

颠茄精氨酸脱羧酶基因的克隆与表达分析

王中平^{1,2}, 秦白富³, 强 玮^{1,2}, 邱 飞^{1,2}, 侯艳玲^{1,2}, 陈 敏⁴, 兰小中⁵, 廖志华^{1,2*}

1. 西南大学生命科学学院 三峡库区教育部生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715

2. 西南大学西藏农牧学院药用植物联合研发中心, 重庆 400715

3. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

4. 西南大学药学院, 重庆 400715

5. 西藏大学农牧学院, 西藏 林芝 850000

摘要: 目的 克隆颠茄 *Atropa belladonna* 精氨酸脱羧酶 (arginine decarboxylase, ADC) 基因并进行生物信息学、组织表达谱和诱导谱分析。方法 以颠茄总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 采用 RACE 技术克隆颠茄 ADC 基因的全长 cDNA 序列, 利用 BLAST 和 PBIL 等在线工具进行生物信息学分析, 采用实时定量 PCR (qRT-PCR) 技术对 ADC 基因进行组织表达谱和诱导谱分析。结果 克隆到 2 个 ADC 基因, 分别命名为 AbADC1 (登录号 KT802752) 和 AbADC2 (登录号 KT802751)。AbADC1 基因 cDNA 全长为 2 817 bp, 编码 712 个氨基酸残基; AbADC2 基因 cDNA 全长为 2 992 bp, 编码 715 个氨基酸残基。蛋白质序列比对表明, AbADC1 与马铃薯 *Solanum tuberosum* ADC 的相似性较高, 为 89%; AbADC2 与曼陀罗 *Datura stramonium* ADC 的相似性较高, 为 90%。qRT-PCR 检测结果表明, AbADC1 在须根中的表达量最高, 而 AbADC2 在主根中的表达量最高; AbADC1 和 AbADC2 均不受盐胁迫响应, AbADC2 受低温胁迫响应。结论 首次克隆并获得了 2 条颠茄 ADC 基因全长序列, 为进一步研究颠茄托品烷类生物碱的代谢合成奠定了基础。

关键词: 颠茄; 精氨酸脱羧酶; 基因表达; 托品烷类生物碱; 总 RNA; cDNA

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)15-2734-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.15.023

Cloning and expression analysis on arginine decarboxylase genes in *Atropa belladonna*

WANG Zhong-ping^{1,2}, QIN Bai-fu³, QIANG Wei^{1,2}, QIU Fei^{1,2}, HOU Yan-ling^{1,2}, CHEN Min⁴,
LAN Xiao-zhong⁵, LIAO Zhi-hua^{1,2}

1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest university, Chongqing 400715, China

2. SWU-TAAHC Medicinal Plant Joint R&D Centre, Southwest university, Chongqing 400715, China

3. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China

4. School of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

5. Agricultural and Husbandry College, Tibet University, Linzhi 850000, China

Abstract: Objective To clone the full-length cDNAs encoding arginine decarboxylase (ADC) from *Atropa belladonna*, and to characterize the genes at the bioinformatics and expression levels. **Methods** cDNAs were used as templates, the full-length cDNAs of ADC in *A. belladonna* was cloned through rapid amplification of cDNA ends (RACE) technique; Bioinformatics analysis of AbADC genes was performed by BLAST and PBIL on line. The expression levels of the two AbADC genes in different tissues as well as under two different types of stresses were detected based on qPCR analysis. **Results** Two ADC genes, namely AbADC1 and AbADC2, were cloned from *A. belladonna*. AbADC1 was 2 817 bp in length that encoded 712 amino acids with the highest identity of 89% with ADC from *Solanum tuberosum*; The full-length cDNA of AbADC2 was 2 992 bp in length that encoded 715 amino acids with the highest identity of 90% with ADC from *Datura stramonium*. The expression level of AbADC1 was significantly higher in secondary roots than

收稿日期: 2015-12-23

基金项目: 教育部新世纪人才支持计划 (NCET-12-0930); 国家自然科学基金项目 (31370333); 重庆市科技攻关项目 (CSTC2012GGYYJS80013); 西南大学中央高校基本科研业务费专项 (XDJK2013A024)

作者简介: 王中平, 硕士研究生, 研究方向为植物生物学与生物技术。Tel: (023)68367146 E-mail: zpwang1990@163.com

*通信作者 廖志华, 博士, 教授, 博士生导师。Tel: (023)68367146 E-mail: zhliao@swu.edu.cn

that in any other organ, while the AbADC2 expression level was higher in main roots than that in other detected organs. The transcriptional levels of both AbADC1 and AbADC2 were not affected under salinity stress; AbADC2 expression decreased under cold stress, while AbADC1 did not. **Conclusion** The cloning and characterization of the cDNAs encoding ADC from *A. belladonna* are reported for the first time, which provides the new candidate genes for engineering biosynthetic pathway of tropane alkaloids.

