

小桐子 *JcYkt6* 基因的克隆和表达分析

黄尧瑶¹, 邓明华³, 龚明⁴, 陈浩维¹, 施卫省², 文锦芬^{2,*}

昆明理工大学¹现代农业工程学院, ²建筑与城市规划学院, 昆明650500; ³云南农业大学园林园艺学院, 昆明650201; ⁴云南师范大学生命科学学院, 昆明650500

摘要:以小桐子(*Jatropha curcas*) cDNA为模版, 克隆了*JcYkt6*基因的CDS序列。序列分析表明该基因包含600 bp完全阅读框(ORF), 编码199个氨基酸。预测其编码蛋白质的分子量为22.53 kDa, 等电点为6.90。Blast搜索结果及进化分析结果表明, *JcYkt6*蛋白与西瓜和黄瓜的Ykt6蛋白序列一致性最高(91%), 亲缘关系最近。该基因编码的蛋白具有一个典型的VAMP基元。定量分析结果显示, *JcYkt6*基因在小桐子根、茎、叶、花、果皮和种子中都有表达, 并且在种子中表达量最高。在种子生长发育的前期其表达水平不断增加, 在种子生长发育的后期(50 d)达到最高值, 然后下降。表达量变化过程与种子中储藏蛋白质合成趋势基本一致, 推测其参与小桐子种子储藏蛋白质的合成和运输。ABA、PEG、NaCl、4°C和机械损伤处理下*JcYkt6*表达水平都不同程度上调, 推测*JcYkt6*具有多种功能, 可能参与小桐子非生物胁迫响应和激素信号传导。

关键词:小桐子; SNAREs; *JcYkt6*; 克隆; 生物信息学分析; 表达分析

真核细胞含有复杂的内膜系统, 细胞内的物质交换通过囊泡运输方式来完成(Stachelin 1997)。囊泡运输主要包括运输囊泡的出芽、定向移动、锚定和膜融合等过程, 可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(SNAREs)在膜融合过程中发挥重要作用(Cai等2007)。根据位于SNAREs结构域中心的氨基酸不同, 将SNAREs分为Q-SNAREs和R-SNAREs (Fasshauer等1998)。Q-SNAREs可以细分为Qa、Qb和Qc-SNAREs, R-SNAREs含有一个Q-SNAREs没有的“longin结构域(longin-domain)”, 根据Longin结构域的长短被划分为VAMPs (Galli等1998)、Sec22 (Sacher等1997)和Ykt6 (小突触膜蛋白) (McNew等1997)。与Q-SNAREs不同的是, 迄今为止对R-SNAREs的功能还知之甚少。植物中有相当大数目的SNAREs, 全基因组分析表明, 模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的基因组中含有64个SNAREs, 水稻(*Oryza sativa*)基因组中含有60个SNAREs, 毛果杨(*Populus trichocarpa*)的基因组中含有74个SNAREs (Lipka等2007)。SNAREs在植物中有较高丰度可以说明这个蛋白家族在植物的生长发育中具有非常重要的作用(Sanderfoot等2000)。近年的研究成果显示, 植物SNAREs是一个具有非常广泛的生物学功能的蛋白家族, 它不仅通过介导囊泡融合参与植物正常的生长发育及对非生物胁迫的响应, 还参与ABA信号传导、生长素的极性运输、抗病过程、向重力性作用和胞质分裂(封华等2009)。

SNAREs在各种贮藏性和功能性物质的合成

与运输中也发挥重要作用, 保证了组织细胞维持其特异性和正常的生命活动。种子贮藏蛋白质是种子萌发和植物初期生长的重要营养物质来源, 贮藏蛋白质的合成、运输、加工和贮存等过程都会影响种子蛋白质的含量与品质, 种子贮藏蛋白质的研究能够为提高蛋白质品质和含量的分子育种工作提供重要的理论依据(韩宝达和李立新2010)。储藏蛋白质从内质网(合成场所)运输到高尔基体(加工和分类)再运输到蛋白质贮藏型液泡的过程涉及各种SNARE因子, 其中Ykt6是从植物、酵母到人类高度保守的蛋白质。虽然大多数SNAREs通过它们的跨膜结构域永久地固定在膜上, 但是在胞质上也发现有Ykt6存在, 因为Ykt6缺乏膜锚定蛋白, 通过其双重脂质化末端可以同时存在于胞质和内膜上。Ykt6参与多个囊泡的转运途径, 包括从内质网至高尔基体、高尔基体逆向运输、高尔基体内的囊泡转运以及同源囊泡融合等(Chen等2005), 这些途径都是贮藏蛋白质从合成场所内质网运输到蛋白质贮藏型液泡的重要途径。研究表明VTI12、SYP4/SYP6与Ykt6形成的复合体也在贮藏蛋白质的运输中起重要作用, 其中一个或者多个缺失都会影响贮藏蛋白质的运输、品质和含量(Sanmartin等2007; Ebine等2008)。目前关于植物Ykt6的报道较少, 只在少数植物如巴西橡胶树(邓柳红等2007)、烤烟(胡重怡和蔡刘体2011)等中被

收稿 2016-11-09 修定 2017-03-14

资助 国家自然科学基金(31460355、31260064和31460059)。

* 通讯作者(E-mail: wenjf888@163.com)。

克隆出来。邓柳红等(2007)克隆得到巴西橡胶树R295基因,生物信息学分析发现其属于R-SNAREs中的*Ykt6*,半定量RT-PCR检测巴西橡胶树R295在胶乳中特异表达,在叶中没有表达,推测其可能参与割胶后的胁迫信号传导过程,在巴西橡胶树抵御非生物胁迫方面发挥重要作用。

