

doi: 10.11830/ISSN.1000-5013.201703016



巨尾桉铜分子伴侣 *EuCCS* 基因的克隆及表达分析

赵艳玲, 姚婕

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 以巨尾桉为研究对象, 克隆得到巨尾桉铜分子伴侣(CCS)基因(GenBank 注册号为 KJ755351.1), 生物信息学分析表明: *EuCCS* 蛋白定位于叶绿体, 与龙眼同源基因的一致性达到 99%。巨尾桉 CCS 的原核表达载体 pET-*EuCCS* 在大肠杆菌细胞内可以稳定表达, 超氧化物歧化酶(SOD)活检测结果表明: 转化菌株的 SOD 酶活性比对照菌株高, 说明外源基因 *EuCCS* 具有生物学活性。利用荧光定量聚合酶链式反应(PCR)技术分析 CCS 在巨尾桉中的表达特性, 结果表明: 在植株生长旺盛的部位, CCS 表达量较大, 如植株幼叶, 随植株叶片慢慢衰老, CCS 的表达量也随之下落; 在组培苗中, 叶片的 CCS 表达量最大, 其次是茎。

关键词: 巨尾桉; 铜分子伴侣; 克隆; 原核表达; 聚合酶链式反应

中图分类号: Q 943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2017)03-0374-05

Cloning and Expression of Copper Chaperone for Superoxide Dismutase Gene in *Eucalyptus grandis* × *E. ophylla*

ZHAO Yanling, YAO Jie

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

Abstract: The major pathway for activation of *Cu/ZnSOD* requires the CCS copper chaperone to insert copper and activate *Cu/ZnSOD* through oxidation of an intramolecular disulfide. The *EuCCS* gene is cloned by RT-PCR from *Eucalyptus grandis* × *E. ophylla* (GenBank Accession Number: KJ755351.1). Bioinformatics analysis suggests that CCS is located in the chloroplast and the evolutionary distance between eucalyptus and longan is quite close with the identity of 99%. The strain prokaryotic expression vector pET-*EuCCS* can be expressed stably in *E. coli*, and the superoxide dismutase enzyme activity is higher than control indicating that the cloned *EuCCS* gene could activate *Cu/ZnSOD*. Besides, the expression characteristics of eucalyptus CCS gene are analyzed by quantitative PCR. And the results show that the *EuCCS* quantity of the young leaves is relatively higher than that of the old one to greenhouse seedling and for tissue culture seedling the *EuCCS* is expressed higher in leaves than stem and root.

Keywords: *Eucalyptus grandis* × *E. ophylla*; copper chaperone for superoxide dismutase; clone; prokaryotic expression; polymerase chain reaction

铜离子是细胞色素氧化酶、铜锌超氧化物歧化酶(*Cu/Zn superoxide dismutase, Cu/ZnSOD*)、漆酶、赖氨酰氧化酶和多巴胺单加氧酶等所必需的辅助因子, 在维持植物正常的新陈代谢及生长发育中发挥着重要作用^[1]。当铜离子超过一定值时, 铜离子参与 Fenton 反应会生成大量的羟自由基, 对生物体产

收稿日期: 2016-05-18

通信作者: 赵艳玲(1978-), 女, 助理研究员, 博士, 主要从事植物分子生物学的研究. E-mail: zhaoyl@hqu.edu.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31300497)

生重金属毒害作用,所以在长期进化过程中,生物体内形成一套完整的铜代谢调控机制,分子伴侣和铜螯合剂调控细胞内和细胞外铜的转运,达到生物体内铜离子的稳态^[2].铜分子伴侣(CCS)可以传递铜离子到 *Cu/ZnSOD* 中,并将其激活生成有活性的酶分子^[3-7].相关研究表明:CCS在调控植物体内铜离子平衡过程中发挥着特殊作用^[8-9].本文克隆了巨尾桉的 CCS 基因,通过初步构建该基因原核表达体系,测定该酶的活性,并通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)和实时定量聚合酶链式反应(quantitative PCR)技术分析巨尾桉中 CCS 的表达特性,研究了该基因的基本功能特点.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与植物材料 pET-32a(+), *E. coli* JM109, BL21(DE3), 巨尾桉植株为本实验室保存.

