

余璐璐, 龚绒雪, 吕林涛, 等. 拟南芥氰丙氨酸合酶 *CYS-C1* 基因扩增及多克隆抗体制备[J]. 江苏农业学报, 2017, 33( 6 ): 1235-1241.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.06.006

## 拟南芥氰丙氨酸合酶 *CYS-C1* 基因扩增及多克隆抗体制备

余璐璐<sup>1</sup>, 龚绒雪<sup>1</sup>, 吕林涛<sup>1</sup>, 杨虹<sup>1</sup>, 裴周颖<sup>1</sup>, 徐飞<sup>1,2</sup>

(1. 武汉生物工程学院生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430415; 2. 武汉生物工程学院应用生物技术研究中心, 湖北 武汉 430415)

**摘要:** 已有研究表明, 植物自身能产生剧毒的氰化物(如 HCN), 而氰丙氨酸合酶(Cyanoalanine synthase, CAS)是植物解氰作用的关键酶, 在植物生长、发育及逆境胁迫响应过程中起重要作用。本研究通过克隆拟南芥 CAS 合酶关键基因 *CYS-C1* 全长后, 构建原核表达载体 pEASY-*CYS-C1* 并导入大肠杆菌 *E. coli* 受体细胞中进行表达。结果表明, 在大肠杆菌 *E. coli* 细胞中成功诱导出可溶性的 CYS-C1 蛋白, 其中 IPTG 最佳诱导时间为 4 h, 最佳诱导浓度为 0.2 mmol/L。原核表达的 CYS-C1 蛋白经 Ni 柱纯化并免疫新西兰白兔制备多克隆抗体, Western blot 检测结果表明, CYS-C1 蛋白多克隆抗体的特异性较好。本试验结果对于进一步开展 CAS 合酶的功能研究奠定了基础。

**关键词:** 拟南芥; 氰丙氨酸合酶; 多克隆抗体

**中图分类号:** Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1235-07

## Cyanoalanine synthase *CYS-C1* gene amplification and polyclonal antibody preparation in *Arabidopsis thaliana*

YU Lu-lu<sup>1</sup>, GONG Rong-xue<sup>1</sup>, LYU Lin-tao<sup>1</sup>, YANG Hong<sup>1</sup>, PEI Zhou-ying<sup>1</sup>, XU Fei<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science and Biotechnology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430415, China; 2. Center of Applied Biotechnology, Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430415, China)

**Abstract:** Previous study results showed that plant contained variety of cyanides such as HCN, which was toxic to the plant. However, cyanoalanine synthase was the key enzyme of cyanide detoxication in plant, which played important roles in plant growth, plant development and stress tolerance. In the present study, the full-length of *Arabidopsis CYS-C1* gene was cloned and linked to pEASY vector to construct the prokaryotic expression vector pEASY-*CYS-C1*, which was then transformed into *E. coli*. The results showed that the soluble CYS-C1 protein was induced in *E. coli*. The optimum-induced time was 4 h and the optimum-induced IPTG concentration was 0.2 mmol/L. The recombinant CYS-C1 protein was purified by nickel column. Then the purified CYS-C1 protein was injected into rabbit to prepare polyclonal antibody. Western blot detection results showed that the obtained polyclonal antibody with high specificity that could be used for further experiments.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; cyanoalanine synthase; polyclonal antibody

收稿日期: 2017-06-02

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31400242)

作者简介: 余璐璐 (1984-), 女, 湖北随州人, 硕士研究生, 主要从事植物生理生态研究。(E-mail) 785837433@qq.com

通讯作者: 徐飞, (Email) feixu501@whsw.edu.cn

氰丙氨酸合酶(Cyanoalanine synthase, CAS)是植物解氰作用的关键酶, 在植物生长、发育及逆境胁迫

迫响应过程中起重要作用<sup>[1-2]</sup>。众所周知,氰化物进入人体后析出氰离子,与细胞线粒体内氧化型细胞色素氧化酶(如细胞色素 c)的三价铁结合,阻止三价铁还原,从而导致线粒体电子传递受阻,呼吸速率下降,机体进入窒息状态<sup>[3]</sup>。

常见的氰化物分为无机氰化物和有机氰化物,前者包括有氰化钾(KCN)、氰化钠(NaCN)、氰氢酸(HCN)等;后者包括如乙腈、丙烯腈、正丁腈等,这些氰化物均属高毒类。值得注意的是,植物自身能够产生氰化物,且在不同生长发育时期及不同部位含量有较大差异。研究表明,新鲜竹笋中氰化物含量平均为 35.33 mg/kg,而笋尖的氰化物含量高达 183.43 mg/kg<sup>[4]</sup>。澳大利亚研究人员发现木薯中氰化物含量高达 262.00 mg/kg<sup>[5]</sup>。Prasad 等研究发现,高粱在抽穗期 HCN 含量也可达 66.50 mg/kg<sup>[6]</sup>。相比较而言,杏、李、梅核仁中的氰化物含量更多,其中杏仁中氰化物含量高达 4.69 g/kg<sup>[7]</sup>。

