

甘薯 *TPS* 基因家族分析及 *IbTPS7a* 基因克隆与功能研究

邵欢欢¹, 郑海燕¹, 廖若星², 徐攀¹, 费雪婷¹,
雍彬^{*1}, 马沁沁¹, 袁向华¹, 王晓燕¹

(1. 四川师范大学 生命科学学院, 四川 成都 610101; 2. 四川师范大学 附属中学, 四川 成都 610101)

摘要: 为了研究甘薯 *TPS* 基因家族及功能, 采用生物信息学手段分析鉴定了甘薯转录组数据库中 7 个 *TPS* 基因, 并对甘薯 *TPS* 基因家族编码蛋白进行了进化树分析, 结果发现 7 个 *IbTPS* 基因可以分成两个亚家族, *IbTPS7a* 蛋白与 *Nicotiana sylvestris* 和 *Solanum tuberosum* 的 *TPS7* 蛋白亲缘关系最接近。利用 RT-PCR 技术成功克隆得到全长为 2 568 bp 的 *IbTPS7a* 基因, 将 *IbTPS7a* 基因转化大肠杆菌和酿酒酵母进行过表达, 实验结果发现在非生物胁迫下重组菌株的生长趋势或生存率有明显提升。数字表达谱的结果表明 *IbTPS7a* 基因在甘薯不同组织中的表达量并不相同, 其在茎中的表达量最高, 在须根中的表达量最低。以上结果表明甘薯中也存在 *TPS* 基因家族, *IbTPS7a* 可以有助于提升细胞在非生物胁迫下的抗逆能力。

关键字: 甘薯; 海藻糖; 抗逆; 数字表达谱

中图分类号: Q 789 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2018)10—1099—08

Analysis of Trehalose-6-Phosphate Synthase(*TPS*) Gene Family and Identification of *IbTPS7a* in Sweet Potato(*Ipomoea batatas*(L.) Lam.)

SHAO Huanhuan¹, ZHENG Haiyan¹, LIAO Ruoxing², XU Pan¹, FEI Xueting¹,
YONG Bin^{*1}, MA Qinqin¹, YUAN Xianghua¹, WANG Xiaoyan¹

(1. College of Life Science, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China; 2. The middle school attached to Sichuan normal university, Chengdu 610101, China)

Abstract: In order to study the structure and function of *TPS* family genes in *Ipomoea batatas*, 7 *IbTPS* family genes were identified and their sequences, structures and functional properties were determined by bioinformatic method. These *IbTPS* genes were divided into class I and class II subfamilies according to their structure and phylogeny relationship. In this study, the complete *IbTPS7a* gene cloned from *Ipomoea batatas* contains an open reading frame (ORF) of 2 568 bp.

收稿日期: 2016-09-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(21472132); 四川师范大学校级科研启动项目(341426001); 四川省大学生创新创业训练计划项目(201610636116); 四川师范大学校级科研项目(14qn08)。

作者简介: 邵欢欢(1984—), 男, 河南巩义人, 理学博士, 讲师, 主要从事分子遗传学研究。E-mail: wsshforget@163.com

* 通信作者: 雍彬(1973—), 男, 四川南充人, 理学博士, 教授, 主要从事微生物基因工程研究。E-mail: bingyong1225@163.com

引用本文: 郑海燕, 廖若星, 徐攀, 等. 甘薯 *TPS* 基因家族分析及 *IbTPS7a* 基因克隆与功能研究[J]. 食品与生物技术学报, 2018, 37(10): 1099-1106.

Meanwhile, IbTPS7a was transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and *Saccharomyces cerevisiae* INVSc1, respectively. The results indicated that over-expression of IbTPS7a conferred recombinant strains better growth or survival rate than control strain. Digital gene expression profiling (DGE) proved that the expression level of IbTPS7a has a difference in different tissues, the highest transcription level of IbTPS7a was in stem and the lowest level was in fibrous root. The results indicated that IbTPS7a gene family existed in sweet potato and IbTPS7a was helpful to enhance cell resistance to abiotic stress.

Keywords: *Ipomoea batatas*, trehalose, stress resistance, digital gene expression profiling

