

二色补血草 *OEE2* 基因的克隆和表达

张大伟, 王玉成*, 杨传平

东北林业大学林木遗传育种与生物技术教育部重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 从二色补血草中分离出一条含有完整开放读码框(ORF)序列的 *OEE2* 基因。该基因全长 994 bp, 其中 5' 非翻译区 27 bp, 3' 非翻译区 160 bp, ORF 全长 807 bp, 共编码 264 个氨基酸, 编码蛋白的分子量为 28.2 kDa, 理论上的等电点为 7.66。BlastP 分析表明, 二色补血草 *OEE2* 与马铃薯 *OEE2* 序列同源性最高, 与喇叭水仙 *OEE2* 序列同源性最低, 从 9 个物种的氨基酸多序列比对中可以看出, *OEE2* 的氨基酸序列保守性较高。实时定量 RT-PCR 方法检测该基因对低温、NaCl 和聚乙二醇(PEG)胁迫的基因表达模式的结果表明, PEG 和低温能诱导 *OEE2* 基因在二色补血草叶中表达, 这两种处理的 *OEE2* 基因表达量于胁迫 48 h 后都达到高峰, 而在 NaCl 胁迫下 *OEE2* 在二色补血草根和叶中表达都受抑制。

关键词: 二色补血草; *OEE2*; 基因表达; 实时定量 RT-PCR

Cloning and Expression Analysis of An Oxygen-evolving Enhancer Protein II Gene (*OEE2*) from *Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze

ZHANG Da-Wei, WANG Yu-Cheng*, YANG Chuan-Ping

Key Laboratory of Forest Tree Genetic Breeding and Biotechnology, Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The sequence of oxygen-evolving enhancer protein II (*OEE2*), which contained a complete open reading frame (ORF), was cloned from a cDNA library of *Limonium bicolor*. The sequence was 994 bp in length, including a 27 bp sequence of 5' untranslated region and a 160 bp sequence of 3' untranslated region. It had an ORF of 807 bp in length, which encoded a deduced amino acids of 264 residues. The molecular weight of deduced protein was 28.2 kDa with a theoretical pI of 7.66. Multiple sequence alignments of *OEE2* proteins from 9 plant species revealed that the *OEE2* proteins shared high identities in amino acid sequence. The BlastP analysis revealed that amino acid sequence of *OEE2* protein from *L. bicolor* shared the highest amino acid sequence similarity with that from *Solanum tuberosum* and the lowest similarity with that from *Narcissus pseudonarcissus* among the 9 *OEE2* proteins. We examined the expression pattern of the *OEE2* gene in leaves and roots of *L. bicolor* in response to NaCl, low temperature and PEG stresses at different time points by using real time RT-PCR. The results showed that *OEE2* could be induced by low temperature and PEG treatment in leaves, its expression reached maximum level after treatment for 48 h by both low temperature and PEG. However, the expression of *OEE2* was inhibited by NaCl treatment in both leaves and roots of *L. bicolor*.

Key words: *Limonium bicolor*; oxygen-evolving enhancer protein 2; gene expression; real time RT-PCR

植物光合作用系统 II 含有 3 个外周蛋白, 它们的比率为 1:1:1 (Andersson 等 1984), 其中氧不断变化的增强蛋白 2 (oxygen-evolving enhancer protein II, *OEE2*) 由细胞核基因组中 *psbP* 基因编码, *OEE2* 蛋白与维持 Ca^{2+} 和 Cl^- 的结合相关(吴守锋等 2007), 这种结合在维持光系统 II (PSII) 的稳定和生物功能中起作用(谭翠燕等 2003), 光合放氧是植物 PSII 的功能, 它催化水裂解而放出氧气。因此, *OEE2* 蛋白在维持 PSII 的稳定性和保证植物光合作用正常进行中起作用。已有的一些研究认为 *OEE* 家族基因在植物中的表达与非生物胁迫有关。例如, 有研

究报道 NaCl (Sugihara 等 2000)、 NaHCO_3 (杨传平等 2004) 以及高温和重金属胁迫(周海燕等 2006) 可以明显改变 *OEE* 基因家族中的 *OEE1* 或 *OEE2* 基因表达的变化, 这些提示, *OEE* 基因家族参与植物的抗胁迫反应。

