

丁泽红,付莉莉,黄 猛,等. 木薯 *MeP5CS1* 基因的克隆、表达分析及载体构建[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):40-43.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.009

木薯 *MeP5CS1* 基因的克隆、表达分析及载体构建

丁泽红,付莉莉,黄 猛,颜 彦,铁韦韦,张家明,胡 伟

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所,海南海口 571101)

摘要:对从木薯 Ku50 叶片中克隆的 1 个 *P5CS* 基因 *MeP5CS1* 进行聚乙二醇(PEG)、脱落酸(ABA)、盐胁迫下的表达分析,结果表明,基因 *MeP5CS1* 具有 1 个 2 220 bp 的开放阅读框,编码 739 个氨基酸,且含有 *P5CS* 保守结构域;*MeP5CS1* 与杨树、杞柳的 *P5CS* 基因亲缘关系相对较近,序列相似性分别达到 88.61%、88.95%;*MeP5CS1* 基因在第 1 张完全展开叶、老叶中的表达量受到 PEG 处理诱导,且与叶片中脯氨酸的含量变化趋势一致;*MeP5CS1* 基因的表达还受到脱落酸(ABA)、盐胁迫处理的诱导。在此基础上,成功构建 *MeP5CS1* 基因的植物表达载体 pCambia 2300-*MeP5CS1*,为进一步解析 *MeP5CS1* 在木薯抗旱中的作用机制提供参考。

关键词:木薯;*MeP5CS1*;非生物胁迫;克隆;基因表达;载体构建

中图分类号:S533.01 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)18-0040-03

干旱是世界农业面临的最严重问题之一。随着全球发生周期性降水分布不均、水资源受到污染等现象,植物面临干旱胁迫的程度日益加剧,不但导致农作物产量严重减少,而且还使得旱地面积持续扩大,制约着农业的可持续发展^[1]。在漫长的环境适应和驯化过程中,植物形成了多种生理生化策略以应对干旱胁迫,如当植物遭受长时间和较为严重的干旱时,植物冠层的光合作用将显著减少;为尽快适应缺水的情况,植物通过老叶的脱落来减少水分消耗,或增加根长来吸收更深层的地下水^[2],脯氨酸等各种小分子化合物将被合成并迅速积累以保持细胞中的含水量^[3]等等。

脯氨酸是植物面对水分、高盐等逆境胁迫最为重要的渗透调节物质,提高植物中脯氨酸的积累对提升植物抗渗透胁迫能力具有重要的意义。 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)是植物脯氨酸生物合成途径中的关键酶,决定着植物体内脯氨酸的积累速度^[4]。目前,对很多植物中的 *P5CS* 基因研究较为深入^[5-7],并发现 *P5CS* 转基因植株的抗逆性表型增强^[8-9]。木薯是重要的粮食作物和经济作物,虽具有一定的抗旱特性,但同大多数作物一样,干旱胁迫仍严重地影响木薯的生长和发育,导致木薯块根产量减少^[2],而与模式植物相比,木薯的重要经济性性状基础理论研究还相对薄弱,与抗旱相关的分子机制尚不明确。本研究在克隆木薯 *P5CS* 基因 *MeP5CS1* 的基础上,分析 *MeP5CS1* 基因在聚乙二醇(PEG)、脱落酸(ABA)和盐胁迫条件下的表达量变化,并构建相关的植物表达载体,为进一步解析木薯的抗旱机制提供参考。

1 材料与方法

收稿日期:2016-05-09

基金项目:海南省自然科学基金(编号:20163120,20153048)。

作者简介:丁泽红(1982—),男,湖南岳阳人,博士,助理研究员,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:dingzehong@itbb.org.cn。

通信作者:胡 伟,博士,副研究员,主要从事植物分子生物学研究。

Tel:(0898)66989380;E-mail:huwei2010916@126.com。

1.1 试验材料的准备

试验材料为木薯栽培品种 Ku50,由中国热带农业科学院热带生物技术研究所提供,在木薯种植季节,将 Ku50 种茎切成长度约 15 cm 的茎段,挑选含 3~4 个芽眼/茎段、粗细均匀一致的茎段,扦插于高为 18.8 cm,上、下直径分别为 18.5、14.8 cm 的塑料盆中,1 茎段/盆。基质采用营养土与蛭石以 1:1 的体积比进行混合。木薯种植约 10 d 进行间苗,保留 1 苗/盆。

