

• 农业生物技术 •

小麦谷氨酰胺合成酶的原核表达特点

谷明鑫¹, 韦一昊², 贾喜婷¹, 熊淑萍², 马新明², 王小纯^{1,2,3}

1 河南农业大学 生命科学院, 河南 郑州 450002

2 河南农业大学 河南粮食作物协同创新中心, 河南 郑州 450002

3 河南农业大学 省部共建小麦玉米作物学国家重点实验室, 河南 郑州 450002

谷明鑫, 韦一昊, 贾喜婷, 等. 小麦谷氨酰胺合成酶的原核表达特点. 生物工程学报, 2018, 34(2): 264–274.

Gu MX, Wei YH, Jia XT, et al. Expression characteristics of glutamine synthetase of wheat in *Escherichia coli*. Chin J Biotech, 2018, 34(2): 264–274.

摘要: 谷氨酰胺合成酶 (GS) 是植物氮同化的关键酶, 为了研究小麦 GS 同工酶的结构及其表达特点, 我们构建了小麦 GS1、GSr、GSe、GS2 和 GS2 前体 GS2p 的原核表达载体, 并对表达条件进行了优化。结果表明, 尽管小麦 GS 同工酶氨基酸序列同源性达 70%–80%, 蛋白质表达却各具特点。30 °C 诱导 3 h 后, GSr、GSe 及 GS2 表达量达最大, 诱导 7 h 后 GS1 表达量达最大, GS2p 不表达, 表达量依次为 GS1 (22%) > GSr (15%) > GS2 (12%) > GSe (5%); 且 GSe 可溶性表达, GS1 主要为可溶性表达, 而 GSr 和 GS2 为包涵体。30 °C 诱导 3 h, GS 同工酶相对转录量为 GSr (7.59) > GS2 (1.84) > GS2p (1.66) > GSe (1.46) > GS1 (1.00), 酶蛋白质翻译水平与转录水平不一致。mRNA 结构分析显示, GS 同工酶翻译起始区稳定二级结构的自由能不同: GS1 (14.4) < GSr (17.2) < GS2 (22.6) < GSe (25.4) < GS2p (31.6), 自由能越小, 翻译起始区结构越不稳定, 蛋白表达水平越高。GS1、GSr、GSe 和 GS2 可溶性表达的最佳诱导条件不同, 分别是 30 °C 诱导 5 h、16 °C 诱导 15 h、37 °C 诱导 5 h 及 25 °C 诱导 7 h; 可溶性表达量为 GS1 (20%) > GSr (13%) > GS2 (10%) > GSe (7%), 酶活性为 GS1 > GSe > GS2, GSr 无活性。可见, GS 同工酶的基因序列决定了蛋白质在原核细胞中的表达量、状态及其活性。

关键词: 谷氨酰胺合成酶, 同工酶, 原核表达, 表达特点

Received: May 31, 2017; **Accepted:** August 1, 2017

Supported by: National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0300205), Modern Agricultural Technology System in Henan Province (No. S2010-01-G04).

Corresponding author: Xiaochun Wang. Tel: +86-371-63555790; E-mail: xiaochun.w@163.com

国家重点研发计划支持项目 (No. 2016YFD0300205), 河南省现代农业 (小麦) 产业技术体系技术创新团队项目 (No. S2010-01-G04) 资助。

网络出版时间: 2017-09-06

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170906.1515.006.html>

Expression characteristics of glutamine synthetase of wheat in *Escherichia coli*

Mingxin Gu¹, Yihao Wei², Xiting Jia¹, Shuping Xiong², Xinming Ma²,
and Xiaochun Wang^{1,2,3}

¹ Department of Biochemistry, College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

² Collaborative Innovation Center of Henan Grain Crops, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

³ State Key Laboratory of Wheat and Maize Crop Science in China, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China

Abstract: Glutamine synthetase is a key enzyme in plant nitrogen assimilation. To study the structure of wheat glutamine synthetase isoenzymes, GS1, GSr, GSe, GS2 and GS2p of wheat were cloned into pET-21a, and the expression condition was optimized. Although wheat glutamine synthetase isoenzymes had 70%–80% amino acid sequence homology, the isoforms expressed with different characteristics. Induced at 30 °C, the most expression level of GSr, GSe and GS2 was after 3 h, and of GS1 was at the 7 h whereas no GS2p was expressed, and the GS isoenzymes showed different expression level, with the order of GS1 (22%)>GSr (15%)>GS2 (12%)>GSe (5%). GSe expressed as soluble protein, and GS1 expressed mainly as soluble protein whereas GSr and GS2 expressed as insoluble proteins. Induced at 30 °C for 3 h, mRNA transcript levels of GS isoforms were different, with the order of GSr (7.59)>GS2 (1.84)>GS2p (1.66)>GSe (1.46)>GS1 (1.00). The levels of mRNA transcription were not consistent with the level of the protein translation. The analysis of mRNA secondary structure showed the free energy of translation initiation region of glutamine synthetase isoforms was different, with the order of GS1 (14.4)<GSr (17.2)<GS2 (22.6) <GSe (25.4) <GS2p (31.6), the smaller freed energy, the more unstable mRNA secondary structure of translation initiation region and the higher level of protein expression. Soluble expression condition of glutamine synthetase isozymes was also different, with GS1, GSr, GSe and GS2 induced at 30 °C for 5 h, 16 °C for 15 h, 37 °C for 5 h, and 25 °C for 7 h respectively. The soluble protein showed different expression level with GS1 (20%)>GSr (13%)>GS2 (10%)>GSe (7%), and different activities with GS1>GSe>GS2, and the activity of GSr was not detected. The gene sequence of glutamine synthetase isoenzymes determines the amount, status and activity of proteins expressed in prokaryotic cells.

