

研究报告 Original Papers

大麦铁蛋白基因(*HvFer1*) cDNA 的克隆和表达牛洪斌¹, 尹钧^{1,*}, 邓德志¹, 李巧云^{1,2}, 任江萍¹, 李永春¹¹河南农业大学农学院, 国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002; ²山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006

摘要: 根据玉米铁蛋白 ZmFer1 的氨基酸序列, 采用同源序列法进行序列拼接和引物设计, RT-PCR 扩增获得了 1 个源自二叶期大麦叶片 mRNA 的大麦铁蛋白基因 cDNA 片段, *HvFer1* (GenBank 登录号为 EF440353)。 *HvFer1* 全长 1 023 bp, 5'非翻译区 56 bp, 3'非翻译区 202 bp, 开放阅读框编码 254 个氨基酸。序列分析表明, 此蛋白与已知植物铁蛋白高度同源, 相似性介于 56.7%~83.7% 之间, N 端具 27 个氨基酸的信号肽, C 端(84~247)具有 1 个类似铁蛋白的功能域。RT-PCR 表达谱分析显示, *HvFer1* 在大麦的茎、叶、幼穗和幼根均能表达, 茎和幼穗中表达量略高些。此外, *HvFer1* 受 PEG 和盐胁迫的强烈诱导表达, 中度铁胁迫也可不同程度地增加 *HvFer1* 的表达量。

关键词: 大麦; 铁蛋白基因; 克隆; 表达分析

Clone and Expression of *HvFer1* cDNA from BarleyNIU Hong-Bin¹, YIN Jun^{1,*}, DENG De-Zhi¹, LI Qiao-Yun^{1,2}, REN Jiang-Ping¹, LI Yong-Chun¹¹National Engineering Research Center for Wheat, College of Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ²School of Life Science & Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: Using maize ferritin ZmFer1 (GenBank accession No. CAA58146) amino acid sequence as a querying probe, many highly homologous EST sequences were obtained from GenBank and a putative cDNA sequence of barley ferritin was assembled. Furthermore, a barley ferritin gene cDNA, named *HvFer1* (GenBank accession number EF4403530) was cloned. *HvFer1* was 1 023 bp in full length, including 5' untranslated region of 56 bp, 3' untranslated region of 202 bp with Poly A, and an open reading frame (ORF) encoding 254 amino acid. Sequence analysis indicated that the protein contained characteristic features of typical ferritin iron-binding regions signature, a ferritin-like diiron domain at the C-terminus. Signal peptide prediction with software found that *HvFer1* included a 27-residue signal peptide with the cleavage site between glycine and serine. Homology analysis showed that the deduced amino acid sequence of *HvFer1* shared 56.7%~83.7% identity with ferritins from other plants. Semi-quantity RT-PCR analysis showed that the *HvFer1* was expressed universally in barley stems, leaves, immature spikes and roots. The expression profiling also showed that *HvFer1* mRNA was up-regulated by drought, salt and iron in barley seedling.

Key words: barley (*Hordeum vulgare*); *HvFer1* (*Hordeum vulgare* ferritin1); gene cloning; expression analysis

铁蛋白是一类广泛存在于动植物体内的铁贮藏结合蛋白(Paolo 和 Sonia 2002)。生物体内的铁蛋白是由 24 个亚基组成的巨大复合体, 可结合多达 4 500 个铁原子(Harrison 和 Arosio 1996)。植物铁蛋白广泛存在于前质体和白色质体等非绿色质体中, 主要分布于植物的种子、幼苗和根尖(Lobreaux 和 Briat 1991), 以及豆科植物年幼根瘤等组织中(Ragland 和 Theil 1993)。此外, 线粒体、叶绿体、植物导管细胞、维管形成层、生殖细胞和衰老细胞中也有铁蛋白的存在(Zancani 等

2004; Briat 等 1999)。

铁蛋白能够结合贮藏大量的铁原子, 并参与多种植物逆境胁迫应答反应。其在植物体中的主要功能之一就是贮存铁原子(Laulhere 和 Briat 1993; Briat 等 1999), 为植物光合作用和生物固

