

一个麻疯树胞质 II 类小热激蛋白基因 *JcHSP17.5* 的克隆和异源表达

朱勋路, 朱习红, 辜小苹, 徐莺*, 陈放

四川大学生命科学学院, 成都 610065

摘要: 从麻疯树胚乳cDNA文库中得到分子量大小约为17.5 kDa的胞质II类小热激蛋白基因, 命名为*JcHSP17.5*, GenBank登录号为GU320741。通过构建外源表达载体, 将*JcHSP17.5*基因分别在大肠杆菌以及酿酒酵母中过量表达来研究基因的耐热和耐渗透压胁迫能力, 发现两种重组菌在逆境下都较对照组生活力有显著提高。推测*JcHSP17.5*在麻疯树生长过程中可能与麻疯树耐热、耐旱以及耐离子胁迫相关。

关键词: 麻疯树; 小热激蛋白; 基因表达; 耐热; 耐渗透压

Cloning and Heterologous Expression of a Cytosolic Class II Small Heat Shock Protein Gene (*JcHSP17.5*) from *Jatropha curcas* L.

ZHU Xun-Lu, ZHU Xi-Hong, GU Xiao-Ping, XU Ying*, CHEN Fang

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China

Abstract: *JcHSP17.5*, an approximately 17.5 kDa cytosolic class II small heat shock protein (HSP) gene was cloned from a *Jatropha curcas* endosperm cDNA library (GenBank accession number is GU320741). To verify its possible function, the thermally and osmotically tolerant characteristics were tested by overexpressing the recombinant *JcHSP17.5* gene in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*, respectively. The results showed that the recombinant cells exhibited significantly improved viability in both thermal and osmotic stress condition compared with the control. It suggested that the *JcHSP17.5* represented an example of a HSP which was capable of protecting cells against environmental extreme.

Key words: *Jatropha curcas*; small heat shock protein; gene expression; thermotolerance; osmotolerance

在胁迫环境下, 生物体内会产生一组分子量大小在15~42 kDa的蛋白, 被称为小热激蛋白(small heat shock proteins, sHSPs) (Vierling 1991, 1997)。小热激蛋白具有分子伴侣功能(Horwitz 1992; Jakob 等 1993), 能在不依赖 ATP 的情况下阻止在逆境胁迫下的变性蛋白的累积以及保护蛋白的正确折叠(Beissinger 和 Buchner 1998), 从而减少胁迫对生物的伤害。植物小热激蛋白都是由核基因编码, 根据DNA序列相似性分析、免疫交叉反应以及胞内定位方法, 小热激蛋白可以分为5类(Waters 等 1996), 其中2类(CI和CII)分别定位于胞质或是细胞核内(Scharf等2001), 其余3类分别定位于质体(Vierling 1991)、内质网(Helm 等 1995)和线粒体(LaFayette 等 1996)。小分子热激蛋白表达可受多种因素诱导, 例如高温、低温、干旱、重金属离子、氧化物胁迫、种子发育、激素刺激等(Sun 等 2001)。在环境胁迫条件下, 小热激蛋白迅速大量表达, 其

积累量随温度升高和胁迫时间的延长而增加; 在胁迫解除后, 小热激蛋白会持续很长时间, 其半衰期在30~50 h (DeRocher 等 1991)。外源表达的小热激蛋白在逆境情况下可以发挥分子伴侣作用(Yeh 等 1997; Joe等2000), 阻止变性蛋白的积累(Collada 等 1997), 保护蛋白的正常折叠与表达。

麻疯树是具有耐干旱、耐高温、耐贫瘠生长特点的一种含油植物。在热带及亚热带干热河谷有大量的野生群落。通过研究麻疯树中小热激蛋白的耐热、耐旱作用机制, 可以对其它作物提高抗逆能力, 发现高效抗逆基因提供帮助。虽然对麻疯树的研究已经经历了10多年, 但是对麻疯树的抗逆机制还缺乏比较系统的研究报道。本文报道了

