

胡萝卜抗冻蛋白基因的克隆及其在 *E. coli* 中的表达^{*}

范云, 刘兵, 王宏斌, 王树启, 王金发

(中山大学基因工程教育部重点实验室//生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要: 对中国的一个胡萝卜品种进行了冷诱导前后幼苗总蛋白组成的比较、分析, SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果表明两者在相对分子质量 36 000 附近有一条蛋白带的差别。由此推测实验的胡萝卜品种在冷诱导过程中有抗冻蛋白 (AFP) 表达。根据相关的研究结果设计引物, 以胡萝卜幼苗基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到了长 1 099 bp 的抗冻蛋白基因。测序结果表明其与 GenBank 公布的 *afp* 序列仅有 3 个碱基的差别。将此抗冻蛋白基因克隆进大肠杆菌表达载体 pGEX4T1, 在 IPTG 的诱导下表达出了含有 AFP 的约 60 000 的融合蛋白, 证明该 AFP 基因在原核表达系统中可以正常表达。

关键词: 胡萝卜; 冷诱导; 抗冻蛋白基因 (AFP 基因); 克隆

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2002) 03-0052-04

低温寒害是农业生产中的一种严重的自然灾害, 获得植物内源的抗冻蛋白及其编码基因不仅具有重要的理论意义, 而且具有广泛的应用价值。关于抗冻蛋白 (antifreeze proteins, AFPs) 及其基因的研究已有 40 多年的历史, 但实验材料大多集中于鱼类和昆虫^[1]。1998—1999 年, 英国的 Dawn Worrall 和 Knut Meyer 等人先后对胡萝卜的抗寒性进行了研究, 发现胡萝卜中存在可经冷诱导表达的抗冻蛋白, 并随即克隆了该基因^[2,3]。这是首次明确提出获得植物的抗冻蛋白及其基因, 并进行了分子水平上的抗冻功能检测, 同时也预示了植物内源的抗冻蛋白基因用于植物抗寒性研究的广阔前景。本文报道了中国的一个胡萝卜栽培品种中抗冻蛋白基因的克隆、鉴定与表达。

1 材料与方法

1.1 植物材料

胡萝卜 (*Daucus Carota* var. *sativa*) 种子购于广州杨伟星种子有限公司 (商品名: 精选五寸胡萝卜); 烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. North Carolina 82) NC82 种子由广东省农业科学院蔬菜研究所提供。

1.2 载体与宿主菌

pBluescript SK (M13-) 质粒由本实验室提供, pGEX4T1 质粒由中山大学生物工程中心植物分子遗传学实验室提供; *E. coli* DH5 α [*supE44* Δ *lacU169* (ψ = 80 *lacZ* Δ *M15*) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1*

relA1] 和 *E. coli* BL21 (DE3) [*F⁻ ompT hsdSB (r⁻bm⁻) gal dcm* (DE3)] 菌株由本实验室提供。

1.3 试剂

IPTG 购自 Sigma 公司; *pfu* DNA polymerase 购自 Promega 公司; *Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切核酸酶、DL2000 核酸相对分子质量标准物、 λ DNA 购自 TaKaRa 公司; 质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜生物公司; 引物合成及测序由上海基康公司完成; 其他常用试剂均为分子生物学级或分析纯。

1.4 主要仪器

2400 型 PCR 仪, Pekin Elmer 公司; 紫外/可见光蛋白核酸分析仪, Amersham Pharmacia Biotech 公司; MV-II 型双垂直拟电泳槽, 宁波新芝科器研究所; 高速冷冻离心机, Beckman 公司; 低温生化培养箱, 广东省医疗器械厂。

1.5 胡萝卜幼苗的萌发和冷诱导

Daucus Carota var. *sativa* 种子 25 °C 水萌。1 周后, 分出一部分幼苗在 4 °C 冷诱导 72 h, 光照条件均为 16 h/d。

1.6 植物基因组 DNA 的分离

采用 Clark 等^[4] 的 CTAB 法并略作改动。

1.7 目的 DNA 的 PCR 扩增

基于 Saiki 等^[5] 的方法进行 PCR 反应, 参考 GenBank 公布的 *afp* 序列设计 AFP 基因扩增引物 Forward: 5' TCT AGACTC GAA AAC ATA ATC CA 3';

* 收稿日期: 2001-12-19

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (990258)

作者简介: 范云 (1977-), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 王金发; E-mail: ls19@zsu.edu.cn

Reverse 5' TGC ACT GCT TGAGCT GC ATA 3'。

1.8 PCR 产物的连接和转化

使用 *Taq* DNA 聚合酶扩增得到的 PCR 产物与从 pBluescript 构建的 T 载体^[6,7] 进行连接，而通过 *pfu* DNA 聚合酶得到的 PCR 产物则直接与纯化后的 pBluescript/*Eco*R V 的酶切产物进行平端连接。连接产物通过氯化钙法^[8] 转化大肠杆菌 DH5α，进而通过酶切确认重组子和重组质粒中外源片段的插入方向。

