

巴西橡胶树 *HbHEV3* 基因的克隆和表达分析

朱家红¹, 徐靖², 畅文军¹, 张治礼^{2*}

(1 中国热带农业科学院热带作物生物技术研究所, 农业部热带生物技术重点开放实验室, 海口 571101; 2 海南省农业科学院, 海口 571100)

摘要: 根据 EST 序列信息, 通过 RT-PCR 获得了一个编码橡胶素前体的基因, 命名为 *HbHEV3*。*HbHEV3* 编码区 cDNA 长度为 630 bp, 编码 209 个氨基酸。预测的 *HbHEV3* 蛋白包含 1 个信号肽, 1 个具有几丁质结合特性的 Hevein 结构域和 1 个 Barwinn 结构域, *HbHEV3* 与橡胶树及其他植物中类似蛋白具有很高的同源性。分离获得了 *HbHEV3* 起始密码子上游 1 050 bp 的启动子序列, 该序列含有众多应答激素和胁迫信号元件。实时荧光定量 PCR 分析结果表明, *HbHEV3* 在所检测的组织中均有表达, 其中在胶乳中的表达量最高, 乙烯诱导能显著上调胶乳中 *HbHEV3* 的表达。研究表明, *HbHEV3* 可能参与了橡胶树乙烯介导的防御反应, 并在橡胶凝集过程中具有重要功能。

关键词: 巴西橡胶树; 橡胶素; 基因表达; 乙烯利

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning and Expression Analysis of *HbHEV3* Gene from *Hevea brasiliensis*

ZHU Jiahong¹, XU Jing², CHANG Wenjun¹, ZHANG Zhili^{2*}

(1 Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Tropical Biotechnology, Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 2 Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China)

Abstract: Based on EST sequence, we cloned a gene named *HbHEV3* coding prohevein. Sequence analysis revealed that *HbHEV3* ORF cDNA length was 630 bp, encoding 209 amino acids. *HbHEV3* shared high identities to prohevein from *Hevea brasiliensis* and other plants, had the typical structure of prohevein, containing a signal peptide, a conserved hevein/chitin binding domain and a Barwinn domain. The 1 050 bp promoter sequence of *HbHEV3* was isolated and several regulatory elements related to hormone and stress responses were found in promoter region. The real-time PCR results indicated *HbHEV3* was expressed in all detected organs, in which, the transcripts of *HbHEV3* were higher in latex than that in other organs, and *HbHEV3* was also induced significantly by ethephon. The results showed that *HbHEV3* may be involved in ethylene-mediated defense responses and may play an important role in the process of latex aggregation.

Key words: *Hevea brasiliensis*; hevein; gene expression; ethephon

植物凝集素是一类在植物界普遍存在的能够与单糖或寡糖特异性可逆结合的蛋白质^[1]。许多证据

表明, 植物凝集素在防御反应中扮演着重要的角色, 它们在植物的生长发育阶段以不同的方式参植物对

收稿日期: 2014-03-18; 修改稿收到日期: 2014-06-13

基金项目: 国家自然科学基金(31360193); 中央级公益性科研院所业务费专项资金(ITBB110201); 海南省重大科技项目子课题热带生物种质与基因资源研究(ZDZX2013023-1)

作者简介: 朱家红(1982—), 男, 助理研究员, 主要从事植物分子遗传学研究。E-mail: hjzhu1010@163.com

* 通信作者: 张治礼, 研究员, 主要从事植物分子遗传学研究。E-mail: zzl_catas@hotmail.com

病原菌和捕食者侵害的免疫反应^[2-4]。根据植物凝集素的氨基酸序列的同源性及其进化关系,凝集素可分为豆科凝集素、单子叶植物甘露糖结合凝集素、包含橡胶素(hevein)结构域的壳多糖结合蛋白、2 型核糖体失活蛋白、葫芦科韧皮部凝集素、木菠萝素家族和苋科凝集素等 7 个蛋白质家族^[5]。

