

张丽丽, 徐碧玉, 刘菊华, 等. 香蕉 *MaASR1* 基因的生物信息学分析及原核表达[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1129-1135.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.026

香蕉 *MaASR1* 基因的生物信息学分析及原核表达

张丽丽¹, 徐碧玉¹, 刘菊华¹, 贾彩红¹, 张建斌¹, 金志强^{1,2}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所/农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 海口 571101; 2. 中国热带农业科学院海口实验站/海南省香蕉遗传育种改良重点实验室, 海南 海口 570102)

摘要: 为了深入研究 *MaASR1* 基因的分子生物学功能, 利用 RT-PCR 技术从拟南芥转基因株系 L14 中克隆到 *MaASR1* 基因的 cDNA 序列, 该序列含有 1 个 432 bp 的开放阅读框, 编码 143 个氨基酸的蛋白质, 并对该序列进行了生物信息学分析。将该基因克隆到原核表达载体 PET-30a 中, 经酶切和测序鉴定后, 将正确的重组质粒 pET30a-*MaASR1* 导入大肠杆菌 BL21(DE3), 成功构建了该基因的原核表达载体。利用所构建的原核表达载体进行原核表达, 经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 电泳检测, 结果表明表达蛋白质与预期蛋白质大小基本一致。利用 Ni 柱亲和层析方法进一步获得了纯度较高的重组蛋白质, 并用 Western blot 方法确定此重组蛋白质为目的蛋白质。

关键词: *MaASR1* 基因; 原核表达; 生物信息学; 蛋白质纯化

中图分类号: S668.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-1129-07

Bioinformatics analysis and prokaryotic expression of *MaASR1* gene from banana

ZHANG Li-li¹, XU Bi-yu¹, LIU Ju-hua¹, JIA Cai-hong¹, ZHANG Jian-bin¹, JIN Zhi-qiang^{1,2}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Haikou 571101, China; 2. Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Hainan Provincial Key Laboratory for Genetics and Breeding of Banana, Haikou 570102, China)

Abstract: In order to study the molecular biological function of *MaASR1* gene, the cDNA sequence of *MaASR1* from *Arabidopsis thaliana* transgenic line L14 was cloned by RT-PCR. The open reading frame of *MaASR1* was 432 bp in length, which encoded 143 amino acids sequence. The sequence was analyzed by bioinformatics. *MaASR1* gene was inserted into the prokaryotic expression vector PET-30a. After confirmation by digestion and sequencing, the recombinant plasmid pET30a-*MaASR1* was transformed into *Escherichia coli* strain BL21(DE3). The recombinant protein with the predicted molecular weight was successfully induced to express using IPTG and was detected and confirmed by SDS-PAGE and Western blot. The highly purified recombinant protein was obtained by Ni affinity chromatography.

Key words: *MaASR1* gene; prokaryotic expression; bioinformatics; protein purification

收稿日期: 2017-07-03

基金项目: 转基因生物新品种培育国家科技重大专项(2016ZX08012005-007); 国家香蕉产业技术体系品种改良项目(CARS-31); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(1630052017012)

作者简介: 张丽丽(1984-), 女, 山东滨州人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物分子遗传学研究。(Tel) 0898-66894828; (E-mail) zhanglili@itbb.org.cn

通讯作者: 金志强, (E-mail) jinzhiqiang@itbb.org.cn

脱落酸、胁迫、成熟-响应蛋白质(ABA-, stress-, ripening-induced protein, ASR)是一类亲水性小分子量的植物特异性蛋白质, 香蕉 ASR 基因家族包含至少 4 个成员, 它们有 2 个外显子、1 个内含子, 存在 1 个 ABA/WDS(abscisic acid/water deficit stress)的氨基酸结构域(PF02496)^[1-2]。一些 ASR 蛋白质包含一个锌指 DNA 结合域^[3], 可以以单体或者同源二聚

体的形式与 DNA 结合。

目前的研究结果表明,ASR 基因的功能主要是调控植物生长发育,包括衰老、果实成熟、花粉成熟和葡萄糖代谢等^[4-5]。ASR 具有转录因子和胚胎晚期富集蛋白(LEA)的基本特征,在植物响应生物胁迫^[6]、非生物胁迫^[7-12]方面发挥着重要作用。

