

菘蓝环硫指定蛋白基因*IiESP*的克隆及其编码产物的亚细胞定位

马燕勤, 李典珍, 姚静雯, 李琦, 徐子勤*

西北大学生命科学学院, 陕西省生物技术重点实验室, 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室, 西安710069

摘要: 为了探究十字花科植物环硫指定蛋白(ESP)对硫代葡萄糖苷分解的导向作用所具有的生物学功能, 从菘蓝中克隆了*IiESP*基因的cDNA和基因组序列, 并分析了其表达模式。在此基础上利用GFP标签对*IiESP*蛋白进行了亚细胞定位, 并根据氨基酸序列预测了该蛋白的三维结构。结果表明: *IiESP*基因含有2个外显子和1个内含子, 其基因组、cDNA和ORF序列长度分别为1 555、1 315和1 164 bp。*IiESP*蛋白由387个氨基酸构成, 含有5个Kelch模块, 可折叠形成球状超螺旋管结构。多重比对发现*IiESP*与欧洲菘蓝ItESP、拟南芥AtESP和甘蓝BoESP在氨基酸序列上的一致性分别为79%、76%和77%。通过农杆菌渗入法在本氏烟草叶片表皮细胞中瞬时表达*IiESP*基因, 证实*IiESP*蛋白定位于叶绿体中。RT-PCR分析结果显示, *IiESP*主要在下胚轴、茎、早期花序、成熟花序、花、萼片和花瓣中表达, 其在花被中的高活性可能与吸引昆虫进行传粉有关。

关键词: 菘蓝; 环硫指定蛋白; 表达分析; 亚细胞定位; Kelch模块

植物细胞能够合成各种各样的次生代谢产物, 这些物质可以提供防御食草性动物的功能, 对植物有保护作用。硫代葡萄糖苷(glucosinolate, 又名葡萄糖异硫氰酸盐或芥子油苷)是十字花科植物组织中含有的一类重要的含硫次生代谢产物, 其主链由一个 β -硫代葡萄糖残基、一个N-羟基氨基硫酸酯和一个可变的侧链组成(Rodman等1998)。通常根据是否来自脂肪族氨基酸、芳香族氨基酸或者色氨酸将硫代葡萄糖苷划分为脂肪类、芳香类和吲哚类3种类型(Kliebenstein等2005)。

硫代葡萄糖苷-黑芥子酶(myrosinase, 亦称为葡萄糖硫苷酶, EC 3.2.1.147)体系是十字花科植物中最具化学活性的防御体系。在完整的植物组织中, 硫代葡萄糖苷和黑芥子酶是完全分开的。硫代葡萄糖苷存在于液泡中, 相对较为稳定; 黑芥子酶则存在于特定的蛋白体中。当细胞受到伤害时, 硫代葡萄糖苷和黑芥子酶的区室化分布被破坏, 作为底物的硫代葡萄糖苷和作为催化剂的黑芥子酶就会相互接触(Halkier和Gershenzon 2006), 硫代葡萄糖苷被水解成异硫氰酸酯、硫氰酸酯和腈类等具有不同毒性的物质(Bones和Rossiter 1996), 使植物个体对食草动物和微生物病原体表现出抗性(Buxdorf等2013)。

硫代葡萄糖苷-黑芥子酶体系还包括一类蛋白质因子——环硫指定蛋白(epithiospecifier protein, ESP), 它们能够间接地影响黑芥子酶对硫代葡萄糖苷的分解作用, 使水解产物从异硫氰酸盐变为具有环硫结构的腈类物质(Matusheski等2006;

Brandt等2014)。ESP蛋白存在于许多植物中, 但也有些含硫代葡萄糖苷的植物没有ESP蛋白。根据硫代葡萄糖苷侧链的不同, 水解产物可以是异硫氰酸盐、环硫腈类或简单腈类。在黑芥子酶的作用下, 硫代葡萄糖苷的糖苷键被打断, 脱去1分子葡萄糖后形成一个不稳定的酰基。在生理条件下, 酰基自发重排形成异硫氰酸盐。但是当ESP存在时, 酰基更倾向于重排形成腈类化合物(图1)(Bernardi等2000)。

尽管已有研究证明异硫氰酸盐对许多微生物和个别食草昆虫是有毒的, 但是腈类化合物和环硫指定蛋白是否具有类似的作用还不清楚(Wittstock等2003)。ESP是一类不稳定的小分子蛋白, 不具有酶活性, 最早是从海甘蓝种子中分离得到的(Tookey 1973), 随后在油菜中也发现了这种蛋白质(Foo等2000; Bernardi等2000)。在拟南芥中, ESP位点的遗传多样性与个体对多种草食性动物的抗性相关。已有的研究结果显示, 与水解形成异硫氰酸盐的植物相比, 形成腈类的植物更容易受到鳞翅类幼虫的伤害(Lambrix等2001), 这说明ESP对硫代葡萄糖苷分解的导向作用有助于鳞翅类幼虫的发育和生长(Burow等2006)。另外, 在绣线菊和拟南芥中还找到了能够负调节ESP活性的*EPITH-*

收稿 2015-10-15 修定 2015-12-14

资助 国家自然科学基金(30870194和J1210063)、陕西省重点实验室科研计划(15JS111、12JS103和2010JS090)和西北大学研究生创新计划(YZZ14076和YZZ13068)。

* 通讯作者(E-mail: ziqinxu@nwu.edu.cn)。

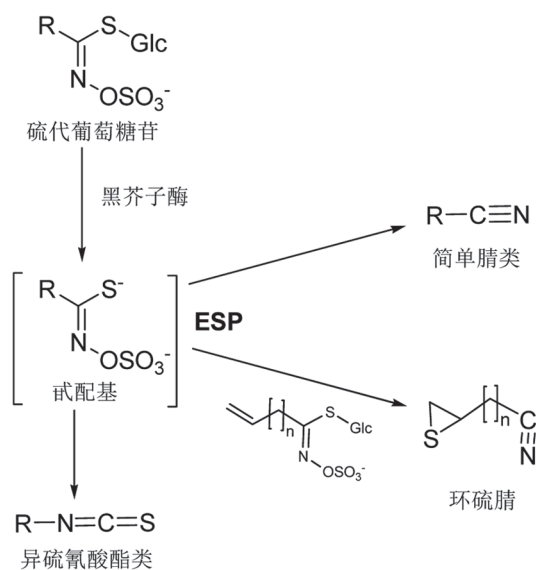


图1 硫代葡萄糖苷的酶解途径

Fig.1 Enzymolysis pathway of glucosinolate

*IOSPECIFIER MODIFIER1*基因, 可以使硫代葡萄糖苷主要分解为异硫氰酸盐, 说明植物次生代谢产物的分解具有复杂的调控机制(Kissen等2012; Slabaugh等2015)。

目前已经通过分析粗提物研究了许多十字花科植物ESP蛋白的活性, 如海甘蓝(*Crambe abyssinica*)、芜菁(*Brassica campestris ssp. rapifera*)、孢子甘蓝(*Brassica oleracea var. gemmifera*)、结球甘蓝(*Brassica oleracea var. capitata*)和拟南芥等(Verhoeven等1997; Brandt等2014)。采用同样的方法, 在甘蓝型油菜(*Brassica napus ssp. oleifera*)中也发现了ESP蛋白, 并对其部分肽段的氨基酸序列进行了鉴定(Bernardi等2000)。

随着分子生物学的进展, 人们已经开始研究ESP基因在植物体内的调节机制以及能够影响其表达的外部环境因素。例如在白菜中分析了信号分子茉莉酸对ESP表达的诱导作用(王政等2012), 但相关工作在菘蓝中尚未见报道, ESP在菘蓝属植物中对硫代葡萄糖苷分解代谢的调控作用也还不清楚。为了阐明ESP在菘蓝中的功能, 本研究分离了菘蓝的环硫指定蛋白基因*IiESP*, 并对其功能进行了初步分析。

材料与方法

1 试验材料和菌种

植物材料为温室中种植的菘蓝(*Isatis indigotica*

Fortune)植株。克隆实验采用的宿主细胞为大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5α菌株。植物遗传转化实验采用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404菌株。植物双元表达载体为pCAM-BIA1302。

