野生种马铃薯 *SpPHYB* 基因的克隆与表达分析

张易，杨清*，王全逸，郭建林，梁峰
南京农业大学生命科学学院，南京 210095

提要：采用RT-PCR技术从野生种马铃薯中克隆到一个光敏色素基因 *PHYB*，其cDNA全长为3 470 bp。含有一个3 393 bp的完整开放阅读框，编码一条长1 130个氨基酸的蛋白，分子量为125 kDa，等电点为5.6。该基因编码的蛋白序列与栽培种马铃薯、番茄和烟草同源基因编码的氨基酸序列一致性分别为98%、95%、92%，命名为*SpPHYB*。半定量PCR分析表明，根、茎、叶和芽中 *SpPHYB* 表达水平较高且相似，但在花和块茎成熟器官中表达量稍低。
关键词：野生种马铃薯；*SpPHYB*；克隆；表达

Cloning and Expression Analysis of *SpPHYB* Gene from *Solanum pinnatisectum* Dunal

ZHANG Yi, YANG Qing*, WANG Quan-Yi, GUO Jian-Lin, LIANG Feng
College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The full-length cDNA of *SpPHYB* gene was cloned from wild potato (*Solanum pinnatisectum*) by RT-PCR. The cDNA was 3 470 bp long with an open reading frame (ORF) of 3 393 bp and encoded 1 130 amino acid residues with a predicted molecular weight of 125 kDa and an isoelectric point of 5.6. The protein sequence comparison showed that the predicted protein had higher identities to those from *Solanum tuberosum*, *Lycopersicon esculentum* and *Nicotiana tabacum* (98%, 95% and 92%). Semi-quantitive RT-PCR indicated that the expression level of *SpPHYB* was higher and similar in roots, stem, leaves and sprouts, and lower in flowers and tubers.
Key words: *Solanum pinnatisectum*; *SpPHYB*; cloning; expression

光敏色素是植物体内感受光信号的一类大小约124 kDa的光受体蛋白，包含光敏色素A、B、C、D和E 5个成员(Nagatani等1991；Somers等1991；Lopez-Juez等1992)，其在植物种子萌发、幼苗生长、茎的伸长、子叶伸展、开花控制和花色苷合成等生长发育过程中均起作用(Furuya 1993；周波和李玉花2006)。光敏色素B (PHYB)参与植物开花调节和对光周期的识别，虽然迄今为止与其相关的机制还不很清楚(Thiele等1999；Scohfield和Paliyath 2005)，但近年来有报道认为，*PHYB* 的表达受抑制后，无论在短日照还是长日照条件下马铃薯均能结薯，而作为短日照植物的马铃薯，在通常情况下，只有短日照诱导下才能结薯，这表明长日照条件下PHYB对薯块形成起抑制作用(Aksenova等2002；Boccalandro等2003)。但其抑制机制仍不清楚(Jackson 1999)。

马铃薯是无性繁殖植物，块茎是其繁殖器官，也是产品器官。采用基因工程技术抑制*PHYB*基因在植株体内的表达可能有调节马铃薯对光周期敏感性的作用，因而对培育栽培适应性广的品种似乎有一定的潜在理论和应用意义。马铃薯*Solanum pinnatisectum*是一个花色苷合成光敏感的野生马铃薯，用其研究马铃薯中光信号转导可能是一个适宜的植物材料。我们以前曾从此种马铃薯中克隆了 *PHYA* 基因(张易等2006)，本文报道克隆 *PHYB* 基因的结果。

材料与方法

野生种马铃薯(*Solanum pinnatisectum* Dunal)由美国国家马铃薯种质资源库提供。植株分别盆植在塑料大棚(自然光照)和具有温光控制的人工生长室(8 h·d^{-1} 光照或黑暗，开花前1个月进行光、

收稿 2007-07-09 修定 2007-09-25
资助 国家转基因植物研究与产业化开发专项(JY03-A-11)。
* 通讯作者(E-mail：qyang19@njau.edu.cn；Tel：025-84395221)。

暗处理30 d)内，常规管理。于生长旺盛期(现蕾前)从大棚栽培的植株上取幼嫩叶片提取RNA，用于*SpPHYB*基因cDNA全长的克隆；开花期取根、茎、叶、花、芽和块茎提取RNA，用于组织表达实验；用于光、暗诱导表达分析提取RNA的根、茎、叶、花、芽和块茎取自人工生长室培养的植株。试验中使用的LA Taq DNA聚合酶、pMD18-T载体、大肠杆菌DH5α和凝胶回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司(TaKaRa)。

