

朱彬彬,崔百明,向本春. 番茄叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *cab-1a* 的克隆与定位[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):20-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.006

番茄叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *cab-1a* 的克隆与定位

朱彬彬¹, 崔百明¹, 向本春²

(1. 石河子大学生命科学学院, 新疆石河子 832000; 2. 石河子大学农学院, 新疆石河子 832000)

摘要:在进行酵母双杂交试验时发现,马铃薯 Y 病毒 HC-Pro 蛋白与番茄未知蛋白发生相互作用,经测序、Blast 比对,确认为番茄叶绿素 a/b 结合蛋白 Cab-1A, Genebank 序列号为 XM_010318610.1。为初步验证这一发现,设计引物,然后以番茄 cDNA 文库为模板,克隆出 798 bp 的 *cab-1a* 全长序列,并构建了 *cab-1a* 基因的亚细胞定位载体 pSPGFP-Cab-1A,并运用叶盘法将其转化到烟草表皮细胞中,在荧光共聚焦显微镜下观察其定位情况。结果表明, *cab-1a* 基因编码的 Cab-1A-like 蛋白位于细胞核和细胞质中,为与马铃薯 Y 病毒 (potato virus Y, PVY) 蛋白 HC-Pro (helper component proteinase) 相互作用的后继研究奠定理论基础。

关键词:番茄; 叶绿素 a/b; 蛋白 Cab-1A; 亚细胞定位; GFP; 烟草表皮细胞

中图分类号: S641.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0020-04

光合作用是地球上生命现象的基础,高等植物光合作用光能的捕获与传递主要是通过光捕获叶绿素 a/b 结合蛋白 (chlorophyll a/b binding protein, Cab) 来完成^[1],在高等植物中大部分叶绿素分子都结合在光系统 I (PS I) 和光系统 II (PS II) 的天然色素蛋白复合物上^[2]。这些蛋白复合物共同组成一个很重要而又很庞大的家族,但特点又不是很明显。光捕获叶绿素 a/b 结合蛋白 Cab 是一类能捕获光能,并把光能转化成电能迅速传至光反应中心引起光化学反应的色素蛋

白,这些蛋白复合体由属于同一家族的色素结合蛋白与色素结合而形成,然后通过色素结合蛋白的跨膜区将其锚定在类囊体膜上。高等植物中大部分的叶绿素分子都结合在 PS I、PS II 的捕光色素蛋白复合物上,其中 PS II 捕光色素蛋白复合物结合的叶绿素约占类囊体膜上色素量的 50%^[3],除与光能的传递相关之外,其在响应外界生物胁迫方面也发挥着重要作用^[4-5],且随着电子晶体学研究方法的发展,对 Cab 蛋白晶体结构的分析也日趋深入^[6]。

叶绿素 a/b 结合蛋白由定位于细胞核内的 *cab* 基因编码^[7],核基因 *cab* 转录产生的 mRNA 在细胞质的 80 S 核糖体上翻译成前体多肽,这些前体多肽被运进叶绿体并被加工切割成成熟蛋白,其转移过程借助于被称为过渡肽 (transit peptide) 或引导肽 (leader peptide) 的 N 末端扩展序列。过渡肽和切割位点下游 6—15 氨基酸残基区域是 Cab 蛋白前体的

收稿日期:2016-03-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260420)。

作者简介:朱彬彬(1989—),男,河南焦作人,硕士,研究方向为细胞分子生物学。E-mail:bbz525@163.com。

通信作者:向本春,博士,教授,研究方向为植物分子病理与植物保护。E-mail:xbc@shz.edu.cn。

[4] 沈建国,翟梅枝,林奇英,等. 我国植物源农药研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(1):26-31.

[5] 刘海龙,黎妍妍,郑露,等. 番茄青枯病菌的分子鉴定及其生物学特性研究[J]. 南方农业学报,2015,46(3):415-420.

[6] 乔俊卿,陈志谊,刘卹洲,等. 茄科作物青枯病研究进展[J]. 植物病理学报,2013,43(1):1-10.

[7] 史忠良. 辣椒青枯病生防菌的分离和鉴定[J]. 安徽农业科学,2015,43(18):128-129.

