

丹参中硫堇基因 *SmTHI* 的克隆和表达分析

曹晓燕, 王喆之*

陕西师范大学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, 西安 710062

摘要: 丹参 EST 序列的 Blast 分析表明, 一条序列与硫堇(thionin, THI)基因有较高的同源性, 该序列长 575 bp, 包含 1 个长 366 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 121 个氨基酸, 命名为 *SmTHI*, GenBank 登陆号为 DQ212984。在此基础上设计引物, 分别从 cDNA 和 gDNA 水平上克隆到该基因的全编码区序列的结果表明, 该基因无内含子。序列分析表明, 该编码蛋白与大多数植物的 THI 蛋白前体高度同源, 并符合植物硫堇类蛋白的序列模式和特征: C-C-X(5)-R-X(2)-[FY]-X(2)-C, N 端具 17 个氨基酸的信号肽, 中间 46 个氨基酸为成熟 THI 部分, C 端的 58 个氨基酸为酸性多肽部分。成熟的 THI 蛋白带正电荷, 偏碱性, 推测可能有抗病原微生物活性。实时定量 PCR 检测 *SmTHI* 在丹参不同组织部位的表达以及在黄瓜细菌性角斑病菌(PSL)、NaCl 和水杨酸(SA)溶液诱导下的表达结果表明: *SmTHI* 在植物的根、茎和叶中均有不同程度的表达, 其表达丰度为叶>茎>根; 在 PSL、NaCl 和 SA 溶液诱导下该基因的表达呈上调趋势。

关键词: 丹参; 硫堇; 克隆; 实时定量 PCR

Cloning and Expression of *SmTHI* from *Salvia miltiorrhiza* Bge.

CAO Xiao-Yan, WANG Zhe-Zhi*

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

Abstract: By blasting EST sequences of *Salvia miltiorrhiza*, one sequence named as *SmTHI*, was found to have high homology with thionin. The sequence of *SmTHI* was 575 bp, and contained a 366-bp open reading frame (ORF) encoding a 121-amino acid peptide (GenBank accession number: DQ212984). The full-length sequences were cloned from cDNA and gDNA on the base of the sequence, respectively, and no introns existed in the encoding region. The deduced amino acid sequence of *SmTHI* protein shared high identity with THI precursor in most plants. The protein precursor of *SmTHI* possessed a conserved signature sequence of "C-C-X(5)-R-X(2)-[FY]-X(2)-C" and could be divided into three distinct domains, including an amino-terminal (N-terminal) signal peptide, a mature THI, and a carboxy-terminal (C-terminal) acidic domain, composed of 17, 46 and 58 amino acid, respectively. The mature THI had positive charge and showed slightly high basic, which was presumed involving in antimicrobial activity. Real-time quantitative PCR showed that expression of *SmTHI* is the highest in leaf, followed by in stem, and lowest in root. The expression of *SmTHI* was obviously increased under the induction of *Pseudomonas lachrymans*, sodium chloride (NaCl) and salicylic acid (SA).

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge.; thionin; cloning; real-time quantitative PCR

硫堇是一类小分子量多肽, 具有热稳定性高、带正电荷和巯基含量高等特性(Lee等2000; Bohlmann和Apel 1991), 在植物防御系统中起作用(Bohlmann等1988), 是植物抗病基因工程研究中的理想材料。迄今, 已从拟南芥、烟草、大麦、小麦、辣椒、欧洲板栗、白菜和番茄等多种植物中克隆到植物硫堇基因。Epple等(1997)的研究表明, 内源硫堇基因过量表达的拟南芥对病原真菌镰刀霉菌的抗性增强; Iwai等(2002)曾报道, 过量表达橡胶细胞壁富集型硫堇的转基因水稻对细菌的抗性提高; 薛哲勇等(2004)将大麦叶片中特异的 α -硫堇基因 *DB4*

导入到普通小麦中后, 获得的转基因植株后代对小麦白粉病的抗性明显提高。

丹参为唇形科(Labiatae)鼠尾草属多年生草本植物, 是我国的传统中药材。随着中药丹参在治疗心脑血管疾病、降低“氧化疲劳”和抗病毒中的广泛应用, 其需求量和种植面积越来越大。本文从丹参中克隆出硫堇基因 *SmTHI* 并分析了其在丹参不

