

烟草赖氨酸脱羧酶基因*NtLDC1*的克隆和表达分析

张吉顺¹, 张孝廉^{1*}, 林世锋¹, 付强¹, 余婧¹, 邹颖¹, 李勇²

¹贵州省烟草科学研究院, 烟草行业分子遗传重点实验室, 贵阳550081; ²遵义师范学院生命科学学院, 贵州遵义563002

摘要: 赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC)是生物碱合成第一步所需的关键酶。为研究LDC基因在烟草中特性和功能, 本研究采用同源克隆和RT-PCR方法从栽培烟草‘K326’中克隆得到一个LDC基因, 命名为*NtLDC1*, GenBank登录号为KU507075。序列分析表明烟草*NtLDC1*基因ORF全长666 bp, 编码221个氨基酸的蛋白, 相对分子质量为24 264.9 Da, 等电点为5.43。不同植物中LDC蛋白较为保守, *NtLDC1*与番茄和马铃薯的LDC蛋白高度相似, 进化分析表明*NtLDC1*与番茄中LDC的亲缘关系最近。利用实时荧光定量PCR对*NtLDC1*基因进行组织表达分析, 结果显示*NtLDC1*基因在烟草根、茎、叶、花中均有表达, 在叶片中的表达水平最高。低温可以诱导*NtLDC1*基因的表达, 在低温处理8 h基因的表达量达到最高, 表明*NtLDC1*可能在烟草低温胁迫应答中发挥作用。

关键词: 烟草; 赖氨酸脱羧酶(LDC); 基因克隆; 表达分析

赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC)是生物碱合成第一步所需的关键酶, 赖氨酸在LDC的催化下生成戊二胺(尸胺) (Hartmann等1980)。有研究发现LDC和尸胺的含量与植物的抗逆性有关(苗永美等2013; Kuznetsov等2007)。烟草是一种重要的经济作物, 生物碱的含量和类型是影响烟叶品质和安全的因素, 此外, 温度对烟草生长发育有很大影响, 苗期遭遇低温会引起早花(杨静等2013), 从而严重影响烟叶产量, 因此培育苗期耐低温的品种对提高烟叶产量会有很大帮助。

目前已有学者研究了苦豆子、蛇足石杉、羽扇豆和黄瓜等植物的赖氨酸脱羧酶活性和功能, 克隆了部分LDC基因。杨毅等(2015)用PEG6000处理刚萌动的苦豆子, 发现干旱条件下苦参碱(matrine, MA)和氧化苦参碱(oxymatrine, OMA)的含量与LDC表达量有一定关系。杜次等(2014)通过RT-PCR方法克隆从蛇足石杉中得到2个赖氨酸脱羧酶基因*LDC1*和*LDC2*, 并进行了原核表达和功能分析, 发现重组融合蛋白Trx-LDC1和Trx-LDC2均能催化赖氨酸脱羧生成尸胺。Bunsupa等(2012)将羽扇豆的*LaLDC*基因转入模式植物拟南芥和烟草后发现转基因植株的尸胺含量发生变化。经过NaCl处理的冰叶日中花LDC活性提高, 且尸胺含量增加(Kuznetsov等2007)。在黄瓜中的研究发现黄瓜发芽期的耐冷性与LDC基因表达有关, 低温和盐胁迫可诱导LDC的表达, 并克隆得到了黄瓜LDC基因, 进行了遗传转化(逯明辉等2005; 苗永美等2013; 简兴等2015)。

鉴于LDC基因可能在栽培烟草的生物碱合成

及耐低温作用中发挥重要作用, 本研究采用RT-PCR方法克隆了栽培烟草LDC基因的全长序列, 并对该基因进行生物信息学分析, 应用荧光定量PCR技术分析了*NtLDC1*基因在烟草不同组织和低温诱导下的表达情况, 为进一步阐明*NtLDC1*基因在栽培烟草生物碱合成及耐低温中的作用奠定基础。

材料与方法

1 材料

试验所用材料为栽培烟草(*Nicotiana tabacum* L.) ‘K326’, 采用漂浮育苗法育苗, 温室培养至5~6片真叶时将幼苗移栽至含有基质的花盆中培养。分别取生根期幼苗的根、茎和开花期的叶片和花, 液氮迅速冷冻, 于-80°C保存备用。对于低温处理实验的幼苗, 待7~8片真叶时, 将烟苗转移至低温光照培养箱中, 设置光周期12 h/12 h, 温度4°C, 湿度60%, 分别在处理的0、2、4、8、12和24 h取叶片, 设置3次重复。

2 DNA、RNA的提取和cDNA第一链的合成

所有烟草组织在液氮中磨成粉末, DNA和总RNA的提取分别参照天根植物DNA提取试剂盒和总RNA提取试剂盒的说明书进行, 参照TaKaRa公司反转录试剂盒说明书进行反转录合成cDNA第一条链。

收稿 2016-01-13 修定 2016-03-30

资助 烟草行业重点实验室专项(110201403019和110201403018) 和中国烟草总公司科技重点项目(110201302004)。

* 通讯作者(E-mail: xiaolian_zhang@sina.cn)。

3 *NtLDC1*基因的克隆及测序

以黄瓜*LDC*基因全长CDS序列(登录号: KC-202438)为信息探针, 利用NCBI烟草EST数据库比对, 利用Primer Primer 5.0设计引物LDC-F1和LDC-R1 (表1), 分别以烟草‘K326’的cDNA和基因

