

枸杞酸性转化酶基因的克隆及组织表达分析

王丽娟, 赵辉, 王彦才, 丁向真, 马建明

(宁夏大学 生命科学学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:以“宁杞1号”枸杞为试材,通过 RT-PCR 及 RACE 技术进行枸杞酸性转化酶基因的克隆及组织表达分析,并运用 MEGA 5.0 软件对植物转化酶基因进行了系统树分析。结果表明:扩增获得 2 193 bp 的枸杞酸性转化酶基因,命名为 *LbSAI* (GenBank:KC776575),该基因推导氨基酸序列与马铃薯、番茄、梨等酸性转化酶基因氨基酸序列同源性为 68%~100%;*LbSAI* 编码的蛋白质属于液泡酸性转化酶;Real-time PCR 表达分析显示,*LbSAI* 基因在枸杞花中表达量最高,在根中表达水平较低。

关键词:枸杞;酸性转化酶;基因克隆;表达分析

中图分类号:R 282.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)01-0086-05

宁夏枸杞(*Lycium barbarum* L.)属茄科枸杞属多年生落叶灌木,果实称为枸杞子(Fructuslyii),核小、鲜红色,具有补肾养肝、润肺明目之效。枸杞素有“红宝”之称,其果、花、叶、皮和根均可入药,有很高的营养价值和药用保健功效,不仅是我国传统的名贵中药,也是我国的重要经济资源^[1]。在世界范围内枸杞有 80 多个品种,我国有 7 个品种,主要分布于西北地区的宁夏、新疆、内蒙古、甘肃等。但以宁夏中宁栽培的宁夏枸杞最为地道。

蔗糖、葡萄糖和果糖是植物果实中主要的可溶性糖,其含量对果实品质起着重要作用。近年来人们对苹

果、葡萄、网纹甜瓜、草莓、西瓜、桃和柑橘的研究表明,蔗糖代谢相关酶与果实糖积累之间存在密切联系^[2-4]。蔗糖是植物同化物运输的主要形式,是体内最重要的一种糖类。蔗糖为植物提供碳源和能源,首先依赖其裂解形成己糖,这一过程至少受 2 类不同酶的催化:1 类为蔗糖合酶^[5],可催化蔗糖裂解为尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和果糖;另 1 类为转化酶,催化蔗糖裂解形成葡萄糖和果糖。

生理学研究发现酸性转化酶在枸杞果实的糖代谢中起着主要的调控作用,叶片中果糖的含量与酸性转化酶呈显著正相关;果实中葡萄糖和果糖的含量与酸性转化酶均呈极显著正相关,而与其它酶无相关性^[6]。随着现代化分子生物学及细胞生物学的发展,人们逐步认识到一切生理、生化进程的调控最根本原因是由基因开闭决定的,研究与了解其代谢分子机理,可以为调控代谢、

第一作者简介:王丽娟(1974-),女,博士,副教授,现主要从事植物基因工程等研究工作。E-mail:Lijuanwang279@hotmail.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31260065)。

收稿日期:2013-09-10

Study on the Plant Landscape Planning and Design of Henan Agricultural University New Campus

LI Sa, SU Fang, TIAN Guo-xing

(College of Forestry, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: In recent years landscape design with plants for campus tends to part design. It's deficient in overall perspective. The landscape design with plants for Longzi lake campus of Henan Agriculture University is trying to start from the overall perspective. Mixing together the botanical garden with the campus. On the premise of humanized design and inheritance of educations, using the small space environment to create a distinctive landscape. Merging agricultural technology demonstrations, popularization of science, recreation. This campus will service teachers, students and surrounding residents.

Key words: campus; plants landscape; planning and design; botanical garden

提高其品质提供理论依据。然而,有关枸杞果实蔗糖代谢分子机制研究尚鲜见报道。现以宁夏枸杞为试材,克隆其蔗糖代谢途径中的酸性转化酶基因(SAI),并对其序列和表达分析,以期为进一步研究蔗糖代谢机制和利用生物代谢工程的手段提高枸杞品质奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试枸杞“宁杞1号”种植于宁夏农林科学院园艺研究所试验田,于2011年8月,选取生长5a枸杞幼树,从植株树冠的各方向采取无病虫害的果实,取样后于液氮中速冻后,−70℃保存用于RNA提取。

