

马铃薯 *StASR* 基因的生物信息学分析及基因克隆

王树林^{1,2}, 李高峰^{1,2}, 张 荣^{1,2}, 文国宏^{1,2}, 李建武^{1,2}

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 国家农业科学种质资源渭源观测实验站, 甘肃 渭源 748201)

摘要: 将拟南芥 *AtASR* 基因核苷酸序列作为查询序列, 在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 得到马铃薯 *StASR* 基因 (GenBank 登录号: XM_006359742) 的序列。通过生物信息学分析发现, 该基因位于 4 号染色体上, 基因长度为 654 bp, 编码 108 个氨基酸残基, 其编码的蛋白质具有典型的 ABA/WDS 保守结构域。启动子区域分析后发现, 马铃薯 *StASR* 基因含有水分响应元件 MYCATERD1、冷胁迫响应元件 DRECRTOREAT 和盐胁迫响应元件 GTIGMSCAM4 等多种与非生物胁迫响应相关元件以及马铃薯生长发育相关顺式作用元件, 对其进行蛋白质互作网络的分析发现与低温、水分胁迫等基因互作。用 PCR 技术成功的克隆到马铃薯 *StASR* 基因, 其结果可以为深入研究马铃薯 *StASR* 基因的功能提供基础。

关键词: *ASR* 基因; 干旱胁迫; 马铃薯; 生物信息学

中图分类号: Q781; S532

文献标志码: A

文章编号: 1001-1463(2022)03-0020-05

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2022.03.005](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2022.03.005)

Bioinformatics Analysis and Cloning of the *StASR* Gene in *Solanum tuberosum*

WANG Shulin^{1,2}, LI Gaofeng^{1,2}, ZHANG Rong^{1,2}, WEN Guohong^{1,2}, LI Jianwu^{1,2}

(1. Institute of Potato, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. National Germplasm Resources Agricultural Experimental Station, Weiyuan Gansu 748201, China)

Abstract: In this experiment, the sequence of the potato *StASR* gene (Genbank Accession number: XM_006359742) was obtained by BLAST comparison in NCBI database using the nucleotide sequence of the *Arabidopsis AtASR* gene as the query sequence. Bioinformatics analysis revealed that the gene was located on chromosome 4 with a length of 654 bp and encodes 108 amino acid residues, and the encoded protein has a typical ABA/WDS conserved domain. After analyzing the promoter region, it was found that the potato *StASR* gene contains water response element MYCATERD1, cold stress response element DRECRTOREAT, salt stress response element GTIGMSCAM4 and other abiotic stress response related elements as well as potato growth and development related cis-acting elements. The analysis of protein interaction network found that it interacted with genes such as low temperature and water stress. In addition, the potato *StASR* gene was successfully cloned by PCR technology, and the results can provide a basis study of the function of the potato *StASR* gene.

Key words: *ASR* gene; Drought stress; Potato; Bioinformatics

植物在生长发育的过程中生长环境对其产生重大的影响。为应对环境中的各种非生物胁迫, 植物自身发展出了复杂的调控网络来适应环境带来的影响^[1]。尽管越来越多的非生物胁迫调控网络被鉴定出来, 但许多功能机制还尚未完全明确。

ASR 蛋白是一类高等植物中特有的蛋白质,

具有小而亲水的特征^[2]。第一个 *ASR* 蛋白在番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 中被分离出来后^[3], 越来越多的植物中, 如百合 (*Lilium* L.)、葡萄 (*Vitis vinifera* L.)、水稻 (*Oryza sativa* L.) 和玉米 (*Zea mays* L.) 中也相继鉴定到 *ASR* 基因^[4]。研究发现 *ASR* 蛋白具有典型的由 60~80 个氨基酸残基构成高度

收稿日期: 2021-11-24; 修订日期: 2022-01-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31760410); 甘肃省种业攻关项目(GZGG-2021-4); 现代丝路寒旱农业马铃薯产业发展项目(GNKJ-2020-1); 甘肃省农业科学院生物育种专项(2020GAAS10)。

作者简介: 王树林(1992—), 男, 甘肃古浪人, 研究实习员, 硕士, 研究方向为植物分子生物学。联系电话: (0931)7706264。Email: 1825631205@qq.com。

