

谷子 DnaJ 蛋白基因的克隆

崔润丽^{1,2}, 智慧¹, 王永芳¹, 李伟¹, 李海权¹, 黄占景³, 刁现民¹

(1. 国家谷子改良中心, 河北省农林科学院谷子研究所, 河北 石家庄 050031;

2. 河北化工医药职业技术学院, 河北 石家庄 050016; 3. 河北师范大学 生命科学院, 河北 石家庄 050012)

摘要: DnaJ 蛋白是近年研究较多的同热激等胁迫反应相关的基因。本研究用 0.8% NaCl 胁迫下的谷子幼苗提取 RNA, 用反转录酶 M-MLV 扩增得到第一链 cDNA, 再以第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 克隆获得了完整的谷子 DnaJ 蛋白基因, 该基因 cDNA 全长 1 260 bp, 编码 419 个氨基酸, 具有 DnaJ 蛋白分子伴侣系统的 3 个保守结构域。将谷子 DnaJ 蛋白基因构建入表达载体 pGFP, 获得了谷子 *DnaJ* 基因的表达载体。该基因的克隆和表达载体构建, 为谷子 DnaJ 蛋白基因的功能分析以及谷子耐热抗旱机理研究有重要意义。

关键词: 谷子; DnaJ; 基因克隆

中图分类号: S515.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2007)04-0009-05

Cloning of DnaJ-like Protein Gene from Foxtail Millet

CUI Run-li^{1,2}, ZHI Hui¹, WANG Yong-fang¹,

LI Wei¹, LI Hai-quan¹, HUANG Zhan-jing³, DIAO Xian-min¹

(1. National Millet Improvement Center, Institute of Millet Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031, China; 2. Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050016, China; 3. College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: The DnaJ-like proteins and related genes are frequently studied which are related with heatshock and other stresses in plant recently. Using RT-PCR we cloned a foxtail millet DnaJ like gene in this report. RNA isolation was carried out by the Trizol method with 0.8% NaCl solution treated foxtail millet seedling; first chain cDNA was obtained with the reverse transcriptase M-MLV and then used as template to PCR cloning the cDNA sequence of the foxtail millet DnaJ like genes. A PCR fragment of predicted size of 1.2 kb was cloned and sequenced. The cloned fragment contains 1 260 bp sequence which encodes a protein of 419 amino acids. Both the DNA sequence and amino acid sequence show great similarity with their corresponding sequences from rice, maize and wheat. The predicted protein has the three conserved domains which characteristic the structure of DnaJ protein family members. The cloned foxtail millet DnaJ gene was constructed into an expression vector for further functional and transformation study.

Key words: Foxtail millet; DnaJ; Gene cloning

Georgopoulos 等^[1]1980 年将从大肠杆菌中分离的一种 41 kD 的热激蛋白称为 DnaJ, 以后在包括人类、动物、植物、酵母等许多真核生物都发现有它的同源序列, 最近的研究表明该蛋白的同源序列存在于几乎所有的生物体, 形成了一个 J 蛋白基因家族, 它们都含有一个高度保守的 70 氨基酸的 J- 结构域。DnaJ 蛋白在生物体内具有非常重要的生理功

能。DnaJ 蛋白家族中有一部分具有热激蛋白的特征, 高温诱导能使其表达量升高^[2]。它还是一类重要的分子伴侣, 在正常和胁迫情况下参与蛋白质的折叠(重塑)、转运、分泌和目标蛋白的降解等作用。大量研究发现, DnaJ 蛋白和热激蛋白 70 (HSP70) 组成有序分子复合体在细胞中起分子伴侣机器的作用, 而且有研究发现 DnaJ 蛋白与 HSP70 的结合具有

收稿日期: 2007-06-25

基金项目: 国家自然科学基金(30630045); 河北省自然科学基金资助(C2004000697)