组DNA为模板, 使用全式金公司的HiFi高保真酶进行烟草*LDC*基因的CDS和全长基因组序列的PCR扩增。利用胶回收试剂盒对PCR产物进行胶回收后, 连入pGEM-T载体, 转化大肠杆菌DH5 α , 挑取阳性克隆送去Invitrogen公司测序。

表1 引物序列及预期片段大小

Table 1 Sequences of primers and preproduction length

引物名称	引物序列(5'→3')	扩增片段长度/bp
LDC-F1	ATGGAGAGGGAGATGATCAGTGA	666
LDC-R1	TCACCGCGCCATTTCTTGT	
LDC-RT-F1	CGGTAGGATTGCTGAATGTGG	229
LDC-RT-R1	ATTTCTTGTGCTTGCGGATAG	
LDC-RT-F2	GGTGAAACAGTAGGAGAAGTGAAG	183
LDC-RT-R2	CACATTCAGCAATCCTACCG	
Ref-RT-F	CAAGGAAATCACCGCTTTGG	108
Ref-RT-R	AAGGGATGCGAGGATGGA	

4 *NtLDC1*蛋白的生物信息学分析

在NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上BLASTp进行蛋白预测, 利用Specialized BLAST (CDD search)进行保守域分析。选择其他物种中相似性较高的LDC序列19条用MEGA5.0构建系统进化树, 采用邻接法(Neighbor Joining Method)作图, 重复次数为1 000。在蛋白生物信息学网站(<http://www.expasy.org/proteomics>)对*NtLDC1*蛋白的理化性质、亲水性/疏水性、跨膜结构及二级结构进行预测和分析。

5 *NtLDC1*基因的表达分析

根据*NtLDC1*的cDNA序列设计荧光定量特异引物2对(表1), 同时选用烟草*Actin*基因(NTU60495)为内参基因, 并设计定量PCR引物Ref-RT-F和Ref-RT-R (表1)。采用SYBR Green法在ABI Stepone Plus实时荧光定量PCR仪上进行RT-qPCR实验, 设置3次生物学重复和3次实验重复, PCR反应体系和反应程序参照TaKaRa定量PCR试剂盒说明书。对溶解曲线、扩增效率和相关系数进行分析, 选取特异性好、扩增效率接近1的引物进行实验, 分析*NtLDC1*基因在烟草不同组织中及不同低温处理时间的表达情况。将茎中和低温处理0 h的叶片的相对表达量分别设置为1, 其余组织中相对表达量按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行计算。

实验结果

1 *NtLDC1*基因的克隆

以栽培烟草‘K326’的cDNA为模板进行PCR扩增, 获得与预期片段大小(666 bp)一致的条带(图1)。同时, 以‘K326’的基因组DNA为模板进行PCR扩增获得4 542 bp大小的片段(图1)。

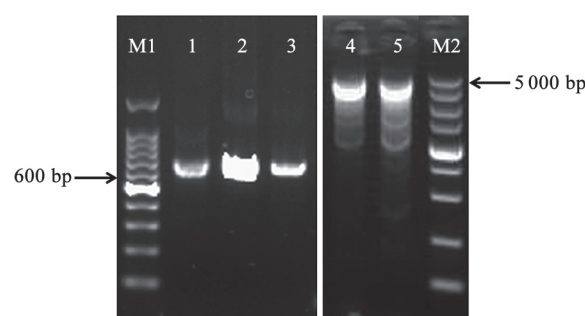
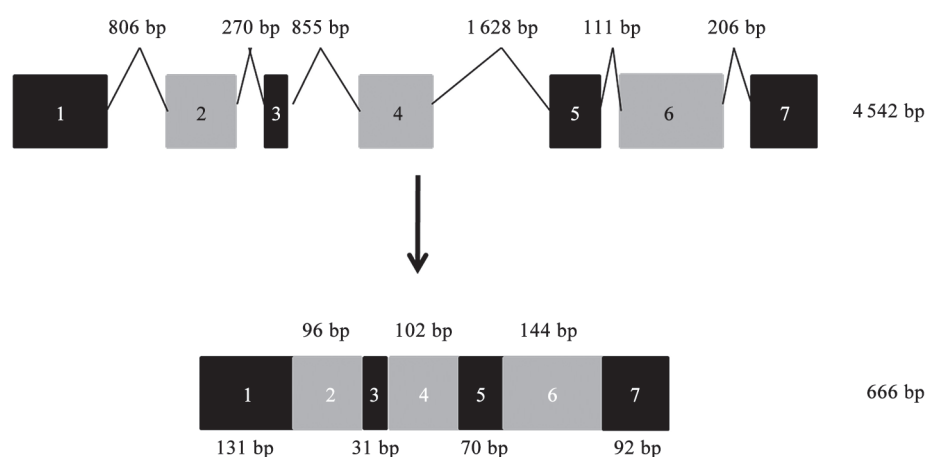


图1 烟草*NtLDC1*基因的PCR扩增结果

Fig.1 The PCR amplification results of *NtLDC1* gene from *N. tabacum*

M1: 100 bp Ladder Marker, M2: DL5000 Marker; 1~3泳道为cDNA模板的PCR产物, 4、5泳道为基因组DNA模板的PCR产物。

为分析*NtLDC1*基因的结构, 将其cDNA序列与克隆获得的基因组序列进行比较, 结果显示*NtLDC1*基因包含7个外显子和6个内含子(图2)。将该基因和蛋白的序列提交到NCBI数据库中,