保守的 ABA/WDS (abscisic acid/water deficit stress) 结构域, 并且在 N 端具有锌指结合位点。ASR 蛋白能够以单体或者复合体的形式与特定的 DNA 结构结合^[5]。虽然在多种作物中已经克隆到 ASR 基因, 但其 ABA/WDS 结构域的功能并不明晰, 其蛋白质由 70~230 个氨基酸残基组成^[6]。具有 ABA/WDS 结构域的蛋白质复合物能够响应干旱胁迫、盐碱胁迫、低温胁迫。在干旱胁迫的调控中能够响应依赖于 ABA 的调控途径^[7], 在低温胁迫的调控中以分子伴侣的形式进行调控。另外在植物生长发育的各个时期也具有重要的调控作用, 如在花粉发育、果实成熟和植株衰老的过程中表达量都有显著变化^[8]。在干旱胁迫相关研究中, 将 ASR 基因在水稻中进行超表达后发现转基因水稻的耐旱能力得到大幅提升, 其中 ASR3 也成为水稻耐旱关联图谱的候选基因^[9]。将外源 ASR 基因在拟南芥中进行超表达也提高了拟南芥的耐旱性和耐盐碱性^[10]。有研究证实, 在水稻中 ASR 蛋白在干旱响应调节通路中通过减轻细胞膜损伤, 保持水分含量来提高作物的耐旱性^[9]。然而, ASR 蛋白是否在渗透胁迫下作为一个调控因子通过激活植物抗氧化系统和其他胁迫相关的基因开始转录来参与 ROS 稳态的调节目前还尚未阐明。

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是世界上主要的粮食作物, 非生物胁迫如干旱、盐碱、低温均对其植株生长发育和块茎的膨大具有较大的影响^[11]。尽管有研究表明 ASR 蛋白在马铃薯块茎中响应盐碱胁迫, 但该基因在干旱和盐碱胁迫中的信号通路机制尚不清楚^[12]。我们分析了马铃薯 StASR 基因的结构和蛋白质互作网络, 以期为进一步研究 StASR 基因在逆境胁迫响应网络中的功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验所用的 PCR 酶、T4 连接酶、限制性内切酶和 pMD18-T 载体等均购自大连宝生物公司。RNA 提取试剂盒、cDNA 反转录试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒等均购自 TANGEN 公司。指示马

铃薯品种为大西洋。盆栽马铃薯在温室中的生长条件为: 生长温度(24 ± 2) °C, 白天/夜晚光照周期为 16/8 h。取样后立即用液氮处理并存储于 -80 °C 冰箱。

1.2 生物信息学分析

将拟南芥 *AtASR* 基因作为同源序列在 NCBI 中进行 BLAST 比对, 得到马铃薯 *StASR* 基因序列。将得到的马铃薯 *StASR* 基因的全基因组序列在 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 BLAST 同源比对, 找到相似度较高的其他物种 ASR 基因序列做进化树。*StASR* 基因在染色体上所处的位置分析使用马铃薯数据库(http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/pgsc_download.shtml)。启动子分析采用在线网站(<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>)。蛋白质一级结构分析采用 ExPASy(<https://web.expasy.org/protparam/>)。蛋白互作网络分析采用在线网站(<https://string-db.org/>)。

1.3 马铃薯总 RNA 的提取及 StASR 基因的克隆

对供试马铃薯品种大西洋进行取样后, 提取马铃薯总 RNA, 反转录成 cDNA 作为 DNA 克隆模板。根据马铃薯 *StASR* 基因序列设计 PCR 克隆引物, 正向引物为 StASR-F: CGCGGATCCACAACA TTATCTCATCACTCACGC; 反向引物为 StASR-R: CGG GGTACCTCAAGCACTCTGAAGGGAAAC。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后将 PCR 产物进行胶回收。

2 结果与分析

2.1 马铃薯 StASR 基因及其蛋白质分析

生物信息学分析表明, 马铃薯 *StASR* 基因位于马铃薯第 4 号染色体上, 基因长度 654 bp, 放阅读框长度为 327 bp。NCBI SPlign 分析结果(图1)显示, StASR 蛋白结构分析发现包含有典型的 ABA/WDS 结构。采用蛋白质分析在线软件分析蛋白一级结构发现, 蛋白质化学式为: $C_{538}H_{819}N_{165}O_{158}S_1$, 该蛋白由 108 个氨基酸残基构成。分子量为 12 158.49 Da, 理论等电点为 6.65, 其中含量较高的氨基酸有 Glu、His 和 Lys, 都达到了 16.7%; 含量较低的