[8] 孙炳剑,陈清清,袁虹霞,等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测小麦纹枯病菌体系的建立和应用[J]. 中国农业科学,2015,48(1):55-62.

[9] 王恒波,陈平华,高三基,等. 甘蔗宿根矮化病菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 植物病理学报,2015,45(3):232-238.

[10] 潘明森,王震铎,方敦煌,等. 土壤中黑胫病菌荧光定量 PCR 快速检测体系的建立及初步应用[J]. 江西农业大学学报,2015,37(4):712-718.

[11] Postma J, Schilder M T, van Hoof R A. Indigenous populations of three closely related *Lysobacter* spp. in agricultural soils using real-time PCR[J]. Microbial Ecology,2011,62(4):948-958.

[12] Nicholson P, Turner A S, Edwards S G, et al. Development of stem-base pathogens on different cultivars of winter wheat determined by quantitative PCR[J]. European Journal of Plant Pathology,2002,108(2):163-177.

[13] 潘娟娟,骆勇,黄冲,等. 应用 real-time PCR 定量检测小麦条锈菌潜伏侵染量方法的建立[J]. 植物病理学报,2010,40(5):504-510.

[14] 闫佳会,骆勇,潘娟娟,等. 应用 real-time PCR 定量检测田间小麦条锈菌潜伏侵染的研究[J]. 植物病理学报,2011,41(6):618-625.

[15] 成娟丽. 茄科雷尔氏菌 3-酮基脂酰 ACP 合成酶同源蛋白在脂肪酸合成代谢中的功能鉴定[D]. 广州:华南农业大学,2010.

[16] 钟贵,郑常格,汤历,等. 茄科作物青枯病生物防治研究进展[J]. 广东农业科学,2005(2):55-57.

[17] 贾春燕. 烟草青枯病菌的分子检测与烟草品种抗病性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2011.

[18] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream[J]. Experimental Hematology,2002,30(6):503-512.

多变区^[8]。

番茄中,目前为止已报道的 Cab 蛋白有 21 种^[9],其中 Cab-1A 为高等植物中的主要光捕获蛋白之一,别称 LHCB1-1。本研究对光捕获叶绿素 a/b 结合蛋白 Cab-1A 进行定位,结合对与 PVY HC-Pro 相互作用的研究,以期为探索叶绿素 a/b 结合蛋白的新功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 (*Escherchia coil*) DH5 α 、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 以及各个载体骨架均由笔者所在实验室保存提供。

限制性内切酶 *Xba* I、*Cla* I、*Sal* I、*Kpn* I、*Sma* I 均购自于赛默飞世尔科技(中国)有限公司。*Eco*R I、T₄ DNA ligase、pGEM-T Easy Vector、Wizard DNA clean-up 凝胶回收试剂盒等购自普洛麦格生物技术有限公司。DNA Marker III、Marker DL15000+2000 均购自于天根生化科技(北京)有限公司。

从加工番茄 (*Solanum lycopersicum*) 里格尔 87-5 中提取的 cDNA、试验所用本氏烟草种子均由笔者所在实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 加工番茄 *cab-1a* 基因克隆 以加工番茄里格尔 87-5 cDNA 为模板,根据已报道的序列^[10],设计相应的引物(表 1),PCR 克隆得到 *cab-1a* 基因片段。将 PCR 扩增获得的目的基因片段进行凝胶电泳检测,并对检测到的目的基因片段运用试剂盒进行凝胶回收,进而连接到 T 载体 pGEM-Easy Vector 上,送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 Cab-1A-like 蛋白的生物信息学分析 运用 ExPASy 程序(<http://www.expasy.org>)进行氨基酸序列生物信息学分析^[11];假定蛋白质的多重比对和进化树分析在 Vector NTI 11.5 进行;跨膜区域和构向预测在 TMpred 程序(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)中

进行;通过 HNN 二级结构预测程序(http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)推定蛋白质的二级结构;三级结构模型建立使用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org>)程序。

