

# 枸杞脱落酸生物合成关键酶基因 *NCED* 的克隆及表达分析

陆 平<sup>1</sup>, 田跃胜<sup>2</sup>, 王名雪<sup>2</sup>, 李 杉<sup>1</sup>, 赵静雅<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006; <sup>2</sup> 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

**摘要:** 脱落酸 (abscisic acid, ABA) 对植物的生长发育具有独特的调控功能, 并在植物适应逆境环境中发挥重要作用。9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶 (NCED) 是高等植物中 ABA 生物合成途径的一个关键酶。根据 GenBank 中的植物 *NCED* 基因的同源序列设计简并引物, 通过 RT-PCR 及 RACE 技术从枸杞叶片中克隆到 1 个编码 NCED 的基因, 命名为 *LbNCED*。其 cDNA 全长为 2316 bp, 含有 1 个 1824 bp 的开放阅读框, 编码 1 个含 607 氨基酸残基, 分子量为 67.38 kDa、等电点 (pI) 为 6.43 的假定蛋白, 其氨基酸序列与番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 和马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 的同源性达 90%, 在 N-末端具有 1 个含 15 个氨基酸的叶绿体转运肽。Southern 杂交结果表明, 该基因在枸杞基因组中以低拷贝形式存在。盐处理和脱水处理的枸杞叶片中 *LbNCED* 基因的表达与内源 ABA 的积累同步变化。

**关键词:** 枸杞; ABA; *NCED* 基因; RACE; 环境胁迫

## Cloning and Characterization of 9-cis-epoxycarotenoid Dioxygenase Gene (*NCED*) Encoding a Key Enzyme during Absciscic Acid Biosynthesis in *Lycium barbarum* L.

LU Ping<sup>1</sup>, TIAN Yue-sheng<sup>2</sup>, WANG Ming-xue<sup>2</sup>, LI Shan<sup>1</sup>, ZHAO Jing-ya<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006;

<sup>2</sup> School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240)

**Abstract:** Absciscic acid (ABA) regulates the essential physiological and developmental processes of plants and plays important roles in plant responses to various environmental stresses. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) is the key regulatory enzyme in the biosynthesis pathway of ABA in higher plants. In the study, a full-length cDNA of *NCED* gene (*LbNCED*) was firstly isolated and characterized from the leaves of *L. barbarum*. *LbNCED* was 2316 bp, containing a 1824 bp ORF and encoding 607 amino acids. Comparative and bioinformatics analysis revealed that the homology amino acid sequence of *Lycopersicon esculentum* and *Solanum tuberosum* *LbNCED* was 90%. At the N-terminus of the *LbNCED* located a 15 amino acids putative chloroplast transit peptide. Southern blot analysis revealed that it was a low-copy gene in the genome of *L. barbarum*. Real-time Quantitative PCR (RT-QPCR) analysis showed that *LbNCED* mRNA most abundantly accumulated in leaves. The RT-QPCR analysis revealed that dehydration and salt stress significantly enhanced *LbNCED* transcript expression and ABA content accumulation.

**Key words:** *Lycium barbarum* L.; abscisic acid (ABA); 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene (*NCED*); RACE; abiotic stress

收稿日期: 2012-02-29 修回日期: 2012-04-25 网络出版日期: 2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1617.009.html>

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2007AA10Z189)

作者简介: 陆平, 硕士研究生。研究方向: 植物基因工程。E-mail: luping0712@163.com

通信作者: 李杉, 博士, 副教授。研究方向: 植物生物技术。E-mail: lishan@scut.edu.cn

赵静雅, 博士, 副教授。研究方向: 植物生物技术。E-mail: zhaojy@sjtu.edu.cn

脱落酸(abscisic acid, ABA)对植物的生长发育具有独特的调控功能,并在植物胁迫环境抗逆性中发挥重要作用<sup>[1]</sup>。干旱、高盐和低温胁迫均能引起植物内源 ABA 水平的提高<sup>[2-3]</sup>。植物中 ABA 的合成有直接途径和间接途径,直接途径由 C<sub>15</sub> 前体直接转化成 ABA;间接途径由 C<sub>40</sub> 前体裂解成 C<sub>15</sub> 化合物,然后转化成 ABA。间接途径被公认为是高等植物中 ABA 合成的主要途径<sup>[4-5]</sup>,而 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)催化的氧化裂解反应是 ABA 生物合成途径中的关键步骤<sup>[6-7]</sup>。NCED 基因最初从玉米的 ABA 缺失突变体 *VP14* 中克隆得到,随后在番茄(*Lycopersicon esculentum*)<sup>[8]</sup>、大豆(*Phaseolus vulgaris*)<sup>[9]</sup>、豇豆(*Vigna unguiculata*)<sup>[10]</sup>、鳄梨(*Persea americana*)<sup>[11]</sup>、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)<sup>[12]</sup>、花生(*Arachis hypogaea*)<sup>[13]</sup>、柱花草(*Stylosanthes guianensis*)<sup>[14]</sup>、柠条锦鸡儿(*Caragana korschinskii*)<sup>[15]</sup>等植物中均克隆到 NCED 基因。研究表明,番茄中超表达 *LeNCED* 能提高转基因番茄中的 ABA 含量及抗逆性<sup>[8]</sup>,烟草中也有类似的结果<sup>[16]</sup>,表明 NCED 基因在提高植物抗逆性方面具有良好的应用前景。

