

## 研究报告

### Research Report

# 花生脱落酸 8'-羟化酶基因 *AhCYP707A4* 的克隆及表达分析

康苗苗<sup>1</sup> 张冲<sup>2</sup> 庄瑞蓉<sup>3</sup> 李毓<sup>1\*</sup> 陈华<sup>4\*</sup>

1 福建农林大学作物科学学院, 福州, 350002; 2 福建农林大学资源与环境学院, 福州, 350002; 3 福建农林大学生命科学学院, 福州, 350002; 4 福建农林大学植物保护学院, 福州, 350002

\* 通讯作者, YL0934@163.com; hchen2013@163.com

**摘要** 脱落酸(ABA)在植物生长发育和逆境胁迫响应等过程中具有重要作用。脱落酸 8'-羟化酶是 ABA 分解及其代谢的关键酶,可降解内源 ABA 水平。本研究利用 Reverse Transcription PCR (RT-PCR)的方法从花生品种闽花 6 号叶片中克隆了脱落酸 8'-羟化酶基因 *AhCYP707A4* 的开放阅读框(Open Reading Frame, ORF)。*AhCYP707A4* 基因 ORF 长 1 446 base pairs (bp), 编码 481 个氨基酸。生物信息学分析表明,该蛋白 N 端有一个长 32 个氨基酸残基的信号肽序列,其后为 P450 蛋白保守区,符合典型的 P450 蛋白的结构特征。氨基酸多序列比对显示 *AhCYP707A4* 具有较高的保守序列。实时荧光定量 PCR 分析表明,该基因在不同发育时期的果皮、种皮和胚中均有表达。在果皮和种皮中,该基因在花生果针入土后 40 d (days after pegging, DAP)表达量最高,而胚中在 60 d 中表达量达到最高。*AhCYP707A4* 基因可能在花生发育过程起重要的调控作用,是调控花生种子发育特别是胚发育的重要候选基因。

**关键词** 花生, 脱落酸 8'-羟化酶基因, 基因克隆, 表达分析, 胚发育

## Cloning and Expression Analysis of *AhCYP707A4* Gene from Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

Kang Miaomiao<sup>1</sup> Zhang Chong<sup>2</sup> Zhuang Ruirong<sup>3</sup> Li Yu<sup>1\*</sup> Chen Hua<sup>4\*</sup>

1 College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002; 2 College of Resource and Environmental Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002; 3 College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002; 4 College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002

\* Corresponding authors, YL0934@163.com; hchen2013@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.014.000812

**Abstract** Abscisic acid (ABA) plays important roles in plant growth and development as well as in stress responses. 8'-hydroxylase is the key enzyme for ABA catabolism and it can degrade endogenous ABA levels in plants. In this study, we used RT-PCR method to obtain the full-length of *AhCYP707A4* open reading frame (ORF) from Minhua 6 peanut leaf. The length of *AhCYP707A4* ORF was 1 446 bp encoding 481 predicted amino acids. Bioinformatics analysis showed that *AhCYP707A4* has a signal peptide sequence with 32 amino acid residues at the N side, followed by P450 protein conservative area. This features conform to the structure characteristics of the typical P450 proteins. Multiple sequence alignment of CYP707A4 proteins revealed that the *AhCYP707A4* has a high conservative in sequence. Real-time PCR analysis showed that *AhCYP707A4* gene can express in the pericarp, testa and embryo at different stages. It has the highest expression level in pericarp and testa at 40 DAP. However, the relative expression level in embryo reached the highest at 60 DAP. *AhCYP707A4* may play an important regulatory role in peanut development process and is an candidate gene related to peanut seed development especially embryo development.

**Keywords** Peanut, *AhCYP707A4* gene, Gene cloning, Expression analysis, Embryo development

基金项目 本研究由国家“863”计划项目(2013AA102602-5)资助

花生(*Arachis hypogaea* L.)是世界范围内广泛种植的油料和经济作物,具有重要的营养价值和药用价值。胚发育是影响花生产量和品质的关键。研究发现,脱落酸(ABA)对某些植物体细胞胚特异基因的表达起着重要的调控作用(李明等, 2011),它对于植物的生长,气孔关闭,侧根形成以及种子休眠和萌发意义重大(Melcher et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Arc et al., 2013; Zheng et al., 2015; Yu et al., 2015)。外源或是内源 ABA 含量的增高均可抑制植物的正常生长(Tung et al., 2008)。

植物组织细胞中 ABA 的生物活性主要受两方面的调节。一是 ABA 的生物合成;二是 ABA 的分解代谢(Sawada et al., 2008)。活性 ABA 的最终浓度和效果是由二者的动态平衡决定的(Liu et al., 2014)。其中 ABA 的分解代谢主要由两条途径完成,分别是氧化失活和结合失活,而 ABA 氧化失活是高等植物内源 ABA 分解代谢的主要方式(Mizutani and Todoroki, 2006; Seki et al., 2007; Arve et al., 2015)。ABA 氧化失活主要通过羟基化途径,其中 8'-甲基羟基化途径是高等植物 ABA 分解代谢的主要途径(Kushiro et al., 2004; Yang and Zeevaart, 2006; Liu et al., 2014)。

