

丹参非特异性脂质转移蛋白基因(*SmLTP1*)的克隆及其表达分析

刘梅, 生华, 化文平, 储君, 王喆之*

药用资源与天然药物化学教育部重点实验室, 西北濒危药材资源开发国家工程实验室, 陕西师范大学生命科学院, 西安 710062

摘要: 对丹参EST序列进行Blast分析, 获得一个新的非特异性脂质转移蛋白基因, 命名为 *SmLTP1* (GenBank注册号为EF187461)。该基因cDNA全长593 bp, 包含一个长为357 bp的开放读码框, 编码118个氨基酸。生物信息学结构分析表明, 该蛋白具有植物nsLTP的典型结构, 即4对二硫键, 4个 α -螺旋, 1个可结合和容纳脂肪酸分子的类似口袋状的疏水结构。实时荧光定量PCR分析结果表明, *SmLTP1*基因在丹参不同组织器官中差异表达, 其表达受病原菌和茉莉酸甲酯的诱导, 显示*SmLTP1*基因在植物防御反应中发挥作用。

关键词: 丹参; 非特异性脂质转移蛋白; 基因克隆; 生物信息学分析; 实时荧光定量PCR

Cloning and Expression Analysis of A Non-Specific Lipid Transfer Protein Gene (*SmLTP1*) from *Salvia miltiorrhiza* Bunge

LIU Mei, SHENG Hua, HUA Wen-Ping, CHU Jun, WANG Zhe-Zhi*

Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest of China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

Abstract: By analyzing EST sequences of *Salvia miltiorrhiza*, we found a new gene which showed high homology with plant non-specific lipid transfer proteins and named as *SmLTP1* (GenBank accession number: EF187461). *SmLTP1* consists of 593 nucleotides, including a single 357-bp opening reading frame and encoding a 118-amino-acid peptide. Bioinformatics analysis showed that *SmLTP1* had the typical structure of the plant non-specific lipid transfer protein, including 4 pairs of disulfide, 4 α -helices and 1 tunnel-like hydrophobic cavity which could contain lipid molecules. Quantitative RT-PCR analysis revealed that the gene expressed in different organs, and could be induced by methyl jasmonate (MeJA) and pathogen. These results showed that the *SmLTP1* might be pathogen-responsive gene in plant defenses and involve in a complex gene regulation network.

Key words: *Salvia miltiorrhiza*; non-specific lipid transfer proteins; gene clone; bioinformatics analysis; quantitative RT-PCR

植物非特异性脂质转移蛋白(non-specific lipid transfer protein, nsLTP)是一类广泛存在于高等植物中的碱性小分子脂质结合蛋白, 至今已发现其存在于50多种植物中(Kader等1984; Jose-Estanyol等2004; Yeats和Rose 2008), 该类蛋白其分子组成最重要的特点是含有8个高度保守的半胱氨酸(Kader 1996), 由4个二硫键连接构成稳定的三级结构, 这种结构具有一个疏水性空穴, 可以转运多种类型的脂质(Kader等1984)。根据其一级结构, nsLTP被分为3类, 其中nsLTPI和nsLTPII分子量分别约为9和7 kDa, pI介于8.8~10.0之间, 均为碱性蛋白(Kader 1997; Boutrot等2008), 而nsLTPIII是一类花

粉特异表达蛋白, 其分子量等化学特性与nsLTPII相似(Lauga等2000)。自1975年Kader等首次从马铃薯块茎中分离得到非特异性脂质转移蛋白, 现已从水稻、豇豆、大麦、玉米、谷子、绿豆等植物中分离出50多种非特异性脂质转移蛋白或基因(汪少芸等2004)。

