

研究报告

Research Report

菊芋果聚糖合成酶基因 *1-FFT* 启动子克隆与功能分析

孙雪梅^{1,3,4,5} 宗渊^{1,2,5} 杨世鹏^{4,5} 王丽慧^{4,5} 张怀刚^{1,2,3*}

1 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810000; 2 中国科学院西北高原生物研究所, 青海省作物分子育种重点实验室, 西宁, 810000; 3 中国科学院大学, 北京, 100049; 4 青海省农林科学院, 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 西宁, 810000; 5 青海大学农牧学院, 西宁, 810000

* 通信作者, hg Zhang@nwipb.cas.cn

摘要 本研究通过 Tail-PCR 方法分离到菊芋 *1-FFT* 基因上游长度为 1 611 bp 的片段(FFTP)。神经网络启动子在 FFTP 序列中预测到 8 个启动子核心结构, 瞬时表达结果显示起始密码子上游 400 bp 的启动子核心结构域与 1 611 bp 的启动 GUS 基因表达的活性无明显差异, 表明 -296 到 -246 区域就是 *1-FFT* 基因的启动子区域。PlantCARE 分析表明, FFTP 序列中除基本启动子元件(TATA-box 和 CAAT-box)外, 还含有与 MYB 转录因子结合的元件 3 个, 参与光调控的顺式作用元件 12 个, 茉莉酸反应、厌氧过程、脱落酸、抗逆反应的元件各 2 个, 昼夜节律控制、生长素和赤霉素反应的元件各 1 个。这些顺式作用元件的鉴定为 *1-FFT* 参与相应的生物学过程提供理论依据。

关键词 菊芋(*Helianthus tuberosus* L.), 果聚糖, *1-FFT*, 启动子, 功能分析

Cloning and Fructan Synthase Gene *1-FFT* Promoter in Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.)

Sun Xuemei^{1,3,4,5} Zong Yuan^{1,2,5} Yang Shipeng^{4,5} Wang Lihui^{4,5} Zhang Huaigang^{1,2,3*}

1 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810000; 2 Qinghai Province Key Laboratory of Crop Molecular Breeding, Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining, 810000; 3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049; 4 Key Laboratory of vegetable Genetics and Physiology in Qinghai Province, Qinghai Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Xining, 810000; 5 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining, 810000

* Corresponding author, hg Zhang@nwipb.cas.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.018.001792

Abstract In this study, a 1 611 bp fragment (FFTP), upstream to *1-FFT*, was isolated by Tail-PCR from Jerusalem artichoke. Neural network promoters predicted eight promoter core structures in the FFTP sequence. Because of there was no significant difference in the activity of *GUS* gene expression between the FFTP400 promoter core domain and FFTP promoter in transient expression, it could be inferred that the core promoter regions from -296 to -246 were the promoter regions of *1-FFT* gene. PlantCARE analysis showed that besides the basic promoter elements (TATA-box and CAAT-box), FFTP sequence contained three elements binding to MYB transcription factor, 12 cis-acting elements involved in light regulation, eight elements involved in jasmonic acid reaction, anaerobic process, abscisic acid and stress resistance, three elements relative to circadian rhythm control, auxin and gibberellin. The cis-acting elements identification provides a theoretical basis for *1-FFT* to participate in the corresponding biological processes.

Keywords *Helianthus tuberosus* L., Fructan, *1-FFT*, Promoter, Function analysis

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31460523)、青海省应用基础研究项目(2016-ZJ-751)、青海省创新服务平台项目(2018-ZJ-T08)和青海省创新平台建设专项(2017-ZJ-Y18)共同资助

引用格式: Sun X.M., Zong Y., Yang S.P., Wang L.H., and Zhang H.G., 2020, Cloning and fructan synthase gene *1-FFT* promoter in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.), *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 18(6): 1792-1798 (孙雪梅, 宗渊, 杨世鹏, 王丽慧, 张怀刚, 2020, 菊芋果聚糖合成酶基因 *1-FFT* 启动子克隆与功能分析, 分子植物育种, 18(6): 1792-1798)

