

# 油菜含 MATH 结构域基因 *BnaMT-1* 的克隆及表达分析

赵黎明<sup>a</sup>, 余媛<sup>b</sup>, 刘春林<sup>b</sup>, 阮颖<sup>a\*</sup>

(湖南农业大学 a.生物科学与技术学院; b.农学院, 湖南 长沙 410128)

**摘 要:** 利用已构建的甘蓝型油菜种子发育过程 SSH 文库, 筛选得到 1 个含 MATH 结构域的 EST 序列, 并以其为信息探针, 经电子克隆获得了该基因的全长 cDNA, 命名为 *BnaMT-1*。*BnaMT-1* 的开放阅读框(ORF)全长 1 209 bp, 编码 402 个氨基酸, 相对分子质量为 46 130.7, 预测的理论等电点为 8.50, 其结构包括信号肽、跨膜结构及 2 个连续的 MATH 结构域, 为亲水性胞外分泌蛋白; 进化树分析发现, 该基因与拟南芥含 MATH 结构域基因亲缘关系较近; 利用半定量 RT-PCR 技术对该基因在甘蓝型油菜湘油 15 号不同组织及种子不同发育时期的表达分析表明: *BnaMT-1* 在叶、花和果荚中都有表达, 在根和茎中没有表达; 种子发育过程中, *BnaMT-1* 均有表达, 且表达量于花后 30~35 d 最高, 之后表达量下降。推测该基因可能与种子发育及油脂合成代谢相关。

**关 键 词:** 油菜; MATH 结构域基因; 克隆; 表达分析

中图分类号: S634.3; Q781

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)03-0251-05

## Cloning and expression analysis of a MATH-domain gene *BnaMT-1* in *Brassica napus*

ZHAO Li-ming<sup>a</sup>, SHE Yuan<sup>b</sup>, LIU Chun-lin<sup>b</sup>, RUAN Ying<sup>a\*</sup>

(a.College of Bioscience and Biotechnology ;b.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** An EST sequence containing MATH domain was selected from the SSH library constructed from the developing seeds. According to the sequence, a full cDNA was cloned using *in silico* cloning, named *BnaMT-1*. *BnaMT-1* contained 1 209 bp and encoded a hydrophilic secretory protein of 402 amino acid residues containing a signal peptide, a transmembrane domain and two MATH domains. The estimated molecular weight and isoelectric point of the putative protein were 46 130.7 and 8.50, respectively. Phylogenetic analysis showed that *BnaMT-1* was closely related to *Arabidopsis thaliana*. The expression map was done in the whole plant and at different developmental stages of seeds by semi-RT-PCR. The results showed that *BnaMT-1* was expressed in leaf, flower and silique, but not in root and stem. *BnaMT-1* was expressed through the seed developmental stages with the expression first up-regulated, then kept at the highest level from 30 days to 35 days after flowering, and down-regulated afterwards. It was inferred that the function of *BnaMT-1* gene may be related to seed development.

**Key words:** *Brassica napus* L.; MATH-domain gene; cloning; expression analysis

安眠蛋白与 TRAF-C 同源结构域(meprin and TRAF-C homology domain, MATH)由 7 个反向平行的  $\beta$ -螺旋折叠组成。安眠蛋白为一类细胞外金属肽酶<sup>[1-3]</sup>, 锚定于质膜上, 与生长因子、胞外基质

蛋白、生物活性肽密切相关<sup>[4-5]</sup>。肿瘤抑制因子受体协助因子(TNF-receptors associated factor, TRAFs)是一类能介导和调控 TNF-Receptors(TNFR)家族不同成员结合的受体蛋白<sup>[6-9]</sup>。TRAF 家族在其 C 端具

收稿日期: 2012-02-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071455)

作者简介: 赵黎明(1987—), 女, 内蒙古赤峰人, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究, zhu\_zhaoliming@163.com; \*通信作者, yingruan@hotmail.com.cn

