

文章编号:1674-7054(2014)02-0111-09

甘蔗 *B12D* 基因全长 cDNA 克隆与表达分析

张玉叶, 黄宁, 肖新换, 黄珑, 苏炜华, 许莉萍, 阙友雄

(福建农林大学 农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室/国家甘蔗产业技术研发中心 福建 福州 350002)

摘要: 对甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 茎全长 cDNA 文库进行大规模测序, 获得了 *B12D* 基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *ScB12D* (GenBank Accession number: KF714497)。生物信息学分析表明, 该基因全长 771 bp, 编码 87 氨基酸 (ORF 104~367 bp); 该基因编码的蛋白无信号肽, 为亲水性非分泌型蛋白; 有 1 个 *B12D* 家族保守结构域, 二级结构为无规则卷曲; 基因定位于质膜, 参与能量代谢。同时, 甘蔗 *ScB12D* 基因在不同物种间具有一定的保守性, 在近缘植物中具有高度的保守性, 与单子叶禾本科植物玉米、粟米、高粱及水稻的同源性超过 90%, 与双子叶甘薯和山茶的同源性在 70% 左右。荧光定量 PCR 表达分析结果表明, 甘蔗 *ScB12D* 基因在根、蔗芽、茎 (包括蔗皮和蔗髓)、叶片和叶鞘等组织中组成型表达, 其中在叶鞘和根中表达量较高; 在生物胁迫黑穗病胁迫下, 该基因的表达量在所有时间段均呈下调趋势; 在非生物胁迫时, 该基因的表达受 NaCl 胁迫后表达量最高, 在 ABA 胁迫下表达量次之, 推测该基因的表达可能与甘蔗响应生物和非生物胁迫的机制有关。

关键词: 甘蔗; *B12D* 基因; 生物信息学; 荧光定量 PCR

中图分类号: S 566.1 **文献标志码:** A

Aalen 等^[1]于 1994 年, 首次在大麦中发现了 *B12D* 基因, 该基因属于 *Balem* (Barley aleurone and embryo, 大麦灌浆和胚发育) 转录表达基因中的一类。 *Balem* 基因主要分为两类, 一类基因 *Per1*, *Ole1* (以前分别称为 *B15C* 和 *B23D*) 和 *Ole2*, 另一类为 *B12D* 和 *B22E*。 *Per1*, *Ole1* 和 *Ole2* 基因的表达与胚胎晚期丰富蛋白 (late embryogenesis abundant protein, *Lea*) 基因类似^[2], 而 *B12D* 和 *B22E* 基因与大麦灌浆和胚发育有关^[3]。此后, 在拟南芥^[4]、板栗^[5]等植物中均发现了 *B12D* 基因, 但该基因编码的蛋白质的功能尚有待进一步研究。 Reuman 等的研究表明, *B12D* 基因亚细胞定位于线粒体, 参与了叶片衰老的生物进程^[6]。 *B12D* 蛋白在受到脱落酸 (abscisic acid, ABA) 胁迫^[7]和植物机械损伤^[5]时特异性表达。 鉴于 ABA 可在种子休眠、萌发、气孔关闭及干旱、低温、离子渗透等非生物胁迫应答和生物胁迫应答中起重要的调控作用^[8-9], 推测甘蔗 *B12D* 基因与其响应生物或非生物胁迫的应答机制有关。 我国甘蔗的种植面积占常年糖料作物种植面积的 85% 以上, 产糖量占食糖总产量的 92% 以上^[10]。 但干旱、洪涝、低温、霜冻、病虫害等逆境因子不仅影响甘蔗品质, 还降低甘蔗产量^[9]。 改良甘蔗品种, 提高甘蔗品种抗性是最终的解决办法。 近年来, 利用分子生物学手段, 克隆抗性关键基因, 而后在深入阐明 *B12D* 基因功能的基础上, 将该基因导入目标甘蔗品种, 定向改良该品种抗性, 已成为甘蔗品种改良的一种有效手段^[10]。 笔者以甘蔗为材料, 通过大规模测序, 从甘蔗茎全长 cDNA 文库中获得甘蔗 *B12D* 基因 cDNA 全长序列, 而后, 在生物信息学分析的基础上, 进行实时荧光定量 PCR 研究, 旨在获得 *ScB12D* 基因在各种胁迫应答中的初步信息, 为更深入地研究该基因功能、最终利用其进行甘蔗品种的定向改良提供研究基础。

收稿日期: 2014-02-19

基金项目: 国家自然科学基金 (31340060); 教育部博士点基金 (20103515120006); 福建农林大学杰出青年基金 (xjq201202)

作者简介: 张玉叶 (1990-), 女, 福建农林大学 2012 级硕士研究生, E-mail: 2072352@qq.com

通信作者: 许莉萍, 博导, 研究员, 博士, 主要从事甘蔗遗传育种与生物技术研究, E-mail: xlpmail@126.com;

阙友雄, 硕导, 副研究员, 博士, 从事甘蔗应用基因组学研究, E-mail: queyouxiong@126.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 甘蔗茎全长 cDNA 文库由本实验室提供。甘蔗品种为福农 40 和崖城 05-179, 种植在福建农林大学农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室的试验田内, 取生长 1 年的成熟甘蔗为材料。

