

花生 *AhRab7* 基因的克隆及其原核表达研究

向小华¹, 宋琳¹, 裴玉贺¹, 郭新梅¹, 隋炯明², 宋希云¹

(¹ 青岛农业大学农学与植保学院/青岛市主要农作物种质资源创新与应用重点实验室, 青岛 266109;

² 青岛农业大学生命科学学院/植物生物技术重点实验室, 青岛 266109)

摘要: 为了研究花生小 G 蛋白 *AhRab7* 基因在大肠杆菌中的表达模式及与高盐胁迫的关联性, 采用 RT-PCR 技术从花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种花育 20 中克隆了 *AhRab7*(7-1、7-2) 的 cDNA 全长序列, 通过核苷酸序列和氨基酸序列分析结果表明 *AhRab7*(7-1、7-2) 的 cDNA 全长分别为 872 bp、816 bp, 分别含 1 个 621 bp、618 bp 大小的开放阅读框 (ORF, open reading frame), 拟编码氨基酸数分别为 206aa、205aa。将携带完整的 ORF 序列连入表达载体 pET-28a(+) 中, 经 IPTG 诱导后进行耐盐性测定, 结果表明两种全长重组酶 (分别含 pET-28a-*Rab7-1* 和 pET-28a-*Rab7-2* 的重组质粒) 均具有正常酶活性, 明显缓解了高盐环境 (5.5% ~ 10% NaCl 溶液) 对大肠杆菌的生长胁迫, 而对照组 (含空载体 pET-28a) 未能检测出相同的酶活性, 结果表明 *AhRab7* 基因表达可以显著缓解高盐胁迫影响。目的基因经 IPTG 诱导后高效表达, SDS-PAGE 电泳检测到目标蛋白的大小为 23kDa, 与预测结果一致。这为后期探讨花生对盐胁迫及其他非生物胁迫的研究奠定了一定的基础。

关键词: 花生; *Rab7* 基因克隆; 原核表达; 盐胁迫

Cloning and Prokaryotic Expression Character Analysis of *AhRab7* Genes from Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

XIANG Xiao-hua¹, SONG Lin¹, PEI Yu-he¹, GUO Xin-mei¹, SUI Jiong-ming², SONG Xi-yun¹

(¹ Key Laboratory of Qingdao Major Crop Germplasm Resource Innovation and Application/College of Agriculture and Plant Protection, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109; ² College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University/Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao 266109)

Abstract: The full length cDNA of *AhRab7-1* and *AhRab7-2* was isolated from HuaYu 20 (*Arachis hypogaea* L.) by RT-PCR and transferred into *Escherichia coli* to analyze whether the expression of the small G protein *AhRab7* in *E. coli* was associated with the tolerance to high salt environment for *E. coli*. *AhRab7-1* and *AhRab7-2* were 872 bp and 816 bp, containing a 621 bp and 618 bp open reading frame and encoding 206 and 205 amino acids, respectively. *AhRab7-1* and *AhRab7-2* were constructed into the expression vector pET-28a(+) with full-length ORF, then transferred into *E. coli*. After inducing by IPTG, the *E. coli* were treated with high salinity stresses and the function of the protein *AhRab7* could be tested. The tolerance activity assay showed that pET-28a-*AhRab7-1* and pET-28a-*AhRab7-2* had normal restructure enzyme activities and significantly released the salt tolerance of *E. coli* in LB medium with high NaCl concentration (5.5% -10%). The control which had been transferred into the vector pET-28 did not showed the similar enzyme activity. The result suggested the expression of *AhRab7* in *E. coli* could extremely improve the salt tolerance for *E. coli*. The product proteins of *AhRab7-1* and *AhRab7-2* were detected by SDS-PAGE and the proteins were 23 kDa as expected. Our researches could be used as a starting point for generation of plants tolerance to saline-alkali and other abiotic stress in the future.

Key words: Peanut (*Arachis hypogaea* L.); *AhRab7* cloning; prokaryotic expression; salinity stress

收稿日期: 2012-09-14 修回日期: 2012-10-23 网络出版日期: 2013-06-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130607.1547.001.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (30871544); 山东省自然基金青年基金 (ZR2011CQ026)

第一作者研究方向为作物分子育种。E-mail: woshixiaohua.cool@163.com

通信作者: 宋希云, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: songxy@qau.edu.cn

花生是我国主要经济作物和油料作物之一,年均总产 1435 万 t,单产、总产均居世界之首。土壤盐渍化是世界范围内影响花生产量和品质的最重要因素之一,全国每年因此引起的花生减产率平均达 20% 以上,造成的直接经济损失超过 50 亿元^[1-3]。近些年有关耐盐植物的选育和植物耐盐机理以及植物耐盐基因工程等方面的研究中已取得了一定的进展。

