

枸杞脂肪酰基还原酶基因的克隆及表达分析

石晶, 石鑫强, 管翠萍, 郑蕊, 杨亚璐, 王丽娟, 梁文裕

(宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘要:脂肪酰基还原酶基因广泛参与植物的脂类代谢过程, 影响植物雄配子体花药发育以及表皮蜡酯合成等。本研究利用 RACE 方法从宁夏枸杞(宁杞 1 号)花药中克隆脂肪酰基还原酶 *LbMS2-2* 基因, 开放阅读框全长 1800 bp, 编码 599 个氨基酸, 等电点为 9.00。生物信息学分析表明, *LbMS2-2* 蛋白定位于叶绿体中, 该蛋白序列与茄科植物甜辣椒、烟草和马铃薯中的脂肪酰基还原酶表现出较高的序列相似性; 实时荧光定量 PCR 显示, *LbMS2-2* 基因在枸杞花器官中表达, 且在枸杞花药发育的四分体时期、单核花粉时期和双核花粉时期表达量较高。原位杂交结果证实该基因只在花药绒毡层和小孢子中表达。亚细胞定位结果进一步验证 *LbMS2-2* 基因的叶绿体定位。以上结果表明, 枸杞脂肪酰基还原酶基因是枸杞花器官发育过程中的重要基因。

关键词:枸杞; 花药发育; 脂肪酰基还原酶; *LbMS2-2*; 表达分析

Cloning and Expression Analysis of Fatty Acyl Reductase in *Lycium barbarum* L.

SHI Jing, SHI Xin-qiang, GUAN Cui-ping, ZHENG Rui, YANG Ya-jun, WANG Li-juan, LIANG Wen-yu

(College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract: Fatty acyl reductase are widely involved in the process of lipid metabolism, affecting anther development and cuticular wax sunthesis of male gametophytes. In this study, *LbMS2-2* gene encoding fatty acyl reductase was isolated using RACE(rapid-amplification of cDNA ends)method from Ningxia wolfberry (*Lycium barbarum* L.). *LbMS2-2* contains an open reading frame(ORF)with length of 1800 bp, encoding a deduced protein of 599 amino acid residues, with its isoelectric point of 9.00. Bioinformatic analysis indicated that *LbMS2-2* protein was located to the chloroplast. The amino acid sequence of *LbMS2-2* shared high homology with fatty acyl reductase from *Capsicum annuum* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Solanum tuberosum* L.. Real-time fluorecence quantitative PCR results revealed that *LbMS2-2* expressed highly in tetrad stage, single nucleus pollen stage and double nucleus pollen stage of anther development. The results of subcellular localization and *in situ* hybridization further confirmed that the *LbMS2-2* gene mainly detected in the tapetum and microspores of anther, and its protein was predominantly localized in chloroplast. As the result, the fatty acyl reductase is an important gene in the organ development of *Lycium barbarum* L.

Key words: wolfberry (*Lycium barbarum* L.); anther development; fatty acyl reductase; *LbMS2-2*; expression analysis

深入对花器官结构多样性的认识是探讨被子植物系统发育的重要基础。目前发现的大量花器官变异提高了我们对被子植物花结构多样性的认识。通过不懈努力,人们对植物花药发育分子机制有了一定认识,揭示了一批花药发育过程中的重要调控基因,

涉及花药分化阶段、绒毡层发育阶段和花粉发育阶段等^[1]。这些基因在花器官发育过程中一旦发生改变,会造成植物雄性器官的部分败育及完全败育。拟南芥 *CER1* (*ECERIFERUM 1*) 基因编码膜蛋白,是花发育过程中花药及花粉表皮蜡酯和含油层合成的关键

收稿日期: 2017-08-03 修回日期: 2017-08-29 网络出版日期: 2018-02-09

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180209.0903.022.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31401444, 31260065, 31360361)

第一作者研究方向为植物分子生物学。E-mail: shijing216@aliyun.com

通信作者: 梁文裕, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: liangwy2009@163.com

基因。*CER1* 基因主要在拟南芥的茎和花中高效表达,研究表明 *cer1* 突变体茎上的蜡酯明显减少,花粉壁含油层呈现出颗粒状表面,含油层中脂滴个体小数量多。生化分析表明,*cer1* 突变体蜡酯形成过程中烷烃、酮和醇的合成途径受阻,推测 *CER1* 蛋白可能作为一种酶参与蜡酯合成途径中长链烷烃的形成^[2]。拟南芥中的 *nefl* (*no exine formation 1*) 突变体,在小孢子从四分体释放之后发生异常,开花期花粉粒完全败育。透射电镜揭示突变体中花药孢粉素虽正常形成,但不能正确积累在小孢子原生质膜上,因此导致小孢子外壁异常发育。突变体中脂类成分含量较少的现象也说明 *NEF1* 参与到脂质合成代谢过程中^[3]。*MS2* (*MALE STERILITY 2*) 基因是拟南芥中较早发现的雄性不育基因,该基因在野生型花药绒毡层中特异表达。*ms2* 突变体花粉外壁非常薄,因此外壁对醋酸试验很敏感。研究表明 *MS2* 基因的氨基酸序列与加州希蒙得木蛋白 *FAR* (*Fatty Acid Reductase*) 相似度很高,编码脂肪酰基还原酶,参与花药发育过程中脂肪酸向脂肪醇的转变^[4]。本人早年克隆了拟南芥 *MS2* 基因在水稻中的同源基因 *DPW* (*Defective Pollen Wall*), 该基因同样在水稻花药绒毡层中特异表达,基因突变后引起水稻花药绒毡层发育异常且花粉败育,导致水稻雄性不育。*DPW* 基因也编码脂肪酰基还原酶,在水稻花药绒毡层中的脂类代谢过程中发挥重要作用^[5]。

枸杞 (*Lycium barbarum* L.), 是茄科小灌木枸杞的成熟子实。枸杞药食同源的历史悠久,是驰名中外的名贵中药材,早在《神农本草经》中就被列为上品,称其为“久服轻身不老、耐寒暑”,有延衰抗老的功效。枸杞中含有多种氨基酸,并含有甜菜碱、玉蜀黍黄素、酸浆果红素等特殊营养成分,使其具有非常好的保健功效。宁夏枸杞是唯一被载入新中国药典的枸杞品种,所以素有“天下枸杞出中国,宁夏枸杞甲天下”的美誉。宁夏枸杞中的宁杞1号是宁夏农林科学院1973年选育的高产、优质、适应性强的枸杞品种,已在宁夏、新疆、甘肃、内蒙古、湖北、陕西等省、自治区推广种植。宁杞1号是我国枸杞的主栽品种,在生产中表现丰产、稳产、果粒大、品质好、易制干、病虫害综合抗性高、管理简单等综合优势。近年来,基于具有重大的经济价值,单子叶植物的禾本科、双子叶植物的茄科、豆科和十字花科中的雄性生殖发育相关问题最引起人们的重视^[6-9],但是对于重要的中药材植物资源——枸杞上的研究却少见报道。此外,现有对枸杞的研究多集中在枸杞抗逆胁迫机理分析、果实活性成分研究等方面,

