

柴达木盆地梭梭 *P5CS* 基因的扩增及序列分析

马玉花, 冶贵生, 马娟, 冶桂莲, 龙晓晨, 李玉英, 马秀芳

(青海大学 农牧学院, 青海 西宁 810016)

摘要:以柴达木盆地梭梭同化枝为材料, 扩增其 *P5CS* 基因并进行序列测定。结果表明: 所得柴达木盆地梭梭 *P5CS* 基因的碱基数量为 442 个, 编码 146 个氨基酸。另外, 同源性比对分析结果显示梭梭与甜菜、可可等植物的 *P5CS* 基因具有较高的同源性。研究结果将为下一步梭梭 *P5CS* 基因的结构与功能研究奠定基础。

关键词:梭梭; *P5CS* 基因; 扩增; 序列分析

中图分类号:S727.23 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)01-0088-04

Amplification and Sequence Analysis of *P5CS* Gene in *Haloxylon ammodendron* in Qaidam Basin

MA Yu-hua, YE Gui-sheng, MA Juan, YE Gui-lian, LONG Xiao-chen, LI Yu-ying, MA Xiu-fang

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

Abstract: The fragment of *P5CS* gene of assimilating branches of *Haloxylon ammodendron* in Qaidam Basin was amplified and sequenced by the specific primers, then the nucleotide sequence and amino acid sequence of *P5CS* gene was identified and summarized. The sequence analysis indicated that the total length of *P5CS* gene was 442 bp to encode 146AA. Homology analysis showed that there had high homology among *Haloxylon ammodendron* *P5CS* gene and other plants. This results would lay foundation for the further study of the structure of *P5CS* gene and its function in *H. ammodendron*.

Key words: *Haloxylon ammodendron*; *P5CS* gene; amplification; sequence analysis

梭梭 (*Haloxylon ammodendron*) 为藜科梭梭属植物, 是治理流动沙地和土壤侵蚀区的先锋树种, 具有抗旱、耐盐碱特性, 广泛用于沙漠地区的植被修复^[1]。梭梭不仅是优良的薪炭材料和饲料植物, 还是珍贵药材肉苁蓉的寄主^[2], 因而对梭梭的研究和开发利用具有重要的生态、经济和社会价值。

在众多的渗透调节物质中, 脯氨酸是主要的渗透调节物质, 目前国内外学者对逆境胁迫下脯氨酸累积的研究比较多。植物体内脯氨酸的合成常通过谷氨酸和鸟氨酸途径来完成, 其中谷氨酸途径是在逆境胁迫条件下作用的主途径^[3]。在谷氨酸途径中, 首先以谷氨酸为底物, 经二氢吡咯-5-羧酸合成酶 (*P5CS*) 催化形成 *P5C*, 再由 Δ^1 -二氢吡咯-5-羧酸还原酶 (*P5CR*) 催化生成脯氨酸, 其中 *P5CS* 是高等

植物谷氨酸途径合成脯氨酸的关键酶^[4-5]。自从 Hu^[6] 等从豇豆中分离得到 *P5CS* 基因以来, 已在多种植物中克隆获得了 *P5CS* 基因。

对于同一个物种, 长期生长于高盐环境可使其具有较其他生长于低盐环境的植物更强的耐盐性^[7-8], 梭梭便是这样的一种植物。前人对于干旱区盐生植物的生理生化研究显示, 相对于白梭梭、怪柳、胡杨、枸杞、柠条、扬柴、沙棘、沙枣等旱生植物, 梭梭具有更强的耐盐性, 但目前为止有关梭梭抗逆相关基因 *P5CS* 基因克隆的研究未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试梭梭的种子采自青海省柴

达木盆地。供试土壤为园土：泥炭＝2：1。2013 年 9 月中旬采集梭梭的种子，经消毒后播种到 30 cm×25 cm(内径×高)的花盆中，待梭梭苗木长到 10 cm 左右时采集位于中上部的绿色同化枝进行总 RNA 的提取。

1.1.2 主要试剂 Ex Taq DNA 聚合酶、反转录酶、DL2000 DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,植物 RNA 提取试剂盒购自北京艾德莱生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 根据已发表的 *P5CS* 基因序列设计扩增引物,由大连宝生物工程有限公司合成,预期目的片段长度为 442 bp。引物序列为: *P5CS*-F:5'-ATTACCCAGCTGCTTGYYAAYGCN-ATGG-3'、*P5CS*-R: 5'-ACTCCAAGTGGTCCCC-KNGCRTGDAT-3'。

1.2.2 梭梭总 RNA 的提取 参照试剂盒说明提取梭梭总 RNA。

1.2.3 RT-PCR 取提取的梭梭总 RNA 5 μL,下游引物 4 μL,DNTP Mixture 3 μL,RNase-Free ddH₂O 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 ddH₂O 至总体积为 50 μL。得到的 cDNA 于-20℃保存。

