

烟草氧化胁迫相关基因 *NtOSA1* 的克隆表达 及亚细胞定位分析

刘继恺^{1,2}, 高永峰¹, 吴婵娟^{1,2}, 张 林¹, 陈彩霞¹

(1 西南科技大学 生命科学与工程学院, 四川绵阳 621010; 2 西南科技大学 核废物与环境安全国防重点实验室, 四川绵阳 621010)

摘 要: 植物类蛋白激酶 Abc1 家族(activity of bc1 complex)在植物生长发育及响应非生物胁迫中起着重要的作用。该研究通过将拟南芥 *AtOSA1* 蛋白氨基酸序列与烟草转录组数据进行比对, 利用巢式 PCR 技术克隆得到 1 个烟草氧化胁迫相关 Abc1 家族基因 *NtOSA1*, *NtOSA1* 与拟南芥 *AtOSA1* 基因具有 72.89% 的一致性。*NtOSA1* 基因开放阅读框长度为 2 283 bp, 编码 760 个氨基酸, 含有典型的 ABC1 结构域、一个激酶结构域、叶绿体定位信号肽和两个跨膜结构域。采用实时荧光定量 PCR 技术, 对 *NtOSA1* 基因在烟草不同组织以及氧化胁迫、盐胁迫等处理下的表达分析表明: *NtOSA1* 基因的表达具有组织特异性, 主要在叶片中表达; *NtOSA1* 基因在 H₂O₂ 和 NaCl 处理后表达量上升, 均在处理后 6 h 达到最大值, 分别为处理前的 1.95 和 2.69 倍。亚细胞定位结果表明, *NtOSA1* 蛋白定位在细胞叶绿体上, 与预测结果一致。研究表明, *NtOSA1* 基因参与了烟草抗氧化胁迫和盐胁迫的响应。

关键词: 烟草; 氧化胁迫相关 Abc1 基因; 基因克隆; 表达特性; 亚细胞定位

中图分类号: Q785; Q786

文献标志码: A

Cloning, Expression Characterization and Subcellular Localization of *NtOSA1* Gene from *Nicotiana tabacum*

LIU Jikai^{1,2}, GAO Yongfeng¹, WU Chanjuan^{1,2}, ZHANG Lin¹, CHEN Caixia¹

(1 School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China;

2 Fundamental Science on Nuclear Wastes and Environmental Safety Laboratory, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621010, China)

Abstract: Members of the activity of bc1 complex (Abc1) family are protein kinases that are functionally diverse proteins with multiple roles in the regulation of plant growth and development and abiotic stress tolerance. According to the amino acid sequence of *AtOSA1* and the transcriptome data of *Nicotiana tabacum*, a Abc1 like gene was isolated and designated as *NtOSA1*, as for the high identity with the *AtOSA1* (*Arabidopsis thaliana* oxidative stress-related Abc1-like protein). The open reading frame (ORF) of the *NtOSA1* gene is 2 283 bp which encoded a deduced protein including 760 amino acid residues. The protein sequence of *NtOSA1* possesses a conserved ABC1 domain, one kinase domain, one chloroplast localization signal peptide and two transmembrane spans. The relative expression of *NtOSA1* was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results showed that *NtOSA1* gene was expressed particularly in leaves, but also in flowers. After treatment of H₂O₂ and NaCl for 6 h, the expression of *NtOSA1* in-

收稿日期: 2016-04-27; 修改稿收到日期: 2016-06-15

基金项目: 国家自然科学基金(31500205); 西南科技大学博士研究基金(14zx7153); 西南科技大学校长机动费特殊资助(14zx1104); 四川省生物质资源利用与改性工程中心项目(13zxsk02)

作者简介: 刘继恺(1983—), 女, 博士, 讲师, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: kateryan@163.com

creased to the maximum, which was 1.95 and 2.69 folds of the control, respectively. When fused to green fluorescent protein (GFP), NtOSA1 localized to the chloroplast in tobacco protoplasts, which was consistent with the prediction results of the software TargetP 1.1 Server. These results suggested that NtOSA1 may be involved in response to oxidative and salt stress in tobacco.

Key words: *Nicotiana tabacum*; oxidative stress-related abc1-like protein; gene clone; expression characterization; subcellular localization

植物在生长发育过程中不可避免会遭遇到各种逆境胁迫,如高温、低温、干旱、重金属和盐碱等。这些逆境胁迫会使植物氧化还原代谢失衡,导致体内积累大量的活性氧,从而产生氧化胁迫。过量的活性氧能与脂质、蛋白质、DNA 以及其他生物大分子发生反应,从而造成机体损伤甚至死亡^[1]。

生物体内存在多种参与氧化胁迫响应的蛋白家族,比如 Abc1 家族,该家族是一类庞大的具有多种生物学功能的蛋白家族,广泛存在于原核和真核生物中,这类蛋白具有高度保守的 ABC1 结构域和蛋白激酶结构域^[2]。在原核和真核生物线粒体中,Abc1-like 蛋白是辅酶 Q 合成的重要调控因子,参与到呼吸链的电子传递和抗氧化过程^[3-8]。酵母 COQ8 是第一个被鉴定的 Abc1 基因,其编码蛋白具有类分子伴侣活性,能够抑制细胞色素 b mRNA 翻译的缺陷以及维持线粒体呼吸链中 bc1 复合体的活性^[9-10]。

