

# 青海野生中国沙棘 *P5CS* 基因的扩增及序列分析

马玉花, 冶贵生, 刘宝尧, 张亚波, 郑 娜

(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

**摘 要:**以青海野生中国沙棘的嫩叶为材料, 扩增其 *P5CS* 基因并进行序列测定。结果表明: 所得的中国沙棘的 *P5CS* 基因的碱基数量为 434 bp, 其中 A 碱基 115 个, T 碱基 119 个, G 碱基 107 个, C 碱基 93 个。另外, 通过对中国沙棘 *P5CS* 基因的氨基酸的序列分析显示, 所得 *P5CS* 基因片段编码 144 个氨基酸, 其中强碱性氨基酸 21 个, 强酸性氨基酸 8 个, 疏水性氨基酸 53 个, 亲水性氨基酸 34 个。

**关键词:**青海野生中国沙棘; *P5CS* 基因; 扩增; 序列分析

**中图分类号:**S793.608      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2014)05-0088-04

## Amplification and Sequence Analysis of *P5CS* in Wild *Hippophae rhamnoides* in Qinghai

MA Yu-hua, YE Gui-sheng, LIU Bao-yao, ZHANG Ya-bo, ZHENG Na

(College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

**Abstract:** The fragment of *P5CS* of wild *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* in Qinghai province was amplified by the specific primers, then the nucleotide sequence and amino acid sequence of *P5CS* was identified. The sequence analysis indicated that the total length of *P5CS* was 434bp, and the nucleotide composition analysis showed that the number of A, T, G, C were 115, 119, 107 and 93, respectively. On the other hand, the total length of amino acid was 144, and the amino acid composition analysis demonstrated that there were 21 strongly basic (+) amino acids, 8 strongly acidic (−) amino acids, 53 hydrophobic amino acids and 34 polar amino acids.

**Key words:** *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*; *P5CS*; amplification; sequence analysis

沙棘 (*Hippophae rhamnoides*) 是胡颓子科 (Elaeagnaceae) 沙棘属 (*Hippophae*) 植物的统称。青藏高原是沙棘的起源地, 青海是沙棘的重要分布区, 该区沙棘资源具有分布广、种类多, 且具有抗旱抗寒、耐盐碱、耐瘠薄等生态特性, 是防风固沙、涵养水源、保持水土的优良树种, 目前, 作为一种先锋树种, 沙棘已被成功应用于水土保持和生态系统退化地区的植被重建<sup>[1-2]</sup>, 其中中国沙棘 (*Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis*) 广泛分布于青海各地, 因其具有优良的抗旱性而成为青海省林业建设的优良乡土树种, 为青海省林业以及林业经济发展起到

了重要的作用。

在青藏高原地区, 干旱是发展林业产业的限制性因子, 它严重影响着林木生长及林产品产量。因所处自然环境的特殊性, 使广布于青海地区的林木资源往往具有很强的抗旱、抗寒等特性, 因此从青海省丰富的野生沙棘资源中寻找并开发抗性强、品质优的优良品种, 对于青海省沙棘产业的发展具有重要的现实意义。

笔者在前期对青海野生中国沙棘和肋果沙棘的抗旱生理进行了研究, 并通过抗旱性比较研究表明中国沙棘相对于肋果沙棘具有更强的抗旱性<sup>[3-4]</sup>,

但目前有关沙棘属植物抗旱相关基因的研究报道尚少。因此以青海野生中国沙棘为研究对象,通过其P5CS基因的扩增、测序及序列分析研究,旨在为中国沙棘抗旱分子机理的深入系统研究奠定基础,并为沙棘抗旱新品种的培育以及抗逆分子育种的进行提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试中国沙棘的种子采自青海省大通县。供试土壤为园土,按1:2的比例加入泥炭。2012年9月中旬采集中国沙棘的种子,带回实验室后经消毒和催芽处理后播种到30 cm(高)×25 cm(内径)的花盆中,在苗木生长期间保持充足的养分和水分供应。待沙棘苗木长到10 cm左右时采集位于中上部的幼嫩叶片进行总RNA的提取。

