

文章编号:1674-7054(2011)02-0117-06

橡胶 *HbJAZ1* 基因的原核表达与纯化分析

刘伟,翟金玲,许慧敏,黄惜

(海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/海南大学 农学院 生物科学技术研究所,海南 海口 570228)

摘要: 为了鉴定巴西橡胶树中存在与 JAZ 蛋白特异性结合的蛋白,利用 pGEX-6p-1 载体构建橡胶 JAZ (*HbJAZ1*) 与 GST (Glutathione S-transferase) 融合表达载体,并成功转化大肠杆菌进行原核表达,同时利用谷胱甘肽-琼脂糖填料成功纯化 *gcHbJAZ1*-GST 融合表达蛋白。在纯化实验中,发现 *HbJAZ1* 融合表达蛋白在大肠杆菌原核表达中是难溶蛋白,大多存在于裂解菌液的沉淀物中。

关键词: 巴西橡胶树; JAZ; 原核表达; 蛋白纯化

中图分类号: Q 781

文献标志码: A

天然橡胶是一种重要的战略物资,巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)是天然橡胶的主要来源。乳管是橡胶树合成和贮存胶乳的重要器官^[1]。在橡胶乳管分化和产胶机理的研究中,发现机械损伤和排胶能够促进乳管分化,外施茉莉酸也能够诱导乳管分化,这说明茉莉酸是调控橡胶树乳管分化的重要信号分子^[2-3]。茉莉酸(jasmonic acid, JA)是植物体中十八碳脂肪酸(亚麻酸)的衍生物,它是一种重要的植物激素,不仅参与植物对机械损伤、虫害和病害的反应,还在植物生长和发育中起重要作用^[4-5]。茉莉酸信号途径被认为是早期陆地植物适应环境中存在的大量生物胁迫与非生物胁迫所使用的信号传导方式^[6]。对于茉莉酸信号途径的研究,在2007年,Chini等和Thines等在拟南芥突变体中鉴定到茉莉酸信号调控途径中起关键作用的 JAZ 基因家族将几个信号传递通路连接起来,这使人们对茉莉酸信号途径有了一个相对完整的认识^[7-8]。JAZs 属于一个叫 TIFY 蛋白的大基因家族,它们具有一个定位于 ZIM domain 中的高度保守的 TIF[F/Y]XG 序列^[9]。JAZs 不含有任何已知的 DNA 结合结构域,但是有些 JAZs 被证明定位于细胞核^[7-9]。JAZ 蛋白的明显特征是定位于 C 端附近的 jas 基序(SLX2FX2KRX2RX5PY)^[6]。到目前为止,只在拟南芥上鉴定了1个受 JAZ 调控的 MYC2 转录因子,该基因的 Knot-out 突变体并未完全终止茉莉酸信号,这说明还有其他茉莉酸相关调控因子未被鉴定, JAZ 蛋白可能还有其他目标基因。橡胶 JAZ 基因最近已被鉴定^[10],但在橡胶中与 JAZ 互作的蛋白尚未见报道。为了鉴定巴西橡胶树中与 JAZ 蛋白特异性结合的蛋白,笔者采用 RT-PCR 扩增 *HbJAZ1* 基因,利用 pGEX-6p-1 载体,构建橡胶 *HbJAZ1* 与 GST (Glutathione S-transferase) 融合表达载体,然后进行原核表达和融合蛋白的纯化研究,其结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料 巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)热研 7-33-97 的叶片均采自本实验室种植在实验田中的巴西橡胶树。pMD-20T 载体购自 Takara 公司;大肠杆菌 DH5a 菌株和原核表达载体 pGEX-6p-1 为本实验室保存;原核表达 BL21 菌种(Transetta 一种 BL21 的衍生菌)购自北京全式金生物技术有限公司;Taq DNA 聚合酶购自天根生化科技有限公司;T₄ DNA 连接酶购自 NEB 公司;限制性内切酶和反转录试剂盒购自 Fermentas 公司;凝胶回收试剂盒与质粒 DNA 小量试剂盒购自 AxyGen 公司;其他生化试剂和常规试剂均

