

罗 岸. 烟草合子时期特异表达基因的克隆与分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 65–68.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.017

烟草合子时期特异表达基因的克隆与分析

罗 岸

(长江大学生命科学学院, 湖北荆州 434023)

摘要:在烟草合子中克隆到 1 种新型的未知功能基因 *NiZE583*, 编码包含有 91 个氨基酸残基的多肽链。生物信息学分析显示:该蛋白的 N 端含有 1 段疏水性信号肽,但在其他物种中没有发现同类蛋白。*NiZE583*–绿色荧光蛋白(*NiZE583*–GFP)融合蛋白亚细胞定位显示,该蛋白可能存在于液泡中。利用染色体步移技术获得该基因 5'端上游 3 866 bp 的侧翼序列(启动子和 5'UTR),经检测发现,具有较强的启动子活性。研究结果为进一步研究该基因在烟草早期胚胎发生中的功能奠定了基础。

关键词:烟草;合子;液泡;基因克隆;信号肽

中图分类号: S572.01; Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0065-04

被子植物的受精过程被称为双受精,即来自同一花粉的 2 个精子同时进入胚囊,1 个与卵细胞结合形成二倍体的合子,另 2 个与中央细胞结合形成三倍体的胚乳母细胞。受精完成后,胚胎逐渐形成基本的形态和生理结构^[1],而胚乳则在此过程中扮演支持者的角色^[2-3]。

对于受精和早期胚胎发生过程的分子机制在动物中研究得比较深入,但是在植物中由于技术手段的限制导致对这方面的认识一直有许多空白。因为植物的受精和胚胎发生过程都存在于深埋在植物孢子体内的胚囊中,所以很难对整个过程中直接进行观察并了解背后的分子机制。随着现代生物学技术的发展,目前已能获得玉米、拟南芥、大米、大麦等一些植物的配子、合子和早期胚胎;此外,这些植物中与生殖发育息息相关的细胞 cDNA 文库、转录谱等也已陆续获得^[4-7]。这些进展对于研究植物的受精和胚胎发生过程起到了推动作用。

为了探索受精和早期胚胎发生的分子机制,特别是早期胚胎发生中的表观调控机制、合子不等分裂、细胞间通信等重大问题,笔者所在实验室用前期建立的胚胎分离技术^[8-9]和 SMART™ cDNA library construction 试剂盒构建了烟草合子和卵细胞的 cDNA 差减文库,通过筛选获得了许多在合子时期特异表达的基因^[10]。对其中 1 个具有信号肽结构的未知基

因 *NiZE583* 进行克隆和染色体步移,获得了其完整 CDS 序列和有活性的 5'侧翼调控序列,为进一步利用基因敲除和过表达技术来研究其在烟草早期胚胎发育中的作用打下基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白表达载体, GFP 核定位表达载体在 pART27 载体上改造而成,由武汉大学彭雄波副教授提供。大肠杆菌 DH5 α 感受态为笔者所在实验室自制。

1.1.2 植物材料 试验材料为野生型烟草(*Nicotiana tabacum* var. SR1),种植于长江大学生命科学学院所属温室内,室温 25 ℃,光照时间 16 h。

1.1.3 主要试剂 普通 DNA 片段回收试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒(天根生化科技有限公司); DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN 公司); Universal Genome Walker Kit (Clontech 公司); DNA 聚合酶 Ex Taq (TaKaRa 公司); DNA 聚合酶 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (限制性内切酶(NEB 公司); T4 DNA ligase (Fermentas 公司); Dynalbeads mRNA DIRECT Micro Kit (Life technologies 公司); SMARTer® Pico PCR cDNA Synthesis Kit (Life technologies 公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草 genome walking 文库的构建和 *NiZE583* 基因 5'侧翼区的克隆 取烟草幼叶,按照 DNeasy Plant Mini 试剂盒的要求提取 DNA。用 Universal Genome Walker 试剂盒构建

收稿日期:2015-04-29

基金项目:长江大学自然科学基金(编号:2014NSFY023)。

作者简介:罗 岸(1984—),男,湖北荆州人,博士,讲师,研究方向为植物生殖发育。E-mail: Anluo@whu.edu.cn。

星 DNA 分析[J]. 昆虫学报, 2013, 56(5): 554–560.

