

星星草脱氢抗坏血酸还原酶(*PtDHAR*) cDNA 的克隆及表达分析

聂玉哲, 张晓磊, 许志茹, 张旻, 李玉花*

东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要: 脱氢抗坏血酸还原酶是抗坏血酸代谢循环中的关键酶, 在多种植物中与抗胁迫相关。为了获得抗盐碱植物星星草中该基因序列, 利用 RACE 技术, 从星星草中克隆出脱氢抗坏血酸还原酶基因(*PtDHAR*)的 cDNA 全长序列, 其 GenBank 登录号为 HM125046。 *PtDHAR* cDNA 核苷酸序列长度为 987 bp, 开放阅读框为 639 bp, 编码 213 个氨基酸。该基因编码的氨基酸序列与水稻、小麦等禾本科作物具有很高的同源性。Northern 杂交分析表明, 该基因在盐碱胁迫下表达量显著升高。

关键词: 星星草; 脱氢抗坏血酸还原酶; 基因克隆; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of Dehydroascorbate Reductase Gene (*PtDHAR*) in *Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scribn. et Merr.

NIE Yu-Zhe, ZHANG Xiao-Lei, XU Zhi-Ru, ZHANG Yang, LI Yu-Hua*

College of Life Science, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: Dehydroascorbate reductase (DHAR) is the key enzyme in ascorbate metabolic cycle which was reported related with stress resistant in many plants. RACE technology was employed to obtain full-length cDNA from *Puccinellia tenuiflora* named *PtDHAR* (GenBank accession number HM125046), which was 987 bp length. The open reading frame encoding 213 amino acids which had a high identity with DHAR from *Oryza sativa* and *Triticum aestivum*. Northern blotting analysis showed that the expression level of *PtDHAR* under saline-alkali stress was significantly up-regulated than that with no stress.

Key words: *Puccinellia tenuiflora*; dehydroascorbate reductase; gene clone; expression analysis

脱氢抗坏血酸还原酶(dehydroascorbate reductase, DHAR)能够催化脱氢抗坏血酸还原为抗坏血酸。抗坏血酸(L-ascorbic acid, AsA)又名维生素C, 是植物细胞中一种重要的抗氧化剂(Amin 2010)。抗坏血酸-谷胱甘肽活性氧清除系统在抗氧化胁迫反应中起着关键的作用(Krishnan 等 2009)。在这个系统中, AsA 自身被氧化为单脱氢抗坏血酸(monodehydroascorbate, MDA)。一部分 MDA 在单脱氢抗坏血酸还原酶(monodehydroascorbate reductase, MDHAR)的催化下还原为 AsA, 另一部分 MDA 被氧化为脱氢抗坏血酸(dehydroascorbate, DHA)。DHAR 以谷胱甘肽(glutathion, GSH)为底物, 催化 DHA 还原为 AsA (图 1)。DHAR 可使 AsA 循环利用, 促进植物体内 AsA 的增加(Chen 等 2003), 是 AsA 在植物体内循环的一个重要途径(Ishikawa 等 2006)。盐碱环境胁迫使植物体内活性氧(reactive oxygen species, ROS)代谢系统的平衡被破坏, 活性氧水平增高, 过量的活性氧对具有细胞毒害作用(Ashraf 和 Harris 2004)。因此, DHAR 在保护细胞组分抵御氧化损

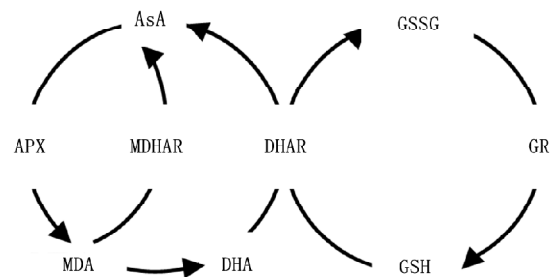


图 1 AsA-GSH 活性氧清除系统作用模式

Fig.1 The model of AsA-GSH ROS scavenging system

APX: 抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase); MDA: 单脱氢抗坏血酸; MDHAR: 单脱氢抗坏血酸还原酶; AsA: 抗坏血酸; DHA: 脱氢抗坏血酸; DHAR: 脱氢抗坏血酸还原酶; GSSG: 氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione); GSH: 谷胱甘肽; GR: 谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase)。

