

干旱胁迫条件下发菜 Ferritin 差异表达与基因克隆

梁文裕¹, 焦广飞², 周有文¹, 张亚萍¹, 陈伟²

(1. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; 2. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

摘要: 发菜(*Nostoc flagelliforme*)是一种陆生固氮蓝藻,具有强烈的旱生生态适应性。运用双向电泳技术、凝胶图像分析、MALDI-TOF-TOF/MS 质谱鉴定和数据库检索,发现发菜 Ferritin 在干旱胁迫条件下表达量逐渐降低。根据鉴定的 Ferritin 已知氨基酸序列设计简并性引物克隆该基因,获得了长度为 540 bp 的 DNA,GenBank 登陆号为 HM854287。序列比较显示该基因具有较高的保守性,蛋白质二级结构主要由 α 螺旋和随机卷曲构成。RT-PCR 分析表明,Ferritin mRNA 在干旱胁迫条件下表达量逐渐降低,与 Ferritin 的表达趋势一致。将 Ferritin 基因在大肠杆菌中表达,获得符合预期的外源重组蛋白(22.4 kD)。实验结果可为进一步研究发菜耐旱的分子机理及探讨发菜对极端干旱环境的适应和保护机制奠定基础。

关键词: 发菜; Ferritin; 差异表达; 基因克隆; RT-PCR; 原核表达

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2012)01-0072-07

Differential Expression and Gene Cloning of Ferritin from *Nostoc flagelliforme* Subjected to Desiccation

LIANG Wen-Yu¹, JIAO Guang-Fei², ZHOU You-Wen¹, ZHANG Ya-Ping¹, CHEN Wei²

(1. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China ;

2. College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: *Nostoc flagelliforme* is a terrestrial nitrogen-fixing cyanobacterium with strong drought adaptability. We performed 2-DE analysis, gel image analysis and MALDI-TOF-TOF/MS to compare and identify differential proteins from *N. flagelliforme* subjected to desiccation. The results indicated that Ferritin, Dps family protein expression quantum gradually declined under desiccation stress. The Ferritin gene was cloned by designed degeneracy primer based on identified amino acid sequences. A full length of 540 bp DNA was obtained (GenBank access number: HM854287). Homology analysis showed that the *N. flagelliforme* Ferritin gene had high consensus regions. The secondary structures of Ferritin were made up of α helix and random coil. The RT-PCR showed that mRNA of Ferritin gradually declined under drought stress. The Ferritin gene was expressed in *Escherichia coli*, and a 22.4 kD heterologous protein was observed. The results laid a foundation for understanding the drought-resistant molecular mechanisms and protection mechanisms of *N. flagelliforme* in extreme arid environments.

Key words: *Nostoc flagelliforme*; Ferritin; Differential expression; Gene cloning; RT-PCR; Prokaryotic expression

Ferritin (Dps 家族蛋白)广泛存在于原核生物和真核生物中^[1],不仅具有储存铁的特性^[2,3],而且可将 H_2O_2 还原为水($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH$),因而具有抗氧化和清除自由基的作用,保

护 DNA 免受自由基伤害,是一种重要的抗氧化蛋白,是细胞内清除活性氧的主要保护蛋白之一^[4-9]。植物在正常生长的条件下,抗氧化酶系彼此协调,使细胞内活性氧维持在较低水平,不会引起植物损伤。

收稿日期: 2011-05-09,修回日期: 2011-07-18。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31060038)。

作者简介: 梁文裕(1969-),男,博士,教授,主要从事植物资源及植物分子生物学研究(E-mail: liangwy2009@163.com)。

当处于干旱胁迫时,植物体内活性氧产生和清除的平衡遭到破坏,从而加速活性氧的积累,当其浓度超过一定阈值时,就会使植物细胞内的大分子物质发生过氧化,影响植物的正常生长^[10]。因此,Ferritin在不同条件下的差异表达反应了 Ferritin 基因及其相关基因表达调控的变化,对植物在逆境胁迫条件下维持正常的生命活动具有重要意义。

