

蚬壳花椒 ZdICL 基因的克隆表达以及种子萌发过程中表达量变化

周 韬¹, 荣 健¹, 孙吉康^{1*}, 王 平^{2*}, 李 强³

1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南 长沙 410004

2. 中南林业科技大学环境科学与工程学院, 湖南 长沙 410004

3. 汝南县林业技术推广站, 河南 洛阳 471200

摘 要:目的 克隆表达蚬壳花椒种子萌发过程中油脂代谢关键调控基因, 研究该基因在蚬壳花椒种子外源激素赤霉素(GA)促萌下调控蚬壳花椒种子人工萌发分子机制。方法 根据蚬壳花椒转录组测序结果, 筛选克隆油脂代谢关键基因, 并利用原核表达体系表达纯化目的蛋白, 对其编码产物进行生物信息学分析和预测。种子萌发实验分为清水对照组与 GA 促萌发实验组, 设定 0、6、12、24、48 h 为萌发取样点, 相对荧光定量分析该基因表达量变化。结果 通过克隆该基因片段及序列分析, 确定该基因编码异柠檬酸裂解酶(ICL), 将其命名为 ZdICL。该基因开放阅读框全长为 1 728 bp, 编码产物包含 575 个氨基酸。构建原核表达载体 pET-28a-ZdICL, 并在大肠杆菌 BL21(DE3)中获得高效表达, 对该基因编码产物的氨基酸序列进行聚类分析表明, 其与甜橙同源性最高, 而与模式生物拟南芥同源性最低。在种子萌发过程中其表达量在 GA 促萌发过程中第 48 小时前逐步降低, 到第 48 小时表达量升高, 与外源激素 GA 对种子萌发过程中脂肪动员代谢调控相吻合。结论 通过对 ZdICL 基因进行克隆表达以及表达量分析, 初步认为蚬壳花椒种子自然繁育率低下的原因之一可能是自身内源激素 GA 含量不足, 导致 ICL 活性不足, 无法有效保护种子抵御氧化损伤, 致死种现象较多, 同时为探索该基因在蚬壳花椒种子萌发过程中的调控功能奠定基础。

关键词: 蚬壳花椒; ZdICL; 克隆; 原核表达; 大肠杆菌

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4628-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.025

Zanthoxylum dissitum ZdICL gene cloning expression and its expression changes during seed germination

ZHOU Tao¹, RONG Jian¹, SUN Ji-kang¹, WANG Ping², LI Qiang³

1. College of Life Science and Technology, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

2. College of Environmental Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China

3. Runan County Forestry Technology Promotion Station, Luoyang 471200, China

Abstract: Objective To clone and express the key genes regulating oil metabolism during seed germination of *Zanthoxylum dissitum*, and investigate the molecular mechanism of the gene regulating artificial seed germination of *Z. dissitum* under the stimulation of exogenous hormone gibberellin (GA) of its seeds. **Methods** According to the transcriptome sequencing results of *Z. dissitum*, the key genes related to lipid metabolism were screened and cloned, the target protein was expressed and purified by prokaryotic expression system, and the encoded products were analyzed and predicted by bioinformatics analysis. Meanwhile, seed germination experiment was designed with the classification of two groups, including clear water control group and GA germination promoting experiment group. Germination sampling points were set at 0, 6, 12, 24, and 48 h. Furthermore, the relative fluorescence quantitative analysis was carried out to evaluate the changes in the expression of target genes. **Results** By gene cloning and sequences analysis, this gene was identified as isocitrate lyase (ICL) gene, which named as ZdICL. The total length of such open reading frame of the gene was 1 728 bp, and the coding product included 575 amino acids. Moreover, clustering analysis of the amino acid sequences of ZdICL gene coding product indicated that it had the highest homology with *Citrus sinensis*, but it has the

收稿日期: 2018-03-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31370612); 湖南省高校科技成果产业化繁育项目(15CY011)

作者简介: 周 韬(1991—), 男, 硕士, 生物化学与分子生物学专业。Tel: 18674812717 E-mail: 1505726228@qq.com

*通信作者 孙吉康, 男, 博士在读, 讲师。E-mail: 1825856598@qq.com

王 平, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: wangping@csuft.edu.cn

lowest homology with model organism *Arabidopsis thaliana*. Then the prokaryotic expression vector pET-28a-ZdICL was constructed with high-efficiency expression in *Escherichia coli* BL21 (DE3). In the seed germination process, the expression quantity gradually declined gradually in the GA aided germination process before 48 h, and increased at 48 h. In the seed germination process under the effect of exogenous hormones GA, it was identical to the lipid mobilization metabolism regulation. **Conclusion** In our study, clone expression of ZdICL gene and analysis of expression quantity suggested that one of the reasons for the low natural breeding rate of ZdICL capitatum seeds was the lack of endogenous hormone GA content, leading to inadequate activity of isocitrate, which can not effectively protect the seeds to against oxidative damage and cause more death. Such gene lays foundation for exploring the regulatory function of the gene in the seed germination process of *Z. dissitum*.

