

文章编号:1001-7380(2016)06-0001-05

柳树 *SjMIPS* 基因的克隆及其表达分析

周洁¹, 宋雪晴², 何旭东¹, 王保松¹

(1. 江苏省林业科学研究院, 江苏 南京 211153; 2. 上海市七宝德怀特高级中学, 上海 201101)

摘要:肌醇磷酸合成酶(MIPS)以葡萄糖-6-磷酸为合成前体,是肌醇合成过程中关键酶。MIPS生成的肌醇在耐盐植物的耐盐机制中起到渗透压调节物的作用。该研究从柳树(*Salix Jiangsuensis* 2345)叶片中成功克隆出MIPS基因,命名为*SjMIPS*。对扩增的基因进行生物信息学分析显示柳树*SjMIPS*基因包含1 533 bp的开放阅读框,编码1个511个氨基酸的蛋白质。蛋白质结构域分析显示*SjMIPS*基因含有4个保守的结构域,结构域1(GWGGNNG),结构域2(LWTANTERY),结构域3(NGSPQNTFVPG)和结构域4(SYNHLGNNDG),属于典型的MIPS基因。系统进化树分析表明柳树*SjMIPS*基因与杨树*PtMIPS*基因亲缘关系较近。实时荧光定量PCR结果显示柳树*SjMIPS*基因在171 mM NaCl盐胁迫处理24—48 h后上调,表明柳树MIPS基因是盐胁迫诱导型基因。该研究表明柳树*SjMIPS*基因为盐胁迫应答基因,在参与肌醇的生物合成、调节渗透压方面起着重要作用。

关键词:柳树;肌醇磷酸合成酶;肌醇;基因;克隆;盐胁迫;表达

中图分类号:S792.12;Q943.2 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2016.06.001

Molecular cloning and expression analysis of *MIPS* gene from *Salix* under salt stress

ZHOU Jie¹, SONG Xue-qing², HE Xu-dong¹, WANG Bao-song¹

(1. Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211135, China; 2. Shanghai Qibao Dwight High School, Shanghai 201101, China)

Abstract: Myo-inositol phosphate synthase (MIPS) is the key enzyme of myo-inositol synthesis, using glucose-6-phosphate as the initial precursor. MIPS producing myo-inositol plays a pivotal role in protection mechanisms in salt-tolerant plant species. In this research, a MIPS gene was cloned from salt-treated leaves of *Salix Jiangsuensis* 2345 and named *SjMIPS*. *SjMIPS* contained a 1 533 bp of the largest open reading frame, encoding 511 amino acids. Protein alignment showed *SjMIPS* contained four complete conserved domains, Domain 1 (GWGGNNG), Domain 2 (LWTANTERY), Domain 3 (NGSPQNTFVPG) and Domain 4 (SYNHLGNNDG). Phylogenetic analysis showed that *SjMIPS* was closer to MYBs from *Populus trichocarpa*. Real-time PCR analysis showed *SjMIPS* was in response to salt stress after treated with 171 mM NaCl for 24, 48 h, indicating that *SjMIPS* was responsive to salt. It was concluded that *SjMIPS* was a salt responsive gene and its expression product might function as compatible solute for protection against salt stress in *Salix*.

Key words: *Salix* sp.; Myo-inositol phosphate synthase; Myo-inositol; Gene; Cloning; Salt Stress; Expression

肌醇磷酸合成酶(MIPS, myo-inositol phosphate synthase),以葡萄糖-6-磷酸为合成前体,是肌醇合成过程中的关键酶^[1]。肌醇是细胞代谢和植物生长过程中所必需的多种化合物的前体物,肌醇的衍

生物也起着至关重要和多种多样的生物功能,包括以植酸(InsP6)的形式存储磷酸,细胞壁的生物合成,生长素的生理调控,细胞膜的生物合成,信号转导和耐受环境胁迫^[2]。肌醇可以作为一种亲和性

收稿日期:2016-10-11;修回日期:2016-10-27

基金项目:江苏省自然科学基金项目“柳树盐胁迫响应基因表达谱分析和重要耐盐基因鉴定”(BK20141039);国家自然科学基金项目“灌木柳盐胁迫基因表达谱的解析和重要耐盐基因的鉴定”(31400572);江苏省科技支撑(农业)项目“耐盐高生物量灌木柳新品种选育及高效栽培技术研究”(BE2013449)