Key words: *Atropa belladonna* L.; arginine decarboxylase; gene expression; tropane alkaloids; total RNA; cDNA

颠茄是我国药典收录的托品烷类生物碱 (tropane alkaloids, TAs) 药源植物^[1], 其次生代谢产物莨菪碱 (hyoscyamine) 和东莨菪碱 (scopolamine) 具有重要的药用价值。TAs 主要在须根中合成并存储于植物的根中, 同时也存在转运机制将其运输到植物地上部位进行储存^[2]。由于化学合成困难且昂贵, TAs 无法进行大规模的人工合成^[3]。目前, TAs 主要从茄科类植物中提取^[4]。因此, 研究 TAs 代谢途径上的各种功能基因, 进而采取分子生物学的方法提高颠茄中 TAs 的产量具有重要意义。

精氨酸脱羧酶 (arginine decarboxylase, ADC) 是生物体中多胺合成途径上的一个关键限速酶, 属于磷酸吡哆醛依赖性酶基因超家族 III 型 PLPDE 成员, 含有 III 型 PLPDE 典型的 N 端 Orn-Arg-deC-N 结构域和 C 端 Orn-DAP-Arg-deC 结构域^[5]。在磷酸吡哆醛的催化作用下, ADC 可以催化精氨酸 (arginine) 脱羧^[6], 生成鲛精胺 (agmatine), 再水解鲛精胺生成腐胺 (putrescine), 腐胺又可以在亚精胺合成酶 (spermidine synthase) 和精胺合成酶 (spermine synthase) 的作用下分别合成亚精胺 (spermidine) 和精胺 (spermine)。

ADC 的催化产物腐胺是托品烷类生物碱生物合成的前体物质, 因此 ADC 基因对托品烷类生物碱的合成也具有重要作用。近年来, 棉花^[7]、甘蓝型油菜^[8]、桃树^[9]、甘蓝^[10]、水稻^[11]等多种植物的 ADC 基因已经被克隆, 并证明其参与广泛的生理过程和胁迫反应, 然而有关颠茄 ADC (AbADC) 基因的研究尚未见报道。本研究从颠茄中克隆到 2 条 ADC 基因, 并进行了生物信息学分析、组织表达谱分析及盐胁迫和低温处理诱导表达分析, 旨在为 AbADC 的进一步研究奠定基础, 同时也为颠茄中托品烷类生物碱的合成代谢调控提供候选基因。

1 材料与试剂

1.1 材料

样品由西南大学博士生导师廖志华教授鉴定为颠茄 *Atropa belladonna* L., 植株保存于西南大学甘

薯研究中心。大肠杆菌 DH5 α 来源于复旦大学唐克轩教授实验室, 现由本实验室保存。

1.2 试剂

总 RNA 提取试剂盒为 RNA simple Total RNA Kit (TIANGEN); RNA 反转录及 3'RACE 试剂盒为 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa); 5'RACE 试剂盒为 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit, BD AdvantageTM 2 PCRKit (CLONTECH); 质粒提取及胶回收试剂盒为 BioSpin Gel Extraction Kit、BioSpin plasmid DNA Extraction Kit (BioFlux); 高保真 Taq DNA 聚合酶为 PrimeSTAR HS DNA Polimerse (TaKaRa); T 载体、连接试剂盒、荧光定量相关试剂分别为 pMD19-T Vector、DNA Ligation 2.0、PrimerScriptTM RT-PCR Kit 和 SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time) (TaKaRa)。本研究所用引物及测序服务由上海英骏生物技术有限公司提供。其他试剂均为国产分析纯试剂。

2 方法

2.1 RNA 的提取与 cDNA 的合成

取适量颠茄样品在液氮中研磨, 按照 RNA simple Total RNA Kit 说明书提取总 RNA, HITACHI U-3010 紫外可见分光光度计检测 RNA 纯度和浓度。严格按照 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa) 试剂盒说明书反转录获得第一链互补链 DNA (cDNA) 用于核心片段 PCR 扩增和 3'RACE, 按照 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 和 BD AdvantageTM 2 PCR Kit (CLONTECH) 试剂盒说明书反转录获得第一链互补链 DNA (cDNA) 用于 5'RACE。

2.2 AbADC1 和 AbADC2 基因的克隆

在 NCBI 网站上下载已报道的烟草、曼陀罗、大豆、马铃薯 ADC 基因的 cDNA 序列。使用软件 Vector NTI8.0 进行 ADC 核苷酸序列的多重比对, 根据保守区段的核苷酸序列设计一对简并引物 F-AbADC、R-AbADC (本研究所有引物序列均见表 1), 以上述第一条 cDNA 链为模板进行 AbADC 核心片段的扩增。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫

外检测后,回收合适大小的 DNA 条带。胶回收产物与 PMD19-T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,涂布于加有氨苄霉素的 LB 平板上,37 °C 培养约 12 h 后挑取抗性菌落,PCR 检测为阳性后送测序。根据测序结果,分别设计 3'RACE 的基因特异性引物(F-AbADC1-3-1、F-AbADC1-3-2、F-AbADC2-3-1、F-AbADC2-3-2)和 5'RACE 的基因特异性引物(R-AbADC1-5-1、R-AbADC1-5-2、R-AbADC2-5-1、R-AbADC2-5-2),以相应的 cDNA 为模板进行巢式 PCR 扩增,同上方法回收并测序。将获得的 AbADC1、

AbADC2 的核心片段,3'RACE 序列和 5'RACE 序列在 VectorNTI8.0 软件中进行电子拼接,拼接后获得 AbADC1、AbADC2 的电子拼接 cDNA 全长序列。根据电子全长序列设计扩增 AbADC1、AbADC2 的物理全长的 PCR 引物(F-AbADC1、R-AbADC1、F-AbADC2、R-AbADC2),进行 PCR 扩增。回收合适大小的电泳条带,连接 T 载体后转化大肠杆菌,对 PCR 检查为阳性的克隆进行测序。将测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,判断其序列为 AbADC1、AbADC2 的物理全长序列。

