

麻疯树两种核糖体失活蛋白的表达模式分析

秦小波, 邵彩霞, 徐莺*, 陈放

四川大学生命科学学院, 成都 610064

摘要: 目前, 麻疯树核糖体失活蛋白已发现2种: 种子中的毒蛋白curcin和叶片中的逆境诱导蛋白curcin-L, 其基因的表达模式均呈现出器官特异性。mRNA和蛋白质水平分析显示, curcin只在种子的胚乳中积累, 且表达开始于心型胚时期, 成熟时达到最高; 而curcin-L在正常生理条件下并不表达, 但受脱落酸、水杨酸、干旱、高低温等胁迫诱导时仅在叶片中表达。

关键词: 麻疯树; 核糖体失活蛋白; 胁迫; 表达模式

Analysis on the Expression Patterns of Two Ribosome Inactivating Proteins from *Jatropha curcas* L.

QIN Xiao-Bo, SHAO Cai-Xia, XU Ying*, CHEN Fang

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China

Abstract: So far, two types of ribosome inactivating proteins (RIPs) have been found in *Jatropha curcas*, one is curcin in seeds, and the other is curcin-L in leaves. The results showed that the character of their genes' expression pattern was organ-specific. Analysis on the levels of mRNAs and proteins showed that, curcin only expressed and accumulated in endosperm of *Jatropha curcas* from heart-shape embryo period to mature embryo period. Curcin-L didn't express under common physiological conditions. However, it could be induced in leaves by abscisic acid, salicylic acid, drought, high or low temperature and so on.

Key word: *Jatropha curcas*; ribosome inactivating protein; stress; expression pattern

大多数核糖体失活蛋白(RIPs)在不同时期内积累。例如: 蓖麻毒蛋白(ricin)及其基因转录物在种子成熟晚期外种皮形成时积累(Chamberland等1992); 苜蓿素(tricin)和大麦RIP的基因转录物在种子发育的后III期积累(Leah等1991; Massiah和Hartley1995)。在上述基因的上游, 对控制器官特异性表达的假定元件已有描述, 但其调控机制在分子基础上的细节仍然未知。

某些物种中, RIPs的表达和积累会受到生物和非生物胁迫以及信号分子的影响。比如: 在沙盒树(*Hura crepitans*)及美洲商陆(*Phytolacca americana*)叶片中, 经热处理和渗透压胁迫后, RIPs的活性增强到原来的15倍(Stirpe等1996); 在分离的幼嫩大麦叶片中, 植物信号分子茉莉酮酸甲酯介导JIP60(一种III型RIP)的合成, 并与抑制因子脱落酸协同作用(Chaudhry等1994); 在盐生冰草(*Mesembrianthemum crystallinum*)中, 盐分也介导了I型RIP的表达。

在麻疯树中, 已发现的RIPs有2种: 一种是种子中的毒蛋白curcin; 一种是叶片中的逆境诱导蛋

白curcin-L。curcin是在麻疯树中最早发现的核糖体失活蛋白, 发现之初是一种粗蛋白, 纯化后可得到几种分离峰产物, 其中有活性的产物被命名为curcin1(Stirpe等1976), 现在所指的curcin即等同于以前的curcin1。curcin-L原名JFIP, 是本实验室魏琴等人用真菌诱导麻疯树叶片时发现的。根据魏琴(2004)的研究, curcin-L cDNA和curcin cDNA有92%同源性, 编码氨基酸87%相同, 5%相似, 其ORF范围有40个氨基酸不同, 且curcin-L比curcin多16个氨基酸。

基于上述核糖体失活蛋白表达和积累的特点, 本文选取不同时期的麻疯树种子胚乳和6种胁迫条件诱导的麻疯树植株, 研究麻疯树核糖体失活蛋白curcin和curcin-L的表达模式, 揭示其在麻疯树生长发育中的作用。

收稿 2008-05-29 修定 2008-08-06

资助 国家自然科学基金(30670204)、国际科学技术合作项目(2004DFB00300、2006DFB63400)和教育部科技重点项目(104151)。

* 通讯作者(E-mail: qxb_2003@163.com; Tel: 028-85417281)。

材料与方法

麻疯树(*Jatropha curcas* L.)心型胚、半子叶胚和成熟胚等不同时期的种子采自四川省攀枝花地区。植株由成熟种子于温室(33 ℃)萌发、生长2月后得来。

