

文章编号:1674-7054(2011)02-0107-06

# 受乙烯诱导表达的蜻蜓凤梨 *MAPKK* 基因的克隆与序列分析

张 鲲<sup>1,2</sup> 徐 立<sup>2</sup> 丛汉卿<sup>1,2</sup> 丁 静<sup>1,2</sup> 郝宏刚<sup>1,2</sup> 李志英<sup>2,3</sup>

(1. 海南大学 农学院, 海南 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 海南 儋州 571737; 3. 农业部热带作物种质资源利用重点开放实验室/海南省热带作物种质资源遗传改良与创新重点实验室, 海南 儋州, 571737)

**摘 要:** 利用抑制性差减杂交文库筛选到的 1 个被乙烯诱导并与已知植物促丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase kinase, *MAPKK*; MKK) 同源的 cDNA 片段, 通过 RACE 技术得到该基因的全长 cDNA 序列。生物信息学分析表明, 该基因属于植物 *MAPKK* 的 A 亚族, 具有植物 *MAPKK* 的磷酸化一致序列 S/T\* \* \* \* S/T。利用半定量 RT-PCR 检测该基因的表达量在乙烯处理后增强, 推测其在乙烯诱导途径中起重要作用。

**关键词:** 乙烯; 蜻蜓凤梨; *AtMKK1*; 克隆

中图分类号: Q 78; S 682.39

文献标志码: A

乙烯 (ethylene) 作为一种重要的植物激素, 可以引起植物广泛的生理效应及形态建成, 如种子萌发、偏上生长、器官衰老与脱落、果实成熟、对环境胁迫反应等。调控果实后熟、促进衰老和器官脱落的多种酶和伤害诱导的防御反应蛋白的基因都含有受乙烯调控的启动元件<sup>[1]</sup>。观赏凤梨是多年生常绿草本花卉, 单子叶被子植物, 栽培种中除少数种类可食用外, 多数用于观赏。由于观赏凤梨营养生长期较长, 一般采用乙烯及类似物人工诱导其开花, 如对凤梨科果子蔓属 (*Guzmania*) 的植物进行乙烯利处理  $\rho = 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  至少 6 h 可使开花率达到 100%<sup>[2]</sup>。乙烯诱导凤梨开花效果明显, 但机理尚不清楚。本实验着力阐明乙烯在诱导观赏凤梨开花过程中的机理, 以期更科学地指导发展凤梨产业。在初期工作中, 笔者利用 SSH 差减杂交文库的构建、测序及功能注释, 筛选出 205 个与应答乙烯诱导的基因片段进行后续研究, 其中一个片段与拟南芥中 *AtMKK1* 基因同源性较高。*MAPK* 基因家族参与众多的信号转导途径, 在乙烯信号转导途径中, 负调控因子 *CTR1* 是植物中发现的 *MAPKK* 基因的一种, 暗示了 *MAPK* 级联参与了乙烯信号转导过程<sup>[3-4]</sup>。最近有研究表明 *MAPK* 级联反应参与内源乙烯的合成<sup>[5]</sup>。本实验利用 RACE 技术得到此基因的全长, 用相关生物信息学进行了分析, 并做了相关处理的表达水平分析, 为进一步研究其功能奠定了基础。

## 1 材料与方法

1.1 材料 蜻蜓凤梨 (*Aechmea fasciata*) 取自中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所实验基地。选取长势良好, 具有 20 片叶以上的植株。

1.2 试剂和分子克隆试剂盒 *rTaq* 酶、*LA Taq* 酶, T4 连接酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司; pGem-T

收稿日期: 2011-05-03

基金项目: 海南省自然科学基金项目 (808191); 中国热带农业科学院博士启动基金项目 (Pzsb0806, Rkyy0604); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目 (PZS004)

作者简介: 张鲲 (1987-), 男, 山东济南人, 海南大学农学院农业生物技术专业 2008 级硕士研究生。

通信作者: 李志英 (1971-), 女, 中国热带农业科学院品种资源研究所副研究员。E-mail: xllizhiying@vip.163.com.