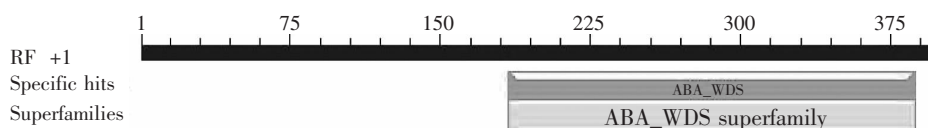


图1 马铃薯 StASR 蛋白结构示意

氨基酸有 Gln 和 Met, 仅占 0.9%。另外分析发现有 21 个带负电的氨基酸残基(Asp + Glu), 带正电的 (Arg + Lys)共有 18 个。蛋白质不稳定系数为 46.37, 将该蛋白性质归类为不稳定蛋白质。

2.2 马铃薯 *StASR* 基因进化分析

通过 NCBI 进行 BLAST 得到 7 个物种与马铃薯 *StASR* 基因同源性较高的蛋白序列。通过 MEGAX 软件使用 NJ 邻进法构建分子系统进化树(图2)。结果显示, 马铃薯 *StASR* 基因与番茄具有高度相似的进化关系, 与黄瓜与凤梨的次之, 与水稻及玉米的进化关系最远。分析结果与马铃薯进化关系基本相一致。

2.3 马铃薯 *StASR* 基因的启动子区分析

对基因启动子上游序列 1 000 bp 的区域进行分析发现, 马铃薯 *StASR* 基因包含不同的顺式作用元件, 如脱落酸(ABA)响应元件 ABREZMRAB28。脱水响应元件 ABRELATERD1。与非生物胁迫响应的相关元件, 如水分响应元件 MYCATERD1、冷胁迫响应元件 DRECRTCOREAT、盐胁迫响应元件 GT1GMSCAM4。另外还包含一些与光调节相关的顺式作用元件, 如元件 GT1CONSENSUS 和较多的 DNA 结合元件 ARR1AT(表1)。这些元件显示马铃薯 *StASR* 基因可能在其逆境胁迫机制中发挥重要作用。

2.4 马铃薯 *StASR* 基因的克隆

以供试马铃薯品种大西洋提取 RNA 后反转录

表 1 马铃薯 *StASR* 基因的启动子元件分析

元件名称	序列(5'-3')	功能	数量/个
ABRELATERD1	ACGTG	脱水响应	2
ABRERATCAL	MACGYGB	钙响应元件	2
ABREZMRAB28	CCACGTGG	ABA响应元件	1
ARR1AT	NGATT	DNA结合元件	9
DRECRTCOREAT	RCCGAC	冷胁迫响应元件	1
EBOXBNNAPA	CANNTG	R响应元件	3
GATABOX	GATA	色素结合相关元件	4
GT1CONSENSUS	GRWAAW	光调节相关	6
GT1GMSCAM4	GAAAAA	盐胁迫响应元件	2
MYBCORE	CNGTTR	MYB转录因子	3
MYBST1	GGATA	ABA调节响应元件	3
MYCONSENSUSAT	CANNTG	非生物胁迫相关	3
MYCATERD1	CATGTG	水分响应元件	1
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	器官特异性元件	2
P1BS	GNATATNC	PHR1结合元件	1
POLASIG3	AATAAT	Poly A相关元件	1
POLLEN1LELAT52	AGAAA	花粉发育相关	1
SEF4MOTIFGM7S	RTTTTTR	贮藏蛋白	1
SITEIIATCYTC	TGGGCY	细胞色素相关元件	1
TAAAGSTKST1	TAAAG	TAAAG元件	2
TATABOX5	TTATTT	TATA框	2
WRKY71OS	TGAC	WRKY转录因子相关	5