发菜(*Nostoc flagelliforme*)是一种分布于干旱-半干旱荒漠草原地区的陆生固氮念珠藻,在结构和生理上表现出强烈的旱生生态适应性^[11-13]。已有研究表明陆生念珠藻耐干旱的机理是其结构、生理及分子水平上协调作用的综合反映^[14,15]。就生理和分子水平而言,干旱胁迫对念珠藻细胞造成的伤害主要来自于活性氧自由基(ROS)所引起的氧化作用。目前蓝藻体内清除氧自由基的研究主要集中在 SOD 和 CAT 等领域^[16],而关于 Ferritin 却鲜有报道。本研究运用双向电泳和串联质谱分析发菜在干旱胁迫条件下 Ferritin 的差异表达,进而克隆该基因并研究其原核表达,为进一步研究发菜耐旱的分子机理及探讨发菜对极端干旱环境的适应和保护机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 生物材料

发菜(*Nostoc flagelliforme*)采自宁夏香山发菜自然生长地,人工模拟发菜生长环境进行培养。培养条件为:温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$,光周期为 12 h/12 h,光照强度为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 。每天供水 1 次,供水量一致,使发菜充分吸胀。培养 30 d 后测定光合速率和呼吸速率,确保其处于正常生长状态(与野生状态对照),然后进行样品处理:(a)发菜藻体充分吸水 4 h,藻体含水量为 $835\% \pm 10\%$;(b)发菜藻体充分吸水 4 h 后自然失水 6 h,藻体含水量为 $120\% \pm 15\%$;(c)发菜藻体充分吸水 4 h 后自然失水 48 h,藻体含水量为 $9.5\% \pm 2\%$ 。将样品立即放入液氮中冷冻后置于 -80°C 冰箱中备用。

1.1.2 试剂

固相 pH 梯度干胶条 pH 4 ~7(24 cm)、IPG 缓冲液(Ampholine)购自 GE 公司。甲叉双丙烯酰胺

(Bis)、丙烯酰胺、尿素、硫脲、三羟甲基氨基甲烷、过硫酸铵、3-[3-(胆酰氨丙基)二甲胺基]丙磺酸内盐(CHAPS)、十二烷基磺酸钠、四甲基乙二胺、二硫苏糖醇(DTT)购自 Sigma 公司。碘乙酰胺购自 Fluka 公司。DNA 提取试剂盒购自北京鼎国生物技术有限责任公司。Taq Dye PCR MasterMix、DNA 胶回收试剂盒、限制性内切酶均购自北京百泰克生物技术有限。RNA 提取试剂(Biozol)、DEPC(Amersco)、Taq DNA 聚合酶、HPRI(Ribonuclease inhibitor)、pMD18-T 载体和 DNA Ligation Kit Ver. 2.0 购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。DNase(RNase free)、反转录酶 MMLV Rnase H⁻ 购自 Promega 公司。质粒 pET28a(+)、大肠杆菌 DH5a、BL21 由本实验室保存。考马斯亮蓝 R-250、G-250、牛血清白蛋白(BAS)等试剂均为国产分析纯。引物合成由上海生物工程公司完成。测序由北京天根生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 双向电泳及凝胶分析

发菜总蛋白提取和双向凝胶电泳参考梁文裕等的方法^[17],蛋白质含量的测定参考 Bradford 的方法^[18]。双向电泳图谱采用 Image Master 2D 软件分析。

1.2.2 发菜 Ferritin 的 MALDI-TOF-TOF/MS 肽质量指纹图谱分析及数据库分析

发菜 Ferritin 胶内酶解、MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析、数据库查询及蛋白质鉴定参考梁文裕等的方法^[19]。

1.2.3 发菜基因组 DNA 提取

采用北京鼎国生物技术有限责任公司 AFLP 试剂盒(*Eco*R I / *Mse* I) DNA 提取系统提取发菜基因组 DNA。

1.2.4 Ferritin 基因的 PCR 扩增

根据 Ferritin MALDI-TOF-TOF/MS 肽质量指纹图谱测定的部分氨基酸序列设计简并性引物,上游引物的序列为,P1: 5'-ATGC(C/G)T(A/G)(G/C)(A/G)ATA AACATTGG-3',下游引物的序列为,P2: 5'-(T/C)TA CACACC(A/C)ACAGG(T/A)GT(T/C)TTAG-3'。PCR 扩增条件为: 94°C 变性 8 min, 94°C 50 s, 49°C 50 s, 72°C 1 min,共进行 35

个循环,72℃延伸 10 min。

1.2.5 PCR 产物的回收及克隆

PCR 扩增产物经 1.0 g/L 琼脂糖电泳,回收纯化后连接到 pMD18-T 载体上,然后转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆子,PCR 检测后送至天根公司测序。