Key words: *Zanthoxylum dissitum* Hemsl; ZdICL gene; cloning; prokaryotic expression; bioinformatics; *Escherichia coli*

蜆壳花椒 *Zanthoxylum dissitum* Hemsl 为芸香科花椒属植物, 又称单面针、钻山虎, 在我国属于重要的珍贵药用植物资源。其根、茎、叶因富含白藜碱、茵芋碱、熊果酸及黄酮苷类等多种药用成分, 临床上具有活血散瘀、祛风活络、解毒消肿的功效, 主要用于治疗腰痛、骨骼疼痛、产后月经不调等症^[1]。蜆壳花椒果实呈棕红色, 干燥后为灰白色, 种子为球状或扁椭圆状, 果皮呈黑色且有光泽, 有坚硬外壳, 种壳外附着一层黑色粉末状油质。近年来, 随着人们对蜆壳花椒药材制品的需求量和药材应用领域越来越大, 致使相关药企对其需求量急剧增加, 而自然条件下蜆壳花椒繁殖率低、生长周期长, 使蜆壳花椒野生资源日趋匮乏, 逐渐影响到相关药厂的正常生产^[2]。种子的萌发过程都伴随着种子储能物质的转化, 其中储能物质代谢通路中, 油脂代谢是至关重要的, 而异柠檬酸裂解酶 (ICL) 是这一通路中重要的代谢调控原件之一^[3]。ICL 是乙醛酸循环下游的关键限速酶之一^[4], 它通过催化异柠檬酸生成乙醛酸和琥珀酸, 从而改变碳源的方向, 跳过三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA) 中的 CO₂ 合成步骤, 进入到乙醛酸循环中生成琥珀酸与草酰乙酸^[5]。其中琥珀酸被作为中间产物来补充 TCA 循环, 草酰乙酸可以利用糖异生途径形成葡萄糖并进一步生成核酸和蛋白质^[6]。

在高等植物中大多数种子的贮藏物质是油料, 油料种子萌发时, 脂肪被水解成甘油和脂肪酸, 脂肪酸在 β 氧化作用下产生乙酰辅酶 A, 通过乙醛酸循环转化为葡萄糖, 为幼芽生长以及新生组织细胞物质的构建提供必需的能量^[7]。因此, 脂肪物质含量高的种子在萌发阶段中, 脂肪急速减少, 而蔗糖及脂肪酸含量则显著增加, 同时葡萄糖也有增加^[8]。一般情况下, 种子在萌发初期时脂肪降解较少, 当胚根突破种壳后含量大幅度下降^[9]。韩克杰等^[10]对欧洲榛子研究时发现在种子萌发早期胚乳中脂肪几乎转化很少或未动员, 当胚根突破种壳后脂肪被大量水

解变为碳水化合物, 用于幼苗的形态建成, 这与蓖麻 *Ricinus communis* L. 种子^[11]和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 种子^[12]萌发过程的研究结果一致。在种子萌发时, 乙醛酸体的数量和乙醛酸循环的关键酶 ICL 活性上升, 随着贮存脂肪的消耗而转入下降, 标示着种子即将萌发。因此本实验从蜆壳花椒油脂代谢通路中挑选 ICL 基因为研究对象, 探索在蜆壳花椒在种子萌发过程中的重要性, 为从分子层面揭示木本植物蜆壳花椒的萌发机制奠定基础。

1 材料

样品采集自湖南省张家界地区, 经中南林业科技大学王平教授鉴定为蜆壳花椒 *Zanthoxylum dissitum* Hemsl 种子。采集时间为 11~12 月, 晾干后置于 4 °C 保存。限制性内切酶 BamH I 和 Xho I, T4-DNA 连接酶, 质粒 pMD-18T Vector 购自于大连宝生物公司。DNA marker 和质粒提取试剂盒购自于天根生化科技有限公司。凝胶回收试剂盒购自于生工生物工程股份有限公司。大肠杆菌 DH5 α 和 BL21 (DE3) 感受态均为实验室制作。PET-28a 表达载体为本实验室保存。

2 方法

2.1 蜆壳花椒种子中 RNA 提取及反转录合成 cDNA 第 1 链

将蜆壳花椒种子在液氮中迅速研磨, 采用改良的 CTAB 法提取总 RNA。以提取的总 RNA 为模板, 采用 PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 合成试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行反转录合成 cDNA, 产物保存于 -20 °C 备用。

2.2 蜆壳花椒 ICL (ZdICL) 基因的克隆

根据高通量转录组测序结果得到的目标基因的编码序列 (open reading frame, ORF, 蜆壳花椒 cDNA 数据已公布于中南林业科技大学校网 <http://bioinformation.csuft.edu.cn/>), 使用 Primer 5.0 设计特异引物 F 5'-CGCGGATCCATGGCTGCAT-CTTACTCGGTGCCTT-3' (下划线为 Bam HI 酶切

位点部分), R 5'-CCGCTCGAGTCACATTCTT-GCCTTAGCAACCACC-3' (下划线为 Xho I 酶切位点部分), 分别在引物两端加入 Bam HI 和 Xho I 酶切位点。以 cDNA 为模板进行全长扩增, 反应产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后用上海生工 SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒切胶回收目的条带, 与 pMD18-T 载体连接。将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态中, 选择阳性单菌落 PCR 鉴定后送往铂尚生物技术有限公司测序, 测序无误后将载体命名为 pMD-18-ZdICL。