ABA 8'-羟化酶属于细胞色素氧化酶 P450,是 ABA 氧化分解的关键酶,可以负调节 ABA 的积累(Zheng et al., 2012)。Ren 等发现甜樱桃(*Prunus avium* L.) *CYP707As* 和 *NCED1* 在胁迫和果实成熟过程中维持着内源 ABA 的动态平衡(Ren et al., 2010)。Yang 和 Zeevaart 将菜豆(*Pharsalus vulgarism* L.)的四种 *CYP707As* 分别遗传转化烟草(Nicotine Sylvester's),转基因烟草都有不同程度的萎蔫,花、果跟野生型烟草相比明显变小,并且发芽率显著降低(Yang and Zeevaart, 2006)。Matakiadis 等(2009)发现硝酸盐诱导拟南芥 *CYP707A2* 基因表达使内源脱落酸含量降低,种子的休眠期缩短。*SlCYP707A2* 是 ABA 合成和分解代谢的关键基因,通过其上调和下调来调控番茄果实的成熟(Ji et al., 2014)。Liu 等发现 *AhCYP707A1* 和 *AhCYP707A2* 在应对渗透胁迫时,对 ABA 的分解代谢起着重要作用(Liu et al., 2014)。这些研究说明 *CYP707A* 是一个调控种子发育和萌发的重要基因。

为了研究 *AhCYP707A4* 基因在花生生长发育过程特别是种子发育过程中的功能,本研究利用 RT-PCR 克隆了花生 *AhCYP707A4* 基因的开放阅读框(ORF),并进行了生物信息学分析,预测该基因功能。利用 qRT-PCR 技术分析了该基因在花生不同发

育时期果皮、种皮和胚中的表达特性,旨在为深入研究该基因调控花生生长发育特别是种子发育的分子机理奠定理论基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 花生 *AhCYP707A4* 基因 ORF 的克隆与序列分析

采用本实验室改良的 CTAB 法(陈华等, 2013)提取闽花 6 号花生叶片的总 RNA(图 1A),以总 RNA 为模板进行逆转录得到 cDNA 后,利用特异性引物 *AhCYP-ORF-F* 和 *AhCYP-ORF-R* 扩增出约为 1500bp 的目的片段(图 1B)。经序列分析,该片段包含一个 1446 bp 的 ORF,编码一个含 481 个氨基酸的蛋白质(图 2)。

### 1.2 花生 *AhCYP707A4* 基因编码蛋白质特征分析

ProtParam 软件分析表明 *AhCYP707A4* 基因编码的蛋白质分子式为  $C_{2519}H_{3919}N_{667}O_{687}S_{20}$ ,相对分子质量(MW)为 55,181.0,氨基酸数 481,等电点为 9.25,负电荷残基(Asp+Glu)数为 47,正电荷残基(Arg+Lys)数为 58,脂溶系数(AI)为 89.17,平均疏水性(GRAVY)为 -0.207,不稳定指数(II) 37.89,显示该蛋白较为稳定(稳定蛋白标准在 40 左右)。采用 SOPMA 软件预测 *AhCYP707A4* 蛋白的二级结构。 $\alpha$ -螺旋(Alpha helix, Hh)和无规卷曲(Random coil, Cc)是其主要的二级结构。其中,有 210 个氨基酸可能形成  $\alpha$ -螺旋,占 43.66%,148 个氨基酸可能形成无规卷曲,占 30.77%,81 个氨基酸可能形成延伸链(Extended strand, Ee),占 16.84%,42 个氨基酸可能形成  $\beta$ -转角(Beta turn, Tt),所占的比例为 8.73%,不含其他二级结构。用 SWISS-MODEL 对花生 *AhCYP707A* 编码蛋白的三级结构进行了建模预测,表明该基因编码蛋白的三级结果与其二级结构预测结果相符(图 3)。