1.2.6 序列分析

将测序结果进行 BLAST 检索,进行基因确认。运用 DNAMAN 软件对基因序列及推导出的氨基酸序列与其他物种进行同源性比较分析。运用 DNA star 6.0 软件对氨基酸序列进行分析。利用 DNAMAN、PBILLYON-GERLAND 信息库、SWISS MODEL 网站和 DNASTar 软件对 Ferritin 二级结构进行预测分析。

1.2.7 Ferritin 基因原核表达

根据发菜 Ferritin 基因的测序结果,设计扩增目的基因引物,并分别在上、下游引物 5'端添加保护碱基(阴影部分)和 BamH I 和 Xho I 限制性酶切位点(下划线部分)(C1: 5'-CGGGGATCCATGCGT-GCAATAAACATTGG-3'; C2: 5'-CGGCTCGAGTTA-CACACCAACAGGAGTT-3')。PCR 扩增条件为: 94℃预变性 8 min,94℃变性 50 s,49℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,共进行 35 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物以 1.0 g/L 琼脂糖电泳检测。

用 BamH I 和 Xho I 双酶切纯化的 PCR 产物和 pET-28a 载体,回收酶切产物,连接目的基因与载体片段,转化 DH5 α 感受态细胞,Kan 抗性筛选阳性克隆,提取质粒酶切鉴定,以鉴定正确的质粒转化 BL21 感受态细胞,以终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 Ferritin 表达。12.5% SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.8 发菜总 RNA 的提取及反转录

发菜总 RNA 的提取、去除基因组 DNA 和总 RNA 纯度的测定参照张晓雯的方法^[20]。将去除基因组 DNA 的 RNA 直接作为反转录的模板,反应体系 25 μ L。反应体系为: RNA 模板 10 μ L,DEPC 水 5 μ L,6 个碱基的随机引物 pd(N)6 (20 μ mol/L) 1 μ L,混匀后于 70℃反应 5 min,冰浴 5 min,再依次加入 5 $\times$ MMLV RT Buffer 5 μ L,dNTP (10 mmol/L) 2 μ L,RNase Inhibitor HPRI 1 μ L,MMLV RNase

H⁻ 1 μ L。混匀后于 42℃反转录 1 h。反应产物可直接用于 PCR 反应或 -20℃长期保存备用。

1.2.9 RT-PCR 引物设计

利用 OMIGA2 软件对发菜 Ferritin 引物设计。上游引物 RT-P1: 5'-CTTCTGCTGGCTGTCTACC-3',下游引物 RT-P2: 5'-TCACTGGGATGTCGTTGG-3'。16s rRNA 的 p1 (5'-CTGACACTGAGG-GACGAA-3') 和 p2 (5'-CGGGACTTAACCCAA-CATT-3') 为内标基因的上下游引物。

1.2.10 RT-PCR 分析 Ferritin 的表达特征

提取干燥失水和恢复吸水条件下的发菜总 RNA,按照前述反转录的方法分别合成 cDNA 后进行 RT-PCR。先取不同的 cDNA 各 1 μ L,以 16s rRNA 基因作为内标,根据其 RT-PCR 产物的亮度调节需要加入 cDNA 模板的量,然后再根据确定的 cDNA 模板的量进行 Ferritin 的 RT-PCR 检测。PCR 扩增条件为: 94℃预变性 5 min,94℃变性 50 s,55℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,共进行 28 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物以 1.0 g/L 琼脂糖电泳检测。

1.3 数据处理

将所得实验数据用 SPSS 13.0 进行方差分析,检验结果的差异显著性。

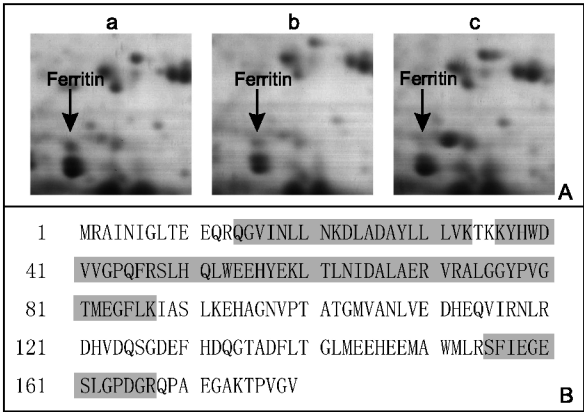
2 结果与分析

2.1 干旱胁迫条件下发菜 Ferritin 差异表达及质谱分析结果

对不同干旱胁迫条件下发菜蛋白质进行 2-DE 分离,发现 45 个蛋白点表达量差异在 2 倍以上,其中 Ferritin 在干旱胁迫条件下表达量逐渐降低($p < 0.05$) (图 1: A)。对 Ferritin 进行 MALDI-TOF-TOF/MS 分析和数据库检索,表明发菜 Ferritin 与点形念珠藻 (*Nostoc punctiforme* PCC 73102) Ferritin 氨基酸的匹配率为 47.49%。其氨基酸序列及串联质谱匹配肽段(见图 1: B 中灰色背景)在序列中的位置见图 1: B 所示。