2.3 构建原核表达及 ZdICL 融合蛋白纯化

用 Bam HI 和 Xho I 分别对 pMD-18-ZdICL 和 pET-28a (+) 载体进行双酶切后用 T4DNA 连接酶连接。将连接产物转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态中, 鉴定出阳性单菌落并测序。确定序列及载体组装正确后将重组载体命名为 pET-28a-ZdICL。从超低温冰箱将含 pET-28a-ZdICL 质粒的菌种接种于 4 mL 含 50 mg/mL 卡那霉素的新鲜 LB 培养基, 37 °C、200 r/min 摇床震荡培养过夜。次日转移至 50 mL 含 50 mg/mL 卡那霉素的新鲜 LB 培养基中进行扩大培养, 培养至 A_{600} 约为 0.8 时吸取 1 mL 菌液, 记为 0 h 的非诱导样品, 然后在剩余菌液中加入终浓度为 1 mmol/L 的异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 取最佳诱导条件为 20 °C, 19 h 诱导表达, 吸取 1 mL 菌液制样, 用 10% SDS-PAGE 电泳对目的蛋白的诱导表达情况进行分析。

将诱导表达成功的重组菌液按 1:1 000 转接到 5 mL LB 液体培养基中 37 °C 震荡培养过夜。活化的菌液按 1:1 000 转接 50 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养基中 37 °C 培养至 A_{600} 为 0.8 左右, 加入 IPTG 使其终浓度为 1 mmol/L, 20 °C 培养 19 h 可提高融合蛋白表达^[13]。随后蛋白纯化按照 Ni-IDA 亲和色谱法进行。

2.4 生物信息学分析

通过 ExPASy-ProtParam、Netphos 3.1、TMpred 等在线软件对该基因编码蛋白的氨基酸的组成、相对分子质量、亲水性/疏水性等理化性质进行初步分析。聚类分析使用 NCBI 数据库中 BLAST 将目标基因编码的氨基酸序列在 GenBank 中进行同源性搜索, 获得与其同源性较高的物种的氨基酸序列。利用 DNAMAN 9 软件通过 Observed Divergency 法构建系统进化树。利用 SOPMA 在线软件对蚬壳花椒 ZdICL 蛋白的二级结构进行预测。

2.5 ZdICL 基因在种子萌发过程中表达量变化分析

设计 ZdICL 荧光定量引物 F 5'-CCAAAGAC-

TATGCCAGAAGAGG-3'; R 5'-AGTTAGCGCCGG-ACCATT-3', 同时参考课题组前期蚬壳花椒种子人工萌发过程中显著形态学变化对应萌发点^[14], 选取人工破壳后赤霉素 (GA) 浸泡 6 h 后培养 0、6、12、24、48、96 h, 以破壳后清水浸泡 6 h 为对照组相应取样, 使用 TaKaRa PrimeScriptTMRT Master Mix, 按照说明书合成每一取样期用于相对荧光定量实验的 cDNA 模板, 选用肌动蛋白基因 Act 为内参基因^[15], 以 TaKaRa PrimeScriptTMRT Master Mix 所提供的 2 步法按照实验说明操作进行模板和引物稀释, 反应在 ABI7500 实时荧光定量仪上进行, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法^[16] 分析结果。

3 结果与分析

3.1 蚬壳花椒种子总 RNA 提取及 ZdICL 基因克隆

对蚬壳花椒种子进行总 RNA 提取。电泳检测结果表明, 样品 RNA 的 28 S 和 18 S 条带清晰整齐, 条带亮度接近 2:1 (图 1)。样品 RNA 的 A_{260}/A_{280} 值均在 1.9~2.0, 纯度较高。证明提取的 RNA 完整性好, 无降解, 适用于后期的分子生物学实验。

通过 PCR 从蚬壳花椒种子的 cDNA 中扩增得到一条长度为 1 728 bp 的 DNA 片段 (图 1)。经测序及 BLAST 比对, 确定成功克隆得到 ICL 基因, 命名为 ZdICL。

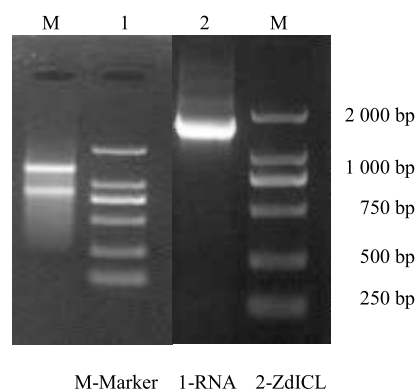


图 1 蚬壳花椒种子总 RNA 电泳图及 ZdICL 基因 PCR
Fig. 1 Electrophoresis of total RNA from *Z. dissitum* and PCR product of ZdICL amplification

