

* 学术论文 *

水稻 *osRACD* 基因编码蛋白质的生化特性分析*许云哲^{1,2} 米志勇¹ 曲红² 尤瑞麟² 吴乃虎^{1**}

1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080; 2. 北京大学生命科学学院, 北京 100871

摘要 将控制光敏核不育水稻农垦 58S 光周期育性转换特性的发育调节相关基因 *osRACD* 克隆在原核表达载体 pET28a(+) 上, 构成重组质粒 pET-*racd*, 并转化给大肠杆菌 BL-21. 提取转化子菌株的蛋白质, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳分析和凝血酶因子的切割作用, 最终获得了单一的 *osRACD* 蛋白. 此蛋白质经过超滤浓缩和谷胱甘肽氧化还原体系的复性作用之后, 供作体外功能鉴定. 结果显示, 在大肠杆菌 BL-21 转化子菌株中表达的 *osRACD* 蛋白, 具有与 GTP 特异结合及水解 GTP 的活性.

关键词 水稻 *osRACD* 基因表达 光周期育性转换 小分子量 GTP 结合蛋白

石明松等于 1973 年发现的光敏核不育水稻农垦 58S 自然突变株具有长日照下不育和短日照下可育的光周期育性转换遗传特性^[1], 为在农业生产中按两系法途径利用水稻杂种优势提供了可能性, 受到了科学工作者的重视^[2]. 近 20 年来, 我国科学工作者为探索水稻光周期育性转换遗传特性的分子机理, 已对光敏核不育水稻农垦 58 S 开展了生理学、遗传学及分子生物学等多方面的研究工作^[3-6]. 最近本实验室应用改良的 mRNA 差别显示技术从光敏核不育水稻农垦 58 S 中获得了低分子量 GTP 结合蛋白家族的 Rho/Rac 亚类的一个新基因 *osRACD*^[7]. 该基因 cDNA 序列全长 594 bp, 编码 197 个氨基酸和一个终止密码子, 转录单位全长 4266 bp, 由 6 个内含子和 7 个外显子组成.

为了进一步鉴定 *osRACD* 基因编码的蛋白质产物的生化功能, 本研究将该基因克隆在原核表达载体 pET28a(+) 上, 构建成重组质粒转化到大肠杆菌 BL-21 中表达. 提取并纯化含有 *osRACD* 多肽的融合蛋白质, 经凝血酶因子切割获得单一的 *osRACD* 蛋白. 体外检测表明, 该蛋白具有与 GTP 特异性结合和水解 GTP 的功能, 从而证实了本实验分离的 *osRACD* 基因在 *E. coli* 中表达的蛋白产物具

有典型的小分子量 GTP 结合蛋白的生物学活性.

1 材料和方法

1.1 实验材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 菌株由北京大学生命科学院胡美浩教授惠赠; pET-28a(+) 质粒购自 Novengen 公司; 限制性核酸内切酶购自华美公司; T4DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、凝血酶因子购自 Promega 公司; Ni-NTA 金属螯合蛋白纯化系统购自 Qiagen 公司. Bio-ScaleQ 购自 BioRad 公司.

谷胱甘肽复性缓冲体系包括复性液 I: 1 mmol/L GSSG, 2 mmol/L GSH, 100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 5 mmol/L EDTA, 0.5 mol/L 精氨酸. 复性液 II: 100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 5 mmol/L EDTA, 0.5 mol/L 精氨酸.

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 反应 以 *osRACD* 基因 cDNA 全长为模板进行 PCR 反应. 实验条件为: 94℃ 变性 5 min 后, 按 94℃ 1 min, 60℃ 1.5 min, 72℃ 1 min 程序共进行 20 个循环, 然后置 72℃ 下延伸 10 min. 将扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 并纯化所得

2003-03-26 收稿, 2003-05-21 收修改稿

* 国家科技部转基因植物研究专项(J00-A-005)、国家重大基础研究发展规划(2001CB1088)和国家“八六三”计划(20002A224061)资助项目

** 联系人, E-mail: nhwu@public3.bta.net.cn

长度约为 600 bp 的 PCR 特异性条带。

1.2.2 osRACD 基因编码蛋白质的诱导表达和纯化 挑取含 osRACD 基因重组质粒的单菌落, 接种在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 震荡培养至 A_{600} 达到 0.6 时, 加入异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度 1 μ mol/L, 30℃ 分别诱导震荡培养 2, 4, 6, 8 h, 离心收集菌体经煮沸裂解, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳的检测及薄层扫描分析。