收稿日期:2011-04-05

基金项目:国家自然科学基金项目(31060107);教育部高等学校博士学科点专项科研基金博导类项目(20104601110003);海南大学 211 工程项目“热带作物遗传育种与生态保育”经费资助。

作者简介:刘伟(1983-),男,天津人,海南大学农学院生物化学与分子生物学 2008 级硕士研究生。

通信作者:黄惜, xihuang01@gmail.com

为国产超纯和分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 扩增橡胶 *HbJAZ1* 基因 参照 Kiefer 等人^[11]的方法从叶片提取橡胶总 RNA。取嫩叶片 1 g 在液氮中研磨后,转入在冰上预冷的 50 mL 离心管中,然后加入 10 mL 65 °C 预热的 2 × CTAB 提取液和 500 μL β-巯基乙醇,剧烈涡旋匀浆后 65 °C 水浴 30 min。加入 10 mL 混合液(水饱和的 $V_{酚}:V_{氯仿}:V_{异戊醇} = 25:24:1$) 涡旋混匀,冰浴 5 min。4 °C, 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取上清,加入等体积的混合液($V_{氯仿}:V_{异戊醇} = 24:1$) 涡旋混匀 5 min,冰浴 5 min。4 °C, 14 000 r · min⁻¹ 离心 10 min。取上清,加入 1/3 体积 8 mol · L⁻¹ 的 LiCl 至终浓度为 2 mol · L⁻¹, -20 °C 沉淀过夜。4 °C, 14 000 r · min⁻¹ 离心 30 min。弃上清,将沉淀溶于 1 mL DEPC 水中,转移至 1.5 mL DEPC 处理过的离心管中,加入 8 mol · L⁻¹ 的 LiCl 使其终浓度为 2 mol · L⁻¹, -20 °C 再次沉淀过夜。4 °C, 14 000 r · min⁻¹ 离心 30 min。弃上清,沉淀用 500 μL 预冷的 φ = 75% 的乙醇漂洗 2 次。弃上清,沉淀置于超净工作台上晾干,最后将沉淀溶于 20 μL DEPC 水中,放于 -80 °C 保存备用。

RNA 样品进行反转录之前,用 *DNase I* 消化 RNA 样品中携带的少量 DNA。50.0 μL 体系中 20.0 μL RNA 样品加入 *DNase I* (RNase-free) 5.0 μL, 10 × *DNase I* Buffer 5 μL, DEPC 水 20.0 μL。在离心管中依次加入以上成分后,轻轻混匀,于 37 °C 水浴反应 60 min,加入 1/10 体积 3 mol · L⁻¹ 的 NaAc (pH 5.2) 和 2.5 倍体积无水乙醇, -20 °C 沉淀 1 h,随后离心收集沉淀,用 φ = 75% 的乙醇清洗沉淀,沉淀置于超净工作台上干燥,并用适量的 DEPC 水溶解。

反转录方法参照 Fermentas 公司反转录试剂盒 (#K1621) 说明书进行,具体步骤如下:根据已发表的 *AtJAZ1* 的序列设计引物^[10] P1 (CTGGGATCCATGGCTGGCTCGCCGGAATTTG) 和 P2 (CGAGTCGACATGGT-GATGGTGATGGTGTGCAAAGATTGACCAGCCAGGC); 以巴西橡胶树树叶 RNA oligo dT 反转录获得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增; P1 和 P2 各 1.0 μL, 10 × PCR Buffer 5 μL, dNTPs (10 mmol · L⁻¹) 和 *Taq* DNA 聚合酶 (5 U · μL⁻¹) 各 1.0 μL, cDNA 模板 1.0 μL, 加入 ddH₂O 补至 50 μL。预变性 95 °C 5 min; 95 °C 变性 45 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 次循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经电泳检测后,切胶回收与 T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5a,测序后,用 *Bam*H1 和 *Sal*I 双酶切 *HbJAZ1*-T 载体,电泳后切胶回收目的片段,然后与用相同的限制性内切酶线性化的载体连接,构建 pGEX-6p-1-*HbJAZ1* 表达载体,转化大肠杆菌 BL21,筛选阳性克隆。

