

研究简报

苦瓜谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶
cDNA 的克隆及其特征分析*

李文君 刘进元** 赵南明

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 根据谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶 (PHGPX) 氨基酸序列中高度保守的区段设计引物, 采用 RACE-PCR 从苦瓜中克隆到一个全长 927 bp 的 cDNA 片段. DNA 序列的数据库分析比较表明, 该 cDNA 编码 167 个氨基酸, 含有动植物 PHGPX 的特征结构, 是一个新发现的苦瓜 PHGPX 基因 (*momPHGPX*). RNA 印迹结果显示, 该基因在苦瓜幼苗的根中表达相对较弱, 茎的信号较强, 叶中最强. 这些结果将有助于深入研究植物 PHGPX 的功能以及全面了解植物抗氧化体系.

关键词 苦瓜, cDNA 克隆, 序列特征, 谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶

学科分类号 Q943.2

谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶 (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, PHGPX) 能特异地催化磷脂氢过氧化物的还原, 保护生物膜免受氧化损伤, 是动植物抗氧化酶系统中的重要一员^[1~3]. 自从 1982 年 Ursini 等^[1]最先从猪的心脏中发现该酶以来, 至今已从多种哺乳动物中检测到这种具有还原磷脂氢过氧化物功能的 PHGPX 蛋白^[4,5]. 而在植物方面到 90 年代初才从高盐胁迫的柑桔培养细胞中分离到一种 Cit-SAP 蛋白, 并经活性测定证实是 PHGPX^[6], 这是第一个得到确认的植物 PHGPX. 最近作者也从水稻中分离到一个 PHGPX 基因^[7], 用该基因的抗体进行的蛋白质印迹结果显示水稻旗叶中该蛋白质的累积量最高, 这是从重要粮食作物中得到确认的第一个 PHGPX 蛋白. 目前随着植物功能基因解析的进展, 已从烟草^[8]、菠菜^[9]、豌豆^[10]、拟南芥^[11]等高等植物中克隆到多个 PHGPX 基因, 但对这些 PHGPX 蛋白的特性与功能却知之甚少. 动植物的 PHGPX 活性相差几百倍, 又有不同细胞定位的同工型^[12], 从不同类型的物种中克隆更多的基因, 将有助于对 PHGPX 结构与功能的认识.

本研究首次从药用植物苦瓜 (*Momordica charantia*) 中克隆到了完整的 PHGPX 的 cDNA, 并对其编码的蛋白质序列特征及其组织分布进行了初步分析, 将为进一步研究植物 PHGPX 的功能以

及全面了解植物抗氧化体系打下基础.

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验中所用苦瓜品种为绿苦瓜 915 (*Momordica charantia* cv. Green 915) 购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 在温室种植供试, 所用样品都取自 4 周龄的苦瓜幼苗.

1.2 RNA 的提取、RACE-PCR 及片段的克隆

用苯酚-SDS 法^[13]提取植物总 RNA. 用 QIAGEN 公司的 Oligotex mRNA Mini Kit 纯化得到高质量的 mRNA. cDNA 合成和 RACE-PCR 参照 CLONTECH 公司的 SMART RACE cDNA Amplification Kit 说明书. PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶分离后回收, 克隆到 TAKARA 公司的 pMD 18-T 载体中, 进行 DNA 序列测定.

1.3 RNA 印迹

用 1.2% 的甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离 RNA 样品, 碱法转移至 Hybond-N⁺ 尼龙膜

* 国家自然科学基金 (39770078, 30170080)、国家重点基础研究专项 (G1998010100)、云南省校合作基金 (98YQ010) 和国家转基因植物研究专项 (J99-A-041) 资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62772243, E-mail: liujy@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2001-05-14, 接受日期: 2001-06-23

(Amersham) 上. 探针的标记和杂交按 PERBIO 公司的 North2South Direct HRP Labeling and Detection Kit 说明书中的方法操作.