1.1.2 试剂 Takara SYBR ExScript 等试剂盒和试剂采购自大连 Takara 公司;引物由厦门精聚公司合成.

1.2 实验方法

1.2.1 巨尾桉 *EuCCS* 基因的克隆方法 具体克隆方法参见文献[10]. PCR 引物为 CCS1:5'-CATG-GCATTCTCTGAGGTCGG-3', CCS2:5'-CTCAGACTTTGCTGGTGAC-3'. CCS 目的片段与 pMD-18T Vector 连接,经聚合酶链式反应(PCR)验证阳性克隆子,命名为 pMD-*EuCCS*,委托华大基因测序.

1.2.2 构建原核表达载体 pET-*EuCCS* 并诱导表达 设计引物 CSS3:5'CGGATCCATG-GCATTCTCTGAGGT 3', CSS4:5'CGAGCTCTCA GACTTTGCTGGTG 3',获得亚克隆载体 pMD-CCS1,用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切连接 pET-32a(+).用质量分数为 12%的 SDS-PAGE 蛋白电泳分析融合基因在大肠杆菌 BL21 中的表达,具体方法参见文献[10].

1.2.3 IPTG 诱导 CCS 蛋白原核表达条件与 SOD 酶活性测定 设计两组实验,一是加入终浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mmol · L⁻¹ 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG),诱导 4 h 后,SDS-PAGE 电泳分析;二是设置 16, 22, 37 °C 摇床中异丙基硫代半乳糖苷诱导 4 h 的 SDS-PAGE 电泳分析.采用氮蓝四唑(NBT)检测超氧化物歧化酶(SOD)蛋白酶活,具体方法参见文献[10].

1.2.4 RT-PCR 和 qPCR 检测 CCS 在巨尾桉不同部位的表达量 巨尾桉叶片及组培苗总核糖核酸(RNA)提取,使用 Takara 公司的 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 去除基因组 DNA, Takara 公司的 PrimeScript II 反转录反应,利用 RT-PCR 检测 CCS 在桉树中的表达情况.利用 Takara SYBR ExScript 试剂和罗氏 LightCycler 480 仪器,以桉树 6 个样本的 cDNA 为模板,内参基因为巨尾桉 18S rRNA(171 bp),引物设计分别为 EgCCS1:5'TCATCAAGTCTTGCCCTGAGC 3', EgCCS2:5'GCTCAAGTCCACCTC AACAT 3', Eg18S1:5'CGCGCTACACTGATGTATTC 3', Eg18S2:5'GTA-CAAAGGGCAGGG ACGTA 3'.预变性:95 °C, 30 s;变性:95 °C, 5 s;退火:60 °C, 20 s, 40 个循环,最后延伸,65 °C, 15 s,分析实时定量 PCR(qPCR)数据,每个反应包括 3 个重复.

2 研究结果

2.1 巨尾桉 CCS 基因的克隆

纯化采用 Trizol 法大量提取巨尾桉总 RNA 获得信使 RNA(mRNA)后,经 RT-PCR 扩增得到非单一条带,如图 1 所示.图 1 中:M 为 DNA Marker;1~3 为 cDNA 序列扩增条带.选择预测的 960 bp 左右的条带为目标条带切胶回收,克隆得到 CCS 基因(GenBank 注册号为 KJ755351.1).

