

# 苜蓿中华根瘤菌与耐盐有关基因 *rstA* 在大肠杆菌中的高效表达及其产物的纯化

葛世超 王 磊 李小红 元苏伟 杨苏声\*

( 中国农业大学生物学院微生物学系 农业部微生物资源及其应用重点实验室 北京 100094 )

**摘 要** :苜蓿中华根瘤菌( *Sinorhizobium meliloti* )042BM 与耐盐有关的 1.9kb DNA 片段含有两个开放阅读框,采用 PCR 方法分别将它们扩增,连接到穿梭质粒上,并进行了耐盐功能检测,证明其中的 ORF2 具有耐盐性,定名为 *rstA* 基因。将它分别克隆到表达载体 pThio-HisA、B 和 C 上,构建成重组质粒 pGSA、pGSB 和 pGSC,转化大肠杆菌( *Escherichia coli* )Top10 后,经 IPTG 诱导,pGSA 获得高效表达。表达蛋白占菌体总蛋白的 36%,但大多数以包涵体形式存在。对表达产物依次进行 ProBond™ 树脂亲和纯化、饱和硫酸铵盐析,最后得到纯度为 95% 的融合蛋白。SDS-PAGE 显示纯化的蛋白质为分子量 43kD 的单一蛋白带,经 Western blot 检测证实了表达结果。

**关键词** :苜蓿中华根瘤菌 耐盐 表达 纯化

中图分类号 :Q78 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2005)03-0455-04

在自然环境中,高盐、碱等不利环境条件使根瘤菌的生存与结瘤固氮能力明显下降<sup>[1]</sup>。近几年来,根瘤菌渗透调节机制的研究逐渐受到人们的重视,取得了一些进展。据 Bostford<sup>[2]</sup>报道,在高盐条件下,苜蓿中华根瘤菌细胞中的谷氨酸水平至少增加 5 倍,并且,谷氨酰胺也是某些细菌在高渗环境中积累的产物<sup>[3]</sup>。甘氨酸甜菜碱是重要的渗透调节保护物,当遇到高渗环境时,有些根瘤菌能积累甘氨酸甜菜碱来平衡细胞内外的渗透压<sup>[4]</sup>。1998 年,Osteras 等<sup>[5]</sup>发现,苜蓿中华根瘤菌的甘氨酸甜菜碱的合成由 *betICBA* 组成的操纵子调控。2002 年,Boscari 等<sup>[6]</sup>克隆了苜蓿中华根瘤菌的 *betS* 基因,其表达产物 BetS 是甘氨酸甜菜碱的主要转运蛋白,在早期的渗透调节中起作用,而且它所介导的甜菜碱的积累是细胞自身蛋白所表现的应激反应,类似于分子伴侣的作用。最近,在热带根瘤菌( *Rhizobium tropici* )还发现一些与耐盐有关的基因如 *ntrY*、*greA*、*dnaJ*、*nifS*、*noeJ* 和 *kup* 等<sup>[7]</sup>。

苜蓿中华根瘤菌 042BM 分离自新疆的和田苜蓿,具有良好的耐盐性状,能在含有 0.6mol/L NaCl 的 TY 培养基上生长。本室克隆了与耐盐有关的 1.9kb DNA 片段,包含 2 个阅读框架 ORF2、ORF3,推测的 ORF2 氨基酸序列与苜蓿中华根瘤菌的硫胺素生物合成酶蛋白有 99.5% 的同源性<sup>[8]</sup>。本研究用 PCR 方法对它们进行克隆,对其耐盐功能进行检测,并对 ORF2 进行蛋白表达和纯化的研究,以期深入探讨其耐盐的机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** :大肠杆菌( *Escherichia coli* )Top10、质粒 pThio-HisA、B 和 C 购自 Invitrogen 公司,转化子 GS2-1 含 1.9kb 与耐盐有关 DNA 片段,为本室构建。苜蓿中华根瘤菌 042BM 及其盐敏感菌株 GZ17、穿梭质粒 pBBR1-MCS2、辅助质粒 pKR2013 和大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为本室所保存。