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.), 又名洋姜、鬼子姜, 为多年宿根性草本植物。由于菊芋块茎中富含果聚糖, 在食品及食品配料、生物质能源、饲料加工等方面得到广泛应用, 并显示出极大的发展潜力(寇一翮等, 2014; 满丽莉等, 2014)。在温带和冷寒地区, 植物通过形成非结构性碳水化合物从而贮藏果聚糖, 约 1/6 的被子植物中都发现含有果聚糖。果聚糖属于第三大贮藏性碳水化合物, 主要存在于菊科、禾本科等植物中(成善汉等, 2002)。除了作为植物异养器官和自养器官的短期或长期贮藏物外, 果聚糖在提高植物的抗寒、抗旱乃至抗盐等方面发挥重要作用, 如调节植物适应低温光合作用(Pollock, 1986; Koops and Jonker, 1996)、调控植物体内蔗糖代谢(Pollock and Cairns, 1991)以及使植物适应缺水(Spollen and Nelson, 1994; Bagherikia et al., 2018)。作为一种功能性食品, 低聚合度的果聚糖是一种低热量值的食品原料和食用甜味剂, 是糖尿病和高血压患者的良好食品和食品添加剂; 高聚合度的果聚糖对人体健康有促进作用(Bach Knudsen and Hessov, 1995)。菊芋是商品化果聚糖的重要来源之一(Saengthongpinit and Sajjaanatakul, 2005)。

植物果聚糖可以划分为五种类型: 第一种线型菊糖型果聚糖(Linear inulin-type fructan), 存在于菊科植物; 第二种菊糖型果聚糖新生系列, 主要存在于百合科植物; 另外三种为线型梯牧草型果聚糖(Linear levan-type fructan)、混合型梯牧草型果聚糖(Mixed levan)和梯牧草型果聚糖新生系列(Levan neoseris), 存在于禾本科植物(Pollock and Cairns, 1991)。果聚糖合成模型则有四种果糖基转移酶参与合成, 即蔗糖: 蔗糖-1-果糖基转移酶(*I-SST*); 果聚糖: 果聚糖-1-果糖基转移酶(*I-FFT*); 蔗糖: 果聚糖-6-果糖基转移酶(*6-SFT*)和果聚糖: 果聚糖-6G-果糖基转移酶(*6G-FFT*)。菊芋块茎中主要以线型菊糖型果聚糖形式存在。这种果聚糖是由 *I-SST* 和 *I-FFT* 共同作用, 由 *I-SST* 催化两个蔗糖分子形成一个 1-蔗果三糖分子, 随后在 *I-FFT* 催化下延伸 1-蔗果三糖形成菊粉型果聚糖, 从而转化形成 1-蔗果三糖和高聚合度(DP)果聚糖分子。*I-FFT* 平均聚合度由果聚糖供体果聚糖 1-蔗果三糖调节。*I-FFT* 的表达强度决定了果聚糖的聚合度和产量(Im et al., 1998)。多个植物中的 *I-SST* 和 *I-FFT* 基因已经被克隆和功能验证(Ende and Laere, 1996; Benkeblia et al., 2003, Suárez-González et al., 2014; Yue et al., 2017), 但关于这些基因的启动子序列分离克隆与功能分析尚未见报道。

启动子位于编码区序列 5' 端上游序列, 主要作用是启动基因的转录。分离开放阅读框(ORF)上游序列, 验证该序列的功能, 以及同源基因之间启动子的功能差异, 从而进一步分析同源基因之间的功能差异。本研究分离并克隆菊芋果聚糖合成关键基因 *I-FFT* 的启动子并开展功能分析, 以期为菊芋 *I-FFT* 基因在转录水平上的表达调控机制研究提供科学依据。