1.2.2 *HbJAZ1* 基因的原核表达及纯化 原核表达的方案参照 pET 系统操作手册第 10 版,具体步骤如下:将构建好的 BL21 甘油菌种和 pGEX-6p-1 空质粒的 BL21 甘油菌种,各取 10 μL 转接于 5 mL 的 LB 液体培养基中, 37 °C, 190 r · min⁻¹ 条件下振荡培养过夜。将过夜培养的种子液,按 $V_{种子液}:V_{LB} = 1:100$ 的比例转接于摇瓶表达的 LB 液体培养基中, 37 °C, 190 r · min⁻¹ 条件下振荡培养至 OD_{600} 为 0.3 ~ 0.5 (需要 2.0 ~ 2.5 h)。加入 100 mmol · L⁻¹ IPTG 储液至终浓度为 1.0 mmol · L⁻¹, 继续培养 2 ~ 4 h。于 2 h 和 4 h 各取 1 mL 菌液, 7 300 r · min⁻¹ 离心,吸干菌液,菌体保存于 -80 °C 冰箱。将菌体重悬于 160 μL 灭菌水中,混匀后,加入 40 μL 5 × SDS-PAGE 上样缓冲液混合, 95 °C 迅速加热 8 min,置于冰上 2 min 后, 8 000 r · min⁻¹ 离心, SDS-PAGE 分析($w = 5\%$ 的浓缩胶, $\mu = 12\%$ 的分离胶) 考马斯亮蓝 R250 染色,具体操作参照文献 [12-13]。

蛋白质的纯化参照文献 [13] 的方法,具体步骤如下:轻轻颠倒盛有谷胱甘肽-琼脂糖树脂的容器,将树脂混成匀浆。取部分匀浆放入 1.5 mL 聚丙烯管中(每 100 mL 细菌培养物需要 2 mL 匀浆), 4 °C, 2 300 r · min⁻¹ 离心 5 min,小心吸出上清。在树脂中加入 10 倍柱床体积的冷的 PBS,颠倒数次,混合均匀, 4 °C, 2 300 r · min⁻¹ 离心 5 min,小心吸出上清。每毫升树脂加入 1 mL 冷的 PBS,制成 φ = 50% 的匀浆,颠倒数次,混合均匀,悬液冰上放置待用。

4 °C, 7 300 r · min⁻¹ 离心 15 min,收集菌体,每 100 mL 培养物的细胞沉淀悬于 4 mL PBS。加入溶菌酶至终质量浓度为 1 g · L⁻¹,冰上放置 30 min。用针筒将 10 mL φ = 0.2% 的 Triton X-100 强行注入黏的细胞裂解物中,剧烈振动数次混匀。加入 *Dnase* 和 *Rnase* 至终质量浓度 5 mg · L⁻¹, 4 °C 振动 10 min。4 °C, 5 700 r · min⁻¹ 离心 30 min,去除不溶性细胞碎片。将上清(细胞裂解物)转移到 1 支干净的试管中,加入 DTT 至终浓度为 1 mmol · L⁻¹。

细胞裂解物与适量 $w = 50\%$ 的谷胱甘肽-琼脂糖树脂匀浆混合, 每 100 mL 细菌培养物加 2 mL 树脂, 于室温轻摇 30 min。混合物于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $2\ 300\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 小心去掉上清并留少许样品进行 SDS-PAGE 分析。沉淀中加入 10 倍柱床体积的 PBS, 颠倒离心管数次, 混匀后洗去未与树脂结合的蛋白。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $2\ 300\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 小心去掉上清并留少许样品进行 SDS-PAGE 分析, 重复洗涤 2 次。加入 1 倍柱床体积的谷胱甘肽洗脱缓冲液洗脱, 室温轻轻搅动 10 min, 洗脱树脂上结合的蛋白。混合物于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $2\ 300\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 将上清移至干净的试管中, 进行 SDS-PAGE 分析。重复洗脱 2 次, 上清移至干净的试管中进行 SDS-PAGE 分析。

