蓖麻 *RcAKT1* 基因的克隆与序列分析

包丽坤,耿学军 (内蒙古民族大学生命科学学院,内蒙古通辽 028000)

摘要 [目的]对蓖麻 *RcAKT1* 基因进行克隆和序列分析。[方法]提取盐胁迫处理的蓖麻新鲜叶片总 RNA,采取 RACE 法克隆蓖麻 *RcAKT1* 基因的3′末端和5′末端,利用生物信息学软件 DNAman 对两端序列进行拼接,最后设计一对特异性引物,从而获得蓖麻 *RcAKT1* 基因的 ORF 全长序列,并对该序列进行生物信息学分析。[结果]该基因的开放阅读框序列长度为 2 253 bp,推测可不间断编码 751 个氨基酸。选取其他植物的 AKT1 序列与蓖麻 *Rc*AKT1 序列进行比对,结果显示同源性很高,其一致性在84% ~97%。[结论]经过生物信息学分析,发现蓖麻 *Rc*AKT1 属于 ANK 超级家族,是亲水性蛋白质。

关键词 蓖麻;内整流 K^+ 通道蛋白基因;基因克隆;生物信息学分析
中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2017)21 - 0138 - 05

Cloning and Sequence Analysis of *RcAKT1* Gene from Castor

BAO Li-kun, GENG Xue-jun (College of Life Science, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028000)

Abstract [Objective]To clone and analyze *RcAKT1* gene sequence from castor. [Method]The total RNA of castor fresh leaves was extracted and the RACE method was used to clone the 3 ′end and 5′ end of *RcAKT1* gene. The two-terminal sequence was spliced by bioinformatics software DNAman. Finally, the ORF full length sequence of *RcAKT1* gene was obtained and the bioinformatics analysis was carried out. [Result]The length of the open reading frame was 2 253 bp, the analysis predicted that 751 amino acids could be encoded without interruption. The AKT1 sequence of other plants was compared with the *RcAKT1* sequence of castor. The results showed that the homology was high and the consistency was between 84% and 97%. [Conclusion]After bioinformatics analysis, it has been found that castor *RcAKT1* belongs to the ANK super family and it's a hydrophilic protein.

Key words Castor; ATK1; Gene cloning; Bioinformatic analysis

植物 K^+ 通道蛋白(Arabidopsis K^+ transporter 1, AKT1)是一个在高亲和钾离子的吸收过程中发挥重要作用的内向整流的钾离子通道,它在植物中的主要作用是负责介导参与其对钾离子的吸收以及钾离子的运输,在水分子的胁迫下可以降低蒸腾、关闭气孔,进而有效地防止植物体内水分流失,维持光合作用从而增加其抗逆性[1-2]。在很多抗逆性强的植物体内的抗逆机制中,*AKT1* 基因发挥了非常大的作用。因此,对该基因的研究具有很大的现实应用性价值。

