

马铃薯 *SoFtsH* 基因全长 cDNA 克隆与在干旱条件下表达研究

范敏^{1,3} 金黎平² 黄三文² 谢开云² 刘庆昌¹ 屈冬玉^{1,2,*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; ² 中国农业科学院蔬菜花卉所, 北京 100081; ³ 新疆农业大学园艺系, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要: FtsH (Filamentation Temperature-Sensitive H) 是一种 ATP 和 Zn^{2+} 依赖型金属蛋白酶, 广泛存在于原核生物和真核生物中, 在真核生物中是多基因家族。FtsH 具有 ATP 酶活性、蛋白水解活性和分子伴侣活性, 参与多种胁迫反应。从抗旱马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 二倍体品系 H145 中分离得到 cDNA-AFLP 差异片段, 利用 RACE 技术克隆了 *SoFtsH* cDNA 全长序列, 并对其进行分析。结果表明, 该序列包含完整的开放阅读框, 长为 723 bp, 编码 129 个氨基酸。*SoFtsH* 具有 2 个铁氧化还原蛋白结合位点, 并存在信号肽序列, 跨膜区域和 Zn^{2+} 结合域。*SoFtsH* 基因序列与 GenBank 数据库中的其他 *FtsH* 基因进行同源序列比对, 并构建系统进化树, 发现该基因与番茄、烟草、拟南芥等高等植物 *FtsH* 基因同源性达 90% 以上。半定量 RT-PCR 和 Northern Blot 杂交结果表明 *SoFtsH* 基因在干旱胁迫下叶片和根系里的表达量明显增加, 且在抗旱品系 H145 与干旱敏感品系 H214 中表达模式不同。说明 *SoFtsH* 基因在马铃薯抗旱中起作用。

关键词: 马铃薯 (*Solanum tuberosum*); 抗旱性; 全长 cDNA; FtsH

Cloning and Expression of a Full-Length cDNA of *SoFtsH* Gene in Potato under Drought Stress

FAN Min^{1,3}, JIN Li-Ping², HUANG San-Wen², XIE Kai-Yun², LIU Qing-Chang¹, and QU Dong-Yu^{1,2,*}

(¹ College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094; ² Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³ Department of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumchi 830052, Xinjiang, China)

Abstract: Filamentation temperature-sensitive H (FtsH) is an ATP dependent metalloprotease and chaperone identified in many prokaryotes and eukaryotes; its homologs have been identified in many plants. FtsH belongs to a larger family of proteins collectively known as the AAA proteins (ATPases associated with diverse cellular activities). Function studies have revealed an important role for FtsH in stress responses. On the basis of one cDNA-AFLP differential fragment isolated from induced mRNA under drought in the potato (*Solanum tuberosum* L.) genotype H145 that is diploid with drought tolerance, the full length cDNA of a putative *FtsH* gene, *SoFtsH* gene was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The gene consists of 723 bp encoding a predicted protein of 129 amino acids. Sequence analysis revealed that it has two 2Fe-2S ferredoxins, iron-sulfur binding regions. The putative signal-peptide, transmembrane regions and the Zn^{2+} binding domain, characteristic of FtsH metalloproteases family, were found in the *SoFtsH* protein. Alignment and phylogenetic analysis of the amino acid sequence deduced from the fragment and the FtsH sequences of other plants retrieved from GenBank were performed with ClustalX program, which showed that *SoFtsH* shares high identity (> 90%) with *FtsH* reported in tomato, tobacco and *Arabidopsis* etc. Transcription level of *SoFtsH* was investigated by semi-quantitative RT-PCR and Northern blot, using actin gene as a control. The result showed that the transcript of *SoFtsH* was significantly enhanced under drought. The different profiles of transcript of *SoFtsH* gene were detected under continuous drought between drought tolerant H145 and drought sensitive H214 that is susceptible to drought. The results suggest that *SoFtsH* gene is closely related with the drought tolerance in potato.

Keywords: Potato; *Solanum tuberosum* L.; Drought tolerance; Full-length cDNA; FtsH

干旱严重影响农作物生产, 是制约作物生产的环境因素之一。马铃薯是世界主要农作物之一, 其产量和质量受干旱的影响非常明显。为了提高马铃薯的产量和质量, 探明马铃薯抗旱的机制, 选育抗旱

优良品种、筛选优秀种质资源有着极其重要的意义。

FtsH (filamentation temperature sensitive H) 属于 AAA 蛋白酶家族, 是由 *FtsH* 基因编码的一种 ATP 和 Zn^{2+} 依赖型兼职蛋白。广泛分布于原核生物和

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA100107)

作者简介: 范敏(1964-), 男, 乌鲁木齐市人, 在读博士生, 研究方向: 马铃薯遗传育种。

* 通讯作者 (Corresponding author): 屈冬玉。E-mail: dyqu@mail.caas.net.cn; Tel: 010-68919398; Fax: 010-68975105

Received (收稿日期): 2007-03-05; Accepted (接受日期): 2007-06-14.

