

新疆雪莲新的内切几丁质酶类冷诱导基因的分离、克隆和测序

李璐 王晓军* 赵安民

中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011

提要 通过 RT-PCR 技术, 从经低温驯化的新疆雪莲的叶片中分离克隆了 1 个新的基因。实验证明, 此基因的转录是由低温诱导激活, 且随着雪莲低温驯化时间的推移, 转录本的量明显增加。测序结果显示, 此基因全长 643 bp, 编码 200 个氨基酸。序列分析发现, 此基因属于 II 类内切几丁质酶基因。初步预测此基因的编码产物可能具有抗冻活性。

关键词 新疆雪莲; 冷诱导基因; II 类内切几丁质酶类基因; 抗冻活性

Isolation, Molecular-cloning and Sequencing of a New Cold-responsive Endochitinase Gene in *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.

LI Lu, WANG Xiao-Jun*, ZHAO An-Min

Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China

Abstract A new gene was isolated from cold-acclimated *Saussurea involucrata* Kar. et Kir. leaves by RT-PCR. Our experiment showed that this gene was induced by low temperature and there was an increase in the level of its transcript during cold acclimation. This gene is 643 bp in length and the predicted open reading frame contains 200 amino acids. Sequence comparisons between this gene and other plants' chitinase genes at the nucleotide level and at the amino acid level revealed that it encodes a class II endochitinase. Moreover, the predicted product of this gene maybe has antifreeze activity.

Key words *Saussurea involucrata* Kar. et Kir.; cold-responsive gene; class II endochitinase gene; antifreeze activity

抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)是存在于许多抗冻生物中的高效抗冻生物活性物质。这些蛋白的特性表现为都具有“热滞”活性, 能降低冰点温度而对熔点温度没有影响, 从而导致溶液的熔点和冰点之间出现差值, 这种差值就是热滞活性(thermal hysteresis activity, THA)。这种热滞活性导致 AFP 吸附在冰核表面而抑制冰晶生长。而且, 当温度降到溶液冰点以下时, AFP 能影响冰晶的形状并抑制重结晶。鱼类的 AFP 研究较早, 昆虫中也发现了比鱼类 AFP 活性更高的不含糖的 AFP, 也称热滞蛋白(thermal hysteresis protein, THP)。在植物中也存在冷诱导蛋白, 它与鱼类和昆虫 AFP 的性质有不少是类似的, 因此人们认为也是一种 AFP^[1, 2]。它们也具有热滞活性, 并已在包括双子叶植物和单子叶植物在内的 20 多种经低温锻炼的植物细胞液中检测到^[2]。

Hon 等^[3]在经低温驯化后的冬小麦的原生质体中发现一种分子量为 35 kD 的蛋白, 经分离纯化后发现其既具有内切几丁质酶活性又具有抗冻活

性, 因此证明此蛋白是具有双重功能的酶。在其他一些植物体, 如黑麦、马铃薯和胡萝卜中也发现这种低温诱发的病理蛋白^[3~5]。但 Hiilovaara-Teijo 等^[6]发现, 冬小麦在常温环境中进行真菌感染后, 同样能产生一些内切几丁质酶, 但这种内切几丁质酶没有抗冻活性。Yeh 等^[7]研究证实, 由低温诱发的内切几丁质酶病理蛋白是一类 AFP 家族, 而单纯由真菌感染诱发的内切几丁质酶则属于另一类蛋白质家族。

新疆雪莲(*Saussurea involucrata* Kar. et Kir.)别名雪荷花, 其种子能在 0℃ 发芽, 3~5℃ 下生长, 幼苗能耐受 -20℃ 的严寒, 其体内必然存在某种抗冻机制。在寻找新的抗冻诱导或抗冻基因的工作中, 我们将研究主要集中在内切几丁质酶类抗冻基因上。通过选取黑小麦的内切几丁质酶类抗冻基因 *CHT9* (GenBank accession no. AF280437) 的