作者简介: 崔润丽(1973-), 女, 河北鹿泉人, 硕士, 主要从事植物、微生物遗传和生物技术教学与研究工作

通讯作者: 刁现民(1963-), 男, 河北南和人, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种与分子生物学研究。

特异性^[2-4]。有的研究表明 DnaJ 蛋白不仅在生物体应对热胁迫方面,而且在应对盐胁迫^[5]、重金属胁迫^[6]等方面有其作用。

谷子(*Setaria italica* Beauv.)是禾谷类作物中抗旱耐盐性较突出的作物,本研究运用 RT-PCR 的方法克隆了谷子的 DnaJ 蛋白基因,得到了包括起始密码子和终止密码子在内的共 1 260 bp 的 cDNA 序列,为深入认识该基因的功能和谷子的抗旱耐盐机理,以及种质创新中利用该基因奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

抗盐谷子品种 Z289 是本实验室通过人工盐胁迫法从 2 600 份来自世界各地的谷子品种资源材料中筛选出的^[7]。

1.2 工具酶与试剂

PGEM-T Vector 购自上海生工生物工程有限公司;DNA 快速纯化回收试剂盒购自北京鼎国生物工程有限公司;Taq 酶由大连 TaKaRa 生物技术公司生产。大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α 为本实验室保存。

1.3 幼苗培养

在人工气候箱中每隔 2 d 浇一次 Hogland 营养液,采用 16 h 光照,8 h 暗培养,培养温度 28℃。幼苗长至两叶一心时,用 0.8% 的 NaCl 胁迫 24, 48 h,取处理谷子的叶片提取 RNA。

1.4 幼苗总 RNA 的提取

利用 Trizol 试剂盒来提取 RNA,为防止 RNA 酶污染,提取 RNA 用的玻璃器具均以 180℃ 烘烤 6 h,塑料制品用 0.1% 的 DEPC 水浸泡,于室温下过夜后,高压灭菌处理。研钵、药匙、涡旋器都用酒精擦拭灭菌。

1.5 DnaJ 基因的反转录

带有锚定引物的反转录引物 Q_T,设计引物序列如下: 5'-CTA CCG CAA CCA GTT AGC CGA CAT CGA TGG C(T)₂₀MN-3' 其中 M= A, G 或 N= A, T, G, 或 C。

反转录体系: RNA 模板 3 μ L, ddH₂O 10.5 μ L, Q_T (100 mmol/L) 0.5 μ L, 70℃ 5 min, 0℃ 10 min, 然后加入 M-MLV 5 \times Reaction Buffer 5 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 5 μ L, M-MLV 反转录酶(200 U/ μ L) 1 μ L, 42℃ 反应 1 h, 72℃ 灭活 10 min。

1.6 DnaJ 基因的 PCR 扩增

根据河北省农林科学院遗传生理研究所李国良提供的一对引物,该对引物是依据玉米、水稻中 DnaJ 的同源序列设计,引物序列含有 BamH I 和 EcoR I 双酶切位点。引物序列如下:上游引物(J1):

5'-AATGGATCCATGTTCCGGCGCGCGCCGAAG-3'; 下游引物(aJ1): 5'-GCCGAATTCTTACTGTTGCGCGCAC TG-3'。

PCR 反应体系: ddH₂O 9.8 μ L, 10 \times pfu Buffer I 2 μ L, dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L) 2 μ L, J1(10 μ mol/L) 2 μ L, aJ1(10 μ mol/L) 2 μ L, 模板 2 μ L, pfu 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.2 μ L; 反应参数: 94℃ 5 min, (94℃ 1 s, 65℃ 1.5 min, 72℃ 1.5 min) 30 个循环后 72℃ 延伸 10 min。

1.7 DnaJ 基因 PCR 产物的克隆

PCR 产物按北京鼎国生物工程公司生产的小量胶回收试剂盒提供的步骤进行,纯化的 DnaJ 直接与 PGEM-T vector 连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,然后进行阳性克隆的筛选和 PCR、酶切鉴定。

