

水蕨中心体蛋白基因的克隆与原核表达

陈雪菲¹, 王尧¹, 秦召远¹, 王全喜^{1,2}, 曹建国^{1*}

(1 上海师范大学 生命与环境科学学院, 上海 200234; 2 上海资源植物功能基因组学重点实验室 上海辰山植物园, 上海 201602)

摘要: 蕨类植物的精子形成是一个运动细胞器重新发生的过程, 但对其精子发生的分子机制仍不甚了解。中心体蛋白(centrin)是定位于细胞中心体上的一种高度保守的钙结合蛋白, 被认为可能是最早参与运动细胞器发生的蛋白质。克隆鉴定 centrin 蛋白为进一步分析蕨类精子发生的分子机制奠定基础。该研究从蕨类模式植物水蕨(*Ceratopteris thalictroides*)中克隆到了水蕨 centrin 基因(*CtCEN*), 其 cDNA 序列全长为 1 077 bp, 结构分析表明 *CtCEN* 基因属于 EF-hand 超家族的 centrin 基因。Centrin 的系统树分析发现, 藻类、蕨类以及动物等具鞭毛游动精子的生物聚为一支, 而被子植物聚为另一分支, 表明 centrin 的功能可能与运动细胞器鞭毛发生有关。原核表达和 Western blot 分析表明, *CtCEN* 基因表达的蛋白能与人源 centrin 抗体发生结合, 这一结果证实克隆到了 centrin 基因。

关键词: 中心体蛋白; 克隆; 原核表达

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Clone and Prokaryotic Expression of Centrin Gene from the Fern *Ceratopteris thalictroides*

CHEN Xufei¹, WANG Yao¹, QIN Zhaoyuan¹, WANG Quanxi^{1,2}, CAO Jianguo^{1*}

(1 College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China; 2 Shanghai Key Laboratory of Plant Functional Genomics and Resource, Shanghai Chenshan Botanical Garden, Shanghai 201602, China)

Abstract: In ferns, the spermatogenesis is a process of *de novo* formation of the motile apparatuses and the molecular mechanisms of the spermatogenesis were unclear. Centrin, a highly conservative calcium binding protein usually locating in the centrosome, was considered to be the protein that participates the formation of motile apparatuses. Cloning of the centrin gene has some significance for elucidating the molecular mechanism of spermatogenesis of ferns. The present investigation cloned the centrin gene (*CtCEN*) from the fern model plant, *Ceratopteris thalictroides*. The full length the cDNA sequence of the *CtCEN* gene is 1 077 bp, and the structural analysis showed that the gene belongs to be centrin gene of EF-hand protein superfamily. Phylogenetic analysis indicated that the *CtCEN* of the algae, ferns, animal and human, all of which produce sperms with flagella, is clustered in one branch. The *CtCEN* of angiosperm is clustered in another branch. It is suggested that the centrin may participate the genesis of flagellum. The prokaryotic expression and Western blot analysis showed that the expressed protein of *CtCEN* can hybridize with the centrin protein antibody of Human, which indicated that the *CtCEN* belongs to the centrin family. The present studies lay a foundation for the molecular mechanism of the centrin participating formation of motile apparatuses in fern spermatogenesis.

Key words: centrin; cloning; prokaryotic expression

收稿日期: 2015-12-18; 修改稿收到日期: 2016-01-29

基金项目: 上海市自然科学基金(13ZR1429700); 上海市科学技术委员会课题(14DZ2260400)