1.2 试验处理

木薯盆栽种植 60 d,选取长势一致的植株用 20% PEG6000 溶液模拟干旱胁迫,以浇灌自来水为对照,分别在处理 0、3、6、12、24 h 时,按照 Bates 等的方法^[10]测定叶片脯氨酸含量,同时,分别在处理 0、3、24 h 时采集未展开叶、第 1 张完全展开叶、老叶、根。此外,对种植 60 d 的木薯幼苗用 100 $\mu\text{mol/L}$ ABA 喷施,在处理 0、2、6、10、24、48、72 h 时采集未展开叶、第 1 张完全展开叶、老叶;另用 200 mmol/L NaCl 进行灌根,在处理 0、2、6 h 及 3、14、18、24 d 同样采集叶片。根、叶样品液氮冷冻、-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,待测。

1.3 RNA 提取与 cDNA 合成

按照天根生化科技有限公司生产的 RNA 提取试剂盒说明书提取木薯的总 RNA;利用 Fermentas 公司生产的第一链 cDNA 合成试剂盒(revert aid first strand cDNA synthesis kit)将总 RNA 反转录成 cDNA,-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存,备用。

1.4 引物设计与实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)

用 Primer 6.0 设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。*MeP5CS1* 基因全长扩增正向、反向引物分别为 L1:5'-GGGGTACCCCTGCTCATGGCTGCAAACTG-3'、R1:5'-GCGTCGACATGAAGCAACGGTGGGAGAT-3'(下划线为酶切位点),分别带有 *Kpn* I 和 *Sal* I 酶切位点及保护碱基,可用于植物表达载体的构建。qRT-PCR 引物包括 *MeP5CS1* 基因特异性引物 L2:5'-GCTTATGCTGGTGTCCCTGT-3'、R2:5'-CACGCGCACCAAAAGTGTTTA-3'及 *actin* 基因引物 L3:5'-GATGAGTCTGGTCCATCCA-3'、R3:5'-

CTCCTACGACCCAATCTCA-3'^[11]。qRT-PCR 采用 TaKaRa 公司生产的 R Green I 试剂盒,按照说明在 Stratagene 公司生产的 3005P 荧光定量 PCR 仪上进行操作,反应程序为 95 ℃ 预变性 30 s;95 ℃ 10 s,55 ℃ 10 s,72 ℃ 20 s,40 个循环。每个样品重复 3 次,表达量按照 $\Delta\Delta C_T$ 法进行计算^[12]。

1.5 生物信息学分析

采用 Clustal X 软件对序列进行比对;采用 CDD 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) 预测保守结构域;采用 ORF Finder、GenScan 软件预测开放阅读框;采用 ExPASy ProtParam 软件分析蛋白质的分子量和等电点;采用 Mega 5.2 软件构建进化树。

1.6 植物表达载体的构建

用限制性内切酶 *Kpn* I、*Sal* I 分别对含有目的基因 *MeP5CS1* 的重组质粒和植物表达载体 pCambia2300 进行双酶切。酶切体系 20.0 μ L; d_2H_2O 7.0 μ L,质粒 10.0 μ L,10 \times FastDigest Buffer 2.0 μ L,*Kpn* I 和 *Sal* I 各 0.5 μ L,37 ℃ 反应 4 h。反应产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,分别回收 *MeP5CS1* 目的片段和 pCambia 2300 载体片段;用 T4 连接酶将目的基因片段和植物表达载体片段进行连接,16 ℃ 过夜反应;将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,通过蓝白斑筛选阳性克隆;进行 PCR 及双酶切验证,测序,构建植物表达载体 pCambia 2300-*MeP5CS1*。

