

王步勇,马 玲. 黄花蒿 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因的生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):42-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.012

黄花蒿 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因的生物信息学分析

王步勇,马 玲

(东北林业大学林学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:以黄花蒿(*Artemisia annua* L.) 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶基因(DXR)为研究对象,利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)网站及生物信息学软件对碱基分布、氨基酸组成、亲疏水性及编码蛋白结构进行预测,用 Clustal W 进行多序列比对,用 MGEA 构建系统发育树,用 STRING 进行蛋白互作网络分析,研究黄花蒿 DXR 基因特征并预测分析 DXR 蛋白结构与功能。结果表明:黄花蒿 DXR 基因 mRNA 序列长度为 1 419 bp,编码蛋白包含 472 个氨基酸,等电点为 6.15;DXR 蛋白为疏水性蛋白,无信号肽,无跨膜结构域。多序列比对及系统发育树分析表明,黄花蒿 DXR 蛋白与杭白菊 DXR(BAE79548.1)的相似度最高,为 98%,且处于同一分支,亲缘关系较近。蛋白结构分析显示, α -螺旋、无规则卷曲是黄花蒿 DXR 蛋白的主要结构元件。互作网络分析显示,黄花蒿 DXR 在 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)代谢途径中,可与 CMS、DXS、HDS 等多个蛋白发生互作。黄花蒿 DXR 基因在进化过程中相对保守,获得的保守区序列信息为其他物种 DXR 基因的克隆奠定了基础,深入研究该蛋白酶的结构和功能特征,也为今后提高青蒿素的生物合成量提供理论支持。

关键词:黄花蒿;DXR 基因;生物信息学;同源序列;多重序列比对;蛋白结构;蛋白互作网络;青蒿素;生物合成量

中图分类号: S188;R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)09-0042-05

黄花蒿(*Artemisia annua* L.)为菊科蒿属的一年生草本植物,生态适应性非常广,在我国各地均有分布,已入药 2 000 多年,具有清热解毒的功效,为我国传统中草药之一。其主要有效成分青蒿素在抗疟,治中暑、荨麻疹和灭蚊等方面具有重要功效,是目前世界卫生组织推荐治疗疟疾的首选药物^[1-2]。中国青蒿素产量占世界总产量的 70% 左右^[3],由于野生资源的黄花蒿中青蒿素含量较低(0.01%~0.8%),致使青蒿素价格较高,很难满足医药需求^[4]。近年来,利用环己烯酮^[5]、青蒿酸^[6-7]等物质化学合成青蒿素取得一定成果,但因青蒿酸的生产主要依赖黄花蒿叶片,青蒿素的全化学合成几乎不可能^[8]。生物合成青蒿素仍是生产青蒿素的主要途径,培育黄花蒿则成为提高青蒿素产量的关键。通过对青蒿素生物合成中关键酶的研究,利用基因工程获得高产转基因黄花蒿植株是解决这一矛盾的有效途径。

青蒿素是含有过氧基团的倍半萜内酯,属于萜类化合物。绝大多数萜类化合物的合成前体是异戊烯基焦磷酸(IPP),植物体内 IPP 的生物合成主要存在 2 条不同的代谢途径:一是定位于细胞质中的甲羟戊酸(mevalonate, MVA)途径^[9];另一条是定位于质体中的 2-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸(2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, MEP)途径^[10]。

1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(DXR)催化 1-脱氧-D-葡萄糖-5-磷酸(DXP)产生异构并还原生产 MEP,是 MEP 代谢途径中最重要限速反应,也是细胞质体内类异戊二烯化合物代谢中的重要调控稳点^[11]。DXR 在植物类异戊二烯生物合成过程中发挥了重要作用。Mahmoud 等发现,薄荷过量表达 DXR,可促进叶片中薄荷油等单萜的合成,使薄荷精油量提高 50%^[12]。Carretero-Paulet 等发现,在过量表达 DXR 的转基因拟南芥中,叶绿素、类胡萝卜素水平都显著提高^[13]。Graham 等通过对青蒿基因组测序并对青蒿素合成相关基因进行分析表明,DXR 与青蒿素合成呈正相关^[14]。

近年来,拟南芥、番茄、水稻、玉米、银杏、橡胶树及喜树等多种植物的 DXR 基因得到解析^[15-16],但尚未有报道利用生物信息学的方法系统研究这些基因,制约了其他物种中该基因的克隆与功能验证。本试验利用生物信息学方法对黄花蒿 DXR 基因以及 GenBank 上已发表的其他植物 DXR 基因进行序列分析和功能预测,利用分子互作技术对黄花蒿 DXR 基因进行全面分析,旨在为提高黄花蒿青蒿素产量提供新思路,为其他植物 DXR 基因的克隆、功能验证提供理论和实践参考依据。

