

巴西橡胶树顺式异戊烯基转移酶基因 cDNA 克隆及其序列特征分析

罗明武¹, 邓柳红^{2*}, 易小平², 曾会才², 肖苏生²

(1. 海南大学材料与化工学院, 海南 儋州 571737; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口 571101)

摘要:以巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)胶乳的 RNA 为 Tester; 叶片 RNA 为 Driver, 利用抑制消减杂交法(suppressive subtractive hybridization, SSH)构建了一个胶乳特异表达基因差减文库。通过反式 Northern 点杂交(reverse Northern dot blots)筛选到一个与顺式异戊烯基转移酶基因(橡胶生物合成的关键酶基因)高度同源的阳性克隆 R363。采用 RACE 方法获得该克隆的全长 cDNA(GenBank 登陆号: AY461414)。序列分析表明, 该基因长 1 156 bp, 含有 873 bp 的阅读框, 编码 290 个氨基酸, 分子量约为 32.9 kD, 等电点为 7.2, 含有 N-端跨膜螺旋区。同源性分析表明 R363 编码的蛋白质具有异戊烯基转移酶家族的特征, 含有 *cis*-异戊烯基链转移酶的 5 个高度保守区, 推测 R363 可能是一种新的顺式-异戊烯基转移酶基因。Northern blot 分析显示, R363 在胶乳中高度表达, 在叶中不表达。乙烯处理前后表达强度一致, 表明该基因表达不为乙烯所诱导。

关键词:巴西橡胶树; 抑制消减杂交法; 胶乳; *cis*-异戊烯基转移酶

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)03-0223-06

Cloning and Sequence Analysis of A Novel *Cis*-prenyltransferases Gene from *Hevea brasiliensis*

LUO Ming-wu¹, DENG Liu-hong^{2*}, YI Xiao-ping², ZENG hui-cai², XIAO Su-sheng²

(1. College of Materials Science and Chemical Engineering, Hainan University, Danzhou, 571737, China; 2. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: *Cis*-prenyltransferases is the key enzyme to rubber biosynthesis. A cDNA fragment which was highly homologous to the gene encoding *cis*-prenyltransferases was isolated by screening of a latex subtracted cDNA library. The latex subtracted cDNA library was constructed by suppressive subtractive hybridization (SSH), in which the polyA + RNA of latex from *Hevea brasiliensis* served as tester, and polyA + RNA of leaves as driver. According to its sequences information, a novel full-length cDNA of 1 156 bp termed R363 (GenBank number: AY461414) was obtained by using rapid amplification of cDNA ends (RACE). R363 contained a 1 035 bp ORF, which encoded 290 amino acids with a theoretical molecular weight of 32.9 kD and an isoelectric point of 7.2. Hydropathy and transmembrane motif analysis of deduced amino acid sequences indicated that R363 possessed a signal peptide of 27 amino acids at its N-end. The result of the conserved domains analysis indicated that R363 contained five highly conserved regions as well as signature motif of undecaprenyl pyrophosphate synthetase family, which implied that R363 would be a *cis*-prenyltransferases gene. Furthermore, the transcripts of R363 were expressed predominantly in the latex as compared with leaves, and exerted no differences in latex with or

收稿日期: 2008-07-30 接受日期: 2009-01-19

基金项目: 中国热带农业科学院中央级公益性科研院所专项基金项目; 华南热带农业大学科技基金项目资助

* 通讯作者 Corresponding author

without 2% ethylene pretreatment.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Suppressive subtractive hybridization (SSH); Latex; *Cis*-prenyltransferase

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)因其产胶量高,胶质好而成为天然橡胶最主要的商业来源。顺式-异戊烯基转移酶位于橡胶生物合成的最后一步,催化异戊烯焦磷酸(isopentenylpyrophosphate, IPP)合成长链橡胶,是天然橡胶合成中最重要的关键酶,该酶在产胶量、橡胶分子大小及橡胶的理化性质等方面可能具有决定性的作用^[1-3]。对橡胶转移酶基因克隆及其功能鉴定的研究将为研究植物体内橡胶生物合成的分子机制提供基础,同时可利用橡胶转移酶基因培育出产胶量高、胶质好、抗逆的橡胶新品系。