收稿 2004-12-29 修定 2005-10-11

*通讯作者(E-mail: lhskj@ms.xjb.ac.cn)。

序列作对照设计引物, 从经低温驯化的新疆雪莲的叶片中分离了1个新的基因*XCH* (Xin chitinase)。实验证明, 此基因是一类冷诱导基因, 在雪莲冷驯化较长一段时间后, 可检测到此基因转录本的存在, 且其转录本的量与雪莲冷驯化时间明显存在正比例关系。进一步进行序列分析表明, *XCH* 基因属于II类内切几丁质酶类基因, 初步预测其编码产物可能具有抗冻活性。

材料与方 法

收购新疆巴里昆雪莲 (*Saussurea involucreta* Kar. et Kir.) 种子放在25℃、光强20 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照8 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的条件下培养成雪莲幼苗。经典总RNA抽提试剂盒、M-MuLV逆转录酶、Taq DNA聚合酶、Silver Beads DNA胶回收试剂盒、限制性内切酶 *EcoRI* 和 *BamHIII*、 T_4 连接酶以及DNA分子量标准均购自Sangon公司; 引物由引物设计Primer 3.0协助设计, 由Sangon公司合成; 菌株大肠杆菌DH5 α 以及质粒pUC18由中国科学院新疆理化技术研究所生化实验室提供; DNA测序由Sangon公司完成。

将雪莲幼苗分为非低温驯化植物(简称NA)和低温驯化植物(简称CA)两组。NA组继续于常温25℃环境下培养; CA组转入5℃/2℃(白天/黑夜)和光照8 $\text{h}\cdot\text{d}^{-1}$ 的环境中, 划分为CA₁、CA₂、CA₃和CA₄组, 分别继续培养1、3、5和8周。

按经典总RNA抽提试剂盒的说明方法, 分别对不同组的雪莲叶片提取总RNA, 乙醇沉淀于-20℃下储存备用。

按下列反应条件进行cDNA第一链的合成以获得PCR反应模板: 2 μg 总RNA、0.5 μg oligo (dT)₁₈, DEPC-H₂O加至总体积为11 μL 。置于75℃水浴中温育5 min后迅速于冰上冷却。再在上述反应管中加入4 μL 5 \times 酶反应缓冲液、2 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4种dNTP混合液、20 U RNase抑制剂, 再加DEPC-H₂O至总体积为19 μL 。置于37℃水浴中温育5 min后, 在反应管中加入200 U的M-MuLV逆转录酶, 于42℃水浴中反应60 min后停止反应, 将反应管于70℃水浴中温育10 min后迅速于冰上冷却。

引物设计为: P1, 5' TTAAGGATCCGGA-

GCAGTGGCGCTCGCANGGC 3'; P2, 5' GGTTG-AATTCTGACTATGCGAACGGCCTCNTG 3'。再按下列反应条件进行PCR扩增反应: (1)反应液中含10 ng模板、5 μL 10 \times PCR反应缓冲液、3 μL 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂、1 μL 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4种dNTP混合液、0.8 μL 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物P1、0.8 μL 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物P2、1.5 U Taq酶, 加去离子水至总体积为50 μL 。(2)反应程序为: 94℃ 4 min预变性; 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1.5 min, 35个循环; 72℃延伸8 min。

PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳、回收目的条带, 连接到pUC18质粒载体上, 转化大肠杆菌DH5 α 细胞, 经酶切鉴定后, 对目的基因进行测序。

序列分析用Blastx进行同源性分析; 用GentymAC软件对该基因的开放阅读框、保守性氨基酸序列进行分析。

实验结果

1 雪莲冷驯化

CA组雪莲在放入低温环境1周后, 与NA组雪莲相比, 叶片明显较绿、较厚; 在放入低温环境3周后, 叶片脆, 易破裂。CA组雪莲在放入低温环境4周后开始长出新的叶片, 此新的叶片在雪莲继续低温驯化5周甚至8周时仍然存活, 而原先的叶片这时已经枯萎死亡(图1)。