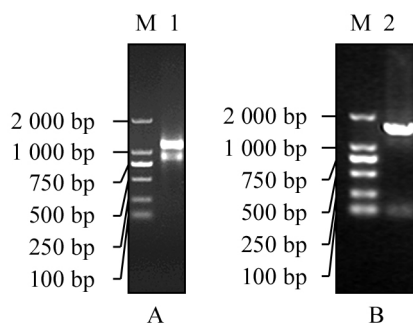


图 1 花生叶片总 RNA 和基因 ORF 电泳

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of total RNA in peanut leaf and ORF-production

```

1  atggagattagtgcttctatatctaccttattattattactatcatggatgcttctcctcttgttcttattcctcttctcaaatctt
   M E I S A S I S T L L L L L S W M C F L L L F L F L F S N L
91  ctaacaagaacgagacaaagtcgaaaacgtagctagtaaactaagcttccacctggctcaatgggttgcccttacgttggagagact
   L T K K R D K V E N V A S K P K L P P G S M G W P Y V G E T
181  cttcagctttattcacaggaccctaacatcttcttggcgtccaaacagaaaagatattggggagatttttaagacacacatactaggtgt
   L Q L Y S Q D P N I F F A S K Q K R Y G E I F K T H I L G C
271  ccatgctgtagtctggcgagtcgccgaggtgctgctgtttagtgacacacgcgactcgttcaagccaacatacccaaaagagcaaa
   P C V M L A S P E G A R F V L V T H A H S F K P T Y P K S K
361  gagaagctcataggtccttctgctattgttctccaccaaggtcactaccatacccttataaggaagcttggcagaactccctctccccg
   E K L I G P S A L F F H Q G H Y H T L I R K L V Q N S L S P
451  gacaccatccgagactcatcccgacatcgagaccgaggttgttctccttggaaatcctgggtctccgagacgctcgtaacagcc
   D T I R R L I P D I E T E V V S S L E S W V S A G D V V N A
541  ttccaagaatgaaaaagtctcttcaacggttggaaatcctcctcagtggttggtaacttggaaaggaattatagagatcggttaaagag
   F Q E M K K F S F N V G I L S V F G N L E G N Y R D R L K E
631  aactacagcatagttgagaaggttacaattcttcccaacaatgattcgtggaacttcatactccaagcactcttggcttaggaagagg
   N Y S I V E K G Y N S F P T M I R G T S Y S K A L L A R K R
721  atcaggagataataagtgaaataattagcaagaggaagcagaaagattgatggagaaggatctattgggtcacatgttgaactacaga
   I R E I I S E I I S K R K E Q R L M E K D L L G H M L N Y R
811  gatgaaaaggggaaaacattaacggatgaacaaatagcagataacggtatttgggggttctggttggcgtcaggacacaacagcaagtgt
   D E K G K T L T D E Q I A D N V I G V L F A A Q D T T A S A
901  ctaacatggattctcaaatatcttcatgatgaccagaaacttcttgaagcaatcaaagcagagcagatggcggtatataagcaactgaa
   L T W I L K Y L H D D Q K L L E A I K A E Q M A V Y E A T E
991  caagggagatgccattgacatgggggtcaaacagaaatagccatttactcataggggtgatattggaaagcctaaggatggcaagcatc
   Q G K M P L T W G Q T R N M P F T H R V I L E S L R M A S I
1 081  atatcttttacatttagggaggctgtggtttagatgtagaataataaaggatattctcataccaaaagggttggaaaggaatgccactattcagg
   I S F T F R E A V V D V E Y K G Y L I P K G W K V M P L F R
1 171  aacatccataatccagaattccaccctctcctcacaattttgaccctcaagatttgagatggctccaaaacccaacacttcatg
   N I H H N P E F H P A P H N F D P S R F E M A P K P N T T F M
1 261  ccatttggcaacgagttcactcttgtccaggaatagacttgcacaaagttgaacatgctgattttaattcaccatttggctaccaaattt
   P F G N G V H S C P G N E L A K L N M L I L I H H L V T K F
1 351  aggtgggaagttgttgaatcagaatggagttcaatatagccattccctgtcctcttcatggtctacctacaagatttgggagaaac
   R W E V V E N Q N G V Q Y S P F P V P L H G L P T R F W R N
1 441  gattag
      D *

```

图 2 花生 *AhCYP707A4* 基因 ORF 序列及其编码的氨基酸Figure 2 Nucleotide sequence of *AhCYP707A4* ORF and deduced amino acid

利用 NCBI 上的 CDD (Conserved Domain Database) 软件对 *AhCYP707A4* 蛋白进行保守结构域预测, 结果表明 *AhCYP707A4* 编码蛋白质 N 端有一个长 32 个氨基酸残基的信号肽序列, 其后为 P450 蛋白保守区, 符合典型的 p450 蛋白的结构特征。

### 1.3 *AhCYP707A* 蛋白序列比对与同源性分析

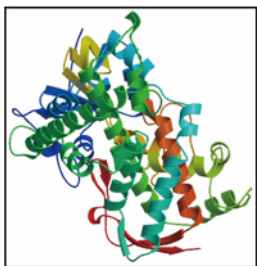
为深入分析花生 *AhCYP707A4* 编码蛋白质与拟南芥 P450 超家族蛋白序列之间的同源进化关系, 本

研究利用 MEGA6.0 软件对花生及拟南芥 *CYP707A* 和 *CYP706A* 氨基酸序列进行多序列比对分析。结果显示, *AhCYP707A4* 基因与拟南芥 *CYP707A4* 亲缘关系最近(图 4), 由此进一步证明该基因属于 *CYP707A4* 基因。

