

不同标签对致病疫霉PiGK5胞外端表达及稳定性的影响

张乐乐¹, 刘惠荣^{1*}, 韩晓东¹, 陈 阳²

¹内蒙古农业大学生命科学学院, 内蒙古 呼和浩特

²内蒙古农牧业技术推广中心, 内蒙古 呼和浩特

收稿日期: 2022年4月2日; 录用日期: 2022年4月29日; 发布日期: 2022年5月6日

摘 要

马铃薯晚疫病病原菌致病疫霉的PiGK5蛋白是一类跨膜蛋白, 该蛋白在致病疫霉的致病性、无性生殖及有性生殖方面均有重要作用, 但其结构与详细功能目前尚未可知。本研究通过PCR扩增PiGK5胞外端编码区, 分别构建融合His标签及MBP和His双标签的原核表达载体, 比较了不同标签对PiGK5胞外端表达水平、可溶性及稳定性的影响。结果显示, 融合His标签的PiGK5胞外端蛋白主要以包涵体形式存在于沉淀中, 仅有少量以可溶性蛋白的形式存在, 1 L大肠杆菌表达的蛋白总量为28.11 mg, 其中可溶性蛋白总量约为2.73 mg, 而纯化后可获得纯蛋白量为0.1175 mg。纯化后的重组蛋白稳定性较好, 可在96小时内维持蛋白结构稳定。融合MBP、His双标签的PiGK5胞外端蛋白主要以可溶性蛋白的形式存在, 1 L大肠杆菌表达的蛋白总量为49.93 mg, 其中可溶性蛋白总量约为44.73 mg, 而纯化后可获得纯蛋白量为6.0125 mg。但重组蛋白的稳定性较差, 仅在1.5小时就出现了蛋白降解现象。因此, 虽然融合His标签的PiGK5胞外端蛋白的可溶性蛋白量较低, 但重组蛋白更稳定, 融合His标签更适合于PiGK5胞外端的原核表达及后续结构与功能研究。本研究比较了不同标签对PiGK5蛋白胞外端表达的影响, 建立了该蛋白的原核表达条件, 为其结构与功能的研究奠定了基础。

关键词

致病疫霉, PiGK5蛋白胞外端, 标签, 表达纯化, 稳定性

Effects of Different Tags on the Expression and Stability of Extracellular Terminal of *Phytophthora infestans* PiGK5

Lele Zhang¹, Huirong Liu^{1*}, Xiaodong Han¹, Yang Chen²

¹College of Life Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot Inner Mongolia

*通讯作者。

²Inner Mongolia Agriculture and Animal Husbandry Technology Popularization Center, Hohhot Inner Mongolia

Received: Apr. 2nd, 2022; accepted: Apr. 29th, 2022; published: May 6th, 2022

Abstract

PiGK5 protein of potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* is a kind of transmembrane protein, which plays an important role in pathogenicity, asexual reproduction and sexual reproduction of *P. infestans*. However, the structure and detailed function of this protein have not been known. In this study, the coding region of cDNA of extracellular terminal of PiGK5 was amplified by PCR, and the prokaryotic expression vectors fused with His tag and fused with MBP and His tags were constructed respectively. The effects of different tags on the expression level, solubility and stability of extracellular terminal of PiGK5 were compared. The results showed that the extracellular terminal of PiGK5 fused with His tag mainly existed in the form of inclusion body, and only a small amount of protein was soluble. The total amount of the protein expressed in 1 L culture medium of *Escherichia coli* was 28.11 mg, in which the total amount of soluble protein was about 2.73 mg, while the amount of the protein obtained after purification was 0.1175 mg. The purified recombinant protein was stable and could maintain structural stability within 96 hours. The extracellular terminal of PiGK5 fused with MBP and His double tags mainly existed in the form of soluble protein. The total amount of the protein expressed in 1 L culture medium of *E. coli* was 49.93 mg, in which the total amount of soluble protein was about 44.73 mg, while the amount of the protein obtained after purification was 6.0125 mg. However, the stability of the recombinant protein was poor, and the protein degradation appeared only in 1.5 hours. Therefore, although the soluble protein content of PiGK5 extracellular terminal fused with His tag is lower, the recombinant protein is more stable and suitable for prokaryotic expression and follow-up study of structure and function of extracellular terminal of PiGK5. In this study, the effects of different tags on the expression of PiGK5 extracellular terminal were compared, and the prokaryotic expression conditions of the protein were established, which laid a foundation for the study of its structure and function.

Keywords

Phytophthora infestans, Extracellular Terminal of PiGK5, Tag, Expression and Purification, Stability

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

疫霉菌(*Phytophthora*)是属于卵菌纲的一类真菌,能够在大多数经济作物中引起毁灭性疾病,其中以致病疫霉(*Phytophthora infestans*)最为严重。致病疫霉(*P. infestans*)是马铃薯晚疫病的病原菌,也是疫霉属的模式种。致病疫霉主要会导致马铃薯和番茄晚疫病,曾经在1845年,引发爱尔兰马铃薯饥荒[1]。今天,它仍然是马铃薯生产的最严重威胁,导致世界范围内的巨大经济损失[2]。全球每年因致病疫霉造成的经济损失高达170亿美元,其中,我国每年的损失就达40亿美元。

致病疫霉存在一类特殊的G蛋白偶联受体(G protein-coupled receptor, GPCR),这个GPCR的N端是典型的七次跨膜的螺旋结构,C端有一个磷脂酸肌醇激酶(Phosphatidylinositol phosphokinase, PIPK)结构

域(GPCR-PIPK) [3]。对致病疫霉的基因组测序工作已完成, 生物信息学分析结果表明, 致病疫霉含有 12 个 GPCR-PIPKs (PiGKs)成员[4] [5] [6] [7]。

研究显示, 致病疫霉的 PiGK 蛋白家族的 PiGK5 蛋白在致病疫霉的有性生殖、无性生殖及致病性中均起重要作用[5]。致病疫霉的 PiGK5 蛋白定位于原生质体膜上及原生质体内部的一些颗粒状结构中。PiGK5 在游动孢子中相对表达量最高, 在休止孢、营养菌丝、孢子囊等中表达量均相对较少。致病疫霉游动孢子的数量随 PiGK5 基因表达水平的降低而显著减少, 菌丝生长速率也随 PiGK5 基因表达水平的降低而明显减小。PiGK5 沉默转化子的卵孢子数量大量减少, 比对照菌株的卵孢子数量减少高达 20 倍。此外, 随 PiGK5 基因沉默水平增加, 致病疫霉游动孢子的侵染能力明显下降, 侵染病斑出现时间变晚, 且病斑面积的扩大也变慢。PiGK5 蛋白包括 920 个氨基酸, 其胞外端由 173 个氨基酸组成。在该蛋白参与的生物过程中, 其胞外端很可能起着与胞外信号分子特异性识别和结合的作用。因此, 本研究克隆了 PiGK5 胞外端编码区并构建了原核表达载体, 比较了不同标签对蛋白表达水平、可溶性及稳定性的影响, 建立了 PiGK5 胞外端蛋白表达纯化条件, 为其结构及功能的进一步研究奠定了基础, 对未来在该蛋白基础上开发有效防治马铃薯晚疫病的靶向药物有重要意义。

