

# 大岩桐 *SsPIN2* 基因的克隆及组织表达分析

徐卫平<sup>1</sup>, 刘凤娟<sup>2</sup>, 毕春晓<sup>2</sup>, 胡鑫<sup>2</sup>, 徐全乐<sup>2</sup>, 蒋景龙<sup>1</sup>

(1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘 要:**以大岩桐为试材, 采用 RT-PCR 方法对大岩桐 *SsPIN2* 基因进行了克隆, 获得 898 bp 的基因序列, 经 BLAST 比对, 采用邻接法构建进化树; 并利用半定量 RT-PCR 方法, 研究了 *SsPIN2* 基因在大岩桐叶、茎尖、根、茎、花瓣和花萼组织的表达情况。结果表明: 大岩桐 *SsPIN2* 基因与黄瓜 *CsPIN2*、豌豆 *PsPIN2* 基因等亲缘关系较近; 该基因在上述 6 种组织中均有表达组织, 其中在茎尖、根、茎和花萼的表达量较高, 在叶和花瓣中的表达量较低。

**关键词:**大岩桐; *SsPIN2*; 基因克隆; 表达分析

**中图分类号:**S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)24-0088-04

大岩桐(*Sinningia speciosa*)属苦苣苔科苦苣苔属多年生肉质草本, 由于其花大艳美而广泛种植<sup>[1]</sup>。但是大岩桐植株自花不育, 其繁殖主要依赖于组织培养等手段<sup>[2]</sup>。在此过程中, 由体细胞突变产生了包含花型<sup>[3]</sup>、叶序<sup>[4]</sup>及叶型改变<sup>[5]</sup>等一系列有价值的表型突变。其中, 对大岩桐叶序突变体 *twp(tricussate whorled phyllotaxis)* 的分析显示, 其内源生长素含量有所下降<sup>[4]</sup>。实际上, PINs(PIN-FORMED)蛋白介导的生长素及其极性运输处于植物叶序调控的核心地位<sup>[6-7]</sup>。在 PINs 蛋白家族中, PIN1 在茎顶端分生组织中朝向高浓度生长素的细胞膜上极性定位, 并决定了叶原基的形成部位<sup>[6,8]</sup>; 在叶序的调控过程中扮演了核心作用。*PIN2* 突变体只在根中产生明显表型, 但 GUENOT 等<sup>[9]</sup>检测了 *PIN2* 在茎尖的表达并发现其极性定位于朝向叶尖端的细胞膜上。对水稻 *OsPIN2* 基因的过表达研究也发现, 该基因能增强生长素从茎向根的运输<sup>[10]</sup>; 参与维持生长素浓度梯度的平衡。该研究通过对大岩桐 *SsPIN2* 基因的克隆、生物信息学预测及其在不同组织中的差异表达分析, 以期为进一步研究大岩桐的叶序调控提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试深红色单瓣品种大岩桐(*Sinningia speciosa*)种

**第一作者简介:**徐卫平(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物抗逆生物学。E-mail: xweiping16@163.com

**责任作者:**蒋景龙(1980-), 男, 博士, 讲师, 硕士生导师, 研究方向为植物学。E-mail: jiangjinglong511@163.com

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31401910); 中国博士后科学基金面上资助项目(2016M590975); 陕西省科技厅自然科学基金面上资助项目(2014JQ3113); 陕西省教育厅自然科学基金资助项目(14JK1158)。

**收稿日期:**2016-09-23

子为西北农林科技大学生命科学学院实验室保存。将其种于含腐殖土、蛭石、珍珠岩(1:1:1)的混和基质中, 于(25±2)℃, 光照强度 24 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>, 光照 16 h·d<sup>-1</sup>条件下进行培养。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 第一链的合成** 采用 Trizol 法分别提取大岩桐叶、茎尖、根、茎、花瓣、花萼等组织的总 RNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测和微量核酸蛋白检测仪(Nanodrop 10000)检测提取质量后, 采用 Oligo(dT) 18 引物, 按照 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒(TaKaRa)说明进行反转录。