巴西橡胶树靠分布于体内的乳管系统产胶,当割胶切断乳管时,胶乳随之流出。胶乳中含有橡胶粒子、黄色体和 F-W 复合体等特化的细胞器^[6]。橡胶粒子凝固导致乳管堵塞是影响橡胶产量的重要因子^[7]。橡胶素是从橡胶树的胶乳中分离到的富含半胱氨酸(Cys)和甘氨酸(Gly)的小分子量单链蛋白质^[8]。橡胶素是胶乳中黄色体内的主要蛋白质之一,是引起橡胶粒子凝集的主要因子,同时橡胶素也是一种凝集素,具有较强的抗菌活性^[8-9]。先前的研究通过筛选乙烯利诱导的胶乳 SSH 文库获得 1 条编码 Hevein 的 EST 序列,本研究在此基础上对该基因进行克隆,对其表达和调控特征进行分析,为深入研究其在橡胶树中的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验所用巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)‘热研 7-33-97’来自中国热带农业科学院试验场。选取 6 年生的未开割树,用 1% 乙烯利进行诱导,处理方法参考 Hao 等^[10]的方法进行,采集处理后 0、3、6、12、24、48 h 的胶乳迅速置于液氮中冷冻,−70 °C 保存,同时采集橡胶树树皮、树叶和花等不同组织于液氮中迅速碾磨成粉末,−70 °C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 核酸提取和 cDNA 合成 橡胶树胶乳总 RNA 提取参考张治礼等^[11]的方法;其他组织 RNA 提取参照 Kiefer 等^[12]的方法;叶片 DNA 提取参考安泽伟等^[13]的方法;cDNA 第一条链合成采用北京全式金公司反转录试剂盒,具体步骤详见说明书。

1.2.2 *HbHEV3* 基因的克隆 用已获得的编码 Hevein 的 EST 序列在 NCBI 数据库中搜索,将搜索结果进行拼接,根据拼接结果设计特异引物 HbHEV3F (5′-TGCTGAGCAATGTGGTAGGCAA-3′)和 HbHEV3R (5′-CCCAATGTTATTAATTAATTAAT-3′)对 *HbHEV3* 全长 cDNA 序列进行扩增。PCR 扩增反应:94 °C 预变性 3 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物经回收和纯化后,

与 T 载体连接。将连接产物转至 DH5a 感受态细胞,通过 PCR 检测确定阳性克隆,送北京诺赛基因组研究中心有限公司测序。

1.2.3 *HbHEV3* 启动子区的克隆 用 Genome Walker 试剂盒(Clontech),根据 *HbHEV3* 的 5′ 端序列设计特异引物 GSP1 (5′-CACCACCCATACTGGCTACAACATAG-3′)和 GSP2 (5′-GCCACCTGCTTGCCTACCACAT-3′),分别和人工接头引物 AP1 和 AP2 配对,以构建好的 Genome Walker 文库为模板,对 *HbHEV3* 启动子区进行 2 轮 PCR 扩增,具体参见试剂盒说明书。目的条带经回收和纯化后与 T 载体连,进行测序鉴定。

1.2.4 生物信息学分析 用 ORF finder 分析 cDNA 序列的开放阅读框,蛋白质序列分析在 <http://www.expasy.org> 网站用相关软件完成,用 DNAMAN 软件进行多重序列比对,利用 PLACE 在线软件对 *HbHEV3* 启动子序列进行分析。

1.2.5 *HbHEV3* 表达分析 提取不同样品的 RNA,进行反转录,以 18S rRNA 作为内参,采用康为世纪公司的 SYBR Green RT-PCR One Step Kit 及 Mx3005P PCR 仪进行基因表达水平检测。用于定量 PCR 的 *HbHEV3* 引物为 QHEV3F (5′-GGACACAGATGGGAAAGGATATG-3′)和 QHEV3R (5′-TGGAGAATAGAGGGTTGAAGGA-3′);内参引物为 Q18SF (5′-GCTCGAAGACGATCAGATACC-3′)和 Q18SR (5′-TTCAGCCTTGCGACCATAC-3′)。具体反应体系为:模板 0.5 μL,上下游引物混合物 1 μL,2×SYBR Premix 10 μL,用水补足 20 μL;PCR 程序为 95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。