2. 实验材料

2.1. 主要试剂及仪器设备

高保真 DNA 聚合酶 Prime STAR GXL, T4 DNA 聚合酶, *Xba* I、*Xho* I、*Ssp* I 限制性核酸内切酶及琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司。Protein Ruler II 未染色蛋白 Marker 购自北京全式金生物技术有限公司, 低分子量蛋白质 Merker、BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司。质粒小量制备试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司, 超声波信号发生器购自上海比朗仪器制造有限公司, AKTA™ prime Plus 蛋白纯化系统购自瑞典 AKTA 公司, 10 kD 截留规格的超滤离心管购自美国 Millipore 公司, Trans-Blot 转印槽购自美国 BIO-RAD 公司, Odyssey 红外激光扫描成像系统购自美国 LI-COR 公司。

2.2. 实验菌株及载体

大肠杆菌 DH5 α 、BL21(DE3)菌株购自北京全式金生物技术有限公司。pET30a(+)载体来自本实验室, pTEV 载体是在 pET30a(+)的 His 标签前插入麦芽糖结合蛋白(Maltose Binding Protein, MBP)标签的双标签改造载体(图 1)。

3. 实验内容

3.1. PiGK5 蛋白胞外端的生物信息学分析

通过在线工具 ExPasy 对 PiGK5 蛋白胞外端进行理化性质分析, 在线工具 Sopma 进行二级结构预测, 在线工具 SWISS-MODEL 进行三维结构预测, 得到 PiGK5 蛋白胞外端的分析数据。

3.2. PiGK5 胞外端 cDNA 编码区的 PCR 扩增

以实验室保存的 PiGK5cDNA 编码区克隆载体为模板, PCR 扩增 PiGK5 胞外端 cDNA 编码区。引物 R: TTATCCACTTCCAATGCTActgagacttgcggttctcgaac (大写序列为 pET30a(+)载体序列, 小写序列为 PiGK5 胞外端 cDNA 编码区序列); 引物 F: TACTTCCAATCCAATGCCatgtcaaggctacacagtac (同引物 R)。PCR 反应条件: 98°C 2 min; 98°C 10 s, 63.1°C 15 s, 72°C 3 min, 30 个循环; 72°C 10 min。PCR 扩增产物经电泳后, 切取大小正确的条带进行 DNA 回收。

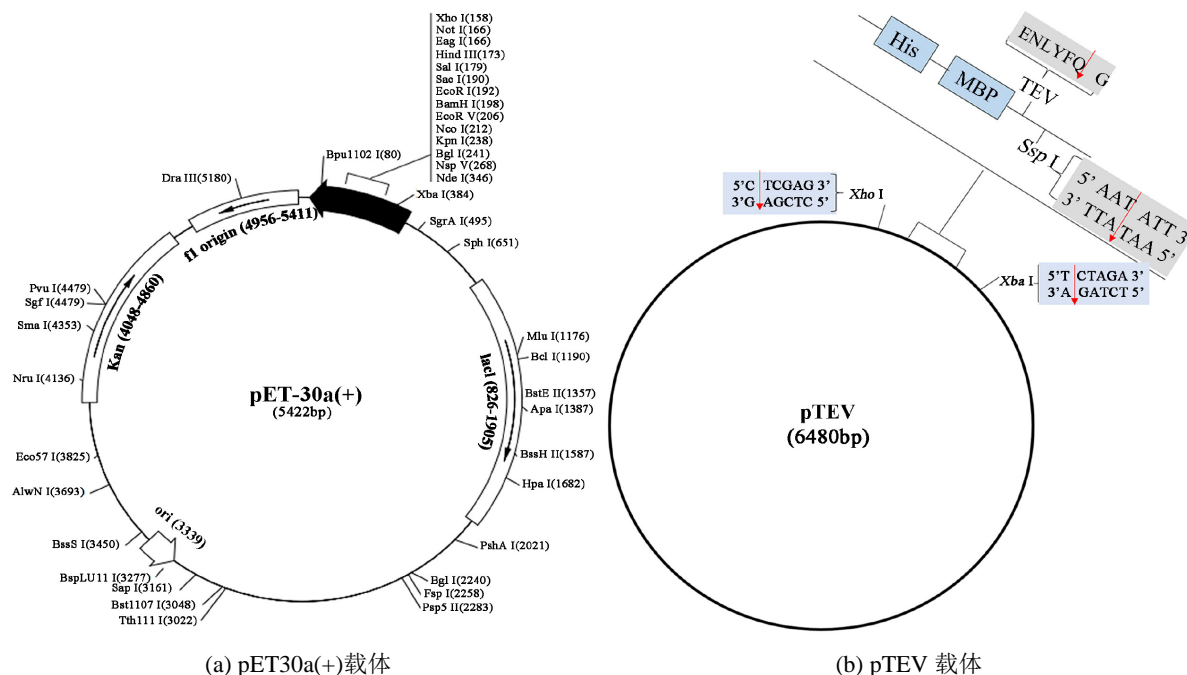


Figure 1. Expression vector for experiment

图 1. 实验用表达载体

3.3. PiGK5 胞外端原核表达载体的构建

将 pET30a(+)载体/pTEV 载体用 *Ssp* I 限制性核酸内切酶 37°C 酶切 2 h，琼脂糖凝胶电泳后，酶切的载体片段进行 DNA 回收。

回收的线性 pET30a(+)载体/pTEV 载体与 T4 DNA 聚合酶、dGTP 混匀后，于 22°C 孵育 30 min，75°C 孵育 20 min，利用 T4 DNA 聚合酶的 3'→5'外切酶特性，酶切为具有粘性末端的线性 pET30a(+)载体/pTEV 载体(图 2)。

回收的 PiGK5 胞外端 cDNA 编码区片段与 T4 DNA 聚合酶、dCTP 混匀后，于 22°C 孵育 30 min，75°C 孵育 20 min，同理，酶切为具有粘性末端的 PiGK5-N 端片段(图 2)。

粘性末端互补的 PiGK5 胞外端 cDNA 编码区片段与线性 pET30a(+)载体/pTEV 载体混匀后于 22°C 孵育 5 min，转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞，被大肠杆菌中的 DNA 连接酶连接为环状重组质粒。将含有重组质粒的大肠杆菌 DH5 α 涂布于 Kan 浓度为 50 μ g/mL 的 LB 平板，筛选阳性克隆菌株，进行 PCR 鉴定。菌落 PCR 鉴定为阳性的菌株扩大培养并提取质粒，进行 *Xba* I、*Xho* I 限制性核酸内切酶的双酶切鉴定。酶切鉴定为阳性的菌液送生工测序。测序正确的表达载体分别命名为 pET30a(+)-PiGK5-N 和 pTEV-PiGK5-N。

3.4. 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 的表达与纯化

将鉴定正确的载体 pET30a(+)-PiGK5-N 和 pTEV-PiGK5-N 分别转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞，涂布于 Kan 浓度为 50 μ g/mL 的 LB 平板，挑取单克隆菌株接种于 10 mL Kan 浓度为 50 μ g/mL 的 LB 液体培养基活化，以 37°C 180 r/min 培养至菌液 OD600 为 0.6。按 1:100 的比例转接至 1 L Kan 浓度为 50 μ g/mL 的 LB 液体培养基，以 37°C 180 r/min 培养至菌液 OD600 为 0.6。然后，将培养温度转为 16°C，添加一定浓度 IPTG，180 r/min 过夜 16 h 培养诱导目的蛋白表达。室温 4500 r/min 离心 15 min 收集菌体沉淀。以同等条件下培养的 BL21(DE3)空白菌株及含空载体 pET30a(+)/pTEV 的 BL21(DE3)菌株为对照。