小桐子又名麻风树,为大戟科麻风树属(曾觉明2006)。种子是小桐子全株最具商业价值的部位,种子含油率最高可达65%以上,种子油具有良好的生物柴油特性,可生产高品质的生物柴油,成为当前可再生能源研究的热点(于帅勇和丁贵杰2009)。小桐子种子蛋白质含量高,榨油后的饼粕是开发动物饲料和制作优质的有机生物肥的优良原料(林娟等2004)。饼粕饲料化既可以降低小桐子生物柴油的成本,也可以满足人们对动物食品的需求,还能消除饼粕对环境的毒害,对小桐子生物柴油产业发展具有极其重要作用(鲍志豪等2011)。小桐子同时还具有抗逆性强、病虫害少、适应性广等优点,能够在干旱贫瘠的土壤中生长,是石漠化地区、干热河谷地区及荒山荒地造林和深林防火的优良树种。本研究克隆了一个小桐子*Ykt6*基因,利用qRT-PCR技术研究其在不同组织、种子发育过程和不同胁迫处理下的表达变化,以期为进一步研究*Ykt6*基因的功能奠定基础。

材料与amp;方法

1 实验材料与材料处理

供试材料小桐子(*Jatropha curcas* L.)取自于云南省昆明市昆明理工大学现代农业工程学院实验基地。取小桐子根、茎、叶、花、果皮和授粉后不同发育阶段(10、20、30、40、50和60 d)的种子,立即液氮速冻后保存在-80℃的环境中备用。每种组织从10株小桐子树上取样,来源于3株树上的组织混合作为1个组织样品,4次重复。

实验处理材料为稳定成熟期的小桐子幼苗,取长势基本一致的小桐子幼苗分别放置于100 μmol·L⁻¹ ABA、250 mmol·L⁻¹ NaCl、30% PEG6000培养液和4℃培养箱中,机械损伤用消过毒的剪刀在每片小桐子叶片上各剪5下,注意不要剪断叶片主脉。不同胁迫处理0(对照)、3、6、12和24 h时取幼嫩的叶片。各处理3次重复,材料用锡箔纸包好,立即液氮速冻后保存在-80℃的环境中备用。

2 RNA的提取和cDNA第一链的合成

小桐子RNA用TIANGEN公司RNAprep pure Kit (DP432)植物总RNA提取试剂盒提取,cDNA链合成用大连宝生物公司TaKaRa PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒,操作过程参考说明。产物放置于-20℃备用。

3 *JcYkt6*基因克隆

*JcYkt6*基因克隆特异引物根据巴西橡胶树*Ykt6*基因保守区及与之高度一致的小桐子EST设计,*JcYkt6*-F (5' AACTCATACTGCTTTCAACGAT 3')和*JcYkt6*-R (5' ATCACATTTTCTATCCACCACA 3'),PCR扩增用大连宝生物公司的TaKaRa Ex Taq Hot Start Version和5×PCR buffer,操作过程参考说明。PCR反应程序:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,53℃退火30 s,72℃延伸40 s,35个循环,72℃延伸5 min。将PCR产物连接到pMD18-T并双向测序,每个基因至少5个克隆。

4 cDNA序列及其编码氨基酸分析

用NCBI网站中的ORF finder找出基因的开放读码框(open reading frame, ORF)和其BLASTp程序进行同源性分析。用DNAMAN软件进行核酸翻译和多序列对比,采用MEGA 7.0 Neighbor-joining (NJ)方法构建进化树进行亲缘关系分析。利用ProtParam在线软件分析氨基酸残基数目、组成和蛋白质的基本性质等参数。利用ExPASy在线分析蛋白质一级结构和预测蛋白质功能位点。通过在线软件SOPMA预测蛋白质二级结构。用Modeling程序(<http://swissmodel.expasy.org/>)对蛋白质的三级结构进行预测。跨膜结构预测用在线软件TMHMM-2.0 server,信号肽预测用SignalP。

5 基因的表达分析

用实时荧光定量PCR方法进行基因表达分析。根据测序结果设计特异引物序列为*JcYkt6*-qF (5' TTGTCTCATCCAACCTCCCTCTG 3')和*JcYkt6*-qR (5' AGGTCTGCCCAGGAAGATAACT 3'),内参基因序列为β-actin-F (5' GCAGGCATCCACGAGACTACT 3')和β-actin-R (5' GTCAGCAATACCAGGGAACATAG 3')。分别对反转录后小桐子不同组织和不同处理材料叶片cDNA进行qRT-PCR分析。实时荧光定量PCR用大连宝生物公司的SYBR® Premix EX Taq™ II (Perfect Real Time),反应体系为:2 μL cDNA模板、12.5 μL Premix Taq™、0.5 μL

JcYkt6-F、0.5 μ L *JcYkt6*-R、加ddH₂O至25 μ L。PCR反应条件为: 94°C预变性3 min, 94°C预变性30 s, 59°C退火1 min, 72°C延伸30 s, 72°C延伸5 min, 35个循环。根据厂商推荐, 在罗氏LightCycler 480系统上进行。每个材料做3次独立重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法分析处理数据(Livak和Schmittgen 2001)。用SPSS软件进行显著性分析, Excel 2013作图。