蓖麻(*Ricinus communis* L.)属于大戟科植物,是一年生或多年生的草本植物。我国土地沙漠化越来越严重,且在农业种植土地总面积当中盐碱土地面积一直占有很大的比例,由于在盐碱土地上种植其他农作物产量很低,所以大部分地区都选择种植抗盐碱性强的农作物。蓖麻的适应性相对于其他植物较强,其可在气候干旱少雨、土地贫瘠且盐碱含量高的地区进行种植,因此它的种植非常广泛。此外,蓖麻的经济地位和应用价值也非常高,现已被应用到了各行各业,目前对蓖麻的抗逆性研究较少。该研究以蓖麻为材料,采用 RACE(rapid-amplification of cDNA ends)等技术,获取蓖麻 K^+ 通道蛋白基因 *RcAKT1*,并进行生物信息学分析,为进一步研究 *RcAKT1* 基因的转化及功能验证奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 蓖麻品种为通蓖 5 号,首先对蓖麻进行盐胁迫预处理,待其长出 3 片真叶后,将新鲜叶片用液氮进行速冻保存,作为试验材料备用。Ex *Taq* DNA 聚合酶、克隆载体 PMD18 - T、3′RACE 试剂盒以及 5′RACE 试剂盒均来自宝生物工程(大连)有限公司,大肠杆菌 JM109 感受态细胞采用钙离子处理法制备,并且保存于实验室超低温冰箱内,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 蓖麻叶片总 RNA 的提取及引物设计。创造一个无 RNase 的环境,使用改良的 Trizol 提取法在蓖麻新鲜叶片中提取总 RNA,将没有蛋白质和 DNA 污染、降解程度低、丰度高的总 RNA 进行分装保存。该试验以 RNA 为模板,采用 RACE 法克隆蓖麻 *RcAKT1* 基因 cDNA 的全长序列[3]。根据其他亲缘关系较近植物中 *RcAKT1* 基因的进化保守区域序列,利用 Premier 5.0 软件,设计出一对 3′RACE 简并性引物:BMF1 和 BMF2。结合获取的蓖麻 *RcAKT1* 基因 3′末端序列,再利用 Premier 5.0 软件,设计出一对 5′RACE 特异性引物:BMR1 和 BMR2。将经公司测序得到的核苷酸 3′末端序列以及 5′末端序列利用 DNAman 软件进行电子序列拼接,最终获得 cDNA 全长核苷酸序列。找出该基因序列的开放阅读框,在序列编码区两端设计出一对全长特异性引物:F 和 R,进行 *RcAKT1* 基因全长克隆。引物序列详见表 1。

表 1 蓖麻 *RcAKT1* 基因克隆引物序列

Table 1 Primer sequence of castor *RcAKT1* gene clones

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Primer sequence
BMF1	VTGCRWTGCWATAYGCCABAABTTT
BMF2	ACARCWTTBTRCAVTACYGWCCRAA
BMR1	CATGATTATGGTCCCATCTCCAATA
BMR2	ATCTCCAATATTTGCCTGAACAATG
F	ATGTCATATCCACGATCCCATCTGA
R	TTAGGGATTATGGCTGTTAGTTTCT

1.2.2 蓖麻 *RcAKT1* 基因全长序列的获取。蓖麻 *RcAKT1* 基因 3′末端序列的克隆是参照 3′RACE 试剂盒的说明书进行

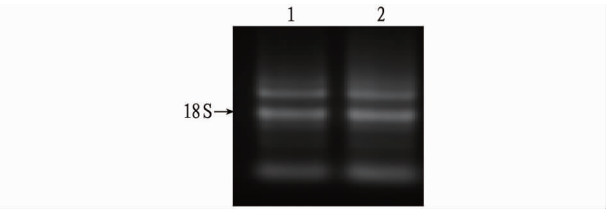
作者简介 包丽坤(1988—),女,内蒙古通辽人,助教,硕士,从事食品安全研究。
收稿日期 2017 - 04 - 20

的,以蓖麻叶片总 RNA 为模板,3′RACE Adaptor(来自 3′ RACE 试剂盒)为反转录引物获取 cDNA 第一条链,反应条件:42 ℃ 60 min;70 ℃ 15 min;4 ℃保存。Outer PCR 使用引物 BMF1 和 3′ RACE Outer primer(来自 3′ RACE 试剂盒),反应条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s;58 ℃ 30 s;72 ℃ 90 s;25 个循环,72 ℃ 10 min;4 ℃保存。Inner PCR 使用引物 BMF2 和 3′ RACE Inner primer(来自 3′ RACE 试剂盒),反应条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s;56 ℃ 30 s;72 ℃ 90 s;25 个循环,72 ℃ 10 min;4 ℃保存。蓖麻 *RcAKT1* 基因 5′末端序列的克隆是参照 5′ RACE 试剂盒的说明书进行的,以 Random 9 mers(来自 5′ RACE 试剂盒)为反转录引物获取 cDNA 第一条链。Outer PCR 使用引物 BMR1 和 5′ RACE Outer primer(来自 5′ RACE 试剂盒),反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s;56 ℃ 30 s;72 ℃ 90 s;25 个循环,72 ℃ 10 min;4 ℃保存。Inner PCR 使用引物 BMR2 和 5′ RACE Inner primer(来自 5′ RACE 试剂盒),反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s;56 ℃ 30 s;72 ℃ 90 s;25 个循环,72 ℃ 10 min;4 ℃保存。逆转录使用 Oligo dT 为引物,反应条件:65 ℃ 5 min;42 ℃ 60 min;70 ℃ 5 min;4 ℃保存。目的基因全长克隆使用引物 R 和 F,反应条件:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s;57 ℃ 40 s;72 ℃ 90 s;30 个循环,72 ℃ 10 min;4 ℃保存。利用胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化,与 PMD18 - T 连接,重组载体转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中,进行氨苄抗性筛选和蓝白斑筛选,提取质粒,进行质粒 PCR 和双酶切鉴定,将疑似阳性克隆菌送至北京华大基因测序。

