

张高阳,邓接楼,柯维忠,等.红麻肌醇加氧酶基因的分离及表达分析[J].江苏农业科学,2017,45(18):48-50.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.011

# 红麻肌醇加氧酶基因的分离及表达分析

张高阳<sup>1,2</sup>, 邓接楼<sup>1</sup>, 柯维忠<sup>1</sup>, 黄思齐<sup>2</sup>, 李德芳<sup>2</sup>

(1. 上饶师范学院生命科学学院,江西上饶 334001; 2. 中国农业科学院麻类研究所,湖南长沙 410205)

**摘要:**干旱是限制植物生长分布和影响作物产量形成的重要非生物因素之一,在响应干旱胁迫过程中植物细胞壁发挥着重要的调节作用,肌醇加氧酶是植物细胞壁合成的前体物质 UDP-葡萄糖醛酸合成中的关键酶。为研究该基因在红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)抗旱和耐盐过程中的作用,通过红麻转录组数据库筛选到肌醇加氧酶(myo-inositol oxygenase)基因的核心片段,利用染色体步移技术获得肌醇加氧酶基因的 cDNA 全长,命名为 *HcMIOX*;生物信息学分析表明,*HcMIOX* 基因编码序列长 948 bp,编码 315 个氨基酸,相对分子量为 31.9 ku,等电点为 4.75;RT-PCR 分析表明,*HcMIOX* 基因在红麻根、茎、叶中均有表达,根中表达量最高,该研究结果对分析该基因功能和了解红麻抗旱的分子机制具有重要意义。

**关键词:**红麻;转录组;肌醇加氧酶;分离;表达分析

**中图分类号:** S563.501 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0048-02

干旱、盐碱和极端温度等是目前世界范围内严重影响作物生长发育和产量形成的主要非生物因素<sup>[1-2]</sup>。红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)是锦葵科木槿属一年生草本韧皮纤维多用途经济作物,在我国广大地区都有种植,因其纤维可以与棉混纺而应用于纺织工业,越来越受到人们的重视。因此,通过基因工程技术培育红麻耐旱品种,在我国广大干旱地区种植,实现其不与粮争地等具有重要意义。

干旱胁迫下,植物叶片细胞生长受阻与细胞壁的硬化密切相关,可有效减少植物绿叶面积,进而明显降低绿叶的蒸腾失水。因此,植物细胞延伸生长与细胞膨压、细胞壁伸展性变化等,可在响应干旱胁迫过程中应对植物失水过程<sup>[3]</sup>。植物体内的肌醇在加氧酶作用下通过氧化还原生成 UDP-葡萄糖醛酸,葡萄糖醛酸是植物细胞壁主要成分葡萄糖醛酸、木糖、芹菜糖和阿拉伯糖等合成的主要前体物质<sup>[4-5]</sup>。维生素 C 在植物体内不仅参与生长发育,还作为一种能清除超氧自由基的抗氧化剂,以缓解其对植物细胞造成的伤害。已有大量研究表明,抗坏血酸参与了对植物逆境胁迫下的保护作用,肌醇加氧酶基因在植物维生素 C 的生物合成中具有重要作用,在拟南芥中过量表达肌醇加氧酶基因,植物体内维生素 C 含量比对照提高了 2~3 倍,植株的抗旱性也能有所增强<sup>[6-7]</sup>。因此,可以认为该基因在应对植物干旱胁迫过程中发挥着重要作用。

有关该基因在植物中的研究,目前只见于水稻中有报道<sup>[8]</sup>,本研究旨在分离红麻肌醇加氧酶基因,并对其在各个

组织中的表达情况进行分析,为今后了解该基因在植物干旱胁迫分子应答中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

红麻(*Hibiscus cannabinus* L.)抗旱品种“非引四号”保存于中国农业科学院麻类研究室,Taq plus DNA 聚合酶、载体 pMD19-T、逆转录试剂盒(TaKaRa AMV Ver 3.0)、dNTPs 均购自宝生物工程(大连)有限公司,感受态细胞 DH5 $\alpha$  保存于笔者所在实验室,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