枸杞(*Lycium barbarum*)耐盐碱、耐干旱、耐寒,是我国北方地区防风固沙、绿化及美化的树种,具有重要的生态效益。同时,枸杞在中国的传统医学中也具有重要的地位,它的根、皮、叶和果实均可入药,枸杞子有降低血糖、抗脂肪肝作用,并能抗动脉粥样硬化。迄今为止,尚未见到有关枸杞脱落酸的生物合成途径及相关合成基因的报道,水分胁迫及盐胁迫下枸杞体内 NCED 基因的表达模式及功能尚不明晰。本试验从枸杞中分离克隆了 NCED 基因,并利用定量 RT-QPCR 的方法分析其在枸杞受到水分胁迫及盐胁迫时的表达特性,进而为阐明枸杞耐旱分子机理及创造耐旱新品种奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

本研究所用的植物材料为宁夏枸杞,种子购于宁夏枸杞公司。种子先用 75% 酒精消毒 2 min,再用 10% 次氯酸钠消毒 10 min,无菌水冲洗后至于 MS 培养基上,在光温调控培养架上进行光培养,温度为 24 ± 2 °C,光照时间为 12 h/d。

### 1.2 RNA 的提取及逆转录反应

取在培养基中生长 30 d 左右的枸杞植株,剪取 2 ~ 3 片新鲜幼嫩叶片,用 RNA prep pure 植物总

RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司,北京)提取枸杞总 RNA,用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 的完整性,用紫外分光光度计测定 OD<sub>260</sub> 与 OD<sub>280</sub>,确定总 RNA 的浓度和纯度。

以枸杞总 RNA 为模板,参照 TaKaRa 公司的 PrimeScript® RT-PCR Kit 说明书的方法合成 cDNA 第 1 条链。

### 1.3 *LbNCED* 基因主体片段的克隆

根据已报道的其他物种 NCED 基因的同源区域设计简并引物 NCED1 和 NCED2(表 1),以 cDNA 第 1 链为模板,NCED1 和 NCED2 为引物,进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):Ex Taq™ DNA 聚合酶(TaKaRa 公司,5 U/μL)0.25 μL、10 × Ex Taq buffer 5 μL、dNTP(2.5 mmol/L)5 μL、NCED1(10 μmol/L)2 μL、NCED2(10 μmol/L)2 μL、反转录第 1 链 cDNA 1 μL、dd H<sub>2</sub>O 35 μL。PCR 反应程序:94 °C 5 min;94 °C 1 min,54 °C 1 min,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物以 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,用 DNA 凝胶回收试剂盒(上海生工公司)回收,连接到 pMD18-T 载体,转化至大肠杆菌,挑取阳性单菌落测序。

### 1.4 *LbNCED* 基因 3' 端与 5' 端的克隆

按照 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH Laboratories, Inc)说明书进行 3'-RACE 和 5'-RACE 克隆。根据已获得的 *LbNCED* 基因主体片段设计 2 条正向嵌套 PCR 引物 NCED3-1、NCED3-2 及 2 条反向嵌套 PCR 引物 NCED5-1、NCED5-2(表 1)。

对于基因 3' 端的克隆,先以接头 3'-RACE CDS primer A(试剂盒提供,表 1)为引物进行反转录,然后以反转录的 cDNA 为模板,进行巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 引物为接头引物 UPM 和特异性引物 NCED3-1,PCR 反应程序:94 °C 3 min;94 °C 0.5 min,68 °C 0.5 min,72 °C 2 min,25 个循环;72 °C 10 min。将第 1 轮产物稀释 50 倍,取 1 μL 作为第 2 轮 PCR 反应的模板,引物为 NUP 和 NCED3-2,反应程序为:94 °C 3 min;94 °C 0.5 min,68 °C 0.5 min,72 °C 2 min;35 个循环;72 °C 10 min。

对于基因 5' 端的克隆,先以接头 5'-RACE CDS primer A 和 SMART II™ A oligo(试剂盒提供,表 1)进行反转录,然后以反转录的 cDNA 为模板,进行巢式 PCR 扩增。第 1 轮 PCR 引物为接头引物 UPM 和特异性引物 NCED5-1,PCR 反应程序:94 °C 3 min;94 °C 0.5 min,68 °C 0.5 min,72 °C 2 min,25 个循环;

表 1 枸杞 *LbNCED* 基因克隆引物

Table 1 Primers used in the cloning of *LbNCED* from *L. barbarum*

引物 Primers	引物序列 (5'-3') Primer sequence(5'-3')
NCED1	GATGG (A/G/T) GATGG (A/G/T) ATGGT (A/G/T) CA (C/T) GC
NCED2	GT (A/C/T) CC (A/G) GTGAA (A/C/T) CCATA (A/T) GG (A/C/T) AC
NCED3-1	TTGAAATGGGTGGAGTGCCTG
NCED3-2	GAAGCAGGAATGGTGAACAGGA
NCED5-1	AGTTTCCGGCTCTTCCCAAGCATTC
NCED5-2	GGCACTCCAACCCATTTCAAACCTG
3'-RACE CDS primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTCC (T) 30VN
5'-RACE CDS primer A	(T) 25 VN
SMART II <sup>TM</sup> A oligo	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG
UPM	Long (0.4 μmol/L): CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT Short (2 μmol/L): CTAATACGACTCACTATAGGGC
NUP	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT
NCEDfull5	ATGGCCACTTCTTCTCCTGCTACA
NCEDfull3	TTAGGCCTGATTTGCCAAATCTTTG
NCED RT-F	CGAATGTGATGAGGGATTAGAGA
NCED RT-R	TCTTTGCTGTTTGGGTCTCTTGG
RPS9F	GCGTTTGGATGCTGAGTTGAAG
RPS9R	GGCGCTCAAGGAAGTTCTCTAC
NCED southern F	CGAATGTGATGAGGGATTAGAGA
NCED southern R	TTAGGCCTGATTTGCCAAATCTTTG