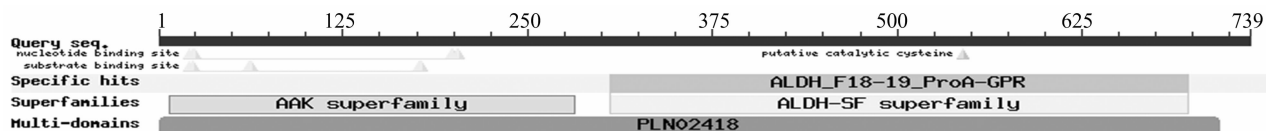


图1 *MeP5CS1* 蛋白质结构域分析

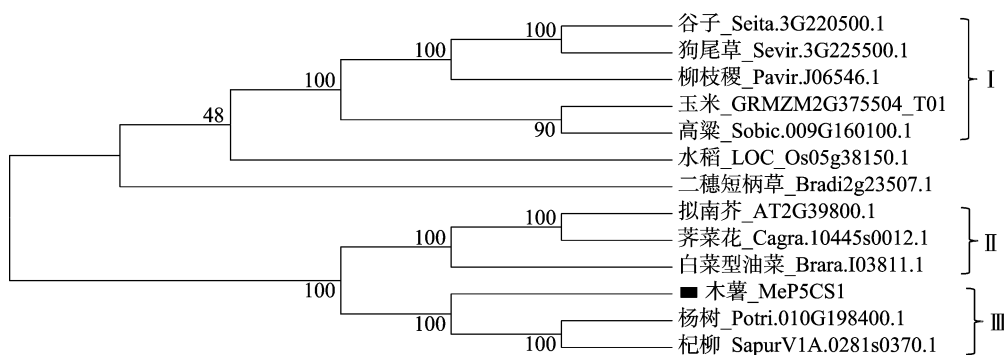


图2 植物中 *P5CS* 基因系统进化树

2.3 脯氨酸含量与 *MeP5CS1* 表达分析

2.3.1 PEG 胁迫对木薯叶片脯氨酸含量的影响 用 20% PEG6000 溶液模拟干旱胁迫,测定 PEG 处理对木薯叶片中脯氨酸含量的影响。由图 3 可见,对照处理(浇灌自来水)的木薯叶片脯氨酸含量相对比较稳定,维持在 22 μ g/g 左右;随处理时间的延长,PEG 处理的木薯叶片脯氨酸含量迅速累积,呈线性增长趋势,24 h 达到最大值。

2.3.2 PEG 胁迫处理对基因 *MeP5CS1* 表达量的影响 由图 4 可见,处理 0 h 时,*MeP5CS1* 在未展开叶、根中的表达量相对比较接近,明显高于在第 1 张完全展开叶、老叶中的表达量;与 0 h 相比,处理 3 h 时各组织中的 *MeP5CS1* 表达量基本没有变化,处理 24 h 时,*MeP5CS1* 在第 1 张完全展开叶中的表达量增加约 2 倍,老叶中增加约 5 倍,未展开叶、根中的变

2 结果与分析

2.1 基因 *MeP5CS1* 的克隆

以木薯 Ku50 叶片 cDNA 为模板,用基因特异性引物进行 PCR 扩增,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,获得 1 条 2 600 bp 左右的单一条带。回收 PCR 产物连接 pMD19-T simple 载体,测序得到 1 条 2 627 bp 的序列,包括 343 bp 的 5' 非翻译区(5' UTR)、2 220 bp 的开放阅读框、64 bp 的非翻译区 3' 非翻译区(3' UTR),该序列编码 739 个氨基酸。Blast 结果表明,*MeP5CS1* 与木薯数据库中公布的 *P5CS* 基因 (Manes. 10G024800.1) 只有 4 个碱基的差异,同源性高达 99%。与基因组信息比对发现,*MeP5CS1* 基因含有 20 个外显子。预测的蛋白质分子量为 80 139.4 ku,理论等电点(pI)为 6.18。蛋白质结构域预测显示(图 1),*MeP5CS1* 编码的蛋白含有 *P5CS* 保守结构域 PLN02418,这进一步表明克隆到的基因为 *P5CS* 基因。

2.2 基因 *MeP5CS1* 进化树分析

经序列比对,获得与 *MeP5CS1* 同源性较高的其他物种序列,由图 2 可见,*P5CS* 基因大致可聚为 3 类;第 I 类以 C_4 物种为代表,包括谷子、狗尾草、柳枝稷、玉米和高粱;第 II 类包括拟南芥、芥菜花和白菜型油菜;木薯 *MeP5CS1* 被聚类到第 III 类,与杨树、杞柳的亲缘关系相对较近,序列相似性分别达到 88.61%、88.95%。

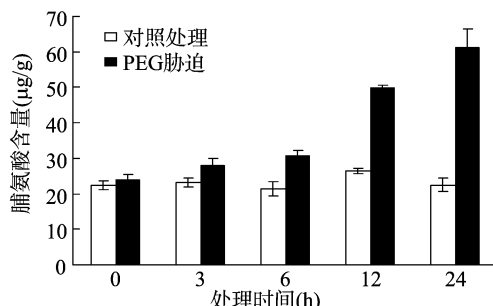
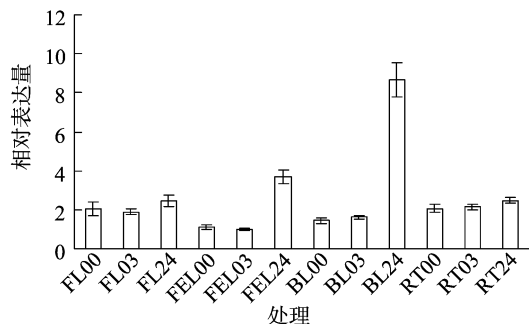