目前顺式-异戊烯基转移酶基因在微球菌、链球菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、拟南芥、酵母和人类等中被克隆出来。尽管橡胶转移酶基因的克隆和鉴定对于橡胶树产胶研究具有及其重要的作用,但目前有关该基因的报道不多,Asawatreratanakul^[4]和 Ko^[5]分别获得了 *HRT1*、*HRT2*、*HbCPT1*、*HbCPT2*、*HbCPT3* 和 *HbCPT4* 等顺式-异戊烯基转移酶基因,认为该基因可能属于多基因家族,与产胶量、橡胶分子大小及橡胶的理化性质等方面可能有着密切关系。

胶乳里存在着特异表达的基因,它们与胶乳再生(橡胶生物合成)和植物抗逆等密切相关。本研究通过筛选胶乳特异表达 cDNA 消减文库,采用 RACE 法获得了 1 个新的顺式异戊烯基转移酶基因(GenBank 登陆号: AY461414),并对该基因进行了序列分析和 Northern 杂交分析,为探讨该基因的功能和调控机理提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料为巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)优良品系“热研 73397”,于 2004 年 6 月从中国热带农业科学院试验场采集,割胶后流出的胶乳直接滴入液氮中保存,叶片采集后立即放入液氮中保存备用。

1.2 胶乳及叶片总 RNA 提取

胶乳总 RNA 的提取 参照 Kush 等^[6]的胶乳提取方法进行。

叶片总 RNA 的提取 叶子 1 g,液氮中研磨

成细粉末,依次用 CTAB 提取液和异硫氰酸胍变性液变性抽提 1 次,再依次用等体积酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提 1 次,取上清,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH 5.2)和 2 倍体积无水乙醇,-20℃ 下放置 2 h,沉淀用预冷的 75% 乙醇漂洗并干燥。

总 RNA 纯度、浓度及完整性检测 对获得的 RNA 产物测定吸光值 A_{230} 、 A_{260} 和 A_{280} ,判断其纯度和浓度;用 2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。纯度及完整性好的胶乳及叶片总 RNA 即用于差减 cDNA 文库构建及 RT-PCR 模板,其余样品加入 3 倍体积的无水乙醇于-70℃ 下保存。

1.3 抑制消减杂交及差减 cDNA 文库构建

抑制消减杂交具体操作参照 CLONTECH 公司的抑制消减杂交试剂盒(Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit)进行,以巴西橡胶树常割树胶乳为 Tester,叶片为 Driver。将正向差减 PCR 产物克隆至克隆载体 pMD18,保存于大肠杆菌(*Escherichia coli*)XL1-Blue 菌株中,建立差减 cDNA 文库。

1.4 顺式-异戊烯基转移酶基因克隆

通过反式 Northern 点杂交(Reverse Northern Dot-Blot)筛选胶乳差减 cDNA 文库,分离到一个与顺式-异戊烯基转移酶高度同源的基因片段 *R363*,根据该基因片段序列信息,设计 5' 和 3' 端特异引物,5'-RACE-GSP:5'-TCAGAGGATTCTTCAACAGC-3'; 3'-RACE-GSP:5'-TGGAGAAGATTGAAGGGATG-3',采用 RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)技术进行 5' 和 3' 端的扩增,方法按 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。PCR 条件为:94℃ 5 s,60℃ 10 s,72℃ 3 min,35 个循环,再 72℃ 延伸 10 min。取 5 μl RACE 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测鉴定,确定 RACE 产物片段的大小。采用上海华舜生物工程公司的小量胶回收试剂盒进行目的片段回收并测序。将获得的 5'-RACE 序列和 3'-RACE 序列去掉插入位点两侧的载体序列后,进行组装拼接,得到拼接好的全长 cDNA 序列。根据拼接好的全长 cDNA 序列信息设计引物:363-1:5'-TAGGATCCATGGAATTA-