为了进一步分析 *AhCYP707A4* 基因的序列特征, 我们将花生 *AhCYP707A4* 与毛果杨 *PtCYP707A* (*Populus trichocarpa*, XP\_006384409.1)、可可 *TcCYP707A* (*Theobroma cacao*, XP\_007042427.1)、蒺藜苜蓿 *Mt-CYP707A* (*Medicago truncatula*, XP\_003607975.1)、拟南芥 *AtCYP707A* (*Arabidopsis thaliana*, AT3G19270) 的蛋白进行多元序列比较。结果显示, 细胞色素氧化酶 P450 保守域(图 5 黑色框)在不同物种保守性很高(图 5)。

### 1.4 花生 *AhCYP707A4* 基因的表达模式分析

为了研究 *AhCYP707A4* 基因在花生果实不同发育时期的表达模式, 我们利用 qRT-PCR 的方法分析

图 3 花生 *AhCYP707A4* 基因编码蛋白质的三级结构预测Figure 3 The predicted tertiary structure of *AhCYP707A4* protein

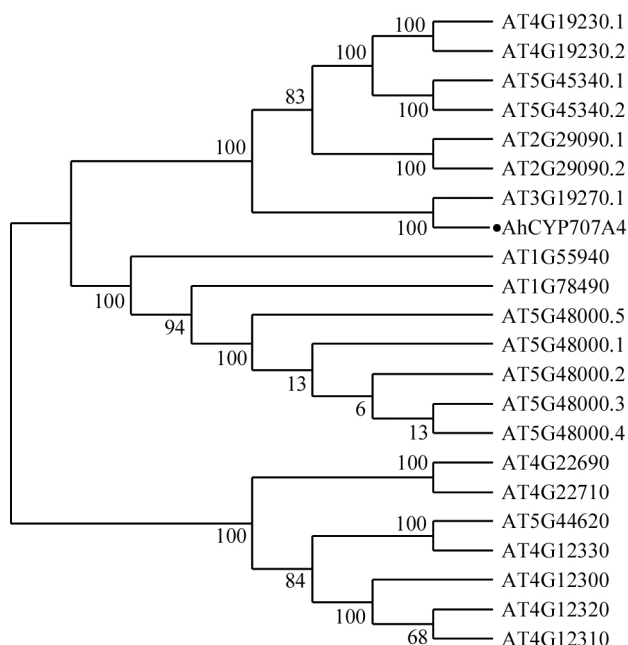


图4 花生 AhCYP707A4 与拟南芥 P450 超家族蛋白质氨基酸序列的同源性分析

注: AT4G19230.1: AtCYP707A1-1; AT4G19230.2: AtCYP707A1-2; AT2G29090.1: AtCYP707A2-1; AT2G29090.2: AtCYP707A2-2; AT5G45340.1: AtCYP707A3-1; AT5G45340.2: AtCYP707A3-2; AT3G19270.1: AtCYP707A4; AT4G22690: AtCYP706A1; AT4G22710: AtCYP706A2; AT5G44620: AtCYP706A3; AT4G12300:AtCYP706A4; AT4G12330: AtCYP706A5; AT4G12320: AtCYP706A6; AT4G12310: AtCYP706A7; AT4G22690: AtCYP706A1; AT4G22710: AtCYP706A2; AT5G44620: AtCYP706A3; AT4G12300: AtCYP706A4; AT4G12330: AtCYP706A5; AT4G12320: AtCYP706A6; AT4G12310: AtCYP706A7; AT1G55940: AtCYP708A1; AT5G48000.5: AtCYP708A2; AT1G78490: AtCYP708A3

Figure 4 Homology analysis of AhCYP707A4 and P450 superfamily proteins of *Arabidopsis thaliana*

Note: AT4G19230.1: AtCYP707A1-1; AT4G19230.2: AtCYP707A1-2; AT2G29090.1: AtCYP707A2-1; AT2G29090.2: AtCYP707A2-2; AT5G45340.1: AtCYP707A3-1; AT5G45340.2: AtCYP707A3-2; AT3G19270.1: AtCYP707A4; AT4G22690: AtCYP706A1; AT4G22710: AtCYP706A2; AT5G44620: AtCYP706A3; AT4G12300:AtCYP706A4; AT4G12330: AtCYP706A5; AT4G12320: AtCYP706A6; AT4G12310: AtCYP706A7; AT4G22690: AtCYP706A1; AT4G22710: AtCYP706A2; AT5G44620: AtCYP706A3; AT4G12300: AtCYP706A4; AT4G12330: AtCYP706A5; AT4G12320: AtCYP706A6; AT4G12310: AtCYP706A7; AT1G55940: AtCYP708A1; AT5G48000.5: AtCYP708A2; AT1G78490: AtCYP708A3

了该基因在花生果针入土后 10 d、20 d、30 d、40 d、50 d 和 60 d 的果皮、种皮和胚中的 mRNA 的相对表达量。图 6 显示,该基因在不同发育时期的花生果皮、