植株在设计好的6种条件下进行诱导。用15 mmol·L⁻¹脱落酸(ABA)、1.0 mmol·L⁻¹水杨酸(SA)、30%聚乙二醇6000(PEG6000)分别浇灌植株,使其根部保持在相应浓度溶液下48 h。此外,将植株分别置于4 ℃和45 ℃下48 h或250 W紫外灯照射下36 h。

将诱导后的各植株分别取其根、茎和叶,在液氮中研磨成粉末状物质,用QIA GEN公司的RNA提取试剂盒提取各组织的RNA。将从原产地用液氮冷冻带回的不同时期的种子或子房也按相同方法提取RNA。RNA浓缩:加入1/10体积NaAc(pH 5.6),摇匀后置于-20 ℃下3 h或更长时间以沉淀RNA;2 ℃,12 000×g离心10 min,70%乙醇洗涤沉淀2次,晾干除去乙醇;沉淀溶解于适量的DEPC水中于-20 ℃中保存。

根据实验室提交的curcin的DNA全长序列(AF469003),设计其特异引物P1:5'-GCC AAA GTC ATA AAT GTA GCG AAT T-3'和P2:5'-CAA CAA GAC TCC CAT GAC ACC TGC-3'。同时,根据curcin-L的cDNA序列(AY435214),设计其特异引物P3:5'-GGA TCC ATG GCT GGT TCC ACT CCA ACT TT-3'和P4:5'-GAG CTC ATA CAT TGG AAA GAT GAG GA-3'。利用DIG PCR探针合成试剂盒合成curcin与curcin-L的特异性DIG杂交探针。RNA变性反应体系:RNA(多达20 μg)2 μL,10×MOPS缓冲液[0.2 mol·L⁻¹ MOPS (pH 7.0),20 mmol·L⁻¹乙酸钠,10 mmol·L⁻¹ EDTA, pH 8.0]2 μL,甲醛4 μL,甲酰胺10 μL,溴化乙锭(200 mg·μL⁻¹)1 μL。置于一离心管中盖紧,于55 ℃温育RNA液体60 min,在冰水中冷却样品10 min,然后离心5 s使得管内所有液体集中于离心管底部。将变性RNA样品上样于1.5%的甲醛变性胶(以100 mL标准,将1.5 g琼脂糖加入72 mL无菌水中100 ℃溶解,降温至55 ℃时加入10 mL 10×MOPS和18 mL去离子甲醛)上,4~5 V·cm⁻¹电压下电泳分离,再转移到尼龙膜上固定(Sambrook和Russell 2001)。采用地高辛标记和检测试剂盒进行杂交和显色处理,按照操作说明操作。

总蛋白提取参照谷瑞升等(1999)文中改良的丙酮沉降提取法。总蛋白沉淀加250 μL上样缓冲液,样品沸水浴5 min后,取35 μL上样于12%的变性聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳胶,按Laemmli(1970)方法进行电泳和分子量计算。按Bradford(1970)的方法测样品的蛋白质总浓度。

抗原(curcin)参照林娟等(2002)文中的方法纯化。用5 mmol·L⁻¹ PBS(含0.5 mol·L⁻¹ NaCl, pH 7.2)从种子中提取粗蛋白质溶液。经分子筛Sephadex G-75(φ6 cm×90 cm)层析柱分离纯化,12%的SDS-PAGE分离得纯蛋白。2 mg的纯蛋白进行第1次皮下免疫注射。4周后,1 mg的纯蛋白进行第2次加强免疫注射。6周后,1 mg的纯蛋白进行第3次加强免疫注射。第7周,收集抗血清。抗血清按修改的ELISA法(Ansubel 1998)检测滴度。10 mg·L⁻¹的毒蛋白溶解在50 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃和NaHCO₃缓冲液(pH 9.6)中,室温温育24 h。用TTBS(0.1% Tween 20,0.9% NaCl,100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl,3% BSA)冲洗,不同稀释度(1:400~1:51 200)的抗血清用TTBS缓冲液稀释,山羊抗兔IgG-AP(Sino-American)用TTBS以1:1 000稀释。底物溶液为3 mmol·L⁻¹ NPP,50 mmol·L⁻¹ Na₂CO₃,50 μmol·L⁻¹ MgCl₂。用1 mol·L⁻¹ NaOH终止反应。测定405 nm的吸光值。测定结果取4次重复的平均值。(待测血清A₄₀₅-空白对照A₄₀₅)/(阴性对照A₄₀₅-空白对照A₄₀₅)≥2.1判定为阳性反应,反之为阴性反应。

