

文章编号:1001-1498(2012)06-0751-05

# 毛竹微管蛋白基因 *PeTua3* 的原核表达及其功能初步研究

李彩丽, 彭镇华, 高志民\*

(国际竹藤中心, 竹藤科学与技术重点实验室, 北京 100102)

**摘要:**作为细胞骨架的重要组成部分,微管蛋白在细胞壁发育过程中起着重要的调控作用。采用 RT-PCR 技术从毛竹叶片中克隆到一个微管蛋白(Tua3)同源基因的 cDNA 序列,长 1 356 bp,编码 451 个氨基酸,命名为 *PeTua3*。构建原核表达载体 pET-32b-*PeTua3*,并将其转入大肠杆菌中诱导表达。蛋白电泳检测结果表明:温度和诱导时间对 *PeTua3* 基因蛋白的表达影响差异显著,其中,在 37 °C 用 0.4 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG 诱导 2 h 的表达效果最好。用 *PeTua3* 基因体外表达的重组蛋白处理拟南芥种子,其幼苗上胚轴明显增粗,侧根增多;超薄切片显微观察显示,重组蛋白处理的拟南芥上胚轴和主根的薄壁细胞数量均增多,细胞体积变大,维管束增粗。

**关键词:**毛竹;细胞骨架;微管蛋白基因;原核表达;细胞生长

中图分类号:S795.7

文献标识码:A

## Prokaryotic Expression and Functional Analysis of Microtubule Gene *PeTua3* from *Phyllostachys edulis*

LI Cai-li, PENG Zhen-hua, GAO Zhi-min

(International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of Science and Technology of Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

**Abstract:** Microtubule protein, one key component of cytoskeleton, plays an important regulation role in the development process of cells. An homologue gene of Tua3 was isolated from the leaves of *Phyllostachys edulis* through RT-PCR method and designed as *PeTua3*. The open reading frame of *PeTua3* was 1 356 bp encoding 451 aa. A prokaryotic expression vector pET-32b-*PeTua3* was constructed and transformed into *Escherichia coli* for expression induced by IPTG. There was significant discrepancy in protein expression efficiency under different temperature and induced time. The best condition for *PeTua3* expression was at 37 °C for 2 h induced by 0.4 mmol · L<sup>-1</sup> IPTG. The seeds of *Arabidopsis thaliana* were treated with the recombination protein of *PeTua3*, the phenotype showed that the epicotyl of seedlings thickened obviously and the quantity of lateral roots increased significantly. The ultra-thin sectioning microscopy showed that the parenchyma cells were more and bigger, and the vascular bundles were thicker in epicotyl and main root of the treated seedlings than those of controls.

**Key words:** *Phyllostachys edulis*; cytoskeleton; microtubule protein gene; prokaryotic expression; cell development

微管是真核生物中普遍存在的蛋白纤维结构,与微丝及中间纤维共同组成植物细胞骨架,与骨架

结合蛋白共同参与细胞分裂、生长、成核、胞内物质运输及形态发育等生理生化过程。细胞骨架指导细

收稿日期:2012-07-10

基金项目:林业公益性行业科研专项“毛竹基因组测序研究”(200704001)

作者简介:李彩丽(1983—),女,山东聊城人,在读博士,主要从事生物技术与功能基因组研究。

\* 通讯作者。

胞壁的生物合成,微管蛋白作为细胞骨架的重要组成部分在细胞壁发育过程中起着重要的调控作用<sup>[1-2]</sup>。

微管蛋白分子生物学研究已在原生动物和低等植物中广泛开展,关于微管结构和功能已有许多相关理论。在高等植物中,微管蛋白的分子生物学研究起步较晚,仅在近年来对一些典型的植物如拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.)<sup>[3]</sup>、玉米(*Zea mays* L.)<sup>[4]</sup>等开始了一些基础性的研究工作,获得了关于微管蛋白基因的基本信息,对其时空表达的特异性有了初步的认识。微管在确定并保持细胞生长的方向性上发挥着重要作用,用微管特异性药剂处理拟南芥叶片表皮铺板细胞,破坏微管阵列之后细胞形态出现异常<sup>[5]</sup>。Thitamadee 等<sup>[6]</sup>筛选出了  $\alpha$ -tubulin 的突变体 left1 和 left2,植株细胞的微管处于不稳定状态,导致根、下胚轴、叶片等器官均表现为螺旋生长,证明微管蛋白对植物的正常生长具有重要的作用。这些成果为研究竹子微管蛋白基因提供了良好的借鉴。

