

麻疯树中 ADP 核糖基化因子基因的克隆和表达

林凡荣, 秦小波, 朱勋路, 叶生亮, 高继海, 徐莺, 陈放*

四川大学生命科学学院 / 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064

摘要: 从麻疯树 cDNA 文库中筛选到包含完整编码序列的 ADP 核糖基化因子的 cDNA 序列, 命名为 *Jc-arf*。其长度为 887 bp, 开放阅读框 546 bp, 推测的编码蛋白含 181 个氨基酸残基, 具有典型的 GTP 结合蛋白家族的特点: P 框(GLDAAGKT)、G' 框(DVGGQ)和 G 框(NKQDL)。序列分析显示, *Jc-arf* 接近于人类 Class I 型 *arf* 基因, 其蛋白序列与多种植物 ARF 有很高的同源性。半定量 RT-PCR 结果显示, *Jc-arf* 的表达具有一定的组织特异性, 在花中最丰富。PEG、低温、NaCl 胁迫下, *Jc-arf* 的表达受 PEG 和低温的诱导, 而对 NaCl 胁迫不敏感。

关键词: 麻疯树; ADP 核糖基化因子; 表达; 胁迫

Cloning and Expression of an ADP-ribosylation Factor Gene in *Jatropha curcas* L.

LIN Fan-Rong, QIN Xiao-Bo, ZHU Xun-Lu, YE Sheng-Liang, GAO Ji-Hai, XU Ying, CHEN Fang*

Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract: An ADP-ribosylation factor gene, named *Jc-arf*, was cloned from *Jatropha curcas*. The cloned cDNA included a 546 bp complete open reading frame, which encoded a 181 amino acids peptid. This putative peptid contained three motifs: GLDAAGKT, DVGGQ and NKQDL, which involved in the feature of GTP-binding proteins. The alignment results showed *Jc-ARF* was high identity with many ARFs in other plants, and it was similar to Class I of human ARFs. The semi-quantitative PCR results showed that *Jc-arf* expression was the highest in flowers. Further, the expression of *Jc-arf* could be induced in roots, stems and leaves by PEG, in roots under cool stress. However, it seemed insensitive to the NaCl stress.

Key words: *Jatropha curcas*; ADP-ribosylation factor; expression; stress

ADP 核糖基化因子(ADP-ribosylation factor, ARF)是小 G 蛋白家族(RAS、RHO、RAB、ARF 和 RAN)的一员, 它们在生物体内起众多的生理作用, 例如参与基因表达、细胞骨架重组、微管的形成以及囊泡和核孔运输机制等(王昕和种康 2005; Yang 2002)。

ARF 蛋白可以激活霍乱毒素的 ADP-核糖基转移酶活性(Vernoud 等 2003), 并由此得名。动物中的研究表明, ARF 蛋白在真核生物细胞的膜转运和信号转导中起作用(D'Souza-Schorey 和 Chavrier 2006), 可参与形成胞质溶性外被蛋白并将其运送到囊泡出芽位点, 运输囊泡的 3 种外被蛋白: COPI、COPII 和笼形蛋白的形成都与 ARF 家族密切相关(Kirchhausen 2000)。拟南芥中的研究表明, ARF1 在内质网和高尔基体之间的小泡运输中起作用, 并对维持高尔基体的正常形态结构起作用。

现在, 人们已从多种动物、微生物中分离出 *arf* 基因, 从高等植物如水稻、马铃薯、拟南芥等中也克隆到一些 *arf* 基因。酵母中 *arf* (Stearns 等

1990; Lee 等 1994)的研究表明, *arf1* 的破坏可导致其生长缓慢和冷敏感, 而同时破坏 *arf1* 与 *arf2* 的突变体则是致死的, 说明 ARF 在生物体中起作用。

