

doi:10.11937/bfyy.20171060

# 黄瓜 *CsPAP-fib* 基因的克隆与序列分析

刘卫锋, 辛 明, 周秀艳, 秦智伟

(东北农业大学 园艺园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:**以温敏型黄瓜‘C09-123’为试材,通过对不同夜温处理的黄瓜幼叶进行差异蛋白质鉴定,筛选出一个与低夜温影响黄瓜雌性形成密切相关的蛋白,采用生物信息学方法,对该蛋白进行生物信息学分析,并运用基因克隆技术克隆了该基因,以期明确该基因在黄瓜性别分化中的作用机制奠定基础,也为进一步试验研究提供基因材料。结果表明:该基因全长 870 bp,编码 289 个氨基酸,该基因编码的蛋白质属于叶绿体中一个不稳定的疏水蛋白质,无明显信号肽,无跨膜结构。与甜瓜为同一进化分支,同源性较高。该蛋白属于 PAP-fibrillin 蛋白家族,因此将编码该蛋白的基因命名为 *CsPAP-fib*。

**关键词:**黄瓜; *CsPAP-fib* 基因; 基因克隆; 序列分析

**中图分类号:**S 642.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)20-0040-06

黄瓜(*Cucumis sativus*)是葫芦科的一种主要蔬菜作物,其性别类型复杂多样。因此在 20 世纪 50 年代末就将黄瓜确定为性型分化研究的模式植物<sup>[1-3]</sup>,黄瓜如此多样的性别分化受控于环境、基因和内源激素,其作用机制十分复杂。目前黄瓜性型分化的研究已经成为植物研究者的关注焦点。对新发现的与低夜温影响黄瓜雌性形成有关蛋白质的研究不仅可以揭示该蛋白质在黄瓜雌性分化中的作用机制,更能为黄瓜高产育种提供相应参考。闫晨曦<sup>[4]</sup>研究了环境影响下黄瓜雌雄花比例的变化,认为外界环境的影响改变了植物新陈代谢的类型,这样必然会定向地改变植物的性别。汪俏梅等<sup>[5]</sup>的研究表明,影响瓜类作物性别表现的因素主要有品种本身的遗传性、环境条件(温度光照等)及化学调控等。马刘峰等<sup>[6]</sup>研究认

为,温度对黄瓜性表现的影响大于光强度和光周期。程国辉等<sup>[7]</sup>的研究表明,低夜温是影响黄瓜雌性形成的主导因素,光周期影响不明显。厉建梅等<sup>[8]</sup>发现了雌花分化受季节影响显著的黄瓜种质资源‘C09-123’。程国辉等<sup>[7]</sup>通过研究其雌性形成的光温条件及黄瓜雌性形成具体的温度反应阈值,确定‘C09-123’为温敏型雌性试验材料,其性别转换温度阈值为 12~24 ℃,12 ℃低夜温有利于‘C09-123’雌花形成,24 ℃高夜温条件下,‘C09-123’不形成雌花。刘欣童<sup>[9]</sup>对不同夜温条件下‘C09-123’相关生理生化指标进行比较分析,通过蛋白质组学研究筛选出与低夜温诱导黄瓜雌性形成密切相关的蛋白质,并发现一个在 12 ℃低夜温处理样品中上调表达的蛋白,该蛋白属于 PAP-fibrillin 蛋白家族,PRUVOT 等<sup>[10]</sup>研究证明该蛋白家族参与了植物生长发育和抗逆反应过程,滕蕾<sup>[11]</sup>也研究发现, *Fibrilliini* 基因表达与环境压力或植物器官的发育过程相关。因此,推测它很可能参与了低温诱导的黄瓜雌花分化。该研究对编码该蛋白的基因进行了克隆,并对核酸和蛋白质进行序列比对,对蛋白质基本性质、结构、功能进行预测,以期为进一步明确该基因在黄瓜性别分化中的作用机制奠定基础。