1 材料与方法

数据来源于美国国家生物技术信息中心(NCBI)核苷酸和蛋白质数据库中已登陆的黄花蒿 DXR 基因的核苷酸序列(GenBank 登录号:AF182287.2)、氨基酸序列(GenBank 登录号:AAD56391.2)^[17]。

黄花蒿 DXR 序列分析:利用 NCBI 在线工具 ORF-Finder 翻译蛋白并进行开放阅读框(ORF)查找。利用 ExPASy

收稿日期:2016-03-24

基金项目:中央高校基本科研业务专项资金(编号:2572015AA09)。

作者简介:王步勇(1989—),男,山东泰安人,博士研究生,主要从事森林保护学方面的研究。E-mail:wangbuyong89@163.com。

通信作者:马 玲,博士,教授,主要从事植物源农药学研究。E-mail:maling63@163.com。

ProtParam 预测分析编码蛋白的相对分子量、理论等电点、稳定性等理化性质^[18]。用 Target 1.1 Server 在线软件分析编码蛋白的导肽^[19]。用 SignalP 4.1 在线软件分析编码蛋白信号肽^[20]。用 TMHMM Server 软件对编码蛋白的跨膜结构域进行预测分析^[21]。用 WOLF PSORT 预测蛋白亚细胞定位信号^[22]。用 ProtScale 分析编码蛋白的亲疏水性。用 NetPhos 2.0 Server 分析编码蛋白潜在的磷酸化位点^[23]。利用 NCBI BLAST 筛选同源序列,用 Bioedit 软件进行多序列比对分析。利用 MEGA 5.2 软件邻接算法 N-J (Neiighbor - Joining)^[24],选用 JTT + I 模型运算 1 000 次构建系统进化树,并利用 Bootstrapping 自展法对其进行评估。

蛋白结构预测及互作网络分析:用 NCBI CDD 工具对蛋白保守区域进行预测分析;用 ExPaSy - SOPMA 软件分析编码蛋白二级结构;用 SWISS - MODEL 自动建模方式来筛选构建三维模型,用 X 射线衍射结构进行模型修饰;用 Swiss - Pdb viewer 构建拉氏构象图,对建模准确性进行评估;用 STRIG 9.1 (<http://string.embl.de/>)^[25] 进行蛋白质互作网络分析。

2 结果与分析

2.1 黄花蒿 DXR 基因分析和蛋白分析

2.1.1 黄花蒿 DXR 基因序列分析 NCBI 上登录的黄花蒿 DXR 序列是从黄花蒿 mRNA 中克隆得到的全长 CDS (coding

sequence) 序列。序列全长为 1 419 bp,其中包含多个起始密码子 (ATG) 和 1 个终止密码子 (TGA)。其中 A 有 379 个, T 有 415 个, A + T 含量较高,为 55.95%; C 有 292 个, G 有 333 个, C + T 含量较少,为 44.05%。

2.1.2 黄花蒿 DXR 编码蛋白的氨基酸组成及其理化性质分析 通过 ORF - Finder 软件分析发现,黄花蒿 DXR 编码蛋白编码 472 个氨基酸。该预测蛋白原子总数为 7 204 个,分子式为 $C_{2\ 278}H_{3\ 634}N_{600}O_{677}S_{15}$,蛋白相对分子量为 50.74 ku;理论半衰期为 30 h;不稳定系数为 33.53,小于 40.0,说明该蛋白属于稳定性蛋白。此外,该蛋白脂肪系数为 98.37,亲水性系数为 0.020,理论等电点 (PI) 为 6.15。由其氨基酸组分可知,丙氨酸 Ala (A)、亮氨酸 Leu (L) 含量最高,为 9.70%;半胱氨酸 Cys (C) 含量最低,为 1.50%;带负电荷总残基数 (Asp + Glu) 为 49 个,带正电荷总残基数 (Arg + Lys) 为 44 个 (图 1)。

2.1.3 DXR 蛋白导肽、信号肽及亚细胞定位预测分析 用 TargetP 1.1 Server 预测 DXR 导肽,结果显示,该序列 *mTP* (定位于线粒体) 值为 0.030, *cTP* (定位于叶绿体) 值为 0.691, *SP* (信号肽) 值为 0.022,推测该序列不含有线粒体目标肽、分类途径信号肽,可能为叶绿体转运肽。SignalP 4.1 预测显示,黄花蒿 DXR 蛋白为非分泌蛋白。用 WOLF PSORT 软件对该蛋白进行亚细胞定位发现,该蛋白最可能定位于细胞质上,可信度高达 76%。

