西北植物学报,2023,43(9):1441-1449
Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.

doi:10.7606/j.issn.1000-4025.2023.09.1441 http://xbzwxb.alljournal.net

新麦草 *IPT* 基因亚细胞定位、过表达载体构建及鉴定

任晓敏[1],云 岚[1,2*],艾 芊[1],李 珍[1],赵 乔[3],石凤翎[1]

(1 内蒙古农业大学 草原与资源环境学院,呼和浩特 010018;2 草地资源教育部重点实验室,呼和浩特 010011;3 中国科学院深圳先进技术研究院,深圳 518055)

摘 要:为了验证 *IPT* 基因在新麦草中的功能,为后续新麦草 *IPT* 基因进一步功能验证提供试验材料和理论依据。研究以 DT 型和 ST 型的新麦草分蘖节为材料,通过 RNA-seq 分析和 qRT-PCR 试验验证 *IPT* 的相对表达量并进行 GO 富集分析,采用 PCR 法克隆 *IPT* 基因,构建 1300-cYFP-*IPT* 过表达载体,并进行生物信息学分析;通过烟草瞬时转染法和蛋白质印迹法鉴定 IPT 蛋白的亚细胞定位及表达情况。结果显示,*IPT* 与 tRNA 二甲基烯丙基转移酶活性相关,在新麦草分蘖中起上调作用;克隆得到新麦草 *IPT* 基因全长,并构建了 1300-cYFP-*IPT* 过表达载体,其开放阅读框(ORF)为 1 362 bp;多序列比对与保守结构域分析表明,新麦草 IPT 蛋白存在 PLN02840 蛋白保守结构域,与二粒小麦、小麦及硬粒小麦 IPT 蛋白的亲缘关系较近;蛋白质二级结构预测显示新麦草 IPT 蛋白二级结构由 α-螺旋、延伸链、β-折叠和不规则卷曲组成;分析显示丝氨酸的磷酸化位点最有可能是蛋白发挥功能的潜在磷酸化位点;烟草瞬时转染显示 IPT 蛋白正常表达,定位于叶绿体中;Western blot 结果显示连接载体的目的蛋白 IPT 正常表达,大小为 76.8 kD。研究表明 *IPT* 基因在新麦草分蘖过程中上调分蘖数,1300-cYFP-*IPT* 载体可在植株叶绿体中正常表达。

关键词:新麦草;*IPT*;基因克隆;过表达载体;亚细胞定位;表达分析

中图分类号:Q786; S543 **文献标志码**:A

Subcellular Localization, Overexpression Vector Construction and Identification of *IPT* Gene in *Psathyrostachys juncea*

REN Xiaomin[1], YUN Lan[1,2*], AI Qian[1], LI Zhen[1], ZHAO Qiao[3], SHI Fengling[1]

(1 College of Grassland Resource and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China; 2 Key Laboratory of Grassland Resources of Education Ministry, Hohhot 010011, China; 3 Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract: In order to verify the function of *IPT* gene in *Psathyrostachys juncea*, provides experimental materials and theoretical basis for further functional verification of *IPT* gene in *P. juncea*, we used the tillering nodes of DT type and ST type as materials. The relative expression of *IPT* was verified by RNA-seq analysis and qRT-PCR test, and GO enrichment analysis was carried out. The *IPT* gene was cloned by PCR method, and the 1300-cYFP-*IPT* overexpression vector was constructed and analyzed by bioinformatics. The subcellular localization and expression of IPT protein were identified by tobacco transient trans-

收稿日期:2022-04-17;**修改稿收到日期**:2023-05-26
基金项目:国家自然基金项目(31860672);内蒙古自治区种业创新重大示范工程"揭榜挂帅"项目(2022JBGS0040)
作者简介:任晓敏(1998-),女,在读研究生,主要从事草种质资源与育种研究。E-mail:2937923090@qq.com
*通信作者:云 岚,教授,博士生导师,主要从事牧草种质资源与遗传育种研究。E-mail:yunlan@imau.edu.cn

fection and Western blot. The results showed that IPT was related to the activity of tRNA dimethylallyl transferase and up-regulated in the tillering of *Psathyrostachys juncea*. The full-length *IPT* gene of *P. juncea* was cloned, and the 1300-cYFP-*IPT* overexpression vector was constructed with an open reading frame (ORF) of 1 362 bp. Multiple sequence alignment and conserved domain analysis showed that the IPT protein of *P. juncea* had a conserved domain of PLN02840 protein, which was closely related to the IPT protein of *Triticum dicoccoides*, *Triticum aestivum* and *Triticum turgidum* subsp. *durum*. Protein secondary structure prediction showed that the secondary structure of IPT protein was composed of alpha helix, extended strand, beta turn and random coil. Analysis showed that serine phosphorylation sites were most likely to be potential phosphorylation sites for protein function. Transient transfection of tobacco showed that IPT protein was normally expressed and localized in chloroplasts. Western blot results showed that the target protein IPT of the connected vector was normally expressed, with a size of 76.8 kD. The results showed that *IPT* gene up-regulated the number of tillers during the tillering process of *P. juncea*, and the 1300-cYFP-*IPT* vector could be normally expressed in the chloroplast of plants.

