

SBD 在重组蛋白质中位移对其酶活性 及与淀粉粒结合性能的影响

季勤^{1 2}, Jean-Paul Vincken¹, Krit Raemakers¹,

Lucas Carolus Josephus Maria Suurs¹, Richard Gerardus Franciscus Visser¹

(1. 瓦赫宁根大学植物科学系作物育种实验室, 荷兰, 瓦赫宁根)

(2. 淮阴师范学院生物系, 223001, 江苏, 淮安)

[摘要] 将环状糊精糖基转移酶的 SBD 基因编码序列连接到萤光素酶基因的 5'-端(SBD-LUC)后, 重组基因通过农杆菌介导导入马铃薯植株中. 对重组蛋白在转基因淀粉粒中的定位与积累、重组蛋白中 SBD 与淀粉的亲合性以及萤光素酶的活性进行了分析比较. 结果表明: 重组蛋白在马铃薯淀粉粒中获得了特异性表达, 当 C-端 SBD 移位到重组萤光素酶蛋白的 N-端后, SBD 和淀粉的亲合性与 LUC-SBD 重组蛋白质比较有所下降, 但萤光素酶活性则与马铃薯遗传背景有关.

[关键词] 重组蛋白质, 萤光素酶, 淀粉结合功能域, 转基因马铃薯

[中图分类号] Q819, [文献标识码] A, [文章编号] 1001-4616(2005)01-0088-05

Effect of SBD 's Position in Fusion Proteins on Activity and Binding Properties

Ji Qin^{1 2}, Jean-Paul Vincken¹, Krit Raemakers¹,

Lucas Carolus Josephus Maria Suurs¹, Richard Gerardus Franciscus Visser¹

(1. Laboratory of Plant Breeding, Department of Plant Sciences, Wageningen University, Wageningen, Netherlands)

(2. Department of Biology, HuaiYin Teachers College, 223001, Huaian, China)

Abstract The starch-binding domain (SBD)-encoding region of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* is fused to the 5'-terminal end of the luciferase (LUC) gene, via an artificial Pro-Thr encoding linker sequence. The genes are introduced in an amylose-containing potato cultivar(cv. Kardal) and/or the amylose-free (*amf*) potato mutant. The results show that the SBD in N-terminal position (SBD-LUC) is capable of granule-targeting during starch biosynthesis. However, the fusion proteins accumulate to lower levels in starch granules than LUC-SBD. The luciferase activities of the fusion proteins appear to be potato genotype-dependent.

Key words fusion protein, luciferase, starch-binding domain, transgenic potato

0 引言

利用基因重组技术改变淀粉生物合成途径, 获得新型淀粉, 这在淀粉品质改良方面有着广阔的应用前景. 我们已将外源基因定位到淀粉粒上, 对淀粉结构进行改良的技术可行性进行了探索^[1]. 利用 *Bacillus circulans* 环状糊精糖基转移酶(cyclodextrin glycosyltransferase, CGTase)的淀粉结合功能域(starch-binding domain, SBD)作为“锚”是该技术的关键. 我们发现, 在淀粉合成过程中, SBD 或 SBD/萤光素酶(luciferase, LUC)重组蛋白实现了在转基因马铃薯淀粉粒中的定位与积累, 而且萤光素酶在重组蛋白质中仍具有活性. 当 LUC 基因编码序列单独导入马铃薯植株中, 未与 SBD 基因编码序列连接, 在转基因淀粉粒中未检测到萤光素酶蛋白. 这表明: 萤光素酶自身缺乏与淀粉粒结合的能力, 要将该酶定位到淀粉粒中, 与

收稿日期: 2004-10-27.

基金项目: 荷兰 Avebe 淀粉公司资助项目.

作者简介: 季勤, 女, 1957—, 博士, 淮阴师范学院生物系副教授, 主要从事 SBD-技术在淀粉结构改良方面的研究.

E-mail: jata1003@sina.com

SBD 相连,用 SBD 作为“锚”是必要的. CGTase 的 SBD 位于该酶蛋白的 C-末端. 上述 SBD/萤光素酶的重组蛋白中, SBD 被放置在 C-端.