图3 PEG 胁迫对木薯叶片脯氨酸含量的影响

化仍然不大,这说明 *MeP5CS1* 主要在第 1 张完全展开叶和老叶中发挥功能。

2.3.3 ABA、NaCl 处理对基因 *MeP5CS1* 表达量的影响 由



FL、FEL、BL、RT 分别表示未展开叶、第 1 张完全展开叶、老叶、根；字母后 00、03、24 分别表示 PEG 处理 0、3、24 h

图4 PEG 胁迫处理对基因 *MeP5CS1* 表达量的影响

图 5、图 6 可见, ABA 处理 2~6 h, 叶片中 *MeP5CS1* 的表达量有明显上升; 与对照 (处理 0 h) 相比, ABA 处理 10 h 的 *MeP5CS1* 表达量没有明显变化, 但在处理 24~72 h 时, 叶片中 *MeP5CS1* 的表达量维持在明显诱导水平; NaCl 处理 3、24 d 时, 叶片中 *MeP5CS1* 表达量被明显诱导, 其他处理时间点与对照相比没有太大变化。因此, ABA、NaCl 处理能够明显诱导 *MeP5CS1* 的表达。

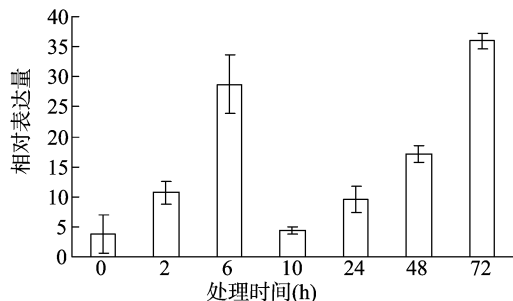


图5 ABA 处理对基因 *MeP5CS1* 在叶片中表达量的影响

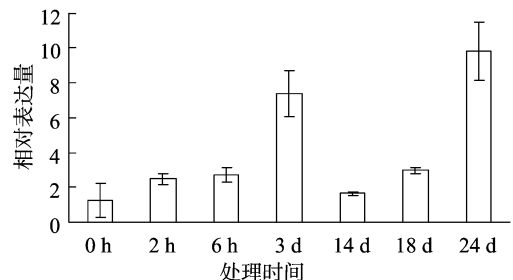


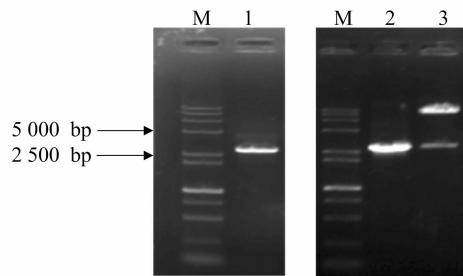
图6 NaCl 处理对基因 *MeP5CS1* 在叶片中表达量的影响

2.4 木薯 *MeP5CS1* 表达载体的构建

用限制性内切酶 *Kpn* I、*Sal* I 分别对含有目的基因 *MeP5CS1* 的重组质粒和植物表达载体 pCambia 2300 进行双酶切, 连接后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒经 PCR 检测, 电泳获得 1 条约 2 600 bp 的条带; 同时, 提取质粒进行双酶切反应, 分别获得约 9 500 bp 的载体和约 2 600 bp 的条带 (图 7), 2 种验证方法都获得与目的基因片段大小一致的条带。经进一步测序验证, 明确为 *MeP5CS1* 基因, 这表明已成功构建 pCambia 2300 - *MeP5CS1* 植物表达载体。

3 结论与讨论

P5CS 是植物细胞脯氨酸生物合成途径的关键酶, 目前,



M—D15000+2000 DNA 标记; 1—*MeP5CS1* PCR 扩增结果; 2—植物表达载体 pCambia 2300-*MeP5CS1* 质粒 PCR 结果; 3—植物表达载体 pCambia 2300-*MeP5CS1* 双酶切结果