2 结果与分析

2.1 *HbHEV3* 的克隆和序列分析

将已获得编码 Hevein 的 EST 序列,作为种子序列在巴西橡胶树 EST 数据库中进行 Blast 搜索,将获得的同源序列和已有的 EST 序列进行拼接,获得 1 条 924 bp 的 cDNA 的序列,利用 NCBI 的 ORF Finder 分析该序列包含 1 个完整的 ORF。根据拼接结果设计特异引物对基因的编码区进行扩增,测序结果和拼接结果完全一致。将获得基因命名为 *HbHEV3*,该基因编码区 cDNA 长度为 630 bp,编码蛋白由 209 个氨基酸组成。

预测的 *HbHEV3* 蛋白分子量 22.38 kD,理论等电点 8.12。*HbHEV3* 具有典型的植物 Hevein

蛋白结构特征,包含 1 个 21 个氨基酸组成的信号肽,1 个具有几丁质结合特性的 Hevein 结构域和 1 个 Barwinn 结构域(图 1)。HbHEV3 与橡胶树中已有的 Hevein 蛋白 HEV1、HEV1.1、HEV1.2、HEV2.1 和 HEV2.2 的相似性分别为 82%、84%、89%、83%和 85%;HbHEV3 的 N 末端比橡胶树中已有的 Hevein 蛋白多出 4 个氨基酸残基,经进一步分析发现橡胶树中已有的 5 个 Helvin 基因 ATG 前 12 bp 处均含有 ATG 起始密码子,且 ATG 之后的序列具有连续的阅读框,所以现有的橡胶树中的 5 个 Hevein 蛋白序列并不完整,N 末端缺失了 4 个氨基酸残基(图 1,A)。HbHEV3 与蓖麻(*Ricinus communis*)、毛果杨(*Populus trichocarpa*)、桑树(*Morus notabilis*)和鹰嘴豆(*Cicer arietinum*)中相应蛋白的相似性分别为 86%、81%、77%和 71%(图 1,B)。

2.2 HbHEV3 启动子的克隆和序列分析

利用 Genome Walking 方法,通过 2 轮 PCR 获得 *HbHEV3* 起始密码子上游 1 050 bp 的启动子序列。利用 PlantCARE 在线软件对启动子序列进行分析,发现该序列具有真核生物典型启动子结构特征(图 2),除了含有多个 TATA-box 和 CAAT-box 等基本元件外,还含有众多应答激素和胁迫信号元件,如赤霉素响应元件 GARE、生长素响应元件 AuxRR-core 和 TGA-element、脱落酸响应元件 ABRE、水杨酸应答元件 TCA-element、乙烯响应元件 GCC-box、真菌响应元件 Box-W1、厌氧应答元件 ARE、低温应答元件、防御和胁迫应答元件 TC-rich repeats 等,这表明 *HbHEV3* 可能参与多种激素和

胁迫响应过程。

2.3 HbHEV3 的表达分析

利用荧光定量 PCR 检测了 *HbHEV3* 在不同组织中表达情况,结果(图 3)显示 *HbHEV3* 在胶乳中的表达量最高,在叶片和树皮总的表达量相对较低,在花中几乎检测不到,这说明其在胶乳中可能具有某种重要的功能。乙烯利刺激后,胶乳中 *HbHEV3* 的表达量 6 h 内无明显变化,处理 12 h 后表达量显著上调并达到最大,随后逐渐降低。

3 讨 论

排胶是影响天然橡胶产量的重要因素,胶乳的停排是由于乳管割口处胶乳絮凝堵塞而引起的。目前就乳管堵塞的机制提出了一些假说,其中凝集素假说是当前较被广泛接受的一种假说^[7,14]。该假说认为橡胶素在乳管堵塞中起到核心作用,并证实橡胶素是一种典型的凝集素,它能够与橡胶粒子膜上的糖蛋白结合,促进橡胶粒子凝集。橡胶素是以前体形式表达,Broekaert 等在胶乳中克隆了编码橡胶素前体的 cDNA,该橡胶素前体蛋白的 N 端区域包含 1 个信号肽和 1 个几丁质结合结构域^[15]。前体蛋白在向黄色体转移的过程中其信号肽被切除,余下的多肽最终被加工成成熟 Hevein 和未知功能的多肽^[16]。Pujade-Renaud 等^[17]在橡胶树中报道了另外 4 个编码橡胶素前体的基因和启动子序列,这 4 个基因的编码区同源性较高,更大的差异体现在启动子区,并认为 Hevein 基因上游调节功能的进化比下游蛋白产物功能的进化要快很多。

