

二棱大麦 LEA cDNA 的克隆与测序

郭卫东¹, 饶景萍¹, 李嘉瑞¹, 郑学勤² ✓

S512.103.4

(1 西北农林科技大学园艺系, 陕西杨陵 712100)

~~S512~~

(2 中国热带农业科学院生物技术国家重点实验室, 海南儋州 571737)

S332.4

[摘要] 从二棱大麦(*Hordeum distichon* Linn.) 幼苗中提取总 RNA, 通过 RT-PCR 获得目的片段 HDCS1, 并采用 T-载体进行克隆。测序结果表明, HDCS1 全长 664 bp, 含有 1 个完整的阅读框架。其编码蛋白质全长 202 个氨基酸, 含有 8 个由 11 个氨基酸残基组成的基元序列, 属第 3 组 LEA 蛋白。HDCS1 与大麦(*Hordeum vulgare* L.) LEA 蛋白、HVA1 具有高度同源性, 其差异在于 HDCS1 比 HVA1 缺少一个完整的由 11 个氨基酸残基组成的基元序列。

[关键词] 二棱大麦; LEA 基因; 克隆; 序列分析; 抗旱基因工程

[中图分类号] S512.103.2; Q943.2

[文献标识码] A

植物能够通过渗透调节、脱水保护、代谢调整等多种途径适应干旱胁迫。LEA 蛋白是一种脱水保护剂, 能够在干旱胁迫条件下保护生物大分子, 尤其是膜结构的稳定性, 减轻干旱造成的伤害。根据其氨基酸序列, LEA 蛋白可划分为若干组^[1]。HVA1 是从大麦糊粉层中克隆的 1 个第 3 组 LEA 基因^[2], 干旱或 ABA 均能诱导该基因的表达^[3]。Xu 等^[4]将 HVA1 cDNA 导入水稻, 获得了耐旱能力较强的转基因水稻, 从而直接证实了 HVA1 是一个有利用价值的抗旱基因。本研究拟根据 HVA1 cDNA 序列合成 1 对引物, 用 RT-PCR 从经 ABA 诱导的二棱大麦(*Hordeum distichon* Linn.) 幼苗中克隆 1 个与 HVA1 高度同源的 3 组 LEA cDNA, 为作物的抗旱基因工程研究奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

二棱大麦(*Hordeum distichon* Linn.) 种子用清水浸泡约 12 h, 播种于铺设 2~3 层吸水纸的培养皿中。种子萌芽 3 d 时参考文献^[5,6]的方法, 用 0.1 mmol/L ABA 浇灌幼苗, 继续生长 24 h, 以诱导 LEA 基因表达。

1.2 方 法

经过诱导的二棱大麦幼苗用 DEPC 处理水反复冲洗, 用灭菌滤纸吸去表面水滴, 称取 0.5~1.0 g 茎叶组织, 加入液氮后研磨成粉末, 采用异硫氰酸胍法提取总 RNA^[7]。取约 5 μg 的总 RNA 参考文献^[7,8]的方法反转录合成 cDNA 第 1 链。根据 HVA1 cDNA

[收稿日期] 1999-05-04

[基金项目] 杨陵农业科技开发基金资助项目(4130202)

[作者简介] 郭卫东(1968-), 男, 副教授, 博士

序列^[2]合成1对引物(P₁: 5'CGTGAGACGAAGATGGCCTCCAACC 3'; P₂: 5'AAACACGACTAAAGGAACGG 3'),在0.5 mL Eppendorf管中加入5 μL 反转录产物、4 μL 引物(P₁, P₂各2 μL,约30 pmol)、10 μL dNTPs(各2.5 mmol/L)、5 μL 反应缓冲液(500 mmol/L KCl,100 mmol/L Tris-HCl,pH9.0,10 g/L Triton X-100,15 mmol/L MgCl₂)、3.5 μL 二甲基亚砜(DMSO)、21.5 μL H₂O,覆盖50 μL 石蜡油,95℃变性10 min,然后,加入1 μL Taq DNA 聚合酶(5 mol/(L·min)),按以下条件进行循环反应:94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,共进行30次循环。PCR产物的回收、连接反应、感受态细胞制备、大肠杆菌转化、质粒的小量或大量提取、酶切反应等均参考文献[6]的方法进行。参照文献[9]的方法,采用ABI 377型DNA自动测序仪进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 通过 RT-PCR 获得目的片段