和酵母相比,植物的 Abc1-like 蛋白具有更多样的功能^[11-13]。拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 基因组中有 17 个基因含有典型的 ABC1 结构域。第一个被研究的是 ABC1At 基因,该基因在拟南芥各个组织中组成型表达,其编码的线粒体蛋白与酵母 ABC1 蛋白有 45% 的相似性,且具有酵母 ABC1 蛋白相似的功能^[14]。另外一个 Abc1 蛋白,AtOSA1 (oxidative stress-related Abc1-like protein) 虽然也和酵母 ABC1 具有 45% 的相似性,但是该蛋白定位于细胞叶绿体中,功能互补实验显示,AtOSA1 蛋白不能恢复酵母 *abc1* 突变体呼吸链的活性。半定量 RT-PCR 结果显示,AtOSA1 基因的表达受到 CdCl₂、H₂O₂ 和高强度光的诱导^[11]。Yang 等的研究显示,AtACDO1 蛋白 (ABC1-like kinase related to chlorophyll degradation and oxidative stress) 定位于叶绿体中,在光氧化胁迫耐受和叶绿素降解过程中发挥作用^[13]。拟南芥 ABC1K1 和 ABC1K3 蛋白也定位于叶绿体质体球,调控质体球异戊二烯基脂代谢过程,在植物逆境应答和叶绿体形态建成中发挥着重要作用^[15-16]。AtSIA1 (salt-induced ABC1

kinase 1) 与 AtOSA1 具有 46% 的相似性,同样定位于细胞叶绿体中,表型分析证明,AtSIA1 和 AtOSA1 能够影响叶绿体中 Fe 的分布,调控对活性氧的产生和氧化胁迫的应答^[17]。此外,王彩香等^[18]克隆了一个小麦 (*Triticum aestivum*) 类 ABC1 基因 *TaABC1L*,并发现该基因能够被渗透、高盐、低温胁迫以及 ABA 处理诱导。高清松等^[19]研究发现,水稻 (*Oryza sativa*) ABC1 基因主要在叶片中表达,并且受多种非生物胁迫因素包括 H₂O₂、ABA、低温以及高盐等的调控。

烟草 (*Nicotiana tabacum*) 是分子生物学和基因工程研究的模式植物,是最有价值的科研生物材料之一。烟草抗逆胁迫应答过程中相关基因的克隆及功能的揭示一直是研究的热点,但目前关于烟草 Abc1 蛋白家族的功能研究还未见报道。本研究首次从烟草中克隆到了 OSA1 的同源基因 NtOSA1,对其序列特征、组织表达特性、亚细胞定位及各种非生物胁迫响应进行了研究,为全面解析 NtOSA1 基因在烟草氧化胁迫和盐胁迫应答中的生物学功能提供了重要参考。

1 材料和方法

1.1 烟草材料

供试植物材料为烟草 ‘NC89’, 实验室常规种植。

1.2 方法

1.2.1 烟草 NtOSA1 基因克隆 用拟南芥 AtOSA1 蛋白的氨基酸序列在 SGN 网站 (<http://solgenomics.wur.nl/>) 进行序列比对 (数据库为烟草 SGN mRNA 序列, 程序为蛋白序列对核苷酸序列)。根据比对出的两条 EST 序列, SGN-E1015449 和 SGN-E1113121, 设计外侧引物 NtOSA1-F1 (5'-TTCCCTTGCGATGCACATACA-3') 和 NtOSA1-R1 (5'-TGATCTCCCAGGGTAACCAT-3'); 含有 *Sma* I 和 *Sal* I 酶切位点的内侧引物 NtOSA1-F2 (5'-CCCGGGATGGCGAGTATTTTCAGCTAC-3') 和 NtOSA1-R2 (5'-GTCGACAGCTGTTTCCTGT-

GATCA -3′)。提取烟草幼苗叶片总 RNA,以反转录获得的 cDNA 第一链为模板,NtOSA1-F1 和 NtOSA1-R1 为引物,用高保真酶 PrimeSTAR HS (TaKaRa 公司)进行第一轮 PCR 扩增。将第一轮 PCR 产物稀释 100 倍,以稀释后的 DNA 为模板,NtOSA1-F2 和 NtOSA1-R2 为引物进行第二轮 PCR 扩增。将第二轮 PCR 产物回收纯化后连接至 pEASY-Blunt 载体(北京全式金生物公司),转化大肠杆菌 (*Escherchia coli*) DH5 α 。以大肠杆菌单克隆为模板,NtOSA1-F2 和 NtOSA1-R2 为引物,进行菌落 PCR 检测,将阳性克隆送华大基因科技股份有限公司测序。

1.2.2 烟草 *NtOSA1* 基因的生物信息学分析 利用 DNAMAN v6 软件分析测序结果,确定 *NtOSA1* 基因的开放阅读框(ORF)序列并推导相应的氨基酸序列。利用在线软件 InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)和 TMPred(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)分别预测 *NtOSA1* 蛋白的功能保守结构域和跨膜结构域;利用在线软件 ProtParam 分析 *NtOSA1* 的氨基酸组成、分子量、等电点等理化性质;利用在线软件 TargetP 1.1 Server 预测 *NtOSA1* 蛋白的亚细胞定位。通过 ClustalW 和 MEGA6.0 软件相结合对 32 个 Abc1 蛋白序列进行序列比对并构建系统进化树,使用 Bootstrap test 检验(重复值为 1 000)进化树的可靠性。

1.2.3 烟草 *NtOSA1* 基因在不同部位表达量定量检测 将野生型烟草种子播种到土里,置于光照培养室培养。培养条件为:温度 25 ℃,湿度 60%~70%,16 h 光照/8 h 黑暗。

