

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)中两种分支酸代谢酶对温度和水杨酸的响应及其原核表达研究*

林丽春 吕燕 孙鹏 孙雪 徐年军

(宁波大学海洋学院 宁波 315211)

摘要 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)在我国主要用作鲍饵料和琼胶生产原料,但是南方夏季高温限制了龙须菜的栽培和产业化。抗逆植物激素水杨酸(salicylic acid, SA)与分支酸代谢之间存在着密切的联系。本文以两种分支酸代谢酶——异分支酸合成酶(isochorismate synthase, ICS)和分支酸变位酶(chorismate mutase, CM)为研究对象,分析了 23°C(常温)和 33°C(高温)条件下添加 SA 对龙须菜中两种分支酸代谢酶编码基因转录水平的影响。结果表明高温和 SA 不同程度地刺激了两种分支酸代谢酶转录水平的表达,如在 3—12h, SA 添加后 *ics* 表达量分别提高到常温对照组的 2.84—4.76 倍和高温对照组的 1.25—1.62 倍;在 24h 时, *cm* 表达量分别提高到常温对照组的 2.73 倍和高温对照组的 1.82 倍。然后,我们将两种酶的编码基因分别转化到原核表达载体 pET28a 中,结果得到了多包涵体形式大量表达的重组 ICS 和 CM 蛋白,其最佳诱导条件为 0.1mmol/L IPTG 在 16°C 诱导 24h,并用镍柱初步纯化了重组蛋白。该研究为阐明温度和外源 SA 对龙须菜中两种分支酸代谢酶的影响规律,以及为从蛋白水平研究这两种代谢酶提供了资料。

关键词 龙须菜;水杨酸;异分支酸合成酶;分支酸变位酶;原核表达

中图分类号 S968.43 doi: 10.11693/hyhz20180800200

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)为红藻门(Rhodophyta)、真红藻纲(Florideophyceae)、江蓠目(Gracilariales)的一种大型海藻。龙须菜含有丰富的蛋白质、碳水化合物、微量元素和维生素等,还富含具有生物活性的酸性多糖和藻胆蛋白,主要用作鲍饵料和琼胶原料。此外,大规模栽培龙须菜可以吸收海水中氮磷等元素,有效改善海洋生态环境(Fei, 2004)。龙须菜生长的适宜温度在 12—23°C,夏季高温会导致藻体腐烂,限制了其在南方海域的大面积栽培。因此提高龙须菜的抗高温能力、延长其养殖期对于龙须菜产业至关重要。

分支酸是连接莽草酸和芳香型化合物代谢的一个重要节点,是芳香型氨基酸及许多天然产物如色素、生物碱、植物激素等合成的前体(Maeda *et al.*, 2012)。分支酸代谢途径有多种酶参与,其中异分支酸

合成酶(isochorismate synthase, ICS)、分支酸变位酶(chorismate mutase, CM)、邻氨基苯甲酸合酶(anthranilate synthase, AS)和氨基脱氧分支酸合酶(aminodeoxychorismate synthase, ADCS)等为常见的分支酸利用酶。

ICS(EC 5.4.4.2)是水杨酸合成途径之一的异分支酸合成途径的关键酶。分支酸在 ICS 和异分支酸丙酮酸裂解酶(isochorismate pyruvatelyase, IPL)的催化作用下合成 SA(Chen *et al.*, 2009)。目前已在长春花(*Catharanthus roseus*)、楸树(*Morinda citrifolia*)、杨树(*Populus tremula*)等多种植物中克隆到 *ics* 基因(Muljono *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2008; Yuan *et al.*, 2009)。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中 *ics1* 基因产物被证实具有 ICS 酶活性,并定位在质体中(Strawn *et al.*, 2007)。ICS 参与了植物激素调控及生物、非生

*国家自然科学基金项目,31672674 号,41376151 号。林丽春,硕士研究生, E-mail: 1274908169@qq.com

通信作者:孙雪,研究员, E-mail: sunxue@nbu.edu.cn

收稿日期:2018-08-17, 收修改稿日期:2018-10-28

物胁迫过程。如甘蓝型油菜(*Brassica napus*)的 *ics1* 基因表达受植物激素网络的调控, 并在核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)侵染初期参与了 SA 信号途径的激活(彭琦等, 2016)。类似地, 烟草(*Nicotiana tabacum*)在受到病原菌侵染、臭氧胁迫时, *ics1* 的转录被促进, 同时伴随着内源 SA 水平升高(Ogawa *et al.*, 2005)。除了合成 SA 之外, ICS 还是铁载体、甲基萘醌合成途径的关键酶, 这些途径主要存在于细菌中。