收稿 2008-11-21 修定 2009-02-23

资助 教育部科学技术研究重点项目(107037)、国家自然科学基金面上项目(30571509)和黑龙江省攻关重点项目(GB06B303-1)。

* 通讯作者(E-mail: wangyucheng1029@yahoo.com.cn; Tel: 0451-82190607)。

二色补血草又名付氏矾松、草原千枝梅, 是多年生草本植物。可在干旱和盐碱地生长, 是盐碱化较严重地区的理想绿化植物, 在不经改良的土壤上可以直接种植, 说明它具有良好的抗干旱和耐盐碱胁迫的能力, 是进行植物抗干旱和耐盐碱基因克隆的理想材料之一。本文克隆了二色补血草的 *OEE2* 基因, 分析其在非生物胁迫逆境下表达的结果表明, 该 *OEE2* 基因的表达受盐、旱、低温等胁迫的调控, 说明 *OEE2* 为胁迫应答基因, 因此, 本文对这一问题作了探讨。

材料与方 法

本文构建了一个二色补血草 [*Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze.] cDNA 文库, 共获得了 2358 条高质量的表达序列标签 (expressed sequence tag, EST) 序列, 通过 EST 分析, 获得了含有完整开放阅读框 (open reading frame, ORF) 序列的 *OEE2* 基因 (Wang 等 2008)。

二色补血草种子种在温室花盆中, 生长基质为沙和草炭土 (2:1)。温室的温度为 24 °C, 平均光照强度为 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 相对湿度在 65%~75% 之间, 每天浇水, 保证土壤水分充足。种子萌发生长 2 个月后, 取二月龄的二色补血草幼苗分别用 0.2 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 和 20% (W/V) PEG6000 溶液浇灌土壤进行盐和干旱胁迫处理; 二色补血草的全株放在 3 °C 的培养箱中进行低温处理。以生长在正常条件下的二色补血草为对照。在胁迫 0、6、12、24 和 48 h 后, 分别取处理和对照二色补血草的健康叶片和根部用蒸馏水清洗, 拭干后置于 -70 °C 中保存备用。

以构建的 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO₃ 胁迫下的二色补血草叶组织的 cDNA 文库为研究对象, 通过对文库克隆的随机测序和 EST 分析获得含有完整 ORF 序列的 *OEE2* 基因。用 NCBI 的 ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件寻找 *OEE2* 基因的 ORF, 用 NCBI 的 Conserved Domains 工具 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 预测保守区, 用 ExPASY 网站 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 计算蛋白的分子量及等电点 (pI), 用 BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性搜索, 选择了 8 种与其相似性高的植物的 *OEE2* 基因氨基酸序列, 用 ClustalX 1.83 程序对烟草、豌豆等 9 种植物的 *OEE2* 蛋白氨基酸序列进行多序列比对和构建系统进化树。

采用 CTAB 法 (王玉成等 2003) 提取不同处理的二色补血草根、叶中总 RNA, 用 DNase I (Promega) 消化, 去除 DNA。进行反转录, 反转录体系为 5 μg 总 RNA、2 μL 10 \times RT 缓冲液、40 U RNasehit、1.5 μL Oligo (dT) (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、3 μL dNTP (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、禽成髓细胞瘤病毒 (AMV) 反转录酶 2 U、9 bp 随机引物 1 μL (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 用水补足体积至 20 μL 。反应程序为: 25 °C 5 min; 42 °C 60 min。将逆转录产物稀释 10 倍, 用作定量 RT-PCR 模板。实时定量 RT-PCR 反应试剂盒为 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (Toyobo, Japan)。反应体系为: 10 μL 2 \times SYBR Green Realtime PCR Master Mix、引物各 0.3 μL (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、6.9 μL 水、2.5 μL 模板。定量 PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 12 s, 58 °C 30 s, 72 °C 40 s, 78.4 °C 1 s, 45 个循环。然后在荧光定量 PCR 仪上完成 RT-PCR。用 18S rRNA (EU039827) 和 β -Tublin (EH793552) 基因作为内参基因。用 2^{- $\Delta\Delta\text{C}_t$} 方法进行基因的相对定量分析 (Livak 和 Schmittgen 2001), 用 GraphPad InStat 3.0 软件进行基因表达数据的显著性分析。引物序列见表 1。

