

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201605003

引文格式: 郑珊, 闵丹丹, 莫燕梅, 等. 罗汉果色氨酸转氨酶基因 *SgTAR2* 的克隆及表达分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(3):365-372
ZHENG S, MIN DD, MO YM, et al. Cloning and expression analysis of tryptophan aminotransferase of *Arabidopsis* 1-Related 2 (*SgTAR2*) of *Siraitia grosvenorii* [J]. Guihaia, 2017, 37(3):365-372

罗汉果色氨酸转氨酶基因 *SgTAR2* 的克隆及表达分析

郑珊¹, 闵丹丹², 莫燕梅¹, 曾娜霞¹, 周琼^{1*}, 李刚³

(1. 广西大学农学院, 南宁 530000; 2. 九江市第三人民医院, 江西九江 332000; 3. 广西药用植物园, 广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 南宁 530023)

摘要: 色氨酸转氨酶基因家族, 是直接参与植物生长素生物合成途径的关键酶基因。该研究在罗汉果转录组测序的基础上, 结合 RACE 技术克隆罗汉果色氨酸转氨酶基因 *SgTAR2* 的全长 cDNA 序列和 DNA 序列; 并对其生物信息学分析和时空表达分析。结果表明: 克隆所得 *SgTAR2* 的 cDNA 全长序列 2 078 bp, 最长 ORF 为 1 332 bp, 编码 443 个氨基酸, GenBank 登录号为 KU949381, 其编码蛋白具有 2 个蒜氨酸酶保守结构域和多个 5'-PLP 结合位点, 推测其可能参与催化色氨酸转氨基作用、化学防御作用、生长素生物合成等生物学过程; *SgTAR2* 基因 DNA 长为 4 103 bp, 含有 4 个内含子和 5 个外显子, 其内含子具有多个高水平转录调控因子和多个与激素、环境等胁迫响应相关的作用元件, 暗示 *SgTAR2* 基因内含子协同调控罗汉果生长素合成、抗胁迫反应、形态发育等生物学过程。实时荧光定量结果显示, *SgTAR2* 基因在罗汉果各组织器官均有表达, 在雌蕊和 15 d 幼果期表达量较高, 暗示该基因参与罗汉果果实早期发育。该研究结果表明 *SgTAR2* 参与了生长素介导的罗汉果不同生长发育过程, 特别对幼果及花的起始发育和器官形态建成等具有重要意义。

关键词: 罗汉果, 色氨酸转氨酶, 克隆, 基因表达

中图分类号: Q943.2, Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)03-0365-08

Cloning and expression analysis of tryptophan aminotransferase of *Arabidopsis* 1-Related 2 (*SgTAR2*) of *Siraitia grosvenorii*

ZHENG Shan¹, MIN Dan-Dan², MO Yan-Mei¹, ZENG Na-Xia¹,
ZHOU Qiong^{1*}, LI Gang³

(1. Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530023, China; 2. Jiujiang Third People's Hospital, Jiujiang 332000, Jiangxi, China; 3. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plant, Guangxi Key Laboratory of Medicinal Resources Protection and Genetic Improvement, Nanning 530023, China)

Abstract: Tryptophan aminotransferase gene family is a key gene that directly involved in auxin biosynthesis pathway in plants. The full-length cDNA sequence and DNA sequence of *Siraitia grosvenorii* tryptophan aminotransferase of *Arabidopsis* 1-Related 2 (*SgTAR2*) gene was amplified by using transcriptome sequencing data and the technology of rapid amplification of cDNA ends (RACE) method. Subsequently, analysis of the gene structure of *SgTAR2* by bioinformatics, and

收稿日期: 2016-06-14 修回日期: 2016-07-16

基金项目: 国家自然科学基金(31260359); 广西大学博士启动项目(XBZ110586) [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31260359); Startup Foundation for Docotors of Guangxi University(XBZ110586)].

作者简介: 郑珊(1991-), 女, 广西贵港人, 硕士研究生, 研究方向为植物资源与利用, (E-mail) zheng--shan@sohu.com。

*通信作者: 周琼, 博士, 高级实验师, 主要从事植物发育生物学研究, (E-mail) qiong9857@126.com。

the expression levels of *SgTAR2* in different tissues of *S. grosvenorii* were analysed by real-time quantitative method. The results showed that cloned full length of *SgTAR2* cDNA sequence was 2 078 bp, containing a 1 332 bp open reading frame (ORF) which encoded 443 amino acids, and GenBank accession number was KU949381. The coding protein had two alliinase domains and multiple 5'-PLP binding sites, which might take part in catalytic amino acid transfer, chemical defense, auxin biosynthesis and other biological processes. The full-length DNA sequence was 4 103 bp with four introns and five exons, and these introns contained multiple 5UTR Py-rich stretch, hormonal and environmental stress responses related cis-acting elements, which might play a role in auxin biosynthesis, stress response, morphological development and other biological processes. The result of Real Time PCR exhibited that *SgTAR2* was the highest abundance in pistils and 15 d fruit, and suggested that auxin synthesis was exuberant in initial development of *S. grosvenorii* fruit. Therefore, *SgTAR2* plays a significant role in the growth and development of *S. grosvenorii* by auxin mediated, especially in young fruit and flower initial development and organ morphogenesis.

