

# 普通烟草鸟氨酸转氨酶基因 *Ntδ-OAT* 的克隆与表达分析

焦 蓉<sup>1,2</sup>, 刘贯山<sup>1</sup>, 刘好宝<sup>1</sup>, 王树林<sup>1,2</sup>, 侯 娜<sup>1,2</sup>, 王全贞<sup>1,2</sup>,  
靳义荣<sup>1,2</sup>, 刘朝科<sup>3</sup>, 冯祥国<sup>3</sup>, 胡晓明<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院烟草研究所/农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 青岛 266101;

<sup>2</sup>中国农业科学院研究生院, 北京 100081; <sup>3</sup>川渝中烟工业公司, 成都 610000)

**摘要:**鸟氨酸转氨酶是以鸟氨酸为前体合成脯氨酸的关键酶, 对植物适应逆境胁迫起关键作用。本研究根据其已知保守序列设计兼并引物, 从普通烟草品种中烟 14 中克隆到一条 425bp 的中间片段, 应用 RACE 方法设计特异性引物扩增得到 5' 末端和 3' 末端 cDNA 序列, 经 BLAST 验证, 首次从普通烟草中克隆到了鸟氨酸转氨酶基因, 命名为 *Ntδ-OAT*, 其 GenBank 登录号为 GU144571。该基因 cDNA 全长为 1781bp, 共编码 477 个氨基酸。系统进化树分析显示, *Ntδ-OAT* 基因的进化符合传统的生物学分类, 主要功能域在生物进化中保守性较高。Real-time PCR 分析表明, *Ntδ-OAT* 基因受干旱、高盐、低温、ABA 等多种胁迫处理的诱导表达, 可能参与普通烟草体内抗渗透胁迫过程。

**关键词:**普通烟草; 鸟氨酸转氨酶; *Ntδ-OAT*; 克隆; 表达分析

## Cloning and Expression Analysis of Orn- $\delta$ -aminotransferase Gene *Ntδ-OAT* in *Nicotiana tabacum*

JIAO Rong<sup>1,2</sup>, LIU Guan-shan<sup>1</sup>, LIU Hao-bao<sup>1</sup>, WANG Shu-lin<sup>1,2</sup>, HOU Na<sup>1,2</sup>, WANG Quan-zhen<sup>1,2</sup>,  
JIN Yi-rong<sup>1,2</sup>, LIU Chao-ke<sup>3</sup>, FENG Xiang-guo<sup>3</sup>, HU Xiao-ming<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Tobacco Quality Control, Ministry of Agriculture/Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101;

<sup>2</sup>Graduate School of CAAS, Beijing 100081; <sup>3</sup>China Tobacco Chuanyu Industrial Corporation, Chengdu 610000)

**Abstract:** Orn- $\delta$ -aminotransferase is the key enzyme for Pro synthesis from Orn, so that it plays an important role in adaptation to environmental stress in plants. A 425-bp segment was cloned from tobacco (*Nicotiana tabacum*, zhongyan 14) using degenerate primer designed from the known conserved regions of Orn- $\delta$ -aminotransferase gene. Special primers derived from the 425-bp segment were used to amplify the 5' and 3' ends of the cDNA by RACE. Comparison and analysis of the sequence was performed with BLAST which proved that it was the first time to get the clone of Orn- $\delta$ -aminotransferase gene from tobacco. The full-length cDNA was termed *Ntδ-OAT* (GenBank accession GU144571) which was 1781 bp in length and encoded a protein of 477 amino acids. According to phylogenetic tree, the evolution of *Ntδ-OAT* corresponds with traditional biological classification. Its functional domain has a high conservative property in the process of biological evolution. By the analysis of real-time PCR, It was determined that *Ntδ-OAT* could express under many inducements such as drought, high salt, low temperature, ABA and so on, from which we might conclude that *Ntδ-OAT* plays a role in the resistance to osmotic stress.

**Key words:** *Nicotiana tabacum*; Orn- $\delta$ -aminotransferase; *Ntδ-OAT*; Cloning; Expression analysis

烟草 (*Nicotiana tabacum*) 作为我国重要的经济作物, 种植面积和产量均居世界首位。烟草起源于

收稿日期: 2010-11-20 修回日期: 2011-05-12

基金项目: 国家烟草专卖局重点科技项目 (110200701021)

作者简介: 焦蓉, 在读硕士, 研究方向: 烟草优质高效栽培工程。E-mail: jrjd-2211@163.com

通讯作者: 刘好宝, 研究员。E-mail: zp3280965@tom.com

热带地区,对水分的要求很高,水分胁迫会严重影响烟草的生长发育,降低烟草的产量和品质<sup>[1]</sup>。目前生产上只能通过灌溉和地膜覆盖等栽培措施缓解干旱,不能从根本上解决问题。采用现代生物学手段筛选烟草抗旱相关基因,通过培育抗逆性强的转基因作物增强植物对逆境胁迫的适应能力,对提高植物的抗逆性具有重大意义。

