

· 生药 ·

黄芩延长因子 1a 基因全长 cDNA 的克隆及其功能

林淑芳¹, 帅凌飞^{1,2}, 袁媛^{1*}, 杨兆春¹, 陈顺钦^{1,2}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 武汉工业学院, 武汉 430023)

[摘要] 目的: 克隆黄芩延长因子 1a 全长 cDNA 序列, 并分析温度对其表达水平的影响。方法: 通过构建黄芩全长 cDNA 文库克隆黄芩延长因子 1a, 利用生物信息学手段分析该基因的序列特征; 利用 RT-PCR 分析温度对黄芩延长因子 1a 基因表达水平的影响。结果: 黄芩延长因子 1a 基因长 1 672 bp, 开放阅读框位于 97 ~ 1 446, 共 449 个氨基酸, 具有典型的延长因子 1a 结构域; 高温和低温处理后, 黄芩 EF1a 的转录水平均显著提高。结论: 黄芩 EF1a 的克隆为进一步研究其在黄芩生长代谢过程中的功能和作用提供了基础。

[关键词] 黄芩; 延长因子; 表达分析

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0126-03

Cloning and Function Analysis of Elongation Factor-1a cDNA in *Scutellaria baicalensis*

LIN Shu-fang¹, SHUAI Ling-fei^{1,2}, YUAN Yuan^{1*}, YANG Zhao-chun¹, CHEN Shun-qin^{1,2}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medicinal Sciences, Beijing 100700, China;
2. Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

[Abstract] **Objective:** To clone elongation factor-1a (EF-1a) gene cDNA and analyse its expression level of the temperature effect. **Method:** Elongation factor-1a (EF-1a) gene was cloned through constructing cDNA library of *Scutellaria baicalensis*, and its characteristics was analysed by bioinformatics method. Its expression level of the temperature effect was analysed by using RT-PCR. **Result:** The length of elongation factor-1a (EF-1a) gene of *Scutellaria baicalensis* was 1 672 bp, the open reading box located in 97-1 446 with 449 aminos. It was a typical elongation factor domain. The transcription levels of SbEF1a were significantly improved with high and low temperature processing. **Conclusion:** 1a (EF-1a) gene of *S. baicalensis* was a elongation factor, participating in translation of protein. Its expression controled by environmental temperature, and its transcription level is significantly increased after high and low temperature processing.

[Key words] *Scutellaria baicalensis*; elongation factor; gene expression

在低温条件下, 黄芩中的黄芩苷、黄芩素和总黄酮含量的积累均受到抑制^[1], 同时温度变化也会影

响植物体内蛋白质等生物大分子的合成, 进而影响到自身的生长代谢, 这些现象均是植物自身对外界环境变化的适应性反应。

蛋白质的生物合成是一个需要许多大分子如起动因子、延伸因子、终止因子、核糖体、信使 RNA、氨酰合成酶和 tRNA 协同作用的复杂的生理生化过程。其中植物蛋白质合成延伸因子 EF1 和 EF2 通过在核糖体上催化氨基酸链的延伸进而推动、控制蛋白质的生物合成, 在植物生长代谢过程中发挥重

[收稿日期] 2011-04-21

[基金项目] 中国博士后基金特别资助项目(201003228); 北京市科技新星项目(2008B62)

[第一作者] 林淑芳, 助理研究员, Tel: 64014411-2955, E-mail: linshufang2006@126.com

[通讯作者] * 袁媛, 副研究员, Tel: 010-64014411-2956, E-mail: yyuan0732@gmail.com

要作用^[2]。其中 EF1a 是真核生物中数量较多的一类蛋白,约占蛋白总量的 1%~2%。目前许多植物的 EF1a 基因已被成功分离,研究表明,植物种间的 EF1a 氨基酸序列高度保守,其表达受激素、环境胁迫和生长发育过程等因素诱导^[3],如玉米 EF1a 基因的表达就受到低温胁迫的诱导^[4]。

本文通过克隆黄芩 EF1a 基因、分析其序列特征、预测基因的功能,并分析了温度对黄芩 EF1a 基因表达的影响,为进一步研究延伸因子在黄芩生长代谢过程中的功能和作用以及阐释黄芩响应逆境胁迫的生理机制提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 黄芩延长因子 1a 基因的克隆 取黄芩新鲜组织 2 g,在研钵中用液氮快速研磨成粉末,采用 CTAB 法提取总 RNA。采用 mRNA 纯化试剂盒 (QuichprepTM Micro mRNA Purification Kit,Pharmacia 公司)分离 mRNA 后,采用 Clontech 公司的 Creator Smart cDNA Library Construction Kit (Cat. 634903) 进行建库。随机挑取 5 000 个单克隆进行菌落 PCR 鉴定。选择条带单一扩增产物送至华大基因公司进行测序,获得黄芩相关基因序列。利用 Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) 软件对黄芩相关基因序列进行功能注释,结果预测其中 1 个 Unigene 的功能为延长因子 1a,命名为 SbEF1a,将该序列在 GeneBank 数据库中进行注册,序列号为 HQ694771。

