

仇保丰,景 瑾,董蓉莲,等. 柔嫩艾美耳球虫江苏株 *SAG10* 基因的克隆及分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):24-28.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.006

柔嫩艾美耳球虫江苏株 *SAG10* 基因的克隆及分析

仇保丰¹, 景 瑾², 董蓉莲³, 宋鸿雁², 刘 春², 朱顺星², 邵义祥², 刘文斌¹, 李 建¹

(1. 南通出入境检验检疫局, 江苏南通 226004; 2. 南通大学实验动物中心, 江苏南通 226001;

3. 江苏省疾病预防控制中心, 江苏南京 210009)

摘要:根据 GenBank 中已发表的柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) *SAG10* 基因序列, 利用计算机软件设计 1 对引物, 从 *E. tenella* 江苏株的第 2 代裂殖子中成功克隆出 *SAG10* 基因。将该基因与 GenBank 中国内外不同 *E. tenella* 分离株的 *SAG10* 基因进行比对, 发现 *E. tenella* 江苏株与北京株的 *SAG10* 基因同源性最高, 高达 99%, 其后依次为杨凌株、豪顿株。4 种不同分离株 *SAG10* 基因的 ORF 之间有 11 个碱基不同, 其中 3 个为无义突变, 8 个为有义突变。分析 4 种分离株 *SAG10* 基因推导蛋白质的亲水性、抗原指数、表面可及性发现, 国内外不同 *E. tenella* 分离株 *SAG10* 蛋白的抗原性总体比较接近且很强, 但国内不同分离株之间的抗原性更加接近, 并优于国外的豪顿株, 这可能是由于氨基酸突变引起蛋白质的空间构象和亲水性等发生变化而引起。将上述 *SAG10* 基因序列与复顶门原虫的其他相关 *SAGs* 基因序列进行遗传进化分析, 发现 *Eimeria* 属球虫 *SAGs* 基因之间相对比较保守, 且与犬新孢子虫 (*Neospora caninum*)、*N. hughesi*、刚地弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 的 *SAG* 基因之间同源性较低, 与已有观点一致; 但神经肉孢子虫 (*Sarcocystis neurona*) 的 2 条 *SAG1* 基因序列却与 *E. tenella* 的 *SAG1* 基因序列表现出更高的同源性, 这与其他研究结论不符。

关键词:柔嫩艾美耳球虫; *SAG10* 基因; 克隆; 分析

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0024-04

鸡球虫基因克隆始于 1987 年, 迄今已有 240 多个基因被成功克隆, 鸡球虫的重组疫苗也得到了广泛研究^[1]。有分析认为, 参与艾美耳球虫宿主细胞入侵过程的相关分子是最具应用潜力的保护性抗原, 如子孢子和裂殖子表面抗原 (surface antigens, 简称 *SAGs*) 以及微线、棒状体、折光体等分泌型亚细胞器的分泌蛋白^[1-2]。柔嫩艾美耳球虫 (*Eimeria tenella*) 表面抗原 *SAG10* (surface antigen 10) 是一种 C 端具有疏水性的糖基化磷脂酰肌醇 (glycosylphosphatidylinositol, 简称 GPI) 锚定结构域的表面蛋白^[3]。由于 *SAG10* 基因在 *E. tenella* 子孢子和第 2 代裂殖子阶段均有表达, 且 *SAGs* 被认为在启动顶复门原虫识别、黏附和侵袭宿主细胞、免疫调节、免疫逃避、宿主特异性等方面均发挥着重要作用, 因此国外很多学者正加大对 *SAG10* 等表面抗原的研究力度^[3-6]。韩德强等^[7]、麦博等^[2]分别对 *E. tenella* 北京株、杨凌株的 *SAG10* 基因进行了研究, 但目前尚无对 *E. tenella* 江苏株 *SAG10* 基因进行研究的报道。麦博等研究发现, *SAG10* 在不同 *E. tenella* 株间存在抗原性差异, 这与认为 *E. tenella* 不存在明显株间抗原性差异的传统观点相对立^[2]。本研究通过对 *E. tenella* 江苏 (Jiangsu) 株的 *SAG10* 基因进行克隆, 并将其与国内外学者在 GenBank 中

