

农业生物技术

江南卷柏脱氢抗坏血酸还原酶的分子特性

成子硕^{1,3}, 兰婷^{1,3}, 李迪², 杨海灵², 曾庆银¹

1 中国科学院植物研究所 系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093

2 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083

3 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要: 脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 在植物抗坏血酸-谷胱甘肽循环中发挥着重要作用。利用同源克隆技术从江南卷柏中克隆到 2 个脱氢抗坏血酸还原酶基因, 分别命名为 *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2*。*SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* 分别编码 218 和 241 个氨基酸, 预测分子量分别是 23.97 kDa 和 27.33 kDa。基因组序列分析显示这 2 个基因分别含有 5 和 6 个内含子。器官表达模式分析发现这 2 个基因在根、茎、叶中均有表达, 是组成型表达基因。在大肠杆菌中表达并纯化了 2 个基因的重组蛋白。酶活性分析显示 *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* 蛋白对底物 DHA 的活性有显著差异, 分别是 19.76 和 0.17 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。热力学稳定性分析显示这 2 个重组蛋白的热力学稳定性具有明显差异。因此, 基因结构与酶学性质的差异预示着这 2 个基因可能存在功能上的分化。

关键词: 江南卷柏, 脱氢抗坏血酸还原酶, 克隆, 蛋白表达, 酶活

Molecular characterizations of two dehydroascorbate reductases from *Selaginella moellendorffii*Zishuo Cheng^{1,3}, Ting Lan^{1,3}, Di Li², Hailing Yang², and Qingyin Zeng¹

1 State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

2 College of Life Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

3 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: Plant dehydroascorbate reductase (DHAR) is a physiologically important reducing enzyme in the ascorbate-glutathione recycling reaction. In this study, two DHARs genes (*SmDHAR1* and *SmDHAR2*) were isolated from *Selaginella moellendorffii*. The *SmDHAR1* and *SmDHAR2* genes encode two proteins of 218 and 241 amino acid residues, with a calculated molecular mass of 23.97 kDa and 27.33 kDa, respectively. The genomic sequence analysis showed *SmDHAR1* and *SmDHAR2* contained five and six introns, respectively. Reverse transcription PCR revealed that the *SmDHAR1* and *SmDHAR2* were constitutive expression genes in *S. moellendorffii*. The recombinant *SmDHAR1* and *SmDHAR2* proteins were overexpressed in *E. coli*, and were purified by

Received: April 7, 2010; **Accepted:** June 7, 2010

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 30770146, 30770149), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB119104).

Corresponding author: Qingyin Zeng. Tel: +86-10-62836440; E-mail: qingyin.zeng@ibcas.ac.cn

国家自然科学基金 (Nos. 30770146, 30770149), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB119104) 资助。

Ni-affinity chromatography. The recombinant SmDHAR1 showed 116-fold higher enzymatic activity towards the substrate dehydroascorbate than recombinant SmDHAR2. The recombinant SmDHAR1 showed higher thermal stability than recombinant SmDHAR2. These results indicated obvious functional divergence between the duplicate genes *SmDHAR1* and *SmDHAR2*.

Keywords: *Selaginella moellendorffii*, dehydroascorbate reductase (DHAR), cloning, protein expression, enzyme activity

还原型抗坏血酸 (Ascorbic acid, AsA) 是植物体内普遍存在的一种小分子抗氧化物质, 可清除由光合作用、呼吸作用等氧化反应产生的超氧自由基、过氧化氢、单线态氧、羟自由基等活性氧自由基^[1], 并被氧化成单脱氢抗坏血酸 (MDA)。MDA 进一步自氧化形成双脱氢抗坏血酸 (DHA), DHA 在脱氢抗坏血酸还原酶 (Dehydroascorbate reductase, DHAR, EC 1.8.5.1) 和谷胱甘肽的作用下能还原成还原型抗坏血酸。因此, DHAR 对于维持植物细胞中还原型抗坏血酸的水平具有重要意义。此外, DHAR 在植物抗逆反应中发挥着重要作用。例如, 在转基因拟南芥中过量表达水稻 DHAR 基因可提高对盐胁迫的抗性^[2]; 在细胞质中过量表达拟南芥 DHAR 基因可使转基因马铃薯增强对臭氧和干旱胁迫的抗性^[3]; 在烟草中过量表达 DHAR 基因可以延缓叶片的衰老, 同时叶绿素和叶黄素的含量增加^[1]。

迄今为止, 对 DHAR 的研究主要集中在拟南芥、小麦、菠菜、水稻等被子植物^[4-7], 对于裸子植物, 我们先前从白皮松中克隆了 1 个 DHAR 基因, 并对它的性质进行详细的研究^[8], 而对于在进化上更古老的蕨类植物, 还没有关于 DHAR 基因的研究报道。蕨类植物是一种古老的维管植物, 化石证据显示它们起源于距今 4 亿年前, 在原始维管植物的进化中具有重要意义^[9]。江南卷柏 *Selaginella moellendorffii* Hieron. 是蕨类植物的一个现存种, 在中国广泛分布于长江流域和长江以南各地^[10], 是一种常用的中草药与民族药^[11]。本研究从江南卷柏中克隆到 2 个 DHAR 基因, 对该基因的基因结构、表达模式、所编码蛋白的结构与生化功能进行了详细的研究, 为深入揭示 DHAR 在植物逆境胁迫中的作用机理奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

江南卷柏采自重庆晋云山。整株活体带土移植, 于光照培养箱 (25 °C) 培养 1 周, 取其嫩叶用于总 RNA 的提取。另外分离叶、茎、根 4 个组织 RNA, 作为组织特异性表达分析材料。