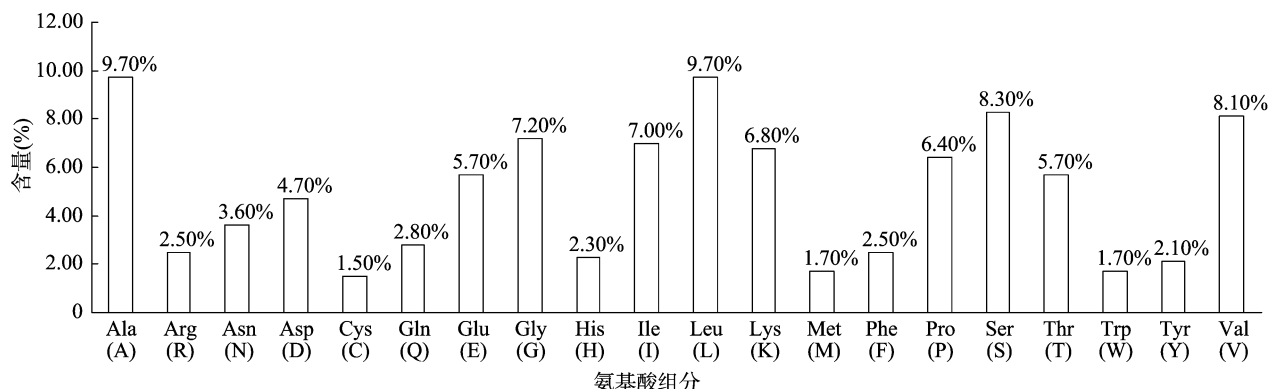


图1 黄花蒿 DXR 基因编码蛋白的氨基酸组成

2.1.4 DXR 蛋白亲/疏水性及磷酸化位点分析 利用 ProtScale 预测黄花蒿 DXR 蛋白的亲/疏水性,由图 2 可见:在黄花蒿 DXR 蛋白氨基酸中,第 167 ~ 193 位氨基酸区域具有很强的疏水性,在第 171 位氨基酸处达到最强疏水性峰值,为 2.444;第 32 ~ 44 位氨基酸区域具有很强的亲水性,在第 40 位氨基酸处达到最强亲水性峰值,为 -2.224。由于亲水性氨基酸的个数多于疏水性氨基酸,预测黄花蒿 DXR 蛋白为亲水性蛋白。

用 NetPhos2.0 Server 预测黄花蒿 DXR 蛋白磷酸化位点发现,在 DXR 有 17 个丝氨酸 (Ser, S) 磷酸化位点、6 个苏氨酸 (Thr, T) 磷酸化位点、3 个酪氨酸 (Tyr, Y) 磷酸化位点。在整个氨基酸序列中,第 7 位氨基酸 (S)、第 40 位氨基酸 (S) 的磷酸化预测值最高,为 0.992,可能受蛋白磷酸化激酶磷酸化。

2.2 多序列比对和系统进化树分析

用 NCBI BLAST 筛选得到 14 条黄花蒿 DXR 同源序列 (表 1),应用 Clustal W 进行多重序列比对分析。图 3 结果发

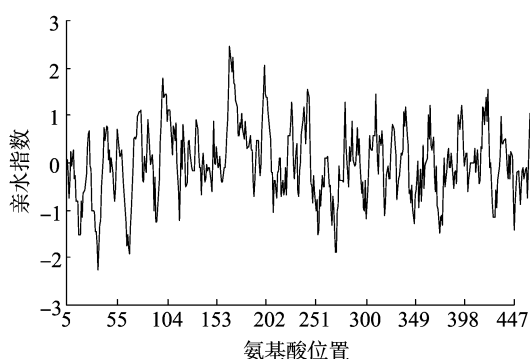


图2 黄花蒿 DXR 蛋白亲/疏水性分析结果

现,中间功能区域的氨基酸序列较为保守,两端区域的氨基酸序列差异较大,且 N - 端差异大于 C - 端差异。用 MEGA5.2 软件 N - J 法构建系统进化树。由图 4 结果可知:16 个物种的 DXR 氨基酸序列聚集成 2 大分支:黄花蒿、艾菊、杭白菊、甜叶菊聚为分支 I;千金子、蓖麻、毛果杨等聚为分支 II。由传统分类学可知,分支 I 中的黄花蒿、艾菊、杭白菊、甜叶菊 4