**1.2.2 *SsPIN2* 基因的克隆** 根据 GeneBank 公布的拟南芥等物种 *PIN2* 基因序列设计引物, 上游引物 f: 5'-GCGTTGAYTCTGAYGTGTTC-3'; 下游引物 r: 5'-GTCATBACACTTGYTGGAGGCAT-3'。以茎尖 RNA 反转录所得 cDNA 为模板, 使用 Premix Taq (Takara) 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 50 μL: Premix Taq 25 μL, plasmid 1 μL, Forward Primer (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, Reverse Primer (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 22 μL。反应条件为 94℃ 3 min; 94℃ 20 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后进行克隆测序。

**1.2.3 *SsPIN2* 基因的生物信息学分析** 测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 分析, 并利用 Mega 4.0 构建系统发育树。运用 EXPASY 在线工具 ProtParam 分析 *SsPIN2* 蛋白的理化性质, ProtScale 进行亲/疏水性分析, NetPhos 2.0 进行磷酸化分析, SignalP4.1 进行信号肽预测, SOPMA 进行二级结构预测。

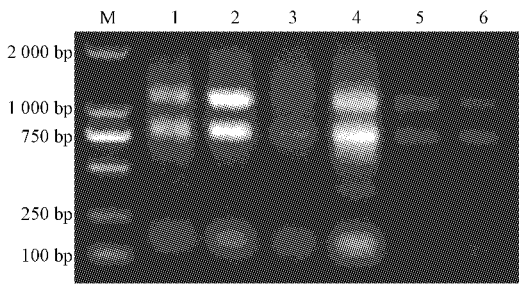
**1.2.4 半定量 RT-PCR 分析** 分别取大岩桐植株叶、茎尖、根、茎、花瓣和花萼的 cDNA, 以大岩桐 *SsUbq* (ubiquitin) 基因作为内参, 检测大岩桐 *SsPIN2* 基因在不

同组织中的表达情况。所用上游引物 f: CAGCAGAG-GTTGATCTTTGCA; 下游引物 r: GGGCCTCA-ATAT-AGGACCCTA。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测显示, 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 无明显降解(图 1); 微量核酸蛋白检测仪分析显示 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值和 OD<sub>260</sub>/OD<sub>230</sub> 比值均在 2.0 左右, 能够满足进一步反转录和基因扩增的要求。



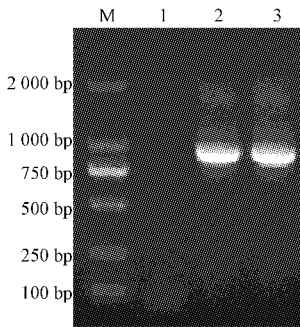
注: M, DL 2 000 DNA Marker; 1. 叶, 2. 茎尖, 3. 根, 4. 茎, 5. 花瓣, 6. 花萼。  
Note: M, DL 2 000 DNA Marker; RNA from 1. Leaf, 2. Shoot tips, 3. Root, 4. Stem, 5. Petal, 6. Calyx.

图 1 大岩桐不同组织总 RNA 提取

Fig. 1 Electrophoregram of extracted total RNA from different tissues of *Sinningia speciosa*

2.2 SsPIN2 基因的克隆

以茎尖 RNA 反转录所得 cDNA 为模板, 利用特异引物进行 PCR 扩增, 扩增产物在 750~900 bp(图 2); 符合预期大小。将上述产物回收、克隆到 T 载体中, 转化 *E. coli* top10。经 PCR 检测阳性菌后进行测序。测序结果表明, 克隆到的目的 SsPIN2 基因片段长 898 bp。



注: M, DL 2 000 Marker; 1. 阴性对照; 2~3. PCR 产物。  
Note: M, DL 2 000 Marker; 1. negative control; 2~3. PCR products.

