



毕雪奇,刘璐璐,任梓齐,等.光核桃 AmRanBP1 重组蛋白表达特性及其抗逆性初步研究[J].黑龙江农业科学,2023(8):58-65,66.

光核桃 AmRanBP1 重组蛋白表达特性及其抗逆性初步研究

毕雪奇^{1,2},刘璐璐^{1,2},任梓齐^{1,2},马珺婕²,狄俊彤²,罗秋香^{1,2}

(1.东北林业大学 盐碱地植被生态恢复教育部重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150040;2.东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:光核桃为蔷薇科桃属落叶乔木,具有耐寒、耐旱等优良特性。为探究 RanBP1 蛋白在光核桃 [*Amygdalus mira* (Koehne)] 中的表达条件及其在逆境胁迫防御反应中的调控作用,利用数据库中碧桃 (*Prunus persica*) 的基因序列采用同源克隆得到 *AmRanBP1*。生物信息学分析结果表明,该基因开放阅读框 ORF 全长 696 bp,编码 231 个氨基酸,无跨膜区域,为亲水性稳定蛋白,无信号肽结构。蛋白序列分析和系统进化分析表明, *AmRanBP1* 与其他植物的 RanBP1 蛋白具有较高的同源性,例如苹果 (*Malus domestica*)、大豆 (*Glycine max*)。构建了 pET-21a-*AmRanBP1* 融合表达载体,优化了蛋白表达条件,即在 40 ℃、IPTG 浓度为 2.00 mmol·L⁻¹,诱导 4.0 h 时可获得较高浓度的重组蛋白,对表达产物进行纯化用以制备单克隆抗体。最后,通过模拟各种非生物胁迫条件考察 *AmRanBP1* 转化菌株在大肠杆菌中的表达模式,发现各种胁迫条件下转 *AmRanBP1* 的菌株抗逆性均优于空载体,并且在高温、NaCl 与 CuSO₄ 胁迫下优势显著,进一步表明 RanBP1 可能在光核桃的防御反应中发挥作用。

关键词:光核桃;Ran 结合蛋白 1;非生物胁迫

Ran 结合蛋白 1(RanBP1)是一种富含细胞质的核质穿梭蛋白,在核转运中起重要作用。RanBP1 是最早被发现的 RanGTP 酶,RanGTPase 循环中的关键因子,RanBP1 特异性的与 RanGTP 结合调控 Ran 与其他因子的相互作用,RanBP1 自身没有催化活性,但可以使 RanGTPase 激活蛋白 RanGAP 的活性提高一个数量级,同时抑制 Ran 的鸟苷酸交换因子 RCC1 的活性,水解 RanGTP 形成 RanGDP^[1-3]。RanBP1 表观分子量 27 kDa,具有 203 个氨基酸,具有高电荷(约 40% Arg、Asp、Glu 和 Lys)及酸性碱基,并且包含 2 个与卷曲螺旋一致序列同源的区域^[2]。RanBP1 在核质转运、核膜重建、DNA 复制以及纺锤体的组装等过程中均发挥重要作用^[4]。

对于 Ran 的发现最初与细胞周期调控有关,小鼠体细胞中的 RanBP1 在 G1 期时表达量最低,S 期开始上升,到 M 期开始累积达到峰值,然

而在分裂末期时迅速降低。可以发现 RanBP1 的表达量随细胞周期的变化与其对细胞分裂调控作用相一致^[5-6]。RanBP1 在多种肿瘤细胞中表达上调,人为的增加 RanBP1 的表达量或许可以引起细胞的癌变,可以作为研究癌症发生机制的模型^[4]。关于 Ran 在植物中的功能研究也有很多进展。研究表明,拟南芥中 Ran1 的过表达促使完整核膜的形成,促进细胞周期进程^[7]。这与在动物细胞中发挥的作用相同。通过构建植物过表达载体,将玉米中 *RanBP1* 转入拟南芥中,并筛选纯化至 T₃代,通过对拟南芥野生型、突变体和过表达植株进行低温处理,发现突变体拟南芥种子显著高于野生型,测定生理指标发现突变体对冷胁迫耐受力更强,初步推断转化 *ZmRanBP1* 基因降低了拟南芥的耐冷性^[8]。甘薯 *Ran* 基因在 NaCl、低温、PEG 处理和外源施加 ABA 后,其表达量均先迅速降低,之后表达量增加^[9]。在茶叶休眠组织中发现低温可显著影响 *Ran2* 的表达^[10]。由此可见,Ran 蛋白在植物生长发育过程中发挥重要的作用。

光核桃又名西藏桃,广泛分布于西藏,云南等地^[11-12]。它具有突出的经济、营养和药用价值,桃仁和光核桃仁都具有活血化瘀功效^[13-14]。课题组在前期关于光核桃蛋白质组的研究结果表

收稿日期:2023-03-21

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(2572017CA10);国家自然科学基金(31500317);国家级大学生创新创业训练计划(202110225051)。

第一作者:毕雪奇(1997—),女,硕士研究生,从事植物逆境生理生态学研究。E-mail:bxq1021@163.com。

通信作者:罗秋香(1976—),女,博士,副教授,从事植物逆境生理生态学研究。E-mail:luoqiuxiang@sina.com。

明,一个 RanBP1 蛋白在重度干旱后表达量骤升,而复水后骤降,推测其表达与光核桃耐逆性有关。本研究以光核桃幼苗为材料,克隆了 *AmRanBP1* 基因,对其进行生物信息学分析,利用原核表达技术体外诱导 AmRanBP1 蛋白并纯化制备单克隆抗体,分析多种逆境胁迫下,*AmRanBP1* 转化菌株在大肠杆菌中的表达特性。本研究为光核桃耐逆机制解析提供基础,同时为研究植物抗逆性提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌感受态 DH5 α 、Rosetta-gami(DE3) pLysS、重组蛋白原核表达载体 pET-21a 由本实验室保存;pLB-Simple Vector 载体购自天根生物科技公司;pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;Plasmid Mini Kit、Gel Extraction Kit 均购自 Omega BIO-TEX 公司;T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 生物科技公司;Q5 High-fidelity DNA Polymerase、限制性内切酶均购自 New England Biolabs(NEB)公司;双色预染蛋白分子量 Marker 购自 ThermoFisher Scientific 公司;His-Tag Ni-NTA Resin 购自 Abbiner 生物科技公司。