图2 *NtLDC1*的基因结构示意图Fig.2 The gene structure schematic diagram of *NtLDC1*

上图为基因全长,方框表示外显子,折线表示内含子,下图为ORF全长。

GenBank登录号为KU507075。*NtLDC1*基因的CDS序列及其编码的氨基酸序列如图3所示。

2 生物信息学分析

用ProtParam工具预测*NtLDC1*编码蛋白的基本理化性质,发现该蛋白含有221个氨基酸,分子式为 $C_{1073}H_{1719}N_{291}O_{324}S_{12}$,相对分子质量为24 264.9 Da,等电点(pI)为5.43,其水溶液在280 nm处的消光系数约为21 555,该蛋白的不稳定系数为34.99,为稳定蛋白。脂肪系数是95.25,平均亲水系数为-0.082,具有亲水性。进一步在ExPasy网站上利用ProtScale软件对*NtLDC1*蛋白亲水性/疏水性进行分析,结果(图4)显示该蛋白多肽链的第30位分值最低,为-2.4,第59位分值最高,为1.8。总体上看其亲水性氨基酸多于疏水性氨基酸,可初步推测*NtLDC1*蛋白为亲水蛋白。

利用SOPMA软件对*NtLDC1*蛋白的二级结构进行预测,结果如图5所示,该蛋白的 α 螺旋占50.68%,延伸链占14.03%, β 转角占7.69%,无规则卷曲占27.06%。

利用在线分析软件SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对*NtLDC1*蛋白的信号肽进行预测,C-值和Y-值都很小(图6),说明该蛋白不存在信号肽,表明*NtLDC1*蛋白不属于膜蛋白或者分泌蛋白。利用SubLoc v1.0在线软件(<http://www.bioinfo.tsinghua.edu.cn/SubLoc/>)对*NtLDC1*蛋白进行亚细胞定位,结果显示该蛋白可能定位于细胞质中。

在ExPASy网站使用NetPhos2.0server对*NtLDC1*蛋白序列的磷酸化位点进行预测,结果表明靶标蛋白在第30、31、112、158、205位氨基酸残基有5个丝氨酸(serine)磷酸化位点,在第88、91、124和182位氨基酸残基有4个苏氨酸(threonine)磷酸化位点,在第32和152位氨基酸残基有2个酪氨酸(tyrosine)磷酸化位点(图7)。磷酸化位点的存在说明可能是植物受到胁迫时,某些蛋白激酶或因子激活该蛋白,从而在植物抵抗外界胁迫中发挥作用。

3 序列比对和系统进化分析

在NCBI数据库中使用Protein Blast程序对*NtLDC1*蛋白进行保守区域检索,发现该蛋白包含一个lysine decarbox结构域,属于DNA processg A亚家族,这一家族的成员具有一个高度保守的基序PGGXGTXXE(图8),该基序很可能具有重要功能。经过蛋白同源检索,发现来自不同植物物种的LDC蛋白有很高的相似性,与烟草LDC1蛋白序列覆盖度为80%~100%,序列一致性为78%~98%。其中,烟草LDC1蛋白与茄科植物番茄、马铃薯具有98%~100%的序列覆盖度和92%~95%的序列一致性,与锦葵科植物棉花序列一致性最高,为98%,但序列覆盖度较低,为90%,综上可以看出烟草LDC1与番茄和马铃薯LDC蛋白相似度最高。选择部分功能注释明确的、有文献报道的以及模式植物拟南芥和水稻的LDC蛋白序列,利用Clustal X进行序列比对,用MEGA5.0进行系统进化树的绘制(图9),

1	ATG GAG AGG GAG ATG ATC AGT GAT GTG ATG GTA GTA TCA AAA TTC	45
1	Met Glu Arg Glu Met Ile Ser Asp Val Met Val Val Ser Lys Phe	15
46	AAG AGG ATT TGT GTG TTT TGT GGG AGT AGT CAA GGG AAA AAG AGT	90
16	Lys Arg Ile Cys Val Phe Cys Gly Ser Ser Gln Gly Lys Lys Ser	30
91	AGT TAT CAA GAT GCT GCT ATT GAG CTT GGC AAT GAA TTG GTC TCA	135
31	Ser Tyr Gln Asp Ala Ala Ile Glu Leu Gly Asn Glu Leu Val Ser	45
136	AGA AAC ATT GAT TTG GTC TAT GGA GGA GGC AGC ATA GGC CTA ATG	180
46	Arg Asn Ile Asp Leu Val Tyr Gly Gly Gly Ser Ile Gly Leu Met	60
181	GGT TTG GTT TCA CAG GCA GTT CAT GAT GGT GGT AGG CAT GTT ATT	225
61	Gly Leu Val Ser Gln Ala Val His Asp Gly Gly Arg His Val Ile	75
226	GGA GTT ATT CCC AAG ACA CTC ATG CCT AGA GAG TTA ACT GGT GAA	270
76	Gly Val Ile Pro Lys Thr Leu Met Pro Arg Glu Leu Thr Gly Glu	90
271	ACA GTA GGA GAA GTG AAG GCA GTT GCA GAT ATG CAT CAA AGG AAA	315
91	Thr Val Gly Glu Val Lys Ala Val Ala Asp Met His Gln Arg Lys	105
316	GCA GAA ATG GCT AGG CAT TCT GAT GCT TTT ATT GCC TTA CCA GGT	360
106	Ala Glu Met Ala Arg His Ser Asp Ala Phe Ile Ala Leu Pro Gly	120
361	GGT TAT GGC ACA CTT GAG GAG CTA CTT GAA GTG ATT ACA TGG GCA	405
121	Gly Tyr Gly Thr Leu Glu Glu Leu Leu Glu Val Ile Thr Trp Ala	135
406	CAA CTT GGC ATC CAC GAT AAG CCG GTA GGA TTG CTG AAT GTG GAT	450
136	Gln Leu Gly Ile His Asp Lys Pro Val Gly Leu Leu Asn Val Asp	150
451	GGA TAT TAC AAT TCA TTA TTG TCA TTT ATT GAC AAA GCT GTG GAG	495
151	Gly Tyr Tyr Asn Ser Leu Leu Ser Phe Ile Asp Lys Ala Val Glu	165
496	GAA GGG TTC ATT AGT CCC AAT GCT CGC GAG ATC ATT GTA TCT GCA	540
166	Glu Gly Phe Ile Ser Pro Asn Ala Arg Glu Ile Ile Val Ser Ala	180
541	CCA ACA GCA AAG GAG CTG GTC AAG AAA CTG GAG GAA TAT GTT CCT	585
181	Pro Thr Ala Lys Glu Leu Val Lys Lys Leu Glu Glu Tyr Val Pro	195
586	TGC CAC GAA CGA GTT GCT TCC AAG TTG AGC TGG GAG ATG GAG CAG	630
196	Cys His Glu Arg Val Ala Ser Lys Leu Ser Trp Glu Met Glu Gln	210
631	CTT GGC TAT CCG CAA GCA CAA GAA ATG GCG CGG TGA	666
211	Leu Gly Tyr Pro Gln Ala Gln Glu Met Ala Arg End	222

