

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.02.011

番茄 *SICDJ2* 蛋白在大肠杆菌和酵母中的表达*

刘 琪 商鑫涛 陈 晨 王国栋[△]

(济宁医学院生物科学学院,日照 276826)

摘要 目的 DnaJ 蛋白作为一种广泛存在于细胞内的分子伴侣,能响应多种胁迫反应。本研究以转基因大肠杆菌和酿酒酵母为材料,研究番茄 *Solanum lycopersicum* Chloroplast DnaJ 2 (*SICDJ2*) 蛋白在渗透胁迫下的表达情况,为进一步在番茄中研究其功能提供初步的理论依据。**方法** PCR 扩增获得 *SICDJ2* 基因,构建大肠杆菌原核表达重组质粒 pET30a-*SICDJ2* 和酵母真核表达重组质粒 pYES2-*SICDJ2*,分别通过热激转化法和醋酸锂酵母转化获得转基因大肠杆菌和酵母菌株,SDS-聚丙烯酰胺电泳分析 *SICDJ2* 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达情况,分光光度法测定转基因大肠杆菌在渗透胁迫下的生长曲线,涂布方法观察转基因酵母菌在渗透胁迫下的生长表型。**结果** *SICDJ2* 蛋白在大肠杆菌中成功诱导表达;转基因大肠杆菌在渗透胁迫下吸光度明显高于野生型大肠杆菌,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。转基因酵母菌在渗透胁迫下的生长菌落明显好于野生型酵母菌。**结论** 在大肠杆菌和酿酒酵母中过表达 *SICDJ2* 基因,有助于提高大肠杆菌和酿酒酵母对渗透胁迫的抗性。

关键词 *SICDJ2* 蛋白;大肠杆菌;酵母;渗透胁迫

中图分类号:Q945.78 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2019)02-122-05

The study of tomato *SICDJ2* protein expression in *Escherichia coli* and yeast

LIU Qi, SHANG Xintao, CHEN Chen, WANG Guodong

(School of Biological Sciences, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective DnaJ protein, as a kind of molecular chaperone widely existing in cells, can respond to a variety of stress responses. In this study, transgenic *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* were used as materials to study the expression of tomato *SICDJ2* protein under osmotic stress, providing a preliminary theoretical basis for further studying its function in tomatoes. **Methods** The *SICDJ2* was obtained by PCR amplification, the recombinant plasmid pET30a-*SICDJ2* and pYES2-*SICDJ2* were constructed and transferred into *E. coli* and *S. cerevisiae* by heat shock and lithium acetate yeast transformation methods to obtain the transgenic *E. coli* and *S. cerevisiae*. Finally, SDS-polypropylene gel electrophoresis (SDS-PAGE) was used to analyze the expression of *SICDJ2* protein in *E. coli*, and the growth curve of transgenic *E. coli* under osmotic stress was measured by spectrophotometry. In addition, the growth phenotype of transgenic yeast under osmotic stress was observed by coating. **Results** SDS-PAGE results showed that *SICDJ2* protein was successfully induced in *E. coli*, and the results of spectrophotometric determination showed that the absorbance of transgenic *E. coli* was significantly higher than that of wild *Escherichia coli* under osmotic stress. The growth phenotype analysis of yeast showed that the growth colony of transgenic yeast was better than that of wild yeast under osmotic stress. **Conclusion** The study showed that *SICDJ2* overexpression was helpful to improve the osmotic stress resistance of *E. coli* and *S. cerevisiae*.

Keywords: *SICDJ2* protein; *E. coli*; *S. cerevisiae*; Osmotic stress

* [基金项目] 山东省自然科学基金博士基金(ZR2018BC032); 济宁医学院大学生创新项目(100220004030); 国家级大学生创新项目(201710443030); 济宁医学院博士基金(600492001)

[△][通信作者] 王国栋, E-mail:gdwang@mail.edu.cn

农业生产中,渗透胁迫是影响作物产量的一个重要环境因素,包括干旱胁迫和高盐胁迫。我国每年因干旱等自然灾害导致粮食减产达 10% 以上,而这个比例因温室效应加剧还在逐年增加^[1]。因此,面对这些自然灾害,提高农业生产力,是我们亟待解决的科学问题。