1.9 AFP 基因在大肠杆菌中的蛋白表达分析

根据克隆到的 AFP 基因设计引物，通过 PCR 扩增得到 *afp* 表达序列。*afp* 表达序列与表达载体 pGEX4T1 构建成重组质粒 pGA-06 后转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，在 IPTG 诱导下进行蛋白表达。收集不同诱导培养时间 (0, 2, 4, 6 h) 的菌体，裂解后 SDS PAGE 检测分析。

2 结 果

2.1 冷诱导与非冷诱导胡萝卜幼苗的总蛋白组成差异比较

冷诱导与非冷诱导胡萝卜幼苗总蛋白的 SDS-PAGE 结果示于图 1。

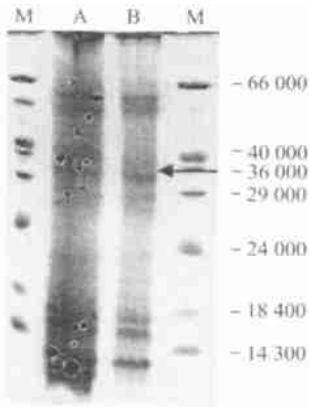


图 1 冷诱导与非冷诱导胡萝卜幼苗总蛋白组成的比较

Fig 1 Comparison of the total proteins composition in cold induced and non induced carrot seedlings

A 非冷诱导胡萝卜幼苗总蛋白;
B 冷诱导胡萝卜幼苗总蛋白;
M 蛋白质相对分子质量标准物

从电泳的条带对比中可观察到在 36 000 附近两样品间有一条蛋白带的差异 (如图 1 所示)，且只有冷诱导的胡萝卜幼苗总蛋白才具有此蛋白条带。与 Dawn Worrall 和 Knut Meyer 等的实验结果对比，发现这条差异蛋白带与他们获得的冷诱导抗冻蛋白相对分子质量大小相近 (36 800)。由此推测我们实验用胡萝卜种可能具有相似的冷诱导抗冻

蛋白基因。

2.2 胡萝卜抗冻蛋白基因的扩增、克隆及鉴定

相关的研究结果已表明 *afp* 序列中没有内含子，因此可以以胡萝卜基因组 DNA 为模板扩增 AFP 基因，分别采用 *Taq* DNA 聚合酶和高保真的 DNA 聚合酶 (*pfu* DNA polymerase) 进行 PCR 扩增，均能得到大小约为 1.1 kb 的 DNA 片段，与预期的 AFP 基因大小一致 (图 2)。将通过不同的聚合酶扩增得到的 PCR 产物分别与载体 pBluescript 构建成重组质粒 pBA-09 和 pBF-10。因为 Forward 引物上预先设计了一个 *Xba* I 酶切位点，结合 pBluescript SK (-) 载体上的多克隆位点分布情况，可以用核酸内切酶 *Xba* I 来筛选 AFP 基因的插入方向为 T7→T3 的重组子 (即基因的起始密码子靠近载体多克隆位点区域的 T7 引物端)。pBA-09 和 pBF-10 都是符合此插入方向的重组子。将 pBA-09 和 pBF-10 两克隆送往上海基康公司进行测序，AFP 基因序列示于图 3。

pBA-09 和 pBF-10 的测序结果完全一致，表明 PCR 扩增是真实的。克隆到的 AFP 基因长度为 1 099 bp，与预期大小完全相同。图 3 中下划单线标出的区域是 AFP 基因中编码信号肽的序列。Dawn Worrall 和 Knut Meyer 等的实验结果表明 *afp* 序列中没有内含子，由此推测我们克隆到的 AFP 基因应该能够编码 332 个氨基酸 (从 34 位的起始密码子 ATG 至 1 030 位的终止密码子 TAG 为 999 bp)，推测的氨基酸序列示于图 4。

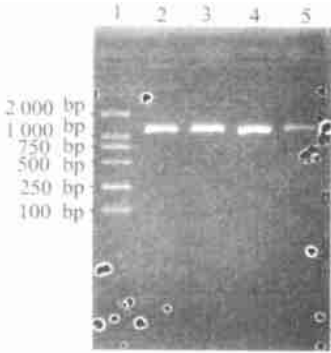


图 2 胡萝卜抗冻蛋白基因的 PCR 扩增

Fig 2 PCR amplification of the AFP gene in carrot
1 DL2000 核酸相对分子质量标准物;
2—5 胡萝卜基因组 DNA 的 PCR 扩增产物