1.2 *AmRanBP1* 基因的克隆

由于光核桃与碧桃(*Prunus persica*)亲缘关系较近,所以推测其 *AmRanBP1* 基因序列与碧桃中的应当具有较高同源性。在 NCBI 数据库中检索出 *PpRanBP1* 基因序列,并根据 *PpRanBP1* 基因序列利用 Primer 5.0 设计上下游引物(F: ATGTCGAGCGCCGATGC; R: TTATGTGTCTTTCTTCTCCTCCTCA)。提取干旱处理 16 d 后的光核桃叶片的 RNA,反转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增。对 PCR 产物进行胶回收,将回收产物与 pMD18-T 中间载体相连,16 °C 过夜连接后,转入大肠杆菌 DH5 α 中,菌液均匀涂布于含有氨苄的 LB 固体培养基中,37 °C 过夜培养。挑取单克隆菌落 PCR 鉴定,将有目的条带的阳性克隆摇菌后送到生物公司测序,得到测序结果进行比对。

1.3 生物信息学分析

利用 NCBI 中 GenBank 数据库找到 AmRanBP1 在不同物种中的同源序列,然后用 DNAMAN(Lynnon Biosoft)对其在不同物种中的氨基酸序列进行比对;利用 MEGA3.1(Mega)软件构建发育树;使用 TMHMM v.2.0 对

AmRanBP1 蛋白进行在线分析;使用 ProtParam tool 分析 AmRanBP1 的理化参数;利用在线网站 SignalP 5.0 Server 对 AmRanBP1 蛋白信号肽进行预测;使用 GeneMANIA 网站对以拟南芥的 RanBP1 为中心,预测与其相关的互作蛋白。

1.4 原核表达载体的构建

利用克隆获得的 *AmRanBP1* 全长 ORF,设计带有酶切位点的特异性上下游引物(F: GGATCCCAGGTCGCTCCGAT; R: GTCGAC-TGTGTCTTTCTTCTCCTCC, 酶切位点为: BamHI、SalI),进行 PCR 扩增,将扩增后得到的片段连接到 pLB-Simple Vector 中间载体上,得到 *AmRanBP1* 质粒,将 *AmRanBP1* 和 pET-21a 载体质粒进行酶切,将酶切后的质粒进行连接,16 °C 过夜连接后涂在含有氨苄的 LB 平板上,过夜培养后挑取单克隆进行培养,提取质粒 DNA,双酶切鉴定后,将样品送到生物公司测序。

1.5 光核桃 AmRanBP1 蛋白的小量诱导及条件优化

将构建好并检测正确的载体质粒转入到大肠杆菌感受态 Rosetta-gami(DE3)pLysS,菌液涂在含有氨苄和氯霉素的 LB 平板上,过夜培养后,挑取单克隆进行 PCR 验证,正确克隆转到 LB 液体培养基中(含氨苄和氯霉素)37 °C 过夜培养后,取过夜菌加 LB 液体培养基按 1:50 比例接种,使菌液浓度 OD₆₀₀ \approx 0.5。对 IPTG 浓度和菌液诱导温度的优化方法:分别添加 IPTG 终浓度为 0,0.1,0.5,1.0 和 2.0 mmol·L⁻¹,在 28,37,40 和 42 °C 下诱导 4 h。对诱导时间的优化方法:以最适的 IPTG 浓度和诱导温度,分别诱导 0,0.5,1.0,2.0 和 4.0 h 后 13 000 r·min⁻¹ 收集菌体,弃上清,加入 200 μ L PBS(PH7.4)悬浮混匀后,超声破碎,取 20 μ L 蛋白样品加入 20 μ L 2 \times Loading Buffer,沸水浴 10 min 后,冰浴 5 min,13 000 r·min⁻¹、4 °C 离心 1 min,取 20 μ L 用于 SDS-PAGE 电泳。

1.6 重组蛋白 AmRanBP1 的大量诱导与纯化

将诱导成功后的菌株加入到 LB 液体培养基中(含氨苄和氯霉素)37 °C 过夜培养,取菌液 2 mL 加入到 200 mL LB 中,37 °C 培养至菌液浓度 OD₆₀₀ \approx 0.5 时,向瓶中加入 IPTG 至终浓度为 2 mmol·L⁻¹、40 °C,培养 4 h 后 13 000 r·min⁻¹、4 °C 离心 10 min,弃上清,加入预冷的 His 蛋白裂解液 10 mL 悬浮菌体并混匀,在冰上进行超声破碎,频率为 50 Hz,每超声 3 s,停 2 s,设置 15 min。

超声后, $13\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 分别保留上清和沉淀用于 SDS-PAGE 电泳。

取上清进行纯化, 将竖直放置的纯化柱加入 2 mL His-Tag Ni-NTA 柱材料, 10 mL Binding Buffer 平衡后, 将大量诱导所获得的上清蛋白样品加入纯化柱, 加入 4 mL Binding Buffer 洗去纯化柱中未结合的蛋白, 依次向柱中加入 10 倍柱体积的 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的 Washing Buffer 和 8 倍柱体积的 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的 Washing Buffer、4 倍柱体积 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的 Washing Buffer 进行洗柱、再添加 3 倍柱体积 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $500\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 咪唑的 Elution Buffer 进行洗脱。收取各部流穿液 1 mL, 最后的 Elution Buffer 全留。分别取 $20\text{ }\mu\text{L}$ 流穿液样品与 $20\text{ }\mu\text{L}$ $2\times$ Loading Buffer 混匀, 沸水浴 10 min, SADS-PAGE 电泳检测纯化结果。最后, 利用透析法提高纯化蛋白的浓度, 将带有样品的透析袋置于透析液 ($0.075\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液, $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $0.002\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA) 中 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 透析 48 h, 透析结束后, 采用 Bradford's 测定纯化蛋白浓度, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白。

1.7 多种逆境胁迫下 *AmRanBP1* 在大肠杆菌中的表达与抗逆性分析

将转入到大肠杆菌 Rosetta-gami (DE3) pLysS 感受态的对照 pET-21a 和 pET-21a-*AmRanBP1* 菌株分别在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养至 $\text{OD}_{600} \approx 0.5$, 保证两种菌液生长密度一致, 按照已优化的最佳诱导条件进行诱导 (IPTG 浓度为 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 4 h)。将对照 pET-21a 和 pET-21a-*AmRanBP1* 两种菌液分别用含有 $800\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘露醇、 $60\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 和不加任何处理的液体 LB 培养基稀释 20 倍, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 10 h, 另外取一组高温 ($40\text{ }^{\circ}\text{C}$) 培养 10 h, 每 2 h 测定 1 次 OD_{600} , 3 次重复。