Easy Vector 购自 promega 公司; SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit ,Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 RNA 提取及检测** 用  $\rho = 560 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙烯利 5 mL 灌心处理蜻蜓凤梨, 1 d 后倒净, 并用清水冲洗。取处理后 6 h 的凤梨茎尖, 用液氮研磨材料, CTAB 法提取凤梨茎尖总 RNA。用核酸/蛋白分析仪检测 RNA 样品的浓度和质量, 并在  $\varphi = 1\%$  的甲醛 - MOPS 变性胶上分离总 RNA, 得到 2 条清晰的带, 28S rRNA 与 18S rRNA 条带亮度接近 2:1, 说明总 RNA 完整。

**1.2.2 基因全长获取** 根据对 SSH 文库中基因片段的筛选, 得到 1 个可被乙烯诱导, 与 *AtMPKK1* 同源的 cDNA 片段。设计引物以获得其全长。根据 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 的要求分别制备 5' - RACE 模板和 3' - RACE 模板, 设计巢式 PCR 引物进行 5' - RACE 和 3' - RACE 巢式 PCR, 分别得到该基因的 5' 和 3' 端。其中 5' - RACE 引物为: P1: ( GCGGAGGTTGATCAACGACAG ) P2: ( TTGTCCGAGATC-CTTTCTGG ); 3' - RACE 引物为 P3: ( AGGTGATTGGAAAGGGTAGTG ) P4: ( ATAAGTGACATTTGGAGCCT-GG )。琼脂糖凝胶检测后, 进行凝胶回收, 产物连接到 pGem-T Easy Vector, 经蓝白斑筛选, PCR 测序后, 送 inveren 公司测序, 并通过拼接得到该基因的理论全长。

根据拼接后获得的序列信息设计引物对 M-F: ( CAGAGTACGCGGGGATCTA ); M-R: ( TATACAAACGT-TATTATTAGCATAAT )。使用 TAKARA 公司的 LA *Taq* 酶进行 PCR ( 94 °C 变性 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min 为 1 个反应循环, 重复 37 次; 72 °C 延伸 10 min ), 同上胶回收、转化质粒、PCR 验证后, 由 inveren 公司测序, 得到了该基因的 cDNA 全长。

**1.2.3 生物信息学分析** 将克隆得到的序列与 NCBI 已提交的该基因同源系列进行序列比对, 用 Clustal X 程序进行进化树分析, 利用 Plantcare ( <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/> ) 进行启动子分析, 用 ExPASy 的 ProtParam 工具预测其编码蛋白质的等电点及相对分子质量。

**1.2.4 乙烯诱导不同时间的基因表达及组织特异性分析** 选取长势良好, 发育完全且大小一致 ( 具 20 片叶以上 ) 的蜻蜓凤梨植株, 用  $\rho = 560 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的乙烯利 5 mL 灌心处理, 1 d 后倒净, 并用清水冲洗。取处理不同时间的植株茎尖, CTAB 法提取总 RNA 并定量, 反转录获得 cDNA 第 1 链, 设计引物对 RT-F: ( AGGTGATTGGAAAGGGTAGTG ) RT-R: ( TAAACCCAGGCTCCAAATGTC ), 利用 TaKaRa 的 *rTaq* 酶进行 PCR 扩增,  $\mu = 1\%$  的琼脂糖电泳检测, 以凤梨  $\beta$ -Actin 基因 ( 来源于建库测序片段, 与菠萝  $\beta$ -Actin 基因同源性 99% )。Act-F: ATCCTCCAATCCAGACACTGT; Act-R: TCAGTGGTCGTACAACCTGGTA) 作为内标。

## 2 结果与分析

**2.1 总 RNA 的提取** 使用 CTAB 法提取蜻蜓凤梨的总 RNA, 结果见图 1, 28S 与 18S 条带明显, 效果理想, 能满足下一步实验所需。

### 2.2 蜻蜓凤梨 MAPKK 基因的获取

**2.2.1 5' - RACE 的扩增** 按照说明书制备 5' - RACE 模板, 以 P1/UPM, P2/NUP ( UPM, NUP 均为试剂盒提供的接头引物 ) 引物对分别为两轮巢式 PCR 的引物, 以制备好的 5' - RACE 模板为 PCR 反应的模板进行巢式 PCR,  $\mu = 1\%$  的琼脂糖凝胶电泳, 获得了 5' - RACE 条带, 经测序, 片段实际长度为 1 048 bp ( 见图 2 a )。