本研究的目的是探索当 CGTase 的 C-端 SBD 移位到蛋白质的 N-端,在重组蛋白中, SBD 与淀粉粒结合的性能和萤光素酶的活性是否保持不变?为此,我们把 SBD 基因编码序列连接到萤光素酶基因的 5'-端,并将这一重组基因分别转入野生型和突变型马铃薯植株中,以研究 SBD 在重组蛋白质中的不同位置对其蛋白质性质的影响. 本研究的结果对利用 SBD-平台技术,在植物体内进行淀粉改良的应用将有着重要的指导作用.

1 材料与方法

1.1 材料

宿主菌 *E. coli* DH 5 α 购自荷兰 Invitrogen 公司,质粒 pLuk07 由美国北卡罗莱那州大学 Mankin 博士提供,本实验中所用其它质粒、基因片段以及马铃薯栽培品种 Kardal 和无直链淀粉 (*amf*) 马铃薯突变体^[2]均由荷兰瓦赫宁根大学植物科学系作物育种实验室提供. 引物和连接肽 (linker) 序列合成以及重组质粒的 DNA 序列分析均由荷兰 Baseclear 公司完成. *Pfu* DNA 聚合酶购自英国 Stratagene 公司, DNA 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 DNA Marker 购自荷兰 Pharmacia 公司, anti-SBD 多克隆抗体由 Ji Q 等人制备^[1],山羊抗兔 IgG (H + L) 抗体购自 Bio-rad 公司, Luciferase 多克隆抗体、驴抗羊 IgG Ap 抗体以及 Bright-Glo 萤光素酶酶活检测底物购自美国 Promega 公司.

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增萤火虫萤光素酶基因

以质粒 pLuk07^[3]中萤光素酶基因 DNA 为模板,设计下列引物用于 LUC 基因片段的扩增.

Luc1 :5'-GGCC GTCCACCGAATTCATGGAAGACGCCAAAAACAT-3'和

Luc2 :5'-CGCTGAATACA GGTACCTTTTACAAT-3'

在上游引物 *Luc1* 中引入 *Sal* I 酶切位点 (黑体划线序列),在下游引物 *Luc2* 中引入 *Kpn* I 酶切位点 (黑体划线序列).

PCR 扩增反应条件为 :94 $^{\circ}$ C 45 s ;95 $^{\circ}$ C 45 s ,52 $^{\circ}$ C 45 s ,72 $^{\circ}$ C 4 min ,25 循环 ;72 $^{\circ}$ C 10 min.

1.2.2 SBD-LUC 重组质粒的构建

二元表达质粒 pBIN19/SBD-LUC 将用于 SBD-LUC (SBD 在 N-端) 重组蛋白在马铃薯薯块中的表达. 质粒的构建是从二元表达质粒 pBIN19/(SBD)₂^[4]开始,在构建 pBIN19/SBD-LUC 质粒时, pBIN19/(SBD)₂ 中的第二个 SBD (*Sal* I-*Kpn* I) 片段被扩增的 LUC *Sal* I-*Kpn* I 基因片段取代后形成二元表达质粒 pBIN19/SBD-LUC (图 1). 该质粒经不同双酶切组合初步鉴定后,正确的质粒进行 DNA 序列鉴定.

