

小叶杨 *CCH* 基因的克隆及其在重金属胁迫下的表达模式

刁 姝, 苏晓华, 丁昌俊, 张冰玉*

(林木遗传育种国家重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091)

摘要:利用生物信息学与分子生物学相结合的策略克隆了小叶杨 *CCH* 基因, 基因编码区全长 258 bp, 编码由 85 个氨基酸残基构成的蛋白质, 蛋白 N 端具有与铜离子结合的保守功能域 MXCXXC, 且具有铜伴侣蛋白典型的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 二级结构, 命名为 *PsCCH*。系统进化分析表明: *PsCCH* 蛋白与橡胶、麻疯树、葡萄的 *CCH* 蛋白的亲缘关系最近(相似性 90%~93%)。通过实时定量 PCR 方法对其在不同浓度铜离子、其它重金属离子及植物生长激素处理下的表达模式进行了分析。结果表明:小叶杨 *PsCCH* 的表达受多种重金属及植物激素的调控, 在低浓度铜离子、铝离子、锌离子、水杨酸处理下, 其 mRNA 表达先上升而后下降; 而在高浓度铜离子、钴离子、汞离子、茉莉酸处理下则是持续下降。

关键词:小叶杨; 铜伴侣蛋白; 基因表达; 重金属胁迫

中图分类号: S718.6

文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of *PsCCH* from *Populus simonii* under Stresses of Heavy Metal

DIAO Shu, SU Xiao-hua, DING Chang-jun, ZHANG Bing-yu

(State Key Laboratory of Forest Genetics and Tree Breeding, Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China)

Abstract: The *CCH* gene from *Populus simonii* leaf was cloned according to a strategy combining bioinformatics and molecular biological approaches and its expression in response to heavy metals and plant growth regulators was detected by qPCR. This gene encodes a polypeptide of 85 amino acids, named as *PsCCH*. The deduced amino acid sequence of *PsCCH* possesses the conserved metal-binding motif in its N-terminal (MXCXXC) and has the classic $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ -fold structure. Phylogeny analysis showed that the *PsCCH* was much closer to the *CCH* from *Hevea brasiliensis*, *Jatropha curcas* and *Vitis vinifera* (with 90% - 93% in amino acids similarity). The results of qPCR showed that the expression of *PsCCH* was regulated by various heavy metals and plant growth regulators; the *PsCCH* transcripts increased within one hour and then decreased to a lower level after 3 hours, such as in zinc, aluminum, low copper and jasmonic acid treatments; and the *PsCCH* transcripts continuously decreased during the treatment, such as in high copper, cobalt, mercury and salicylic acid treatments.

Key words: *Populus simonii*; copper chaperone; gene expression; heavy metal stress

铜作为植物必需的微量元素之一, 以铜离子形式参与植物体内一些重要代谢过程; 然而, 高浓度的

收稿日期: 2013-02-26

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(863 计划)课题(2011AA100201)

作者简介: 刁 姝(1987—), 女, 硕士生, 研究方向为林木基因工程. E-mail: diaoshu0802@163.com

* 通讯作者: 研究员, 研究方向为林木基因工程. Tel: 010-62889661; E-mail: byzhang@caf.ac.cn

铜离子会引起自由基的形成,造成氧化破坏,从而对植物产生毒性^[1]。铜伴侣蛋白是生物体内广泛存在的、参与调控细胞内铜离子水平的重要蛋白,它能与铜离子结合并转运铜离子,保护机体免受游离铜离子的毒性作用,是生物体铜稳态调节的重要蛋白^[2-3]。植物的铜伴侣蛋白由铜伴侣蛋白基因编码,拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.) *AtCCH* 是植物中第一个克隆的类 *Atx1* 铜伴侣蛋白基因。*AtCCH* 具有植物所特有的 C 末端延伸区域以及保守的铜离子结合位点 MXCXXC,并能使酵母突变体 *atx1* 恢复铜离子转运功能^[4]。*AtCCH* 在衰老叶片中以及氧化胁迫后大量表达,当外施过量铜离子(1 mmol · L⁻¹),则抑制 *AtCCH* 的表达,说明 *AtCCH* 在叶片衰老和铜离子转运中具有重要作用^[5-6]。目前,已经在银白杨和欧洲山杨的杂种(*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*)、黄瓜(*Cucumis sativus* Linn.)、西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum* Laxm.)等植物中克隆了 *CCH* 铜伴侣蛋白基因,该基因在植物根、茎、叶中均有表达,并受到铜离子等多种重金属离子、高盐胁迫、植物生长素等多种因素的调控^[7-9]。

