

新疆盐生植物的钙调蛋白基因克隆与序列分析

蔡伦 张富春* 曾幼玲 马纪

新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室, 新疆生物资源基因工程重点实验室, 乌鲁木齐 830046

提要 采用 RT-PCR 扩增的方法, 从新疆盐生植物花花柴(*Karelinia caspica*)、盐爪爪(*Kalidium foliadum*)和盐桦(*Betula halophila*)中分别克隆获得了 450 bp 的 cDNA 片段。基因测序和序列同源性分析的结果表明, 所克隆的基因片段均包含了钙调蛋白基因完整的读码框架。新疆花花柴钙调蛋白基因与盐爪爪钙调蛋白基因同源性达 86%, 盐爪爪与盐桦同源性达 86.77%, 花花柴与盐桦同源性达 85.11%。新疆盐生植物钙调蛋白基因与其它已发表的植物钙调蛋白基因同源性均在 80% 以上, 显示植物钙调蛋白基因具有高度保守性。

关键词 新疆盐生植物; 钙调蛋白基因; RT-PCR; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of the Calmodulin Gene from Halophytes in Xinjiang

CAI Lun, ZHANG Fu-Chun*, ZENG You-Ling, MA Ji

Key Laboratory of Molecular Biology, College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering, Urumqi 830046

Abstract To clone the calmodulin genes from *Karelinia caspica*, *Kalidium foliadum* and *Betula halophila* in Xinjiang, designed primers were used to amplify 450-bp cDNA fragments with RT-PCR. Sequence analysis revealed that the cloned fragments contained entire calmodulin ORF. Sequence similarity searches were performed with BLAST network service. The results showed that high similarity of the calmodulin genes in the three plants, reached 85%. The homology of calmodulin genes between these three plants and the other plants was up to 80%. It indicated that calmodulin gene was highly stable in evolution of plants.

Key words halophytes in Xinjiang; calmodulin gene; RT-PCR; sequence analysis

众多实验已经确认, 钙调蛋白(calmodulin, CaM) 在外界生物和非生物因素如热、冷、光、高盐、病原体胁迫下呈现不同程度的表达^[1~5]。它通过激活 NAD 激酶、Ca²⁺-ATP 酶、蛋白激酶等, 促进蛋白磷酸化、神经递质释放, 调控许多酶的活性, 参与离子运输^[6, 7]、基因调节^[8, 9]、细胞骨架构建^[10]、胁迫耐受^[1, 2]和疾病耐受^[11]等。越来越多的 CaM 基因在动物、植物和微生物中已得到分离克隆, 它在进化上是极其保守的。但盐生植物钙调蛋白的研究较少。目前, 已经证实盐过敏感(salt overly sensitive, SOS)信号途径在植物耐盐中起调控作用。在这条途径中, 钙离子作为第二信使与钙离子结合蛋白结合并激活下游一系列蛋白, 进而调控植物的耐盐性。已有的报道认为, 与植物耐盐相关的一些重要蛋白都是在 Ca²⁺/CaM 复合物的作用下发挥功能的^[13, 14]。

新疆地区的多年生草本植物——菊科花花柴属的花花柴(*Karelinia caspica*)高40~120 cm, 多生于荒漠地带的盐生草甸, 覆沙或不覆沙的盐渍化低地和农田边, 土壤轻中度盐渍化或重度盐渍化, 湿润, 属拒盐盐生植物。藜科盐爪爪属的盐爪爪(*Kalidium foliadum*)为小半灌木, 高20~50 cm, 多生于洪积扇缘地带及盐湖边的潮湿盐土、盐化沙地、砾石荒漠的低湿处, 在根际土壤盐分为 3.22% 的环境下生长良好, 在重度盐渍土上常形成优势群落或与盐穗木、柽柳属植物共同组成群落, 属稀盐盐生植物。而盐桦(*Betula*

收稿 2004-08-10 修定 2004-12-13

资助 国家科技攻关西部科技行动项目(2001BA901A32)和国家“863”项目(2004AA227110-2)。

*通讯作者(E-mail: zfc@xju.edu.cn, Tel: 0991-8583517)。

halophila)为桦木科桦木属的植物,落叶小乔木或直立大灌木,为新疆阿勒泰地区特有盐生植物种类。这3种不同生态类型的盐生植物都是新疆特殊盐碱环境下生长的耐盐植物,而作为抗逆信号转导中重要的蛋白CaM,其基因克隆与分析对于阐明钙信使系统在盐生植物中的耐盐机制有一定意义,本文对此作了探讨。