图 2 SsPIN2 基因克隆

Fig. 2 PCR amplification of the SsPIN2 gene

2.3 SsPIN2 基因的生物信息学分析

为分析大岩桐 SsPIN2 基因与其它物种 PINs 的同源性, 在 NCBI 中对其基因序列进行了 BLAST 分析。比对发现, 大岩桐 SsPIN2 基因与黄瓜、番茄、水稻、蒺藜

状苜蓿、豌豆等多个物种的相似性较高, 均在 80% 以上。使用邻接法构建系统发育树, 其中黄瓜 PIN2 与大岩桐 SsPIN2 亲缘关系最近, 其次为豌豆(图 3)。

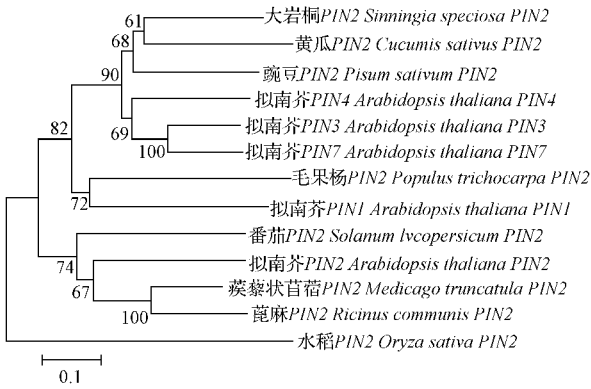


图 3 不同植物 SsPIN2 基因核苷酸序列的同源性分析

Fig. 3 Homology analysis of nucleotide sequences of SsPIN2 gene from various plant species

PIN2 基因编码区长 898 bp, 共编码 308 个氨基酸。运用 ProtScale 工具对大岩桐 PIN2 基因编码蛋白的亲/疏水性进行预测分析, 整个多肽链表现为亲水性, 说明该蛋白为水溶性蛋白。运用 NetPhos2.0 对 SsPIN2 蛋白进行磷酸化分析, 结果显示, 大岩桐氨基酸序列的第 26、138、171、175、221、233、288、289 位存在 8 个丝氨酸(Ser)磷酸化位点, 在第 54、77、102 和 166 位存在 4 个苏氨酸(Thr)磷酸化位点, 在第 209 位存在 1 个酪氨酸(Tyr)磷酸化位点。采用 SignalP4.1 对 SsPIN2 蛋白进行信号肽预测, 结果显示 SsPIN2 蛋白不存在信号肽(表 1)。

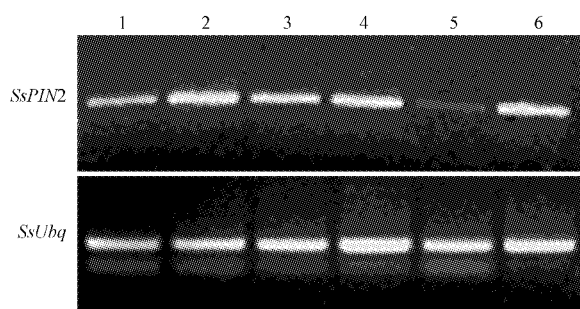
表 1 SsPIN2 蛋白的理化性质预测

Table 1 Physical and chemical parameters of SsPIN2 protein

理化性质	
Physical and chemical properties	
氨基酸数 Number of amino acids	308
分子质量 Molecular mass/U	33 887.8
理论等电点 Theoretical pI	9.2
负电荷氨基酸残基数(Asp+Glu)	25
Total number of negatively charged residues	
正电荷氨基酸残基数(Asp+Lys)	35
Total number of positive charged residues	
半衰期 Estimated half life/h	1.2
不稳定系数 Instability index	46.4
脂肪系数 Aliphatic index	98.15
总平均疏水性 Grand average of hydropathicity (GRAVY)	-0.058

2.4 SsPIN2 基因的组织表达分析

采用 Trizol 法, 分别从野生型大岩桐的根、茎、叶、茎尖、花瓣和花萼中提取总 RNA。经 1% 琼脂糖检测后, 进行反转录。以大岩桐 SsUbiq 基因为内参, 通过半定量 RT-PCR 检测大岩桐 SsPIN2 基因在不同组织中的表达情况。结果表明, SsPIN2 基因在叶、茎尖、根、茎、花瓣和花萼等 6 种组织中均有表达。其中在茎尖、根、茎和花萼的表达量较高, 在叶和花瓣中的表达量较低。



注:1. 叶,2. 茎尖,3. 根,4. 茎,5. 花瓣,6. 花萼。

Note:1. Leaf,2. Shoot tips,3. Root,4. Stem,5. Petal,6. Calyx.

