



白洁霞,李佳昕,刘璐璐,等.藏桃 *AmArg1* 基因克隆与互作蛋白筛选及抗逆性分析[J].黑龙江农业科学,2025(1):40-50.

# 藏桃 *AmArg1* 基因克隆与互作蛋白筛选及抗逆性分析

白洁霞,李佳昕,刘璐璐,罗秋香

(东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室/东北林业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:**为探究藏桃精氨酸酶 1 的耐逆性生物学功能,克隆了精氨酸酶 1 基因(*AmArg1*)全长 ORF,用生物信息学技术分析其蛋白结构和理化性质,结果表明,该蛋白是酸性的无信号肽结构的非分泌蛋白。将 *AmArg1* 转入酵母细胞,其对酵母细胞无毒性、无自激活活性。通过酵母双杂交技术筛选出 *AmArg1* 的互作蛋白 *AmLhcb1*、*AmRabB1b* 并在洋葱活体细胞内验证互作,并初步探究 *AmArg1* 在 NaCl、甘露醇和 CuSO<sub>4</sub> 胁迫下的抗逆性反应,发现过表达转 *AmArg1* 酵母菌具有较强的胁迫耐受性。

**关键词:**藏桃;互作蛋白;非生物胁迫;*AmArg1* 基因

精氨酸酶(Arginase, E. C. 3. 5. 3. 1)又叫做 L-精氨酸尿素水解酶(L-arginine amidinase)或 L-精氨酸脒基水解酶(L-arginine amidinohydrolase),精氨酸酶作为生物体内的一种水解酶,能够特异性地催化 L-精氨酸的水解,从而生成 L-鸟氨酸和尿素,在尿素的循环过程中起到了非常关键的作用<sup>[1]</sup>。该酶参与精氨酸代谢的多个途径,直接或间接影响生成尿素、NO、多胺等物质的过程,这些物质扮演着重要的信号传递角色,参与植物的多种生理和生化活动,能够影响作物生长和抵御胁迫环境的能力<sup>[2]</sup>。

精氨酸酶在多种植物中的存在和具体活性已经得到广泛证实,这为进一步理解其在植物生理过程和抗逆性形成中的功能提供了基础。目前在水稻<sup>[3]</sup>、拟南芥<sup>[4]</sup>、玉米<sup>[5]</sup>、番茄<sup>[6]</sup>和人参<sup>[7]</sup>等多个植物中均检测到精氨酸酶的活性并成功克隆了精氨酸酶基因。相关研究表明,在盐渍和干旱胁迫条件下,水稻 *OsARG1* 受两种胁迫诱导而表达量明显上升<sup>[8]</sup>。张晓旭<sup>[9]</sup>用 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 处理拟南芥幼苗,Northern 杂交表明 *AtARGAH1* 在根和叶片中的表达量均随处理时间的延长而增加,且分别在处理 24 和 12 h 达到峰值。此外,研究还发现棉花 *GhARG1* 可以通过 ABA 和 SA 信号途径参与对 NaCl 和干旱的胁迫响应,信号分

子 ABA 和 SA 能够诱导棉花 *GhARG1* 的表达<sup>[10]</sup>。在小麦中,发现盐胁迫下 *TaARG-2BS* 的表达被诱导;干旱胁迫下 *TaARG-2BS* 和 *TaARG-2DS* 的转录水平上调;低温处理下,两个基因均未受到诱导<sup>[11]</sup>。此外,在番茄果实中,*LeARG1* 和 *LeARG2* 均受低温胁迫诱导<sup>[12-13]</sup>,施加外源精氨酸会提高精氨酸酶活性,从而提高番茄果实对低温的耐受能力<sup>[14]</sup>。在盐胁迫和高温处理后,香菜中的精氨酸酶 *CsARG* 活性显著增强<sup>[15]</sup>。上述研究结果显示了精氨酸酶对植物在响应非生物胁迫时产生的重要影响。

精氨酸酶除了能够抵御非生物胁迫外,在植物遭受多种生物胁迫时也发挥着重要的功能。研究表明,甘蔗和番茄在受到黑穗病菌和丁香假单胞菌感染后,精氨酸酶活性会提高<sup>[16]</sup>。过表达 *AtARGAH2* 可明显提高拟南芥对灰葡萄孢菌的抗性,而 *AtARGAH2* 基因沉默株系和野生型则对灰葡萄孢菌敏感<sup>[17]</sup>。感染白粉病会诱导小麦精氨酸酶基因 *TaARG-2BS* 和 *TaARG-2DS* 的表达<sup>[11]</sup>。此外,酵母双杂交试验发现水稻和小麦精氨酸酶都能和水稻 *OsXA21* 蛋白产生互作<sup>[18]</sup>,表明精氨酸酶可能参与了基于蛋白质-蛋白质相互作用体的生物胁迫。

藏桃(*Amygdalus mira* Koehne)是蔷薇科桃

收稿日期:2024-07-23

基金项目:国家自然科学基金(31500317)。

第一作者:白洁霞(1999—),女,硕士研究生,从事植物逆境生理生态学研究。E-mail:b17735744603@163.com。

通信作者:罗秋香(1976—),女,博士,副教授,从事植物逆境生理生态学研究。E-mail:luoqiuxiang@sina.com。

属的一种落叶乔木,又名光核桃,具有适应性强、耐寒、耐旱、耐瘠、抗病、长寿、结果力强等优良特性,具有很高的生态、经济、药用等价值。

藏桃作为西藏地区分布最广泛的野生果树种质资源之一,同时是中国特有的桃种质资源,是国内外罕见的桃种质资源“活化石群”,具有众多优良特质,如较强的耐寒性、耐旱性、抗病能力等和生态、经济、药用等多重价值<sup>[19-21]</sup>。为探寻藏桃精氨酸酶 1 的耐逆性生物学的多样性功能,本研究克隆了 *AmArg1* 基因,筛选 *AmArg1* 的互作蛋白并验证互作,并将藏桃 *AmArg1* 转入酵母菌株,进行非生物胁迫,验证 *AmArg1* 抗逆性,为今后探讨藏桃抗逆性分子机制奠定初步基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

该研究于 2024 年 1 月—6 月在黑龙江省哈尔滨市东北林业大学生命科学学院的东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室进行。

藏桃:西藏桃种质资源,种子保存于本实验室;cDNA 文库:在进行了 16 d 的干旱处理后,从藏桃叶片中提取 RNA,并将其反转录为 cDNA;大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$ 、pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司;Gel Extraction Kit、Plasmid Mini Kit 均购自 Omega BIO-TEX 公司;限制性内切酶、双色预染蛋白分子量 Marker 购自 ThermoFisher Scientific 公司;T4 DNA Ligase 购自 TaKaRa 生物科技有限公司;INVSc1 酵母菌株、pYES2 酵母抗性载体均购入于唯地生物公司;酵母菌感受态 Y2HGold、农杆菌感受态 GV3101、pGBKT7、pGADT7 酵母双杂交载体、pSPYNE-35S、pSPYCE-35S 双分子荧光互补载体均保存于本实验室。

### 1.2 *AmArg1* 基因的克隆

以碧桃的保守序列在 NCBI 进行搜索,搜索到碧桃的 *Arg1* 基因,鉴于碧桃与藏桃为近缘种,因此以 *PpArg1* 基因序列为模板,并使用 Primer 5.0<sup>[22]</sup> 设计特异性引物。以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,将扩增后的阳性克隆菌落摇菌后测序。