1.1.2 试剂 PrimeScript™ RT-PCR Kit 反转录试剂盒, Gel Extraction Kit 胶回收试剂盒, SYBR R Green PCR Master Mix Kit (Roche) 均出自 TaKaRa 公司。

1.2 方法

1.2.1 植物材料处理 研究目的基因在不同组织中的表达特性时, 从田间选取 3 株健康、长势一致的崖城 05-179 植株, 整株取回。将根部的泥土洗净, 选取白色的幼根作为材料, 同时分别取甘蔗的第 7 或第 8 节的蔗芽、茎(包括蔗皮和蔗髓)叶片和叶鞘。研究目的基因受不同外源胁迫后的表达特性时, 非生物胁迫组处理组均用福农 40。从田间分别选取生长健壮、长势一致的福农 40 蔗茎, 每个不同处理和不同时间点取 3 节蔗茎做生物学重复。清水浸泡、灭菌 24 h 后, 种植于细沙中。置于光照培养箱中, 昼夜光照 12 h, 待芽长至 15 cm, 转至大棚沙培, 在塑料大棚中育苗至其长出第 4 或第 5 叶。选取长势一致的蔗苗水培 1 周, 分为对照和 8 种胁迫组。处理为: 5 mmol · L⁻¹水杨酸(salicylic acid, SA)、100 μmol · L⁻¹茉莉酸甲酯(jasmonic acid methyl ester, JA)、100 μmol · L⁻¹脱落酸(abscisic acid, ABA)、w = 25.0% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG8000)、10 mmol · L⁻¹过氧化氢(H₂O₂)、250 mmol · L⁻¹氯化钠(NaCl)、500 mmol · L⁻¹氯化铜(CuCl₂)和 500 mmol · L⁻¹氯化铬(CdCl₂), 每 1 h 喷撒叶面 1 次, 0 h 未处理的蔗叶作为对照。分别取 24 h 后各小组内 3 棵蔗苗的蔗叶作为胁迫材料。另一方面, 生物胁迫材料用崖城 05-179。从田间选取生长健壮、长势一致的崖城 05-179 的成熟蔗茎, 光照培养箱中水培致芽萌动, 黑穗病菌针刺接种处理萌发蔗芽, 孢子黑穗病菌孢子悬浮的密度为 5 × 10⁻⁵ cfu · mL⁻¹ [11], 取黑穗病菌胁迫 0, 12, 24, 48, 120, 168 h 后的甘蔗芽, 无菌水作为对照。以上所有植物材料均立即投入 -80 °C 液氮中保存。

1.2.2 甘蔗 *ScB12D* 基因序列的获得和生物信息学分析 将甘蔗茎全长 cDNA 文库进行大规模测序和生物信息学分析 [12]。而后, 挑取含有目的基因的克隆测序, 获得目的基因全长序列。利用 NCBI 的 ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) 对获得的 cDNA 序列进行开放阅读框分析及蛋白翻译。利用 ExPASy 中 ProtParam pI/Mw (http://web.expasy.org/compute_pi/)、SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)、ProtScale (<http://web.expasy.org/protscale/>)、Profun 2.2 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)、Psort (<http://www.psort.org/>)、GOR IV (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_gor4.html) 分析该基因编码蛋白的氨基酸序列与组成、亚细胞定位、跨膜区与信号肽、疏水性/亲水性、蛋白质二级结构以及功能等进行分析与预测, 同时在 Blast 上查找同源氨基酸序列用于系统进化分析。

1.2.3 甘蔗 *ScB12D* 基因的实时荧光定量 PCR 采用 Trizol 法提取福农 40 的 SA, JA, ABA, PEG, NaCl, H₂O₂, CuCl₂, CdCl₂ 和黑穗病菌胁迫处理的崖城 05-179 和对照组叶片的总 RNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA, 作为实时荧光定量 PCR 模板, 以 25S rRNA 作为内参基因 [13]。按照 SYBR R Green PCR Master Mix Kit (Roche) 说明书配置定量反应体系。荧光定量 PCR 扩增程序为: 50 °C 2 min; 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 45 个循环; 增加溶解曲线; 反应时设置 3 次技术重复。

甘蔗 *ScB12D* 基因的实时荧光定量 PCR 引物: 5' 端引物 5'-CCCGAGGTGTACCCGCTGTT-3'; 3' 端引物 5'-GCTGCCCTTCCTGCCTTGTTT-3'。

25S rRNA 基因的实时荧光定量 PCR 引物: 5' 端引物 5'-TGCTTTGCTCGGTTTATAGC-3'; 3' 端引物 5'-GCAGCCAAGCGTTCATAGC-3'。

1.3 数据处理 使用 DNAMAN 软件分析氨基酸同源性及多序列比对, 完成并构建系统进化树。在 Excel 中, 利用 2^{-ΔΔC_T} 算法 [14-15] 分析荧光定量 PCR 实验数据, 作图并计算标准误差。