收稿 2009-07-01 修订 2009-08-03

资助 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAI06A12-04)。

* 通讯作者(E-mail: zzwang@snnu.edu.cn; Tel: 029-85310260)。

同部位及在黄瓜细菌性角斑病菌(*Pseudomonas lachrymans*, PSL)、水杨酸(SA)和盐(NaCl)胁迫下的表达, 以期为进一步研究和应用这一基因提供参考。

材料与方法

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge.)种子用0.1%的 HgCl_2 溶液灭菌处理10 min, 无菌水冲洗4遍后, 接种在加有MS固体培养基的三角瓶中, 放在人工气候箱(宁波江南仪器厂, 型号为RXZ-500D)中萌发, 温度为25℃, 湿度为48%, 光照强度为 $216 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照时间为12 h·d⁻¹, 长出6片真叶时取样用于实验。

黄瓜细菌性角斑病原菌(*Pseudomonas lachrymans* Smith et Bryan)菌株购自北京农业科学院, 培养于KB(金氏)培养基(20 g蛋白胨, 1.5 g K_2HPO_4 , 1.5 g MgSO_4 , 20 g琼脂, 加水至1 L, pH为7.0~7.2), 于28℃下培养活化, 菌落生长至指数生长期时用于实验。

Biozol试剂购自BioFlux公司; Bio RT逆转录试剂盒购自杭州博日科技有限公司; SYBR Premix Ex Taq购自TaKaRa公司; PCR产物回收试剂盒购自北京天为时代科技有限公司; 克隆载体pGEM-T Easy vector 购自Promega公司; 大肠杆菌DH5 α 由我们实验室保存。

丹参基因组DNA提取采用常规的CTAB法。用Biozol试剂(BioFlux)提取丹参的总RNA; 以提取的总RNA为模板, 按照反转录试剂盒(博日)说明书进行合成cDNA第一链。

依据丹参EST序列(GenBank登录号CV167327, 长度为575 bp)设计特异性引物, 5'-ATGGGTGCTCTTTGGTGA-3'和5'-GTATAGCCCTTCGATCACTCTTA-3'。以基因组DNA和cDNA为模板扩增*SmTHI*基因。PCR扩增程序为: 94℃变性3 min; 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 30个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物回收与pGEM-T Easy vector连接。用TSS法转化DH5 α , 将细菌涂布于含 α -氨基苄青霉素/IPTG/X-Gal的LB固体培养基上, 在37℃下培养过夜, 于24 h内挑取白色单菌落; 以菌落PCR检测为阳性的菌落送北京澳科生物技术有限公司测序。

根据<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>、<http://www.cbs.dtu.dk/>和<http://cn.expasy.org/>网站提供

的各类生物信息学软件进行在线分析。氨基酸序列的组成成分分析、理化性质分析、开放阅读框(open reading frame, ORF)的查找和翻译用Prot Param和ORF Finder在线工具进行; 氨基酸序列的同源性比对用Blastx在线工具完成; 蛋白质信号肽的预测用在线工具SignalP 3.0完成; 应用Scan Prosite和Motif Scan程序进行结构域和基序分析; ClustalW软件进行多序列比对; Mega3.1分析软件进行系统聚类分析。

采用实时荧光定量PCR的方法, 检测*SmTHI*基因在植物根、茎、叶不同部位和接种黄瓜细菌性角斑病原后的表达情况。取处于指数生长期的PSL菌落, 用 $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 液悬浮制成菌悬浮液, 测得波长600 nm处光的吸收值为0.231, 接种于生长健壮的丹参叶片上, 并用接种环适当在叶表面造成创伤, 丹参放入人工气候箱中继续培养, 分别在接种后24、48、72、96 h取样, 样品置于液氮中冷冻后放在-80℃冰箱中保存。NaCl和SA处理: 将丹参幼苗分别浸泡于 $200 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl溶液和 $300 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 水杨酸(SA)溶液中, 于0、1、2、4和6 h分别取样, 液氮速冻, -80℃储藏备用。

进行实时荧光定量PCR检测时, 以丹参持家基因GAPDH(3-磷酸甘油醛脱氢酶)为内参(引物为5'-CCACCGTCCACTCCATCACT-3'和5'-TGGGAACTCGGAACGACATAC-3'), 检测*SmTHI*(引物为5'-AAGTGAAGTTGTGAATGGAGCAGC-3'和5'-AATTATTGAAAGCCAGAAAAGCGAT-3')的表达量。反应条件: 95℃变性3 min; 95℃变性10 s, 60℃退火20 s, 40个循环。每个样品3个重复。

