

拟南芥中 *Fibrillarin* 基因的克隆·表达·纯化及与 ak6 蛋白相互作用研究李然<sup>1</sup>, 田兆丰<sup>2</sup>, 张飞云<sup>1\*</sup>

(1. 首都师范大学生命科学院, 北京 100048; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

**摘要** [目的] 研究拟南芥中 *Fibrillarin* 基因的克隆、表达及纯化, 并探索其与 ak6 蛋白的相互作用。[方法] 利用 pGEX-6P-1 与 *Fibrillarin* 基因构建重组表达质粒, 将重组质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 中进行诱导表达, 运用同样方法构建 PET-28a-ak6 原核表达质粒, 获得 His-ak6 融合蛋白, 并运用体外 pull down 技术验证二者的相互作用。[结果] 在温度为 37 °C、诱导时间为 16~20 h、IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 时, *fibrillarin* 蛋白的纯化浓度最高。试验成功获得了符合标准的 RNA, 并获得了与预期片段大小相符的清晰的目的条带; pull-down 试验结果表明, 拟南芥中 *fibrillarin* 蛋白与 ak6 蛋白具有相互作用。[结论] 拟南芥 ak6 突变体植株可能由于 ak6 的缺失影响了 rRNA 前体的加工, 从而抑制核糖体的合成, 进而阻碍拟南芥茎的生长, 使植株表现明显的矮小症状。

**关键词** 拟南芥; *fibrillarin* 蛋白; ak6

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)01-0020-04

**Cloning, Expression, Purification and Interaction with ak6 Research of Fibrillarin in *Arabidopsis thaliana***

LI Ran et al (College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048)

**Abstract** [Objective] To study cloning, expression and purification of *Fibrillarin* in *Arabidopsis thaliana*, and explore interaction with ak6. [Method] By using pGEX-6P-1 and *Fibrillarin* to construct recombinant expression plasmid, and then transferred into *E. coli* BL21(DE3) to conduct induction expression. The same method was used to construct prokaryotic expression plasmid to obtain His-ak6, in vitro pull down was used to verify the interaction. [Result] The purification concentration of *Fibrillarin* is the highest under the condition of 37 °C, induction time 16-20 h, IPTG concentration 0.5 mmol/L. The experiment successfully obtained RNA in accordance with the standard. The pull-down test result showed that *Fibrillarin* and ak6 has interaction effect in *Arabidopsis thaliana*. [Conclusion] It was concluded that due to the lack of ak6 in *Arabidopsis thaliana* mutant plant, the processing of rRNA precursors was affected, thereby inhibited the synthesis of ribosomes, hindered the growth of *Arabidopsis thaliana*, thus the plants showed an obvious short symptoms.

**Key words** *Arabidopsis thaliana*; *Fibrillarin*; ak6

随着人类基因组计划的完成和后基因组时代的到来, 对人体内一些结构和功能未知蛋白质的研究已经成为一个热点, 因为通过对这些蛋白质的研究可以使人类更进一步地认识自己, 从而为人类一些相关疾病的预防和治疗提供重要的理论基础。

核糖体 RNA, 即 rRNA, 是最多的一类 RNA, 占 RNA 总量的 82% 左右, 其也是 3 类 RNA (tRNA、mRNA 和 rRNA) 中相对分子质量最大的一类 RNA, 能与蛋白质结合形成核糖体。其功能是作为 mRNA 的支架, 使 mRNA 分子在其上展开, 实现蛋白质的合成, 单独存在时不执行此功能。rRNA 可与多种蛋白质结合形成核糖体, 作为蛋白质生物合成的“装配机”。研究帮忙, 拟南芥 *fibrillarin* 蛋白是核小核糖核蛋白颗粒 (snRNP) 中的组分, 结合于 U3、U8、U13 snRNP 的 RNA, 参与 rRNA 前体的第一步加工, 从而调控蛋白质的翻译过程。拟南芥 ak6 突变体植株较拟南芥野生型植株明显矮小。