1.8 DnaJ 基因测序与分析

从已鉴定的阳性克隆中抽提质粒,送宝生物工程(大连)有限公司进行 DNA 序列测定,而后用 Blast 等软件对 DnaJ 基因序列进行分析。

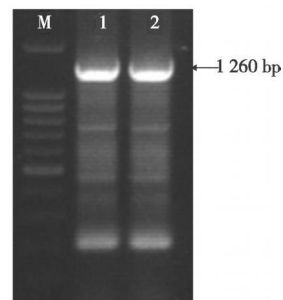
1.9 DnaJ 基因表达载体的构建与鉴定

将含有 DnaJ 基因的 PGEM-T 与 pGFP 载体分别用 BamH I 和 EcoR I 双酶切后进行连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选出转化平板上的阳性菌落,通过 PCR 扩增进行阳性克隆的初步筛选。然后对质粒进行酶切分析,进一步确定表达载体是否构建成功。

2 结果与分析

2.1 谷子总 RNA 的提取

当培养的谷子幼苗长至两叶一心时,用 0.8% 的 NaCl 胁迫分别处理 24, 48 h,取处理谷子的叶片按照试剂盒所示的程序提取 RNA。将提取的总 RNA 进行甲醛变性胶电泳,电泳结果显示有 4 条清晰的带,说明 RNA 质量有保证,可以进行下一步试验。



M. Marker(DL100); 1, 2. PCR 产物

M. Marker(DL100); 1, 2. PCR product

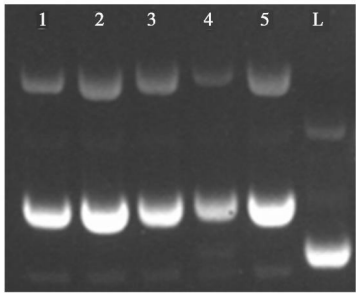
图 1 PCR 扩增产物

Fig. 1 The result of PCR amplification

2.2 谷子 DnaJ 基因的 PCR 扩增

以获得的 RNA 为底物,反转录引物 Q_T 为引物进行第一链 cDNA 的反转录反应;以反转录产物为底物,用所设计的 DnaJ 蛋白基因序列的引物进行 PCR

扩增,电泳结果如图 1 所示。图中显示一条约 1.2 kb 的特异性目标带,其大小与公共数据库中已有禾本科植物的 DnaJ 蛋白基因序列的理论长度一致。



L. 蓝斑质粒 1~ 5. 白斑质粒

L.Plasmid of negative; 1~ 5. Plasmid of positive

图 2 PGEM-T 质粒电泳

Fig. 2 Plasmid electrophoresis

2.3 PCR 扩增产物的克隆及鉴定

用北京鼎国生物工程公司生产的小量胶回收试

剂盒回收 PCR 扩增产物,克隆到 PGEM-T 载体上,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,在 LB 平板培养基上过夜培养,挑取白斑单菌落, LB 液体培养后抽提质粒,经 PCR 鉴定(图 2)和 BamH I 和 EcoR I 双酶切鉴定验证,均证实目的条带已插入到载体中。

2.4 DnaJ 基因序列测定与分析

对经 PCR 鉴定的重组质粒 PGEM-T-DnaJ 进行测序,结果如图 3 所示,并用 GenBank BLAST 程序比较该序列的同源性。序列分析表明:该基因长度为 1 260 bp,与水稻 DnaJ 蛋白基因 AY224432.1 同源性为 90.4%,将该序列与番茄、黄瓜、辣椒、小麦、拟南芥、玉米、土豆等植物的已知 DnaJ 蛋白基因下载序列进行多重比较,与上述已知的 DnaJ 序列同源性分别为 78.3%、77.9%、78.0%、78.8%、59.8%、91.4%、77.5% (图 4)。

