

薛存宝,范莲雪,张 铅,等. 黄瓜耐低氮相关基因 *CsAOC3* 的克隆及表达分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(4):26–29.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2017.04.007

黄瓜耐低氮相关基因 *CsAOC3* 的克隆及表达分析

薛存宝, 范莲雪, 张 铅, 王 悦, 郭冬雪, 秦智伟, 武 涛

(东北农业大学园艺学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要:从黄瓜叶片中分离获得 1 个丙二烯氧化物环化酶基因,命名为 *CsAOC3*。该基因 cDNA 全长为 753 bp,编码 250 个氨基酸,与甜瓜的丙二烯氧化物环化酶(AOC)序列同源性最高。通过荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析发现,*CsAOC3* 在低氮胁迫条件下只有在耐低氮黄瓜品系 D0328 中的表达量明显上调,在耐低氮能力弱的黄瓜品系 D0422 中的表达量并无明显变化。研究结果可为黄瓜耐低氮的基因功能研究提供理论依据。

关键词:黄瓜;耐低氮;*CsAOC3* 基因;克隆;表达分析

中图分类号:Q786 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2017)04–0026–04

氮素由于在植物生长发育中有着不可或缺的作用,因此一直被广泛关注和研究。黄瓜(*Cucumis sativus* L.)作为一种喜硝态氮的蔬菜作物,对于氮素的需求也是毋庸置疑的。近几年来,生产者在盲目追求黄瓜产量的同时,过度施用氮肥的现象十分严重,造成的环境污染、黄瓜产品质量下降等后果也十分严峻^[1–2]。因此,有效提高黄瓜耐低氮能力、培育耐低氮黄瓜品种对于创造绿色农业、现代农业具有重要意义。随着黄瓜基因的测序完成,许多研究已经发展到了分子水平,鉴于其他模式植物如拟南芥等的研究,通过挖掘氮素相关基因,利用基因工程手段提高植物的氮素代谢能力是研究黄瓜耐低氮的重要手段之一^[3]。何红梅等对低氮胁迫下黄瓜钙依赖蛋白激酶基因 *CsCDPK* 进行了克隆、表达分析及遗传转化,也对谷氨酰胺酶基因 *GSI* 和黄瓜硝酸盐转运蛋白基因 *CsNRT1.5* 等进行了克隆与表达分析^[4–6],证明通过转录水平找到黄瓜耐低氮相关基因是可行的。丙二烯氧化物环化酶(allene oxide cyclase,AOC)基因是茉莉酸合成的重要酶基因,目前已经在多种作物中被克隆,如番茄^[7]、拟南芥^[8]、大豆^[9]等。尽管这些 AOC 基因来自不同的植物,但是它们都对生物、非生物胁迫具有类似的响应。例如,麻疯树 *JcAOC* 可响应盐胁迫、低温胁迫^[10];喜树 AOC 基因的过表达可提高烟草对盐胁迫、低温胁迫的耐受性^[11];将大豆 *GmAOC5* 基因导入烟草可提高转基因植株的抗氧化胁迫能力,而 *GmAOC1* 则提高了烟草的耐盐性^[9]。但是,关于黄瓜 *CsAOC3* 基因对低氮胁迫的响应还未见报道。

本研究对黄瓜 *CsAOC3* 基因进行分离,获得该基因的全

长 cDNA 序列,并阐述该基因的蛋白结构及系统进化情况,同时研究该基因在耐低氮能力不同的 2 个黄瓜品系中的表达模式。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料为前期筛选出的 2 份黄瓜品系:耐低氮能力强的 D0328、耐低氮能力弱的 D0422^[12],由东北农业大学园艺学院黄瓜课题组提供。