小叶杨(*P. simonii* Carr.)是我国特有乡土树种之一,具有较强的抗重金属污染能力^[10]。为了阐明小叶杨 *CCH* 基因的功能,本文作者克隆了小叶杨 *CCH* 基因(*PsCCH*),并以水培苗为材料,采用实时定量 PCR 的方法对其在不同浓度铜离子、重金属胁迫以及生长因子胁迫下的表达量进行了比较分析,以探讨小叶杨 *PsCCH* 基因抗重金属胁迫的作用机制,为培育抗重金属污染的杨树新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 小叶杨 *PsCCH* 的克隆、序列及系统进化树的构建

以小叶杨叶片为材料,采用 QIAGEN RNeasy Plant Mini 试剂盒提取总 RNA。取 2 μg 总 RNA,以 PrimeScript II 第一链 cDNA 合成试剂盒(Takara 公司,大连)进行反转录,并以此为模板进行 PCR 扩增。根据 *PoCCH* 基因^[7]以及毛果杨(*P. trichocarpa* Torr. & A. Gray)同源序列(XM_002310997.1)设计引物,用正向引物 Cu-F1(5'-ATGTCTCAGACTGTT-GTCCT-3')和反向引 Cu-R(5'-TTATGCAGCAGC-CACGGTTT-3')进行 *PsCCH* 基因编码区(Coding sequence, CDS)序列扩增。PCR 扩增体系包含 1 × GC

缓冲液,60 μg · L⁻¹ cDNA, 200 μmol · L⁻¹ dNTPs, 0.2 μmol · L⁻¹ PCR 引物,1 Unit Taq-酶。扩增程序为先 94 °C 预变性 1 min;94 °C 30 s,59 °C 30 s, 72 °C 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。扩增产物纯化后,连接到 T-easy 载体(Promega 公司,美国),转化大肠杆菌 JM109,通过蓝白斑筛选,挑取阳性克隆进行序列测定。

采用 QIAGEN DNeasy Plant Mini 试剂盒提取小叶杨叶片基因组 DNA,并用上述引物进行基因组 DNA 扩增,获得 *PsCCH* 基因组序列。应用 DNAMAN 软件(Version 6)进行序列分析,在线预测蛋白二级结构(<https://www.predictprotein.org>)。从 NCBI (National Center for Biotechnology Information)网站上,下载拟南芥及其它物种 CCH 蛋白序列,利用 MEGA5.05 软件建立基于氨基酸序列的邻位连接法(NJ,neighbor-joining)系统发育树,遗传距离采用 p-距离,bootstrap 1 000 次检验系统发育树各分支的支持值。

1.2 小叶杨的胁迫处理

以 Hoagland's Solution 培养的小叶杨苗(苗高 30 cm)为材料,通过向培养液中添加 CuSO₄ (50 μmol · L⁻¹, 500 μmol · L⁻¹), ZnSO₄ (250 μmol · L⁻¹), AlCl₃ (300 μmol · L⁻¹), CoCl₂ (3 000 μmol · L⁻¹), HgCl₂ (300 μmol · L⁻¹), 水杨酸(SA, 20 μmol · L⁻¹)和茉莉酸(JA, 10 μmol · L⁻¹)等进行重金属及植物生长调节剂处理,分别在处理后 1、3 h 取功能叶,并迅速在液氮中冷冻,之后保存于 -80 °C 冰箱中备用。

1.3 小叶杨 *PsCCH* 胁迫处理后表达量的 RT-qPCR 检测

采用 QIAGEN RNeasy Plant Mini 试剂盒提取各种处理后的叶片总 RNA。总 RNA 用无 RNase 的 DNase 在 37 °C 下处理 15 min,琼脂糖凝胶(0.8%)电泳检测总 RNA 质量之后,用核酸蛋白定量仪测定总 RNA 的浓度。取 5 μg 经过处理的总 RNA 进行反转录合成第一链 cDNA,用无 RNase 的去离子水以 1:10 进行稀释作为实时 PCR 模板, -20 °C 冰箱保存备用。