**1.2.1 红麻茎皮总 RNA 提取及引物设计** 取田间生长旺盛的红麻茎皮组织,迅速放入液氮中带回实验室,按 TaKaRa 公司 RNA 提取试剂盒操作方法提取总 RNA,以 2  $\mu$ L 总 RNA 为模板,按 TaKaRa 公司反转录试剂盒反应体系和方法合成 cDNA 第 1 条链,并作为后续反应的模板。以从红麻转录组数据库中筛选的 *MIOX* 基因核心片段为基础,利用 primer premier 5.0 软件设计染色体步移引物,*MIOX* 基因 3'端扩增引物为 3F1:(5'-TGACGAACTGTCTGGAATCCG-3'),3F2:(5'-TTCGCTTACTCTACGGTTCACG-3');5'端扩增引物为 5F1:(5'-CGGTGGTGAACATTTCGCTACAG-3'),5F2:(5'-GAAGTTACCGTGAGGAGCAGG-3')。

**1.2.2 红麻 *MIOX* 基因全长 cDNA 的克隆** 红麻 *MIOX* 基因 3'末端扩增参照 TaKaRa 公司试剂盒。使用接头引物进行 RNA 反转录,然后通过接头引物部分重叠的 3'-OUT、3'-IN 引物分别与基因特异性引物 3F1、3F2 进行巢式 PCR,5'端克隆利用末端脱氧核苷酸转移酶法(TdT),在 cDNA 的 3'末端加上 1 个多聚的 dC 尾,然后用 5'-OUT、5'-IN 以及基因特异性引物 5F1、5F2 进行巢式 PCR,RT-PCR 体系为 25  $\mu$ L,含无菌去离子水(17.5  $\mu$ L)、10 $\times$  PCR buffer(2.5  $\mu$ L)、10 mmol/L dNTP Mix(2.5 mmol/L,2  $\mu$ L)、上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 2.5  $\mu$ L、10 U  $\mu$ L/L Taq(0.2  $\mu$ L)、DNA 聚合

收稿日期:2016-04-01

基金项目:江西省教育厅科学技术研究项目(编号:GJJ151050);中国农业科学院创新工程(编号:ASTIP-IBFC03);上饶师范学院 2014 年博士科研启动基金(编号:001055)。

作者简介:张高阳(1982—),男,河南驻马店人,博士,主要从事植物生物技术研究。Tel:(0793)8153721;E-mail:gyzhang2015@163.com。

通信作者:李德芳,博士,研究员,主要从事农业生物技术研究。Tel:(0731)88998506;E-mail:chinakenaf@126.com。

酶(2 U)。反应程序:预变性 95 ℃ 3 min;变性 94 ℃ 40 s,退火 55 ℃ 50 s,延伸 72 ℃ 3 min,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min),PCR 产物用天根生物有限公司琼脂糖胶回收试剂盒回收纯化,连入 pMD18-T 载体,热激转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,菌落 PCR 和质粒酶切验证正确的单克隆送华大基因测序。利用 DNAMAN 软件拼接 *MIOXT* 基因的 3' 末端、5' 末端和核心片段。

**1.2.3 红麻 *MIOX* 基因序列及表达分析** 采用 ProtParam 分析 *HcMIOX* 基因的各种基本理化特性,采用在线软件 NCBI ORFfinder 寻找 *MIOXT* 基因的编码区及其推倒的氨基酸序列。红麻成长至 50 d 后,采用 20% PEG6000 诱导处理后分别取根、茎和叶组织中的 RNA 样品,红麻 18S RNA 为内参,对不同组织中的 *MIOXT* 基因进行半定量分析。

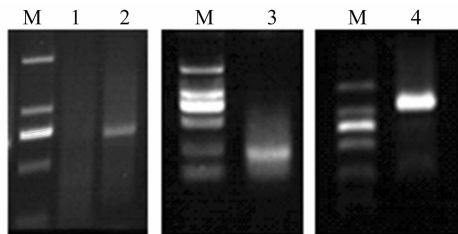
## 2 结果与分析

### 2.1 红麻 RNA 提取

红麻是一种富含多糖、多酚和其他次生代谢物质的植物,高质量的 RNA 获取比较困难,笔者参照陈美霞等的提取方法<sup>[9]</sup>,利用 SDS 法并稍作改进获得高质量的 RNA,总 RNA 主带清晰,条带锋利,无明显降解,28S 条带约为 18S 的 2 倍,提取的 RNA 浓度为 876 ng/ $\mu$ L,  $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}} = 2.02$ ,其浓度和纯度较好,可满足下一步试验的要求。