公布的 *E. tenella* 豪顿 (Houghton) 株、北京 (Beijing) 株、杨凌 (Yangling) 株的 *SAG10* 基因进行比对和分析, 为研究 *E. tenella* *SAG10* 的生物学功能、筛选 *E. tenella* 保护性抗原等工作提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 球虫卵囊 *E. tenella* 分离自江苏省某鸡场, 由南通市出入境检验检疫局有害生物检疫实验室鉴定并保存。

1.1.2 试验鸡 1 日龄 AA 肉鸡, 购自江苏省南通市某商品鸡孵化场, 饲养于严格消毒且无球虫的笼舍中, 饲料中不含抗球虫药。

1.1.3 试剂 焦碳酸二乙酯 (DEPC), 购自 Amresco 公司; 莫洛尼氏鼠白血病毒 (M - MLV)、Oligo (dT)₁₅ Primer, 购自 Promega 公司; pMD18 - T 克隆载体、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、DL 2 000 Marker、限制性内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I、DNA 胶回收试剂盒, 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计与合成 根据 Tabares 等在 GenBank 中发表的 *E. tenella* *SAG10* 基因序列^[3] (登录号: AJ586552), 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对特异性扩增引物, 上游引物为 5' - CAGGATCCATGCTACAGCGGAAGCTAC - 3', 下游引物为 5' - TCGGAATTCTAAAGTCATAATGCCGAAC - 3', 扩增的目的片段长度为 799 bp。为便于后续操作, 分别在上、下游引物中设计了酶切位点 *Bam*H I、*Eco*R I (如下划线部分所示)。引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.2.2 cDNA 模板的制备 将 30 羽 1 日龄 AA 肉鸡饲养至 14 日龄, 经口接种新鲜孢子化卵囊 1×10^5 个/羽, 接种后

收稿日期: 2015-12-13

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31301926); 江苏省自然科学基金 (编号: BK20130388)。

作者简介: 仇保丰 (1978—), 男, 安徽长丰人, 博士, 兽医师, 主要从事动物及动物产品病原体的检测与研究。Tel: (0513) 68588403; E-mail: baofengqiu2008@163.com。

通信作者: 宋鸿雁, 博士, 副教授, 主要从事实验动物学研究。E-mail: songhongyanv@ntu.edu.cn。

120 h 杀鸡取盲肠。参考文献[8]的方法分离和纯化 *E. tenella* 第 2 代裂殖子,再采用一步法^[9]提取总 RNA 并进行反转录,以反转录 cDNA 作为 PCR 模板。

1.2.3 SAG10 基因的克隆及鉴定 采用特异性引物进行 *SAG10* 基因的 PCR 扩增。PCR 反应体系:10 × *Taq* buffer 2.5 μL、MgCl₂ (25 mmol/L) 1.0 μL、dNTP Mix (10 mmol/L each) 0.5 μL、上游及下游引物 (50 μmol/L) 各 0.5 μL、*Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.5 μL、灭菌双蒸水 14.5 μL、cDNA 模板 5 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 55 s,58 ℃ 55 s,72 ℃ 55 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 15 min。循环完毕后,向扩增产物中加入 5 μL 上样缓冲液,在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,并在紫外灯下观察结果。回收 *SAG10* 基因目的条带,连接 pMD18-T 载体并转化 DH5α,用 *Bam*H I + *Eco*R I 双酶切及 PCR 鉴定出阳性克隆,挑取 3 个克隆送至宝生物工程(大连)有限公司测序,将测序结果输入“<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>”进行网上比对。

1.2.4 SAG10 蛋白的特性分析 采用 DNASTar 4.0 软件分别编辑 GenBank 中报道的 *E. tenella* 豪顿株、北京株、杨凌株、本研究克隆的江苏(Jiangsu)株的 *SAG10* 基因序列,分析开放阅读框(ORF)的碱基序列,并推导出编码蛋白的氨基酸序列。采用 MegAlign Clustal V 软件对 *SAG10* 基因 ORF 的碱基序列和推导氨基酸序列进行比对,分析 *E. tenella* 不同分离株之间 *SAG10* 基因碱基和推导氨基酸的突变情况,进一步采用 DNASTar Protean 软件预测这些突变引起 *SAG10* 蛋白亲水性结构(Hydrophilicity Plot)、抗原性指数(Antigenic index)、表面可及性(Surface Probability Plot)的变化情况。