1.2 工具酶和试剂

总 RNA 提取试剂盒 Aurum Total RNA Kit 购自 Bio-Rad 公司, DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒以及 DNA maker 购自 Qiagen 公司, 反转录试剂盒 RNA PCR Kit (AMV) version 3.0、Taq DNA 聚合酶和其他 PCR 试剂购自 TaKaRa 公司, pGEM-T Easy 质粒购自 Promega 公司, 限制性内切酶购自 Invitrogen 公司。

1.3 DHAR 基因序列的鉴定与命名

根据已知拟南芥 DHAR 蛋白序列 (GenBank Accession No. AY039590), 利用 TBLASTN 检索 GenBank 中江南卷柏的 EST 数据库, 获得的 2 组序列与拟南芥 DHAR 序列均具有较高相似性。获得序列经过 Pfam 判读, 确定该序列编码的蛋白具有 DHAR 结构域特征。我们将这 2 组序列分别命名为 SmDHAR1 (GenBank Accession No. FE475698.1) 和 SmDHAR2 (GenBank Accession No. FE454714 和 FE454715)。

1.4 江南卷柏 DHAR 基因的克隆

取新鲜江南卷柏叶组织 0.1 g, 按照试剂盒说明书步骤提取江南卷柏的总 RNA 和基因组 DNA, 并以总 RNA 为模板, 用 Revert Aid First Stand cDNA 试剂盒合成 cDNA。

根据 *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* EST 序列分别设计引物 SmDHAR1-CL1/2、SmDHAR2-CL1/2 (表 1)。

Journals.im.ac.cn

引物均由 Invitrogen 公司合成。分别以江南卷柏叶 cDNA 和基因组 DNA 为模板,利用 2 对引物 SmDHAR1-CL1/CL2 和 SmDHAR2-CL1/CL2 分别进行 PCR 扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收纯化目的条带,纯化产物连接到 pGEM-T 载体上。将构建好的重组质粒转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中。在 X-gal/IPTG Amp 平板上挑取多个阳性克隆进行双向测序。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Gene	Primer name	Sequence (5'-3')
<i>SmDHAR1</i>	SmDHAR1-CL1	CCCTACCCTTGTCAAAGTTAC
	SmDHAR1-CL2	CTTCACAGAGGGAACCGTT
	SmDHAR1-SP1	CAGCTCTTCCCATCTATCCACA
	SmDHAR1-SP2	CGGGGATTCTTCTTGGTTT
	SmDHAR1-EX1	AGATATCATGGCTGTGACTACC ACTGAGG
	SmDHAR1-EX2	TCTCGAGTTATCACGCGCTTAA ATGCTT
<i>SmDHAR2</i>	SmDHAR2-CL1	AGACTATCGAGATTTCAGTCTC
	SmDHAR2-CL2	TGTTGATTACATAAAATCGACACT
	SmDHAR2-SP1	CGGCTATGGCTTCGCAGGAT
	SmDHAR2-SP2	GACACTTGGCCATGAAATTA
	SmDHAR2-EX1	AGATATCATGGCTTCGCAGGATGT GGATCT
	SmDHAR2-EX2	TGAATTCTTACACAAGCGGTGTGA AGG

1.5 系统发生关系分析

SmDHAR1 和 *SmDHAR2* 的蛋白序列与其他植物 DHAR 序列通过 Clustal X 1.83 进行氨基酸序列比对,然后经 BioEdit 手动校对。利用 MEGA v.4.0 的 neighbour-joining(NJ) 模型构建进化树,Bootstrap 值为 1 000。

1.6 江南卷柏 DHAR 基因的组织表达分布

为了研究 DHAR 基因在江南卷柏不同组织中的表达分布,按照试剂盒说明书步骤提取江南卷柏叶、菱叶、茎和根组织的总 RNA,并以总 RNA 为模板反转录合成 cDNA。根据 *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* 的基因序列分别设计 1 对特异性引物 SmDHAR1-

SP1/2 和 SmDHAR2-SP1/2 (表 1),进行 RT-PCR 扩增,在进行 PCR 扩增时,模板 cDNA 上样量为 3 μ L,并且以江南卷柏 *Actin* 基因作为内标。PCR 反应程序是:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。在 PCR 反应中以含有目的基因的 pGEM-T 载体作为阳性对照,以不加任何 cDNA 模板的 PCR 反应液作为阴性对照,PCR 结束后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳上样量为 2 μ L,为了进一步验证所扩增到的是否为目的基因,对 PCR 产物进行测序。

1.7 江南卷柏 DHAR 基因表达载体的构建、融合蛋白的表达与纯化

根据 *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* 的 cDNA 序列设计引物 SmDHAR1-EX1/2 和 SmDHAR2-EX1/2 (表 1),以江南卷柏叶 cDNA 为模板分别进行 PCR 扩增。PCR 产物经酶切回收,连接到带 6 \times His 标签的 PET30a 表达载体中,转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中。将测序验证无突变的重组表达菌于含卡那霉素的 LB 培养基中培养过夜,以 1:100 稀释后扩大培养至 OD_{600} 为 0.5,加入 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L,37 $^{\circ}$ C 过夜诱导。诱导表达后的菌液 4 $^{\circ}$ C、6 500 \times g 离心 10 min 收获菌体,缓冲液 A (20 mmol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Na₃PO₄,pH 7.5) 重悬,冰上超声破碎裂解。4 $^{\circ}$ C、10 000 g 离心 10 min,取少量原菌液、超声破碎后离心上清液和沉淀经 SDS-PAGE 检测具有目的蛋白峰带,SDS-PAGE 检测采用 10% 的分离胶,5% 的浓缩胶。用缓冲液 A 平衡 Ni 柱 (购自于 Amersham Pharmacia Biotech 公司),将超声破碎后离心上清液上样,以缓冲液 A 平衡亲和柱,用缓冲液 B (0.5 mol/L 咪唑,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Na₃PO₄,pH 7.5) 洗脱目的蛋白,收集目的蛋白洗脱峰进行下一步酶学活性分析。