1.2 菌株与试剂

大肠杆菌 DH5 α 菌株、pEASY-T1 克隆载体、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和 *Taq* DNA 聚合酶,购自北京全式金生物技术(TransGen Biotech)有限公司;TRIzol,购自 Invitrogen 公司;SYBR Green PCR Master Mix 荧光定量试剂盒、cDNA 第 1 链合成试剂盒,购自东洋纺(上海)生物科技有限公司(TOYOBO);其他生化试剂均为进口或国产分析纯产品。基因测序由金唯智生物科技(北京)有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 植物培养 将 D0328、D0422 种子浸种催芽后,在人工气候室中进行播种培养,光—暗周期 16 h—8 h,昼—夜温度 26 $^{\circ}\text{C}$ —18 $^{\circ}\text{C}$,空气相对湿度保持在 65%~70%之间,使用全蛭石为基质,浇灌营养液栽培。待其子叶展平时,分别用含低氮(3 mmol/L NO_3^-)、正常氮(14 mmol/L NO_3^-)的营养液进行处理,基础营养液配方:1.512 mmol/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.257 mmol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mmol/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 4 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 6 mmol/L KNO_3 , 8.6 $\mu\text{mol/L}$ $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{FeN}_2\text{NaO}_8 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 10.3 $\mu\text{mol/L}$ MnSO_4 , 1 $\mu\text{mol/L}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 30 $\mu\text{mol/L}$ H_3BO_3 , 24 nmol/L $\text{Na}_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 130 nmol/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ^[13]。用 KCl、 KNO_3 调整营养液中的 K^+ 、 Ca^{2+} 平衡,每隔 1 d 浇灌营养液 1 次。在播种后 37 d 分别取根、茎、叶,液氮速冻后,存放于 -80°C 备用。

1.3.2 总 RNA 提取及 cDNA 第 1 链合成 采用 TRIzol 法提取各部位总 RNA,用分光光度计检测吸光度及浓度;cDNA 第 1 链的合成参照 TOYOBO 公司的 ReverTra Ace qPCR RT Kit 说明书进行。

收稿日期:2016–01–09

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31101545);黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划(编号:UNPYSCT–2015001);2015 年黑龙江省大学生创新创业训练计划(编号:201510224015);东北农业大学“青年才俊”项目(编号:14QC07)。

作者简介:薛存宝(1991–),男,黑龙江依安人,硕士研究生,主要从事蔬菜作物营养及抗逆分子生物学研究。E-mail:flyingsnowings@163.com。

通信作者:武 涛,博士,副教授,从事蔬菜作物营养及抗逆分子生物学研究。Tel:(0451)55190214;E-mail:wutao@neau.edu.cn。

1.3.3 引物设计与合成 以黄瓜基因组数据库中序列号为 Csa5M366670.1 的基因编码序列为模板,利用 Primer Premier 5.0 软件进行克隆引物、qRT-PCR 引物设计(表 1)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 *CsAOC* 基因克隆和 qRT-PCR 引物

基因名称	引物序列 (5'→3')	引物用途
<i>CsAOC3</i> - F	ATGGCGTCCTTCCTCAGTTC	全长扩增
<i>CsAOC3</i> - R	TCAATCGGTAAAGTTAGGAATGG	全长扩增
<i>CsAOC3</i> - qF	TCCAAACCCAACTCAGATCA	qRT-PCR
<i>CsAOC3</i> - qR	TGTCTCGCTCGTTATCTCG	qRT-PCR
<i>CsEF1α</i> - F	CCTTGGTGTCAAGCAGATGA	内参基因扩增
<i>CsEF1α</i> - R	TGAAGACACCTCCTTGATGATTT	内参基因扩增

1.3.4 黄瓜 *CsAOC3* 基因的克隆与序列分析 以 D0328 叶片 cDNA 为模板,利用 PCR 技术进行 *CsAOC* 的克隆,20 μL 反应体系:2 μL 10 × *Taq* Buffer,2 μL dNTP Mix,各 0.5 μL *CsAOC* - F (10 μmol/L)、*CsAOC* - R (10 μmol/L),0.2 μL 5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶,2 μL 200 ng/μL 模板 cDNA,12.8 μL ddH₂O。反应条件:96 ℃ 5 min;95 ℃ 30 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,25 次循环;72 ℃ 10 min。反应结束后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并进行目的条带的回收,与 pEASY-T1 克隆载体连接,转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中,将菌液铺平板,于 37 ℃ 培养过夜,挑斑,摇菌,然后进行质粒提取,酶切鉴定后送阳性样本测序。

