

蚕豆豆类胰岛素基因的 cDNA 克隆及序列分析

谈建中¹, 楼程富², 张国英¹, 孙丙耀¹, 平野久³

(1. 苏州大学生命科学学院, 苏州 215006; 2. 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029;

3. 横滨市立大学木原生物学研究所, 横滨 244-0813, 日本)

摘要:为探明豆科植物中豆类胰岛素基因的结构特征与进化关系,在已获得大豆豆类胰岛素基因的基础上,以蚕豆种子胚根 mRNA 为材料,采用 RT-PCR 技术,克隆了蚕豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列,编码的前体多肽包括信号肽、成熟型豆类胰岛素及另一多肽的 45 个氨基酸残基。DNA 序列分析表明,克隆片段与大豆和豌豆的同源性分别为 62.5% 和 58.7%。在氨基酸水平上分别具有 44.2% 和 43.6% 的同源性,其中存在着高度保守的半胱氨酸位点,它们在维持豆类胰岛素的空间结构与生理功能方面,可能具有重要的作用。

关键词:蚕豆;豆类胰岛素基因;cDNA 序列;RT-PCR

中图分类号:S 643.6

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)02-0168-05

cDNA Cloning and Sequence Analysis of Leginsulin Gene in Broad Bean (*Vicia faba*)

TAN Jian-Zhong¹, LOU Cheng-Fu², ZHANG Guo-Ying¹, SUN Bing-Yao¹, HIRANO Hisashi³

(1. College of Biological Science, Suzhou University, Suzhou 215006, China;

2. Animal Science College, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

3. Kihara Institute for Biological Research, Yokohama City University, Yokohama, 244-0813, Japan)

Abstract: In order to elucidate the relationship between the structural features of leginsulin gene in legume plants and their phylogenetic significance, we have cloned the cDNA sequence of leginsulin gene from radicles of broad bean (*Vicia faba*) via RT-PCR techniques according to the leginsulin gene sequence we previously obtained from soybean (*Glycine max*). The cloned cDNA encoded for a precursor protein consisting of the signal peptide, mature leginsulin and an additional 45 amino acids of another polypeptide. A sequence search for homology comparison revealed the cloned leginsulin cDNA fragment shares 62.5% and 58.7% similarity to soybean and pea, respectively. The results also shown that leginsulin cDNA from broad bean presents 44.2% and 43.6% amino acid sequence homology with soybean and pea (*Pisum sativum*), respectively, and that there exists highly conserved cysteine sites among the leginsulin cDNAs, which may play a crucial role in maintaining the three-dimensional structure and the physiological functions of leginsulin.

Key words: broad bean (*Vicia faba* L.); leginsulin gene; cDNA sequence; RT-PCR

豆科植物种子蛋白除大量的贮存蛋白及结构蛋白以外,还存在多种功能性蛋白。近年来,在大豆等多种豆科作物中发现的 leginsulin (暂命名为豆类胰岛素),它能够特异性结合大豆碱性 7S 球蛋白(Bg),从而促进后者的蛋白激酶活性,并可竞争性

抑制动物胰岛素的 Bg 结合活性^[1,2],在结构特征和生理功能方面表现植物激素的部分特性,可能是一类很重要的活性多肽。

Watanabe 等最初从大豆萌芽种子的幼根中分离了豆类胰岛素,并根据其部分氨基酸序列合成 DNA

探针,从大豆 cDNA 文库中筛选获得了豆类胰岛素基因的 cDNA 克隆,由 DNA 序列推导的前体多肽包括成熟型豆类胰岛素及其下游的另一个 6ku 多肽^[1]。笔者从栽培大豆和野生大豆的基因组 DNA 中分离到了豆类胰岛素基因的全序列,结果也表明成熟型豆类胰岛素及其信号肽、6ku 多肽可能为同一前体 RNA 所编码,并且在信号肽编码区域内存在一个约 300bp 的内含子^[3,4]。研究结果还表明,豌豆种子清蛋白 PA1 与大豆豆类胰岛素也具有较高的同源性^[5],暗示在豆科植物中豆类胰岛素可能具有相似的结构特征。但是,到目前为止,对多数豆科植物及其他植物中此类活性多肽还缺少了解,因此,有必要在多种植物范围内系统地研究豆类胰岛素基因及其表达调控等基础问题,以探明该活性多肽在植物种子发育及信号传递过程中的作用。本文以蚕豆萌芽种子胚根 mRNA 为材料,采用 RT-PCR 技术克隆蚕豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列,并与前人的研究结果进行了比较分析。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料