Rab 蛋白是小 G 蛋白最大的亚家族,最早发现于芽殖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),其组成为 200 ~ 210 个氨基酸,各成员间氨基酸序列的同源性在 35% ~ 80% 之间,有保守的 G 结构域与高度可变的 N 端和 C 端^[4-6]。Rab 蛋白作为细胞内囊泡运输的分子开关及胞内一类具有重要生理调节功能的蛋白质^[7]。在囊泡运输的不同阶段,Rab 蛋白与植物的生长发育、抗逆等生命过程有着密切的关系,在信号转导、细胞增殖、膜泡运输、细胞骨架的组织、调节囊泡芽形成等过程中发挥重要作用^[8-9]。Rab 蛋白在进化上的保守性及其突变体使囊泡运输产生缺陷等特性引起了普遍关注,目前已经从高等植物中分离克隆出部分 Rab 亚家族的基因,通过比较分析不同物种 Rab 蛋白基因序列,表明该类蛋白在真核生物的进化中是高度保守的,但在酵母、无脊椎动物、被子植物和哺乳动物中的数量和功能上出现了分化^[10-13]。在拟南芥中共发现有 8 个亚家族 57 种 Rab,果蝇有 29 种,线虫有 29 种,而人类有 60 多种 Rab 蛋白,是目前研究中发现的最大的家族^[14-15]。已有不少有关 Rab 蛋白与耐盐机制研究相关的报道,A. Mazel 等^[16]研究表明超表达内源囊泡运输蛋白 AtRabG3e (AtRab7) 后能够增强拟南芥对盐的渗透胁迫能力。M. Y. Nahm 等^[17]在水稻中研究证明 *Os-Rab7* 的表达也受到不同外界胁迫的调控。近年来,也有人宣布发现了新 Rab 家族^[18]。目前国内外主要集中在对水稻和人体中的 Rab 蛋白基因的克隆、蛋白表达及功能的相关研究^[18-21],有关花生 Rab 蛋白研究方面目前还鲜有报道。

本研究利用 RT-PCR 方法克隆获得 *AhRab7* 的 cDNA 全长序列,利用含完整 ORF 的序列构建原核表达载体,通过耐盐性测定分析该基因的过表达与对高盐环境耐受性的关系。通过原核表达分析研究该基因的表达模式和功能研究,加深对植物耐盐机理的了解,可为进一步研究 Rab 基因在抗盐基因工程有效利用提供重要的理论指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料

花生品种花育 20 由青岛农业大学遗传教研室王晶珊老师赠予,种子经 0.1% HgCl₂ 浸泡 8 h 后,播种于培养钵中,沙土培植,待出苗生长 10 d 后取样,于 -80 ℃ 保存备用。

表达载体 pET-28a(+) 和表达菌株 BL₂₁ (DE₃) 由青岛农业大学郭宝太老师赠予。克隆载体 pMD18-T 购自 TAKARA (大连) 宝生物公司。感受态细胞 DH5α 为本实验室制备和保存。

Ni-NTA His · Bind® 树脂(货号:70666-3)回收试剂盒均购自 (TAKARA) 大连宝生物公司;质粒提取 Fast Plasmid Minikit 购自康为世纪公司。总 RNA 提取试剂盒 (RNA TRIZOL extraction kit) 购自 Invitrogen 公司。实验引物序列由上海生工生物技术服务有限公司 (Sangong) 合成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成 取花生品种花育 20 新鲜幼嫩叶片 0.1 g,参照 RNA 提取试剂盒 (RNA TRIZOL extraction kit) 提供的步骤稍以修改提取花生叶片总 RNA,DNase I 消化 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 RNA 含量和纯度。

按 TAKARA 反转录试剂盒说明合成第 1 链 cDNA。在 0.2 mL DEPC 水处理的 PCR 管中,加入以下组分:RNA 2 μL、Oligo (dT)₁₈ 1 μL、RNase-Free ddH₂O 2 μL、5 × Buffer 4 μL、RNase Inhibitor 1 μL、dNTP Mix 1 μL、M-MuLV RT 酶 1 μL,反转录程序为 25 ℃ 温育 5 min、42 ℃ 温育 30 min、85 ℃ 温育 5 min,产物保存于 -20 ℃ 中备用。

1.2.2 花生 *Rab7* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析 利用 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中水稻 (*Oryza sativa* L.)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 已有的 *Rab7* 的氨基酸序列作为查询探针,使用 tBlastn 检索 GenBank 中花生的 EST (dbEST) 数据库。将检索到的高相似且含 *Rab7* 保守序列的 EST 序列进行拼接,根据拼接得到的全长 cDNA 序列设计上下游引物进行克隆。

Rab7-1 : F 5'GGGTCGTGTTTGTGTGTGTG

R : 5'ATCTCAGCATTCAACCTGT

Rab7-2 : F 5'AGAGCAATCATGTCAATGCGGAGG

R : 5'GCGGCTGCCGATGCTAATTTC

PCR 扩增反应体系为 25 μL,体系中各组分为:

10 × Buffer 2.5 μL、MgCl₂ (10 mmol/L) 3 μL、dNTP Mix (10 mmol/Leach) 0.5 μL、正反引物 (10 mmol/L) 各 1 μL、cDNA 模板 1 μL、*Taq* 酶 (5 U/μL) 0.5 μL、其余用 ddH₂O 补足至 25 μL；PCR 反应程序为：94 ℃ 预变性 5 min，94 ℃ 变性 40 s，61 ℃ 退火 45 s，72 ℃ 延伸 1 min，共 35 次循环，最后 72 ℃ 延伸 10 min。取 5 μL 扩增产物在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳中检测。

按回收试剂盒说明将与预测大小接近的单一一条带进行回收纯化，连入克隆载体 pMD18-T 中，操作见参考文献[22]。将 TA 载体经 42 ℃ 热激转化后挑取阳性克隆，经菌落 PCR 和质粒酶切验证后，阳性菌落送往上海生工测序部进行双向测序鉴定，结果在 NCBI 中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 BLAST 工具与数据库中的序列进行比对分析；序列拟编码的氨基酸比对分析在软件 Clustal X 中进行。

1.2.3 原核表达的载体构建及其鉴定 以含阳性克隆的 TA 载体为模板，以含有 *Hind* III 和 *Nde* I 限制性酶切位点的特异引物对目的片段的 ORF 进行 PCR 扩增，方法同 1.2.2。