表 1 基因克隆和荧光定量 PCR 所用到的引物

Table 1 Primers designed for detection of gene cloning and real-time PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')	用途
F-AbADC	GAGGAGCTTGAC/TC/TTGGTGATTG	克隆 AbADC 核心片段
R-AbADC	GTCTCGAACATGAGT/CTCA/GGGCTC	
F-AbADC1-3-1	GAATTGGGAAGCAATGGTGG	扩增 AbADC1 3'端片段
F-AbADC1-3-2	CATGTGCTGACGTTCTCC	
F-AbADC2-3-1	GCTTGATGAGTCTGGAATGC	扩增 AbADC2 3'端片段
F-AbADC2-3-2	GTTCCAATTCATCGTTTAGATG	
R-AbADC1-5-1	GAATTGGGAAGCAATGGTGG	扩增 AbADC1 5'端片段
R-AbADC1-5-2	CATGTGCTGACGTTCTCC	
R-AbADC2-5-1	GAGCCTCATAGCCATTGGAATCAACCGCCATATC	扩增 AbADC2 5'端片段
R-AbADC2-5-2	CATATCCGGTGACCAATGGGAACAGGCG	
F-AbADC1	CCATGTCTATMCCCTTGC	克隆 AbADC1 全长片段
R-AbADC1	CAGACCACCTCAACGAC	
F-AbADC2	TTGCCTTGAATTCTAGTTGG	克隆 AbADC2 全长片段
R-AbADC2	CCCCTGCTTTCTACTG	
q-F-AbADC1	CCTGCAGTGGCTATTACTATC	检测 AbADC1 表达量
q-R-AbADC1	CCTCAACGACAACTTTATTACTGG	
q-F-AbADC2	GGTGGCTATTACTATTACAATGAGGAC	检测 AbADC2 表达量
q-R-AbADC2	CAAAGAAACGTGACATCACCAACTAAGG	
F-qPGK	TCGCTCTTGAGAAAGGTTGAC	检测 PGK 表达量
R-qPGK	CTTGTCGCAATCACTACATCAG	

2.3 AbADC 基因的生物信息学分析

利用生物信息学软件和生物信息学网站进行 AbADC1、AbADC2 的生物信息学分析。核苷酸序列比对使用 Vector NTI8.0 软件进行。开放阅读框(ORF)的查找和核苷酸的翻译在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站的 ORF Finder 上进行。利用 <http://www.expasy.org> 网站提供的相关生物信息学分析软件(如 TargetP)进行蛋白质基本性质及转运肽的预测。在 PBIL 网站进行二级结构预测。利用 CLUSTALX 进行氨基酸序列的多重比对。在 CCD 数据库和 InterPro 中分析蛋白保守结构域。利用

WOLF POSRT 网络服务器对 AbADC1 和 AbADC2 进行亚细胞定位分析。利用 MEGA4.1 中的邻位相联法(neighbor-joining, NJ)构建进化树,重复次数设为 1 000 次。

2.4 AbADC 基因的组织表达谱分析

提取颠茄的主根、须根、老叶、嫩叶、嫩茎、花蕾、花蕊、花萼、花瓣、青果和果萼 11 个部位的总 RNA,使用 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0 (TaKaRa)试剂盒将各组织的 RNA 进行反转录,得到 cDNA 第一链作为实时定量 PCR(qRT-PCR)模板。使用 BIO-RAD IQTM5 Multicolor Real-Time PCR 仪,

参照 SYBR Premix Ex TaqTM II (Perfect Real Time) 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 反应。反应条件及程序均按照相关试剂盒说明书进行。以 PGK 基因作为内参, 根据 Pfaffl Method 方法计算各基因的相对表达量。

2.5 AbADC 基因的诱导谱分析

取 3 根 3~5 cm 长的颠茄发根尖接种于 150 mL MS 液体培养基中, 25 °C、110 r/min, 摇床黑暗培养 30 d 后, 收取发根材料作为空白对照, 其余培养瓶倒掉先前的 MS 培养基, 重新加入 150 mL MS 培养基。NaCl 诱导项: 培养基中加入 NaCl 使其终浓度为 100 mmol/L, 继续置于 25 °C, 转速为 110 r/min 的摇床上培养; 4 °C 诱导项: 将换培养基后的三角瓶放置在 4 °C 培养; 所有诱导项分别在诱导 0、4、12、24 h 后取材, 应用 qRT-PCR 技术分别检测 AbADC1 和 AbADC2 的表达情况。

3 结果与分析

3.1 AbADC 基因的克隆和序列分析

以颠茄总 RNA 逆转录获得的 cDNA 为模板, 利用兼并引物进行 AbADC 保守结构的 PCR 扩增, 成功获得一段约 1 226 bp 和一段约 1 232 bp 的核心片段, 分别命名为 AbADC1 和 AbADC2。根据获得的 AbADC 核心片段信息, 设计 3'RACE 和 5'RACE 巢式引物, 用于 AbADC 基因 3'端和 5'端序列的克隆。经过 2 轮巢式扩增, 由 AbADC1 核心片段获得长度分别为 437 bp 的 3'端和 630 bp 的 5'端片段, 由 AbADC2 核心片段获得长度分别为 837 bp 的 3'端和 719 bp 的 5'端片段, 将获得的核心、3'端和 5'端序列在 Vector NTI 8.0 软件中进行重叠群分析, 拼接得到 2 817 bp 的 ADC1 和 2 992 bp 的 AbADC2 基因 cDNA 电子全长序列。设计物理全长引物并利用高保真酶进行 PCR 扩增, 得到 AbADC1 基因 cDNA 全长序列为 2 817 bp, 该物理全长包括长约 2 136 bp 的编码框, 预测编码 712 个氨基酸; 得到的 AbADC2 基因全长序列为 2 992 bp, 该物理全长包括 2 145 bp 的编码框, 预测编码 715 个氨基酸。