### 1.3 生物信息学分析

在 GenBank 数据库找到 *Arg1* 在不同物种中的同源序列,利用 DNAMAN (Lynnon Biosoft)<sup>[23]</sup> 对其在不同物种中的氨基酸序列进行

比对;利用 MEGA<sup>[24]</sup> 软件构建系统进化树;利用 ProtParam tool<sup>[25]</sup> 分析 *AmArg1* 的理化参数;利用 SignalP 5.0 Server<sup>[26]</sup> 对 *AmArg1* 蛋白信号肽进行预测;利用 PROSITE 网站<sup>[27]</sup> 对 *AmArg1* 蛋白功能域进行分析。

### 1.4 pGBKT7-*AmArg1* 重组载体构建

利用克隆获得的 *AmArg1* 全长 ORF,设计带有酶切位点的特异性上下游引物进行 PCR 扩增,扩增得到的片段连接到 pLB-Simple Vector 中间载体上,将 *AmArg1* 从中间载体切下后与 pGBKT7 质粒 16 ℃ 过夜连接后转化到大肠杆菌感受态 DH5 $\alpha$  中,挑取阳性单克隆摇菌,提取质粒进行双酶切鉴定。

### 1.5 酵母自激活和毒性验证

将 pGBKT7 空载和 pGBKT7-*AmArg1* 质粒分别转化到酵母感受态 Y2HGold 中。将转化后的空载 pGBKT7 稀释后涂布在 SD-Trp 固体培养基上;转化后的 pGBKT7-*AmArg1* 菌液稀释后涂布在 SD-Trp 和 SD-Trp+X- $\alpha$ -gal 固体培养基上,30 ℃ 培养。

### 1.6 酵母双杂交筛选互作蛋白

将诱饵蛋白与藏桃 cDNA 文库融合得到的菌液涂布培养在 SD-Trp-Leu-His 平板,生长趋势较好的杂交单克隆菌落划线培养在 SD-Trp-Leu-His+X- $\alpha$ -gal 培养基上,将生长情况正常并且变蓝的单克隆酵母菌用 pGADT7 载体的通用引物进行 PCR,将 PCR 产物测序,得到的序列在 NCBI 数据库进行比对。

### 1.7 互作蛋白共转化

筛选到的互作蛋白与 pGBAD7 载体连接。将这些重组质粒与 pGBKT7-*AmArg1* 进行共转化,涂布于 SD-Trp-Leu 培养基,挑取单克隆进行菌落 PCR 鉴定。调整菌液浓度并培养于 SD-Trp-Leu 和 SD-Trp-Leu-His-Ade+X- $\alpha$ -gal 的培养基上。

### 1.8 BiFC 验证

参照农杆菌 GV3101 感受态转化方法,将 pSPYNE-*AmArg1*、pSPYCE-*AmLhcb1*、pSPYCE-*AmRab1b* 重组质粒进行转化。将转化有 pSPYNE-*AmArg1* 与 pSPYCE-*AmLhcb1*、pSPYCE-*AmRab1b* 质粒的农杆菌菌液分别 1:1 混合共侵染洋葱表皮细胞,暗培养 24 h 后再光照培养 24 h,制成洋葱表皮切片后,用荧光显微镜检测 GFP 荧光信号。

## 1.9 固体培养基胁迫处理

将浓度一致的过表达酵母菌 pYES2-*AmArg1* 和空载酵母 pYES2 菌液进行  $1 \times 10^{-1}$ 、 $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$  浓度梯度稀释, 点于含有 NaCl ( $0, 50$  和  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、甘露醇 ( $0, 100$  和  $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和  $\text{CuSO}_4$  ( $0, 15$  和  $30 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 不同胁迫的 YPD 固体培养基上,  $28^\circ\text{C}$  培养  $2 \sim 3 \text{ d}$ 。

## 1.10 液体培养基胁迫处理

将空载酵母和转基因酵母菌的菌液 OD 值均调整至  $0.2$ 。取调整后浓度一致的菌液  $1 \text{ mL}$ ,  $7\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ,  $30 \text{ s}$  弃上清, 重悬于  $1 \text{ mL}$  不同胁迫的 YPD 液体培养基中。 $28^\circ\text{C}$  震荡胁迫培养  $3, 6$  和  $9 \text{ h}$ , 分别测量各组菌液的 OD<sub>600</sub> 值。

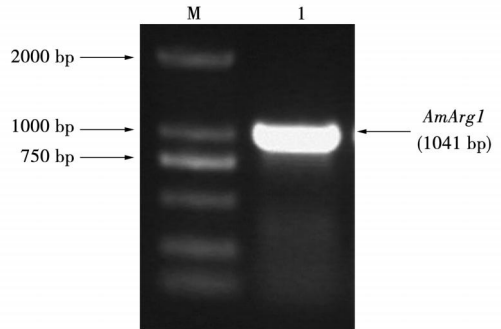
## 2 结果与分析

### 2.1 *AmArg1* 基因扩增结果与分析

以藏桃叶片 cDNA 为模板扩增 *AmArg1* 基因, 由图 1 可见, 在  $1\,000 \sim 2\,000 \text{ bp}$  之间存在一条明亮的条带, 大小约为  $1\,040 \text{ bp}$  左右, 与碧桃 (*Prunus persica*) 的 *PpArg1* 基因大小一致 ( $1\,041 \text{ bp}$ ), 说明 PCR 扩增获得 *AmArg1* 基因。

## 2.2 生物信息学分析

将克隆获得的 *AmArg1* 全长 ORF 测序后翻译成氨基酸序列, 利用 DNAMAN 软件将藏桃的 *AmArg1* 氨基酸序列, 分别与碧桃、扁桃 (*Prunus dulcis*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、小麦 (*Triticum aestivum*) 和番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中 Arg 蛋白的氨基酸序列进行同源性比对 (图 2)。结果表明, 藏桃 *AmArg1* 与碧桃和扁桃的 Arg 蛋白的氨基酸序列具有较高同源性相似性。