### 1.2 试剂

RNA提取试剂盒为北京艾德莱公司产品,反转录酶及试剂、Taq DNA聚合酶及PCR试剂, RNA酶抑制剂均为大连宝生物工程有限公司产品。

### 1.3 引物

根据已发表的植物P5CS基因的核苷酸序列,设计出1对P5CS引物,引物由大连宝生物工程有限公司合成,预期的目的片段长度分别为450 bp。引物序列为:

P5CS-F: 5'-AGCTCCATATGAGGATTCT-TC-3'

P5CS-R: 5'-CAAGTTTATTGCTGCCTCTT-3'

### 1.4 中国沙棘总RNA的提取

参照试剂盒说明提取沙棘总RNA。

### 1.5 目的基因的获得

1.5.1 RT-PCR提取 提取的沙棘总RNA 5 μL,下游引物 4 μL, DNTP Mixture 3 μL, RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 3 μL, 70℃预热5 min,立即冰浴2 min,加入5倍的反转录缓冲液4 μL,反转录酶1 μL,置于42℃水浴50 min, 95℃ 5 min,补加RNase-Free ddH<sub>2</sub>O至总体积为50 μL。得到的cDNA于-20℃保存。

1.5.2 PCR扩增 上述反转录产物2 μL,10倍的PCR缓冲液5 μL, MgCl<sub>2</sub> 3 μL, dNTP 4 μL,上下游引物各2 μL, Taq DNA聚合酶0.5 μL,加RNase-Free ddH<sub>2</sub>O至50 μL后进行扩增。PCR扩增的程序为:94℃预变性5 min后,94℃变性1 min,61℃退火1 min,72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃

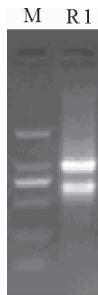
延伸10 min。

### 1.6 序列测定与分析

P5CS序列由宝生物工程(大连)有限公司完成,序列用DNASar软件进行分析,用Blast进行序列同源性分析。

## 2 结果与分析

通过试剂盒的提取,获得了高质量、完整的沙棘总RNA,其中28S条带亮度是18S的2倍,总RNA可以满足后续实验的要求(图1)。

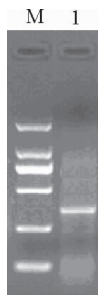


注:M为Marker,从上到下分别为:2 000,1 000,750,500,250 bp和100 bp(图2同);R1为总RNA。

图1 中国沙棘总RNA电泳图

Fig.1 Total RNA of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

将所提取的RNA反转录合成cDNA后进行PCR扩增,得到目的基因DNA(图2),通过电泳图可见所得基因片段大小约为450 bp,且条带明显。



注:1为P5CS。

图2 中国沙棘P5CS电泳图

Fig.2 Amplified results of P5CS *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

PCR扩增产物进行序列测定,测序结果见图3。应用DNASar软件对P5CS基因进行序列分析,结果表明,所得P5CS基因长度为434 bp,其中T碱基含量为119,占27.47%,A碱基含量为115,占26.50%,G碱基含量为107,占24.65%,C碱基含量为93,占21.43%。另外,A+T含量为234,占53.92%,C+G含量为200,占46.08%。

应用DNASar软件对P5CS基因编码的氨基酸进行序列分析,得到氨基酸序列以及序列信息(图4)。由图4可见,所得P5CS基因片段编码144个

氨基酸,其中强碱性氨基酸含量 8 个,占5.56%,强酸性氨基酸含量 21 个,占14.58%,疏水性氨基酸含量 53 个,占36.80%,亲水性氨基酸含量 34 个,占23.61%。

对中国沙棘 *P5CS* 基因编码的氨基酸序列中的氨基酸种类以及数量进行分析(表 1)可以看出,虽然因为密码子的简并性,不同的密码子可以编码同

一氨基酸,但是不同密码子在肽链中出现的频率却相差较大,即氨基酸密码子有偏爱性,如 Ala 均可由 gca,gcc,gcg,gcu 决定,但在 *P5CS* 基因编码的肽链中 Ala 偏爱密码子 gca,它在此肽链中编码 Ala 的次数为 7 次,远多于其他密码子,又如编码 Asn 的密码子有 aac 和 aau,但是在所得到的肽链中 aac 仅出现 1 次,而 aau 出现 4 次。

