

玉米核糖体失活蛋白基因的克隆及序列分析

范 琦* 高晓蓉 李文利* 金礼吉 安利佳**

(大连理工大学生化工程研究所, 大连 116012)

摘 要 将提取的玉米 RNA 反转录成 cDNA, 以此为模板, 合成特异性引物, 应用多聚酶链式反应(PCR)技术扩增出目的片段。对 PCR 片段直接进行序列分析, 测定并克隆玉米的核糖体失活蛋白(RIP)基因。序列分析表明, 已测定的玉米 RIP 基因序列长为 983bp, 其中编码区长 828bp, 共编码有 275 个氨基酸和一个终止密码子, GC 含量为 58.3%。与已发表的序列相比较其核苷酸序列及推导的氨基酸序列的同源性分别为 98.4% 和 97.4%。

关键词 玉米, 核糖体失活蛋白基因, DNA 序列分析

中图分类号 Q812 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0457-04

核糖体失活蛋白(Ribosome-inactivating protein, RIP)是一类在植物中较广泛存在的毒蛋白。RIP 的主要酶学性质是具有 RNA N-糖苷酶活力, 可特异地水解大鼠 28S rRNA 3'-端茎环结构的腺嘌呤残基而导致核糖体失活, 阻止多肽链的延伸, 从而抑制靶细胞中蛋白质合成。RIPs 不影响自身的 28S rRNA, 但对亲缘关系较远植物的核糖体表现不同程度的损伤, 有些 RIPs 被用于治疗肿瘤、爱滋病, 有些 RIPs 也可失活真菌的核糖体^[1-4]。因此分离 RIP 基因并构建基因表达载体, 用于转基因植物, 以提高植株的抗真菌病也是人们研究的热点。

到目前为止, 来自玉米不同组织的 RIP 基因被克隆并测序^[1,2,5], 它们的核苷酸序列不尽相同, 有的甚至差异很大。我们从玉米的叶子中提取总 RNA, 并反转录成 cDNA, 通过对已有玉米 RIP 基因序列的比较, 设计合成引物, 以玉米叶 cDNA 为模板, 用 PCR 方法获得特异性 DNA 条带。序列分析表明, 我们已克隆了一新的玉米 RIP 基因, 为以后的研究工作打下了基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

玉米(*Zea mays*)品种为自交系 3188, 由大连市农科所提供, 室内播种出苗后 3 星期, 用剪刀机械损

伤, 黑暗饥饿 5h, 取嫩叶用于 RNA 提取。RNA 提取所用试剂、cDNA 合成试剂盒、PCR 反应试剂盒、各种限制酶、连接酶等均由 TaKaRa 公司提供。寡核苷酸引物合成, DNA 序列分析在 TaKaRa 公司完成。载体质粒 pUC19, 宿主菌 DH5 等为本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 玉米叶总 RNA 的提取: 参照材料方法 [6] 所述, 提取玉米总 RNA。取约 3g 重的玉米嫩叶, 清洗晾干后在液氮中研磨成粉末, 加不少于 5 倍叶重的裂解液 GTC (4mol/L 盐酸胍, 0.1mol/L Tris·HCl pH7.5, 1% β -巯基乙醇), 再加 12-烷基肌氨酸钠终浓度为 0.5%, 继续研磨。然后转到玻璃匀浆器中, 冰浴下研磨。研磨后的样品经 4℃, 4 500r/min 离心 20min, 取出上清转到超离心管中, 进行 CsCl (5.7mol/L CsCl, 0.01mol/L EDTA) 密度离心。CsCl 与样品的比例为 1:1, 18℃, 35 000r/min 离心约 20h, 弃去上层废液, 用 70% 冷乙醇洗管底部沉淀, 自然干燥后用少量 TES 溶解, 并在乙醇沉淀下保存备用。

1.2.2 cDNA 合成、连接: 参照 TaKaRa cDNA 合成及连接试剂盒的方法进行。取约 1 μ g 的玉米总 RNA, 用逆转录酶(AMV)进行 cDNA 合成, 反应条件: 30℃, 10min; 42℃, 15min; 99℃, 5min; 5℃,