值得注意的是,植物可产氰,但同时具有耐氰特性<sup>[8]</sup>。原因之一是植物体内有交替氧化酶介导的抗氰呼吸途径,可减轻氰化物对呼吸链的抑制作用<sup>[9-10]</sup>。其次,植物含有 CAS 合酶,可将剧毒氰化物转化成无毒的氰丙氨酸,并进一步转化为天冬氨酸或天冬酰胺<sup>[11-13]</sup>。在拟南芥中,有 3 个编码 CAS 合酶蛋白的基因,分别为 *AtCYS-C1* (At3g61440)、*AtCYS-D1* (At3g04940) 和 *AtCYS-D2* (At5g28020) 基因<sup>[14-15]</sup>。从基因编码蛋白作用部位来看,CYS-D1 和 CYS-D2 蛋白主要集中在细胞质,而 CYS-C1 蛋白主要集中在线粒体,且表达量明显高于 CYS-D1 和 CYS-D2 蛋白<sup>[16-17]</sup>。由于线粒体是细胞呼吸和能量代谢的主要场所,因此 CYS-C1 蛋白被认为是植物解氰作用的关键酶。尽管如此,目前 CAS 合酶的研究大多集中在转录水平,有关其酶活性检测分析的报道较少,主要原因是该酶的活性检测须以氰化钾(KCN)和半胱氨酸(L-Cys)为底物<sup>[2]</sup>,而 KCN 为剧毒化合物,不易获得且有一定的安全隐患。因此,制备 CAS 合酶抗体将为从蛋白质水平探究其在植物生长发育中的功能奠定基础。

本试验拟通过基因克隆技术和原核表达系统表达纯化含 His 标签的 CYS-C1 蛋白,并利用纯化后蛋白免疫新西兰白兔,以期获得特异性抗 CYS-C1 的多克隆抗体。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

基因来源:野生型拟南芥(Col 型);菌株:大肠杆菌(DH5 $\alpha$ );抗体制备受体:新西兰白兔,由武汉疾病预防控制中心提供。

### 1.2 主要试剂

pEASY-Blunt-E1 原核表达载体,预染蛋白 Marker,反转录试剂盒 First strand cDNA synthesis Kit, *rTaq* 聚合酶,质粒提取试剂盒,购自北京全式金生物技术公司。蛋白纯化柱及填料(Ni-NTA Agarose),PVDF 膜,异丙基硫化- $\beta$ -D-半乳糖苷(IPTG),福氏佐剂和福氏不完全佐剂,购自 Sigma 公司。碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG,NBT/BCIP 检测试剂盒,购自北京 Solarbio 生物技术公司。

### 1.3 基因的扩增

根据 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找得到拟南芥 *CYS-C1* 基因的 CDS 序列(基因登陆号:AY0930094),设计特异性引物,以 cDNA(提取拟南芥叶片总 RNA 并反转录获得)为模板进行 PCR 扩增。上游引物:5'-ATGGCCTCTGTTTCAAG-GAG-3';下游引物:5'-CAGTCTTCCTTCATCAATCC-3'。引物合成及 PCR 产物序列测定均由武汉华大基因科技有限公司完成。

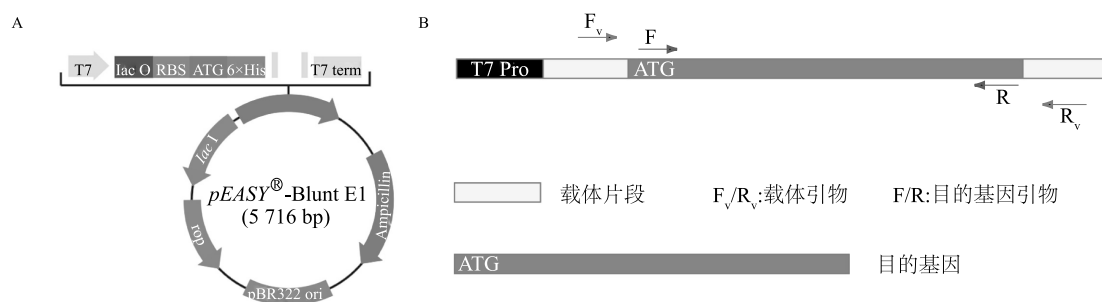
### 1.4 原核表达载体的构建及鉴定

PCR 扩增获得目的基因 *CYS-C1* 后,切胶回收目的片段,并与 pEASY-Blunt-E1 原核表达载体(图 1A)连接,命名为 pEASY-CYS-C1,具体步骤按全式金公司试剂盒说明书进行。连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,LB 培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜。