1.2.3 亚细胞定位载体的构建 设计引物 GFP-S/GFP-AS(表 1),从 pCBGFP:35S-GAi 载体上克隆得到绿色荧光蛋白基因 *GFP* 序列,经 *Xma* I/*Sac* I 双酶切后,凝胶电泳检测并回收目的片段 *GFP*,然后将酶切后的 *GFP* 片段连接到同样酶切的双元载体 pSPYCE:35S 上,转化大肠杆菌并提质粒,酶切鉴定正确后,将构建好的 N 端定位载体骨架 pSPGFP:35S 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。然后将目的基因 *cab-1a* 从 T 载体上酶切下来,连接到 N 端定位载体上,构建最终定位载体 pSPGFP-Cab-1A(图 1),并以 pSPGFP 载体骨架作为对照,酶切鉴定并测序。

1.2.4 农杆菌介导的烟草叶片遗传转化 将测序正确的目标载体运用电击法转化至农杆菌 GV3101 中,克隆 PCR,挑取阳性克隆,接种到 10 mL 的 LB 液体培养基中(含有相应的抗生素),28 ℃ 孵育 24 h 以上,之后在 28 ℃、190 r/min 摇床振荡至培养基 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6~1.0。将培养液以 3 000 g、4 ℃ 离心 15 min,收集农杆菌 GV3101 沉淀。弃废液,向沉淀颗粒中加入新鲜的渗透液^[12](MgCl₂ 10 mmol/L, MES/KOH 10 mmol/L, pH 值 5.7,乙酰丁香酮 150 μ mol/L),使最终悬浮液 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.5 左右。将含有农杆菌细胞的渗透液在摇床中黑暗孵育 2 h,然后用于渗透。

取 3 周大烟草(本氏烟)植株的顶 3 叶,采用叶盘法进行组织培养。从组织培养后的叶组织上切取 1~2 cm² 的小块置于渗透液中,并于 100 r/min 摇床上振荡渗透 10 min。用灭菌的滤纸吸干表面菌液,置于 MS 预培养基上,暗处室温下培养 2 d。2 d 后置于共培养 MS 培养基(含相应抗生素)上进行筛选培养,2 周更换 1 次培养基,直至长出 2 cm 小芽,然后转入 MS 生根培养基,室温下进行生根,生根 2 周后进行荧光检测。

取转化后的植株叶片置于载玻片上,滴几滴清水,盖上盖玻片,在共聚焦荧光扫描显微镜下进行观察。

表 1 本研究所用引物及序列

引物	序列(5'→3')	限制性内切酶
<i>cab-1a-S</i>	CCCTCTAGAACCATGGCAGCTGCTACAATG	<i>Xba</i> I
<i>cab-1a-AS</i>	GCCGGTACCTCACTTTCCGGAACAAAGT	<i>Kpn</i> I
<i>GFP-S</i>	CCCGGG <u>ATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCT</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC (阴影标记部分为 HA 标签蛋白对应的碱基序列)	<i>Xma</i> I
<i>GFP-AS</i>	GAGCTCTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCCTGA	<i>Sac</i> I

2 结果与分析

2.1 序列比对

番茄 *cab-1a* 目的基因的假定蛋白 Cab-1A-like 序列分别与 NCBI 公布的 *cab1a*、*cab1b*、*cab1c*、*cab3a*、*cab3c*、*cab6a* 基因的蛋白序列进行比对分析,相似度达到 95% 以上(图 2),表明克隆的目的基因就是 *cab-1a*,属于 Cab 家族成员。Cab-1C 进化树分析结果(图 3)表明,番茄 Cab-1A-like 蛋白与 Cab-1C 的亲缘关系更近,而与 NCBI 上预测的 Cab-1A 蛋白不属于同一分支,这可能与此蛋白是由假定推测得到的相关,而且与 Cab-3C 的相似度最低。

2.2 生物信息学预测分析

从加工番茄 cDNA 中扩增出约 700 bp 的目的条带,测序分析结果表明,*cab-1a* 基因 ORF 长 798 bp,预测可以编码 1 个含有 265 个氨基酸的多肽序列。用 NCBI CDS 对该多肽进行分析,结果表明,加工番茄 Cab-1A-like 蛋白具有叶绿素 a/b 结合蛋白家族结构域,属于该家族成员(图 4)。

用 iPSORT(<http://ipsort.hgc.jp/>)序列分析表明,番茄的 Cab-1A-like 蛋白 N 端有 1 个潜在的叶绿体转运肽(MAAATMALSSPSFAGQAVKLSPSASEISGN)。

