

小麦 *TaABI5-D3* 基因原核表达及多克隆抗体制备

韩洋, 韩冰, 邢燕平, 杨燕*

内蒙古农业大学 生命科学学院 植物生物技术研究室 麦类种质创新利用自治区高等学校重点实验室,
内蒙古 呼和浩特 010029

韩洋, 韩冰, 邢燕平, 杨燕. 小麦 *TaABI5-D3* 基因原核表达及多克隆抗体制备[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3619-3628.
HAN Yang, HAN Bing, XING Yanping, YANG Yan. Prokaryotic expression of wheat *TaABI5-D3* gene and polyclonal antibody preparation[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3619-3628.

摘要: 碱性亮氨酸拉链转录因子脱落酸不敏感蛋白 5 (abscisic acid-insensitive 5, ABI5) 是脱落酸介导的种子萌发的关键调控因子, 而 *TaABI5* 基因与小麦穗发芽密切相关。 *TaABI5* 的多拷贝基因成员 *TaABI5-D3* 具有编码完整 *TaABI5* 蛋白的能力。本研究通过构建原核表达载体 pET-28a-*TaABI5-D3*, 并在大肠杆菌中进行表达, 最终得到纯化的 His-*TaABI5-D3* 重组蛋白。该重组蛋白以包涵体的形式存在, 最佳表达条件为 16 °C、0.6 mmol/L IPTG、150 r/min 过夜诱导 12 h。进一步将 His-*TaABI5-D3* 重组蛋白进行纯化后免疫 Balb/c 小鼠制备多克隆抗体, Western blotting 结果显示抗体的特异性完好。该研究结果为进一步研究 *TaABI5* 蛋白在小麦籽粒中的功能奠定了基础。

关键词: *TaABI5-D3*; 原核表达; 重组蛋白; 多克隆抗体; 小麦

资助项目: 内蒙古自治区自然科学基金重点项目(2023ZD08); 国家自然科学基金(32460475); 内蒙古自治区直属高校基本科研业务费(BR231519)

This work was supported by the Key Project of Natural Science Foundation of Inner Mongolia Autonomous Region (2023ZD08), the National Natural Science Foundation of China (32460475), and the Basal Research Fund of Universities Directly under Inner Mongolia Autonomous Region (BR231519).

*Corresponding author. E-mail: yangyanchutao@126.com

Received: 2023-12-09; Accepted: 2024-04-01; Published online: 2024-04-09

Prokaryotic expression of wheat *TaABI5-D3* gene and polyclonal antibody preparation

HAN Yang, HAN Bing, XING Yanping, YANG Yan*

Key Laboratory of Germplasm Innovation and Utilization of Triticeae Crops at Universities of Inner Mongolia Autonomous Region, Plant Biotechnology Research Laboratory, College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010029, Inner Mongolia, China

Abstract: Abscisic acid insensitive 5 (ABI5) is a basic leucine zipper transcription factor regulating ABA-mediated seed germination, and *TaABI5* is closely related to the pre-harvest sprouting in wheat. Studies have shown that *TaABI5-D3*, one of multiple copies of *TaABI5* gene, encodes the intact TaABI5 protein. In this study, we constructed the prokaryotic expression vector pET-28a-*TaABI5-D3* for expression of *TaABI5-D3* in *Escherichia coli* and obtained the purified recombinant protein His-TaABI5-D3. This protein existed in the form of inclusion bodies, with the best expression induced by incubation with 0.6 mmol/L IPTG at 16 °C, 150 r/min overnight (for 12 h). Subsequently, the purified His-TaABI5-D3 was injected into Balb/C mice for the preparation of polyclonal antibodies. Western blotting analysis indicated that the polyclonal antibody had relatively high specificity, laying foundations for clarification of the function of TaABI5 protein in wheat.

Keywords: *TaABI5-D3*; prokaryotic expression; recombinant protein; polyclonal antibodies; wheat

植物脱落酸不敏感蛋白 5 (abscisic acid-insensitive 5, ABI5) 是一个在结构和功能上与碱性亮氨酸拉链类(basic leucine zipper, bZIP)蛋白质相关的转录因子,属于 ABI5/ABF/AREB/DPBF 类转录因子家族^[1-2],它介导脱落酸(abscisic acid, ABA)在细胞内的一系列转导反应,在 ABA 信号途径中起着重要作用^[3-4]。

ABI5 作为 ABA 信号途径中的正调控因子受 ABA 诱导,同时受到 *ABI3*、*HYL1* 和 *HY5* 的作用上调^[5-7],受 *WRKY2*、*WRKY40* 等的作用下调^[8-10]; ABA 诱导萌发后的生长停滞以及胚胎发育后期迟熟基因 *LEA* 启动子的表达,而 *ABI5* 对这种生长停滞不敏感,因此改变了 *LEA* 基因启动子的活性^[11-13]。此外,对 *ABI5* 显性突变体的分析表明,*ABI5* 参与调控种子后期发育中 ABA 诱导 *LEA* 的表达过程^[13-14]。