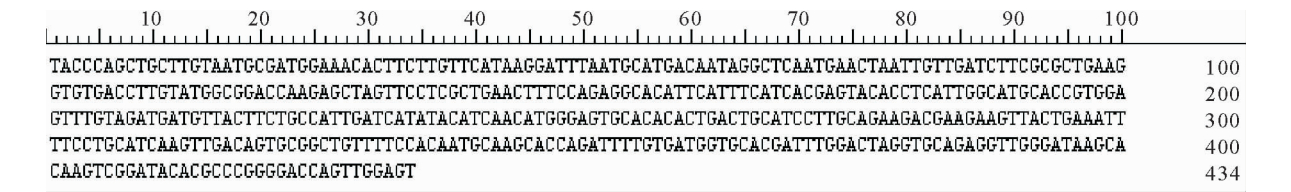


图 3 中国沙棘 *P5CS* 基因序列  
Fig. 3 Nucleotide sequence of *P5CS* of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

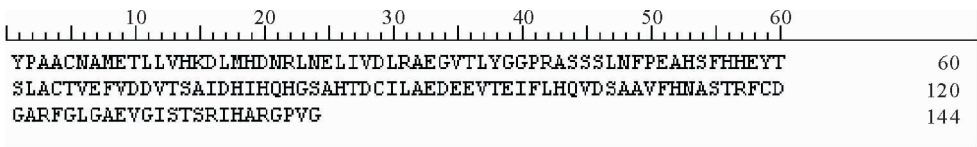


图 4 中国沙棘 *P5CS* 基因氨基酸序列  
Fig. 4 Amino acid sequence of *P5CS* of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

表 1 中国沙棘的 *P5CS* 基因氨基酸序列信息

Table 1 Amino acid sequence information of *P5CS* of *H. rhamnoides* subsp. *sinensis*

氨基酸	三联体密码	数量/个	氨基酸	三联体密码	数量/个	氨基酸	三联体密码	数量/个
Arg 7	aga	2	Ser 11	agc	2	Leu 12	cua	2
	agg	1		agu	4		cuc	1
	cga	1		uca	2		cug	2
	cgc	1		ucc	1		cuu	4
	cgg	2		ucg	1		uua	1
	cgu	0		ucu	1		uug	2
	gca	7		gga	4		cca	4
Ala 16	gcc	2	Gly 10	ggc	1	Pro 4	ccc	0
	gcg	2		ggg	2		ccg	0
	gcu	5		ggu	3		ccu	0
Asn 5	aac	1	Ile 7	aua	3	Val 11	gua	1
	aau	4		auc	1		guc	0
Asp 10	gac	4		auu	3		gug	2
	gau	6	His 12	cac	4	Lys 1	guu	8
Cys 4	ugc	2		cau	8		aaa	0
	ugu	2	Glu 11	gaa	7		aag	1
Gln 2	caa	2		gag	4	Phe 7	uuc	2
	cag	0	Met 2	aug	2		uuu	5

另外,氨基酸分析表明中国沙棘 *P5CS* 编码的 144 个氨基酸残基的肽段中包含了 17 种氨基酸,其中 Ala 最多,为 16 个,所占比例为 11.11%,Ser、His、Leu 均为 12 个,所占比例为 8.33%。

将获得的序列与 NCBI 登录的苹果、大豆、紫花苜蓿等植物的 *P5CS* 基因进行同源性比对分析,结果显示中国沙棘与上述植物的 *P5CS* 基因具有较高的同源性(图 4)。

### 3 结论与讨论

在逆境条件下,植物体内的脯氨酸含量会明显增加<sup>[5-7]</sup>,植物体内脯氨酸的含量在一定程度上反映了植物的抗性,抗旱性强的品种往往积累较多的脯氨酸<sup>[8]</sup>。因此,通过脯氨酸合成过程的关键酶基因的克隆分析,对阐明植物抗旱的分子机理具有重要的意义。

