

文章编号: 1674-7054(2018)02-0170-06

木薯 *MeRbohE* 基因的克隆及表达分析

唐枝娟, 朱寿松, 于心怡, 赵锐, 牛晓磊, 陈银华, 耿梦婷

(海南大学热带农林学院 / 海南省热带生物资源利用重点实验室, 海口 570228)

摘要: 从木薯中克隆了1个 *Rboh* 基因—*MeRbohE*, 该基因全长 5 397 bp, 开放阅读框 2 775 bp, 编码 925 个氨基酸, 编码的蛋白分子量为 104.8 KDa, 理论等电点为 8.90, 蛋白结构具有典型的植物 *Rboh* 基因家族特征。qRT-PCR 结果表明, *MeRbohE* 基因在木薯组培苗的根中表达量最高, 茎中次之, 叶中最低; 在受到低温(4 °C)、高盐(300 mmol·L⁻¹ NaCl)和 100 mmol·L⁻¹ ABA 诱导后, 表达量呈现不同程度的上调, 表明该基因能应答非生物胁迫。

关键词: 木薯 *Rboh* 基因, 非生物胁迫, 表达分析

中图分类号 S 188

文献标志码 A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.2018.02.007

活性氧 ROS(Reactive oxygen species)在植物的生长、发育、分化和增殖中起关键作用。它们一般存在于支持细胞增殖和代谢的细胞中, 是调节细胞中许多重要代谢途径的关键信号分子。植物在受到生物或非生物胁迫时, ROS 在细胞中迅速增加并且可以作为激活程序性细胞死亡或自噬途径的信号。ROS 主要来源于质膜 NADPH 氧化酶、过氧化物酶及胺氧化酶等酶系统^[1], 其中, NADPH 氧化酶是植物细胞中产生活性氧的关键酶。NADPH 氧化酶(NOX 家族酶系列)全称烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶, 位于质膜上, 最早在巨噬细胞中发现。NADPH 氧化酶是 1 种复合体, 由 p22^{phox}, p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}, gp91^{phox}, Rac 共 6 种亚基组成^[2], 其中 gp91^{phox} 亚基是 NADPH 氧化酶的核心功能亚基, 包括 6 个跨膜的 α 螺旋结构域, 含有辅基 FAD、血红素、电子载体以及 NADPH 的结合位点^[3]。在植物中, gp91^{phox} 亚基的同源蛋白还未见报道, 但编码 gp91^{phox} 亚基同源蛋白的基因已被发现, 命名为 *Rboh* 基因 (Respiratory burst oxidase homologues gene)^[4]。与动物不同的是, 植物 NADPH 氧化酶的 N- 末端还存在着可结合 Ca²⁺ 的 EF 手性模体^[5]。Groom 和 Keller 等分别于 1995 和 1998 年在水稻中克隆到 *OsrbohA* 基因^[5-7], 此后, 多种植物的 *Rboh* 基因陆续被克隆, 包括拟南芥^[7]、番茄^[8-9]、烟草^[10]、马铃薯^[11-13]和玉米^[4]等。后续的研究结果均表明, 植物中的 *Rboh* 基因为多基因家族^[4,7], 且参与了植物的生长发育调控及抗逆反应。至今为止, 木薯 (*Manihot esculenta* Crantz)中还没有关于 *Rboh* 基因的研究报道。在非洲、亚洲和拉丁美洲, 木薯是仅次于水稻和玉米的第 3 个最重要的作物^[14]。木薯淀粉产量高, 投入较少, 可为全球 6 亿多人提供膳食碳水化合物的来源, 也是工业淀粉和生物乙醇的来源。木薯在我国的种植集中于广西、广东、海南、云南和福建等 5 个省区^[15]。海南、广东和福建由于其特殊的地理位置, 经常受到台风的影响, 海水入侵或者海水倒灌使得土地的含盐量很高, 木薯很难生长。木薯对低温非常敏感, 低温可使木薯大幅减产甚至绝收^[16]。此外, 其生长和发育仍受到干旱胁迫的严重影响^[17]。因此, 了解木薯对非生物胁迫的抗性分子机制, 可以为木薯的抗逆性遗传改良育种提供有效的方法。本研究采用 RT-PCR 的方法, 从木薯 cDNA 中克隆了 1 个 *Rboh* 基因, 经过生物信息学分析, 初步鉴定其为木薯 *Rboh* 家族的成员, 通过实时荧光定量 PCR 分析了其在木薯根、茎、叶不同组织中的转录丰度及其在受到低温、高盐和 ABA 胁迫处理下的表达水平, 旨在了解 *MeRbohE* 基因在木薯非生物胁迫应答中的功能。