收稿 2010-01-15 修定 2010-04-29

资助 “十一五”科技支撑项目(2006BAD07A04)和国家自然科技资源平台项目(2005DKA21403)。

* 通讯作者(E-mail: yinghsu@263.net; Tel: 028-85417281)。

*JcHSP17.5*基因克隆以及在大肠杆菌与酵母中异源表达的情况,测定该基因编码的蛋白对大肠杆菌和酵母菌在高温胁迫以及高渗透压胁迫下细胞存活率的增强效果,从而揭示该基因对麻疯树在逆境生存条件下的相关胁迫的耐受作用大小。

材料与方 法

1 生物信息学分析

将从不同发育时期麻疯树(*Jatropha curcas* L.)种子胚乳构建的cDNA文库中克隆到的一段序列测序后,利用相关软件分析DNA序列编码的蛋白特性:用BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)工具进行同源性搜索;用ExPASy网站(<http://au.expasy.org>)的Compute pI/Mw程序进行生物信息学分析,计算预测蛋白的分子量、等电点的理论值;用Pfam Search寻找蛋白功能结构域;用SignalP程序分析氨基酸序列中是否存在信号肽;用HMMTOP程序预测跨膜结构。选用部分已报道的植物I类和II类小热激蛋白氨基酸序列,应用MEGA4软件构建系统发育树。

2 载体构建

2.1 原核表达载体构建 根据编码区序列设计5'端引物(5' TCGGATCCATGGATGTCAGGTTCTAGG 3',含BamHI酶切位点)和3'端引物(5' GCAAGCTTTCAAGCAATTTTAACCTCAA 3',含HindIII酶切位点)进行扩增。PCR产物经纯化后用BamHI和HindIII双酶切消化,将酶切后片段与同样双酶切的pET32a(具有氨苄霉素筛选标记)载体采用T4连接酶连接并转入TOP10感受态细胞,在含氨苄霉素的培养基上筛选阳性重组克隆。重组质粒经PCR和酶切验证无误后转入BL21(DE3)大肠杆菌表达菌株。

2.2 酵母表达载体构建 根据In-Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit(Clontech)使用说明设计引物,连接PCR产物与载体。根据pYES2操作手册和*S. c.* EasyComp. Transformation Kit(Invitrogen)构建和筛选阳性重组克隆。

3 重组菌蛋白表达

选取正确的表达菌株在添加了氨苄霉素($50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的LB液体培养基中于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 震荡培养至

OD_{600} 为1.0后,于新鲜培养基中稀释至 OD_{600} 为0.6,培养2 h,添加诱导剂IPTG至终浓度 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,继续培养4 h。各取1 mL处理后的大肠杆菌离心回收,加入 $50 \mu\text{L}$ SDS细菌裂解液,沸水煮4 min裂解细胞,吸取 $20 \mu\text{L}$ 点样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

挑取阳性酵母菌于含2%棉籽糖的液体SC-U预培养培养基中培养,待 OD_{600} 达到0.4后,加入2%半乳糖诱导8 h。取1 mL菌液离心回收。参照pYES2操作手册采用玻璃珠方法裂解细胞,加入 $50 \mu\text{L}$ SDS细菌裂解液,沸水煮4 min,吸取 $20 \mu\text{L}$ 点样,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

4 高温胁迫实验

采用上节方法培养后,分别取1 mL大肠杆菌和酵母菌液于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中进行热胁迫处理,分别于处理0、30和60 min时取样,大肠杆菌稀释5 000倍,酵母稀释20 000倍,分别取 $100 \mu\text{L}$ 菌液铺于固体培养基上,前者于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜(3组重复),次日统计菌落数量,后者于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜(3组重复),2 d后统计菌落数量。

5 渗透压胁迫实验

采用与高温胁迫处理相同的方法,分别将两种菌液于添加了0、0.5和 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl的培养基中处理1 h后涂板统计。

实验结果

1 *JcHSP17.5*生物信息学分析

在对麻疯树胚乳cDNA文库测序后经BlastX比对发现一个与蓖麻(*Ricinus communis*)细胞质II类小热激蛋白(GenBank登录号为XP_002516106)同源性达到89%的cDNA序列,GenBank登录号为GU320741,将该序列编码的蛋白命名为麻疯树细胞质II类小热激蛋白。根据测序结果分析,该cDNA序列包含转录起始位点与多聚腺苷酸加尾信号,含完整开放阅读框(ORF),为全长序列。该cDNA序列全长693 bp,5'非编码区29 bp,3'非编码区191 bp,ORF为474 bp,编码一个具有157个氨基酸的蛋白,经ExPASy网站(<http://au.expasy.org/>)在线工具预测编码蛋白等电点为6.15,分子量大小为 $17\ 559.23 \text{ Da}$,没有信号肽,不含跨膜结构。通过搜