叶片总RNA的提取按照Trizol试剂盒提供的方法进行，根据从GenBank搜索到的四倍体栽培型马铃薯、番茄、茄子的*PHYB*基因的序列，设计*SpPHYB*扩增引物：P1 (5' TGTGTGGAGGAGA-GAGAAATG 3'和P2 (5' GTAAGCTCCTAGCCAA-CACTC 3'。参照Promega公司AMV First Strand cDNA Synthesis Kit制备cDNA。PCR扩增体系25 μL：1 μL cDNA模板、0.5 μL引物P1和P2 (10 pmol·L^{-1})、2.5 μL PCR缓冲液(10×)、4 μL dNTPs (2.5 mmol·L^{-1})、2.5 μL $MgCl_2$ (25 mmol·L^{-1})、0.3 μL LA Taq DNA聚合酶(TaKaRa公司)及13.7 μL无菌双蒸水。PCR扩增条件为：94 ℃预变性3 min；94 ℃ 30 s，51 ℃ 30 s，72 ℃ 4 min，循环30次；72 ℃延伸10 min。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上电泳分离。用TaKaRa公司试剂盒回收扩增产物。将扩增产物连接到pMD18T-Vector载体(TaKaRa公司)上。通过热激转化方法将克隆载体转入大肠杆菌DH5α感受态细胞中，并在含氨苄青霉素和X-gal的平板上筛选白色菌落，然后提取质粒，鉴定，从中挑选单克隆送上海博亚生物工程公司测序。

作*SpPHYB*组织表达和光、暗诱导表达分析时，按照Trizol试剂盒提供的方法，从根、茎、叶、花、芽、块茎中分别提取总RNA，根据克隆的*PHYB*开放阅读框(ORF)序列设计P3 (5' ATTTGCTGTTGATGTTGAAGG 3')，与P2组成引物对，用半定量RT-PCR进行*PHYB*基因表达分析。PCR扩增条件同前，循环数为26。采用*GAPDH*基因为内参，引物分别为*GAPDH*1 (5' CAAGGACTGGAGAGGTGG 3')和*GAPDH*2 (5' TTCACTCGTTGTCGTACC 3')，循环数为26。取5 μL PCR产物点样，1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，并拍照。

实验结果

1 *SpPHYB*基因的cDNA克隆及其编码蛋白的结构

通过RT-PCR，一次扩增获得长度在3.4 kb左右的*PHYB* cDNA片段，与预期的大小一致。该片段回收后，连接到T-载体上，送上海博亚生物工程公司测序。cDNA序列的确切长度为3470 bp，结构分析表明，该序列5'端的第29位存在起始密码子ATG，3'端的第3 419位存在终止密码子TAG，ORF的长度为3 393 bp，编码一个1 130氨基酸多肽，分子量为125 kDa，等电点为5.6。图1显示的为其ORF序列与结构。

在NCBI上的氨基酸序列比对结果显示，野生种马铃薯克隆序列与栽培种马铃薯、番茄及烟草PHYB一致性分别达到98%、95%、92%，表明该序列为光敏色素PHYB，并且在茄科植物内是高度保守的(图2)，此种编码PHYB的克隆序列命名为*SpPHYB*。

2 SpPHYB的系统进化

采用CLUSTAL程序，对SpPHYB和相似性较高的其他代表性物种的PHYB编码蛋白序列进行了系统发育分析，图3的结果显示，SpPHYB与同科植物栽培种马铃薯和番茄在进化树上属于同一分支，表明在进化上茄科SpPHYB是同步的。

3 *SpPHYB*的组织表达

采用半定量RT-PCR的方法分析的结果显示，根、茎、叶和芽中*SpPHYB*表达水平较高且相似，但在花和块茎成熟器官中表达量稍低(图4)。

4 *SpPHYB*的光和暗诱导表达

采用半定量RT-PCR的方法分析了*SpPHYB*在光、暗条件下野生马铃薯植株不同组织的表达(图5)。结果显示，无论在光照还是黑暗条件下，各组织*SpPHYB*都能表达，处理间稍有差异，但不很明显。

