

甘蓝中硫氧还蛋白编码基因 *THL1* 的分子特性及表达研究

高启国¹, 宋 明¹, 牛 义¹, 杨 昆², 朱利泉^{2*}, 王小佳^{1*}

(¹ 西南大学重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400716; ² 西南大学植物生理生物化学实验室, 重庆 400716)

摘 要: 采用 PCR 和 RT-PCR 技术, 以 ‘E1’ 甘蓝基因组 DNA 和柱头 cDNA 为模板对 *THL1* 基因进行扩增克隆, 得到的片段长度分别为 732 bp 和 455 bp。序列分析表明, 克隆的 DNA 和 cDNA 序列与甘蓝 ‘西园四号’ *THL1* 的 DNA 和 cDNA 同源性分别为 97.9% 和 98.3%, 两条序列内含子的大小不同; 同时, 前者第 2 内含子不符合典型的 GT-AG 规则: 即第 2 个内含子 3 端碱基为 AT。将 *THL1* 基因 cDNA 序列定向克隆到原核表达载体 pET-43.1a (+), 构建融合表达质粒 pET43.1a (+)-*THL1*, 在大肠杆菌 BL21 中表达出分子量为 74 kD 的融合蛋白, 经胰岛素检测, *THL1* 有氧化还原活性, 表明 *THL1* 在大肠杆菌中得到了正确表达。

关键词: 甘蓝; 类硫氧还蛋白; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S 635.1; Q 786 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 04-0909-06

Molecular Characterization and Expression of Thioredoxin-like Protein *THL1* Gene from *Brassica oleracea* L.

GAO Qi-guo¹, SONG Ming¹, NIU Yi¹, YANG Kun², ZHU Li-quan^{2*}, and WANG Xiao-jia^{1*}

(¹ Key Laboratory in Olericulture of Chongqing, Southwest University, Chongqing 400716, China; ² Plant Physiology and Biochemistry Laboratory, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: The DNA and cDNA fragments of the *THL1* were amplified from genomic DNA and stigma cDNA of *Brassica oleracea* ‘E1’ by PCR and RT-PCR methods. Their lengths were 732 bp and 455 bp respectively. Sequence analysis indicated that the identities of DNA and cDNA with those cloned from *Brassica oleracea* ‘Xiyuan 4’ previously were 97.9% and 98.3% respectively, the introns of the two sequences were different in size. Moreover, the second intron of *THL1* from *Brassica oleracea* ‘E1’ was not comply with the typical GT-AG rule: AT existed in the 3' end of the second intron. The cDNA of *THL1* was cloned into vector pET-43.1a (+) to be pET43.1a (+)-*THL1*, transferred into *E. coli* BL21 and expressed as a 74 kD fusion protein when induced with IPTG. Thioredoxin activity was measured by ability of the *THL1* to reduce insulin. The result showed the *THL1* gene had been correctly expressed.

Key words: *Brassica oleracea*; Thioredoxin-like protein; Gene clone; Sequence analysis

THL1 (Thioredoxin-like 1) 是类硫氧还蛋白 h 家族的一员, 是一类广泛参与酶活性调节、信号传导等生理过程的重要蛋白质 (Chivers et al, 1997; Motohashi et al, 2003)。Mazzurco 等 (2001) 利用酵母双杂交系统证明 *THL1* 与甘蓝 S-位点受体激酶 (S-locus receptor kinase, SRK) 之间的相互作用, 并将 *THL1* 与 SRK 结合的活性位点定位在 CPPC 上。Cabrillac 等 (2001)、Goring 和 Walker (2004) 研究发现 *THL1* 可以抑制 SRK 的自体磷酸化, 花粉包被蛋白能减轻这种抑制作用, 说明 *THL1* 可能与 SRK 可逆结合而抑制该激酶的活性, 使甘蓝等芸薹属作物的自交不亲和反应难以发生。然而到目前

收稿日期: 2007 - 01 - 15; 修回日期: 2007 - 05 - 14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671429, 30471190); 重庆市自然科学基金项目 (9622)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhuliquan@swau.cq.cn; wxj@swau.cq.cn)