1 结果与分析

1.1 菊芋 *I-FFT* 启动子的分离

用 CTAB 法提取菊芋基因组 DNA, 经琼脂糖凝胶电泳检测无误。以基因组 DNA 为模板, 通过 Tail-PCR 方法, 分离到 1 611 bp 的 FFT 上游序列命名为 FFTP (图 1)。

1.2 启动子区域预测

为了解分离到的 FFTP 启动子序列的启动子核心区域, 利用神经网络(NNPP)进行启动子核心区域预测, 结果表明在 FFTP 中包含有 8 个评分值>0.8 的区域, 评分值在 0.85~0.99 之间, 其中 -296 到 -246 区域的核心区域离目标区域最近, 很有可能就是 FFTP 的启动子核心区域(表 1)。

1.3 瞬时表达验证启动子核心区域

为验证 -296 到 -246 区域是否为 *FFT* 基因的启动子区域, 本研究将分离到的 FFTP 的 1 611 bp 和起始密码子上游 400 bp 的序列替换 pCAMBIA1301 载体

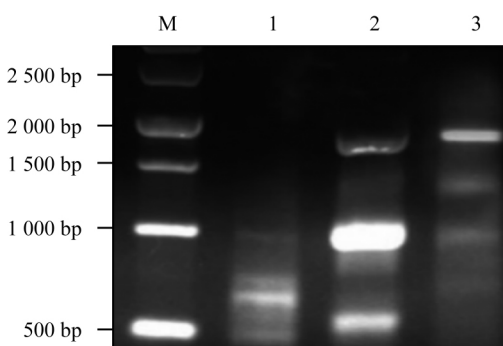


图 1 *I-FFT* 启动子 Tail-PCR 扩增电泳

注: M: 1 kb DNA Marker; 1: 第一轮 PCR 电泳; 2: 第二轮 PCR 电泳; 3: 第三轮 PCR 电泳

Figure 1 The electrophoresis of the amplification products in the process of tail-PCR for the promoter of *I-FFT*

Note: M: 1 kb DNA Marker; 1: First PCR electroporesis; 2: Second PCR electroporesis; 3: Third PCR electroporesis

表 1 FFTP 神经网络启动子预测

Table 1 The promoter prediction of FFTP in neural network promoter prediction software

序号	起始位点	终止位点	评分	序列启动子
No.	Initiation site	Termination site	Score	Promoter sequence
1	-1 565	-1 515	0.87	ATATACTTCCTATAATTAAGGTGGCGGTTATGGGAAGTTTTTAATTAATT
2	-1 376	-1 326	0.86	TAGAAGAGATAATAAAAAATCGGAAAAATCACAAAGGGACAATAAAAAATA
3	-1 346	-1 296	0.99	CAAAGGGACAATAAAAAATAGGGTGAGGCCAAACACACTCATCATACAAG
4	-1 242	-1 192	0.97	TGTAAAGGGTAAAAAAAGTGGTTGTGAGTGGAGGAGAGAGAAAATGTTAC
5	-1 192	-1 142	0.96	TGTTTCATCTGTATATTTGGGGGTGGGGGTTTAGGATTTTGGTGGTGGTGG
6	-837	-787	0.86	TAGAAGAGATAATAAAAAATCGGAAAAATCACAAAGGGACAATAAAAAATA
7	-807	-757	0.99	CAAAGGGACAATAAAAAATAGGGTGAGGCCAAACACACTCATCATACAAG
8	-296	-246	0.85	GAAAAATTACTAAAAAAACCCTCTATACATTAAGGTATCTTGGATGTAA

的 CaMV35S 启动子获得载体 pCAMBIA1301:FFT-P400 和 pCAMBIA1301:FFTP。将 pCAMBIA1301:FFTP400、pCAMBIA1301:FFTP 和 pCAMBIA1301 转化农杆菌 GV3101 后,在烟草叶片进行瞬时表达。GUS 染色后发现,对照 CaMV35S、FFTP 和 FFTP400 均具有驱动 GUS 基因表达的启动子活性。与 CaMV35S、FFTP 和 FFTP400 的活性明显较弱,但 FFTP 和 FFTP400 的活性差异不明显,说明 -296 到 -246 区域就是 *1-FFT* 基因的启动子核心区域(图2)。