收稿日期: 2018-03-20 修回日期: 2018-04-15

基金项目: 海南省研究生创新科研课题 (Hys2017-61); 国家自然科学基金 (31560497); 现代农业产业技术体系 (CARS-11-HNCYH)

作者简介: 唐枝娟 (1992-), 女, 海南大学 2015 级生物化学与分子生物学硕士研究生, E-mail: tangzhijuan2017@163.com

通信作者: 耿梦婷 (1989-), 女, 讲师, 研究方向: 作物遗传育种, E-mail: mengtinggeng8908@163.com

1 材料与方 法

1.1 材料及处理 以木薯栽培品种华南 8 号(SC8)组培苗为实验材料(由本实验室提供),在 MS 培养基(1L 包含:MS 2.2 g,蔗糖 20 g, CuSO_4 0.32 g,植物凝胶 3 g, pH5.8)上,于 25 °C 条件下培养,每天光照 16 h。对于检测组织特异性的材料,选取 3 株 30 d 的组培苗分别对其进行根茎叶采样;对于检测应对胁迫的材料,选取培养 30 d 且生长一致的组培苗分别用 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ABA、低温(4 °C)、 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 处理,每种处理各 18 株苗,并分别在处理 0, 3, 6, 9, 12, 24 h 共 6 个时间点采集叶片。样品采集后立即放入液氮中冷冻,随后置于 -80 °C 保存,用于总 RNA 的提取,每个处理时间点设置 3 个重复。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第 1 链的合成 各样品参照植物总 RNA 提取试剂(TIANGEN, Beijing)说明书进行总 RNA 的分离,并用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶对 RNA 样品的浓度和质量进行检测;cDNA 第 1 链的合成参照 RevertAid First Stand cDNA synthesis(Thermo Scientific, Shanghai)说明书进行。反转完成后采用木薯内参基因进行 RT-PCR 检测 cDNA,并以此作为模板进行后续实验。

1.3 基因克隆 从木薯数据库网站 Phytozome(<http://www.Phytozome.net/cassava.php>)下载基因 CDS 序列及蛋白序列。根据 CDS 序列设计木薯 *Rboh* 基因的全长引物和定量引物,并将引物序列在木薯基因组数据库中 Blast,确定为特异性的引物。以反转录的 SC8 木薯叶片 cDNA 为模板,用基因特异性全长引物进行 PCR 扩增,并将回收产物连接到商业载体 pEASYblunt(TRANSGENE, Beijing)上进行测序。引物合成及测序均由华大基因生物公司完成。

1.4 生物信息学的分析 应用 MEGA7.0 软件对克隆分离得到的序列与拟南芥进行比对,构建进化树,找出拟南芥中的同源基因。用蛋白质组学网站 ExPASy(<http://expasy.org/>)来检测蛋白质的理化性质。用网站 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)预测保守结构域。通过网站 GSDS(<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)分析外显子内含子结构。

1.5 基因表达分析 qRT-PCR 按照 SYBR Premix Ex *Taq*TM(TaKaRa, Japan)说明操作,扩增程序为:95 °C 30 s,40 个循环 95 °C 5 s,55 °C 30 s,72 °C 30 s,72 °C 延伸 10 min。结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的计算方法进行相对定量,以木薯 *Ubq10* 基因作为内标校正模板量。每个样品进行 3 次生物学重复,实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取及 cDNA 质量检测 采用植物总 RNA 提取试剂进行总 RNA 的提取,并对所有提取的 RNA 样本用 Nano drop 2000(Thermo Scientific, Shanghai)进行了测定,RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均约为 2.0,表明 RNA 没有降解。用木薯内参基因 *Ubiquitin10*(*Ubq10*-F: TGCATCTCGTTCCTCCGATTG, *Ubq10*-R: GCGAAGATCAGTCGTTGTTGG)对反转后的 cDNA 进行 RT-PCR 检测,电泳得到大小约 100 bp 的唯一一条带(图 1A),与预期结果一致,说明 cDNA 可用于后续实验。