对于枸杞生殖发育过程的分子机理研究相对较少^[10-13]。

本研究克隆了多年生灌木枸杞中花药发育相关的脂肪酰基还原酶基因 *LbMS2-2*, 对其进行序列和生物信息学分析,结合 Realtime-PCR 技术检测 *LbMS2-2* 基因在枸杞花药发育不同时期以及根、茎、叶中的表达情况,同时利用原位杂交技术和亚细胞定位对基因的时空表达做进一步验证及分析。这些试验的探索为研究该基因在枸杞花药发育过程中的机理奠定分子基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验所用材料均为宁夏枸杞品种的宁杞1号,该样品采于2016年6月宁夏育新枸杞种业有限公司标准化管理的枸杞试验大田。采集过程参照文献[14-16]的方法进行,分别对枸杞的根、茎、叶的幼嫩组织以及花药发育雄蕊原基时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核花粉时期、双核花粉时期和成熟花粉时期的枸杞花蕾进行采样,相同材料重复3次采样。花蕾的采集利用形态观察、纵横径测量和花药压片法,采集后在干冰上剥离花蕾中的花药,并立即置于液氮中速冻,存于-80℃冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 RNA提取和cDNA第一链的合成 枸杞各组织材料总RNA的提取按照Takara公司的RNAiso plus产品说明书进行,提取后利用NanoDrop超微量分光光度计测定RNA样品浓度,琼脂糖凝胶电泳检测RNA完整性。cDNA第一链的合成按照Takara公司的PrimeScript II 1st Strand cDNA试剂盒说明书进行。

1.2.2 *LbMS2-2* 基因的克隆 参照RACE操作手册,利用NCBI数据库已公布的枸杞脂肪酰基还原酶基因的部分序列,用Primer Premier 5.0软件在保守区域进行3'-RACE和5'-RACE的引物设计,正向引物为5' LbMS-2A/B,反向引物为3' LbMS-2A/B(表1)。提取枸杞花发育各时期混合花药的总RNA,以反转录后的cDNA第一链为模版,进行枸杞脂肪酰基还原酶基因的5'末端扩增(5'-RACE)和3'末端扩增(3'-RACE),具体方法参照Clontech公司的SMARTer™ RACE cDNA Amplification试剂盒说明书。PCR扩增目的片段回收纯化后送上海生工生物工程股份有限公司测序。随后将测序结果与已知序列进行拼接,设计1对全长引物,扩增基因的

ORF 区域,引物分别为 LbMS2-2F 和 LbMS2-2R (表 1),由此获得枸杞花药基因 *LbMS2-2* 的 ORF 全

长,PCR 产物回收纯化后连接到 pMD18-T 载体上,送上海生工生物工程股份有限公司测序。

表 1 引物列表

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer	引物说明 Primer introduction	引物序列 Primer sequence(5'-3')
5'LbMS-2A	5'-RACE	CTCTAATTTTCTGGCCCGCTACGTT
5'LbMS-2B	Rapid amplification of cDNA 5'ends	CTAGGGAAGGAGTTTTTGTTGAATTCC
3'LbMS-2A	3'-RACE	CGGTAGCAGCCAGGCTGAAATTAAGG
3'LbMS-2B	Rapid amplification of cDNA 3'ends	TAGGCATTACCAAGTTTCTGAGAGG
LbMS2-2F	<i>LbMS2-2</i> 开放阅读框扩增	ATGGAGGCTATGACTACTCTAAGTTG
LbMS2-2R	Amplification of <i>LbMS2-2</i> ORF	CTATGAGGATGAACTGCATAACCCTC
RTActin-F	实时荧光定量内参	TCTGGTGATGGCGTGA
RTActin-R	Reference gene <i>LbActin</i>	GATGGCTGGAAGAGGAC
RTMS2-2F	实施荧光定量 PCR	GTTATTGAGAGCACCTATAGAGAAC
RTMS2-2R	Real-time PCR of <i>LbMS2-2</i>	CTAATGGATTTACAACAGACGAAGC

1.2.3 生物信息学分析 枸杞 *LbMS2-2* 蛋白的理化性质相关分析采用 Prot Param 在线工具(<http://web.expasy.org/protparam/>)^[17]。通过 SOMPA 在线工具(<http://www.expasy.cn/tools>)和 Phyre2 在线工具(<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2>)分别完成 *LbMS2-2* 蛋白质的二级结构和三维结构分析。利用 TargetP 1.1 Serve 在线工具(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>)和 WoLF PSORT Prediction 在线工具(<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)预测枸杞 *LbMS2-2* 蛋白的亚细胞定位。在 NCBI 上下载 *LbMS2-2* 基因的同源序列,通过 EMBL-EBI 在线工具(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)做多序列比对,通过 MEGA 5.0 软件构建系统发生演化树,利用在线工具(<http://pfam.xfam.org/>)对基因保守结构域进行分析。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 利用合成好的枸杞根、茎、叶以及花药发育雄蕊原基时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核花粉时期、双核花粉时期和成熟花粉时期的花药 cDNA 作为模板,枸杞组成型表达基因 *Actin* 作为内参,通过 Primer Premier 5.0 软件设计 Realtime-PCR 引物,检测脂肪酰基还原酶基因在不同组织及器官中的相对表达量。实时荧光定量中 *LbMS2-2* 基因的引物为 RTMS2-2F 和 RTMS2-2R,枸杞内参 *Actin* 基因引物为 RTActin-F 和 RTActin-R(表 1)。依据 SYBR Premix Ex TaqTM II 产品试剂盒说明书(TAKARA 公司)进行实时荧光定量 PCR 反应,所用仪器为 ABI 公司的 7300 Fast Re-

al-Time PCR System。PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s(荧光检测),72 °C 延伸 30 s,34 个循环,每个样品进行 3 次重复。相对表达量的分析采用 2^{-ΔΔCt} 方法^[18],显著性差异分析采用 SPSS 22.0 软件。

1.2.5 原位杂交 将构建在载体上的 *LbMS2-2* 基因 ORF 全长片段酶切后,按照 ROCHE 标记试剂盒(CAT. NO. 11277073910)及 TAKARA 体外转录试剂盒(SP6 RNA Polymerase 2520A 和 T7 RNA Polymerase 2540A)的操作说明书进行体外转录,转录产物分别用于反义探针和正义探针。新鲜枸杞花药采集后用 FAA 固定液固定,真空抽气机中抽气 10 min 左右,经梯度乙醇脱水后,用石蜡包埋。用 LEICA2150 切片机对花药进行 4~10 μm 的横切。RNA 杂交和探针的免疫检测参照 J. Shi 等^[5]的方法。

1.2.6 亚细胞定位 利用已经得到的枸杞 *LbMS2-2* 基因全长 ORF 序列,引入 *Kpn* I 和 *Xba* I 两个酶切位点,将 PCR 扩增片段构建在 CaMV35s-GFP 载体上,将 *LbMS2-2* 蛋白 C 端和 GFP 蛋白融合,得到 *LbMS2-2*-GFP 蛋白。此外,选用已知在叶绿体定位的蛋白 At5g19750 作为标记,构建在 pCAMBIA1301-35S 载体上,将 At5g19750 蛋白 C 端与 RFP 蛋白融合,得到 At5g19750-RFP 蛋白。为增强融合蛋白的表达,选取 35S 作为启动子。从生长 3~4 周健壮的拟南芥叶片中分离悬浮原生质体,将已构建好的融合蛋白通过 PEG 介导转染原生质体,22 °C 弱光照