材料与方法

花花柴(*Karelinia caspica*)和盐爪爪(*Kalidium foliadum*)新疆五家渠干旱盐碱地区,盐桦(*Betula halophila*)采自阿勒泰地区盐碱地,经实验室组培扩繁获得大量的盐桦组培苗。大肠杆菌DH5 α 菌株为我们实验室的保藏菌种。pMD18-T测序载体、RNA提取试剂盒、PCR产物回收试剂盒、DNA marker、*Bam*HI和*Hind*III限制性内切酶、ExTaq酶以及RT-PCR和PCR引物均购自Takara公司,其它试剂均为分析纯。

花花柴、盐爪爪和盐桦的总RNA提取依据Takara公司操作试剂盒进行。

RT-PCR反应 根据已发表的钙调蛋白基因序列,设计PCR引物序列为:P1, ATGGCGGATCAGCTCACCG; P2, TCACTTGCCATCATGACCTTAAC。依照TaKaRa RNA PCR Kit操作指南进行,反转录用Oligo(dT)作下游引物,反应条件:42 $^{\circ}$ C 30 min, 99 $^{\circ}$ C 5 min, 5 $^{\circ}$ C 5 min。PCR反应用特异引物,扩增参数:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

CaM基因cDNA的克隆 按Takara公司PCR Fragment Recovery Kit说明书进行PCR产物的回收。回收的钙调蛋白cDNA片段与pMD18-T载体在T₄DNA连接酶的作用下16 $^{\circ}$ C过夜,使钙调蛋白cDNA连接到pMD18-T的载体上。连接产物转化感受态细胞,感受态的制备及转化参考文献12进行。

重组质粒的鉴定 按参考文献12进行质粒DNA的小量提取,提取后的质粒用*Hind*III和*Bam*HI双酶切进行重组质粒的鉴定,酶切反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,正确的克隆进行质粒的大量提取。

花花柴、盐爪爪和盐桦CaM基因cDNA的序列测定及序列分析 为鉴定克隆的cDNA序列,对pMD18-T/CaM重组质粒进行纯化,并用BcaBEST primer RV-M和BcaBEST primer M13-47对花花柴、盐爪爪、盐桦钙调蛋白基因cDNA在PE377全自动测序仪进行双向DNA序列测定,所得序列用PE公司SeqEd v1.0.3软件进行分析。

实验结果

1 RT-PCR产物鉴定

采用RT-PCR从花花柴、盐爪爪、盐桦提取的总RNA,以Oligo(dT)为引物进行反转录得到单链cDNA,再以设计的PCR引物进行扩增得到钙调蛋白基因片段。RT-PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳鉴定(图1),可见相应的450 bp的电泳条带,与预计的大小一致。

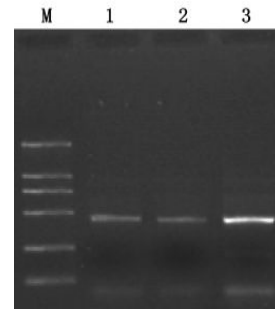


图1 花花柴、盐爪爪、盐桦CaM基因RT-PCR结果
Fig.1 RT-PCR of CaM cDNA from *Karelinia caspica*,
Kalidium foliadum and *Betula halophila*

M: DL2000分子量标记; 1: 花花柴; 2: 盐爪爪; 3: 盐桦。

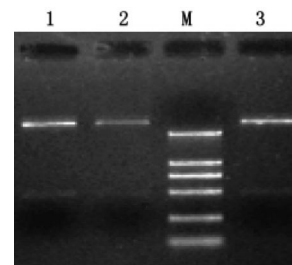


图2 pMD18-T/KcCaM/KfCaM/BhCaM用
*Hind*III和*Bam*HI酶切分析

Fig.2 Identification of pMD18-T/KcCaM/KfCaM/BhCaM digested with *Hind*III and *Bam*HI

M: DL2000分子量标记; 1: pMD18-T/KcCaM; 2: pMD18-T/KfCaM; 3: pMD18-T/BhCaM。

2 测序载体的构建及其鉴定

RT-PCR 产物与克隆载体 pMD18-T 连接, 构建了重组质粒 pMD18-T/CaM. 重组质粒用 HindIII 和 BamHI 酶切, 切出约 450 bp 的 DNA 片段(图 2), 与预计的连接片段的大小相同.