离心收集诱导培养 6 h 的大肠杆菌菌体, 置 -70℃ 迅速冻融, 然后加入 Qiagen 公司 Ni-NTA 蛋白纯化系统的缓冲液 A, 悬浮沉淀并剧烈震荡, 再用超声波破碎菌体, 将离心所得的上清缓缓加入已用缓冲液 A 平衡过的 Ni-NTA 柱, 随后用缓冲液 C、缓冲液 D 及缓冲液 E (Qiagen) 进行 pH 梯度洗脱, 将收集到的融合蛋白产物进行超滤浓缩, 以备下一步研究使用。

1.2.3 osRACD 蛋白的制备 向融合蛋白的浓缩液中加入凝血酶裂解液 (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L CaCl₂, 0.2 μ g 凝血酶), 25℃ 下反应 3 h 后, 加样在 SDS-PAGE 凝胶中, 进行电泳检测切割的效率, 然后用 20 mmol/L Tris-HCl 透析除去切割液^[8], 再经过 Bio-Scale Q 柱层析, 收集 osRACD 蛋白的洗脱峰进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.4 osRACD 蛋白的复性 利用谷胱甘肽氧化还原体系在 4℃ 下复性 osRACD 蛋白, 首先用复性液 I 透析过夜, 次日取透析样品用复性液 II 继续进行透析 8 h, 中间更换一次透析液。然后收集复性的蛋白质进行超滤浓缩, 供作蛋白质的体外活性检测。

1.2.5 osRACD 蛋白的 GTP 结合活性竞争实验 纯化的 osRACD 蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 通过 Bio-Rad 半干转移系统吸印到 PVDF 膜上, 再将此膜浸在加有 6 mol/L 盐酸胍的结合缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L MgCl₂) 中变性处理, 然后通过逐渐稀释盐酸胍的浓度使 osRACD 蛋白在原位复性, 复性后的 PVDF 膜移放在封闭缓冲液 (0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 10 mmol/L MgCl₂, 0.3% BSA, 0.1% Tween 20) 中 25℃ 封闭 30 min, 然后分别加入 γ -³⁵S GTP (10 μ mol/L), γ -³⁵S GTP (10 μ mol/L) 和 GTP (10 μ mol/L), γ -³⁵S GTP

(10 μ mol/L) 和 GTP (100 μ mol/L), 以及 γ -³⁵S GTP (10 μ mol/L) 和 ATP (1 mmol/L), 置 25℃ 下杂交 2 h, 洗膜后进行放射自显影。

2 结果与讨论

2.1 osRACD 基因表达载体的构建及鉴定

利用 GENETYX 软件以 osRACD 基因 cDNA 编码区两侧的序列为模板设计引物。上游引物为 5'-TACAT ATG AGCGCGTCTCGGTTTCAT-3', 包含起始密码子 ATG, 外设 NdeI 酶切位点; 下游引物为 5'-ACGGATCCA TTA CAAGATGGCACAT-3', 包含一个强终止密码子 TAA, 外设 BamHI 酶切位点。用此引物扩增 osRACD 基因的编码区, 并将所得的产物加样在 1% 的琼脂糖凝胶上做电泳分离, 结果呈现一条与预测大小一致的约 600 bp 的电泳谱带。将这一片段通过 NdeI 和 BamHI 双酶切后与表达载体 pET28a(+) 连接, 构建成重组表达质粒载体 pET-racd。其中编码 osRACD cDNA 的 NdeI-BamHI 片段是处在 T7 启动子的控制之下, 可以被 IPTG 诱导高效表达 (图 1)。

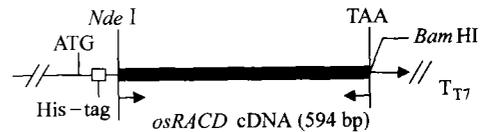


图 1 重组表达质粒 pET-racd 的物理图谱

His-tag 为 6 个组氨酸的融合短肽; T₇ 为 T7 终止子

重组质粒 pET-racd 的转化受体菌是蛋白酶缺陷型的 BL21 菌株, 这样便可有效地防止表达蛋白的降解, 转化混合物涂布在含有卡那霉素的琼脂平板上, 筛选含有重组质粒 pET-racd 的转化子菌株。挑取转化子菌株的单菌落过夜培养, 提取重组表达质粒的 DNA, 经酶切鉴定显示, pET-racd 质粒分子中存在一条其分子量大约为 600 bp 的 NdeI-BamHI 插入片段。核苷酸序列测定结果表明, 该插入片段含有 osRACD cDNA 基因的完整的编码序列, 没有任何碱基错误, 并且是位于 pET28a(+) ATG 起始的可读框内。

