

小桐子非特异性脂质转移蛋白A的基因克隆及其表达和功能分析

王海波^{1,2}, 邹竹荣¹, 龚明^{1*}

¹云南师范大学生命科学院, 生物能源持续开发利用教育部工程研究中心, 云南省生物质能与环境生物技术重点实验室, 昆明650500; ²曲靖师范学院生物资源与环境科学学院, 云南曲靖655011

摘要: 基于我们最近获得的小桐子低温驯化转录组和数字基因表达谱数据, 本工作研究了低温驯化条件下差异表达变化较大的非特异性脂质转移蛋白A基因*JcnsLTPA*。克隆到该基因的cDNA序列全长833 bp, 开放阅读框长度513 bp, 编码170个氨基酸, 存在ATT_LTSS典型保守功能基序。其启动子区域中鉴定到了TATA框、CAAT框、CATA框、W框等顺式作用元件以及CRT/DRE低温响应元件。半定量RT-PCR分析表明, 该基因在茎、根、叶中都有表达, 以茎中表达量最高、且受低温诱导最显著。同时, 酵母表达*JcnsLTPA*也提高了重组酵母菌的抗低温能力。这些结果充分说明了小桐子*JcnsLTPA*是与抗冷性密切相关的基因, 可以用于小桐子的抗冷性遗传改良。

关键词: 小桐子; 非特异性脂质转移蛋白A; 基因克隆; 酵母表达

Molecular Cloning, Expression Analysis and Functional Characterization of the Gene Encoding Non-Specific Lipid Transfer Protein A from *Jatropha curcas*

WANG Hai-Bo^{1,2}, ZOU Zhu-Rong¹, GONG Ming^{1*}

¹School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Engineering Research Center of Sustainable Development and Utilization of Biomass Energy, Ministry of Education, Key Laboratory of Biomass Energy and Environmental Biotechnology of Yunnan Province, Kunming 650500, China; ²College of Biological Resource and Environmental Science, Qujing Normal University, Qujing, Yunnan 655011, China

Abstract: From our previous data of the transcriptome and digital gene expression profiling of cold-acclimated *Jatropha curcas*, a gene encoding the non-specific lipid transfer protein A (*JcnsLTPA*), with highly differential expression under chilling, was selectively studied herein. The full length of our cloned *JcnsLTPA* cDNA is 833 bp, with the entire open reading frame (ORF) of 513 bp encoding a polypeptide of 170 amino acids (with typical ATT_LTSS motif). Its promoter region was characterized by prediction with TATA-box, CAAT-box, CATA-box, W-box, and the cold responsive elements of CRT/DRE. Semi quantitative RT-PCR analysis revealed that *JcnsLTPA* was expressed in stem, root, and leaves, with abundant and remarkably chilling-induced expression particularly in stem. Meanwhile, the yeast expression of *JcnsLTPA* endowed the recombinant yeast strain with an enhanced resistance to low temperature. Conclusively, these results largely implicated the cold relevance of *JcnsLTPA* gene that should be applicable for the genetic improvement on the cold tolerance of *J. curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*; non-specific lipid transfer protein A; gene cloning; yeast expression

小桐子(*Jatropha curcas* L.)属大戟科(Euphorbiaceae)麻疯树属落叶灌木或小乔木(何璐等2010; 崔明昆等2009), 为新兴开发的木本油料植物。小桐子种子油含量高、流动性好、品质优良, 部分油脂关键参数优于国内零号柴油, 达到了欧IV标准, 成分接近石化柴油(刘杰等2006); 同时, 其种子富含氨基酸、萜类、酮类和醇类等物质, 入药有清热解毒、消肿散淤等作用; 其种子中的毒蛋白Curcin可以用作杀虫剂; 种子中富含蛋白质, 在脱毒后可以用作动物饲料(邓志军等2005); 另外, 近年来研究发现小桐子的提取成分还有显著的抗癌

活性(余帅勇和丁贵杰2009)。鉴于以上特性, 小桐子目前已成为多用途能源植物的研究热点。

脂质转移蛋白(lipid transfer protein, LTP)是一类分泌蛋白, 曾被认为是一种在体外膜间进行脂质转移的蛋白。在动物体中, 有特异性与非特异性脂质转移蛋白两种; 而在植物体中, 因其作用范

收稿 2014-11-21 修定 2014-12-16

资助 国家自然科学基金(31260064、31460059和31460179)和云南省教育厅科研基金重大专项(ZD2010004)。

* 通讯作者(E-mail: gongming63@163.com; Tel: 0871-65516069)。

围广泛、没有专一性,被称为非特异性LTP (non-specific lipid transfer proteins, nsLTPs)。nsLTP在植物中含量丰富,占植物可溶性总蛋白的4%左右(Bernhard等1991;冯晓燕等2003),一般分布于植物器官的皮细胞和外周细胞及器官脱离区(汪少芸等2004)。其相对分子量一般为7~10 kDa,等电点为8.8~10,均为可溶性蛋白,并且蛋白质热稳定性较高,在4 °C下存放数月后仍有活性,95 °C加热5 min后仍保持有转移脂质的活性,这与其具有4个二硫键有关。根据其一级结构及分子量的大小,nsLTP一般被分为3类:nsLTPI、nsLTPII和nsLTPIII(Liu等2002)。nsLTPI型,分子量是8~10 kDa,在植物中已经研究得相对较深入,目前克隆到的nsLTP基因大部分属于I型。nsLTPII型,分子量大小约为7 kDa,在植物中研究得相对较少,仅在小麦与水稻中有部分报道。nsLTPIII型分子量小于7 kDa或大于10 kDa,研究更少。I、II、III型nsLTP分别含有1个、2个和1个疏水腔,因此nsLTPII比nsLTPI、nsLTPIII的脂转移活性要高。很多研究证据表明,nsLTPs可能参与角质层的合成与胚胎的发育、各种逆境胁迫适应(陈杨玲等2013)、抑制半胱氨酸蛋白酶与 α 淀粉酶活性、抗病原微生物、抗虫等多方面的植物生理生化反应(Verdoy等2004)。植物nsLTP自1975年首次在马铃薯块茎中发现,现已从玉米(Sossountzov等1991)、甘蓝(Hincha等2001)、小麦(Boutrot等2005)、向日葵(Pagnussat等2009)等许多植物中分离到;但目前对小桐子nsLTP的研究很少,国内还未见报道。最近,我们通过RNA-Seq技术获得了小桐子低温驯化下的转录组和数字基因表达谱数据,并从中发现一些低温驯化条件下差异表达变化较大的基因(Wang等2013, 2014)。在此基础上,本工作首次克隆了小桐子非特异性脂质转移蛋白A基因*JcnsLTPA*,并对其进行了生物信息学分析、半定量表达分析以及酵母背景下的功能初步验证,以期对小桐子抗逆性基因工程改良奠定基础。

