

巴西橡胶树核糖体蛋白 S6 基因的克隆及生物信息学分析

李德军, 邓 治, 陈春柳, 陈守才

(中国热带农业科学院 橡胶研究所/ 农业部橡胶生物学重点开放实验室, 海南 儋州 571737)

摘要: 核糖体蛋白 S6 是核糖体蛋白家族的重要成员, 在核糖体中发挥重要作用。利用农业部橡胶生物学重点开放实验室获得的部分序列设计引物, 采用 3'-RACE 技术从巴西橡胶树胶乳中获得一个核糖体蛋白 S6 基因的完整阅读框。该基因编码 249 个氨基酸的多肽, 含有一个典型的真核生物核糖体蛋白 S6 结构域。在 HbRPS6 氨基酸序列中没有预测到跨膜区和信号肽。二级结构分析表明: HbRPS6 属于混合型蛋白。对 10 个 RPS6 系统进化分析表明: 巴西橡胶树的 RPS6 基因在进化上具有保守性, 与植物类玉米的 RPS5 基因亲缘关系最近, 而与动物和酵母的亲缘关系相对较远。该基因的克隆和生物信息学分析为深入研究其功能奠定了基础。

关键词: 巴西橡胶树; 核糖体蛋白 S6; 基因克隆; 序列分析

中图分类号: S794.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2009)06-0004-05

Cloning and Bioinformatic Analysis of the Gene Encoding the Ribosomal Protein S6 from *Hevea brasiliensis*

LI De-jun, DENG Zhi, CHEN Chun-liu, CHEN Shou-cai

(Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Rubber Biology, Ministry of Agriculture, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: The ribosomal protein S6 is the key member of ribosomal protein family, and it plays an important role in the ribosomal proteins. The primers designed based on the known sequences acquired from Key Laboratory of Rubber Bidoye of Minisby of Agriculture, the gene was cloned with 3'-RACE technique from *Hevea brasiliensis* latex. The open reading frame encoded 249 amino acids containing a conserved ribosomal S6 domain, so the gene was named as HbRPS6. No signal peptide and transmembrane structure were predicted within HbRPS6. The result of secondary structure predicted showed that the protein was classified as mixed type. The result of phylogenetic tree indicated that *HbRPS6* displayed a high degree of sequence similarity to *ZmRPS5* but not to animals and yeast. This paper will be benefit to further analyze the functions of *HbRPS6*.

Key words: *Hevea brasiliensis*; ribosomal protein S6; gene cloning; sequence analysis

核糖体蛋白 S6 在细胞核中组装成 45SrRNA 前体, 位于细胞质 40S 核糖体亚单元头部区域^[1]。核糖体蛋白 S6 直接与 mRNA、tRNA 和起始因子交联, 因此其位于翻译起始区域。核糖体蛋白 S6 是真核生物核糖体主要磷酸化蛋白。在动物和果蝇中, 核糖体蛋白 S6C-端 5 个丝氨酸残基被磷酸化^[2-4]。细胞核中的核糖体蛋白 S6 磷酸化在活跃的核糖体生物发生过程中产生, 而细胞质中的核糖体蛋白 S6 磷酸化被认为是促

进选择性翻译转录本、核糖体蛋白和具有 5'端寡聚嘧啶的延伸因子 mRNAs^[3, 5-9]。核糖体蛋白 S6 高度磷酸化的核糖体有利于活化多核糖体^[7, 8]。研究表明核糖体蛋白 S6 磷酸化不足以吸收 5'端寡聚嘧啶的延伸因子 mRNAs, 因为附属的翻译因子, 如细胞核酸结合蛋白和 La 自体抗原也参与吸收 5'端寡聚嘧啶的延伸因子 mRNAs 的过程^[9]。此外, 生长或有丝分裂刺激等独立于核糖体蛋白 S6 磷酸化机制也可以调控 5'端寡聚嘧啶的延伸因子 mRNAs 的翻译^[10-11]。

外界刺激、胞间信号和发育阶段激活蛋白激酶和磷酸酶相对活性能调节哺乳动物核糖体蛋白 S6 磷酸化的状态。核糖体蛋白 S6 磷酸化需要激活一个核糖体蛋白 S6 激酶, S6K1 或 S6K2^[3, 12]。鼠 2 种激酶的单突变体和双突变体均表现出不同程度的缺乏^[13-19]。有