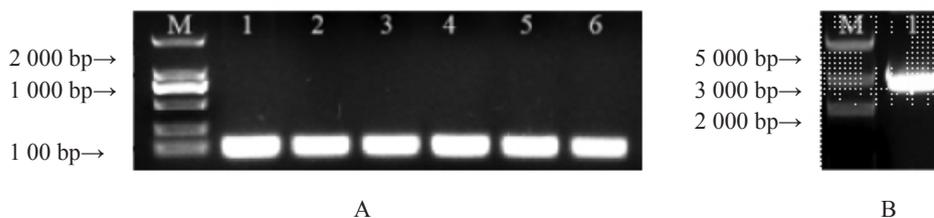


图 1 cDNA 检测和 *MeRbohE* 基因扩增电泳图

A: M 2 000 bp maker; 1~6 样品; B: M 5 000 bp Maker; 1: *MeRbohE*

Fig.1 Detection of cDNA with reference primers and *MeRbohE* gene amplification electrophoresis

A: M 2 000 bp DNA maker; 1-6: Samples; B: Note: M: 5 000 bp DNA maker; 1: *MeRbohE*

2.2 基因的克隆 根据下载的基因序列(Manes.16G092100),设计全长引物为:Full-F: ATGCAAGACATGGGTAGAGAAG, Full-R: TTAGAAATTTTCTTTGTGAAAAT。以木薯 SC8 的 cDNA 为模板,用基因特异性全长引物进行 PCR 扩增,经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,获得 1 条约 2 800 bp 的条带(图 1B)。

回收 PCR 产物连接到 pEASY-blunt 载体, 测序得到长度为 2 775 bp 的序列, 且与木薯数据库中公布的同源性高达 99%。

2.3 进化分析 采用 MEGA7.0 软件构建克隆获得的木薯 *Rboh* 基因及拟南芥的 *Rboh* 基因家族的进化树(图 2), 发现其与拟南芥中的 AtRBOHE 蛋白的亲缘关系最近, 故将克隆得到的基因命名为 *MeRbohE*。这是木薯克隆到的第 1 个 *Rboh* 基因, 在其他物种中, 例如番茄^[8-9]、烟草^[10]、马铃薯^[11-13]和玉米^[4]等, 已有多个 *Rboh* 基因被克隆研究。

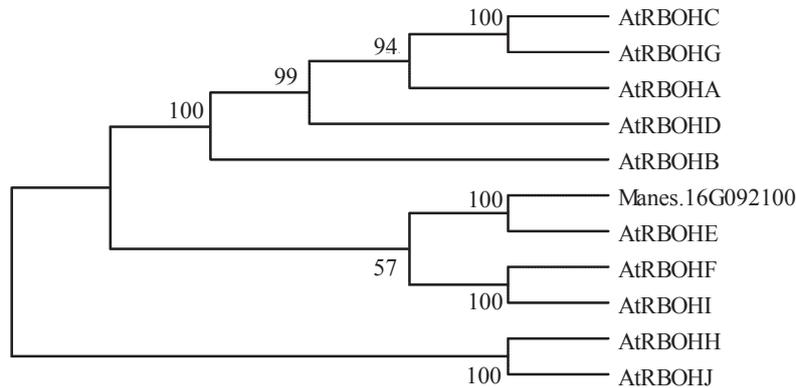


图 2 MeRBOHE 与拟南芥 AtRBOHS 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of MeRBOHE and AtRBOHs in *Arabidopsis thaliana*