收稿日期: 1999-08-02, 修回日期: 2000-03-03。

基金项目: 辽宁省人才基金项目(963005)。

* 现在辽宁省农科院大连生物技术研究所工作。

** 为联系作者。

5min,一个循环。再用 RNaseH 处理,30℃,1h。合成的 cDNA 用 T4 RNA 连接酶连接,16℃ 过夜。

1.2.3 PCR 扩增: 根据对文献^[1,2,5]所报道的玉米 RIP 核苷酸序列的分析比较,设计合成引物,一对引物为:

P1 (+) 5' ATAGTGCCAAAGTTCAC 3',
P2 (-) 5' CTTAACGAGCGCAACGAT 3'.

用这一对引物,以玉米的 cDNA 为模板进行 PCR 反应,并用这一对引物对 PCR 片段进行测序。根据测序结果设计另一对引物:

P3 (+) 5' AGGGGAAGCAGGTGCAGAA 3',
P4 (-) 5' ATGAAGGCCTGTAAGGGTA 3'.

用该引物,以连接后的玉米 cDNA 为模板进行反向 PCR 反应。方法参照 TaKaRa 公司 PCR 试剂盒的方法,反应条件:94℃,40s;94℃,30s;55℃,30s;72℃,90s;30 个循环。最后 72℃,5min,扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测。

1.2.4 DNA 序列分析: 将 PCR 扩增产物回收做模板,分别用引物 P1, P2, P4 做测序引物进行序列分析, DNA 测序工作在 TaKaRa 公司完成。

1.2.5 基因克隆: 根据 DNA 序列分析的结果,设计两条引物,分别加入限制酶识别序列:

P5 (+) 5' CTC GGATCCTTTCAGCTGTTGATACA 3',
P6 (-) 5' CTC GAATTC TATACTGCTACTGTACCA 3'.

用这一对引物,以玉米 cDNA 为模板进行 PCR 反应,条件同上。扩增产物用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切制备,与 pUC19 载体连接,转化到大肠杆菌 DH5,挑出阳性克隆做序列分析。

2 结果

2.1 玉米总 RNA 提取

乙醇沉淀的玉米总 RNA 经 75% 乙醇清洗,干燥后,溶适量的 TE 中,经紫外分光光度计定量,并进行 RNA 琼脂糖凝胶电泳,结果见图 1。

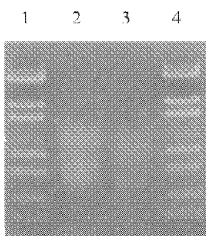


图 1 玉米总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of maize total RNA

1. 4. DNA marker; 2. Maize total RNA; 3. 16~23S RNA marker

2.2 cDNA 合成及 PCR 反应

取 1 μ L cDNA 合成样品为模板,用引物 P1, P2 进行 PCR 反应,电泳结果显示一条约 800bp 的特异性扩增片段。取 1 μ L 连接后 cDNA 合成样品为模板,用引物 P3, P4 进行 PCR 反应,电泳显示一条约 250bp 的特异性扩增片段。见图 2。

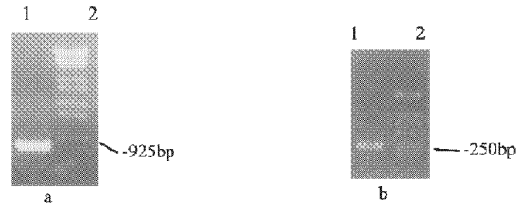


图 2 玉米 cDNA 合成后 PCR 产物凝胶电泳

Fig. 2 Agarose Gel Electrophoresis of maize cDNA-PCR products

a1. PCR product of primer P1, P2; b1. PCR product of primer P3, P4; a2, b2. DNA marker