条件下培养约 18 h,随后在激光共聚焦显微镜下进行观察。

2 结果与分析

2.1 枸杞 *LbMS2-2* 基因克隆和序列分析

以反转录得到的枸杞花药 cDNA 第一链为模板,在 NCBI 数据库已知基因部分序列的保守区域中设计 3'-RACE 引物和 5'-RACE 引物,用设计好的引物进行序列 3'末端扩增(3'-RACE)以及 5'末端的扩增(5'-RACE)。扩增后产物回收并纯化送测序,对测序结果进行序列拼接。利用 ORF 全长扩增引物 *LbMS2-2F* 和 *LbMS2-2R*,扩增基因的编码序列(图 1),胶回收纯化 PCR 产物后连接到 pMD18-T 载体上,送测序。测序后得到的序列与电子拼接得到的序列一致。将该序列命名为 *LbMS2-2*, GenBank 登录号为 KY926850。序列分析结果表明,基因 ORF 片段全长 1800 bp,编码 599 个氨基酸(图 2)。基于 NCBI 数据库检索分析发现 *LbMS2-2* 基因编码脂肪酰基还原酶,属于 FAR(Fatty Acyl Reductase)超基因家族成员之一,该家族的许多蛋白作为脂肪酰基还原酶,作用于中长链脂肪酸的合成。已有报道证实,它们参与了昆虫信息素的形成、植物表皮蜡酯的生产以及哺乳动物体内蜡酯的合成。拟南芥中的 *MS2* 基因也被证实具有同样功能,基因突变后导致拟南芥花药绒毡层及花粉上的脂成分发生改变。

枸杞 *LbMS2-2* 蛋白的分子量为 66.66 kD,分子式为 $C_{2960}H_{4721}N_{811}O_{875}S_{31}$,等电点为 9.00。该蛋白的不稳定系数为 38.73,脂肪系数 88.05,平均亲水系数为-0.233。含有带负电荷的残基(Asp + Glu) 61 个,含有带正电荷的残基(Arg + Lys) 73 个。软件预测 *LbMS2-2* 蛋白的二级结构发现蛋白中的 α 螺旋为 38.56%,不规则卷曲比例为 33.72%,延伸链结构为 18.86%, β -转角所占的比例为 8.85%。对茄科植物中同源的脂肪酰基还原酶蛋白质三维结构进行比较,发现枸杞 *LbMS2-2* 蛋白(图 3A)、烟草(*Nicotiana tabacum* L.) XP_016439946.1 蛋白(图 3B)、马铃薯(*Solanum tuberosum* L.) XP_006360607.1 蛋白(图 3C)以及甜辣椒(*Capsicum annuum* L.) XP_016544884.1 蛋白(图 3D)的三维结构具有一定的相似性,都包含 α 螺旋、不规则卷曲和延伸链结构。通过亚细胞定位分析软件 TargetP 1.1 Serve 和 WoLF PSORT Prediction 预测,枸杞 *LbMS2-2* 蛋白定位在细胞叶绿体中。

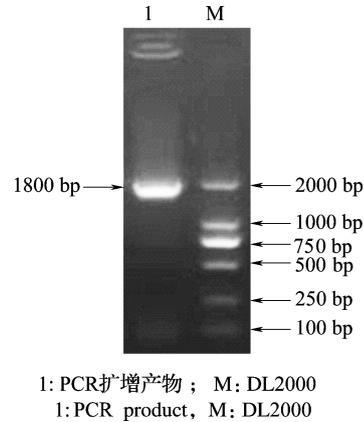


图 1 *LbMS2-2* 基因的 ORF 扩增片段

Fig. 1 The ORF fragment of *LbMS2-2* gene

```
1 ATGGAGGCTATGAGTACTCTAAGTTGTTCTCTATTATATCAAAAACCTATTATGAAATTG
1 M E A M S T L S C S S I I S K T I M K L
61 TCTAAGAATTGCAAAATGGTGCCTCCCAAGAAAGTTGCAACATGGTATATTGCCAAAGT
61 S D H S T A L G S L F L T P N G S S Q A
21 S K N C K W C P P K K V D N M V Y C Q S
21 AGCAGTGGTATAAATGCTATAAAAATCTGGTAAATGCTTCTTCTGTAATAAATCAAGATCA
41 S S G I N A I K S G N A S S V I T K R S
41 TCGGATCATAGCACAGCTTTAGGAAAGTTGTTTTGACTCCAAACGGTAGCAGCCAGGCT
181 S D H S T A L G S L F L T P N G S S Q A
181 GAAATTAAGGTGAAGGATTTGGTGCCTTATGGTCAGTCAAAAGCATGATGATGATGGTATA
61 E I K V K D L V P Y G Q S C K H D D D G I
241 GGCATTACCAAGTTCTGAGAGGCAAAAGCATTTCTATTACTGGTCAACTGGTCTTTCTG
81 G I T K F L R G K A F L I T G A T G F L
301 GGAAAAGTCTTAATTGAGAAGATCTTAAAGGACAGCACCTGATGTGAACAAAATATTCTC
101 G K V L I E K I L R T A P D V N K I F I
361 TTGATCAAGGCAAAAGAACAAACCGAGTTGCTATGCAAGATGGAAGAATGAAATCCCTCAAT
121 L A N V I A K E V D I I V N S A A N T T
421 L I K A K N K R V A M Q R L K N E I L N
141 GCTGATATATTCAATCGCCTCAAACAGTCCATGGGAAATCATATCAGACTTTCATGTTG
481 A D I F N R L K Q V H G K S Y Q T F H L
161 AGCAAGTGTCTACCTGTGGTAGGAAATGTTTGTGAAACTCATCTCGGATTAGACAAGGT
541 S K L L P V V G N V C E E T H L G L D K G
181 TTAGCCAATGTGATCGCTAAAAGAGTGCACATAATTTGTAATCTGCTGCTAATACTACT
601 L A N V I A K E V D I I V N S A A N T T
201 TTTGATGAAAGGTATGATATTGCACTTGATATAAACACCGGTGGACCTAGCCGCCAATG
661 F D E R Y D I A L D I N T G G P S R L M
221 AATTATGCAAAACAATGTCATAACCTGAAGCTTTTCTCCAAATATCCACAGTTATGTT
721 N Y A K Q C H N L K L F L Q I S T A Y V
241 AACGGACAAACGACAGGAAGATCATGGAAGAAAGCTTTCTGTTCTGGAGACGATATAACA
781 N G Q R Q G R I M E K P F C S G D S I T
261 AAAGAGACTCCTCTCTGGAATTCACAAAACCTCCTCCCTAGTTTGAATGTTGAAGAT
841 K E T P L S G I H Q N S F P S L N V E D
281 GAGATAAAGCTGATTTTGGAACTTAAACAGCTGAGAAAGATAACGTAAGCGGCGCAGAAA
901 E I K L I L E S K Q A V E D N V A G Q K
301 ATTAGAGAACTTGGCTTGGAAAGAGCGCAAAATTTGGGTGGCAAGCACTTATGATTT
961 I R E L G L E R A N K F G W Q D T Y V F
321 ACCAAGGCTATGGGAGAGATGATGATCGATACCATGAGAAAGTATATACAGTAGTAATA
1021 T K A M G E M M I D T M R S D I P V V I
341 ATTCCAGCAAGTGTATTGAGAGACCTATGGAACCACTTCAAGTGGATGGATGGAAGGA
1081 I R P S V I E S T Y R E P F S G W H E G
361 AACAGATGATGGATCCAAATTTCTCCACTATGGCAAGGGGAGCTACCCGGTTTTCTT
1141 N R M M D P I I L H Y G K G Q L T G F L
381 GTAGATCCCAACGGAGTTCTAGATGTGGTTCCAGTACATGGTTGTGVAACGCAACGTTG
1201 V D P N G V L D V P V P D M V N A T L
401 GCAGCTATTGCAAAAGCAGCGGGCAGCAGGAAACCCGGGAGTAATATTACCAAGTTGCT
1261 A A I A K H G A A G K P G S N I Y Q V A
421 TCGTCTGTTGAAATCCATAGTCTTCAAGGACCTGGCCAGCTGCTTTTCATCACTTC
1321 S S V V N P L V F K D L A T L L F D H F
441 AATTCTTCCAGTATATTGACTCCAAAGGAGACCTATTCATGTTCCAAAGTGAAGCTG
1381 N S S P Y I D S K G R P I H V P R H K L
461 TTGAACCTCCATGGAAGACCTGTCTTTCCACCTCTGGCAAGACCGTATTAACGAAAGTGGG
1441 L N S M E D L S F H L W Q D A I N R S G
481 CTAACAGATACCGCTGATCCTAACGGAAAGTTGCAAGAACTCGAGAATATTCTGCAGA
1501 L T D T A D P N G K L S R K L E N I C R
501 AAATCAGTGGAGCAAGCAAGTACTTGGCACATATCTATGAAACATCACTTTTATGGA
1561 K S V E Q A K Y L A H I Y E P Y T F Y G
521 GGAAGATTGACAACGCAACACTCAGTGGTTGATGGAATGATGCTTAAAGAAAGCAAGCA
1621 G R F D N S N T Q U L M E C H S K E E R
541 TGCGAGTTGGTTTTGATGTGGAGAACATAGATTGGAAGATTTACATATCCAATGCCAC
1681 W Q F G F D V E N I M K D Y I S N V H
561 ATTCCAGGGCTAAGGAAGTATGTAATGAAAGGAGGTTATGCAAGTTCATCCCTCATAG
1741 I P G L R K Y V M K G R G L C S S S *
581
```