Keywords: glutamine synthetase, isozyme, prokaryotic expression, expression characteristics

大肠杆菌表达系统因遗传背景清晰、培养条件简单、生长速度快、成本低、产量高、表达产物纯化过程简单、产物稳定性好及不易污染等优点,成为基因工程中应用最广泛的原核表达系统,取得了巨大的科研价值及经济效益^[1-3]。但原核表达也存在一些缺点,表达产物常以包涵体形式存在,部分真核基因表达量低,而且由于缺乏翻译后加工修饰机制,表达产物生物活性低等^[4-6]。大肠杆菌表达系统的局限性目前已有一些相应的解决方法,如携带 pRARE2 质粒的 BL21 衍生菌株 Rosetta,补充了稀有密码子对应的 tRNA,可提高稀有密码子多的真核基因在原核细胞中的表达量^[7-8];通过改变 5'端的稀有密码子降低翻译起始区二级结构的稳定性,促进核糖体与 mRNA

结合,增强翻译起始效率以提高表达量^[9];通过降低诱导温度^[10],或通过融合表达增加目的蛋白溶解性。雷荣悦等将人源 BMP6 分别与 5 种融合标签构建重组表达载体,发现只有 MBP 能增强 rhBMP6 的溶解性^[11]。

谷氨酰胺合成酶 (Glutamine synthetase, GS) 是植物氮素同化的关键酶^[12],依据细胞定位分为胞液型 GS (GS1) 和质体型 GS (GS2) 两大类,它们在作物生长发育和产量形成中具有重要作用^[13]。栽培小麦的胞液型 GS1 有 TaGS1 (TaGS1.1)、TaGSr (TaGS1.2) 和 TaGSe (TaGS1.3) 三种,基因序列同源性 65%–75%,氨基酸序列同源性约 80%,亚基约 39 kDa;质体型 GS 只有 TaGS2 一种,与 GS1 基因序列同源性为 50%–60%,与

GS1 氨基酸序列同源性为 70%–75%，亚基约 42 kDa^[14-15]。GS 同工酶在植物氮素代谢中功能不同，TaGS1 和 TaGSr 主要参与小麦衰老叶片的氮素再利用^[16]；大麦根部 HvGSe 能缓解高浓度 NH_4^+ 的毒害，籽粒 HvGSe 参与种子发育过程中的氮素同化^[17]；GS2 则参与光呼吸释放 NH_4^+ 和硝酸根还原产生 NH_4^+ 的同化^[18]。深入研究小麦 GS 同工酶结构及其调控机制有助于阐明提高小麦氮素利用效率的理论基础，但是 GS 同工酶氨基酸序列，尤其是胞液型 GS 同工酶氨基酸序列同源性太高，在蛋白质水平难以区分，目前基因特异性表达分析多局限在 mRNA 水平上。小麦组织中 GS 同工酶量低，加之胞液型 GS 同工酶难以区分，从小麦中纯化 GS 同工酶难以满足深入研究的需求。在原核细胞中表达 GS 同工酶，可获得足量的高纯度的酶蛋白，便于进行结构解析，或筛选特异性抗体开展特异性表达或免疫组化等深入研究。

本研究利用无缝克隆技术将小麦 GS 同工酶 TaGS1、TaGSr、TaGSe、TaGS2 的编码区基因序列及 TaGS2 前体 TaGS2p 的编码区基因序列（含叶绿体定位的信号肽的基因序列）插入 pET-21a 表达载体，分析了小麦 GS 在原核细胞中的表达特点及其原因，探索了 GS 同工酶可溶性表达的条件，为研究小麦 GS 同工酶结构及其表达调控机制奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 质粒和菌株

菌株 *Escherichia coli* DH5 α 和 Rosetta、载体 pET-21a 均由本实验室保存。

1.2 克隆载体构建

从 NCBI 获得小麦 GS1 (DQ124209)、GSr (AY491968)、GSe (AY491970) 及 GS2p (DQ124212) 基因序列，设计特异性克隆引物（表 1），提取叶

表 1 GS 同工酶克隆的特异性引物

Table 1 The specific cloning primers of GS isoenzymes

Primer	Primer sequence (5'–3')
GS1a-S	ACCCGCCTTCCTTCCTGC
GS1a-A	CGATGATGCGACCTACCTAAGC
GSr1-S	CATTCCCTCCTTGCGAG
GSr1-A	AAATGGAAACACGAAACG
GSe1-S	GAAGAAGAAGAAGAGGTAGCCATG
GSe1-A	AACAGAACCCATCAAAGCCAC
GS2a-S	GCGGAGTAAGTAAGTAAGCAGC
GS2a-A	CATGCGGAGCGGTTCTAC

片、籽粒等不同部位 RNA，利用 Hiscript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Vazyme) 逆转录为 cDNA。以此为模板，利用 Phanta EVO Super-Fidelity DNA Polymerase (TaKaRa) 进行 PCR 扩增：95 °C 预变性 3 min；95 °C 变性 15 s，GS1 67 °C/GSr 51 °C/GSe 60 °C/GS2p 57 °C 退火 15 s，72 °C 延伸 35 s，循环 35 次后 72 °C 延伸 7 min。利用 Mini BEST DNA Fragment Purification Kit Ver.4.0 (TaKaRa) 纯化扩增产物，然后连接 T 载体，转化 DH5 α ，筛选阳性克隆送华大基因公司测序鉴定。

1.3 表达载体构建

据测序结果设计无缝克隆引物（表 2）。以重组质粒为模板进行 PCR 扩增：95 °C 预变性 2 min；95 °C 变性 15 s，72 °C 退火 25 s，72 °C 延伸 35 s，30 个循环后 72 °C 延伸 7 min。PCR 产物纯化后，使用 Clon Express One Step Cloning Kit (Vazyme) 构建 pET-21a 重组载体，转化 DH5 α ，筛选阳性克隆并进行 DNA 测序鉴定。提取 pET-21a 重组质粒转化 Rosetta，挑取阳性单克隆，接种于 5 mL LB 液体培养基（含 1 mmol/L 羧苄青霉素 Car、34 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素 Cm），37 °C、220 r/min 培养过夜，将菌种分装保存于 -80 °C。