作者简介:周洁(1986-),女,江苏宜兴人,助理研究员,博士。主要从事林木分子育种研究。

的溶解物抵御胁迫,还可以被转变成其他亲和性的溶解物^[3]。在大多数的植物中,肌醇可以通过肌醇半乳糖苷(GoS)合成酶的催化作用转变成肌醇半乳糖苷,下游的代谢是生成水苏糖,还有以肌醇半乳糖苷和蔗糖为底物生成棉子糖^[2,4]。肌醇含量的下降会导致大豆(*Glycine max*)突变体种子中 MIPS 活性下调,且棉子糖类水平急剧下调^[5]。通过反义 RNA 沉默处理,转基因土豆中 MIPS 活性受抑制^[6]。肌醇和棉子糖类之间的相关性在豌豆和大麦的低植酸突变体中都有发现^[7]。盐生植物水晶冰菜(*Mesembryanthemum crystallinum*)中,肌醇可以转化成 2 种重要的渗透调节物质,即:4-O-甲基内消旋肌醇和 D-松醇^[8]。

MIPS 生成的肌醇在耐盐植物的耐盐机制中起到至关重要的作用。在水晶冰菜中 MIPS 参与了耐盐胁迫应答,而淡土植物拟南芥中 MIPS 的表达并没有参与耐盐胁迫。因此,很可能耐盐植物有独特的调控肌醇合成的途径,并提高胁迫下肌醇的水平。在烟草中过量表达耐盐水稻(*Porteresia coarctata*) *PcIN01* 基因中编码 MIPS 基因,提高了烟草中的肌醇含量,增强了耐盐能力^[9]。

目前有关 MIPS 的研究仅限于草本植物,木本植物中还未见报道。本研究从木本植物柳树中克隆了柳树 MIPS 基因,利用 ExPASy 网站上的生物信息学软件进行蛋白质的基本性质分析,将柳树 MIPS 氨基酸序列与其他物种 MIPS 进行序列比对以及系统进化树分析。为研究柳树 MIPS 与盐胁迫应答间的相关性,通过 qRT-PCR 的方法检测不同胁迫时间柳树 MIPS 基因表达量的变化,初步揭示出柳树 MIPS 基因为盐胁迫应答基因,为柳树 MIPS 基因以及柳树耐盐胁迫机制研究提供研究思路。

1 材料与方 法

1.1 植物材料

本研究以灌木柳(*Salix Jiangsuensis* 2345)叶片作为试验材料。将其 1 年生插穗在温室(湿度为 70%—75%,14 h 光照/10 h 黑暗)中水培 40 d,长出的萌条用 171 mM NaCl 溶液处理 2 h,选取生长状态良好的柳树叶片,冻于液氮中保存。

1.2 柳树中 MIPS 基因的分子克隆

采用 TRIzol © Reagent 试剂提取柳树叶片的 RNA 并进行反转录,利用 Illumina HiSeq™ 2000 platform 对柳树的叶片进行转录组测序,通过组装机

接,获得差异表达基因 c96597_g1_i1;对获得序列进行引物设计,上下游引物分别为 F: ATGTTTATTGAGACGTTTAAG; R: TCACTTGTATTCCAAAATCATG;以该 cDNA 为模板进行 *SjMIPS* 基因编码区的扩增。

1.3 柳树中 MIPS 蛋白序列结构分析和系统进化树的构建

利用 ExPASy 网站(<http://www.expasy.org/vg/index/Protein>)上的生物信息学软件分析蛋白质的基本性质,分别用 ProtParam tool, Predotar v. 1.03, PPsearch 程序运算法则,分析柳树 *SjMIPS* 氨基酸序列特性。

利用 Clustal W2 对 *Populus trichocarpa* (*Pt*), *Oryza sativa* (*Os*), *Arabidopsis thaliana* (*At*), *Zea mays* (*Zm*), *Triticum aestivum* (*Ta*) 和 *Salix jiangsuensis* (*Sj*) 的 MIPS 蛋白基因进行同源性分析,再用 MEGA 6.0 中的 neighbor-joining method,建立 NJ 系统进化树(Neighbor-joining tree)。