**1.1.2 培养基和培养条件** :根瘤菌采用 TY 培养基<sup>[9]</sup>,在 28℃ 培养。大肠杆菌菌株采用 LB 培养基<sup>[10]</sup>,在 37℃ 培养。

**1.1.3 试剂** :限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒和 DNA 聚合酶分别购自华美公司、Promega 和上海 Sangon 公司,ProBond™ 树脂购自原平皓生物技术有限公司。

### 1.2 引物设计和 PCR 扩增

引物 P1 :5'-ACTCTCGAGCATCATCTGCC-3',含 *Xho* I 酶切位点;引物 P2 :5'-ACCTCTAGACGTTTTCAGCG-3',含 *Xba* I 的酶切位点;引物 P3 :5'-ATCGAATTCATGGAGCGGTC-3',含 *EcoR* I 的酶切位点。引物由上海生工有限公司合成。

以 pGS2-1 为模板,在下列反应体系中进行 PCR 扩增 :ddH<sub>2</sub>O 79.5 $\mu$ L,10 $\times$  Taq Buffer 10 $\mu$ L,dNTP(各 10mmol/L)2 $\mu$ L,pGS2-1 模板 DNA 1 $\mu$ L(600ng),上游引物(100pmol)4 $\mu$ L,下游引物(100pmol)4 $\mu$ L,Taq DNA 聚合酶(5U/ $\mu$ L)0.5 $\mu$ L;反应条件 :100℃ 加热,变性 5min,加入 DNA 聚合酶,在 95℃ 1min,52℃ 1min,72℃ 2min 条件下循环 30 次,72℃ 延伸 10min。PCR 产物纯化操作按试剂盒说明书进行。

基金项目 :国家 973 项目(001CB108905)、国家 863 计划(2003AA241150)、欧盟科技合作项目(ICA4-CT-2001-10056)

\* 通讯作者。E-mail :yangssh@cau.edu.cn

作者简介 :葛世超(1963-),男,安徽省人,理学博士,研究方向为分子微生物学。

收稿日期 :2004-10-11,修回日期 :2005-02-05

### 1.3 DNA 操作

质粒的制备、酶切、连接、重组 DNA 的筛选和克隆按文献 10 进行。重组质粒以 DH5 $\alpha$  为受体菌。

### 1.4 三亲本杂交和功能检测

具体操作参照文献 10 进行。

### 1.5 融合蛋白表达载体的构建

用 *Bgl* II 和 *Xba* I 酶切重组质粒,回收含有 ORF2 的 DNA 片段,然后与经同样双酶切的 pThio-HisA、B 和 C 连接。

### 1.6 融合基因的诱导表达和 Western 印迹检测

用构建得到的表达载体 pGSA、pGSB 和 pGSC 转化大肠杆菌 Top10,并在含有 100 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养。当  $OD_{550}$  = 0.5 时,加入 IPTG (终浓度为 1mmol/L) 诱导表达。在 4h 后收获菌体,离心,加入 1 $\times$  SDS 加样缓冲液,煮沸 3min,检测表达情况。

样品处理及转膜按文献 10 和 Promega 及 Invitrogen 的产品说明所介绍的方法进行,其中第一抗体为纯的鼠疫球蛋白单克隆抗体(IgG1K),第二抗体为碱性磷酸酯酶标记的羊抗鼠 IgG。

### 1.7 融合蛋白的纯化

**1.7.1 包涵体的分离、溶解和复性:**菌体用结合缓冲液(20mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500mmol/L NaCl, pH7.8)悬浮,用超声波及冻融法破碎菌体,并在离心后用 SDS-PAGE 分析目的蛋白的存在状态。将离心所得沉淀重悬于裂解液(20mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500mmol/L NaCl, pH7.8; 6mol/L 盐酸胍),在室温下作用 2h 至澄清透明。用 0.22 $\mu$ m 微孔滤膜过滤裂解液,取上清稀释复性。