图3 *NtLDC1*的CDS序列及其编码的氨基酸序列Fig.3 The CDS sequence of *NtLDC1* and its predicted amino acid sequence

结果可以看出,除了烟草中已经报道的另一个LDC家族蛋白AII20186.1外(Goossens等2003),烟草和马铃薯、番茄LDC序列处于同一分支上,这和烟草、马铃薯、番茄同属茄科植物的亲缘关系一致。

4 *NtLDC1*基因的表达特性分析

通过实时荧光定量PCR检测*NtLDC1*基因在各组织中的表达量,发现该基因在烟草‘K326’的各组

织中均有表达(图10),但在叶片中的表达量最高,茎中的表达量最低,整体表现为叶片>花>根>茎。

在4°C低温处理条件下,*NtLDC1*基因的表达量表现出显著变化,由图11可以看出,随着低温处理时间的延长,*NtLDC1*基因的表达量呈现先升高后降低的趋势,在8 h时达到顶峰,为未处理叶片中的9.2倍。

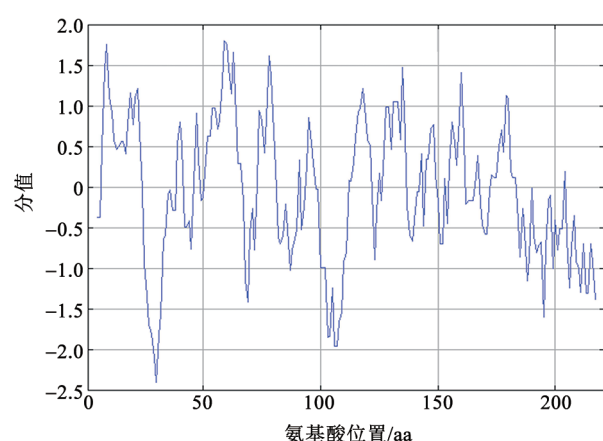


图4 *NtLDC1*蛋白的亲水性/疏水性预测
Fig.4 Analysis of hydrophilicity/hydrophobicity of *NtLDC1*

讨 论

赖氨酸脱羧酶可以催化赖氨酸脱羧反应形成尸胺(Kim等1998, 2015), 尸胺不仅可以作为氧化胁迫下 H_2O_2 的来源(Federico和Angelini 1986), 而且是大豆种子萌发过程中根正常发育的必要条件(Gross等1977; Gamarnik和Frydman 1991)。此外, 尸胺的含量还与植物的抗逆性有关, 对低温胁迫下生长的黄瓜幼苗施用外源尸胺, 其叶片可溶性物质含量增加, 抗氧化酶活性水平提高, 膜脂过氧化水平降低, 从而增加黄瓜幼苗的抗冷性(曹玉杰等2015)。苗永美等(2013)从低温处理的黄瓜幼苗分离到一个赖氨酸脱羧酶基因(*CsLDC*), 本研究以