为止, *THL1*与 *SRK*相互作用还没有在植物体内得到验证。

*THL1*在甘蓝根、茎、叶、花瓣、花粉囊、雌蕊等器官中广泛表达,在花粉囊和雌蕊中的表达量相对较高 (Bower et al, 1996)。刘东等 (2003) 首次从甘蓝 ‘西园四号’ 中克隆了 *THL1*基因的全序列。目前,对其它甘蓝品种中 *THL1*基因的克隆和分析研究还未见报道。由于 ‘西园四号’ 是杂交种,而该基因全序列可能来自于亲本之一;高度自交不亲和系 ‘E1’ 是其杂交亲本,2006年田间统计结果表明 ‘E1’ 的自交亲和指数为 0.01。从包括 ‘E1’ 在内的材料中克隆 *THL1*基因,对于该基因在各种材料及组合之间的变异关系及其体内表达特性的研究具有重要意义。作者以甘蓝 ‘E1’ 为材料,扩增 *THL1*基因的全序列,旨在探索不同甘蓝品种中该基因的差异,并首次构建了 *THL1*的表达型载体,对大肠杆菌中表达的 *THL1*进行了活性检测。这对于制备 *THL1*抗体探针,深入研究 *THL1*基因在芸薹属自交不亲和信号传导中作用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

甘蓝 ‘E1’ 品种,为西南大学园艺园林学院选育的高度自交不亲和材料。载体质粒 pET-43.1a (+)、大肠杆菌 BL21、X1-blue 为本实验室保存; PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase, pMD18-T Vector, T4 DNA Ligase, E. Z. N. A.™ Plasmid Mini Kit 购自大连宝生物公司; UN D-10 Trizol Total RNA Preparation Kit, AMV First Strand cDNA Synthesis Kit, Gel Extraction Mini Kit 购自上海生工生物工程服务有限公司; 限制性内切酶 *Bam*H 和 *Xho*I 为 MB I 产品, MagneHis™ Protein Purification System 购自 Promega 公司。

1.2 PCR扩增甘蓝基因组 *THL1*基因序列

用本室改良 CTAB 法提取总 DNA (朱利泉和王小佳, 2000)。参照刘东等 (2003) 扩增的序列,设计合成了一对扩增引物 P_1 和 P_2 ,引物 P_1 的 5端引入 *Bam*H 酶切位点,引物 P_2 的 5端引入 *Xho*I 酶切位点,其序列为: P_1 : 5'-GA TCC ATGATCCCA GCA GGA GAAGTG-3'; P_2 : 5'-CTCGA GAAA GTGT-CAATAAGGCAAC-3'。

以甘蓝基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 *THL1*基因。PCR 反应条件为 94 热变性 5 min 后,进入以下循环: 94 1 min, 60 1 min, 72 2.5 min, 30 个循环后 72 延伸 10 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.3 RT-PCR扩增甘蓝 *THL1*基因 cDNA 序列、克隆测序和序列分析

以开花前 1~2 d 的甘蓝柱头为材料,用 RNA 提取试剂盒提取柱头总 RNA。以总 RNA 为模板, Oligo (dT)₁₈ 为引物,用反转录试剂盒合成 cDNA 的第 1 条链,以 cDNA 的第 1 条链为模板用引物 P_1 和 P_2 扩增 *THL1*的 cDNA 序列。电泳回收 PCR 产物,加 A 后与 pMD18-T Vector 连接,构建 pMD18-T-*THL1*重组质粒,连接液转化大肠杆菌 X1-blue。挑取阳性菌落和 *THL1*的基因 PCR 产物一起送上海生工测序,测序结果用 Vector NT 进行序列分析。

1.4 pET43.1a (+)-*THL1*表达质粒的构建

重组质粒 pMD18-T-*THL1*和载体质粒 pET-43.1a (+) 经 *Bam*H 和 *Xho*I 双酶切,电泳回收目的片段。在 10 μL 连接体系中加入 1 μL 缓冲液、1 μL T4 DNA 连接酶、6.5 μL *THL1*片段和 1.5 μL pET43.1a (+) 片段过夜连接,转化大肠杆菌 X1-blue。以 P_1 和 P_2 为引物进行菌落 PCR 检测,用质粒提取试剂盒提取质粒,经 *Bam*H /*Xho*I 双酶切,产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,构建正确的质粒命名为 pET43.1a (+)-*THL1*。表达质粒送上海生工测序,鉴定所插入的序列及其读码框是否正确。