**2.2.2 3' - RACE 的扩增** 按照说明书制备 3' - RACE 模板, 以 P3/UPM, P4/NUP 引物对分别为两轮巢式 PCR 的引物, 以制备好的 3' - RACE 模板为 PCR 反应的模板进行巢式 PCR,  $\mu = 1\%$  的琼脂糖凝胶电泳, 获得了 3' - RACE 条带, 经测序, 片段实际长度为 796 bp ( 见图 2 b )。

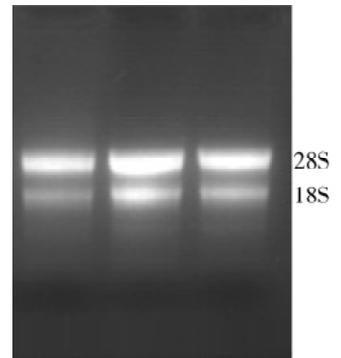


图 1 蜻蜓凤梨心叶总 RNA 的变性琼脂糖凝胶检测

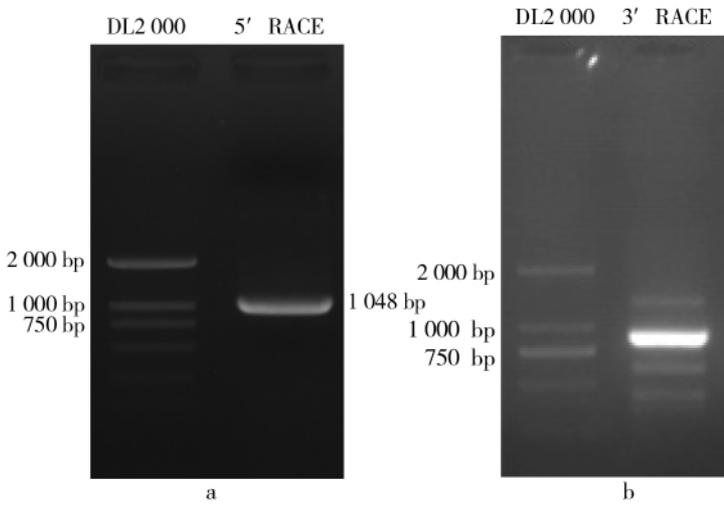


图 2 5'-RACE(a) 与 3'-RACE(b) 扩增电泳

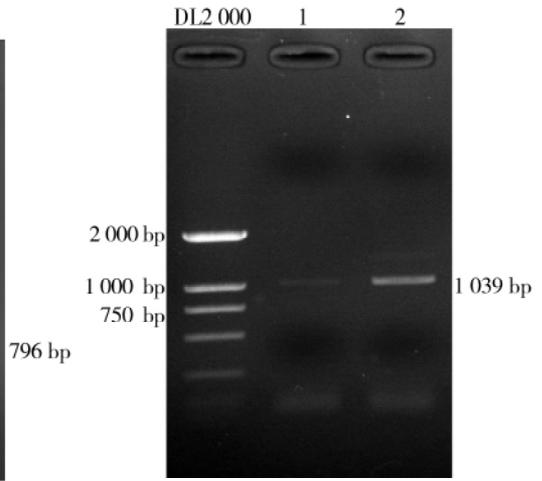


图 3 AfMKK1 基因 ORF 区琼脂糖凝胶电泳

**2.2.3 全长 cDNA 的获得** RACE 反应中, 反转录产物 5' 和 3' 末端完整, 引物设计合理, 所获得扩增片段特异, 大小与预期吻合, 结果良好。通过 5'-RACE 和 3'-RACE 反应, 获得了该基因的 5' 末端序列和 3' 末端序列, 经过与之前已知片段的比对拼接, 获得了该基因 cDNA 的完整序列。根据拼接获得的序列信息设计全长引物, 对该基因的全序列及 ORF 进行扩增。利用提取的总 RNA 反转录产物作为模板, 以设计的引物 M-F, M-R 进行 PCR 扩增,  $\mu = 1\%$  的琼脂糖凝胶电泳分析, 在预期位置获得了特异条带, 经测序确认, 该条带即为目的基因的扩增产物(见图 3), 暂命名该基因为 *AfMAPKK1* (*AfMKK1*)。根据扩增所得的 ORF 序列, 进行后续的分析。