MaASR1 基因在香蕉根、叶和果实中的表达量较高,说明 *MaASR1* 基因的表达有一定的器官特异性。前人的研究表明当对香蕉植株进行盐和干旱胁迫时,*MaASR1* 基因在根部和叶片中的表达量大幅上升,而进行低温胁迫时,*MaASR1* 基因表达量没有明显变化,这说明 *MaASR1* 基因主要参与植物在面临干旱和盐胁迫时的应答反应,对低温胁迫不敏感^[13]。转 *MaASR1* 基因拟南芥株系 L14 在干旱和盐胁迫条件下的存活率均优于野生型拟南芥植株^[13]。并且在转 *MaASR1* 基因拟南芥株系中,*MaASR1* 基因的表达量越大,则该株系表现出来的抗旱能力越强^[13-14]。这些证据都说明 *MaASR1* 基因的转入能够提高拟南芥的抗旱性和抗盐性^[13]。

为了对与 *MaASR1* 蛋白质直接相互作用的基因元件进行体外验证,得到与 *MaASR1* 蛋白质结合的特异 DNA 序列,本研究对从香蕉果实的 cDNA 文库中获得的 1 个 ASR 基因(*MaASR1*, 登录号为 AY628102)^[15]进行生物信息学分析,然后利用 RT-PCR 技术从拟南芥 *MaASR1* 转基因株系 L14 中克隆香蕉 *MaASR1* 基因的 cDNA 序列,再将 *MaASR1* 基因插入表达载体 pET-30a 构建原核表达载体 pET30a-*MaASR1*,用 IPTG 诱导 *MaASR1* 蛋白质的表达,为凝胶阻滞实验(EMSA)提供纯化的 *MaASR1* 蛋白质,进而为探索 *MaASR1* 的分子生物学功能奠定基础,特别是为 *MaASR1* 作为转录因子的调控机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, Columbia ecotype)购自 Arabidopsis Biological Resource Center (Ohio university, Ohio state, USA)。转 *MaASR1* 基因拟南芥 L14 由本实验室前期工作人员转化所得^[13]。表达载体 pET-30a、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 BL21(DE3)菌株均由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 *MaASR1* 的生物信息学分析 用 DNAMAN 软件对 *MaASR1* 进行核苷酸序列分析,通过 ProtParam 分析其理化性质,根据 NCBI 的 BLAST (Find conserved domains in your sequence)对 *MaASR1* 氨基酸序列的保守结构域进行分析,用 SOPMA 对 *MaASR1* 的氨基酸序列进行二级结构预测,通过 SWISS-MODEL 软件对 *MaASR1* 的氨基酸序列进行蛋白质三维结构的同源建模,采用 ProtScale 软件进行亲水性/疏水性预测,用 NetPhos 2.0 Server 软件对 *MaASR1* 的氨基酸序列进行潜在磷酸化位点分析。

1.2.2 引物设计与合成 根据已发表的 *MaASR1* 序列,用 Primer premier 5.0 设计特异引物,序列如下: F: 5'-CGGAATTCCGTCGCAAACCACTGTTTC-3'; R: 5'-CGGTCGACACCAAGCATCCCACACTCA-3', 5' 端带有 *EcoR* I 酶切位点,3'端带有 *Sal* I 酶切位点。

1.2.3 香蕉 *MaASR1* 基因的扩增及测序 以拟南芥 *MaASR1* 转基因株系 L14 的 cDNA 为模板,用带有酶切位点的引物,扩增 *MaASR1* 基因。扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 50 s,共 35 个循环。将扩增到的 *MaASR1* 基因回收后连接到载体 pMD19-T simple vector 上,连接体系(10 μl)为 Solution I 5 μl +目的片段 4 μl +pMD19-T simple vector 1 μl 。转化大肠杆菌感受态 Trans5 α Chemically Competent Cell 后,送至英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序验证。

1.2.4 原核表达载体的构建 将 PET-30a 表达载体和 pMD19-T simple vector 分别进行双酶切,酶切反应体系(50 μl)为 10 \times FastDigest buffer 5 μl +*EcoR* I 2 μl +*Sal* I 2 μl +PET-30a /pMD19-T simple vector 20 μl +ddH $_2$ O 21 μl ,混匀后,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,水浴 1 h,之后电泳鉴定。回收载体片段和目的基因。随后将目的基因片段与表达载体 PET-30a 进行连接,连接体系(20 μl)为 *MaASR1* 基因酶切回收产物 10 μl +PET 30a 酶切回收产物 3 μl +T4 Ligase 2 μl +10 \times T4 Ligase buffer 2 μl +ddH $_2$ O 3 μl ,充分混匀,16 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。然后将连接产物转化 *E.coli* Rosetta(DE3),提取质粒进行双酶切鉴定,双酶切体系(20 μl)为 10 \times FastDigest buffer 2 μl +重组质粒 5 μl +*EcoR* I 1 μl +*Sal* I 1 μl +ddH $_2$ O 11 μl ,同时将含有重组质粒的菌液送至英潍捷基(上海)贸易有限公司进行测序鉴定。

