



张军,史同瑞,邱爽,等.两个大豆肌醇半乳糖苷合成酶基因的原核诱导表达[J].黑龙江农业科学,2020(8):13-17.

两个大豆肌醇半乳糖苷合成酶基因的原核诱导表达

张 军¹,史同瑞¹,邱 爽²,何佳琦²,李铭杨²,翟 莹²

(1.黑龙江省农业科学院 畜牧兽医分院,黑龙江 齐齐哈尔 161005;2.齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:肌醇半乳糖苷合成酶(GolS)是棉子糖系列寡糖(RFOs)生物合成途径中的关键酶,在植物应对非生物胁迫过程中发挥重要作用。本研究通过 RT-PCR 从大豆叶片 cDNA 中扩增获得编码 GolS 的 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 基因。添加酶切位点 *EcoR* I 和 *Sal* I,将 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 分别连入原核表达载体 pET28 中,转化大肠杆菌 Rosetta(DE3),进行 IPTG 诱导表达。SDS-PAGE 电泳分析诱导浓度和诱导时间对蛋白表达的影响。结果表明:在诱导时间为 3 h,IPTG 浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 时,可获得大量 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 的重组蛋白,分子量均大约为 40 kD。

关键词:大豆;肌醇半乳糖苷合成酶;原核表达;载体构建

植物在受到逆境胁迫(如干旱、盐碱和极端温度等)时,体内的渗透压会发生变化导致植株失水,此时植物体内的抗逆机制诱导合成某些渗透调节物质来抵抗外界胁迫^[1]。棉子糖系列寡糖(Raffinose family oligosaccharides, RFOs)就是上述调节物质中的一种,其包括棉子糖、水苏糖及毛蕊花糖。研究表明,在正常情况下,植物体内 RFOs 含量很少,但当逆境胁迫来临时,其体内 RFOs 含量会迅速上升^[2]。肌醇半乳糖苷合成

酶(Galactinol synthase, GolS)是 RFOs 生物合成途径中的关键酶^[3]。它通过催化 UDP 半乳糖和肌醇反应生成肌醇半乳糖苷,而多种寡糖合成酶利用肌醇半乳糖苷中的半乳糖基催化产生多种寡糖,从而提高植物细胞的渗透压,增强植物的抗逆能力。因此 GolS 在植物应对非生物胁迫过程中发挥着十分重要的作用。拟南芥中含有 7 种 *GolS* 基因,其中 *AtGolS1* 和 *AtGolS2* 可以被干旱和高盐胁迫诱导上调表达,*AtGolS3* 可以被低温胁迫诱导上调表达^[4]。小麦 *TaGolS3* 的表达受外源 ABA、低温和盐胁迫的诱导,同时还能被 ZnCl₂ 和 CuCl₂ 所诱导,通过对活性氧的调控,转基因植株表现出对锌胁迫的耐受性^[5]。转小桐子 *JcGS3* 的重组酵母菌与对照相比抗低温能力显著提高^[6];转拟南芥 *AtGolS2* 的二穗短柄草获得了比对照组更高的耐旱性^[7]。

收稿日期:2019-11-30

基金项目:中央引导地方科技发展专项(ZY18C07-12);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(UNPYSCT-2017153);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(植物性食品加工技术特色学科专项)(YSTSXK201878)。

第一作者:张军(1982-),男,硕士,助理研究员,从事大豆分子育种研究。E-mail:haifeng1982518@163.com。

通信作者:翟莹(1982-),女,博士,副教授,从事大豆分子育种研究。E-mail:fairy39809079@126.com。

Comparison Experimental of Different Rice Varieties in Longzhen Farm in 2019

SHANG Quan-yu

(Heihe Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, China)

Abstract: In order to promote the development of rice production in Heihe area, the comparison experiment research was performed on different varieties of rice in Rice Science and Technology Park of Longzhen Farm. The yield, growth period and its component factors were analyzed. The results showed that Yunongjing No. 2, Heida 1951, Suijing 312, Heijing 1808, Longjing 1734, Longjing 1851, Longqingdao 16, Zhongke 651, Jianyuan 181, Hongfengdao No. 8, Kundao 97, Huayan No. 1 and Hongyuan 136 were suitable the local planting.