真核生物中,其生物学功能也多种多样^[1]。FtsH 负责细菌原生质膜、线粒体膜、叶绿体膜上的未装配蛋白的降解^[2,3],通过及时降解非复合体形式的自由亚基(SecY, H + -ATPase F₀ 复合体的 a 亚基)^[4,5],避免其可能的有害积累。FtsH 是许多原核生物生长必需的能量依赖型蛋白酶^[6,7]。FtsH 不仅参与生物体内正常的代谢调节过程,而且与多种逆境胁迫响应密切相关,在抵抗热激和高渗、盐害和冷胁迫中起作用^[8]。FtsH 蛋白除了作为蛋白酶发挥功能外,还作为分子伴侣参与蛋白的装配和折叠^[9],这种分子伴侣功能独立于它的蛋白酶功能之外^[10]。高等植物中,拟南芥 *AtFtsH1* 参与 D1 蛋白光氧化损伤产物 23 kD 肽段的降解^[11]。*AtFtsH5* (VAR1) 和 *AtFtsH2* (VAR2) 参与光保护和类囊体发育过程^[12];烟草叶绿体 FtsH 蛋白同系物 DS9 表达降低能增强叶片对病毒感染的超敏反应,说明其与植物抗病性有一定关系^[13]。FtsH 在苜蓿低温^[14]、番茄热激^[15]、冰叶日中花盐胁迫^[16]中也发挥作用。现已知干旱胁迫下耐脱水的复苏植物 *Xerophyta viscosa*^[17]、野生西瓜^[18]、玉米^[19]、芥菜^[20] FtsH 蛋白表达量增加,但 *FtsH* 基因在植物抗旱中的作用还不清楚,在马铃薯等重要农作物上的作用还未见报道。

本研究从基因的差异表达入手,利用 cDNA-AFLP 技术研究干旱胁迫前后基因表达的变化,以发现与马铃薯抗旱性密切相关的 cDNA 片段,以此为基础,利用 RACE 技术克隆马铃薯 *SoFtsH* 基因的全长 cDNA,通过序列比对分析和构建系统树了解所克隆的干旱诱导 *SoFtsH* 与已发表的植物 *FtsH* 基因的同异,为全面了解 *FtsH* 在马铃薯抗旱中作用奠定基础,并利用半定量 RT-PCR 和 Northern 杂交法研究其在干旱条件下的表达情况。

1 材料与与方法

1.1 材料和试验处理

以抗旱二倍体品系 H145 和干旱敏感二倍体品系 H214 为材料,采用 10 cm × 10 cm 苗钵栽培,于苗龄 40 ~ 50 d (8 ~ 10 片叶),取样幼苗顶部 2 ~ 3 片叶用于检测。置光照培养箱中通过控制浇水进行干旱处理,箱内昼夜温度为 23℃/18℃,相对湿度为 80% ~ 90%,光子量流量密度为 200 mol m⁻² s⁻¹,光照时间为 12 h d⁻¹。干旱处理共分 5 个级别,分别为停止浇水后 0、7、10、12、14 d, H145 叶片相对含水量依次为 88.5%、85.4%、83.1%、78.6% 和 77.5%; H214 叶片

相对含水量依次为 87.7%、85.3%、82.7%、77.8% 和 76.5%。相对含水量 = (FW - DW)/(TW - DW), FW 为鲜重, DW 为干重, TW 为吸涨重,参照 Ober 方法^[21]。

1.2 cDNA-AFLP

分别提取正常浇水(对照)、干旱处理 10 d 的 H145 40 ~ 50 d 苗龄植株叶和根的总 RNA。对照和干旱处理植株土壤含水量依次为 82.5% 和 45.1%, 叶片相对含水量为依次 88.5%、75.6%。采用液氮研磨加 Trizol (Invitrogen) 法提取 RNA, 按 Invitrogen 的 SuperscriptRT II 操作说明合成 cDNA。参照 Christian 等^[22] 的 cDNA-AFLP 体系及程序,合成的双链 cDNA 经 *Eco*RI/*Mse*I 双酶切并加接头进行预扩增,将预扩产物稀释 50 倍作为模板,以 E/M 引物组合进行选择性地扩增。共利用 144 个引物组合进行差异片段筛选。