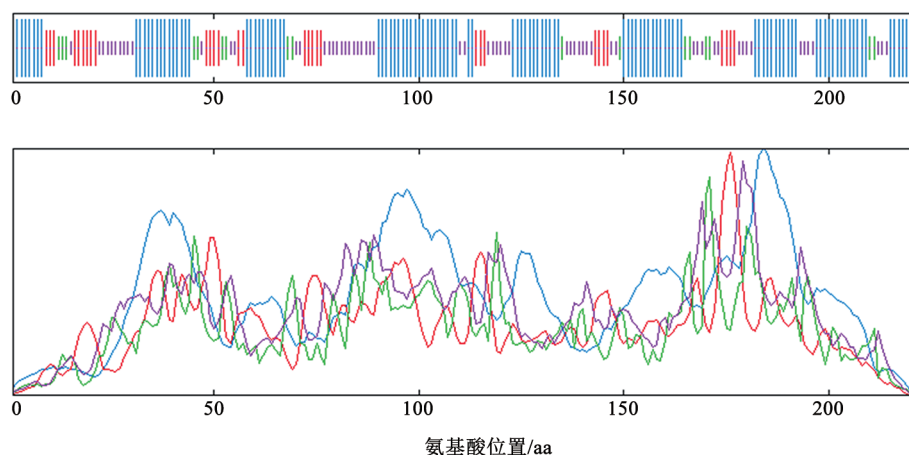


图5 *NtLDC1*蛋白二级结构预测
Fig.5 Prediction for secondary structure of *NtLDC1* protein
蓝色代表 α 螺旋, 红色代表延伸链, 绿色代表 β 转角, 紫色代表无规则卷曲。

黄瓜的*LDC*基因序列为参考, 通过同源克隆获得栽培烟草*LDC*基因, 该基因全长4 542 bp, CDS区666 bp, 包含7个外显子, 编码221个氨基酸。对其编码的蛋白进行生物信息学分析, 结果表明*NtLDC1*蛋白相对分子质量为24 264.9, 等电点(pI)为5.43, 初步推测其为稳定的亲水性蛋白。对*NtLDC1*蛋白的二级结构进行预测, 发现该蛋白的 α 螺旋占50.68%, 延伸链占14.03%, β 转角占7.69%, 无规则卷曲占27.06%。该蛋白不存在信号肽, 可能位于细胞质中。经过蛋白同源检索, 不同植物物种的*LDC*蛋白有很高的相似性, *NtLDC1*与茄科植物番茄、马铃薯相似性最高且亲缘关系最近。黄瓜中的实时荧光定量PCR证明低温会上调*CsLDC*基因

的表达, 说明该基因可能与黄瓜幼苗期的耐低温性存在一定关系(苗永美等2013)。而本研究中低温处理也可以诱导烟草植株*NtLDC1*基因的表达, 在处理8 h时基因相对表达量达到顶峰, 后又表现出下降趋势。然而, *NtLDC1*基因在烟草耐逆中的作用机制仍有待于进一步深入研究。

研究发现*LDC*除了与耐逆相关, 还参与了生物碱的合成过程(Goossens等2003), 生物碱是烟草中的重要物质, 其种类和含量是影响烟叶品质和安全的因素。早在1986年就有人研究过尸胺和赖氨酸脱羧酶活性在粉蓝烟草中的分布, 发现在根、茎、叶中均能检测到*LDC*活性和尸胺的分布, 但在根中*LDC*活性高于茎和叶片, 尸胺在根中

