

# 拟南芥蛋白激酶 SnRK2.6 的原核表达、纯化及活性分析

杨凤博, 王鲜萍\*, 李 坤

(河南大学 生命科学学院 植物逆境生物学重点实验室, 河南 开封 475004)

**摘要:** 从哥伦比亚生态型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Columbia 0) 中克隆 SnRK2.6 [SNF1 (sucrose non-fermenting-1)-related protein kinase 2.6] 的完整编码序列 (coding sequence, CDS), 构建该基因的原核表达载体, 将其转化 BL21(DE3), 经表达纯化得到 SnRK2.6 蛋白。激酶活性分析发现, 原核表达纯化的 SnRK2.6 有自磷酸化和磷酸化 MBP (myelin basic protein) 的活性, 为后续试验分析 SnRK2.6 的功能奠定基础。

**关键词:** 原核表达; 纯化; 蛋白激酶; 脱落酸

中图分类号: Q78 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)10-0026-04

## Prokaryotic Expression, Purification and Activity Analysis of Protein Kinase SnRK2.6 in *Arabidopsis thaliana*

YANG Feng-bo, WANG Xian-ping\*, LI Kun

(Key Laboratory of Plant Stress Biology, College of Life Science, Henan University, Kaifeng 475004, China)

**Abstract:** The whole coding sequence of SnRK2.6 [SNF1 (sucrose non-fermenting-1)-related protein kinase 2.6] was cloned from *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia 0. The prokaryotic expression vector of the gene was constructed and transformed into *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) to obtain SnRK2.6 protein by induction and purification. By activity analysis, the purified SnRK2.6 had both autophosphorylation activity and phosphorylation activity of the myelin basic protein (MBP) substrate. This study lays the foundation for further study of the function of SnRK2.6.

**Key words:** prokaryotic expression; purification; protein kinase; ABA

研究植物渗透胁迫应答机制, 对提高植物在逆境胁迫下的存活率极为重要。蛋白激酶 SnRK2 [SNF1 (sucrose non-fermenting-1)-related protein kinase 2] 家族成员受渗透胁迫激活, 是脱落酸 (abscisic acid, ABA) 信号转导途径的重要组分<sup>[1]</sup>。植物细胞失水诱导内源 ABA 的合成, ABA 与其受体 PYR1 (pyrabactin resistance 1) 结合, 再与 A 类的

PP2C<sup>[2]</sup> (protein phosphatases 2C) (拟南芥中参与 ABA 信号转导的 PP2C) 结合形成三元复合体, 从而抑制了 PP2C 的活性, 使受 PP2C 抑制的 III 类 SnRK2 (SnRK2.2/2.3/2.6) 处于活性状态<sup>[3-6]</sup>。SnRK2 能磷酸化 ABA 响应元件 (ABA response element, ABRE) 结合蛋白或结合因子 (ABRE binding factors, ABEB/ABFs), 激活 ABA 应答基因的表

收稿日期: 2014-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31070239)

作者简介: 杨凤博 (1987-), 女, 河南三门峡人, 在读博士研究生, 研究方向: 植物生理与分子生物学。

E-mail: yangfengbo.2008@163.com

\* 通讯作者: 王鲜萍 (1979-), 女, 山西大同人, 讲师, 硕士, 主要从事遗传学研究。E-mail: xpwang@henu.edu.cn

达,从而调控植物的生理反应和生长发育。目前已经发现拟南芥 SnRK2 家族有 10 个成员,仅Ⅲ类 SnRK2 的激酶活性不仅受外源 ABA 激活,而且受渗透胁迫的强烈激活<sup>[7]</sup>。Ⅲ类 SnRK2 的三突变体 *snrk2 2/2 3/2 6* 表现出对干旱的敏感性和对 ABA 的不敏感,调控种子萌发、植物生长发育和相关基因表达等<sup>[8-9]</sup>。目前,对于Ⅲ类 SnRK2 的研究主要集中于其对逆境信号转导的调控作用,特别是渗透胁迫和 ABA 信号转导<sup>[10]</sup>,但是对于其参与 ABA 信号转导与调控植物体内氧化还原平衡间的关系还知之甚少。