**1.7.2 亲和层析:**按说明书将 ProBond<sup>TM</sup> 树脂预平衡。将复性的蛋白质溶液直接上柱,使目的蛋白结合到 ProBond<sup>TM</sup> 树脂上,先用结合缓冲液,后用洗液(20mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 500mmol/L NaCl, pH6.0)洗柱。然后依次用 50、200、350 和 500mmol/L 咪唑洗脱液将目的蛋白洗脱下来,分管收集并编号。采用 SDS-PAGE 检查其蛋白含量。

**1.7.3 饱和硫酸铵盐析:**将含有目的蛋白的不同浓度的咪唑洗脱液合并、透析,然后将透析后的蛋白液依次用 50%、75% 的饱和硫酸铵沉淀。重新悬浮沉淀、透析,以 SDS-PAGE 检查纯度。

**1.7.4 蛋白定量和 SDS-PAGE 蛋白质密度扫描:**以牛血清白蛋白作标准,用考马斯亮蓝染料法进行定量分析,然后用图像密度扫描仪扫描蛋白质的电泳凝胶,确定表达的融合蛋白占菌体总蛋白的比例和纯度。

## 2 结果

### 2.1 *rstA* 基因的克隆和功能检测

042BM 与耐盐有关的 1.9kb DNA 片段包括两个开放阅读框 ORF2 和 ORF3,其转录方向相反<sup>[8]</sup>。以 P1、P3 为引物, pGS2-1 为模板,通过 PCR 扩增出 ORF2,在其两端引入了 *Eco*R I 和 *Xho* I 的酶切位点,扩增的 DNA 片段为 925bp。将产物回收、纯化后,用此双酶切消化,连接到经同样酶切的

pBBR-MCS2 上。然后将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,得到转化子 GS3,提取其重组质粒 pGS3,经酶切检测正确。以 GS3 为供体,盐敏感突变株 GZ17 为受体,在辅助质粒 pRK2013 的协助下进行三亲本杂交,在含有 0.4mol/L NaCl、30 $\mu$ g/mL 萘啶酮酸和 30 $\mu$ g/mL 卡那霉素的 FY 平板上获得了接合子 GSZ3,证明 ORF2 使盐敏感突变株恢复了耐盐性,定名为 *rstA* 基因。

以 P2、P3 为引物扩增出 ORF3,扩增的 DNA 片段为 819bp,连接到 pBBR-MCS2 上,得到重组质粒 pGS4,经酶切检验正确。以 GS4 为供体, GZ17 为受体,进行三亲本杂交,发现 ORF3 不能使盐敏感突变株恢复耐盐性。

### 2.2 重组表达载体的构建

表达载体 pThioHisA、B 和 C 的大小分别为 4.4kb,含有一个杂合的启动子 (*trc* *trp-lac*),它能使连接在下游的靶基因和上游的 HP-硫氧还蛋白基因一起高效表达形成融合蛋白。用 *Eco*R I、*Xho* I 酶切重组质粒 pGS3,回收含有目的基因的片段,分别插入到 pThioHisA、B 和 C 的 *Eco*R I、*Xho* I 位点之间,将重组的表达质粒转化大肠杆菌 Top10,大量筛选得到含有目的基因的 3 种重组质粒,编号为 pGSA、pGSB 和 pGSC。由于 pThioHisA、B 和 C 在多克隆酶切位点后相互之间错开 1 个碱基,由此构成 3 种编码氨基酸的方法,使连接到酶切位点后的外源片段编码氨基酸的读框方式得以和其中的一种相吻合,从而获得符合阅读框表达的重组载体。