3 花花柴、盐爪爪和盐桦钙调蛋白基因 cDNA 序列测定及序列分析

对 pMD18-T/KcCaM、pMD18-T/KfCaM、pMD18-T/BhCaM 重组质粒进行测序, 测序结果如图 3~5.

ATGGGGATCAGCTCACCGATGACCAGATCTCTGAGTTCAAGGAAGCTTT
CAGCCTATTTCGATAAAGGATGGCGATGGTTGCATCACGACAAAGGAGCTTG
GAACGGTGTAGATCTCTTGGTCAGAATCCCACTGAGGCTGAACTOCAA
GACATGATAAACGAAGTTGATGCTGATGGCAATGGAACAATTGATTTCOC
CGAGTTTCTAAATCTCATGGCGAGGAAGATGAAGGATACAGACTCTGAGG
AAGAAGTGAAGGAAGCATTGAGAGTTTGGACAAGGATCAGAATGGTTTC
ATTTCTGCTGCGAGCTGCGTCATGTTATGACAAATCTCGGGGAAAAACT
TACTGATGAAGAAGTTGATGAAATGATCCGGGAGGCTGATGTTGATGGTG
ATGGCCAAATCAACTATGAGGAGTTTGTAAAGTTATGATGGCCAAGTAA

图 3 花花柴 CaM 基因 cDNA 的序列

Fig.3 The sequence of CaM cDNA in Karelinia caspica

ATGGGGATCAGCTCACCGATGACCAGATCTCTGAGTTCAAGGAAGCTTT
CAGCCTATTTCGATAAAGGATGGCGATGGTTGCATCACGACCAAGGAGCTTG
GAACAGTGTAGATCCCTTGGTCAGAACCCAAGTGGCCGAGCTACAG
GATATGATAAACGAGGTTGATGCTGATGGAAATGGTACTATTGATTTCOC
TGAATTTCTTAATCTGATGGCTAGAAGATGAAAGACACTGATTCTGAGG
AGGAGTTGAAGGAAGCTTTCGGTGTCTTCGACAAGGACCAGAATGGCTTC
ATCTCTGCTGCTGAGCTGGACACGTTATGACAACTCGGGGAGAAGCT
TACTGATGAAGAAGTTGATGAGATGATCCCGAGGCTGATGTTGATGGTG
ATGGCCAAATCAATTATGAGGAGTTTGTAAAGTTCATGATGGCCAAGTGA

图 4 盐爪爪 CaM 基因 cDNA 的序列

Fig.4 The sequence of CaM cDNA in Kalidium foliadum

ATGGCGGATCAGCTCACCGACGACCAGATCTCTGAGTTCAAGGAGGC
CTTCAGCTTGTTCGACAAGGATGGCGATGGCTGCATCACTACCAAGGAGC
TTGGGACTGTGATGAGGTCACCTGGGCAGAATCCAACCGAAGCAGAGCTC
CAGGACATGATCAACGAAGTTGATGAGATGGAATGGGACTATTGATT
CCCTGAGTTCCTGAACCTGATAGCCAGGAAGATGAAAGACACTGACTCGG
AGGAGGAGCTTAAAGAGGCATTCGGAGTTTGGACAAGGACCAGAOCGGG
TTCATCTCTGCTGCTGAGTTGGCCGCTGTGATGACCAACTTGGGGAGAA
GCTCACCGATGAAGAGGTTGATGAGATGATCAGGGAGGCTGATGTTGATG
GTGATGGCCAGATAAATATGAGGAGTTTGTAAAGTTCATGATGGCCAAG
TGA

