

小麦 *TaMAPK2* 激酶基因 的原核表达及多克隆抗体制备

刘 沛^{1,2}, 徐兆师², 晏月明¹, 李连城², 陈 明², 马有志²

(¹首都师范大学生命科学院, 北京 100048; ²中国农业科学院作物科学研究所 国家农作物基
因资源和基因改良国家重大科学工程 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081)

摘要: MAPK 蛋白激酶是一类重要的植物胁迫信号调控因子。为了研究小麦 MAPK 基因的功能, 本试验克隆了小麦 MAPK 蛋白激酶基因 *TaMAPK2*。为了制备 *TaMAPK2* 基因的多克隆抗体, *TaMAPK2* 的非保守区段的 DNA 序列 *antiTaMAPK2* 被构建到原核表达载体 pET-28a- (+) 上, 表达融合蛋白 His-antiMAPK2。在终浓度为 1 mmol/L IPTG 诱导 1h 的条件下, 融合蛋白 His-antiMAPK2 表达量达到最大。通过蛋白标记亲和层析柱 (HisTrapTM HP) 得到纯化的 His-antiMAPK2 融合蛋白。利用新西兰大白兔制备了 *TaMAPK2* 基因的多克隆抗体, ELISA 竞争抑制法检测抗体效价检测, 效价为 1:80000 能满足后续试验要求的效价值, 为进一步分析 *TaMAPK2* 的蛋白定位、表达等提供基础。

关键词: 小麦; MAPK 蛋白激酶; 原核表达; 蛋白纯化; 多克隆抗体

Prokaryotic Expression and Polyclonal Antibody Preparation of the Wheat *TaMAPK2* Gene

LIU Pei^{1,2}, XU Zhao-shi², YAN Yue-ming¹, LI Lian-cheng², CHEN Ming², MA You-zhi²

(¹College of Life and Health Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048; ²National Key Facility for Crop Gene Resources
and Genetic Improvement Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture/Institute of
Crop Sciences, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081)

Abstract MAPKs are important in stress signal transduction process of plant. In order to investigate the function of wheat MAPKs, a MAPK gene named *TaMAPK2*, was isolated from wheat. To obtain the polyclonal antibody of *TaMAPK2*, the non-conservation fraction of *TaMAPK2* gene was constructed into prokaryotic expression vector pET-28a(+). Under the condition of 1 mmol/L of IPTG, the expression of the fusion protein His-antiMAPK2 was up to the peak. The fusion protein His-antiMAPK2 was purified by HisTrapTM HP and used to prepare antibody. The titer of the rabbit's antiserum was measured by ELISA method. The rabbit's antiserum with high titer (> 80000) was obtained. The polyclonal antibodies can be used for further investigation, which establish the foundation for investigating the function of the *MAPK2* gene in protein level.

Keywords Wheat MAPKs; Prokaryotic expression; Protein purification; Polyclonal antibodies

在逆境条件下, 植物可以感受外界胁迫信号并通过激活一系列的代谢反应, 产生生理以及形态的变化来适应不利的环境因素^[1]。MAPK 级联系统是目

前了解比较清楚的细胞内信号调节途径。在真核生物中, MAPK 级联系统高度保守^[2-3]。MAPK 在细胞凋亡、转录调控、细胞骨架形成以及细胞生长中发挥重要功能^[4-5]。

Fatma 等^[6]研究表明, 植物 MAPK 在乙烯信号传

收稿日期: 2010-05-27 修回日期: 2010-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30700504); 转基因生物新品种培育重大专项 (2009ZX08009-083B 和 2009ZX08002-008B)

作者简介: 刘沛, 硕士, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。Email: lp0341@gmail.com

通讯作者: 徐兆师, 副研究员, 博士, 主要从事植物抗逆分子生物学研究。Email: xuzhaoshi@yahoo.com.cn

导途径中起重要的调节作用。苜蓿和拟南芥中不同的 MAPK 蛋白激酶受到乙烯前体 ACC 的诱导表达。在苜蓿中, 由 ACC 激活的 MAPKs 被称为 *SMK* 和 *MMK3*, 在拟南芥中为 *MPK6*。过表达 *SMKK* 的转基因拟南芥株系保持 *MPK6* 的高活性以及乙烯诱导的基因表达。*SMKK* 的过表达株系在缺少 ACC 的条件下表现出乙烯的三重反应 (即乙烯对植物的生长具有抑制茎的伸长生长、促进茎或根的增粗和使茎横向生长)。而在 *etr1*、*ein2* 和 *ein3* 突变株系中 *MPK6* 则不被激活。Seo 等^[7] 证明烟草 MAPK 蛋白激酶参与了损伤信号转导过程。将编码 MAPK 蛋白基因的反向 DNA 转入烟草, 使其内源同源基因反式失活, 结果伤诱导的茉莉酸以及伤诱导基因的转录都被抑制; 相反, 水杨酸以及病原体诱导的基因被上调。以上研究表明, MAPK 蛋白激酶位于植物损伤响应信号途径的起始位置。