Key words: *Psathyrostachys juncea*; *IPT*; gene cloning; overexpression vector; subcellular localization; expression analysis

IPT 基因编码的异戊烯基转移酶(isopentenyl-transferases),是细胞分裂素(cytokinin,CK)合成过程中的第一限速酶[1],即使 *IPT* 基因表达很低也可以促进细胞分裂素的增加,而 CK 具有促进细胞分裂以及根部分化等作用[2],和植物产量密切相关。在油菜中,过表达 SAG12-*ipt* 基因的植株相比正常植株的分枝数明显增加,在一定程度上为提高油菜单产提供了新的优质材料[3]。*ipt* 基因与果蝇热激蛋白 hsp70 启动子相结合转化蓝雪叶烟草,阳性植株侧芽明显增多,植株相对矮小,其体内的细胞分裂素含量增加了几十倍到上百倍[4]。中间偃麦草是优质的禾本科牧草,有研究构建 *ipt* 基因的双元表达载体通过基因枪轰击法获得中间偃麦草的阳性过表达植株,阳性植株相比未转化植株有明显的丛生矮化现象,同时植株内的细胞分裂素含量也相对增加[5]。中国牧草产业起步较晚,育种技术相对落后,导致突破性品种少,优质本土牧草的推广范围小,牧草种子很大程度上仍需靠进口补给[6]。

新麦草[*Psathyrostachys juncea* (Fisch.) Nevski]又名俄罗斯野黑麦(Russian wildrye),是一种适应半干旱气候的冷季型牧草,是新麦草属中唯一的刈割放牧兼用型草种[7],也是禾谷类作物改良的潜在种质资源[8],在中国主要分布在内蒙古和新疆等地,具有抗寒、抗旱、耐盐碱、耐牧、返青早等优良特性,在北方寒旱区生态治理方面具有重要价值[9]。随着中国畜牧业高质量发展和生态治理的逐步推进,对优质高产草种的需求不断增加,提高草产量成为当下草育种需要解决的关键问题。

前期研究发现并筛选了和新麦草分蘖相关的基因,其中 *IPT* 在新麦草中与调控分蘖形成有关[10],而分蘖数是影响新麦草饲草和种子产量的关键因素之一。目前新麦草中的 *IPT* 基因功能尚未被验证,相关试验分析也鲜见报道。因此,本试验通过定量实时 PCR(qRT-PCR)对 *IPT* 基因在新麦草少分蘖(ST)和多分蘖(DT)材料中的表达量进行了分析,并从新麦草中克隆出该基因,利用同源性比较及生物信息学分析其蛋白结构和特性;构建过表达载体并通过烟草的瞬时转染鉴定该基因的表达性并分析其在烟草中的亚细胞定位情况;通过蛋白质印迹法(Western blot)检测该基因在蛋白水平的表达,为深入了解 *IPT* 基因在多年生禾本科牧草生长发育中的作用机制及新麦草 *IPT* 基因功能验证提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

研究以种植于内蒙古呼和浩特市牧草资源圃的 30 株 ST 型和 30 株 DT 型的新麦草为材料,取分蘖节提取总 RNA,进行 RNA-seq 测序。另取相同生育期的 DT 型新麦草材料的分蘖节提取总 RNA,进行 qRT-PCR 验证,以种植 1 个月左右的烟草为瞬时转染材料。植物过表达载体为 1300-cYFP,转化用的菌株为 DH5α 感受态,侵染烟草用的农杆菌菌株为 GV3101 感受态,卡那霉素(Kan)、利福平(Rif)均由中国科学院深圳先进技术研究院合成所实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 *IPT* 基因的表达量分析

通过 3 种内参基因稳定性评估软件 Ge Norm、

Norm Finder 和 Best Keeper 对 RNA-seq 数据进行分析，筛选出表达稳定的 *IPT* 基因，通过软件 IBM SPSS Statistics 23 和在线网站（http://www.gene-ontology.org/）分别进行 *IPT* 基因在 DT 及 ST 中的表达量和基因本体（GO）分析。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物（表 1），以新麦草分蘖节为材料用天根试剂盒提取总 RNA 并反转录 cDNA，以 4 个质量浓度梯度的 1 μL cDNA 为模板，上下游引物各 0.6 μL，2×Talent qPCR Pre Mix 10 μL，RNase-free ddH_2O 7.8 μL，总体系 20 μL，进行 qRT-PCR 验证，通过 qRT-PCR 的标准曲线评估 *IPT* 的扩增效率，用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算 *IPT* 分别在 DT 和 ST 种的表达量，并用微生信（http:// www.bioinformatics.com.cn）平台进行作图分析。

表 1　新麦草 *IPT* 基因引物

Table 1　*IPT* gene primers of *Psathyrostachys juncea*

基因名 Gene name	引物 Primer (5′→3′)	引物序列 Primer sequence (5′→3′)
IPT	qRT-PCR-F	GCTGCGAGTCATCGAGAGAT
	qRT-PCR-R	AGAACGCTTCCCGAACTAGC
	PCR-F	ATGTGCTGTGAAATGAGGCCAC
	PCR-R	CTTCCCCTGTGTCCTTCTAATCC
	1300-LJ-F	CCGAATTCGGAGTCGACACTAGTATGTGCTGTGAAATGAGGCCAC
	1300-LJ-R	TCCACCTCCGACCGGTGCACTAGTCTTCCCCTGTGTCCTTCTAATCC
内参基因 *Actin*	*Actin*-F	TGGTATGGAAGCTGCTGGAA
	Actin-R	TCAGCAATACCCGGGAACAT

1.2.2　*IPT* 基因克隆及过表达载体构建

提取 DT 型新麦草材料分蘖节的总 RNA，并反转录成 cDNA，通过 SnapGene 6.0.2 软件设计 PCR 及 1300 连接引物（表 1），以 2 μL 的 cDNA 为模板，2×Phanta Max Master Mix 25 μL，上下游引物各 2 μL，ddH_2O 补足到 50 μL 进行 PCR 反应，PCR 反应程序为：95 ℃ 3 min 1 个循环，95 ℃ 15 s、56 ℃ 15 s、72 ℃ 1 min 30 s 共 35 个循环，72 ℃ 5 min 1 个循环，4 ℃∞，反应结束后加 10 μL 6×Loading buffer 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，按照天根胶回收试剂盒的方法对目的条带进行胶回收，并用全式金的 Blunt 基因克隆试剂盒将胶回收产物与 Blunt 进行连接转化，挑取单菌落于 10 μL ddH_2O 中，以 M13F 和 M13R 为引物进行菌液 PCR，反应程序为：94 ℃ 5 min 1 个循环，94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s、72 ℃ 1 min 30 s 共 30 个循环，72 ℃ 5 min 1 个循环，4 ℃ ∞，选取阳性菌液加到 1×LB 5 mL＋50 mg/mL 卡那霉素 5 μL 的摇菌管中过夜摇菌，按照天根试剂盒质粒小提试剂盒提取质粒，并测序。取测序正确的克隆质粒为模板加 0.5 μL，上下游引物为 1300 连接引物各 2 μL，其余同 PCR 反应，总体系 50 μL，电泳后胶回收，用 SpeI 酶 1.5 μL 和 Cut Smart 5 μL，37 ℃水浴锅中单酶切 20 μL 1300-cYFP 载体质粒 2 h，总体系 50 μL，加 10 μL 6×Loading buffer 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后胶回收，将上述 2 个胶回收产物进行连接转化，2 μL 5×CE Ⅱ buffer，1 μL E×nase Ⅱ，胶回收产物共 7 μL，总体系 10 μL，37 ℃反应 30 min，菌液 PCR 引物为实验室保存的 1300 上下游引物，转化及提质粒测序同克隆过程。