实验结果

1 二色补血草 *OEE2* 基因的获得和序列分析

通过对二色补血草 cDNA 文库克隆的随机测序, 获得了含有完整 ORF 序列的 *OEE2* 基因 (图 1), 全长为 994 bp, 用 ORF founder 分析表明该基因 5'

表 1 荧光定量 RT-PCR 的引物序列

Table 1 The primer sequences used in real time RT-PCR analysis

引物名称	正向和反向引物序列
<i>OEE2</i> 基因	5' TTTGGAAGCAGAAGACC 3'; 5' ACCACCCTCGGAATCAGT 3'
18S rRNA 基因	5' CCGTTCTTAGTTGGTGGAG 3'; 5' CTCGTTGAATACATCAGTGTAG 3'
β -Tublin 基因	5' GGTTGAGTGAGCAGTTCAC 3'; 5' GATAACCAGACCACACCTTAGC 3'

1	GGA CAG AGT GAG TGA AAG AGT AAA ACA ATG GCG TCA ACA GCA TGC	45
	M A S T A C	6
46	TTC TCG CAT CAT TAT GCT CTC TCC TCA TCT TCT AAC TCC GCC AGA	90
7	F S H H Y A L S S S S N S A R	21
91	AAT TCA TTG GCG TCG CAG CGC CAA GGC CTG AGT ACC TCT AAA TOG	135
22	N S L A S Q R Q G L S T S K S	36
136	GGA GCC TTG GTA ATC TGC AAT GCT CAA AAG CAG GAT CAG ATT AGC	180
37	G A L V I C N A Q K Q D Q I S	51
181	AAT ACC GCC GTG AAC GAG TCA ATT TCA CGG CGT CTG GCT CTT ACA	225
52	N T A V N E S I S R R L A L T	66
226	TTG TTT GTT GGC GCT GCG GCG GTT GGG TCT AAG GTT AAT CCA GCT	270
67	L F V G A A A V G S K V N P A	81
271	GAC GCC GCC TAT GGC GAA TCT GCA AAT GTT TTT GGG AAG CAG AAG	315
82	D A A Y G E S A N V F G K Q K	96
316	ACC ACC GAC TTT ACG GCA TAT GTT GGC GAG GGA TTC AAG CTG CAG	360
97	T T D F T A Y V G E G F K L Q	111
361	ATC CCT GCT AAA TGG AAC CCT AGC AGA GAG ATT GAA TTC CCT GGT	405
112	I P A K W N P S R E I E F P G	126
406	CAG GTC CTC CGA TTT GAG GAC AAC TTT GAC ACA ACC AGC AAC GTA	450
127	Q V L R F E D N F D T T S N V	141
451	AGC GTC ATG ATC AAC CCC ACC GAC AAG AAA TCC ATC ACT GAT TTT	495
142	S V M I N P T D K K S I T D F	156
496	GGA ACA CCT GAA GAG TTC CTC TCT ACT GTT AAC TAC TTG TTT GGC	540
157	G T P E E F L S T V N Y L F G	171
541	TCT CAG GCT TAC TTC GGT AAA ACT GAT TCC GAG GGT GGT TTC GAT	585
172	S Q A Y F G K T D S E G G F D	186
586	TCG GGC GTG GTG GCC TCG GCC AAC ATA CTG GAG ACA TCA TCC COG	630
187	S G V V A S A N I L E T S S P	201
631	ACT ATT GAT GGT AAG CCA TAC TAC ATT CTA TCC GTC TTG ACG AGG	675
202	T I D G K P Y Y I L S V L T R	216
676	ACT GCT GAT CGA GAT GAA GGG GGA AAC CAC CAG CTC ATC AGT GCG	720
217	T A D G D E G G K H Q L I S A	231
721	ACC GTG AAT GGC GGC AAG CTC TAC ATT TGC AAG GCC CAG GCT GGA	765
232	T V N G G K L Y I C K A Q A G	246
766	GAC AAG AGA TGG TTC AAG GGT GCA AAG AAG TTT GTC GAG AAC GCT	810
247	D K R W F K G A K K F V E N A	261
811	GCA ACT TCT TTT AGC GTT GCT TGA GAG TTT TTT TCT GTA ATT GCT	855
262	A T S F S V A *	
856	ACA ACG AAG CAG TTT ATT TGT ATG CTG TAT GTA ATT AAT TGT ACT	900
901	ACC AGT TTC AGA ACA ACA TTC CAC CAG TAT GCT TCC TTG TTT TGA	945
946	TCT AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	990
991	AAA	993