1.5 重组蛋白的诱导表达和 SDS-PAGE 检测

将表达质粒 pET43.1a (+)-*THL1*转化表达宿主菌 BL21。挑取单菌落,接种于 1 mL 含有 50 μg/mL

氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C 摇床上培养过夜。过夜培养物按 1:100 扩大培养, 当 OD_{600} 在 0.8~1 时加入 IPTG。IPTG 浓度设为 0.1、0.5 和 1.5 mmol/L 等 3 个梯度, 诱导温度设为 28 °C 和 37 °C 两个梯度, 按两个因素交叉分组设计, 共 6 个组合 (表 1)。225 r/min 下培养 4 h, 取 1 mL 诱导表达的菌液, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 沉淀用 1 mL 样品缓冲液 (含 0.1% SDS) 悬浮, 100 °C 煮沸 5 min。样品用 4% 浓缩胶, 12% 分离胶进行 SDS-PAGE, 电泳结束后用 0.05% 考马斯亮蓝染色, 染色后置于脱色液中脱色, 直至蛋白质条带清楚。

1.6 *THL1* 的活性检测

用蛋白纯化试剂盒纯化后回收诱导表达的 *THL1*。参照 Holmgren (1979) 的方法检测 *THL1* 的活性。预先配制 0.39 mmol/L 胰岛素和 3 mmol/L 的二硫苏醇糖溶液, 分别取 50 μ L 胰岛素、50 μ L 二硫苏醇糖和 50 μ L *THL1* 蛋白纯化液, 三者混合, 用分光光度计测反应混和物在 650 nm 的吸光值, 每 2 min 记数 1 次。以 50 μ L 胰岛素、50 μ L 二硫苏醇糖和 50 μ L 水的混合液作为对照。

2 结果与分析

2.1 *THL1* 基因 DNA 和 cDNA 的扩增与序列分析

PCR 产物电泳结果显示我们克隆片段与刘东等 (2003) 从 ‘西园四号’ 克隆的序列大小一致 (图 1)。测序结果表明甘蓝 ‘E1’ 中 *THL1* 基因 DNA 为 732 bp、cDNA 为 455 bp。

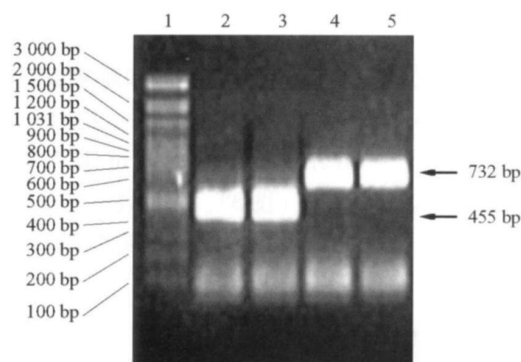


图 1 *THL1* 基因 DNA 和 cDNA 的 PCR 产物电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis pattern of the DNA and cDNA PCR products of gene *THL1*

1: 3 000 marker; 2 and 3: The cDNA PCR product; 4 and 5: The DNA PCR product

两者序列比较显示: 该基因包括 3 个外显子和两个内含子, 与刘东等 (2003) 分析的结果一致, 但两条序列内含子的大小不同。‘E1’ 的 *THL1* 基因两个内含子为 195 bp 和 82 bp, 而 ‘西园四号’ 的为 207 bp 和 81 bp。另外, ‘E1’ 中 *THL1* 基因第一个内含子剪切位点符合经典的 GT-AG 规则 (Benjamin, 2000), 但第 2 个内含子剪切位点 5 端碱基为 GT, 3 端碱基为 AT, 为排除测序错误, 将产物送不同的公司测序, 结果肯定了序列的正确性, 说明甘蓝 ‘E1’ *THL1* 基因该位点发生了变异。

用 VectorNTI 进行比对分析, 甘蓝 ‘E1’ 中 *THL1* 基因 DNA 和 cDNA 序列与 ‘西园四号’ *THL1* 基因 DNA 和 cDNA 序列的同源性分别为 97.9% 和 98.3% (序列未提供), 其编码区仅有 4 个碱基差

异, 分别为: GCT GCG ATC GTC AAA AAG GCC GCG, 其中 3 个为无义突变, 推导的氨基酸序列仅在第 92 位存在 E K 氨基酸差异, 活性位点的 CPPC 序列没有发生突变 (图 2)。

由于 'E1' 是 '西园四号' 的杂交亲本, 两者 *THL1* 基因核苷酸序列的差异说明该基因在杂交选育过程中发生了自身变异, 尤其是内含子大小不同及其剪切位点变异可能影响该基因表达过程中 mRNA 的有效剪切, 并最终造成 *THL1* 蛋白在两种材料中表达量的差异。

