

毛竹 *PsbS* 基因的克隆及其原核表达特征研究

高志民^{1*}, 于小清^{1,2}, 郑波¹, 李雪平¹, 胡陶¹

(1. 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京 100102; 2. 美国普渡大学农学系, 美国印第安纳州 47907)

摘要:采用 RT-PCR 技术从毛竹(*Phyllostachys edulis*)叶片中克隆到 1 个 *PsbS* 基因, 命名为 *PePsbS* (GenBank No. FJ600727), 其编码区为 810 bp, 编码 269 个氨基酸。序列分析表明, *PePsbS* 编码的蛋白与其它单子叶植物的 *PsbS* 蛋白有很高的相似性。蛋白结构分析表明, *PePsbS* 基因编码蛋白包含导肽部分和成熟蛋白, 其中成熟蛋白包含 4 个跨膜结构域。将 *PePsbS* 基因编码成熟蛋白的序列构建到原核表达载体 pET23a 中, 并转入大肠杆菌, 用 IPTG 进行诱导表达。结果表明, 41℃ 下诱导 4 h 的表达效果最好, 目的蛋白含量约占总蛋白的 21.5%, 分子量约为 22.0 kD。这说明温度和诱导时间明显影响 *PePsbS* 基因的表达。

关键词:毛竹; *PsbS* 基因; 克隆; 载体构建; 原核表达; 温度

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)06-0513-06

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.06.004

Cloning of *PsbS* Gene from Moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*) and Its Characterization of Prokaryotic Expression

GAO Zhi-min^{1*}, YU Xiao-qing^{1,2}, ZHENG Bo¹, LI Xue-ping¹, HU Tao¹

(1. International Center for Bamboo and Rattan, SFA Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing 100102, China; 2. Department of Agronomy, Purdue University, Indiana 47907, USA)

Abstract: *PsbS* protein plays an important role in non-photochemical quenching (NPQ) in plants. A *PsbS* gene was cloned from Moso bamboo (*Phyllostachys edulis*) leaves by RT-PCR method, which named *PePsbS* (GenBank No. FJ600727) with 810 bp in length, and encoded a polypeptide with 269 amino acids. Homology analysis showed that the deduced *PsbS* was highly homologous to those from other monocotyledon plants. The protein structure analysis indicated that *PePsbS* consists of transit peptide and mature protein including four transmembrane domains. The fragment of *PePsbS* gene encoding mature protein was constructed in multiple cloning site of pET23a and expressed in *Escherichia coli* induced by IPTG. The expression of *PePsbS* was the best under 41℃ for 4 hours, the recombinant protein accounted for 21.5% of the total proteins with molecular weight about 22 kD. It indicated that there were significant effects of temperature and IPTG induced time on protein expression.

Key words: *Phyllostachys edulis*; *PsbS* gene; Clone; Construction of expression vector; Prokaryotic expression; Temperature

植物将光能转变为化学能是通过光合作用来实现的, 不同植物的光合作用能力存在着较大差异。竹子具有速生的特点, 它对光能的利用可能具备特殊机制, 能够将光能较快地转变为化学能进而

为其速生提供能量。目前已从竹子的光合作用变化规律^[1-5]、光合固碳^[6-8]和叶绿素荧光动力学^[9]等方面都进行了大量研究, 对竹子的光合生理有了较为深入的了解。然而由于竹子遗传背景的复杂性,

收稿日期: 2011-04-01 接受日期: 2011-06-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(30972328); 林业公益性行业科研专项(200704001); 国际竹藤网络中心基本科研业务费专项基金(1632010004)资助

作者简介: 高志民, 男, 博士, 副研究员, 主要从事生物技术与功能基因组研究

* 通讯作者 Corresponding author, email: gaozhimin@icbr.ac.cn

导致对其光合作用机制的研究进展较为迟缓,目前仅获得了一些竹子光合捕光蛋白基因^[10-13]。竹子主要分布在热带、亚热带地区,在高温、强光环境下竹子对光破坏的防御分子机理研究尚属空白。