实验结果

1 小桐子*JcYkt6*基因的克隆

用RT-PCR方法对*JcYkt6*基因进行克隆, 琼脂糖凝胶电泳后在凝胶成像仪上观察得到一条大约700 bp的产物(图1), 对其测序后, 用ORF finder软件分析*JcYkt6*基因编码氨基酸序列, 完整的ORF框编码区为600 bp, 编码蛋白包含199个氨基酸(图2)。

2 蛋白质一级结构分析

通过ProtParam软件分析表明, *JcYkt6*蛋白相对分子量为22.5 kDa, 理论等电点为6.90, 酸性氨基酸残基总数(Asp+Glu)为25个, 碱性氨基酸残基总数(Arg+Lys) 25个, 原子总数是3 157个, 分子式为C₉₉₉H₁₅₇₂N₂₇₄O₃₀₅S₇。不稳定系数为42.07, 是不稳定蛋白。脂肪系数为79.85, 疏水系数为-0.437, 是亲水蛋白。

```

1 ATGAAGATCACGGCGCTTGTGTATTGAAGTGCCTCCGGAGGGATCCGGATCCGATTATTTTAGCAAACGCCTCCGATGTGAGTCGTTTT
1 M K I T A L V V L K C T P E G S D P I I L A N A S D V S R F
91 GGGTACTTTCAAAGGTCAGCGTCAAAGAATTCATTGTTTTGTCCAGCCGGACAGTCGCCAAACGGACTCCTCCGGCCAAACGTCAGTCC
31 G Y F Q R S S V K E F I V F V S R T V A K R T P P G Q R Q S
181 GTCCAGCAGGAAGAGTACAATGTGCATTCTTACAATAGAAATGGCCTATGTGCGTTGGGTTTTATGGACCTCATTATCCAGTTCGAAGT
61 V Q H E E Y N V H S Y N R N G L C A L G F M D P H Y P V R S
271 GCATTTTCGGTTCCTCAATCAGGTGATTGATGAGTATCAGAAGAAITTTGGAGATTCTGGAGGTCTGCCAGGAAGATAACTCTGAACCT
91 A F S V L N Q V I D E Y Q K N F G D S W R S A Q E D N S E P
361 TGGCTTATTTGGCTGAAGCTGTGACCAAGTTTCAAGATCCTGCGGAGGCGGACAAGTTGTTGAAAATTCAGAGGGAGTTGGATGAGACA
121 W P Y L A E A V T K F Q D P A E A D K L L K I Q R E L D E T
451 AAAATATCCTTCATAAACTATTGACAGTGTCTTGCACGAGGTGAGAAAATGGACAGTCTAGTTGAGAAGAGTTCAGATCTGAGCGCT
151 K I I L H K T I D S V L A R G E K L D S L V E K S S D L S A
541 GCTTCTCAGATGTTCTACAAGCAAGCAAAAAAACAATCAATGTTGCACCGTACTGTAA
181 A S Q M F Y K Q A K K T N Q C C T V L *

```

图2 小桐子*JcYkt6*基因的cDNA序列及其推导的氨基酸序列

Fig.2 cDNA sequence and deduced amino acid sequences of *JcYkt6* gene

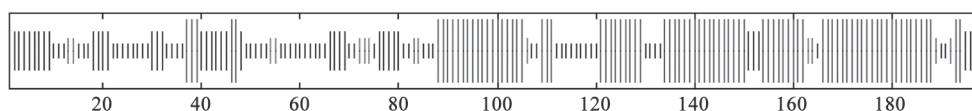


图3 *JcYkt6*蛋白二级结构分析

Fig.3 Secondary structure prediction of *JcYkt6*

竖线由长及短分别为 α -螺旋(43.22%)、延伸链(19.10%)、 β -转角(7.04%)和无规则卷曲(30.65%)。

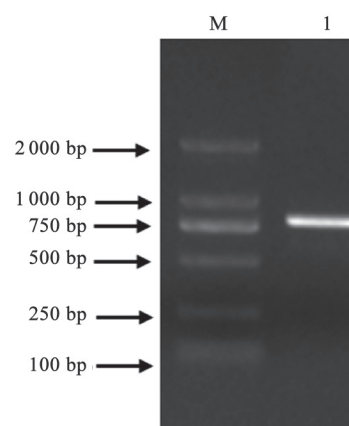


图1 *JcYkt6*基因电泳检测图

Fig.1 PCR product of *JcYkt6* gene

M: DNA marker; 1: *JcYkt6*的PCR产物。

3 蛋白质二级结构及三级结构分析

通过在线软件SOPMA对蛋白质进行二级结构预测, 结果显示*JcYkt6*蛋白含有大量的 α 螺旋(alpha helix)和无规则卷曲(random coil), 其中 α 螺旋占43.22%, 主要分布于氨基酸残基的1~80区域; 无规则卷曲占30.65%, 主要分布于氨基酸残基的88~188区域。延伸链(extended strand)占氨基酸残基总数的19.10%, 分布于氨基酸序列的多个区域; β -转角(beta turn)占氨基酸残基总数的7.04% (图3)。

通过Prosite在线数据库分析,发现JcYkt6蛋白序列含有5类功能位点包括1个异戊烯结合位点(prenyl group binding site, CAAX box)、1个N-糖基化位点(N-glycosylation site)、1个豆蔻酰化位点(N-myristoylation site)、2个蛋白激酶C磷酸化位点(protein kinase C phosphorylation site)和3个酪蛋白激酶II磷酸化位点(casein kinase II phosphorylation site)。还包含3个典型结构域,包括1个Longin结构域(7~123 bp)、1个v-SNARE结构域(139~199 bp)和1个小突触囊泡蛋白(VAMP)典型基元(157~176 bp)。