农作物在生长过程中容易受到干旱、极端温度、高盐及病虫害等胁迫,使其生长发育受到限制,进而影响产量。为了应对来自环境中的非生物或生物胁迫,经过长期的进化,植物形成了复杂的响应机制,例如植物可以改变其形态和生理生化状态来适应环境的变化^[1]。海藻糖(Trehalose)是一种非还原性二糖,由两分子葡萄糖通过半缩醛羟基缩合反应形成的 $\alpha, \alpha-1, 1$ 糖苷键连接而成,在细菌、真菌、昆虫、无脊椎动物和植物中广泛存在^[2]。海藻糖在酸、碱、高温等条件下具有很强的稳定性和强吸水性,可以有效地保护细胞并使其具有抗脱水作用。海藻糖分子中具有较多的羟基可以与多种生物大分子结合形成氢键,对生物大分子能起到保护作用并降低失活风险,有助于维持细胞或生物体的正常生命过程,进而提升生物体的抗逆能力^[3]。自然界中已经发现了5个海藻糖合成通路,分别是TPS-TPP途径、TreP途径、TreS途径、TreY-TreZ途径和TreT途径,其中TPS-TPP途径是高等植物唯一的海藻糖合成途径^[4-6]。TPS-TPP途径是由两个关键酶经过两步反应形成,首先在TPS催化下尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)和6-磷酸-葡萄糖(G6P)反应生成6-磷酸海藻糖(T6P),T6P在磷酸海藻糖磷酸酯酶(TPP)催化下最终形成海藻糖^[7]。

甘薯(*Ipomoea batatas* (L.) Lam.), 旋花科(Convolvulaceae)番薯属(*Ipomoea*)一年生草本植物,淀粉含量高且营养丰富,是一种重要的粮食作物。中国甘薯资源十分丰富,种植面积和产量均居世界第一^[8]。甘薯多被种植在不发达地区的边缘土地中,产量很高但并不占用良田,对环境要求较低,容易受到干旱、盐碱、极端温度等非生物胁迫,因此其抗胁迫能力也较强。

在高等植物中已经发现了较多的TPS基因,有

些植物中具有由一系列TPS基因组成的TPS基因家族,例如拟南芥基因组中具有11个TPS基因(AiTPS1-11)组成的AiTPS基因家族^[9],根据拟南芥TPS基因家族序列特点在杨树和水稻等植物中也发现了类似的TPS基因家族,其中杨树TPS基因家族有12个PtTPS基因,水稻TPS基因家族有11个OsTPS基因^[10-11]。目前还没有关于甘薯TPS基因家族及功能研究的报道,作者根据NCBI数据库中拟南芥和杨树的TPS基因家族序列,利用本地Blast(BlastN和BlastP)在甘薯转录组数据库^[12]中共发现了7个TPS基因,成功克隆得到了IbTPS7a基因,分析了IbTPS7a基因在甘薯不同组织中的表达量,在大肠杆菌和酿酒酵母对IbTPS7a基因的抗逆功能进行了验证,有助于了解甘薯的TPS基因抗逆功能和作用机制,为未来甘薯的育种及基因工程改造研究打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 薯材、菌株、质粒 甘薯品种为徐薯18,大肠杆菌克隆及表达菌株分别为*Escherichia coli* DH5 α 和*E. coli* BL21 (DE3),酵母表达菌株为*Saccharomyces cerevisiae* INVSc1,大肠杆菌表达载体为pET-32a(+),酵母表达载体为pYES2。

1.1.2 主要试剂、工具酶和分析软件 RNA提取试剂盒 MiniBEST Plant RNA Extraction Kit: 购自TaKaRa公司;PCR高保真酶 PrimeSTAR[®] HS (Premix): 购自TaKaRa公司;酵母基因组提取试剂盒: 购自北京天根生物科技有限公司;胶回收试剂盒 E.Z.N.A.[™] Plasmid Mini Kit I: 购自Omega Bio-tek公司;M-MLV逆转录酶: 购自Invitrogen;RNase inhibitor及各种常规限制内切酶: 购自Thermo

Scientific 公司;引物合成及测序:成都擎科梓熙生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 甘薯 *TPS* 基因家族分析及进化树构建 利用已知的单子叶植物水稻和双子叶植物拟南芥中 *TPS* 基因家族核酸序列和蛋白序列,用 BlastParser 软件对甘薯转录组数据库分别进行本地 BlastN 和 BlastP(e -value 为 $1e-10$)比对,获得相关同源序列,结合两种比对结果分析甘薯转录组数据库中可能存在的 *TPS* 基因家族。将获得的甘薯 *TPS* 基因家族序列与拟南芥的相关序列使用 MEGA 5.0 软件采用 Neighbor-joining 法制作系统进化树。

1.2.2 总 RNA 提取及反转录 根据 TaKaRa 公司植物总 RNA 提取试剂盒的推荐方法对分别对徐薯 18 的叶片、块根和茎提取总 RNA,将去除基因组 DNA 后无降解的总 RNA 使用 Thermo 公司的 Nanodrop 2000 进行 RNA 浓度测定,并根据浓度按照比例将 3 个组织样品的总 RNA 进行等量混合,以 M-MLV 反转录酶反转录得到 cDNA 第一链,分装后保存在 -20°C 冰箱中备用。