表 1 NCBI 登录的 DXR 同源序列

物种	NCBI 序列号	蛋白描述	相似度 (%)	覆盖度 (%)
艾菊 (<i>Tanacetum parthenium</i>)	AER00470.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	98	99
杭白菊 (<i>Chrysanthemum x morifolium</i>)	BAE79548.1	1 - deoxyxylulose 5 - phosphate reductoisomerase	98	99
甜叶菊 (<i>Stevia rebaudiana</i>)	CAD22156.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	87	98
积雪草 (<i>Centella asiatica</i>)	AF064619.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	82	99
千金子 (<i>Euphorbia lathyris</i>)	AFZ93643.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	83	99
杜仲 (<i>Eucommia ulmoides</i>)	AFU93070.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductase	81	99
毛果杨 (<i>Populus trichocarpa</i>)	XP_002318048.2	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	83	99
中果咖啡 (<i>Coffea canephora</i>)	CDP12403.1	unnamed protein product	80	99
萝芙木 (<i>Rauwolfia verticillata</i>)	AAV87151.2	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	81	99
马铃薯 (<i>Solanum tuberosum</i>)	XP_006345056.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	80	99
蓖麻 (<i>Ricinus communis</i>)	XP_002511399.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	81	99
胡杨 (<i>Populus euphratica</i>)	XP_011001537.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	81	99
玉米 (<i>Zea mays</i>)	DAA53825.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	79	97
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_001190600.1	1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase	75	98