1.8 江南卷柏 DHAR 蛋白的酶学活性和热力学稳定性测定

植物 DHAR 类基因是植物谷胱甘肽转移酶 (GST) 超家族的一个亚类型,本实验对 GST 常见底

物 CDNB (Including 1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 的活性测定参照 Habig 等^[12]的方法,对 NBD-Cl (7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole) 的催化活性测定参照 Ricci 等^[13]的方法,对 DHA (Dehydroascorbate) 的催化活性测定参照 Edwards 等^[14]的方法。酶热力学稳定性的测定方法是先将酶在指定温度下保温 15 min,在保温结束后检测酶对 DHA 底物的催化活性。

1.9 江南卷柏 DHAR 蛋白结构模拟

选取线虫 EXC-4 蛋白 (PDB: 2yv9A) 的 X 衍射晶体结构为模板,以 Align 2D 程序 (InsightII 的 Homology 模块) 进行序列比对,运用 InsightII 的 Modeler 模块构建蛋白质三维结构,产生 10 个结构,每个结构产生 10 个不同的环区结构,优化水平为高等,以 Profiles-3D 对各结构进行评价,选取最优结构。

2 结果与分析

2.1 江南卷柏 DHAR 基因的系统发生关系分析

选取 5 个代表不同进化历史的陆地植物物种的 DHAR 基因为研究对象,包括苔藓植物小立碗藓 *Physcomitrella patens*、蕨类植物水蕨 *Ceratopteris richardii*、裸子植物白云杉 *Picea glauca*、单子叶植物水稻 *Oryza sativa* 和双子叶植物拟南芥 *Arabidopsis thaliana*。另外 DHAR 基因被证明是 GST 基因家族的成员,在系统发育分析中,植物 GST 基因家族其他类型,包括 Tau、Phi、Lambda、Theta 和 Zeta GSTs 序列也同时进行系统发育分析。系统发育树显示所有 DHAR 基因聚成一大支,而且有着大于 98% 的支持率 (图 1)。我们发现这些 DHAR 基因聚成 2 小支 (D1 和 D2, 图 1), *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* 分别聚在 D1 支和 D2 支中,另外每一小支都有小立碗藓和白云杉 DHAR 基因,这说明在陆地植物形成的早期, DHAR 基因发生了一次古老的基因重复事件,在这次基因重复事件中产生的 2 个重复基因拷贝在江南卷柏中被保留了下来。

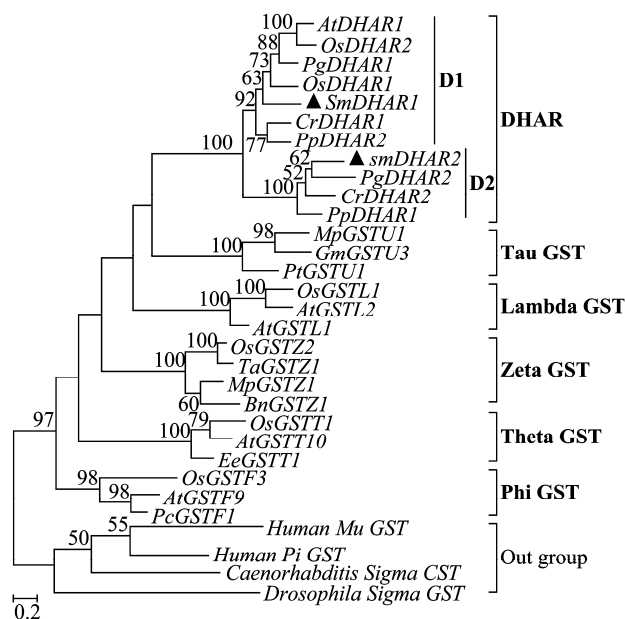


图 1 江南卷柏 DHAR 基因的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic tree showing relationships between *SmDHAR* and other classes of plant GSTs.

2.2 江南卷柏 DHAR 基因的克隆与基因结构分析

以江南卷柏叶 cDNA 以及基因组 DNA 为模板,引物 *SmDHAR1*-CL1/CL2 分别克隆到 *SmDHAR1* 的 cDNA 与基因组序列 (图 2A)。 *SmDHAR1* cDNA 序列包括 657 bp 的开放阅读框 (包括终止密码子)、60 bp 上游非编码序列和 68 bp 下游非编码序列。cDNA 编码 218 个氨基酸的蛋白,预测分子量为 23.97 kDa。 *SmDHAR1* 基因组序列长 1 123 bp,包括 5 个内含子,内含子长度分别为 61、53、72、67 和 85 bp (图 2A)。

引物 *SmDHAR2*-CL1/CL2 分别克隆得到 *SmDHAR2* 的 cDNA 与基因组序列 (图 2B)。 *SmDHAR2* cDNA 序列包含 726 bp 的开放阅读框 (包括终止密码子),60 bp 上游非编码区和 35 bp 下游非编码区。cDNA 编码的蛋白包含 241 个氨基酸,预测分子量为 27.33 kDa。 *SmDHAR2* 基因组序列长 1 220 bp,包括 6 个内含子,长度分别为 68、59、58、60、78 和 76 bp (图 2B)。