2 结果与分析

2.1 甘蔗 *ScB12D* 基因的获得 在对甘蔗茎全长 cDNA 文库大规模测序的过程中, 发现了 1 个与玉米

B12D 基因(NP_001148351.1) 同源性达 99% 的表达序列标签(EST) ,找到该 EST 所对应的克隆 ,并将其完全测序 ,获得该克隆的全序列 ,把获得的该基因命名为 *ScB12D* (GenBank:KF714497) 。该序列全长 771 bp ,使用 ORF finder 分析发现 ,该基因含有 1 个 495 bp 的开放阅读框(ORF ,104 ~ 367 bp) ,编码 87 个氨基酸(图 1)。

```

1 AGCTTAGCGGAGCTGCCCTCGGCCGTCGCCCTCTCCGCTTCCCCCATCCTTCTCCGCGGT
61 CGCCGTCGCGGCCGCGTCCAGTCCGAAGAGCCTCCGACTCTGATGCCAGCCGCTGGGT
      M A S R W V
121 CCGACCCGAGGTGTACCCGCTGTTTCGCGGCATGGGCGTCGCCGTCGGCATCTGCGGGTT
      R P E V Y P L F A A M G V A V G I C G F
181 TCAGCTTCCGGAACATCACCGCAACCCGGAAGTCAGGGTAAACAAGGCAGGAAGGGC
      Q L F R N I T G N P E V R V N K A G R A
241 AGCTGGGGTGCTTGAGAATCATGAGGAGGGAGACGTTACGCGATGCATGGCCTAAGAAG
      A G V L E N H E E G R R Y A M H G L R S
301 CTTTGTGCATGACAAGACCCCTGAAATTATGCCTGCTATCAACAAGTTCCTCACTGAGCC
      F V H D K T P E I M P A I N K F F T E P
361 GAAGTGAAGCATGTTGATTGGCTGTTGATGGTTCTGCTACTAGTTGCTAATGGGGATTGT
      K *
421 ACCCTTTTCTGGCAATTCAATATGTTGTGCCGTCCATATTGGAGGACATCTTACTCTT
481 ATAAAGTACCGTATGAATGCTTGGTGATGACTTGCTATAATGATGATGGTGAATGAGTTT
541 GATCGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAACCTCGGGGGGGGGCCCGGGCCCTTTTCCCTT
601 TTGGGGGGCGAAATTCGGGGATTNAANCGAAANNNANCNTATCATATTTTTTTTCTT
661 AAGGGGGGTGAGGTACCTTGGGCGTTGAACCGAACCCCTTTTCGCCCCGGTGTATTGAA
721 TATGCTTCCCTTTGTTTGTGTTTGGCCACGTCATTTGGGTTTCGTTTC
    
```

图 1 获得的甘蔗 *ScB12D* 基因的 cDNA 全长序列及其氨基酸序列

* 终止密码子

Fig. 1 Nucleotide acid sequence and amino acid sequence of sugarcane *ScB12D* gene obtained

* stop codon

2.2 甘蔗 *ScB12D* 基因的生物信息学分析

2.2.1 甘蔗 *ScB12D* 基因编码氨基酸的一级结构预测 对甘蔗 *ScB12D* 基因编码氨基酸进行一级结构预测 ,从表 1 可知 ,该基因相对分子质量为 9.74×10^3 ,编码带正电荷碱性蛋白 ,与拟南芥中的 *B12D* 蛋白的基本信息相符^[6]。

表 1 *ScB12D* 的一级结构预测分析

Tab. 1 Primary structure analysis of *ScB12D*

一级结构特性 Primary structure characteristics	预测结果 Predicted result
编码的氨基酸数/个 Number of amino acids	87
等电点 (PI) Theoretical PI	9.74
相对分子质量 (MW) / Da Molecular weight	9 787.3
负电荷残基 (Asp + Glu) Total number of negatively charged residues	8
正电荷残基 (Arg + Lys) Total number of positively charged residues	12
分子式 Formula	$C_{439}H_{684}N_{128}O_{117}S_5$
不稳定系数 (II) Instability index	73.33
平均疏水性 (GRAVY) Grand average of hydropathicity	-0.233
脂肪系数 (AI) Aliphatic index	72.87

2.2.2 甘蔗 *ScB12D* 蛋白二级结构预测和分析 从表 2 可知 ,无规则卷曲占的比例最高 ,为 43.68 % ;其次是 α -螺旋 ,所占的比例为 36.78% ;最低的是延伸链 ,所占比例为 19.54% 。其中 α -螺旋主要集中在 35 ~ 60 氨基酸之间(图 2)。