1.2.3　蓖麻 *RcAKT1* 基因生物信息学分析。将经过生物公司测序得到的核苷酸序列进行一系列分析,发现该序列具有完整的开放阅读框,并确定该开放阅读框为蓖麻 *RcAKT1* 基因 cDNA 的全长序列。利用 NCBI、TMHMM 网站以及 DNAman、ClustalX、MEGA5.2 等生物信息学软件对该基因核苷酸序列进行氨基酸序列预测,分析出该基因的理化性质、亲水性、疏水性,蛋白质的跨膜结构区,并将蓖麻与其他几种植物的 AKT1 序列进行多重序列比对,观察序列的一致性。构建蓖麻与这几种植物 K^+ 通道蛋白序列系统进化树。

2　结果与分析

2.1　蓖麻 *RcAKT1* 基因的全长克隆　将在蓖麻新鲜叶片中提取的总 RNA 进行 0.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,在电泳图上显示出清晰的 3 条带,其中第 2 条带最亮,第 3 条带最暗,充分说明提取的总 RNA 中蛋白质和 DNA 的污染少、降解量低且丰度较高,表明其质量非常好(图 1)。以蓖麻叶片总 RNA 为模板,设计引物,利用 RACE 的方法先后克隆出蓖麻 *RcAKT1* 基因的 3′末端和 5′末端,将经公司测序得到的 3′末端序列和 5′末端序列利用 DNAman 软件进行拼接,从而得到目的基因的全长序列[4],并根据该全长序列设计一对特异性引物,进行 PCR 克隆,电泳图显示在 2 253 bp 处得到一条清晰的条带,该条带长度完全符合两条引物间的序列长度。可确定该 PCR 产物为目的基因的 ORF 全长序列(图 2),命名为蓖麻 *RcAKT1*。

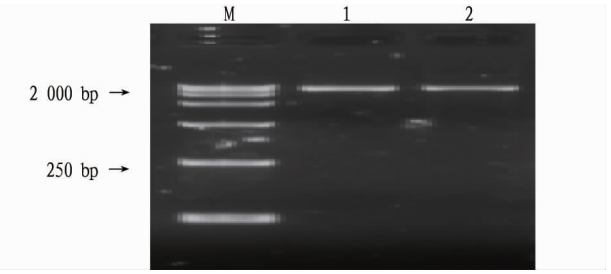


注:1,2 为蓖麻叶片 RNA

Note:1,2 represented castor leaf RNA

图 1　蓖麻总 RNA 电泳结果

Fig. 1　Total RNA electrophoresis result of castor



注:M 为 DL - 2000 marker;1,2 为扩增的 *RcAKT1* 基因全长

Note:M was DL - 2000 marker;1,2 represented the PCR product of the whole sequence of *RcAKT1*

