

黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 的原核表达载体的构建及表达分析

陈巧 陈书霞* 王聪颖 郝丽宁 万旭花 申晓青 程智慧

(西北农林科技大学园艺学院, 农业部西北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 陕西杨凌 712100)

摘要: 以先前克隆到的黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 全长的 cDNA 为模板, 用含有特异性酶切位点的 Yh1、Yh2 为引物, 通过 PCR 方法将黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 的 ORF 区构建到大肠杆菌表达载体 pGEX-4T-1 上获得原核表达载体 p4t-LOX2, 将该表达载体 p4t-LOX2 转化到大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 中, 获得相应的重组工程菌。在 IPTG 诱导下, 通过 SDS-PAGE 电泳, 得到一条约 115 kD 的融合蛋白条带, 除去 pGEX-4T-1 自身诱导的约 26 kD 大小的 GST 标签蛋白后, *CsLOX2* 编码一个约 89 kD 的蛋白。经过融合蛋白表达体系的优化分析, 表明该融合蛋白在 37℃, 0.80 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导表达 10.5 h, 可获得融合蛋白的最大表达量。

关键词: 黄瓜; 脂氧合酶; 原核表达

中图分类号: S642.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2013) 10-0029-07

Construction and Expression of a Cucumber Lipoygenase Gene *CsLOX2* in Prokaryotic Cells

CHEN Qiao, CHEN Shu-xia*, WANG Cong-ying, HAO Li-ning, WAN Xu-hua, SHEN Xiao-qing, CHENG Zhi-hui

(College of Horticulture, Northwest A&F University, Key Laboratory of Horticultural Plant Germplasm Resources Utilization in Northwest China, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: The ORF of cucumber (*Cucumis sativus* L.) *CsLOX2* gene was inserted into an expression vector pGEX-4T-1 through PCR method using specific primers Yh1 and Yh2, and the recombinant expression vector p4t-LOX2 was constructed. The expression amount of fusion protein was detected under different expressive conditions, such as different time, different temperature and different concentration of IPTG. The 115 kD fusion protein was obtained and induced by IPTG and it showed that *CsLOX2* gene encoded a 89 kD protein after the 26 kD GST protein tag was removed. The proper induction condition was 37 °C temperature, 0.80 mmol · L⁻¹ IPTG concentration and 10.5 h inducing time.

Keywords: Cucumber; Lipoygenase; Prokaryotic expression

收稿日期: 2013-01-09; 接受日期: 2013-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071813), 陕西省留学人员优先资助项目 (A289021202), 高校基本科研业务费项目 (QN2011088), 西北农林科技大学国际合作基金项目 (A213021102)

作者简介: 陈巧, 女, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜生理与生物技术, E-mail: chenqiaozhen510@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 陈书霞, 女, 副教授, 博士生导师, 专业方向: 蔬菜生理与生物技术, E-mail: shuxiachen@nwsuaf.edu.cn

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是一种重要的世界性蔬菜, 属于葫芦科黄瓜属一年生草本植物, 其果实脆嫩多汁且具有独特的芳香气味, 因而备受人们青睐。目前已分离到的与黄瓜果实芳香气味有关的化合物主要是一些小分子的醇、醛及酯类物质, 如反, 顺-2, 6-壬二烯醇和反, 顺-2, 6-壬二烯醛等 (徐坤范, 2006)。在植物体内, 这些小分子物质主要是由脂氧合酶/脂氢过氧化物裂解酶 (LOX/HPL) 联合催化途径催化产生的 (刘春香等, 2002), 在黄瓜果实芳香物质的形成过程中, 脂氧合酶 (LOX) 主要催化多不饱和脂肪酸形成 9-氢过氧化物 (9-HPOs), HPL 则系统表现为对 9-HPOs 和 13-氢过氧化物 (13-HPOs) 具有相似的催化活性 (Galliard et al., 1976)。目前研究表明, LOX/HPL 联合催化途径是黄瓜芳香物质产生的唯一一条代谢途径。因此, 作为黄瓜果实芳香物质形成途径中的第一个酶, 脂氧合酶催化反应的位置专一性很可能决定了黄瓜果实中 C6、C9 醛含量的高低, 并进一步地决定黄瓜果实风味的浓郁程度。