[6] 徐新建, 周姝婧, 朱翔杰, 等. 黄土高原中华蜜蜂遗传多样性的微卫星 DNA 分析[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2013, 42(6): 638–642.

[7] 余林生, 解文飞, 巫厚长, 等. 尼日利亚非洲蜂和安徽意大利蜜蜂及其杂交二代形态特征与微卫星 DNA 遗传多样性[J]. 生态学报, 2012, 32(11): 3555–3564.

[8] 吉 挺. 中国东方蜜蜂资源遗传多样性分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2009: 35–48.

[9] 殷 玲. 东方蜜蜂抗螨相关基因的筛选及初步验证[D]. 扬州: 扬州大学, 2013: 31–32.

[10] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314–331.

[11] Goudt J. FSTAT version 2. 9. 3. 2 [M]. Switzerland Lausanne: Department of Ecology and Evolution, 2002.

[12] 张 扬, 黄正洋, 陈 阳, 等. 采用微卫星 DNA 标记分析巢湖鸭异地小群保种效果[J]. 中国畜牧杂志, 2012, 48(11): 7–11.

genome walking 文库,检测合格后按照试剂盒要求设计 GSP 引物。反应体系和反应条件参照试剂盒要求,引物退火温度灵活掌握,得到目的片段后送样测序,引物序列详见表 1。

表 1 5'侧翼区扩增所需引物		
扩增批次	编号	引物序列(5'→3')
第 1 轮	GSP1	CTTCTGGTGCCTATGATAGCTCCGATAC
	GSP2	AGACTCTGGCACCCTTGAGTTAATGAA
第 2 轮	GSP1	AAAGATCTCTCAACAAATTCAGCACT
	GSP2	TCCATAAACACAATCATGTCACCAGC
第 3 轮	GSP1	CTGCCTTGTGGACTCCGAAATCTACCG
	GSP2	CAACCCTAGCAAGCATGATCAACAACA

1.2.2 烟草合子的分离与少量细胞 RT-PCR 用酶解-研磨法分离得到 50 个烟草合子^[8-9]。按照 Dynalbeads mRNA DIRECT Micro 试剂盒的说明分离出合子的 mRNA,并使用 SMARTer[®] Pico PCR cDNA Synthesis 试剂盒制成合子 cDNA 库。在已知 EST 序列 2 端设计检测引物扩增 *NtZE583* 基因 CDS 序列,扩增产物经电泳检测正确后送样测序,引物序列详见表 2。

表 2 CDS 扩增引物	
编号	引物序列(5'→3')
CDS-F1	ATGACAAAATCAACCAATGTTTTGG
CDS-R1	TCCAATGCATGAGCCTTTATCG

1.2.3 *NtZE583*-EGFP 融合蛋白和 EGFP 核定位表达载体的构建 依据已知序列,分别设计用于扩增 *NtZE583* 基因的 5'侧翼区和 CDS 的引物,并在 5'端添加酶切位点,引物序列见表 3。用 CDS-F2/CDS-R2 引物,在烟草合子 cDNA 库中扩增 CDS 序列;用 PRO-F/PRO-R 在烟草基因组中扩增 *NtZE583* 基因侧翼序列(启动子和 5'UTR)。对目的条带回收后进行双酶切,并分别连入 *NtZE583*-GFP 融合蛋白表达载体、GFP 核定位表达载体。

表 3 载体构建所需引物	
编号	引物序列(5'→3')
CDS-F2	nnnnCTGCAGATGACAAAATCAACCAATGTTTTGG
CDS-R2	nnnnAAGCTTTTCGAATGCATGAGCCTTTATCG
PRO-F	nnnnGGTACCCATTGTGATGTGAGATATA
PRO-R	nnntctagaCGTAAATAACTATACTTGTATGCC

1.2.4 *NtZE583*-GFP 融合蛋白亚细胞定位和 *NtZE583* 启动子活性的观察 应用基因枪法将构建好的 *NtZE583*-GFP 融合蛋白表达载体和 EGFP 核定位表达载体转入洋葱表皮细胞,培养 24 h 后用普通荧光显微镜观察。