腺苷酸激酶 (Adenylate kinase, AK) 是一种核苷酸单磷酸激酶 (Nucleoside monophosphate kinases, NMPKs), 广泛存在于生物体中, 能可逆地催化  $\gamma$  磷酸基团的转移 (通常作用于 ATP), 将 ATP 和 AMP 反应, 生成 2 分子的 ADP, 以此来维持细胞内的能量平衡<sup>[1]</sup>。因此, 腺苷酸激酶在细胞的新陈代谢

以及 DNA 和 RNA 的合成中扮演着重要的角色。目前已经发现并深入研究了其前 5 种亚型 (AK1~AK5)。研究表明, 这些酶在核苷酸的合成中起着重要的作用, 在各种细胞代谢过程中都是必需的<sup>[11-12]</sup>。由于腺苷酸激酶涉及细胞中核苷酸的合成与代谢, 所以对治疗用的核苷和核苷类似物的化疗药物进行活化及代谢也是必需的。ak6 是 Hui Ren (2004) 等在人体肾上腺中发现了一个定位于细胞核的新型腺苷酸激酶<sup>[7]</sup>。目前, AK6 基因已在大多数动物如人类、果蝇、线虫以及酵母中有了较深入的研究, 但在植物中鲜有报道, 课题小组前期的研究表明, *aak6* - / *aak6* - 突变体植株与野生型植株相比, 突变体植株表现明显的矮小状况<sup>[13-14]</sup>。

*fibrillarin* 蛋白参与 rRNA 前体的加工过程, 影响植株的能量代谢, 推测可能影响拟南芥的生长状况。笔者构建了 *fibrillarin* 蛋白的表达载体, 并对其进行了表达、纯化, 然后用体外 pull-down、SDS-PAGE 和 western blot 检测技术, 探究拟南芥中 *fibrillarin* 蛋白与 ak6 蛋白是否存在相互作用, 以期找到突变体植株矮小的原因。

**1 材料与方法****1.1 材料**

**1.1.1 菌株和质粒。** pET-28a 载体、pGEX-6P-1 载体、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  与 TOP10、BL21 (DE3), 均为实验室保存。

**1.1.2 主要试剂。** Trizol, 购自美国 TEL-TEST Inc; 逆转录试剂盒, 购自 Fermenters 公司; 高保真 PCR 试剂盒、随机引物和 T-A cloning 试剂盒, 均购自全式金公司; 各种构建载体所需工具酶 (如限制性内切酶、*Tap*DNA 聚合酶、T4 连接酶等), 均

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (31071075)。**作者简介** 李然 (1988 - ), 女, 河北承德人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学, E-mail: Iran1988@163.com。\* 通讯作者, 副教授, 硕士生导师, 从事植物分子生物学和植物分子病毒学研究, E-mail: feiyun39@126.com。**收稿日期** 2013-12-09

购自 Takala 公司;质粒小提试剂盒和琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购自 QIN-GEN 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取、反转录及检测。**以生长 4 周左右的拟南芥(未抽薹)的叶片为材料,用 Trizol 法提取总 RNA,并用反转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。

**1.2.2 *Fibrillarlin* 基因的扩增。**根据 GenBank 中 ig52490 序列利用 PrimerPremier5.0 设计引物,上游 BamH1 酶切位点,下游加入 EcoR1 酶切位点,引物序列为:

上游引物: 5'-CGGGATCCCGATGAGACCCCCAGTTA-CAGGAG-3'

下游引物: 5'-CGGAATCCGGCTATGAGGCTGG-GGTCTTTTGT-3'

以制备好的拟南芥 cDNA 为模板,扩增体系为 50  $\mu$ l。反应程序:预变性:94  $^{\circ}$ C, 5 min;变性:94  $^{\circ}$ C, 30 s;退火:58  $^{\circ}$ C, 40 s;延伸:72  $^{\circ}$ C, 1 min;30 个循环后,72  $^{\circ}$ C, 5 min。反应结束后,取出 4  $\mu$ l 进行电泳,检测是否扩增出目的片段,检测到目的片段后用胶回收试剂盒进行回收。