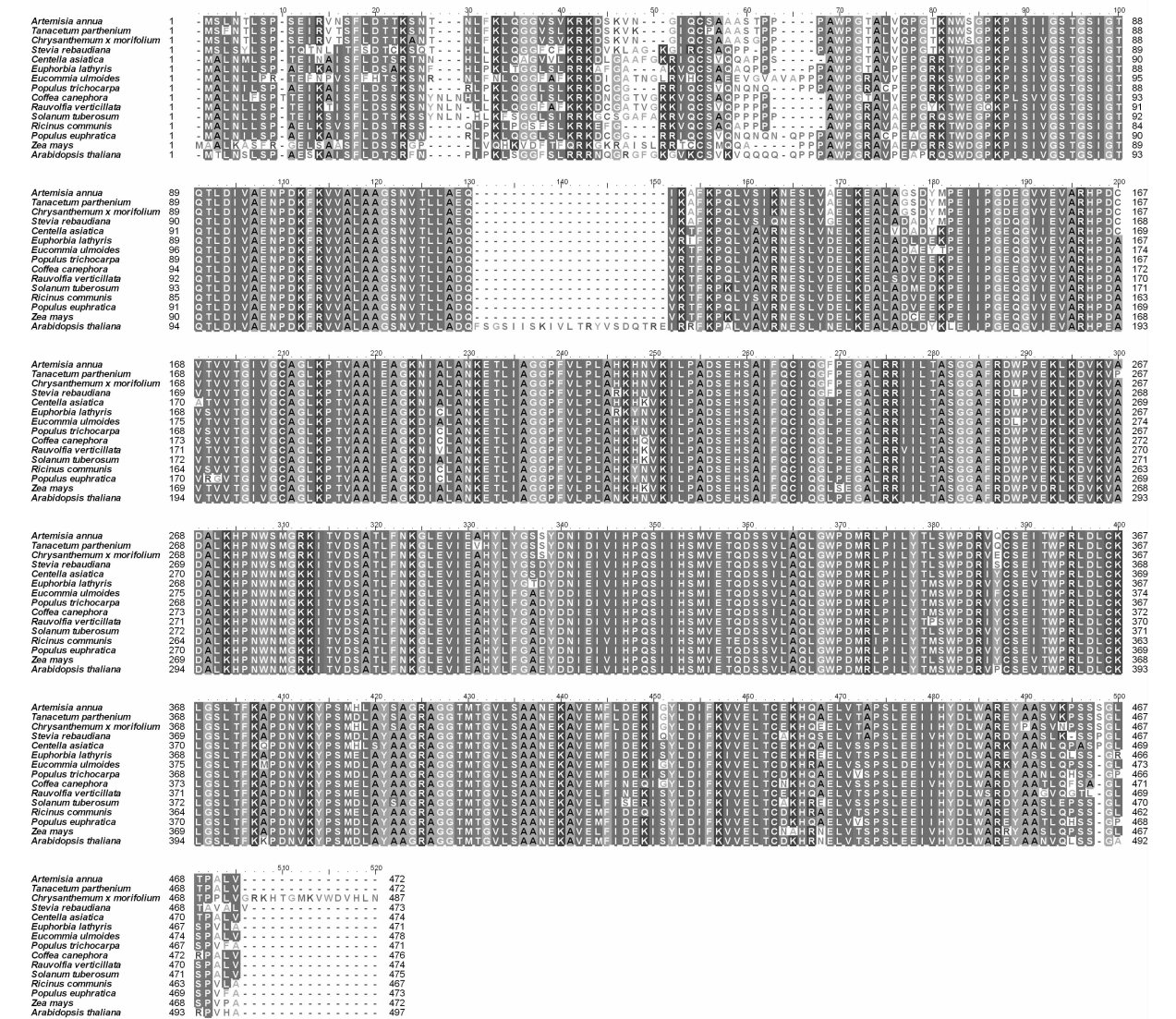


图3 DXR多重序列比对分析结果

个物种均属菊科,分支Ⅱ中的千金子、蓖麻、毛果杨等 11 个物种不属于菊科。这表明 DXR 是 1 种相对保守的蛋白,物种的进化速度与物种 DXR 蛋白的进化速度是一致的,DXR 可以作为生物遗传分析、分子进化研究的重要因子。

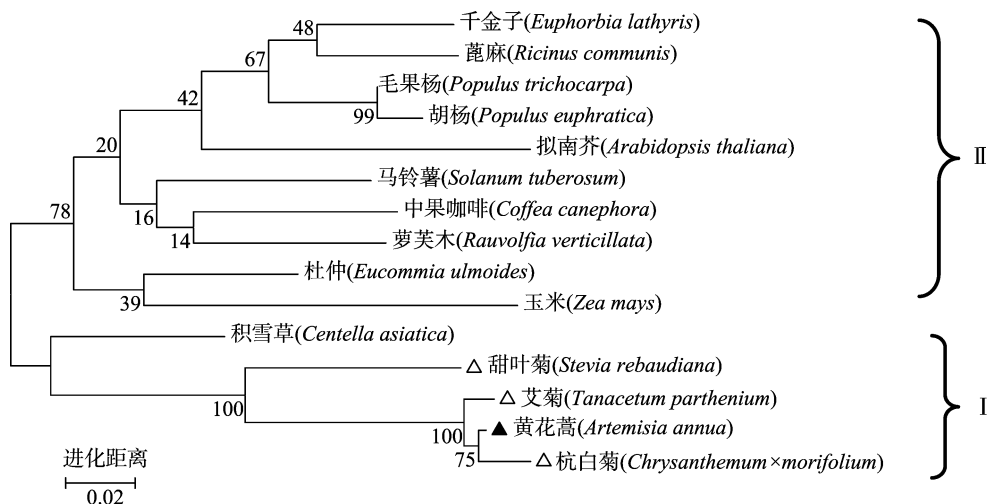


图4 系统进化树分析结果

2.3 DXR 蛋白结构预测及互作网络分析

2.3.1 黄花蒿 DXR 蛋白保守区预测 利用 NCBI CDD 在线分析黄花蒿 DXR 蛋白保守区域。图 5 结果显示,DXR 蛋白

含有 DXP_reductoisom、DXP_redisom_C、DXPR_C 3 个保守结构区域,预测该蛋白属于 SDR 超家族、DXP_redisom_C 超家族及 DXPR_C 超家族。

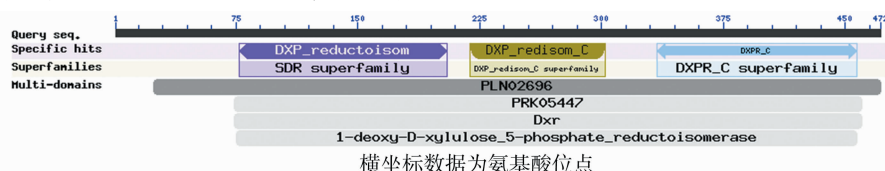


图5 黄花蒿 DXR 蛋白保守区域预测结果

2.3.2 黄花蒿 DXR 蛋白结构分析 用 ExPaSy - SOPMA 软件分析 DXR 蛋白二级结构。由图 6 可知,该蛋白由 37.08% 无规则卷曲、28.81% α -螺旋、23.94% 延伸链、10.17% β -转角组成,无规则卷曲、 α -螺旋是其主要构件,延伸链贯穿于整个蛋白质中。

利用 Swiss - MODEL 根据同源蛋白构建黄花蒿 DXR 蛋白的三级结构(图 7 - A),该蛋白包含 28 个 α -螺旋、25 个

β -折叠和大量无规则卷曲。通过 Swiss - Pdb Wiewer 构建拉氏构象图(图 7 - B)对预测的 DXR 三维模型进行评估发现,预测模型的二面角位于黄色核心区域,其空间结构稳定,该蛋白利用 Swiss - MODEL 同源建模得到的三维结构的可信度极高。用 VAST Search 在线软件预测 DXR 蛋白的功能位点(图 7 - C),预测 DXR 蛋白两端的 α -螺旋、 β -折叠结合部位为主要的功能位点。