登录<http://swissmodel.expasy.org/>中的MODELING,对小桐子JcYkt6蛋白质三级结构建模,建模结果如图4所示。



图4 JcYkt6蛋白质三级结构预测
Fig.4 Third structure prediction of JcYkt6

4 蛋白质亚细胞定位、跨膜结构和信号肽预测分析

蛋白质亚细胞定位预测跨JcYkt6最有可能位于质膜。跨膜预测结果显示JcYkt6不具有跨膜结构域。信号肽预测结果表明JcYkt6不具有信号肽,表明JcYkt6不是一个分泌蛋白。

5 JcYkt6基因同源性及进化分析

通过NCBI Blast序列比对后发现, Ykt6基因在多种植物中均存在, JcYkt6属于SNARE超家族(图5)。JcYkt6基因编码的氨基酸序列与葫芦科香瓜(*Cucumis melo*)和黄瓜(*Cucumis sativus*)序列一致性最高,都为91%,与大戟科橡胶树(*Hevea brasiliensis*)、杨柳科毛果杨(*Populus trichocarpa*)序列一致性为90%,与胡桃科核桃(*Juglans regia*)、锦葵科雷蒙德氏棉(*Gossypium hirsutum*)、梧桐科可可树(*Theobroma cacao*)、葡萄科葡萄(*Vitis vinifera*)、桃金娘科巨桉(*Eucalyptus grandis*)序列一致性为89%,与锦葵科陆地棉(*Gossypium hirsutum*)、大戟科蓖麻(*Ricinus communis*)和豆科红豆(*Vigna angularis*)和绿豆(*Vigna radiate*)序列一致性为88%,与胡麻科芝麻(*Sesamum indicum*)、蔷薇科白梨(*Pyrus bretschneideri*)和茄科烟草(*Nicotiana glauca*)序列一致性为87%。JcYkt6与不同种类植物Ykt6序列一致性较高说明该基因在植物进化过程中比较保守(图6)。

用MEGA 7.0软件对JcYkt6和其他植物的Ykt6氨基酸序列构建系统进化树,进化结果基本符合植物分类学分类,并具有明显的种属特性,如同属锦葵科的雷蒙德氏棉和陆地棉组成一个分支。JcYkt6与锦葵科香瓜和黄瓜Ykt6聚在一枝,表明JcYkt6与香瓜和黄瓜Ykt6亲缘最近(图7)。

6 JcYkt6基因的表达分析

以 β -actin作为内参,对JcYkt6在小桐子不同组织和种子不同发育阶段的表达情况进行qRT-PCR分析。结果(图8)表明, JcYkt6在小桐子根、茎、叶、花、果皮和种子中都有表达,在种子中表达量最高,果皮次之,花中表达最少。JcYkt6在种子发育过程中的定量分析表明:该基因在种子整个生长发育期都有表达,在种子发育前期(10~30 d)表达量缓慢增加,第30天开始快速增加,种子生长发育

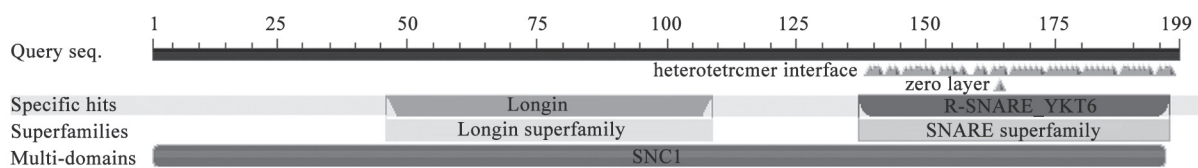


图5 小桐子JcYkt6氨基酸序列保守结构域预测
Fig.5 Prediction of conserved domain of amino acid sequences of JcYkt6