利用美国国立生物技术信息中心(网址: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 简称 NCBI) 在线 Blast 工具和 DNAMAN、DNASar 进行序列比对、分析;利用在线软件 ExPASy、TMHMM 等进行氨基酸组成、稳定系数、亲水系数等分析;利用 MEGA 5.10 软件,采用邻近法构建系统进化树。

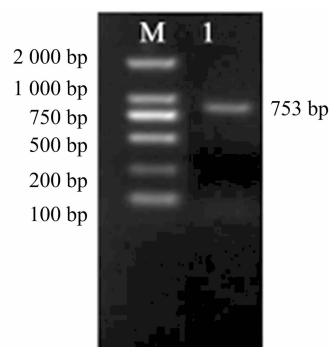
1.3.5 低氮胁迫条件下的表达分析 以低氮、正常氮处理植株的根、茎、叶 cDNA 为模板,进行 qRT-PCR,20 μL 反应体

系:10 μL SYBR Green PCR Master Mix,各 0.5 μL *CsAOC3* - qF(10 μmol/L)、*CsAOC3* - qR(10 μmol/L),1 μL 150 ng/μL cDNA,8 μL ddH₂O。反应条件:96 ℃ 1 min;95 ℃ 15 s,56 ℃ 15 s,72 ℃ 45 s,45 次循环。以本试验中的 *CsEF1α* 作为参照基因。

2 结果与分析

2.1 *CsAOC3* 克隆

以低氮处理的黄瓜叶片 cDNA 为模板,以 *CsAOC3* - F、*CsAOC3* - R 为引物,通过 PCR 扩增出 1 条约 750 bp 的亮带(图 1)。回收目标条带,并与 pEASY-T1 克隆载体连接,经阳性菌液酶切检测后,送交金唯智生物科技(北京)有限公司测序得到碱基序列,全长为 753 bp,该序列与黄瓜基因组数据库 Csa5M366670.1 基因编码区序列完全一致,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TGA,表明成功获得全长目的基因。



M—Trans 2K DNA marker; 1—*CsAOC3*

图1 *CsAOC* 全长扩增

2.2 序列分析

利用 DNAMAN 8.0 软件翻译该序列,发现该序列共编码 250 个氨基酸(图 2)。通过 NCBI 对该基因的氨基酸序列保守结构域分析发现,其蛋白属于丙二烯氧化物环化酶超家族

```

1  ATGGCGTCCTTCCTCAGTTCCTTCCACATCAATTTCTTCCCTGAGAATACCCACCTCTCCT
1  M A S F L S S T S I S S L R I P T S P
61  CTGCTCTCTCAAACCCAACTCTTTTGCTTTTAATCTCTCACAATCACAATCTTTCTCT
21  L L S Q T Q T L L P F N L S Q S Q S F S
121  TCTCCAGCATTACGATCTTCATCATCCGTCTCAACTACCTCCAACAACCTCCACAATCACA
41  S P A L R S S S S V S T T S N S T I T
181  TCACTTCTCTTCAAAAAATCCAAACCCAACTCAGATCATCCCAATCCGCAAGAGTACAA
61  S L L F K K S K P N S D H P K S A R V Q
241  GAACTGTTCGTGTACGAGATAAACGACGCGAGACAGGGGAAGCCAGCATTCTTAAACTA
81  E L F V Y E I N E R D R G S P A F L K L
301  AGCAAGAAAGGTGAGAAATCACTGGGGGATTGGTCCCATTACGACCAACAGCTTCTACTCC
101  S K K A E N S L G D L V P F S N K L Y S
361  GCGACCTTCAGAAGCGGCTCGGCATAACGACCGGCCTCTGCGTCTTAATTCAGCACTTG
121  G D L Q K R L G I T T G L C V L I Q H L
421  CCTGAAAGAAAAGGGGACCGCTACGAGCCATCTACAGTCTTCTTTGGCGATTACGGC
141  P E K K G D R Y E A I Y S F Y F G D Y G
481  CACATAACCGTCCAAGGCGCCTACTTGACTTATCAAGACACCTACTTACCGTTACCGGC
161  H I T V Q G A Y L T Y Q D T Y L A V T G
541  GGCAGTGGCATCTTTGAAGGCGTTTCCGGCCAGGTCAAGTTGCAGCAGATCGTTTTCCCT
181  G S G I F E G V S G Q V K L Q I V F P
601  TTTAAGCTGTCTACACCTTTTATTTGAAGGGATCGCGGATTTCGGCGTCACTTGTTC
201  F K L F Y T F Y L K G I A D L P A E L L
661  GGAAGCCTGTTCCGCCGTCTCCACCGTCGAGCCAGCTCCTGCGGCCAAGGCTTGTGAC
221  G K P V P S P T V E P A P A A K A C D
721  CCTTCCGCCGCCATTCTTAACCTTTACCGATTGA
241  P S A A I P N F T D *