1.2.4 PCR 扩增 上述反转录产物 2 μL,10 倍的 PCR 缓冲液 5 μL,MgCl₂ 3 μL,dNTP 4 μL,上下游引物各 2 μL,Taq DNA 聚合酶 0.5 μL,加 RNase-Free ddH₂O 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,60℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。

1.2.5 序列测定与分析 由宝生物工程(大连)有限公司完成序列测定,序列用 DNASTAR 软件进行序列分析。

2 结果与分析

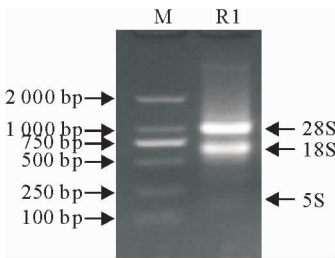
2.1 梭梭总 RNA 提取

提取的梭梭总 RNA 经 1%琼脂糖凝胶电泳检测表明(图 1),RNA 所在泳道目的条带清晰,28S 为 18S 的 2 倍,提取的总 RNA 可以满足后续试验的要求。

2.2 梭梭 *P5CS* 基因 PCR 扩增结果

将 *P5CS* 基因的 PCR 扩增产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,结果表明(图 2)*P5CS* 基因所在泳道出

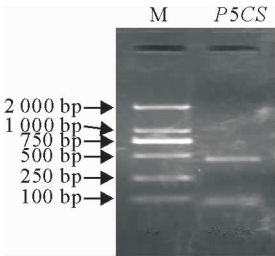
现目的条带,大小与预期的 442 bp 长度相符。



M. DNA 标准 DL 2 000;R1. 梭梭总 RNA

图 1 梭梭总 RNA 电泳图

Fig. 1 Total RNA of *H. ammodendron*



M. DNA 标准 DL 2 000

图 2 *P5CS* 基因 PCR 产物电泳图

Fig. 2 Amplified results of *P5CS* gene

2.3 *P5CS* 基因核苷酸序列和氨基酸序列分析

2.3.1 核苷酸序列分析 测定的 *P5CS* 基因核苷酸序列经 DNASTAR 软件分析后结果表明(表 1),*P5CS* 基因核苷酸序列长度为 442 bp,其中 A 碱基 126 个,占碱基总数的 28.51%,T 碱基 121 个,占碱基总数的 27.38%,G 碱基 119 个,占碱基总数的 26.92%,C 碱基 76 个,占碱基总数的 17.19%。另外,(A+T)的含量占 55.88%,(G+C)的含量占 44.12%。

2.3.2 氨基酸序列分析 推导的 *P5CS* 基因氨基酸序列经 DNASTAR 软件分析后结果表明(图 3),氨基酸序列长度为 146 aa,其中强碱性氨基酸有 10 个,强酸性氨基酸有 18 个,疏水性氨基酸有 55 个,亲水性氨基酸有 37 个。另外,密码子的简并性使不同的密码子编码着同一个氨基酸,但同一氨基酸其编码密码子出现的频率是不同的,如 20 个编码 Ala 的密码子中,GCA 出现 4 次,GCC 出现 4 次,GCG 出现 1 次,而 GCU 出现 8 次,编码 Gly 的 23 个密码子中,GGA 出现 7 次,GGC 出现 1 次,GGG 出现 3 次,GGU 出现 1 次。

2.3.3 *P5CS* 基因与参考基因核苷酸序列和氨基酸序列比较结果 将获得的柴达木盆地梭梭 *P5CS* 基因与 Genebank 中登录的甜菜(*Beta vulgaris*, XM_010693229)、克莱门柚(*Citrus clementina*, XM_006429125、XM_006435545)、橙子(*C. sinensis*,

XM_006493524)、中棉(*Gossypium arboreum*, EU417651)、毕氏海蓬子(*Salicornia bigelovii*, KF288934)和可可(*Theobroma cacao*, XM_007009139)等6种植物的P5CS基因核苷酸序列与氨基酸序列进行比较,结果表明(图4、图5),所得梭梭P5CS基因序列与非梭梭属植物P5CS基因序

列间存在着丰富的变异,其核苷酸序列的同源性在73.6%~87.6%间,氨基酸序列同源性在76.2%~92.5%间,其中梭梭与甜菜的P5CS基因序列同源性最高,其核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别为87.8%和92.5%。

表 1 P5CS 基因核苷酸序列分析

Table 1 Nucleotide sequence analysis of P5CS gene

指标	A/%	G/%	T/%	C/%	A+T/%	C+G/%
含量	28.51	26.92	27.38	17.19	55.88	44.12
碱基数	126	119	121	76	147	195