1.4 GS 同工酶原核表达

取上述菌种 5 μL 接入 5 mL LB 液体培养基（含

表 2 GS 同工酶无缝克隆引物

Table 2 One step cloning primers of GS isoenzymes

Primer	Primer sequence (5'-3')
GS1-S	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGCT CCTCACCGATCTCC
GS1-A	TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTGGGCT TCCACAGGATGGTGGTCTC
GSr-S	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCCA GCCTCGCCGACC
GSr-A	TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTGAGG AGGAGCGTGGTCTCGGCG
GSe-S	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCTCC GCTCGCCGACCTTC
GSe-A	TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTCTTGC CATTGGAGAGACCGGCC
GS2-S	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGCTCGG CCCGGAGACCACCG
GS2-A	TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTACCT TCAGCGCCAGCTTCTTGGC
GS2p-S	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCGC AGGCGGTGGTGC
GS2p-A	TGCTCGAGTGCGGCCGCAAGCTTTACCT TCAGCGCCAGCTTCTTGGC

1 mmol/L Car, 34 $\mu\text{g/mL}$ Cm), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 过夜活化。取活化菌液 4 mL 接入 100 mL LB 液体培养基 (含上述浓度抗生素), 扩大培养至 OD_{600} 达 0.6 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L。分别于 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 诱导 3 h、5 h、7 h 后取样 10 mL, 离心收集菌体, 用 1 mL 裂解液 (含 10 mmol/L Tris, 10 mmol/L MgCl_2 , 0.05% Triton X-100, 100 $\mu\text{g/mL}$ PMSF, pH 7.5) 悬浮菌体, 超声波破碎后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、13 000 r/min 离心 30 min, 取出上清; 沉淀用 1 mL 裂解液悬浮。利用 SDS-PAGE 分离菌体裂解液、菌体裂解液上清和沉淀中的蛋白质, 利用 Quantity One 分析目的蛋白含量。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、30 $^{\circ}\text{C}$ 、25 $^{\circ}\text{C}$ 、16 $^{\circ}\text{C}$ 等不同温度下诱导表达, 并利用 SDS-PAGE 检测诱导后不同时间点菌体裂解液上清和沉淀中的蛋白表达情况, 以确定最佳诱导条件。

1.5 RNA 提取和 RT-qPCR 分析

取诱导 3 h 后的上述菌液 1 mL, 离心沉淀菌体, 用细菌总 RNA 提取试剂盒 (生工生物工程

(上海) 有限公司) 提取 RNA, 逆转录获得相应的 cDNA。利用 SYBR Green Mix (Vazyme) 进行 RT-qPCR 扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 共 40 个循环, 利用 iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection system (Bio-Rad) 检测产物荧光信号 (引物见表 3)。以 *E. coli* RecA 基因为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算基因的相对表达量。

1.6 翻译起始区二级结构预测

利用 RNA Structure 5.3 对 GS 同工酶重组载体翻译起始区 100 nt (-30 nt~+70 nt) 的 mRNA 二级结构和自由能 (ΔG) 进行分析预测^[19-20]。

1.7 Western blotting 鉴定 GS 同工酶

利用 SDS-PAGE 分离蛋白样品, 然后转移至 PVDF 膜上, 利用小麦 GS 多克隆抗体检测 GS 同工酶的特异表达, 使用 Bio-Rad Clarity Western ECL 试剂盒显色^[21-22], 用 Chemi DocTM XRS+ Imaging System (Bio-Rad) 扫描试验结果。

1.8 酶活测定

分别挑 3 个含 GS 同工酶的阳性克隆, 在最佳诱导条件下诱导, 取 10 mL 菌液离心, 沉淀菌体加入 1 mL 裂解液悬浮, 超声破碎后离心取上清 (方法同前) 测定 GS 酶活^[23]。

表 3 GS 同工酶 qPCR 引物

Table 3 qPCR primers of GS isoenzymes

Primer	Primer sequence (5'-3')
GS1-qPCR-S	AAGGACGGCGGGTTCAA
GS1-qPCR-A	GCGATGTGCTCCTTGTGCTT
GSr-qPCR-S	GAGGACAGCGAAGTCATCCTCTA
GSr-qPCR-A	AGGTTGTCACCCCTCCTGAA
GSe-qPCR-S	CTGTGACTGCTATGCGCCTAAC
GSe-qPCR-A	CCGCGTTGTACCGCTTGT
GS2-qPCR-S	GGTTGACAGGGCTACACGAGA
GS2-qPCR-A	GAGCAGCCACGGTTCGC
RecA-S	CTTGCGGCACGTATGATGAG
RecA-A	GCAGCGTGTGGACTGCTTC

2 结果与分析

2.1 GS 同工酶在大肠杆菌中的表达特点

30 °C 下, GS 同工酶在 Rosetta 菌株中表达特点各不相同 (图 1A)。与诱导前 (0) 相比, 诱导后 GS1 和 GSr 在约 41 kDa 处出现大量特异表达的蛋白, 与融合蛋白理论值一致, 且 GS1 于诱导 7 h 后表达量达最大, 约占细菌总蛋白的 22%; GSr 于诱导 3 h 后表达量达最大, 约占菌体总蛋白的 15%。GSe 在 41 kDa 处出现一条微弱的蛋白带, 与融合蛋白理论值一致。GS2 在 44 kDa 处出现诱导蛋白带, 与融合蛋白理论值一致, 且诱导后 3–7 h 差异不大, 约占细菌总蛋白的 12%。GS2p 没有出现特异的诱导蛋白带。Western blotting 进一步证明, GSe 的确微量表达, 而 GS2p 无表达 (图 1B)。可见, 高度同源的 GS 同工酶在原核细胞中的表达水平存在明显差异, 这些差异可能与基因序列的差异有关。