DnaJ 蛋白,是广泛存在于细胞内的一种分子伴侣,具有完成蛋白质折叠、解折叠、向特定细胞器运输和调节蛋白复合物解聚等功能^[2]。据报道,DnaJ 蛋白能参与细胞内多种生化过程和响应多种胁迫反应,进而增强植物的抗逆性^[3]。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 是一种革兰氏阴性菌,是遗传学和生物化学研究常用的菌体。酵母作为一种真核生物,细胞对渗透压的反应是相对恒定的,比植物更易用于遗传研究。本研究中,我们首次从番茄叶片中分离克隆得到 *SICDJ2* 基因,经过生物信息分析发现,*SICDJ2* 基因编码的蛋白属于 DnaJ 蛋白家族^[4]。将 *SICDJ2* 基因转入大肠杆菌和酵母中,与野生菌株相比,转基因大肠杆菌和酵母均提高了对渗透胁迫的抗性。报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验菌株:大肠杆菌 (*Escherichia coli* strain BL21) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* strain YPH500),由山东农业大学作物生物学国家重点实验室提供。

1.2 方 法

1.2.1 *SICDJ2* 基因的克隆及测序 在 NCBI GENEBANK 数据库中查得 *SICDJ2* 基因的 mRNA 序列 (GenBank 序列号: AK323942),设计特异引物(上游引物: ATGAGCAATTTGAGATCGAT; 下游引物: CTATAGATTCTTATCGTCCTCCT),以番茄叶片的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,程序为 95℃ 预变性 5min; 95℃ 50s, 55℃ 退火 50s, 72℃ 延伸 1min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。随后对 PCR 产物进行测序验证。

1.2.2 *SICDJ2* 基因在大肠杆菌中的表达 设计特异性引物,上游引物: GGATCCATGAGCAATTTGAGATCGAT,下划线是 BamH I; 下游引物: GAGTCCTATAGATTCTTATCGTCCTCCT,下划线是 Sac I。将 *SICDJ2* 基因的编码序列采用 PCR 技术扩增出来,利用酶切位点 *BamH I* 和 *Sac I*,进行

双酶切反应,将该基因编码序列连接到原核表达载体 pET30a 上。然后,将重组质粒转化 *E. coli* BL21,获得阳性菌株,再将野生菌株和阳性菌株分别在 20ml LB 液体培养基中培养 (37℃, 200rpm/min),当菌液 OD600 = 0.6 时,首先将野生菌液和转基因菌液各取 1ml,置于 4℃ 冰箱内备用,再向剩余菌液加入 IPTG (Isopropylthio-β-d-galactoside),使其终浓度为 1mM,持续培养 6h,每隔 1h,取样 1 次,将所有样品,经 10000rpm/min,离心 1min,倒掉上清,菌体沉淀备用。最后,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 将诱导表达的蛋白分离开来^[5]。

1.2.3 大肠杆菌在渗透胁迫下的生长分析 为了分析含空载 pET30a 和含有 pET30a-*SICDJ2* 重组质粒的大肠杆菌在正常和盐胁迫下的生长情况,首先配制 IPTG 终浓度为 1mM, NaCl 终浓度分别为 200mM、400mM 和 800mM 的 LB 液体培养基,各 100ml。然后,取 100μl OD600 = 0.8 的菌液分别加入以上 LB 液体培养基中,37℃, 200rpm/min,持续培养 28h。同样,为了分析含空载 pET30a 和含有 pET30a-*SICDJ2* 重组质粒的大肠杆菌在干旱胁迫下的生长情况,首先配制 IPTG 终浓度为 1mM,甘露醇 (Mannitol) 终浓度分别为 200mM、400mM 和 800mM 的 LB 液体培养基,各 100ml。然后,取 100μl OD600 = 0.8 的菌液分别加入以上 LB 液体培养基中,37℃, 200rpm/min,震荡培养 28h。最后,使用分光光度计检测不同时间点的菌体 OD600 值。以上实验均进行 3 次生物学重复。