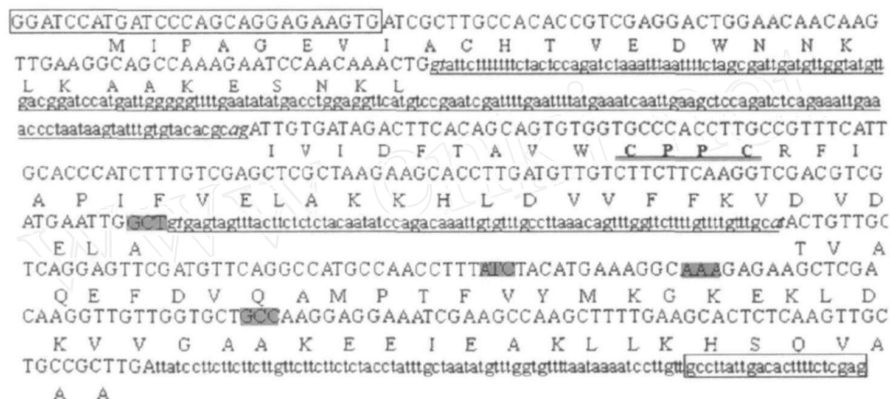


图 2 *THL1* 基因的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列分析

核苷酸大写部分为开放阅读框, 其下面为相应的氨基酸序列, 其中双划线部分为活性位点, 单划线部分为内含子序列; 方框内序列为 *THL1* 扩增引物; 斜体部分为内含子剪切位点, 阴影部分显示与刘东等 (2003) 扩增序列的差异碱基。

Fig. 2 Analysis of the nucleotide sequence of *B. oleracea* L. *THL1* and deduced amino acid sequence

The ORF was indicated with capital letter and its deduced amino acid sequence was shown in one-letter under the DNA sequence;

Active site residues were double underlined; The introns were single underlined; The primers were boxed;

The cleavage sites were inclined; The base different with the report were shaded

2.2 表达质粒 pET43.1a (+)-*THL1* 的 PCR、双酶切检测和测序验证

将连接产物转化大肠杆菌质粒 X1-blue, 经菌落 PCR 检测后, 提取质粒用 *Bam*H 和 *Xho*I 酶切, 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示双酶切后有大小约 450 bp 和 7 200 bp 两条带, 单酶切只有一条带, 与预期值大小一致, 说明表达质粒构建正确 (图 3)。将构建的表达质粒 pET43.1a (+)-*THL1* 送上海生工测序, 测序结果 (序列未提供) 进一步也表明, 表达质粒的 *THL1* 基因片段插入完全正确。

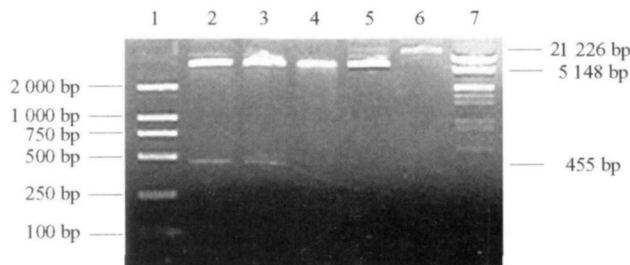


图 3 pET43.1a (+)-*THL1* 酶切电泳图

1: DL2000 DNA marker; 2 和 3: *Bam*H / *Xho*I 双酶切; 4: *Bam*H 单切; 5: *Xho*I 单切;

6: pET43.1a (+)-*THL1* 质粒对照; 7: Lambda DNA marker

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis patterns of the restriction enzymes digestion of pET43.1a (+)-*THL1*

1: DL2000 DNA marker; 2 and 3: The recombinant digested by *Bam*H and *Xho*I; 4: The recombinant digested by *Bam*H;

5: The recombinant digested by *Xho*I; 6: pET43.1a (+)-*THL1* without digestion as control; 7: Lambda DNA marker

2.3 重组蛋白的诱导表达和 SDS - PAGE检测

表达产物的 SDS - PAGE结果显示, 在 74 kD 左右处有重组蛋白表达特异带出现, 其蛋白质相对分子质量与预期值相符, 而未诱导的重组子菌液不见此条带 (图 4)。表明表达质粒 pET43.1a (+) -THL1 构建正确, 且融合蛋白在大肠杆菌中正确表达。另外, 各条带之间重组蛋白的表达量差异不大, 说明 IPTG 浓度和诱导温度对该蛋白表达量的影响不大。