2.3 基因的核苷酸序列分析及克隆

通过对上述 PCR 片段的 DNA 序列分析,以及进一步对克隆的基因片段进行序列分析,结果证实我们得到了一个玉米 RIP 基因序列(见图 3)。

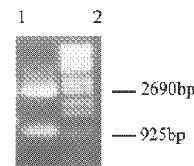


图 3 玉米 RIP 基因的酶切分析

Fig. 3 Restriction enzyme analysis of recombinant maize RIP gene

1. pUC19/maize-RIP, *Bam*HI + *Eco*RI; 2. DNA marker

测定的基因序列全长 983bp,其中编码区长 828bp,共编码有 275 个氨基酸和一个终止密码子,GC 含量为 58.3% (GenBank accession number: AF233881)。

2.4 核苷酸序列及氨基酸序列同源性分析

将我们所测定的玉米 RIP 基因序列与 Bass (1995)发表的玉米 RIP 基因(源于叶片组织 DNA)序列进行比较,发现两个基因中编码区的核苷酸序列有 13 处有差异,其中前者基因序列比后者少 9 个碱基,另有 4 处碱基有变异,其同源性为 98.4%。比较编码区的氨基酸序列,两者间有 7 处不同,同源性为 97.4%。在已测定的序列中,5' 端非编码区碱基的同源性比较高,而 3' 端非编码区碱基序列的同源性相对较低。

如果将我们所测定的玉米 RIP 基因编码的氨基酸序列与 Walsh^[1](1991)及 Bass^[2](1992)文中的玉米种子 RIP 的氨基酸序列进行比较可以看出(见图 4):在前导肽 16 个氨基酸序列中,分别有 8 个和 4 个氨基酸残基不同,仔细比较会看出它们都有一些相同的氨基酸残基,但排序却有很大不同,在 α 肽

链部分,我们所测定的玉米 RIP 氨基酸数目要少 1 个,同源性可达到 85.5%;比较连接肽段的氨基酸会发现这部分变化很大,但富含谷氨酸和丙氨酸; β 肽链的氨基酸数目相同,其同源性为 67.6%;C 端肽段中三者的氨基酸数目相差很大,但比较已有的氨基酸序列同源性也达到 81.5%。

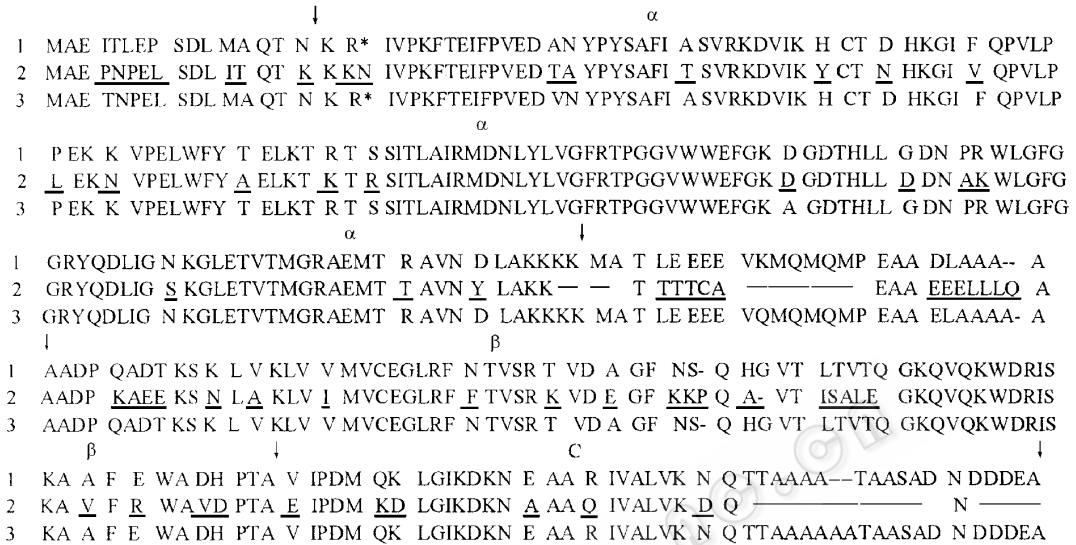


图 4 玉米叶 RIP 基因编码氨基酸的同源性分析

Fig. 4 Homologous analysis of deduced amino acid sequence of maize RIP genes

1. The amino acid sequence of maize RIP from kernels published by Walsh, 1991;
2. The deduced amino acid sequence of maize RIP gene determined in this paper;
3. The amino acid sequence of maize RIP from endosperm published by Bass, 1992