2 结果与分析

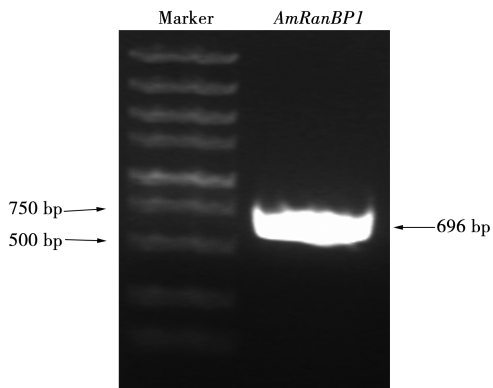
2.1 *AmRanBP1* 基因扩增结果与分析

以光核桃叶片 cDNA 作为模板扩增 *AmRanBP1* 基因, 由图 1 可以看到, 在 $500\sim 750\text{ bp}$ 之间存在一条明亮条带, 大小约为 750 bp 左右, 与碧桃中的 *RanBP1* 基因大小一致 (696 bp)。

2.2 生物信息学分析

分别选择碧桃 (*Prunus persica*)、苹果 (*Malus domestica*)、大豆 (*Glycine max*)、大桉 (*Eucalyptus*

grandis)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的氨基酸序列进行对比, 发现该蛋白的氨基酸序列与其他植物的 *RanBP1* 具有较高保守区, 其中与普通桃同源性达到 99%, 与苹果的同源性达到 97% (图 2a)。分别选择碧桃、扁桃 (*P. dulcis*)、梅花 (*P. mume*)、苹果、大豆、大桉、蓖麻 (*Ricinus communis*)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*)、胡杨 (*P. euphratica*)、拟南芥, 利用 MEGA3.1 在线软件应用最大邻近法构建系统发育树后发现, 光核桃 *AmRanBP1* 蛋白与碧桃、扁桃等植物的 *RanBP1* 蛋白聚成一类 (图 2b)。



Marker, DNA Marker DL5000; *AmRanBP1*, PCR 产物。

图 1 *AmRanBP1* 基因 PCR 反应的凝胶电泳分析

使用 TMHMM v. 2.0^[15] 对 *AmRanBP1* 蛋白进行在线分析 (图 3a), 发现 *AmRanBP1* 没有明显的跨膜区, 即为非生物膜上的功能蛋白; 使用 ProtParam tool^[16] 分析 *AmRanBP1* 的理化参数 (图 3b), 该蛋白质分子式、分子量和理论等电点等理化性质。AmRanBP1 的分子式为 $\text{C}_{1101}\text{H}_{1771}\text{N}_{307}\text{O}_{382}\text{S}_6$, 分子量为 25 613.36, 理论等电点为 4.67, 氨基酸总数为 231, 为酸性蛋白质。采用在线软件 SignalP 5.0 Server 对 *AmRanBP1* 蛋白信号肽进行预测 (图 3c), *AmRanBP1* 序列中无明显的信号肽序列, 结果表明该蛋白是无信号肽结构的非分泌蛋白。使用 GeneMANIA 网站对以拟南芥的 *RanBP1B* 为中心, 预测与其相关的互作蛋白 (图 3d)。RanBP1A、RanBP1B、RanBP1C、Ran2、Ran3、AT5G20010 这几个蛋白之间可能存在互作。除了 MAG、IMPA7、AT5G20010 和 IMP4 之外, 推测其余蛋白之间存在共表达。推测除了 MAG、AT1G69680、FIO1、UVR8、CY19-3 其余蛋白存在共享蛋白质结构域。RANBP1C 和 IMPA3 之间可能存在共定位。