图 5 盐桦 CaM 基因 cDNA 的序列

Fig.5 The sequence of CaM cDNA in Betula halophila

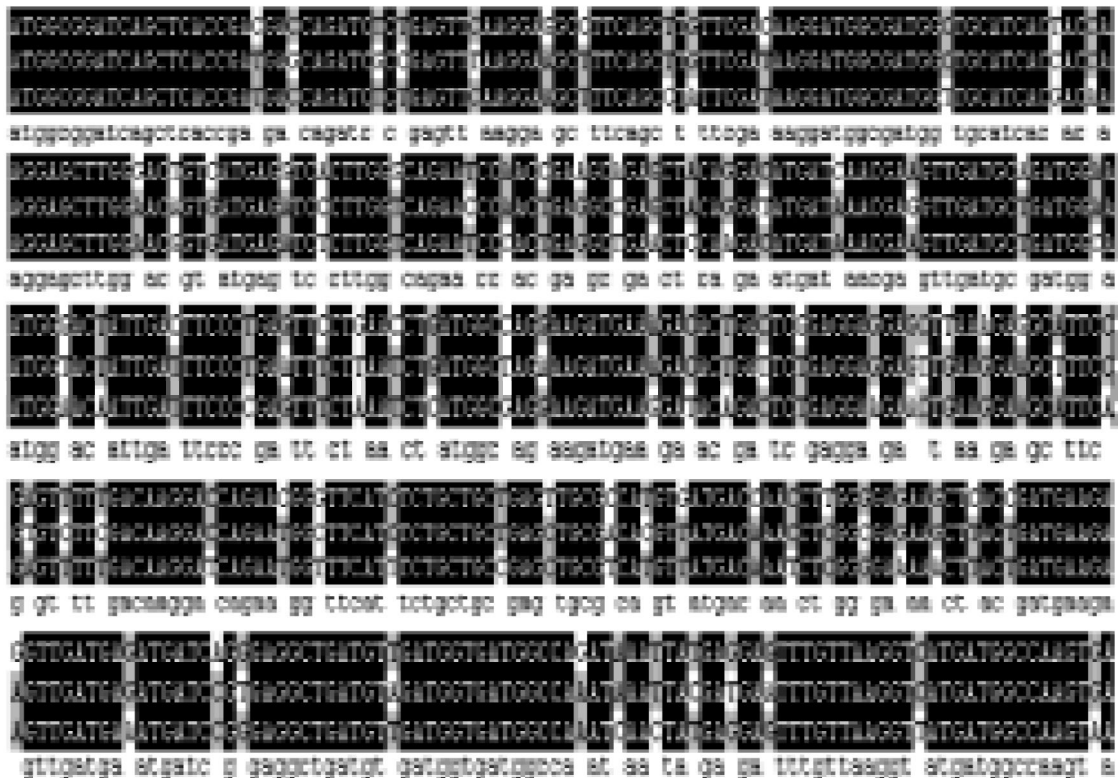


图 6 花花柴、盐爪爪、盐桦钙调蛋白基因的核苷酸序列比较

Fig.6 Comparisons of nucleotide sequence of calmodulin gene from Karelinia caspica with Kalidium foliadum and Betula halophila

4 钙调蛋白基因序列的同源性分析

钙调蛋白在生物体的生命活动中起作用, 其活性部位的突变常常是致死的, 因此其结构和功能非常保守。将3种植物中得到的CaM的基因序列进行比较, 并将蛋白序列同烟草(*Nicotiana tabacum*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、拟南芥

(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、大豆(*Glycine max*)与榉木(*Fagus sylvatica*)的序列相比的结果表明, 其基因序列同源性很高, 大于90%(图6)。其编码的蛋白质序列同源性更高, 达99%(图7)。经瑞士蛋白数据库分析, 其二级结构与已经发表的模式图