1.2.3　1300-cYFP-*IPT* 过表达载体农杆菌转化

取出保存在－80 ℃冰箱中的 GV3101 感受态菌株于冰上融化，分装后将连接产物加入混匀，冰上静置 20 min，液氮冰浴 1 min，37 ℃热击 5 min，冰浴 2 min，在超净台中加入 1 mL 1×LB，30 ℃复苏 2 h，4 000 r/min 离心 3 min，留少许上清重悬菌体，涂在含 Kan 和 Rif 的抗性版上，30 ℃培养箱培养 2 d，将菌落挑到含 Kan 和 Rif 抗生素的 5 mL 1×LB 中，30 ℃过夜小摇，吸取 1 mL 小摇后的菌液于 20 mL 1×LB（含 Kan 和 Rif）中，30 ℃ 200 r/min 大摇 12 h，落地离心机 4 000 r/min 离心 30 min，倒干净上清后加入 2 mL 侵染液重悬，4 000 r/min 离心 10 min，侵染液为 1 mol/L $MgCl_2$ 500 μL，1 mol/L MES 500 μL，200 mmol/LAS 50 μL，超纯水定容到 50 mL，倒掉离心后的上清，加 2 mL 侵染液重悬后作为母液，另取新的 50 mL 离心管倒入 15 mL 侵染液，加入适当母液，以侵染液为标准测菌液的 OD_{600}，OD_{600} 值在 0.5～0.6 为宜。

1.2.4　烟草瞬时转染及亚细胞定位

取上述配好的菌液，用 1 mL 的注射器吸取菌

液注射烟草叶片背面，注射 2 株烟草，共 6 片叶子，短日照培养 2 d，取叶片组织于尼康共聚焦 AX 显微镜下观察拍照。

1.2.5 SDS-PAGE 凝胶电泳及 Western blot

将上述注射过菌液的烟草叶片于液氮中研磨，研磨后置于 1.5 mL 离心管中，加入等量的 2×SDS loading buffer，涡旋混匀，沸水浴加热 10 min，12 000 r/min 离心 2～5 min，取上清即为蛋白上样液。取 12 孔的预制胶，安装在电泳槽中，倒入 1×SDS-PAGE 电泳缓冲液，向胶孔中点入蛋白上样液和混入二倍体积 2×SDS loading buffer 的全新预染彩色蛋白 Marker，电压 120 V 电泳 1～1.5 h。待电泳快结束前，用甲醇浸泡 PVDF 膜，然后放入电转液中，同时将滤纸也放入电转液中，电转液由 5.8 g Tris、2.9 g 甘氨酸、0.37 g SDS 和 200 mL 甲醇配制而成，并由 ddH_2O 定容至 1 L，电泳结束后，将凝胶置于 1 层海绵和 3 层滤纸之上，覆盖 1 层 PVDF 膜、3 层滤纸和 1 层海绵于电泳槽中 4℃恒压 100 V 转膜 60～90 min。转膜完成后，取出 PVDF 膜于孵育盒中，加入封闭液，室温 40 r/min 摇 1 h，封闭液是含 5%脱脂奶粉的 1×TBST（20×TBST、Tween-20 和 ddH_2O 组成），结束后倒掉封闭液，加入含 GFP 抗性的封闭液室温低速摇 1 h，倒掉上述封闭液，加入 1×TBST 低速摇床洗涤 10 min，共 3 次，倒掉 1×TBST，加入含标记山羊抗小鼠的封闭液，室温 40 r/min 摇 1 h，倒掉封闭液，1×TBST 低速摇床洗涤 5 min，共 2 次，向 PVDF 膜滴加 ECL 工作液（等量的 BeyoECL Moon A 液和 B 液混合），于 WB 曝光仪成像拍照。

1.2.6 *IPT* 基因生物信息学分析

以克隆出的新麦草 *IPT* 基因氨基酸序列为模板，通过 NCBI 数据库中的 BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）进行同源序列比对，获得小麦（*Triticum aestivum*）等 9 个物种的氨基酸序列信息（表 2），利用 DNAMAN 软件对以上 10 个物种进行序列比对，通过 NCBI 中的 Structure（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi）对新麦草 *IPT* 编码蛋白的保守结构域进行分析，利用 PRABI 中的 SOPMA（http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl? page = npsa_sopma.html）进行新麦草 IPT 蛋白的二级结构预测，并通过在线软件 NetPhos 3.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/）对新麦草 IPT 蛋白磷酸化位点进行预测。

表 2 近缘物种 *IPT* 氨基酸序列信息

Table 2 Amino acid sequence information of *IPT* from related species

物种 Species	序列标识符 Sequence version
黑麦草 *Lolium perenne*	XP_051209981.1
硬直黑麦草 *Lolium rigidum*	XP_047096434.1
小麦 *Triticum aestivum*	XP_044436176.1
乌拉尔图小麦 *Triticum urartu*	XP_048539596.1
节节麦 *Aegilops tauschii* subsp. *strangulata*	XP_020163508.1
二穗短柄草 *Brachypodium distachyon*	XP_003563223.2
硬粒小麦 *Triticum turgidum* subsp. *durum*	VAI94183.1
二粒小麦 *Triticum dicoccoides*	XP_037463502.1
大麦亚种 *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare*	XP_044958180.1