生物信息学分析(数据未列出)的结果表明:CCS 蛋白是定位在叶绿体中的亲水的、稳定的酸性蛋白质,该蛋白含 2 个跨膜螺旋,从 N 末端朝外由内到外进行跨膜.该蛋白主要由 59.6%的无规则卷曲,29.5%的 β -折叠和 11.0%的 α -螺旋等构成,并存在多个磷酸化位点和保守结构域,这些保守结构域的存在可能是激活 SOD 表达所必须的.采用 MEGA 5.2 对来自

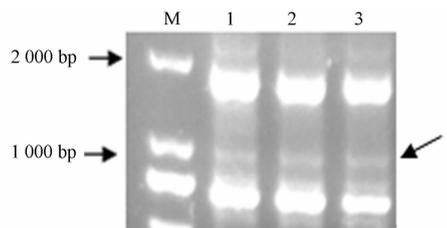


图 1 RT-PCR 扩增巨尾桉 CCS 基因
Fig. 1 Amplification products of eucalyptus CCS cDNA sequence

11种不同物种的 CCS 核酸序列作进化树分析(数据未列出),巨尾桉 CCS 与龙眼、葡萄、蓖麻处于同一分支中,与它们在进化距离上较为接近,同源性分别为 99%,81%,80%.

2.2 原核表达载体 pET-EuCCS 的构建与诱导表达

亚克隆获得具有 *Sac* I/*Bam*H I 酶切位点的 pMD-EuCCS 与线性载体 PET-32a(+)同时双酶切,凝胶回收之后,连接产物转化 *E. coli* BL21,*Sac* I/*Bam*H I 双酶切筛选阳性质粒,命名为 pET-EuCCS.

pET-EuCCS *Sac* I/*Bam*H I 双酶切验证,如图 2 所示.图 2 中:M 为 DNA Marker;1~3 为 pET-EuCCS *Sac* I/*Bam*H I 双酶切条带.

pET-32a(+)载体的 N 端部分分子量大约为 18 ku,基因完整阅读框为 960 bp,编码 320 个氨基酸,理论上可表达 32 ku 大小,加上表达系统的融合蛋白部分,预期融合蛋白大小是 50 ku.经 IPTG 诱导之后,重组质粒表达一条大约 50 ku 条带,如图 3 所示.这与预期的表达目标蛋白一致.图 3 中:M 为蛋白 Marker;1 为未诱导的空菌株;2 为诱导的空菌株;3 为未诱导的含 pET-32a(+)的菌株;4 为诱导的含 pET-32a(+)的转化菌株;5 为未诱导的含 pET-EuCCS 的转化菌株;6 为诱导的含 pET-EuCCS 的转化菌株;箭头所示为表达的融合蛋白条带位置.

2.3 CCS 蛋白原核表达条件的初步研究

在不同浓度 IPTG 诱导 CCS 蛋白表达实验中,IPTG 添加量为 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,足以诱导 CCS 蛋白表达,如图 4 所示.图 4 中:M 为蛋白 Marker;1~5 分别为 $0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诱导 4 h 的蛋白表达;箭头所示为表达的融合蛋白条带. $16, 22, 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的 IPTG 诱导含 pET-EuCCS 菌株都能正常表达出 CCS 蛋白,如图 5 所示.图 5 中:M 为蛋白 Marker;1 为 $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ IPTG 诱导 pET-32a;2 为 $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ IPTG 诱导 pET-EuCCS;3 为 $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ IPTG 诱导 pET-32a;4 为 $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ IPTG 诱导 pET-EuCCS;5 为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ IPTG pET-32a;6 为 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ IPTG 诱导 pET-EuCCS.为了检测最佳的 IPTG 诱导时间,对 $16, 22, 37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下的 IPTG 诱导时间进行研究.结果表明: $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导下,9 h 后,CCS 蛋白表达量趋于稳定; $22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导下,6 h 后,CCS 蛋白表达达到最大量; $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导下,4 h 后,CCS 蛋白表达趋于稳定(数据未列出).