材料与方法

1 实验材料及处理

供试小桐子(*Jatropha curcas* L.)种子取自云南省楚雄州元谋县。选取饱满的小桐子种子,用1.5% CuSO₄消毒20 min,无菌水漂洗5次,于26 °C

的恒温培养箱中吸涨24 h(李忠光和龚明2010)。将吸涨的种子在无菌水中漂洗3次,播于垫有5层用无菌水湿润滤纸的白磁盘(24 cm×16 cm)中,于相对湿度(RH) 75%、昼夜温度26 °C/20 °C、16 h/8 h光周期的恒温培养箱中萌发5 d。将发芽的种子播于消毒的培养土中并于RH 75%、昼夜温度26 °C/20 °C、16 h/8 h光周期的恒温培养箱中生长15 d至第2片真叶展开,每天用无菌水润湿培养土。将生长15 d的小桐子幼苗置于RH 75%、12 °C(昼夜相同)、16 h/8 h光周期的低温培养箱中进行低温处理,分别取低温驯化12、24、48 h与对照(正常培养)的根、茎及第2片真叶,用铝箔纸包好,液氮速冻后于-80 °C冰箱中保存用于RNA的提取。

2 菌株与主要试剂

大肠杆菌Trans1-T1(DH5 α)、BL21(DE3)及酵母菌INVSc1菌株由本实验室保存;TransZol Up、DNase I、TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix、TransStart Taq DNA Polymerase、Amp(氨苄青霉素)、X-gal、IPTG、2×EasyTaq PCR SuperMix (+dye)、EasyPure Quick Gel Extraction Kit、EasyPure Plasmid MiniPrep Kit、pEASY-T1 Cloning Kit和Trans 2K Plus II DNA Marker购自北京全式金生物技术有限公司;HindIII和XhoI限制性内切酶购自大连宝生物公司;引物合成和测序由深圳华大基因有限公司完成。

3 实验方法

3.1 总RNA的提取及cDNA第一链的合成

利用TransZol Up试剂提取小桐子对照与12 °C低温驯化12、24、48 h的根、茎及叶片的总RNA,并利用DNaseI消化RNA中的基因组DNA,得到纯化的总RNA。以Anchored Oligo(dT)₁₈为逆转录引物,利用TransScript Two-Step RT-PCR SuperMix合成第一链cDNA。

3.2 小桐子*JcnsLTPA*基因全长cDNA的克隆

以小桐子低温驯化转录组测序数据的NCBI Nr注释结果筛选得到小桐子*JcnsLTPA*基因的序列Unigene992_JC-CK_1A(1 008 bp),NCBI ORF finder序列分析表明其包含完整ORF编码框(513 bp),以此序列为基础设计全长扩增特异性*JcnsLTPA*引物(上游引物F: 5'-AGAGGGGATTAGGCAAAGT-3';下游引物R: 5'-GGGAAAGGAAGAGAGCAAG-3'),并送深圳华大基因有限公司合成。

以小桐子12 °C低温驯化24 h的根提取的总RNA反转录得到的cDNA为模板,使用热启动双封闭DNA聚合酶TransStart Taq DNA Polymerase进行PCR扩增,扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,53 °C 30 s,72 °C 1 min,35个循环;72 °C 10 min。扩增完成后用1%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,利用Easy-Pure Quick Gel Extraction Kit从琼脂糖凝胶回收目的基因条带(833 bp)。将目的基因片段与克隆载体pEASY-T1连接,转化大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞,涂LB抗性平板(LB-Amp⁺+IPTG+X-gal),过夜生长,进行蓝白斑筛选。经过菌落PCR验证的阳性克隆,命名为pEASY-T1-*JcnsLTPA*,送深圳华大基因有限公司利用M13正反向通用引物进行双向测序。

3.3 小桐子*JcnsLTPA*基因的生物信息学分析

利用在线工具ProtParam计算蛋白质的理论分子量、等电点等基本参数。利用WolfSport在线软件对蛋白质亚细胞定位进行预测,并利用SignalP 3.0 Server分析蛋白质信号肽序列,接着利用在线工具TMHMM与Proscale检测其跨膜结构与亲水/疏水特性。利用Spidey软件进行克隆cDNA序列与其基因组序列(小桐子基因组数据库<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>)比对以确定基因内含子与外显子的结构。利用在线软件PlantCARE与PLACE进行启动子顺式作用元件的分析。利用NCBI CDD工具进行结构域与功能元件的鉴定。从NCBI下载其他物种nsLTPA的氨基酸序列,利用ClustalW进行序列相似性比对,然后用MEGA4.0软件通过邻接法构建系统进化树,并采用泊松法进行检验。利用Phyre2进行蛋白质三维结构的同源建模,利用VMD软件显示其三维空间结构,并结合Ramachandram图验证其准确性。

