

枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因的克隆与表达分析

乔枫¹ 耿贵工² 曾阳¹ 金兰¹ 谢惠春^{1*}

(1. 青海师范大学 青藏高原药用动植物资源重点实验室, 西宁 810008;

2. 青海大学 农林科学院/农业部农产品质量安全风险评估实验室(西宁), 西宁 810016)

摘要 为探索青海枸杞抗坏血酸过氧化物酶(APX)基因信息,并对枸杞 APX 基因进行生物信息学分析以及基因表达研究,通过 RT-PCR 和 RACE 方法克隆枸杞 APX 基因,利用生物信息学软件预测基因结构,采用实时荧光定量 PCR 方法分析基因表达的变化。结果显示:枸杞 APX 基因的全长 cDNA 序列为 1 047 bp(Genbank No. KX981601),命名为 *LcAPX* 基因。该基因含有 1 个 753 bp 的完整开放阅读框(ORF),编码 250 个氨基酸,包含亚铁血红素结合位点、底物结合位点和 K⁺ 结合位点。枸杞 *LcAPX* 与茄科植物的 APX 蛋白聚为一类,说明两者的亲缘关系较近。*LcAPX* 基因在枸杞的成熟叶中表达量最高,花中表达量最少。其在聚乙二醇(PEG)、氯化钠(NaCl)胁迫下诱导表达,显示 *LcAPX* 在枸杞抗干旱和抗盐逆境过程起一定作用。

关键词 枸杞; 抗坏血酸过氧化物酶基因 (APX); 基因克隆; 表达分析

中图分类号 Q752

文章编号 1007-4333(2019)04-0064-09

文献标志码 A

Molecular cloning and expression patterns of *LcAPX* from *Lycium chinense*

QIAO Feng¹, GENG Guigong², ZENG Yang¹, JIN Lan¹, XIE Huichun^{1*}

(1. Medicinal Animal and Plant Resources Key Laboratory of Qinghai-Tibet Plateau, Qinghai Normal University, Xining 810008, China;

2. Academy of agriculture and forestry /Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products,

Ministry of Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, China)

Abstract The objective of this study was to explore a ascorbate peroxidase (APX) gene in *Lycium chinense* by the methods of Reverse-Transcription PCR and RACE, and deduce the structure of this gene by bioinformatics, and analyze gene expression by real time PCR. The full-length cDNA of *L. chinense* APX (designated as *LcAPX*) was 1 047 bp (Genbank No. KX981601), and contained a complete open reading frame (ORF) of 753 bp, which encoded 250 amino acid residues. Sequence analysis showed that *LcAPX* protein contains the heme binding site, substrate binding site, and K⁺ binding site. Homology analysis indicated that the deduced *LcAPX* protein was highly homologous to other APX proteins from different species. *LcAPX* protein had closer relationship with APXs from *Solanaceae* plants than from other plants. The expression of *LcAPX* gene was the strongest in the mature leaves of *L. chinense*, and the least in flowers. Furthermore, *LcAPX* transcription level was induced under the treatment of PEG and NaCl stresses, and *LcAPX* played a role in resistance to drought and salt stress processes.

Keywords *Lycium chinense*; ascorbate peroxidase; gene cloning; expression analysis

抗坏血酸过氧化物酶(APX, EC1. 11. 1. 11), 也叫维生素 C 过氧化物酶, 存在于高等植物、真核藻类以及某些蓝细菌中, 在某些昆虫中也能检测出

APX 的活性^[1]。植物 APX 基因家族由 4 个亚家族组成, 即 c APX, p APX, s APX, t APX, 分别位于细胞质、过氧化物酶体、叶绿体和线粒体中^[2]。抗坏

收稿日期: 2018-05-14

基金项目: 教育部项目(Z2016098); 青海省科技厅重点项目(2017-zj-y13); 教育部项目(Z2017049); 青海省科技厅项目(2017-ZJ-774)

第一作者: 乔枫, 教授, 主要从事植物生理和分子生物学研究, E-mail: qiaofnm@163.com

通讯作者: 谢惠春, 教授, 主要从事生物资源研究, E-mail: yezino.1@163.com

血酸过氧化物酶是一种很好的活性氧清除剂,是清除 H_2O_2 的关键酶^[3-6],其以还原型抗坏血酸为反应底物,催化 H_2O_2 产生单脱氢抗坏血酸和 H_2O ,而且 APX 对抗坏血酸具有很高的特异性和亲和性。目前,在胡萝卜^[7]、草莓^[8]、番茄^[9]、烟草^[10]、小麦^[11]、冬油菜^[12]、甘蔗^[13]等植物中的研究已经证实,APX 基因参与植物生长发育和多种逆境胁迫的响应过程。

枸杞是茄科枸杞属灌木,其果实叫枸杞子,是一种重要的传统中草药。枸杞可以抵抗低温、盐碱、干旱,具有较广的抗逆性和较强的适应能力,枸杞能够生长在我国西北干旱、盐碱地区,可以用来防风固沙、改善盐碱环境。枸杞作为我国西北土壤盐碱化的先锋植物,而 APX 是清除 H_2O_2 的关键酶,因此有必要对枸杞 APX 基因进行分子生物学研究。本研究通过设计简并引物,利用 RT-PCR 方法及 RACE 技术,克隆枸杞 APX 基因的 cDNA 全长序列,并用生物信息学分析该基因的序列特征,利用 Real-Time PCR 方法检测 APX 基因在枸杞各组织中的表达特性,以期揭示该基因在枸杞不同器官中的调控作用,为枸杞抗逆性以及药学的研究提供一定的分子理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