**1.2.3 原核表达质粒的构建和鉴定。**将纯化后的 PCR 产物和 pGEX-6P-1 分别用限制性内切酶 BamH1 和 EcoR1 进行双酶切,胶纯化回收以后将 PCR 产物与 pGEX-6P-1 线性片段连接,16  $^{\circ}$ C 连接过夜,连接体系如表 1 所示。

将连接产物转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞中,37  $^{\circ}$ C 活化 1 h 后涂 LB AMP 抗性平板,置 37  $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养。转化后,用抗生素筛选后的单克隆进行如下程序检测:菌落 PCR 筛选 - 酶切检验 - 测序,最终找出正确的重组克隆。

表 1 PCR 产物与 pGEX-6P-1 线性片段连接体系

编号	试验组	用量/ $\mu$ l	试验组	用量/ $\mu$ l
1	T4 连接酶	1	T4 连接酶	1
2	10 $\times$ buffer	1	10 $\times$ buffer	1
3	载体片段	1	载体片段	1
4	目的片段	7	ddH <sub>2</sub> O	7

**1.2.4 重组蛋白在大肠杆菌中的表达和纯化。**将测序结果正确的重组质粒转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞表达菌株,将表达检测成功的样本接种到 200 ml 含 50  $\mu$ g/ml 氨苄霉素的 LB 培养基中,于 37  $^{\circ}$ C, 200 r/min 过夜培养,然后以 1:20 接种到大瓶 LB 培养基中,37  $^{\circ}$ C 继续培养至  $OD_{600nm}$  为 0.6,然后加入 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导,于 16  $^{\circ}$ C 培养 16 h;然后于 8 679 r/min, 10 min 低温离心,弃掉上清;用 5.0 ml PBS 悬浮沉淀,超声破碎,在 4  $^{\circ}$ C, 14 000 r/min 离心 30 min,收集上清,上清和沉淀分别留少许样进行 SDS-PAGE 检测。在上清中加入适量 GST beads,于 4  $^{\circ}$ C 旋转令其吸附蛋白 2.5 h;于 4 340 r/min, 3 min 离心弃上清;加入至少 50 ml 的 PBS 溶液,轻摇至 beads 悬浮于溶液中,于 4 340 r/min, 离心 3 min,弃上清;重复用 PBS 洗 beads 2 次;加入 1.0 ml 的 GST Elution Buffer,轻摇 10 min;于 4 340 r/min, 离心 3 min,收集上清;重

复用 GST Elution Buffer 洗 2 次,收集上清进行 SDS-PAGE 检测,进行 SDS-PAGE 电泳检测。

**1.2.5 ak6 蛋白的制备。**采用“1.2.4”中方法获得表达的拟南芥。

**1.2.6 体外 pull-down 寻找与 fibrillarlin 相互作用的蛋白及免疫检测。**用 200  $\mu$ l 的 GST beads 和 1.0 ml 的 GST-fibrillarlin 蛋白在 4  $^{\circ}$ C 混合,将过表达的 HIS-AK6 蛋白混合液加入经处理的 GST beads 中,在 4  $^{\circ}$ C 旋转混合孵育 10 h,用冰冷的细胞裂解液重复洗涤 3 次,然后采用 SDS-PAGE 方法对结果进行检测。将跑好的胶在冰浴中转 PVDF 膜 1 h,再将膜从电转槽中取出,依次用去离子水和 PBST 稍加漂洗,然后浸没于封闭液(脱脂牛奶)中,于 4  $^{\circ}$ C 缓慢摇荡 1 h;然后加一抗(AK6 单抗),4  $^{\circ}$ C 摇动孵育 12 h 过夜;用 PBST 洗膜 3 次,每次 5 min;之后加入羊抗鼠二抗,用 PBST 再洗膜 3 次,每次 15 min;最后进行自显影。

## 2 结果与分析

**2.1 总 RNA 的提取及反转录** 用 Trizol 从拟南芥的叶片中提取 RNA,根据检测的浓度利用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA,保存在 -20  $^{\circ}$ C 备用,结果表明成功获得了符合标准的 RNA(图 1)。