1.4 顺式作用元件预测

为明晰 *1-FFT* 基因很有可能参与的生物学过程,通过 PlantCARE 对 FFTP 序列进行了生物信息学分析。FFTP 序列中共检测到 121 个顺式作用元件,除启动子所具备的基本元件 39 个 TATA-box 和 22 个 CAAT-box 之外,尚有 60 个参与 *1-FFT* 基因表达调控的顺式作用元件。在 60 个顺式作用元件中,26 个顺式作用元件能够预测其功能。参与光调控的 12 个,与 MYB 转录因子作用元件有 3 个,茉莉酸反应、厌氧

过程、脱落酸、抗逆反应的有 2 个,昼夜节律控制、生长素和赤霉素反应的调控元件各有 1 个(表 2)。

2 讨论

启动子位于转录起始位点上游,它就像“开关”,通过与转录因子的结合而控制基因活动。启动子含有部分功能元件,并且具有方向性,利用这些元件从而启动下游的基因的转录。启动子的长度具有不确定性,部分基因含有多个启动子从而调控不同转录本的表达。某些启动子表达具有时空性和组织特异性(邢冉冉和潘秋红,2016)。分析启动子的各类功能元件,有利于了解顺式作用元件对启动子活性的影响,为后续研究等位基因启动子功能差异以及下游基因作用机制提供丰富的理论基础(李涵哲等,2015)。该研究通过 Tail-PCR 方法得到了 *1-FFT* 启动子序列,并通过瞬时表达的方法进行了启动子核心区域的验证。PlantCARE 分析表明,FFT 5' 端上游序列含有多个启动子功能元件,其中包括:TATA-box、GATA-box 和 MYB-related 等元件,这个顺式作用元件分别参与逆境胁迫响应的茉莉酸反应、厌氧过程、脱落酸和抗逆反应作用元件。前期有研究表明,低温和干旱胁迫条件下果聚糖含量的增加有利于植物增强抗逆性(Ji et al., 2007)、缺氧(Albrecht et al., 1997)、盐害(Kafi et al., 2003)等。本研究进一步验证了果聚糖合成酶基因 *1-FFT* 可能参与植物的抗逆生理过程。此外果聚糖的合成积累都在植物的根部,该组织与其他组织相比,弱光是其主要特征,因此在 *1-FFT* 区域中存在较多的光反应与调控元件。

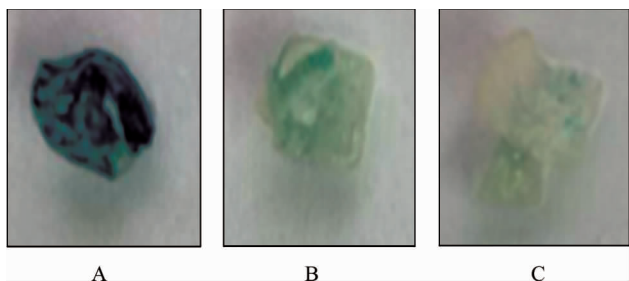


图 2 不同处理 GUS 染色后的烟草叶片

注: A: pCAMBIA1301; B: pCAMBIA1301: FFTP400; C: pCAMBIA1301: FFTP

Figure 2 The tobacco leaves after GUS staining in transient experiments treated with different constructs

Note: A: pCAMBIA1301; B: pCAMBIA1301: FFTP400; C: pCAMBIA1301: FFTP

3 材料与方法

3.1 实验材料

试验材料为‘青芋 1 号’菊芋(*Helianthus tuberosus*)

表 2 FFTP 区域具有功能注释的顺式作用元件特征

Table 2 The plant cis-acting regulatory elements with functions annotation in FFTP region