枸杞(*Lycium chinense*)由青海农林科学院提供。取新鲜、无病虫害的叶、茎、花、根和果实等材料立即置于液氮中,于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用,用于总 RNA 的提取、基因克隆、实时荧光定量 PCR、APX 活性的测定。

1.2 LcAPX 基因的克隆

使用试剂 Trizol reagent(Invitrogen)提取枸杞总 RNA,通过琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计(GE)检测 RNA 浓度和完整性。利用 AMV First Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa)进行 cDNA 第一链的合成, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。以上述合成的第一链 cDNA 为模板,进行 PCR 扩增,扩增体系 $50\text{ }\mu\text{L}$,包括:cDNA $2.0\text{ }\mu\text{L}$,上、下游引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)各 $1.0\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ PCR Buffer $5\text{ }\mu\text{L}$,dNTP(10 mmol/L) $1.0\text{ }\mu\text{L}$,LA Taq 聚合酶($5\text{ U}/\mu\text{L}$,TaKaRa) $0.4\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O 补足至 $50\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min ; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 1 min , $58\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 1 min ; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 2 min , 35 个循环; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min 。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收试剂盒(北京

三博远志生物公司)纯化后连接至 pMD18-T 载体(TaKaRa),转化 JM109 感受态细胞(北京三博远志生物公司)。蓝白斑筛选阳性克隆,经酶切和 PCR 鉴定后选用 $2\sim 4$ 个阳性克隆送北京三博远志生物公司测序。

采用 5'-RACE 和 3'-RACE 方法分别扩增枸杞 APX 的 cDNA 5' 末端和 3' 末端序列。根据上述 PCR 获得的枸杞 APX 基因片段序列,在 5' 和 3' 端分别设计特异性巢式引物(表 1),并利用 5'-Full RACE Kit 2.0(TaKaRa)和 3'-Full RACE Kit 2.0(TaKaRa)扩增末端序列,试验操作按照试剂盒说明书进行。PCR 产物经纯化、克隆后测序。

1.3 基因序列的生物信息学分析

用 DNASTAR 软件对所克隆的基因片段进行拼接,获得了完整的枸杞 APX 全长 cDNA,然后在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站进行 Blast 分析,并通过软件 ORF Finder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)进行了 ORF 的查找和核苷酸的翻译;应用 ExPASy(<http://www.expasy.org>)提供的相关软件,综合预测分析了编码蛋白的基本性质、结构特点和亚细胞定位;利用 Mega3.1 软件的 Clustal X(1.83)对不同 APX 基因编码氨基酸序列进行多重序列比对,构建系统发育树。采用 SWISS-MODEL(<http://swissmodel.expasy.org/>)对枸杞 APX 的二级结构进行预测,并用软件 Weblab Viewerilte 4.0 进行分析。

1.4 LcAPX 基因组织表达特异性检测

以枸杞 Actin 基因为内参,以此序列设计 Actin 基因荧光定量分析的特异引物 GACTINYF1 和 GACTINYR1(表 1),预期扩增片段长度为 96 bp 。

根据 LcAPX 基因序列设计荧光定量分析引物 GAPXYF1 和 GAPXYR1(表 1),预期扩增片段长度为 98 bp 。采用 TaKaRa 公司 SYBR® Premix Ex Tag™(Tli RNaseH Plus)试剂盒程序进行荧光定量 PCR 反应。反应在 iQ5(BIO-RAD)荧光定量 PCR 仪上进行,反应体系($20\text{ }\mu\text{L}$)为: $2\times$ SYBR Premix Ex Taq™(TaKaRa) $10\text{ }\mu\text{L}$,cDNA template $2.0\text{ }\mu\text{L}$,上下游引物($10\text{ }\mu\text{mol/L}$)各 $0.4\text{ }\mu\text{L}$, $50\times$ ROX Reference Dye $0.4\text{ }\mu\text{L}$,ddH₂O $0.6\text{ }\mu\text{L}$,每个反应做 3 个重复。PCR 扩增程序为: $95\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s ; $95\text{ }^\circ\text{C}$ 5 s , $60\text{ }^\circ\text{C}$ 31 s , 40 个循环,反应结束后确认 Real-Time PCR 扩增曲线和融解曲线。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因的相对表达量^[14]。

表1 试验分析所用引物
Table 1 Primers used in this test

引物	核苷酸序列(5'→3')	用途
Primer	Nucleotide sequence(5'→3')	Purpose
APX-QF1	TG(T/C)GCTCCT(A/C)T(T/C)ATGCT	cDNA 片段克隆
APX-QR1	AAGAAGGC(G/A)TCTTCATCC	For cloning the fragment of cDNA
3outer APX1	CCGGAGGACCTGATGTTCCCTTTC	3'-RACE 扩增
3in APX1	GGCTCTACTCTGTGATCCCGCTTTCC	3'-RACE amplification A
3in APX2	AGGGCTGTGACCACTTGAGGGATG	
5outer APX1	CCTCAAGTGGTCACAGCCCTTGGT	5'-RACE 扩增
5in APX1	AGCCTTGAGGTACTCCTCGCTCACG	5'-RACE amplification
5in APX2	CCAGGGTCAAAGGGAACATCAGGTC	
GAPX5F1	ATGGG(C/T)AAGT(C/G)CTATCCAC(T/C)GT	全长基因扩增
GAPXR1	TTAAGCTTCAGCAAATCCCAAT	For cloning the full length cDNA
GACTINYF1	CCATCTACGAGGGTTACGCTTTG	参考基因
GACTINYR1	AGTCAAGAGCCACATAGGCAAGC	For reference gene
GAPXYF1	AGGGCTTCTACAGTTGCCATCAG	RT-qPCR 表达
GAPXYR1	GTGAGCCTCAGCATAGTCAGCAA	RT-qPCR expression