经胁迫诱导处理的根、茎、叶、相应的蛋白质成分、种子的粗蛋白液及未处理对照在12%的SDS-PAGE上分离,按Towbin法(Ansubel 1998)进行抗体结合和酶显色反应。一抗为curcin的抗血清,工作浓度为1:1 000;二抗为碱性磷酸酯酶(AP)偶联的山羊抗兔IgG,工作浓度为1:1 000,AP的反应底物为氯化硝基四氮唑蓝(NBT)和5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸甲苯胺蓝(BCIP)。

结果与讨论

1 麻疯树RNA的提取与纯度检测

从麻疯树组织中提取的RNA溶于DEPC处理水中,经测定其含量可达到500 ng·μL⁻¹,OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为1.97。通过琼脂糖凝胶电泳分析,所得RNA符合实验要求(图1)。

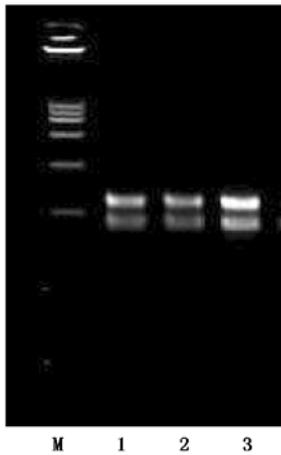


图1 麻疯树 RNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.1 The electropherogram of total mRNAs from

Jatropha curcas

1: RNA 提取于麻疯树根; 2: RNA 提取于麻疯树茎; 3: RNA 提取于麻疯树叶。

2 种子不同发育时期 *curcin* 和 *curcin-L* 的表达情况

种子的形成过程伴随着细胞的分裂和分化, 涉及到很多与发育时期相关的信号调控及各种基因的开关, 因此有必要研究不同发育时期对 *curcin* 和 *curcin-L* 的表达造成的影响。

分别将 *curcin* 和 *curcin-L* 的特异性探针与不同时期的种子或子房中的 RNA 进行杂交后, 发现只有 *curcin* 的特异性探针与 RNA 产生了杂交反应。如图 2 所示, 杂交条带在心型胚时期开始出现, 条带强度逐渐加强, 在成熟胚时期最显著。这表明 *curcin* 从心型胚时期开始表达, 其表达量随着时间推移不断增加, 在成熟胚时期达到最高值。从图 2 右侧的柱状图还可以看出, 以 18S rRNA 的表达量

作为参照, *curcin* 的表达量明显低于 18S rRNA。

上述结果中, *curcin-L* 不能在种子中表达, 但 *curcin* 可以在种子中表达, 且受种子不同发育时期的影响。这说明两种蛋白在麻疯树中可能具有不同的作用。种子胚乳是提供营养的组织, *curcin* 在胚乳中的表达可能作为储存蛋白为种子提供营养。同时, 作为一种有毒性的蛋白, 它还可能具有防止种子被动物吞食的功能。要进一步分析 *curcin* 在种子发育中的作用以及更深入地研究发育时期对其诱导的影响, 需要扩大时间范围、采集更多时期的种子。同时, 还可以增加不同花期的材料进行研究。但对于花等器官组织, 要取其各时期的样本, 目前还存在取材上的困难。

3 不同胁迫诱导下 *curcin* 和 *curcin-L* 的表达情况

许多研究表明, 植物胁迫诱导表达的蛋白, 如蛋白激酶、转录因子、磷脂酶等, 是通过参与到植物胁迫信号转导途径, 或通过调节其他效应分子的表达和活性而起作用的(Shinozaki和Yamaguchi-shinozaki 1997)。因此我们设计了 6 种不同的胁迫和诱导处理, 从激素诱导、干旱胁迫、低高温胁迫和紫外损伤几方面研究麻疯树核糖体失活蛋白在体内的表达情况。在 ABA、SA 和 PEG 的浓度上参考了以前的相应的浓度梯度实验和相关研究(崔婧 2007; 万正林和罗庆熙 2007; 魏琴 2004)。在处理时间上, 由于有研究表明较短的 UV-B 辐射可以促进某些蛋白的合成(Cambell等1998), 因此在其他条件均处理 48 h 的情况下, 紫外线照射仅使用 36 h。总体上, 本实验所设计的条件弥补了之前研究中条件设计的空白。