3.2 AbADC 基因编码蛋白的生物信息学分析

3.2.1 理化性质分析 AbADC1 蛋白由 712 个氨基酸编码, 预测相对分子质量为 77 600, 理论等电点为 4.94; AbADC2 蛋白由 715 个氨基酸编码, 预测相对分子质量为 76 700, 理论等电点为 4.93。

3.2.2 AbADC 编码蛋白二级结构预测 PBIL 网站预测 AbADC1 编码蛋白包含 36.52%的 α -螺旋、

16.15%的延伸链和 47.33%的无规卷曲; AbADC2 编码蛋白包含 35.38%的 α -螺旋、17.34%的延伸链和 47.27%的无规卷曲。

3.2.3 AbADC 氨基酸序列与保守结构域分析 用 NCBI 网站的 BLAST 服务器对 AbADC1 和 AbADC2 氨基酸序列和保守结构域进行分析 (图 1)。结果表明, AbADC1 氨基酸序列与马铃薯 *Solanum tuberosum* L. (XP_006360614) 的 ADC 序列一致性最高, 为 89%, 其次为烟草 *Nicotiana tabacum* L. (BAD06581), 一致性为 87%; AbADC2 的氨基酸序列与曼陀罗 *Datura stramonium* L. (AJ251898) 的 ADC 序列一致性最高, 达到 90%, 其次为马铃薯 (XP_006359602.1) 的 ADC, 一致性为 87%。结构域预测发现 AbADC 包括 2 个保守的氨基酸结构域: ADC 家族 2 磷酸吡哆醛结合位点和 ADC 家族 2 标记 2 序列^[7], 分别负责结合吡哆醛磷酸盐和甲基丙烯酸十二氟庚酸 (DFMA) 的赖氨酸、半胱氨酸残基。

3.2.4 AbADC 编码蛋白信号肽和亚细胞定位预测分析 利用 Signal 4.1 Server 网络服务器对 AbADC1 和 AbADC2 进行信号肽分析, AbADC1 和 AbADC2 都不存在信号肽, 属于胞质蛋白。利用 WOLF POSRT 网络服务器对 AbADC1 和 AbADC2 进行亚细胞定位分析, AbADC1 主要定位于细胞质, AbADC2 主要定位于细胞质膜。

3.2.5 AbADC 分子进化树的构建 将 AbADC1 和 AbADC2 蛋白的氨基酸序列与来源于其他植物和大肠杆菌的 ADC 蛋白氨基酸序列在 CLUSTALX 和 MEGA4.1 软件中进行进化树分析, 以大肠杆菌的 ADC 作为系统树的外类群基于 NJ 的原理建树 (图 2)。系统树可以分为 2 个主要分支, 第一个主分支包括水稻和燕麦的单子叶序列; 第二个分支包括茄科、十字花科和蔷薇科为代表的双子叶序列。由进化树可知 AbADC1 与番茄的 ADC 亲缘关系较近, 而 AbADC2 与曼陀罗的 ADC 的亲缘关系较近。

3.3 AbADC 基因的组织表达和诱导表达分析

采用 qRT-PCR 技术对 AbADC 在颠茄花、叶、须根和主根等组织中的表达情况进行了分析, 采用 PGK 作为内参基因 (引物序列见表 1)。结果表明, AbADC1 在须根中表达量最高, 其次为主根和嫩茎 (图 3); AbADC2 在主根中表达量最高, 其次为须根、花蕊、花蕾和青果 (图 3)。

