

水稻一个 C3HC4 型锌指蛋白编码基因的 克隆表达与分析

刘丽华^{1,2}, 林玲^{1,2}, 鲁国东¹, 王宗华¹

(¹福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福州 350002;

²福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

摘要: 锌指蛋白是生物体内数量最多的转录调控因子,它在动植物的生长发育过程中均起到十分重要的作用。通过 RT-RCR 从水稻 cDNA 文库中扩增获得一个锌指蛋白基因 *OsZFP1* 的完整阅读框,序列分析表明该基因编码 253 个氨基酸的多肽,且含有一个典型的 C3HC4 型锌指结构。将测序后正确的 *OsZFP1* 基因克隆到表达载体 pGEX-KG 中,成功地构建了原核表达载体 pGEX-KG-*OsZFP1*,转化宿主菌 BL21(DE3),IPTG 诱导后 SDS-PAGE 电泳检测表明,水稻 *OsZFP1* 基因在大肠杆菌中以融合蛋白的形式大量表达。

关键词: 水稻; 锌指蛋白; 基因克隆; 表达

中图分类号: S435.111.41 文献标识码: A 论文编号: 2009-0621

Cloning, Expression and Analysis of a Rice C3HC4-type Zinc Finger Protein Encoding Gene

Liu Lihua^{1,2}, Lin ling^{1,2}, Lu Guodong¹, Wang Zonghua¹

(¹Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education,

Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002;

²College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract: The zinc finger proteins belong to the largest family of regulatory transcription factors, which play important roles during growth and development in animals and plants. In this study, a zinc finger gene *OsZFP1* was isolated from rice cDNA library by RT-PCR. Sequence analysis indicated that the gene encodes a 28 kDa protein with 253 amino acids and contains one typical C3HC4 zinc finger domain. The entire coding region of *OsZFP1* gene was then cloned into the bacterial expression vector pGEX-KG. The resulting recombinant expression vector pGEX-KG-*OsZFP1* was transformed into *E. coli* BL21 for protein expression. After IPTG induction, the expressed protein was analyzed by SDS-PAGE, and the results showed that the target protein was expressed at a high level in bacterial cells.

Key words: rice, zinc finger protein, gene cloning, expression

0 引言

生物胁迫(病原微生物、动物及杂草等)和非生物胁迫(高盐、干旱和低温等)是影响植物生长发育和正常代谢的重要限制因子,高等植物为了抵抗这些逆境,形成了许多复杂的防御机制。这种机制往往是通过一系列感知和传导逆境的信号分子来实现的,如转录因

子、酶和离子通道等^[1-2]。锌指蛋白是真核生物基因组中最丰富的一类转录因子,根据半胱氨酸(C)和组氨酸(H)残基的数目和位置,可将含锌指结构域的转录因子分为 C2H2、C2C2、C3H、C3HC4(RING finger)和 C3HC5(LIM finger)5 个亚类^[3]。锌指蛋白主要通过与核酸的相互作用来显示不同的功能,如促进转录、抑制

基金项目: 国家自然科学基金资助项目“稻瘟病菌激发子受体的筛选及其结构与功能研究”(30500325)。

第一作者简介: 刘丽华,女,1982 年出生,福建莆田人,博士研究生,研究方向:生化与分子生物学。通信地址:350002 福建农林大学生命科学学院, Tel: 0591-83758395, E-mail: hellolihua88@163.com。