原核表达载体的鉴定:挑取单菌落,在含 50 mg/L Amp 的 LB 培养基中 37  $^{\circ}\text{C}$ ,220 r/min 振荡培养过夜,取菌液及提取质粒进行 PCR 鉴定。具体方法如图 1B 所示。

### 1.5 *CYS-C1* 基因的诱导表达及蛋白质纯化

影响大肠杆菌诱导表达的条件主要有时间和 IPTG 浓度,因此本试验采用在不同时间及 IPTG 浓度条件下进行诱导表达,确定最优条件。将鉴定正确的重组质粒 pEASY-CYS-C1 菌种按 2% 的接种量接入 10 ml 含 50 mg/L Amp 的 LB 液体培养基中。37  $^{\circ}\text{C}$ ,200 r/min 过夜活化培养。次日,将活化培养物按 1% 的接种量接入 200 ml 含 50 mg/L Amp 的 LB 液体培养



A: pEASY-Blunt-E1 载体结构示意图, 载体与目的基因通过 T/A 实现连接; B: pEASY-*CYS-C1* 原核表达载体 PCR 鉴定; 用 pEASY-Blunt-E1 载体上游引物  $F_v$  和 *CYS-C1* 基因下游引物或 pEASY-Blunt-E1 载体下游引物  $R_v$  和 *CYS-C1* 基因上游引物进行 PCR 扩增。若  $F_v/R$  或  $F/R_v$  能扩增出目的基因, 则代表目的基因连接成功, 且方向性是正确的。

图 1 重组原核表达载体的构建及鉴定

Fig.1 Construction and identification of recombinant prokaryotic expression vector

基中, 37 ℃, 200 r/min 转速摇菌培养 3~4 h, 至  $OD_{600}=0.5\sim0.7$  时取 1 ml 菌液作为诱导前样品。剩余的培养基中加入 0.4 mmol/L IPTG (异丙基- $\beta$ -D-硫代吡喃半乳糖苷), 37 ℃, 200 r/min 摇菌诱导, 诱导时间分为 1 h、2 h、3 h、4 h、5 h、6 h, 在每个时间段各取 1 ml 菌液用于检测。在确定最佳诱导时间后, 采用 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L、0.4 mmol/L、0.5 mmol/L、0.6 mmol/L、0.7 mmol/L IPTG 浓度梯度处理菌体, 以进一步确定最佳 IPTG 诱导浓度。在此基础上, 对目的蛋白进行大量诱导, 超声波破碎, 12 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤杂质后用 Ni 柱纯化蛋白质。

### 1.6 多克隆抗体的制备

取纯化后的蛋白质 (约 500  $\mu$ g) 作为抗原, 免疫接种新西兰白兔, 接种量为 1 ml。首次免疫将蛋白质与完全弗式佐剂等量乳化, 采用背部皮下多点注射。2 周后加强免疫 1 次, 共加强免疫 2 次, 并于第 2 次免疫后 1 周从耳缘静脉取血检测, 鉴定抗体效价后 1 周内颈动脉取血, 成功制备多克隆抗体。

### 1.7 Western blot 检测抗体特异性

制备的抗血清稀释 500~1 000 倍后通过 Western blot 检测抗体特异性。提取拟南芥叶片总蛋白, 经 SDS-PAGE 电泳后, 转 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, 孵育一抗过夜, PBST 漂洗 3 次 (每次 15 min) 后加入碱性磷酸酶标记的二抗孵育 2 h。PBST 漂洗 4 次 (每次 15 min) 后, 用 NBT/BCIP 显色液显影 10~15 min, 拍照记录。

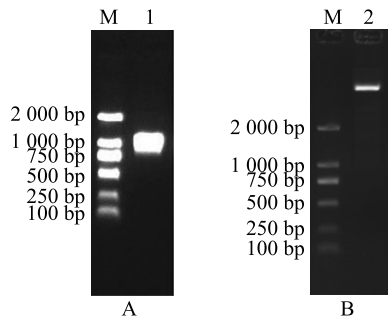
## 2 结果与分析

### 2.1 目的基因的扩增及 pEASY-*CYS-C1* 原核表达载体的构建

拟南芥 *CYS-C1* 基因 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳结果如图 2A 所示, *CYS-C1* 基因 PCR 扩增条带清晰, 浓度高, 片段大小为 1 100 bp 左右, 与预期大小一致, 表明成功获得 *CYS-C1* 基因。将目的基因切胶回收后, 与 pEASY-Blunt-E1 原核表达载体连接 (命名为 pEASY-*CYS-C1*), 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  受体细胞, 37 ℃、200 r/min 培养过夜, 挑取单克隆, 摇菌提取质粒结果如图 2B 所示。从图中可以看出, 质粒浓度高, 条带清晰, 初步表明目的基因与载体成功连接。