合成 cDNA 为模板进行基因 PCR 扩增。扩增引物根据马铃薯 *StASR* 基因序列设计, PCR 扩增引物为: 正向引物为 *StASR*-F: CGCGGATCCACAACATTATCTCATCACTCACGC; 反向引物为 *StASR*-R: CGGGTACCTCAAGCACTCTGAAGGGAAAC。PCR 扩增结束后用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳得到长度为 570 bp 左右长度的 DNA 片段 (图3), 其大小符合预期。将 PCR 产物进行回收, 回收目的片段通过 T4-DNA 连接酶将其连接在克隆载体上。

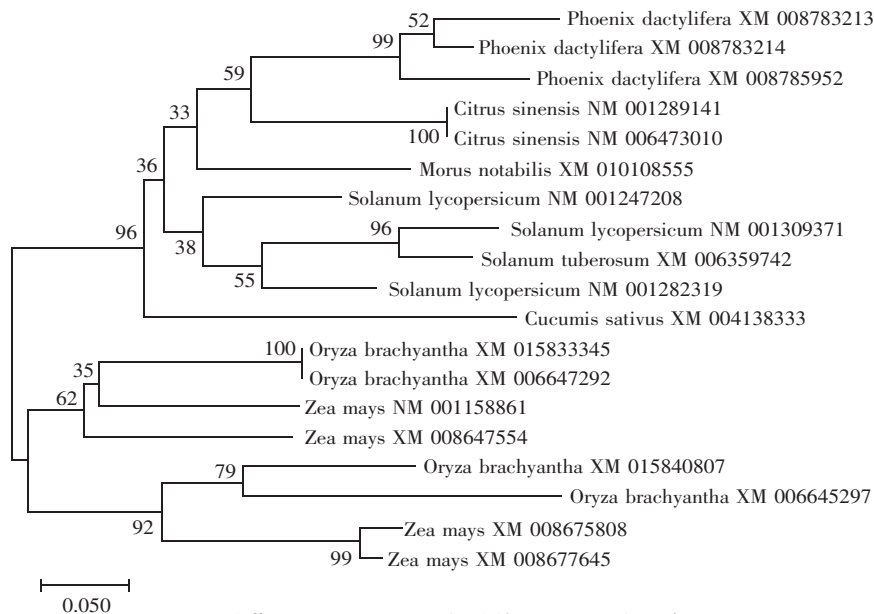
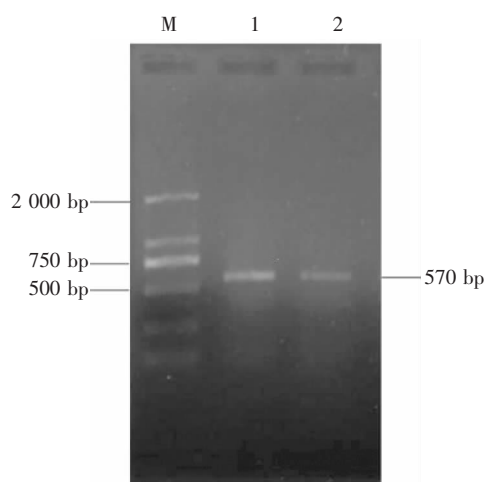


图 2 马铃薯 *StASR* 蛋白序列与其他物种序列的系统进化树分析



M 为 DNA Marker; 1、2 为 *StASR* 基因扩增条带

图3 马铃薯 *StASR* 基因 PCR 扩增

2.5 马铃薯 *StASR* 蛋白互作网络分析

通过在线软件 STRING 进行马铃薯 *StASR* 蛋白互作网络分析(图4)显示, 马铃薯 *StASR* 蛋白与脂质转运相关蛋白 (putative LTP)、磷酸酶蛋白、生长素响应蛋白 (IAA4)、泛素连接酶蛋白、低温响应蛋白、肽酶、硝酸盐蛋白具有互作作用, 说明马铃薯 *StASR* 蛋白能够参与到生长发育和逆境胁迫响应当中。

3 结论与讨论

通过生物信息学的方法分析了马铃薯 *StASR* 基因与其他物种中的同源基因, 从基因结构、启动子区域分析、蛋白理化性质、物种进化关系、蛋白互作网络 5 个角度分析表明, 该基因位于 4