收稿日期: 2009-08-05

基金项目: 国家天然橡胶现代农业产业技术体系建设项目 (nycytx-34-GW1-2); 中国热带农业科学院橡胶研究所基本科研业务费专项资金资助项目 (XJS YWFZX2009-08)

第一作者简介: 李德军 (1975-), 男, 辽宁朝阳人, 博士, 助理研究员, 从事巴西橡胶树死皮病分子机制与防治研究。E-mail: djli_riccas@gmail.com。

丝分裂、胰岛素和大量氨基酸能引发信号传导级联反应, 该反应通过改变蛋白构象的分级磷酸化激活 S6K1。此途径包括磷脂酰肌醇 3 激酶、蛋白激酶 B、不规则蛋白激酶 C、磷酸肌醇酯依赖性蛋白质激酶 1 和雷帕霉素激酶靶^[12]。通过调控雷帕霉素靶活性, 细胞间 ATP 浓度直接控制 S6 激酶活性^[17]。完成细胞周期 G₁ 期进入 S 期后 S6 激酶才具有活性, S6 激酶活性在调节哺乳动物和果蝇细胞大小中发挥重要作用^[12 18 22]。核糖体蛋白 S6 磷酸化被认为是 S6 激酶激活的下游效应, 该过程的直接效应是调控 5' 端寡聚嘧啶的延伸因子 mRNAs 翻译。相比之下, 负调控核糖体蛋白 S6 磷酸化还不清楚。在动物中, 丝/苏氨酸蛋白磷酸酶 2A 通过调控雷帕霉素靶和 S6 激酶激活控制以上过程^[22 26]。少数几个研究表明磷酸盐代谢回转可以调节。在鼠细胞中蛋白磷酸酶 1 被认为是重要的核糖体蛋白 S6 磷酸化酶^[27], 在人造血细胞中导癌素 A 敏感丝/苏氨酸磷酸酶在 S6 激酶的下游发挥作用^[10]。因此磷酸酶通过间接调控 S6 激酶活性或直接从核糖体蛋白中去除磷酸盐控制核糖体蛋白 S6 磷酸化的负调控。近年来研究发现, 鼠核糖体蛋白 S6 磷酸化缺乏表现为肌肉无力^[28]。

有证据表明, 核糖体蛋白 S6 磷酸化在植物发育和应对环境改变时能被调控。在热激组培番茄细胞、玉米胚和缺氧的玉米根中, 30kD 核糖体蛋白被磷酸化^[29 31]。相比之下, 玉米胚轴在吲哚乙酸处理和吸收后, 30kD 核糖体蛋白磷酸化程度增加, 这种现象也出现在细胞分裂素处理的南瓜子叶中^[30, 32-33]。在正常生长的拟南芥组培细胞中, 核糖体蛋白 S6 以三种磷酸化和一种非磷酸化形式积累, 在热激反应中转化成低磷酸化形式^[34]。在血清受激的哺乳动物细胞中表达人类 S6k1 同源基因, 拟南芥 AtS6k2, 在体外能磷酸化动植物核糖体蛋白 S6。在哺乳动物细胞中激活 AtS6k2 被磷脂酰肌醇 3 激酶抑制子-渥曼青霉素抑制, 但不能被雷帕霉素靶抑制子-雷帕霉素抑制。对雷帕霉素不敏感的 AtS6k2 在激酶氨基端存在差异, 这些差异为哺乳动物雷帕霉素敏感所必须。植物中存在磷脂酰肌醇 3 激酶、雷帕霉素激酶、丝/苏氨酸蛋白磷酸酶 2A 和蛋白磷酸酶 1^[35-37], 可是这些蛋白在调控核糖体蛋白 S6 磷酸化中的作用还没有报道。

天然橡胶(顺式-1, 4-聚异戊二烯)具有很强的弹性、良好的绝缘性、坚韧的耐磨性、隔水隔气的气密性和耐曲折的性能, 是关系到国计民生的主要战略物资, 是不可缺少的工业原料之一, 历来受到世界主要产胶国和消费国的重视。世界上产胶植物有 2 000 余种, 其中巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)以其产量高、品质好、经济寿命长、易栽培采割、成本