脯氨酸是植物体内适应逆境胁迫的一种重要的渗透调节物质。高等植物中脯氨酸代谢因其初始底物不同,分为谷氨酸(Glu)和鸟氨酸(Orn)两条合成途径。鸟氨酸转氨酶( $\delta$ -OAT)是 Orn 合成途径的关键酶<sup>[2]</sup>,水分胁迫下植物  $\delta$ -OAT 活性提高与脯氨酸代谢关系密切<sup>[3]</sup>。1959 年首先在高等植物中发现 L-Orn 的转氨作用<sup>[4]</sup>,随后从花生、南瓜等植物中分离纯化获得  $\delta$ -OAT 蛋白<sup>[5]</sup>。1993 年 Delauney 等<sup>[6]</sup>通过反向互补法从乌头叶菜豆中克隆得到第一个植物  $\delta$ -OAT 基因,2002 年 Roosens 等<sup>[7]</sup>最先在烟草中超量表达  $\delta$ -OAT 基因。目前,该基因已从拟南芥<sup>[8]</sup>、水稻、甘蔗<sup>[9]</sup>、豌豆<sup>[10]</sup>等植物中得到克隆,但有关  $\delta$ -OAT 基因功能方面的研究相对滞后, $\delta$ -OAT 基因在植物体内的作用机制尚不清楚。本研究从普通烟草中克隆得到了  $\delta$ -OAT 基因的全长 cDNA 序列,并通过实时荧光定量 PCR 技术分析该基因在逆境胁迫下不同时间和部位的表达模式,利用生物信息学初步分析该基因的结构和功能,揭示了该基因对逆境胁迫的应答机制,为后续利用该基因改良普通烟草的抗渗透胁迫能力奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试材料为普通烟草品种中烟 14,由中国农业科学院烟草研究所种质资源库提供。播种出苗后先在温室中培养至 3~4 片真叶幼苗,再移至沙培育苗盘中,浇灌 Hoagland 营养液培养 15d,然后开始对幼苗进行干旱(20% PEG6000)、高盐(200mmol/L NaCl)、低温(4℃,12h 光照)和 ABA(100 $\mu$ mol/L)诱导处理。基因克隆以干旱处理 12h 的烟草上部嫩叶为试验材料。荧光定量表达分析分别以干旱、高盐、低温和 ABA 处理 2h、4h、6h、9h、12h、24h、48h 共 7 个时间点的叶片和根为试验材料,并以正常培养的幼苗为对照。所有材料均存于 -70℃ 冰箱备用。

### 1.2 总 RNA 提取

按 RNAPrep pure 植物总 RNA 提取试剂盒(金诺生物技术有限责任公司)说明,采用改进的异硫

氰酸胍/酚一步法获得。在 RNA 专用电泳槽中利用琼脂糖凝胶电泳检测其质量和含量。

### 1.3 中间片段的扩增

利用 Primer premier 5.0 软件设计兼并引物(OATF:GTNAAYCARGGNCAYTGYC;OATR:TCNC-CYTGDATNGGYTTCR),引物由大连宝生物工程公司合成。参照 Primescript<sup>TM</sup> TaKaRa RT-PCR Kit 试剂盒操作说明合成 cDNA 第一链,以 OATF 和 OATR 为引物扩增中间片段。反应程序:94℃ 5min;(94℃ 30s,58℃ 35s,72℃ 1min)×40 循环;72℃ 10min;4℃ 保存。

### 1.4 RACE 扩增 3'端和 5'端序列

5'端和 3'端的 RACE 反应按照 Clontech 的 SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒操作说明进行。3'端以 3'-RACE CDS Primer A 为反转录引物,5'端以 5'-RACE CDS Primer A 和 SMARTer<sup>TM</sup> A Oligonucleotide 为反转录引物,在 SMART-Scribe Reverse Transcriptase 作用下分别合成 3'-RACE 和 5'-RACE 的 cDNA 第一链。

根据已获得普通烟草  $\delta$ -OAT 基因的中间片段设计特异性引物 3'GSP(5'-GGCTCAAACGCTCACTCT-TAGTTCTCG-3')和 5'GSP(5'-CATGGAAGCAGCCA-CAGCATGAGACAA-3')。以 UPM 和 3'GSP 引物扩增基因的 3'端,3'RACE 反应程序如下:95℃ 5 min;(94℃ 30s,68℃ 40s,72℃ 2min)×35 循环;72℃ 10min,4℃ 保存。以 UPM 和 5'GSP 引物扩增基因的 5'端,5'RACE 反应程序如下:95℃ 5 min;(94℃ 30s,64℃ 35s,72℃ 2min)×40 循环;72℃ 10min,4℃ 保存。再将 5'RACE 的 PCR 产物用 ddH<sub>2</sub>O 稀释 500 倍后,取 1 $\mu$ l 稀释产物作为二次 PCR 反应的模板,以 5'NGSP 与 NUP 为引物做二次 PCR。二次 PCR 的反应程序:95℃ 5 min;(94℃ 30s,64℃ 30s,72℃ 150s)×35 循环;72℃ 10min,4℃ 保存。

### 1.5 PCR 产物的回收、克隆

PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,将目的条带按照 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit 的说明操作进行纯化回收,纯化后的 PCR 产物连接到 pMD19-T 载体上进行克隆并转化至 E. coli 的 DH5 $\alpha$  中,在添加 Amp、IPTG、X-gal 的 LB 平板上培养 12~16h 后挑选白色菌落。碱裂解法提取质粒后,经酶切和 PCR 双重鉴定选择有正确插入片段的阳性克隆,送大连宝生物工程公司测序。

### 1.6 实时荧光定量 PCR

根据普通烟草内参基因 18S rRNA 和目的基因

*Ntδ-OAT* 设计荧光定量 PCR 引物 (18SF1: 5'-TTC-CTAGTAAGCGCGAGTCATCAGC-3'; 18SR1: 5'-GCG-ACGGGCGGTGTGT-3'; RTF1: 5'-AGTGCCCAAT-TACCATCC-3'; RTR1: 5'-AGTGAGCGTTTGAGCCT-GTT-3')。按照大连宝生物工程公司 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 的操作说明, 将不同胁迫处理下叶和根的总 RNA 反转录成 cDNA, 利用 SYBR Green I 荧光染料法进行相对荧光定量 PCR 反应, 每个样品设 3 次重复, 操作步骤参照宝生物 SYBR® Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) 的说明书进行。PCR 反应采用 25ul 体系, 包括 10μl ddH<sub>2</sub>O、12.5μl SYBR Green Master Mix Reagent、0.5μl Rox Dye II、1μl cDNA 和上、下游引物各 0.5μl。PCR 程序为 95℃ 1 min, 40 个循环 × (95℃ 15s, 60℃ 35s), 并添加溶解扩增阶段。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Ntδ-OAT* 基因克隆与序列分析

