

# 巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 微管相关蛋白 全长 cDNA 克隆及表达分析

邓柳红<sup>1</sup>, 肖苏生<sup>1</sup>, 罗明武<sup>2</sup>, 张春发<sup>1\*</sup>

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所热带作物国家重点实验室, 海口 571101;

2. 华南热带农业大学, 海南 儋州 571737)

**摘要:** 从巴西橡胶树 *Hevea brasiliensis* 差减 cDNA 文库中分离到微管相关蛋白(Microtubule-associated protein, MAPs) 基因片段, 根据该基因片段序列信息, 设计特异引物, 采用 cDNA 末端快速扩增技术 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 进行差异片段的 5' 和 3' 端的扩增, 获得了长度为 788 bp 的全长 cDNA, 该基因在 GenBank 中的登录号为 AY461412。序列分析表明该基因包含完整的开放阅读框, 编码 144 个氨基酸, 与微管相关蛋白基因家族具有很高的同源性, 推测该基因是微管相关蛋白基因。半定量 RT-PCR 检测证实它在胶乳中的表达强于叶中, 胁迫处理(伤害及乙烯处理)使其表达上调。

**关键词:** 巴西橡胶树; 微管相关蛋白; cDNA 末端快速扩增技术; RT-PCR

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)06-0480-05

## Cloning and Identification of a cDNA Encoding Putative Microtubule-associated Proteins from *Hevea brasiliensis*

DENG Liu-hong<sup>1</sup>, XIAO Su-sheng<sup>1</sup>, LUO Ming-wu<sup>2</sup>, ZHANG Chun-fa<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;

2. South China University of Tropical Agriculture, Danzhou, 571737, China)

**Abstract:** The cell skeleton of laticiferous cell might play a very important role in latex production and latex flow, and in wound healing and laticifer blocking of tapped *Hevea brasiliensis*. In order to understand the relationship between cell skeleton of laticiferous cells and latex exploitation and laticifer blocking, a clone R329 was isolated from the subtracted cDNA library of *Hevea brasiliensis*, which showed high homology with microtubule-associated proteins. The complete cDNA of R329 was obtained by using 3'-and 5'-RACE strategies. It was 788 bp long containing an 435 bp ORF, flanked by a 173 bp 5'-UTR and a 179 bp 5'-UTR including a poly(A) tail of 28 bp. The DNA sequence of R329 is available from the GenBank databases under the accession number AY461412. The transcripts of R329 were observed by RT-PCR, no signal was detected in leaves of *Hevea brasiliensis*, whereas significant signals of transcripts were clearly shown in latex isolated from virgin rubber trees, regularly tapped trees and ethylene-treated rubber trees. These results indicate that the expression of the gene is strongly induced by stress (wound and ethylene) treatments.

**Key words:** *Hevea brasiliensis*; Microtubule-associated protein; Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE); RT-PCR

收稿日期: 2005-03-16 接受日期: 2005-09-28

基金项目: 中国热带农业科学院科技基金项目资助

\* 通讯作者 Corresponding author

天然橡胶主要来源于大戟科的巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)体内的乳管系统。乳管的排胶时间与胶乳再生能力是胶乳产量的主要限制因子。研究认为胶乳的停排是由于乳管割口处橡胶粒子絮凝堵塞而引起的,因此乳管的堵塞成为限制橡胶树胶乳产量的一个重要因素<sup>[1]</sup>。

人们对乳管堵塞过程中橡胶粒子的凝固机制做了很多研究,在分子生物学领域上最有代表性的是 Giordl 等<sup>[2]</sup>发现 *Hevein* 基因参与胶乳凝固。而郝秉中等<sup>[3]</sup>发现乳管割口除凝固的橡胶粒子外,还形成一个明显的蛋白质网,推测乳管细胞骨架可能参与割胶后乳管伤口的封闭过程,并在橡胶树乳管排胶和乳管堵塞中起重要作用<sup>[4,5]</sup>,但是这一推断目前还缺乏分子生物学方面的证据。

微管是乳管细胞骨架主要组成之一。微管相关蛋白(Microtubule-associated protein, MAPs)是与微管特异结合并影响其结构与功能的一类微管辅助蛋白,它既能稳定微管,也可促进微管解聚合,对细胞中微管的调控和分布起很重要的作用<sup>[6,7]</sup>。通过对 MAPs 研究,可以了解乳管细胞内的微管的功能及分布,进而研究微管在排胶和乳管堵塞中所起的作用。

