

## 海马齿 $\Delta^1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶(*SpP5CS*)基因的克隆和表达分析

申龙斌<sup>1</sup>, 杨成龙<sup>2,\*</sup>, 郭建春<sup>3</sup>, 段瑞军<sup>3</sup>

<sup>1</sup>中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室, 海南儋州571737; <sup>2</sup>贵州省亚热带作物研究所, 贵州兴义562400; <sup>3</sup>中国热带农业科学院生物技术研究所, 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海口571101

**摘要:** 以海马齿为材料, 根据已克隆的*P5CS*基因的保守序列设计简并引物, 利用RT-PCR和RACE技术从海马齿中获得了一个海马齿 $\Delta^1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶基因。该基因cDNA序列全长2 452 bp, 其中包括开放读码框为2 169 bp、5'-UTR 52 bp和3'-UTR 231 bp, 推断其编码722个氨基酸, 分子量79.4 kDa, 根据序列比对其蛋白命名为SpP5CS。对该蛋白质序列进行生物信息学分析表明: SpP5CS与冰叶日中花、海蓬子和葡萄等双子叶植物相似性较高, 而与小麦、狗尾草和水稻等单子叶植物相似性较低。荧光定量PCR分析表明, 该基因在海马齿的叶中表达量最高, 在茎中其次; 海马齿*SpP5CS*基因在各部分中的表达量随着盐胁迫的时间延长在叶中变化最为明显: 在400和600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫9 h表达量最高, 在800 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫12 h最高, 其表达均表现先升高后降低的趋势。*P5CS*基因是植物体内合成脯氨酸的关键酶基因, *SpP5CS*基因的克隆将为作物抗逆分子育种和进一步的功能分析打下基础。

**关键词:** 海马齿; *SpP5CS*; 盐胁迫; 表达分析

## Cloning and Expression Analysis of $\Delta^1$ -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase (*SpP5CS*) from *Sesuvium portulacastrum*

SHEN Long-Bin<sup>1</sup>, YANG Cheng-Long<sup>2,\*</sup>, GUO Jian-Chun<sup>3</sup>, DUAN Rui-Jun<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; <sup>2</sup>Guizhou Institute of Subtropical Crops, Xingyi, Guizhou 562400, China; <sup>3</sup>Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

**Abstract:** In this study, taking *Sesuvium portulacastrum* as an experimental material, *SpP5CS* gene has been cloned by designed primers according to conserved sequence of cloned *P5CS* genes through the means of RT-PCR and RACE technology. There are 2 452 bp in this gene cDNA which include 2 169 bp of open reading frame, 52 bp of 5'-URT and 213 bp of 3-UTR. 722 amino acids were coded according to estimation with 79.4 kDa formed this protein which named SpP5CS by alignment. This kind of SpP5CS sequence has higher similarity to dicotyledon such as *Mesembryanthemum crystallinum*, *Salicornia* and grape, etc., but lower similarity to monocotyledon such as wheat, rice and foxtail through bioinformatics analysis. As a result, it has highest gene expression in the leaves of *S. portulacastrum*, and low expression level in its stems through RT-PCR analysis. With the prolonging the stress of salt, the *SpP5CS* gene expression level in the leaves of *S. portulacastrum* has been significant impacted: with treatment of 400 and 600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, the highest expression level reached at 9 h, with treatment of 800 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl, the highest expression level reached at 12 h, and with the same trend that: firstly increase and then decreasing. *P5CS* gene is a key enzyme gene in the synthesis of proline in plants, so the cloning of *SpP5CS* gene might lay a foundation for the adversity resistance molecular breeding of crop and further function analysis.

**Key words:** *Sesuvium portulacastrum*; *SpP5CS*; salt stress; expression profiles

收稿 2015-07-02 修定 2015-11-02

资助 海南耕地改良关键技术与示范专项(HNGDhs2015)和中国热带农业科学院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ITBB130302和ITBB130505)。

\* 通讯作者(E-mail: yangchenglong208@163.com; Tel: 0589-3911295)。

盐碱、低温和干旱等环境因子不仅严重限制了植物生长,也限制了农作物种植面积的扩增和产量的提高。研究表明,脯氨酸(proline)在植物体内具有重要的生理功能:脯氨酸具有渗透调节作用,在植物受到环境胁迫时作为一种渗透调节物质,起到维持细胞内水分和氧化还原反应的平衡、调节细胞渗透压、清除活性氧、保护蛋白质分子和亚细胞结构的稳定的作用(Lehmann等2010; Chen等2010),使植物在逆境胁迫下维持正常生长。虽然脯氨酸在植物体内可通过鸟氨酸或谷氨酸两个途径合成,但在逆境胁迫下,谷氨酸合成途径起主要作用(Delauney等1993)。 $\Delta^1$ -吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)是谷氨酸合成途径中的限速酶,具有谷氨酸激酶和谷氨酸- $\gamma$ -半醛脱氨酶活性,催化脯氨酸合成的前2步反应,同时,P5CS的反馈调节在控制植物处于正常和胁迫条件下脯氨酸的水平起着重要作用(Zhang等1995; Verbruggen和Hermans 2008)。