脂氧合酶 (LOX, EC1. 13. 11. 12) 又叫脂肪氧化酶、胡萝卜素氧化酶、加氧酶或氧合酶, 系统命名为亚油酸根: 氧氧化还原酶 (linoleate: oxygen oxidoreductase), 即亚油酸氧化还原酶, 其广泛存在于植物、哺乳动物及微生物中 (Galliard & Phillips, 1976)。LOX 的分子质量范围一般在 94 ~ 103 kD 之间, 肽段长度在 838 ~ 923 个氨基酸之间, 有 9-LOX 和 13-LOX 两种类型, 是一种含非血红素蛋白质。其专一催化包括亚油酸、亚麻酸、花生四烯酸在内的具有顺, 顺-1, 4-二戊烯结构的多元不饱和脂肪酸, 生成具有共轭双键的过氧化氢物 (Hydroperoxides, HPOD) 9-HPOs 和 13-HPOs (Thanh et al., 2008)。在黄瓜中, HPOs 由氢过氧化物裂解酶 (Hydroperoxides, HPL) 裂解为 C6、C9 醛后再由乙醇脱氢酶 (ADH) 催化为相应的醇类, 醇类物质在酰基转移酶 (AAT) 参与下转化为酯类 (Thanh et al., 2008), 该过程中生成的各种挥发性的小分子醛、醇及酯类物质, 即是黄瓜果实芳香气味的来源 (刘春香等, 2002)。

目前已从苹果、猕猴桃、马铃薯等多种果蔬中发现并克隆得到了脂氧合酶基因。在番茄中就已克隆到 4 种不同的 LOX 基因, 即从果实中得到的 *tomLOXA* 和 *tomLOXB*, 以及从叶片中得到的 *tomLOXC* 和 *tomLOXD* (Heitz et al., 1997)。通过对黄瓜基因组测序及生物信息学分析表明, 黄瓜基因组中可能存在 23 个 LOX 基因 (Liu et al., 2011), 目前已克隆得到了黄瓜中的脂氧合酶基因有 *LOX-1* 基因 (accession No. U25058) (Matsui et al., 1999)、*CrLOX-1* 基因 (accession No. U36339) (Matsui et al., 1998), 以及 *9-LOX* 基因 (accession No. AJ271161) (Matsui et al., 2006), 但对这些基因编码的蛋白的性质及催化反应情况了解较少。Cheng 等 (2006) 对从杨树中克隆得到的 *LOX-1* 和 *LOX-2* 进行了原核表达研究, 汪仁等 (2008) 对水稻的 *LOX-1* 进行了原核表达研究, 试验表明脂氧合酶在体外合成后具有生物活性。本试验在已经克隆的黄瓜 *CsLOX2* 基因 (登录号: KC429651) cDNA 的基础上, 对其进行了生物信息学分析, 构建 p4t-LOX2 原核表达载体, 并在大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达, 为黄瓜 *CsLOX2* 蛋白的进一步分离纯化以及结构和功能的研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

本试验中使用的材料为西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组培育的黄瓜种质材料华北型黄瓜 26 号种质, 其果实具有较高的 2, 6-壬二烯醛/E-2-壬烯醛的比值, 香味浓郁, 具有较强的抗病能力。

试验材料于 2011 年 2 月 20 日在西北农林科技大学园艺学院园艺场塑料大棚内播种, 采用 50 孔穴盘进行基质育苗。当幼苗长到 3 ~ 4 片真叶时定植。定植后 30 d 采摘植株的幼嫩叶片, 采回的样本于液氮中速冻, 置于 -70℃ 超低温冰箱中保存备用。