1.2.5 SAG10 基因遗传进化分析 分别收集若干条 GenBank 中公布的 *E. tenella* 和毒害艾美耳球虫、新孢子虫、肉孢子虫、弓形虫等其他顶复门原虫 SAGs 基因家族(SAGs gene family)序列,结合 GenBank 中已公布及本研究克隆的 *E. tenella* *SAG10* 基因序列,共同采用 MEGA 6.06 软件构建遗传进化发生树,分析本研究克隆 *SAG10* 基因和其他 *SAG* 基因之间的遗传进化关系。

2 结果与分析

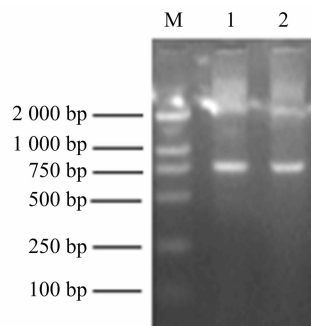
2.1 SAG10 基因的克隆

从 *E. tenella* 第 2 代裂殖子中提取总 RNA 并进行逆转录 PCR(RT-PCR)扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,发现 2 个泳道中均有 1 条约 799 bp 的条带(图 1),与预期大小相吻合。切胶并回收目的条带后,连接 pMD18-T 载体,转化大肠杆菌 DH5α。

2.2 SAG10 基因的鉴定

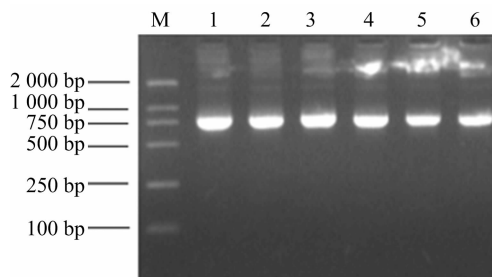
提取 pMD18-T-SAG10 基因重组质粒,经双酶切鉴定,可获得与预期大小一致的目的条带,进一步采用 PCR 方法进行鉴定,也能得到约 799 bp 的条带(图 2),与理论值相吻合。从双酶切和 PCR 鉴定的阳性克隆中挑取 3 个菌落进行 DNA 测序,然后将测序结果输入 GenBank 进行 Blast 比对,发现本研究克隆的 *E. tenella* 江苏株 *SAG10* 基因与 GenBank 中公布的 *E. tenella* 北京株 *SAG10* 基因同源性最高,高达 99%,其后依次为杨凌株、豪顿株,表明 *SAG10* 基因克隆成功。

2.3 SAG10 的蛋白特性分析



M—DL 2 000 DNA Ladder; 1~2—*SAG10* 基因 PCR 扩增产物

图1 *SAG10* 基因的 PCR 扩增结果



M—DL 2 000 DNA Ladder; 1~6—*SAG10* 基因连接T载体PCR鉴定结果

图2 *SAG10* 基因连接T载体的 PCR 鉴定结果

目前,GenBank 中公布的 *E. tenella* *SAG10* 基因序列共有 4 条,其中同源性为 100% 的 2 条豪顿株 *SAG10* 基因序列由国外不同研究小组发表,北京株、杨凌株 *SAG10* 基因序列均由国内学者发表(表 1)。这 4 条 *SAG10* 基因均只有完整的 ORF 部分,无两端序列,全长 786 bp,编码 261 个氨基酸,蛋白分子量约为 27.9 ku。本研究克隆的 *E. tenella* 江苏(Jiangsu)株 *SAG10* 基因全长 799 bp,其中不仅包含 *E. tenella* *SAG10* 基因完整 ORF,同时还包含引物设计过程中人为添加的保护碱基和酶切位点。采用 DNASTar 4.0 软件分析本研究克隆的 *SAG10* 基因的 ORF,并推导出氨基酸序列,与 GenBank 中发表的 4 条序列共同采用 MegAlign Clustal V 软件比对 ORF 内碱基序列和推导氨基酸序列。结果发现,4 种不同 *E. tenella* 分离株 *SAG10* 基因之间共有 11 个位点存在差异(本研究中引物设计时人为引入的突变未计算在内,下同),除去第 426、435、552 位 3 个位点的碱基突变为无义突变外,其余 8 个碱基突变均为有义突变,引起了 8 个氨基酸突变(表 1)。进一步采用 DNASTar Protean 软件中的 Kety-Doolittle、Jameson-Wolf、Emimi 算法,依次分析 *SAG10* 蛋白的亲水性结构、抗原指数、表面可及性的变化情况。结果显示,不同 *E. tenella* 分离株 *SAG10* 蛋白的 N 端和 C 端疏水性均较强,而中间段则有很多亲水性区域。国内外不同 *E. tenella* 分离株之间,*SAG10* 蛋白抗原性总体比较接近,且抗原性很强,但国内不同分离株之间的抗原性更加接近,它们与国外豪顿株的氨基酸序列在 140~160 位差异均较大,且国内分离株的抗原性优于国外豪顿株(图 3)。这可能是由于 *E. tenella* 国内分离株和国外豪顿株的 *SAG10* 氨基酸序列在 140~160 位变化频率较高(表 1),引起蛋白质的空间构象和亲水性发生一定变化而导致。采用 Emimi 算法分析 *SAG10* 蛋白的表面可及性,发现 140~