ATGTTGCGGCGCGCGCAAGAAGAGCGACAACACCAAGTACTACGAGATCCTCGGGGTGCCAAGTCCGCCTCCAG
GATGACCTCAAGAAGGCTACCGCAAGGCCGATCAAGAACCATCCCGACAAGGCGCGAGCCCGAGAAGTTCAAGG
AGCTTGACACAGCTTATGAGGTTTAAAGTGACCCAGAGAAGCGTGAGATTATGATCAGTACGGTGAAAGATGCCCTCAA
GGAAGGAATGGGTGGAGGAGGAGGCCATGTCGATCCATTTGACATCTTCTCATCTTTGGACCTCTTTTGGAGGA
GGTGGTGGCAGCAGCAGGCGACGCGCAAGGAGGGGAGAAGATGTAGTGATCCACTTAAAGTTTCTGTGAAGATC
TTTACAATGGTACCTCAAAGAAGCTCTCCCTCTCGCGCAATGTTATCTGCTCGAAGTGAAGGGCAAGGGCTCCAAGTC
TGGTGCTTCAATGAGGTGCCAGGTGTCAGGGTTCAGGTATGAAAGTACCATCCGCCAGTGGGGCCTTCCATGATA
CAGCAGATGCAGACGGCTTGCAATGAGTGCAAGGGGACTGGAGAGAGCATCAATGAGAAGGATCGCTGCCAGGGTGCA
AGGGTGAGAAGGTTGTCAGGAGAAGAAGGTTCTGGAAGTACATGTTGAGAAGGGGATGCAACACGGCCAGAAGATCAC
CTTCCCGGTGAAGCTGATGAAGCGCTGATACTACCACTGGAGACACTGTATTCTCTCCAGCAGAGAAGGATCACTCC
AAGTTCAAGAGAAAGGTGATGACCTTTTATGAGCACATTTGCTCTGACTGAGGCTCTCTGTGGGTTCGAATTG
TTCTTACACATCTGGACAAACAGGCAGCTTCTCATCAAGTCAAAACCTGGTGAAGTTGTTAAGCCTGACCAATTCAAGGC
GATAAACGATGAGGGGATGCCAATGTACCAGAGGCCCTTCATGAAGGGCAAGCTCTACATTCACTTCACTGTGGAGTTC
CCTGACTCGTGGCGCCAGAGCAGTGCAAGGCTCTTGAGGCGGTCTTCCACCAAAGCCTACGTCCAAGCTGACAGACA
TGGAGATAGATGAGTGGAGGAGACCACTATGCACGACGTGAACAACATCGAGGAAGAGATGCGCAGGAAGCAAGCTCA
TGCTGCCAGGAGGCGTACGAGGAGGACGATGATATGCCTGGAGGTGCTCAAAGAGTGCAGTGGCGCAACAGTAG