本研究从橡胶树差减 cDNA 文库中分离到在胶乳中高表达的微管相关蛋白家族基因片段,并采用 cDNA 末端快速扩增技术首次获得了橡胶树微管相关蛋白基因全长 cDNA,对其序列特征及基因表达进行了分析。该基因的克隆为进一步研究乳管细胞骨架在乳管排胶和乳管堵塞中所起的作用奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

试验材料为巴西橡胶树优良品系“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 橡胶树胶乳及叶片总 RNA 提取

**橡胶树胶乳总 RNA 提取** 参照 Kush 等<sup>[8]</sup>的胶乳提取方法。取 10 ml 胶乳加入等体积 2 倍胶乳 RNA 提取缓冲液,涡旋混匀,加入等体积酚/氯仿/异戊醇,涡旋混匀,4℃,9 000 ×g 离心 15 min,取上

清液,加入等体积酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提一次,取上清液,加入 1/3 体积 8 mol/L LiCl 过夜沉淀总 RNA,4℃,9 000 ×g 离心 30 min,取沉淀,用 200 μl RNase-free 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解后,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH5.2) 和 2 倍体积无水乙醇,-20℃下放置 2 h,沉淀用预冷的 75%乙醇漂洗并干燥后,加 200 μl RNase-free 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解,取部分样品测 λ230、260、280 下的 OD 值检定 RNA 样品的纯度、浓度及进行 2%变性电泳检测 RNA 的完整性。

**橡胶树叶片总 RNA 提取** 叶片 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一次后,再依次用等体积酚/氯仿/异戊醇和氯仿/异戊醇各抽提一次,取上清液,加入 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH5.2) 和 2 倍体积无水乙醇,-20℃下放置 2 h,沉淀用预冷的 75%乙醇漂洗并干燥后,加 200 μl RNase-free 的 ddH<sub>2</sub>O 溶解,取部分样品测 λ230、260、280 下的 OD 值检定 RNA 样品的纯度、浓度及进行 2%变性电泳检测 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 采用 RACE 克隆巴西橡胶树微管相关蛋白基因全长 cDNA

**引物设计** 从抑制消减杂交获得的橡胶树差减 cDNA 文库中分离到一个与 MAPs 高度同源的基因片段 R329,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'-CCACAGTCAAGTCAGCTGGGACAAGGT-3'; 3'-RACE-GSP: 5'-TGTCTGAATCCCCGGCTGCC-CATAGTT-3'。5' 和 3' 末端 cDNA 末端的快速扩增 (RACE) 采用 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 技术进行差异片段的 5' 和 3' 端的扩增,方法按 Clontech 公司的 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。首先进行反转录反应,制备 5'-RACE-Ready cDNA 和 3'-RACE-Ready cDNA。5'-RACE-Ready cDNA 以 5'-RACE CDS Primer (5'-(T)25V N-3') 和 BD SMART II™ A Oligonucleotide (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCA-GAGTACGCGGG-3') 为引物,3'-RACE-Ready cDNA 以 3'-RACE CDS Primer A (5'-AAGCAGTGGTA-

TCAACGCAGAGTAC(T)30V N-3')为引物,加入巴西橡胶树胶乳总 RNA,在逆转录酶作用下合成。5'-和 3'-cDNA 末端 PCR 扩增分别以通用引物混合物(5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT-3',5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3')和基因特异引物 5'-RACE-GSP 和 3'-RACE-GSP 进行。PCR 条件为:94°C 5 s,60°C 10 s,72°C 3 min,共计 35 个循环,再 72°C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ l RACE 产物于 1% Agrose Et/Br 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。与 TaKaRa 公司的 pMD18-T Vector 连接后转化 *Escherichia coli* XL1-Blue 受体菌,过夜培养。次日挑取白色菌斑,经酶切鉴定后送去上海生物工程有限公司测序。将通过测序获得的 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,得到拼接好的全长的 cDNA 序列。

#### 1.4 cDNA 序列及其编码氨基酸分析

核酸和蛋白质序列比较、可读框架 ORF 分析及序列提交在 NCBI 进行,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 workbench 上进行。前导肽和功能位点分析分别采用 SignalP 和 Motif Scan 进行,序列多重比较及进化关系分析采用 Clustal W 程序进行。