2 结果与分析

2.1 新麦草 *IPT* 基因 GO 分析

通过对新麦草 *IPT* 基因进行 GO 富集分析（表 3）显示，*IPT* 在细胞组分中主要与线粒体和质体相关，并参与 tRNA 修饰的生物学过程，同时与 tRNA 二甲基烯丙基转移酶活性相关，在新麦草多分蘖型材料中起到上调的作用。

表 3 IPT 基因 GO 分析

Table 3 GO analysis of *IPT* gene

GO 分析 GO_annotation		*IPT* 基因 ID *IPT* gene ID	调控 Regulation
细胞组分 Cellular component，CC	线粒体 Mitochondrion 质体 Plastid	BMK_Unigene_065650	上调 Up
生物学过程 Biological process，BP	tRNA 修饰 tRNA modification		
分子功能 Molecular function，MF	tRNA 二甲基烯丙基转移酶活性 tRNA dimethylallyltransferase activity		

2.2 新麦草 *IPT* 基因表达量分析

通过对 RNA-seq 的数据分析（图 1）显示，*IPT* 在多分蘖的新麦草中表达量远高于少分蘖中的表达量，qRT-PCR 试验结果与 RNA-seq 数据分析结果

一致，在 ST 和 DT 中 *IPT* 基因表达差异显著，说明 *IPT* 在新麦草分蘖过程中起到一定的调控作用，且在该过程中上调新麦草分蘖数。

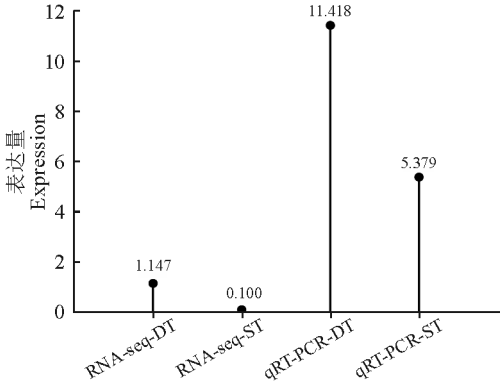

图 1　新麦草 *IPT* 基因表达量分析

Fig. 1　Analysis of *IPT* gene expression in *Psathyrostachys juncea*

2.3　新麦草 *IPT* 基因克隆及过表达载体构建

以 DT 型新麦草为材料，提取分蘖节总 RNA，以反转录的 cDNA 为模板，进行 PCR 反应并克隆 *IPT* 基因，结果显示在目的片段位置成功克隆出了新麦草 *IPT* 基因，该基因片段大小为 1 362 bp（图 2，A），以克隆质粒为模板，成功构建了 1300-cYFP-*IPT* 过表达载体，其菌液 PCR 显示均为目的片段大小（图 2，B）。

2.4　1300-cYFP-*IPT* 过表达载体亚细胞定位

为了研究新麦草 IPT 蛋白在细胞中的表达状态及定位情况，将构建成功的 1300-cYFP-*IPT* 过表达载体和 1300-cYFP 载体转化 GV3101 农杆菌，注射到烟草的叶片中，在共聚焦显微镜下观察，结果（图 3）显示，空载 1300-cYFP 可以正常表达，新麦草 IPT 蛋白定位于叶绿体中，且能够在植株中正常表达。