拟南芥 *ABI3* 基因与玉米和小麦中的 *Vp-1* 基因同源,具有调节胚发育、促进胚成熟和休眠的功能^[15-16]。*ABI3* 是 *ABI5* 表达的必要条件^[1,6,17]。*ABI3* 与 *ABI5* 共同作用,调控胚胎基因表达和种子对 ABA 的敏感性^[11,18]。Lopez-Molina 等^[19]和 Argyris 等^[20]利用酵母双杂交系统发现了 *ABI3* 和 *ABI5* 之间存在直接的相互作用,*ABI3* 和 *ABI5* 在种子萌发过程中被蛋白酶体降解。*ABI5* 蛋白被 ABA 激活成为生长抑制因子,并增加靶启动子的占有率^[6];此外 ABA 还能抑制 *ABI5* 蛋白通过 26S 蛋白酶体降解^[19]。通过酵母双杂交实验分离的 *ABI5* 结合蛋白 AFP 在幼苗发育中发挥作用;在种子发育和干燥过程中,*AFP* 的转录和翻译水平逐渐增加,最终在成熟种子中趋于稳定^[21-22]。与 *ABI5* 互作的 AFP 作为 ABA 应答的负调控因子作用于 *ABI5* 上游,通

过促进 ABI5 蛋白的降解抑制其合成^[21-23], 从而减弱 ABA 信号调控, 这可能与促进胚萌发、抑制种子休眠的调控机制密切相关^[24-26], 所以 ABI5 是影响幼苗成熟、休眠发育、种子萌发和萌发后幼苗生长的关键因素^[1,3,11,19], 其转录水平在胚胎发育晚期达到最高, 在种子干燥过程中达到峰值^[27-28]。

前期研究在白粒小麦品种‘周 8425B’中克隆了 16 个 *TaABI5* 基因的多拷贝序列^[29], 其中 *TaABI5-D3* 可以编码完整的 TaABI5 蛋白。为了进一步研究 *TaABI5* 的功能, 本研究以 *TaABI5-D3* 为代表, 将 *TaABI5-D3* 的编码区与原核表达载体 pET-28a 融合, 使植物蛋白在原核细胞中有效表达, 纯化后免疫小鼠制备抗体, 以期为进一步研究 TaABI5 的功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

动物材料: Balb/c 小鼠购自内蒙古大学, 用于多克隆抗体的制备。

植物材料: 6 份不同休眠特性的小麦品种分别为‘小偃 6 号’[发芽指数(germination index, GI): 13.7%]、‘万县白麦子’(GI: 7.6%)、‘小白玉花’(GI: 4.0%)、‘京 411’(GI: 64.2%)、‘周 8425B’(GI: 56.0%)和‘衡水 7228’(GI: 68.4%)。以上品种的蜡熟期种子用于检测种子中 *TaABI5-D3* 蛋白的含量。

原核表达载体 pET-28a, 购自安徽通用生物有限公司; 感受态细胞大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、原核表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)、内切酶 *Nco* I 和 *Xho* I, 购自 TaKaRa 公司; 11–180 kDa 蛋白标记、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记兔抗鼠 IgG 抗体, 购自优宁维试剂公司。

1.2 方法

1.2.1 原核表达载体的构建

根据 *TaABI5-D3* 基因的编码序列(GenBank 登录号: MK287857.1), 以 *Nco* I 和 *Xho* I 作为酶切位点(图 1), 将 *TaABI5-D3* 基因完整地融合载体 pET-28a-*TaABI5-D3* 上切除。重组 pMD-19T-*TaABI5-D3* 与原核表达质粒 pET-28a 分别用 *Nco* I 和 *Xho* I 进行双酶切, 产物连接后热击法转化至大肠杆菌感受态 DH5 α 中, 筛选单菌落, PCR 鉴定阳性克隆并接种于含卡那霉素抗性的液体 LB 培养基中, 过夜培养 12 h 后提取质粒, 使用 *Nco* I 和 *Xho* I 进行酶切鉴定。

1.2.2 重组蛋白的诱导表达

重组质粒 pET-28a-*TaABI5-D3* 及 pET-28a 空载体转化 *E. coli* BL21(DE3), 筛选阳性克隆, 挑取单菌落接种于含有卡那霉素(50 μ g/mL)的无菌液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 过夜培养 12 h。次日取出, 以 1:100 的体积比接种于含有相应抗生素的无菌液体 LB 培养基中, 继续培养至 OD_{600} 在 0.7–0.8 之间。设计不同终浓度的诱导剂异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactoside, IPTG), 分别为 0.4、0.8、1.2 mmol/L^[30], 以 pET-28a 空质粒作为对照, 对目的蛋白进行优化表达, 寻找最适诱导浓度。4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 每克菌体加入 20 mL 1 \times PBS 缓冲液重悬浮, 于冰上进行超声波破碎 20 min, 功率 500 W, 工作 3 s, 间隔 5 s; 随后在 4 $^{\circ}$ C、18 000 r/min 离心 40 min, 分别收集沉淀和上清, 通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离, 分析电泳结果确定最佳诱导条件。

