

文章编号:1000-8551(2010)06-1286-05

甜瓜属野生种铝胁迫诱导基因 *ChAI* 的克隆及序列分析魏 跃^{1,2} 王永平¹ 王全智¹ 史红林¹ 薄凯亮² 陈劲枫²

(1. 江苏农林职业技术学院,江苏 镇江 212400; 2. 南京农业大学,南方蔬菜遗传改良重点开放实验室,江苏 南京 210095)

摘要:应用同源序列克隆策略从铝盐胁迫处理的甜瓜属野生种(*Cucumis hystrix* Chakr.) 叶片中获得了 612bp 的片段,通过在 EST 数据库进行同源检索,发现一条甜瓜 EST 序列(GenBank 登录号:AM724963.2)与之高度同源,据此设计引物并经 RT-PCR 扩增和序列拼接,最后获得了铝诱导基因 cDNA 序列全长,命名为 *ChAI* (GenBank 登录号:FJ968438)。序列分析表明该基因全长 967bp,其中开放读码框(ORF)长 711bp 编码 236 个氨基酸组成的多肽,5' 和 3' 端非编码区长度各为 15bp 和 241bp。DNAMAN 同源性分析表明该基因与葡萄、棉花、羊乳(轮叶党参)、白骨壤(真红树植物)、拟南芥等植物的铝诱导蛋白的氨基酸序列具有 78.6% 以上的同源性。运用半定量 RT-PCR 技术对 *ChAI* 基因的转录水平进行分析,根据该基因在铝胁迫下大量表达推测 *ChAI* 与耐铝盐胁迫响应相关,但具体耐铝胁迫机制还有待深入研究。

关键词:甜瓜属野生种;表达序列标签;克隆;铝诱导

CLONING AND SEQUENCE ANALYSIS OF ALUMINUM-INDUCED GENE
ChAI FROM THE WILD *CUCUMIS* SPECIES (*Cucumis hystrix* Chakr.)

WEI Yue^{1,2} WANG Yong-ping¹ WANG Quan-zhi¹ SHI Hong-lin¹
BO Kai-liang² CHEN Jin-feng²

(1. Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Zhenjian, Jiangsu 212400;

2. Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetics Improvement, Nanjing Agricultural University, Nanjing Jiangsu 210095)

Abstract: Degenerated primers were designed based on conserved amino acids region of aluminum-induced protein from other plants, and a 612bp special fragment was amplified from the wild *Cucumis* species (*Cucumis hystrix* Chakr.) leaves under aluminum stress through homologous strategy. Using this fragment sequence data as a querying probe, one highly homologous melon EST sequence (Accession: AM724963.2) was detected. Primers designed based on this EST sequence, the full-length of aluminum-induced gene, designated as *ChAI* (GenBank Accession no: FJ968438), was obtained by RT-PCR method and sequence assembling. Sequence analysis showed that *ChAI* was 967bp in length, which encompassed an 711bp open reading frame (ORF) encoding 236 amino acid residues, and adjacent non-translation 15bp of 5'-terminal region and 241bp of 3'-terminal region, respectively. The results of DNAMAN homologous analysis demonstrated that *ChAI* had more than 78.6% identity of the amino acids residue with *Vitis vinifera*, *Gossypium hirsutum*, *Codonopsis lanceolata*, *Avicennia marina* and *Arabidopsis thaliana*. The transcription analysis of *ChAI* by semi-quantitative-PCR revealed the high expression under Al stress, the expression of *ChAI* was predicted to be related to anti-Al stress responsive mechanism, but its accurate function and anti-Al stress mechanism were still elusive and needed to

收稿日期:2010-04-12 接受日期:2010-06-21

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30830079),国家自然科学基金(No. 30671419, 30700541),国家高技术研究发展计划 863 专项经费(2008AA10Z150, 2006AA10Z1A8, 2006AA100108)

作者简介:魏 跃(1970-),男,湖北黄石人,博士,副教授,研究方向为园艺植物遗传育种与分子生物学。E-mail: wyue12170059@yahoo.cn

通讯作者:陈劲枫(1960-),重庆人,男,教授,博士生导师,研究方向为园艺蔬菜遗传与育种。E-mail: jfchen@njau.edu.cn

be further investigated.