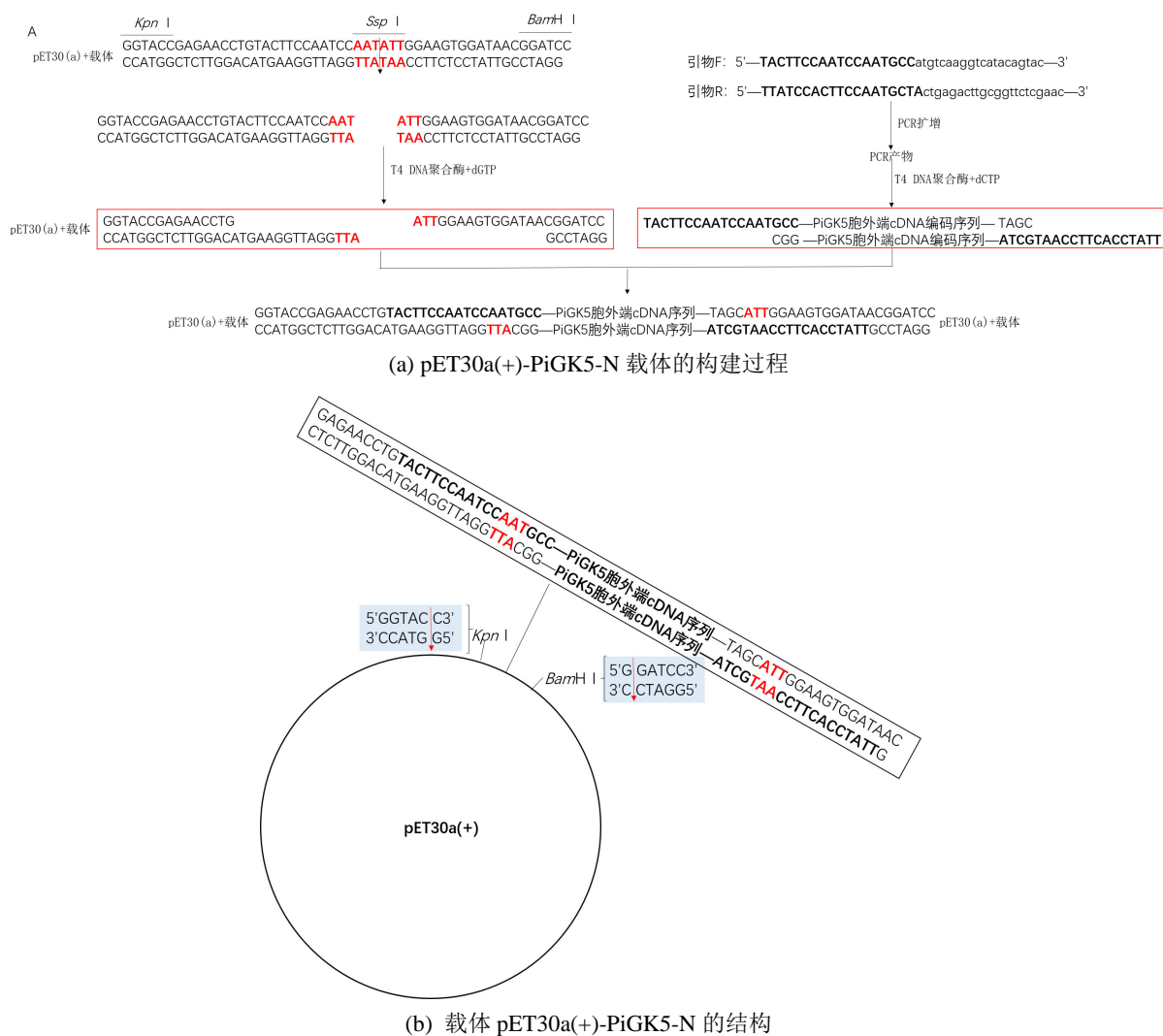


Figure 2. Construction of prokaryotic expression vector pET30a(+)-PiGK5-N

图 2. 原核表达载体 pET30a(+)-PiGK5-N 的构建

用 30 mL 柱平衡缓冲液(50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0)重悬菌体沉淀。超声破碎(30%功率, 时间 20 min, 工作 2.0 s, 间隔 4.0 s)菌体, 4°C 18,000 r/min 离心 40 min 得到菌体沉淀与上清液。

使用 His Trap™ IMAC (镍柱), 分离上清液中的重组蛋白。取上清液缓慢(0.6 mL/min)流经预平衡后的镍柱, 用 0 mM、10 mM、20 mM、50 mM、100 mM、200 mM、500 mM 咪唑的洗脱缓冲液(25 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8.0)依次洗脱镍柱, 收集各洗脱液, 并与沉淀、上清液分别取样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。

观察 SDS-PAGE 电泳图, 取含有可溶性目的蛋白的洗脱液, 用截留规格为 10 kD 的超滤离心管进行浓缩, 浓缩体积至 2 mL。0.22 μm 滤器过滤后使用 AKTA™ prime Plus 蛋白纯化系统分离纯化蛋白, 结合紫外吸收峰收集目的蛋白, SDS-PAGE 电泳验证蛋白分子量正确, 用超滤离心管对含有目的蛋白的洗脱液进行脱盐处理, 得到 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 两种蛋白。

使用软件 Image J 对两种蛋白 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 的 SDS-PAGE 电泳图进行蛋白条带的灰度分析, 得到两种蛋白表达与纯化过程中最合适的 IPTG 添加浓度。

3.5. 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 的蛋白浓度与稳定性检测

使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。将重组蛋白置于 4℃，避光的条件下保存。重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 间隔时间 24 h，连续 5 次取样；重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 间隔 1.5 h，连续 3 次取样。SDS-PAGE 凝胶电泳，观察两种重组蛋白的稳定性。

3.6. 可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的 Western Blot 检测

配制好的 12% 分离胶 4℃ 过夜，然后配置 5% 的浓缩胶。每孔蛋白样品的上样体积为 20 μL。浓缩胶的电泳电压为 90 V，时间 30 min；分离胶的电泳电压为 120 V，时间 90 min。蛋白通过半干转膜方法转移到 PVDF 膜上，然后用 5% 脱脂奶粉封闭 3~4 h，100 r/min 孵育兔抗 His 标签的一抗(1:1000, 5% BSA 稀释) 4℃ 过夜，1 × TBST 清洗一抗，100 r/min 避光孵育 LICOR IRDye 800 CW 山羊抗兔 IgG(H + L)二抗(1:10,000, 5% BSA 稀释) 90 min 结束，1 × TBST 避光清洗二抗，最后用 Odyssey 红外激光扫描成像系统照膜，检测目的蛋白 PiGK5 胞外端-His 蛋白。

4. 实验结果

4.1. PiGK5 蛋白胞外端的生物信息学分析

使用 ExPASy 预测得到的 PiGK5 蛋白胞外端的理化性质结果如下，PiGK5 蛋白胞外端的氨基酸数目为 173 个，分子量约为 19.3 kD，分子式为 C₈₀₉H₁₂₉₀N₂₆₂O₂₇₁S₈，理论等电点为 10.43，在大肠杆菌中的预计半衰期大于 600 分钟，不稳定指数为 71.98，为不稳定蛋白；亲水平均值为 -0.984，为亲水蛋白。

使用 Spoma 预测得到的 PiGK5 蛋白胞外端的二级结构分析如图所示(图 3)，23 个 α 螺旋(蓝)占比 13.29%，10 个 β 折叠(绿)占比 5.78%，112 个无规则卷曲(紫)占比 64.74%，28 个延伸链(红)占比 16.18%。