3.2 原核表达载体的构建

用带有酶切位点的引物进行 PCR 扩增, 得到 ZdICL 基因的 cDNA 编码区序列。电泳检测结果表明片段与预期大小相一致, 无非特异扩增带。将目的片段回收纯化后, 使用 BamH I 和 Xho I 双酶切, 连接到相同酶切回收后的原核表达载体 pET-28a 上, 获得 pET-28a-ZdICL 原核表达载体, 转化到大

肠杆菌 DH5 α 。对重组质粒进行 PCR 及双酶切鉴定，都能获得一条长约 1 700 bp 的条带，与预期大小一致（图 2）。将目的条带测序，序列比对结果与高通量测序结果一致，表明 pET-28a-ZdICL 原核表达载体构建成功。将正确的阳性克隆质粒转化到大肠杆菌 BL21 中，进行蛋白诱导。

3.3 原核表达产物的检测与纯化

重组质粒 pET-28a-ZdICL 转化到表达菌株 BL21 感受态细胞中，用 IPTG 诱导重组蛋白表达，菌体经超声破碎，离心后收集上清和沉淀，SDS-PAGE 凝胶电泳分析（图 3），发现上清和沉淀

中都有 ZdICL 表达，说明其以可溶性形式表达，但是在上清中表达量较低。为了获得足够可溶性表达的目的蛋白，取最佳诱导条件为 20 $^{\circ}\text{C}$ ，19 h 诱导成功的菌液，超声波破碎细胞菌液，离心，取上清用于 Ni-IDA 亲和色谱介质纯化，将收集的蛋白溶液转移到透析袋中，置入提前预冷的透析液中，透析 3 次，取透析浓缩后的蛋白，SDS-PAGE 电泳检测（图 4），发现获得较纯的 ZdICL 蛋白。利用 Bradford 法，测得纯化透析后的 ZdICL 蛋白质量浓度为 610 $\mu\text{g/mL}$ ，ZdICL 融合蛋白酶活性室温下为 23.5 mg/mL 。

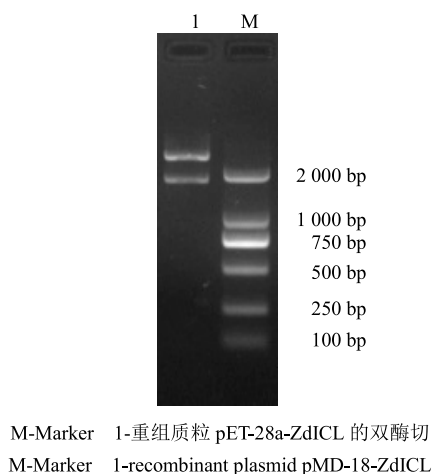
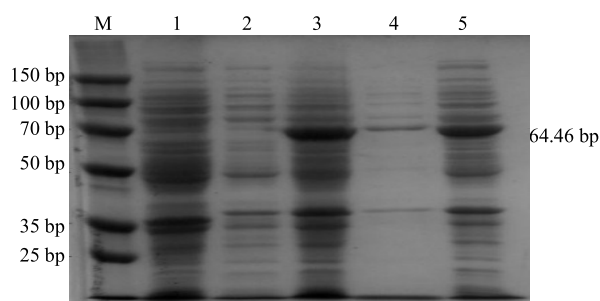


图 2 重组质粒 pET-28a-ZdICL 酶切分析

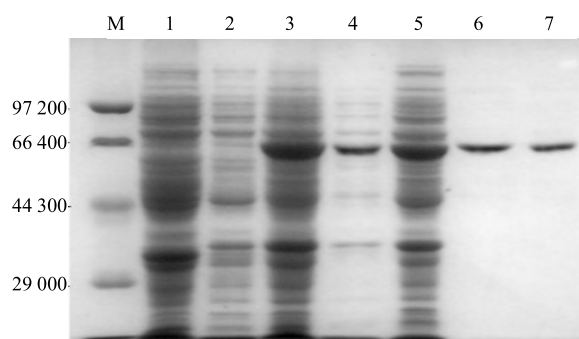
Fig. 2 Enzymatic digestion of recombinant plasmid pET-28a-ZdICL



M-Marker 1-BL21 菌体 2-IPTG 诱导的含 pET-28a 的 BL21 菌体
3-IPTG 诱导的含 pET-28a-ZdICL 的 BL21 菌体 4-含 pET-28a-ZdICL 的 BL21 诱导后上清 5-含 pET-28a-ZdICL 的 BL21 诱导后沉淀
M-Marker 1-BL21 (DE3) 2-pET-28a-BL21 with IPTG induction
3-pET-28a-ZdICL-transformed BL21 without IPTG induction
4-supernatant of BL21 with pET-28a-BL21 after induction 5-pellet of BL21 with pET-28a-BL21 after induction

图 3 融合载体 pET-28a-ZdICL 的表达蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 3 SDS-PAGE of expression of pET-28a-ZdICL



M-Marker 1-BL21 菌体 2-IPTG 诱导的含 pET-28a 的 BL21 菌体 3-IPTG 诱导的含 pET-28a-ZdICL 的 BL21 菌体 4-含 pET-28a-ZdICL 的 BL21 诱导后上清 5-含 pET-28a-ZdICL 的 BL21 诱导后沉淀 6、7-纯化的 His-ZdICL 蛋白