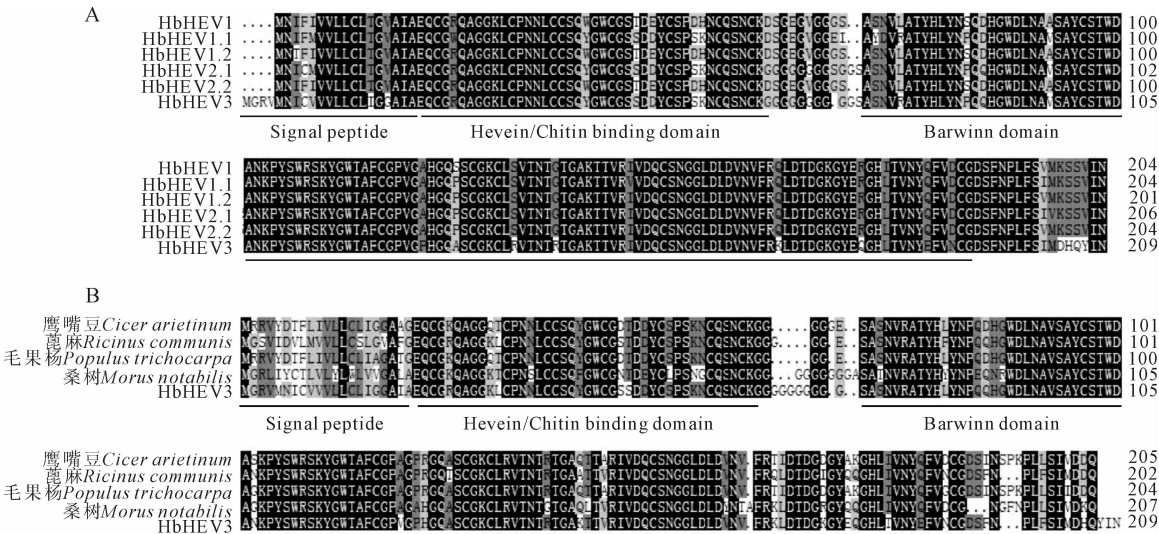
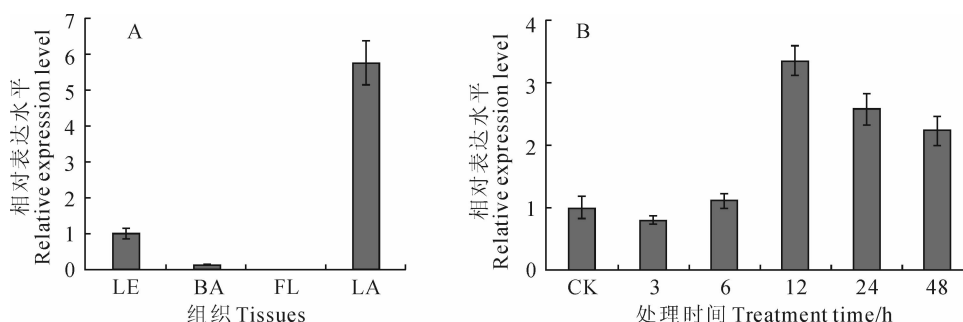


图 1 HbHEV3 与橡胶树(A)及其他植物(B)中 Hevein 蛋白的序列比对

Fig. 1 Sequence alignment between HbHEV3 and Hevein proteins from rubber tree(A) and other plants(B)

