

大豆过氧化物酶基因的克隆及其表达载体的构建

曾家豫¹, 袁红霞¹, 廖世奇^{2,*}, 周思彤¹, 梁琼¹

(1.西北师范大学生命科学学院, 甘肃 兰州 730070; 2.甘肃省医学科学研究院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 大豆过氧化物酶(soybean peroxidase, sbp)基因的克隆及其表达载体的构建将有利于人们更深入的从分子生物学角度研究 sbp 基因的结构与功能。首先从大豆根中获取总 RNA, 通过 RT-PCR 获得 sbp 基因。再将 sbp 基因与表达载体 pPICZ α -A 双酶切后连接, 构建重组表达载体 pPICZ α -A-sbp。将 pPICZ α -A-sbp 转化大肠杆菌筛选阳性克隆体并测序。结果表明: 获得的 sbp 基因序列与已报道的 sbp[U51191(GmEpa1)]基因序列有 92% 的同源性。重组表达载体 pPICZ α -A-sbp 的成功构建为其在毕赤酵母中表达奠定了基础。

关键词: 大豆过氧化物酶; 基因克隆; 表达载体

Cloning and Plasmid Construction of Soybean Peroxidase Gene for Prokaryotic Expression System

ZENG Jia-yu¹, YUAN Hong-xia¹, LIAO Shi-qi^{2,*}, ZHOU Si-tong¹, LIANG Qiong¹

(1. College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China;

2. Gansu Province Institute of Medical Sciences, Lanzhou 730050, China)

Abstract: The cloning and plasmid construction of soybean peroxidase (sbp) for prokaryotic expression system will provide more information to study the structure and function of soybean peroxidase by means of molecular biology. Total RNA was extracted from soybean root. Soybean peroxidase gene was obtained by RT-PCR technique and transferred into pPICZ α -A vector through restriction endonuclease digestion. The resulting recombinant pPICZ α -A-sbp expression vector was transformed into *E. coli* and the amplified recombinant pPICZ α -A-sbp expression vector was selected and sequenced. Results indicated that cloned DNA sequence from soybean root exhibited 92% homology to the reported sbp (U51191 (GmEpa1) DNA sequence. Therefore, pPICZ α -A-sbp was successfully constructed, which will provide base for its expression in *Pichia pastoris* (Gs115).

Key words: soybean peroxidase; gene cloning; expression vector

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)05-0197-04

大豆过氧化物酶(Soybean peroxidase, sbp)与辣根过氧化物酶同属于III类过氧化物酶(EC1.11.117), 结构和功能也非常相似^[1]。目前辣根过氧化物酶已经作为一种商品化试剂广泛用于免疫测定技术、电泳技术、酶联反应和免疫印迹等生物学研究, 同时在生物传感器、木素降解、工业“三废”处理等方面也有应用^[2], 所以大豆过氧化物酶同样有着广泛的应用前景。另外大豆过氧化物酶具有底物作用范围广、耐热性能高、酸碱稳定性好、无污染、安全系数高、来源容易等优点^[3], 可作为面包中已禁用添加剂溴酸钾的代替品, 是同类过氧化物酶不可比拟的^[4]。目前, sbp 作为食品添加剂已开始用于生产中, 应用前景将非常广阔。

本实验利用 RT-PCR 从大豆根中分离和克隆 sbp 基

因。再将 sbp 基因与表达载体 pPICZ α -A 双酶切后连接, 构建重组表达载体 pPICZ α -A-sbp, 并且将 pPICZ α -A-sbp 转化大肠杆菌, 筛选阳性克隆体并测序, 以期为其在毕赤酵母中表达提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

陇豆 2 号 甘肃省农科院。

E. coli 菌株 DH5 α (Amp^r、R^r、M^r)为本实验室保存; pPICZ α -A Invitrogen 公司。

DEPC、Trizol、pfu 保真酶、OligodT₍₁₈₎ 上海生物工程技术有限公司; 限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 北京赛百盛公司; DNA ladder Marker、T4DNA 连接酶

收稿日期: 2009-05-26

基金项目: 甘肃省教育厅科研项目(0601-28; 0501B-16); 甘肃省自然科学基金计划项目(096RJZA035)