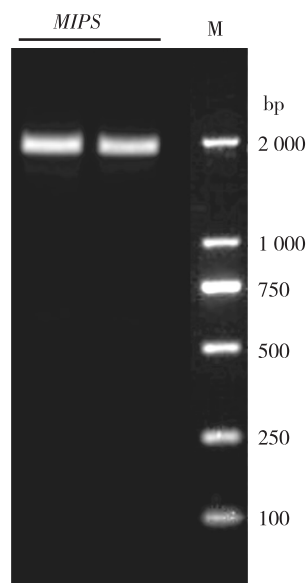
1.4 盐胁迫处理条件下柳树 MIPS 表达分析

采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 的方法,以 *actin1* 基因为内参对照,检测盐胁迫条件下 0, 2, 6, 12, 24, 48 h 不同时间点下的基因表达量。*actin1* 基因的引物是实时定量 PCR 分析中基因引物是 F: CTCAACCCTAAGGCTAACAG, R: GGTACGACCAGCAAGAT。利用 Plant RNA Isolation Reagent (Invitrogen) 试剂盒,从 171 mM NaCl 盐处理 0—48 h 后的柳树样品,提取总 RNA,并用 RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒进行纯化。上述过程合成了 cDNA 第 1 条链。以 0.5 μL 的 cDNA 为模板,进行后续 PCR 扩增。利用 Light Cycler 480 System II (Roche) 仪器和 Light Cycler 480 SYBR Green I Master reagents (Roche) 试剂,进行实时定量 PCR 分析。

2 结果与分析

2.1 柳树 MIPS 基因的克隆

SjMIPS 基因 PCR 产物凝胶电泳(如图 1)显示能扩增到单一条带,分子大小与预期吻合。切胶回收后进行 TA 克隆,转化大肠杆菌,分别取 3 个阳性转化子进行测序。结果显示,3 个克隆中,2 个克隆的序列与测序的结果完全一致,表明该序列为柳树的 MIPS 基因,命名为 *SjMIPS*。

图 1 *SjMIPS* 基因 PCR 产物凝胶电泳结果

2.2 柳树 *SjMIPS* 基因蛋白特性分析

通过对柳树叶片克隆得到的进行 PCR 并测序验证, 获得柳树的 MIPS 基因, 命名为 *SjMIPS*, 该基因的开放阅读框 (ORF) 为 1 533 bp, 编码 510 个氨基酸残基的蛋白质。推测得到的氨基酸序列大小为 56 kDa, 理论等电点 PI 为 5.24。将柳树 MIPS 核苷酸序列的编码区与 Genbank 中搜索到的其他物种中 MIPS 基因序列相比对, 结果显示序列间的相似性为 87%—97%。Predotar v. 1.03 程序运算法则分析得出, 在柳树 MIPS 蛋白质的氮端无信号肽, 叶绿体转运肽和线粒体的靶标肽。PPsearch 程序运算法分析结果显示, 蛋白质氨基酸序列中有肌醇-1-磷酸合成酶的活性 Domain, NAD(P) 结合 Domain 和 GDPH-like Domain。推测柳树 MIPS 有肌醇-3-磷酸合成酶活性, 参与肌醇和磷脂的生物合成过程。