目前认为nsLTP成员具有不同的生物学功能,

收稿 2010-09-08 修定 2010-11-17

资助 国家自然科学基金(31000134)和陕西省科技研究发展(攻关)计划(2006K16-G15)。

* 通讯作者(E-mail: zzwang@snnu.edu.cn; Tel: 029-85301260)。

主要涉及角质单体的合成、表皮蜡质生成等(Pyee 等 1994; Cameron 等 2006)。一些研究表明 nsLTP 参与植物防御机制,对细菌、真菌甚至病毒具有抗性(Molina 和 Garcia-Olmedo 1997; Salcedo 等 2007),并且发现其可作为抑制 α -淀粉酶而具有抗虫活性(Skinner 等 1995; Jones 和 Marinac 2000)。另外, *nsLTP* 基因还受低温(Hincha 等 2001)、干旱(Trevino 和 O'Connell 1998)、ABA (Arondel 等 2000) 等非生物因素的诱导而被大量表达。此外, nsLTP 还可以调节分解代谢脂质储藏的 α -氧化、体细胞胚胎形成、植物信号转导,参与植物有性生殖和花粉发育等(田爱梅和曹家树 2008)。因此,系统地分析 nsLTP 蛋白结构、特性和表达模式等生物学特征,明确其在植物抗性形成方面的作用,对于植物抗病和胁迫抗逆性研究和利用基因工程改良植物抗性有重要意义。

中药丹参为唇形科鼠尾草属多年生药用植物丹参的干燥根及根茎,具有活血祛瘀、养血安神、调经止痛、凉血消痈的功效,在临床上具有多种药理作用,是重要的大宗药材之一(冯玲玲和周吉源 2004)。本文从植物丹参中克隆出了非特异性脂质转移蛋白基因,命名为 *SmLTP1*,分析其分子特征及其在丹参不同组织及甘蓝黑腐病黄单胞菌和茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)等抗逆信号诱导下的表达情况,为丹参非特异性脂质转移蛋白的研究以及培育丹参抗逆新品种建立了一定的基础。

材料与方 法

1 材料与试剂

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)种子种于含蛭石的营养钵中,放于人工气候箱中培养,培养条件为:温度(25±2) °C,湿度 48%,光照强度 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期为光照 16 h/黑暗 8 h。

BIOZOL 试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和反转录试剂盒均购自杭州博日科技有限公司; SYBR Green I 和 pMD19-T Simple Vector 购自 TaKaRa 公司。大肠杆菌 DH5 α 和甘蓝黑腐病黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, XC-1)均由本实验室保存。

2 处理方法

病原菌处理:挑取对数生长期黑腐病菌 XC-1

用生理盐水稀释至约 OD₆₀₀=0.2,喷洒于生长旺盛的八周龄丹参实生苗叶片上。MeJA 处理: 5 mmol·L⁻¹ MeJA 直接喷洒于生长旺盛的八周龄丹参实生苗叶片上。于人工气候箱按原条件继续培养,分别于接种后 6、12、24、48 h 采样,液氮速冻,于 -80 °C 储藏备用。

3 丹参基因组 DNA 和总 RNA 的提取

丹参基因组 DNA 提取用 CTAB 法(郝岗平等 2006)。用 Biozol 试剂提取丹参全株、根、茎、叶,以及各处理样品提取的总 RNA,以之为模板,按照逆转录试剂盒说明书合成 cDNA 第一链。

4 *SmLTP1* 基因的克隆

依据丹参 EST 序列,采用 Premier Primer 5.0 软件设计一对特异性引物: 5'-CGGGATCCATGGCTGCAATGACCAAGGC-3' (*Bam*HI); 5'-CCCAGGCTTTTCACCTCACCTTAGTGCAGTCAGT-3' (*Hind*III)。以丹参基因组 DNA 和 cDNA 为模板,扩增 *SmLTP1* 片段。反应程序为: 95 °C 变性 3 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经胶回收与 pMD19-T Simple Vector 连接转化大肠杆菌 DH5 α ,送至上海华大测序公司测序。