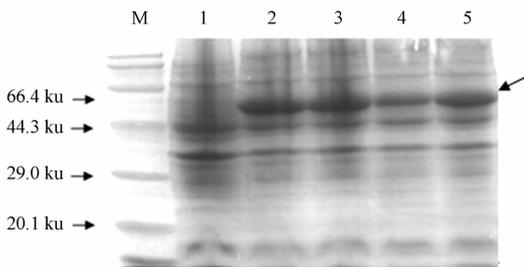


图 4 不同浓度 IPTG 诱导对 EuCCS 蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of IPTG concentration on expression of recombinant EuCCS protein expression

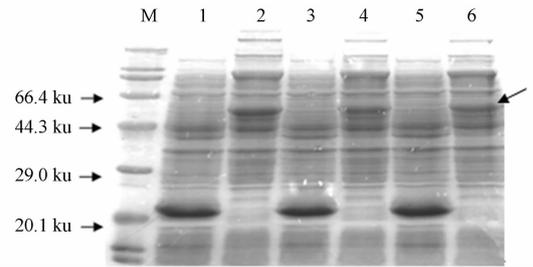


图 5 不同温度 IPTG 诱导对 CCS 蛋白表达的影响
Fig. 5 Effect of IPTG temperature on expression of CCS protein expression

CCS 的酶活性无法直接检测,可以通过检测 CCS 底物 *Cu/ZnSOD* 酶活来间接检测 CCS 的活性.为了检测外源基因 CCS 诱导表达的蛋白是否具有生物学活性,利用氮蓝四唑法检测不同温度诱导菌株的 SOD 酶活,如图 6 所示.图 6 中: z 为酶活; t 为温度.由图 6 可知:在 $16, 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ IPTG 诱导下,转化菌株 pET-EuCCS 的 SOD 酶活性高于对照菌株 pET-32a,说明 EuCCS 的表达可以提高大肠杆菌 *Cu/ZnSOD* 的活性;在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 诱导下,SOD 酶活变化不大,可能是由于表达蛋白在此温度下形成包涵体所致,包

涵体中的蛋白无酶活性。

2.4 巨尾桉 CCS 的表达分析

巨尾桉 CCS 基因在组培苗根、茎、叶和植株幼叶、中段叶和老叶均有表达,如图 7 所示. 由图 7 可知:组培苗叶片中的 CCS 表达量比根、茎更大,植株中幼叶的 CCS 表达量最大,之后是成熟叶和老叶。

利用实时定量 PCR 方法进行基因表达解析,选择 18S RNA 作为参比基因来对所有样品进行归一化处理,再对不同样品之间的目的基因表达量进行比较. 用目的基因 CCS 的定量结果除以管家基因 18S 的定量结果得到校正值. 实时定量 PCR 分析巨尾桉 CCS 基因表达,如图 8 所示. 由图

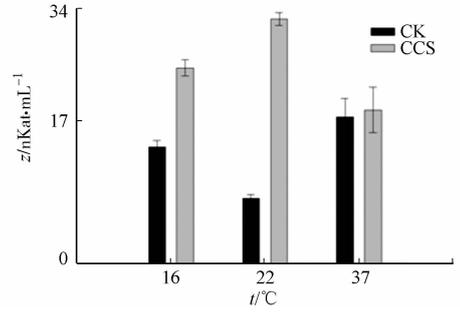
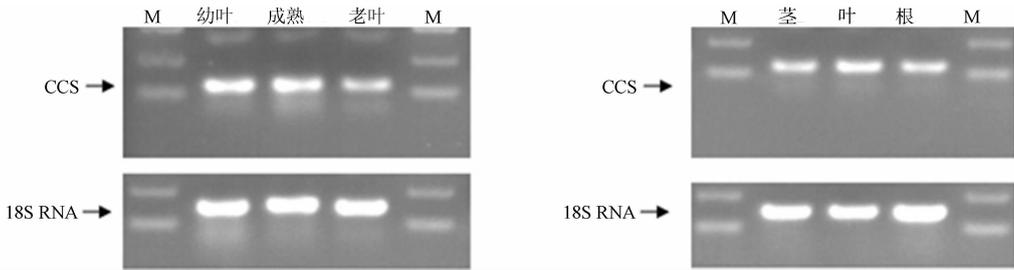