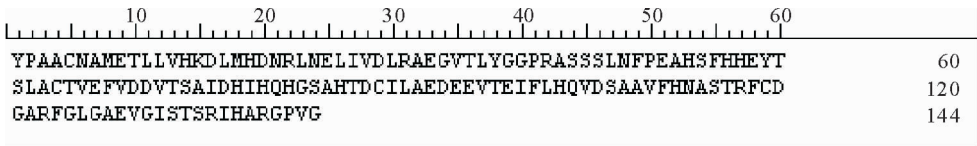


图 4 *P5CS* 基因同源性比对结果

Fig. 4 Results of homologous alignment analysis

植物体内脯氨酸的合成根据起始氨基酸的不同分为谷氨酸(Glu)和鸟氨酸(Orn)途径<sup>[9-10]</sup>,其中谷氨酸途径在干旱胁迫和缺少 N 素的情况下起主导作用<sup>[11-12]</sup>,而 *P5CS*(吡咯啉-5-羧酸合成酶)则是植物体内催化谷氨酸合成脯氨酸(Pro)过程中的关键酶。谷氨酸在吡咯啉-5-羧酸合成酶的作用下发生磷酸化和谷氨酸-γ-半醛还原形成吡咯啉-5-羧酸(P5C),P5C 再在吡咯啉-5-羧酸还原酶(P5CR)在催化下生成脯氨酸<sup>[13-14]</sup>。

目前关于 *P5CS* 基因的克隆及分析的研究在很多植物中已有报道,且大量的研究都表明 *P5CS* 基因在植物遭遇逆境时大量表达,对提高植物的抗逆性起到了重要的作用<sup>[15-18]</sup>,可见在逆境胁迫下,植物通过 *P5CS* 基因的表达调控从而调控脯氨酸的合成,使植物在恶劣条件下表现出更优良的抗逆性。

通过提取中国沙棘总 RNA,用特异性 *P5CS* 引物经反转录和扩增后得到长度为 434 bp 的 *P5CS* 基因产物,通过分析其氨基酸编码信息,表明 434 bp 的片段编码含 144 个氨基酸的肽段。对青海野生中国沙棘 *P5CS* 基因的分析研究,为沙棘抗逆的分子机理的阐明奠定了基础,同时也为今后抗逆分子育种提供了新的基因资源,为沙棘抗逆分子育种奠定基础。

参考文献:

[1] YANG B, KALLIO H. Composition and physiological effects of sea buckthorn (*Hippophae*) lipids[J]. Trends Food Sci. Technol., 2002, 13(5): 160-167.

[2] LI T S C, SCHROEDER W R. Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.): a multipurpose plant[J]. Hort Technology, 1996, 6(4): 370-380.

[3] 马玉花, 高英, 周至远, 等. 干旱胁迫对肋果沙棘幼苗生理指标及膜特性的影响[J]. 青海大学学报: 自然科学版, 2013, 31(2): 1-5.

MA Y H, GAO Y, ZHOU Z Y, et al. Effects of Drought Stress on Physiological Characteristics of *Hippophae neurocpa* [J]. Journal of Qinghai University: Nat. Sci. Edi., 2013, 31(2): 1-5. (in Chinese)

[4] 马玉花, 刘品高, 高英, 等. 干旱胁迫下肋果沙棘渗透调节物及保护酶活性变化的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(4): 100-104.

MA Y H, GAO Y, XIANG Q S, et al. Changes of the os-

moregulation substance and protective enzyme of *Hippophae neurocpa* under drought stress [J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013, 48(4): 100-104. (in Chinese)

[5] 吉增宝, 王进鑫. 干旱胁迫对侧柏幼树某些生理特性的影响[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(6): 6-9.