光能是植物光合作用的原初动力,光能不足会限制光合作用效率,但光能过多同样会对光合作用产生抑制作用,甚至破坏光合机构。因此,植物为了适应自然界中复杂多变的光胁迫,在其进化中除了形态适应机制外,还形成了一套生物物理和生物化学机制以最低限度地降低过剩光能的危害,如提高光合能力、热耗散、减少光吸收等,其中热耗散被认为是植物保护其光合机构免受过剩光能伤害的主要机制^[14]。由于热耗散不是把能量用于光化学反应,而是将过剩光能以热的形式耗散掉,因此也称其为非光化学淬灭(NPQ)。

有研究表明,PsbS 蛋白是能态淬灭产生的关键蛋白之一,它作为光系统Ⅱ超级复合体的蛋白组分之一是耗散过剩光能不可或缺的部分,在 NPQ 中发挥着重要作用^[15]。对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) NPQ 突变体的研究表明,天线色素蛋白复合体 PsbS 是依赖于叶黄素循环的热耗散的发生位点,推测它们可能是热耗散的组织者,或许它们由质子化引起的构象变化可引发整个捕光色素蛋白系统的结构变化进而导致热耗散^[16-17],这在拟南芥野生型(Col-0)、PsbS 缺陷型和 PsbS 过量表达植株中得到了证实^[18]。本研究以重要经济竹种毛竹(*Phyllostachys edulis*)为材料,克隆了编码 PsbS 蛋白的 *PePsbS* 基因,并对其原核表达特性进行了研究,以期为进一步认识 *PePsbS* 在竹子光保护中的作用提供分子生物学证据。

1 材料和方法

1.1 植物材料和大肠杆菌菌株

从国家林业局林木种子分公司购买毛竹(*Phyllostachys edulis*)种子,在国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室内进行培养,选取 4 个月的盆栽实生苗用于实验。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 和 BL21(DE3)由本实验室保存。

1.2 总 RNA 提取与 cDNA 合成

取新鲜毛竹叶片,采用 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 提取 RNA^[19],用 Promega 公司的反转录试

剂盒合成 cDNA。

1.3 基因的克隆、测序与分析

根据水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)等植物 *PsbS* 同源基因序列设计 PCR 引物,*PsbS*-F: 5'-ATG-GCACGGTCGATGCTTAT-3' 和 *PsbS*-R: 5'-CTACTC-TTCGTGTCGTCAGTGGTGA-3',由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以毛竹 cDNA 为模板,进行梯度 PCR,反应条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 55℃ ~ 65℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用上海申能博彩生物科技有限公司试剂盒回收,按照 Promega 的 pGEM-T easy 载体快速连接试剂盒操作流程连接到载体上,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株,经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒并经酶切图谱分析正确后,送北京三博远志科技有限公司测序。利用 DNASTar、SMART 等生物软件对获得的 cDNA 序列及其编码蛋白质的结构特点进行分析,并与 NCBI 数据库中的核酸和蛋白质进行比较。

1.4 *PePsbS* 基因重组表达载体的构建

根据原核表达载体(pET-23a)的多克隆位点和 *PePsbS* 基因编码成熟序列的酶切位点特征,选用了 *Nde* I 和 *Xho* I 进行载体构建。设计添加酶切位点的引物 *PsbS*-F1: 5'-A Acatatg GCGCGCCGGCAA-GGAAGGC-3' 和 *PsbS*-R1: 5'-ctcgagCTCTTCGTGTCGTCAGTGGTG-3',扩增产物经测序正确后,用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切后连接到 pET-23a 载体,构建重组表达载体 pET-*PePsbS*-mature。