本试验所用的菌株 DH5 α 和 *E. coli* 菌株 BL21 (DE3) 购自 TIAN-GEN 生物公司, pMD19-T vector、限制性核酸内切酶 *Sal* I、*Not* I、*Taq* DNA 聚合酶、蛋白质 Marker 购自 TaKaRa 宝生物工程公司, Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自沃尔森生物公司, RNA 提取试剂盒购自天恩泽公司。载体 pGEX-4t-1 由徐炎副教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成 根据 *CsLOX2* 的序列和酶切位点, 在起始密码子和终止密码子附近设计引物: Yh1 为 5'-CGCGTGC GACTC-ATGTTTGG AATTGGGAAGA ACATC-3'; Yh2 为 5'-ATA-AGAATGCGGCCGC-TGCCCTTCAAATAGAGATACTGT-3'。上游引物 Yh1 的 5' 端加有 *Sal* I (GTCGACTC) 酶切位点, 下游引物 Yh2 的 5' 端加有 *Not* I (GCGGCCGC) 酶切位点, 便于后面原核表达载体的构建。

1.2.2 原核表达载体 p4t-LOX2 的构建 以先前克隆到的黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 全长 cDNA 为模板, YH1、YH2 为引物, PCR 扩增 *CSLOX2* 的编码框全长序列。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。用 *Not* I 和 *Sal* I 双酶切纯化的 PCR 产物和 pGEX4T-1, 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳后, 切胶回收、连接, 获得重组质粒 p4t-LOX2, 并转化至表达宿主菌 BL21 (DE3), 挑取阳性菌落, 进行 PCR 检测, 提取质粒进行双酶切检测, 以确保重组表达载体的正确性。

1.2.3 编码蛋白的理化性质分析与结构预测 利用生物信息学数据库及在线软件对 *CsLOX2* 基因进行分析。用 Protparam 分析 *CsLOX2* 基因编码蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量、等电点和亲/疏水性等理化性质; 用 TMpred 分析 *CsLOX2* 基因编码蛋白的跨膜区域。

1.2.4 黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 融合蛋白表达形式的确定 将含有重组质粒 p4t-LOX2 和 pGEX-4T-1 空载体的 BL21 (DE3) 菌株于 500 mL 的 LB 液体培养基中 [含氨苄西林 (Amp) 50 mg \cdot L $^{-1}$] 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8, 加入 0.4 mmol \cdot L $^{-1}$ 的 IPTG, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 5 h 后各取出 2.0 mL 菌液, 12 000 r \cdot min $^{-1}$ 离心 1 min, 弃上清液, 加入 100 μ L 1 \times SDS 加样缓冲液重悬后煮沸 5 min, 取 15 μ L 样品进行 10% SDS-PAGE 电泳检测, 考马斯亮蓝 R250 染色, 脱色后观察并分析结果。

1.2.5 黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 融合蛋白表达条件的优化

(1) 适宜诱导时间的优化。将包含重组质粒 p4t-LOX2 的阳性菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 达 0.6 ~ 0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol \cdot L $^{-1}$, 在 30 $^{\circ}\text{C}$ 分别诱导 1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0、10.5 h 后经 SDS-PAGE 电泳检测分析, 选择适宜的诱导时间。

(2) 适宜诱导剂浓度的优化。将包含重组质粒 p4t-LOX2 的阳性菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 达 0.6 ~ 0.8, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0.01、0.02、0.04、0.10、0.40、0.80、1.20 mmol \cdot L $^{-1}$, 诱导培养 6 h, 经 SDS-PAGE 电泳检测分析, 选择适宜的诱导剂浓度。

(3) 适宜诱导温度的优化。将包含重组质粒 p4t-LOX2 的阳性菌在 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 OD₆₀₀ 达 0.6 ~ 0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.4 mmol \cdot L $^{-1}$, 分别在 18、22、26、30、34、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 6 h。经 SDS-PAGE 电泳检测分析, 选择适宜的诱导温度。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体的构建及重组子的鉴定

通过 PCR 方法, 以带有特异性酶切位点的引物 Yh1 和 Yh2 扩增到黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 的 ORF 区全长, 扩增产物利用 *Not* I 和 *Sal* I 酶切, 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 可见 1 条约 2 640 bp 的 DNA 片段 (图 1), 该片段与预期 PCR 产物长度一致, 将此片段切胶回收。