作者简介: 陈雪菲(1986—), 女, 在读博士研究生, 主要从事蕨类植物生物学研究。E-mail: cxf_227@163.com

* 通信作者: 曹建国, 教授, 主要从事蕨类植物生殖发育和蕨类植物资源开发与利用的研究。E-mail: cao101@shnu.edu.cn

中心体蛋白,即 centrin 最初是从绿藻(*Tetraselmis striata*)中分离得到的一种钙结合蛋白,属于高度保守的 EF-hand 蛋白超家族^[1],现已知 centrin 蛋白存在于从藻类、酵母到人类等所有生物的微管组织中心中^[2]。衣藻中 centrin 主要参与鞭毛形成,是核-基体连接纤维的一个主要成分^[3-4]。芽殖酵母 centrin 蛋白对细胞周期依赖性的纺锤体复制起重要作用^[5]。Errabolu 等从人中克隆及鉴定到了 3 个 centrin 同源蛋白^[6-7],其中 Hscen3 在中心体复制中具有重要作用^[8]。高等植物的 centrin 蛋白研究比较少,最早在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和烟草(*Nicotiana tabacum*)中获得了 centrin 同源基因^[9-11],但有关它们的功能未见报道。随后 Klink 等^[12]在异形孢子蕨类苹(*Marsilea vestita*)中克隆得到 *Mv-centrin*,这个基因在苹小孢子发育阶段就已经发生转录并且以蛋白形式储存于未萌发的孢子中,此后在雄配子体发育和精子发生过程中,centrin 蛋白参与了运动细胞器的形成过程^[12]。综上所述,centrin 蛋白在高等生物中主要参与中心体复制以及细胞分裂过程,而在低等生物中主要参与运动细胞器鞭毛的发生。蕨类植物是高等植物中的一个特殊类群,其精子发生是一个运动细胞器重新形成的过程,centrin 蛋白极有可能参与了这一过程。本研究从蕨类模式植物水蕨[*Ceratopteris thalictroides* (L.) Brongn.]中克隆到 centrin 基因(*CtCEN*)并对其进行了验证,这对阐明 centrin 在蕨类精子发生中的功能以及进一步研究 centrin 蛋白参与运动细胞器形成的过程和分子机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以无菌培养 3 周左右的水蕨成熟雄配子体为实验材料。载体 pET-32a 购买于北京全式金基因有限公司。菌株购买于北京博大泰克生物科技有限公司。人源 centrin 蛋白的鼠抗购买于上海熠晨生物科技有限公司。

1.2 *CtCEN* 基因的克隆

按康为世纪植物 RNA 提取试剂盒说明书提取水蕨配子体总 RNA。采用 Invitrogen 公司的 SuperScript™ RT III 反转录试剂盒反转录获得 cDNA。根据 GenBank 已经公布的 centrin 基因,进行同源性比较,获得较为保守的区域(约 300 bp)。根据保守区的已知序列,设计保守区扩增引物(5'-GACACTGATGGGTCAGGCAC-3'和 5'-CAAGA-

GATGATTGATGAAGC-3')。通过 PCR 反应获得保守片段,其反应体系及条件为:10×LA PCR Buffer 5 μL,LA Taq 酶 0.5 μL,dNTP Mix 8 μL,模板 1 μL,引物各 5 μL,加 ddH₂O 补至 50 μL。反应程序为:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,59.9℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;72℃延伸 10 min。获得的保守片段由北京六合华大公司完成测序,根据 NCBI 的比对结果,证实该保守片段与其他物种的 centrin 基因具有同源性。根据 Invitrogen 公司的 GeneRacer™ Kit 说明书分别设计 5'末端和 3'末端引物(5'-TCAGGAAGGCGTTCAAGC-3',5'-CTTGAACGCCTTCTGATCTCC-3'),采用 RACE 技术分别扩增目的基因的 3'末端和 5'末端,测序拼接获得完整的 *CtCEN* 基因 cDNA。进一步对获得的全长 cDNA 的 ORF 区域进行分析,设计含酶切位点的引物(5'-C[CTCGAG]ATGTCGAGCTTCAGGAAAGGTG-3',框内为 Xho I 酶切位点;5'-C[GGATCCG]CTAAAAGAGGCTTGTTTCTTCATG-3',框内为 BamH I 酶切位点),扩增 *CtCEN* 蛋白的编码序列。

1.3 *CtCEN* 基因原核表达载体的构建

通过琼脂糖凝胶电泳检测 *CtCEN* 编码区 PCR 产物,采用 DNA 纯化试剂盒进行目的片段回收。使用限制性内切酶 BamH I 和 Xho I 对测序正确的目的基因和原核表达载体(pET-32a)分别双酶切,对酶切后的质粒和 PCR 产物分别进行回收,按 1:4 的比例用 T₄ DNA 连接酶在 16℃连接过夜。用连接产物转化 DH5α 感受态细胞,涂板挑取单克隆,测序检测重组目的基因。提取转化成功的重组质粒,命名为 pET32a-*CtCEN*。