```

左侧数字为碱基、氨基酸位置;“*”表示终止密码子

图2 *CsAOC3* 序列与其编码氨基酸序列信息

(allene oxide cyclase superfamily)(图3)。通过在线软件 Ex-pasy-ProtParam(<http://www.expasy.org/>)分析该基因所编码蛋白的理化性质,结果表明,CsAOC3 蛋白的分子量为 27.17 ku,理论等电点为 8.93,不稳定系数为 51.92,平均亲水系数为 -0.155,因此该蛋白属于不稳定型的疏水蛋白。利用

TMHMM Server v 2.0(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)跨膜结构区预测表明,CsAOC3 蛋白不具有跨膜蛋白结构。用 TargetP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)分析表明,该蛋白无信号肽,此外亚细胞定位显示,该蛋白最可能定位于叶绿体。

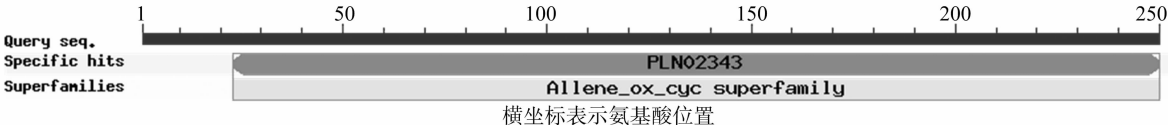


图3 CsAOC3蛋白保守结构域分析

2.3 系统进化分析

将 DNAMAN 8.0 软件翻译获得的 CsAOC3 编码的氨基酸序列在 NCBI 蛋白数据库中比对发现,该蛋白与甜瓜、菜豆、胡杨等 16 种植物的 AOC 蛋白有 65% ~ 94% 的同源性,其中与甜瓜的蛋白同源性最高,为 94%。将 CsAOC3 与这十余条

AOC 蛋白序列进行多重比较并用 MEGA 5.10 软件构建系统进化树,可以看出,这 17 条蛋白序列明显地聚为 2 类:CsAOC3 与甜瓜、大豆、拟南芥、烟草等为第 1 类,其中黄瓜与同属葫芦科作物的甜瓜亲缘关系非常接近;菜豆、葡萄则为第 2 类(图 4)。