72 ℃ 10 min。将第 1 轮产物稀释 50 倍,取 1 μL 作为第 2 轮 PCR 反应的模板,引物为 NUP 和 NCED5-2,反应程序为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 0.5 min,68 ℃ 0.5 min,72 ℃ 2 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。取第 2 轮 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,切胶回收后连接到 pMD18-T 载体,转化至大肠杆菌,挑取阳性单菌落测序。

1.5 *LbNCED* 基因 cDNA 全长的克隆

将主体片段及 3'-RACE 和 5'-RACE 克隆得到的 3' 端和 5' 端的 cDNA 序列在 Vector NTI 11 上进行序列拼接,获得 *LbNCED* 基因 cDNA 全长。并根据该序列设计两端引物 NCEDfull5 和 NCEDfull3 扩增 cDNA 全长。反应体系:Ex Taq<sup>TM</sup> DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.25 μL、NCEDfull5 (10 μmol/L) 2 μL、NCEDfull3 (10 μmol/L) 2 μL、10 × Ex Taq buffer 5 μL、dNTP (2.5 mmol/L) 5 μL、反转录第 1 链 cDNA 2 μL、dd H<sub>2</sub>O 34 μL。PCR 反应程序:94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,35 个循环; 72 ℃ 10 min。PCR 产物回收后,连接到 pMD18-T 载体,转化至大肠杆菌,挑取阳性单菌落测序。本研究中所有引物合成工作在上海生工生物工程有 限公司进行,测序均在上海英骏生物技术公司完成。

1.6 *LbNCED* 基因及其编码蛋白的分析

基因及蛋白质基本性质,开放阅读框 (ORF) 查找和翻译等在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 完成,在线 (<http://bip.weizmann.ac.il/bio-tools/faq.htm>) 预测蛋白三维结构,用基于同源建模的分析工具 Swiss-mode 进行 3D 结构预测。在 NCBI 网站上进行 BLASTp 同源性分析;用 Vector NTI 11 进行氨基酸序列的多重比对,MEGA version 4.1 软件<sup>[17]</sup>构建氨基酸序列系统发育进化树;采用 iPSORT 运算法则<sup>[18]</sup>进行亚细胞定位预测 (<http://hc.ims.utokyo.ac.jp/iPSORT/>)。

1.7 Southern 杂交

用 CTAB 法提取枸杞叶片 DNA,取 40 μg DNA 分别用 *Hind*III、*Eco*RI 和 *Xba*I 于 37 ℃ 酶切过夜,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离后,转移至尼龙膜 Hybond-N + (Amersham 公司,英国)。以枸杞 DNA 为模板,NCED southern F 和 NCED southern R 为引物的 PCR 扩增产物为探针。探针标记、杂交、洗膜、信号探测均按照试剂盒说明书进行。

1.8 荧光定量 PCR

取生长 60 d 的枸杞苗,分别进行脱水处理 (枸杞叶片置于通风橱内吹风,分别于 0、0.5、2、4、6、9 h 取样) 和盐处理 (枸杞苗浸于 300 mmol/L NaCl 溶

液,含蔗糖 30 g/L,分别于 0、1、2、4、6、12、24 h 取样)。参照植物 RNA 抽提试剂盒说明书,分别提取脱水处理和盐处理的枸杞叶片。

根据获得的 cDNA 序列,设计引物 NCED RT-F 和 NCED RT-R,同时设计看家基因 *RPS9* 基因中的 1 对引物 RPS9F 和 RPS9R,使用 Takara 的 SYBR Ex-Script RT-PCR kit,用 *RPS9* 基因作为内标,按照试剂盒说明书进行 RT-QPCR 反应。反应体系为:SYBR Premix Ex Taq™ (2 ×) mix 12.5 μL、Forward Primer (10 μmol/L) 0.5 μL、Reverse Primer (10 μmol/L) 0.5 μL、cDNA 2 μL、ddH<sub>2</sub>O 9 μL。反应条件为:94 ℃ 30 s(1 个循环);94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s(40 个循环)。

1.9 ABA 含量的测定

取 200 mg 植物叶片研磨后加 1.5 mL PBS (0.01 mol/L, pH 7.4),萃取过夜,3500 r/min 离心 10 min,取上清用 ABA-ELISA (酶联免疫试剂盒, Rapidbio 公司),参照说明书的方法测定 ABA 含量。

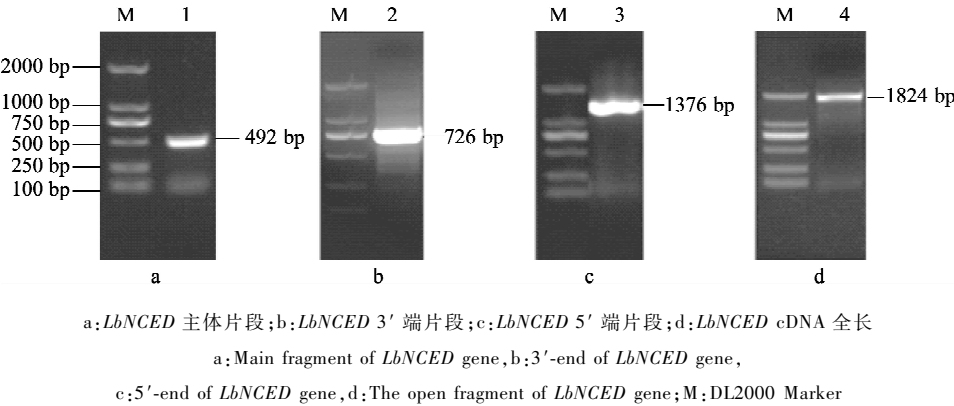


图 1 枸杞 *LbNCED* 基因的 RT-PCR 克隆  
Fig. 1 Cloning of *LbNCED* from *L. barbarum* by RT-PCR

