

研究报告

Research Report

菊芋果聚糖 1- 果糖基转移酶 1-FFT 基因的克隆及表达分析

杨世鹏¹ 刘宝龙² 王丽慧¹ 赵孟良¹ 钟启文¹ 李莉¹ 孙雪梅^{1*}

1 青海大学农林科学院菊芋研发中心, 青海省蔬菜遗传与生理重点实验室, 西宁, 810016; 2 中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001

* 通讯作者, sunxuemei1008@163.com

摘要 果聚糖作为一种重要的渗透调节物质, 与植物碳素分配和抗逆性的密切相关。为明确果聚糖在植物生长发育过程中的作用, 本研究以菊芋为材料, 克隆出果聚糖 1- 果糖基转移酶 1-FFT 基因, 其 CDS 长 2 025 bp, 编码 641 个氨基酸, 该蛋白的分子量(Mw)为 73.906 kD, 蛋白的等电点(pI)为 10.01。进化树分析显示菊芋中 1-FFT 基因与维氏菊的 1-FFT 基因进化距离最近, 具有较高的保守性。荧光定量检测结果显示, 1-FFT 基因在菊芋的叶、根、花、茎和块茎中均有表达, 其中在块茎中表达量最高。本研究为解析果聚糖合成酶的分子调控机理及功能鉴定提供依据。

关键词 菊芋, 1-FFT 基因, 克隆, 表达分析

Cloning and Expression Analysis of Fructan: fructan 1 -fructosyl-transferase 1 -FFT Gene in Jerusalem Artichoke

Yang Shipeng¹ Liu Baolong² Wang Lihui¹ Zhao Mengliang¹ Zhong Qiwen¹ Li Li¹ Sun Xuemei^{1*}

1 Research and Development Center of the *Helianthus Tuberosus* L., Qinghai Academy of Agriculture and Forestry, Qinghai Province Laboratory of Vegetable Genetics and Physiology, Xi'ning, 810016; 2 Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xi'ning, 810001

* Corresponding author, sunxuemei1008@163.com

DOI: 10.13271/j.mpb.014.000337

Abstract Fructan as an important osmotic regulation substances and is closely related to the carbon distribution and resistance of plants. To identify the role of fructan in plant growth and development process, we used Jerusalem artichoke clone Fructan:fructan 1 -fructosyltransferase 1-FFT gene. The CDS of 1-FFT is 2 025 bp in length which presumably code 641 amino acids; Its MW is 51.29 kD with the isoelectric point 10.01. Phylogenetic analysis showed that Jerusalem artichoke 1-FFT gene was closest with *Cichorium intybus* L. and *Lactuca sativa* 1-FFT gene. qPCR results shows that:1-FFT gene was expressed in the Jerusalem artichoke leaves, roots, flowers, stems and tubers, among the highest expression in the tubers. This study provides further insight into analyzing the molecular regulation mechanism and function of identification in fructan synthetase.

Keywords Jerusalem Artichoke, 1-FFT gene, Cloning, Expression analysis

果聚糖是温带和冷寒地区植物非结构性碳水化合物的主要贮藏方式。目前约 15% 的被子植物中发现含有果聚糖, 被认为是植物的第三种碳水化合物贮藏形式, 主要存在于菊科、禾本科、百合科等植物中(Vijn and Smeekens, 1999)。果聚糖在植物中除作为贮藏性碳水化合物外, 其代谢还是植物调节环境胁迫的一种重要机制, 它的积累和降解可以使植物在多种生物或非生物胁迫下的适应性增强, 如干旱(Joudi et al., 2012)、寒冷(Kawakami et al., 2005)、盐碱

(Zhao et al., 2006)等。植物中的果聚糖因其不同的糖苷键连接方式, 主要分 5 种类型: 菊粉型、梯牧草型、混合型梯牧草型、菊粉型新生系列和梯牧草型新生系列(Roberfroid, 2007)。

菊芋(*Helianthus tuberosus* L.)是典型的果聚糖积累植物, 贮藏直链的菊粉型果聚糖, 其块茎中果聚糖含量占干物质的 85% 以上, 聚合度在 3~35 之间 (Marx et al., 1997)。从菊芋等植物中提取的果聚糖是许多食品的重要添加成分, 作为益生元促进益生菌

基金项目 本研究由国家自然科学基金项目(31460523)和青海省科技厅应用基础研究项目(2013-Z-718)共同资助

的增殖,具有多种健康功能(Ritsema and Smeekens, 2003)。菊芋中果聚糖的合成以蔗糖为底物,由蔗糖:蔗糖 1-果糖基转移酶(1-SST)和果聚糖:果聚糖 1-果糖基转移酶(1-FFT)催化,在 1-SST 作用下催化两个蔗糖分子形成一个 1-蔗果三糖分子,在 1-FFT 催化下延伸 1-蔗果三糖形成长链果聚糖。