有 180 个氨基酸残基,形成 7~8 个反向平行的  $\beta$ -螺旋折叠的 TRAF 结构域,即 MATH 结构域。TRAF 结构域介导 TRAFs 成员和受体、TRAFs 成员之间、TRAFs 成员和一些胞内蛋白或信号分子的相互作用。含 MATH 结构域的蛋白在哺乳动物生长发育和衰老过程中发挥重要作用,因而在医学上研究较多。在植物中,较多的研究集中在模式植物拟南芥上,在其他植物尤其是具有一定经济价值的植物中报道较少。Kallijarvi 等<sup>[10]</sup>认为,所有包含 MATH 结构域的蛋白亚家族在蛋白互作过程中都起着非常明显的调控作用。

油菜为中国主要的油料作物<sup>[11]</sup>,其菜油产量与品质的进一步提高是当前研究的重点,而对油菜储存油脂的脂肪酸代谢调控的内在机制研究则是一条重要途径。笔者以已经构建的油菜种子发育中同化产物转化的 2 个关键时期(20、35 d)的 SSH 文库<sup>[12]</sup> 35 d 的 EST 文库为基础,克隆了 1 个含有 MATH 结构域的基因全长序列,命名为 *BnaMT-1*,对该基因进行了生物信息学分析,并对油菜不同组织及种子不同发育时期的表达进行了研究,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)湘油15号种子及大肠杆菌DH5 $\alpha$ 均由湖南农业大学植物代谢调控实验室提供;pMD-19载体购自TaKaRa公司;LongAmp Taq DNA Polymerase购自BioLabs公司;Taq MasterMix购自康为世纪生物公司;RNA转录试剂盒购自Fermentas公司;DNA凝胶回收试剂盒购自TransGen公司;dNTPs、DNAMarker购自天根生物公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 甘蓝型油菜 *BnaMT-1* 基因的克隆

以 *BnaMT-1* 的 EST 为探针,与已经完成测序的 BRAD<sup>[13]</sup>数据库(<http://brassicadb.org/brad/>)进行比对,

获得 3 条同源性较高的片段,分别为 KBrB045112、KBrB004019、KBrH001N23,将 3 个片段对应的基因组序列于 MIT 数据库(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)进行基因扫描,通过 mRNA 拼接后得到完整的 *BnaMT-1* cDNA 序列,全长为 1 261 bp, CDS 全长为 1 215 bp。根据此序列的起始外显子与终止子设计引物:BnaMT-1F,5'-ATGAAGAGTCGTTACACA AAGACCG-3';BnaMT-1R,5'-CTAACTAGGAAA GTACTTGGTTGTA-3'。提取湘油 15 号花后 35 d 种子 RNA,通过 RNA 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链,并以此 cDNA 为模板扩增 *BnaMT-1* 基因全长,反应体系为:5 $\times$ Long Amp Taq Buffer 3  $\mu$ L, dNTPs 0.45  $\mu$ L, Long Taq DNA 聚合酶 0.6  $\mu$ L,引物各 0.6  $\mu$ L,模板 0.75  $\mu$ L,加 ddH<sub>2</sub>O 至 15  $\mu$ L。反应程序:95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95  $^{\circ}$ C 变性 10 s,61  $^{\circ}$ C 退火 30 s,65  $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 35 个循环;65  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。经琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带回收并连入 pMD-19 载体,热激法将连接质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,重组子经鉴定后送南京金斯瑞生物技术公司测序。

#### 1.2.2 *BnaMT-1* 基因的生物信息学分析

测序结果用 DNA Star 进行拼接,得到完整 *BnaMT-1* 基因全长 CDS,将此序列在 BRAD 数据库进行 BLAST 比对,确定其正确性;通过 NCBI 对该 CDS 序列进行氨基酸推导及结构域分析,采用文献[14]中的生物学网站和软件对 *BnaMT-1* 基因编码的蛋白的亲水性/疏水性、信号肽、二级结构及跨膜结构进行分析和预测;采用 MEGA 4.1 软件将 *BnaMT-1* 与所含 MATH 结构域比较具有代表性的物种的序列进行聚类分析。

#### 1.2.3 *BnaMT-1* 基因在湘油15号不同组织中的表达

分别提取湘油 15 号同一植株的根、茎、叶、花及开花后 5 d 的果荚总 RNA 以及花后 20、25、30、35、40 d 种子的总 RNA,反转录后以 cDNA 为模板,对  $\beta$ -Actin 基因和目标基因进行半定量 RT-PCR 表达分析。