		1	100
颠茄 ADC1 (1)		MPALGCCVDAVSPPLGYSLWDNTLP-----TPEIFSSGVPPSTN-----TTTWSSELSDDLRYRDGAGAPYFTINSSGDISVRPHGDTLPHQEDIDLLK	
颠茄 ADC2 (1)		MPALGCCVDAVSPPLGYSLWDNTLP-----TPEIFSSGVPPSTN-----TTTWSSELSDDLRYRDGAGAPYFTINSSGDISVRPHGDTLPHQEDIDLLK	
拟南芥 ADC (1)		MPALACVDTSPFPAYAFSDTAG-----DVPFAPSSPTS-----AAVVVDNRSSLSLSSLYRDGAGAPYFTINSSGDISVRPHGDTLPHQEDIDLLK	
曼陀罗 ADC (1)		MPALGCCVDAVSPPLGYSLWDNTLP-----TPEIFSSGVPPSTN-----TTTWSSELSDDLRYRDGAGAPYFTINSSGDISVRPHGDTLPHQEDIDLLK	
烟草 ADC (1)		MPALGCCVDAVSPPLGYSLWDNTLP-----TPEIFSSGVPPSTN-----TTTWSSELSDDLRYRDGAGAPYFTINSSGDISVRPHGDTLPHQEDIDLLK	
马铃薯 ADC (1)		MPALGCCVDAVSPPLGYSLWDNTLP-----TPEIFSSGVPPSTN-----TTTWSSELSDDLRYRDGAGAPYFTINSSGDISVRPHGDTLPHQEDIDLLK	
Consensus (1)		MPALGCCVDAVSPPLGYSLWDNTLP-----TPEIFSSGVPPSTN-----TTTWSSELSDDLRYRDGAGAPYFTINSSGDISVRPHGDTLPHQEDIDLLK	
		101	200
颠茄 ADC1 (92)		VVKKASDPKNSGGLGLQLPLVVRFPDVLKNRLELSQAFDVAHSCGYE-HYQGVPVVKCNQDRFVVEDIVKFGSGPRFGLGAGSKPELLAMSLCCKGS	
颠茄 ADC2 (93)		VVKKASDPKNSGGLGLQLPLVVRFPDVLKNRLELSQAFDVAHSCGYE-HYQGVPVVKCNQDRFVVEDIVKFGSGPRFGLGAGSKPELLAMSLCCKGS	
拟南芥 ADC (89)		VVKKASDPKNSGGLGLQLPLVVRFPDVLKNRLELSQAFDVAHSCGYE-HYQGVPVVKCNQDRFVVEDIVKFGSGPRFGLGAGSKPELLAMSLCCKGS	
曼陀罗 ADC (99)		VVKKASDPKNSGGLGLQLPLVVRFPDVLKNRLELSQAFDVAHSCGYE-HYQGVPVVKCNQDRFVVEDIVKFGSGPRFGLGAGSKPELLAMSLCCKGS	
烟草 ADC (94)		VVKKASDPKNSGGLGLQLPLVVRFPDVLKNRLELSQAFDVAHSCGYE-HYQGVPVVKCNQDRFVVEDIVKFGSGPRFGLGAGSKPELLAMSLCCKGS	
马铃薯 ADC (91)		VVKKASDPKNSGGLGLQLPLVVRFPDVLKNRLELSQAFDVAHSCGYE-HYQGVPVVKCNQDRFVVEDIVKFGSGPRFGLGAGSKPELLAMSLCCKGS	
Consensus (101)		VVKKASDPKNSGGLGLQLPLVVRFPDVLKNRLELSQAFDVAHSCGYE-HYQGVPVVKCNQDRFVVEDIVKFGSGPRFGLGAGSKPELLAMSLCCKGS	
		201	300
颠茄 ADC1 (192)		PDALLVCNGFKDAEYISLALVARKLLNTVIVLEQEEEDLDVIDISRKMAVRPVIGLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTITQILRVVKKLDESGLMD	
颠茄 ADC2 (193)		PDALLVCNGFKDAEYISLALVARKLLNTVIVLEQEEEDLDVIDISRKMAVRPVIGLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTITQILRVVKKLDESGLMD	
拟南芥 ADC (189)		PDALLVCNGFKDAEYISLALVARKLLNTVIVLEQEEEDLDVIDISRKMAVRPVIGLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTITQILRVVKKLDESGLMD	
曼陀罗 ADC (199)		PDALLVCNGFKDAEYISLALVARKLLNTVIVLEQEEEDLDVIDISRKMAVRPVIGLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTITQILRVVKKLDESGLMD	
烟草 ADC (194)		PDALLVCNGFKDAEYISLALVARKLLNTVIVLEQEEEDLDVIDISRKMAVRPVIGLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTITQILRVVKKLDESGLMD	
马铃薯 ADC (191)		PDALLVCNGFKDAEYISLALVARKLLNTVIVLEQEEEDLDVIDISRKMAVRPVIGLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTITQILRVVKKLDESGLMD	
Consensus (201)		PDALLVCNGFKDAEYISLALVARKLLNTVIVLEQEEEDLDVIDISRKMAVRPVIGLRAKLRTKHSGHFGSTSGEKGKFGLTITQILRVVKKLDESGLMD	
		301	400
颠茄 ADC1 (292)		CLQLLHFHIGSQIPSTALLADGVGEAAQIYCELVRGAGMKFIDTGGGLGIDYDGKSSDSVSVGYGLQYASTVQVAVRVFVCDRGNVHPVICSESGR	
颠茄 ADC2 (293)		CLQLLHFHIGSQIPSTALLADGVGEAAQIYCELVRGAGMKFIDTGGGLGIDYDGKSSDSVSVGYGLQYASTVQVAVRVFVCDRGNVHPVICSESGR	
拟南芥 ADC (289)		CLQLLHFHIGSQIPSTALLADGVGEAAQIYCELVRGAGMKFIDTGGGLGIDYDGKSSDSVSVGYGLQYASTVQVAVRVFVCDRGNVHPVICSESGR	
曼陀罗 ADC (299)		CLQLLHFHIGSQIPSTALLADGVGEAAQIYCELVRGAGMKFIDTGGGLGIDYDGKSSDSVSVGYGLQYASTVQVAVRVFVCDRGNVHPVICSESGR	
