

铁皮石斛中性/碱性转化酶(DoNI2)基因的克隆和表达分析

苗小荣^{1,2}, 牛俊奇², 莫昭展², 何龙飞¹, 王爱勤^{1*}

1. 广西大学农学院, 广西 南宁 530005

2. 玉林师范学院生物与制药学院, 广西 玉林 537000

摘要:目的 克隆珍稀濒危兰科药用植物铁皮石斛中性/碱性转化酶(alkaline/neutral invertase, NI)家族基因成员, 并对其定量表达以及生物信息学分析。方法 采用转录组测序和 RACE 技术相结合克隆 NI 基因的 cDNA 序列, 利用生物信息学工具对其进行分析, 并采用实时荧光定量 PCR 方法检测 NI 基因在铁皮石斛根、茎和叶中的表达情况。结果 克隆获得 1 个新的铁皮石斛 NI 基因, 命名为 DoNI2 (GenBank 登录号 KY794404), 全长 2 397 bp, 开放阅读框(ORF)为 1 836 bp, 编码 611 个氨基酸。DoNI2 蛋白预测的理论相对分子质量和等电点分别为 69 050 和 6.38, 不稳定系数为 42.95, 疏水性系数为 -0.232。DoNI2 基因在铁皮石斛根、茎和叶中均有表达, 其中在茎中表达量最高, 根中最低。不同生长年限茎中 DoNI2 基因表达量与 NI 酶活性呈显著正相关。结论 克隆了线粒体型的 DoNI2 基因的全长 cDNA 序列, 为进一步阐明该基因在铁皮石斛蔗糖代谢途径中的重要作用奠定基础。

关键词: 铁皮石斛; 中性/碱性转化酶; 基因克隆; 基因表达; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3659-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.027

Cloning and expression analysis of a novel alkaline/neutral invertase (DoNI2) gene in *Dendrobium officinale*

MIAO Xiao-rong^{1,2}, NIU Jun-qi², MO Zhao-zhan², HE Long-fei¹, WANG Ai-qin¹

1. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China

2. College of Biology and Pharmacy, Yulin Normal University, Yulin 537000, China

Abstract: Objective To clone novel member of alkaline/neutral invertase (NI) gene in a rare and endangered medicinal plant of *Dendrobium officinale*, conduct bioinformatic analysis and detect the quantitative expression in different organs. **Methods** Primers were designed according to NI gene segment which was selected from leaf transcriptome sequencing results of *D. officinale*. The full-length cDNA of NI gene was cloned via homology-based cloning and rapid amplification of cDNA ends (RACE) approach. The physical and chemical properties, secondary structure and tertiary structure of NI protein were forecasted and analyzed using related software. The expression levels of NI gene in roots, stems, and leaves of *D. officinale* were detected using real-time PCR. **Results** A novel gene encoding a NI protein was cloned from *D. officinale*. This gene (named as DoNI2, GenBank accession number: KY794404) had a total length of 2 397 bp with an open reading frame of 1 836 bp, and encoded a predicted polypeptide of 611 amino acids with a molecular weight of 69 050. Bioinformatics predicted that the isoelectric point of DoNI2 gene encoding protein was 6.38, the instability coefficient was 44.95, and the hydrophobic coefficient was -0.232. RT-PCR showed that DoNI2 gene expressed in all organs with highest expression level in stems and the lowest in roots. DoNI2 gene expression was significantly positively correlation with NI enzymatic activities at different growth years of *D. officinale*. **Conclusion** The full length cDNA sequence in a mitochondrial DoNI2 gene was identified, facilitating future functional analysis of the gene involving in the regulation of sugar metabolism in *D. officinale*. **Key words:** *Dendrobium officinale* Kimura et Migo; alkaline/neutral invertase; gene cloning; gene expression; qRT-PCR

铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo 价值, 而且具有滋阴补肾、生津益胃、润肺止咳等是兰科石斛属多年生附生草本植物, 不仅具有观赏功效, 被称为“中华九大仙草”之首, 已被录入《中

收稿日期: 2018-01-12

基金项目: 国家高新技术研究发展计划(“863”计划)(2013AA102604); 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 1298001-3-1); 广西省南宁市重点研发项目(20162094)

作者简介: 苗小荣(1983—), 女, 河南汤阴人, 在读硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。Tel: 18503922559 E-mail: miaomiao3218@163.com

***通信作者:** 王爱勤(1966—), 女, 广西上思人, 硕士生导师, 教授, 研究方向为植物分子生物学。Tel: (0771)3237917 E-mail: waqing1966@126.com

国药典》2015 年版。石斛属植物主要药效成分为多糖、生物碱、糖苷、萜类、联苳类和氨基酸等，其中多糖是其主要药理活性物质之一，也是目前评价铁皮石斛品质的主要指标^[1]。现代药理研究发现，石斛多糖具有显著的调节机体免疫力、抗氧化、降血糖、抗肿瘤和抗白内障等作用。目前，已分离纯化得到了 8 种石斛多糖，分别为 DT2、DT3、黑节草多糖 I、黑节草多糖 II、黑节草多糖 III、DOPP-1-A1、DCPP3c-1、DCPP1a-1，都属于水溶性多糖，水解产物主要有葡萄糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖等，其中葡萄糖含量最高，为 64.7%^[2]。