通讯作者: 王宗华,男,1962 年出生,福建尤溪人,研究员,研究方向:分子植物病理学。E-mail: zonghuaw@163.com。

收稿日期: 2009-03-31, **修回日期:** 2009-05-13。

转录、单链DNA结合、IKNA结合或RNA/DNA双向结合^[4]。目前,已经在矮牵牛、拟南芥^[5]、小麦^[6]、棉花^[7]、大豆^[8]等植物中相继分离了近40个植物锌指蛋白基因,其中大部分具有QALGGH保守结构,少数具有类似QALGGH的结构。近年来,越来越多的研究表明,锌指蛋白在调节植物防卫基因表达和抗性反应上起关键作用。该研究小组通过酵母双杂交的方法从水稻cDNA文库中筛选到了一个与抗病相关的C3HC4型锌指蛋白基因*OsZFP1*,通过RT-PCR和生物信息学的方法获得并分析了该基因的完整阅读框,随后在大肠杆菌中对其进行了表达,为深入研究*OsZFP1*的性质及其在抗病反应中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

取粳稻(*Oryza sativa* L. subs. japonica)品种日本晴的种子,经0.1% HgCl₂消毒15 min、蒸馏水冲洗3次后,在37℃培养箱浸种催芽,播种在小花盆中置于温室培养。取3~4叶期的幼苗在液氮中速冻后,保存于-80℃冰箱,用于RNA抽提和后续目标基因的克隆。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取和cDNA第一链的合成 总RNA采用上海英骏公司的Trizol试剂按照说明抽提,取2 μg的总RNA用于cDNA第一链的合成(具体方法参见Promega相关试剂盒说明书)。

1.2.2 *OsZFP1*的克隆与序列测定 以从水稻cDNA文库中获得的一段约500 bp的EST序列为信息探针,搜索位于GenBank的水稻EST库,通过同源比较,寻找与之部分序列完全一致的EST序列用于构建EST重叠群,并根据最终拼接序列设计一对特异性PCR引物:ZN1:5' - CTCGGAATTCGTATGGACCAGATTTA - 3', ZN2:5' - ATTAGTCGACTCAGAACAAGAGCAGGC - 3' (引物由上海英骏公司合成)。通过如下PCR程序扩增目标基因:94℃预变性5 min;94℃变性45 S,51℃复性45 S,72℃延伸1 min,共30个循环;最后72℃延伸7 min。目的条带经胶回收纯化后连接到pMD-18T载体(购自TaKaRa公司)中,转化大肠杆菌JM109,测序由上海英骏公司完成。

1.2.3 生物信息学分析 利用在线工具TMHMM v2.0、SignalP v3.0、COILS^[9]、SMART v4.0^[10]等分析*OsZFP1*蛋白是否含有跨膜区、信号肽。同时通过PredictProtein Server和SWISS-MODEL^[11]分别对*OsZFP1*蛋白二级结构及三维结构进行预测。

1.2.4 *OsZFP1*原核表达重组质粒的构建 质粒提取、酶切、连接、感受态细胞的制备及转化等参照试剂说明书

和相关的分子生物学方法^[12]。简要步骤如下:提取原核表达载体pGEX-KG和测序正确的pMD-18T-*OsZFP1*转化子质粒,用限制性内切酶EcoRI和SalI双酶切并回收载体片段和*OsZFP1*目的基因片段,16℃连接后转化到表达宿主菌*E. coli*. BL21 (DE3)中,待长出单菌落,按照上述PCR方法以转化子菌液为模板快速初步筛选出阳性转化子后,进一步进行酶切验证,将验证无误的转化子命名为pGEX-KG-*OsZFP1*。

1.2.5 锌指蛋白的诱导表达和检测 挑取pGEX-KG-*OsZFP1*单菌落和只含pGEX-KG的单菌落,分别接种于5 ml含Amp(100 mg/ml)的LB液体培养基中,37℃振荡培养过夜,第2天按1:100稀释到50 ml含Amp(100 mg/ml) LB培养基中,当培养至OD₆₀₀值达0.4左右时,加入终浓度为1 mmol/L IPTG诱导培养,共同置于28℃恒温摇床中振荡培养6 h后,将菌液分别转入50 ml的离心管中,4℃,5000 r/min离心10 min,弃上清,向沉淀中加入5 ml PBS后进行超声处理。处理后,12 000 r/min离心10 min,取上清作为蛋白样品。样品通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分析。SDS-PAGE试剂的配制及方法参照文献^[13]。