实验结果

1 丹参硫堇基因*SmTHI*的克隆及序列特征分析

丹参EST序列的Blast分析表明, GenBank登录号为CV167327的一条序列与硫堇(thionin, THI)基因有较高的同源性, 该序列长575 bp, 包含1个长366 bp的开放阅读框(ORF), 编码121个氨基酸, 推测该基因可能是一种新的硫堇基因, 命名为*SmTHI*, GenBank登录号为DQ212984。在此基础上设计引物, 分别从cDNA和gDNA水平上克隆到该基因的全编码区序列, 从cDNA和gDNA水平克隆到的序列完全一致, 长431 bp, 说明该基因无内含子。

Prot Param、SignalP 3.0 和 Scan Profile 程序分析的结果显示, 硫堇蛋白前体的等电点(IEP)为5.4, 分子量(MW)为 12.4 kDa。N端第 1~17 位氨基酸区段疏水性很强, 第 17 位丙氨酸(A)和第 18 位精氨酸(K)为信号肽切割位点, 这一段具典型信号肽特征, 为信号肽部分。第 18~63 位氨基酸区段为成熟

硫堇部分, 亲水性较强, 具 6 个半胱氨酸, 占成熟硫堇氨基酸数量的 13%, 带正电荷, 呈碱性, IEP 为 8.92, MW 为 4.9 kDa。靠近 C 端的第 64~121 位氨基酸区段为酸性多肽部分。这些特征与大多数植物硫堇前体一致, 推断 SmTHI 在丹参中是以此三部分构成的前体形式存在的(图 1)。



图 1 *SmTHI* 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig.1 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *SmTHI*

斜体部分的 17 个氨基酸为信号肽; 底纹部分为 46 个氨基酸的成熟硫堇蛋白; 其他部分氨基酸为酸性多肽部分; 方框内为开放阅读框。

Motif Scan 程序分析显示, 成熟 THI 部分的第 4、5、17、26、32 和 40 位的 6 个半胱氨酸(C)残基是植物硫堇极为保守的 3 个二硫键的形成位点, 第 11 和 14 位氨基酸分别为植物硫堇保守的精氨酸(R)和芳香族氨基酸[这里为酪氨酸(Y)], 具有显著的植物硫堇标签(plant thionins signature) C-C-X(5)-R-X(2)-[FY]-X(2)-C 序列特征。C 端酸性多肽部分第 14~19 位氨基酸区段为许多植物硫堇保守的酰基化序列 GCASSV 位点(图 2)。

2 丹参硫堇基因 *SmTHI* 所编码的蛋白前体序列与其他物种的硫堇蛋白前体序列的比较

用 NCBI 中的 Blastx 对丹参硫堇基因 *SmTHI* 编码的蛋白前体序列与燕麦(*Avena sativa*)、大麦(*Hordeum vulgare*)、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)、白菜(*Brassica rapa*)、郁金香(*Tulipa gesneriana*)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)

这 7 种植物中的硫堇蛋白前体序列进行同源性的比较的结果显示: 丹参与拟南芥(GenBank 登录号 NP_565038)、白菜(GenBank 登录号 AAF21800)、水稻(GenBank 登录号 BAB93111)、大麦(GenBank 登录号 CAD48489)、小麦(GenBank 登录号 CAA65313)、燕麦(GenBank 登录号 BAB93112)、郁金香(GenBank 登录号 CAA57350)的同源性分别为 57%、56%、51%、44%、42%、39% 和 37%。

运用 EBI 网址中的 ClustalW 软件对这 8 种硫堇蛋白前体进行多序列比对(图 2), Mega3.1 分析软件对 8 种硫堇蛋白前体进行系统聚类分析(图 3)的结果显示: 硫堇蛋白的部分序列较为保守, 丹参中的硫堇与拟南芥、白菜中的硫堇同源性较高, 最先聚在一起, 单子叶植物中的燕麦、小麦和大麦优先聚在一起。