近年来,人们对P5CS研究逐渐深入,已在拟南芥、水稻(Choudhary等2005)、烟草(Kishor等1995)、马铃薯(Hmida-Sayari等2005)、蒺藜状苜蓿(Kim和Nam 2013)、甜高粱(Su等2011)等高等植物中被克隆,并通过转基因技术诱导P5CS基因过量表达,发现该基因能够显著提高植物的耐旱性和耐盐性。因此,植物积累脯氨酸的能力被视为植物抗逆性强弱的重要指标之一,而P5CS已被认为是一个重要的抗逆相关基因(Zhu等1998)。

海马齿为真盐生红树林植物,番杏属,该属一共有8个种,我国只有一个种,多生长于福建、广东、海南、台湾中南部及澎湖列岛海岸(唐昌林1996)。海马齿逆境生活能力非常强,主要表现为耐盐、耐旱和抗重金属(杨成龙等2010)。目前,海马齿P5CS基因的克隆与功能研究还未见报道。本研究从海马齿中分离脯氨酸合成关键酶基因P5CS的全长cDNA序列,分析该基因的序列特征、进化关系和不同盐胁迫诱导下的表达模式,揭示其对盐胁迫诱导的应答机制,为利用该基因改良作物的抗逆境胁迫能力提供理论指导。

## 材料与方法

### 1 试验材料和试剂

海马齿(*Sesuvium portulacastrum* L.)采自海南

省海口市郊区白沙门海滨。将同一株海马齿剪成带有2个节间的茎段,每个茎段上带有叶芽和2片真叶,将这些茎段放入Hoagland全营养液中培养1周左右,使其根长至5~10 cm。选取大小一致的幼苗分别在200、400、600和800 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl处理0、3、6、9、12、24和48 h,然后取根、茎和叶,液氮速冻,-80 °C保存备用。

植物RNA抽提试剂RNAlant plus Reagent购自天根生物公司、LA Taq DNA聚合酶、pMD18-T克隆载体、T<sub>4</sub>DNA连接酶、Real-time PCR和RT-PCR相关试剂购自大连宝生物工程公司,DNA琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA Marker购自东盛公司,限制性内切酶、Taq DNA聚合酶购自Fermentas公司,引物合成及序列测定均由上海生物工程股份有限公司完成。大肠杆菌感受态DH5 $\alpha$ 由本实验保存。

### 2 RNA提取和cDNA第一链的合成

所有植物材料RNA采用RNAlant plus Reagent试剂说明书提取总RNA,参照大连宝生物工程公司PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书合成cDNA第一链。

### 3 SpP5CS基因的克隆

#### 3.1 SpP5CS基因cDNA部分片段的扩增及克隆

参照GenBank登录的植物P5CS基因的核苷酸保守区序列,设计一对简并引物P1和P2(表1,上海生物工程股份有限公司合成),以反转录产物为模板进行中间片段扩增:94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 57 °C 45 s, 72 °C 2 min,共35个循环;72 °C延伸10 min。

#### 3.2 SpP5CS基因5'RACE和3'RACE的克隆

根据P5CS基因片段的测序结果设计5'RACE和3'RACE特异引物(表1)。通用引物APP和AUAP的序列和RACE操作流程参照文献(Scotton-Lavino等2006),方法略有改动。

进行5'RACE时,以P5CS2为引物进行cDNA第1链合成,反应产物经PCR纯化试剂盒纯化去除多余dNTP和引物后,利用末端转移酶TdT对产物加polyA尾巴。以加尾的cDNA为模板,APP和P5CS3(表1)为引物进行第1轮扩增:94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 50 °C 45 s, 72 °C 3 min,共35个循环;72 °C 10 min。第1轮扩增产物稀释100倍后,取1  $\mu$ L稀释产物作为模板,AUAP和P5CS1(表1)为引物进行第

表1 海马齿*SpP5CS*基因克隆引物Table 1 Primers of cloning *SpP5CS* cDNA from *S. portulacastrum*

引物	引物序列(5'→3')	碱基数
P1	CTTGATGGGAAAGCATGTGC	20
P2	CCTCGAGCATGAATCCTACTT	21
P5CS1	CCGTCACCAGAAAGTTGAGCAGA	22
P5CS2	TCTGTTTGATGCTTCTCTCGGAC	23
P5CS3	AAGTCGTTGTCCGTCACCAGAA	22
P5CS32	GTACTGTGGAAATAGTGGATGA	22
P5CS33	TTGGGTTGGGTGCTGAGGTCGG	22
APP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG	36
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC	20
QT	CCAGTGAGCAGAGTGACGAGGACTCGAGCTCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTT	52
QO	CCAGTGAGCAGAGTGACG	18
QI	GAGGACTCGAGCTCAAGC	18
P5CS-F	CGCGGATCCGCTTCGCTGTTGCTATGGGC	30
P5CS-R	CCGGTCGACGAGAGGAGGCGAAAAACACGA	30
qP5CS-F	TATGGAGGAGCCTATTGGTAAAA	23
qP5CS-R	TCTGAACTAAAGCATCTGGACGA	23
GAPDH-1	TTGGCATCGTTGAGGGTCT	19
GAPDH-2	CAGTGGGAACACGGAAAGC	19

