

OsLEA5c 在大肠杆菌中的表达、纯化及对蛋白质的保护效应研究

胡廷章,陈再刚,秦娟,黄小云
(重庆三峡学院 生命科学与工程学院,重庆 404100)

摘要: 为了研究 OsLEA5c 蛋白对其他蛋白的保护效应,在大肠杆菌 DL21 中异源表达 OsLEA5c 蛋白,采用 HiTrap™ chelating HP 层析柱纯化 OsLEA5c 蛋白。纯化的 OsLEA5c 蛋白用于高温、脱水和冻融胁迫下对乳酸脱氢酶的保护效应研究。结果表明,在 PBS 缓冲体系中,50 ℃ 处理 10、20、30 min 后,乳酸脱氢酶的活性分别残留 43.20%、24.53%、17.55%;而按 1:1 的质量比加入纯化的 OsLEA5c 蛋白后,乳酸脱氢酶活性分别保留 85.77%、74.24%、65.27%。干燥脱水 5 h 后,乳酸脱氢酶活性仅保留 2.55%~4.19%;按 2:1、5:1 和 10:1 的质量比加入 OsLEA5c 蛋白,乳酸脱氢酶活性分别保留 17.59%、24.73%、36.39%。反复冻融 5 次,乳酸脱氢酶活性残留 9.41%~12.14%;而按 2:1、5:1 和 10:1 的质量比加入纯化的 OsLEA5c 蛋白,乳酸脱氢酶活性分别保留 28.09%、69.44%、95.16%。表明 OsLEA5c 蛋白对其他蛋白质具有保护作用,能减少高温、脱水和冻融胁迫对蛋白质的损伤。

关键词: 胚胎发育后期丰富蛋白; OsLEA5c 蛋白; 乳酸脱氢酶; 蛋白质活性
中图分类号: Q512 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)12-0011-04

Expression and Purification of OsLEA5c in *Escherichia coli* and Its Protective Effect on Proteins

HU Tingzhang, CHEN Zaigang, QIN Juan, HUANG Xiaoyun
(School of Life Science and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China)

Abstract: In order to investigate protective effect of OsLEA5c protein on other proteins, OsLEA5c protein was heterologously expressed in *Escherichia coli* DL21, and purified using HiTrap™ chelating HP column. The purified OsLEA5c protein was used to study the protective effect of the OsLEA5c protein on lactate dehydrogenase (LDH) activity under heating, drying, and freeze-thaw stresses. LDH was incubated in PBS buffer at 50 ℃ for 10, 20, 30 min, its activity was decreased to 43.20%, 24.53% and 17.55%, respectively. However, when OsLEA5c protein was added into LDH solution at a mass ratio of 1:1 (OsLEA5c: LDH), enzyme activity remained at 85.77%, 74.24% and 65.27%, respectively, after treatment in the same way. After air-drying for 5 h, the residual activity of LDH were 2.55%—4.19%; while OsLEA5c was added into LDH solution at mass ratios of 2:1, 5:1 and 10:1, its residual activity were 17.59%, 24.73% and 36.39%, respectively. After 5 cycles of freeze-thaw treatments, the activity of residual LDH was decreased to 9.41%—12.14%, while OsLEA5c was added to LDH solution at mass ratios of 2:1, 5:1 and 10:1, its residual activity were 28.09%, 69.44% and 95.16%, respectively, after freeze-thaw treatments. Therefore, the result suggested that OsLEA5c protein could protect other protein and decrease damage from heating, drying, and freeze-thaw stresses.

Key words: late embryogenesis abundant protein; OsLEA5c protein; lactate dehydrogenase; protein activity

胚发育后期丰富蛋白(late embryogenesis abundant protein, LEA)广泛存在于高等植物中,是水稻、玉米、小麦等作物种子的重要成分。不同类型的 LEA 蛋白的功能存在差异,但主要在植物抗高温、干旱、高盐、高渗透压、低温和损伤等方面发挥重要作用^[1-4]。在 Battaglia 等^[5]划分的 7 个不同组或的亚家族 LEA 蛋白中,第 1、2、3、4、6、7 组各自具有一致的序列和典型的结构域,都是高度亲水的蛋白,属于典型的 LEA 蛋白;而第 5 组较典型 LEA 蛋白分子有更多的疏水残基,成员之间缺乏典型的结构域和一致的序列,是一类非典型的 LEA 蛋白,根据其结构域不同,分为 5A、5B 和 5C 3 个亚组^[5]。已有的研究表明:OsLEA5c 蛋白由 151 个氨基酸残基组成,具有典型的 LEA 蛋白 5C 亚组的特征,该蛋白富含 Leu、Ser 和 Asp,是一种酸性蛋白。该蛋白的 3 个主要的疏水区分布在蛋白序列 C-端的结构域 LEA_2 中,OsLEA5c 蛋白的平均亲水系数(GRAVY)为 0.020,是疏水蛋白。利用基因重组技术获得表达 OsLEA5c 蛋白的工程菌株 BL/OsLEA5c。与大肠杆菌 DL21 比较,该工程菌对高温、高盐、高渗透压和反复冻融具有更强的抗性^[6]。