号染色体上, 基因长度为 654 bp, 编码 108 个氨基酸残基, 其编码的蛋白质具有典型的 ABA/WDS 保守结构域, 并且在进化关系上与番茄高度相似, 说明马铃薯 *StASR* 基因在与茄科作物进化分歧前就发生复制现象, 起源较早^[13]。启动子区域分析后发现, 马铃薯 *StASR* 基因含有水分响应元件 MYCATERD1、冷胁迫响应元件 DRECRTOREAT 和盐胁迫响应元件 GT1GMSCAM4 等多种与非生物胁迫响应相关元件, 对其进行蛋白质互作网络的分析发现与低温, 水分胁迫等基因互作。另外用 PCR 技术成功的克隆到马铃薯 *StASR* 基因, 其结果可以为深入研究马铃薯 *StASR* 基因的功能提供基础。启动子区分析和蛋白质一级结构分析发现其基因上游区间有水分、低温、盐碱胁迫相关的响应元件, 表明马铃薯 *StASR* 基因能够参与到逆境胁迫响应的通路当中。另外在蛋白质互作网络分析中发现马铃薯 *StASR* 蛋白能与低温、干旱和生长发育相关的 10 个蛋白质互作, 也说明其能够调节作物响应逆境胁迫的能力。

马铃薯是我国第三大粮食作物和四大主粮作物之一^[14-15]。马铃薯 *StASR* 基因虽然结构简单, 但其广泛的参与到马铃薯对逆境胁迫响应信号通路中, 对马铃薯抗旱调节具有重要的潜在作用^[16]。我们仅对马铃薯 *StASR* 基因在基因结构、蛋白功能方面进行了分析, 其在调控网络中的具体作用机制还需要进一步的研究。在干旱胁迫中依赖于

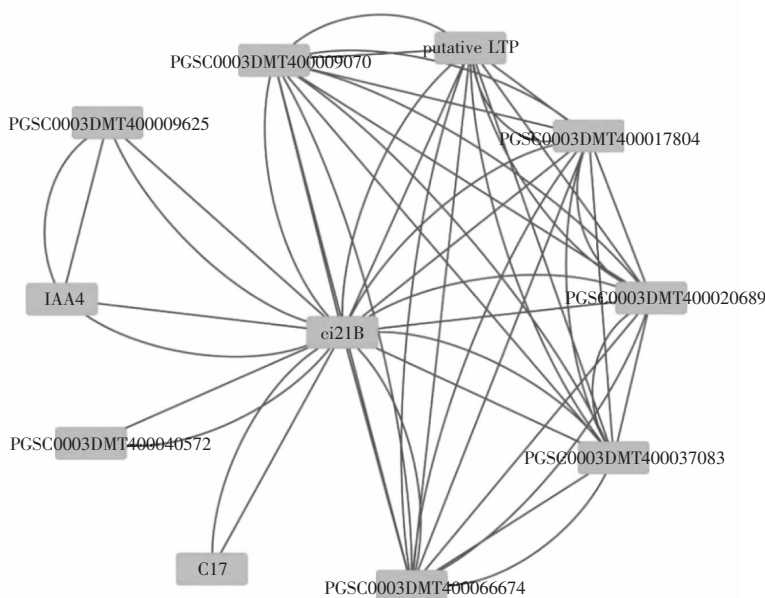


图4 马铃薯 *StASR* 蛋白 (ci21B) 的互作网络分析

ABA 或者独立于 ABA 的信号通路中都有 ASR 基因参与。在水分胁迫下, 番茄 *SlASR* 基因与百合 *ASR* 基因表达量显著升高^[17]。草莓 *FaASR* 基因与葡萄 *VsASR* 基因在外源 ABA 处理下都有显著的升高^[18-19]。另外有研究表明, 病原菌也会诱导 *ASR* 基因的表达, 如樟疫霉菌(*Phytophthora cin-namomi*)、枯萎病菌(*F. oxysporun* f. sp. *Cubense*)能够使 *ASR* 基因或者同源蛋白的表达量增高^[20]。在不同作物的不同生长发育时期 *ASR* 基因的表达模式也不相同。番茄中果实在成熟期 *SlASR2* 基因表达量下降, 草莓果实转色后基因表达量上升, 葡萄从坐果期到成熟期 *VvASR* 基因的表达量先升高后降低^[21]。将 PVX、PVS、PVY 和 PLRV 4 种病毒 CP 融合基因导入马铃薯, 并对影响遗传转化的因素进行了优化^[22]。