Key words: *Siraitia grosvenorii*, tryptophan aminotransferase of *Arabidopsis* 1-Related, cloning, gene expression

生长素是一类重要植物激素,从胚胎发育到器官形态建成和衰老,植物生长发育的每个阶段几乎都受到它的调控。在花期应用生长素类物质(2,4-D 溶液)涂抹罗汉果果柄或子房能诱导单性结实(李珍贞和邬辉平,1988)。由 *TAA1/TAR* 基因家族编码的色氨酸转氨酶催化 Trp (色氨酸)通过转氨基作用生成 IPA(吲哚丙酮酸),再由 *YUC* 基因家族编码的类黄素单加氧酶催化 IPA 合成 IAA,是植物中迄今发现的第一个完整的生长素生物合成途径(图 1)(Mashiguchi et al, 2011; Wang et al, 2015)。

TAA1/TAR 作为生长素合成途径中的关键酶基因之一,其突变或异常表达对植物生长发育具有广泛、深刻的影响。拟南芥中,*TAA1/TAR* 基因在胚胎形成初期及以后均能检测到,但突变体 *tar1/tar2* 受到抑制(Tao et al, 2008)。由于 *TAA1* 和 *TAR2* 的突变,细胞核扩散功能缺失,导致雌配子体形成空泡或胚囊各向异性生长(Panoli et al, 2014);*TAA1/TAR* 突变体的功能缺失导致根、茎、叶、下胚轴等器官发育受到影响(Stepanova et al, 2008)。施加外源生长素能抑制 *TAA1/TAR* 表达,揭示生长素能反馈调控局部生长素合成(Masashi et al, 2009);在短柄草幼苗中,导入 *TAR2-like* 基因能引起下游基因表达下调以及转氨酶活性降低,但使用 *TAA1/TAR* 特异抑制剂却可促进下游生长素合成(Davidal et al, 2013)。前期转录组研究表明,罗汉果 *TAA1/TAR* 基因(*SgTAR2*)与果实早期发育密切相关,但迄今为止未见关于该基因的研究报道。本研究在罗汉果 *SgTAR2* 的 unigene 序列基础上,结合 RACE 技术克隆 *SgTAR2* 基因 cDNA 和 DNA 全长,考察该基因在罗汉果不同组织器官中的时空表达,初步明确其分子和生物学功能,为深入利用 *SgTAR2* 进行罗汉果

生长发育等遗传改良奠定基础。

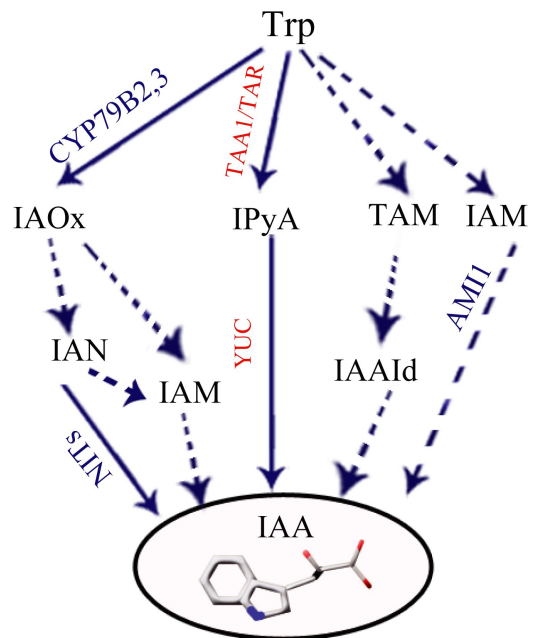


图 1 植物 IAA 生物合成途径

Fig. 1 IAA biosynthesis pathway in plants

1 材料与方 法

1.1 材料

所用罗汉果“青皮 1 号”雌株采自广西药用植物园实验基地。分别取罗汉果盛花期雌株的茎、叶、芽、雌蕊、雄蕊及 15 d 果、30 d 果,提取 DNA 和 RNA。

pMD19-T 载体、Pfu DNA 聚合酶、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、PrimeScript Reverse Transcriptase、SYBR Premix Ex Taq II、DNA 连接试

试剂盒购自 Takara 公司, Easy Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、感受态细胞 DH5 α 购自全式金公司, DNA 凝胶回收试剂盒、TRNzol 总 RNA 提取试剂购自天根公司, 其余试剂均为分析纯; 引物合成和测序工作均交由深圳华大基因公司完成。实时荧光定量 PCR Bio-Rad CFX96 型荧光定量 PCR 仪。

1.2 方法

1.2.1 DNA 和 RNA 提取 罗汉果各组织器官总 DNA 采用改良 CTAB 法提取 (魏胜华和孟娜, 2011)。各组织器官总 RNA 提取参照 TRNzol 总 RNA 提取试剂 (天根) 说明书操作。RNA 反转录参照 RNA 反转录试剂盒 (TAKARA) 说明书操作。用超微量分光光度计 (Thermo Scientific) 和 1% 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 DNA 和 RNA 纯度和质量。