2轮嵌套扩增: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 58 °C 1 min, 72 °C 3 min, 共35个循环; 72 °C 10 min。进行3'RACE时, 以QT为引物进行cDNA第1链合成。以cDNA产物为模板, 用QO和P5SC32 (表1)进行第1轮PCR扩增, 扩增程序与5'RACE的第1轮PCR扩增程序相同。第1轮PCR产物稀释100倍后, 取1  $\mu$ L稀释产物作为模板, QI和P5SC33 (表1)为引物进行第2轮嵌套扩增, 扩增程序与5'RACE的第2轮PCR扩增程序相同。

### 3.3 *SpP5CS*基因全长cDNA的克隆

利用DNAMAN软件对海马齿*P5CS*基因cDNA部分片段、5'端和3'端序列进行拼接, 得到海马齿*P5CS*基因全长cDNA的拼接序列。根据5'端和3'端序列设计一对引物P5CS-F和P5CS-R (表1), 用LA *Taq* DNA聚合酶进行PCR扩增。扩增程序为: 94 °C 4 min; 94 °C 45 s, 61 °C 45 s, 72 °C 3 min, 共35个循环; 72 °C 10 min。

上述PCR产物均进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测, 并回收纯化目的条带, 克隆到pMD18-T载体上, 送上海生物工程股份有限公司测序。

### 4 *SpP5CS*基因的生物信息学分析

利用NCBI在线分析软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)对*SpP5CS*基因全长cDNA序

列的开放读码框进行预测, 并通过网站中的软件对*SpP5CS*基因核苷酸序列利用Blastn软件进行比对, 对其推测的氨基酸序列利用Blastp软件进行比对和保守性功能域预测, 最后利用([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html))网站分析*SpP5CS*基因编码蛋白质的等电点和分子量, 利用MEGA 5.0软件分析*SpP5CS*基因氨基酸序列的结构域、同源性, 并构建系统进化树。

### 5 *SpP5CS*基因的不同胁迫条件下的表达模式分析

根据已获得*SpP5CS*基因全长设计引物qP5CS-F和qP5CS-R (表1), 扩增200 bp左右的基因片段, 以海马齿看家基因*GAPDH*作为内参。qPCR体系按照SYBR Premix *Ex Taq*<sup>TM</sup> II说明书进行加样。扩增程序为95 °C 1 min; 95 °C 5 s, 61 °C 30 s, 45个循环。每个处理分别设3个重复, 用Excel进行数据分析。

## 实验结果

### 1 海马齿叶片总RNA的提取

参考PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser试剂盒说明书提取海马齿总RNA, 1%非变性琼脂糖凝胶检测, 图1结果表明RNA条带清楚, 且28S rRNA与18S rRNA之比为2:1, 带与带之间无弥

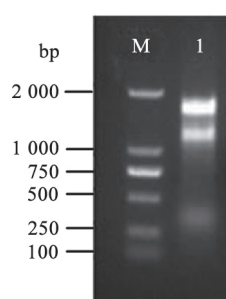


图1 海马齿总RNA提取

Fig.1 Extraction of total RNAs from *S. portulacastrum*

M: DL2000 Marker; 1: RNA.

散现象,说明RNA完整性比较好。因此,可以选取这样的RNA样品进行反转录,作为后续分子实验的模板。

## 2 *SpP5CS*基因克隆和序列分析

利用简并引物扩增得到一条1 500 bp左右的中间片段(图2-B),通过Blastn软件比对分析表明,该片段与多种植物的*P5CS*基因有较高的同源性,由此判断该片段为海马齿*SpP5CS*基因cDNA的部分序列。根据中间片段设计RACE特异性引物,5'RACE扩增获得1条特异性较强的700 bp左右的片段(图2-A),3'RACE扩增得到1条1 000 bp的片段(图2-C)。在3'端和5'端拼接后的全长序列的起始密码子和终止密码子附近设计一对特异引物,PCR扩增获得约2 275 bp的目的条带,测序结果与拼接的编码区序列结果完全吻合(图2-D)。将该基因命