Key words: *Cucumis hystrix* Chakr.; expressed sequence tags; clone; aluminum-induced

铝是地壳中的丰富金属元素,通常土壤中的铝以硅酸盐或其他沉淀物形式存在,对植物无毒性。然而在酸性土壤条件下($\text{pH} < 5$),铝的溶解度会大大增加,主要以 Al^{3+} 的形式对大多数植物产生毒害。生理学研究表明,植物在受到铝毒胁迫时表现出多方面的应对机制,如通过诱导有机酸的分泌、根际 pH 的提高、磷酸盐的分泌、酚类物质的分泌和黏胶的分泌将大量的铝拒于根表之外而免遭毒害^[1-3];通过细胞质中有机酸、蛋白质及其他有机化合物对铝的螯合、液泡的区室化^[4]将已吸收的铝转化为无毒性或毒性很小的结合形态,从而缓解乃至消除体内铝的毒害作用。

近年来植物在铝胁迫下的分子机制研究日益受到重视,迄今为止,在大田作物如小麦、玉米中已有多个铝胁迫诱导基因被克隆鉴定^[5-9],且多采用抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)技术^[10],而在园艺蔬菜中有关耐铝胁迫基因的研究少有报道。本研究利用甜瓜属野生种(*Cucumis hystrix* Chakr.)耐铝盐胁迫特性(另文发表),采用同源序列克隆策略并结合 EST 数据库信息对铝胁迫诱导基因进行了克隆,为深入研究耐铝胁迫响应分子机制和利用基因工程提高作物耐铝盐胁迫能力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为甜瓜属野生种(*Cucumis hystrix* Chakr.)种子由南京农业大学园艺学院黄瓜课题组提供。

M-MLV 反转录酶、PMD-19T Vector 载体、*Taq* 酶均为 TaKaRa 公司产品,DNA 纯化试剂盒、宿主菌大肠杆菌 TOP₁₀ 购自天根公司,TRIZOL 为美国 BIPEC 公司生产。

1.2 材料处理

将甜瓜属野生种种子播于装有营养土的塑料钵中,在苗期分为对照组(CK)和处理组 2 组,对照组浇灌 Hoagland 培养液,处理组则在浇灌的 Hoagland 培养液中加入 0.1 mol/L AlCl_3 ($\text{pH} 4.3$),每隔 1~2 d 浇灌 1 次,连续浇灌 3 次^[11],处理后 12、24 和 36 h 分别对植株叶片随机进行取样,液氮速冻后于 -80°C 下贮存用于总 RNA 的提取。

1.3 方法

1.3.1 甜瓜属野生种耐铝盐基因 *ChAI* cDNA 克隆

采用 TRIZOL 试剂法提取经铝胁迫处理叶片的 RNA,以 Oligo(dT)₁₄: 5'-GACTCGAG TCGAC ATCGA-TTTTTTTTTTTTTT-3'^[12,13] 为反转录引物,M-MLV 反转录酶合成第一链 cDNA。根据葡萄、棉花、羊乳(轮叶党参)、白骨壤(真红树植物)、拟南芥等植物铝盐胁迫诱导蛋白的保守氨基酸序列(RDRAPYP)设计 1 条上游简并引物 S_1 : 5'-GIGAYMGIGCICCCITAYCC-3',以 cDNA 为模板, S_1 和 Oligo(dT)₁₄ 为上下游引物进行 PCR 扩增,反应程序为:94℃ 3min;94℃ 30S,50℃ 30S,72℃ 1.5min,35 个循环;72℃ 10min。PCR 反应体系为 50 μl ,各组分最终浓度为 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 引物,0.1 mmol/L dNTP,1 \times *Taq* polymerase buffer (含 MgCl_2) 和 1.5U 的 *Taq* 聚合酶。将第 1 次 PCR 扩增产物稀释 10 倍,取 2 μl 做第 2 次 PCR 反应模板,反应程序、体系与第 1 次相同,将 PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测和分离,用 DNA 纯化试剂盒纯化后连接到 PMD-19T Vector 中,转化到 TOP₁₀ 感受态细胞,挑取单菌落放大培养,同上条件下进行 PCR 扩增检测,挑取阳性克隆由上海生工进行测序。