麻疯树是大戟科(*Euphorbiaceae*)麻疯树属(*Jatropha*)植物, 耐干旱和贫瘠的能力极强; 麻疯树胚乳中含有大量的油脂, 近年来主要用于生物柴油的研究和开发, 是一种极具开发潜力的多用途经济作物(林娟等 2004)。我们从已构建的麻疯树 cDNA 文库中筛选出一个 *arf* 基因, 对其进行了生物信息学初步分析; 为了揭示 *arf* 基因在麻疯树中的生理作用, 本文用半定量 RT-PCR 的方法对不同组织中 *Jc-arf* 基因的表达进行了初步分析, 同时也对不同胁迫条件下该基因的表达进行了研究。

收稿 2009-01-09 修定 2009-05-20

资助 国家自然科学基金(30670204)、科技部国际合作项目(2006DFB63400)和“十一五”科技支撑项目(2006BAD07A04)。

* 通讯作者(E-mail: scuchenfang@yahoo.com.cn; Tel: 028-85417281)。

材料与方法

以麻疯树(*Jatropha curcas* L.)根、茎、叶、花、种子胚乳为材料。其中, 种子、花取自四川西昌地区; 根、茎、叶取自本校实验室温室培养的长出4片真叶的麻疯树幼苗。用4片真叶的麻疯树幼苗进行胁迫处理, 30% PEG6000、500 mmol·L⁻¹ NaCl每日浇灌至花钵底孔刚有液体渗出; 低温胁迫条件为: 白天12 h, 25 °C, 光照强度为324 μmol·m⁻²·s⁻¹; 夜晚12 h, 2 °C, 黑暗条件。分别处理1、2、3 d取根、茎、叶等组织材料液氮中保存。

按照文库说明书的步骤环化麻疯树胚乳cDNA文库, 随机挑选单克隆, 利用pBlueScript SK-质粒插入片段两侧已知的引物: T7引物(5' GTAATAC-GACTCCTATAGGGC 3')、SK引物(5' GATCC-ACTAGTTCTAGAGCG 3')进行PCR扩增, 得到的扩增结果经酶切检验确认无误后测序。利用软件DNAMAN对获得的测序结果进行比对, 检测有无相同的序列, 将检测结果在GenBank数据库中利用Blastn、Blastx与其它生物的同源序列进行比对, 得到一条与多种生物ARF序列相似的EST序列。

得到的*Jc-arf*基因用BLAST工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)进行同源性搜索; 应用DNAMAN软件进行同源核苷酸和氨基酸序列的多重比对; 用DNASTAR由核苷酸序列推断其氨基酸序列, 计算预测蛋白的分子量、等电点的理论值, 分析氨基酸组成等。

*Jc-arf*基因编码的推测蛋白产物用TMHMM、TMPred预测其跨膜结构; 应用SignalP分析氨基酸序列中是否存在信号肽; 采用PROSCAN寻找蛋白修饰位点; 用SOPMA预测二级结构; 用SWISS-MODEL预测三级结构。用Philip构建系统进化树。

以麻疯树18S RNA为内部参照物, 用半定量RT-PCR的方法对麻疯树中*Jc-arf*基因的表达进行检测。分别提取各试验材料的总RNA, 用不含RNase的DNaseI去除RNA中的基因组DNA, 再用分光光度计测定其浓度, 并用DEPC水稀释至相同浓度。分别以等量各组织的总RNA为模板, 以Oligo d(T)为引物进行反转录(按TaKaRa公司AMV反转录酶操作说明书进行)。以等体积的反转录产物为模板, 以18S RNA的一对引物18S-P1: 5' CAACCATAAACGATGCCGACC 3'/18S-P2: 5'

CAGCCTTGCGACCATACTCCC 3'及*Jc-arf*的引物RT-P1: 5' TGGTCAGGACAAGATTCG 3'/RT-P2: 5' CTCAGCAGCATTCATAGC 3'采用以下程序进行PCR扩增: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s(循环); 72 °C 10 min, 其中18S RNA扩增循环为26个, *Jc-arf*的扩增循环数为30个。PCR结束后, 分别取3 μL产物1%琼脂糖电泳检测, UV(美国UVP公司)透射仪检测产物浓度。