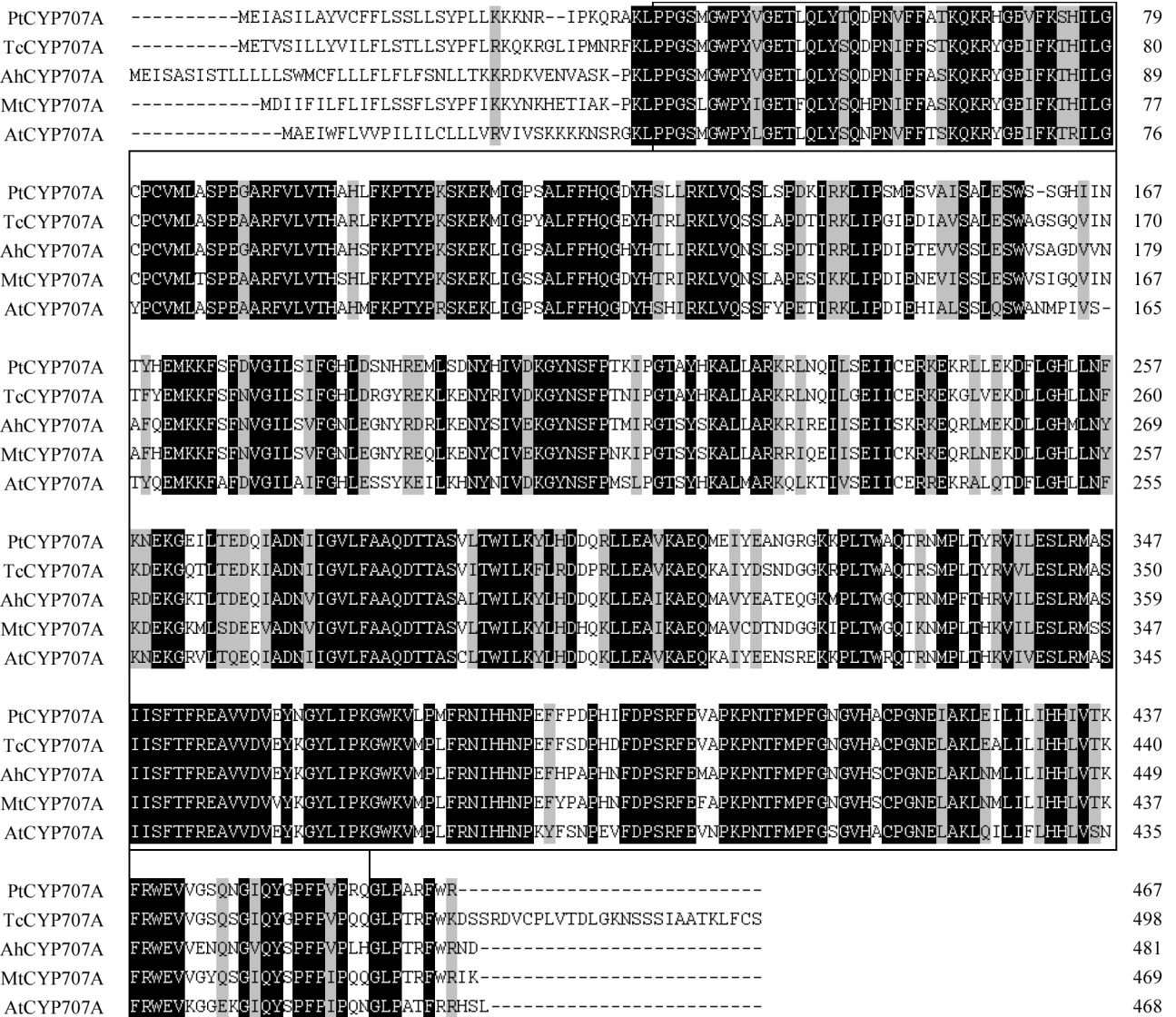
种皮和胚中均有表达,且不同发育时期差异较大。在花生果皮中,该基因的相对表达量随着果皮的发育持续增加,至果针入土 40 d 在果皮中的相对表达水平最高,之后随着果皮的发育表达量逐渐降低,至 60 d 时表达量降至最低水平(图 6A)。在种皮中的表达模式与果皮基本一致(图 6B)。相比果皮和种皮,该基因在胚中的相对表达情况与之不同。随着花生胚发育,该基因表达量持续增加,至花生果针入土 60 d 时,该基因在胚中的表达量达到最高,是 10 d 的 4 倍左右(图 6C)。由此推测,该基因在花生胚发育的整个过程都起着重要的作用,是调控花生种子发育特别是胚发育的关键基因。

