

烟草 WS38 生长素结合蛋白基因 cDNA 的克隆及序列分析

刘晓柱, 黄妤, 彭珍子, 周晶辉, 洪亚辉, 张学文*

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 以烟草 WS38 为材料, 根据 GenBank 中登录的烟草生长素结合蛋白(ABP1)氨基酸序列设计引物, 通过 RT-PCR 克隆了烟草 WS38 *ABP1* 基因 cDNA 分子编码区, 序列全长为 564 bp, 可编码 1 条 188 个氨基酸的多肽. 利用 Clustal X 软件对该序列翻译获得的多肽序列与报道的烟草生长素结合蛋白氨基酸序列比较, 两者同源性为 98.4%, 存在 2 个氨基酸的差异, 但差异氨基酸对 *ABP1* 结构和功能影响微弱. 认为克隆的 cDNA 序列即为烟草 WS38 *ABP1* cDNA, 不同品种烟草 *ABP1* 基因存在的核苷酸单位点多态性(SNP)造成了两者氨基酸序列的差异.

关键词: 烟草; 生长素结合蛋白; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: Q785 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)04-0388-04

Cloning and sequence analysis of auxin-binding proteins gene cDNA of *Nicotiana tabacum* WS38

LIU Xiao-zhu, HUANG Yu, PENG Zhen-zi, ZHOU Jing-hui, HONG Ya-hui, ZHANG Xue-wen*

(College of Bioscience and Biotechnology, HNAU, Changsha 410128, China)

Abstract: *Nicotiana tabacum* WS38 *ABP1* cDNA coding sequence was cloned by RT-PCR with the primers that were designed according to reported *Nicotiana tabacum* ABP1 amino acid sequence in GenBank. The sequence analysis showed that the length of the cDNA was 564 bp. Information analysis indicated that the open reading frame can encode 188 amino acids polypeptide with the 98.4% homology with the reported ABP1. It also demonstrated that the *ABP1* in *Nicotiana tabacum* varied in different cultivars and there was some single nucleic acid polymorphasim with WS38 and NK326.

Key words: *Nicotiana tabacum*; auxin-binding proteins(ABP); cDNA cloning; sequence analysis

生长素参与植物细胞伸长、分裂及分化的信号传导^[1-2], 调控植物器官的建构、果实的发育、顶端优势、向性运动以及植物的衰老死亡等生命过程^[3]. 从植物中分离的生长素结合蛋白(ABP1)与生长素具高亲和性. 研究发现, 细胞质膜、内膜系统和细胞核中都有 ABP1 的存在, 内质网是 ABP1 的主要分布场所^[4]. 细胞质中也发现了可溶性 ABP1^[5-6]. 作为生长素信号传导中的关键因子, ABP1 在植物细胞感受生长素信号过程中具有重要的功能^[7], 其含

量既关系到细胞的相对生长, 又直接影响细胞对生长素的敏感性^[8]. 以棉花为材料研究发现, 棉花生长素结合蛋白(GhABP)可能与生长素介导调节棉纤维发育有直接关系^[9]. 目前已从苧麻^[10]、陆地棉^[11]、辣椒^[12]、玉米^[13]等植物中克隆出生长素结合蛋白 *ABP1* 基因. 对于烟草生长素结合蛋白 ABP1, GenBank 中公布了烟草 NK326 T85 生长素结合蛋白基因的核苷酸序列(登录号 X70902), 该基因至少包含了 5 个外显子和 4 个内含子, 全长 6 053 bp^[14]. T85

收稿日期: 2010-04-14

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(08JJ5020)

作者简介: 刘晓柱(1984—), 男, 河南商丘人, 硕士研究生; *通讯作者, xwzhang@hunau.net

基因编码187个氨基酸序列(登录号CAA50259).但在GenBank中并没有登录其cDNA序列.笔者根据GenBank中提交的氨基酸序列设计引物,通过RT-PCR技术,克隆出烟草WS38 *ABP1* 编码区cDNA序列,并对其序列进行了生物信息学分析.

1 材料与方法

1.1 材料

烟草WS38.

1.2 方法

1.2.1 烟草WS38生长素结合蛋白*ABP1* cDNA序列的克隆

取生长旺盛的烟草WS38叶片组织约500 mg,按TRIZOL试剂说明书提取总RNA.

检索GenBank中蛋白质数据库,根据所提交的烟草氨基酸序列,通过Primer 5.0分析软件,选取已发表的10种植物的KDEL信号位点的核苷酸序列比对分析,设计了1对引物,引物序列为Nt-*ABP1* Up Primer :ATGGCTCGTCATGTTTTAGTCGTAGTG ; Nt-*ABP1* Dn Primer : (A/T)(A/C/T)(A/G/T)TTCGCTTTCCATGATGTG GTCTG.