Keywords: 2019; Longzhen Farm; rice varieties; comparative experiment

大豆(*Glycine max* L.)是世界范围内广泛种植的经济作物之一,在农业生产中有着重要地位。大豆中 *GolS* 基因的克隆、抗体制备和酶活检测等对于大豆棉籽糖代谢途径的研究,尤其是对 *GolS* 特性的研究具有重要意义。但到目前为止,有关大豆中 *GolS* 的研究非常少见。本研究将大豆中两个编码 *GolS* 的基因 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 构建原核表达载体,在大肠杆菌中诱导表达,并对诱导条件进行优化,为基因功能的进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆品种北豆 9 号由齐齐哈尔大学植物分子育种研究室提供。

1.1.2 菌种与质粒 大肠杆菌 DH5 α 菌株、Rossetta 菌株、原核表达载体 pET28 均由齐齐哈尔大学植物分子育种研究室提供。

1.1.3 工具酶和主要试剂 克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Sal* I、DNA 连接试剂盒、DNA Marker、ExTaq、RNAiso Plus 等均购自 TaKaRa 公司;低分子量蛋白 Marker、cDNA 反转录试剂盒均购自 Novoprotein 公司;质粒提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒均购自 TIAN-GEN 公司。其余常规试剂为国产或进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大豆叶片总 RNA 的提取及 cDNA 反转录 按照说明书,使用 RNAiso Plus 提取 0.1 g 大豆叶片总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳和 OD_{260/280} 值检测提取的 RNA 质量。使用 cDNA 反转录试剂盒合成第一链 cDNA。

1.2.2 基因的克隆 在 NCBI 数据库中搜索获得 *GmGolS2-1* 与和 *GmGolS2-3* 的基因序列,根据 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 的基因编码序列设计引物。*GmGolS2-1* 上游引物:5'-GGAATTCAT-GCCACCTAACATCACCAC -3',*GmGolS2-1* 下游引物:5'-TGCGGTCTGACTTAGGCAGCAGAAGGT-GCT-3'(下划线部分分别代表 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶

切位点);*GmGolS2-3* 上游引物:5'-GGAATTCAT-GGCACCTAACATCACCAC -3',*GmGolS2-3* 下游引物:5'-TGCGGTCTGACTTAGGCAGCAGAAGGT-GCT-3'(下划线部分分别代表 *EcoR* I 和 *Sal* I 酶切位点)。以合成的第一链 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增(退火温度均为 56 ℃)。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳,回收目的基因片段并连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,经质粒双酶切鉴定,挑取阳性克隆送生工公司进行测序。

1.2.3 原核表达载体构建 使用 *EcoR* I 及 *Sal* I 双酶切上述测序鉴定完毕的重组质粒并切胶回收,将回收片段分别与 pET28 载体连接,转化大肠杆菌 Rosetta 感受态细胞,经菌落 PCR 和质粒双酶切鉴定,挑取阳性克隆保存菌种备用。