### 2.2 红麻 *HcMIOX* 基因克隆

通过对红麻转录组数据库的筛选,获得红麻 *MIOX* 基因的核心片段,根据核心片段设计扩增该基因的 5' 端和 3' 末端引物,在 5' 末端克隆中,以 5' - IN 和 5' F2 为引物扩增得到 1 条 502 bp 的片段,3' 末端扩增反应中,以 3' - IN 和 3' F2 为引物扩增得到约 213 bp 的条带;最后利用基因特异引物扩增获得包括 5' UTR 部分序列的 *MIOX* 基因 cDNA 全长 1 216 bp 的片段(图 1)。



M—DL2 000 marker; 1—阴性对照; 2—*HcMIOX* 基因 5' 端扩增产物; 3—*HcMIOX* 基因 3' 端扩增产物; 4—*HcMIOX* 基因全长扩增产物

图1 *HcMIOX* 基因 cDNA 扩增产物

### 2.3 红麻 *HcMIOX* 基因序列及表达分析

利用 DNAMAN 软件对测序结果进行拼接后得到 948 bp 的核苷酸序列,编码 1 段含有 315 个氨基酸的推导性蛋白质(图 2),分子量为 31.9 ku,等电点为 4.75。图 3 表明,红麻 *HcMIOX* 在根、茎、叶中均有表达,在根中的表达量最高。

## 3 结论与讨论

肌醇加氧酶是植物细胞壁合成中前体物质 UDP - 葡萄糖醛酸和抗坏血酸的生物合成中的关键酶,在植物的逆境成长发育过程中,抗坏血酸起着重要的保护作用,有关植物肌醇加氧酶的研究只在水稻中有报道<sup>[4-6]</sup>。王海光等研究了不同

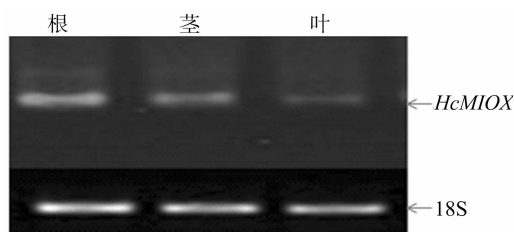
```

200 ATGACTATCCTCATCGAGAAGCCTGAGCTAGCGTCTCAAGCAGAT
1 M T I L I E K P E L A S Q A D
245 TCCAGGATCTCGTTGCGAAGCCAGGAATTGGTGTTCGACGGC
16 S Q D L V A K A T E L V F D G
290 GGATTTCCGGTGCCGAATCTCTGTCGGGAGACGGATTTTTTGCA
31 G F P V P K S L S G D G F F A
335 CCGGAGATCAATTCAATTCGGCAACTCTTCAGGGATTACAATGCA
46 P E I N S F G N S F R D Y N A
380 GAAAGTGAGAGGCAAAAGAGCGGTGAGGAATTCTACAGGACGAA
61 E S E R Q K V S E E F Y R Q Q
425 CATATTAACAGACATATGATTTTGTGCGAGAAGATGAGGGAAGAA
76 H I N Q T Y D F V Q K M R E E
470 TATTCGAAGCTGAACAGGATGGAATGAGCATATGGGATGCTGT
91 Y S K L N R M E M S I W E C C
515 GAATTGTGACGAAGTTGTGGATGACAGTACCCTGATCTGGAT
106 E L L N E V V D D S D P D L D
560 GAACCCCAATCCAGCACTTGCTTCAATCCGCCAAGCGATCAGA
121 E P Q I Q H L L Q S A E A I R
605 AAAGATTATCCGATGAAGATTGGCTGCAATTGACCGCCCTCATT
136 K D Y P D E D W L H L T A L I
650 CACGATCTTGGTAAGGTCTTCTTCTTCCCAAGTTCGGAGGGCTT
151 H D L G K V L L L P K F G G L
695 CCGCAATGGGCCGTCGTCGGCGACAGTTTCTCTTGGATGCGCT
166 P Q W A V V G D T F P L G C A
740 TCGACGAAGCCAATATTCACCAAGTATTTGAGGAGAACC CG
181 F D E A N I H H K Y F E E N P
785 GATTATTACAATCTGCTTACAACACCAAGATGGGATTTACTCC
196 D Y Y N P A Y N T K N G I Y S
830 GATGGCTGTGGACTTGACAATCTTACCATTTCATGGGGCATGAT
211 D G C G L D N L T I S W G H D
875 GATTACATGTACTTGGTTGCGAAGGAAATGGAACCACTCTACCT
226 D Y M Y L V A K E N G T T L P
920 TCGGCTGGGCTTTTCATCATCGGATATCATTACATTTATCCTTA
241 S A G L F I I R Y H S L Y P L
965 CACAAGGAAGAAGCATACATGCAAGTTCTTAACGATGAGGACAAG
256 H K E E A Y M Q F L N D E D K
1010 GAAAACATGAATGGCTGAGAATTTCAACAATACGATCTCTAC
271 E N M K W L R I F N K Y D L Y
1055 AGCAAGAGCAAGTCCCTGTGACGTTGAGAAAAGTGAAGCGGTAT
286 S K S K V P V D V E K V K P Y
1100 TATCTCTCATTATTGAGAAATATTTCACGACCAAGCTCAAGTGG
301 Y L S L I E K Y F P A K L K W
1145 TGA 1147

