

研究报告 Original Papers

二色补血草硫氧还蛋白(*Trx*)的克隆和表达分析

张大为, 杨传平, 王玉成*, 班巧英, 马辉

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 cDNA 文库中分离出 1 个硫氧还蛋白基因全长 cDNA 序列。基因全长 1 138 bp, 其中, 5' 非翻译(UTR)区 128 bp, 3' 非翻译区 212 bp, 开放阅读框(ORF)全长 798 bp, 编码 265 个氨基酸, 编码蛋白的分子量为 28.58 kDa, 理论等电点(pI)为 9.68。BlastP 分析表明二色补血草 *Trx* 与拟南芥 *Trx* 序列同源率为 52%, 与葡萄 *Trx* 序列同源率为 76%, 从 11 个物种的氨基酸多序列比对可以看出 *Trx* 氨基酸序列保守性较高。实时定量 RT-PCR 方法检测低温、NaCl 和 PEG 胁迫不同时间后的基因在二色补血草中表达模式的结果表明, NaCl 能诱导 *Trx* 基因在二色补血草叶中表达, 胁迫 24 h 后达到高峰, 而聚乙二醇和低温处理则抑制 *Trx* 在二色补血草根和叶的表达。

关键词: 二色补血草; 硫氧还蛋白; 基因克隆; 实时荧光定量 PCR

Cloning and Expression Analysis of Thioredoxin Gene (*Trx*) from *Limonium bicolor*

ZHANG Da-Wei, YANG Chuan-Ping, WANG Yu-Cheng*, BAN Qiao-Ying, MA Hui

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

Abstract: The full length cDNA of a novel thioredoxin was cloned from *Limonium bicolor* cDNA library. The sequence of thioredoxin was 1 138 bp in length, including 128 bp of 5' untranslated region and 212 bp of 3' untranslated region. It had an open reading frame (ORF) of 798 bp and encoded a protein with 265 amino acid residues. The encoded protein molecular weight was 28.58 kDa and its theoretical pI was 9.68. Multiple sequence alignment of *Trx* proteins from 11 plants revealed that the *Trx* gene share high identities in sequence. We examined the expression pattern of the *Trx* gene in leaf and root of *L. bicolor* treated with NaCl, low temperature and PEG stresses for different time using real time RT-PCR. The results showed that the *Trx* was induced by NaCl treatments in leaf of *L. bicolor* with a expression peak at treatment for 24 h. However, *Trx* was inhibited by low temperature and PEG treatment in both leaf and root of *L. bicolor*.

Key words: *Limonium bicolor*; thioredoxin; gene cloning; RT-PCR

植物遭受盐、干旱和低温胁迫后, 初期会造成植物体离子失衡和渗透紊乱, 引发植物的“生理性干旱”; 胁迫的延续或加重还会伴有活性氧(ROS)的产生和次生性氧化胁迫的发生。以致细胞的氧化还原内环境发生改变, 并且会诱发包括硫氧还蛋白(*Trx*)的表达增加在内的一系列应答氧化胁迫的应急反应。另有实验证明, 转基因植物中 ROS 清除因子的过量表达或具有更高 ROS 清除功能的突变体对环境胁迫具有更强的耐受性(Bohnert 和 Sheveva 1998)。硫氧还蛋白是一种低分子量的热稳定蛋白, 广泛存在于植物、细菌、酵母和动物体中。它们在多种反应中通过可逆的双硫键和硫醇变化起氧化还原载体的作用, 是酶

活性调节蛋白(Nishiyama 等 2001)。*Trx* 在细胞内主要的功能是还原目标蛋白质的二硫键, 具有抗氧化、细胞因子以及趋化的特性(Sederberg 等 2000), 并能够清除因胁迫产生的 ROS。因此认为, 可能与植物抵抗逆境胁迫相关。

二色补血草(*Limonium bicolor*)又名付氏矾松、草原干枝梅。多年生草本植物。可在干旱和盐碱

收稿 2007-10-16 修定 2008-02-14

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: 0451-82191627)。

地生长,是碱化较严重地区的理想绿化植物,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 *Trx* 基因,并对其在非生物胁迫逆境下的表达进行了分析,这为以后深入了解 *Trx* 基因功能和其在植物抗逆中的作用积累了基础资料。

材料与方 法

二色补血草 [*Limonium bicolor* (Bunge) Kuntze] 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℃,平均光照强度为 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,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, 20% (W/V) PEG 6000 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℃ 的培养箱中进行低温处理,并以生长在正常条件下的二色补血草作为对照。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(地上部分)和根部用蒸馏水清洗,拭干后置于 -70℃ 中保存备用。