1.5 APX 酶活性的测定

APX 活性测定按照苏州科铭生物技术有限公司(www.cominbio.com)的试剂盒完成的。

1.6 胁迫处理

以枸杞幼苗为试验材料,采用干旱(50% PEG)、100 μmol/L 的 NaCl 溶液处理幼苗。处理 0、6、12、24、48 和 72 h 后取枸杞叶片,用于枸杞 APX 基因表达分析。

2 结果与分析

2.1 LcAPX 基因全长 cDNA 克隆与序列分析

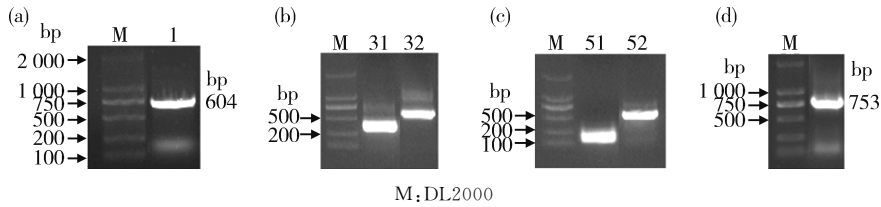
以枸杞叶片总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板,采用 RT-PCR 方法和 RACE 方法扩增枸杞抗坏血酸过氧化物酶 LcAPX 基因的全长 cDNA。首先以引物组合 APX-QF1/APX-QR1(表 1)进行扩增,RT-PCR 结果经测序获得 604 bp 的片段(图 1(a))。根据测序结果,设计 3'-RACE 特异巢式引物:外引物 3outerAPX1 和内引物 3inAPX1、3inAPX2(设计了 2 个内引物)(表 1),3'-RACE-PCR 扩增结果(图 1(b)中 31、32 泳道)经测序分别为 300 和 522 bp 条带;根据测序结果,设计 5'-RACE 特异巢式引物:外引物 5outerAPX1 和内引物 5inAPX1、

5inAPX2(设计了 2 个内引物)(表 1),5'-RACE PCR 扩增结果(图 1(c)中 51 和 52 泳道)经测序分别获得 139 和 447 bp 条带。

使用 DNAssist 软件进行序列拼接获得枸杞 APX 基因全长 cDNA 序列 1 047 bp,利用引物组合 GAPX5F1/GAPXR1 扩增枸杞 APX 基因的开放阅读框序列 753 bp(图 1(d)),编码 250 个氨基酸。通过 Blast 比对,根据同源性将其代表的基因命名为 LcAPX,其核苷酸和氨基酸序列见图 2。DNASTAR 软件对预测的 LcAPX 氨基酸序列分析表明,该蛋白分子量为 27.48,等电点 pI 为 5.798,其中碱性氨基酸 30 个,酸性氨基酸 37 个,疏水性氨基酸 88 个,极性氨基酸 43 个。枸杞 LcAPX 的三级结构图见图 3。

2.2 LcAPX 的氨基酸序列分析

将枸杞 LcAPX 与马铃薯(*Solanum tuberosum*)、番茄(*S. lycopersicum*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、茄子(*S. melongena*)、地黄(*Rehmannia glutinosa*)等植物的 APX 氨基酸序列进行 BLAST 同源性比对,发现枸杞的 APX 基因编码的蛋白序列与其他物种的 APX 氨基酸序列相似程度较高,其中马铃薯、辣椒、番茄的氨基酸序列



(a)引物组合 APX-QF1/APX-QR1 结果;(b)3'-RACE 结果,31 为 3inAPX1,32 为 3inAPX2 结果;(c)5'-RACE 结果,51 为 5inAPX1,52 为 5inAPX2 结果;(d)引物 GAPX5F1/GAPXR1 扩增 ORF。

M. DL2000;(a) The result with primers APX-QF1/APX-QR1; b. The result of 3' RACE, 31 with 3inAPX1, 32 with 3inAPX2;(c)The result of 5' RACE, 51 with 5inAPX1, 52 with 5inAPX2;(d)ORF with primers GAPX5F1/GAPXR1.