CM(EC 5.4.99.5)负责催化分支酸生成预苯酸的化学反应, 是苯丙氨酸和酪氨酸合成途径的第一个关键酶, 多步反应后可以生成多种次级代谢物如木质素、异喹啉、生物碱类、酪醇等。植物激素和一些生物或非生物胁迫同样调控了 CM 的表达。例如, 用 0.5mmol/L 水杨酸处理桦褐孔菌(*Inonotus obliquus*)IO-U1 株感染的日本桦树(*Betula maximowiczii*), 其 CM 蛋白表达量显著增加(Suzuki *et al.*, 2014)。类似地, 核盘菌感染后的甘蓝型油菜 CM 的编码基因 SS1G-14320 表达量升高, 同时 SA、茉莉酸、脱落酸和乙烯水平也发生了显著变化(Nováková *et al.*, 2014)。以上研究表明分支酸变位酶与 SA 等植物激素之间存在着一定的联系。

两种分支酸利用酶 ICS 和 CM 参与了 SA 等下游代谢产物合成的调控过程, 但目前 ICS 和 CM 在藻类中相关的研究非常少。我们前期研究发现高温和外源 SA 均能诱导龙须菜内源 SA 水平的升高(Hou *et al.*, 2018), 但具体的分子机制尚不明确。因此本文首次从转录水平上探讨了这两种分支酸利用酶对温度和外源 SA 的响应, 以阐明以上两种因素对藻类分支酸代谢的影响, 然后利用原核表达和亲和柱纯化, 获得了初步纯化的 ICS 和 CM 重组蛋白, 为后续制备抗体进行蛋白水平的研究做好准备。

1 材料与方法

1.1 实验材料处理

本实验所用材料为龙须菜 981 抗高温品系, 购自福建霞浦养殖场。实验室培养条件: 用 Provasoli 海水培养基, 光照强度 40 μ mol/(m²·s), 光周期 L:D =12h:12h。常温组在 23 $^{\circ}$ C 光照培养箱中进行, 高温组在 23 $^{\circ}$ C 预培养 30h 后依次在 28 $^{\circ}$ C 和 33 $^{\circ}$ C 再分别预培养 6h 和 12h。

实验分为 4 组: 23 $^{\circ}$ C 常温组(记为 23)、常温加 100 μ mol/L SA 组(记为 23+SA)、33 $^{\circ}$ C 高温组(记为 33)、高温加 100 μ mol/L SA 组(记为 33+SA), 每组三个平行。分别在处理 3、6、12、24h 后, 取吸干水分的 120—150mg 藻体, 液氮速冻后立即放入-80 $^{\circ}$ C, 用于后续 RNA 提取。

1.2 RNA 提取及 cDNA 合成

采用 RNeasy plant mini kit (Qiagen, Germany)进行龙须菜 RNA 的提取, 然后用 NanoDrop 1000 Spectrophotometer 测定 RNA 浓度和纯度, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。检测合格的 RNA 样品用 TransScript all-in-one first-strand cDNA synthesis supermix for qPCR 试剂盒(全式金, 北京)合成 cDNA 第一链, 冻存储用。

1.3 *ics* 和 *cm* 基因的荧光定量 PCR 分析

根据龙须菜基因组测序获得的 *ics* 和 *cm* cDNA 序列, 用 primer premier5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物, 以 18S rRNA 基因为内参(表 1)。利用 TransStart tip green qPCR supermix SYBR (全式金, 北京)进行荧光定量 PCR。在 20 μ L 反应体系中: 10 μ L SYBR mix, 2 μ L cDNA, 正反向引物各 0.4 μ L, 7.2 μ L H₂O。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C, 3min; 40 个循环(95 $^{\circ}$ C, 10s; 55 $^{\circ}$ C, 20s; 72 $^{\circ}$ C, 20s)。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法分析基因的相对表达量。

表 1 引物序列和扩增长度列表
Tab.1 List of primer sequences and amplification lengths

引物名称	引物序列(5'—3')	扩增长度(bp)
Q-ics1432	TATGGCAATAAAGTGGTGG	
Q-ics1561	CCATTTTCAGAACGGATAGA	130
Q-cm109	CCGCCGACTTTCATAGCACCAT	
Q-cm316	CGCTAAGGAGCAAGGGCACACC	208
18sF	CCTGAGACGGCTACCACATCCA	
18sR	AGACTTGCCCTCTGCTGGCTCCTC	166
<i>ics1</i>	CGCGGATCCATGACTGAGCAACTTCTATATCGT	
<i>ics1</i> 761	CGCGTCGACTCAAGAGTTTTGGCAGACTTTTCGTGT	1761
<i>cm1</i>	CGCGGATCCATGGGCGCTAACGAAGTTCC	
<i>cm1</i> 095	CGCAAGCTTTTACGCATTGGCATCACTTTT	1095

注: 下划线序列为限制性内切酶识别序列, 其中 GGATCC、GTCGAC、AAGCTT 分别为 *Bam*H、*Sal* 和 *Hind* 的识别序列

1.4 *ics* 和 *cm* 全序列扩增和克隆

根据 *ics* 和 *cm* cDNA 序列信息, 设计包含整个开放阅读框全序列的扩增引物(表 1), 并在 *ics* 引物两端分别加上 *Bam*H 和 *Sal* 的酶切位点和保护碱基, *cm* 引物两端分别加上 *Bam*H 和 *Hind* 的酶切位点和保护碱基。PCR 程序为: 预变性 94°C, 5min; 35 个循环 (94°C, 30s; 58°C, 30s; 72°C, 1.5min); 72°C, 10min。PCR 产物经过电泳检测、回收、连接到 pMD18-T 载体并转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 然后将 PCR 检测大小正确的单菌落扩大培养后送往上海桑尼公司测序, 最后将测序检测插入序列正确的重组子分别命名为 T-*ics* 和 T-*cm*。