2.3 江南卷柏 DHAR 基因的组织表达模式分析

通过 RT-PCR 研究江南卷柏 DHAR 基因在正常

生长下不同组织 (叶、菱叶、茎和根) 中的表达分布。RT-PCR 后对 PCR 产品进行测序, 测序结果表明 *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* 基因在江南卷柏所有组织中均表达 (图 3), 这表明 2 个 DHAR 基因是组成型表达基因, 可能在江南卷柏的生长发育中发挥着重要作用。

A catctatccacacagcagctttcttcgcacgtacgtcagcatccttctagagtttgcgc
ATGGCTGTGACTACCACTGAGGCTGTGGAGGTTTGGTGAAAGCCGCAATGGCGATCCA
M A V T T T E A V E V L V K A A N G D P
TCCCGCTTGGCAGATTGTgagtatcatctacattgcttttttcatctctttt
S R L G D C
ttctttgtcactccaggtCCATTTTCTCAGCGAGTGCTACTCACTCTGGAGGAGAAAGG
P F S Q R V L L T L E E K G
GATTCTCTATAAATCCAAATTCGTGGATATGGAGAACAGCCGCGATGGTTTctatttg
I P Y N S K F V D M E N K P A W F
ttcttttatttttctgttggtgacatggtgaattttccaggttttTGGAGCAAAATCCA
L E A N P
GAAGTAAAGTTCCACTGATCAAGGACGATGAAATGGTGGCGGATCGGAGCTTATC
E K V P V I K D D G K W V A D S D V I
ACGACGCTCATCGAGCAAAAGTTCCGCTCACCTTCTCTGGTACACCACTGAAAGTCA
T Q L I E T K F P S P S L V T P P E K S
AGCGTgaagtcttctcgtcttttttcttctcgttctgtgtcagatggcctttgatttg
S V
cttgcctcaaatcttcagTGGCTCGAAGATCTTCTCGTCTCTCGTAAATTCCTCAAGGC
G S K I F S S F V K F L K S
AAGGATCCGAGGATGGCTCCGAGGCTGCTCTCGTGAAGAGCTGAAGACGCTGGATGAG
K D P S D G T S E A A L L E E L K T L D E
TATCTCGCAAGATGtaagtcttctcgtatctctcgttcttccaggaacaaaaagtc
Y L A K N
ctggctttttgttgggtggcagGACCATTCGTGAATGGATCAACATCTCCGCTGTGGA
G P F V N G S N I S A V D
TCTCAGCTCGCCCAAGCTCTACCACTTAAATCGCGCTGGCCATTACAGCAGTG
L S L A P K L Y H L K I A L G H Y K Q W
GTCAAGTCCCAAAATCTCAGCAATCTCAACTCTTACATGGAGTaaacacacagaa
S V P Q N L T N L N S Y M E
aaaaatattcttttccaggtgtaattatcgtcactcagctcgtgtctcttcttctt
cgttgagggtCTCTCTTCAAGCGAGAAAGCTTCCAGAAACGATGGCTCCGGCGGAGTAG
A L F K R E S F Q K T M A P A E V
TCGTCAAAAGGATGGGCAAGCATTAAAGCGGTGagcaaaactggaaaaacagaagaa
V V K G W A K H L S A *
tccccggagattcaagagaatcgaaacggttccctctgtgaag

B ccagctctcttggagctcttctcttcgcgacgtcagggcagtttgcagagagatcagggc
ATGGCTTCGAGGATGTGGATCTTTGAAGTTTTCGGCAAGCGGCTACTGGGATGGAGAG
M A S Q D T E V F G K A A T G T G S
CCGAGCAACCAAGAGGAGATTGtagttctatcttccatagctggcgagcttccattg
P S N Q D C
atatcttattggtatttgaattgtcttccaggtCCATTCTCTCAGCGAGTTTACATGGTTC
P F S Q R V Y M V
TGGAGGtatgaaacttttggattgtcttcttgggttccaattccaagtttggattct
L E
cgaagAGAAACATCTTCTTCAAGGCAACTTATGTCGAGGAAGGCCCAACAGCCTGA
E K H L P Y K A T Y V E E G P N K P D
CTGGTCagttacgagagatcagttgatttttcttaggagaaggatttggtttctcgc
W
ggcttTGAACCAATCCCTCTGGCTTGAAGCGGCTTCCGTCGACGCTGCTGATTGGA
F M Q H N P S G L M P V L R D A A D W
TTCAAGACTCGGACCAAGATCTTTCAGCATGTGGAGAACAGTTTCAAGAGGAGCTCCCTGA
I Q D S D K I F E H V E N K F K E P S L
AAACTCCAGCAGGTTCAAGAGCGTgaagtcgattcattgttttccgaagctcgac
K T P D E F K S V
tgagatattgagattggtatttccagGGGCGTGGCATTTTCCAGCGTTCAACAACTGGC
G A G I F P A F T N W
TCAAGTCCAAGGACCGAAACGCTCCAGCGAAGCAAGATTATCAACGAGCTCACAGCTC
L K S K D R N A P A K Q E F I N E L T A
TCGAGGAGCACTTGAAGAGCAGTgaagcttcttctgagtttctcctcatcgaagatttct
L E E H L K K H
tccatgaacgttcttctacaaatgtgttgggtttctcagggGCCCTTACATCGCTGGAA
G P Y I A G
AGAATCCCACGACTCCGACTTTGCTTTGGCTCCAAAGCTTCGTACGCTAGAGTGGCTC
K N P T D S D F A L A P K L R H A R V A
TTAAGCACTTCATAGACTTCTCTCCCGCAATCTCCAGCATGTCCGAAAATACATCG
L K H F I D F V F P S N L Q H V A K Y I
AGGcaagtttttccaccaggttcttctcgtcttctcgcacatgatctctcagattgt
E
cttttctcttttggtagCTCATGGAACGAGGCCAAGCTTCAAGAAGACGATTCTCCA
L M E T R P S F K K T D S P
GACGAGATGATCATCGGGCTGGCAGACCAAGTTTGTATCTCCGGACAAAGATTGACAAG
D E M I I A G W Q T K F D L P D K I D K
AACTCGGACAGGAGAAAGAAACAGCCTTCAACCGCTTGTGTAAtttcatggccaagtg
N S G Q E K K T A F T P L V *
tcgattttatgtaatacaaca