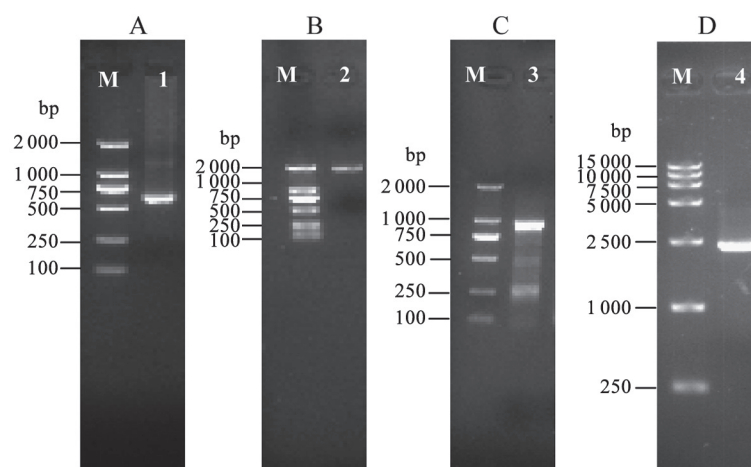
名为*SpP5CS*,该cDNA推导编码722个氨基酸。

将两端的通用引物序列去除,使用DNAMAN软件将1 000 bp的3'RACE序列、1 500 bp的中间序列和700 bp 5'RACE序列进行拼接,获得一条长度为2 452 bp的全长基因cDNA序列。ORF Finder软件分析表明,该基因含有一段52 bp的5'端非编码区(5'-UTR)、一段包含polyA尾巴的231 bp的3'端非编码区(3'-UTR)和一个长度为2 169 bp的完整的阅读框,编码722个氨基酸,分子量为79.4 kDa,等电点(pI)为6.23。

Blastp比对结果显示,*SpP5CS*基因编码的氨基酸与其他植物*P5CS*基因编码的氨基酸序列具有很高的同源性,与冰叶日中花*McP5CS* (*Mesembryanthemum crystallinum*, O65361.1)同源性为90%,与海蓬子*SbP5CS* (*Salicornia bigelovii*, AGW51410.1)同源性为87%,与葡萄*VvP5CS* (*Vitis vinifera*, CBI31612.3)同源性为81% (图3)。该结果表明,本研究所克隆的cDNA序列为海马齿二氢吡咯-5-羧酸合成酶基因,该基因命名为*SpP5CS* (*S. portulacastrum*  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase)。

## 3 *SpP5CS*基因的生物信息学分析

利用DNAMAN软件对*SpP5CS*基因编码的氨基酸序列与冰叶日中花、海蓬子、麻疯树(*Jatropha curcas*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)和葡萄等*P5CS*基因编码的氨基酸序列进行多序列比对发现,*SpP5CS*基因的保守区域与冰叶日中花、海蓬子、麻

图2 海马齿*SpP5CS*基因PCR扩增Fig.2 Agarose gel electrophoresis for the cloning of *SpP5CS* from *S. portulacastrum*