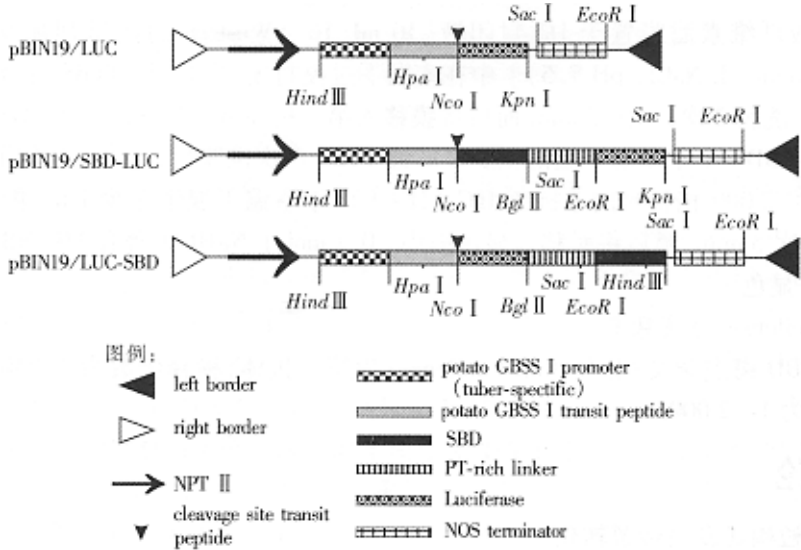


图 1 萤光素酶和萤光素酶/SBD 重组基因植物表达质粒载体示意图

1.2.3 马铃薯转化及植株再生

马铃薯转化参考 Visser 等人的方法^[5].

为了比较 SBD 在组件式重组蛋白质中的位置(在 C-端或 N-端)对酶活性以及 SBD 与淀粉结合功能的影响,将双元表达质粒 pBIN19/SBD-LUC 以及 pBIN19/LUC-SBD 和 pBIN19/LUC^[1]同时转入马铃薯栽培品种 Kardal 和无直链淀粉(*amf*)的马铃薯突变体植株中,转化后形成 6 个不同的转基因系列.

每一系列,选择 50 株独立的小苗转移到含有卡那霉素的 MS 30 培养基^[6]上诱导生根.在栽培品种 Kardal 中,每一系列获得 45 株完整的再生转基因的幼苗.在突变体 *amf* 中,每一系列获得 17 株完整的再生转基因的幼苗,幼苗再进行扩繁,待幼苗生长到大约 5 cm 高时,每一株系选择 5 株移入温室中继续生长. Kardal 和 *amf* 非转基因苗作为对照同时移入温室中生长.

1.2.4 萤光素酶活性的分析

1.2.4.1 转基因薯块中酶活性的测定

从每一株系收获一大一小相似的成熟薯块,沿纵轴对半切开,切取厚度为 2 mm 的薄片,再在薄片的同一部位用叶片取样器(直径为 9 mm)切取圆片.用微型喷雾器将萤光素(0.15 mg/mL)底物均匀喷在薄片上,用发光检测仪计数在 20℃ 时 20 s 内从薯块样品中测得的光子总量^[1].

1.2.4.2 转基因淀粉中酶活性的测定

淀粉粒中酶活的检测是将 10 mg 干淀粉与 30 μ L Bright-Glo 酶活分析底物混合,用发光检测仪计数在 20℃ 时 5 min 内从淀粉样品中测得的光子总量^[1].

1.2.5 Western 斑点杂交分析

对 LUC 和 LUC/SBD 重组蛋白在转基因淀粉粒中积累量的估计采用 Western 斑点杂交分析方法^[1].

1.2.5.1 制胶

制得 12.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶(50 mm \times 50 mm \times 3 mm),在其上用叶片取样器打 9 个直径为 9 mm 的圆孔.然后将带孔的胶片置于尺寸相同,且经转移缓冲液浸湿处理的 Hybond ECL 硝酸纤维素滤膜上.

1.2.5.2 样品制备

20 mg 干淀粉与 200 μ L 2 \times SDS 样品缓冲液(250 mmol/L Tris-HCl pH 6.8, 30% 甘油, 8% SDS, 200 mmol/L DTT, 0.05% 溴酚蓝)混合,并在 100℃ 的水浴中加热 5 min 使蛋白质变性,冷却到室温后,将同一个样品的淀粉胶全部移入胶中一个小孔中.

1.2.5.3 蛋白质转移

将淀粉胶中的蛋白质转移到 Hybond ECL 硝酸纤维素滤膜上的这一操作是在 Phastsystem 全自动多功能水平电泳仪上进行的.转移条件为:20 V, 25 mA, 15℃, 45 min.