## 2 讨论

脱落酸在植物生长发育和抗逆中发挥着重要的作用,参与调控植物生长发育的多个方面,如胚胎发育、种子休眠与萌发、气孔关闭、果实成熟等(Melcher et al., 2009; Nishimura et al., 2009; Arc et al., 2013; Zheng et al., 2015; Yu et al., 2015)。ABA 8'-羟化酶属于细胞色素氧化酶 P450,是 ABA 氧化分解的关键酶,可以负调节 ABA 的积累(Zheng et al., 2012)。CYP707A 基因编码 ABA 8'-羟化酶,可调控 ABA 水平,在植物的生长发育及逆境胁迫响应过程中发挥重要作用,这在拟南芥(Zhang et al., 2012)、小麦(Manmathan et al., 2013)、大豆(Zheng et al., 2012)、櫻桃(Li et al., 2015)等多种植物上都得到证实。因此,克隆花生 CYP707A 基因对深入研究该基因在调控花生种子发育中的功能具有重要作用。

本研究通过 RT-PCR 的方法从花生中成功分离出 AhCYP707A4 基因的开放阅读框,长度为 1 446 bp,编码 481 个氨基酸。利用生物信息学软件对 AhCYP707A4 基因所编码的蛋白质二级结构、三级结构以及蛋白保守域进行预测分析。与毛果杨、可可、蒺藜苜蓿和拟南芥等植物 CYP707A4 蛋白进行多元序列比较,同源性均在 96%以上,表明 CYP707A4 蛋白在物种之间是相对保守的,推测 AhCYP707A4 基因具有 8'-羟化酶的功能。

对花生果皮、种皮和胚不同发育时期中 AhCYP707A4 的表达研究表明,该基因在不同发育时期的花生果皮、种皮和胚中均有表达。其中,在果皮中,随着果皮的发育该基因的相对表达量持续增加,至果针入土 40 d 在果皮中的相对表达水平最高,60 d 时表达量降至最低水平。在种皮中的表达模式与果皮基本一致。值得注意的是,随着花生胚发育,该基

图 5 花生 *AhCYP707A4* 蛋白与其他物种 *CYP707A* 蛋白多重序列比对

注: PtCYP707A: 毛果杨 XP\_006384409.1; TcCYP707A: 可可 XP\_007042427.1; MtCYP707A: 蒺藜苜蓿 XP\_003607975.1; AtCYP707A: 拟南芥 AT3G19270

Figure 5 Multiple sequence alignment of *AhCYP707A4* protein sequence with that of other species

Note: PtCYP707A: *Populus trichocarpa*, XP\_006384409.1; TcCYP707A: *Theobroma cacao*, XP\_007042427.1; MtCYP707A: *Medicago truncatula*, XP\_003607975.1; AtCYP707A: *Arabidopsis thaliana*, AT3G19270

因表达量持续增加,至花生果针入土 60 d 时,该基因在胚中的表达量达到最高,是 10 d 的 4 倍左右。由此推测,该基因在花生胚发育的整个过程都起着重要的作用,是调控花生种子发育特别是胚发育的关键基因。

花生种子发育直接关系到产量和品质。挖掘花生种子发育的重要基因对了解花生种子发育的分子机理及其遗传改良具有重要的意义。目前,已报道的花生种子发育关键基因不多。本研究首次从闽花 6 号花生中获得了 *CYP707A4* 基因,并对该基因进行了生物信息学和表达特性研究,为其后通过构建植

物表达载体转化花生、研究其调控花生胚发育的分子机理奠定了理论基础。

### 3 材料与方法

#### 3.1 植物材料与试剂

花生品种闽花 6 号由福建农林大学油料作物研究所培育,于花生果针入土后 10 d、20 d、30 d、40 d、50 d 和 60 d 分别采集果皮、种皮和胚,立即投入液氮速冻, -80℃ 超低温冰箱保存备用。

实验所用试剂大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , PrimeScript 逆转

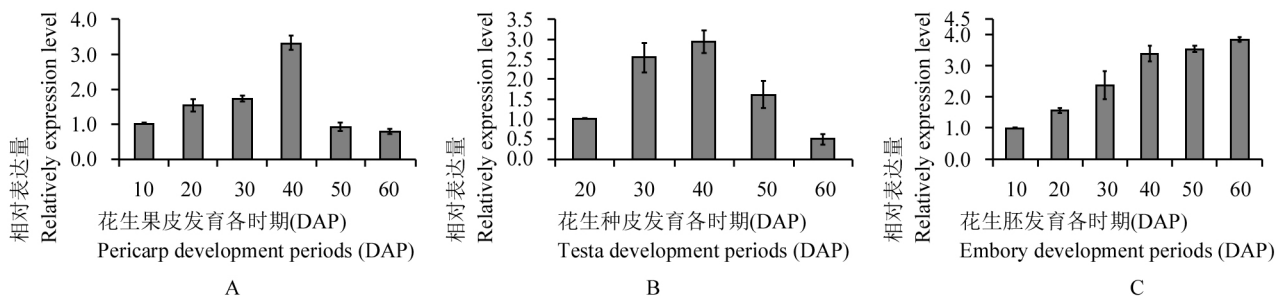


图 6 *AhCYP707A4* 在花生种子发育不同时期的相对表达量  
Figure 6 Relative expression levels of *AhCYP707A4* in different seed development stages