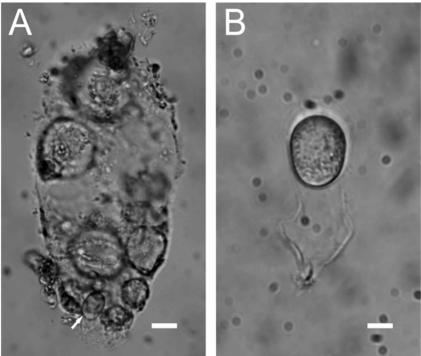
1.2.5 生物信息学分析 用 Omega 分析 EST 序列的开放阅读框。用 Protparam、ProtScale 软件预测蛋白质的氨基酸组成和理论等电点等基本理化性质,并通过 SOPMA 软件预测其二级结构。分别用 PSORT、SignalP 软件预测蛋白质的亚细胞定位和信号肽。

2 结果与分析

2.1 烟草早期胚胎的分离

植物的胚胎发育过程发生在母体组织中。由于母本组织的干扰,通常难以有效地获取正在发育的胚胎细胞。目前通

过酶解和显微操作已经能够精确地分离出烟草 SR1 胚珠中合子发育时期的胚囊(图 1-A)。合子为胚囊细胞所包裹,必须进行 2 次酶解和显微操作才能获得未附带母体组织的完整的合子(图 1-B)。图 1 结果显示:经过酶解和显微操作分离后的合子形态正常,背景清晰无杂质,这说明分离的合子状态良好且无母体组织污染,可以用于后续少量细胞 mRNA 的提取和 cDNA 库的制作。



A—烟草合子时期的胚囊,箭头表示合子,比例尺=20 μm;
B—烟草合子,比例尺=10 μm

图1 烟草合子胚囊和合子

2.2 *NtZE583* 基因在合子中的检测

根据笔者所在实验室之前获得的烟草合子 cDNA 文库信息,已知烟草合子中存在 *NtZE583* 基因的表达。*NtZE583* 基因 EST 序列长度为 449 bp, Omega 软件分析显示,该基因拥有 1 个 273 bp 的开放阅读框,可以在合子 cDNA 库中得到扩增(图 2)。经过 NCBI 数据比对发现,尚无类似基因存在于其他物种中,表明 *NtZE583* 基因属于 1 个未知功能的、在早期胚胎发育时期表达的新型基因。

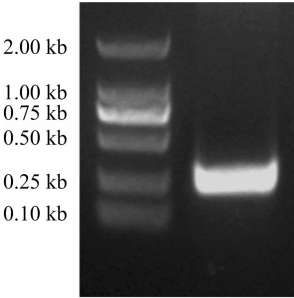


图2 *NtZE583* 基因 CDS 序列

2.3 *NtZE583* 蛋白一级结构预测分析

运用软件对 *NtZE583* 蛋白进行生物信息学分析,结果显示:*NtZE583* 蛋白的分子量为 9.785 3 ku,理论等电点为 8.46,属于碱性蛋白。该蛋白多肽链包含 91 个氨基酸残基,含 18 种基本氨基酸类型,不含组氨酸、色氨酸,其中丝氨酸含量最高,占 16.5%。氨基酸一级结构预测分析表明:*NtZE583* 蛋白拥有 8 个正电荷残基、5 个负电荷残基,该蛋白脂肪系数为 72.86,不稳定性指数为 50.07,平均总疏水性为 0.286,预测为疏水性蛋白,且不太稳定(表 4)。

2.4 *NtZE583* 蛋白二级结构的预测

蛋白质多肽链自身通过氢键沿一定方向盘绕、折叠而形成的构象称为蛋白质二级结构,α-螺旋、β-转角等属于蛋白质的基本二级结构。正确的二级结构有助于蛋白质正常履

表 4 *NiZE583* 基因编码的氨基酸一级结构预测分析结果

一级结构特征	氨基酸数量 (个)	分子质量 (ku)	理论等 电点	负电荷残基 (Asp + Glu) 数(个)	正电荷残基 (Arg + Lys) 数(个)	脂肪系数	不稳定性 系数	平均总 疏水性
预测结果	91	9.785 3	8.46	5	8	72.86	50.07	0.286