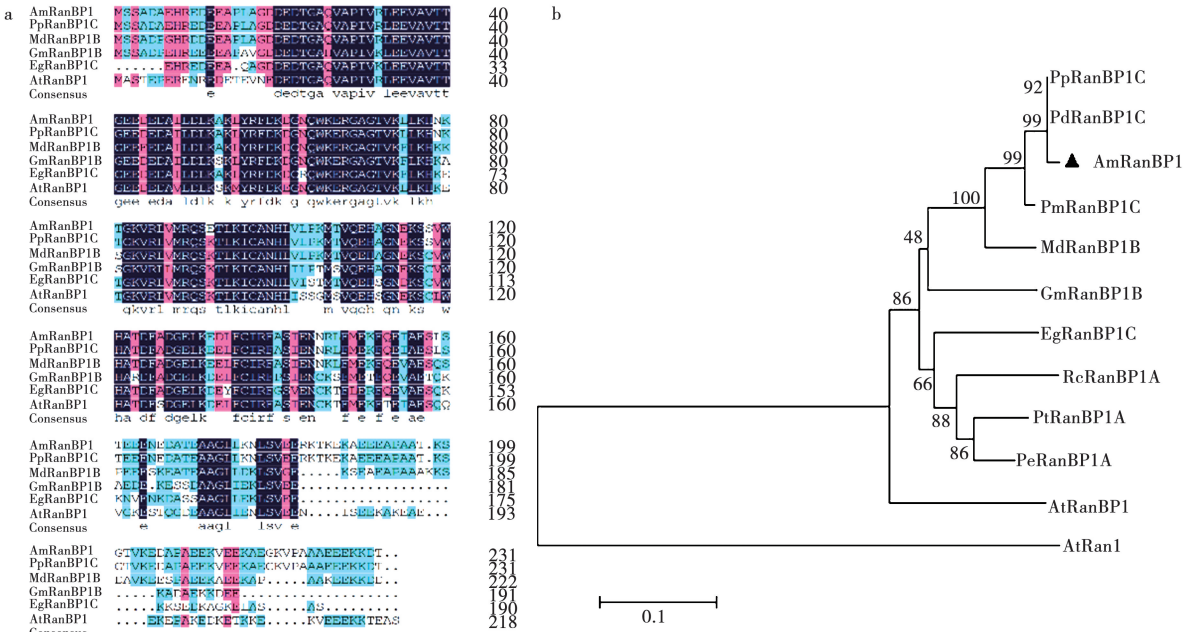
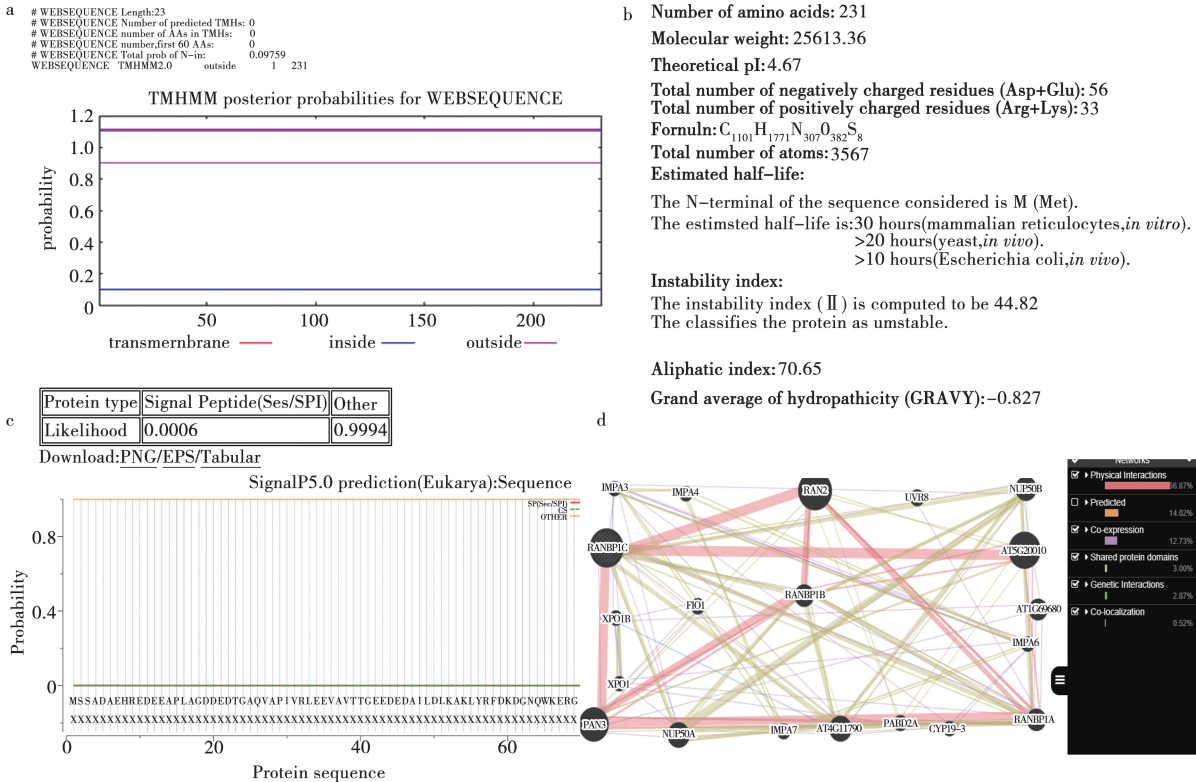


图 2 AmRanBP1 与其他不同物种 RanBP1 氨基酸序列多重比对(a)和系统发育进化树(b)



a. 跨膜区分析; b. 理化性质分析; c. 信号肽分析; d. 预测互作蛋白分析图。

图 3 AmRanBP1 蛋白的生物信息学分析

2.3 原核表达载体的构建

构建重组载体 pET-21a-AmRanBP1, 分别在 *AmRanBP1* 上下游加上 *Bam*HI 和 *Sa*II 酶切位点, 构建至 pMD18-T 中间载体(图 4a)。将 *Am*-

RanBP1 从中间载体上切下来, 构建到 pET-21a 上, 最后通过双酶切验证, 出现两条带且大小均符合载体及片段大小(图 4b), 说明 pET-21a-*AmRanBP1* 重组质粒构建成功。

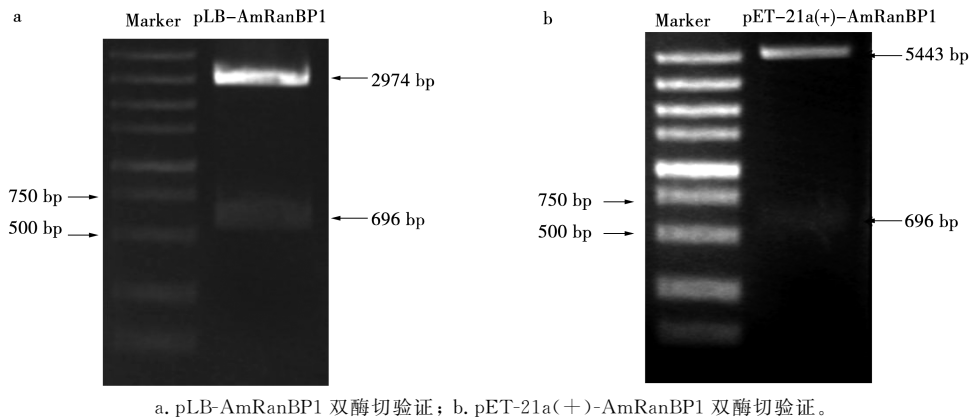
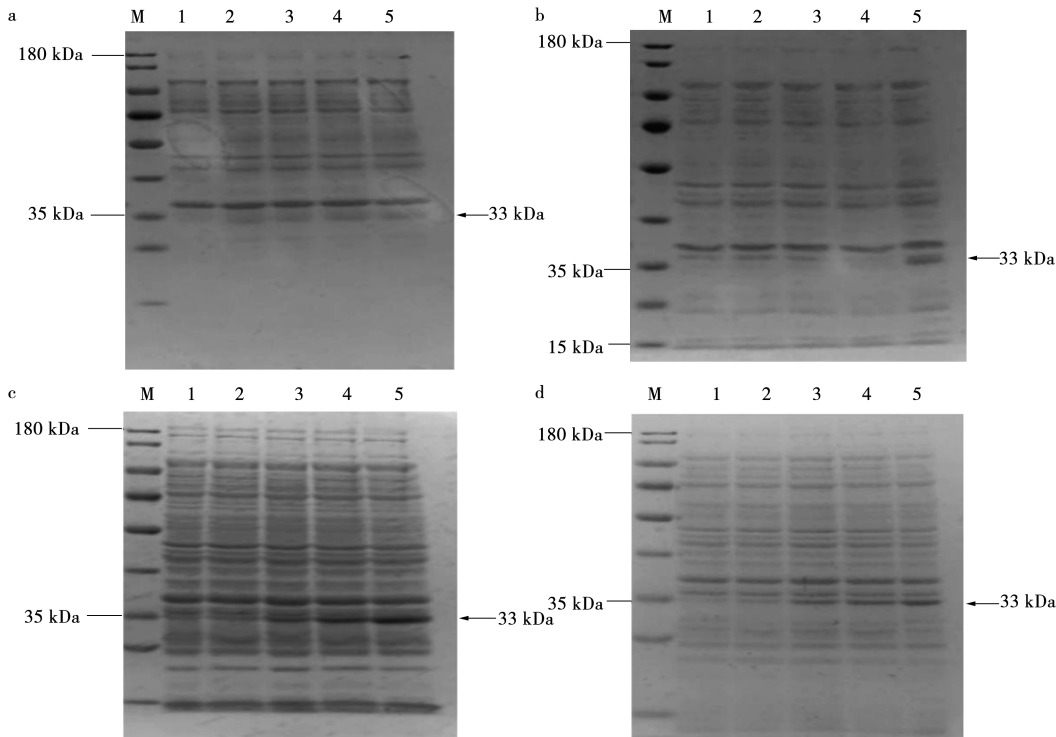