1.5 表达载体 pET28a-*ics* 和 pET28a-*cm* 的构建

分别对 pET28a 和 T-*ics* 用 *Bam*H 和 *Sal* 进行双酶切, 对 pET28a 和 T-*cm* 用 *Bam*H 和 *Hind* 进行双酶切。在 37°C 酶切 12h 后, 割胶回收、连接酶切后的目的片段和 pET28a 载体片段。连接产物转化到大肠杆菌 BL21(DE3)或 BL21-codonplus-RIL 中。将经过 PCR 和双酶切检测插入片段大小正确的重组菌落送去测序。

1.6 重组蛋白诱导表达条件的优化

将测序验证序列正确的重组菌接种到 LB 培养基 (含 50 μ g/mL 卡那霉素) 中, 在 37°C, 200r/min 培养至 OD₆₀₀ 在 0.6—0.8 之间, 然后进行诱导条件的优化: 诱导时间梯度分别为 0、4、8、12h; 诱导剂 IPTG 浓度梯度分别为 0、0.1、0.5、1mmol/L; 诱导温度/时间分别为 16°C (24h)、20°C (15h)、25°C (10h)、30°C (8h)。

1.7 重组蛋白的检测及纯化

诱导结束后 12000r/min 离心 2min 收集菌体, 加入 5mL 0.1mol/L PBS 缓冲液悬浮, 然后用超声波破碎仪进行细胞破碎(功率为 360W, 超声 2s 间隔 3s 持续 30min)。12000r/min (4°C)离心 20min 收集上清(可溶性蛋白)并转移到干净的离心管中, 沉淀(包涵体蛋白)用 6mol/L 尿素冰浴 1h 变性。取上清与沉淀分别

与等体积的 2 \times 蛋白上样缓冲液混合后进行 SDS-PAGE 电泳, 用考马斯亮蓝染色, 蒸馏水加热脱色直至背景清晰, 拍照。利用 His 标签蛋白纯化试剂盒(康为, 北京), 对重组 ICS 和 CM 蛋白分别进行纯化。操作步骤参考说明书, 分别用 10、50、100、250、500mmol/L 咪唑进行梯度洗脱。

1.8 数据统计

利用 Excel 2010 进行数据统计和作图, 结果以平均值 \pm 标准方差(mean \pm SD)表示。使用 SPSS19.0 软件的 Turkey 多重比较检验法进行不同时间点或不同处理间的单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 作为差异显著的标准。

2 结果与分析

2.1 两种温度下 SA 对 *ics* 基因表达的影响

高温和外源激素添加显著影响了龙须菜 *ics* 转录水平的表达(图 1a, 1b)。在 23°C 条件下, 龙须菜 *ics* 转录水平相对稳定; 100 μ mol/L SA 添加后龙须菜 *ics* 基因的转录表达量升高, 在 3、6、12h 时其表达量分别为各时间点对照组的 3.33 倍、4.76 倍和 2.84 倍($P < 0.05$)。在 33°C 条件下, *ics* 表达量急速上升(在 3h 时最高), 但随着处理时间延长其表达量逐渐下降; 添加 SA 后, *ics* 表达量在 3、6、12h 时分别为各时间点高温组的 1.25 倍、1.62 倍和 1.44 倍($P < 0.05$)。上述结果表明高温和外源 SA 都可以促进龙须菜 *ics* 基因的转录, 且常温下 SA 的促进效果更显著。

2.2 两种温度下 SA 对 *cm* 基因表达的影响

与 *ics* 类似, 常温条件下 *cm* 转录水平较稳定, 添加 SA 后 *cm* 基因表达量多显著高于对照组, 其中 3h 和 24h 时其相对表达量分别为对各自对照组的 2.16 倍和 2.73 倍(图 2a)。高温条件下龙须菜 *cm* 基因表达出现波动, 其中 3h 和 12h 时高温组 *cm* 表达量分别达到常温组的 1.79 倍和 2.04 倍; 在高温条件下添加 SA 后在 6h 和 24h 时 *cm* 表达量分别上升为高温对照组的 1.65 倍和 1.82 倍($P < 0.05$), 其余时间点 *cm* 表达量与高温组无显著差异(图 2b)。