Rab7-1': F 5' GCCATATGATGCCTTCCAGAAGAAGAAC
R 5' CGAAGCTTTTCATCTCAGCATTCACAACCTGT
Rab7-2': F 5' GCCATCTGATGTCAATGCCGAGG
R 5' CGAAGCTTTTAGCATGCGCGCACCCGC
CATATG 为 *Nde*I 酶切位点，AAGCTT 为 *Hind* III 酶切位点。

PCR 产物及原核表达载体 pET-28(+) 经 *Nde* I、*Hind* III 酶切纯化后，按常规方法进行连接、转化、菌落 PCR 初筛重组子、双酶切鉴定及测序验证插入序列的正确性，测序结果在 NCBI 中用 BLAST 工具进行同源分析比较。

1.2.4 *AhRab7* 基因在大肠杆菌中的诱导表达与纯化 挑取含测序正确的阳性重组质粒 pET-28a(+) -*AhRab7* 的大肠杆菌 BL₂₁ (DE₃) 单菌落接种于含 100 μg/mL Kana 的液体 LB 培养基中，37 ℃ 摇床 250 rpm 培养 16 h，按 1:30 的比例转接过夜菌液 (约 340 μL) 到 10 mL 含 100 μg/mL Kana 的液体 LB 培养基中，37 ℃ 摇床 250 rpm 活化 2~3 h，当菌液 OD_{600 nm} 达到 0.6~0.8 时加入 100 mmol/L IPTG 使终浓度达 1 mmol/L，37 ℃ 摇床 250 rpm 诱导培养 8 h，设置只含 pET-28a(+) 空载体的大肠杆菌 BL₂₁ (DE₃) 用 IPTG 诱导 8 h 产物作为负对照。取诱导 8 h 的重组 BL21 (DE3) 菌液，经 100 ℃ 煮沸 5 min 后冷至室温，12000 rpm 离心 2 min 后，分别取上清液和细胞破碎沉淀物在 5% 浓缩胶及 12% 分离胶的 SDS-PAGE 上进行检测分析，纯化步骤按照 NAT-Ni

柱试剂盒的说明进行。

1.2.5 含重组质粒大肠杆菌的耐盐性测定 按 1:100 比例取经 IPTG 诱导的重组菌和空白对照将其分别置于 10 mL 含 0、0.5%、1.5%、2.5%、3.5%、4.5%、5.5%、6.5%、7.5%、8.5%、10%、15% NaCl (100 μg/mL Kana) 的液体 LB 中培养，取 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、3 h、4 h 的培养物测其 OD_{600 nm} 的吸光度，3 次重复，根据实验结果绘制大肠杆菌在不同处理下的生长曲线，对实验结果进行 *t* 方检测。

2 结果与分析

2.1 *AhRab7* 基因的获得

基于 *Rab7* 在花生中存在本底表达，选取花育 20 的幼嫩叶片提取总 RNA (图 1)，经凝胶电泳后可见 3 条清晰条带，表明提取的 RNA 质量高、完整性较好，可以用于反转录和 RT-PCR 扩增。根据 *Rab7* 的 EST 拼接序列设计特异性引物，以第 1 链 cDNA 为模板经 RT-PCR 扩增得到 2 种特异条带，其大小在 800 bp 左右，与预期结果相吻合，并命名为 *AhRab7-1*、*AhRab7-2* (图 2)。

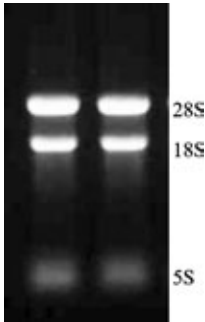
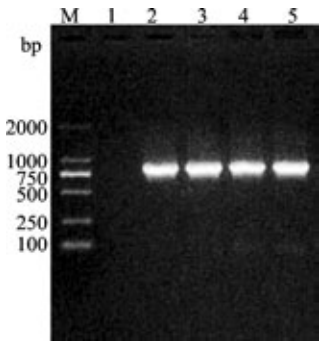


图 1 花生叶片总 RNA

Fig. 1 The total RNA of peanut from leaves



M: DNA Ladder 2000; 1: 空白对照; 2, 3: *Rab7-1* 扩增片段; 4, 5: *Rab7-2* 扩增片段

M: DNA Ladder 2000; 1: Control; 2, 3: The amplification fragments of *Rab7-1*; 4, 5: The amplification fragments of *Rab7-2*

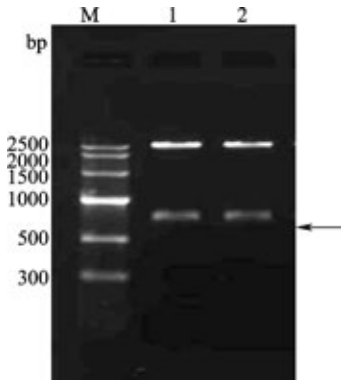
图 2 RT-PCR 扩增 *Rab7* 片段

Fig. 2 Amplification of *Rab7* by RT-PCR

采用 TA 克隆法,将纯化后的 RT-PCR 扩增产物热激转化连入克隆载体 pMD18-T 中。在含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素(Kana)的筛选培养基上得蓝白斑,碱裂解法提取质粒,后经 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切验证(图 3),结果表明目的片段已成功连入 T 载体中。测序结果表明其中 *AhRab7-1* 的 cDNA 全长为 872 bp,包含 1 个大小为 621 bp 的完整 ORF,其 5'端和 3'端非编码序列(UTR, untranslated region) 分别为 201 bp 和 50 bp, 拟编码 206 个氨基酸,推测其分子量大小为 23 kDa; *AhRab7-2* 的 cDNA 序列全长为 816 bp 也只含 1 个完整的 ORF,大小为 618 bp,5'和 3'UTR 分别为 40 bp