### 2.2 pEASY-*CYS-C1* 原核表达载体鉴定

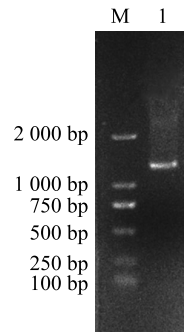
为进一步确定 pEASY-*CYS-C1* 原核表达载体是否正确, 我们接下来将上述提取的质粒进行 PCR 鉴定。结果表明, 质粒 PCR 扩增出 1 100 bp 左右大小基因片段, 与目的基因大小相同 (图 3)。此外, 将质粒送武汉华大基因科技有限公司进行测序, 并进行比对分析。结果 (图 4) 表明, 原核表达载体上目的基因序列与 *CYS-C1* 基因开放阅读框 (ORF) 完全一致, 无碱基突变及移码突变, 且与 pEASY 原核表达载体起始密码子间隔 54 个碱基对 (3 的整数倍), 表明不会影响目的基因的读码翻译。这些结果表明, pEASY-*CYS-C1* 原核表达载体构建成功, 可用于后期蛋白质诱导试验。



M: DL2000 marker; 1: 拟南芥 *CYS-C1* 基因 PCR 扩增结果; 2: pEASY-*CYS-C1* 重组质粒电泳检测结果。pEASY-Blunt-E1 为线性载体, 与目的基因 *T/A* 连接后成环, 可在受体细胞中复制。

图 2 目的基因的扩增 (A) 及重组质粒的检测 (B)

Fig.2 The gene amplification (A) and detection of recombinant plasmid (B)



M: DL2000 marker; 1: pEASY-*CYS-C1* 原核表达载体质粒 PCR 鉴定。

图 3 重组质粒的 PCR 鉴定

Fig.3 The results of PCR identification of recombinant plasmid

原核表达载体测序.seq	TAATTTTGTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATCGGGTTCTCATCATCATCATCATCGGTATGGCTAGCGAATTGGCCCTTATGCCCTCTGTT	10
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	.....ATGCCCTCTGTT	
原核表达载体测序.seq	TCAAGCAGGTTACTCAGGACAGACGATCCCTGTTTCAGCCACACCGTCAGGAACTCTCTCCACCGTTGGATCTCCTTCTTTTCTCAGAGACTCA	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	TCAAGCAGGTTACTCAGGACAGACGATCCCTGTTTCAGCCACACCGTCAGGAACTCTCTCCACCGTTGGATCTCCTTCTTTTCTCAGAGACTCA	
原核表达载体测序.seq	CAGATCTCCCAAGACTTCCCTCTACCAAGCCAAACGTCAGGCTCTCTGCTTATTCGGAAAACCCCTCTTCTGTTCTTCAACAAAGTCACTCAAGG	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	CAGATCTCCCAAGACTTCCCTCTACCAAGCCAAACGTCAGGCTCTCTGCTTATTCGGAAAACCCCTCTTCTGTTCTTCAACAAAGTCACTCAAGG	
原核表达载体测序.seq	TTGTGAAGCCTATCTTGGAGCCAAACAAACATTTCCAGCCAACTTGTAGCATTAAGACAGACCAGCTATAGCCATGATTGCAGATGCAGAGAAAGAA	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	TTGTGAAGCCTATCTTGGAGCCAAACAAACATTTCCAGCCAACTTGTAGCATTAAGACAGACCAGCTATAGCCATGATTGCAGATGCAGAGAAAGAA	
原核表达载体测序.seq	AAACTAATCATCCCTCGAAAAACAACACTGATAGAGCTTACTTCAGGAACATGCGAATCAGTTTGGCTTTCATCGCTGCTATGAAAGGTTACAGGATTA	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	AAACTAATCATCCCTCGAAAAACAACACTGATAGAGCTTACTTCAGGAACATGCGAATCAGTTTGGCTTTCATCGCTGCTATGAAAGGTTACAGGATTA	
原核表达载体测序.seq	TAATGACGATCCCTTCGTACACTAGCTTGGACAGGAGAGTACGATGAGTCCCTTTCGTCTGAGCTTCTTCTCACTGATCCAGCCAAAGGAATGGCTGG	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	TAATGACGATCCCTTCGTACACTAGCTTGGACAGGAGAGTACGATGAGTCCCTTTCGTCTGAGCTTCTTCTCACTGATCCAGCCAAAGGAATGGCTGG	
原核表达载体测序.seq	AACCTTTAAGAAAGCTTATCACTCTCTTATAGTACTTCTGATGCTTTCATCTGTGCAACACTTTCCTAATCTTCAAAACACTCAGATTCATTTTGATACA	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	AACCTTTAAGAAAGCTTATGACCTCTTATAGTACTTCTGATGCTTTCATCTGTGCAACACTTTCCTAATCTTCAAAACACTCAGATTCATTTTGATACA	
原核表达载体测序.seq	ACTGCTCCTGAGATTTGGCAAGATACACTTGCAAATCTTGATATATTTGATGCGAATTCGACGTCAGGACAGTCTCTGCTGTTTGGCCATACCTTA	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	ACTGCTCCTGAGATTTGGCAAGATACACTTGCAAATCTTGATATATTTGATGCGAATTCGACGTCAGGACAGTCTCTGCTGTTTGGCCATACCTTA	
原核表达载体测序.seq	AATCTAAAAACCCCAATGTCACATATATGGAGTGGAGCCTCTGAAAGCAACATCTCAACGCTGGCAAAACAGGTCCACATGCTATCACAGGCAATGG	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	AATCTAAAAACCCCAATGTCACATATATGGAGTGGAGCCTCTGAAAGCAACATCTCAACGCTGGCAAAACAGGTCCACATGCTATCACAGGCAATGG	
原核表达载体测序.seq	TGTTGGATTCAAACAGAAATCTTGATATGCATGTATGGAGAGTCTCTTGAGGTTAGTACGATGCTATAAAGATGGCTACAGAAATGGCAATTG	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	TGTTGGATTCAAACAGAAATCTTGATATGCATGTATGGAGAGTCTCTTGAGGTTAGTACGATGCTATAAAGATGGCTACAGAAATGGCAATTG	
原核表达载体测序.seq	AAAGAGGCTCTCATGTTTGGATATCGTCGGAGCTAACACCGTGGCAGCAATTAGACTTGGGAAAATGCCAGAGAAATAAAGGCAAACTCATTTGTACAA	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	AAAGAGGCTCTCATGTTTGGATATCGTCGGAGCTAACACCGTGGCAGCAATTAGACTTGGGAAAATGCCAGAGAAATAAAGGCAAACTCATTTGTACAA	
原核表达载体测序.seq	TTTCATCGAGCTTCGGAGAAAGATATCTGCTCTGTCTCTTTGATGAGCTGAGCAAAAGCAGACGATCAAGCCAGTTTCACTTGGATTGAGCAAG	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	TTTCATCGAGCTTCGGAGAAAGATATCTGCTCTGTCTCTTTGATGAGCTGAGCAAAAGCAGACGATCAAGCCAGTTTCACTTGGATTGAGCAAG	
原核表达载体测序.seq	GGCCAAATTCGTAGCCATACCATGATGATGATGATGAGAACCCCGCATATGTATATCTCTTCTTAAAGTTAAACAAAATATTTCTAGAGGGG	
<i>CYS-C1</i> -ORF.seq	.....	