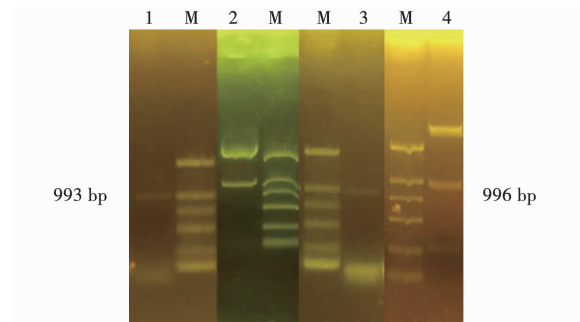
1.2.4 重组蛋白的诱导表达 挑取 pET28-*GmGolS2-1* 和 pET28-*GmGolS2-3* 阳性克隆以及 pET28 空载体克隆至添加 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素和 15 mg·L⁻¹ 氯霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃ 震荡培养过夜。按 1:100 的比例分别转接至 20 mL LB 液体培养基中,37 ℃ 继续震荡培养至 OD₆₀₀ 处于 0.4~0.6 时,加入终浓度 0.1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG,分别诱导培养 0,1,2,3,4,5 和 6 h 后,取样进行 SDS-PAGE 电泳,确定最佳诱导时间。再按同样方法,分别加入终浓度为 0,0.1,0.2 和 0.3 mmol·L⁻¹ 的 IPTG 进行诱导培养,确定最佳 IPTG 诱导浓度。

2 结果与分析

2.1 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 的克隆

在 NCBI 数据库中搜索得到编码大豆肌醇半乳糖苷酶的基因 *GmGolS2-1* 与和 *GmGolS2-3*, Genebank 登陆号分别为 XM003554563 和 XM003521610。以大豆叶片 cDNA 为模板,经 PCR 扩增分别得到 993 bp 的 *GmGolS2-1* 基因全序列和 996 bp 的 *GmGolS2-3* 基因全序列,条带大小符合预期(图 1),经测序与原序列一致。基因编码蛋白预测显示,*GmGolS2-1* 编码的蛋白质

含有 330 个氨基酸,分子量为 38.05 kD,*GmGolS2-3* 编码的蛋白质含有 331 个氨基酸,分子量为 38.1 kD。



M:DL 2000 Marker;1:*GmGolS2-1*PCR 产物;2:pMD18-T-*GmGolS2-1* 质粒双酶切;3: *GmGolS2-3* PCR 产物;4:pMD18-T-*GmGolS2-3* 质粒双酶切
M: DL 2000 Marker; 1: PCR products of *GmGolS2-1*; 2:Plasmid double digestion of pMD18-T-*GmGolS2-1*; 3:PCR products of *GmGolS2-3*;4:Plasmid double digestion of pMD18-T-*GmGolS2-3*

图1 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3*PCR 扩增和质粒双酶切
Fig.1 PCR amplification and plasmid double digestion of *GmGolS2-1* and *GmGolS2-3*

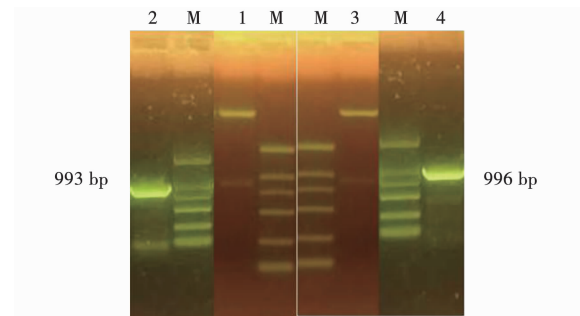
2.2 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 原核表达载体的构建

通过酶切位点 *EcoR* I和 *Sal* I将 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 构建至原核表达载体 pET28 上。质粒双酶切和菌液 PCR 结果如图 2 所示, *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 已成功连接至 pET28 并获得了含有重组质粒的 Rosetta(DE3)菌株。