**2.3 AfMKK1 基因的序列与分析** 克隆到的蜻蜓凤梨 *MAPKK* 基因全长 1 868 bp, 编码 342 个氨基酸, 利用 ProtParam 预测其等电点 pI6.00, 相对分子质量为  $38 \times 10^3$ 。图 4 边框中的部分是 *AfMKK1* 蛋白活化环 (activation loop) 中的保守的天冬氨酸和赖氨酸残基 -D(L/IV)K- 以及植物 *MAPKK* 的磷酸化一致序列 S/T\*\*\*\*S/T。利用 BLAST 比对发现 *AfMKK1* 基因属于 *MAPKK* 家族 A 亚家族<sup>[6]</sup>, 与拟南芥中 A 亚家族 *AtMKK1* 和 *AtMKK6* 的同源性较高, 利用 Clustal W2 将 *AfMKK1* 与拟南芥 *MAPKK* 家族以及部分已知植物的 *MAPKK* 基因的氨基酸序列进行进化树分析, 其中选取的同源比对序列来自 GeneBank: *AtMKK1* (*Arabidopsis thaliana*, AAC72754); *SlMKK* (*Solanum lycopersicum*, CAA04261); *NtMKK* (*Nicotiana tabacum*, AAF67262.1); *OsMKK* (*Oryza sativa*, ABP88102) 结果见图 5。

1	M	R	P	N	L	L	I	S	P	P	A	H	E	D	A	I	G	R	F	L
21	T	Q	S	G	T	F	K	H	G	D	L	L	V	N	K	D	G	L	R	I
41	V	S	H	S	E	E	A	E	P	P	L	I	T	P	S	D	N	Q	L	S
61	L	A	D	L	D	A	V	K	V	I	G	K	G	S	E	G	I	V	Q	L
81	V	R	H	K	W	T	G	Q	F	F	A	L	K	V	I	Q	L	N	I	Q
101	E	S	V	R	K	Q	I	A	Q	E	L	K	I	S	L	S	T	Q	C	P
121	Y	V	V	V	C	Y	Q	S	Y	Y	D	N	G	V	I	S	I	V	L	E
141	Y	M	G	G	G	S	L	A	D	F	L	K	K	V	K	T	I	P	E	P
161	Y	L	A	A	I	C	K	Q	V	L	K	G	L	M	Y	L	Y	H	E	K
181	R	I	I	H	R	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	P	S	N	I	L	I	N	H	R	G	E	V
201	K	I	S	D	F	G	V	S	A	I	I	A	S	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>T</b>
221	F	I	G	T	Y	N	Y	M	S	P	E	R	I	S	G	Q	K	H	G	Y
241	I	S	D	I	W	S	L	G	L	V	M	L	E	C	A	T	G	Q	F	P
261	Y	P	P	R	E	S	F	Y	E	L	L	E	A	V	V	D	Q	P	P	P
281	F	A	P	P	D	Q	F	S	E	Q	F	C	S	F	I	S	D	C	V	Q
301	K	N	A	T	D	R	K	S	A	Q	V	L	L	T	H	P	F	L	S	L
321	Y	D	D	I	N	V	D	L	A	S	Y	F	T	T	A	G	S	P	L	A
341	T	F	*																	