采用RevertAid™ First Strand Synthesis Kit (Fermentas)合成cDNA第一链.摸索确定RT-PCR最佳反应体系为25 μ L : cDNA(1 μ L)、10 μ mol/L Nt-*ABP1* Up primer(1.0 μ L)、10 μ mol/L Nt-*ABP1*Dn primer(1.0 μ L)、10 \times PCR Buffer(2.5 μ L)、25 mmol/L MgCl₂(1.5 μ L)、10 mmol/L dNTPs Mix(1.0 μ L)、1 U/ μ L (0.5 μ L)*Taq* DNA polymerase、ddH₂O(16.5 μ L).

采用Eppendorf 5-331梯度PCR仪进行PCR,反应程序为95 $^{\circ}$ C预变性4 min,94 $^{\circ}$ C变性1 min,48 $^{\circ}$ C退火50 s,72 $^{\circ}$ C延伸50 s,共35个循环,最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min.

将PCR产物采用安比奥公司凝胶回收试剂盒进行切胶、回收、纯化,连接到pMD18-T(TaKaRa)载体上,热激转化到大肠杆菌Inv α F'感受态细胞,进行Amp抗性筛选和X-gal/IPTG蓝白斑筛选.选取白色菌落进行PCR,将检测为阳性的菌落进行液体培养,以强碱法进行质粒DNA分离,以限制性内切酶酶切检测重组质粒插入目的片段,选取PCR检测及

酶切检测均为阳性的菌落,送上海英骏生物技术公司测序.

序列比对在Clustal X软件上进行;ORF查找、ORF翻译等在DNAMAN和BioEdit软件上进行;GenBank BLAST在NCBI网站上进行;系统进化树的构建在MEGA软件上进行.

1.2.2 烟草WS38 *ABP1*性质分析

烟草WS38 *ABP1*与*T85*基因编码*ABP1*蛋白性质分析在互联网数据库在线进行.

2 结果与分析

2.1 烟草WS38总RNA的分离

RNA琼脂糖凝胶电泳分析结果(图1)显示,28S rRNA和18S rRNA 2条主带明显,且28S rRNA条带亮度约为18S rRNA条带亮度的2倍.紫外检测总RNA质量浓度为0.8034 μ g/ μ L, $OD_{260nm}/OD_{280nm}=1.91$,其浓度和质量达到了反转录的要求.

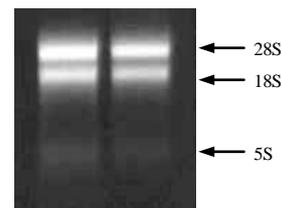
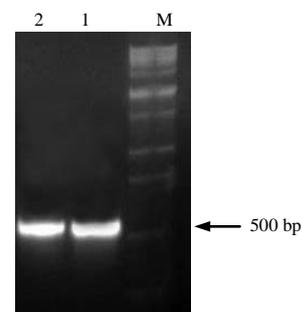


图1 烟草总RNA琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel of total RNA preparation from *Nicotiana tabacum* WS38

2.2 烟草WS38生长素结合蛋白*ABP1*基因cDNA序列的克隆

以烟草WS38 cDNA为模板,以Nt-*ABP1* Up和Nt-*ABP1* Dn为引物,RT-PCR扩增得到约600 bp特异性条带(图2).



M 1 kb plus DNA 分子量标准;1、2 目的片段扩增结果.