1.2.3 *IbTPS7a* 基因克隆及表达载体构建 以甘薯转录组测序数据及前期经比对得到的甘薯 *TPS* 基因家族中的 *IbTPS7a* 序列为模板,使用 SLIC(sequence and ligation independent cloning)法设计引物,引物序列如下所示:TPS-32sF:5'-GAAAACCTGTACTTCCAGGGTATGATGTCCAAATCGTATACCAACTT-3';TPS-32sR:5'-GTTTAGAGGCCCAAGGGGTTATCAATCCGAGCTTCCGGTGG-3';PET_TPS-F:5'-CCACCGGAAGCTCGGATTGATAACCCCTTGGGGCCTCTAAAC-3';PET_TPS-R:5'-ACCCTGGAAGTACAGGTTTTACACAGAAGAATGATGATGATGATGG-3'其中下划线部分为 pET32a(+)载体骨架部分。以反转录得到的 cDNA 和 pET32a(+)质粒为模板,分别以 TPS-32sF 和 TPS-32sR 以及 PET_TPS-F 和 PET_TPS-R 为引物,使用 PrimeSTAR[®] HS (Premix) 分别进行 PCR 扩增 *IbTPS7a* 基因和线性 pET32a(+)载体,PCR 产物经电泳后胶回收,回收产物经 T4 DNA Polymerase 处理、退火,构建得到重组质粒 pET32-*IbTPS*。把得到的 pET32-*IbTPS* 质粒经 PCR 验证后送至成都擎科梓熙生物技术有限公司进行测序,以测序正确的质粒为模板使用引物 TPS-yF(5'-CGGGATCCCGATG

ATGTCCAAATCGTATACCAACTT-3') 和 TPS-yR(5'-GCTCTAGAGCTCAATCCGAGCTTCCGGTGG-3')进行 PCR,将纯化后的 PCR 产物和 pYES2 载体使用 *Bam*H I 和 *Xba* I 进行双酶切,胶回收使用 T4 DNA ligase 于 18°C 过夜连接后转化大肠杆菌 DH5 α ,获得的阳性克隆进行培养后提取质粒,将质粒酶切和 PCR 验证后送至公司进行测序。

1.2.4 生物信息学分析 根据测序得到 *IbTPS7a* 基因序列,用 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)和 DNAMAN 进行基因及蛋白同源序列比对;使用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)对 *IbTPS7a* 蛋白质理化性质进行预测;进化树使用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建,蛋白质氨基酸进化距离计算采用 Poisson correction 模型,bootstrap 自检重复 1 000 次;信号肽使用 Signal IP 4.1 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)进行预测;跨膜结构分析使用 TMPred(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html);亚细胞定位使用 Wolf psort (<http://www.genscript.com/wolf-psort.html>)。

1.2.5 原核表达及非生物胁迫耐受性分析 将成功构建的 pET32-*IbTPS* 质粒转化 *E. coli* BL21(DE3)菌株,使用含有氨苄青霉素(Ampicillin,50 $\mu\text{g/mL}$)抗性平板筛选,挑取单菌落至 2 mL 的液体 LB 中过夜培养,取 500 μL 菌液加入 50 mL 液体 LB 中, 37°C 培养至 $A_{600\text{nm}}$ 为 0.4~0.6 时加入 IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactoside,终浓度为 1 mmol/L),将 50 mL 菌液放置于 18°C 培养箱中诱导表达 16 h,SDS-PAGE 电泳检测 *IbTPS7a* 蛋白表达效果。

挑取含有 pET32-*IbTPS* 质粒的阳性克隆菌落于含 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp 的 2 μL LB 液体培养基中 37°C 震荡过夜培养,取 100 μL 将其接入 10 mL 液体 LB(含 50 $\mu\text{g/mL}$ Amp)中当 $A_{600\text{nm}}$ 为 0.6 时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L, 18°C 诱导培养 4 h。按 1%比例,取 500 μL 此培养物分别移入 50 mL 含 0.6 mol/L NaCl、0.8 mol/L NaCl、质量分数 20% PEG6000 和 30% PEG6000 的液体 LB 培养基(IPTG 终浓度为 1 mmol/L)中,在 37°C 培养箱中持续震荡培养 3 d,每间隔 4 h 取样并测定其 $A_{600\text{nm}}$ 值,绘制生长曲线,实验均重复 3 次,含空载体的对照菌株按照相同的方法绘制生长曲线。

1.2.6 酿酒酵母转化及非生物胁迫耐受性分析 利用醋酸锂法将 pYES2-IbTPS 和 pYES2 质粒分别转化 *S. cerevisiae* INVSc1, 将两种菌落接种至液体培养基中,使用酵母基因组提取试剂盒提取含有质粒的酿酒酵母总 DNA, 用引物 TPS-yF 和 TPS-yR 以提取得到的 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 检测成功转化质粒的菌株,鉴定正确的菌液划线固体平板保存至 4 ℃冰箱中短暂保存。

分别挑取含有 pYES2 空载体和 pYES2-IbTPS 的单菌落接种于 10 mL SD-URA 液体培养基中,30 ℃振荡培养 24 h,测定 $A_{600\text{nm}}$ 值,将菌液转接至含有半乳糖(20 g/L)的诱导培养基中,使初始 $A_{600\text{nm}}$ 值均为 0.4,30 ℃诱导表达 30 h,将最终菌液 $A_{600\text{nm}}$ 值调为一致。取 1 mL 诱导的酵母菌液,离心后去上清