2.3 蛋白的诱导表达

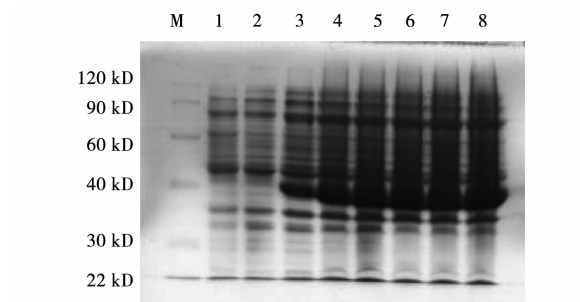
为了获得 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 的原核表达蛋白,对 IPTG 的浓度和诱导时间进行了优化。图 3 是 *GmGolS2-1* 的 IPTG 不同诱导时间结果,3-8 号泳道与对照(孔道 1 为空载体、孔道 2 为未诱导菌体)相比,在大概 40 kD 处有目的蛋白的表达。图 4 是 *GmGolS2-3* 的 IPTG 不同诱导时间结果,3-8 号泳道与对照(孔道 1 为空载体、孔道 2 为未诱导菌体)相比,在大概 40 kD 处有目的蛋白的表达。*GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 蛋白分子量大小分别为 38.05 和 38.1 kD,加上组氨酸标签之后的融合蛋白大小均约为 40 kD,因此

表达的蛋白大小均与预期结果相符,且在对照中均无此蛋白的表达。表明 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 基因已经在大肠杆菌中成功表达。如图 3 和图 4 所示,在 IPTG 诱导 1 h 时均已出现重组蛋白,随着诱导时间的延长,重组蛋白的表达量随之增加,到 3 h 时 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 的表达量均达到最大值,之后差别不大。所以后续试验 IPTG 的诱导时间均设为 3 h。



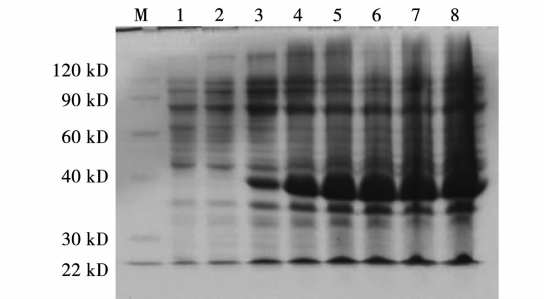
M:DL 2000 Marker;1:pET28- *GmGolS2-1* 质粒双酶切;2:pET28- *GmGolS2-1* 阳性克隆 Rosetta 菌液 PCR;3:pET28-*GmGolS2-3* 质粒双酶切;4:pET28-*GmGolS2-3* 阳性克隆 Rosetta 菌液 PCR
M:DL 2000 Marker;1: Plasmid double digestion of pET28-*GmGolS2-1*;2:PCR of Rosetta containing pET28-*GmGolS2-1*; 3:Plasmid double digestion of pET28-*GmGolS2-3*;4:PCR of Rosetta containing pET28-*GmGolS2-3*

图2 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 原核表达载体构建
Fig.2 Construction of prokaryotic expression vectors of *GmGolS2-1* and *GmGolS2-3*



M:蛋白 Marker;1:pET28 空载体对照;2:未诱导菌体;3-8:IPTG诱导 1,2,3,4,5 和 6 h 的表达产物
M:Protein marker;1:pET28 control;2:Engineered strain without IPTG; 3-8:1,2,3,4,5 and 6 h expression products with IPTG

图3 *GmGolS2-1* 原核表达诱导时间优化
Fig.3 Optimization of induction time of *GmGolS2-1* prokaryotic expression



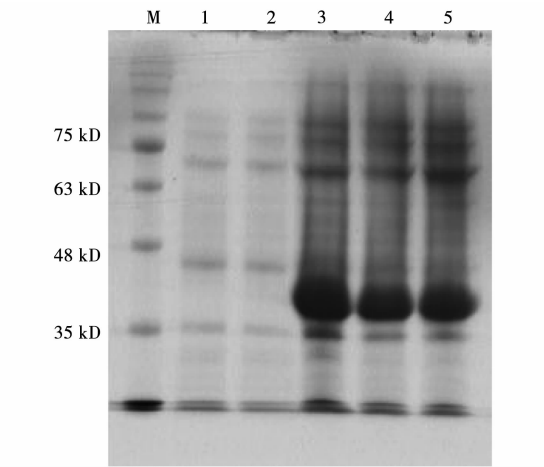
M:蛋白 Marker; 1: pET28 空载体对照; 2: 未诱导菌体; 3-8: IPTG诱导 1,2,3,4,5 和 6 h 表达产物