图2 Nt *ABP1*基因cDNA RT-PCR扩增凝胶电泳结果

Fig.2 Agarose gel of RT-PCR product of Nt *ABP1* cDNA

2.3 烟草WS38生长素结合蛋白ABP1 cDNA序列测定及生物信息学分析

测序结果表明,克隆的烟草WS38 ABP1 cDNA全长564 bp(图3),以DNAMAN软件及序列处理在线工具包将获得的564 bp核苷酸序列进行氨基酸翻译序列分析,该cDNA具有一编码188个氨基酸序列的开放式阅读框(ORF)。以Clustal X软件分析得到的氨基酸序列与GenBank中所提交的氨基酸序列进行比对,两者同源率为98.4%,有2个氨基酸序列的差别,分别为:第7位缬氨酸(V)的缺失、第25位异亮氨酸(I)替换为缬氨酸(V)。

```

1 M A R H V L V V V V A V L L F A T A E A
1 ATGGCTCGTCATGTTTTAGTCGTAGTGGTAGCTGTTTTGTTGTCGCACTGTGAAGCT
21 S Q C S V N G L P L V R N I S E L P Q E
61 TCTCAATGCTCAGTTAACGGATTACCACTGTGAGGAATATCAGCGAGCTCCACAGGAA
41 N Y G R S G L S H T T I A G S V L H G M
121 AACTATGGGAGGTCGGTTTATCTCACACTACAATTGCAGGTTCACTCTGCACGGCATG
61 K E I E V W L Q T F A P G S R T P I H R
181 AAAGAGATAGAAGTGTGGCTTCAAACTTTGCCCCAGGATCTCGCACACCAATACACAGG
81 H S C E E I F V V L K G Q G I L Y L T P
241 CACTCATGTGAAGAAATTTTCGTGCTTGAAGGGTCAAGGCATTCTATATCTCACTCTC
101 S S H S K Y P G N P Q E F H I F P N S T
301 AGTTCACATTCAAAGTACCCGGGGAACCCGAGGATTCATATATCCCTAATAGCAC
121 F H I P V N D V H Q V W N T G E H E D L
361 TTCCATATCCCTGTTAATGATGTTACCAGGTATGGAACACTGGTGAGCATGAAGATCTA
141 Q V L V V I S R P P V K V F M Y D D W S
421 CAAGTTTTAGTTGTTATCTCGCTCCTCCAGTGAAGGTGTTTATGTATGATGACTGGTGC
161 M P H T A A K L K F P Y Y W D E E C Y Q
481 ATGCCACACAGGCTGCCAAATGAAGTTCCTTATTACTGGGATGAGGAATGTTATCAG
181 T T S W K D E L
541 ACCACATCATGGAAAGACGAACTT

```

图3 烟草WS38 ABP1基因cDNA及编码氨基酸序列

Fig.3 cDNA and amino acids sequences of ABP1 of *Nicotiana tabacum* WS38

用BLAST在线分析软件将烟草WS38 ABP1基因cDNA序列与GenBank中登录的番茄等多种植物进行同源性比较,发现该基因核苷酸序列与烟草T85、番茄、辣椒、葡萄等生长素结合蛋白ABP1基因具有较高的同源性。与拟南芥及苎麻进行比较分析,烟草WS38 ABP1 cDNA与拟南芥的同源性为68.7%,与苎麻的同源性为73.4%。而烟草WS38生长素结合蛋白氨基酸序列进行BLAST序列比对,与番茄、辣椒、苎麻、毛白杨、向日葵、葡萄等植物生长素结合蛋白ABP1则有着较高的序列同源性,且都达近80%或80%以上。

在蛋白比对的基础上,利用MEGA软件将烟草WS38 ABP1与拟南芥、亚洲稻、花生、辣椒、陆地棉、杨树、葡萄等进行系统进化分析,烟草WS38 ABP1在进化上与番茄、辣椒等茄科植物有最高的同源性。这与三者进化上有着较近的亲缘关系相一致。

2.4 烟草WS38生长素结合蛋白ABP1性质分析

2.4.1 烟草WS38生长素结合蛋白ABP1保守结构分析

通过在线蛋白质预测分析软件对烟草WS38 ABP1蛋白质结构特征进行分析。结果表明,烟草WS38 ABP1蛋白具有生长素结合蛋白的特征性保守结构域。

2.4.2 烟草WS38 ABP1与T85基因编码ABP1蛋白等电点及大小分析

将烟草WS38 ABP1的氨基酸序列及烟草T85 ABP1氨基酸序列提交瑞士生物信息学研究中心蛋白质专业分析系统进行在线蛋白质等电点及分子量预测分析,结果:NtABP1蛋白等电点为5.96,相对分子质量为21 340;T85基因编码ABP1蛋白等电点为5.96,相对分子质量为21 260。两者蛋白的等电点相同,相对分子质量相差80。

2.4.3 烟草WS38 ABP1编码蛋白与T85编码ABP1蛋白的跨膜区的预测分析

将烟草WS38 ABP1与T85基因编码ABP1蛋白在丹麦技术大学生物序列分析中心(CBS)的网站,通过其TMHMM Server V.2.0 World Wide Web Server进行跨膜区的预测,结果表明,烟草WS38 ABP1基因编码蛋白与T85基因编码ABP1蛋白,都属于镶嵌蛋白,可定位于质膜的原生质表面(PS),二者结构一致。

2.4.4 烟草WS38 ABP1编码蛋白与T85基因编码ABP1蛋白的信号肽切割位点预测分析

将WS38 ABP1编码蛋白与T85 ABP1蛋白在CBS网站,通过其SignalP V3.0 WorldWide Web Server进行信号肽切割位点预测。结果表明,WS38 ABP1信号肽切割位点在N-端第20位与21位氨基酸残基之间,成熟蛋白质为168个氨基酸;T85基因编码ABP1蛋白信号肽切割位点在N-端第19位