对各种处理后的小叶杨 *PsCCH* 基因表达量进行 RT-qPCR 检测。20 μL 实时定量 PCR 反应体系中含有 1 μL 第 1 链 cDNA, 200 nmol · L⁻¹ 的引物和 1 × SYBR PCR 混合物(大连宝生物公司)。使用 ABI Prism 7500 荧光定量 PCR 仪,反应条件为 94 °C

变性 5 min,然后在 94 °C 变性 10 s、55 °C 退火 10 s、72 °C 延伸 35 s 条件下进行 40 个循环,并在 72 °C 时收集荧光信号。每个反应进行 4 次重复。以 UBQ 为内参,*PsCCH* 实时定量 PCR 引物序列为:5'-GTCATGCGAAGGCTGTGTT-3' 和 5'-GTTTCTGCAGGCTTTGCTG-3'。

2 结果与分析

2.1 小叶杨 *PsCCH* 的克隆及序列分析

以小叶杨 cDNA 为模板,用 *CCH* 全长引物 Cu-F1、Cu-R1 进行扩增,扩增产物为 258 bp 长的片段。双向测序结果表明:该序列包含完整的 CDS 序列,编码由 85 个氨基酸残基构成的蛋白质。预测编码蛋白质的分子量为 8.908 kD,等电点 (*PI*) 为 6.58。蛋白 N 端具有铜伴侣蛋白典型的与铜离

子结合的保守功能域 MXCXXC, C 端具有富含赖氨酸区域(图 1),蛋白质二级结构为铜伴侣蛋白典型的 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 结构。用推导的 *PsCCH* 蛋白序列进行 Genbank BLASTP 搜索,其氨基酸序列与从银白杨和欧洲山杨的杂种 (gb|AAT12488.1|) 悬浮细胞中克隆的 *PoCCH* 基因编码的蛋白一致性达 100%,与其他多种植物的 *CCH* 基因编码的蛋白也有较高的一致性(83%~93%),其中,与橡胶 (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. Arg.)、麻疯树 (*Jatropha curcas* Linn.)、葡萄 (*Vitis vinifera* Linn.) 一致性达 90%~93%。进一步的系统进化分析也证实,小叶杨 *PsCCH* 与橡胶、麻疯树 *CCH* 蛋白的亲缘关系最近(图 2);因此,推断该基因为小叶杨铜伴侣蛋白基因,命名为 *PsCCH*。

```

1      ATGTCTCAGACTGTTGTCCTCAAGGTTGGTATGTCATGCGAAGGCTGTGTTGGGGCTGTG
1      M S Q T V V L K V G M S C E G C V G A V
61     AAAAGGGTTTTGGGCAAAATGGAAGGTGGAATCATAACGACATTGATTTGAAGGAGCAA
21     K R V L G K M E G V E S Y D I D L K E Q
121    AAAGTCACAGTGAAGGAAATGTGCAGCCAGATGCTGTTCTTCAGACCGTCTCTAAGACC
41     K V T V K G N V Q P D A V L Q T V S K T
181    GGAAGAAGACTGCCTTCTGGGAAGCAGAGGCCAGCTGAACCAGCAAAGCCTGCAGAA
61     G K K T A F W E A E A P A E P A K P A E
241    ACCGTGGCTGCTGCATAA
81     T V A A A *

```

图 1 小叶杨 *PsCCH* 基因 CDS 序列及对应的氨基酸序列(双线处为铜离子结合位点,单线处为富含赖氨酸区域)

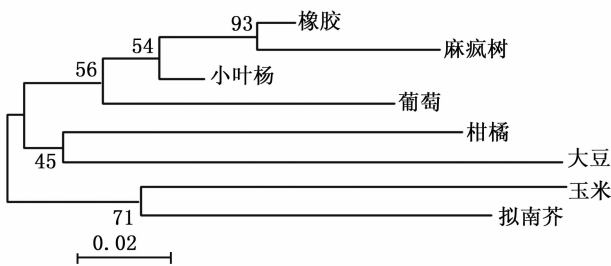


图 2 通过 MEGA5.0 获得的小叶杨 *PsCCH* 推导蛋白与其他植物 *CCH* 蛋白系统进化树(树上的数字表示 bootstrap 支持率)