索 Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)发现 JcHSP17.5 在序列 C 端有大小为 100 个氨基酸的 α - 晶体蛋白保守区域, 属于 α - 晶体 - 热激蛋白 23 类超基因家族(α -crystallin-Hsps_p23-like superfamily)特有结构域。同时, JcHSP17.5 氨基酸序列也具有典型的 II 类保守结构域。

2 JcHSP17.5 系统进化分析

选取已报道的部分植物的 I 类或 II 类小热激蛋

白氨基酸序列, 经 Clustal W 比对后, 采用 MEGA4 软件, 选择内分枝测试(interior branch test)中的邻接法(neighbor joining tree)构建分子进化树, 预测 JcHSP17.5 蛋白的生物进化地位。

从图 1 的分子进化分析中可以看出, 细胞质 I 类小热激蛋白聚为一群, 细胞质 II 类小热激蛋白聚在另一群上。JcHSP17.5 分布在胞质 II 类小热激蛋白分支上, 且与蓖麻胞质 II 类小热激蛋白最近, 从而也提示 JcHSP17.5 是胞质 II 类小热激蛋白。

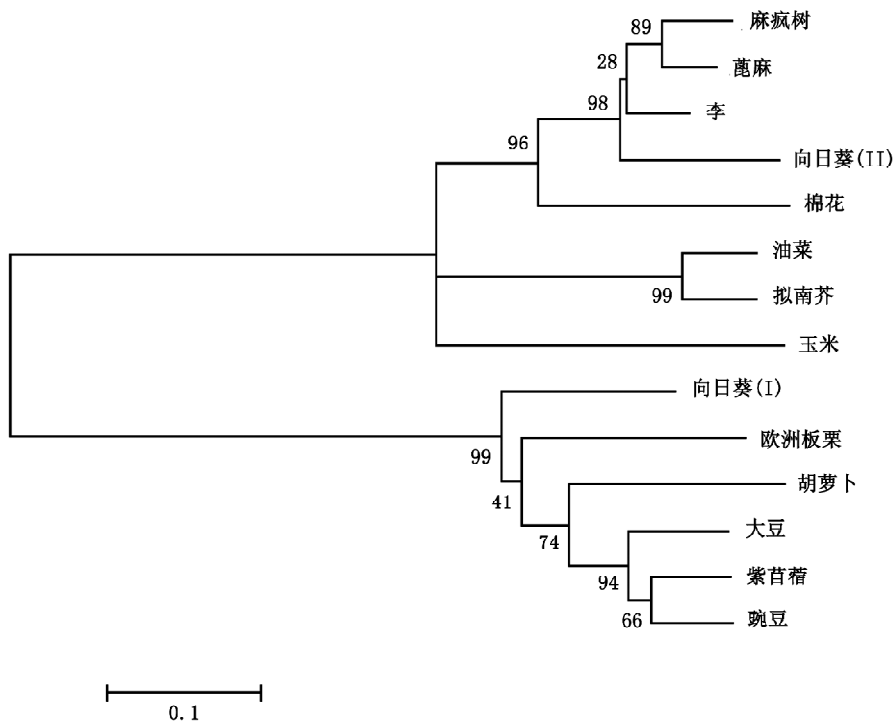


图 1 几种植物小热激蛋白的分子进化树分析

Fig.1 Phylogenetic analysis of small heat shock proteins from some plants

上分支为 II 类小热激蛋白, 下分支为 I 类小热激蛋白。各氨基酸序列 GenBank 登录号为: 麻疯树(*Jatropha curcas*), GU320741; 蓖麻(*Ricinus communis*), XP_002516106; 李(*Prunus salicina*), ACV9325; 向日葵(*Helianthus annuus*) (II), P46516; 棉花(*Gossypium hirsutum*), ABW89469; 油菜(*Brassica rapa*), ABV89637; 玉米(*Zea mays*), NP_001148454; 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), NP_196763; 欧洲板栗(*Castanea sativa*), CAA08908; 胡萝卜(*Daucus carota*), P27396; 大豆(*Glycine max*), P05478; 紫苜蓿(*Medicago sativa*), P27880; 豌豆(*Pisum sativum*), P19243; 向日葵(*Helianthus annuus*) (I), AAB63311。