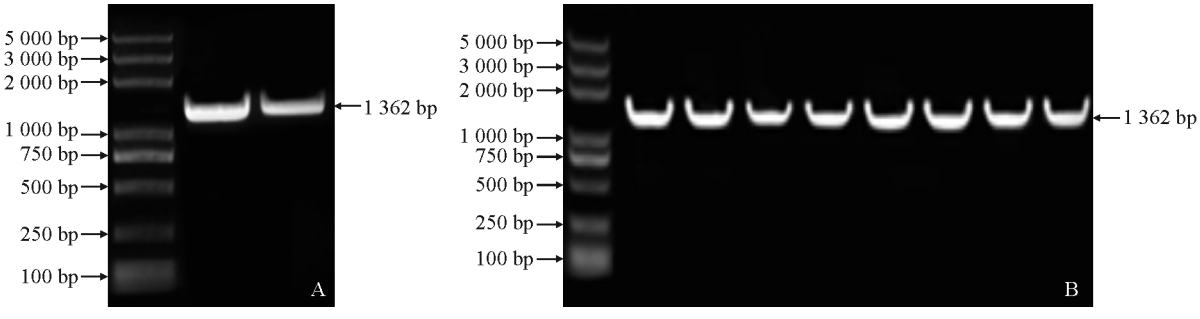

图 2　新麦草 *IPT* 基因克隆及 1300-cYFP-*IPT* 载体菌液 PCR

Fig. 2　Cloning of *IPT* gene and PCR of 1300-cYFP-*IPT* vector

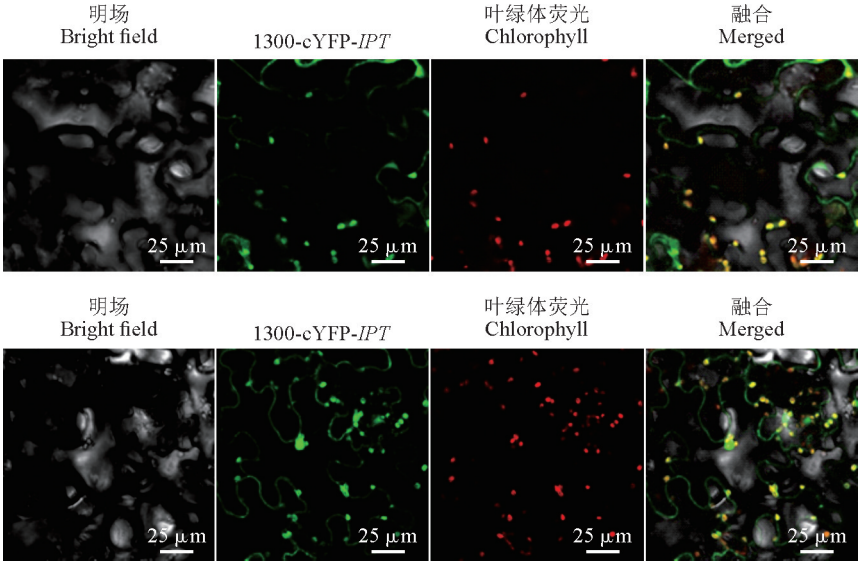

图 3　IPT 的亚细胞定位

Fig. 3　Subcellular localization of IPT

2.5 Western blot 分析

通过蛋白质印迹法分析目的蛋白 IPT 的表达情况，结果(图 4)显示，连接 1300-cYFP 载体的 IPT 能够正常表达，位置大小在 76.8 kD，说明 1300-cYFP-*IPT* 过表达载体可以转入到目的植物中表达。

2.6 近缘物种多序列比对及分析

新麦草与其近缘物种的 *IPT* 氨基酸序列比对图中不同颜色代表氨基酸序列的保守程度(图 5)，其中黑色代表序列的高度保守性，结果显示，新麦草与 9 个近缘物种的氨基酸序列相似度较高，尤其同二粒小麦(*Triticum dicoccoides*)、小麦(*Triticum aestivum*)及硬粒小麦(*Triticum turgidum* subsp. *durum*)的氨基酸序列相似度最高，说明 *IPT* 基因在新麦草及麦类作物中可能具有相似的功能。

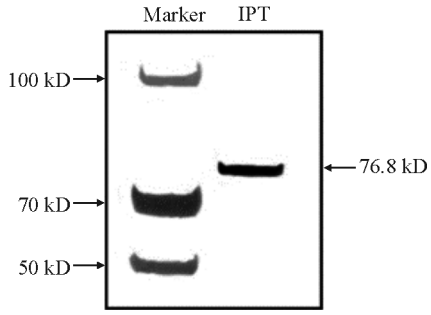

图 4 新麦草 IPT 蛋白印迹

Fig. 4 IPT Western blot of *P. juncea*

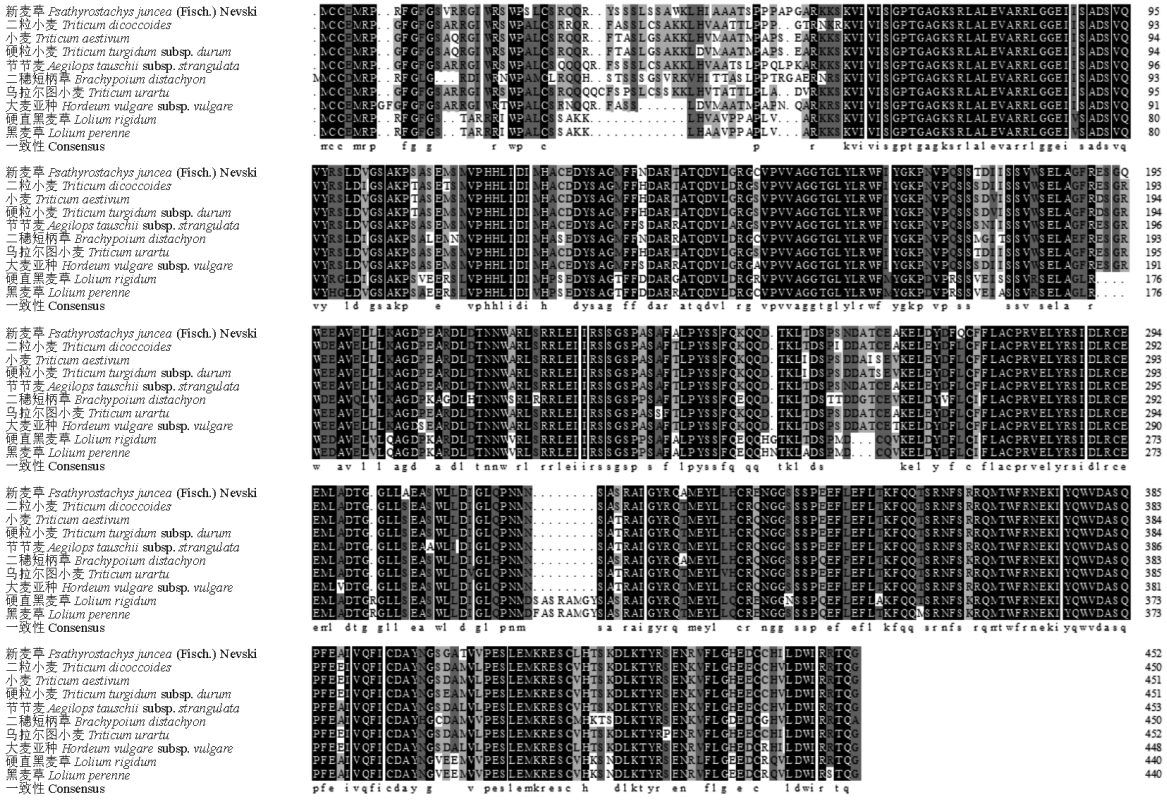

图 5 近缘物种氨基酸序列比对

Fig. 5 Amino acid sequence alignment of related species

2.7 新麦草 IPT 保守结构域及二级结构分析

新麦草 IPT 保守结构域分析(图 6)显示，该蛋白存在 PLN02840 结构域，该结构域是 tRNA 二甲基烯丙基转移酶家族保守结构域，其范围是从第 58 位氨基酸开始，到第 453 位氨基酸结束。通过 SOPMA 对 IPT 蛋白二级结构分析(图 7)发现，该蛋白二级结构由 α-螺旋、延伸链、β-转角和不规则卷曲组成，其中 α-螺旋有 211 个氨基酸，占 46.58%；延伸链有 49 个氨基酸，占 10.28%；β-转角有 24 个氨基酸，占 5.3%；不规则卷曲有 169 个氨基酸，占 37.31%。