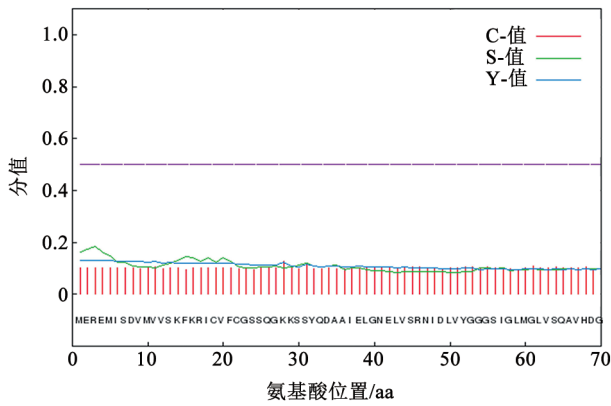


图6 NtLDC1蛋白的信号肽预测

Fig.6 Prediction for the signal peptide of NtLDC1 protein

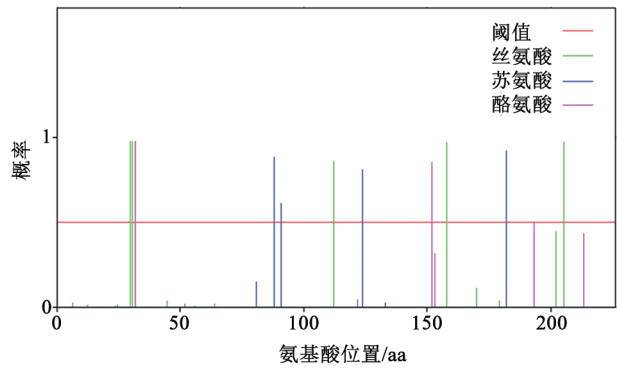


图7 NtLDC1蛋白磷酸化位点预测

Fig.7 Prediction of phosphorylation sites in NtLDC1 protein sequence

烟草LDC1MEREMISDVVVSKKFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAIBLGNELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	68
番茄XP_004246656MEMESDVVVS.KKFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAIBLGRKELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	65
马铃薯XP_006354329MEMGSEVVS.KKFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAIBLGRKELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	65
拟南芥NP_18258MEIKGESMQKSKFRFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAVDLGNELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	66
水稻EAY86771.1	MEIKDEETTAEVAMVVQSRFRFCVFCGSSHGKSKTYCDAAIBLGRKELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	73
黄瓜XP_004137827	...MEGLIMNHMKPLSKFRFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAIBLGRKELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	69
可可XP_07027342MEMESETQ.CSRFRFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAIBLGRKELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	65
油菜XP_013651897.1MEVNTETMQSKFRFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAVDLGNELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	66
蒺藜苜蓿XP_003590484.1METNGEIRVSKFRFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAIBLGNELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	65
蛇足石杉AFG28179.1MEAFIDPLEVKSSEKFRICVFCGSSQGGKSSYCDAAIBLGRKELVSRNIDLIVYGGGSIGLMGLVSCAVH	68
烟草LDC1	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVKAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	141
番茄XP_004246656	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVKAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	138
马铃薯XP_006354329	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVKAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	138
拟南芥NP_18258	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVRAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	139
水稻EAY86771.1	NGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVKAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	146
黄瓜XP_004137827	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVKAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	142
可可XP_07027342	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVKAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	138
油菜XP_013651897.1	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVRAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	139
蒺藜苜蓿XP_003590484.1	EGGRHVICVLPKTLMPRELTIGETVGEVKAVAMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	138
蛇足石杉AFG28179.1	EGGCHVTCVLPKALMPSSEISGSPVGEVLAVALMHQRKAEMARHSDAFTAI PGGYGTIEELLEVIHWAQLGIHD	141
	PGGXGTXE 基序	
烟草LDC1	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARQLIVSAFTAREIVKRLLEYYVFOHERVASKISWEMEQ.LGY	213
番茄XP_004246656	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARQLIVSAFTAREIVKRLLEYYVFOHERVASKINWTEEQ.LGY	210
马铃薯XP_006354329	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARQLIVSAFTAREIVKRLLEYYVFOHERVASKINWTEEQ.LGY	210
拟南芥NP_18258	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARQLIVSAFTAREIVKRLLEYYVFOHERVATKLOWEMDR.IGY	211
水稻EAY86771.1	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARHILVIAFTPRELIERKLEYYVFOHERVSKMRWEMEQ.MSY	218
黄瓜XP_004137827	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFVSESARQLIVSAFTAREIMKRLLEYYVFOHERVASKISWEMEQ.LGY	214
可可XP_07027342	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARQLIVSAFTAREIVKRLLEYYVFOHERVASKISWEMEQ.LGY	210
油菜XP_013651897.1	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARQLIVSAFTAREIVKRLLEYYVFOHERVASKLOWEIER.IGY	211
蒺藜苜蓿XP_003590484.1	KFVGLINVDGYNSLLSFLDKAVEEGFISFNARHILVSAFTSKRELIVKRLLEYYVFOHEGVASKISWCMCEQLAY	211
蛇足石杉AFG28179.1	KFVGLINVDGYNSLLKLEKDKTEEGFTKGGFRQLIVSAFTAREILPRELLEYYVEMEDGVAPRETWEIER.LV.	212
烟草LDC1	FQACEMAR.....	221
番茄XP_004246656	FCVCEIAR.....	218
马铃薯XP_006354329	FCVCEIAR.....	218
拟南芥NP_18258	SSEE.....	215
水稻EAY86771.1	FQNYDIPRPKEGKMIIEAQRGSRVWISDPKRMSEFVDFCQSEETVNSEISARENASLGLHNHDKCQGTSS	288
黄瓜XP_004137827	L.....	215
可可XP_07027342	SKTYDISR.....	218
油菜XP_013651897.1	SSEE.....	215
蒺藜苜蓿XP_003590484.1	PEEYNIISR.....	219
蛇足石杉AFG28179.1	212