作者简介: 曾家豫(1963—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yuanyhongxia520@126.com

*通信作者: 廖世奇(1963—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: yuanyhongxia520@163.com

TaKaRa 生物技术有限公司; 抗生素 Zeocin™ Invitrogen 公司; 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒 Omega 公司; 酵母提取物和胰蛋白酶 英国 Oxoid 公司。

1.2 方法

1.2.1 PCR 引物设计与合成

根据 Chen 等^[5]在 NCBI 核酸数据库报道的 *sbp* 基因 [U51191(GmEpa1)] 序列设计了一对寡核苷酸引物, 在两端加上合适的酶切位点 *Xho* I、*Xba* I 和保护碱基, 引物序列为:

P1: 5' CCGCTCGAGACTCAAGCTTCTAGGATTGTGCC3';

P2: 5' GCCTCTAGATTACCACTTATCCATCGCACATACAAC3'

以上引物由上海生工生物工程有限公司合成, 合成产物经 PAGE 纯化, 下划线之处为酶切位点。

1.2.2 总 RNA 提取

称取新鲜大豆根 0.1g, 用 Trizol 试剂提取大豆根总 RNA, 操作方法按说明书进行。

1.2.3 总 RNA cDNA 的获得

取提取的大豆根总 RNA 12 μL、OligodT(18)2 μL, 70℃保温 10min 后迅速在冰上急冷 2min 以上, 再加入 5 × Reaction buffer 4 μL、dNTP mix (10mol/L) 1 μL、RNase inhibitor(40U/μL) 0.5 μL、RTase (20U/μL)0.5 μL 混匀, 42℃保温 60min, 70℃保温 15min 后用冰冷却, 得 cDNA。

1.2.4 目的基因扩增

以 cDNA 为模板, 按表 1 加入反应组分到置于冰上的 PCR 管中, 混匀。以 95℃预变性 5min; 95℃变性 1min, 57℃退火 1min, 72℃延伸 1.5min, 共 30 个循环; 72℃延伸 7min。进行 PCR 反应, 获得目的基因。

表 1 PCR 反应体系

Table 1 Composition of PCR reaction system used in this study

PCR 体系组分	体积/μL
10 × PCR buffer(Mg ²⁺)	10
dNTP Mixture(10mmol/L)	8
Primer 1(20 μmol/L)	1
Primer 2(20 μmol/L)	1
pfuTaq 酶(5U/μL)	1
Template cDNA	4
灭菌三蒸水	75
总体积	100

1.2.5 重组表达质粒的构建及鉴定

1.2.5.1 *sbp* 基因和 pPICZ α-A 的双酶切

sbp 基因的双酶切: 经琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化的 *sbp* 基因 10 μL, 限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 各 1 μL,

10 × 缓冲液 2 μL, 灭菌三蒸水 6 μL, 于 37℃反应 3h。

pPICZ α-A 的双酶切: pPICZ α-A 载体 10 μL, 限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 各 1 μL, 10 × 缓冲液 2 μL, 灭菌三蒸水 6 μL, 于 37℃反应 3h。

1.2.5.2 *sbp* 基因与 pPICZ α-A 的连接反应

在重组表达载体的构建中, 设计了两个黏端的定向克隆, 对目的片段和质粒载体分别进行双酶切之后连接, 连接体系为 10 μL, 质粒载体与外源 DNA 的物质的量之比为 1:3 时连接效率最高, 由此算得酶切载体与酶切片段的质量比为 1:1。将无菌微量离心管置于冰浴中, 按表 2 加入试剂。

表 2 *sbp* 基因与 pPICZ α-A 的连接反应体系
Table 2 Composition of ligation reaction system between *sbp* gene and pPICZ α-A vector

组分	连接反应	对照 1	对照 2
pPICZ α-A	5 μL (0.08 μg/μL)	5 μL (0.08 μg/μL)	
<i>sbp</i> 基因	0.5 μL (0.8 μg/μL)		0.5 μL (0.8 μg/μL)
10 × T ₄ DNA 连接 buffer	2.5 μL	2.5 μL	2.5 μL
T ₄ DNA 连接酶(0.2U)	1 μL	1 μL	1 μL
去离子水	1 μL	1.5 μL	6 μL