A: 5'端编码区片段; B: 中间片段; C: 3'端cDNA片段; D: cDNA全长; M: DNA Marker; 1~4: 扩增条带。

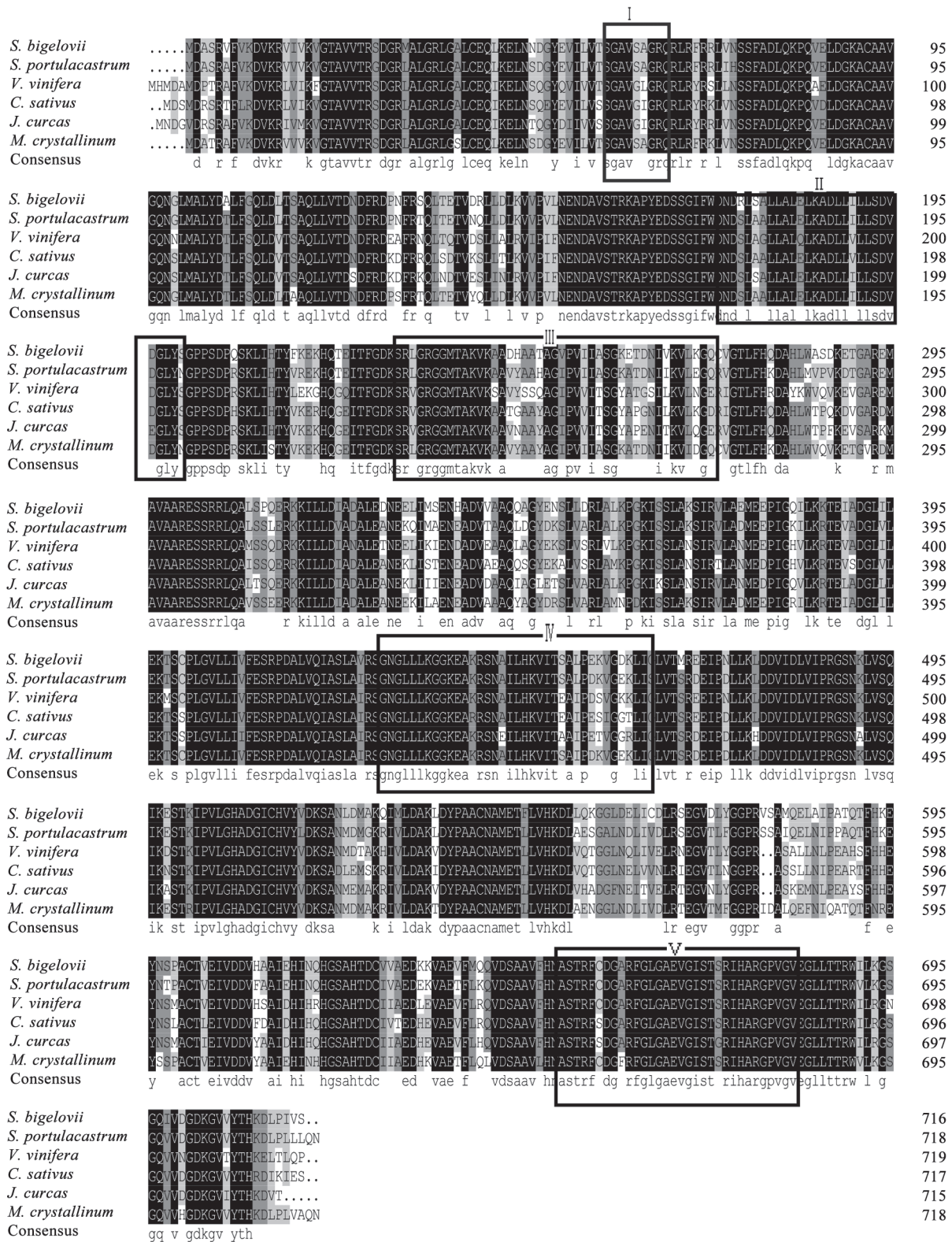


图3 *SpP5CS*基因氨基酸序列和其他物种*P5CS*基因比较分析

Fig.3 Comparison of the deduced amino acid sequences of *SpP5CS* with other plants

I: ATP 结构域; II: 亮氨酸功能域; III: 谷氨酸激酶结构域; IV: NAD(P)H结构域; V: 谷氨酸- $\gamma$ -半醛(GSA)结构域。 *S. bigelovii*: 海蓬子; *S. portulacastrum*: 海马齿; *V. vinifera*: 葡萄; *C. sativus*: 黄瓜; *J. curcas*: 麻风树; *M. crystallinum*: 冰叶日中花。

疯树、黄瓜和葡萄的保守结构域一致, P5CS蛋白保守结构域含有以下5个主要功能域(图3): 谷氨酸激酶( $\gamma$ -GK)保守域、谷氨酸- $\gamma$ -半醛脱氢酶(GSADH)保守域、一个假想的亮氨酸保守域及ATP结合位点、NAD(P)H结合位点。*SpP5CS*基因编码产物具有的这些特征表明, 该基因编码的氨基酸序列为典型的植物二氢吡咯-5-羧酸合成酶。

利用NCBI数据库对*SpP5CS*的结合位点和结构域分析表明: *SpP5CS*多肽的N端为氨基酸激酶(AAK)超家族成员G5K结构域, 含有ATP结合位点、磷酸结合位点和脯氨酸的变构结合位点, G5K催化ATP释放能量并转移末端磷酸基团给L-Glu生

成谷氨酰胺磷酸(CGP); C端为醛脱氢酶(ALDH-SF)超家族 $\gamma$ -谷氨酸磷酸还原酶(GPR, 等同于GSADH)结构域, 催化NADPH传递氢给CGP生成GSA。

利用MEGA5.0工具对*SpP5CS*与植物中其他已克隆的P5CS氨基酸序列进行同源性分析比对: 结果表明*SpP5CS*与冰叶日中花P5CS的同源性为90%; 而与拟南芥、蓖麻和小麦等的P5CS同源性相对较低。进化树(图4)分析表明, P5CS类蛋白在进化过程中出现了较大差异, 大致可以分为3个类群, 来源于单子叶植物的P5CS, 来源于双子叶植物的P5CS, 以及亲缘关系较近且相对抗性较强的一类植物。