将 pGEX-4T-1 载体用 *Sal* I 和 *Not* I 酶切后经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2), 回收大小约为 4 900 bp 的目的条带。将两次的回收产物用 T4DNA 连接酶连接, 构建重组子 p4t-LOX2。构建的重组子使用酶切和 PCR 分析方法进行鉴定。经双酶切检测得到约 4 900 bp 的 pGEX-4T-1 线性片段和约 2 640 bp 的插入片段 (图 3); PCR 检测得到同样为 2 640 bp 的条带 (图 4)。测序结果显示, *CsLOX2* 的开放阅读框与 pGEX-4T-1 的蛋白阅读框完全吻合, 没有移码。检测结果表明已成功地构建黄瓜 *CsLOX2* 的原核表达重组质粒 p4t-LOX2。

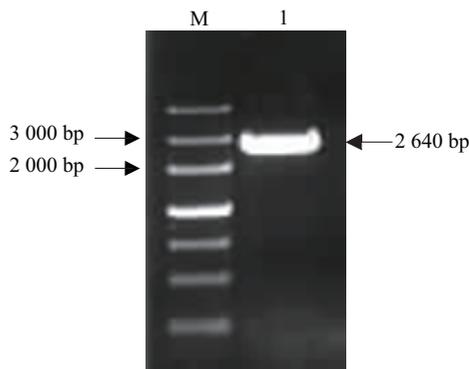


图 1 *CsLOX2* 的 CDS 序列

M: DL 5 000 Marker; 1: CDS 产物。

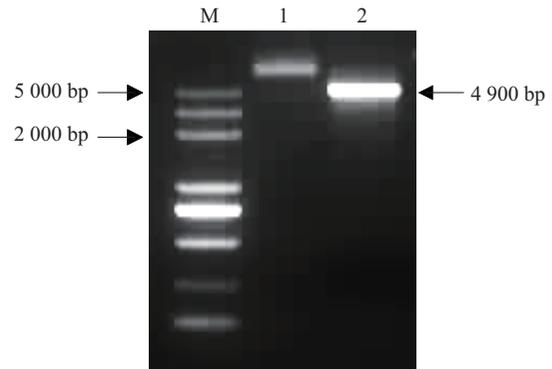


图 2 pGEX-4T-1 载体酶切结果

M: DL 5 000 Marker; 1: pGEX-4T-1 载体的质粒; 2: 双酶切的 pGEX-4T-1。

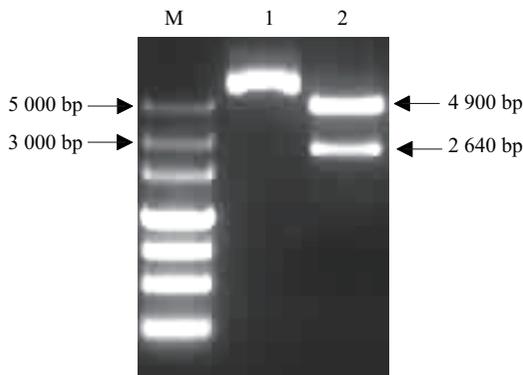


图 3 重组质粒 p4t-LOX2 的双酶切结果

M: DL 5 000 Marker; 1: 重组质粒; 2: 双酶切的重组质粒 p4t-LOX2。

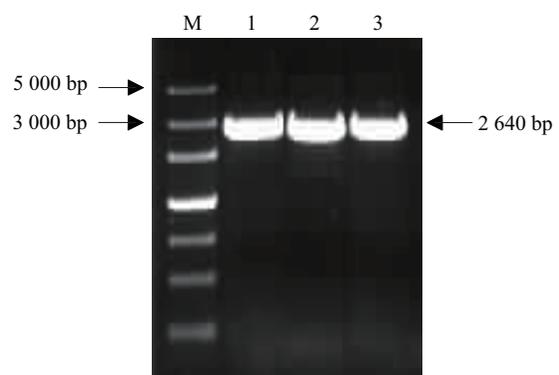


图 4 重组质粒 p4t-LOX2 的 PCR 检测

M: DL 5 000 Marker; 1~3: 重组载体 p4t-LOX2 PCR 检测结果。

2.2 黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 编码蛋白的理化性质及结构预测

2.2.1 黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 编码蛋白的理化性质分析 应用 ProtParam 预测黄瓜 *CsLOX2* 基因编码蛋白的理化性质, 推测出该蛋白的相对分子质量为 99.36 kD, 分子式为 $C_{4490}H_{6945}N_{1203}O_{1312}S_{13}$, 等电点 (pI) 为 6.28, 不稳定系数 (instability index) 是 39.18, 属于稳定蛋白。该蛋白中组成相对较多 (超过 10%) 的氨基酸为亮氨酸 (Leu) 94 个, 占 10.4%, 其余的皆小于 8%; 带负电荷的氨基酸残基总数 (Asp+Glu) 为 111 个, 总的正电荷氨基酸残基 (Arg+Lys) 总数为 102 个。用 DNASTAR 进行亲疏水性分析, 显示出明显的亲水性, 为水溶性蛋白。

2.2.2 黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 编码蛋白的结构预测 利用在线 TMpred 软件 (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) 分析黄瓜 *CsLOX2* 基因编码的蛋白的跨膜区域, 结果表明该蛋白有 5 个主要的跨膜区, 其中 4 个是从膜内向膜外的螺旋, 分别从 11 到 31、70 到 88、716 到 737 和 774 到 796, 其中从 774 到 796 是跨膜最多的区域, 1 个是从膜外向膜内的螺旋,

