

朝鲜碱茅 Δ' -吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS) 基因的克隆及表达分析

徐 博^{1,2},任 伟³,徐安凯³,王志锋³,孙启忠¹

(1. 中国农业科学院 草原研究所 内蒙古 呼和浩特 010010; 2. 中国农业科学院 研究生院 北京 100081; 3. 吉林省农业科学院 吉林 公主岭 136100)

摘要:脯氨酸在提高植物抗逆性方面起着非常重要的作用。本研究以朝鲜碱茅茎叶组织提取的 RNA 为模板,根据已报道的 P5CS 基因同源序列设计引物,通过 RT-PCR 法扩增出 1 个 P5CS 的 cDNA 序列,全长 2 158 bp,是一个完整开放阅读框,编码含 716 个氨基酸的蛋白,Genbank 登陆号为: HQ637435。与其他植物 P5CS 基因进行同源性比对的结果显示,朝鲜碱茅 P5CS 基因的核苷酸和氨基酸序列与小麦的同源性最高。并对其信号肽、疏水性、跨膜结构、二级结构和主要功能域做了预测。半定量 RT-PCR 结果表明, *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅的根部和叶片均有表达,但是根部的表达量较低,叶片中的表达量较高,在 4 种胁迫处理条件下,表达规律也不尽相同。

关键词:朝鲜碱茅; Δ' -吡咯啉-5-羧酸合成酶; 基因克隆

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)06-0020-07

Molecular Cloning and Expression Analysis of Delta 1-pyrroline-5-carboxylate Synthetase(P5CS) Gene in *Puccinellia chinampoensis*

XU Bo^{1,2}, REN Wei³, XU An-kai³, WANG Zhi-feng³, SUN Qi-zhong¹

(1. Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Huhhot 010010, China;

2. Graduate School, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081, China; 3. Academy of

Agriculture Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase(P5CS) plays a critical role in improving the stress tolerance of plants. In this study, the full length cDNA sequence of P5CS gene was cloned from Alkaligrass(*Puccinellia chinampoensis*) leaves using RT-PCR method, the primers were designed according to the homologous P5CS gene sequences of other plant species. Sequence analysis showed that the nucleotide sequence of this gene is 2 158 bp, containing a complete open reading frame and encoding 716 amino acids, Genbank: HQ637435. Nucleotide and amino acid sequence analysis revealed that *PuP5CS* shares high identity with the orthologs from *Triticum aestivum*. And its signal peptide, hydrophobicity/hydrophilic, trans-membrane domain, secondary structure and main functional domains were predicted. Semi-quantitative RT-PCR analysis showed that *PuP5CS* expressed in different tissues, but the expression in root was lower, and in leaf much higher. Various elevated levels of *PuP5CS* expression have been detected when exposed to 4 different stress experimental treatment, and the results was not the same.

Key words: *Puccinellia chinampoensis*; P5CS; Gene clone

细菌、真菌和植物在遇到高盐、干旱和低温等外界恶劣环境时,常通过积累体内脯氨酸来达到渗透调节的作用^[1]。脯氨酸作为一种细胞相容性的有机小分子物质,具有调节细胞渗透势、稳定蛋白质、膜系统和亚细胞结构以及清除活性氧的作用,是一

种重要的渗透调节保护剂^[2]。已有研究表明,植物体内脯氨酸的合成有两条途径,根据起始氨基酸分别命名为谷氨酸(Glu)途径和鸟氨酸(Orn)途径。其中谷氨酸途径在干旱胁迫和缺少氮素的情况下起主导作用^[3]。谷氨酸在 Δ' -吡咯啉-5-羧酸合成酶(Delta 1-

收稿日期:2011-09-01

基金项目:国家牧草产业技术体系

作者简介:徐 博(1982-),男,吉林人,在读博士,主要从事牧草分子生物学研究。

通讯作者:孙启忠(1959-),男,内蒙古五原人,研究员,博士,博士生导师,主要从事草地生态与牧草生产技术研究。

pyrroline-5-carboxylate synthetase, P5CS) 的作用下发生磷酸化和谷氨酸- γ -半醛还原形成吡咯琳-5-羧酸 (P5C), P5C 再在 Δ^1 -吡咯琳-5-羧酸还原酶 (P5CR) 催化下生成脯氨酸^[4]。可以看出, P5CS 具有谷氨酸激酶 (γ -GK) 和谷氨酰- γ -半醛脱氨酶 (GSADH) 的活性, 是一个双功能酶, 催化脯氨酸合成过程中的前 2 步反应^[5], 是脯氨酸合成途径的限速酶。

研究发现, 在水分胁迫下, 拟南芥体内的脯氨酸含量与 P5CS 基因的 mRNA 表达水平成正相关, 而与 P5CR 基因的 mRNA 表达水平没有明显的相关性, 无论是干旱、盐胁迫或是 ABA, 都不能明显提高 P5CR 的表达水平^[6]。转入 P5CR 基因的烟草的脯氨酸含量增长不明显, 而转 P5CS 基因的烟草的脯氨酸水平却显著提高^[7]。此外, 在转基因水稻 (*Oryza sativa*)^[8]、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)^[9]、黑麦草 (*Lolium perenne*)^[10]、冰草 (*Agropyron cristatum*)^[11] 和菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)^[12] 等植物的研究中发现, 单独转化 P5CS 基因就可以提高植株脯氨酸的含量, 起到抗旱、耐盐的作用。因此 P5CS 是植物通过谷氨酸途径合成脯氨酸的关键酶。