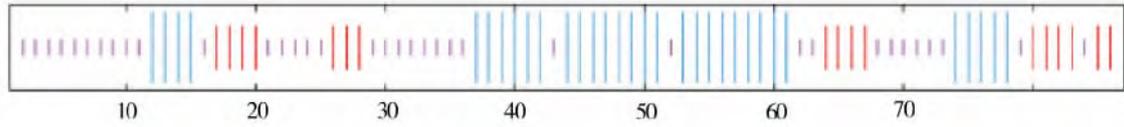


图2 甘蔗 ScB12D 蛋白二级结构预测

短竖线区:无规则卷曲;中竖线区:延伸链;长竖线区:α-螺旋

Fig. 2 Predicted secondary structure of sugarcane ScB12D protein

Short vertical bar area: random coil; moderately long vertical bar area: extended strand;

long vertical bar area: alpha helix

表2 甘蔗 ScB12D 蛋白二级结构预测分析

Tab. 2 Secondary structure prediction of sugarcane ScB12D protein

二级结构类型 Secondary structure types	氨基酸残基数目/个 Number of amino acids	百分比/% Percentage
无规则卷曲 Random coil	38	43.68
α-螺旋 Alpha helix	32	36.78
延伸链 Extended strand	17	19.54
β-螺旋 Beta turn	0	0

2.2.3 甘蔗 ScB12D 蛋白的保守结构域分析 如图5所示,甘蔗 ScB12D 蛋白包含1个保守结构域 B12D superfamily 进一步确认其序列为 B12D 基因序列。其保守结构域编码 NADH 辅酶氧化还原酶中的亚基^[16] 与研究过氧化物酶体作用相符,说明在甘蔗中 ScB12D 蛋白也有可能是过氧化物酶体蛋白的1种。

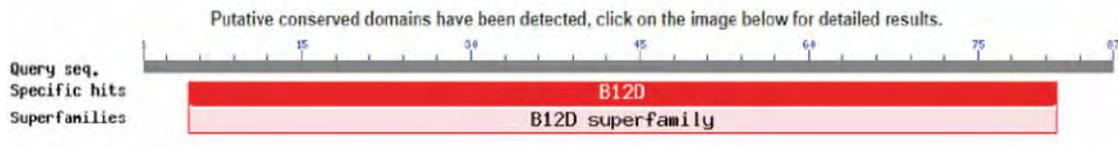


图3 甘蔗 ScB12D 蛋白的保守结构域分析

Fig. 3 Conserved domain prediction of ScB12D protein

2.2.4 甘蔗 ScB12D 蛋白信号肽预测和分析 结果如表3所示,第35位天冬氨酸残基具有最高的原始剪切位点分值0.126,第1位蛋氨酸具有最高的信号肽分值0.293,第11位酪氨酸残基具有最高的综合剪切位点分值0.166。由于最后算得氨基酸残基的加权平均值较小0.203 (<0.5),则推测 ScB12D 基因所编码的蛋白不存在信号肽,为非分泌蛋白,说明该蛋白在细胞质中合成后不能进行蛋白转运。

表3 甘蔗 ScB12D 蛋白信号肽预测

Tab. 3 Signal P-NN prediction for sugarcane ScB12D protein

指标 Measure	位点 Site	分值 Score	有无信号肽 Signal peptide
Max. C	35	0.145	
Max. Y	11	0.166	
Max. S	1	0.293	
Mean S	1-10	0.259	
D	1-10	0.203	无 No

注: C score:原始剪切位点的分值; S score:信号肽的分值; Y score:综合剪切位点的分值; S-mean :信号肽分值的平均值; D score:S mean 和 Y-max 的加权平均值

Notes: C score: scores of putative cleavage site; S score: scores of signal peptide; Y score: scores of synthesis cleavage site; S-mean: the average of the S-scores; D score: a weighted average of the S-mean and the Y-max scores

2.2.5 甘蔗 ScB12D 蛋白疏水性/亲水性的预测和分析 从图 3 可知,第 17 位具有最高分值,为 2.433,疏水性最强;第 55 位具有最低分值 -3.100,亲水性最强。GRAVY 值为 -0.233,故推测甘蔗 ScB12D 蛋白是一种亲水蛋白。

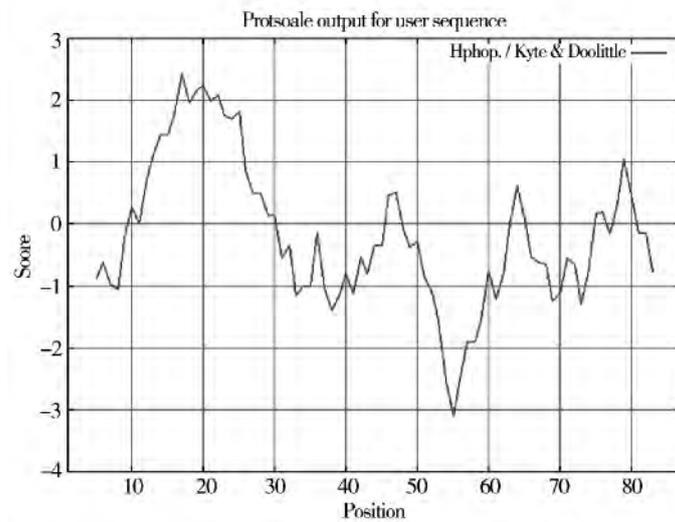


图 4 甘蔗 ScB12D 蛋白氨基酸疏水性/亲水性预测

Fig. 4 Predicted hydrophobicity/hydrophilicity of the amino acid sequence of sugarcane ScB12D protein