2.2 GS 同工酶在大肠杆菌中的转录水平

由于 GS 同工酶在 Rosetta 菌株中表达量差异很大, 我们提取了诱导 3 h 的细菌 RNA, 利用

RT-qPCR 检测了 GS 同工酶的相对转录水平。结果显示, GSr 的 mRNA 表达量为 7.59, 远远高于 GS1 (1.00)、GSe (1.46)、GS2 (1.84) 及 GS2p (1.66), 后 4 个基因的 mRNA 水平相近。可见, GS 同工酶的蛋白质翻译与转录水平不一致, 原核生物蛋白质表达量不是由相应的 mRNA 量决定。

2.3 GS 同工酶翻译起始区二级结构预测

原核生物基因表达没有时空差异, 即转录与翻译同时进行。只有出现像终止子那样稳定的二级结构才会影响蛋白质的翻译。利用 RNA Structure 5.3 预测了 GS 同工酶原核表达载体翻译起始区 mRNA 二级结构及维持二级结构的自由能。结果表明, 同工酶翻译起始区二级结构的自由能为: GS1 (14.4) < GSr (17.2) < GS2 (22.6) < GSe (25.4) < GS2p (31.6)。GS1 的 mRNA 二级结构自由能最小, 最不稳定, 蛋白质表达量最高; GS2p 的 mRNA 二级结构自由能最大, 在 SD 序列及 ATG 附近都形成了稳定的发夹结构, 蛋白质翻译无法起始 (图 2)。可见, mRNA 二级结构越不稳

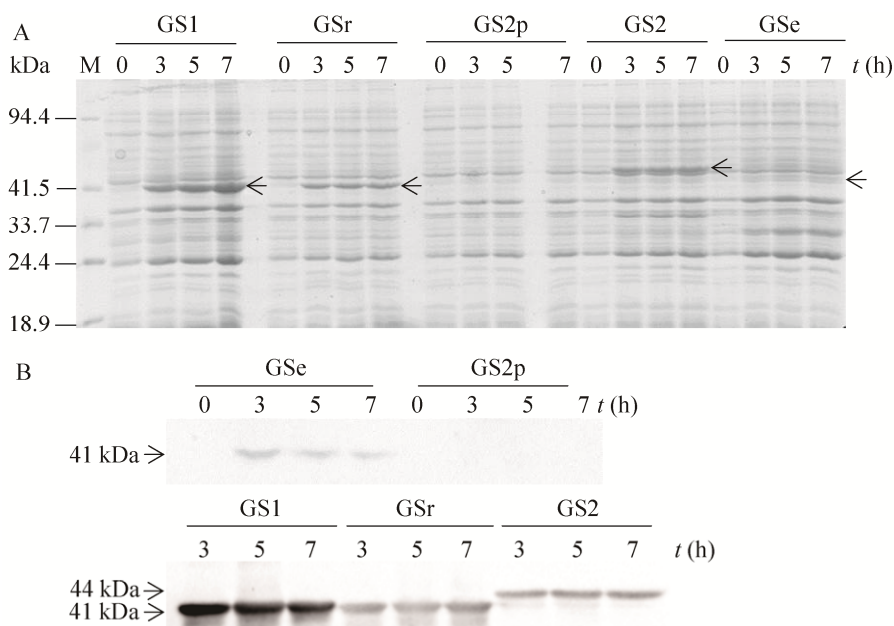


图 1 GS 同工酶在表达菌株 *E. coli* Rosetta 中的表达 (A) 及 Western blotting 鉴定 (B)

Fig. 1 Prokaryotic expression of GS isoenzymes in *E. coli* Rosetta cell (A) and identification of recombinant protein GS by Western blotting (B).