16℃温育 15h, 70℃温育 15min 终止反应, 即得 pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒。该反应设立了两个对照反应, 对照 1 只有 pPICZ α-A 质粒载体, 对照 2 只有 *sbp* 基因, 其他操作与连接反应相同。

连接所得的 pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 检测后可用于转化实验。

1.2.5.3 pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒转化 *E.coli* DH5 α

pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒转化 *E.coli* DH5 α, 培养于含 25 μg/mL Zeocin 的 LLB 琼脂平板上。随机挑取单菌落, 分别接种到 5mL 含有 25 μg/mL Zeocin 的 LLB 液体培养基中, 37℃、150r/min 振荡培养过夜(约 14~16h)^[6]。

1.2.5.4 pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒的鉴定

pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒的提取按 Omega 公司的质粒抽提试剂盒说明书进行, 提取的 pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒用限制性内切酶 *Xho* I、*Xba* I 双酶切后经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。再以 0.5 μL pPICZ α-A-*sbp* 重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增鉴定(条件同 1.2.4 节)。初步鉴定为阳性的重组质粒由上海生工生物工程有限公司进行自动化测序, 测序引物为 5' AOX1 引物和 3' AOX1 引物, 引物序列显示如下:

5' AOX1 引物: 5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3';

3' AOX1 引物: 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增 *sbp* 基因

用 Trizol 试剂从约 0.1g 新鲜大豆根中抽提总 RNA, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 可以看到 3 条带, 分别为 A、B、C, 条带 C 较弱, 条带 A、B 明亮但有拖尾现象, 可能是由于部分 RNA 的降解所致。总 RNA 包括 rRNA, mRNA 和 tRNA, 其中 rRNA 约占总 RNA 的 80% 以上, 根据沉降系数可将 rRNA 分为 28S、18S、5S, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 5S 通常稍低于指示剂溴酚蓝, 18S、28S 位于 5S 之上且距离接近, 电泳结果的 3 条带显示了 rRNA 的完整性, 通常认为 rRNA 的完整性即反应了总 RNA 的完整性, 可以满足后续实验要求(图 1)。

以 OligodT₍₁₈₎ 为引物作逆转录, 得到总 mRNA 的 cDNA, 然后用引物 P1 和引物 P2 进行 PCR 扩增, 从 15 循环起每隔 5 循环取样 10 μL, 1、2、3、4、6 为 PCR 循环数分别为 15、20、25、30、35。经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后, 在约 1kb 处有一条电泳条带, 此带即为克隆的 sbp 双链 DNA。随着循环数的增加, 条带逐渐变亮, 30 循环时条带明亮, 35 循环时条带很亮但有弥散现象, 所以确定 30 循环为 PCR 扩增的最佳循环数(图 2)。在约 2kb 处的电泳条带为引物的非特异性扩增, 条带较弱, 由于此杂带的出现, 实验对目的条带进行了切胶回收。

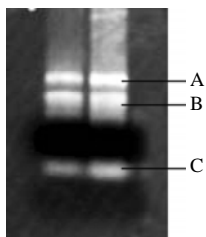
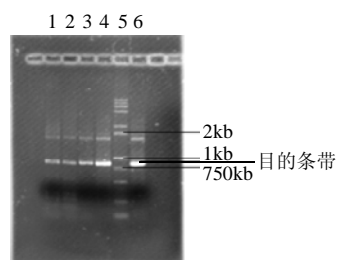


图 1 大豆根总 RNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of total RNA from soybean root



1、2、3、4、6 条带 PCR 循环数分别为 15、20、25、30、35; 5 为 DNA ladder marker。

图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

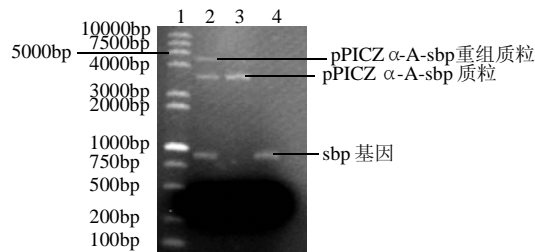
Fig.2 Agarose gel electrophoresis of PCR products