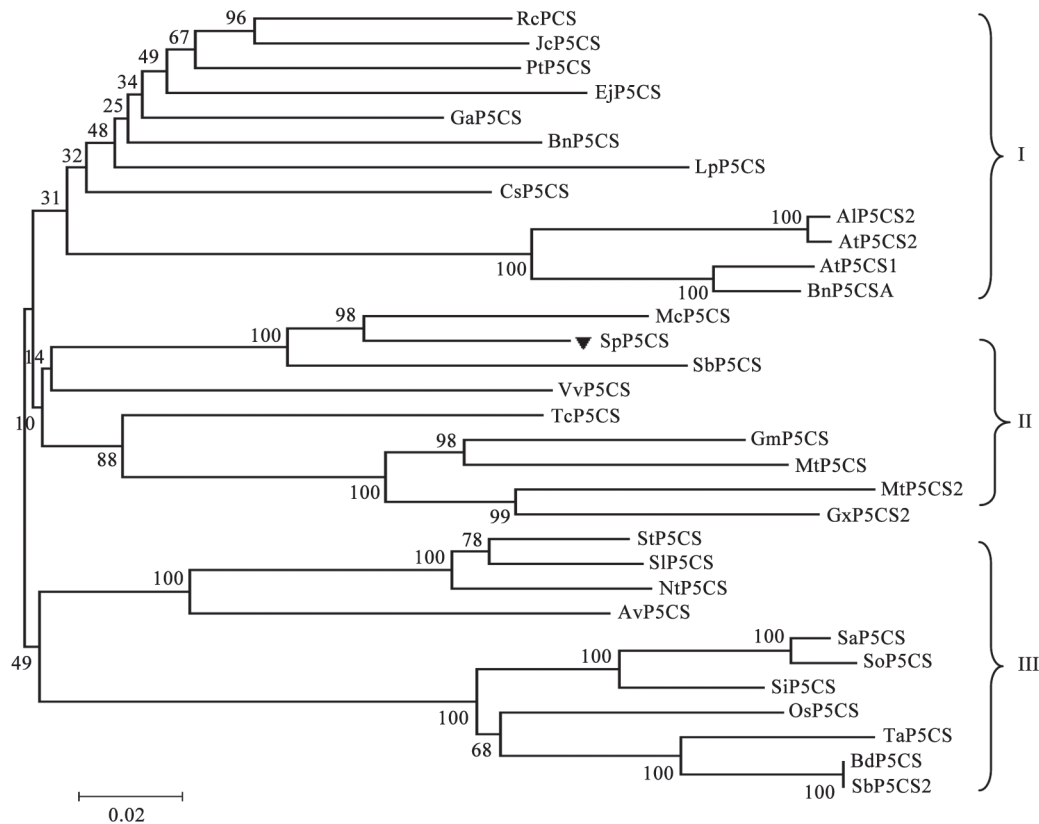


图4 *SpP5CS*蛋白与其他植物P5CS的氨基酸序列进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of amino acid sequences between *SpP5CS* and other P5CS proteins

蛋白质序列为: 海马齿*SpP5CS*, 蓖麻RcP5CS (XP\_002524230.1), 麻疯树JcP5CS (ADK37758.1), 杨树PtP5CS (XP\_002315202.1), 大叶黄杨EjP5CS (ACF19677.1), 亚洲棉GaP5CS (ACI62865.1), 苎麻BnP5CS (AEV46825.1), 牛蒡子LpP5CS (AFW04294.1), 黄瓜CsP5CS (XP\_004138450.1), 琴叶拟南芥AIP5CS2 (XP\_002878042.1), 拟南芥AtP5CS2 (NP\_191120.2), 拟南芥AtP5CS1 (NP\_181510.1), 欧洲油菜BnP5CSA (AAK01360.1), 冰叶日中花McP5CS (O65361.1), 海蓬子SbP5CS (AGW51410.1), 葡萄VvP5CS (CB131612.3), 可可TcP5CS (EOY07413.1), 大豆GmP5CS (XP\_003516890.1), 蒺藜状苜蓿MtP5CS (AET35478.1), 蒺藜状苜蓿MtP5CS2 (AET87351.1), 大豆GxP5CS2 (XP\_003552202.1), 水茄StP5CS (AEN04068.1), 番茄SiP5CS (NP\_001233907.1), 烟草NtP5CS (ADL61840.1), 罗布麻AvP5CS (ABO70348.1), 斑茅SaP5CS (ABV03819.1), 甘蔗SoP5CS (ABV03819.1), 狗尾草SiP5CS (XP\_004961886.1), 水稻OsP5CS (BAA19916.1), 小麦TaP5CS (AAX35536.1), 二穗短柄草BdP5CS (XP\_003568327.1), 高粱SbP5CS2 (ACU65227.1)。I: 单子叶类植物的P5CS蛋白; II: 双子叶类植物的P5CS蛋白; III: 亲缘关系较近且相对抗性较强的一类植物的P5CS蛋白。

#### 4 *SpP5CS*基因表达特征分析

##### 4.1 海马齿*SpP5CS*在根茎叶中的表达量分析

分别提取海马齿的根、茎和叶部位的RNA进行荧光定量PCR, 分析*SpP5CS*在海马齿不同器官中的表达模式。图5结果表明, *SpP5CS*在海马齿的各组织中均有表达, 其中在叶表达较高, 茎表达量

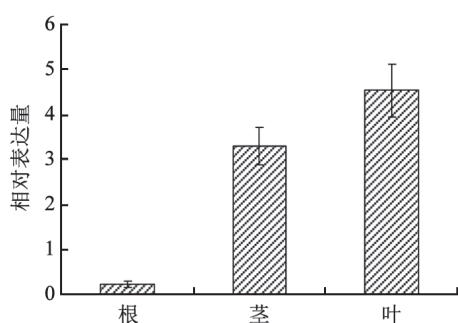


图5 正常条件下*SpP5CS*基因在海马齿根、茎和叶表达量分析

Fig.5 Expression analysis of *SpP5CS* in root, stem, and leaf of *S. portulacastrum* under normal condition

次之, 在根中表达最弱。表明正常生长情况下, *SpP5CS*在海马齿的各组织中都有表达, 其中地上部器官中表达量显著高于地下器官中的表达量。

##### 4.2 *SpP5CS*在盐胁迫下的表达模式分析

在200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫下, 随着盐胁迫时间的增加, 海马齿茎的*SpP5CS*基因的表达量变化最为明显, 表达量在12 h最高(图6-A)。在高浓度盐胁迫下, 海马齿*SpP5CS*基因在各部分中的表达量随着盐胁迫的时间延长在叶中变化最为明显: 在400和600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl时9 h表达量最高(图6-B、C), 在800 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl时12 h最高(图6-D); 在400和600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl时, *SpP5CS*基因在茎中的表达量分别在12和6 h时最高。