石斛体内多糖积累过程受多糖合成途径相关酶活性的调节，其具体合成途径目前还不清楚，而蔗糖是多糖合成前体物质，它只有分解为葡萄糖和果糖，才能进入下游各种代谢途径，因此研究蔗糖代谢相关酶活性是研究铁皮石斛多糖积累的重要组成部分。蔗糖合成酶(SS)、蔗糖磷酸合成酶(SPS)和转化酶(INV)是与蔗糖代谢密切相关的 3 种酶，其中转化酶不仅参与植物的生长发育、形态建成等的重要的生理过程，而且在蔗糖的转运、贮藏和分配以及作物经济产量形成与果实品质改良中发挥重要作用^[3]。INV 依据亚细胞定位、溶解性和最适 pH 值的不同可分为 3 种类型：细胞壁结合转化酶(CIN)、可溶性酸性转化酶(SAI)和中性/碱性转化酶(NI)^[4]。CIN 位于细胞壁，是质外体韧皮部蔗糖卸载通道的关键酶。SAI 主要存在于液泡中，该酶活性与植物幼嫩组织的快速生长和贮藏器官的迅速膨大相关^[5]。NI 主要存在于细胞质，高活性的 NI 能增强蔗糖的水解，从而提高葡萄糖和果糖的浓度，以满足植物代谢中对己糖的需要^[6]。

NI 能不可逆地催化蔗糖分解成葡萄糖和果糖，在植物生长发育和应对环境胁迫中起重要作用。迄今已经从杨树^[7]、水稻^[8]和木薯^[9]等植物中克隆到多个 NI 家族基因，而在铁皮石斛中目前仅克隆到 1 个 DoNI1 基因，研究发现该基因与 NI 酶活性和石斛多糖积累密切相关^[10]。本研究通过对铁皮石斛转录组数据库进行筛选，从中筛选到 1 个新的 NI 基因核苷酸序列，通过设计特异引物，采用 RACE 技术克隆其全长 cDNA 序列。同时采用生物信息学方法对该序列进行了同源性分析，预测了其编码蛋白的理化性质，并通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术对铁皮石斛不同部分进行表达分析，为后续进一步研究该基因在铁皮石斛蔗糖代谢途径中作用

和调控机制奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

铁皮石斛取自玉林师范学院生物与制药学院桂东南特色植物繁育基地，经玉林师范学院莫昭展教授鉴定为铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura et Migo。以 1 年生铁皮石斛幼嫩叶片 cDNA 为材料进行基因克隆。分别取 1 年生的铁皮石斛根、茎和叶，以及 1~3 年生铁皮石斛的茎为材料。液氮速冻后，用于 RNA 提取的材料置-80 °C 保存，用于酶活性测定的材料置于-20 °C 保存。

1.2 试剂

RNA 提取 Trizol 试剂盒购于天根生化科技(北京)有限公司；5'-RACE 试剂盒购于 Invitrogen 公司；RNA 反转录试剂盒、Ex Taq 酶、dNTPs、pMD18-T 载体、PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Eraser、Genome Walking Kit、SYBR Premix Ex Tap II 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。本实验所用特异引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。实时荧光定量 PCR 采用 ABI Stepone Plus 型荧光定量 PCR 仪测定。

2 方法

2.1 RNA 提取和 cDNA 合成

以铁皮石斛幼嫩叶为材料提取总 RNA，RNA 提取采用天根 Trizol-A⁺提取液，具体提取过程参照 Trizol 试剂盒说明书。利用琼脂糖凝胶电泳检测总 RNA 完整性，利用 Thermo Scientific Nanodrop 2000c 检测总 RNA 浓度及纯度。反转录按照 ReverAid First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书反转录成 cDNA 第一链。

2.2 铁皮石斛 NI 基因 5'-RACE 克隆

从转录组数据库中筛选出的 NI 基因核苷酸序列为 1 685 bp，经序列分析，发现尚缺少 5'和 3'片段序列。因而以 NI 基因中间核苷酸序列为模板，设计 2 条特异下游引物 SYR1 和 SYR2 (表 1)，与 5'-RACE 试剂盒提供上游引物 Outer Primer 和 Inner Primer 进行 5'端序列 PCR 扩增。扩增体系为 25 μL (下同): Ex Taq 酶 0.25 μL、2×GC Buffer II 12.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μL、10 mmol/L 上下游引物各 1 μL，模板 cDNA 1 μL 和 ddH₂O 7.75 μL。

按照 5'-RACE 试剂盒说明书的方法合成的 cDNA 为模板，做巢式 PCR 扩增：以外引物 SYR1 和 Outer Primer 进行第 1 轮 PCR 扩增。PCR 反应体

系: 94 °C、5 min; 94 °C、50 s, 58 °C、30 s, 72 °C、2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。取第 1 轮 PCR 产物 2 μL, 以内引物 SYR2 和 Inner Primer 进行第 2 轮 PCR 扩增。PCR 反应体系: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1.30 min, 35 个循环; 72 °C、10 min。PCR 产物经胶回收纯化后克隆到 T 载体, 转入感受态细胞 DH5α 中, 经菌液 PCR 检测正确后送深圳华大测序。