2 引物合成

试验所用引物及其序列见表1。根据拟南芥*AtESP*编码区和起始密码子前保守区域设计简并引物(上游M1、M2和M3, 下游M4、M5和M6), 扩增得到保守片段。根据cDNA片段设计引物, 用ESP-3'RACE和oligo dT18扩增*IiESP* 3'端, 用ESP-5'RPrimer和UPM以及NUP (来自Clontech RACE试剂盒)扩增*IiESP* 5'端。用cDNA设计引物ESP-Upstream1和ESP-Upstream2扩增*IiESP* 5'UTR。用ESP-Downstream1和ESP-Downstream2扩增*IiESP*的内含子区域。ESP-gfp-FPrimer和ESP-gfp-RPrimer用于构建植物双元表达载体。ESP-FPrimer和ESP-RPrimer用于鉴定*IiESP*在不同组织中的表达水平。引物IactinF和IactinR用于参照基因*Actin* (GenBank登记号AY870652.1)的表达分析。

3 RNA提取和cDNA第一链的合成

采集菘蓝的花, 用于RNA提取和cDNA合成。RNA的提取采用Trizol法。在分离保守区和3'端序列时, 使用反转录试剂盒PrimeScript[®] 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara)合成cDNA。在分离5'端序列时, 使用SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)合成cDNA。

4 cDNA保守区、5'端和3'端的扩增

在扩增保守区时, PCR反应体系的总体积为20 μL, 含有10 μL 2×Master Mix、1 μL上游引物(M1、M2和M3)、1 μL下游引物(M4、M5和M6)、1 μL模板cDNA和7 μL ddH₂O。PCR扩增条件为: 94°C预变性10 min; 94°C变性30 s, 48°C退火30 s, 72°C延伸1 min, 35个循环; 最后在72°C延伸10 min。

采用巢式Touchdown PCR方法扩增*IiESP* cDNA的5'端。第1次PCR反应体系的总体积为50 μL, 含5 μL 10×Advantage2 PCR Buffer、1 μL dNTP Mix (10 mmol·L⁻¹)、1 μL 50×Advantage2 polymerase Mix (TaKaRa)、34.5 μL PCR-Grade

表1 文中用到的引物

Table 1 Primers used in the present work

引物名称	序列(5'→3')	备注
M1	ATGGGRAGRGGDARRGTBCA	保守区域扩增
M2	ATGGGRAGRGGDARRGTBGA	保守区域扩增
M3	ATGGGRAGRGGDARRATHGA	保守区域扩增
M4	ATSARRGCDACYTCDGCRTC	保守区域扩增
M5	CKYTCNARDATNCKYTCCAT	保守区域扩增
M6	GAGAAGAYGATSARRGCDAC	保守区域扩增
ESP-3'RACE	GACATTCCTCGAAAAGAAGAG	cDNA扩增
ESP-5'RPrimer	CTACCGCAGTTGCAAAGACGCTCCTTGC	cDNA扩增
ESP-Upstream1	GGGTTGACATCGTCCCGCCTTGTTTC	基因组扩增
ESP-Upstream2	AGTCTCGGGTCTCCCATCTCACCGAG	基因组扩增
ESP-Downstream1	CTTCGGCAAGGAGCGTCTTGCAACTGC	基因组扩增
ESP-Downstream2	ACGGTCCAGGAAGTTGTCTAATGAAGG	基因组扩增
ESP-gfp-FPrimer	GCGCCATGGATGAATATTCATGTAAATTC	载体构建
ESP-gfp-RPrimer	GCGACTAGTCGCGGAATTGACTGCGTAGAAG	载体构建
ESP-FPrimer	ATGAATATTCATGTAAATTC	表达分析
ESP-RPrimer	TCACGCGGAATTGACTGCGTAG	表达分析
lactinF	TATTGTTGGTCTGCCAGGC	<i>Actin</i> 检测
lactinR	ACGACCACTGGCGTAAAGAG	<i>Actin</i> 检测

R: 腺嘌呤或鸟嘌呤; D: 非胞嘧啶; B: 非腺嘌呤; H: 非鸟嘌呤; Y: 胞嘧啶或胸腺嘧啶; K: 鸟嘌呤或胸腺嘧啶; S: 胞嘧啶或鸟嘌呤; N: 腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤或胸腺嘧啶。

Water、5 μ L 10 \times UPM (Clontech)、1 μ L 10 \times ESP-5'RPrimer和2.5 μ L cDNA模板。PCR扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 25个循环。第2次PCR的模板为1 μ L第1次PCR产物, 上游引物为1 μ L 10 \times NUP (Clontech), 其他试剂和PCR条件均保持不变。

liESP cDNA 3'端扩增的PCR反应体系总体积为25 μ L, 含0.25 μ L LA *Taq* DNA polymerase (TaKaRa)、2.5 μ L 10 \times Buffer、2.5 μ L dNTP Mix、0.5 μ L oligo dT18引物、0.5 μ L ESP-3'RACE引物、1 μ L模板cDNA和17.75 μ L ddH₂O。PCR扩增条件: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 48 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 32个循环; 72 $^{\circ}$ C再延伸10 min。

从凝胶中回收PCR产物, 与pMD18-T载体连接, 然后转化到大肠杆菌DH5 α 菌株中。提取质粒DNA进行菌落PCR鉴定, 将阳性菌株送到上海生工生物技术有限公司进行测序。通过NCBI BLAST在线工具(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)对测序结果进行同源性搜索, 使用DNASar、DNAMAN等软件包进行序列比对分析。

5 *liESP*基因组DNA的扩增

利用CTAB法提取菘蓝基因组DNA, 用于构建基因组步移文库。利用Universal GenomeWalkerTM 2.0 Kit (Clontech)中提供的4种限制性内切酶分别切割基因组DNA, 反应条件为37 $^{\circ}$ C酶切16 h。给4种酶切产物加上接头, 反应条件为4 $^{\circ}$ C连接16 h, 然后在70 $^{\circ}$ C处理5 min终止反应。文库构建完成后, 需要进行2次PCR。第1次PCR的引物为试剂盒提供的Adaptor primer1 (AP1)以及来自cDNA的*liESP*特异性引物ESP-Upstream1和ESP-Downstream1。将纯化的第1次PCR产物作为第二PCR反应的模板, 第2次PCR反应的引物为试剂盒提供的Adaptor primer2 (AP2)以及来自cDNA的*liESP*特异性引物ESP-Upstream2和ESP-Downstream2。两次PCR均为Touchdown PCR。回收第2次PCR产物, 连接至pMD18-T载体。转化大肠杆菌后提取质粒DNA进行菌落PCR鉴定, 将阳性菌落送到上海生工生物技术有限公司进行测序。

6 不同组织中*liESP*基因的表达分析

表达分析以根、下胚轴、莲座叶、茎生叶、茎、茎尖、花序、花、花萼、花瓣、雄蕊、雌蕊

和短角果为材料。将0.2 g不同材料在液氮中研磨成粉末状,用TRIzol试剂提取总RNA,用反转录试剂盒PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)合成cDNA 第一链,然后进行PCR检测。PCR体系的总体积为20 μ L,含10 μ L 2 \times Master Mix、7 μ L ddH₂O、1 μ L ESP-FPrimer、1 μ L ESP-RPrimer和1 μ L模板cDNA。PCR扩增条件:94°C预变性10 min;94°C变性30 s,58°C退火30 s,72°C延伸90 s,35个循环;72°C再延伸10 min。用菘蓝*Actin*基因作为内参。

7 植物双元表达载体的构建和鉴定

取0.2 g花于液氮中研磨成粉状,用TRIzol法提取RNA,用反转录试剂盒PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)反转录生成第一链cDNA,作为PCR模板。PCR反应体系的总体积为20 μ L,含0.4 μ L Prime STAR GXL DNA Polymerase (TaKaRa)、4 μ L 5 \times PrimeSTAR GXL Buffer、1.6 μ L dNTP、11 μ L ddH₂O、1 μ L ESP-gfp-FPrimer、1 μ L ESP-gfp-RPrimer和1 μ L cDNA模板。PCR条件:94°C预变性10 min;94°C变性30 s,60°C退火30 s,72°C延伸90 s,35个循环;72°C再延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳分离后,进行胶回收。用限制性内切酶*Bgl*II和*Spe*I对扩增产物和植物双元表达载体pCAMBIA1302进行双酶切,反应条件为37°C消化8 h。电泳分离后从琼脂糖凝胶中回收线性化的pCAMBIA1302载体大片段和*IiESP*片段,用T₄ DNA连接酶在16°C过夜连接,然后转化到大肠杆菌DH5 α 中。在附加50 mg·L⁻¹卡那霉素的LB固体培养基上进行选择培养,对具有Kan抗性的克隆进行菌落PCR鉴定,将鉴定正确的菌液送往上海生工生物技术有限公司进行测序。通过扩大培养从测序正确的菌落提取质粒DNA,采用冻融法将重组质粒转入农杆菌LBA4404菌株,经菌液PCR检测后将得到的阳性克隆保存于-70°C。