2.8 新麦草 IPT 编码蛋白磷酸化位点预测

磷酸化位点分析结果(图 8)显示，IPT 蛋白共有 55 个磷酸化位点，其中丝氨酸有 38 个，苏氨酸有 11 个，酪氨酸有 6 个。丝氨酸的磷酸化位点最有可能是潜在的磷酸化位点，它们的值远远高于临界值 0.5，表明该蛋白可能通过调控相应的磷酸化位点发挥功能。

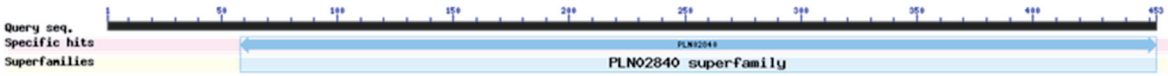

图 6　新麦草 IPT 保守结构域

Fig. 6　IPT conserved domain of *P. juncea*

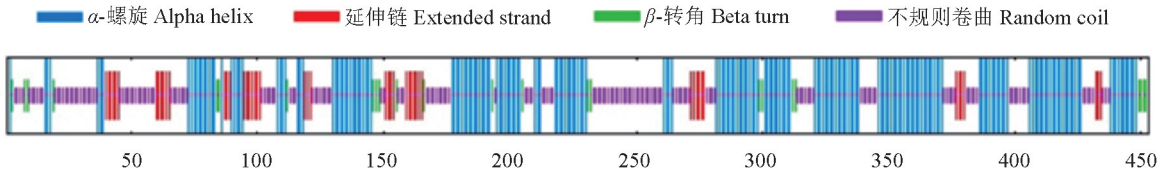

图 7　新麦草 IPT 蛋白质二级结构预测

Fig. 7　Secondary structure prediction of IPT protein in *P. juncea*

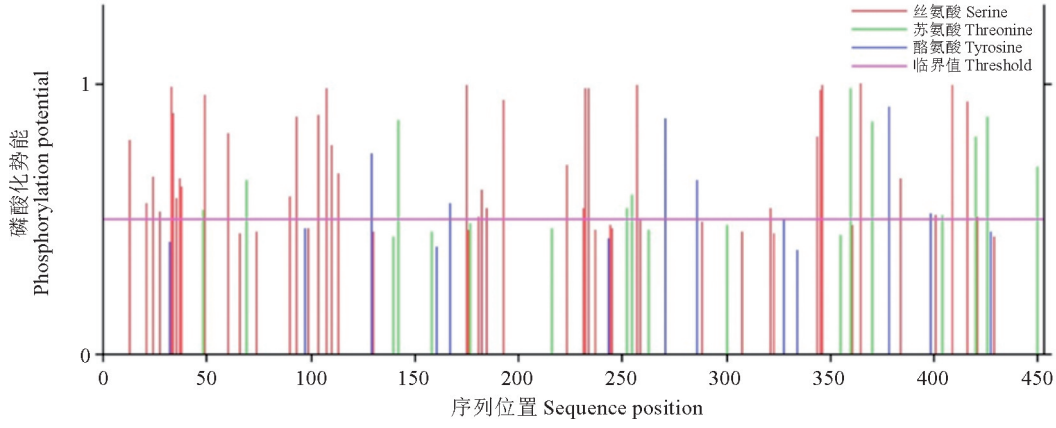

图 8　新麦草 IPT 蛋白磷酸化位点预测

Fig. 8　Phosphorylation site prediction of IPT protein in *P. juncea*

3　讨　论

异戊烯基转移酶（isopentenyl-transferases，IPT）是细胞分裂素（CK）合成过程中的重要限速酶[1]，主要由植物和细菌产生，包括植物促生细菌（PGPB）和植物病原细菌，其中与 PGPB 相关的 IPT 主要倾向于和其他参与细胞分裂素代谢及降解的基因共发生[11]，而 CK 是植物生长发育过程中的重要激素，在植物细胞分裂、分枝数目及形成愈伤组织等方面起调控作用，具有提高植物产量的巨大潜力[12]，推测新麦草 IPT 主要是与植物促生细菌相关的酶，进而调控植株分蘖数，影响新麦草产量。

IPT 基因表达量分析显示，在新麦草分蘖数较多的材料类型中，*IPT* 基因显著上调，这与中间偃麦草的 *IPT* 基因研究结果相同，其阳性过表达植株中的细胞分裂素含量明显增加，植株也出现了明显的丛生矮化现象[5]，北沙参异戊烯基转移酶 *GlIPT*1 基因在北沙参香豆素合成途径中表达量上调，为后续北沙参高产植株的研究奠定了基础[13]，与 SSU（磷酸核酮糖羧化酶小亚基启动子）融合的 *IPT* 基因在转基因烟草中表达后，烟草的细胞分裂素水平明显提高，相比正常烟草约增加了 10 倍，其形态上也表现出枝叶生长茂盛等典型的细胞分裂素作用反应[14]，油菜中过表达 SAG12-*ipt* 基因的植株分枝数明显增加，一定程度上可以提高油菜的产量[3]，结合前期研究，推测新麦草 *IPT* 基因也是通过提高内源细胞分裂素含量来调控植株分蘖数量的。

通过 PCR 法从新麦草中成功克隆了 *IPT* 基因的全长并构建了 1300-cYFP-*IPT* 过表达载体，对其全长的氨基酸序列进行了相关生物信息学分析，多序列比对发现小麦类禾本科植物的 *IPT* 基因与新麦草的相似度最高，亲缘关系最近，说明新麦草 IPT 蛋白和小麦类的 IPT 蛋白有功能相似的部分，新麦草 IPT 存在 tRNA 二甲基烯丙基转移酶家族保守结构域，说明该蛋白为 tRNA 型 IPT[12]，该类型的异戊烯基转移酶可以催化生成顺式玉米素（*cis*-zeatincZ），从而影响细胞分裂素的合成[15]，过