为了确定 OsLEA5c 蛋白提高工程菌株 BL/OsLEA5c 对非生物胁迫抗性的作用机制,利用工程菌株 BL/OsLEA5c 在大肠杆菌 DL21 中异源表达 OsLEA5c 蛋白,并采用亲和层析纯化系统纯化 OsLEA5c 蛋白,旨在研究 OsLEA5c 蛋白在非生物胁迫下对乳酸脱氢酶的保护效应。

1 材料和方法

1.1 菌株及主要仪器、试剂

表达 BL/OsLEA5c 的工程菌株 BL/OsLEA5c 由重庆三峡学院生命科学与工程学院实验室保存。

DU® 640 紫外分光光度仪购于 Beckman 公司;Ni²⁺-NTA-agrose 亲和层析柱购于上海化科实验器材有限公司;BCA 蛋白浓度检测试剂盒购于上海生物工程有限公司;蛋白标准品购于上海博谷生物科技有限公司;乳酸脱氢酶试剂盒购于南京建成生物工程研究所;IPTG、氨苄青霉素购自 TaKaRa 公司;其他常规试剂均为国产分析纯。

1.2 OsLEA5c 蛋白的表达、纯化和电泳分析

将 BL/OsLEA5c 菌株在含 100 μg/mL 氨苄青霉素的 LB 平板上划线,挑取单菌落,按胡廷章等^[6]的方法,用 IPTG 诱导 OsLEA5c 蛋白表达。在 37 °C 诱导培养 4 h 后,离心收集细菌,将收集细菌重悬于 PBS 缓冲液,在冰浴中超声裂菌,于 4 °C、8 000 r/min 离心 20 min 后,利用 Ni²⁺-NTA-agrose 亲和层析柱纯化上清液中的 OsLEA5c 融合蛋白。然后,对纯

化蛋白进行梯度透析复性,超滤浓缩。BCA 法测定蛋白质的浓度,对纯化的蛋白质进行 SDS-PAGE 电泳分析^[6]。

1.3 OsLEA5c 蛋白对其他蛋白活性的保护分析

为了研究 OsLEA5c 蛋白在不同胁迫条件下对其他蛋白活性的保护效应,以乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)为测试对象,以未加 OsLEA5c 蛋白的溶于水中和 PBS 缓冲液中的 LDH 为对照,在 PBS 缓冲体系中,按下列方式分析 OsLEA5c 蛋白对 LDH 的保护效应:①将 OsLEA5c 蛋白与 LDH 按 1:1 的质量比混合,置于 50 °C 分别处理 10、20、30 min。②配制质量比为 2:1、5:1 和 10:1 的 OsLEA5c-LDH 混合液,在室温(32 °C),置于通风橱内吹干 5 h,然后再加水至原来的体积,室温恢复 10 min。③将质量比为 2:1、5:1 和 10:1 的 OsLEA5c-LDH 混合液,置于液氮中冷冻 1 min,取出在室温(32 °C)放置 10 min,反复冻融 5 次。

用 DU® 640 紫外分光光度仪(Beckman 公司)测定 LDH 活性,具体方法按 LDH 测定试剂盒说明书进行。每个指标重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 OsLEA5c 蛋白的诱导表达和纯化

SDS-PAGE 分析表明,经纯化的 OsLEA5c 融合蛋白有大约 34 ku 的特异蛋白带,与推测的分子质量大小一致(图 1),说明 IPTG 诱导表达的 OsLEA5c 融合蛋白经 HiTrap™ chelating HP 层析柱亲和层析纯化后得到了纯化。

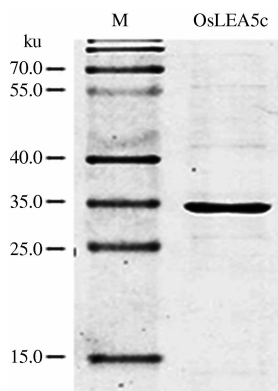


图 1 OsLEA5c 蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.2 高温胁迫下 OsLEA5c 对 LDH 活性的保护