图 4 AmRanBP1 原核表达载体的构建

2.4 光核桃 AmRanBP1 蛋白的小量诱导及条件优化

将重组载体 pET-21a-AmRanBP1 转入 Rosetta-gami(DE3)感受态,小量诱导优化表达条件,预测分子量大小为 33 kDa,SDS-PAGE 检测为 33 kDa 清晰特异条带。首先在 37 ℃时,IPTG

浓度为 0,0.05,0.10,1.00 和 2.00 mmol·L⁻¹。结果表明在 2.00 mmol·L⁻¹时表达量最大(图 5a)。然后分别在 37,40 和 42 ℃时,TPTG 浓度为 2.00 mmol·L⁻¹时,诱导 0,0.5,1.0,2.0 和 4.0 h。结果表明在 40 ℃时,IPTG 浓度为 2.00 mmol·L⁻¹时,诱导 4.0 h 表达量最大(图 5c)。



a. IPTG 浓度梯度诱导,1~5 泳道为 0,0.05,0.10,1.00 和 2.00 mmol·L⁻¹,37 ℃诱导 4 h 的蛋白;b、c、d. 分别为 37,40 和 42 ℃下时间梯度诱导,1~5 泳道分别为 0,0.5,1.0,2.0 和 4.0 h,IPTG 浓度为 2.00 mmol·L⁻¹,M 为蛋白 Marker。

图 5 重组蛋白 AmRanBP1 小量诱导表达的 SDS-PAGE 电泳分析

2.5 重组蛋白 AmRanBP1 大量诱导及纯化

将 pET-21a-AmRanBP1 在大肠杆菌 Rosetta-gami(DE3)的菌株根据优化获得的诱导表达条件(40 ℃,IPTG 浓度为 2.00 mmol·L⁻¹,诱导 4.0 h)

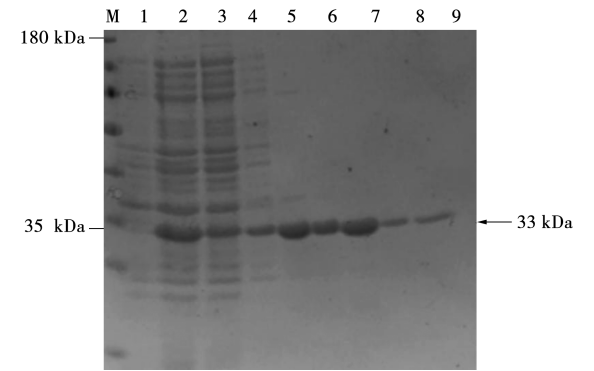
大量培养并诱导的蛋白用 Ni-NTA 柱子进行纯化,用 20,50,100,150 和 500 mmol·L⁻¹咪唑进行洗脱发现,含 50 mmol·L⁻¹咪唑基本可将杂蛋白洗掉。在 100 mmol·L⁻¹咪唑洗脱组液里含单一