2 RT-PCR结果

对低温驯化8周(CA₄组)的雪莲叶片进行RT-PCR, 电泳结果显示, 在600 bp处出现1条清晰的条带(图2)。对NA组、CA₁组和CA₂组雪莲叶片的RNA以同样反应条件分别进行RT-PCR, 电泳检测均未见扩增条带。而对CA₃组雪莲进行RT-PCR时, 在600 bp处出现1条扩增条带。进一步比较CA₃组和CA₄组雪莲叶片RT-PCR的电泳结果发现, 在电泳上样量相同的情况下, CA₄组雪莲叶片RT-PCR产物条带亮度明显大于CA₃组雪莲(图3)。

3 目的基因测序与序列分析

RT-PCR产物经回收、克隆、测序得到基因序列(图4)。此基因简称为*XCH*, 全长643 bp。通过软件DNAssist 2.2分析预测, 其开放式阅读框包含200个氨基酸, 5'端下游37 bp处是起始



图1 低温驯化5周和8周的雪莲苗
Fig.1 *S. involucrata* cold acclimated for 5 and 8 weeks
a: 低温驯化5周的雪莲; b: 低温驯化8周的雪莲。

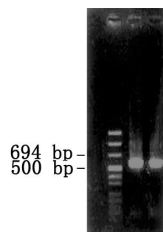


图2 低温驯化8周的雪莲RT-PCR产物的电泳分析
Fig.2 Electrophoresis analysis of RT-PCR products from the leaves of 8-week cold acclimated *S. involucrata*

密码子ATG,距起始密码子600 bp处是终止密码子。通过与黑小麦几丁质酶类抗冻基因 *CHT9* 核酸序列比对,两者相似程度达60.5%(图5)。

*CHT9*与*XCH*编码的氨基酸序列比对的结果显示,*XCH*缺失富含半胱氨酸的区段和富含脯氨酸的区段,但与*CHT9*的高保守的催化区具有高

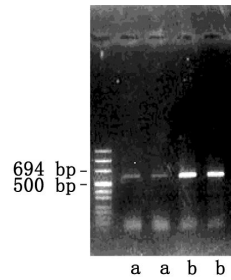


图3 CA₃组和CA₄组雪莲叶片RT-PCR产物的电泳分析
Fig.3 Electrophoresis analysis of RT-PCR products from the leaves of *S. involucrata* grown under cold-acclimations for 5 and 8 weeks

a: CA₃组,低温驯化5周的雪莲;b: CA₄组,冷驯化8周的雪莲。上样量均为20 μL。

度同源性,尤其是N端32个氨基酸的同源性达84.7%(图6)。

讨 论

1 *XCH*为一类冷诱导基因

RT-PCR反应的结果可以定性反映基因在植物体内某一特定时间内转录表达的水平。本实验结果显示,*XCH*基因在雪莲未经低温诱导时不转录表达;而当雪莲低温驯化5周时,可以检测到*XCH*基因转录本的存在。可见,*XCH*基因在植物体中的转录是由低温诱导激活的。在低温驯化1和3周的雪莲叶片中检测不到*XCH*基因转录本的存在,而在低温驯化8周的雪莲叶片中*XCH*基因转录本的水平明显高于5周的水平,*XCH*基因的表达水平与雪莲低温驯化时间存在正比例的关系,此基因是一类低温相关基因。而只有在低温驯化达5周以上的雪莲叶片中才能检测到*XCH*转录本的结果,说明此基因需长期低温诱导才可以检测到。这可能是由于低温驯化5周后此基因才开始被激活转录,也可能是因为随着低温诱导达5周时此基因转录本稳定性逐渐增强以至能检测到。总之,实验表明*XCH*是一类冷诱导基因。

2 *XCH*是II类内切几丁质酶类基因

植物的内切几丁质酶至少分4类^[7]。I类几丁质酶包括3个部分:富含半胱氨酸的结合区、富含脯氨酸的铰链区和高保守的催化区;II类几丁质酶与I类相比缺少结合区与铰链区,但其催化区与I类高度一致;III类几丁质酶无结合区,

