

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2019.03.003

魔芋 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因 及其启动子的克隆与分析^①

李鹏佳, 焦茂娟, 王启军, 苏承刚

西南大学 园艺园林学院/南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715

摘要:以花魔芋和白魔芋为材料,通过魔芋 5 个转录组高通量测序数据库,与拟南芥进行 tBlastn 比对、拼接,得到魔芋中的 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因 *GMP* 的推定全长,设计基因特异性引物,克隆得到魔芋 *GMP* 基因的部分 cDNA 序列,长度为 1 233 bp,其中基因编码区长度为 1 086 bp,编码的氨基酸为 361 个.在此基础上运用 FNPI-PCR 技术得到了魔芋 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因 *GMP* 上游启动子 2 116 bp,经生物信息学分析,该序列具有典型的 TATA-box、CAAT-box 及与胁迫相关的元件和光应答元件.

关键词:魔芋; GDP-甘露糖焦磷酸化酶; 启动子克隆与功能分析

中图分类号: S632.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2019)03-0014-09

魔芋是天南星科(Araceae)魔芋属(*Amorphophallus*)多年生草本植物,是迄今发现的极少能大量合成葡甘聚糖(konjac glucomannan, KGM)的植物种群,主要分布在亚洲和非洲热带及亚热带的一些国家和地区,仅部分亚洲国家有栽培.大面积主栽种为花魔芋(*A. konjac* K. Koch)和白魔芋(*A. albus* P. Y. Liu et J. F. Chen),其中我国学者刘佩瑛、陈劲枫发现并命名的新种白魔芋为我国特有,品质最佳.魔芋是我国传统栽培的重要经济作物,具有极高的经济价值,其所含葡甘聚糖具有诸多优点,已成为食品、医药、化工、石油、纺织等工业中具有重要用途的原料与产品,出口欧美、日本等,带动了一大批相关产业的发展^[1].

葡甘聚糖含量是魔芋品质的最重要衡量指标.1975年, Muoat 通过实验认定 GDP-甘露糖是魔芋葡甘聚糖生物合成的甘露糖供体,而 GDP-甘露糖的合成由 GDP-甘露糖焦磷酸化酶催化形成,因此 GDP-甘露糖焦磷酸化酶对于葡甘聚糖的合成起着重要调控作用.何春梅等的研究表明^[2],在铁皮石斛中, GDP-甘露糖焦磷酸化酶参与葡甘聚糖的合成、抗坏血酸合成以及糖基化作用等过程,对植物的正常生长以及抗逆性起着重要作用^[3].近年来,已有学者在其他一些植物例如拟南芥中分离纯化出这种酶,得到了 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因的全长序列,并对其功能进行了研究^[4].但在魔芋当中,对于 GDP-甘露糖焦磷酸化酶及其基因的研究非常少,仅有 Markus Pauly^[5]通过转录组 454 高通量测序方法,得到该基因的全长序列,并已在 GenBank 登陆(登陆号 JF727269).其基因全长 801 bp(包含部分 UTR 区域),编码氨基酸长度是 146 个(登陆号 AEH27534.1),对比其他物种 GDP-甘露糖焦磷酸化酶氨基酸长度为 360 多个氨基酸,数目和序列相差都很大.且文中未显示该序列的 PCR 扩增鉴定,更未有进行功能验证,故 Markus Pauly

① 收稿日期: 2018-04-13

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710635018); 国家自然科学基金项目(31071796).

作者简介: 李鹏佳(1996-), 女, 硕士研究生, 主要从事生物技术研究.

通信作者: 苏承刚, 高级实验师.

得到的 *GMP* 基因序列可能存在一定的问题。本研究将重新克隆该基因及其启动子序列,将得到的基因序列与其他物种进行对比,并对启动子序列进行功能分析预测,以期初步验证我们的猜想,也为之后进行该基因的功能验证打下基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

花魔芋、白魔芋叶片、球茎等。

1.2 菌株和载体

大肠杆菌 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 和克隆中间载体 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 购自全式金生物;克隆中间载体 pClone007 Simple Vector Kit 购自北京擎科新业生物技术有限公司;

1.3 试剂

Quick RNA Isolation Kit 试剂盒(北京华越洋生物技术有限公司);TaKaRa 反转录试剂盒(宝日医生物技术有限公司);克隆所需酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 和 2×Taq Master Mix(诺唯赞生物);Trans2K Plus II DNA Marker(全式金生物);高效植物基因组 DNA 提取试剂盒 Hi-DNAsecure Plant kit、通用型 DNA 纯化回收试剂盒 Universal DNA Purification Kit、质粒小提试剂盒 TIANprep Mini Plasmid Kit(天根生化科技有限公司);Nucleic Acid Stain 核酸染料(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);PCR 引物合成和 DNA 测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成,X-Gal, LB, 琼脂粉等为常规试剂。