液,菌体分别悬浮于 1 mL 的 5 mol/L NaCl、4 mol/L 山梨醇和 PBS 溶液(pH 7.4),置于 4 ℃胁迫处理 24 h,稀释 1 000 倍,取 50 μL 涂布于不含半乳糖的 SD-URA 固体平板上,放至 30 ℃培养箱中培养,通过平板计数计算酿酒酵母细胞的生存率。

1.2.7 数字表达谱分析 利用 Illumina Pipeline 软件获取甘薯的嫩叶、成熟叶片、茎、须根、初始块根、膨大块根和收获块根等 7 个不同组织原始的 21 bp 的 DGE 标签,Bowtie 定位有关 IbTPS7a 基因完整 CDS 的 clean tag (仅允许一个碱基错配)。使用 edgeR package 程序对 RNA 的组成和不同的测序库规模进行误差评估,对获得的基因的表达式进行标准化,从而获得准确的 IbTPS7a 基因的表达式^[13]。

表 1 甘薯的 TPS 基因家族
Table 1 TPS family genes in *Ipomoea batatas*

基因	ORF/bp	氨基酸个数	亚家族	N-terminal	亚细胞定位	相对分子质量	等电点 (pI)	功能域
IbTPS1	2 805	934	I	MPGNKYNG	Chloroplast	105×10^3	6.85	GT1_TPS, Trehalose_PPase
IbTPS5	2 592	863	II	MVSRYSYN	Cytoplasmic	97.3×10^3	5.58	GT1_TPS, Trehalose_PPase
IbTPS6	2 580	859	II	KRRPDNEG	Cytoplasmic	97.4×10^3	5.7	GT1_TPS, Trehalose_PPase
IbTPS7a	2 568	855	II	MMSKSYTN	Chloroplast	96.4×10^3	5.58	GT1_TPS, Trehalose_PPase
IbTPS7b	2 580	859	II	MMSRSYTN	Cytoplasmic	97.5×10^3	5.46	GT1_TPS, Trehalose_PPase
IbTPS9	2 568	855	II	MASISSAN	Nuclear	96.7×10^3	5.98	GT1_TPS, Trehalose_PPase
IbTPS11	2 601	866	II	MLSRSCFN	Cytoplasmic	97.5×10^3	5.65	GT1_TPS, Trehalose_PPase

2 结果

2.1 甘薯 TPS 基因家族挖掘及分析

为了挖掘甘薯的 TPS 基因家族,作者根据拟南芥和水稻的 TPS 家族核酸及蛋白序列对甘薯转录组数据库分别进行 BlastN 和 BlastP,将比对得到的 contig 序列翻译得到的 TPS 蛋白进行序列和功能单元分析,共筛选得到 7 个全长 IbTPS 基因(如表 1 所示),其中有两个 IbTPS 蛋白序列经比对发现其同源性达到 75 %,且这两个 IbTPS 蛋白与其它物种的 TPS7 蛋白序列同源性最高,因此分别被命名为

IbTPS7a 和 IbTPS7b。生物信息学分析发现甘薯 TPS 蛋白都具有 TPS 蛋白所含有的 N 端 GT1_TPS 保守区域及 C 端 Trehalose_PPase 保守区域。信号肽分析结果表明 7 个甘薯 TPS 蛋白都没有信号肽,亚细胞定位分析发现 IbTPS1 和 IbTPS7a 最有可能位于叶绿体中,IbTPS5、IbTPS6、IbTPS7b 和 IbTPS11 可能位于细胞质中,而 IbTPS9 可能位于细胞核中,这表明甘薯不同的 IbTPS 蛋白在胞内分布区域及功能可能有所不同。利用已知的拟南芥 11 个 TPS 蛋白与甘薯 7 个 TPS 蛋白进行进化树分析,结果发现与拟南芥 TPS 蛋白家族类似,甘薯的 TPS 蛋白也可以分

为两个亚家族,其中 IbTPS1 属于 I 类家族,其余 IbTPS 蛋白属于 II 类家族(如图 1 所示)。

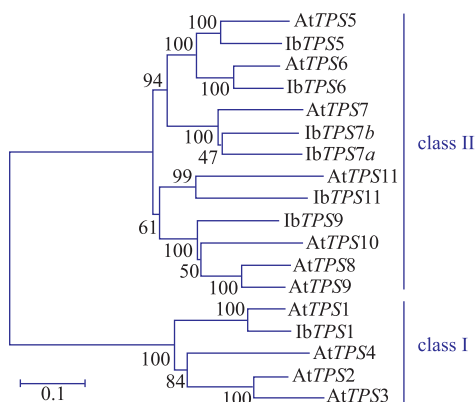
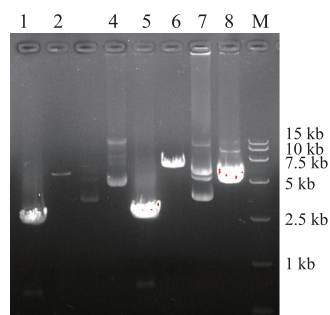