讨 论

本文从野生种马铃薯中克隆到*SpPHYB*基因，其编码的氨基酸序列与栽培种马铃薯有很高

```
   1                                                          GTCGACGA TTTGTGTGGA GGAGAGAGAA
  29 ATGGCTTCTG  GAAGTAGAAC AAAGCATTCC CATCATAATT CATCTCAAGC TCAATCTTCA GGTACAAGTA ATGTAAATTA
 109 CAAAGATTCA  ATAAGCAAAG CTATAGCACA GTACACAGCT GATGCTAGGC TTCATGCTGT GTTTGAACAA TCTGGTGAGT
 189 CTGGAAAGTT  TTTTGATTAT TCAGAGTCTG TTAAAACTAC TACACAATCT GTGCCTGAAA GGCAAATCAC TGCTTATTTG
 269 ACTAAAATTC  AAAGAGGAGG TCATATTCAG CCTTTTGGTT GTATGATAGC TGTAGATGAG GCTAGTTTTC GTGTAATAGC
 349 TTATAGTGAA  AATGCCTTTG AAATGCTTAG TTTAACTCCA CAATCTGTTC CAAGCCTTGA GAAGTGTGAG ATCCTCACTA
 429 TTGGAACTGA  TGTTAGGACC CTTTTTACCC CTTCTAGCTC TGTTTTGCTA GAAAGAGCAT TTGGGGCACG TGAGATCACT
 509 TTACTCAACC  CAATTTGGAT TCATTCCAAG AATTCTGGAA AGCCCTTTTA TGCAATTTTG CACAGGGTTG ATGTTGGTAT
 589 TGCCATTGAT  TTGGAGCCTG CTAGAACTGA GGACCCTGCT TTATCTATTG CTGGAGCAGT GCAGTCACAG AAACTTGCAG
 669 TGAGGGCTAT  TTCTCATTTG CAATCACTTC CTGGTGGGGA CATTAAGCTT TTGTGTGATA CTGTTGTTGA GAGTGTCAGG
 749 GAGTTAACCG  GGTATGACCG GGTTATGGTA TATAAATTTC ATGAGGATGA GCATGGAGAG GTAGTGGCTG AGAGTAAAAG
 829 ATCAGATTTA  GAGCCCTATA TCGGTTTGCA TTATCCTGCT ACTGATATTC CTCAAGCTTC ACGGTTTTTG TTTAAGCAGA
 909 ACAGGGTGAG  AATGATTGTG GACTGTCATG CTACCCCTGT GCGGGTTACT CAGGATGAAT CACTGATGCA GCCTTTATGT
 989 CTAGTTGGTT  CCACACTTAG AGCACCTCAT GGTTGCCACG CACAGTACAT GGCAAATATG GGGTCTATTG CCTCATTAAC
1069 ACTGGCAGTT  ATTATCAACG GAAATGATGA GGAAGCTGTG GGTGGCGGTC GAAATTCAAT GAGGCTATGG GGCTTGGTTG
1149 TTGGACACCA  CACTTCTGTT CGGTCCATTC CTTTCCCTCT TAGGTATGCA TGTGAATTCC TTATGCAGGC CTTTGGACTC
1229 CAATTGAACA  TGGAGTTGCA ATTGGCGTCA CAGTTGTCTG AGAAACATGT TTTAAGGACA CAAACACTGT TATGTGACAT
1309 GCTCCTTCGA  GACTCTCCAC CGGGGATTGT TACCCAAAGC CCCAGTATTA TGGACCTTGT GAAGTGCGAT GGTGCTGCTC
1389 TATACTACCA  GGGGAAGTAC TATCCATTAG GTGTCACACC AACTGAAGCT CAGATAAAGG ACATTGTGGA GTGGTTATTG
1469 GCTTACCATG  GAGACTCAAC AGGTTTAAGT ACTGACAGTT TGGCTGATGC TGGGTATCCT GGAGCAGCTT CACTTGGTGA
1549 TGCAGTTTGT  GGTATGGCTG TCGCTTATAT ATCTTCTAAA GATTTCTTGT TTTGGTTTCG CTCCCACACA GCGAAAGAA
1629 ATAAAGTGGGG TGGTGCAAAG CATCATCCTG AAGACAAGGA TGATGGACTG AGAATGCATC CACGTTCTTC CTTCAAGGCA