收稿 2007-06-26 修定 2007-11-10

资助 国家自然科学基金(30370877)和河南省科技成果转化项目(0636000005)。

* 通讯作者(E-mail: xmxzyj@126.com; Tel: 0371-63558203)。

氮提供铁源(Paolo 和 Sonia 2002; Petit 等 2001)。此外, 作为胁迫反应蛋白, 铁蛋白广泛参与清除由于过量铁(Gaymard 等 1996; Savino 等 1997)、 H_2O_2 (Balla 等 1992)、光抑制(Murgia 等 2001)和除草剂(Arnaud 等 2006)等逆境因子诱导产生的活性氧, 缓解活性氧对植物体的危害, 以及参与抵制病原菌侵染(Dellagi 等 2005)和ABA胁迫应答(Petit 等 2001; Lobreaux 等 1993)。

植物铁蛋白由 1 个小的基因家族编码合成(Petit 等 2001)。1991 年, Lescure 等首次报道获得大豆铁蛋白编码基因, 此后陆续从豇豆(*Vigna sesquipedalis*)、玉米(*Zea mays*)、大豆(*Glycine max*)、油菜(*Brassica napus*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、豌豆(*Vicia venosa*)、苜蓿(*Medicago truncatula*)(vanWuytswinkel 等 1995; 习阳等 2003), 以及水稻(*Oryza sativa*) (International Rice Genome Sequencing Project 2005)、加拿大蓬(*Conyza canadensis*)(Soos 等 2006)和拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (Petit 等 2001)等植物中克隆到铁蛋白基因。本文根据已知植物铁蛋白的氨基酸序列, 借助生物信息学技术和 RT-PCR 方法从大麦中获得 1 个铁蛋白编码基因 cDNA 序列, 并对该基因的时空表达特性和逆境应答模式作了检测, 以期能为深入研究铁蛋白的生物功能和挖掘优异基因资源建立基础资料。

材料与方法

大麦品种‘豫啤’(*Hordeum vulgare* subsp. ‘Yupi’)由周口市农科所提供; 菌种为本实验室保存; pBS-T 载体由 TIANGENE (北京)公司提供; 各种酶、试剂盒购自 TaKaRa (大连)公司; 所用引物自行设计并由 Invitrogen (北京)公司合成。

选取籽粒饱满的大麦种子, 以 0.1% $HgCl_2$ 表面消毒 10 min, 无菌水充分冲洗后于 25℃ 培养箱中暗发芽, 发芽后选择芽长一致的种子, 用 Hoagland 营养液置于光照培养箱中水培, 温度为 $(20 \pm 1)^\circ C$, 每天光照 12 h, 光照强度为 $300 \mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$, 相对湿度为 60%。幼苗长至两叶一心时分别用浓度为 $200 mmol \cdot L^{-1}$ NaCl、20% 聚乙二醇(PEG6000)和 $50 \mu mol \cdot L^{-1}$ 柠檬酸铁进行胁迫处理, 处理后分 0、4、8、16、32 和 64 h 取样,

重复 3 次。所有处理试剂均于处理前加入 Hoagland 溶液中, 每天更换处理液, 以 Hoagland 培养液培养的为对照。取样立即于液氮中速冻, 再置于 -80℃ 超低温冰箱中保存备用。

RNA 的抽提采用大连宝生物公司的 Trizol 试剂, 2 μg 的总 RNA 用于 cDNA 第 1 链的合成, 并用 RNase 消化 cDNA 产物。

根据玉米铁蛋白 ZmFer1 (GenBank 录用号 CAA58146)的氨基酸序列, 采用同源序列法模拟拼接了 1 个大麦铁蛋白基因的 cDNA 序列, 并根据此序列设计 PCR 引物 HvF1f: 5' GACCAAATCCCGCTCCACACA 3', HvF1r: 5' TTTGACAAGATTAGAGCAGAATA 3'。PCR 扩增条件为 94℃ 5 min 预变性后; 94℃ 30 s, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶检测、回收目的条带, 与 pBST 载体(TIANGENE)连接, 16 h 过夜。连接产物转化至大肠杆菌菌株 JM109, 在 Xgal/IPTG 琼脂糖平板上挑选白色克隆, 由大连宝生公司完成序列测定。采用 Megalign 和 Clustal \times 1.83 软件进行序列联配和聚类分析, 信号肽预测采用 SignalP 3.0 (Park 等 2004)。

采用半定量 RT-PCR 法检测 *HvFer1* 的转录表达水平, 所用引物和 PCR 反应条件同上述基因克隆, 循环次数降为 28 个。以肌动蛋白基因作为内部参照, 肌动蛋白基因 PCR 引物为: A1: 5' GGAAGTGGTATGGTCAAGGC 3', A2: 5' AGTCTCATGGATAACCGCAG 3', PCR 扩增程序如下: 94℃ 5 min 预变性后; 94℃ 30 s, 56℃ 40 s, 72℃ 50 s, 共 28 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。