收稿 2010-04-19 修定 2010-05-12

资助 国家科技部“863”项目(2006AA10Z129, 2008AA10Z156)和黑龙江省科技计划(攻关)项目(GB06B112-5)。

* 通讯作者(E-mail: lyhshen@126.com; Tel: 0451-82191733)。

伤中发挥重要作用(Yabuta 等 2002; Kwon 等 2003; 余春梅等 2009), 特别是参与了植物抵御盐胁迫的反应(Ushimaru 等 2006)。

星星草为禾本科碱茅属多年生草本植物, 其耐盐、耐碱性均较强, 在土壤 pH 值达到 10、表土含盐量达到 5% 时仍能生长良好, 是进行植物耐盐碱机理研究的良好材料。本研究以星星草为试材, 用 RACE 方法克隆了星星草 *PtDHAR* 基因, 并对其在盐碱胁迫下的表达情况进行了分析, 为在分子水平上研究星星草耐盐碱机制、深入了解 *DHAR* 基因的功能奠定了试验基础。

材料与amp;方法

星星草 [*Puccinellia tenuiflora* (Griseb.) Scribn. et Merr.] 种于温室中, 土壤条件为草炭土: 珍珠岩: 蛭石 (3: 2: 1), 温度约为 25 °C, 光照强度约为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度 65%~75%, 8 周龄时用于试验处理。

感受态大肠杆菌 Top10 购自 TaKaRa 公司, pBS-T 载体购自 TIANGEN 公司, DNA 纯化回收试剂盒购自 TOYOBO 公司, Trizol Reagent 购自 Invitrogen 公司, SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 BD Biosciences 公司, LA Taq DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司, 引物合成及 DNA 测序均由上海生物工程有限公司完成。

按照说明书用 Trizol 试剂提取星星草地上部总 RNA, 用 RACE 试剂盒构建 cDNA 库。根据我们获得的 *DHAR* EST 序列 (GenBank 登录号为 HM125046) 设计 5' 及 3' 序列基因特异性引物 GSP1 和 GSP2。50 μL PCR 反应体系中含有 1 \times LA Taq 缓冲液、200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs、50 ng 引物、0.5 μL LA Taq DNA 聚合酶、100 ng cDNA 模板。5' 序列扩增条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 3 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。3' 序列扩增条

件为: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 5 s, 68 °C 4 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物经连接到 pBS-T 载体、转化 Top10 感受态细胞后挑选白斑阳性克隆, 经 PCR 验证后测序。

将测序得到的 5' 和 3' 序列用 CAP3 软件进行拼接后设计全长引物 P1 和 P2。PCR 反应体系同上, 反应条件为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物的克隆和测序同上。所得序列与 GenBank 数据库中序列进行比对, 并用 Clustal 软件对同源蛋白质序列进行比较和分析; 使用 NCBI 提供的 ORF-finder 与保守区数据库 (conserved domain database, CDD) 分别进行基因开放阅读框分析与蛋白保守结构域分析; 用 ExPASy 软件计算蛋白的理论分子量、等电点、不稳定系数及疏水性; 用 LOCSVMPSI 软件对其蛋白质亚细胞定位进行预测; 用 MEGA4 软件构建系统发生树。

为了检测星星草 *PtDHAR* 基因与盐碱逆境的应答关系, 利用 Na_2CO_3 模拟盐碱胁迫, 对星星草 *PtDHAR* 基因的表达特性进行 Northern 杂交检测。将 8 周龄星星草用 0、50、100、150 和 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 分别处理 24 h 后取其地上部, 另用 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2CO_3 处理星星草 0、2、6、12 和 24 h 后取其地上部。按照说明书用 Trizol 试剂提取经 Na_2CO_3 处理的星星草总 RNA, 取 10 μg 于 1.0% 的甲醛琼脂糖变性凝胶上电泳, 并转移到 Hybond-N⁺ 尼龙膜上, 65 °C 预杂交 1 h, 用地高辛标记的 *PtDHAR* 基因探针 65 °C 杂交 1 h, 显影, 通过 Northern 杂交检测 *PtDHAR* 基因的表达变化。