-37	GGAGCAGTGGCGCTCGCAGGGCTGAAACTTAAAGGAA	1
1	ATG GGT GAT GGT GCA GCG CGT GCC TAC TCG GCC GAG GCC TTT GTC	45
	M G D G A A R A Y S A E A F V	
46	TGG TTA ATT CCA CAG GGC GCC GCC ACC TCA GCC TGC TAC CTA GCT	90
	W L I P Q G A A T S A C Y L A	
91	ATG TGG AGG TAT CCC TCC ACG GCC AGC CAG AAG AGA GAG CTA TGG	135
	M W R Y P S T A S Q K R E L W	
136	CCT TTT AGG CCA CAG ACC TCC CAC GAG ACC ACC CGC CTG GGC TGC	180
	P F R P Q T S H E T T G L G C	
181	CCT AGA TGT TCT GGG CCG CAC TCG TCG CTA CAC TGC TGT ATT CGA	225
	P R C S G P H S S L H C C I R	
226	CGC AGA CCT CCC ACT GGC CCG ACA TGC CCG GGT AAA CCT TTG ATA	270
	R R P P T G P T C P G K P L I	
271	TTC TCC TCC GGG CGG GCC ATC GGC AAC CCT GAC CTC CTG GAG TCA	315
	F S S G R A I G N P D L V E S	
316	TCA GCT CGC GTT GAC TAC GTC CCT GCC CTT TGT TTC TAC ATG ACC	360
	S A R V D Y V P A L C F Y M T	
361	CCG TTC GCA GAA TTC CTA GTA AGC GCG AGT CAT CAG CTC GCG TTG	405
	P F A E F L V S A S H Q L A L	
406	ACT ACG TCC CTG CCC TTT GTA CAC ACC AGA GGC CGT GTG CCT GGC	450
	T T S L P F V H T R G R V P G	
451	TCC GTG ATC ACG AAC CTC ATC AGC CCG CAG TCA CTA CGT CCC TGC	495
	S V I T N V T S P Q S I R P C	
496	CCT TCG TAC ACA CCA GAC CGA ATC GGG AGA ATT CCT CGC TAC TGC	540
	P S Y T P D R I G R I P R Y C	
541	GAG CTA CTA GCT GGC ACC TAC GCT GAC AAT GCC CTT TGT ACA TAC	585
	E L L A G T Y A D N A L C T Y	
586	CAG AGG CCG TTC GCA TAG TCA	606
	Q R P F A *	

图4 *XCH*核苷酸以及预测氨基酸序列Fig. 4 The nucleotide and predicted amino acid sequences of *XCH*

催化区与 I 类一致的也较少; IV 类几丁质酶具有富含半胱氨酸的结合区, 但保守的催化区一致性较差。根据以上特征以及序列分析的结果可知 *XCH* 基因是 II 类内切几丁质酶类基因。

Hon 等^[3]总结自己以及他人的研究发现, 凡是具有抗冻活性的内切几丁质酶, 其 N 端 32 个氨基酸序列是高度保守一致的, 而无抗冻活性的内切几丁质酶此段的氨基酸序列的相似性较差。从由 *CHT9* 与 *XCH* 所编码的氨基酸序列来看, *XCH* 与 *CHT9* 的高保守的催化区具有高度相似性, 尤其是 N 端的 32 个氨基酸与经典的 I 类内切几丁质酶类抗冻蛋白的 N 端 32 个氨基酸^[3]具有 84.7% 的相似性, 初步证明此基因编码的 II 类内切几丁质酶可能具有抗冻活性。