3 讨论

尽管玉米 RIP 基因序列已有报道,但由于各自的序列不尽相同,因此想直接快速获得该基因有一定难度。我们以玉米叶为材料,用传统的方法提取总 RNA,并反转录合成 cDNA。通过对已发表的玉米 RIP 基因序列进行比较,找出保守区段,合成引物,用 cDNA 做模板进行正向和反向 PCR,都获得了特异的扩增片段。对 PCR 产物直接进行序列分析,测定了玉米的 RIP 基因全序列,这样可使我们准确克隆该基因。对阳性克隆的序列分析也获得一致的结果,没有发生碱基突变情况。

分析 Walsh 及 Bass 等人发表的玉米 RIP 基因序列,可以知道虽然都是取材于玉米种子,但所测定的玉米 RIP 基因序列及氨基酸序列却各不相同。将我们所测定的玉米 RIP 基因序列与 Bass(1995)发表的玉米 RIP 基因(源于叶片组织 DNA)序列进行比较,也可以看出它们的不同。变化主要发生在连接肽段中,前者比后者少 9 个碱基。我们认为这

种差异主要是玉米品种间的差异造成的。另外 RIP 在植物中存在基因多样性也形成了即使在同种植物同种组织器官中,RIP 经常以不同的亚型存在。

将本文所测玉米 RIP 基因编码的氨基酸序列与 Walsh 及 Bass 等人发表的玉米 RIP 氨基酸序列进行比较(图 4),可见变异主要发生在前导肽,连接肽及 C 端肽段等部位,这可能与不同品种、不同组织的蛋白质后加工能力有关,因为这些肽段在 RIP 由前体形成成熟蛋白时被剪切掉。在 α 肽链和 β 肽链中,尽管氨基酸序列有些不同,但它们的同源性仍是最高的,尤其是 α 肽链。这也反过来说明了在结构和功能上玉米 RIP 的 α 肽链和 β 肽链的保守性。

目前我们已完成了玉米 RIP 植物表达载体的构建,正进行转基因植物的研究,进一步的结果将另文发表。

致谢:本项工作得到 TaKaRa 大连有限公司袁晓东先生、野泽先生以及楮金霞等技术人员的大力协助,在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Walsh T A ,Morgan A E ,Hey T D. *J Biol Chem* ,1991 ,**266** :23422~23427
- [2] Bass H W ,Webster C ,OBrian G R *et al* . *Plant cell* ,1992 ,**4** :225~234
- [3] 张劲松 ,刘望夷 . 生物化学与生物物理进展 ,1994 ,**21**(1) :23~26
- [4] 李向东 ,刘望夷 . 细胞生物学杂志 ,1997 ,**19**(2) :69~75
- [5] Bass H W ,OBrian G R ,Boston R S. *Plant Physiol* ,1995 ,**107**(2) :661~662
- [6] 萨姆布鲁克 J ,弗里季 E F ,曼尼阿蒂斯 T.《分子克隆实验指南》北京 :科学出版社 ,1992

Cloning and Sequencing of the Maize Ribosome-inactivating Protein Gene

FAN Qi GAO Xiao-Rong LI Wen-Li JIN Li-Ji An Li-Jia

(Institute of Bio-chemistry Engineering ,Dalian University of Technology ,Dalian 116012)

Abstract A gene encoding maize Ribosome-inactivating protein was amplified by means of PCR using mRNA of maize leaves as a template and cloned into pUC19 vector. The amplified DNA sequence has been determined ,which consists of 828bp and encodes 275 amino acid residues. Comparison with previously reported sequence shows 98.4% homologies in nucleotide sequence and 97.4% in amino acid sequence respectively.

Key words Maize ,ribosome-inactivating protein gene ,DNA sequence analysis