行其在细胞生命活动中的功能。软件分析显示,*NiZE583* 蛋白的二级结构有 3 种形式,分别为 α -螺旋、无规则卷曲、延伸链,分别占 18.68%、52.75%、28.57%。图 3 结果显示,无规则卷曲这类二级结构在 *NiZE583* 蛋白中最多, α -螺旋主要集中在蛋白的 N 端,而延伸链则在蛋白中零星分布(表 5、图 3)。

表 5 *NiZE583* 蛋白二级结构的预测

二级结构类型	氨基酸残基数目(个)	占比(%)
α -螺旋	17	18.68
延伸链	26	28.57
β -转角	0	0
无规则卷曲	48	52.75

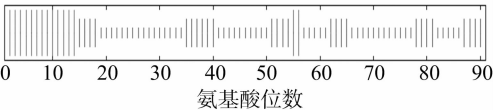


图3 *NiZE583* 蛋白二级结构预测

2.5 *NiZE583* 蛋白信号肽的预测与蛋白亚细胞定位的分析

用 Psort 软件对 *NiZE583* 蛋白亚细胞分布进行预测,发现最可能分布在膜外。同时用 ProtScale 软件预测 *NiZE583* 蛋白 N 端的氨基酸发现,其具有较强的疏水性;用 SignalP 软件预测 *NiZE583* 蛋白发现可能存在信号肽,并在第 24、第 25 个氨基酸之间剪切(图 4)。为了进一步分析 *NiZE583* 蛋白的亚细胞定位,采用融合蛋白载体瞬时转化洋葱表皮细胞。由图 5 可以看出,35S 启动子驱动的 GFP 蛋白在细胞中均匀分布,而 35S 启动子驱动的 *NiZE583*-GFP 融合蛋白则主要分布在细胞质的液泡中,暗示 *NiZE583* 蛋白的亚细胞定位受其 N 端的信号肽控制。

2.6 *NiZE583* 基因的 5'侧翼序列在早期胚胎时期的活性

以 EST 序列为基础,通过染色体步移技术共获得 *NiZE583* 基因起始密码子 ATG 前共 3 866 bp 的侧翼序列。为

验证其启动活性,扩增了其中的 2 725 bp(包括部分启动子、全部 5'UTR 序列)接入 GFP 核定位载体,采用基因枪将载体注射入洋葱表皮细胞中进行观察。荧光显微镜中可以看到,洋葱表皮细胞的细胞核中有清晰可辨的绿色荧光(图 6),表明所获基因的 5'侧翼序列确实具有较强的启动子活性。

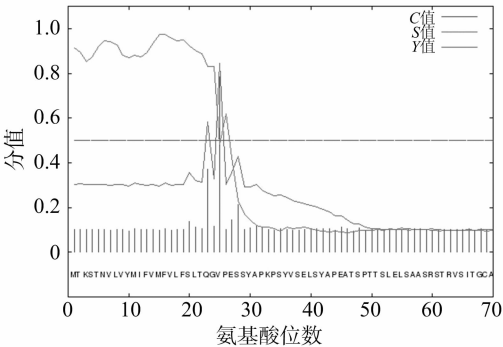
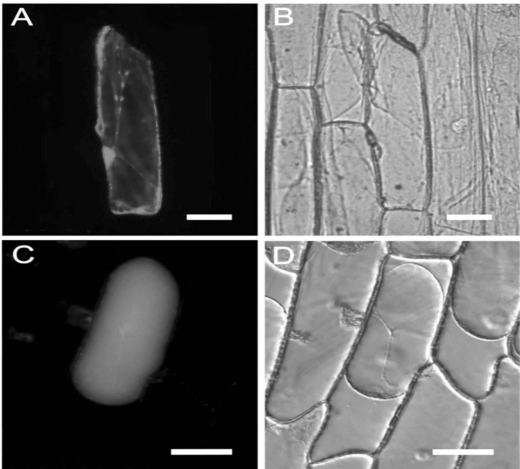
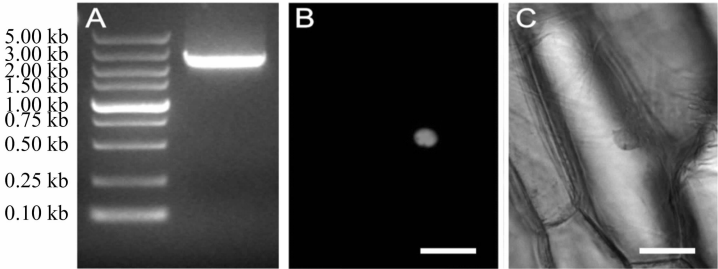