目前, P5CS 基因已经在豇豆 (*Vigna unguiculata*)^[5]、大豆 (*Glycine max*)^[13]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)^[14]、蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula Gaertn*)^[15]、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)^[16]、水稻 (*Oryza sativa*)^[17] 和小叶杨 (*Populus simonii Carr*)^[18] 等植物中陆续被克隆, 但是有关碱茅 P5CS 基因的研究尚未报道, 而碱茅作为盐碱地的先锋植物, 是一种宝贵的盐生植物种质资源^[19]。因此, 本研究利用 RT-PCR 的方法在朝鲜碱茅 (*Puccinellia chinampoensis*) 中分离到一个 P5CS 的同源新基因, 命名为: *PuP5CS*, 对其序列进行相关生物信息学分析, 并研究了其在不同人工胁迫条件下的表达情况, 为进一步研究脯氨酸在碱茅中的抗寒、耐盐碱作用机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料为朝鲜碱茅, 由吉林省农业科学院草地所提供。将种子用 15% 的次氯酸钠溶液消毒 15 min, 无菌水清洗 5 次, 置于洁净的培养皿中, 暗培养直至种子萌发。然后将幼苗移栽至培养基质中 (黑土: 蛭石: 珍珠岩 = 3: 1: 1), 每盆 12 株, 于 20℃/15℃ (昼/夜) 温室中正常生长, 大约 14 d 后, 待其长出五叶一心时, 处理备用。为了研究 *PuP5CS* 基因的表达情况, 本试验设计了以下 4 种不同的胁迫

处理: 盐胁迫 (1.5% NaCl)、碱胁迫 (1.5% Na₂CO₃)、干旱胁迫 (20% PEG) 和盐碱复合胁迫 (1.5% NaCl + 1.5% Na₂CO₃)。分别于处理的 0, 3, 6, 12, 24, 48 h 剪取碱茅叶片和须根, 液氮速冻 (-70℃) 保存。

TRNzol 试剂为北京天根公司提供, PMD18-T 载体、Taq 酶产品由 TakaRa 公司提供, 反转录酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒由 MBI Fermentas 公司提供, 大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存, 其余为国产分析纯试剂。

1.2 总 RNA 的提取

取不同处理的朝鲜碱茅叶片, 参照北京天根公司的 TRNzol 试剂说明书逐步提取总 RNA, 质量和浓度的确定采用 1.0% 甲醛变性凝胶电泳检测。

1.3 RT-PCR

以提取的总 RNA 为模板, 经反转录合成 cDNA 第一链。根据已发表的 P5CS 基因序列设计一对全长引物 P1 (5'-GCGGCCATGGCCACCGCGGACC-3') 和 P2 (5'-CTCATTGCAAAGGAAGGTTCTTATG-3'), 由上海生工生物工程技术有限公司合成。以反转录产物 cDNA 作为 DNA 模板, 在 25 L 体系中加入下列成分: DNA template 1 μ L, P1 1 μ L, P2 1 μ L, ddH₂O 10 μ L, PCR-Mix 12 μ L。扩增条件: 94℃ 预变性 1 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 32 个循环。

1.4 P5CS 基因的克隆及测序

将 RT-PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 并用试剂盒回收目的片段。取回收产物与 pMD18-T Vector 连接过夜。转化感受态大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆。将阳性重组子培养后快速提取质粒并鉴定。然后将样品送上海生工生物工程有限公司测序。

1.5 序列分析

PuP5CS 基因生物信息学分析采用下列方法:

①核苷酸序列同源性比对由 NCBI 的 BLAST 程序进行。②氨基酸的多重序列比较, 等电点, 分子量的预测以及进化树的构建由 DNAMAN 软件完成。③蛋白质疏水性、跨膜结构、二级结构分别由 ProtScale, TMHMM 和 HNN 软件来预测, 使用信号肽预测工具 SignalP 分析信号肽。④蛋白质保守结构域 (Domains) 由 Smart 程序来推测。

1.6 朝鲜碱茅 *PuP5CS* 基因在不同胁迫处理下的组织表达分析

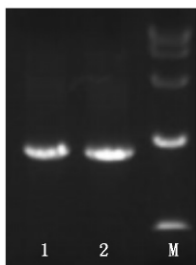
用上述方法提取不同处理条件下朝鲜碱茅叶片或根部总 RNA, 反转录合成 cDNA。根据测序后的全长序列设计 5' 端引物 (5'-GCAACGACTAAGAT-

TCCTGTTCTT-3') 和 3' 端引物(5'-CTCATTGCAAAG-GAAGGTTCTTATG-3') 以 *Actin* 基因为内标(Genebank 登录号: FJ545641), 采用半定量 RT-PCR 的方法分析 *PuP5CS* 基因的表达情况, 反应条件为退火温度 56℃, 24 个循环, 反应产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。

2 结果与分析

2.1 朝鲜碱茅 *PuP5CS* 基因的克隆与分析

用设计的全长引物对朝鲜碱茅 cDNA 进行扩增, 获得了 2 100 bp 左右的条带(图 1)。将此条带进行回收, 连接转化, 筛选阳性克隆, 挑取阳性克隆摇菌提取质粒, 经 PCR 鉴定, 电泳后也得到约 2 100 bp 的条带(图 2), 并且与 cDNA 的 PCR 扩增产物电泳位置相同。对测序结果进行分析表明, 获得的 *PuP5CS* 基因全长 2 158 bp, 包括起始密码子(ATG)和终止密码子(TAG), 是一个完整的开放阅读框, 编码 716 个氨基酸, 推测其蛋白质分子量为: 77.68 kDa, 等电点: 6.10, 并登陆 Genebank: HQ637435。将其核酸序列用 NCBI 的 BLAST 程序检索比对发现, 与其他植物的 *P5CS* 基因有着较高的同源性: 小麦(*Triticum aestivum*) 92%, 水稻(*Oryza sativa Japonica*) 86%, 甘蔗(*Saccharum*) 85%, 玉米(*Zea mays*) 84%, 大麦(*Hordeum vulgare*) 78%, 猕猴桃(*Actinidia chinensis*) 74%, 赖草(*Leymus secalinus*, 部分) 92%, 珍珠粟(*Pennisetum glaucum*, 部分) 84%, 獐茅(*Aeluropus sinensis*, 部分) 85%。测序结果和核苷酸序列的同源性对比验证了该基因的准确性。