根据编码区核苷酸序列推测的 osRACD 蛋白氨基酸序列结构分析显示, 在该蛋白质的氨基酸组成中, 大肠杆菌的罕用密码子精氨酸 (Arg) 只占 3.54%, 从而避免了因密码子使用偏爱性对基因表达效率造成的影响, 使得 osRACD 基因能够在大肠

杆菌细胞中获得高效表达。

2.2 *osRACD* 基因编码蛋白质的诱导表达与纯化

含有重组质粒 pET-*racd* 的转化子菌株 BL-21 在 IPTG(终浓度 0.4 mol/L)诱导下可产生分子质量为 24 ku 的蛋白质, 其表达量随诱导培养时间的延长而逐渐增加, 但当诱导培养时间达到 8 h 时, 其表达量则有所下降(图 2)。薄层扫描分析揭示, 当诱导培养时间为 6 h 时, 由 N 端多肽(包括 His-tag)和 *osRACD* 组成的融合蛋白的含量可占菌体总蛋白的 40% 以上。

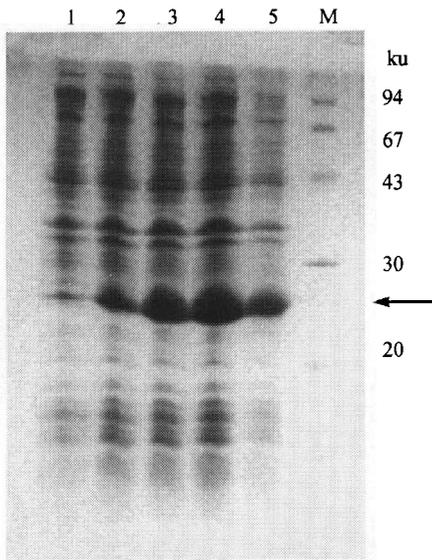


图 2 *osRACD* 基因诱导表达产物的 15% SDS-PAGE 图谱

M, 蛋白分子量标记; 1, 未诱导; 2, 诱导 2 h; 3, 诱导 4 h; 4, 诱导 6 h; 5, 诱导 8 h

由于在 pET28a(+) 表达质粒的 *NdeI* 克隆位点的上游序列部位存在有一个凝血酶因子切割位点的编码序列, 所以纯化的融合蛋白经凝血酶因子酶解之后, 便会释放出单纯的、具有天然结构特性的 *osRACD* 蛋白。将此酶解产物再一次通过 Ni-NTA 柱, 于是被切割下来的 N 端多肽就会吸附在层析柱的介质上, 再将过柱收集到的未被吸附的蛋白组分, 继续过 Bio-ScaleQ 离子层析柱, 经洗脱得到单一的洗脱峰。SDS-PAGE 电泳检测表明, 此洗脱峰是一种分子质量约为 21 ku 的单一蛋白组分(图 3), 其分子量与天然的 *osRACD* 基因编码的蛋白质的大小相当, 因此可认定是 *osRACD* 蛋白。

双波长薄层扫描分析显示, 层析洗脱收集的融合蛋白和 *osRACD* 蛋白的纯度均在 90% 以上。将多次洗脱后收集的 *osRACD* 蛋白超滤浓缩后, 需经复