1.2.5.4 Anti-SBD 免疫杂交

将转印的硝酸纤维素滤膜置于 1% 封闭液[10 mL 10 \times Western 封闭试剂加 90 mL TBS 溶液(20 mmol/L Tris, 500 mmol/L NaCl, pH 7.5)]中在室温下过夜封闭.次日,用 TTBS 溶液(1 L TBS 溶液中含 0.05% Tween-20)洗膜 2 次,每次 5 min.而后将膜移入第一抗体液(48 mL TTBS 溶液,2 mL 封闭液和 1:500 倍稀释的 anti-SBD)中于室温下温浴至少 2 h.经 TTBS 两次洗膜后,与第二抗体液(32 mL TTBS 溶液,12 mL 封闭液和 1:2 000 倍稀释的羊抗兔 IgG (H + L))于室温下温浴至少 1 h.再用 TTBS 洗膜 2 次和 TBS 洗膜一次,每次 5 min.最后将膜移入显色液中(0.1 mol/L NaHCO₃ 含有 1% NBT/BCIP 和 0.01 mol/L MgCl₂, pH 9.8)显色.

1.2.5.5 Anti-Luciferase 免疫杂交

程序与 anti-SBD 斑点杂交相同. Anti-Luciferase 为第一抗体,稀释倍数为 1:250.第二抗体为驴抗羊 IgG Ap, 稀释倍数为 1:2 000.

2 结果与讨论

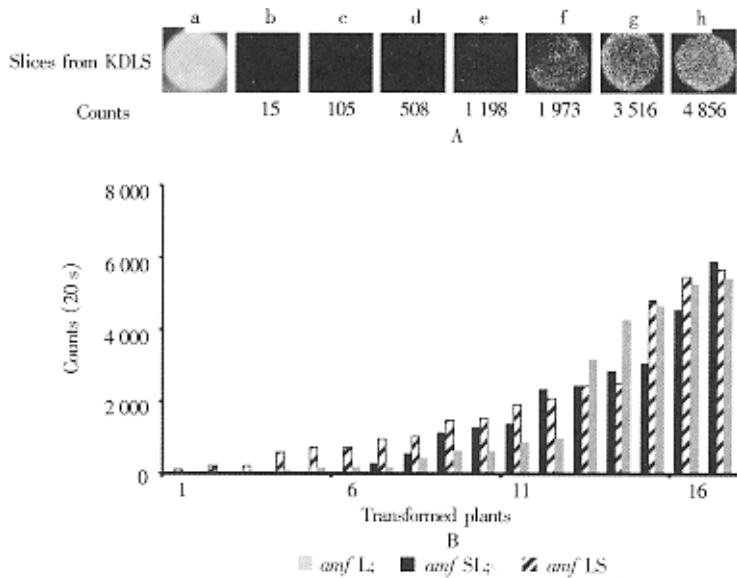
2.1 双元表达质粒构建及马铃薯转化

本试验中,我们构建了 pBIN19/SBD-LUC 表达质粒, SBD 和 LUC 基因是通过一段人工合成的、富含脯氨酸和苏氨酸的肽链(PT-linker)编码序列^[1]连接的.为使表达后的 SBD-LUC 蛋白能够定位到马铃薯淀

粉粒中,在 SBD-LUC 重组基因的 5'-端融合了马铃薯淀粉结合型淀粉合成酶 I (GBSSI) 基因的薯块特异性表达启动子和 GBSSI 蛋白质跨膜运转的信号肽序列 (图 1). 为了比较,我们将质粒 pBIN19/SBD-LUC 和 pBIN19/LUC-SBD 及 pBIN19/LUC 同时转入马铃薯品种 Kardal 和马铃薯突变体 *amf* 植株中,转化后共得到 6 个转基因系列,分别命名为 KDL xx , KDSL xx , KDLS xx , *amf*L xx , *amf*SL xx 和 *amf*LS xx ,其中 L, SL 和 LS 分别代表 LUC, SBD-LUC 和 LUC-SBD 基因, xx 代表在该系列中的株系号. 在 Kardal 的 3 个转基因系列中,每一系列获得 45 个转基因株系,在 *amf* 的 3 个转基因系列中,每一系列获得 17 个转基因株系. 转基因幼苗移入到温室中继续生长,在整个生长期间其表现型与对照相似.