M. Marker, 从上至下: 15, 10, 5, 2.5, 1 kb.
M. Marker, from up to down: 15, 10, 5, 2.5, 1 kb.

图 1 RT-PCR 电泳

Fig. 1 The electrophoresis of RT-PCR

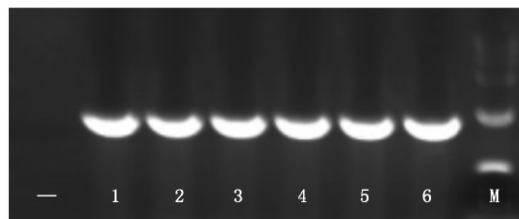
2.2 信号肽的预测与分析

神经网络算法的预测结果表明(图 3), *PuP5CS* 编码蛋白的原始剪切位点分值(C 值)、信号肽分值(S 值)和综合剪切位点分值(Y 值)均比较低, 无氨基酸残基位点, 因此, 它可能不存在导肽酶切位点, 没有信号肽, 是一个非分泌蛋白。

2.3 疏水性的预测与分析

蛋白质疏水性分析对于研究其跨膜特征和二级

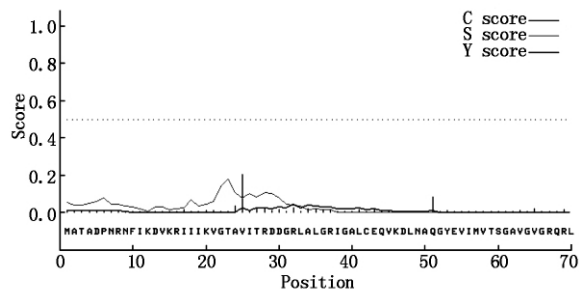
结构有着重要的指导意义, 通常认为, 氨基酸分值越低亲水性越强和分值越高疏水性越强。如图 4 所示, *PuP5CS* 编码氨基酸序列的第 408 位氨基酸分值最高, 为 2.789, 疏水性最强, 第 70 位氨基酸分值最低, 为 -2.589, 亲水性最强, 而就整体分析而言, 亲水性氨基酸均匀分布在整個多肽链中, 没有明显的疏水性区域, 因此, 推测 *PuP5CS* 编码蛋白是一个亲水性蛋白。



- . 负对照。
- . Negative control.

图 2 阳性克隆 PCR 鉴定

Fig. 2 The PCR of positive cloning



C score. 原始剪切位点的分值; S score. 信号肽的分值;
Y score. 综合剪切位点的分值。
C score. Score of cleavage site; S score. Score of signal peptide;
Y score. Score of comprehensive cleavage sites.

图 3 *PuP5CS* 编码蛋白信号肽分析

Fig. 3 Analysis on the signal peptide encoded by *PuP5CS*

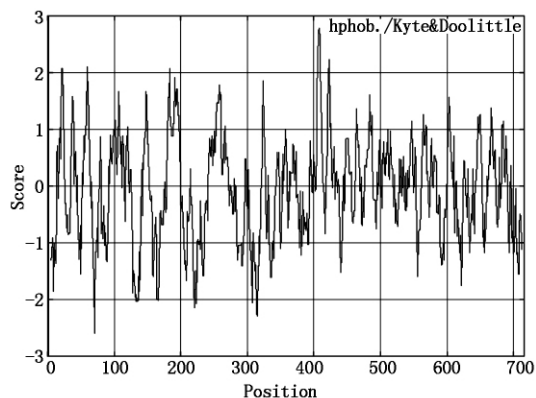


图 4 *PuP5CS* 编码蛋白的疏水性/亲水性预测

Fig. 4 Predicted hydrophobicity/hydrophilic for *PuP5CS*

2.4 跨膜结构域的预测

TMHMM 的预测结果表明(图 5), 朝鲜碱茅 *P5CS* 蛋白的整条肽链位于细胞膜外面, 不具有跨膜结构域, 与疏水性分析结果相一致, 与水稻^[17] 和黑麦草^[7] *P5CS* 蛋白的分析结果相类似。

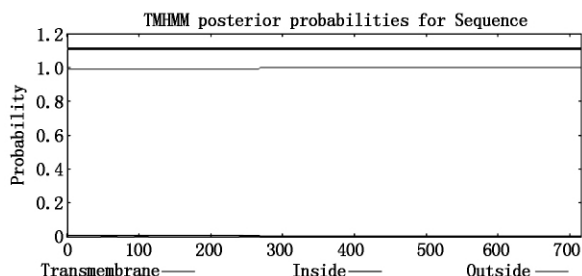
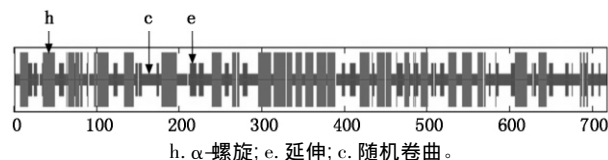


图 5 *PuP5CS* 编码蛋白跨膜结构域的预测结果
Fig.5 Trans-membrane domain prediction result of *PuP5CS*



h. α -螺旋; e. 延伸; c. 随机卷曲。

h. Alpha helix; e. Extended; c. Random coil.

