

两种麻疯树核糖体失活蛋白基因 *Curcin* 和 *Curcin C* 在种子萌发过程中的表达模式研究

张敬, 吉柔风, 杨千, 丁蒙蒙, 陈放, 徐莺
(四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065)

摘要: 为了研究和开发丰富的麻疯树资源,本研究以四川省西昌市金沙江干热河谷地区的麻疯树种子为材料,将种子浸水萌发后收集各组织用于实验. qRT-PCR 结果显示胚乳中 *Curcin*、*Curcin C* 基因表达先增加后减少,在子叶中 *Curcin C* 基因的表达也是如此. Western Blot 结果显示 *Curcin* 蛋白在根、下胚轴、真叶、子叶中不表达, *Curcin C* 蛋白在根和下胚轴中也不表达,而在真叶、子叶中表达. 生物信息学软件预测及亚细胞定位结果都显示 *Curcin*:GFP 和 *Curcin C*:GFP 融合蛋白定位在细胞壁上. 本研究初步阐明了两种麻疯树核糖体失活蛋白 *Curcin*、*Curcin C* 的表达模式并对其进行了亚细胞定位.

关键词: 麻疯树; *Curcin*; *Curcin C*; 基因表达模式

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A **DOI:** 10.19907/j.0490-6756.2021.016001

Study on the expression patterns of two ribosome inactivated protein genes *Curcin* and *Curcin C* of *Jatropha curcas* during the process of seed germination

ZHANG Jing, JI Rou-Feng, YANG Qian, DING Meng-Meng, CHEN Fang, XU Ying
(Key Laboratory of Bio-Resources and Eco-Environment Ministry of Education,
College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: In order to research and develop the abundant resources of *Jatropha curcas*, the seeds of *Jatropha curcas* from the dry hot valley of Jinsha River in Xichang City, Sichuan Province were used as materials. The tissues for experiment were collected after soaking seeds in water to germinate. The qRT-PCR results showed that the expression of *Curcin* and *Curcin C* genes in endosperm increased first and then decreased, as did the expression of *Curcin C* gene in cotyledons. Western Blot results showed that *Curcin* protein was not expressed in roots, hypocotyls, true leaves and cotyledons, *Curcin C* protein was also not expressed in roots and hypocotyls, but expressed in true leaves and cotyledons. Both bioinformatics software prediction and subcellular localization results showed that *Curcin*:GFP and *Curcin C*:GFP fusion proteins were localized in the cell wall. In this study, the expression patterns of two ribosome-inactivated proteins *Curcin* and *Curcin C* in *Jatropha curcas* were preliminarily elucidated and subcellular localization was performed.

Keywords: *Jatropha curcas*; *Curcin*; *Curcin C*; Gene expression patterns

收稿日期: 2020-06-28
基金项目: 国家自然科学基金(31870315)
作者简介: 张敬(1991—), 女, 汉族, 四川广元人, 硕士研究生, 研究方向为植物生理、基因功能与表达. E-mail: 448409140@qq.com
通讯作者: 徐莺. E-mail: xuying@scu.edu.cn

1 引言

最初,核糖体失活蛋白是从蓖麻种子中分离纯化出来的,被人们命名为 ricin^[1]. 之后,随着研究的不断深入,已经在 14 个家族中发现了超过 50 种核糖体失活蛋白,研究较为清楚的有美洲商陆、麻疯树、苦瓜、相思子、丝瓜、樟树等^[2]. 植物核糖体失活蛋白已被证实具有 N-糖苷酶活性、水解酶活性、DNA 酶活性等酶学活性和抗真菌、抗病毒、抗肿瘤等生物学活性,关于其酶学活性研究的较为透彻和深入,而生物学活性的作用机制和机理,目前还没有确切的结论^[3]. 实验研究表明,麻疯树核糖体失活蛋白 Curcin 具有抗肿瘤、抗真菌等生物学活性. Zhang 等人从麻疯树子叶中提取出核糖体失活蛋白 Curcin C,证明其具有 N-糖苷酶活性、翻译抑制作用、抗肿瘤活性. 关于核糖体失活蛋白的作用机制,并没有得到很清晰的验证^[4].