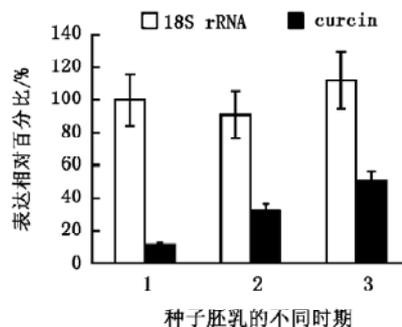
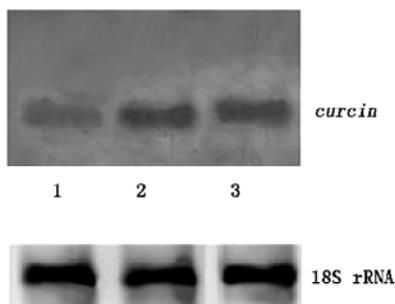


图2 Northern 杂交分析种子不同时期 *curcin* 基因的表达

Fig.2 Northern blot analysis of the *curcin* gene expression in endosperm

每个泳道上样 20 μ g 总 RNA, 最下面用各样品中的 18S rRNA 作表达量参照。1: 上样 RNA 提取于心型胚期的子房; 2: 上样 RNA 提取于半子叶胚期的种子胚乳; 3: 上样 RNA 提取于成熟胚期的种子胚乳。

对处理后的植株,仍然用 *curcin* 和 *curcin-L* 的特异性探针对根、茎、叶组织中的 RNA 进行检测,并用 18S rRNA 作为参照。我们发现, *curcin* 的特异性探针与所检测的各组织中的 RNA 均未产生杂交反应,而 *curcin-L* 的特异性探针与被诱导的麻疯树苗叶片中的 RNA 产生了杂交反应。如图 3

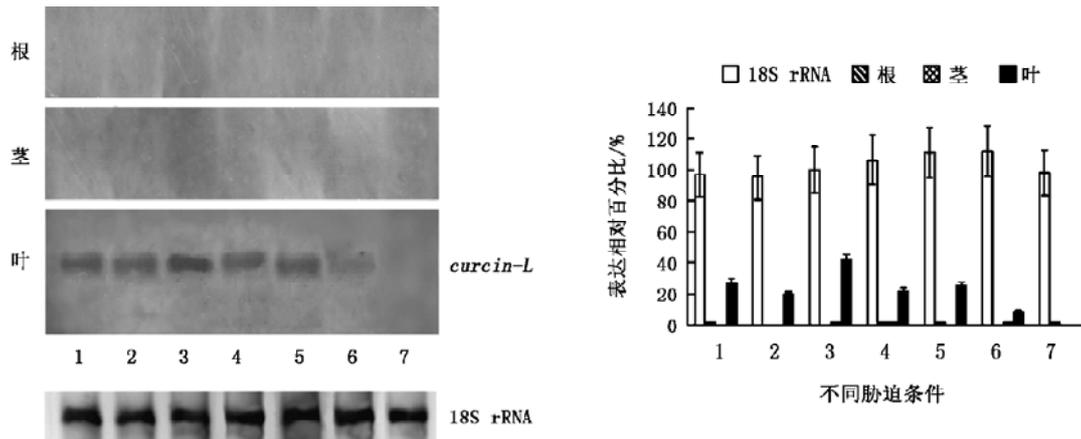


图3 不同诱导下 *curcin-L* 基因表达的 Northern 杂交分析

Fig.3 Northern blot analysis of the *curcin-L* gene expression under different stress

每个泳道上样 20 μg 总 RNA, 最下面用各样品中的 18S rRNA 作表达量参照。1: 上样 RNA 提取于经 15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 诱导的麻疯树苗各组织; 2: 上样 RNA 提取于经 1.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 诱导的麻疯树苗各组织; 3: 上样 RNA 提取于经 30% PEG6000 诱导的麻疯树苗各组织; 4: 上样 RNA 提取于经 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温诱导的麻疯树苗各组织; 5: 上样 RNA 提取于经 45 $^{\circ}\text{C}$ 高温诱导的麻疯树苗各组织; 6: 上样 RNA 提取于经紫外线诱导的麻疯树苗各组织; 7: 上样 RNA 提取于未经诱导的麻疯树苗各组织。