竹类植物因其速生的特点而倍受关注,研究其细胞壁发育的分子调控有助于理解竹材形成机制。本研究以我国分布广泛的重要经济竹种毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) H. de Lehaie)为材料,分离微管蛋白基因,构建基因的原核表达载体,进行基因的体外表达,用表达的蛋白处理拟南芥种子,通过分析拟南芥的表型来鉴定蛋白的活性,初步判断微管蛋白基因的功能,以期为揭示毛竹微管蛋白基因在其细胞壁生物合成中的作用提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料和菌株

从国家林业局林木种子分公司购买毛竹种子,在竹藤科学与技术重点实验室内进行培养,4 个月和 1 a 的盆栽实生苗用于实验。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$  和 Rosetta( DE3)由本实验室保存。

### 1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

毛竹 RNA 提取采用 Trizol 法<sup>[7]</sup>,cDNA 合成按照 Promega 公司的反转录试剂盒操作说明进行。

### 1.3 基因的克隆、测序与分析

利用本项目组前期获得的毛竹全长 cDNA 序列数据库<sup>[8]</sup>,搜索微管蛋白基因序列,根据 FP100535 序列的编码区,用软件 Primer5.0 设计引物,Tua-F: 5'-ATGAGAGAGTGCATCTCGATCCAC-3'; Tua-R: 5'-

GTACTCGTCTCCCTCATCACCTTC-3',由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。以毛竹 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件:95  $^{\circ}$ C 5 min,94  $^{\circ}$ C 1 min,55 ~ 65  $^{\circ}$ C 1 min,72  $^{\circ}$ C 1.5 min,35 个循环;72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

利用梯度 PCR 筛选出的适宜退火温度进行 PCR,产物经琼脂糖凝胶电泳后用 DNA/PCR 产物回收试剂盒回收,并按照快速连接试剂盒(Promega 公司)操作流程克隆到 pGEM-T easy 载体上,热击转化大肠杆菌感受态细胞(DH5 $\alpha$ ),经抗性筛选,提取阳性克隆质粒并经酶切初步分析正确后,送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。用 DANSTAR、SMART 等生物软件对获得的基因序列及其编码蛋白质的结构特点进行分析,并与 NCBI 数据库中的核酸序列和蛋白质结构进行比较。

### 1.4 *PeTua3* 基因的组织特异性表达检测

根据获得的基因序列设计实时定量 PCR 引物,PeTua3-F: 5'-ACTACCAGCCACCAAGTGTCTCGTC-3', PeTua3-R: 5'-CCTCCTCGTAATCCTTCTCCAGC-3'。分别以毛竹 1 年生实生苗根、茎、叶和鞘 4 种组织的 cDNA 为模板,并以毛竹  $\beta$ -actin 基因(FJ601918)为内参<sup>[9]</sup>,利用罗氏 480 荧光定量 PCR 仪和 SYBR Premix Ex Taq<sup>TM</sup>(TaKaRa 公司)实时定量 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增和实时定量检测分析。每种材料设置 3 次重复,数据采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法进行分析<sup>[10]</sup>。

### 1.5 重组表达载体的构建

根据原核表达载体(pET-32b)的多克隆位点和目的基因序列的酶切位点特征设计引物,上游引物的 5' 端添加 *Nco* I 酶切位点,NF1: 5'-ccatggATGAGAGAGTGCATCTCGATCCAC-3',下游引物的 5' 端添加 *Not* I 酶切位点,NR1: 5'-gcggccgcGTACTCGTCTCCCTCATCACCTTC-3'。以上述测序正确的质粒为模板,采用高保真酶(pyrobest polymerase)进行 PCR 扩增,扩增产物经测序正确后,采用双酶切(*Nco* I / *Not* I)将目的基因克隆到 pET-32b 载体中,形成原核表达载体。