低廉等众多优点而倍受青睐。然而, 目前还没有巴西橡胶树的核糖体蛋白 S6 的研究和报道。本研究以巴西橡胶树为研究材料, 根据胶乳抑制性消减文库中得到的部分 RPS6 基因序列设计引物, 采用 cDNA 快速扩增技术克隆巴西橡胶树 RPS6 基因, 并通过生物信息学手段分析基因功能。

1 材料与方 法

1.1 材料

巴西橡胶树品系为热研 8-79, 定植于中国热带农业科学院橡胶研究所实验场五队。菌种 *Escherichia coli* JM109 为农业部橡胶生物学重点实验室保存。DNA 凝胶回收试剂盒购自 Axygen 公司, PCR 试剂、DNase I(RNase free)、RNase 抑制剂、pMD18-T 载体、3'-RACE 试剂盒和 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司。引物合成和 DNA 测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成 胶乳总 RNA 的提取参照傅荣昭等提供的方法进行^[38]。取 5 μ g 总 RNA 用于 cDNA 第一链的合成(方法参见 Promega 和大连宝生物公司说明书、相关试剂盒说明书)。

1.2.2 HbRPS6 的克隆与序列测定 在构建橡胶树胶乳抑制性消减文库中得到一段长 510 bp 的 EST 序列, 在 NCBI 网站做 BlastX 比对发现该 EST 序列编码一段含有起始密码子的 40S 核糖体蛋白 S6。为得到橡胶树 40S 核糖体蛋白 S6 的整个编码区序列, 根据已知序列设计引物, 3'-RACE 外侧引物 5'-cttcctggatgatgaagac-3' 和内侧引物 5'-tgatttgctgggttgactg-3', 采用 3'-RACE 技术获得基因序列。具体 3'-RACE 操作见大连宝生物公司说明书。进行 3'-RACE 时, 以 50 ng cDNA 第一链为模板, 使用基因特异的外侧引物和试剂盒提供的外侧引物进行第 1 轮 PCR 扩增, 扩增程序为: 首先, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 然后, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 30 个循环, 最后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物稀释 100 倍后, 取 1 μ L 稀释产物作为模板, 以基因特异的内侧引物和试剂盒提供的外侧引物进行第 2 轮嵌套扩增, PCR 扩增程序同第 1 轮。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物, 回收纯化目的条带, 并克隆到 pMD18-T 载体上, 送公司测序。

1.2.3 生物信息学分析 用 DNASTAR 软件预测基因的最长开放阅读框、并进行蛋白的基本性质和系统进化分析。在 NCBI 网站上对氨基酸序列进行比对和保守结构域分析^[39-40], 利用在线工具 TM-HMM V2.0、SignalP v3.0、COILS^[41]、SMART v4.0^[42] 等分析核糖体蛋白 S5 的跨膜区、信号肽和结构域, 通过 PredictProtein Server^[43] 对 HbRPS6

蛋白二级结构进行预测。

2 结果与分析

2.1 HbRPS6的克隆

利用已知序列设计特异性嵌套引物,利用3'-RACE 技术从橡胶树胶乳 cDNA 中扩增出了 1 条约 600 bp 的 PCR 产物(见图 1)。回收 PCR 扩增产物并将其连接到 pMD-18T 载体中,转化大肠杆菌 JM109,获得的转化产物通过 PCR 及双酶切双重验证,阳性克隆送上海生工生物工程技术服务有限公司完成其测序,测序结果与已知序列拼接获得长 1 036 bp 的序列(见图 2)。该基因预测最长开放阅读框长 750 bp,5'非翻译区长 49 bp,3'非翻译区长 220 bp。该基因开放阅读框长编码 249 个氨基酸,NCBI 网站 BlastP 比对结果表明与核糖体蛋白 S6 一致性最高,因此命名为 HbRPS6。