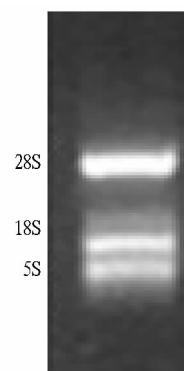
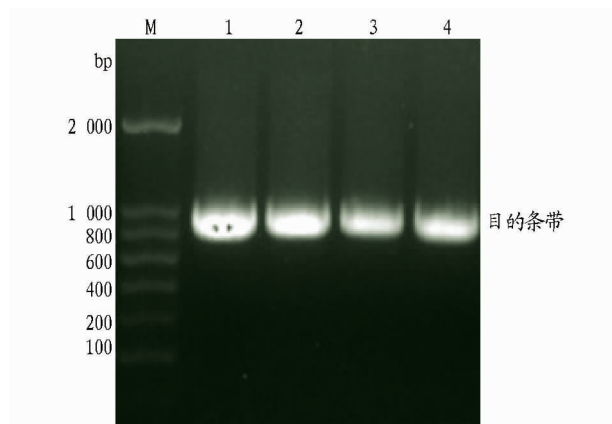


图 1 拟南芥总 RNA

利用设计好的特异上、下游引物通过 PCR 程序从拟南芥 cDNA 中扩增得到目的条带,然后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增出的 PCR 产物,结果表明成功获得了与预期片段大小相符的清晰的目的条带(图 2)。

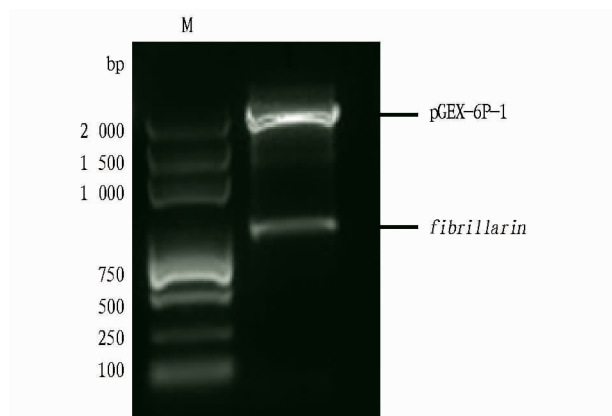
**2.2 原核重组表达质粒的构建和鉴定** 将切胶回收的目的基因 PCR 产物与表达载体质粒分别用限制性内切酶 EcoRI 和 BamH1 在 37  $^{\circ}$ C 进行双酶切,把切下的目的基因和双酶切后的 pGEX-6P-1 载体在 16  $^{\circ}$ C 连接过夜,转化,挑取健壮的单克隆摇菌,用菌液 PCR 检测出单一条带,然后用质粒小提试剂盒提取菌液 PCR 检测为阳性的重组质粒,用内切酶进行双酶切鉴定,琼脂糖凝胶电泳检测得到 2 个片段,即载体 DNA 片段和相应的目的片段,与预期的目的片段大小完全吻合(图 3)。将检验正确的质粒送去测序,测序结果与 NCBI 的相关序列比对完全相同。

**2.3 原核重组表达载体的表达及蛋白纯化** 将测序正确的重组质粒转化到 BL21 (DE3) 中,挑取健壮的单克隆菌落在 37  $^{\circ}$ C 液体 LB 培养基中培养至  $OD_{600nm}$  为 0.6,加入诱导剂



注: M为DNA Marker; 1、2、3、4为目的条带。

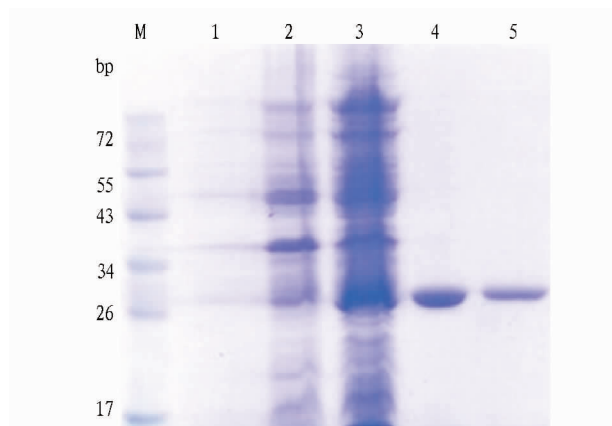
图2 目的基因 PCR 图谱



注: M为Marker; 1为双酶切后的质粒和目的基因的重组载体。

图3 双酶切检测图谱

IPTG在16℃诱导16h,然后在8679 r/min,离心10 min,弃上清;用5 ml PBS悬浮沉淀,然后超声破碎,上清和沉淀分别用SDS-PAGE检测,蛋白过柱子纯化后,经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测得到比较单一的条带(图4)。