5 *SmLTP1* 蛋白的生物信息学分析

根据生物信息学软件进行在线分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; <http://www.cbs.dtu.dk/>; <http://cn.expasy.org/>; <http://psort.nibb.ac.jp/>)。用 DNASTar、ProtParam 进行开放阅读框的查找和翻译,氨基酸序列的组成成分、理化性质分析;用在线工具 PSORT、TMHMM 2.0 Server、ProtScale、SOPMA、SWISS-MODEL 完成蛋白质亚细胞定位、跨膜结构域、亲水/疏水性、二级结构和三维结构的分析。

6 *SmLTP1* 基因的表达分析

以丹参根、茎、叶的 cDNA 以及黑腐病菌 XC-1 或 MeJA 处理不同时间的样品 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 反应。进行实时荧光定量 PCR 检测时,以丹参持家基因磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)基因为内参,检测 *SmLTP1* 的表达量,引物见表 1。反应条件: 95 °C 变性 3 min; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 25 s, 40 个循环。每个实验 3 个重复。

表1 实时荧光定量PCR检测*SmLTP1*基因表达所用引物
Table 1 Primers used for the analysis of the expression level of *SmLTP1* by quantitative RT-PCR

基因	扩增产物长度/bp	引物名称	序列
<i>SmLTP1</i>	170	SmLTP1S	5'-TACTTGTCACCGTGCCTCCCATATA-3'
		SmLTP1A	5'-GCCTTGCTGAGGTTGATGTTGC-3'
<i>GAPDH</i>	183	GAPDHS	5'-ACCCTCACGGGGAAGACCATC-3'
		GAPDHA	5'-ACCACGGAGACGGAGACAAG-3'

实验结果

1 *SmLTP1* 基因的克隆与生物信息学分析

1.1 *SmLTP1* 基因的克隆与序列分析

对丹参 EST 序列进行 Blast 分析, 获得一个新的非特异性脂质转移蛋白基因, 命名为 *SmLTP1*。从丹参全株 cDNA 中克隆到 *SmLTP1*, 该基因 cDNA 全长 593 bp, 包含 5' 非翻译区为 38 bp, 3' 非翻译区 198 bp 和一个 357 bp 的开放读码框, 编码 118 个氨基酸, gDNA 序列与 cDNA 序列对比发现该基因不含内含子(图 1)。该基因已经登入 GenBank, 登入号为 EF187461。使用 SignalP 3.0 预测显示该基因 5' 端第 1~27 位具有典型信号肽特征。去除信号肽, 利用 NCBI 的 BlastP 在蛋白保守区数据库 (Conserved Domain Database, CDD) 对 *SmLTP1* 基因编码的蛋白进行蛋白保守区预测, 结果表明, 该蛋白具有保守的脂质结合基序(lipid-binding motifs) DRQ (Botton 等 2002) 以及由 8 个保守的半胱氨酸残基组成 AAL-LTSS 超家族保守结构域(图 2), 该结构域是胰蛋白酶和 α -淀粉酶抑制剂、种子储藏蛋白以及 nsLTP 蛋白所共有的特征。使用 ProtParam 在线软件分析 *SmLTP1* 基因编码蛋白的理化性质, 推测的蛋白质分子量为 11.84 kDa, 等电点 9.08。

1.2 *SmLTP1* 蛋白氨基酸序列的亲水性/疏水性、跨膜结构域及亚细胞定位分析

蛋白质的折叠总是倾向于把疏水残基埋藏在分子的内部, 蛋白质的亲水性/疏水性预测, 为其三维结构的预测提供了理论参考。利用 ProtScale 预测 *SmLTP1* 蛋白氨基酸序列的亲水性/疏水性, 结果显示该蛋白为疏水性蛋白。这点与 LTPs 含有保守的 8 个疏水氨基酸以及其分子内部含有一个可结合和容纳脂肪酸分子的类似口袋状的疏水结构相符 (Samuel 等 2002; Carvalho 和 Gomes 2007; Salcedo 等 2007)。