**第一作者简介:**刘卫锋(1990-),男,硕士研究生,研究方向为黄瓜分子遗传育种。E-mail:liuweifeng3385@126.com.

**责任作者:**秦智伟(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为黄瓜遗传育种。E-mail:qzw303@126.com.

**基金项目:**黑龙江省普通本科高等学校青年创新人才培养计划资助项目(UNPYSCT-2016007)。

**收稿日期:**2017-07-10

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试黄瓜为温敏型雌性品种‘C09-123’,种子由东北农业大学园艺园林学院黄瓜课题组提供。

逆转录酶、DNA聚合酶、dNTP、T/A克隆载体均购自 TaKaRa 公司, TRIzol 购自 Invitrogen 公司, 质粒小量提取试剂盒和 DNA 凝胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 黄瓜材料‘C09-123’总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

在 2 叶 1 心期取黄瓜叶片, 利用液氮研磨后采用 TRIzol 法进行总 RNA 的提取<sup>[12]</sup>, 利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。使用反转录试剂盒合成单链 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

#### 1.2.2 引物的设计与合成

使用软件 Primer Premier 5.0 (Premier Bio-soft International, Palo Alto, CA) 设计克隆基因全长所用引物, 上游引物 CsPAP-fib-F: 5'-ATGGAAATTATGGAACACAACAG-3', 下游引物 CsPAP-fib-R: 5'-TCAAGAGATGAAATCTAGAGAGTCA-3'。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

#### 1.2.3 CsPAP-fib 的 RT-PCR 扩增及克隆

PCR 扩增体系 20  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$ PCR Buffer 2  $\mu\text{L}$  (含 20  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ ), dNTPs (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 上游引物 (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , 下游引物 (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 (2 U) 0.2  $\mu\text{L}$ , 加 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min; 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

PCR 产物经 1.5% 琼脂糖电泳分析后, 回收目的片段, 连接到 pGEM-T 克隆载体上, 采用热激法转化到 Trans1-T1 感受态细胞中, 在卡那抗性平板上进行阳性克隆筛选, 送至苏州金唯智生物科技有限公司测序。

#### 1.2.4 氨基酸序列的生物信息学分析

通过 NCBI 的 Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对基因序列进行保守结

构域的分析; 利用 ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) 计算蛋白质的理论分子量、理论等电点、原子组成、稳定系数和脂肪系数。利用蛋白质亚细胞定位工具 PSORT (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) 预测蛋白质的定位。通过 SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行蛋白质的信号肽预测。利用 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对蛋白质进行跨膜区域预测。通过 ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>) 分析蛋白质的亲水性与疏水性。通过 SOPMA (<http://sopma.expasy.org/>) 及 Phyre 2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) 分别对蛋白质的二级、三级结构进行预测。通过 Blast 分析蛋白质的同源性, 并用 DNAMAN 软件构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 CsPAP-fib 基因总 RNA 的提取

总 RNA 提取后, 琼脂糖凝胶电泳检测结果 (图 1) 显示 RNA 条带清晰, 质量良好, 可以用于后续试验操作。

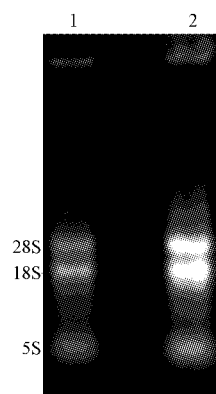


图 1 总 RNA 电泳检测

Fig. 1 Electrophoretic analysis of RNA

### 2.2 CsPAP-fib 基因的克隆

以 CsPAP-fib-F、CsPAP-fib-R 为引物, 黄瓜叶片 cDNA 为模板, 通过 PCR 技术, 扩增出 1 条 750~1 000 bp 的条带 (图 2-A), 将回收纯化的目的片段与 pEASY-1250 载体连接, 提取质粒并进行酶切验证, 酶切后回收目的基因片段 (图 2-B),