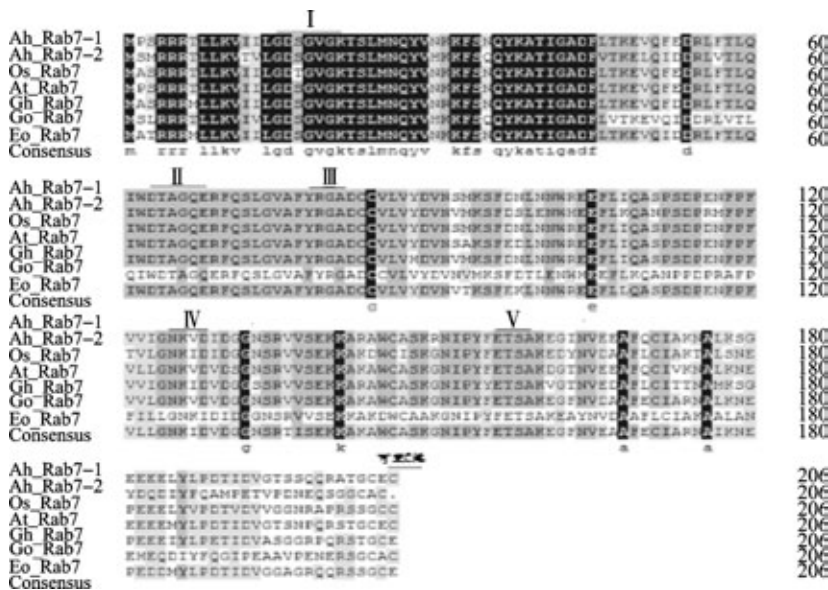
和 158 bp,共编码 205 个氨基酸,推测其分子量大小也为 23 kDa,且与拼接序列的同源性分别为 99.63%、99.84%。利用 NCBI 中的 Blastp 工具进行蛋白序列保守结构域分析,及其拟编码的氨基酸序列与已知物种 *Rab7* 基因编码的氨基酸序列的同源比对分析。

分析结果表明 *AhRab7-1*、*AhRab7-2* 基因分别编码 206、205 个氨基酸,该类蛋白质具有结合 GTP/GDP 所必需的 5 个保守结构域: I 结合磷酸基的结构域 GDSGVGK; II 协调 GTP 的 β 和 γ -磷酸基的序列 DTAGQE; III Rab 家族共有的结构域 YRGA; IV 强化鸟嘌呤结合的蛋白序列 NKVD; V 协助鸟嘌呤结合和解离的 ETSA 序列以及 C 端可变序列。将 *AhRab7-1*、*AhRab7-2* 基因拟编码的氨基酸序列在 GenBank 中进行氨基酸序列同源连配比较,分析表明其具备了 Rab 蛋白家族成员所共有的序列元件。在 *AhRab7-1* 和 *AhRab7-2* 蛋白的 C 端都具有 1 个保守的半胱氨酸(Cyt),且两者之间的同源性为 71.71%; *AhRab7-1* 与拟南芥的氨基酸序列同源性最高,达 90.78%;与大豆的氨基酸序列同源性最低,仅为 70.87%; *AhRab7-2* 与大豆的氨基酸序列同源性最高,达 85.85%,与拟南芥的氨基酸序列同源性最低,仅为 69.76%。另外, *AhRab7-1*、*AhRab7-2* 的编码产物都含有整个 Rab 蛋白家族保守的 KATIGADF 基序(图 4、表 1)。



M: DNA Ladder 2500; 1, 2: 重组质粒酶切鉴定结果
M: DNA Ladder 2500, 1, 2: Digested identification of recombinant vector T-*AhRab7-1* and T-*AhRab7-2*

图 3 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切验证 *AhRab7* 基因 TA 克隆载体
Fig. 3 Enzyme digestion of the TA-*AhRab7* clone vector



Ah: 花生 (*Arachis hypogaea*); Os: 水稻 (*Oryza sativa*, AY226827); At: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, AC007504); Gh: 棉花 (*Gossypium hirsutum*, AAD22451); Gm: 大豆 (*Glycine max*, S39566); Pg: 豌豆 (*Pennisetum glaucum*, A829438)

图 4 花生 *Rab7* 拟合成蛋白结构域序列与不同物种间的同源比对

Fig. 4 Alignment of the amino acid sequence of *AhRab7* with its homologues

表 1 几个物种 *Rab* 基因编码氨基酸序列的同源性分析

Table 1 The homology sequence analysis of *Rab* amino acid in several species (%)

	AhRab7-1	AhRab7-2	OsRab7	AtRab7	GhRab7	GmRab7
AhRab7-2	71. 71					
OsRab7	85. 92	72. 20				
AtRab7	90. 78	69. 76	82. 52			
GhRab7	85. 92	74. 15	86. 89	83. 50		
GmRab7	70. 87	85. 85	71. 36	68. 45	73. 79	
PgRab7	82. 04	73. 17	83. 98	82. 52	88. 89	73. 30