此外,ExPASy(http://web.expasy.org/peptide_mass/)对其预测结果表明,Cab-1A-like 蛋白分子量约是 28.07 ku,

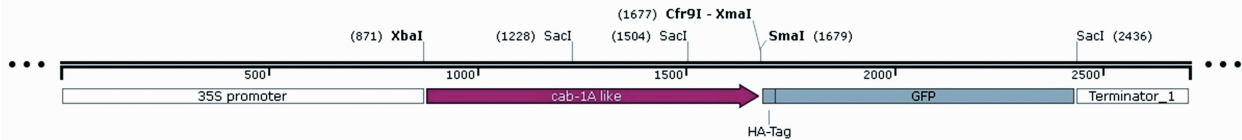


图1 亚细胞定位载体 pSPGFP-*cab-1a* 骨架图示

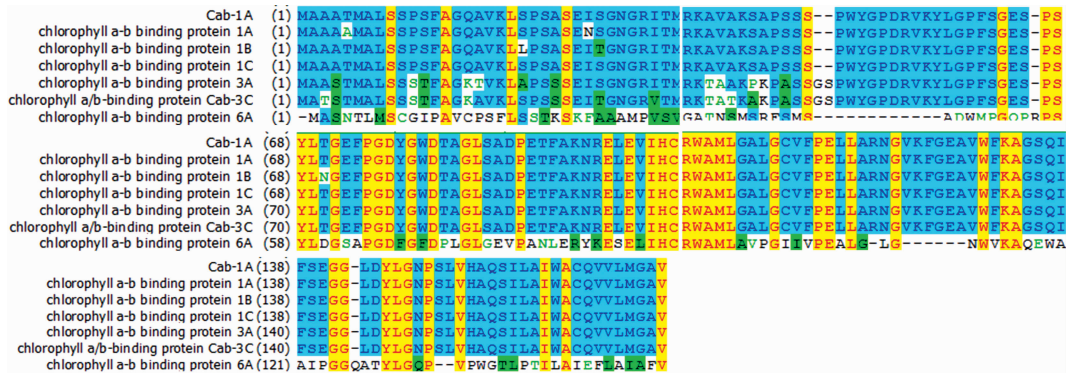


图2 本研究克隆的加工番茄 Cab-1A-like 蛋白与其他番茄Cab蛋白的氨基酸序列比对分析

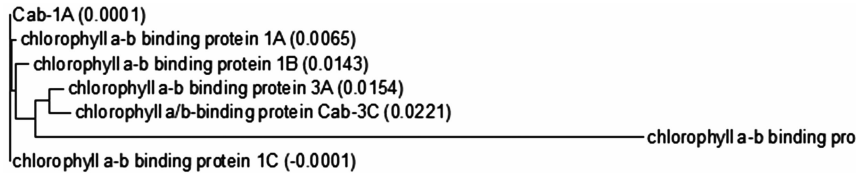


图3 不同番茄 Cab 蛋白的进化树分析

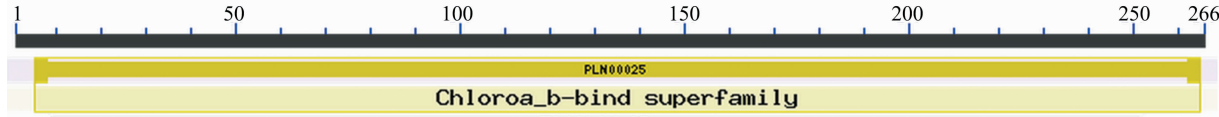


图4 加工番茄 Cab-1A like 蛋白的保守域

等电点(PI)为 5.51,保守序列约占 92.1%。对 Cab-1A 二级结构的预测结果表明,其有 3 个跨膜螺旋,且有 35.09% α -螺旋、8.68% β -折叠、56.2% 的无规卷曲结构。

三级结构模型用 Swiss Model (<http://swissmodel.expasy.org/templates/1rwt.1>) 进行预测,其空间结构与菠菜(SMTL id:1rwt.1)的 Cab 蛋白有 95.65% 相似度。