图 1 枸杞叶片 LcAPX 的 cDNA 序列的克隆

Fig. 1 Cloning of LcAPX cDNA from Lycium chinense

```

-94  GAAAACCTCATTTCATTTTCAGTGTGTTGTGGTTGGTCGTCGCCGTTCTATTCTCTCTAGGTTTAAACATTTTGCTTCT
-14  TCAGAACAGTACTATGGTGAAGTGCTATCCTACCGTGAGCGAGGAGTACCTCAAGGCTGTTGACAAATGTAAGGAA
      M G K C Y P T V S E E Y L K A V D K C K R K
67   CTCAGAGGACTCATGTGAGAGAATTTGTCCTCTATTATGTCCTCGTCTGCATGGCCTGCTGCTGGTACGATGATGT
      L R G L I A E K N C A P I M L R L A W H S A G T Y D V
147  GTGTTCCAAAACGGAGTCTTCGGTACCATGAGGTTCAAAGCTGAACAAGGACATGGAGCAAACAATGGTCTTGACA
      C S K T G P F G T M R F K A E Q G H G A N N G L D
227  TTGCTCTGAGACTCTTGAGGCCATTAGGAGCAGTTTCCTATCTCTCCCATGCTGATTTCTACCAATGGCTGGTGTG
      I A L R L L E P I R E Q F P I L S H A D F Y Q L A G V
307  GTTGTGTTGAAGTTACTGGAGGACCTGATGTTCCCTTTCACCTGGTAGAGAGGACAAGCCAGAACCACCTGTTGAAGG
      V A V E V T G G P D V P F H P G R E D K P E P P V E G
387  TCGCTTGCTGATGCCACCAAGGGCTGTGACCACTGAGGGATGTTGTCGTGAAACAAATGGGCTTTCTGACAAGGATA
      R L P D A T K G C D H L R D V F V K Q M G L S D K D
467  TTGTTGCGCTCTCTGGTGCCCATACCTTGGGAAGGTGCCACAAGGAGCGATCTGGTTTGGAGGACCTTGGACTGCCAAT
      I V A L S G A H T L G R C H K E R S G F E G P W T A N
547  CCCCTGCTCTTTGACAACATCATACTTTAAGGAACCTTTGAGTGGTGAAAAGGAGGCTTCTACAGTTGCCATCAGACAA
      P L V F D N S Y F K E L L S G E K E G L L Q L P S D K
627  GGCTCTACTCTGTGATCCTGCTTCCGTCCTGTTGAGAAATATGCTGCGGATGAAGATGCTTCTTTGCTGACTATG
      A L L C D P A F R P L V E K Y A A D E D A F F A D Y
707  CTGAGGCTCATTGAAGCTCTGTGAATTGGGGTTTGCTGAAGCTTAAAGATGGTGATTCAGAAGGGTGGGAGTAGTGGCAT
      A E A H L K L C E L G F A E A
787  GTTTTGTGTTTATGTTTCACTTTTGAAGCTAGCTGGCGTGTGGATTTTGTCTCTTTTGCTGCTTACATCATGAT
867  ATAAATTTGGCAGCTATATAGACGATTATATTGCTACTCTCGTCCAGCTTAATAAGTTTCTATTTCGTTTTTGATAAAA
947  AAAAAAA
  
```

方框内字母表示起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA。

The start codon (ATG) and stop codon (TAA) are framed.

图 2 LcAPX 基因 cDNA 序列及推定氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence and putative amino acid sequences of LcAPX gene

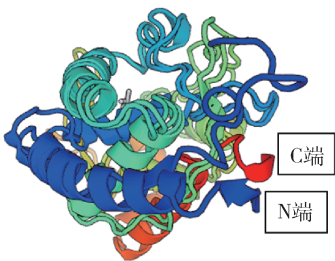


图 3 枸杞 LcAPX 蛋白的三级结构

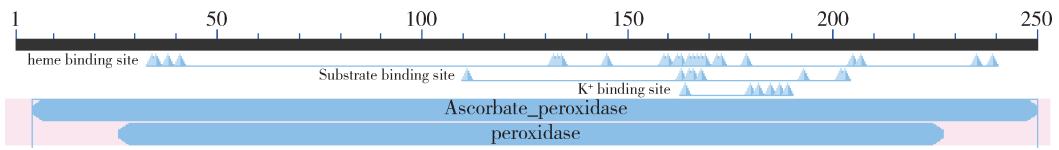
Fig. 3 Tertiary structural model of LcAPX from Lycium chinense

与本试验中克隆的 APX 同源性达到 96%。对这些氨基酸序列进行多重比对后,结果发现其均含有 3 类结合位点,即亚铁血红素结合位点、底物结合位点

和 K⁺ 结合位点(图 4)。这些植物中的氨基酸残基数均为 250 个,表明该基因在这些植物间具有高度同源性。

2.3 LcAPX 编码蛋白与其他植物同源性比较

枸杞 LcAPX 基因推导氨基酸序列与其他作物 APX 编码的氨基酸序列多重比对分析(图 5)发现,它们之间有较高的同源性,LAPX 氨基酸序列与马铃薯、番茄、辣椒的同源性达到了 96%,这进一步证实克隆获得的是枸杞的 APX 基因。表明不同植物 APX 蛋白序列存在高度保守序列,但也有较明显的长度和组成上的变异性。可见抗坏血酸过氧化物酶在进化的过程中保持了足够的遗传稳定性和演化趋同性。



亚铁血红素结合位点、底物结合位点和 K^+ 结合位点。

Heme binding site, substrate binding site and K^+ binding site.