图 6 *PuP5CS* 二级结构预测结果
Fig.6 Secondary structure prediction result of *PuP5CS*

TriticumMAGPIPRSEMKDKVRIIKVGTAVITR.NDGRLLMGRIGLCEQVKDLNACGMEVIMVSGAVGVGRQRIYRKINSSSFADLQK	85
OryzaMASVIPSSEVRDVRRVIRKVGIAVWSR.QDGRLLMGRIGLCEQVKDLNACGMEVIMVSGAVGVGRQRIYRKINSSSFADLQK	85
SaccharumMATPRRTRPMKDKVRIIKVGTAVITR.HDGRLLMGRIGLCEQVKDLNACGMEVIMVSGAVGVGRQRIYRKINSSSFADLQK	85
ZeaMATPRRTRPMKDKVRIIKVGTAVITR.HDGRLLMGRIGLCEQVKDLNACGMEVIMVSGAVGVGRQRIYRKINSSSFADLQK	86
ActinidiaMDAVSTRRVRKVRVIRKVGIAVITR.ADGRLLMGRIGLCEQVKDLNACGMEVIMVSGAVGVGRQRIYRKINSSSFADLQK	85
PuccinelliaAAMATPIPRSEIKDKVRIIKVGTAVITR.DDGRLLMGRIGLCEQVKDLNACGMEVIMVSGAVGVGRQRIYRKINSSSFADLQK	87
Hordeum	MGRGGIGGAVAAADLENSESTRRVRKVRVIRKVGIAVITR.CDGRLLMGRIGLCEQVKDLNACGMEVIMVSGAVGVGRQRIYRKINSSSFADLQK	99
Consensus	d r f vkr kvgtav grla gr g lceq ln g evi vsgavgvgr qri yrkl nssfadiq	
Triticum	PQMLDGRACAAGVCGSLMAYDLEFLQDVSSQLLVITDSDFNSKFRERFRETIVSLDETRVDFNFENDASTRAPYEDSGIFWINDSLACILLAL	185
Oryza	PQMLDGRACAAGVCGSLMAYDLEFLQDVSSQLLVITDSDFNSKFRERFRETIVSLDETRVDFNFENDASTRAPYEDSGIFWINDSLACILLAL	185
Saccharum	PQMLDGRACAAGVCGSLMAYDLEFLQDVSSQLLVITDSDFNSKFRERFRETIVSLDETRVDFNFENDASTRAPYEDSGIFWINDSLACILLAL	185
Zea	PQMLDGRACAAGVCGSLMAYDLEFLQDVSSQLLVITDSDFNSKFRERFRETIVSLDETRVDFNFENDASTRAPYEDSGIFWINDSLACILLAL	186
Actinidia	PQMLDGRACAAGVCGSLMAYDLEFLQDVSSQLLVITDSDFNSKFRERFRETIVSLDETRVDFNFENDASTRAPYEDSGIFWINDSLACILLAL	185
Puccinellia	PQMLDGRACAAGVCGSLMAYDLEFLQDVSSQLLVITDSDFNSKFRERFRETIVSLDETRVDFNFENDASTRAPYEDSGIFWINDSLACILLAL	187
Hordeum	PQMLDGRACAAGVCGSLMAYDLEFLQDVSSQLLVITDSDFNSKFRERFRETIVSLDETRVDFNFENDASTRAPYEDSGIFWINDSLACILLAL	199
Consensus	pq ldgkacaavqg gl a yd lf qldv s qlvtd df f l etv sll l v p fnenda str apyed sgifw indsla lla	
Triticum	ELADLLVLSDEVGLYSFSESSSKRIHTYIKERKHYHEIFGKSRVGRGGMAKVAACAAVWASTGGEVIVITSGCASQSVKVIKGERIGTLFFERKAS	285
Oryza	ELADLLVLSDEVGLYSFSESSSKRIHTYIKERKHYHEIFGKSRVGRGGMAKVAACAAVWASTGGEVIVITSGCASQSVKVIKGERIGTLFFERKAS	285
Saccharum	ELADLLVLSDEVGLYSFSESSSKRIHTYIKERKHYHEIFGKSRVGRGGMAKVAACAAVWASTGGEVIVITSGCASQSVKVIKGERIGTLFFERKAS	284
Zea	ELADLLVLSDEVGLYSFSESSSKRIHTYIKERKHYHEIFGKSRVGRGGMAKVAACAAVWASTGGEVIVITSGCASQSVKVIKGERIGTLFFERKAS	286
Actinidia	ELADLLVLSDEVGLYSFSESSSKRIHTYIKERKHYHEIFGKSRVGRGGMAKVAACAAVWASTGGEVIVITSGCASQSVKVIKGERIGTLFFERKAS	285
Puccinellia	ELADLLVLSDEVGLYSFSESSSKRIHTYIKERKHYHEIFGKSRVGRGGMAKVAACAAVWASTGGEVIVITSGCASQSVKVIKGERIGTLFFERKAS	287
Hordeum	ELADLLVLSDEVGLYSFSESSSKRIHTYIKERKHYHEIFGKSRVGRGGMAKVAACAAVWASTGGEVIVITSGCASQSVKVIKGERIGTLFFERKAS	299
Consensus	el adll lsdv gly sp s p sk ihtyi i fg ksrvggqgm akv aa a q p vi s qe agtlfh a	
Triticum	LWESKSTVREMAVAPARDOSRRQLNLSSEDRKILLDADALPANELLRSENEADVAQAQAGYEKSLIRLTLKPGKIASLARSRTIARMEPFIHQ	385
Oryza	LWESKSTVREMAVAPARDOSRRQLNLSSEDRKILLDADALPANELLRSENEADVAQAQAGYEKSLIRLTLKPGKIASLARSRTIARMEPFIHQ	385
Saccharum	LWESKSTVREMAVAPARDOSRRQLNLSSEDRKILLDADALPANELLRSENEADVAQAQAGYEKSLIRLTLKPGKIASLARSRTIARMEPFIHQ	384
Zea	LWESKSTVREMAVAPARDOSRRQLNLSSEDRKILLDADALPANELLRSENEADVAQAQAGYEKSLIRLTLKPGKIASLARSRTIARMEPFIHQ	386
Actinidia	KWAFVGDVGRADMAVAPARDOSRRQLNLSSEDRKILLDADALPANELLRSENEADVAQAQAGYEKSLIRLTLKPGKIASLARSRTIARMEPFIHQ	385