设计 *NtOSA1* 基因 qRT-PCR 引物 NtOSA1 rt-F(5′-TGTTCTGGTGCCTACTGGTGAC -3′)和 NtOSA1rt-R (5′-AAGTTCTGCTTGTGCCATTTTC-3′),以烟草 *NtRL2*(GenBank 登录号 Z14081)为内参基因,引物为 NtRL2 rt-F (5′-GTAAGG-GAGCGGGTTTCAGTCT-3′)和 NtRL2 rt-R (5′-AACGGA GCACCCCTACCTG -3′)。按照 Trizol (Thermo 公司)试剂盒说明书操作,分别提取野生型烟草根、茎、叶片、花和种子的总 RNA,经反转录获得 cDNA 第一链。按 RealMasterMix(天根生化科技有限公司)试剂盒说明书,在 CFX96Real-Time System(Bio-Rad 公司)进行 qRT-PCR 扩增,程序为:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 30 s,40 个循环,65 ℃延伸 5 s,然后以每秒 0.5 ℃

升至 95 ℃,61 个循环。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

1.2.4 烟草的胁迫处理及 *NtOSA1* 基因的表达量检测 参照 Lee^[20] 等的方法,将烟草播种于 1/2 MS 固体培养基^[21]上,生长 2 周,选取长势良好,大小一致的幼苗分别转入含 10 mmol/L H₂O₂ 和 200 mmol/L NaCl 的 1/2 MS 液体培养基中,在处理的 0、3、6 和 12 h 取幼苗样品,液氮速冻后置于 -80 ℃储存备用。

参照 Hermand 等^[22] 的方法,将烟草播种于定植泡沫中,用 1/2 Hoagland^[23] 营养液培养烟草,生长 30 d 后,选取长势良好,大小一致的幼苗连同定植泡沫转入分别含 0、30、60 和 100 μ mol/L CdCl₂ 的新鲜 1/2 Hoagland 营养液中,在处理的 48 h 取幼苗叶片,液氮速冻后置于 -80 ℃储存备用。

提取以上处理材料的总 RNA,经反转录得到 cDNA 第一链,以 NtOSA1rt-F 和 NtOSA1rt-R,NtRL2 rt-F 和 NtRL2 rt-R 为引物,按照 RealMaster-Mix(天根生化科技有限公司)试剂盒说明书,在 CFX96Real-Time System(Bio-Rad 公司)进行 qRT-PCR,分析 *NtOSA1* 基因的相对表达量。扩增程序为:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 10 s,60 ℃退火 30 s,40 个循环,65 ℃延伸 5 s,然后以每秒 0.5 ℃升至 95 ℃,61 个循环。数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算,DPS v7.05 进行显著性分析。

1.2.5 融合表达载体的构建、烟草原生质体转化及荧光显微镜观察 原生质体转化载体 pTEX-GFP 含有氨苄青霉素筛选标记、CaMV35S 启动子、多克隆位点和 *GFP* 基因编码区序列。

用 *Sma* I 和 *Sal* I(Thermo 公司)同时双酶切测序正确的 *NtOSA1* 基因片段和 pTEX-GFP 载体,将完整的 *NtOSA1* 基因编码区插入到 pTEX-GFP 载体的多克隆位点,使 *NtOSA1* 和 *GFP* 基因融合表达,将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。以大肠杆菌单克隆为模板,NtOSA1-F2 和 NtOSA1-R2 为引物,进行菌落 PCR 检测,将阳性克隆送华大基因科技股份有限公司测序。

以本生烟草(*Nicotiana benthamiana*)为实验材料,参照 Yoo 等^[24] 的方法制备烟草原生质体,将酶解条件改为黑暗酶解 4 h。将构建好的融合表达载体 pTEX-NtOSA1-GFP 通过 PEG 介导法转化到本生烟草原生质体中,室温下(20~25)℃黑暗诱导 24~48 h。利用激光扫描共聚焦荧光显微镜(卡尔蔡司公司,型号 LSM710),观察 NtOSA1-GFP 融合蛋白的亚细胞定位情况。设定参数:GFP 蛋白的激发