M. DNA Marker DL2000; 1. *AmArg1* PCR 产物。

图 1 *AmArg1* 基因 PCR 反应的凝胶电泳分析

AmArg1	MFSSSLVSAMSIIGRGIFHLKLNENVE.....GALIEGQSLIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	114
PpArg1	MFSSSLVSAMSIIGRGIFHLKLNENVE.....GALIEGQSLIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	114
PdArg1	.....MSIIGRGIFHLKLNENVE.....GALIEGQSLIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	105
AtArg1	.....MSRIIGRGINYLHRLNSASFT.....SVSASSIEFGQNRVIDASLTILRESAKLGEIVRLGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	109
AtArg2	.....MKNIGRGVVFQRLIAFPFTLRSLPTSEIVETGQNRVIDASLTILRESAKLGEIVRLGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	111
GhArg1	.....MSSSGVVRGIIHYLQKLNENVE.....SDLEKQGNRVIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	107
OsArg1	.....MGGAAGTNIHWRVRLSAKVS.....ADALFEGQSVVIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	107
TaArg1-2B	.....MGGAAGTNIHWRVRLSAKVS.....ADALFEGQSVVIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	107
TaArg1-2D	.....MKGASMGSTNYMQLTISNVE.....KEVVFEGQSVVIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	105
LeArg2	.....MKSAGRMGIHYMQLHASNVE.....KELVFEGQSVVIDASLTILRESAKLGEIVRALGGAVASTLLGVPLGHNSFFLQGFAPFAPPIREAIWCGSTNSTTEEGKELR	105
Consensus	m grrgih kl a nvp l e gq rvidasltilresaklgeivralgga astllgvplghnsfflqgfapfaprireaiwcgstnstteegkel	
AmArg1	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	234
PpArg1	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	234
PdArg1	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	225
AtArg1	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	229
AtArg2	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	231
GhArg1	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	227
OsArg1	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	227
TaArg1-2B	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	227
TaArg1-2D	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	21
LeArg2	DPRVLTVDGIFVQEIRDCGVEDRLNMVISESVKLVMEQDPLRPLVLGGDHSISYFVVRVASEKLGPFVDILHLDAHDPDIYDAFEGNYSHASSFARMMEGGYARRLLQVGRSINIEG	225
Consensus	dprvltvdgd pvqeirdcgv ddrilm visesvklvmeeqdplrlplvlggdhsisypvvravseklgpfvdiilhlдахdpdiydafegn yshassfarimeggyarrllqvgrsinieg	225
AmArg1	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	346
PpArg1	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	346
PdArg1	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	337
AtArg1	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	341
AtArg2	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	343
GhArg1	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	339
OsArg1	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	339
TaArg1-2B	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	339
TaArg1-2D	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	133
LeArg2	REQGKRFGEVEYEMRTFSDREHLENLKLGEVGVGVISVDVDCDLPFAEGVSHDEGGLSFRDVLNHLNLQGITVAGDVVEFNPCQRTVDGMTAMVAAKIVRELAKHS	337
Consensus	reqgkrfgeveyemrtfsidr flenlklgevgvgvisvdcvcdlpafagvshdegglsfrdvlnhlnlqgitvagdvefnpcqrdtdgmtamvaakivrelaakis	337

Am. 藏桃; Pp. 碧桃; Pd. 扁桃; At. 拟南芥; Gh. 棉花; Os. 水稻; Ta. 小麦; Le. 番茄。

图 2 *AmArg1* 同源蛋白的氨基酸序列比对

利用 MEGA 软件中 PHYLOGENY 的 Construct/Test Neighbor-Joining Tree 的分析功能进行多序列比对,构建 *AmArg1* 的系统发育进化