不溶性蛋白的纯化步骤: $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $7\ 300\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集菌体, 每 100 mL 培养物的细胞沉淀悬于 4 mL PBS。加入溶菌酶至终质量浓度 $1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 冰上放置 30 min。细胞裂解物在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 $10\ 400\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 移出上清保留, 将沉淀悬于 8 mL 混合液中 [$w = 1.5\%$ 的 N-十二烷基肌酸钠, $25\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三乙醇胺, $1\ \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA (pH8.0)]。于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 静置 10 min, 然后 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ $10\ 400\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。与上清合并后, 按照可溶性蛋白纯化步骤进行上柱、洗涤、洗脱, 然后进行 SDS-PAGE 分析。

2 结果

2.1 橡胶 *HbJAZ1* 基因的扩增

采集巴西橡胶树(热研 7-33-97)的叶片材料, 用 CTAB 法提取叶片总 RNA, 经过 LiCl 重沉淀后, 用 RNase free 的 DNase 处理去掉基因组 DNA 污染, 结果如图 1a 所示。以橡胶 cDNA 为模板, 以 P1: 1 250 和 P2: 1 251 为引物 PCR 扩增 *HbJAZ1* 基因, 如图 1b 所示, 1 号是橡胶脱水素的阳性对照, 2 号为 *HbJAZ1* 基因, 与预计的大小 855 bp 相符。将该 PCR 片段与 T 载体 pMD-20T 连接, 转化大肠杆菌 DH5a 菌株, 筛选阳性克隆后, 测序结果正确。

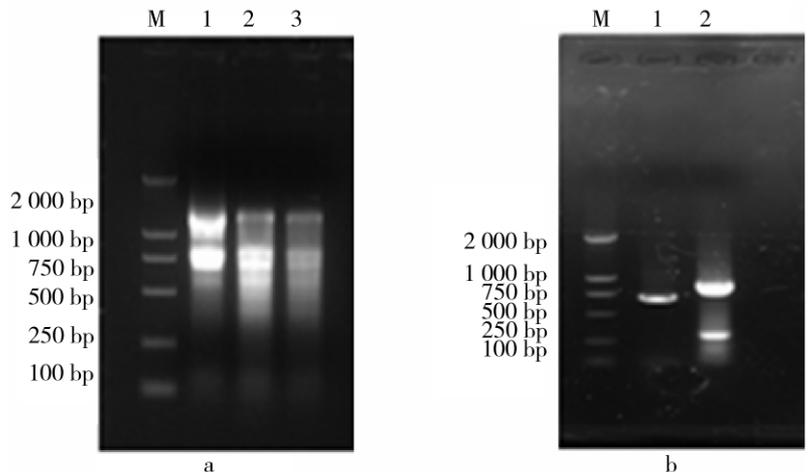


图 1 橡胶 *HbJAZ1* 基因的扩增

a. 橡胶总 RNA 提取; b. 橡胶 *HbJAZ1* 基因的 PCR 产物。M 是 Marker(宝生物 DL2000); 在图 1b 中, 1 是以图 1a 中 3 号 cDNA 为模板的橡胶脱水素基因产物; 在图 1b 中 2 是以图 1a 中 3 号 cDNA 为模板的 *HbJAZ1* 基因的 PCR 产物。

2.2 PCR 扩增 *HbJAZ1* 基因与构建表达载体 构建 pGEX-6p-1-*HbJAZ1* 表达载体, 转化大肠杆菌 DH5a 菌株, 筛选阳性克隆并双酶切鉴定, 结果如图 2a 所示, 测序结果正确后, 用此质粒转化大肠杆菌 BL21, 筛选阳性克隆, 结果如图 2b 所示。