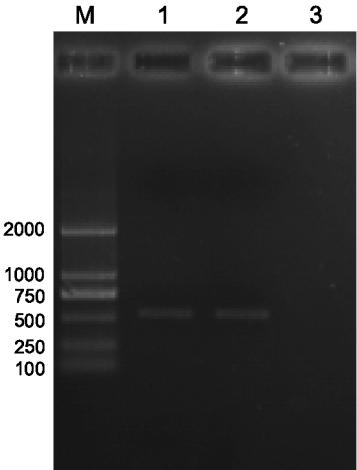
2.2 发菜 Ferritin 基因的 PCR 扩增结果

对发菜总 DNA 进行提取,以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,产物经 1.0 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定,得到一条长度与预期大小相符的 DNA 扩增片段(图 2)。



a: 发菜藻体充分吸水 4 h; b: 发菜藻体充分吸水 4 h 后自然失水 6 h; c: 发菜藻体充分吸水 4 h 后自然失水 48 h。
a: Colonies were subjected to 4 hours of rehydration; b: Colonies were subjected to 4 hours of rehydration followed by dehydration for 6 hours; c: Colonies were subjected to 4 hours of rehydration followed by dehydration for 48 hours.

图 1 干旱胁迫条件下发菜 *Ferritin* 2-DE 图谱 (A) 及 MALDI-TOF-TOF/MS 测定的发菜 *Ferritin* 肽段氨基酸序列 (灰色背景) 在 *Nostoc punctiforme* PCC 73102 的 *Ferritin* 氨基酸序列中的匹配位置 (B)
Fig. 1 2-DE map of *Nostoc flagelliforme* (A) and some amino acid sequences of *Ferritin* from *N. flagelliforme* subjected to dehydration and position of matching peptide segments by MALDI-TOF-TOF/MS (gray background) in total *Ferritin* sequences from *N. punctiforme* PCC 73102 (B)



M: DL2000; 1, 2: *Ferritin* 基因; 3: 阴性对照。
M: DL2000; 1, 2: *Ferritin* gene; 3: Negative control.

图 2 *Ferritin* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 2 *Ferritin* gene PCR amplification

2.3 发菜 *Ferritin* 基因目的片段的克隆、序列测定及同源分析

用 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段连接到 pMD18-T 载体上,转化到大肠杆菌 DH5a,挑选阳

性单菌落进行 PCR 鉴定,结果表明外源目的片段已成功克隆。为进一步鉴定所得到的 DNA 片段是否确为目的基因,运用 pMD18-T 载体通用引物对目的 DNA 片段进行双向测序,结果表明,目的 DNA 片段大小为 540 bp。对测序结果进行 BLAST 检索,确定获得了发菜 *Ferritin* 基因的编码序列 (图 3)。由 *Ferritin* 基因序列所推译的氨基酸序列表明 *Ferritin* 包含 179 个氨基酸残基。通过 DNA star 6.0 分析表明 *Ferritin* 的带电荷总氨基酸为 29.05%,极性氨基酸占 22.35%,疏水氨基酸占 35.20%,酸性氨基酸和碱性氨基酸分别占 13.97% 和 8.38%。在 *Ferritin* 中含量最丰富的氨基酸为 Leu (12.29%)、Gly (9.50%)、Glu (7.82%)、Ala (7.26%)、Gln (6.70%)、Val (6.70%)、Asp (6.15%)、Thr (6.15%)。