图7 *MeP5CS1* 基因扩增产物及植物表达载体 pCambia 2300 - *MeP5CS1* 质粒 PCR 和双酶切验证

已经从许多植物中分离得到, 并从分子角度证明该基因是一个重要的植物抗逆相关基因^[6-9], 而木薯中有关 *P5CS* 基因的研究相对很少。本研究从木薯 Ku50 中克隆了 *MeP5CS1* 基因, 该基因具有 1 个 2 220 bp 的开放阅读框, 编码 739 个氨基酸, 与其他物种中的 *P5CS* 大小基本一致^[7-9], 序列分析表明, *MeP5CS1* 与杨树、杞柳中 *P5CS* 基因的亲缘关系相对较近。

脯氨酸是植物细胞中重要的渗透调节物质, 在干旱、高盐等逆境胁迫条件下, 脯氨酸含量会迅速积累以减轻胁迫伤害^[8]。*P5CS* 作为脯氨酸合成途径的限速酶, 其表达量也相应地被快速诱导, 且具有不同的组织表达特异性^[13]。木薯作为一种典型的抗旱作物, 有关其 *P5CS* 基因对非生物逆境胁迫的响应尚不清楚。本研究发现, PEG6000 胁迫处理能诱导木薯叶片中脯氨酸含量快速积累, PEG 胁迫处理 24 h, *MeP5CS1* 在第 1 张完全展开叶和老叶中的表达量增加 2~5 倍, 与脯氨酸含量的变化相对一致, 暗示 *MeP5CS1* 主要负责胁迫木薯第 1 张完全展开叶、老叶中脯氨酸的积累; 正常条件下, *MeP5CS1* 倾向于在幼嫩的组织和根中的表达, 与周精华等研究结论^[14] 相对一致。此外, *MeP5CS1* 表达还受到 ABA、盐胁迫处理的诱导。

构建表达载体是基因功能验证的主要手段之一。张霞等将 2 个水稻 *P5CS* 基因在烟草中进行过表达, 转基因植株脯氨酸含量有显著增加^[9]; Ehsanpour 等研究也表明, 干旱条件下 *P5CS* 转基因在烟草叶片、根中的脯氨酸含量有显著增加^[15]。本研究成功构建了木薯 *MeP5CS1* 基因表达载体 pCambia 2300 - *MeP5CS1*, 为进一步研究该基因在木薯干旱等非生物胁迫中的功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] Hlavinka P, Trnka M, Semerádová D, et al. Effect of drought on yield variability of key crops in Czech Republic [J]. *Agricultural and Forest Meteorology*, 2009, 149 (3/4): 431 - 442.
- [2] Okogbenin E, Setter T L, Ferguson M, et al. Phenotypic approaches to drought in cassava: review [J]. *Frontiers in Physiology*, 2013 (4): 93.
- [3] Li D X, Li C D, Sun H C, et al. Effects of drought on soluble protein content and protective enzyme system in cotton leaves [J]. *Frontiers of Agriculture in China*, 2010, 4 (1): 56 - 62.
- [4] Lehmann S, Funck D, Szabados L, et al. Proline metabolism and transport in plant development [J]. *Amino Acids*, 2010, 39 (4): 949 - 962.

张雪娇,王利平,赵振军,等. 来源于西洋梨的苹果茎沟病毒分离物基因组分子特性研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):43-47.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.010

来源于西洋梨的苹果茎沟病毒分离物 基因组分子特性研究

张雪娇¹, 王利平², 赵振军¹, 郑银英¹, 陈 婕², 崔百明¹

(1. 石河子大学, 新疆石河子 832003; 2. 华中农业大学湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室, 湖北武汉 430070)

摘要:为了获得来源于西洋梨红贝雷沙寄主潜带苹果茎沟病毒(ASGV)分离物的基因组全长序列,并明确其分子特性,采用 RT-PCR、RACE 末端克隆及生物信息学方法,对 ASGV 分离物基因组全长进行序列测定,并对其序列特点进行分析。结果发现,来源于西洋梨的 ASGV-HB 分离物的基因组全长序列为 6 496 nt (GenBank 登录号: KU605672),含有 2 个开放阅读框 ORF1、ORF2 及 2 个可变区 VI、VII。序列分析表明 ASGV-HB 与 GenBank 登录的 18 个 ASGV 分离物的基因组全长核苷酸序列同源性为 80.6%~87.7%;ORF1 和 ORF2 编码的氨基酸同源性分别为 84.3%~92.3%和 94.4%~98.7%;VI 和 VII 可变区的氨基酸序列同源性分别为 22.9%~68.8%和 48.8%~92.2%;系统发育树分析显示,来源于不同国家的相同寄主的 ASGV 分离物聚集为同一分支。结果表明,ASGV 的分子变异无地域相关性,具有一定的寄主选择性,研究结果为进一步探究 ASGV 的群体遗传进化机制及其防治提供了重要的分子信息。