从麻疯树中分离出的核糖体失活蛋白多为 I 型核糖体失活蛋白, Curcin 是最早从麻疯树中分离出来,是由林娟等人根据前人的经验,纯化出 Curcin,该蛋白分子量为 28.2 kD,等电点为 8.54,并验证具有 N-糖苷酶活性、翻译抑制活性^[5]. 之后魏琴等人发现了核糖体失活蛋白 Curcin 2, Curcin L 等与胁迫相关的蛋白,这种特殊蛋白的存在,可能会起到保护麻疯树的正常发育生长、抵御不良生理环境的作用^[6-7]. 近年来, Zhang 等人从麻疯树子叶中分离提取出麻疯树核糖体失活蛋白 Curcin C,活性实验表明, Curcin 和 Curcin C 蛋白均具有抗肿瘤活性,但两者抗肿瘤活性效率差异较大^[4,8]. 植物核糖体失活蛋白可抑制蛋白质合成,也因其酶学活性和生物学活性,在生物医学领域具有广阔的应用前景^[9]. 也有研究显示,西昌地区的麻疯树种子核糖体失活蛋白含量最高,可作为核糖体失活蛋白应用的材料来源和研究的重要原材料. 这些麻疯树核糖体失活蛋白的特性可能与其定位、生物学作用具有紧密的关联,一直以来是研究的热点和重点.

麻疯树在中国西南和东南地区有着丰富的资源,为了研究和开发这一资源,因此本研究以此为切入点,首先探讨麻疯树种子萌发和幼苗生长过程的形态学的变化,为后续的研究奠定一定的基础,其次从基因层面研究麻疯树核糖体失活蛋白的在种子萌发和幼苗生长过程中的一个动态变化,以及在各个组织器官中的表达情况,进而推测其在种子

萌发和幼苗形成过程中可能发挥的作用. 采用生物信息学以及构建含有 GFP 基因的瞬时表达载体等方法确定了这两种蛋白的亚细胞定位信息. 这些研究对于揭示其存在及发挥作用的机制具有重要的意义,同时也为这两种蛋白质的结构和功能研究打下了基础.

2 材料与方法

2.1 材料

购买于四川省西昌市金沙江干热河谷地区的麻疯树成熟种子.

2.2 方法

2.2.1 种子萌发 选取干粒质量达到 0.68 g 以上的麻疯树种子置于室温条件下用水浸泡 2 h,将蛭石和营养土等比例混合均匀,加入适量的水,保证湿润. 浸泡完毕后,将种子种入花盆中,萌发条件为 30 ℃,光照/黑暗为 18 h/6 h;定期浇水使得培养床保持一定的湿度;每天定时观察并记录萌发状态,随时准备收集各个时期的胚乳、子叶、胚根等样品.

2.2.2 *Curcin*、*Curcin C* 基因表达分析 按照天根 RNAprep Pure 植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取材料的总 RNA,采用琼脂糖凝胶电泳检测核酸的完整性. 利用 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TAKARA, 大连)试剂盒合成单链 cDNA. 反应完成后 cDNA 产物 -20 ℃ 保存备用. 采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒对 *Curcin*、*Curcin C* 基因进行荧光定量 PCR,每个样品均重复三次以避免加样误差,实验数据利用 iQ5-Cycler 进行分析,分析方法为 $\Delta\Delta C_t$ 法.

2.2.3 *Curcin*、*Curcin C* 蛋白表达分析 采用磷酸盐缓冲液浸提丙酮沉淀法提取不同组织(胚根、胚轴、子叶、真叶)的总蛋白后进行 SDS-PAGE、转膜、封闭、孵育抗体以及显色反应.

2.2.4 生物信息学分析 利用在线网站 Cell-PLoc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>) 对 *Curcin*、*Curcin C* 蛋白亚细胞定位进行预测,利用在线网站 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对 *Curcin*、*Curcin C* 蛋白信号肽进行预测.