2.2 重组表达质粒的构建及鉴定

2.2.1 pPICZ α -A-sbp 重组质粒的构建

构建的 pPICZ α -A-sbp 重组质粒用 1% 的琼脂糖凝胶

电泳检测(图 3)。电泳图谱显示泳道 2 为连接后的结果; 泳道 3 为未连接目的基因的 pPICZ α -A 质粒, 泳道 4 为 sbp 基因。与泳道 3 和 4 相对比, 泳道 2 在约 4.6kb 处的条带即为连接的 pPICZ α -A-sbp 重组质粒。说明 pPICZ α -A-sbp 质粒构建成功。



1. DNA ladder Marker; 2. pPICZ-A-sbp 重组质粒; 3. pPICZ-A 质粒; 4. 目的片段。

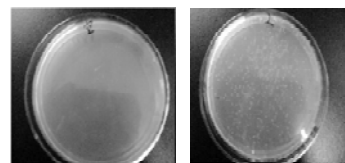
图 3 pPICZ α -A-sbp 重组质粒的琼脂糖凝胶电泳检测图谱

Fig.3 Agarose gel electrophoresis of recombinant pPICZ α -A-sbp plasmid

pPICZ α -A 质粒的大小为 3593bp, 其多克隆位点位于 1208~1276bp 处, 外源 sbp 基因可插入到该多克隆位点。将连接外源目的基因的重组 pPICZ α -A 质粒转化宿主细胞。实验采用限制性内切酶 *Xho*I 和 *Xba*I 双酶切法将 sbp 基因连接到 pPICZ α -A 质粒中, 采用这种定向连接方法构建 pPICZ α -A-sbp 重组质粒的优点是可有效避免 sbp 基因的反向连接发生; 同时也可有效地防止线状 pPICZ α -A 质粒末端的自身环化, 这样消化的线状 pPICZ α -A 质粒末端不需要去磷酸化操作。

2.2.2 pPICZ α -A-sbp 重组质粒转化 *E.coli* DH5 α

2.2.2.1 阳性克隆双酶切及 PCR 扩增鉴定



阴性对照 带有目的片段的阳性克隆

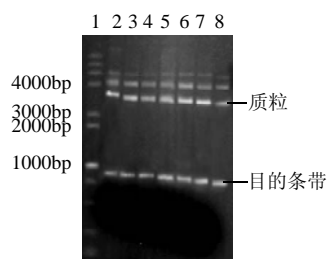
图 4 pPICZ α -A-sbp 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 长出阳性克隆的 LLB 平板

Fig.4 Colonies of *E. coli* DH5 α containing recombinant pPICZ α -A-sbp plasmid on LLB plates

选取 7 个转化的 *E.coli* DH5 α 阳性克隆(图 4), 提取其质粒 DNA, 经纯化后, 分别用 *Xho*I 和 *Xba*I 双酶切及 PCR 扩增两种方法进行鉴定。

选取 7 个阳性克隆质粒, 重新进行 *Xho*I 和 *Xba*I 双酶切, 其产物应为质粒载体 pPICZ α -A 和 sbp 基因, 酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 在 3.6kb 处出现

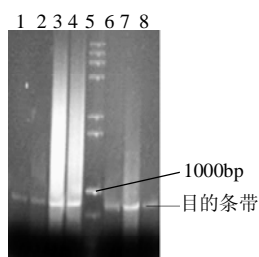
的电泳条带与线性的质粒载体 pPICZ α -A 大小一致, 1.0kb 处的电泳条带与 sbp 基因大小一致(图 5)。



1. DNA ladder Marker; 2、3、4、5、6、7、8. 重组表达质粒 pPICZ α -A-sbp 的双酶切产物。

图5 重组表达质粒 pPICZ α -A-sbp 双酶切的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.5 Agarose gel electrophoresis of recombinant pPICZ α -A-sbp plasmid digested by restriction endonuclease

以选取的 7 个阳性克隆质粒为模板, 用 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增, 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在约 1kb 处均有单一的条带, 为 sbp 基因(图 6)。