3.4 半定量RT-PCR分析

利用3.1节中正常及低温驯化各组织材料总RNA的反转录cDNA为模板,以18S rRNA (GenBank登录号:AY823528)为内参(上游引物F:5'-AGAAACGGCTACCACATC-3';下游引物R:5'-CCAAGGTCCAACACTACGAG-3'),进行*JcnsLTPA*的RT-PCR扩增(上游引物F:5'-CTTCAAGGTCCTCCCTAATA-3';下游引物R:5'-ATGTGCCATCTACTTCTGTT-3')。18S rRNA的扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 1 min,26个循环;72 °C 10 min。*JcnsLTPA*的扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C

30 s,51 °C 30 s,72 °C 1 min,28个循环;72 °C 10 min。反应完毕后取5 μL进行1%的琼脂糖凝胶电泳检测,以18S rRNA为内参进行*JcnsLTPA*基因表达的差异性分析。

3.5 小桐子*JcnsLTPA*基因酵母表达载体的构建、转化及功能验证

利用HindIII与XhoI双酶切质粒pEASY-T1-*JcnsLTPA*与酵母表达载体pYES2,切胶回收*JcnsLTPA*基因片段与pYES2的酶切大片段,T₄ DNA连接酶22 °C连接5 h,转化大肠杆菌DH5α感受态细胞,涂LB-Amp⁺平板,过夜生长,经过菌落PCR验证的阳性克隆命名为pYES2-*JcnsLTPA*。提取质粒并转化酿酒酵母野生型菌株INVSc1,命名为INVSc1-pYES2-*JcnsLTPA*;同时将对照空载体pYES2质粒也转化INVSc1,命名为INVSc1-pYES2;通过酵母菌落PCR以验证阳性克隆。

分别挑取重组酵母INVSc1-pYES2-*JcnsLTPA*及对照INVSc1-pYES2单菌落,接种于15 mL YPD培养基中,30 °C振荡过夜培养。加入YPD培养基调整菌液OD₆₀₀=0.4~0.6。取20 mL菌液,8 000 r·min⁻¹离心1 min,弃上清,用20 mL YPG诱导培养基重悬菌体,30 °C诱导表达24~36 h至OD₆₀₀>2.0。取诱导表达菌液1 mL,用YPG诱导培养基调整菌液OD₆₀₀=2.0,将菌液依次稀释1、10、20、40、80、160倍,各取2 μL稀释菌液点板于YPG诱导培养基平板,分别在正常30 °C与18 °C低温条件下倒置培养2~3 d,对比观察菌落的生长情况。同时,取诱导表达菌液2 mL至60 mL YPG诱导培养基中,调整菌液OD₆₀₀=0.2,在正常30 °C条件下与18 °C低温下继续振荡培养,每3 h间隔取样,测定样品的OD₆₀₀值。以时间为横坐标,OD₆₀₀为纵坐标,绘制酵母菌的生长曲线,比较重组酵母菌与对照酵母菌在正常和低温条件下的生长差异。

实验结果

1 小桐子*JcnsLTPA*基因全长cDNA的克隆

以小桐子12 °C低温驯化24 h的根材料提取总RNA,并反转录cDNA为模板,利用*JcnsLTPA*正向引物扩增*JcnsLTPA*基因的全长cDNA。结果表明,扩增得到的产物约0.8 kb,与预期大小一致。将目的条带切胶回收后与T/A克隆载体pEASY-T1连接,转化大肠杆菌,并经菌落PCR验证,阳性克隆取名为pEASY-T1-*JcnsLTPA*,接菌提取质粒。

2 小桐子 *JcnsLTPA* 基因的生物信息学分析

经过测序, 克隆的 *JcnsLTPA* 基因 cDNA 序列为 833 bp, 已提交至 NCBI GenBank (登录号: KJ670152.1)。利用 NCBI ORF finder 分析表明其包含完整的开放阅读框(ORF) 513 bp, 编码一个由 170 个氨基酸(aa)组成的蛋白质(图1), 其理论分子量推测为 17 kDa, 等电点为 4.59。目前发现大部分 I 型、II 型 nsLTP 属于碱性蛋白质, 等电点大于 7; 而部分报道的 III 型 nsLTP 为酸性蛋白, 等电点小于 5, 本工作中 *JcnsLTPA* 推导蛋白质可能属于此类。该蛋白质中极性氨基酸与疏水氨基酸分别占 20.8% 与 32.4%, 后者占其总氨基酸数的 1/3; 另外, 预测分析发现该蛋白质富含疏水区域, 存在两个明显的跨膜区域(1~19 aa, 149~170 aa)。疏水氨基酸对于 nsLTP 蛋白质组成非极性空穴容纳脂类至关重要, 这也是 nsLTPs 家族蛋白质的共同特征。此外, SignalP 预测该蛋白质 N 端包含一个信号肽(1~24 aa), PSORT 预测其主要定位在叶绿体。综合以上分析推测, 小桐子 *JcnsLTPA* 蛋白质可能定位在叶绿体膜或类囊体膜上, 通过叶绿体前导信号肽转运至叶绿体, 负责细胞质与叶绿体之间脂类的转移反应。

利用克隆的 *JcnsLTPA* cDNA 序列, 对小桐子基因组数据库 (<http://www.kazusa.or.jp/jatropha/>) 进行在线 Blast 检索, 得到其对应基因组序列, 包含 3 个外显子与 2 个内含子。同时, 得到了该基因 ORF 上游 1 000 bp 的启动子序列, 并利用在线软件 PlantCARE 与 PLACE 进行了顺式作用元件分析(图2)发现, *JcnsLTPA* 基因启动子中分布有常见的 RNA 聚合酶结合与增强的顺式作用元件, 如 TATA-box、CAAT-box、CATA-box 等。另外, 还鉴定出与植物抗冷性相关的 CRT/DRE 元件, 说明该基因直接受 ICE-CBF 冷信号转导系统调节。此外, 在 *JcnsLTPA* 基因启动子中还发现有 W-box 元件, 该元件可以结合 WRKY 类转录因子, 而许多文献已经报道 WRKY 类转录因子通常调控抗逆性相关基因, 这也说明我们筛选的这个 *JcnsLTPA* 基因是影响小桐子抗冷性的关键基因。