大量目的条带。150 和 500 mmol·L⁻¹ 咪唑也可以得到纯度较高的重组蛋白(图 6)。收集重组蛋白进行除盐透析及浓度测定,用于后续的抗体制作。

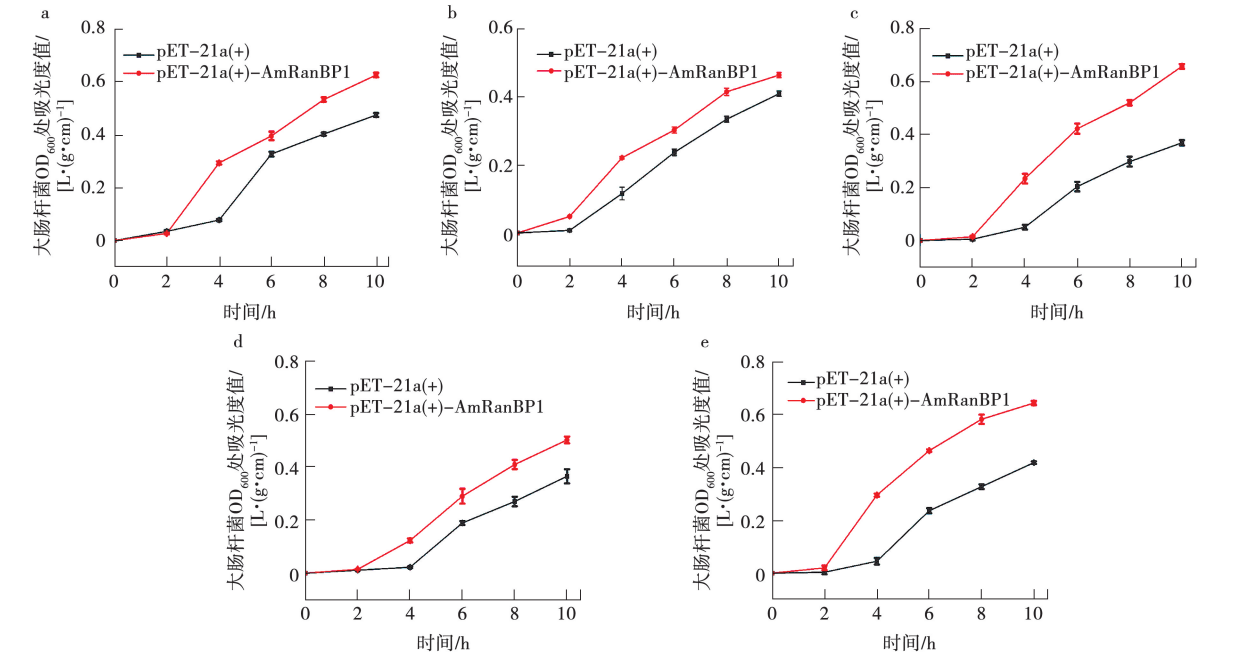
2.6 多种逆境胁迫下 AmRanBP1 在大肠杆菌中的表达与抗逆性分析

为研究 AmRanBP1 在多种非生物胁迫下大肠杆菌中的表达情况,比较了 pET-21a 和 pET-21a-AmRanBP1 转化子在大肠杆菌中的生长情况。由图 7 可知,在对照培养基(图 7a)中,pET-21a 空载体株系和 pET-21a-AmRanBP1 转化子株系在前 2 h 生长速度没有差异,但在 2 h 后,两种株系均进入指数生长阶段。在甘露醇(图 7d)胁迫下两种株系的生长速率没有明显差异。在高温(40 ℃)胁迫下两种菌株在最开始前 2 h,就已经表现出差异,两种菌株在 2 h 后呈指数生长。在 NaCl(图 7c)和 CuSO₄(图 7e)胁迫下,pET-

21a-AmRanBP1 转化子的生长速率明显快于 pET-21a 空载体的生长速率,这种差异随着时间的增加而增大。



M 蛋白 Marker;1~3 泳道.未诱导的总蛋白,加 IPTG 诱导的上清液,穿透液;4~9 泳道.20,50,50,100,150 和 500 mmol·L⁻¹ 咪唑洗脱的 pET-21a-AmRanBP1 蛋白。
图 6 AmRanBP1 重组蛋白纯化



a. 对照; b. 40 ℃ 处理后的大肠杆菌细胞生长; c. 800 mmol·L⁻¹ NaCl 处理后的大肠杆菌细胞生长; d. 200 μmol·L⁻¹ 甘露醇处理后的大肠杆菌细胞生长; e. 60 μmol·L⁻¹ CuSO₄ 处理后的大肠杆菌细胞生长; a~e 中 pET-21a 表示带有空载体的大肠杆菌,误差线为 3 次重复的标准误差。

图 7 非生物胁迫下 AmRanBP1 的表达对大肠杆菌生长的影响

3 讨论

RanBP1 是一种在许多真核生物中发现的 Ran-GTP 结合蛋白,在使用纯化蛋白的体外检测中,它刺激 RanGAP1 的活性大约提高 10 倍,从而调节 GTP-Ran 和 GDP-Ran 之间的波动^[17-18]。

RanBP1 是一种胞质 Ran 结合蛋白,在核运输中起着关键作用^[19]。目前 Ran 蛋白在植物研究较少,而植物 Ran 首先是从番茄中得到。现已从小麦、洋葱、大蒜、水稻、蚕豆、高羊茅、龙眼中成功分离出了 Ran 蛋白^[20]。本研究成功克隆出了光核桃 AmRanBP1 基因。

为研究 AmRanBP1 重组蛋白的表达特性和功能,本研究构建了原核表达载体,实现原核表达与纯化 AmRanBP1 蛋白,采用 IPTG 诱导和镍柱亲和层析纯化出重组蛋白 AmRanBP1 并制备多克隆抗体。本研究的难点在于重组蛋白无表达,在试验过程中,先是构建了 pQE-30 原核表达载体,转入相应 M15 表达菌株发现重组蛋白无表达。又构建了 pET-21a,转入 BL21 表达菌株发现重组蛋白无表达。后又将质粒转入 Rosetta-gami(DE3) pLysS 还是无表达。推测在蛋白前端可能存在信号肽或前导肽结构,信号肽为存在蛋白质 N 段的一种短肽,蛋白质需要对其进行切割,使之成为成熟肽^[21-22]。所以在 AmRanBP1 的 N 段去掉 25 个氨基酸,重新转入 Rosetta-gami(DE3) pLysS 表达菌株中,最终在 40 ℃, 2.00 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 4.0 h 发现重组蛋白含量最多。此外,RanBP1 被报道与植物抗逆有关,在拟南芥中,Ran-1 在受到 150 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 48 h 后,丰度明显上升^[23]。而在野生西瓜中发现两个 Ran 蛋白受干旱胁迫调控^[24]。NbRanBP1-1 在增强烟草对非生物和生物胁迫的耐受性过程中发挥着一定作用^[25]。拟南芥中,抑制 AtRanBP1c 的表达改变主根的生长和发育,以及这些根对生长素的超敏感性^[26]。单细胞真菌藻类 Ran 受强光影响表达量会有所下降^[27]。不同光源可通过光敏色素信号介导的通路亦可以调控拟南芥 Ran 蛋白的表达^[28]。在本研究中,模拟多种胁迫条件下对照菌株 pET-21a 和表达质粒 pET-21a-AmRanBP1 的转化菌株在大肠杆菌中的表达,发现 *AmRanBP1* 基因受多种胁迫诱导均有响应且表达上调,各种胁迫条件下转 *AmRanBP1* 的菌株抗逆性均优于空载体,并且在高温、NaCl 与 CuSO₄ 胁迫下优势显著,说明 AmRanBP1 可能提高了大肠杆菌对于多种非生物胁迫的抗性。其他学者 Ran 蛋白的研究也得出过类似结论,例如低温与水杨酸胁迫可显著影响三明野生蕉中 Ran 蛋白的表达^[29];在龙眼中发现异位表达龙眼 Ran 可提高植株抗寒能力^[30];草菇 *Ran* 基因在冷胁迫下表达量会上升^[31]。以上这些研究说明 Ran 蛋白在植物体内可能对温度较为敏感,可能在植物对温度胁迫响应中发挥作用。关于 AmRanBP1 蛋白在温度、盐碱、重金属等胁迫下的作用,还有待于课题组进一步利用转基因拟南芥进行验证。