图1 二色补血草 *OEE2* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *OEE2* gene from *L. bicolor*

非翻译区 27 bp, 3'非翻译区 160 bp, ORF长 807 bp, 编码 264 个氨基酸, 终止密码子为 TGA, 包含一个 46 bp 的多聚腺苷酸尾(polyA)。

2 OEE2 基因的氨基酸序列分析

用 NCBI 的保守功能区域(conserved domains)

分析程序(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)预测基因的保守区, 图 2 显示, 该基因为 *PsbP* 家族基因, 包含有 *PsbP* 保守序列(位于第 93~264 氨基酸之间)。

通过 ExPASy 网站(<http://au.expasy.org/tools/>)



图2 OEE2 保守区预测

Fig.2 The conserved domain of OEE2 protein

protparam.html)的在线分析, 计算该基因编码的蛋白质分子量为 28.2 kDa, 理论上 pI 为 7.66, *OEE2* 基因的 264 个氨基酸中 Ser 最多, 有 31 个, 占氨基酸总数的 11.7%。带负电荷的氨基酸(Asp+Glu)有 25 个, 带正电的(Arg+Lys)共有 26 个。不稳定系数为 39.32, 该蛋白是稳定蛋白。

对该序列进行 BlastX 分析, 并选取与二色补血草 *OEE2* 蛋白相近的 8 个物种的蛋白序列, 用多序列比对程序(ClusalX 1.8)进行分析得到的结果(图3)表明二色补血草 *OEE2* 的氨基酸序列与其它 8 种植物的同源性在 63%~72% 之间, C 末端的氨基酸序列具有很高的保守性, 但在其 N 末端氨基酸序列构成上有较大的差异, 而且其氨基酸序列的长度也基本相似, 说明 *OEE2* 蛋白序列在不同植物中具有一定的保守性。

在这 9 个物种中, 二色补血草 *OEE2* 蛋白与烟草(*Nicotiana tabacum*) *OEE2* 序列同源性最高, 为 72%, 与喇叭水仙(*Narcissus pseudonarcissus*) *OEE2* 序列同源性最低, 为 63%。对该序列进行分子进化树绘制, 结果如图 4。二色补血草 *OEE2* 氨基酸聚类分析结果表明, 二色补血草与烟草最为相似, 其次为菠菜, 而豌豆、喇叭水仙等聚在一起与二色补血草进化上相距较远。

3 低温、盐和干旱胁迫下的 *OEE2* 表达

为了研究二色补血草 *OEE2* 基因对逆境胁迫的应答, 我们用定量 RT-PCR 技术检测 NaCl、PEG 和低温(3 °C) 3 种逆境胁迫下二色补血草 *OEE2* 基因表达(图 5)的结果表明, *OEE2* 基因在根、叶中均表达。其中, 在根中各个时间点的表达量无显著性变化($P>0.05$), 并且表达量始终低于未做胁迫处理的; 但在叶中的诱导表达情况却有所不同, 在低

温和 PEG 胁迫后 48 h 的表达量升高都极显著($P<0.01$)。这可能表明在根和叶中, *OEE2* 基因可能产生 2 个不同的作用机理。同时, *OEE2* 基因在根和叶中的表达水平存在着显著性差异($P<0.05$), 说明 PEG 和低温胁迫可以诱导 *OEE2* 基因在叶中的表达, 而抑制其在根中的表达。在 NaCl 胁迫下, *OEE2* 基因在根和叶中的表达量都被抑制, 始终低于未做胁迫处理的, 但不同胁迫时间的基因表达量有变化, 这些说明, *OEE2* 基因的表达受 NaCl、低温和 PEG 等胁迫的调控。