1.3 差异片段回收及克隆测序

将产生差异片段引物组合的 PCR 产物在 6% 的丙稀酰胺胶上分离,通过银染显色。用刀片切取差异条带,浸泡在高盐缓冲液中(20% 乙醇, 1 mol L⁻¹ LiCl, 10 mmol L⁻¹ Tris) 24 h, 65℃ 水浴 1 h, 然后用氯仿抽提,乙醇沉淀吹干后,将 DNA 溶于 40 μL 水。取 5 μL 用作模板在相同的 PCR 条件下重新扩增,程序为 95℃ 5 min 变性, 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 60 s, 30 个循环后 72℃ 10 min。

扩增产物在 1.2% 的琼脂糖上分离,检验差异片段的大小是否正确,利用 TAKARA 公司 PMD18-T 载体克隆差异片段,由中国农业科学院作物所重大科学开放实验室代测序。

1.4 序列比较分析

利用 BLAST 联网服务 (National Center for Biotechnology Services, NCBI) 比较所得序列,将获得的差异序列利用 BLASTN、BLASTX 以及 Uniprot、Prosite 程序与数据库中所有序列进行比较。

1.5 马铃薯 *SoFtsH* 基因全长 cDNA 克隆

根据 cDNA-AFLP 克隆到的片段,经生物信息学分析后,利用 3'-RACE 法延伸基因 3' 端,利用 5'-RACE 法延伸基因 5' 端。参照 TAKARA 公司产品说明:(1) 利用带 PolyA 的接头引物进行合成第一链 cDNA;(2) 利用已知的序列设计的基因特别引物 GSP1 (引物序列为 5'-TTTGTAGACTGTTGGAGCAGGTG-3') 和该系统提供的通用引物 3' RACE Inner Primer (3RIP) (5'-CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG-3') 进行第一轮 PCR;(3) 稀释第一轮产物为模板,利

用已知的序列设计的巢式特别引物 GSP2(引物序列为 5'-TGCAGGAGGTGAACAAAGAAT-3')和该系统提供的通用引物进行第二轮 PCR。PCR 产物用 QiaGENE 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒回收,回收的产物插入 PMDI8-T 载体,转化大肠杆菌,蓝白斑筛选阳性克隆,PCR 鉴定后,重组质粒送中国农业科学院作物所重大科学开放实验室代测序。

1.6 半定量 RT-PCR

参考王桂荣等^[23]方法进行半定量 RT-PCR,以 1 μL cDNA 为模板,加 10 \times ExTaq 缓冲液 5 μL (含 Mg^{2+}),正向引物 DF1(序列为 5'-GCGGACTGCGTACCAATTC-3')和反向引物 DR1(引物序列为 5'-GCGGATGAGTCTGAGTAACTT-3')各 0.4 μL (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$),内标基因 Actin 的扩增引物各 0.4 μL (Actin: 5'-CAGCAACTGGATGATATGG-3' 和 18SR: 5'-ATTTCGCTTCAGCAGTGGT-3'),10 mmol L^{-1} dNTP 1 μL , ExTaq DNA 聚合酶 0.25 μL (5 U μL^{-1}),加水至 50 μL 。反应程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.7 Northern Blot 杂交

提取各样品总 RNA,每个样品取 20 μg 总 RNA,经 1.2% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳,后将 RNA 用 20 \times SSC 毛细管法转膜至带正电的尼龙膜(Amersham)上。探针的标记、杂交、洗膜及显色处理均按照 DIG 标记检测试剂盒说明进行(Roche 产品)。将 cDNA-AFLP 获得的 403 bp 片段用于探针标记。于 65 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 1 h、杂交 8 h,其后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下用 2 \times SSC/0.1% SDS 溶液洗膜 5 min,并重复 2 次;50 $^{\circ}\text{C}$ 下以 0.1 \times SSC/0.5% SDS 溶液洗膜 15 min,重复 2 次,按试剂盒说明进行杂交信号检测,在封闭液中封闭 45 min,加抗 DIG-AP 的反应液温育 45 min。显色 16 h,并对杂交结果进行照相分析。

2 结果与分析

2.1 马铃薯干旱胁迫差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析

为了分离与抗旱性有关的基因,首先研究了抗旱二倍体品系 H145 在干旱胁迫下的基因表达的差异。以 H145 基因型的叶和根组织的 cDNA 为模板,通过 cDNA-AFLP 技术对 H145 基因型在干旱胁迫下基因表达状况进行了分析。共用 144 对引物组合进行选择性地扩增,共找到仅在干旱条件下表达的差异片段 34 条。将 34 条差异表达片段进行回收、克隆,

随机选择其中 20 条进行测序。序列经 Blast 比对,其中一条 403 bp 的片段(编号 D1-2)(见图 1)与 *FtsH* 基因同源性较高(并且为 *FtsH* 基因 5' 端),命名为 *SoFtsH*。由于该基因在原核生物和真核生物中都与抵抗胁迫有关,故对它进行了进一步研究。