1 ATGCGAGTATTTACAGCTACACTTCCACTGCAACTCTACCAGAGCTCAAATTTCTGTGTTCAAATTCAGCTTCTAGAAGCTTCCGCTGTA
1 M A S I S A T L S T A T L P E L K F L C S N S A S R S F R V
91 CCGCTCTCTAGGTTTTTCATCGCGTCCGCGAGTTTGATTGCAATTAAAGCGGTGAATAGAGAAGAGAGTGGCGGTAGTGGAAAGAGAGGAT
31 P L S R F S S R R R S L I R I K A V N R E E S A V V E E R D
181 GCGGAATTTGGTGAAGAAAGTGAACGGTAGTGTGAATGGAAGTGTGAAGAGATCGATGATTTGAACGGTGCATTGTTAGTGGAGAGTAC
61 A E L V R K V N G S V N G S V K K I D D L N G A L L V E K Y
271 ACGAATGCTAGTGTAGGTGTGAGTGAGAGTGAAGTGTGATGAAGTATGTGAATGGGAATGGGAATGCTGTAGCGCGCAAGAGT
91 T N G S V G V S E S E N E S L M K Y V N G N G V A A K S
361 AGGACAGAGTTTGTGAGAGTGAAGCGCGAAGAGTGTGAGAGAGAGGAGAAGCAGAGTGTAGAGAGATTTGACAGAGAGCAAGCT
121 R D E V V E V K A E E V V E K K E K K Q S V E E I G Q E A
451 TGGTTTAAAGAAGTATGATCAAGTTGAGCTTTCTGTCGCGCTGGAGGCCCTTGGAAAGAGATTCAAACATATTCAAACATTCAGAGACT
151 W F K K N D Q V E V S V R P G G R W N R F K T Y S T I O R T
541 TTGAGATATGGGATCTGTTTTCACCTTTTATATTAGGCTTGGCTGAATAATCAAAGTTCTCTATCGAGGTGGAATGACAGAGCGG
181 L E I A T G C G S V F T P I F R A W L N N Q K F S Y R G G M T E A
631 AAAAAGCTGAGCGGAGAAAGTACTGCTAGGTGTTGTTAAAGAAACTATTTGAGATTGAGTCTACTTTTCAAAATTTGCCAGCAA
211 K K A E R R K V L A R W L K E T I L R L G P T F I K I G Q Q
721 TTCTCAACAGAGGTGGATATTTCTGCTCAAGAGTATGTTGATCAGTTGTCGAGCTTCAGAGTTCCTCTCTTCCATTCGAACT
241 F S T R V D I L A Q E Y V D Q L S E L Q Q V P P P S E T
811 GCTGTTTAAATGTTGAAGAACTTGGGGCCCATTTGGGTGATGATTTTGAAGATTTGACCGTGAACCAATAGCTGCTGCAAGTCTT
271 A G V L I V E E E L G G P L G D V F E R F D R E P I A A S L
961 GGTGAGGTGCATCGTCAAGATTGAATGGCGAGGAAGTAGTTTAAAGTACAGAGGCCCGCTTTAAGGATCTTTTGTATTCGATCTT
301 G Q R L N G O E V V V K V Q R P G K D L F I D L
991 AAAAAGCTGAGGTGATAGCTGAATATCTGCAGAAATAGATCCTAAATCTGATGCTGAGTGGTCAAAAAGAGCTGGTGTCAATATATGATGAA
331 K N L R V I A E Y L O K I D P K S D G A K R D W V A I Y D E
1081 TGTGCAAGTGTCTTGTATCAGGAGATTGATTACACTAAGGAAGCTGCTAACCCGAACTGTTTGCAGTAAGTCTCAAGACATGAGATTAT
361 C A S V L Y O E I D Y T K E A A N A E L F A S N F K N M D Y
1171 GTGAAGTCCCACAGATTAAGTGGGATATACACACAGAGTTTGAACATGGAGTATGTCAGGCTATTAATAAAGAGGATACAA
391 V K V P A T T I Y W E Y T T P Q V L T M E Y V P G I K I N R I Q
1261 GCCTTAGATCAATTTGGTGTGATAGCAAAAGGTTAGCGAGTATGCGGTGAATCCTATCTGAGCAGATCCTGTCTCATGCTTTTTC
421 A L D Q L G V D R K R L G R Y A V E S Y L E Q I L S H G F P
1351 CATGCTGATCCACATCTCTGAAATATAGTGTGGATGATGTCATGCGGGAAGGCTGATCTTTATGATTTTGAATGATGGGAAGTATA
451 H A D P H P G N I A V D D V N G G R L I F Y D F G M M G S I
1441 AGTCTAATATCAGAGAAGGATTGCTGGAACATTCTATGAGTTTATGAGAAAGATCCAGATAAGGCTGTGCAAGCAGCGATTCAAATG
481 S P N I R E G L L E T P Y G V Y E K D P D K V G Q A I Q M
1531 GGTGTTCTGGTGCCTACTGTTGACATGACTGCTGTCAGACGAAGTGCACAGTTTTCCTTAATAGTTTGAAGAGCCCTTGACGACAA
511 G V L V P T G D M T A V R R T A Q F P F L N S F E E R L A A Q
1621 AGAAAGGAGAGAAATGGCAAGCAGAAGTGTGCTTCAAAAGCCATTAAGCAAGGAGGAACAAATAGAGAAAAGAACAGCGGTTG
541 R K E R E M A Q A E L G P K K K P L S K E E Q I E K K K Q R L
1711 GCTGCAATTTGGTGAAGATCTATTAAGCATTTGACGACATTCGAGTTTTCCTGACATCTACTTTTGGTTAGAGATTTCAT
571 A A I G E D L L S I A A D Q P P R P P A A T F T P V V R A F S
1861 GTCTGGATGGCATCGAAAGGCTCTGATCCAGATTTGATATCACCGAGATGCGCAACCCATGCGCCTAGAGTTGCTTAGGTTTCGT
601 V L D Q L G I G K G L D P K F D I T E I A K P Y A L E L L R F R
1891 CAAGCTGGTGTGGAAGTTGTGCTTAAAGGACTTCAGGAACAGATGGGACAGAACTCTGTCATTTACAACCTGTTTCAGGCAGGCTGAT
631 E A G V E V V L K D F F N R W D R Q S R A F Y N L F R Q A D
1981 AGAGTTGAGAGACTTGTGAAATTTATCCAGCGATTGGAGCAAGCGATCTTAAGCTTCGGGTTAGAGCTTTAGAAATCTGAAGGGCTTTC
661 R V E R L A E I I Q R L E Q G D L K L R V R A L C E S E R A P
2071 CAACGTGTGACGCTGTCCAGAAAATATTTGGAAGTGCAGTTGACGTGGAAGCTTGGTTAAGCTAGCTACAATGTTGATCTCAATTC
691 Q R V A V Q K T I G S A V A A G S L V N L I G L N S
2161 ATCCGTATGCTCTATTATAGCATACGCTGTCTGTGATCTTTGGCTTCCAAGTCTCTTTGGCTTTTGAAGTTAAGAATTTGGAT
721 I R M P S I I A Y A V C A F F G F Q V L F G L L K V K K L D
2251 CAACGAGAAAATTTGATCAGGAACAGCTTGA
751 Q R E K L I T G T A *

粗体表示叶绿体定位信号肽;下划线表示 ABC1 结构域;粗斜体表示跨膜结构域; * 表示终止密码子

图 1 *NtOSA1* 的 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Chloroplast targeting pre-sequences are presented in bold; Underline represents the ABC1 conserved domain; Putative trans-membrane spans are presented in bold italic; * Stop codon

Fig. 1 cDNA and deduced amino acid sequences of *NtOSA1*



深灰色框代表 ABC1 结构域;浅灰色框代表激酶结构域;
白色框代表跨膜结构域

图 2 烟草 *NtOSA1* 蛋白质结构示意图

Dark gray box, ABC domain; Light gray box, kinase domain;
White barrels, predicted transmembrane domains