为 287 到 313。

2.3 黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 融合蛋白在大肠杆菌中的诱导表达及表达形式的确定

将具有 *CsLOX2* cDNA 的重组质粒 p4t-*LOX2* 转入大肠杆菌 BL21 (DE3) 后, 加入终浓度为 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导, 以未诱导的 pGEX-4T-1 空载体为对照, 在 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下诱导 5 h, 将诱导菌经超声波处理后, 离心收集上清和沉淀, 分别制样进行 SDS-PAGE 分析。结果 (图 5) 表明在沉淀中表观分子量约为 115 kD 处有条带, 上清中该处没有出现条带, 这说明 GST/*CsLOX2* 融合蛋白在诱导条件下获得了表达, 且是以包涵体形式表达的。获得的重组蛋白约为 115 kD, 除去 pGEX-4T-1 自身诱导的约 26 kD 的 GST 标签蛋白, *CsLOX2* 编码一条约 89 kD 的蛋白。

2.4 黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 融合蛋白表达条件的优化

(1) 适宜诱导时间的优化。阳性重组菌在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养条件下, 分别诱导培养 1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0、10.5 h, 经 SDS-PAGE 分析表明, 融合蛋白表达量随着诱导时间的延长而增加 (图 6), 诱导 10.5 h 表达量最大, 说明较长时间的诱导有助于融合蛋白的大量表达。

(2) 适宜诱导剂浓度的优化。阳性重组菌在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养条件下, 加入 IPTG 分别至终浓度为 0.01、0.02、0.04、0.10、0.40、0.80、 $1.20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 诱导培养 5 h 后, 经 SDS-PAGE 电泳分析, 表明融合蛋白的表达量随 IPTG 浓度的增加逐渐增加 (图 7), IPTG $0.80 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时融合蛋白表达量最大, 随后表达量下降。

(3) 适宜诱导温度的优化。阳性重组菌加 $0.40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 后, 分别在 18、22、26、30、34、 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导培养 6 h, SDS-PAGE 电泳结果表明, 融合蛋白的表达量随诱导温度的增加逐渐增加 (图 8), 在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 达到最大量。