2.2.6 甘蔗 ScB12D 蛋白的功能预测 如表 4 所示,软件分析该蛋白的最主要功能指向为能量新陈代谢,也有一定可能性参与了翻译及脂肪酸代谢等。参与能量新陈代谢这一结果与文献 [6,16] 的研究结果相符。

表 4 甘蔗 ScB12D 蛋白功能预测

Tab. 4 Function prediction for sugarcane ScB12D protein

功能类别 Functional category	可能性 Odds
能量新陈代谢 Energy metabolism	4.172
细胞膜蛋白 Cell envelope	2.078
细胞发育 Cellular_processes	1.292
氨基酸生物合成 Amino_acid_biosynthesis	2.042
脂肪酸新陈代谢 Fatty acid metabolism	3.480
翻译 Translation	4.813

2.2.7 甘蔗 ScB12D 蛋白的亚细胞定位 从表 5 可知,甘蔗 ScB12D 蛋白可能定位于质膜中,也有可能在内质网膜中。过氧化物酶体遍存于真核生物的细胞器中,与拟南芥中 B12D 蛋白亚细胞定位于线粒体中不同,该预测结果需进一步验证。

表 5 甘蔗 ScB12D 蛋白的亚细胞定位

Tab. 5 Subcellular location of ScB12D protein

亚细胞定位 Subcellular localization	概率 Probability
质膜 Plasma membrane	0.685
内质网(膜) Endoplasmic reticulum (membrane)	0.640
高尔基体 Golgi body	0.370
微体(过氧化物酶体) Microbody (peroxisome)	0.248

2.2.8 甘蔗 ScB12D 蛋白的氨基酸同源性分析 在结果中选择玉米(*Zea mays*_gb| NP_001148351.1 |)、粟米(*Setaria italica*_gb| XP_004965125.1 |)、高粱(*Sorghum bicolor*_gb| XP_002438146.1 |)、水稻(*Oryza sativa Japonica* Group_gb| NP_001057280.1 |)、大麦(*Hordeum vulgare subsp*_gb| CAA54065.1 |)、甘薯(*Ipomoea batatas*_gb| AAD22104.1 |)和山茶(*Camellia sinensis*_gb| AEC10990.1 |)进行分析,蛋白的氨基酸序列相似性分别为 99% 99% 97% 93% 84% 74% 和 74%。

从图 5 可以看出,同属禾本科植物的甘蔗和粟米、玉米同源性最高。系统进化树显示(图 6):禾本科植物甘蔗、玉米、粟米、高粱和水稻为一大分支,甘薯和山茶单独各为一分支。因此,该基因在不同物种间具有一定的保守性,在近缘植物中具有高度的保守性。

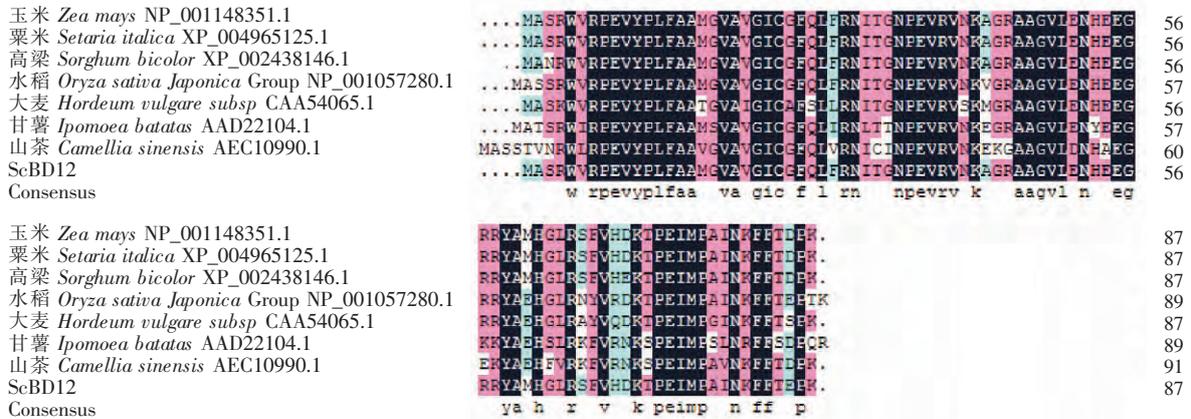


图 5 甘蔗 ScB12D 蛋白与其他植物种蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 5 Homology analysis of encoded amino acid sequences of ScB12D and those from other plant species