经测序,得到与黄瓜基因组数据库基因(Csa3M134880.1)编码区序列完全一致的碱基序

列,该基因全长为 870 bp,表明已成功获得目的基因。

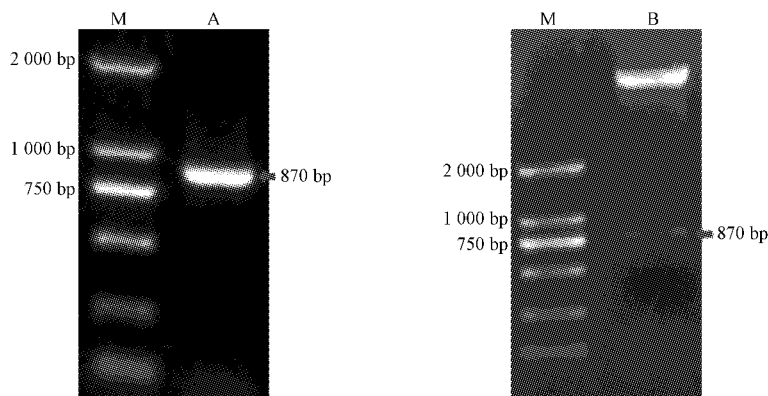


图2 *CsPAP-fib* PCR 扩增产物(A)与酶切验证(B)

Fig. 2 PCR analysis of *CsPAP-fib* (A) and identification by restriction enzymes digestion (B)

## 2.3 生物信息学分析

### 2.3.1 蛋白质理化性质分析

利用 ProtParam 分析显示,CsPAP-fib 蛋白包含 289 个氨基酸,预测理论分子量 31.15 kDa,理论等电点为 6.34,原子组成为  $C_{1393}H_{2256}N_{378}O_{424}S_2$ ,稳定系数为 40.85,属于不稳定蛋白质(稳定系数

大于 40 时不稳定),脂肪系数为 102.94。蛋白质亚细胞定位工具 PSORT 预测,CsPAP-fib 定位于叶绿体基质,属于叶绿体蛋白。其氨基酸序列在 NCBI 的 blast 结果显示,带有 PAP-fibrillin 结构域(图 3),因此将编码该蛋白质的基因命名为 *CsPAP-fib*。

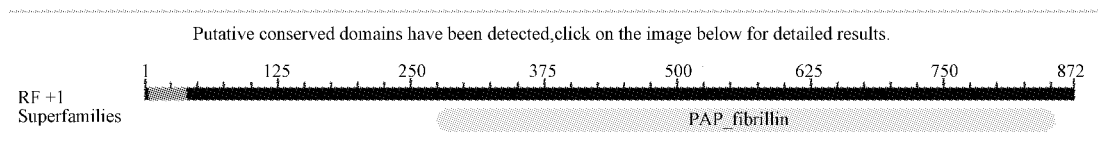


图3 *CsPAP-fib* 的保守结构域

Fig. 3 Conserved domain of *CsPAP-fib*

### 2.3.2 蛋白质信号肽预测

信号肽是引导新合成的蛋白质向分泌通路转移的短肽链(长度 5~30 个氨基酸),常指新合成多肽链中用于指导蛋白质的跨膜转移(定位)的 N-末端的氨基酸序列(有时不一定在 N 端)。利用 SignalP 程序分析该基因编码的蛋白质,结果发现检测不到明显的信号肽序列(图 4)。说明该蛋白质可能是细胞质基质或细胞器基质中的蛋白质,不属于膜蛋白或分泌蛋白。