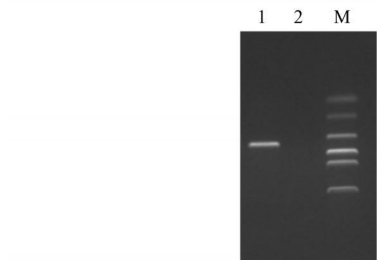


图1 3'-RACE 技术扩增 HbRPS6 电泳

1: 以巴西橡胶树胶乳 cDNA 为模板, HbRPS6 第 2 轮扩增; 2: 以水为模板的阴性对照, M 为 DL2000 分子量标记

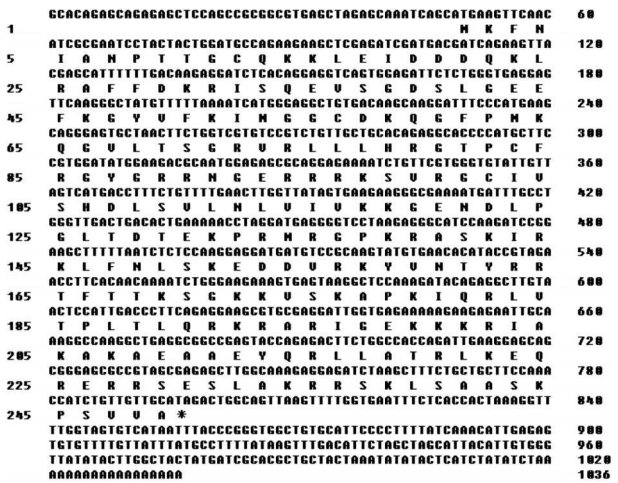


图2 HbRPS6 核苷酸序列及其编码的氨基酸序列

2.2 HbRPS6 的序列分析

为了解 HbRPS6 蛋白的性质,我们用生物信息学方法对 HbRPS6 蛋白进行了深入分析。DNASTAR 软件预测 HbRPS6 蛋白分子量约为 28 kDa,理论等电点为 10.79。HbRPS6 蛋白氨基酸序列没有预测到跨膜螺旋序列,与 PredictProtein 服务器上预测的结果相同。NCBI 保守结构域分析结果表明, HbRPS6 蛋白的1-190

位氨基酸含有核糖体蛋白 S6e 结构域,而 SMART 软件预测核糖体蛋白 S6e 结构域的位置在 1-129 位氨基酸处,187-223 位氨基酸处为卷曲螺旋(见图 3)。

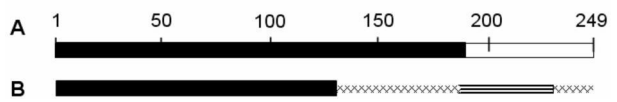


图3 HbRPS6 蛋白结构域预测

A:NCBI 网站 HbRPS6 蛋白结构域预测结果; B: SMART 软件 HbRPS6 蛋白结构域预测结果。黑色部分表示 HbRPS6 蛋白结构域,横线部分为超螺旋结构

另外应用 PredictProtein Server 对 HbRPS6 蛋白的二级结构进行预测,在 HbRPS6 蛋白的二级结构组分中, α 螺旋(H)占 28.51%, β 折叠(E)占 22.09%,无规则卷曲(L)占 49.40%,故 HbRPS6 蛋白属于混合型蛋白。

2.3 HbRPS6 的进化分析

为进一步分析 HbRPS6 的系统进化关系。利用 DNASTAR 软件对包括 HbRPS6 基因在内的 10 个不同来源的 RPS6 基因进行了系统进化分析(见图 4)。

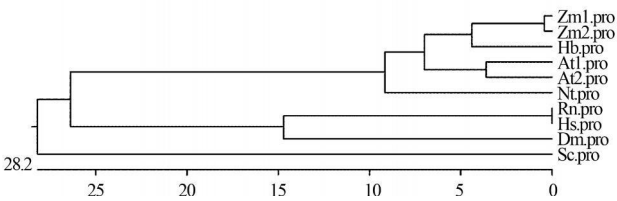


图4 HbRPS6 基因的系统进化分析

利用 DNASTAR 软件对来自橡胶树 Hb、拟南芥 (*At1* 和 *At2*)、玉米 (*Zm1* 和 *Zm2*)、烟草 *Nt*、人 *Hs*、鼠 *Rn*、果蝇 *Dm* 和酵母 *Sc* 在内的 10 个 RPS6 基因的进化树

10 个 RPS6 基因明显分成三大类,拟南芥、烟草、玉米和橡胶树分成一类,人、鼠和果蝇归为一类,酵母单独分为一类。从进化树中可以看出,橡胶树的 RPS6 基因被划分为植物类,与动物和酵母的亲缘关系较远。在植物类中,与玉米亲缘关系最近。在动物类中,人和鼠的 RPS6 基因相同。