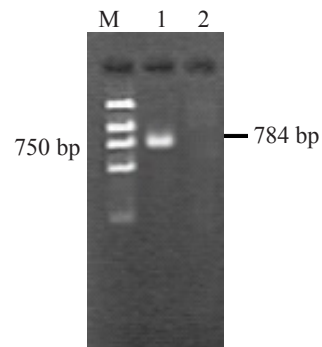


图1 PCR扩增-*OsZFP1*基因

1:以cDNA为模板PCR扩增-*OsZFP1*基因;2:阴性对照

2 结果与分析

2.1 *OsZFP1*的克隆

利用设计的一对特异性PCR引物,从水稻幼苗的cDNA中扩增出了1条约800 bp的PCR产物(图1),命名为*OsZFP1*。同时将其TA克隆到pMD-18T载体中,转化大肠杆菌JM109,获得的转化子通过PCR及双酶切双重验证(图2),其测序结果表明序列与拼接获得的序列完全一致(测序结果未显示)。

2.2 *OsZFP1*序列分析

*OsZFP1*的测序结果通过ExPASy服务器上的ProtParam、Seqtools及Bioedit软件预测得知,该基因的编码区为762 bp,共编码253个氨基酸,其蛋白分子量

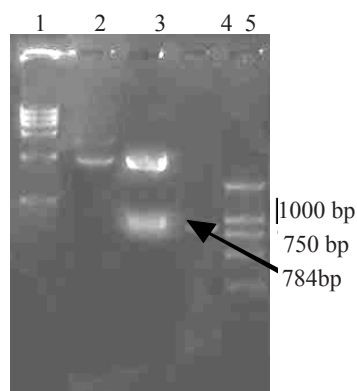


图2 pMD-18T-OsZFP1 重组质粒的酶切验证

注: 1: DNA Marker DL 15000; 2: 质粒 pMD-18T-OsZFP1/Sal I; 3: 质粒 pMD-18T-OsZFP1/EcoRI+HindIII(Sal I); 4: PCR 阳性对照; 5: DNA Marker DL 2000

约为 28 kDa、理论等电点 pI 为 7.19。OsZFP1 蛋白氨基酸序列接近 C 端的 176~200 和 235~252 位之间有两个跨膜螺旋序列, 与 PredictProtein 服务器上的 PHD Predictions 预测的跨膜区位置接近(图3)。

利用 SMART v4.0 软件分析发现, OsZFP1 蛋白氨

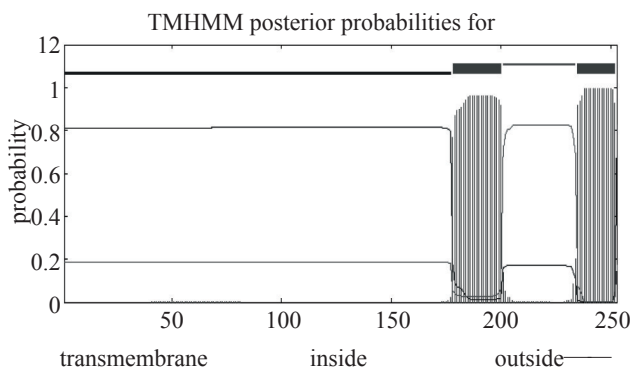


图3 OsZFP1 蛋白的跨膜螺旋区

注: 图示阴影区域即 OsZFP1 蛋白的跨膜区

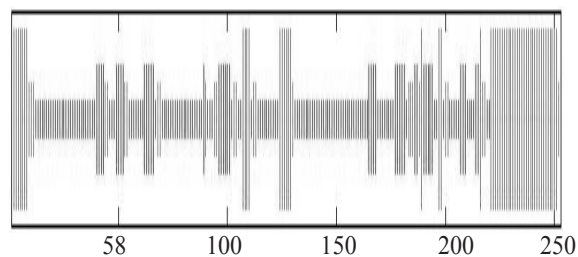


图5 OsZFP1 蛋白二级结构

2.3 OsZFP1 表达质粒的获得

原核表达载体 pGEX-KG 在其多克隆位点上游有一个谷胱甘肽-s-转移酶编码序列, 目的基因在不改变阅读框架的条件下插入多克隆位点(MCS), 在转化大肠杆菌后经过异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)的诱导及相