M-Marker 1-BL21 (DE3) 2-pET-28a-BL21 with IPTG induction
3-pET-28a-ZdICL-transformed BL21 without IPTG induction
4-supernatant of BL21 with pET-28a-BL21 after induction 5-pellet of BL21 with pET-28a-BL21 after induction 6,7-Purified His-ZdICL protein

图 4 His-ZdICL 融合蛋白纯化

Fig. 4 Purification of His-Nanog fusion protein

3.4 生物信息学分析

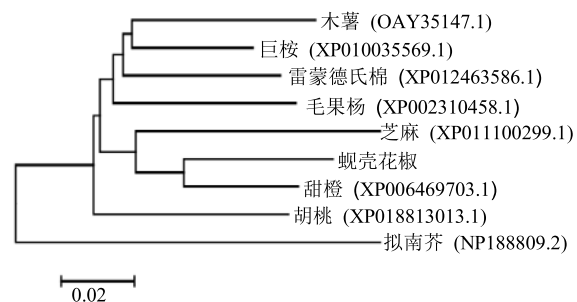
3.4.1 ZdICL 基因编码蛋白的理化性质分析 通过 ProParam 在线软件分析 ZdICL 编码蛋白的理化性质，结果表明，该蛋白由 575 个氨基酸残基组成，蛋白相对分子质量为 64 460，理论等电点 (PI) 为 6.94，说明 ZdICL 属于酸性蛋白质。其总共包括 8 974 原子，分子式为 $\text{C}_{2850}\text{H}_{4443}\text{N}_{801}\text{O}_{850}\text{S}_{29}$ ，带正电荷的氨基酸残基 (Arg+Lys) 数为 68，带负电荷的氨基酸残基 (Asp+Glu) 数为 69。ZdICL 编码蛋白中均有 20 种氨基酸，其中 Ala 所占比例最高，达到 11.7%，Glu 和 Leu 所占比例次之，达到 7.1%，Cys 所占比例最低。ZdICL 蛋白的脂肪指数为 75.25，不稳定指数为 31.97。

3.4.2 ZdICL 蛋白保守域分析及聚类分析 将

ZdICL 蛋白的氨基酸序列与 GenBank 中已注册的不同物种的氨基酸序列利用 BioEdit 软件进行同源性比对与分析, 结果表明 ZdICL 蛋白的氨基酸含有 TIM_phosphate_binding 保守结构域, KKCGHM 活性中心, S/ARM 定位信号, 与其他物种高度保守。构建的蚬壳花椒 ZdICL 系统进化树结果表明, 蚬壳花椒 ZdICL 基因与甜橙 *Citrus sinensis* (L.) Osbeck 的 CiICL 亲缘关系最近; 与芝麻 *Sesamum indicum* L. 的 SeICL (XP011100299.1)、毛果杨 *Populus trichocarpa* Torr. & Gray 的 PopICL (XP002310458.1) 亲缘关系较近; 与雷蒙德氏棉 *Gossypium raimondii* Ulbrich 的 GoICL (XP012463586.1)、巨桉 *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden 的 EuICL (XP010035569.1)、木薯 *Manihot esculenta* Crtantz 的 MaICL (OAY35147.1) 亲缘关系较远; 与拟南芥的 ArICL (NP188809.2) 的亲缘关系最远 (图 5)。这表明 ICL 在蚬壳花椒等木本类植物中遗传进化具有较高的保守性, 其功能保守位点在同属物种中高度保守, 而离草本模式植物拟南芥遗传距离最远, 这有可能预示着二者在其植物中的生理生化功能有较大差异^[17]。

使用 ProtScale 软件预测蚬壳花椒 ZdICL 蛋白的亲水性和疏水性, 亲水性分布图反映了该蛋白质的折叠情况。该蛋白中以第 220 处氨基酸残基疏水性最强, 以 145 和 146 处氨基酸残基亲水性最强, 且疏水氨基酸的数量远大于亲水氨基酸, 推断其为疏水性蛋白。

3.4.3 蚬壳花椒 ZdICL 蛋白二级结构、三级结构及亚细胞定位的预测 利用 SOPMA 在线软件对蚬壳花椒 ZdICL 蛋白的二级结构进行预测, 其二级结构



0.02 表示为物种间平均遗传距离

The average genetic distance between species is 0.02

图 5 蚬壳花椒 ZdICL 基因与其他植物 ICL 基因的系统进化分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of *Zanthoxylum dissitum* ICL gene and its homologous genes in other plants species

α 螺旋 (H) 占 50.78%, β 折叠 (E) 占 11.65%, β 转角 (T) 占 8.87%, 无规卷曲 (C) 占 28.70%, 其中 α 螺旋和无规卷曲是二级结构中最大的结构元件。利用 SWISS-MODEL 同源建模预测 ZdICL 的三级结构模型 (图 6)。

利用 Psort 在线软件预测 ZdICL 蛋白进行亚细胞定位, 结果显示该蛋白定位于细胞质的可能性为 43.5%, 位于细胞核的可能性为 26.1%。通过 Netphos 3.1 server 预测了 ZdICL 蛋白的磷酸化位点, 结果表明 ZdICL 蛋白含有 24 个丝氨酸位点、16 个苏氨酸位点和 9 个酪氨酸位点。