在 PBS 缓冲体系中,将纯化的 OsLEA5c 蛋白与 LDH 按 1:1 的质量比混合,50 °C 高温处理 10、20、30 min 后,LDH 的活性分别为 85.77%、74.24%、65.27%;而未加 OsLEA5c 蛋白的 LDH 活性残余是 17.55%~43.20%;在水溶液中,高温处理的 LDH 的活性较在 PBS 缓冲体系中稍低,为 12.20%~

39.22% (图 2)。说明高温处理会降低 LDH 活性,并且随着处理时间的增加,LDH 的活性损失更严重。但在相同的处理时间下,加 OsLEA5c 蛋白的 LDH 活性较未加 OsLEA5c 蛋白的 LDH 活性高。说明 OsLEA5c 蛋白能增加 LDH 的稳定性,降低高温对 LDH 的损伤,使残留的 LDH 活性增加。

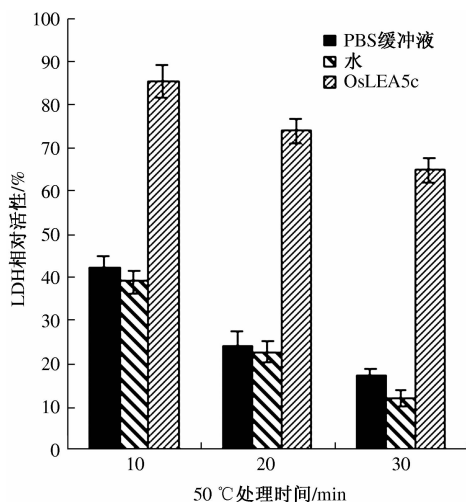


图 2 高温胁迫下 OsLEA5c 对 LDH 活性的保护

2.3 脱水胁迫下 OsLEA5c 对 LDH 活性的保护

在 PBS 缓冲体系中,按 2:1、5:1 和 10:1 的质量比混合 OsLEA5c 蛋白和 LDH,在通风橱内吹干 5 h,测定 LDH 活性,未加 OsLEA5c 蛋白的对照组的 LDH 活性几乎全部丧失,残余活性为 2.55% ~ 4.19%;而加 2、5、10 倍 OsLEA5c 蛋白的 LDH 活性分别是 17.59%、24.73%、36.39%。在水溶液中,LDH 的活性与 PBS 缓冲体系中的一致,为 2.19% ~ 6.56% (图 3)。说明脱水胁迫会引起 LDH 活性的严重丧失。但 OsLEA5c 蛋白能减轻脱水对 LDH 的伤害,并且,在 OsLEA5c 和 LDH 的质量比为 0:1 ~ 10:1 时,随着 OsLEA5c 蛋白添加量的增加,保留的 LDH 活性增加。

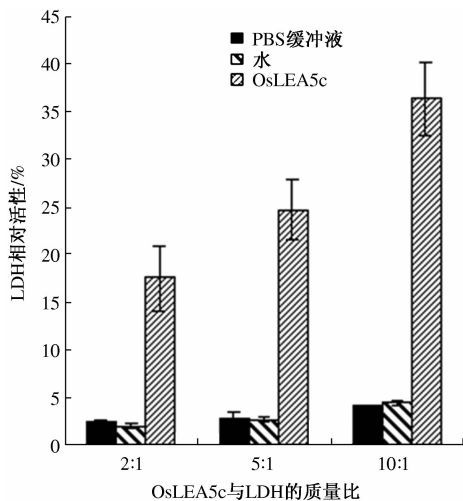


图 3 脱水胁迫下 OsLEA5c 对 LDH 活性的保护

2.4 冻融胁迫下 OsLEA5c 对 LDH 活性的保护

在 PBS 缓冲体系中,将 OsLEA5c 纯化蛋白与 LDH 按 2:1、5:1 和 10:1 的质量比混合,在液氮和室温中反复冻融 5 次,检测 LDH 活性,其活性为 28.09% ~ 95.16%;而未加 OsLEA5c 蛋白的 LDH 活性是 9.41% ~ 12.14%。在水溶液中,经相同处理的 LDH 的活性较在 PBS 缓冲体系中的更低,为 4.39% ~ 7.07% (图 4)。说明反复冻融会降低 LDH 活性。但加 OsLEA5c 蛋白的 LDH 活性较未加 OsLEA5c 蛋白的活性高,在 OsLEA5c 蛋白与 LDH 为 10:1 的质量比时,LDH 活性保留高达 95.16% (图 4)。因此,在反复冻融胁迫条件下,OsLEA5c 蛋白对 LDH 有较强的稳定作用,使残留的 LDH 活性大大提高。