以取得的序列为信息探针,运行 BLAST 程序搜索 GenBank 的 EST 数据库,发现甜瓜 EST 序列(GenBank 登陆号:AM724963.2)核苷酸序列与之有高达 99% 同源一致性,根据该 EST 序列和已获得的序列设计一对上下游引物 S_2 : 5'-TTTGAAAGTGAAGCCATG-3'和 A_2 : 5'-CACCGACTTTATTAACC-3',进行 PCR 扩增获得 930bp 片断。经过测序运用 ContigExpress 软件将 2 个片断序列进行拼接,最终获得甜瓜属野生种铝盐胁迫诱导基因 *ChAI* cDNA 序列。

1.3.2 生物信息学分析 序列开放阅读框的查找、氨基酸翻译通过 ORF Finder 在线分析工具和 Primer 5.0 软件进行;氨基酸的分子结构、理化性质等预测在 <http://www.expasy.org/tools/ProtParam> 进行;跨膜结构域通过 TMHMM 在线分析,信号肽和剪切位点由 Signal P 3.0 预测;蛋白的二级结构通过 PHD 软件分析,运用 DNAMAN 软件进行氨基酸同源性比较分析。

1.3.3 *ChAI* 在铝盐胁迫后不同处理时期叶片中的表达分析 根据 *ChAI* cDNA 序列设计一对上下游引物,上游引物为 S_3 : 5'-TTTCGCCTTCATCGTCTTT-3',下游引物 A_3 : 5'-CCTCATTAGCAGGAACAGC-3',以 *actin* 为内标调整 cDNA 模板浓度,对 *ChAI* 在分别经过铝盐胁迫

迫 12、24 和 36h 后叶片中的表达水平进行半定量分析,同时设立没有经铝盐胁迫处理叶片为对照。

2 结果与分析

2.1 *ChAI* 基因的克隆

以经过铝胁迫处理后叶片 cDNA 第一链为模板, S_1 -Oligo(dT)₁₄ 为 1 对上下游引物,通过 2 次 PCR 扩增得到长度为 612bp 的片段(图 1-A),测序后以该序列信息为探针在 EST 数据库搜索,发现 1 条与之高度同源的甜瓜 EST 序列(GenBank 登陆号: AM724963.2),根据该 EST 序列和已知的 612bp 序列设计另 1 对上下游引物 S_2 - A_2 ,通过 PCR 扩增反应获得了序列长度为 930bp 的条带(图 1-B),经测序和对比,该条带序列 3'端与第 1 次获得的 612bp 长度序列有 575bp 的重叠区域(图 2),表明第 2 次扩增是第 1 次获得序列 5'端的成功延伸。运用 ContigExpress 软件将 2 条序列进行拼接,最终获得了长度为 967bp 的甜瓜属野生种铝胁迫诱导蛋白基因 cDNA 序列,命名为 *ChAI*(登录号为 FJ968438)。

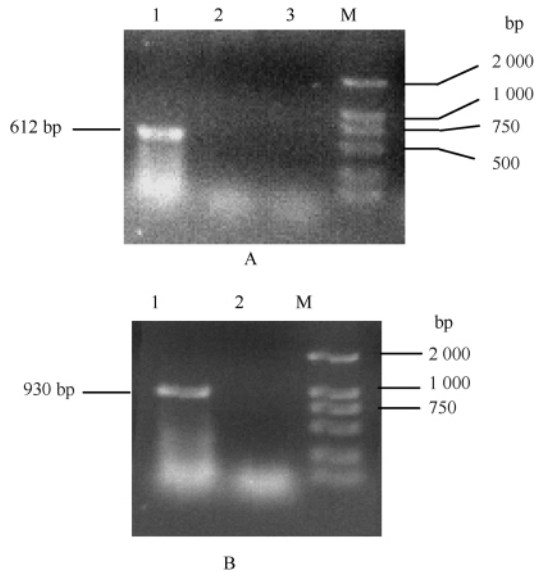


图 1 *ChAI* 基因的 cDNA RT-PCR 扩增产物
Fig. 1 RT-PCR amplification production of *ChAI* gene

A: *ChAI* 基因的 3'端扩增片段; B: *ChAI* 基因的 5'端上游延伸扩增片段; 1: RT-PCR 的扩增产物; 2、3: 阴性对照; M: DL2 000 DNA 标准分子量