序号	位点名称	来源	位置	方向	评分	序列	功能注释
Item	Site name	Organism	Position	Strand	Score	Sequence	Function annotation
1	GATA-motif	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	687	+	7.0	GATAGGG	光响应元件 Part of a light responsive element
2	TCT-motif	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	160	+	6.0	TCTTAC	光响应元件 Part of a light responsive element
3	TCT-motif	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	565	+	6.0	TCTTAC	光响应元件 Part of a light responsive element
4	TCT-motif	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	556	+	6.0	TCTTAC	光响应元件 Part of a light responsive element
5	TCT-motif	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	1 167	-	6.0	TCTTAC	光响应元件 Part of a light responsive element
6	Box 4	缙叶石蛇床 <i>Petroselinum crispum</i>	88	+	6.0	ATTAAT	与光响应有关的保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
7	Box 4	缙叶石蛇床 <i>Petroselinum crispum</i>	1 458	-	6.0	ATTAAT	与光响应有关的保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
8	Box 4	缙叶石蛇床 <i>Petroselinum crispum</i>	130	+	6.0	ATTAAT	与光响应有关的保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
9	Box 4	缙叶石蛇床 <i>Petroselinum crispum</i>	97	+	6.0	ATTAAT	与光响应有关的保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
10	Box 4	缙叶石蛇床 <i>Petroselinum crispum</i>	1 434	-	6.0	ATTAAT	与光响应有关的保守 DNA 模块 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
11	MRE	缙叶石蛇床 <i>Petroselinum crispum</i>	521	-	7.0	AACCTAA	与光响应相关的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness
12	MRE	缙叶石蛇床 <i>Petroselinum crispum</i>	971	+	7.0	AACCTAA	与光响应相关的 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness
13	MBSI	矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	473	-	10.5	aaaAaaC(G/C)GTTA	与类黄酮合成相关 MYB 基因 MYB binding site involved in flavonoid biosynthetic genes regulation
14	P-box	水稻 <i>Oryza sativa</i>	1 027	-	7.0	CCTTTTG	赤霉素应答元件 Gibberellin-responsive element
15	CGTCA-motif	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	921	-	5.0	CGTCA	茉莉酸顺式作用元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
16	TGACG-motif	大麦 <i>Hordeum vulgare</i>	921	+	5.0	TGACG	茉莉酸顺式作用元件 Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness
17	G-Box	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	205	+	6.0	CACGTT	光响应顺式作用元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
18	G-Box	豌豆 <i>Pisum sativum</i>	931	+	6.0	CACGTT	光响应顺式作用元件 Cis-acting regulatory element involved in light responsiveness
19	Circadian	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	1 514	+	9.0	CAAAGATATC	昼夜响应顺式作用元件 Cis-acting regulatory element involved in circadian control

续表 2
Continuing table 2

序号 Item	位点名称 Site name	来源 Organism	位置 Position	方向 Strand	评分 Score	序列 Sequence	功能注释 Function annotation
20	ARE	玉米 <i>Zea mays</i>	943	+	6.0	AAACCA	厌氧诱导顺式调节元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
21	ARE	玉米 <i>Zea mays</i>	1 484	+	6.0	AAACCA	厌氧诱导顺式调节元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
22	ABRE	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	931	-	5.0	ACGTG	脱落酸反应顺式作用元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
23	ABRE	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	205	-	5.0	ACGTG	脱落酸反应顺式作用元件 Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness
24	TC-rich repeats	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	1 100	-	9.0	GTTTCTTAC	防御和应激反应顺式作用元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
25	TC-rich repeats	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	1 167	-	9.0	GTTTCTTAC	防御和应激反应顺式作用元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
26	TGA-element	芸苔 <i>Brassica oleracea</i>	1 199	+	6.0	AACGAC	生长素反应元件 Auxin-responsive element

L.), 由青海省农林科学院提供, 本氏烟草由青海省作物分子育种重点实验室提供。大肠杆菌(*E. coli*)菌株 TOP10、农杆菌 GV3101 菌株购自上海生物工程技术有限公司。小提质粒试剂盒, DNA 聚合酶购自 Thermo 公司, DNA Marker、Lodding Buffer、限制性内切酶、DNA 连接酶购于 NEB 公司, 凝胶回收试剂盒和 T 载体试剂盒购于甘肃鹏程生物工程有限公司。