SWISS-MODEL 预测的 PiGK5 蛋白胞外端的三维结构如图所示(图 4)，与 PiGK5 蛋白胞外端相似的模型 SMTL ID 为 4qiw.2，序列一致性为 21.88%。

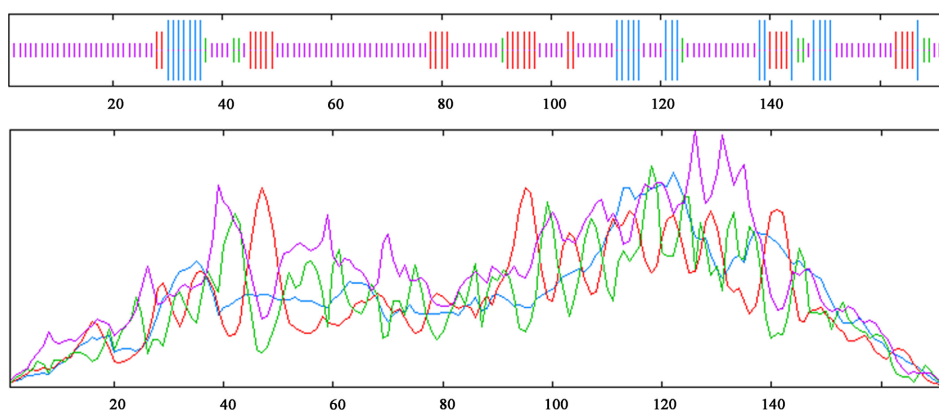


Figure 3. Analysis of the secondary structure of extracellular terminal of PiGK5 protein

图 3. PiGK5 蛋白胞外端的二级结构分析

4.2. PiGK5 胞外端 cDNA 编码区的 PCR 扩增

PCR 扩增 PiGK5 胞外端 cDNA 编码区片段如图 5(a)，PiGK5 胞外端 cDNA 编码区为 519 bp，在琼脂糖凝胶电泳图中的 DNA 条带大小约为 500 bp，二者大小相符，初步说明 PiGK5 胞外端 cDNA 编码区的 PCR 扩增成功。

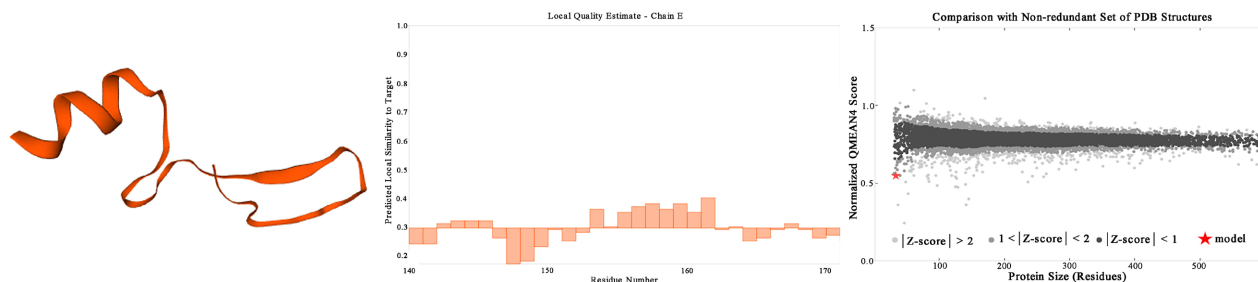


Figure 4. Analysis of the tertiary structure of extracellular terminal of PiGK5 protein

图 4. PiGK5 蛋白胞外端的三维结构分析

4.3. 表达载体 pET30a(+)-PiGK5 胞外端和 pTEV-PiGK5 胞外端的构建

将具有粘性末端的线性 pET30a(+)载体/pTEV 载体与 PiGK5 胞外端 cDNA 编码区片段孵育后转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。菌落 PCR 鉴定结果显示(图 5(b)、图 5(c)), 阳性克隆菌株经过扩增得到大小为 500 bp 的片段, 与预计扩增片段 519 bp 大小相符。对菌落 PCR 鉴定为阳性的菌株进行 *Xho* I、*Xba* I 限制性核酸内切酶的酶切鉴定, 将酶切鉴定为阳性的菌株送公司测序, 结果显示, DNA 序列无突变, 且读码框正确, 说明载体构建成功。



(a) PiGK5 胞外端 cDNA 编码区的 PCR 扩增。M: DL 1000 DNA Marker; 1~3: PiGK5 胞外端 cDNA 编码区的 PCR 扩增结果。(b) 含 pET30a(+)-PiGK5-N 载体的菌落 PCR 扩增。M: DL 500 DNA Marker; 1~3: 含 pET30a(+)-PiGK5-N 载体的菌落 PCR 扩增结果。(c) 含 pTEV-PiGK5-N 载体的菌落 PCR 扩增。M: DL 500 DNA Marker; 1~3: 含 pTEV-PiGK5-N 载体的菌落 PCR 扩增结果。

Figure 5. PCR amplification of cDNA coding region of extracellular terminal of PiGK5 and colony PCR identification of the recombinants

图 5. PiGK5 胞外端 cDNA 编码区的 PCR 扩增及重组子的菌落 PCR 鉴定

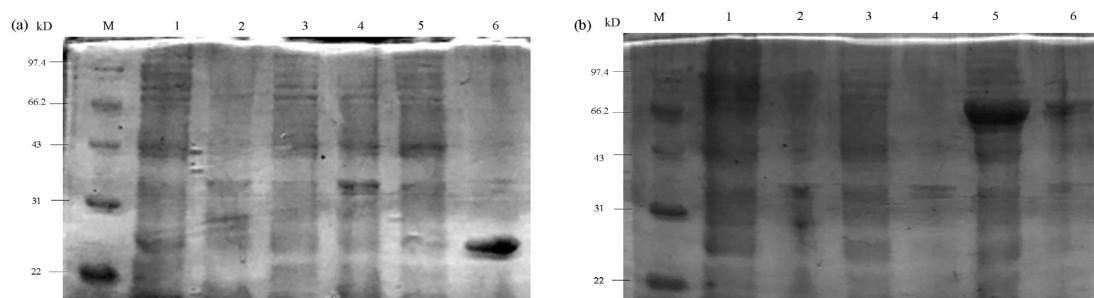
4.4. 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 的表达与纯化

将测序正确的表达载体 pET30a(+)-PiGK5-N 和 pTEV-PiGK5-N 分别转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞。低温 16°C 添加终浓度为 100 μ M IPTG 诱导目的蛋白表达, 收集菌体沉淀, 将菌体超声破碎后取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 电泳。

电泳结果显示(图 6), 与其他样品相比在 pET30a(+)-PiGK5-N 载体转化菌株的菌体沉淀中看到一条染色非常深的分子量约为 25 kD 的蛋白带, 说明该蛋白条带可能为大肠杆菌表达的 PiGK5 胞外端, 且该蛋白主要在大肠杆菌的包涵体中表达。PiGK5 胞外端-His 蛋白的预测分子量为 20.1 kD, 在电泳结果中显示的蛋白分子量比预测的蛋白分子量略大, 分析其原因可能是, PiGK5 胞外端蛋白是碱性蛋白, 电泳时碱性蛋白结合的 SDS 偏少, 携带净负电荷低于预期, 泳动速率偏慢, 迁移距离较小; 此外, 氨基酸侧链向外延伸, 导致蛋白的流体动力学体积大于预期, 空间位阻效应较大, 迁移距离较小[8] [9] [10]。