### 2.3.3 *CsPAP-fib* 蛋白跨膜区域预测

使用在线生物软件 TMHMM 对 *CsPAP-fib* 蛋白进行跨膜区域预测,结果表明 *CsPAP-fib* 蛋白基因没有明显的跨膜区域。

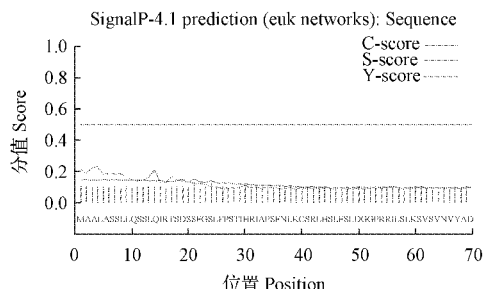


图4 *CsPAP-fib* 蛋白 SignalP-HMM 信号肽预测

Fig. 4 Signal peptide of the *CsPAP-fib* protein predicted by SignalP-HMM

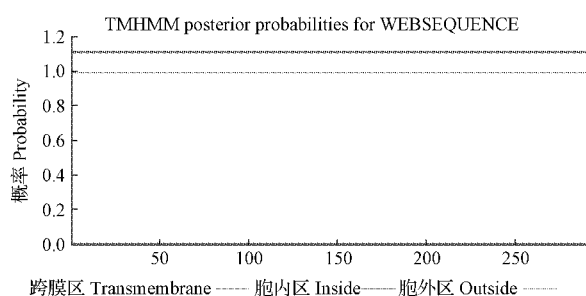


图 5 CsPAP-fib 蛋白 TMHMM 跨膜结构预测

Fig. 5 Transmembrane domain of the CsPAP-fib protein predicted by TMHMM

### 2.3.4 CsPAP-fib 蛋白质亲水性与疏水性预测

蛋白质结构决定其生物功能,疏水性在蛋白质结构形成过程中起关键性作用。利用 ProtScale 对 CsPAP-fib 蛋白疏水性预测发现(图 6),氨基酸链第 5 位上的丙氨酸(A5)疏水性最强,分值为 1.900;分值最低的是第 114 位的亮氨酸(L114)及 115 位的谷氨酰胺(Q115),疏水值均为-2.144。CsPAP-fib 疏水区多于亲水区,总平均亲水值为-0.106,表现出明显的疏水性。推测 CsPAP-fib 为疏水性较强的疏水性蛋白质。

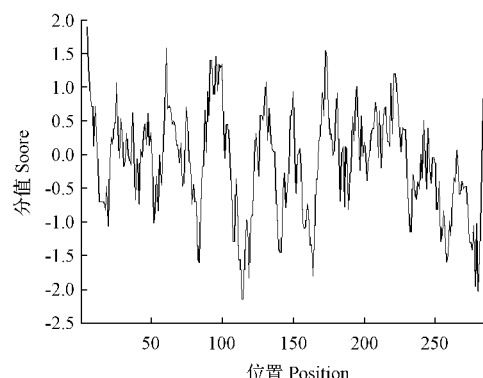


图 6 CsPAP-fib 蛋白疏水性预测

Fig. 6 Hydrophobicity analysis of the CsPAP-fib protein

### 2.3.5 CsPAP-fib 蛋白的高级结构预测

采用 SOPMA 软件分析了 CsPAP-fib 表达蛋白的二级结构,预测结果表明,CsPAP-fib 编码蛋白中有 104 个  $\alpha$  螺旋,占整个多肽链的 35.74%;62 个延伸主链,占整个多肽链的 21.31%;17 个  $\beta$  折叠,占整个多肽链的 5.84%;108 个无规则卷曲,占整个多肽链的 37.11%(图 7)。同时,将蛋白全序列提交到蛋白同源建模 Phyre,预测蛋白质三级结构(图 8)。