图4 *SsPIN2* 基因在大岩桐不同组织中的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *SsPIN2* gene in different tissues of *S. speciosa*

### 3 讨论

叶序是植物发育的关键形态特征之一,其形成可以追溯到顶端分生组织中叶原基的形成与排列方式<sup>[7]</sup>。在叶序的调控机制中,无论是基于植物分生组织原套区局部机械压力改变的生物物理模型,还是基于生长素极性分布与运输的生物化学模型,最终都指向 PIN1 的极性定位与调控<sup>[11-13]</sup>。但是,GUENOT 等<sup>[9]</sup>在对 *pin1* 突变体进行深入细致研究的基础上提出:拟南芥营养生长阶段叶的排列方式可能不存在依赖 PIN1 的调控模式。在排除了生长素输入载体 AUX1/LAX、生长素合成基因 YUC 等在叶序形成的作用后,他们认为 KNOX (*KNOTTED1*-like homeobox genes) 基因等可能起一定作用。例如,*PttKNI* 基因在竹节海棠<sup>[14]</sup>、彩叶草<sup>[15]</sup>等植株中的过表达确实引起了叶序形态的改变。这种改变可能与 KNOX 基因与生长素、细胞分裂素等激素的相互作用有关。对玉米 *abph1* (*aberrant phyllotaxy1*) 突变体的研究也表明,生长素和细胞分裂素信号及其相互作用对于植物叶序的调控至关重要<sup>[12,16-17]</sup>。此外,PLT 蛋白可能通过调控生长素合成基因 YUCCA (YUC) 影响 SAM 中央区生长素合成,进而微调生长素极性运输调节不同叶序之间的转变<sup>[18-19]</sup>;水稻 *DECUSSATE* (*DEC*) 基因可以通过调节细胞分裂素信号而影响叶序的形成<sup>[20]</sup>;谷氧还蛋白基因 *MALE STERILE CONVERTED ANTHER1* (*MSCA1*) 参与了玉米 *abph2* 突变体由互生叶序向对生叶序的转变<sup>[21]</sup>等。由此可见,叶序的形成是一个高度复杂的调控过程,可能是多种机制共同作用的结果<sup>[22]</sup>。因而,研究 PIN1 蛋白以外的 PINs 蛋白及其它蛋白对于叶序调控的作用可以丰富叶序调控网络。

目前,关于 PINs 蛋白与生长素作用机制的研究主要集中在拟南芥中,并已分离出 8 种同源蛋白。该研究分离得到了大岩桐 *SsPIN2* 基因,通过对其基因序列分析、推导蛋白结构与特征、与其它物种同源性的分析和系统发育树构建,将其确定为大岩桐生长素输出载体基因 *SsPIN2*。在此基础上,利用半定量 RT-PCR 研究了