采用 *CCH* 全长引物扩增出了该基因基因组序列,扩增片段 DNA 全长为 786 bp,序列分析表明,该片段含有 2 个外显子和 1 个内含子,长度分别为 87、528、171 bp。

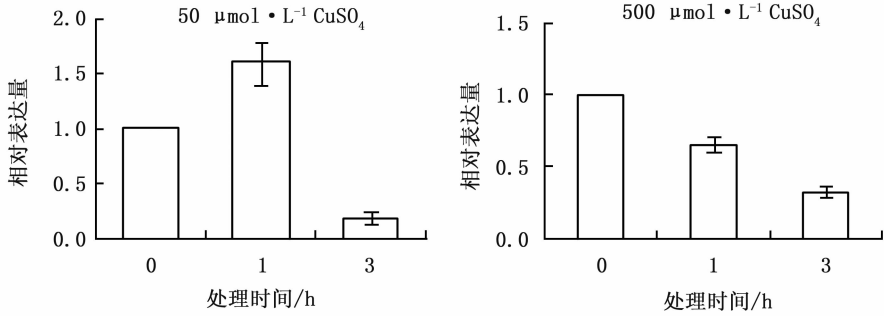
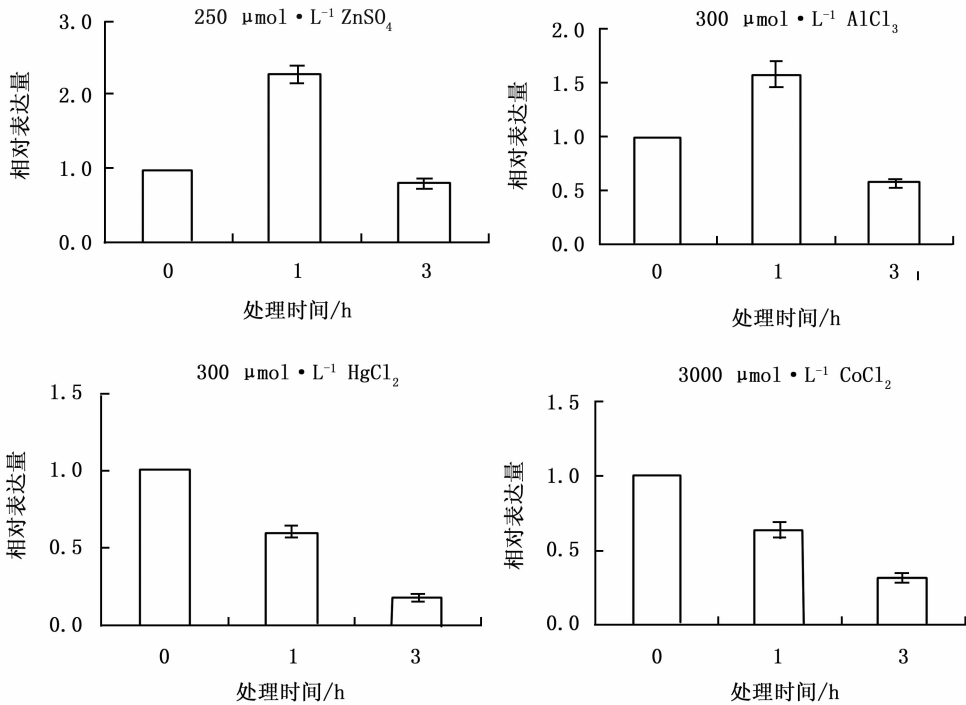
2.2 不同浓度铜离子处理下小叶杨 *PsCCH* 的表达

实时定量 PCR 结果(图 3)表明:小叶杨 *PsCCH* 基因对不同浓度铜离子处理的反应不同,当用 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 低浓度 CuSO_4 处理时,1 h 后小叶杨

PsCCH 的表达量约提高了 57.5%,3 h 后是处理前的 18.0% 左右;当用 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 高浓度 CuSO_4 处理时,小叶杨 *PsCCH* 表达量持续下降,1 h 是处理前的 64.4%,3 h 是处理前 32.2%。