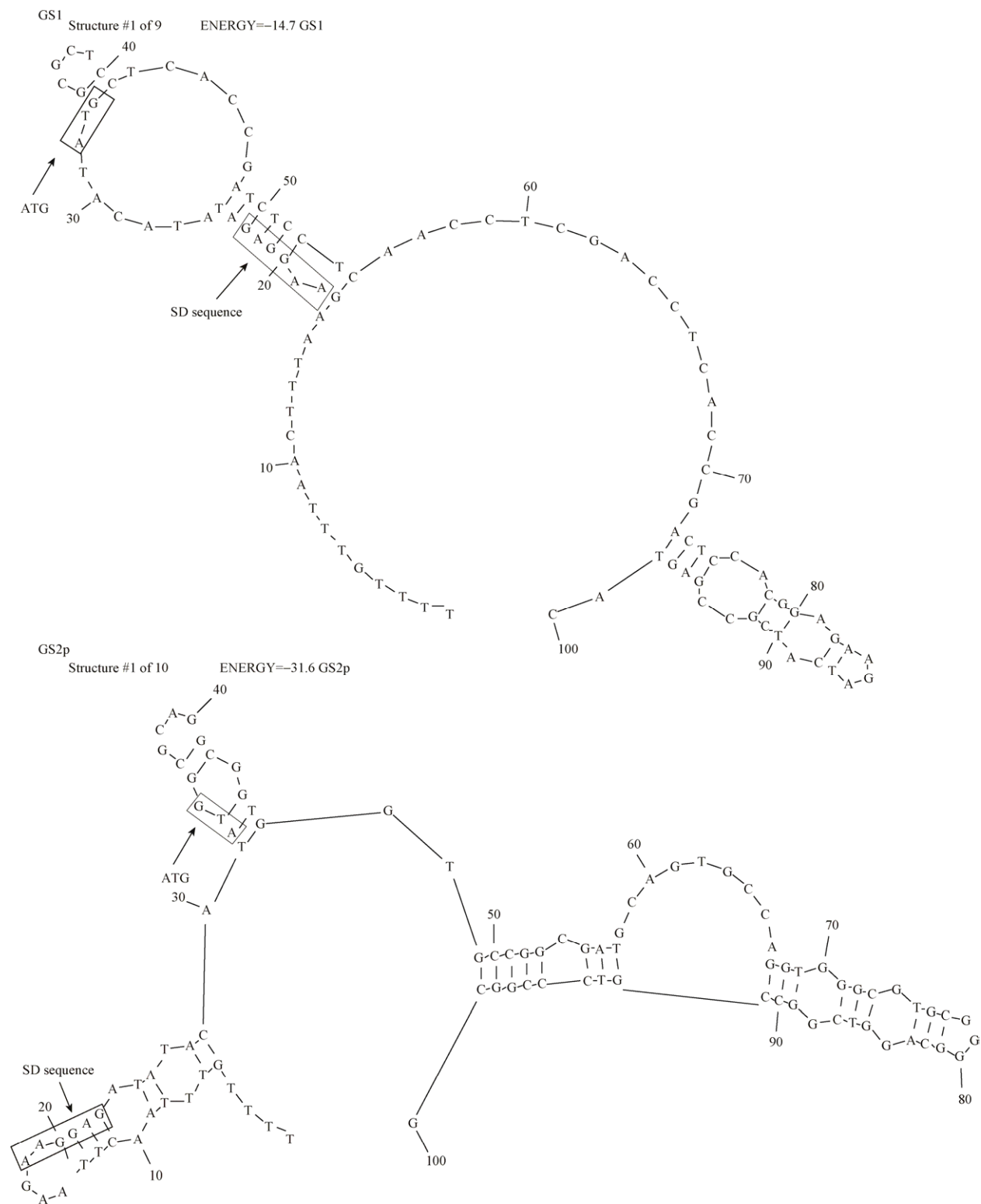


图 2 GS1 和 GS2p 翻译起始区 mRNA 二级结构

Fig. 2 The secondary structure of mRNA translation initiation region of GS1 and GS2p.

定,越有利于暴露核糖体结合位点和起始密码子 ATG,有利于核糖体与 mRNA 结合,从而提高翻译起始效率^[24]。

2.4 GS 同工酶原核表达条件优化及可溶性分析

翻译起始区稳定的 mRNA 二级结构不利于起始翻译,影响蛋白表达量。适当升高温度可能有助于打开 mRNA 的二级结构,提高翻译起始效率,增加蛋白表达量。但是,如果外源蛋白表达过快可能形成包涵体,影响蛋白质的活性,需要降低培养温度以降低外源蛋白表达速率,增加外源蛋白的可溶性。

GS1 于 30 °C 诱导 5 h 后不仅有较大的表达量,且可溶性蛋白含量最高。在 30 °C 下诱导,GSr 大量表达且为包涵体;在 25 °C 及 20 °C 下诱导,GSr 主要表达产物为包涵体;16 °C 诱导 6 h 以后,GSr 可溶性表达量逐渐升高,诱导 15 h 后可溶性 GSr 占比达到最大。尽管降低诱导温度可以增加外源蛋白的可溶性,但随着诱导温度的降低,外源蛋白表达量减少,需要延长诱导时间以获得较多的外源蛋白。GSe 在 37 °C 下诱导的表达量明显高于 30 °C,且主要为可溶性蛋白,并于诱导后 5 h 含量达最高。在 30 °C 下诱导,GS2 主要为包涵体;在 25 °C 下诱导,GS2 的可溶性表达比例增加,并于诱导 7 h 后蛋白量达最大(图 3)。GS2p 在 37 °C、30 °C、25 °C 及 20 °C 下诱导均无表达。

2.5 原核表达 GS 同工酶的活性

收获最佳表达条件下的菌体 1 mL,破碎后测定上清液中相应的 GS 同工酶活性。结果表明,GS1、GSe 及 GS2 均有活性,GSr 无活性;酶活性大小为 GS1>GSe>GS2(图 4A)。Western blotting 分析显示,GS1 含量最高,GSe 含量最低,GS2 与 GSr 蛋白含量相近(图 4B)。可见,原核表达

GS 同工酶蛋白含量与酶活性不一致,可能与小麦中 GS 同工酶修饰有关。

3 讨论

同源性很高的 GS 同工酶在相同的原核表达载体、受体菌株及诱导条件下,蛋白表达却差异极大,推测 GS 同工酶基因存在调控位点控制蛋白质的表达。首先是稀有密码子的数量与分布,稀有密码子分析发现,GSr、GSe 和 GS2p 基因 5' 端均存在连续的稀有密码子。当受体菌株是 BL21(DE3) plyss 时,GS1 和 GS2 表达,而 GSr、GSe 和 GS2p 不表达(图 5);当受体菌株为 Rosetta 时,显著提高 GSr 和 GSe 的表达。但是突变 GSe 基因中的稀有密码子 AGGAGG(又似 SD 序列)为大肠杆菌偏爱的密码子(CGTCGT),并没有提高其表达量(图 6)。其次是翻译起始区 mRNA 的二级结构。由于 GSr 转录水平远高于 GSe、GS2 及 GS2p,均高于 GS1,与蛋白表达水平不一致,鉴于原核生物基因边转录边翻译的特点,推测翻译起始区 mRNA 的二级结构影响翻译效率。利用 RNA Structure 5.3 分析包含载体 SD 序列到起始密码子下游的 100 nt 序列,发现 GS1 翻译起始区的 mRNA 二级结构最不稳定,GS1 表达量最高;GS2p 翻译起始区的 mRNA 二级结构最稳定,GS2p 无表达。当将 GS2p 构建在 PET28a 载体时,由于 N 端含有载体的融合肽,即使在 BL21(DE3) plyss 菌株中也大量表达(图 7),进一步证明 mRNA 二级结构的稳定性影响翻译效率。尽管原核与真核基因表达调控机制不同,但在小麦中 GS2、GSr 和 GS1 表达量较高,与原核表达相似,是否基因编码区序列本身也参与真核基因表达调控是一个非常有趣的科学问题。