结果与讨论

1 *Jc-arf*的cDNA序列及蛋白质特征分析

序列分析表明, *Jc-arf*的cDNA序列长887 bp, 含有一个由546 bp碱基组成的完整开放阅读框, 3'非翻译区长280 bp, 5'非翻译区长61 bp (GenBank登录号EU940696)。 *Jc-arf*基因编码的推测蛋白产物由181个氨基酸组成, 采用软件DNASTAR、ProtParam tool对其进行分析, 该预测蛋白含有22个碱性氨基酸(K+R)、23个酸性氨基酸(D+E), 等电点(PI)为6.765, 为中性蛋白, 元素组成为C₉₂₈H₁₄₆₆N₂₅₄O₂₇₀S₆, 不稳定系数为32.18, 说明此蛋白可以稳定的存在, 预测其蛋白分子量为20 652 Da, 这与其他生物的ARF蛋白的分子量是相近的。该预测蛋白不含有信号肽, 无跨膜区。

*Jc-ARF*蛋白的修饰位点预测分析, 发现其含有1个N-糖基化位点(60NISF)、2个蛋白激酶C磷酸化位点(140TDK、147SLR)、2个酪蛋白激酶II磷酸化位点(64TVWD、161 TSGE)、3个N-豆蔻酰化位点(2 G L S F T K、2 4 G L D A A G、165GLYEGL)、1个微体C端靶信号位点(179NKA)和1个ARF家族信号(151 RHWYIQSTCATSGEGLYEGLDWL)。这与香蕉ARF蛋白的修饰位点类型和数量是一致的, 同时也反映了ARF在植物进化上的保守性, 而这些活性位点的基本功能都与膜质运输和维持细胞器的完整性有密切关系。 *Jc-ARF*蛋白的二级结构预测表明, 其含有38.12% α螺旋、7.73% β折叠和33.15%无规则卷曲。根据已知的人类ARF1蛋白三维结构, 预测*Jc-ARF*蛋白的三级结构(Arnold等2006; Schwede等2003; Guex和Peitsch 1997)(图1), 二者空间结构高度相似, 具有ARF蛋白的突出特征: N末端都具有一个α螺旋, 并且具有2个相同的效应结构域Switch1和Switch2, 他们之间由2个折叠相连接(interswitch),

Interswitch 区的存在使 ARF 蛋白能够进行空间构象的转换, 实现与 GDP/GTP 的结合, 从而完成非活性、活性形式的相互转换, 这种构象的转换对 ARF 蛋白功能的发挥可能有作用(Pasqualato 等 2001)。

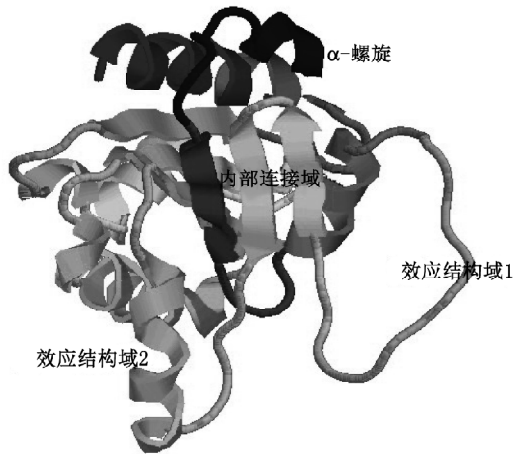


图1 Jc-ARF 蛋白的三维结构图(Arnold 等 2006; Schwede 等 2003; Guex 和 Peitsch 1997)

Fig.1 Three-dimensional structure of Jc-ARF protein

2 Jc-ARF蛋白的同源性分析及系统进化树的建立

选取胡萝卜等9种植物的 ARF 序列, 它们与 Jc-ARF 同源性的结果(图 2)表明: 植物间的 ARF 序列有很高的同源性, Jc-ARF 与胡萝卜 ARF002 的同源性高达 99.45%, 与拟南芥 ARF3 的同源性最低为

60.99%, 与毛白杨的同源性为 77.95%, 其余都在 98% 以上, 显示了其在植物进化上的保守性。它们都存在 3 个保守框 P 框(GLDAAGKT)、G' 框(DVGGQ)和 G 框(NKQDL), 这三个框是 GTP 结合蛋白家族中涉及 GTP 结合和水解所必需的。另外, 作为膜定位和 ARF 活性所需的 2-甘氨酸豆蔻酰化位点也很保守。