3 结论与讨论

LOX 催化的脂肪酸代谢途径是多种果蔬香气物质形成的重要来源, 目前对草莓 (Perez et al., 1999)、苹果 (Echeverria et al., 2004; Defilippi et al., 2005)、番茄 (Chen et al., 2004) 和猕猴桃 (Zhang et al., 2009) 等果实中 LOX 催化途径产生 C6 类醇和醛进行了研究。在大多数果蔬中, 作为 C6 类醛和醇的前体物质的不饱和脂肪酸大量存在于植物细胞的类囊体中, LOX 可以作为启动因子促使叶绿体向有色体转化时类囊体膜结构的裂解 (Ferrie et al., 1994; Griffiths et al., 1999), 进而确保脂氧合酶/脂氢过氧化物裂解酶 (LOX/HPL) 联合催化途径的

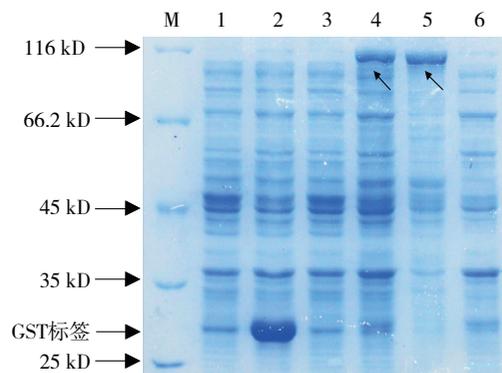


图 5 黄瓜 *CsLOX2* 基因融合蛋白表达形式 SDS-PAGE 的结果

M: 蛋白质 Marker; 1: 未加 IPTG 诱导的对照的总蛋白; 2: 加 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 5 h 的对照的总蛋白; 3: 未加 IPTG 诱导的重组载体的总蛋白; 4: 加 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 5 h 的重组菌的总蛋白; 5: 加 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 4 h 的重组菌沉淀; 6: 加 $0.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导 5 h 的重组菌上清。

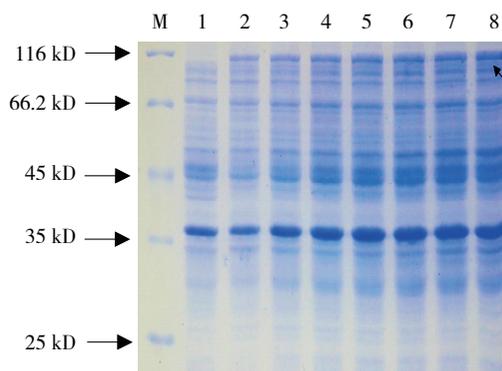


图 6 不同诱导时间诱导表达黄瓜 *CsLOX2* 基因融合蛋白的 SDS-PAGE 结果

M: 蛋白质 Marker; 泳道 1~8 分别为: 0、1.5、3.0、4.5、6.0、7.5、9.0、10.5 h 的诱导时间。

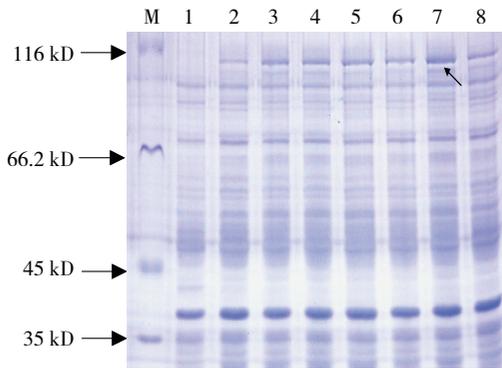


图7 不同IPTG浓度诱导表达黄瓜*CsLOX2*基因融合蛋白的SDS-PAGE结果

M: 蛋白质 Maker; 泳道 1: 未诱导的 p4t-LOX2 载体; 泳道 2~8 分别为: 0.01、0.02、0.04、0.10、0.40、0.80、1.20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG。