2.2 *LbNCED* 基因 cDNA 全长的拼接及编码区的克隆

用 Vector NTI 11 软件,将 *LbNCED* 主体片段、3' 端和 5' 端序列拼接起来,得到 *LbNCED* 基因 cDNA 的全长序列,以引物 NCEDfull5 和 NCEDfull3 扩增出 *LbNCED* 基因的编码区约 1800 bp 的片段,测序结果证实该片段与拼接序列的编码区一致(图 1d)。所获得的 cDNA 序列共 2316 bp,包含 141 bp 的 5' 端非编码区、1824 bp 的开放阅读框架和 351 bp 的 3' 端非编码区,最后以 polyA 结尾。开放阅读框编码 1 个含 607 氨基酸残基,分子量为 67.38 kDa、等电点(pI)为 6.43 的假定蛋白(图 2)。GenBank 登录号为 JQ319069。

2.3 *LbNCED* 基因的蛋白结构、序列分析和分子进化树分析

亚细胞定位预测表明 *LbNCED* 蛋白的 N-末端具有叶绿体转运肽(图 2)。用 SOPMA 对 *LbNCED* 编码蛋白的结构进行预测。结果显示,*LbNCED* 蛋白由 14.17% 的 α-螺旋(α-helix),23.06% 的延伸链(extended strand),5.77% 的 β-转角(β-turn)和 57% 的不规则卷曲(random coil)组成。延伸链和不规则卷曲是该蛋白最大量的结构元件(图 3a)。使用 SWISS-MODEL 预测了 *LbNCED* 蛋白的三维结构(图 3b)。通过 Expasy 分析 *LbNCED* 的疏水区域,结果显示 *LbNCED* 是一个疏水蛋白。同时,氨基酸序列同源分析,发现推导的 *LbNCED* 基因表达的蛋

2 结果与分析

2.1 *LbNCED* 基因主体片段、3' 端及 5' 端的克隆

以枸杞 cDNA 为模板,简并引物 NCED1、NCED2 为上下游引物进行 RT-PCR 反应,扩增出了约 492 bp 的 *LbNCED* 主体片段(图 1a),与预期的片段长度相符。对测序结果进行 tBLASTx 分析,该片段与 NCBI 数据库中其他 *NCED* 基因具有高度同源性。用 3'-RACE 试剂盒扩增出了 3' 端为 726 bp 的片段(图 1b),其中 87 bp 与主体片段重合,测序结果表明其 3' 末端以 polyA 结尾,BLASTn 分析确认该片段与 NCBI 数据库中其他 *NCED* 基因的 3' 端有很高的同源性。用 5'-RACE 试剂盒扩增出了 5' 端为 1376 bp 的片段(图 1c),与主体片段重合 191 bp。BLASTn 分析表明,该片段与 NCBI 数据库中其他 *NCED* 基因的 5' 端有很高的同源性。NCBI 在线分析确认 5' 端序列已经包含了完整开放阅读框的起始密码子。