拟南芥	---MKG-RILILSLLIMSLVMAQ--VQVEAK-ICCPNQARNGYSVCRIR-FSKGRCMQV	52
丹参	-----MGALLVSLVLGQ--IQVEAKKSCPSTARNIYNTCRLR-LPASSCADL	46
白菜	---MEG-KTVILGVIIMSLVMAQ--NQVEAK-ICCPRTIDRNIYNACRLTGASMTNCANL	53
水稻	---MEGVKSLIMCMLVLGLVLQEQEQVEAK-SCCPSTARNVYNSCRFAGGSRDTCAKL	56
大麦	MATNKSIKSVVICVLILGLVLEQ--VQVEGK-SCCKNTTGRNCYNACHFAGGSRPVCATA	57
燕麦	MGSIKGLKSVVICVLVLGIVLEQ--VQVEGK-SCCKDIMARNCYNVCRIPGTTPRVCATT	57
小麦	MGS-KGFKGVIVCLLILGLVLEQ--LQVEGK-SCCRSTLGRNCYNLCRARG-AQKLCAGV	55
郁金香	-----MMVVVILGLVVAQ--TQVEAK-SCCRTTAARNCYNVCRLLGGTPTLCART	47
	: : : : * : * * * . * * * * * * : . *	
拟南芥	SGCQNSD--TCPRGWVNAILENSADA--TNEHCKLGCETSVCGAMNTLQNSDASEIVNGA	108
丹参	SGCKVIDGGTCTPTGWTNDILENTVD-----EFCKLGCASSVCAAITTLQNSDASEVVNGA	101
白菜	SGCKIVSGTTCPPGYTHDILQNYGDA--VNEYCKLGCASSVCGALTTLKNS-MQVNCEGA	110
水稻	SGCKIVDG-NCKPPYVHHTLHPEABESEVDFCKLGCASSVCSTMSTLFAN---EEANHA	112
大麦	CGCKIISGPTCPRDYPKLNLLPESGEPNATEYCTIGCRTSVCDNMDNVSRG---QEMKFD	114
燕麦	CRCKIISGNKCPKDYPKLHGDPDAGTPNAIEFCNTGCMSSICDNMNNAYNV---EDKEID	114
小麦	CRCKISSGLSCPFGPKLALESNSDEPDTIEYCNLGCSSVCDYMVNAAADD---EEMKLY	113
郁金香	CDCIHITGNCPRSHPKLGSASSTSTTNVDEALDVVDEVLDVAK-----EAMKEA	99
	. * . * : : . . : :	
拟南芥	SEQCAKGCSIFCTKSYVPPGPPKLL	134
丹参	AEKCSQACSAFCTKASVSAA-----	121
白菜	VSQCTNACSNFCTKGSAKVVETA---	133
水稻	VDRNEACRRFCTKEAETVTVVS---	135
大麦	MGLCSNACARFCNDGDVIQSVEA---	137
燕麦	VELCGNACTSFNCQIIVRASVAA---	137
小麦	VENCADACVSFCNGDAGLPSLDAY---	137
郁金香	VERCNNACSEVCTKG-SYAVVTA---	121
	* . . * . *	

图2 丹参与其他7种植物的硫堇蛋白前体序列比较

Fig.2 Comparison of amino acid sequence of thionin precursor of *S. miltorrhiza* with other seven plants

GenBank 登录号分别为 NP_565038 (拟南芥)、ABA87107 (丹参)、AAF21800 (白菜)、BAB93111 (水稻)、CAD48489 (大麦)、BAB93112 (燕麦)、CAA65313 (小麦)和 CAA57350 (郁金香)。