1.4 cDNA 和蛋白质序列的计算机分析及分子系统进化树的构建

cDNA 序列用 DNASIS 软件翻译成氨基酸序列; cDNA 和蛋白质序列使用 Gapped BLAST 程序搜索 DNA 序列库; 蛋白质基序查询 PROSITE 数据库^[14]; 蛋白质家族分析查询 Pfam 数据库^[15]. 采用 CLUSTAL W1.7 软件进行序列同源性比较分析, 并用 PHYLIP 软件进行分子系统进化树的构建.

2 结果与讨论

2.1 苦瓜 PHGPX 全长 cDNA 的获得及序列分析

根据 PHGPX 氨基酸序列中高度保守的两个区段 NVAS (KQ) CG 和 KWNF (ST) KFL^[12] 设计出一对简并引物, 用 RT-PCR 从苦瓜 cDNA 中扩增出 PHGPX cDNA 的中间段. 然后再根据中间段

的核苷酸序列设计非简并的特异性引物分别进行 3'-和 5'-SMART RACE-PCR, 分别得到了 500 bp 和 750 bp 左右的 DNA 片段. 序列分析结果显示这两个片段包含完整的 PHGPX cDNA 序列 (图 1). 如图 1 所示, 该 cDNA 长 927 bp, 由 504 bp 的读码框、212 bp 的 3' 端非翻译区和 211 bp 的 5' 端非翻译区组成, 编码 167 个氨基酸, 其聚腺苷酸化信号 AATAAA 位于终止密码子下游 24 bp 处. 由于在 ATG 上游有三个连续的与读码框框架相同的终止密码子, 因此这个读码框编码的是一个全长蛋白质. 经计算机搜索 EMBL/GenBank/DBJ 数据库确认该 cDNA 与植物 PHGPX 基因的同源性较高, 是苦瓜中发现的一个新的植物 PHGPX 基因, 命名为 *mocPH GPX* 即 苦瓜 PHGPX, 并已登录 GenBank, 其全序列的接收号为 AF346906. 该基因在距离起始密码子 ATG - 3 和 + 4 位置上分别是 A 和 G, 这种围绕起始密码子的特征是高效转录起始的一致信号^[16], 这暗示着 PHGPX 在体内具有重要作用.

```

GGAAATTTCTTGCTCATCTAACTAAGGAAA 30
TAATTTTCTTTTATTTTCTTCCACGGACGTAAGGCTGCGTTGAAGATTAAATCGTTGAAA 90
TTGAATTCTCTTCGAATGCATTTCTTCAAAAATTGCCAATTGGATCGCCCTCTTGTTTCT 150
CTGTTTCTCCGCATTTTATTACTACCAAACAGGCCAAATTTCTCACTCGTTTCTTCTCAA 210
TATGGCTGAAGAATCCCCAAATCCATATATGATTTCACTGTCAAGGATATTCTGTTGGAA 270
M A E E S P K S I Y D F T V K D I R G N 20
TGATGTGTGCCCTTAGTCAATACAGTGGGAAGGTTCTTCTGATAGTGAATGTTGCTTCTAA 330
D V C L S Q Y S G K V L L I V N V A S K 40
GTGTGTTTTACGGATTCAAACACAAGGAATTGAATGTATTGTATGACAAGTACAAAAG 390
C G F T D S N Y K E L N V L Y D K Y K S 60
TCAAGGTTTCGAGATATTAGCATTTCTTGAATCAATTTGCACGACAAGAGCCAGGAAC 450
Q G F E I L A F P C N Q F A R Q E P G T 80
CAATGAGGAGATCCAGGAACTCTATGCACAAGGTTCAAAGCAGAATTCCTCATCTTTGA 510
N E E I Q E T L C T R F K A E F P I F D 100
TAAGGTCGAGGTTAACGTAAGAATGCAGCACCCATTTATAAATTCCTGAAATTGAAAAA 570
K V E V N G K N A A P I Y K F L K L K K 120
GGGTGGAATATTTGGCGATGGCATCAAATGGAACCTCACGAAGTTCTTGTTGAACAGAGA 630
G G I F G D G I K W N F T K F L V N R E 140
AGGAAAGGTCGTTGACAGATATGCTCCTACCACCCCTCTCTCAACATTGAGAAAGATAT 690
G K V V D R Y A P T T P P L N I E K D I 160
CCAGAATCTATTGGGATCTGCTTGAACACAAGGTCAGGAACCATACACAAATAAACTCCTG 750
Q N L L G S A * 167
CAGTGCTTGTTTATATGATTGCTTTGTTATGTGAATGCACTTGTAACGTTTCTATGAAC 810
ATGTTTTTATTTTCTCTAGAGGCTGAATCCACATTACATAGTCATGCTTGAACACTGCTT 870
TTTTTTTTTTTATATGCAATGCTGAATTAGTAAGATTACAGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 927