白质序列在 319-327、371-378 处具有 *NCED* 蛋白的特征序列 MEAHPKXDP 和 HDFAITK<sup>[19]</sup> (图 4)。

```

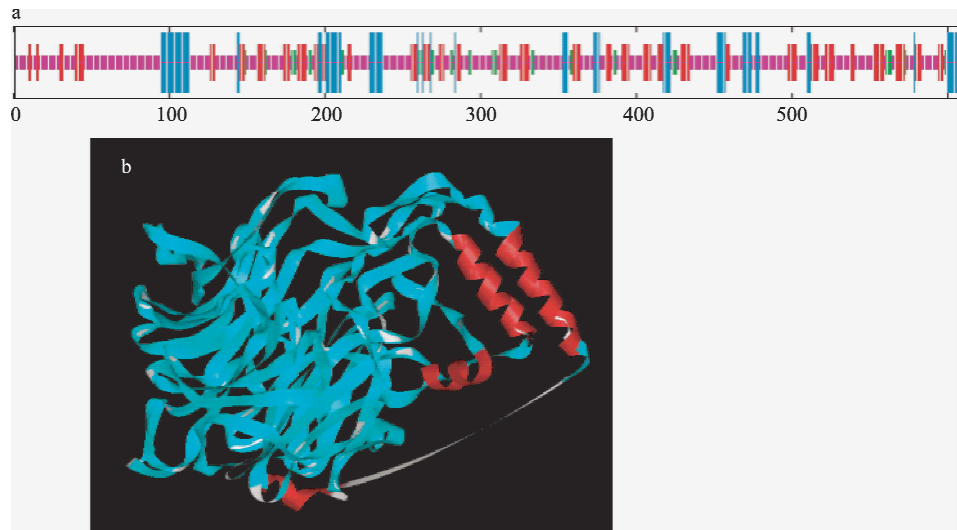
1 gaccacaaactcaccttcaaaaaaaaaaacaactctctatttcccaccttt
52 ttctctctaaaaatttctcacattttcccttcacaaacacccccaaaactagcaccttactatatacaaaaaacattcaaaaataggtagtc
142 atggccactctctctctgtctacaaaatcacatggattaaacccaagatataatgccatcatcaagagaggttggctattcttcaaacctt
M A T S S P A T M T W I K P K I S M P S S R E F G H S S N S
232 atttctactactcaaaaacagccttaataaaatcacttgcctctcttcaagctccacctatttctccatttccctaaacaacaattctcaaat
Q A P P I L H F P K Q Q S S N I S L L K N K P N K I T G S L
322 tatcaaacacacctaaaaccaataccattcccacttcaaaaccaaccacaaaaatctcacatccaagaagaataatctctctcttct
Y Q T P K T N T I P T S K P T T K I S H P K Q E M K S S S S
412 tctctcttgaatttagtacaagaagcagcaaatggctttagatgctgtgagaagtgttttaacaaaacacgaacttgaacacctttaa
S P L N L U Q K A A A M A L D A V E S U L T K H E L E H P L
502 ccaaaaacagctgatcagctgtccaaatttcggtaacttcgctcggtaactgaaatccagtcactcaatcggctcggtaaccgga
P K T A D P R U Q I S G N F A P U P E N P U Q S L P U T G
592 aaaataccaaaatgtttaacgggtgtatagcttgcgtacggagctaacccggttattcgaaaccaagctggtaaccatttctttagatggc
K I P K C U N G U Y U R N G A N P L F E P T A G H H F D G
682 gatggtatggtatagctgttcaattcaaaaacggatcagcaagttacgcttgcggtttcactgaaactgaaagattgggtcaagagaaa
D G H U H A V Q F K N G S A S Y A C R F T E T E R L U V Q E K
772 gctttgggtcgacctgttttccaaaagccattgggtgaattacatgggtcattctgggtattgcaaggttattgtttttagtgaacgtgtt
A L G R P U F P K A I G E L H G H S G I A R L M L F V A R G
862 gtttttggcttattgatatagtaacggaaactgggtgttgcatacgtgtgttgggtttattttaaataacggtttacttgcattgtctgaa
V F G L U D H S N G T G U A H A G L U Y F M N R L L A H S E
952 gatgatttgccttaccattgttagggtaacggctaatgggtgatcttgaactgtaggaaggttcgatttgcattgggcaattaaaatcaaca
D L P Y H U R U T A N G D L E T D D G R F D L K S T
1042 atgatagctcaaccgaaacttgatctctgtttcaggggagctttttgctcttagttacgatgtgattcagaacccgtatttgaagtacttc
M I A H P K L D P U S G E L F A L S Y D U I Q K P Y L K V F
1132 aggttttcaaaaacggggagaaatcaatgatgttgagattctctgttgaagaccaacaatgatgcatttgcgataaacggagaaa
R F S K N G E K S N D U E I P U E D P T M M H D F A I T E K
1222 ttcgctgttattctctgatcaacaagttgtgttcaagatgtctgaaatgacccgtggaggttccactgttttattgacaagaacaaagtt
F U U I P D Q Q U U F K M S E H I R G G S U U V D K N K U
1312 tcaagatttgggtatttggataagtatgctaagatggatcaggtttgaaatgggttgaagtgcctgattgttttgtttccatttatgg
S R F G I L D F Y A K D G S G L K W U E U P D C F C F H L W
1402 aatgcttgggaagaccggaaactgatgaacttgggtgattgggtcatgtatgacaccactgactcaatttttaacgaatgtgatgag
N A W E E P E T D E L U U I G S C M T P P D S I F N E C D E
1492 ggattagagagtggttttatcagaacttcggctcaatttgaaaactggaaaatcaacaagaaggctcttattcaaaaacgaagaagaacag
G L E S U L S E I R L N L K T G K S T R K A L I Q N E E E Q
1582 gtgaattagaagcaggaatggtagacaggaacaaacttgggagaaaaacgcagtagcatatttggctattgcagaaccatggccaaa
U N L E A G M U H R N K L G R K T Q Y A Y L A I A E P W P K
1672 gtttctggttttggcagaagtagacctttttacaggtgaaattacaagttcttttatggtgacacaagatggtggggagcctcttttt
V S G F A K U D L F T G E I N K F F Y G D N K Y G E P L F
1762 ttaccaagagaccacaacagcaagatgaagatgatggttacatttttagcttttgtgatgatgagaagaatggaatcagagctgcaa
L P R D P N S K D E D D G Y I L A F U H D E K E W K S E L Q
1852 attgttaatgcaatgaccttaaggttagagccacagtgaaacttccatcaagagtccttattgttttccatggaaacttccataaatgcc
I U N A M T L K K L E A T U K L P S R U P Y G F H G T F I N A
1942 aaagatttggcaaatcaggcctaa 1965
K D L A N Q A *
1966 tttggaagcgaaaaagggtcgaatttgcatttggctattacagaggagatttaccagagggtggttttagattatagctccccgg
2056 aatttctctataataggatttttttctatttttttttttttttaaatattgtgagagattttcagagaccatgctttagcttggatgtag
2146 ttagaaattggagctcagctggtttttctgcttatttttccatttattgtgcatgtgagagagtatatataccatataggaatact
2236 gtacaatgttctgtcaacctctgtttcttgtatatagaatgatggcctatactatttccactggctaaaaaaaaaaaaa