*为终止密码子 *means stop codon of amino acids

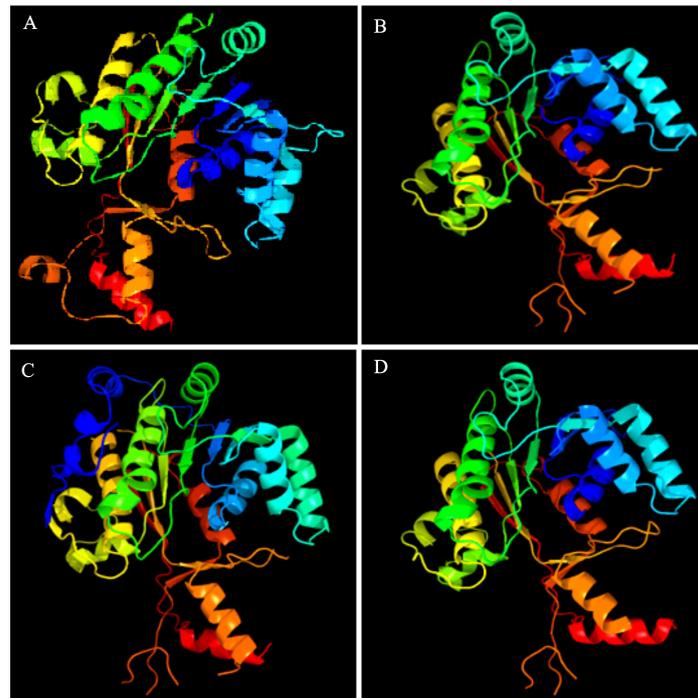
图 2 *LbMS2-2* 基因的核苷酸序列及其氨基酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence and amino acid sequence of *LbMS2-2* in *Lycium barbarum* L.

2.2 LbMS2-2 核酸序列比对与进化分析

以 *LbMS2-2* 的氨基酸序列为信息探针,用 Blast 程序查找该蛋白在不同物种中的同源序列,发现 *LbMS2-2* 基因编码的氨基酸序列与茄科植物烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) (XP_016439946.1)、马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) (XP_006360607.1)、甜辣椒 (*Capsicum annuum* L.) (XP_016544884.1) 中同源基因的氨基酸序列相似性较高,都为 82%,并且它们都编码脂肪酰基还原酶。此外,在亲缘关系不同的

其他物种中也发现了 *LbMS2-2* 的同源蛋白。选取上述同源蛋白的氨基酸序列下载后利用 MEGA5.0 软件构建其系统发育进化树(图 4),结果发现宁夏枸杞与茄科物种处于同一个进化分支上,表明他们具有较近的亲缘关系。牵牛花 (*Ipomoea nil* (L.) Roth) (XP_019154139.1)、野大豆 (*Glycine soja* Siebdt & Zucc.) (KHN43996.1)、巴西橡胶 (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.) (XP_021659691.1)、木薯 (*Manihot esculenta* Gratz)



A: 枸杞 *LbMS2-2* 蛋白; B: 烟草 XP_016439946.1 蛋白; C: 马铃薯 XP_006360607.1 蛋白; D: 甜辣椒 XP_016544884.1 蛋白
A: *LbMS2-2* in *Lycium barbarum* L., B: XP_016439946.1 in *Nicotiana tabacum* L.,
C: XP_006360607.1 in *Solanum tuberosum* L., D: XP_016544884.1 in *Capsicum annuum* L.