蚕豆(*Vicia faba*)种子在 25℃~18℃昼夜变温条件下催芽生长,播种后 10d 选取长度为 1~1.5cm 胚根为材料提取总 RNA。

1.1.2 主要化学试剂与酶类

PCR 试剂盒(GIBCO BRL)、 β -Agarase(New England Biolabs)、克隆载体 pT7Blue(Novagen)、限制酶和 T4-DNA 连接酶(TaKaRa)、cDNA 合成试剂盒(Amersham,RPN 1266)、DNA 测序试剂盒(Amersham)等购自所列有关公司。

1.2 方 法

1.2.1 总 RNA 的提取

采用改良 LiCl 沉淀法从蚕豆幼根中提取总 RNA,操作过程如下:新鲜幼根经液氮研磨成粉状,加入 9 倍体积(V/W)的 RNA 抽提缓冲液(0.1mol/L Tris-HCl(pH 9.0)、0.1mol/L LiCl、1% SDS、10mmol/L EDTA),充分研磨后加入等体积的苯酚及氯仿/异戊醇混匀,室温下 15 000 r/min 离心 10min,重复处理 2 次以除去蛋白质。仔细吸取上层水相,加入 1/5 倍体积的 12 mol/L LiCl,混匀置冰上过夜,4℃、15 000r/min、离心 20min 以上。弃上清,白

色沉淀即为总 RNA 样品。室内干燥后重悬于 500 μ L TE 中,再经酚-氯仿处理 2~3 次,以充分除去蛋白质。回收上清液,经乙醇沉淀、真空干燥后,溶于无 RNase 的重蒸水,置于-80℃保存备用。

1.2.2 cDNA 第一链的合成

以上述总 RNA 为模板,采用 Amersham 公司的 cDNA 合成试剂盒及说明书推荐的反应参数及条件,反转录合成 cDNA 第一链(RT 产物)。

1.2.3 DNA 扩增反应

PCR 反应体系为 25 μ L,分别加入 RT 产物 1 μ L、10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L、dNTP(各 2.5mmol/L) 2 μ L、上下游引物各 0.5 μ L、Taq 酶 0.1U。循环参数为:94℃,30s;55℃,30s;72℃,30s,35 个循环,最后 72℃延伸 7min。同时,分别以栽培大豆的豆类胰岛素基因 cDNA(MC-cDNA;pBS)和蚕豆总 RNA 作为 PCR 反应的正负对照区。PCR 反应结束后,取反应产物 1 μ L,在 Agarose 胶上电泳检测反应结果。用于扩增反应的 4 种引物如下:

引物 1(FP1): 5'-CCTATGGCTGTCTTCTTGCT-3'

引物 2(FP2): 5'-CTYGCTYCTWTGRYKGTCTT-3'

引物 3(RP1): 5'-GAATCAGAGTCAAAACACCA-3'

引物 4(RP2): 5'-AGTTGCGTACTGGAGCACTC-3'

1.2.4 扩增产物的克隆与测序

反应产物经电泳检测后,用低熔点琼脂糖回收目的片段,采用 TA 载体直接克隆方法,与克隆载体 pT7Blue(R)连接。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,在含 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上培养。然后采用 direct-PCR 方法进行鉴定,即从 LB 平板上挑选白色菌落,直接进行 PCR,同时复制至另一含 Amp 的 LB 平板。根据 PCR 产物的电泳结果再从 LB 平板上挑选目的重组子,提取质粒 DNA,在 LI-COR 公司的 DNA 测序仪 Model 4000 进行测序,用 Aloka 公司的 Base Image^{IR} Software Version 2.20 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 蚕豆幼根总 RNA 的质量鉴定

鉴于大豆豆类胰岛素基因的 cDNA 最早是从发芽种子的幼根中分离得到的,因此,本研究选择蚕豆幼苗的胚根作为实验材料,采用改良的 LiCl 沉淀法提取总 RNA。该提取方法对所用器皿无须进行 DEPC 处理,操作简便,成本低廉。从抽取的总 RNA

电泳结果看,28S 与 18S 两个条带比较清晰(图 1),前者的含量较高,说明提取的总 RNA 没有被降解。同时,紫外测定表明, $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}} > 1.8$, $D_{260\text{nm}}/D_{230\text{nm}} > 2.0$,RNA 样品纯度符合反转录反应的要求。

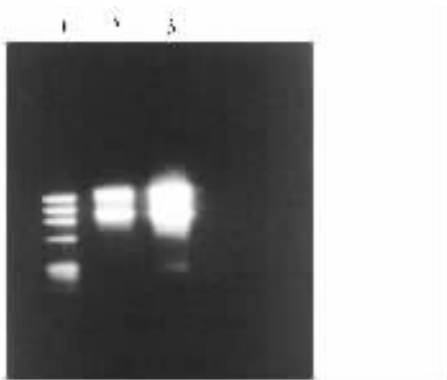


图 1 蚕豆胚根总 RNA 的电泳检测

1:DNA 分子量标记(Φ X174/*Hae*III);
2,3: 提取的总 RNA 样品。

Fig. 1 Electrophoretic analysis of total RNA isolated from broad bean redicles

1: DNA Marker (Φ X174/*Hae*III); 2,3: Total RNA.