```

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *mocPHGPX*

The nucleotide and the amino acids are numbered from the 5' end of the cDNA and from the initiation methionine residues, respectively. The stop codon is marked by an asterisk and the modified polyadenylation signals are underlined.

通过查询 Pfam 数据库发现, *mocPHGPX* 中含有两个 PHGPX 的特征基序: 第 29~44 号氨基酸残基是 PHGPX 的催化活性区; 第 66~73 号氨基酸残基是 PHGPX 的标志性基序. 在动物 PHGPX 酶分子中, 催化残基 Q、W 和 X (selenocystine, SeCys) 分别位于三个保守结构域: ILAFPCNQF、KWNF (S/T) KFL 和 NVASQXG 中^[12], 这三个结构域在 *mocPHGPX* 中也高度保守. 唯一的区别在于 *mocPHGPX* 中是由 Cys (由 UGU 编码) 替代了 SeCys (由终止密码子 UGA 编码), 其他已报道的植物 PHGPX 也是如此, 说明 *mocPHGPX* 和其他植物 PHGPX 都是非硒依赖型蛋白. 这一点可能就是植物和动物 PHGPX 之间的最显著的差异. SeCys 比 Cys 对底物具有更大的还原潜力, 因而硒依赖型 PHGPX 的催化活性会高于非硒依赖型. 实际上植物也和动物一样存在合成含硒蛋白的机制, 为何植物 PHGPX 在进化过程中选择了活性较低的非硒依赖型目前尚不清楚, 但由于植物 PHGPX 的催化活性低于动物 PHGPX, 而且植物还含有高水平的抗坏血酸过氧化物酶 (APx)^[18], 因此 PHGPX 在植物和动物抗氧化体系中所起的作用应当有所不同.

同源性比较显示, *mocPHGPX* 与其他植物 PHGPX 的同源性明显高于动物 PHGPX, 例如与来自拟南芥、柑桔、烟草、番茄、人和猪的 PHGPX 的氨基酸同源性分别为 76%、72%、71%、68%、50% 和 50%. 且 *mocPHGPX* 与动物 PHGPX 一样, 都在 C 端缺失了谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) C 端中高度保守的 20 个氨基酸残基, 而在 GPx 的 C 端与蛋白质的空间结构和底物特异性两个方面相关, 而这二者正是 PHGPX 与 GPx 家族成员的主要区别所在^[18]. 这些都进一步证实本研究所克隆到的正是 PHGPX 基因.

2.2 苦瓜幼苗中 PHGPX mRNA 的组织分布

为了研究苦瓜 PHGPX 基因的表达模式, 分别从苦瓜幼苗的根、茎和叶中提取总 RNA, 以 PHGPX cDNA 为探针进行 RNA 印迹, 结果表明 PHGPX 在所检测的各组织中均有表达, 转录物大小约 1.0 kb, 与 PHGPX cDNA 长度相当. 而在各组织中的转录量有所不同, 其中根杂交信号相对较弱, 茎的信号较强, 叶中最强 (图 2). 苦瓜 PHGPX 的这一组织表达特征与水稻 PHGPX 的有所不同^[7], 这说明在不同的植物中, PHGPX 基因

的表达模式不尽相同.