3.2 基因组 DNA 提取

采用 CTAB 方法, 叶片液氮研磨后加 CTAB 提取液, 65°C 温育 30 min, 之后氯仿抽提后加异丙醇沉淀。沉淀的 DNA 水溶解后加 RNAaseA 去除 RNA 后再乙醇沉淀, 沉淀的 DNA 水溶备用。

3.3 PCR 和 Tail-PCR

PCR 扩增使用高保真酶 High-fidelity Phusion DNA polymerase (Thermo-Fisher Scientific) 在 GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) 梯度 PCR 扩增仪进行。反应程序为: 98°C 2 min; 98°C 10 s, 62°C 30 s, 72°C 2 min, 32 个循环; 72°C 10 min。Tail-PCR 根据已知的 FFT 序列, 在其 5' 端设计 3 个反向的巢式引物 SP1、SP2 和 SP3。参考文献选择 4 个简并引物 AD1-4 (表 3)。以 10 ng 的基因组 DNA 为模板, 3 个特异巢式引物与任一种随机引物进行 Tail-PCR 扩增

(反应体系及反应条件按文献进行)。反应产物通过琼脂糖凝胶上进行电泳分离检测, 将目的基因切胶后利用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Tiangen)回收。将回收片段加 A 后连接至 PGEM-Teasy 载体(Promega Corporation)上, 转化大肠杆菌 DH5α, 检测得到的阳性克隆送至华大公司测序。

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
AP1	NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA
AP2	TG(A/T)GNAG(G/C)ANCA(G/C)AGA
AP3	AG(A/T)GNAG(A/T)ANCA(A/T)AGG
AP4	(G/C)TTGNTA(G/C)TNCTNT
SP1	AGTCCAGTCAGTCACCAT
SP2	TACCAGTCCAGTCAGTCA
SP3	AGTCCAGTCAGTCACCAT
FFTP-F	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGTTATATA CTTACTGAATTGTGTT
FFTP-R	TTACCCTCAGATCTACCATGGGGTGACTG ACTGGACTGGTAAG
FFTP400-F	TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGCAATGGCA GATCCAGGGGTT
FFTP400-R	TTACCCTCAGATCTACCATGGGGTGACTG ACTGGACTGGTAAG

3.4 农杆菌介导的瞬时表达

利用重组方法将克隆到的 *FFT* 基因启动子序列和起始密码子上游 400 bp 区域替换 pCAMBIA1301 载体上启动 *GUS* 基因的 35S 启动子。*Pst* I 和 *Nco* I 双酶切 pCAMBIA1301 载体, 切除 *GUS* 基因前的 35S 启动子序列, 回收载体骨架后与扩增的 FFTP 和 FFTP400 片段进行重组反应(Vazyme 公司 One Step Cloning Kit)。反应产物转化大肠杆菌, PCR 检测阳性菌落后, 选取阳性菌落提取质粒, 测序确认 FFTP 和 FFTP400 已正确融合于 *GUS* 基因 5' 端, 获得 pCAMBIA1301:FFTP400 和 pCAMBIA1301:FFTP 载体。以空载体 pCAMBIA1301 为对照, 将测序正确的载体质粒采用液氮冻融法转化农杆菌 GV3101 菌株, PCR 验证后选阳性菌落备用。