3 雪莲低温驯化过程中的现象讨论

在对雪莲低温驯化过程中, 雪莲在常温下已

存在, 后被转入低温环境驯化的叶片(简称 CW 叶片)在低温驯化 5~8 周时逐渐枯萎死亡。而在雪莲低温驯化 4 周后, 在低温环境中会长出新的叶片(简称 DW 叶片), 此新叶在雪莲低温驯化 8 周时仍然存活。这表明两种不同环境下长成的叶片在接受低温驯化时, 其耐受低温伤害的能力是不一样的。DW 叶片可能因某种 CW 叶片不存在的抗冻机制而延缓死亡。到底是什么样的机制使两类叶片存在如此大的差异, 目前还不清楚。但实验显示, 只有在低温驯化达 5 周以上的雪莲叶片中才能检测到 *XCH* 转录本, 而低温驯化 1 和 3 周的雪莲叶片中 *XCH* 基因转录本不存在; 低温驯化 1 和 3 周的雪莲叶片正是 CW 叶片, 而雪莲低温驯化达 5 周以上时 CW 叶片均已死亡, 实验检测的叶片正是 DW 叶片。也就是说, *XCH* 转录本只存在于 DW 叶片中。由此推测, 可能是由于某些冷诱导

```
XCH -----
CHT9 ATGAGAGAGACTTGGGTGTTGGCCATGCTGAGCCGCGCCCTTCGCCCTGTT

XCH -----
CHT9 CTGCACACGCGCGAGCAATGGGCGCTCCAGCCGCGCGGCGCGCGACGTCGCG

XCH -----
CHT9 TAAATTCGCTTTTATGTTGAGGAAGTTGAGTTCCTGAGCAATGAGTTGAGAT

XCH -----
CHT9 ACTGCGGCAGACGCTTCCAGAGCCAATGCAACCGTTCGACGCGCACACC

XCH -----
CHT9 AGTACCGGTACCGACCCCGCACCGGCGCGCGCGCTGTCCTCCATCATGTCG

XCH -----
CHT9 TAAATTCGCTTTTATGTTGAGGAAGTTGAGTTCCTGAGCAATGAGTTGAGAT

XCH TTTTAA----TTTCCAA-----GGGCGCCTGCTTGAAGCTTATTC--
CHT9 TAACTCAAGGGCTTCTACAACTACGCGGCTTGAATGCAAGCGCGCAACTC

XCH ---GTAAGTAACTGTAAGGTATCCCTCGAGCGCAGCCCAAAAAGAAAGC
CHT9 GPTGGCGGCTCCTCAGCCAGCGCGCGCAGCCCAAGGTCAAGAAAGCGCAGG

XCH TATGAGCTTTTAGAGCAAGGAGCGTGGAGAGAGAGAGCGAGGTGAGCGTT
CHT9 TAAATTCGCTTTTATGTTGAGGAAGTTGAGTTCCTGAGCAATGAGTTGAGAT

XCH TTTTAAATTTT-----GTAAGTAACTGTAAGGTATCCCTCGAGCGC
CHT9 GGTACCGGTACCGACCCCGCACCGGCGCGCGCGCTGTCCTCCATCATGTCG

XCH -----TTTGA-----GCAACCTTCCAGCCTGGCGCGAGA
CHT9 CGGCGCGCGCGCGCGAGTACTGCTCGCGAGAGTCCAGAGGCGCGTGGG

XCH TCGGAGATGA-----AAGTTGATGTA--
CHT9 TAAATTCGCTTTTATGTTGAGGAAGTTGAGTTCCTGAGCAATGAGTTGAGAT

XCH --TTTCCCTTGG-----GCTCATGCTCA
CHT9 ACTAACAAGTACCGACCTGCGCGCGCGCGCCAGCGCGCAGAACCTACTCAA

XCH --AGGCTAGCGCGTGAAGTATCAAGTCCGGTGCAGACCTCCGTTGGC
CHT9 CAGCCAGAGCCGCGCGCGCGCAGAGCCAGCGCGCGCGTCAATTAGAGCGGA

XCH TTTTATTTTAAATTTGATTTGATGTTA--TTTATTTGATTTTATTTT
CHT9 TAAATTCGCTTTTATGTTGAGGAAGTTGAGTTCCTGAGCAATGAGTTGAGAT

XCH GAGCGCTTTTACTACTTCTT--CTTCTTTAGCAACAGAGAGCC
CHT9 GTCGCGCGCTGAGGTTGAGCCTTCCGCGCGCGCGGAGCGCGCGAGCGCGTA

XCH GTTGGCTTGCCTCC---TGATCAGAGCTGATCAAGCCGAG--GGCG
CHT9 GCGGCGCGCGCGAGCCCGAGAGCGCAAGAGCAGCGAGGCGCGCGCGAGG

XCH AATTCGCTTTTATGTTGAGGAAGTTGAGTTCCTGAGCAATGAGTTGAGAT
CHT9 TAAATTCGCTTTTATGTTGAGGAAGTTGAGTTCCTGAGCAATGAGTTGAGAT

XCH GCTACTGCGAGTACTACTGCACTACTACTGTAACAATCCCTTTG--TACA
CHT9 GCTACTGCGAGCTGCGCGCTGAGGTTGAGCCTTCCGCGCGCGCGAGCGCGTA

XCH TACCAAGGCGGTTGCCA
CHT9 -ACCAGAGGCGGTTGCCA
```