图 1 甘薯和拟南芥中 TPS 蛋白家族进化树分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of the TPS family in *Arabidopsis* and *Ipomoea batatas*

2.2 IbTPS7a 基因克隆及表达载体构建

以提取得到的徐薯 18 总 RNA 为模板,使用通用引物 oligo (dT)15 进行反转录得到 cDNA,再以 cDNA 为模板使用 TPS-32sF 和 TPS-32sR 进行 PCR,以 pET32a(+)质粒为模板使用 PET_TPS-F 和 PET_TPS-R 进行扩增,电泳检测在约 2 600 bp 左右和 5 900 bp 左右各有一明亮条带(图 2),与之前预期的扩增的 IbTPS7a 基因大小和 pET32a(+)质粒大小一致;使用 SLIC 法构建 pET32-TPS 质粒,以测序正确的 pET32-TPS 质粒为模板,使用 TPS-yF 和 TPS-yR 进行 PCR 扩增,在 2 600 bp 左右有一明亮条带,将 PCR 片段与 pYES2 载体分别双酶切后连接转化,得到 pYES2-IbTPS 质粒。



M: DL15000 DNA marker;1:IbTPS7a 基因原核表达 PCR 产物;2:pET32a (+) 载体 PCR 产物;3:pET32a (+) 质粒;4:pET32-TPS 质粒;5:IbTPS7a 基因双酶切产物;6:pYES2 质粒双酶切产物;7:pYES2 质粒;8:pYES2-IbTPS 质粒

图 2 IbTPS7a 基因 PCR 产物及载体构建

Fig. 2 Agarose electrophoresis analysis and expression vector construction of IbTPS7a

2.3 IbTPS7a 生物信息学分析

生物信息学分析结果显示,IbTPS7a 基因长度为 2 568 bp,其翻译的蛋白长度为 855 aa,IbTPS7a 蛋白分子式为 $C_{4310}H_{6710}N_{1158}O_{1277}S_{40}$,蛋白相对分子质量为 94.46×10^3 ,理论等电点 5.58,脂肪系数为 87.22,亲水性值为 -0.230,因此 IbTPS7a 是一个亲水性蛋白;信号肽预测分析发现 IbTPS7a 没有明显的信号肽,可见 IbTPS7a 是一个胞内蛋白,主要在细胞内发生作用,跨膜结构分析发现 IbTPS7a 具有两个明显的由外到内跨膜结构区域:474-491 和 790-812;通过亚细胞定位软件 Wolf psort 对 IbTPS7a 蛋白在甘薯细胞内的位置进行了预测,结果发现 K 最近邻(k-Nearest Neighbor,KNN)值为 14,其中 7 个位于叶绿体中,5 个位于细胞核中,2 个位于液泡中,即 IbTPS7a 定位可能性为:叶绿体>细胞核>液泡。

2.4 IbTPS7a 蛋白进化树分析

使用 DNAMAN 软件将 10 种其它植物的 TPS 蛋白与甘薯 IbTPS7a 蛋白进行序列比对,发现它们同源性都在 82 % 以上,其中 IbTPS7a 与 *Nicotiana sylvestris* 和 *Solanum tuberosum* 蛋白同源性最高为 86.7%,与 *Eucalyptus grandis* 的 TPS7 蛋白同源性最低为 82%(如图 3 所示)。将这 11 条蛋白序列首先进行 MEGA 5.0 软件进行 Clustal W 比对,然后将比对后的蛋白序列采用 Neighbor-joining 法构建系统进化树,Bootstrap 自检 1 000 次,甘薯 IbTPS7a 蛋白与 *Nicotiana sylvestris* 和 *Solanum tuberosum* 的 TPS7 蛋白亲缘关系最近,该结果与同源比对结果一致。

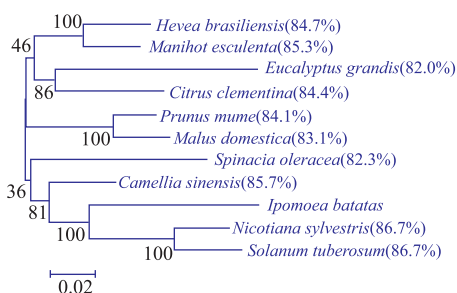


图 3 IbTPS7a 蛋白进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of IbTPS7a protein

2.5 含 IbTPS7a 基因的大肠杆菌 BL21 重组子抗逆境胁迫分析

为了验证 IbTPS7a 基因在原核细胞中的功能,将 pET32-IbTPS 质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 并使用 IPTG 进行诱导表达,分别使用 0.6、0.8 mol/L