图 6 不同温度诱导菌株的 SOD 酶活检测
Fig. 6 SOD enzyme activity detection under different induction temperatures

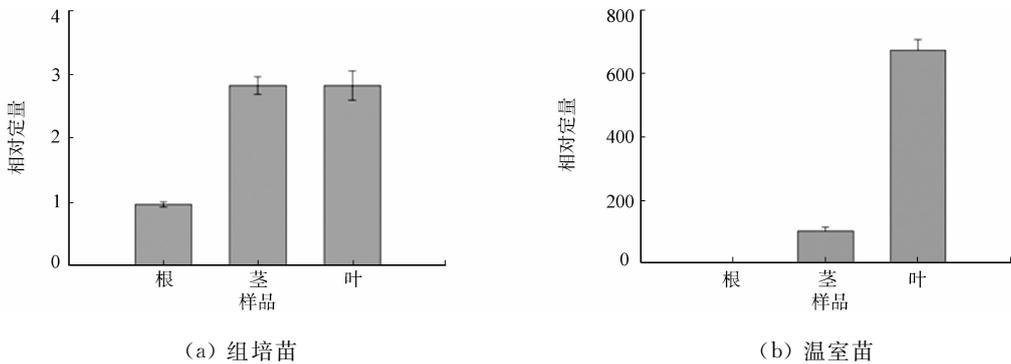


(a) 温室苗的不同龄叶片 (b) 组培苗的不同部位

图 7 RT-PCR 检测巨尾桉不同部位的 CCS 表达情况

Fig. 7 RT-PCR detection of CCS expression in eucalyptus

8(a)可知:用目的基因 CCS 校正值作柱状图,巨尾桉组培苗叶和茎中的 CCS 表达量较高,而根中的表达量相对较低. 由图 8(b)可知:巨尾桉温室苗幼叶中的 CCS 表达量最高,其次是成熟叶,衰老叶片中检测不到 CCS 的表达,可能是由于表达量太小所致,这个结果和 RT-PCR 的结果基本一致。



(a) 组培苗 (b) 温室苗

图 8 实时定量 PCR 分析巨尾桉 CCS 基因表达

Fig. 8 Quantitative PCR analysis of CCS relative expression in eucalyptus

3 讨论

CCS 基因的功能研究的方法主要是原核表达和真核表达研究. 拟南芥的 CCS 基因转入酵母表达体系中发现,拟南芥 CCS 可以激活酵母细胞中 *Cu/ZnSOD* 的表达^[11],大豆的 CCS 基因,构建原核表达载体后转化到大肠杆菌中,也具有表达活性^[6]. 文中巨尾桉 CCS 基因可以稳定地在大肠杆菌中表达,在 37,22,16 °C 条件下,1 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导到 4,6,12 h,可达到稳定. 通过 SOD 酶活测定 22,16 °C 诱导下,转化菌株酶活比对照组明显升高,说明该温度下获得的 *EuCCS* 表达产物可以提高大肠杆菌的 *Cu/ZnSOD* 活性。

研究者已经对马铃薯、拟南芥等的 CCS 的表达特性进行了研究. 在 CCS 表达部位的研究有将马铃薯的 CCS 启动子区域融合荧光素酶序列,转基因发现在马铃薯茎块和匍匐枝中 CCS 基因表达量最大,

在根部和花部的表达量最小^[4]. 拟南芥全长 CCS 基因融合绿色荧光蛋白基因的表达载体转入拟南芥后荧光蛋白集中在叶绿体内. 这表明克隆得到的拟南芥 CCS 主要定位于叶绿体内^[11]. 利用 RT-PCR 和 qPCR 技术研究巨尾桉的 CCS 基因发现, 在植株生长旺盛的部位 CCS 表达量较大, 如植株幼叶, 随植株叶片慢慢衰老, CCS 的表达量也随之下降; 巨尾桉组培苗中叶片中 CCS 的表达量最大, 其次是茎和根, 与该基因可能定位于叶绿体表达的研究结果相呼应.