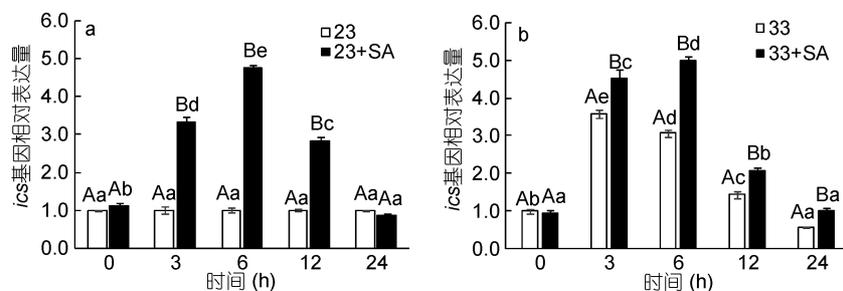


图 1 两种温度下水杨酸对 *ics* 基因表达的影响(a: 23°C, b: 33°C)

Fig. 1 Effect of salicylic acid on the expression of *ics* gene under two temperatures (a: 23°C; b: 33°C)

注: 大写字母表示同时间点不同组间的差异, 小写字母表示同组不同时间点间的差异

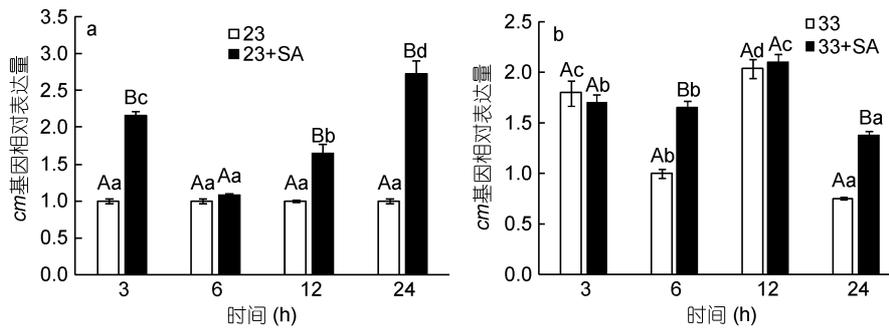


图2 两种温度下水杨酸对龙须菜 *cm* 基因表达的影响(a: 23°C, b: 33°C)

Fig.2 Effect of salicylic acid on the expression of *cm* gene under two temperatures (a: 23°C; b: 33°C)
注: 大写字母表示同时间点不同组间的差异, 小写字母表示同组不同时间点间的差异

2.3 表达载体 pET28a-ics 和 pET28a-cm 的构建

ics 和 *cm* 全 cDNA (包含各自完整的开放阅读框) 的扩增长度分别为 1761bp 和 1095bp, PCR 扩增条带大小与预期结果一致。将两个基因分别克隆到 pMD18-T 载体中, 经测序验证序列正确。pET28a 载体、T-ics 和 T-cm 载体双酶切的电泳结果分别如图

3a—图 3c 所示, 酶切完全且片段大小正确。pET28a-ics 和 pET28a-cm 重组载体的菌落 PCR 检测结果表明目的片段已克隆到 pET28a 中(图 3d, 图 3e)。为了进一步确认重组载体构建的正确性, 将 PCR 验证正确的重组菌落送去测序, 测序结果表明两条基因序列和插入方向均正确。

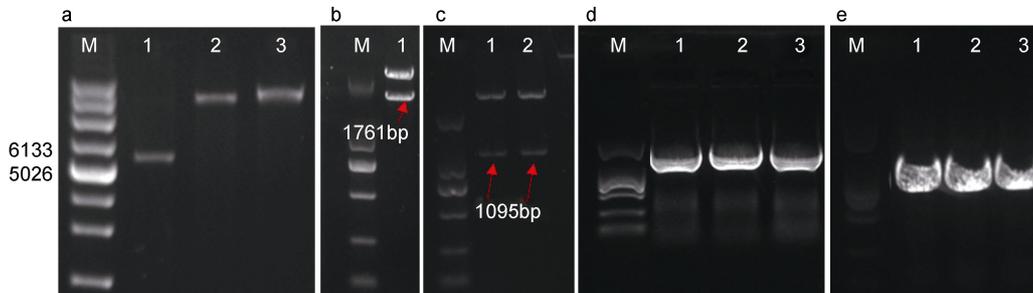


图3 酶切和重组 pET28a 载体菌落 PCR 检测

Fig.3 Double-enzyme cutting and PCR detection of recombinant pET28a vector

注: a: pET28a 载体的双酶切结果, M 为超螺旋 marker, 1 为 pET28a, 2 为 *Bam*H 和 *Hind* 酶切后的 pET28a, 3 为 *Bam*H 和 *Sal* 酶切后的 pET28a; b: T-ics 经 *Bam*H 和 *Sal* 双酶切的结果(1 泳道); c: T-cm 经 *Bam*H 和 *Hind* 双酶切的结果(1, 2 泳道); d: pET28a-ics 菌落 PCR 验证(1-3 泳道); e: pET28a-cm 菌落 PCR 验证(1-3 泳道); 图 b—e 中的 M 均为 DL2000 marker