表 1 不同 *E. tenella* 分离株 *SAG10* 基因和推导氨基酸序列差异比较

<i>E. tenella</i> 分离株	<i>SAG10</i> 基因碱基序列差异位点										<i>SAG10</i> 基因推导氨基酸序列差异位点								
	172	280	379	403	426	431	435	440	470	552	691	58	94	127	135	144	147	157	231
江苏株(本研究)	C	A	G	A	A	G	A	A	T	T	A	H	T	V	K	R	D	V	N
北京株(EU378908)	C	A	G	A	A	G	A	A	C	T	G	H	T	V	K	R	D	A	D
杨凌株(EF649989)	G	G	G	A	A	G	A	A	T	T	G	D	A	V	K	R	D	V	D
豪顿株(AJ586552)	C	A	A	G	T	A	G	G	T	C	G	H	T	I	E	K	G	V	D
豪顿株(XM13375905)	C	A	A	G	T	A	G	G	T	C	G	H	T	I	E	K	G	V	D

注:表中数据表示碱基位置。

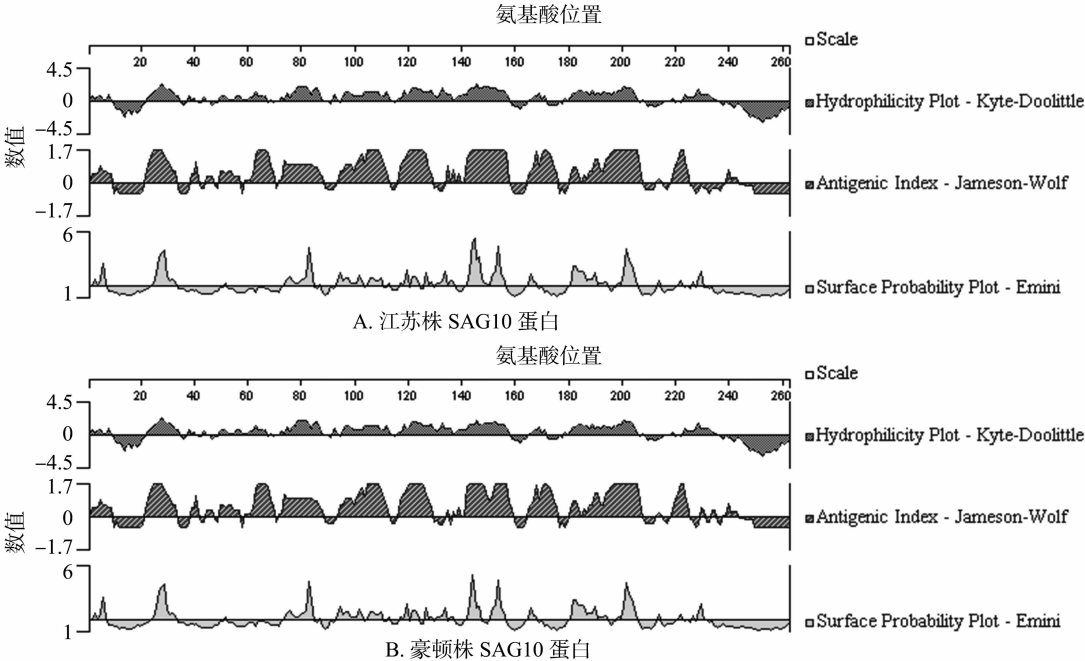


图3 不同 *E. tenella* 分离株 *SAG10* 蛋白特性的分析和比较

160 位氨基酸序列位于 *SAG10* 蛋白表面的可能性较大,一定程度上可解释为何该区域氨基酸突变频率较高会对国内外分离株之间抗原性差异产生影响。

2.4 *SAG10* 基因遗传进化分析

本研究收集了 GenBank 中已发表的 *E. tenella* 4 条 *SAG10* 基因和 1 ~ 2 条不等的 *SAG1*、*SAG5*、*SAG8*、*SAG9*、*SAG11*、*SAG12* 基因序列。同时收集了毒害艾美耳球虫(*Eimeria necatrix*)*SAG* 基因家族序列和犬新孢子虫(*Neospora caninum*)、洪氏新孢子虫(*Neospora hughesi*)、神经肉孢子虫(*Sarcocystis neurona*)的 *SAG1* 基因序列,以及刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)*SAG1*(别称 P30)和 *SAG5*(可分为 A、B、C、D 共 4 种多肽)的基因序列,结合本研究克隆的 *E. tenella* *SAG10* 基因序列,共同采用 MEGA 6.06 软件构建遗传进化发生树(图 4)。