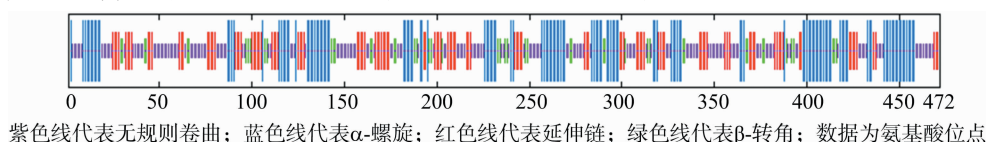


图6 黄花蒿 DXR 蛋白二级结构预测

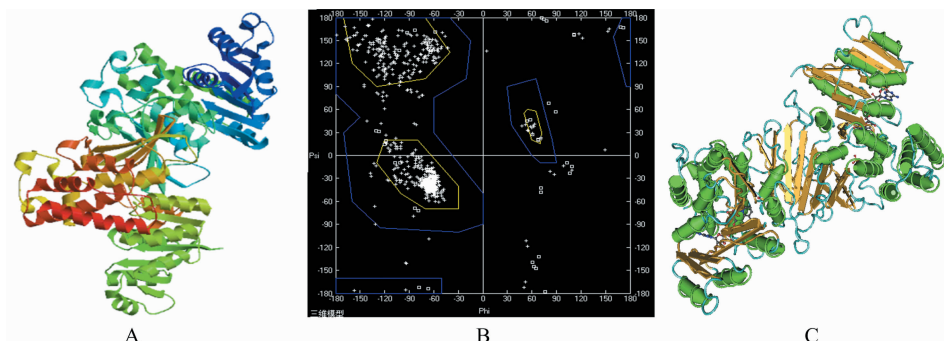


图7 黄花蒿 DXR 蛋白三级结构预测结果

2.3.3 黄花蒿 DXR 蛋白互作网络分析 根据黄花蒿 DXR 蛋白质三维结构模型,利用 STRING 交互式数据库进行蛋白质互作网络分析。结果表明,DXR 在催化 DXP 产生异构并

还原生产 MEP 代谢过程中与多个蛋白发生互作,主要包括: CMS、DXS、eugene3. 09030001、gw1. III. 2599. 1、gw1. 171. 35. 1、gw1. VI. 2744. 1、estExt_Genewise1_v1. C_LG_XVIII1471、

MCS、gw1. I. 8813. 1、HDS 等(图 8)。

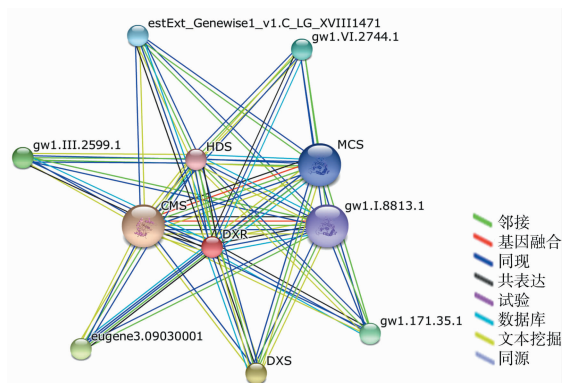


图8 黄花蒿 DXR 蛋白互作网络分析结果

3 结论与讨论

次生代谢产物是地球上最丰富的有机化合物,由于其功能特殊、用途广泛,现已成为国际上研究的热点、焦点。目前已经有多种萜类化合物被分离提取,应用到医学、农业、工业等各领域。青蒿素作为黄花蒿的 1 萜类次生代谢产物,因其具有抗疟效率高、速度快、毒性低等优点,已经成为全球抗疟的主要药物。2011 年,因对青蒿素的抗疟研究作出贡献,我国的女药学家屠呦呦获得了拉斯克奖^[26]。青蒿素的获取主要依赖于黄花蒿的生物合成,全面了解青蒿素生物合成途径关键酶的功能,通过基因工程等手段调控其在植物体内表达,获得大量有用的青蒿素,可为提高青蒿素产量开辟新的思路。