Fig. 2 Schematic representation of the *NtOSA1* protein

光为 488 nm,吸收光为 500~525 nm;叶绿体的激
发光为 633 nm,吸收光为 650~720 nm。

2 结果与分析

2.1 烟草 *NtOSA1* 基因克隆及序列分析

测序结果显示,获得的片段与拟南芥 *AtOSA1*

基因核苷酸序列具有高度的一致性(72.89%),因此
命名为 *NtOSA1* (GenBank 登录号 KU565475)。
NtOSA1 基因的开放阅读框长度为 2 283 bp,编码
760 个氨基酸。

为了解 *NtOSA1* 蛋白的生物学活性及潜在功
能,利用在线软件分别对 *NtOSA1* 蛋白的理化性质
和结构域进行分析和预测,结果显示:*NtOSA1* 蛋白
分子量为 86.07 kD,理论等电点为 8.92;在氨基酸
序列的 277~397 具有 ABC1 结构域,在 364~502
具有激酶结构域,*NtOSA1* 蛋白 C 端具有 2 个跨膜
结构,分别位于氨基酸序列的 703~721 和 726~
743(图 1、2)。将拟南芥、水稻、酵母和集胞藻 4 个
物种的典型 Abc1 蛋白与 *NtOSA1* 蛋白进行序列比
对,发现 *NtOSA1* 具有典型的 ABC1 保守结构域
(图 3),表明 *NtOSA1* 属于 Abc1 家族。

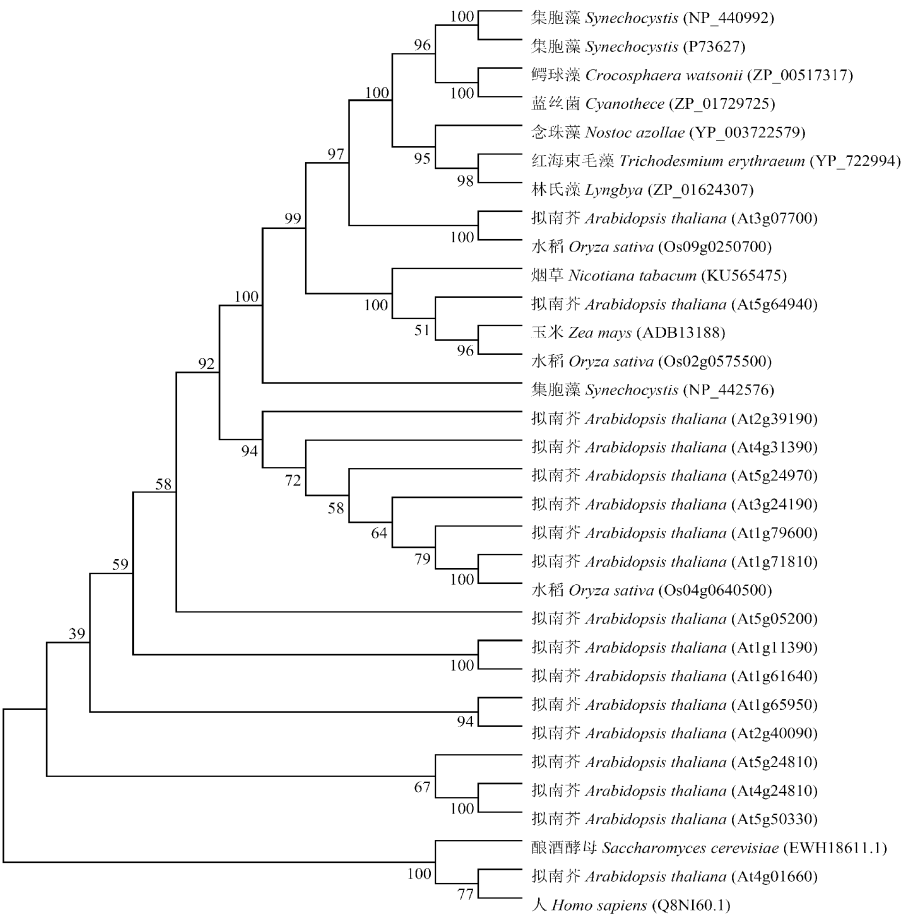
NtOSA1	EEELGGPLGDVFERFDREFTAAASIGQVHRARLN.GQEVVVKVQRPGLKDLFDIDLKNIKRV	61
AtOSA1	EEELGGSVEDIFDRFDYEFIAAASIGQVHRARLK.GQEVVVKVQRPGLKDLFDIDLKNIKRV	61
OsABC1	EEELGASVNKIFDRFDREFTAAASIGQVHRACLN.GKEVVVKVQRPGLKELFDIDLKNIKRV	61
SynABC1	EEELGKPIAKLYRSFDVPVIAAASIGQVHRAQLHTGELVVVKVQRPGLKFLFTIDLAILEKI	62
AtABC1	DAELGSNNQSKLTSFDYEFIAAASIGQVHRVTKDGLVAMKICYPGVANSIESDINENRRL	62
ScCOQ8	AKELGANWKTKEKFKIPIIAAASIGQVHRPELPSGQEVVVKVQYFVGVESIDSLNSLML	62
NtOSA1	AEYLQKILPKSDGAKRDWVAIYDECASVLYCEIDYTRAEANAEI.EASNFKNMDYVVFVETIY	122
AtOSA1	AEYLQKVLPKSDGAKRDWVAIYDECASVLYCEIDYTRAEANSELEANNFKDLEYVVFVETIY	122
OsABC1	AEYLQKVLPKSDGAKRDWVAIYDECASVLYCEIDYTRAEFNAEK.ESENFKNMDYVVFVETIL	122
SynABC1	AQYFQN.EPKFW.GRGRDWNIGIYECCCKILWQEDYLRGRSALTERRNFRGEDWVFVETVY	121
AtABC1	LNNTNL.IPKG...LFLDRAIKVAKETACEDYEIEFVSQKRRFDLLSDTPGFYVFLVV	118
ScCOQ8	LTASSL.IPKG...LFLDKTIANARTDKWQEDYINREARALCKFEALLKDDPAFVVEHVF	118