烟草 ADC (294)		CLQLLHFHIGSQIPSTALLADGVGEAAQIYCELVRGAGMKFIDTGGGLGIDYDGKSSDSVSVGYGLQYASTVQVAVRVFVCDRGNVHPVICSESGR	
马铃薯 ADC (291)		CLQLLHFHIGSQIPSTALLADGVGEAAQIYCELVRGAGMKFIDTGGGLGIDYDGKSSDSVSVGYGLQYASTVQVAVRVFVCDRGNVHPVICSESGR	
Consensus (301)		CLQLLHFHIGSQIPSTALLADGVGEAAQIYCELVRGAGMKFIDTGGGLGIDYDGKSSDSVSVGYGLQYASTVQVAVRVFVCDRGNVHPVICSESGR	
		401	500
颠茄 ADC1 (392)		AIVSHHSVLIFEAVSSTITLQELSTIG-LQSFVBEKNDADATYRLSAAAIRGEYDTCLYSDQLKQRCVECFKEGSLDIEQLAADVSDIVFSKAI	
颠茄 ADC2 (393)		AIVSHHSVLIFEAVSSTITLQELSTIG-LQSFVBEKNDADATYRLSAAAIRGEYDTCLYSDQLKQRCVECFKEGSLDIEQLAADVSDIVFSKAI	
拟南芥 ADC (389)		AIVSHHSVLIFEAVSSTITLQELSTIG-LQSFVBEKNDADATYRLSAAAIRGEYDTCLYSDQLKQRCVECFKEGSLDIEQLAADVSDIVFSKAI	
曼陀罗 ADC (399)		AIVSHHSVLIFEAVSSTITLQELSTIG-LQSFVBEKNDADATYRLSAAAIRGEYDTCLYSDQLKQRCVECFKEGSLDIEQLAADVSDIVFSKAI	
烟草 ADC (394)		AIVSHHSVLIFEAVSSTITLQELSTIG-LQSFVBEKNDADATYRLSAAAIRGEYDTCLYSDQLKQRCVECFKEGSLDIEQLAADVSDIVFSKAI	
马铃薯 ADC (391)		AIVSHHSVLIFEAVSSTITLQELSTIG-LQSFVBEKNDADATYRLSAAAIRGEYDTCLYSDQLKQRCVECFKEGSLDIEQLAADVSDIVFSKAI	
Consensus (401)		AIVSHHSVLIFEAVSSTITLQELSTIG-LQSFVBEKNDADATYRLSAAAIRGEYDTCLYSDQLKQRCVECFKEGSLDIEQLAADVSDIVFSKAI	
		501	600
颠茄 ADC1 (491)		GAADPVRTYHVNLSVFTSIPDFWAGLQFPVPHKLDKQFARGILSDLTCDSDGKIDKFIGESSLPHELGS-----NGGRYVLMGLGGAYEEALGG	
颠茄 ADC2 (493)		GAADPVRTYHVNLSVFTSIPDFWAGLQFPVPHKLDKQFARGILSDLTCDSDGKIDKFIGESSLPHELGS-----NGGRYVLMGLGGAYEEALGG	
拟南芥 ADC (486)		GAADPVRTYHVNLSVFTSIPDFWAGLQFPVPHKLDKQFARGILSDLTCDSDGKIDKFIGESSLPHELGS-----NGGRYVLMGLGGAYEEALGG	
曼陀罗 ADC (498)		GAADPVRTYHVNLSVFTSIPDFWAGLQFPVPHKLDKQFARGILSDLTCDSDGKIDKFIGESSLPHELGS-----NGGRYVLMGLGGAYEEALGG	
烟草 ADC (494)		GAADPVRTYHVNLSVFTSIPDFWAGLQFPVPHKLDKQFARGILSDLTCDSDGKIDKFIGESSLPHELGS-----NGGRYVLMGLGGAYEEALGG	
马铃薯 ADC (489)		GAADPVRTYHVNLSVFTSIPDFWAGLQFPVPHKLDKQFARGILSDLTCDSDGKIDKFIGESSLPHELGS-----NGGRYVLMGLGGAYEEALGG	
Consensus (501)		GAADPVRTYHVNLSVFTSIPDFWAGLQFPVPHKLDKQFARGILSDLTCDSDGKIDKFIGESSLPHELGS-----NGGRYVLMGLGGAYEEALGG	
		601	700
颠茄 ADC1 (588)		HNLFGGSPVVRVQSQSPHSFAVTRAPGSCADVLRAMQHEPELMFETLKHRAEEFVINEEQE-----DKELAFASLSSLSFHNMPYLVAPSSC	
颠茄 ADC2 (591)		HNLFGGSPVVRVQSQSPHSFAVTRAPGSCADVLRAMQHEPELMFETLKHRAEEFVINEEQE-----DKELAFASLSSLSFHNMPYLVAPSSC	
拟南芥 ADC (585)		HNLFGGSPVVRVQSQSPHSFAVTRAPGSCADVLRAMQHEPELMFETLKHRAEEFVINEEQE-----DKELAFASLSSLSFHNMPYLVAPSSC	
曼陀罗 ADC (595)		HNLFGGSPVVRVQSQSPHSFAVTRAPGSCADVLRAMQHEPELMFETLKHRAEEFVINEEQE-----DKELAFASLSSLSFHNMPYLVAPSSC	
烟草 ADC (593)		HNLFGGSPVVRVQSQSPHSFAVTRAPGSCADVLRAMQHEPELMFETLKHRAEEFVINEEQE-----DKELAFASLSSLSFHNMPYLVAPSSC	
马铃薯 ADC (587)		HNLFGGSPVVRVQSQSPHSFAVTRAPGSCADVLRAMQHEPELMFETLKHRAEEFVINEEQE-----DKELAFASLSSLSFHNMPYLVAPSSC	
Consensus (601)		HNLFGGSPVVRVQSQSPHSFAVTRAPGSCADVLRAMQHEPELMFETLKHRAEEFVINEEQE-----DKELAFASLSSLSFHNMPYLVAPSSC	
		701	741
颠茄 ADC1 (682)		S-----GYRRNDNIVGVGAESLIGEEFVWPYVVA	
颠茄 ADC2 (683)		CFTAATANNNGY-YYNEDNAA-----DCATGEDEIWSYCTA	
拟南芥 ADC (685)		P-----SNLSAAISNLFYVDEDDVYDLSA	
曼陀罗 ADC (689)		CFTAATANNNGY-YYNEDNAA-----DCATGEDEIWSYCTA	
烟草 ADC (684)		CFTAATANNNGY-YYNEDNAA-----DCATGEDEIWSYCTA	
马铃薯 ADC (682)		CFSALAA-NSGGYVNDNIVGVGAESLIGEEFVWPYVVA	
Consensus (701)		CFTAATANNNGY-YYNEDNAA-----DCATGEDEIWSYCTA	