2.4 重组 ICS 和 CM 蛋白的表达

在常用的几种诱导温度和 IPTG 诱导浓度下, 重组 ICS 蛋白和 CM 蛋白均在包涵体中较多, 上清中较少(图 4)。ICS 蛋白大小约为 70kDa(图 4a), 比理论分子量大小 65kDa 稍大, 可能是因为 *ics* 片段上没有终止密码子, 融合了载体下游的标签。CM 蛋白大小在 40kDa 左右(图 4b), 与预测的分子量 41kDa 大小一致。我们还比较了 BL21(DE3)和 RIL 表达菌对融合蛋白产量的影响, 结果表明 RIL 在蛋白表达量和蛋白可溶性方面, 均优于 BL21(DE3)(图未给出)。

2.5 重组蛋白诱导表达条件的比较

ICS 蛋白的诱导表达结果见图 5a, 在 37°C 用

1mmol/L IPTG 诱导时, 随着诱导时间延长蛋白表达增加, 但 8h 后基本稳定。IPTG 浓度为 0.1 或 0.5mmol/L 时诱导效果似乎比 1mmol/L 要稍好一些。对于诱导温度/时间, 16°C 长时间诱导与 37°C 短时间诱导效果类似, 但低温有利于蛋白的正确折叠, 使目的蛋白保持活性。

在不同诱导条件下, CM 蛋白的表达结果表明诱导温度对于蛋白表达的影响较大, 低温长时间诱导效果更好(图 5b)。其中 20°C 诱导 15h 时 CM 蛋白的表达最多, 37°C 诱导 4—12h 表达量较少, 30°C 诱导 8h 和 25°C 诱导 10h 的蛋白表达量类似。因此, 对于 ICS 和 CM 重组蛋白的最佳诱导条件, 我们均选用 0.1mmol/L IPTG, 在 16°C 诱导 24h。

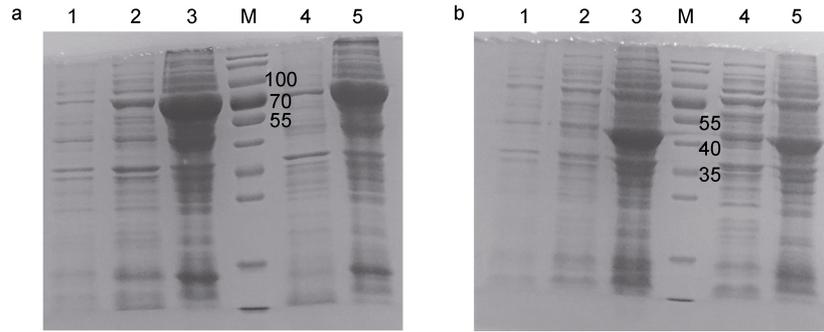


图 4 pET28a-ics (a)和 pET28a-cm (b)的诱导表达

Fig.4 Induced expression of pET28a-ics (a) and pET28a-cm (b)

注: a: 1: 对照组; 2—3: 20°C (15h)的上清和包涵体; 4—5: 25°C (10h)的上清和包涵体; b: 1: 对照组; 2—3: 0.1mmol/L IPTG 诱导(16°C, 24h)的上清和包涵体; 4—5: 0.5mmol/L IPTG 诱导(16°C, 24h)的上清和包涵体

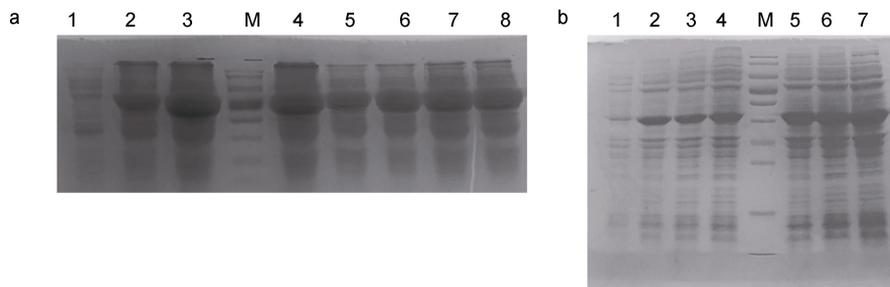


图 5 不同条件下 pET28a-ics (a)和 pET28a-cm (b)诱导表达的结果

Fig.5 Induced expression of pET28a-ics (a) and pET28a-cm (b) under different conditions

注: a: 1—4: 1mmol/L IPTG 分别诱导 0、4、8、12h (37°C); 5—6: 0.1 和 0.5mmol/L IPTG 分别诱导 4h (37°C); 7—8: 分别用 0.1 和 0.5mmol/L IPTG 诱导 24h (16°C); b: 1—4: 1mmol/L IPTG 分别诱导 0、4、8、12h (37°C); 5: 1mmol/L IPTG 诱导 8h (30°C); 6: 1mmol/L IPTG 诱导 10h (25°C); 7: 1mmol/L IPTG 诱导 15h (20°C)