### 1.6 原核表达与纯化

应用电转化法将重组质粒转入感受态细胞 Rosetta( DE3),选取单克隆,经菌液 PCR 检测正确后,在 37  $^{\circ}$ C 条件下培养过夜,再将菌液稀释 100 倍于含氨苄青霉素(100 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)的 LB 培养基中培养,待菌液生长至 OD<sub>600</sub> 为 0.6 ~ 0.8 时,加入 IPTG (浓度分别为 0.4 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 和 1.0 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)进

行诱导培养,分别在1、2、3、4 h后,收集菌体,用1%的SDS剧烈震荡破菌后,离心后进行SDS-PAGE电泳分析(浓缩胶浓度5%,分离胶浓度12%)。蛋白纯化按照Merck公司提供的His·Tag融合蛋白纯化试剂盒操作手册进行<sup>[11]</sup>。

### 1.7 重组蛋白的生物活性鉴定

将纯化的重组蛋白稀释至不同的浓度,在无菌条件下用0.2 μm的滤膜过滤后,加入尚未凝固的MS固体培养基中,混均后分装入培养皿,同时以加入纯化的载体表达蛋白、未纯化的载体表达蛋白的培养基为对照,播种拟南芥后于4℃冰箱过夜。然后置于光下培养(150 μmol·s<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup>),温度为21℃,光周期光照/黑暗=16 h/8 h。定期观察拟南芥的表型,分别取60株处理的拟南芥,测量其侧根数量和上胚轴粗度,取其平均值,数据采用Microsoft Excel软件进行统计分析。

处理15 d后取拟南芥的不同组织制作超薄切片<sup>[12]</sup>,进行显微观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因克隆与分析

以Tua-F和Tua-R为引物的PCR产物电泳,EB染色结果显示,在1.4 kb左右有1条亮带(图略),与预测的基因片段相符,初步确定为目的基因片段。回收目的片段并克隆到pGEM-T easy载体上测序。测序结果表明:插入片段包含一个完整的编码区为1 353 bp(不含终止密码子)、编码451个氨基酸的蛋白,与推定的毛竹Tua3基因(FP100535)序列的编码区相似性达100%,完全一致。

通过DANStar软件分析表明:该序列编码一个451 aa的蛋白,蛋白的等电点和分子量分别为4.811和49.716 kDa。该蛋白氨基酸中以疏水性氨基酸为主(153 aa),占总数的33.9%;其次是极性氨基酸(115 aa),占总数的25.5%;碱性氨基酸、酸性氨基酸分别为40 aa和64 aa,各占总数的8.9%和14.2%。经过MotifScan软件分析,*PeTua3*氨基酸序列包含N-糖基化位点、磷酸化酪蛋白激酶II位点、N-肉豆蔻酰化位点、磷酸化蛋白激酶位点、GTP酶域和C末端结构域等位点。应用Blast在线软件比较分析发现,其编码的蛋白与其它植物(如拟南芥、玉米等)的Tua3均具有较高的一致性,因此确认该基因属于Tua3家族,命名为*PeTua3*。