单下划线部分为鸟氨酸/二氨基庚二酸/ADC 家族 2-磷酸吡哆醛结合位点; 不连续的下划线部分为底物识别信号; 参与磷酸吡哆醛结合的赖氨酸残基用灰色背景标示

Single underlines indicate the conserved ADC family 2 pyridoxal phosphate binding motif; Discontinuous underlines indicate the ADC family 2 signature 2 motif; The top of conserved lysine residue involved in pyridoxal phosphate binding is shown in yellow

图 1 来自不同植物的 ADC 氨基酸序列多重比对

Fig. 1 Multi-alignment of amino acid sequences of ADC from other plants

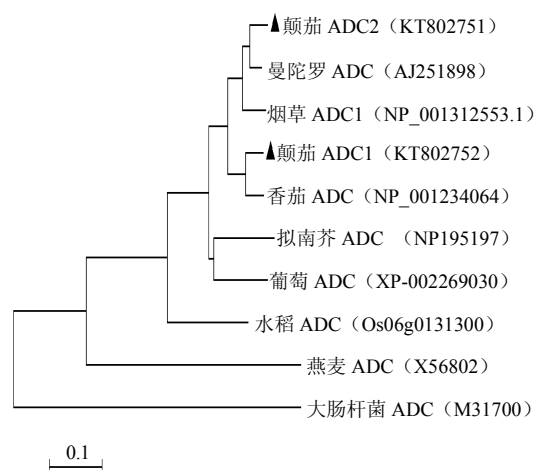


图 2 基于 MEGA4.1 软件平台用 NJ 方法构建 AbADC 分子进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of AbADC from different organisms constructed by NJ method on MEGA 4.1

将黑暗培养 1 个月的发根分别进行盐胁迫处理 (100 mmol/L NaCl) 和 4 °C 冷处理, qRT-PCR 检测结果显示,在 NaCl 处理项中相比于对照组,AbADC1 和 AbADC2 表达量在各时间点都有所降低,但无显著性的变化 (图 4)。在 4 °C 冷处理项, AbADC1 表

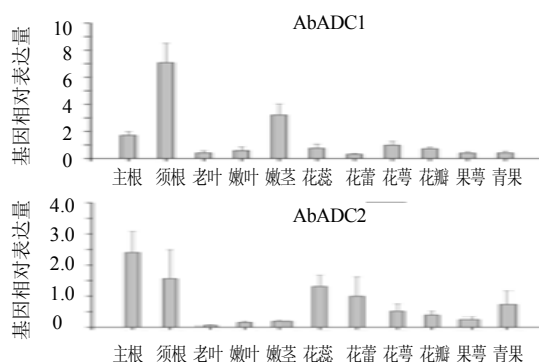


图 3 AbADC1 和 AbADC2 在不同组织中的表达分析
Fig. 3 Tissue-expression analyses of AbADC1 and AbADC2 using real-time PCR

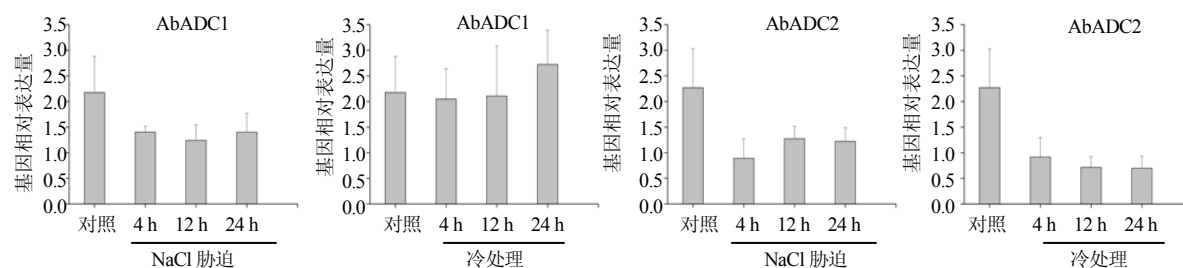


图 4 不同处理下 AbADC1 和 AbADC2 基因表达

Fig. 4 Expression of AbADC1 and AbADC2 in hair roots with different treatments

达量基本无变化; AbADC2 在 4、12、24 h 3 个时间点的基因表达量都显著的降低 (图 4)。

4 讨论

ADC 是多胺合成途径上的一个关键酶,其催化产物腐胺也是尼古丁和托品烷类生物碱生物合成的前体物质。本实验采用 RACE 技术获得了颠茄中的 2 个 ADC 基因 AbADC1 和 AbADC2,蛋白质结构域分析表明 AbADC 属于磷酸吡哆醛依赖性酶 (PLPDE) 家族 III 型 PLPDE 亚家族成员,具有 2 个保守结构,ADC 家族 2 磷酸吡哆醛结合位点和 ADC 家族 2 标记 2 序列,这 2 个保守的功能域在所有原核和真核生物中普遍存在。