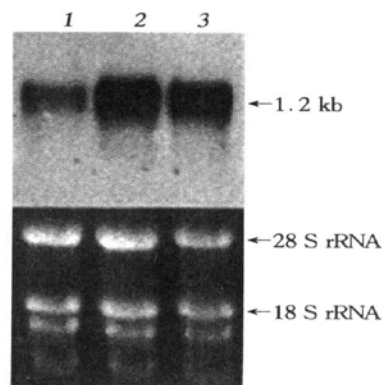


Fig 2 Tissue distribution of *mocPHGPX* in the bitter melon seedlings

20 μ g total RNA from different tissues of the seedlings including roots (1), leaves (2) and stem (3) was separated on a formaldehyde gel, blotted and hybridized with the ³²P-labeled *mocPHGPX* cDNA probe. Ethidium bromide staining of 25 S and 18 S rRNA is shown below as a control of loading homogeneity.

2.3 PHGPX 的分子系统进化分析

为了研究 PHGPX 的进化关系, 对苦瓜 PHGPX 以及从 EMBL 和 SWISSPROT 数据库检索到的其他 19 种生物 PHGPX 的氨基酸序列进行了同源性比较分析, 根据同源性高低, 绘出了分子系统进化树 (图 3). 结果显示 PHGPX 在进化上首先形成单细胞生物和多细胞生物两大分支, 在多细胞生物中又形成动物和植物两大分支, 其中在动物中

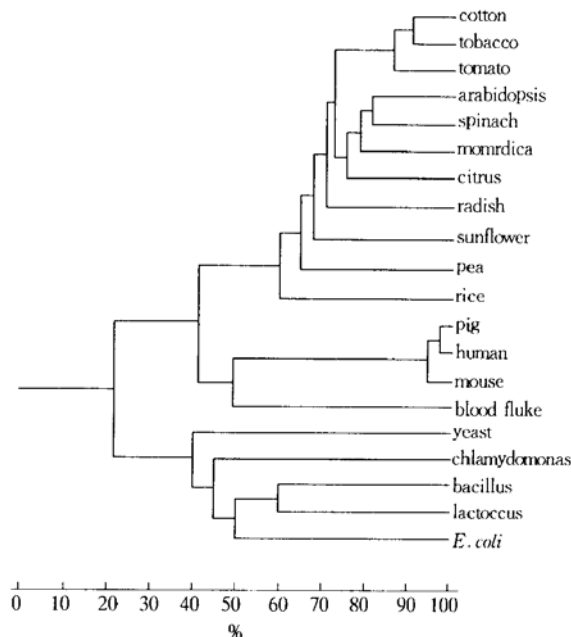


Fig 3 Evolutionary tree of the PHGPX

The percentage shows the similarity between PHGPXes.

又产生无脊椎动物和脊椎动物两个分支, 在植物中也产生单子叶植物和双子叶植物两个分支. PHGPX 的这一分子进化过程与生物物种的整体进化过程, 即目前公认的由低等到高等、由简单到复杂的演变过程是一致的. 这种一致性暗示 PHGPX 在生物体的抗氧化过程中承担着重要使命. 对苦瓜 PHGPX 基因的基因结构和表达特征的进一步研究将为深入了解植物 PHGPX 的功能奠定基础.