录酶, LA Taq 酶, pMD18-T 试剂盒、SYBR premix EX Taq 试剂盒来自 TaKaRa 公司, 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒来自北京康为世纪生物科技有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。

### 3.2 RNA 的提取和基因克隆

分别取不同发育时期的花生果皮、种皮和胚(10 d, 20 d, 30 d, 40 d, 50 d 和 60 d)用于总 RNA 提取。RNA 提取方法采用改良的 CTAB 法(陈华等, 2013)。

根据 *AhCYP707A4* 基因序列设计特异引物, 由北京六合华大基因科技股份有限公司合成(表 1)。以 cDNA 第一链为模板, 用 AhCYP-ORF-F 和 AhCYP-ORF-R 引物 PCR 扩增。反应程序为 94°C 5 min, (94°C 30 s, 57°C 30 s, 72°C 90 s) 30 cycles, 72°C 10 min。PCR 产物经纯化、连接、转化和阳性克隆鉴定, 送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

### 3.3 基因的生物信息学分析

利用 BioXM2.6 软件分析基因的开放阅读框。*AhCYP707A4* 基因编码蛋白的理化性质使用 Prot Param (<http://web.expasy.org/protparam/>)进行在线分析; 二级结构用 ExPASy Proteomics tools (<http://expasy.org/proteomics>)的中 SOPMA 进行预测; 三级结构用 SWISS MODEL 进行预测; 保守结构域用 NCBI 上的 CDD (Conserved Domain Database)软件进行预

表 1 所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物名称 primer ID	引物序列 (5'-3') primer sequence (5'-3')
AhActin-F	GAGGAGAAGCAGAAGCAAGTTG
AhActin-R	AGACAGCATATCGGCACTCATC
AhCYP-ORF-F	ATGGAGATTAGTGCTTCTATATCTAC
AhCYP-ORF-R	CTAATCGTTTTCTCCAAAATCTTGTAG
qRT-AhCYP-F	ACTCGTTCAAGCCAACATAC
qRT-AhCYP-R	AGTTCTCTTTAAGCCGATCTC

测; 蛋白多序列比对用 Clustal W2 软件进行; 使用 MEGA6 软件将所获 *AhCYP707A4* 氨基酸序列与拟南芥基因序列进行同源比对, 采用邻接法(Neighbor-joining)作图构建基因的系统进化树。

### 3.4 实时荧光定量 PCR 与基因表达谱芯片分析

以不同发育时期的花生果皮、种皮和胚 cDNA 为模板, 以花生 Actin 作为内参基因, 使用 SYBR® Premix Ex Taq 试剂, 利用 ABI-7500 荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 反应, 分析该基因在花生发育不同时期果皮、种皮和胚中的表达情况, 所用引物序列见表 1。反应体系包括 10 μL 2 × SYBR Premix Ex-Taq buffer, 正反引物各 0.5 μL, 补水到 20 μL。qRT-PCR 反应条件: 95°C 预变性 5 min, 95°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 30 s, 40 个循环。根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算基因的相对 mRNA 表达量(Livak and Schmittgen, 2001)。实时定量 PCR 分析共进行 3 次生物学重复。

### 作者贡献

康苗苗是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 完成实验数据分析以及论文初稿的写作; 张冲指导实验结果分析与文章修改; 庄瑞蓉参与部分实验研究; 李毓和陈华是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家“863”计划项目(2013AA102602-5)资助。

### 参考文献

Arc E., Sechet J., Corbinau F., Rajjou L., and Marion-Poll A., 2013, ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination, *Front. Plant Sci.*, 63(4): 1-19