以构建的 0.4 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaHCO_3 胁迫下的二色补血草叶组织的 cDNA 文库,通过对文库克隆的随机测序和 EST 分析获得 *Trx* 基因的全长 cDNA 序列。用 NCBI 的 ORF (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 软件寻找 *Trx* 基因的开放读码框 (ORF),用 NCBI 的保守功能区域 (conserved domains) 分析程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 预测保守区,用 ExPASy 网站 (http://us.expasy.org/tools/pi_tool) 计算蛋白的分子量及等电点,用 BlastP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 进行同源性搜索,选择了 10 种与其相似性高的植物的 *Trx* 基因氨基酸序列,用 Clustal X1.83 程序对烟草、豌豆等 11 种植物的 *Trx* 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) 提取不同处理时的二色补血草根、叶中总 RNA,并用 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 RNA 酶抑制剂; 1.5 μL Oligo d(T) (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℃ 5 min; 42℃ 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℃ 预变性 30 s; 94℃ 12 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 78.4℃ 读板 1 s, 45 个循环。然后在荧光定量 PCR 仪上完成 RT-PCR。用 18 S rRNA (EU039827) 和 β -Tublin (EH793552) 基因作为内参基因。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 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。

表 1 荧光定量 PCR 的引物序列

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

引物名称	正反引物序列
<i>Trx</i> 基因	5'-TCTGTGTCACGGATTCTCAT-3' 5'-GTTTCCCAGTGTACTGCTTT-3'
18 S rRNA 基因	5'-CCGTTCTTAGTTGGTGGAG-3' 5'-CTCGTTGAATACATCAGTGTAG-3'
β -Tublin 基因	5'-GGTTGAGTGAGCAGTTCAC-3' 5'-GATAACCAGACCACACCTTAGC-3'

实验结果

1 二色补血草 *Trx* 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,获得的 *Trx* 基因的全长 cDNA 序列,全长为 1 138 bp,其中 5' 非翻译区 128 bp, 3' 非翻译区 212 bp,开放读码框长 798 bp,编码 265 个氨基酸,终止密码子为 TAA。具有硫氧还蛋白非常保守的活性中心序列氨基酸是胱氨酸-甘氨酸-脯氨酸-胱氨酸(图 1)。

2 *Trx* 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/Structure/>)