DXR 在萜类物质 MEP 合成途径中具有特殊作用,可将 DXP 异构化并还原生产 MEP。黄花蒿 DXR 作为青蒿素生物合成的重要限速酶而倍受关注。生物信息学是当今生命科学和自然科学的核心领域,是后基因组时代的重要研究方法。本研究根据 NCBI 上登录的黄花蒿 DXR 基因序列,应用生物信息学技术对该基因及编码蛋白进行比对、分析、建模等研究,应用 STRING 对该基因编码蛋白进行互作网络分析。基因序列分析发现,该基因中 A + T 碱基含量较高,为 55.95%,高于 50%,且错配率较低,核苷酸稳定。编码蛋白氨基酸序列分析发现,DXR 蛋白不稳定系数为 33.53,属于不稳定性蛋白。多序列比对及系统发育树分析发现,黄花蒿 DXR 与杭白菊 DXR 同源性最高,为 98%,亲缘关系最近。DXR 在进化上高度保守,可作为其他物种生物遗传分析和分子进化研究的重要因子。蛋白结构分析显示,无规则卷曲、 α -螺旋是其主要结构元件。蛋白互作网络分析表明,黄花蒿 DXR 可能与 1-脱氧木糖-5-磷酸合成酶(DXS)互作。本研究结果为深入探讨黄花蒿 DXR 蛋白功能和萜类生物合成的分子机制提供重要基础信息,为提高黄花蒿青蒿素的生物合成量提供了理论支持,也为其他植物萜类等次生代谢产物的研究提供了一定依据。

参考文献:

[1] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China[J]. Science, 1985, 228(473): 1049 - 1055.
[2] World Health Organization. World malaria report 2010[R]. Geneva: WHO, 2010.

[3] White N J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success [J]. Science, 2008, 320(5874): 330 - 334.
[4] Liu B, Wang H, Du Z, et al. Metabolic engineering of artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(5): 689 - 694.
[5] Zhu C, Cook S P. A concise synthesis of (+) - artemisinin [J]. Journal of the American Chemical Society, 2012, 134(33): 13577 - 13579.
[6] Lévesque F, Seeberger P H. Continuous - flow synthesis of the anti - malaria drug artemisinin [J]. Angewandte Chemie, 2012, 51(7): 1706 - 1709.
[7] Hao H D, Li Y, Han W B, et al. A Hydrogen peroxide based access to qinghaosu (artemisinin) [J]. Organic Letters, 2011, 13(16): 4212 - 4215.
[8] Yadav J S, Babu R S, Sabitha G. Stereoselective total synthesis of (+) - artemisinin [J]. Tetrahedron Letters, 2003, 44(2): 387 - 389.
[9] Newman J D, Chappell J. Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon partitioning within the cytoplasmic pathway [J]. Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1999, 34(2): 95 - 106.
[10] 马 靛, 丁 鹏, 杨广笑, 等. 植物类萜生物合成途径及关键酶的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2006(21): 22 - 30.
[11] Takahashi S, Kuzuyama T, Watanabe H, et al. A 1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2 - C - methyl - D - erythritol 4 - phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, 95(17): 9879 - 9884.
[12] Mahmoud S S, Croteau R B. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(15): 8915 - 8920.
[13] Carretero - Paulet L, Cair   A, Botella - Pav   P, et al. Enhanced flux through the methylerythritol 4 - phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5 - phosphate reductoisomerase [J]. Plant Molecular Biology, 2006, 62(4/5): 683 - 695.
[14] Graham I A, Besser K, Blumer S, et al. The genetic map of *Artemisia annua* L. identifies loci affecting yield of the antimalarial drug artemisinin [J]. Science, 2010, 327(5963): 328 - 331.
[15] Seetang - Nun Y, Sharkey T D, Suvachittanont W. Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis* [J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(9): 991 - 1002.
[16] Yao H, Gong Y, Zuo K, et al. Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a DXR gene encoding 1 - deoxy - D - xylulose 5 - phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata* [J]. Journal of Plant Physiology, 2008, 165(2): 203 - 213.
[17] Souret F F, Weathers P J, Wobbe K K. The mevalonate - independent pathway is expressed in transformed roots of *Artemisia annua* and regulated by light and culture age [J]. In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2002, 38(6): 581 - 588.
[18] Wilkins M R, Gasteiger E, Bairoch A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server [J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112(112): 531 - 552.

张娜,李群,高兴旺,等. 葡萄 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交设计优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(9):47-50.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.09.013

葡萄 ISSR-PCR 反应体系的建立与正交设计优化

张娜,李群,高兴旺,赖晓辉,李佳,丁金鹏

(新疆大学生命科学与技术学院,新疆乌鲁木齐 830046)

摘要:建立和优化稳定的葡萄 ISSR-PCR 反应体系,为进一步开展葡萄遗传多样性研究和品种选优提供理论依据。运用改良的 CTAB 法从葡萄嫩叶中提取基因组总 DNA,通过单因素试验分析 dNTPs 浓度、 Mg^{2+} 浓度、引物浓度、DNA 模板用量、*Taq* DNA 聚合酶用量等 5 个因素对葡萄 ISSR-PCR 反应体系扩增结果的影响,并采用正交设计试验方法优化建立葡萄 ISSR-PCR 最佳反应体系。优化的最佳 ISSR-PCR 反应体系(20 μ L)为:10 \times PCR buffer、0.225 mmol/L dNTPs、*Taq* DNA 聚合酶 1.0 U、1.00 μ mol/L 引物、2.75 mmol/L Mg^{2+} 、DNA 模板 30 ng。利用优化的 ISSR-PCR 反应体系能够扩增获得清晰、稳定的 DNA 条带,可用于后续的葡萄种质资源遗传多样性分析。