实时定量PCR结果(图1)表明:*PeTua3*基因在

毛竹根、茎、叶和鞘中均有表达,其中在根中的表达丰度最高,在茎中次之,在鞘中的表达丰度最低。

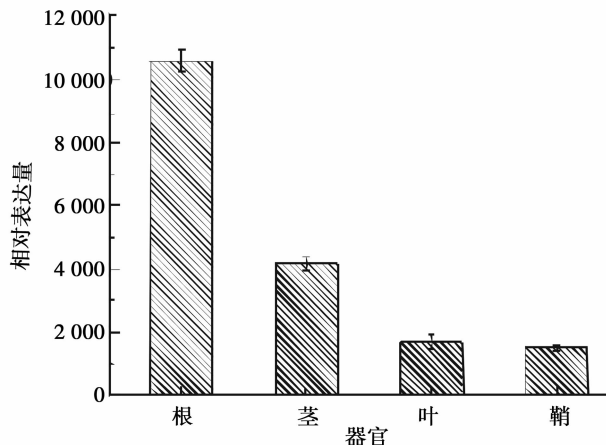


图1 *PeTua3* 基因在毛竹不同器官中的相对表达量

### 2.2 原核表达载体构建

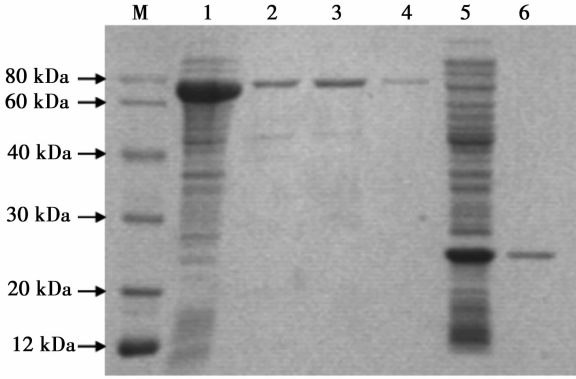
用引物NF1和NR1的PCR扩增产物电泳结果显示:在1.4 kb左右有1条清晰的亮带(图略)。回收目的条带并加A后连接到pGEM-T easy载体上测序,结果表明插入片段为1 367 bp,包含2个酶切位点14 bp和蛋白的编码区1 353 bp(不含终止密码子)。用Nco I和Not I双酶切,将*PeTua3*编码区直接插入到载体pET-32b的多克隆位点,即构建了含有T7启动子、*PeTua3*和组氨酸序列标签(His·Tag)的原核表达载体pET-32b-*PeTua3*。

### 2.3 基因原核表达

将pET-32b-*PeTua3*质粒转入表达菌株Rosetta(DE3),接种单克隆进行培养<sup>[13]</sup>,收集菌体提取蛋白后电泳。结果显示:经IPTG诱导含有pET-32b-*PeTua3*的克隆表达产生一特异的蛋白条带,而空载体及未经IPTG诱导的pET-32b-*PeTua3*克隆均不能表达产生此蛋白条带(图略)。目的蛋白主要以包涵体形式存在,可溶蛋白较少。通过对IPTG浓度以及诱导时间的优化,电泳结果表明:在37℃条件下,用0.4 mmol·L<sup>-1</sup>的IPTG诱导2 h可溶性蛋白的表达丰度最高。利用Ni-NTA亲和柱纯化目的蛋白,经过1次分离,2次漂洗去粗蛋白,再经过3次Ni-NTA洗脱缓冲液洗脱目的蛋白后,进行电泳检测。结果(图2)显示:重组蛋白纯度较高,分子量与预期的大小基本一致,约为73.0 kDa,包含了目的蛋白49.7 kDa和载体蛋白23.0 kDa。

### 2.4 重组蛋白对拟南芥生长的影响

对拟南芥观察表明:不同浓度的*PeTua3*重组蛋



M: 蛋白质分子量标记; 1: pET-32b-PeTua3总蛋白; 2,3: pET-32b-PeTua3纯化总蛋白; 4: pET-32b-PeTua3纯化可融蛋白; 5: pET-32b总蛋白; 6: pET-32b纯化蛋白

图2 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测

白对拟南芥上胚轴、主根的粗度和侧根数量有着不同程度的影响。当浓度为  $20 \sim 180 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时,拟南芥上胚轴、主根都有不同程度的增粗,侧根数量表现为不同程度的增加,其中以浓度为  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的处理效果最为明显;而当浓度超过  $200 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  时,对上胚轴、主根的粗度以及侧根数量均产生抑制作用(图3、4)。

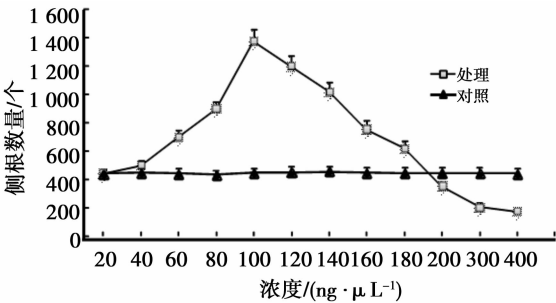


图3 不同浓度的 PeTua3 重组蛋白对拟南芥侧根数量的影响

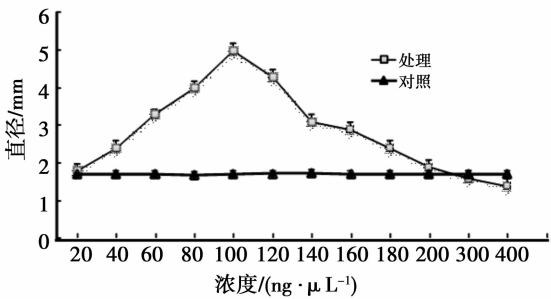


图4 不同浓度的 PeTua3 重组蛋白对拟南芥上胚轴的影响

用浓度为  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 PeTua3 重组蛋白处理拟南芥,7 d 后拟南芥上胚轴粗度是对照的 2.12 倍,侧根数量是对照的 4.2 倍;15 d 后拟南芥上胚轴粗度是对照的 2.8 倍,侧根数量是对照的 3 倍(图5、6)。