表达该基因的转基因植株细胞分裂素水平明显提高，导致植株顶端优势消失，促进侧芽生长[16]。蛋白质二级结构骨架中的原子之间通过相互作用进而形成多肽并决定蛋白质的结构，从而影响蛋白的生化功能[17]，新麦草 IPT 蛋白质二级结构主要由 α-螺旋、延伸链、β-转角和不规则卷曲组成，探究其蛋白二级结构有助于揭示该蛋白的功能。磷酸化是生物体内的一种翻译后修饰，可调节蛋白质活力及功能，丝氨酸、酪氨酸和苏氨酸是常见的可磷酸化修饰的氨基酸，新麦草中 IPT 的磷酸化修饰位点主要是丝氨酸磷酸化位点，而磷酸化可以激活或失活蛋白质，从而调控细胞分裂素的合成，调控新麦草的分蘖数[18]，以进一步改善新麦草的产量。

蛋白的亚细胞定位与其生物学功能有很强的相关性，拟南芥中个分支的 AGO 分别定位于细胞质、细胞核及核质-细胞质双重亚细胞定位，定位于核质-细胞质中的蛋白功能更加丰富[19]，因此研究新麦草 IPT 蛋白的亚细胞定位有助于其功能的进一步解析，新麦草 IPT 蛋白定位于叶绿体中，与藜麦的 CqIPT 蛋白研究结果相符，CqIPT 蛋白均能定位到叶绿体中[1]，苦参 8-异戊烯基转移酶基因的蛋白质亚细胞定位预测显示也定位于叶绿体中[20]，以上结果均与新麦草的 IPT 蛋白定位相同，说明叶绿体是新麦草 IPT 蛋白发挥功能的主要场所，且蛋白均能正常表达，Western blot 的结果也同样证实了新麦草 IPT 蛋白可在目标植物中正常表达。烟草的瞬时表达可以为后续 IPT 在目标植物中表达提供可行性依据，瞬时表达是以非整合的方式将外源基因导入到目标物种的细胞中，在短时间内验证目的基因表达情况的技术[21-22]，水母雪莲[23]和二穗短柄草[24]的相关基因研究均以该方式对蛋白定位及表达进行了探讨。利用烟草的瞬时转染及 Western blot 鉴定新麦草 *IPT* 基因在植物中的表达情况，可为后续新麦草的功能验证提供理论与技术基础。

本研究克隆得到了新麦草 *IPT* 基因，并构建了 1300-cYFP-*IPT* 过表达载体，*IPT* 基因的 cDNA 全长序列为 1 362 bp；通过生物信息学分析及试验验证等方式分析了新麦草 *IPT* 基因的表达情况及其蛋白的功能，显示 *IPT* 基因在密集分蘖型新麦草中的表达量远远高于稀疏分蘖型当中的表达量，说明 *IPT* 是调控新麦草分蘖的上调基因，蛋白质印迹法和烟草瞬时转化显示 IPT 蛋白均可以正常表达，其亚细胞定位于叶绿体中，推测在新麦草中该基因会正常表达；新麦草 IPT 主要与二粒小麦、小麦及硬粒小麦亲缘关系较近，推测新麦草 IPT 与小麦类的 IPT 具有相似的功能，但 *IPT* 相关功能还需要进一步验证，本研究将为后续 *IPT* 基因在新麦草分蘖过程中的调控机制奠定理论基础。

参考文献：

[1] 田晓芹，褚 晶，丁洪霞，等. 藜麦异戊烯基转移酶基因(*CqIPT*)家族的全基因组鉴定与分析[J]. 烟台大学学报(自然科学与工程版)，2023，**36**(2)：149-156.
TIAN X Q，CHU J，DING H X，*et al*. Genome-wide identification and analysis of isopentenyltransferase gene (*CqIPT*) family in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.)[J]. *Journal of Yantai University* (Natural Science and Engineering Edition)，2023，**36**(2)：149-156.

[2] 周 雪，李 嘉，李艳花，等. 二穗短柄草异戊烯基转移酶(*IPT*)编码基因的进化及功能分析[J]. 麦类作物学报，2016，**36**(3)：273-280.
ZHOU X，LI J，LI Y H，*et al*. Evolutionary analysis and functional characterizations of *IPT* genes in *Brachypodium distachyon*[J]. *Journal of Triticeae Crops*，2016，**36**(3)：273-280.

[3] 文红秀. 植物激素合成酶基因 *ipt*、*iaaM* 及其双价基因转入甘蓝型油菜对其产量性状的影响[D]. 重庆：西南农业大学，2003.

[4] SMIGOCKI A C. Cytokinin content and tissue distribution in plants transformed by a reconstructed isopentenyl transferase gene[J]. *Plant Molecular Biology*，1991，**16**(1)：105-115.

[5] 王珏琼. 异戊烯基转移酶(*ipt*)基因导入中间偃麦草及组织培养再生体系的建立[D]. 呼和浩特：内蒙古大学，2007.

[6] 王茹佳，唐 凤，张树振，等. 密度和氮肥互作对老芒麦种子产量和活力的影响[J]. 新疆农业科学，2022，**59**(3)：533-540.
WANG R J，TANG F，ZHANG S Z，*et al*. Effects of the interaction between density and nitrogen fertilizer on seed yield and activity of *Elymus sibiricus*[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*，2022，**59**(3)：533-540.

[7] 张 晨，云 岚，李 珍，等. 新麦草种质的 SSR 遗传多样性及群体结构分析[J]. 植物遗传资源学报，2019，**20**(1)：48-59.
ZHANG C，YUN L，LI Z，*et al*. Genetic diversity and structure analysis in *Psathyrostachys* nevski population using SSR markers[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*，2019，**20**(1)：48-59.