图4 *NiZE583* 蛋白的信号肽的预测



A、B—洋葱表皮细胞中 GFP 荧光分布及其明视野；C、D—洋葱表皮细胞中 *NiZE583*-GFP 荧光分布及其明视野,比例尺=50 μ m

图5 *NiZE583*-GFP 融合蛋白的亚细胞定位



A—载体中接入的 *NiZE583* 基因 5'侧翼序列；B、C—*NiZE583* 基因 5'侧翼序列启动的 GFP 核定位荧光及其明视野,比例尺=50 μ m

图6 洋葱表皮细胞中 *NiZE583* 基因 5'侧翼序列的启动活性

3 讨论

在烟草合子中表达的 *NiZE583* 基因含有 273 bp 的 CDS 区,其编码的蛋白质作为一种未知功能的新型蛋白,在 NCBI

数据库收录的双子叶和单子叶植物的基因信息中均未发现,其可能在烟草合子的发育过程中起着某种独特的作用。对新获得的 *NiZE583* 蛋白序列进行分析表明,该蛋白具有信号肽;将 *NiZE583* 蛋白与 GFP 蛋白融合后在洋葱表皮细胞中观察

其亚细胞定位,发现它极有可能定位于细胞的液泡中。

植物细胞相对于动物细胞而言,普遍含有液泡这一特殊的细胞器^[11-13]。液泡由单层质膜包围而成并充满液体,与植物细胞的各种重要的生命活动息息相关,如参与细胞渗透压和膨压的维持与调节、帮助稳定细胞内 pH 值、消除由某些有毒物质导致的毒害作用、存储营养物质及其多种代谢产物、保证细胞生物合成原料的稳定供应等。

NiZE583 基因的发现表明,在烟草合子的发育过程中有一种独特的未知功能的蛋白存在于液泡中并发挥了重要作用。本研究利用染色体步移技术对 *NiZE583* 基因的 5' 侧翼序列进行了克隆,将包括启动子、5' UTR 区的序列连接 GFP 后瞬时转化洋葱表皮细胞,能观察到极强的绿色荧光。说明获得的表达调控序列具有较强的启动子活性,为今后使用 RNA 干扰 (RNAi) 和过表达等基因功能分析手段对 *NiZE583* 基因在合子发育中的功能进行研究提供了帮助,将丰富我们对植物早期胚胎发生过程中的分子调控机制的认识。

4 结论

本试验成功克隆了烟草合子表达基因 *NiZE583*, 并获得了具有启动子活性的 5' 侧翼序列, 为阐明 *NiZE583* 基因参与早期胚胎发生的机制奠定了基础。

参考文献:

- [1] Le B H, Wagmaister J A, Kawashima T, et al. Using genomics to study legume seed development [J]. *Plant Physiology*, 2007, 144 (2): 562 - 574.
- [2] Lopes M A, Larkins B A. Endosperm origin, development, and function [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5 (10): 1383 - 1399.
- [3] Olsen O A. Nuclear endosperm development in cereals and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell*, 2004, 16 (Suppl): 851 - 856.