ABA 诱导能提高二棱大麦幼苗总 RNA 中 LEA mRNA 的丰度^[5]。紫外扫描分光光度计测定分析和甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分析表明,提取的总 RNA 纯度较高且比较完整,未发生严重的降解。以二棱大麦总 RNA 为反应底物,反转录合成 cDNA 第 1 链,其中含有从 LEA mRNA 反转录得到的 LEA cDNA 第 1 链。采用根据 HVA1 cDNA 序列^[2]合成的 1 对引物,以 cDNA 第 1 链为模板进行 PCR,扩增得到长约 700 bp 的 DNA 片段(图 1),此片段长度与 HVA1 相似。在 PCR 反应体系中加入 70 mL/L 的 DMSO 提高引物与模板结合的特异性,使目的片段条带清晰,反应副产物减少(图 1)。

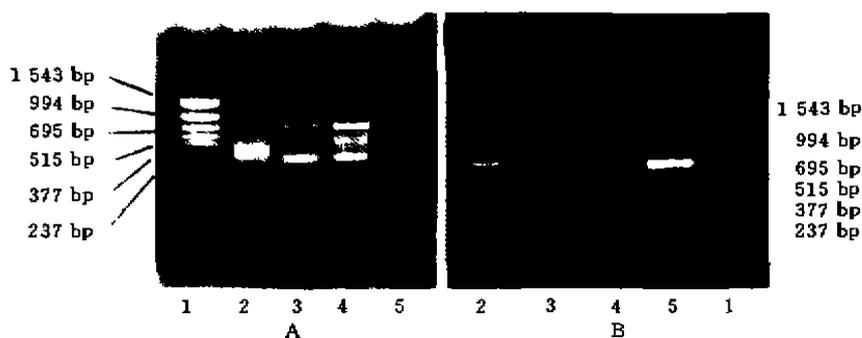


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶(10 g/L)电泳结果

A: 未加 DMSO 的 PCR; B: 加 DMSO 的 PCR

1. 购自 SABC 的 PCR Markers; 2~5. PCR 产物

2.2 目的片段的克隆

回收长约 700 bp 的 PCR 扩增片段,利用 T-载体进行克隆。采用 PE 公司生产的 ABI377 型 DNA 自动测序仪对目的片段分别进行了正向和反向序列分析,将 2 个方向的测定结果核对、合并后得到目的片段 HDCS1 的核苷酸序列(图 2)。HDCS1 全长 664 bp,有 1 个完整阅读框架,编码蛋白质全长 202 个氨基酸,存在 8 个由 11 个氨基酸残基构成的基元序列,这是第 3 组 LEA 蛋白的结构特征,表明 HDCS1 属于第 3 组 LEA cDNA。

	CGTGAGACGAAG	-12
ATG GCC TCC AAC CAG AAC CAG GGG AGC TAC CAC GCC GGC GAG ACC AAG GCC CGC ACC GAG		-72
M A S N Q N Q G S Y H A G E T K A R T E		-20
GAG AAG ACC GGG CAG ATG ATG GGC GCC ACC AAG CAG AAG GCG GGG CAG ACC ACC GAG GCC		-132
E K T G Q M M G A T K Q K A G Q T T E A		-40
	1	
ACC AAG CAG AAG GCC GGC GAG ACG GCC GAG GCC ACC AAG CAG AAG ACC GCC GAG ACC GCC		-192
T K Q K A G E T A E A T K Q K T G E T A		-60
	2	3
GAG GCC GCC AAG CAG AAG GCC GCC GAG GCC AAG GAC AAG ACG GCG CAG ACC GCC CAG GCC		-252
E A A K Q K A A E A K D K T A Q T A Q A		-80
	4	
GCC AAG GAC AAG ACG TAC GAG ACG GCG CAG GCG GCC AAG GAG GCG GCC GCC CAG GCC AAG		-312
A K D K T Y E T A Q A A K E R A A Q G K		-100
	5	6
GAC CAG ACC GCC AGC GCC CTC GGC GAG AAG ACG GAG GCG GCC AAG CAG AAG GCC GCC GAG		-372
D Q T G S A L G E K T E A A K Q K A A E		-120
	7	
ACG ACG GAG GCG GCC AAG CAG AAG GCG TCC GAC ACG GCG CAG TAC ACC AAG GAG TCC GAG		-432
T T E A A K Q K A S D T A Q Y T K E S A		-140
	8	
GTG GCC GGC AAG GAC AAG ACC GGC AGC GTC CTC CAG CAG GCC GGC GAG ACG GTG GTG AAC		-492
V A G K D K T G S V L Q Q A G E T V V N		-160
GCC GTG GTG GGC GCC AAG GAC GCC GTG GCA AAC ACG CTG GGC ATG GGA GGG GAC AAC ACC		552
A V V G A K D A V A N T L G M G G D N T		-180
AGC GCC ACC AAG GAC GCC ACC ACC GGC GCC ACC GTC AAG GAC ACC ACC ACC ACC AGG		-612
S A T K D A T T G A T V K A T T T T T R		-200
AAT CAC TAG ACGCATGCGTTTCGCGCTTAATTTCCGTTCTTTAGTCGTGTTT		-664
N H End		-202