组织表达谱显示 AbADC1 主要在须根中表达, AbADC2 主要在主根中表达, AbADC1 和 AbADC2 在茎和叶片中的表达量都较低,这与已经报道^[7]的其他物种中同源基因的表达模式并不相同。在棉花中,ADC 在叶片组织中的表达量远远高于根部和茎

部,且在所检测的 3 个组织中根中的表达量最低^[7];在桃树中,ADC 在根和老叶中表达量最低而在嫩枝和幼嫩叶片中的表达高于花和茎^[9];在拟南芥中,AtADC1 为组成性表达,AtADC1 仅在莲座叶和角果中表达,并对多种非生物胁迫有响应^[12];在芥菜中,ADC 主要在根和茎中表达,在叶片中几乎不表达^[13]。托品烷类生物碱主要在根部合成,预示着颠茄 ADC 与生物碱的合成有一定的关系,也说明同源蛋白间组织表达的差异,可能与其参与的功能相关。

许多植物的 ADC 表达量会受不同诱导因素的影响,本研究中,仅 AbADC2 在冷处理后表达量出现下调,在盐胁迫下均略有降低; AbADC1 的表达量在 2 种处理中均无显著变化,这与该基因在黄瓜^[14]、森林草莓^[15]、拟南芥^[16]和芥菜^[13]等植物中的表达情况并不相同。在低温处理的黄瓜幼苗中,ADC 活性有一定的提高。冷、盐胁迫后的森林草莓中,FvADC 表

达量均出现上调。拟南芥 ADC1 在受到盐胁迫后基因表达量显著提高,而 ADC2 并无明显变化。同样,受盐胁迫后的芥菜中,ADC3 表达量也显著提高,但是 ADC1 和 ADC2 表达量并无变化。根据本实验的结果,AbADC2 是低温胁迫响应基因,而 AbADC1 和 AbADC2 都不是盐胁迫响应基因,推测颠茄中可能还存在另外一条或多条 ADC 基因,其表达受盐胁迫响应。此外,AbADC1 和 AbADC2 是否对颠茄中生物碱的合成有重要影响还有待进一步研究。在后期的工作中,将分别构建 AbADC 的超表达和干扰载体,并导入颠茄获得转基因发根和植株,在代谢水平上进一步研究 AbADC 的功能及其对 TAs 生物合成的影响。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] Kanegae T, Kajiya H, Amano Y, *et al.* Species-dependent expression of the hyoscyamine 6-beta-hydroxylase Gene in the Pericycle [J]. *Plant Physiol*, 1994, 105(2): 483-490.
- [3] Oksman-Caldentey K M, Arroo R. Regulation of tropane alkaloid metabolism in plants and plant cell cultures [A]/Verpoorte R, Alfermann A W. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism* [M]. Kluwer: Dordrecht, 2000.
- [4] Jaber-Vazdekis N, Barres M L, Ravelo A G, *et al.* Effects of elicitors on tropane alkaloids and gene expression in atropa baetica transgenic hairy roots [J]. *J Nat Prod*, 2008, 71: 2026-2031.
- [5] Saowarath J, Heidi K, Delphine C, *et al.* Structural modeling and environmental regulation of arginine decarboxylase in *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Archiv Microbiol*, 2006, 184: 397-406.
- [6] Sandmeier E, Hale T I, Christen P. Multiple evolutionary origin of pyridoxal-5-phosphate-dependent aminoacid decarboxylases [J]. *Eur J Biochem*, 1994, 221(3): 997-1002.
- [7] 李亚栋, 默辉娟, 王省芬, 等. 棉花精氨酸脱羧酶基因 GhADC1 克隆与表达分析 [J]. 棉花学报, 2013, 25(4): 291-299.
- [8] 洪林, 闫晓红, 袁亚宾, 等. 甘蓝型油菜 BnADC 基因的克隆及原核表达 [J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(1): 8-15.
- [9] Liu J H, Yusuke B, Wen X P, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of an arginine decarboxylase gene from peach (*Prunus persica*) [J]. *Gene*, 2009, 429: 10-17.
- [10] Hummel I, Gouesbet G, Amrani A E, *et al.* Characterization of the two arginine decarboxylase (polyamine biosynthesis) paralogues of the endemic subantarctic cruciferous species *Pringlea antiscorbutica* and analysis of their differential expression during development and response to environmental stress [J]. *Gene*, 2004, 342: 199-209.
- [11] Akiyama T, Jin S. Molecular cloning and characterization of an arginine decarboxylase gene up-regulated by chilling stress in rice seedlings [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 64: 645-654.
- [12] Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, *et al.* Characterization of Arabidopsis genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages [J]. *Plant Cell Environ*, 2003, 26(11): 1917-1926.
- [13] Mo H, Pua E C. Up-regulation of arginine decarboxylase gene expression and accumulation of polyamines in mustard (*Brassica juncea*) in response to stress [J]. *Physiol Plant*, 2002, 114(3): 439-449.
- [14] Shen W Y, Kazuyoshi N, Shoji T. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of Cucumber cultivars [J]. *Plant Physiol*, 2000, 124(1): 431-439.
- [15] 王静, 赵密珍, 王壮伟, 等. 森林草莓精氨酸脱羧酶基因的电子克隆与序列分析 [J]. 江苏农业学报, 2011, 27(3): 628-633.
- [16] Urano K, Yoshiba Y, Nanjo T, *et al.* Arabidopsis stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 2004, 313: 369-375.