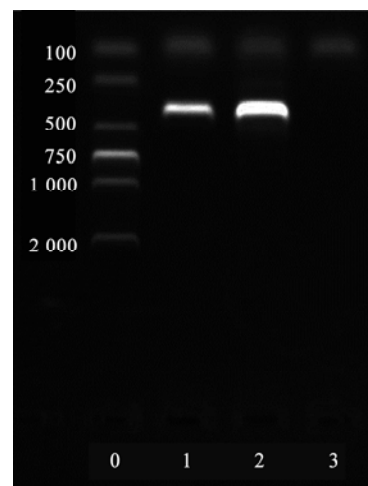


图1 *SmLTP1* 基因 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of *SmLTP1* gene

0: Marker DL2000; 1: *SmLTP1* 基因的 DNA 扩增产物; 2: *SmLTP1* 基因的 cDNA 扩增产物; 3: 不加模板的阴性对照。

跨膜结构域的预测和分析, 有助于正确认识和了解蛋白质的结构、种类、功能和定位。利用 TMHMM 2.0 Server 程序对 *SmLTP1* 蛋白的跨膜结构域进行分析, 结果显示该蛋白无跨膜区域。

LTPs 的细胞内定位也较复杂, 免疫定位研究表明 LTPs 存在于细胞壁上, 并发现 LTPs 可能是一种分泌型蛋白, LTPs 在内质网中形成后全部进入内质网腔, 并经高尔基体分泌到细胞外, 从而推论 LTPs 是一种胞外蛋白 (Sossountzor 等 1991; Sterk 等 1991; Kader 1997)。利用 PSORT 程序对丹参 LTP1 蛋白进行定位的结果显示, 该蛋白显示出定位于细胞外的预测值远大于其他, 这与之前的文献报道一致 (Sossountzor 等 1991; Kader 1996, 1997)。因此, 从信号肽、跨膜结构域和亚细胞定位的预测结果来看, 本文克隆的 *SmLTP1* 基因编码的是一种分泌蛋白。

