

烟草 *NtRAX* 基因的克隆和序列分析

高晓明¹, 张泽坤², 王卫锋¹, 刘贯山¹, 李凤霞¹, 崔萌萌¹, 孙玉合^{1*}

(1. 农业部烟草生物学与加工重点实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 青岛农业大学, 青岛 266109)

摘要: 根据 GenBank 中拟南芥 *RAX* 基因序列, 在烟草 EST 数据库中进行 Blastp 检索, 获得与之同源性较高的蛋白质序列, 选取同源性最高的蛋白质序列所对应的核酸序列, 设计引物, 获得中间片段, 再运用中间片段设计引物, 应用 RACE 方法获得其 5' 和 3' 末端 cDNA 序列, 将获得的 3 段序列拼接, 结合全长克隆测序验证, 获得一个新的普通烟草基因, 将其命名为 *NtRAX* (NCBI 登录号为 JQ228591)。 *NtRAX* 的 cDNA 全长为 1112 bp, 5' 端非编码区 96 bp, 3' 端非编码区 62 bp, 编码区长度为 954 bp, 编码 317 个氨基酸, 预测的分子量是 35.42 KDa。对该基因进行序列分析和功能预测, 得出该基因属于 MYB 基因家族, 是具有转录激活活性的烟草腋芽分生组织形成的调控基因。

关键词: 烟草; 腋芽; 基因; *NtRAX*

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2012) 05-0014-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.05.003

Cloning and Sequence Analysis of *NtRAX* Gene in Tobacco

GAO Xiaoming¹, ZHANG Zekun², WANG Weifang¹, LIU Guanshan¹,
LI Fengxia¹, CUI Mengmeng¹, SUN Yuhe^{1*}

(1. Key Laboratory for Tobacco Biology and Processing, Ministry of Agriculture, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China; 2. Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

Abstract: Based on Arabidopsis *RAX* gene sequence in GenBank, we conducted a Blastp search in tobacco EST database, and acquired a high homology with the protein sequence, then selected the highest protein sequence homology to the corresponding nucleic acid sequences to design primers, obtained the middle fragment, then used it to design primers, obtained the 5' and 3' ends of the cDNA sequence by RACE strategy, a gene named *NtRAX* (NCBI accession number JQ228591) was obtained by splicing three cDNA sequences and sequencing full-length cloning. The full-length cDNA of *NtRAX* is 1112bp long with 96bp 5'-UTR, 62bp 3'-UTR and 954bp coding sequence. The deduced amino acid is 641 AA long. Predicted molecular weight is 35.42KDa. *NtRAX* was predicted a tobacco axillary meristem formation regulatory genes with transcriptional activation activity, belonged to the MYB gene family.

Keywords: tobacco; axillary bud; Gene; *NtRAX*

烟株上腋芽的存在, 会消耗大量养分, 严重影响烟叶的产量和品质^[1]。烟草中, 已经获得与腋芽分生组织形成相关基因 *NtLS*, 该基因与拟南芥中控制腋芽分生组织形成的 *LAS* 基因高度相似^[2], 对该基因进行 RNA 干扰研究, 所获得的转基因烟草植株, 在腋芽的发生方面与野生型相比没有明显的区别^[3]。 *LAS* 和 *RAX* 是两条相对独立的调控途径, 但是在功能上可能存在互补^[4-5]。拟南芥中, 现已发现 *RAX1*、*RAX2*、*RAX3* 基因, 同属于 MYB 基因家族。

MYB 基因家族是植物最大的转录因子家族之一, 现有研究表明, 植物 MYB 转录因子在植物器官形成、植物叶片的形态建成及抗病中起重要作用^[6], 其途径之一包括调节腋芽分生组织的形成^[7]。拟南芥中, *RAX* 基因控制腋芽分生组织形成的非常早期的一步。 *RAX* 突变株沿茎轴侧芽形成有缺陷。 *RAX* 基因在功能上的冗余, 对拟南芥次生轴的形成产生微调。其中, *RAX1*、*RAX3* 基因在腋芽中心组织表达量较高^[8]。