```

下划线区为叶绿体转运肽 Chloroplast transit peptide is underlined

图 2 *LbNCED* 基因的 cDNA 序列及其编码的氨基酸序列

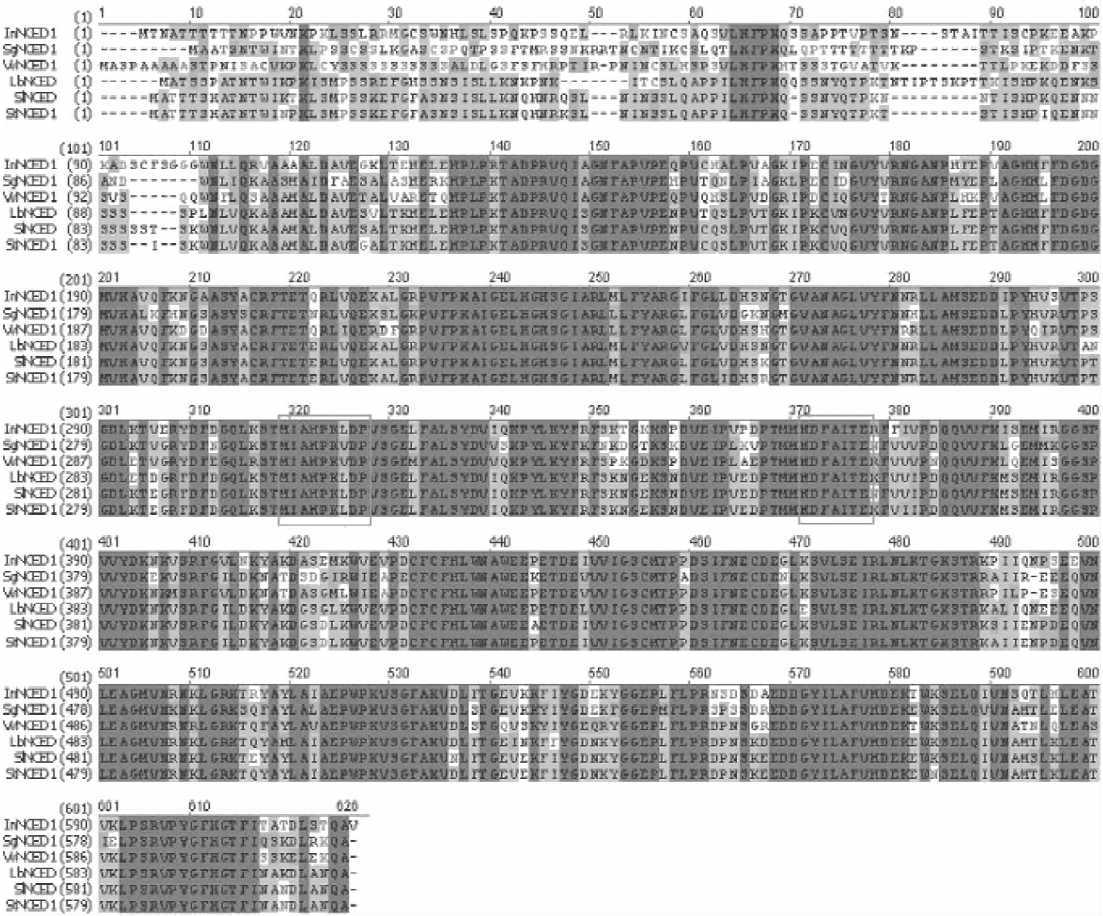
Fig. 2 Nucleotide sequence and translated amino acid sequence of *LbNCED*



a: *LbNCED* 蛋白的二级结构,  $\alpha$ -螺旋和不规则卷曲分别用垂直的长线和短线表示。b: *LbNCED* 蛋白的 3D 结构预测  
a: The secondary structure of *LbNCED* protein.  $\alpha$ -helix and random coil were denoted as vertical long bars and vertical short bars, respectively. b: The computational 3-D structure of *LbNCED* protein

图 3 *LbNCED* 蛋白的二级结构及 3D 结构预测

Fig. 3 The secondary and three-dimensional structure of the predicted protein of the *LbNCED*



NCED 氨基酸序列分别是马铃薯 (AAT75151.1)、牵牛花 (AEH41591.1)、番茄 (CAB10168.1)、葡萄 (AAR11193.1) 及柱花草 (AAY98512.2); 黑色部分表示所比较的几个物种的 NCED 氨基酸之间完全相同; 方框区为 NCED 蛋白的特征序列 MEAHPKXDP 和 HDFAITK

The alignment NCEDs are from *S. tuberosum* (AAT75151.1), *I. nil* (AEH41591.1), *S. Lycopersicum* (CAB10168.1), *V. vinifera* (AAR11193.1), and *S. guianensis* (AAY98512.2). Black regions designate the homologous regions with 100% identification. The NCED motifs of MEAHPKXDP and HDFAITK were boxed

图 4 枸杞 LbNCED 氨基酸序列与其他物种氨基酸序列的多重序列比对  
Fig. 4 Multialignment of amino acid sequences of LbNCED and other NCEDs

在 NCBI 上用 BLASTp 程序进行蛋白质同源性检索, *LbNCED* 编码的氨基酸序列与多种植物的 NCED 氨基酸序列有较高同源性, 其中与马铃薯的 StNCED1 及番茄的 SINCED 蛋白序列高度同源 (90%), 与其他植物的同源性也很高 (72% ~ 79%) (图 4)。用 MEGA version 4.1 软件构建氨基酸序列系统发育树 (图 5), 发现 LbNCED 与同为茄科的马铃薯 StNCED1 及番茄 SINCED 蛋白亲缘关系最近, 其次为牵牛花; 而番红花与玉米则聚合成同为单子叶的一组, 这与植物分类学上的亲缘关系一致。