8 *IiESP*在本氏烟草叶片细胞中的瞬时表达

对-80°C保存的含有*IiESP-gfp*融合表达载体和*gfp*空载体的根癌农杆菌LBA4404进行划线培养,挑取单菌落接种于5 mL含有20 mg·L⁻¹利福平、50 mg·L⁻¹链霉素和50 mg·L⁻¹卡那霉素的YEB液体培养基(5 g·L⁻¹蛋白胨、1 g·L⁻¹酵母提取物、5 g·L⁻¹蔗糖和0.493 g·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, pH 7.0)中,

180 r·min⁻¹、28°C培养至对数生长期。再以菌液与培养基1:100的比例扩大培养,至所需OD值。选取生长3周的本氏烟草植株叶片,用75%乙醇擦洗其下表皮,用5 mL无针头医用注射器吸取不同浓度的菌液,将注射器顶端紧贴住叶片下表面(避开叶脉),从下表皮经气孔将菌液缓缓渗入叶片内。之后将注射过菌液的叶片用锡箔纸包裹,在人工气候室中于22~24°C进行避光培养。在不同的时间段进行取样,撕取烟草叶片下表皮,压片后用激光共聚焦显微镜观察荧光信号。检测绿色荧光的激发光波长为488 nm,发射光波长为625~725 nm。

实验结果

1 *IiESP* cDNA 3'端和5'端序列的克隆

以菘蓝cDNA第一链为模板,利用引物Oligo dT18和ESP-3'RACE进行PCR扩增,得到约600 bp的3'端片段(图2-B),经测序为628 bp。采用Clontech RACE试剂盒中的引物UPM和菘蓝*IiESP*基因的特异性引物ESP-5'RPrimer进行PCR,扩增得到约1 000 bp的5'端片段(图2-C),经测序为945 bp。对3'端和5'端序列进行拼接,得到*IiESP* cDNA全长序列,大小为1 315 bp。

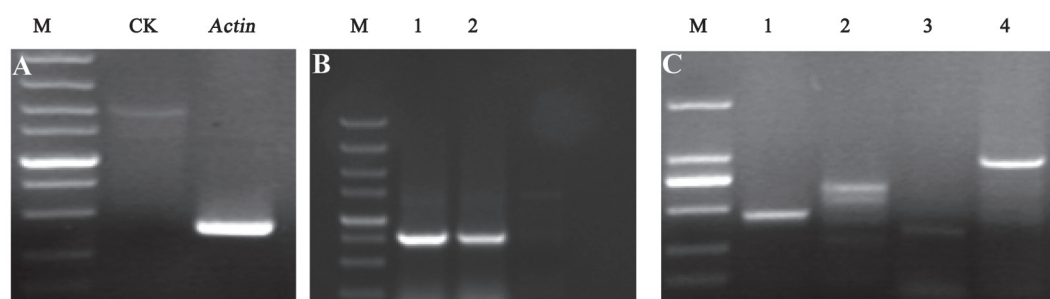
2 *IiESP*基因组序列的克隆

以ESP-Upstream1/2和AP1/2 (Clontech)以及ESP-Downstream1/2和AP1/2 (Clontech)为引物,以经过酶切且连有接头的基因组DNA为模板,分别扩增*IiESP*的启动子区域和下游序列,得到的片段长度分别为800 bp (图3-A)和约1 kb (图3-B)。

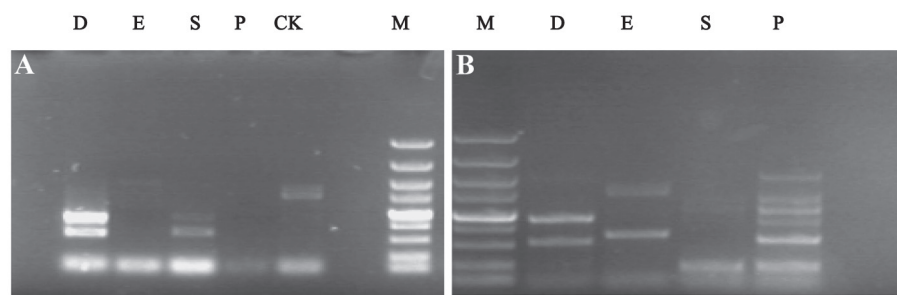
将回收的片段连接至pMD18-T载体,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞后进行菌落PCR鉴定。将阳性克隆送至上海生工生物技术有限公司测序,得到797 bp的上游启动子区域和945 bp的下游序列。拼接得到的*IiESP*基因组序列全长为1 555 bp。基因组、cDNA和编码序列比对结果显示*IiESP*基因包含2个外显子和1个内含子(图4)。

3 *IiESP*编码蛋白的结构分析

以ESP-FPrimer和ESP-RPrimer为引物,以反转录生成的cDNA第一链为模板,扩增*IiESP*基因的开放阅读框(ORF),得到长约1.1 kb的片段(图5-A和B)。序列分析结果表明,*IiESP*基因的编码序列长1 164 bp,可编码387个氨基酸。利用氨基酸序列

图2 *IiESP* cDNA的扩增Fig.2 Amplification of *IiESP* cDNA

A: *Actin* cDNA片段的扩增, 其中M为DL5000 DNA Marker, CK为试剂盒阳性对照; B: *IiESP* cDNA 3'端的扩增, 其中M为DL5000 DNA Marker, 1和2为3'端目的产物; C: *IiESP* cDNA 5'端的扩增, 其中M为DL2000 DNA Marker, 1~4分别为*IiAPI1*、*IiSEP1*、*IiSEP3*和*IiESP*基因的5'端目的产物。

图3 *IiESP*基因组序列的扩增Fig.3 Amplification of the genomic DNA of *IiESP*

A: *IiESP*基因启动子序列的扩增; B: *IiESP*基因下游序列的扩增。M: DL5000 DNA Marker; D: 模板为*DraI*酶切片段; E: 模板为*EcoRV*酶切片段; S: 模板为*StuI*酶切片段; P: 模板为*PvuII*酶切片段; CK: 试剂盒对照。

进行BLAST搜索, 发现*IiESP*蛋白含有5个Kelch模块(图6), 同时还能够找到2个重叠的Kelch模块, 每个Kelch模块由4个串联的 β 折叠片组成(图7-A)。进一步通过SWISS-MODEL在线工具(<http://swiss-model.expasy.org/>)进行建模分析, 结果显示这些Kelch模块通过分子内相互作用形成了一个大的球状超螺旋管结构, 即 β 螺旋管结构域(图7-B)。通过氨基酸序列比对发现*IiESP*蛋白与欧洲菘蓝*ItESP*、甘蓝*BoESP*和拟南芥*AtESP*的一致性(identity)很高, 分别为79%、77%和76%(图8)。

4 *IiESP*基因的表达模式分析

以ESP-FPrimer和ESP-RPrimer为引物, 通过RT-PCR检测了*IiESP*在菘蓝不同组织和器官中的表达水平, 发现*IiESP*在茎生叶中不表达, 在根、莲座叶、早期花序、雄蕊、雌蕊和果实中的表达量较低, 在下胚轴、茎、茎尖、成熟花序、花、萼片和花瓣中的活性很高(图9)。

5 *IiESP*蛋白的亚细胞定位

本实验所用的定位载体为pCAMBIA1302, 在35S启动子和*gfp*报告基因之间有3个酶切位点, 在构建融合表达载体时选择了*BglII*和*SpeI*两个酶切位点。在扩增目的片段时, 上游引物5'端引入了*BglII*限制性酶切位点, 下游引物5'端引入了*SpeI*限制性酶切位点。以菘蓝花cDNA第一链为模板进行PCR扩增, 得到长约1.2 kb的片段(图10-A)。从凝胶中回收DNA片段, 用限制性内切酶*BglII*和*SpeI*进行双酶切, 然后连接至用相同限制性内切酶线性化的pCAMBIA1302空载体中。对转化DH5 α 感受态细胞得到的抗性克隆进行菌液PCR鉴定(图10-B), 对阳性克隆进行测序, 结果显示序列完全正确。通过液氮冻融法将重组质粒导入LBA4404菌株, 经菌液PCR鉴定后用阳性克隆(图10-C)进行亚细胞定位实验。

将OD₆₀₀为0.8的农杆菌菌液渗入本氏烟草叶

Genomic DNA AAAAATGTTACAAAACCTGATATTTAGTCACGTAGATTTTACGCTATAAATAGACAACA
cDNA
ORF

Genomic DNA TCGAAAGAACTGAAGGACACAACAAGCAGAAAAGCAAAAGACTTGAGAAACAACAGAAAAATTAAGACTTTTGTGCTTCTATTGCGAGAAGAA
cDNA CGAGAAGAA
ORF