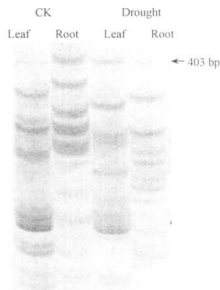


图 1 E35/M62 引物 cDNA-AFLP 分析马铃薯 H145 正常浇水与干旱处理的表达差异

Fig. 1 Electrophoretogram showing landing patterns of differentially expressed transcripts as result of the cDNA-AFLP experiment with E35/M62 primer under different stages of drought stress in potato H145

2.2 马铃薯 *SoFtsH* 基因全长 cDNA 的克隆及序列分析

根据已获得的 403 bp D1-2 片段 cDNA 片段序列,设计两条基因特别嵌套引物 GSP1、GSP2,与通用引物 3' RACE Inner Primer 组合,进行巢式 PCR 扩增。得到了 1 条 413 bp 的片段(见图 2),该片段具有 polyA,表明其为基因 3' 端。将 403 bp D1-2 片段序列与扩增的 413 bp 3' RACE 片段序列进行拼接,去除重叠序列得到马铃薯 *SoFtsH* 基因 723 bp 的全

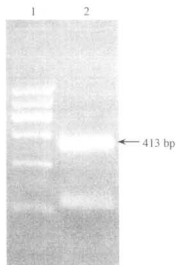


图 2 *SoFtsH* 片段 3' RACE 电泳结果
Fig. 2 Electrophoretic analysis of 3' RACE products of *SoFtsH*

1: DNA marker; 2: 3' RACE 扩增结果。
1: DNA marker; 2: Amplified product by 3' RACE.

长 cDNA。

2.3 *SoFtsH* 基因核苷酸序列和氨基酸序列的分析

用 ORF Finder 在线寻找 cDNA 的开放读码框,发现该序列开放读码框位于第 70 ~ 456 bp 之间,长 387 bp,共编码 129 个氨基酸(见图 3)。

从 Prosite 数据库(<http://us.expasy.org/prosite/>)对推导的氨基酸序列进行分析,*SoFtsH* 蛋白存在信号肽序列和跨膜区域等,这是一般 FtsH 类蛋白所具

有的特征。*SoFtsH* 基因的翻译区有两个铁氧化还原蛋白(2Fe-2S ferredoxins, iron-sulfur binding region)结合位点分别位于第 422 ~ 430 bp(包含的 9 碱基的核心序列为 CATGGCAAC)和第 492 ~ 500 bp(包含的 9 碱基的核心序列为 CAAATCATC)(见图 4)。通过 ExPASY 网站(http://us.expasy.org/tools/pi_tool.htm)的在线分析,推测 *SoFtsH* 基因编码蛋白的分子量为 15.096 kD,理论等电点为 9.58。

```

1   GATTGACTCGTACCAATTCACAACAGACAGCTCGTGGGAAATGGGATAAGCGGAGGGTG
61  CCAACACGAAATGTGGACTAGTTCAGAGGTTCTCTGGTTCATATGCGCGATGGATGTTCT
      M W T S S E V P L L V P Y A R W M F
121 ATAGCAAGAAATGTAGTAAAGATGTTGTACTGGCTTCAAATATTATCTGCAACAGCTTGT
      I A R N V S K M L Y W L Q I L S A T A C
181 TTGGTGCTTTCGTTGAAAGCTTGTGTTGAGGAACTTGGTGAAGTGGCCAAAGGAGAT
      L V L S L M K L V L R N F G E V A K G D
241 ACCGATAAGAGGAGCAGGAAAAGTGCTCTACTTATATCTACTCCCTCGCGTTCACGGAG
      T D K K R S R K S A L L I F Y S L A T T A F T
301 GCATTGCTTTCTTCTGGAAAAGCATATTTGGGAATGGAAGTCAACTTTGTTAGACTG
      A L L F L L E K A Y W E W K I N F C R L
361 TTGGAGGAGGTGGTGAAGCCCTTCTCTGGCCAACAGATGTCAACCAGAAAAGACTACT
      L E E V V E A G L S L A N R C Q P R K K T T
421 CCATGGCAACAGCCGATGTGGTGTGATGCTGAAGTAAGGGGATTGGTTGAAAAGGCATACG
      P W Q Q P M W L M L K *
481 AAAGAGCTACGCAAAATCATCAACTCACAATCGACATCCACACAAACTTGCTCAGCTGT
541 TGATAGAGAAAGAACTGTTGATGGTGAAGAGTTCATGAGCCTTTCATCGATGGCRAAG
601 CCGAGTATTCATTGCCTGATTCCCAATGTATCTCACCACCTATGTATGTATATTAAC
661 AAATATACATACAATGTACACATTGAGAAATTTATTTTTCATATTTTGACAAAAA
721 AAA
  