树,如图 3 所示,藏桃 *AmArg1* 与碧桃、扁桃和梅等植物的 *Arg1* 蛋白的亲缘关系较近。

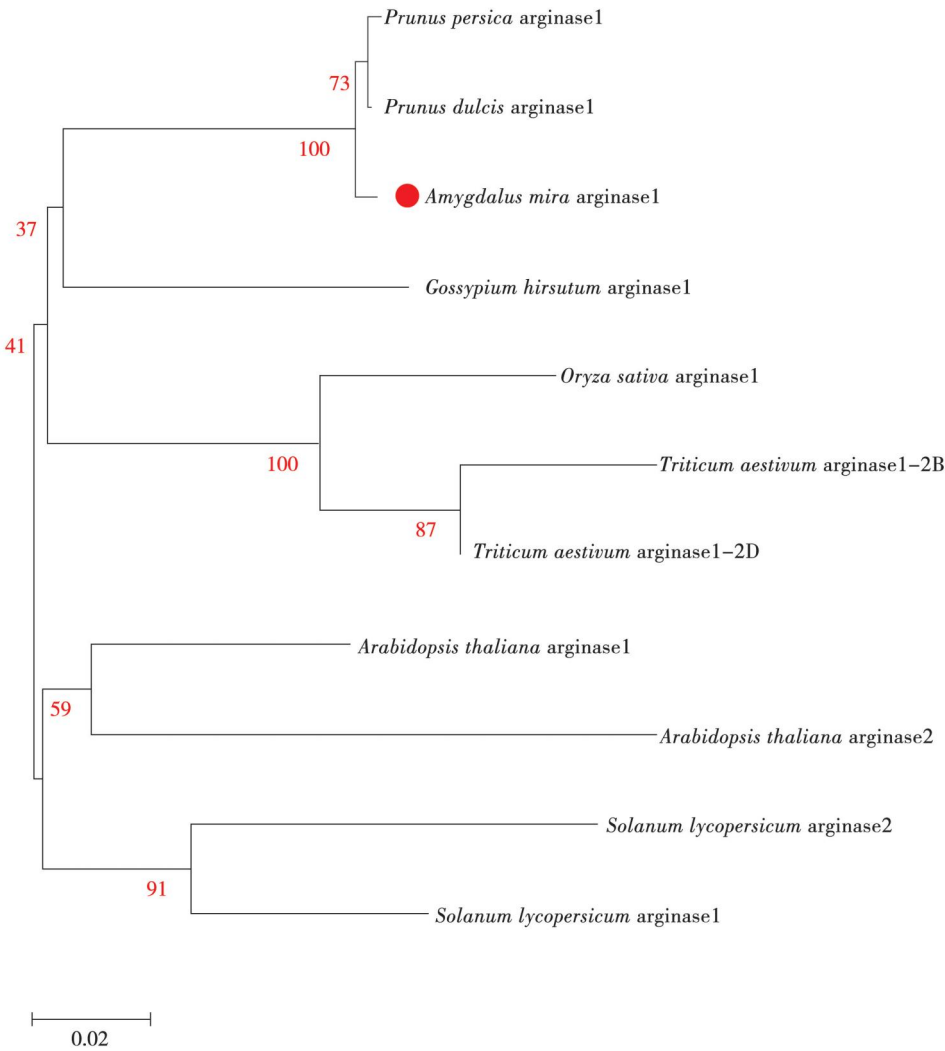


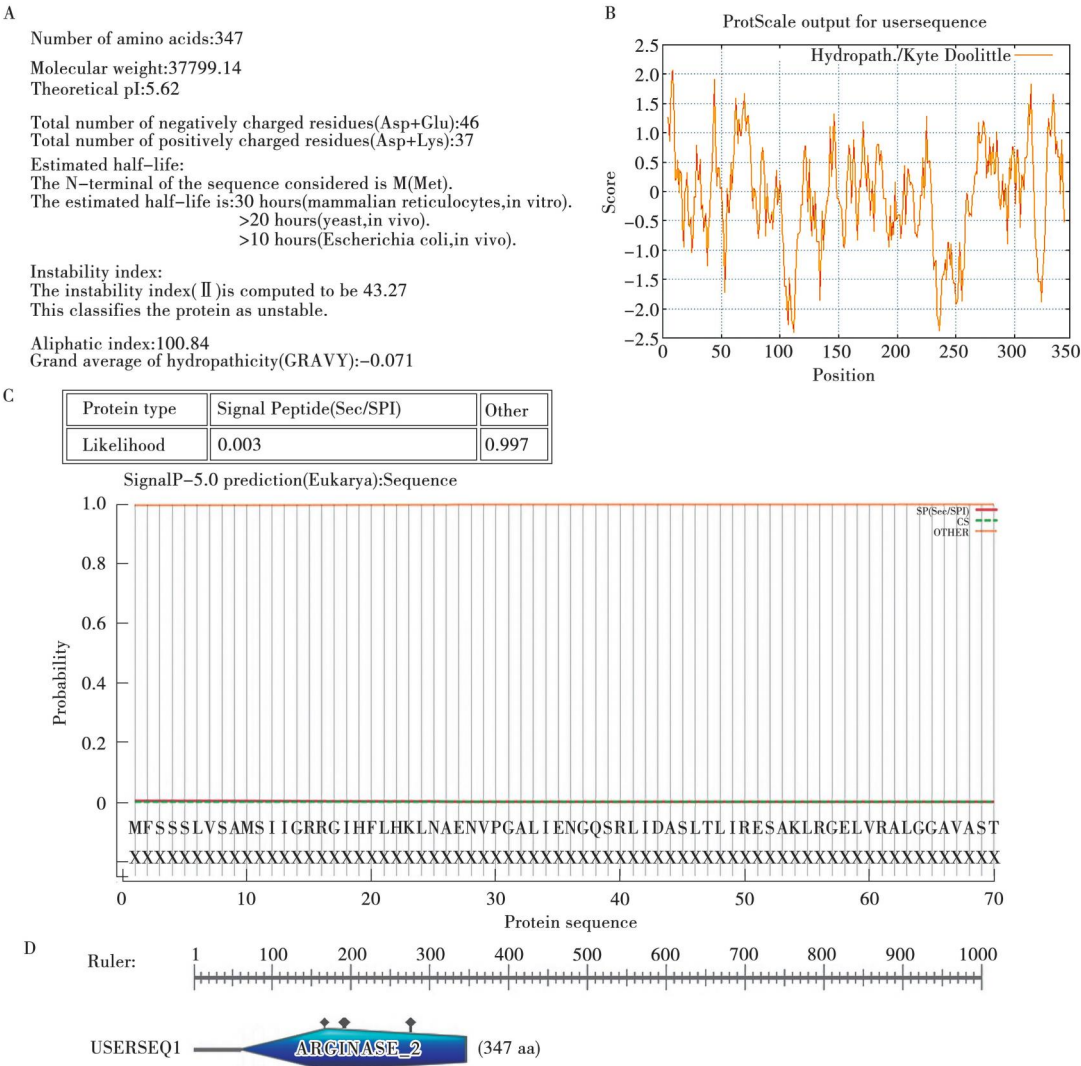
图 3 *AmArg1* 系统发育进化树分析

使用 ProtParam tool 分析 *AmArg1* 的理化参数,*AmArg1* 的分子式  $C_{1692}H_{2704}N_{470}O_{525}S_{12}$ , 分子量为 37 799. 14,理论等电点为 5. 62,氨基酸总数为 347,属于酸性蛋白(图 4A)。以 Hphob. / Kyte & Doolittle 为标度对 *AmArg1* 的一级结构进行 ProtScale 分析(图 4B),利用 ProtParam 分析可知,氨基酸序列平均疏水指数为 -0. 071,即该蛋白为亲水性蛋白。采用在线软件 SignalP 5. 0 Server 对 *AmArg1* 蛋白信号肽进行预测(图 4C),氨基酸序列中无明显的信号肽序列,表

明该蛋白是无信号肽结构的非分泌蛋白。将 *AmArg1* 通过 PROSITE 网站分析其功能域(图 4D),结果显示 *AmArg1* 的 61~347 位氨基酸处具有 ARGINASE-2 结合域。

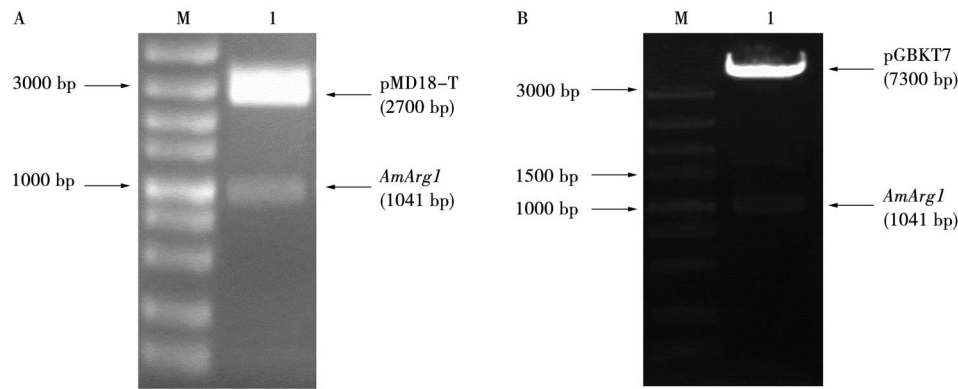
2. 3 pGBKT7-*AmArg1* 重组载体构建

构建重组载体 pGBKT7-*AmArg1*,在 *AmArg1* 片段已知序列的上下游,通过 PCR 扩增的方法加入酶切位点 *Bam*HI、*Sal*II。经双酶切验证,目的基因 *AmArg1* 和载体的位置均正确,由图 5 可知,pGBKT7-*AmArg1* 重组质粒构建成功。



A. 理化性质分析;B. 疏水性分析;C. 信号肽分析;D. 功能域分析。

图 4 AmArg1 蛋白的生物信息学分析



A. pMD-18T-AmArg1 双酶切验证;B. pGBKT7-AmArg1 双酶切验证。

图 5 pGBKT7-AmArg1 重组载体构建

2.4 藏桃 *AmArg1* 蛋白的毒性和自激活检测

如图 6 所示,将 pGBKT7 空载体和构建好的 pGBKT7-*AmArg1* 重组质粒转化到酵母菌并涂布于 SD-Trp 培养基,两个培养基中的酵母菌长势基本一致,菌落数目大小相近,说明将 *AmArg1* 构建重组质粒转入酵母中,对酵母菌的生长无毒性。

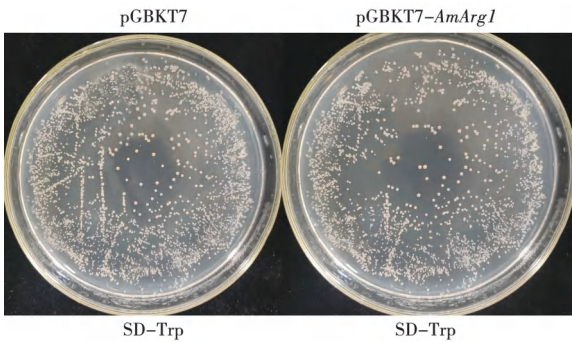


图 6 诱饵蛋白毒性验证

将 pGBKT7-*AmArg1* 重组质粒成功转化的酵母单克隆菌液,涂布于加有 X- $\alpha$ -gal 的 SD-Trp 培养基上,结果如图 7A 所示,生长的酵母菌株并没有变蓝的情况发生;与酵母菌的阳性和阴性对照菌液置于同一加有 X- $\alpha$ -gal 的 SD-Trp 培养基上共同培养时,结果如图 7B 所示,在阳性和阴性