图 2 *SmDHAR1* (A) 和 *SmDHAR2* (B) 的核酸及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *SmDHAR1* (A) and *SmDHAR2* (B). The intron sequence is in lower case. The exon sequence is marked in gray. The stop codon is denoted by an asterix.

Journals.im.ac.cn

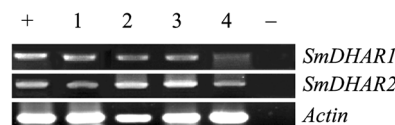


图 3 江南卷柏 DHAR 基因在不同组织中的表达模式

Fig. 3 Expression of the *SmDHAR1* and *SmDHAR2* gene in various tissues of *S. moellendorffii*. 1-4: leaf, scale leaf, stem and root tissues. +: positive control using the pGEM-T constructs including target genes as PCR template; -: negative control using RT-PCR reaction without template.

2.4 江南卷柏 DHAR 蛋白的三维结构建模

图 4A 展示了模拟的 2 个江南卷柏 DHAR 蛋白的三维结构。优化后的构象用 Profile-3D 进行氨基酸残基的兼容性考察, 结果如图 4B 所示, 从图中可以看到大部分氨基酸残基得分都是正值, 位于合理的范围。SmDHAR1 和 SmDHAR2 具有谷胱甘肽转移酶 (GST) 结构, 包括 2 个结构域: 由 α 螺旋和 β 折叠组成类硫氧还原蛋白结构域 (N 末端结构域) 以及由多个 α 螺旋组成的 C 末端结构域, 2 个结构域由 10 个氨基酸组成的 linker 相连接。2 个蛋白的 N 末端结构域氨基酸大约组成了蛋白全长的 1/3, 包括 1 个 β - α - β - α 结构域。C 末端结构域占整个蛋白质的 2/3, SmDHAR1 由 6 个 α 螺旋组成, 而 SmDHAR2 比 SmDHAR1 在 C 末端多 1 个 α 螺旋 (图 4A 黑色箭头处)。

2.5 江南卷柏 DHAR 蛋白的生化特性分析

将构建的表达载体 pET30a/SmDHAR1 和 pET30a/SmDHAR2 分别转化到大肠杆菌 BL21 感受态细胞中, 经 IPTG 诱导后发现 SmDHAR1 和 SmDHAR2 蛋白能在大肠杆菌 BL21 中进行可溶性表达 (图 5)。通过镍柱亲和层析纯化后, 获得纯化的重组蛋白 (图 5), SDS-PAGE 结果显示蛋白分子量与预测的 SmDHAR1 和 SmDHAR2 蛋白大小一致。

DHAR 是植物 GST 基因家族的成员, 由于植物 GST 对多种底物如 CDNB、NDB-Cl、DHA 等具有广泛的活性^[15], 所以我们分别测定了 SmDHAR1 和 SmDHAR2 蛋白对 DHA、NBD-Cl 和 CDNB 三种底物的活性, 结果表明, SmDHAR1 和 SmDHAR2 对 NBD-Cl 和 CDNB 没有活性, 但是对 DHA 具有催化

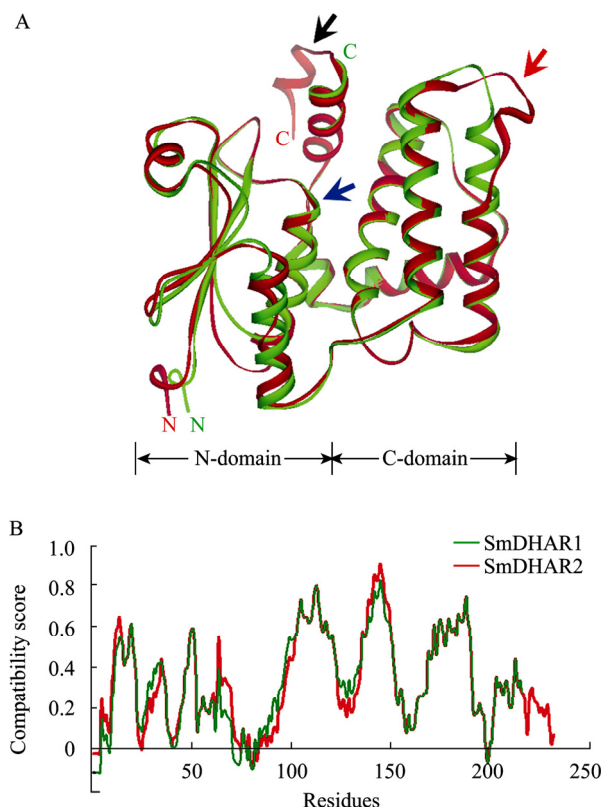


图4 SmDHAR1和SmDHAR2蛋白三维结构的比较

Fig. 4 Structure modelling of SmDHAR1 and SmDHAR2. (A) Structural comparison of SmDHAR1 (green) and SmDHAR2 (red), N: N-terminus; C: C-terminus. (B) Evaluation of the structure of SmDHAR1 and SmDHAR2 by Profile-3D program.