结果表明,*E. tenella* 和 *E. necatrix* 的 *SAGs* 基因家族序列均分布在进化树的同一较大分支上,表明艾美耳属(*Eimeria*)球虫的 *SAGs* 基因之间可能相对比较保守。*N. caninum*、*N. hughesi*、*T. gondii* 的 *SAG* 基因则分布在进化树的另一较大分支上,其中同为新孢子虫属(*Neospora*)的 *N. caninum* 和 *N. hughesi* *SAG1* 基因序列也分布在同一亲缘关系较近的分支上,这与 *Eimeria* 属球虫 *SAGs* 基因的特性相似。另外,GenBank 中已发表的 4 条 *E. tenella* *SAG10* 基因与本研究克隆 *SAG10* 基因的亲缘关系较近,分布在同一较小分支上,

且 *E. tenella* 江苏株和北京株的 *SAG10* 基因分布最近,与“2.2”节中江苏株 *SAG10* 基因的 BLAST 结果一致。

已有研究认为,顶复门原虫的 *SAGs* 编码基因在组织寄生型原虫(包囊形成型原虫,如 *T. gondii*、*S. neurona*、*N. caninum*)间是高度同源的,但 *Eimeria* 与隐孢子虫、疟原虫及这三者与弓形虫间无任何同源性^[10-11]。本研究发现,*T. gondii*、*N. caninum*、*N. hughesi*、*Eimeria* 球虫 *SAGs* 基因之间确实表现出了上述特点,但例外的是,*S. neurona* 的 2 条 *SAG1* 基因却与 *T. gondii*、*N. caninum*、*N. hughesi* 的 *SAGs* 基因序列均表现出了较低的同源性,反而与 *Eimeria* 球虫 *SAGs* 基因分布在进化树的同一较大分支上,且与 *E. tenella* 的 *SAG1* 基因间表现出较高的同源性,这与上述已有观点明显不符。

3 结论与讨论

GPI 锚定蛋白是一类通过其羧基末端的糖基化磷脂酰肌醇结构锚定于真核细胞膜表面的蛋白,与传统的跨膜型表面蛋白不同,它们不跨越细胞膜脂质双层,只通过其羧基末端的 GPI 锚定于细胞上,同时这种 GPI 锚在磷脂酶 C 的处理下又可从细胞膜上脱落^[12]。已发现的 GPI 锚定蛋白种类很多,包括水解酶、细胞黏附分子、表面抗原、受体、朊病毒等^[13]。GPI 锚定蛋白功能广泛,涉及细胞识别、信号转导、生长发育、分化、程序性死亡等重要生命过程,与血栓形成、白血病等很多