图 3 蛋白质的三维结构图

Fig. 3 Three-dimensional structure of deduced protein

(XP_021619273.1)、可可 (*Theobroma cacao* L.) (XP_007029101.2)、樱桃 (*Prunus avium* (L.) L.) (XP_021804805.1)、甜橙 (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) (XP_006481696.2)、亚麻 (*Linum usitatissimum* L.) (ACA28679.1)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) (CAA52019.1) 和油菜 (*Brassica napus* L.) (XP_013640161.1) 处在不同的进化分支中,虽然它们与枸杞的亲缘关系较远,但是它们的氨基酸序列与 *LbMS2-2* 蛋白氨基酸序列的相似性都达到了 60% 左右。

对进化树中不同物种同源基因的保守结构域进行分析,发现枸杞 *LbMS2-2* 基因与其同源基因结构域非常相似,大多数包含两个保守功能域,分别为 *NAD_binding_4* 结构域和雄性不育结构域(图 4)。

研究表明 *NAD_binding* 结构域归属于一大类家族蛋白,存在于多种代谢途径中,如糖酵解和其他氧化还原反应,它们负责与特殊的底物结合,并催化特定的酶反应。雄性不育结构域广泛存在于各类植物及动物中,如拟南芥、油菜、小鼠、果蝇等,该结构域多位于基因序列的 C-末端区域,其氨基酸序列的正常编码与物种育性直接相关。除此之外,在甜辣椒、烟草、马铃薯、牵牛花、野大豆、拟南芥和油菜的基因中还存在低复杂性区域(LCR, low complexity region),该区域的构成组分有许多单个或多个残基的重复。LCR 在蛋白质中普遍存在,具有重要的生物学功能,研究认为这种简单的重复组件的重组能够大大加快进化的步伐,许多蛋白中的 LCR 有时候促进蛋

白的结构稳定,有时候又呈现出弹性的结构以便于蛋白与多种其他蛋白结合。分别对不同物种的 NAD_binding_4 结构域和雄性不育结构域做多序列比对,结果发现宁夏枸杞 *LbMS2-2* 基因与烟草、马铃薯、牵牛花、可可和油菜中的同源基因在这两个保守功能域中的氨基酸序列相似性非常高,在 NAD_binding_4 结构域中约有 60% 的碱基完全一致,雄性

不育结构域中约有 56% 的碱基完全一致,推测这两类结构域在不同物种中具有类似的功能(图 5)。以上这些结果说明脂肪酰基还原酶蛋白在高等植物中存在多样性的特点,它们的氨基酸结构在不同物种中既有相似处也存在差异,这类蛋白在植物进化及发育过程中发挥了重要的作用,它们是功能较为保守的一类蛋白。

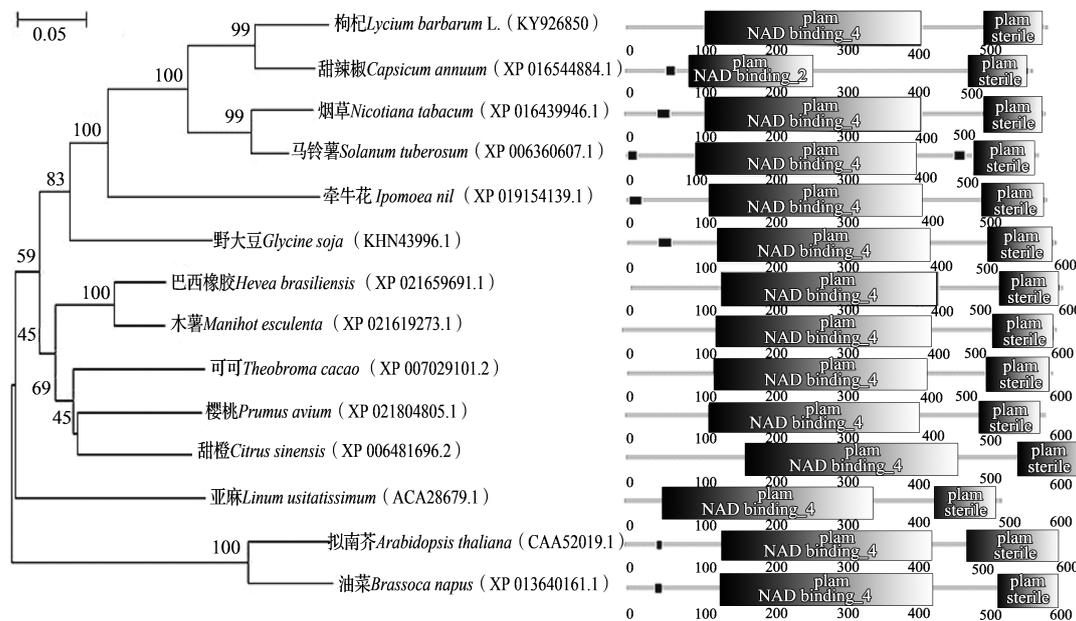
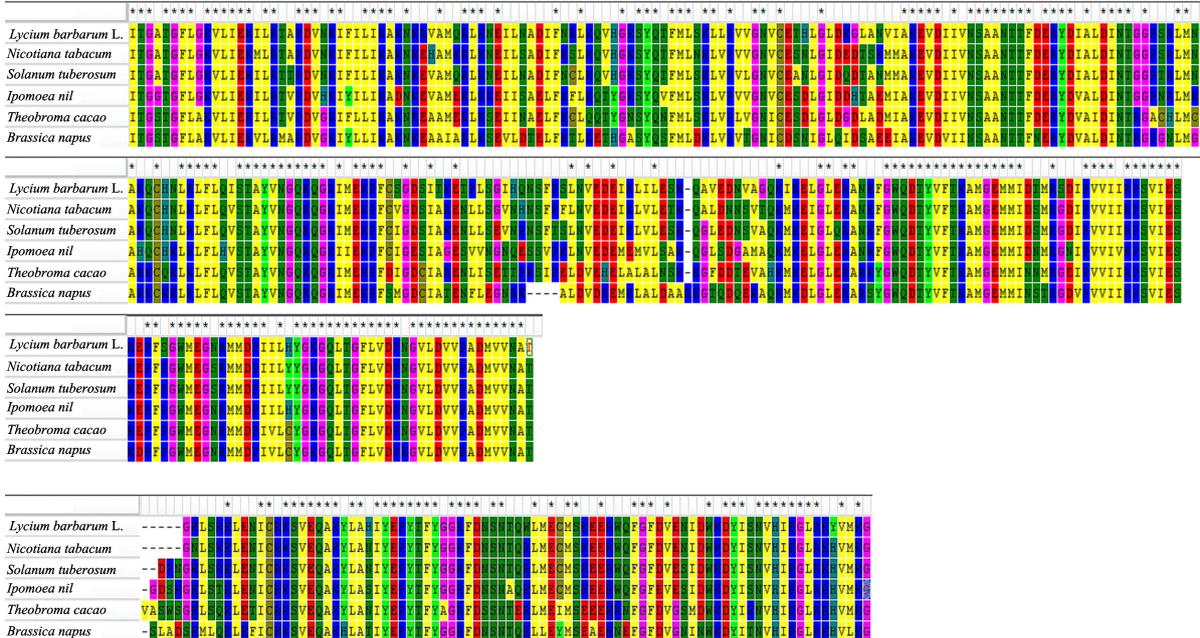


图 4 系统进化及基因结构分析

Fig. 4 Phylogenetic tree and analysis of functional domains

NAD_binding_4 domain



枸杞; *Lycium barbarum* L.; 烟草; *Nicotiana tabacum* L.; 马铃薯; *Solanum tuberosum* L.; 牵牛花; *Ipomoea nil* (L.) Roth; 可可; *Theobroma cacao* L.; 油菜; *Brassica napus* L.