结果与amp;讨论

1 星星草 *PtDHAR* 基因全长 cDNA 序列的克隆和分析

本研究从构建的星星草 RACE cDNA 文库中克隆得到脱氢抗坏血酸还原酶基因, 将此基因命名为 *PtDHAR* (GenBank 登录号 HM125046)。其 cDNA 序列全长 987 bp, 5' 非翻译区 75 bp, 3' 非翻译区 273 bp, 开放阅读框 (ORF) 区域为 639 bp, 编码 213 个氨基酸 (图 2)。该基因编码蛋白的预测分子量为 23.4 kDa, 且 LOCSVMPSI 软件分析该蛋白存在于细胞质中, 与水稻 DHAR1 一致 (Urano 等 2000)。理

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列 (5' → 3')
GSP1	ATGGACGCTGGTCAGGGTTTCGG
GSP2	CCTTCGTCAAGACCAAGCCACC
P1	GCGGATCACCCTACAAC
P2	ATGCAAGAAGAGGCTCAC

1 TGGGGATCACCCTACAACCCACACTCGTCACTCAGGAGTC
53 AGTCAGGAGATTCGGTCGCCGTCGATCGACATGACCGTGGAGGTGTGCGTCAAGGCGGCCGTCGGGCACCCCGACACCCCTCGCGCAGTGT
M T V E V C V K A A V G H P D T L G D C 20
143 CCCTTCTCCCAGAGGGTGTGCTCGCGCTGGAGGAGAAGAAGGTGCCCTACCAGATGAAGTTCATCGACGTCAGCAGCAAGCCCAATGG
P F S Q R V L L A L E E K K V P Y Q M K L I D V S S K P K W 50
233 TTTTGGAGATCAACCCAGAGGAAAGGTGCCTGTGTTAAACGGTGGTATGTTAAATGGATTGCTGATTCCGATGTAATTACTCAGGTC
F L E I N P E G K V P V F N G G D G K W I A D S D V I T Q V 80
323 ATTGAGGAGAAGTACCAACTCCATCACTTGTCAACCCCTCCTGAGTATGCTTCAAGTCAAGATCTTCTCAACCTTCGTCGCATTT
I E E K Y P T P S L V T P P E Y A S V G S K I F S T F V A F 130
413 TTGAAGCAAGGATGCTACTGATGGTACGGAGAAGGCACTTGTGACGAGTGCAGGCTCTTGACGGGCACCTAAAAGTTCATGGCCCC
L K S K D A T D G T E K A L V D E L Q A L D G H L K A H G P 150
503 TACATCAATGGGGAGAAAGTATCGGCTGTGATCTGAGCCTTGCCCAAAGCTTCCATCTCCAGGTGCCCTGGAGCATTTCAAAGGA
Y I N G E K V S A V D L S L A P K L F H L Q V A L E H F K G 170
593 TGAAGTCCCGAAAACCCCTGACCAGCGTCCATGCCTACACCAAGGCTCTGTTACCGCGGAATCCTTCGTCAGACCAAGCCCAACG
W K V P E T L T S V H A Y T K A L F S R E S F V K T K P T K 190
683 GAGAACCTGATCGCCGGATGGGCGCCAAAGTGAACCCGTAAGCCCGCTGCTTGGAGACCACCACCGTTTGTGCTGCTCGGTCCCTT
E N L I A G W A P K V N P * 213
773 GTCAGTAGTGGTTATGGGCAGTAGTAGGCC TCCTCCTCTGTAGACTGATCGCATGAGCTGGGTGGAATAATGCGTAGCCTTGCTGGGTC
863 GCTGTGTTGTGGAAGCGCGCACTATCTGCGTGAACCTTCTATCTATGCTCTGGTGCAGGGGTATGTGACTGCGATGTGAACCTTTTATC
953 GTGTGAATGAATAATGGAGATGTGAGCCTCTTCTGCATAACTI

图2 *PtDHAR* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Fig.2 The cDNA and deduced amino acid sequences of *PtDHAR*