Puccinellia	LWESKSTVREMAVAPARDOSRRQLNLSSEDRKILLDADALPANELLRSENEADVAQAQAGYEKSLIRLTLKPGKIASLARSRTIARMEPFIHQ	387
Hordeum	WDCREKVTREMAVAPARDOSRRQLNLSSEDRKILLDADALPANELLRSENEADVAQAQAGYEKSLIRLTLKPGKIASLARSRTIARMEPFIHQ	399
Consensus	w r m v a sr lq s r killd adale n li enead a agy l r k k sla s r a me pi	
Triticum	ILKRTVADGLVLEKTSQPLGVLLIFESRPDALVQIASLARSNGNGLKGGKEARNSATLHKVITNFIHNVGERLIGLVTIRDEIDLLKDDVID	485
Oryza	ILKRTVADGLVLEKTSQPLGVLLIFESRPDALVQIASLARSNGNGLKGGKEARNSATLHKVITNFIHNVGERLIGLVTIRDEIDLLKDDVID	485
Saccharum	ILKRTVADGLVLEKTSQPLGVLLIFESRPDALVQIASLARSNGNGLKGGKEARNSATLHKVITNFIHNVGERLIGLVTIRDEIDLLKDDVID	484
Zea	ILKRTVADGLVLEKTSQPLGVLLIFESRPDALVQIASLARSNGNGLKGGKEARNSATLHKVITNFIHNVGERLIGLVTIRDEIDLLKDDVID	486
Actinidia	VLKRTVADGLVLEKTSQPLGVLLIFESRPDALVQIASLARSNGNGLKGGKEARNSATLHKVITNFIHNVGERLIGLVTIRDEIDLLKDDVID	485
Puccinellia	ILKRTVADGLVLEKTSQPLGVLLIFESRPDALVQIASLARSNGNGLKGGKEARNSATLHKVITNFIHNVGERLIGLVTIRDEIDLLKDDVID	487
Hordeum	ILKRTVADGLVLEKTSQPLGVLLIFESRPDALVQIASLARSNGNGLKGGKEARNSATLHKVITNFIHNVGERLIGLVTIRDEIDLLKDDVID	499
Consensus	lk te lv ek plgvllif fesrpdalvqia la rsgngl kggkea rsn lkhvit ip vg ligl i dlk dvid	
Triticum	LVIIPRGSNVLVQIRSTRIFVLGHADGCHVYDKSAMDMARRVMDARLDYPAACNAMETLLVHKDLMKTFPNDILVAKTAGVNLVCGVFAHKVL	585
Oryza	LVIIPRGSNVLVQIRSTRIFVLGHADGCHVYDKSAMDMARRVMDARLDYPAACNAMETLLVHKDLMKTFPNDILVAKTAGVNLVCGVFAHKVL	585
Saccharum	LVIIPRGSNVLVQIRSTRIFVLGHADGCHVYDKSAMDMARRVMDARLDYPAACNAMETLLVHKDLMKTFPNDILVAKTAGVNLVCGVFAHKVL	584
Zea	LVIIPRGSNVLVQIRSTRIFVLGHADGCHVYDKSAMDMARRVMDARLDYPAACNAMETLLVHKDLMKTFPNDILVAKTAGVNLVCGVFAHKVL	586
Actinidia	LVIIPRGSNVLVQIRSTRIFVLGHADGCHVYDKSAMDMARRVMDARLDYPAACNAMETLLVHKDLMKTFPNDILVAKTAGVNLVCGVFAHKVL	585
Puccinellia	LVIIPRGSNVLVQIRSTRIFVLGHADGCHVYDKSAMDMARRVMDARLDYPAACNAMETLLVHKDLMKTFPNDILVAKTAGVNLVCGVFAHKVL	587
Hordeum	LVIIPRGSNVLVQIRSTRIFVLGHADGCHVYDKSAMDMARRVMDARLDYPAACNAMETLLVHKDLMKTFPNDILVAKTAGVNLVCGVFAHKVL	599
Consensus	l prgsn lv qik tkipvlghadg chvy dks m mak v dak dypaacnametllvhkd l 1 l gv gp a l	
Triticum	GFEKALSHHEYSYSACTEVDVQSAIDHIFRGSHTDCVITDDKVAETFLRCVDSAPVFNASTRFDGFRFLGAEVGISTGRIHARGFVGVB	685
Oryza	GFEKALSHHEYSYSACTEVDVQSAIDHIFRGSHTDCVITDDKVAETFLRCVDSAPVFNASTRFDGFRFLGAEVGISTGRIHARGFVGVB	685
Saccharum	CIEKALSHHEYSYSACTEVDVQSAIDHIFRGSHTDCVITDDKVAETFLRCVDSAPVFNASTRFDGFRFLGAEVGISTGRIHARGFVGVB	684
Zea	CIEKALSHHEYSYSACTEVDVQSAIDHIFRGSHTDCVITDDKVAETFLRCVDSAPVFNASTRFDGFRFLGAEVGISTGRIHARGFVGVB	686
Actinidia	HIEKALSHHEYSYSACTEVDVQSAIDHIFRGSHTDCVITDDKVAETFLRCVDSAPVFNASTRFDGFRFLGAEVGISTGRIHARGFVGVB	685
Puccinellia	GFEKALSHHEYSYSACTEVDVQSAIDHIFRGSHTDCVITDDKVAETFLRCVDSAPVFNASTRFDGFRFLGAEVGISTGRIHARGFVGVB	687
Hordeum	KVEKALSHHEYSYSACTEVDVQSAIDHIFRGSHTDCVITDDKVAETFLRCVDSAPVFNASTRFDGFRFLGAEVGISTGRIHARGFVGVB	699
Consensus	p s h eyss act e vdd ai hi r gs htd t d a f vds v nastxf dg rfglgaevgis rihargpvqv	
Triticum	LLITRNLIRGSGQVVGDKRDVYTHRSPLQ	716
Oryza	LLITRNLIRGSGQVVGDKRDVYTHRSPLQ	716
Saccharum	LLITRNLIRGSGQVVGDKRDVYTHRSPLQ	715
Zea	LLITRNLIRGSGQVVGDKRDVYTHRSPLQ	717
Actinidia	LLITRNLIRGSGQVVGDKRDVYTHRSPLQ	716
Puccinellia	LLITRNLIRGSGQVVGDKRDVYTHRSPLQ	718
Hordeum	LLITRNLIRGSGQVVGDKRDVYTHRSPLQ	730
Consensus	llttr rg sgqv gdg ythk l	