挑取 PCR 检验正确的菌落接入 5 mL YEP (含抗生素 Kan 50 mg/L+Rif 25 mg/L+Gen 25 mg/L)液体培养基中, 28℃ 摇床(180 r/min)过夜培养。培养物 7 000 r/min 离心后收集菌体, 用 5 mL 的重悬液(含 10 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L MES, 150 μmol/L AS)重悬并室温静置 3 h。静置后的农杆菌(设重悬液阴性对照)注射 5 叶期的本氏烟草(约生长 1 个月)叶片, 每株注射 2~3 个叶片, 每个处理注射 2 株, 各设 2 个重复。注射后的植株培养在 25℃ 黑暗过夜后, 16 h 光照, 8 h 黑暗条件下生长。农杆菌注射后 3 d, 采集注射叶(2 个重复), 加 *GUS* 染液 37℃ 过夜染色, 再用 70% 的乙醇脱色(去除叶绿素)后观察并拍照。

3.5 生物信息学分析

使用 Vector NTI 10 生物学软件(Invitrogen)进行

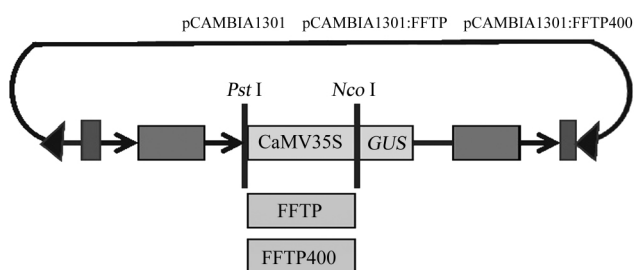


图 3 载体构建流程

注: 整个图形代表环形质粒; 每个方框代表功能元件; *Pst* I 和 *Nco* I 为酶切位点; CaMV35S, FFTP, FFTP400 为启动子序列; *GUS* 代表 β-葡萄糖苷酶基因

Figure 3 Carrier construction process

Note: The entire pattern represents the ring plasmid; Each box represents a functional element; *Pst* I and *Nco* I as restriction sites; CaMV35S, FFTP, FFTP400 as promoter sequence; *GUS* for β-glucuronidase gene

序列拼接及比对。Primer Primer 5.0 软件设计引物。利用神经网络启动子预测分析 NNPP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)软件进行启动子核心区域生物信息学分析, 利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线软件预测顺式作用元件。

作者贡献

孙雪梅是本研究的实验设计者和实验研究的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 宗渊参与实验设计, 试验结果分析; 杨世鹏和王丽慧是项目的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析; 张怀刚指导论文写作和修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31460523)、青海省应用基础研究项目(2016-ZJ-751)、青海省创新服务平台项目(2018-ZJ-T08)和青海省创新平台建设专项(2017-ZJ-Y18)共同资助。

参考文献

- Albrecht G., Biemelt S., and Baumgartner S., 1997, Accumulation of fructans following oxygen deficiency stress in related plant species with different flooding tolerances, *New Phytol.*, 136 (1): 137-144
- Bach Knudsen K.E., and Hessov I., 1995, Recovery of inulin from jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the small intestine of man, *Br. J. Nutr.*, 74(1): 101-113
- Bagherikia S., Pahlevani M., Yamchi A., Zaynalinezhad K., and Mostafaie A., 2018, Transcript profiling of genes encoding fructan and sucrose metabolism in wheat under terminal drought stress, *Journal of Plant Growth Regulation*, 38: 148-163
- Benkeblia N., Onodera S., and Shiomi N., 2003, Effect of temperature and storage time on fructosyltransferase activities (1-Fft and 6G-Fft) in onion bulb tissues, *Acta Agriculturae Scandinavica*, 53(4): 211-214
- Cheng S.H., Xie C.H., and Liu J., 2002, Recent progress in studies on fructans in higher plants, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 19(3): 280-289 (成善汉, 谢从华, 柳俊, 2002, 高等植物果聚糖研究进展, *植物学通报*, 19 (3): 280-289)
- Ende W.V.D., and Laere A.V., 1996, Variation in the *in vitro* generated fructan pattern from sucrose as a function of the purified chicory root 1-SST and 1-FFT concentrations, *J. Exp. Bot.*, 47(304): 1797-1803