表 1 引物名称及序列
Table 1 Sequence of primers

引物用途	引物名称	引物序列 (5'-3')
5'-RACE	SYR1	CGTCACCACCGACTTCTTCAACA
	SYR2	CGAGGAAATCAGGTCGGTATGA
3'-RACE	XYF1	TTTGCTTGGTAATCTCTGGGCCA
	XYF2	TTCCAAACATGGACTATCGCTGG
	XYR1	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
	GZS	GGCCACGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTT TTTTT
ORF 序列	TF1	ATGAATGCAACGAGCTCGATGCG
	TR1	TTAGATTAGAATCTGAGATTAG
qRT-PCR	TF2	TGACGAATGGCGCATAATAA
	TR2	GCCTTCCCATCTTAATGCAA

2.3 铁皮石斛 NI 基因 3'-RACE 克隆

依据 NI 基因中间片段的核苷酸序列, 设计用于 3'端扩增的 2 条特异上游引物 XYF1 和 XYF2(表 1)。以提取的铁皮石斛叶总 RNA 为模板, 按照 ReverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书, 以 GZS 核苷酸序列(表 1)作为反转录引物, 反转录合成 cDNA 第一链。用 XYF1 和 XYR1(表 1)引物进行第 1 轮 PCR 扩增, PCR 产物稀释 20 倍后作为引物 XYF2 和 XYR1 的模板, 进行第 2 轮 PCR 扩增。PCR 反应程序: 94 °C、5 min; 94 °C、50 s, 58 °C、30 s, 72 °C、1.30 min, 35 个循环; 72 °C、10 min。产物经胶回收纯化后克隆到 T 载体并测序。

2.4 铁皮石斛 NI 全长 cDNA 拼接验证

将 NI 基因中间片段与“2.2”项和“2.3”项中所克隆的 2 个序列, 利用软件 ContigExpress 进行拼接, 获得了 NI 基因的全长 cDNA 序列。在预测的编码区设计一对引物 TF1 和 TR1(表 1), 对 3 部分拼接结果进行 PCR 扩增验证。PCR 扩增程序: 94 °C、5 min; 94 °C、50 s, 58.5 °C、30 s, 72 °C、

2 min, 35 个循环; 72 °C、10 min。

2.5 生物信息学分析

利用 <http://web.expasy.org/protparam> 分析编码蛋白的氨基酸组成、理论相对分子质量和等电点; 利用 http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html 分析跨膜结构; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP> 分析蛋白的亚细胞定位; 利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP> 分析蛋白质信号肽; 利用 http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan 分析蛋白的活性位点; 利用 Vector NTI Advance 11.0 进行基因氨基酸序列同源性比对分析; 利用 MEGA6.0 软件构建基因系统进化树。

2.6 基因表达分析和酶活性测定

根据拼接后 NI 基因全长 cDNA 序列设计用于 qRT-PCR 的引物 TF2 和 TR2(表 1)。以持家基因 Actin 为内参基因, 引物序列参照蒋园等^[11]的方法。利用荧光染料法进行实时荧光定量表达分析, 反应参数: 95 °C、30 s, 1 个循环; 95 °C、5 s, 60 °C、20 s, 共 45 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据, 分析基因的相对表达量。同时, 采用高俊凤等^[12]的方法测定铁皮石斛茎中的 NI 酶活性。

采用 Excel 2007 进行数据处理, 并利用 SPSS 15.0 软件进行显著性和相关性分析。

3 结果与分析

3.1 铁皮石斛 DoNI2 基因的克隆

5'-RACE 和 3'-RACE PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测分别如图 1-A、B 所示, 经华大测序 5'片段的 PCR 产物长度为 285 bp, 3'片段扩增产物为 548 bp。利用 ContigExpress 软件将 5'片段、中间片段和 3'片段的核苷酸序列拼接后, 获得了 NI

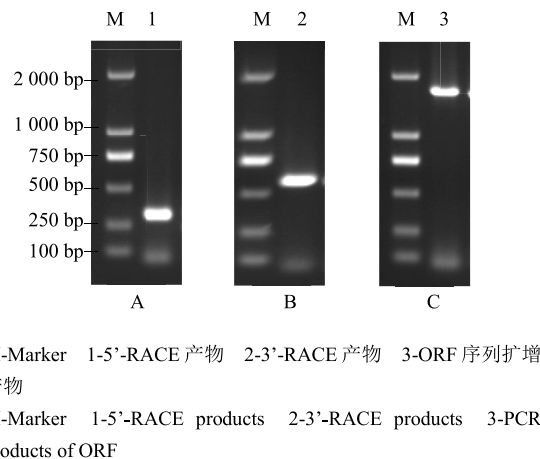


图 1 DoNI2 基因序列扩增结果

Fig. 1 PCR products of DoNI2 gene from *D. officinalis*

基因全长 cDNA 序列, 全长 2 397 bp, 包括 1 个 1 836 bp (在 142~1 977 bp 间) 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 611 个氨基酸。其中 5' 非编码区和 3' 非编码区长度分别为 141 bp 和 420 bp, 并带有真核生物典型的 polyA 尾巴 (图 2)。编码区引物 TF1 和 TR1 PCR 扩增产物 (图 1-C), 测序结果为 1 836 bp, 与拼接结果的编码区核苷酸序列大小相符, 二者核苷酸序列同源率为 99.9%, 说明拼接结果正确。该基因核苷酸序列与油棕、海枣