2.3 其它重金属处理下小叶杨 *PsCCH* 的表达

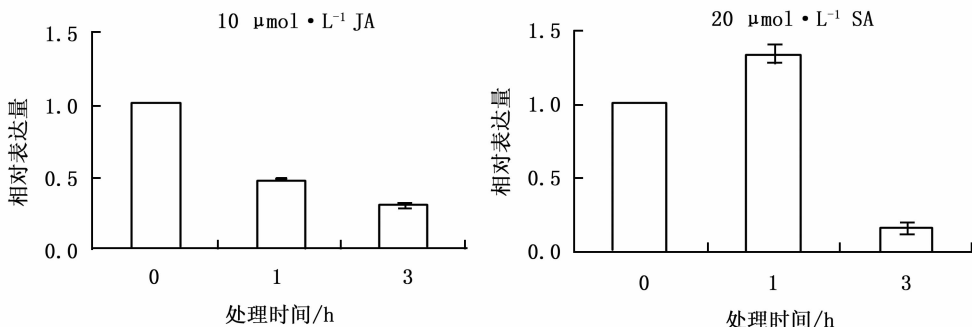
在 ZnSO_4 等其它重金属处理下,*PsCCH* 基因的表达也发生了很大变化。250 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ZnSO_4 处理 1 h,其表达量是处理前的 2.25 倍,3 h 后 *PsCCH* 的表达量又降至处理前的 77%;300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AlCl_3 处理后 1 h,*PsCCH* 的表达量是处理前的 1.6 倍,3 h 后其表达量降至处理前的 55%;300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HgCl_2 处理,*PsCCH* 表达量持续下降,1 h 后其表达量降至处理前的 60%,3 h 后表达量降至处理前的 17%;3 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 处理,*PsCCH* 表达量持续下降,1 h 时其表达量降至处理前的 62.5%,3 h 后表达量降至原来的 30.6%(图 4)。

图3 小叶杨 *PsCCH* 基因在不同浓度 CuSO_4 溶液处理下的表达情况图4 小叶杨 *PsCCH* 基因在 ZnSO_4 等其它溶液处理下的表达情况

2.4 植物生长激素(JA,SA)处理下小叶杨 *PsCCH* 的表达

为了检测小叶杨 *PsCCH* 基因是否受到外源植物生长激素的调控,本文作者检测了小叶杨 *PsCCH* 基因对JA、SA的反应。实时定量PCR结果显示:当

用 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ JA 处理时,*PsCCH* 的表达量持续降低,1 h 后 *PsCCH* 的表达量降至处理前的 45%,3 h 后降至处理前的 30%;用 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 处理 1 h 时, *PsCCH* 的表达量增加了 30%,3 h 后又降至很低的水平,约为处理前的 16%(图 5)。

图5 小叶杨 *PsCCH* 基因在植物生长调节剂茉莉酸(JA)和水杨酸(SA)处理下的表达情况

3 结论与讨论

本研究获得了完整的小叶杨 *PsCCH* 基因编码序列及基因组序列,由基因编码序列推断其编码 85 个氨基酸,分子质量为 8.908 kD,该蛋白能够形成 $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ 的二级结构,其 N 端具有保守的铜离子结合位点 MXCXXC,且与其它植物 CCH 蛋白具有较高的同源性,因此,获得的铜伴侣蛋白属于 CCH 类铜伴侣蛋白。