JI Z B, WANG J X. The Effect of drought stress on some physiological characters of *Platycladus orientalis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2009, 24(6): 6-9. (in Chinese)

[6] 郭改改, 魏钰, 封斌, 等. 我国几个不同地域长梗扁桃苗木的抗寒性研究[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(4): 11-15.

GUO G G, WEI Y, FENG B, et al. Cold-resistance of *Amygdalus pedunculata* from different provenances in China [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(4): 11-15. (in Chinese)

[7] 刘建锋, 史胜青, 江泽平. 几种引进柏树的抗旱性评价[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(1): 13-17.

LIU J F, SHI S Q, JIANG Z P. Drought-resistance of several exotic cypress species [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(1): 13-17. (in Chinese)

[8] 全先庆, 张渝洁, 单需, 等. 脯氨酸在植物生长和非生物胁迫耐受中的作用[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(1): 159-162.

[9] ADAMAS E, FRANK L. Metabolism of proline and the hydroxyprolines [J]. Ann. Rev. Biochem, 1980, 49: 1005-1061.

[10] DELAUNEY A J, VERMA D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants [J]. The Plant Journal, 1993, 4(2): 215-223.

[11] RHODS D, HANDA S, BRESSAN R A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress [J]. Plant Physiology, 1986, 82: 890-903.

[12] ALIA, PRASAD K V S K, SARADHI P P. Effect of zinc on free radicals and proline in Brassica and Cajanus [J]. Phytochemistry, 1995, 39(1): 45-47.

[13] DELAUNEY A J, VERMA D P S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants [J]. The Plant Journal, 1993, 4(2): 215-223.

[14] 许祥明, 叶和春, 李国风. 脯氨酸代谢与植物抗渗透胁迫的研究进展[J]. 植物学通报, 2000, 17(6): 536-542.

[15] 徐博, 任伟, 徐安凯, 等. 朝鲜碱茅吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)基因的克隆及表达分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(6): 20-26.

XU B, REN W, XU A K, et al. Molecular cloning and expression analysis of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene in *Puccinellia chinampoensis* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2011, 26(6): 20-26. (in Chinese)

指标与植株全氮含量间关系的研究表明,蓝光标准值是进行夏玉米氮素营养诊断的最佳冠层图像色彩参数指标。可见,应用数字图像技术对棉花、玉米等作物进行营养诊断是可行的。

在本研究中,展叶后期和子房膨大期的 SPAD 值与叶片 N 含量间呈极显著正相关;展叶后期, $H$ 、 $B$ 、 $NBI$  与叶片 N 含量呈极显著正相关, $NGI$ 、 $G/B$ 、 $R/B$  与叶片 N 含量呈极显著负相关;子房膨大期, $H$ 、 $B$ 、 $NBI$  与叶片 N 含量呈极显著正相关, $NGI$ 、 $G/R$ 、 $G/B$ 、 $R/B$  与叶片 N 含量呈极显著负相关;幼果迅速发育期, $I$ 、 $R$ 、 $B$  与叶片 N 含量呈极显著正相关。可见,应用数字图像技术进行杂交榛氮素营养诊断是可行的。

参考文献:

[1] 郭秀珠,陈巍,黄品湖,等. 不同施肥措施对早香柚果实产量与品质的影响[J]. 江苏农业科学,2009(2):163-166.

[2] 孙建军,刘红. 不同配方施肥对大棚草莓生长结实的影响[J]. 西北林学院学报,2013,28(2):114-117.

SUN J J,LIU H. Effects of different formulated fertilizations on the growth and fruiting of greenhouse fragaia ananassa[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013,28(2): 114-117. (in Chinese)

[3] 刘倩雯,王渭玲,徐福利,等. 施用沼肥和发酵豆饼肥对黄土高原山地梨枣产量和品质的影响[J]. 西北林学院学报,2012,27(4):39-42.

LIU Q W,WANG W L,XU F L,*et al.* Effects of the application of biogas manure and soybean cake compost on yield and fruit quality of pear-jujube in mountainous region of loess plateau[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012,27(4):39-42. (in Chinese)

[4] ADAMSEN F J,PINTER P J,BARBES E M,*et al.* Measuring wheat senescence with a digital camera[J]. Crop Sci. , 1999, 39:719-724.