4 结束语

CCS 与逆境相关的表达特性主要体现为: 环境中铜离子过量时, 拟南芥茎和根中 CCS 的表达量上升, 反之则下降^[12]. 马铃薯的 CCS 启动子区域包含几个同源的顺式作用因子, 其中有 3 个和植物生长素响应有关, 4 个和应激响应有关. CCS 可以被植物生长素、赤霉素、果糖、蔗糖、葡萄糖诱导表达, 高浓度的铜离子则抑制表达^[4]. 植物在衰老状态下, CCS 的表达量也会随之增加^[13]. CCS 是一个与逆境相关的基因, 调控 CCS 的表达可能会提高植物的耐受逆境的能力, 下一步的工作是把基因转入到植物中, 研究基因的功能和调控机理, 定向培育高抗植物.

参考文献:

- [1] FANG Qian, LI Peng, JIN Si. Transporter system and regulation of copper in yeast and plants[J]. Chin Bull Bot, 2007, 24(6): 807-815.
- [2] 姚婕, 赵艳玲. 植物 Cu, Zn-SOD 分子调控机理研究进展[J]. 热带农业科学, 2014, 34(3): 55-60.
- [3] VALENTINE S J, GRALLA E B. Delivering copper inside yeast and human cells[J]. Science, 1997, 278(5339): 817-818.
- [4] TRINDADE L M, HORVATH B M, BERGERVOET M J, *et al.* Isolation of a gene encoding a copper chaperone for the copper/zinc superoxide dismutase and characterization of its promoter in potato[J]. Plant Physiology, 2003, 133(2): 618-629.
- [5] CHU C C, LEE W C. A copper chaperone for superoxide dismutase that confers three types of copper/zinc superoxide dismutase activity in Arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2005, 139(1): 425-436.
- [6] SAGASTI S, YRUELA I. Characterization of the recombinant copper chaperone (CCS) from the plant *Glycine (G. max.)* [J]. Metallomics, 2011, 3(2): 169-175.
- [7] 林玉玲, 赖钟雄. 龙眼胚性愈伤组织 Cu/ZnSOD 分子伴侣基因 CCS 的克隆及其在体胚发生过程中的表达分析[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 18(3): 351-358.
- [8] COHU C M, ABDEL-GHANY S E. Copper delivery by the copper chaperone for chloroplast and cytosolic copper/zinc-superoxide dismutases: Regulation and unexpected phenotypes in an *Arabidopsis mutant* [J]. Mol Plant, 2009, 2(6): 1336-1350.
- [9] BRADY G F, GALBAN S, LIU Yuwen, *et al.* Regulation of the copper chaperone CCS by XIAP-mediated ubiquitination[J]. Mol Cell Biochem, 2010, 30(8): 1923-1936.
- [10] 赵艳玲, 周利建. 巨尾桉胞质 *EuCuZnSOD* 基因的克隆与原核表达[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 2015, 36(6): 693-697.
- [11] ABDEL-GHANY S E. Contribution of plastocyanin isoforms to photosynthesis and copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* grown at different copper regimes[J]. Planta, 2009, 229(4): 767-779.
- [12] DEL P T, CAMBIAZO V. Gene expression profiling analysis of copper homeostasis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(2): 248-252.
- [13] ABDEL-GHANY S E, BURKHEAD J L. AtCCS is a functional homolog of the yeast copper chaperone Ccs1/Lys7 [J]. FEBS Lett, 2005, 579(11): 2307-2312.

(责任编辑: 钱筠 英文审校: 刘源岗)