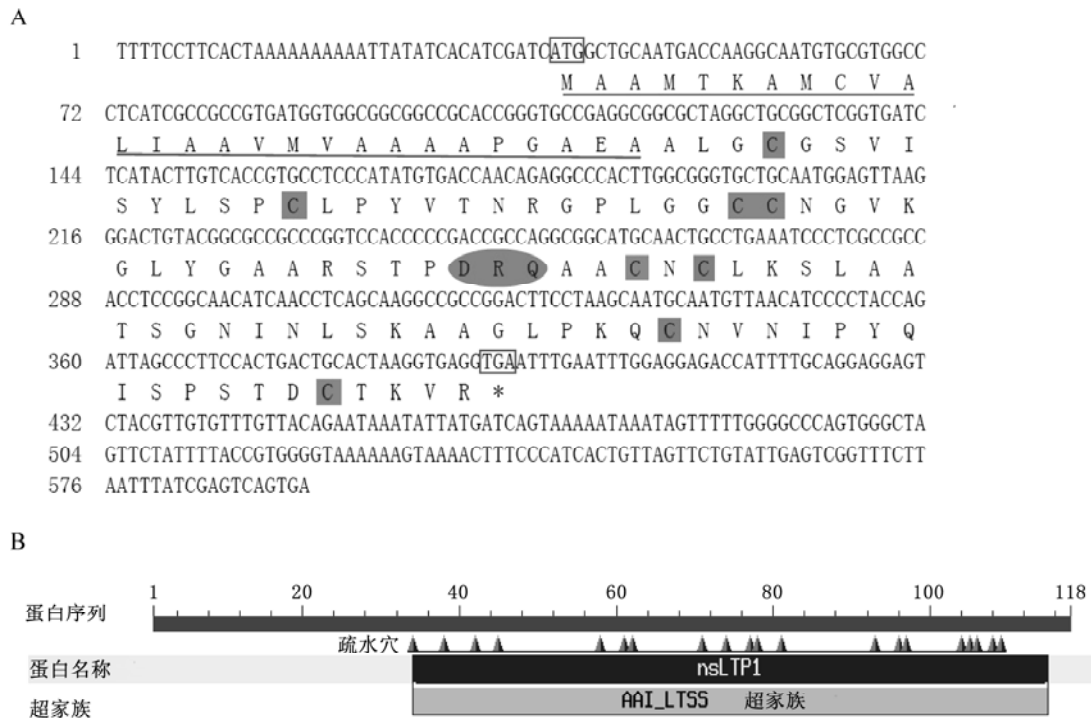


图2 *SmLTP1* 基因核酸序列及其编码蛋白序列和序列特征

Fig.2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *SmLTP1* gene and its sequence character

A: *SmLTP1* 基因核酸序列及其编码的蛋白序列。方框内分别为起始和终止密码子; *表示终止密码子; 划线处为信号肽; 灰色椭圆阴影表示脂质结合区域; 灰色方框阴影为8个半胱氨酸。B: *SmLTP1* 基因保守结构域。蛋白序列上的数字表示组成 *SmLTP1* 蛋白的氨基酸序号; 三角表示组成疏水穴的20个氨基酸。

1.3 *SmLTP1* 蛋白高级结构的预测

蛋白质的生物功能取决于它的高级结构, 蛋白质高级结构的预测对于理解其功能有一定的意义。利用 SOPMA 程序对 *SmLTP1* 蛋白的二级结构进行预测, 结果显示该蛋白的二级结构由 47.46% 的不规则卷曲、6.78% 的延伸链、41.53% 的 α -螺旋和 4.24% 的 β -转角构成, 不规则卷曲和 α -螺旋是该蛋白二级结构的主要成分。

用 SWISS-MODEL 对 *SmLTP1* 蛋白的三级结构进行预测, 结果表明, *SmLTP1* 基因编码的蛋白具有非特异脂质转移蛋白的典型结构, 即 4 对二硫键, 4 个 α -螺旋, 1 个可结合和容纳脂肪酸分子的类似口袋状的疏水结构(hydrophobic cavity) (图3)。这符合 I 类 nsLTPs 蛋白的保守结构特征(Samuel 等 2002; Carvalho 和 Gomes 2007; Salcedo 等 2007)。

2 *SmLTP1* 基因的表达分析

以丹参 *GAPDH* 基因为内参, 进行 *SmLTP1* 基因的荧光定量分析, 结果显示, 该基因在丹参的茎

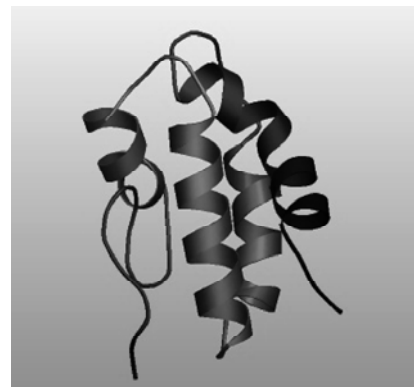


图3 *SmLTP1* 蛋白三维结构预测

Fig.3 3-D deduced structure of *SmLTP1* protein

中表达最丰富, 其次是叶中, 根中几乎不表达(图4)。在 XC-1 菌侵染处理后, *SmLTP1* 基因表达量明显上调, 在 48 h 内该基因的表达持续增长(图 5-A)。在 MeJA 诱导后 *SmLTP1* 基因表达量也上调, 在检测时间段内, 接种 48 h 后表达量达到最大, 表达量为对照的近 8 倍(图 5-B)。

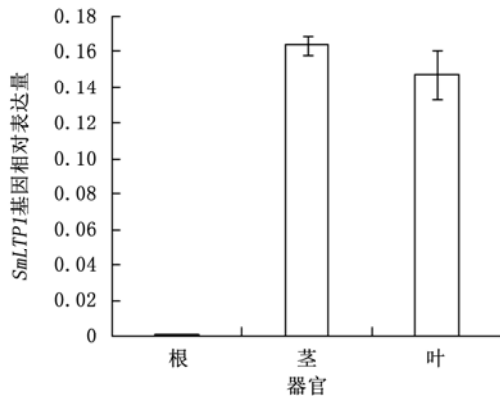


图4 *SmLTP1* 基因在丹参不同器官中的表达
Fig.4 Expression levels of *SmLTP1* in different organs of *S. miltiorrhiza*