图5 XCH与CHT9核酸序列比对

Fig.5 Pairwise alignment of nucleotide sequences of XCH and CHT9
灰色表示相同区域。

```

XCH -----
CHT9 MRGVVVVAMLAAPAVSAHAKQCGSQAGGATCPMCLCCSKPGFC

XCH -----MEDGAARAYSAEAFVM
CHT9 GSTSEYCGDGCQSQCNROGGTPVPVPTPGGVSSIIISQSLFDQ

XCH LIPQG-----AATSACYLANWRYFSTASQKREL
CHT9 MLLHRNDAACLAKGFYNYGAFIAAANSFSAPATDGGIDVFRKREV

XCH MPFRPQTSHEPTGLGCPRCSPHSSSLHCIRRR--P-----PTG-
CHT9 AAFLAQTSHETTGGNPTAPDGFYSNGVCPNQERGARSDVCSFSSQ

XCH -PTCPGK-----PLIFSS-----GRAIG-----MPDLNESSARV
CHT9 WPCAPGKKYFGRGPIQISYNYNYGPAAGRAIGTOLLNMPDLNATDATTV

XCH DYVPALCFYMTFFAEFLVSAHQALTTSLPFWHTRGVFPGS-VITN
CHT9 SFKLTALWFMTEPQSPKPS SHDVITGFWSPSGADQAAERWPGYGVITN

XCH VLSF--QSLRPCPSYTPDRIGRIPRYCELLAGTYADNALCTYQRPFA
CHT9 IINGGLECGRGQDARVADRIGFYKRYCDLLGVTYGDMLDCTYNQRPFA

```

图6 *CHT9*与*XCH*预测氨基酸序列比对Fig. 6 Sequence alignment of predicted amino acid sequences for *XCH* and *CHT9*

深灰底色表示完全相同, 浅灰底色表示同源。

基因只被定向运输到 DW 叶片中, 造成了 DW 叶片比 CW 叶片更加耐寒。这种定向运输可能是低温环境中生成的叶片与常温下生成的叶片相比, 在某些方面发生改变的原因, 这种改变可能是叶片细胞液 pH 等环境改变, 也可能是叶片细胞膜上某个载体蛋白结构或性质的改变从而更易于识别抗冻蛋白的信号肽。具体是什么原因, 有待进一步研究。

参考文献

- 1 Urrutia ME, Duman JG, Knight CA. Plant thermal hysteresis proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1121: 199~206
- 2 Griffith M, Antikainen M, Hon W-C et al. Antifreeze proteins in winter rye. *Physiol Plant*, 1997, 100: 327~332
- 3 Hon WC, Griffith M, Mlynarz A et al. Antifreeze proteins in winter rye are similar to pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol*, 1995, 109: 879~889
- 4 Zhu B, Chen THH, Li PH. Expression of an ABA-responsive osmotin-like gene during induction of freezing tolerance in *Solanum commersonii*. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 729~735
- 5 Gatschet MJ, Taliaferro CM, Porter DR et al. A cold-regulated protein from bermuda grass crowns is a chitinase. *Crop Sci*, 1996, 36: 712~718
- 6 Hiilovaara-Teijo M, Hannukkala A, Griffith M et al. Snow mold-induced apoplastic protein in winter rye leaves lack antifreeze activity. *Plant Physiol*, 1999, 121: 665~674
- 7 Yeh S, Moffatt BA, Griffith M et al. Chitinase genes responsive to cold encode antifreeze proteins in winter cereals. *Plant Physiol*, 2000, 124: 1251~1264