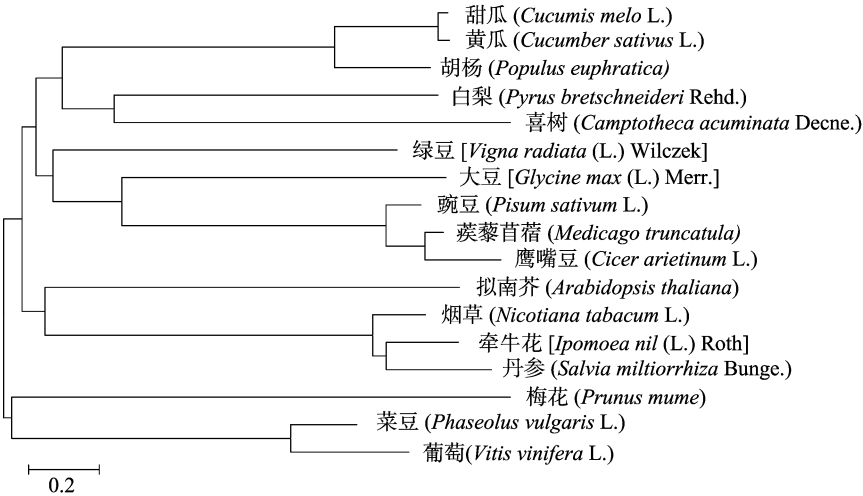


图4 CsAOC3 蛋白与其他植物 AOC 蛋白系统进化树分析

2.4 CsAOC3 在低氮胁迫条件下的表达分析

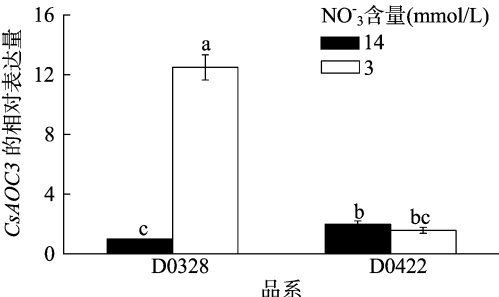
在播种 37 d 后对低氮处理、正常氮处理的 2 个黄瓜品系 D0328、D0422 的第 3 张叶片进行取材,提取总 RNA,进行反转录获得 cDNA。利用 qRT-PCR 技术对 CsAOC3 在低氮胁迫条件下 2 个耐低氮能力不同的黄瓜品系叶片中的表达情况进行分析。图 5 表明,在耐低氮强的黄瓜品系 D0328 中,与正常氮处理相比,CsAOC3 在低氮胁迫条件下的表达量明显上调,提高了 11 倍多;在耐低氮能力弱的黄瓜品系 D0422 中,低氮胁迫条件与正常氮条件下的 CsAOC3 表达量并没有明显变化。

3 讨论与结论

本研究首先利用 PCR 技术,从黄瓜叶片中扩增获得丙二烯氧化物环化酶基因 CsAOC3 的 cDNA 全长。通过保守结构域分析表明,该基因编码植物丙二烯氧化物环化酶超家族蛋白;其氨基酸序列与其他植物 AOC 基因编码的氨基酸序列同源性较高,其中与同属葫芦科的甜瓜同源性最高。而且进化分析表明,该蛋白与多数作物亲缘关系较近,符合植物进化规律。

丙二烯氧化物环化酶(AOC,E 5.3.99.6)可以将不稳定的丙二烯氧化物衍生物转变为 12-氧-植物二烯酸还原酶(12-oxo-phytodienoic acid,简称 OPDA),进而促进茉莉酸基本结构的形成^[7,9],因此 AOC 被视为茉莉酸合成中极其重要的酶。许多研究已经证明,茉莉酸是一种植物适应多种逆境的重要激素之一^[14-17]。因此涉及茉莉酸合成和信号的基因也逐渐被研究,如拟南芥、番茄、水稻、玉米等^[16-19]。

目前,尽管 AOC 基因在不同作物中已有较为广泛的研究,但是关于该基因对低氮响应的研究尚不明确。现有研究表明,茉莉酸、乙烯能够调控硝酸盐转运蛋白 AtNPF7.2、AtNPF7.3,从而影响和调节植物的氮素吸收和转运^[20]。本研究对 CsAOC3 在低氮胁迫条件下的表达进行分析,发现该基



不同处理间标有不同小写字母表示差异显著(P<0.05)
图5 CsAOC3 在不同黄瓜品系中的表达分析结果

因在低氮条件下的耐低氮黄瓜品系中的表达量显著上调,而在耐低氮弱的黄瓜品系中表达量几乎不变,说明该基因是在耐低氮品系中特异上调表达的基因,暗示 2 个黄瓜品系之所以有耐低氮能力差异,可能是由于二者在低氮胁迫时,对于氮素吸收的能力有明显差异引起的,也就是说,对于耐低氮品系 D0328 来说,低氮胁迫会激发它通过 *CsAOC3* 的迅速上调表达来促进茉莉酸合成,从而增强氮素的吸收能力;而耐低氮弱品系 D0422 中的 *CsAOC3* 则没有作出相应反应。Wang 等最近研究发现,陆地棉 *GhAOC1* 基因过表达可增强拟南芥对铜的耐受性^[21],因此该基因可能会对植物营养胁迫作出响应。