1.2.3 包涵体纯化

在最适 IPTG 的诱导浓度下, 根据上述最佳培养条件, 在 1 L 液体 LB 培养基中进行诱导。

4 °C、5 000 r/min 离心 20 min 收集菌体, 于 8 mol/L 尿素溶解, 并与等体积 1×PBS 缓冲液重悬浮, 在冰上进行超声波破碎 30 min, 4 °C、18 000 r/min 离心 40 min, 采用亲和层析法利用 His 标签纯化树脂(Ni-NTA), 使用含 200 mmol/L 咪唑的 1×PBS 纯化洗脱蛋白, 并进行 SDS-PAGE 检测^[31-32]。随后用 BCA 蛋白检测试剂盒(Solarbio)对纯化后的蛋白进行定量, 纯化蛋白于-80 °C保存, 用于后续试验。

1.2.4 多克隆抗体制备与检测

选用 5 只健康的 5 周龄雄性 Balb/c 小鼠制备多克隆抗体^[33-35]。第一次免疫时, 将 600 μg 纯化的 His-TaABI5-D3 蛋白与相同体积的弗氏完全佐剂(Sigma)乳化后, 多点注射到小鼠腹部皮下。在接下来的两次免疫中, 注射 300 μg 纯化的 His-TaABI5-D3 蛋白, 加入相同体积的弗氏不完全佐剂(Sigma), 间隔 15 d。最后一次免疫 1 周后, 采集小鼠颈总动脉血, 离心收集血清, 于-80 °C保存。该动物实验获得了内蒙古农业大学实验动物福利与伦理委员会批准(批准号: NND2021101)。

1.2.5 提取小麦种子总蛋白

成熟小麦种子总蛋白的提取: 选取蜡熟期小麦种子提取总蛋白(Sangon Biotech), 与 5×SDS-PAGE 加载缓冲液(pH 6.8、Tris/HCl、SDS、溴酚蓝、甘油)以 20:5 的比例进行混合, 用 SDS-PAGE (12%分离凝胶, 5%堆积凝胶)检测总蛋白提取情况。

1.2.6 Western blotting

取原核表达纯化的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后用 TE70XP 型 Hoefer 半干转膜仪将目的蛋白转移至聚偏氟乙烯(poly vinylidene fluoride, PVDF)膜上, 电压 14 V, 50 min; 将转印好的 PVDF 膜用 5%的脱脂奶粉 50 r/min, 室温封闭 2 h; 将制备的多克隆抗体 1:1 000 稀释

作为一抗, 60 r/min 孵育 2 h; 随后用 1×PBST 缓冲液洗 3 次, 以 HRP 标记兔抗鼠 IgG (1:5 000 稀释)为二抗(上海优宁维生物科技有限公司) 60 r/min 孵育 1.5 h; 1×PBST 缓冲液洗脱 3 次后显影。

2 结果与分析

2.1 pET-28a-TaABI5-D3 原核表达载体的构建

重组质粒 pET-28a-TaABI5-D3 经 DH5α 大肠杆菌扩繁, 提取质粒进行 *Nco* I、*Xho* I 双酶切鉴定, 检测到 1 200 bp 左右的目的基因片段及 5 000 bp 左右的原核表达载体 pET-28a 片段(图 1A)。结果显示 *TaABI5-D3* 基因按正确编码框插入载体多克隆位点(图 1B), 表明成功构建了 pET-28a-TaABI5-D3 重组表达载体。

2.2 His-TaABI5-D3 重组蛋白的诱导表达及纯化

通过原核表达技术在 *E. coli* BL21(DE3)菌株中成功获得了重组蛋白 His-TaABI5-D3。SDS-PAGE 检测重组蛋白 His-TaABI5-D3 的产物(图 2A), 结果表明, 重组蛋白 His-TaABI5-D3 主要在沉淀中表达, 在可溶性上清中检测不到(图 2B), 最佳诱导条件为: 16 °C, IPTG 终浓度 0.4–0.8 mmol/L, 150 r/min 过夜诱导 12 h。将沉淀中的包涵体于 8 mol/L 尿素中溶解, 利用 Ni-NTA 树脂纯化经高浓度咪唑洗脱, 得到约 46 kDa 的单条蛋白带(图 3), 大小与重组蛋白 His-TaABI5-D3 的预期蛋白一致, 浓度为 1.27 mg/mL。

2.3 TaABI5-D3 多克隆抗体的制备与检测

在最佳诱导条件(16 °C, 0.6 mmol/L IPTG, 150 r/min)过夜诱导 12 h 后, 诱导大量菌体进行重组蛋白表达。将纯化后的目的蛋白免疫 Balb/c 小鼠血清制备多克隆抗体, 在第 3 次加强免疫后