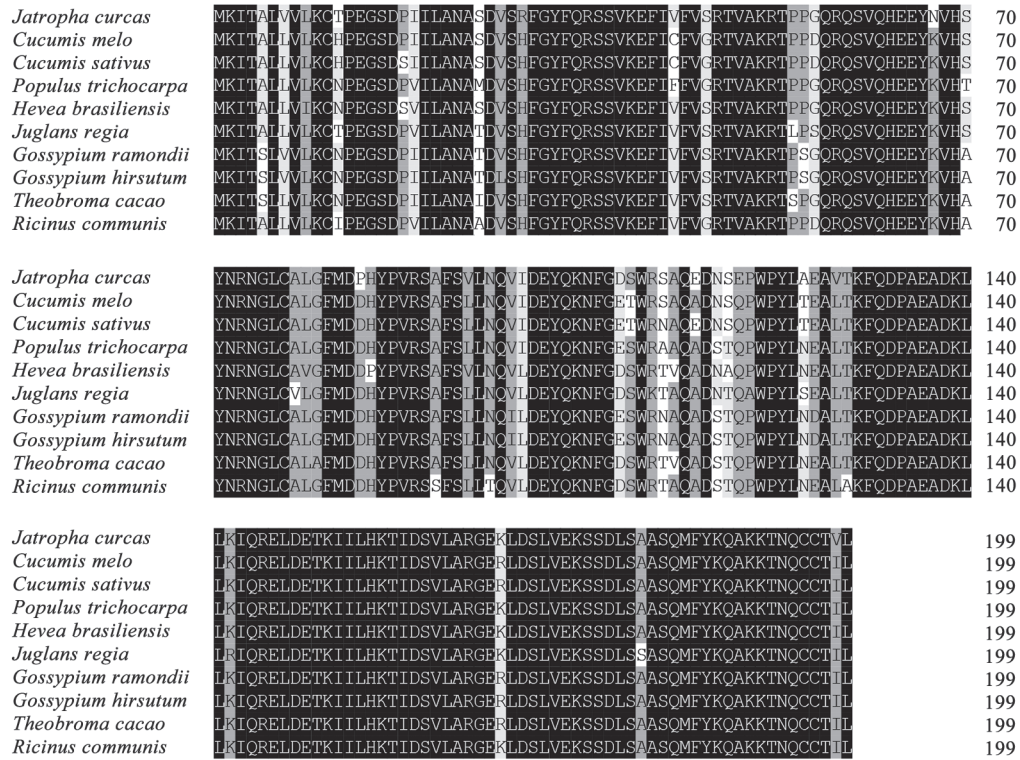


图6 *JcYkt6*与其他物种Ykt6蛋白的多序列比对分析

Fig.6 Multiple alignment of the deduced protein of *JcYkt6* with other species

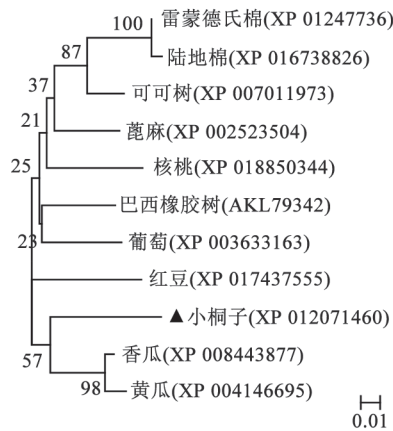


图7 小桐子*JcYkt6*与其他植物Ykt6蛋白的系统进化树分析

Fig.7 Phylogenetic analysis of *JcYkt6* with other Ykt6 proteins from different species

标尺代表遗传距离; 数值代表从1 000次重复计算得到的Bootstrap百分比值。

的后期(50 d)表达量达到最高值, 然后下降。表达量总体呈现先增长后下降的趋势(图8)。

ABA、PEG、NaCl、4°C和机械损伤处理下*JcYkt6*表达水平都不同程度上调, 但是表达模式不

尽相同(图9)。ABA处理下*JcYkt6*表达呈高-低-高-低的模式, 在12 h达到表达量最高值, 为对照样品的6.8倍左右。NaCl和PEG处理下*JcYkt6*表达都呈先升高再降低的单峰曲线, NaCl在处理6 h表达量达到最高值, 为对照样品的3.2倍左右; PEG处理下12 h表达量达到最高值, 为对照样品的5倍左右。低温4°C处理下, 表达水平不断升高, 在24 h才达到最高值, 为对照样品的3.5倍左右。机械损伤处理后表达在3 h就达到最高值, 为对照样品的2.1倍左右, 之后缓慢降低。

讨论

本研究克隆了一个小桐子*JcYkt6*基因。通过Blast比对, *JcYkt6*在进化过程中比较保守与其他植物的Ykt6高度同源, 属于SNARE超家族。蛋白质基本性质分析发现, *JcYkt6*最有可能定位于质膜, 没有疏水区域也不含跨膜区。*JcYkt6*含有5类功能位点, 其中羧基端的一个异戊烯基结合位点(CAAX box), 可以把法尼基或牻牛儿牻牛儿基加到该位点的半胱氨酸残基上进行转录后修饰, 从而将

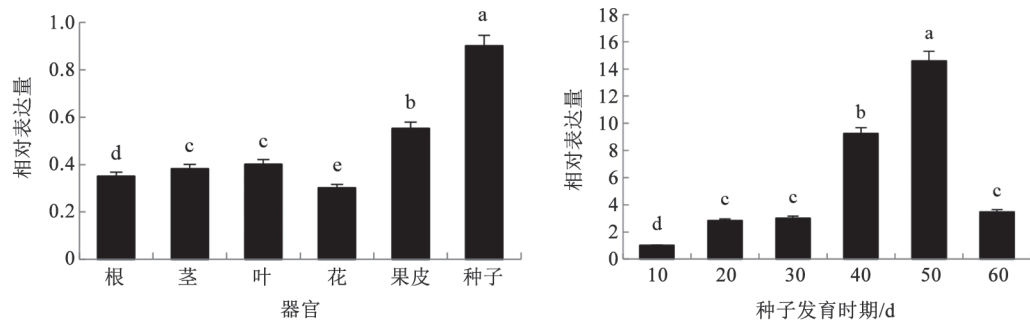


图8 *JcYkt6*基因在小桐子不同组织和种子不同发育阶段的表达

Fig.8 Expression levels of *JcYkt6* gene in different organs and different seed development stages of *J. curcas*