1.5 *PePsbS* 基因的原核表达与纯化

应用电转化法将 pET-*PePsbS*-mature 转入表达宿主菌 BL21(DE3),选取单克隆,经菌落 PCR 检测正确后,培养过夜。再将细菌 100 倍稀释于含氨苄青霉素(100 mg L⁻¹)的 LB 培养基中,待菌液浓度达到 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8 时,加入 IPTG 进行诱导培养。培养后收集菌体用 1% 的 SDS 剧烈振荡破菌,15294 $\times$ g 离心 2 min,上清液进行 SDS-PAGE 电泳(5% 的浓缩胶、12% 的分离胶),考马斯亮蓝 R-250 染色检测蛋白表达情况。

取诱导过的菌液,按照 MERCK 公司提供的 His-Tag 融合蛋白纯化试剂盒[His-Bind Purification Kit (Cat. No. 70239-3)]操作,在变性条件下进行目的蛋白的纯化。

2 结果和分析

2.1 基因克隆与分析

以毛竹 cDNA 为模板,以 *PsbS*-F 和 *PsbS*-R 为引物进行 PCR 扩增,PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,经 EB 染色后,在 800 bp 左右有一条亮带(图略),与预测的基因片段大小相符,初步确定为目的基因片段。将目的基因片段回收并连接到 pGEM-T easy 载体上,送公司测序。测序结果表明,插入片段包含 1 个完整的编码区,大小为 810 bp,编码 269 个氨基酸组成的蛋白(图 1)。通过 DNASTar 软件预测,该蛋白的等电点和分子量分别为 8.929 和 28.06482 kD。用 Motif scan 在线软件分析表明,该蛋白的第 79~218 位包括 1 个典型的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白功能域,第 160~163、166~169、237~240 位为 3 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点,第 12~17、81~86、88~93、150~155、167~172、178~183、184~189、209~214、233~238 位为 9 个 N-豆蔻酰化位点,第

17~19、49~51、117~119、220~222、259~261 位为 5 个蛋白激酶 C 的磷酸化位点。经同源性比较表明,该蛋白属于叶绿素 a/b 结合蛋白超家族的成员。因此,将该基因命名为 *PePsbS* (GenBank No. FJ600727)。经在线软件 <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/> 预测,其 *PePsbS* 编码的氨基酸第 1~63 位为导肽,之后为成熟蛋白,包含了 4 个跨膜区(图 1)。

2.2 *PePsbS* 基因重组表达载体的构建

以测序正确的质粒为模板,采用高保真酶(pyrobest polymerase)进行 PCR。扩增产物的凝胶电泳结果显示,引物 *PsbS*-F1 和 *PsbS*-R1 的扩增产物在 600 bp 左右有一条清晰的亮带(图 2),与预测的基因片段大小相符。将回收的 DNA 片段加 A 后连接到 T-easy 载体上测序,结果表明插入片段大小为 632 bp,包含保护碱基 AA、酶切位点 *Nde* I 和 *Xho* I 以及成熟蛋白的编码区。以 pET-23a 为载体,用