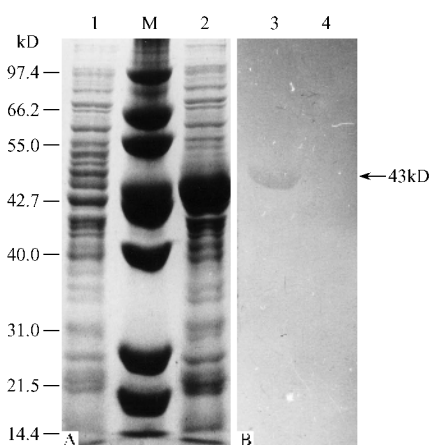


图1 (A)融合基因 *trxA-rstA* 通过 IPTG 诱导表达的 SDS-PAGE 图谱 (B)通过 IPTG 诱导表达的融合蛋白 TrxA-RstA 的 Western 印迹电泳图谱

Fig.1 (A) SDS-PAGE analysis of fusion gene *trxA-rstA* expression induced by IPTG; (B) The SDS-polyacrylamide gel recombinant electrophoresis of Western blot of fusion proteins TrxA-RstA induced by IPTG

M. Mid-range protein molecular weight markers; 1. Whole cell SDS-PAGE of *E. coli* Top10 (pGSA) without induction 2. Whole cell SDS-PAGE of *E. coli* Top10 (pGSA) induced by IPTG. 3. Western blot of the whole cell of *E. coli* Top10 (pGSA) induced by IPTG 4. Western blot of the whole cell of *E. coli* Top10 (pGSA) without induction.

2.3 融合基因的诱导表达及 Western 印迹检测

重组质粒 pGSA、pGSB 和 pGSC 在大肠杆菌 Top10 中经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 检测后发现 ,在含有 pGSA 的大肠杆菌 Top10 中 ,融合蛋白 TrxA-RstA 得到诱导表达 ,其大小为 43kD ,是 12kD 硫氧还蛋白与推测的 31kD 的 RtsA 蛋白分子量之和(图 1-A)。Western blot 检测表明 ,含有 pGSA 的 Top10 经 IPTG 诱导后比未经诱导的对照出现了 1 条大约 43kD 的特异蛋白带(图 1-B)。

2.4 融合蛋白的纯化

含有 pGSA 的重组菌株经 IPTG 诱导后得到高效表达 ,表达产物为包涵体 ,在诱导 4h 后 ,融合蛋白占菌体总蛋白质的 36%。将包涵体分离、溶解和复性稀释 ,经 ProBond™ 树脂亲和和纯化 ,纯化后的融合蛋白占菌体总蛋白的比例为 90%(图 2-A)。将此蛋白液透析后用饱和硫酸铵沉淀 ,结果得到的融合蛋白占菌体总蛋白的比例为 95%(图 2-B)。

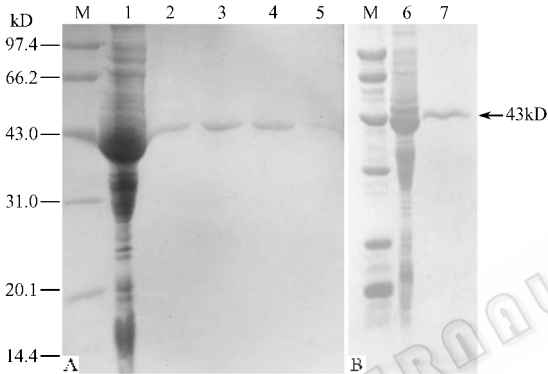


图 2 (A)亲和层析 TrxA-RstA 融合蛋白后的 SDS-PAGE 图谱 (B)饱和硫酸铵盐析 TrxA-RstA 蛋白后的 SDS-PAGE 图谱

Fig.2 (A) SDS-PAGE analysis of TrxA-RstA fusion proteins induced by IPTG using ProBond™ resin affinity chromatography (B) SDS-PAGE analysis of fusion protein precipitated by saturated ammonium sulfate. M. Mid-range protein molecular weight markers ;1. Whole cell protein profiles of *E. coli* Top10 (pGSA) induced by IPTG ;2 ~ 5. Protein solutions of 50 ,200 ,350 ,500mmol/L imidazole gradient elution by using ProBond™ resin affinity chromatography ;6. Whole cell protein SDS-PAGE of *E. coli* Top10 (pGSA) induced by IPTG ;7. Profiles of fusion protein precipitated by saturated ammonium sulfate.