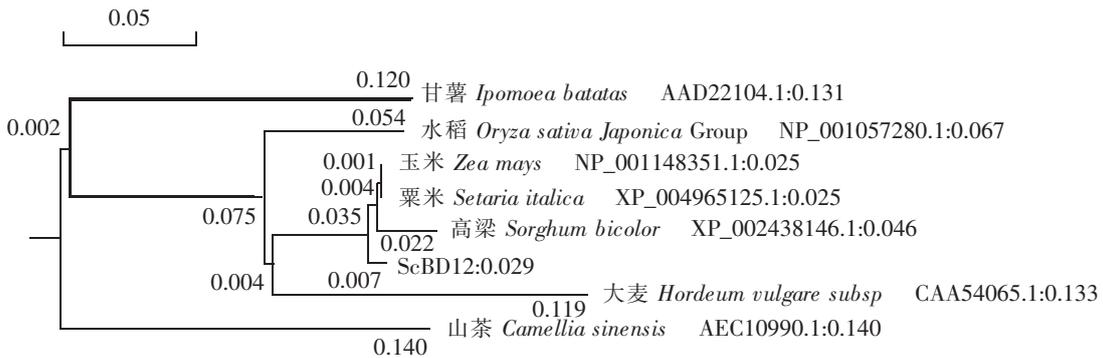


图 6 8 个物种基于 B12D 基因氨基酸序列的系统进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of eight plant species based on amino acid sequences of the B12D gene

2.3 甘蔗 ScB12D 基因的表达特性分析 组织特异性表达分析结果如图 7 所示。从图 7 中可以看出,甘蔗 ScB12D 基因在根、蔗芽、茎(包括蔗皮和蔗髓)、叶片和叶鞘等各个组织中均有表达,为组成型表达模式,但在叶鞘和根中相对表达量较高,分别是芽中相对表达量的 96.38 倍和 40.9 倍。图 8 和图 9 分别为甘蔗 ScB12D 基因在生物和非生物胁迫下的表达特性分析结果。图 8 显示,在黑穗病菌诱导下,甘蔗 ScB12D 基因的表达呈现“抑-升-抑”的趋势。首先受到抑制,一直到 24 h 时相对表达量略微上升,但其后仍呈现下调趋势,总体来说胁迫后相对表达量与对照组相比是下降的。从图 9 可知,甘蔗 ScB12D 基因在不同胁迫下的相对表达量趋势是不同的,在 NaCl 和 ABA 胁迫下的相对表达量呈现上调趋势,其中 NaCl 胁迫下表达量最高为对照组的 1.572 倍,而在 PEG, SA, JA, H₂O₂ 和 CuCl₂, CdCl₂ 胁迫表达中呈现下调趋势。

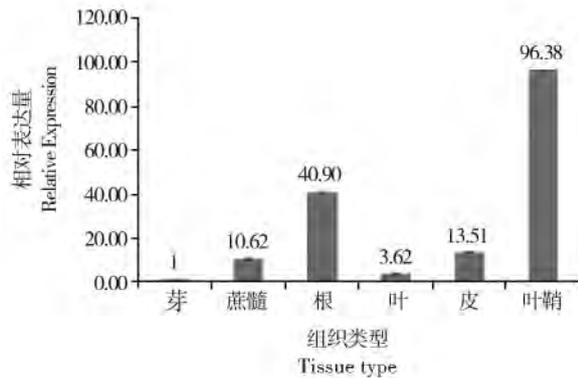


图 7 甘蔗 *ScB12D* 基因在不同组织中的表达
误差线为每组处理的标准误差 ($n = 3$), 以下同

Fig. 7 The relative expression of *ScB12D* gene in different sugarcane tissues

The error bars represent the standard error of each treating group ($n = 3$), Similarly hereinafter

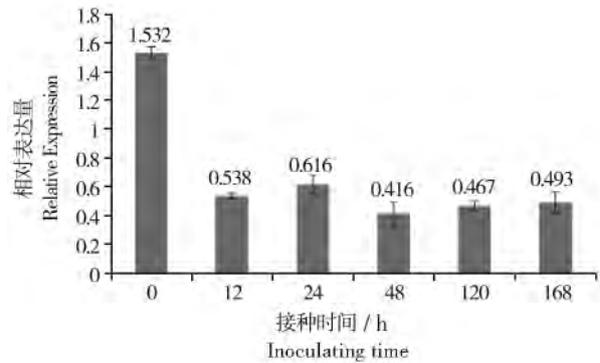


图 8 甘蔗 *ScB12D* 基因在黑穗病胁迫下的表达

Fig. 8 The *ScB12D* gene expression of sugarcane after inoculation with *Sporisorium scitaminea*

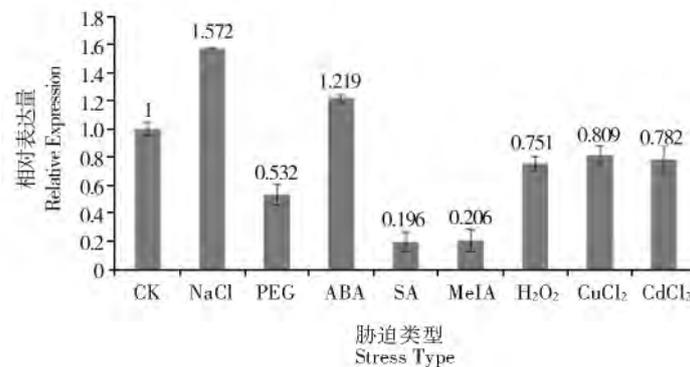


图 9 甘蔗 *ScB12D* 基因在不同非生物外源胁迫下的表达

Fig. 9 The *ScB12D* gene expression of sugarcane under different abiotic exogenous stresses