2.2 cDNA 第一链的合成及扩增反应

本研究目的是为了克隆蚕豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列,以便对多种豆科作物的胰岛素基因结构进行比较。鉴于大豆豆类胰岛素基因的 cDNA 探针与蚕豆基因组 DNA 杂交能够检测到杂交谱带而又信号较弱的特点^[6],依据 watanabe 等报道的大豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列设计了 4 种 RT-PCR 引物,设计扩增片段分别为 310bp(FP_1/RP_1)和 470bp(FP_1/RP_2)。从 RT-PCR 产物的电泳结果(图 2)看,以 FP_1/RP_2 为引物的扩增片段在 600~800bp 之间(lane 3),比设计片段或对照区(lane 6)相应片段大 200bp 左右(FP_2/RP_2 的结果相同,图略),而以 FP_1/RP_1 为引物的扩增片段在 300 bp 左右(lane 2),与设计片段或对照区(lane 5)相应片段比较吻合,因此,将该扩增片段作为目的基因进行克隆。

上述目的扩增片段经低熔点琼脂糖回收、纯化后,连接到克隆载体 pT7Blue 的 *E. coli* DH5 α 的 *coRV* 位点,连接产物转化 *E. coli* DH5 α ,在含 Amp 的平板上筛选,阳性克隆进行直接 PCR 鉴定,结果筛选到了含有目的片段的重组子(图 3)。

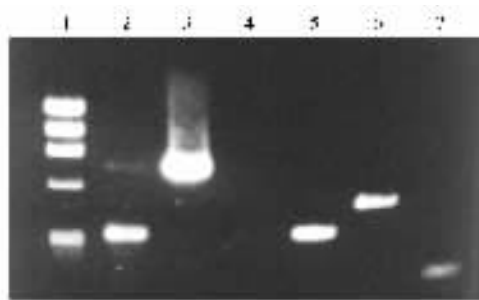


图 2 蚕豆幼根总 RNA 的 RT-PCR 电泳图谱

1:DNA 分子量标记(Φ X174/*Hae*III);
2: RT-PCR (FP_1/RP_1 ,PCR 模板为 RT 产物);
3: RT-PCR (FP_1/RP_2 ,PCR 模板为 RT 产物);
4: CK⁻ (FP_1/RP_1 ,PCR 模板为蚕豆总 RNA);
5: CK⁺ (FP_1/RP_1 ,MC-cDNA;pBS);
6: CK⁺ (FP_1/RP_2 , MC-cDNA;pBS); 7: CK⁻ (H_2O)。

Fig. 2 RT-PCR amplification of total RNA

1:DNA Marker (Φ X174/*Hae*III);
2: RT-PCR (FP_1/RP_1 ,RT products for PCR template);
3: RT-PCR (FP_1/RP_2 ,RT products for PCR template);
4: CK⁻ (FP_1/RP_1 ,total RNA for PCR template);
5: CK⁺ (FP_1/RP_1 ,MC-cDNA;pBS);
6: CK⁺ (FP_1/RP_2 , MC-cDNA;pBS); 7: CK⁻ (H_2O)。



图 3 重组子的直接 PCR 鉴定

1,11:DNA 分子量标记(Φ X174/*Hae*III);
2~8: 含扩增片段的重组子;
9:CK⁺ (MC-cDNA;pBS);10:CK⁻ (H_2O)。

Fig. 3 Direct-PCR amplification of combinants

1,11:DNA Marker(Φ X174/*Hae*III);
2~8:combinants containing RT-PCR products;
9:CK⁺ (MC-cDNA;pBS);10:CK⁻ (H_2O)。

2.3 蚕豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列分析

随机挑选目的重组子,用碱裂解法抽提质粒 DNA 进行序列分析,结果见图 4。为便于几种豆科植物间的序列分析,将栽培大豆和豌豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列及所推导的氨基酸序列也分别列于图 4 和图 5。结果表明,(1)克隆的蚕豆(BC)豆类胰岛素基因 cDNA 序列长为 305bp,与栽培大豆