1.4 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因的克隆

利用 Quick RNA Isolation 试剂盒提取花魔芋球茎总 RNA,利用 TaKaRa 反转录试剂盒将 RNA 反转录成单链 cDNA,并通过魔芋仅有的 5 个转录组高通量测序数据库,与拟南芥中 *GMP* 氨基酸序列,进行 Blast 比对、拼接,得到魔芋 *GMP* 基因的推定全长,尽量包括 UTR 区域,再据此序列设计基因特异性引物 *GMP-F/GMP-R*(表 1)。

使用高保真酶进行 *GMP* 基因的克隆,PCR 反应程序为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 50 s,32 个循环,总延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收目标条带,将纯化后的产物与 pEASY-Blunt Simple Cloning 载体连接,再经过 42 °C 热激转入大肠杆菌 Trans1-T1 Phage Resistant Chemically Competent Cell 中,菌落 PCR 检测后将阳性克隆送北京擎科新业生物技术有限公司测序。

1.5 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因启动子的克隆和其生物信息学分析

以魔芋幼叶为材料,利用试剂盒提取花魔芋的总 DNA。根据已克隆得到的 *GMP* 基因序列测序结果,利用 FPNI-PCR 法克隆 *GMP* 基因的启动子,设计 3 个嵌套式的特异性引物 80063,80064,80065(表 1),3 轮反应程序具体参照 WANG 等^[6]的方法,在第 3 轮中发现 3 条特异条带,经切胶回收、热激连接 pClone007 Simple Vector,阳性菌落检测,送样测序。

根据第 1 轮测序结果设计引物,分别在距离 ATG 上游 2 116 bp 和 207 bp 处设计扩增全长启动子上下游引物,为 80073 和 80065(表 1)。以花魔芋的总 DNA 为模板,使用 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 进行扩增,PCR 反应程序为:95 °C 预变性 3 min,95 °C 变性 15 s,57 °C 退火 15 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环,总延伸 5 min。经切胶回收、热激连接 pEASY-Blunt Simple Cloning 载体(全式金生物),阳性菌斑检测,送样测序。

利用 PlantCARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线数据库分析所克隆得到的 *GMP* 基因的启动子调控原件,据此,对 *GMP* 基因的启动子进行功能分析预测,利用 TSSP

(<http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/promoter/tssp.pl>), 分析预测 *GMP* 基因转录起始位点。

表 1 引物序列

引物名称	序列(5' to 3')	退火温度/°C	产物
GMP-F	CTCTCCTCGTTGGGATCTGC	60	cDNA
GMP-R	GAGAGAGAAGGACGCAGCTTG	60	cDNA
80011(第 2 轮)	GTAATACGACTCACTATAGGGC	62	启动子 Promoter
80012(第 3 轮)	ACTATAGGGCACGCGTGGT	60	启动子 Promoter
80063(第 1 轮)	GGTGAACCCAAAGGAGGAAGG	60	启动子 Promoter
80064(第 2 轮)	ATGAGTGCCTTCATGGTGGG	62	启动子 Promoter
80065(第 3 轮)	TGCTTCTGCCACACAAAAGC	57	启动子 Promoter
80073	CATAGGGAGGGCGATAGAGG	57	启动子 Promoter