比较发现此 AFP 基因与 GenBank 公布的 Dawn Worrall 和 Knut Meyer 等克隆到的 *afp* 序列有 3 个碱基的差别，分别是 175 位 (A→G)、216 位 (T→C) 和 675 位 (T→C) (图 3)。由于密码子的简并性，这 3 个碱基的差别最终只导致第 48

位一个氨基酸的不同 (苏氨酸→丙氨酸) (图 4)。推测这种差别是由于不同品种间的差异所致。

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
TCTAGACTCG	AAACATAAAT	CCAAATAATC	AATATGAATA	TTGAATC ATC	TTTCTGCCCT	ATTTTGIGCA	TATGCATGAT	TTTCTCTCTG	CTTCCAAACC
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
TCCTCTGCATC	ACAAAGATGC	AACAAACAGC	ACAAACAGC	TTTACTCCAA	ATC AAAACAG	CCTTGAAAAA	CCCCGCCATT	ACAGACTCAT	GGGTGTCAGA
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
CGACGATGTGT	TGTGGCTGGG	ACCTAGTCGA	ATGTGACGAA	ACCAGCAACC	GCATAATATC	CCTCATATAT	CAAGACGACG	AAGCTCTCAC	CGGCCAATTC
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CCACCTCAGG	TGGGAGACCT	ACCATATCCT	C AAGCCTTAT	GGTTCGGTAA	ACTCCCCAAT	C TTTTCGGAA	AAATCCCAGA	AGAAATTTCT	GCATCTAAAG
410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
ACCTAAAATC	CCTCAGACTC	AGCTCGACCA	GTCTCAGTGG	CCCTGTCCCT	TTATCTTTCC	CTCAGCTTAC	GAAACTAACT	TGTTTAGACT	TATCGTTTAA
510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
C AAATTTTGG	GGTGTAAATC	CTCCTCAGCT	TTCTCCTCTT	CCGAACCTTA	AAGCCTTGCA	CTTAGAAGT	ACGAATCTCA	CCGGTGAAAT	CCCCGATATC
610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
TTTGGGAATT	TTGCTGATTC	CCCGGACATA	TATCTTTTGC	ATAACACGCT	CACCGGTTT	GTTCCTAAAA	CTTTCCTAG	ACGAGATCCA	ATTAGGCTCG
710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
ACTTCTCAGG	GATCAGACTA	GAAGGTGATA	TTTCTATCTT	GTTTGGCCCT	AAAAACGCT	TGAAATGCT	AGATTTTCTA	GGAACGTGC	TTAGTTTCAA
810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
TTTCTCCAGG	GTCAGAGAT	TTCCATCCCT	TTTGAATATC	TTTGAATTGA	ACCATAACCA	GATCAGCGGA	AGTCTGTCGA	GTGATTTGGC	TAAATTTGAC
910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
CTGCAGACAT	TTAAGCTCAG	TGATATATAT	CTCTGCGCA	AGATTCATAC	AGGGGGAATC	CTCCAGAGAT	TCGACCGTAC	GGCTTATCTC	CACAACAGTT
1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
GCCTGTGTGG	TGCTCCATTC	CCAGATGTCT	AGTTACCATG	C AAAATGTGC	C TTAAGGTTA	TC TTTGTAAAT	GAGATATATT	ATGCAGCTCA	ACAGTGCACA

图 3 AFP 基因的全序列
Fig 3 The sequence of AFP gene

10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MNIESSFCPI	LCICMIFLCL	PNLSAQRCN	NNDKQALIQI	KTKLKNPAT	DSWSDDDC	GWLVBCDET	SNRIISLIQ	DDEALTQIP	PQVGDLPYLQ
110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
ALWFRKPLNL	FGKIPPELSA	LKDLKSLRLS	STSLSGPVPL	FRPQLTKLTC	LDLSFNKLIG	VIPPQLSTLP	NKALHLERN	ELTGTETDIF	GNFAGSPDIY
210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
LSHNQLTGFV	PKTFARADPI	RLDFSGNRLE	GDISFLFGPK	KRLKMLDFSG	NVLSFNFSRV	QEFPSPSLTYL	ILNHNQISGS	LSSELAKLIL	QTFNVSINNL
310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
CGKIPTGQNL	QFFDRTPAYLH	NSCLGAPIP	CEK *.....						