2.4 生物信息学分析 对 MeRBOHE 进行蛋白质理化性质预测, 结果表明, 该蛋白由 925 个氨基酸组成, 编码的蛋白分子量为 104.8 KDa, 理论等电点为 8.90。运用 SMART 对 MeRBOHE 蛋白序列进行保守结构域和功能域进行预测, 结果发现, MeRBOHE 拥有 NADPH、FAD 及 NAD 保守结构域, 这是 *Rboh* 基因家族的基本特征(图 3A)。为了进一步了解 *MeRbohE* 基因结构特点, 笔者还分析了其内含子/外显子结构。基因结构分析表明, *MeRbohE* 基因具有 14 个外显子和 13 个内含子(图 3B)。

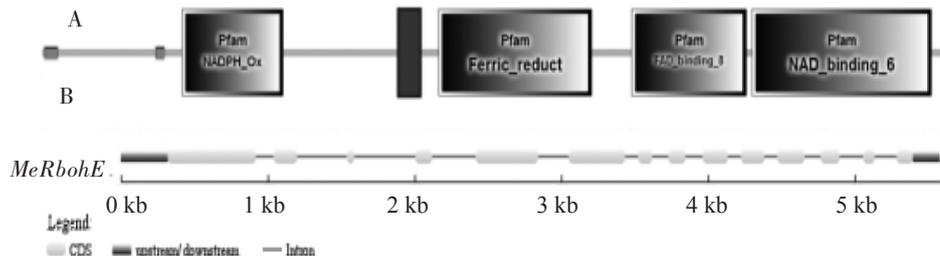


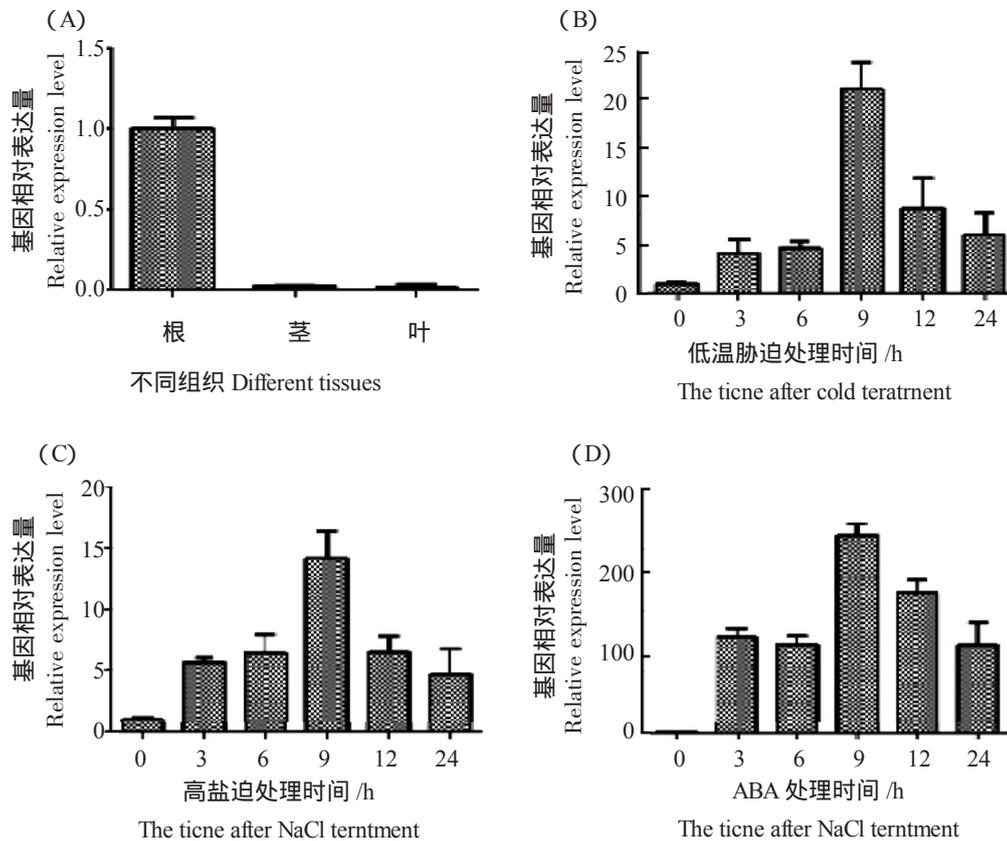
图 3 MeRBOHE 蛋白保守结构域及 MeRbohE 序列内含子/外显子结构