#### 1.5 表达产物检测

分别以等量的巴西橡胶树叶片总 RNA、巴西橡胶树未割树胶乳总 RNA、常割树胶乳总 RNA 和 2% 乙烯处理的胶乳总 RNA 为模板,进行反转录,合成单链 cDNA,RT-PCR 的正义引物为 5'-CGGA-ATTCATGTCAAAGAGTTACTTCA-3',反义引物为 5'-GTCGACT TAGACAATCCTCACGGAA-3';以 18S rRNA 的扩增作为内参用来校正模板的用量。RT-PCR 程序为:94°C 变性 5 min,然后 94°C 30 s,59°C 30 s,72°C 50 s,25 个循环。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 巴西橡胶树微管相关蛋白全长 cDNA 克隆及其序列同源比较分析

获得的全长 cDNA 长度 788 bp,命名为 R329。该序列中最大的一个开放阅读框(ORF)长度为 435 bp,编码 144 个氨基酸残基。该 cDNA 的起始密码子 ATG 的 -3 位核苷酸为嘌呤,起始密码子 ATG 上游同一阅读框内含有多个终止密码子;在其阅读框终止密码子 TAA 下游同一阅读框内含有多个终止密码子,并有 polyA 尾,这些都符合有效翻译的基因的全长 cDNA 的特征。因此断定克隆到的 R329 包含一个完整的 ORF,其 5'UTR 有 173 个核苷酸,3'UTR 有 179 个核苷酸(图 1)。该 cDNA 全

```

1   acgcggggaaatttagggcagcgattatataaattaaatagttggataagctaacactcage
61   gcaaggcggcattttattttatctgcatctgcaacgaaaacccagagcttccgagagtg
121  tttgatctgaaagttatcttctttcttcttctgctgtatcctaaggcggaaatgtcaaaag
                                     M S K
181  agttacttcaagcaagagcatgatctgcacaagagacgggcagaggcagctagatcagg
    S Y F K Q E H D L D K R R A E A A R I R
241  gaaaaataaccagataggattccagtgattgtggagaaggcagaaagaagtgatatacca
    E K Y P D R I P V I V E K A E R S D I P
301  aacatagataagaaaaagtacottgtccagctgacttgactgtggacagttgtatata
    N I D K K K Y L V P A D L T V G Q F V Y
361  gttattcgtaaaggattaaattaagtgacagagaaggcaatttttatatttggacaat
    V I R K R I K L S A E K A I F I F V D N
421  gtgcttctctacaggtgccattatgtctgccatataatgaagagaagaagaagatgaagat
    V L P S T G A I M S A I Y E E K K D E D
481  ggatttctttatgttacctacagggagaaaaacacattcggatcctaataccactgtagc
    G F L Y V T Y R E K T H S D L I S H C S
541  gtcgttgggatttgcattgtttcttccottgtttcatcaatttgattccgtgaggatt
    V V V G F A L F L P L F H Q F D S V R I
601  gtctaaatcccgctgccatagtttcattgtccgcctgatcataaagttcctgccagtg
    V *
661  atatgatgtacagttaaatattgtatataagcatgaaggtgacttgttcaactttcaatgt
721  taaatgttccagtcatttttaagaaatccttcagtcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
781  aaaaaaa

```

图 1 全长 cDNA 序列及其推导的蛋白质氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of the full-length cDNA

长序列已在 GenBank 中登录(登录号 AY461412)。

对该基因编码的氨基酸序列进行蛋白质基本性质分析,该蛋白质的理论分子量为 16.713 kD,等电点为 9.258,有疏水性区域,2 个推测的跨膜螺旋区(76-96aa 和 118-138aa)(图 2),没有发现有信号肽。PROSITE 数据库分析该基因编码的氨基酸序列中包含有 4 种类型功能位点:2 个蛋白激酶 C 磷酸化位点,2 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点,1 个 N-十四酰化位点,1 个酪氨酸激酶磷酸化位点。

多重比较结果表明 R329 与鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、水稻(*Oryza sativa*)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、小麦(*Triticum aestivum*)、人类以及马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans*) 等的微管相关蛋白具有较高的同源性,分别为 86%、81%、76%、73%、70%、53%和 74%。进化关系表明,橡胶树 R329 与鹰嘴豆、拟南芥、人类以及马铃薯晚疫病菌等的微管相关蛋白同属一组,与鹰嘴豆的亲缘关系最近。图 3、4 分别为橡胶树 R329 与这 7 种微管相关蛋白的多重