1.2.2 *SgTAR2* 基因全长 cDNA 和 DNA 扩增 根据罗汉果转录组分析中注释为 TAR2 蛋白的相应 uni-gene 序列, 用 Primer 5.0 软件设计特异引物 tar2S/tar2A, 扩增 cDNA 中间序列。采用改良 RACE 法 (罗聪等, 2011) 进行 *SgTAR2* 基因 3' 和 5' 端序列扩增; 根据 cDNA 中间序列分别设计 5' RACE 和 3' RACE 特异引物 tar5'1/tar5'2/tar5'3 和 tar3'1/tar3'2, 深圳华大公司合成 5' RACE 和 3' RACE 锚定引物 Anchor/AUAP 和 RTP3/S3, 以罗汉果混合样反转录 cDNA 第一链为模板, 按 RACE 方案, 进行槽式 PCR 扩增。回收目的条带后, 连 T 克隆, 经蓝白斑鉴定、筛选, 送华大基因公司测序。将测序验证后的 5' RACE 片段、cDNA 中间序列、3' RACE 片段进行拼接, 获得全长 cDNA 序列。再根据拼接序列, 在两端设计特异引物 Tar2-cF/Tar2-cR 分别以罗汉果 DNA 和混合样反转录 cDNA 第一链为模板扩增全长 DNA 序列和 cDNA 序列。

PCR 反应体系: 罗汉果 DNA 或 cDNA 模板 0.5 μ L, 10 \times PCR Buffer 1.0 μ L, 上下游引物 (10 μ mol \cdot L $^{-1}$) 各 0.3 μ L, Taq 酶 (5 U \cdot μ L $^{-1}$) 0.1 μ L, dNTP mix (2.5 mmol \cdot L $^{-1}$) 0.8 μ L, 加水补至 10 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。将 PCR 反应产物纯化回收, 经 T 克隆蓝白斑筛选后送公司测序。

1.2.3 *SgTAR2* 基因生物信息学分析 对不同测序片段, 利用 DNASTAR-SeqMan 构建重叠群, 用 DNASTAR-EditSeq 对 *SgTAR2* 的 cDNA 全长查找最长开放阅读框 (ORF), 并翻译成相应蛋白序列。在 NCBI 上利用 BLASTP 工具初步分析 *SgTAR2* 相应结构域及功

表 1 本研究所用到的引物序列
Table 1 List of primers used in this article

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
tar2S	GCTGCCCTCTATGCTCTGTCTC
tar2A	TACCGCCACTTCTGTTCCACC
Tar2-cF	CACGACCGATTATTTCTCTG
Tar2-cR	CTTCAACCTCTAATGAACGCC
RTP3	GACTAGATCTCCATGGCCTAGGTTTTTTTTTTTTT
S3	GACTAGATCTCCATGGCCTAGG
Anchor	CUACUACUACUAGGCCACGCGTCTGACTAG-TACGGGHGG
AUAP	GGCCACGCGTCTGACTAGTAC
tar3'1	CACAAATGGGCTGGTGATGCT
tar3'2	GGACGAGCCCTACATTGAGTTG
tar5'1	CCATTGTGGAGCCCGACTT
tar5'2	CCACGCTGATGGGTTGAGACG
tar5'3	TATTGCTCATACTGTCGGGTC
q-TAR2-F	GGAGACTGAGTTTGGGAAGC CGCTGATGGGTTGAGACG
q-TAR2-R	CGCTGATGGGTTGAGACG
q-Actin-F	TGTCTGGATCGGTGTTCTCT
q-Actin-R	AACAGGACCTCAGGGCACC

能; 利用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>) 进行保守结构域预测; 利用在线工具 ExPASy (<http://web.expasy.org/>) 对基因编码蛋白进行基本理化性质分析; 利用 SOPMA (<https://prabi.ibcp.fr/>) 工具和 SWISS-MODLE (<http://www.swissmodel.expasy.org/>) 工具进行蛋白进行二级结构和三级结构分析预测; 利用在线工具 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/>) 和 PLACE (<http://sogo.dna.affrc.go.jp/>) 预测基因内含子顺式作用元件。

1.2.4 *SgTAR2* 基因荧光定量 PCR 分析 以基因表达稳定性较好的肌动蛋白 *actin* 为内参基因 (涂冬萍等, 2015)。根据罗汉果 *actin* 基因 (登录号为 KU949382) 和 *SgTAR2* 基因分别设计荧光定量引物 q-Actin-F/q-Actin-R 和 q-TAR2-F/q-TAR2-R。分别提取大约 1 μ g 的罗汉果各组织器官的 RNA, 利用 TaKaRa 公司 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA

Eraser 试剂盒反转录得到 cDNA 第一链模板,以罗汉果叶 cDNA 以 5 倍浓度梯度稀释 6 个浓度梯度标准品,在 Bio-Rad CFX96 仪器上进行荧光定量实验,分别制作内参基因和目的基因的标准曲线计算扩增效率,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量。

荧光定量 PCR 反应体系:cDNA 模板 0.5 μL ,上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.4 μL , $2 \times \text{SYBR Premix Ex Taq II}$ 5 μL ,加水补至 10 μL 。反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,40 个循环。以 *SgTAR2* 在罗汉果叶中的表达量为对照,用 SPSS 16.0 软件,用 duncan 对数据进行方差分析(显著水平 $\alpha=0.05$),并用 Excel 统计软件绘图。

2 结果与分析

2.1 罗汉果总 DNA 和总 RNA 的提取

采用 CTAB 法提取的总 DNA 经琼脂糖凝胶电泳检测质量较好(图 2:a),可用于下一步实验。采用 Trizol 法提取的 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测显示, RNA 条带清晰,28S、18S、5S 三条带清晰可见,且 28S 和 18S 其亮度比例接近 2:1(图 2:b);经分光光度计检测, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 在 1.8~2.0 之间,表明 RNA 完整性较好,无明显降解,可用于下一步实验。