根据基因大小、氨基酸序列、系统发生以及基因结构的异同, 人类基因组中的 6 个 *arf* 基因分成 3 类(D'Souza-Schorey 和 Chavrier 2006), 即 Class I (*arf1-3*)、Class II (*arf4-5*) 和 Class III (*arf6*)。选取了油棕、人、土豆、苜蓿等共 28 种生物的 ARF, 利用 Philip 软件构建了 ARF 蛋白的系统进化树, 发现 Jc-ARF 蛋白与胡萝卜 ARF002 的亲缘关系最近, 其次为陆地棉及拟南芥 ARF2。与人类 ARF 聚类时, 其与人类 ARF1、ARF3 等 Class I 类 ARF 的亲缘关系更近, 而与人类 ARF4~6 都较远, 根据 Jc-ARF 的氨基酸数目、序列, 我们认为, 本文所克隆的 *Jc-arf* 相似于人类 Class I 类 *arf* 基因。

3 Jc-arf的组织特异性表达

为研究 *Jc-arf* 在麻疯树中的作用, 我们对 *Jc-arf* 在麻疯树各组织器官中的表达情况进行了半定量 RT-PCR 分析。如图 4 所示, *Jc-arf* 在种子胚乳、根、茎、叶、花中均有表达, 但表达有明显的组织特异性: 在花中的表达量最高, 在胚乳、根、茎、叶中表达差异不大。

	豆蔻酰化位点	GTP (I)	GTP (II)							
JcARF	NGLSFTKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
DcARF002	NGLSFTKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
MsARF	NGLSFTKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
VuARF	NGLSFTKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
GhARF	NGLSFAKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
PtARF	NGLSFTKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
AtARF1	NGLSFGKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
AtARF3	NGLLFTRM	SSVFGNKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	RFCVWDLGGQTSIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
SbARF	NGLSFTKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
OsARF	NGLSFTKLF	SRLFAKKE	RLLVGLDAAGKTTILYSLKLG	EVITIPITIGFNVETVEYNI	SFTVWDGGQDKIRPWRWFYFNTQGLIFVVDSDRD	98				
	GTP (III)									
JcARF	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	ANKA	181	
DcARF002	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	ANKA	181	
MsARF	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	ASKA	181	
VuARF	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	ASKA	181	
GhARF	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	ANKG	181	
PtARF	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	SPKP	194	
AtARF1	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	ASKA	181	
AtARF3	RIIV	GAKEE	PHATL	EE	DEHLKCAV	MLTFANKQDLP	CAALDLAAVTEALTELPKIKSRQVA	FRITCAVKGEGLYEGLDWLSNITLKS	SGS	182
SbARF	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	SSKA	181	
OsARF	RIIV	EARDELHRM	NEDEL	RD	AVLLNFANKQDLP	NAVNAAEITDKLGLHSLRQRHWYI	QSTCATSGEGLYEGLDWLSNNI	ANKA	181	

图2 麻疯树 ARF 蛋白与其他植物 ARF 蛋白氨基酸序列比对

Fig.2 Alignment of the deduced amino acid sequence from Jc-ARF cDNA with the other ARF sequences

麻疯树 JcARF (登录号 ACL67836); 胡萝卜 DcARF002 (登录号 ABB03801); 紫花苜蓿 MsARF (登录号 AAR29293); 豇豆 VuARF (登录号 AAB91395); 陆地棉 GhARF (登录号 CAD12855); 毛白杨 PtARF (登录号 AAR18698); 拟南芥 AtARF1 (登录号 AAA32729); 拟南芥 AtARF3 (登录号 CAA54564); 杨柳 SbARF (登录号 BAA24696); 水稻 OsARF (登录号 AAT77289)。