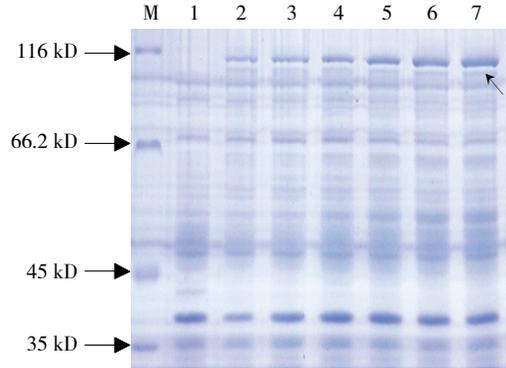


图8 不同诱导温度诱导表达黄瓜*CsLOX2*基因的融合蛋白的SDS-PAGE结果

M: 蛋白质 Maker; 泳道 1: 未诱导的 p4t-LOX2 载体; 泳道 2~7 分别为: 18、22、26、30、34、37 °C 的诱导温度。

进行。研究表明,使用 LOX 作用抑制剂 [stannous (tin II) chloride] 处理猕猴桃果实,可以显著降低其 C6 类芳香物质的含量 (Zhang et al., 2009)。LOX 反义 RNA 的转基因番茄果实中 C6 类醛和醇中的己烯醛和己烯醇水平被抑制了 98.5%, 丧失了果实特有的香气特征 (Chen et al., 2004)。由此可知 LOX 对于果实芳香物质合成具有重要作用。

本试验从华北型黄瓜种质 26 号的幼叶基因组中克隆到脂氧合酶基因 *CsLOX2*, 利用生物信息学对该基因编码的蛋白进行分析, 结果表明 *CsLOX2* 蛋白有明显的亲水性, 为水溶性蛋白。该蛋白序列含有 5 个主要的跨膜区。通常含有跨膜区的蛋白往往和细胞的功能密切相关, 说明它可能作为膜受体参与细胞内物质的转移。

本试验在获得 *CsLOX2* 基因全长的基础上, 通过构建原核表达载体, 诱导表达出 115 kD 的 GST/*CsLOX2* 融合蛋白, 这与预测值 125 kD (*CsLOX2* 分子量 99 kD, GST 标签蛋白分子量 26 kD) 不完全相同, 可能是由于将真核生物的基因导入原核细胞进行表达所造成的。可溶性分析表明 GST/*CsLOX2* 融合蛋白主要以包涵体形式表达; 对融合蛋白表达条件的优化分析表明, 在 37 °C, 0.80 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ IPTG 诱导表达 10.5 h, 融合蛋白的表达量达到最大, 这说明较高的诱导温度及较长的诱导时间有助于融合蛋白的大量表达。

华北型黄瓜种质 26 号中克隆的 *CsLOX2* 可在大肠杆菌中得到高效的表达, 但表达产物主要以包涵体形式存在于沉淀中, 可能由于较高的诱导温度使得原核表达的目标重组蛋白多以包涵体的形式存在, 而要使包涵体蛋白具有生物活性需经过复杂的复性过程 (Schein, 2001)。有研究者通过改善诱导条件, 使目的蛋白的可溶性提高。汪仁等 (2008) 对水稻 LOX-1 的研究发现较高温度 (37 °C) 诱导使得目标重组蛋白多以包涵体形式存在, 而较低温度 (20 °C) 诱导时, 可以抑制包涵体的形成, 从而增加可溶性蛋白形式存在的重组蛋白。在本试验中, 通过优化各种诱导条件 (如表达菌株、诱导温度、IPTG 浓度、诱导时间) 都未能得到可溶性的目的蛋白。然而, 包涵体蛋白的复性是一项复杂、困难的工作, 为了得到纯化的蛋白需要寻求一种最适合的方法。

本试验是在已经克隆到黄瓜脂氧合酶基因 *CsLOX2* 的基础上, 构建了重组原核表达载体 p4t-LOX2, 转化重组质粒 p4t-LOX2 到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 得到约为 115 kD 的融合蛋白。在 37 °C 下, 经 0.80 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导 10.5 h 可获得融合蛋白的最大表达量。下一步要进行的是对原核表达的黄瓜 *CsLOX2* 蛋白进行纯化和分离, 为深入探讨 *CsLOX2* 的功能和作用