Genomic DNA CATGAATATTCATGTAAATTCACCTCAAATCCACCATGCCATACCAATCTGTCCCGCTCGGTCACCAAGTTCGTTATGCCTCGCAACTGTTC
cDNA CATGAATATTCATGTAAATTCACCTCAAATCCACCATGCCATACCAATCTGTCCCGCTCGGTCACCAAGTTCGTTATGCCTCGCAACTGTTC
ORF ATGAATATTCATGTAAATTCACCTCAAATCCACCATGCCATACCAATCTGTCCCGCTCGGTCACCAAGTTCGTTATGCCTCGCAACTGTTC

Genomic DNA GTC AAGCCTCACACATCTCTACTCGGAGTCTGAAAATCGCAGCTGTGGCTCCAACCTTGC AAGGCGAGTGGATCAAGGTATAGATTATTTATTTTGGC
cDNA GTC AAGCCTCACACATCTCTACTCGGAGTCTGAAAATCGCAGCTGTGGCTCCAACCTTGC AAGGCGAGTGGATCAAGGT
ORF GTC AAGCCTCACACATCTCTACTCGGAGTCTGAAAATCGCAGCTGTGGCTCCAACCTTGC AAGGCGAGTGGATCAAGGT

Genomic DNA AAGGATTCTATTTACCATGTTGTTTTAATATCTCACAAATTCATCATCAACATCATCATGGGTATCATCATCATCATCATGTTTTGGTAATAGGTG
cDNA G
ORF G

Genomic DNA GAGCAGAAAGGAGAAAGGCACCAGGAAATAGATGCTCGCAGCGCATAGCTGTGGTGGGGAC AAGCTCTACTCTTTCCGGGGCGAGTTAGAGACAAA
cDNA GAGCAGAAAGGAGAAAGGCACCAGGAAATAGATGCTCGCAGCGCATAGCTGTGGTGGGGAC AAGCTCTACTCTTTCCGGGGCGAGTTAGAGACAAA
ORF GAGCAGAAAGGAGAAAGGCACCAGGAAATAGATGCTCGCAGCGCATAGCTGTGGTGGGGAC AAGCTCTACTCTTTCCGGGGCGAGTTAGAGACAAA

Genomic DNA CGTTGCCATCGACAAAGACCTTTACGTCCTTGACCTCAACACTCAAAAATGGTCAATCGCTCCGGCAACCGAGACGTCCTTATATCAGCAGCTTCG
cDNA CGTTGCCATCGACAAAGACCTTTACGTCCTTGACCTCAACACTCAAAAATGGTCAATCGCTCCGGCAACCGAGACGTCCTTATATCAGCAGCTTCG
ORF CGTTGCCATCGACAAAGACCTTTACGTCCTTGACCTCAACACTCAAAAATGGTCAATCGCTCCGGCAACCGAGACGTCCTTATATCAGCAGCTTCG

Genomic DNA GGGTCCGCACGGTGGCCGTGGGAACCTAAGCTCTATGTCTTCGGAGGCCGCAATGAGAAGAAAGTGCCTAACGACTTTTACTCGTACGATACGGTGACG
cDNA GGGTCCGCACGGTGGCCGTGGGAACCTAAGCTCTATGTCTTCGGAGGCCGCAATGAGAAGAAAGTGCCTAACGACTTTTACTCGTACGATACGGTGACG
ORF GGGTCCGCACGGTGGCCGTGGGAACCTAAGCTCTATGTCTTCGGAGGCCGCAATGAGAAGAAAGTGCCTAACGACTTTTACTCGTACGATACGGTGACG

Genomic DNA AACGAGTGGAAAGTTCCTGACGAAGCTCGGTGAGATGGGAGGACCCGAGACTCGTACTTACCACCTCGATGGCTTCGGATGAAAACACGCTGTACGTAT
cDNA AACGAGTGGAAAGTTCCTGACGAAGCTCGGTGAGATGGGAGGACCCGAGACTCGTACTTACCACCTCGATGGCTTCGGATGAAAACACGCTGTACGTAT
ORF AACGAGTGGAAAGTTCCTGACGAAGCTCGGTGAGATGGGAGGACCCGAGACTCGTACTTACCACCTCGATGGCTTCGGATGAAAACACGCTGTACGTAT

Genomic DNA CCGTGGGTGAACCAAGGCGGGACGATGTCAACCCCTTTCCGTTTCAGAACGGTTCGAGTCGTAT AACATTTGCTGATGGGAAATGGGTTCAGCTACCTG
cDNA CCGTGGGTGAACCAAGGCGGGACGATGTCAACCCCTTTCCGTTTCAGAACGGTTCGAGTCGTAT AACATTTGCTGATGGGAAATGGGTTCAGCTACCTG
ORF CCGTGGGTGAACCAAGGCGGGACGATGTCAACCCCTTTCCGTTTCAGAACGGTTCGAGTCGTAT AACATTTGCTGATGGGAAATGGGTTCAGCTACCTG

Genomic DNA ATCTTGAGACAACCTTCGAGAAAAGAGGAGGAGCCGGATTCATGTGGTGAAGGGAAGATTTGGGTGTGTTACGGGTTTGC GACTTCGCTTACGCCIT
cDNA ATCTTGAGACAACCTTCGAGAAAAGAGGAGGAGCCGGATTCATGTGGTGAAGGGAAGATTTGGGTGTGTTACGGGTTTGC GACTTCGCTTACGCCIT
ORF ATCTTGAGACAACCTTCGAGAAAAGAGGAGGAGCCGGATTCATGTGGTGAAGGGAAGATTTGGGTGTGTTACGGGTTTGC GACTTCGCTTACGCCIT

Genomic DNA GATGGGAAAAATGACTATGAGTCTGATAAAGTGAATTTTATGATCCCGCTTCTCAAAAATGGACTCAAGTAGAGACTAAAGGAGACAACCTTCGGC
cDNA GATGGGAAAAATGACTATGAGTCTGATAAAGTGAATTTTATGATCCCGCTTCTCAAAAATGGACTCAAGTAGAGACTAAAGGAGACAACCTTCGGC
ORF GATGGGAAAAATGACTATGAGTCTGATAAAGTGAATTTTATGATCCCGCTTCTCAAAAATGGACTCAAGTAGAGACTAAAGGAGACAACCTTCGGC

Genomic DNA AAGGAGCGCTTTTGAACCTGCGGTAGTGGGAAAACATATCTAATATTCGGAGGTGAGACTGGCCGGACCCAAATGGCCATACGGTCCAGGGAAGT
cDNA AAGGAGCGCTTTTGAACCTGCGGTAGTGGGAAAACATATCTAATATTCGGAGGTGAGACTGGCCGGACCCAAATGGCCATACGGTCCAGGGAAGT
ORF AAGGAGCGCTTTTGAACCTGCGGTAGTGGGAAAACATATCTAATATTCGGAGGTGAGACTGGCCGGACCCAAATGGCCATACGGTCCAGGGAAGT

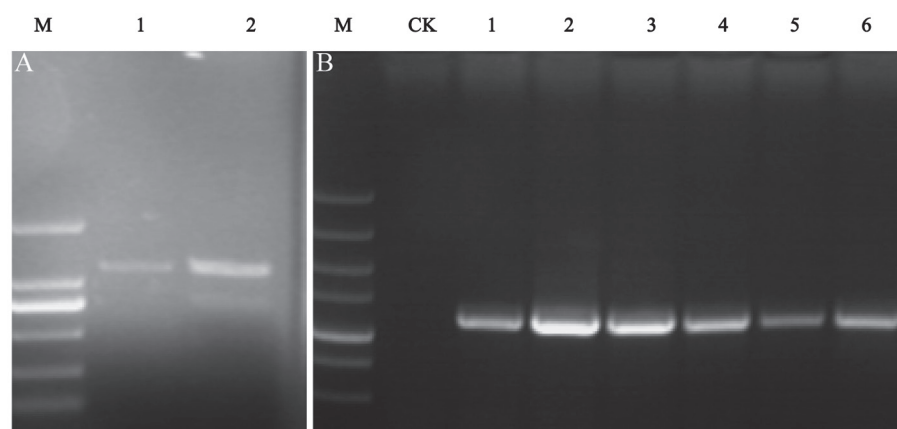
Genomic DNA TGTCTAATGAAGTTTTTCGATTTGGACACAGAGACATTTGGTCTGGGAGAGTTTGGAGGAGGGATGAACCGGCTACACGTGGTGGACGGCTTCCACT
cDNA TGTCTAATGAAGTTTTTCGATTTGGACACAGAGACATTTGGTCTGGGAGAGTTTGGAGGAGGGATGAACCGGCTACACGTGGTGGACGGCTTCCACT
ORF TGTCTAATGAAGTTTTTCGATTTGGACACAGAGACATTTGGTCTGGGAGAGTTTGGAGGAGGGATGAACCGGCTACACGTGGTGGACGGCTTCCACT