GS 同工酶基因不仅影响其在原核中的蛋白质表达量,还影响蛋白质表达方式。GS1 在 30 °C

下诱导 5 h 主要为可溶性蛋白, GSr 在 20–30 °C 诱导均表达为包涵体蛋白, 在 16 °C 诱导 15 h 为可溶性蛋白, 但表达量极少; 37 °C 诱导提高 GSe 的表达, 且为可溶性蛋白。推测温度升高有利于

打开 mRNA 的二级结构, 提高翻译效率, 温度降低抑制蛋白质翻译, 促进蛋白质可溶表达。也可能是 GS 同工酶组装的方式不同, 原核细胞没有 GSr 组装的条件, 所以才以包涵体形式存在。

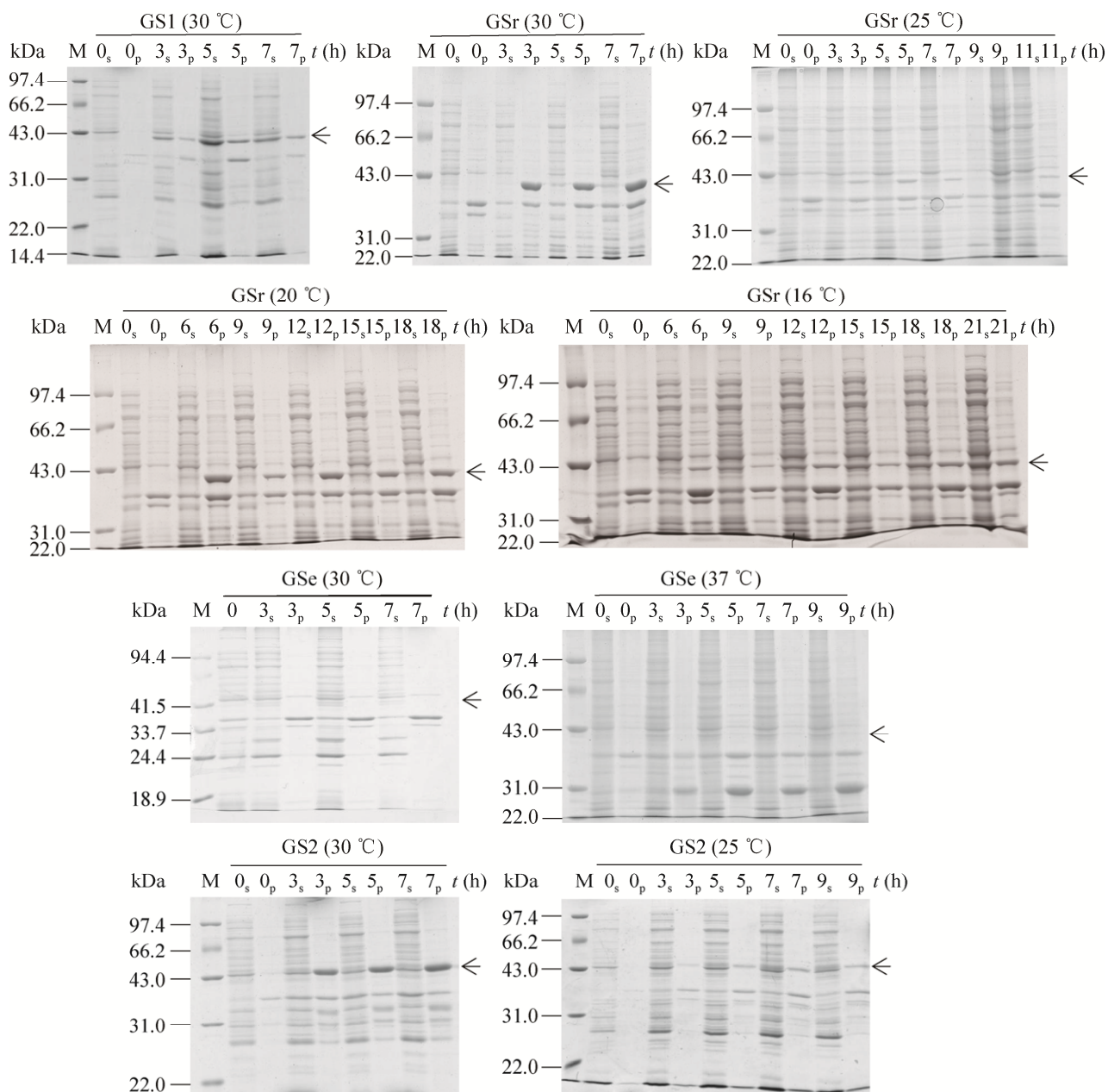


图 3 重组 GS 同工酶在 Rosetta 中诱导表达条件的优化 (s 指上清, p 指沉淀)

Fig. 3 Optimization of induction conditions for inducible expression of GS isoenzymes. “s” is supernatant, and “p” is precipitation.

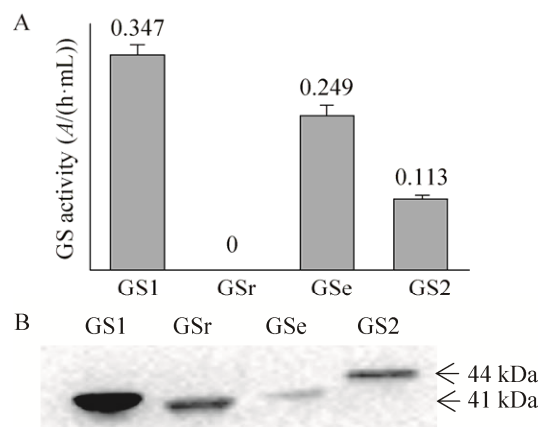


图4 最佳诱导条件下重组GS的全酶活测定(A)及表达量鉴定(B)

Fig. 4 Determination of recombinant protein GS activity (A) and identification of recombinant protein GS by Western blotting (B) under the condition of the best induction.