(MC)和豌豆(PC)的相应区域分别具有62.5%和58.7%的同源性,根据 cDNA 推导的氨基酸序列的同源性分别为 44.2%和 43.6%,显示了比较高的同源性。(2)由 cDNA 推导的氨基酸序列还包含了 6ku 多肽的 45 个氨基酸残基,推测蚕豆类胰岛素与 6ku 多肽也由同一前体 RNA 所编码,而后在翻译过程中被加工为两个不同的多肽。(3)在蚕豆豆类胰岛素的成熟肽序列(图 5 中用字符底纹表示部分)内,存在着 6 个保守的半胱氨酸(Cys)位点:

Cys³、Cys⁷、Cys¹⁵、Cys²⁰、Cys²²、Cys³²,除 Cys⁷ 位点稍有不同外,其余 5 个位点与栽培大豆及豌豆的结果完全相同,在 6ku 多肽的氨基酸序列中,也存在着 4 个保守的 Cys。推测一级结构中的这些 Cys 位点对于多肽分子内或分子间二硫键的形成以及空间结构具有重要作用。(4)相对于成熟型豆类胰岛素而言,其下游 6ku 多肽的氨基酸序列具有更大的保守性,与大豆的同源性高达 66.7%,暗示该多肽可能具有重要的生理功能。