1.2.5 工程菌的诱导和表达 挑取含重组质粒的

单菌落,接种于 LB 液体培养基中(其中 Kan 浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$),接种后放置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床中(转速 220 r/min)培养。当菌液培养至 OD_{600} 值介于 0.6 和 0.8 之间时,吸取 1 ml 未诱导的菌液,迅速在室温下以 12 000 r/min 离心 1 min,收集菌体(作为阴性对照);在剩下的菌液中加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L,诱导培养,加入 IPTG 后每隔 1 h 取出 1 ml 菌液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,12 000 r/min 离心 1 min,弃上清后收集菌体,将得到的沉淀重悬于 50 μl 2 \times 上样缓冲液,沸水浴中加热 5 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000 r/min 离心 5 min,吸取 10 μl 上清液于 12% SDS-PAGE 凝胶中进行电泳分析。

1.2.6 Western blot 鉴定 将蛋白质从 SDS-PAGE 胶上转移到 NC 膜上,用 60 mA 电流转膜 1 h。然后

将膜放置培养皿中用去离子水漂洗,之后在封闭液中过夜封闭。封闭完成后再浸洗 3 次。之后加入稀释 1 000 倍的 *MaASR1* 抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。一抗孵育结束后,再洗膜 3 次,每次 10 min。然后加入稀释 5 000 倍的羊抗兔二抗,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 2 h。二抗孵育结束后,洗膜 3 次,每次 10 min。最后加入显色剂显色,拍照保存。

2 结果与分析

2.1 香蕉 *MaASR1* 基因生物信息学分析

MaASR1 基因序列分析结果(图 1)表明,该基因全长 683 bp,其中 5'非编码区 64 bp,3'非编码区 142 bp,开放阅读框 432 bp,共编码 143 个氨基酸。起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAG。

```

1  TCGGCCATTACGGCCGGGGACAGCCACCCGTCGCAAACCACTGTTTCAGTCTTACCTGCA
61  AAAGATGGCCGAGGAGAAGCACCACCACCGCTCTTCCACCACCACAAGGAGGAGAAGCC
21  M A E E K H H R L F H H H K E E K P
121 CGCGGAGGAGGTGATATACTCCGAGACAGCCTACTCCGGCGGCGATGACTACGCCTCGGG
41  A E E V I Y S E T A Y S G G D D Y A S G
181 CTACACCGAGACTGTCTGTCGCCGAGTCGGCTTCCGATGAGTACGAGAAGTACAAGAAGGA
61  Y T E T V V A E S A S D E Y E K Y K K E
241 AGAAGATCACAAGCACAAGGAGCACCTCGGCGAGATGGGCGCTGTGCGCCGCGGTGC
81  E K H H K H K E H L G E M G A V A A G A
301 CTTTGCTCTGTACGAGAAGCAGGCGAAGAAGGACCCCGATCACGCCACAAGCACAA
101 F A L Y E K H E A K K D P D H A H K H K
361 GATCGAGGAGGAGATCGCTGCAGCGGTGGCGGTTGGCAGCGGAGGCTATGCCTTCCACGA
121 I E E E I A A A V A V G S G G Y A F H E
421 GCACATGAGAAGAGGGATGCCAAGAACGAGCGGAGGAAGCGAGCGGAAAGAAGCATCA
141 H H E K R D A K N E A E E A S G K K H H
481 CCACCATCTCTTTAGGGGCTGCCCTCTGATCGGCTTCCGTGTCTGCACCAAATAAGTT
161 H H L F *
541 GAGGCTGGCTTGTCTATGATGGCCTTGGCTGTACAATAATTGGGTGCATGTGTTATGTGA
601 AATAGACTTGTGTTGAGTGTGGGATGCTTGGTACTTTTGTGTTTTTTTCTTTTATCCTTG
661 TATCAAAAACCTTAAAAATAAG