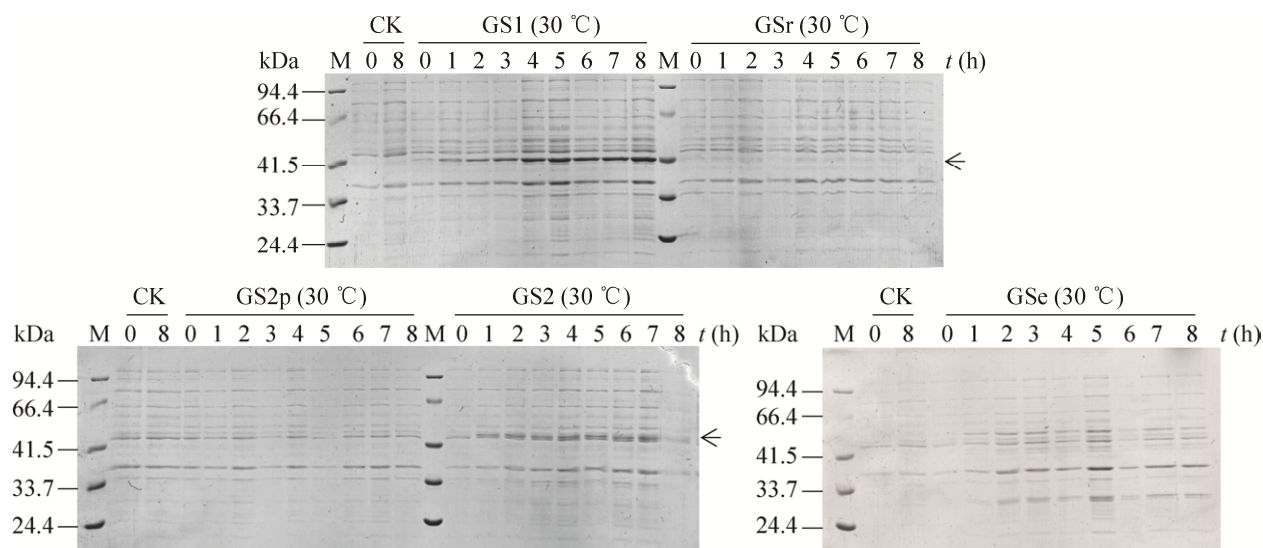


图5 GS同工酶在BL21(DE3)plyss菌株中的表达

Fig. 5 Prokaryotic expression of GS isoenzymes in BL21(DE3) plyss cell.

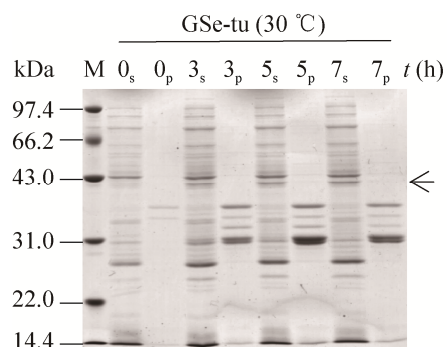


图6 PET-21a-GSe-tu在Rosetta菌株中的表达(s指上清, p指沉淀)

Fig. 6 Prokaryotic expression of PET-21a-GSe-tu in Rosetta cell. "s" is supernatant, and "p" is precipitation.

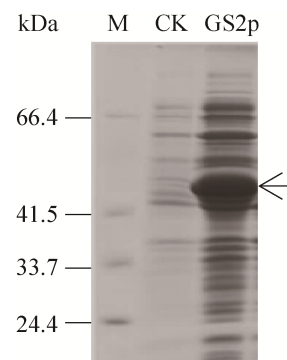


图7 PET-28a-GS2p在BL21(DE3)plyss菌株中的表达

Fig. 7 Prokaryotic expression of PET-28a-GS2p in BL21(DE3) plyss cell at 16 °C.

真核生物新生蛋白质需要不同程度的加工修饰才能变为有活性的成熟蛋白,大肠杆菌缺少蛋白加工修饰机制,这可能就是原核表达的 GS 在酶活性水平与蛋白水平不一致的原因。GSe 虽然蛋白含量低,但却具有较高的酶活水平,可能是 GSe 在小麦中修饰的较少;GSr 虽然表达量高,却没有 GS 催化活性,可能是 GSr 在小麦中翻译后需要较多的加工修饰才能形成有活性的结构。