A: 3' end fragment of *ChAI* gene; B: 5' upstream sustainable sequence of *ChAI* gene. Lane 1: product of RT-PCR; 2, 3: negative control of RT-PCR; M: DL2 000 marker

2.2 *ChAI* 基因分析

2.2.1 序列分析 通过 ORF Finder 等分析工具对 *ChAI* 序列进行分析(图 2),起始密码子 ATG 的上游有 15bp 的 5'端非编码区(5'UTR),终止密码子 TGA 下游有 241bp 的 3'端非编码区(3'UTR),序列末端有一个 polyA 多聚核苷酸结构,在 polyA 上游 16bp 处有 'AATAAA',该序列为典型的加尾信号,这些特征都表明获得的 *ChAI* 基因含有完整的开放阅读框(ORF)和 3'UTR。ProtParam 软件在线分析显示,*ChAI* 编码区长度为 711bp,编码一条 236 个氨基酸的多肽。推测蛋白分子量 25.31kD,总原子数目为 3551,分子式为 $C_{1134}H_{1768}N_{300}O_{341}S_8$,理论等电点为 6.08,属酸性蛋白,GRA-VY(Grand average of hydropathicity)值为 0.017,表明其为疏水蛋白,摩尔消光系数为 21680,不稳定参数为 37.24,属较稳定蛋白。

2.2.2 蛋白结构预测及同源性比对 TMHMM 软件分析显示 *ChAI* 无跨膜螺旋区,SignalP 3.0 分析显示其不含有信号肽、无信号锚定,最大断裂在 $A_{19} \sim G_{20}$ 间,其概率为 0.031。用 PHD 软件分析蛋白的二级结构 236 个氨基酸中有 112 个氨基酸具有卷曲(coil)构象,占全长比率为 47.46%,为该蛋白的构象主体;59 个氨基酸具有螺旋(helix)构象,比率为 25%;其余 65 个氨基酸具有伸展构象(strand),比率为 27.54%。应用 DNAMAN 软件进行同源性比较分析,显示 *ChAI* 与一些已知高等植物的铝诱导氨基酸有 67.8% ~ 84.3% 的同源性(表 2),其中与葡萄同源性最高,为 84.3%,其次是棉花为 82.2%,与羊乳、白骨壤、拟南芥的同源性依次为 80.9%、79.7%、78.6% 和 78.6%,而与油棕同源性较低,只有 67.8%。

表 2 *ChAI* 与其他物种铝诱导蛋白的相似性比较

Table 2 Alignment of *ChAI* with other plants

Al-induced proteins		
物种 species	GenBank 登陆号 accession number in GenBank	相似性 similarity (%)
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	XP 002280658	84.3
棉花 <i>Gossypium hirsutum</i>	AAQ74889	82.2
羊乳 <i>Codonopsis lanceolata</i>	AAW02789	80.9
白骨壤 <i>Avicennia marina</i>	AAK50814	79.7
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAK64050	78.6
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	AAM44947	78.6
芜菁 <i>Brassica rapa</i>	ABV89631	76.3
油菜 <i>Brassica napus</i>	BAA25999	74.6
油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	ACF06515	67.8

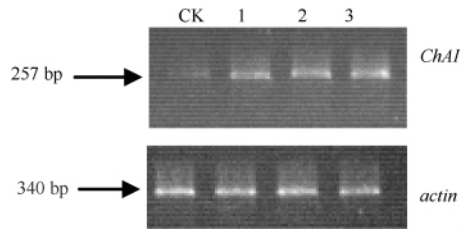


图3 *ChAI* 基因的半定量 RT-PCR 表达分析。
Fig. 3 Expression analysis of *ChAI* gene
by semi-QRT-PCR.