通过 ClustalW 软件对包括小桐子在内不同植物的 nsLTPA 进行氨基酸序列对比发现, nsLTPA 蛋白的 N 端序列差异性较大, 尤其是以疏水氨基酸组成的信号肽部分(图3-A); 中间的 4 段 α -螺旋区域(H1~H4)以及 C 端则较为保守, 特别是 8 个 Cys 的位

```

1   AGAGGGGATTAGGCAAAGTTGGTCACCAACACAATCCATTTCTCATTGTGCACTTGTGGCCTCATCTTCTATAAAGTTTACACTTCCTT
91  TTCCTAATCCATTAATCTAATCACAAAGAGCTTCAATCTTCACATTGCACAAGCAGTTTTAGAGAACCAATGGCATAACGGAGGTCTGG
                                     M A Y G G L
181 CAATGAGTTTGGCTCTGATCCTAGTGAGTATGCTATGGTCAGGAGCTATGGCTCAGTCTTCCAGTTGTACAAATGTCTTAATAAGCATGT
    A M S L A L I L V S M L W S G A M A Q S S S C T N V L I S M
271 CACCGTGCCTGAATTATATCACAGGGAACCTCCTCAACTCCATCTTCACAATGTTGCACACAGCTTTCTAGTGTGTTGCTCGCTCGCCAC
    S P C L N Y I T G N S S T P S S Q C C T Q L S S V V R S S P
361 AGTGCTGTGTGAAGTTCTAAATGGTGGTGGCTTCTCACTTGGGATTAACATCAACCAAAACCCAGGCTTTAGCCTTACCTGGAGCTTGCA
    Q C L C E V L N G G G S S L G I N I N Q T Q A L A L P G A C
451 ATGTTCAGACTCCACCCCTCAGCCGCTGCAACGCTGCTTCTCCGGCCGACTCTCCTGCAGGAACAGCAGAAGTTCCAACTACTAACCCAG
    N V Q T P P L S R C N A A S P A D S P A G T A E V P T T N P
541 GAACAGGATCTAAAAGTGTACCTTCAACAGAAGTAGATGGCACATCGGATGGAAGCTCCATCAAGTTGTCCATGACAATGCTTGCATTTC
    G T G S K T V P S T E V D G T S D G S S I K L S M T M L A F
631 TGCTCTTGGCCGATCATATAGTTCAATTTTCATAACATACTGATTTTCTCTATTTACAGTTGCCCTTATATTATTGATTTTATAGAATT
    L L F A A S Y S S I F I T Y *
721 ATTCTTGATTCTCTTGGTTGAGGGCTTATGTATTATTTATTTTACATGACCTCTTATGGGGTTGGTGTAGTTTGTATTACTGAAGAG
811 ACTTCTTGCTCTCTTCCCTTTCCC

```

图1 小桐子 *JcnsLTPA* 基因的 cDNA 与推导的氨基酸序列

Fig.1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *JcnsLTPA* cDNA from *J. curcas*