结果与讨论

1 大麦 HvFer1 基因的 cDNA 克隆和序列分析

以玉米 ZmFer1 的氨基酸序列为信息探针搜索 GenBank 数据库, 获得许多与之相匹配的大麦 EST, 采用软件对高度同源的 EST 序列模拟拼接, 获得 1 个含有完整编码框的大麦铁蛋白基因的 cDNA 序列 *HvFer1*。根据拼接序列设计引物, 其中正向引物序列产生于序列 CK125836, 反向引

```

1  GACCAAATCCCCTCCACAAAATCCGAAAACGCAACGCCGCGTTCGACTTCGAGATGCTTCCTAGGGTTGCGCGGTCCTCCGGCCACCG
1  M L P R V A P S P A T A
91  CCGCCGCGCGGTTGGCCAGCTCTCCGGTGGCGGGCTCACCTCCGGTTCGGTGAGGCTGCCGGGGCCCTGCCGCTGCGGCAGGGTCGG
13  A A A V G Q L S G A G L T S G V S V R L P G A L P S A A G S A
181  CGGTCTGCTGCAGGGCCGCGGGAAGGGAAGGAGGTGCTCAGCGGGTCAATGTTCCAGCCGTTCCGAGGAGCTCAAGGGCGAGCTCTCCC
43  V C C R A A A K G K E V L S G V M F Q P F E E L K G E L S L
271  TCGTGCCGAGGCAAGGACCAGTCCGCTCGCCAGGCACAAGTTCGTAGACGAGTGCAGGGCCGCCCTCAACGAGCAGATCAATGTGGAGT
73  V P Q G K D Q S L A R H K F V D E C E A A L N E Q I N V E Y
361  ACAATGCTCGTACGGTATCACTCCCTCTTCGCTACTTTGACCGCGACAACGTTGCTCTCAAGGGATTGCAAGTTCTTCAAGGAAT
103  N A S Y A Y H S L F A Y F D R D N V A L K G F A K F F K E S
451  CAAGCAGCAGGAGAGAGGACACGCGGAGAAGCTCATGGAGTACCAGAACAAACGCGGAGGAAGGGTGAGGCTCCAGTCAATGTGCACAC
133  S D E E R G H A E K L M E Y Q N K R G G R V R L Q S I V T P
541  CCTTAACGGAGTTCGACCATCCGAGAAAGGTGATGCCCTCTATGAATGGAGTTGGCTCTAGCTCTTGAAAAGCTGGTGAATGAAAAAC
163  L T E F D H P E K G D A L Y A M E L A L A L E K L V N E K L
631  TGCACAACCTGCACAGTGTAGCTACTAGGTGCAATGATCCTCAGCTGACCGATTTCGTTGAGAGTGAATTCCTCAGGAGCAGGTTGACG
193  H N L H S V A T R C N D P Q L T D F V E S E F L Q E Q V D A
721  CCATCAAGAAGATCTCTGAGTATGTGTCGACGCTGAGAAGAGTGGGCAAAGCCACCGAGTGTGGCACTTCGATCAGATGCTGCTTGAAG
223  I K K I S E Y V S Q L R R V G K G H G V W H F D Q M L L E E
811  AGGCGCTTGAAGGACATAATGACGACGGCAAGGAAGATGCTAGTGTCAAATGTCAAGTAGTGGAGATAAGCCAACGACTGGATGTG
253  A A *
901  GTTTTGGGGATTTTTCAGTCCGGTTTGTAGGTGCTATGCTGTTGTTGGATTGAAATAAACGAAGGGAGATGTGCCACCTCT
991  TAAATGCCAGTATTCTGCTCTAATCTTGTCAA

```

图1 大麦铁蛋白 *HvFer1* cDNA 的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列Fig.1 cDNA and deduced protein sequence of *HvFer1*

物产生于序列 BJ467072, PCR 产物测序结果证实所得序列为目的片段。序列分析显示 *HvFer1* 全长 1 023 bp, 5' 非翻译区 56 bp, 3' 非翻译区 202 bp, 包含 1 个典型的加尾信号 AATAAA (图 1 阴影处), 开放阅读框编码 254 个氨基酸, 分子量约为 28 kDa。此序列已提交到 GenBank, 登录号为 EF440353。