2.2 转基因薯块中萤光素酶活性的检测

对萤光素酶以及萤光素酶/SBD 重组基因在蛋白质水平上表达,首先是采用发光测定仪检测了各株系薯块中萤光素酶的活性. 图 2A 为选择的 KDLS 转基因薯块样品在与萤光素底物反应 20 s 时所获得的萤光素酶活性的萤光影像图和检测到的光子总数. 图 2B 为萤光素酶在 3 个 *amf* 转基因系列薯块中的活性 (为酶与底物反应 20 s 所检测到的光子总数). 从图 2 中可以看出, *amf*L 系列 17 个株系的薯块中所测得的最高萤光素酶活性与 *amf*LS 和 *amf*SL 系列中测得的最高酶活性差异很小,而且 *amf*LS 和 *amf*SL 系列中的酶活性差异也不是很明显,这些结果说明了 SBD 在重组蛋白中的位置对萤光素酶的活性有影响.



A. 选择的 KDLS 转基因薯块样品与萤光素反应后萤光素酶活性的萤光影像图；
a. 薯块影像图； b. 非转基因薯块萤光影像图；
c ~ h. 选择的 KDLS 转基因薯块的酶活性萤光影像图；
B. 3 个 *amf* 转基因系列薯块样品在 20℃ 时, 20 s 内检测到的光子总数.

图 2 转基因马铃薯薯块中萤光素酶的活性

2.3 转基因淀粉粒中重组蛋白积累量的分析

根据薯块中萤光素酶活性的检测结果,将淀粉从每一个系列中酶活性表现最高的薯块中分离出来.对萤光素酶和它的重组蛋白在转基因淀粉粒中积累的水平分别用 anti-SBD 和 anti-Luciferase pAb 抗体进行了 Western 斑点杂交分析.重组蛋白积累量的估计是通过将硝酸纤维素滤膜上蛋白显色点颜色的深浅与标样点^[4]相比较得出的(见表 1).从表 1 中可以看出:(1)当 SBD 位于重组蛋白 C-端,其蛋白质的积累量高于 N-端 SBD 的重组蛋白,该结果与 SBD 蛋白在同样的马铃薯遗传背景中的积累量相同^[1],这表明:在 LUC-SBD 重组蛋白中,SBD 对淀粉粒的亲性不受相连的萤光素酶影响.但当 C-端 SBD 移位到 N-端后,SBD 对淀粉粒的亲性有所下降.这可能是由于重组蛋白折叠后,萤光素酶的肽链将 SBD 表面与淀粉结合的氨基酸遮挡住所造成的^[7].(2)两种重组蛋白质在 *amf* 中的积累量高于它们在 Kardal 中的,说明了重组蛋白质在淀粉粒中积累水平的高低与马铃薯的遗传背景有关. Kardal 和 *amf* 的主要区别是前者体内含淀粉粒结合型的淀粉合成酶 GBSSI,而后者没有.由此我们认为,转基因 Kardal 淀粉粒中,GBSSI 和 SBD 与淀粉结合的位点可能是相同,而且 GBSSI 对淀粉粒的亲性要强于 SBD,因此,SBD 在与

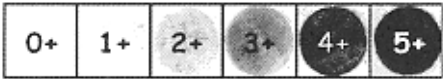
万方数据

淀粉粒结合时不能有效的与 GBSSI 竞争结合位点 ,使得重组蛋白的积累量减少.(3) 在 KDL17 和 *amf*L3 淀粉样品中未检测出萤光素酶蛋白 ,这表明 :萤光素酶自身对淀粉粒缺乏亲和性 ,要将该酶 (非淀粉粒结合型酶) 定位到淀粉粒中 ,连接 SBD“ 锚 ”是必要的.