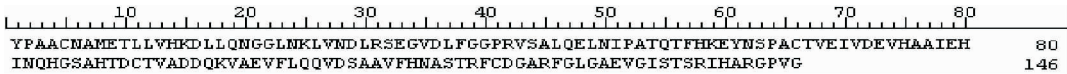


图 3 柴达木盆地梭梭 P5CS 基因氨基酸序列

Fig. 3 Amino acid sequence of P5CS gene of *H. ammodendron*

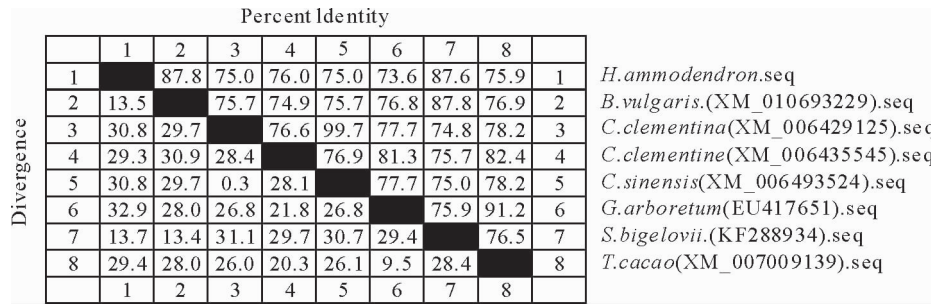


图 4 P5CS 基因核苷酸序列同源百分比

Fig. 4 The nucleotide sequence of percentage homology of P5CS

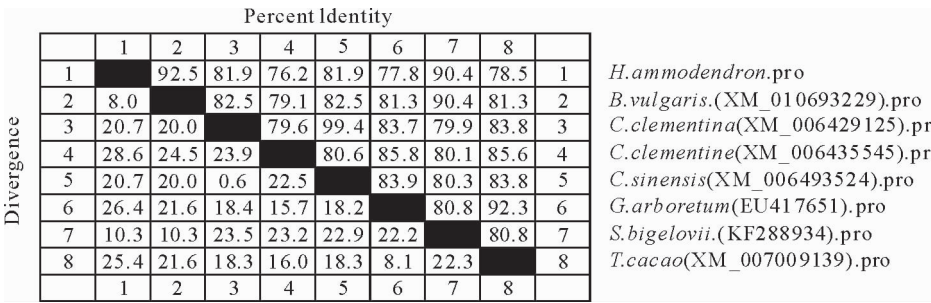


图 5 P5CS 基因氨基酸序列同源百分比

Fig. 5 The amino acid sequence of percentage homology of P5CS

3 结论与讨论

作为重要的渗透调节,关于脯氨酸在环境胁迫下的作用,通过生理方面的研究,有的学者认为它是植物对盐害产生的积极响应,其积累与盐胁迫是正相关的,随盐胁迫时间和盐浓度的增加,脯氨酸^[9-11]含量有一定程度的上升,但也有研究表明随着盐浓度的增加,脯氨酸含量虽然有所上升,但其浓度上升幅度很小^[12],因而有学者认为脯氨酸作为渗透调节物其调节能力很有限,其累积并不能代表植物抗盐

能力的大小,不能将其作为抗盐生理指标^[13]。另外也有学者认为脯氨酸的积累是植物遭受胁迫的反映,是植物受害的产物^[14]。尽管脯氨酸在渗透胁迫下的作用还有争议,但是它对于逆境胁迫下的酶的功能和膜完整性方面都起着积极的作用^[15],因而脯氨酸含量及与之相关的合成酶基因的研究成为植物抗逆相关研究的重要内容。

P5CS 是在脯氨酸合成途径中起主要调控作用的关键酶,研究表明 P5CS 基因在植物抗性中扮演着重要的作用^[16],逆境胁迫下植物通过 P5CS 基因

的表达从而提高胞内脯氨酸的含量以应对胁迫,从而使植物免受恶劣环境的伤害^[17-19],而梭梭作为极端环境的适生植物,其具有极强的抗旱耐盐性,对其 *P5CS* 基因的研究对于阐明梭梭耐盐分子机制及发掘抗逆基因具有重要意义。

本文所得柴达木盆地梭梭 *P5CS* 基因片段长度为 442 bp,共编码 146 个氨基酸。另外,将获得的梭梭 *P5CS* 基因序列与 NCBI 登录的其他植物的 *P5CS* 基因序列进行同源性比对分析,表明所得梭梭 *P5CS* 基因序列与非梭梭属植物 *P5CS* 基因核苷酸序列的同源性在 73.6%~87.6%间,氨基酸序列同源性在 76.2%~92.5%间,其中梭梭与同为藜科植物的甜菜的 *P5CS* 基因序列同源性最高,其核苷酸序列和氨基酸序列同源性分别为 87.8%和 92.5%,可见梭梭 *P5CS* 基因与各比对物种间具有较高的保守性,但同时也有一定的差异性。推测 *P5CS* 基因在这些植物抗逆性中可能具有相同的作用,也为进一步深入研究梭梭 *P5CS* 基因的分子进化关系提供了基础资料。