5'及3'引物序列、GST-N-family及GST-C-DHAR保守区分别用浪线、单线和双线标记。左右两侧的数字分别标注核苷酸及氨基酸的位置。

论等电点(pI)为6.60;负电荷残基总数(Asp+Glu)为26,正电荷残基总数(Arg+Lys)为25;不稳定系数为22.08,属于稳定蛋白;亲水性(grand average of hydropathicity, GRAVY)值为-0.156,说明此蛋白属于亲水蛋白。

2 *PtDHAR* 同源性分析

通过NCBI BlastX对*PtDHAR*基因进行同源氨基酸序列搜索,星星草*PtDHAR*基因编码的氨基酸序列与其它物种的DHAR具有很高的相似性(图3),在62%~91%,其中与禾本科植物小麦、水稻的相似性最高,分别为91%和83%(表2)。系统发生树结果显示,星星草*PtDHAR*基因编码蛋白与单子叶植物的DHAR为同一起源,并与小麦的同源性最高,在进化上属同一种分支(图4)。

3 *PtDHAR* 基因编码蛋白序列的保守性分析

利用NCBI的蛋白保守区数据库(CDD)对*PtDHAR*编码的氨基酸序列进行蛋白保守区预测。

结果显示,*PtDHAR*基因编码的蛋白具有2个保守区,分别是GST的N末端(GST-N-family)和GST的C末端亚家族(GST-C-DHAR)。水稻DHAR1(Urano等2000)及青花菜BoDHAR(张国裕等2006)

表2 *PtDHAR* 基因编码蛋白与其它植物DHAR蛋白的同源性分析Table 2 Homology analysis of the deduced amino acid sequences coded by *PtDHAR* with other plants' DHAR sequences

物种	GenBank 登录号	氨基酸残基/个	相似性/%
小麦	AAL71854	212	91
水稻	BAA90672	213	83
马铃薯	ABA46750	210	72
烟草	AAL71857	212	71
拟南芥	AAM65005	213	70
芥菜	AAN04049	217	62
蒺藜苜蓿	AAY85185	264	62

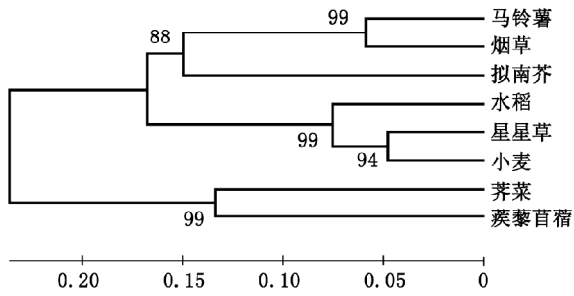


图4 各物种DHAR进化树分析

Fig.4 Phylogenetic analysis of DHAR in various plant species

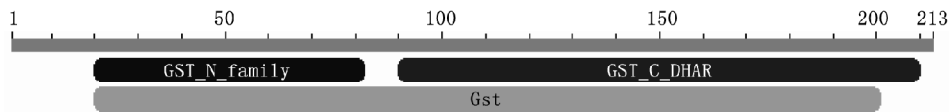
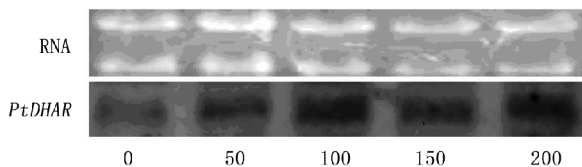
都属于GSH依赖型DHAR, 且含有GST-C-DHAR保守区, 由于*PtDHAR*编码的蛋白C末端与N末端都存在与谷胱甘肽连接的保守区(图5), 表明*PtDHAR*编码的蛋白具有高度的保守性, 且可能与GSH偶联参与到AsA-GSH抗氧化系统中。

4 盐碱胁迫下*PtDHAR*基因的表达分析

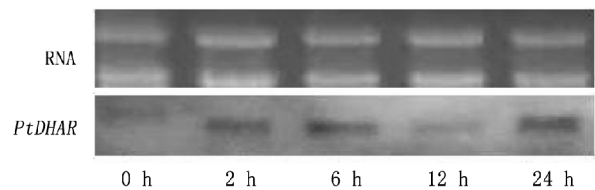
用不同浓度的 Na_2CO_3 对星星草进行处理,

Northern杂交结果表明 $50\sim 200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 处理24 h后植株地上部*PtDHAR*的表达量均比未处理对照植株有明显的增加, 且在 $100\sim 200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 高浓度盐碱胁迫下表达量要高于 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 水平, 说明该基因表达量与盐碱胁迫的程度具有一定的相关性(图6)。