本研究以菊芋为研究材料,克隆分离出 1-FFT 基因,通过生物信息学的方法分析该基因的核酸和氨基酸序列,预测了该编码蛋白的二级结构,同时通过对不同部位 1-FFT 基因的表达情况进行分析,旨在深入研究 1-FFT 基因的功能,为研究菊芋中果聚糖合成代谢的分子调控机理提供依据。

1 结果与分析

1.1 菊芋总 RNA 的提取

本研究通过 CTAB 法提取菊芋幼嫩叶片的总 RNA,通过 1% 琼脂糖电泳检测 28S 和 18S RNA 条带清晰可见,利用紫外分光光度计测得提取 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 和 OD_{260}/OD_{230} 的比值均为 2.0 左右,表明提取的 RNA 质量较好,可用于后续试验。

1.2 1-FFT 基因的克隆

利用全长特异引物 1-FFT-F 和 1-FFT-R(表 1),在“青芋 1 号”菊芋中扩增得到了 1-FFT CDS 片段(图 1),将该条带回收,连接克隆载体 pMD19-T,转化大肠杆菌 DH5 α 后菌液 PCR 验证测序,显示与电泳片段大小一致。经 Blast 对比后确认该序列为菊芋 1-FFT 基因片段。

1.3 1-FFT 基因的生物信息学分析

通过生物信息学软件分析 1-FFT 基因(图 2),结果显示:1-FFT 基因 CDS 序列为 2 025 bp,编码 641

表 1 引物序列

Table 1 Sequences of the primers

引物名称	引物序列(5'-3')
Name of primer	Sequence of primer (5'-3')
1-FFT-F	GGAATTCCATATGGTCCAGTCAG TCACCATGCA
1-FFT-R	CCGCTCGAGTTCCCATAAACACC ATTCAT
Actin-F	CTGGAATGGTCAAGGCTGGT
Actin-R	TCCTTCTGTCCCATCCCTACC
1-FFT-QF	GAGCCCGGTTCAATCATTCC
1-FFT-QR	TGGTCCCAAACCTCCCCTTT

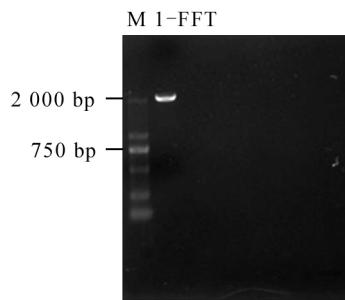


图 1 1-FFT 的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of 1-FFT

个氨基酸,该蛋白的分子量(Mw)为 73.906 kD,蛋白的等电点(pI)为 10.01,疏水性弱(图 3),1-FFT 蛋白不具跨膜结构,理论推算 1-FFT 蛋白半衰周期大于 30 h,不稳定系数为 46.08,属于不稳定蛋白。通过在线工具分析 1-FFT 蛋白的二级结构,结果显示:不规则卷曲结构所占比例最大,为 43.68%;其次为延伸结构、 α -螺旋和 β -转角,分别为 31.20%、15.91% 和 9.20%(图 4)。说明 1-FFT 蛋白的二级结构的组成主要由不规则卷曲结构构成。

1.4 菊芋 1-FFT 同源比对及进化分析

从 Genebank 上下载跟 1-FFT 同源的基因,利用 MEGA6.0 进行多序列比对,将菊芋(*Helianthus tuberosus*)、菊苣(*Cichorium intybus* JQ346800.1)、莴苣(*Lactuca sativa* EU293871.1)、大豹毒(*Doronicum pardalianches* AJ811696.1)、牛蒡(*Arctium lappa* AB47946.1)、维氏菊(*Viguiera discolor* AJ811625.1)、雏菊(*Bellis perennis* AJ811697.1)、硬叶蓝刺头(*Echinops ritro* AJ-811624.1)、西洋蒲公英(*Taraxacum officinale* AJ8295-50.1)、朝鲜蓟(*C.scolymus* Y09662.1)的 1-FFT 蛋白序列进行多重比较,结果显示:各个植物的 1-FFT 基因的氨基酸序列都具有一些序列保守的结构域(图 5),这些结构域都属于糖基水解酶 32 家族。利用邻位相接法构建 1-FFT 蛋白序列进化树分析,结果表明不同物种间 1-FFT 基因的氨基酸序列同源性较高,其中菊芋中 1-FFT 与维氏菊的 1-FFT 基因进化距离最近,与同属不同科的雏菊、蓝刺头和朝鲜蓟等进化距离较远(图 6)。

1.5 菊芋 1-FFT 基因的表达特征分析

采用实时荧光定量 PCR 方法研究 1-FFT 基因在菊芋花期不同器官的表达模式,结果表明 1-FFT 在菊芋叶片、茎段、根、花及块茎中均有表达,但在不同组织中的表达水平有显著差异。从图 7 中可以看