3	CTA	GTC	ACT	GCT	TCT	ATA	TGC	AGT	TGG	CAT	ACT	GGA	TTC	AGT	GAA	47
48	GGC	GTC	AAG	CTC	CCA	GCA	ATG	TGT	AGT	ACT	TAC	CGT	AGC	ACC	AGC	92
93	TTA	CAC	GTG	CTC	GGT	TGT	GTG	TGA	GAG	TGG	GAG	GGT	ATG	CTC	TGC	137
													M	L	C	2
138	GCA	GAA	TGT	GTC	GCT	GAT	TCG	CCT	AGC	TTG	ATC	TAC	CTA	CAT	AGA	182
3	A	E	C	V	A	D	S	P	S	L	I	Y	L	H	R	17
183	CGA	ACA	AAG	CTG	ATC	TCC	CCG	CGT	GGC	CGC	TCT	ATG	ACT	AGT	GAT	227
18	R	T	K	L	I	S	P	R	G	R	S	M	T	S	D	32
228	CCC	GCG	GGC	TGC	AGT	ATC	GCG	AGA	GCT	CAT	TGT	CGC	AAA	GCC	GCG	272
33	P	A	G	C	S	I	A	R	A	H	C	R	K	A	A	47
273	ACA	GGA	CTG	ACA	AAC	AAC	CAC	ACT	CCT	CCG	GAG	TTC	TCT	ACT	GGA	317
48	T	G	L	T	N	N	H	T	P	P	E	F	S	T	G	62
318	TCC	tTA	GCA	TCT	TGG	ATC	TCC	aAG	GCA	TCT	GTC	tTC	CTt	TCA	TCT	362
63	S	L	A	S	W	I	S	K	A	S	V	F	L	S	S	77
363	ATG	GCT	GCC	GTA	TTC	GAA	TCA	GTC	TCA	GTT	CCT	CGC	TCT	TCC	ATA	407
78	M	A	A	V	F	E	S	V	S	V	P	R	S	S	I	92
408	GTT	ACT	TCG	GCG	GCT	CTT	GCG	CCG	ATC	GTC	TCG	CTA	TCc	TCC	GTC	452
93	V	T	S	A	A	L	A	P	I	V	S	L	S	S	V	107
453	GTC	TCC	TTC	TCC	TGC	GCT	CGT	CAA	CCT	GTT	AAA	TTG	GCT	AAA	TTC	497
108	V	S	F	S	C	A	R	Q	P	V	K	L	A	K	F	122
498	AGT	GGT	CTT	AGA	GTC	ATA	TCG	AGC	GCG	TCT	ACT	CGC	CGC	TTG	AGG	542
123	S	G	L	R	V	I	S	S	A	S	T	R	R	L	R	137
543	CCC	TTA	AGA	TCC	TCC	GGG	GTT	CGC	CGC	AGT	GGG	CGA	GTG	GTG	TGC	587
138	P	L	R	S	S	G	V	R	R	S	G	R	V	V	C	152
588	GAG	AGC	CCA	GAC	ACC	GCC	GTT	GAA	GTG	CAA	TCT	GTC	ACG	GAT	TCC	632
153	E	S	P	D	T	A	V	E	V	Q	S	V	T	D	S	167
633	TCA	TGG	CAG	TCA	CTC	GTG	CTG	GAG	TCG	GAC	TCT	CCG	GTT	CTT	GTT	677
168	S	W	Q	S	L	V	L	E	S	D	S	P	V	L	V	182
678	GAA	TTC	TGG	GCC	CCA	TGG	TGT	GGC	CCT	TGC	CGC	ATG	ATC	CAT	CCA	722
183	E	F	W	A	P	W	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>P</u>	<u>C</u>	R	M	I	H	P	197
723	ATT	ATT	GAT	GAG	CTG	GCA	AAG	CAG	TAC	ACT	GGG	AAA	CTC	AAA	TGC	767
198	I	I	D	E	L	A	K	Q	Y	T	G	K	L	K	C	212
768	TTT	AAA	GTA	AAC	ACT	GAC	GAA	AGC	CCC	TCC	ATT	GCA	ACT	CGC	TAT	812
213	F	K	V	N	T	D	E	S	P	S	I	A	T	R	Y	227
813	GGA	ATC	CGA	AGC	ATT	CCA	ACT	GTT	ATG	ATC	TTC	AAG	AAT	GGG	GAG	857
228	G	I	R	S	I	P	T	V	M	I	F	K	N	G	E	242
858	AAA	AAA	GAC	GCA	GTA	ATT	GGT	GCT	GTT	CCA	AAA	TCT	ACT	CTC	ACC	902
243	K	K	D	A	V	I	G	A	V	P	K	S	T	L	T	257
903	ACG	AGT	ATA	GAG	AAG	TTC	TTA	TAA	GTA	GGC	TTT	GCT	GTG	GAT	GAG	947
258	T	S	I	E	K	F	L	*								
948	TAT	TTA	ATT	AAC	TCT	TCT	AGT	ATT	CTC	TAC	TGT	GGC	ATC	TCT	AGG	992
993	GTT	TTA	TGG	TTT	ATA	TTC	TGA	TAT	CGC	TGA	ACT	ATA	CCG	ATG	AAA	1037
1038	ACA	AAT	AAG	TGT	TGT	ATG	ATG	TAC	ACT	CAT	GTA	TAG	TTC	GAC	TCT	1082
1083	GTG	GCT	TTT	GCT	ACT	GGA	AGG	CGA	TGT	TTA	CTC	GGT	CAA	AAA	AAA	1127
1128	AAA	AAA	AAA													1136

图1 二色补血草 *Trx* 基因 cDNA 序列和氨基酸序列

Fig.1 The cDNA and deduced amino acid sequence of *Trx* gene
下划线标记的氨基酸为非常保守的活性中心序列。

cdd/wrpsb.cgi)预测基因的保守区,图2显示,该基因为类 *Trx* 家族基因,其保守序列位于第168~262氨基酸之间。

通过ExPASY网站(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.htm)的在线分析,计算该基因编码蛋白的分

子量为28.58 kDa,理论等电点(pI)为9.68,为碱性氨基酸,其中丝氨酸最多,有42个,占氨基酸总数的15.8%。带负电荷的氨基(天门冬氨+谷氨酸)有19个,带正电的(精氨酸+赖氨酸)共有33个。不稳定系数为51.21,为不稳定蛋白。