pEASY-*CYS-C1* 原核表达载体质粒测序与 *CYS-C1* 基因开放阅读框 (ORF) 比对分析结果; 方框 ATG 为载体起始密码子。

图 4 重组质粒的测序比对结果

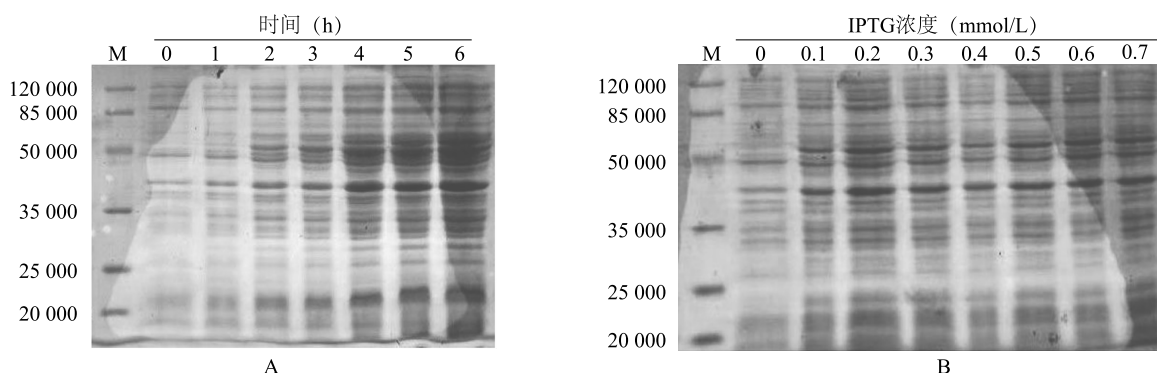
Fig.4 The results of sequencing of recombinant plasmid



### 2.3 重组蛋白的诱导表达

将含有 pEASY-CYS-CI 原核表达载体的大肠杆菌菌液在不同时间和不同 IPTG 浓度条件下进行诱导, SDS-PAGE 检测诱导蛋白质的表达量。从图 5A

可以看出, 诱导时间在 4 h 及以上, 蛋白质表达量差异不明显, 表明最佳诱导时间为 4 h。同样, 从图 5B 可以看出, 最佳 IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L, 更高 IPTG 浓度并没有增强目的蛋白的表达量。