该基因在大岩桐不同组织中的表达情况,为进一步研究 *SsPIN2* 在生长素及叶序调控中的功能奠定了良好的基础。

### 参考文献

- [1] 徐全乐,谢亚红,刘文婷,等. 大岩桐高频再生体系建立的两种途径[J]. 园艺学报,2010,37(1):135-140.
- [2] 徐全乐. 大岩桐组织培养研究进展[J]. 北方园艺,2011(23):166-170.
- [3] 庞基良,王利琳,胡江琴,等. 重瓣紫蓝大岩桐组培苗的花同源异型现象[J]. 实验生物学报,2003,36(1):76-81.
- [4] XU Q L, HU Z, LI C Y, et al. Tissue culture of *Simingia speciosa* and analysis of the *in vitro*-generated tricussate whorled phyllotaxis (twp) variant[J]. *In Vitro Cell and Developmental Biology Plant*, 2009, 45:583-590.
- [5] 胡鑫,徐全乐. 连续组织培养引起大岩桐再生植株的表型变化[J]. 西北农业学报,2010,19(5):167-170.
- [6] REINHARDT D. Phyllotaxis: a new chapter in an old tale about beauty and magic numbers[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2005, 8:487-493.
- [7] 徐全乐,胡鑫. 植物叶序的发生和影响因素[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(4):405-412.
- [8] REINHARDT D, PESCE E R, STIEGER P, et al. Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport[J]. *Nature*, 2003, 426(6964):255-260.
- [9] GUENOT B, BAYER E, KIERZKOWSKI D, et al. PIN1-independent leaf initiation in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiol*, 2012, 159(4):1501-1510.
- [10] CHEN Y, FAN X, SONG W, et al. Over-expression of *OsPIN2* leads to increased tiller numbers, angle and short plant height through suppression of *OsLAZY1*[J]. *Plant Biotechnol J*, 2012, 10(2):139-149.
- [11] BENJAMINS R, QUINT A, WEIJERS D, et al. The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport[J]. *Development*, 2001, 128:4057-4067.
- [12] LEE B H, JOHNSTON R, YANG Y, et al. Studies of aberrant phyllotaxy mutants of maize indicate complex interactions between auxin and cytokinin signaling in the shoot apical meristem[J]. *Plant Physiol*, 2009, 150:205-216.
- [13] NAKAYAMA N, SMITH R S, MANDEL T, et al. Mechanical Regulation of Auxin-Mediated Growth[J]. *Curr Biol*, 2012, 22:1468-1476.
- [14] XU Q L, DONG J L, GAO N, et al. Transgenic lines of *Begonia maculata* generated by ectopic expression of *PttKNI* [J]. *Biologia*, 2011, 66(2):251-257.
- [15] XU Q L, RUAN M Y, HU X. Ectopic expression of the *PttKNI* gene in coleus (*Solenostemon scutellarioides*) [J]. *Indian J Genet*, 2013, 73(4):419-425.
- [16] JACKSON D, HAKE S. Control of phyllotaxis in maize by the *abphyl1* gene[J]. *Development*, 1999, 126:315-323.
- [17] GIULINI A, WANG J, JACKSON D. Control of phyllotaxy by the cytokinin-inducible response regulator homologue ABPHYL1 [J]. *Nature*, 2004, 430:1031-1034.
- [18] PALAUQUI J C, LAUFS P. Phyllotaxis: In Search of the Golden Angle [J]. *Curr Biol*, 2011, 21:502-504.
- [19] PRASAD K, GRIGG S P, BARKOULAS M, et al. *Arabidopsis* PLETHORA transcription factors control phyllotaxis[J]. *Curr Biol*, 2011, 13:1123-1128.
- [20] ITOH J, HIBARA K, KOJIMA M, et al. Rice DECUSSATE controls phyllotaxy by affecting the cytokinin signaling pathway[J]. *Plant J*, 2012, 72:869-881.
- [21] YANG F, BUI H T, PAUTLER M, et al. A maize glutaredoxin gene, *abphyl2*, regulates shoot meristems size and phyllotaxy[J]. *Plant Cell*, 2015, 27:121-131.
- [22] SMITH R S, GUYOMARCH' H S, MANDEL T, et al. A plausible model of phyllotaxis[J]. *PNAS*, 2006, 103:1301-1306.