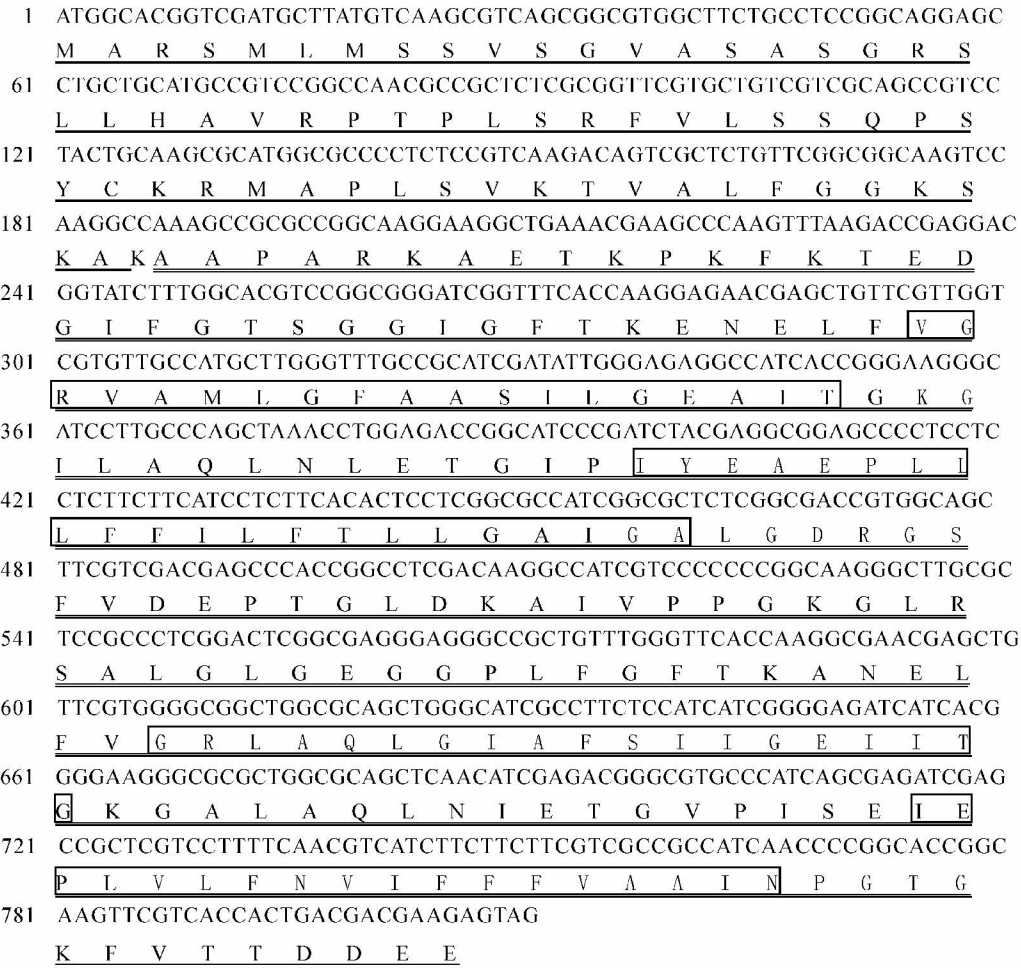


图 1 *PePsbS* 编码区核苷酸序列及其推导的氨基酸序列。___: 导肽; ==: 成熟蛋白; □: 跨膜区。
Fig. 1 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *PePsbS* cDNA. ___: Transit peptide; ==: Mature protein; □: Transmembrane region.

Nde I 和 *Xho* I 双酶切,将 *PePsbS* 基因编码成熟蛋白的序列部分(*PePsbS*-mature)直接插入到 pET-23a 载体的多克隆位点,即构建了含有 T7 启动子、*PePsbS*-mature、组氨酸序列标签(His·Tag)的原核表达载体 pET-*PePsbS*-mature(图 3)。

2.3 *PePsbS* 基因的原核转化子检测

对重组质粒进行酶切检测后,电击转化感受态细胞 BL21(DE3)。以 *PePsbS* 基因重组表达载体的单克隆菌落为模板,用 *PsbS*-F1 和 *PsbS*-R1 为引物,同时以重组质粒和水为对照。菌落 PCR 产物的电泳结果(图 4)表明,单克隆菌落含有目的基因片段,可用于蛋白的诱导表达实验。

2.4 *PePsbS* 基因的原核表达

2.4.1 温度对表达的影响

按照高志民等^[13]的方法接种单克隆,分别在

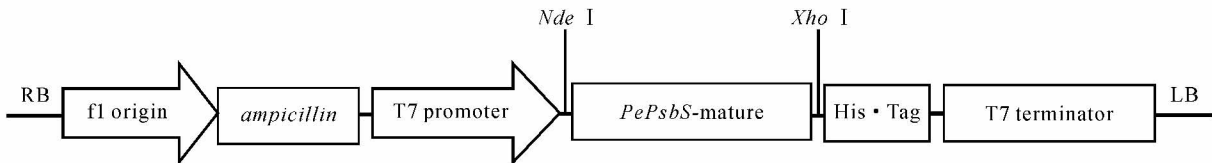


图 3 原核表达载体 pET-*PePsbS*-mature
Fig. 3 Prokaryotic expression vector of pET-*PePsbS* -mature