图 3 谷子 DnaJ 的核苷酸序列信息

Fig. 3 The sequence of DnaJ of foxtail millet

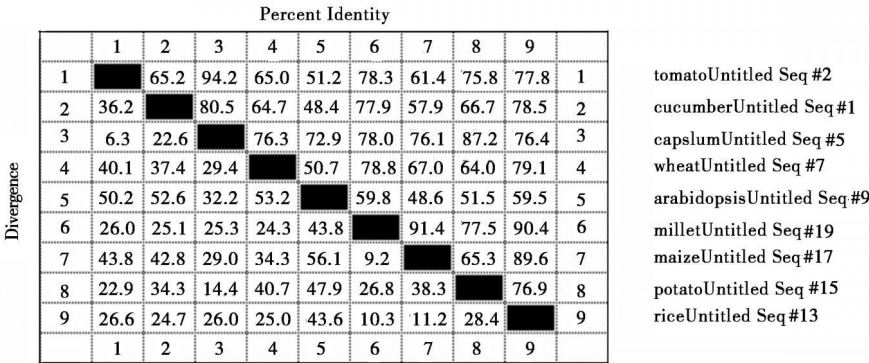


图 4 不同来源的 DnaJ 蛋白基因的同源性比较

Fig. 4 Identity comparison of DnaJ like genes of different origin

对该序列进行系统进化分析(图 5),可以看谷子的 DnaJ 蛋白基因序列与玉米的 DnaJ 蛋白基因序列最相近,二者之间的碱基序列一致性高达 91.4%,其次是和水稻的 DnaJ 蛋白基因序列一致性达 90.4%;而和来源于双子叶植物的 DnaJ 蛋白基因序列表现了程度不同相对较低的一致性。从图 6 结果看,在禾本科中,谷子的 DnaJ 序列同玉米最近,水

稻次之,同小麦的相差最远;在禾本科分类中谷子和玉米同属黍亚科黍族,而水稻属稻亚科,小麦属早熟禾亚科,本研究的 DnaJ 蛋白基因序列分析同已知的分类结果是一致的。在双子叶植物中,同属茄科的番茄、马铃薯、辣椒的 DnaJ 序列紧密的聚在一起,而同拟南芥的结果则相差较远。这些结果与已有的传统分类结果一致,也反应了单个基因序列分析能够

揭示物种进化的关系。

所克隆的谷子 *DnaJ* 蛋白基因包含编码 419 个氨基酸残基的完整序列,与玉米 *DnaJ* 氨基酸序列 AAC08009.1 同源性为 96%,通过 NCBI 的蛋白质比对功能,结果显示该氨基酸序列具有 *DnaJ* 蛋白分子伴侣系统的 3 个保守结构域:高度保守的 *DnaJ* CXXCXGXC 结构域,富含苯丙氨酸、半胱氨酸的 G (GF) 结构域,和 G 末端结构域(图 6),是典型的 J 蛋白。将该 cDNA 翻译成氨基酸序列后,用 DNASTAR

的 Protein 分析功能,得出该部分肽段的分子量为 46 504.58 D,极性氨基酸占 29.83%,其中酸性氨基酸占 15.5%,碱性氨基酸占 14.33%,另外含有疏水性氨基酸 24.34%,整体肽段等电点 6.42。经过 Garnier-Robson 法分析发现该部分序列含有大量的 β 折叠和 α 螺旋,其中 β 折叠为 38.6%, α 螺旋为 37.87%,另外还含有 23.53%的转角结构,没有无规则卷曲(表 1)。