TACAACG-3',363-2:5'-GGTCGACTTATTTTAAGT-ATTCCT-3',将胶乳 RNA 通过 RT-PCR 反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,获取全长 cDNA R363。

1.5 cDNA 序列及其编码氨基酸分析

利用 NCBI 的 Blast、ORF finder 和 BankIt 服务

器进行核酸和蛋白质序列比较、阅读框架确定及序列在线提交。蛋白质疏水/亲水性、分子量及等电点预测等基本性质分析在公用数据库 Workbench 上进行。前导肽、功能位点分析和序列同源比较及进化关系分析分别采用 SignalP、Motif Scan 和 Clustal W 程序进行。

```

    acatgcatgtttaccatcttttctcttattottgtgttccattaagattgctcattc 61
62  ggggtgctcaagtgacaaaccacatttgatcctggaggatttaccgagtcacatacaggct 121
122  tcgggttaagtcagtggtttaagtaaaatggaattatacaacgggtgggaggccaagtgtg 181
                                     M E L Y N G G R P S V
182  ttcagacttttaggaagtatatgagaaaagggttatatggcatcctaaccagggtccc 241
    F R L L G K Y M R K G L Y G I L T Q G P
242  atccctactcatcttgccttcatattggatggaacaggaggtttgctaagaagcataaa 301
    I P T H L A F I L D G N R R F A K K H K
302  ctgccagaaggagggtggtcataaggctggatttttagctcttctgaocgtactaacttat 361
    L P E G G G H K A G F L A L L N V L T Y
362  tgctatgagtttaggagtgaaatatgcgactatctatgccttttagcatogataatttctga 421
    C Y E L G V K Y A T I Y A F S I D N F R
422  aggaaacctcacgaggttcagtaacgtaacgtaacgtaacgtaacgtaacgtaacgtaac 481
    R K P H E V Q Y V M D L M L E K I D G M
482  atcaaggaagaaagtatcatcaatgcttatgatatttgcgtacgttttgtggtaacctg 541
    I K E E S I I N A Y D I C V R F V G N L
542  aagcttttaagtgagccagtcagaccgcagcagataagattatgagggctactgccaac 601
    K L L S E P V K T A A D K I M R A T A N
602  aattccaaatggtgtccttctccttgcctgtgtgtctatacttcaactgatgagatcgtgat 661
    N S K C V L L L A V C Y T S T D E I V H
662  gctgttgaagaatcctctgaattgaactccaatgaagtttgaacaatcaagaattggag 721
    A V E E S S E L N S N E V C N N Q E L E
722  gaggcaaatgcaactggaagcagctactgtgattcaaacgagaactggagtcgtattct 781
    E A N A T G S S T V I Q T E N M E S Y S
782  ggaataaaactttagaccttgagaaaaacacctacataaaatccttctcctgatgttctg 841
    G I K L V D L E K N T Y I N P Y P D V L
842  attcgaacttctggggagaccctctgagcaactacttactttggcagactactaattgc 901
    I R T S G E T R L S N Y L L W Q T T N C
902  atactgtattctccttatgcactgtggccagagattggtcttgcacagctggtgtgtgca 961
    I L Y S P Y A L W P E I G L R H V V W S
962  gtaattaacttccaacgtcattattcttacttggagaacataaggaatacttaaaataa 1021
    V I N F Q R H Y S Y L E K H K E Y L K *
1022  tttgtttctgttctagctcatcctgccttattcgcgatagttaagcttaagcatatcct 1081
1082  tgtggaataaactcggacacttaattaagccggtattttgtcttttttgaaaaaaaaaa 1141
1142  aaaaaaaaaaaaaaaaaa 1156
  
```

图1 R363 全长 cDNA 序列及其推导的蛋白质氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino sequences of R363 from *Hevea brasiliensis* (GenBank Accession No. AY461414)

* : 终止密码子 Stop codon.