植物RNA提取试剂盒,dNTP、TOP-10感受态细胞,琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,pGM-T克隆试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Revert Aid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Fermentas 公司;SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit,RNase H,TdT,LA Taq DNA聚合酶购自 Takara 公司;质粒小提试剂盒,PCR产物纯化试剂盒,购自 Biomiga 公司;其它试剂均为国产分析纯。引物委托上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 总RNA的提取及cDNA第1链的合成 按照植物RNA提取试剂盒说明书的要求,称取0.01g枸杞果实提取总RNA,取总RNA 3 μL,根据 RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒的说明,以Oligo-dT为引物通过RT-PCR逆转录制备cDNA第1链。

1.2.2 LbSAI基因保守区的克隆 利用 Dnaman 6.0 软件分析已知物种SAI基因的核苷酸序列,在保守区域设计1对寡核苷酸引物。上游引物SAI-1F:5'-CTC-CATGTTAACTCAGCCGCAC-3',下游引物SAI-1R:5'-CTGATGGCCGAGCAAAGACTC-3'。以逆转录获得的cDNA为模板,使用SAI-1F和SAI-1R引物PCR扩增枸杞SAI基因的保守片段。反应条件为:94℃、3 min;变性94℃、30 s;退火58℃、30 s;延伸72℃、40 s。30个循环后72℃延伸10 min。PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测、回收纯化后连接pGM-T Easy克隆载体,转化大肠杆菌TOP10后提取重组质粒并送Invitrogen公司测序。

1.2.3 5'RACE技术获取枸杞SAI基因cDNA 5'末端序列 根据获得的枸杞SAI cDNA的保守片段,设计5'RACE特异性引物SAI5-1:5'-CCTGGCCCGTTATAT-GATGTGTC-3'和SAI5-2:5'-CAATCCGTTTGAGTC-TACGGTGGATAC-3',参照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit的说明,进行逆转录、加尾和5'RACE扩增。按照“1.2.2”项中的方法回收、克隆、测序。

1.2.4 3'RACE技术获取枸杞SAI基因cDNA 3'末端

序列 根据“1.2.2”项中所获得的枸杞SAI cDNA的保守片段,设计3'RACE特异性引物1,SAI3-1:5'-GGAG-GTGCTGCTAGCAGAGGCATAT-3'和引物2,SAI3-2:5'-GGACCATTTGGTGTCTGTTGTAATTGCTG-3'。按照SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit说明书的要求逆转录和进行2轮套式PCR反应,反应体系中模板量为3 μL,2轮PCR的退火温度均为55℃,延伸均为50 s,其它按照说明书进行。按照“1.2.2”项中的方法回收、克隆、测序。

1.2.5 枸杞SAI基因全长的拼接与PCR验证 利用Dnaman 6.0软件将“1.2.2”项中获得的保守序列、“1.2.3”项中获得的5'末端序列和“1.2.4”项中获得3'末端序列进行拼接,获得枸杞SAI基因的全长cDNA序列。根据拼接的序列,设计扩增枸杞SAI基因全长cDNA的上游引物SAI2F:5'-AATACTCGAGATGGC-TACCCACCATTCAG-3'和下游引物SAI2R:5'-AATA-GAGCTCTTACAAATTTTCCAAGGGGAAG-3'。以“1.2.1”项中逆转录的cDNA为模板,PCR扩增SAI cDNA的全长序列。反应条件为94℃、3 min;94℃、1 min;58℃、50 s;72℃、60 s,35个循环,72℃、10 min。参照“1.2.1”项中的方法回收、克隆、测序。

1.2.6 枸杞SAI基因的生物信息学分析 通过Dnaman 6.0将枸杞SAI基因cDNA全长序列翻译成氨基酸序列;通过PROSITE进行蛋白质功能结构域分析;利用ProtParam预测蛋白质的基本理化性质;利用PSORT进行蛋白质的亚细胞定位;利用SOPMA进行蛋白质二级结构分析;使用在线工具Swiss-Model进行蛋白质的三维结构预测,采用MEGA 5.0软件构建其系统发育进化树。