本实验室早期研究发现,拟南芥中 GPX3 (glutathione peroxidase 3) 与 ABI2 (ABA insensitive 2) 偶联,共同参与调控 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的信号转导。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在时,还原态的 GPX3 与 ABI2 构象会发生改变,A 类 PP2C 类磷酸酶 ABI1、ABI2 的活性在 GPX3 存在时分别降低约 40%、70%<sup>[11]</sup>,而 A 类 PP2C 类磷酸酶的活性与 SnRK2.6 的激酶活性直接相关<sup>[3-6]</sup>。鉴于此,原核表达并纯化了 SnRK2.6 蛋白,并对其激酶活性进行检测,为继续开展其活性位点、催化位点分析及其活性是否受活性氧调控的机制研究提供材料,从而为进一步阐明 SnRK2.6 在 ABA 信号转导中或响应其他逆境胁迫时导致植物体内氧化还原状态转变的功能机制奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 拟南芥种植条件

提取 RNA 所用的哥伦比亚生态型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* Columbia 0) 购自 NASC (European *Arabidopsis* Stock Centre)。选取籽粒饱满的拟南芥种子,经 0.1% HgCl<sub>2</sub> 表面消毒 5 min 后,用灭菌蒸馏水冲洗 5 次,再播种于 0.6% 的 MS 培养基中,4 °C 春化 3 d,然后放置于 21 °C 光照培养箱内 16 h 光/8 h 暗培养,相对湿度 70% 左右,光照强度为 60 μmol/(m<sup>2</sup> · s)。

### 1.2 菌株及主要试剂

BL21(DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物公司;大肠杆菌 DH5α、pET28a 载体均为本实验室保存;Ni Sepharose<sup>TM</sup> excel 购自 GE Healthcare 公司;质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、核酸内切酶、DNA 连接酶试剂盒、低分子量蛋白 Marker 购自 TaKaRa 公司;PCR 高保真酶 KOD-401 购自 TOYOBO 公司;M-MLV Reverse Transcriptase 购

自 Promega 公司;HIS 标签抗体购自天津三箭生物技术公司;彩色预染蛋白 Ladder # P7711V 购自 NEB 公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。

### 1.3 方法

1.3.1 拟南芥总 RNA 的提取及检测 拟南芥整株幼苗总 RNA 的提取及检测参考文献<sup>[12]</sup>的方法。

1.3.2 PCR 产物检测及表达载体的构建 将提取的总 RNA 反转录,以反转录的 cDNA 为模板,采用 SnRK2.6 引物(正向引物:5'-GCCGAATTCATG-GATCGACCAGCAGTGA-3';反向引物:5'-CCCGTCGACTCACATTGCGTACACAATC-3')扩增 *SnRK2.6* 基因,根据设计引物所用酶切位点用 *EcoR*、*Sal* I 双酶切 *SnRK2.6* 基因扩增产物,与双酶切后的 pET28a 载体进行连接,转化 DH5α,筛选阳性克隆。然后重组质粒经双酶切验证,测序,筛选正确的重组质粒。测序由北京金维智生物科技有限公司完成。所得到的重组质粒命名为 p28a-SnRK2.6。

1.3.3 重组蛋白的诱导表达及纯化 将鉴定正确的重组质粒转化 BL21(DE3),PCR 鉴定阳性克隆。分别挑取阳性单菌落,接种于新鲜的含 0.1 mg/mL 氨苄青霉素/卡那霉素的 300 mL LB 液体培养基中,37 °C 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 达到 0.6~0.8,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPIG,于 16 °C (预试验结果)诱导 12 h。将诱导后的菌液倒入离心管中,10 °C、4 000 r/min 离心 15 min,收集菌体,沉淀用 A 缓冲液(20 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,pH 值 8.0)悬浮,超声波破菌。4 °C、14 000 r/min 离心 40 min,取上清液转移至分别用去离子水和 A 缓冲液平衡过的 Ni Sepharose<sup>TM</sup> excel 柱子中,使目的蛋白结合在柱子上,即以含低浓度咪唑(20、50、100、200、250 mmol/L)的 A 缓冲液洗脱杂质蛋白质,然后以含有 500 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液洗脱目的蛋白,按每管收集 1 mL 目的蛋白,依次分别标号为 1、2、3、4 等。