表 1 转基因淀粉粒中萤光素酶的活性以及重组蛋白质的积累量

株系	光子数(5 min) ¹	蛋白质在淀粉粒中的积累量 ²	
		anti-SBD	anti-Luciferase
KD-UT	0	n. t. ³	n. t.
KDL17	49 (± 28.0)	n. t.	—
KDLS16	3 920 (±11.7)	++	+
KDSL23	7 117 (±20.2)	+	±
<i>amf</i> -UT	0	n. t.	n. t.
<i>amf</i> L32	22 (±11.2)	n. t.	—
<i>amf</i> LS13	50 076 (±33.3)	+++	++
<i>amf</i> SL12	29 225 (±51.1)	++	+

1. 数据(± 标准偏差)为三次测定的平均值 ;
2. 用 Westren 斑点杂交分析法 ,估计重组蛋白在淀粉粒中的积累量是通过与下列标准点样进行比较获得 :



3. 没有检测.

2.4 转基因淀粉粒中萤光素酶活性的检测

转基因淀粉粒中萤光素酶酶活的检测结果(见表 1)表明 :(1) 萤光素酶在转基因 *amf*L 和 KDL 淀粉中的活性极低 ,这是与 Western 印迹分析结果是一致的.(2) 萤光素酶在 *amf*SL12 淀粉中表现出较高的活性 ,其酶活性是 KDSL23 的 4 倍 ,说明了 C - 端 SBD 移位到蛋白质的 N-端后 ,萤光素酶在重组蛋白质中仍然具有活性. N-端 SBD 将萤光素酶定位到 *amf* 淀粉粒中比定位到 Kardal 淀粉粒中更为有效 ,这一结果与重组蛋白在不同遗传背景的马铃薯淀粉粒中的积累量也是一致的.(3) 在比较两种重组萤光素酶在 *amf* 转基因淀粉粒中活性时发现 ,*amf*LS13 中的酶活高于 *amf*SL12 ,而在 Kardal 转基因淀粉粒得到了相反的结果. 这可能是由于 Kardal 淀粉粒中的直链淀粉对 KDLS 重组蛋白的折叠有影响.

3 结论

C-端 SBD 可以作为 N-端的“ 锚 ”将萤光素酶在淀粉的生物合成过程中定位到淀粉粒中 ,并保持它的活性 ,但重组蛋白中的 SBD 与淀粉粒的亲和性有所下降. 而萤光素酶的活性的高低则与马铃薯的遗传背景有关.

[参考文献]

[1] Ji Q , Vincken J P , Suurs L C J M , *et al.* Microbial starch-binding domains as a tool for targeting proteins to granules during starch biosynthesis[J]. Plant Mol Biol , 2003 , 51(5) : 789—801.

[2] Jacobsen E , Hovenkamp-Hermelink J H M , Krijgsheld H T , *et al.* Phenotypic and genotypic characterization of an amylose-free starch mutant of potato[J]. Euphytica , 1989 , 44(1) : 43—48.

[3] Mankin S L , Allen G C , Thompson W F. Introduction of a plant intron into the luciferase gene of Photinus pyralis[J]. Plant Mol Biol Rep , 1997 , 15(2) : 186—196.

[4] Ji Q , Oomen R J F J , Vincken J-P , *et al.* Reduction of starch granule size by expression of an engineered tandem starch-binding domain in potato plants[J]. Plant Biotechnol J , 2004 , 2(3) : 251—260.

[5] Visser R G F. Plant Tissue Culture Manual [M]. Dordreche The Netherlands : Kluwer , 1991.

[6] Murashige T , Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultur[J]. Physiol Plant , 1962 , 15(3) : 473—497.

[7] Kok-Jacon G A , Ji Q , Vincken J P , *et al.* Towards a more versatile α-glucan biosynthesis in plants[J]. J Plant Physiol , 2003 , 160(7) : 765—777.

[责任编辑 孙德泉]