M:Protein Marker; 2: pET28control; 3: Engineered strain without IPTG; 4: 1,2,3,4,5 and 6 h expression products with IPTG

图 4 *GmGolS2-3* 原核表达诱导时间优化

Fig. 4 Optimization of induction time of *GmGolS2-3* prokaryotic expression

图 5 和图 6 分别为 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 的 IPTG 不同诱导浓度结果。如图所示,不同浓度的 IPTG 对两个蛋白的诱导表达量影响均不明显,在 IPTG 浓度为 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均已达到最大表达量,故 IPTG 诱导浓度选择 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 即可。

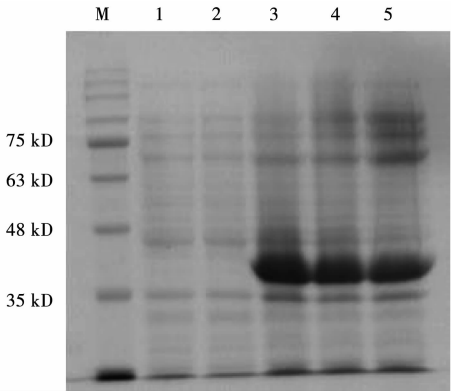


M:蛋白 Marker; 1: pET28 空载体对照; 2: 未诱导菌体; 3-5: $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达产物

M:Protein marker; 2: pET28 control; 3: Engineered strain without IPTG; 3-5: Expression products with 0.1 、 0.2 and $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG

图 5 *GmGolS2-1* 原核表达 IPTG 诱导浓度优化

Fig. 5 Optimization of IPTG induction concentration of *GmGolS2-1* prokaryotic expression



M:蛋白 Marker; 1: pET28 空载体对照; 2: 未诱导菌体; 3-5: 0.1 、 0.2 和 $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达产物

M:Protein marker; 2: pET28 control; 3: Engineered strain without IPTG; 3-5: Expression products with 0.1 、 0.2 and $0.3\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ IPTG

图 6 *GmGolS2-3* 原核表达 IPTG 诱导浓度优化

Fig. 6 Optimization of IPTG induction concentration of *GmGolS2-3* prokaryotic expression

3 结论与讨论

GolS 在植物的抗逆反应、光合产物转运和种子发育中发挥重要作用^[8]。进一步研究 *GolS* 基因的表达与 *GolS* 酶活性、RFOs 的积累以及植物抗逆性的关系,能够为植物抗逆新品种的培育提供更全面的理论基础。

大肠杆菌表达系统作为一种表达量较高、成本较低且操作简单的系统,目前已被广泛应用于原核表达过程中。融合蛋白在该系统中的表达结果可受多种因素影响,如诱导温度、诱导剂的浓度、诱导时间等^[9-10]。本试验将两个大豆肌醇半乳糖苷合成酶基因 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 构建原核表达载体,转入大肠杆菌 Rosetta 菌株中,使用 IPTG 诱导融合蛋白的表达并对诱导条件进行了优化处理,优化条件为 IPTG 浓度及诱导时间。*GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 均在大肠杆菌中成功表达,两个融合蛋白的分子量均大约为 40 kD 。其中, IPTG 诱导时间对融合蛋白表达的影响较为明显,但诱导浓度对融合蛋白的表达量影响不大,这与前人的某些试验结果相似^[11-12]。本试验为进一步研究 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3*