2.2 罗汉果 *SgTAR2* 基因 cDNA 全长和 DNA 全长扩增

PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,扩增产物电泳条带清晰且单一,回收测序结果为 235 bp。在得到中间序列的基础上,采用改良 RACE 技术扩增 5' 和 3' 序列,分别得到 511 bp 和 945 bp 的片段。将前述 3 段序列(图 3)分别经 BLASTN 验证后,拼接重叠群,再次利用 BLASTN 对比,发现 5' UTR 仍有部分序列未扩增出来,继续设计引物 tar5' 3 进行第二次 5' RACE 扩增。将所有扩增得到的序列拼接,并根据该拼接序列的 CDS 两端设计基因全长特异引物,以验证拼接全长正确性。同时,以罗汉果 cDNA 和 DNA 为模版扩增该基因 cDNA 及 DNA 序列。PCR 扩增后经克隆测序表明,该全长 cDNA 序列与拼接序列结果一致,DNA 序列相比 cDNA 序列多出 2 143 bp。序列分析表明,该基因 cDNA 全长 2 078 bp,CDS 包含一个 1 332 bp 的最长 ORF,编码 443 个氨基酸,包含 566 bp 5' UTR 和 180 bp 3' UTR,GenBank 登录号为 KU949381。

2.3 罗汉果 *SgTAR2* 基因生物信息学分析

2.3.1 *SgTAR2* 基因编码蛋白特性分析 利用 NCBI

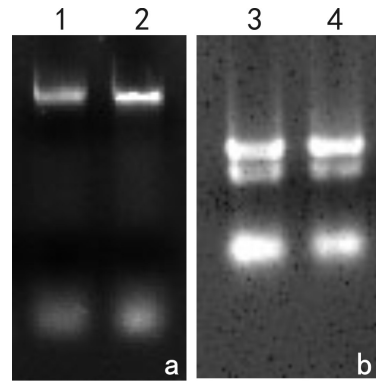


图 2 罗汉果总 DNA (a) 和总 RNA (b) 电泳结果
1, 2. 总 DNA; 3, 4. 总 RNA。

Fig. 2 Electrophoresis results of total DNA (a) and total RNA (b) of *Siraitia grosvenorii*

1, 2. Total DNA; 3, 4. Total RNA.

上 Blastx 工具对比发现 *SgTAR2* 基因属于“ AAT-I superfamily”超基因家族(图 5:a)。利用 ExPASy 对该基因进行蛋白基本理化性质分析,*SgTAR2* 编码蛋白理论分子量为 49.15 kD,等电点 7.24,平均总亲水性 -0.146,脂肪系数 83.39,预测分子式为 $\text{C}_{2215}\text{H}_{3419}\text{N}_{595}\text{O}_{639}\text{S}_{17}$,编码蛋白不稳定系数 43.72。利用 SOPMA 软件进行二级结构分析显示,该蛋白 β 转角占 8.82%、 α 螺旋占 36.20%、延伸链占 22.17%、随机线圈占 32.81%。通过 SWISS-MODLE 对该蛋白进行三级结构预测如图 4。

利用在线工具 Blastp 和 InterProScan 对 *SgTAR2* 的蛋白进行分析发现,该蛋白含有 12 个保守结构域(图 5:b);其中,50~422 位之间有 5 个保守域,分别是 EGF 类蒜氨酸酶 (EGF-like alliinase, IPR006947)、磷酸吡哆醛依赖转移酶 (Pyridoxal phosphate-dependent transferase, IPR015424)、蒜氨酸酶 C 末端 (Alliinase C-terminal, IPR006948)、磷酸吡哆醛依赖转移酶主要结构域 I (Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 1 IPR015421)、磷酸吡哆醛依赖转移酶主要结构域 II (Pyridoxal phosphate-dependent transferase, major region, subdomain 2 IPR015422)。其中,EGF 类蒜氨酸酶和蒜氨酸酶 C 端基因本体预测表明,该蛋白具有碳硫解酶活性(GO:0016846)的分子功能;磷酸吡哆醛依赖转移酶主要结构域本体预测表明,该蛋白具有催化活性(GO:0003824)。