图 2　*RcAKT1* 基因全长的 PCR 扩增

Fig. 2　PCR amplification of the whole sequence of *RcAKT1*

2.2　蓖麻 *RcAKT1* 基因的生物信息学分析　将获得的目的基因 3′末端与 5′末端核苷酸序列利用 DNAman 软件进行电子序列拼接,得到 *RcAKT1* 基因的 ORF 全长序列[5]。利用生物信息学软件对该基因的核苷酸序列进行理化性质分析,发现该序列的开放阅读框为 2 253 bp,推测可不间断编码 751 个氨基酸(图 3),分子量为 84.043 ku,等电点(PI)值为 6.35,pH = 7.0 时电荷为 - 7.52,同时对预测的 *Rc*AKT1 氨基酸序列进行了亲水性和疏水性分析,在图中显示其亲水性的平均值为正值,疏水性的平均值为负值,因而断定该蛋白为亲水性蛋白(图 4)。将 *RcAKT1* 基因的氨基酸序列在 NCBI 网站上进行 Blast 比对,发现蓖麻与其他植物该基因的氨基酸序列同源性很高,均为 84% ~97%(图 5),将与蓖麻亲缘关系较近植物(胡杨、木本棉、葡萄、麻疯树、胡桃)的 AKT1 氨基酸序列,使用 DNAman 软件与蓖麻进行多重序列比对,结果表明其一致性达 77.17%(图 6)。利用 NCBI 网站的 Conserved Domains (http:// www. ncbi. Nlm. nih. gov/ Structure/cdd/wrpsb/cgi)预测 *RcAKT1* 基因具有的保守区域,假定保守域检测结果显示该基因属于 ANK 超级家族,猜测蓖麻 *RcAKT1* 基因与这个家族中所包含的其他所有基因具有一样的功能(图 7)。将基因的氨基酸序列利用网络上的服务器 TMHMM(http://www. cbs. dtu. dk/services/TMHMM/)进行跨膜区的结构分析,跨膜结构分析的结果发现该蛋白的氨基酸序列共包含了 5 个跨膜结构区,由此推断蓖麻 *Rc*AKT1 为跨膜蛋白,并且该蛋白的跨膜结构区全部集中在 N 端,而 C 端不含跨膜结构区(图 8)。