1.3.4 纯化蛋白质的检测 取纯化后的目的蛋白各 40 μL,加入 10 μL 的 5 倍加样缓冲液,100 °C 变性 5 min,分别加样于 2 块 12% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测,于 70 V 恒定电压下电泳至溴酚蓝移至分离胶处,150 V 条件下电泳至溴酚蓝移出分离胶,取一块凝胶进行考马斯亮蓝染色观察,另一块凝胶转移到硝酸纤维素膜上进行 Western blot 以检测带 HIS 标签的蛋白质。用 Hoefer 公司 TE77X 半干转膜仪 30 V 转膜 30 min,封闭 2 h,加

入 HIS 标签抗体于 4 ℃ 摇床孵育过夜, TBST 缓冲液清洗膜 4 次, 加入二抗后孵育 1 h, TBST 清洗膜 3 次, A 缓冲液清洗膜 1 次, 加入发光底物曝光检测。

1.3.5 纯化蛋白质的激酶活性检测 分别取原核表达纯化的激酶蛋白 0.1 μg 和底物蛋白质 0.5 μg, 加入 10 × 反应缓冲液 (pH 值为 7.5, 0.5 mol/L Hepes 200 μL, 1 mol/L MgCl<sub>2</sub> 200 μL, 1 mol/L DTT 10 μL 混匀) 2.5 μL, 1 mmol/L 冰上预冷的 ATP (含 [γ-32P] 的 ATP 与 1 mmol/L 的 ATP 按体积 1 : 10 混匀) 2.5 μL, 30 ℃ 反应 30 min, 加入 4 × SDS 加样缓冲液, 100 ℃ 煮沸 2 min, 进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳。以双蒸水洗去胶上残留的同位素, 干胶后将 X 光胶片曝光<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体的构建

采用设计的特异性引物通过 PCR 扩增获得 *SnRK2.6* 基因全长 (图 1A)。分别将 *SnRK2.6* 与提取的质粒 PET28a 用 *EcoR* I 和 *Sal* I 进行双酶切, 再用 DNA 连接酶进行连接、转化, 对筛选到的阳性克隆提取质粒进行双酶切验证 (图 1B), 测序, 得到重组载体。

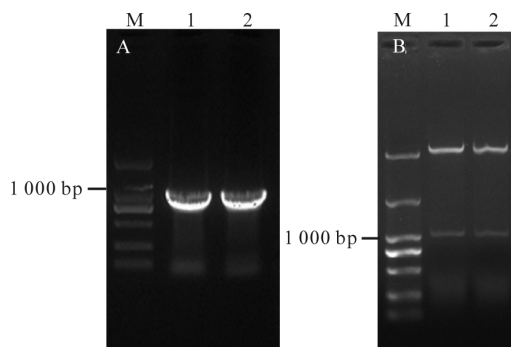


图 1 拟南芥 *SnRK2.6* 基因的克隆 (M 为 DNA Marker, 1 和 2 为 PCR 扩增产物); B. 双酶切验证重组载体 (1 和 2 为 PET28a-*SnRK2.6*, M 为 DNA Marker)

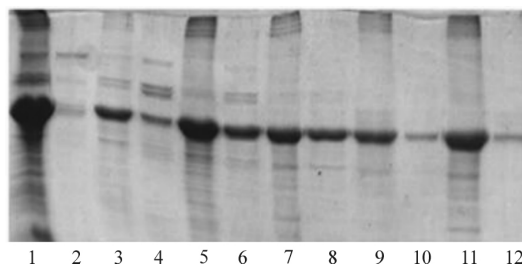
图 1 拟南芥 *SnRK2.6* 原核表达载体的构建

### 2.2 重组蛋白的表达和纯化

将鉴定正确的重组质粒 p28a-*SnRK2.6* 转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 菌落 PCR 鉴定阳性克隆, 挑选 p28a-*SnRK2.6* 的阳性克隆进行诱导表达, 并纯化蛋白质。初步结果表明: *SnRK2.6* 蛋白是可溶性蛋白, 带有 HIS 标签的 *SnRK2.6* 融合蛋白的表达量很高, *SnRK2.6* 编码 362 个氨基酸, 分子量为 41.047 kD, 预测等电点为 4.690 4, HIS 标签分子