参 考 文 献

- 1 Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim Biophys Acta*, 1985, **839** (1): 62~ 70
- 2 李文君, 谷 硕, 金 岚等. 植物谷胱甘肽磷脂氢过氧化物酶基因的筛选. *清华大学学报*, 2000, **40** (11): 12~ 14
Li W J, Gu S, Jin L, *et al.* *J Tsinghua Univ (Sci&Tech)*, 2000, **40** (11): 12~ 14
- 3 Ursini F, Sabina H, Kiess M, *et al.* Dual functional of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, 1999, **285** (5432): 1393~ 1396
- 4 Chu F, Doroshov J, Esworthy R. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem*, 1993, **268** (4): 2571~ 2576
- 5 Thimmalapura R, Burdsall A, Oleksa L, *et al.* Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *J Biol Chem*, 1995, **270** (10): 26993~ 26999
- 6 Tzahar T B, Hayim G B, Holland D, *et al.* A stress associated citrus protein is a distinct plant phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *FEBS Lett*, 1995, **366** (2~ 3): 151~ 155
- 7 Li W J, Feng H, Fan J H, *et al.* Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1493** (2): 225~ 230
- 8 Cricqui M C, Jamet E, Parmentier Y, *et al.* Isolation and characterization of a plant cDNA showing homology to animal glutathione peroxidases. *Plant Molecular Biology*, 1992, **18** (3): 623~ 627
- 9 Sugimoto M, Furui S, Suzuki Y. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase from spinach. *Biosci Biotech Biochem*, 1997, **61** (8): 1379~ 1381
- 10 Mullineaux P M, Karpinski S, Jimenez A, *et al.* Identification of cDNAs encoding plastid-targeted glutathione peroxidase. *Plant J*, 1998, **13** (3): 375~ 379
- 11 Sugimoto M, Sakamoto W. Putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene from *Arabidopsis thaliana* induced by oxidative stress. *Genes Genetic Systems*, 1997, **72** (5): 311~ 316
- 12 Wang Z, Liu J. Primary structural characterization of phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. *Tsinghua Science and Technology*, 2001, **6** (5): 417~ 420
- 13 Palmiter R D. Magnesium precipitation of ribonucleoprotein complexes: expedient techniques for the isolation of undergraded polysomes and messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*, 1974, **13** (17): 3606~ 3610
- 14 Hofmann K, Bucher P, Falquet L. The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res*, 1999, **27** (1): 215~ 219
- 15 Sonnhammer E L, Eddy S R, Durbin R. Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*, 1997, **28** (3): 405~ 420
- 16 Kozak M. The scanning model for translation: An update. *J Cell Biol*, 1989, **108** (2): 229~ 234
- 17 Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, *et al.* Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol*, 2000, **123** (1): 223~ 34
- 18 Ursini F, Maiorino M, Flohé R B, *et al.* Diversity of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 1995, **252**: 38~ 53

Cloning and Characterization of a Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase Gene from *Momordica charantia**

LI Wen-Jun, LIU Jir-Yuan**, ZHAO Nan-Ming

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Using RACE-PCR technique, a full-length cDNA was cloned from *Momordica charantia* and named *mocPHGPX*. The entire *mocPHGPX* cDNA (AF346906) is 927 bp, and encodes 167 amino acids. The derived amino acid sequence data showed that this protein contains the typical (high conservative) structure of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX) previously found in animals and plants. Northern blot analysis displayed that the corresponding transcript is abundant in the leaves and stems but lower in the roots. These results will be helpful to make a thorough investigation of the function of plant PHGPX and to understand the antioxidative systems of plants in an all-round way.

Key words *Momordica charantia*, phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPX), cDNA cloning, sequence characterization

* This work was supported by grants from the National Natural Sciences Foundation of China (39770078, 30170080), the National Basic Research Program of China (G1998010100), Yunnan Province University Cooperation Foundation (98YQ010) and the National Transgenic Plant Research Project (J99-A-041).

** Corresponding author. Tel: 86-10-62772243, E-mail: liujy@mail.tsinghua.edu.cn

Received: May 14, 2001 Accepted: June 23, 2001