应用 DNAMAN 软件将发菜 *Ferritin* 基因核苷酸序列和氨基酸序列与 GenBank 中收录的一些藻类相关序列进行 BLAST 比较,发现发菜 *Ferritin* 基因具有较高的保守性,与点形念珠藻 (*N. punctiforme* PCC 73102) *Ferritin* 基因核苷酸同源性达 93.1%,氨基酸同源性达 94.4%;与念珠藻 (*Nostoc* sp. PCC7120) 基因核苷酸同源性达 78.9%,氨基酸同源性为 80.4%;与多变鱼腥藻 (*Ananaena variabilis*) 基因核苷酸同源性为 78.9%,氨基酸同源性为 80.4%;与多变鱼腥藻 ATCC 29413 (*A. variabilis* ATCC 29413) 基因核苷酸同源性为 78.1%,氨基酸同源性达 80.4%。而与蓝杆藻 (*Cyanothecce* sp. ATCC 51142) 基因核苷酸序列和氨基酸同源性最低,分别为 65.6% 和 65.4% (图 4)。

2.4 发菜 *Ferritin* 二级结构预测结果

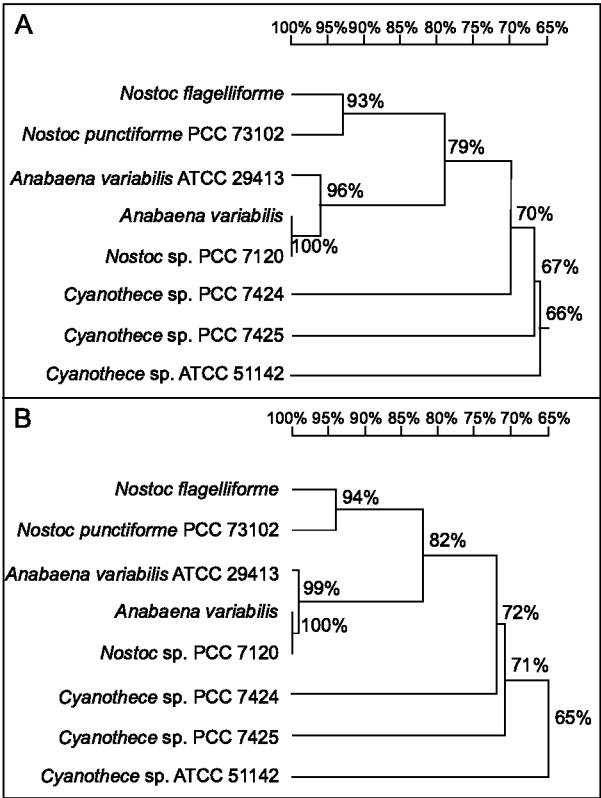
运用 DNAMAN 软件、PBILLYON-GERLAND 信息库、SWISS MODEL 网站和 DNASTar 软件对 *Ferritin* 二级结构进行预测分析结果表明,发菜 *Ferritin* 主要是由 α 螺旋和随机卷曲构成 (表 1)。

2.5 *Ferritin* 在 *E. coli* 中的表达

PCR 扩增 *Ferritin* 基因,构建 *Ferritin* 基因表达载体 pET28a-*Ferritin*。将重组质粒 pET28a-*Ferritin* 转化到大肠杆菌,通过卡纳青霉素抗性挑选阳性克隆子,提取质粒进行 PCR 和双酶切验证。pET28a-*Ferritin* 经双酶切后,在 540 bp 处出现一条特异条

1 ATGCGTACAATAAACATTGGTTTGGCTGAAGAACAGCGTCAAGGTGTAATTAATCTGTAAATCAAGATTGGCAGATGCTTATTACTG
1 M R T I N I G L T E E Q R Q G V I N L L N Q D L A D A Y L L
91 TTGGTGAACCAAAAAAGTATCACTGGGATGTCGTTGGGCTCAGTTCGCTCTTTGCACCAGCTTTGGGAAGAACTACCAACGCTG
31 L V K T K K Y H W D V V G P Q F R S L H Q L W E E H Y Q T L
181 ACTCTAAATATTGATGCTTTGGCAGAGCGGATTCGTGCTTTGGCGCGTTATCCAGTTGGCAGATTGGAAGGATTCTCAAGATTGCTAGC
61 T L N I D A L A E R I R A L G G Y P V G T L E G F L K I A S
271 CTCAAGGAACATGCTGGTAATGTTCCACAGCAACGGGGATGGTATCTAATCTAGTGAATGATCATGAGCAAGTTATTCTGAACCTAAGA
91 L K E H A G N V P T A T G M V S N L V N D H E Q V I R N L R
361 GACCATGTGGATCAGTCTGGTGACCAAGTCCACGATCAGGGCAGTGTGACTTTCTGACTGGACTGATGGAACAGCATGAGGAAATGGCT
121 D H V D Q S G D Q F H D Q G T A D F L T G L M E Q H E E M A
451 TGGATGTTACGTTTCATTGTAAGGCGAAGCACTAGGCCAGATGGTAGACAGCCAGCAGAAGGGGCTAAAACTCTGTTGGTGTGTAA
151 W M L R S F I E G E A L G P D G R Q P A E G A K T P V G V *