在 pTEV-PiGK5-N 载体转化菌株的菌体破碎上清液及沉淀中均看到一条约 66 kD 的蛋白带, 而在空白与空载体对照菌株的沉淀和上清中均未看到相应蛋白条带, 说明该蛋白条带为大肠杆菌表达的连有 MBP 标签的 PiGK5 胞外端蛋白, 且该蛋白在大肠杆菌中主要以可溶性的状态表达。PiGK5 胞外端

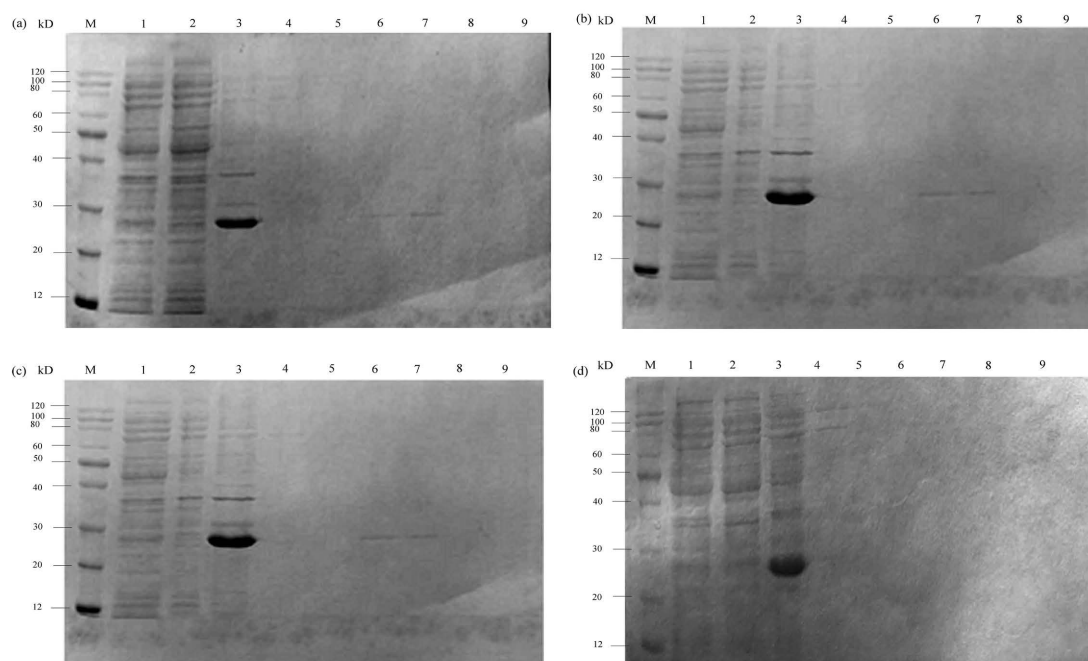
-MBP-His 蛋白的预测分子量为 62.1 kD, 电泳结果中的表观分子量稍大于实际分子量, 可能原因同 PiGK5 胞外端-His 蛋白一致。



(a): 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的诱导表达。(b): 重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的诱导表达。M: 低分子量蛋白质 Marker; 1: BL21(DE3)菌株超声破碎后的上清液; 2: BL21(DE3)菌株超声破碎后的菌体沉淀; A3: 含空载体 pET30a(+)的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的上清液; A4: 含空载体 pET30a(+)的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的菌体沉淀; A5: 含载体 pET30a(+)-PiGK5-N 的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的上清液; A6: 含载体 pET30a(+)-PiGK5-N 的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的菌体沉淀; B3: 含空载体 pTEV 的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的上清液; B4: 含空载体 pTEV 的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的菌体沉淀; B5: 含载体 pTEV-PiGK5-N 的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的上清液; B6: 含载体 pTEV-PiGK5-N 的 BL21(DE3)菌株超声破碎后的菌体沉淀。

Figure 6. SDS-PAGE results of extracellular terminal-His and extracellular terminal-MBP-His of PiGK5 induced by IPTG

图 6. IPTG 诱导的 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 的 SDS-PAGE 结果



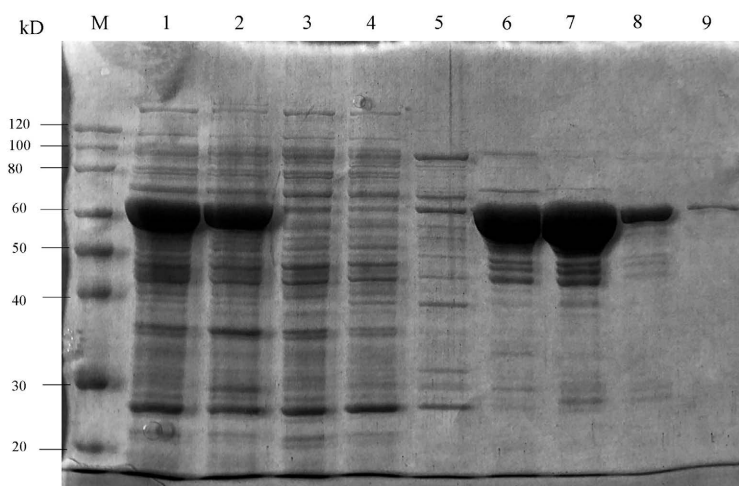
(a): 100 μ M IPTG 诱导表达的 PiGK5 胞外端-His。(b): 150 μ M IPTG 诱导表达的 PiGK5 胞外端-His。(c): 200 μ M IPTG 诱导表达的 PiGK5 胞外端-His。(d): 300 μ M IPTG 诱导表达的 PiGK5 胞外端-His。M: Protein Ruler II 未染色蛋白 Marker; 1: 菌体超声破碎离心后的上清; 2: 镍柱亲和层析后的穿透液; 3: 菌体超声破碎离心后的菌体沉淀; 4: 10 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 5: 20 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 6: 50 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 7: 100 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 8: 200 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 9: 500 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物。

Figure 7. SDS-PAGE result of extracellular terminal-His of PiGK5 purified by nickel column affinity chromatography

图 7. 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的镍柱亲和层析 SDS-PAGE 结果

鉴于重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的表达量较少, 接下对诱导表达该蛋白的最佳 IPTG 浓度进行了优化。分别加入 100 μM 、150 μM 、200 μM 和 300 μM 的 IPTG 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 诱导目的蛋白表达后收集菌体沉淀, 将菌体超声破碎后取上清液过 His TrapTM IMAC 柱(镍柱), 用含不同浓度咪唑的洗脱缓冲液进行洗脱。SDS-PAGE 电泳结果再次显示(图 7), 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 主要以包涵体形式存在于沉淀中, 只有少量存在于上清中。在咪唑浓度为 50 mM 和 100 mM 的洗脱缓冲液中可以看到少量可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His。IPTG 浓度为 200 μM 时得到的可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 最多, 因此, 确定重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 诱导表达的最佳 IPTG 浓度为 200 μM 。

重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 表达时, 添加常规的 100 μM IPTG 时即可得到较高产量的可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His, 因此未尝试用其他浓度的 IPTG 诱导。SDS-PAGE 电泳结果表示(图 8), 重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 主要以可溶性蛋白的形式存在于上清液中, 在咪唑浓度为 50 mM 和 100 mM 的洗脱缓冲液中含有大量的可溶性重组蛋白, 在咪唑浓度为 200 mM 和 500 mM 的洗脱缓冲液中也含有少量的可溶性重组蛋白。



M: Protein Ruler II 未染色蛋白 Marker; 1: 菌体超声破碎离心后的上清; 2: 镍柱亲和层析后的穿透液; 3: 菌体超声破碎离心后的菌体沉淀; 4: 10 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 5: 20 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 6: 50 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 7: 100 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 8: 200 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物; 9: 500 mM 咪唑洗脱缓冲液的洗脱产物。