[5] JIA L L,CHEN X P,ZHANG F S,*et al.* Use of digital to assess nitrogen status of winter wheat in the Northern China plain[J]. Journal of Plant Nutrition,2004,27(3):441-450.

[6] LUKINA E V,STONR M L,RAUN W R. Stimating vegetation coverage in wheat using digital images[J]. J. Plant Nutr. , 1999,22:341-350.

(上接第 91 页)

[16] 张乐新,苏蔓,马甜,等. 羊草 1-吡咯琳-5-羧酸合成酶(LcP5-CS1)基因的克隆与分析[J]. 草业学报, 2013, 22(4): 197-204.

ZHANG L X, SU M,MA T,*et al.* Cloning and analysis of the  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (LcP5CS1) from *Leymus chinensis* [J]. Acta Prataculturae Sinica,2013,22(4): 197-204. (in Chinese)

[7] 石晓燕. 应用数字图像技术对冬小麦叶片部分生理指标的估测[D]. 保定:河北农业大学,2005.

[8] 李锦卫. 基于计算机视觉的水稻、油菜叶色—氮营养诊断机理与建模[D]. 长沙:湖南农业大学,2010.

[9] 赵静,韩甜甜,张鲜鲜. 应用数码图像技术对梨树叶片营养诊断的初探[J]. 中国农学通报,2011,27(3):272-276.

ZHAO J, HAN T T, ZHANG X X. Preliminary study of whangkeumbae leaf nutrients status diagnosis by using digital image processing technique[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2011,27(3):272-276. (in Chinese)

[10] 雷彤,赵庚星,朱西存,等. 基于高光谱的苹果果期冠层光谱特征及其果量估测[J]. 生态学报,2010,30(9):2276-2285.

LEI T,ZHAO G X,ZHU X C,*et al.* Canopy spectral features and fruit amount estimation of apple tree at fruit stage based on hyperspectral data[J]. Acta Ecological Sinica, 2010, 30(9):2276-2285. (in Chinese)

[11] 雷彤,赵庚星,朱西存,等. 基于高光谱和数码照相技术的苹果花期光谱特征研究[J]. 中国农业科学,2009,42(7):2481-2490.

LEI T,ZHAO G X,ZHU X C,*et al.* Research of apple florescence spectral feature based on hyperspectral data and digital photos[J]. Science Agricultural Sinia, 2009, 42(7): 2481-2490. (in Chinese)

[12] 潘微微. 应用叶绿素仪进行棉花氮素营养诊断[D]. 石河子:石河子大学,2008.

[13] 王秀峰. 应用数字图像技术进行黄瓜和番茄氮素营养诊断的研究[D]. 长春:吉林农业大学,2005.

[14] 石媛媛. 基于数字图像的水稻氮磷钾营养诊断与建模研究[D]. 杭州:浙江大学,2010.

[15] 王晓静,张炎,李磐,等. 地面数字图像技术在棉花氮素营养诊断中的初步探究[J]. 棉花学报,2007,19(2):106-113.

WANG X J,ZHANG Y,Li P,*et al.* Study on cotton N status diagnosis using digital image processing[J]. Cotton Science, 2007,19(2):106-113. (in Chinese)

[16] 张立周,王殿武,张玉铭,等. 数字图像技术在夏玉米氮素营养诊断中的应用[J]. 中国生态农业学报,2010,18(6):1340-1344.

ZHANG L Z,WANG D W,ZHANG Y M,*et al.* Diagnosis of N nutrient status of corn using digital image processing technique[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010,18(6): 1340-1344. (in Chinese)

[17] ZHANG H, HUANG Q M,SU J. Development of alfalfa (*Medicago sativa* L.) regeneration system and agrobacterium-mediated genetic transformation[J]. Agricultural Sciences in China,2010,9(2):170-178.

[18] YANG S L, LAN S S, GONG M. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings[J]. J. Plant Physiol,2009,66:1694-1699.