1.2.4 酵母表达载体的构建 首先设计特异性引物,上游引物: GAGTCATGAGCAATTTGAGATCGAT,下划线是 *Sac I*; 下游引物: GGATCCCTATAGATTCTTATCGTCCTCCT,下划线是 *BamH I*。采用 PCR 技术扩增 *SICDJ2* 基因的编码序列。再利用 *Sac I* 和 *BamH I* 内切酶将 PCR 产物和酵母表达载体 pYES2 进行双酶切反应,最终将 *SICDJ2* 基因的编码序列连接到酵母表达载体 pYES2 上,构建重组质粒。

1.2.5 酵母遗传转化 将酵母空载 pYES2 和 pYES2-*SICDJ2* 重组质粒转入酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* strain YPH500) 中。利用醋酸锂酵母转化系统获得了阳性酵母菌株^[6]。

1.2.6 酵母在渗透胁迫下的生长分析 *S. cerevisiae* strain YPH500 在 YPD (yeast extract/peptone/

dextrose) 培养基中培养,而含有重组质粒的酵母菌株在 YNB_{Ura}-(yeast nitrogen extract, (NH₄)₂SO₄, glucose, His/trp/leu/lys 和 Ademine) 培养基中培养。为了分析含空载 pYES2 和 pYES2-*SICDJ2* 重组质粒的酵母菌在正常和渗透胁迫下的生长情况,首先,分别配制 NaCl 和 Mannitol 终浓度为 200mM、400mM 和 800mM 的 YNB_{Ura}-固体培养基。然后,挑取阳性菌株到 10ml YNB_{Ura}-液体培养基(含终浓度 2% 的棉子糖)中,28℃,200rpm/min,震荡培养 72h 后,吸取 1ml 培养物到 25ml YNB_{Ura}-液体培养基(含终浓度 2% 的半乳糖,1% NP-40)中,22℃,200rpm/min,继续震荡培养 48h,直至菌液 OD₆₀₀ = 1.0。吸取 100μl 的菌液连续稀释 10 倍,稀释 3 次,将稀释后的菌液吸取 10μl 点在不同浓度 NaCl 和 Mannitol 的培养基上,28℃ 条件下,培养 5d,拍照记录。

1.3 统计学方法

所有数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,在 SPSS 18.0 统计分析软件中利用 *t* 检验进行组间比较, $P < 0.05$,为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 *SICDJ2* 基因的克隆

根据 NCBI GenBank 数据库中的 mRNA 序列(GenBank 序列号: AK323942),设计特异引物,以番茄叶片总 RNA 反转录获得的 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,经过琼脂糖凝胶电泳分离到一条 834 bp 的 DNA 条带,与 GenBank 数据库中查得的大小一致(图 1),测序结果显示序列完全正确。这些结果说明,成功地克隆得到了 *SICDJ2* 基因。*SICDJ2* 基因全长为 1159bp,开放阅读框为 834bp,第 66 个核苷酸处为起始密码子 ATG,第 898 个核苷酸处为终止密码子 TAG,开放阅读框编码 277 个氨基酸,预测分子量为 32.7kDa,等电点为 9.30 (http://web.expasy.org/compute_pi/)。

2.2 *SICDJ2* 蛋白在大肠杆菌中的诱导表达

将转 pET-*SICDJ2* 融合质粒的大肠杆菌阳性菌株,进行 IPTG 诱导 6h 后,将样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,结果显示在大肠杆菌中有一条大约 34kDa 的带,诱导后的蛋白为连有组氨酸标签的融合蛋白(图 2)。这个结果说明 *SICDJ2* 蛋白能在大肠杆菌中经诱导表达。

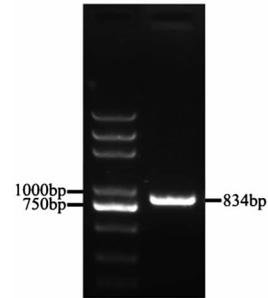
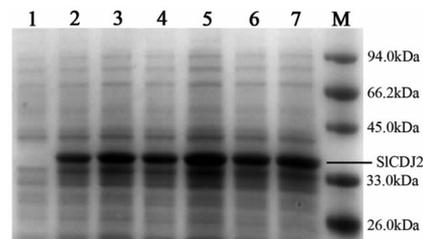