2.3.2 *SgTAR2* 基因结构及其内含子信息分析 将

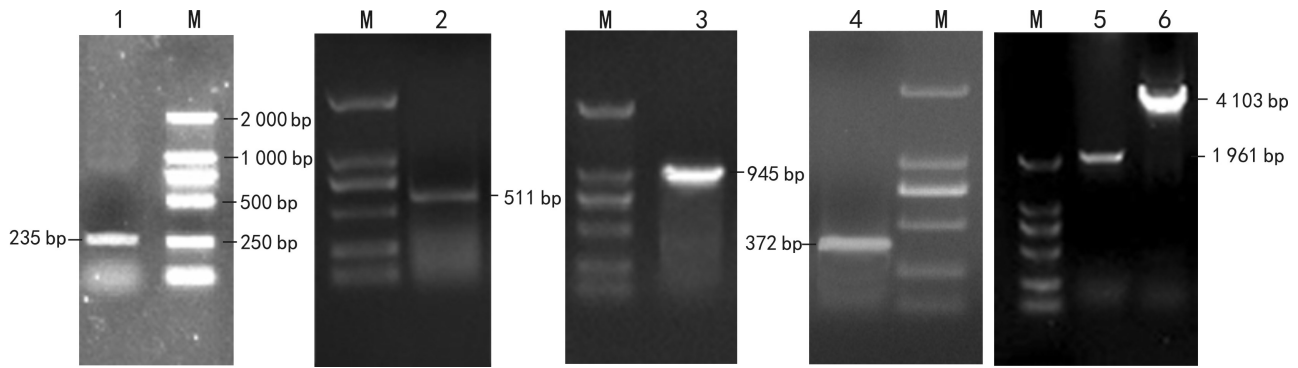


图 3 罗汉果 *SgTAR2* 基因 5'RACE、3'RACE、cDNA 全长、DNA 全长扩增产物 M. DL 2000 分子量标记; 1. 保守区扩增产物; 2. 第一次 5'RACE 扩增产物; 3. 3'RACE 扩增产物; 4. 第二次 5'RACE 扩增产物; 5. cDNA 全长扩增产物; 6. DNA 全长扩增产物。
Fig. 3 Amplification of conserved region, 5'RACE, 3'RACE, full-length of cDNA and full-length of DNA from *SgTAR2* of *Siraitia grosvenorii* M. DL 2 000 marker; 1. Conserved region amplification; 2. 5'RACE amplification for the first time; 3. 3'RACE amplifications; 4. Secondary 5'RACE amplification; 5. Amplification for full-length of cDNA; 6. Amplification for full-length of DNA.

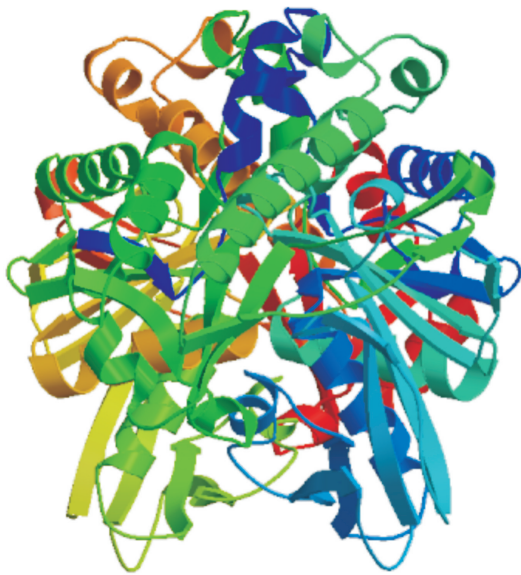


图 4 罗汉果 *SgTAR2* 蛋白的三级结构预测
Fig. 4 Deduced three-dimensional structure of *SgTAR2* from *Siraitia grosvenorii*

SgTAR2 基因的 cDNA 序列和 DNA 序列进行对比分析,结果显示该基因编码区含有长度分别为 1 458、498、77 和 110 bp 的 4 内含子,5 个外显子长度分别为 791、304、283、303 和 269 bp(图 6),外显子和内含子的剪切符合 GT-AG 原则,4 个内含子 AT 含量比较高。

利用在线工具 PlantCARE (<http://bioinformatics>.

psb.ugent.be/webtools/plantcare) 和 PLACE (<https://sogo.dna.affrc.go.jp/page=newplace>) 预测 *SgTAR2* 基因内含子顺式作用元件,结果显示,内含子 1 具有生长素响应元件(AuxRR-core)、光响应元件(SP1)、ABA 响应元件(ABRE)、厌氧响应元件(ARE)、乙烯响应元件(ERE)、热激响应元件(HSE)、赤霉素响应元件(P-box)、低温诱导响应元件(LTR)、干旱胁迫响应元件(MBS)、水杨酸响应元件(TCA-element)胚乳特异性响应元件(Skn-1_motif)、分生组织特异性响应元件(CCGTCC-box)、胁迫防御响应元件(TC-rich repeats),此外,还具有 4 个高水平转录调控因子(5UTR Py-rich stretch)、24 个 CAAT-box 和 23 个 TATA-box;内含子 2 具有光响应元件、高水平转录调控因子、分生组织特异性响应元件、7 个 CAAT-box、23 个 TATA-box、光响应的 MYB 结合位点、赤霉素响应元件;内含子 3 具有 1 个 TATA-box、干旱胁迫响应元件、胁迫防御响应元件;内含子 4 具有 4 个 TATA-box、2 个 CAAT-box 和光响应元件。

2.4 罗汉果 *SgTAR2* 基因荧光定量 PCR 分析

为明确 *SgTAR2* 基因在罗汉果雌株系各组织器官的时空表达,采用荧光定量 PCR 方法分析该基因的表达情况。结果显示,罗汉果内参基因 *actin* 斜率为 -2.4315, R^2 为 0.979 8,扩增效率为 93%,目的基因 *SgTAR2* 斜率为 -2.364 6, R^2 为 0.999,扩增效率为 97.5%,样品溶解曲线均为单一峰,均在线性范围内,阴性对照没有检测到荧光信号,表明反应体系无污染,引物特异性好,线性关系好,实时定量试验真