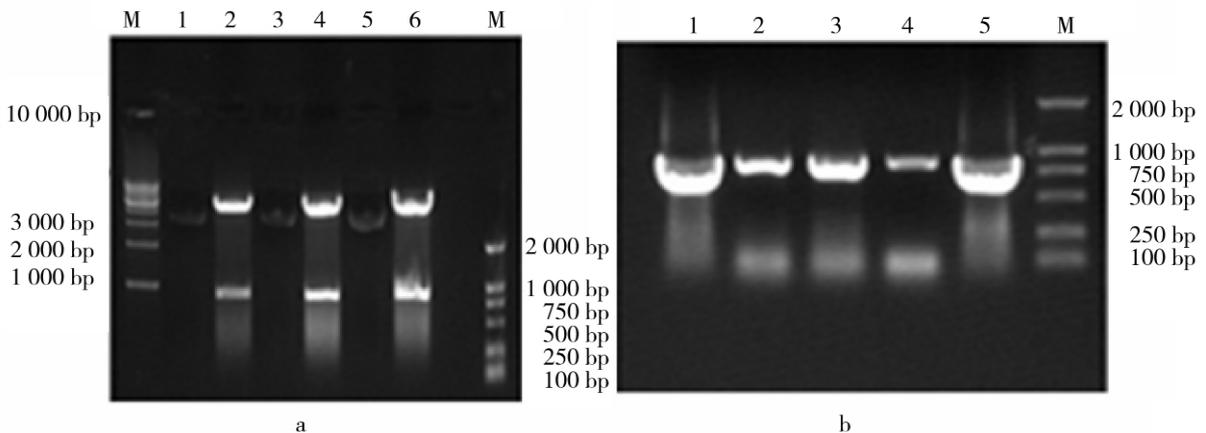


图 2 橡胶 *HbJAZ1* 基因 GST 融合表达载体的构建及检测

a. 双酶切鉴定 pGEX-6p-1-*HbJAZ1*, M 是 Marker(申能博彩生物 perfect 1kb Ladder); 1 3 5 是未酶切质粒对照; 2 4 6 是双酶切质粒。b. 转化 BL21 后菌液 PCR 检测, M 是 Marker(宝生物 DL2 000); 1 5 是阳性对照; 2 3 4 是转化 BL21 的菌液 PCR 检测。

2.3 蛋白质表达及纯化 选取4个BL21阳性克隆进行震荡预表达 将预培养液按照 $V_{\text{预培养液}}:V_{\text{主培养液}} = 1:10$ 的接种量接种主培养液 37 °C 条件下 培养约 2 h 当 OD_{600} 达到 0.3 左右后 加入 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 储液至终浓度 $2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 继续培养 4 h 取 1 mL 菌液离心收集菌体后 进行 SDS-PAGE 分析 结果如图 3 所示 3 5 6 号菌株出现诱导表达蛋白 随后以 3 号菌株作为后续实验的表达菌株。

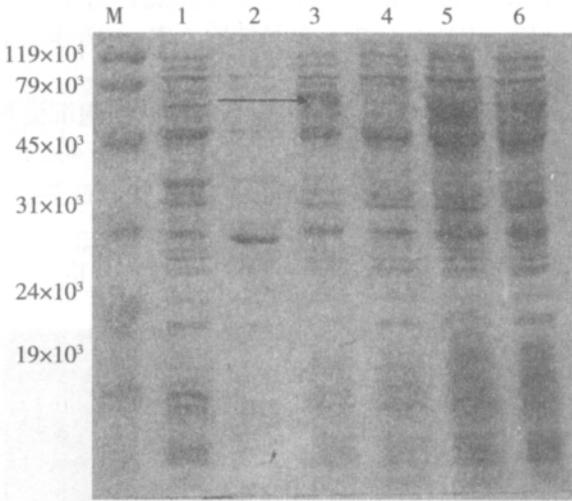


图3 筛选 pGEX-6p-1-HbJAZ1 原核表达菌株

M 是 Marker(Fermentas SM0441);1 和 2 分别是 pGEX-6p-1 空载体未有诱导和诱导 3 h 的蛋白样品;3~6 转化后的 BL21 菌株样品,箭头所指的条带为诱导的融合表达蛋白。