```

斜体和下画线字母分别代表甲硫氨酸密码子和终止密码子

图2 红麻肌醇加氧酶基因 cDNA 及推导的蛋白质序列



第1行为*HcMIOX*在根、茎、叶中的情况,第2行为18S内参基因在根、茎和叶中的表达情况

图3 红麻 *HcMIOX* 基因表达分析

水稻肌醇加氧酶基因水分胁迫下的表达情况,结果表明,在旱稻(IRAT109)中 *OsMIOX* 基因的表达上调,在旱稻(IRAT109)和毫格劳)中的表达量明显高于水稻(越富和日本晴)品种,这说明水稻和旱稻中存在不同的分子响应机制以应对水分胁迫<sup>[8]</sup>。肌醇加氧酶基因在红麻不同组织中都有表达,但根中表达量最高,水分胁迫直接影响着根部的生理代谢活动,很可能是红麻主要通过根部生理变化、基因表达来应对干旱胁迫。

本研究通过分析红麻干旱胁迫转录组数据,筛选到 1 个红麻受干旱胁迫诱导高效表达的基因(*MIOX*)片段,利用染色体步移技术获取该基因全长 cDNA 序列。生物信息学分析表明,*HcMIOX* 基因编码序列长 948 bp,编码 315 个氨基酸,相对分子量为 41.8 ku,等电点为 4.86。干旱胁迫诱导表达分

张俊,李伟,张静,等. 青岛烟草番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定与全基因组序列分析[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):50-53.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.012

# 青岛烟草番茄黄化曲叶病毒的分子鉴定 与全基因组序列分析

张俊<sup>1,2</sup>, 李伟<sup>3</sup>, 张静<sup>3</sup>, 申莉莉<sup>2</sup>, 王凤龙<sup>2</sup>, 章松柏<sup>1</sup>, 杨金广<sup>2</sup>

(1. 长江大学农学院,湖北荆州 434025; 2. 中国农业科学院烟草研究所,山东青岛 266101;

3. 红云红河烟草(集团)有限责任公司,云南昆明 650231)