图4 LcAPX 氨基酸的3个保守位点

Fig. 4 Three putative conserved domains in LcAPX amino acids

番茄	1	MGKSYPTVSAEYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
马铃薯	1	MGKSYPTVSEBYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
枸杞	1	MGKCYPTVSEBYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
烟草	1	MGKCYPTVSEBYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
拟南芥	1	MTKNYPTVSEYKKAVERKORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
柠檬	1	MTKNYPTVSEYKKAVERKORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
大豆	1	MGKSYPTVSAEYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
毛白杨	1	MGKCYPTVSEBYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
水稻	1	MAKNYPTVSAEYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
玉米	1	MAKNYPTVSAEYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
葡萄	1	MGKSYPTVSAEYLKAVDHCORRKLRLIABKNCAPIMLR LAVHSAGTYVCSKGTGGPPGTYMFKAEQAHGANNGIDIALRLLPEIKEQPTLSHADYQLAGVVAVEVTGG	110
番茄	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
马铃薯	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
枸杞	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
烟草	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
拟南芥	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
柠檬	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
大豆	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
毛白杨	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
水稻	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
玉米	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
葡萄	111	PDVFFHFGREDKPEPPVEGRLPDATTGSDHLRDVFKQMGLSQKDI VALSGAHTLGRCHKERSGFEGFWITANPLIFDINSYFTELLSGEKEGLLQLPSDKALLSDPAFRLL	220
番茄	221	VEKYAADEDAFFADYAKAHLTISELGFAEA	250
马铃薯	221	VEKYAADEDAFFADYAKAHLTISELGFAEA	250
枸杞	221	VEKYAADEDAFFADYAEAHKLCSELGFAEA	250
烟草	221	VEKYAADEDAFFADYAEAHKLCSELGFAEA	250
拟南芥	221	VEKYAADEDAFFADYAEAHMKLSELGFADA	250
柠檬	221	VEKYAADEDAFFADYAEAHKLCSELGFAEA	250
大豆	221	VDKYAADEDAFFADYAEAHKLCSELGFADA	250
毛白杨	221	VEKYAADEDAFFADYAEAHMKLSELGFAEA	250
水稻	221	VEKYAADEKAFEDYKEAHLKLCSELGFADA	250
玉米	221	VEKYAADEKAFEDYKEAHLKLCSELGFADA	250
葡萄	221	VEKYAADEDAFFEDYKEAHLKLCSELGFADA	250

玫红色代表氨基酸相同,深绿色代表有2种氨基酸。Rose-red color presents the same amino acid and deep-green color presents two kinds of amino acids.

番茄 *Solanum lycopersicum* (NP_001234788.1); 马铃薯 *S. tuberosum* (BAC22953.1); 枸杞 *Lycium chinense* (KX981601); 烟草 *Nicotiana tabacum* (AAA86689.1); 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (BAA03334.1); 柠檬 *Citrus limon* (ADK38619.1); 大豆 *Glycine max* (AAA61779.1); 毛白杨 *Populus tomentosa* (AGY78306.1); 水稻 *Oryza sativa* (BAA08264.1); 玉米 *Zea mays* (NP_001152746.1); 葡萄 *Vitis pseudoreticulata* (AAZ79357.1)

图5 10种植物 APX 氨基酸序列多重比对

Fig. 5 Multiple sequence alignment of amino acids of the APX proteins isolated from ten plants

为研究枸杞 LcAPX 与其他植物 APX 的进化关系,用 Clustalx 1.83 软件对氨基酸序列比对后,通过邻接法构建氨基酸序列的进化树,结果(图6)显示,枸杞 APX 与茄科植物马铃薯、烟草、番茄聚为一个分支,亲缘关系最近,符合传统的植物分类关系。

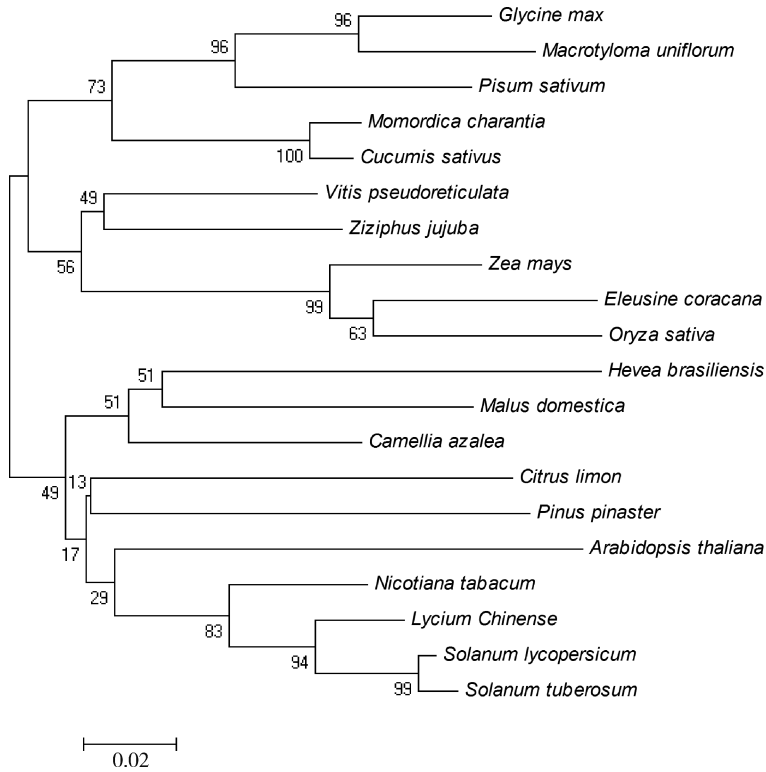
2.4 LcAPX 基因的组织特异性表达

以枸杞 ACITIN 基因为参照,运用 Real-Time PCR,分析枸杞的嫩叶、嫩茎、成熟叶、成熟茎、花、绿

果(不成熟果实)、红果(成熟果实)不同组织中 APX 基因的相对表达量。结果(图7)显示枸杞 APX 基因在成熟叶中相对表达量最高,其次在嫩茎中,在花中相对表达量最低。成熟叶、嫩茎、嫩叶中 APX 表达量分别是花的 7.6、6.2、5.0 倍。以上结果表明, LcAPX 在各组织中均有表达。

2.5 枸杞 APX 活性

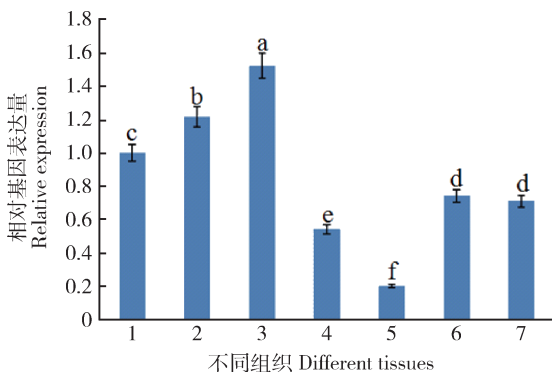
枸杞不同器官中 APX 活性变化见图8, APX 活性在成熟叶和嫩茎中较高,在花中较低。其中成