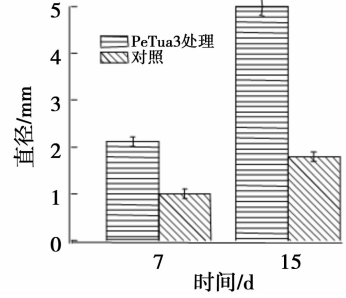


图5 拟南芥上胚轴粗度对比

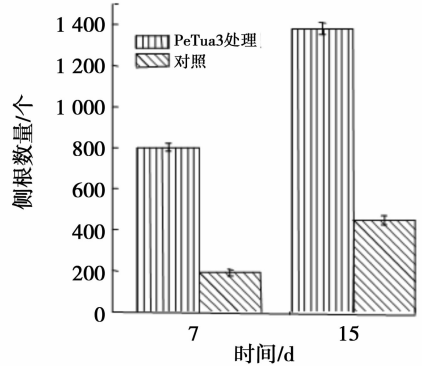
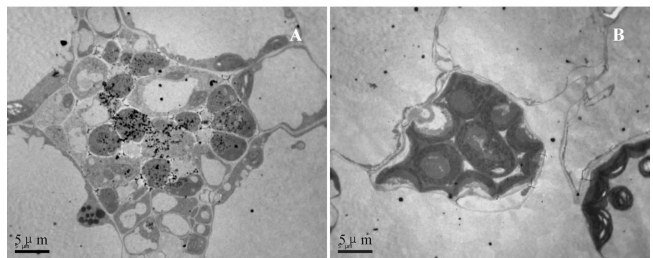


图6 拟南芥侧根数量对比

为了解是由于细胞数量增加还是细胞体积增大导致了拟南芥上胚轴和根增粗,取处理 15 d 的拟南芥上胚轴和根,同时取未处理拟南芥的相同部位作为对照,制作超薄切片。透射电镜观察结果显示:处理的拟南芥上胚轴的维管束细胞数量增多,体积增大,均约是对照的 2 倍,并且维管束细胞层数增多,大约为 7 层细胞层,而对照的细胞层为 3 层(图7);处理的拟南芥主根维管束细胞数量增多,体积增大,分别约是对照的 2 倍;细胞层数增多,大约为 9 层细胞层,而对照的细胞层为 7 层(图8)。

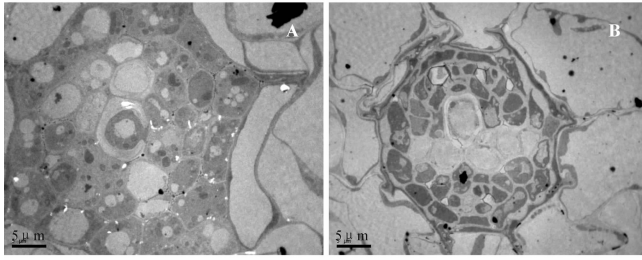


A: 处理; B: 野生型对照

图7 拟南芥上胚轴横切面电镜观察

### 3 讨论

植物细胞的伸长生长是植物生长发育过程中的重要环节,在这一环节中,微管骨架发挥着重要的生



A: 处理; B: 野生型对照

图8 拟南芥主根对比电镜观察

理功能,如参与细胞的有丝分裂、细胞内物质运输、细胞壁构建、形态发生、极性建立等<sup>[14]</sup>。在高等植物中 tubulin 蛋白是最保守的蛋白之一,其中  $\alpha$  微管蛋白通常由多基因家族所编码,形成结构和功能不同的微管骨架,从而满足细胞生长的各种需要<sup>[15]</sup>,而 *Tua3* 蛋白在细胞分裂、细胞的增大及细胞壁的形成中发挥着重要的生理功能<sup>[14]</sup>。本研究从毛竹中分离的 *PeTua3* 基因属于  $\alpha$ -tubulin 基因家族,编码的蛋白为 *Tua3* 蛋白,组织特异性表达表明,*PeTua3* 基因为组成型表达,其中在根中的表达丰度最高,这与拟南芥的 *tual* 基因在根中优先表达是一致的<sup>[16]</sup>,然而 *PeTua3* 基因在毛竹体内是否具有类似的功能需要进一步证实。