**2.1.1 *Ntδ-OAT* 基因克隆** 用兼并引物通过 PCR 扩增得到一条 425bp 的片断, 该片段与葡萄 *Vvδ-OAT* 基因同源性高达 79%, 由此判断该片段为烟草 *δ-OAT* 基因 cDNA 的部分序列。根据这条 425bp 的中间片段设计 RACE 特异性引物, 5'RACE 扩增获得一条特异性较强的 676bp 的序列, 3'RACE 特异性扩增得到一条长度为 1450bp 的序列 (图 1)。

**2.1.2 *Ntδ-OAT* 基因序列分析** 利用 VecScreen 软件去除序列两端的通用引物序列, 再用 DNASTAR 的 Seqman 软件将 1450bp 的 3'RACE 序列、425bp 的中间序列和 676bp 的 5'RACE 序列拼接起来, 获得一条长度为 1781bp 的全长 cDNA 序列。将该序列输入到 ORF Finder 中, 分析出该序列含有一段 116bp 的 5'端非编码区 (5'-UTR)、一段包含 polyA 尾巴的 231bp 的 3'端非编码区 (3'-UTR) 和一个长度为 1434bp 的完整的阅读框, 编码 477 个氨基酸, 分子量为 52.406KD, 等电点 (pI) 为 7.98。经 Blastp 比对结果显示, 克隆基因编码的氨基酸与其他植物 *δ-OAT* 的氨基酸序列具有很高的同源性, 与葡萄

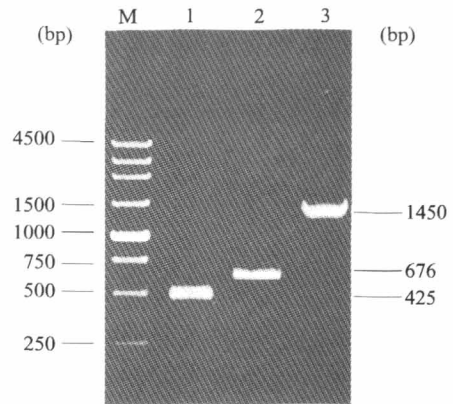


图 1 PCR 产物扩增结果

Fig. 1 Products of PCR amplification

M: 大连宝生物 250bp 分子量标准; 1: 中间片段扩增结果;

2: 5'RACE 扩增结果; 3: 3'RACE 扩增结果

M: TaKaRa 250bp DNA marker; 1: Product of segment;

2: Product of 5'RACE; 3: Product of 3'RACE

*Vvδ-OAT* (*Vitis vinifera*, XP\_002278418.1) 同源性为 81%, 与拟南芥 *Atδ-OAT* (*Arabidopsis thaliana*, NP\_199430.1) 同源性为 75%, 与大豆 *Gmδ-OAT* (*Glycine max*, ABA86965.1) 同源性 74%, 与甘蔗 *Scδ-OAT* (*Saccharum officinarum*, ABP38411.1) 同源性为 74%。表明新克隆的 cDNA 序列为普通烟草鸟氨酸转氨酶基因, 将该基因命名为 *Ntδ-OAT* (*Nicotiana tabacum* ornithine  $\delta$ -aminotransferase), 并将其登录 GenBank, 登陆号为 GU144571。

### 2.2 *Ntδ-OAT* 编码产物的生物信息学分析

**2.2.1 *Ntδ-OAT* 的结构域预测** 利用 NCBI 数据库的 CDD 软件对 *Ntδ-OAT* 的结合位点和结构域分析表明 (图 2), *Ntδ-OAT* 属于天冬氨酸转氨酶超家族磷酸吡哆醛依赖酶, 催化转氨作用的关键部位磷酸吡哆醛 (PLP) 结合位点<sup>[2]</sup>由 (G<sup>142</sup>A<sup>143</sup>F<sup>177</sup>H<sup>178</sup>E<sup>234</sup>D<sup>265</sup>Q<sup>268</sup>K<sup>294</sup>) 8 个氨基酸残基构成, 其中 294 位的 K (赖氨酸) 是催化中心, PLP 作用位点的结合导致构象变化并激活转氨酶活性。抑制因子结合位点由 (T<sup>141</sup>G<sup>142</sup>A<sup>143</sup>F<sup>177</sup>H<sup>178</sup>R<sup>190</sup>E<sup>234</sup>D<sup>265</sup>I<sup>267</sup>Q<sup>268</sup>K<sup>294</sup>) 11 个氨基酸残基构成, (2S, 5S)-5-氟代鸟氨酸乙酯是目前为止已知的唯一的鸟氨酸转氨酶抑制剂<sup>[11]</sup>。

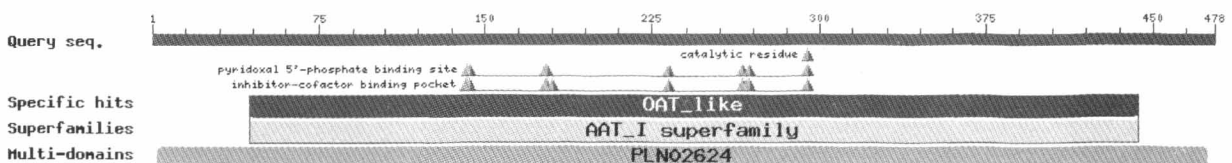


图 2 *Ntδ-OAT* 编码氨基酸的保守区域分析结构图

Fig. 2 Conserved domains analysis of *Ntδ-OAT* deduced amino acid

**2.2.2 *Ntδ-OAT* 蛋白跨膜结构预测分析** 通过 TMPRED ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) 对 *Ntδ-OAT* 基因编码的氨基酸序列进行跨膜区预测,大于 500 分即存在有意义的跨膜螺旋。根据 TMPRED 模型分析,N 末端位于膜内,在 168~185 位、289~307 位和 324~342 位形成 3 个可能的跨膜螺旋,加权总得分达 1703 分,表明跨膜预测真实有效,据此推测该基因编码的酶为跨膜蛋白,预测结果如图 3。