和小果野芭蕉的中性/碱性转化酶基因核苷酸序列同源性较高, 分别为 81%、81% 和 79%, 说明本研究克隆到的是铁皮石斛中性/碱性转化酶基因。该基因与已报道的铁皮石斛 NI1 (KP742351) 的核苷酸序列的同源性为 57%, 说明本研究克隆的是 1 个新的铁皮石斛中性/碱性转化酶家族基因。参照 Gao 等^[10]对铁皮石斛中性/碱性转化酶基因的命名方法, 将其命名为 DoNI2。该基因已在 GenBank 数据库注册, 其登录号为 KY794404。

```

1                                     CACGGAGCAAGATTTTCTCCGCGTTTACGCCAATTTT
40 CTGAACCTCTGTGTTTCCGCTTGATTCTCTCACGAAACGCTCTCGAATTTTCCCTTACAGCTAAAAATTAACCATCTATTGCTTTTCGATCCTCTTGTC
142 ATGAATGCAACGAGCTCGATGCGCATGCGACCATGAGGCCCTGCTTCCGTTCTCTTACGCTCCGGCCAGGCCGCCGCGCATTGCCCTTCCCAAAATACCCC
    M N A T S S M R I A T M R P C F R F L F S S G Q A A A I A F P K Y P      34
244 TTTCTGTTCCTCAAAATGCCCTCATACCGACGTATTCTCTCGGCCCTCTGCCTCGCGCGGAGAGAAGCCGCGCTGGTGAGGCGGTGGCCGCTGCACGGTCT
    F L F P K C P H T D L I S S A S A S R R R E A A L V R A V A G A R S      68
346 ATGGGACGCTCGCGGAGCCGATCATCAGCGGGGAGAAGGCTTTCGATCGGATCTATGAGCAGGGGCTCGCGGAAAGCCGATCGTGATCGAGAGGGTGAA
    M G T S A E P I I S G E K A F D R I Y E Q G L A G K P I V I E R V E      102
448 CCCGGGCCAGGGCCGAGGTGGAGAAGAAGAGGTGGCTAGTGGGAGGCATGAAACGGAGGAGGAGAAGGAGCGTGAGATTGTTGAAGAAGTCGGTG
    P G P G P E V E K K E E V A S G R H E T E E E K E A W R L L K K S V      136
550 GTGACGTATTGCGGACTCCGGTGGGAACGGTGGCGGCCGACGATCCGGTGAATGGAGGGCAGATGCTTAATTACGATCAGGTTTTATTAGGATTTCGTG
    V T Y C G T P V G T V A A D D P V N G G Q M L N Y D Q V F I R D F V      170
652 CCCTCAGCGCTGGCTTTTCTACTCAAGGGGAGACGGAGATTGTCAAGAAATTTCTACTGCACACGTTGCAATTGCAGAGCTGGGAAAGACTGTGTACTGC
    P S A L A F L L K G E T E I V R N F L L H T L Q L Q S W E K T V D C      204
754 TACAGCCCTGGGCAAGGATTGATGCCCCGACGTTTAAAGGTCGAACCTGCCTTTGAGTGATGACAAGGAAGCATACGAGGAGGTTCTTGATCCTGATTTT
    Y S P G Q G L M P A S F K V R T L P L S D D K E A Y E E V L D P D F      238
856 GGTGAGTCGGCATTGGACGTGTAGCCCGGTTGATTCTGGATTGTGGTGATCATTTTGCTGAGAGCTTATGGAAAGATCTCTGAGACTATGCATTGCAG
    G E S A I G R V A P V D S G L W W I I L L R A Y G K I S G D Y A L Q      272
958 GAACGTGTGATGTGCAACAGGGATCAGACTCATCTTGAATTTATGTTTAAACAGATGGCTTTGACATGTTTCCAACCTCTCTGGTAACTGATGGCTCTTGC
    E R V D V Q T G I R L I L N L C L T D G F D M F P T L L V T D G S C      306
1 060 ATGATAGATAGAAGATGGGCATCCATGGCCATCCTCTTGAATCCAATCTTTGTTCTACTCAGCTTTACGGTGCTCCCGTGAAATGATCACTCCTAATGAA
    M I D R R M G I H G H P L E I Q S L F Y S A L R C S R E M I T P N E      340
1 162 GGGTCCAAGAACTAATTCATGCCATCAATAATCGGCTCAGTGCATTATCATTTACATAAGAGAGTATTATTGGGTGGACATGAATAAGATTAATGAGATT
    G S K K L I H A I N N R L S A L S F H I R E Y Y W V D M N K I N E I      374
1 264 TATCGATATAAGACAGAAGAGTACTCATATGATGCTGCAACAGTTCAATATATATCTTGAACAGATTCTTCATGGCTAGTGAATTGGATTCTGATAAA
    Y R Y K T E E Y S Y D A A N K F N I Y P E Q I P S W L V N W I P D K      408
1 366 GGAGGCTATCTTATTGGAACGTGCAGCTGCTCATATGGATTTCAGGTTCTTTTGCTTGGTAATCTCTGGGCCATAACTTCATCCTTAACACACCTTGG
    G G Y L I G N V Q P A H M D F R F F L L G N L W A I T S S L T T P W      442
1 468 CAAGCTGAGGCGATCCTCAATCTTATAGAGACAATGGGATGATCTTGTGGGAAATATGCCTCTAAAGATATGTTACCCTGCATTGGAGAATGACGAATGG
    Q A E G I L N L I E D K W D D L V G N M P L K I C Y P A L E N D E W      476
1 570 CGCATAATAACCGAAGTGATCCAAGAACTCCTTGGTCAATCATAATGGGGGATCTTGGCCTACTCTTTTGTGGCAGTTACCTTGGCTTGCATTAAG
    R I I T G S D P K N T P W S Y H N G G S W P T L L W Q F T L A C I K      510
1 672 ATGGGAAGGCCTGAGTTAGCCAGAAAAGCCGTTGCAGTTGCAGAGAAGAGACTTCAAAGGACAAATGGCCGAGTACTATGACACCAGAACTGGCAGGTTT
    M G R P E L A R K A V A V A E K R L S K D K W P E Y Y D T R T G R F      544
1 774 ATTGGAAGCAGTCACGGCTGTTCAAACATGGACTATCGTGGTTACTTGACCTCAAAATGCTTTTGGAAAGGCCAGAATTGTGCTCCATCCTCACCTGT
    I G K Q S R L F Q T W T I A G Y L T S K M L L E R P E L C S I L T C      578
1 876 GAAGAAGACCTTGAACCTTCTCGAGGGCTGTTCTCTGTAGCCTAAAGAAGAACGCAAGAACAGGTGCTCCCGCCCTGCTGCTAAATCTCAGATTCTAATCTAA
    E E D L E L L E G C S C S L K K N A R T R C S R P A A K S Q I L I *      612
1 978 CTGCAATTAAGAACTCATCACTTCAATTCATATACTTGTATATAAGAAATAATTATGTGAAGGAATCAGAAAAATAAGAAAGATGGAATACTTGTCTGC
2 080 ATGGAAGTGAAGTTTGATTCATTGCTCCACTCGATACGAAGCTGCAAGCTCATTATTTAGTTGAGCTGCGACTTGATGGGTTTCCAATTGGGTGGATGGTT
2 182 CTTATTAGAAATTTTTATTCTTATTTATTAGAGTCTTTAGATGTTTGTGAAGTACATATGTGGGAAGGAAATCATGTATAACAACAAATTTCTTGCTTC
2 284 TATTCTCTAGAACTGAGGATAGAACTTTATCTCTTGTATATGTAAGTGCCTTTATGGAATCAAGAATCCCTTAATTCAGAAATCTGAAAAATGAAAAA
2 386 AAAAAAAAAA