2.3 系统进化树的构建

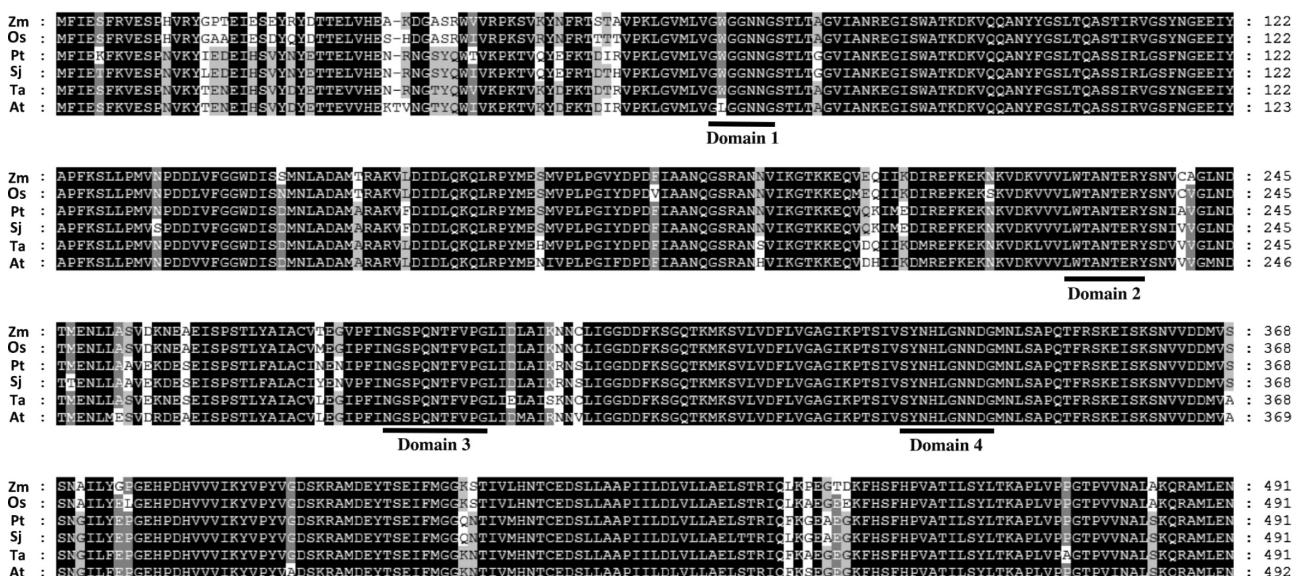
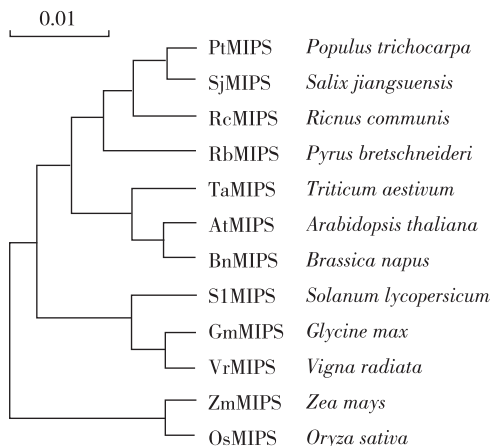


图 2 不同植物中 MIPS 氨基酸序列比对: *Populus trichocarpa* (Pt), *Oryza sativa* (Os), *Arabidopsis thaliana* (At), *Zea mays* (Zm), *Triticum aestivum* (Ta) 和 *Salix babylonica* (Sb)。黑色和灰色背景用来突出不同位置。黑色下划线标注的是相同或相似的残基, 分别为结构域 1 (GWGGNG), 结构域 2 (LWTANTERY), 结构域 3 (NGSPQNTFVPG) 和结构域 4 (SYNHLGNNDG)。

将推断出的柳树 MIPS 的氨基酸序列与其他植物中 MIPS 氨基酸序列进行比对后, 表现出高度的相似性: 与小麦 (*Triticum aestivum*) 的氨基酸序列相似性为 90%, 玉米 (*Zea mays*) 87%, 水稻 (*Oryza sativa*) 87%, 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 88%, 毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 97%, 油菜 (*Brassica napus*) 90%, 大豆 (*Glycine max*) 90%, 番茄 (*Solanum lycopersicum*) 91%, 梨属白梨 (*Pyrus × bretschneideri*) 91%,

绿豆苗 (*Vigna radiate*) 90%, 蓖麻 (*Ricinus communis*) 93%。图 2 即为典型的各种植物中 MIPSs 氨基酸序列比对结果, 表明 MIPS 在进化上是保守的。本研究中, 氨基酸序列比对结果与之前的研究一致, 揭示了 MIPS 蛋白质 4 个关键结构域^[10] (见图 2)。结构域 1 (GWGGNG), 结构域 2 (LWTANTERY), 结构域 3 (NGSPQNTFVPG) 和结构域 4 (SYNHLGNNDG)。这 4 个结构域在之前真核生物 MIPS 的

研究中就表现出了高度的保守性。它们分别参与了 MIPS 蛋白质的结合,并且是 MIPS 蛋白质功能的基础,例如作为 NAD^+ 结合以及酶促反应的共同因子。Abreu 等构建了 MIPS 基因的系统进化树分析,依据分类学中分化的概念,将 MIPS 基因进行分簇^[11]。图 3 系统进化树结果表明,柳树 *SjMIPS* 与杨树 *PtMIPS* 在进化上最紧密相关。