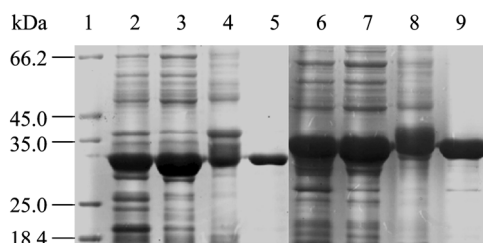


图5 SmDHAR1和SmDHAR2蛋白在大肠杆菌BL21中的表达和纯化

Fig. 5 Overexpression and purification of recombinant SmDHAR1 and SmDHAR2. 1: protein marker; 2 and 6: total cellular extracts from induced bacteria containing recombinant SmDHAR1 and SmDHAR2, respectively; 3 and 7: supernatant after ultrasonication and centrifugation of cells expressing recombinant SmDHAR1 and SmDHAR2, respectively; 4 and 8: cell pellet after ultrasonication and centrifugation of cells expressing recombinant SmDHAR1 and SmDHAR2, respectively; 5 and 9: the purified recombinant SmDHAR1 and SmDHAR2, respectively.

活性(图6),说明江南卷柏DHAR蛋白具有脱氢抗坏血酸还原酶活性。对DHA的催化活性测定参照Edwards等^[14]的方法。纯化的SmDHAR1和SmDHAR2蛋白浓度分别是0.039 mg/mL和0.655 mg/mL,反应3 min后 A_{265} 值分别是0.539和0.078(图6),经计算后SmDHAR1和SmDHAR2的活性分别为19.76 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 和0.17 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$,SmDHAR1的酶活性是SmDHAR2的116倍,说明SmDHAR1和SmDHAR2对DHA的活性有巨大的分化。

SmDHAR1和SmDHAR2蛋白热力学稳定性结果如图7所示。结果显示SmDHAR1和SmDHAR2蛋白的热力学稳定性具有较大差异。SmDHAR1在50 $^{\circ}\text{C}$ 时还保持着最高活性的80%,这预示着

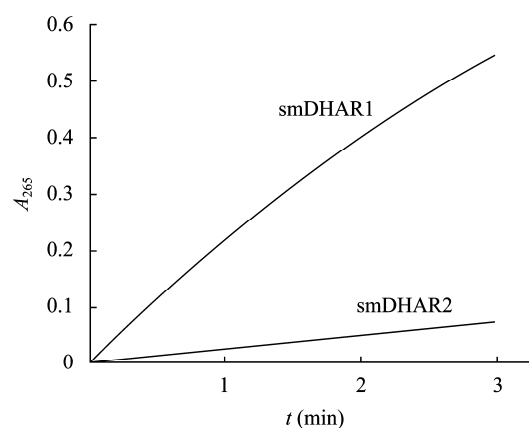


图6 SmDHAR1和SmDHAR2的酶活性分析

Fig. 6 Activity analysis of recombinant SmDHAR1 and SmDHAR2.

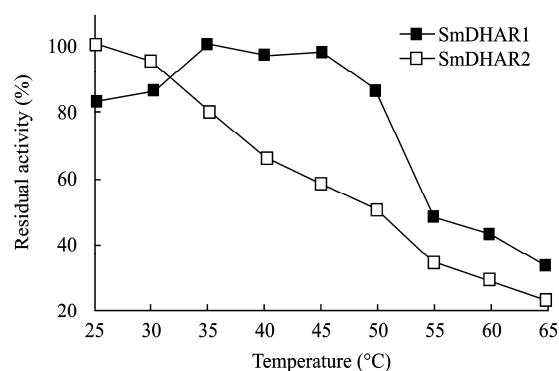


图7 SmDHAR1和SmDHAR2蛋白的热力学稳定性

Fig. 7 Thermal stability of recombinant SmDHAR1 and SmDHAR2.

SmDHAR1 蛋白在 50 °C 以下都是稳定的, 表明 SmDHAR1 是一个热稳定的酶, 可能在适应高温环境中发挥重要作用。而 SmDHAR2 在 50 °C 时只剩 50% 的活性, 活性随着温度的升高一直下降, 预示着 SmDHAR2 蛋白热稳定性较低。

3 讨论

抗坏血酸还原酶广泛存在于植物的叶绿体、线粒体和细胞质中, 对于保持植物细胞中 AsA 水平具有重要意义, 而且广泛地参与植物的抗逆反应。蕨类植物约有 1.2 万多种, 在植物系统中介于苔藓植物和种子植物之间, 分布广泛, 除沙漠外世界各地都有生长^[16]。在植物漫长的演化过程中, 蕨类植物是最早脱离水体束缚、最早适应陆地生态环境和最早出现维管组织的类群^[17], 因此在蕨类植物中研究与适应性密切相关的 DHAR 基因对于理解植物的适应性有重要的理论意义。在本研究中, 我们从江南卷柏中克隆到 2 个 DHAR 基因, 对该基因的基因结构、表达模式、所编码蛋白的结构与生化功能进行了比较详细的研究。