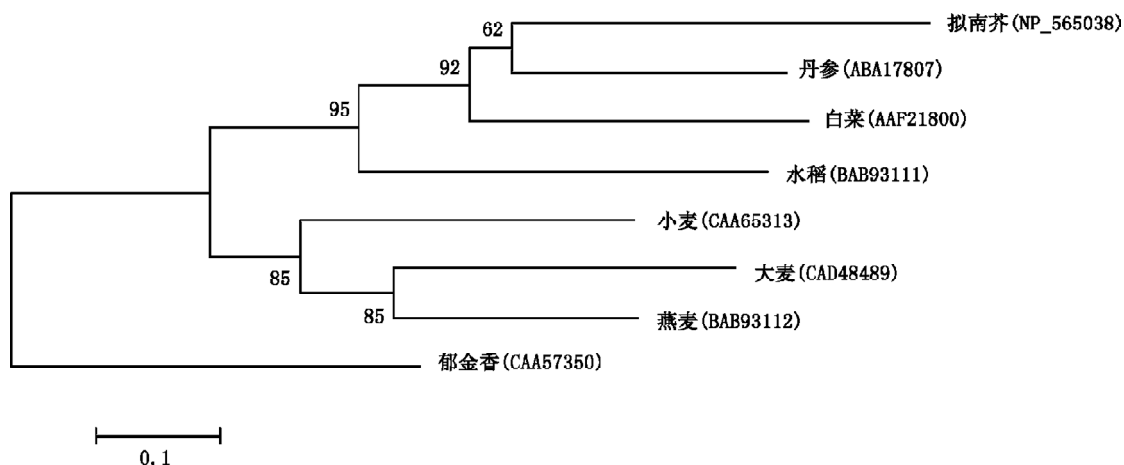


图3 八种植物硫堇前体蛋白的系统进化树

Fig.3 Evolutionary tree of eight plant thionin precursor

3 丹参硫堇基因 *SmTHI* 表达水平的检测

SmTHI 在丹参植株根、茎、叶等不同部位的表达分析的结果(图4)表明, *SmTHI* 在植物的根、茎、叶中均有不同程度的表达, 其中在叶中的表达丰度最高, 分别为根和茎的4.5和2.7倍。丹参叶片接种黄瓜角斑病病原菌后, *SmTHI*表达量上调, 在

检测时间段内, 接种24h后的表达量达到最大, 为不接种的3.4倍(图5)。在NaCl和SA胁迫处理后, *SmTHI* 表达量均发生了变化, 在6h内该基因均呈非线性增长趋势, 且都是在处理1h后表达量最高(图6、7), 接着分别在NaCl和SA胁迫处理后的6h和4h出现表达量的再次升高。

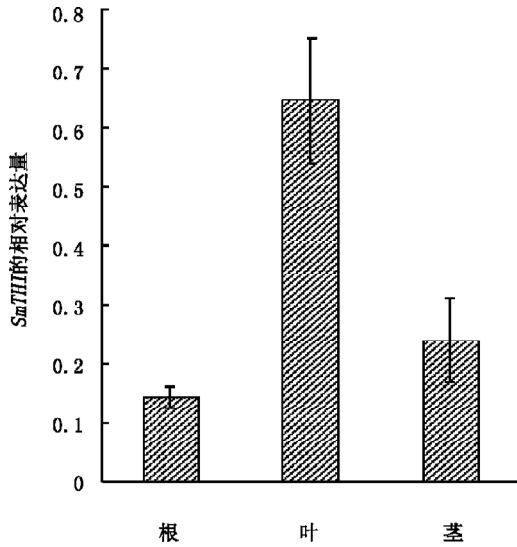


图4 *SmTHI* 在根、茎、叶中的表达量
Fig.4 Expression of *SmTHI* in the root, stem and leaf

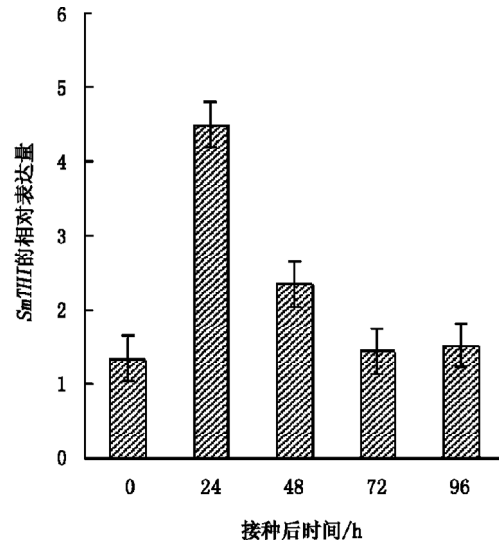


图5 黄瓜角斑病病原菌诱导 *SmTHI* 不同时间后的表达量
Fig.5 Expression of *SmTHI* after infected by *P. lachrymans*

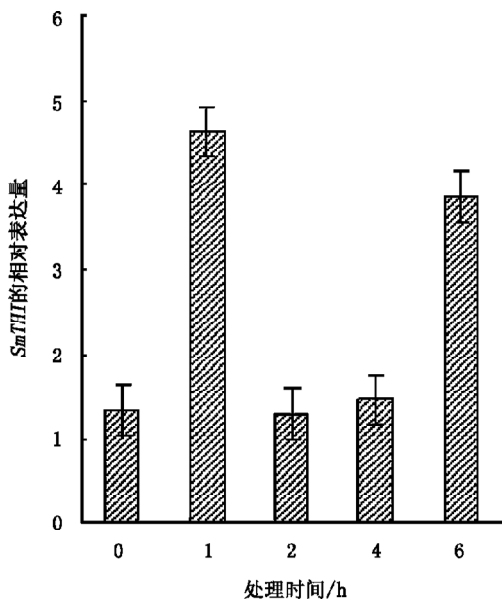


图6 NaCl胁迫下 *SmTHI* 的表达
Fig.6 Expression of *SmTHI* under NaCl stress
NaCl 浓度为 200 mmol·L⁻¹。