Rab 蛋白的 G 结构域从酵母到动植物都具有高度保守性,其 N 端和 C 端在长度和序列具有高度可变性,研究发现模体中的 C 端的 C、CX、CXC、CXXX 模体作为定位信号;另外,半胱氨酸(Cyt)经过异戊二烯化修饰后可与细胞膜连接;N-端的作用可能是参与指导 C 端半胱氨酸进行异戊二烯化修饰^[23]。利用蛋白结构分析软件分析了 AhRab7 蛋白的保守结构图(图 5),由图 5 可见,AhRab7 蛋白含有 GTP/Mg²⁺ 结合位点、*Rab* 蛋白家族共有的 5 个(G1 ~ G5)元件及主结构域,说明这类蛋白具有相当高的保守性,也进一步验证了目标基因所编码的蛋白属于 *Rab* 家族。

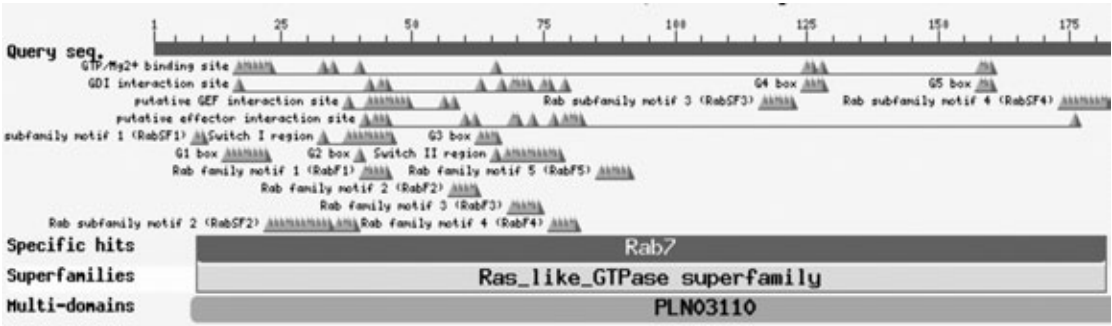


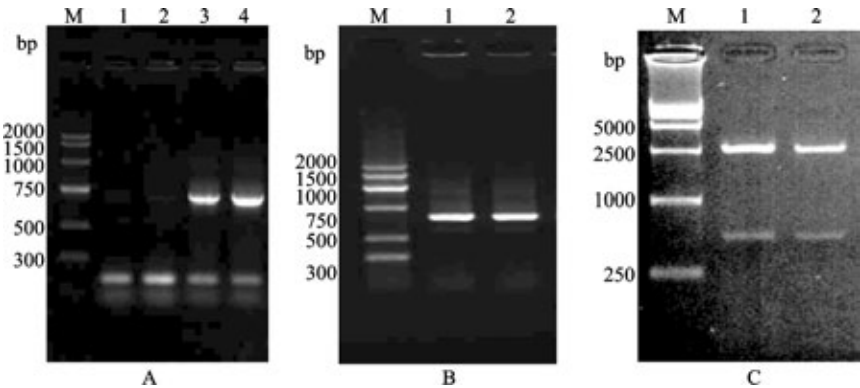
图 5 AhRab7 蛋白保守结构域模式图

Fig. 5 The patterning of AhRab7 protein conservative structure domain

2.2 *AhRab7* 的原核表达载体的构建

以含 *AhRab7* (*AhRab7-1*、*AhRab7-2*) 的 TA 克隆载体为模板,用含有 *Nde* I 和 *Hind* III 酶切位点的特异引物将 *AhRab7* 基因亚克隆到原核表达载体 pET-28a(+) 上,成功构建了阳性重组表达质粒(图 6),测

序表明在 *AhRab7-1* 的克隆序列中有 1 个位点(505 位 T→C)发生颠换,但其为无意突变并不影响所编码的氨基酸序列,*AhRab7-2* 无变化。并将此质粒通过热激法转化到表达菌株 BL₂₁ (DE₃) 中,分别得到了含有 pET-28a-*AhRab7-1*、pET-28a-*AhRab7-2* 阳性克隆重组子。



A: 菌落 PCR 验证阳性克隆;M: DNA Ladder 2000;1: 水;2: 含空载体;3、4: 以重组子 pET-28a-*AhRab 7-1*、pET-28a-*AhRab 7-2* 的大肠杆菌为模板
A: Verification of positive clones by bacteria PCR, M: DNA Ladder 2000, 1: Water, 2: Empty vector, 3、4: The PCR products of *E. coli* contain recombinant plasmid pET-28a-*AhRab 7-1* and pET-28a-*AhRab 7-2*
B: 重组质粒 PCR 验证阳性克隆;M: DNA Ladder 2000;1、2: 以 pET-28a-*AhRab7-1*、pET-28a-*AhRab7-2* 为模板
B: Verification of positive clones by plasmid PCR, M: DNA Ladder 2000, 1、2: The PCR products of recombinant plasmid pET-28a-*AhRab 7-1* and pET-28a-*AhRab 7-2*
C: *Nde* I、*Hind* III 双酶切验证阳性克隆;M: DNA Ladder 15000;1、2: 重组质粒 pET-28a-*AhRab7-1*、pET-28a-*AhRab7-2* 双酶切
C: Verification of positive clones by enzyme digestion, M: DNA Ladder 15000, 1、2: Digested identification of recombinant plasmid pET-28a-*AhRab7-1* and pET-28a-*AhRab7-2*