NaCl、质量分数 20% PEG6000 和 30 % PEG6000 对 IbTPS7a 基因过表达菌株进行高盐及干旱模拟胁迫,并对生长曲线进行测定。如图 4 显示,在无胁迫的 LB 培养基中含有空载体的对照菌株和转 IbTPS7a 基因菌株的生长曲线几乎没有差异(图 4);在 0.6 mol/L NaCl 胁迫处理下,转 IbTPS7a 基因菌株(0 h)相比对照菌株(4 h)更早进入指数生长期,但是两者进入稳定期的时间差异不大,转基因菌株

生长效果较优于对照菌株;在 0.8 mol/L NaCl 胁迫处理下,两种菌株的生长都受到抑制,但转基因菌株的生长明显优于对照菌株;在 20% PEG6000 胁迫处理下,两种菌株的生长效果差异并不明显;在 30% PEG6000 胁迫处理下,对照菌株生长困难,转基因菌株明显优于对照菌株,但是相比 20% PEG6000 胁迫转基因菌株进入指数生长期的时间也明显延长。

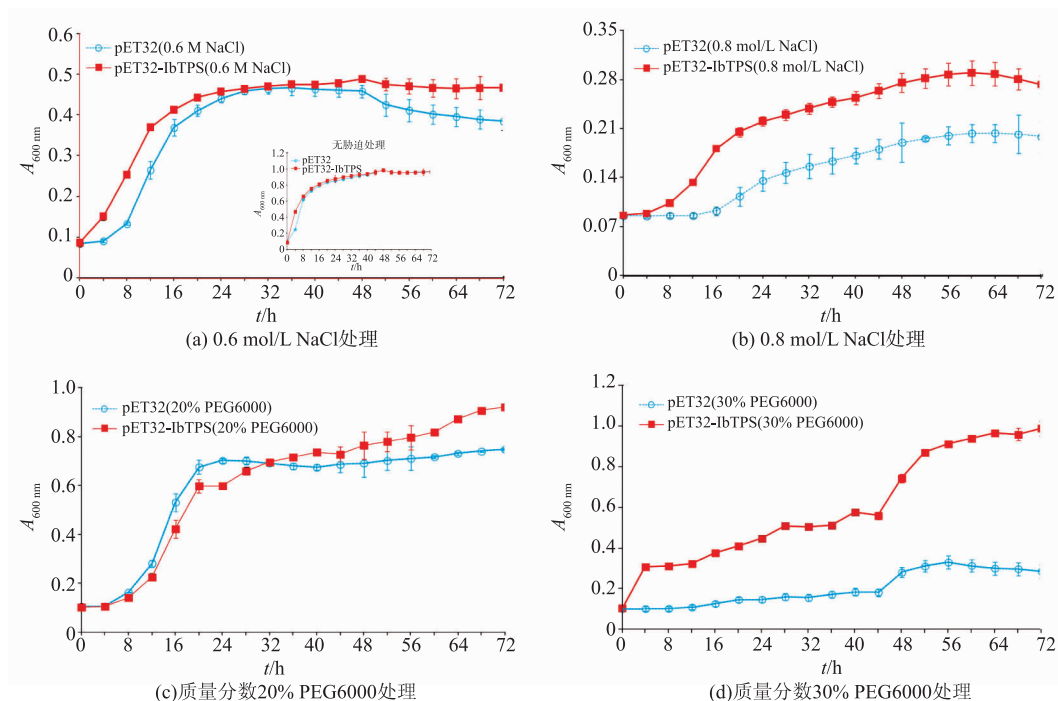


图 4 重组大肠杆菌 BL21/IbTPS7a 在盐胁迫及干旱胁迫培养基中的生长曲线
Fig. 4 Growth curves of IbTPS7a in *E. coli* BL21 under salt and drought stress

2.6 转基因酵母抗逆境胁迫分析

如图 5 所示,在无胁迫压力下,含有 pYES2 空载体的酵母菌株和转 IbTPS7a 的菌株涂平板后的菌落数基本一致,这表明 IbTPS7a 基因的过表达对酿酒酵母的正常生长没有明显的影响;两种菌株分别在 5 mol/L NaCl 和 4 mol/L 山梨醇进行胁迫处理后,转 IbTPS7a 基因的酿酒酵母菌株的存活率明显高于对照菌株,因此实验结果表明 IbTPS7a 基因的过表达可以有效提升酿酒酵母的生存率,降低外界环境改变对细胞的伤害。

2.7 IbTPS7a 基因数字表达谱分析

利用数字表达谱对甘薯 IbTPS7a 基因的组织特异性表达进行分析,结果(如图 6 所示)发现,甘薯

在多个组织中的表达量相对较低,其中在茎(ST)中的表达量最高为 15.35 TPM,其次是嫩叶(YL)为 12.23 TPM,在根部组织的表达量都比较低,其中在须根(FR)中的表达量最低为 0.84 TPM。