目的基因的扩增引物为:B-ESTF,5'-GGCG

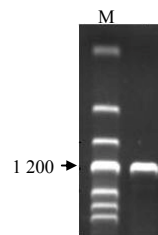
CGCCGGATCCGTAAAGCGAAATGAACCC-3' ;  
B-ESTR ,5'-CCATGG TCTAGAACAGGAGAATG  
GAGCAA-3'。反应体系为 :*Taq* MasterMix 7.5  $\mu$ L ,  
引物各 0.5  $\mu$ L ,cDNA 模板 1  $\mu$ L ,ddH<sub>2</sub>O 加至 15  $\mu$ L。  
反应程序 :94  $^{\circ}$ C 预变性 4 min ,94  $^{\circ}$ C 变性 40 s ,57  $^{\circ}$ C  
退火 40 s ,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min ,共 28 个循环 ; 72  $^{\circ}$ C  
延伸 7 min。

*Actin* 的扩增引物为 :ActF ,5'-TTCAATGTCCC  
TGCCATGTATGT-3' ;ActR ,5'-TCTTAGCCGTCT  
CCAGCTCTTGC-3' ; 反应程序和体系与扩增目的  
基因的体系和体系相同。

## 2 结果与分析

### 2.1 *BnaMT-1* 基因克隆

利用引物 *BnaMT-1F* / *BnaMT-1R* ,以湘油 15  
号 35 d 种子 cDNA 为模板进行 PCR 扩增 ,得到 1  
条约 1 200 bp 的扩增条带(图 1) ,条带大小与预期相  
符。测序结果表明 ,扩增产物长度为 1 209 bp ,序  
列与电子克隆产物同源性为 99%。由此表明 ,所  
克隆的片段为甘蓝型油菜 *BnaMT-1* 基因的 CDS  
全长序列。



M DNA MarkerIII ; 1 *BnaMT-1* 基因 CDS。

图 1 *BnaMT-1* 基因 CDS 的 PCR 扩增片段

Fig.1 PCR product of *BnaMT-1* gene full-length CDS

### 2.2 *BnaMT-1* 基因序列及蛋白质理化性质

*BnaMT-1* 基因编码 402 个氨基酸(图 2)。  
*BnaMT-1* 蛋白相对分子质量为 46 130.7 ,等电点(pI)  
为 8.50 ;疏水性/亲水性分析表明 ,多肽链第 17 位  
半胱氨酸(Cys)疏水性最强 ,第 151 位天冬酰胺  
(Asn)、第 152、301 位赖氨酸(Lys)和第 344 位精氨  
(Arg)亲水性最强。整体看来 ,亲水性氨基酸均  
均匀分布在整条肽链中 ,并多于疏水性氨基酸 ,整个  
肽链表现为亲水性 ,可以认为 *BnaMT-1* 蛋白是亲  
水性蛋白。用隐马尔可夫模型(HMM)进行信号肽  
分析 ,结果显示此蛋白中有 1 个信号肽 ,成熟位点  
在 24~25 的丙氨酸(Ala)和丝氨酸(Ser)之间 ,1~24  
个氨基酸为信号肽部分 ,从第 25 个氨基酸开始为  
成熟蛋白部分。亚细胞定位预测结果显示该基因被  
定位于胞外 ,为分泌蛋白。

```

1 atgaagagctgttacacaaagaccggtctctgtgtaattctcttgtttgtctattcatcatcaccctctgcctcttca
M K S R Y T K T G P A V I L L F C L F I I T S A S S
79 agttcttcatacagcaagccactgatgacttcaccacaaacttgcaattggacgatggagatggaccagaccaatc
S S F I Q Q A T D D F T T N L Q L D D G D G P D P I
157 caggagaaagcacattactttcacacacatgttcaagacggagatggaccagatccaatccaggagaagccattac
Q G E A H Y F H T H V Q D G D G P D P I Q G E A H Y
235 ttacataaccatgaccaagaggtctcatcagtgactataaagtctcagcttcaaacgcaatagtgagggtctcaga
L H N H D Q E V S S R D Y K V S A S N A I V K G L R
313 agtcgtctccatcttcttactctctaaagatggagtcgttcaacaccctacttaagtgcgaatactcagagagatat
S R P P S S Y S L K M E S F N T L L K S K Y S E R Y
391 gtatctcgtctcttctcagccgttgctataactggacacttgtgtgtacccgaacgggaacaagaatgataaaggt
V S R P F S A A G Y N W T L V V Y P N G N K N D K G
469 tcagggtacctctcgttttacgcagccatagacaactccactctcgtccacatgaagaggtttacgttgatctcagg
S G Y L S L Y A A I D N S T L A P H E E V Y V D L R
547 ttttacgtcttcaacaagaagagaagaagtactttaccatccaagatgtttggagatataataatttcaaaacgatg
F Y V F N K K E K K Y F T I Q D V W R Y N N F K T M
625 tgggggttctcaggttctccctggttatacatttaaaagccctataatggatacctctatgatggagatcactgc
W G F S Q V L P G Y T F K S P Y N G Y L Y D G D H C
703 gagtttggtgttgatgtgaccactcccactgtcttcaacatcagaacttttactgttgcttaacaatttcaaaacc
E F G V D V T T P T V F Q T S E L F T V A N N F K T
781 ccgacattcactggagacttctgaagttctccagttgctcgaagatacttactgtctgatactttctccatcgga
P T F T W R L L K F S T L L E D T Y L S D T F S I G
859 ggaagacgttggaatatacaagtgaaatcaagtggtggtgacaaaggaaggaagaaagcttggatgatattatc
G R R W N I Q V N P S G R D K G K G K A L S M Y L I
937 gttaatcataacgaggaactcagaccttttgagaggatttatgttctgtaagcttcgagttcttaacaaattcaaa
V N H N E E L R P F E R I Y V R A K L R V L N K F K
1015 ttcaaaaagcttgaaaggcaactgataactggttcagtcgttggaaactggagctgcttatggttggggttctagt
F R N V E R Q T D N W F S R W E T G R A Y G W G S S
1093 gaatttgcctctctctaatctcaagattcatcaagggtttcttggatgataagttgactgttcaagtcgaa
E F V P L S N L K D S S K G F L V D D K L T V Q V E
1171 attgaagccgttttctacaacagttactttctagtttag 1209
I E A V S T T K Y F P S *