氨基酸序列分析结果显示(图 1), *HvFer1* N 端含有 27 个氨基酸的信号肽, C 端(84~247)含有 1 个类铁蛋白功能域(ferritin-like diiron domain), 其间(204~224)具有 21 个氨基酸组成的铁结合序列(DPQLTDFVESEFLQE QVDAIK)。此外, 该蛋白还存在 4 个 N-豆蔻酰化位点(17~22、21~26、23~28、33~38 和 40~45), 3 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点(132~135、133~136、164~167), 以及 1 个蛋白激酶 C I 磷酸化位点(28~30), 1 个 N-糖基化位点(103~106)和 1 个 cAMP-cGMP 依赖的蛋白激酶磷酸化位点, 表明在 *HvFer1* 的生物合成过程中需要多种翻译后加工修饰作用才能成为具有天然功能的成熟多肽。

聚类分析显示(图 2), *HvFer1* 与其他已知植物来源铁蛋白的氨基酸序列同源性介于 56.7%~83.7% 之间, 与水稻 *OsFer1* 同源性最高(83.7%), 与拟南芥 *AtFer1* 同源性最低(56.7%), 显示出植物铁蛋

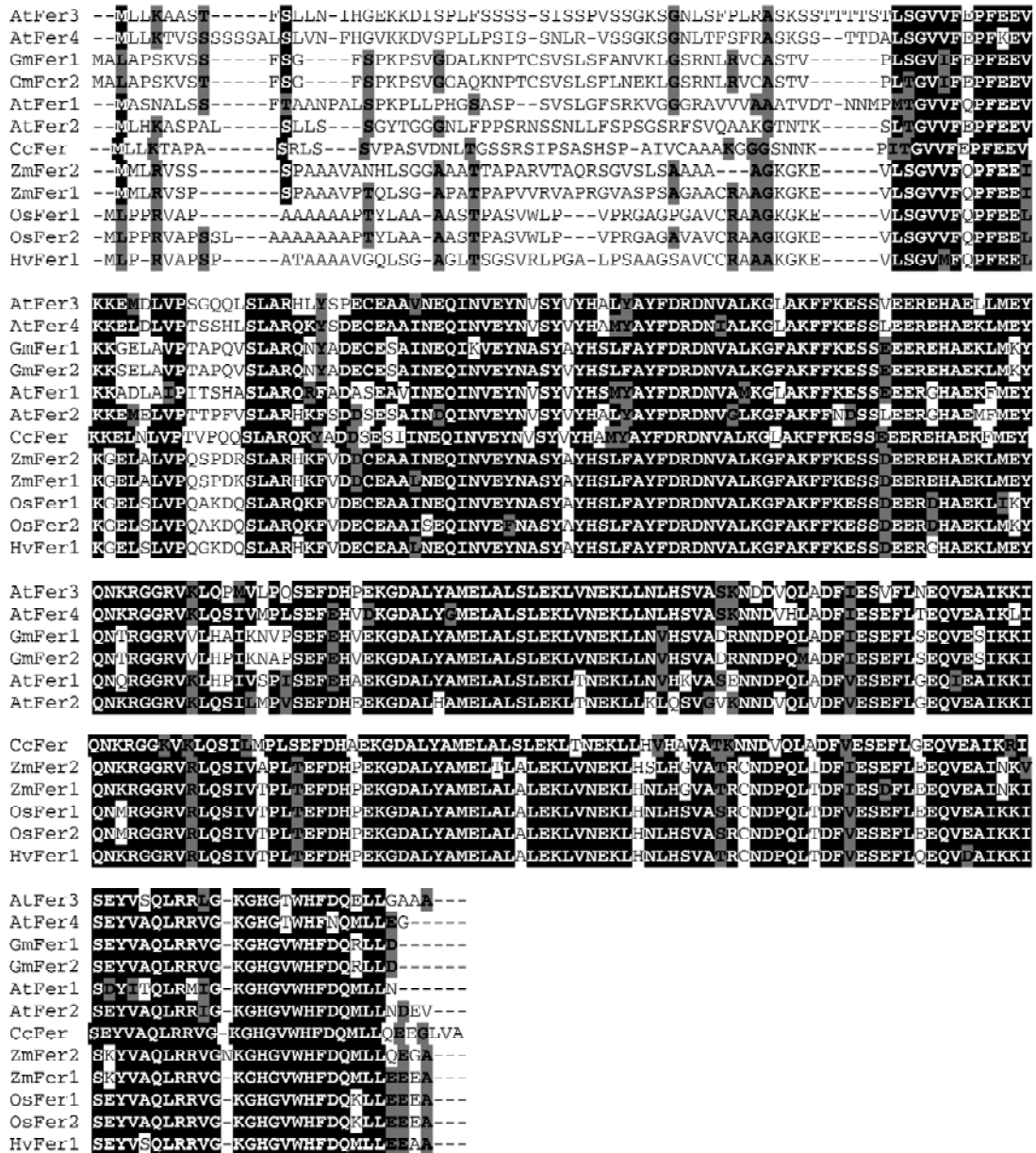
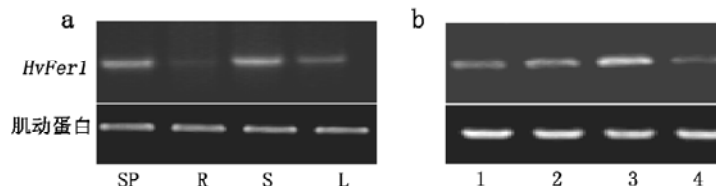
白基因的演变发生于单双子叶植物分化的早期。进一步分析显示, 铁蛋白成熟多肽, 尤其是功能域之间高度同源, 表明植物铁蛋白基因在遗传进化过程中具有较高的保守性。