蛋白的作用和理化性质奠定基础。

本研究通过 RT-PCR 从大豆叶片 cDNA 中扩增获得编码的肌醇半乳糖苷合成酶基因 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3*, 通过酶切位点 *EcoR* I 和 *Sal* I 连入原核表达载体载体 pET28 中, 转化大肠杆菌 Rosetta(DE3) 表达, IPTG 诱导时间为 3 h, IPTG 浓度为 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 可获得大量 *GmGolS2-1* 和 *GmGolS2-3* 的重组蛋白, 分子量约为 40 kD。

参考文献:

- [1] 马仲炼, 周航飞, 冉春艳, 等. 甜菜碱和水杨酸对干旱胁迫下辣椒开花结果期生理特性的影响[J]. 三峡生态环境监测, 2019, 4(2): 57-63.
- [2] 林世锋, 王仁刚, 任学良, 等. 烟草肌醇半乳糖苷合成酶基因 *NtGolS1* 的克隆及序列分析[J]. 东北农业大学学报, 2012, 43(7): 113-118.
- [3] Elsayed A I, Rafudeen M S, Golldack D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress [J]. Plant Biology, 2014, 16(1): 1-8.
- [4] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2002, 29(4): 417-426.

- [5] Wang Y, Liu H, Wang S, et al. Overexpression of a common wheat gene GALACTINOL SYNTHASE3 enhances tolerance to zinc in Arabidopsis and rice through the modulation of reactive oxygen species production [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2016, 34(4): 794-806.
- [6] 王海波, 邹竹荣, 龚明. 小桐子肌醇半乳糖苷合成酶 3 的基因克隆及其生物信息学分析和功能初步验证[J]. 生物技术通报, 2015, 31(7): 91-100.
- [7] Yasuyo H, Kanako I, Fumie M, et al. Arabidopsis galactinol synthase *AtGolS2* improves drought tolerance in the monocot model *Brachypodium distachyon* [J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(13): 1127-1131.
- [8] Zhou T, Zhang R, Guo S D. Molecular cloning and characterization of *GhGolS1*, a novel gene encoding galactinol synthase from cotton (*Gossypium hirsutum*) [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30(3): 699-709.
- [9] 王宁, 陈静, 高飞, 等. 盐芥 *TsGPX3* 基因的克隆、亚细胞定位与原核表达[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 110-115.
- [10] 李秀娟. 盐藻 *DsRab* 基因的载体构建、原核表达及亚细胞定位分析[D]. 大连: 大连海洋大学, 2014.
- [11] 杨泽伟, 王龙海, 朱莉, 等. 高粱 *SbGABA-Ts* 基因的克隆、原核表达及纯化[J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 93-99.
- [12] 廖小森, 何其光, 刘耀, 等. 橡胶树炭疽菌 *CsPbs2* 基因的原核表达分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(7): 2126-2132.

Prokaryotic Induced Expression of Two Galactinol Synthase Gene of Soybean

ZHANG Jun¹, SHI Tong-rui¹, QIU Shuang², HE Jia-qi², LI Ming-yang², ZHAI Ying²

(1. Branch of Animal Husbandry and Veterinary, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161005, China; 2. College of Life Science and Agro-Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, China)

Abstract: Galactinol synthase (GolS) is a key enzyme in the biosynthesis pathway of raffinose oligosaccharides (RFOs), which plays an important role in plant response to abiotic stress. In this study, *GmGolS2-1* and *GmGolS2-3* encoding GolS were amplified from cDNA of soybean leaves by RT-PCR. The *GmGolS2-1* and *GmGolS2-3* were subcloned into prokaryotic expression vector pET28, respectively, using restricted enzymes *EcoR* I and *Sal* I, and the obtained recombinant vectors were transformed into Rosetta (DE3) to get the recombinant protein by IPTG induction. SDS-PAGE electrophoresis was used to analyze the effects of induction concentration and induction time on protein expression. The results showed that two recombinant proteins were expressed when the induction time and concentration of IPTG were 3 h and $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, whose molecular weights were both about 40 kD.

Keywords: soybean; galactinol synthase; prokaryotic expression; vector construction