为研究 *PeTua3* 基因的功能,采用了基因体外表达蛋白处理拟南芥种子的间接方式来证明。结果表明,*PeTua3* 重组蛋白具有生物活性,不同浓度的 *PeTua3* 重组蛋白对拟南芥上胚轴、主根的粗度和侧根数量的影响,表现为低浓度促进生长,高浓度抑制生长,这种作用类似于植物激素的作用<sup>[17]</sup>。以浓度  $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  的 *PeTua3* 重组蛋白处理拟南芥的表型最为明显,超薄切片观察结果证实是细胞的体积增大、数量增加导致了拟南芥上胚轴、主根增粗。同时,*PeTua3* 重组蛋白处理的拟南芥主根的维管束体积增大,细胞层数增多,这与维管束的生理作用紧密相关,维管束体积增大可以加速根毛吸收的物质向地上部分运输,为植物的快速生长提供物质基础,这意味着 *PeTua3* 基因将是未来分子育种的一个候选基因。*PeTua3* 重组蛋白在竹子体内的生物活性与生长素、BR 的生理功能可能存在一定的联系,但其是如何参与竹子细胞分裂、细胞生长及细胞壁的形成,有待通过对竹子的转 *PeTua3* 基因进行深入研究。

## 参考文献:

- [1] Staiger C J. Signaling to the actin cytoskeleton in plants [J]. *Annu Rev Plant Physiol Mol Biol*, 2000, 51(1): 257–288
- [2] Wasteney G O, Galway M E. Remodeling the cytoskeleton for growth and form; an overview with some new views [J]. *Annual Rev Bio1*, 2003, 54(31): 691–722
- [3] Carpenter J K, Kopczak S D, Snustad D P, et al. Semi-constitutive expression of an *Arabidopsis thaliana*  $\alpha$ -tubulin gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21(5): 937–942
- [4] Montolieu L, Rigau J, Puigdomenech P. A tandem of  $\alpha$ -tubulin genes preferentially expressed in radicular tissues from *Zea mays* [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 14(1): 1–15
- [5] Mathur J. Cell shape development in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(12): 583–590
- [6] Thitamadee S, Tuchiara K, Hashimoto T. Microtubule basis for left-handed helical growth in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 2002, 417(9): 193–196
- [7] Gao Zhimin, Li Xueping, Li Lubin, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. *Chinese Forestry Science and Technology*, 2006, 5(3): 52–54
- [8] Peng Z H, Lu T T, Li L B, et al. Genome-wide characterization of the biggest grass, bamboo, based on 10,608 putative full-length cDNA sequences [J]. *BMC Plant Biology*, 2010, 10(6): 1–13
- [9] 高志民, 彭镇华, 李雪平, 等. 毛竹苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及组织特异性表达分析[J]. *林业科学研究*, 2009, 22(3): 449–453
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408
- [11] 马歇克 D R, 门永 J T, 布格斯 R R, 等. 蛋白质纯化与鉴定实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 141–151
- [12] 徐是雄. 植物材料的薄片切片超薄切片技术[M]. 北京: 北京大学出版社, 1981: 4–15
- [13] 高志民, 刘成, 刘颖丽, 等. 毛竹捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *cab-PhE1* 的克隆与表达分析[J]. *林业科学*, 2009, 45(3): 145–149
- [14] McKean P G, Vaughan S, Gull K. The extend tubulin superfamily [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114(15): 2723–2733
- [15] Kopczak S D, Haas N A, Hussey P J, et al. The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed  $\alpha$ -tubulin genes [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(5): 539–547
- [16] Carpenter J L, Ploense S E, Snustad D P, et al. Preferential expression of an  $\alpha$ -tubulin gene of *Arabidopsis* in pollen [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(5): 557–571
- [17] Paul A, Lal L, Ahuja P S, et al. Alpha-tubulin (*CsTUA*) up-regulated during winter dormancy is a low temperature inducible gene in tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(4): 3485–3490