2.2.5 农杆菌侵染烟草叶片表达 *Curcin*/*Curcin C*-GFP 融合蛋白 设计引物并构建 pBI221-*Curcin*/pBI221-*Curcin C* 重组载体,将重组载体转入大肠杆菌并挑选阳性克隆进行测序,采用质粒大量

提取纯化试剂盒(Vigorous Plasmid Maxprep Kit)提取 pBI221-*Curcin*/*Curcin C* 重组质粒,将其转入农杆菌,挑选阳性单菌落转入烟草中,注射后培养 2~3 d,在共聚焦显微镜下进行荧光检测。

2.2.6 原生质体转化 参考 Dr. Sheen's Lab(http://genetics.mgh.harvard.edu/sheenweb/protocols_reg.html)的操作手册进行拟南芥原生质体制备,利用 PEG 介导的方式进行原生质体转化,取出转化后的原生质体于载玻片上,荧光共聚焦显微镜观察。

3 结 果

3.1 *Curcin*、*Curcin C* 在种子萌发及幼苗生长过程中的动态变化

为了探究 *Curcin* 和 *Curcin C* 基因在胚乳和子叶中的表达量情况,我们采用了 qRT-PCR 实验对 *Curcin* 基因和 *Curcin C* 基因在种子萌发及幼苗生长过程中各个时期的胚乳、子叶中的表达水平进行了定量分析,研究结果表明(图 1),*Curcin* 基因在种子萌发过程中的胚乳中的表达呈现 C₁、C₃ 期逐渐增加,C₅、C₇、C₉ 开始出现下降,C₁₃、C₁₅、C₁₇ 期最少,呈现出先增加后减少的趋势。然而,*Curcin* 在子叶中基本没有表达^[4]。*Curcin C* 基因则在种子萌发的初始阶段胚乳中 C₃ 期表达量最高,随着萌

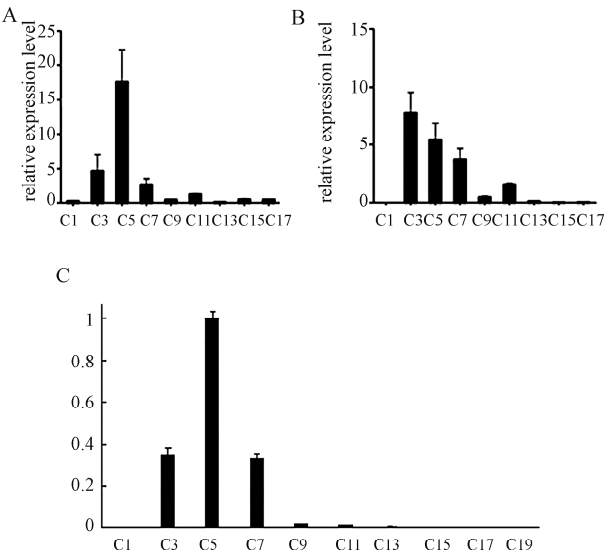


图 1 不同萌发时期 *Curcin*、*Curcin C* 基因在胚乳、子叶中的表达分析
A: 胚乳 *Curcin*; B: 胚乳 *Curcin C*; C: 子叶 *Curcin C*
Fig. 1 Expression analysis of *Curcin*, *Curcin C* gene at different seed germination stages of endosperm and cotyledon

发过程的进行,表达量逐渐下降,在 C₁₅、C₁₇ 期几乎

检测不到。在子叶中,*Curcin C* 基因的表达经历了“从无到有,先上升后下降”的过程,*Curcin C* 的转录产物首先在 C3 期出现,其表达量在 C5 时期达到最大值,随后迅速下降,到 C9 期时,其水平不到最高期的 10%,到 C15 期就低至无法检测的水平了。