1.4 *CtCEN* 基因原核表达

将 pET32a-*CtCEN* 重组质粒转化 *E. coli* BL21 菌株,挑选单个菌落进行扩大培养。在菌液 OD₆₀₀ 达到 0.6 左右时,加入适量诱导剂 IPTG,37℃继续振荡 4 h,每小时取 1 次菌液(0.5 mL),离心收集菌体,使用超声仪进行超声破碎,离心后分别取上清和沉淀制样并通过 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定表达结果。为了进一步证实该蛋白属于 centrin 蛋白,对上述诱导重组蛋白样品进行 Western blot 实验验证。一抗采用的是人源 centrin 蛋白的鼠抗,稀释倍数是 1:1000;二抗选择的是辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG,稀释倍数是 1:2500。最后,按辣根过氧化物 DAB 显色试剂盒说明书进行显色及终止反应。

1.5 *CtCEN* 基因的生物信息学分析

对测序获得的 *CtCEN* 基因所编码的氨基酸序列同 GenBank 中已知的 centrin 氨基酸序列进行相似性比对。利用 Clustal X 和 MEGA 5.0 软件构建 NJ 系统树。

2 结果与分析

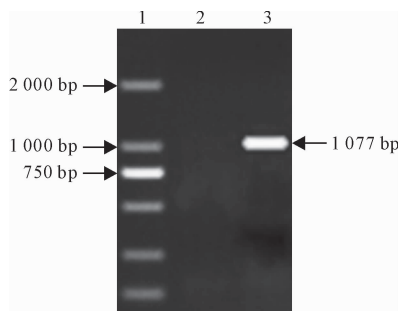
2.1 *CtCEN* 基因的克隆与序列分析

根据苹 *Mv-centrin* 基因保守区设计引物扩增获得的水蕨 *CtCEN* 基因保守区序列,经克隆测序获得长度为 342 bp 的序列。利用 RACE 技术分别对 *CtCEN* 基因 5'末端和 3'末端进行扩增,经克隆测序去除引物接头后分别获得 5'末端 504 bp、3'末端 734 bp 的序列。对获得的序列进行拼接,设计全长引物获得 *CtCEN* 基因的全长 cDNA。由图 1 可知,扩增序列长度大约 1 000 bp,与目的基因的序列长度相似。

将目的基因片段切胶回收后连接至克隆载体,转化挑选阳性菌落测序,测序结果比对后发现其与其他物种的 centrin 基因同源,序列全长为 1 077 bp (图 2)。通过在 NCBI 中进行 Blastn 分析,结果表明 *CtCEN* 序列与苹、小立碗蕨、衣藻、江南卷柏具有较高相似性,均在 80%左右。该基因包含一个 510 bp 开放阅读框,编码具有 170 个氨基酸残基的蛋白质,使用蛋白质功能结构域分析软件 SMART 对氨基酸序列进行分析,结果显示 *CtCEN* 具有 4 个钙结合位点(EF-hand),这 4 个 EF-hand 分别位于第 30~58、66~94、103~131 和 139~167 氨基酸,由此可以推断 *CtCEN* 基因属于 EF-hand 超家族。

2.2 *CtCEN* 系统树构建

GenBank 已公布 centrin 基因序列的物种主要



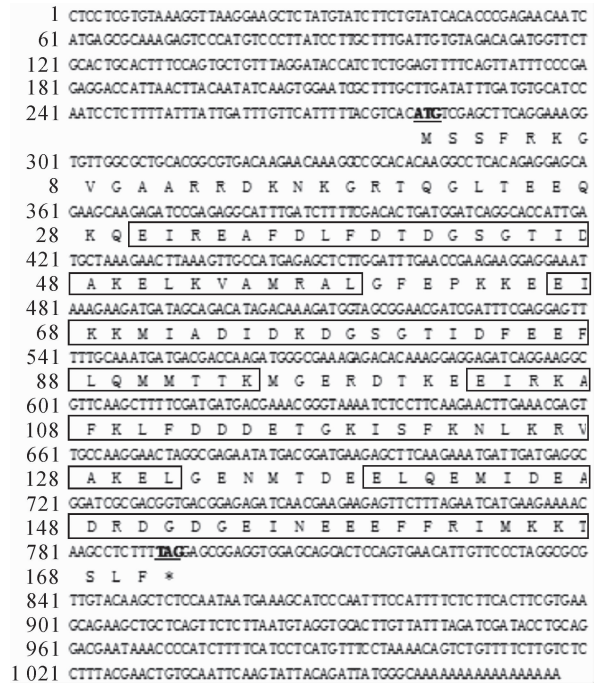
1. DL2000;2. 阴性对照(无模板);3. *CtCEN* 基因全长 cDNA