基金项目: 中国农业科学院基本科研业务费项目“烟草腋芽基因的 RNA 干扰研究”(0032011022)

作者简介: 高晓明, 女, 硕士, 助理研究员, 从事烟草分子生物学与转基因研究。E-mail: simuxi123@yahoo.com.cn。*通信作者, E-mail: yhsun@163.com

收稿日期: 2011-12-14

修回日期: 2012-01-14

本研究通过在 GenBank 中寻找拟南芥 *RAX* 基因相关序列,通过同源比对,采用 RACE 技术,克隆获得普通烟草中与 *RAX* 基因高度相似的基因,目的是为研究该基因的功能奠定基础,进而为通过分子手段解决烟草腋芽问题奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试烟草品种为 K326。2010 年冬,在温室内播种,自然光照条件下生长至营养生长期。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和检测 取烟草 K326 幼嫩叶片为材料,Trizol 法提取幼嫩叶片的总 RNA。1×TBE 缓冲液,1%琼脂糖凝胶,电泳检测总 RNA。

1.2.2 反转录获得 cDNA 以总 RNA 为模板,按照 PrimeScript™ RT-PCR Kit 的说明书进行。

1.2.3 *NtRAX* 中间片段的获得 以 NCBI 的拟南芥 *AtRAX2* 基因的序列 (NM_129245.2) 为信息探针,在烟草 EST 数据库中进行 Blastp 检索,获得若干与之同源性较高的蛋白质序列。选取与 e 值最低的蛋白质序列对应的核酸序列 (471 bp) 为参照,设计引物, RAX-1 : GAAGACAGAGTCATTTGTAGCC ; RAX-2 : ATTTGGAGTAGAGGGGAAG, 以 cDNA 模板,进行 PCR 扩增,对 400 bp 附近的条带回收并测序。

1.2.4 *NtRAX* 末端 cDNA 第一链的合成 3'RACE 和 5'末端第一链 cDNA 的合成,分别以提取的 RNA 为模板,按照 Invitrogen 的 Generacer 试剂盒说明书进行。

1.2.5 3'末端片段的扩增 用已经获得并测序验证的 404 bp 大小的中间片段为模板链,设计 2 条末端扩增引物:

3race-GSP1 : CCAGTTACCAGGCAGGACAGACAATG ;

3race-GSP2 : TGAAGGCGGAGGAAAGCCAATGAATG ;

按照 Generacer 试剂盒说明书配制 PCR 扩增体系。反应程序如下: 94 °C, 5 min ; 94 °C, 30 s, 66 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 5 个循环 ; 94 °C, 30 s, 65 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 5 个循环 ; 94 °C, 30 s,

64 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 5 个循环 ; 94 °C, 30 s, 62 °C, 30 s, 72 °C, 2min, 5 个循环 ; 72 °C, 10 min, 4 °C, HOLD。

1.2.6 5'末端片段的扩增 用已经获得并测序验证的 404 bp 大小的中间片段为模板链,设计 2 条末端扩增引物:

5race-GSP1 : TCATTGTCTGTCTGCCTGGTAACTGG ;

5race-GSP2 : CCATTTCCATTCATTGGCTTTCCTCCG ;

按照 Generacer 试剂盒说明书配制 PCR 扩增体系。反应程序如下: 94 °C, 5 min ; 94 °C, 30 s, 68 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 5 个循环 ; 94 °C, 30 s, 66 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 5 个循环 ; 94 °C, 30 s, 64 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 5 个循环 ; 94 °C, 30 s, 62 °C, 30 s, 72 °C, 2 min, 5 个循环 ; 72 °C, 10 min, 4 °C, HOLD。

1.2.7 PCR 产物的回收、连接及测序 1%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下切胶,按照康为世纪琼脂糖凝胶产物回收试剂盒说明书进行凝胶回收。将回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化 TOP10 *E.coli* 感受态细胞,进行蓝白斑筛选,挑取白斑进行菌落 PCR 鉴定后,选择阳性克隆摇菌并测序。