在我们先前的研究中发现 DHAR 基因在裸子植物白皮松和双子叶植物杨树中均是组成型表达基因^[8,18]。最近对小麦 2 个 DHAR 基因 (*TaDHAR1* 和 *TaDHAR2*) 的研究发现, 这 2 个 DHAR 基因在小麦的各个器官中均有表达, 且表现出相似的表达模式, 均表现为在幼穗中转录本水平最高, 在根和小花中的转录本水平相对较低^[7]。在本研究中, 利用 RT-PCR 并结合 PCR 产品测序, 我们发现 *SmDHAR1* 和 *SmDHAR2* 基因在江南卷柏所有组织中均表达 (图 3)。因此这一系列研究结果预示着在蕨类植物、裸子植物、单子叶植物和双子叶植物中 DHAR 基因可能均是组成型表达基因, 在植物的生长发育中可能发挥着重要作用。

通过蛋白质的序列比对, 我们发现所有 DHAR 蛋白都具有 CPFS 的保守基序 (Motif) (图 8A)。大量研究证明 CXXS 基序在氧化还原酶中高度保守, 在

催化反应中作为酶的催化反应中心, CXXS 基序中的第一个半胱氨酸与底物的半胱氨酸形成分子间共价二硫键^[19]。江南卷柏 SmDHAR1 和 SmDHAR2 蛋白均含有 CPFS 的保守基序, 位于蛋白 N 末端结构域的第一个 α 螺旋的起始处 (图 4A 中的蓝色箭头处)。对比 SmDHAR1 和 SmDHAR2 蛋白的三维结构, 发现 SmDHAR1 蛋白的 CPFS 保守基序中, Ser 侧链上的羟基与 Pro 主链上的羰基形成氢键 (图 8B), 而 SmDHAR2 没有形成这个氢键, 预示着 SmDHAR1 和 SmDHAR2 的活性中心的构象可能有较大的差异, 这种构象的差异可能对酶的催化活性有重要影响, 事实上, SmDHAR1 的催化活性是 SmDHAR2 的 116 倍, 因此, 酶学活性的结果也支持这 2 个酶的催化中心构象可能有较大差异。

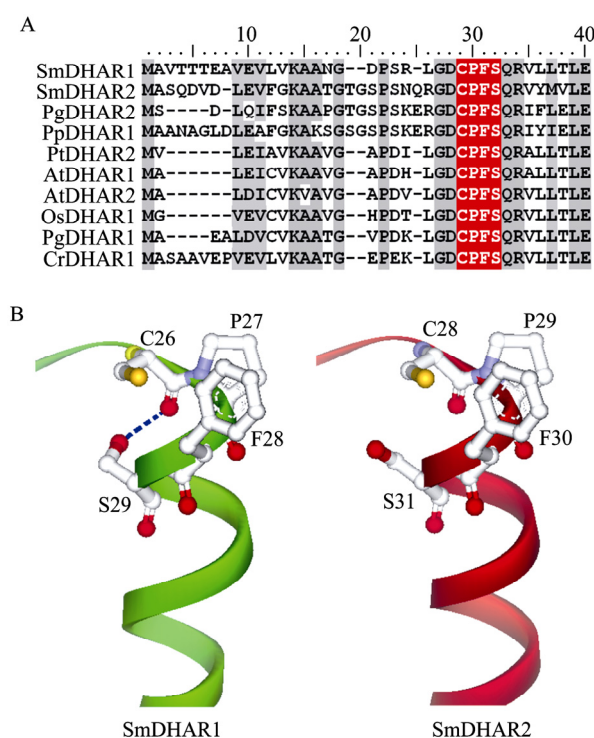


图 8 DHAR 蛋白 CPFS 保守基序的序列与结构比较

Fig. 8 Sequence and structural comparison of CPFS motif in DHAR proteins. (A) N-terminal amino acid sequence alignment of DHAR protein, CPFS motif was marked in red. (B) Structural comparison of CPFS motif between SmDHAR1 and SmDHAR2, Blue dashed represent hydrogen bond.

谷胱甘肽转移酶 (GST) 基因家族被分为 8 个亚家族, 分别是 DHAR、Tau、Phi、Zeta、Theta、Lambda、TCHQD 和 EF1B γ ^[18]。植物 Tau、Phi 和 Zeta 类 GST 的晶体结构已被解析, 结构显示所有植物 GST 的 N 末端结构域高度保守, 而且主要负责和所有 GST 的共同底物谷胱甘肽 (GSH) 结合^[15]。结构比较发现预测的 SmDHAR2 与 SmDHAR1 蛋白的 N 末端结构域高度保守 (图 4A), 都具有 β - α - β - α - β - α 结构, 预示着这 2 个蛋白都能与 GSH 结合, 实验结果显示这 2 个蛋白都具有依赖 GSH 的 DHA 活性, 因此酶学结果支持预测的三维结构。

结构比较发现植物 GST 的 C 末端结构域变异较大, 这与 GST 的功能相关, 因为植物 GST 的 C 末端结构域主要负责结合特异性底物^[18], 不同的 GST 能结合特定底物而发挥不同的生理功能。在本研究中, SmDHAR2 与 SmDHAR1 蛋白的 C 末端结构域差异较大, SmDHAR2 比 SmDHAR1 在 C 末端多 1 个 α 螺旋 (图 4A 黑色箭头处), 而且在蛋白的第 4 个与第 5 个 α 螺旋之间的 Loop 结构变化较大 (图 4A 红色箭头处), 这种 C 末端结构的变化预示着这 2 个 DHAR 的功能可能不同。事实上, SmDHAR1 具有较高的催化活性 (19.76 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$), 而 SmDHAR2 的催化活性非常低 (0.14 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$), 另一方面, 热力学稳定性分析显示 SmDHAR1 比 SmDHAR2 蛋白更稳定, 这些生化实验结果也预示着这 2 个蛋白可能存在功能上的分化。