图 2 HDCS1 cDNA 核苷酸序列及其编码蛋白的氨基酸序列

2.3 HDCS1 与 HVA1 同源性分析

利用计算机软件 PCGENE 对 HDCS1 与 HVA1 的核苷酸序列及其所编码的蛋白质氨基酸序列进行了同源性分析。结果表明, HDCS1 的 664 个核苷酸残基均与 HVA1 相同, 但是, 与 HVA1 相比, HDCS1 缺少了 C₃₉₉~C₄₃₁ 的 33 个核苷酸。HDCS1 编码的 202 个氨基酸也均与 HVA1 相同, 同样也缺少相应的 Thr₁₂₂~Ala₁₃₂ 的 11 个氨基酸残基, 这 11 个氨基酸是一个完整的基元序列, 即 HDCS1 比 HVA1 缺少 1 个基元序列(图 3), 除此之外, 其他部分则完全相同。

HDCS1	-	MASNQNQGSYHAGETKARTEEKTGQMMGATKQKAGQTTEATKQKAGETAE	-50
HVA1	-	MASNQNQGSYHAGETKARTEEKTGQMMGATKQKAGQTTEATKQKAGETAE	-50
		1 2	
HDCS1	-	ATKQKTGETAEAAKQKAAEAKDKTAQTAQAADKTYETAQAAKERAAQGGK	-100
HVA1	-	ATKQKTGETAEAAKQKAAEAKDKTAQTAQAADKTYETAQAAKERAAQGGK	-100
		3 4 5 6	
HDCS1	-	DQTGSALGEKTEAAKQKAAET-----TEAAKQKASDTAQYTKES	-139
HVA1	-	DQTGSALGEXTAAKQKAAETTEAAKQKAAEATEAAKQKASDTAQYTKES	-150
		7 8 9	
HDCS1	-	AVAGKDKTGSVLLQAGETVVNAVVGAKDAVANTLGMGGDNTSATKDATTG	-189
HVA1	-	AVAGKDKTGSVLLQAGETVVNAVVGAKDAVANTLGMGGDNTSATKDATTG	-200
HDCS1	-	ATVKDTTTTTRNH	-202
HVA1	-	ATVKDTTTTTRNH	-213
		Identity : 202 (100%)	
		Number of gaps inserted in HDCS1: 1	
		Number of gaps inserted in HVA1: 0	