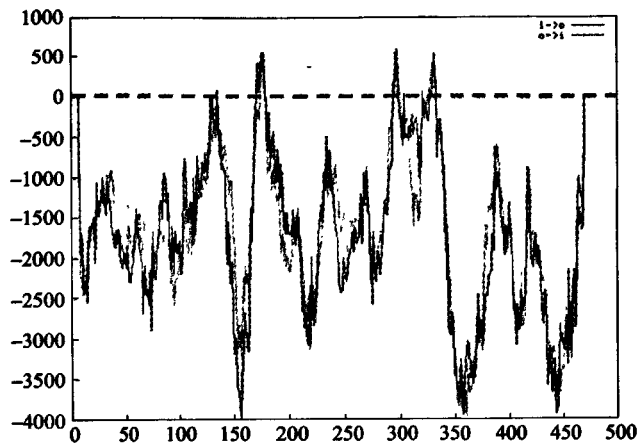


图 3 *Ntδ-OAT* 蛋白跨膜区域预测图

Fig.3 Transmembrane domain prediction graphics of *Ntδ-OAT*

### 2.3 系统进化树分析

选择与普通烟草 *Ntδ-OAT* 编码的氨基酸同源性较高的  $\delta$ -OAT 氨基酸序列 10 个,利用 ClustalW 和 MEGA4.0 软件<sup>[12]</sup> 构建邻接法 NJ (neighbor joining) 系统进化树(图 4)。结果表明,以 0.05 为结点,可分为 2 大类群:第 I 类为双子叶植物中  $\delta$ -OAT 的进化关系,普通烟草 *Ntδ-OAT* 与葡萄 *Vvδ-OAT* 亲缘关系最近,在同一分支,可能为直系同源蛋白,其次为豆科作物和十字花科植物;第 II 类主要为单子叶植

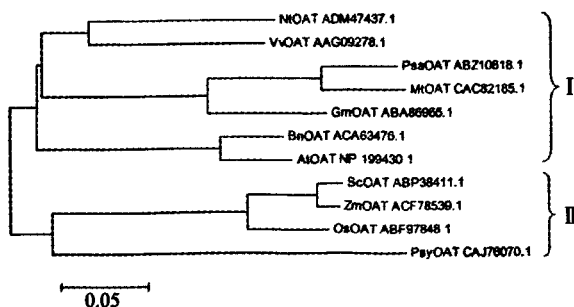


图 4 *Ntδ-OAT* 与其他植物  $\delta$ -OAT 蛋白的系统进化关系

Fig.4 Phylogenetic relatedness among *Ntδ-OAT* and other  $\delta$ -OAT proteins in plants

物和裸子植物中  $\delta$ -OAT 的进化关系,单子叶植物水稻 *Osδ-OAT*、甘蔗 *Scδ-OAT*、玉米 *Zmδ-OAT* 可聚为一类,离 *Ntδ-OAT* 遗传距离较远,而裸子植物欧洲赤松 *Psyδ-OAT* 与 *Ntδ-OAT* 的亲缘关系最远。 $\delta$ -OAT 的进化关系与植物形态学上分类的进化关系基本一致,因而该分子系统树基本上可反映该蛋白的进化规律和物种的亲缘关系规律。

$K_s$  和  $K_a$  是估算分子进化动力的重要指标<sup>[13]</sup>。根据构建的系统进化树,推测普通烟草 *Ntδ-OAT* 和葡萄 *Vvδ-OAT* 可能是直系同源基因,利用 CBU 在线服务的  $K_a/K_s$  Calculation tool 计算其  $K_s$  (同义突变频率) 和  $K_a$  (非同义突变频率)。*Ntδ-OAT/Vvδ-OAT* 的  $K_a/K_s$  值为 0.1772 ( $K_s$ :0.2825,  $K_a$ :0.0487),这对基因的  $K_a/K_s$  值远远小于 1,说明 *Ntδ-OAT* 基因在进化上非常保守,氨基酸在纯化选择(负选择)压力下保守地突变<sup>[14]</sup>。

### 2.4 *Ntδ-OAT* 荧光定量表达分析

通过荧光定量 PCR 技术对 *Ntδ-OAT* 基因在对照及胁迫处理后的表达特性进行分析。分别构建内参基因和目的基因标准曲线,然后根据标准曲线的线性公式计算目的基因在不同部位和不同时间点的相对浓度。同一模板中管家基因和目的基因的相对浓度的比值即可作为目的基因相对表达水平。

**2.4.1 *Ntδ-OAT* 标准曲线的构建** 将反转录得到的样品 cDNA 模板按照  $5^0$ 、 $5^{-1}$ 、 $5^{-2}$ 、 $5^{-3}$ 、 $5^{-4}$  和  $5^{-5}$  浓度进行稀释,以稀释浓度的对数值为横坐标,以临界循环值  $C_t$  为纵坐标分别对内参基因和目的基因制作标准曲线。内参基因标准曲线  $R^2 = 0.996491$ , 直线方程为  $Y = -3.740749X + 29.474642$ ; 目的基因标准曲线的  $R^2 = 0.986664$ , 直线方程为  $Y = -3.481415X + 35.532726$ 。

**2.4.2 *Ntδ-OAT* 的表达部位分析** 分别以正常生长及 PEG 胁迫处理 12h 普通烟草生根期幼苗的根、茎、叶和芽 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 反应。表达分析结果表明(图 5),在正常幼苗体内,*Ntδ-OAT* 基因的表达量整体水平较低,茎、芽中的表达量相对较高。但在干旱胁迫处理后的幼苗体内,叶和根中 *Ntδ-OAT* 的表达量成倍增加,分别是正常幼苗叶和根中表达量的 10.34 倍和 20.58 倍,其中叶片中的表达量最高。说明普通烟草在受到水分胁迫时主要通过 *Ntδ-OAT* 基因在叶和根中的上调表达来适应逆境。

