

石蒜核糖体蛋白 L21 的基因克隆及氨基酸序列分析

佟金凤, 汪仁, 李晓丹, 江玉梅, 彭峰, 夏冰^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园)江苏省植物迁地保护重点实验室, 江苏南京 210014]

摘要: 根据已知核糖体蛋白 L21(RPL21)基因的保守序列设计 1 对引物,采用 PCR 技术从石蒜 [*Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.]叶片全长 cDNA 文库中筛选出阳性克隆。通过测序和分析,获得 1 条石蒜 RPL21 基因全长 cDNA 序列,命名为 *LrRPL21*, GenBank 登录号为 FJ972626;序列全长 709 bp,编码 1 条具有 164 个氨基酸残基的多肽。采用多种分析程序对石蒜 RPL21 的理化性质以及氨基酸序列的同源性进行了分析比较。结果显示:石蒜 RPL21 的预测分子量为 18 628,理论等电点为 10.36,分子式为 $C_{833}H_{1348}N_{254}S_4$,总平均疏水性指数为 -0.668,为亲水性蛋白;石蒜 RPL21 与其他 8 种植物 RPL21 的氨基酸序列同源性百分率均较高,达到 85%~95%;根据系统树可推测其与油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.)RPL21 的进化关系最近。

关键词: 石蒜;核糖体蛋白;基因;序列分析;氨基酸序列

中图分类号: Q78; Q517 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)04-0013-04

Gene cloning and amino acid sequence analysis of ribosomal protein L21 from *Lycoris radiata*

TONG Jin-feng, WANG Ren, LI Xiao-dan, JIANG Yu-mei, PENG Feng, XIA Bing^① (Jiangsu Province Key Laboratory for Plant *Ex-situ* Conservation, Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(4): 13-16

Abstract: A pair of primers were designed according to the known conserved sequence of ribosomal protein L21 (RPL21) gene, and the positive clone was selected from full length cDNA library of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. leaf by PCR technology. By means of sequencing and analyzing, a full length cDNA sequence of *L. radiata* RPL21 gene was obtained, which was named *LrRPL21* and its GenBank accession number was FJ972626. The full length of *LrRPL21* is 709 bp, which encodes a polypeptide being composed of 164 amino acid residues. Physicochemical property and amino acid sequence homology of *L. radiata* RPL21 were analyzed and compared by some analysis programs. The results show that the putative molecular weight and theoretical isoelectric point of *L. radiata* RPL21 are 18 628 and 10.36, respectively, the molecular formula is $C_{833}H_{1348}N_{254}S_4$, and the grand average index of hydrophobicity is -0.668, which is a hydrophilic protein. Homologous percentage of amino acid sequence of RPL21 between *L. radiata* and other eight species is higher with a percentage of 85%~95%. And according to phylogenetic tree, it can be conjectured that the evolutionary relationship of RPL21 between *L. radiata* and *Elaeis guineensis* Jacq. is the nearest.

Key words: *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.; ribosomal protein; gene; sequence analysis; amino acid sequence

核糖体是细胞进行蛋白质合成的重要场所,通过解码 mRNA,与 tRNA 协同作用合成相应的蛋白质。一般来说,真核生物的核糖体为 80S,由 40S 和 60S 2 个亚基组成,含 3~4 种 RNA 和 80 多种蛋白质^[1]。

核糖体组装过程可分为 3 步:首先在细胞质中合成核糖体蛋白并运送到细胞核内;在核仁内,核糖体蛋白与 rRNA 组装成核糖体;组装完成的核糖体被运送到细胞质中,经过后期加工形成成熟的具有功能的核糖

收稿日期: 2010-08-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30700057);江苏省公益研究服务与条件设备专项(BM2007509)