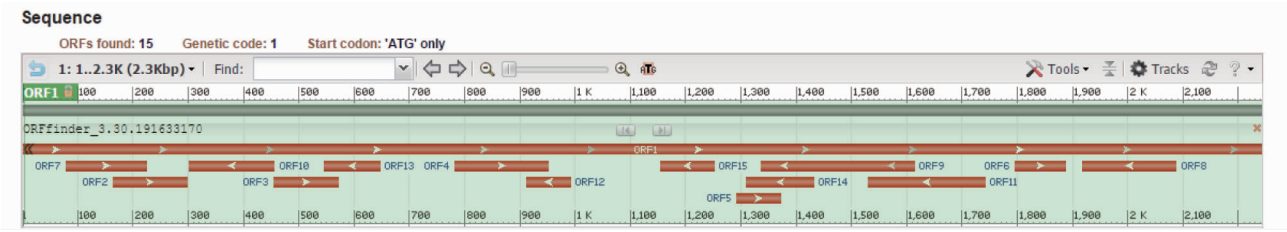


图 3 蓖麻 *RcAKT1* 基因的编码区序列及其对应的氨基酸序列

Fig. 3 *RcAKT1* cDNA sequence and its deduced amino acid sequence

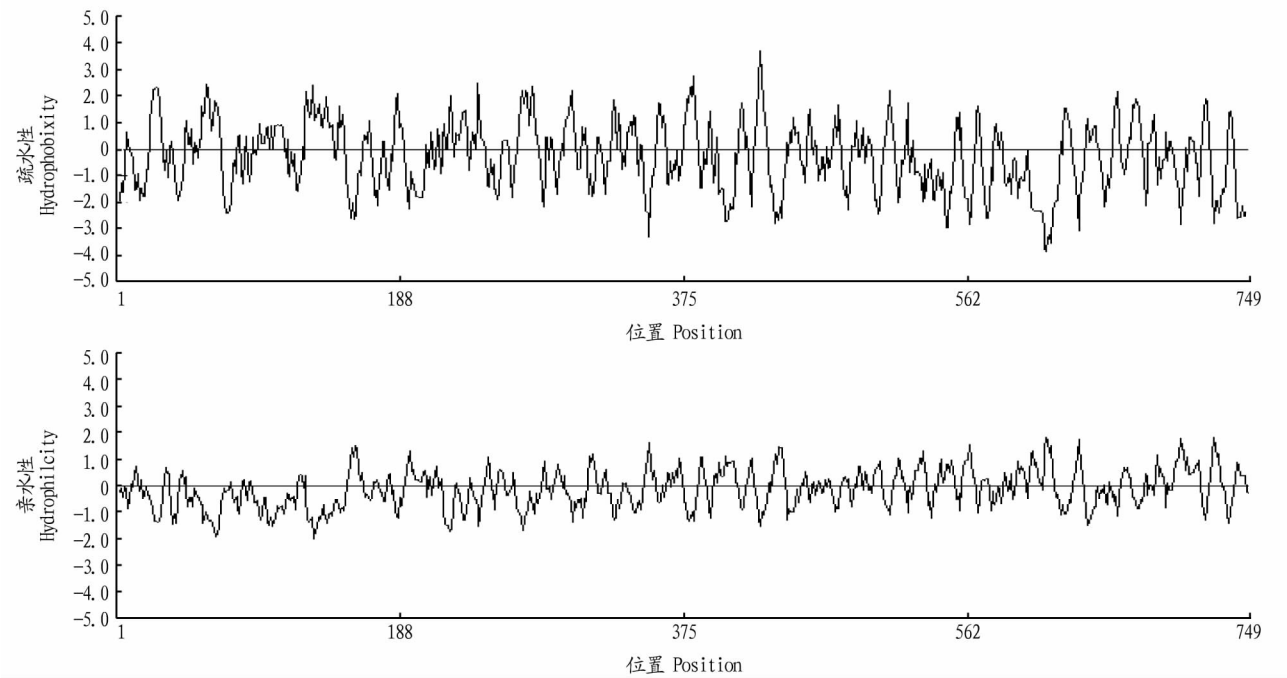