- Im V.D.M., Koops A.J., Hakkert J.C., and Van Tunen A.J., 1998, Cloning of the fructan biosynthesis pathway of jerusalem artichoke, *Plant J.*, 15(4): 489-500
- Ji X.M., Ende W.V.D., Schroeven L., Clerens S., Geuten K., Cheng S.H., and Bennett J., 2007, The rice genome encodes two vacuolar invertases with fructan exohydrolase activity but lacks the related fructan biosynthesis genes of the pooideae, *New Phytol.*, 173(1): 50-62
- Kafi M., Stewart W.S., and Borland A.M., 2003, Carbohydrate and proline contents in leaves, roots, and apices of salt-tolerant and salt-sensitive wheat cultivars, *Russian Journal of Plant Physiology*, 50(2): 155-162
- Koops A.J., and Jonker H.H., 1996, Purification and characterization of the enzymes of fructan biosynthesis in tubers of *Helianthus tuberosus* colombia, *Plant Physiol.*, 110(4): 1167-1175
- Kou Y.X., Lü S.Q., Liu J.Q., and Zhao C.M., 2014, The review of *Helianthus tuberosus* L. and its comprehensive utilization as abioenergy plant rich in oligosaccharide, *Shengming Kexue (Chinese Bulletin of Life Sciences)*, 26(5): 451-457 (寇一翮, 吕世奇, 刘建全, 赵长明, 2014, 寡糖类能源植物菊芋及其综合利用研究进展, *生命科学*, 26(5): 451-457)
- Li H.Z., Jiang M., Sun M.Y., Chen W., Li Y., Li Y.G., Meng F.L., and Li W.B., 2015, Cloning and function analysing of *Gm-GolS2* gene promoter in soybean, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(12): 2683-2689 (李涵哲, 姜敏, 孙铭阳, 陈薇, 李悦, 李永光, 孟凡立, 李文滨, 2015, 大豆 *GmGolS2* 基因启动子的克隆及功能分析, *基因组学与应用生物学*, 35(12): 2683-2689)
- Man L.L., Xiang D.J., Niu M., Li F.Y., Meng X.C., Li X.H., Yang J., Wang F.F., Sui C.G., and Zhang C.F., 2014, Function of jerusalem artichoke and its applications in food, *Xumu Yu Siliao Kexue (Animal Husbandry and Feed Science)*, 35(5): 50-52 (满丽莉, 向殿军, 牛墨, 李凤玉, 孟祥晨, 李晓红, 杨静, 王菲菲, 隋春光, 张春风, 2014, 菊芋的功能及其在食品中的应用, *畜牧与饲料科学*, 35(5): 50-52)
- Pollock C.J., 1986, Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants, *New Phytol.*, 104(1): 1-24
- Pollock C.J., and Cairns A.J., 1991, Fructan metabolism in grasses and cereals, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 42(1): 77-101
- Saengthongpinit W., and Sajjaanantakul T., 2005, Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers, *Postharvest Biology and Technology*, 37(1): 93-100
- Spollen W.G., and Nelson C.J., 1994, Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue, *Plant Physiol.*, 106(1): 329-336
- Suárez-González E.M., López M.G., Délano-Frier J.P., and Gómez-Leyva J.F., 2014, Expression of the 1-SST and 1-FFT genes and consequent fructan accumulation in *Agave tequilana* and *A. inaequidens* is differentially induced by diverse (a) biotic-stress related elicitors, *J. Plant Physiol.*, 171(3-4): 359-372
- Xing R.R., and Pan Q.H., 2016, Molecular cloning and light response of the *Vv5GT3* gene promoter from cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.), *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(11): 3128-3134 (邢冉冉, 潘秋红, 2016, ‘赤霞珠’葡萄 *Vv5GT3* 基因启动子的克隆及其对光照的响应, *基因组学与应用生物学*, 35(11): 3128-3134)
- Yue A.Q., Li A., Mao X.G., Chang X.P., Li R.Z., and Jing R.L., 2017, Single-nucleotide polymorphisms, mapping and association analysis of *1-Ffi-A1* gene in wheat, *J. Int. Agr.*, 16(4): 789-799