A: MeRBOHE 蛋白保守结构域; B: MeRbohE 内含子/外显子结构

Fig.3 Conserved domain of MeRBOHE protein and intron/exon structure of MeRbohE sequence

A: Conserved domain of MeRBOHE protein; B: Intron/exon structure of MeRbohE sequence

2.5 基因表达分析 设 *MeRbohE* 在叶中的表达量为 1, 检测了其在 30 d 大小的组培苗的根、茎和叶中的表达量, 发现 *MeRbohE* 在根中的表达量最高, 在茎中次之, 在叶中最低(图 4A)。为了检测 *MeRbohE* 基因在非生物胁迫下的转录水平, 笔者利用 100 mmol·L⁻¹ ABA、低温(4 °C)、300 mmol·L⁻¹ NaCl 分别处理生长了 30 d 的木薯组培苗。利用 qRT-PCR 技术对基因的表达量进行相对定量检测, 结果发现 *MeRbohE* 基因可以响应低温(4 °C)、ABA 和 NaCl 胁迫(图 4B~D)。经过处理后, *MeRbohE* 基因的表达模式基本相似, 表达水平均有提高, 在处理 9 h 后, 表达量达到最高。而且 *MeRbohE* 基因可以快速响应 ABA 诱导, 在处理 3 h 后, 其表达量就可以上调 115 倍。这些结果充分表明, *MeRbohE* 基因转录水平受低温、ABA 和高盐处理诱导, 可进一步研究其在木薯抗逆反应中的功能。

图 4 *MeRbohE* 基因表达分析

(A) *MeRbohE* 基因在木薯根、茎、叶中的组织特异性表达分析；
 (B)~(D) *MeRbohE* 基因在受到低温、高盐和 ABA 胁迫处理后的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *MeRbohE* gene

(A) Tissue specific expression of *MeRbohE* gene in cassava root, stem and leaf ;
 (B)~(D) Expression of *MeRbohE* gene under low temperature, high salt and ABA treatment

3 讨论

据报道,目前,已在多种植物中发现了 *Rboh* 基因,但在热带重要作物木薯中还尚未见有关该基因的报道。笔者从华南 8 号木薯中首次克隆得到了 1 个 *Rboh* 基因,通过与拟南芥中的 *Rboh* 基因比对,发现其与 *AtRbohE* 基因同源性最高,故将其命名为 *MeRbohE*,序列分析表明,其包含完整的编码序列,蛋白保守结构域分析显示,其 FAD 结合结构域和 NADPH 结合结构域与已报道的其他物种的 *Rboh* 基因一致。

近年来,已有大量文献报道了 *Rboh* 基因在防御反应和生长发育发生过程中的作用,如细胞扩增,花粉管生长,种子发芽和后熟,根毛伸长, Ca^{2+} 依赖性气孔关闭等。*Rboh* 研究最多的功能有 3 种:非生物胁迫、生物胁迫和发育^[18]。例如,烟草 *NtRbohF* 在花粉管生长中起作用^[19],苜蓿 *MtRbohF* 在根毛发育中发挥作用^[20],玉米 *ZmRbohB α* 和 *ZmRbohB β* 涉及非生物胁迫^[21],而 *BoRbohD* 和 *BoRbohF* 在乙烯信号传导和重金属胁迫方面已有报道^[22],*CsRboh* 在油菜素内酯胁迫耐受中发挥关键作用^[23],葫芦科的 *CcRbohF* 具有耐旱性^[24]等。本实验中,笔者检测了 *MeRbohE* 基因在受到低温、高盐和 ABA 处理后的表达水平,结果发现,3 种处理均能诱导 *MeRbohE* 的表达量上升。这些结果表明, *MeRbohE* 可能参与了低温、高盐和 ABA 介导的非生物逆境胁迫应答,但具体的作用机制有待深入研究。

植物中 NADPH 氧化酶基因一般以基因家族的形式存在^[4,7],现在已知拟南芥中有 10 个 *Rboh* 基因 (*AtRbohA-J*)^[25],水稻中有 9 个 (*OsRbohA-I*)。各基因家族成员在不同组织中表达量不同,发挥的功能有相