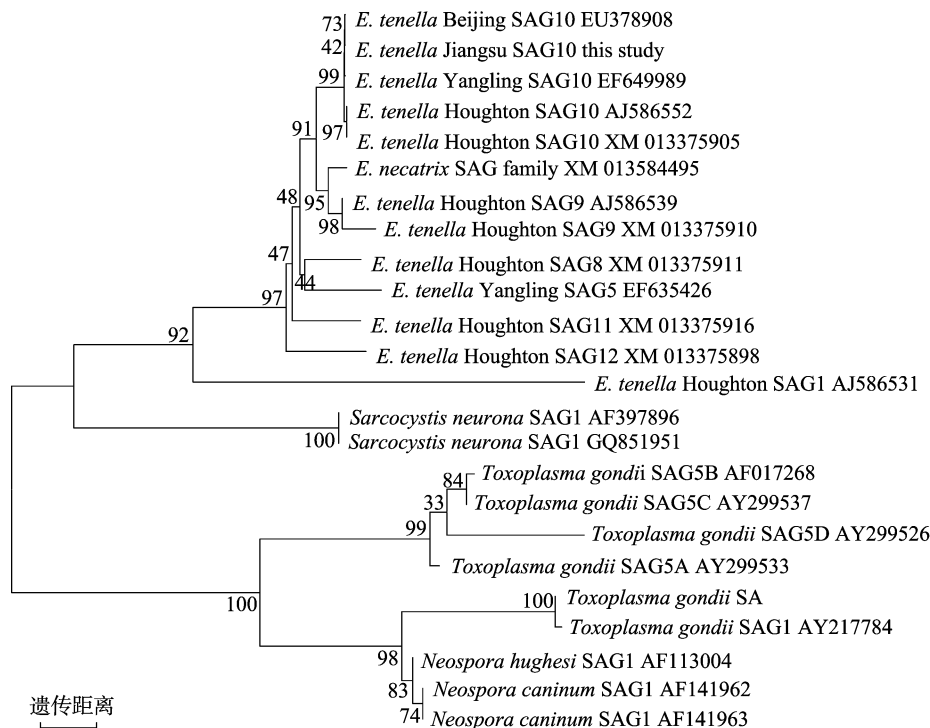


图4 SAG10 基因系统进化树

疾病有着一定联系^[14]。SAGs 是一类 GPI 锚定蛋白,大量分布于弓形虫、疟原虫、隐孢子虫、新孢子虫等侵袭性阶段虫体细胞表面,是虫体与宿主细胞黏附的主要分子^[10]。目前,弓形虫的 SAGs 已被深入研究,但针对 *E. tenella* SAGs 的研究仍有待进一步加强^[3,10]。

麦博等对 *E. tenella* 杨凌株 SAG10 基因及其氨基酸序列进行了研究,发现 SAG10 在不同 *E. tenella* 株间存在抗原性差异^[2]。简永利等对 *E. tenella* 杨凌株 SAG2 基因进行研究后也发现了类似现象^[10]。但这些发现与认为 *E. tenella* 不存在明显株间抗原性差异的传统观点相对立。韩德强等对 *E. tenella* 北京株 SAG10 基因进行了研究,未报道是否发现这一现象^[7]。为澄清这一问题,同时为研究 *E. tenella* SAG10 的生物学功能以及为筛选理想的 *E. tenella* 保护性抗原等提供信息,本研究对 *E. tenella* 江苏株的 SAG10 基因进行了克隆,并将它与国内外在 GenBank 中发表的 *E. tenella* 豪顿株、北京株、杨凌株的 SAG10 基因进行了系统比对和分析。结果表明,*E. tenella* 江苏株 SAG10 基因与 GenBank 中收录的 *E. tenella* 北京株 SAG10 基因同源性最高,高达 99%,其后依次为杨凌株、豪顿株 SAG10 基因。对 4 种不同 *E. tenella* 分离株 SAG10 基因和推导氨基酸序列进行研究发现,SAG10 基因之间共有 11 个位点存在差异,其中 8 个碱基突变为有义突变,引起了 8 个氨基酸突变。分析 SAG10 蛋白的亲水性、抗原性、表面可能性等特性发现,国内外不同 *E. tenella* 分离株之间的 SAG10 蛋白抗原性总体比较接近,且抗原性很强,但国内不同分离株之间的抗原性更加接近,它们均与国外豪顿株的氨基酸序列在 140~160 位差异较大,且国内分离株的抗原性优于国外豪顿株。这可能是由于 *E. tenella* 国内分离株和国外豪顿株的 SAG10 氨基酸序列在 140~160 位变化频率较高,引起蛋白的空间构象、亲水性等发生变化而导致。