3 JcHSP17.5 蛋白功能的验证

根据上文所述方法分别构建大肠杆菌和酵母菌的空白载体和重组载体, 分别命名大肠杆菌空白载体和重组载体为 pET32a 和 pET32a-HSP, 酵母菌空白载体和重组载体分别为 pYES2 和 pYES2-HSP。以空白载体为对照, 分别在高温(50 °C)和高渗透压

(0.5 和 1 mol·L⁻¹ NaCl)情况下检测 JcHSP17.5 蛋白对重组菌抗逆能力提高的效果。

3.1 蛋白表达 在重组菌诱导后用 SDS-PAGE 检测蛋白表达情况, 在重组大肠杆菌和重组酵母菌中分别出现大小为 35 kDa (图 2)和 17.5 kDa 左右的新蛋白条带(图 3)。

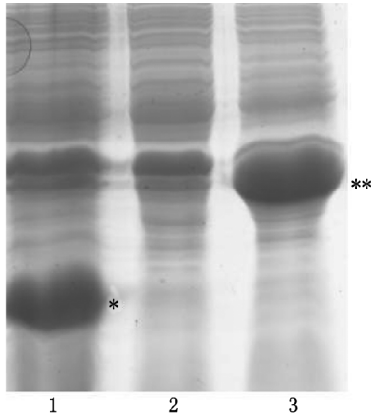


图2 HSP在重组大肠杆菌中的表达

Fig.2 Expression of HSP in recombinant *E. coli* cells

1: 诱导后的 pET32a; 2: 未诱导的 pET32a-HSP; 3: 诱导后的 pET32a-HSP。*: 35 kDa 左右的新蛋白条带; **: 17 kDa 左右的 pET32a 表达标签。

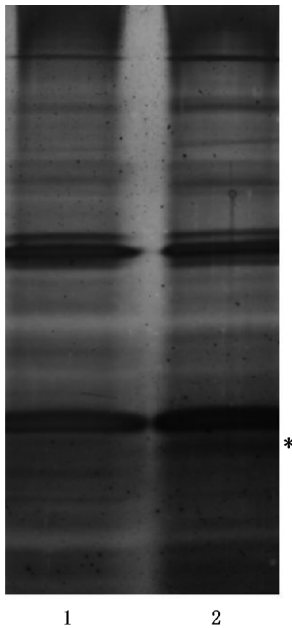


图3 HSP在重组酵母诱导后的表达

Fig.3 Expression of HSP in recombinant

S. cerevisiae cells after inducing

1: pYES2; 2: pYES2-HSP。*: 17.5 kDa 左右的新蛋白条带。

3.2 高温胁迫 由图4-c中可以观察到,在50℃高温胁迫下重组大肠杆菌细胞存活率下降速率缓于对照组。在胁迫30 min后, pET32a和pET32a-HSP的细胞存活率分别下降至16%和26%,而60 min处理后,分别有1%和3%的细胞存活。重组菌与对照相比,细胞存活率在30和60 min处理后分别提

高了72.5%和200%。从图4-d中可以观察到,在50℃高温胁迫下重组酵母菌细胞存活率同样高于对照。在30 min时存活率分别为49%和38%,在60 min时存活率分别为36%和25%。重组菌相比对照,细胞活力在两个时段分别提高28.9%和44%。结果显示,在高温胁迫条件下重组菌的细胞存活率相对于对照有明显提高,说明JcHSP17.5蛋白在生物遭受高温胁迫时,具有维持生物细胞生活力的功能。