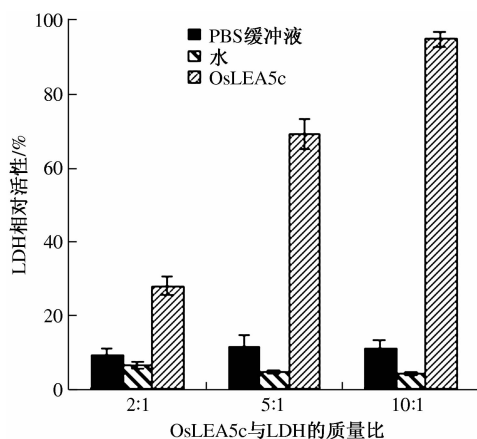


图 4 冻融处理下 OsLEA5c 对 LDH 活性的保护

3 结论与讨论

脱水、高温和低温胁迫会引起细胞的酶变性,功能丧失^[7-9],但许多 LEA 蛋白能有效降低高温、干燥和冻融对蛋白质的损害^[10]。本研究表明,纯化的 OsLEA5c 蛋白能提高 LDH 的稳定性,有效降低高温、干燥和冻融对 LDH 的损害。

LEA 蛋白对蛋白活性的保护可能有 2 种作用机制。一种机制是作为分子伴侣发挥保护剂的作用。传统的分子伴侣不但能阻碍不合适的蛋白质之间聚集,还能与目标蛋白结合形成特异、临时的复合物。Wise 等^[11]的 POPP 信息学分析表明,LEA 蛋白具有某些分子伴侣相似的多肽性质。分子伴侣可以稳定蛋白质的结构,防止其进一步变性。拟南芥 (*Arabidopsis*) 的 2 个干旱诱导产物 *Athsp70-1* 及 *Athsp70-2* 能够在水分胁迫时使错误折叠的蛋白质恢复其天然构象^[10]。Goyal 等^[8]认为,LEA 蛋白的部分保护功能是因为能够防止脱水敏感蛋白的聚集。另一种机制是 LEA 蛋白是作为“分子屏障”行使保护功能^[8]。在逐渐稠密的脱水的拥挤环境下,结构松散的 LEA 蛋白能够发挥体积效应,以减少部分变性蛋白质的相互接触进而聚集。这些分子屏障也可能与

其他蛋白质表面相互作用产生立体稳定效应,阻碍冰晶体的形成,加强可塑性,防止脱水或冰冻引起的蛋白质损伤。作为“分子屏障”的 LEA 蛋白是很多生物组织中抵抗水分胁迫的一种重要保护机制^[12]。

虽然 OsLEA5c 蛋白保护蛋白质活性的机制还不完全清楚,但从相关的研究可以推测,OsLEA5c 蛋白也可能作为分子伴侣或“分子屏障”稳定蛋白的结构,行使保护功能,降低高温、干燥和冻融对蛋白质的损害。

参考文献:

- [1] Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, *et al.* Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67 (1/2): 107-124.
- [2] Dalal M, Tayal D, Chinnusamy V, *et al.* Abiotic stress and ABA-inducible group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance [J]. *J Biotechnol*, 2009, 139 (2): 137-145.
- [3] Liu Y, Zheng Y, Zhang Y, *et al.* Soybean PM2 protein (LEA3) confers the tolerance of *Escherichia coli* and stabilization of enzyme activity under diverse stresses [J]. *Curr Microbiol*, 2010, 60 (5): 373-378.
- [4] Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J L, *et al.* Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154 (1): 373-390.
- [5] Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, *et al.* The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148 (1): 6-24.
- [6] 胡廷章, 杨俊年, 周大祥, 等. 水稻 *OsLEA5c* 基因的克隆、表达和抗逆性分析 [J]. *河南农业科学*, 2014, 43 (9): 18-23.
- [7] Liu D, Lu Z, Mao Z, *et al.* Enhanced thermotolerance of *E. coli* by expressed OsHsp90 from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Curr Microbiol*, 2009, 58 (2): 129-133.
- [8] Goyal K, Walton L J, Tunnacliffe A. LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress [J]. *Biochem J*, 2005, 388: 151-157.
- [9] Reyes J L, Campos F, Wei H, *et al.* Functional dissection of hydrophilins during *in vitro* freeze protection [J]. *Plant Cell Environ*, 2008, 31 (12): 1781-1790.
- [10] Kiyosue T, Yamaguchi-shinozaki K, Shinozaki K. Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress (ERDs) in *Arabidopsis thaliana* L.: Identification of three ERDs as HSP cognate genes [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 25 (5): 791-798.
- [11] Wise M J, Tunnacliffe A. POPP the question: What do LEA proteins do? [J]. *Tren Plant Sci*, 2004, 9 (1): 13-17.
- [12] Tunnacliffe A, Wise M J. The continuing conundrum of the LEA proteins [J]. *Naturwissenschaften*, 2007, 94 (10): 791-812.