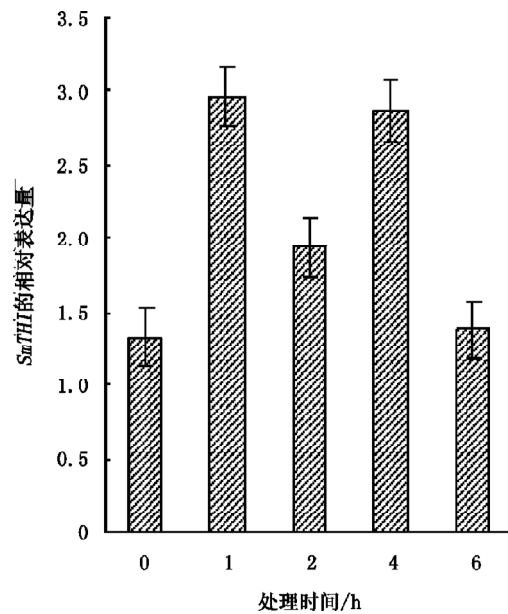


图7 SA胁迫下 *SmTHI* 的表达
Fig.7 Expression of *SmTHI* under SA stress
SA 浓度为 200 mmol·L⁻¹。

讨 论

根据植物的种类、发生部位、总静电荷、氨基酸的数量和成熟蛋白质中二硫键的位置, 硫堇至少可以分为4类(Florack和Stiekema 1994)。I型硫堇主要在禾本科植物的胚乳中大量表达, 在45个氨基酸中含有8个半胱氨酸, 形成4个二硫键; II型硫堇主要是从大麦及寄生植物短柔毛檀梨的叶和坚果中提取, 分别由46或47个氨基酸组成, 也形成4个二硫键; III型硫堇来源于多种植物的茎和叶中, 种子中也可检测到硫堇, 由45或46个氨基酸组成, 可形成3个或4个二硫键; IV型硫堇是从甘蓝的种子中提取出来的, 由46个氨基酸组成, 含有3个二硫键。其中前3种均为碱性, 带正电荷, 具有抗菌活性, 而第4种为中性, 不带电荷。经比较分析, 本文所克隆的*SmTHI*, 其所编码的成熟硫堇为III型硫堇。

硫堇广泛存在于植物的种子、叶及根的表皮细胞中, 可以抑制多种植物病原细菌以及20多种病原真菌的生长(陈彤彤等2006), 越来越受到人们的关注。本文从丹参中克隆到的硫堇基因受病原菌侵害后可大量表达, 推测这一基因所编码的成熟硫堇蛋白可能有抗菌活性。但是否有, 还待进一步研究。

参考文献

- 陈彤彤, 宋晓妍, 解树涛, 樊守金, 张玉忠(2006). 植物源抗菌肽的研究进展. 西北植物学报, 26 (2): 420~426
- 薛哲勇, 支大英, 任伟, 夏光敏 (2004). 根瘤农杆菌介导将大麦叶片型 α -硫堇 DB4 基因导入小麦获得转基因植株及后代. 高技术通讯, 9: 34~38
- Bohlmann H, Apel K (1991). Thionins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 42: 227~240
- Bohlmann H, Clausen S, Behnke S, Giese H, Hiller C, Reimann-Philipp U, Schrader G, Barkholt V, Apel K (1988). Leaf-specific thionins of barley – a novel class of cell wall proteins toxic to plant-pathogenic fungi and possibly involved in the defense mechanism of plants. *EMBO J*, 7: 1559~1565
- Epple P, Apel K, Bohlmann H (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, 9: 509~520
- Florack DEA, Stiekema WJ (1994). Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. *Plant Mol Biol*, 26: 25~37
- Iwai T, Kaku H, Honkura R, Nakamura S, Ochiai H, Sasaki T, Ohashi Y (2002). Enhanced resistance to seed-transmitted bacterial diseases in transgenic rice plants overproducing an oat cell-wall-bound thionin. *Mol Plant Microbe Inter*, 15: 515~521
- Lee SC, Hong JK, Kim YJ, Hwang BK (2000). Pepper gene encoding thionin is differentially induced by pathogens, ethylene and methyl jasmonate. *Physiol Mol Plant Pathol*, 56: 207~216