图片中的 bar 表示进化树中与 bar 等长的枝相当于每个残基 0.01 个氨基酸变化

图 3 柳树和其他植物中的 MIPS 系统进化树分析

2.4 盐胁迫下柳树 MIPS 基因表达分析

为了揭示柳树 MIPS 基因在盐胁迫条件下的表达模式,采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 的方法,以 actin1 为内参,可以分别检测不同胁迫时间下柳树 MIPS 基因表达量的变化。试验结果显示(见图 4),柳树 *SjMIPS* 基因在 171 mM NaCl 胁迫 48 h 后表达量就增加到对照组的 3 倍;而盐胁迫处理的前 12 h 内,随着时间延长表达量随之降低。上述结果表明,柳树 MIPS 基因表达受盐胁迫的诱导。同时,在不同时间点,对盐胁迫的反应有显著的差异性,说明该基因是盐胁迫时间依赖型基因。

3 讨 论

MIPS,是肌醇代谢过程中至关重要的生物合成酶,是目前唯一 1 个已知参与葡萄糖-6-磷酸和肌醇磷酸间转化的催化酶。它还是植物体中参与磷的存储、信号转导、胁迫应答、植物激素的动态平衡和细胞壁合成过程中很多化合物的前提物质。目前已经成功对各种植物中的 MIPS 基因进行克隆和分类,其中包括野生耐盐型的水稻 (*Ponera coarctata*)^[9],百香果 (*Passiflora edulis*)^[11],小麦 (*Oryza sativa*)^[12]和黄花苜蓿 (*Medicago falcate*)^[13]。

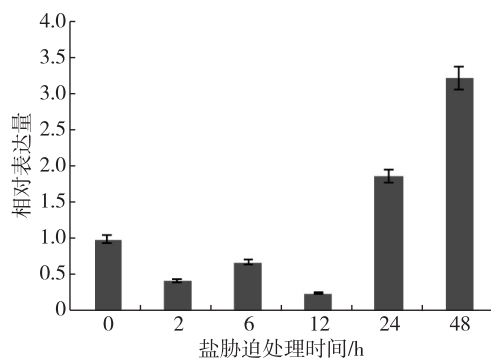


图 4 171 mM NaCl 胁迫不同时间后 *SjMIPS* 基因的相对表达量

但此前植物中 MIPS 基因的研究均仅限于草本植物。本研究是首次从木本植物柳树 (*Salix jiangsuensis* 2345) 中成功克隆得到柳树 *SjMIPS* 基因,克隆得到的柳树 *SjMIPS* 基因 ORF 为 1 533 bp,编码了 510 个氨基酸。与杨树等 11 种植物中 MIPS 氨基酸序列进行比对,序列间的相似性高达 87%—97%,且与已有的研究结果一致,典型的 MIPS 蛋白结合和功能相关的 4 个关键结构域是高度保守的^[10],MIPS 在植物中是高度保守的。其次,生物信息学软件分析结果表明,与已研究的植物 MIPS 相同,柳树 MIPS 可能是位于细胞质中,具有肌醇-3-磷酸合成酶活性,参与了肌醇和磷脂的生物合成过程^[14]。2004 年,Majee 等首次分离克隆得到与耐盐相关的 MIPS 基因 *PINO1*。在烟草中过表达 *PINO1*,使得转基因烟草在高盐环境中肌醇的产量提高并且保持光合作用能力。从转基因烟草中分离出的 MIPS 在植物体外也表现出耐高盐胁迫,表明 *PINO1* 功能性表达^[9]。本研究进一步的耐盐胁迫表达模式分析揭示,柳树 MIPS 基因表达受盐胁迫诱导,在 171 mM NaCl 胁迫 24—48 h 后表达量上调了 2—3 倍。MIPS 以葡萄糖-6-磷酸为前体,是肌醇合成过程中的关键酶,是目前唯一已知参与葡萄糖-6-磷酸和肌醇磷酸间转化的催化酶。推测柳树 MIPS 也有肌醇-3-磷酸合成酶活性,参与肌醇的生物合成过程,并最终参与植物耐盐胁迫应答过程。肌醇合成量的提高和储存有利于植物生长和光合作用。已有的研究表明,盐胁迫条件下,肌醇合成量的提高和转运在钠离子扣押和光合能力的保持中起到至关重要的作用^[15-16]。肌醇对于植物光合效率的维持作用起到保护作用^[9],与肌醇类似,如甘氨酸、三甲胺乙内酯和脯氨酸等的渗透压调节物质也均证实有上述生理作用^[17-18]。