对照生长正常的情况下,pGBKT7-*AmArg1* 重组质粒成功转化的酵母单克隆菌株并没有变蓝,这些结果说明该基因在转入酵母后无自激活活性。

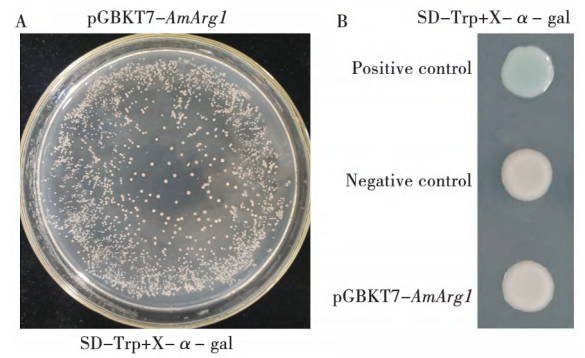
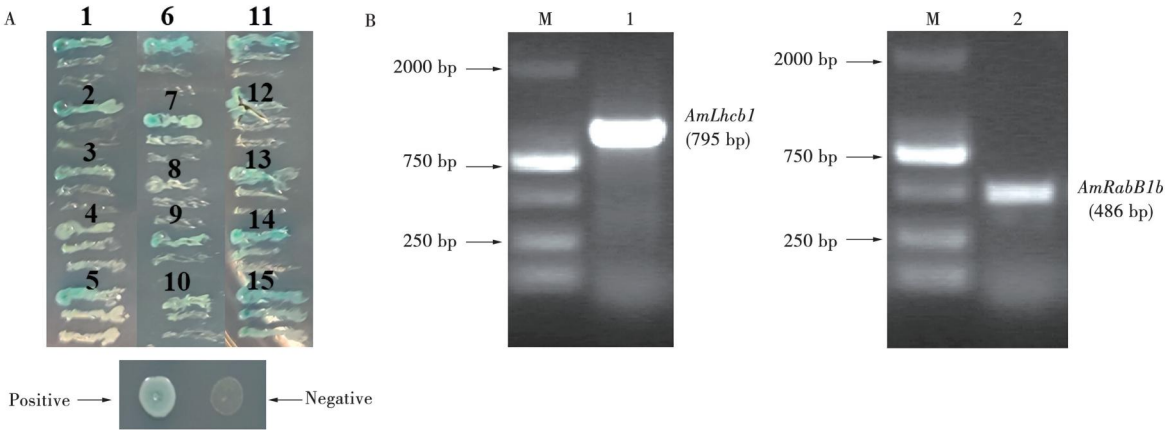


图 7 诱饵蛋白的自激活检测

2.5 藏桃 *AmArg1* 互作蛋白的筛选

将 pGBKT7-*AmArg1* 重组质粒成功转化的酵母单克隆菌株与藏桃 cDNA 酵母文库的酵母菌株进行共培养,杂交的单克隆菌株划线培养在 SD-Trp-Leu-His+X- $\alpha$ -gal 平板上,生长情况如图 8A 所示,杂交的单克隆酵母菌生长情况正常并且均有变蓝,对杂交成功的酵母菌株进行 PCR 送测,得到的序列在 NCBI 进行比对。最终筛选出互作蛋白叶绿素结合蛋白 *AmLhcb1*、Ras 相关蛋白 *AmRabB1b*(图 8B)。



A. 阳性菌落划线到 SD-Trp-Leu-His+X- $\alpha$ -gal 培养基; B. 互作蛋白基因片段 PCR 扩增;M. DNA Marker DL2000。

图 8 文库融合筛选互作蛋白

2.6 藏桃 *AmArg1* 与互作蛋白共转化验证

将互作蛋白基因片段构建到 pGADT7 载体上,得到 pGADT7-*AmLhcb1* 和 pGADT7-*AmRabB1b* 重组质粒。pGBKT7-*AmArg1* 分别和 pGADT7-*AmLhcb1*、pGADT7-*AmRabB1b* 质粒

组合转入酵母菌中得到共转化酵母菌。这些酵母菌在 SD-Trp-Leu 培养基正常生长,在 SD-Trp-Leu-His-Ade+X- $\alpha$ -gal 培养基上生长且变蓝,结果如图 9 所示。

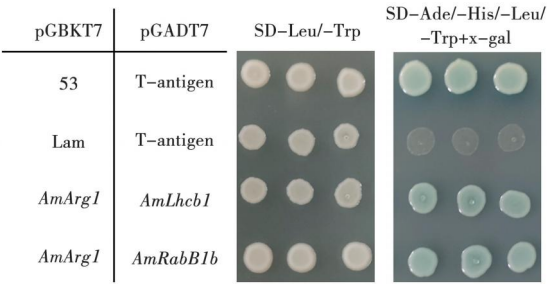


图 9 交互蛋白共转化验证

2.7 BiFC 实验重组质粒的构建

将 *AmArg1* 和 *AmLhcb1*、*AmRabB1b* 分别构建到 pSPYNE 和 pSPYCE 载体上,最终得到 pSPYNE-*AmArg1* 和 pSPYCE-*AmLhcb1*、pSPYCE-*AmRabB1b* 重组质粒。双酶切验证重组质粒是否构建成功,结果如图 10 所示,目的基因和载体条带位置正确,表明重组质粒构建成功。

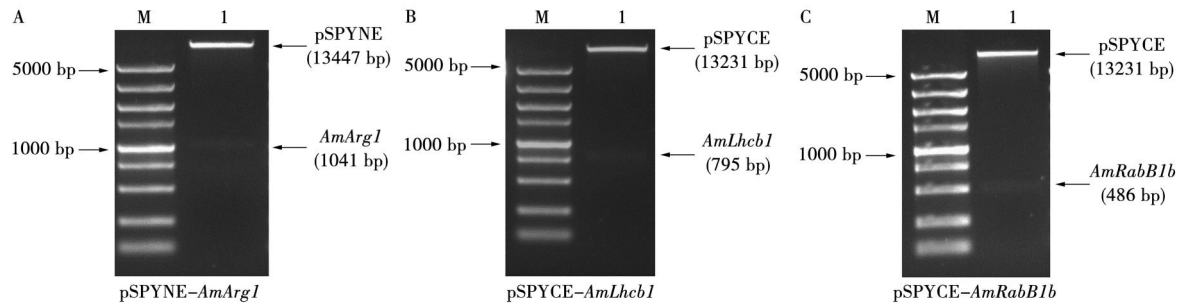


图 10 BiFC 实验重组质粒双酶切鉴定

2.8 藏桃 *AmArg1* 与交互蛋白的 BiFC 验证

将转化有 pSPYNE-*AmArg1* 质粒的 GV3101 农杆菌与转化有 pSPYCE-*AmLhcb1*、pSPYCE-*AmRabB1b* 质粒的农杆菌的菌株两两混合菌液分别共侵染洋葱表皮细胞,暗培养 24 h 后再光照培养 24 h,制成洋葱表皮切片后,用荧光显微镜检测

GFP 荧光信号,结果如图 11 所示,洋葱表皮细胞中 pSPYNE-*AmArg1* 与 pSPYCE-*AmLhcb1* 和 pSPYCE-*AmRabB1b* 的共表达产生了绿色荧光信号。以上结果进一步证实了 *AmArg1* 与 *AmLhcb1*、*AmRabB1b* 之间存在互作关系。