3 讨论

核糖体是细胞内一种核糖核蛋白颗粒,主要由 rRNA 和蛋白质构成,其基本功能是按照 mRNA 的指令将氨基酸合成蛋白质多肽链,所以核糖体是细胞内蛋白质合成的分子机器。除以上基本功能外,核糖体蛋白 S6 磷酸化在植物发育和应对环境改变时发挥重要作用^[29-34]。核糖体蛋白 S6 在低等和高等生物中广泛存在,是核糖体蛋白家族的重要成员。虽然核糖体蛋白 S6 行使重要生物学功能,但对其研究相对较少,在植物中尤为如此。

该研究首次克隆了巴西橡胶树核糖体蛋白 S6 基因,并利用生物信息学方法系统分析了基因功能。

HbRPS6 蛋白含有保守的核糖体蛋白 S6 结构域, 说明巴西橡胶树的核糖体蛋白 S6 在进化上具有高度保守性。生物信息学分析表明, HbRPS6 蛋白不含有信号肽, 推断该蛋白不是通过分泌而产生的。此外, HbRPS6 蛋白也不存在跨膜区, 提示它不能作为膜受体起作用, 也不可能是定位于膜的锚定蛋白或者离子通道等, 对 HbRPS6 蛋白的深入研究将揭示其在巴西橡胶树中的功能。

进化分析结果表明, 巴西橡胶树的 *RPS6* 基因和植物类的拟南芥、烟草和玉米 *RPS6* 基因分成一类, 与玉米亲缘关系最近。相比之下, 与动物和酵母的亲缘关系相对较远, 而在动物类中, 人和鼠的 *RPS6* 基因相同, 这与相应物种间的传统分类地位相符合。为深入研究 *HbRPS6* 的功能, 我们正通过 RT-PCR 技术分析 *HbRPS6* 在不同组织和各种逆境条件下的表达模式, 同时已构建了 *HbRPS6* 的过表达载体, 试图通过反向遗传学手段在模式植物中分析 *HbRPS6* 生物学功能。

参考文献:

- [1] Nygård O, Nilsson L. Translational dynamics: interactions between the translational factors tRNA and ribosomes during eukaryotic protein synthesis [J]. *Eur J Biochem*, 1990, 191: 1-17.
- [2] Krieg J, Olivier A R, Thomas G. Analysis of 40S ribosomal protein S6 phosphorylation during the mitogenic response [J]. *Methods Enzymol* 1988 164: 575-581.
- [3] Fumagalli S, Thomas G. S6 phosphorylation and signal transduction [C] // JWB Hershey, MB Mathews, N Sonenberg. *Translational Control of Gene Expression*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 695-717.
- [4] Radimerski T, Mini T, Schneider U, et al. Identification of insulin-induced sites of ribosomal protein S6 phosphorylation in *Drosophila melanogaster* [J]. *Biochemistry*, 2000, 39: 5766-5774.
- [5] Reinhard C, Fernandez A, Lamb N J C, et al. Nuclear localization of p85 s6k: functional requirement for entry into S phase [J]. *EMBO J* 1994 13: 1557-1565.
- [6] Jefferies H B J, Fumagalli S, Dennis P B et al. Rapamycin suppresses 5' TOP mRNA translation through inhibition of p70^{s6k} [J]. *EMBO J* 1997 16: 3693-3704.
- [7] Jefferies H B J, Thomas G. Ribosomal protein S6 phosphorylation and signal transduction [C] // Hershey J W B, Mathews M B, Sonenberg N. *Translational Control of Gene Expression*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1996: 389-409.
- [8] Meyuhas O, Hornstein E. Translational control of TOP mRNAs [C] // Hershey J W B, Mathews M B, Sonenberg N. *Translational Control of Gene Expression*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000: 671-693.
- [9] Schlatter S, Fussenegger M. Novel CNBP- and Lac-based translation control systems for mammalian cells [J]. *Biotechnol Bioeng* 2002 81: 1-12.
- [10] Barth-Baus D, Stratton C A, Parrott L, et al. S6 phosphorylation-independent pathways regulate translation of 5'-terminal oligopyrimidine tract-containing mRNAs in differentiating hematopoietic cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 1919-1928.
- [11] Stolovich M, Tang H, Homstein E, et al. Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor pS6 phosphorylation [J]. *Mol Cell Biol* 2002, 22: 8101-8113.
- [12] Kozma S C, Thomas G. Regulation of cell size in growth development and human diseases: PI3K, PKB and S6K [J]. *BioEssays*, 2002, 24: 65-71.
- [13] Shima H, Pende M, Chen Y, et al. Disruption of the p70^{s6k}/p85^{s6k} gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase [J]. *EMBO J*, 1998 17: 6649-6659.
- [14] Pende M, Kozma S C, Jaquet M, et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished beta-cell size in S6K1-deficient mice [J]. *Nature*, 2000 408: 994-997.
- [15] Ohanna M, Sobering A K, Lapointe T, et al. Atrophy of S6K1/2 skeletal muscle cells reveals distinct mTOR effectors for cell cycle and size control [J]. *Nat Cell Biol* 2005 7: 286-294.
- [16] Pende M, Um S H, Mieulet V, et al. S6K1/2/2 mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24: 3112-3124.
- [17] Dennis P B, Jaeschke A, Saitoh M, et al. Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor [J]. *Science*, 2001, 294: 1102-1105.
- [18] Peterson R T, Schreiber S L. Translation control: connecting mitogens and the ribosome [J]. *Curr Biol* 1998 8: R248-R250.
- [19] Dennis P B, Fumagalli S, Thomas G. Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9: 49-54.
- [20] Montagne J, Stewart M J, Stocker H, et al. *Drosophila* S6 kinase: a regulator of cell size [J]. *Science*, 1999 285: 2126-2129.
- [21] Pende M, Kozma S C, Jaquet M, et al. Hypoinsulinaemia, glucose intolerance and diminished β -cell size in S6K1-deficient mice [J]. *Nature*, 2000 408: 994-997.
- [22] Petritsch C, Beug H, Balmain A, Olt M. TGF- β inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G1 arrest [J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 3093-3101.
- [23] Millward T A, Zolnierowicz S, Hemmings B A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A [J]. *Trends Biochem Sci.*, 1999, 24: 186-191.
- [24] Peterson R T, Desai B N, Hardwick J S, et al. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase and is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 4438-4442.
- [25] Westphal R S, Coffee R L Jr, Marotta A, et al. Identification of kinase-phosphatase signaling modules composed of p70 S6 kinase-protein phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated kinase-PP2A [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 687-692.
- [26] Hartley D, Cooper G M. Role of mTOR in the degradation of IRS-1: regulation of PP2A activity [J]. *J Cell Biochem*, 2002 85: 304-314.
- [27] Olivier A R, Ballou L M, Thomas G. Differential regulation of S6 phosphorylation by insulin and epidermal growth factor in Swiss mouse 3T3 cells: insulin activation of type 1 phosphatase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 4720-4724.
- [28] Ruvinsky A, Katz M, Dreazen A, et al. Mice Deficient in Ribosomal

Protein S6 Phosphorylation Suffer from Muscle Weakness that Reflects a Growth Defect and Energy Deficit[J] . PLoS ONE, 2009, 4:5618.

[29] Scharf K D, Nover L. Heat-shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures[J] . Cell, 1982, 30: 427-437.

[30] Beltran-Pen A E, Aguilar R, Ortiz-Lopez A, et al. Auxin stimulates S6 ribosomal protein phosphorylation in maize thereby affecting protein synthesis regulation[J] . Physiol Plant, 2002, 115: 291-297.

[31] Bailey-Serres J, Freeling M. Hypoxic stress-induced changes in ribosomes of maize seedling roots[J] . Plant Physiol, 1990, 94: 1237-1243.

[32] Perez L, Aguilar R, Mendez A, et al. Phosphorylation of ribosomal proteins induced by auxins in maize embryonic tissues[J] . Plant Physiol, 1990, 94: 1270-1275.

[33] Yakovleva L A, Kukaeva O N. The effect of phytohormones on phosphorylation of ribosomal proteins in detached pumpkin cotyledons[J] . Biochem Physiol Pflanzen, 1987, 182: 359-365.

[34] Turk F, Kozma S C, Thomas G, et al. A heat-sensitive Arabidopsis thaliana kinase substitutes for human p70 S6k function in vivo[J] . Mol Curr Biol, 1998, 18: 2038-2044.

[35] Smith R D, Walker J C. Plant protein phosphatases[J] . Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1996, 47: 101-125.