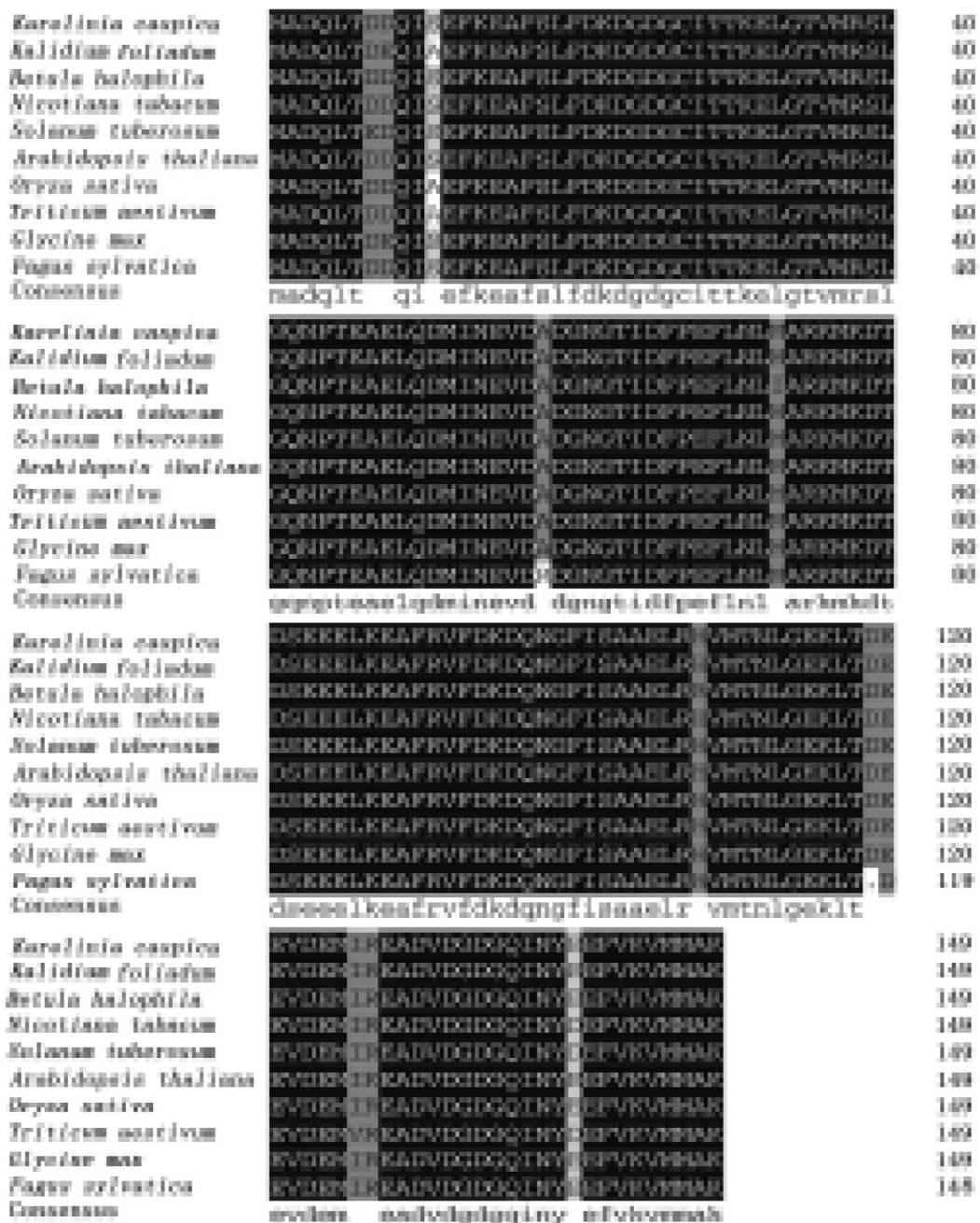


图7 花花柴、盐爪爪、盐桦CaM基因编码的氨基酸序列与其它植物CaM基因编码的氨基酸序列的比较
Fig.7 Comparisons of amino acid sequences derived from calmodulin genes of *Karelinia caspica*, *Kalidium foliadum* and *Betula halophila* with other plants

相似。

讨 论

本文通过 RT-PCR 技术扩增新疆盐生植物花花柴、盐爪爪和盐桦钙调蛋白基因, 根据已发表的相关植物钙调蛋白基因同源性分析, 设计特异性引物, 以合适的 PCR 条件即可扩增出相应目的基因片段。序列比较分析发现花花柴与盐爪爪钙调蛋白基因、盐爪爪与盐桦钙调蛋白基因两者间相似性达 87%, 花花柴与盐桦相似性达 85%。这些基因片段与已发表的植物钙调蛋白基因相似性均在 80% 以上, 并且, 其表达的蛋白序列同源性更高, 说明 CaM 基因是植物中高度保守的一类基因, 在一些生物或非生物应答过程中, 发挥相同的作用。