小麦是我国重要的粮食作物, 如何提高小麦对不利环境的适应能力, 提高小麦的产量是一个重要的研究领域。本实验室从小白麦中克隆得到一个 *TaMAPK2* 基因。为了进一步研究 *TaMAPK2* 基因的功能, 将 *TaMAPK2* 基因的一个特异片段 *antMAPK2* 克隆到 pET-28-a(+) 表达载体上, 表达 His-antMAPK2 融合蛋白, 并且获得 TaMAPK2 抗体, 为进一步在蛋白水平上研究 *TaMAPK2* 基因功能提供基础。

1 材料与方法

1.1 *TaMAPK2* 基因特异片段 *antMAPK2* 的扩增

根据 *TaMAPK2* 基因的 cDNA 序列 (序列号: ABC54585), 在两条引物上引入 *Bam*HI、*Xho*I 酶切位点, N 端引物为 TaMAPK2F: 5'-CATGGATCCTTTGAGAGACGAAGAAT-3', C 端引物为 TaMAPK2R: 5'-ACTCTCGAGTACCAGGTGTTGAACAAT-3', 高保真酶 primer star (TaKaRa) PCR 扩增 *TaMAPK2* 基因 ORF 非保守区段的一个特异片段 *antMAPK2*, 大小为 462 bp。将 *antMAPK2* 片段插入到中间载体 pEASY-BLunt 测序, 然后使用 *Bam*HI 和 *Xho*I 酶切, 得到酶切后的 *antMAPK2* 片段。

1.2 构建 pET: *antMAPK2* 原核表达载体

回收 *antMAPK2* 目的片段, 纯化, 连接到原核表达载体 pET-28-a(+) 上, 热激转入 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞, 通过 PCR、酶切筛选阳性克隆, 并对阳性克隆进行测序验证。

1.3 IPTG 不同诱导时间对融合蛋白表达量的影响

37℃ 预培养过夜, 将含有 pET: *antMAPK2* 重

组质粒的菌液按 1:50 的比例转接到 5 ml LB (含 100 mg/L 的 Amp) 液体培养基中, 37℃ 培养至 OD₆₀₀ 值至 0.5 左右, 加入 IPTG (终浓度为 1 mmol/L) 诱导, 37℃ 分别诱导 1、2、4 h 后收集菌液; 阴性对照不加 IPTG, 1 h 后收集菌液 (8000 rpm 离心 10 min)。菌液样品加入 20 μl ddH₂O, 90℃ 加热 5 min, 取 10 μl 进行 SDS-PAGE 电泳, 分析蛋白诱导表达结果, 选取 IPTG 的最佳诱导时间。

1.4 融合蛋白 His-antMAPK2 的纯化

37℃ 过夜培养菌液至 OD₆₀₀ 值达到 0.6 加入 IPTG, 诱导 1 h 后收集菌体。用 5 ml 1 × PBS 悬浮, 按 100:1 加入菌液裂解酶, 用 10 μl 1 m LDNase 消化残留 DNA, 室温放置 15 min, 用冰融法反复冻融 10 次, 12000 rpm 离心 10 min, 吸取上清液。His-antMAPK2 融合蛋白在上清液中。

将收集的含有 antMAPK2 蛋白的上清液用亲和层析柱 (HisTrapTM HP) (GE Healthcare) 的方法纯化。测定蛋白浓度, -80℃ 冰箱保存。

1.5 TaMAPK2 多克隆抗体的制备

对一只 2.5 kg 左右的新西兰大白兔进行皮下多点注射, 按照每 kg 体重 1 mg 进行免疫。初次免疫时, 将抗原与等量的弗氏完全佐剂混合乳化, 后续免疫时将抗原与等量的弗氏不完全佐剂混合乳化免疫。免疫间隔为 2 周。第 3 次免疫后第 10 天耳缘静脉采血, 后续也按照免疫后 10 d 采血。