4 结论

本研究以光核桃叶片 cDNA 作为模板成功扩增了 *AmRanBP1* 基因。对 AmRanBP1 蛋白进行生物信息学分析,发现 AmRanBP1 与碧桃和苹果等具有较高的同源性,没有明显的跨膜区,为酸性的非生物膜上的功能蛋白,且是无信号肽结构的非分泌性蛋白。成功构建重组载体 pET-21a-AmRanBP1,对重组蛋白诱导条件进行优化发现 AmRanBP1 在 40 ℃下加入 2.00 mmol·L⁻¹ IPTG 诱导 4.0 h 表达量最大,并发现重组蛋白在上清液中大量表达。为研究 *AmRanBP1* 在多种非生物胁迫下大肠杆菌中的表达情况,比较了 pET-21a 和 pET-21a-AmRanBP1 转化子在大肠杆菌中的生长情况,发现在高温、NaCl 与 CuSO₄ 胁迫下 pET-21a-AmRanBP1 转化子优势显著,说明 *AmRanBP1* 可能提高了大肠杆菌对于多种非生物胁迫的抗性。本研究初步表明 AmRanBP1 蛋白响应盐、高温和重金属胁迫,推测该基因有可能在光核桃逆境防御反应中发挥作用,为深入探究 AmRanBP1 的生物学功能提供了思路。

参考文献:

- [1] LI Y, ZHOU J, MIN S, et al. Distinct RanBP1 nuclear export and cargo dissociation mechanisms between fungi and animals [J]. *Elife*, 2019, 8: e41331.
- [2] BISCHOFF F R, PONSTINGL H. Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1 [J]. *Nature*, 1991, 354(6348): 80-82.
- [3] BISCHOFF F R, PONSTINGL H. Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(23): 10830-10834.
- [5] 张媛,李欣,刘春丽,等. Ran 结合蛋白 RanBP1 的生物学功能及研究进展[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2019, 50(5): 580-586.
- [6] HAYASHI N, YOKOYAMA N, SEKI T, et al. RanBP1, a Ras-like nuclear G protein binding to Ran/TC4, inhibits RCC1 via Ran/TC4 [J]. *Molecular and General Genetics*, 1995, 247: 661-669.
- [7] PEIPEI X, AIPING Z, HAIYING C, et al. The small G protein AtRAN1 regulates vegetative growth and stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS One*, 2016, 11: e0154787.
- [8] 马宁. 玉米冷响应基因 *ZmRanBP1* 的克隆及功能分析[D]. 吉林: 吉林大学, 2018.
- [9] 乾程,王亚,隋炯明,等. 甘薯 *Ran* 基因的克隆和表达分析[J]. *农学学报*, 2013, 3(3): 4-9.
- [10] PAUL A, KUMAR S. Responses to winter dormancy,

temperature, and plant hormones share gene networks[J]. Functional & Integrative Genomics, 2011, 11(4): 659-664.

[11] 阙金涛, 王敬阳, 刘传彝, 等. 磷酸活化光核桃核壳对 Cr(VI) 的吸附机理探究[J]. 水处理技术, 2022, 48(4): 80-84, 97.

[12] XU L P, HU Y B, JIN G Z, et al. Physiological and proteomic responses to drought in leaves of *Amygdalus mira* (Koehne) Yü et Lu[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 12: 620499.

[13] 董国正. 西藏光核桃的调查[J]. 中国林副特产, 1991(3): 44-45.

[14] 孙位军. 光核桃仁油的化学成分和促进毛发生长作用机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2018.

[15] 韩雪梅. 蚕豆种质资源淀粉含量分析及 *Waxy* 基因遗传多样性研究[D]. 青海: 青海大学, 2021.

[16] QIANDA C, BIHONG D, YANG Y, et al. ASFV pp62 protein has 9 dominant B-T cell combined epitopes[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2022, 14(4): 13-20.

[17] GANG N, SHUHUA Z, TING W, et al. CD147 supports paclitaxel resistance via interacting with RanBP1 [J]. Oncogene, 2022, 41(7): 983-996.

[18] AUDIA S, BRESCIA C, DATTILO V, et al. RANBP1 (RAN binding protein 1): the missing genetic piece in cancer pathophysiology and other complex diseases[J]. Cancers, 2023, 15: 486.

[19] LOUNSBURY K M, MACARA I G. Ran-binding protein 1 (RanBP1) forms a ternary complex with Ran and karyopherin beta and reduces Ran GTPase-activating protein (RanGAP) inhibition by karyopherin beta[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(1): 551-555.

[20] ACH R A, GRUISSEM W. A small nuclear GTP-binding protein from tomato suppresses a *Schizosaccharomyces pombe* cell-cycle mutant[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, 91(13): 5863-5867.

[21] von HEIJNE G. Signal sequences: the limits of variation [J]. Journal of Molecular Biology, 1985, 184(1): 99-105.

[22] PAETZEL M, DALBEY R E, STRYNADKA N C. The structure and mechanism of bacterial type I signal peptidases: a novel antibiotic target [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2000, 87(1): 27-49.

[23] JIANG Y Q, YANG B, HARRIS N S, et al. Comparative proteomic analysis of NaCl stress-responsive proteins in *Arabidopsis* roots[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(13): 3591-3607.

[24] YOSHIMURA K, MASUDA A, KUWANO M, et al. Programmed proteome response for drought avoidance/ tolerance in the root of a C(3) xerophyte (wild watermelon) under water deficits[J]. Plant & Cell Physiology, 2008, 49(2): 226-241.

[25] MIZUNO Y, OHTSU M, SHIBATA Y, et al. *Nicotiana benthamiana* RanBP1-1 is involved in the induction of disease resistance via regulation of nuclear-cytoplasmic transport of small GTPase Ran [J]. Frontiers in Plant Science, 2019, 10: 222.

[26] SOO-HWAN K, DAVID A, ALAN L, et al. Antisense expression of an *Arabidopsis* Ran binding protein renders transgenic roots hypersensitive to auxin and alters auxin-induced root growth and development by arresting mitotic progress[J]. The Plant Cell, 2001, 13(12): 2619-2630.

[27] MAHONG B, ROYTRAKUL S, PHAONAKLOP N, et al. Proteomic analysis of a model unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, during short-term exposure to irradiance stress reveals significant down regulation of several heat-shock proteins [J]. Planta, 2012, 235(3): 499-511.