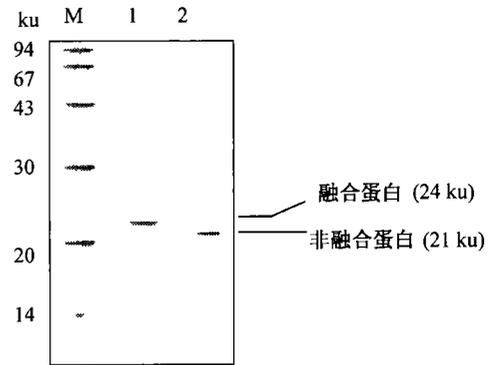


图 3 *osRACD* 融合蛋白和非融合蛋白纯化产物的 SDS-PAGE 图谱

M, 蛋白分子量标记; 1, 融合蛋白; 2, 非融合蛋白

性处理方可用于功能检测。为此, 我们试验了多种复性体系, 如多聚乙醇复性体系、凝胶过滤层析复性体系及谷胱甘肽氧化还原体系, 分别将不同体系复性的蛋白与 γ -³⁵S GTP 结合检测显示, 经 PEG 浓缩复性的蛋白与 γ -³⁵S GTP 的结合率只有 10.5 mmol/g, 凝胶过滤层析后的蛋白结合率则更低, 而经谷胱甘肽氧化还原体系复性的蛋白与 γ -³⁵S GTP 的结合率可达 18.8 mmol/g。此外还观察到, 当蛋白浓度超过 300 μ g/mL 时, 将会聚集形成沉淀, 从而降低了天然活性蛋白的得率, 只有将 *osRACD* 蛋白浓度降到约 50 μ g/mL, 并辅助加以 L-精氨酸, 方可提高蛋白质的稳定性, 获得理想的复性效果。

2.3 *osRACD* 蛋白的 GTP 结合活性

纯化的 *osRACD* 蛋白与 GTP 结合活性测定结果显示, 以 γ -³⁵S GTP 为反应底物时, 随着加入在反应体系中 *osRACD* 蛋白数量的增多, 滞留在 PVDF 膜的放射性计数平行上升, 两者呈正比关系。而当以 γ -³⁵S ATP 为反应底物时, 尽管加入在反应体系中的 *osRACD* 蛋白的数量不断上升, 从 0.2 到 1.8 μ g, 而滞留在 PVDF 膜的放射性计数却基本上保持不变(图 4)。按照曲线斜率计算得到 *osRACD* 蛋白与 γ -³⁵S GTP 的结合率为 18.8 mmol/g, 而与 γ -³⁵S ATP 的结合率仅为 0.73 mmol/g。非同位素标记的 GTP 及 ATP 与同位素标记的 GTP 的竞争结合实验, 进一步证实了 *osRACD* 蛋白具有与 GTP 特异结合的活性。图 5 显示, 加入 10 倍竞争 GTP 时, 可将大部分与 *osRACD* 蛋白结合的 γ -³⁵S GTP 竞争掉; 而加入 100 倍竞争 ATP 几乎没有任何竞争效果, 与仅加入 γ -³⁵S GTP 探针的杂交条带的强弱相当。

研究发现 osRACD 蛋白的结合活性区会受到效应物的影响. 据文献报道^[9], 底物一般以 $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ GTP·Mg²⁺ 形式与 G 蛋白进行结合, 在缺少二价阳离子的条件下, $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ GTP 与 G 蛋白的结合物在 30℃ 下反应 60 min 便会有 80% 发生解离, 反应体系中至少应该有 1 mmol/L Mg²⁺, 才能维持初始的结合水平. 在高浓度的二价阳离子的存在下, G 蛋白最大活性能够持续 10 min 左右. 据此在本实验中我们将 Mg²⁺ 浓度控制在 10 mmol/L, 从而较大地激活了 osRACD 蛋白的 GTP 结合活性.

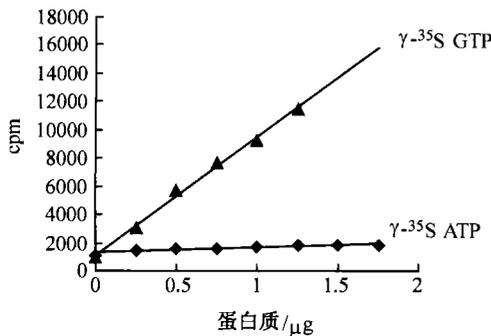


图4 osRACD 蛋白与 $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ GTP 和 $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ ATP 的结合曲线



图5 osRACD 蛋白的 GTP 结合活性竞争实验

1, $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ GTP; 2, $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ GTP+1 倍竞争 GTP; 3, $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ GTP+10 倍竞争 GTP; 4, $\gamma\text{-}^{35}\text{S}$ GTP+100 倍竞争 ATP

2.4 osRACD 蛋白的 GTP 水解酶活性

GTP 水解后释放的无机磷可以与钼酸胺反应, 形成的钼蓝在 A_{660} 下有特异的吸收峰^[10,11]. 根据这种吸收特性建立的定磷实验可以测定出无机磷释放量与 GTP 水解程度之间的相关曲线. 实验中将 1 μg 纯化的 osRACD 蛋白, 与不同数量的 GTP 底物 30℃ 下反应 30 min, 加入 TCA 终止反应, 测定 A_{660} 下的钼蓝吸收峰曲线(图 6); 同理, 利用 1 μg GTP 与不同数量纯化的 osRACD 蛋白反应, 测定另一吸收峰曲线(图 7). 研究结果显示, 随着蛋白加入量的增加, 或者是 GTP 底物加入量的增加, 水解产生的无机磷量都呈现明显上升的趋势. 这种吸收峰曲线的变化特征, 显示 osRACD 基因编码的蛋白具备一定的水解 GTP 的能力.