1、2、3 分别为铝胁迫后 12、24 和 36h *ChAI* 的表达量
Lane 1, 2, 3 the expression of *ChAI* in 12, 24,
36h after Al stress treatment, respectively

为克隆 3'UTR 序列提供了新的方法。

表达序列标签 (Expressed Sequence Tags, EST) 数据库信息可以帮助进行克隆, 具有简单、快速、针对性强等优点, 已成为一种广泛使用的基因克隆技术^[14, 15]。本研究中由于受到 EST 数据库丰富度的限制, 探针基因没有搜索到甜瓜属野生种的相关同源序列, 但获得了核苷酸序列同源性极高、来自亲缘关系较近的甜瓜 EST 序列, 根据该序列设计引物成功获得了部分 5' UTR 和完整的编码区序列。虽然 5' 端非编码区序列不完整, 但对研究基因功能和转基因利用没有影响。这表明充分利用亲缘关系相近物种的 EST 数据库信息资源, 可以加速目标物种基因的克隆。

本试验在前人研究基础上, 通过同源序列克隆结合利用 EST 数据库信息, 以具有耐铝胁迫特征的甜瓜属野生种 (*Cucumis hystrix* Chakr.) 为材料获得了 *ChAI* 基因的完整序列, 所推导的氨基酸序列与其他一些物种的铝诱导蛋白具有较高的同源性, 根据其在铝胁迫环境下大量诱导表达的情况, 推测该基因与抗铝盐胁迫响应相关, 但其具体性质与功能还不清楚。虽然通过相关软件对 *ChAI* 基因及其蛋白质结构进行了分析, 但目前还无法判断该基因是启动后续基因表达的某个特定的初级调控因子, 还是某种可以解除铝毒的大量表达后续响应基因, 其作用机理和具体功能等还需要进一步鉴定和验证。

参考文献:

[1] Larsen P B, Stenzler L M, Tai C Y. Molecular and physiological

analysis of Arabidopsis mutants exhibiting altered sensitivities to aluminum [J]. Plant and Soil, 1997, 192: 3 - 7

- [2] Zheng S J, Yang J L. Target sites of aluminum phytotoxicity [J]. Biol Plant, 2005, 49: 321 - 331
- [3] Delhaize E, Ryan P R. Aluminum toxicity and tolerance in plants [J]. Plant Physiol, 1995, 107: 315 - 32
- [4] Lazof D B, Goldsmith J G, Ruffy T W. Rapid uptake of aluminum into cells of intact soybean root tips: amicro analytical study using secondary ion mass spectrometry [J]. Plant Physiology, 1994, 106 (3): 1107 - 1114
- [5] Snowden K C, Gardner R C. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots [J]. Plant Physiol, 1993, 103: 855 - 861
- [6] Cruz Ortega R, Cusman J C, Ownby J. cDNA clones encoding 1 β -glucanase and a fimbrin-like cytoskeletal protein are induced by Al toxicity in wheat roots [J]. Plant Physiol, 1997, 114: 1453 - 1460
- [7] 汤 华, 郑用琏, 贺立源, 李建生. 玉米耐铝毒基因的分离 [J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31 (5): 507 - 514
- [8] 谷俊涛, 韩胜芳, 柏贵华, 肖 凯. 铝胁迫条件下小麦根系特异表达基因的研究 [J]. 作物学报, 2007, 33 (6): 1025 - 1028
- [9] Pellet D M, Papernik L A, Kochian L V. Multiple aluminum-resistance in wheat: roles of root apical phosphate and malate exudation [J]. Plant Physiol, 1996, 112: 591 - 597
- [10] Diatchenko L, Lau Y F, Campbell A P. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025 - 6030
- [11] Cancado G M A, Loguerio L L, Martins P R. Hematoxyoin staining as a phenotypic index for aluminum tolerance selection in tropical maize (*Zea mays* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 747 - 754
- [12] Iturbe-Ormaetxe I, Haralampidis K, Papadopoulou K. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* L. and *Lotus japonicus* L. [J]. Plant Mol Biol 2003, 51: 731 - 743
- [13] Hayashi H, Huang P, Takada S. Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra* L [J]. Biol Pharm Bull, 2004, 27: 1086 - 1092
- [14] Hou Fu Yun, Huang Ji, Lu Ju Fei. Isolation and expression analysis of plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33 (5): 441 - 448
- [15] 黄 骥, 王建飞, 张红生, 曹雅君, 林长发, 王 东, 杨金水. 水稻葡萄糖 - 6 - 磷酸脱氢酶 cDNA 的电子克隆 [J]. 遗传学报, 2002, 29 (11): 1012 - 1016

(责任编辑 邱爱枝)