大豆 *Glycine max* (AAA61779. 1), 硬皮豆 *Macrotyloma uniflorum* (AFN21427. 1), 豌豆 *Pisum sativum* (AAA33645. 1), 苦瓜 *Momordica charantia* (AGJ72851. 1), 黄瓜 *Cucumis sativus* (AGJ72850. 1), 葡萄 *Vitis pseudoreticulata* (AAZ79357. 1), 枣 *Ziziphus jujuba* (BAM28755. 1), 玉米 *Zea mays* (NP_001152746. 1), 穆子 *Eleusine coracana* (AEI98602. 1), 水稻 *Oryza sativa* (BAA08264. 1), 橡胶树 *Hevea brasiliensis* (AAO14118. 1), 苹果 *Malus domestica* (ABP87792. 1), 杜鹃红山茶 *Camellia azalea* (AKP06507. 1), 柠檬 *Citrus limon* (ADK38619. 1), 海岸松 *Pinus pinaster* (AAR32786. 1), 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (BAA03334. 1), 烟草 *Nicotiana tabacum* (AAA86689. 1), 枸杞 *Lycium chinense* (KX981601), 番茄 *Solanum lycopersicum* (NP_001234788. 1), 马铃薯 *S. tuberosum* (BAC22953. 1)

图 6 LcAPX 与其他植物 APX 蛋白系统图进化树

Fig. 6 Phylogenetic tree of LcAPX and membership of APX proteins in other plants

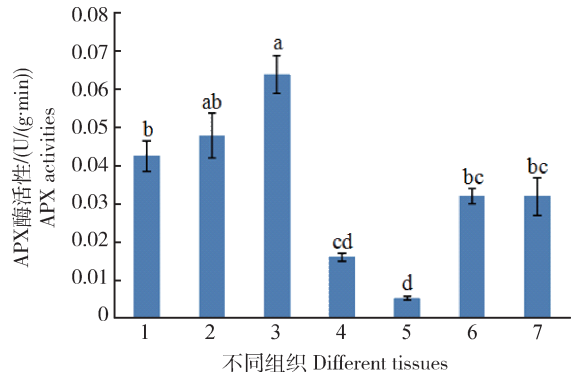


1,嫩叶;2,嫩茎;3,成熟叶;4,成熟茎;5,花;6,绿果;7,红果。不同字母表示不同材料间在 0.05 水平存在显著性差异。

1, Young leaf; 2, Young stem; 3, Mature leaf; 4, Mature stem; 5, Flower; 6, Green fruit; 7, Red fruit. Different letters mean significant difference at $P < 0.05$.

图 7 LcAPX 在枸杞不同组织中的表达

Fig. 7 Expression of LcAPX in tissues of *Lycium chinense*



1,嫩叶;2,嫩茎;3,成熟叶;4,成熟茎;5,花;6,绿果;7,红果。不同字母表示不同材料间在 0.05 水平存在显著性差异。

1, Young leaf; 2, Young stem; 3, Mature leaf; 4, Mature stem; 5, Flower; 6, Green fruit; 7, Red fruit. Different letters mean significant difference at $P < 0.05$.

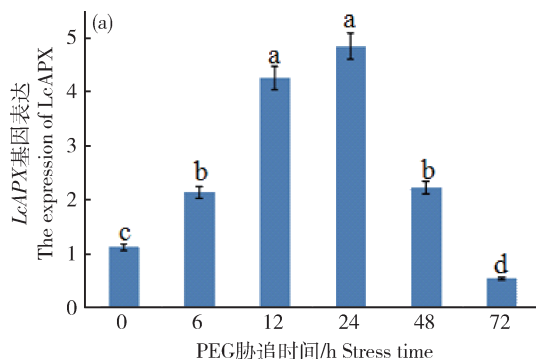
图 8 在枸杞不同组织中的 APX 酶活性

Fig. 8 APX activities in tissues of *Lycium chinense*

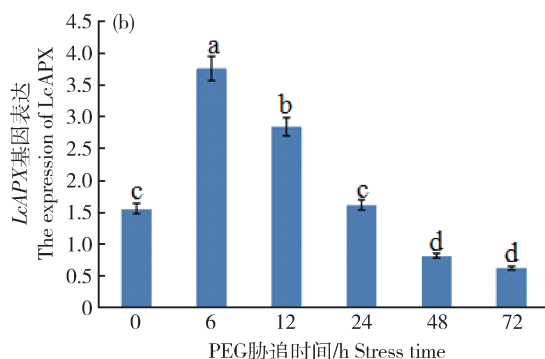
熟叶、嫩茎、嫩叶中 APX 活性分别是花的 12.1、9.1、8.1 倍。APX 活性的变化趋势与 APX 基因表达量变化趋势呈高度正相关,相关系数为 0.989 9。

2.6 LcAPX 在 PEG 和 NaCl 胁迫下的表达量分析

在干旱和盐胁迫下 *LcAPX* 均被诱导表达(图 9)。在 PEG 模拟的干旱胁迫下 *LcAPX* 的表达呈先上升后下降的趋势,在处理 24 h 后表达量达最



高为对照的 4.33 倍。在 NaCl 胁迫下 *LcAPX* 表达量表现出先升高后降低的变化趋势,在处理 6 h 后达到最高值是对照的 2.42 倍,随着处理时间的延长,APX 酶活性显著降低,在 48~72 h,APX 酶活性为对照的 40%~53%。在 PEG 和 NaCl 胁迫下, *LcAPX* 基因表达都呈现上升后下降的趋势,只是时间不同。



不同字母表示不同材料间在 0.05 水平存在显著性差异。
Different letters mean significant difference at $P < 0.05$.