3 讨论

本研究以甘蔗为实验材料,首次获得 *B12D* 基因。生物信息学分析结果显示,甘蔗 *ScB12D* 基因编码的蛋白无信号肽,定位于质膜,为亲水性非分泌型碱性蛋白;二级结构为无规则卷曲;蛋白参与能量代谢,有 1 个 *B12D* 家族保守结构域。其中 *B12D* 基因编码蛋白的保守结构域 *B12D* superfamily 属于 NADH - 辅酶还原酶复合体 1-MLRQ 亚基中的一种,可能在 ATP 合成中发挥作用,从而参与能量代谢^[16-17]。此外,在同源性分析中,甘蔗 *B12D* 基因与单子叶禾本科植物玉米、粟米、高粱和水稻同源性高达 90% 以上,与双子叶甘薯和山茶同源性在 70% 左右。因此,该基因在不同物种间具有一定的保守性,在近缘植物中具有高度的保守性。

实时荧光定量 PCR 能实现对核酸快速、灵敏、高效特异检测,是一种被广泛应用的基因表达分析技术^[18]。本实验通过实时荧光定量 PCR 实验对甘蔗 *ScB12D* 基因的组织特异性表达情况进行分析。结果显示,该基因在根、蔗芽、茎(包括皮和蔗髓)、叶片和叶鞘等所有组织中组成型表达,但在叶鞘和根中相对表达量最高。需要特别指出的是,虽然本研究中甘蔗 *ScB12D* 基因来自于甘蔗茎全长 cDNA 文库,但在茎(包括皮和蔗髓)中该基因的表达低于叶鞘和根中该基因的表达量。在甘蔗中,根主要吸收水、矿物盐和氮素,叶鞘着生于甘蔗节间,对节间的生长带、芽和根带起着机械保护的作用。同时,一些昆虫取食甘蔗

叶鞘,譬如跗线螨^[19],也会造成甘蔗叶鞘机械损伤。本研究中,甘蔗 *ScB12D* 基因在根中高水平表达,推测甘蔗 *ScB12D* 基因与矿物盐的吸收及响应盐胁迫有关,同时,其在叶鞘中高水平表达说明该基因还可能与抗机械或病虫害损伤有关,这与前人研究结果是一致的^[5]。

其次,本实验还同时通过实时荧光定量 PCR 手段对甘蔗 *ScB12D* 基因在生物和非生物胁迫下的表达模式进行分析。前人研究结果表明,ABA 主要在种子休眠、萌发、气孔关闭及干旱、低温、离子渗透等非生物胁迫应答中起重要调控作用^[7]。而植物受 NaCl 胁迫后主要表现为渗透胁迫和 Na⁺ 毒害效应^[20]。本研究中定量 PCR 分析结果显示,接种黑穗病后, *ScB12D* 基因的表达受到抑制,虽然在 24 h 时间点相对表达量有小幅度的上升,但其后又呈现下调趋势,总体来说黑穗病菌胁迫后相对表达量与对照组相比都是显著下降的,这表明该基因可能在甘蔗抗黑穗病胁迫中发挥了一定的作用,起负调控作用,但具体调控模式有待进一步的研究验证。此外,在非生物胁迫下,该基因的表达受 NaCl 胁迫后相对表达量最高,其次为 ABA。值得注意的是,在 ABA 诱导下甘蔗 *ScB12D* 基因的表达量有一定程度的升高,说明该基因在干旱、低温、离子渗透等胁迫下起一定的作用,但这个基因的表达可能由于本实验中使用的甘蔗田间材料受气候影响无法开花结实,而弱化了 ABA 胁迫对该基因表达量的影响。在 NaCl 胁迫下,甘蔗 *ScB12D* 基因表达呈上调趋势,为对照组的 1.572 倍,故推测 *ScB12D* 基因的表达与甘蔗抗盐胁迫或渗透相关。

本研究通过生物信息学手段和定量 PCR 分析技术,获得了甘蔗 *ScB12D* 基因序列特征及其表达特性,从而获得了有关该基因潜在功能的初步信息,推测该基因的表达与甘蔗抗盐胁迫或渗透胁迫及机械损伤有关,这为更深入地研究该基因功能、最终利用其进行甘蔗品种的定向改良奠定了一定的研究基础。

参考文献:

- [1] AALEN R B, OPSAHL-FERSTAD H G, LINNESTAD C, et al. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds [J]. The Plant Journal, 1994(5): 385 - 396.
- [2] ESPELUND M, D E BEDOUT J A, OUTLAW W H, et al. Environmental and hormonal regulation of barley late-embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs is via different signal transduction pathways [J]. Plant Cell Environ., 1995(18): 943 - 949.
- [3] STEINUM T M, BERNER H S, STACY R A P, et al. Differential regulation of the barley (*Hordeum vulgare*) transcripts B22E and B12D in mature aleurone layers [J]. Plant Physiology, 1998(102): 337 - 345.
- [4] SALANOUBAT M, LEMCKE K, RIEGER M, et al. Letters to nature sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Nature, 2000(408): 820 - 823.
- [5] SCHAFLEITNER R, WILHELM E. Isolation of wound-responsive genes from chestnut (*Castanea sativa*) microstems by mRNA display and their differential expression upon wounding and infection with the chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*) [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2002, 61: 339 - 348.
- [6] REUMANN S, QUAN S, AUNG K, et al. In-depth proteome analysis of Arabidopsis leaf peroxisomes combined with *in vivo* subcellular targeting verification indicates novel metabolic and regulatory functions of peroxisomes [J]. Plant Physiol, 2009, 150:125 - 43.
- [7] AALEN R B, SALEHIAN Z, STEINUM. Stability of barley aleurone transcripts: Dependence on protein synthesis, influence of the starchy endosperm and destabilization by GA3 [J]. Physiologia Plantarum, 2001, 112:403 - 413.
- [8] FUJIIITA M, FUJIIITA Y, NOUTOSHI Y, et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: A current view from the points of convergence in the stress signaling networks [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006(9): 436 - 442.
- [9] TON J, MAUCH-MANI B. β -amino-butyric acid induced resistance against necrotrophic pathogens is based on ABA dependent priming of callose [J]. The Plant Journal, 2004, 38(1): 119 - 130.
- [10] 陈如凯, 许莉萍, 林彦铨, 等. 现代甘蔗遗传育种[M]. 北京: 中国农业出版社, 2011.
- [11] QUE Y X, LIN J W, SONG X X, et al. Differential gene expression in sugarcane in response to challenge by fungal pathogen *Ustilago scitaminea* revealed by cDNA-AFLP [J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2011, Article ID 160934, 10 pages, doi:10.1155/2011/160934.
- [12] 刘金仙, 阙友雄, 郭晋隆, 等. 甘蔗茎全长 cDNA 文库构建及 EST 序列分析[J]. 热带作物学报, 2013, 34(3): 480 - 485.
- [13] 阙友雄, 许莉萍, 徐景升, 等. 甘蔗基因表达定量 PCR 分析中内参基因的选择[J]. 热带作物学报, 2009, 30(3): 274 - 27.
- [14] LINAK 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, 25:402 – 408.
- [15] 阙友雄,许莉萍,林剑伟,等. 甘蔗 NBS-LRR 类抗病基因同源序列的分离与鉴定[J]. *作物学报*, 2009, 35(4): 631 – 639.
- [16] WALKER J E, ARIZMENDI J M, DUPUIS A, et al. Sequences of 20 subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. Application of a novel strategy for sequencing proteins using the polymerase chain reaction [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1992, 226(4):1051 – 1072.
- [17] GABALDON T, RAINEY D, HUYNEN M A. Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) [J]. *Journal of molecular biology*, 2005, 348:857 – 870.
- [18] 马月萍,戴思兰,马艳蓉. 荧光定量 PCR 技术在植物研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2011(7):37 – 45.
- [19] 张琼,黎教良,黄鸿能,等. 附线螨为害甘蔗初报[J]. *甘蔗糖业*, 2006(6):15 – 19.
- [20] 刘正鲁,朱月林,魏国平,等. NaCl 胁迫对茄子嫁接苗叶片多胺代谢和 ABA 含量的影响[J]. *生态学报*, 2008, 28(4):1586 – 1592.

Cloning and Expression Analysis of Full cDNA of *B12D* Gene in Sugarcane

ZHANG Yuye, HUANG Ning, XIAO Xinhuan, HUANG Long, SU Weihua, XU Liping, QUE Youxiong
(Key Laboratory of Sugarcane Biology and Genetic Breeding (Fujian), Ministry of Agriculture, Fujian Agriculture and Forestry University/Sugarcane Research & Development Center, China Agricultural Technology System, Fuzhou 350002, China)

Abstract: A full length cDNA sequence of sugarcane gene was obtained from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) stem full length cDNA library through large-scale sequencing and validated by the corresponding bioinformatics analysis, termed *ScB12D* (Genbank Accession number: KF714497). The full length of *ScB12D* gene was 771 bp, with a 264 bp open reading frame (ORF), encoding 87 amino acids residues. The *ScB12D* of sugarcane was a basic protein, which has a conserved functional domain with the main function for energy metabolism, and this protein was located in plasma membrane. The main secondary structure element was random coil. At the same time, the *ScB12D* genes is conservative in different species, especially highly conservative in kindred plants. The *B12D* gene in sugarcane has a homology of more than 90% with the same genes in the monocotyledonous gramineous plants of maize, millet, sorghum and rice, and around 70% with the same genes in the dicotyledonous plants of sweet potatoes and camellia. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis revealed that the expression of *ScB12D* was higher in root and sheath than in leaf sheath, stem (contain pith and skin), lateral buds and leaf. Moreover, after inoculation with *Sporisorium scitamineum*, the expression of this gene decreased in the different time points. Meanwhile, the expression of *ScB12D* in the NaCl stress was the highest in abiotic stresses and slightly lower under the abscisic acid stress. It can be inferred that the sugarcane *B12D* gene be associated with the reaction mechanism of sugarcane to biotic and abiotic stresses.

Key words: sugarcane; *B12D* gene; bioinformatics; real-time PCR