M: 蛋白质 marker (120 000); A: 不同诱导时间对蛋白质表达的影响; B: 不同 IPTG 浓度诱导处理对蛋白质表达的影响。

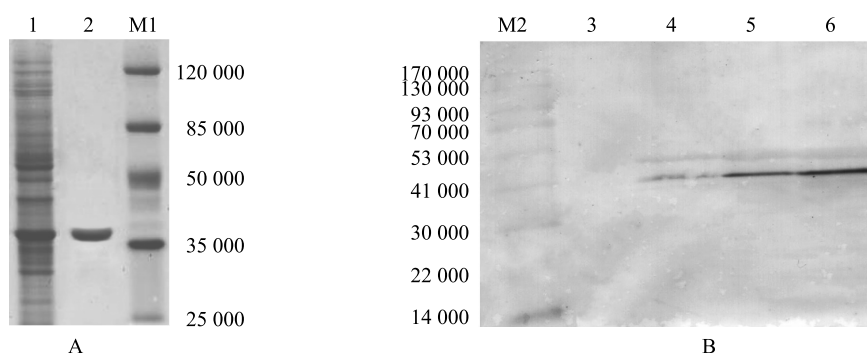
图 5 重组蛋白诱导表达结果

Fig.5 Inducible expression of recombinant protein

### 2.4 重组蛋白纯化及 Western blot 检测分析

重组蛋白经大量诱导表达后, 超声波破碎重组诱导菌的菌体, 12 000 r/min 离心 1 h, 收集上清液, 0.45  $\mu$ m 滤膜过滤杂质后用 Ni 柱纯化蛋白质。从图 6A 可以看出, 纯化的蛋白质条带清晰, 表明纯化效果较好, 可作为抗原用于免疫新西兰白兔。将免

疫获得的抗体(一抗)按 1 : 500 稀释后, 与提取的拟南芥叶片总蛋白进行 Western blot 特异性检测分析。结果表明, 抗体特异性较好, Western blot 检测显影出清晰的条带, 5~20  $\mu$ g 蛋白质上样量均能显影出目的条带(图 6B), 表明制备的多克隆抗体效价较好。



A: 重组蛋白 Ni 柱纯化结果, 洗脱用 50 mmol/L 咪唑; B: 制备抗体 Western blot 杂交结果; M1: 蛋白质 marker (120 000); 1: 重组融合蛋白大量诱导后裂解液电泳结果; 2: 融合蛋白纯化后电泳结果。M2: 蛋白质预染 marker (170 000); 3: 空白对照; 4~6 分别为提取拟南芥叶片总蛋白质不同上样量(分别为 5  $\mu$ g, 10  $\mu$ g 和 20  $\mu$ g) Western blot 杂交结果。

图 6 重组蛋白表达纯化及免疫印迹杂交

Fig.6 Purification of recombinant protein and western blot

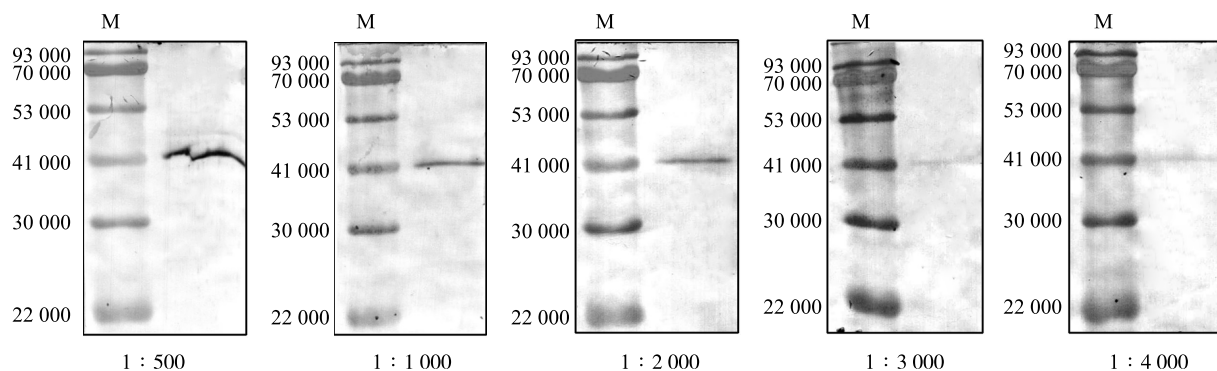
### 2.5 抗体效价分析

为进一步分析制备的血清抗体效价, 将抗血清按 1 : 500, 1 : 1 000, 1 : 2 000, 1 : 3 000 和 1 : 4 000

稀释后, 与提取的拟南芥叶片总蛋白质进行 Western blot 检测分析。从图 7 可以看出, 蛋白质上样量为 10  $\mu$ g 时, 抗血清稀释 500 至 2 000 倍后, 免疫印迹反