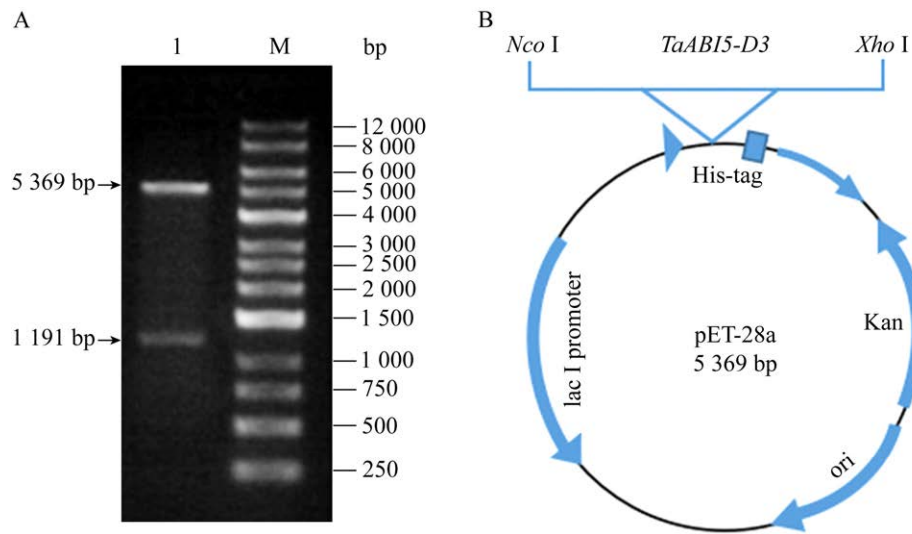


图 1 pET-28a-*TaABI5-D3* 原核表达载体构建与鉴定 A: 重组质粒的双酶切. B: 载体构建图谱

Figure 1 Construction and identification of prokaryotic expression vector pET-28a-*TaABI5-D3*. A: Double enzyme digestion of recombinant plasmid. M: Molecular weight standard; Lane 1: The digestion product of recombinant plasmid. B: Vector construction diagram.

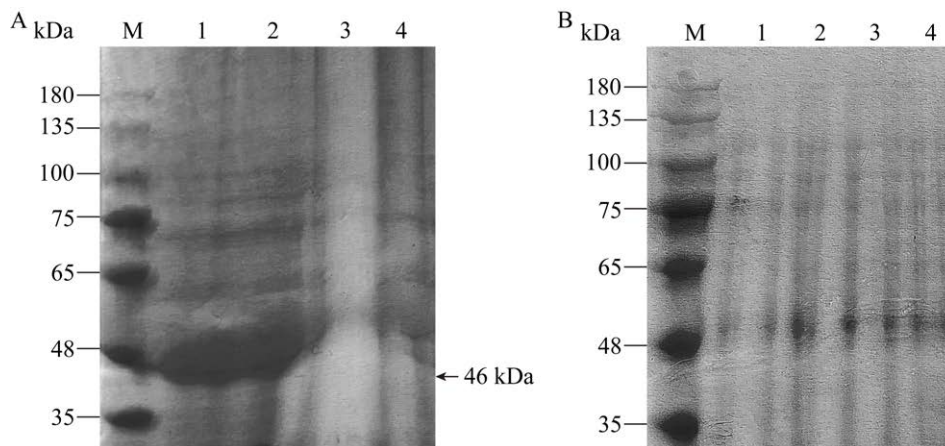


图 2 重组蛋白 His-TaABI5-D3 表达 A: 在沉淀中的表达水平. B: 在上清液中的表达水平

Figure 2 Expression of the recombinant protein His-TaABI5-D3. A: Expression level in precipitation. M: Protein marker (11–180 kDa); Lane 1–3: 0.4, 0.8 and 1.2 mmol/L IPTG induction; Lane 4: 0.8 mmol/L IPTG induced empty vector. B: Expression level in supernatant. M: Protein marker (11–180 kDa); Lane 1–3: 0.4, 0.8 and 1.2 mmol/L IPTG induction; Lane 4: 0.8 mmol/L IPTG induced empty vector.

取血并收集血清。Western blotting 检测发现，经纯化的目的蛋白检测到有较强的信号出现(图 4)，证明抗体制备成功。

将制备的 *TaABI5-D3* 抗体作为一抗，以

HRP 标记兔抗鼠 IgG 作为二抗。用 Western blotting 检测 6 种具有不同穗发芽抗性的小麦品种‘小偃 6 号’ (GI: 13.7%)、‘万县白麦子’ (GI: 7.6%)、‘小白玉花’ (GI: 4.0%)、‘京 411’ (GI: 64.2%)、

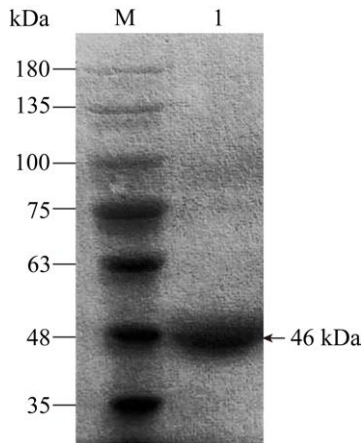


图 3 重组蛋白 His-TaABI5-D3 的纯化
Figure 3 Purification of the recombinant protein His-TaABI5-D3. M: Protein marker (11–180 kDa); Lane 1: Purified the recombinant protein.