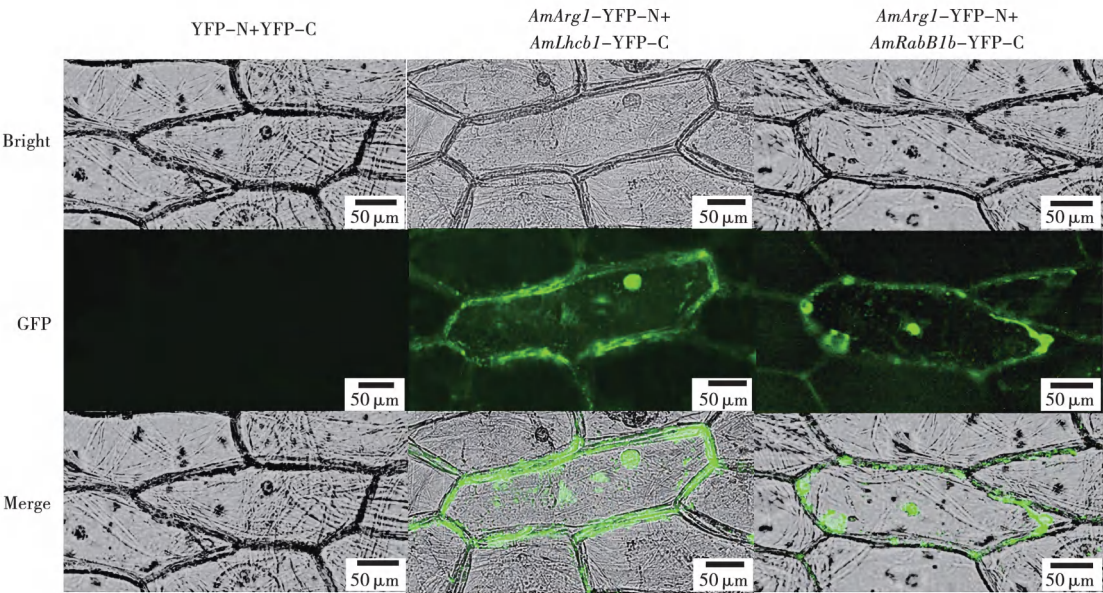
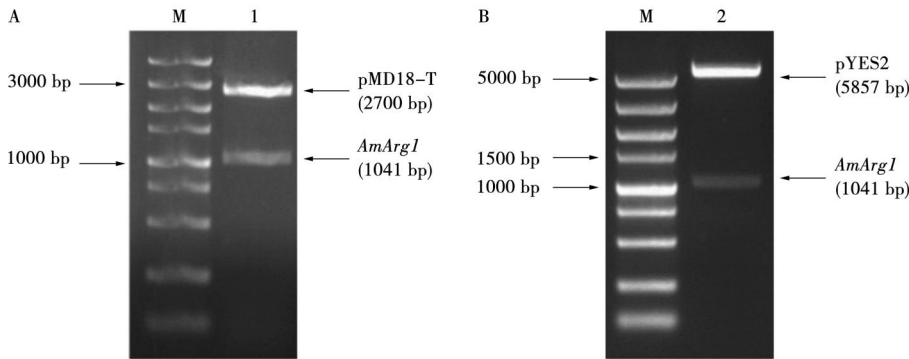


图 11 BiFC 验证试验

2.9 pYES2-*AmArg1* 重组载体构建

在 *AmArg1* 片段已知序列的上下游,通过 PCR 扩增的方法加入酶切位点 *Xho*I、*Xba*I。经

双酶切验证,图 12 结果表明 pYES2-*AmArg1* 重组质粒构建成功。



A. pMD-18-T-*AmArg1* 双酶切鉴定;B. pYES2-*AmArg1* 双酶切鉴定。  
图 12 pYES2-*AmArg1* 载体鉴定

2.10 固体培养条件下转基因酵母对逆境胁迫的生长响应

如图 13 所示,在对照组的培养基上,两种酵母菌株的生长趋势相似。在高浓度的 NaCl、甘露

醇和  $\text{CuSO}_4$  胁迫下,转 pYES2-*AmArg1* 的酵母菌株的生长状态明显优于空载酵母菌株,pYES2 空载酵母菌株的生长受到明显抑制。

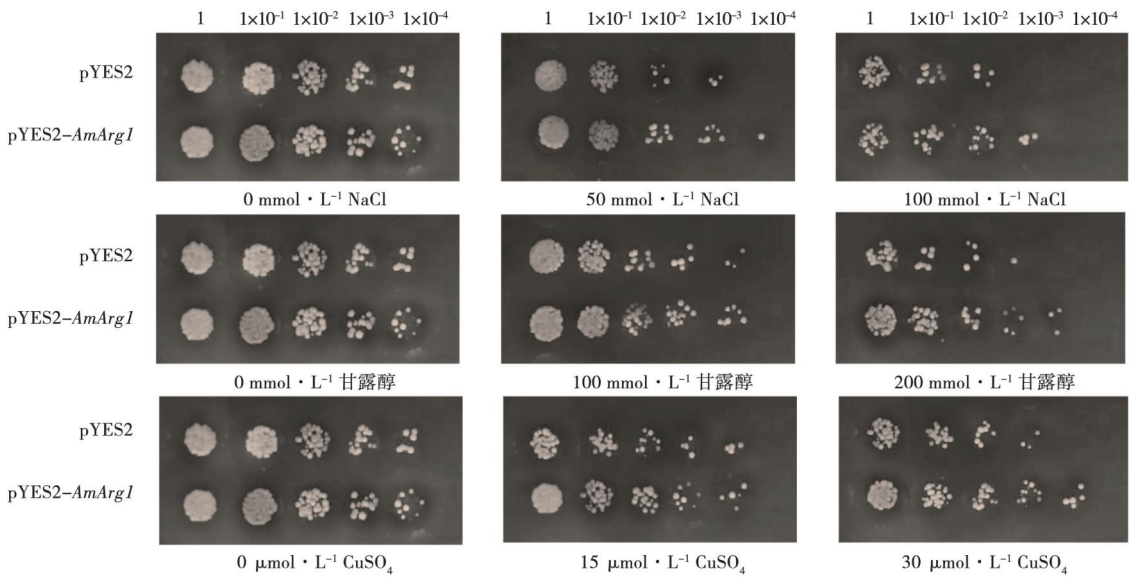
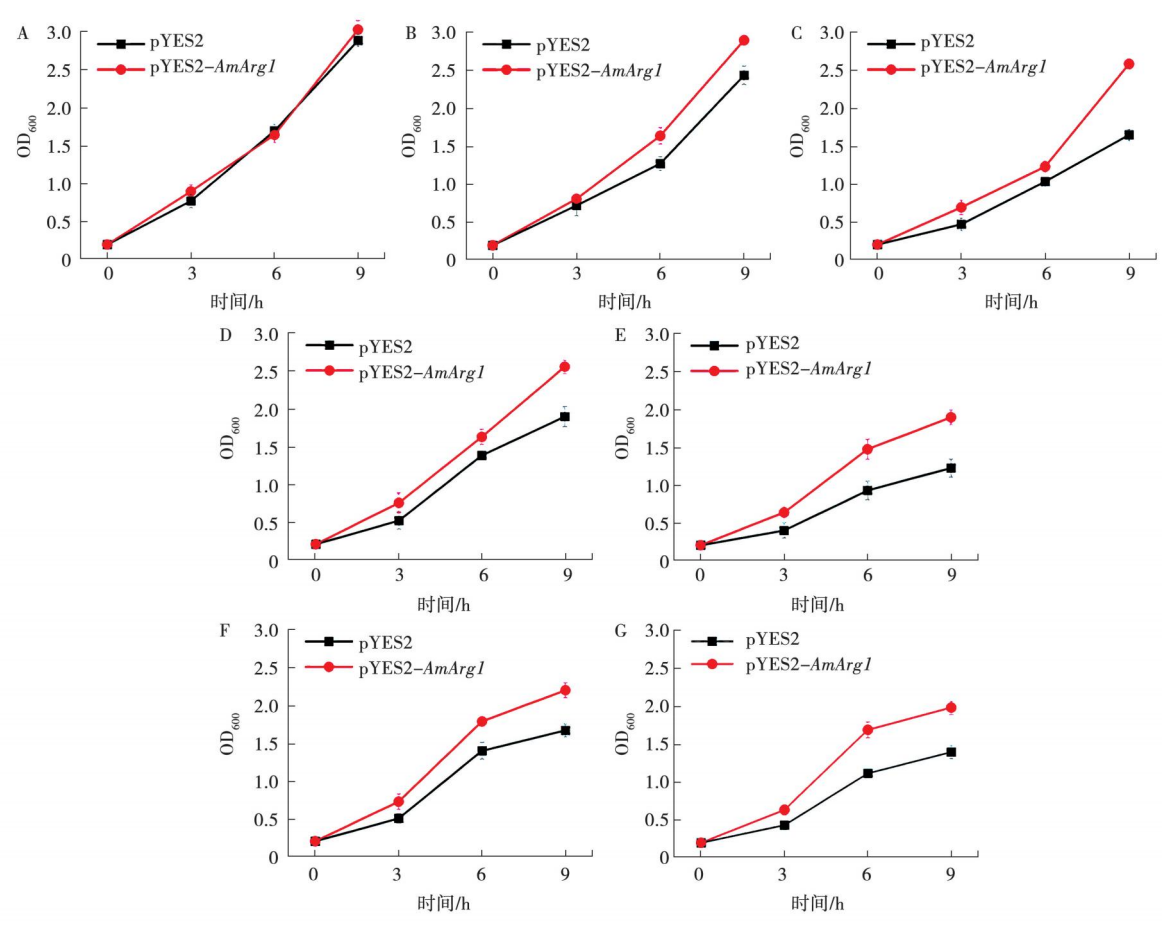