图 4 蜻蜓凤梨 AfMKK1 基因编码的氨基酸全长序列

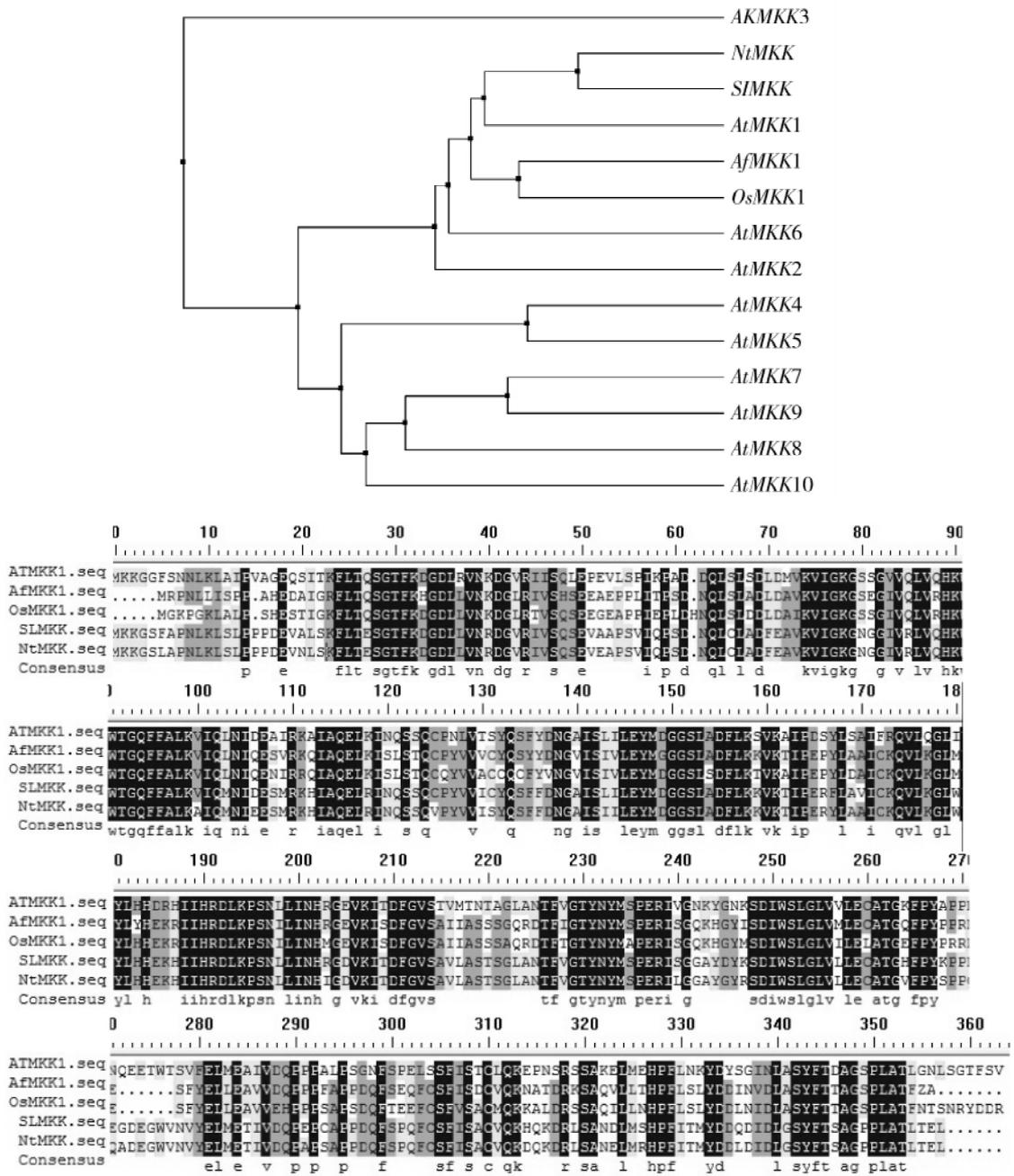
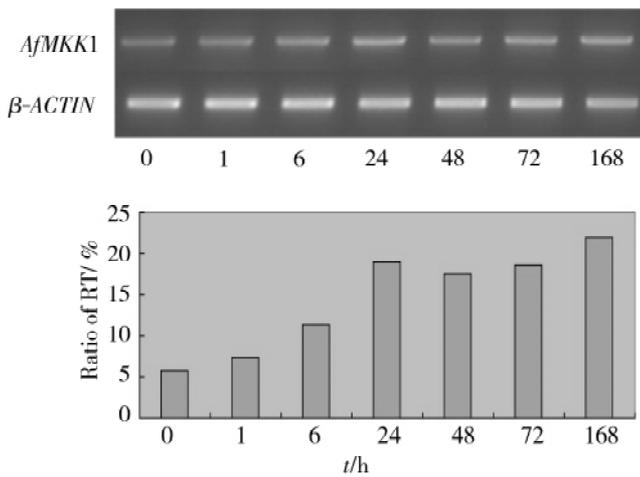
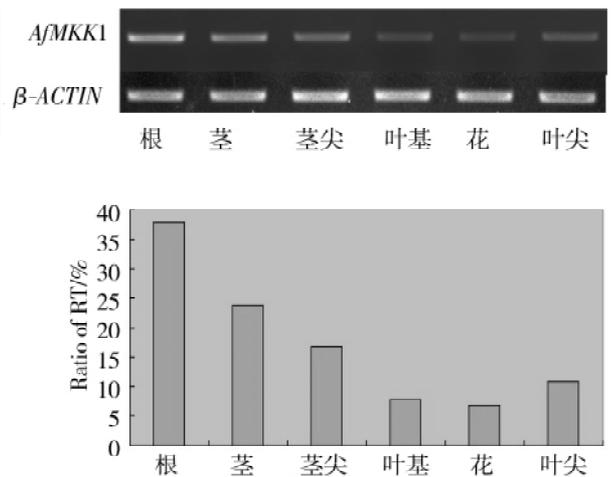