AtOSA1 (At5g64940) 和 AtABC1 (At4g01660) 来自拟南芥; OsABC1 (Os02g0575500) 来自水稻; SynABC1 (P73627) 来自集胞藻; ScCOQ8 (EWH18611.1) 来自酵母

图 3 烟草 NtOSA1 与其他物种 ABC1 结构域比对

AtOSA1 (At5g64940) and AtABC1 (At4g01660) are from *Arabidopsis thaliana*; OsABC1 (Os02g0575500) is from *Oryza sativa*; SynABC1 (P73627) is from *Synechocystis*; ScCOQ8 (EWH18611.1) is from *Saccharomyces cerevisiae*

Fig. 3 Comparison of ABC1 domain alignments among NtOSA1 and other species



节点上的数值表示 Bootstrap 重复 1 000 次的置信度

图 4 烟草 NtOSA1 与其它 Abc1 蛋白的系统进化树

Values at nodes show the confidence level of Bootstrap replication 1 000

Fig. 4 Phylogenetic tree of the alignment of NtOSA1 deduced amino acid sequence with other Abc1 proteins

2.2 烟草 *NtOSA1* 基因系统发育树构建

选取酵母、拟南芥、水稻、玉米、集胞藻等 12 个物种的 32 个 *Abc1* 蛋白序列进行多重比对,构建进化树,结果(图 4)显示,*NtOSA1* 蛋白与拟南芥 *AtOSA1* 蛋白的亲缘关系最近,一致性为 76.04%;与玉米 *ADB13188* 蛋白的一致性为 74.15%;与水稻 *Os02g0575500* 的一致性为 73.45%。表明,*NtOSA1* 与拟南芥、玉米和水稻的亲缘关系相对较近,而与第一个被鉴定的 *Abc1* 蛋白、酵母 *ScCOQ8*、以及拟南芥 *AtABC1* 和人类 *HsCABC1* 的亲缘关系较远(图 4)。

2.3 烟草 *NtOSA1* 基因的组织表达

利用 qRT-PCR 检测 *NtOSA1* 基因在烟草不同组织中的表达情况。结果显示(图 5),*NtOSA1* 基因主要在烟草叶片中表达(相对表达量是根中的 137.83 倍),在花中有少量表达(相对表达量是根中的 10.75 倍),而在根、茎和种子中的表达量很低,几乎检测不到。表明,*NtOSA1* 基因具有组织特异表达的特征。

2.4 不同胁迫条件下烟草 *NtOSA1* 基因的表达

采用 qRT-PCR 检测 *NtOSA1* 基因在 10 mmol/L H_2O_2 和 200 mmol/L NaCl 处理后不同时间点的烟草幼苗中的表达量变化,结果显示(图 6, I),*NtOSA1* 基因在 H_2O_2 和 NaCl 处理前期表达量上升,均在处理后 6 h 达到最大值,分别为处理前的 1.95 和 2.69 倍。在 H_2O_2 处理后 12 h,*NtOSA1* 基因表达量受到部分抑制,为处理前的 0.6 倍,在 NaCl 处理后 12 h,*NtOSA1* 基因表达量恢复到

处理前水平。

用不同质量浓度的 $CdCl_2$ 处理烟草水培苗, qRT-PCR 结果显示(图 6, II),*NtOSA1* 基因的表达量在不同质量浓度 $CdCl_2$ 处理下没有显著性差异,暗示该基因可能并不参与烟草植株体内 $CdCl_2$ 的应答。

2.5 烟草 *NtOSA1* 蛋白的亚细胞定位

TargetP 1.1 Server 软件预测结果显示,*NtOSA1* 蛋白 N 端含有一个 46 个氨基酸的叶绿体定位信号肽(图 1),预测该蛋白定位于细胞叶绿体中,可靠性等级为 1,为最高等级。用激光扫描共聚焦荧光显微镜检测 *NtOSA1* 蛋白的亚细胞定位,结果显示,*NtOSA1* 定位于细胞叶绿体中(图 7),与软件预测结果符合。

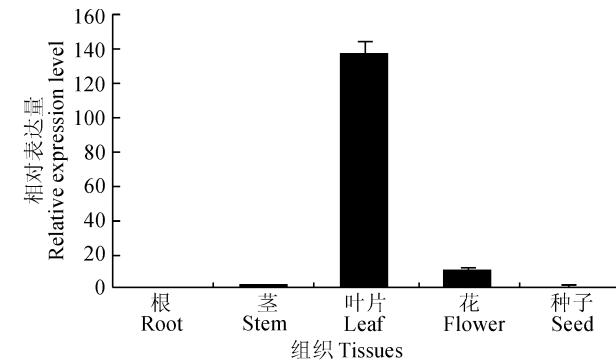
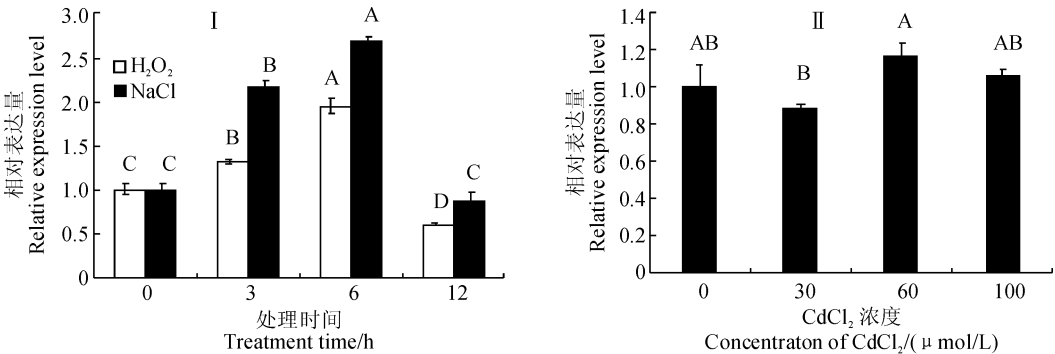