```

图 3 马铃薯 *SoFtsH* 基因 cDNA 及其编码氨基酸的全长序列
Fig.3 Nucleotide and predicted amino acid sequences of *SoFtsH* in potato

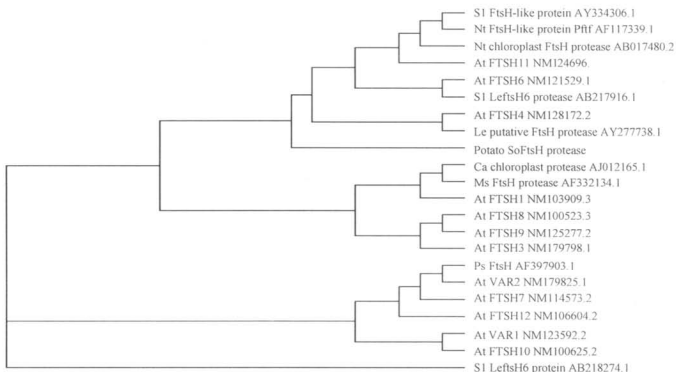


图 4 *SoFtsH* 基因及其在植物种间同源序列的进化树
Fig.4 Bootstrap consensus phylogenetic tree of *SoFtsH* genes from plant species

进化树构建所用序列均来自 GenBank。种名缩写方式为豌豆 *Ps*(*Pisum sativum* L.);拟南芥 *AT*(*Arabidopsis thaliana*);番茄 *Sl*(*Solanum lycopersicum*);番茄 *Le*(*Lycopersicon esculentum*);辣椒 *Ca*(*Capiscum annuum* L.);苜蓿 *Ms*(*Medicago sativa* L.);烟草 *Nt*(*Nicotiana tabacum* L.)

The tree includes sequences from GenBank. Abbreviation of the species are: *Ps*: *Pisum sativum* L.; *AT*: *Arabidopsis thaliana*; *Sl*: *Solanum lycopersicum*; *Le*: *Lycopersicon esculentum*; *Ca*: *Capiscum annuum* L.; *Ms*: *Medicago sativa* L.; *Nt*: *Nicotiana tabacum* L.

2.4 *SoFtsH* 基因的同源比对与系统树构建

用 BLASTX 对 *SoFtsH* 基因序列的同源性分析和对 7 种不同生物来源的 22 种 *FtsH* 基因所编码蛋白质序列的联配分析的结果表明,所分析的 7 种生物 22 种 *FtsH* 基因所编码的蛋白质序列之间存在高度保守的区域。将 *SoFtsH* 基因推导的氨基酸序列与报道的其他高等植物的 *FtsH* 基因同源性在 90% 以上(与番茄 *FtsH*、烟草 *FtsH* 同源性达 95% ~ 98%)。系统树(见图 6)表明,马铃薯 *SoFtsH* 基因与番茄 *FtsH*(AY277738.1)、烟草 *FtsH*、拟南芥 *FtsH4*、*FtsH6*、*FtsH11* 基因同源性较高,而与番茄 *LeFtsH6* 基因同源性(AB218274.1)稍低。在拟南芥 12 个 *FtsH* 蛋白中,*SoFtsH* 基因推导的氨基酸序列与 *FtsH4* 蛋白最为相似(同源性为 93.8%),所以 *SoFtsH* 基因在分类上属于 *FtsH4* 基因。

2.5 干旱胁迫下 *SoFtsH* 基因的表达分析

2.5.1 干旱胁迫下 *SoFtsH* 基因在耐旱品系 H145 中的表达

以抗旱马铃薯品系 H145 为材料,分

别提取干旱处理 0、7、10、12 和 14 d 的植株叶片和根总 RNA,利用内标基因 *Actin* 的引物和 *SoFtsH* 基因 403 bp D1-2 片段的引物 DF1 和 DR1 分别进行 RT-PCR 扩增。从图 5-A 和图 6-B 可以看出,马铃薯 *SoFtsH* 基因在抗旱品系 H145 的叶片中表达量在干旱处理第 7 天比对照明显增加,并达到较高的水平。随着干旱胁迫的持续 *SoFtsH* 基因表达量有所下降,但仍比对照表达量多。在抗旱品系 H145 的根系中,干旱胁迫下 *SoFtsH* 基因的表达逐渐增加,第 10 天达到高峰,随后呈下降趋势,但仍比对照表达量多。以 *SoFtsH* 基因 403 bp D1-2 片段为探针进行 Northern 杂交,从图 6-A 和图 6-B 可以看出,干旱胁迫时马铃薯 *SoFtsH* 基因在抗旱品系 H145 的叶片和根系中表达量都比对照增加,并且叶片里 *SoFtsH* 基因表达量在干旱的早期比根系里增加快。