注: M为蛋白质Marker; 1为pGEX-6P-1-fibrillarlin诱导前沉淀; 2为pGEX-6P-1-fibrillarlin诱导后沉淀; 3为pGEX-6P-1-fibrillarlin诱导后上清; 4、5为纯化以后的fibrillarlin蛋白。

图4 SDS-PAGE电泳分析纯化蛋白表达

## 2.4 用上述同样方法获得过表达的拟南芥 ak6 蛋白

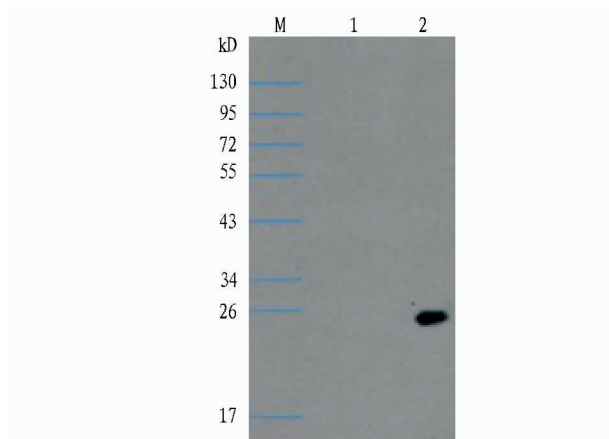
### 2.4.1 ak6 引物。

上游引物: 5'-ggaattccatattggcgagacgtaaccgtggg-3' (NdeI)

下游引物: 5'-cgggatcctcagggttgccatgcatta-3' (BamHI)

**2.4.2 载体构建和重组蛋白的表达纯化。**成功构建原核表达质粒 pET-28a-ak6 获得 ak6 蛋白,其中载体 pET-28a 中带有 HIS 标签,用 ak6 的单克隆抗体作为后续 pull-down 试验中进行 western blot 检测所以的一抗,鉴定 ak6 蛋白,从而证明拟南芥中 fibrillarlin 蛋白与 ak6 蛋白具有相互作用。

**2.5 核糖体组成蛋白 fibrillarlin 与 ak6 相互作用** 将纯化后的 HIS-ak6 融合蛋白和 GST-fibrillarlin 融合蛋白及 pGEX-6P-1 蛋白同时加入到 GST beads 中,4℃共同孵育10 h,经离心收集洗脱复合物和洗涤后,取胶,在冰浴中转 PVDF 膜 2 h,再加入 ak6 单克隆抗体过夜,洗脱,加二抗,最后进行自显影,结果如图5所示,证明二者存在相互作用。



注: M为蛋白质Marker; 1为pGEX-6P-1表达作为空白对照; 2为用 ak6 抗体处理后对应的条带。

图5 western blot 检测 pull-down 结果

## 3 结论与讨论

试验选取拟南芥作为研究对象,构建了 fibrillarlin 蛋白的表达载体,通过对诱导温度、诱导时间、IPTG 浓度等条件的摸索,发现在温度为 37℃、诱导时间为 16~20 h、IPTG 浓度为 0.5 mmol/L 时, fibrillarlin 蛋白的纯化浓度最高。