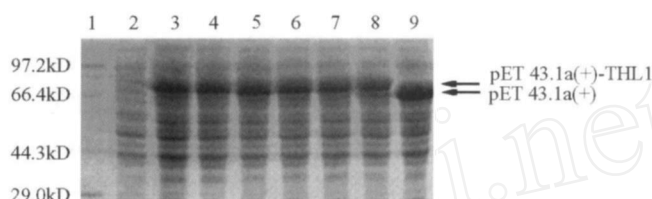


图 4 不同条件对 pET43.1a (+) -THL1 融合蛋白诱导表达的影响

1: 蛋白质低分子量标记; 2: 未诱导的 pET43.1a (+) -THL1 对照; 3~8: 与表 1 中的 1~6 对应; 9: 诱导的 pET43.1a (+) 对照。

Fig 4 The influence of different inducing condition to pET43.1a (+) -THL1 express

1: Protein molecular weight marker; 2: pET43.1a (+) -THL1 without inducement as control;
3 - 8: Corresponding to 1 - 6 of the Table 1; 9: pET43.1a (+) induced by IPTG as control

2.4 THL1 的活性检测

胰岛素分子由 A 链和 B 链组成, 两者以两个二硫键结合在一起, 二硫苏醇糖可以还原该二硫键, 使 A 链与 B 链解离, 解离后的 B 链使反应混合液呈现白色混浊, 硫氧还蛋白可以加速该反应的进程 (Holmgren, 1979)。通过反应混合物的 OD_{650} 值来检测该反应过程。从图 5 可以看出加 THL1 混合液的 OD_{650} 值增长速率要明显的比对照快, 说明加 THL1 混合液中 B 链的形成速率比对照快, 表达的 THL1 蛋白有活性。

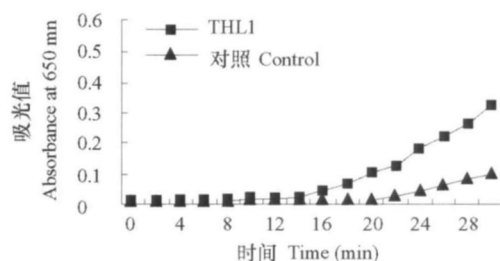


图 5 反应混合液吸光值的变化

THL1 代表 THL1、二硫苏醇糖和胰岛素混合液的吸光值; 对照为二硫苏醇糖和胰岛素混合液的吸光值。

Fig 5 Change of the absorbance at 650 nm of the reaction mixture

THL1 indicated the absorbance at 650 nm of the mixture of THL1, DTT and insulin,
the absorbance at 650 nm of the mixture of DTT and insulin without THL1 as control

3 讨论

作者以高度自交不亲和系甘蓝 'E1' 为材料克隆了 *THL1* 基因的全序列, 首次对 'E1' 及其杂交后代 '西园四号' (刘东等, 2003) 中该基因的全序列进行了比对分析。分析结果证实 *THL1* 基因由 3 个外显子两个内含子组成。两种材料中 *THL1* 基因 DNA 和 cDNA 序列的同源性分别为 97.9% 和 98.3%, 两者都编码 117 个氨基酸, 同源性为 99.1%, 其活性位点序列完全一致。进一步将 *THL1* DNA 的编码区与非编码区序列比较发现, 编码区序列高度保守, 而两个内含子序列和 3 端非翻译区 (UTR) 的保守程度较低, 说明这些序列比编码区累积变异的程度更高。两条序列中内含子的大小有较大差异, 其内含子剪切位点也不完全一致: 'E1' 中第 1 个内含子为 195 bp, 而 '西园四号' 中增

加到 207 bp, 第 2 个内含子的大小基本一致; ‘西园四号’ *THL1* 基因的两个内含子的剪切位点完全符合典型的 GT-AG 规则 (Benjamin, 2000), 而其亲本 ‘E1’ *THL1* 基因第 1 个内含子的剪切位点符合 GT-AG 规则, 第 2 个内含子剪切位点 5 端碱基为 GT, 3 端碱基为 AT, 既不符合 GT-AG 规则也不符合 AT-AC 规则 (朱玉贤和李毅, 2002)。一般在含有多个内含子基因的正确表达过程中, mRNA 的剪切十分重要。两条序列内含子大小不同及其剪切位点变异可能影响该基因表达过程中 mRNA 的有效剪切, 并最终造成 *THL1* 蛋白在两种材料中表达量的差异。