1.3 序列分析

采用 ContingExpress 软件进行序列的拼接组装;NCBI 的 ORF finder 预测开放阅读框;用 NCBI 的 BLASTn 序列比对工具进行同源性比对;蛋白质的等电点和分子量计算,采用 ExPASy 网站的 Compute PI/Mw tool ; Pfam 在线(<http://pfam.sanger.ac.uk/>)进行序列保守功能区的分析;采用 Clustalx 软件进行多序列比对;以序列比对的结果为基础,利用 MEGA5.0 软件构建系统进化树。

2 结果

2.1 *NtRAX* 中间片段的获得

以 cDNA 为模板, RAX-1 和 RAX-2 为引物,扩增获得一条 400 bp 附近片段。经测序验证,共 404 bp。

2.2 *NtRAX* 全长基因的获得

转角 - 螺旋结构, 组成 1 个疏水核心。按照含有的 MYB 结构域的数量, MYB 转录因子可分成 R1、R2R3、R1R2R3 三个家族^[9]。MYB 转录因子主要参与生物的生长、发育和抗胁迫等方面的调节^[10]。绝大多数 MYB 转录因子在植物代谢调控中起转录激活作用, 也有少量起转录抑制作用^[11-13]。

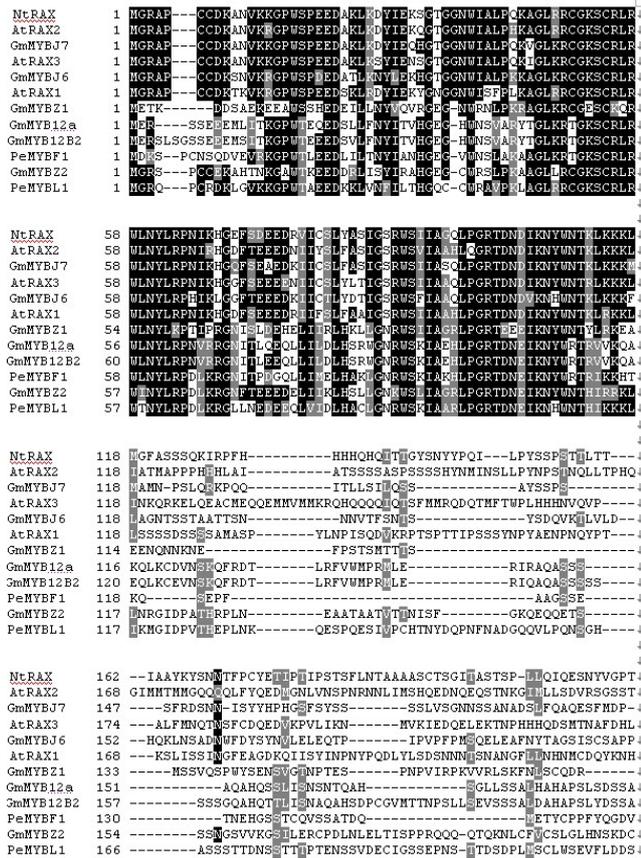


图 3 *NtRAX* 蛋白与其他 MYB 蛋白多重比对

Fig. 3 Multi-alignment of *NtRAX* and other MYB proteins

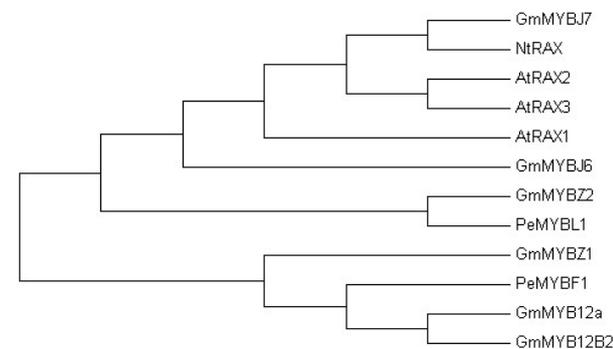


图 4 烟草、拟南芥、大豆、杨树的部分 MYB 基因系统进化树

Fig. 4 A phylogenetic tree of MYB gene from *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis*, *Glycine max* and *Populus euramericana*