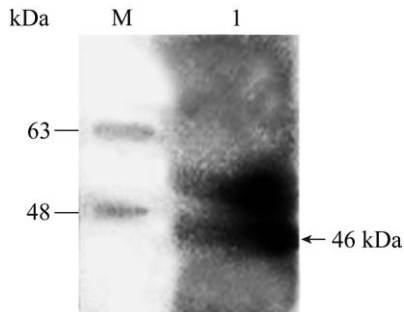


图 4 重组蛋白的 Western blotting 分析
Figure 4 Western blotting analysis of recombinant protein. M: Protein marker (11–180 kDa); Lane 1: Detection of TaABI5-D3 protein by polyclonal antibody.

‘周 8425B’ (GI: 56.0%)、‘衡水 7228’ (GI: 68.4%) 的成熟籽粒中 TaABI5-D3 蛋白的表达水平。结果表明，制备的多克隆抗体 TaABI5-D3 能够特异性识别在小麦中表达的 TaABI5-D3 蛋白，具有较高的敏感性(图 5A)。同时，用 Image J 和 GraphPad prism 软件对 Western blotting 在 6 个不同休眠水平品种的成熟种子中检测到的 TaABI5-D3 蛋白表达量进行量化分析，结果表明，6 个小麦品种的成熟种子中，TaABI5-D3 蛋白的表达水平无显著差异(图 5B)。

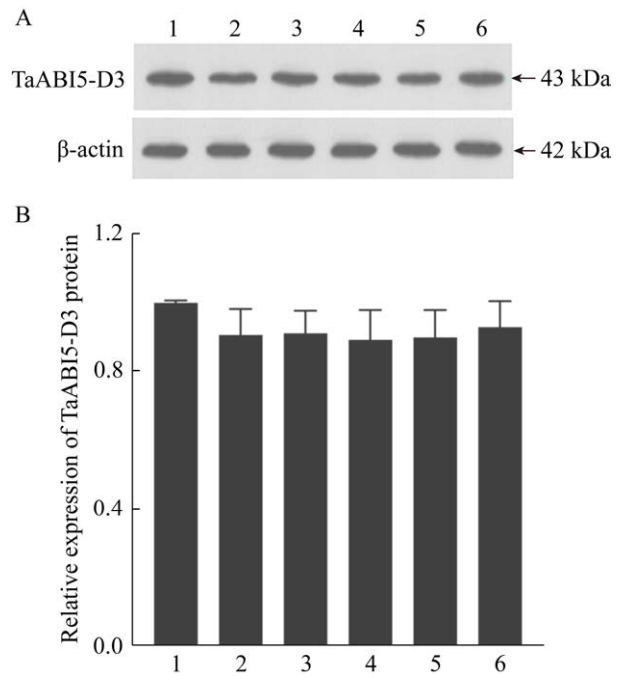


图 5 不同休眠特性小麦种子中 TaABI5-D3 蛋白的 Western blotting 分析 A: Western blotting 检测 TaABI5-D3 蛋白的表达. B: TaABI5-D3 蛋白的相对表达水平

Figure 5 Western blotting analysis of TaABI5-D3 proteins in wheat seeds with different dormancy capacity. A: Detection of TaABI5-D3 proteins with Western blotting. B: The relative expression level of TaABI5-D3 proteins. The numbers of 1 to 6 represents: ‘xiaoyan 6’, ‘wanxianbaimaizi’, ‘xiaobaiyuhua’, ‘jing 411’, ‘zhou 8425B’ and ‘hengshui 7228’, respectively.

3 讨论

本课题组前期研究中表明，小麦 *TaABI5* 基因与小麦籽粒的休眠能力密切相关^[29,36]。为进一步研究 *TaABI5* 基因在小麦中的功能，研究人员已经进行了该基因组成、基因标记的开发、种子休眠能力分子标记的开发验证和其转录本在不同发育阶段表达水平的研究^[29,36]，但是尚未对该基因表达的蛋白进行系统的研究，所以本研究利用原核表达系统和抗体制备系统制备

了 *TaABI5-D3* 的抗体, 为下一步蛋白质功能的研究奠定了基础。

目前常用大肠杆菌进行原核表达, 该方法虽能高效获得目的蛋白并相对安全, 但是容易形成包涵体。影响大肠杆菌重组蛋白融合表达的因素有很多, 主要包括诱导温度、适宜的菌株、诱导剂 IPTG 的浓度及时间等^[30,37-38]。本研究在获得 *TaABI5* 基因序列的前提下, 将其中完整编码蛋白的 *TaABI5-D3* 编码区克隆至原核表达载体 pET-28a 中, 在 *E. coli* BL21(DE3) 中进行了高效表达。因考虑到融合蛋白的表达更多受 IPTG 浓度的影响, 故在实验中参考前人的经验设计了不同 IPTG 浓度进行了诱导, 最终实验结果表明 IPTG 的最佳诱导浓度为 0.6 mmol/L。本研究在 16 °C、0.6 mmol/L IPTG、150 r/min 和过夜诱导 12 h 的最佳诱导条件下获得了大量的目的蛋白(图 2A)。