图 1 *CtCEN* 基因全长 cDNA 序列 PCR 电泳

1. DL2000;2. Negative control (without templates);3. *CtCEN* cDNA

Fig. 1 The gel electrophoresis of *CtCEN* gene cloned from cDNA by PCR

包括蕨类植物苹(*M. vestita*)和江南卷柏(*Selaginella moellendorffii*);藻类植物衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)和团藻(*Volvox carteri* f. *nagariensis*);高等植物拟南芥(*A. thaliana*)、烟草(*N. tabacum*)和可可(*Theobroma cacao*);人(*Homo sapiens*);鼠(*Mus musculus*)等。从构建的系统关系(图 3)可知,这 10 个物种的 centrin 基因分成两大支,第一大支包括藻类植物的团藻和衣藻,蕨类植物苹、卷柏和水蕨,哺乳动物人和鼠,其中水蕨、苹和卷柏聚在一起,其自展支持率达到 96%,体现了它们之间较近的亲缘关系。这几种蕨类又与 2 种藻类聚在一起,它们都属于鞭毛类植物;这些鞭毛类植物的 centrin 基因又与哺乳动物人和鼠的聚为一支,且自展支持率达到 100%,从产生的精子特征上来看,该支物种的共同特征是都能够产生具鞭毛的游动精子,因此,centrin 的功能可能与鞭毛发生有关。第二大支包括拟南芥、烟草和可可,这些物种属于被子植物,在整个生活史过程中都不产生游动细胞,因此,被子植物中 centrin 的功能可能发生了改变。



粗体加下划线 ATG 表示起始密码子,粗体加下划线

TAG 表示终止子,方框区域为推测的 EF-hand 结合域

图 2 *CtCEN* 基因核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

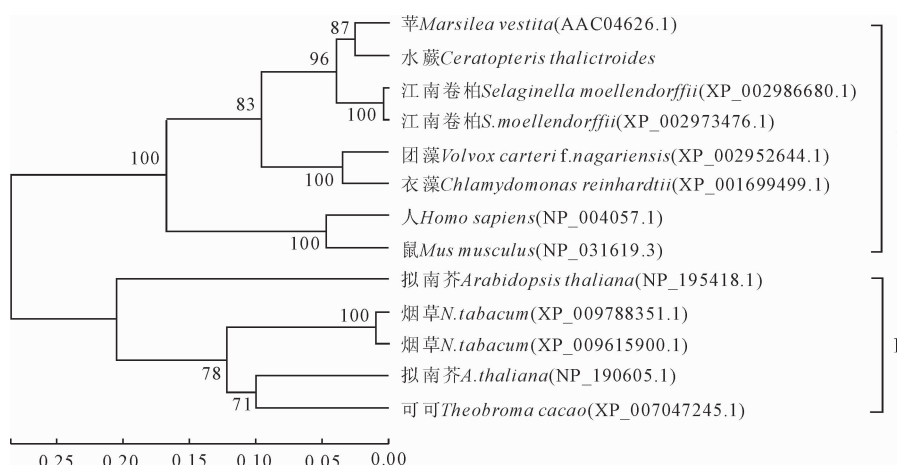
The ATG initiation codon is in bold and indicated by underline;

the TAG termination codon is in bold and indicated by

underline. The frames show putative EF-hand domains

Fig. 2 Nucleotide sequence of *CtCEN*

and the deduced amino acid sequence



图中分支点的数字表示基于 1 000 次重复该节点的自展支持率;标尺代表遗传距离

图 3 水蕨与其它物种 centrin 基因序列系统演化关系

The figure at the nodes shows the bootstrap value based on 1 000 replications,
and the scale represents the genetic distance