```

图 2 DoNI2 的 cDNA 序列及预测的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequences and deduced amino acid sequences of DoNI2 gene

3.2 DoNI2 基因的生物信息学分析

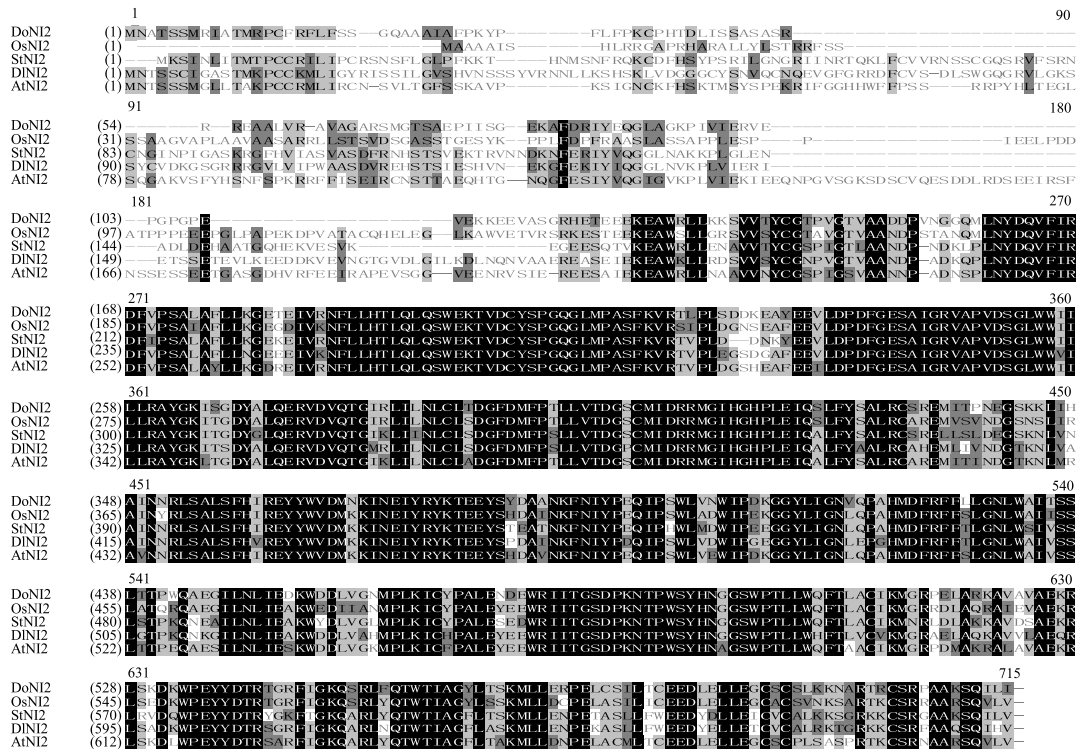
利用 ProtParam 对 DoNI2 蛋白的理化性质进行分析, 预测该蛋白质理论相对分子质量为 69 050, 等电点 (pI) 6.38, 分子式为 $C_{3106}H_{4838}N_{830}O_{895}S_{29}$, 平均亲水性为 -0.232, 可能为亲水性蛋白, 不稳定系数为 42.95。利用 <http://smart.embl-heidelberg.de> 分析 DoNI2 蛋白在 128~570 aa 具有植物中性/碱性转化酶基因保守结构域 Pfam: Invertase_neut, 属于糖基水解酶家族 (glycosyl hydrolase family 100, GH100)。用 TMHMM Server v.2.0 预测该蛋白不含跨膜结构。Target P1.1 在线软件预测该蛋白的亚细胞定位最可能定位于线粒体, 其可能性为 0.495, 而定位于叶绿体和细胞质的可能性分别为 0.101 和 0.019。