不同小写字母表示数据间差异显著($P<0.05$), 下图同此。

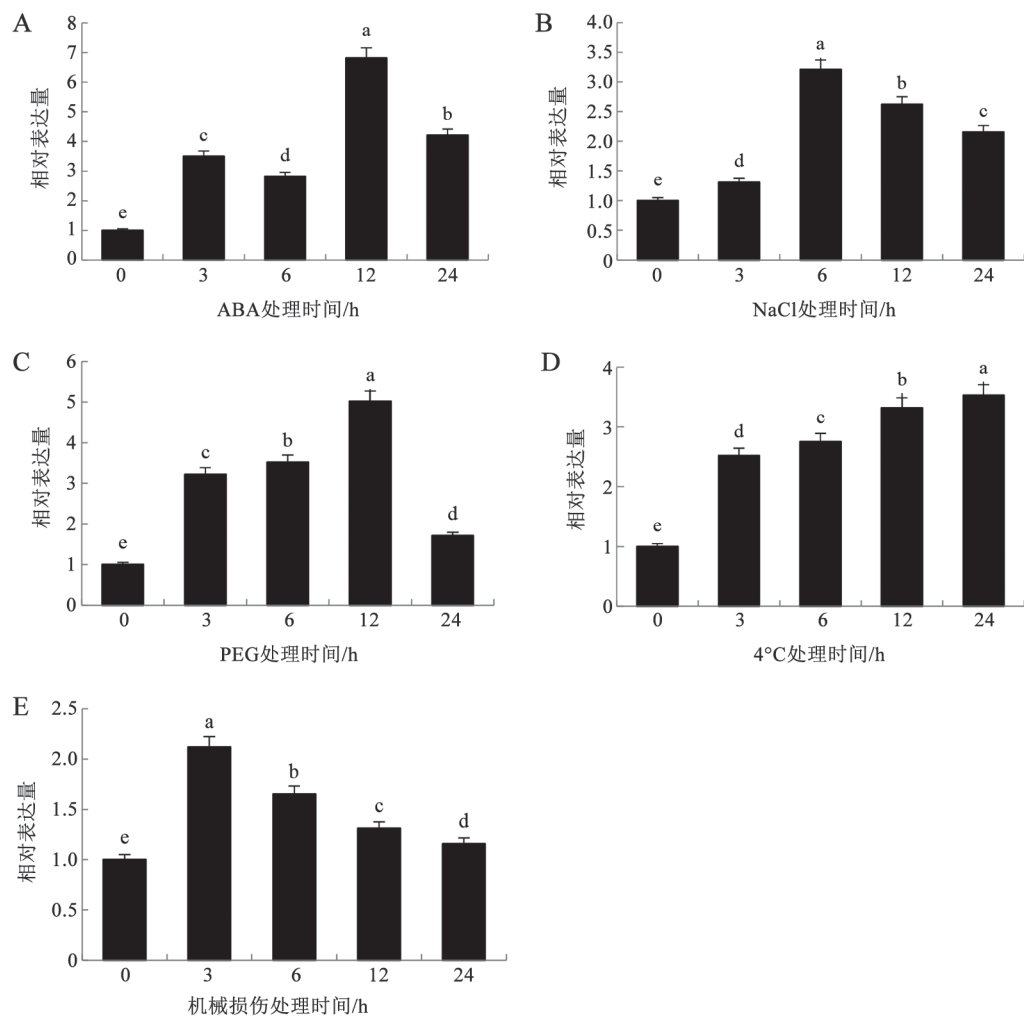


图9 不同处理下小桐子*JcYkt6*基因的表达

Fig.9 Expression of *JcYkt6* gene in *J. curcas* under different treatments

其锚于胞膜上。JcYkt6还含有一个典型的VAMP基元,属于R-SNAREs中一种特殊的Longins。

定量分析结果表明*JcYkt6*基因在小桐子根、茎、叶、花、果皮和种子中都有表达,并且在种

子中表达量最高,表明*JcYkt6*主要在小桐子种子中行使功能。*JcYkt6*在种子生长发育的前期其表达水平不断增加,10~30 d缓慢增加,30 d开始快速增加,在种子生长发育的后期(50 d)达到最高值,然后下降,表达量变化总体呈现先增长后下降的趋势。储存蛋白质是种子蛋白质的主要成分,占种子蛋白质80%以上(Fuji等2007),它在种子在发育过程中大量累积,为种子的萌发和植物初期生长提供重要的营养来源,邓志军等(2005)研究表明小桐子种子蛋白质含量较高,一般为18.2%左右。虽然小桐子种子储藏蛋白质的合成规律还没有明确报道,但是杨学军等(2008)报道种子在其发育后期大量累积储藏蛋白质。大豆储藏蛋白质在开花后15~20 d时开始逐渐合成,整个蛋白质绝对含量的增加速率呈现先慢后快、最后又趋缓慢的S型曲线(许月等1998)。花生种子储藏蛋白质变化过程与花生胚发育过程基本一致,储藏蛋白质在花生种子由成熟中期转入成熟中后期时大规模合成(黄上志和傅家瑞1992)。这些研究都与本实验*JcYkt6*的表达变化趋势一致,结合前人的研究结果Ykt6在储藏蛋白质合成和运输过程中发挥重要的作用(Chen等2005; Sanmartin等2007; Ebine等2008),由此可以推测*JcYkt6*参与小桐子种子发育过程中储藏蛋白质的合成和运输。应用研究表明,对种子贮藏蛋白质表达的合理调控可提高作物的产量和营养价值(杨学军等2008)。小桐子种子具有重要的经济价值,但关于其种子发育及其调控方面的研究还很少,本研究*JcYkt6*基因在小桐子不同组织和种子发育过程中的表达为调控种子生长发育和提高种子蛋白质含量和品质而进行的分子育种提供了理论依据。