另外, 通过对诱导表达的上清液及沉淀分别进行 SDS-PAGE 电泳检测后发现, 本研究中的目的蛋白以包涵体形式存在(图 2A)。包涵体形式蛋白不易纯化且不具有活性, 故为继续后续试验, 需对其进行溶解。蛋白表达的速度过快、不正确折叠, 甚至多肽链疏水区域之间的非特异性相互作用等因素都可能导致包涵体的形成^[39-40]。本研究在构建表达载体时, 让 pET-28a 带有组氨酸(His)标签, 该标签分子量较小, 几乎不会影响重组蛋白的分子量^[41-42]; 同时, 该标签的携带为后续重组蛋白的纯化提供了便利^[43-44]。

本课题组前期从小麦品种‘周 8425B’中扩增了 *TaABI5* 全长序列, 共获得 *ABI5* 基因的 16 个多拷贝序列, 并且在普通小麦的 3D 染色体上鉴定了 2 个关于 *TaABI5-D7* 的等位基因, 分别为 *TaABI5-D71* 和 *TaABI5-D72*; 含有 *TaABI5-D71* 和 *TaABI5-D72* 两种不同单倍型的小麦其籽粒

休眠特性具有显著差异^[29,36]。*TaABI5-D71* 和 *TaABI5-D72* 序列是假基因, 不能编码完整的 *TaABI5* 蛋白, 所以本研究选择多拷贝序列中与 *TaABI5-D7* 同源性最高且可完整编码蛋白质的 *TaABI5-D3* 为目的基因^[29], 利用原核表达系统得到高效表达且可满足免疫实验小鼠的需要, 成功制备了 *TaABI5-D3* 多克隆抗体。但是由于该抗体为多克隆抗体, 具备多个不同抗原结合位点, 而 *ABI5* 基因在小麦中存在 16 个多拷贝序列, *TaABI5-D3* 多克隆抗体可能也会结合小麦中其他 *ABI5* 蛋白。为消除这一疑虑, 下一步应制备 *TaABI5-D3* 单克隆抗体。单克隆抗体的制备将会为进一步深入研究 *TaABI5-D* 类型蛋白的功能和 *TaABI5* 蛋白在小麦种子休眠特性方面的作用机制奠定基础。

4 结论

本研究将 *TaABI5-D3* 编码区克隆至原核表达载体 pET-28a 中, 成功构建重组表达载体 pET-28a-*TaABI5-D3*, 并得到与预期大小相符的重组蛋白(其分子量约 46 kDa); 重组蛋白 His-*TaABI5-D3* 免疫 Balb/c 小鼠后成功制备得到了 *TaABI5-D3* 多克隆抗体, 且该多克隆抗体可用于 Western blotting 检测分析(图 5)。以上研究结果为进一步获得 *TaABI5* 类纯化蛋白和相应抗体以及进一步研究该基因的功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] FINKELSTEIN RR, LYNCH TJ. The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(4): 599-609.
- [2] LI ZL, LUO XF, WANG L, SHU K. ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 mediates light-ABA/gibberellin crosstalk networks during seed germination[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2022, 73(14): 4674-4682.