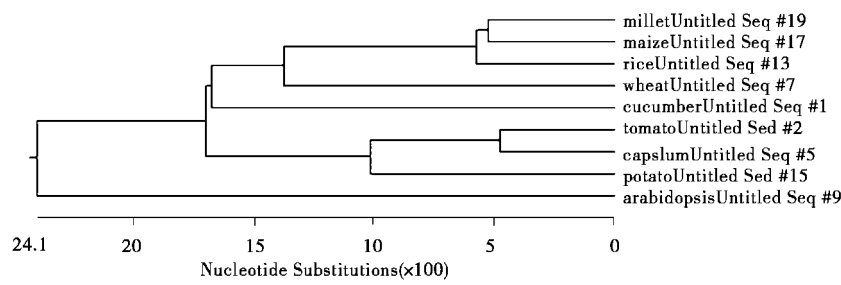


图 5 *DnaJ* 基因的系统进化树

Fig. 5 The phygeny tree of plant *DnaJ* genes on their sequence

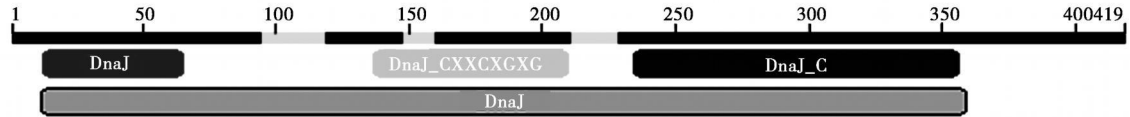


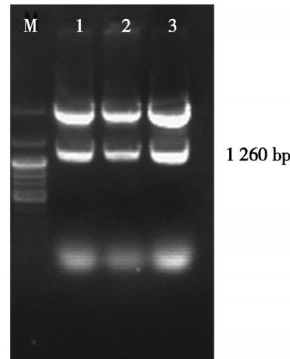
图 6 谷子 *DnaJ* 蛋白结构域分析

Fig. 6 Functional domain structure of foxtail millet *DnaJ*

表 1 cDNA 编码的氨基酸组成分析

Tab. 1 The composition of the amino acids encoded cDNA sequence

| 类别 Sort | 氨基酸 Amino acid | 数目 Number count | 百分比/ Percent |
|--------------------|---------------------|-----------------------|-----------------|
| 极性氨基酸 Charged | R, K, H, Y, C, D, E | 159 | 37.95 |
| 酸性氨基酸 Acidic | D, E | 65 | 15.51 |
| 碱性氨基酸 Basic | K, R | 60 | 14.32 |
| 极性氨基酸 Polar | N, C, Q, S, T, Y | 102 | 24.34 |
| 疏水性氨基酸 Hydrophonic | A, I, L, F, W, V | 102 | 24.34 |



M. Marker (100 bp); 1- 3. *DnaJ*

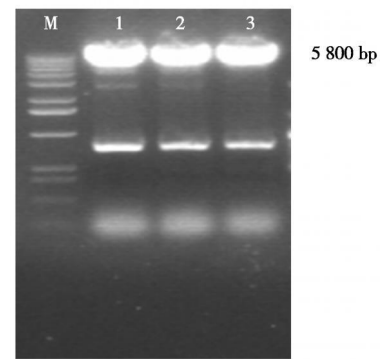
图 7 PGEM-T 质粒酶切

Fig. 7 Digisted plasmid result

2.5 *DnaJ* 基因表达载体的构建与鉴定

用 *Bam* H I 和 *Eco* R I 对重组质粒 PGEM-T-

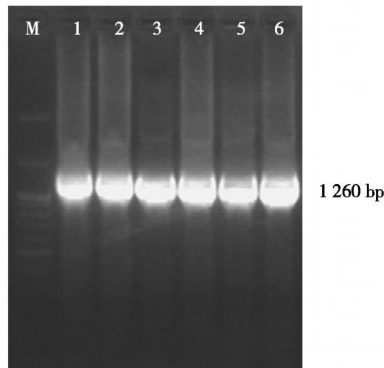
DnaJ 和 pGFP 载体进行双酶切(图 7, 8)。从凝胶中回收约 1.2 kb 的谷子 *DnaJ* 基因片段和约 5.8 kb 的载体片段,纯化后按照摩尔比 5:1 经 T4 DNA 连接酶于 4℃ 过夜连接并转化 DH5a, 挑选菌落,提取质粒 DNA 进行 PCR 检测。用特异性上下游引物 J1 和 aJ1 分别进行 PCR 扩增,凝胶电泳检测均显示单一目的条带(图 9)。为进一步鉴定重组质粒,将上述质粒进行酶切分析(图 8),该结果进一步表明 *DnaJ* 基因已正确插入到载体 pGFP 中,已能够利用该表达载体进行谷子 *DnaJ* 蛋白基因转化和功能研究。