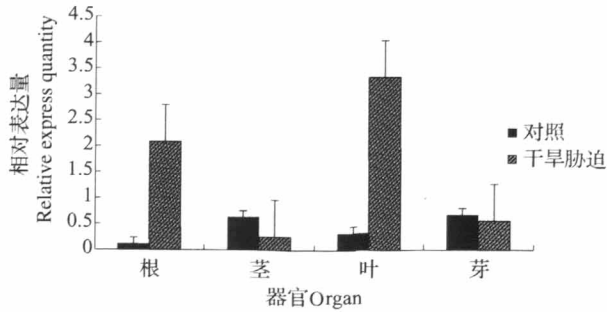


图5 *Ntδ-OAT* 在烟草不同部位的表达分析  
Fig.5 Expression analysis of *Ntδ-OAT* in different organ of *Nicotiana tabacum*

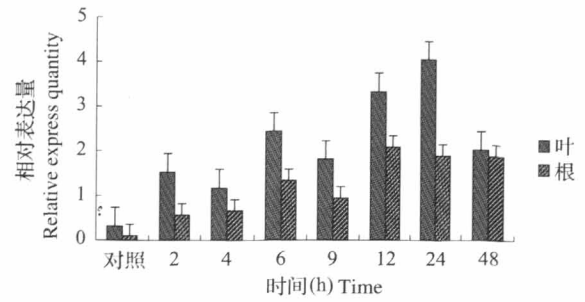


图6 *Ntδ-OAT* 在干旱胁迫处理不同时间点的表达  
Fig.6 The expression patterns of *Ntδ-OAT* induced by drought stress with different times

2.4.3 *Ntδ-OAT* 的胁迫处理表达分析 普通烟草 *Ntδ-OAT* 基因在干旱、高盐、低温和 ABA 胁迫处理下的荧光定量 PCR 表达分析结果如下。

在干旱胁迫处理期间,叶中 *Ntδ-OAT* 基因从处理 2h 开始逐渐上调表达,24h 时达到最大,为对照的 12.54 倍;根中 *Ntδ-OAT* 基因表达量随胁迫时间延长逐渐增加,12h 时达到最大,为对照的 20.58 倍,24h 和 48h 时依然维持在较高水平(图 6)。说明在干旱胁迫处理下,普通烟草主要通过叶和根中 *Ntδ-OAT* 基因后期的上调表达适应干旱。

在盐胁迫处理期间,叶中 *Ntδ-OAT* 基因在胁迫处理 4h、9h、12h 和 24h 4 个时间点与对照相比表达量明显增高,分别是对照的 3.95、4.88、3.87 和 5.39 倍,在 24h 时达到最高;根中 *Ntδ-OAT* 基因表达水平从处理 4h 开始上调表达,6h 时即达到最大,为对照的 21.74 倍,呈现先上升后降低的变化趋势(图 7)。说明盐胁迫时 *Ntδ-OAT* 基因优先在根中表达调控细胞的渗透压。

在低温胁迫处理期间,叶中 *Ntδ-OAT* 基因表达水平呈现逐渐升高的趋势,48h 达到最大,为对照的 5.12 倍;根中 *Ntδ-OAT* 基因整体上调表达,但表达量变化不大,不同胁迫时间的表达量均值为对照的 4 倍左右,维持在相对稳定的水平(图 8)。说明在低温胁迫下普通烟草抗逆胁迫主要通过叶片中 *Ntδ-OAT* 基因后期的上调表达实现。

在 ABA 诱导处理期间,叶中 *Ntδ-OAT* 基因的表达出现两次高峰,在 8h 和 48h 两个时间点表达量分别是对照的 7.40 倍和 11.30 倍;根中 *Ntδ-OAT* 从 4h 开始上调表达,48h 达到最大,为对照的 36.28 倍(图 9)。可见,ABA 可以显著诱导 *Ntδ-OAT* 的上调表达。

总之, *Ntδ-OAT* 基因是受干旱、高盐、冷害和 ABA 逆境胁迫诱导表达的基因,该基因可能参与多种逆境胁迫过程中普通烟草体内的渗透调节过程。

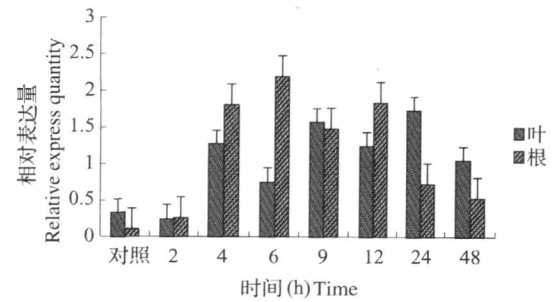


图7 *Ntδ-OAT* 在盐胁迫处理不同时间点的表达  
Fig.7 The expression patterns of *Ntδ-OAT* induced by salt stress with different times

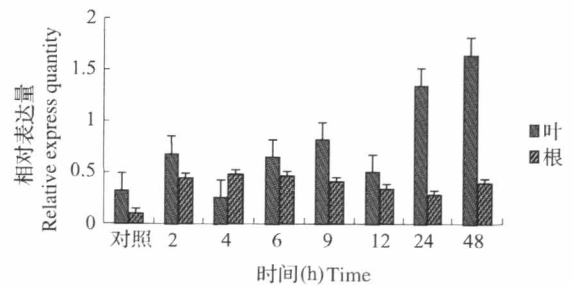


图8 *Ntδ-OAT* 在低温胁迫处理不同时间点的表达  
Fig.8 The expression patterns of *Ntδ-OAT* induced by Low Temperature stress with different times