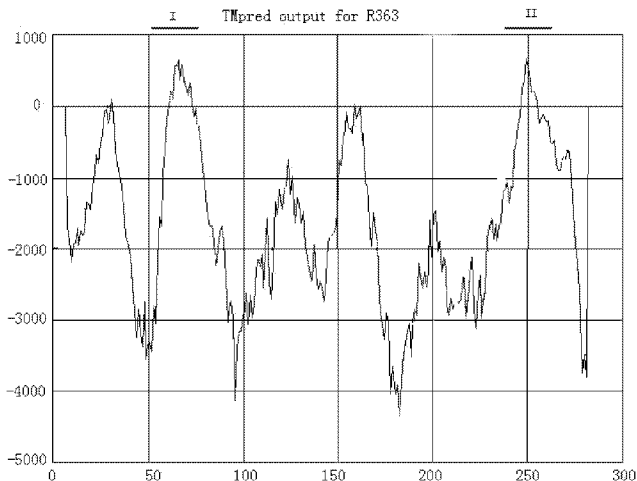


图 2 R363cDNA 编码的蛋白质疏水性分析

Fig. 2 Hydropathy profiles of the deduced protein of R363

横线表示两个跨膜结构域 The two putative transmembrane segments are indicated with horizontal lines and denoted by Roman numerals.

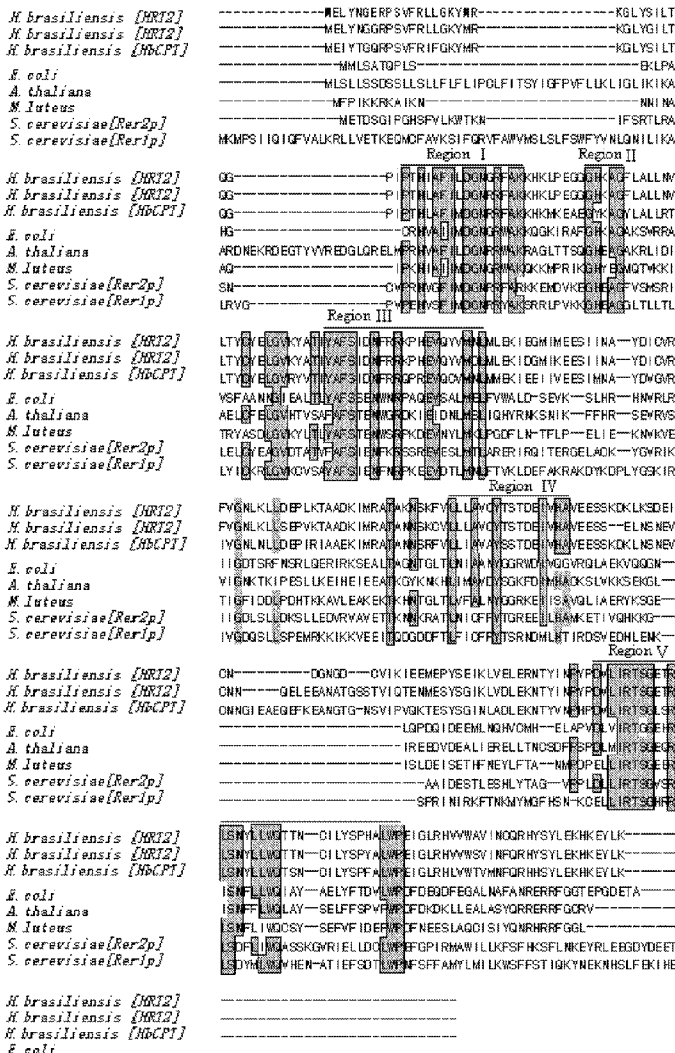


图 3 R363 与不同物种的顺式异戊烯基转移酶氨基酸序列同源比较结果

Fig. 3 Multialignment of the deduced amino acid sequences of R363 and cis-prenyltransferases from various species I ~ V: 顺式异戊烯基转移酶的 5 个保守区 The five conserved regions of cis-prenyltransferases; 黑色框表示 8 个序列中有 6 个以上的氨基酸相同 The black boxes indicated the same sequences with more than six in the eight sequences.