2 *HvFer1* 基因转录表达的时空特异性

组织表达谱分析显示(图 3-a), 在花后 12 d 大麦植株的根、茎、叶中均能检测到相应的目的条带。其中, 茎和未成熟穗部表达量显著高于根和叶, 表明 *HvFer1* 在大麦的不同组织中的表达有差异, 具有较强的组织特异性。进一步检测大麦麦穗成熟期 *HvFer1* 基因表达特性的结果显示(图 3-b), 随着麦穗的发育进程, *HvFer1* 的转录本含量逐渐增加, 花后 5 d 表达量达最大值, 此后开始下降, 表明 *HvFer1* 基因在大麦穗部表达有较强的时间特异性。

3 逆境胁迫诱导的 *HvFer1* 表达

图 4 显示:(1) 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸铁可以诱导 *HvFer1* 的转录表达, 胁迫后 4 h 起, 此基因表达水平即高于未作胁迫处理的对照, 胁迫 8 h 表达达到高峰, 此后一直维持在该水平直至 64 h, 并有延续该水平表达的趋势, 由于胁迫处理时采用中等程度的醋酸铁浓度, 图中所示曲线未能反映出 *HvFer1* 基因的完整表达模式, 需进一步研究;(2) 在 200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 胁迫条件下, 大麦幼苗

图2 大麦 *HvFer1* 与其他已知植物铁蛋白基因氨基酸序列相似性的比较Fig.2 Alignment of full amino acid sequences from *HvFer1* and other plant ferritin proteins图3 大麦 *HvFer1* 转录表达的半定量 RT-PCR 分析Fig.3 Semi-quantitative RT-PCR expression analysis of *HvFer1* gene from barley

a: 花后 12 d 大麦 *HvFer1* 转录表达; SP: 未成熟穗子; R: 根; S: 茎; L: 叶片; b: 大麦麦穗成熟期 *HvFer1* 转录表达; 1: 半穗期穗子(half-heading spikes); 2: 完全抽穗期穗子(full-heading spikes); 3: 花后 5 d 穗子; 4: 花后 12 d 穗子。

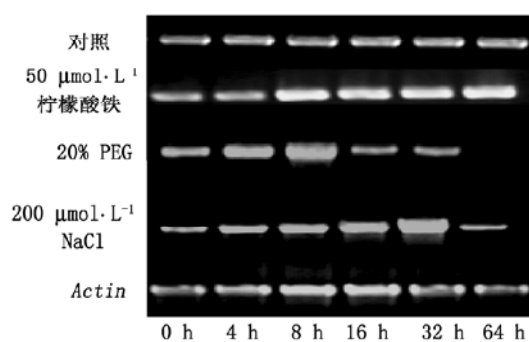


图4 逆境胁迫下大麦幼苗期叶中 *HvFer1* 转录表达的半定量 RT-PCR 分析

Fig.4 The RT-PCR assay of *HvFer1* mRNA in barley seedlings under iron citrate, NaCl or PEG6000 stress