图5 *AfMCK1* 基因氨基酸序列与不同植物同源序列的比对及进化树

### 2.4 乙烯诱导 *AfMCK1* mRNA 水平变化

检测了  $\rho = 560 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  乙烯利处理凤梨后 1 周内 *AfMCK1* 转录水平变化, 利用 Quantity One 软件计算电泳条带平均灰度 结合条带面积, 将其转化为总光密度(OD)后 根据 *AfMCK1* 和 Actin 的总光密度值的比值对 RT 结果进行量化, 发现在加入乙烯后 *AfMCK1* 基因 mRNA 水平升高, 到 168 h 时达到最高值(见图 6)。

2.5 *AfMCK1* 基因表达的组织特异性 检测了  $\rho = 560 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  乙烯利处理凤梨后 6 h *AfMCK1* 在不同组织的表达量水平, 利用 Quantity One 软件计算电泳条带平均灰度 结合条带面积, 将其转化为总光密度(OD)后 根据 *AfMCK1* 和 Actin 的总光密度值的比值对 RT 结果进行量化, 发现 *AfMCK1* 基因在根中的表达量最高, 在花中最低(见图 7)。

图 6 乙烯处理后 *AfMCK1* 基因的表达变化图 7 *AfMCK1* 基因表达的组织特异性

### 3 讨 论

*MAPK* 级联反应在植物响应生物与非生物胁迫,以及植物激素和细胞周期的信号转导中起重要作用<sup>[7-8]</sup>。其途径为 *MAPKKK-MAPKK-MAPK*,通过逐级磷酸化将信号级联放大。*MAPK* 有众多磷酸化底物,如转录因子、蛋白激酶、细胞骨架结合蛋白等等。通过对克隆到的凤梨 *MAPKK* 基因进行生物信息学分析,发现在其存在保守的天冬氨酸和赖氨酸残基 -D(L/IV)K-以及植物 *MAPKK* 的磷酸化一致序列 S/T\* \* \* \* S/T<sup>[9]</sup>,暂命名为 *AfMCK1*。与拟南芥等模式植物 *MAPKK* 基因的同源比对,进化树分析确定了克隆到的凤梨 *AfMCK1* 基因属于 A 亚族。在拟南芥中 *MAPKK* 家族 A 亚族可由多种非生物胁迫诱导,参与介导触发子引起的信号转导<sup>[10]</sup>。所以,推测分离到的凤梨 *AfMCK1* 基因在凤梨中也具有相似的功能。*MAPK* 级联反应参与调控乙烯信号转导过程。在拟南芥中,乙烯信号转导途径中第 1 个负调控因子 *CTR1* 是 *MAPKKK* 的一种,这暗示了 *MAPK* 级联反应参与了乙烯信号的传递过程。有研究表明,乙烯信号途径关键因子 *EIN3*,受 *MAPK3/6* 激酶直接的磷酸化调控<sup>[11-12]</sup>。同时,研究发现存在途径 *MAPKK4/5*,*MAPKK9-MAPK3/6-ACS2/6*-乙烯合成,表明 *MAPK* 途径参与内源乙烯的合成,间接调控乙烯信号转导途径<sup>[13]</sup>。RT-PCR 显示在施用外源乙烯(乙烯利)灌心处理凤梨植株后短时间 *AfMCK1* 表达量即大幅度上调,说明同拟南芥一样,凤梨中 *MAPK* 信号途径对乙烯信号的响应很迅速,可能参与了凤梨中内源乙烯合成或乙烯信号转导过程。凤梨科植物的开花可受乙烯及替代物诱导,乙烯作为一种重要的植物激素,在凤梨中的作用更是与众不同。乙烯信号转导和花发育的启动在凤梨成株中被偶联在一起,而对在乙烯合成和信号传递中起重要作用的 *MAPK* 级联反应的深入研究有助于进一步探究凤梨乙烯催花的整个过程。本实验利用 RACE 技术首次在蜻蜓凤梨中克隆到 *MAPKK* 基因家族成员之一,暂命名为 *AfMCK1*,并利用半定量 RT-PCR 验证了其受乙烯信号激活的特性,为进一步验证其参与的途径与在信号转导中的功能奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] B BLEECKER, HANS KENDE. ETHYLENE: A Gaseous SignalMolecule in Plants [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000, 16: 1-18.
- [2] DUKOVSKI DANIJELA, BEMATZKY ROBERT, HAN SUSAN, et al. Flowering induction of *Guzmania* by ethylene [J]. *Scientia Horticulturae* 2006, 110(1): 104-108.
- [3] KIEBER J J, ROTHENBERG M, ROMAN G, et al. *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases [J]. *Cell* 1993, 72: 427-441.
- [4] FINDELL J L, KIEBER J J, SCHALLER G E. Localization of the Raf-like kinase *CTR1* to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes [J]. *J Biol Chem* 2003, 278: 34725-34732.