M. Marker (1 kb); 1- 3. PGFP

图 8 PGFP 质粒酶切电泳鉴定

Fig. 8 Digist PGFP



M. Marker(100 bp) ; 1- 6. PGFP
图 9 PGFP 构建质粒 PCR 鉴定
Fig. 9 PGFP plasmid PCR

3 讨论

DnaJ 基因最初是通过对热激反应的研究得到的,随着研究的逐渐深入,发现高温并不是唯一诱导 *DnaJ* 蛋白表达的刺激因子,像冷、高盐、乙醇、砷、重金属、氨基酸类似物,以及其他的一些理化因素会在不同的生物中部分或全部地影响不同种类的 *J* 蛋白基因的表达,可见生物的胁迫反应是相当复杂的。谷子在禾谷类作物中具有相对较突出的抗旱性、耐盐性和适应性,谷子对旱和盐胁迫的适应性是否同其 *DnaJ* 蛋白有关,以及相关的程度有多高均未有研究报道。本研究克隆的谷子 *DnaJ* 蛋白基因因为相关的研究奠定了基础。植物耐盐相关基因的克隆受到人们广泛的关注。近年来,利用转基因操作技术直接将植物耐盐基因转入预改良的作物,已经成为耐盐作物育种最为有效的手段之一。*DnaJ* 基因的克隆和表达载体的构建为谷子耐盐抗旱机理研究及利用谷子的抗性基因改良其他作物的耐盐性奠定了一定的基础。

从图 5 利用不同植物种来源的 *DnaJ* 蛋白基因所构建的系统进化树可以看出,来自禾本科的谷子、玉米和小麦的 *DnaJ* 蛋白基因序列紧密的聚在一起,反映了它们进化上的同源性和紧密的遗传关系。谷子和玉米同属禾本科的黍亚科黍族,因此它们之间的 *DnaJ* 蛋白基因序列的同源性高达 91.4%。在双子叶植物组中,均属茄科植物的番茄、马铃薯、辣椒

的 *DnaJ* 序列紧密聚在一起,反映了它们之间紧密的遗传关系。这种利用一个基因的序列即能反应物种间进化关心的结果,在 Wang Zining 等^[8]克隆 Na^+/H^+ 反转运蛋白基因时也观察到。有趣的是,本研究中来自黄瓜的 *DnaJ* 蛋白基因序列却未表现和同属双子叶的其他植物较近的关系,反映了对个别基因在不同物种间进化选择的差异性。因此虽然利用执行功能的单一基因序列分析,能基本反映种间进化关系,但也存在一定的不准确性,综合分析多个基因的序列才能较准确的反应这种进化关系。

致谢:河北省农林科学院遗传生理研究所周人纲研究员和李国良助理研究员等在引物设计和论文修改方面给予帮助和指导,作者表示衷心感谢!

参考文献:

[1] Georgopoulos C P, Lundquist-Heil A, Yochem J, *et al.* Identification of the *E. coli DnaJ* gene product [J]. Mol Gen Genet, 1980, 178: 583- 588.

[2] 周人纲, Miemyk J A. 拟南芥 *AtJ3* 基因的克隆和分析 [J]. 植物学报, 1999, 41: 597- 602.

[3] Chevalier M, Rhee H, Elguindi E C, *et al.* Interaction of murine BiP/GRP78 with the *DnaJ* homologue MTJ1 [J]. JBC, 2000, 275: 19620- 19627.

[4] Diefenbach J, Kindl H. The membrane-bound *DnaJ* protein located at the cytosolic of glyoxysomes specifically binds the cytosolic isoform 1 of Hsp70 but not other Hsp70 species [J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 746- 754.

[5] Zhu J K, Shi J, Bressan R A, *et al.* Expression of an Atriplex nummularia gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone *DnaJ* [J]. Plant Cell, 1993, 5: 341- 350.

[6] 柴团耀, 张玉秀, 赵文明. *DnaJ*-like 蛋白 cDNA 的克隆及其在重金属胁迫下的表达研究 [J]. 自然科学进展, 2000, 10: 135- 140.

[7] 智慧, 刁现民, 吕 , 等. 人工盐胁迫法鉴定谷子及狗尾草物种耐盐基因型 [J]. 河北农业科学, 2004, 8(4): 9- 15.

[8] Wang Zi-ning, Zhang Jin-song. Cloning and characterization of the Na^+/H^+ antiport genes from *triticum aestivum* [J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(10): 1203- 1208.