I. ATP 结合位点; II. 假定的亮氨酸保守域; III. 谷氨酸激酶保守域; IV. NADPH 结合保守域; V. 谷氨酰胺半脱氢酶保守域; \downarrow . 苯丙氨酸位点。

I. ATP binding site; II. Conserved Leu zipper; III. Glu-5-kinase domain; IV. NADPH binding domain;

V. GSA-DH domain; \downarrow . Indicate Phenylalanine.

图 7 *PuP5CS* 氨基酸序列与其他植物同源序列的比对

Fig.7 Comparison of the amino acid sequences about *PuP5CS* with other plants

2.5 二级结构的预测分析

蛋白质二级结构是构成三级结构的基础,对其空间结构和功能有着重要意义。预测结果表明(图6) *PuP5CS* 编码蛋白的肽链有301个氨基酸参与了 α -螺旋结构,占到了42.04%;有290个氨基酸构成了随机卷曲,占到了40.50%;有125个氨基酸参与了延伸链结构,占到了17.46%;其中 α -螺旋结构和随机卷曲占据了大多数。

2.6 保守结构域的预测与对比

朝鲜碱茅 *PuP5CS* 的高度保守区域与其他高等植物是一致的,包括5个主要功能域:谷氨酰激酶(GK)结构域,谷氨酸半醛(GSA)结构域,亮氨酸结构域,ATP和NADPH结合位点,说明 *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅脯氨酸合成中起重要作用。除谷氨酰激酶(GK)结构域外,其他4个功能域的差异都较小,说明P5CS蛋白质的主要功能域相对保守。已有的研究表明,豇豆 *VaP5CS* 氨基酸序列的129位点^[5]和黑麦草 *LpP5CS* 氨基酸序列的128位点^[7]均存在脯氨酸的保守反馈抑制位点-苯丙氨酸(Phenylalanine, F),该位点的突变能使脯氨酸合成酶的反饋抑制作用丧失^[20]。本研究中朝鲜碱茅 *PuP5CS* 氨基酸序列的130位点也发现苯丙氨酸,说明其活性可

能被高浓度脯氨酸所抑制(图7)。

2.7 氨基酸同源性分析与系统进化树的构建

利用 DNAMAN 序列分析软件对朝鲜碱茅 *PuP5CS* 蛋白氨基酸序列和其他6种植物进行对比(图7),发现它们之间的相似性很高,依次为:小麦(AY888045)94%,水稻(D49714)87%,甘蔗(EU113257)86%,玉米(BT083588)86%,猕猴桃(U92286)76%,大麦(AK251855)73%,与核苷酸的同源性分析结果基本一致。表明朝鲜碱茅与同属的禾本科植物有着很高的氨基酸序列同源性,但是在长期的进化过程中,由于生长方式和环境的不同,造成不同物种又具有自身的特异性。其中禾本科大麦的P5CS氨基酸序列有些特殊,N端比其他植物多出13个氨基酸。

从构建的P5CS氨基酸序列系统发育树状图(图8)可以看出:以0.020为结点,可以分为4组,第1组为:苜蓿、蓖麻、四季豆和杨树;第2组为:拟南芥和芸薹属;第3组为:甘蔗、玉米、水稻、小麦和朝鲜碱茅;第4组是大麦。其中朝鲜碱茅和小麦的同源关系最近,大麦和其他植物P5CS氨基酸序列的同源关系比较远,这与前面核苷酸序列的同源性分析结果相一致。