2 结 果

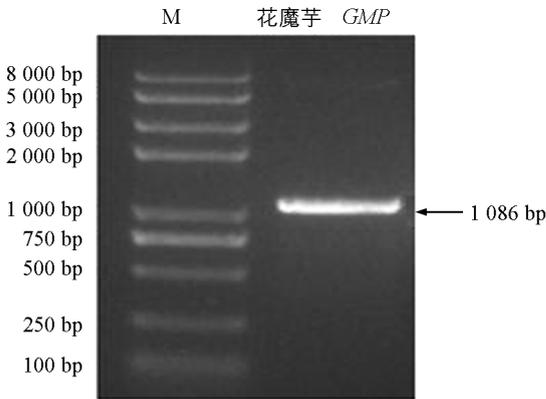
2.1 魔芋 *GMP* 基因克隆

通过仅有的魔芋 5 个转录组高通量测序数据库拼接得到魔芋 *GMP* 的推定序列, 设计基因特异性引物扩增 *GMP* 基因, 测序结果发现, 得到了花魔芋和白魔芋中部分 cDNA 序列: CTCTCCTCGTTGGGATCTGCTGTCGGCGCATCCAATCCGGGGCATCTCCAGTAGGGCACGAGAAGGGAGGGTTAGCATCCCGCCCACCATGAAGGCACTCATCCTGGTTCGGAGGCTTTGGCACTCGGCTACGGCCGCTGACACTCAGCGTCCCCAAGCCGCTTGTTCGATTTTCGCCACAAGCCCATGATCGTACACCAGATCGAAGCTCTCA AAGCAATTGGAGTCACAGAAGTGGTCTTGGCCATCAACTACCAACCAGAGGTAATGCTCAACTTCTTGAAGGAGTACGAAGCCAAGCTGGGGCTCAAGATCACCTGCTCTCAGGAGACTGAACCACTCGGGACGGCCGGTCCCCTGGCCCTGGCCAGGGACAAGCTGATAGATGACTCCGGCGAGCCCTCTTTGTCTCAACAGCGATGTCATCAGCGAGTACCCCCTCGCTGAGATGATCCAGTTCCACAAGTCTCATGGGGGGGAAGCATCCATCATGGTGACCAAGGTGGATGAGCCTTCAAAGTATGGGGTGGTTGTTACGGATGAGGAGACCGGGAAAGTAGAGAAATTTGTGGAGAAGCCAAAGATCTTTGTGGCAACAAGATCAACGCCGCATCTACCTGTTGAACCCCTCTGTTCTGGACCGGATCCAGCTCCGTCCCACCTCCATCGAGAAGGAGGTCTTCCCCAAGATCGCCGCGGAGAAGCAGCTCTATGCCATGTCTCTCCCCGGGTTCTGGATGGACATCGGCCAGCCGAGGGACTACATCACCGGCCTGCGCCTCTACCTCGACGCCCTCCGGAAGCGGTCTGCCGCCAGGCTCGCCGTCGGCCCCACGTCGTCGGCAACGTTTTGGTGCACGAGACGGCGGCCATCGGGGAGGGCTGTCTGATCGGCCCCGACGTGGCCATCGGCCGGGCTGCGTTCGAGCCCGGCTCCGGCTGTCGAGGTGCACGGTATGCGCGGGGCCCGCATCAAGAAGCACGCCTGCGTCTCCAGCAGCATCATCGGGTGGCACTCCACTGTTGGGCAGTGGGCGCGGGTGGAGAACATGACCATCCTCGGGGAGGACGTGCATGTGGGCGATGAGATTTACAGCAATGGCGGGTGGTGCTCCCCACAAGGAGATCAAGTCCAGCATATTGAAGCCTGAGATCGTCATGTGATGTGAGTGGCCCAAGTCCATGTTGTCCATGTCACTGTTCCAAGCTGCGTCTCTCTCTC, 长度为 1 233 bp, 推定开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)为 1 086 bp, 编码 361 个氨基酸残基, 且两种魔芋 *GMP* 的氨基酸序列一致(图 1 和图 2)。

利用 DNAMAN, 将 Markus Pauly 登陆的花魔芋 *GMP* 蛋白的氨基酸序列与拟南芥、木薯、大桉中的 *GMP* 蛋白的氨基酸序列进行比对(图 3), 发现氨基酸的长度与序列相差很大, 同源性很低。而将本研究得到的 *GMP* 蛋白的氨基酸序列与拟南芥、木薯、大桉中的 *GMP* 蛋白的氨基酸序列比对(图 4), *GMP* 蛋白与拟南芥(NP_181507.1)中 *GMP* 蛋白(NP_181507.1)具有 88% 的同源性, 与木薯中 *GMP* 蛋白(XP_021626075.1)具有 93% 的同源性, 与大桉中 *GMP* 蛋白(XP_010067451.1)具有 92%

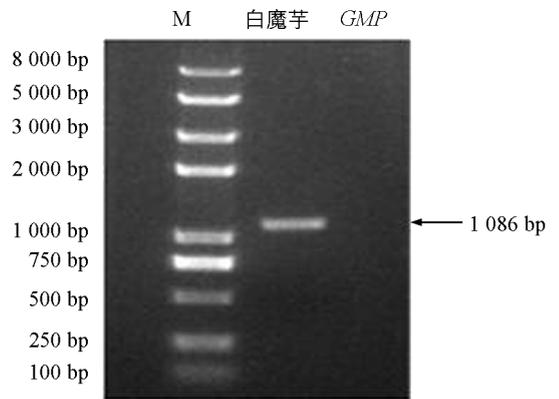
的同源性. 本研究得到的魔芋的 GMP 蛋白的氨基酸序列与 Markus Pauly 所登陆的 GMP 蛋白的氨基酸序列差距很大(图 5). 因其在论文中并没有提及对 GMP 基因进行功能验证, 我们猜想 Markus Pauly 得到的 GMP 基因全长序列存在一定的问题, 并经过以上分析, 认为我们更有可能得到的是魔芋中 GMP 基因的正确全长序列.

在魔芋和其他物种基因组中对 GMP 的相似基因进行分析, 利用 MEGA7.0 基于最大似然法的分子系统发育分析构建含有 13 个 GMP 氨基酸序列的进化树(图 6), 用于建树的酶如下: 拟南芥 AtGMP(NP_181507.1)、木薯 MeGMP(XP_021626075.1)、大桉 EgGMP(XP_010067451.1)、橡胶 HbGMP(XP_021653979.1)、芝麻 SiGMP(XP_011076786.1)、阔叶猕猴桃 AIGMP(ACN38266.1)、哈密瓜 CmGMP(XP_008441398.1)、莲 NnGMP(XP_010256792.1)、南瓜 CmGMP(XP_022954947.1)、榴莲 DzGMP(XP_022765102.1)、醉蝶花 ThGMP(XP_010554624.1)、大豆 GmGMP(ACW84415.1). 结果表明, 我们所得到的 GMP 与其他植物的 GDP-甘露糖焦磷酸化酶的系统发育有一定的相关性, 这进一步显示了本研究得到的魔芋 GMP 基因的正确性.