Genomic DNA GCTGCTACAGCCTATGGGAAGAAAGGCTCTTTCATGCATGGAGGAAAAATTCGACCAATGACCGAAGTGAAGTCTACTTCTACGCAGTCAATTC
cDNA GCTGCTACAGCCTATGGGAAGAAAGGCTCTTTCATGCATGGAGGAAAAATTCGACCAATGACCGAAGTGAAGTCTACTTCTACGCAGTCAATTC
ORF GCTGCTACAGCCTATGGGAAGAAAGGCTCTTTCATGCATGGAGGAAAAATTCGACCAATGACCGAAGTGAAGTCTACTTCTACGCAGTCAATTC

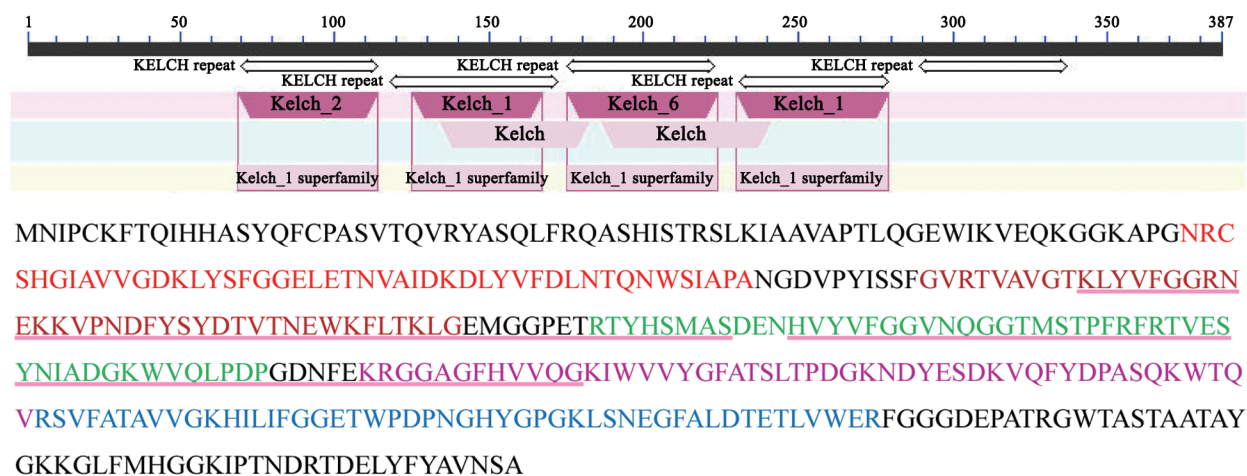
Genomic DNA CCGGTGATCAGTGTCTCAAGATTAATATGTTTTTTTTTTGGTGAAGTCAAGATTAATATGTTTTGTGTTATATGGTGGATTTTGGATTTATATG
cDNA CCGGTGATCAGTGTCTCAAGATTAATATGTTTTTTTTTTGGTGAAGTCAAGATTAATATGTTTTGTGTTATATGGTGGATTTTGGATTTATATG
ORF CCGGTGA

Genomic DNA ATCCAATAAAGGTTTGTGAACCTT
cDNA ATCCAATAAAGGTTTGTGAACCTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
ORF

图4 *IiESP*基因的结构Fig.4 The structure of *IiESP*

图5 *liESP*基因编码序列的克隆Fig.5 Cloning of the coding sequence of *liESP*

A: 编码序列的扩增, 其中M为DL2000 DNA Marker, 1和2为编码序列; B: 编码序列的菌液PCR鉴定, 其中M为DL5000 DNA Marker, CK为阴性对照, 1~6为不同的大肠杆菌抗性克隆。

图6 *liESP*蛋白的保守性模块Fig.6 The conserved motifs in *liESP*

5种不同颜色代表不同的Kelch模块, 下划线表示2个重叠的Kelch模块。

片下表皮, 在避光条件下共培养40 h, 以获得最佳的瞬时表达效果。通过激光共聚焦显微镜检测荧光信号, 发现*liESP*-GFP融合蛋白产生的绿色荧光定位在叶绿体中, 可以与叶绿体红色荧光重合(图11-B、D、F和H)。相反, 空载体中GFP基因表达产生的绿色荧光分布在细胞质中, 不能与叶绿体的红色荧光重合(图11-A、C、E和G)。

讨 论

硫代葡萄糖苷是十字花科植物中一类主要的含硫次生代谢产物, 在黑芥子酶的催化下可水解

生成异硫氰酸盐、腈类化合物、氰基环硫烷烃类化合物、硫酸盐、硫元素以及葡萄糖等。这些化合物中有些对植物防御害虫和微生物病原体十分重要。另外, 硫代葡萄糖苷和它的代谢产物也具有保健活性(Bones和Rossiter 1996)。已有的研究发现硫代葡萄糖苷及其代谢产物对菜青虫和小菜蛾等寄主专一性昆虫以及桃蚜和甘蓝夜蛾等杂食性昆虫均具有抵抗和防御作用(Kim等2008)。根据侧链化学性质和水解条件的不同, 硫代葡萄糖苷可以水解形成不同类型的产物。比如, 侧链为脂肪类的硫代葡萄糖苷在pH=7.0的条件下会水解生成

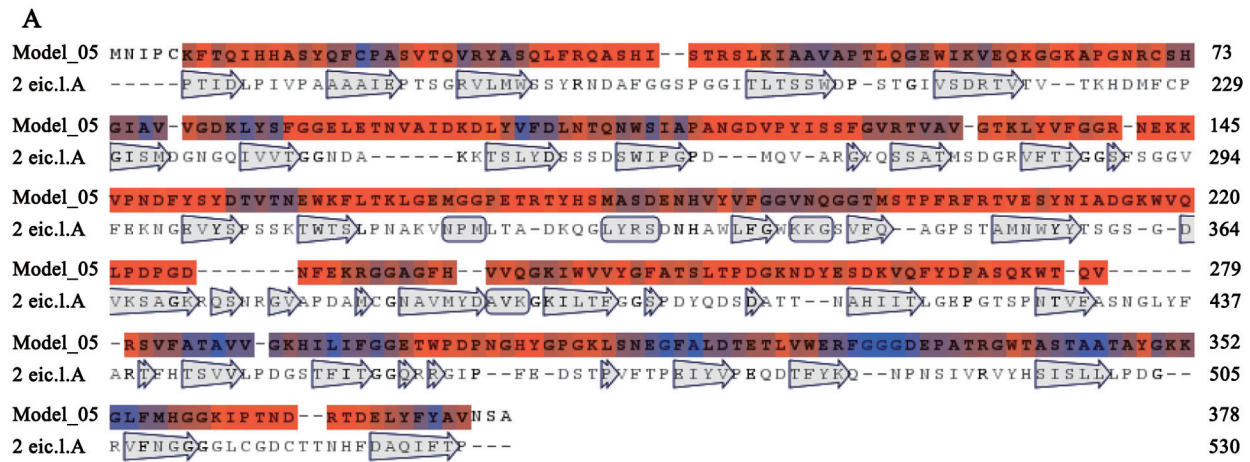
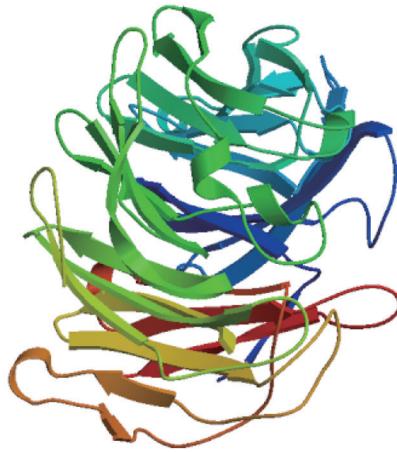
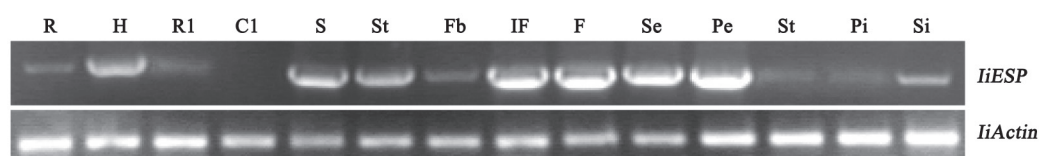
**B**