目前对于 *E. tenella* SAGs 的研究深度远远落后于弓形虫等其他复顶门原虫 SAGs,因此在开展 *E. tenella* SAGs 的蛋白结构、生物学功能等研究过程中,常须要从弓形虫等其他复顶门原虫 SAGs 的研究中获得启发,并进行对比和推测。简永利等研究发现,*E. tenella* 杨凌株与豪顿株的 SAG2 基因序列高度同源,但与 *T. gondii*、*Neospora caninum*、*Sarcocystis neurona* SAG2 无任何同源性^[10]。更有观点认为,顶复门原虫的 SAGs 编码基因在组织寄生型原虫(包裹形成型原虫,如 *T. gondii*、*S. neurona*、*N. caninum*)间是高度同源的,但 *Eimeria* 与隐孢子虫、疟原虫及这三者与弓形虫间无任何同源性^[10-11]。为证实这一观点,本研究收集了 GenBank 中已发表的 *E. tenella* 4 条 SAG10 基因和 1~2 条不等的 SAG1、SAG5、SAG8、SAG9、SAG11、SAG12 的基因序列,同时收集了 *E. necatrix*、*N. caninum*、*N. hughesi*、*S. neurona*、*T. gondii* 的相关 SAG 基因序列,结合本研究克隆的 *E. tenella* SAG10 基因序列,共同采用 MEGA 6.06 软件构建遗传进化发生树。结果发现,*E. tenella* 和 *E. necatrix* 的 SAGs 基因家族的序列均分布在进化树的同一较大分支上,表明同为 *Eimeria* 属的球虫 SAGs 之间可能相对比较保守。*N. caninum*、*N. hughesi*、*T. gondii* 的 SAG 基因则分布在进化树的另一较大分支上,其中,同为 *Neospora* 属的 *N. caninum* 和 *N. hughesi* SAG1 基因序列也分布在同一亲缘关系较近的分支上,这与 *Eimeria* 属球虫 SAGs 基因的特性相似,也与上述其他学者的观点一致。但例外的是,*S. neurona* 的 2 条 SAG1 基因却均与 *T. gondii*、*N. caninum*、*N. hughesi* 的 SAG1 基因序列表现出了较低的同源性,反而与 *Eimeria* 球虫 SAGs 基因分布在进化树的同一较大分支上,且与 *E. tenella* 的 SAG1 基因间表现出较高的同源性,这与已有研究结果^[10-11]明显不符。导致这一异常现象的原因有待进一步研究,同时须分析比对更多的序列。

李先良,李居宁,张喜才,等. 荆半夏胚性愈伤组织的诱导[J]. 江苏农业科学,2017,45(3):28-30.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.03.007

荆半夏胚性愈伤组织的诱导

李先良¹, 李居宁¹, 张喜才¹, 赵志常²

(1. 荆楚理工学院生物工程学院/荆楚理工学院科技处,湖北荆门 448000;

2. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部华南作物基因资源与种质创制重点开发实验室,海南儋州 571737)

摘要:以竹叶型荆半夏叶柄为外植体,研究不同培养基、激素配比、不同叶柄处理方式对愈伤组织诱导的影响。结果表明,单独添加 2,4-D 或 6-BA 均能诱导半夏叶柄愈伤组织,但诱导率较低,愈伤组织质量相对较差。叶柄不同部位对愈伤组织诱导有显著影响,叶柄下段适合愈伤组织诱导,黄化处理能提高叶柄愈伤组织诱导的效果。正交试验结果表明,4 因素对半夏愈伤组织诱导影响从大到小为 2,4-D 浓度 > 叶柄位置 > 6-BA 浓度 > 蔗糖浓度。从诱导率和愈伤组织质量考虑,取半夏叶柄下段接种于培养基 MS + 2.0 mg/L 2,4-D + 0.5 mg/L 6-BA + 60 g/L 蔗糖上进行培养,效果较好。

关键词:荆半夏;叶柄;胚性;愈伤组织;诱导;培养基;激素

中图分类号: S567.23⁺9.043 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)03-0028-03

半夏(*Pinellia ternata*)是天南星科多年生草本植物,主要分布于湖北省、四川省、河南省、贵州省、安徽省等地,其中产于湖北省荆州市的半夏被称为荆半夏,因色白、质坚实、粉性足等优点而被誉为上品。半夏是传统中药,据对 558 个处方分析,半夏出现频率位于第 22 位。半夏以块茎入药,含半夏