1.2 黄芩延长因子 1a 基因序列分析 利用在线软件对 SbEF1a 进行序列分析,主要包括:①开放阅读框 (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/); ②结构域分析 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd); ③系统进化分析 (http://www.ebi.ac.uk/

Tools/services/web _ clustalw2); ④ GO 注释 (www.geneontology.org/)。

1.3 黄芩延长因子 1a 基因表达分析 将收集于甘肃陇西的黄芩种子撒播于花盆 (800 cm³) 混合土中,土壤为泥炭:岩沙 (2:1),光照强度 100 μmol·L⁻¹ m⁻² s⁻¹,光周期设置为光照 16 h/黑暗 8 h,控制温度在 25 ℃、湿度为 60% 左右。在栽培 3 个月后,把盆栽黄芩随机分成 3 组:高温组 (40 ℃)、低温组 (10 ℃)、对照组 (25 ℃),每组重复 3 次。8:00 浇水 80 mL dH₂O/盆,每 2 天浇 1 次。分别于处理后 30,40,50 d 取样,并置于 -80 ℃ 冰箱中保存备用。

按照 Invitrogen 公司的 Trizol reagent 的操作说明进行黄芩根总 RNA 的抽提。利用核酸定量仪测定总 RNA 浓度,选择 A_{260nm}/A_{280nm} 为 1.8~2.0 的总 RNA 进行反转录,方法参见 TaKaRa 1st cDNA 合成试剂盒说明书。根据黄芩延长因子 1a 以及 18S 基因序列 (Genbank FJ527609) 分别设计引物,如表 1 所示,引物由华大基因公司合成。取反转录产物 1 μL,分别加入基因正向引物 0.5 μL (10 pmol·μL⁻¹),反向引物 0.5 μL (10 pmol·μL⁻¹),dNTP 1 μL,10× Buffer 2.5 μL,rTaq 酶 0.5 μL,H₂O 19 μL,进行 PCR 反应,反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 充分延伸 10 min。SbEF1a,18S 的退火温度分别为 47 ℃,60 ℃。在目标 PCR 产物长度位置出现条带为基因有表达,利用凝胶成像仪扫描黄芩延长因子 1a 基因与 18S rRNA 的光吸收值,其比值的差异表示该基因在不同处理条件下的表达量。每个样品重复 3 次。

表 1 2 种基因引物序列

基因	正向引物 (5'-3')	反向引物 (5'-3')
SbEF1a	TGGAGGCTCTTCTCGGTG	ATCTGCCCTGGGTGGTTC
18S	CGTTGACTACGTCCCTGCCCTT-	GTTACCTACGGAAACCTGTGTACGAC

2 结果与分析

2.1 黄芩延长因子 1a 基因的克隆 在黄芩全长 cDNA 文库中,随机挑选克隆进行测序,利用 BLASTn 和 BLASTx 对所获得的片段进行同源性分析,获得 SbEF1a 片段,该序列长 1 672 bp,开放阅读框位于 97~1 446,共 449 个氨基酸。

2.2 黄芩延长因子 1a 基因序列分析 保守结构域分析对 SbEF1a 氨基酸序列的结构域进行分析,结

果表明 SbEF1a 具有典型的 EF1-alpha [cd01883], EF1-alpha-III [cd03705], EF1-alpha_II [cd03693], PTZ00141 [PTZ00141] 结构域。

基因系统进化分析 利用 ClustalW2 软件对拟南芥和黄芩 EF1a 基因进行系统进化分析。拟南芥 EF1a 基因序列包括 AT1G18070, AT5G60390, AT1G07930, AT1G07940, AT1G07920, AT5G10630。结果表明, SbEF1a 与 AT5G60390, AT1G07930, AT1G07940,

AT1G07920 氨基酸序列相近,如图 1 所示。

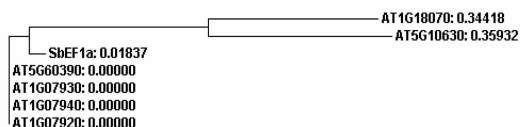
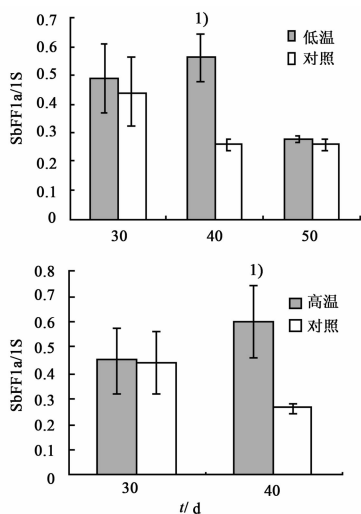