图 1 *SICDJ2* 基因核酸凝胶电泳图



1: pET-*SICDJ2* 未经 IPTG 诱导;2-7: 分别经 IPTG 诱导 1~6h;
M: 蛋白 Maker

图 2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

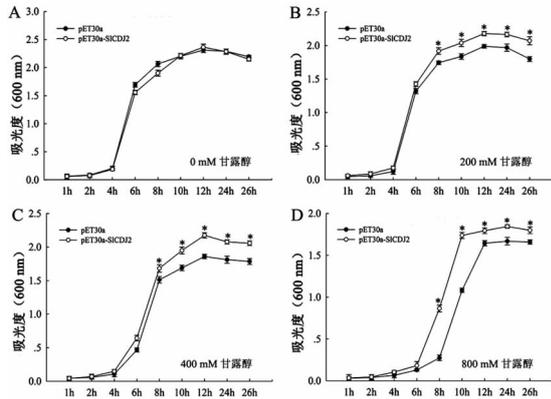
2.3 *SICDJ2* 蛋白大肠杆菌对渗透胁迫抗性的增强

将结果 2.1 中获得的转 pET30a-*SICDJ2* 阳性菌株和转 pET30a 空载菌株在甘露醇模拟的干旱胁迫下,进行持续 26h 诱导表达,分别在 1、2、4、6、8、10、12、24h 和 26h 时间点取样检测。结果如图 3 显示:在没有胁迫条件下(0mM 甘露醇),转基因菌株和对照菌株的生长情况没有明显差异(图 3A)。在干旱胁迫条件下,转基因菌株的生长状况明显好于对照菌株(图 3B、3C、3D),只是随着胁迫程度的加深,转基因菌株和对照菌株生长情况均在变差。在进行盐胁迫处理时,如结果图 4 显示:与干旱胁迫的结果极其相似(图 4A、4B、4C、4D)。只是盐胁迫对转基因和对照菌株生长的影响明显大于干旱胁迫。总之,将番茄 *SICDJ2* 蛋白在大肠杆菌中进行表达,增强了转基因大肠杆菌对渗透胁迫的抗性。

2.4 *SICDJ2* 蛋白酵母对渗透胁迫抗性的增强

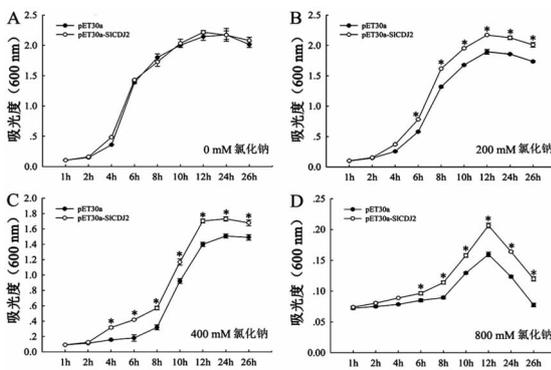
为了进一步探究 *SICDJ2* 在酵母中是否具有与在大肠杆菌中同样的功能,我们构建了 pYES2-*SICDJ2* 酵母表达载体,并成功转化酵母,获得阳性菌株。如图 5 显示:不论是在干旱胁迫下还是盐胁迫下,转 pYES2-*SICDJ2* 的酵母菌株均比转 pYES2 空载的对照菌株菌落密度要大,只是随着胁迫程度加

大,阳性菌株和对照菌株的菌落密度均在逐渐减小,这就说明阳性菌株的生长状况要优于对照菌株的生长状况。这些结果说明,*SICDJ2* 蛋白有助于增强转基因酵母对渗透胁迫的抗性。



**代表与对照组相比存在显著差异 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

图3 干旱胁迫对转 *SICDJ2* 基因的大肠杆菌生长的影响 (Mean \pm SE, n=6)



*代表与对照组相比存在显著差异 ($P < 0.05$)