图 5 烟草 *NtOSA1* 基因在不同组织中的表达
Fig. 5 Expression profiles of *NtOSA1* gene in different tissues of tobacco

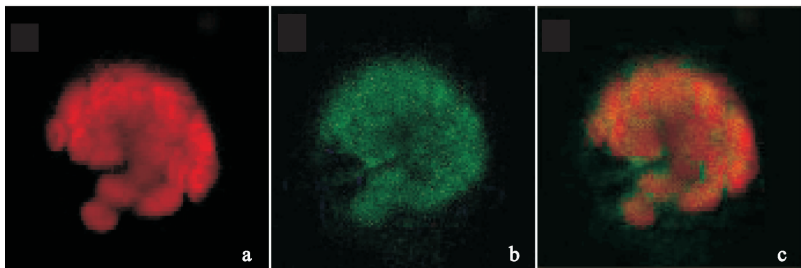


不同大写字母表示同一处理不同时间点(浓度)的显著性差异($P<0.01$, LSD 检验)

图 6 烟草 *NtOSA1* 基因对 H_2O_2 , NaCl (I) 和 $CdCl_2$ (II) 的响应

Different capital letters refer to significant differences among different time points (concentration) of the same treatment ($P<0.01$, LSD test)

Fig. 6 Expression analysis of *NtOSA1* gene in response to H_2O_2 , NaCl (I) and $CdCl_2$ (II) treatment



a. 叶绿体自发荧光;b. *NtOSA1*-GFP 蛋白荧光;c. 合并图
图 7 *NtOSA1*-GFP 蛋白在烟草原生质体中的荧光显微观察

a. The fluorescence of chlorophyll; b. The fluorescence of *NtOSA1*-GFP; c. Merged image

Fig. 7 Fluorescence microscope observation of *NtOSA1*-GFP proteins in tobacco mesophyll protoplasts

3 讨 论

Abc1 家族在进化过程中演化成了两种独立的类型:一种存在于蓝藻细菌和叶绿体,比如拟南芥 *AtOSA1* 蛋白,另一种存在于线粒体,比如酵母 *ScCOQ8*^[17]。本研究克隆得到的 *NtOSA1* 基因与拟南芥 *AtOSA1* 基因同源性极高,其编码蛋白具有典型的 ABC1 保守结构域和激酶结构域。序列比对和系统进化树分析显示,*NtOSA1* 与来自于拟南芥、水稻和玉米等植物的 Abc1 蛋白亲缘关系较近,而与酵母 *ScCOQ8* 亲缘关系较远。亚细胞定位结果显示,*NtOSA1* 蛋白定位于烟草原生质体细胞的叶绿体中,这与 *AtOSA1* 蛋白的定位结果一致。这些结果表明,烟草 *NtOSA1* 是 Abc1 家族的同源基因,其编码蛋白属于 Abc1 家族的第一种类型,可能与 *AtOSA1* 蛋白具有相似的功能。

研究显示,*AtOSA1* 基因主要在拟南芥的叶片中表达,其次为花中,在茎中有少量表达,在根中的表达量非常低^[11]。此外,水稻 ABC1 基因也主要在叶片中表达^[19]。本研究中,组织表达分析表明,*NtOSA1* 基因在烟草不同组织中的表达量具有明显差异,主要在叶片中表达,其次为花、根、茎和种子,为组织特异性表达,这与拟南芥 *AtOSA1* 基因和水稻

ABC1 基因的表达模式相一致。由于花组织中含有绿色的萼片,并且 *NtOSA1* 蛋白定位于细胞的叶绿体中,这些结果暗示,*NtOSA1* 基因主要在绿色组织中表达。随着基因工程技术的迅猛发展和日趋成熟,对于能够驱动外源片段在特异组织表达的启动子的需求越来越大。烟草 *NtOSA1* 基因的组织表达结果暗示,该基因的启动子是一种绿色组织特异表达启动子,因此下一步对 *NtOSA1* 基因启动子的克隆及功能研究,将会为组织特异性启动子的开发和利用提供重要的遗传资源和数据支撑。

之前的研究表明,拟南芥 *AtOSA1* 基因的表达量受到 CdCl₂ 的调控,而本研究发现,烟草 *NtOSA1* 基因的表达量在不同质量浓度 CdCl₂ 处理下没有显著差异,表明 OSA1 基因在不同物种中基因表达调控方式存在差异。拟南芥 *AtOSA1* 基因的突变能够导致植株对氧化胁迫的敏感度增加,本研究发现烟草 *NtOSA1* 基因在 H₂O₂ 和 NaCl 处理后表达量上升,均在处理后 6 h 达到最大值,这一结果也与小麦和水稻 ABC1 基因的表达调控特性相一致。以上结果暗示,*NtOSA1* 基因参与了烟草氧化胁迫和盐胁迫的应答反应,这为今后阐明烟草 *NtOSA1* 基因的生物学功能,以及通过基因工程的方法提高烟草抗逆性提供了理论基础。

参考文献:

[1] 赵中秋, 席梅竹. Cd 对植物的氧化胁迫机理研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 47-51.
ZHAO Z Q, XI M Z. Advances in research on mechanisms of Cd-induced oxidative stress in plants[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(S1): 47-51.