采用棋盘滴定法进行效价测定。将免疫原用 PBS 溶液稀释至一定浓度以 100 μl 每孔包被 96 孔酶标板, 37℃ 包被 2 h 甩干, 洗板, 37℃ 封闭 1 h, 洗板, 甩干备用。将抗体以 PBS 梯度稀释后, 以 50 μl 每孔加入包被好的酶标板孔, 37℃ 反应 30 min 后, 取出洗板。加入 3000 倍稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗, 37℃ 反应 15 min 取出洗板, 加入显色液, 显色反应 15 min 以 2 mol/L 硫酸中止反应。以酶标仪测定 450 nm 处吸光度值。

2 结果与分析

2.1 *antMAPK2* 片段的获得

利用设计的特异性引物, PCR 扩增 *TaMAPK2* 基因片段 *antMAPK2* (图 1), 并克隆到 pEASY-BLunt 载体上、测序。使用 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切中间载体 pEASY: *antMAPK2*, 得到目的片段 *antMAPK2*, 大小为 462 bp 编码 154 个氨基酸。

2.2 融合表达载体的构建

将 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切后的 *antMAPK2* 片段

连接到 pET-28-a(+), 构建融合表达载体 pET : *anti-MAPK2*(图 2)。酶切验证构建好的原核表达载体, 如图 3所示, 酶切获得的片段与目的片段大小一致。

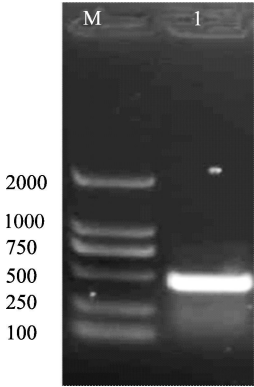


图 1 基因片段 *antiMAPK2* 的扩增

Fig 1 The amplification of *antiMAPK2*

M: DL2000 marker 1: *antiMAPK2* 片段

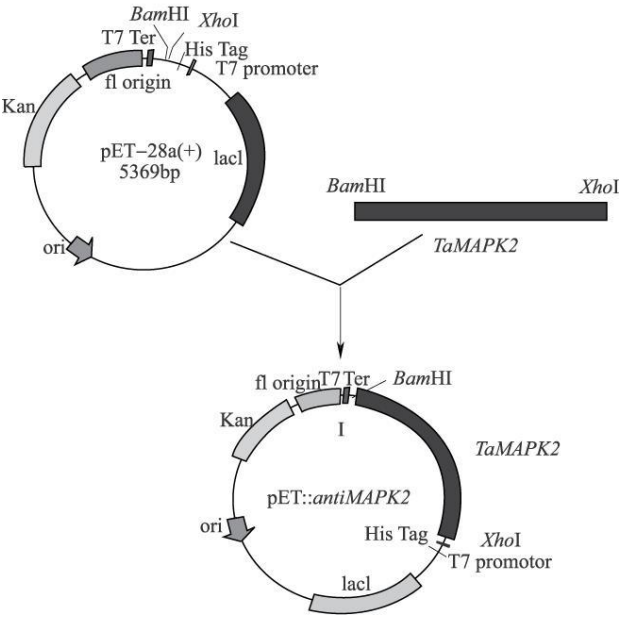


图 2 融合蛋白原核表达载体 pET : *antiMAPK2* 构建过程示意图

Fig 2 Sketch map of construction of fusion protein expression vector pET : *antiMAPK*

2.3 IPTG 不同诱导时间对融合表达的影响

为了确定融合蛋白 His-*antiMAPK2*最佳表达时间, 终浓度 1mmol 的 IPTG 分别诱导 1、2、4h。图 4 所示, 融合蛋白 His-*antiMAPK2*(大小约为 16.9kD) 在 1、2、4h 都能被诱导, 但在 1h 以后没有诱导量的增加。因此, 后续诱导蛋白实验的诱导时间采用 1h。

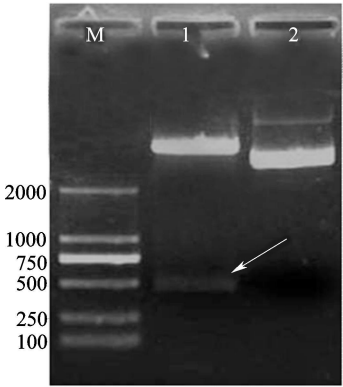


图 3 *Bam*HI 和 *Xho*I 双酶切重组载体 pET : *antiMAPK2*

Fig 3 Double restriction digestion analysis of recombination vector pET : *antiMAPK2*