同也有不同。拟南芥中 *AtRbohH* 和 *AtRbohJ* 具有花粉特异性功能^[19] *AtRbohC* 在根生长和细胞壁完整性中发挥功能^[18] *AtRbohF* 和 *AtRbohD* 在生物和非生物胁迫中起到多种作用^[18]。水稻中 *OsRbohE* 已知参与生物胁迫^[26] *OsRbohA* *OsRbohC* 和 *OsRbohH* 在干旱和生长调节中起作用^[27-29]。本实验中 笔者通过 RT-PCR 的方法克隆了 1 个木薯 *Rboh* 基因 分析显示其为 *AtRbohE* 的直系同源基因。后期实验 笔者拟尝试用其他方法进一步发掘更多的木薯 *Rboh* 基因 以深入研究该基因家族在木薯应答非生物胁迫中发挥的作用。

参考文献：

- [1] Hu X L, Zhang A Y, Zhang J H, et al. Abscisic acid is a key inducer of hydrogen peroxide production in leaves of Maize plants exposed to water stress[J]. Plant and Cell Physiology, 2006, 47(11): 1484- 1495.
- [2] Babior B M, Lambeth J D, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase[J]. Arch Biochem BioPhys, 2002, 397(2): 342- 344.
- [3] Moshe Sagi, Robert Fluhr. Production of reactive oxygens species by plant NADPH oxidases [J]. Plant physiol, 2006, 14(2): 336- 340.
- [4] 林凡. 玉米 (*Zea mays* L.) NADPH 氧化酶基因克隆、表达特性及功能研究[D]. 南京:南京农业大学, 2008.
- [5] Keller T, Damude H G, Werner D, et al. A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs[J]. Plant Cell, 1998, 10(2): 255- 266.
- [6] Groom Q J, Torres M A, Fordham-Skelton A P, et al. *RbohA*, a rice homologue of the mammalian gp91^{phox} respiratory burst oxidase gene[J]. Plant J., 1996, 10(3): 515- 522.
- [7] Torres M A, Onouchi H, Hamada S, et al. Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91^{phox}) [J]. Plant J., 1998, 14(3): 365- 370.
- [8] Amicucci E, Gaschler K, Ward J M. NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curlyleaf Pondweed (*Potamogeton crispus*)[J]. Plant Biology, 1999, 1(5): 524- 528.
- [9] Sagi M, Davydov O, Orazova S, et al. Plant respiratory burst oxidase homologs impinge on wound responsiveness and development in *Lycopersicon esculentum*[J]. Plant Cell, 2004, 16(3): 616- 628.
- [10] Yoshioka H, Numata N, Nakajima K, et al. Nicotiana benthamiana gp91^{phox} homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*[J]. Plant Cell, 2003, 15(3): 706- 718.
- [11] Yoshioka H, Sugie K, Park H J, et al. Induction of plant gp91^{phox} homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2001, 14(6): 725- 736.
- [12] Yamamizo C, Doke N, Yoshioka H, et al. Involvement of mitogen- activated protein kinase in the induction of *StrbohC* and *StrbohD* genes in response to pathogen signals in Potato[J]. J.Gen Plant Pathol, 2007, 73(5): 304- 313.
- [13] Kumar G N, Iyer S, Knowles N R. *StrbohA* homologue of NADPH oxidase regulates wound-induced oxidative burst and facilitates wound-healing in potato tubers[J]. Planta, 2007, 227(1): 25- 36.
- [14] 方佳, 濮文辉, 张慧坚. 国内外木薯产业发展近况[J]. 中国农学通报, 2010, 26(16): 353- 361.
- [15] 林洪鑫, 袁展汽, 刘仁根, 等. 木薯高产栽培及产后废弃物处理国内研究进展[J]. 江西农业学报, 2011, 23(2): 30- 32.
- [16] 卢赛清, 盘欢, 马崇熙, 等. 2008 年广西木薯低温冻害情况及应对措施[J]. 广西热带农业, 2009(1): 21- 22.
- [17] Okogbenin E, Setter T L, Ferguson M, et al. Phenotypic approaches to drought in cassava[J]. Frontiers in Physiology, 2013(4): 93.
- [18] Marino D, Dunand C, Puppo A, et al. A burst of plant NADPH oxidases[J]. Trends Plant Sci., 2012, 17(1): 9- 15.
- [19] Potock M, Jones M A, Bezvoda R, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth[J]. New Phytol., 2007, 174(4): 742- 751.
- [20] Marino D, Andrio E, Danchin E G J, et al. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning [J]. New Phytol., 2011, 189(2): 580- 592.
- [21] Lin Fan, Zhang Y, Jiang M Y. Alternative splicing and differential expression of two transcripts of nicotine adenine dinucleotide phosphate oxidase B gene from *Zea mays*[J]. Integr Plant Biol., 2009, 51(3): 287- 298.
- [22] Jakubowicz M, Galganska H, Nowak W, et al. Exogenously induced expression of ethylene biosynthesis, ethylene perception, phospholipase D, and *Rboh*-oxidase genes in broccoli seedlings[J]. Exp. Bot., 2010, 61(12): 3475- 3491.
- [23] Xia X J, Wang Y J, Zhou Y H, et al. Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid induced stress tolerance in cucumber[J]. Plant Physiol., 2009, 150(2): 801- 814.
- [24] Si Y, Dane F, Rashotte A, et al. Cloning and expression analysis of the *CcRboh* gene encoding respiratory burst oxidase in *Citrullus colocynthis* and grafting onto *Citrullus lanatus* (watermelon)[J]. Exp. Bot., 2010, 61(6): 1635- 1642.