与20位氨基酸残基之间,成熟蛋白质为168个氨基酸。两者虽然在信号肽切割位点相差1个氨基酸序列,但是成熟的蛋白质都是168个氨基酸序列。烟草WS38 *ABP1* 基因编码188个氨基酸序列, *T85* 生长素结合蛋白基因编码187个氨基酸序列,相差1个氨基酸,但两者在信号肽切除后产生同样大小的成熟蛋白。

GenBank 中公布的 *T85* 基因编码的生长素结合蛋白 *ABP1* 来自于烟草NK326(*Nicotiana tabacum* L. cv. NK326)。两烟草栽培品种在 *ABP1* 核苷酸序列水平的同源性为98%,存在十多个核苷酸位点的多态性(SNP),造成了2个编码的氨基酸多态性,其中1个氨基酸位于信号序列内,另1个氨基酸为同性氨基酸的替换,因此并不影响其蛋白结构和功能的发挥。

3 讨论

近年来对拟南芥的研究发现,缺失*ABP1*基因功能突变体具有胚胎致死效应,沉默*ABP1*基因的拟南芥植株与对照组相比较具有明显的生长滞后性,而过表达*ABP1*基因的拟南芥植株细胞体积是对照组的近2倍^[15]。足以说明*ABP1*具有介导细胞伸长、胚胎发生、细胞增大,以及参与生长素诱导的细胞分裂等众多的生物学功能^[16]。克隆的烟草WS38生长素结合蛋白*ABP1*编码的核苷酸序列与烟草NK326 *T85*基因核苷酸序列之间存在着单核苷酸多态性(SNP),达2%左右,但不同类型的SNP可通过类似或不同的分子机制,分别在基因转录水平、转录后水平、翻译水平、翻译后蛋白折叠及蛋白的细胞定位水平对基因功能的发挥进行影响^[17],因此两者编码的蛋白也可能存在着功能上的差别。

参考文献:

- [1] Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, et al. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins[J]. *Dev Cell*, 2005(9): 109-119.
- [2] Hagen G, Guilfoyle T J. Auxin-responsive gene expression: Genes, promoters and regulatory factors [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49: 373-385.
- [3] Sun Tao, Chai Tuanyao, Liu Geyu. Progress in the plant GH3 gene family[J]. *Biotech*, 2008 (11): 1860-1866.
- [4] Johns A M, Herman E M. KDEL-containing auxin binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall[J]. *Plant Physiol*, 1993, 101: 595-606.
- [5] Lobter M, Klambt D. Auxin-binding proteins from coleoptile membrane of corn(*Zea mays* L.) I. Purification by immunological methods characterization[J]. *Biol Chem*, 1985, 260: 9848-9853.
- [6] Lobter M, Klambt D. Auxin-binding proteins of corn: Localization of a potato receptor[J]. *Biol Chem*, 1985, 260: 9854-9859.
- [7] Tomasz, Friml. Auxin signaling[J]. *Journal of Cell Science*, 2006, 119: 1199-1202.
- [8] 刘进平. 生长素受体与信号转导机制研究进展[J]. *生物技术通报*, 2007(3): 22-30.
- [9] 陈青, 王荣, 白瑞雪, 等. 生长素信号转导及其在棉花纤维发育中的作用[J]. *高技术通讯*, 2007(1): 108-114.
- [10] 黄妤, 刘峰, 郭清泉, 等. 苎麻生长素结合蛋白*ABP1* 基因cDNA的克隆及表达[J]. *作物学报*, 2008, 34(8): 1358-1365.
- [11] 孙建波, 崔百明, 刘德兵, 等. 棉花生长素结合蛋白 *ABP1* 基因cDNA的克隆及序列分析[J]. *棉花学报*, 2007, 19(4): 243-247.
- [12] Choi S Y. Molecular cloning and expression of the hot pepper ERabp1 gene encoding auxin-binding protein [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32: 995-997.
- [13] Hesse, Feldwisch, Balshüsemann, et al. Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin[J]. *The EMBO*, 1989(8): 2453-2461.
- [14] Shinichiro, Watanabe, Shoji Shimomura. Cloning and expression of two genes encoding auxin-binding proteins from tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 36: 63-74.
- [15] Palme, Hesse, Campos, et al. Molecular analysis of an auxin binding protein gene located on chromosome 4 of *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 1992(4): 193-201.
- [16] Chen, Ullah, Young, et al. *ABP1* is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis[J]. *Genes Dev*, 2001, 15: 902-911.
- [17] 刘越, 吕社民. 单核苷酸多态性影响基因功能的机制[J]. *生命的化学*, 2008, 28(2): 214-216.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 胡东平