[28] YEW L, MIN-HEE K, SEONG-KI K, et al. Phytochrome-mediated differential gene expression of plant Ran/TC4 small G-proteins[J]. Planta, 2008, 228(1): 215-224.

[29] 张雅玲, 方智振, 赖钟雄. 三明野生蕉 Ran 基因克隆及其组织特异性与低温胁迫表达分析[J]. 果树学报, 2015, 32(1): 26-36.

[30] 田奇琳. 龙眼胚性培养物 *DiRan3A* 和 *DiRan3B* 基因的功能分析[D]. 福建: 福建农林大学, 2017.

[31] YAN J J, XIE B, ZHANG L, et al. Small GTPases and stress responses of *vvrn1* in the straw mushroom *volvariella volvacea* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17(9): 1527.

A Preliminary Study on the Expression Characteristics and Stress Resistance of AmRanBP1 Recombinant Protein in *Amygdalus mira*

BI Xueqi^{1,2}, LIU Lulu^{1,2}, REN Ziqi^{1,2}, MA Junjie², DI Juntong², LUO Qiuxiang^{1,2}

(1. Key Laboratory of Saline-alkali Vegetation Ecology Restoration, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 2. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)



孙小川,丁竞,王纪忠,等.外源硒对萝卜芽苗菜生长特性及营养品质的影响[J].黑龙江农业科学,2023(8):66-71.

外源硒对萝卜芽苗菜生长特性及营养品质的影响

孙小川¹,丁 竞²,王纪忠¹,周晓玉¹,徐 坤¹,王 娟¹

(1. 淮阴工学院 生命科学与食品工程学院,江苏 淮安 223003; 2. 江苏省淮安市淮安区农业技术推广中心,江苏 淮安 223003)

摘要:为提高萝卜芽苗菜产量和品质,开发富硒萝卜与芽苗菜,以‘四季青’萝卜为试材,设置 6 个亚硒酸钠处理浓度(0,2,4,6,8 和 10 mg·L⁻¹),研究外源硒浸种处理对萝卜种子萌发、芽苗菜的生长指标、生理指标和营养品质的影响。结果表明,适宜浓度的亚硒酸钠浸种处理能够有效促进萝卜种子萌发,提高芽苗菜的生长及营养品质。与对照相比,6 mg·L⁻¹亚硒酸钠浸种处理能有效促进萝卜种子萌发和芽苗菜生长,其发芽率、发芽率、鲜重和干重分别提高了 7.22%、5.75%、43.43%和 46.03%;提升了萝卜芽苗菜的抗氧化能力,SOD、POD 和 CAT 等抗氧化酶活性显著提高,膜脂过氧化产物 MDA 含量得到抑制;同时,显著改善了芽苗菜的营养品质,其中硝态氮含量降低了 23.30%,可溶性糖和可溶性蛋白含量分别提高了 131.25%和 80.92%。此外,萝卜芽苗菜中总硒含量随硒处理浓度升高而增加,在 10 mg·L⁻¹时最高。综上所述,本试验条件下,最适宜萝卜种子萌发和芽苗菜生长的亚硒酸钠浸种处理浓度是 6 mg·L⁻¹。

关键词:萝卜;芽苗菜;硒处理;萌发;生长指标;营养品质

硒(Se)是环境中重要的生命元素,也是人体必需的营养元素之一,在人体内能够发挥诸多效用。相关研究表明,人体缺硒可引起某些重要器官的功能失调,导致许多严重疾病的发生,如大骨节病和克山病可能与缺硒密切相关^[1-2]。我国是严重缺硒的国家之一,从东三省起斜穿至云贵高原,

占国土面积 72%的地区缺硒,其中 30%为严重缺硒地区,因而导致当地农作物硒含量较低,达不到人体的摄入需求^[3]。植物作为人类摄入硒元素的重要来源,补充硒营养的重要途径之一就是提高农产品硒含量。目前通过在作物生产中人工施用硒肥,可以增加作物产量,提高营养品质和硒含量,已在马铃薯^[4]、芒果^[5]、大豆^[6-8]、生菜^[9]、枣^[10]、蔬菜^[11]、水稻^[12]等作物上取得了一定成效。然而,硒对植物生长发育的影响也存在剂量效应,即适量的硒能够促进植物生长发育,提高作物产量与品质,但过量的硒则会对植物产生毒害作用,进而抑制植物生长^[13-14]。

收稿日期:2023-04-11

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(32102399);江苏省自然科学基金青年基金项目(BK20181062);淮阴工学院博士科研启动基金(Z301B16556)。

第一作者:孙小川(1987—),男,博士,讲师,从事蔬菜作物遗传育种与分子生物学研究。E-mail: xchsun1987@163.com。

Abstract: *Amygdalus mira* (Koehne) is a deciduous tree of Rosaceae, which has excellent characteristics such as cold resistance and drought resistance. In order to explore the expression conditions of RanBP1 protein in *A. mira* Koehne and analyze its regulatory role in stress defense response, AmRanBP1 was obtained by homologous cloning using the gene sequence of *Prunus persica* in the database. The results showed the ORF of this gene was 696 bp in length, encoding 231 amino acids. Bioinformatics analysis results indicated it has no transmembrane region, stable hydrophilic, and no signal peptide structure. Protein sequence and phylogenetic analysis showed that AmRanBP1 had high homology with RanBP1 proteins of other plants, such as *Malus domestica*, *Glycine max*. The pET-21a-AmRanBP1 fusion expression vector was constructed, and the protein expression conditions were optimized. The recombinant protein with higher concentration was obtained at 40 °C, IPTG concentration of 2.00 mmol·L⁻¹ and induction time of 4.0 h. Monoclonal antibody was prepared after purification of AmRanBP1 fusion protein. Finally, the expression pattern of AmRanBP1-transformed strains in *E. coli* was investigated by simulating various abiotic stress conditions. The results showed that the stress resistance of AmRanBP1-transformed strains was better than that of empty vector under various stress conditions, and the advantages were significant under high temperature, NaCl and CuSO₄ stress, further indicating that RanBP1 may play a role in the defense response of *A. mira* Koehne. This study laid a foundation for revealing the biological role of AmRanBP1 protein.

Keywords: *Amygdalus mira* (Koehne); Ran binding protein 1; abiotic stress