上述结果中, *curcin-L* 对 PEG 干旱胁迫最敏感, 可能与其生长在干热环境有关。它对 ABA 和 SA 的反应可能与其作为病程相关蛋白 (PRs) 有关 (Lo 等 1999), 有报道指出 ABA 在生物体内最主要的功能是其作为胁迫激素参与了植物对外界胁迫条件的适应。而外源 SA 可诱发烟草、黄瓜、马铃薯、菜豆、豇豆、水稻和拟南芥等多种植物积累病程相关蛋白 (PRs), 并产生对真菌、细菌、病毒等多种病原物的抗性 (Malamy 等 1990)。 *curcin-L* 对高、低温诱导的反应表明它可能是一种抗逆蛋白。有研究显示对拟南芥、油菜和菠菜等植物, 低温能使其基因表达发生改变并合成新的蛋白质 (刘祖祺和王洪春 1989), 而高温引起其体内信号分子浓度变化从而诱导蛋白的产生 (王利军和黄卫东 2000)。 *curcin-L* 对紫外线辐射的反应虽然很弱, 诱导的表达水平很低, 但对于麻疯树, 首次引入紫外线辐射作为胁迫因子 (Zhang 等 2005) 进行诱导, 为研究麻疯树核糖体失活蛋白的抗逆机制提供了新的内容, 但

所示, 经过 30% PEG6000 诱导的麻疯树苗, 其叶片中 mRNA 杂交得到的条带最明显; 而经过紫外线照射的麻疯树苗, 其叶片中 mRNA 杂交得到的条带最弱; 其余 4 种条件处理的麻疯树苗, 其叶片中 mRNA 杂交得到的条带弱于 30% PEG6000, 强于紫外线照射, 且清晰可见。

其作用机理有待进一步研究。

4 不同胁迫诱导下麻疯树 RIPs 在蛋白水平的表达

蛋白质分析发现, 根、茎中的总蛋白样品没有发生免疫杂交反应, 而叶片、种子中均有免疫杂交反应。如图 4 蛋白质电泳和 Western 杂交分析所示, 经激素和 PEG 诱导后的植株, 其叶片蛋白中都显示出两条蛋白杂交带, 分子量分别约为 32 kDa 和 65 kDa。而高、低温和紫外辐射诱导后的植株, 其叶片蛋白中仅显示出一条蛋白杂交带, 分子量约为 32 kDa。种子蛋白中也仅显示出一条杂交带, 分子量约为 29 kDa。从分子量大小分析, 32 kDa 与 *curcin-L* 的分子量相近, 29 kDa 与 *curcin* 的分子量相近。这就揭示了 *curcin-L* 是叶片专一性的, 且需要诱导信号的诱导才能表达, 而 *curcin* 是胚乳专一性的。对于 65 kDa 大小的条带, 可能的一种解释是形成了二聚体。

结果表明, 两种核糖体失活蛋白的表达在组织上是分隔的, 且在诱导的信号上也是不同的。

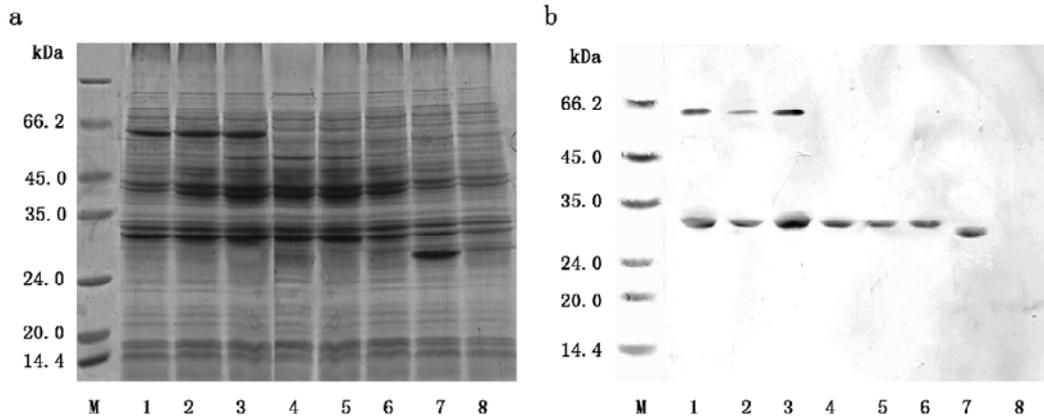


图4 麻疯树核糖体失活蛋白在蛋白水平的表达分析

Fig.4 The expression analysis of the RIPs on protein level from *Jatropha curcas*