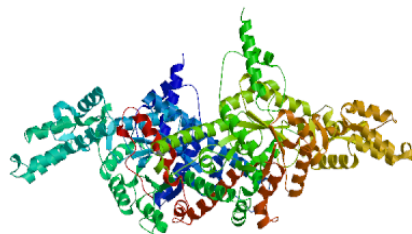


图 6 蚬壳花椒 ZdICL 蛋白的三级结构分析

Fig. 6 Tertiary structure prediction analysis of ZdICL of *Zanthoxylum dissitum*

3.5 ZdICL 基因在种子萌发过程中表达量变化分析

ZdICL 基因在蚬壳花椒 GA 处理组与清水处理组 0~96 h 均有表达, 但是两者总体趋势有所不同 (图 7)。其中清水处理的蚬壳花椒种子在整个萌发期间 ZdICL 基因表达量的趋势是先上升后下降, 在 24 h 时 ZdICL 的表达水平达到最高, 这是由于前期种子吸水, 开启了种子中油脂代谢途径, 随着萌发时间的推移, 种子代谢油脂的速率也急速增加, 从而在 24 h 时 ZdICL 基因的表达水平最高。但是脂肪酸通过 β 氧化途径也会产生 H_2O_2 , 在 0~24 h 随着 ZdICL 基因表达量的增加, 种子内产生 H_2O_2 的速度大于清除 H_2O_2 的速率, 进而对细胞造成氧化性损伤, 致使种子在 48~96 h ZdICL 基因的表达量显著降低。因此在萌发培养过程中, 这一表达量变化有可能是清水组的种子往往会腐烂衰败, 无法萌发为幼苗的原因之一。而 GA 组 ZdICL 基因的表达量呈先降低后大幅升高, 第 48 小时升高种子露白萌发, 这与外源 GA 调控种子中脂肪动员代谢机制相吻合。说明外源 GA 的加入确实促进了蚬壳花椒 ICL 的表达, 从而提高了 ZdICL 在种子中活性, 保护了种子细胞避免氧化损伤, 从而进入萌发阶段。

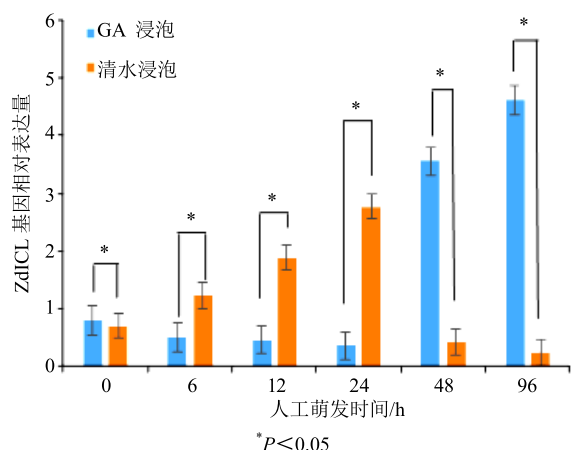


图7 *ZdiICL* 基因在蚬壳花椒人工萌发过程中的相对表达量
Fig. 7 Relative expression levels of *Z. dissitum* ZdiICL in the artificial germination of pepper

在自然环境中生长的大部分蚬壳花椒种子都有坏死现象,即种子的胚及胚乳在壳内腐烂衰败,这说明自然情况下生长的蚬壳花椒种子有可能内源激素 GA 含量不足,无法有效保护细胞以避免氧化性损伤,导致自然繁育率低下。

4 讨论

4.1 蚬壳花椒 *ZdiICL* 基因的克隆表达

本研究从蚬壳花椒中克隆到 1 个编码 ICL 的基因 *ZdiICL*,对该基因的核苷酸序列及其编码产物进行了生物分析和预测,结果表明 *ZdiICL* 蛋白为疏水性蛋白,其氨基酸序列存在多个功能域,如 TIM_phosphate_binding。聚类分析表明,其与甜橙的 ICL 基因的同源性最高,表明成功获得蚬壳花椒的 *ZdiICL* 基因。构建原核表达载体 pET-28a-*ZdiICL*,并将 *ZdiICL* 蛋白在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中高效表达,成功获得了具有酶活性的 *ZdiICL* 蛋白,为今后深入研究 *ZdiICL* 蛋白在蚬壳花椒种子萌发过程中的调控作用奠定基础。

4.2 蚬壳花椒 *ZdiICL* 基因在种子人工萌发中表达量分析

ICL 基因在油料种子萌发早期催化脂肪向糖类的转变以满足萌发的需要发挥重要作用,但在外界因素的影响下,会导致种子萌发过程中 ICL 基因表达的 ICL 蛋白活性产生较大的变化^[18]。例如黄瓜种子经多裂骆驼蓬中生物碱处理后,种子中 ICL 活性随着生物碱浓度的增大而下降,说明多裂骆驼蓬中生物碱是通过抑制种子贮存脂肪向糖类转变而抑制种子萌发及生长发育^[19]。黄瓜种子在氯化钠胁迫下,使种子中 ICL 活性受到不同程度抑制,抑制