图 5 保守结构域氨基酸序列比对

Fig. 5 Sequence alignment of conserved domains

2.3 *LbMS2-2* 的表达模式分析

枸杞花药各个时期的采集参照徐青等^[14]的方法,按照花蕾长度,将枸杞花药发育分为 6 个时期,分别为雄蕊原基时期、小孢子母细胞时期、四分体时期、单核花粉时期、双核花粉时期和成熟花粉时期。分别以枸杞根、茎、叶以及枸杞发育各个时期花药的总 RNA 为模版,以组成型表达基因 *Actin* 为内参。通过实时荧光定量 PCR 技术检测 *LbMS2-2* 基因在枸杞不同器官以及花发育不同时期的表达情况。结

果显示,*LbMS2-2* 基因在枸杞的根、茎、叶中均没有表达,在花器官中优势表达,并且基因在花药发育初级阶段的雄蕊原基时期和孢子母细胞时期表达量较低,在花药发育最后阶段的成熟花粉时期表达量也较低。*LbMS2-2* 基因在花药发育减数分裂的四分体时期以及小孢子发育阶段的单核花粉时期和双核花粉时期表现出较高的表达量。由此推测该基因可能在花药发育减数分裂阶段和小孢子发育阶段发挥作用。

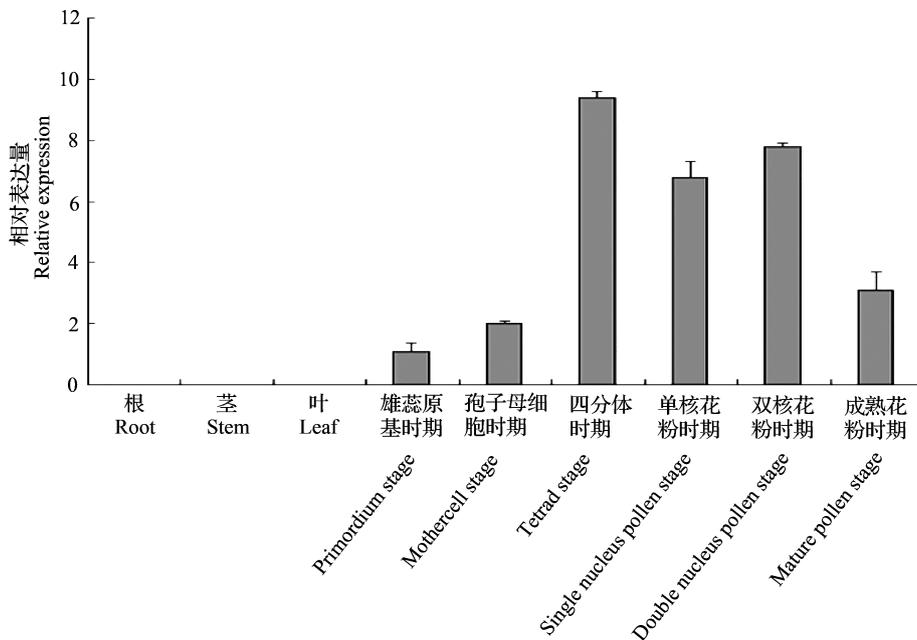


图 6 枸杞不同器官及花药发育不同时期中 *LbMS2-2* 基因的相对表达量

Fig. 6 The relative expression of *LbMS2-2* in different organs and different stage of anther development in *Lycium barbarum* L.

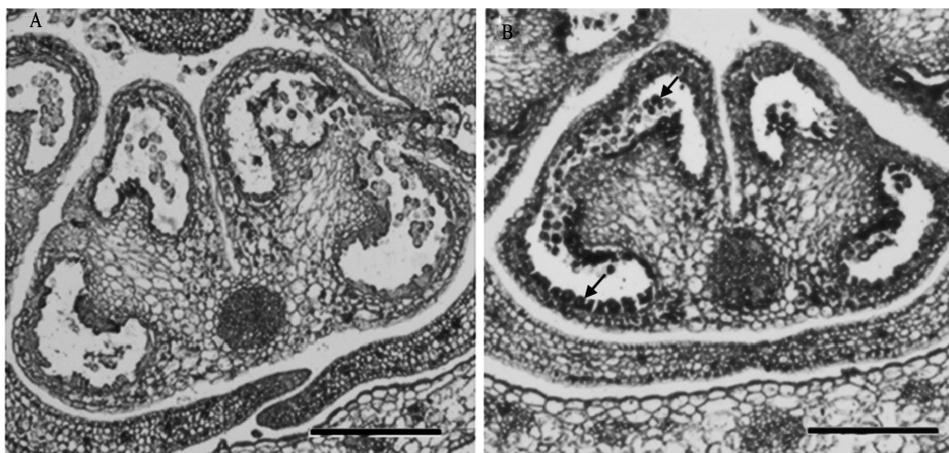
2.4 原位杂交

为了更深入了解 *LbMS2-2* 基因的时空表达特点,运用 RNA 原位杂交技术观察该基因在枸杞花药小孢子发育阶段中的表达。结果表明,在小孢子发育阶段的单核花粉时期,检测到 *LbMS2-2* 基因在花药绒毡层和小孢子中都有较强的表达(图 7B)。作为对照,在正义探针杂交的切片上仅检测到背景信号(图 7A)。这一结果预示枸杞脂肪酰基还原酶基因可能直接作用于花药发育,且对花器官的建成起到至关重要的作用。

2.5 枸杞 *LbMS2-2* 蛋白亚细胞定位

为了进一步验证信息学分析中预测的 *LbMS2-2*

蛋白亚细胞定位,利用 PEG 介导拟南芥叶片原生质体瞬时转化方法,构建植物表达载体 CaMV35s-MS2-GFP,将 *LbMS2-2* 蛋白 C 端和 GFP 蛋白融合(图 8A)。同时选用已知在叶绿体定位的蛋白 At5g19750 作为标记,构建在 pCAMBIA1301-35S 载体上,将 At5g19750 蛋白 C 端与 RFP 蛋白融合(图 8B)。结果显示 *LbMS2-2* 蛋白与 At5g19750 蛋白的两种荧光可以完全重叠(图 8C),证实了 *LbMS2-2* 蛋白生物叶绿体定位。然而将原始空载体转入拟南芥原生质体中(阴性对照),利用激光共聚焦显微镜观察到荧光分布于整个原生质体细胞中(图 8D~F)。