```

图2 *BnaMT-1* 基因序列及推导的氨基酸序列

Fig.2 Gene sequence and deduced amino acid sequence of *BnaMT-1*

### 2.3 蛋白结构特征与进化树分析

*BnaMT-1* 编码的蛋白质由 19.15%的  $\alpha$ -螺旋、5.47%的  $\beta$ -转角、27.36%的  $\beta$ -折叠和 48.01%的随

机卷曲组成,随机卷曲结构是主要组成部分。通过 NCBI 对蛋白质保守结构域分析(图 3),该蛋白包含 2 个连续的 MATH 结构域。

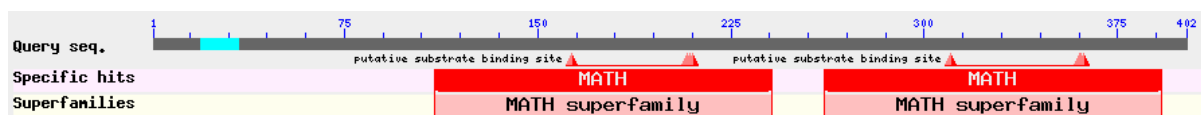


图3 *BnaMT-1*基因的保守结构域分析结果

Fig.3 Analysis of the conserve domain of *BnaMT-1*

通过 TMHMM Server 2.0 对蛋白质 *BnaMT-1* 的跨膜区进行预测,该蛋白的 1~11 位氨基酸为膜内结构;12~34 位氨基酸为跨膜区域;35~402 位氨基酸为膜外结构。由此可以推断 *BnaMT-1* 编码蛋白存在跨膜结构域,属跨膜蛋白。通过 NCBI 将该基因编码的氨基酸序列与含有 MATH 结构域的拟

南芥、水稻、苔藓、红藻、绿藻、真菌、病毒、线虫、小鼠、人类的序列比对,发现 *BnaMT-1* 与拟南芥同源性最高,用 MEGA 4.1 构建 MATH 结构域在不同物种间的进化树(图 4),该基因与拟南芥来源的相关基因先聚在一起,然后再与其他生物来源的含 MATH 基因再一次聚在一起。