作者简介: 佟金凤(1980—),女,辽宁昌图人,硕士,助理研究员,主要从事植物生物技术方面的研究。

^①通信作者 E-mail: xiabingbg@sina.com

体^[2-4]。研究结果表明:很多核糖体蛋白除具有组成核糖体和参与蛋白质生物合成的功能外,还具有参与复制、转录加工、翻译调控、DNA 修复、耐药性形成、自体翻译、调控细胞凋亡和正常细胞的恶性转化及发育调控等作用^[5-7]。核糖体蛋白 L21 (RPL21) 是位于真核生物 60S 亚基上的蛋白质,其具体功能迄今为止仍未得到很好的阐释,目前已在 GenBank 登录的 RPL21 超过千条,主要来源于动物和微生物,来源于植物尤其是高等植物的 RPL21 尚不多见。

石蒜 [*Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.] 体内所含的加兰他敏可用于治疗阿尔茨海默氏病和小儿麻痹症等疾病^[8]。目前,有关石蒜的研究较多,作者所在课题组对石蒜也进行了遗传多样性分析、cDNA 文库建立及总 RNA 提取方法等方面的研究^[9-11],但对石蒜 RPL21 尚无研究报道。作者根据来源于其他植物的已知 RPL21 的氨基酸序列,借助生物信息学技术和 PCR 技术筛选 cDNA 文库的方法扩增石蒜 RPL21 基因的 cDNA 序列,并对扩增序列进行测序分析,以期对石蒜 RPL21 及其基因的功能研究提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 材料

实验所用的石蒜叶片全长 cDNA 文库为本实验室采用发芽 20 d 的石蒜嫩叶建立的 cDNA 文库^[10];供试的宿主菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α , 质粒为 pDNR-LIB。

实验用 TRIzol[®] Reagent 购自 Invitrogen 公司; DNA Marker DL2000、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、pMD 18-T Vector 和所有限制性内切酶均购自 Takara 公司;DNA 纯化回收试剂盒购自上海华舜生物工程技术有限公司;其他常规试剂均为国产分析纯。

实验仪器有 AIR TECH 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司生产)、PCR 仪(德国 Eppendorf 公司生产)、电热恒温隔水式精密培养箱(上海天恒医疗器械有限公司生产)、全温振荡培养箱(太仓市华美生化仪器厂生产)、PB303-S 电子精密天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司生产)和 79HW-1 恒温磁力搅拌器(金坛市荣华仪器制造有限公司生产)。

1.2 方法

参考 GenBank 中已经公布的下列植物的 RPL21 基因的保守序列设计引物,包括拟南芥 [*Arabidopsis*

thaliana (L.) Heynh.] *AtL21* (登录号 NM_100831)、大麦 (*Hordeum vulgare* L.) *HvL21* (登录号 AK252012)、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula* Gaertn.) *MtL21* (登录号 BT051422)、油棕 (*Elaeis guineensis* Jacq.) *EgL21* (登录号 EU284979)、毛竹 (*Phyllostachys heterocycla* 'Pubescens') *PeL21* (登录号 FP099981)、水稻 (*Oryza sativa* L.) *OsL21* (登录号 AF093630)、高粱 [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] *SbL21* (登录号 XM_002468489)、小麦 (*Triticum aestivum* L.) *TaL21* (登录号 AF475114) 以及玉米 (*Zea mays* L.) *ZmL21* (登录号 EU976390)。获得的 1 对 PCR 引物中,上游引物序列为 5'-GTTAACGGCGCCGTCACAAG-3';下游引物序列为 5'-CATGTGCAGCCTTCAAGATGC-3'。

随机选取保存于 -75 °C 超低温冰箱中的石蒜叶片全长 cDNA 文库,用灭菌的 LB 液体培养基将原始菌液 ($OD_{600} = 1.2$) 依次稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 的菌液,分别取各级菌液 2 μ L,均匀涂抹在含质量浓度 30 μ g \cdot mL⁻¹ 氯霉素的 LB 固体培养基上,封口膜封口后于 37 °C 恒温条件下倒置培养过夜(或 16 h);随机挑取分散均匀的单菌落,利用 RPL21 引物进行菌落 PCR 检测。PCR 反应结束后,用质量体积分数 1.2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,PCR 产物上样量为 4 μ L。将 PCR 检测为阳性的克隆交由上海英骏生物技术有限公司进行测序,结合序列对比方法,获得该克隆的全长 cDNA 序列。