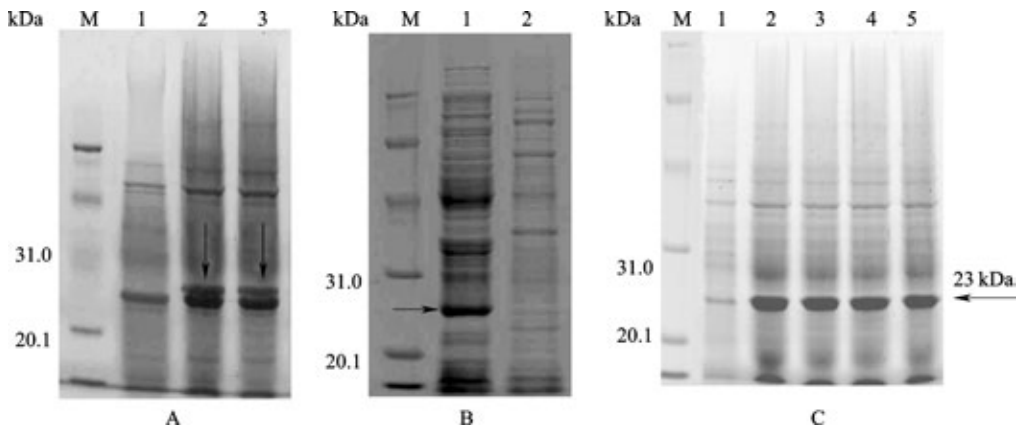
图 6 原核表达载体的构建验证

Fig. 6 Construction of prokaryotic expression vector

2.3 *AhRab7* 目的蛋白的诱导表达和纯化

重组菌和对照组经 1 mol/L 的 IPTG 诱导后,在重组菌破裂后的上清液中收集到目的蛋白,经 SDS-PAGE 检测到大小约 23 kDa 的特异性蛋白条带,与预期结果相吻合(图 7),并且在破碎沉淀物和对照组的破碎物中没有检测到目的蛋白条带。结果表明在重组子 pET-28a-*AhRab7* 中,目的蛋白经诱导后高效表达,且目的蛋白以包涵体的形式

存在于细胞裂解液的上清中。由于所选用的载体 pET-28a(+) 上有 His₆形成的标签,将上清用特异性较强的 Ni 柱纯化,将流出液经 SDS-PAGE 的检测,证明目的蛋白在 60 mmol/L 咪唑洗脱的后期开始被洗脱下来,在洗脱液浓度为 80 mmol/L 时目的蛋白浓度达到顶峰。该融合蛋白的大小约为 23 kDa,大小与预期相符(图 7B),表明目的基因在受体菌中成功表达。



A: *AhRab7* 目的蛋白经 IPTG 诱导后的表达;M:蛋白标准分子量;1~3:含载体 pET-28a、pET-28a-*AhRab7*-1、pET-28a-*AhRab7*-2 的重组菌总蛋白,如箭头所示

A: Expression of *AhRab7* recombinant protein after IPTG induced for 8 hours, M: Protein marker, 1-3: BL21 (pET28a), BL21 (pET28a-*AhRab7*-1), and BL21 (pET28a-*AhRab7*-2), respectively. Arrow indicates *AhRab7* protein

B: 纯化样品成分比较;M:蛋白标准分子量;1:加洗脱液时流出样品;2:未加洗脱液时流出样品

B: The comparison of purification component, M: Protein marker, 1: Elute with addition of imidazole buffer, 2: Elute without addition of imidazole buffer

C: 目的蛋白的纯化;M:蛋白标准分子量;1:空载体 pET-28a;2、3:重组载体 pET-28a-*AhRab7*-1;4、5:重组载体 pET-28a-*AhRab7*-2, 如箭头所示

C: Purification of expressed protein, M: Protein marker, 1: Empty vector, 2-3: Recombinant pET-28a-*AhRab7*-1, 4-5: Recombinant pET-28a-*AhRab7*-2. Arrow indicates *AhRab7* protein