本研究克隆获得了 *NtRAX* 基因, 对新基因功能的预测, 主要是通过同源比对, 利用同源基因的功能来推测, 得出 *NtRAX* 基因是具有转录激活活性的烟草腋芽分生组织形成的调控基因。该基因的功能, 还应在后续试验中不断验证。

本试验中烟草品种选择了作为常规对照的品种 K326, 所取组织为幼嫩叶片。从研究腋芽基因的角度考虑, 有以下想法, 可在将来的试验中进一步研究: (1) 选择腋芽多发的烟草品种。不同品种的烟草有其独特的生物学表现, 腋芽多发品种中相关基因的存在与表达情况是否与常规品种一致。(2) 选择烟草植株不同组织, 研究相关基因在不同组织的表达情况。(3) 对烟草植株进行打顶处理, 研究打顶前和打顶后不同组织相关基因的表达情况。

4 结 论

本研究运用 RACE 方法克隆得到了烟草腋芽基因 *NtRAX*, NCBI 登录号为 JQ228591, 该基因全长 1112 bp, 编码区 954 bp, 编码 317 个氨基酸, 同源性分析表明, *NtRAX* 属于 MYB 基因家族。MYB 家族蛋白是一类转录因子, 因此, *NtRAX* 基因编码的产物可能通过与相关的转录调节因子结合, 激活和促进腋芽的生长。*NtRAX* 基因的克隆, 为进一步研究烟草腋芽, 从分子角度对腋芽的发生进行干扰奠定了基础。

参考文献

[1] 中国农业科学院烟草研究所. 中国烟草栽培学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005.

[2] 太帅帅. 烟草 *GRAS* 和 *CDPK* 基因家族的研究[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2009.

[3] 王卫锋, 太帅帅, 王鲁, 等. 烟草 *NtLS* 基因 RNA 干扰表达载体的构建及遗传转化[J]. 中国烟草科学, 2011, 32 (4) 31-35.

[4] Greb T, Clarenz O, Schafer E, et al. Molecular analysis of the LATERAL SUPPRESSOR gene in *Arabidopsis* reveals a conserved control mechanism for axillary meristem formation [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 1175-1187.

[5] Keller T, Abbott J, Moritz T, et al. *Arabidopsis* regulator

- of axillary meristems controls a leaf axil stem cell niche and modulates vegetative development[J]. *Plant Cell*, 2006, 18: 598-611.
- [6] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, et al. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants[J]. *Plant Journal*, 2004, 37(1): 115-127.
- [7] Schmitz G, Tillmann E, Carriero F, et al. The tomato blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 1064-1069.
- [8] Dörte Müller, Gregor Schmitz, Klaus Theres. Blind Homologous R2R3 MYB Genes Control the Pattern of Lateral Meristem Initiation in *Arabidopsis*[J]. *The Plant Cell*, 2006, 18: 586-597.
- [9] Thompson M A, Ramsay R G. MYB : an old oncoprotein with new roles[J]. *Bioessays*, 1995, 17: 341-350.
- [10] Stracker. The R2R3MYB gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4: 447-456.
- [11] Lodovico T, Angel M, Adrian P, et al. The *AmMYB308* and *AmMYB330* transcription factors from *antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco [J]. *The Plant Cell*, 1998, 10: 135-154.
- [12] Jin H, Cominelli E, Bailey P, et al. Transcriptional repression by *AtMYB4* controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*[J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2000, 19: 6150-6161.
- [13] Aharoni A, De Vos C H, Wein M, et al. The strawberry *FaMYB1* transcription factor suppresses anthocyanin and flavonol accumulation in transgenic tobacco[J]. *Plant Journal*, 2001, 28: 319-332.