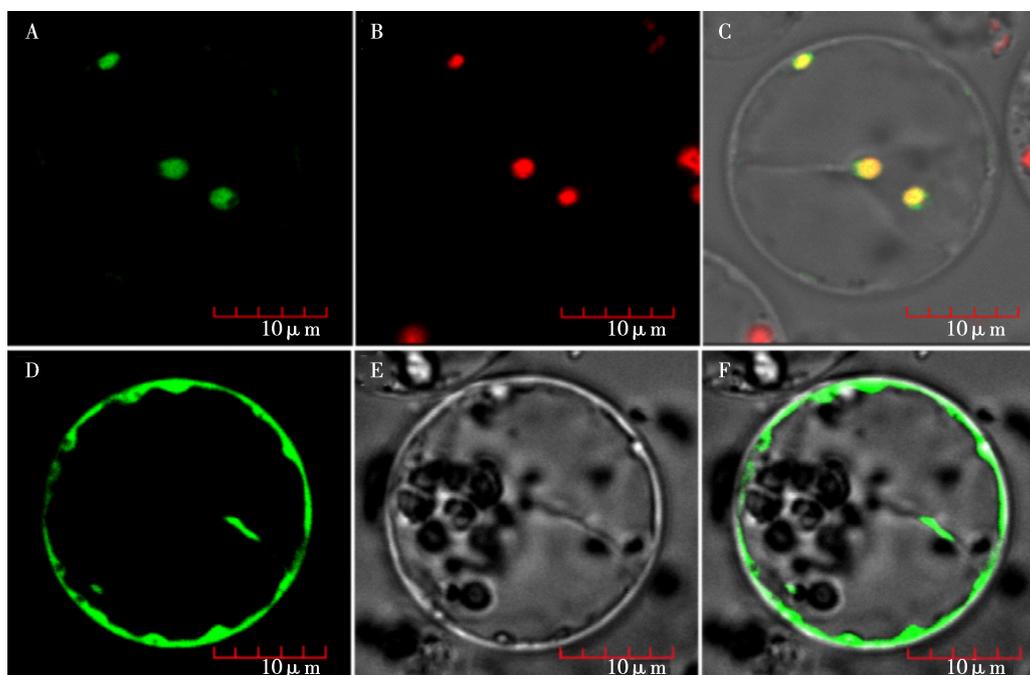
A: 单核花粉时期花药, *LbMS2-2* 正义探针对照; B: 单核花粉时期花药, *LbMS2-2* 在花药绒毡层和小孢子的杂交信号(箭头)

A: An anther at single nucleus pollen stage with the *LbMS2-2* sense probe,

B: An anther at single nucleus pollen stage showing *LbMS2-2* expression in tapetal cells and microspores (arrow)

图 7 *LbMS2-2* 基因在枸杞花药发育单核花粉时期的原位杂交

Fig. 7 *In situ* hybridization of *LbMS2-2* in anthers of *Lycium barbarum* L. at single nucleus pollen stage



A: 实验组 CaMV35s-MS2-GFP 融合蛋白在激发光下拍摄的图片; B: 实验组 pCambia1301-At5g19750-RFP 融合蛋白在激发光下拍摄的图片; C: A 与 B 的荧光重叠图片; D: 对照组原始空载体在激发光下拍摄的图片; E: 对照组原始空载体在自然光下拍摄的图片; F: D 与 E 的重叠图片

A: Photographing of CaMV35s-MS2-GFP under the exciting light, B: Photographing of pCambia1301-At5g19750-RFP under the exciting light, C: The merged signal of A and B, D: Photographing of empty vector under the exciting light, E: Photographing of empty vector under the nature light, F: The merged signal of D and E

图 8 枸杞 *LbMS2-2* 蛋白在拟南芥原生质体中的亚细胞定位

Fig. 8 Subcellular localization of *LbMS2-2* in *Arabidopsis* protoplast

3 讨论

脂肪酰基还原酶是真核生物中一类重要的蛋白,其家族成员众多,功能多样。现已证实脂肪酰基

还原酶是微生物中蜡酯合成所必需的,而蜡酯是微生物中重要的储存脂类,当细胞中含有过多的游离脂肪酸时,它们就会转化为蜡酯等无毒的储存复合物,使细胞避免受损伤^[19]。哺乳动物中的脂肪酰基

还原酶使用还原性的 NADPH 将脂酰辅酶 A 还原成脂肪醇和辅酶,然后由蜡酯合成酶催化脂肪酸和脂肪醇的转酯反应形成蜡酯。现已在小鼠的多数组织中都检测到脂肪酰基还原酶的 mRNA,其中皮脂腺组织和眼睑腺中含量最高^[20]。在植物中关于脂肪酰基还原酶的研究最早在拟南芥和加州希蒙得木(*Jajoba*)的种子中进行,脂肪酰基还原酶将酰基辅酶 A 直接还原为相应的脂肪醇,而不会产生脂肪醛中间产物。本试验克隆到枸杞中的脂肪酰基还原酶基因,并对该基因在枸杞发育过程中的作用进行研究。

开花植物的花药发育过程中脂肪醇及其衍生物是花药表皮和花粉壁的主要成分,它们作为蜡酯和孢粉素的前体,在花粉表面脂成分的形成中起到了重要作用,当这些成分缺少后会引引起植物花药以及花粉的发育异常,从而导致植物雄蕊败育。脂类代谢过程中脂肪醇由脂肪酰基还原酶所合成,因此植物花药发育中的脂肪酰基还原酶一旦发生异常,必会导致脂类代谢紊乱,引起花药绒毡层及花粉壁的不规律发育。已有研究表明植物绒毡层作为花药壁的最内层细胞^[21],是向花粉运输物质的枢纽,绒毡层中的代谢产物最终被极性的转运至药室内侧,并分泌到药室中,从而为花粉正常发育提供所需要的营养^[22]。植物花粉外壁质地硬而厚,含有大量的孢粉素,孢粉素已经被证实含有聚合的苯酚和脂肪酸衍生物复合物^[23]。在花粉外壁的缝隙中填充着一些粘性油脂以及类似于蛋白的物质,统称为含油层。它的主要成分为脂肪酸和长链脂肪酸衍生物,如酯和油脂的不稳定复合物以及各种蛋白^[24]。综上所述,脂类代谢在植物花药及花粉发育过程中发挥着重要的作用,脂类物质也是花器官的重要组成部分。本研究中,*LbMS2-2* 基因编码脂肪酰基还原酶,实时荧光定量 PCR 明确了枸杞 *LbMS2-2* 基因的特异性表达情况,证实该基因只在枸杞花器官中表达,在枸杞根、茎、叶中没有表达。此外,*LbMS2-2* 基因在花药发育的四分体时期、单核花粉时期和双核花粉时期表达量较高,因此推测枸杞 *LbMS2-2* 基因参与到枸杞花药发育的脂类代谢过程中,当基因功能缺失后有可能导致枸杞花药中脂类成分积累异常从而引起雄性不育的性状,这一推测有待于对基因功能进一步的挖掘来证实。