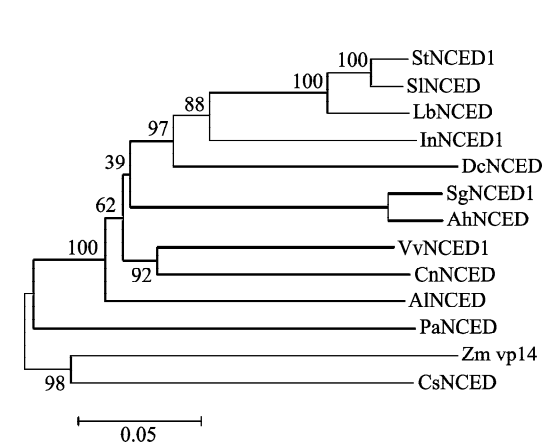
2.4 *LbNCED* 在枸杞基因组中的拷贝数

枸杞基因组 DNA 经 *Xba*I、*Hind* III 酶切后, 杂交结果只显示出 1 条带, 而经 *Eco*RI 酶切的样品出现 2

条带 (图 6), 表明 *LbNCED* 在枸杞基因组中以低拷贝 (单拷贝或双拷贝) 的形式存在。

2.5 *LbNCED* 基因的表达分析

为了研究 *LbNCED* 基因与 ABA 生物合成是否相关, 对枸杞进行脱水处理和盐处理, 测定基因的表达与 ABA 含量变化。结果表明, 随着枸杞叶片脱水时间的延长, *LbNCE* 基因的表达量 0.5 h 时急剧升高, 并持续升高到 9 h 达到最大值, 而内源 ABA 含量和 *LbNCED* 表达量出现同步 (图 7)。盐处理中, *LbNCED* 基因的表达量随处理时间的延长而提高, 同时 ABA 含量也随之升高。证明 ABA 含量的变化与 *LbNCED* 表达相关 (图 8)。在脱水处理 0.5 h 时, *LbNCED* 就开始大量表达, 表明 *LbNCED* 基因能够强烈响应水分胁迫。



图中的 *NCED* 分别来自于马铃薯 (AAT75151.1)、牵牛花 (AEH41591.1)、葡萄 (AAR11193.1)、番茄 (CAB10168.1)、桂花草 (AAY98512.2)、花生 (CAE00459.2)、玉米 (AAB62181.2)、拟南芥 (NP\_188062.1)、蜜柑 (BAE92960.1)、胡萝卜 (ABB52080.1)、鳄梨 (AAK00623.1)、番红花 (ACD44928.1)

The *NCEDs* used in the phylogenetic tree analysis were from *S. tuberosum* (AAT75151.1), *I. nil* (AEH41591.1), *S. Lycopersicum* (CAB10168.1), *V. vinifera* (AAR11193.1), *S. guianensis* (AAY98512.2), *A. Hypogaea* (CAE00459.2), *Z. mays* (AAB62181.2), *A. thaliana* (NP\_188062.1), *C. unshiu* (BAE92960.1), *P. americana* (AAK00623.1), *D. carota* (ABB52080.1) and *C. Sativus* (ACD44928.1)

图 5 枸杞 *LbNCED* 和其他 12 种植物 *NCED* 蛋白的系统进化分析  
Fig. 5 Phylogenetic tree of *LbNCED* protein with *NCEDs* of other 12 plant species

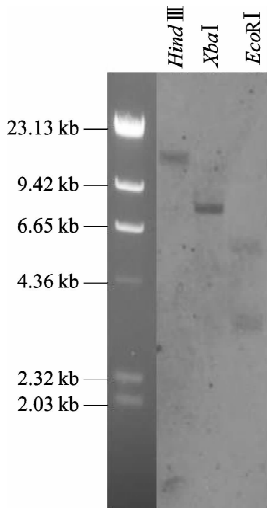


图 6 枸杞 *LbNCED* 的 Southern 杂交分析  
Fig. 6 Southern blot analysis of *LbNCED* in *L. barbarum*

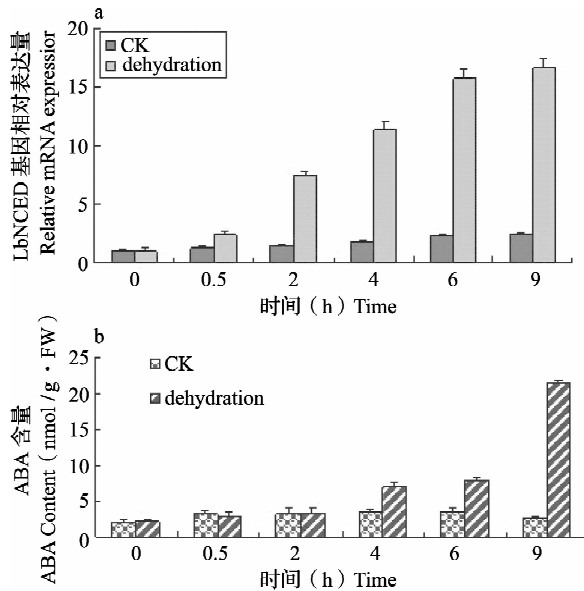


图 7 脱水胁迫下枸杞叶片中 *LbNCED* 基因的表达量及 ABA 含量分析  
Fig. 7 Expression pattern of the *LbNCED* gene and ABA accumulation in *L. barbarum* under dehydration stress