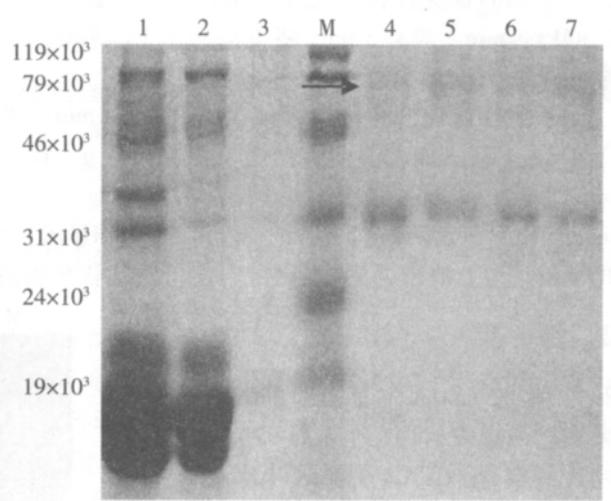


图4 菌体裂解液中蛋白纯化

M 是 Marker(Fermentas SM0441);1 是菌体裂解液离心后上清;2 是过柱后蛋白样品;3 是洗涤非特异性结合蛋白;4 和 6 是第 1 次谷胱甘肽洗脱;5 和 7 是第 2 次谷胱甘肽洗脱。箭头所指的条带为诱导的融合表达蛋白。

用 $1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导融合蛋白,然后将细菌离心并进行溶菌酶裂解 将裂解后的菌液进行再离心 取上清液与谷胱甘肽-琼脂糖混合震荡 使融合蛋白与谷胱甘肽-琼脂糖结合 SDS-PAGE 分析可以看到 细菌上清液在谷胱甘肽-琼脂糖凝胶结合后 GST-标签蛋白明显变浅(图 4 条带 1~2)。用谷胱甘肽洗脱后 洗脱出谷胱甘肽-琼脂糖结合的蛋白 纯化后融合蛋白的条带似乎略微比纯化前大 位于 $46 \times 10^3 \sim 79 \times 10^3$ 之间 这可能是由于电泳时电压不均匀引起条带扭曲而造成的(图 4 条带 4~6)。纯化后的融合表达蛋白条带比较淡 但 GST 标签很清楚。造成以上结果的原因有可能是由于洗脱液稀释的缘故 也可能是由于融合蛋白在裂解和离心后没有释放到上清液中 而保留在沉淀物中造成的。

为了验证融合蛋白在裂解和离心后是否保留在沉淀物中 笔者将菌体裂解离心后所得沉淀 使用分子克隆实验指南提供的不溶性蛋白纯化方案进行纯化。

纯化后的 SDS-PAGE 分析显示 在 79×10^3 与 46×10^3 之间也能看到较浅的纯化的目的蛋白 说明融合蛋白确实不溶于上清液而更多保留在沉淀物中(图 5 条带 4~6)。图 4 与图 5 相比, GST 标签蛋白在沉淀物的纯化产物中的条带很淡 说明 GST 标签蛋白可能是可溶性蛋白 所以在沉淀物中的存量很少。