- [3] FINKELSTEIN RR, GAMPALA SSL, ROCK CD. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14(suppl): S15-S45.
- [4] CHEN K, LI GJ, BRESSAN RA, SONG CP, ZHU JK, ZHAO Y. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2020, 62(1): 25-54.
- [5] ZHANG XR, GARRETON V, CHUA NH. The AIP2 E3 ligase acts as a novel negative regulator of ABA signaling by promoting ABI3 degradation[J]. *Genes & Development*, 2005, 19(13): 1532-1543.
- [6] LOPEZ-MOLINA L, MONGRAND S, MCLACHLIN DT, CHAIT BT, CHUA NH. ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2002, 32(3): 317-328.
- [7] CHEN H, XIONG LM. Role of HY5 in abscisic acid response in seeds and seedlings[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3(11): 986-988.
- [8] JIANG WB, YU DQ. *Arabidopsis* WRKY2 transcription factor mediates seed germination and post germination arrest of development by abscisic acid[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9: 96.
- [9] SHANG Y, YAN L, LIU ZQ, CAO Z, MEI C, XIN Q, WU FQ, WANG XF, DU SY, JIANG T, ZHANG XF, ZHAO R, SUN HL, LIU R, YU YT, ZHANG DP. The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition[J]. *The Plant Cell*, 2010, 22(6): 1909-1935.
- [10] RUSHTON DL, TRIPATHI P, RABARA RC, LIN J, RINGLER P, BOKEN AK, LANGUM TJ, SMIDT L, BOOMSMA DD, EMME NJ, CHEN XF, FINER JJ, SHEN QJ, RUSHTON PJ. WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signaling[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2012, 10(1): 2-11.
- [11] LOPEZ-MOLINA L, CHUA NH. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2000, 41(5): 541-547.
- [12] CARLES C, BIES-ETHEVE N, ASPART L, LÉON-KLOOSTERZIEL KM, KOORNNEEF M, ECHEVERRIA M, DELSENY M. Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes: role of ABI5[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2002, 30(3): 373-383.
- [13] ZOU MJ, GUAN YC, REN HB, ZHANG F, CHEN F. Characterization of alternative splicing products of bZIP transcription factors OsABI5[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 360(2): 307-313.
- [14] SU MY, HUANG G, ZHANG Q, WANG X, LI CX, TAO YJ, ZHANG SC, LAI JB, YANG CW, WANG YQ. The LEA protein, ABR, is regulated by ABI5 and involved in dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology*, 2016, 247: 93-103.
- [15] MCCARTY DR, HATTORI T, CARSON CB, VASIL V, LAZAR M, VASIL IK. The *Viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator[J]. *Cell*, 1991, 66(5): 895-905.
- [16] YOTSUI I, SARUHASHI M, KAWATO T, TAJI T, HAYASHI T, QUATRANO RS, SAKATA Y. ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 regulates abscisic acid-responsive gene expression with the nuclear factor Y complex through the ACTT-core element in *Physcomitrella patens*[J]. *The New Phytologist*, 2013, 199(1): 101-109.
- [17] SÖDERMAN EM, BROCARD IM, LYNCH TJ, FINKELSTEIN RR. Regulation and function of the *Arabidopsis* *ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124(4): 1752-1765.
- [18] FINKELSTEIN RR. Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations[J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(6): 765-771.
- [19] LOPEZ-MOLINA L, MONGRAND S, CHUA NH. A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(8): 4782-4787.
- [20] ARGYRIS J, DAHAL P, HAYASHI E, STILL DW, BRADFORD KJ. Genetic variation for lettuce seed thermoinhibition is associated with temperature-sensitive expression of abscisic acid, gibberellin, and ethylene biosynthesis, metabolism, and response genes[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(2): 926-947.
- [21] LOPEZ-MOLINA L, MONGRAND S, KINOSHITA N, CHUA NH. AFP is a novel negative regulator of ABA signaling that promotes ABI5 protein degradation[J]. *Genes & Development*, 2003, 17(3): 410-418.
- [22] LYNCH TJ, ERICKSON BJ, MILLER DR, FINKELSTEIN RR. ABI5-binding proteins (AFPs) alter transcription of ABA-induced genes via a variety