[36] Dr bak B K, Dewey R E, Boss W F. Phosphoinositide kinases and the synthesis of polyphosphoinositides in higher plant cells[J] . Int Rev Cytol, 1999, 189: 95-130.

[37] Menard B, Desnos T, Nussaume L, et al. Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene[J] . Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 6422-6427.

[38] 傅荣昭, 孔勇如, 贾士荣. 植物遗传转化手册[M] . 北京: 中国科技出版社, 1994: 141-144.

[39] Marchler-Bauer A, Anderson J B, Chitsaz F, et al. CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database[J] . Nucleic Acids Research, 2009, 37: 205-210.

[40] Marchler-Bauer A, Bryant S H. CD-Search: protein domain annotations on the fly[J] . Nucleic Acids Research, 2004, 32: 327-331.

[41] Lupas A, van Dyke M, Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences[J] . Science, 1991, 252: 1162-1164.

[42] Schultz J, Milpetz F, Bork P, et al. SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains[J] . Proc. Natl. Acad. Sci., 1998, 95(11): 5857-5864.

[43] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling service[J] . Nucleic Acids Research, 2003, 31: 3381-3385.

(上接第 3 页)

3 讨论

建立高效再生体系是进行马铃薯遗传转化的前提,而影响马铃薯植株再生频率的因素较多,其内在因素主要是马铃薯的基因型和外植体种类,而外在因素主要是培养基的激素种类浓度^[7]。试验结果表明:两个品种的不同外植体在不同培养基中虽然都能诱导出愈伤组织,但差异较大,这与前人的研究结果一致。在本研究中,无论是茎段还是叶片,“Wen-40”都能分化出芽,建立高效再生体系,而“紫花白”却不能,这说明马铃薯作为受体进行遗传转化时,选择高植株再生率的基因型可能比选择外植体类型更重要。同时,高浓度的 6-BA 和高浓度的 GA₃对马铃薯愈伤组织诱导有促进作用,而一定浓度的 IAA 有利于马铃薯芽的分化。在利用农杆菌介导法进行基因转化时,转化后期为抑制农杆菌的生长和筛选具有抗生素抗性标记的转化体,常在培养基中加入一定浓度的抗生素。适合的抗生素浓度既要能有效地抑制非转化细胞生长,又要不影响转化细胞的正常生长。因此,建立基因转化受体系统时必须针对不同的受体材料确定适合的筛选浓度。Km 是一种很强的细胞生长抑制剂,也是植物转基因技术中用于抗性筛选的抗生素,而 Cef 是一种广谱的抗菌剂,能有效抑制农杆菌的生长。本研究结果表明:25 mg·L⁻¹的 Km 能完全抑制马铃薯茎段的诱导分化,而 200 mg·L⁻¹的 Cef 对马铃薯茎段的诱导分化有显著的抑制作用。因此,在开展马铃薯转基因技术研究时,25 mg·L⁻¹的 Km 是合适的转基因植株的抗性筛选,而在进行除菌培养时,Cef 浓度低于 200 mg·L⁻¹为宜。

参考文献:

[1] 齐恩芳, 张金文, 王一航. 马铃薯茎段再生的植物激素配比优化[J] . 甘肃农业大学学报, 2006(6): 14-17.

[2] 白建明, 李先平, 杨万林, 等. 彩色马铃薯叶片再生体系的研究[J] . 西南农业学报, 2006, 19(9): 83-88.

[3] 王晓杰, 乔利仙, 张敏凤, 等. 马铃薯微型薯切块离体再生的研究[J] . 青岛农业大学学报, 2008, 25(2): 120-122.

[4] 王梓全, 卢翠华, 邱宏, 等. 马铃薯花药培养再生植株的诱导与鉴定[J] . 东北农业大学学报, 2008, 39(8): 10-14.

[5] 王红梅, 李淑洁, 张正英. 不同基因型马铃薯试管薯的诱导及其再生研究[J] . 甘肃农业大学学报, 2008, 43(5): 55-58.

[6] 蒋敏华, 黄先群, 李丽, 等. 基因型和激素对转基因马铃薯植株再生的影响[J] . 种子, 2007, 26(8): 1-4.

[7] 王萍, 王罡, 季静. 马铃薯两个基因型不同外植体的组织培养与植株再生[J] . 中国马铃薯, 2006, 20(6): 326-328.