**摘要:**2016 年 6 月从青岛即墨市中国农业科学院烟草研究所试验基地采集疑似感染番茄黄化曲叶病毒的烟叶样品。提取病叶总 DNA,使用双生病毒(Geminivirus)通用引物 PA/PB 对样品进行 PCR 扩增和测序,感病叶片 DNA 仅检测出番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus,简称 TYLCV);根据测定的部分序列片段,设计了 1 对全长序列反向引物,对其基因组全长进行克隆测定。结果显示,该病毒核酸为单链环状 DNA,基因组为单一组分 DNA-A,经过分子比对和系统进化树分析发现,TYLCV-SDQDJM(GenBank:KY640456)与山东省潍坊市番茄分离物 TYLCV、山东省泰安市番茄分离物 TYLCV 同源性最高为 99%,与已经报道的其他地区 TYLCV 分离物同源性均在 97% 以上,因此确定从青岛即墨市采集的烟草矮化病毒症状烟株是由 TYLCV 侵染所致;同时采集了发病植株以及周边蔬菜保护地部分蔬菜上的烟粉虱成虫进行检测,其中 15.0% 的烟粉虱样品检出番茄黄化曲叶病毒,因此明确了侵染该地区烟草的番茄黄化曲叶病毒是由带毒烟粉虱传播的。

**关键词:**番茄黄化曲叶病毒;烟草;烟粉虱;分子鉴定;全基因组序列分析

**中图分类号:**S435.72 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)18-0050-04

烟草是我国重要的经济作物之一,其病毒病的危害是最

收稿日期:2016-03-13

基金项目:中国烟草总公司重大专项[编号:110201601024(1S-04)];山东省自然科学基金(编号:ZR2015YL065、ZR2014CQ025);红云红河烟草(集团)有限责任公司科技项目(编号:HYHH2016YL02)。

作者简介:张俊(1993—),男,湖北松滋人,硕士研究生,研究方向为植物病毒监测。E-mail:191172885@qq.com。

通信作者:章松柏,博士,副教授,研究方向为病毒监测与分子病毒学,E-mail:yangtze2008@126.com;杨金广,博士,副研究员,研究方向为烟草病毒病综合防治与分子病毒学,E-mail:yangjinguang@caas.cn。

析表明,*MIOX* 基因在红麻根、茎和叶组织中均有表达,在根中的表达量最高。这是在纤维作物红麻中首次分离得到该基因,研究结果为下一步分析该基因的功能和了解红麻抗旱的分子机制提供参考。

**参考文献:**

- [1] Fang Y J, Xiong L Z. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015, 72(4): 673-689.
- [2] Zhang H Y, Li W, Mao X G, et al. Characterization of genomic sequence of a drought-resistant gene *TaSnRK* in wheat species[J]. Genet, 2015, 94(2): 299-304.
- [3] 李连朝, 王学臣. 水分亏缺下细胞延伸生长与细胞膨压和细胞壁特性的关系[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(3): 161-167.
- [4] Kanter U, Usadel B, Guerinéau F, et al. The inositol oxygenase gene

为严重的。烟草病毒病曾相继在世界各主产烟区暴发流行,每年给烟草生产带来重大损失,严重影响烟叶的品质,给烟农造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。2016 年 6 月,青岛即墨市烟田发现了部分烟株表现矮小,叶片黄化上卷,呈现皱缩症状,推测该烟株疑似感染双生病毒(Geminivirus)。该病毒病在我国西南烟区发生尤为普遍,特别是在部分烟区的冬春烟墒危害严重,例如在广西省百色烟区冬春烟上发病率超过 60%,给当地烟叶生产造成极大损失,直接导致百色烟区冬春烟的绝产,促使了百色烟区烟叶种植模式的调整<sup>[2]</sup>。

作为菜豆金色花叶病毒属(*Begomovirus*)的典型代表,番茄黄化曲叶病毒(tomato yellow leaf curl virus,简称 TYLCV)是

family of *Arabidopsis* is involved in the biosynthesis of nucleotide sugar precursors for cell-wall matrix polysaccharides[J]. Planta, 2005, 221(2): 243-254.

- [5] Lorence A, Chevone B I, Mendes P, et al. Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis[J]. Plant Physiology, 2004, 134(3): 1200-1205.
- [6] Sharma P, Dubey R S. Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings[J]. Plant Growth Regulation, 2005, 46(3): 209-221.
- [7] Huang C H, He W L, Guo J K, et al. Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(422): 3041-3049.
- [8] 王海光, 张洪亮, 段俊枝, 等. 水稻肌醇加氧酶基因的表达分析及植物表达载体的构建[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(4): 1-6.
- [9] 陈美霞, 陈富成, 颜克伟, 等. 红麻叶片高质量 RNA 提取方法比较分析[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2011, 40(6): 561-565.