生物体进行一系列的生命活动需要化学能,而这些化学能的获得绝大部分是来自于 ATP。ATP 是一种高能化合物,通过一系列的代谢过程,例如糖酵解、三羧酸循环以及氧化磷酸化来产生。ATP 的能量转移使得动植物的各种重要生命活动有了能量来源,如肌肉收缩、神经信号的传导、主动运输等,保持着生物体生命活动的正常进行。利用 ATP 转移走一个磷酸基团生成 ADP,然后 ADP 再获得一个磷酸基团生成 ATP,以此完成 ATP 的利用循环。换言之,这种以 ATP 为中介物的生成与再利用循环是生物体能量流动的核心,并以此维持着生物体的各项生命活动。

ak6 是腺苷酸激酶的一种,根据前人研究,除酵母外,人类、线虫、果蝇中的 ak6 的同源蛋白都具有激酶活性<sup>[9-10]</sup>,能使所有类型的 NTPs 和 dNTPs 充当磷酸供体,为细胞代谢提供能量。课题组为探索缺失 ak6 的突变体植株与野生型相比长势矮小的原因,通过体外试验寻找与 ak6 蛋白具有相互作用的功能蛋白。由于在进行 pull-down 试验时加入的是 GST beads,那么在收集的上清液蛋白中,只可能存在带有

GST 标签的蛋白以及与其发生相互作用的蛋白,west-blot 检测时加入 ak6 抗体,使 HIS-AK6 融合蛋白与之结合,结果表明抗体是与 ak6 结合而不是与 GST 标签结合,从而证明拟南芥中 fibrillar 蛋白与 ak6 蛋白发生了特异性结合,二者存在相互作用。fibrillar 蛋白在生物体内参与 rRNA 前体的加工,那么可以推测,突变体植株长势矮小,可能是由于 ak6 的缺失,导致 fibrillar 蛋白与其无法融合,影响了 rRNA 的合成,使核糖体的合成发生障碍,影响细胞能量代谢,从而使植株长势矮小。但这仅是推测,结论还有待进一步考证。

试验成功构建了带有 GST 标签的拟南芥中 fibrillar 蛋白的表达载体,在原核生物大肠杆菌中对重组蛋白进行了诱导表达,纯化后得到了 fibrillar 蛋白;通过体外 pull-down 试验证明,拟南芥中的 fibrillar 蛋白与 ak6 蛋白具有相互作用。

### 参考文献

- [1] NODA L H. Adenylate Kinase[M]// BOYER P D. The Enzymes. 3rd Ed. Ed. New York, USA: Academic Press, 1973:279 – 305.
- [2] MENG G, ZHAI R, CHEN B, et al. Identification and characterization of human adenylate kinase 6 homologues from *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochemistry* (Moscow), 2008, 73(1):38 – 43.
- [3] WHITFORD P C, MIYASHITA O, LEVY Y, et al. Onuchic. Conformational Transitions of Adenylate Kinase: Switching by Cracking [J]. *J Mol Biol*, 2007, 366:1661 – 1671 .
- [4] VAN ROMPAY AR, JOHANSSON M, KARLSSON A. Identification of a novel human adenylate kinase. cDNA cloning, expression analysis, chromosome localization and characterization of the recombinant protein [J]. *Eur J*

- Biochem*, 1999, 261:509 – 517.
- [5] ZANCANI M, CASOLO V, VIANELLO A, et al. Involvement of apyrase in the regulation of the adenylate pool by adenylate kinase in plant mitochondria [J]. *Plant Sci*, 2001, 161:927 – 933.
- [6] ZHAI R, MENG G, ZHAO Y, et al. A novel nuclear – localized protein with special adenylate kinase properties from *Caenorhabditis elegans* [J]. *FEBS Lett*, 2006, 580:3811 – 3817.
- [7] TSUYOSHI TANABE, MAMORU YAMADA, TAKAFUMI NOMA, et al. Tissue-Specific and Developmentally Regulated Expression of the Genes Encoding Adenylate Kinase Isozymes [J]. *The Journal of Biochemistry*, 1993, 113(2):200 – 207.
- [8] REN H, WANG L, BENNETT M, et al. The crystal structure of human adenylate kinase 6: An adenylate kinase localized to the cell nucleus [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102:303 – 308.
- [9] PETER ROBERT LANGE, CLAUDIA GESERICK, GILBERT TISCHENDORF, et al. Functions of Chloroplastic Adenylate Kinases in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2007, 146:492 – 504.
- [10] JUHNKE H, CHARIZANIS C, LATIFI F, et al. The essential protein *fap7* is involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Mol Microbiol*, 2000, 35:936 – 948.
- [11] CARRARI F, COLL-GARCIA D, SCHAUER N, et al. Deficiency of a plastidial adenylate kinase in *Arabidopsis* results in elevated photosynthetic amino acid biosynthesis and enhanced growth [J]. *Plant Physiol*, 2005, 137:70 – 82.
- [12] ZHANG J F, ZHANG F Y, ZHENG X F. Depletion of hCINAP by RNA interference causes defects in Cajal body formation, histone transcription, and cell viability [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2010, 67:1907 – 1918.
- [13] TANABE T, YAMADA M, NOMA T, et al. Tissue – specific and developmentally, Regulated expression of the genes encoding adenylate kinase isozymes [J]. *J Biochem*, 1993, 113:200 – 207.
- [14] NELSON D L, COX M M; *Lehninger principles of Biochemistry* [M]. Third ed. New York; Worth Publishers, 2000:501.