M: DNA Marker(DL8000).

图 1 花魔芋 GMP 的克隆



M: DNA Marker(DL8000).

图 2 白魔芋 GMP 的克隆

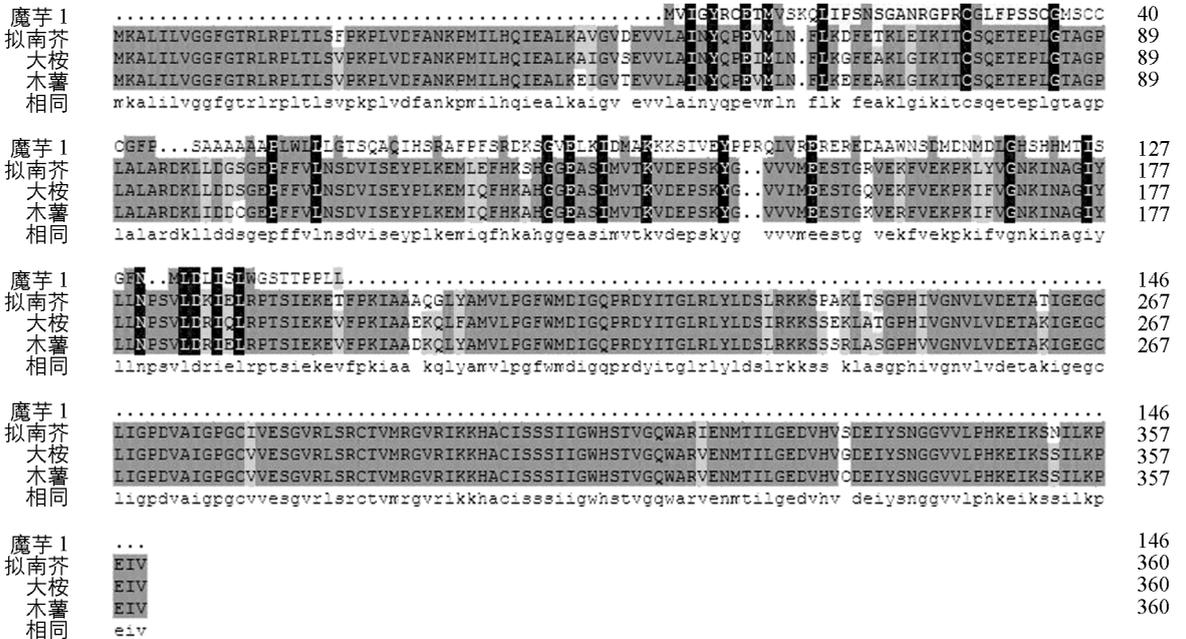


图 3 Markus Pauly 得到的 GMP 的氨基酸序列 Konjak1 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、木薯 (*Manihot esculenta* Crantz)、大桉 (*Eucalyptus grandis* Hill) 中的 GMP 的氨基酸序列比对