AATAAAATTTTCATTATATAATGATAATAGCGCCAAAAAAGGATTTTATGTGATATTTTCCTC
 TTTTAATTAACTTTATATTGAATAAGTTTTTTATTTGCAATTAATAATTTTTTTTGGTTAACTCTCA
 GARE
 TACAGTAAAATTAATTTTTGTTTTTAAAGTAACTGTCAAAGCTGATTTTTTTTTATAGATTTAA
 TATATTTAAATAAATAATTTAAAAATATTCGTAAATAGATGCTAATTCAACTATATGGACATG
 GACCATTTGATGTGCTACACTATCACAAGGCACAAGCCATCAGAACCAACACCAAAATACTCAT
 AuxRR-core
 CCAAACATATCCTAATAATTGAACAGTCATTTCTACTCTAAAATGGCAGCTATTGACCCATTTT
 Box-W1
 GGCTCAAATTTGACCGTATTTTTTTAAATTTTTAGTCAAATAATTCTCAATTCATTAAACGAT
 Box-W1 ABRE
 TAATATTTTATAAATGAGAAAAATATATTGTTATGATTTAATATTATCTTGATAATAAGATAAAA
 TCA-element
 GTAAATCTGGTTTACCTTTAATTGGATGTTTAAATGCTTAATGGCTAAGGAAATTCATGTTTAA
 ARE
 AATAAAAGAAATTGAGAAAAATAAATGAAAGTGTGAAAAATGAATAAAATTTGGCCTTATCCTC
 TC-rich repeats
 TTTATTAGGGATGGAGTGGGAAGCCACCTCTCATGTGTCGTTCATCTTCGAACAACGACTCAA
 TGA-element
 CCCAAAGCACACACACGTAGCCGCCTCACATCATCCCTTTGAATATTCCACCCTAACAGCCA
 ABRE GCC box

 TACCGAAAAATCAAGAATAGGAAAGAAATGGGAAGAGTTATGAATATATGTGTGTTGTTTAA
 LTR
 TTATGTTTAAATAGGTGGTGCAATTGCTGAGCAATGTGGTAGGCAAGCAGGTGGCAAGCTCTG

图2 *HbHEV3* 启动子序列及主要顺式作用元件Fig. 2 The promoter sequence of *HbHEV3* and major *cis*-acting elements图3 *HbHEV3* 的表达A. *HbHEV3* 在橡胶树叶(LE)、皮(BA)、花(FL)和胶乳(LA)中的表达; B. *HbHEV3* 在乙烯利刺激条件下的表达Fig. 3 Expression of *HbHEV3*A. Expression of *HbHEV3* in leaf(LE), bark(BA), flower(FL) and latex(LA);B. Expression of *HbHEV3* with ethephon treatment

本研究在橡胶树中分离了1个新的 Hevein 基因 *HbHEV3*, *HbHEV3* 蛋白序列和橡胶树中已有的5个 Hevein 蛋白具有类似的结构特征, 序列同源性都在80%以上, 说明他们可能具有类似的功能。橡胶素已证实除了在橡胶粒子凝集过程中具有作用外, 还具有抗真菌的性质^[7-8]。*HbHEV3* 的启动子区存在2个真菌响应元件 Box-W1 和1个防御和胁迫应答元件 TC-rich repeats, 这进一步说明 *HbHEV3* 可能参与了真菌响应过程。此外, 在 *HbHEV3* 的启动子区发现1个乙烯响应元件 GCC-box, 表达分析也证实 *HbHEV3* 受乙烯利诱导表达, 表明 *HbHEV3* 参与了橡胶树对乙烯的响应。

乙烯是植物防御反应的报警信号, 并参与防御反应; 乙烯能够诱导许多病程相关蛋白和抗菌肽的表达和积累^[18-19]。这说明 *HbHEV3* 可能参与了橡胶树乙烯介导的防御反应。乙烯利是目前最有效的橡胶树胶乳增产刺激剂, 其增产效应主要通过延长排胶时间来实现^[20]。橡胶树胶乳中除了含有橡胶素凝集因子外, 还含有几丁质酶等抗凝集因子, 乙烯利刺激同样能诱导抗凝集因子几丁质酶基因都超量表达^[7, 9, 21]。这说明在乙烯利刺激延长排胶延长时间的情况下, 抗凝集因子的效果可能更显著, 但乙烯利在延长排胶时间阻止凝集的同时为何诱导凝集因子的表达, 是否存在反馈调控还有待进一步研究。本