2.5.2 干旱胁迫下 *SoFtsH* 基因在对干旱敏感品系 H214 中的表达

以干旱敏感马铃薯品系 H214 为材料,分别提取干旱处理 0、7、10、12 和 14 d 的植株

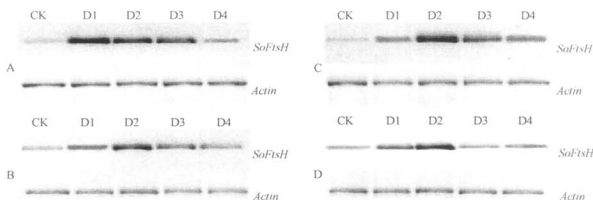


图 5 用半定量 PCR 分析干旱胁迫下马铃薯品系 H145、H214 叶片和根系 *SoFtsH* 的转录

Fig. 5 Transcription level of *SoFtsH* in potato H145 & H214 Leaves and roots under drought analyzed by semiquantitative RT-PCR

(A) H145 的叶片; (B) H145 的根; (C) H214 的叶片; (D) H214 的根; CK、D1、D2、D3、D4 分别为控水 0、7、10、12、14 d。

(A) Leaf of H145; (B) Root of H145; (C) Leaf of H214; (D) Root of H214; CK, D1, D2, D3, D4 mean withholding water for 0, 7, 10, 12, 14 days, respectively.

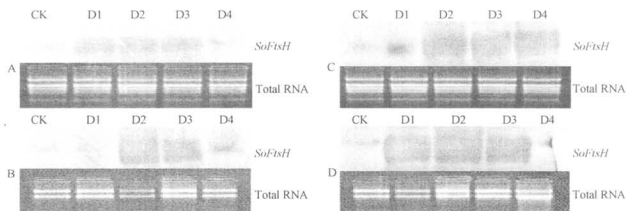


图 6 用 Northern Blot 杂交分析干旱胁迫下马铃薯品系 H145、H214 叶片和根系 *SoFtsH* 转录状况

Fig. 6 Transcription level of *SoFtsH* in potato H145 & H214 leaves and roots under drought analyzed by Northern blot

(A) H145 的叶片; (B) H145 的根; (C) H214 的叶片; (D) H214 的根; CK、D1、D2、D3、D4 分别为控水 0、7、10、12、14 d。

(A) Leaf of H145; (B) Root of H145; (C) Leaf of H214; (D) Root of H214; CK, D1, D2, D3, D4 mean withholding water for 0, 7, 10, 12, 14 days, respectively.

叶片和根总 RNA, 利用内标基因 *Actin* 的引物和 *SoFtsH* 基因 403 bp D1-2 片段的引物 DF1 和 DR1 分别进行 RT-PCR 扩增。从图 5-C 和图 5-D 可以看出, 马铃薯 *SoFtsH* 基因在叶片和根系中表达量都比对照增加, 随着干旱胁迫的持续 *SoFtsH* 基因表达量逐渐增加, 第 10 天时达到高峰, 随后呈下降趋势, 但仍比对照表达量多。以 *SoFtsH* 基因 403 bp D1-2 片段为探针进行 Northern 杂交, 从图 6-C 和图 5-D 可以看出, 干旱胁迫时马铃薯 *SoFtsH* 基因在干旱敏感品系 H214 的叶片和根系中表达量都比对照明显增加, 但叶片的 *SoFtsH* 基因表达量在干旱早期没有根系增加快。

3 讨论

植物在长期的进化过程中形成了自身适应干旱等逆境胁迫的机制, 比如能够忍受完全脱水干燥而存活的复苏植物 (*Xerophyta viscosa*) 在干旱条件下合成大量包括 FtsH 在内的耐脱水蛋白; 起源于非洲沙漠的野生西瓜在干旱条件下体内合成大量瓜氨酸多肽和包括 FtsH 在内的蛋白。说明植物在干旱条件下表达 FtsH 等蛋白是抵抗干旱的一种机制。

无论是原核生物还是真核生物在多种逆境胁迫中 FtsH 蛋白都发挥作用, 在高等植物中干旱诱导 FtsH 蛋白目前仅在耐脱水的复苏植物 (*Xerophyta viscosa*)、野生西瓜、玉米、芥菜 (*Boechera holboellii*) 等中发现, 但干旱诱导 *FtsH* 基因及其 cDNA 全长克隆还未见报道。本研究在马铃薯中所发现和克隆的干旱诱导 *SoFtsH* 基因 cDNA 全长, 为进一步研究 *FtsH* 基因功能奠定了基础。