魔芋 2	MKALILVGGFGTRLRPLTLSVPKPLVDFANKPMILHQIEALKAIGVTEVVLAINYQPEVMLNFKLDFEIKLKITCSQETEPLGTAGPLALARDKLIDD	100
拟南芥	MKALILVGGFGTRLRPLTLSVPKPLVDFANKPMILHQIEALKAIGVTEVVLAINYQPEVMLNFKLDFEIKLKITCSQETEPLGTAGPLALARDKLIDD	100
大桉	MKALILVGGFGTRLRPLTLSVPKPLVDFANKPMILHQIEALKAIGVTEVVLAINYQPEVMLNFKLDFEIKLKITCSQETEPLGTAGPLALARDKLIDD	100
木薯	MKALILVGGFGTRLRPLTLSVPKPLVDFANKPMILHQIEALKAIGVTEVVLAINYQPEVMLNFKLDFEIKLKITCSQETEPLGTAGPLALARDKLIDD	100
相同	mkalilvggfgtrlrpltlsvpkplvdfankpmilhqiealkaigvtevvlainyqpevmlnflkfeaklgikitcsqeteplgtagplalardklidd	
魔芋 2	SGEPFFVNLNSDVISEYPLAEMIQFHKSHGGEASIMVTKVDEPSKYGVVIMDESTGKVEKFEVEKPKIFVGNKINAGIYLLNPSVLDRIICLRPTSIEKEVFF	200
拟南芥	SGEPFFVNLNSDVISEYPLAEMIQFHKSHGGEASIMVTKVDEPSKYGVVIMDESTGKVEKFEVEKPKIFVGNKINAGIYLLNPSVLDRIICLRPTSIEKEVFF	200
大桉	SGEPFFVNLNSDVISEYPLAEMIQFHKSHGGEASIMVTKVDEPSKYGVVIMDESTGKVEKFEVEKPKIFVGNKINAGIYLLNPSVLDRIICLRPTSIEKEVFF	200
木薯	SGEPFFVNLNSDVISEYPLAEMIQFHKSHGGEASIMVTKVDEPSKYGVVIMDESTGKVEKFEVEKPKIFVGNKINAGIYLLNPSVLDRIICLRPTSIEKEVFF	200
相同	sgepffvlnsdviseyplkemiqfhkshggeasimvtkvdepskygvvimeestgkvekfevekpkifvgnkinagiyllynpsvldriielrptsiekevff	
魔芋 2	KIAAEKQLYAMVLPGFWMIDIGQPRDYITGLRLYLDA LRKRSAA RLAVGPHVGVNVLVHETAAIGEGCLIGPDVAIGPGCVVEGVRLSRCTVMRGARIKK	300
拟南芥	KIAAQCQLYAMVLPGFWMIDIGQPRDYITGLRLYLDA LRKRSAA RLAVGPHVGVNVLVHETAAIGEGCLIGPDVAIGPGCVVEGVRLSRCTVMRGARIKK	300
大桉	KIAAEKQLYAMVLPGFWMIDIGQPRDYITGLRLYLDA LRKRSAA RLAVGPHVGVNVLVHETAAIGEGCLIGPDVAIGPGCVVEGVRLSRCTVMRGARIKK	300
木薯	KIAAQCQLYAMVLPGFWMIDIGQPRDYITGLRLYLDA LRKRSAA RLAVGPHVGVNVLVHETAAIGEGCLIGPDVAIGPGCVVEGVRLSRCTVMRGARIKK	300
相同	kiaaekqlyamvlpfgfwmidigqprdyitglrllyldalrkrksaarlavgphvgnvvlvhetaaigegcligpdvaigpgcvvepgvrlsroctvmrgarik	
魔芋 2	HACVSSSIIGWHSTVGQWARVENMTILGEDVHVGD E IYSNGGVVLPHKEIKSILKPEIV	360
拟南芥	HACVSSSIIGWHSTVGQWARVENMTILGEDVHVGD E IYSNGGVVLPHKEIKSILKPEIV	360
大桉	HACVSSSIIGWHSTVGQWARVENMTILGEDVHVGD E IYSNGGVVLPHKEIKSILKPEIV	360
木薯	HACVSSSIIGWHSTVGQWARVENMTILGEDVHVGD E IYSNGGVVLPHKEIKSILKPEIV	360
相同	hacvsssiigwhstvgqwarvenmtilgedvhvgdeiynggvvlpheikssilkpeiv	

图 4 本研究中得到的 GMP 的氨基酸序列 Konjak2 与拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、木薯 (*Manihot esculenta* Crantz)、大桉 (*Eucalyptus grandis* Hill) 中的 GMP 的氨基酸序列比对

魔芋 2	MKALILVGGFGTRLRPLTLSVPKPLVDFANKPMILHQIEALKAIGVTEVVLAINYQPEVMLNFKLDFEIKLKITCSQETEPLGTAGPLALARDKLIDD	100
魔芋 1MVIYGRQIMTVSKQLIPNSGNA RGRRCGL.....FPSSCGMSCCGFPSAAAAPLPIWLLIGTSQAQ	63
相同	mkalilvggfgtrlrpltlsvpkplvdfankpmilhqiealkaigvtevvlainyqpevmlnflkfeaklgikitcsqeteplgtagplalardklidd	
魔芋 2	SGEPFFVNLNSDVISEYPLAEMIQFHKSHGGEASIMVTKVDEPSKYGVVIMDESTGKVEKFEVEKPKIFVGNKINAGIYLLNPSVLDRIICLRPTSIEKEVFF	200
魔芋 1	IHSRAEPFSSRIKSGVELKIDIAKKK.....SIWEYIFRQ.....IVREPRREDAAWNSDMDNMDI GSHHMTISGFN...MIDISWGSTTTFPLE..	146
相同	igepafpfnrdkigealkadwafkshggeasimvsiwdeppkqgvlvvdeereadaakfsdkdkidlgkhkhagisgfnpsrldliqlrgessiekelfp	
魔芋 2	KIAAEKQLYAMVLPGFWMIDIGQPRDYITGLRLYLDA LRKRSAA RLAVGPHVGVNVLVHETAAIGEGCLIGPDVAIGPGCVVEGVRLSRCTVMRGARIKK	300
魔芋 1	146
相同	kiaaekqlyamvlpfgfwmidigqprdyitglrllyldalrkrksaarlavgphvgnvvlvhetaaigegcligpdvaigpgcvvepgvrlsroctvmrgarik	
魔芋 2	HACVSSSIIGWHSTVGQWARVENMTILGEDVHVGD E IYSNGGVVLPHKEIKSILKPEIV	360
魔芋 1	146
相同	hacvsssiigwhstvgqwarvenmtilgedvhvgdeiynggvvlpheikssilkpeiv	