氨基酸序列第 39~89 位之间含有一个保守的结构域(图4)。该结构域是一个环指结构域(ring finger), 一般由 40~60 个氨基酸组成, 是一个富含半胱氨酸的基序, 形成 C3HC4 锌指基序的形式, 可以与两个锌离子以一种特异的交叉联结体系结合。由于锌离子的螯合作用, 此区域形成了一个公共的疏水核心, 而在保守的连接区之间变化的序列则提供了蛋白相互识别、相互作用的特异性。研究表明 C3HC4 锌指蛋白主要为一些核内转录因子。

另外应用 PredictProtein Server 对 OsZFP1 蛋白的二级结构进行预测, 预测结果(图5)显示, 在 OsZFP1 蛋白的二级结构组分中, α 螺旋(H)占 21.34%、 β 折叠(E)占 16.21%、无规则卷曲(L)占 52.17%, 故 OsZFP1 蛋白属于 α/β 型蛋白。

应用 Phyre Server 分析的结果显示, 折叠子 1Jm7 与 OsZFP1 蛋白的匹配性比较好, 其综合分值最高, 为人肿瘤细胞 Ring/U-box 超家族成员, 以该折叠子的 X 衍射结构为模板, 置换相应的肽段序列, 由 SWISS-MODEL 服务器优化模式重新拟和 OsZFP1 蛋白的三维结构, 如图6所示。

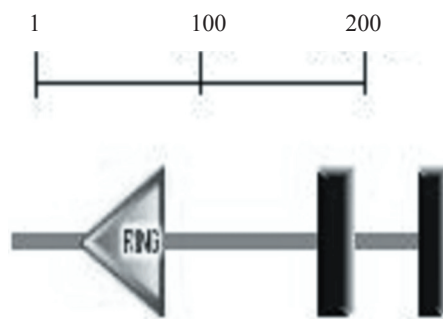


图4 OsZFP1 的结构域



图6 OsZFP1 蛋白三维结构预测结果

应条件的优化, 就可表达出与谷胱甘肽-s-转移酶融合的蛋白。将之前构建好的 TA 克隆子用 Sal I 和 EcoR I 双酶切并回收目的条带后, 与同样使用 Sal I 和 EcoR I 双酶切过的表达载体 pGEX-KG 连接, 转化大肠杆菌 BL21, 并通过 PCR 和双酶切验证阳性转化子(图7)。

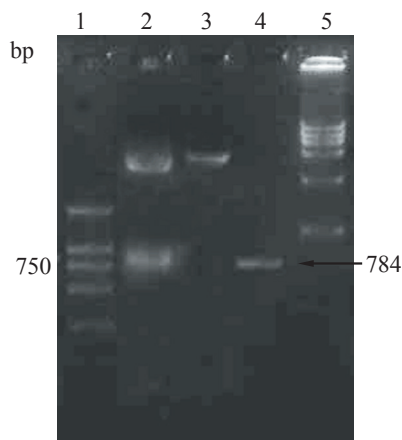


图7 *OsZFP1* 表达载体的酶切验证

注: 1: DNA Marker DL 2000;
2: 质粒 pGEX-KG-OsZFP1 / *EcoR* I + *Sal* I ;
3: 质粒 pGEX-KG-OsZFP1 / *EcoR* I ;
4: PCR 阳性对照; 5: DNA Marker DL 15000。