M: DL2000 marker 1: 重组载体 pET : *antiMAPK2* 双酶切; 2 未切重组载体 pET : *antiMAPK2* 对照

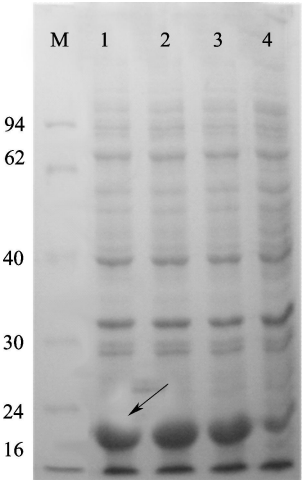


图 4 不同诱导时间下 His-*antiMAPK2* 蛋白的表达情况

Fig 4 The expression analysis of *antiMAPK2* at different time

M: Protein Molecular Weight Marker (Low);
1 *antiMAPK2* 蛋白 1h 诱导; 2 *antiMAPK2* 蛋白 2h 诱导;
3 *antiMAPK2* 蛋白 4h 诱导; 4 pET 对照载体 1h 诱导

2.4 *antiMAPK2* 蛋白纯化、检测及多克隆抗体的制备

通过液氮反复冻融法分离总蛋白上清液和沉淀, 经过 SDS-PAGE 分析, His-*antiMAPK2* 以可溶性蛋白的形式在上清液中。将分离的上清液用镍离子标记的组蛋白亲和层析柱 (HisTrap™ HP) 纯化蛋白, SDS-PAGE 检测结果显示蛋白条带大小约为 17kD (图 5), 无杂带出现, 纯度较高, 测得纯化蛋白的浓度为 0.5mg/ml 可以用作免疫原。

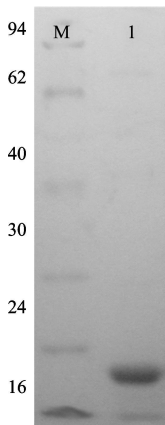


图 5 antMAPK2蛋白纯化

Fig 5 Purification of protein antMAPK2

M: Protein Molecular Weight Marker (Low);
1: antMAPK2蛋白纯化

将纯化的 His-antMAPK2免疫新西兰白兔, 制备抗体。用 ELISA 竞争抑制法检测纯化血清和

表 1 ELISA 竞争抑制法检测抗体效价检测

Table 1 Determine of antibody titer by competitive ELISA method

标准品 Standard substance	纯化血清 Purified serum					未纯化血清 Unpurified serum					阴性 Negative
	5K	10K	20K	40K	80K	5K	10K	20K	40K	80K	
0	2.828	2.886	2.649	2.292	1.612	2.631	2.706	2.525	2.426	1.796	0.365
	2.711	2.861	2.681	2.236	1.492	2.703	2.732	2.568	2.406	1.734	0.332
2000	2.752	2.792	2.383	1.645	1.018	2.587	2.770	2.520	1.758	1.331	0.328
	2.716	2.817	2.417	1.684	1.035	2.694	2.811	2.481	1.783	1.083	0.321
1000	2.776	2.630	2.165	1.217	1.169	1.718	2.718	2.157	1.352	0.845	0.331
	2.925	2.807	2.085	1.259	1.122	2.807	2.939	2.179	1.469	0.930	0.332
500	2.778	2.633	1.547	0.907	0.609	2.706	2.467	1.715	1.033	0.662	0.364
	2.734	2.306	1.264	0.975	0.624	2.719	2.616	1.806	1.090	0.722	0.358

目前, 已知有 3 个 MAPK 亚家族: extracellular signal-regulated kinases (ERKs)、c-Jun N-terminal kinases (JNKs) 以及 p38-MAPKs^[10-15]。其中 JNKs 和 p38-MAPK 在细胞响应胁迫过程中发挥重要作用。Xiong 等^[16] 的研究表明, 水稻 *O. MAPK5* (属于 p38 蛋白家族成员) 在各种胁迫条件下, 如低温、病害、干旱以及高盐等, *O. MAPK5* 在转录水平、蛋白水平以及其蛋白激酶的活性水平都被诱导提高; *O. MAPK5* 提高转基因水稻对干旱、盐以及低温的抗性, 同时增强了转基因水稻对多种病害的抗性。Jammes 等^[17] 报道, 拟南芥 *MPK9* 和 *MPK12* (*MPK9* 和 *MPK12* 属于 JNKs 亚家族成员) 参与调节活性氧介导的 ABA 信号通路。在 *MPK9* 和 *MPK12* 的基因沉默突变株系中, ABA 介导的气孔关闭过程异常。*MPK9/MPK12* 双突变株系对失水、ABA 及 H₂O₂ 等