BlastP分析该序列,选取与二色补血草 *Trx* 基因相近10个物种的 *Trx* 基因序列,用多序列比对程序(Clustal X1.8)进行分析得到的结果表明:二色补血草 *Trx* 基因与其他10种植物的同源性在

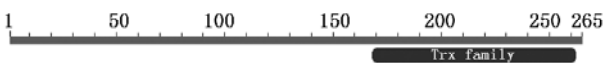


图2 *Trx* 蛋白保守区的预测

Fig.2 The prediction of the conserved domain of *Trx* protein

52%~76% 之间,但C末端的氨基酸序列具有很高的保守性,且存在1个高度保守的胱氨酸-甘氨酸-脯氨酸-胱氨酸的氨基酸序列(图1),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,充分说明了 *Trx* 基因

在不同植物中的保守性。

在这11个物种中,二色补血草 *Trx* 与葡萄 *Trx* 序列同源性最高,为76%,与拟南芥 *Trx* 序列同源性最低,为52%。这11个物种的 *Trx* 序列绘制分子进化树如图3所示。



图3 11种植物 *Trx* 家族蛋白的分子进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of *Trx* family in 11 plants

3 寒冷、盐和干旱胁迫下的 *Trx* 表达

为了研究二色补血草 *Trx* 基因与逆境胁迫的应答关系,我们用定量 RT-PCR 技术检测 NaCl、PEG和冷(3)3种逆境胁迫下二色补血草 *Trx* 基因表达的结果(图4)表明,在盐胁迫下, *Trx* 基因在叶中的表达量明显高于未做胁迫处理的,并随着时间进程而明显上升,胁迫24 h后的表达量最高,而后急剧下降,在48 h达到最小值,甚至低于未做胁迫处理的。我们的PCR结果显示, *Trx* 基因在根中各个时间点的表达量无显著性变化($P > 0.05$),但在叶中的诱导表达情况却有所不同,在NaCl胁迫12、24、48 h的表达量差异极显著($P < 0.01$),而在PEG和冷胁迫下的表达量则无显著性变化($P > 0.05$),并且表达量始终低于未做胁迫处理的。同时 *Trx* 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NaCl胁迫可以诱导 *Trx* 基因在叶中的表达,而抑制其在根中的表达。在PEG和冷胁迫下, *Trx* 基因在根和叶中的表达水平都存在着显著性差异($P < 0.05$),但在根和叶中的表达量都低于未做胁迫处理的,说明在PEG和冷胁迫下, *Trx* 基因在叶和根中的表达都被抑制,但不同胁迫时间的基因表达量有变化。这些

说明, *Trx* 可对NaCl、冷和PEG的胁迫作出应答。

讨 论

根据序列分析可以看出,二色补血草 *Trx* 基因属于I类 *Trx* 家族基因,它与其他物种的同源性较高,达到52%以上,N端氨基酸序列保守性差,而C端氨基酸序列高度保守,说明C端可能对维持 *Trx* 蛋白的结构与功能起作用。

已有研究表明,高温、低温和重金属等胁迫都会诱导 *Trx* 基因的表达(Esposio等1995),但在不同器官中的表达模式存在差异,说明硫氧还蛋白的表达可增强植物抗这些胁迫的能力。实时定量RT-PCR研究结果也证明,二色补血草的 *Trx* 基因对NaCl、低温和PEG胁迫具有应答反应。其中,NaCl能诱导 *Trx* 基因在叶中的表达,NaCl胁迫24 h后的 *Trx* 基因表达量最高,是未作胁迫处理的5倍(图4), *Trx* 基因的诱导表达可能是提高了二色补血草的耐盐能力,说明其与盐胁迫中的 Na^+ 有应答关系。以往的研究也证明 *Trx* 基因与植物的耐盐等逆境相关,例如,夏德习等(2007)发现转 *Trx* 基因的拟南芥在 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl盐逆境下的生长明显好于非转基因植株。孙志宾