PCR 反应体系的总体积为 10 μ L,包括 0.5 μ L 菌液(即模板 DNA)、2.5 mmol \cdot L⁻¹ 上游和下游引物各 0.5 μ L、10 \times PCR buffer (含 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂) 1.0 μ L、2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 0.8 μ L、5 U \cdot μ L⁻¹ *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μ L 和 6.5 μ L 双蒸水。PCR 扩增程序为:94 °C 预变性 5 min;然后于 94 °C 变性 30 s、55 °C 退火 1.5 min、72 °C 延伸 1 min,共 33 个循环反应;最后于 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物于 -20 °C 冰箱中保存、备用。

1.3 序列分析

检测并去除所测序列两端的载体序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>),通过开放阅读框寻找并分析新基因的阅读框 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>),核酸和氨基酸序列同源性采用 DNAMAN 软件 (Version 5.2.2.9) 进行分析,并用 ClustalX 1.8 和 PhyloDraw V0.82 软件进行系统树分析。采用 ProtParam 程序 (

expasy.org/tools/protparam.html)分析石蒜 RPL21 的氨基酸组成,并用 ProtScale 程序(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>)分析石蒜 RPL21 的疏水性。采用 Psort 程序(<http://www.psort.org>)进行石蒜 RPL21 的亚细胞定位分析。