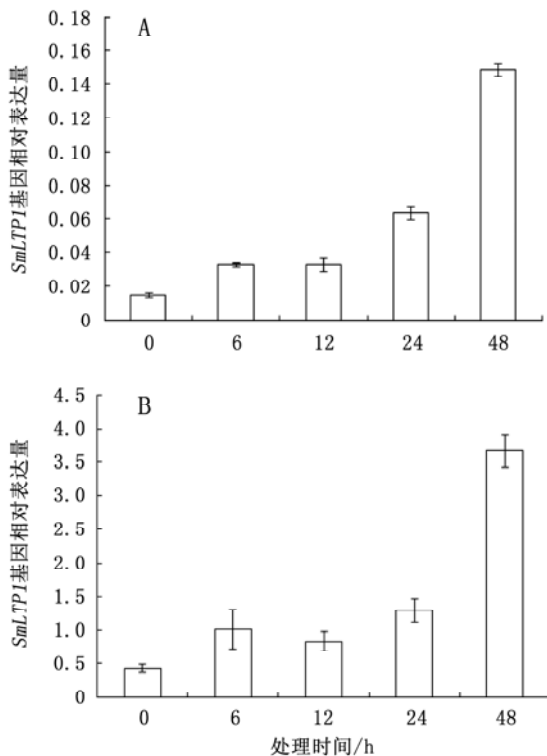


图5 XC-1 菌(A)和 MeJA (B)诱导下 *SmLTP1* 基因的表达
Fig.5 Expression levels of *SmLTP1* induced by XC-1 (A) and MeJA (B)

讨 论

本研究从丹参中克隆了非特异性脂质转移蛋白基因*SmLTP1*, 其编码的蛋白在结构上具有nsLTPs的共同特征和典型结构, 其中1个类似口袋状的疏

水结构使其具有可结合和容纳脂肪酸分子的功能, 4对二硫键使得该蛋白相对热、化学变性、酶的消化均很稳定(Samuel等2002; Carvalho和Gomes2007; Salcedo等2007)。另外, *SmLTP1* 蛋白N端具有典型信号肽特征, 表明其被合成后可能被运送或分泌到植物的特定部位执行特殊功能, 参与细胞的分泌代谢途径(Carvalho和Gomes2007)。

LTP 基因家族各成员有着各自不同的组织特异性, 从而在不同器官形成功能性的LTP蛋白。近年来, 对一些植物LTP基因表达的研究表明, LTP基因存在于不同器官的不同细胞内, 如菜豆中发现的一种LTP基因仅在根中专一性表达(Choi等1996)。本实验中*SmLTP1*在丹参的茎中表达最丰富, 其次是叶中, 而根中几乎不表达, 这种在不同器官中表达量的差异, 预示着其在不同器官中起到的作用也不尽相同。此外, *SmLTP1*仅在茎和叶中表达可能表示该基因编码的蛋白与丹参抗虫活性相关。在黑腐病菌XC-1侵染处理后*SmLTP1*基因表达量呈现增长趋势, 在MeJA诱导后*SmLTP1*基因表达量明显上调, 表明*SmLTP1*基因可能在植物抵抗和适应胁迫环境中有着重要的作用。

nsLTPs蛋白基因作为一种能使植物适应生物与非生物胁迫环境的基因, 对其的研究是十分必要的。在后续的实验中, 我们可能将其原核表达并提取该蛋白进行体外实验, 通过在丹参植物体内过表达和敲除该基因对其功能做更进一步的研究。