1.2.7 枸杞SAI基因不同器官表达模式分析 取5a生枸杞的根、茎、叶、花、果柄、果实为材料,提取总RNA,并进行反转录。以持家基因β-actin为内参(引物:Actin1:5'-TCACACTTTCTACAATGAGCT-3';Actin R:5'-GATATCCACATCACACTTCAT-3'),以合成的样品cDNA稀释50倍为模板,采用Real-time PCR检测SAI基因在枸杞不同器官中的表达量。采用Primer Primer 5.0设计荧光定量引物。PCR扩增引物(SAI 3F:5'-GCGTGGTCAAATGCTATGCTT-3';SAI3R:5'-GCGAAAGGCAAGTAGAGCCA-3')。PCR反应程序为:95℃预变性3 min;95℃变性10 s,60℃退火30 s,35个循环,每个样品3次重复。

2 结果与分析

2.1 枸杞SAI基因的克隆

利用引物SAI-1F和SAI-1R以枸杞cDNA为模板,进行PCR扩增,测序获得1条850 bp的条带(图1)。经NCBI的BLAST比对,确定该序列为枸杞SAI基因

cDNA 的部分片段。以 cDNA 的加尾产物为模板,利用引物对 UPM-SAI5-1 和 UPM-SAI5-2 进行的 5'RACE 扩增获得长约 978 bp 的片段(图 2)。利用 3'RACE SAI3-1 和 SAI3-2 引物对,3'RACE 获得长约 712 bp 的片段(图 3)。将所获得的保守区段、5'末端和 3'末端 cDNA 序列进行拼接,应用 NCBI 的 ORF finder 软件对该 cDNA 序列进行 ORF 分析,发现该序列包含枸杞 SAI 基因的完整 ORF。以枸杞 cDNA 为模板,利用引物 SAI-2F 和 SAI-2R 扩增获得 2 193 bp 的 1 条带(图 4),与预期大小相符。该片段的测序结果与保守区段、5'末端和 3'末端 cDNA 序列拼接获得的序列相同。

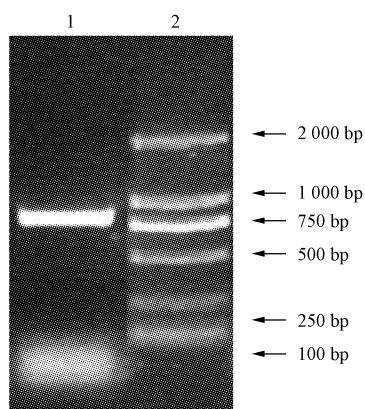


图 1 *LbSAI* 基因片段克隆

注:1. DL 2 000 marker;2. PCR 产物。

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of *LbSAI* gene partial

Note:1. DL 2 000 marker;2. PCR product.

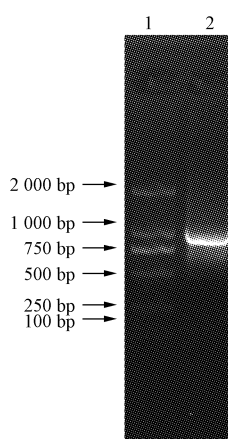


图 2 *LbSAI* 基因 5'片段克隆

注:1. DL 2 000 marker;2. 5'RACE PCR 产物。

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product of *LbSAI* gene 5'RACE

Note:1. DL 2 000 marker;2. 5'RACE PCR product.

2.2 枸杞 SAI 基因的生物信息学分析

枸杞 SAI 基因全长 2 193 bp(GenBank 登录号: KC776575,其中 5'端非翻译区(5'UTR)长 283 bp,3'端非翻译区(3'UTR)长 299 bp,终止密码子为 TGA,ORF 长

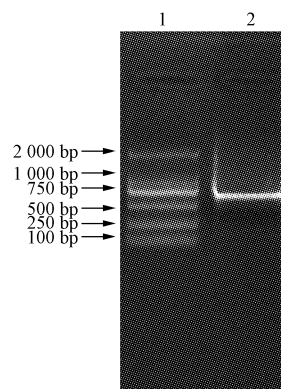


图 3 *LbSAI* 基因 3'片段克隆

注:1. DL 2 000 marker;2. 3'RACE PCR 产物。

Fig. 3 Electrophoresis of PCR product of *LbSAI* gene 3'RACE

Note:1. DL 2 000 marker;2. 3'RACE PCR product.

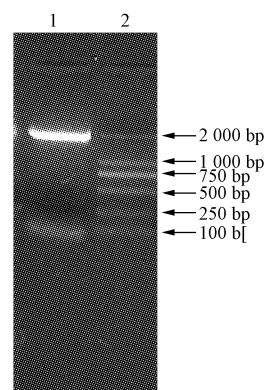


图 4 *LbSAI* 基因全长克隆

注:1. PCR 产物;2. DL 2 000 marker。

Fig. 4 Electrophoresis of *LbSAI* full-length

Note:1. PCR product;2. DL 2 000 marker.