[8] WEI J Z，CAMPBELL W F，SCOLES G J，*et al*. Cytological identification of some trisomics of Russian wildrye (*Psathy-*

rostachys juncea)[J]. *Genome*, 1995, **38**(6): 1 271-1 278.

[9] 张荟荟，艾尔肯·达吾提，梁维维，等. 新麦草种子产量及其构成因素与播量的关系[J]. 草食家畜，2020(5): 28-33.
ZHANG H H, AIERKEN·Dawuti, LIANG W W, *et al*. Relationship between sowing rate of *Psathyrostachys juncea* nevski and seed yield and its components[J]. *Grass-Feeding Livestock*, 2020(5): 28-33.

[10] LI Z, YUN L, REN X M, *et al*. Analysis of controlling genes for tiller growth of *Psathyrostachys juncea* based on transcriptome sequencing technology[J]. *BMC Plant Biology*, 2022, **22**(1): 456.

[11] WEI X, MORENO-HAGELSIEB G, GLICK B R. *et al*. Comparative analysis of adenylate isopentenyl transferase genes in plant growth-promoting bacteria and plant pathogenic bacteria[J]. *Heliyon*, 2023, **9**(3): e13955.

[12] 蔡兆明，程春红，廖静静，等. 茎瘤芥异戊烯基转移酶家族基因全基因组鉴定及表达分析[J]. 西北植物学报，2022，**42**(1): 38-47.
CAI Z M, CHENG C H, LIAO J J, *et al*. Genome-wide identification and expression analysis of isopentenyl transferases genes in *Tuber* mustard[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2022, **42**(1): 38-47.

[13] 陈泓宇，任宏伟，张玉喜，等. 北沙参异戊烯基转移酶 *GlIPT1* 基因的克隆及生物信息学分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化，2020，**22**(4): 1 176-1 184.
CHEN H Y, REN H W, ZHANG Y X, *et al*. Cloning and bioinformatics analysis of isopentenyltransferase gene in *Glehniae Radix* (*GlIPT1*)[J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*, 2020, **22**(4): 1 176-1 184.

[14] 马庆虎，张　韧，HIGGINS-THOMAS J V. 异戊烯基转移酶基因在转基因烟草中的特异性表达[J]. 植物学报，1994，**36**(5): 339-344.
MA Q H, ZHANG R, HIGGINS-THOMAS J V. Specific expression of isopentenyl transferase gene in transgenic tobacco[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 1994, **36**(5): 339-344.

[15] 李　皓，张　文，赵旭勉，等. 苹果异戊烯基转移酶基因家族(*MdIPTs*)的克隆与 *MdIPT5a* 功能分析[J]. 中国农业科学，2011，**44**(19): 4 029-4 036.
LI H, ZHANG W, ZHAO X M, *et al*. Molecular cloning of isopentenyl transferases genes family in *Malus domestica* Borkh. and a preliminary functional analysis of *MdIPT5a* [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, **44**(19): 4 029-4 036.

[16] ZUBKO E, ADAMS C J, MACHÁÈKOVÁ I, *et al*. Activation tagging identifies a gene from *Petunia hybrida* responsible for the production of active cytokinins in plants[J]. *The Plant Journal*, 2002, **29**(6): 797-808.

[17] UZMA M, MANZOOR U, HALIM Z. Protein encoder: An autoencoder-based ensemble feature selection scheme to predict protein secondary structure[J]. *Expert Systems with Applications*, 2023, **213**: 119 081.

[18] 孙夫德，任美娜，赵丽娜，等. 磷酸化调节的膜蛋白结构及其功能研究进展[J]. 河北工业大学学报，2023，**52**(1): 1-12.
SUN F D, REN M N, ZHAO L N, *et al*. Structure and function of membrane proteins modulated by phosphorylation [J]. *Journal of Hebei University of Technology*, 2023, **52**(1): 1-12.

[19] MARTÍN-MERCHÁN A, MORO B, BOUET A, *et al*. Domain organization, expression, subcellular localization, and biological roles of ARGONAUTE proteins in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2023, **74**(7): 2 374-2 388.

[20] 张　宁，温银元，王金荣，等. 苦参 8-异戊烯基转移酶基因蛋白家族生物信息学分析[J]. 山西农业科学，2018，**46**(5): 692-695.
ZHANG N, WEN Y Y, WANG J R, *et al*. Bioinformatics analysis of 8-prenyltransferase carrier protein synthase gene family in *Sophora flavescens*[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2018, **46**(5): 692-695.

[21] 张悦婧，李　颖，王娟娟，等. 不同转化条件对 3 种农杆菌 *GFP* 基因在本氏烟草中瞬时表达的影响[J]. 植物研究，2022，**42**(1): 121-129.
ZHANG Y J, LI Y, WANG J J, *et al*. Effects of three kinds of *Agrobacterium* and different transformation conditions on the transient expression of *GFP* in *Nicotiana benthamiana* [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2022, **42**(1): 121-129.

[22] WYDRO M, KOZUBEK E, LEHMANN P. Optimization of transient *Agrobacterium*-mediated gene expression system in leaves of *Nicotiana benthamiana*[J]. *Acta Biochimica Polonica*, 2006, **53**(2): 289-298.

[23] 蒋欣悦，史国民，代吴斌，等. 水母雪莲通气组织形成的相关基因 *SmLSD1* 克隆及表达[J]. 西北植物学报，2023，**43**(4): 550-558.
JIANG X Y, SHI G M, DAI W B, *et al*. Cloning and expression of aerenchyma-related gene *SmLSD1* in *Saussurea medusa* Maxim. [J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(4): 550-558.

[24] 呼　宁，何兆峰，朱雨遥，等. 二穗短柄草根部木栓质调控基因 *BdMYB92* 的克隆及功能研究[J]. 西北植物学报，2023，**43**(3): 359-365.
HU N, HE Z F, ZHU Y Y, *et al*. Cloning and functional research of *BdMYB92*, which regulates the suberin biosynthesis in roots of *Brachypodium distachyon*[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2023, **43**(3): 359-365.

（编辑：韦青侠）