2.3 亚细胞定位载体的鉴定

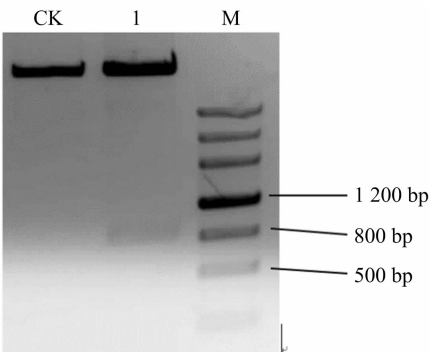
取菌落 PCR 阳性克隆,提取质粒 DNA,并根据所设计引物进行 XbaI/KpnI 双酶切鉴定,获得 1 条约 800 bp 的条带,该条带为目的基因 *cab-1a* (图 5),与预期相符,对酶切正确的质粒进行测序,结果表明,构建的亚细胞定位载体是正确的。

2.4 荧光检测

将双元表达载体 pSPGFP-Cab-1A 运用电击法转化到农杆菌 GV3101 中,用克隆 PCR 鉴定正确的菌株侵染本氏烟表皮细胞 48 h,激光共聚焦显微镜下观察到绿色荧光分布在烟草表皮细胞的细胞核膜和细胞质上,并且细胞核上的荧光比细胞质的荧光要强(图 6)。

3 结论与讨论

cab 基因家族在长期进化过程中,cDNA 序列是相当保守的^[13]。同样的,番茄 *cab-1a* 基因作为 LhcbI 类基因成员^[10],其对应的蛋白序列与其他几个 Cab 基因蛋白序列的一



CK—对照(载体骨架); 1—试验组; M—marker III

图5 亚细胞定位载体酶切鉴定

致性在 85% 以上,进一步证明此基因在进化过程中是相对保守的。但是,由 *cab-1* 基因与 *cab-3* 基因编码的多肽相比,转运肽和 N 末端的结构域有明显差别,而其余部分的序列基本是相同的。因为 *cab* 基因编码的叶绿素 a/b 结合蛋白最终定位在叶绿体类囊体膜上,所以这段引导肽对其至关重要,由于这类蛋白的引导肽多位于蛋白序列的 N 端,所以,本研究只是将 GFP 蛋白序列添加到了其 C 端,不影响其正确的定位。

此外,本研究对 Cab-1A-like 蛋白的亚细胞定位结果表明,其位于细胞的细胞质和细胞核中,细胞质中的蛋白属于

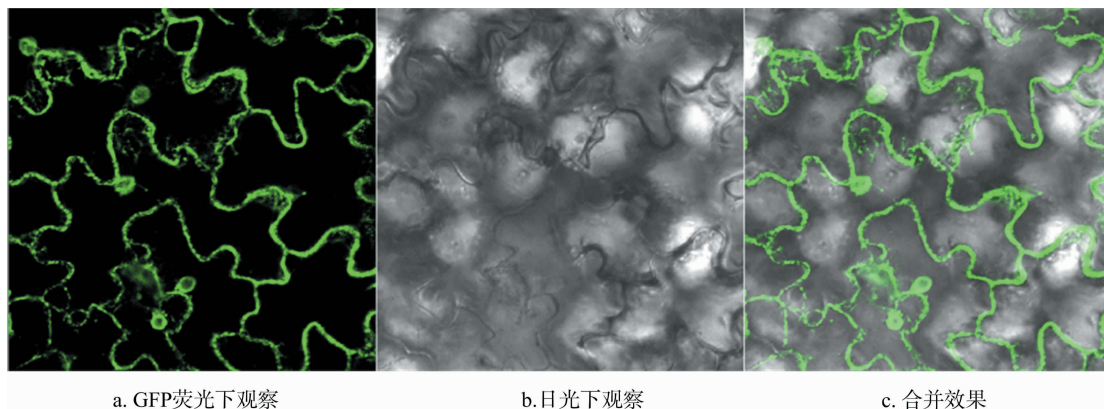


图6 激光共聚焦显微镜下观察的 Cab-1A-like 蛋白在烟草表皮细胞中的定位情况

叶绿体内定位的蛋白或者是内质网和高尔基体上正在加工的不成熟蛋白;对于细胞核上的定位,大多位于细胞核核膜上,本研究猜测这可能是由于该蛋白引导肽与某个蛋白的核定位信号序列结构相似所致。