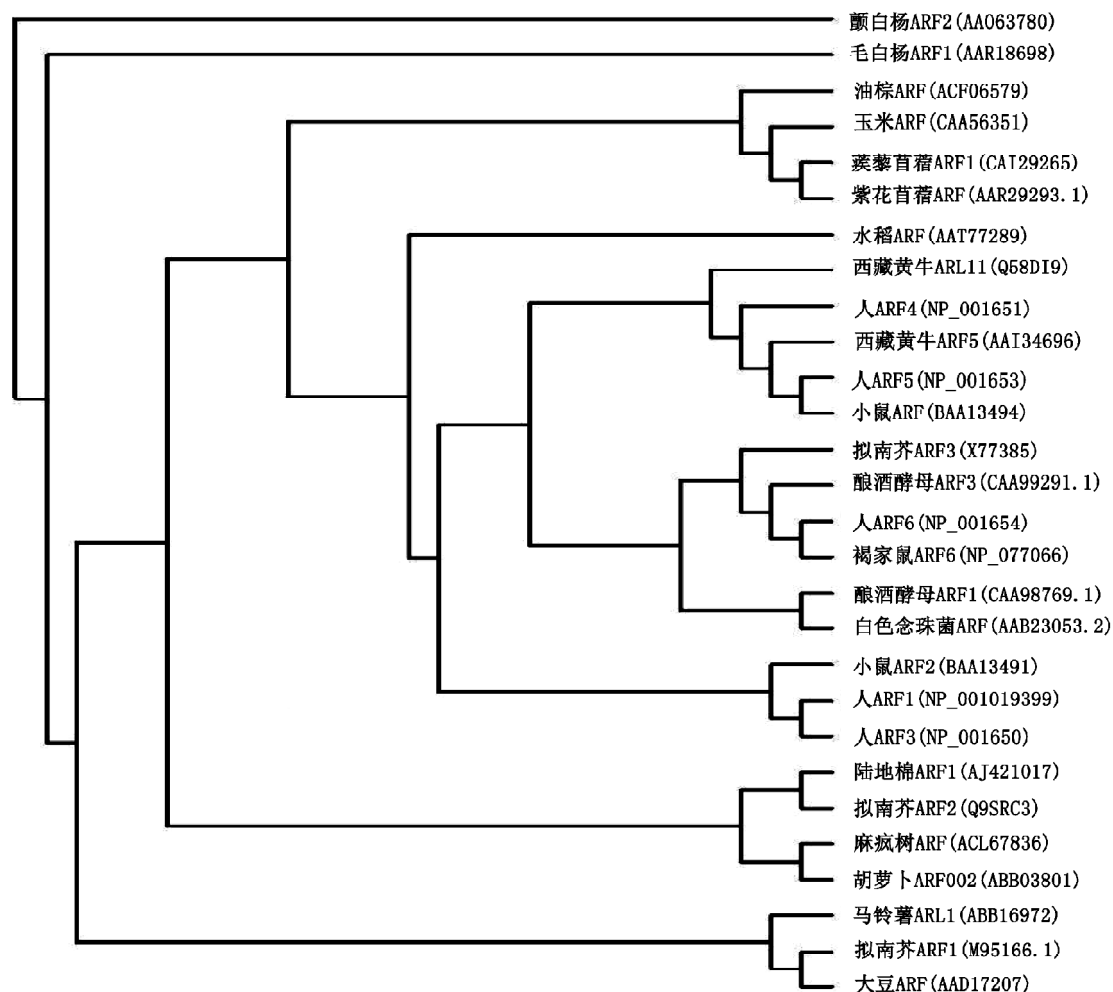


图3 ARF蛋白的系统发育树
Fig.3 Phylogenetic tree of ARF proteins

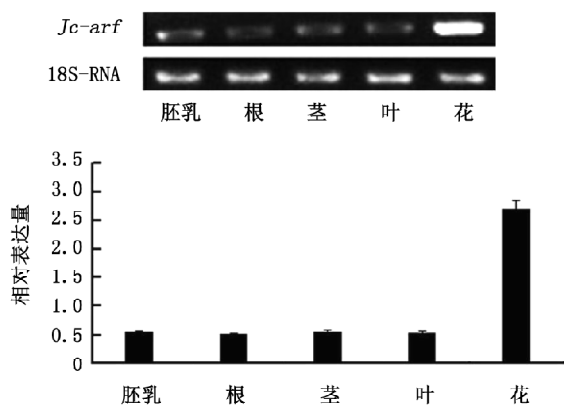


图4 *Jc-arf*的组织特异性表达
Fig.4 Expression of *Jc-arf* in different organizes

目前的研究表明, 虽然 *arf* 在各物种中普遍存在, 但组织特异性有较为明显的差异, 这可能是因

为 *arf* 有很多种类, 而各类型的 *arf* 分别会在不同的组织器官中起作用之故。 *Jc-arf* 在花中相对表达量最高, 可能为花特异性表达。这与任茂智等 (2004) 报道的棉花中 *arf* 在花、蕾等组织中呈显著优势表达的结果是一致的, 在花的发育过程中不仅有物质的极性运输, 而且有细胞膜的形成、细胞壁的扩展等过程, 这些过程均需要高尔基体以物质分泌的形式参与, *Jc-ARF* 可能在此过程中起作用 (Pimpl 等 2003; Takeuchi 等 2002), 因此具有较高的表达水平。同时, 我们的结果也显示 *Jc-arf* 在根中同样有所表达, 暗示其可能在根中也起某种作用, Zhuang 等 (2005, 2006) 对水稻 ARF 的研究就发现其与根的发育过程有关。 *Jc-ARF* 蛋白是否也在麻疯树的根发育中起作用仍需进一步的研究。

4 不同胁迫诱导条件下 *Jc-arf* 的表达

用半定量 RT-PCR 的方法, 分析 NaCl、PEG、低温胁迫下, *Jc-arf* 在根、茎、叶中表达量变化的结果(图 5)表明: 在 PEG 胁迫下, *arf* 在根、茎、叶中表达量均有明显上升, 并且随处理时间的延长, *arf* 在茎中的表达量最多增加 3.2 倍; 在低温胁迫下,

茎、叶中 *arf* 基因表达量无明显的变化; 在根中, 从第 2 天开始, *arf* 表达量增加 1.5 倍, 并在第 3 天维持高水平表达。NaCl 胁迫条件下, *arf* 在根中的表达量随时间的推移反而下降, 在第 3 天时, 只有正常情况下的 64.7%; 在茎、叶中, *arf* 的表达量在第 1 天有所增加, 而后逐渐降低至正常水平。