从上述结果可知 ,*rstA* 基因的大小为 925bp ,编码 266 个氨基酸 ,通过与非重复基因库进行同源性比较 ,已发现氨基酸序列与苜蓿中华根瘤菌焦磷酸硫酸素合成酶蛋白有 99.5% 的同源性<sup>[8]</sup>。由于硫酸素是碳水化合物代谢中转酮酶、 $\alpha$ -酮酸脱羧酶、 $\alpha$ -酮酸脱氢酶和乙酰乳酸合成酶的辅酶 ,在代谢中具有不可替代的作用 ,主要是稳定乙酰负离子。所以 ,如果缺乏硫酸素 ,就会导致糖代谢的阻断以及丙酮酸的积累 ,影响糖代谢过程中能量的产生。由此 ,可能会对耗能的耐盐调

节机制产生影响。另外 ,在高渗条件下 ,大肠杆菌的生长抑制可被外源性的甘氨酸甜菜碱与脯氨酸所缓解 ,而这两种物质可通过 ProP 和 ProU 转运系统在细胞内积累 ,以抵抗外界环境的高渗透冲击。ProP 系统是存在于细胞膜上的脯氨酸与甘氨酸甜菜碱的渗透酶 ,这种酶在高渗环境中被激活 ,催化有关的反应 ,直到环境中渗透压恢复正常时为止<sup>[11]</sup>。由于 *proP* 的表达受到渗透压的调控 ,而 *rstA* 的启动区存在 1 个类似于大肠杆菌 *proP* 基因启动子 -35 和 -10 区的元件 ,由此推测 *rstA* 可能参与耐盐的调控。本文将 *rstA* 基因导入大肠杆菌 ,获得高效表达 ,并纯化了其蛋白产物 ,以便进一步研究其结构和耐盐功能。

参 考 文 献

[ 1 ] Steinbom J ,Roughley R J. Sodium chloride as a cause of low numbers of *Rhizobium* in legume inoculants. *J Appl Bacteriol* ,1974 **37** :93 - 99.

[ 2 ] Bostford J L , Lewis T A. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti* production of glutamic acid in response to osmotic stress. *Appl Environ Microbiol* ,1990 **56** :488 - 494.

[ 3 ] Hua S S ,Tsai T ,Lcheus G M , *et al.* Accumulation of amino acid in *Rhizobium* sp. strain WR1001 in response to sodium chloride salinity. *Appl Environ Microbiol* ,1982 **44** :135 - 140.

[ 4 ] Sauvage D , Hamelin J , Larher F. Glycine betaine and other structurally related component improve the salt tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Plant Sc Lett* ,1983 **31** :291 - 302.

[ 5 ] Osteras M ,Boncompagni E , Vincent N , *et al.* Presence of a gene encoding choline sulfatase in *Sinorhizobium meliloti* bet operon : Choline-O-sulfate is metabolized into glycine betaine. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1998 **95** :11394 - 11399.

[ 6 ] Boscari A ,Mandon K ,Dupont L , *et al.* BetS is a major glycine betaine/proline betaine transporter required for early osmotic adjustment in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* ,2002 **184** (10) : 2654 - 2663.

[ 7 ] Nogales J , Campos R , BenAbdelkhalik H , *et al.* *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant Microbe Interact* ,2002 **15** (3) :225 - 232.

[ 8 ] 葛世超 樊振川 ,陈雪松 ,等. 苜蓿中华根瘤菌与耐盐有关 DNA 的亚克隆和序列分析. *微生物学报* ,2001 **41** (1) :9 - 15.