翻译起始密码子(ATG)与终止密码子(TGA)用下划线标注; 信号肽用虚线标注; 两个跨膜疏水区域用点划线标注。

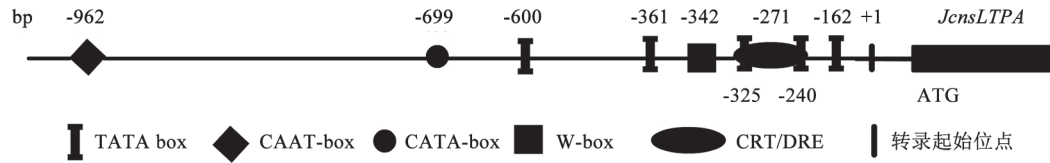


图2 小桐子JcnsLTPA基因启动子顺式作用元件

Fig.2 Cis-acting elements of the promoter of JcnsLTPA gene from J. curcas

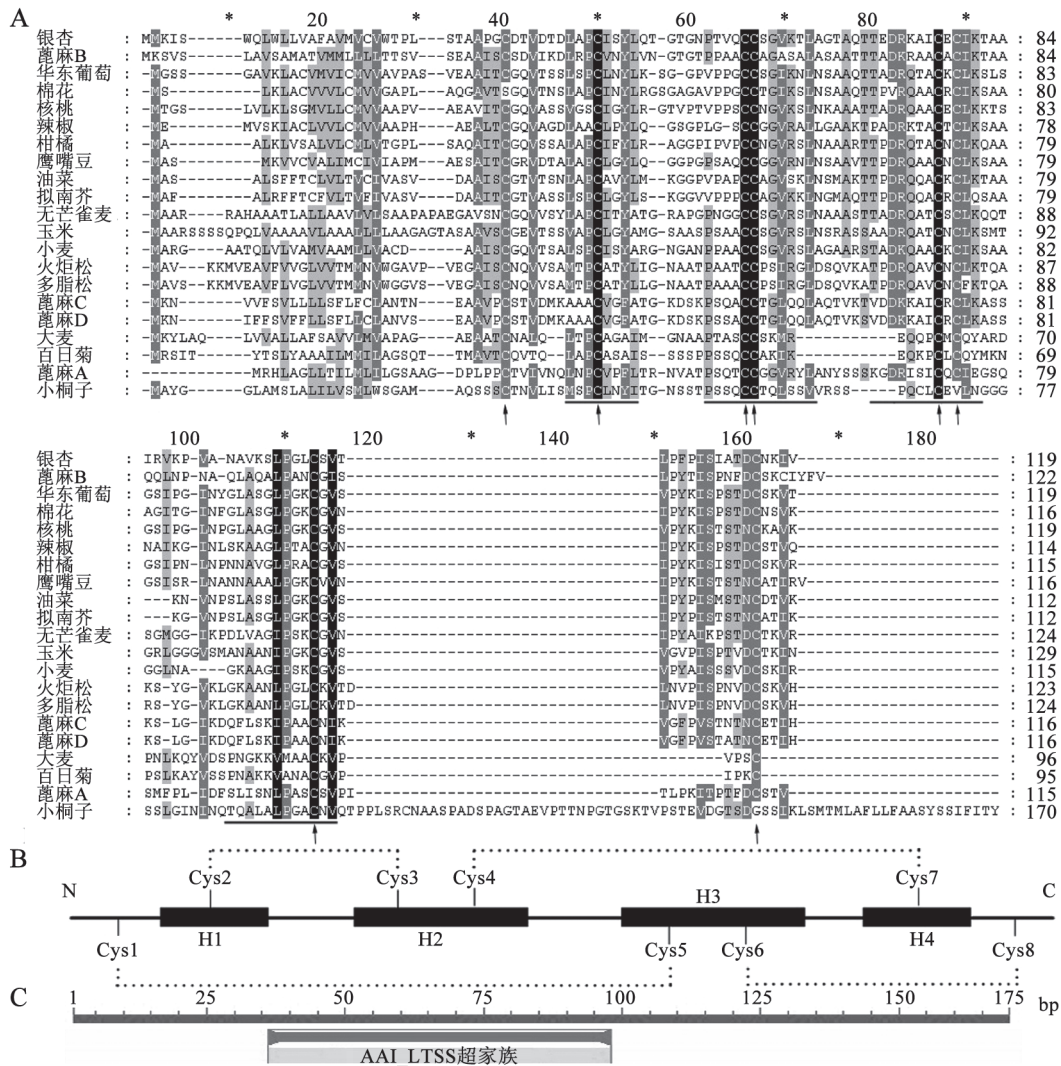


图3 小桐子JcnsLTPA与其他植物nsLTPA的多重序列比对及其保守结构域预测

Fig.3 Sequence alignment of nsLTPA from J. curcas against those of other organisms and the corresponding conserved domain prediction

A: 多重序列比对, 其中箭头表示8个保守的Cys残基, 横线表示4段保守的 α -螺旋; B: nsLTPA蛋白共同的基本结构[4段 α -螺旋(H1~H4)、4对二硫键]; C: NCBI推测的保守结构域。银杏(*Ginkgo biloba*), ABI26087.1; 华东葡萄(*Vitis pseudoreticulata*), AFM35695.1; 棉花(*Gossypium hirsutum*), AAA75599.1; 核桃(*Juglans regia*), ACI47547.1; 辣椒(*Capsicum annuum*), AAR83849.1; 柑橘(*Citrus jambhiri*), BAH03575.1; 鹰嘴豆(*Cicer arietinum*), CAA05771.1; 油菜(*Brassica napus*), AAD09107.1; 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), AAK59520.1; 无芒雀麦(*Bromus inermis*), AAL23748.1; 玉米(*Zea mays*), ACG36597.1; 小麦(*Triticum aestivum*), AFR54362.1; 火炬松(*Pinus taeda*), AAA82182.1; 多脂松(*Pinus resinosa*), AAK00625.1; 蓖麻(*Ricinus communis*), XP_002509959.1, XP_002524756.1, BAA01802.1, XP_002533768.1; 大麦(*Hordeum vulgare*), AAB47967.1; 百日菊(*Zinnia violacea*), AAB06586.1; 小桐子(*Jatropha curcas*)。

置基本是固定的,也是形成4个二硫键的基础(图3-A、B);而 α -螺旋之间的序列则变化较大,主要以无规则卷曲出现在空间结构中,作为调节该蛋白质脂质容纳空穴的基础(图3-A)。NCBI保守结构域(CDD)分析发现,小桐子JcnsLTPA蛋白存在AAT_LTSS典型结构域(图3-C),该结构域具有 α -淀粉酶抑制剂活性、脂类转移活性以及储藏蛋白功能,存在于诸多蛋白之中,在植物抵御病虫害、跨膜运输脂类分子以及植物种子营养物质贮藏等方面发挥作用。

进一步通过MEGA软件将上面ClustalW分析得到的植物nsLTPA序列比对数据,以邻近法构建其系统进化树(图4)。结果发现,小桐子JcnsLTPA蛋白与研究较多的I型nsLTP在氨基酸序列上有较大差别,尤其是在C端,而且保守的Cys位置也存在某种程度的特异性(图3);在进化上该蛋白与小桐子同科的蓖麻的多个nsLTP蛋白序列相似性最高,聚类在了一起(图4)。

另外,我们基于同源建模的方法构建了小桐

子JcnsLTPA蛋白的空间结构(图5-A);Ramachandram能量图分析显示有98.8%的氨基酸残基处于能量稳定区域,说明预测的三维结构是可信的(图5-B)。对其结构分析表明,4对二硫键虽然在位置上与I型nsLTPA稍有不同,但二硫键在维持4段 α -螺旋稳定性并形成疏水性空穴的结构特征却是完全保守的,只是由于在C端较I型nsLTPA氨基酸序列长出约20 aa,导致了在第3、4段 α -螺旋之间以及第4段 α -螺旋之后有更突出的无规则卷曲,但完全没有影响其脂质容纳空穴的形成。不但如此,正是由于在 α -螺旋之间有不同程度的加长,致使小桐子JcnsLTPA的脂质容纳空穴的柔韧性更强,可以在很大程度上调节脂质容纳空穴的空间结构,便于携带不同长度的脂肪酸链,从而增加了其运输不同脂类的非特异性。