研究对 *HbHEV3* 进行了克隆,并对其表达和调控特征进行了分析,研究结果不仅丰富了 Hevein 蛋白

家族的基因信息,同时为进一步研究其在橡胶树中的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] PEUMANS W J, AN DAMME E J M. Lectins as plant defense proteins[J]. *Plant Physiology*, 1995, **109**(2): 347—352.
- [2] DA SILVA L C, CORREIA M T. Plant lectins and Toll-like receptors: implications for therapy of microbial infections[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2014, **5**: 20.
- [3] R SHUKUROV R, D VOBLIKOVA V, NIKONOROVA A K, *et al.* Transformation of tobacco and *Arabidopsis* plants with *Stellaria media* genes encoding novel hevein-like peptides increases their resistance to fungal pathogens[J]. *Transgenic Research*, 2012, **21**(2): 313—325.
- [4] GUO P P, WANG Y, ZHOU X H, *et al.* Expression of soybean lectin in transgenic tobacco results in enhanced resistance to pathogens and pests[J]. *Plant Science*, 2013, **211**: 17—22.
- [5] SCHALLER A. Induced Plant Resistance to Herbivory[M]. Dordrecht: Springer Verlag, 2008: 285—307.
- [6] COOK A S, SEKHAR B C. Fractions from *Hevea brasiliensis* latex centrifuged at 59,000 g[J]. *Rubber Chemistry and Technology*, 1954, **27**(1): 297—301.
- [7] GIDROL X, CHRESTIN H, TAN H L, *et al.* Hevein, a lectin-like protein from *Hevea brasiliensis* (rubber tree) is involved in the coagulation of latex[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, **269**(12): 9 278—9 283.
- [8] VAN PARIJS J, BROEKAERT W F, GOLDSTEIN I J, *et al.* Hevein: an antifungal protein from rubber-tree (*Hevea brasiliensis*) latex[J]. *Planta*, 1991, **183**(2): 258—264.
- [9] WANG X C, SHI M J, WANG D, *et al.* Comparative proteomics of primary and secondary luteoids reveals that chitinase and glucanase play a crucial combined role in rubber particle aggregation in *Hevea brasiliensis*[J]. *Journal Proteome Research*, 2013, **12**(11): 5 146—5 159.
- [10] HAO B Z, WU J L. Laticifer differentiation in *Hevea brasiliensis*: induction by exogenous jasmonic acid and linolenic acid[J]. *Annals of Botany*, 2000, **85**(1): 37—43.
- [11] ZHANG ZH L(张治礼), YANG Y(杨云), LIU K C(刘宽灿), *et al.* A rapid and efficient protocol for total RNA isolation from latex of *Hevea brasiliensis*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*(植物学通报), 2007, **24**(4): 516—520(in Chinese).
- [12] KIEFER E, HELLER W, ERBST D. A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, **18**(1): 33—39.
- [13] AN Z W(安泽伟), HUANG H S(黄华孙). A method for genomic DNA extraction from leaves of rubber tree(*Hevea brasiliensis*) [J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2005, **41**(4): 513—515(in Chinese).
- [14] WITITSUWANNAKUL R, PASITKUL P, JEWTRAGOON P, *et al.* *Hevea* latex lectin binding protein in C-serum as an anti-latex coagulating factor and its role in a proposed new model for latex coagulation[J]. *Phytochemistry*, 2008, **69**(3): 656—662.
- [15] BROEKAERT I, LEE H I, KUSH A, *et al.* Wound-induced accumulation of mRNA containing a hevein sequence in laticifers of rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1990, **87**(19): 7 633—7 637.
- [16] LEE H I, BROEKAERT W F, RAIKHEL N V. Co- and post-translational processing of the hevein preproprotein of latex of the rubber tree (*Hevea brasiliensis*) [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1991, **266**(24): 15 944—15 948.
- [17] PUJADE-RENAUD V, SANIER C, CAMBILLAU L, *et al.* Molecular characterization of new members of the *Hevea brasiliensis* hevein multigene family and analysis of their promoter region in rice[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2005, **1 727**(3): 151—161.
- [18] YANG D L, YANG Y, HE Z. Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity[J]. *Molecular Plant*, 2013, **6**(3): 675—685.
- [19] VAN LOON L C, GERAATS B P, LINTHORST H J. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants [J]. *Trends in Plant Science*, 2006, **11**(4): 184—191.
- [20] ZHU J H, ZHANG Z L. Ethylene stimulation of latex production in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2009, **4**(11): 1—3.
- [21] ZHU J H(朱家红), ZHANG Q Q(张全琪), ZHANG ZH L(张治礼). Ethephon stimulation on latex production and its molecular biological basis in *Hevea brasiliensis*[J]. *Plant Physiology Communications*(植物生理学通讯), 2010, **46**(1): 87—93(in Chinese).