```

ATG 为起始密码子; * 表示终止密码子 TAG; 左侧数字分别为核苷酸和氨基酸序号。

图 1 *MaASR1* 基因的核苷酸序列和推测的氨基酸序列

Fig.1 cDNA sequence and deduced amino acid sequence of *MaASR1*

通过 ProtParam 分析 *MaASR1* 的理化性质,分析结果表明, *MaASR1* 蛋白质分子质量约为 1.626×10^4 , 理论等电点为 5.99, 预测分子式为 $\text{C}_{715}\text{H}_{1062}\text{N}_{210}\text{O}_{225}\text{S}_2$, 不稳定系数为 43.12 (40 以下为稳定蛋白质)。对 *MaASR1* 蛋白质中相对含量较多的氨基酸数量和所占的百分数进行统计,结果显示谷氨酸(Glu) 25 个(占 17.5%), 丙氨酸(Ala) 21 个(占 14.7%), 组氨酸(His) 21 个(占 14.7%), 赖氨酸(Lys) 18 个(占 12.6%), 甘氨酸(Gly) 10 个(占 7.0%)。带负电荷的残基(Asp + Glu)总数为 31, 带正电荷的残基(Arg + Lys)总数为 20。总平均亲水系数为 -1.238, 预测该蛋白质为亲水性蛋白质, 其脂肪指数为 45.94。

氨基酸序列的保守结构域分析结果(图 2)显示,该基因具有 ASR 家族典型的保守结构域 ABA_WDS。用 TMHMM-2.0 对 *MaASR1* 的氨基酸序列进行分析,结果表明该蛋白质没有跨膜结构域。

将 *MaASR1* 与其他植物的 ASR 氨基酸序列进行同源性比较分析,发现在 *MaASR1* 序列中有 2 个较为保守的区域,在 N 端和 C 端各有 1 个。N 端有依赖于 Zn^{2+} 的 DNA 结合位点,而 C 端则有一个核定位信号^[13]。 *MaASR1* 和其他作物 ASR 的系统发育树表明, *MaASR1* 与水稻 OsASR 和玉米 ZmASR1 这些单子叶植物中的同源基因亲缘关系较近,而与番茄中 3 个 ASR 基因以及马铃薯 ASR 基因的亲缘关系较远^[13]。

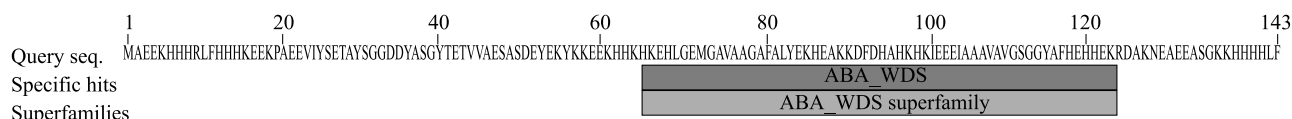


图2 MaASR1 氨基酸序列的保守结构域

Fig.2 Conserved domains of amino acid sequences of MaASR1

对于蛋白质亲水和疏水性的分析有利于对蛋白质二级结构及功能域的预测。利用 ProtScale 软件对 MaASR1 进行亲水性和疏水性预测,结果(图3)表明该蛋白质氨基酸分值较低,推测 MaASR1 属于亲水性蛋白质,整体上亲水性氨基酸数量多于疏水性氨基酸数量,并且均匀地分布在整个肽链中。

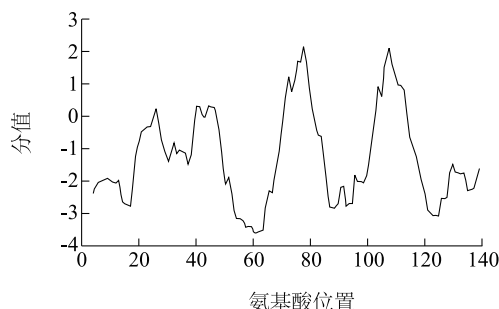


图3 香蕉 MaASR1 蛋白质亲水/疏水性预测结果

Fig.3 The prediction of hydrophilicity hydrophobicity of banana MaASR1 protein

二级结构主要指多肽链依赖氢键排列成在一维方向上具有周期性结构的构象,对 MaASR1 蛋白质二级结构的预测和分析有助于我们认识蛋白质的空间结构。采用 SOPMA 软件预测 MaASR1 蛋白质的二级结构,结果(图4)显示组成 MaASR1 蛋白质多肽链的二级结构主要有 4 种类型,分别为 α -螺旋(55.24%)、 β -转角(5.59%)、延伸链结构(10.49%)以及无规则卷曲(28.67%),以 α -螺旋和无规则卷曲为主。

通过 SWISS-MODEL 软件对 MaASR1 的氨基酸序列进行蛋白质三维结构的同源建模,获得其氨基酸序列的预测三维结构(图5)。

磷酸化和去磷酸化在多种真核细胞的新陈代谢、细胞分裂以及信号转导等方面都发挥着至关重要的作用。我们通过 NetPhos 3.1 Server 软件对 MaASR1 的氨基酸序列进行潜在磷酸化位点的分析。结果(图6)显示 MaASR1 的氨基酸序列潜在的磷酸化位点分别位于丝氨酸 Ser(共 7 个;第 26、31、