在原核生物中已经鉴定了多种 FtsH 的底物, 主要是膜蛋白 (SecY 蛋白、质子 ATP 酶 F_0 部分的 α 亚基、YccA 等) 和胞质调节蛋白 (如热激转录因子 σ^{32} 、LpxC、 λ C II 等)^[1,8]。植物中膜蛋白复合体的未装配亚基 (如细胞色素复合体的 Rieske Fe-S 蛋白) 以及和光氧化伤害蛋白 (如光系统 II 反应中心 D1 蛋白的 23 kD 片段) 均可作为 FtsH 降解。本实验所克隆的 *SoFtsH* 基因全长 cDNA 片段, 从核酸序列和推测的蛋白序列来看, *SoFtsH* 蛋白存在信号肽序列、跨膜区域、 Zn^{2+} 结合域和 2 个铁氧化还原蛋白结合位点, 说明 *SoFtsH* 蛋白有可能在细胞器膜如质膜、叶绿体类囊体膜、线粒体膜等相关部位, 发挥作用, 有可能在识别和降解植物膜蛋白复合体的未装配亚基 (如细胞色素复合体的 Rieske Fe-S 蛋白) 和光氧化伤害蛋

白中发挥作用。

由于 FtsH 蛋白还具有分子伴侣功能, 在修复和缓解叶绿体、线粒体等膜蛋白损伤中起作用。本实验中 *SoFtsH* 基因在抗旱马铃薯品系叶片中表达量升高较快, 而干旱敏感品系叶片中表达量虽也升高, 但升高速度较缓慢, 这是否是 2 个品系抗旱性存在差异的原因之一, 还有待进一步试验验证。*SoFtsH* 基因在抗旱品系 H145, 叶片中表达量比根系中增加较快, 是否意味着在干旱胁迫下叶片膜系统比根系膜系统更易受到损伤, 更需要 FtsH 等蛋白进行修复和保护, 仍待进一步试验证实。

无论是耐旱品系 H145 还是干旱敏感品系 H214, 随着干旱胁迫的加重, 叶片和根系的 *SoFtsH* 表达量都有所增加, 但到干旱特别严重时 *SoFtsH* 的表达量反而下降。其可能原因是, 随着干旱的加重植物体需要较多的 FtsH 蛋白来修复和保护膜系统, 且 FtsH 要在叶绿体合成、类囊体形成中发挥作用^[24], 很可能需合成和储存较多的 FtsH 以便复水时可以迅速装配类囊体膜或其他膜 (如线粒体膜等), 很快恢复正常代谢; 而在干旱较重时, 作物整个代谢系统受水胁迫的限制而制约了 *SoFtsH* 表达。当然这些都有待于进一步的实验来证实。

4 结论

在抗旱性鉴定的基础上, 以抗旱马铃薯二倍体品系 H145 为材料, 经苗期干旱诱导胁迫处理, 利用 cDNA-AFLP 和 RACE 技术克隆到与马铃薯抗旱相关基因 *SoFtsH* 全长 cDNA。它与已知高等植物 *FtsH* 基因 (番茄、烟草、拟南芥等) 同源性较高。在干旱条件下马铃薯 *SoFtsH* 基因的表达量增加, 但抗旱品系和干旱敏感品系 *SoFtsH* 基因表达方式有所不同。说明该基因在马铃薯抗旱中可能发挥重要作用。本实验结果为深入研究 *FtsH* 基因的遗传进化规律和基因表达调控机制提供了有益依据, 为探明马铃薯抗旱机制提供了参考, 为基因工程培育马铃薯等抗旱品种奠定了良好的基础。