在实际生产中,为了不与粮食作物争地及改良生态环境,小桐子一般种植在干旱、贫瘠和高海拔等边际性土地上,常处于各种逆境胁迫下,使植株遭受不同程度的伤害,引起品质和经济产量的下降,甚至导致植株生长的停滞和死亡(陈杨玲等2013)。因此,研究小桐子有利用价值的抗逆基因,为小桐子抗逆性机理的研究和高抗新品种的分子育种提供依据,对小桐子新品种的选育、适应性的提高、种植面积的扩大以及产量的增加具有重要意义。SNARE蛋白具有广泛的生理功能,

qRT-PCR分析发现*MsSNARE*基因在紫花苜蓿的根、茎和叶中都有表达,在受到干旱、盐胁迫和ABA诱导等外界胁迫时*MsSNARE*表达水平均上调均有不同程度的上调,说明该基因可能参与调控植物非生物胁迫应答反应(张通2016)。属于R-SNAREs的*AtVAMP71*家族介导转运囊泡与液泡的融合,Leshem等(2006)研究表明植株在受到盐胁迫时,含有H₂O₂的囊泡与液泡的融合会对植物造成毒害,而*AtVAMP71*功能的缺失使这种融合受阻,从而减少了高盐对植物的毒害作用。Leyman等(1999)在筛选与ABA相关的信号元件时克隆到编码Qa-SNARE的*NtSYR1*,该基因功能的缺失会导致叶片保卫细胞中ABA对K⁺和Cl⁻通道的调节受阻。本实验小桐子幼苗在ABA、PEG、NaCl、4°C和机械损伤处理下*JcYkt6*表达水平都不同程度上调,推测*JcYkt6*在小桐子中具有多种功能,可能参与小桐子非生物胁迫响应和激素信号传导。本研究通过克隆小桐子*JcYkt6*基因并分析其在不同组织和不同胁迫处理下的表达变化,对更深入地了解Ykt6基因功能奠定了基础。

参考文献

- Bao ZH, Fu LL, Wang XH, Zhang CH, Zheng S (2011). Developing the seed cake of *Jatropha curcas* L. as animal feed is an important measure for the industrialization of *Jatropha* biodiesel. *Nat Prod Res Dev*, 23: 288–292 (in Chinese with English abstract) [鲍志豪, 付亮亮, 王兴红, 张长河, 郑水(2011). 小桐子饼粕饲料化是小桐子生物柴油产业化的重要举措. 天然产物研究与开发, 23: 288–292]
- Cai H, Reinisch K, Ferro-Novick S (2007). Coats, tethers, rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Dev Cell*, 12: 671–682
- Chen Y, Shin YK, Bassham DC (2005). Ykt6 is a core constituent of membrane fusion machineries at the Arabidopsis trans-Golgi network. *J Mol Biol*, 350 (1): 92–101
- Chen YL, Wang HB, Chen K, Cui MK, Gong M (2013). The research progress on stress resistance of energy plant *Jatropha curcas* L. *Chin Agric Bull*, 29 (10): 1–6 (in Chinese with English abstract) [陈杨玲, 王海波, 陈凯, 崔明昆, 龚明(2013). 能源植物小桐子抗逆性研究进展. 中国农学通报, 29 (10): 1–6]
- Deng LH, Luo MW, Zhang CF (2007). Cloning a novel gene encoding long vesicle associated membrane protein from *Hevea brasiliensis*. *Acta Agron Sin*, 33 (5): 826–830 (in Chinese with English Abstract) [邓柳红, 罗明武, 张春发(2007). 巴西橡胶树SNARE蛋白全长cDNA克隆及其序列特征分析. 作物学报, 33 (5): 826–830]
- Deng ZJ, Cheng HY, Song SQ (2005). Studies on *Jatropha curcas* seed. *Acta Bot Yunnan*, 27 (6): 605–612 (in Chinese with En-