- of interactions with chromatin modifiers[J]. *Plant Molecular Biology*, 2017, 93(4): 403-418.
- [23] OHNISHI N, HIMI E, YAMASAKI Y, NODA K. Differential expression of three ABA-insensitive five binding protein (AFP)-like genes in wheat[J]. *Genes & Genetic Systems*, 2008, 83(2): 167-177.
- [24] WEI JK, LI XJ, SONG P, WANG YG, MA JZ. Studies on the interactions of AFPs and bZIP transcription factor ABI5[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 590: 75-81.
- [25] 李鲁华, 王忠妮, 王文新, 王怀玉, 任明见, 徐如宏. 植物 ABI5 转录因子的研究进展[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2019, 50(4): 537-541.
LI LH, WANG ZN, WANG WX, WANG HY, REN MJ, XU RH. Research advances of plant ABI5 transcription factors[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2019, 50(4): 537-541 (in Chinese).
- [26] ALBERTOS P, ROMERO-PUERTAS MC, TATEMATSU K, MATEOS I, SÁNCHEZ-VICENTE I, NAMBARA E, LORENZO O. S-nitrosylation triggers ABI5 degradation to promote seed germination and seedling growth[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8669.
- [27] JAKOBY M, WEISSHAAR B, DRÖGE-LASER W, VICENTE-CARBAJOSA J, TIEDEMANN J, KROJ T, PARCY F, GROUP BR. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(3): 106-111.
- [28] BROCARD-GIFFORD I, LYNCH TJ, GARCIA ME, MALHOTRA B, FINKELSTEIN RR. The *Arabidopsis thaliana* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE8 locus encodes a novel protein mediating abscisic acid and sugar responses essential for growth[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16(2): 406-421.
- [29] 王增. *TaABI5* 基因在小麦中的分离和与穗发芽抗性相关 STS 分子标记研发[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2019.
WANG Z. Isolation of *TaABI5* and development of a STS marker for pre-harvest sprouting resistance in Chinese bread wheat[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [30] 周炎, 樊帆, 雷东阳, 卢学丹. 水稻逆境响应蛋白 OsSGL 的生物信息学分析及原核表达条件优化[J]. *分子植物育种*, 2021, 19(5): 1531-1540.
ZHOU Y, FAN F, LEI DY, LU XD. Bioinformatics analysis and optimization of protein expression in prokaryotic system of rice stress responsive protein OsSGL[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(5): 1531-1540 (in Chinese).
- [31] 徐明波, 董晓杰, 孟文华, 朱耀先, 张明伟, 马贤凯. 原核基因工程中以包涵体形式表达产物的中试分离纯化研究[J]. *高技术通讯*, 1993, 3(9): 11-15.
XU MB, DONG XJ, MENG WH, ZHU YX, ZHANG MW, MA XK. Pilot purification of recombinant proteins expression in *E. coli* inclusion bodies[J]. *High Technology Letters*, 1993, 3(9): 11-15 (in Chinese).
- [32] SINGH A, UPADHYAY V, UPADHYAY AK, SINGH SM, PANDA AK. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process[J]. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 41.
- [33] 程彦伟, 李亮, 沈嵘, 齐耀程, 刘晓宇, 王宁, 张伟. 水稻 LRR 型类受体蛋白激酶胞外区的原核表达及多克隆抗体制备[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008, 35(9): 1077-1083.
CHENG YW, LI L, SHEN R, QI YC, LIU XY, WANG N, ZHANG W. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of the extracellular domain about rice LRR receptor-like protein kinase[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2008, 35(9): 1077-1083 (in Chinese).
- [34] 谭才邓, 李静, 李峰, 庄楚雄. 水稻 *PDK2* 基因原核表达和多克隆抗体制备[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(6): 1039-1042.
TAN CD, LI J, LI F, ZHUANG CX. Prokaryotic expression and polyclonal antibody preparation of rice *PDK2*[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2009, 28(6): 1039-1042 (in Chinese).
- [35] GRODZKI AC, BERENSTEIN E. Antibody purification: affinity chromatography-protein A and protein G Sepharose[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 588: 33-41.
- [36] 孙晓燕. *ABI5* 基因在不同休眠特性小麦中的鉴定和表达特异性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2016.
SUN XY. Isolation and characterization of *ABI5* in Chinese wheats with different depth of dormancy[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [37] 高荣凯, 王琰. 外源基因在大肠杆菌中的表达[J]. *海军总医院学报*, 1997(4): 221-224.
GAO RK, WANG Y. Expression of foreign genes in *Escherichia coli*[J]. *Journal of Naval General Hospital of PLA*, 1997(4): 221-224 (in Chinese).
- [38] 廖美德, 谢秋玲, 林剑, 洪岸, 孙奋勇. 外源基因在大肠杆菌中的高效表达[J]. *生命科学*, 2002, 14(5): 283-287.

- LIAO MD, XIE QL, LIN J, HONG A, SUN FY. Heterologous gene high expression in *Escherichia coli*[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2002, 14(5): 283-287 (in Chinese).
- [39] OBERG K, CHRUNYK BA, WETZEL R, FINK AL. Nativelike secondary structure in interleukin-1 beta inclusion bodies by attenuated total reflectance FTIR[J]. Biochemistry, 1994, 33(9): 2628-2634.
- [40] 常恒祯, 常江, 战俊澎, 杨馨, 郭珣, 刘益辛, 邹德颖, 任洪林. 包涵体重组蛋白不同纯化方法的比较[J]. 中国生物制品学杂志, 2021, 34(7): 862-867.
- CHANG HZ, CHANG J, ZHAN JP, YANG X, GUO X, LIU YX, ZOU DY, REN HL. Comparison of various methods for purification of recombinant inclusion body protein[J]. Chinese Journal of Biologicals, 2021, 34(7): 862-867 (in Chinese).
- [41] KIELKOPF CL, BAUER W, URBATSCH IL. Solubilization of expressed proteins from inclusion bodies[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2021(2).
- [42] 杨书玲, 张龙雨, 张改生, 桑青, 刘红占, 朱启迪, 张新铎, 赵新亮. 小麦 *TaPDK* 基因的序列分析、原核表达及纯化[J]. 核农学报, 2013, 27(8): 1081-1089.
- YANG SL, ZHANG LY, ZHANG GS, SANG Q, LIU HZ, ZHU QD, ZHANG XB, ZHAO XL. Sequence analysis, prokaryotic expression and purification of *TaPDK* gene in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27(8): 1081-1089 (in Chinese).
- [43] 赵静, 丁丽华, 仇玮玮, 牛畅, 陈力权, 甘纯玘, 叶棋浓. GST-His 双标签原核表达载体的构建及应用[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 520-522.
- ZHAO J, DING LH, QIU WY, NUI C, CHEN LQ, GAN CJ, YE QN. Construction and application of prokaryotic expression plasmid containing GST and His tags[J]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(4): 520-522 (in Chinese).
- [44] ALIZADEH AA, RASOULI S, JAMSHIDI KANDJANI O, HEMMATI S, DASTMALCHI S. Expression, purification and characterization of functional teduglutide using GST fusion system in prokaryotic cells[J]. Advanced Pharmaceutical Bulletin, 2023, 13(3): 592-600.

(本文责编 郝丽芳)