# “宁杞 1 号”枸杞不同外植体愈伤组织诱导

徐蕊, 于元元, 石晶, 毛桂莲, 姚新灵, 郑蕊

(宁夏大学 生命科学学院, 西部特色生物资源保护与利用教育部重点实验室, 宁夏 银川 750021)

**摘要:**以不同生长来源的 3 种“宁杞 1 号”枸杞苗为试材, 通过比较其生长状态及特点, 筛选诱导愈伤组织形成的外植体来源枸杞苗。同时, 研究了不同激素组合对枸杞愈伤组织形成的影响。在此基础上, 比较了以叶片和茎段为外植体, 愈伤组织形成的时间及长势。结果表明:“宁杞 1 号”枸杞种子种植的无菌苗长势好, 继代后性状稳定, 可作为最佳外植体材料来源; 以叶片为外植体, 诱导愈伤组织形成时间短、长势好、不定芽形成早; 初步确定诱导枸杞叶片形成愈伤组织的最佳培养基为  $MS+0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+1.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$ 。

**关键词:**“宁杞 1 号”枸杞; 材料来源; 叶片; 愈伤诱导

**中图分类号:**S 567.1<sup>+</sup>9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)24-0091-05

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科(Solanaceae)枸杞属(*Lycium*)多年生落叶灌木, 是宁夏地区主要经济树种之一, 为宁夏“五宝”之首。传统医学认为枸杞子具有补肾益精、养肝明目、润肺止咳的作用。现代医学表明, 枸杞多糖具有多种功能, 比如, 调节机体免疫<sup>[1]</sup>、抗氧化、抗衰老<sup>[2]</sup>、抗肿瘤等作用<sup>[3]</sup>。此外, 枸杞中胚的衍生物还具有降血糖的功效<sup>[4]</sup>。

世界分布枸杞属约有 80 余种, 在我国大面积生产

推广应用的品种有“宁杞 1 号”“宁杞 4 号”“蒙杞 1 号”和菜用枸杞“宁杞菜 1 号”4 个新品种。其中, “宁杞 1 号”是宁夏农林科学院自 1973 年从中宁原农家品种大麻叶的丰产园中采用单株选优方法选育, 后经无性扩繁形成的无性系。它具有丰产、稳产、果粒大、品质好、易制干、病虫害抗性高、管理简单等综合优势, 广泛应用于枸杞种植和生产领域。

但在育种过程中, 由于缺乏自主知识产权及育种价值的基因和标记, 对控制重要性状的基因、基因间及其与环境互作的分子基础知之甚少, 多种遗传改良信息和技术的集成应用不足, 缺乏系统的品种设计思路, 导致育种进程缓慢, 枸杞品种相对单一, 不能很好地适应枸杞产业多元化发展的需求。

在已有研究中, 安焕霞等<sup>[5]</sup>以“青杞 1 号”叶片为外植体, 探索出诱导叶片生成愈伤组织的最佳培养基是

**第一作者简介:**徐蕊(1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物基因工程。E-mail:1412807332@qq.com.

**责任作者:**郑蕊(1972-), 女, 博士, 教授, 现主要从事植物生物技术等研究工作。E-mail:xlzheng@126.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31360361, 31560418, 31401444, 31360168, 31360275)。

**收稿日期:**2016-09-26

## Cloning of *SsPIN2* Gene From *Sinningia speciosa* and Its Expression in Different Tissues

XU Weiping<sup>1</sup>, LIU Fengjuan<sup>2</sup>, BI Chunxiao<sup>2</sup>, HU Xin<sup>2</sup>, XU Quanle<sup>2</sup>, JIANG Jinglong<sup>1</sup>

(1. School of Biological Science and Engineering, Shaanxi Sci-tech University, Hanzhong, Shaanxi 723001; 2. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** *Sinningia speciosa* were used as materials, and 898 bp cDNA in length of *SsPIN2* gene was isolated. BLAST and phylogenetic trees via neighbor-joining (NJ) method were used to analysis sequence. And semi-quantitative RT-PCR was used to investigate the different expression level of *SsPIN2* gene in different tissues of leaf, shoot tips, root, stem, petal and calyx. The results indicated that *SsPIN2* shared a high sequence identity with *CsPIN2* and *PsPIN2*. *SsPIN2* was expressed in all of the above tissues and relatively higher in shoot tips, root, stem and calyx and relatively lower in leaf and petal.

**Keywords:** *Sinningia speciosa*; *SsPIN2* gene; gene cloning; expression analysis