(上接第 16 页)

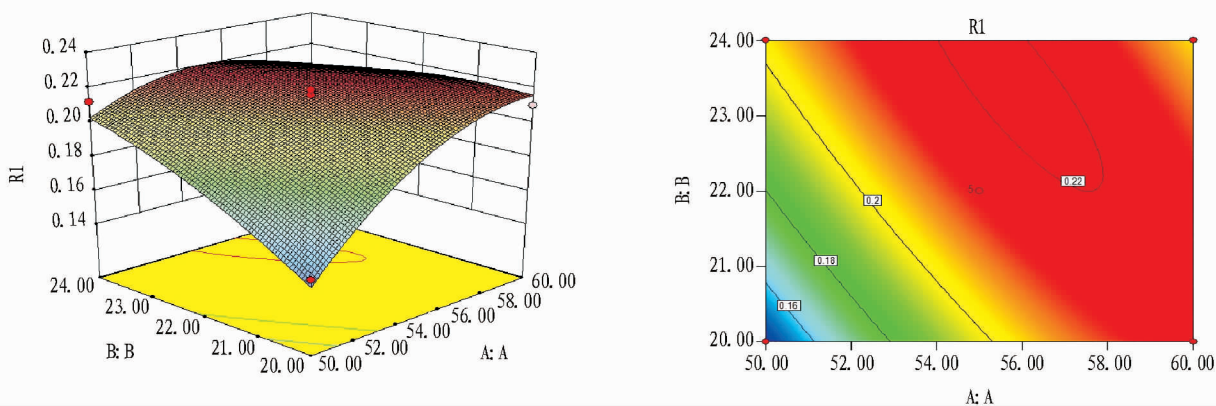


图 1 葡萄糖、酵母膏交互影响的响应面曲面及等高线图

发酵生产奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 鲁念慈, 谭天伟. 透明质酸的制备及其应用 [J]. *功能高分子学报*, 2001, 14(3):370 – 376.
- [2] 黄小忠, 高天响, 张雪松. 透明质酸钠瓶发酵条件的优化 [J]. *江苏农业学报*, 2013, 41(2):311 – 313.
- [3] 吴明霞, 陈爱萍, 蔡彬新. 透明质酸发酵条件的优化 [J]. *农产品加工 (学刊)*, 2011(6):45 – 47.
- [4] 陈永浩, 王强. 发酵液中透明质酸含量快速检测方法研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2009, 35(1):134 – 135.

- [5] 欧宏宇, 贾士儒. SAS 软件在微生物培养条件优化中的应用 [J]. *天津轻工业学院学报*, 2001(3):14 – 17.
- [6] 郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应法在优化微生物的培养基中的应用 [J]. *食品研究与开发*, 2006, 27(1):38 – 41.
- [7] 于晓丹, 马霞, 王可, 等. 利用响应面法优化  $\gamma$  – 聚谷氨酸发酵培养基 [J]. *中国酿造*, 2010(11):132 – 134.
- [8] LI J, ZANG J, XIAO L D, et al. Optimization of the Extraction Conditions of Celery Flavonoids by Response Surface Methodology [J]. *Medicinal Plant*, 2012, 3(3):65 – 67, 70