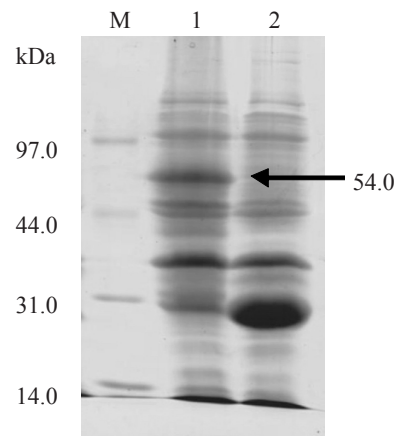


图8 *OsZFP1* 融合表达产物 SDS-PAGE 分析

注: M: 蛋白 Marker; 1: pGEX-KG-OsZFP1 / *E.coli* BL21 IPTG 诱导. 2: pGEX-KG / *E.coli* BL21 IPTG 诱导。

2.4 *OsZFP1* 的原核表达检测

将构建好的含有 *OsZFP1* 基因的原核表达载体 pGEX-KG-OsZFP1 和空白对照质粒 pGEX-KG 分别转化大肠杆菌 BL21(DE3), 经 IPTG 诱导后, 表达产物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 经考马斯亮蓝染色成像 (图8)。由于所克隆的基因约为 784 bp, 所以编码蛋白分子量约为 28 kDa, 加之表达载体 pGEX-KG 上的 GST 蛋白约 26 kDa, 因此其融合蛋白的分子量约为 54 kDa。从 SDS-PAGE 结果可以看出, 在预计的大小处有明显的深染蛋白条带, 而空载对照没有, 说明已成功构建了 pGEX-KG-OsZFP1 基因原核表达载体, 并在大肠杆菌中成功表达。

3 讨论

随着水稻基因组测序的完成, 在水稻中已发现了多个锌指家族的基因, 它们有的参与调控凋亡、细胞周期、分化、代谢通路、细胞对生物及非生物的应答等诸多重要的生命过程, 有的是构成核小体的主要部分, 有的还起着 E3 泛素连接酶的功能等。Liu H^[14] 等研究发现, 水稻一个 C3H2C3 型的锌指蛋白 OsBIRF1 能够影响植物的生长, 并且对生物和非生物胁迫产生防卫反应。Arumugam TU^[15] 等研究表明, Makorin 锌指蛋白对水稻的发芽、叶子和外侧根的形态建成起关键作用。Koiwai H^[16] 等发现, 一个含有 RING-H2 结构域的水稻蛋白具有泛素酶 E3 的活性, 在水稻根形成后, 它作为泛素酶 E3 膜锚定蛋白对维持细胞活力起作用。Liu K^[17] 等过表达冷诱导的锌指蛋白 OsCOIN 发现它能提高水稻抗非生物胁迫的能力和脯氨酸水平。目前植物中对锌指家族的研究主要集中在 C2H2 型, 对

C3HC4 型的研究比较少, 尤其是对水稻 C3HC4 型锌指蛋白的研究, 几乎未见报道。该课题组已通过酵母双杂交技术, 以稻瘟菌的分泌蛋白丝氨酸蛋白酶为诱饵从水稻 cDNA 文库中筛选到了一个 C3HC4 型锌指蛋白。通过实时定量 PCR 分析了这个基因在野生型稻瘟菌和分泌蛋白缺失突变体分别接种的水稻中的表达情况, 发现这个基因在前者中表达量高于后者, 推测它可能与稻瘟菌的分泌蛋白存在互作关系。为了进一步研究二者间的相互识别机理, 构建了水稻 *OsZFP1* 基因的原核表达载体, 使其以融合蛋白的形式在大肠杆菌中得以大量表达, 这将为进一步分离纯化 *OsZFP1* 蛋白, 研究其性质和功能奠定基础。