植物花药发育是生物学上的重要课题,对其调控机制进行研究不仅有助于充分了解花药发育的分子机理,还能更好的在生产上加以应用。深入了解

雄蕊和花粉发育调控的分子机理对于研究生物的发育过程、农业生产、环境保护等都具有重大意义^[25]。植物花药发育是一个复杂的过程,大量基因在这一过程中起作用。例如拟南芥中的 *DEFECTIVE IN EXINE FORMATION 1(DEX1)* 基因参与正常的花药发育过程,*dex1* 突变体表现出不正常的花药发育,导致小孢子退化。该突变发生在小孢子从四分体释放的过程中。*dex1* 突变体中的花粉孢粉素虽然可以正常合成,但却异常积累在小孢子表面,形成不正常的小孢子壁结构^[26]。拟南芥中的 *FACELESS POLLEN-1(FLP1)* 基因参与花药发育过程中花粉表面蜡酯形成,*flp1* 突变体呈现出异常光滑的花粉表面,其花粉对醋解试验非常敏感。研究证实 FLP1 蛋白与花粉含油层和表面孢粉素的合成相关^[27]。除此之外还有许多花发育相关基因的功能一一被证实。现有研究发现,植物花药发育涉及孢子体细胞分化、减数分裂以及小孢子外壁发育等多个过程。小孢子外壁发育涉及绒毡层的细胞分化,绒毡层细胞分化形成后又进一步功能特化为分泌型细胞,向小孢子输送发育所必需的营养成分,随后绒毡层逐渐完成细胞凋亡。这些复杂精密的细胞行为涉及到大量基因的特异性表达,因此要深入了解花药发育这一现象的本质还需做大量基础研究。本试验利用 RACE 方法在宁夏枸杞中克隆了枸杞 *LbMS2-2* 基因的 ORF 序列。生物信息学分析表明,该基因与已报道的拟南芥 *MS2* 基因和水稻 *DPW* 基因一样,都编码脂肪酰基还原酶。实时荧光定量及原位杂交结果证实枸杞的 *LbMS2-2* 基因仅在枸杞花药绒毡层和小孢子中表达,这一结果与拟南芥 *MS2* 和水稻 *DPW* 基因功能的研究结果相吻合,说明这一类脂肪酰基还原酶基因的功能与植物花药发育息息相关。此外,*LbMS2-2* 基因与本实验室前期克隆的枸杞中另一个脂肪酰基还原酶基因 *LbMS2* 序列相似性很高,达到了 89%,推测两基因在枸杞花器官发育过程中发挥着相似的功能,并且预示着此类蛋白对于枸杞花发育是非常重要的。

参考文献

- [1] Li H F, Liang W Q, Hu Y, et al. Rice *MADS6* interacts with the floral homeotic genes *SUPERWOMAN1*, *MADS3*, *MADS58*, *MADS13*, and *DROOPING LEAF* in specifying floral organ identities and meristem fate [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(7): 2536-2552
- [2] Aarts M, Keijzer C J, Stiekema W J, et al. Molecular characterization of the *CERI* gene of *Arabidopsis* involved in epicuticular wax biosynthesis and pollen fertility [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(12): 2115-2127
- [3] Aizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, et al. Disruption of the novel

- plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 2004, 39(4):170-181
- [4] Aarts M G, Hodge R, Kalantidis K, et al. The *Arabidopsis* MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes [J]. *Plant J*, 1997, 12(3):615-623
- [5] Shi J, Tan H X, Yu X H, et al. *Defective Pollen Wall (DPW)* is required for anther and microspore development in rice and encodes a fatty acyl ACP reductase [J]. *Plant Cell*, 2011, 23(6):2225-2246
- [6] Chang Z Y, Chen Z F, Yan W, et al. An ABC transporter, OsABC26, is required for anther cuticle and pollen exine formation and pollen-pistil interactions in rice [J]. *Plant Sci*, 2016, 253(9):21-30
- [7] Yong M L, Zhuo F Z, Yan L L, et al. A preliminary identification of *Rf^{*}-A619*, a novel restorer gene for CMS-C in maize (*Zea mays* L.) [J]. *PeerJ*, 2016, 4(4):e2719
- [8] Liu H, Tan M, Yu H, et al. Comparative transcriptome profiling of the fertile and sterile flower buds of a dominant genic male sterile line in sesame (*Sesamum indicum* L.) [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16(1):250
- [9] Smith A R, Zhao D. Sterility caused by floral organ degeneration and abiotic stresses in *Arabidopsis* and cereal grains [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 14(7):1503
- [10] Fu Y, Yang T, Zhao J, et al. Determination of eight pesticides in *Lycium barbarum* by LC-MS/MS and dietary risk assessment [J]. *Food Chem*, 2017, 218(1):192-198
- [11] Fang F, Peng T, Yang S, et al. *Lycium barbarum* polysaccharide attenuates the cytotoxicity of mutant huntingtin and increases the activity of AKT [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2016, 52(8):66-74
- [12] Mocan A, Vlase L, Raita O, et al. Comparative studies on antioxidant activity and polyphenolic content of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill leaves [J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(7):1511-1515
- [13] Shu Z, Ding S, He X, et al. Preparation of polysaccharide loaded collagen membrane with anti-oxidative activity [J]. *Biomed Mater Eng*, 2015, 26(S1):81-87
- [14] 徐青, 秦垦, 冯爱玲, 等. 枸杞不育系与可育系花药发育的细胞学研究 [J]. *宁夏大学学报:自然科学版*, 2009, 30(3):263-267
- [15] 郑蕊, 岳思君, 王丽娟. 枸杞 *LbMYB1* 基因的克隆与表达分析 [J]. *江西农业大学学报*, 2016, 38(1):174-179
- [16] 徐惠娟, 郑蕊, 陈任, 等. 枸杞 *WRKY₃* 基因克隆及组织表达分析 [J]. *西北植物学报*, 2016, 36(9):1721-1727
- [17] 翟莹, 张军, 赵艳, 等. 大豆 ERF 转录因子基因 *GmERF8* 的克隆与表达分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(6):1036-1040
- [18] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C (T)} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408
- [19] Fixter L M, Nagi M N, McCormack J G, et al. Structure, distribution and function of wax ester in *Acinetobacter calcoaceticus* [J]. *J Gen Microbiol*, 1986, 132(11):3147-3157
- [20] Cheng J B, David W. Mammalian wax biosynthesis II, Expression cloning of wax synthase cDNAs encoding a member of the acyltransferase enzyme family [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(36):37798-37807
- [21] Kunst L, Samuels A L. Biosynthesis and secretion of plant cuticular wax [J]. *Prog Lipid Res*, 2003, 42(1):51-80
- [22] 李婉莎, 杨红玉. 花药绒毡层发育相关基因的研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(14):4120-4123
- [23] 罗鑫娟, 刘旭昊, 王新宇. 绒毡层小体, 一种在花药绒毡层细胞中新发现的含油细胞器 [J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(1):61-65
- [24] Prapapan T, Xiao Q. Fatty Acyl-CoA Reductase and wax synthase from *Euglena gracilis* in the biosynthesis of medium-chain wax esters [J]. *Lipids*, 2010, 45(3):263-273
- [25] Wang A M, Xia Q, Xie W S, et al. Male gametophyte development in bread wheat (*Triticum aestivum* L.): molecular, cellular, and biochemical analyses of a sporophytic contribution to pollen wall ontogeny [J]. *Plant J*, 2002, 30(6):613-623
- [26] Paxson-Sowers D M, Dodrill C H, Owen H A, et al. DEX1, a novel plant protein, is required for exine pattern formation during pollen development in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(4):1739-1749
- [27] Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, et al. A novel male-sterile mutant of *Arabidopsis thaliana*, *faceless pollen-1*, produces pollen with a smooth surface and an acetolysis-sensitive exine [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 53(2):107-116