图 9 *LcAPX* 在 PEG 和 NaCl 胁迫下的表达变化

Fig. 9 Expression profiles of *LcAPX* gene under PEG and NaCl stress

3 讨论

本研究中克隆的枸杞 *LcAPX* 基因编码的蛋白质与番茄、烟草、辣椒等 20 多种植物中预测的蛋白质高度同源,具有类似的保守结构域,说明 APX 在进化上相对保守^[15]。进化树分析进一步显示,枸杞 *LcAPX* 与同属茄科番茄、马铃薯进化关系最为接近。对枸杞 *LcAPX* 氨基酸序列分析发现,其三维结构大部分有 α -螺旋构成,将枸杞与其他 20 种同源性较高的植物进行氨基酸序列多重比对,结果显示 APX 基因编码的蛋白均含有三类结合位点,即亚铁血红素结合位点、底物结合位点和 K^+ 结合位点,这 3 个位点在植物清除体内过氧化物上面发挥着重要的作用,而其中的 H-163、L-165、G-166 既是亚铁血红素结合位点又是底物结合位点,在空间位置上也较为接近,表明它们可能共同参与清除植物体内积累的过氧化物,从而提高植物抗逆性^[3-4,16-17]。高海伶^[18]从中华枸杞中分离了细胞质型 APX(cDNA) 基因全长 965 bp,ORF 为 753 bp,将该基因转到烟草中,转基因植株的 APX 酶活性高于对照组,与本研究中所克隆的基因的 ORF 的大小相同。

APX 与植物个体的生长发育相关^[19-21],并在

植物根、叶柄、叶片等组织中具有表达特异性^[22-23],另外 APX 基因可以响应高温、低温、干旱、盐害、病害等非生物胁迫^[24-28]。本研究结果也证实,枸杞中 *LcAPX* 基因表达呈现出明显的组织特异性,其在枸杞成熟叶中的表达量最高,在花和成熟茎中表达较低。在不同非生物胁迫中也呈现不同的响应情况,*LcAPX* 在 PEG 处理 24 h 表达达到最大,之后降低;在 NaCl 胁迫 6 h 表达最强。本研究是从枸杞中克隆获得 *LcAPX* 基因,对进一步研究茄科植物 APX 基因及其功能也具有重要的意义。

参考文献 References

- [1] Marcia C P, Mariana B O, Pedro L. Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus* [J]. *Insect Biochemistry and Physiology*, 2001, 48(2): 63-71
- [2] Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yoshimura Y. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1305-1319
- [3] 孙卫红, 王伟青, 孟庆伟. 植物抗坏血酸过氧化物酶的作用机制、酶学及分子特性 [J]. *植物生理学通讯*, 2005, 41(2): 143-147