途径提供可能。

参考文献

- 刘春香, 何启伟, 刘扬岷. 2002. 黄瓜香气成分的顶空固相微萃取气质联用分析. 园艺学报, 29(6): 581-583.
- 汪仁, 沈文彪, 江玲, 刘玲珑, 翟虎渠, 万建民. 2008. 水稻脂氧合酶基因 *OsLOX1* 的原核表达、纯化及鉴定. 中国水稻科学, 22(2): 118-124.
- 徐坤范. 2006. 不同季节黄瓜果实芳香物质含量变化及氮对风味品质的影响 [硕士学位论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Chen G P, Hackett R, Walker D, Taylor A, Lin Z F, Grierson D. 2004. Identification of a specific isoform of tomato lipoxygenase (tomlox) involved in the generation of fatty acid-derived flavor compounds. *Plant Physiology*, 136(1): 2641-2651.
- Cheng Q, Zhang B, Zhuge Q, Zeng Y, Wang M, Huang M. 2006. Expression profiles of two novel lipoxygenase genes in populus deltoides. *Plant Science*, 170(6): 1027-1035.
- Defilippi B G, Dandekar A M, Kader A A. 2005. Relationship of ethylene biosynthesis to volatile production, related enzymes, and precursor availability in apple peel and flesh tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8): 3133-3141.
- Echeverria G, Graell J, Lopez M L, Lara I. 2004. Volatile production, quality and aroma-related enzyme activities during maturation of 'fuji' apples. *Postharvest Biology and Technology*, 31(3): 217-227.
- Ferrie B J, Beaudoin N, Burkhardt W, Bowsher C G, Rothstein S J. 1994. The cloning of 2 tomato lipoxygenase genes and their differential expression during fruit ripening. *Plant Physiology*, 106(1): 109-118.
- Galliard T, Phillips D R. 1976. The formation of cis-3-nonenal, trans-2-nonenal and hexanal from linoleic acid hydroperoxide isomers by a hydroperoxide cleavage enzyme system in cucumber (*Cucumis sativus*) fruits. *Biochimica et Biophysica Acta*, 441: 181-192.
- Griffiths A, Barry C, Alpuche-Solis A G, Grierson D. 1999. Ethylene and developmental signals regulate expression of lipoxygenase genes during tomato fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 50(335): 793-798.
- Heitz T, Bergey D R, Ryan C A. 1997. A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology*, 114(3): 1085-1093.
- Liu S Q, Liu X H, Jiang L W. 2011. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of the lipoxygenase gene family in cucumber. *Genetics and Molecular Research*, 10(4): 2613-2636.
- Matsui K, Nishioka M, Ikeyoshi M, Matsumura Y, Mori T, Kajiwara T. 1998. Cucumber root lipoxygenase can act on acyl groups in phosphatidylcholine. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1390(1): 8-20.
- Matsui K, Hijiyama K, Tabuchi Y, Kajiwara T. 1999. Cucumber cotyledon lipoxygenase during postgerminative growth. Its expression and action on lipid bodies. *Plant Physiology*, 119(4): 1279-1287.
- Matsui K, Minami A, Hornung E, Shibata H, Kishimoto K, Ahnert V, Kindl H, Kajiwara T, Feussner I. 2006. Biosynthesis of fatty acid derived aldehydes is induced upon mechanical wounding and its products show fungicidal activities in cucumber. *Phytochemistry*, 67(7): 649-657.
- Perez A G, Sanz C, Olias R, Olias J M. 1999. Lipoxygenase and hydroperoxide lyase activities in ripening strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1): 249-253.
- Schein C H. 2001. Producing soluble recombinant RNases and assays to measure their interaction with interferon-gamma in vitro. *Methods in Molecular Biology*, 160: 113-137.
- Thanh H T, Vergoignan C, Cachon R, Kermasha S, Gervais P, Nguyen T X S, Belin J M, Husson F. 2008. Recombinant hydroperoxide lyase for the production of aroma compounds: effect of substrate on the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 52-53: 146-152.
- Zhang B, Yin X R, Shen J Y, Chen K S, Ferguson I B. 2009. Volatiles production and lipoxygenase gene expression in kiwifruit peel and flesh during fruit ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134(4): 472-477.