2.6 包涵体中重组蛋白的纯化

ICS 蛋白纯化结果表明 50mmol/L 咪唑洗脱时得到的目的蛋白条带最亮, 杂蛋白较少, 说明大部分的 ICS 蛋白被洗脱下来; 随着咪唑浓度的提高, 洗脱下来的目的蛋白量迅速降低(图 6a)。在 CM 蛋白纯化结果中, 50mmol/L 咪唑可以将目的蛋白洗脱下来, 与 ICS 蛋白不同的是咪唑浓度继续增大到 100 或 250mmol/L 时, CM 蛋白量与 50mmol/L 咪唑洗脱的结果类似, 杂蛋白更少, 直至 500mmol/L 咪唑洗脱下来的重组蛋白量明显降低(图 6b)。

3 讨论

3.1 水杨酸与异分支酸合成酶

SA 是植物体内一种普遍存在的小分子酚类物质, 它不仅能够调控植物体生长、发育、成熟、衰老等生理过程, 还可以激活植物的系统获得性抗性, 提高植物对高低温、盐渍、干旱等非生物逆境的耐受性, 以及对病虫害的抗性(Hayat *et al*, 2010)。在不利环境或生物胁迫条件下植物体会迅速积累 SA, 从而刺激机

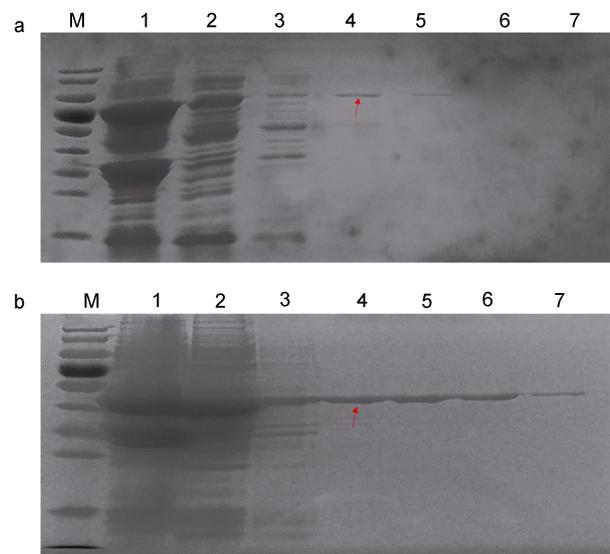


图 6 包涵体中 ICS(a)和 CM(b)重组蛋白的纯化

Fig.6 Purification of ICS (a) and CM (b) recombinant proteins in the inclusion body

注: a, b 图: 1: 未纯化的包涵体; 2: 流穿液; 3—7: 10、50、100、250、500mmol/L 咪唑洗脱结果。箭头分别指示 ICS 和 CM 重组蛋白

体产生一系列的防御反应, 如抗氧化系统相关酶的激活、热激蛋白和渗透调节物质的合成和钙离子稳态的改变等(Pan *et al*, 2006; Wang *et al*, 2006; 曹福亮等, 2008)。

异分支酸途径在植物抗病防御中是合成 SA 信号的主力军。在转入异分支酸合成途径关键酶——大肠杆菌 ICS 编码基因和假单胞菌 IPL 编码基因的转基因烟草中, SA 和水杨酸葡萄糖苷的含量显著高于野生型烟草(Nugroho *et al*, 2002)。非生物胁迫因素如紫外线、臭氧等能诱导 *ics* 基因的表达(Ogawa *et al*, 2007; Catinot *et al*, 2008)。同样地, 在低温胁迫处理的“嘎啦”苹果中 *ics* 基因表达被诱导(马长青等, 2016)。本研究也得到类似结果, 即在高温胁迫下, 龙须菜中 *ics* 基因表达量迅速升高, 但随着胁迫时间的延长, *ics* 表达量逐渐降低。这些结果表明在逆境条件下, ICS 酶可能参与了 SA 信号分子合成从而激活系统获得抗性以应对不利环境。

外源 SA 可调节 *ics* 基因表达来影响异分支酸合成。如 0.1mmol/L SA 可以诱导青蒿 AaICS1 的表达, 在处理 8—12h 时 *ics* 基因表达水平最高(Wang *et al*, 2017); 1mmol/L SA 能显著诱导红花 *ics* 基因表达水平(Sadeghi *et al*, 2013)。以上结果与本研究中外源 SA 可以促进龙须菜 *ics* 基因表达的结果类似。

3.2 水杨酸与分支酸变位酶

分支酸变位酶控制着碳同化物由莽草酸途径进入类苯基丙烷代谢途径, 影响着下游芳香型氨基酸、酚类、醌类、色素、维生素、生物碱、SA 等的合成。异分支酸途径关键酶的表达抑制了分支酸流向类苯基丙烷途径中, 从而导致其下游产物合成量降低。如在 SA 组成型表达的转异分支酸合成途径关键酶的转基因烟草中, CM、苯丙氨酸解氨酶和查尔酮合成酶的活性均低于野生型, 对应的下游代谢产物黄酮和绿原酸的含量也相对降低(Nugroho *et al*, 2002)。