图 4 亲水性及疏水性预测

Fig. 4 Hydrophicity and hydrophobixity prediction

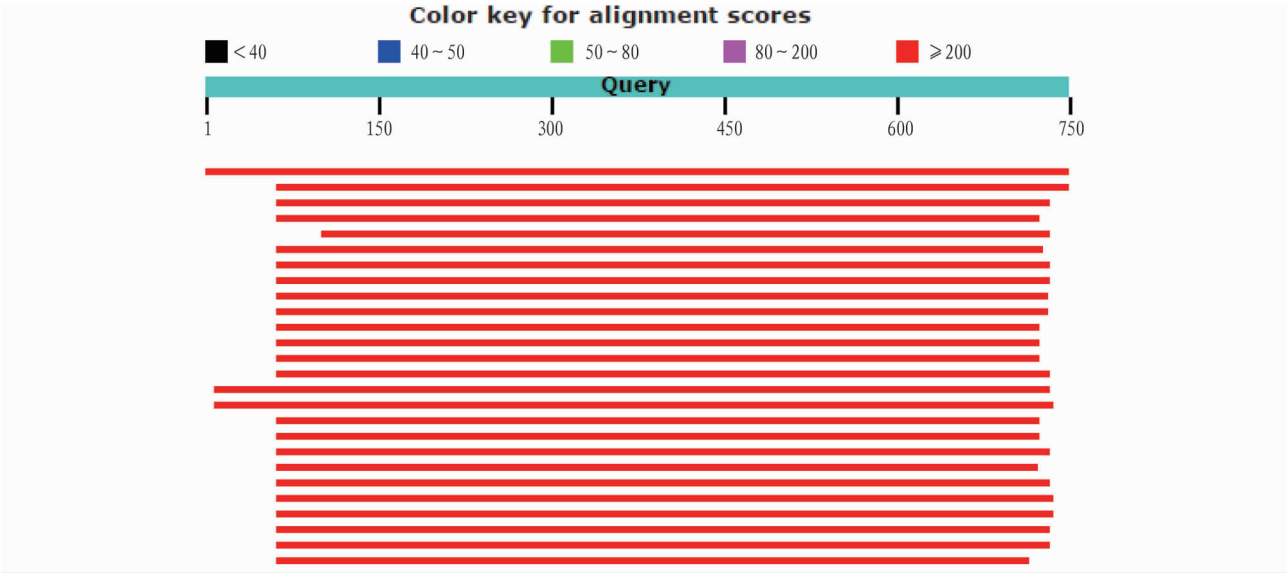
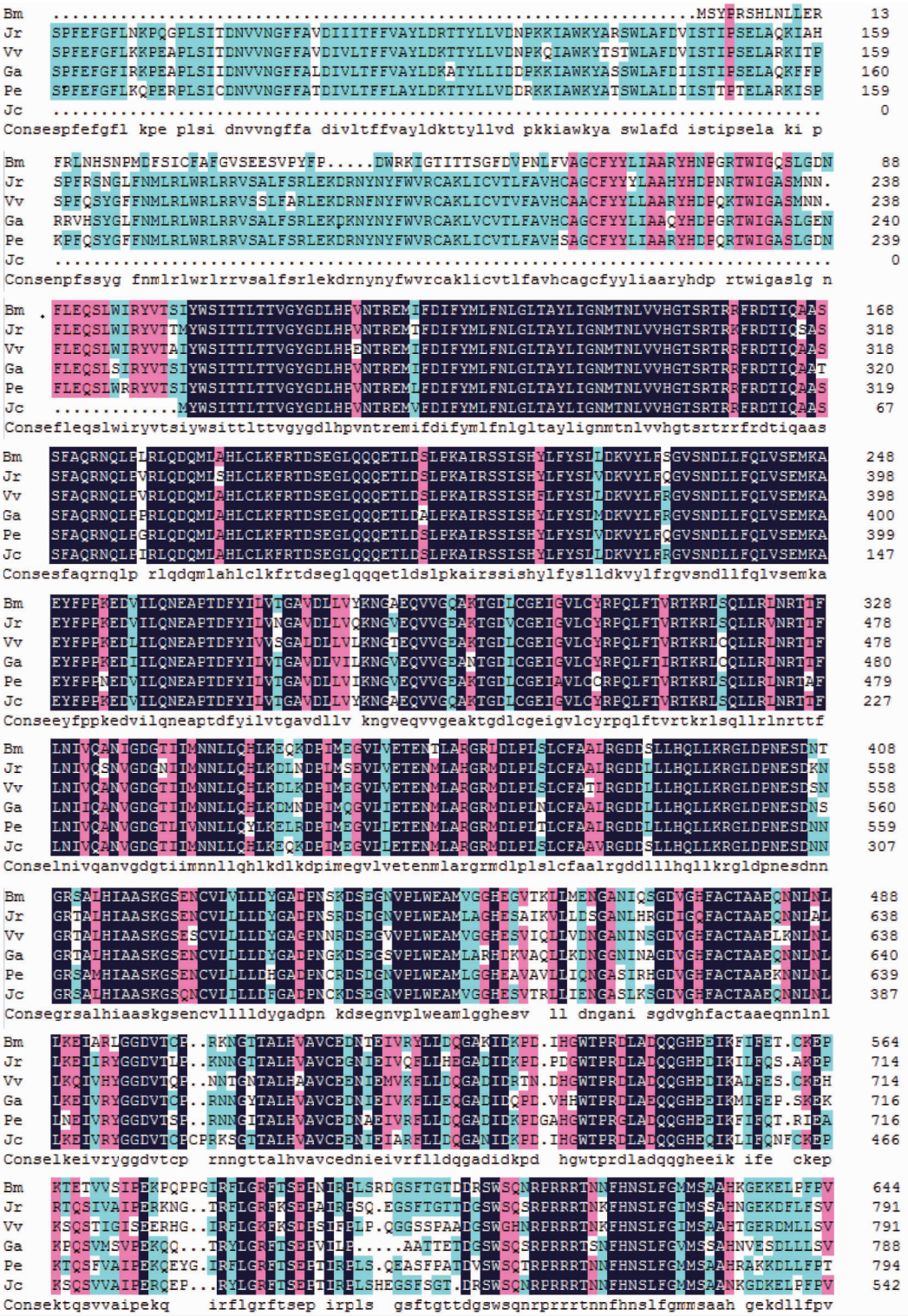