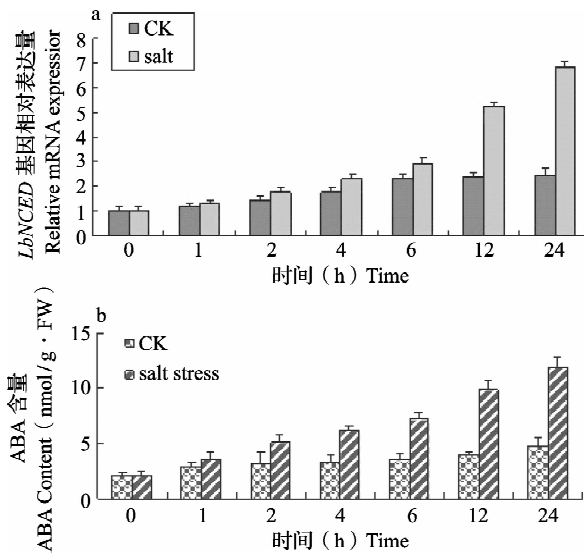


图 8 盐胁迫下枸杞叶片中 *LbNCED* 基因的表达量及 ABA 含量分析  
Fig. 8 Expression pattern of the *LbNCED* gene and ABA accumulation in *L. barbarum* under salt stress

### 3 讨论

*NCED* 是 ABA 合成途径的关键酶,目前已从许多植物中分离到 *NCED* 基因,但在枸杞中仍未见报道。本研究通过 RT-PCR 结合 RACE 及嵌套 PCR 的方法,首次从枸杞中分离到 *LbNCED* 基因并进行了序列分析。结果表明,*LbNCED* 具有 1 个 1824 bp

的完整开放阅读框,推定其编码 607 个氨基酸残基的蛋白,分子量为 67.38 kDa、等电点(pI)为 6.43,与其他物种推导的 NCED 蛋白质相似。序列分析结果表明,LbNCED 与同为茄科的番茄 NCED 及马铃薯 NCED 同源性最高,达 90%;与牵牛花、胡萝卜等其他植物的同源性也较高,这与植物分类学上的亲缘关系一致。

S. Iuchi 等<sup>[10]</sup>的 sGFP 融合实验发现 VuNCED1 蛋白的 N-末端序列可能有转运肽的功能,能够将 VuNCED1 引导进入叶绿体,使其固定在类囊体膜上。之后鳄梨中的 NCED 也得到类似的结果<sup>[11]</sup>。先前的研究表明 NCED 的 N-末端转运肽能够引导 NCED 蛋白进入质体,NCED 是在胞质内合成后在转运肽引导下进入质体催化叶绿醇的氧化裂解反应<sup>[3]</sup>。对 LbNCED 蛋白的亚细胞定位预测证实其 N-末端具有叶绿体转运肽,表明 LbNCED 主要在地上绿色组织中起作用,推测 LbNCED 可能在光合组织中发挥催化作用。本研究结果表明,干旱胁迫和盐胁迫能够强烈诱导 *LbNCED* 基因的表达,并且 ABA 含量的变化与 *LbNCED* 的表达量平行。前人的研究结果证明 *NCED* 基因在干旱胁迫下大量表达,并调控内源 ABA 的合成<sup>[14-15,20]</sup>。

本研究克隆了 *LbNCED* 基因,为进一步研究 *LbNCED* 基因表达的调控、枸杞抗逆分子机理及创造耐盐新品种奠定了基础。

## 参考文献

- [1] Zeevaart J A D, Creelman R. Metabolism and physiology of abscisic acid[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1988, 39:439-473
- [2] Liotenberg S, North H, Marion-Poll A. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants[J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37(5):341-350
- [3] Seo M, Koshiba T. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants[J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(1):41-48
- [4] Nambara E, Marion P A. Abscisia acid biosynthesis and catabolism[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2005, 56:165-185
- [5] Schwartz S H, Qin X, Zeevaart J A D. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes[J]. *Plant Physiol*, 2003, 131:1591-1601
- [6] Tan B C, Schwartz S H, Zeevaart J A D, et al. Genetic control of

- abscisic acid biosynthesis in maize[C]. *P Natl Acad Sci USA*, 1997, 94:12235-12240
- [7] Taylor I B, Burbidge A, Thompson A J. Control of abscisic acid synthesis[J]. *J Expe Bot*, 2000, 51:1563-1574
- [8] Burbidge A, Grieve T M, Jackson A, et al. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize *Vp14*[J]. *Plant J*, 1999, 17:427-431
- [9] Qin X, Zeevaart J A D. The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean[C]. *P Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:15354-15361
- [10] Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea[J]. *Plant Physiol*, 2000, 123:553-562
- [11] Chernys J T, Zeevaart J A. Characterization of the 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124:343-353
- [12] Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2001, 27:325-333
- [13] Wan X R, Li L. Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L [J]. *DNA Sequence*, 2005, 16:217-223
- [14] Yang J F, Guo Z F. Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene(*SgNCED1*) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses[J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26:1383-1390
- [15] Wang X M, Wang Z, Dong J, et al. Cloning of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene and the response of *Caragana korshinskii* to a variety of abiotic stresses [J]. *Gene Genet Syst*, 2009, 84:397-405
- [16] Qin X, Zeevaart J A D. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128:544-551
- [17] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17:1244-1245
- [18] Bannai H, Tamada Y, Maruyama O, et al. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals [J]. *Bioinformatics*, 2002, 18:298-305
- [19] Huang F C, Peter M, Wilfried S. Cloning and functional characterization of carotenoid cleavage dioxygenase 4 genes[J]. *Exp Bot*, 2009, 60(11):3011-3022
- [20] Rodrigo M J, Alquezar B, Zacaras L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57(3):633-643