3.3 渗透压胁迫 在图5-c中, pET32a对照组在含0.5和1 mol·L⁻¹ NaCl的培养基中分别处理1 h后,细胞存活率为71%和51%,重组菌pET32a-HSP的细胞存活率则是92%和68%。重组菌与对照相比,细胞活力在0.5和1 mol·L⁻¹的NaCl处理后分别提高29.5%和33%。在图5-d中, pYES2对照中细胞存活率分别是67%和52%, pYES2-HSP中细胞存活率分别为88%和71%。重组菌与对照相比,细胞活力在0.5和1 mol·L⁻¹的NaCl处理后分别提高31.3%和36.5%。

测定结果显示,在高渗透压胁迫的情况下,过表达JcHSP17.5对重组菌的细胞存活率有很明显的提高,说明JcHSP17.5蛋白在生物遭受高渗透压胁迫时,具有维持生物细胞生活力的功能。

讨 论

麻疯树细胞质II类小热激蛋白在NCBI中的BLAST比对结果显示,同源性最高的是蓖麻的胞质II类小热激蛋白,与其余几种植物的胞质II类小热激蛋白同源性也比较高(图1)。在JcHSP17.5的氨基酸序列C端大约有包含100个氨基酸的α-晶体蛋白保守区域。小热激蛋白C端保守区域可分为保守序列I和保守序列II,中间有不同长度的亲水域。在保守序列I中,具有小热激蛋白共有的氨基酸残基Pro-X(14)-Gly-Val-Leu,保守序列II的共有序列为Pro-X(14)-Val/Leu/Ile-Val/Leu/Ile(Waters和Vierling 1999)。胞质II类小热激蛋白具有II类特有的N端与C端保守区域(Waters等1996)。N端除保守域外则是差异很大的氨基酸序列,N端序列的多样性决定了HSP蛋白结合底物的情况(Basha等2006)。