图 7 SDS-PAGE 检测分析 *AhRab7* 重组蛋白的诱导表达与纯化

Fig. 7 SDS-PAGE analysis and detection induced expression of *AhRab7* proteins

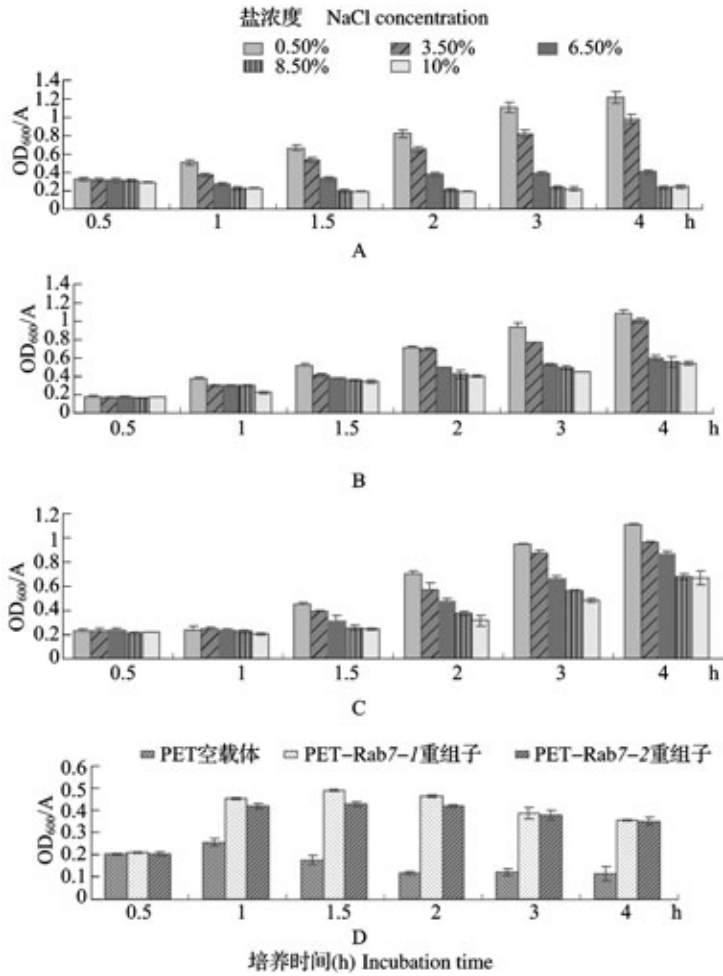
2.4 重组菌的耐盐性检测

重组质粒 pET-28a-*AhRab7*-1 和 pET-28a-*AhRab7*-2 及空载体 pET-28a 经 IPTG 诱导后,在不同的时间点测定 OD_{600 nm},绘制其生长曲线(图 8A、B、C),NaCl 的浓度在 0.5% ~ 6.5% 之间,所有的大肠杆菌都能正常生长, *AhRab7* 基因的过量表达并未对其生长产生明显影响;培养基中的盐离子浓度增大到 8.5% ~ 10%,含空载体的大肠杆菌生长明显减缓且生长受到抑制,而重组菌的生长曲线受盐浓度的变化趋势不明显,将盐浓度继续增加到 15%,对照组和试验组的差异更加明显(图 8D),结果经过 *t* 检验,pET-28a-*AhRab7*-1 与对照组在高盐条件下的差异达极显著,pET-28a-*AhRab7*-2 与对照组的差异也为显著水平。表明目的基因 *AhRab* 在受体菌中已经高效表达,且 2 个基因的表达产物

对高盐胁迫的缓解机制在存在差异,也进一步验证了 *AhRab7* 基因对高盐环境胁迫有较好的耐受性。

3 讨论

小分子 GTP 结合蛋白作为一种参与调控多种生命活动的分子开关,与植物的基因表达、生长发育和形态建成、膜泡运输、抗逆等生命过程息息相关,其调控途径已成为近年来研究细胞信号调控途径的重点和热点^[16]。Rab 蛋白作为小 G 蛋白家族中最重要成员,通过与上游调控因子和下游特定的效应因子相互作用。作为分子开关与 GTP 的结合和水解过程相偶联,在囊泡形成、转运、粘附、锚定及融合等阶段发挥作用^[13,24-27]。随着更多的 Rab 亚家族蛋白的发现和深入研究,通过不同物种基因组中 Rab



A: 含空载体的对照组大肠杆菌在不同盐浓度下的生长情况; B: 含重组质粒 pET-28a-AhRab7-1 的大肠杆菌在不同盐浓度下的生长情况; C: 含重组质粒 pET28a-AhRab7-2 的大肠杆菌在不同盐浓度下的生长情况; D: 含不同形式重组子的大肠杆菌在高盐(15% NaCl 溶液)胁迫下的生长情况

A: Growth curve of control in LB with different NaCl concentrations, B: Growth curve of recombinants with pET28a-AhRab7-1 in LB with different NaCl concentrations, C: Growth curve of recombinants with pET28a-AhRab7-2 in LB with different NaCl concentrations, D: Growth situation of different recombinants in high NaCl stress(15% NaCl)

图 8 不同形式的重组子经 IPTG 诱导后在不同盐浓度的生长情况

Fig. 8 Growth tendency of the recombinants in LB with different NaCl concentrations under IPTG induction

蛋白基因序列分析表明, Rab 蛋白在真核生物的进化过程中是高度保守的。有关花生 Rab 蛋白与耐盐机制方面还鲜有报道, 拟南芥中 *AtRab7* 主要通过钠离子在液泡中的积累以及 ROS (reactive oxygen stress) 反应两种机制参与耐盐的调控^[16]。

花生是异源四倍体植物, 由于基因结构复杂、基因组测序计划目前尚未启动等因素, 对花生一些重要基因的克隆带来困难, 随着分子生物学和生物信息学的发展, 本研究拟通过原核表达分析和研究 *AhRab7* 基因的表达模式和功能, 以水稻 *OsRab7*、*AtRab7* 基因的序列为探针, 从花生 EST 数据库中筛选出该基因的同源序列, 并根据 EST 拼接序列设计引物进行 RT-PCR 扩增, 结果扩增出 2 条带 *AhRab7-1*

(872 bp)、*AhRab7-2* (816 bp)。与其他物种 Rab 基因的氨基酸序列进行比对, 其中 *AhRab7-1* 与拟南芥的氨基酸序列同源性最高, 达 90.78%; *AhRab7-2* 与大豆的氨基酸序列同源性最高达 85.85%; *AhRab7-1*、*AhRab7-2* 两者之间的同源性为 71.71%。本研究成功构建了 *AhRab7* 基因的原核表达载体, 实现了目的蛋白质的高效表达, 结果表明目的蛋白是以包涵体的形式存在于宿主菌中, 这与罗文新等^[28]、杨晓华等^[29]的研究结果相一致。大肠杆菌重组子耐盐性检测试验结果初步表明, 花生 *AhRab7* 基因的编码产物能够提高大肠杆菌对高盐胁迫的耐受性, 对提高花生品种耐盐性和品种改良以及花生耐盐机理研究起到基础作用。然而, 植物在其生长