参考文献

- 冯玲玲, 周吉源(2004). 丹参的研究现状与应用前景. 中国野生植物资源, 23 (2): 4~7
- 郝岗平, 边高鹏, 张媛英(2006). 泰山白花丹参干叶片高质量DNA的提取. 中草药, 37 (6): 855~857
- 田爱梅, 曹家树(2008). 植物脂质转移蛋白. 细胞生物学杂志, 30: 483~488
- 汪少芸, 叶秀云, 饶平凡(2004). 植物非特异脂质转移蛋白的研究. 生物学通报, 39 (9): 11~13
- Aronel V, Vergnolle C, Cantrel C, Kader J-C (2000). Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci, 157 (1): 1~12
- Botton A, Begheldo M, Rasori A, Bonghi C, Tonutti P (2002). Differential expression of two lipid transfer protein genes in reproductive organs of peach (*Prunus persica* L. Batsch). Plant Sci, 163: 993~1000
- Boutrot F, Chantret N, Gautier M-F (2008). Genome-wide analysis of the rice and *Arabidopsis non-specific lipid transfer protein*

- (*nsLtp*) gene families and identification of wheat *nsLtp* genes by EST data mining. *BMC Genomics*, 9: 86
- Cameron KD, Teece MA, Smart LB (2006). Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol*, 140 (1): 176~183
- Carvalho AO, Gomes VM (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—a concise review. *Peptides*, 28: 1144~1153
- Choi D-W, Song J-Y, Oh M-H, Lee J-S, Moon J, Suh S-W, Kim S-G (1996). Isolation of a root-specific cDNA encoding a nsLTP-like protein from the roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Mol Biol*, 30 (5): 1059~1066
- Hincha DK, Neukamm B, Srór HA, Sieg F, Weckwarth W, Ruckels M, Lullien-Pellerin V, Schroder W, Schmitt JM (2001). Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol*, 125 (2): 835~846
- Jones BL, Marinac LA (2000). Purification and partial characterization of a second cysteine proteinase inhibitor from ungerminated barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Agr Food Chem*, 48 (2): 257~264
- Jose-Estanyol M, Gomis-Ruth FX, Puigdomenech P (2004). The eight-cysteine motif, a versatile structure in plant proteins. *Plant Physiol Biochem*, 42: 355~365
- Kader JC (1975). Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochim Biophys Acta*, 380 (1): 31~44
- Kader JC (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 47 (1): 627~654
- Kader JC (1997). Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. *Trends Plant Sci*, 2: 66~70
- Kader JC, Julienne M, Vergnolle C (1984). Purification and characterization of a spinach-leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *Eur J Biochem*, 139: 411~416
- Lauga B, Charbonnel-Campaa L, Combes D (2000). Characterization of *MZm3-3*, a *Zea mays* tapetum-specific transcript. *Plant Sci*, 157: 65~75
- Molina A, Garcia-Olmedo F (1997). Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J*, 12 (3): 669~675
- Pyee J, Yu H, Kolattukudy PE (1994). Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch Biochem Biophys*, 311 (2): 460~468
- Salcedo G, Sanchez-Monge R, Barber D, Diaz-Perales A (2007). Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta*, 1771: 781~791
- Samuel D, Liu Y-J, Cheng C-S, Lyu P-C (2002). Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol Chem*, 277: 35267~35273
- Skinner HB, McGee TP, McMaster CR, Fry MR, Bell RM, Bankaitis VA (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* phosphatidylinositol-transfer protein effects a ligand-dependent inhibition of choline-phosphate cytidylyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 (1): 112~116
- Sossountzor L, Ruiz-Avila L, Vignols F, Jolliot A, Arondel V, Tchang F, Grosbois M, Guerbette F, Miginiac E, Delseny M et al (1991). Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3 (9): 923~933
- Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Van Kammen A, De Vries SC (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3 (9): 907~921
- Trevino MB, O'Connell MA (1998). Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different developmental patterns of expression. *Plant Physiol*, 116 (4): 1461~1468
- Yeats TH, Rose JKC (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci*, 17: 191~198