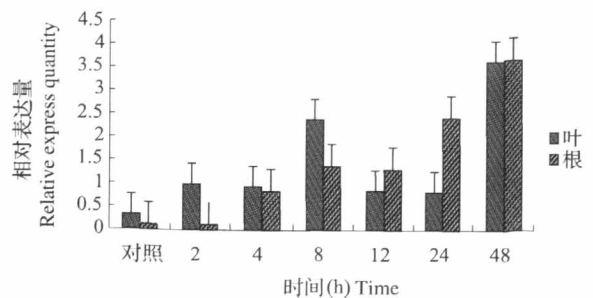


图9 *Ntδ-OAT* 在 ABA 诱导处理不同时间点的表达  
Fig.9 The expression patterns of *Ntδ-OAT* induced by ABA with different times

### 3 讨论

#### 3.1 *Ntδ-OAT* 基因的克隆

本研究采用同源克隆法从受干旱胁迫诱导的普通烟草中克隆到一个未报道的胁迫诱导应答基因 *Ntδ-OAT*, 全长 1781bp, 编码 477 个氨基酸。通过同源性比对结果显示所克隆的 *Ntδ-OAT* 基因与其他植物  $\delta$ -*OAT* 基因具有很高的同源性, 主要功能域 PLP 结合位点在进化中比较保守。

#### 3.2 *Ntδ-OAT* 的结构分析

结构域分析表明 *Ntδ-OAT* 初级结构由 3 部分组成, 分别为非保守的 N 末端、PLP 结合区域和 C 末端, 其 N-端前肽序列具备线粒体转运肽的基本特征。前人研究证实除酵母外所有动物和植物鸟氨酸转氨酶都是由核基因编码, 在胞质中合成蛋白质后利用其转运肽序列进行线粒体定位<sup>[8,15]</sup>, 说明普通烟草 *Ntδ-OAT* 也是定位于线粒体基质。这与最近报道的欧洲赤松精氨酸酶和  $\delta$ -*OAT* 定位于线粒体中一致<sup>[16]</sup>。跨膜结构预测 *Ntδ-OAT* 可能为跨膜蛋白, 存在 3 个可能的跨膜区。

#### 3.3 *Ntδ-OAT* 基因的功能预测

通过  $K_A/K_S$  分析选择压力, 发现 *Ntδ-OAT* 基因进化的非常保守, 具有一般鸟氨酸转氨酶保守的功能, 即以氧化戊二酸为氨基受体催化 L-Orn 转换为谷氨酸- $\gamma$ -半醛 (GSA), 进而生成脯氨酸<sup>[2]</sup>。系统进化分析表明, *Ntδ-OAT* 与其他双子叶植物  $\delta$ -*OAT* 亲缘关系较近, 可能由同一祖先进化而来, 功能也最为相似。而在拟南芥、豌豆等双子叶植物中研究证实  $\delta$ -*OAT* 在脯氨酸生物合成过程中起着重要作用, 并对多种不同类型的压力响应<sup>[8,10]</sup>, 进而推测普通烟草 *Ntδ-OAT* 的主要功能是在渗透胁迫下催化脯氨酸的生成来适应逆境胁迫。

#### 3.4 *Ntδ-OAT* 基因的表达分析

利用实时荧光定量 PCR, 分析普通烟草不同部位 *Ntδ-OAT* 基因的表达情况发现, 非胁迫条件下, *Ntδ-OAT* 基因的整体表达水平较低, 其转录水平由高到低依次为茎 > 芽 > 叶 > 根。与甘蔗 *Scδ-OAT* 的表达模式相似, 甘蔗是茎中表达较高, 其次是叶和根<sup>[9]</sup>; 但与蒺藜苜蓿 *Mtδ-OAT* 表达模式不同, 蒺藜苜蓿是在根和芽中的表达量最大, 在叶片和生殖器官较低<sup>[17]</sup>, 推测原因是豆科植物根瘤具有固氮能力, 而  $\delta$ -*OAT* 基因在高氮条件下表达水平较高<sup>[6]</sup>。渗透胁迫条件下, 普通烟草主要通过叶和根中 *Ntδ-OAT* 基因的上调表达来适应逆境胁迫。

对干旱、高盐、低温、ABA 处理下的普通烟草 *Ntδ-OAT* 基因的表达情况进行分析表明: (1) *Ntδ-OAT* 基因在这些逆境胁迫诱导下都上调表达, 但干旱胁迫和 ABA 处理比盐胁迫和低温胁迫更高效地诱导 *Ntδ-OAT* 基因的表达; (2) 渗透胁迫条件下 *Ntδ-OAT* 基因主要在胁迫后期上调表达, 与前人研究基本一致, 胁迫下脯氨酸的积累优先通过 Glu 途径进行, Orn 途径在胁迫后期起主要作用<sup>[17-18]</sup>。但盐胁迫下根中 *Ntδ-OAT* 基因在胁迫前期表达, 分析原因可能是根对高盐产生的离子毒害较为敏感, 在受到胁迫时根中反应最迅速。低温胁迫下根中 *Ntδ-OAT* 基因表达变化不显著, 可能是因为低温对地下部分影响比较小, 其变化幅度较小。

普通烟草 *Ntδ-OAT* 基因的获得为脯氨酸合成酶系基因的系统研究奠定了基础, 后续研究可对普通烟草的脯氨酸合成途径进行系统分析, 明确 Glu 途径和 Orn 途径之间的相互调控机制; 还可采用基因沉默的方法研究 *Ntδ-OAT* 基因对植物生长发育影响及其抗渗透胁迫作用; 利用酵母双杂交技术从蛋白角度探究  $\delta$ -*OAT* 蛋白的结构、功能, 进一步分析普通烟草 *Ntδ-OAT* 在抗逆生理生化方面的具体功能; 构建普通烟草 *Ntδ-OAT* 基因的表达载体进行转基因研究, 利用基因工程手段改良烟草的抗逆品质, 对提高作物的生产利用价值有重要意义。