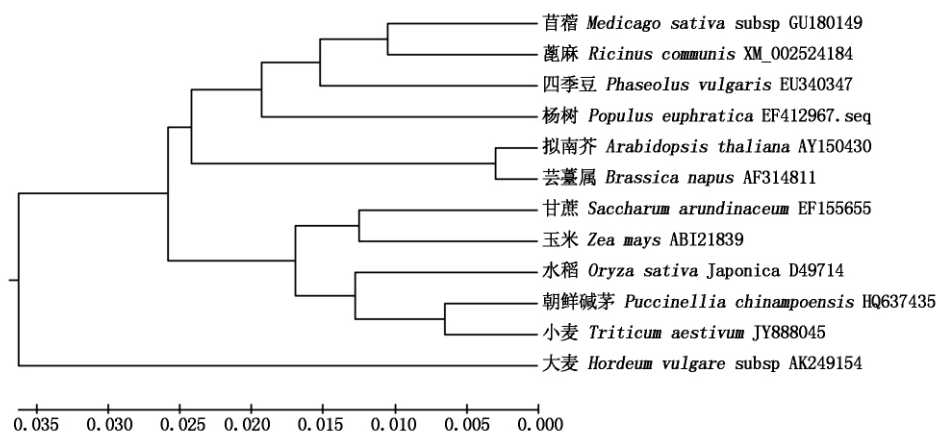


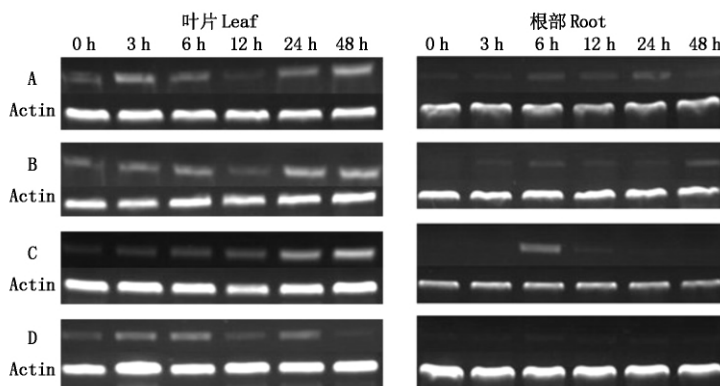
图8 进化树分析

Fig. 8 Analysis of homology-tree

2.8 不同胁迫处理下 *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅叶和根中的表达

半定量 RT-PCR 结果表明 *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅的根部和叶片均有表达,但是根部的表达量较低,叶片中的表达量较高。在根部 *PuP5CS* 基因受盐胁迫、碱胁迫和盐碱复合胁迫诱导的表达量比受干旱胁迫诱导的表达量要高,在叶片中4种胁迫处理均可以诱导 *PuP5CS* 基因显著表达,但变化规律不同。如图9所示,在盐胁迫或碱胁迫的处理条件下 *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅叶片中的表达量,于处

理48 h最高,处理12 h最低,随着处理时间的逐渐延长,总体呈现出先增加后降低,然后又升高的变化态势。在盐碱复合胁迫的处理条件下, *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅叶片中的表达量随着时间的延长逐渐增加。在干旱胁迫处理的条件下, *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅叶片中的表达量,于处理12 h和48 h有突然降低的现象。总的来看,朝鲜碱茅 *PuP5CS* 基因受盐、碱、干旱的诱导而显著表达,但叶片中的表达量在4种胁迫处理后的12 h均比较低。



A. 1.5% NaCl; B. 1.5% Na_2CO_3 ; C. 1.5% NaCl + 1.5% Na_2CO_3 ; D. 20% PEG; Actin. 内参。

图9 朝鲜碱茅 *PuP5CS* 基因在叶和根中的表达

Fig. 9 Analysis of *PuP5CS* gene expression in leaf and root of *Puccinellia chinampoensis*

3 讨论

土壤干旱、盐渍化是影响我国粮食生产的重要因素。随着分子生物学技术的飞速发展,植物基因工程研究已取得很多进展^[21]。通过分离克隆植物抗旱、耐盐碱的相关功能基因,研究其相关因子的信号转导途径,并采用转基因技术培育抗旱、耐盐碱的农作物新品种已成为解决我国干旱、半干旱地区土壤盐渍化的有效手段之一。盐生植物碱茅之所以能在长期干旱和盐渍的环境中正常生长,是多种抗逆机制综合作用的结果,大量研究表明,碱茅在盐渍环境下,除了钠离子和钾离子的相互平衡作用外^[22-23],体内脯氨酸的积累也起着非常重要的作用^[24-25]。因此本研究分离克隆了朝鲜碱茅 *PuP5CS* 基因。

研究发现它与其他高等植物 *P5CS* 基因的核苷酸序列以及氨基酸序列有很高的同源性,对小麦、水稻、甘蔗、玉米、猕猴桃、大麦和朝鲜碱茅 7 种植物 *P5CS* 基因的 5 个主要功能域进一步比对发现也存在很高的一致性,表明 *P5CS* 基因在进化上存在高度保守性。这也是本研究能够利用同源克隆法将碱茅 *PuP5CS* 基因成功分离的理论基础。同时也发现大麦 *P5CS* 基因的核苷酸序列和氨基酸序列与其他禾本科植物同源序列的 N 端差异较大,表明不同物种在长期的进化过程中,可能会在主要功能域以外的位置发生些许变异。分子系统树的分析结果与传统形态学的分类结果基本吻合,表明根据 *P5CS* 基因信息构建的分子系统树基本上可以反映这一组物种的亲缘关系规律。