图4 盐胁迫对转 *SICDJ2* 基因的大肠杆菌生长的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=6)

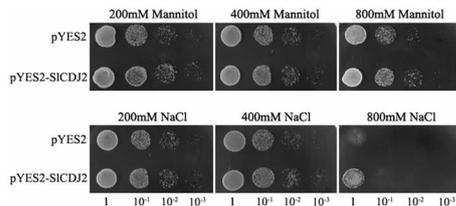


图5 干旱和盐胁迫对转 *SICDJ2* 基因酵母生长的影响

3 讨论

DnaJ 蛋白是生物体内广泛存在的一种参与多种生理生化过程,并响应多种胁迫的热激蛋白,最早发现于大肠杆菌中^[7]。近几年,几乎在所有的生物类群中均有 DnaJ 蛋白的发现,且具有多种不同的生物特征^[8]。Hsp70-DnaJ 分子伴侣系统能够

维持多种胁迫下细胞内蛋白质的稳定,进而提高生物体的抗逆性^[9]。例如 AtDjA2 和 AtDjA3 蛋白有助于提高拟南芥的高温抗性^[10]。AtDjB1 可以通过保护细胞免受高温诱导的氧化胁迫的伤害,进而提高拟南芥的耐热性^[11]。异源表达大豆 GmDjp1 能够显著提高大肠杆菌的高温抗性^[12]。Schafleitner 等^[13]研究发现 6 个 DnaJ 蛋白均受到水分胁迫的诱导而上调表达,其作用可能是维持干旱胁迫下细胞内蛋白组分的稳定性,从而减轻细胞的损伤。Zhao 等^[14]研究表明,在大肠杆菌中异源表达拟南芥 DnaJ 蛋白能够增强细菌对盐的耐受性。目前,番茄中 DnaJ 蛋白功能研究较少,尤其是对渗透胁迫条件下其功能研究更少。因此,本研究中我们从番茄叶片中克隆得到一个 DnaJ 基因 (*SICDJ2*),该基因全长为 1159 bp,开放阅读框为 834 bp,编码 277 个氨基酸(图 1)。先前研究表明,番茄 *SICDJ2* 基因受干旱胁迫的诱导表达^[15]。在本研究中,在大肠杆菌中表达 *SICDJ2* 蛋白(图 2),转基因大肠杆菌在干旱和盐胁迫的生长状况明显好于对照菌株(图 3,4),说明 *SICDJ2* 蛋白有助于提高转基因大肠杆菌对渗透胁迫的抗性。同样,在酵母中表达 *SICDJ2* 蛋白,转基因酵母菌株在干旱和盐胁迫下的菌落密度均高于对照菌株(图 5),说明 *SICDJ2* 蛋白有助于转基因酵母提高对渗透胁迫的抗性。这些研究初步表明,番茄 *SICDJ2* 基因在响应渗透胁迫过程发挥重要的功能,但 *SICDJ2* 基因在番茄中的具体功能仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 张峭,王克. 我国农业自然灾害风险评估与区划[J]. 中国农业资源与区划,2011,32(3):32-36.
- [2] 孔凡英,邓永胜,孟庆伟. 叶绿体 J 蛋白研究进展[J]. 植物生理学报,2011,47(3):235-243.
- [3] Rajan VB, DSilva P. Arabidopsis thaliana J-class heat shock proteins; cellular stress sensors [J]. Functional & Integrative Genomics, 2009, 9:433-446.
- [4] Wang GD, Kong FY, Zhang S, et al. A tomato chloroplast-targeted DnaJ protein protects Rubisco activity under heat stress [J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(11):3027-3040.
- [5] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. Nature, 1970, 227:680-685.