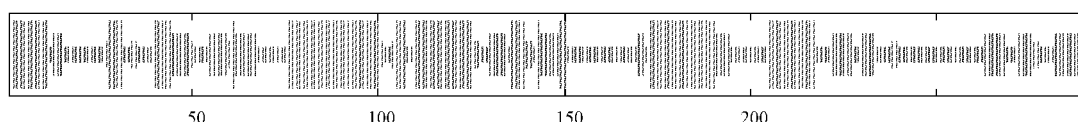


图 7 CsPAP-fib 蛋白的二级结构

Fig. 7 Secondary structure prediction of the CsPAP-fib protein

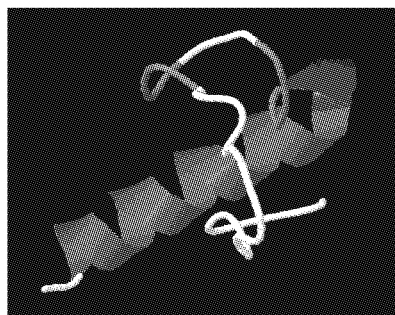


图 8 CsPAP-fib 蛋白三级结构模型

Fig. 8 Tertiary structure prediction of the CsPAP-fib protein

### 2.3.6 CsPAP-fib 蛋白系统进化分析

从 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载 18 个不同物种的 *Fib* 基因氨基酸序列进行同源性比对,结果输入 MEGA 5.0 软件,用 Neighbor-joining 法构建系统进化树。由图 9 可知,包括黄瓜 CsPAP-fib 在内的 18 个成员被聚为 2 个大类群,不同物种间 *Fib* 蛋白保守性较强,相同科属的植物相似度较高。黄瓜和甜瓜构成一个小的进化分支,同源关系很近,二者与伞形科的胡萝卜 (*Daucus carota* L.) 同源性相对较高。

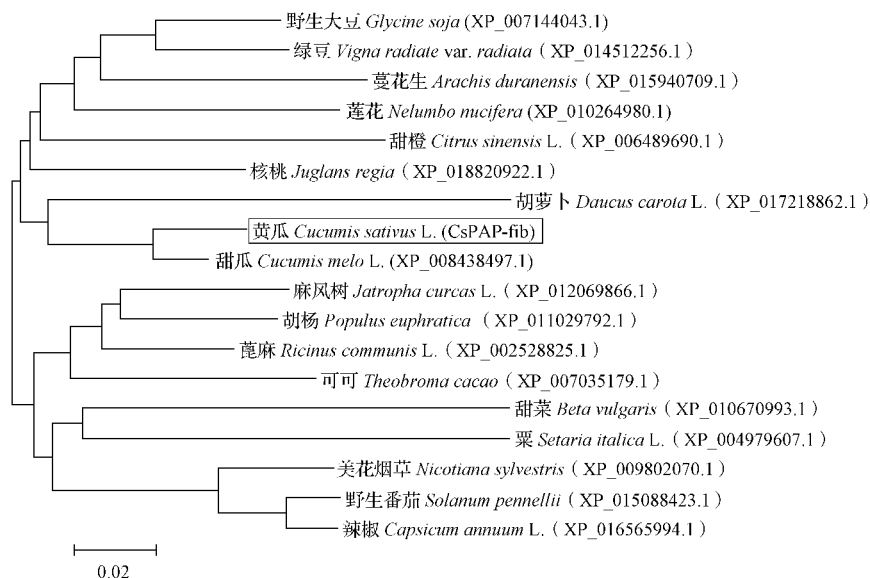


图9 CsPAP-fib 蛋白系统进化分析(括号中为 GenBank 登录号)

Fig. 9 Phylogenetic analysis of CsPAP-fib(GenBank accession numbers are in parentheses)

### 3 讨论

该研究从前期转录组测序数据中筛选出一个与低夜温影响黄瓜雌性形成密切相关的假定蛋白,并利用PCR克隆技术成功获得编码该蛋白的基因cDNA全长。通过保守结构域分析发现,该假定蛋白属于PAP-fibrillin蛋白家族,因此将编码该蛋白的基因命名为CsPAP-fib。