纯化血清效价, 结果显示: 当抗原稀释比例为 3000 倍时, 纯化血清抗体效价和零标准 OD 值为 1: 80000 和 1.552。非纯化血清抗体效价和零标准 OD 值为 1: 80000 和 1.765。说明被免疫的兔子产生了抗体, 且抗血清中抗体浓度能够满足后续实验 (如 Western blot) 要求的效价值 (表 1)。

3 讨论

植物在长期的进化过程中形成精细而复杂的信号传递网络。近年来的研究发现, MAPK 信号级联系统在植物响应多种生物及非生物胁迫过程中起到重要作用^[8]。目前已经鉴定了多种植物 MAPK 在细胞信号转导中的功能。然而, 信号转导途径组分众多, 且各种信号转导路径之间存在平衡调控, MAPK 在响应逆境过程中所起的可能的正向或反向调控还不是十分清楚^[9]。

外界信号引起的气孔关闭更加迟钝, 同时 ABA 和钙离子不能够激活阴离子通道, 证明 *MPK9/MPK12* 激酶位于阴离子通道的上游途径。

研究从小麦中得到一个 *TaMAPK2* 基因, 属于 MAPK 的 JNKs 亚家族成员。为了深入了解其在细胞中的功能以及植物响应逆境过程中的地位和作用, 制备了 *TaMAPK2* 的抗体。获得高纯度的、足量的蛋白是制备抗体、研究蛋白质功能所必需的。本研究诱导表达了大量的融合蛋白 His-antMAPK2 并对目的蛋白进行了亲和层析纯化, 获得了高纯度的 His-antMAPK2 融合蛋白, 用得到的蛋白抗原制备了高效价、高特异性抗体, 为在蛋白水平上研究小麦 *TaMAPK2* 蛋白激酶参与细胞信号传导、结构与功能奠定了基础。

(参考文献见第 102 页)