综合这些分析看来,虽然小桐子JcnsLTPA与常见的I型nsLTP在蛋白序列上存在较大的差异性,



图4 通过ClustalW序列比对和MEGA4.0邻近法构建的植物nsLTPA进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of various plant nsLTPA by ClustalW alignment and MEGA4.0 mapping via neighbor-joining method

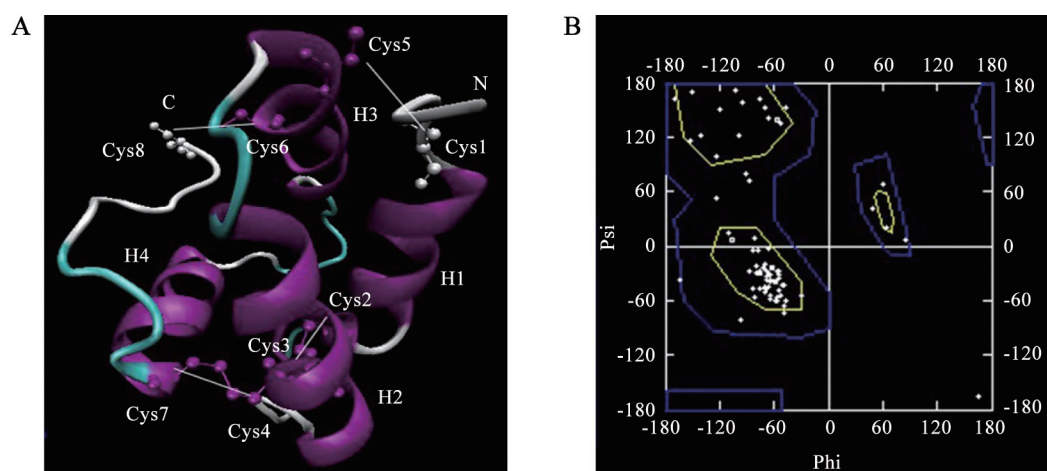


图5 小桐子JcnsLTPA蛋白的三维空间结构

Fig.5 The 3-D structure of JcnsLTPA protein constructed by homology-based modeling

A: 三维结构卡通模型; B: Ramachandran能量图, 其中Psi与Phi表示蛋白质的二面角。

但其预测空间结构与众多nsLTP家族的其他成员是基本相同的, 这充分说明了该蛋白质在高级结构上的进化保守性。nsLTP家族虽然在类型上较多, 但氨基酸序列的多重进化并没有影响其空间功能结构域的形成, 更没有影响其脂类转移的功能。

3 低温驯化下不同组织中JcnsLTPA基因的差异表达分析

通过半定量RT-PCR分析JcnsLTPA基因在不同组织及不同低温驯化时间下的表达情况, 结果表明, JcnsLTPA基因表达量在茎中最高、根中次之、在叶片中相对较低, 存在明显的组织表达特异性。

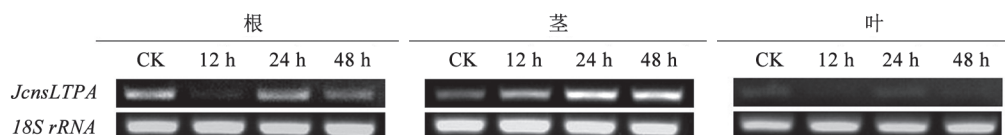


图6 低温驯化下不同组织中JcnsLTPA基因的差异表达分析

Fig.6 Differential expression analysis of JcnsLTPA gene in different tissues under chilling hardening

通过观察比较重组酵母菌INVSc1-pYES2-JcnsLTPA与对照酵母菌INVSc1-pYES2的菌落生长状况, 可以看出: 在正常30 °C生长条件下, 重组酵母菌和对照酵母菌在不同稀释倍数下的生长情况基本相同, 没有出现明显的稀释效应(图7-A); 而在18 °C低温胁迫条件下, 重组酵母菌的菌落长势总体上显著好于对照菌, 尽管两者都受低温抑制(图7-B)。再比较重组酵母菌与对照酵母菌的生长曲线, 发现:

而且, 该基因在茎中受低温诱导显著, 随着12 °C低温驯化时间的延长其表达量逐渐增加, 到24 h时达到最大, 之后又开始缓慢下降; 而在根中, 该基因表达量表现为先下调后上调的变化趋势(图6)。

4 通过酵母表达初步验证小桐子JcnsLTPA的功能

将小桐子JcnsLTPA基因通过HindIII与XhoI从质粒pEASY-T1-JcnsLTPA上克隆到酵母表达质粒pYES2中, 获得其重组酵母表达载体pYES2-JcnsLTPA。随后将其转化酵母菌INVSc1, 利用JcnsLTPA上下游引物进行酵母菌落PCR鉴定, 结果表明该重组酵母表达载体已经成功转化酵母。

在正常30 °C生长条件下, 两者的生长速率基本相似, 且几乎不存在停滞期而直接进入对数生长期, 在30 h时基本都进入了稳定平台期(图7-C), 这表明正常条件下JcnsLTPA基因的表达对酵母菌生长几乎没有影响。在18 °C低温胁迫条件下, 对照菌出现了约3 h的生长停滞期, 之后逐渐进入对数生长期; 而JcnsLTPA重组酵母菌则直接进入快速对数生长期, 且在到达平台期前的生长速率都明显快于对照酵