图 1 系统进化分析

GO 分析 GO 注释结果预示, SbEF1a 参与翻译延伸 (GO:0006414) 等生物过程, 主要存在于细胞质 (GO: 0005737)、线粒体 (GO: 0005739)、细胞核 (GO: 0005634)、质膜 (GO: 0005886)、液泡 (GO: 0005773) 中, 具有钙调素结合 (GO:0005516) 等分子功能, 也具有翻译延伸因子活性 (GO:0003746)。

2.3 黄芩延长因子 1a 基因转录分析 利用 RT-PCR 分析 SbEF1a 在不同温度处理的黄芩根组织中的转录情况。结果表明, 与对照相比, 高温和低温处理 40 d 后, SbEF1a 的转录水平均显著提高, 分别为对照的 2.3, 2.15 倍 (图 2)。



与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 2 温度对 SbEF1a 基因转录水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论

EF1a 是广泛存在于真核细胞内的延伸因子, 其在核糖体上可以催化氨基酸链的延伸进而推动。在植物蛋白质合成延伸过程中, EF1a 是一个重要的翻译因子, 其表达调控保守, 表达水平同细胞生长及增殖速度有关。Ransom 对拟南芥中 EF1a 基因的研究认为, 真核生物的伸长因子 EF1a 的编码基因属于 GTP 结合蛋白家族, 在体内和体外均能同肌动蛋白纤维及微管蛋白结合, 是细胞骨架运动性的调节蛋白^[5]。除了参与翻译控制有关的信号传导外, 还参与细胞生长、应激反应及与运动性有关的信号传导,

并且与细胞凋亡等有关^[6], 如 EF1a 基因在香蕉果实采后的表达量开始是呈逐渐上升的趋势, 这一变化与香蕉果实采后乙烯释放量的变化、果实软化的进程一致^[7]。同时, 有研究表明, EF1a 基因在水稻幼苗中的表达明显受盐胁迫和 ABA 胁迫所诱导, 且 ABA 胁迫处理对该基因转录的诱导要早于盐胁迫的诱导作用。此外, 干旱 (15% PEG6000)、冷胁迫 (4℃) 和热激 (37℃) 对水稻 EF1a 的转录均有明显的诱导作用。上述结果说明 EF1a 的诱导表达可能是植物细胞对逆境胁迫的一种适应性反应^[4]。

本实验通过构建黄芩全长 cDNA 文库克隆黄芩 EF1a, 并利用生物信息学手段分析该基因的序列特征, 结果表明 SbEF1a 具有典型的延长因子 1a 结构域, 在蛋白质合成代谢过程中具有翻译延伸等生物学功能, 同时其在黄芩根中的表达受到环境温度的调控, 即在高温和低温处理后转录水平均显著提高, 表明温度胁迫对 EF1a 的表达具有诱导作用。这一结果为进一步研究延伸因子在黄芩生长代谢过程中的功能和作用以及阐释黄芩响应逆境胁迫的生理机制提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] 李子银, 陈受宜. 环境因子胁迫下水稻翻译延伸因子 1a 基因的诱导表达 (英) [J]. 植物学报, 1999, 41 (8): 800.
- [2] 陈建中, 章镇, 戴剑. 植物蛋白质合成延伸因子 [J]. 植物生理学通讯, 2002, 4: 406.
- [3] 覃迎姿, 黄先益, 叶兴枝, 等. 植物延伸因子 eEF1a 研究进展 [J]. 广西农业科学, 2009, 5: 472.
- [4] Berberich T, Sugawara K, Harada M, et al. Molecular cloning, characterization and expression of an elongation factor 1 alpha gene in maize [J]. Plant Mol Biol, 1995, 29(3): 611.
- [5] Ransom-Hodgkins W D. The application of expression analysis in elucidating the eukaryotic elongation factor one alpha gene family in Arabidopsis thaliana [J]. Mol Genet Genomics, 2009, 281(4): 391.
- [6] He L, Ban Y, Miyata S, et al. Apple aminopropyl transferase, MdACL5 interacts with putative elongation factor 1-alpha and S-adenosylmethionine synthase [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 366: 162.
- [7] 陈敦忠. 香蕉延长因子 1a 基因全长 cDNA 的克隆及其特征分析 [D]. 华南热带农业大学, 2005.

[责任编辑 何伟]