1 614 bp,编码 537 个氨基酸,3'端具有 28 bp 的 polyA 尾。<http://www.expasy.org> 中的 ProtParam 软件预测的蛋白质相对分子质量为 5.9428×10^4 ,理论等电点(pI)为 5.24,属于稳定蛋白。氨基酸序列与马铃薯(*Solanum tuberosum*, E1AXT4)、番茄(*Solanum lycopersicum*, P29000)、烟草(*Nicotiana tabacum*, Q8GUA)、甘薯(*Convolvulus batatas*, Q94C05)和胡萝卜(*Daucus carota*, P80065)的同源性分别达到 96%、95%、90%、78% 和 74%。

通过 NCBI 的 BLAST 比对发现,枸杞 SAI 蛋白与已知的蛋白质结构功能数据库中其它物种的 SAI 具有相似的结构功能域。编码蛋白属于 GH43-62-32-68superfamily,具有 GH32-B-Fructosidase 保守 domain。枸杞 SAI 的 300~1 750 氨基酸为 glycosyl hydrolase 家族的基本结构,300~1 300 氨基酸残基处为 B-Fructosidase 的标志性序列。PSORT 服务器的亚细胞定位分析

表明,枸杞 SAI 定位于液泡中。运用 Sopma 软件预测枸杞 SAI 蛋白质的二级结构的结果表明,该蛋白质含有 56 个 α 螺旋,占 10.43%;149 个延伸链,占 27.75%;31 个 β 转角,占 5.77%;301 个不规则蜷曲,占 56.05%(图 5)。进一步采用 SWISS-MODEL 在线工具对 Lb SAI 行同源建模,枸杞 SAI 蛋白质的三维结构如图 6 所示,其中模型覆盖范围为 2~532,模型样本为[3ugfB](1.70),序列一致性为 65.35%。

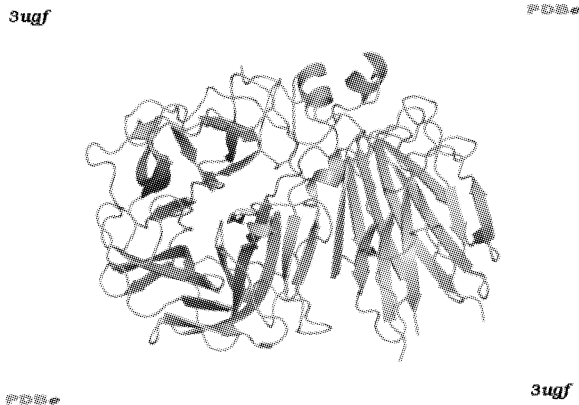


图 5 LbSAI 蛋白质三维结构
Fig. 5 3D structure of LbSAI

2.3 SAI 蛋白质的分子系统进化分析

进化分析采用 MEGA 5.0 软件对 10 种植物的 SAI 依据氨基酸序列进行系统进化分析,采用邻近法(Neighbor-joining, NJ)构建 SAI 分子系统发生树。如图 6 所示,整个系统树分为两大支,真菌单独聚为一枝,植物聚为一大支。植物分支中双子叶植物单独聚为一支,单子叶植物单独聚为一支。枸杞 SAI 与马铃薯、番茄、甜瓜

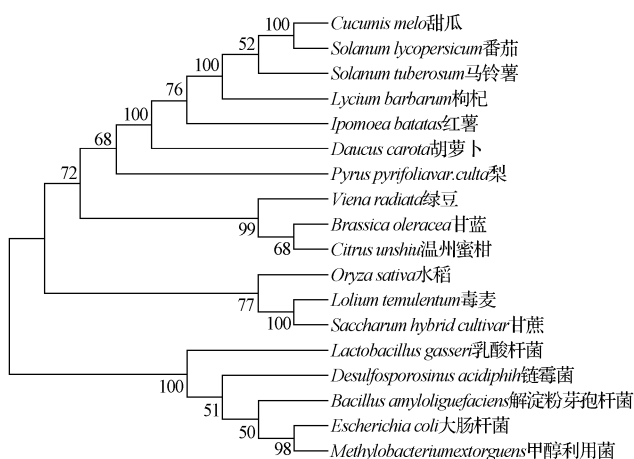


图 6 利用 MEGA 5.0 对不同物种来源的酸性转化酶
基因氨基酸序列系统树分析

Fig. 6 Phylogenetic tree analysis of LbSAI from various organisms by MEGA 5.0

蛋白质亲缘关系最近,首先聚为一支可信度 100%,后与其它植物聚为一个大的分支,与红薯、温州蜜柑、梨的可信度分别为 76%、72%、68%,与传统结果方法相一致。