前人对脯氨酸提高碱茅抗逆性的生理机制进行了研究,本试验利用生物信息学的手段,对 *PuP5CS* 编码蛋白的信号肽、疏水性、跨膜结构和二级结构逐一进行了分析,为更好地研究 *PuP5CS* 蛋白的高级

结构与功能奠定了基础,也为深入研究脯氨酸提高朝鲜碱茅抗逆性的分子机制提供了理论依据。半定量 RT-PCR 的研究结果表明, *PuP5CS* 基因在朝鲜碱茅地上部分起的抗逆作用更显著。通常认为脯氨酸在增强植物的抗寒性、抗旱性和抗盐碱性方面均有重要的渗透调节作用,对于朝鲜碱茅而言, *PuP5CS* 基因在增强其抗盐碱性方面更为突出,因为试验结果表明在不同胁迫处理后的 48 h,干旱诱导的表达量非常少,而盐碱诱导的表达量呈增强态势。在 4 种胁迫处理 12 h 后, *PuP5CS* 基因的表达量由降低转为增加,可能是随着时间的延长,引起了朝鲜碱茅地上部其他信号转导因子的参与,激活了 *PuP5CS* 基因的再次表达,有待于做进一步的研究。

参考文献:

- [1] Mansour M. Physiological attributes associated with early season against NaCl stress [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1998, 39(10): 1039 - 1044.
- [2] Zhao F Y, Guo S L, Wang Z L *et al.* Recent advances in study on transgenic plants for salt tolerance [J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2003, 29(3): 71 - 78.
- [3] Delauney A J, Verma D S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants [J]. *The Plant Journal*, 1993, 4(2): 215 - 223.
- [4] Kavi Kishor P B, Sangam S, Amrutha R N *et al.* Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance [J]. *Current Science*, 2005, 88: 424 - 438.
- [5] Hu C A, Delauney A, Verma D S. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89: 9354 - 9358.
- [6] Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T *et al.* Correlation be-

- tween the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress [J]. *Plant Journal*, 1995, 7(5): 751–760.
- [7] 曹丽, 孙振元, 义鸣放, 等. 多年生黑麦草 P5CS 基因的 cDNA 克隆、表达及亚细胞定位 [J]. *园艺学报*, 2010, 37(9): 1477–1484.
- [8] Zhu B. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water and salt stress in transgenic rice [J]. *Plant Science*, 1998, 139: 40–48.
- [9] Aida H S, Radhia G B, Amira B. Over expression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants [J]. *Plant Science* 2005, 169(4): 74–752.
- [10] 杨成民, 王宏芝, 孙振元, 等. 利用基因枪共转化法获得转 *bar* 与 *P5CS* 基因黑麦草 [J]. *草地学报* 2005, 13(1): 34–38.
- [11] 徐春波, 米福贵, 王勇. 转基因冰草植株耐盐性研究 [J]. *草地学报* 2006, 14(1): 20–23.
- [12] Chen J B, Wang S M, Jing R L, *et al.* Cloning the *PtP5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses [J]. *Journal of Plant Physiology* 2009, 166(1): 12–19.
- [13] 张春宝, 赵洪锟, 李启云, 等. 野生大豆 Δ^1 -吡咯琳-5-羧酸合成酶 (P5CS) 基因的克隆与序列分析 [J]. *大豆科学* 2008, 27(6): 915–920.
- [14] Savouré A, Jaoua S, Hua X J, *et al.* Isolation, characterization and chromosomal location of a gene encoding the delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Lett*, 1995, 372(1): 13–19.
- [15] Armengaud P, Thiery L, Buhot N, *et al.* Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features [J]. *Physiol Plant* 2004, 120: 442–450.
- [16] Ginzberg I, Stein H, Kapulnik Y, *et al.* Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase in alfalfa transcriptionally induced upon salt stress [J]. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38: 755–764.
- [17] Igwrash. Characterization of the gene for pyrroline carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* L [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33(5): 857–865.
- [18] 韩素英, 张守攻, 汪泉, 等. 小叶杨 Δ^1 -吡咯琳-5-羧酸合成酶 (P5CS) 基因克隆及在杂种落叶松中的转化 [J]. *生物技术通报* 2006, 3: 92–99.
- [19] 任伟, 王志锋, 徐安凯. 碱茅耐盐碱基因克隆研究进展 [J]. *草业学报* 2010, 19(5): 260–266.
- [20] Hong Z, Lakkineni K, Zhang Z, *et al.* Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress [J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 1129–1136.
- [21] 张一弓, 张丽静, 傅华. 植物维生素 E 合成酶基因克隆及其逆境生理研究进展 [J]. *草业学报* 2009, 18(5): 235–242.
- [22] Wang S M, Zhao G Q, Gao Y S. *Puccinellia tenuiflora* exhibits stronger selectivity for K^+ over Na^+ than wheat [J]. *Journal of Plant Nutrition* 2004, 27: 1841–1857.
- [23] Wang C M, Zhang J L, Liu X S. *Puccinellia tenuiflora* maintains a low Na^+ level under salinity by limiting unidirectional Na^+ influx resulting in a high selectivity for K^+ over Na^+ [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2009, 32: 486–496.
- [24] 石德成, 殷丽娟. 盐与碱对星星草胁迫作用的差异 [J]. *植物学报*, 1993, 35(2): 144–149.
- [25] 王锁民, 朱兴运, 赵银. 盐胁迫对拔节期碱茅游离氨基酸成分及脯氨酸等含量的影响 [J]. *草业学报*, 1994, 3(3): 22–26.