图 5 Markus Pauly 得到的 GMP 的氨基酸序列 Konjak1 与本研究中得到的 GMP 的氨基酸序列 Konjak2 的氨基酸序列比对

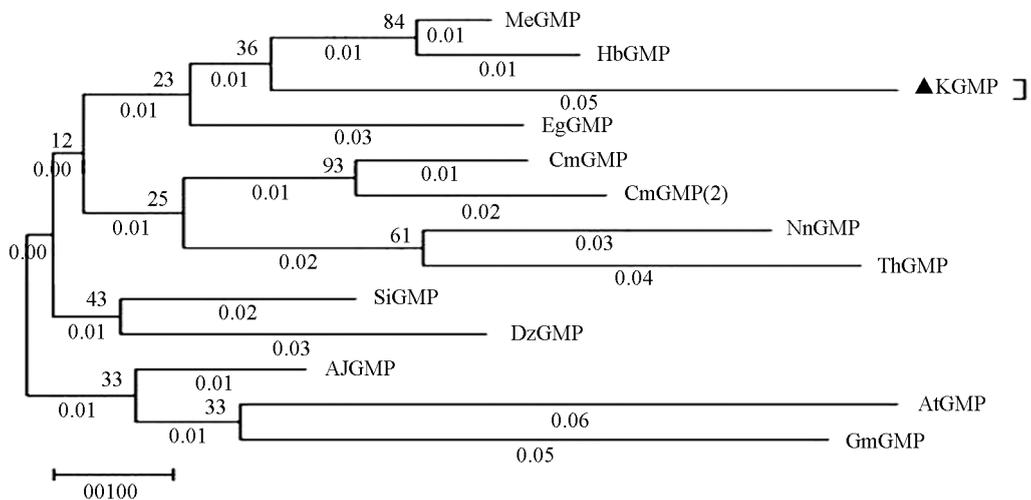
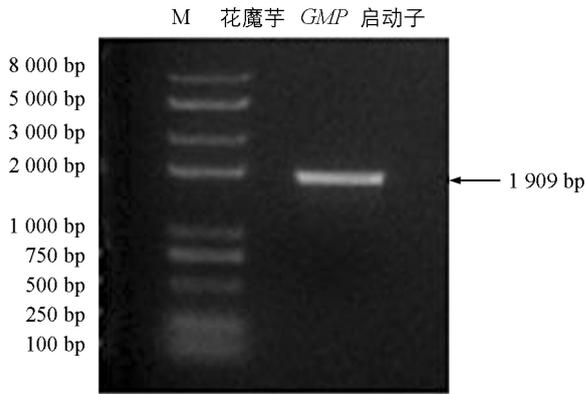


图 6 基于 MEGA7.0 构建的 GMP 系统进化树

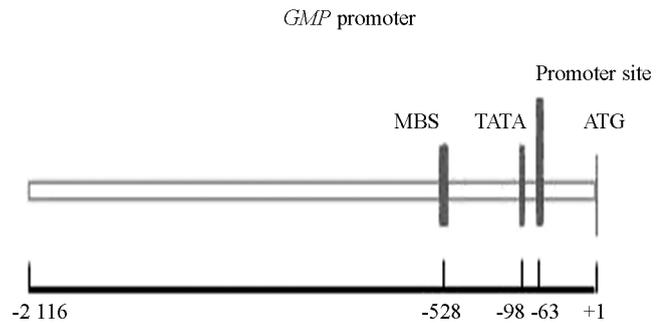
2.2 花魔芋 GMP 启动子克隆和顺式原件预测

利用染色体步移技术 FPNI-PCR 方法对 GMP 启动子序列进行两次克隆。第 1 次使用普通 Taq 酶扩增, PCR 扩增产物存在 3 种条带的大小, 经测序验证分别为 3 种长度的该基因的起始密码子 ATG 上游序列, 即启动子序列, 其中最长的启动子序列接近 2 000 bp, 因此第 2 次扩增使用高保真酶, 以第 1 次扩增得



M: DNA Marker(DL8000).

图 7 花魔芋 *GMP* 启动子的克隆



负数表示核苷酸相对于翻译起始位点的位置

+1 表示起始密码子(ATG)的 A 所在的位置.