2 结果和分析

2.1 石蒜核糖体蛋白 L21 基因全长 cDNA 序列分析

通过对筛选的阳性克隆进行测序,并删除载体序

列及引物序列。获得的石蒜核糖体蛋白 L21 基因的全长 cDNA 序列见图 1。该序列已登录在 GenBank 中,登录号为 FJ972626,命名为 *LrRPL21*。将 *LrRPL21* 的基因序列在 NCBI 提供的基因库中进行序列同源性检索,通过 BLASTn 分析,确定该基因的长度为 709 bp,包含 53 bp 的 5'非编码区、161 bp 的 3'非编码区和 495 bp 的完整开放阅读框,开放阅读框的起始位点在 54 bp 处,终止位点在 548 bp 处,编码 164 个氨基酸残基。

```

1  GGGGAGCCTCAATCCCCATTCTACAAAATAACAAGAAGAGAAAAAATAATGCCGGCGGGTCACGGTCTCCGATCGCGCACGGCGC
                                     M P A G H G L R S R T R
91  ATCTGTTCCGACGGCCGTTTCAGGAAGAAGGGGTATATTCCTTAACGACGTATCTTCGGAGCTACAAGATTGGGGACTACGTCGACGTCA
   D L F A R P F R K K G Y I P L T T Y L R S Y K I G D Y V D V
181 AAGTTAACGGCGCGCTCCACAAGGGCATGCCCAAGTTCTACCACGGCCGACCGGCATCGTATGGAACGTCACCAAGCGCGCCATCG
   K V N G A V H K G M P H K F Y H G R T G I V W N V T K R A I
271 GCCTCGAGATCAACAAGCAGGTAGGCAATAGAATCATTAGGAAGAGGATCCACGTGAGAGTAGAGCATGTGCAGCCTTCAAGATGCACTG
   G V E I N K Q V G N R I I R K R I H V R V E H V Q P S R C T
361 AGGATTTCCCTCTGAGGAAGATTAAGAACGATAAGCTAAAGGCAGAGGCAAAGGCTCGTGTGAGGTTATCAGCACCAAGCGACAACCTG
   E D F R L R K I K N D K L K A E A K A R G E V I S T K R Q P
451 AAGGTCCCAAGCCTGGTTTCATGTTAGAAGGAGCGACGTTGGAGACTGTCACCTCCTATTCCTTATGATGTTGGCAACGACCTCAAGGGTG
   E G P K P G F M V E G A T L E T V T P I P Y D V G N D L K G
541 GTTATTAGA GCGCTTTTATGTTATGCTTTATGATGTTTATTTGCTTCTTCCA AAGACTTTGTTGTTGTTGTTGAA ACTTTTGTCT
   G Y *
631 TCATTAGAGTTATTTGACAACTTAAATATGTGTTTTGGATTGTTACTAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

*: 终止密码 Stop codon.

图 1 石蒜 *LrRPL21* 基因的 cDNA 序列及核糖体蛋白 L21 的氨基酸序列

Fig. 1 The cDNA sequence of *LrRPL21* gene and amino acid sequence of ribosomal protein L21 of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.

2.2 石蒜核糖体蛋白 L21 的理化性质分析

使用 ProtParam 程序对 *LrRPL21* 基因编码的蛋白质一级结构和理化性质进行预测,结果显示该蛋白质的分子量为 18 628,理论等电点为 10.36;分子式为 $C_{833}H_{1348}N_{254}S_4$,半衰期为 30 h,不稳定指数为 40.63,脂肪指数为 76.59,总平均疏水性指数为-0.668。因此,判定该基因编码的蛋白质为亲水性蛋白。

2.3 石蒜 *LrRPL21* 基因编码的氨基酸序列的同源性分析及系统树分析

将石蒜 *LrRPL21* 基因编码的 RPL21 氨基酸序列与其他 8 种植物 RPL21 的氨基酸序列进行同源性比较,结果见表 1。由表 1 可以看出:石蒜 *LrRPL21* 基因编码的 RPL21 与其他 8 种植物 RPL21 的氨基酸残基数相同,均为 164;它们的氨基酸序列有较高的同源性,同源性百分率达到 85%~95%。其中,石蒜

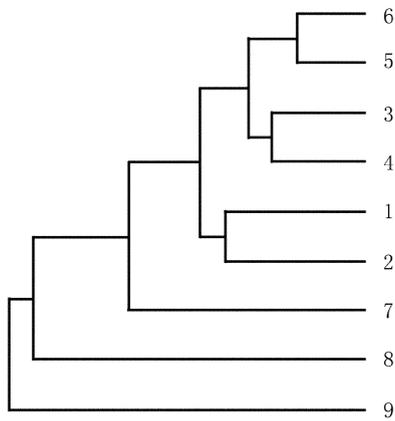
表 1 石蒜与其他 8 种植物核糖体蛋白 L21 氨基酸序列的同源性比较
Table 1 Homology comparison of amino acid sequence of ribosomal protein L21 between *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. and other eight species

种类号 ¹⁾ No. of species ¹⁾	基因登录号 Gene accession number	同源性百分率/% Homologous percentage
1	FJ972626	
2	EU284979	95
3	FP099981	94
4	AF093630	93
5	XM_002468489	93
6	EU976390	93
7	AK252012	90
8	BT051422	87
9	NM_100831	85

¹⁾ 1. 石蒜 *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.; 2. 油棕 *Elaeis guineensis* Jacq.; 3. 毛竹 *Phyllostachys heterocyclus* 'Pubescens'; 4. 水稻 *Oryza sativa* L.; 5. 高粱 *Sorghum bicolor* (L.) Moench; 6. 玉米 *Zea mays* L.; 7. 大麦 *Hordeum vulgare* L.; 8. 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.; 9. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

LrRPL21 基因编码的 RPL21 的氨基酸序列与油棕 RPL21 的同源性百分率最高, 达到 95%; 与拟南芥 RPL21 的同源性百分率最低, 但也达到 85%。