致谢: 感谢中国农业科学院蔬菜花卉所段绍光、丁春松、刘杰、庞万福、李颖、张忠华、王晓武、张延国在试验材料准备、数据分析、药品购置等方面的大力支持。

References

- [1] Sakamoto W. Protein degradation machineries in plastids. *Annu Rev*

- Plant Biol.*, 2006, 57:599-621
- [2] Osterseker O, Adam Z. Light-stimulated degradation of an unassembled Rieske FeS protein by a thylakoid-bound protease: The possible role of the FisH protease. *Plant Cell*, 1997, 9: 957-965
- [3] Lindahl M, Tabak S, Cseke L, Pichersky E, Andersson B, Adam Z. Identification, characterization, and molecular cloning of a homologue of the bacterial FisH protease in chloroplasts of higher plants. *J Biol Chem*, 1996, 271: 29329-29334
- [4] Kihara A, Akiyama Y, Ito K. FisH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4532-4536
- [5] Akiyama Y, Kihara A, Ito K. Subunit of a proton ATPase F_0 sector is a substrate of the FisH protease in *Escherichiacoli*. *FEBS Lett*, 1996, 399: 26-28
- [6] Duwat P, Ehrlich S D, Gruss A. The *recA* gene of *Lactococcus lactis*: Characterization and involvement in oxidative and thermal stress. *Mol Microbiol.*, 1995, 17: 1121-1131
- [7] Beier D, Spohn G, Rappuli R, Scarlato V. Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J Bacteriol*, 1997, 179: 4676-4683
- [8] Ito K, Akiyama Y. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FisH protease. *Annu Rev Microbiol*, 2005, 59:211-231
- [9] Akiyama Y, Ogura T, Ito K. Involvement of FisH in protein assembly into and through the membrane: I. Mutations that reduce retention efficiency of a cytoplasmic reporter. *J Biol Chem*, 1994, 269: 5218-5224
- [10] Jayasekera M M K, Olson E R, Holler T P, Foltin S K. *Escherichia coli* requires the protease activity of FisH for growth. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 380: 103-107
- [11] Lindahl M, Spetea C, Handal T, Oppenheim AB, Adam Z, Andersson B. The thylakoid FisH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell*, 2000, 12: 419-431
- [12] Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z, Takahashi Y. Coordinated regulation and complex formation of YELLOW VARIATED1 and YELLOW VARIATED2, chloroplastic FisH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell*, 2003, 15: 2843-2855
- [13] Seo S, Okamoto M, Iwai T, Iwano M, Fukui K, Isogai A, Nakajima N. Reduced levels of chloroplast FisH protein in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves accelerate the hypersensitive reaction. *Plant Cell*, 2000, 12: 917-932
- [14] Iwashita S, Imai R, Uchiyama K, Gau M, Shimamoto Y. Changes in chloroplast FisH-like gene during cold acclimation in alfalfa (*Medicago sativa*). *J Plant Physiol*, 2002, 159: 85-90
- [15] Sun A Q, Yi S Y, Yang J-Y, Zhao C-M, Liu J. Identification and characterization of a heat-inducible FisH gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Sci*, 2006, 170: 551-562
- [16] Kore-eda S, Cushman M A, Akseelrod I, Bufford D, Fredrickson M, Clark E, Cushman J C. Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Gene*, 2004, 341:83-92
- [17] Robert A I, Ulrike G S, Jill M F, Jennifer A T, Sagadevan G M. Proteomic analysis of leaf proteins during dehydration of the resurrection plant *Xerophyta viscosa*. *Plant Cell Environ*, 2007, 30: 435-446
- [18] Akashi K, Nishimura N, Ishida Y, Yokota A. Potent hydroxyl radical-scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323: 72-78
- [19] Andjelkovic V, Thompson R. Changes in gene expression in maize kernel in response to water and salt stress. *Plant Cell Rep*, 2006, 25: 71-79
- [20] Charles A K, Heiko V, Juergen K, Alice S, Hanneke W, Thomas M O. Expression profiling and local adaptation of *Boechera halboellii* populations for water use efficiency across a naturally occurring water stress gradient. *Mol Ecol*, 2006, 15: 1229-1237
- [21] Ober E S, Bloa M L, Clark C J, Royal A, Jaggard K W, Pidgeon J D. Evaluation of physiological traits as indirect selection criteria for drought tolerance in sugar beet. *Field Crops Res*, 2005, 91: 231-249
- [22] Bachem C W B, Oomen R J F J, Visser R G F. Transcript Imaging with cDNA-AFLP: A Step-by-Step. *Plant Mol Biol Rep*, 1998, 16: 157-173
- [23] Wang G-R(王桂荣), Wu K-M(吴孔明), Liang G-M(梁革梅), Guo Y-Y(郭予元). Gene cloning, expression of cadherin in midgut of *Helicoverpa armigera* and its CrY1A binding region. *Sci in China(中国科学)*, 2005, 48(4): 346-356 (in Chinese)
- [24] Zaltsman A, Ori N, Adam Z. Two types of FisH protease subunits are required for chloroplast biogenesis and photosystem II repair in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17: 2782-2790

欢迎订阅 2008 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农科院主办的学术性期刊。《大豆科学》是中国自然科学核心期刊,中国科学引文数据库来源期刊及国内外多家权威数据库收入期刊源。主要刊登有关大豆的遗传育种,品种资源,生理生态,耕作栽培,病、虫、杂草防治,营养施肥,生物技术,食品加工,药理研究和工业用途等方面的科研报告,学术论文,国内、外研究进展评述,研究简报,学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生,各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行,双月刊,16开本,每期200页。国内每期订价:10.00元,全年60.00元,邮发代号:14-95。国外每期订价:10.00美元(包括邮资),全年60美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行,北京399信箱。国外代号:Q5587。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301004010071。

地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)

电话:0451-86668735; E-mail: dadoukx@sina.com; ddkxue@126.com