图 8 TSSP 预测的 TATA 框、转录起始位点

表 2 启动子顺式作用原件

元件	序列及位置	数量	功能
ABRE	TACGTG; -245	1	参与脱落酸反应的顺式作用元件
ACE	ACGTGGA; 1 326	1	涉及光响应的顺式作用元件
AE-box	AGAAACAA; -1 217	1	光响应模块的一部分
ARE	TGGTTT; -1 142; -869	2	厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件
CATT-motif	GCATTC; -1 084	1	光敏元件的一部分
CCAAT-box	CAACGG; -1 362; -318	2	MYBHv1 结合位点
CGTCA-motif	CGTCA; -1 495; -1 486; -1 335; -896; -200	5	参与茉莉酸甲酯响应的顺式调控作用元件
G-Box	CACGTA; -245; TCCACATGGCA; -170	1 1	参与光应答的顺式调控元件
GAG-motif	GGAGATG; -258	1	部分光响应元件
GARE-motif	AAACAGA; -850; -796; -41	3	赤霉素反应元件
GC-motif	CCCCCG; -1 413; -824	1	参与缺氧特异性诱导的增强子样元件
	GCCCCGG; -264	2	
MBS	CAACTG; -528	1	与抗性诱导相关的 MTB 结合位点
GT1-motif	GGTTAAT; -53	1	光响应元件
	GGTTAA; -53	1	
MSA-like	CCCAACGGT; -317	1	参与细胞周期调控的顺式作用元件
O2-site	GATGACATGG; -904; -112	2	参与玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式作用调节元件
Skn-1_motif	GTCAT; -1 496; -1 487; -1 334; -199; -115	5	胚乳表达所需的顺式作用调控元件
TCA-element	GAGAAGAATA; -1 246	1	参与水杨酸反应的顺式作用元件
TCCC-motif	TCTCCCT; -145; -1 233	2	光敏元件的一部分
Y-box	TGTGGAGGAGC; -1 310	1	未知

3 讨论

由于与魔芋的近缘物种, 即使是一个科的研究都很少, 魔芋尚未进行全基因组测序, 目前魔芋分子生

物学特别是功能基因组的研究相当滞后,已发现的基因组资源极为有限,在 GenBank 上登陆的魔芋属 (*Amorphophallus*) 的核酸序列、ESTs 和克隆的基因序列都很少,而关于葡甘聚糖合成调控分子机制的研究更是有限,这都极大地阻碍了魔芋品质改良的进程。GDP-甘露糖焦磷酸化酶(GMP)直接控制 GDP-甘露糖的合成,为魔芋葡甘聚糖的合成最后一步提供两个底物之一,故是魔芋葡甘聚糖生物合成路径中的关键酶。目前已有学者从一些植物中克隆得到了 *GMP* 基因并对其进行了功能验证,如拟南芥、铁皮石斛。在魔芋中,对于 GDP-甘露糖焦磷酸化酶及其基因的研究非常少,仅有 Markus Pauly^[5] 通过转录组 454 高通量测序方法,得到注释为花魔芋的 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因的全长序列,并已在 GeneBank 登陆(登陆号 JF727269)。登陆的基因全长 801 bp(包含部分 UTR 区域),编码氨基酸长度是 146 个,对比其他物种 GDP-甘露糖焦磷酸化酶氨基酸长度为 360 多个氨基酸,数目和序列相差都很大。但其研究结果未显示该序列的 PCR 扩增鉴定以及功能验证,我们推测所登陆的该基因序列很可能存在问题。因此对魔芋 GDP-甘露糖焦磷酸化酶基因进行克隆和功能研究是非常有必要的。本研究利用魔芋的转录组高通量测序数据库,进行 tBlastn 和拼接,再据此设计基因特异性引物,扩增得到推定的 *GMP* 基因,包含部分 UTR 区的序列,其编码氨基酸序列与其他物种的具有很高的相似性,初步说明我们得到的应该是该基因,关于其功能验证正在进行中。

现阶段克隆启动子比较常用的方法有 PCR 法、TAIL-PCR^[7]、接头 PCR^[8] 等方法。PCR 法较为简便,但只限于已知序列的克隆;TAIL-PCR 近年来应用比较广泛,但过程较为繁琐,总之这些启动子克隆方法各有利弊。由于魔芋的整个基因组没有进行完全的测序,因此花魔芋 *GMP* 基因的启动子序列是未知的,不能直接用常规的 PCR 的方法进行克隆,本研究采用了 FPNI-PCR 的方法^[9] 克隆得到了 *GMP* 基因 ATG 上游长度为 2 116 bp 的启动子序列,并在拼接得到的启动子序列的基础上设计引物,运用常规的 PCR 方法,使用高保真酶,在花魔芋总 DNA 中再次克隆得到 *GMP* 基因的启动子序列。运用 PlantCARE 等在线软件对序列进行预测分析^[10],发现该启动子含有多种生物学顺式作用元件,推测 *GMP* 基因的转录水平可能受到多种因素的调控。除了典型的 TATA-box 和 CAAT-box 核心启动子原件外,还具有一些与光响应、激素相关的调控元件,推测 *GMP* 的转录水平与激素的调节有关。在拟南芥中,已研究得到 GDP-甘露糖焦磷酸化酶参与抗坏血酸的合成;在铁皮石斛中,也有研究表示该酶与抗盐胁迫密切相关。因此,我们推测在 *GMP* 基因的启动子中可能含有一些与抗胁迫相关的调控元件。通过对得到的启动子序列的分析发现,除以上顺式作用元件外,该序列中还包含 MYBHv1 结合位点元件,厌氧诱导所必需的顺式作用调节元件等非生物胁迫响应元件,暗示在魔芋中 *GMP* 基因可能参与对非生物胁迫的耐受能力。