1709 TTTCTGGAAG  TTGTTAAAAG TCGGAGCTCA CCATGGGAAA ATGCCGAAAT GGATGCAATC CACTCTTTGC AGCTAATTCT
1789 GCGAGATTCA  TTTAAGGATG CTGAGGCAAG TAATTCTAAG GCTATTGTGC ATGCTCATCT TGGGGAAATG GAGTTGCAAG
1869 GGATAGATGA  ACTGAGTTCT GTTGCCAGAG AAATGGTTAG ATTGATCGAA ACTGCAACAG CTCCCATATT TGCTGTTGAT
1949 GTCGAAGGTC  GCATAAATGG GTGGAATGCA AAGGTCGCTG AATTGACAGG TTTATCAGTT GAAGAAGCAA TGGGGAAGTC
2029 CTTGGTTCAT  GAGCTTGTGT ACAAAGAATC ACAGGAGACT GCTGAGAAGC TTCTGTATAA TGCTCTAAGA GGCGAGGAAG
2109 ATAAAAATGT  AGAAATAAAG TTGAGGACAT TTGGAGCTGA ACAACTGGAG AAAGCTGTTT TTGTGGTGGT TAATGCTTGC
2189 GCTAGCAAAG  ATTACACAAA CAACATTGTT GGTGTTTGCT TTGTTGGGCA GGATGTTACT GGGGAAAAAG TTGTTATGGA
2269 CAAGTTTATT  AACATCCAAG GTGATTACAA GGCCATTGTG CACAGCCCCA ATCCTCTGAT CCCTCCAATA TTTGCATCAG
2349 ATGAGAACAC  TTGTTGCTCC GAGTGGAACA CTGCCATGGA AAAACTCACT GGTTGGTCTA GAGGGGAGAT TGTTGGAAAA
2429 ATGTTAGTTG  GTGAGATTTT TGGAAGTTGT TGTCGGCTCA AGGGCCCAGA TGCCATGACA AAGTTCATGA TCGTGTTGCA
2509 TAATGCAATT  GGAGGACAGG ATACAGACAA GTTTCCATTT TCCTTTTTTG ACCGAAATGG GAAATATGTG CAAGCTCTTT
2589 TGACTGCTAA  CAAGAGAGTC AATATGGAGG GCAATACTAT TGGGGCTTTC TGTTTCATAC AGATAGCCAG TCCCGAACTG
2669 CAGCAAGCTC  TAAGAGTTCA AAGGCAACAG GAAAAGAAGT GTTATTCTCA GATGAAAGAG CTGGCATACA TTTGTCAGGA
2749 AATAAAAAGT  CCTCTTAATG GTATACGCTT TACAAATTCA TTGTTGGAGG CCACAAATTT GACAGAAAAT CAGAAGCAGT
2829 ATCTAGAGAC  AAGTGCTGCT TGTGAGAGGC AGATGTCTAA GATCATTAGG GATGTTGATC TGGAAAACAT TGAGGACGGT
2909 TCACTGACCC  TTGAGAAAGA AGATTTTTTT CTTGGGAGTG TAATAGATGC TGTTGTTAGC CAAGTGATGT TATTGCTGAG
2989 GGAAAAAGGC  GTGCAGTTAA TCCGTGATAT ACCAGAGGAA ATTAAGACAT TAACAGTACA TGGTGATCAA GTGAGAATTC
3069 AACAGGTCTT  GGCAGATTTC TTGTTGAACA TGGTACGGTA TGCACCATCA CCTGATGGGT GGGTAGAAAT CCAACTTCGA
3149 CCAAGTATGA  TGCCAATATC TGATGGAGTA ACTGGTGTGC ATATTGAACT CAGGATTATA TGCCCTGGCG AAGGGCTTCC
3229 TCCTGAATTG  GTTCAAGATA TGTTCCACAG CAGTCGGTGG GTAACTCAGG AAGGCCTAGG ACTGAGCACG TGCAGAAAAA
3309 TGTTAAAGCT  TATGAATGGA GAAATCCAGT ATATCAGAGA ATCAGAAAGA TGCTATTTCC TGATTGTCCT TGACCTGCCA
3389 ATGACCCGCA  AAGGTCCAAA GAGTGTTGGC TAGGAGCTTA CAATCTCTAG AGGATCCCCG GGTACCGAGC TCGAATTCGT
3469 AA
```