用 Motif Scan Results 进行蛋白活性位点分析, 结果显示该蛋白有 1 个 N 糖基化位点: 2~5 aa; 5 个酪蛋白激酶位点: 71~74 aa、122~125 aa、337~340 aa、480~483 aa 和 577~580 aa; 7 个豆蔻酰基化位点: 23~28 aa、141~146 aa、156~161 aa、210~215 aa、429~434 aa、495~500 aa 和 587~592 aa; 10 个蛋白激酶 C 磷酸化位点: 6~8 aa、11~13 aa、52~54 aa、117~119 aa、215~217 aa、342~344 aa、

541~543 aa、562~564 aa 和 591~593 aa; 3 个酪氨酸激酶磷酸化位点: 81~87 aa、370~377 aa 和 378~384 aa。在线利用 <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html> 对 DoNI2 编码蛋白的三级结构进行预测, 结果显示含有 18 个 α -螺旋、7 个 β -折叠、24 处无规则卷曲, 其中 α -螺旋占 48%、 β -折叠占 6%、无规则卷曲占 21% 和延伸链占 25%。

3.3 DoNI2 与其他 NI 氨基酸序列的比对分析

在 NCBI 网站上运用 Protein blast 对 DoNI2 进行氨基酸同源性比对分析, 该蛋白与水稻 *Oryza sativa* L. (XP015632948)、马铃薯 *Solanum tuberosum* L. (XP006344790)、龙眼 *Dimocarpus longa* Lour. (AJW82915)、拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. (XP002891983) 等植物 NI 氨基酸序列的同源性较高, 分别为 84%、74%、72% 和 72%。将 DoNI2 与以上 4 个物种 NI 进行氨基酸序列多重比对分析 (图 3), 结果表明 DoNI2 蛋白与其他物种 NI 蛋白存在很高的保守性, 其中在 5' 端保守性较低, 在不同物种间差异明显。而在保守结构域 Pfam: Invertase_neut 氨基酸序列保守性很高, 但不同物种间也存在差异。



DoNI2-铁皮石斛 OsNI2-水稻 StNI2-马铃薯 DINI2-龙眼 AtNI2-拟南芥
DoNI2-Dendrobium officinale OsNI2-Oryza sativa StNI2-Solanum tuberosum DINI2-Dimocarpus longa AtNI2-Arabidopsis thaliana

图 3 DoNI2 氨基酸序列与其他物种同源氨基酸序列多重比对

Fig. 3 Alignment of deduced DoNI2 amino acid sequences and its homologous amino acid sequences

3.4 NI 氨基酸序列的系统进化分析

利用 MEGA7.0 软件将来自 NCBI GenBank 数据库中的油棕 *Elaeis guineensis* Jacq. (6 个)、海枣 *Phoenix dactylifera* L. (6 个)、水稻 (6 个) 和拟南芥 (5 个) 和铁皮石斛 (2 个) NI 蛋白进行系统进化分析 (图 4), 结果显示 NI 蛋白可以分为 3 个亚家族: I 类属于线粒

体型、II 类属于质体型和 III 类属于胞质型。DoNI2 蛋白首先与单子叶棕榈科油棕属油棕 (XP010941514) 聚类, 其次与棕榈科刺葵属海枣 (XP008794511) 和水稻聚类, 最后与拟南芥聚类, 在进化分支上属于 I 类, 可能存在于线粒体中。而 DoNI1 (KP742351) 属于 III 类胞质型, 可能存在于细胞质内。