5. DNA ladder Marker; 1、2、3、4、6、7、8. 重组表达质粒 pPICZ α -A 的 PCR 产物。

图6 重组表达质粒 pPICZ α -A-sbp PCR 检测的琼脂糖凝胶电泳图谱
Fig.6 Agarose gel electrophoresis of recombinant pPICZ α -A-sbp plasmid detected by PCR

以上电泳检测结果都初步证明了 pPICZ α -A-sbp 质粒的成功构建, 并且成功转化到宿主 *E.coli* DH5 α 中。

2.2.2.2 sbp 基因的序列测定

选取上述阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序, 测序结果显示, 从大豆根中克隆到的 sbp 基因序列与 Chen 等^[5]在 NCBI 核酸数据库报道的基因序列号为 U51191(GmEpa1)的 sbp 基因序列通过 Blast 比较, 两者有 92% 的同源性, 进一步说明了表达载体的成功构建。

测得的 sbp 基因序列全长为 975bp, 其中编码蛋白的 909bp 的核酸序列与基因序列号为 U51191 的 sbp 编码序列几乎完全相同, 实验为了保证蛋白编码序列不发生大的变异, 使信号肽编码序列和 RNA 转录本上的位点有所缺失, 导致同源性只达到 92%。

3 讨论

sbp 具有底物作用范围广、耐热性能高、酸碱稳定性好、pH 值适用范围宽等优点, 不仅已经成功用于体外诊断试剂和生物检测, 在食品添加剂和生物传感器中也崭露头角^[7-9]。而且在环保方面的应用更是大家所关注的焦点, 尤其在含有多酚类、木质素等物质及有机溶剂的污水处理方面^[10]。所以对 sbp 基因的克隆具有重要意义。实验从大豆根中获取总 RNA, 通过 RT-PCR 获得的 sbp 基因序列与已报道的 sbp[U51191(GmEpa1)] 基因序列有 92% 的同源性, 其中编码蛋白的 909bp 的核酸序列与基因序列号为 U51191 的 sbp 编码序列几乎完全相同。

在重组表达载体的构建中, 实验设计了两个黏端的定向克隆, 采用限制性内切酶 *Xho*I 和 *Xba*I 双酶切法将 sbp 基因连接到 pPICZ α -A 质粒中, 构建的重组表达载体 pPICZ α -A-sbp 分别用双酶切及 PCR 扩增分析鉴定构建成功。

sbp 基因重组表达质粒的成功构建是一项很有意义的工作, 为其在毕赤酵母中表达和进化, 筛选出高效表达的基因工程菌奠定了基础。

参考文献:

- [1] SIEGEL B Z. Plant peroxidases: an organismic perspective[J]. Plant Growth Regulation, 1993, 12(3): 303-312.
- [2] 季钟煜, 费锦鑫. 辣根过氧化物酶及其同工酶[J]. 生命的化学, 1992, 12(3): 30-32.
- [3] NISSUM M, FEIS A, SMULEVICH G. Characterization of soybean seed coat peroxidase: resonance raman evidence for a structure-based classification of plant peroxidases[J]. Bio-spectroscopy, 1998, 4(6): 355-364.
- [4] 严群, 张建国, 徐芝勇. 大豆过氧化物酶研究进展[J]. 中国粮油学报, 2005, 20(3): 51-53.
- [5] CHEN H B, VIERLING R A, CHEN H B. Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families[J]. Plant Science, 1999, 150(2): 129-137.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] 徐芝勇, 严群, 张建国, 等. 大豆过氧化物酶纯化及酶学特性研究[J]. 中国粮油学报, 2006, 21(2): 82-85.
- [8] MCELDOON J P, DORDICK J S. Unusual thermal stability of soybean peroxidase[J]. Biotechnol Prog, 1996, 12(4): 555-558.
- [9] 刘稳, 李杨, 段新源, 等. 改良的大豆种皮过氧化物酶纯化方法及酶的底物氧化特性研究[J]. 山东大学学报, 2001, 36(1): 78-83.
- [10] CAZA N, BEWTRA J K, BISWAS N, et al. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase [J]. Water Research, 1999, 33(13): 3012-3018.