叶中 *HvFer1* 的表达水平随着胁迫时间的延长而上升, 胁迫 32 h 时达到高峰, 此后迅速下降; (3) 20% PEG 胁迫条件下 *HvFer1* 基因的表达模式与盐胁迫条件下十分类似, 只是表达高峰提前, 胁迫 8 h 时即达到高峰, 此后基因表达量逐渐下降, 胁迫 64 h 时已见不到相应的转录本, 这可能是胁迫 64 h 后大麦植株已经受到严重的破坏, 逆境应答系统崩溃的结果。铁蛋白基因作为应答基因广泛参与多种逆境胁迫已在多种作物中得到验证, 本文结果显示 *HvFer1* 基因也有上述典型的应答模式, 表明植物铁蛋白功能的保守性。

参考文献

- 习阳, 刘祥林, 黄琴妮 (2003). 植物铁蛋白转基因的应用. 植物生理学通讯, 39 (3): 284~288
- Arnaud N, Murqia I, Boucherez J, Briat J F, Cellier F, Gaymard F (2006). An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFer1* ferritin gene expression. J Biol Chem, 281 (33): 23579~23588
- Arosio P, Levi S (2002). Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage. Free Radic Biol Med, 33 (4): 457~463
- Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM (1992). Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. J Biol Chem, 267 (25): 18148~18153
- Briat J F, Lobréaux S, Grignon N, Vansuyt G (1999). Regulation of plant ferritin synthesis: how and why. Cell Mol Life Sci, 56: 155~166
- Dellagi A, Rigault M, Segond D, Roux C, Kraepiel Y, Cellier F, Briat JF, Gaymard F, Expert D (2005). Siderophore mediated up-regulation of *Arabidopsis* ferritin expression in response to *Erwinia chrysanthemi* infection. Plant J, 43 (2): 262~

272

- Gaymard F, Boucherez J, Briat J F (1996). Characterization of a ferritin mRNA from *Arabidopsis thaliana* accumulated in response to iron through an oxidative pathway independent of abscisic acid. Biochem J, 318: 67~73
- Harrison PM, Arosio P (1996). The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. Biochim Biophys Acta, 1275 (3): 161~203
- International Rice Genome Sequencing Project (2005). The map-based sequence of the rice genome. Nature, 436: 793~800
- Laulhere JP, Briat JF (1993). Iron release and uptake by plant ferritin: effects of pH, reduction and chelation. Biochem J, 290: 693~696
- Lescure A, Proudhon D, Pesey H, Ragland M, Theil EC, Briat J (1991). Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures. Proc Natl Acad Sci USA, 88: 8222~8226
- Lobreaux S, Briat JF (1991). Ferritin accumulation and degradation in different organs of pea (*Pisum sativum*) during development. Biochem J, 274: 601~606
- Lobreaux S, Hardy T, Briat JF (1993). Abscisic acid is involved in the iron-induced synthesis of maize ferritin. EMBO J, 12 (2): 651~657
- Murgia I, Briat J F, Tarantino D, Soave C (2001). Plant ferritin accumulates in response to photoinhibition but its ectopic overexpression does not protect against photoinhibition. Plant Physiol Biochem, 39: 797~805
- Park M, Soo J K, Vitale A, Hwang I (2004). Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. Plant Physiol, 134 (2): 625~639
- Petit J M, Briat J F, Lobréaux S (2001). Structure and differential expression of the four members of the *Arabidopsis thaliana* ferritin gene family. Biochem J, 359: 575~582
- Ragland M, Theil EC (1993). Ferritin (mRNA, protein) and iron concentrations during soybean nodule development. Plant Mol Biol, 21 (3): 555~560
- Savino G, Briat JF, Lobreaux S (1997). Inhibition of the iron-induced *ZmFer1* maize ferritin gene expression by antioxidants and serine/threonine phosphatase inhibitors. J Biol Chem, 272 (52): 33319~33326
- Soos V, Jori B, Paldi E, Szego D, Szigeti Z, Racz I, Laszitty D (2006). Ferritin2 gene in paraquat-susceptible and resistant biotypes of horseweed *Conyza canadensis* (L.) Cronq. J Plant Physiol, 163 (9): 979~982
- van Wuytswinkel O, Savino G, Briat JF (1995). Purification and characterization of recombinant pea-seed ferritins expressed in *Escherichia coli*: influence of N-terminus deletions on protein solubility and core formation *in vitro*. Biochem J, 305 (1): 253~261
- Zancani M, Peresson C, Biroccio A, Federici G, Urbani A, Murgia I, Soave C, Micali F, Vianello A, Macri F (2004). Evidence for the presence of ferritin in plant mitochondria. FEBS J, 271 (18): 3657~3664