#### 参考文献

- [1] 中国农业科学院烟草所. 中国烟草栽培学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005
- [2] Stránká J, Kopečný D, Tylichová M, et al. Ornithine delta-aminotransferase: An enzyme implicated in salt tolerance in higher plants [J]. *Plant Signal Behav*, 2008, 3 (11): 929-935
- [3] Slama I, Messedi D, Ghnaya T, et al. Effects of water deficit on growth and proline metabolism in *Sesuvium portulacastrum* [J]. *Environ Exp Bot*, 2006, 56 (3): 231-238
- [4] Bone D H. Metabolism of citrulline and ornithine in mung bean mitochondria [J]. *Plant Physiol*, 1959, 34: 171-175
- [5] Mazelia M, Fowden L. Conversion of ornithine into proline by enzymes from germinating peanut cotyledons [J]. *Phytochemistry*, 1969, 8: 801-809
- [6] Delauney A J, Hu C A A, Kishor P B K, 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
- [7] Roosens N H C J, Bitar F A, Loenders K, et al. Overexpression of ornithine- $\delta$ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants [J]. *Molec Breedi*, 2002, 9: 73-80
- [8] Roosens N H C J, Thu T T, Iskandar H M, et al. Isolation of ornithine- $\delta$ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117: 263-271
- [9] 张积森, 陈由强, 郭春芳, 等. 甘蔗水分胁迫响应的  $\delta$ -鸟氨酸转氨酶基因克隆及分子特征分析 [J]. *热带作物学报*, 2009, 30 (8): 1062-1068

(下转第 600 页)

- nol oxidase activities in heats and flours from Australian and U. S. cultivars [J]. *J Cereal Sci*, 1994, 19: 291-296
- [5] 杨杰, 赵娇, 赵福昌, 等. 日本对虾中多酚氧化酶同工酶及分子量测定 [J]. *中国公共卫生*, 1999, 15(6): 548
- [6] 郑校先, 戚晓玉, 周培根, 等. 乌贼墨中多酚氧化酶的分离及纯化 [J]. *上海水产大学学报*, 2001, 10: 154-157
- [7] Bertrand G, Muttermilch W. On the presence of a tyrosinase in the wheat bran. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, 1907, 144: 1285
- [8] 葛秀秀, 张立平, 何中虎, 等. 冬小麦 PPO 活性的主基因 + 多基因混合遗传分析 [J]. *作物学报*, 2004, 30(1): 18-20
- [9] 葛秀秀, 何中虎, 杨金, 等. 我国冬小麦品种多酚氧化酶活性的遗传变异及其与品质性状的相关分析 [J]. *作物学报*, 2003, 29(3): 481-485
- [10] Jimenez M, Dubcovsky J. Chromosome location of genes affecting polyphenol oxidase activity in seeds of common and durum wheat [J]. *Plant Breeding*, 1999, 118: 395-398
- [11] Udall J. Important alleles for noodle quality in winter wheat as identified by molecular markers [M]. M. S. Thesis, University of Idaho, Moscow, ID, 1997
- [12] Demeke T, Morris C F, Campbell K G, et al. Wheat polyphenol oxidase: distribution and genetic mapping in three inbred line populations [J]. *Crop Sci*, 2001, 41: 1750-1757
- [13] Raman R, Raman H, Johnstone K, et al. Genetic and in silico comparative mapping of the polyphenol oxidase gene in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Funct Integr Genom*, 2005, 5: 185-200
- [14] 张立平, 葛秀秀, 何中虎, 等. 普通小麦多酚氧化酶活性的 QTL 分析 [J]. *作物学报*, 2005, 31(1): 7-10
- [15] Mares D J, Campbell A W. Mapping components of flour and noodle color in Australian wheat [J]. *Aus J Agric Res*, 2001, 52: 1297-1309
- [16] 孙道杰, 张立平, 夏先春, 等. 小麦多酚氧化酶 (PPO) 活性的 SSR 标记筛选与验证 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(7): 1295-1299
- [17] Sun D J, He Z H, Xia X C, et al. A novel STS marker for polyphenol oxidase activity in bread wheat [J]. *Molecular Breeding*, 2005, 16: 209-218
- [18] He X Y, He Z H, Zhang L P, et al. Allelic variation of polyphenol oxidase (PPO) genes located on chromosomes 2A and 2D and development of functional markers for the PPO genes in common wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 47-58
- [19] Lagudah E S, Appels R, McNeil D. The Nor-D3 locus of *Triticum tauschii*: natural variation and genetic linkage to markers in chromosome 5 [J]. *Genome*, 1991, 34: 387-395
- [20] Röder M S, Korzun V, Wendehake K. A microsatellite map of wheat [J]. *Genetics*, 1998, 149: 2007-2023
- [21] Xu S B, Tao Y F, Yang Z Q, et al. A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas*, 2002, 24: 335-336
- [22] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155: 945-959
- [23] Edward Bucker Lad Diversity Research [EB/OL]. [2007-09-08]. <http://www.maizegenetics.net/bioinformatics>
- [24] McCaig T N, Fenn D Y K, Knox R E, et al. Measuring polyphenol oxidase activity in a wheat breeding program [J]. *Canadian J Plant Sci*, 1999, 79: 507-514
- [25] Taneja S R., Abrol Y P, Sachar R C. Modulation of o-diphenolase and monophenolase enzymes during wheat grain development [J]. *Cereal Chem*, 1974, 51: 457-465
- [26] 肖永贵, 何心尧, 刘建军, 等. 中国冬小麦品种多酚氧化酶活性基因等位变异检测及其分布规律研究 [J]. *中国农业科学*, 2008, 41(4): 954-960
- [27] 郝晨阳, 董玉琛, 王兰芬, 等. 我国普通小麦核心种质的构建及遗传多样性分析 [J]. *科学通报*, 2008, 53(8): 908-915
- [28] Delphine V I, Albrecht E M, Claude L, et al. Population structure and genetic diversity in a commercial maize breeding program assessed with SSR and SNP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 120: 1289-1299