量小, 对蛋白质的构象和活性影响小。

初步纯化 HIS-*SnRK2.6* 如图 2, 以含有不同浓度咪唑的 A 缓冲液洗脱目的蛋白, 含有 20 mmol/L 咪唑和 50 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液能从镍柱上将大量的杂蛋白质洗脱下来, 同时也洗脱下少量的 HIS-*SnRK2.6*, 尤其是 50 mmol/L 咪唑处理洗脱下的杂蛋白质较多, 而洗脱残留的 HIS-*SnRK2.6* 蛋白也较多, 有利于得到纯度高的 HIS-*SnRK2.6*。因此, 后续蛋白质纯化试验中, 采用含 50 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液洗脱杂蛋白质, 采用含 500 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液洗脱 HIS-*SnRK2.6*。



1 为破碎大肠杆菌后高速离心得到的含 HIS-*SnRK2.6* 蛋白上清液; 2、4、6、8、10、12 分别为以含 20、50、100、200、250、500 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液洗脱镍柱获得的 HIS-*SnRK2.6*; 3、5、7、9、11 分别为以含 20、50、100、200、250 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液洗脱镍柱后 HIS-*SnRK2.6* 的残留量

图 2 SDS-PAGE 检测不同咪唑浓度梯度洗脱的 HIS-*SnRK2.6*

### 2.3 原核表达 HIS-*SnRK2.6* 蛋白的检测结果

纯化后的 HIS-*SnRK2.6* 经 SDS-PAGE 电泳 (图 3), 得到分子量约 42 kD 的融合蛋白 HIS-*SnRK2.6*, 与 *SnRK2.6* 的分子量一致。将凝胶上的蛋白质经半干转膜仪转移至硝酸纤维素膜, 经化学发光的 Western blot 检测, 目的蛋白是带有 HIS 标签的融合蛋白 (图 4), 表明所纯化蛋白质是 HIS-*SnRK2.6*。

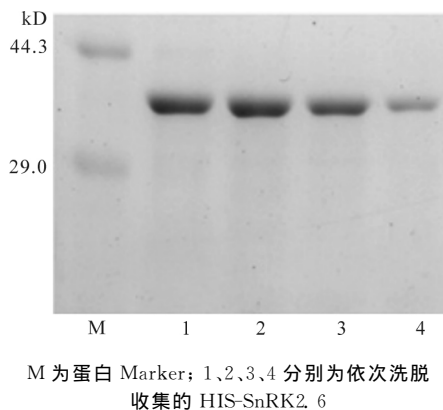
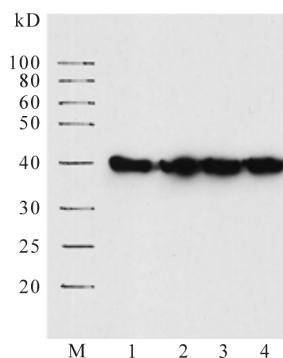


图 3 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯化的 HIS-*SnRK2.6*



M 为预染蛋白 Marker; 1、2、3、4 分别为依次洗脱收集的 HIS-SnRK2.6

图 4 蛋白质印迹法检测带 HIS 标签的融合蛋白

## 2.4 SnRK2.6 蛋白的激酶活性检测结果

图 5 显示,原核表达纯化的 SnRK2.6 蛋白有自磷酸化活性,并且能够磷酸化 MBP(myelin basic protein)蛋白,表明原核表达纯化的 SnRK2.6 蛋白是有活性的蛋白。