## 讨 论

植物在盐胁迫、干旱等逆境条件下积累脯氨酸是一种较普遍的现象(Hare和Cress 1997), 植物通过积累小分子有机物来调节体内的渗透调节,

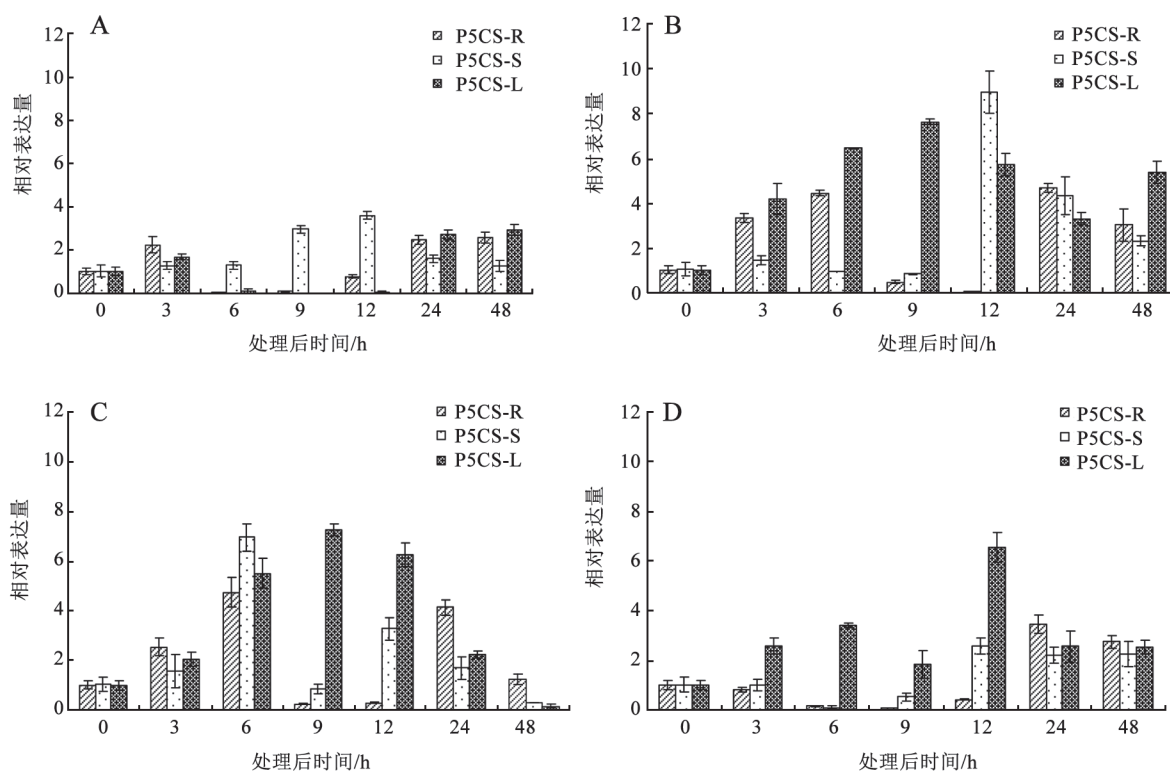


图6 不同浓度NaCl处理后*SpP5CS*基因在根(R)、茎(S)和叶(L)中表达的动态规律

Fig.6 The dynamic rule of expression of *SpP5CS* in root (R), stem (S), and leaf (L) of *S. portulacastrum* under different concentrations of NaCl stresses

A: 200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl; B: 400 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl; C: 600 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl; D: 800 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl.

抵御不利环境对其的伤害。大量研究表明,脯氨酸是植物在受到各种非生物胁迫时在体内大量积累维持渗透压稳定和氧化还原反应平衡的一种重要的物质(Lehmann等2010; Szabados和Savouré 2010; Strizhov等1997; Hong等2000)。研究发现, *P5CS*具有ATP结合位点、NADPH结合位点、谷氨酰激酶(GK)结构域和谷氨酸半醛(GSA)结构域,催化从L-Glu到脯氨酸等过程中的关键酶(Fujita等1998)。本研究通过RT-PCR结合RACE技术从海马齿中克隆到*SpP5CS*基因的全长cDNA序列,通过对其功能域分析和Clustal W多重比对发现,该基因推测的氨基酸序列与其他物种*P5CS*基因氨基酸序列在蛋白质结构上很类似,且在ATP结合位点、NADPH结合位点、谷氨酰激酶(GK)结构域和谷氨酸半醛(GSA)结构域均较为保守,这与其他人的研究结果相一致(Su等2011),从而证明该基因保守性很高。本试验发现,随盐胁迫浓度的升高,海马齿叶片中*SpP5CS*基因的变化最为明显(图6),这为实验室前期研究发现盐胁迫下海马齿叶片中脯氨酸含量增加,并与盐浓度之间呈正相关提供了理论依据(杨成龙等2010),说明了海马齿的叶片是盐胁迫最敏感的部位,并且盐离子最终被贮藏在海马齿叶片的液泡中(Yeo和Flowers 1977)。海马齿在受到盐胁迫时,能主动通过大量增加脯氨酸来缓解盐胁迫引起的渗透胁迫,从而对盐碱起到抵抗作用,即海马齿体内脯氨酸含量的积累可能是其耐盐性的生理机制之一(杨成龙等2010)。