Figure 8. SDS-PAGE result of extracellular terminal-MBP-His of PiGK5 purified by nickel column affinity chromatography

图 8. 重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的镍柱亲和层析 SDS-PAGE 结果

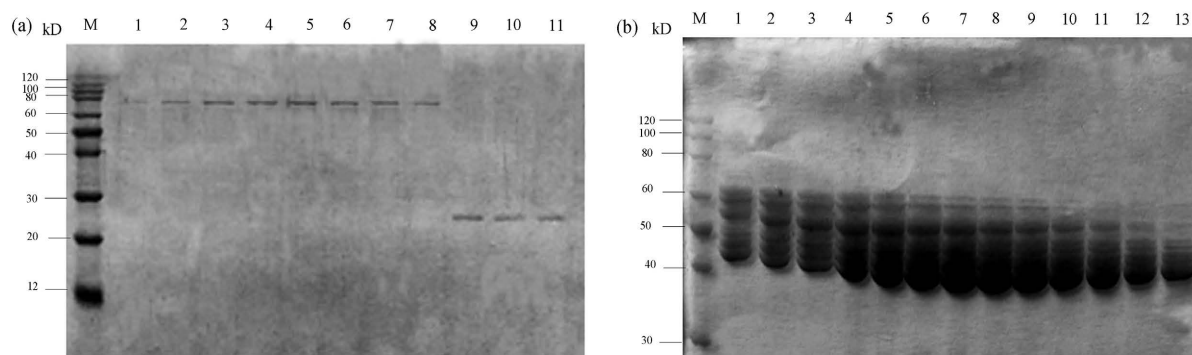
以蛋白电泳采用的 ProteinRuler II 未染色蛋白 Marker 的蛋白条带为标准, 使用软件 Image J 对图 7 和图 8 的 SDS-PAGE 电泳图进行蛋白条带的灰度分析, 得到目的蛋白电泳条带的蛋白量。灰度分析得到的不同浓度 IPTG 诱导下重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的表达量及 100 μM IPTG 诱导下重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的表达量, 其结果与 SDS-PAGE 电泳结果相似。IPTG 添加终浓度为 200 μM 时, 1 L 菌体培养得到的重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 表达量最高, 总蛋白量约为 28.11 mg; 其中, 可溶性蛋白占比 9.71%, 为 2.73 mg。IPTG 添加终浓度为 100 μM 时, 1 L 菌体培养得到的重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的总蛋白量约为 49.93 mg; 其中, 可溶性蛋白占比 89.59%, 为 44.73 mg (表 1)。

Table 1. Protein expression level of extracellular terminal-His and extracellular terminal-MBP-His of PiGK5 induced by different concentrations of IPTG**表 1.** 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 在不同浓度 IPTG 诱导下的蛋白表达量

重组蛋白 IPTG 添加浓度	PiGK5 胞外端-His			PiGK5 胞外端-MBP-His		
	菌体沉淀中含有 的目的蛋白总量 (mg)	菌体上清中的可溶 性目的蛋白总量 (mg)	表达的目的 蛋白总量 (mg)	菌体沉淀中含有的 目的蛋白总量 (mg)	菌体上清中的可溶 性目的蛋白总量 (mg)	表达的目的 蛋白总量 (mg)
100 μ M	6.70	1.65	8.35	5.20	44.73	49.93
150 μ M	16.25	2.53	18.78	—	—	—
200 μ M	26.38	2.73	28.11	—	—	—
300 μ M	13.43	2.40	15.83	—	—	—

表中的“—”表示未进行测量与分析。

将可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的 50 mM 咪唑的洗脱缓冲液和 100 mM 咪唑的洗脱缓冲液浓缩、过滤后经 AKTATM prime Plus 蛋白纯化系统纯化, 收集有明显紫外吸收峰的洗脱液。电泳结果如图所示(图 9(a)), 第二个吸收峰的蛋白条带位于 20 kD 与 30 kD 之间, 与重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的预测分子量 20.1 kD 相符, 所以第二个吸收峰的蛋白应该是重组蛋白 PiGK5 胞外端-His。



(a): 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的 SDS-PAGE 电泳。M: Protein Ruler II 未染色蛋白 Marker; 1~8: 第一个紫外吸收峰的第 1~8 号管蛋白洗脱液; 9~11: 第二个紫外吸收峰的第 1~3 号管蛋白洗脱液。(b): 重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的 SDS-PAGE 电泳。M: Protein Ruler II 未染色蛋白 Marker; 1~13: 紫外吸收峰的第 17~29 号管蛋白洗脱液。

Figure 9. SDS-PAGE result of recombinant protein purified by AKTATM prime Plus protein purification system

图 9. AKTATM prime Plus 蛋白纯化系统纯化后的重组蛋白 SDS-PAGE 结果

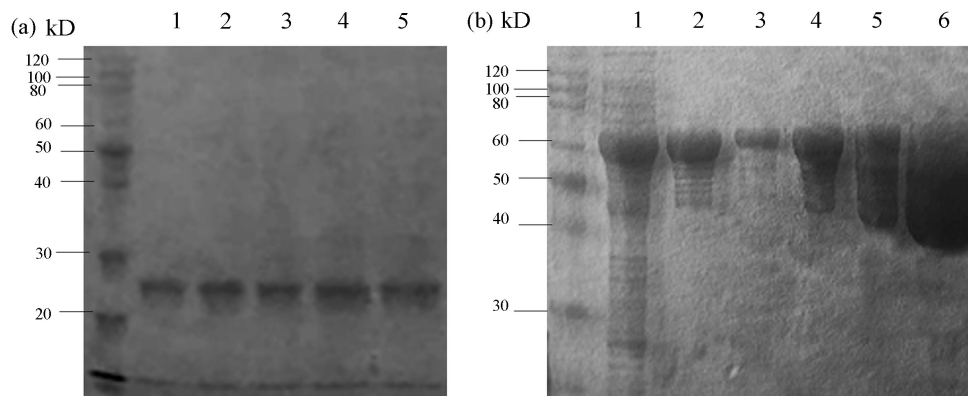
将可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的 50 mM 咪唑的洗脱缓冲液和 100 mM 咪唑的洗脱缓冲液进行相同处理。经过 AKTATM prime Plus 蛋白纯化系统纯化后仅出现一组有明显紫外吸收的洗脱液。电泳结果如图所示(图 9(b)), 在 60 kD 处有蛋白条带, 与重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的预测分子量 62.1 kD 相符, 应该为重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 条带。但在小于 60 kD 的下方有几条大小不等的蛋白带, 随着洗脱时间的延长, 约 60 kD 的蛋白带呈现越来越弱的趋势, 而下方分子量较小的蛋白带却随着洗脱时间有增强的趋势, 说明重组蛋白在较长时间的处理纯化过程中可能发生了降解。

4.5. 获得的可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 纯蛋白量及其稳定性

将含有可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的 1~3 号管洗脱液浓缩至 500 μ L, BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 每 1 L 菌体纯化获得的可溶性蛋白 PiGK5 胞外端-His 蛋白量为 0.1175 mg。可溶性重

组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 以相同方法测定, 每 1 L 菌体纯化获得的可溶性蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 蛋白量为 6.0125 mg。

500 μ L 的可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His, 于 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 每 24 小时取样一次, 连续 5 次取样, 并进行 SDS-PAGE 电泳验证, 结果如图所示(图 10(a)), 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 在 96 小时内都保持相对稳定, 未出现明显的降解现象。