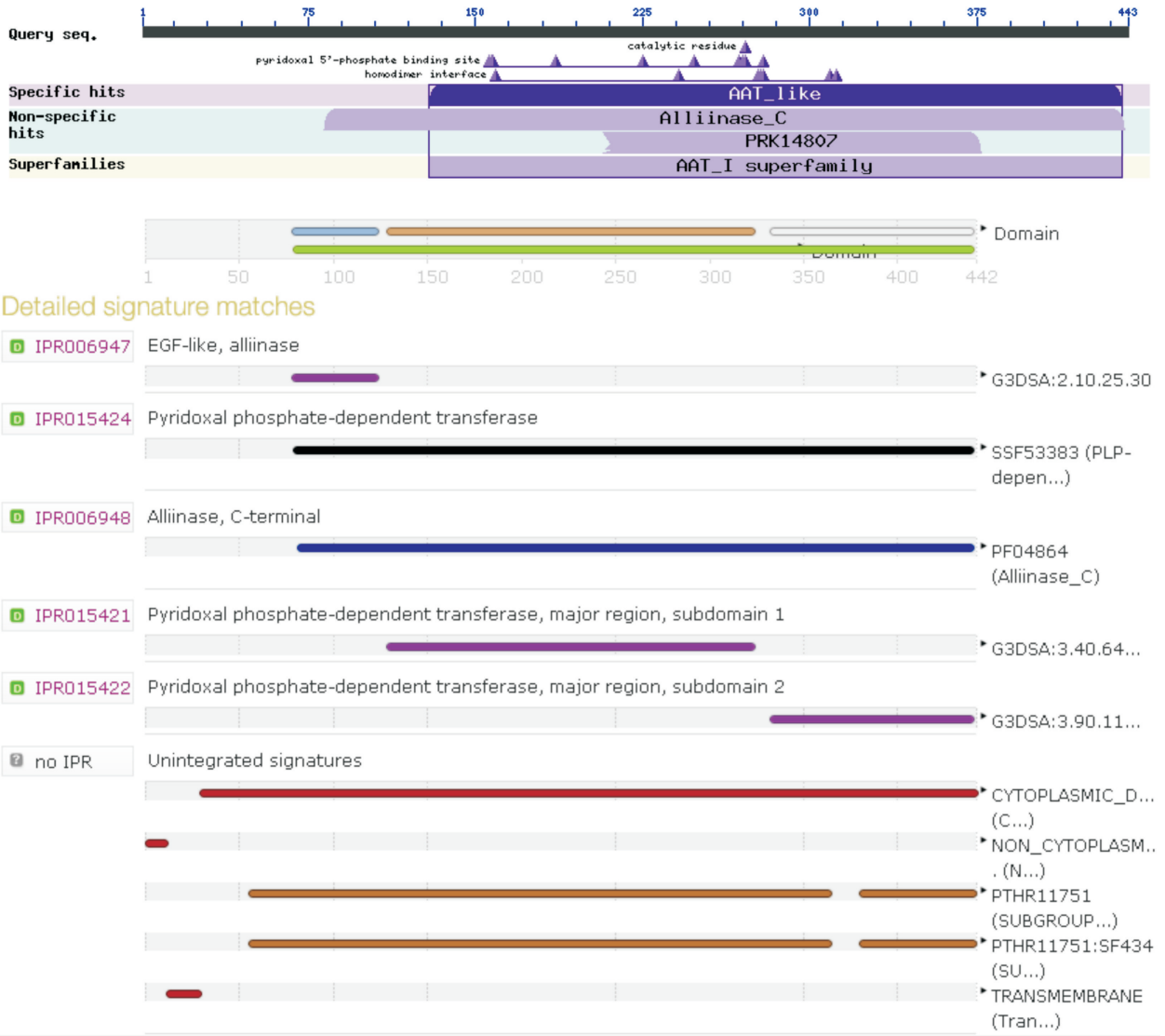


图 5 罗汉果 *SgTAR2* 基因的保守域

Fig. 5 Conserved domain of *SgTAR2* from *Siraitia grosvenorii*

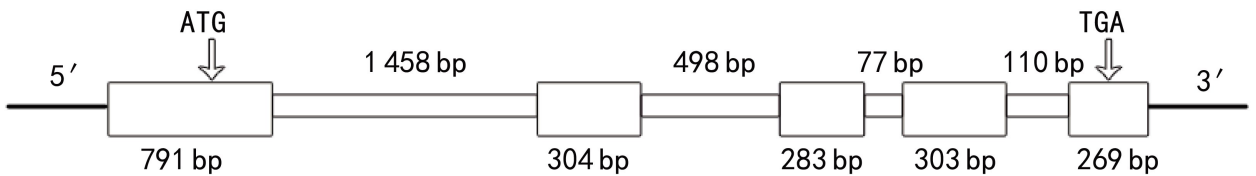


图 6 罗汉果 *SgTAR2* 基因的结构 宽框表示外显子,窄框表示内含子,开放阅读框起始密码子和终止子密码子分别为 ATG 和 TGA。

Fig. 6 Genomic structure of *SgTAR2* from *Siraitia grosvenorii* Exons are indicated by wide boxes, introns are indicated by narrow boxes, the begin code and stop code are ATG and TGA.