3.2 *Curcin*、*Curcin C* 在幼苗中的组织特异性表达

为了探究核糖体失活蛋白在幼苗中各个组织中的表达情况,我们收集了 C11 时期的幼苗,分别以该时期的根、下胚轴和真叶为对象进行荧光定量实验和 Western blot 杂交鉴定。荧光定量结果显示(图 2A),可以看出,在子叶、真叶组织中 *Curcin* 基因的表达量比 *Curcin C* 基因的表达量低,*Curcin* 基因在这四种组织中的表达量都特别低;对于 *Curcin C* 基因来说,在真叶和子叶中的表达量很高,而在根和下胚轴中几乎检测不到。Western 杂交实验显示(图 2B、C),*Curcin* 蛋白在根、下胚轴、子叶和真叶中几乎不表达;*Curcin C* 蛋白则在根、下胚轴中不表达,而在子叶和真叶中表达,且在子叶中表达量高于真叶的表达量。荧光定量实验检测 *Curcin*、*Curcin C* 基因的表达情况与 Western 实验检测结果基本一致。

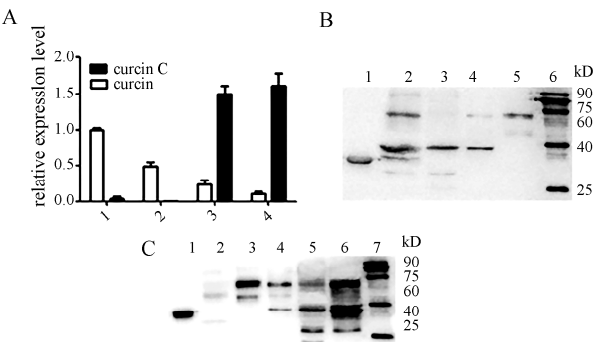


图 2 *Curcin*、*Curcin C* 组织特异性表达分析
A: *Curcin*、*Curcin C* 基因组织表达分析(1: 根; 2: 下胚轴; 3: 子叶; 4: 真叶); B: 各组织器官中 *Curcin* 的含量研究(1: *Curcin* 纯品; 2: 真叶; 3: 子叶; 4: 下胚轴; 5: 根; 6: Marker); C: 各组织器官中 *Curcin C* 的含量研究(1: *Curcin C* 纯品; 2: *curcin*; 3: 根; 4: 下胚轴; 5: 真叶; 6: 子叶; 7: Marker)
Fig. 2 Tissue-specific expression analysis of *Curcin*, *Curcin C*

3.3 *Curcin* 和 *Curcin C* 的亚细胞定位研究

为了进一步确定 *Curcin*、*Curcin C* 蛋白在亚细胞结构上的定位,进而研究其在种子萌发和幼苗生长中所具有的功能。我们首先利用在线网站(<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-PLoc-2/>、<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)

对 Curcin、Curcin C 蛋白信号肽、亚细胞定位进行预测,结果显示两种蛋白都含有信号肽且都定位在细胞壁上. 为了对预测结果进行验证,我们分别构建了 *Curcin:GFP* 和 *Curcin C:GFP* 融合蛋白的植物表达载体,以 *35S:GFP* 为对照载体,分别用根癌农杆菌介导侵染烟草叶片法和原生质体转化法让其在植物细胞中瞬间表达,在激光共聚焦显微镜下检测荧光信号,确定亚细胞定位信息. 实验结果如下:阳性对照组为图 3A(g、h、i),可以看到在烟草表皮细胞的细胞膜(壁),细胞核,细胞质中都

有表达,*Curcin*、*Curcin C* 蛋白的结果分别如图 3A(a、b、c 和 d、e、f),在细胞膜(壁)上可以看到荧光信号,由此可以初步的确定这两种蛋白定位在细胞壁或者细胞膜上. 之后进行亚细胞定位实验,结果如下,阳性对照如图 3B(a、b、c、d),在细胞质中检测到了荧光信号,而对于实验组(图 3B(e、f、g、h 和 i、g、k、l))未检测到荧光信号. 结合这两种方法的实验结果,可以从侧面间接的说明这两种蛋白可能定位在细胞壁上,通过分泌到细胞外发挥相应的生物学作用. 该结果与网站预测的结果基本一致.