- satellite on chromosomes 6B and a STS on 7D of bread wheat showing an association with pre-harvest sprouting tolerance [J]. Theor Appl Genet 1999, 99 (1-2): 336-340
- [19] Groos C, Gay G, Perretat M R, et al Study of the relationship between pre-harvest sprouting and grain color by quantitative trait loci analysis in a white X red grain bread wheat cross [J]. Theor Appl Genet 2002, 104 (1): 39-47
- [20] Lebedeff G A. Studies on the inheritance of hard seeds in beans [J]. J Agric Res 1947, 74: 205-215
- [21] Donnelly E D, Watson J E, McGuire J A. Inheritance of hard seed in *Vicia* [J]. J Heredity 1972, 63: 361-365
- [22] Williams R W. A study of the causes of and selection for resistance to weather damage in mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek *V. mungo* (L.) Hepper]. [D] Brisbane University of Queensland, Australia 1989
- [23] Malik B A, Singh V P. Genetics of some metric traits in greengram [J]. Indian J Agric Sci 1983, 53: 1002-1005
- [24] Humphry M E, Lambides C J, Liu C J, et al Relationships between hard seediness and seed weight in mungbean (*Vigna radiata*) assessed by QTL analysis [J]. Plant Breed 2005, 124: 292-298
- [25] James A T, Lawn R J, Lambides C J, et al Cross fertility of Australian accessions of wild mungbean (*Vigna radiata* ssp. *sublobata*) with green gram (*V. radiata* ssp. *radiata*) and black gram (*V. mungo*) [J]. Aust J Bot 1999, 47: 601-610
- [26] Fery R L. Genetics of *Vigna* [C] // Janick J Horticultural Reviews AVI Publishing Westport 1980: 311-394
- [27] Fatokun C A, Young N D, Menancio-Hautea D I, et al Evidence for orthologous seed weight genes in cow pea and mung bean based on RFLP mapping [J]. Genetics 1992, 132: 841-846
- [28] Orf J H, Chase K, Jarvik T, et al Genetics of soybean agronomic traits I Comparison of three related recombinant inbred populations [J]. Crop Sci 1999, 39: 1642-1651
- [29] Csanadi G J, Volkmann J, Stiff G, et al Seed quality QTLs identified in a molecular map of early maturing soybean [J]. Theor Appl Genet 2001, 103: 912-919
- [30] Patto M C V, Torres A M, Koblikova A, et al Development of a genetic composite map of *Vicia faba* using F_2 populations derived from trisomic plants [J]. Theor Appl Genet 1999, 98: 736-743
- [31] Park S O, Coyne D P, Jung G, et al Mapping of QTL for seed size and shape traits in common bean [J]. J Am Soc Hort Sci 2000, 125: 466-475
- [32] Lambides C J, Godwin ID, Lawn R J, et al Segregation distortion for seed testa color in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) [J]. J Hered 2004, 95 (6): 532-541
- [33] Hazarkar R, Banua P K. Effect of fertilization and lining on hard seediness in green gram (*Vigna radiata* L. Wilczek) [J]. Euphytica 2002, 86: 167-181
- [34] Kingston R W. Berkerr a new mungbean variety [J]. Qd Agric J 1975, 101: 659-661
- [35] Lawn R J, Cottrell A W. Wild mungbean and its relatives in Australia [J]. Biologist 1988, 35: 267-273
- [36] Rebetzke G J. Attributes of potential adaptive and agronomic significance in the wild mungbean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek ssp. *sublobata* (Roxb.) Verdc.] [D]. Brisbane Australia University of Queensland, 1994
- [37] Lawn R J, Lambides C J. Tow genetic linkage maps of mungbean using RFLP and RAPD markers Australian [J]. J Agric Res 2000, 51: 415-425
- [38] Li H, Ye G, Wang J. A modified algorithm for the improvement of composite interval mapping [J]. Genetics 2007, 175: 361-374
- [39] Inrie B C, Williams R W, Lawn R J. Breeding for resistance to weather damage in mungbean [C] // Proceedings of the Second International Symposium on Mungbean AVRDC, Taiwan, 1988: 130-135
- [40] Lambides C J. Breeding for improved seed quality traits in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) using DNA markers [D]. Brisbane University of Queensland, Australia 1996
- [41] Mei L, Cheng X Z, Liu C J, et al Relationship between bruchid resistance and seed mass in mungbean based on QTL analysis [J]. Genome 2009, 52: 589-596
- [42] Inrie B C, Lawn R J, Yeates S J. Mungbean breeding and cultivar development in Australia [C] // Mungbean the Australian Experience Proceedings of the First Australian Mungbean Workshop 1991: 14-20

(上接第 95 页)

参考文献

- [1] Bohnert H J, Nelson D E, Jensen R G. Adaptations to environmental stresses [J]. Plant Cell 1995, 7(7): 1099-1111
- [2] Hith H. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction [J]. Trends Plant Sci 1997, 2(1): 11-15
- [3] Kult D. Phylogenetic and functional classification of mitogen and stress-activated protein kinases [J]. J Mol Evol 1998, 46(5): 479-489
- [4] Obata T, Brown G E, Yaffe M B. MAP kinase pathways activated by stress The p38 MAPK pathway [J]. Critical care medicine 2000, 28(4): N67-77
- [5] Neary J T. MAPK cascades in cell growth and death [J]. Physiology 1997, 12(2): 286-293
- [6] Fama O, Wilfried R, David L, et al A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants [J]. EMBO J 2003, 22(6): 1282-1288
- [7] Seo S, Okamoto M, Seo H, et al Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways [J]. Science 1995, 270: 1988-1992
- [8] Suzuki K, Shinshi H. Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor [J]. Plant Cell 1995, 7(5): 639-647
- [9] Tena C, Asai T, Chin W L, et al Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades [J]. Curr Opin Plant Biol 2001, 4(5): 392-400
- [10] Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade [J]. FASEB 1995, 9(8): 726-735
- [11] Tibbles L A, Woodgett J R. The stress-activated protein kinase pathways [J]. CMLS 1999, 55(10): 1230-1254
- [12] Wilmann C, Gibson S, Jape M B. Mitogen-activated protein kinase Conservation of a three-kinase module from yeast to human [J]. Physiological 1999, 79(1): 143-180
- [13] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades [J]. Nature 2001, 410(1): 37-40
- [14] Johnson G L, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases [J]. Science 2002, 298(5600): 1911-1912
- [15] Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. Cell 2000, 103(2): 239-252
- [16] Xiong L, Yang Y. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase [J]. Plant Cell 2003, 15(3): 745-759
- [17] James F, Song C, Shin D, et al MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling [J]. PNAS 2009, 106(48): 20520-20525