相对于动物来说, 植物体内含有的钙调蛋白基因种类更多, 有很多基因编码同一种蛋白的异型体, 行使类似的功能, 但是在不同的情况下, 其表达量又有差异。同时, 钙调蛋白基因编码的产物在植物的生长、发育以及对环境变化的应答中起调控作用。钙调素是钙离子传感器, 它调节许多蛋白的活性, 这些蛋白又作用于下游靶蛋白, 进而调节细胞中的各种生理活动。这些靶蛋白功能已越来越多地被确定, 一部分确定与胁迫应答有关。钙调素负责酵母中耐盐功能蛋白 HSP 的激活, 而钙调素的活化是通过与钙离子钙调蛋白复合物的结合完成的^[13]。在植物耐盐中, Botella 等^[14]发现红豆在盐胁迫下, 钙调蛋白 (MBCaM21 和 MBCaM22) 表达量增高, 4 h 达到最大值。转基因拟南芥中, 钙调蛋白结合蛋白 AtCaMBP25 基因反义链表达的植物耐 NaCl 胁迫的能力大于野生型植株^[15]。在这一依赖于钙调蛋白的途径中, AtCaMBP25 基因功能是由 CaM 调控的。众多研究表明, CaM 在许多盐生植物耐盐性中起到枢纽作用, 它作为第二信使结合蛋白与钙离子形成复合物, 接受外界盐胁迫信号, 同时将信息传递到胞内, 引起细胞内一系列的适应性应答。

花花柴、盐爪爪和盐桦是新疆地区分布较为典型的盐生植物, 分离它们的钙调蛋白基因, 采用不断发展的功能基因组学和由它所产生的的一些研究方法, 对钙调蛋白进行功能性缺失、功能性恢

复等研究, 可以确定其下游受体蛋白, 并进一步揭示钙调蛋白在植物耐盐过程中的作用机制和其参与植物耐盐生理的调控方式。同时, 利用盐生植物改善盐碱环境也是很有意义的, 值得人们注意。

参考文献

- 1 Reddy AS. Calcium: silver bullet in signaling. *Plant Sci*, 2001, 160: 381~404
- 2 Snedden W, Fromm H. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants. *New Phytol*, 2001, 151:35~66
- 3 Townley HE, Knight MR. Calmodulin as a potential negative regulator of *Arabidopsis* *COR* gene expression. *Plant Physiol*, 2002, 128:1169~1172
- 4 Liu H-T, Li B, Shang Z-L. Calmodulin is involved in heat shock signal transduction in wheat. *Plant Physiol*, 2003, 132: 1186~1195
- 5 Ali GS, Reddy VS, Lindgren PB. Differential expression of genes encoding calmodulin-binding proteins in response to bacterial pathogens and inducers of defense responses. *Plant Mol Biol*, 2003, 51:803~815
- 6 Arazi T, Sunkar R, Kaplan B. A tobacco plasma membrane calmodulin-binding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J*, 1999, 20: 171~182
- 7 Sze H, Liang F, Hwang I. Diversity and regulation of plant Ca²⁺ pumps: insights from expression in yeast. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51:433~462
- 8 Yang T, Poovaiah BW. A calmodulin-binding/CGCG box DNA-binding protein family involved in multiple signaling pathways in plants. *J Biol Chem*, 2002, 277: 45049~45058
- 9 Bouché N, Scharlat A, Snedden W. A novel family of calmodulin-binding transcription activators in multicellular organisms. *J Biol Chem*, 2002, 277:21851~21861
- 10 Reddy AS. Molecular motors and their functions in plants. *Int Rev Cytol*, 2001, 204:97~178
- 11 Kim MC, Panstruga R, Elliott C. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defense against mildew in barley. *Nature*, 2002, 416:447~451
- 12 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 19~56
- 13 Imai J, Yahara I. Role of HSP90 in salt stress tolerance via stabilization and regulation of calcineurin. *Mol Cell Biol*, 2000, 20: 9262~9270
- 14 Botella JR, Arteca JM, Somodevilla M et al. Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*). *Plant Mol Biol*, 1996, 30:1129~1137
- 15 Perruc E, Charpentreau M, Ramirez BC. A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J*, 2004, 38: 410~420