Fig. 3 Phylogenetic relationship of the centrin gene sequences among *C. thalictroides* and other species

2.3 CtCEN 基因原核表达载体的鉴定

利用引入酶切位点 *Bam*H I 和 *Xho* I 的引物将 *CtCEN* 连入 pET-32a 表达载体,重组质粒经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后获得大小约 6 kb 的载体片段和 500 bp 左右的插入片段(图 4),对阳性克隆进行测序。测序结果表明获得克隆片段长度为 510 bp,与 *CtCEN* 基因序列完全一致,即已成功克隆了 *CtCEN* 基因并构建了表达载体。

2.4 目的蛋白的原核表达与纯化

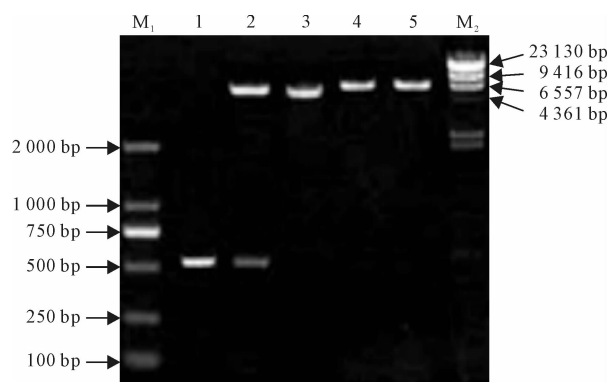
将 pET32a-CtCEN 重组质粒转入 BL21 空菌中,用 1 mmol/L IPTG 诱导表达后进行 SDS-PAGE 鉴定,得到有明显诱导趋势的条带(图 5,A),大小在 38 kD 左右,在线软件 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)预测的目的蛋白 CtCEN 大小约为 19 kD,此结果与预测的结果相符。

2.5 蛋白质印迹实验鉴定

经 IPTG 诱导表达的重组蛋白按常规方法纯化后经 SDS-PAGE 分析,用半干法移至 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭后,依次加入稀释的人源 centrin 蛋白的鼠抗和羊抗鼠 IgG 二抗进行孵育,最后使用显色试剂盒显色。结果如图 5,B 所示,表明克隆并表达的 CtCEN 蛋白能够与人源 centrin 蛋白抗体杂交,克隆出来基因是水蕨的 centrin 基因。

3 讨论

Centrin 蛋白是中心体中的钙调蛋白,在动物、植物、微生物中均有广泛的分布。我们从水蕨配子



M₁. DL2000; M₂. λ Hind III; 1. *CtCEN* 基因 PCR 产物;
2. pET32a-CtCEN *Bam*H I / *Xho* I 双酶切产物;

3. pET32a *Bam*H I / *Xho* I 双酶切产物; 4. pET32a-CtCEN
*Bam*H I 单酶切; 5. pET32a-CtCEN *Xho* I 单酶切

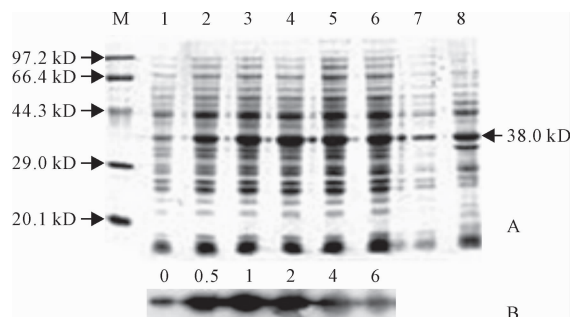
图 4 重组质粒 pET32a-CtCEN 酶切鉴定

M₁. DL2000; M₂. λ Hind III; 1. PCR product of *CtCEN*;
2. pET32a-CtCEN digested by *Bam*H I / *Xho* I ;

3. pET32a digested by *Bam*H I / *Xho* I ; 4. pET32a-CtCEN
digested by *Bam*H I ; 5. pET32a-CtCEN digested by *Xho* I

Fig. 4 Identification of the recombinant pET32a-CtCEN
plasmid digested with *Bam*H I and *Xho* I