在许多情况下, 含有锌指元件的蛋白都会以一种序列特异性方式与其他蛋白相互作用, 成为人们研究蛋白-蛋白相互作用的一个理想对象。研究锌指蛋白作用方式, 旨在揭示蛋白间的作用规律, 推测蛋白-蛋白间相互作用, 设计和改变锌指结构中起关键作用的几个保守的氨基酸位点, 使整个锌指的识别特异性发生变化, 从而设计出序列特异的 DNA 结合蛋白, 为以安全高效的方式用于许多病害的防治提供了广阔前景。此外, 目前用于研究蛋白间的相互的方法主要有 GST-pulldown、免疫共沉淀、串联亲和纯化等技术, 然而这些技术都需要对目的蛋白进行表达, 因此该研究将对后续进一步研究这个 C3HC4 型锌指蛋白与稻瘟菌分泌蛋白的互作区域及其功能奠定基础, 将有助于更深入地了解它在水稻应答生物胁迫过程中的作用, 进而为阐明水稻对稻瘟病菌的抗性机制及二者的互作机理提供理论依据, 也为培育抗病品种提供理论基础。

参考文献

- [1] Qi-Feng L. Halophyte research in China. Beijing: Science Pub--lishing Company, 2004.
- [2] Mukhopadhyay A, Vij S, Tyagi A K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, 101(16): 6309-6314.
- [3] 刘强,张贵友.植物转录因子的结构与调控作用[J].科学通报,2000, 45(014):1465-1474.
- [4] Laity J H, Lee B M, Wright P E. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2001, 11(1): 39-46.
- [5] Dathan N, Zaccaro L, Esposito S, et al. The Arabidopsis SUPERMAN protein is able to specifically bind DNA through its single Cys2-His2 zinc finger motif[J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(22): 4945.
- [6] Sakamoto A, Minami M, Huh G H, et al. The putative zinc-finger protein WZF1 interacts with a cis-acting element of wheat histone genes[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 217(3): 1049-1056.
- [7] 杨郁文,倪万潮,张保龙,等.陆地棉SUPERMAN类似锌指蛋白基因的克隆与表达分析[J].遗传,2006,28(004):443-448.
- [8] Kim J C, Lee S H, Cheong Y H, et al. A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants[J]. The Plant Journal, 2001, 25(3): 247-259.
- [9] Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting Coiled Coils from Protein Sequences, Science,1991, 252:1162-1164.
- [10] Schultz J, Milpetz, F, Bork P,et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. PNAS,1998, 95(11): 5857-5864.
- [11] Schwede T, Kopp J, Guex N. et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Research[J]. 2003. 31:3381-3385.
- [12] 萨姆布鲁克丁,弗里奇EF,曼尼阿蒂斯T.分子克隆实验指南[M].2版.北京:科学出版社,1989:34-74.
- [13] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [14] Liu H, Zhang H, Yang Y, et al. Functional analysis reveals pleiotropic effects of rice RING-H2 finger protein gene OsBIRF1 on regulation of growth and defense responses against abiotic and biotic stresses[J]. Plant Mol Biol, 2008,68(1-2):17-30.
- [15] Arumugam T U, Davies E, Morita E H, et al. Sequence, expression and tissue localization of a gene encoding a makorin RING zinc-finger protein in germinating rice (*Oryza sativa* L. ssp. Japonica) seeds[J]. Plant Physiology et Biochemistry, 2007, 45 (10-11): 767-780.
- [16] Koiwai H, Tagiri A, Katoh S, et al. RING-H2 type ubiquitin ligase EL5 is involved in root development through the maintenance of cell viability in rice[J]. The Plant Journal, 2007, 51(1): 92-104.
- [17] Liu K, Wang L, Xu Y, et al. Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice[J]. Planta, 2007, 226(4): 1007-1016.

致谢:感谢汪世华副教授的指导以及陈晓峰博士生在文章修改过程中的帮助,同时也感谢国家自然科学基金的支助。