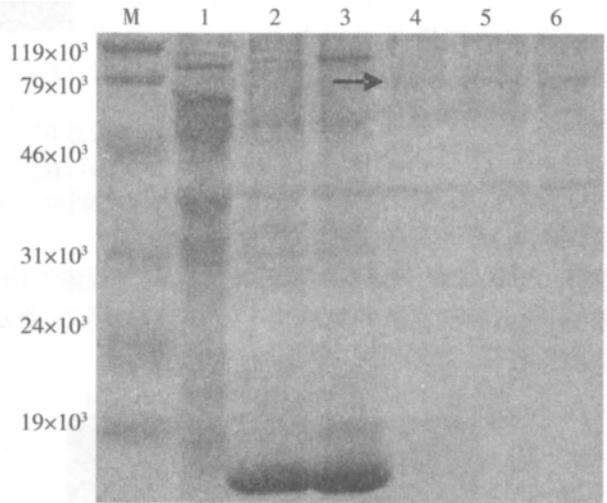


图5 菌体裂解后沉淀中纯化的目的蛋白

M 是 Marker(Fermentas SM0441 prestained Protein Molecular Weight Marker);1 是 6 h, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IPTG 诱导的蛋白样品;2 是菌体裂解液离心后沉淀重溶解后蛋白样品;3 是过柱后蛋白样品;4 是第 1 次谷胱甘肽洗脱;5 是第 2 次谷胱甘肽洗脱;6 是第 3 次谷胱甘肽洗脱样品。箭头所指的条带为诱导的融合表达蛋白。

3 讨论

原核表达是体外获得目的蛋白常用的分子生物学技术,具有安全、高效、操作简单、成本低廉等特点^[14]。如前言所述, *HbJAZ1* 是茉莉酸信号途径中的关键阻遏蛋白,为了分离与之互作的蛋白,本研究采用 GST-tag 融合技术,在大肠杆菌表达 GST-*HbJAZ1* 融合蛋白,然后探寻融合蛋白的纯化分离的方法。

本实验在发酵时,为了获得良好的通气,培养基的含量是摇瓶体积的 10%,一般情况下,培养基最多只能是摇瓶体积的 20%^[15]。GST-tag 可增加目的蛋白的可溶性,融合蛋白的可溶性问题是纯化能否成功的关键,除此之外,融合蛋白的大小(特别是大于 50×10^3)和是否含有高度疏水区也会影响纯化效果^[12]。

随后的 GST-*HbJAZ1* 融合蛋白纯化,是利用 GST-tag 能与谷胱甘肽-琼脂糖树脂填料中的谷胱甘肽特异性的结合的特性,1 mL 谷胱甘肽-琼脂糖树脂填料能结合约 5 mg 的谷胱甘肽-S-转移酶(详见 Glutathione-Sepharose 4B 产品说明书),用 PBS 洗涤杂蛋白后,用还原性谷胱甘肽洗脱目的蛋白。此方法的优点是步骤少,且可避免目的蛋白的降解^[12]。在 pGEX 原核蛋白表达系统中,培养物中的融合蛋白的产量一般为 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (详见 Glutathione-Sepharose 4B 产品说明书)。而蛋白带考马斯亮蓝染色的检查下限为 $0.3 \sim 1.0 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{条}^{-1}$ ^[12]。从图 4 可以明显看到,过柱后的 GST-tag 变浅,但目的蛋白的 GST-tag 过柱后,经 SDS-PAGE 分析,发现其变化不明显,分析产生这种现象的原因,一方面可能是由于洗脱液稀释的缘故,另一方面,也可能是由于融合蛋白在裂解和离心后没有释放到上清液中,而保留在沉淀物中。随后,将细胞裂解后离心的沉淀,用分子克隆实验指南中不溶性蛋白的纯化方案,重新溶解后,经过上柱、洗涤、洗脱后,纯化的目的蛋白大小比预计大小偏大,如图 5 所示。对于目的蛋白纯化后偏大,如图 4 所示,纯化后的 GST-tag 明显比纯化前大,应为正常现象,因为在大多数情况下,可溶性并非有或无的现象,载体、宿主菌及培养基的不同选择可以增加或降低可溶/不溶蛋白的量^[15]。