图7 IiESP蛋白的结构分析和建模

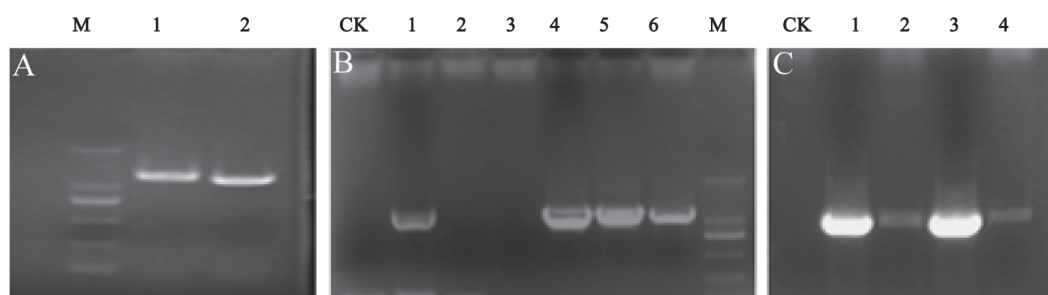
Fig.7 Structure analysis and modeling of IiESP

A: 二级结构预测; B: 利用SWISS-MODEL建立的三维结构。

ITESP	M	A	P	S	V	Q	G	E	W	K	L	E	Q	K	G	K	P	G	P	R	S	H	G	I	A	V	V	G	D	K	L	Y	S	F	G	G	E	L	T	P	N	I	S	D	K	D	51																																																	
BOESP	M	A	P	S	V	Q	G	E	W	K	L	E	Q	K	G	Q	T	P	G	P	R	S	H	G	I	A	V	V	G	D	K	L	Y	S	F	G	G	E	L	T	P	N	I	S	D	K	D	51																																																
ATESP	M	A	P	T	L	Q	Q	W	K	V	G	K	G	G	T	P	G	P	R	S	H	G	I	A	V	V	G	D	K	L	Y	S	F	G	G	E	L	T	P	N	K	H	D	K	D	51																																																		
IIESP	M	N	I	P	C	K	F	T	Q	I	H	H	A	S	Y	Q	F	C	P	A	S	V	T	Q	V	R	Y	A	S	Q	L	F	R	Q	A	S	H	I	--	S	T	R	S	L	K	I	A	A	V	A	P	T	L	Q	G	E	W	K	L	E	Q	K	G	K	A	P	C	N	R	C	S	H	G	I	A	V	V	G	D	K	L	Y	S	F	G	G	E	L	E	T	N	V	A	D	K	D	98
ITESP	L	Y	V	F	D	N	T	H	T	W	S	A	P	A	N	G	D	V	P	N	V	K	L	G	T	R	M	S	V	G	T	K	L	Y	L	F	G	G	R	D	E	K	K	Q	F	D	D	I	Y	S	Y	D	T	V	K	K	E	W	K	F	L	I	K	L	D	Q	L	G	G	P	E	A	R	T	Y	H	S	M	A	S	D	E	N	H	V	Y	V	F	G	G	S	K	G	149			
BOESP	L	Y	V	F	D	N	T	H	T	W	S	S	P	S	K	G	V	A	P	D	V	K	L	G	T	R	M	S	V	G	T	K	L	Y	L	F	G	G	R	D	E	N	K	K	F	D	D	I	Y	S	Y	D	T	V	N	E	W	T	K	L	I	L	D	Q	L	G	G	P	E	A	R	T	Y	H	S	M	A	S	D	E	N	H	V	Y	V	F	G	G	S	K	G	149					
ATESP	L	Y	V	F	D	N	T	H	T	W	S	A	Q	P	K	G	D	A	P	T	V	S	C	L	G	V	R	M	A	V	G	T	K	L	Y	L	F	G	G	R	D	E	N	R	N	E	N	R	S	Y	D	T	V	T	S	E	W	T	F	L	I	K	L	D	V	G	G	P	E	A	R	T	Y	H	S	M	A	S	D	E	N	H	V	Y	V	F	G	G	S	K	G	149					
IIESP	L	Y	V	F	D	N	I	Q	N	W	S	A	P	A	N	G	D	V	P	Y	I	S	S	F	G	V	R	T	V	A	V	G	T	K	L	Y	L	F	G	G	R	N	E	K	K	V	P	N	D	I	Y	S	Y	D	T	V	T	N	E	W	K	F	L	I	K	L	G	L	M	G	G	P	E	T	R	T	Y	H	S	M	A	S	D	E	N	H	V	Y	V	F	G	G	N	O	G	196	
ITESP	G	T	N	K	T	P	V	R	F	R	T	I	E	A	Y	N	A	D	G	K	W	I	Q	L	P	D	P	G	E	Q	H	N	F	E	K	R	G	G	A	F	L	V	V	O	G	K	I	W	V	Y	G	F	A	T	S	P	D	P	N	G	K	N	D	Y	E	S	D	Q	V	Q	F	Y	D	P	A	T	K	K	W	I	Q	V	E	T	K	G	E	K	P	S	A	R	S	V	247		
BOESP	G	T	N	K	T	P	V	R	F	R	T	I	E	A	Y	N	A	D	G	K	W	S	Q	L	P	D	P	G	E	Q	P	R	F	E	R	R	G	G	A	F	V	V	O	G	K	I	W	V	Y	G	F	A	T	S	P	D	P	N	G	K	N	D	Y	E	S	D	Q	V	Q	F	Y	D	P	A	T	Q	K	W	I	E	V	E	T	K	G	D	K	P	S	A	R	S	V	247			
ATESP	G	T	N	I	P	T	R	F	R	T	I	E	A	Y	N	A	D	G	K	W	A	Q	L	P	D	P	G	..	D	N	F	E	K	R	G	G	A	F	A	V	V	O	G	K	I	W	V	Y	G	F	A	T	S	T	P	G	G	D	D	Y	E	S	N	A	V	Q	F	Y	D	P	A	S	K	K	W	I	E	V	E	T	T	G	A	K	P	S	A	R	S	V	244						
IIESP	G	T	M	S	T	P	V	R	F	R	T	V	E	S	Y	N	A	D	G	K	W	V	Q	L	P	D	P	G	..	D	N	F	E	K	R	G	G	A	F	H	V	V	O	G	K	I	W	V	Y	G	F	A	T	S	L	T	P	D	G	K	N	D	Y	E	S	D	K	V	Q	F	Y	D	P	A	S	Q	K	W	I	Q	V	E	T	K	G	D	K	P	S	A	R	S	V	291			
ITESP	F	A	H	A	V	V	G	K	Y	L	I	F	G	G	E	T	W	P	D	P	K	A	H	L	G	P	G	T	L	S	D	E	G	F	A	L	D	T	E	T	L	V	W	E	K	F	G	G	D	E	P	S	K	R	G	W	P	A	Y	T	S	A	T	I	Y	G	K	K	L	L	M	H	G	G	L	P	T	N	N	R	T	D	D	L	Y	F	Y	A	V	N	S	A	343				
BOESP	F	G	H	A	V	V	G	K	Y	L	I	F	G	G	E	T	W	P	D	P	K	A	H	L	G	P	G	T	L	S	D	E	G	F	A	L	D	T	E	T	L	V	W	E	R	F	G	G	G	A	E	P	G	Q	L	W	P	G	Y	T	A	T	I	Y	G	K	K	L	L	M	H	G	G	L	P	T	N	N	R	T	D	D	L	Y	F	Y	A	V	N	S	A	343					
ATESP	F	A	H	A	V	V	G	K	Y	L	I	F	A	G	E	V	W	P	D	L	N	G	H	Y	G	P	G	T	L	S	N	E	G	Y	A	L	D	T	E	T	L	V	W	E	R	F	G	G	E	E	G	A	P	I	P	R	G	W	T	A	Y	A	A	T	V	D	G	K	N	L	L	M	H	G	G	L	P	T	N	E	R	T	D	D	L	Y	F	Y	A	V	N	S					

图9 *IiESP*的表达模式分析Fig.9 Expression pattern analysis of *IiESP*

R: 根; H: 下胚轴; Rl: 莲座叶; Cl: 茎生叶; S: 茎; St: 茎尖; Fb: 早期花序; IF: 花序; F: 花; Se: 萼片; Pe: 花瓣; St: 雄蕊; Pi: 雌蕊; Si: 短角果。