‘西园四号’是杂交种, ‘E1’为其亲本, 两种材料中 *THL1* 序列的差异可能是该基因自身的突变造成的; 另一个可能的原因是 ‘E1’ 与其它材料杂交过程中引起的变异。研究结果表明, *THL1* 蛋白参与甘蓝自交不亲和信号传导过程, 是信号传导的功能因子 (Mazzurco et al, 2001; Goring et al, 2004)。高度自交不亲和性甘蓝 ‘E1’ 是育种的亲本材料, 因此从 ‘E1’ 克隆的 *THL1* 基因的全序列以及该材料中 *THL1* 基因的生物学功能对于该基因在甘蓝自交不亲和信号传导中作用的阐述更具有说服力。作者对 ‘E1’ 中 *THL1* 基因全序列的克隆以及其序列比对分析的工作为进一步从甘蓝柱头等量 cDNA 文库中钓取 *THL1* 的启动子, 通过转基因等技术对 *THL1* 在自交不亲和信号传导中生物学作用的深入研究奠定了基础。

另外, 本研究首次构建了 *THL1* 基因的原核表达质粒 pET43.1a (+)-*THL1*, 在大肠杆菌 BL21 中表达出约 74 kD 的融合蛋白, 表达的 *THL1* 纯化回收后用胰岛素检测其活性, 结果表明 *THL1* 蛋白有氧化还原活性, 初步说明了序列克隆的正确性。可望为制备 *THL1* 抗体探针, 在蛋白质水平上深入研究 *THL1* 在自交不亲和信号传导中生物学作用奠定了技术基础, 也可望为对甘蓝自交不亲和性的深入研究和利用提供新内容。有关 *THL1* 在甘蓝自交不亲和性不同材料中的表达差异及其与 SRK 相互作用的机理的研究正在进行中。

References

- Benjamin L. 2000. Genes. Oxford: Oxford University Press
- Bower M S, Matias D D, Fernandes-carvalho E. 1996. Two members of the thioredoxin-h family interact with the kinase domain of a *B. brassica* S-locus receptor kinase. *Plant Cell*, 8: 1641 - 1650.
- Cabrillac D, Cock J M, Dumas C, Gaude T. 2001. The S-locus receptor kinase is inhibited by thioredoxins and activated by coat protein. *Nature*, 410 (6825): 220 - 223.
- Chivers P T, Prehoda K E, Raines R T. 1997. The CXXC motif: A rheostat in the active site. *Biochemistry*, 36: 4061 - 4066.
- Goring D R, Walker J C. 2004. Self-rejection, a new kinase connection. *Science*, 303: 1474 - 1475.
- Holmgren A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *Journal Biological Chemistry*, 254: 9627 - 9632.
- Liu Dong, Zhu Li-quan, Wang Xiao-jia. 2003. Cloning and characterization of SRK-binding protein *THL1* gene from *B. brassica oleracea* L. in self-incompatibility signaling process. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (1): 56 - 58. (in Chinese)
- 刘东, 朱利泉, 王小佳. 2003. 甘蓝自交不亲和信号传导中 SRK 结合蛋白基因 *THL1* 的克隆与序列分析. *园艺学报*, 30 (1): 56 - 58.
- Mazzurco M, Sulaman W, Elina H. 2001. Further analysis of the interactions between the *B. brassica* S receptor kinase and three interacting proteins (ARC1, *THL1* and *THL2*) in the yeast two-hybrid system. *Plant Molecular Biology*, 45: 365 - 376.
- Motohashi K, Koyama F, Nakanishi Y, Ueoka-Nakanishi H, Hisaori T. 2003. Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin: Thiol modulation of the peptidyl-prolyl isomerase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 278 (34): 31848 - 31852.
- Zhu Li-quan, Wang Xiao-jia. 2000. Rapid identification of self-incompatibility and S-alleles of cabbage by the polymorphism of S-locus. *Acta Botanica Sinica*, 42 (6): 595 - 599. (in Chinese)
- 朱利泉, 王小佳. 2000. 利用 S 位点多态性快速测定甘蓝自交不亲和性及其 S 等位基因系. *植物学报*, 42 (6): 595 - 599.
- Zhu Yu-xian, Li Yi. 2002. Modern molecular biology. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press: 88 - 91. (in Chinese)
- 朱玉贤, 李毅. 2002. 现代分子生物学. 第 2 版. 北京: 高等教育出版社: 88 - 91.