图 13 过表达 pYES2-*AmArg1* 酵母抗性分析

2.11 液体培养条件下转基因酵母对逆境胁迫的生长响应

将转化有 pYES2-*AmArg1* 和空载 pYES2 酵母菌液浓度调整一致,比较在不同浓度梯度的 NaCl、甘露醇、 $\text{CuSO}_4$  的胁迫培养基中两种酵母的生长状态。如图 14 所示,在正常无胁迫的条件下,两种酵母菌株的生长趋势是基本一致的。在

不同胁迫下,过表达酵母菌的存活率均优于对照组,在  $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaCl}$ 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  甘露醇和  $30\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ CuSO}_4$  胁迫下,过表达转 *AmArg1* 酵母菌在胁迫处理 9 h 时的存活率明显高于对照空载酵母,说明 *AmArg1* 的表达提高了酵母抵御盐胁迫、甘露醇胁迫和  $\text{CuSO}_4$  胁迫的能力。



A. CK; B. 50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl; C. 100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl; D. 100 mmol·L<sup>-1</sup> 甘露醇; E. 200 mmol·L<sup>-1</sup> 甘露醇; F. 15 μmol·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>; G. 30 μmol·L<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub>。

图 14 非生物胁迫下 *AmArg1* 的表达对酵母菌的生长的影响

### 3 讨论

植物精氨酸酶作为一种水解酶,在尿素循环中扮演着至关重要的角色<sup>[1]</sup>。精氨酸酶有 I 型和 II 型两种类型,其在植物系统中的主要作用是在种子发芽期间调动储存的精氨酸,并在发育期为合成其他氨基酸和多胺提供氮和碳源,其中就包括 NO 和多胺,而这两种物质是信使分子,植物体中绝大多数的生理生化过程中都有它们的参与,包括影响植物的生长发育、提高植物抗逆性等<sup>[28-30]</sup>。本研究从藏桃的 cDNA 文库中克隆到了 *AmArg1*。对藏桃 *AmArg1* 的氨基酸序列与多种植物的精氨酸酶的氨基酸序列进行同源性分析,发现藏桃 *AmArg1* 与碧桃的 *PpArg1* 以及扁桃的 *PdArg1* 氨基酸序列同源性最高。在多种不同的网站上对藏桃 *AmArg1* 进行理化性质等特性分析,可知藏桃的 *AmArg1* 是分子量为 37 799.14, pI 值为 5.62 的酸性亲水性蛋白,它也是无信号肽的非分泌蛋白。

蛋白质通常作为动态网络的一部分来行使其功能。大量的研究表明,蛋白质通过直接或间接的互作关系,参与胞内多种生物过程<sup>[31]</sup>。因此将 *AmArg1* 与藏桃 cDNA 文库进行杂交,最终筛选出了两个与 *AmArg1* 互作的蛋白,分别是叶绿素结合蛋白 *AmLhcb1* (chlorophyll a-b binding protein of LHCII type 1)、Ras 相关蛋白 *AmRabB1b* (rasrelated protein RAB1b),之后进行了共转化验证和 BiFC 验证,结果表明 *AmArg1* 与 *AmLhcb1* 和 *AmRabB1b* 具有相互作用关系。

酵母与植物应对逆境的机制高度相似<sup>[32]</sup>,对于某个基因的研究来说,酵母表达系统对于其抗逆性功能的探究有很大帮助,20 世纪 90 年代研究人员用酵母表达系统来研究植物的耐盐性<sup>[33]</sup>。本研究将 *AmArg1* 基因转入了酵母细胞,旨在验证该基因的抗逆功能。结果显示,在 NaCl、甘露醇和 CuSO<sub>4</sub> 胁迫的液体胁迫培养基上,转 pYES2-*AmArg1* 的酵母菌株表现出更高的存活率;

同时,在加有 NaCl、甘露醇和  $\text{CuSO}_4$  胁迫的固体培养基上,过表达 *AmArg1* 酵母菌的生长趋势明显优于空载对照酵母菌株。这与 *TrSOS1* 等基因在酵母中的过表达能够提高酵母菌胁迫耐受性的结果相一致<sup>[34]</sup>。因此推测过表达 *AmArg1* 可能提高了酵母菌对盐、干旱和  $\text{CuSO}_4$  的耐逆能力。

## 4 结论

本研究以藏桃叶片 cDNA 为模板成功扩增出 *AmArg1* 基因,对 *AmArg1* 蛋白进行生物信息学分析,发现 *AmArg1* 与碧桃和扁桃具有较高的同源性,是酸性的无信号肽结构的非分泌蛋白。成功构建 pGBKT7-*AmArg1* 重组载体,筛选出了互作蛋白 *AmLhcb1*、*AmRabB1b* 并通过 BiFC 验证其相互作用。过表达转 *AmArg1* 酵母菌株在液体培养基中的存活率更高,且在固体培养基中的生长表型更优,表明过表达转 *AmArg1* 酵母菌具有较强的对盐、甘露醇、金属 Cu 胁迫的耐受性。为深入探究 *AmArg1* 的生物学功能提供了思路。