应均有清晰的显影条带,抗血清稀释 3 000 至 4 000 倍后,虽然显影条带较弱,但仍能检测出目的条带,

这些结果表明本试验制备的血清抗体效价较高,可用于常规的植物学研究。



M:蛋白质预染 marker(170 000);本试验中,蛋白质上样量为 10  $\mu$ g。

图 7 Western blot 检测抗血清效价结果

Fig.7 Antibody titer determination by western blot

### 3 讨论

植物产氰是一种普遍现象,迄今已发现包括蕨类、裸子及被子植物在内的 110 科 3 000 多种植物可产生氰糖苷或氰酯,已报告的氰糖苷多达 75 种<sup>[18]</sup>,这些氰化物均能转化为有毒的氰化氢(HCN)。据报道,植物产氰特性具有防止食草动物大量啃食的作用,尤其是在种子萌发和幼苗期,从而有利于植物自身的生长和发育<sup>[19]</sup>。值得注意的是,植物能产氰也能耐氰,其中氰丙氨酸合酶(CAS)是植物解氰、耐氰以及利用氰化物转化为氮源的关键酶。因此,深入研究 CAS 合酶的功能已成为国内外研究的热点。本研究通过原核表达载体的构建,制备并获得 CAS 合酶关键基因 *CYS-CI* 蛋白抗体,Western blot 检测抗体特异性较好。

对于目的基因原核表达载体的构建及表达,以往的研究多采用 pET 系列载体,如 pET28a 等。本研究通过克隆 *CYS-CI* 基因,并将其构建到原核表达载体 pEASY-Blunt-E1 质粒上,操作简单,速度快。pEASY-Blunt-E1 原核表达载体,采用 T/A 克隆方式连接目的基因,通过载体引物和基因引物即可检测基因连接方向性,检测速度快,结果准确,省去了酶切连接的时间,可大大提高原核表达载体构建效率。此外,本研究发现 pEASY-*CYS-CI* 蛋白质表达量多,且为可溶性蛋白。一般而言,原核表达蛋白质受 IPTG 浓度及诱导时间的影响。IPTG 是  $\beta$ -半乳糖苷

酶的活性诱导物质,它能够诱导外源基因的表达并普遍应用于原核表达系统,使其表达量增加<sup>[20]</sup>。IPTG 具有使表达产物稳定、易鉴定、易纯化等优点,但对于特定的外源基因,其最佳诱导条件往往有所不同。因此,对 IPTG 最佳诱导浓度和诱导时间的摸索就成为整个抗体制备过程中至关重要的一个环节。本研究结果表明,pEASY-*CYS-CI* 蛋白质最佳诱导时间为 4 h,最佳 IPTG 诱导浓度为 0.2 mmol/L。

考虑到 pEASY-Blunt-E1 原核表达载体上有 6 个 His 标签,因此在大量诱导目的蛋白后,本研究采用 Ni 柱进行融合蛋白纯化。结果表明,*CYS-CI* 融合蛋白诱导情况较好,蛋白镍(Ni)柱纯化结果较理想。目前常用的蛋白质纯化标签是 GST、His 和表位标签(如 HA,c-Myc 和 FLAG 等),其中 His 标签是目前高通量蛋白质纯化最普遍使用的亲和标签,广泛用于多种重组蛋白在各种表达系统的表达与纯化<sup>[21-23]</sup>。这主要是由于,其一,His 标签很小,不会改变目标蛋白的可溶性,且有助于融合蛋白的表达<sup>[24-25]</sup>。其二,His 标签融合蛋白一般采用固定化金属离子(如  $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  等)亲和层析进行分离纯化,具有配体简单、吸附量大、通用性强、纯化条件温和、上样条件可选择范围广等特点<sup>[24, 26]</sup>。Ni 柱纯化融合蛋白常用 Ni-NTA Agarose 和 Ni-IDA Agarose 作为亲和介质,其中 Ni-NTA Agarose 具有结合容量高,能够进行多次再生循环和耐受性强等特点。本研究