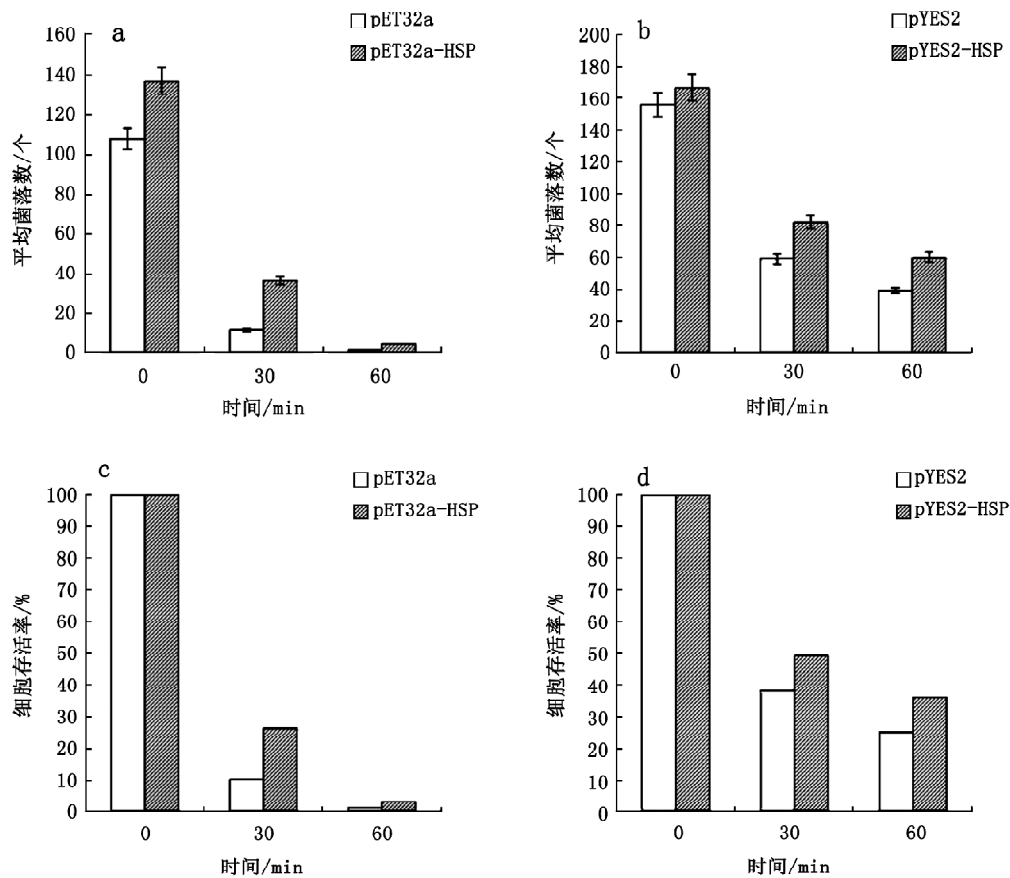


图4 高温胁迫对菌落数及细胞存活率的影响

Fig.4 Effect of heat stress on cell number and viability

a 和 c: 大肠杆菌表达系统; b 和 d: 酵母表达系统。

小热激蛋白通常是在生物受到逆境胁迫(温度、重金属、氧化、干旱、外源激素等)后出现大量表达的。如 *CsHSP17.5* 等与温度胁迫相关 (Craig 等 1993; Thieringer 等 1998; Soto 等 1999), *AtHsp17.7-CII* (Sun 等 2001) 与渗透压胁迫相关, *HaHsp17.6-CI* (Almoguera 和 Jordano 1992) 与脱落酸胁迫相关, *OsHsp26.6-P* (Lee 和 Vierling 2000) 与氧化胁迫相关, *MsHsp18.2-CI* (Gyorgyey 等 1991) 与重金属胁迫相关。Almoguera 和 Jordano (1992) 研究发现, 向日葵种子胚发育阶段也会有 HSP 的表达。*JcHSP17.5* 是从发育时期的种子胚乳 cDNA 文库中克隆的, *JcHSP17.5* 可能在种子胚发育阶段得到表达来对抗种子胚发育阶段遭受的高温及干旱胁迫。

从外源表达情况来看, *JcHSP17.5* 有较强的改善高温和高渗透压胁迫的能力(图 4 和图 5)。外源

表达的 *JcHSP17.5* 蛋白在高温和高渗透压逆境条件下发挥分子伴侣作用(Yeh 等 1997; Joe 等 2000), 结合宿主蛋白, 阻止变性蛋白的积聚(Collada 等 1997), 保护蛋白的正常折叠与表达, 从而提高细胞的存活率。

麻疯树是一种热带植物, 生长在干旱贫瘠地区, 有较强的耐高温和耐干旱能力。麻疯树小热激蛋白参与抗逆境胁迫过程, 为麻疯树正常生长提供保护作用。揭示麻疯树小热激蛋白与麻疯树抗逆能力的关系有助于将麻疯树小热激蛋白应用于一些抗逆能力较弱的植物品种, 提高植物的抗逆能力。而且小热激蛋白在体外无 ATP 的情况下也能起到分子伴侣作用(Beissinger 和 Buchner 1998), 或许可以为保护一些易失活的蛋白酶提供一定参考。