利用实时荧光定量PCR,分析海马齿不同部位*SpP5CS*基因的表达情况发现:(1)非胁迫条件下,*SpP5CS*基因在叶中的表达量最高,根中最低。盐处理后,*SpP5CS*基因显著上调表达,茎和叶中的表达量最高,这与黑麦草的表达模式相同(曹丽等2010);未处理海马齿*SpP5CS*叶中的表达量最高,盐处理后叶和茎中表达量最高,根中最低。(2)*SpP5CS*基因在高盐胁迫下海马齿叶中明显增加,为海马齿更加适应盐胁迫提供渗透调节物质,也为海马齿叶片内酶系统提供一个更适的微环境,从而说明*SpP5CS*基因在盐胁迫下脯氨酸含量的变化中起关键作用。本研究获得了*SpP5CS*基因并对其表达模式进行初步研究,为研究*SpP5CS*基因在海马齿抗逆过程所起到的作用以及为培育耐盐作物奠定基础。

## 参考文献

- 曹丽, 孙振元, 义鸣放, 韩蕾辛, 海波(2010). 多年生黑麦草*P5CS*基因的cDNA克隆、表达及亚细胞定位. 园艺学报, 37 (9): 1477~1484
- 唐昌琳(1996). 中国植物志(第26卷). 北京: 科学出版社, 302~321
- 杨成龙, 段瑞军, 李瑞梅, 胡新文, 符少萍, 郭建春(2010). 盐生植物海马齿耐盐的生理特性. 生态学报, 30 (17): 4617~4627
- Chen JB, Zhang XY, Jing RL, Blair MW, Mao XG, Wang SM (2010). Cloning and genetic diversity analysis of a new *P5CS* gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Theor Appl Genet, 120: 1393~1404
- Choudhary NL, Sairam RK, Tyagi A (2005). Expression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). Indian J Biochem Biophys, 42 (6): 366~370
- Delauney AJ, Hu C-AA, Kavi Kishor PB, Verma DPS (1993). Cloning of ornithine  $\delta$ -aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by *trans*-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. J Biol Chem, 268: 18673~18678
- Fujita T, Maggio A, Garcia-Rios M, Bressan R, Csonka LN (1998). Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato. Plant Physiol, 118: 661~674
- Hare PD, Cress WA (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. Plant Growth Regul, 21: 79~102
- Hmida-Sayari A, Gargouri-Bouzid R, Bidani A, Jaoua L, Savoure A, Jaoua S (2005). Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. Plant Sci, 169 (4): 746~752
- Hong ZL, Lakkineni K, Zhang ZH, Verma DPS (2000). Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. Plant Physiol, 122: 1129~1136
- Kim GB, Nam YW (2013). A novel  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene of *Medicago truncatula* plays a predominant role in stress-induced proline accumulation during symbiotic nitrogen fixation. J Plant Physiol, 170: 291~302
- Kishor PBK, Hong Z, Miao GH, Hu C-AA, Verma DPS (1995). Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol, 108 (4): 1387~1394
- Lehmann S, Funck D, Szabados L, Rentsch D (2010). Proline metabolism and transport in plant development. Amino Acids, 39: 949~962
- Scotto-Lavino E, Du G, Frohman MA (2006). 5' end cDNA amplification using classic RACE. Nat Protocols, 1 (6): 2555~2562
- Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blicking S, Zilberstein A, Schell J, Koncz C, Szabados L (1997). Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABA1*, *ABI1* and *AXR2* in *Arabidopsis*. Plant J, 12: 557~569
- Su M, Li XF, Ma XY, Peng XJ, Zhao AG, Cheng LQ, Chen S, Liu GS (2011). Cloning two *P5CS* genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treat-



- ment. *Plant Sci*, 181: 652~659
- Szabados L, Savaouré A (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci*, 15: 89~97
- Verbruggen N, Hermans C (2008). Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids*, 35 (4): 753~759
- Yeo AR, Flowers TJ (1977). Salt tolerance in the halophyte *Suaeda maritima* Dum.: interaction between aluminium and salinity. *Ann Bot*, 41: 331~339
- Zhang CS, Lu Q, Verma DPS (1995). Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *J Biol Chem*, 270 (35): 20491~20496
- Zhu B, Su J, Chang M, Verma DPS, Fan UL, Wu R (1998). Overexpression of a  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Sci*, 139: 41~48