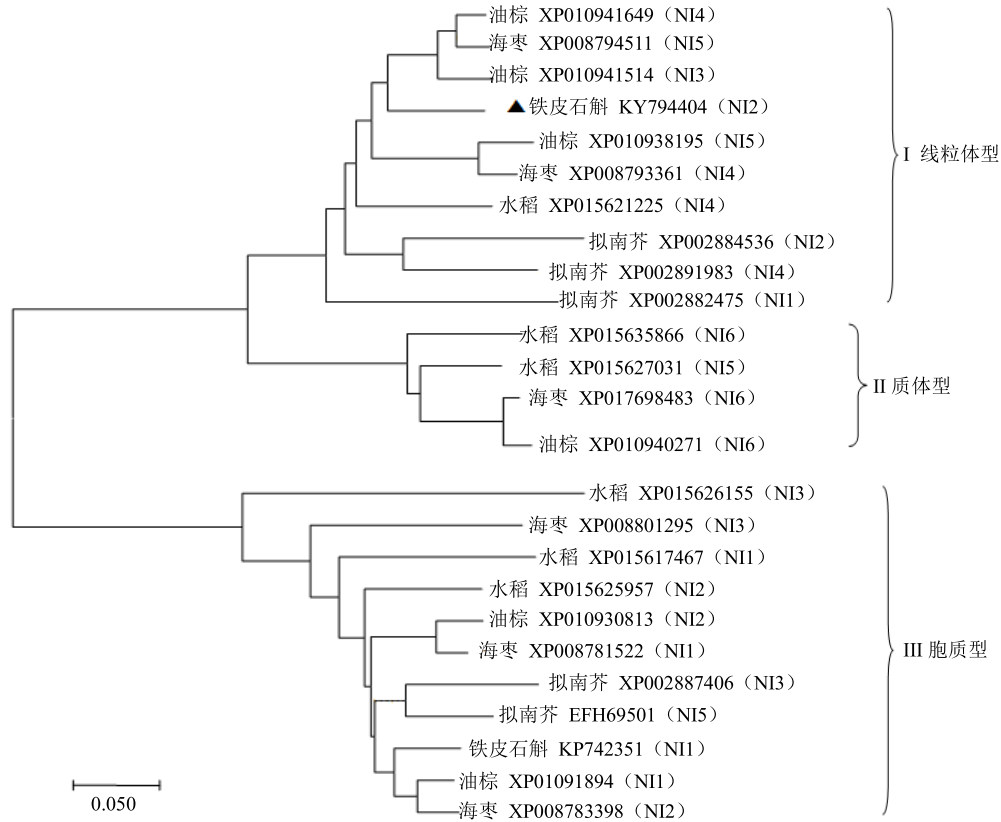


图 4 DoNI2 氨基酸序列 NJ 系统进化树

Fig. 4 Neighbor-joining dendrogram of DoNI2 amino acid sequences in *D. officinale* and other species

3.5 DoNI2 基因在不同组织中的表达分析

荧光定量 PCR 结果表明, DoNI2 基因在铁皮石斛根、茎和叶中均有表达, 在茎中基因表达量最高, 其次是叶中, 在根中的基因表达量最低 (图 5)。该基因在茎中基因表达量是叶中的 1.52 倍, 根中的 1.87 倍。

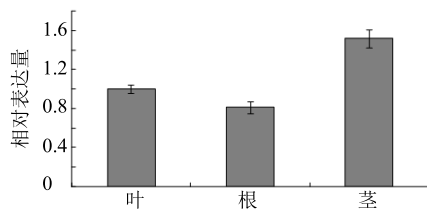


图 5 铁皮石斛不同部位 DoNI2 基因的表达分析

Fig. 5 Relative quantity of DoNI2 gene in different organs of *D. officinale*

3.6 不同生长年限茎中基因表达量与 NI 酶活性分析

1~3 年生铁皮石斛植株中, DoNI2 基因在 1 年生茎中基因表达量最高, 其次是 3 年生茎中, 而在 2 年生茎中基因表达量最低 (图 6)。在 1 年生茎中 DoNI2 基因表达量是 2 年生茎中的 1.6 倍, 是 3 年生茎中的 1.21 倍。

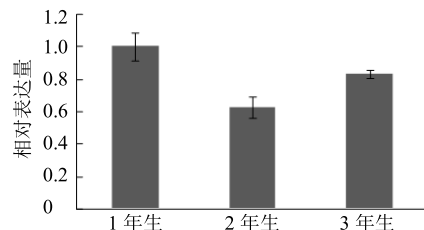


图 6 不同生长年限铁皮石斛茎中 DoNI2 基因的表达分析

Fig. 6 Relative quantity of DoNI2 gene in stems at different growth years of *D. officinale*

NI 酶活性在 1~3 年生铁皮石斛茎中变化趋势呈现为 1 年生茎>3 年生茎>2 年生茎 (图 7), 在 1 年生茎中 NI 酶活性分别是 2 年生和 3 年生茎中的 1.76 倍和 1.43 倍。其中在 1 年生茎中 NI 酶活性与 2 年生茎中酶活性差异达到显著水平 ($P<0.05$), 而与 3 年生茎中 NI 酶活性差异不显著。相关性分析表明, 茎中 DoNI2 基因的表达量与 NI 酶活性呈显著正相关, 相关系数为 0.978。

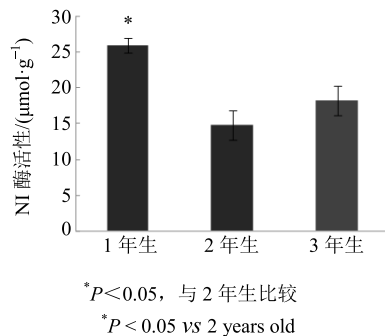


图 7 铁皮石斛不同生长年限茎中 NI 酶活性分析

Fig. 7 NI enzymatic activity in stems at different growth years of *D. officinale*

4 讨论

早期对酸性转化酶的研究比较多, 而由于 NI 酶活性较低, 且在提取过程中容易失活, 因此认为它们仅是在酸性转化酶活性低时, 维持蔗糖降解基础水平的酶。近年来对 NI 的研究不断增多, 全基因组分析显示在杨树^[7]、水稻^[8]和木薯^[9]等植物中 NI 基因的数目都超过酸性转化酶基因数目, 研究证实 NI 在一些大量需求单糖或己糖的生物过程中, 如在产能和生物合成中发挥重要作用^[13]。本研究将 NI 蛋白家族分为 I 类线粒体型、II 类质体型和 III 类胞质型, 这与前人 NI 酶主要存在于细胞质中, 但近年来在线粒体和叶绿体中也发现其存在相一致^[14]。