目前,利用原核表达 GS 并成功解析其结晶三维结构的基因有玉米 GS1 和苜蓿 GS1^[25-26],其他 GS 同工酶的三维结构尚未见报道,可能是由于原核表达的结构不稳定。植物中 GS 表达量少,纯化复杂,很少用天然蛋白来研究其结构。本研究构建了 GS 同工酶的原核表达载体,分析了其原核表达特点及其原因,探索了其可溶性表达的条件,为 GS 同工酶结构研究及特异性抗体的筛选奠定了基础,也为深入研究小麦 GS 同工酶调控机制奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lee PS, Lee KH. *Escherichia coli*—a model system that benefits from and contributes to the evolution of proteomics. *Biotechnol Bioeng*, 2003, 84(7): 801–814.
- [2] Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Postepy Biochemii*, 2006, 52(4): 448–456.
- [3] Dong X, Tang B, Li J, et al. Expression and purification of intact and functional soybean (Glycine max) seed ferritin complex in *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(2): 299–307.
- [4] Daly R, Hearn MT. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 2005, 18(2): 119–138.
- [5] Chaudhuri TK, Horii K, Yoda T, et al. Effect of the extra N-terminal methionine residue on the stability and folding of recombinant alpha-lactalbumin expressed in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 1999, 285(3): 1179–1194.
- [6] Wang JY, Wang TN, Lu L, et al. Research advances in secretary production of recombinant protein using *Escherichia coli* type I secretion system and strategies for enhancement of secretion of type I pathway. *China Biotechnol*, 2014, 34(6): 98–104 (in Chinese).
王靖瑶, 王天女, 卢磊, 等. 大肠杆菌 I 型分泌表达系统研究进展及提高蛋白表达量的策略. *中国生物工程杂志*, 2014, 34(6): 98–104.
- [7] Lu JB, Wei D, Wang YF, et al. High-level expression and single-step purification of recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen from *Escherichia coli*. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52(2): 107–112.
- [8] Ivanov AV, Korovina AN, Tunitskaya VL, et al. Development of the system ensuring a high-level expression of hepatitis C virus nonstructural NS5B and NS5A proteins. *Protein Expr Purif*, 2006, 48(1): 14–23.
- [9] Zhang SH, Xing JL, Yao XY, et al. Non-fused expression of HAB18GEF by reducing stability of translational initiation region in mRNA. *Chin J Biotech*, 2004, 20(2): 175–180 (in Chinese).
张思河, 邢金良, 姚西英, 等. 降低 mRNA 翻译起始区的稳定性原核非融合表达 HAB18GEF. *生物工程学报*, 2004, 20(2): 175–180.
- [10] Qu YP, Zhang ZJ, Wang CL, et al. Expression, purification and characterization of arabinose-5-phosphate isomerase from *Arabidopsis thaliana*. *Chin J Biotech*, 2016, 32(8): 1060–1069 (in Chinese).
屈亚平, 张智俊, 王超莉, 等. 拟南芥阿拉伯糖-5-磷酸异构酶的原核表达、纯化及酶催化特性. *生物工程学报*, 2016, 32(8): 1060–1069.
- [11] Lei RY, Qiao YH, Yan JD, et al. Soluble expression of recombinant human BMP6 in *Escherichia coli* and its purification and bioassay *in vitro*. *Chin J Biotech*, 2008, 24(3): 452–459 (in Chinese).
雷荣悦, 乔玉欢, 闫继东, 等. 重组人 BMP6 在大肠杆菌中可溶表达、纯化及活性分析. *生物工程学报*, 2008, 24(3): 452–459.
- [12] Kusano M, Tabuchi M, Fukushima A, et al. Metabolomics data reveal a crucial role of cytosolic glutamine synthetase 1; 1 in coordinating metabolic

- balance in rice. *Plant J*, 2011, 66(3): 456-466.
- [13] Mifflin BJ, Habash DZ. The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot*, 2002, 53(370): 979-987.
- [14] Bernard SM, Møller AL, Dionisio G, et al. Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*, 2008, 67(1/2): 89-105.
- [15] Forde BG, Cullimore JV. The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *J Postgrad Med*, 1989, 34(2): 67-71.
- [16] Bernard SM, Habash DZ. The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol*, 2009, 182(3): 608-620.
- [17] Goodall AJ, Kumar P, Tobin AK. Identification and expression analyses of cytosolic glutamine synthetase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(4): 492-505.
- [18] Keys AJ. The re-assimilation of ammonia produced by photorespiration and the nitrogen economy of C₃ higher plants. *Photosynth Res*, 2006, 87(2): 165-175.
- [19] Zhang J, Shi XF, Liu CQ. Secondary structure of Yeast genomic downstream region and polyadenylation signals. *Prog Biochem Biophys*, 2001, 28(4): 523-527 (in Chinese).
张静, 石秀凡, 刘次全. Yeast 基因下游二级结构与多聚腺苷作用信号. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(4): 523-527.
- [20] Ganoza MC, Kofoed EC, Marlière P, et al. Potential secondary structure at translation-initiation sites. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(1): 345-360.
- [21] Zhang ZY, Xiong SP, Wei YH, et al. The role of glutamine synthetase isozymes in enhancing nitrogen use efficiency of N-efficient winter wheat. *Sci Rep*, 2017, 7: 1000.
- [22] Zhang YW, Ye J, Shi N, et al. Experimental research on protein immunoblot assay. *Exp Technol Manag*, 2008, 25(10): 35-37 (in Chinese).
张燕婉, 叶珏, 时那, 等. 蛋白质免疫印迹技术的实验研究. *实验技术与管理*, 2008, 25(10): 35-37.
- [23] Ma XM, Li L, Zhao P, et al. Effect of water control on activities of nitrogen assimilation enzymes and grain quality in winter wheat. *Acta Phytoecol Sin*, 2005, 29(1): 48-53 (in Chinese).
马新明, 李琳, 赵鹏, 等. 土壤水分对强筋小麦“豫麦 34”氮素同化酶活性和籽粒品质的影响. *植物生态学报*, 2005, 29(1): 48-53.
- [24] Li SX, Han R, Yuan LL, et al. Analysis of rare codon and mRNA structure about ustilago maydis CYP51 and molecular docking with fungicide tebuconazole. *Prog Biochem Biophys*, 2011, 38(8): 751-758 (in Chinese).
李书祥, 韩睿, 袁利玲, 等. 玉米黑粉菌 CYP51 稀有密码子和 mRNA 二级结构分析及与杀菌剂戊唑醇分子对接. *生物化学与生物物理进展*, 2011, 38(8): 751-758.
- [25] Unno H, Uchida T, Sugawara H, et al. Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. *J Biol Chem*, 2006, 281(39): 29287-29296.
- [26] Torreira E, Seabra AR, Marriott H, et al. The structures of cytosolic and plastid-located glutamine synthetases from *Medicago truncatula* reveal a common and dynamic architecture. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70: 981-993.

(本文责编 郝丽芳)