植物在长期进化过程中,不断抵御外部伤害,包括有害生物的入侵,其体内逐渐形成了一套完整的保护机制^[14-15],无论是针对细菌还是病毒,植物能抵抗绝大多数微生物的侵染,主要是因为植物细胞具有识别微生物保守分子模式的受体,这些受体能把胞外信号传递到胞内,触发植物的先天免疫反应。病原物在与植物的长期互作过程中进化出效应蛋白,这些效应蛋白能够抑制植物的先天免疫反应,从而使病原物可以成功地侵染特定的植物^[16]。本研究在前期进行的酵母双杂交试验过程中发现,Cab-1A-like 蛋白与马铃薯 Y 病毒 HC-Pro 蛋白相互作用,由于酵母双杂交系统的筛选存在假阳性结果^[17-18],使得本研究有必要对该蛋白作出进一步深层次的分子鉴定,为后续验证该蛋白质与马铃薯 Y 病毒蛋白相互作用机理奠定基础。

参考文献:

- [1] Green B R, Pichersky E, Kloppstech K. Chlorophyll a/b - binding proteins; an extended family [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1991, 16(5): 181 - 186.
- [2] 汪仁, 李晓丹, 江玉梅, 等. 石蒜捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因的克隆和序列分析[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(2): 42 - 44.
- [3] 孙钦秒, 冷静, 李良璧, 等. 高等植物光系统 II 捕光色素蛋白复合体结构与功能研究的新进展[J]. 植物学通报, 2000, 17(4): 289 - 301.
- [4] Ganeteg U, Külheim C, Andersson J, et al. Is each light - harvesting complex protein important for plant fitness? [J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 502 - 509.
- [5] Xu Y H, Liu R, Yan L, et al. Light - harvesting chlorophyll a/b - binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 2012, 63(3): 1095 - 1106.
- [6] Liu Z F, Yan H C, Wang K B, et al. Crystal structure of spinach major light - harvesting complex at 2.72 Å resolution [J]. Nature, 2004, 428(6980): 287 - 292.
- [7] 石兰馨, 张晓平, 梁厚果. 捕光叶绿素 a/b 结合蛋白和 cab 基因 [J]. 植物生理学通讯, 1995, 31(6): 470 - 476.
- [8] Bennett J. Protein phosphorylation in green plant chloroplasts [J]. Annual Review of Plant Biology, 1991, 42: 281 - 311.
- [9] Jansson S, Pichersky E, Bassi R, et al. A nomenclature for the genes encoding the chlorophyll a/b - binding proteins of higher plants [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1992, 10(3): 242 - 253.
- [10] Pichersky E, Bernatzky R, Tanksley S D, et al. Molecular characterization and genetic mapping of two clusters of genes encoding chlorophyll a/b - binding proteins in *Lycopersicon esculentum* (tomato) [J]. Gene, 1985, 40(2/3): 247 - 58.
- [11] Qiao G, Wen X P, Zhang T. Molecular cloning and characterization of the light - harvesting chlorophyll a/b gene from the pigeon pea (*Cajanus cajan*) [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 177(7): 1447 - 1455.
- [12] 杨成丽, 刘树楠, 周吉源, 等. 高效烟草遗传转化体系的建立及甜蛋白基因的导入 [J]. 生物技术, 2004, 14(2): 9 - 11.
- [13] 向太和, 王利琳, 庞基良. 水稻 (*Oryza sativa* L.) 捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因全长 cDNA 的克隆和特性分析 [J]. 作物学报, 2005, 31(9): 1227 - 1232.
- [14] 李春雷, 倪德江. 氟对幼龄茶树叶绿素含量及抗氧化酶活性的影响 [J]. 江苏农业学报, 2015, 31(5): 1149 - 1153.
- [15] 孙红炜, 路兴波, 杨崇良, 等. 不同抗性玉米品种接种甘蔗花叶病毒 (SCMV) 后 4 种防御酶活性变化研究 [J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 181 - 184.
- [16] 崔福浩. 丁香假单胞效应蛋白 AvrRpt2 抑制植物免疫分子机制的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2013.
- [17] 谌思. DND1 与 GRN 相互作用的鉴定 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2015.
- [18] 汪义龙, 夏莹萍, 梁建生. 水稻 *OsCATA* 基因相互作用蛋白的筛选和表达分析 [J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 20 - 23.