GTP 水解后形成的 G 蛋白与 GDP 的复合物还会发生部分再解离, 重新参与水解 GTP 的循环反

应. 低浓度 Mg²⁺ 条件下, 加入 GDP 解离抑制因子 (GDI), 可以有效地抑制 Rho 类小分子量 GTP 结合蛋白与 GDP 的解离^[12], 同时也可抑制 G 蛋白本身水解酶的活性, 而高浓度的 Mg²⁺ 本身就可以稳定 G 蛋白与 GDP 的结合^[13,14], 因此实验中将 Mg²⁺ 的浓度控制在 100 mmol/L, 有利于准确地观察 osRACD 蛋白水解 GTP 的酶动力学.

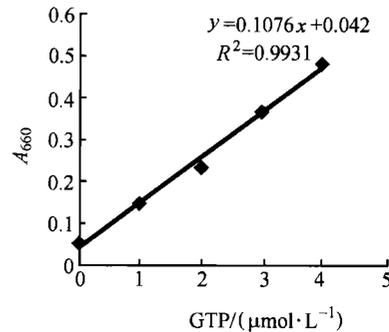


图6 不同含量的 GTP 底物与恒量的 osRACD 蛋白纯化产物的反应曲线

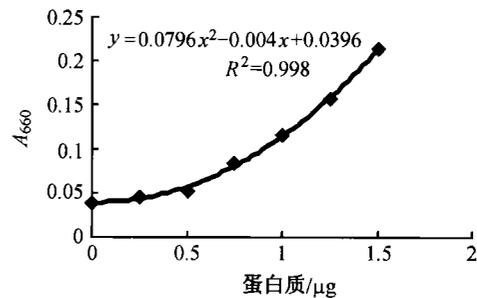


图7 不同浓度的 osRACD 蛋白量纯化产物与恒量的 GTP 底物的反应曲线

从图 7 可以看出, osRACD 蛋白加入量为 1.5 μg 时仍未达到的饱和值, 而且在 0.5 μg 以下反应曲线已经有一个拐点. 所以我们设想或许 osRACD 蛋白自身有一种协同效应, 在未达到饱和值之前, 这种协同效应使其呈现一种较强的水解能力. 而在图 6 所示的实验中, 由于所用的 osRACD 蛋白的量较少, 尚未达到协同效应的临界点, 因此随着底物量的增加, 反应曲线呈线性上升.

本研究证实, pET-racd 转化的 *E. coli* 转化子中表达出的 osRACD 蛋白, 在体外具有与 GTP 特异结合的活性和水解 GTP 的功能. 那么从理论上讲该蛋白质就应该具有相应的功能结构域. 为此我们利用国际互联网络, 在蛋白质三级结构数据库 (PDB) 中进行氨基酸同源性比较. 结果显示, 水稻 osRACD 蛋白与人 Rac 亚类低分子量 GTP 结合蛋白

Cdc42 之间有 64% 氨基酸序列同源性。同时以 Abdul^[15] 利用核磁共振测定的 Cdc42 的三级结构为基础, 采用 GCG 分析软件对水稻的 osRACD 蛋白进行分析, 结果证实该蛋白的三级结构中, 的确存在 GTP 结合位点、GTP 酶活性结构域、Mg²⁺ 离子结合效应区和丝氨酸/苏氨酸磷酸化位点(图未示出)。这些数据进一步支持了本实验分离的水稻 osRACD 基因蛋白质编码产物的正确性。我们认为光

敏核不育水稻农垦 58S 所表现的光周期育性转换遗传特性, 是植物体通过信号传导途径对环境光条件作出的一种复杂的发育调节反应。与此相应的是, 本实验关于水稻 osRACD 蛋白的翻译后修饰位点分析表明, 它可能存在磷酸化、糖基化、异戊二烯化等多种修饰方式(图 8), 因此在与环境光周期转换的应答过程中, 有可能与多种蛋白质因子发生作用, 参与光信号的传导。