图 5 Blast 的结果

Fig. 5 Blast result

3 结论与讨论

内整流 K^+ 通道蛋白基因在植物的抗逆方面起到非常重要的作用,该试验利用 RACE 法克隆出蓖麻 *RcAKT1* 基因的 cDNA 全长序列,该序列长度为 2 253 bp,推测可不间断编码 751 个氨基酸。选取其他植物的内整流 K^+ 通道蛋白序列与蓖麻的 AKT1 序列进行比对,结果显示同源性很高,其一致



注：完全相同的氨基酸序列片段用深蓝色块表示，为得到最大的同源性指数而插入的间隔区域用圆点表示；Bm 为蓖麻，Jr 为胡桃，Vv 为葡萄，Ga 为麻疯树，Pe 为胡杨，Jc 为木本棉

Note：Dark blue shading indicated identical aminal acids，dots represented gaps introduced into sequences to maximize homology alignments；Bm was castor，Jr was walnut，Vv was grape，Ga was *Jatropha carcas* L.，Pe was *Populs euphratica*，Jc was tree cotton

图 6　蓖麻与其他 5 种植物 AKT1 氨基酸多重序列比较

Fig. 6　Multiple sequence comparison of the amino-acid of AKT1 from castor and other 5 kinds of plants

性在 84% ~97%。经过生物信息学分析，发现蓖麻丝氨酸/苏氨酸激酶属于 ANK 超级家族，是亲水性蛋白质。

通过对 *RcAKT1* 基因序列的生物信息学分析，在分子水平预测其结构与功能特性，可以更好地掌握它的作用机制，也为研究其他与抗逆相关的基因奠定了坚实的基础。植物的抗逆是一个十分复杂的过程，是由植物体内多个基因相互

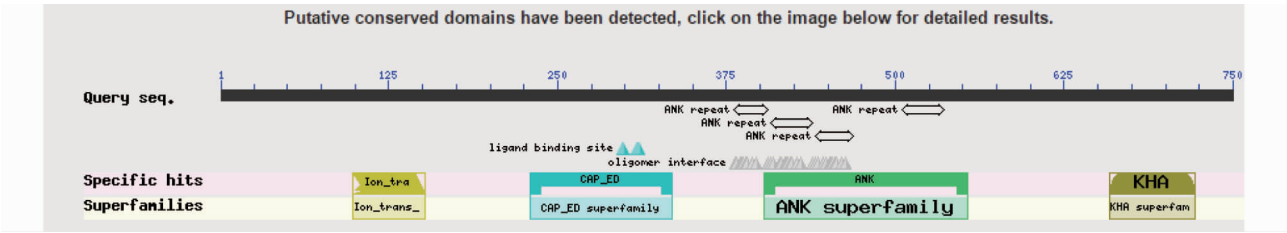


图 7 *Rc*AKT1 蛋白保守区预测

Fig. 7 Prediction of *Rc*AKT1 protein conserved domains

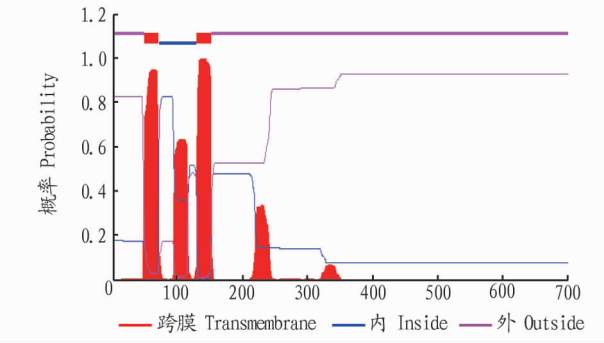


图 8 跨膜结构

Fig. 8 Transmembrane structure

协调作用的结果[6]，为进一步研究蓖麻的抗逆过程，首先要在蓖麻体内克隆出所有与抗逆相关的基因，并探索出这些基因的相互作用机制，今后可以利用转基因的手段，将这些抗逆基因转入到其他抗逆性差的植物体内，有望在提高植物的抗逆性方面取得重要突破，为农作物生产和应用做出贡献。同时，还可以采取分子生物学的一些方法研究该基因，并进一步转化到蓖麻植株内，以培育出抗逆效果更加显著的蓖麻新品种。