中,我们采用 Ni-NTA Agarose 进行 CYS-CI 融合蛋白纯化,结果表明蛋白质纯化效果较好,免疫兔子所获得抗体效价高。

总之,本研究通过构建拟南芥氰丙氨酸合酶关键基因 *CYS-CI* 的原核表达载体 pEASY-*CYS-CI*,诱导并纯化目的蛋白后免疫新西兰白兔,获得了效价较高的多克隆抗体,为今后进一步开展 CAS 合酶在植物生长发育及植物逆境响应过程中的功能研究奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] O'LEARY B, PRESTON GM, SWEETLOVE L J. Increased  $\beta$ -cyanoalanine nitrilase activity improves cyanide tolerance and assimilation in *Arabidopsis* [J]. *Molecular Plant*, 2014, 7(1):231-243.
- [2] 梁五生,毛碧增,李德葆.烟草叶片中氰丙氨酸合成酶活性的测定[J].植物生理学报,2001,37(2):140-142.
- [3] XU F, ZHANG D W, ZHU F, et al. A novel role for cyanide in the control of cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings response to environmental stress [J]. *Plant Cell and Environment*, 2012, 35(11):1983-1997.
- [4] 黄辉,夏学京,陈志霞.新鲜竹笋中氰化物含量测定及家庭加工方法对其含量的影响[J].职业与健康,2010,26(5):514-515.
- [5] 郑淑娟.澳大利亚研究人员在木薯里发现致命的氰化物[J].世界热带农业信息,2011(11):13.
- [6] PRASAD S, DHANYA M S. Determination and detoxification of cyanide content in sorghum for ethanol production using *Saccharomyces* [J]. *Journal of Metabolomics and Systems Biology*, 2011, 2(1):10-14.
- [7] SHRAGG T A, ALBERTSON T E, JR F C. Cyanide poisoning after bitter almond ingestion [J]. *Western Journal of Medicine*, 1982, 136(1):65-69.
- [8] 吴阳晨,徐飞,林宏辉.黄瓜幼苗对外源氰化物耐受性研究[J].四川大学学报(自然科学版),2015,52(4):917-924.
- [9] XU F, YUAN S, LIN H H. Response of mitochondrial alternative oxidase (AOX) to light signals [J]. *Plant Signal and Behavior*, 2011, 6(1):55-58.
- [10] XU F, YUAN S, ZHANG D W, et al. The role of alternative oxidase in tomato fruit ripening and its regulatory interaction with ethylene [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(15):5705-5716.
- [11] 余璐璐,曹中权,刘龙山,等.盐芥 CAS 基因的生物信息学分析及在盐胁迫下的表达[J].江苏农业科学,2015,43(7):25-29.
- [12] EBBS S D, KOSMA D K, NIELSON E H, et al. Nitrogen supply and cyanide concentration influence the enrichment of nitrogen from cyanide in wheat (*Triticum aestivum* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L.) [J]. *Plant Cell and Environment*, 2010, 33(7):1152-1160.
- [13] SIEGIEN I, BOGATEK R. Cyanide action in plants — from toxic to regulatory [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2006, 28(5):483-497.
- [14] ALVAREZ C, CALO L, ROMERO L C, et al. An *O*-acetylserine (thiol) lyase homolog with *L*-cysteine desulfhydrase activity regulates cysteine homeostasis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2009, 152(2):656-669.
- [15] 余璐璐,阳敦润,曹中权,等.拟南芥 CAS 基因的生物信息学分析及超表达载体构建[J].江汉大学学报(社会科学版),2015,43(4):150-157.
- [16] GARCIA I, CASTELLANO JM, VIOQUE B, et al. Mitochondrial  $\beta$ -cyanoalanine synthase is essential for root hair formation in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2010, 22(10):3268-3279.
- [17] GARCIA I, ROSAS T, BEJARANO E R, et al. Transient transcriptional regulation of the *CYS-CI* gene and cyanide accumulation upon pathogen infection in the plant immune response [J]. *Plant Physiology*, 2013, 162(4):2015-2027.
- [18] 梁五生,毛碧增,李帅,等.水稻种子萌发过程中氰丙氨酸合酶的活性变化与分布[J].植物生理学报,2001,27(3):243-247.
- [19] MØLLER B L, SONNEWALD U, FROMMER W B. Functional diversifications of cyanogenic glucosides [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(3):337-346.
- [20] 万小颖,秦立志,施丽娟,等.兔白细胞介素-10 基因的克隆、原核表达及其多克隆抗体的制备[J].畜牧兽医学报,2013,44(5):788-795.
- [21] RASHID Z, GHahremanzadeh R, NEJADMOGHADDAM M R, et al. Nickel-Salen supported paramagnetic nanoparticles for 6-His-target recombinant protein affinity purification [J]. *Journal of Chromatography A*, 2017, 1490:47-53.
- [22] VINCENTELLI R, CIMINO A, GEERLOF A, et al. High-throughput protein expression screening and purification in *Escherichia coli* [J]. *Methods*, 2011, 55(1):65-72.
- [23] LESLEY S A. High-throughput proteomics: protein expression and purification in the postgenomic world [J]. *Protein Expression and Purification*, 2001, 22(2):159-164.
- [24] 陈爱春,彭伟,汪生鹏.亲和标签在重组蛋白表达与纯化中的应用[J].中国生物工程杂志,2012,32(12):93-103.
- [25] CHEUNG R C, WONG J H, NG T B. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 96(6):1411-1420.
- [26] 崔超,呼延霆,尹大川.重组标签蛋白在蛋白质纯化中的研究进展[J].现代生物医学进展,2014,14(32):6372-6378.

(责任编辑:陈海霞)