比较结果和进化关系。

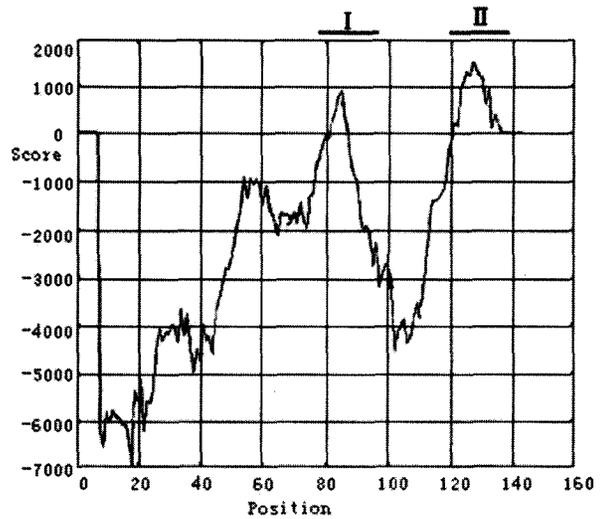


图 2 R329cDNA 编码的蛋白质疏水性分析

Fig. 2 Hydropathy profiles of the deduced protein of R329. 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.

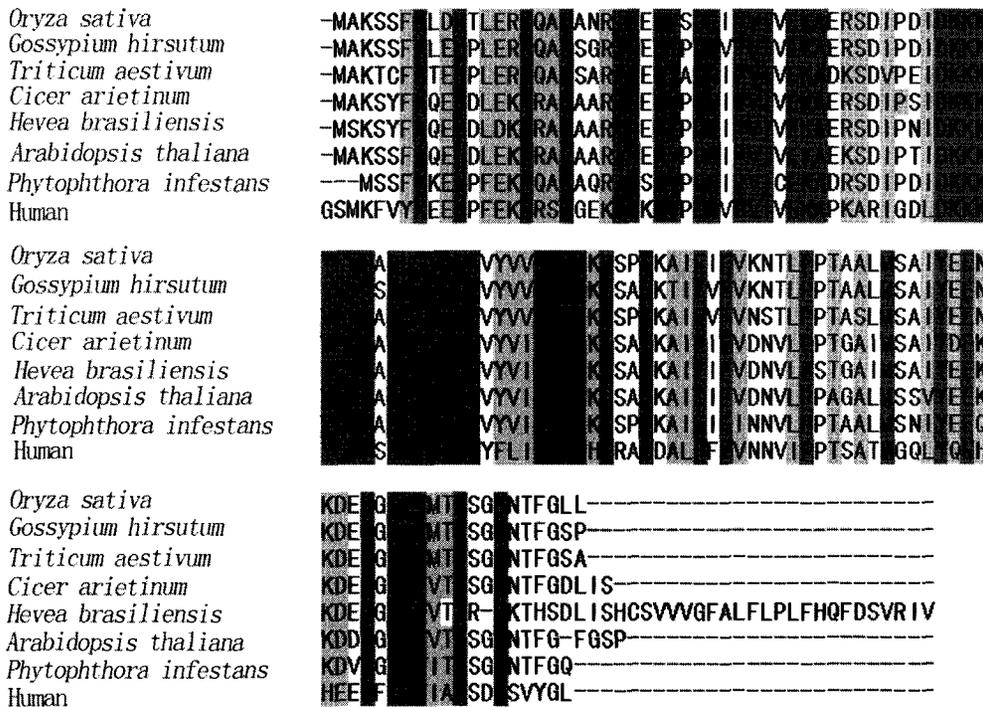
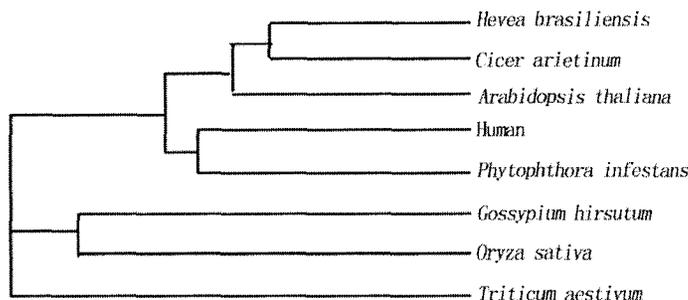