- [5] YOO S D , CHO Y H , TENA G , et al. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> signalling [J]. Nature 2008 ,451: 789 – 795.
- [6] LOUIS-PHILIPPE Hamel ,MARIE-CLAUDE Nicolel ,SOMRUDEE Sritubtim ,et al. Ancient signals: comparative genomics of plant *MAPK* and *MAPKK* gene families [J]. TRENDS in Plant Science 2006 ,11( 4) : 192 – 198.
- [7] NAKAGAMI H , PITZSCHKE A , HIRT H. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling [J]. Trends Plant Sci , 2005 , 10: 339 – 346.
- [8] MISHRA N S , TUTEJA R , TUTEJA N. Signaling through MAP kinase networks in plants [J]. Arch Biochem Biophys , 2006 , 452: 55 – 68.
- [9] MAPK GROUP. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature [J]. Trends Plant Sci , 2002 , 7: 301 – 308.
- [10] CARDINALE F ,MESKIENE I ,OUAKED F. Convergence and divergence of stress induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases [J]. Plant Cell , 2002 ,14: 703 – 711.
- [11] FENGYING An , QIONG Zhao , YUSE Ji , et al. Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in Arabidopsis [J]. Plant Cell 2010 22( 7) : 2384 – 2401.
- [12] CHEN H , XUE L , CHINTAMANANI S , et al. ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 expression to negatively regulate plant innate immunity in Arabidopsis [J]. Plant Cell 2009 21: 2527 – 2540.
- [13] XU J , LI Y , WANG Y , et al. Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis [J]. J Biol Chem 2008 283: 26996 – 27006.

## Cloning and Sequencing of *AfMKK1* , A Novel *MAPKK* Gene Induced by Ethylene in *Aechmea fasciata*

ZHANG Kun<sup>1 2</sup> , XU Li<sup>2</sup> , CONG Han-qing<sup>1 2</sup> , DING Jing<sup>1 2</sup> , HAO Hong-gang<sup>1 2</sup> , LI Zhi-ying<sup>2 3</sup>

( 1. College of Agriculture , Hainan University , Haikou 570228 , China;

2. Tropical crops genetic resources institute , Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences , Danzhou 571737 , China)

**Abstract:** A cDNA fragments homologue of the known plant mitogen activated protein kinase ( *MAPKK* , *MKK* , *MEK* ) was selected by the suppression subtractive hybridization ( SSH ) library , and which can be induced by ethylene , and Rapid Amplification of cDNA Ends ( RACE ) were used to obtain the full length cDNA. Bioinformatic analysis results suggested that the gene belongs to a subfamily of plant *MAPKK* with a conserved region phosphorylation consensus sequence S/T \* \* \* \* S/T. Semi-quantitative RT-PCR results indicated that the expression of this gene increased after ethylene treatment , which suggested it may play an important role in the ethylene induction pathway.

**Key words:** Ethylene; *Aechmea fasciata*; *AfMKK1*; cloning