[ 9 ] Honeycutt R J ,McClland M ,Sobral B W. Physical map of the genome of *Rhizobium meliloti* 1021. *J Bacteriol* ,1993 **175** (21) : 6945 - 6952.

[ 10 ] Sambrook J ,Fritsch E F , Maniatis T. *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* 2<sup>nd</sup> ed. New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press ,1989 :908.

[ 11 ] Dunlap V J , Csonka L N. Osmotic regulation of L - Proline transport in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* ,1985 **163** :296 - 304.

## The expression of gene related to salt tolerance from *Sinorhizobium meliloti* 042BM in *Escherichia coli* and purification of its fusion protein

GE Shi-chao WANG Lei LI Xiao-hong QI Su-wei YANG Su-sheng\*

( Department of Microbiology , College of Biological Sciences ,Key Laboratory for Agro-Microbial Resources and Application of Agriculture Ministry , China Agricultural University , Beijing 100094 , China )

**Abstract :** A 1.9kb DNA fragment related to salt tolerance of *S. meliloti* strain 042BM containing two open reading frames were obtained by PCR amplication and ligated into shuttle vector pBBR1-MCS2. The complementation experiment showed that ORF2 is related to salt tolerance and named as *rstA* gene. Then the gene was cloned into the expression vector pThio-HisA , B and C , respectively , and recombinant expression vectors pGSA , pGB and pGC were constructed , and transformed into *E. coli* Top10. Inducing by IPTG and analyzing with SDS-PAGE , the fusion protein encoded by pGSA was obtained and it is 36% content of whole cell protein. It was isolated and purified by affinity chromatography on ProBond™ , and the inclusion body precipitated by saturated sulfate ammonium , and 95% purity of fusion protein was obtained. The final product displayed a single band with a corresponding molecular weight 43kD in SDS-PAGE , and was verified by the Western blot.

**Key words :** *Sinorhizobium meliloti* , Salt tolerance , Expression , Purification

Foundation item :National Key Base Research Developing Project Program ( 001CB108905 ) ; Chinese National Program for High Technology Research and Development ( 2003AA241150 ; European Commission INCO-DC Program ( ICA4-CT-2001-10056 )

\* Corresponding author. E-mail : yangssh@cau.edu.cn

Received date :10-11-2004

### 敬告作者

近年《微生物学报》的投稿激增,由于有些作者对本刊不甚了解,将不适宜在本刊刊出的稿件也投向本刊,由此延误了论文的发表。另外,投稿时提供的材料也不符合本刊要求。鉴于此种情况,本刊编辑部特此提醒热心投稿本刊的作者,在投稿之前注意本刊的特点。

1. 办刊宗旨 《微生物学报》是以微生物学基础研究、应用基础研究以及高技术创新为主的综合性学术刊物,主要报道微生物学研究领域中的最新研究成果和研究动态,促进学术交流。

2. 报道内容:普通微生物学、工业、农业、医学、兽医微生物学、病毒学、免疫学以及与微生物学有关的生物工程等方面的研究成果。应用机理的研究涉及到农业、食品、医药、化工轻工和能源环保等领域。

3. 栏目设置:设有研究报告、研究简报和小型综述等3个栏目。本刊主要刊登微型综述(Mini review),来稿字数最好控制在5000字以内,作者一定要结合自己的工作,要求文献新,观点明,有评论,有展望,切忌堆砌资料只述不评。

4. 单位介绍信 《微生物学报》是我国微生物领域中很有影响力的刊物,已交换发行到海外40多个国家和地区。为了维护我国科学研究成果的知识产权,本刊编辑部在“投稿要求”和“收稿通知”中向所有作者一再强调“投稿时务必附有“研究内容所属单位”的介绍信,说明是否涉及保密、作者和单位的署名是否无误、有无一稿两投等事项。

另外,与国外作者合写的论文,应出示国外作者同意以中文形式发表及署名顺序的说明。