讨 论

从序列分析中可以看出, 二色补血草 *OEE2* 基因为 *PsbP* 家族基因, 它与其他物种的同源性高达 63% 以上, 具有高度的保守性, 为研究 *PsbP* 蛋白家族的性质和进化具有重要的意义, 其 N 端氨基酸序列保守性较差, 而 C 端氨基酸序列高度保守, 说明 C 端可能对维持 *OEE2* 蛋白的结构与功能起作用。虽然, *OEE2* 与光合作用相关(于勇等 2001), 但在二色补血草的根中也检测到它的表达, 并且其在根中的表达可受 NaCl、PEG 和低温胁迫所抑制。因此, 其在根中的作用值得进一步研究。

迄今对 *OEE* 家族基因在非生物胁迫情况下的表达已有一些研究, 其中, *OEE1* 蛋白由 PSII 中的 *OEE* 亚基和 D1 蛋白组成, 所以 *OEE1* 蛋白含量上升可能会提高植物的光合效率(茹巧美等 2006), 显示 *OEE1* 蛋白对维持 PSII 的稳定和生物功能有作用。盐胁迫直接影响植物的光合作用, 盐胁迫下, 植物光合速率下降(王仁雷等 2002)。这些研究表明 *OEE* 基因家族成员可能参与了植物的抗逆胁迫。我们的实时定量 RT-PCR 分析的结果也表明, *OEE2*