了乙醛酸循环的效率,影响种子萌发;而外源褪黑素处理黄瓜种子后 ICL 活性提高,保证了油脂和能量的正常代谢^[20],从而提高了种子的萌发率,缩短了萌发周期。同时已有研究发现,不同浓度的重金属对油料种子中 ICL 活性有不同影响。低浓度镉处理油菜种子会明显降低种子的 ICL 活性,使种子内油脂转化过程受阻,萌发过程中所需的营养和能量供应不足,从而抑制种子的萌发^[21]。本研究通过前期实验表明,用一定浓度的外源激素 GA 处理蚬壳花椒种子能够增加种子萌发率外,相对清水对照组在种子萌发前期可有效避免种子腐败坏死现象,推测可能是 GA 在蚬壳花椒萌发前期参与抑制种子油脂动员,从而减少脂肪动员后脂肪酸 β 氧化产生过量 H_2O_2 ,避免对种子造成氧化性伤害,保护了蚬壳花椒种子萌发后期的正常萌发。然而自然环境下生长的蚬壳花椒种子很有可能因缺乏内源激素 GA 造成 ICL 活性不足,无法有效保护种子细胞避免氧化性损伤,造成种子坏死现象。

ZdiICL 基因表达量在种子萌发过程中的趋势为先下降后上升。这可能是赤霉素处理的蚬壳花椒种子在 0~24 h 抑制了种子中脂肪动员代谢,避免了种子在对 H_2O_2 氧化能力耐受性较低的情况下造成细胞的氧化性损伤^[22],所以在这段时间种子中 *ZdiICL* 基因表达量有逐渐下降的趋势,其趋势并不显著。在 48~96 h 时,种子中各种抗氧化酶的抗氧化能力也逐渐增强,同时 GA 抑制脂肪动员代谢减弱,油脂动员代谢趋于活跃,为种子萌发提供碳源与能量,促进种子萌发^[23],*ZdiICL* 基因的表达量在 48 h 时忽然升高,并非逐步提升,这可能由于种子萌发前期,外源 GA 的加入是通过间接或直接改变 *ZdiICL* 蛋白酶活调控脂肪动员代谢,并未影响到 ICL 的信号通路,从而使得种子保持较强的抗氧化性损伤能力,这与清水对照组不同的是 0~24 h 时,清水组与 GA 组相比,已然在通过相对较高的 *ZdiICL* 表达量来提升 ICL 活性,12~24 h 后才尤为显著,这可能由于 2 组样品都通过了人为破壳。破壳后种子解除了外部屏障,胚轴裸露接收光照信号预示萌发,然而清水组并未使用活性 GA 处理,在其他抗氧化性酶活性尚不满足种子萌发抗氧化性损伤能力的前提下,为种子快速供能启动了油脂动员代谢途径,课题组前期转录组与代谢组数据分析,蚬壳花椒种子光信号通路确实会影响油脂代谢通路,且在种子萌发前期为正调控机制。从而使得大

量的油脂储能分解为碳水化合物提供碳能,加速萌发营养供给的同时也同样加速了细胞的氧化损伤,使得胚轴细胞并未完成分化延伸时就趋于氧化性损伤死亡状态。这也就不难解释清水对照组大部分种子在 48 h 后都大量出现腐败坏死现象。同理,在自然界中的蚬壳花椒种子初期的生理生化实验也表明了这一推测观点的正确性,野生状态下的蚬壳花椒种子在油脂储备量上是足以完整种子萌发供能的,但内源 GA 的不足可能是难以萌发的关键原因所在。活性 GA 促使种子萌发是逐步趋于萌发状态,而非直接作用于所有基因表达相关调控,先是激活完善种子细胞的抗氧化能力,再提高种子供能代谢途径,这与已报道的苹果酸合成酶受外源激素的调控机制相似^[22],在蚬壳花椒萌发前期通过对 ZdICL 的活性抑制让其避免萌发初期较强的氧化性损伤,同时也会激活各类萌发信号通路,其中就包括了提高抗氧化性酶基因表达的代谢通路^[23]。比清水对照组,外源激素处理后的蚬壳花椒种子,在萌发期间油脂含量是逐步减少,其萌发培养 48 h 后尤为显著与 ZdICL 基因表达量成反比关系,间接说明,GA 也有可能是在 48 h 后,利用反馈调节作用才提高了蚬壳花椒种子脂肪代谢通路中 ICL 的表达量,从而提高 ICL 活性,加速了油脂动员代谢供能的,加之内源活性 GA 的自我消耗,使其前期抑制 ICL 能力减弱,从而促进种子逐步趋于萌发。然而对于蚬壳花椒 ZdICL 基因在 GA 处理过的蚬壳花椒种子萌发过程中确切的分子机制,有待进一步深入研究。