图8 不同植物LDC蛋白序列同源性比较

Fig.8 Alignment of LDC proteins from different plants

合成后迅速运输到叶片中(Bagni等1986)。而本研究发现*NtLDC1*基因在烟草‘K326’的各组织中均有表达,整体表现为叶片>花>根>茎。也有研究将

细菌*LDC*基因导入到烟草根系培养物中, *LDC*活性升高,尸胺合成增多,导致新烟碱含量的大幅提高和羟基肉桂尸胺的形成(Berlin等1998)。在返青

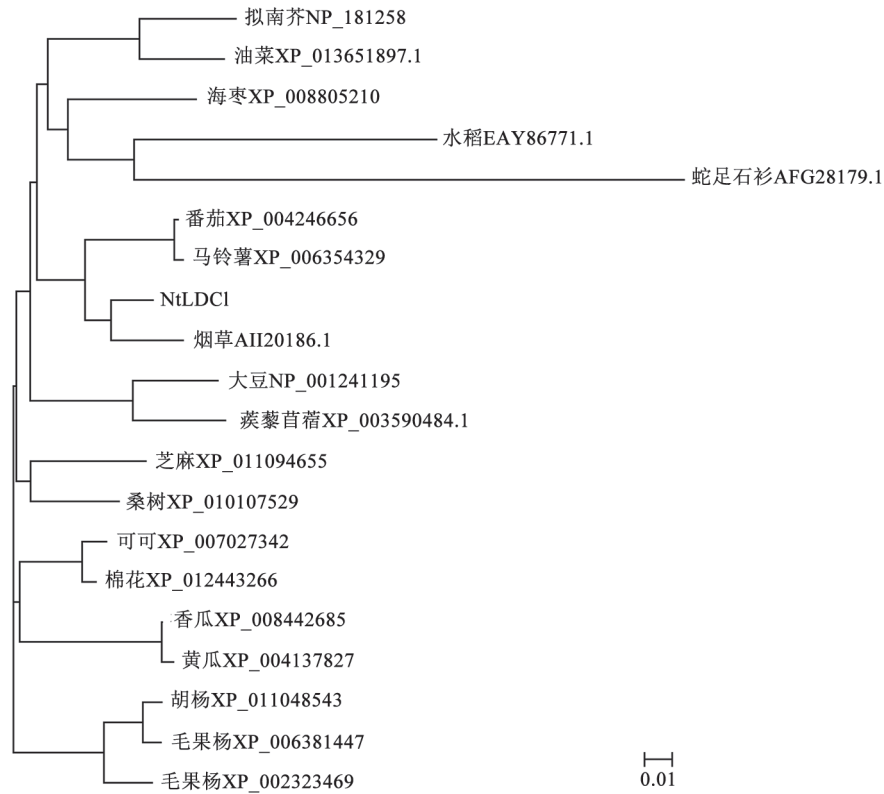


图9 不同植物物种中LDC构建进化树

Fig.9 The phylogenetic tree of LDC from different plant species

标尺为遗传距离, 单位eM。

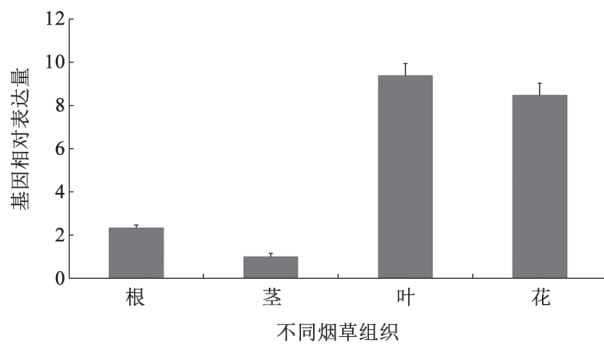


图10 *NtLDC1*在烟草不同组织中的相对表达量

Fig.10 The relative expression level of *NtLDC1* in different tissues of tobacco

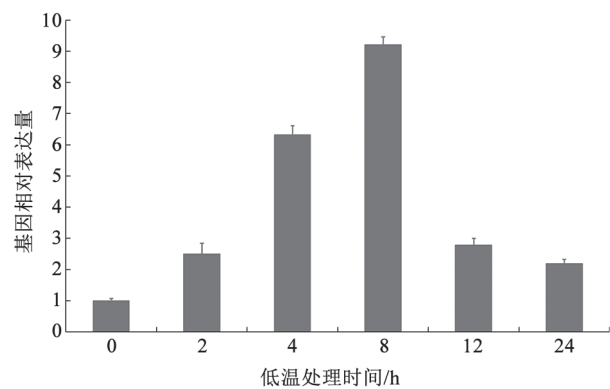


图11 低温处理对*NtLDC1*基因表达水平的影响

Fig.11 The effect of low temperature treatment on *NtLDC1* gene expression level

期的羽扇豆(*Lupinus polyphyllus*)叶片中LDC活性与叶绿素含量正相关, 在白羽扇豆(*L. albus*)和黄羽扇豆(*L. luteus*)叶片中生物碱的含量与LDC活性呈现正相关(Schoofs等1983)。有关烟草中*NtLDC1*基因在生物碱合成中的作用还有待于进一步研究。

参考文献

- Bagni N, Creus J, Pistocchi R (1986). Distribution of cadaverine and lysine decarboxylase activity in *Nicotiana glauca* plants. *J Plant Physiol*, 125 (1/2): 9-15
- Berlin J, Mollenschott C, Herminghaus S, Fecker LF (1998). Lysine decarboxylase transgenic tobacco root cultures biosynthesize