[2] LEONARD C J, ARAVIND L, KOONIN E V. Novel families of putative protein kinases in bacteria and archaea: evolution of the “eukaryotic” protein kinase superfamily[J]. *Genome Research*, 1998, 8: 1 038-1 047.

[3] ERNSTER L, FORSMARK-ANDREE P. Ubiquinol: an endogenous antioxidant in aerobic organisms[J]. *Clinical Investigation*, 1993, 71: S60-S65.

[4] MACINGA D R, COOK G M, POOLE R K, *et al.* Identification and characterization of *aarF*, a locus required for production of ubiquinone in *Providencia stuartii* and *Escherichia coli*

- and for expression of 2'-N-acetyltransferase in *P. Sturtii* [J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180: 128-135.
- [5] POON W W, DAVIS D E, HA H T, *et al.* Identification of *Escherichia coli ubiB*, a gene required for the first monooxygenase step in ubiquinone biosynthesis[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182: 5 139-5 146.
- [6] DO T Q, HSU A Y, JONASSEN T, *et al.* A defect in coenzyme Q biosynthesis is responsible for the respiratory deficiency in *Saccharomyces cerevisiae abc1* mutants[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276: 18 161-18 168.
- [7] IIZUMI M, ARAKAWA H, MORI T, *et al.* Isolation of a novel gene, *CABC1*, encoding a mitochondrial protein that is highly homologous to yeast activity of bcl complex[J]. *Cancer Research*, 2002, 62: 1 246-1 250.
- [8] MOLLET J, DELAHODDE A, SERRE V, *et al.* *CABC1* gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2008, 82: 623-630.
- [9] BOUSQUET I, DUJARDIN G, SLONIMSKI P P. *ABC1*, a novel yeast nuclear gene has a dual function in mitochondria; it suppresses a cytochrome b mRNA translation defect and is essential for the electron transfer in the bcl complex[J]. *EMBO Journal*, 1991, 10: 2 023-2 031.
- [10] BRASSEUR G, TRON G, DUJARDIN G, *et al.* The nuclear *ABC1* gene is essential for the correct conformation and functioning of the cytochrome bcl complex and the neighbouring complexes II and IV in the mitochondrial respiratory chain[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1997, 15: 103-111.
- [11] JASINSKI M, SUDRE D, SCHANSKER G, *et al.* AtOSA1, a member of the Abc1-Like family, as a new factor in cadmium and oxidative stress response[J]. *Plant Physiology*, 2008, 147: 719-731.
- [12] GAO Q S, YANG Z F, ZHOU Y, *et al.* Characterization of an Abc1 kinase family gene *OsaABC1-2* conferring enhanced tolerance to dark-induced stress in rice[J]. *Gene*, 2012, 498: 155-163.
- [13] YANG S, ZHANG Q, LI T, *et al.* AtSIA1, an ABC1-like kinase, regulates salt response in *Arabidopsis*[J]. *Biologia*, 2012, 67: 1 107-1 111.
- [14] CARDAZZO B, HAMEL P, SAKAMOTO W, *et al.* Isolation of an *Arabidopsis thaliana* cDNA by complementation of a yeast *abc1* deletion mutant deficient in complex III respiratory activity[J]. *Gene*, 1998, 221: 117-125.
- [15] LUNDQUIST P K, POLIAKOV A, GIACOMELLI L, *et al.* Loss of plastoglobule kinases ABC1K1 and ABC1K3 causes conditional degreening, modified prenyl-lipids, and recruitment of the jasmonic acid pathway[J]. *Plant Cell*, 2013, 25: 1 818-1 839.
- [16] MARTINIS J, GLAUSER G, VALIMAREANU S, *et al.* A chloroplast ABC1-like kinase regulates vitamin E metabolism in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2013, 162: 652-662.
- [17] MANARA A, DALCORSO G, LEISTER D, *et al.* AtSIA1 AND AtOSA1: two Abc1 proteins involved in oxidative stress responses and iron distribution within chloroplasts[J]. *New Phytologist*, 2014, 2: 452-465.
- [18] 王彩香, 景蕊莲, 毛新国, 等. 小麦 *TaABC1L* 的克隆及表达特性分析[J]. 作物学报, 2007, 33(6): 878-884.
- WANG C X, JING R L, MAO X G, *et al.* Cloning and expression analysis of a new stress-responsive gene *TaABC1L* in wheat [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(6): 878-884
- [19] 高清松, 张 丹, 徐 亮, 等. 水稻 *ABC1* 基因家族的鉴定及在非生物胁迫下的表达分析[J]. 中国水稻科学, 2011, 25(1): 1-10.
- GAO Q S, ZHANG D, XU L, *et al.* Systematic identification of rice *ABC1* genes and their expression analysis under abiotic stresses[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2011, 25(1): 1-10.
- [20] LEE S S, PARK H J, JUNG W Y, *et al.* OsaCYP21-4, a novel Golgi-resident cyclophilin, increase oxidative stress tolerance in rice[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 797.
- [21] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473-497.
- [22] HERMAND V, JULIO E, DORLHAC DE BORNE F, *et al.* Inactivation of two newly identified tobacco heavy metal ATPases leads to reduced Zn and Cd accumulation in shoots and reduced pollen germination[J]. *Metallomics*, 2014, 6(8): 1 427-1 440.
- [23] HOAGLAND D R, ARNON D I. The water-culture method for growing plants without soil[J]. *California Agricultural Experiment Station Circular*, 1950, 347: 1-32.
- [24] YOO S D, CHO Y H, SHEEN J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis[J]. *Nature Protocols*, 2007, 2: 1 565-1 575.

(编辑:宋亚珍)