关键词:葡萄;ISSR-PCR;反应体系;单因素试验;正交设计;优化

中图分类号:S663.103 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)09-0047-04

葡萄属于葡萄科(Vitaceae)葡萄属(*Vitis* L.)藤本植物,是起源最古老的果树之一,其果实可用于酿酒、鲜食、制汁等,具有重要的经济价值,在世界范围内广泛栽培。由于葡萄的基因组高度杂合,使得其具有丰富的种质资源。种质资源是进行农业生产和创新育种的重要物质保障,也是解决各种病虫害问题有利的“基因武器库”。因此,充分了解葡萄种质资源的遗传信息、分析其种质资源遗传多样性,对有效利用现有的葡萄种质资源以及促进和加快葡萄分子育种进程具有重要意义。目前,分子标记技术已广泛应用于葡萄遗传多样性研究,以期为进一步开展葡萄分子育种奠定了一定的基础。黄远飞利用 RAPD 技术对 53 份葡萄材料进行遗传多样性分析,发现 53 份葡萄材料间具有较高的遗传多样性^[1]。吴子龙等建立了葡萄 SSR 标记和 ISSR 的反应体系,并研究了葡萄种质资源的遗传多样性^[2-3]。张淑静利用 SSR 技术分析了 39

份葡萄品种的遗传多样性,发现这些材料间存在明显的遗传多态性差异^[4]。郭大龙等建立了适用于葡萄的 SRAP 反应体系,为葡萄种质遗传多样性评价、遗传改良等研究提供了基础^[5]。张玉玉等建立了葡萄的目标起始密码子多态性的反应体系,可用于葡萄种质遗传多样性评价^[6]。赖呈纯等也分别建立了适用于葡萄的 ISSR-PCR 反应体系。ISSR 标记技术结合了 SSR 和 RAPD 等 2 种标记技术的优点,但其最关键的步骤是须要针对不同的物种建立相应的 PCR 反应体系^[7-8]。虽然前人已建立了适用于葡萄的 ISSR 技术的 PCR 反应体系,但均未对 Mg^{2+} 这一影响因素进行分析,因此本研究通过优化 ISSR-PCR 反应中的各项参数,建立适用于葡萄 ISSR 技术的最佳反应体系。以新疆葡萄种质资源嫩叶为材料,通过单因素试验和正交设计试验优化葡萄种质资源 ISSR 反应体系,并对 PCR 反应过程中的退火温度进行筛选,为进一步开展葡萄遗传多样性研究和品种选优提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试葡萄种质嫩叶采自新疆鄯善县新疆瓜果研究中心葡萄种质资源圃,-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存备用。ISSR 引物序列参考哥伦比亚大学公布的序列,送往华大基因进行合成;所用试剂 dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶(简称 *Taq* 酶)购自宝生物工程(大

收稿日期:2015-08-11

基金项目:新疆维吾尔自治区重大科技专项(编号:201130102-1-3)。

作者简介:张娜(1989—),女,新疆奇台人,硕士研究生,主要从事植物生理与分子生物学研究。E-mail:zhangna7887@sina.com。

通信作者:李群,博士,副教授,主要从事植物逆境生理与分子机制研究。E-mail:liqun_007@126.com。

[19] Emanuelsson O, Brunak S, Von Heijne G, et al. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools [J]. Nature Protocols, 2007, 2(4): 953-971.

[20] Petersen T N, Brunak S, Von Heijne G, et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785-786.

[21] Möller S, Croning M D, Apweiler R. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions [J]. Bioinformatics, 2001, 17(7): 646-653.

[22] Horton P, Park K J, Obayashi T, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35 (Web Server

issue): W585-W587.

[23] Blom N, Gammeltoft S, Brunak S. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites [J]. Journal of Molecular Biology, 1999, 294(5): 1351-1362.

[24] Gascuel O, Steel M. Neighbor-Joining revealed [J]. Molecular Biology & Evolution, 2006, 23(11): 1997-2000.

[25] Franceschini A, Szklarczyk D, Frankild S, et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration [J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41: D808-D815.

[26] Miller L H, Su X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden [J]. Cell, 2011, 146(6): 855-858.