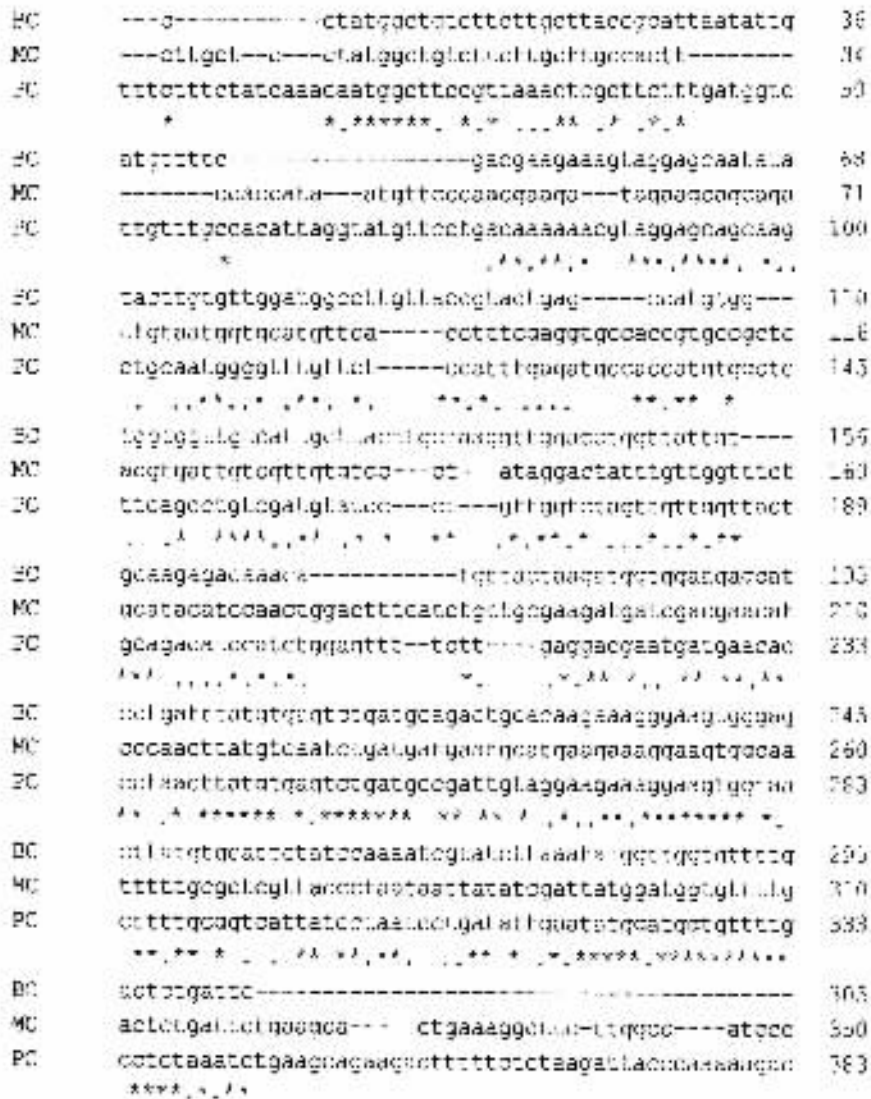


图 4 3 种豆类胰岛素基因的 cDNA 序列比较

Fig. 4 Comparison of cDNA sequence in three leginsulin genes

BC	MAVFLLTALTEIMPST-----KRVGAIYTCWGWPC--YRHHPCGGGEGCHC	41
MC	MAVFLLATSTIMPPT-----KIEAA-DCNG-ACSPREVEVPCRSKDCRC	41
PC	MASVKLASLNVLFATLGMPLLKNVGAASGKRG-NDSPREHURPESGACRC	48
	* * * * *	
BC	LLAVWVINGYCAKDEHVT--KMVSEHPDLCEBDALCTPKGSGSLCAPYTK	88
MC	YPIELAVVGFCEHPTGLSSVAKYLDSEHNLCQSDDECMKKGSGNPLARYFN	91
PC	EPVGLAVVGFCEHPTGLSSVAKYLDSEHNLCQSDDECMKKGSGNPLARYFN	96
	. . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *	
BC	SYLKYGNCFDSE-----	100
MC	NYTIVGRCFDSDSEALRCFLA-----MPRATTK	110
PC	PDIEYGNCFASKSEA-RDFFSKITQkuLLKSVSTA	130
	. . . * * * * *	

图 5 3 种豆类胰岛素(前体多肽)氨基酸序列的比较

Fig. 5 Comparison of amino acid sequence in three leginsulins (precuser peptide)

3 讨 论

在克隆栽培大豆和野生大豆豆类胰岛素基因的基础上^[6],本研究以蚕豆胚根总 RNA 为模板,采用 RT-PCR 技术对蚕豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列进行克隆。根据上述结果,发现其 cDNA 序列及所推导的氨基酸序列与栽培大豆或野生大豆的同源性差异,与三者的 Southern 杂交结果比较一致。即在栽培大豆、野生大豆及蚕豆基因组 DNA 进行 Southern 杂交时,在杂交温度较低(58℃)及松弛型洗脱条件下,三者都能检测到杂交信号,只是蚕豆基因组的信号较弱;但在杂交温度较高(60℃)及严紧型洗脱条件下,蚕豆基因组未能检测到杂交信号^[6],说明在豆科作物的不同种属之间,豆类胰岛素基因及其氨基酸序列的同源性关系比较复杂,可能在基因水平上反映了豆科植物种属间的进化关系。

本次试验结果及有关资料表明,豆类胰岛素存在于大豆、蚕豆、豌豆及羽扇豆^[7]等多种豆科作物中,并且表现较高的同源性,如在核苷酸水平上,本研究克隆的蚕豆豆类胰岛素基因的 cDNA 序列与大豆和豌豆同源性分别为 62.5% 和 58.7%,在氨基酸水平上,分别具有 44.2% 和 43.6% 的同源性。在成熟型豆类胰岛素及其相关的 6ku 多肽序列中,都存在着高度保守的半胱氨酸位点,由此推测豆类胰岛素不仅广泛存在于豆科植物中,而且在种属的遗传进化过程中具有

较高的保守性,尤其是与蛋白质空间结构密切相关的半胱氨酸位点是高度保守的,这些都显示了豆类胰岛素基因可能是豆科作物进化上较为保守的基因,其产物在种子生命活动中担负着重要的生理功能。

参 考 文 献 (References):

- [1] Watanabe Y, Barbashow S F, Komatsu S, *et al.* A peptide that stimulates phosphotyrosine phosphorylation of the plant insulin-binding protein isolation, primary structure and cDNA cloning[J]. *Eur J Biochem*, 1994, 224: 167~172.
- [2] 平野久, 坂田京子, 高冈素子. ダイズレグインスリンの構造と機能[A]. 第 17 回种子生理生化学研究会讲演要旨集[C], 1996, 28~29.
- [3] Tan J Z, Lou C F, Hisashi H. Cloning and sequence analysis of the leginsulin gene from soybean[P]. EMBL Accession Number AJ223037, 1998.
- [4] Tan J Z, Lou C F, Hisashi H. Characterization of the leginsulin gene from wild soybean (*Glycine soja*) [P]. EMBL Accession Number AJ011935, 1999.
- [5] Higgins T J, Chandler P M, Randall P T, *et al.* Gene structure, protein structure and regulation of the synthesis of a sulfur-rich protein in pea seed [J]. *J Biol Chem*, 1986, 261: 11124~11130.
- [6] 谈建中, 楼程富, 平野久. 栽培大豆和野生大豆的豆类胰岛素基因分析[J]. *应用与环境生物学报*, 1999, 3: 165~168.
- [7] Esnault M A, Citharel J, Thomas D, *et al.* Behaviour of conglutin- γ , a major lupin seed protein during germination [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1996, 34: 101~109.