图10 *IiESP-gfp*融合表达载体的构建Fig.10 Construction of *IiESP-gfp* fusion expression vector

A: *IiESP*编码序列的扩增, 其中M为DL2000 DNA Marker, 1和2为含酶切位点的目的片段; B: 大肠杆菌DH5 α 的菌液PCR鉴定, 其中CK为阴性对照, 1~6为抗性克隆, M为DL2000 DNA Marker; C: 农杆菌LBA4404的菌液PCR鉴定, 其中CK为阴性对照, 1~4为抗性克隆。

异硫氰酸酯; 相反, 当pH<7.0或者有亚铁离子存在时, 则水解产生腈类(Galletti等2001)。植物中的小分子蛋白ESP对硫代葡萄糖苷-黑芥子酶体系具有调节作用, 能够作为黑芥子酶的辅助因子间接地改变硫代葡萄糖苷的水解产物。硫代葡萄糖苷的R基为烯烃基时, ESP可将硫转移到R基团的烯烃基末端, 使其形成环硫腈类化合物, 而不是异硫氰酸盐。也有研究发现ESP能够使带有非烯烃基的硫代葡萄糖苷转化为简单腈类化合物(Lambrix等2001)。

本研究克隆了菘蓝*IiESP*基因, 它的基因组序列的长度为1 555 bp, 包括2个外显子和1个内含子。该基因cDNA序列的长度为1 315 bp, ORF序列的长度为1 164 bp, 可编码387个氨基酸。生物信息学分析结果显示, *IiESP*蛋白含有5个Kelch模块, 可以折叠形成一个 β 螺旋管结构域。Kelch重复模块被认为能够与其他蛋白尤其是黑芥子酶相互作用, 可以使硫代葡萄糖苷水解形成特殊的腈类化合物, 但是含有Kelch模块的蛋白质在功能上并不仅限于此, 它们在各种不同的生物学过程中都能够发挥作用(Burow等2006; Adams等2000)。通过半定量RT-PCR发现*IiESP*在萼片和花瓣中表达水

平很高, 说明ESP蛋白帮助黑芥子酶水解产生的腈类物质可能对昆虫的毒性较小, 可以促进传粉过程。通过*gfp*融合表达载体发现*IiESP*蛋白定位于叶绿体中, 这与软件预测结果一致(PSORT WWW Server, <http://psort.hgc.jp/>)。

*ESP*基因的表达也可能与植物对昆虫的防御、昆虫对寄主的选择以及昆虫的生长发育有关。硫代葡萄糖苷-黑芥子酶系统是植物防御虫害最有效的生化武器, 但是与寡食性昆虫相比, 广食性昆虫对硫代葡萄糖苷更为敏感(Ahuja等2010)。例如, 取食野生甘蓝的硫代葡萄糖苷以后, 仅仅使寡食性的小菜蛾(*Plutella xylostella*)和菜粉蝶(*Pieris rapae*)的发育周期变长, 成年昆虫的体质减轻, 但可以使广食性的甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)的成活率明显降低(Harvey等2007)。

除此之外, 有些寡食性昆虫还将硫代葡萄糖苷作为其营养物质。例如大菜粉蝶(*Pieris brassicae*)不仅喜欢在硫代葡萄糖苷含量较高的黑芥(*Brassica nigra*)花上取食, 与此同时它们的生长速度也会达到最大(Smallegange等2007)。目前, 大部分学者认为寡食十字花科植物的昆虫是通过硫代葡萄糖苷的挥发性代谢物, 如异硫氰酸盐、腈类

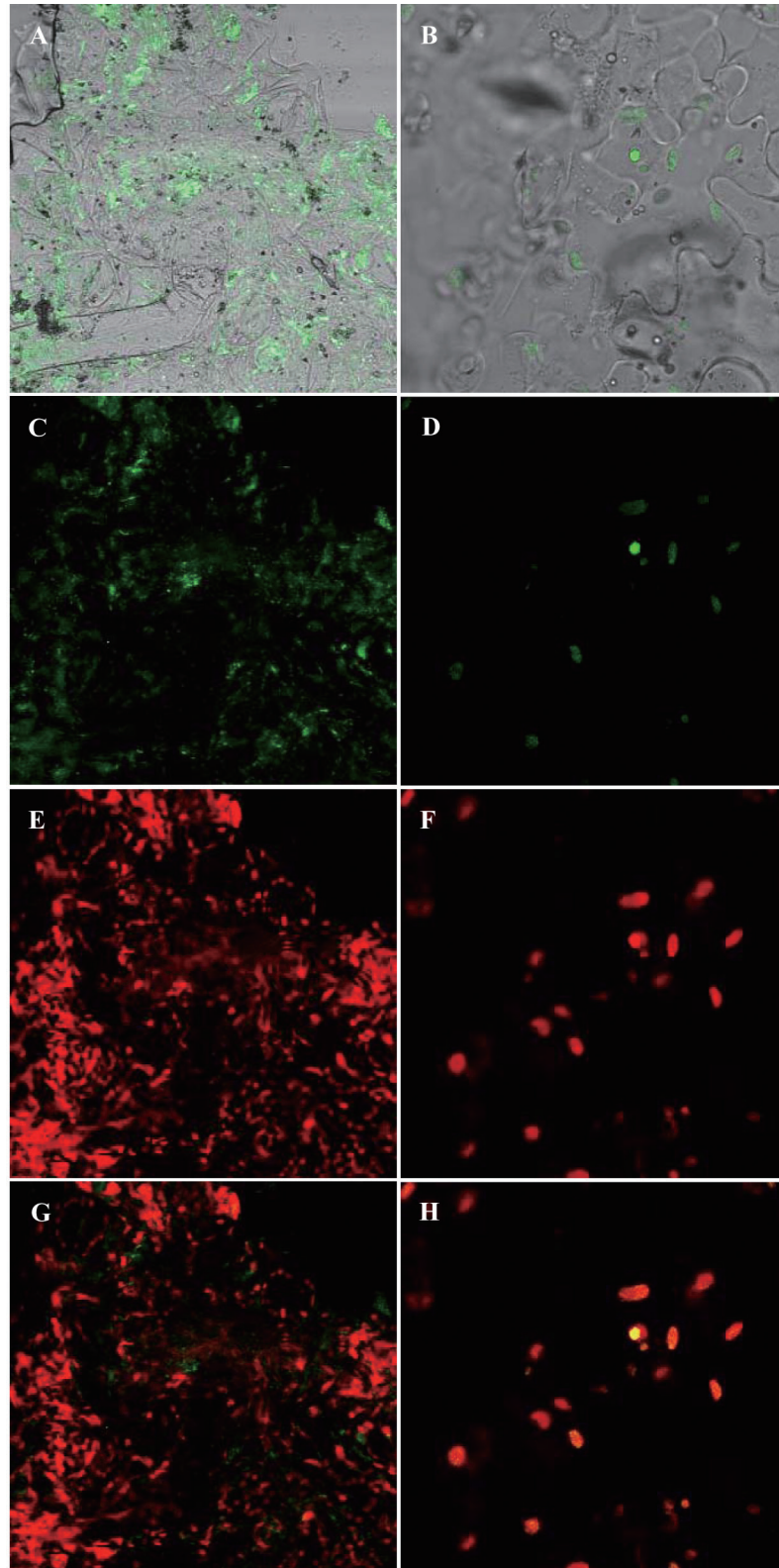


图11 liESP蛋白的亚细胞定位

Fig.11 The subcellular localization of liESP

A和B: 明视野与GFP荧光叠加; C和D: GFP荧光; E和F: 叶绿体荧光; G和H: 叶绿体荧光与GFP荧光叠加; A、C、E和G: pCambia1302空载体; B、D、F和H: *liESP-gfp*融合表达载体。

化合物等,对远距离的寄主进行定向(Städler和Reifenrath 2009)。小菜蛾成虫夜间活动主要依靠嗅觉进行寄主定向,挥发性的异硫氰酸盐在小菜蛾产卵时对寄主的选择过程中发挥着重要作用(Dai等2008)。相反,为了降低后代的同种竞争压力,菜粉蝶会在没有损害或没有同类卵的寄主植株上产卵。这是因为虫害后植物体内的硫代葡萄糖苷被水解形成挥发性的腈类化合物,这些化合物对菜粉蝶具有驱除作用(Little等2007)。与此一致,过量表达环硫指定蛋白的转基因拟南芥以及外施吲哚-3-乙腈的拟南芥都不能吸引菜粉蝶雌虫(de Vos等2008; Mumm等2008)。