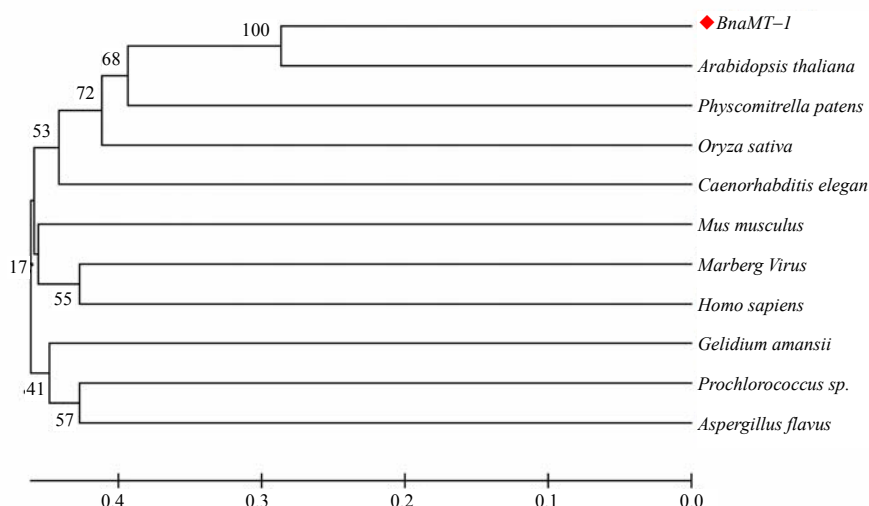
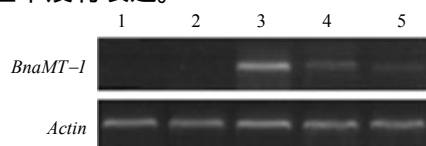


图4 MATH结构域在不同物种间的进化树

Fig.4 Phylogenetic analysis of MATH domain in different species

### 2.4 *BnaMT-1* 基因在湘油 15 号不同组织中的表达

从图 5 可以看出,*BnaMT-1* 基因仅在湘油 15 号的叶、花及果荚中有表达,叶的表达量最高,而在根与茎中没有表达。

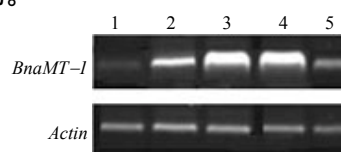


1 根;2 茎;3 叶;4 花;5 果荚(花后5 d)。

图5 *BnaMT-1*在湘油15号不同组织中的表达

Fig.5 Expression analysis of *BnaMT-1* in different Xiangyou 15 tissues

从图 6 可以看出,*BnaMT-1* 基因在花后 20~40 d 的种子中均有表达,表达量在 30 d 以前呈上升趋势,30~35 d 表达量维持高水平,35 d 以后表达量呈下降趋势。



1 20 d;2 25 d;3 30 d;4 35 d;5 40 d。

图6 *BnaMT-1*基因在种子不同发育时期的表达

Fig.6 Expression analysis of *BnaMT-1* in seeds at different developmental stages