图 4 推测的 AFP 氨基酸序列
Fig 4 The derived amino acid sequence of AFP

2.3 AFP 基因在 *E. coli* 中的表达分析

将 PCR 扩增得到的 *afp* 表达序列 (共 938 bp, 不包括图 3 中的编码信号肽的序列和其它非编码区) 与载体 pGEX4T1 构建成重组质粒 pGA-06。IPTG 诱导表达后的菌体总蛋白电泳检测结果示于图 5。

SDS PAGE 的结果表明, 未插入 *afp* 片段的 pGEX4T1 空载体在 BL21 (DE3) 菌中经 IPTG 诱导可表达出相对分子质量约 26 000 的蛋白 (谷胱甘肽 S 转移酶, GST), 而带有 pGA06 的 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导则表达出相对分子质量约 60 000 的 GST-AFP 融合蛋白。这说明我们克隆到 pGEX4T1 表达载体上的 AFP 表达序列可编码预期的 34 000 蛋白。

3 讨论

虽然对抗冻蛋白及其基因的研究已经取得了一

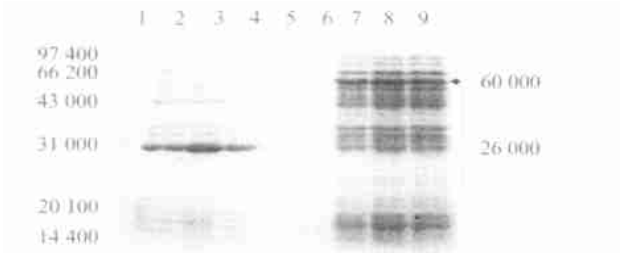


图 5 *afp* 序列在大肠杆菌中的表达
Fig 5 The results of *afp* expression in *E. coli*
1—4 分别为 BL21 (DE3) (pGEX4T1) 经 IPTG 诱导 0, 2, 4, 6 h 后的蛋白表达产物;
5—9 分别为 BL21 (DE3) (pGA-06) 经 IPTG 诱导 0, 2, 4, 6 h 后的蛋白表达产物;
5 蛋白质相对分子质量标准物

些进展, 但多集中在鱼类, 在 1998 年以前还没有真正从植物中分离到抗冻蛋白基因。在植物转基因工程方面也普遍采用鱼类抗冻蛋白基因转化植物,

但由于动植物的基因表达系统有差异, 密码的偏爱性也有所不同, 因此从植物中分离抗冻基因将为植物抗冻基因工程的发展开辟新的领域。本实验成功地从胡萝卜中分离得到了 AFP 基因, 并根据 DNA 序列预测了其编码的蛋白质产物的一级结构。此基因克隆进原核表达载体后, 能够在大肠杆菌中成功地得以表达。证明我们已经从胡萝卜中克隆到了能表达正常相对分子质量蛋白产物的 AFP 基因, 这方面的研究在国内尚属首次。今后的研究重点将是该 AFP 基因对植物抗寒基因工程的作用, 相关的研究已经开展。

参考文献:

[1] JANG Y, JIA S R, FEI Y B, et al. Antifreeze proteins and their role in plant antifreeze physiology[J] . Acta Bot Sin, 1999, 41(7): 677—685. (in Chinese)
[2] WORRALL D, ELIAS L, ASHFORD D, et al. A carrot leucine-rich repeat protein that inhibits ice recrystallization[J] . Science, 1998, 282(2): 11—13.

[3] MEYER K, KEIL M, NALDRETT M J. A leucine-rich repeat protein of carrot that exhibits antifreeze activity [J] . FEBS Letters, 1999, 447: 171—178.
[4] CLAEK M S, GU H Y, QU L J. Translated // Plant molecular biology. A laboratory manual[M] . Beijing: Chinese High Education Press, 1998: 4—7. (in Chinese)
[5] SAIKI R K, GELFAND D H, STOFFEL S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase[J] . Science, 1988, 239: 487—491.
[6] MARCHUK D, DRUMM M, SAULINO A, et al. Construction of T-vector, a rapid and general syetem for direct cloning of unmodified PCR products[J] . Nucleic Acids Res, 1991, 19(5): 1154.
[7] KHAN I M, ZAMMIT P S, GREEN M, et al. A simple ligation step improves the efficiency of T-overhang vectors [J] . Trends Genet, 1994, 10(7): 225—226.
[8] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS J T, et al. Translated // Molecular cloning A laboratory manual[M] . 2nd eds. Beijing: Science Press, 1993: 55—56. (in Chinese)

Cloning and Expression of an Antifreeze Protein Gene in Carrot

FAN Yun, LIU Bing, WANG Hong bin, WANG Shu qi, Wang Jin fa

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Sun Yat sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Composition of total proteins in cold induced carrot seedlings was compared with that in non induced carrot seedlings by SDS PAGE. A different protein band, about 36 000 appeared. This result indicated that antifreeze proteins (AFPs) were expressed in cold induced carrot seedlings. Based on what was reported by Dawn Worrall and Knut Meyer, the gene encoding this antifreeze protein which is 1 099 bp long, was amplified by PCR using genomic DNA of carrot seedlings as template. Sequencing results show that there is only a difference of three bases between this cloned gene and that published on GenBank. This antifreeze protein gene (AFP gene) was cloned in the expression vector (pGEX4T1) of *E. coli*. A fusion protein, about 60 000, could be detected after IPTG induction.

Key words: carrot; cold induce; antifreeze protein gene (AFP gene); clone