已有研究表明,GDP-甘露糖焦磷酸化酶参与植物多糖合成、抗坏血酸合成以及糖基化作用等过程^[11],对植物的正常生长以及抗逆性起着重要作用。鉴于 Markus Pauly 虽拼接得到花魔芋 *GMP* 基因的序列,但是并没有对其进行功能验证,而本研究得到的魔芋 *GMP* 基因的全长序列具有较强的保守性。并且本研究还克隆得到了该基因的启动子序列,该序列具有可能提高植物对非生物胁迫的耐受能力的调控元件,因此 *GMP* 基因极有可能与抗逆性有关,这更加验证了我们的猜测——Markus Pauly 在 GeneBank 中登陆的 *GMP* 基因的全长序列存在一定的问题。为了证实我们的猜测,还需要进行 *GMP* 基因及其启动子的功能验证^[12] 等方面的研究。

参考文献:

- [1] 刘佩瑛. 魔芋学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2004: 15.
- [2] HE C M, ZENG S J, da SILVA J A T, et al. Molecular Cloning and Functional Analysis of the Phosphomannomutase (PMM) Gene from *Dendrobium Officinale* and Evidence for the Involvement of an Abiotic Stress Response during Germination [J]. *Protoplasma*, 2017, 254(4): 1693-1704.
- [3] HE C M, YU Z M, da SILVA J A T, et al. DoGMP1 from *Dendrobium Officinale* Contributes to Mannose Content of Water-Soluble Polysaccharides and Plays a Role in Salt Stress Response [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 41010-1-41010-13.
- [4] BARTH C, GOUZD ZA, STEELE HP, et al. A Mutation in GDP-Mannose Pyrophosphorylase Causes Conditional Hypersensitivity to Ammonium, Resulting in *Arabidopsis* Root Growth Inhibition, Altered Ammonium Metabolism, and Hormone Homeostasis [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2010, 61(2): 379-394.

- [5] GILLE S, CHENG K, SKINNER ME, et al. Deep Sequencing of Voodoo Lily (*Amorphophallus Konjac*) an Approach to Identify [J]. *Planta*, 2011, 234(3): 515-526.
- [6] WANG Z, YE S F, LI J J, et al. Fusion Primer and Nested Integrated PCR (FPNI-PCR): A New High-Efficiency Strategy for Rapid Chromosome Walking or Flanking Sequence Cloning [J]. *BMC Biotechnology*, 2011, 11: 109-121.
- [7] 郑 岑, 张立平, 唐忠辉, 等. TAIL-PCR 技术及其在植物基因中的克隆 [J]. *基因组学和应用生物学*, 2009, 28(3): 544-548.
- [8] 程国灵, 许文涛, 石 慧, 等. A-T 连接接头 PCR 基因组步移技术 [J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(12): 1527-1527.
- [9] 李 婧, 曾 媛, 龚 胜, 等. 大花三色堇 FPNI-PCR 反应体系的优化 [J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(5): 72-75.
- [10] 刘 祥, 赵志新, 王 斐, 等. 蜡梅水通道蛋白基因 CpAQP1 转录水平变化及其启动子克隆 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2014, 36(2): 48-55.
- [11] SAWAKE S, TAJIMA N, MORTIMER JC, et al. KONJAC1 and 2 are Key Factors for GDP-Mannose Generation and Affect l-Ascorbic Acid and Glucomannan Biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2015, 27(12): 3397-3409.
- [12] 邵铁梅, 仵 陶, 焦 展, 等. 油葵种子特异性基因 HaAP10 启动子克隆及功能验证 [J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 41(10): 39-45.

Cloning and Characterization of GDP-Mannose Pyrophosphorylase Gene in Konjac and Its Promoter

LI Peng-jia, JIAO Mao-juan, WANG Qi-jun, SU Cheng-gang

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions of Ministry of Education, Chongqing 400715, China

Abstract: In this study, tBlastn searches of high-throughput transcriptome sequencing databases of *Amorphophallus konjac* and *A. albus* were aligned and spliced with the amino acid sequence of *Arabidopsis thaliana*, and the *GMP* transcript was assembled. The putative full-length sequence of the *GMP* gene was cloned. By designing gene-specific primers, a partial cDNA sequence of konjac *GMP* gene with a length of 1 233 bp was cloned. The length of the coding region of the gene was 1086 bp, and the encoded amino acid was 361. Based on the above results, using FNPI-PCR technology, we got konjac GDP-mannose pyrophosphorylase gene *GMP* upstream promoter 2 116 bp in length. According to bioinformatics analysis, typical TATA-box, CAAT-box, and stress-related elements and light responsive elements and other cis-elements were identified in the promoter region.

Key words: *Amorphophallus*; GDP-mannose pyrophosphorylase; promoter cloning and functional analysis

责任编辑 潘春燕