## 参考文献:

- [1] SIDDAPPA S, MARATHE G K. What we know about plant arginases? [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 156: 600-610.
- [2] WINTER G, TODD C D, TROVATO M, et al. Physiological implications of arginine metabolism in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 534.
- [3] CAO F Q, WERNER A K, DAHNCKE K, et al. Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(1): 98-108.
- [4] ZONIA L E, STEBBINS N E, POLACCO J C. Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds[J]. *Plant Physiology*, 1995, 107(4): 1097-1103.
- [5] 郭新海,祖洪月,杨帆,等.转精氨酸酶基因 *ZmARG* 玉米后代株系的遗传稳定性分析和功能验证[J]. *玉米科学*, 2017, 25(1): 34-38.
- [6] CHEN H, McCaig B C, MELOTTO M, et al. Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(44): 45998-46007.
- [7] HWANG H J, KIM E H, CHO Y D. Isolation and properties of arginase from a shade plant, ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) roots[J]. *Phytochemistry*, 2001, 58(7): 1015-1024.
- [8] 杨慧.水稻精氨酸酶基因启动子表达模式及精氨酸酶基因的功能研究[D].北京:中国农业科学院,2014.
- [9] 张晓旭.拟南芥精氨酸酶基因(*AtARGA1*、*AtARGA2*)功能解析以及对氮源和盐胁迫的响应[D].哈尔滨:东北林业大学,2014.
- [10] 王慧飞,冯雪,张一名,等.棉花精氨酸酶基因 *GhARG1* cDNA 的克隆与表达分析[J]. *华北农学报*, 2018, 33(4): 17-24.
- [11] SHE M Y, WANG J, WANG X M, et al. Comprehensive molecular analysis of arginase-encoding genes in common wheat and its progenitor species[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 6641.
- [12] MIN D D, LI F J, ZHANG X H, et al. *SlMYC2* involved in methyl jasmonate-induced tomato fruit chilling tolerance[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(12): 3110-3117.
- [13] ZHANG X H, SHEN L, LI F J, et al. Methyl salicylate-induced arginine catabolism is associated with up-regulation of polyamine and nitric oxide levels and improves chilling tolerance in cherry tomato fruit[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(17): 9351-9357.
- [14] ZHANG X H, SHEN L, LI F J, et al. Up-regulating arginase contributes to amelioration of chilling stress and the antioxidant system in cherry tomato fruits[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(13): 2195-2202.
- [15] SIDDAPPA S, BASRUR V, RAVISHANKAR RAI V, et al. Biochemical and functional characterization of an atypical plant l-arginase from Cilantro (*Coriandrum sativum* L.) [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 118: 844-856.
- [16] MILLANES A M, FONTANIELLA B, LEGAZ M E, et al. Glycoproteins from sugarcane plants regulate cell polarity of *Ustilago scitaminea* teliospores[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2005, 162(3): 253-265.
- [17] BRAUC S, de VOGHT E, CLAEYS M, et al. Overexpression of arginase in *Arabidopsis thaliana* influences defence responses against *Botrytis cinerea* [J]. *Plant Biology*, 2012, 14(Suppl 1): 39-45.
- [18] YANG B J, RUAN R, CANTU D, et al. A comparative approach expands the protein-protein interaction node of the immune receptor XA21 in wheat and rice [J]. *Genome*, 2013, 56(6): 315-326.
- [19] 左力旭.西藏核桃功效成分及制粉技术研究[D].天津:天津科技大学,2019.
- [20] 李媛蓉.西藏核桃嫁接繁育技术[J]. *安徽农学通报*, 2021, 27(7): 56-57, 95.
- [21] 李亚斌.核桃实生苗培育技术[J]. *安徽农学通报*, 2013, 19(9): 65, 83.
- [22] 张新宇,高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧[J]. *生物信息学*, 2004, 2(4): 15-18, 46.
- [23] 孙佳,刘跃华,秦珂茹,等.人 ANKRD49 基因及其编码蛋白质的生物信息学分析[J]. *中国生物制品学杂志*, 2021, 34(8): 904-909, 916.
- [24] 季梦玮,滕飞翔,周敏,等.原生动物 AQP 系统进化树的构建以及结构分析[J]. *江苏科技信息*, 2019, 36(13): 46-51.
- [25] CAO Q D, DAI B H, YANG Y, et al. ASFV pp62 protein

- has 9 dominant B-T cell combined epitopes[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2022, 14(4): 13-20.
- [26] 谭妮. 苹果树腐烂病菌 CAP 蛋白 VmPR1c 功能域研究及作用靶标鉴定[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2021.
- [27] 杨艳北, 许晶, 马荆鄂, 等. 沼泽红假单胞菌相似菌株间差异功能模体的筛选和分析 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(3): 73-78.
- [28] SPLITTSTOESSER W E. The appearance of arginine and arginase in pumpkin cotyledons. Characterization of arginase[J]. Phytochemistry, 1969, 8(4): 753-758.
- [29] MICALLEF B J, SHELPI B J. Arginine metabolism in developing soybean cotyledons: II. biosynthesis[J]. Plant Physiology, 1989, 90(2): 631-634.
- [30] KING J E, GIFFORD D J. Amino acid utilization in seeds of loblolly pine during germination and early seedling growth (I. arginine and arginase activity) [J]. Plant Physiology, 1997, 113(4): 1125-1135.
- [31] LIN J S, LAI E M. Protein-protein interactions: co-immunoprecipitation [M]//Methods in Molecular Biology. New York, NY: Springer New York, 2017: 211-219.
- [32] HASEGAWA P M, BRESSAN R A, ZHU J K, et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity[J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2000, 51: 463-499.
- [33] SERRANO R. Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses[J]. International Review of Cytology, 1996, 165: 1-52.
- [34] CHE B N, CHENG C, FANG J J, et al. The recretehalophyte *Tamarix TrSOS1* gene confers enhanced salt tolerance to transgenic hairy root composite cotton seedlings exhibiting virus-induced gene silencing of *GhSOS1* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(12): 2930.

## Gene Cloning, Interacting Protein Screening and Stress Resistance Analysis of *AmArg1* Gene from *Amygdalus mira* Koehne

BAI Jiexia, LI Jiaxin, LIU Lulu, LUO Qiuxiang

(Key Laboratory of Northeast Saline-alkali Vegetation Restoration and Reconstruction, Ministry of Education / School of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

**Abstract:** In order to investigate the arginase 1 (*AmArg1*) of *Amygdalus mira*, the full-length ORF of the arginase 1, *AmArg1* was cloned and therefore, the deduced protein sequence was predicted for structure and physicochemical properties via bioinformatics analysis. The results showed that the protein was an acidic, non-secreted protein with no signal peptide structure. *AmArg1* was transferred into yeast cells and it was non-toxic and non-self-activating for yeast cells. The interacting proteins, *AmLhcb1* and *AmRabB1b* of *AmArg1* were screened by yeast two hybrid assays, and their interactions were validated by BiFC analysis. Transgenic yeast in response to NaCl, mannitol, and CuSO<sub>4</sub> stress was preliminarily explored, and found that over-expression of *AmArg1* might increase the tolerance to these stresses.

**Keywords:** *Amygdalus mira* Koehne; interacting proteins; abiotic stress; *AmArg1* gene

### 协办单位

黑龙江省作物学会

黑龙江省农业科学院水稻研究所

黑龙江省农业科学院克山分院

黑龙江省农业科学院黑河分院

黑龙江省农业科学院绥化分院

黑龙江省农业科学院佳木斯分院

黑龙江省农业科学院牡丹江分院