图 1 *SpPHYB* 的 cDNA 序列

Fig.1 cDNA sequence of *SpPHYB*

下划线处分别为起始密码子和终止密码子。

的一致性(98%)，显示 PHYB 蛋白是保守性的。

在正常光照生长条件下，*SpPHYB* 在根、茎、叶、芽、块茎和花中都能表达，尽管在块茎和花的表达量稍低于其他器官，这表明 *SpPHYB* 不具有组织表达特异性，这与 Heyer 和 Gatz (1992)在栽培种马铃薯中观察到的结果是相

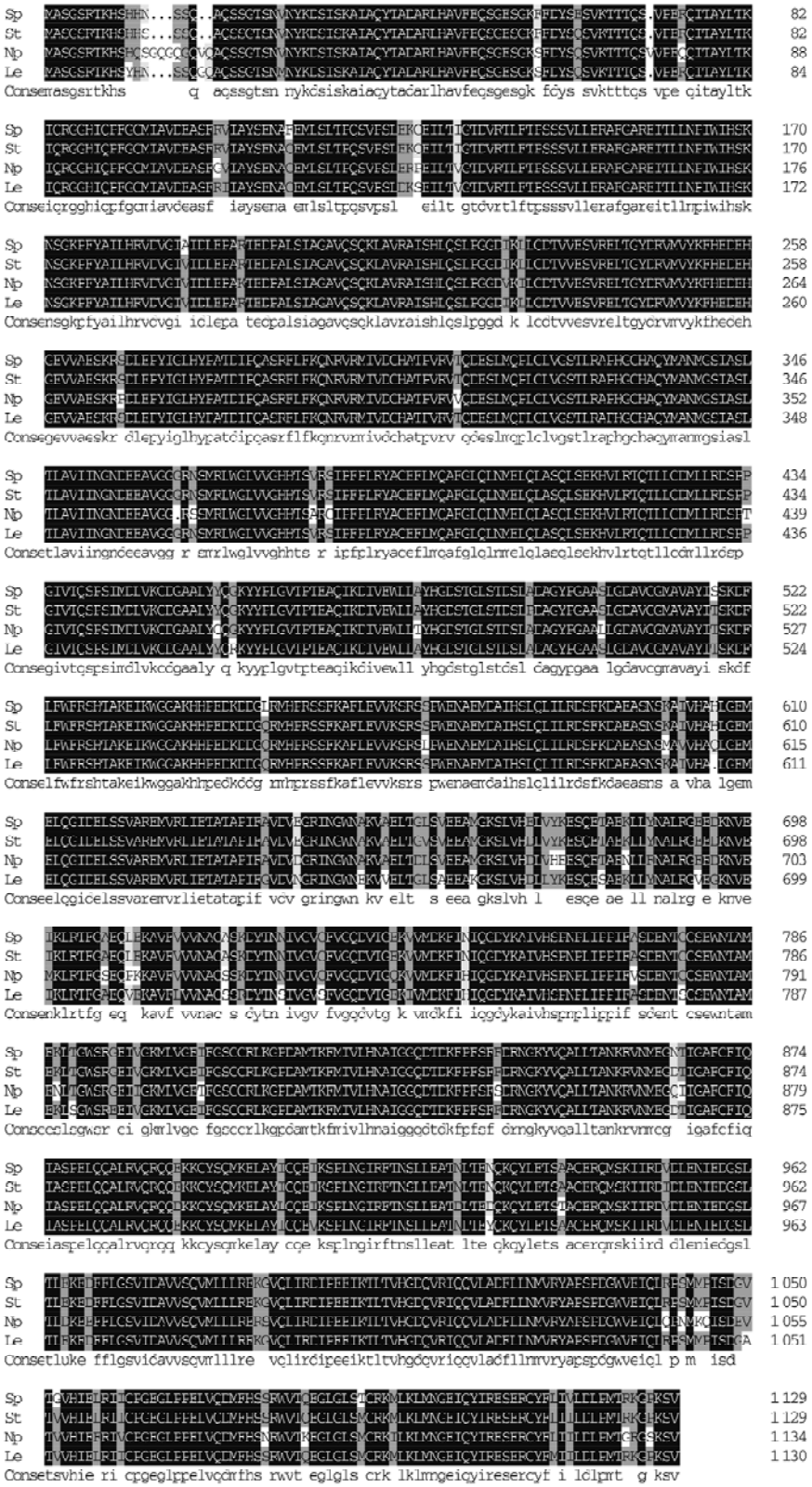

图 2 SpPHYB 与其他植物同源蛋白氨基酸序列比对

Fig.2 Comparison on amino acid sequences between SpPHYB and its homologous proteins from other plants