通过本研究我们得到了菘蓝环硫指定蛋白基因*IiESP*,并分析了其表达模式及其编码蛋白的结构与亚细胞定位特征。这不仅为后续菘蓝ESP蛋白的原核表达提供了研究基础,而且为进一步研究药用植物菘蓝对生物胁迫的防御机制提供了理论依据。

参考文献

- Adams J, Kelso R, Cooley L (2000). The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol*, 10 (1): 17–24
- Ahuja I, Rohloff J, Bones AM (2010). Defence mechanisms of Brassicaceae: implications for plant-insect interactions and potential for integrated pest management. A review. *Agron Sustain Dev*, 30 (2): 311–348
- Bernardi R, Negri A, Ronchi S, Palmieri S (2000). Isolation of the epithiospecifier protein from oil-rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) seed and its characterization. *FEBS Lett*, 467 (2–3): 296–298
- Bones AM, Rossiter JT (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol Plant*, 97 (1): 194–208
- Brandt W, Backenköhler A, Schulze E, Plock A, Herberg T, Roesch E, Wittstock U (2014). Molecular models and mutational analyses of plant specifier proteins suggest active site residues and reaction mechanism. *Plant Mol Biol*, 84 (1–2): 173–188
- Burow M, Müller R, Gershenzon J, Wittstock U (2006). Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*. *J Chem Ecol*, 32 (11): 2333–2349
- Buxdorf K, Yaffe H, Barda O, Levy M (2013). The effects of glucosinolates and their breakdown products on necrotrophic fungi. *PLoS ONE*, 8 (8): e70771
- Dai J, Deng J, Du J (2008). Development of bisexual attractants for diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) based on sex pheromone and host volatiles. *Appl Entomol Zool*, 43 (4): 631–638
- de Vos M, Kriksunov KL, Jander G (2008). Indole-3-acetonitrile production from indole glucosinolates deters oviposition by *Pieris rapae*. *Plant Physiol*, 146 (3): 916–926
- Foo HL, Grønning LM, Goodenough L, Bones AM, Danielsen BE, Whiting DA, Rossiter JT (2000). Purification and characterisation of epithiospecifier protein from *Brassica napus*: enzymic intramolecular sulphur addition within alkenyl thiohydroximates derived from alkenyl glucosinolate hydrolysis. *FEBS Lett*, 468 (2–3): 243–246
- Galletti S, Bernardi R, Leoni O, Rollin P, Palmieri S (2001). Preparation and biological activity of four epiprogoitrin myrosinase-derived products. *J Agric Food Chem*, 49 (1): 471–476
- Halkier BA, Gershenzon J (2006). Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 303–333
- Harvey JA, Gols R, Wagenaar R, Bezemer TM (2007). Development of an insect herbivore and its pupal parasitoid reflect differences in direct plant defense. *J Chem Ecol*, 33 (8): 1556–1569
- Kim JH, Lee BW, Schroeder FC, Jander G (2008). Identification of indole glucosinolate breakdown products with antifeedant effects on *myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J*, 54 (6): 1015–1026
- Kissen R, Hyldbakk E, Wang CWV, Sørmo CG, Rossiter JT, Bones AM (2012). Ecotype dependent expression and alternative splicing of epithiospecifier protein (ESP) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 78 (4–5): 361–375
- Kliebenstein DJ, Kroymann J, Mitchell-Olds T (2005). The glucosinolate–myrosinase system in an ecological and evolutionary context. *Curr Opin Plant Biol*, 8 (3): 264–271
- Lambrix V, Reichelt M, Mitchell-Olds T, Kliebenstein DJ, Gershenzon J (2001). The *Arabidopsis* epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell*, 13 (12): 2793–2807
- Little D, Gouhier-Darimont C, Bruessow F, Reymond P (2007). Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 143 (2): 784–800
- Matusheski NV, Swarup R, Juvik JA, Mithen R, Bennett M, Jeffery EH (2006). Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane. *J Agric Food Chem*, 54 (6): 2069–2076
- Mumm R, Burow M, Bukovinszkyne Kiss G, Kazantzidou E, Wittstock U, Dicke M, Gershenzon J (2008). Formation of simple nitriles upon glucosinolate hydrolysis affects direct and indirect defense against the specialist herbivore, *Pieris rapae*. *J Chem Ecol*, 34 (10): 1311–1321
- Rodman JE, Soltis PS, Soltis DE, Sytsma KJ, Karol KG (1998). Parallel evolution of glucosinolate biosynthesis inferred from congruent nuclear and plastid gene phylogenies. *Am J Bot*, 85 (7): 997–1006
- Slabaugh MB, Cooper LD, Kishore VK, Knapp SJ, Kling JG (2015). Genes affecting novel seed constituents in *Limnanthes alba* Benth: transcriptome analysis of developing embryos and a new genetic map of meadowfoam. *PeerJ*, 3: e915
- Smallegange RC, van Loon JJA, Blatt SE, Harvey JA, Agerbirk N, Dicke M (2007). Flower vs. leaf feeding by *Pieris brassicae*:

- glucosinolate-rich flower tissues are preferred and sustain higher growth rate. *J Chem Ecol*, 33 (10): 1831–1844
- Städler E, Reifenrath K (2009). Glucosinolates on the leaf surface perceived by insect herbivores: review of ambiguous results and new investigations. *Phytochem Rev*, 8 (1): 207–225
- Tookey HL (1973). Crambe thioglucoside glucohydrolase (EC 3.2.3.1): separation of a protein required for epithiobutane formation. *Can J Biochem*, 51 (12): 1654–1660
- Verhoeven DTH, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G (1997). A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem-Biol Interact*, 103 (2): 79–129
- Wang Z, Tan XL, Zhang ZY, Gu SL, Li GY (2012). Sequence analysis and induced expression of epithiospecific protein (ESP) from *Brassica napus*. *Food Sci*, 33 (7): 209–214 (in Chinese with English abstract) [王政, 谭小力, 张志燕, 顾守来, 李冠英(2012). 甘蓝型油菜表皮特异硫蛋白(ESP)的序列分析及其诱导表达. *食品科学*, 33 (7): 209–214]
- Wittstock U, Kliebenstein DJ, Lambrix V, Reichelt M, Gershenzon J (2003). Glucosinolate hydrolysis and its impact on generalist and specialist insect herbivores. In: Romeo JT (ed). *Integrative Phytochemistry: from Ethnobotany to Molecular Ecology: Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 37. Amsterdam: Elsevier, 101–125

Cloning of the epithiospecifier protein gene *IiESP* from *Isatis indigotica* and subcellular localization of the encoding product

MA Yan-Qin, LI Dian-Zhen, YAO Jing-Wen, LI Qi, XU Zi-Qin*

Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, Ministry of Education; Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology; College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China

Abstract: In order to investigate the biological functions of epithiospecifier proteins (ESPs) in specifying the enzymolysis products of glucosinolate in cruciferous plants, the cDNA and the genomic DNA sequences of *IiESP* were cloned from *Isatis indigotica* at first, and the expression patterns of this gene were characterized subsequently. Then the subcellular localization of *IiESP* was determined by using the GFP tag and the three-dimensional structure of *IiESP* was predicted based on the amino acid sequences. The results show that *IiESP* contains two exons and one intron, and its genomic DNA, cDNA and open reading frame (ORF) are 1 555, 1 315 and 1 164 bp in length, respectively. *IiESP* is constituted by 387 amino acid residues and contains 5 Kelch motifs which can fold into a spherical super-solenoid structure. Multiple alignments of the amino acid sequences indicate that the identities of *IiESP* with *ItESP* of *Isatis tinctoria*, *AtESP* of *Arabidopsis thaliana* and *BoESP* of *Brassica olerace* are 79%, 76% and 77%, respectively. By agroinfiltration method, *IiESP* was confirmed to be located in chloroplasts after transient expression in leaf epidermal cells of *Nicotiana benthamiana*. RT-PCR analyses showed that *IiESP* was mainly expressed in hypocotyl, stem, early inflorescence, mature inflorescence, flower, sepal and petal, and its higher activity in perianth was probably associated with insect attraction and entomophilous pollination.

Key words: *Isatis indigotica*; epithiospecifier protein; expression analysis; subcellular localization; Kelch motif

Received 2015-10-15 Accepted 2015-12-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 30870194 and J1210063), the Research Project of Provincial Key Laboratory of Shaanxi (Grant Nos. 15JS111, 12JS103 and 2010JS090), and the Graduate Research Project of Northwest University (Grant Nos. YZZ13068 and YZZ14076).

*Corresponding author (E-mail: ziqinxu@nwu.edu.cn).