1.6 Northern 杂交分析

取胶乳、2% 乙烯处理的胶乳和叶片总 RNA 各 15 μg , 甲醛变性凝胶电泳, 转膜, *R363* 基因片段用地高辛标记。具体操作按 Roche 的地高辛标记和检测试剂盒 (DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit11) 进行。

2 结果和分析

2.1 cDNA 克隆及其序列同源性比较

获得的全长 cDNA 长度 1 156 bp, 命名为 *R363*。该序列中最大的一个阅读框 (ORF) 长度为 873 bp, 编码 290 个氨基酸残基。该 cDNA 的起始密码子 ATG 的 -3 位为 A, +4 为 G, 符合 Kozak 规律, 起始密码子 ATG 上游同一读框内还含有 1 个终止密码子; 在其阅读框终止密码子 TAA 下游同一读框内含有多个终止密码子, 并有 AATAAA 加尾信号和 polyA 尾 (图 1), 这些都符合有效翻译的基因的全长 cDNA 的特征^[7], 因此断定克隆到的 *R363* 包含一个完整的阅读框。该 cDNA 全长序列已在 GenBank 中登录 (登录号 AY461414)。

对该基因编码的氨基酸序列进行蛋白质基本性质预测分析, 该蛋白质的理论分子量为 32.9 kD, 等电点为 7.2。该基因编码的蛋白质是疏水性蛋白, 该基因编码的蛋白质是疏水性蛋白, 有 2 个推测的 N-端跨膜螺旋区 (55~75) 和 (240~260) (图 2)。

PROSITE 数据库分析该基因编码的氨基酸序列中包含 5 个功能位点: 1 个异戊烯基合成酶家族特征, 2 个糖基化位点, 5 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点, 1 个酪氨酸激酶磷酸化位点, 3 个 N-十四酰化位点。

多重比较结果显示 *R363* 与巴西橡胶树 HRT2 (GenBankTM Accession No. AB064661)、HbCPT (GenBankTM Accession No. AY124466)、大肠杆菌 *Escherichia coli* (Swiss-Prot Q47675), 小球菌 *Micrococcus luteus* (GenBankTM Accession No. AB004319), 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (GenBankTM Accession No. AF162441)、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* [Srt1p] (Swiss-Prot Q03175) 和 [Rer2p] (Swiss-Prot P35196) 等顺式-异戊烯基转移酶的同源性分别为 88%, 77%, 24%, 28%, 24%, 27% 和 27%。*R363* 具有异戊烯基合成酶 (undecaprenyl pyrophosphate synthetase) 家族的 5 个保守区 (图 3)。

2.2 *R363* 基因表达分析

对该基因进行 Northern 杂交分析, 结果表明 *R363* 在叶片中没见杂交信号, 而在常割树的胶乳和乙烯处理的常割树的胶乳中有杂交信号, 而且强度一致 (图 4), 说明该基因为胶乳特异表达基因, 并且其表达不被乙烯处理所诱导。

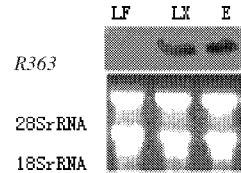


图 4 *R363* Northern blotting 分析

Fig. 4 Northern blotting analysis of *R363* mRNA

LF. 叶片 Leaf; LX. 无乙烯处理的胶乳 Latex without ethylene treatment; E. 2% 乙烯处理的胶乳 Latex treated with 2% ethylene.