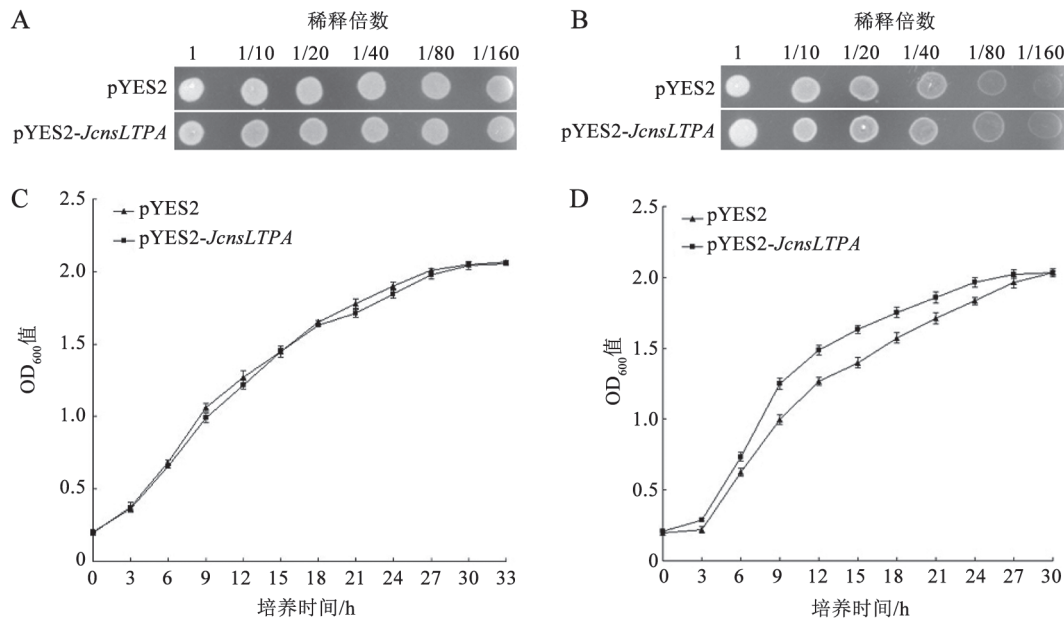


图7 重组酵母菌INVSc1-pYES2-*JcnsLTPA*与对照酵母菌INVSc1-pYES2的菌落生长情况与生长曲线
Fig. 7 Colony growth and growth curves of the recombinant yeast strain INVSc1-pYES2-*JcnsLTPA* and the control yeast strain INVSc1-pYES2

A、C: 无胁迫条件(30 °C); B、D: 18 °C低温胁迫; 其中A与B在酵母菌生长48 h时拍摄。

母菌(图7-D)。另外, *JcnsLTPA*重组酵母菌在进入平台期时, 对照菌由于低温胁迫仍保持有生长的趋势, 进入平台期的时间要稍晚3~6 h。这些结果说明 *JcnsLTPA*是与抗冷性直接相关的基因, 其在酵母中过量表达增强了酵母菌的低温抵抗能力, 间接初步地验证了它在小桐子抗冷性形成中的作用。

讨 论

晶体结构研究表明, 所有的非特异性脂质转移蛋白(nsLTP)蛋白都有共同的基本结构: 4个 α -螺旋(H1、H2、H3、H4)、4对二硫键(图3-B), 这种nsLTP典型的二硫键分布模式为其一级结构折叠形成疏水空腔提供驱动。形成的口袋状疏水穴贯穿整个nsLTP蛋白分子, 可结合并容纳疏水配体如酰基链、磷脂等脂类化合物, 这种空间结构也是 α 淀粉酶抑制剂、胰蛋白酶、种子储藏蛋白以及LTP蛋白共同的结构特征。另外一些碱性氨基酸残基如Lys和Arg, 使nsLTP携带大量正电荷与细胞相互吸引, 有助于nsLTP保持膜的识别能力。而nsLTP较强的疏水性造成脂质膜结构的改变并进一步引发形成离子通道(疏水空腔), 继而N端的插入导致细胞膜破裂和内容物外泄, 从而达到抗菌

抑菌的效果而表现出植物防御蛋白的生物活性。另外, nsLTP蛋白的N端具有信号肽结构, 而C端的非螺旋区域是结合和稳定脂质的关键部位, 且缺乏长的羧基尾端。II型nsLTPs虽然与I型nsLTPs拥有相同的二级结构模型, 但有3个 α -螺旋与1个单匝螺旋区域, 进而构成2个空穴(Samuel等2002)。

研究表明, 脂质转移蛋白能够转移磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇和磷脂酰丝氨酸, 并能够促进线粒体和微体之间的磷脂交换(Carvalho和Gomes 2007), 其转脂活性很大程度上取决于其空穴结构。在nsLTPs的一级结构中, Arg⁴⁴、Tyr⁷⁹、Ile⁸¹与脂结合能力直接相关, 而T/S-X-X-D-R与P-Y-X-I-S两段五肽被认为是植物nsLTPs的特征基序, 对其脂质结合非常重要(Douliez等2000)。Sodamo等(1997)对小麦的nsLTP进行荧光标记, 发现其可以结合DMPG (1,2-二甲叉磷酸甘油酸)的2条酰基链。Zachowshi等(1998)对玉米nsLTP进行了进一步的研究, 发现16~18个碳原子的饱和脂肪酸链分子与nsLTP的结合最为紧密, 而12~14个碳原子的脂肪酸链的结合能力很低, 20~22个碳原子的脂肪酸由于碳链过长而不能与nsLTP的疏水空穴很好地结合。另外, 植物中nsLTPs蛋白的疏水空穴还能够根据脂类分子