实可靠。利用 SPSS 软件,对不同类型组织部位的相对表达量进行差异显著性分析,结果(图 7)表明,

SgTAR2 基因在罗汉果雌株的叶、芽、茎、雌蕊、雄株雄蕊以及授粉后 15 d、30 d 果实中均有表达,表达量

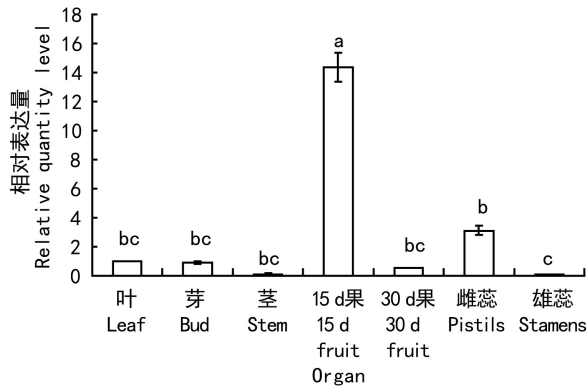


图 7 *SgTAR2* 基因在罗汉果各组织中的相对表达量

Fig. 7 Relative quantity level of *SgTAR2* in different tissues of *Siraitia grosvenorii*

相对大小依次为 15 d 果>雌蕊>叶>芽>30 d 果>茎>雄蕊;可见, *SgTAR2* 在雌蕊、雄蕊和 15 d 果中表达量依次递增,彼此间均达到显著差异;在 15 d 果中的表达量比 30 d 果的显著增高;在叶、芽、茎和 30 d 果中表达量略有差异,但没有达到显著差异。

3 讨论

本研究中,罗汉果 *SgTAR2* 基因相应蛋白属于天门冬氨酸氨基转移酶家族,该家族蛋白具有特征性的 AAT_like 保守结构域,在该结构域上发现 2 个蒜氨酸酶保守结构域和多个 5'-PLP 结合位点。PLP(磷酸吡哆醛)依赖酶主要参与催化氨基酸和氨基酸衍生物的合成和降解过程,按进化起源分为五大类:天门冬氨酸氨基转移酶超家族、色氨酸合成酶超家族、丙氨酸消旋酶超家族、D-氨基酸超家族、肝糖磷酸化酶家族(Christen & Mehta, 2001; Kirsch, 2004)。蒜氨酸酶表现 C-S 裂解酶活性,被认为是植物原始防御系统的组成部分,当细胞受到外力破坏等作用,蒜氨酸酶与底物发生反应,产生含硫复合物、丙酮酸等物质,前者具有抗微生物的化学防御作用(Scharfenberg et al, 1990; Shimon et al, 2007),后者参与生长素生物合成等多个代谢途径(Liu et al, 2011)。暗示罗汉果 *SgTAR2* 具有复杂的分子功能,可能参与催化色氨酸转氨基作用和生长素生物合成等重要生物学过程。

许多植物基因中的内含子因其具有特征性序列或调控元件在基因表达调控中起重要作用(Chung

et al, 2006)。水稻 OsBP-73 基因的启动子驱动特异基因表达时,需要基因内含子的参与(陈俊和王宗阳, 2004);拟南芥 *AGAMOUS* 基因在花中的特异表达,也需要内含子序列的参与(Sieburth & Meyerowitz, 2004);拟南芥 *PAT1* 基因的内含子有增强基因表达的作用(Simpson & Filipowicz, 1996)。第一个内含子对基因表达调控贡献往往最大。水稻 *TPI* 基因需要第 1 内含子的参与才能驱动 *GUS* 基因在水稻组织中表达(Xu et al, 1994);水稻 *OsTubA1* 基因在分生组织中的正确表达由第 1 内含子介导(Jeon et al, 2010)。本研究表明,罗汉果 *SgTAR2* 基因含有 4 个内含子,均表现出顺式作用元件的序列特征。其中,内含子 1 具有多个高水平转录调控因子和与环境胁迫以及与其它激素互作相关的作用元件。因此, *SgTAR2* 基因的表达可能受这些特征序列以及环境因子的影响或调控。拟南芥中, *TAA1/TAR* 参与调控植物避荫反应(Tao et al, 2008); *TAA1/TAR* 功能缺失能抑制高温诱导的拟南芥下胚轴伸长(Masashi et al, 2009);乙烯能通过调控 *TAA1/TARA* 活性而影响生长素合成(Wen et al, 2011)。暗示 *SgTAR2* 基因内含子协同参与调控罗汉果生长素合成、抗胁迫反应、形态发育等生物学过程。

TAA1 的基因表达能影响到所有组织,在 *TAA1/TIR2* 启动子的调控下,拟南芥野生型 *tir2-1* 幼苗恢复表型, *GUS* 基因在叶、芽、茎、下胚轴、根、胚胎等都有表达(Stepanova et al, 2008; Masashi et al, 2009)。本研究表明,罗汉果 *SgTAR2* 基因在所有组织中均具有组成型表达的特点,表明该基因参与罗汉果各器官的生长发育、形态建成等生物学过程;在 15 日龄的罗汉果幼果中 *SgTAR2* 表达量较高,与植物幼果中 IAA 等激素含量较高,成熟期其含量下降(Bapat et al, 2010)的一般规律相似,可见 *SgTAR2* 参与生长素介导的罗汉果果实起始发育及其形态建成。综上所述,罗汉果 *SgTAR2* 基因克隆和功能的初步研究不仅对深入生长素合成及其生长发育机制研究具有理论意义,而且对实现果实发育及其它激素调控相关的遗传改良也有重要应用价值。

参考文献:

- BAPAT VA, TRIVEDI PK, GHOSH A, et al, 2010. Ripening of fleshy fruit: molecular insight and the role of ethylene [J]. *Bio-technol Adv*, 28(1):94-107.
- CHEN J, WANG ZY, 2004. Expression of *OsBP-73* gene requires in-