研究发现,PAP-fibrillin家族是植物体中一种保守的脂结合蛋白家族<sup>[13]</sup>,早在1976年,WUTTKE<sup>[14]</sup>、WINKENBACH等<sup>[15]</sup>就分离出了玫瑰(*Rosa rugosa*)和金莲花(*Tropaeolum majus*)花瓣有色体原纤维中大小约为30 kDa的蛋白质。随后,在鸭跖草(*Palisota barteri*)果皮和金莲花中也分离出了类似蛋白质<sup>[16-17]</sup>,但这些蛋白质还未被命名。直到从甜椒果皮、马铃薯叶片<sup>[10]</sup>、黄瓜花冠<sup>[18]</sup>、油菜花药<sup>[19]</sup>、豌豆叶片<sup>[20]</sup>、拟南芥叶片<sup>[21]</sup>等不同作物组织中获得了fibrillin相似蛋白后,才最终把这些类似的蛋白质命名为原纤蛋白<sup>[22]</sup>。

有研究表明编码该蛋白的基因受高温、低温、盐害、干旱和强光氧化损伤等胁迫诱导表达,随后,转基因研究证明该基因家族参与了植物生长发育和抗逆反应过程<sup>[10,19,23]</sup>。大量生产实践和科学试验证明,高温和长日照促进黄瓜雄花分化;低

温和短日照则促进花芽向雌性转化,有利于雌花形成<sup>[24]</sup>。2003年YAMASAKI等<sup>[25]</sup>认为黄瓜的性型分化是遗传因素与环境因素共同决定的,除个别黄瓜品种外,低温均有利于黄瓜雌花的形成。梁永宏等<sup>[26]</sup>的研究也指出影响黄瓜性型决定的温度主要是夜间低温的影响。程国辉等<sup>[7]</sup>研究表明,温敏型黄瓜材料‘C09-123’在低夜温12℃雌花分化率达到最大,这与梁永宏等<sup>[26]</sup>的研究结果相符。2016年,刘欣童<sup>[9]</sup>通过蛋白质组差异分析发现该蛋白在12℃低夜温处理样品中上调表达。因此,推测该蛋白很可能参与了低温诱导黄瓜雌花分化,该研究对该假定蛋白质进行基因克隆及生物信息学分析,为后续研究低温诱导黄瓜雌花分化的分子机制奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 张微,李锡香. 黄瓜花芽性别分化的研究进展与展望[J]. 华北农学报,2015,30(s1):74-80.
- [2] MALEPSZY S, NIEMIROWICZ-SZCZYTT K. Sex determination in cucumber (*Cucumis sativus*) as a model system for molecular biology[J]. Plant Science,1991,80(1):39-47.
- [3] TANURDZIC M, BANKS J A. Sex-determining mechanisms in land plants[J]. Plant Cell,2004,16:S61-S71.
- [4] 闫晨曦. 影响植物新陈代谢的环境因素分析[J]. 现代园艺,2011(12x):4.
- [5] 汪俏梅,曾广文. 苦瓜性别表现研究概况及展望[J]. 中国蔬菜,1995(4):50-53.