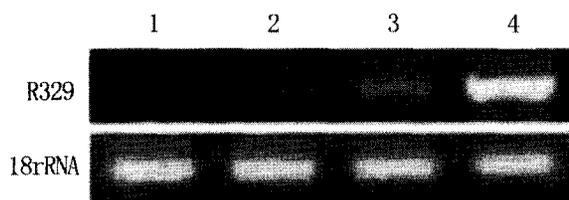
图 3 R329 与不同物种微管相关蛋白氨基酸序列多重比较结果

Fig. 3 Multialignment of the deduced amino acid sequences from R329 with Microtubule-associated protein from various species. 黑色表示一致氨基酸,灰色表示相似氨基酸。Identity is indicated by a black box, and similarity by a grey box.

图 4 *R329* 与不同物种微管相关蛋白的亲缘关系Fig. 4 Phylogenetic tree of *R329* with 7 Microtubule-associated protein from different species

## 2.2 巴西橡胶树 *R329* 基因表达分析

通过 RT-PCR 对 *R329* 基因表达进行分析, 结果(图 5)显示, 该基因在胶乳中有表达, 而在叶中没检测到其表达, 说明该基因在乳管里特异表达。在不同胁迫处理下, 该基因表达强弱依次为: 乙烯处理的胶乳、常割树胶乳及未割树胶乳, 说明该基因可能受伤害及被乙烯所诱导。

图 5 巴西橡胶树 *RMAPs* 基因表达分析Fig. 5 RT-PCR analysis of *RMAPs* mRNA

1: 叶片 Leaf; 2: 未割树胶乳 Latex isolated from virgin rubber trees; 3: 常割树胶乳 Latex isolated from regularly tapped trees; 4: 乙烯处理的胶乳 Latex isolated from ethylene-treated rubber trees.

## 3 讨论

在橡胶树中, 有研究<sup>[3-5]</sup>认为在采胶的情况下, 为了维持乳管中胶乳的再生系统, 乳管细胞骨架可能起非常重要的作用, 并可能参与割胶后乳管伤口的封闭过程, 但这一推测目前还缺乏分子生物学上的证据。本研究克隆到的 *R329* 包含一个完整的 ORF, 是一个有效翻译的基因的全长 cDNA。同源比较及功能保守区分析结果表明, 该基因与微管相关蛋白基因家族具有很高的同源性, 推测获得的

*R329* 全长 cDNA 是微管相关蛋白家族基因。研究发现该基因在乳管里特异表达, 且可能受伤害及被乙烯等胁迫条件诱导表达, 说明该基因在采胶情况下表达活跃。由于微管相关蛋白是与微管特异结合并影响其结构与功能的一类微管辅助蛋白, 橡胶树的微管相关蛋白基因的克隆及其表达分析, 有助于进一步了解微管在排胶及乳管堵塞中的作用。

## 参考文献

- [1] D'auzac J, Jacob J L, Crestin H, et al. The Regeneration of cis-polyisoprene production from *Hevea brasiliensis* [J]. Present Res Plant Physiol, 1997, 1:273-331.
- [2] Gidrol X, Chrestein H, Tan H L, et al. Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex [J]. J Bio Chem, 1994, 269:9278-9283.
- [3] Hao B Z, Wu J L, Tan H Y. Laticifer plugging of *Hevea brasiliensis* after severing [J]. Chin J Trop Crop, 1996, 17(1):1-6. (in Chinese)
- [4] Gao Z Q, Hao B Z. The possible effect of plant cell skeleton on latex production and latex flow of *Hevea brasiliensis* [J]. J Hainan Nor Univ (Nat Sci), 2001, 14:1-3. (in Chinese)
- [5] Gao Z Q, Meng C X, Wu J L, et al. Actin cytoskeleton in laticiferous cells of *Hevea brasiliensis* in relation to latex exploitation [J]. Chin J Trop Crop, 2003, 24(3):22-26. (in Chinese)
- [6] Hepler P K, Hush J M. Behavior of microtubules in living plant cells [J]. Plant Physiol, 1996, 112:455-461.
- [7] Jourdain L, Curmi P, Sobel A, et al. Stathmin is a tubulin sequestering protein which forms a ternary T2S complex with two tubulin molecules [J]. Biochemistry, 1997, 36:10817-10821.
- [8] 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.