(a): 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 每 24 小时取样的 SDS-PAGE 结果。M: Protein Ruler II 未染色蛋白 Marker; 1~5: 重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 保存 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 时的电泳结果。(b): 重组蛋白 PiGK5 胞外端-N-NBP-His 每 1.5 小时取样的 SDS-PAGE 结果。M: Protein Ruler II; 1: 含 PiGK5 胞外端-MBP-His 的菌体超声破碎离心后的上清液; 2: 100 mM 咪唑洗脱缓冲液洗脱的重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 在 0 h 时取样; 3: 50 mM 咪唑洗脱缓冲液洗脱的重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 在 0 h 时取样; 4: 100 mM 咪唑洗脱缓冲液洗脱的重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 在 1.5 h 时取样; 5: 100 mM 咪唑洗脱缓冲液洗脱的重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 在 3 h 时取样; 6: 100 mM 咪唑洗脱缓冲液洗脱的重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 在 4.5 h 时取样。

Figure 10. SDS-PAGE result of stability test of soluble recombinant protein

图 10. 可溶性重组蛋白稳定性检测的 SDS-PAGE 结果

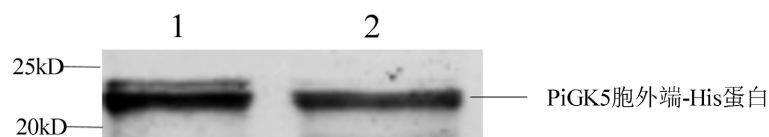
将 100 mM 咪唑洗脱缓冲液洗脱的重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 于 4 $^{\circ}$ C 避光保存, 每 1.5 小时取样一次, 进行 SDS-PAGE 电泳检测, 结果如图所示(图 10(b)), 重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 结构极不稳定, 1.5 小时后就出现了降解情况; 之后, 随着时间的延长, 重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的降解情况进一步加剧。

4.6. 可溶性重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 的 Western Blot 检测

通过 Western Blot 检测表达的 PiGK5 胞外端-His, 结果(图 11)表明, PiGK5 胞外端-His 蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)菌株中得到了表达, 大小约为 25 kD, 比蛋白的实际分子量稍大, 造成此现象的可能原因同上文。

5. 讨论

马铃薯晚疫病是一种毁灭性的马铃薯病害, 但由于马铃薯晚疫病的致病机制、生殖调控机制和相关调控物质等的现有数据有限, 还没有有效的方法来预防和控制该病害。目前防治马铃薯晚疫病的常用方式是化学药剂防治。但在马铃薯生产过程中频繁使用杀菌剂[11], 不但会破坏环境, 而且会导致致病疫霉耐药性的增加。



1、2: 经镍柱纯化后的 PiGK5 胞外端-His 蛋白。

Figure 11. Western Blot detection of extracellular terminal-His of PiGK5 purified by nickel column affinity chromatography

图 11. 镍柱纯化的 PiGK5 胞外端-His 蛋白的 Western Blot 检测

致病疫霉是马铃薯晚疫病的病原菌，其无性生殖和有性生殖对病害的发生和传播起着非常重要的作用。致病疫霉无性生殖产生孢子囊，有性生殖产生卵孢子。致病疫霉的孢子囊很轻，能够在风速为 1~2 m/s 的情况下，3 小时内向空中传播 20 公里。孢子囊的这一特性，使得致病疫霉能够快速扩散，导致马铃薯晚疫病的大范围爆发[12]。卵孢子作为致病疫霉的一种生殖结构，优势在于卵孢子的细胞壁很厚，可以在恶劣的环境条件下休眠数年[13] [14] [15]。卵孢子对马铃薯晚疫病的大流行有重要意义，原因为卵孢子是越冬后侵染马铃薯的主要病原菌结构[16]；有性生殖可以实现基因重组，进而可能会产生新的基因型菌株，增强菌株的致病性和抗药性[17]。已有的研究结果显示，PiGK5 蛋白与致病疫霉的致病性、无性生殖及有性生殖均密切相关。因此，PiGK5 蛋白的结构与功能研究对阐明致病疫霉的致病及生殖机制有重要意义，对未来在该蛋白基础上开发有效防治马铃薯晚疫病靶向生物农药具有重要指导作用。

然而，PiGK5 蛋白属于跨膜蛋白，具有疏水性的特点，在大肠杆菌中重组表达时易出现低表达、错误折叠等问题，正确表达时往往会以包涵体的形式表达[18]。基于 PiGK5 蛋白的这一特点，分段表达 PiGK5 蛋白的胞外端和胞内端对研究该蛋白的结构与功能具有重要意义。PiGK5 蛋白胞外端由 173 个氨基酸组成。在该蛋白参与的生物过程中，其胞外端很可能起着与胞外信号分子特异性识别和结合的作用。因此，本研究比较了不同标签对 PiGK5 蛋白胞外端表达水平、可溶性及稳定性的影响。

在表达重组蛋白时，融合标签的选择极为重要。实验中常用的标签包括谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、硫氧还蛋白(TRX)、His 标签和麦芽糖结合蛋白(MBP)等，其主要作用为增强重组蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达及便于重组蛋白的纯化和鉴定。

His 标签是由六个组氨酸残基组成的融合标签，可连接在目的蛋白的 N 端或 C 端。His 标签较其他融合标签分子量小，只有 0.84 kD 左右，与目的蛋白融合后基本不会改变蛋白的生物结构及溶解性[19]。并且 His 残基侧链与固态镍有较强烈的吸引力，可以用固定化金属螯合层析(IMAC)对重组蛋白实现分离纯化。除此之外，His 标签可以应用于多种表达系统，且纯化条件较为温和。使用 His 标签，构建的重组蛋白 PiGK5 胞外端-His，在软件 Image J 预测时 1 L 菌体培养可得到可溶性蛋白量为 2.73 mg。但经过蛋白分离与纯化，1 L 菌体纯化获得可溶性蛋白 PiGK5 胞外端-His 蛋白量仅为 0.1175 mg。

His 标签的另一个的优势是因为其分子量很小可以与其他亲和标签构建双亲和标签。MBP 标签能够显著增强目的蛋白的溶解度[20]。MBP 由 malE 基因编码，分子量为 42 kD [21]。对 MBP、GST 和 TRX 这三种可溶性融合标签进行了比较，发现 MBP 是一种比其他两种融合标签更有效的增溶标签。对 6 种不同多肽实验得到的结果，MBP 融合蛋白的可溶性蛋白表达量约为其他两种标签融合蛋白可溶性蛋白表达量的三倍左右[20]。并且 MBP 在蛋白质的合成期间及合成之后能够起到稳定及保护融合蛋白免受蛋白酶降解的作用[22]，因此可以在大肠杆菌中获得大量的 MBP 融合蛋白[23]。在本实验中，也借鉴了 His 标签和 MBP 标签双融合标签的优点，既具有 MBP 标签的增溶作用，又具有 His 标签的易于分离纯化的作用。使用 MBP 和 His 双标签表达重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His，1 L 菌体纯化获得可溶性蛋白的 PiGK5 胞外端-MBP-His 蛋白量为 6.0125 mg，是重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 可溶性表达量的 51 倍左右，与文

献报道 MBP 标签可促进蛋白的可溶性表达一致。但是, 重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 的稳定性明显下降, 在 1.5 h 时就出现了蛋白降解现象。分析蛋白降解的可能原因, 大肠杆菌或环境中的蛋白酶导致重组蛋白的降解; 蛋白纯化时间过长, 且室温环境不利于蛋白结构的稳定; 纯的蛋白溶液容易发生降解。对蛋白降解的可能原因做出的相应改进方法, 在缓冲液或洗脱液中添加适量的蛋白酶抑制剂, 蛋白提取全程置于冰上进行, 蛋白质干粉或蛋白溶液加甘油于 -20°C 保存。