目前,关于黄瓜耐低氮相关基因的报道较少。本研究通过克隆获得了 *CsAOC3* 并对它在低氮胁迫下的响应作了初步检测,证明该基因是耐低氮黄瓜品系中特异上调表达基因,这一结论将为后续研究黄瓜耐低氮生理及分子机制提供思路和线索,也为下一步利用转基因技术提高黄瓜耐低氮能力奠定了基础。

参考文献:

- [1] Robertson G P, Vitousek P M. Nitrogen in agriculture: balancing the cost of an essential resource[J]. Environment and Resources, 2009 (34): 97–125.
- [2] 洪春来, 黄锦法, 贾彦博, 等. 施氮水平对黄瓜硝酸盐积累的影响[J]. 浙江农业科学, 2003(4): 174–175.
- [3] Fan S, Lin C, Hsu P, et al. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source – to – sink remobilization of nitrate [J]. The Plant Cell, 2009, 21 (9): 2750–2761.
- [4] 何红梅. 黄瓜 *CDPK* 基因的克隆及遗传转化[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.
- [5] 冯 卓, 秦智伟, 武 涛, 等. 黄瓜细胞质型谷氨酰胺合成酶基因 (*GSI*) 的克隆及其在低氮条件下的表达[J]. 中国农业科学, 2012, 45(15): 3100–3107.
- [6] 秦智伟, 冯 卓, 武 涛, 等. 黄瓜硝酸盐转运蛋白基因 *CsNRT1.5* 的克隆及表达分析[J]. 东北农业大学学报, 2013, 44(7): 80–84.
- [7] Ziegler J, Stenzel I, Hause B, et al. Molecular cloning of allene oxide cyclase. The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2000, 275 (25): 19132–19138.
- [8] Stenzel I, Hause B, Miersch O, et al. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(6): 895–911.
- [9] Wu Q, Wu J, Sun H, et al. Sequence and expression divergence of the *AOC* gene family in soybean: insights into functional diversity for stress responses[J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(7): 1351–1359.
- [10] Liu B, Wang W, Gao J H, et al. Molecular cloning and characterization of a jasmonate biosynthetic pathway gene for allene oxide cyclase from *Jatropha curcas* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2010, 32 (3): 531–539.
- [11] Pi Y, Jiang K, Cao Y, et al. Allene oxide cyclase from *Camptotheca acuminata* improves tolerance against low temperature and salt stress in tobacco and bacteria[J]. Molecular Biotechnology, 2009, 41(2): 115–122.
- [12] 冯 卓. 低氮胁迫下黄瓜幼苗差异表达基因鉴定与蛋白质组学分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [13] Fujiwara T, Hirai M, Chino M, et al. Effects of sulfur nutrition on expression of the soybean seed storage protein genes in transgenic petunia[J]. Plant Physiology, 1992, 99(1): 263–268.
- [14] Creelman R A, Mullet J E. Biosynthesis and action of jasmonates in plants[J]. Plant Biology, 1997, 48(48): 355–381.
- [15] Parchmann S, Gundlach H, Mueller M. Induction of 12 – oxo – phytyldienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures[J]. Plant Physiology, 1997, 115(3): 1057–1064.
- [16] Wasternack C. Action of jasmonates in plant stress responses and development – applied aspects[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(1): 31–39.
- [17] Wasternack C, Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development[J]. Annals of Botany, 2013, 111(6): 1021–1058.
- [18] Song S, Qi T, Huang H, et al. Regulation of stamen development by coordinated actions of jasmonate, auxin, and gibberellin in *Arabidopsis* [J]. Molecular Plant, 2013, 6(4): 1065–1073.
- [19] Song S, Qi T, Wasternack C, et al. Jasmonate signaling and crosstalk with gibberellin and ethylene[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2014, 21: 112–119.
- [20] Zhang G, Yi H, Gong J. The *Arabidopsis* ethylene/jasmonic acid – NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the trade – off between growth and environmental adaptation[J]. The Plant Cell, 2014, 26(10): 3984–3998.
- [21] Wang Y, Liu H H, Xin Q G. Improvement of copper tolerance of *Arabidopsis* by transgenic expression of an allene oxide cyclase gene, *GhAOC1*, in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. The Crop Journal, 2015, 3(4): 343–352.