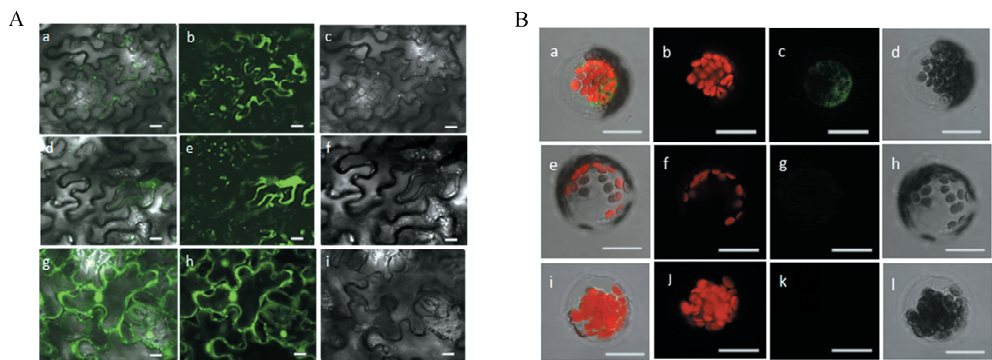


图 3 *Curcin*、*Curcin C* 蛋白亚细胞定位分析
A: a-c: *m-GFP-Curcin* 融合蛋白, d-f: *m-GFP-Curcin C* 融合蛋白, g-i: 阳性对照, 融合图片 (a、d 和 g), GFP 荧光 (b、e 和 h), 白视野 (c、f 和 i); B: a-d: 阳性对照, e-h: *m-GFP-Curcin* 融合蛋白, i-l: *m-GFP-CurcinC* 融合蛋白, 融合图片 (a、e 和 i), GFP 荧光 (c、g 和 k), 白视野 (d、h 和 l); bar 的长度: A 图是 0.1 mm, B 图是 30 μm .

Fig. 3 Subcellular localization analysis of *Curcin* and *Curcin C*

4 讨 论

Curcin、*Curcin C* 蛋白是分别从麻疯树的种仁和子叶中提取分离纯化出来的,为了更深入的了解这两种蛋白的生物学功能,本文首先对麻疯树种子萌发和幼苗生长过程中各个组织器官的动态变化进行了相关的研究,通过收集不同萌发时期的胚乳和子叶材料,探讨了麻疯树种子萌发和幼苗生长过程中 *Curcin*、*Curcin C* 基因在胚乳和子叶中的表达情况,并推测其在萌发及幼苗生长中所发挥的生物学作用,进而加快探索核糖体失活蛋白在生物体内存在意义的进程. 之后对 *Curcin*、*Curcin C* 蛋白的组织特性进行了相关的研究,研究发现, *Curcin* 基因在这四种组织中的表达量都特别低,可以认为几乎不表达,结合 *Curcin* 基因在种子萌发中的动态变化的研究,以及 *Curcin* 蛋白的抗真菌、抗病毒活性等,由此推测,该蛋白可能是在种子萌发过程中,既作为一种贮藏蛋白,为种子后续的萌发提供营养物质,又作为一种防御性蛋白维护种子的正常萌发起到一定的作用. *Curcin C* 蛋白在真叶和

子叶中都有表达,由此推测它可能是一种诱导性蛋白,在发育过程、胁迫,病毒感染等生物学过程中表达,起着保护植物正常生长的作用.

通过对核糖体失活蛋白 *Curcin*、*Curcin C* 的生物信息学的分析得出这两种蛋白质的亚细胞定位预测及信号肽的分析,对于后续的对这两种核糖体失活蛋白的研究奠定相应的基础. 蛋白质在亚细胞结构中的定位,直接影响着其在生物体内功能作用的发挥,为了进一步探究两种核糖体失活蛋白的定位,之后通过将核糖体失活蛋白 *Curcin*、*Curcin C* 基因构建绿色荧光蛋白表达载体,注射烟草和转化拟南芥原生质体后,采用激光共聚焦显微镜观察这两种蛋白的亚细胞结构的定位,综合两种实验结果表明,这两种蛋白可能定位在细胞壁上.