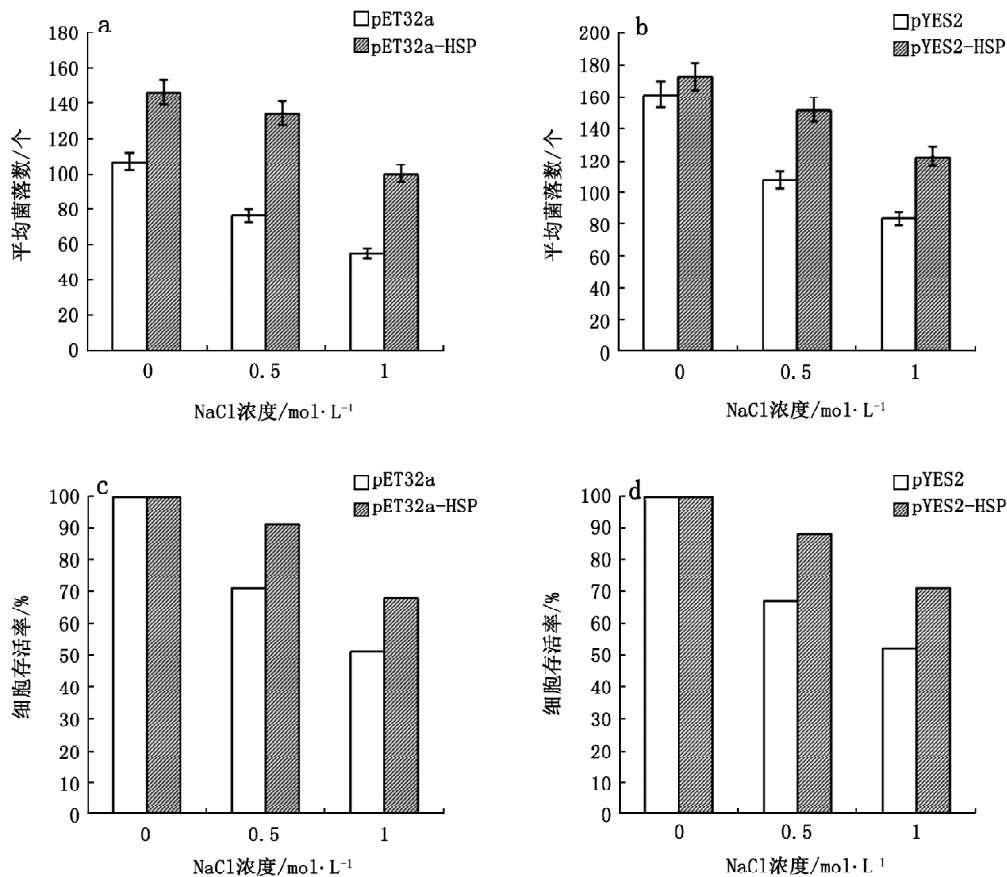


图5 NaCl胁迫对菌落数及细胞存活率的影响

Fig.5 Effect of NaCl stress on cell number and viability

a 和 c: 大肠杆菌表达系统; b 和 d: 酵母表达系统。

参考文献

- Almoguera C, Jordano J (1992). Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Mol Biol*, 19 (5): 781~792
- Basha E, Friedrich KL, Vierling E (2006). The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *J Biol Chem*, 281: 39943~39952
- Beissinger M, Buchner J (1998). How chaperones fold proteins. *Biol Chem*, 379: 245~259
- Collada C, Gomez L, Casado R, Aragoncillo C (1997). Purification and *in vitro* chaperone activity of a class I small heat-shock protein abundant in recalcitrant chestnut seeds. *Plant Physiol*, 115: 71~77
- Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev*, 57: 402~414
- DeRocher AE, Helm KW, Lauzon LM, Vierling E (1991). Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol*, 96: 1038~1047
- Gyorgyey J, Gartner A, Nemeth K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D (1991). Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Mol Biol*, 16 (6): 999~1007
- Helm KW, Schmeits J, Vierling E (1995). An endomembrane-localized small heat-shock protein from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 107: 287~288
- Horwitz J (1992). α -Crystallin can function as a molecular chaperone. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 10449~10453
- Jakob U, Gaestel M, Engel K, Buchner J (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268: 1517~1520
- Joe MK, Park SM, Lee YS, Hwang DS, Hong CB (2000). High temperature stress resistance of *Escherichia coli* induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. *Mol Cells*, 10: 519~524
- LaFayette PR, Nagao RT, O'Grady K, Vierling E, Key JL (1996). Molecular characterization of cDNAs encoding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean. *Plant Mol Biol*,

- 30: 159~169
- Lee GJ, Vierling E (2000). A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol*, 122: 189~197
- Scharf KD, Siddique M, Vierling E (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones*, 6: 225~237
- Soto A, Allona I, Collada C, Guevara MA, Casado R, Rodriguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gomez L (1999). Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiol*, 120: 521~528
- Sun W, Bernard C, Cotte BVD, Van Montagu M, Verbruggen N (2001). *At-HSP17.6A*, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J*, 27: 407~415
- Thieringer HA, Jones PG, Inouye M (1998). Cold shock and adaptation. *BioEssays*, 20: 49~57
- Vierling E (1991). The roles of heat shock proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42: 579~620
- Vierling E (1997). The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiol Plant*, 19: 539~547
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J Exp Bot*, 47: 325~338
- Waters ER, Vierling E (1999). The diversification of plant cytosolic small heat shock proteins preceded the divergence of mosses. *Mol Biol*, 16 (1): 127~139
- Yeh CH, Chang PFL, Yeh KW, Lin WC, Chen YM, Lin CY (1997). Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, *Oshsp16.9*, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94 :10967~10972