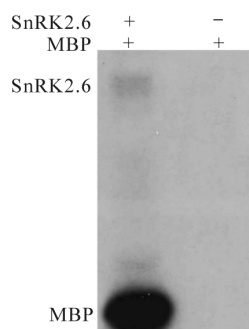


图 5 纯化的 SnRK2.6 蛋白激酶活性检测

## 3 讨论

获得大量高纯度的蛋白质是对蛋白质进行生物化学分析的基础,而获得高纯度蛋白质的方法很多,包括原生质体转化、农杆菌注射渗透转化烟草、毕赤酵母表达和原核表达的体系等,其中,原核表达蛋白具有繁殖快、操作简单、获取蛋白质量大等优点,且可选择多种亲和纯化标签对表达蛋白进行纯化,因此被广泛地用于表达真核生物的蛋白质<sup>[14]</sup>,目前也有关于其方法学的应用和综述报道<sup>[15-16]</sup>。本研究结果表明,对于 HIS-SnRK2.6,用 0.2 mmol/L IPTG、16℃诱导 12 h,获得的蛋白质经过含 50 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液冲洗,再以含 500 mmol/L 咪唑的 A 缓冲液洗脱,收集到的 HIS-SnRK2.6 纯度高、量大。该方法为通过生物化学和生物物理方法分析 SnRK2.6 的功能,深入研究 SnRK2.6 所参与的 ABA 信号转导和 GPX3 参与的氧化还原信号的调控之间的关系提供了基础,同时也为研究其他真核

基因的原核表达和蛋白纯化提供了参考。

### 参考文献:

- [1] Fujii H, Verslues P E, Zhu J K. *Arabidopsis* decuple mutant reveals the importance of SnRK2 kinases in osmotic stress responses *in vivo* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, 108: 1717-1722.
- [2] Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I. Plant PP2C phosphatases: Emerging functions in stress signaling [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9: 236-243.
- [3] Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R, *et al.* Abscisic acid: Emergence of a core signaling network [J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 651-679.
- [4] Hubbard K E, Nishimura N, Hitomi K, *et al.* Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions [J]. Genes Dev, 2010, 24: 1695-1708.
- [5] Raghavendra A S, Gonugunta V K, Christmann A, *et al.* ABA perception and signaling [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15: 395-401.
- [6] Weiner J J, Peterson F C, Volkman B F, *et al.* Structural and functional insights into core ABA signaling [J]. Curr Opin Plant Biol, 2010, 13: 495-502.
- [7] Boudsocq M, Barbier-Brygoo H, Lauriere C. Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in *Arabidopsis thaliana* [J]. J Biol Chem, 2004, 279: 41758-41766.
- [8] Fujii H, Zhu J K. *Arabidopsis* mutant deficient in 3 abscisic acid-activated protein kinases reveals critical roles in growth, reproduction, and stress [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 8380-8385.
- [9] Nakashima K, Fujita Y, Kanamori N, *et al.* Three *Arabidopsis* SnRK2 protein kinases, SRK2D/SnRK2.2, SRK2E/SnRK2.6/OST1 and SRK2I/SnRK2.3, involved in ABA signaling are essential for the control of seed development and dormancy [J]. Plant Cell Physiol, 2009, 50: 1345-1363.
- [10] Fujita Y, Yoshida T, Yamaguchi-Shinozaki K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants [J]. Physiol Plant, 2013, 147: 15-27.
- [11] 李坤, 杨凤博, 苗雨晨. 拟南芥膜蛋白 GPX3 的原核表达及纯化 [J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2013, 43: 662-666.
- [12] Miao Y, Lv D, Wang P, *et al.* An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox-transducer and a scavenger in ABA and drought stress responses [J]. Plant Cell, 2006, 18: 2749-2766.
- [13] Wang P, Du Y, Li Y, *et al.* Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2010, 22: 2981-2998.
- [14] Georgiou G, Valax P. Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli* [J]. Curr Opin Plant Biol, 1996, 7: 190-197.
- [15] Lesley S A. High-throughput proteomics: Protein expression and purification in the postgenomic world [J]. Protein Expr Purif, 2001, 22: 159-164.
- [16] Gräslund S, Nordlund P, Weigelt J, *et al.* Protein production and purification [J]. Nat Methods, 2008, 5: 135-146.