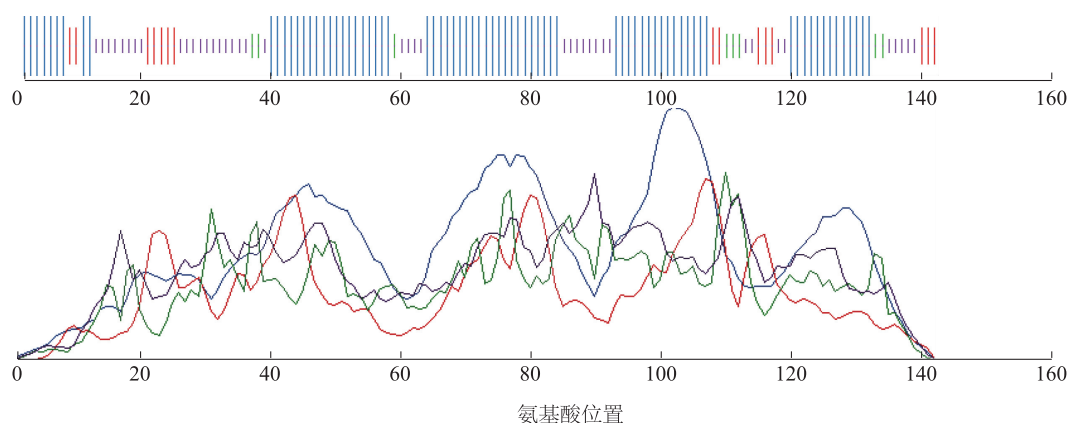
38、48、50、112、134 个氨基酸)、苏氨酸 Thr(共 1 个;第 43 个氨基酸)和酪氨酸 Tyr(6 个;第 25、30、36、40、53、56 个氨基酸)上。该结果说明, MaASR1 能够被丝氨酸激酶、苏氨酸激酶和酪氨酸激酶所磷酸化,这些残基上具有游离的羟基,且本身不带电荷,当发生磷酸化作用后,蛋白质便具有了电荷,从而使结构发生变化,进一步引起蛋白质活性的变化,从而实现其功能的调控。

2.2 香蕉 MaASR1 蛋白质的原核表达

提取拟南芥 *MaASR1* 转基因株系 L14 的 RNA,以反转录后合成的 cDNA 为模版,经 PCR 扩增后得到含有完整编码区的目的基因 *MaASR1*,琼脂糖凝胶电泳验证片段长度为 604 bp(图7)。

将克隆到的 *MaASR1* 基因连接到 T 载体上,经测序公司鉴定序列正确后,将含有 *MaASR1* 基因的大肠杆菌质粒用 *EcoR* I 和 *Sal* I 在 37 °C 条件下进行双酶切,凝胶电泳回收 *MaASR1* 基因片段后,将其连接到 pET 30-a 载体上。再提取阳性质粒进行 *EcoR* I / *Sal* I 双酶切鉴定(图8)。将阳性质粒进行测序鉴定,结果表明测序得到的碱基序列与已有基因登录号的 *MaASR1* 基因序列完全一致,说明原核表达载体 pET 30a-*MaASR1* 构建成功。

将含有 pET30a-*MaASR1* 的菌液培养至 OD 值为 0.6,然后加入不同浓度(0.01 mmol/L、0.02 mmol/L、0.04 mmol/L 和 0.08 mmol/L)的 IPTG 分别诱导 5 h。收集 IPTG 诱导后的菌液菌体,进行超声波破碎,取沉淀用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 *MaASR1* 的表达情况,结果表明原核表达的 MaASR1 蛋白质分子量大小约为 1.4×10^4 。从图9中可以看出,当 IPTG 诱导浓度为 0.02 mmol/L 时,目的蛋白的表达量与没有经过 IPTG 诱导的阴性对照样品相比较已经有了比较明显的升高,0.02 mmol/L IPTG 诱导后的蛋白质表达量与 0.04 mmol/L、0.08 mmol/L 没有明显差异。所以 0.02 mmol/L 的 IPTG 诱导浓度为最佳诱导浓度。