3 讨论

TPS 基因可通过多种信号传导途径参与植物的代谢、生长发育及抗逆作用,不同物种的 TPS 基因对胁迫条件的反应机制存在差异,TPS 基因在不同的组织中的表达量也不尽相同^[14-15]。甘薯是一种重要的粮食作物,其栽培品种是六倍体,基因组庞大且结构复杂,由于甘薯基因组测序尚未完成,现在对于甘薯遗传资源的挖掘多通过转录组数据来实

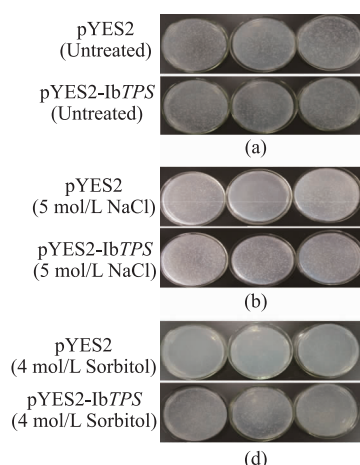
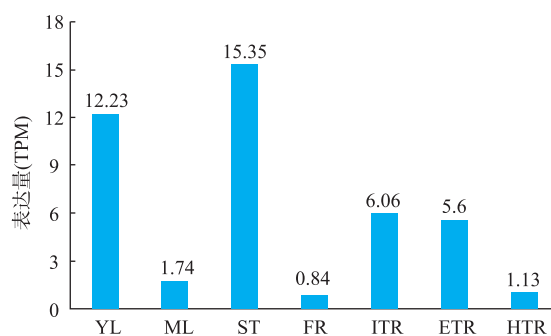


图5 重组酿酒酵母菌在盐胁迫及干旱胁迫条件下的生长
Fig. 5 Growth of *IbTPS7a* in yeast under salt and drought stresses



YL,嫩叶;ML,成熟叶;ST,茎;FR,须根;ITR,初始块根;ETR,膨大块根;HTR,收获块根

图6 *IbTPS7a* 基因在甘薯不同组织样品中的表达量
Fig. 6 Expression level of *IbTPS7a* in different tissues of *Ipomoea batatas* by digital gene expression profiling (TPM means the transcript per million)

现^[16-17]。在已完成基因组测序的高等植物中都发现有 *TPS* 基因家族,而目前尚没有对甘薯 *TPS* 基因家族研究的报道。

4 结 语

作者使用生物信息学方法对甘薯转录组数据库进行比对分析,首次鉴定得到7个具有完整 ORF 结构的甘薯 *TPS* 基因家族成员,其中有两个 *TPS* 基

因经鉴定为 *TPS7* 基因的两个亚型即 *IbTPS7a* 和 *IbTPS7b*, 本研究对于 *TPS* 基因家族的挖掘基于转录组数据,没有找到全部的甘薯 *TPS* 基因,显示了数据不足的缺憾,但是也为未来甘薯 *TPS* 基因的研究提供了重要的数据。将甘薯的 *TPS* 基因家族与其拟南芥的 *TPS* 基因进行了进化树分析,结果发现与拟南芥类似,甘薯 *TPS* 基因家族也可以被分为两个亚家族,其中 *IbTPS1* 归属于 class I,其余的 *IbTPS* 基因属于 class II。拟南芥的 *TPS1* 被证明具有 *TPS* 活力,但 class II 的 *TPS* 尚未被证明具有活力^[18],为了研究甘薯 class II 中 *TPS* 基因的功能,作者利用 RT-PCR 方法成功克隆得到 class II 的 *IbTPS7a* 基因,并对其在大肠杆菌和酿酒酵母中的抗逆作用进行的研究,结果发现转 *IbTPS7a* 基因后诱导过表达的大肠杆菌菌株相比对照菌株在高盐和干旱胁迫下生长能力明显提升,在酿酒酵母中过表达 *IbTPS7a* 基因也可以有效增强真核细胞在高盐和干旱胁迫下生存率也显著提高,这说明过表达甘薯 *IbTPS7a* 有助于提升细胞的耐盐和耐干旱作用,增强细胞适应外界环境变化及抵御胁迫的能力。细菌中海藻糖合成除了 TreS 和 TreY/Z 途径外还可以通过 TPP/TPS 途径,酵母中也具有 TPP/TPS 途径,研究发现外源 *TPS* 基因的导入可以很好的修复相关缺陷菌株的海藻糖合成能力,因此甘薯 *TPS* 基因的过表达可能有助于促进大肠杆菌和酵母胞内海藻糖的合成,从而保护细胞免受环境胁迫造成的伤害^[19-20]。大豆和拟南芥的 *TPS* 基因在根和根瘤等组织中的表达量较高^[21],而作者发现 *IbTPS7a* 基因在茎和嫩叶中的表达量较高,但是在多个根部组织中的表达量较低,这可能是由于甘薯 *IbTPS7a* 基因与其它植物中的 *TPS* 基因在功能上有所不同。由于海藻糖对生物体优良的保护性能,其在食品、保健、医疗等行业应用越来越普遍^[22],因此本研究不仅为进一步研究甘薯 *TPS* 基因家族及 *IbTPS7a* 的功能打下了基础,也为拓展甘薯海藻糖合成酶在未来的应用提供了理论依据。