图 3 发菜 *Ferritin* DNA 的核苷酸序列 (上行) 及推导的氨基酸序列 (下行)
Fig. 3 Schematic representation of the nucleotide sequence (upper lines) and its deduced amino acid sequence (lower lines) of *Ferritin* of *N. flagelliforme*



A: 核苷酸序列同源树; B: 氨基酸序列同源树。从上到下物种依次为: 发菜、点形念珠藻、多变鱼腥藻、多变鱼腥藻、念珠藻、蓝杆藻 (PCC 7424)、蓝杆藻 (PCC 7425)、蓝杆藻 (ATCC 51142)。
A: Homology tree of nucleotide sequences; B: Homology tree of amino acid sequences.

图 4 *Ferritin* 核苷酸序列和氨基酸序列同源树
Fig. 4 Homology tree of nucleotide sequences and amino acid sequences of *Ferritin*

带,与预期片段大小一致。测序结果表明插入的 DNA 片段就是 *Ferritin* 基因。将 pET28a-*Ferritin* 阳性质粒转化到 BL21 感受态细胞中,并以 IPTG 诱导 *Ferritin* 蛋白表达,SDS-PAGE 电泳结果表明有大量

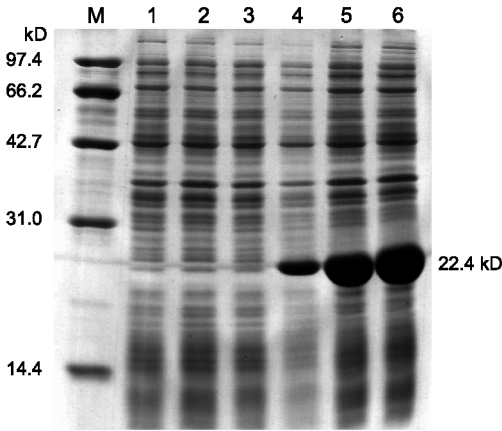
表 1 发菜 <i>Ferritin</i> 二级结构预测结果				
Table 1 The secondary structure prediction of <i>Ferritin</i> from <i>N. flagelliforme</i>				
分析方法 Method	α 螺旋 α helix	β 折叠 β strands	转角 Turn	随机卷曲 Random coil
DNAMAN	90* (50.28% **)	8 (4.47%)	0	81 (45.25%)
PBILLYON- GERLAND Hopfield (HNN)	116 (64.80%)	3 (1.68%)	0	60 (33.52%)
SWISS MODEL	116 (64.86%)	0	0	63 (35.14%)
DNA Star (Garner-Robson)	95 (53.07%)	14 (7.82%)	27 (15.08%)	45 (25.14%)

* 氨基酸数目; ** 占全部氨基酸的百分比。
* Amount of amino acid; ** Amino acid in total percentage.

外源蛋白表达 (图 5), 外源蛋白分子量约为 22.4 kD, 与预测的 *Ferritin* 分子量相近。经凝胶扫描测定, IPTG 诱导 5 h 后外源蛋白约占细菌蛋白总量的 72.5%。

2.6 发菜干旱胁迫条件下 *Ferritin* 基因的表达特征
提取不同干旱条件下发菜的总 RNA, 并进行定量。取等量的总 RNA 进行反转录, 并取等量的反转录产物进行 RT-PCR 扩增。最后取等量的 PCR 产物在琼脂糖凝胶电泳分析。结果表明, 随着干旱胁迫程度的加深, *Ferritin* 的转录水平表达量逐渐降低, 在失水干燥 48 h 后的表达量明显低于充分吸水时的表达量 ($p < 0.05$) (图 6), 这与 *Ferritin* 在干燥和恢复吸水条件下的表达趋势基本一致。

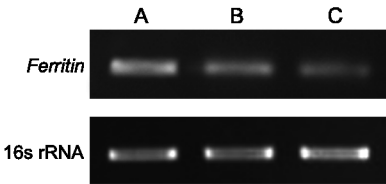
3 讨论
植物在干旱条件下体内会产生大量的 ROS, 由于 ROS 对细胞具有严重的伤害作用, 因此 ROS 的