- glish abstract) [邓志军, 程红焱, 宋松泉(2005). 麻疯树种子的研究进展. 云南植物研究, 27 (6): 605–612]
- Ebine K, Okatani Y, Uemura T, Goh T, Shoda K, Niihama M, Morita M, Spitzer C, Otegui M, Nakano A, et al (2008). A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 20: 3006–3021
- Fasshauer D, Sutton RB, Brunger AT, Jahn R (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (26): 15781–15786
- Feng H, Chen C, Wang YQ, Qiu JL, Chu CC, Du XH (2009). Plant SNAREs and their biological functions. *Hereditas*, 31 (5): 471–478 (in Chinese with English abstract) [封华, 陈晨, 王义琴, 邱金华, 储成才, 杜希华(2009). 植物可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子连接物复合体(SNAREs)及其生物学功能研究进展. 遗传, 31 (5): 471–478]
- Fuji K, Shimada T, Takahashi H, Tamura K, Koumoto Y, Utsumi S, Nishizawa K, Maruyama N, Hara-Nishimura I (2007). *Arabidopsis* vacuolar sorting mutants (green fluorescent seed) can be identified efficiently by secretion of vacuole-targeted green fluorescent protein in their seeds. *Plant Cell*, 19: 597–609
- Galli T, Zahranui A, Vaidyanathan V, Raposo G, Tian MJ, Karin M, Niemann H, Louvard D (1998). A novel tetanus neurotoxin-insensitive vesicle associated membrane protein in SNARE complexes of the apical plasma membrane of epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 95 (26): 15781–15786
- Han BD, Li LX (2010). Plant seed storage proteins and their intracellular transport and processing. *Bull Bot*, 45 (4): 492–505 (in Chinese with English abstract) [韩宝达, 李立新(2010). 植物种子贮藏蛋白质及其细胞内转运与加工. 植物学报, 45 (4): 492–505]
- Hu CY, Cai LT (2011). Cloning and bioinformatics analysis of a SNARE protein T-NTGP2 cDNA from flue-cured tobacco. *Biotechnol Bull*, 7: 77–81 (in Chinese with English abstract) [胡重怡, 蔡刘体(2011). 烤烟SNARE蛋白基因T-NTGP2全长cDNA克隆与生物信息学分析. 生物技术通报, 7: 77–81]
- Huang SZ, Fu JR(1992). Development and storage protein accumulation in peanut seeds. *J Plant Physiol*, 18 (2): 142–150 (in Chinese with English abstract) [黄上志, 傅家瑞(1992). 花生种子的发育与贮藏蛋白质的合成和积累. 植物生理学报, 18 (2): 142–150]
- Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A (2006). Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂ containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103 (47): 18008–18013
- Leyman B, Geelen D, Quintero FJ (1999). A tobacco syntaxin with a role in hormonal control of guard cell ion channels. *Science*, 283 (5401): 537–540
- Lin J, Zhou XW, Tang KX, Chen F (2004). A survey of the studies on the resources of *Jatropha curcas* L. *J Trop Subtrop Bot*, 12 (3): 285–290 (in Chinese with English abstract) [林娟, 周选围, 唐克轩, 陈放(2004). 麻疯树植物资源研究概况. 热带亚热带植物学报, 12 (3): 285–290]
- Lipka V, Kwon C, Panstruga R (2007). SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23: 147–174
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25: 402–408
- McNew JA, Sogaard M, Lampen NM, Machida S, Ye RR, Lacomis L, Tempst P, Rothman JE, Tomas H (1997). Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum—Golgi transport. *Biol Chem*, 272: 17776–17783
- Sacher M, Stone S, Ferro-Novick S (1997). The synaptobrevin-related domains of *BosIP* and *Sec22p* bind to the syntaxin-like region of *Sed5p*. *Biol Chem*, 272: 17134–17138
- Sanderfoot AA, Assaad FF, Raikhel NV (2000). The *Arabidopsis* genome. An abundance of soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptors. *Plant Physiol*, 124 (4): 1558–1569
- Sanmartin M, Ordonze A, Sohn EJ, Robert S, Sanchez-Serrano JJ, Surpin MA, Raikhel NV, Rojo E (2007). Divergent functions of *VTII2* and *VTIII* in trafficking to storage and lytic vacuoles in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 3645–3650
- Staehelein LA (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant*, 11: 1151–1165
- Xu Y, Zhu CF, Shi LX (1998). General review the study of the soybean seed storage protein. *Soyb Sci*, 17 (3): 262–267 (in Chinese with English abstract) [许月, 朱长甫, 石连旋(1998). 大豆种子贮藏蛋白的研究概况. 大豆科学, 17 (3): 262–267]
- Yang XJ, Yu FY, Zhang HX (2008). Progress in research and application on expression and regulation of seed storage protein. *Plant Sci J*, 26 (2): 203–212 (in Chinese with English abstract) [杨学军, 喻方圆, 张欢喜(2008). 种子贮藏蛋白质表达调控及应用研究进展. 武汉植物学研究, 26 (2): 203–212]
- Yu SY, Ding GJ (2009). Research progress of energy plant *Jatropha curcas* L. *Guizhou For Sci Tec*, 37 (1): 49–54 (in Chinese with English abstract) [余帅勇, 丁贵杰(2009). 能源植物麻疯树研究进展. 贵州林业科技, 37 (1): 49–54]
- Zeng JM (2006). Biomass energy plant with potential development: *Jatropha curcas* L. *Yunnan For*, 27 (2): 21–22 (in Chinese with English abstract) [曾觉民(2006). 可大力发展的生物质能源植物-膏桐. 云南林业, 27 (2): 21–22]
- Zhang T (2016). Cloning and expression analysis of *MsSNARE* genes from alfalfa (*Medicago sativa* L.) (Master's thesis). Yangling: Northwest A&F University (in Chinese with English abstract) [张通(2016). 紫花苜蓿*MsSNARE*基因的克隆及表达分析(硕士论文). 杨凌: 西北农林科技大学]

Cloning and expression analysis of *JcYkt6* gene in *Jatropha curcas*

HUANG Yao-Yao¹, DENG Ming-Hua³, GONG Ming⁴, CHEN Hao-Wei¹, SHI Wei-Sheng², WEN Jin-Fen^{2,*}

¹Faculty of Modern Agricultural Engineering, ²Faculty of Architecture and City Planning, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; ³College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; ⁴School of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China

Abstract: A complete CDS sequence of *JcYkt6* was cloned from *Jatropha curcas*. Sequence analysis showed that the complete ORF of *JcYkt6* was 600 bp, encoding 199 amino acid residues. Putative molecular mass of *JcYkt6* was 22.53 kDa and isoelectric point (PI) was 6.90. The results of Blast and phylogenetic analysis showed that *JcYkt6* had highest identity (91%) and closest relationship with *Ykt6* protein of *Cucumis melo* and *C. sativus*. The gene encodes a protein with a typical VAMP motif. The *JcYkt6* expressed significantly in different organisms and had the highest transcript profile in seed. The expression level of *JcYkt6* increased in early stage of seed growth, and reached the highest value in late stage (50 d), then declined. Expression level of *JcYkt6* in seed had the same trends with seed storage protein accumulation, indicating that *JcYkt6* probably involved in the synthesis and transport of seed storage protein. The treatments of ABA, PEG, NaCl, 4°C and mechanical damage upregulated *JcYkt6* gene expression, indicating that *JcYkt6* also involved in response abiotic stress and signal transduction process in *J. curcas*.

Key words: *Jatropha curcas*; SANREs; *JcYkt6*; clone; bioinformatics analysis; expression analysis

Received 2016-11-09 Accepted 2017-03-14

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31460355, 31260064 and 31460059).

*Corresponding author (E-mail: wenjf888@163.com).