生物碱、β-谷甾醇等成分^[1-2],具有燥湿化痰、降逆止呕,消痞散结等多种功效^[3-4]。近年来,半夏蛋白被发现还具有抗早孕、抗肿瘤^[4-6]、抗心律失常、抗衰老^[7-8]的特殊功效。半夏市场需求量大,市场价格比较稳定,野生半夏满足不了市场需求,人工栽培逐渐发展起来。人工栽培半夏种茎价格较高,目前湖北省半夏栽培使用种茎量为 4.5~6 t/hm²,需 9 万~12 万元/hm²。因此,降低种茎成本可以有效提高半夏人工栽培效益。

半夏自然状态下可进行有性繁殖和无性繁殖。有性繁殖形成的种子发芽率低,除了种子外,半夏通过块茎形成珠芽来进行无性繁殖,一般 2~3 年生的块茎会形成 1~2 个珠芽,无性繁殖效率较低。因此,组织培养作为一种高效繁殖方法,将其运用于半夏种苗或种茎的培育一直备受重视。半夏主要通

收稿日期:2016-08-16

基金项目:国家自然科学基金(编号:31471850);湖北省荆门市科技局科学基金(编号:110588)。

作者简介:李先良(1976—),男,副教授,研究方向为园艺植物遗传改良和分子生物学。E-mail:libusher@sina.com。

通信作者:赵志常,副研究员,研究方向为热带果树遗传育种与分子生物学。E-mail:zhaozhichang2001@163.com。

参考文献:

- [1] 曹利利,姚新华,侯洪烈,等. 柔嫩艾美耳球虫长春株 SAG2 基因的克隆与序列分析[J]. 动物医学进展,2013,34(12):115-120.
- [2] 麦博,覃宗华,于三科,等. 柔嫩艾美耳球虫杨凌株表面抗原 SAG10 基因的克隆与原核表达[J]. 中国兽医科学,2007,37(9):751-755.
- [3] Tabarés E, Ferguson D, Clark J, et al. *Eimeria tenella* sporozoites and merozoites differentially express glycosylphosphatidylinositol-anchored variant surface proteins[J]. Molecular & Biochemical Parasitology, 2004, 135(1):123-132.
- [4] Ngo H M, Hoppe H, Joiner K. Differential sorting and post-secretory targeting of proteins in parasitic invasion[J]. Trends in Cell Biology, 2000, 10(2):67-72.
- [5] Frasch A C. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*[J]. Parasitology Today, 2000, 16(7):282-286.
- [6] Lekutis C, Ferguson D, Grigg M, et al. Surface antigens of *Toxoplasma gondii*: variations on a theme[J]. International Journal for Parasitology, 2001, 31(12):1285-1292.

- [7] 韩德强,丁宏标,乔宇,等. 鸡柔嫩艾美耳球虫表面抗原基因 *sag10* 在毕赤酵母中的表达及鉴定[J]. 寄生虫与医学昆虫学报, 2006, 13(4):199-203.
- [8] 蒋建林,蒋金书. 柔嫩艾美耳球虫各阶段虫体纯化方法的改进[J]. 中国农业大学学报, 1996, 1(5):99-102.
- [9] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社, 2002:1256-1259.
- [10] 简永利,蔡建平,于三科,等. 柔嫩艾美耳球虫表面抗原 SAG2 基因的克隆与表达[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(6):10-13.
- [11] Jung C, Lee C Y, Grigg M E. The SRS superfamily of *Toxoplasma* surface proteins[J]. International Journal for Parasitology, 2004, 34(3):285-296.
- [12] 熊茂林,宋畅,罗荣城,等. 人糖基磷脂酰肌醇(GPI)-B7-1 真核表达载体的构建及表达[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(1):154-158.
- [13] 苏建亚,沈晋良. 棉铃虫幼虫中肠非糖基磷脂酰肌醇锚着氨肽酶 N 基因的克隆和测序[J]. 昆虫学报, 2005, 48(3):444-449.
- [14] 张云华,黄瑾. GPI 锚定蛋白的合成及功能[J]. 农垦医学, 2012, 34(1):59-62.