关于 CM 的研究多集中在线虫和植物病原菌中, 这些寄生生物可以向植物宿主释放自身的 CM 蛋白, 促进植物的分支酸代谢流偏向于形成预苯酸, 从而减少 ICS 催化形成 SA 等抗逆信号分子, 利于病原菌和线虫的定殖和扩散(Long *et al*, 2006; Djamei *et al*, 2011)。以上研究说明 CM 的大量表达可以减少内源 SA 的形成, 但外源 SA 对 CM 影响的文献未见报道。本文结果表明, 在常温或高温胁迫下外源 SA 多诱导了 *cm* 基因的表达。而 CM 负责提供的芳香氨基酸可用于蛋白质的合成, 可能与常温培养时 SA 促进龙须

菜的生长或高温条件下促进藻体抵抗高温胁迫等有关。但外源 SA 对 *cm* 基因表达的影响无论是时间点的多少还是表达量增加的倍数都不如对 *ics* 影响显著, 尤其是高温条件下更加明显。

3.3 影响藻类基因原核表达的因素

影响原核表达的因素很多, 如目的蛋白的性质、载体种类、表达菌种类、稀有密码子、蛋白毒性、培养基类型和诱导条件等都会影响蛋白表达(Allert *et al*, 2010; Khaw *et al*, 2012)。Shafiee 等用响应面法对 DT386-BR2 融合蛋白的诱导条件进行了优化, 在 37°C 用 1mmol/L IPTG 诱导 2h 得到了 224.86 μ g/mL 的融合蛋白(Shafiee *et al*, 2017)。本研究中两个重组蛋白多在包涵体中, 对诱导条件及表达菌进行优化和比较, 结果表明低温长时间诱导以及诱导剂浓度的降低虽然能影响重组蛋白的表达量, 但对改变蛋白可溶性的作用并不显著, 其原因可能与目的蛋白自身性质有关。表达蛋白不可溶, 这种情况在其它藻类中也出现过, 如转入盐藻淀粉磷酸化酶基因(*DsSP*)的重组 pGS21a-DsSP 载体, 在 28°C 用 0.3mmol/L IPTG 诱导 4h 后, 重组蛋白大部分在包涵体中(Liu *et al*, 2014); 转入海带磷酸甘露糖异构酶 PMI4 基因的重组表达载体 pET32a-PMI4 在表达菌株 BL21 中也以包涵体形式为主(张亚兰, 2013)。表达蛋白不可溶可能与原核表达系统无法对蛋白进行翻译后修饰, 且添加诱导剂后目的蛋白表达速度过快, 无法进行正确折叠, 从而形成成熟且有活性的重组蛋白有关。

4 结论

本研究表明高温或水杨酸处理可促进龙须菜 *ics* 的转录表达, 对 *cm* 基因表达也多为促进作用; 而且, 在原核表达载体 pET28a 中成功表达了 ICS 和 CM 这两种分支酸利用酶, 其表达产物多为包涵体蛋白。本研究是首次研究大型藻类中外源植物激素和分支酸利用酶之间的关系, 为探究植物激素和藻类次级代谢的关联、及从蛋白水平来研究水杨酸代谢途径相关酶的功能提供了资料。

参 考 文 献

- 马长青, 柏素花, 董超华等, 2016. 苹果异分支酸合酶基因 MdICS1 的克隆与表达分析. 植物生理学报, 52(9): 1361—1370
- 张亚兰, 2013. 海带磷酸甘露糖异构酶基因(PMI)的克隆、分析及表达. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文
- 曹福亮, 欧祖兰, 2008. 水杨酸对银杏幼苗抗高温胁迫能力的影响. 浙江林学院学报, 25(6): 756—759