REFERENCES

- [1] Chen Z, Gallie DR. Dehydroascorbate reductase affects leaf growth, development, and function. *Plant Physiol*, 2006, 142(2): 775–787.
- [2] Ushimaru T, Nakagawa T, Fujioka Y, et al. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J Plant Physiol*, 2006, 163(11): 1179–1184.
- [3] Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, et al. Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol Plant*, 2006, 127(1): 57–65.
- [4] Kato Y, Urano J, Maki Y, et al. Purification and characterization of dehydroascorbate reductase from rice. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(2): 173–178.
- [5] Shimaoka T, Yokota A, Miyake C. Purification and characterization of chloroplast dehydroascorbate reductase from spinach leaves. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(10): 1110–1118.
- [6] Dixon DP, Davis BG, Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 2002, 277(34): 30859–30869.
- [7] Yu CM, Yang YP, Liu XY, et al. Molecular and biochemical analysis of two genes encoding dehydroascorbate reductase in common wheat. *Chin J Biotech*, 2009, 25(10): 1483–1489.
- [8] 余春梅, 杨艳萍, 刘鑫燕, 等. 普通小麦中双脱氢抗坏血酸还原酶 (TaDHAR) 基因的克隆与生化特性分析. *生物工程学报*, 2009, 25(10): 1483–1489.
- [9] Yang HL, Zhao YR, Wang CL, et al. Molecular characterization of a dehydroascorbate reductase from *Pinus bungeana*. *J Integr Plant Biol*, 2009, 51(11): 993–1001.
- [10] Weng JK, Tanurdzic M, Chapple C. Functional analysis and comparative genomics of expressed sequence tags from the lycophyte *Selaginella moellendorffii*. *BMC Genomics*, 2005, 6:85.
- [11] Cao Y, Tan NH, Chen JJ, et al. Bioactive flavones and biflavones from *Selaginella moellendorffii* Hieron. *Fitoterapia*, 2010, 81(4): 253–258.
- [12] Wan DR, Chen KL, Zhan YH. Investigations and studies on medicinal plants from Selaginellaceae in Hubei Province. *J Chin Materia Medica*, 2005, 30(19): 1507–1510.
- [13] 万定荣, 陈科力, 詹亚华. 湖北省卷柏科药用植物调查与研究. *中国中药杂志*, 2005, 30(19): 1507–1510.
- [14] Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, 1974, 249(22): 7130–7139.
- [15] Ricci G, Caccuri AM, Lo Bello M, et al. Colorimetric and fluorometric assays of glutathione transferase based on 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal Biochem*, 2006, 354(1): 1–6.

Journals.im.ac.cn

- 1994, 218(2): 463-465.
- [14] Edwards R, Dixon DP. Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol*, 2005, 401: 169-186.
- [15] Basantani M, Srivastava A. Plant glutathione transferases - a decade falls short. *Can J Bot*, 2007, 85(5): 443-456.
- [16] Liu HM, Wang L, Zhang XC, et al. Advances in the studies of lycophytes and monilophytes with reference to systematic arrangement of families distributed in China. *J Syst Evol*, 2008, 46(6): 808-829.
- 刘红梅, 王丽, 张宪春, 等. 石松类和蕨类植物研究进展: 兼论国产类群的科级分类系统. *植物分类学报*, 2008, 46(6): 808-829.
- [17] Li CX, Lu SG, Yang Q. Advances in the studies of the origin and systematics of pteridophytes. *Chin Bull Bot*, 2004, 21(4): 478-485.
- 李春香, 陆树刚, 杨群. 蕨类植物起源与系统发生关系研究进展. *植物学通报*, 2004, 21(4): 478-485.
- [18] Lan T, Yang ZL, Yang X, et al. Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione *S*-transferase supergene family. *Plant Cell*, 2009, 21(12): 3749-3766.
- [19] Fomenko DE, Gladyshev VN. CxxS: fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *Protein Sci*, 2002, 11(10): 2285-2296.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

生物工程中游技术实验手册

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

雷德柱 胡位荣 主编

开本: B5 营销分类: 生物科学 装帧: 平装

ISBN 978-7-03-029413-5 ¥ 35.00 2010 年 11 月出版

内容简介

本书包括微生物工程实验、植物细胞工程实验及动物细胞工程实验三部分, 它们在培养对象和培养方法上有区别, 但在原理上又有内在联系。学生在系统地掌握实验的基本技术和理解实验的基本原理后, 可以灵活运用, 相互贯通。具体内容包括培养基的设计、菌种的诱变筛选、嫌气性发酵、好氧发酵、发酵过程的相关参数的检测、植物器官培养、植物组织培养、植物细胞和原生质体培养、动物细胞培养、动物细胞融合等。所开设的实验主要为基础性实验, 学生通过实验熟悉实验的基本原理, 掌握实验的基本技术。在此基础上, 再开设综合性实验, 培养学生的综合能力和创新能力。

本书可以作为生物工程中游技术实验、发酵工程实验或细胞工程实验的本科或专科学生的教材或参考用书, 也可以作为相关实验技术工作者的参考用书。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书 (免邮费)

邮购地址: 北京东黄城根北街 16 号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编: 100717

联系人: 周文字 (010-64031535)

网上订购: www.dangdang.com www.joy.com www.amazon.cn www.beifabook.com

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>, 欢迎致电索要书目