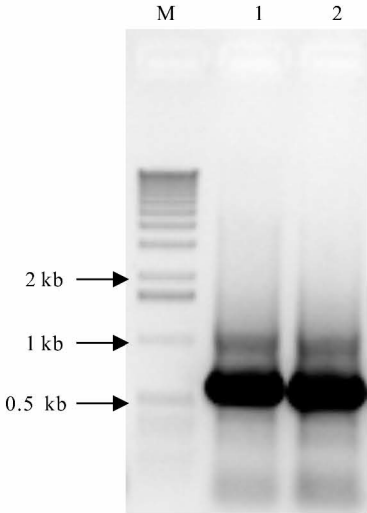


图 2 引物 *PsbS*-F1 和 *PsbS*-R1 扩增的 PCR 产物电泳结果。M. 分子量标记; 1~2. 扩增产物。
Fig. 2 PCR amplification products by primers *PsbS*-F1 and *PsbS*-R1. M. Maker; 1-2. Amplification products.

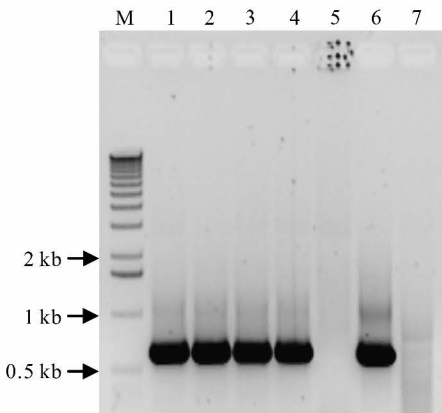


图 4 单克隆菌落 PCR 电泳。1~4: 单克隆菌落; 5: pET23a 对照; 6: 重组表达载体对照; 7: 水; M: 分子量标记。
Fig. 4 PCR products of single clones. 1-4: Single clone amplification; 5: Control of pET23a; 6: Control of reconstruction vector; 7: Water; M: Maker.

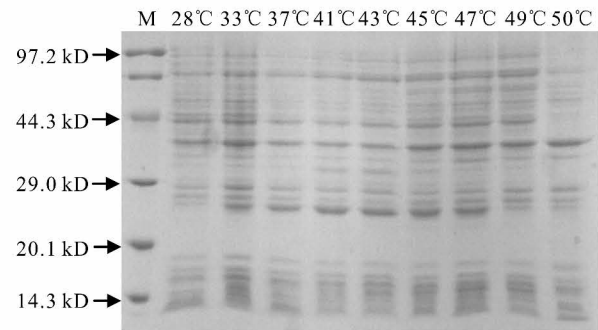


图 5 温度对 pET-*PePsbS*-mature 原核表达的影响
Fig. 5 Effects of temperature on prokaryotic expression of pET-*PePsbS*-mature

蛋白均能被 IPTG 诱导,其诱导表达的蛋白分子量约为 22.0 kD。

28℃、33℃、37℃、41℃、43℃、47℃、49℃、55℃ 下培养,菌液浓度至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加入 IPTG 诱导培养 4 h 后,收集菌体,用 1% 的 SDS 剧烈振荡破菌,离心,上清液进行电泳分析(图 5),结果表明重组

不同温度培养的差异明显,应用凝胶成像仪 ALPHA2000 所带的分析软件进行定量分析,从图 6 可见,在 28℃~41℃ 范围内,随着温度增加,目的蛋白表达量呈现明显的上升趋势,且 41℃ 下诱导的目的蛋白含量约占总蛋白的 21.5%;而在 43℃、45℃ 下的表达量趋于下降,之后随温度的上升蛋白表达量迅速

下降。

2.4.2 诱导时间对表达的影响

在 37℃ 下将菌液培养至 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8 时,加入 IPTG(终浓度 100 μmol/L)后 41℃ 下进行诱导,分别诱导 2、3、4、5 h 后,收集菌体,处理后进行电泳。结果(图 7)显示,在 2~4 h 内随诱导时间的增加重组蛋白的表达量逐渐增加,而诱导 5 h 的表达量却下降。综合考虑既经济又有效的诱导表达条件为:41℃ 诱导培养 4 h。