参考文献:

- [1] KIM H S, PARK S C, JI C Y, et al. Molecular characterization of biotic and abiotic stress-responsive MAP kinase genes, *IbMPK3* and *IbMPK6*, in sweet potato[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 108: 37-48.
- [2] ELBEIN A D, PAN Y, PASTUSZAK I, et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule [J]. *Glycobiology*, 2003, 13

- (4):17R-27R.
- [3] HUANG He, LI Zhuofu, WANG Xiaonan, et al. The expression analysis of tps genes in winter wheat and chinese spring with different cold resistance under cold acclimation and freezing conditions[J]. **Journal of Nuclear Agricultural Sciences**, 2003, 13 (4):17R-27R. (in Chinese)
 - [4] FERNANDEZ O, BETHENCOURT L, QUERO A, et al. Trehalose and plant stress responses [J]. **Trends in Plant Science**, 2010, 15(7):409-417.
 - [5] AVONCE N, MENDOZA V A, MORETT E, et al. Insights on the evolution of trehalose biosynthesis[J]. **BMC Evolutionary Biology**, 2006, 6(1):1-15.
 - [6] PAUL M J, PRIMAVESI LF, JHURREEA D, et al. Trehalose metabolism and aignaling [J]. **Annual Review of Plant Biology**, 2008, 59(1):417-441.
 - [7] LIU Jiao, JIANG Dagang. Research advance on trehalose synthesis related genes in crops [J]. **Genomics and Applied Biology**, 2008, 59(1):417-441. (in Chinese)
 - [8] DAI Qiwei, NIU Fuxiang, SUN Jian, et al. Changes analysis of sweet potato production and consumption structure in China[J]. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2016, 18(3):201-209. (in Chinese)
 - [9] VANDESTEENE, MATTHEW, RAMON, et al. A single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in *Arabidopsis*[J]. **Molecular Plant**, 2010, 3(2):406-419.
 - [10] YANG H L, LIU Y J, WANG C L, et al. Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice[J]. **Plos One**, 2012, 7(8):e42438.
 - [11] ZANG B, LI H, LI W, et al. Analysis of trehalose-6-phosphatesynthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice[J]. **Plant Molecular Biology**, 2011, 76(6):507-522.
 - [12] TAO X, GU YH, WANG HY, et al. Digital gene expression analysis based on integrated de novo transcriptome assembly of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam][J]. **Plos One**, 2012, 7(7):e36234.
 - [13] YONG Bin, HE Bing, XU Pan, et al. Cloning, organ-specific expression pattern and sequence analysis of HXK gene in Sweet potato[J]. **Journal of Sichuan University**, 2014, (2):378-384. (in Chinese)
 - [14] IORDACHESCU M, IMAI R. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses [J]. **Journal of Integrative Plant Biology**, 2008, 50(10):1223-1229.
 - [15] GOMEZ LD, BAUD S, GILDAY A, et al. Delayed embryo development in the *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation [J]. **Plant Journal**, 2006, 46(1):69-84.
 - [16] YAN L, LAI X, LI X, et al. Analyses of the complete genome and gene expression of chloroplast of sweet potato [*Ipomoea batata*] [J]. **Plos One**, 2015, 10(4).
 - [17] MA P, BIAN X, JIA Z, et al. De novo sequencing and comprehensive analysis of the mutant transcriptome from purple sweet potato (*Ipomoea batatas* L.)[J]. **Gene**, 2016, 575(2 Pt 3):641-649.
 - [18] RAMON M, DE SMET I V E, VANDESTEENE L, et al. Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the Class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana* [J]. **Plant, Cell & Environment**, 2009, 32(8):1015-1032.
 - [19] ARGUELLES J C. Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis [J]. **Archives of Microbiology**, 2000, 174(4):217-224.
 - [20] GONG Tao, LIU Ddehai, WANG Jiwen, et al. Advances in trehalose biosynthesis pathways and application of molecular biology technique[J]. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, 2016, 32(14):62-67. (in Chinese)
 - [21] XIE Ling, WANG Zhangxun, HUANG Bo. Genome-wide identification classification and expression of TPS family genes in soybean[J]. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, 2014, 36(2):160-167. (in Chinese)
 - [22] ZHANG Yue, SU Lingqia, WU Jing. Optimization of trehalose synthase fermentation conditions from recombinant *Escherichia coli*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2016, 35(9):913-919. (in Chinese)