竖线从长到短依次为 α -螺旋、延伸链结构、 β -转角、无规则卷曲。

图4 *MaASR1* 的二级结构预测

Fig.4 The secondary structure prediction of *MaASR1*



图5 *MaASR1* 的三级结构预测模型

Fig.5 Model of tertiary structure prediction of *MaASR1*

将含有 pET30a-*MaASR1* 表达载体的菌液培养至 OD 值为 0.6, 然后加入 0.02 mmol/L IPTG, 分别诱导 2 h、3 h、4 h 和 5 h。收集经不同时间 IPTG 诱导后的菌液, 进行超声波破碎, 取沉淀用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 *MaASR1* 的表达情况。结果表明随着 IPTG 诱导时间的延长, *MaASR1* 蛋白质的表达量逐渐上升, 当诱导时间为 5 h 时 *MaASR1* 蛋白质的表达量最大(图 10)。

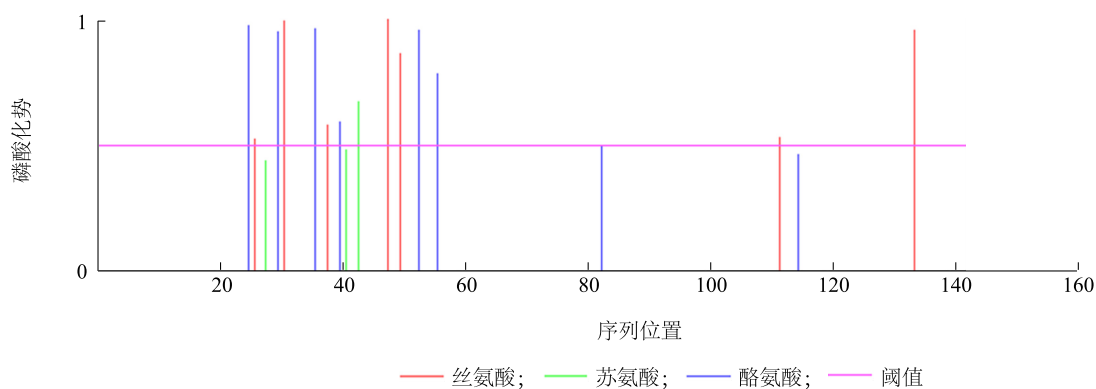


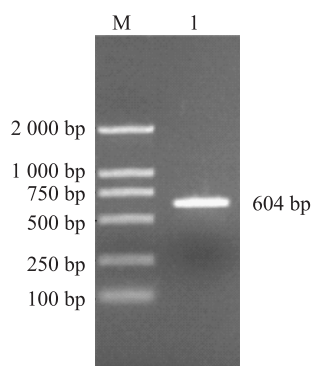
图6 香蕉 *MaASR1* 的磷酸化位点预测

Fig.6 The prediction of phosphorylation sites of banana *MaASR1*

将在最佳条件 0.02 mmol/L IPTG 诱导 5 h 时的菌液离心收集菌体, 然后将得到的包涵体沉淀用超声波破碎。破碎后的包涵体沉淀洗涤后溶于尿素溶液中, 之后离心吸取上清液。用细菌过滤器过滤后上样于 Ni-Agarose 亲和层析柱, 用洗脱液洗脱, 将收集到的 *MaASR1* 蛋白质进行 SDS-PAGE(图 11)和 Western(图 12)验证, 结果表明得到的蛋白质即为重组蛋白质。

3 讨论

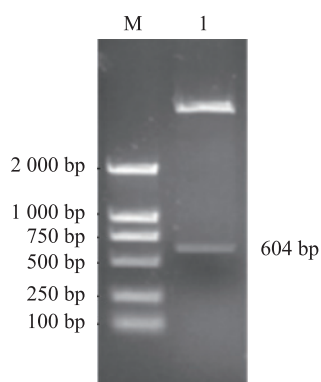
作为一种重要的水果作物, 香蕉的产量不仅在经济上至关重要, 还关系到许多农民的生计问题。ASR 蛋白质是改善提高香蕉品质的候选蛋白质, mRNA1 在渗透胁迫下表达水平显著上调^[16]。并且 ASR 基因可以影响果实的产量, 玉米 ASR 基因



M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: PCR 产物。

图 7 *MaASR1* 基因的 PCR 扩增验证

Fig.7 PCR amplification of *MaASR1* gene



M: DNA 分子量标准 DL2000; 1: 酶切产物。

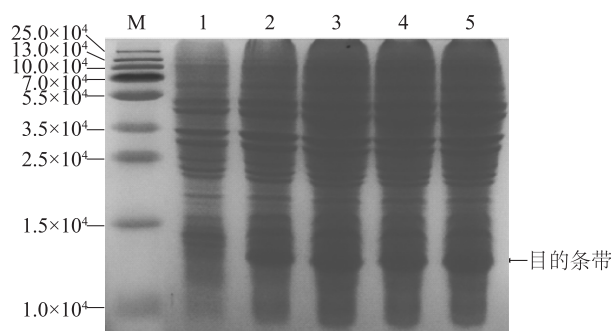
图 8 原核表达载体 pET30a-*MaASR1* 双酶切鉴定

Fig. 8 The identification of prokaryotic expression vector pET30a-*MaASR1* by double enzyme digestion