参考文献

[1] 伍国强，水清照，冯瑞军. 植物 K^+ 通道 AKT1 的研究进展[J]. 植物学报，2017，52(2)：225－234.
[2] 胡静，胡小柯，尉秋实，等. 植物内整流 K^+ 通道 AKT1 的研究进展[J]. 草业科学，2017，34(4)：813－822.
[3] 杨玲玲. RACE 法克隆紫花苜蓿光敏色素 A 基因[D]. 郑州：河南农业大学，2008.
[4] 宋笛. Race 方法克隆云芝免疫调节蛋白基因[J]. 农业与技术，2016，36(17)：21－23.
[5] 崔素萍，刘博，黄丽丽，等. 利用 RACE 方法克隆小麦 β－1，3－葡聚糖酶基因的全长 cDNA[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2008，36(7)：79－84.
[6] 于鸿燕. 草鱼三个 PI3K/AKT 通路相关基因的克隆和表达分析[D]. 上海：上海海洋大学，2015.

(上接第 130 页)

[3] 吕汰，虎东岳，汪卯全. 海藻肥在蔬菜作物上的增产效果研究[J]. 甘肃农业科技，2003(10)：38－40.
[4] 保万魁，王旭，封朝晖，等. 海藻提取物在农业生产中的应用[J]. 中国土壤与肥料，2008(5)：12－18.
[5] 王强，石伟勇. 海藻肥对番茄生长的影响及其机理研究[J]. 浙江农业科学，2003(2)：67－70.
[6] 王强，石伟勇. 海藻液肥对草莓品质及贮藏的影响[J]. 土壤通报，2004，35(1)：94－96.
[7] 王云峰，石伟勇，潘超君. 海藻液体肥肥效的研究[J]. 东海海洋，2001，19(3)：43－47.
[8] 赵博生，衣艳军，刘家尧. 外源甜菜碱对干旱/盐胁迫下的小麦幼苗生长和光合功能的改善[J]. 植物学通报，2001，18(3)：378－380.
[9] 贾庚祥，朱至清，李银心. 甜菜碱与植物耐盐基因工程[J]. 植物学通报，2002，19(3)：272－279.
[10] 卢元芳. 甜菜碱处理种子对小麦和玉米幼苗抗盐性的效应[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版)，1997，23(3)：83－86.
[11] 宋丽丽，阚振荣. 甜菜碱的制备、含量测定及其应用[J]. 河北林果研究，2002，17(4)：383－388.
[12] 胡彩虹，夏枚生，许建蜂. 甜菜碱分析方法进展[J]. 中国饲料，1997(7)：24－25.
[13] 齐永秀，郝立勇，瞿宏艳，等. 非水滴定法测定盐酸甜菜碱的含量[J]. 泰山医学院学报，2002，23(4)：355－356.
[14] 杨昕，BARWELL C，刘焱文. 高效液相色谱法测定 4 种海藻中甜菜碱的含量[J]. 中国中医药信息杂志，2001，8(2)：35－36.
[15] 王隶书，吕咏，程东岩，等. 薄层扫描法测定糖蜜酒渣中甜菜碱的含量[J]. 吉林中医药，1994(6)：39.
[16] 胡彩虹，刘波静. 重量法测定甜菜碱和甜菜碱预混剂中甜菜碱含量[J]. 中国饲料，2002(4)：27－28.
[17] 李炜，张丹参. 甜菜碱的提取分离及测定方法研究进展[J]. 医学综述，2006，12(8)：506－508.
[18] 江泽荣，包文芳，范知宇，等. 甜菜碱(Betaine)的研究概况[J]. 沈阳药学院学报，1989，6(2)：140.
[19] 刘志刚，钱捷，杨明康. 甜菜碱含量测定方法研究进展[J]. 江西化工，2012(3)：9－11.
[20] 杨雪，王洪荣，邹益东，等. 甜菜碱含量的测定方法比较[J]. 饲料工业，2013，34(7)：48－51.

科技论文写作规范——引言

扼要地概述研究工作的目的、范围、相关领域的前人工作和知识空白、理论基础和分析、研究设想、研究方法和实验设计、预期结果和意义等。一般文字不宜太长，不需做详尽的文献综述。在最后引出文章的目的及试验设计等。“引言”两字省略。