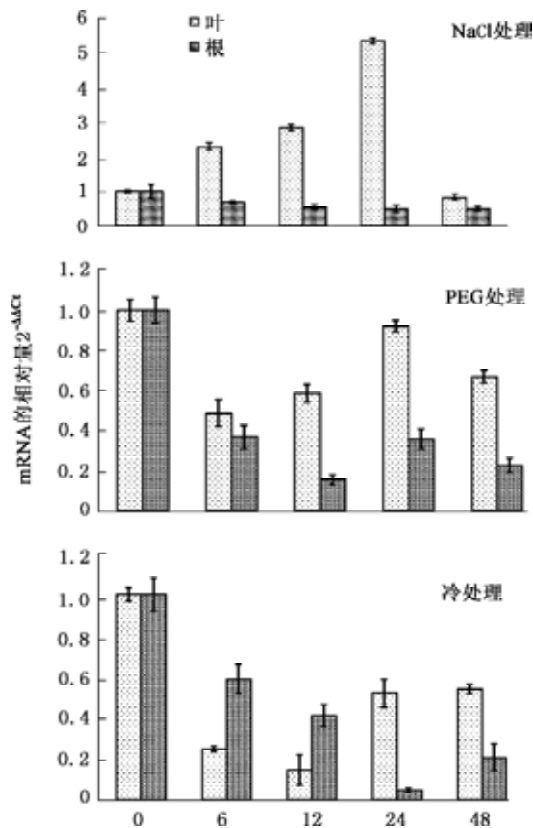


图4 NaCl、冷和PEG胁迫下二色补血草中 *Trx* 基因的表达

Fig.4 The expression patterns of *Trx* in leaf and root of *L. bicolor*

NaCl 处理为 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫时, *Trx* 的表达量随时间变化而变化的相对量; 冷处理为低温(3°C)胁迫时, *Trx* 的表达量随时间变化而变化的相对量; PEG 处理为 20% (W/V) PEG 胁迫时, *Trx* 的表达量随时间变化而变化的相对量; 数据为 3 次重复的平均值。

(2006)在研究不同浓度 NaCl 对拟南芥萌发率的影响的试验中也发现, 在萌发阶段, 转 *Trx* 基因和非转基因的种子萌发速率都受 NaCl 的抑制, 但转基因的受抑制程度较非转基因的低。此外, Kim 等(2003)将小麦的 *Trx* 基因导入大麦中后, 转基因大麦抗硒污染的能力明显提高, 在含有 $1 \sim 2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的硒溶液中, 转基因大麦种子的发芽率分别是 80% 和 65%, 而非转基因植株的发芽率分别是 80% 和 10%, 并且转基因大麦的根、芽比

非转基因的长 5~10 倍。本文结果也表明, NaCl 在二色补血草的根和叶中的表达模式不同, 这暗示此种基因在二色补血草的根和叶中处于不同的表达调控体系。

综上所述, 本文和前人的研究都显示 *Trx* 基因可受盐离子诱导表达, 并具有耐盐能力。我们的结果还表明冷和 PEG 明显削弱了 *Trx* 基因在二色补血草根和叶片中的表达, 与盐胁迫的结果相反。冷和旱胁迫对 *Trx* 基因的影响不同, 相对于盐和旱胁迫而言, NaCl 胁迫能促使盐离子在二色补血草中积累, 从而导致 *Trx* 基因上调表达。即 *Trx* 基因的表达可能受离子胁迫高效诱导, 这一点还需进一步研究。

参考文献

- 孙志宾 (2006). 盐芥 Th TRXh 功能分析和盐芥不同生态型的比较蛋白质组学初步研究[学位论文]. 济南: 山东师范大学
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2003). 柎柳总 RNA 提取方法的建立. 东北林业大学学报, 31 (5): 99~100
- 夏德习, 管清杰, 金淑梅, 李宇佳, 梁涵, 张欣欣, 西内俊策, 高野哲夫(2007). 拟南芥硫氧还蛋白 M1 型基因(*AtTRX m1*)与环境逆境之间的关系. 分子植物育种, 5 (1): 21~26
- Bohnert HJ, Sheveva E (1998). Plant stress adaptations making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol*, 1: 267~274
- Esposio F (1995). DNA binding activity of the glucocorticoid receptor is sensitive to redox changes in intact cells. *Biochim Biophys Acta*, 1260 (3): 308~314
- Kim YB, Garbisu C, Pickering IJ, Prince RC, George GN, Cho MJ, Wong JH, Buchanan BB (2003). Thioredoxin h overexpressed in barley seeds enhances selenite resistance and uptake during germination and early seedling development. *Planta*, 218: 186~191
- 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
- Nishiyama A, Masutani H, Nakamura H, Nishinaka Y, Yodoi J (2001). Redox regulation by thioredoxin and thioredoxin-binding proteins. *IUBMB Life*, 52 (1): 29~33
- Sederberg A, Sahaf B, Rosn A (2000). Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res*, 60 (8): 2281~2289