将石蒜 *LrRPL21* 基因编码的 RPL21 的氨基酸序列与油棕、毛竹、水稻、高粱、玉米、大麦、蒺藜苜蓿和拟南芥的 RPL21 氨基酸序列进行系统进化分析, 获得的系统树见图 2。结果显示: 石蒜 *LrRPL21* 基因编码的 RPL21 与油棕 RPL21 的进化关系最近, 与拟南芥 RPL21 的进化关系最远。该结果与同源性分析和经典分类的结果基本一致。



1. 石蒜 *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb.; 2. 油棕 *Elaeis guineensis* Jacq.; 3. 毛竹 *Phyllostachys heterocyclus* 'Pubescens'; 4. 水稻 *Oryza sativa* L.; 5. 高粱 *Sorghum bicolor* (L.) Moench; 6. 玉米 *Zea mays* L.; 7. 大麦 *Hordeum vulgare* L.; 8. 蒺藜苜蓿 *Medicago truncatula* Gaertn.; 9. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

图 2 基于核糖体蛋白 L21 氨基酸序列的石蒜与其他 8 种植物的系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Lycoris radiata* (L'Hér.) Herb. and other eight species based on amino acid sequence of ribosomal protein L21

3 讨论和结论

目前, 分离克隆目的基因的方法有很多, 在已经建立了高质量全长 cDNA 文库的基础上筛选目的基因, 则以采用根据保守序列设计引物并进行 PCR 扩增的方法最为简单快速。本研究正是在建立了高质量石蒜叶片全长 cDNA 文库的基础上成功克隆获得了石蒜体内 *LrRPL21* 基因的全长 cDNA 序列。

核糖体蛋白 L21 是构成真核生物核糖体的 80 多种蛋白之一^[1]。然而, 许多核糖体蛋白除了组成核糖体和行使其功能以外, 还具有其他重要的生理功能^[5]。目前, 对某些核糖体蛋白及其功能已有广泛研

究, 例如 L11^[12], 但有关植物核糖体蛋白 L21 及其功能的报道比较少。作者成功克隆获得了石蒜的 *LrRPL21* 基因, 序列全长 709 bp, 编码 1 条具有 164 个氨基酸残基的多肽, 预测分子量是 18 628, 理论等电点为 10.36, 分子式为 $C_{833}H_{1348}N_{254}S_4$, 总平均疏水性指数为 -0.668, 属于亲水性蛋白。氨基酸序列比较结果表明: 石蒜核糖体蛋白 L21 的氨基酸序列与其他 8 种植物核糖体蛋白 L21 的氨基酸序列的同源性百分率均较高, 达到 85% ~ 95%, 其中, 石蒜核糖体蛋白 L21 与油棕 L21 氨基酸序列的进化关系最近。有关石蒜核糖体蛋白 L21 的功能有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Wool I G. The structure and function of eukaryotic ribosomes [J]. Annual Review of Biochemistry, 1979, 48: 719-754.
- [2] Mager W H. Control of ribosomal protein gene expression [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1988, 949(1): 1-15.
- [3] Espinosa L, Martín M, Nicolas A, et al. Primary sequence of the human, lysine-rich, ribosomal protein RPL38 and detection of an unusual RPL38 processed pseudogene in the promoter region of the type-1 angiotensin II receptor gene [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1997, 1354(1): 58-64.
- [4] Daigneault L, Beaulieu R, Filion M, et al. Cloning and identification of genes differentially expressed in metastatic and non-metastatic rat rhabdomyosarcoma cell lines [J]. Clinical and Experimental Metastasis, 1995, 13(5): 345-356.
- [5] Wool I G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins [J]. Trends in Biochemical Sciences, 1996, 21(5): 164-165.
- [6] Clemens M J. Targets and mechanisms for the regulation of translation in malignant transformation [J]. Oncogene, 2004, 23(18): 3180-3188.
- [7] Stoneley M, Willis A E. Aberrant regulation of translation initiation in tumorigenesis [J]. Current Molecular Medicine, 2003, 3(7): 597-603.
- [8] 阮龙喜. 石蒜科植物生物碱的一些研究进展 [J]. 药学通报, 1988, 23(8): 453-455.
- [9] 袁菊红, 权俊萍, 胡绵好, 等. 石蒜 SRAP-PCR 扩增体系的建立与优化 [J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4): 1-6.
- [10] 王春燕, 夏冰, 李晓丹, 等. 石蒜叶片全长 cDNA 文库的构建 [J]. 江苏农业学报, 2009, 25(3): 542-546.
- [11] 江玉梅, 汪仁, 束晓春, 等. 用改良 CsCl 密度梯度离心法提取石蒜叶片和鳞茎总 RNA [J]. 植物资源与环境学报, 2008, 17(3): 78-80.
- [12] 王玉瑶, 张志云, 梁爱华. 核糖体蛋白 L11 及其功能 [J]. 生命的化学, 2008, 28(1): 104-106.