4.3 小结

本实验从蚬壳花椒基因组中克隆得到 ZdICL,并在原核表达体系中高效表达了具有活性的 ZdICL。通过实时荧光定量,分析了该基因在蚬壳花椒人工种子萌发过程中的表达量变化,其表达量变化在 0~96 h 时,外源激素促进萌发组与清水组均有表达,但二者趋势不同,清水组中其基因表达量逐步升高,24 h 后种子趋于死亡,酶活性降低,而激素 GA₃ 处理组中随着种子趋于萌发其表达量变化呈逐步降低后大幅升高的趋势,这有可能是 GA 先通过直接抑制 ZdICL 活性,激活种子抗氧化能力的代谢途径,才反馈调节油脂动员代谢途径,使其种子细胞具有抗氧化性损伤能力,萌发后期 ZdICL 的表达量大幅升高,油脂代谢趋于活跃,储能物质消耗种子萌发完成。而蚬壳花椒种子自然生境下发

育率低下,其原因之一可能是其自身内源激素 GA 含量不足。

参考文献

- [1] 马英姿,王平,梁文斌.药用植物蚬壳花椒的生境及生物学调查[J].经济林研究,2007,25(1):25-30.
- [2] 李猛,王平,孙吉康,等.天然蚬壳花椒种群遗传多样性的 ISSR 标记分析[J].中药材,2014,37(12):2159-2163.
- [3] 周丹,赵江哲,柏杨,等.植物油脂合成代谢及调控的研究进展[J].南京农业大学学报,2012,35(5):77-86.
- [4] Hatano T, Inada K, Ogawa T O, et al. Aliphatic acid amides of the fruits of *Zanthoxylum piperitum* [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(18): 2599-2604.
- [5] Luttik M A, Kötter P, Salomons F A, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* ICL2 gene encodes a mitochondrial 2-methylisocitrate lyase involved in propionyl-coenzyme A metabolism [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(24): 7007-7013.
- [6] Famiani F, Paoletti A, Battistelli A, et al. Phosphoenolpyruvate carboxykinase, pyruvate orthophosphate dikinase and isocitrate lyase in both tomato fruits and leaves, and in the flesh of peach and some other fruits.[J]. *J Plant Physiol*, 2016, 202: 34-44.
- [7] 陈丽培.油松种子萌发初始阶段生理生化特性研究[D].南京:南京林业大学,2009.
- [8] Famiani F, Walker R P. Changes in abundance of enzymes involved in organic acid, amino acid and sugar metabolism, and photosynthesis during the ripening of blackberry fruit [J]. *J Am Soc Hortic Sci*, 2009, 134(2): 167-175.
- [9] 黎锡扬,邱鸿滨,简志英,等.赤霉素对小麦和大麦糊粉层细胞中异柠檬酸裂解酶形成的作用[J].植物生理学报,1983,21(2):175-181.
- [10] 韩克杰,孙霞,邢世岩,等.欧洲榛子贮藏及萌发生理特性研究[J].武汉植物学研究,2006,24(5):435-440.
- [11] Wang Y S. Effect of saline alkali stress on seeds germination of castor [J]. *J Am Agric Sci*, 2007, 35(1): 41-43.
- [12] Gallardo K, Job C, Groot S P C, et al. Proteomic Analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming 1 [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(2): 835-848.
- [13] Esposito D, Chatterjee D K. Enhancement of soluble protein expression through the use of fusion tags [J]. *Curr Opinion Biotechnol*, 2006, 17(4): 353-358.
- [14] 周韬,王平,孙吉康,等.蚬壳花椒 *GID1* 同源基因克隆及其在种子萌发过程中的表达分析[J].植物生

- 理学报, 2017, 53(8): 1499-1506.
- [15] 袁 伟, 万红建, 杨悦俭. 植物实时荧光定量 PCR 内参基因的特点及选择 [J]. 植物学报, 2012, 47(4): 427-436.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 桑世飞, 王 会, 梅德圣, 等. 利用全基因组 SNP 芯片分析油菜遗传距离与杂种优势的关系 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(12): 2469-2478.
- [18] 刘建新, 胡浩斌, 赵国林. 多裂骆驼蓬的生物碱对黄瓜种子萌发的影响 [J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 250-254.
- [19] 黄韞宇, 张海军, 邢燕霞, 等. NaCl 胁迫对黄瓜种子萌发的影响及 DNA 甲基化的 MSAP 分析 [J]. 中国农业科学, 2017, 46(8): 1646-1656.
- [20] Eprintsev A T, Fedorin D N, Salnikov A V, *et al.* Expression and properties of the glyoxysomal and cytosolic forms of isocitrate lyase in *Amaranthus caudatus* L. [J]. *J Plant Physiol*, 2015, 181(8): 1-8.
- [21] Bradbeer J W. Studies in seed dormancy: IV. The role of endogenous inhibitors and gibberellin in the dormancy and germination of *Corylus avellana* L. seeds [J]. *Planta*, 1968, 78(3): 266-276.
- [22] Sun J K, Wang P, Zhou T, *et al.* Transcriptome analysis of the effects of shell removal and exogenous gibberellin on germination of *Zanthoxylum* seeds [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-07424-0.
- [23] Pua E C, Chandramouli S, Han P, *et al.* Malate synthase gene expression during fruit ripening of Cavendish banana (*Musa acuminata* cv. *Williams*) [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(381): 309-311.