2.4 枸杞 SAI 基因不同器官表达模式分析

每种植物中 SAI 通常以基因家族形式存在,不同的转化酶基因在不同品种、器官、时间、诱导剂作用下,其基因表达模式却存在很大差异,由图 7 可知, LbSAI 主要在枸杞花和果柄中表达高,而在叶和根表达较少,说明 LbSAI 在枸杞果实发育过程中起着重要的作用,可能主要参与果实中己糖的合成。

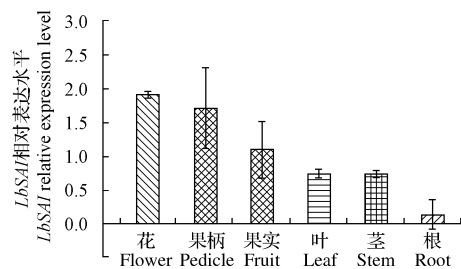


图 7 LbSAI 基因在枸杞不同器官中的表达

Fig. 7 LbSAI gene expression in different organs of *Lycium barbarum* L.

3 讨论

转化酶是蔗糖代谢的关键酶,在调节韧皮部糖的卸载、控制贮藏器官中糖的组成、参与植物对逆境胁迫的响应、影响植物早期生长发育以及在信号转导等方面都具有重要的作用,近年来,植物酸性转化酶基因及其表达调控的研究引起了人们广泛的重视。该研究首次从枸杞中分离到了酸性转化酶基因,该基因编码的氨基酸序列与番茄、马铃薯等植物酸性转化酶基因氨基酸序列相似性为 100%~68%,聚类结果显示, LbSAI 属于酸性转化酶中的液泡转化酶,与细菌、单子叶植物的亲缘关系较远,推测其编码的蛋白质定位于液泡。该基因已经在 GenBank 登录,登录号为 KC776575。半定量 Real-Time PCR 分析显示, LbSAI 在花中表达量最高,而在根表达较低。

氨基酸序列的同源性分析和 BLAST 比对结果表明,该研究所获得的枸杞 LbSAI 与马铃薯、番茄、烟草等物种已知的酸性转化酶基因之间同源性较高,说明不同植物同种转化酶在不同物种间保守性较高,这些蛋白靠近成熟蛋白的 N-末端都含有 1 个 β -呋喃果糖苷酶的特征序列^[7]:五肽 NDPNG/A,靠近 C-末端具有高度保守的半胱氨酸(Cys)残基及其邻近的氨基酸(MWECV/P),组成酸性转化酶重要的催化区域^[8-10]。然而同种植物中的不同酸性转化酶的氨基酸序列差异很大,葡萄果实液泡蔗糖酶 cDNA GIN1 和 GIN2,2 个基因氨基酸同源性为 62%^[11]。

对 *LbSAI* 基因的表达分析发现,该基因在花和果柄表达较高,而在叶片、根组织中表达水平则普遍偏低,说明碳水化合物的供给可能促进其表达,与 Xu 等^[12]在玉米上的研究结果相一致。植物生长发育的不同阶段和不同器官酸性转化酶的基因表达具有时间和空间的差异。Sturm^[13]从萝卜中分离 2 个编码 SAI 的基因(*sI*、*sII*),发现它们的表达方式明显不同;具有器官的特异性,*sI*主要在初生根中,而 *sII*在发育的根尖中。在拟南芥中,对不同发育时期不同的器官中 2 种 SAI 基因的表达水平进行分析,同样表明它们的表达具有明显的发育和器官特异性,而且还受到环境因子的调节^[14]。在百合花花芽^[15]、胡萝卜^[16]和番茄^[17]中也存在花特异性表达的酸性转化酶基因。

该研究首次成功分离了枸杞 *LbSAI* 基因,并对其序列结构和表达特点进行了初步分析,为进一步研究该基因的功能,通过改变枸杞体内转化酶基因的表达水平,操作碳水化合物的代谢与分配,特异地改变枸杞的生长和发育模式,从而探明枸杞品质形成机理等方面都具有重要意义。