文章通过对柴达木盆地梭梭的 *P5CS* 基因进行扩增、测序,在此基础上对序列进行分析,研究结果将为其作为柴达木盆地梭梭耐盐基因的结构与功能的进一步研究奠定基础,并为培育转基因抗逆植物新品种提供新的有效的基因资源。

参考文献:

[1] 许强,杨自辉,郭树江,等. 梭梭不同生长阶段的枝系构型特征[J]. 西北林学院学报,2013,28(4):50-54.
XU Q,YANG Z H,GUO S J,*et al.* Branch system configuration features of *Haloxylon ammodendron* in different growth stages[J]. Journal of Northwest Forestry University,2013,28(4):50-54. (in Chinese)

[2] 李霞,马永清,宋玉霞,等. 肉苁蓉寄生对梭梭幼苗水分生理特征及生长的影响[J]. 西北林学院学报,2009,24(3):20-23.
LI X,MA Y Q,SONG Y X,*et al.* Effects of *Cistanche deserticola* parasitizing on water physiological characters and growth of *Haloxylon ammodendron*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2009,24(3):20-23. (in Chinese)

[3] DELAUNEY A J,HU C A A,KISHOR PBK,*et al.* Cloning of ornithine-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis [J]. J. Biol. Chem., 1993, 268: 18673-18678.

[4] ZHANG C S,LU Q,VERMA DPS. Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5- carboxylate synthetase,a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants[J]. J. Biol. Chem.,1995,270 (35):20491-20496.

[5] RAI A,PENNA S. Molecular evolution of plant *P5CS* gene involved in proline biosynthesis[J]. Molecular biology reports,

2013,40(11):6429-6435.

[6] HU C A,DELAUNEY A J,VERMA D P. A bifunctional enzyme (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA,1992,89(19):9354-9358.

[7] MUHAMMAD SAA,MUHAMMAD A,QASIM A. Soil salinity as a selection pressure is a key determinant for the evolution of salt tolerance in blue panicgrass (*Panicum antidotale* Retz.)[J]. Flora,2010,205(1):37-45.

[8] LONG X H,HUANG Z R,HUANG Y L,*et al.* Response of two Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) cultivars differing in tolerance to salt treatment[J]. Pedosphere,2010,20(4):515-524.

[9] HASSINE A B,LUTTS S. Differential responses of saltbush *Atriplex halimus* L. exposed to salinity and water stress in relation to senescing hormones abscisic acid and ethylene[J]. Journal of Plant Physiology,2010,167(17):1448-1456.

[10] AZZA CC,MOSBAH AB,MAALEJ M,*et al.* In vitro salinity tolerance of two pistachio rootstocks:*Pistacia vera* L. and *P. atlantica* Desf[J]. Environmental and Experimental Botany, 2010,69(3):302- 312.

[11] PAGTER M,BRAGATO C,MALAGOLI M,*et al.* Osmotic and ionic effects of NaCl and Na₂SO₄ salinity on *Phragmites australis*[J]. Aquatic Botany,2009,90(1):43-51.

[12] JAMPEETONG A,BRIX H. Effects of NaCl salinity on growth, morphology,photosynthesis and proline accumulation of *Salvinia natans*[J]. Aquatic Botany,2009,91 (3):181-186.

[13] 孙金月,赵玉田,常汝镇,等. 小麦细胞壁糖蛋白的耐盐性保护作用与机制研究[J]. 中国农业科学,1997,30(4):9-12.

[14] ASHRAF M,HARRIS PJC. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants[J]. Plant Sci.,2004,166(1):3-16.

[15] ASHRAF M,FOOLAD MR. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance[J]. Environmental and Experimental Botany,2007,59(2):206-216.

[16] ARCHANA NR,PENNA S. Molecular evolution of plant *P5CS* gene involved in proline biosynthesis[J]. Mol. Biol. Rep.,2013,40(11):6429-6435.

[17] 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):88-92.

[18] 陈吉宝,赵丽英,毛新国,等. 转 *PvP5CS* 基因拟南芥植株对干旱和盐胁迫的反应[J]. 作物学报,2010,36(1):147-153.
CHEN J B,ZHAO L Y,MAO X G,*et al.* Response of *PvP5CS* transgenic arabidopsis plants to drought- and Salt-Stress[J]. Acta Agronomica Sinica,2010,36(1):147-153. (in Chinese)

[19] DENG G,LIANG J,XU D,*et al.* The relationship between proline content,the expression level of *P5CS*(Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase), and drought tolerance in Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*) [J]. Russian Journal of Plant Physiology,2013,60(5):693-700.