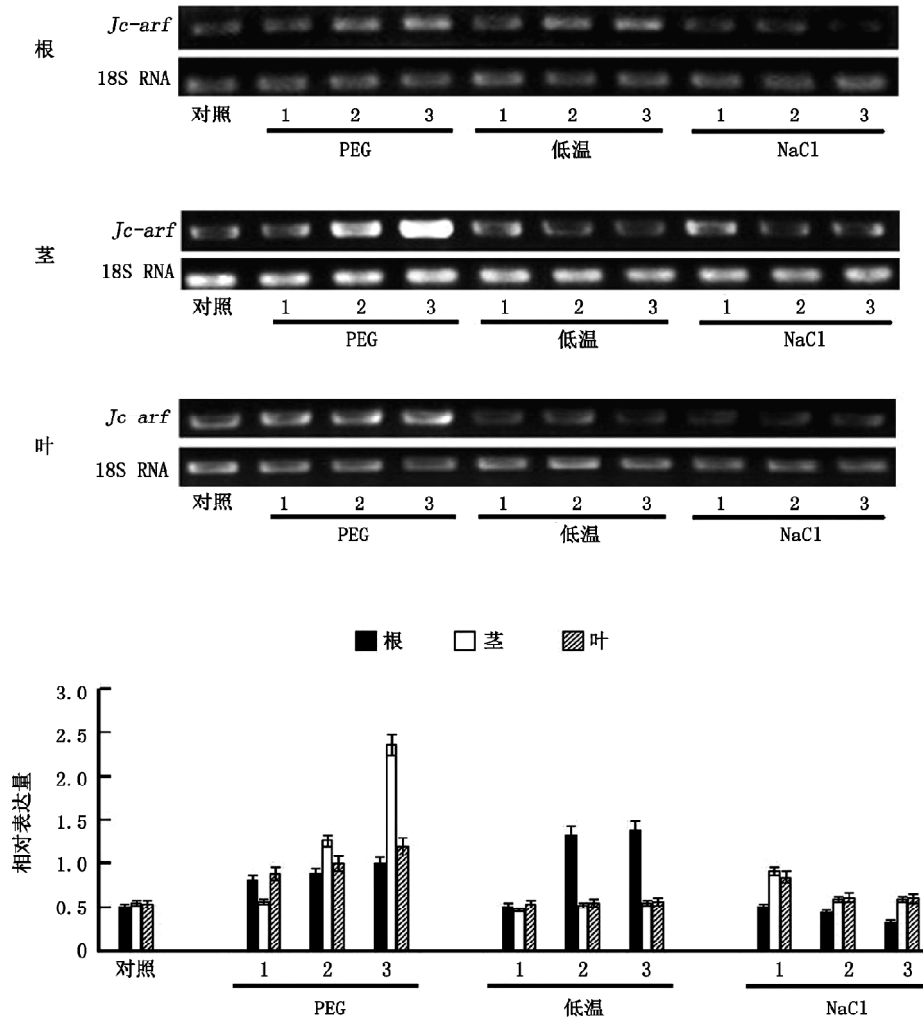


图 5 不同胁迫条件下 *Jc-arf* 的表达模式

Fig.5 Expression patterns of *Jc-arf* under different stresses

1: 处理 1 d; 2: 处理 2 d; 3: 处理 3 d。

参考文献

林娟, 周选围, 唐克轩, 陈放(2004). 麻疯树植物资源研究概况. 热带亚热带植物学报, 12 (3): 285~290
 任茂智, 陈全家, 张锐, 郭三堆(2004). 棉花腺苷酸核糖基化作用因子 1 (*arf1*) 的结构特征、替换剪接和遗传表达分析. 遗传学报, 31 (8): 850~857
 王昕, 种康(2005). 植物小 G 蛋白功能的研究进展. 植物学通报, 22 (1): 1~10

Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T (2006). The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22: 195~201
 D'Souza-Schorey C, Chavrier P (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 (5): 347~358
 Guex N, Peitsch MC (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis*, 18: 2714~2723

- Kirchhausen T (2000). Three ways to make a vesicle. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 1: 187~198
- Lee FJ, Stevens LA, Kao YL, Moss J, Vaughan M (1994). Characterization of a glucose-repressible ADP-ribosylation factor 3 (ARF3) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 269: 20931~20937
- Pasqualato S, Menetrey J, Franco M, Cherfils J (2001). The structural GDP/GTP cycle of human Arf6. *EMBO Rep*, 2 (3): 234~238
- Pimpl P, Hanton SL, Taylor JP, Pinto-daSilva LL, Denecke J (2003). The GTPase ARF1p controls the sequence-specific vacuolar sorting route to the lytic vacuole. *Plant Cell*, 15: 1242~1256
- Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucl Acids Res*, 31: 3381~3385
- Stearns T, Kahn RA, Botstein D, Hoyt MA (1990). ADP ribosylation factor is an essential protein in *Saccharomyces cerevisiae* and is encoded by two genes. *Mol Cell Biol*, 10: 6690~6699
- Takeuchi M, Ueda T, Yahara N, Nakano A (2002). Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *Plant J*, 31: 499~515
- Vernoud V, Horton AC, Yang Z, Nielsen E (2003). Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 131: 1191~1208
- Yang Z (2002). Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell*, 14 (suppl): S375~S388
- Zhuang X, Xu Y, Chong K, Lan L, Xue Y, Xu Z (2005). OsAGAP, an ARF-GAP from rice, regulates root development mediated by auxin in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ*, 28: 147~156
- Zhuang X, Jiang JF, Li J, Ma Q, Xu Y, Xue Y, Xu Z, Chong K (2006). Overexpression of OsAGAP, an ARF-GAP, interferes with auxin influx, vesicle trafficking and root development. *Plant J*, 48: 581~591