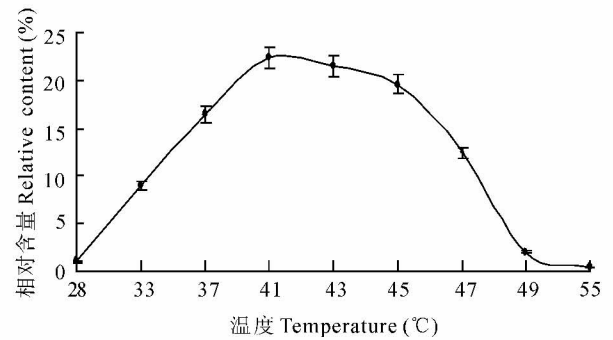


图 6 温度对目的蛋白相对含量的影响
Fig. 6 Effects of temperature on relative contents of objective protein

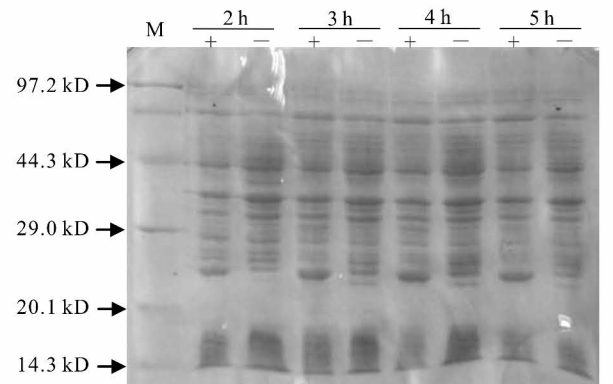


图 7 诱导时间对 pET-*PePsbS*-mature 原核表达的影响。M: 分子量标记; +: IPTG 诱导; -: 对照。
Fig. 7 Effects of induced time on prokaryotic expression of pET-*PePsbS*-mature. M: Marker; +: Induced by IPTG; -: Control.

2.5 *PePsbS* 基因原核表达成熟蛋白纯化与检测

重组表达载体 BL21(DE3)pET-*PePsbS*-mature 经 IPTG 诱导(41℃ 培养 4 h)后,收集菌体,非变性条件下超声波破碎细胞,用 SDS-PAGE 电泳分析可溶组分和不可溶组分表明,目的蛋白主要以包涵体形式存在,可溶性蛋白所占比重较少(图略)。采用 His-Bind Ni-NTA 树脂在变性条件下对 BL21(DE3)pET-*PePsbS*-mature 表达的目的蛋白进行纯化,经过 1 次分离两次漂洗去除杂蛋白,再用 Ni-NTA 洗脱缓冲液 3 次洗脱

后,进行电泳检测。从图 7 可见,重组蛋白的纯度较高,分子量与预期基本一致,约为 22 kD。

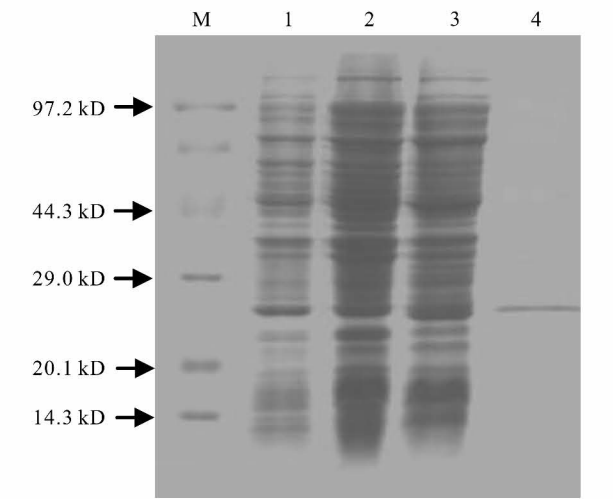


图 8 pET-*PePsbS*-mature 原核表达蛋白的纯化。M. 分子量标记; 1. pET-23a 对照; 2. 不经 IPTG 诱导; 3. IPTG 诱导; 4. IPTG 诱导后纯化。
Fig. 8 Purified protein from prokaryotic expression of pET-*PePsbS*-mature. M. Marker; 1. Control of pET-23a; 2. Induced without IPTG; 3. Induced by IPTG; 4. Purification after induced by IPTG.