体中克隆到 centrin 的 cDNA 片段,其大小占完整编码框的 50%,编码的氨基酸序列基本覆盖了 4 个钙离子结合结构域。Western blot 分析显示该 CtCEN 蛋白可与人源 centrin 蛋白的抗体结合,表明克隆到的基因确为 centrin 基因。同源性分析表明 *CtCEN* 基因与其他物种的 centrin 基因同源性较高,相对较为保守。从系统演化关系来看, *CtCEN*



A. 重组质粒 pET32a-CtCEN 的诱导表达分析: M. 蛋白 marker (Takara 公司); 1. 未经 IPTG 诱导的总蛋白; 2~6. 诱导 0.5、1、2、4、6 h 后的全菌蛋白; 7. 经过 6 h 诱导的可溶性蛋白; 8. 经过 6 h 诱导的非可溶性蛋白(10%分离胶); B. 经 IPTG 诱导 0、0.5、1、2、4、6 h 后, 重组蛋白的 Western blotting 检测结果

图 5 重组质粒 pET32a-CtCEN 在大肠杆菌中的诱导表达及重组蛋白的免疫印迹分析

A. Inducible expression of the recombinant

pET32a-CtCEN plasmid; M. Protein marker; 1. Total protein without induction; 2-6. Samples collected after induction by IPTG for 0.5, 1, 2, 4, 6 h, respectively; 7. Soluble protein for 6 h; 8. Insoluble protein for 6 h; B. After induction by IPTG for 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 h, Western blotting analysis of the recombinant protein

Fig. 5 Inducible expression of the recombinant

pET32a-CtCEN plasmid in *E. coli* by IPTG and

western blotting analysis of the recombinant protein

参考文献:

- [1] SALISBURY J L, BARON A, SUREK B, *et al.* Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle[J]. *Journal of Cell Biology*, 1984, **99**(3): 962-970.
- [2] HU H, SHEE HAN J H, CHAZIN W J. The mode of action of centrins: binding of Ca^{2+} and a peptide fragment of Karlp to the C-terminal domain [J]. *Journal of Biochemistry*, 2004, **279**(49): 50 895-50 903.
- [3] SALISBURY J L, SANDERS M A, HARPST L. Flagellar root contraction and nuclear movement during flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. *Journal of Cell Biology*, 1987, **105**(4): 1 799-1 805.
- [4] HAYASHI M, YAGI T, YOSHIMURA K, *et al.* Real-time observation of Ca^{2+} -induced basal body reorientation in *Chlamydomonas* [J]. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 1998, **41**(1): 49-56.
- [5] FISCHER T, RODRIGUEZ-NAVARRO S, PEREIRA G, *et al.* Yeast centrins Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery [J]. *Nature Cell Biology*, 2004, **6**(9): 840-848.
- [6] LEE V, HUANG B. Molecular cloning and centrosomal localization of human caltractin [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, **90**(23): 11 039-11 043.
- [7] MIDDENDORP S, PAOLETTI A, SCHIEBEL E, *et al.* Identification of a new mammalian centrins gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, **94**(17): 9 141-9 146.
- [8] WIECH H, GEIER B M, PASCHKE T, *et al.* Characterization of green alga, yeast, and human centrins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1996, **271**(37): 22 453-22 461.
- [9] CORDEIRO M C, PIQUERAS R, OLIVEIRA D E D, *et al.* Characterization of early induced genes in *Arabidopsis thaliana* responding to bacterial inoculation: identification of centrins and of a novel protein with two regions related to kinase domains [J]. *Febs Letters*, 1998, **434**(3): 387-393.
- [10] STOPPIN-MELLET V, AM C J L. Characterization of microsome-associated tobacco BY-2 centrins [J]. *European Journal of Cell Biology*, 1999, **78**(11): 842-848.
- [11] HART P E, WOLNIAK S M. Molecular cloning of a centrins homolog from *Marsilea vestita* and evidence for its translational control during spermiogenesis [J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 1999, **77**(2): 101-108.
- [12] KLINK V P, WOLNIAK S M. Centrins is necessary for the formation of the motile apparatus in spermatids of *Marsilea* [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2001, **12**(3): 761-776.
- [13] 黄武杰. 水蕨雌、雄配子体差异表达蛋白质组学的分析 [D]. 上海: 上海师范大学, 2011.

(编辑: 宋亚珍)