(下转第 130 页)

10. 1038/srep38524.
- [5] Abankwa D, Kury P, Muller HW. Dynamic changes in gene expression profiles following axotomy of projection fibres in the mammalian CNS [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2002, 21 (3): 421-435.
- [6] Hall A, Lalli G. Rho and Ras GTPases in axon growth, guidance, and branching [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010, 2 (2): a1818. DOI: 10. 1101/cshperspect. a001818.
- [7] Dickson BJ. Rho GTPases in growth cone guidance [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11 (1): 103-110.
- [8] Tan HB, Zhong YS, Cheng Y, et al. Rho/ROCK pathway and neural regeneration: a potential therapeutic target for central nervous system and optic nerve damage [J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4 (6): 652-657. DOI: 10. 3980/j. issn. 2222-3959. 2011. 06. 16.
- [9] Fu Q, Hue J, Li S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs promote axon regeneration via RhoA inhibition [J]. *J Neurosci*, 2007, 27 (15): 4154-4164. DOI: 10. 1523/JNEUROSCI. 4353-06. 2007.
- [10] Madura T, Tomita K, Terenghi G. Ibuprofen improves functional outcome after axotomy and immediate repair in the peripheral nervous system [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2011, 64 (12): 1641-1646. DOI: 10. 1016/j. bjps. 2011. 07. 014.
- [11] Xing B, Li H, Wang H, et al. RhoA-inhibiting NSAIDs promote axonal myelination after spinal cord injury [J]. *Exp Neurol*, 2011, 231 (2): 247-260. DOI: 10. 1016/j. expneurol. 2011. 06. 018.
- [12] Wang X, Budel S, Baughman K, et al. Ibuprofen enhances recovery from spinal cord injury by limiting tissue loss and stimulating axonal growth [J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26 (1): 81-95. DOI: 10. 1089/neu. 2007. 0464.
- [13] Fukushima M, Nakamura M, Kohjima M, et al. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase (ROCK) inhibitor, suppresses collagen production and enhances collagenase activity in hepatic stellate cells [J]. *Liver Int*, 2005, 25 (4): 829-838. DOI: 10. 1111/j. 1478-3231. 2005. 01142. x.
- [14] Zhou H, Li YJ, Wang M, et al. Involvement of RhoA/ROCK in myocardial fibrosis in a rat model of type 2 diabetes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32 (8): 999-1008. DOI: 10. 1038/aps. 2011. 54.

(收稿日期 2018-11-22)

(本文编辑:石俊强)

+++++

(上接第 125 页)

- [6] Cai GH, Wang GD, Wang L, et al. A maize mitogen-activated protein kinase kinase, ZmMKK1, positively regulated the salt and drought tolerance in transgenic Arabidopsis [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, 171: 1003-1016.
- [7] Georgopoulos CP, Heil AL, Yochem J, et al. Identification of the E. coli DnaJ gene product [J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1980, 178: 583-588.
- [8] Craig EA, Huang P, Aron R, et al. The diverse roles of J proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone [J]. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology*, 2006, 156 (156): 1-21.
- [9] Pulido P, Leister D. Novel DNAJ-related proteins in Arabidopsis thaliana [J]. *New Phytologist*, 2018, 217: 480-490.
- [10] Li GL, Chang H, Li B, et al. The roles of the atDja2 and atDja3 molecular chaperone proteins in improving thermotolerance of Arabidopsis thaliana seedlings [J]. *Plant Science*, 2007, 173: 408-416.
- [11] Zhou W, Zhou T, Li MX, et al. The Arabidopsis J-protein AtDjB1 facilitates thermotolerance by protecting cells against heat-induced oxidative damage [J]. *New Phytologist*, 2012, 194: 364-378.
- [12] So HA, Chung E, Lee JH. Molecular characterization of soybean GmDjp1 encoding a type III J-protein induced by abiotic stress [J]. *Genes & Genomics*, 2013, 35 (2): 247-256.
- [13] Schafleitner R, Gutierrez Rosales RO. Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45 (9): 673-90.
- [14] Zhao ZC, Zhang WR, Yan JP, et al. Overexpression of Arabidopsis DnaJ (Hsp40) contributes to NaCl-stress tolerance [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2010, 9: 972-978.
- [15] Wang GD, Cai GH, Kong FY, et al. Overexpression of tomato chloroplast-targeted DnaJ protein enhances tolerance to drought stress and resistance to Pseudomonas solanacearum in transgenic tobacco [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2014, 82: 95-104.

(收稿日期 2018-11-07)

(本文编辑:石俊强)