建立好纯化体系后,利用串联亲和和沉淀纯化的原理,以原核表达的 *HbJAZ1*-GST 融合蛋白谷胱甘肽琼脂糖凝胶复合体与橡胶乳清混合并在低温震荡温浴,再经过离心和洗脱,就可以分离到与 *HbJAZ1* 蛋白互作的蛋白质。通过双向电泳的方法,将蛋白分开并通过质谱分析,就可以鉴定与 *JAZ* 互作的侯选蛋白。*JAZ* 作为茉莉酸信号途径中的阻遏蛋白,不仅其自身能与 *JAZ* 家族基因发生同源互作和异源互作,还能与茉莉酸相关的转录因子结合,如 MYC2。分离与 *JAZ* 互作的蛋白,为发现 *JAZ* 负调控目标和茉莉酸信号途径的鉴定打下良好的基础。

参考文献:

- [1] 刘登冉,史敏晶,陈月异. 茉莉酸诱导巴西橡胶树乳管分化的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(1): 104-105.
- [2] 郝秉中,吴继林,云翠英. 排胶对橡胶树乳管分化的促进作用[J]. 热带作物学报, 1984, 5(2): 19-23.
- [3] HAO B Z, WU J L. Laticifer Differentiation in *Hevea brasiliensis*: Induction by Exogenous Jasmonic Acid and Linolenic Acid [J]. *Annals of botany*, 2000, 85: 37-43.
- [4] SEMBDNER G, PARTHIER B. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1993, 44: 569-589.
- [5] CREELMAN R A, MULLET J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 1997, 48: 355-381.
- [6] KATSIR L, CHUNG H S, KOO A J K, et al. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing [J]. *Current opinion in plant biology*, 2008, 11: 428-435.
- [7] CHINI A, FONSECA S, FERNANDEZ G, et al. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling [J]. *Nature*, 2007, 448: 666-671.
- [8] THINES B, KATSIR L, MELOTTO M, et al. JAZ repressor proteins are targets of the SCF (COII) complex during jasmonate signalling [J]. *Nature*, 2007, 448: 661-665.

- [9] VANHOLME B , GRUNEWALD W , BATEMAN A , et al. The tify family previously known as ZIM [J]. Trends Plant Sci , 2007 ,12: 239 – 244.
- [10] TIAN W M , HUANG W F , ZHAO Y. Cloning and characterization of *HbJAZ1* from the laticifer cells in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) [J]. Trees-Structure and Function 2010 24: 771 – 779.
- [11] KIEFER E , HELLER W , ERNST D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites [J]. Plant Mol Biol Rep 2000 ,18: 33 – 39.
- [12] BROWN T , MACKEY K. Current Protocols in Molecular Biology [M]. FREDERICK M A , BRENT R , KINGSTOM R E , et al. PROTEIN EXPRESSION 16.7.6 Expression and Purification of Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins . Analysis of proteins 10.6.1 detection of protein. New York: Wiley ,1997: 6 – 7 ,16.
- [13] SAMBROOK J , RUSSELL D. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂 , 王嘉玺 , 朱厚础 译. 3 版. 北京: 科学出版社 , 2002: 1247 – 1248.
- [14] 吴乃虎. 基因工程原理: 下册 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社 , 2001: 112.
- [15] MIERENDORF R. The PET system Manual [M]. Germany: Novagen EMD Biosciences Inc , 2003: 5 – 31.

Prokaryotic Expression and Purification of *HbJAZ1* Protein of *Hevea brasiliensis*

LIU Wei , ZHAI Jin-ling , XU Hui-min , HUANG Xi

(Key Laboratory of Tropic Biological Resources of Ministry of Education/Institute of Bio-Science and Technology ,
Hainan University , Haikou 570228 , China)

Abstract: In order to identify the proteins in *Hevea* that interacted specifically with *JAZ* , the recombinant plasmid that expressed fusion protein of *Hevea JAZ* (*HbJAZ1*) and GST (Glutathione S-transferase) was constructed and transformed into *Escherichia coli* (*E. coli*) for prokaryotic expression and further purification. The results indicated that *HbJAZ1*-GST fusion protein was successfully expressed and purified , and the fusion proteins exist in pellet of bacterial lysis suspension.

Key words: *Hevea brasiliensis*; *JAZ*; prokaryotic expression; protein purification