3 讨论

PsbS 属于叶绿素 a/b 结合蛋白超家族的成员, *PePsbS* 编码的蛋白与水稻、烟草 (*Nicotiana benthamiana*)、棉花(*Gossypoides kirkii*)、菠菜(*Spinacia oleracea*)、陆地棉 (*Gossypium hirsutum*)、大车前 (*Plantago major*)、玉米、蓖麻(*Ricinus communis*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、拟南芥、龙葵 (*Solanum nigrum*) 的光系统 II 的 *PsbS*(22 kD) 蛋白的一致性都在 80% 以上,充分显示了基因家族在进化上的保守性。研究表明,*PsbS* 与 *Lhcb* 基因编码的蛋白具有较高的同源性,*PsbS* 含有 4 个跨膜螺旋而被认为是 LHCB 蛋白的共同前体^[20]。因此, *PePsbS* 可能同其他物种的 *PsbS* 蛋白一样,在调节 NPQ 中起重要作用。

本研究结果表明, *PePsbS* 基因在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达时,诱导温度对目的蛋白的表达影响明显,从 28℃~41℃,目的蛋白的表达量呈线性上升的趋势,但随温度的进一步升高,其表达量开始下降,高于 45℃ 则呈显著下降趋势,因此选择最佳诱导温度为 41℃。这与其他捕光蛋白基因体外表达的最适温度(一般为 37℃)有所差异,可能与 *PePsbS* 参与 NPQ 的功能有关。有研究表明,

PsbS 蛋白对 NPQ 发生作用,除了受温度影响外,还会受到 Mg^{2+} 和 pH 值的影响。PsbS 通过 Glu-122 和 Glu-226 位点作为传感器来行使功能,在 pH 7.5 时能与能态淬灭抑制剂(DCCD)结合,而在 pH 7.8 时则检测不到^[21]。在 NPQ 过程中,PsbS 是一个依赖于 pH 值的激发者,在叶绿体膜上调控 LHCb II 和 PS II 之间的相互作用,引起 PS II 捕光系统构象发生变化,在垛叠的 PS II 周围 Mg^{2+} 促进 PsbS 推动 HLC II 的横向排列^[18]。关于 PePsbS 的活性与 Mg^{2+} 浓度、pH 值的关系尚需进行深入研究。