(*ZmASR1*) 的异位表达对玉米产量有很大的影响, *ZmASR1* 对支链氨基酸生物合成基因的调节可能有助于改善玉米的产量^[17]。

香蕉 *MaASR1* 基因的生物信息学分析结果表明, 该基因全长 683 bp, 其中 5' 非编码区 64 bp, 3' 非编码区 142 bp, 开放阅读框 432 bp, 共编码 143 个氨基酸。本研究利用生物信息学的方法对 *MaASR1* 基因进行基因结构、编码的氨基酸序列、蛋白质二级结构和三级结构、蛋白质理化性质、氨基酸序列的保守结构域等方面进行了全方位的预测和分析。

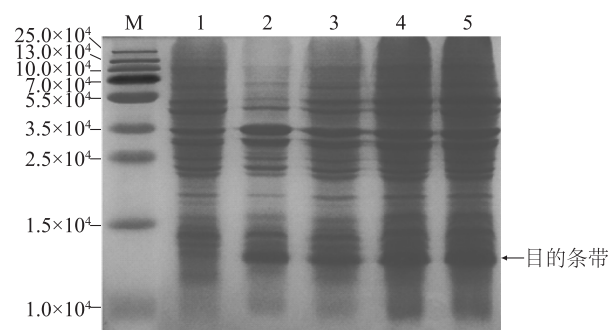
以拟南芥 *MaASR1* 转基因株系 L14 的 cDNA 为模板克隆得到含有 *MaASR1* 完整阅读框的序列, 构建原核表达载体 pET30a-*MaASR1* 进行原核表达, 研究了 pET30a-*MaASR1* 在大肠杆菌 Rosetta(DE3) 中的表达与蛋白质纯化方法, 通过试验获得了优化的诱导条



M: 蛋白质分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导的阴性对照; 2~5: IPTG 浓度分别为 0.01 mmol/L、0.02 mmol/L、0.04 mmol/L 和 0.08 mmol/L。

图 9 不同浓度 IPTG 诱导的 *MaASR1* 原核表达

Fig.9 Prokaryotic expression of *MaASR1* induced by different concentrations of IPTG



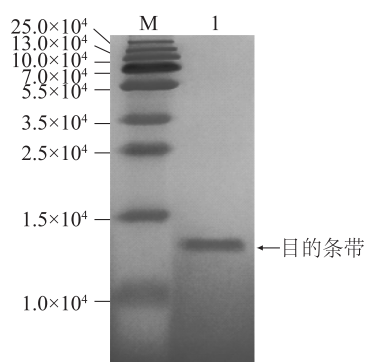
M: 蛋白质分子量标准; 1: 未经 IPTG 诱导的阴性对照; 2~5: 分别为 0.02 mmol/L IPTG 诱导 2 h、3 h、4 h 和 5 h。

图 10 不同诱导时间的 *MaASR1* 原核表达

Fig.10 *MaASR1* prokaryotic expression induced by IPTG for different times

件。外源基因能否在大肠杆菌中正确表达, 受很多因子的影响, 例如目的基因本身的特性、诱导温度和诱导时间等。由于不同诱导条件在一定程度上决定了目的蛋白质的最终得率, 因此优化目的蛋白质的诱导表达条件非常必要。本试验中, IPTG 的诱导浓度对目标蛋白质的表达影响不明显, 但诱导时间对目的蛋白质的表达有明显影响。目的条带用 Ni-Agarose 亲和层析柱纯化后进行 SDS-PAGE 电泳分析, 结果表明没有出现非特异性条带, 纯化效果良好。

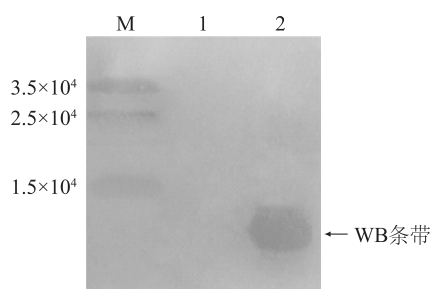
通过染色质免疫共沉淀技术 (Chromatin immunoprecipitation, ChIP)^[18-19] 可以得到 *MaASR1* 作为转录因子所直接调控的基因, 但由于 DNA 质量和片段长短不同导致的扩增效率差异, 基因组的重复程