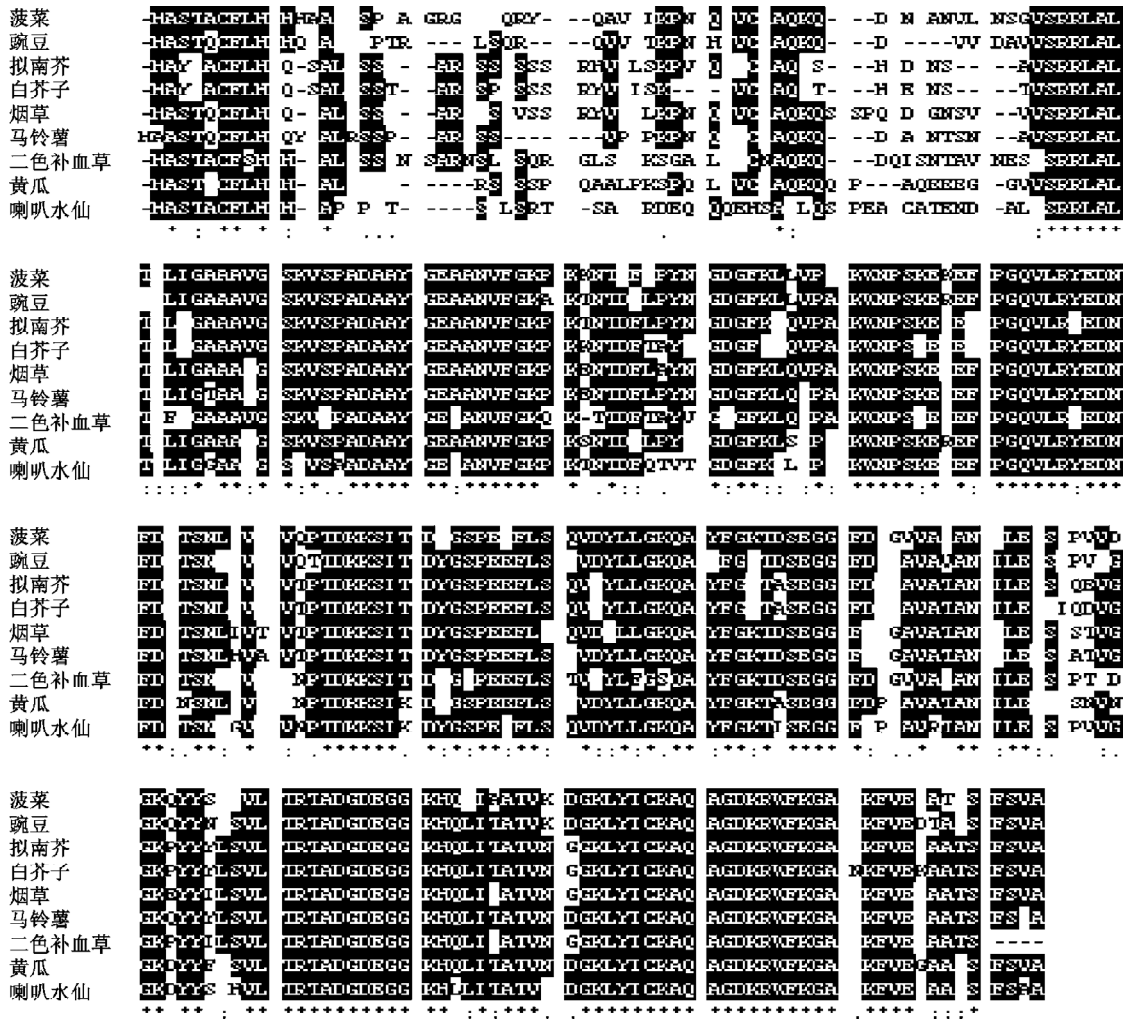


图3 9个不同物种的OEE2氨基酸多序列比对

Fig.3 Amino acid multiple sequence alignments of OEE2 from nine different species

加号标记相同的氨基酸, 原点标记氨基酸的保守替换, 横线表示引进缺口。菠菜(*Spinacia oleracea*): P12302; 豌豆(*Pisum sativum*): P16059; 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): NM_100545; 白芥子(*Sinapis alba*): P11594; 烟草(*Nicotiana tabacum*): Q7DM39; 马铃薯(*Solanum tuberosum*): P93566; 二色补血草(*Limonium bicolor*): EU047509; 黄瓜(*Cucumis sativus*): Q9SLQ8; 喇叭水仙(*Narcissus pseudonarcissus*): Q40407。

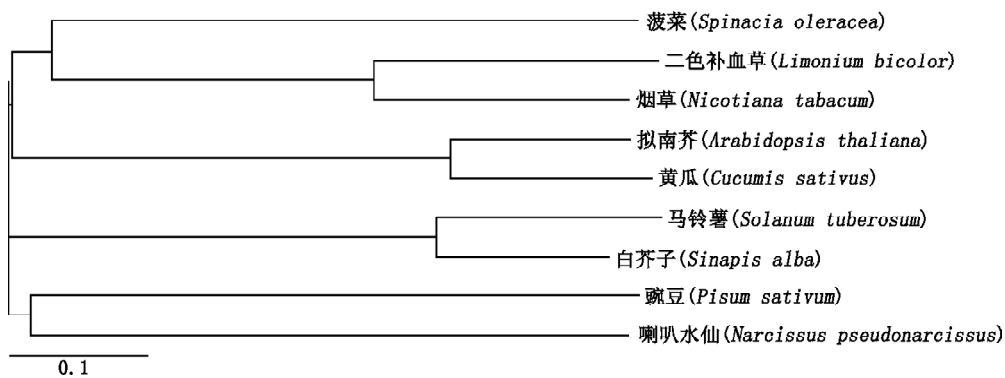


图4 9种植物OEE2家族蛋白的分子进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of OEE2 family from nine plant species