参考文献

- [1] 白寿宁.宁夏枸杞研究[M].银川:宁夏人民出版社,1999:29-30.
- [2] Schaffer A A, Aloni B, Fogelman E. Sucrose metabolism and accumulation in developing fruit of *Cucumis* [J]. *Phytochem*, 1987(26):1883-1887.
- [3] 王永章, 张大鹏. “红富士”苹果果实蔗糖代谢与酸性转化酶和蔗糖合成酶关系的研究[J]. *园艺学报*, 2001, 28(3):259-261.
- [4] Hubbard N L, Parr D M, Huber S C. Sucrose-phosphate synthase and other sucrose metabolizing enzymes in fruit of various species[J]. *Physiol Plant*, 1991, 82:191-196.
- [5] Winter H, Huber S C. Regulation of sucrose and regulation of activity of key enzymes[J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2000, 19(1):31-67.
- [6] 郑国琦, 罗霄, 买立芸, 等. 不同品种宁夏枸杞果实糖积累差异的生理原因[J]. *农业科学研究*, 2009, 30(1):1-4.
- [7] Haouazine T N, Tymowska L Z, Takvorian A, et al. Characterization of two members of the *Arabidopsis thaliana* gene family, Atbfruct3 and Atbfruct4, coding for vacuolar invertases[J]. *Gene*, 1997, 197:239-251.
- [8] Lorenz K, Lienhard S, Sturm A. Structural organization and differential expression of carrot β -fructofuranosidase genes; identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme[J]. *Plant Mol Biol*, 1995(28):189-194.
- [9] Mercier R W, Gogarten J P. A second cell-wall acid invertase gene in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol*, 1995, 107:659-660.
- [10] Kim J Y, Mahe A, Sylvain G, et al. Characterization of two members of the maize gene family, Incw3 and Incw4, encoding cell-wall invertases[J]. *Gene*, 2000, 245:89-102.
- [11] Davies C, Robinson S P. Sugar accumulation in grape berries, cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111:275-283.
- [12] Xu J, Avigne W T, McCarty D R. A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both paths of sucrose metabolism. Evidence from a maize invertase gene family [J]. *Plant Cell*, 1996(8):1202-1220.
- [13] Sturm A. Molecular characterization and functional analysis of sucrose-cleaving enzymes in carrot (*Daucus carota* L.) [J]. *J Exp Bot*, 1996, 47:1187-1192.
- [14] Tymowska-Lalanne Z, Kreis M. Expression of the *Arabidopsis thaliana* invertase gene family[J]. *Planta*, 1998b, 207:259-265.
- [15] Ranwala A P, Baird W V, Miller W E. Organ specific localization and molecular properties of three soluble invertase from *Lilium longiflorum* flower buds[J]. *Physiologia Plantarum*, 1998, 103:551-559.
- [16] Lorenz K, Lienhard S, Sturm A. Structural organization and differential expression of carrot β -fructofuranosidase genes identification of a gene coding for a flower bud-specific isozyme [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28:189-194.
- [17] Godt D E, Roitsch T. Regulation and tissue specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests; an important function in establishing and maintaining sink metabolism[J]. *Plant Physiology*, 1997, 115:273-282.

Cloning and Tissues Expression Analysis of Soluble Acid Invertase Gene from *Lycium barbarum* L.

WANG Li-juan, ZHAO Hui, WANG Yan-cai, DING Xiang-zhen, MA Jian-ming
(College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Using *Lycium barbarum* L. ‘Ningqi No. 1’ as material, cloning and tissue expression analysis of SAI genes of *Lycium barbarum* L. was studied, and using MEGA 5.0 software to SAI genes for phylogenetic tree was analyzed. The results showed that by RT-PCR and RACE methods a SAI gene named as *LbSAI* (GenBank number: KC776575) was identified from *Lycium barbarum* L. the full length cDNA of *LbSAI* was 2 193 bp; the amino acid sequences of *LbSAI* were 68%~100% identical to the sequences of potato, tomato, pear etc. The putative protein encoded by *LbSAI* was belonged to cell wall invertase. Real-time PCR analysis showed that the *LbSAI* gene was the highest expressed in flower, the expression level reached the lowest level in root.

Key words: *Lycium barbarum* L.; soluble acid invertase(SAI); gene cloning; expression analysis