 14: 178–184.
- [6] 陆海, 吴薇, 曾庆银, 等. 大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达重组蛋白的研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2001, 23 (6): 1–4.
- [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]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254.
- [8] LIZADA M C C, YANG S F. A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid [J]. *Anal Biochem*, 1979, 100: 140–145.
- [9] LI N, MATTOO A K. Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key protein in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive, monomeric enzyme [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 6908–6917.

(下转第 78 页)

Construction of Two Plant Expression Vectors for Enhancing
Expression and Immunogenicity of HBsAg in Tomato

QI Yu, HE Zhu mei, ZHENG Nuo yan, XU Yin

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Expression amount and immunogenicity of plant produced vaccine are two main problems in the development of plant based vaccine. For the purpose of enhancing expression in tomato fruits and immunogenicity of HBsAg, we constructed plant expression vector pBIES2, which contains HBsAg M protein gene and under the control of E8 tomato fruit specific promoter. Another expression vector pBIES, containing HBsAg S protein gene and under the control of E8 promoter, was constructed as well. Both the vectors were introduced into *A. tumefaciens* LBA4404. A brief discussion for the advantages of pBIES2 was processed at the end of the article.

Key words: E8 promoter; HBsAg; plant expression vector

(上接第 74 页)

The Expression of Tomato 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate
Synthase in *Escherichia coli*

LI Jian feng¹, ZHOU Hui¹, XU Zeng fu¹, LI Ning², QU Liang hu²

(School of Life Sciences //Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education,
Sun Yat sen Universty, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Biology, The Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Hongkong SAR, China)

Abstract: Ethylene is a simplest phytohormone regulating many aspects of the developmental process in higher plants. ACC synthase is the committed enzyme to regulate the rate limiting step in ethylene biosynthetic pathway. This work clones the cDNA of tomato ACC synthase (*LeACS2*) by RT-PCR and overproduced it in *Escherichia coli* BL21 starTM (DE3) pLysS cells as C terminal fusion with GST tag. The resultant 83 kDa fusion protein was found to have good solubility. The LeACS2 enzyme was purified by GST affinity purification and MonoQ chromatography. Consequent enzymatic activity assay confirmed its intact catalytic function.

Key words: ACC synthase; LeACS2; GST fusion; good solubility; purification; activity assay