M: 蛋白分子量标准; 1: 未诱导的空质粒转化子; 2: IPTG 诱导的空质粒转化子; 3: 未诱导的阳性质粒转化子; 4: IPTG 诱导 1 h 的阳性质粒转化子; 5: IPTG 诱导 3 h 的阳性质粒转化子; 6: IPTG 诱导 5 h 的阳性质粒转化子。
M: Protein marker; 1: IPTG uninduced negative transformant; 2: IPTG induced negative transformant; 3: IPTG uninduced positive transformant with pET28a-*Ferritin*; 4: IPTG induced positive transformant with pET28a-*Ferritin* after 1 h; 5: IPTG induced positive transformant with pET28a-*Ferritin* after 3 h; 6: IPTG induced positive transformant with pET28a-*Ferritin* after 5 h.

图 5 *Ferritin* 蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 5 SDS-PAGE map of *Ferritin* expressed in *E. coli*



A: 发菜藻体充分吸水 4 h; B: 发菜藻体充分吸水 4 h 后自然失水 6 h; C: 发菜藻体充分吸水 4 h 后自然失水 48 h。
A: Colonies were subjected to 4 hours of rehydration; B: Colonies were subjected to 4 hours of rehydration followed by dehydration for 6 hours; C: Colonies were subjected to 4 hours of rehydration followed by dehydration for 48 hours.

图 6 干旱胁迫条件下发菜 *Ferritin* 的表达谱

Fig. 6 Semiquantitative RT-PCR reveals the transcriptional dynamics of *Ferritin* when *N. flagelliforme* subjected to desiccation

及时清除对植物耐旱性能的提高具有重要的意义。Shirkey 等^[16]认为,清除氧自由基的机制对增强原核生物的抗胁迫有重要作用。本研究结果表明,发菜 *Ferritin* 表达量随着干旱胁迫的加深表达量逐渐降低(图 1),而 *Ferritin* 是一种 Dps 家族蛋白,不仅具有储存铁的功能,而且是一种重要的抗氧化蛋白,其表达受到铁和氧化性损伤调节^[21,22]。因此,这一结果暗示 *Ferritin* 在发菜耐旱作用中可能发挥了重

要作用,其表达量可能受到铁和氧化性损伤调节,但是铁和氧化性损伤是如何在分子、细胞和组织水平上调控发菜 *Ferritin* 表达的,目前还不明确。此外,任何蛋白(酶)发挥其表达调控都是多个因素综合作用的结果^[23],植物体内 *Ferritin* 的表达与植物的生长发育和所处的环境密切相关。发菜生长于极端干旱的环境中,其风干含水量在 7.3% ~ 11.2% 之间,饱和含水量在 616% ~ 1258.4% 之间,相对含水量极低,只有 1% 左右,与其他旱生植物相比,对极端干旱环境具有更强的适应能力^[13,24]。此外,发菜在干旱胁迫条件下,新陈代谢减弱,光合活性降低,固氮能力下降,而恢复吸水时,光合活性和固氮能力升高^[25-27]。因此,发菜的在其生长发育和抗逆过程中,*Ferritin* 究竟是单独起到抗逆作用还是与其他因素相互影响共同抵御干旱环境,仍需要深入研究。

本研究运用蛋白质组学方法和技术比较发菜在干旱胁迫条件下的差异蛋白质变化,确定了下调表达的 *Ferritin* 蛋白,根据 *Ferritin* 鉴定的氨基酸序列设计简并性引物,成功克隆出了发菜中编码 *Ferritin* 的基因。同源性比较发现发菜 *Ferritin* 基因具有较高的保守性,与点形念珠藻(*N. punctiforme* PCC 73102) *Ferritin* 基因核苷酸同源性达 93.1%,氨基酸同源性达 94.4%。二级结构预测表明发菜 *Ferritin* 主要由 α 螺旋和随机卷曲构成。这为进一步研究发菜 *Ferritin* 结构及其在陆生蓝藻干旱防御和胁迫应答、控制细胞的氧化还原平衡和提高陆生蓝藻的抗逆性机制等方面奠定了基础。此外,本研究构建了发菜 *Ferritin* 高效表达载体,表达率占可溶性蛋白的 70% 以上,且以可溶性蛋白的形式存在,为今后利用工程菌大量生产 *Ferritin* 提供了试验依据。

参考文献:

[1] Simon C A. The Ferritin-like superfamily: Evolution of the biological iron storeman from a rubrerythrin-like ancestor [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800: 691-705.
[2] Chasteen N D. Ferritin. Uptake, storage, and release of iron [J]. *Met Ions Bio Syst*, 1998, 35: 479-514.
[3] Carrondo M A. Ferritins, iron uptake and storage from the bacterioferritin viewpoint [J]. *EMBO J*,

- 2003, 22: 1959–1968.
- [4] Grant R A, Filman D J, Finkel S E, Kolter R, Hogle J M. The crystal structure of Dps, a ferritin homolog that binds and protects DNA [J]. *Nat Struct Biol*, 1998, 5: 294–303.
- [5] Zhao G, Bou-Abdallah F, Arosio P, Levi S, Janus-Chandler C, Chasteen N D. Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin. The role of hydrogen peroxide [J]. *Biochemistry*, 2003, 42: 3142–3150.
- [6] Almiron M, Link A J, Deirdre F, Kolter R. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli* [J]. *Genes Dev*, 1992, 6: 2646–2654.
- [7] Chiancone E, Ceci P. The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: detoxication of iron and hydrogen peroxide and DNA binding [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800: 798–805.
- [8] Harrison P M, Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1275: 161–203.
- [9] Paolo A, Rosaria I, Patrizia C. Ferritins: A family of molecules for iron storage, antioxidation and more [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1790: 589–599.
- [10] Angelini R, Manes F, Federico R. Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chickpea stems [J]. *Planta*, 1990, 182: 89–96.
- [11] Gao K S. Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*, a review [J]. *J Appl Phycol*, 1998, 10: 37–49.
- [12] Cameron R E. Species of *Nostoc vaucher* occurring in the Sonoran Desert in Arizona [J]. *Tran Am Microsc Soc*, 1962, 81: 379–384.
- [13] 钱凯先, 朱浩然, 陈树谷. 发菜的生态条件及其规律分析 [J]. 植物生态学与地植物学报, 1989, 13(2): 97–105.
- [14] 张爱红, 邱保胜, 刘志礼. 陆生念珠藻的耐干旱机制 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(3): 516–521.
- [15] Potts M. Desiccation tolerance of prokaryotes [J]. *Micro Rev*, 1994, 58: 755–805.
- [16] Shirkey B, Kovarcik D P, Wright D J. Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant sodF mRNA in *Nostoc commune* (Cyanobacteria) after years of desiccation [J]. *J Bact*, 2000, 182(2): 189–197.
- [17] 梁文裕, 王星, 焦广飞, 张喜娟, 陈伟. 发菜蛋白质组双向电泳技术的建立及优化 [J]. 西北植物学报, 2009, 29(8): 1550–1556.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 7: 248–254.
- [19] 梁文裕, 焦广飞, 游向荣, 周有文, 陈伟. 干燥和复吸水条件下发菜 Mn-CAT 的差异表达与基因克隆 [J]. 西北植物学报, 2011, 31(2): 248–254.
- [20] 张晓雯. 蓝藻信号转导系统的比较基因组学分析及重要基因功能的验证 [D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2008: 70–74.
- [21] Theil E C. Ferritin: at the crossroads of iron and oxygen metabolism [J]. *J Nutr*, 2003, 133: 1549S–1553S.
- [22] Theil E C. Coordinating responses to iron and oxygen stress with DNA and mRNA promoters: the ferritin story [J]. *Biomaterials*, 2007, 20: 513–521.
- [23] 汪莹, 陈李萍, 陈晓, 章秀, 于晶, 王全喜. 发菜中超氧化物歧化酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. 植物研究, 2007, 27(3): 289–292.
- [24] 唐进年, 赵明, 张吨明, 张锦春. 念珠藻发菜的水分生理特性 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 236–243.
- [25] Zhao X M, Bi Y H, Chen L, Hu S, Hu Z Y. Responses of photosynthetic activity in the drought-tolerant cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme* to rehydration at different temperature [J]. *J Arid Environ*, 2008, 72: 370–377.
- [26] 毕永红, 胡征宇. 水分对发状念珠藻生理活性的影响 [J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(6): 503–507.
- [27] Wei L Z, Ma L M, Wang Q X, Mi H L. Effect of cell amount on photosynthetic yield in the cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* and involvement of NADPH dehydrogenase-mediated cyclic electron transport [J]. *J Appl Phycol*, 2009, 21: 179–184.