6. 结论

本实验检测了不同标签对 PiGK5 蛋白胞外端表达的影响, 结果表明, 1 L 大肠杆菌表达的可溶性 PiGK5 胞外端-MBP-His 蛋白量为 44.73 mg, 获得纯蛋白量为 6.0125 mg; 可溶性 PiGK5 胞外端-His 蛋白量为 2.73 mg, 获得纯蛋白量为 0.1175 mg。表达的可溶性蛋白量前者是后者的 16.38 倍, 获得纯蛋白量前者是后者的 51.17 倍。重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 可在长达 96 h 内维持蛋白结构的稳定, 但重组蛋白 PiGK5 胞外端-MBP-His 仅在 1.5 h 时就出现了蛋白降解现象, 蛋白结构极不稳定

综合比较重组蛋白 PiGK5 胞外端-His 和 PiGK5 胞外端-MBP-His 的特性, 虽然融合 His 标签的 PiGK5 胞外端蛋白的可溶性蛋白量较低, 但重组蛋白更稳定, 融合 His 标签更适合于 PiGK5 胞外端的原核表达及后续结构与功能研究。

基金项目

国家自然科学基金“性激素 $\alpha 2$ 调控的疫霉菌有性生殖细胞信号转导通路的初步研究”(编号 31760252)。

参考文献

- [1] Kirk, W.W., Samen, A.E., Tumbalam, P., *et al.* (2009) Impact of Different US Genotypes of *Phytophthora infestans* on Potato Seed Tuber Rot and Plant Emergence in a Range of Cultivars and Advanced Breeding Lines. *Potato Research*, **52**, 121-140. <https://doi.org/10.1007/s11540-009-9125-6>
- [2] Jahan, S.N., Asman, A.K., Corcoran, P., *et al.* (2015) Plant-Mediated Gene Silencing Restricts Growth of the Potato Late Blight Pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 2785-2794. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv094>
- [3] Bakthavatsalam, D., Meijer, H.J.G., Noegel, A.A., *et al.* (2006) Novel Phosphatidylinositol Phosphate Kinases with a G-Protein Coupled Receptor Signature Are Shared by *Dictyostelium* and *Phytophthora*. *Trends in Microbiology*, **14**, 378-382. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.006>
- [4] Balla, T. (2005) Inositol-Lipid Binding Motifs: Signal Integrators through Protein-Lipid and Protein-Protein Interactions. *Journal of Cell Science*, **118**, 2093-2104. <https://doi.org/10.1242/jcs.02387>
- [5] 崔海辰. 致病疫霉 PiGK5 基因功能的研究及 $\alpha 1$ 性激素诱导下致病疫霉有性生殖的磷酸化蛋白质组学分析[D]: [博士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.
- [6] Hua, C., Meijer, H.J.G., de Keijzer, J., *et al.* (2013) GK4, a G-protein-Coupled Receptor with a Phosphatidylinositol Phosphate Kinase Domain in *Phytophthora infestans*, Is Involved in Sporangia Development and Virulence. *Molecular Microbiology*, **88**, 352-370. <https://doi.org/10.1111/mmi.12190>
- [7] Yang, X., Zhao, W., Hua, C., *et al.* (2013) Chemotaxis and Oospore Formation in *Phytophthora sojae* Are Controlled by G-Protein-Coupled Receptors with a Phosphatidylinositol Phosphate Kinase Domain. *Molecular Microbiology*, **88**, 382-394. <https://doi.org/10.1111/mmi.12191>
- [8] Barton, R.J. (1972) Anomalous Behavior of Bovine Serum Albumin in Electrophoresis on Non-Denaturing Polyacrylamide Gel. *Biochemical Journal*, **129**, 983-985. <https://doi.org/10.1042/bj1290983>
- [9] Creamer, L.K. and Richardson, T. (1984) Anomalous Behavior of Bovine α_{s1} - and β -Caseins on Gel Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate Buffers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **234**, 476-486. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(84\)90295-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(84)90295-9)
- [10] Samsó, M., Daban, J.R., Hansen, S., *et al.* (1995) Evidence for Sodium Dodecyl Sulfate/Protein Complexes Adopting a Necklace Structure. *European Journal of Biochemistry*, **232**, 818-824. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.818zz.x>

- [11] Haverkort, A., Boonekamp, P., Hutten, R., *et al.* (2016) Durable Late Blight Resistance in Potato through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project. *Potato Research*, **59**, 35-66. <https://doi.org/10.1007/s11540-015-9312-6>
- [12] Maurice, S., Montes, M.S., Nielsen, B.J., *et al.* (2019) Population Genomics of an Outbreak of the Potato Late Blight Pathogen, *Phytophthora infestans*, Reveals Both Clonality and High Genotypic Diversity. *Molecular Plant Pathology*, **20**, 1134-1146. <https://doi.org/10.1111/mpp.12819>
- [13] Turkensteen, L.J., Flier, W.G., Wanningen, R. and Mulder, A. (2000) Production, Survival and Infectivity of Oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, **49**, 688-696. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00515.x>
- [14] Mayton, H., Smart, C.D., Moravec, B.C., *et al.* (2000) Oospore Survival and Pathogenicity of Single Oospore Recombinant Progeny from a Cross Involving US-17 and US-8 Genotypes of *Phytophthora infestans*. *Plant Disease*, **84**, 1190-1196. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.11.1190>
- [15] Drenth, A., Janssen E.M. and Govers, F. (1995) Formation and Survival of Oospores of *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology*, **44**, 86-94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02719.x>
- [16] Wang, X.W., Lv, J.L., Shi, Y.R., *et al.* (2020) Comparative Transcriptome Analysis Revealed Genes Regulated by Histone Acetylation and Genes Related to Sex Hormone Biosynthesis in *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Genetics*, **11**, Article No. 508. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00508>
- [17] 杨宇红, 冯兰香, 谢丙炎, 等. 致病疫霉有性生殖在晚疫病流行中的意义[J]. 植物保护, 2003, 29(5): 51-54.
- [18] Chayen, N.E. (2004) Turning Protein Crystallisation from an Art into a Science. *Current Opinion in Structural Biology*, **14**, 577-583. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.08.002>
- [19] 张丹, 于浩, 荣义辉. 戊型肝炎病毒 ORF3 和标签 His 融合真核表达载体的构建与表达[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(2): 164-167.
- [20] Kapust, R.B. and Waugh, D.S. (1999) *Escherichia coli* Maltose-Binding Protein Is Uncommonly Effective at Promoting the Solubility of Polypeptides to Which It Is Fused. *Protein Science*, **8**, 1668-1674. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1668>
- [21] 李祥魁, 范翠英, 崔亚君, 等. 重组蛋白可溶性表达促进标签的研究进展[J]. 生物技术, 2013, 23(2): 93-97.
- [22] Costa, S., Almeida, A., Castro, A., *et al.* (2014) Fusion Tags for Protein Solubility, Purification and Immunogenicity in *Escherichia coli*: The Novel Fh8 System. *Frontiers in Microbiology*, **5**, Article No. 63. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00063>
- [23] Nallamsetty, S., Austin, B.P., Penrose, K.J., *et al.* (2005) Gateway Vectors for the Production of Combinatorially-Tagged His6-MBP Fusion Proteins in the Cytoplasm and Periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Science*, **14**, 2964-2971. <https://doi.org/10.1110/ps.051718605>