M:蛋白质分子量标准;1:纯化后 *MaASR1* 蛋白质。

图 11 经镍柱亲和层析纯化后表达蛋白质 *MaASR1* 的 SDS-PAGE 分析

Fig.11 SDS-PAGE analysis of expressed *MaASR1* protein after Ni-agarose affinity chromatography



M:蛋白质分子量标准;1:阴性对照;2:*MaASR1* 纯化蛋白质。

图 12 *MaASR1* 纯化蛋白质的 Western blot 鉴定

Fig.12 Western blot identification of *MaASR1* purified protein

度以及测序和序列比对过程中的错误都会引入系统误差造成假阳性^[20],所以该技术得到的基因需要进行体外凝胶阻滞实验(EMSA)的验证。通过原核表达获得的纯化 *MaASR1* 蛋白质可用于 EMSA 验证。

参考文献:

- [1] CANEL C, BAILEY-SERRES J N, ROOSE M L. Pomelo fruit transcript homologous to ripening-Induced genes [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108(3): 1323-1324.
- [2] PADMANABHAN V, DIAS D M, NEWTON R J. Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35(6): 801-807.
- [3] KALIFA Y, GILAD A, KONRAD Z, et al. The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein [J]. *Biochem J*, 2004, 381: 373-378.
- [4] DOMINGUEZ P G, FRANKEL N, MAZUCH J, et al. *ASR1* medi-

ates glucose-hormone cross talk by affecting sugar trafficking in tobacco plants [J]. *Plant Physiol*, 2013, 161(3): 1486-1500.

- [5] SAUMONNEAU A, LALOI M, LALLEMAND M, et al. Dissection of the transcriptional regulation of grape *ASR* and response to glucose and abscisic acid [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(3): 1495-1510.
- [6] LIU H Y, DAI J R, FENG D R, et al. Characterization of a novel plantain *Asr* gene, *MpAsr*, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and abiotic stresses [J]. *J Integr Plant Biol*, 2010, 52(3): 315-323.
- [7] DAI J R, LIU B, FENG D R, et al. *MpAsr* encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(7): 1219-1230.
- [8] VIRLOUVET L, JACQUEMOT M P, GERENTES D. The *ZmASR1* protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(2): 917-936.
- [9] JOO J, LEE Y H, KIM Y K, et al. Abiotic stress responsive rice *ASR1* and *ASR3* exhibit different tissue-dependent sugar and hormone-sensitivities [J]. *Mol Cells*, 2013, 35(5): 421-435.
- [10] HU W, HUANG C, DENG X, et al. *TaASR1*, a transcription factor gene in wheat, confers drought stress tolerance in transgenic tobacco [J]. *Plant Cell Environ*, 2013, 36(8): 1449-1464.
- [11] KIM I S, KIM Y S, YOON H S. Rice *ASR1* protein with reactive oxygen species scavenging and chaperone-like activities enhances acquired tolerance to abiotic stresses in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Cells*, 2012, 33(3): 285-293.
- [12] HSU Y F, YU S C, YANG C Y, et al. Lily *ASR* protein conferred cold and freezing resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2012, 49(9): 937-945.
- [13] 王 园. 香蕉 *ASR* 基因抗逆功能的研究 [D]. 海南: 海南大学, 2010.
- [14] 苗红霞, 王 园, 徐碧玉, 等. 香蕉 *MaASR1* 基因的抗干旱作用 [J]. *植物学报*, 2014, 49(5): 548-559.
- [15] 冯仁军. 香蕉果实中 ABA 相关 cDNA 克隆的筛选及其功能的初步分析 [D]. 海口: 华南热带农业大学, 2004.
- [16] CARPENTIER S C, VERTOMMEN A, SWENNEN R, et al. Sugar-mediated acclimation: the importance of sucrose metabolism in meristems [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(10): 5038-5046.
- [17] VIRLOUVET L, JACQUEMOT M P, GERENTES D, et al. The *ZmASR1* protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions [J]. *Plant Physiol*, 2011, 157(2): 917-936.
- [18] RUSK N. Reverse ChIP [J]. *Nat Methods*, 2009, 6(3): 187.
- [19] DEJARDIN J, KINGSTON R E. Purification of proteins associated with specific genomic loci [J]. *Cell*, 2009, 136(1): 175-186.
- [20] NIX D A, COURDY S J, BOUCHER K M. Empirical methods for controlling false positives and estimating confidence in ChIP-Seq peaks [J]. *BMC Bioinformatics*, 2008, 9(1): 1-9.

(责任编辑:张震林)