(上接第 61 页)

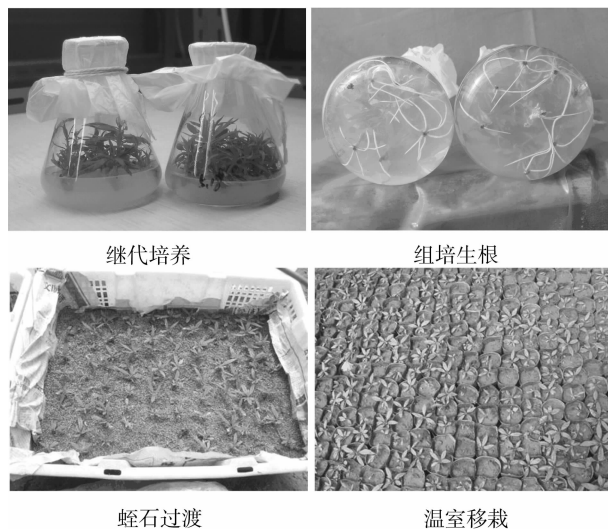


图1 GF677砧木组培快繁技术

- [4] Engel M L, Annie C, Christian D, et al. Sperm cells of *Zea mays* have a complex complement of mRNAs [J]. *Plant Journal*, 2003, 34 (5): 697 - 707.
- [5] Nodine M D, Bartel D P. Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos [J]. *Nature*, 2012, 482 (7383): 94 - U120.
- [6] Anderson S N, Johnson C S, Jones D S, et al. Transcriptomes of isolated *Oryza sativa* gametes characterized by deep sequencing: evidence for distinct sex - dependent chromatin and epigenetic states before fertilization [J]. *The Plant Journal*, 2013, 76 (5): 729 - 741.
- [7] Domoki M, Szűcs A, Jäger K, et al. Identification of genes preferentially expressed in wheat egg cells and zygotes [J]. *Plant Cell Reports*, 2013, 32 (3): 339 - 348.
- [8] Zhang J E, Luo A, Xin H P, et al. Genes of both parental origins are differentially involved in early embryogenesis of a tobacco interspecies hybrid [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (8): e23153.
- [9] Fu C M, Sun M X, Zhou C, et al. Isolation of fertilized embryo sacs and zygotes and triggering of zygote division *in vitro* in *Nicotiana tabacum* [J]. *Acta Bot Sin*, 1996, 38: 262 - 267.
- [10] Zhao J, Xin H, Qu L, et al. Dynamic changes of transcript profiles after fertilization are associated with de novo transcription and maternal elimination in tobacco zygote, and mark the onset of the maternal - to - zygotic transition [J]. *The Plant Journal*, 2011, 65 (1): 131 - 145.
- [11] 李红, 李波, 陈雪梅, 等. 苜蓿愈伤组织细胞学观察及芽分化的研究 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43 (6): 49 - 51.
- [12] 宋晓慧, 陆引罡, 何丹, 等. 烟草对镉的吸收及镉在亚细胞中的分布 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (5): 116 - 117.
- [13] 梁魁景, 侯晓杰, 刘海鹏. 苯磺隆诱导甘蓝型油菜中双 2 号雄性不育的花药细胞学观察 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43 (9): 128 - 129.

3 结论

由本试验结果可知,桃抗重茬砧木 GF677 茎段初代最佳培养基为 $F_{14} + 1.0 \text{ mg/L } 6 - \text{BA} + 0.1 \text{ mg/L IBA}$; 继代增殖最佳培养基为 $F_{14} + 1.0 \text{ mg/L } 6 - \text{BA} + 0.1 \text{ mg/L IBA} + 0.1 \text{ mg/L GA}_3$; 不定芽在 $1/2\text{MS} + 1.0 \text{ mg/L IBA}$ 生根培养基上培养 30 d 后生根率为 89.40%, 移栽成活率达 60%。

参考文献:

- [1] 李勇, 朱更瑞, 方伟超, 等. 桃设施栽培研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (7): 162 - 166.
- [2] 陈尚平, 苏家乐, 何丽斯. 我国观赏桃的栽培起源和发展 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (3): 128 - 130.
- [3] 蔡婧茹. 我国 26 个观赏桃花主推品种的特征特性、栽培技术和生产应用 [J]. *江苏农业科学*, 2014, 42 (4): 146 - 148.