Sp：野生马铃薯；St：栽培型马铃薯；Np：烟草；Le：番茄。

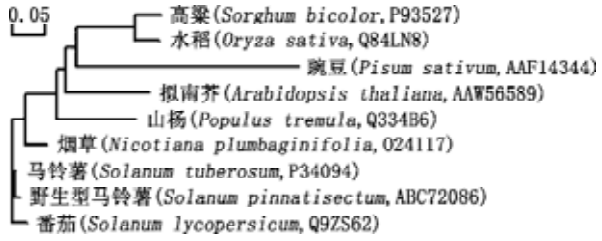

图3 SpPHYB的系统发生分析

Fig.3 Phylogenetic analysis of SpPHYB

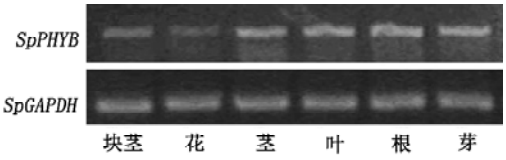

图4 *SpPHYB*在不同组织的表达

Fig.4 Expression of *SpPHYB* in different tissues

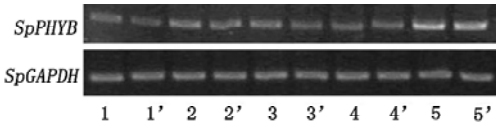

图5 光和暗诱导下野生型马铃薯*SpPHYB*的组织表达

Fig.5 Expression of *SpPHYB* in different tissues of *S. pinnatisectum* under light and dark conditions

1~5为光照处理的根、茎、叶、块茎、芽；1'~5'为黑暗处理的根、茎、叶、块茎、芽。

似的。

本文的结果表明，经8 h短光照和黑暗处理的马铃薯植株，其*SpPHYB*在块茎中的表达较低，且处理间的差异不很明显，这表明尽管光照对*SpPHYB*的表达量有影响，但*SpPHYB*的表达与否并不依赖于光照条件。

参考文献

张易，郭建林，卢其能，杨清(2006). 野生种马铃薯(*Solanum pinnatisectum*) *PHYA*基因cDNA的克隆与表达分析. 植物生理学通讯, 42 (6): 1081~1085

周波，李玉花(2006). 植物的光敏色素与光信号转导. 植物生理学通讯, 42 (1): 134~140

Aksenova NP, Konstantinova TN, Golyanovskaya SA, Gukasyan IA, Gatz C, Romanov GA (2002). Tuber formation and growth of *in vitro* cultivated transgenic potato plants overproducing phytochrome B. Russ J Plant Physiol, 49: 478~483

Boccalandro HE, Ploschuk EL, Yanovsky MJ, Sanchez RA, Gatz C, Casal JJ (2003). Increased phytochrome B alleviates density effects on tuber yield of field potato crops. Plant Physiol, 133: 1539~1546

Furuya M (1993). Phytochromes: their molecular species, gene families, and functions. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 44: 617~645

Heyer A, Gatz C (1992). Isolation and characterization of a cDNA-clone coding for potato type B phytochrome. Plant Mol Biol, 20: 589~600

Jackson S (1999). Multiple signaling pathways control tuber induction in potato. Plant Physiol, 119: 1~8

Lopez-Juez E, Nagatani A, Tomizawa KI, Deak M, Kern R, Kendrick RE, Furuya M (1992). The cucumber long hypocotyl mutant lacks a light-stable PHYB-like phytochrome. Plant Cell, 4: 241~251

Nagatani A, Chory J, Furuya M (1991). Phytochrome B is not detectable in the *hy3* mutant of *Arabidopsis*, which is deficient in responding to end-of-day far-red light treatments. Plant Cell Physiol, 32: 1119~1122

Scohfield A, Paliyath G (2005). Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. Plant Physiol Biochem, 43: 1052~1060

Somers DE, Sharrock RA, Tepperman JM, Quail PH (1991). The *hy3* long hypocotyl mutant of *Arabidopsis* is deficient in phytochrome B. Plant Cell, 3: 1263~1274

Thiele A, Herold M, Lenk I, Quail PH, Gatz C (1999). Heterologous expression of *Arabidopsis* phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. Plant Physiol, 120: 73~81