(上接第 593 页)

- [10] Jana Stránská, Martina Tylichová, David Kopečný, et al. Biochemical characterization of pea ornithine- $\delta$ -aminotransferase: Substrate specificity and inhibition by di- and polyamines [J]. *Biochimie*, 2010, 3: 1-9
- [11] Nataraj Sekhar P, Naga Amrutha R, Shubhada Sangam, et al. Biochemical characterization, homology modeling and docking studies of ornithine  $\delta$ -aminotransferase-an important enzyme in proline biosynthesis of plants [J]. *J Mole Graphi Mod*, 2007, 26(4): 709-719
- [12] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molec Biol Evol*, 2007, 24: 1596-1599.
- [13] 王俊, 丛丽娟, 郑洪坤. 常用生物数据分析软件 [M]. 北京: 科学出版社, 2008: 249-250
- [14] Nielsen R. Molecular signatures of natural selection [J]. *Annu Rev Genet*, 2005, 39: 197-218
- [15] Inana G, Totsuka S, Redmond M, et al. Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986, 83(5): 1203-1207
- [16] Rafael A Cañas, David P Villalobos, Sara M Díaz-Moreno, et al. Molecular and Functional Analyses Support a Role of Ornithine-Aminotransferase in the Provision of Glutamate for Glutamine Biosynthesis during Pine Germination [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148: 77-88
- [17] Patrick A, Laurent T, Nathalie B, et al. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features [J]. *Physiol Planta*, 2002, 120(3): 442
- [18] 吴杨, 贺俐, 李伟, 等. 斑茅  $\delta$ -OAT 基因克隆及其序列分析 [J]. *植物研究*, 2009, 29(5): 577-584



作者: 焦蓉, 刘贯山, 刘好宝, 王树林, 侯娜, 王全贞, 靳义荣, 刘朝科, 冯祥国, 胡晓明, JIAO Rong, LIU Guan-shan, LIU Hao-bao, WANG Shu-lin, HOU Na, WANG Quan-zhen, JIN Yi-rong, LIU Chao-ke, FENG Xiang-guo, HU Xiao-ming

作者单位: 焦蓉, 王树林, 侯娜, 王全贞, 靳义荣, JIAO Rong, WANG Shu-lin, HOU Na, WANG Quan-zhen, JIN Yi-rong(中国农业科学院烟草研究所/农业部烟草类作物质量控制重点开放实验室, 青岛266101; 中国农业科学院研究生院, 北京100081), 刘贯山, 刘好宝, LIU Guan-shan, LIU Hao-bao(中国农业科学院研究生院, 北京, 100081), 刘朝科, 冯祥国, 胡晓明, LIU Chao-ke, FENG Xiang-guo, HU Xiao-ming(川渝中烟工业公司, 成都, 610000)

刊名: 植物遗传资源学报 

英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources

年, 卷(期): 2011, 12(4)

## 参考文献(18条)

1. Jana Stránská;Martina Tylichová;David Kopecny Biochemical characterization of pea ornithine- $\delta$ -aminotransferase:Substrate specificity and inhibition by di-and polyamines 2010(03)
2. 张积森;陈由强;郭春芳 甘蔗水分胁迫响应的 $\delta$ -鸟氨酸转氨酶基因克隆及分子特征分析 2009(08)
3. 吴杨;贺俐;李伟 斑茅 $\delta$ -OAT基因克隆及其序列分析 2009(05)
4. Patrick A;Laurent T;Nathalie B Transcriptional regulation of proline biosynthesis in Medicago truncatula reveals developmental and environmental specific features 2002(03)
5. Rafael A Ca(n)as;David P Villalobos;Sara M Díaz-Moreno Molecular and Functional Analyses Support a Role of Ornithine Aminotransferase in the Provision of Glutamate for Glutamine Biosynthesis during Pine Germination 2008
6. Inana G;Totsuka S;Redmond M Molecular cloning of human ornithine aminotransferase mRNA 1986(05)
7. Nielsen R Molecular signatures of natural selection[外文期刊] 2005
8. 王俊;丛丽娟;郑洪坤 常用生物数据分析软件 2008
9. Tamura K;Dudley J;Nei M MEGA4:Molecular Evolutionary Genetics Analysis(MEGA) software version 4.0[外文期刊] 2007
10. Nataraj Sekhar P;Naga Amrutha R;Shubhada Sangam Biochemical characterization, homology modeling and docking studies of ornithine  $\delta$ -aminotransferase-an important enzyme in proline biosynthesis of plants 2007(04)
11. Slama I;Messedi D;Ghnaya T Effects of water deficit on growth and proline metabolism in Sesuvium portulacastrum [外文期刊] 2006(03)
12. Stránská J;Kopecny D;Tylichová M Ornithine delta-aminotransferase:An enzyme implicated in salt tolerance in higher plants 2008(11)
13. Roosens N H C J;Thu T T;Iskandar H M Isolation of ornithine- $\delta$ -aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in Arabidopsis[外文期刊] 1998
14. Roosens N H C J;Bitar F A;Loenders K Overexpression of ornithine- $\delta$ -aminotransferase increases proline biosynthesis and confers osmotolerance in transgenic plants 2002
15. Delauney A J;Hu C A A;Kishor P B K Cloning of ornithine-aminotransferase cDNA from Vigna aconitifolia by trans complementation in Escherichia coli and regulation of proline biosynthesis 1993
16. Mazelis M;Fowden L Conversion of ornithine into proline by enzymes from germinating peanut cotyledons[外文期刊] 1969
17. Bone D H Metabolism of citrulline and ornithine in mung bean mitochondria[外文期刊] 1959
18. 中国农业科学院烟草所 中国烟草栽培学 2005