- [25] Foreman J , Demidchik V , Bothwell J H F , et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth[J]. *Nature* ,2003 ,422(6930): 442- 446.
- [26] Yoshie Y , Goto K , Takai R , et al. Function of the rice gp91^{phox} homologs *OsrbohA* and *OsrbohE* genes in ROS-dependent plant immune responses[J]. *Plant Biotechnol* ,2005 ,22(2): 127- 135.
- [27] Wang X , Zhang M M , Wang Y J , et al. The plasma membrane NADPH oxidase *OsRbohA* plays a crucial role in developmental regulation and drought-stress response in rice[J]. *Physiol Plant* ,2016 ,156(4): 421- 443.
- [28] Wang G F , Li W Q , Li W Y , et al. Characterization of rice NADPH oxidase genes and their expression under various environmental conditions[J]. *Int J. Mol. Sci.*, 2013, 14(5): 9440- 9458
- [29] Kaur G, Pati P K. Analysis of cis-acting regulatory elements of respiratory burst oxidase homolog (*Rboh*) gene families in *Arabidopsis* and rice provides clues for their diverse function[J]. *Comput Biol Chem* ,2016 ,62: 104- 118.

Cloning and Expression Analysis of *MeRbohE* Gene in Cassava

Tang Zhijuan, Zhu Shousong, Yu Xinyi, Zhao Rui, Niu Xiaolei, Chen Yinhua, Geng Mengting

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry of Hainan University, Hainan University, Hainan Haikou 570228/Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Hainan Haikou 570228 China)

Abstract In this paper, we cloned a *Rboh* gene from cassava-*MeRbohE*, the whole length of the gene is 5 397 bp, open reading frame is 2 775 bp, encoding 925 amino acids, the molecular weight of the protein is 104.8 KDa, and the theoretical isoelectric point of the protein is 8.90, the protein structure has typical plant *Rboh* gene family characteristics. The results of qRT-PCR showed that the expression of *MeRbohE* gene was the highest in the roots, followed by the stems, and the lowest in the leaves; the expression of *MeRbohE* gene was up-regulated after being induced by low temperature (4 °C), high salt (300 mmol·L⁻¹ NaCl) and 100 mmol·L⁻¹ ABA. The results indicated that the gene could respond to biological stress and lay a foundation for elucidating the mechanism of cassava *Rboh* gene in stress resistance.

Keywords :Cassava ;*Rboh* gene ;Abiotic stress ;Expression analysis

(责任编辑 潘学峰)