的大小而进行改变,更好或更多地容纳脂类分子(Carvalho和Gomes 2007),这也是植物中发现的脂类转移蛋白大部分属于非特异性类型的原因。

具有广泛底物结合特性的植物nsLTP还是最丰富的蜡质相关蛋白,直接参与植物表皮蜡质的合成;同时,在低温、干旱、光、重金属环境胁迫下蜡质合成的增加与nsLTP表达量的增加直接相关。Carvalho和Gomes (2007)发现豇豆种子组织中的nsLTP基因在不同生物与非生物胁迫下表现出不同的表达模式。Jang等(2008)对小麦nsLTP基因做胁迫分析,未检测到nsLTP4、nsLTP6、nsLTP11等常见的与抗逆相关的nsLTP基因的大量表达,却检测到了未曾报道的其他nsLTP基因。以上事实说明,nsLTP属于一个较大的家族(如拟南芥中发现49个,水稻中发现了52个,小麦中发现了122个(Boutrot等2008),不同的蛋白类群负责不同的功能,且响应不同的外界逆境信号,其对应调控机理需要进一步的深入研究。本工作首次克隆得到的小桐子JcnsLTPA,是参与小桐子抗冷性形成的基因(Wang等2013),半定量RT-PCR分析表明其表达具有组织特异性、而且受低温影响(图6),同时酵母异源表达实验也初步验证了它与抗冷性的关系(图7),因而应该可以用于小桐子的抗冷性遗传改良。另一方面,从小桐子JcnsLTPA蛋白的氨基酸序列长度(170 aa)与分子量(17 kDa)来看,推测它属于III型nsLTP,但预测的空间结构及序列功能域分析结果表明,其具备4个 α -螺旋、4个二硫键及空穴等所有nsLTP蛋白的基本结构特征,从而补充了nsLTP家族III型的知识内容。

参考文献

- 陈杨玲,王海波,陈凯,崔明昆,龚明(2013). 能源植物小桐子抗逆性研究进展. 中国农学通报, 29 (10): 1~6
- 崔明昆,林锦,李红朝,龚明(2009). 云南的能源植物资源. 云南师范大学学报(自然科学版), 29 (4): 39~46
- 邓志军,程红焱,宋松泉(2005). 麻疯树种子的研究进展. 云南植物研究, 27 (6): 605~612
- 冯晓燕,于静娟,赵倩,敖光明(2003). 谷子脂转移蛋白cDNA的克隆及特性研究. 农业生物技术学报, 11 (1): 11~15
- 何璐,虞泓,范源洪,沙毓沧,袁理春(2010). 麻疯树(*Jatropha curcas* L.)植物学研究进展. 长江流域资源与环境, 19 (Z1): 120~127
- 刘杰,李黔柱,尹航,杨松,宋宝安(2006). 麻疯树植物资源的研究与开发利用进展. 贵州大学学报(自然科学版), 23 (2): 105~109
- 李忠光,龚明(2010). 不同化学消毒剂对小桐子种子萌发和幼苗生长的影响. 种子, 30 (1): 4~7, 12
- 余帅勇,丁贵杰(2009). 能源植物麻疯树研究进展. 贵州林业科技, 37 (1): 49~54
- 汪少芸,叶秀云,饶平凡(2004). 植物非特异脂转移蛋白的研究. 生物学报, 39 (9): 11~12
- Bernhard WR, Thoma S, Botella J, Somerville CR (1991). Isolation of a cDNA clone for spinach lipid transfer protein and evidence that the protein is synthesized by the secretory pathway. *Plant Physiol*, 95 (1): 164~170
- Boutrot F, Chantret N, Gantier MF (2008). Genome-wide analysis of the rice and *Arabidopsis non-specific lipid transfer protein (nsLtp)* gene families and identification of wheat *nsLtp* genes by EST data mining. *BMC Genomics*, 9: 86
- Boutrot F, Guirao A, Alary R, Joudrier P, Gautier MF (2005). Wheat non-specific lipid transfer protein genes display a complex pattern of expression in developing seeds. *Biochem Biophys Acta*, 1730 (2): 114~125
- Carvalho AO, Gomes VM (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology—A concise review. *Peptides*, 28 (5): 1144~1153
- Doulliez JP, Michon T, Elmorjani K, Marion D (2000). Structure, biological and technological functions of lipid transfer proteins and indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J Cereal Sci*, 32 (1): 1~20
- Hincha DK, Neukamm B, Srer HA, Sieg F, Weckwarth W, Ruckels M, Lullien-Pellerin V, Schroder W, Schmitt JM (2001). Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol*, 125 (2): 835~846
- Jang CS, Yim WC, Moon JC (2008). Evolution of non-specific lipid transfer protein (nsLTP) genes in the Poaceae family: their duplication and diversity. *Mol Genet Genomics*, 279 (5): 481~497
- Liu YJ, Samuel D, Liu CH, Lyu PC (2002). Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochem Biophys Res Commun*, 294 (3): 535~540
- Pagnussat LA, Lombardo C, Regente M, Pinedo M, Martin M, Canal L (2009). Unexpected localization of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol*, 166 (8): 797~806
- Samuel D, Liu YJ, Cheng CS (2002). Solution structure of plant non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol Chem*, 277 (38): 35267~35273
- Sodano P, Caille A, Sy D, de Person G, Marion D, Ptak M (1997). ^1H NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. *Global fold of the complex*. *FEBS Lett*, 416 (2): 130~134
- Sossountzov L, Ruiz-Avila L, Vignols F, Jolliot A, Arondel V, Tchanga F, Grosbois M, Guerbette F, Miginiac E, Delseny M et al (1991). Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3 (9): 923~933
- Verdoy D, Lucas MM, Manrique E, Covarrubias AA, Defelipe MR, Pueyo JJ (2004). Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Cell Environ*, 27 (6): 757~767
- Wang HB, Zou ZR, Wang SS, Gong M (2013). Global analysis of transcriptome responses and gene expression profiles to cold stress of *Jatropha curcas* L. *PLoS ONE*, 12: e82817
- Wang HB, Zou ZR, Wang SS, Gong M (2014). Deep sequencing-based transcriptome analysis of the oil-bearing plant *Physic Nut (Jatropha curcas L.)* under cold stress. *Plant Omics J*, 7 (3): 178~187
- Zachowski A, Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader JC (1998). Characterization of acyl binding by a plant lipid-transfer protein. *Eur J Biochem*, 257 (2): 443~448