### 3 结论与讨论

MATH 结构域蛋白在人体中参与多项生命活动过程,与多种疾病有着直接的联系<sup>[15]</sup>。刘青等<sup>[16]</sup>构建了 TRAF-6 与绿色荧光蛋白融合的真核表达载体,为研究其在口腔疾病发病中的相关功能奠定了基础。王妮丹等<sup>[17]</sup>构建了融合蛋白 TRAF1-DsRed 的真核表达载体,用于研究相关的 TRAF1 的信号传导通路。但在植物中只是对其相关结构、参与的代谢途径等进行了初步研究,而具体功能与作用机理仍不清楚。Jane 等<sup>[18]</sup>从甘蓝型油菜种子的蛋白储存液泡(PSV)膜上发现了 1 种具有 2 个连续的 MATH 结构域蛋白 BPEPs, BPEPs 可与某些蛋白发生特异性的相互作用,且可能与 PSVs 的结构稳定性有关。笔者在甘蓝型油菜湘油 15 号中克隆得到 *BnaMT-1* 基因全长 CDS,生物信息学分析发现, *BnaMT-1* 基因编码蛋白为胞外分泌蛋白,与 BPEPs 同源性为 72%,且在结构上有高度的相似性,均具有 1 个跨膜结构域及 2 个连续的 MATH 结构域。在油菜种子发育的 20~35 d,是淀粉合成向油脂合成转换的关键时期,也是胚快速生长的时期,35 d 时,种子油脂合成进入高峰期。通过对 *BnaMT-1* 基因在湘油 15 号种子不同发育时期的表达分析发现, *BnaMT-1* 表达水平在花后 20~30 d 快速上升,并在 35 d 左右仍保持高水平表达,这与种子中油脂的合成动态基本保持一致。结合 *BnaMT-1* 与 BPEPs 结构的高度一致性,推测 *BnaMT-1* 基因编码蛋白可能与 BPEPs 具有类似的功能,参与维持油菜 PSVs 结构的稳定性,在种子发育及油脂合成代谢中发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [1] Sunnerhagen M, Pursglove S, Fladvad M. The new MATH: Homology suggests shared binding surfaces in meprin tetramers and TRAF trimers[J]. FEBS Lett, 2002, 530: 1-3.
- [2] Uren A G, Vaux D L. TRAF proteins and meprins share a conserved domain[J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 244-245.
- [3] Cosson P, Sofer L, Le Q H, et al. RTM3, which controls long distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene class encoding a Meprin and TRAF homology domain-containing protein[J]. Plant Physiol, 2010, 154: 222-232.
- [4] Bond J S, Beynon R J. The astacin family of metalloendopeptidases[J]. Protein Sci, 1995, 4: 1247-1261.
- [5] Villa J P, Bertenshaw G P, Bylander J E, et al. Meprin proteolytic complexes at the cell surface and in extracellular spaces [J]. Biochem Soc Symp, 2003, 70: 53-63.
- [6] Zapata J M, Pawlowski K, Haas E, et al. A diverse family of proteins containing tumor necrosis factor receptor-associated factor domains[J]. Biol Chem, 2001, 276: 24242-24252.
- [7] Chung J Y, Park Y C, Ye H, et al. All TRAFs are not created equal: Common and distinct molecular mechanisms of TRAF-mediated signal transduction[J]. Cell Sci, 2002, 115: 679-688.
- [8] Bradley J R, Pober J S. Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) [J]. Oncogene, 2001, 20: 6482-6491.
- [9] Bishop G A. The multifaceted roles of TRAFs in the regulation of B-cell function[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(10): 775-786.
- [10] Kallijarvi J, Avela K, Lipsanen-Nyman M, et al. The TRIM37 gene encodes a peroxisomal RING-B-box-coiled-coil protein: Classification of mulibrey nanism as a new peroxisomal disorder[J]. Am J Hum Genet, 2002, 70: 1215-1228.
- [11] 潘刚, 周永明. 甘蓝型油菜遗传转化的研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(3): 90-98.
- [12] 谢青轩, 彭琦, 刘春林, 等. 白菜型油菜 *BraSDG8* 基因的克隆与序列分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2011, 37(4): 372-375.
- [13] 彭琦, 胡燕, 杜培粉, 等. 甘蓝型油菜种子不同发育时期 SSH 文库的构建[J]. 作物学报, 2009, 35(9): 1576-1583.
- [14] 张妙霞, 赖钟雄. 野生香蕉几丁质酶基因的克隆与序列分析[J]. 热带作物学报, 2010, 31(8): 1244-1252.
- [15] 胡燕, 彭琦, 尹峰, 等. 甘蓝型油菜含 MATH 结构域基因 *BnaMT-1* 干扰载体的构建及遗传转化[J]. 分子植物育种, 2010, 8(2): 283-286.
- [16] 刘青, 金岩, 吴织芬, 等. TRAF-6 真核表达载体的构建和转染牙龈上皮细胞[J]. 牙体牙髓病学杂志, 2005, 15(6): 305-308.
- [17] 王妮丹, 王晶, 潘玉玲, 等. TRAF1-DsRed 真核表达载体的构建及其在 COS-7 细胞中的定位[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(5): 491-493.
- [18] Jane G, Sally W R, Mike D, et al. A unique family of proteins associated with internalized membranes in protein storage vacuoles of the Brassicaceae[J]. The Plant Journal, 2005, 41: 429-441.

责任编辑: 杨盛强