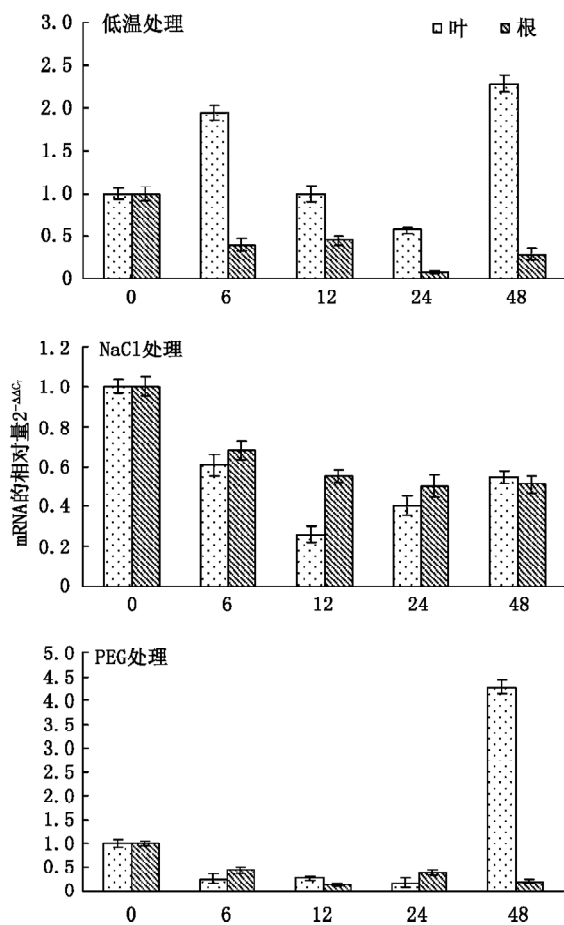


图5 NaCl、低温和PEG胁迫下二色补血草根和叶中 *OEE2* 基因的表达

Fig.5 The expression patterns of *OEE2* gene in leaves and roots of *L. bicolor* in response to NaCl, low temperature and PEG stress

NaCl、低温、PEG 处理分别为 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、 $3 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、20% (W/V) PEG 胁迫时, *OEE2* 的表达量随时间变化而变化的相对量。

基因对 NaCl、低温和 PEG 胁迫有明显的应答反应。其中, PEG 和低温胁迫能诱导 *OEE2* 基因可在叶中表达, 并在胁迫 48 h 后 *OEE2* 的基因表达量达到最高(图5), *OEE2* 基因的诱导表达可能与二色补

血草适应这些胁迫相关。但在 NaCl 胁迫下, *OEE2* 基因的表达受抑制, 这提示盐胁迫下植物的光合作用可能受抑, 以致 *OEE2* 基因表达下降。本文的结果表明, 低温和旱胁迫过程中, *OEE2* 基因表达量上升后, 植物的光合能力可能增强, 因而植物的抗低温和抗旱能力增强。

参考文献

- 茹巧美, 郑海雷, 肖强(2006). 红树植物耐盐机理研究进展. 云南植物研究, 28 (1): 78~84
- 谭翠燕, 徐春和, 沈均人, Sakuma S, Yamamoto Y, Balny C, 阮康成(2003). 光合作用系统 II 外周蛋白——P23k 去折叠的热力学和动力学. 生物化学与生物物理学报, 35 (7): 677~681
- 王仁雷, 华春, 刘友良(2002). 盐胁迫对水稻光合特性的影响. 南京农业大学学报, 25 (4): 11~14
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2003). 胡杨、柽柳总 RNA 提取方法的建立. 东北林业大学学报, 31 (5): 99~100
- 吴守锋, 韩科, 郭军伟, 张年辉, 杜林方(2007). 重金属 Hg^{2+} 离子作用于 PSII 23 kD 外周蛋白的光谱学研究. 天然产物研究与开发, 19 (1): 81~83
- 杨传平, 王玉成, 刘桂丰, 姜静(2004). 应用 SSH 技术研究 NaHCO_3 胁迫下柽柳基因的表达. 遗传学报, 31 (9): 926~933
- 于勇, 翁俊, 徐春和(2001). 植物光系统 II 放氧复合体外周蛋白结构和功能的研究进展. 植物生理学报, 27 (6): 441~450
- 周海燕, 赵世杰, 孟庆伟(2006). 高等植物光系统 II 对高温的响应. 生物技术通报, (5): 8~12
- Andersson B, Larsson C, Jansson C, Ljungberg U, Akerlund H-E (1984). Immunological studies on the organization of proteins in photosynthetic oxygen evolution. Biochim Biophys Acta, 766: 21~26
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Methods, 25: 402~408
- Sugihara K, Hanagata N, Dubinsky Z, Baba S, Karube I (2000). Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorrhiza*. Plant Cell Physiol, 41 (11): 1279~1285
- Wang Y, Ma H, Liu G, Zhang D, Ban Q, Zhang G, Xu C, Yang C (2008). Generation and analysis of expressed sequence tags from a NaHCO_3 -treated *Limonium bicolor* cDNA library. Plant Physiol Biochem, 46 (11): 977~986