关键词:梨;苹果茎沟病毒;基因组全长序列;系统发育树分析;同源性

中图分类号: S436.611.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0043-05

苹果茎沟病毒(apple stem grooving virus, ASGV)为 β -线性病毒科(Flexiviridae)发状病毒属(*Capillivirus*)的代表种^[1],是一种严重危害果树产业的潜隐性病毒。ASGV 感染梨树后一般不产生明显的症状,但对产量和品质有严重的影

响,给果树生产带来严重的经济损失。且 ASGV 一旦感染便较难脱除,脱除率仅为 68.9%^[2]。ASGV 存在多种分子变异,目前尚未报道西洋梨寄主 ASGV 分离物基因组全长序列信息,了解 ASGV 的分子序列变异特点为研究 ASGV 的群体遗传和果树防治提供重要的分子依据。自 1965 年 Waterworth 首次报道苹果被感染 ASGV 后,陆续在梨、杏、柑橘、百合、猕猴桃、樱桃等^[3-7]植株上发现该病毒。研究明确 ASGV 基因组含有 2 个重叠开放阅读框(open reading frame, ORFs),分别编码多聚蛋白(polyprotein)和运动蛋白(MP),多聚蛋白包含 4 个结构域,分别为甲基转移酶(Met)、类木瓜蛋白酶(P-Pro)、解旋酶(Hel)、RNA 聚合酶(RdRp)和外壳蛋白

收稿日期:2016-05-07

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201488);国家梨产业技术体系(编号:nycytx-29-08)。

作者简介:张雪娇(1990—),女,河南周口人,硕士,研究方向为植物分子遗传学。E-mail:yaqifeixue62@sina.com。

通信作者:崔百明,博士,副教授,研究方向为植物分子遗传学。E-mail:2247237543@qq.com。

[5] Su M, Li X F, Ma X Y, et al. Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment[J]. *Plant Science*, 2011, 181(6): 652-659.

[6] Székely G, Abrahám E, Cséplő A, et al. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis[J]. *Plant Journal*, 2008, 53(1): 11-28.

[7] 高明潇,郭 娜,薛晨晨,等. 大豆 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因 *GmP5CS1* 和 *GmP5CS2* 的克隆与过表达载体构建[J]. *大豆科学*, 2016, 35(1): 25-30, 38.

[8] Zhu B, Su J, Chang M, et al. Overexpression of a $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice[J]. *Plant Science*, 1998, 139(1): 41-48.

[9] 张 霞,唐 维,刘 嘉,等. 过量表达水稻 *OsP5CS1* 和 *OsP5CS2* 基因提高烟草脯氨酸的生物合成及其非生物胁迫抗性[J]. *应用与环境生物学报*, 2014, 20(4): 717-722.

[10] Bates L S, Waldren R P, Teare I D. Rapid determination of free proline for water-stress studies[J]. *Plant and Soil*, 1973, 39(1):

205-207.

[11] Xu J, Duan X, Yang J, et al. Enhanced reactive oxygen species scavenging by overproduction of superoxide dismutase and catalase delays postharvest physiological deterioration of cassava storage roots[J]. *Plant Physiology*, 2013, 161(3): 1517-1528.

[12] 胡 伟,颜 彦,韦运谢,等. 木薯 *MeASR* 基因克隆及表达分析[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(10): 125-130.

[13] 张积森,陈由强,李 伟,等. 甘蔗 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因(*P5CS*)的克隆及其表达分析[J]. *热带作物学报*, 2009, 30(9): 1337-1344.

[14] 周精华,邢虎成,揭雨成,等. 苧麻 $\Delta 1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶(*P5CS*)基因的克隆和表达分析[J]. *作物学报*, 2012, 38(3): 549-555.

[15] Ehsanpour A A, Zarei S, Abbaspour J. The role of over expression of *P5CS* gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) plant under *in vitro* drought stress[J]. *Journal of Cell and Molecular Research*, 2012, 4(1): 43-49.