随着核苷酸测序技术的不断发展, 植物转录组成为一个新的研究热点。基于高通量转录组数据的分析研究, 将有助于获得新的功能基因, 为种质资源鉴定、保存、扩大与优良种质选育提供分子基础。本研究在铁皮石斛转录组测序分析结果的基础上, 采用 RACE 技术克隆获得一个新的 NI 基因, 聚类分析表明 DoNI2 属于线粒体型, 这与 Target P1.1 预测结果一致, 该酶可能在线粒体中起作用。前人研究表明位于线粒体中 NI 酶与其膜上蔗糖转运蛋白酶活性密切相关, 在调节细胞渗透压和中间产物

代谢方面起着重要作用^[15]。敲除拟南芥叶绿体 A/N-InvE 基因, 叶片中 A/N-InvE 基因表达量降低, 淀粉积累量减少, 推测 A/N-InvE 基因可能参与叶绿体和线粒体之间的碳循环调节^[16]。然而, 本研究所报道的 DoNI2 在酶学水平上, 具体属于中性还是碱性转化酶, 最佳 pH 值是多少? 底物特异性如何? 还需要进一步研究。

NI 基因突变体表型为短根、开花延迟、部分不育, 说明该基因在调节植物生长和生殖发育方面具有重要作用^[17-18]。本研究表明 DoNI2 基因在 1 年生铁皮石斛茎中的表达量最大, 在 3 年生铁皮石斛的不同生长年限的茎中该基因的表达量与 NI 酶活性呈正相关, 这与 Gao 等^[10]的研究结果一致。本研究后续将利用 RNAi 或过量表达技术研究 DoNI2 基因在铁皮石斛蔗糖代谢中的生物学功能, 为通过遗传工程手段改良铁皮石斛种质奠定基础。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 胡贤春, 郭永兵, 向劲松, 等. 铁皮石斛多糖的研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2015, 43(15): 78-80.
- [3] Ren X, Zhang J. Research progresses on the key enzymes involved in sucrose metabolism in maize [J]. *Carbohydrate Res*, 2013, 368(10): 29-34.
- [4] 蓝基贤, 唐朝荣. 高等植物中转化酶生理生化特性的研究进展 [J]. 热带物学报, 2012, 33(9): 1702-1707.
- [5] Tian H, Kong Q G, Feng Q, et al. Cloning and characterization of a soluble acid invertase-encoding gene from muskmelon [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(3): 611-617.
- [6] Bachar D, Fei W, Peng T, et al. *Ptra/NINV*, an alkaline/neutral invertase gene of *Poncirus trifoliata*, confers enhanced tolerance to multiple abiotic stresses by modulating ROS levels and maintaining photosynthetic efficiency [J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16(1): 76-84.
- [7] Bock P N, Morse A M, Dervinis C, et al. Evolution and diversity of invertase genes in *Populus trichocarpa* [J]. *Planta*, 2008, 227(3): 565-576.
- [8] Ji X, Ende W V D, Laere A V, et al. Structure, evolution, and expression of the two invertase gene families of Rice [J]. *J Mol Evol*, 2005, 60(5): 615-634.
- [9] Liu S, Lan J, Zhou B, et al. HbNIN2, a cytosolic alkaline/neutral-invertase, is responsible for sucrose catabolism in rubber-producing laticifers of *Hevea brasiliensis* (para rubber tree) [J]. *New Phytol*, 2015, 206(2): 709-725.
- [10] Gao F, Cao X F, Si J P, et al. Characterization of the alkaline/neutral invertase gene in *Dendrobium officinale*

- and its relationship with polysaccharide accumulation [J]. *Genet Mol Res Gmr*, 2016, 15(2): 1-8.
- [11] 蒋园, 朱玉球, 高燕会, 等. 铁皮石斛 WRKY5 基因的克隆与表达分析 [J]. 中草药, 2016, 47(2): 301-308.
- [12] 高俊凤. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [13] Yao Y, Geng M T, Wu X H, *et al.* Genome-wide identification, expression, and activity analysis of alkaline/neutral invertase gene family from Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2014, 33(2): 1-12.
- [14] Murayama S J, Handa H. Genes for alkaline/neutral invertase in rice: alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids [J]. *Planta*, 2007, 225(5): 1193-1203.
- [15] Szarka A, Horemans N, Passarella S, *et al.* Demonstration of an intramitochondrial invertase activity and the corresponding sugar transporters of the inner mitochondrial membrane in *Jerusalem Artichoke* (*Helianthus tuberosus* L.) tubers [J]. *Planta*, 2008, 228(5): 765-775.
- [16] Vargas W A, Pontis H G, Salerno G. New insights on sucrose metabolism: evidence for an active A/N-Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the intracellular carbon trafficking [J]. *Planta*, 2008, 227(4): 795-807.
- [17] Jia L Q, Zhang B T, Mao C Z, *et al.* OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Planta*, 2008, 228(1): 51-59.
- [18] Yao S G, Kodama R, Wang H, *et al.* Analysis of the rice SHORT-ROOT5 gene revealed functional diversification of plant neutral/alkaline invertase family [J]. *Plant Sci*, 2009, 176(5): 627-634.