综上所述,本研究成功克隆了柳树 *SjMIPS* 基因,并分析了蛋白理化性质以及不同盐胁迫处理时间下基因表达量的差异。柳树 MIPS 是进化上保守的一种酶,与其他物种中的 MIPS 氨基酸序列有极高的相似度。推测柳树 MIPS 有肌醇-3-磷酸合成酶活性参与肌醇的生物合成过程,并最终参与植物耐盐胁迫应答过程。有关催化生成渗透压调节物质的酶工程的研究,有利于促进提高植物耐盐胁迫能力的研究^[19]。为了深入研究木本植物 MIPS 以及肌醇代谢在耐盐胁迫中的作用,后续需要进行柳树 MIPS 过表达的研究。

参考文献:

- [1] MAJUMDER A L, JOHNSON M D, HENRY S A. 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1997, 1348(1-2): 245-256.
- [2] LOEWUS F A, MURTHY P P N. Myoinositol metabolism in plants [J]. *Plant Science*, 2000, 150(1): 1-19.
- [3] TAJI T, TAKAHASHI S, SHINOZAKI K. Inositols and their metabolites in abiotic and biotic stress responses [J]. *Sub-cellular biochemistry*, 2006, 39(190): 239-264.
- [4] TAJI T, OHSUMI C, IUCHI S, et al. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2002, 29(4): 417-426.
- [5] HITZ W D, CARLSON T J, KERR P S, et al. Biochemical and molecular characterization of a mutation that confers a decreased raffinose and phytic acid phenotype on soybean seeds [J]. *Plant Physiology*, 2002, 128(2): 650-660.
- [6] KELLER R, BREARLEY C A, TRETHEWEY R N, et al. Reduced inositol content and altered morphology in transgenic potato plants inhibited for 1D-myo-inositol 3-phosphate synthase [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(4): 403-410.
- [7] KARNER U, PETERBAUER T, RABOY V, et al. Myoinositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(405): 1981-1987.
- [8] NELSON D E, RAMMESMAYER G, BOHNERT H J. Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(5): 753-764.
- [9] MAJEE M, MAITRA S, DASTIDAR K G, et al. A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance phenotype [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(27): 28539-28552.
- [10] MAJUMDER A L, CHATTERJEE A, GHOSH D K, et al. Diversification and evolution of L-myo-inositol 1-phosphate synthase [J]. *FEBS Letters*, 2003, 553(1-2): 3-10.
- [11] ABREU E F M, ARAGAO F J L. Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress [J]. *Annals of Botany*, 2007, 99(2): 285-292.
- [12] RAY S, PATRA B, DAS-CHATTERJEE A, et al. Identification and organization of chloroplastic and cytosolic L-myo-inositol-1-phosphate synthase coding gene (s) in *Oryza sativa*: comparison with the wild halophytic rice, *Porteresia coarctata* [J]. *Planta*, 2010, 231(5): 1211-1227.
- [13] TAN J, WANG C, XIANG B, et al. Hydrogen peroxide and nitric oxide mediated cold- and dehydration-induced myoinositol phosphate synthase that confers multiple resistances to abiotic stresses [J]. *Plant Cell & Environment*, 2013, 36(2): 288-299.
- [14] LACKEY K H, POPE P M, JOHNSON M D. Expression of 1L-myo-inositol-1-phosphate synthase in organelles [J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(4): 2240-2247.
- [15] NELSON D E, BOHNERT H J. Regulation of cell-specific inositol metabolism and transport in plant salinity tolerance [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(5): 753-764.
- [16] NELSON D E, KOUKOUMANOS M, BOHNERT H J. Myoinositol-dependent sodium uptake in ice plant [J]. *Plant Physiology*, 1999, 119(1): 165-172.
- [17] HASEGAWA P M, BRESSAN R A, BOHNERT H J. Plant cellular and molecular responses to high salinity [J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2000, 51(51): 463-499.
- [18] WANG W, VINOCUR B, ALTMAN A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance [J]. *Planta*, 2003, 218(1): 1-14.
- [19] VINOCUR B, ALTMAN A. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations [J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16(2): 123-132.