参考文献

- [1] Huang C C(黄承才), Ge Y(葛滢), Chang J(常杰). Studies on photosynthesis and respiration of blades of *Phyllostachys heterocyclus* cv. pubescens in eastern mid-subtropical zone, China [J]. J Zhejiang For Sci Techn(浙江林业科技), 2000, 20(5): 14-16. (in Chinese)
- [2] Chen C J(陈存及), Qiu E F(邱尔发), Liang Y C(梁一池), et al. Study on the photosynthetic characters of *Phyllostachys heterocyclus* cv. pubescens provenances [J]. Sci Silv Sin(林业科学), 2001, 37(6): 15-19. (in Chinese)
- [3] Zheng B S(郑炳松), Jin A W(金爱武), Cheng X J(程晓建), et al. Study on the photosynthetic characteristics of lei bamboo leaves [J]. J Fujian Coll For(福建林学院学报), 2001, 21(4): 359-362. (in Chinese)
- [4] Huang Y(黄勇). Study on the photosynthetic characteristics of *Dendrocalamopsis oldhami* provellalce [J]. J Fujian Sci Techn(福建林业科技), 2003, 30(3): 50-53, 72. (in Chinese)
- [5] Lin Q Y(林琼影), Chen J X(陈建新), Yang S Z(杨淑贞), et al. Gas exchange with *Phyllostachys pubescens* on Mount Tianmu, Zhejiang Province [J]. J Zhejiang For Coll(浙江林学院学报), 2008, 25(4): 522-526. (in Chinese)
- [6] Isagi Y, Kawahara T, Kamo K, et al. Net production and carbon cycling in a bamboo *Phyllostachys pubescens* stand [J]. Plant Ecol, 1997, 130(1): 41-52.
- [7] Scurlock J M O, Dayton D C, Hames B. Bamboo: An overlooked biomass resource? [J]. Biomass Bioenergy, 2000, 19(4): 229-244.
- [8] Shi J M(施建敏), Guo Q R(郭起荣), Yang G Y(杨光耀). Seasonal photosynthetic responses of *Phyllostachys edulis* to light under doubled CO₂ concentration [J]. Acta Agri Univ Jiangxi(江西农业大学学报), 2007, 29(4): 215-219. (in Chinese)
- [9] Zheng R(郑蓉), Zheng W P(郑维鹏), Zheng Q F(郑清芳), et al. Comparison of chlorophyll fluorescence parameters in ornamental bamboo [J]. J Fujian Coll For(福建林学院学报), 2008, 28(2): 146-150. (in Chinese)
- [10] Gao Z M(高志民), Li X P(李雪平), Peng Z H(彭镇华), et al. Cloning and characterization of a full-length gene encoding the light harvesting chlorophyll a/b binding protein in bamboo [J]. Sci Silv Sin(林业科学), 2007, 43(3): 34-38. (in Chinese)
- [11] Gao Z M(高志民), Li X P(李雪平), Yue Y D(岳永德), et al. Cloning and construction of expression vector of *cab-BO2* gene encoding the light harvesting chlorophyll a/b-binding protein in bamboo (*Bambusa oldhamii*) [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2007, 5(3): 431-435. (in Chinese)
- [12] Tang W L(唐文莉), Peng Z H(彭镇华), Gao J(高健). Cloning and sequence analysis of the light harvesting complex I gene (*Lhca1*) from three kinds of *Phyllostachys* and structure prediction of the protein [J]. J Beijing For Univ(北京林业大学学报), 2008, 30(4): 109-115. (in Chinese)
- [13] Gao Z M(高志民), Liu C(刘成), Liu Y L(刘颖丽), et al. Cloning and high prokaryote expression of the light harvesting chlorophyll a/b-binding protein gene from bamboo (*Phyllostachys edulis*) [J]. Sci Silv Sin(林业科学), 2009, 45(3): 145-149. (in Chinese)
- [14] Gilmore A M. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves [J]. Physiol Plant, 1997, 99(1): 197-209.
- [15] Li X P, Bjorkman O, Shih C, et al. A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting [J]. Nature, 2000, 403(6768): 391-395.
- [16] Wentworth M, Ruban A V, Horton P. Chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complexes induced by zeaxanthin [J]. FEBS Lett, 2000, 471(1): 71-74.
- [17] Li X P, Phippard A, Pasari J, et al. Structure-function analysis of photosystem II subunit S (PsbS) *in vivo* [J]. Funct Plant Biol, 2002, 29(10): 1131-1139.
- [18] Kiss A Z, Ruban A V, Horton P. The PsbS protein controls the organization of the photosystem II antenna in higher plant thylakoid membranes [J]. J Biol Chem, 2008, 283(7): 3972-3978.
- [19] Gao Z M, Li X P, Li L B, et al. An effective method for total RNA isolation from bamboo [J]. Chin For Sci Techn, 2006, 5(3): 52-54.
- [20] Funk C, Schröder W P, Green B R, et al. The intrinsic 22 kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II [J]. FEBS Lett, 1994, 342(3): 261-266.
- [21] Li X P, Gilmore A M, Caffari S, et al. Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein [J]. J Biol Chem, 2004, 279(22): 22866-22874.