图 3 HDCS1 与 HVA1 所编码的蛋白质氨基酸序列同源性分析

3 讨 论

抗旱基因工程具有巨大的应用潜力,因此,抗旱基因的克隆引起了人们的极大兴趣。目前,已克隆了许多与抗旱相关的基因,例如催化脯氨酸生物合成的 Δ^1 -二氢吡咯-5-羧酸合成酶(P5CS)基因^[10]、催化甘氨酸甜菜碱生物合成的甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因^[11]、海藻糖合成的酶基因^[12,13]等。胚胎发生后期丰富蛋白是植物脱水保护剂,在干旱胁迫下能保护膜系统的稳定性^[14,15]。大麦(*H. vulgare* L.)与二棱大麦(*H. distichon* L.)是同属的近缘植物,因而具有几乎相同的第 3 组 LEA 基因。HVA1 与 HDCS1 在结构上的差异仅在于 HDCS1 比 HVA1 缺少 1 个含有 11 个氨基酸残基的基元序列,其他部分则完全相同。由 11 个氨基酸残基构成的基元序列是第 3 组 LEA 蛋白的结构特征,该基元序列是亲水亲脂兼性的,呈 α -螺旋结构,可能是形成第 3 组 LEA 蛋白高级结构的基础^[1]。然而,基元序列的数量多少是否会对第 3 组 LEA 蛋白高级结构和脱水保护功能的发挥产生影响?影响的程度如何?这方面的问题尚缺少深入研究。HDCS1 和 HVA1 的差异为研究这些问题提供了试验的材料。

[参考文献]

- [1] Dure J., Crouch M., Harada J., et al. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants[J]. *Plant Mol Biol.* 1989, 12: 475~486.
- [2] Hong B., Uknes S. J., Ho D. T. Cloning and characterization of a cDNA encoding a mRNA rapidly-induced by ABA in barley aleurone layers[J]. *Plant Mol Biol.* 1988, 11: 495~506.
- [3] Straub P. F., Shen Q., Ho T. H. D. Structure and promoter analysis of an ABA-and stress regulated barley gene. HVA1[J]. *Plant Mol Biol.* 1994, 26: 617~630.
- [4] Xu D., Duan X., Wang B., et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice[J]. *Plant Physiol.* 1996, 110: 249~257.
- [5] Hong B., Barg R., Ho D. T. Developmental and organ specific expression of an ABA and stress induced protein in barley[J]. *Plant Mol Biol.* 1992, 18: 663~674.
- [6] Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning a Laboratory manual. 2nd edition[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [7] 顾红雅, 翟礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995. 78~79, 117~118, 229~235.
- [8] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 88~90.
- [9] 邵寒霜. 拟南芥 *Lfy* cDNA 的克隆及转化菊花的研究[D]. 海南儋州: 中国热带农业科学院华南热带农业大学, 1997.
- [10] Hu C. A., Delauney A. J., Verma D. P. S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9354~9358.
- [11] Ishitani M., Nakamura M., Han S. Y., et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress[J]. *Plant Mol Biol.* 1995, 27: 307~315.
- [12] Bell W., Klaassen P., Ohnacker M., et al. Characterization of the 56 kDa subunit of yeast trehalose-6-phosphate synthase and cloning of its gene reveal its identity with the product of CIF1, a regulator of carbon catabolite inactivation[J]. *Eur J Biochem.* 1992, 209: 951~959.
- [13] Kaasen I., McDougall J., Strom A. R. Analysis of the *ots* BA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the *Ots* A and *Ots* B proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex[J]. *Gene*, 1994, 145: 9~15.
- [14] Baker J., Steele C., Dure J. L. Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton[J]. *Plant Mol Biol.* 1988, 11: 277~291.
- [15] Ingram J., Bartels D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants[J]. *Annu Rev plant physiol Plant Mol Biol.* 1996, 47: 377~403.

Cloning of a group 3 Lea cDNA from two-row barley

GUO Wei-dong¹, RAO Jing-ping¹, LI Jia-rui¹, ZHENG Xue-qin²

(1 Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agricultural and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

(2 National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: Total RNA is extracted from two-row barley (*Hordeum distichon* Linn.) seedlings induced with 0.1 mmol/L ABA and reversely transcribed to first strands of cDNA. The interest fragment, HDCS1, is obtained by PCR and cloned by T-overhang vectors. HDCS1 is 664 bp long containing one open reading frame. It encodes a deduced protein of 202 amino acid residues, which contains eight motifs composed of 11 amino acids and belongs to group 3 LEA protein. HDCS1 is highly homologous to barley (*H. vulgare* Linn.) HVA1. The only difference between them is that the number of 11-mer repeating units of HDCS1 is one less than that of HVA1.

Key words: two-row barley; LEA cDNA; cloning