- novel hydroxycinnamoylcadaverines. *Phytochemistry*, 48 (1): 79–84
- Bunsupa S, Katayama K, Ikeura E, Oikawa A, Toyooka K, Saito K, Yamazaki M (2012). Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae. *Plant Cell*, 24 (3): 1202–1216
- Cao YJ, Bo KL, Cheng CY, Qian CT, Chen JF (2015). Physiological mechanism of exogenous cadaverine enhancing the chilling tolerance of cucumber seedlings. *Jiangsu J Agric Sci*, 31 (1): 122–129 (in Chinese with English abstract) [曹玉杰, 薄凯亮, 程春燕, 钱春桃, 陈劲枫(2015). 外源尸胺增强黄瓜幼苗耐冷性的生理机制. *江苏农业学报*, 31 (1): 122–129]
- Du C, Li J, Tang YT, Peng QZ (2014). Cloning, prokaryotic expression and characterization of lysine decarboxylase gene from *Hesperia serrata*. *Chin J Biotechnol*, 30 (8): 1299–1307 (in Chinese with English abstract) [杜次, 李菁, 唐云涛, 彭清忠(2014). 蛇足石杉赖氨酸脱羧酶基因的克隆、原核表达及其功能分析. *生物工程学报*, 30 (8): 1299–1307]
- Federico R, Angelini R (1986). Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyls. *Planta*, 167 (2): 300–302
- Gamarnik A, Frydman RB (1991). Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiol*, 97 (2): 778–785
- Goossens A, Häkkinen ST, Laakso I, Seppänen-Laakso T, Biondi S, De Sutter V, Lammertyn F, Nuutila AM, Söderlund H, Zabeau M, et al (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100 (14): 8595–8600
- Gross GG, Janse C, Elstner EF (1977). Involvement of malate, monophenols, and the superoxide radical in hydrogen peroxide formation by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia* Gilib.). *Planta*, 136 (3): 271–276
- Hartmann T, Schoofs G, Wink M (1980). A chloroplast-localized lysine decarboxylase of *Lupinus polyphyllus*: the first enzyme in the biosynthetic pathway of quinolizidine alkaloids. *FEBS Lett*, 115 (1): 35–38
- Jian X, Miao TM, Sui YH, Bian ZW, Chen CK, Huang CJ, Li ZX (2015). Cloning and expression vector construction of cucumber *LDC* and transformation to tobacco. *Guihaia*, 35 (2): 255–260 (in Chinese with English abstract) [简兴, 苗永美, 隋益虎, 边卓吾, 陈存款, 黄春景, 李振兴 (2015). 黄瓜 *LDC* 克隆、表达载体的构建及烟草转化研究. *广西植物*, 35 (2): 255–260]
- Kim HJ, Kim YH, Shin JH, Bhatia SK, Sathiyarayanan G, Seo HM, Choi KY, Yang YH, Park K (2015). Optimization of direct lysine decarboxylase biotransformation for cadaverine production with whole-cell biocatalysts at high lysine concentration. *J Microbiol Biotechnol*, 25 (7): 1108–1113
- Kim HS, Kim BH, Cho YD (1998). Purification and characterization of monomeric lysine decarboxylase from soybean (*Glycine max*) axes. *Arch Biochem Biophys*, 354 (1): 40–46
- Kuznetsov V, Shorina M, Aronova E, Stetsenko L, Rakitin V, Shevyakova N (2007). NaCl- and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. *Plant Sci*, 172: 363–370
- Lu MH, Li XM, Chen JF, Chen LZ, Qian CT (2005). Study on chilling tolerance of cucumber during germination and expression of lysine decarboxylase gene. *Sci Agric Sin*, 38 (12): 2492–2495 (in Chinese with English abstract) [逯明辉, 李晓明, 陈劲枫, 陈龙正, 钱春桃(2005). 黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达. *中国农业科学*, 38 (12): 2492–2495]
- Miao YM, Ning Y, Shen J, Jia L, Li J, Lou QF, Wen YQ, Chen JF (2013). Cloning of *LDC* gene and its expression analysis under several adversity stresses from *Cucumis sativus* L. *J Nanjing Agric Univ*, 36 (3): 8–14 (in Chinese with English abstract) [苗永美, 宁宇, 沈佳, 贾利, 李季, 娄群峰, 翁益群, 陈劲枫(2013). 黄瓜 *LDC* 基因克隆及逆境胁迫下的表达分析. *南京农业大学学报*, 36 (3): 8–14]
- Schoofs G, Teichmann S, Hartmann T, Wink M (1983). Lysine decarboxylase in plants and its integration in quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 22 (1): 65–69
- Yang J, Chen J, Guo HY, Chen JJ, He GS, Deng SY, Wang W (2013). Review on research of tobacco premature flowering mechanism. *Biotechnol Bull*, (1): 8–15 (in Chinese with English abstract) [杨静, 陈杰, 郭鸿雁, 陈建军, 贺广生, 邓世媛, 王维(2013). 烟草早花机理研究进展. *生物技术通报*, (1): 8–15]
- Yang Y, Tian L, Liu P, Liu JR (2015). Relationship between gene expression of lysine decarboxylase and accumulation of matrine and oxymatrine in *Sophora alopecuroides*. *Chin Pharm J*, 50 (10): 846–849 (in Chinese with English abstract) [杨毅, 田蕾, 刘萍, 刘姣蓉(2015). 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因表达与苦参碱和氧化苦参碱含量的关系. *中国药学杂志*, 50 (10): 846–849]

Cloning and expression analysis of lysine decarboxylase gene *NtLDC1* from *Nicotiana tabacum*

ZHANG Ji-Shun¹, ZHANG Xiao-Lian^{1*}, LIN Shi-Feng¹, FU Qiang¹, YU Jing¹, ZOU Jie¹, LI Yong²

¹Molecular Genetics Key Laboratory of China Tobacco, Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550081, China; ²College of Life Science, Zunyi Normal College, Zunyi, Guizhou 563002, China

Abstract: Lysine decarboxylase (LDC) is the key enzyme in the first step of alkaloid synthesis. In order to study the characteristics and function of LDC in tobacco, we cloned a LDC gene from *Nicotiana tabacum* 'K326' by RT-PCR technology, naming *NtLDC1*, GenBank accession number is KU507075. *NtLDC1* gene has a 666-bp open reading frame (ORF), encoding 221 amino acids. The putative protein molecular weight was 24 264.9 Da and its theoretical isoelectric point was 5.43. Sequence alignment displayed that LDC protein from different plants were conserved and that *NtLDC* protein showed high similarity to tomato and potato LDC proteins. Evolution analysis result suggested that *NtLDC1* has the nearest genetic relationship with tomato LDC. Real-time PCR result showed that the relative expression level of *NtLDC1* gene in leaf is the highest. Low temperature can induce *NtLDC1* gene expression, the expression level peak at 8 h after low temperature treatment, suggesting *NtLDC1* gene may play a role in the tobacco response to low temperature.

Key words: tobacco; lysine decarboxylase; gene clone; expression analysis

Received 2016-01-13 Accepted 2016-03-30

This work was supported by Special Projects of Tobacco Key Laboratory (Grant Nos. 110201403019 and 110201403018) and Key Technology Program of China National Tobacco Corporation (Grant No. 110201302004).

*Corresponding author (E-mail: xiaolian_zhang@sina.cn).