- 彭琦, 高建芹, 周晓婴等, 2016. 甘蓝型油菜异分支酸合酶基因的克隆及信号通路相关基因的诱导表达. 中国油料作物学报, 38(1): 7—12
- Allert M, Cox J C, Hellinga H W, 2010. Multifactorial determinants of protein expression in prokaryotic open reading frames. *Journal of Molecular Biology*, 402(5): 905—918
- Catinot J, Buchala A, Abou-Mansour E *et al*, 2008. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Letters*, 582(4): 473—478
- Chen Z X, Zheng Z Y, Huang J L *et al*, 2009. Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 4(6): 493—496
- Djamei A, Schipper K, Rabe F *et al*, 2011. Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature*, 478(7369): 395—398
- Fei X G, 2004. Solving the coastal eutrophication problem by large scale seaweed cultivation. *Hydrobiologia*, 512(1—3): 145—151
- Hayat Q, Hayat S, Irfan M *et al*, 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and Experimental Botany*, 68(1): 14—25
- Hong T S, Roslan H A, 2008. Cloning of a near complete *Isochorismate synthase* (ICS) cDNA from *Morinda citrifolia* L. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 31(1): 101—105
- Hou S N, Lin L C, Lv Y *et al*, 2018. Responses of lipoxygenase, jasmonic acid, and salicylic acid to temperature and exogenous phytohormone treatments in *Gracilariopsis lemaneiformis* (Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, 30: 1—8, doi: 10.1007/s10811-018-1514-2
- Khow O, Suntrarachun S, 2012. Strategies for production of active eukaryotic proteins in bacterial expression system. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(2): 159—162
- Liu S C, Chai X J, Guo W H *et al*, 2014. Cloning, analysis and prokaryotic expression of *DsSP* gene from *Dunaliella salina*. *Agricultural Science and Technology*, 15(6): 907—915
- Long H, Wang X, Xu J, 2006. Molecular cloning and life-stage expression pattern of a new chorismate mutase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne arenaria*. *Plant Pathology*, 55(4): 559—563
- Maeda H, Dudareva N, 2012. The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 63: 73—105
- Muljono R A B, Talou J R, Scheffer J J C, 2002. Biosynthesis of 2,3-dihydroxybenzoic acid in transgenic *Catharanthus roseus* cell cultures overexpressing isochorismate synthase. *Heterocycles*, 56(1—2): 341—352
- Nováková M, Šašek V, Dobrev P I *et al*, 2014. Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum*-reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. *Plant Physiology and Biochemistry*, 80: 308—317
- Nugroho L H, Verberne M C, Verpoorte R, 2002. Activities of enzymes involved in the phenylpropanoid pathway in constitutively salicylic acid-producing tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 755—760
- Ogawa D, Nakajima N, Sano T *et al*, 2005. Salicylic acid accumulation under O₃ exposure is regulated by ethylene in tobacco plants. *Plant and Cell Physiology*, 46(7): 1062—1072
- Ogawa D, Nakajima N, Tamaoki M *et al*, 2007. The isochorismate pathway is negatively regulated by salicylic acid signaling in O₃-exposed *Arabidopsis*. *Planta*, 226(5): 1277—1285
- Pan Q H, Zhan J C, Liu H T *et al*, 2006. Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Science*, 171(2): 226—233
- Sadeghi M, Dehghan S, Fischer R *et al*, 2013. Isolation and characterization of isochorismate synthase and cinnamate 4-hydroxylase during salinity stress, wounding, and salicylic acid treatment in *Carthamus tinctorius*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(11): e27335
- Shafiee F, Rabbani M, Jahanian-Najafabadi A, 2017. Optimization of the expression of DT386-BR2 fusion protein in *Escherichia coli* using response surface methodology. *Advanced Biomedical Research*, 6(1): 22
- Strawn M A, Marr S K, Inoue K *et al*, 2007. *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *Journal of Biological Chemistry*, 282(8): 5919—5933
- Suzuki H, Takashima Y, Ishiguri F *et al*, 2014. Proteomic analysis of responsive proteins induced in Japanese birch plantlet treated with salicylic acid. *Proteomes*, 2(3): 323—340
- Wang L J, Chen S J, Kong W F *et al*, 2006. Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*, 41(3): 244—251
- Wang L Y, Zhang Y, Fu X Q *et al*, 2017. Molecular cloning, characterization, and promoter analysis of the isochorismate synthase (*AaICS1*) gene from *Artemisia annua*. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 18(8): 662—673
- Yuan Y N, Chung J D, Fu X Y *et al*, 2009. Alternative splicing and gene duplication differentially shaped the regulation of isochorismate synthase in *Populus* and *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(51): 22020—22025

RESPONSES OF TWO CHORISMATE METABOLIC ENZYMES TO TEMPERATURE AND SALICYLIC ACID IN *GRACILARIOPSIS LEMANEIFORMIS* AND THEIR PROKARYOTIC EXPRESSION ANALYSIS

LIN Li-Chun, LÜ Yan, SUN Peng, SUN Xue, XU Nian-Jun
(School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract The economic seaweed *Gracilariopsis lemaneiformis* is widely cultivated for feeding abalone and producing agar in China. However, high temperatures have limited its growth and industrialization in the southern coast. The stress-resistant phytohormone salicylic acid (SA) is intimately related to chorismate metabolism. In this study, the transcriptional level of two chorismate metabolic enzymes, isochorismate synthase (ICS) and chorismate mutase (CM) from *G. lemaneiformis*, were used to analyze the effects of the addition of SA under two temperature conditions. Results showed that high temperature (33°C) and SA stimulated the transcriptional expression of the two enzymes, e.g., compared to the corresponding control, *ics* expression level ranged from 2.84 to 4.76 times at 23°C and from 1.25 to 1.62 times at 33°C after addition of SA within 3—12h; *cm* expression level increased to 2.73 times at 23°C and 1.82 times at 33°C at 24h. Then, the encoding genes of the two enzymes were transferred into pET28a vector, respectively, and the recombinant ICS and CM proteins were expressed largely in the inclusion bodies. The optimal induction conditions of the recombinant proteins were at 16°C for 24h by 0.1mmol/L IPTG. Finally, the recombinant proteins were preliminarily purified with a nickel column. This work provides the base for the research on the regulation of temperature and exogenous SA on the chorismate metabolism enzymes, and for the further research on the two enzymes at the protein levels in *G. lemaneiformis*.

Key words *Gracilariopsis lemaneiformis*; salicylic acid; isochorismate synthase; chorismate mutase; prokaryotic expression