- Arve L.E., Kruse O.M.O., Tanino K.K., Olsen J.E., Futsaether C., and Torre S., 2015, Growth in continuous high air humidity increases the expression of CYP707A-genes and inhibits stomatal closure, *Env. Exp. Bot.*, 115: 11-19
- Chen H., Jiang B.J., Zhang C., Cai T.C., Zeng J.B., Deng Y., and Zhuang W.J., 2013, Construction and primary analysis of peanut pericarp full-length cDNA library, *Fujian Nonglin Daxue Xuebao (Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition))*, 42(1): 57-62 (陈华, 姜宝杰, 张冲, 蔡铁城, 曾建斌, 邓焯, 庄伟建, 2013, 花生果皮全长 cDNA 文库的构建及初步分析, *福建农林大学学报(自然科学版)*, 42(1): 57-62)
- Ji K., Kai W., Zhao B., Sun Y., Yuan B., Dai S., Li Q., Chen P., Wang Y., Pei Y., Wang H., Guo Y., and Leng P., 2014, *SINCE1* and *SICYP707A2*: key genes involved in ABA metabolism during tomato fruit ripening, *J. Exp. Bot.*, 65(18): 5243-5255
- Kushiro T., Okamoto M., Nakabayashi K., Yamagishi K., Kitamura S., Asami T., Hirai N., Koshiha T., Kamiya Y., and Nambara E., 2004, The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism, *EMBO J.*, 23(7): 1647-1656
- Li M., Wang S.X., and Feng D.L., 2011, The advance of plant somatic embryogenesis and development, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 27(3): 237-241 (李明, 王树香, 冯大领, 2011, 植物体细胞胚发生及发育研究进展, *中国农学通报*, 27(3): 237-241)
- Li Q., Chen P., Dai S.J., Sun Y.F., Yuan B., Kai W.B., Pei Y.L., He S.H., Liang B., Zhang Y.S., and Leng P., 2015, *Pac-CYP707A2* negatively regulates cherry fruit ripening while *PacCYP707A1* mediates drought tolerance, *J. Exp. Bot.*, 66(13): 3765-3774
- Liu S., Lv Y., Wan X.R., Li L.M., Hu B., and Li L., 2014, Cloning and expression analysis of cDNAs encoding ABA 8'-Hydroxylase in peanut plants in response to osmotic stress, *PLoS One*, 9(5): e97025
- Livak K.J., and Schmittgen T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method, *methods*, 25(4): 402-408
- Manmathan H., Shaner D., Snelling J., Tisserat N., and Lapitan N., 2013, Virus-induced gene silencing of *Arabidopsis thaliana* gene homologues in wheat identifies genes conferring improved drought tolerance, *J. Exp. Bot.*, 64(5): 1381-1392
- Matakiadis T., Alboresi A., Jikumaru Y., Tatematsu K., Pichon O., Renou J.P., Kamiya Y., Nambara E., and Truong H.N., 2009, The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene CYP707A2 plays a key role in nitrate control of seed dormancy, *Plant Physiol.*, 149(2): 949-960
- Melcher K., Ng L.M., Zhou X.E., Soon F.F., Xu Y., Suino-Poel-Iell K.M., Park S.Y., Weiner J.J., Fujii H., Chinnusamy V., Kovach A., Li J., Wang Y.H., Li J., Peterson F.C., Jensen D. R., Yong E.L., Volkman B.F., Cutler S.R., Zhu J.K., and Xu H.E., 2009, A gate-latch-lock mechanism for hormone signaling by abscisic acid receptors, *Nature*, 462(7273): 602-608
- Mizutani M., and Todoroki Y., 2006, ABA 8'-hydroxylase and its chemical inhibitors, *Phytoch. Rev.*, 5(2-3): 385-404
- Nishimura N., Hitomi K., Arvai A.S., Rambo R.P., Hitomi C., Cutler S.R., Schroeder J.I., and Getzoff E.D., 2009, Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1, *Science*, 326(5958): 1373-1379
- Ren J., Sun L., Wu J., Zhao S., Wang C., Wang Y., Ji K., and Leng P., 2010, Cloning and expression analysis of cDNAs for ABA 8'-hydroxylase during sweet cherry fruit maturation and under stress conditions, *J. Plant Physiol.*, 167(17): 1486-1493
- Sawada Y., Aoki M., Nakaminami K., Mitsuhashi W., Tatematsu K., Kushiro T., Koshiha T., Kamiya Y., Inoue Y., Nambara E., and Toyomasu T., 2008, Phytochrome and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds, *Plant Physiol.*, 146(3): 1386-1396
- Seki M., Umezawa T., Urano K., and Shinozaki K., 2007, Regulatory metabolic networks in drought stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 10(3): 296-302
- Tung S.A., Smeeton R., White C.A., Black C.R., Taylor I.B., Hilton H.W., and Thompson A.J., 2008, Over-expression of *LeNCED1* in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with the *rbCS3C* promoter allows recovery of lines that accumulate very high levels of abscisic acid and exhibit severe phenotypes, *Plant Cell Environment*, 31(7): 968-981
- Yang S.H., and Zeevaert J.A., 2006, Expression of ABA 8' hydroxylases in relation to leaf water relations and seed development in bean, *Plant J.*, 47(5): 675-686
- Yu Y.T., Wu Z., Lu K., Bi C., Liang S., Wang X.F., and Zhang D. P., 2015, Overexpression of the MYB37 transcription factor enhances abscisic acid sensitivity, and improves both drought tolerance and seed productivity in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 90(3): 267-279
- Zhang G.H., Zhang Y.J., and Su Z., 2012, CYP51: a structure-based interface for cytochrome P450s and ligands in *Arabidopsis thaliana*, *BMC Bioinformatics*, 13: 332
- Zheng C., Halaly T., Acheampong A.K., Takebayashi Y., Jikumaru Y., Kamiya Y., and Or E., 2015, Abscisic acid (ABA) regulates grape bud dormancy, and dormancy release stimuli may act through modification of ABA metabolism, *J. Exp. Bot.*, 66(5): 1527-1542
- Zheng Y., Huang Y.Y., Xian W.H., Wang J.X., and Liao H., 2012, Identification and expression analysis of the *Glycine max CYP707A* gene family in response to drought and salt stresses, *Annals of Botany*, 110(3): 743-756