文献研究结果表明: I 型核糖体失活蛋白在亚细胞结构中定位主要有:细胞间隙处(dioicin 1、dioicin 2、Gypsophilin)、细胞壁和细胞膜之间的拟壁体(皂草素)以及叶肉细胞的细胞壁基质(PAP)^[10-13]. 众所周知,核糖体失活蛋白对核糖体具有一定的抑制作用,而这种特殊的定位分离了蛋

白与自身细胞核糖体,使其自身细胞不会受到核糖体失活蛋白的毒害作用^[14]. 并且,一般来说膜定位的蛋白质一般会存在至少一个跨膜结构域,通过对这两种蛋白进行跨膜结构域的预测,发现并未含有跨膜结构域,结合相关文献及实验结果,从而推测这两种蛋白定位在细胞壁上,通过分泌到胞外来发挥相应的生物学功能.

参考文献:

[1] 陈翼胜, 郑硕. 中国有毒植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 258.

[2] 郑万均, 中国树木志(第三卷)[M]. 北京: 中国林业出版社, 1998: 2977.

[3] Jummai A T, Okoli B J. Curcin from *Jatropha curcas* seed as a potential anthelmintic[J]. *Adv Med Plant Res*, 2014, 6: 2277.

[4] Zhang Y, Qian Y, Li C, *et al.* Curcin C, a novel type I ribosome-inactivating protein from the post-germinating cotyledons of *Jatropha curcas* [J]. *Amino Acids*, 2017, 49.

[5] 林娟. 麻疯树(*Jatropha curcas*)毒蛋白(Curcin)的分离纯化、基因克隆及作用机理研究[D]. 成都: 四川大学, 2002.

[6] 魏琴, 廖毅, 周黎军, 等. 麻疯树毒蛋白(Curcin)的抗真菌活性研究[J]. *中国油料作物学报*, 2004, 26: 71.

[7] 邵子静, 蒋楠, 晏华立, 等. 麻疯树核糖体失活蛋

白 Curcin2 的原核可溶性表达及其抗真菌活性研究 [J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33: 43.

[8] Lin J, Yan F, Tang L, *et al.* Antitumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas* [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24: 241.

[9] Puri M, Kaur I, Perugini M A, *et al.* Ribosome-inactivating protein: current status and biomedical applications [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17: 774.

[10] Dang L, Rougé P, Damme E J M V. Expression analysis of ribosome-inactivating proteins from cucumber [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2017, 44: 929.

[11] Parente A, Conforto B, Maro A D, *et al.* Type I ribosome-inactivating proteins from *Phytolacca dioica* L. leaves: differential seasonal and age expression, and cellular localization [J]. *Planta*, 2008, 228: 963.

[12] Carzaniga R, Croy R R D. Cellular and subcellular distribution of saporins, type-I ribosome-inactivating proteins, in soapwort (*Saponaria officinalis* L.) [J]. *Planta*, 1994, 194: 461.

[13] Cola A D, Marcozzi G, Balestrini R, *et al.* Localization of the type I ribosome-inactivating protein, luffin, in adult and embryonic tissues of *Luffa cylindrica* L. Roem [J]. *J Exp Bot*, 1999, 50: 573.

[14] 付饶. 美洲商陆抗病毒蛋白Ⅱ在油菜细胞中的定位及信号肽修饰的初步研究[D]. 北京: 北京师范大学, 2008.

引用本文格式:
中 文: 张敬, 吉柔风, 杨千, 等. 两种麻疯树核糖体失活蛋白基因 *Curcin* 和 *Curcin C* 的在种子萌发过程中的表达模式研究 [J]. *四川大学学报: 自然科学版*, 2021, 58: 016001.
英 文: Zhang J, Ji R F, Yang Q, *et al.* Study on the expression patterns of two ribosome inactivated protein genes *Curcin* and *Curcin C* of *Jatropha curcas* during the process of seed germination [J]. *J Sichuan Univ: Nat Sci Ed*, 2021, 58: 016001.