参考文献:

- [1] 张 凤, 陈 伟. 代谢组学在植物逆境生物学中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2021, 37(8): 1-11.
- [2] 程维舜, 孙玉宏, 曾红霞, 等. ASR 蛋白与植物的抗逆性研究进展[J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 2049-2057.
- [3] IDO G, GUADALUPE D P, ZVIA K, et al. Tomato Abscisic Acid Stress Ripening (*ASR*) Gene Family Revisited[J]. Plos One, 2014, 9(10): e107117.
- [4] HUANG K, ZHONG Y, LI Z Y. Genome-wide identification and expression analysis of the apple *ASR* gene family in response to *Alternaria alternata* f. sp. *mali*[J]. Genome, 2016, 59, 866-878.
- [5] HENRY I M, CARPENTIER S C, PANIS B, et al. Structure and regulation of the abscisic stress ripening (*ASR*) gene family in banana[M]. United States: Cambridge University Press, 2009.
- [6] PHILIPPE R, COURTOIS B, MCNALLY K L, et al. Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(4): 769-787.
- [7] ROSSI M., CARRARI F, CABRERA-PONCE, et al. Analysis of an abscisic acid(ABA)-responsive gene promoter belonging to the *Asr* gene family from tomato in homologous and heterologous systems[J]. Molecular & General Genetics, 1998, 258(1-2): 1-8.
- [8] 余克琴. 甜橙果实发育与成熟过程中转录组变化及 *CsASR* 基因的功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [9] PHILIPPE R, COURTOIS B, MCNALLY K L, et al. Structure, allelic diversity and selection of *Asr* genes, candidate for drought tolerance, in *Oryza sativa* L. and wild relatives[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 121(4): 769-787.
- [10] CHIANYI SUE, YUCHIE WANG. The spatial and temporal expression of potato *ci21a* promoter in tomato and *Arabidopsis*[J]. Bio Formosa, 2009, 44(1): 23-30.
- [11] 周真珍, 徐 明. 马铃薯分子抗性育种研究进展[J]. 作物研究, 2015(5): 550-554.
- [12] FRANKEL N, NUNES-NESE A, BALBO I, et al. *ci21A/Asr1* expression influences glucose accumulation in potato tubers[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 63(5): 719-730.
- [13] FRANKEL N, CARRARI F, HASSON E, et al. Evolutionary history of the *Asr* gene family[J]. Gene, 2006, 378: 74-83.
- [14] 王 敏, 吕和平, 高彦萍, 等. 微生物菌肥在马铃薯疮痂病防治上的应用效果[J]. 甘肃农业科技, 2021, 52 (10): 27-31.
- [15] 黄 凯, 何万春, 权小兵, 等. 地面覆盖方式对马铃薯产量和水分利用效率的影响[J]. 甘肃农业科技, 2021, 52(6): 4-7.
- [16] KONRAD Z, BAR-ZVI D. Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated *ASR1* protein and the osmolyte glycine-betaine [J]. Planta, 2008, 227(6): 1213-1219.
- [17] 李建锐. 谷子 *SiASR4* 基因参与植物响应干旱和盐胁迫的功能研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018.
- [18] IUSEM N D, RICARDI M M, GONZÁLEZ RODRIGO M. Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 1-11.
- [19] R DÓCZI, CSANAKI C, Z. BÁNFALVI. Expression and promoter activity of the desiccation-specific *Solanum tuberosum* gene, *StDS2*[J]. Plant Cell & Environment, 2010, 25(9): 1197-1203.
- [20] CHEN J Y, LIU D J, JIANG Y M, et al. Molecular characterization of a strawberry *FaASR* gene in relation to fruit ripening[J]. Plos One, 2011, 6(9): e24649
- [21] YANG C Y, CHEN Y C, JAUH G Y, et al. A lily *asr* protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2005, 139(2): 836-846.
- [22] DAI J R, BING L, FENG D R, et al. *MpAsr* encodes an intrinsically unstructured protein and enhances osmotic tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Cell Reports, 2011, 30(7): 1219-1230.