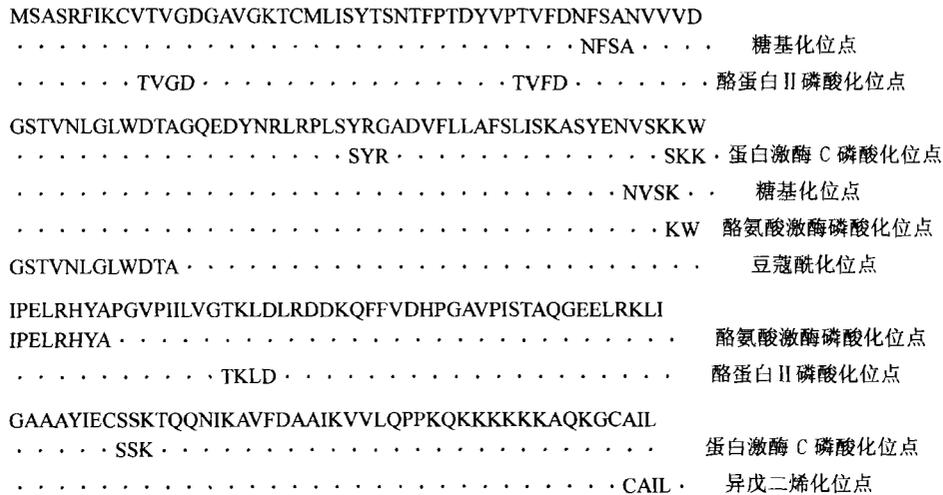


图 8 osRACD 蛋白翻译后修饰位点结构分析

osRACD 蛋白质结构中的磷酸化位点, 正是为这种蛋白因子间的相互作用提供了识别标志^[16]。表面静电势分析显示水稻 osRACD 蛋白质分子表面含有两个疏水结构面(图未示出), 这暗示着 osRACD 蛋白质单体分子间存在着形成寡聚体的可能性。这些结构特征使得 osRACD 蛋白质能够在光信号传导通路中起到相应的功能作用。

参 考 文 献

- 1 石明松, 等. 对光照长度敏感的隐性雄性不育水稻的发现和初步分析. 中国农业科学, 1985, 2: 44
- 2 袁隆平, 等. 两系法杂交水稻研究进展. 中国农业科学, 1990, 23(1): 1
- 3 张 锐, 等. 光敏核不育水稻短日照植株的雄性器官和育性异常. 植物学报, 1991, 41: 1317
- 4 李泽炳. 光敏核不育水稻育性转换机理与应用研究. 武汉: 湖北科学出版社, 1995. 533~593
- 5 李子银, 等. 利用分子标记定位农垦 58S 的光敏核不育基因. 植物学报, 1999, 41(7): 731
- 6 Zhang Q, et al. Bulked extremes and recessives class to map genes for photoperiod -sensitive genic male sterility in rice. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(18): 8675

- 7 Mi Z Y, et al. Isolation of osRACD gene encoding a small GTP-binding protein from rice. Chinese Science Bulletin, 2002, 47 (20): 1673
- 8 F 奥斯伯, 等. 颜子颖, 等译. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 642~643
- 9 Higashijima T, et al. The effect of activating ligands on the intrinsic fluorescence of guanine nucleotide-binding regulatory proteins. J Biol Chem, 1987, 262(2): 752
- 10 张龙翔, 等. 生化实验方法和技术(第二版). 北京: 高等教育出版社, 1997. 195~196
- 11 Reid T W, et al. E. coli Alkaline Phosphatase. In: Enzymes. New York, London: Academic Press, 1971. 373~415
- 12 Bosch B, et al. The Guanine-Nucleotide Binding Proteins: Common Structural and Functional Properties. New York: Plenum Corp, 1989. 77~85
- 13 Steph R S. G Protein mechanisms: Insights from structural analysis. Annu Rev Biochem, 1997, 66: 639
- 14 Julie A P, et al. G Protein-coupled receptor kinase. Annu Rev Biochem, 1998, 67: 653
- 15 Abdul N, et al. Structure of Cdc42 in complex with the GTPase binding domain of the Wiskott Aldrich syndrome protein. Nature, 1999, 399: 379
- 16 李 林, 等. 蛋白质磷酸化作用结构基础. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(4): 291