选择 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 对星星草进行处理, 并进行时间梯度的表达分析。Northern杂交结果表明, *PtDHAR*基因在无盐碱处理的样品(0 h)中有少量表达; 盐碱处理2 h和6 h后表达量增加; 12 h后表达量有所回落, 24 h后表达量又上升, 且在24 h的表达量明显高于2 h和6 h的表达量, 说明该基因的表达与胁迫时间具有一定的相关性, 由于盐碱胁迫12 h的取样在夜间, 植物在昼夜代谢中存在活性氧代谢差异(Apel和Hirt 2004), 因此该时间点下*PtDHAR*基因的表达量回落可能与光照相关(图7)。

图5 *PtDHAR*基因编码蛋白的氨基酸保守区Fig.5 The conserved domain of *PtDHAR*图6 不同浓度 Na_2CO_3 处理后*PtDHAR*基因的表达Fig.6 *PtDHAR* expression after different Na_2CO_3 concentration stress

0、50、100、150和200分别表示0、50、100、150和 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 处理。

图7 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$ 处理不同时间后*PtDHAR*基因的表达Fig.7 *PtDHAR* expression after time gradient stress with $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Na}_2\text{CO}_3$

本研究利用RACE技术, 从星星草中克隆出脱氢抗坏血酸还原酶基因(*PtDHAR*)的cDNA全长序列, 该基因在盐碱胁迫下表达量显著升高, 其编码的氨基酸序列与水稻、小麦等禾本科作物具有很高的同源性。作为潜在的植物抗盐碱基因资源, *PtDHAR*经过更深入的功能研究后可能具有重要的应用价值。

参考文献

- 余春梅, 李斌, 李世民, 陈静, 王道文(2009). 拟南芥和作物中维生素C生物合成与代谢研究进展. 植物学报, 44 (6): 643~655
- 张国裕, 康俊根, 张延国, 程智慧, 王晓武(2006). 青花菜雄性不育相关基因*BoDHAR*的克隆与表达分析. 生物工程学报, 22 (5): 751~756
- Amin MA (2010). Role of dissolved oxygen reduction in improvement inhibition performance of ascorbic acid during copper

- corrosion in 0.50 mol/L sulphuric acid. *Chin Chem Lett*, 21 (3): 341~345
- Apel K, Hirt H (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 55: 373~399
- Ashraf M, Harris PJC (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci*, 166: 3~16
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR (2003). Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (6): 3525~3530
- Ishikawa T, Dowdle J, Smimoff N (2006). Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiol Plant*, 126: 343~355
- Krishnan N, Kodrik D, Kludkiewicz B, Sehnal F (2009). Glutathione-ascorbic acid redox cycle and thioredoxin reductase activity in the digestive tract of *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Insect Biochem Mol Biol*, 39: 180~188
- Kwon SY, Choi SM, Ahn YO, Lee HS, Lee HB, Park YM, Kwak SS (2003). Enhanced stress-tolerance of transgenic tobacco plants expressing a human dehydroascorbate reductase gene. *J Plant Physiol*, 160: 347~353
- Urano J, Nakagawa T, Maki Y, Masumura T, Tanaka K, Murata N, Ushimaru T (2000). Molecular cloning and characterization of a rice dehydroascorbate reductase. *FEBS Letters*, 466: 107~111
- Ushimaru T, Nakagawa T, Fujioka Y, Daicho K, Naito M, Yamauchi Y, Nonaka H, Amako K, Yamawaki K, Murata N (2006). Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J Plant Physiol*, 163: 1179~1184
- Yabuta Y, Motoki T, Yoshimura K, Takeda T, Ishikawa T, Shigeoka S (2002). Thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase is a limiting factor of antioxidative systems under photo-oxidative stress. *Plant*, 32: 915~925