- Sun W H, Wang W Q, Meng Q W. Functional Mechanism and Enzymatic and Molecular Characteristic of ascorbate peroxidase in Plants[J]. *Plant Physiology Communication*, 2005, 41(2):143-147 (in Chinese)
- [4] 张维静, 陆海, 杜希华. 抗坏血酸过氧化物酶在植物抵抗氧化胁迫中的作用[J]. *山东师范大学学报: 自然科学版*, 2008, 23(4): 113-115
- Zhang W J, Lu H, Du X H. The function of ascorbate peroxidases plant resistance to oxidative stress[J]. *Journal of Shandong Normal University: Natural Science*, 2008, 23(4): 113-115 (in Chinese)
- [5] Anjum N A, Sharma P, Gill S S, Hasanuzzaman M, Khan E A, Kachhap K, Mohamed A A, Thangavel P, Devi G D, Vasudhevan P, Sofo A, Khan N A, Misra A N, Lukatkin A S, Singh H P, Pereira E, Tuteja N. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(19):19002-19029
- [6] Carolina W R, Ana P K, Julio A G, Douglas J M, Fabricio E L C, Rachel H V S, Andreia C, Felipe K T, Joaquim A G S. Rice peroxisomal ascorbate peroxidase knockdown affects ROS signaling and triggers early leaf senescence[J]. *Plant Science*, 2017, 263:55-65
- [7] 张馨月, 王广龙, 黄蔚, 王枫, 倪桢葵, 熊爱生. 胡萝卜抗坏血酸过氧化物酶基因的分离及其对非生物胁迫的响应[J]. *南京农业大学学报*, 2016, 39(1):55-62
- Zhang X Y, Wang G L, Huang W, Wang F, Ni Z Y, Xiong A S. Cloning of the gene encoding ascorbate peroxidase from carrot and its response to abiotic stress[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, 39(1):55-62 (in Chinese)
- [8] Hou Y X, Tang H R, Zhang Y. Cloning and expression analysis of ascorbate peroxidase gene during fruit development and ripening in *Fragaria × ananassa* cv Toyonaka [J]. *World Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 5:675-679
- [9] Liu K L, Shen L, Wang J Q, Sheng J P. Rapid inactivation of chloroplastic ascorbate peroxidase is responsible for oxidative modification to Rubisco in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under cadmium stress[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50(4):415-426
- [10] Orvar B L, Ellis B E. Isolation of a cDNA encoding cytosolic ascorbate peroxidase in tobacco[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108(2):839-840
- [11] Chen Y P, Wang H Z, Wang X E, Cao A Z, Chen P D. Cloning and expression of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from wheat[J]. *Molecular Biology Reports*, 2006, 33:207-213
- [12] 曾秀存, 孙万仓, 方彦, 刘自刚, 董云, 孙佳, 武军艳, 张鹏飞, 史鹏辉, 孔德晶, 张腾国, 何丽, 赵彩霞. 白菜型冬油菜抗坏血酸过氧化物酶 (APX) 基因的克隆、表达及其活性分析[J]. *作物学报*, 2013, 39(8):1400-1408
- Zeng X C, Sun W C, Fang Y, Liu Z G, Dong Y, Sun J, Wu J Y, Zhang P F, Shi P H, Kong D J, Zhang T G, He L, Zhao C X. Cloning, expression, and activity analysis of ascorbate peroxidase (APX) gene from winter turnip rape (*Brassica campestris* L)[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2013, 39(8):1400-1408 (in Chinese)
- [13] Muhannada K, Ahmad W. A novel L-ascorbate peroxidase 6 gene, ScAPX6, plays an important role in the regulation of response to biotic and abiotic stresses in Sugarcane[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 17:2262-2273
- [14] Kenneth J K, Thomas D S. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_t} method [J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408
- [15] 刘娜, 吴金华, 安亚茹, 杨君, 张艳, 王省芬, 马峙英. 陆地棉抗坏血酸过氧化物酶基因家族全基因组生物信息学分析[J]. *棉花学报*, 2017, 29(1):17-28
- Liu N, Wu J H, An Y R, Yang J, Zhang Y, Wang X F, Ma Z Y. Bioinformatics analysis of the ascorbate peroxidase gene family in the *Gossypium hirsutum* L Genome [J]. *Cotton Science*, 2017, 29(1):17-28 (in Chinese)
- [16] Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372):1305-1319
- [17] Cao S, Du X H, Li L H, Liu Y D, Zhang L, Pan X, Li Y, Li H, Lu H. Overexpression of *Populus tomentosa* cytosolic ascorbate peroxidase enhances abiotic stress tolerance in tobacco plants [J]. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2017, 64(2):224-234
- [18] 高海伶. 枸杞抗坏血酸过氧化物酶基因 *LmAPX* 的克隆及表达分析[D]. 天津: 天津大学, 2015
- Gao H L. Cloning and characterization of a cytosolic ascorbate peroxidase gene *LmAPX* from *Lycium chinense* Miller [D]. Tianjin: Tianjin University, 2015 (in Chinese)
- [19] Li Y J, Hai R L, Du X H, Jiang X N, Lu H. Overexpression of a *Populus peroxisomal* ascorbate peroxidase (*PpAPX*) gene in tobacco plants enhances stress tolerance [J]. *Plant Breeding*, 2009, 128(4):404-410
- [20] Wu B M, Li L, Qiu T H, Zhang X, Cui S X. Cytosolic APX2 is a pleiotropic protein involved in H₂O₂ homeostasis, chloroplast protection, plant architecture and fertility maintenance [J].

- Plant Cell Rep.*, 2018, 37(6): 833-848
- [21] Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals[J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2018(3): 33-46
- [22] Liu H C, Tian D Q, Liu J X, Ma G Y, Zou Q C, Zhu Z J. Cloning and functional analysis of a novel ascorbate peroxidase (APX) gene from *Anthurium andraeanum* [J]. *Journal of Zhejiang University-Science B: Biomedicine and Biotechnology*, 2013, 14(12): 1110-1120
- [23] 方涛,董艳苹,李亚楠,陈德富,陈喜文. 水稻叶绿体抗坏血酸过氧化物酶在干旱和高盐胁迫中的作用[J]. *植物生理学报*, 2015, 51(12): 2207-2213
- Fang T, Dong Y P, Li Y N, Chen D F, Chen X W. Function of rice chloroplastic ascorbate peroxidases in drought and salt stress conditions[J]. *Plant Physiology Journal*, 2015, 51(12): 2207-2213 (in Chinese)
- [24] Wang Y J, Michael W, Richaed M. Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress[J]. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 2005, 130: 167-173
- [25] 陈露,李卓夫,王晓楠,付连双,孙莹璐. 低温下冬小麦 SOD 及 APX 酶相关基因的表达分析[J]. *麦类作物学报*, 2016, 36(8): 982-988
- Chen L, Li Z F, Wang X N, Fu L S, Sun Y L. Expression of genes related to SOD and APX enzymes in winter wheat at low temperature[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2016, 36(8): 982-988 (in Chinese)
- [26] Pandey S, Fartyal D, Agarwal A, Shukla T, James D, Kaul T, Negi Y K, Arora S, Reddy M K. Abiotic stress tolerance in plants: myriad roles of ascorbate peroxidase[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 581-587
- [27] Chiang C M, Chen C C, Chen S P, Lin K H, Chen L R, Su Y H, Yen H C. Overexpression of the ascorbate peroxidase gene from eggplant and sponge gourd enhances flood tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. *Journal of Plant Research*, 2017, 130(2): 373-386
- [28] Jiang G H, Yin D D, Zhao J J Y, Chen H L, Guo L Q, Zhu L H, Zhai W X. The rice thylakoid membrane-bound ascorbate peroxidase *OsAPX8* functions in tolerance to bacterial blight [J]. *Scientific Reports*, 2016(6): 26104

责任编辑:王燕华