- volvement of its intron in rice [J]. *J Plant Physiol Mol Biol*, 30 (1):81-86. [陈俊, 王宗阳, 2004. 水稻 *OsBP-73* 基因表达需要其内含子参与 [J]. *植物生理与分子生物学学报*, 30 (1):81-86.]
- CHRISTEN P, MEHTA PK, 2001. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes [J]. *Chem Rec*, 1(6): 436-447.
- CHUNG BY, SIMONS C, FIRTH AE, et al, 2006. Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Bmc Genom*, 7(1):1-13.
- DAVID PV, MARTIAL S, KARIN L, et al, 2013. Disturbed local auxin homeostasis enhances cellular anisotropy and reveals alternative wiring of auxin-ethylene crosstalk in *Brachypodium distachyon* seminal roots. [J]. *Plos Genet*, 9(6):388-393.
- GO QQ, MA XJ, BAI LH, et al, 2014. Screening of reference genes in *Siraitia grosvenorii* and spatio-temporal expression analysis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 45(15):2224-2229. [郭茜茜, 马小军, 白隆华, 等, 2014. 罗汉果内参基因筛选和 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶时空表达分析 [J]. *中草药*, 45(15):2224-2229.]
- JEON JS, LEE S, JUNG KH, et al, 2010. Tissue-preferential expression of a rice alpha-tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. [J]. *Plant Physiol*, 34(1):55-62.
- KIRSCH JF, 2004. Pyridoxal phosphate enzymes: mechanistic, structural, and evolutionary considerations. [J]. *Ann Rev Biochem*, 73(73):383-415.
- LI ZZ, WU HP, 1988. 2,4-D and *Siraitia grosvenorii* parthenocarpy [J]. *Plant J*, (3). [李珍贞, 邬辉平, 1988. 2,4-D 与罗汉果单性结实 [J]. *植物杂志*, (3).]
- LUO C, HE XH, CHEN H, et al, 2011. A high-efficient method of RACE technique for obtaining the gene 5'end [J]. *J Plant Physiol*, (4):409-414. [罗聪, 何新华, 陈虎, 等, 2011. 一种高效获取基因 5'末端的 RACE 方法 [J]. *植物生理学报*, (4):409-414.]
- MASASHI Y, KATIE G, PRIGGE MJ, et al, 2009. The transport inhibitor response2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. [J]. *Plant Physiol*, 151 (1):168-179.
- MASHIGUCHI K, TANAKA K, SAKAI T, et al, 2011. The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 108(45):18512-18517.
- MCSTEEN P, ZHAO Y, 2008. Plant hormones and signaling: common themes and new developments. [J]. *Dev Cell*, 14 (4):467-473.
- PANOLI A, MARTIN MV, ALANDETESAEZ M, et al, 2014. Auxin import and local auxin biosynthesis are required for mitotic divisions, cell expansion and cell specification during female gametophyte development in *Arabidopsis thaliana*. [J]. *PLoS ONE*, 10(9):1121-1133.
- SCHARFENBERG K, WAGNER R, WAGNER KG, 1990. The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines [J]. *Canc Lett*, 53(2-3): 103-108.
- SHIMON L, RABINKOV AI, MIRON T, et al, 2007. Two structures of alliinase from allium sativum L.: apo form and ternary complex with aminoacrylate reaction intermediate covalently bound to the PLP cofactor [J]. *J Mol Biol*, 366(2):611-625.
- SIEBURTH LE, MEYEROWITZ EM, 1997. Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that cis elements for spatial regulation are located intragenically. [J]. *Plant Cell*, 9 (3):355-365.
- SIMPSON GG, FILIPOWICZ W, 1996. Splicing of precursors to mRNA in higher plants: mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery [J]. *Plant Mol Biol*, 32(1-2):1-41.
- STEPANOVA AN, JOYCE RH, JEONGA Y, et al, 2008. TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. [J]. *Cell*, 133(1):177-191.
- TAO Y, FERRER JL, ZHAO Y, et al, 2008. Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants [J]. *Cell*, 133(1):164-176.
- TU DP, MO CM, MA XJ, et al, 2015. Selection of reference genes of *Siraitia grosvenorii* by real-time PCR [J]. *Chin J Chin Mat Med*, 40(2):204-209. [涂冬萍, 莫长明, 马小军, 等, 2015. 罗汉果实时荧光定量 PCR 内参基因的选择 [J]. *中国中药杂志*, 40(2):204-209.]
- WANG B, CHU J, YU T, et al, 2015. Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis* [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 112(15):4821-4826.
- WEI SH, MENG N, 2011. A modified CTAB method for total DNA extraction from the medicinal herb leaves of *Euphorbia* Linn [J]. *Hubei Agric Sci*, 50(16):3418-3420. [魏胜华, 孟娜, 2011. 改良 CTAB 法提取大戟属药用植物叶片总 DNA 试验 [J]. *湖北农业科学*, 50(16):3418-3420.]
- WEN RH, JAVIER B, HONG JL, et al, 2011. A small-molecule screen identifies L-kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. [J]. *Plant Cell*, 23(11):3944-3960.
- XU Y, YU H, HALL TC, 1994. Rice triosephosphate isomerase gene 5 [prime] sequence directs [beta]-glucuronidase activity in transgenic tobacco but requires an intron for expression in rice [J]. *Plant Physiol*, 106(2):459-467.