3 讨论

顺式-异戊烯基转移酶催化异戊烯焦磷酸合成长链橡胶, 是天然橡胶合成中最重要 的关键酶。从目前研究结果推断它属于多基因家族, 在胶乳里可能有多个不同的顺式-异戊烯基转移酶基因。Ko^[5] 和 Han^[6] 等通过差减杂交、EST 和 cDNA-AFLP 等方法来筛选橡胶合成相关基因, 但没有筛选到与顺式-异戊烯基转移酶基因有同源性的差异片段, 可能是顺式-异戊烯基转移酶基因为低丰度表达基因, 经过差减后的 EST 库检测不到; 同时顺式-异戊烯基转移酶基因没有在 cDNA-AFLP 分析中用到的 *ApoI* 和 *MseI* 酶切位点。而胶乳中存在着与胶乳再生 (橡胶生物合成) 特异表达的相关基因, 因此本研究通过筛选胶乳特异表达 cDNA 消减文库, 得到了多个与顺式异戊烯基转移酶基因高度同源的差异片段, 阳性克隆 *R363* 是其中之一。

对 *R363* 基因进行序列分析, 表明它与顺式-异戊烯基转移酶具有较高的同源性, 具有顺式-异戊烯基转移酶家族的特征, 含有顺式-异戊烯基转移酶的五 个高度保守区。而且 *R363* 基因编码的蛋白是一种疏水性蛋白, 有一个跨膜螺旋区, 而蛋白质序列含有跨膜区提示它可能作为膜受体起作用或是定位于膜的锚定蛋白。研究发现橡胶转移酶是紧密结合在胶粒的表面结构上, 也是一种疏水性膜蛋白^[9]。推测 *R363* 可能是一种顺式-异戊烯基转移酶基因。

R363 Northern 杂交分析表明, *R363* 基因在胶

乳中高度表达,在叶中不表达,乙烯刺激也不改变 *R363* 基因的转录水平,这与某些橡胶合成相关基因,如 HMGC_oA 还原酶^[10]、橡胶延长因子(REF)^[11] 和小橡胶粒子蛋白(SRPP)等基因特征相似,即胶乳中的表达量比叶片高得多,而且乙烯刺激和伤害均不改变基因的转录水平^[12],从而推测 *R363* 也是与橡胶合成相关的基因。

参考文献

- [1] Cornish K, Backhuas R A. Rubber transferase activity in rubber particles of guayule [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(12): 3809–3813.
- [2] Orgura K, Koyam T. Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation [J]. *Rev Chem*, 1998, 98: 1263–1276.
- [3] Koyama T. Molecular analysis of prenyl chain elongation enzymes [J]. *Biochemistry*, 1999, 63: 1671–1676.
- [4] Asawatreratanakul K, Zhang Y W, Wititsuwannakul D, et al. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding *cis*-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis* [J]. *Europ J Biochem*, 2003, 270: 4671–4680.
- [5] Ko J H, Chow K S, Han K H. Transcriptome analysis reveals novel features of the molecular events occurring in the laticifers of *Hevea brasiliensis* (the para rubber tree) [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53: 1–14.
- [6] Kush A, Goyvaerts E, Chye M L, et al. Laticifer specific gene express in *Hevea brasiliensis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1787–1790.
- [7] Zhang Q H(张庆华), Mao M(茅矛), Chen Z H(陈竺). Progress of the full-length cDNA cloning strategy in human genome research [J]. *Prog Biotechn(生物工程进展)*, 2000, 20(4): 3–5.(in Chinese)
- [8] Han K H, Shin D H, Yang J M, et al. Genes expressed in the latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Tree Physiol*, 2000, 20: 503–510.
- [9] Cornish K. The separate roles of plant *cis*- and *trans*-prenyltransferase in *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis [J]. *Europ J Biochem*, 1993, 218: 267–271.
- [10] Chye M L, Tan S A, Tan C T, et al. Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding the precursor of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16(6): 1077–1078.
- [11] Goyvaerts E, Dennis M S, Light D R, et al. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis* [J]. *Plant Physiol*, 1991, 97: 317–321.
- [12] Oh S K, Shin D H, Yang J M, et al. Isolation, characterization, and functional analysis of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein (SRPP) from *Hevea brasiliensis* [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(4): 17132–17138.