发育过程中往往会受到多种逆境的影响,各种逆境对植物的危害是相互关联的,同样植物对不同逆境的适应也是相互联系的,即植物经历某种逆境后能提高对其他逆境的适应能力,这种现象亦称为“交叉适应”^[30-31]。最近的研究进一步表明,在冷冻、PEG 模拟的干旱以及生长素 ABA 存在的条件下,*Rab* 基因的 mRNA 的表达量也呈现出不同的趋势,也表明该基因在不同的环境刺激下受到不同的调控^[17],P. J. O'Mahony 等^[32]在牧草(*Sporobolus Stapfianus*)中克隆到 *sRab2* 基因,该基因很可能涉及由植物 ABA 参与的耐旱信号的传导。*AhRab7* 的功能及是否被干旱、低温、ABA 等非生物胁迫因素诱导及在真核生物中是否具有同样的抗盐效力,还要进一步深入研究。

参考文献

- [1] Trethowan R M, Crossa J, van Ginkel M, et al. Relationships among bread wheat international yield testing locations in dry areas [J]. *Crop Sci*, 2001, 41 (5) : 1461-1469
- [2] 姜慧芳. 花生的抗旱育种 [M]//孙大容. 花生育种学. 北京: 中国农业出版社, 1998: 256-275
- [3] 姜慧芳, 段乃雄. 花生抗旱机制的研究进展 [J]. *中国油料作物学报*, 1997, 19 (3) : 73-76
- [4] 樊俊蝶, 王伟, 梁爱华. Rab 蛋白的结构、功能及进化 [J]. *生命的化学*, 2004, 24 (1) : 31-33
- [5] Nepomuceno-Silva J L, de Melo L D, Mendonça S M, et al. RILs: a new family of Ras-related GTP-binding proteins [J]. *Gene*, 2004, 327 (2) : 221-232
- [6] Segev N, Mulholland J, Botstein D. The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery [J]. *Cell*, 1988, 52 (6) : 915-924
- [7] Yang Z B. Small GTPases: Versatile signaling switches in plants [J]. *Plant Cell*, 2002, 14 : 375-388
- [8] Eathiraj S, Pan X, Ritacco C, et al. Structural basis of family-wide Rab GTPase recognition by rabenosyn-5 [J]. *Nature*, 2005, 436 : 415-419
- [9] 翟中和, 王喜忠, 丁明孝. 细胞生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 177-194
- [10] Pereira-Leal J B, Seabra M C. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins [J]. *J Mol Biol*, 2001, 313 (4) : 889-901
- [11] Zerial M, McBride H. Rab proteins as membrane organizers [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2 : 107-117
- [12] Vernoud V, Horton A C, Yang Z B, et al. Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 131 (3) : 1191-1208
- [13] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81 (1) : 153-208
- [14] 陈金峰, 胡斌杰. 拟南芥 *Rab GAP* 基因对 ABA 反应的功能分析 [J]. *植物研究*, 2008, 28 (2) : 232-235
- [15] Bock J B, Matern H T, Pedena A, et al. A genomic perspective on membrane compartment organization [J]. *Nature*, 2001, 409 : 830-842
- [16] Mazel A, Leshem Y, Tiwari B S, et al. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e) [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134 (1) : 118-128
- [17] Nahm M Y, Kim S W, Yun D, et al. Molecular and biochemical analyses of OsRab7, a rice Rab7 homolog [J]. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44 (12) : 1341-1349
- [18] 林慧贤, 刘筱斌, 李发强, 等. 水稻小 GTP 蛋白基因 *Osrab5B* 基因的克隆和鉴定 [J]. *高技术通讯*, 2001, 11 (3) : 9-14
- [19] 康巧华, 陈巧林, 季清洲, 等. G 蛋白 Rab3a cDNA 的克隆与表达 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2002, 18 (1) : 75-79
- [20] 李希, 许根兴, 王建军, 等. 人 *rabl3* 基因克隆和表达 [J]. *南京大学学报*, 2000, 6 (5) : 653-658
- [21] 陈宣茂, 孙朝晖, 王兆, 等. 人 Rab 蛋白 cDNA 的克隆和表达 [J]. *复旦学报*, 2000, 39 (6) : 688-691
- [22] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M] 3 版//黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2008: 99-102
- [23] Sanford J C, Pan Y, Wessling-Resnick M. Properties of Rab5 N-terminal domain dictate prenylation of C-terminal cysteines [J]. *Mol Biol Cell*, 1995, 6 (1) : 71-85
- [24] Diao A, Frost L, Morohashi Y, et al. Coordination of golgin tethering and SNARE assembly: GM130 binds syntaxin 5 in a p115-regulated manner [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283 (11) : 6957-6967
- [25] Bentley M, Liang Y J, Mullen K, et al. SNARE status regulates tether recruitment and function in homotypic COPII vesicle fusion [J]. *Biol Chem*, 2006, 281 (50) : 38825-38833
- [26] Grosshans B L, Ortiz D, Novick P. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (32) : 11821-11827
- [27] Deneka M, Neeft M, van der Sluijs P. Regulation of membrane transport by Rab GTPases [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2003, 38 (2) : 121-142
- [28] 罗文新, 张军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体的构建及初步应用 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16 (5) : 578-581
- [29] 杨晓华, 彭晓珏, 杨国华, 等. 水稻 *OsRab7* 耐盐功能的初步鉴定及其表达载体的构建 [J]. *武汉植物学研究*, 2008, 26 (1) : 1-6
- [30] 王利军, 李绍华, 李家永, 等. 温度逆境交叉适应对葡萄叶片膜脂过氧化和细胞钙分布的影响 [J]. *植物生态学报*, 2004, 28 (3) : 326-332
- [31] 武杭菊. 小麦幼苗对干旱、低温逆境交叉适应的反应机制 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007
- [32] O'Mahony P J, Oliver M J. Characterization of a desiccation responsive small GTP-binding protein (Rab2) from the desiccation tolerant grass *Sporobolus stapfianus* [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39 (4) : 809-821