植物 *CCH* 基因的表达受到铜离子浓度的调控:高浓度铜离子会抑制其 mRNA 的表达,铜离子缺失的条件下,*CCH* 表达会提高^[5,7,11]。除此之外,植物 *CCH* 基因的表达还与各种非生物胁迫甚至于生物胁迫相关^[5,7]。尽管小叶杨 *PsCCH* 基因与杂种杨悬浮细胞中克隆的 *PoCCH* 基因^[7] 编码蛋白的一致性达到 100%,但二者在相同处理条件下的表达模式却存在很大的不同。杂种杨悬浮细胞在 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铜离子处理下,0.5 h 就能够检测到 *CCH* 基因表达水平降低,6 h 后才恢复到处理前的水平;而 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铜离子处理促进了小叶杨 *PsCCH* 基因的表达(处理 1 h),之后逐渐降低,在 3 h 后其表达水平甚至比处理前更低。同样,在锌离子和铝离子处理下,杂种杨悬浮细胞 *PoCCH* 基因表达逐渐增加,而在同等条件下小叶杨 *PsCCH* 基因是先升高(处理 1 h)后下降至比处理前更低的水平(处理 3 h)。在植物生长激素处理下,小叶杨 *PsCCH* 基因的表达也与杂种杨悬浮细胞 *PoCCH* 表达完全不同: $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ JA 处理 3 h 过程中,*PsCCH* 的表达量持续降低;在 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ SA 处理下,其表达量先增加,而 3 h 后又降至比处理前更低的水平;而 *PoCCH* 基因在同等浓度的 JA 和 SA 处理下,0.5 h 后 2 种处理的 *CCH* 基因转录本没有变化,6 h 后用 JA 处理的 *CCH* 基因转录本明显增加,用 SA 处理后的 *CCH* 基因的转录本增加不明显。导致这种表达差异的可能原因主要有以下 2 个方面,一是杨树树种对重金属离子抗性的差异,二是所用实验材料的差异。Lee 等^[7] 所用的材料为银白杨和欧洲山杨的杂种,其抗重金属的能力较差,且其所用的材料为杨树的悬浮细胞,是未分化细胞团,而本文所用的材料是对重金属具有较强抗性、整株小叶杨苗,与悬浮细胞相比,整株植物已经分化出了各种器官和组织,具有更强的抵抗力和自我保护调控机制。如 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铜离子已经对该杂种杨造成了毒害,所以其 *CCH* 基因

表达下降,而同等浓度的铜离子并未对小叶杨造成伤害,反而促进了 *CCH* 基因表达,只有当植株吸收了足够多的铜离子后,*CCH* 基因表达下调,来避免过多吸收铜离子。

植物激素在植物应对各种生物胁迫及非生物胁迫过程中起重要的信号调控作用^[12]。小叶杨 *PsCCH* 基因在各种重金属处理下有 2 种表达模式,一种是先上升而后下降,与 SA 处理下 *CCH* 基因的表达模式类似;另一种是持续下降,与 JA 处理类似。据此推测,不同重金属处理可能启动了杨树不同的信号通路,从而导致了小叶杨 *PsCCH* 基因不同的表达模式。

参考文献:

- [1] Karlstrom A R, Levine R L. Copper inhibits the protease from human immunodeficiency virus 1 by both cysteine-dependent and cysteine-independent mechanisms[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88(13): 5552 - 5556.
- [2] Puig S, Thiele D J. Molecular mechanisms of copper uptake and distribution[J]. Curr Opin Chem Biol, 2002, 6(2): 171 - 180.
- [3] Laliberte J, Labbe S. The molecular bases for copper uptake and distribution: lessons from yeast[J]. Med Sci (Paris), 2008, 24(3): 277 - 283.
- [4] Harrison M D, Jones C E, Dameron C T. Copper chaperones: function, structure and copper-binding properties [J]. J Biol Inorg Chem, 1999, 4(2): 145 - 153.
- [5] Mira H, Martinez-Garcia F, Penarrubia L. Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH[J]. Plant J, 2001, 25(5): 521 - 528.
- [6] Puig S, Mira H, Dorcey E, et al. Higher plants possess two different types of ATX1-like copper chaperones[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 354(2): 385 - 390.
- [7] Lee H, Lee J S, Bae E K, et al. Differential expression of a poplar copper chaperone gene in response to various abiotic stresses[J]. Tree Physiol, 2005, 25(4): 395 - 401.
- [8] 井 鑫, 张兴国. 黄瓜 *CCH* 基因的生物信息学及表达分析[D]. 重庆: 西南大学, 2006: 32 - 39.
- [9] 刘关君, 曲春浦, 刘明坤, 等. 西伯利亚蓼铜伴侣蛋白基因在盐胁迫条件下的表达分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(11): 1034 - 1039.
- [10] 智颖颀, 王再岚, 王中生, 等. 公路绿化植物油松 (*Pinus tabulaeformis*) 和小叶杨 (*Populus simonii*) 对重金属元素的吸收与积累 [J]. 生态学报, 2007, 27(5): 1863 - 1872.
- [11] Company P, Gonzalez-Bosch C. Identification of a copper chaperone from tomato fruits infected with *Botrytis cinerea* by differential display[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(4): 825 - 830.
- [12] Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones J D. Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism[J]. Annu Rev Phytopathol, 2011, 49: 317 - 343.