- [6] 马刘峰,易海艳,易霞,等.不同光周期和温度处理对黄瓜花芽分化的影响[J].北方园艺,2012(21):25-26.
- [7] 程国辉,秦智伟,冯卓,等.光周期和温度对黄瓜品种‘C09-123’性别分化的影响[J].北方园艺,2012(15):35-37.
- [8] 厉建梅,秦智伟,周秀艳,等.黄瓜雌性性状的遗传分析[J].中国农业科学,2011,44(15):3169-3176.
- [9] 刘欣童.低夜温下黄瓜雌性分化相关代谢与蛋白质变化的初步分析[D].哈尔滨:东北农业大学,2016.
- [10] PRUVOT G, CUINÉ S, PELTIER G, et al. Characterization of a novel drought-induced 34-kDa protein located in the thylakoids of *Solanum tuberosum* L. plants[J]. *Planta*, 1996, 198(3): 471-479.
- [11] 滕蕾. *Fibrillin* 转入甘蓝型油菜中的研究[D]. 雅安: 四川大学, 2006.
- [12] CHEN R, TIAN M, WU X, et al. Differential global gene expression changes in response to low nitrogen stress in two maize inbred lines with contrasting low nitrogen tolerance[J]. *Genes & Genomics*, 2011, 33(5): 491.
- [13] 周慧梅,谢德颖,邹娟子,等.植物质体 *Fibrillin* 蛋白家族的起源、结构和功能[J].中国农业科技导报,2014,16(4):41-49.
- [14] WUTTKE H G. Chromoplasts in *Rosa rugosa*: Development and chemical characterization of tubular elements[J]. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 1976, 31(7-8): 456-460.
- [15] WINKENBACH F, FALK H, LIEDVOGEL B, et al. Chromoplasts of *Tropaeolum majus* L.: Isolation and characterization of lipoprotein elements[J]. *Planta*, 1976, 128(1): 23-28.
- [16] KNOTH R, HANSMANN P, SITTE P. Chromoplasts of *Palisota barteri*, and the molecular structure of chromoplast tubules. [J]. *Planta*, 1986, 168(2): 167-174.
- [17] EMTER O, FALK H, SITTE P. Specific carotenoids and proteins as prerequisites for chromoplast tubule formation[J]. *Protoplasma*, 1990, 157(1-3): 128-135.
- [18] VISHNEVETSKY M, OVADIS M, ITZHAKI H, et al. Molecular cloning of a carotenoid-associated protein from *Cucumis sativus* corollas: Homologous genes involved in carotenoid sequestration in chromoplasts[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 1996, 10(6): 1111-1118.
- [19] HERNÁNDEZPINZÓN I, ROSS J H, BARNES K A, et al. Composition and role of tapetal lipid bodies in the biogenesis of the pollen coat of *Brassica napus* [J]. *Planta*, 1999, 208(4): 588-598.
- [20] KESSLER F, SCHNELL D, BLOBEL G. Identification of proteins associated with plastoglobules isolated from pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts[J]. *Planta*, 1999, 208(1): 107-113.
- [21] VIDI P A, KANWISCHER M, BAGINSKY S, et al. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(16): 11225-11234.
- [22] SINGH D K, MCNELLIS T W. *Fibrillin* protein function: The tip of the iceberg?[J]. *Trends in Plant Science*, 2011, 16(8): 432-441.
- [23] GILLET B, BEYLY A, PELTIER G, et al. Molecular characterization of CDSP 34, a chloroplastic protein induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants, and regulation of CDSP 34 expression by ABA and high illumination[J]. *Plant Journal*, 1998, 16(2): 257-262.
- [24] 邹晓艳. 黄瓜性型遗传规律及性别决定相关基因的分布和表达研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [25] YAMASAKI S, FUJII N, TAKAHASHI H. Characterization of ethylene effects on sex determination in cucumber plants [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 2003, 16(3): 103-111.
- [26] 梁永宏,李广林,郭韬,等.黄瓜性型分化的分子机制[J]. 生命科学,2010(11):1177-1183.

## Cloning and Sequence Analysis of *CsPAP-fib* Gene in Cucumber

LIU Weifeng, XIN Ming, ZHOU Xiuyan, QIN Zhiwei

(College of Horticulture and Architecture Landscape, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** The temperature-sensitive cucumber cultivar ‘C09-123’ was used as material in this study, a protein which concerned the formation of cucumber femaleness under low night temperature had been found by the identification of differential proteins in cucumber young leaves treated by different night temperatures, then was analysed by bioinformatics technology. The gene encoded this protein was cloned by cloning technique to establish a foundation for confirming the functional mechanisms of *CsPAP-fib* in cucumber sex differentiation, and provide the genetic material for further research. The results showed that the gene length was 870 bp, encoding 289 amino acids. The protein encoded by this gene was an unstable, hydrophobic and non-transmembrane protein without signal peptide located in chloroplast, and it was highly homologous to *Cucumis melo* L. The gene was named as *CsPAP-fib*, based on the protein family PAP-fibrillin which the protein encoded by the gene.

**Keywords:** cucumber; *CsPAP-fib* gene; clone; sequence analysis