a: SDS-PAGE 电泳图; b: Western 杂交。蛋白样品提取于 1: 经 $15 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ABA 诱导的麻疯树苗叶片; 2: 经 $1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 诱导的麻疯树苗叶片; 3: 经 30% PEG6000 诱导的麻疯树苗叶片; 4: 经 4°C 低温诱导的麻疯树苗叶片; 5: 经 45°C 高温诱导的麻疯树苗叶片; 6: 经紫外线诱导的麻疯树苗叶片; 7: 麻疯树成熟种子; 8: 未经诱导的麻疯树苗叶片。

curcin 是在种子中表达的, 且受种子不同发育时期的信号诱导, 反映了它在麻疯树中的作用很可能与种子的养料和保护相关。而 curcin-L 是在叶片中表达的, 但需要诱导条件的作用, 例如本实验中所设计的 6 种诱导条件, 则反映了它可能与麻疯树的抗逆性有关, 可能是植物防御反应的一种表现(Lo 等 1999)。

参考文献

- 崔婧(2007). 水杨酸与植物抗逆性. 安徽农学通报, 13 (9): 35~38
- 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 蒋湘宁(1999). 木本植物蛋白提取和 SDS-PAGE 分析方法的比较和优化. 植物学通报, 16 (2): 171~177
- 林娟, 颜钊, 唐琳, 陈放(2002). 麻疯树核糖体失活蛋白的分离纯化和作用机制研究. 高技术通讯, 11: 36~40
- 刘祖棋, 王洪春(1989). 植物耐寒性及防寒技术. 上海: 学术书刊出版社, 93~115
- 万正林, 罗庆熙(2007). SA、ABA、BR 诱导植物抗高温可能机理的研究. 西南农业学报, 20 (6): 1399~1403
- 王利军, 黄卫东(2000). 高温胁迫及其信号转导. 植物学通报, 17 (2): 114~120
- 魏琴(2004). 麻疯树(*Jatropha curcas* L.)种子抗真菌蛋白及相关基因的分离表达研究[博士学位论文]. 成都: 四川大学
- Ansubel FM (1998). Short Protocols in Molecular Biology (A Laboratory Manual). 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 352
- Bradford MM (1970). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254

- Cambell D, Eriksson MJ, Oquist G, Gustafsson P, Clarke AK (1998). The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem reaction-center D1 proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 95 (1): 364~371
- Chamberland S, Daigle N, Bernier F (1992). The legumin boxes and the 3' part of a soybean beta-conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants. Plant Mol Biol, 19: 937~949
- Chaudhry B, Muller-Uri F, Cameron-Mills V, Gough S, Simpson D, Skriver K, Mundy J (1994). The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. Plant J, 6 (6): 815~824
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680~685
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J (1991). Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. J Biol Chem, 266: 1564~1573
- Lo SC, Hipskind JD, Nicholson RL (1999). cDNA cloning of a sorghum pathogenesis-related protein (PR-10) and differential expression of defense-related genes following inoculation with *Cochliobolus heterostrophus* or *Colletotrichum sublineolum*. Mol Plant-Microbe Interact, 12: 479~489
- Malamy J, Carr JP, Klessig DF, Raskin L (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. Science, 250: 1002~1004
- Massiah AJ, Hartley MR (1995). Wheat ribosome-inactivating proteins: seed and leaf forms with different specificities and cofactor requirements. Planta, 197: 633~640
- Sambrook J, Russell D (2001). Molecular Cloning: A Laboratory

- Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Lab Press, 502~825
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*, 115: 327~334
- Stirpe F, Barbieri L, Gorini P, Valbonesi P, Bolognesi A, Polito L (1996). Activities associated with the presence of ribosome-inactivating proteins increase in senescent and stressed leaves. *FEBS Lett*, 382: 309~312
- Stirpe F, Pession-Brizzi A, Lorenzoni E, Strocchi P, Montanaro L, Sperti S (1976). Studies on the proteins from the seeds of *Croton toglum* and of *Jatropha curcas*. *Biochem J*, 156: 1~6
- Zhang PY, Tang XX, Cai HJ, Yu J, Yang Z (2005). Effects of UV-B radiation on protein and nucleic acid synthesis in three species of marine red-tide microalgae. *J Plant Ecol*, 29 (3): 505~509