1 : M P A G R R F R S S F P * H H S F I T R
 1 : ATGCCCTGCAGGTCGACGATTCCGCTCGAGTTCCCATAACACCATTCAATTATTACTAGA
 21 : S T I T R T N I Y Q T K R F K R K L R Y
 61 : AGCACAATAACAAGAACTAATATTTATCAAACAAAAAGGTTAAAAGAAAATTAAAGATAC
 41 : I N T D N K K D S D S R * L K R V L M N
 121 : ATAAATACCGATAACAAAAAGGATAGCGATAAGCCGGTAATTAAAACGAGTATTGATGAAT
 61 : W C R S H L P N L E R C F H T R T C G V
 181 : TGGTGCAGAACGCCATTGCCAAATCTTGAGAGATGCTTCACACTCGTACCTGTGGCGTT
 81 : V E Q E Q L R L F V Y R F C W I R P * C
 241 : GTTGAACAAAGAACAGCTTCGCTTGTCTGTATATCGCTTTGGATACGCCCTTGATGT
 101 : Y N R P S S L R K P L H Y R M I H Q * P
 301 : TATAACCCTGCCTCCCTGCACAAACCCCTCCACTATCGAATGATCCACCAATAGCCT
 121 : H C E F F I I * H R N S A P I H H S L P
 361 : CATTTGTGAGTTCTCATCTAACACAGGAACAGTGCTCCCATACACCACTCTCCCC
 141 : I I I * * P * L I G T K M C R H T S I
 421 : ATCATAATCTAGTGTGACCTTAGCTTACGGTACAAAAATGTGTCGACACACCTCCATC
 161 : G L F S Y I E I N R S * L R K G S I G *
 481 : GGCCTTTTAGCTATATAGAAATAAACCGGAGTTAACTCAGAAAGGGTTCCATCGGCTAG
 181 : N R K T K W S Q T S P L G C T * A S G A
 541 : AACCGCAAGACCAAATGGTCCCAAACCTCCCTTGGGCTGCACCTAACGCTAGTGGTGCA
 201 : T I N I I G F T C R V Q R C L I H L K C
 601 : ACCATAAATATCATCGGTTCACATGTCGCGTTCAACGCTGTTGATCCACCTCAAATGT
 221 : C N Y V Q L C S R A Y V E W N D * T G L
 661 : TGCAACTATGTCCAACGTGTAGCCGTGCCTATGTCGAGTGGAAATGATTGAACCGGGCTC
 241 : * L D L F K L L T V V S Q T L D F L N G
 721 : TAGCTTGATCTTTAAACTCTGACCGTTGATCTCAAACCTCTGACCTTCCTCAAACGGG
 261 : P M K * M G P G L S I * Y N C S S N I I
 781 : CCAATGAAGTAAATGGGTCCCCTGTTCTATCTAGTACAATTGTTCTCCAAACATTATA
 281 : N Y C P S S R E V L I N T I * F C N I T
 841 : AACACTGCCATCCTCTAGAGAGGTCTGATCAACACTATCTGATTCTGCAACATAACC
 301 : P S D P P F L Q W V I K T L * C K K P P
 901 : CCAAGTGATCCTCCTTCTCAATGGGTCAAAAGACTCTTGATGCAAAAAACCTCCC
 321 : V I A P * P D T D I * F R V I R S P F I
 961 : GTAATCGCACCGTAACCCGATAACCGACATCTAGTTCCGGTTATCCGGAGTCCATTATC
 341 : I Y R V I C P D * I P I H S M S L P T F
 1021 : ATTATCGCGTCATATGTCGGATTGAATACCAATCCATTCCATGTCCTCCCAACTTTC
 361 : F N N V F D T R P I G R H I K C T I I G
 1081 : TTTAATAACGTGTTGATACCCGACCCATAGGCCGCATATCAAGTGCACATCATTGGT
 381 : * * N R V K V D A F P H I G V G N R V Q
 1141 : TAATGAAACCGGGTAAAGTCGACGCATTCCCACATATCGGTTGGGAACAGAGTGC
 401 : R L I Q Q L V V R V I S G M V N K Y H A
 1201 : CGGCTCATCCAACAACCTCGTAGTTCTGTAATCAGGGTATGGTAAACAAGTACCATGCC
 421 : C I A T F S S H D H P M L S I G T R P D
 1261 : TGTATTGCCACGTTAGTCCCATGATCATCCTATGCTTCATCGGGACCCGTCCAGAC
 441 : C * R V P V V H * P N P R W S V Q N W V
 1321 : TGTTGACGGGTCCCGGTAGTCCACTAACCAATCCCCGGTGGAGTGTACAGAAATTGGGTT
 461 : I V I L D P L N K K R V R * V Y G Y S F
 1381 : ATCGTCATACTTGACCCACTCAATAAGAAGCGGGTCAGATAAGTTACGGTACAGCTT
 481 : A L * L G K I I S V P S I Q C K D L T V
 1441 : GCATTGTAATTGGGAAAAATCATTAGCGTCCCGAGTATAACATGCAAAGATCTGACCGTT
 501 : W K G R G R P G * D A L D I I P F G R D
 1501 : TGGAAAGGGCGTGGTAGACCCGATAAGACGCCCTCGATATCATTGGTGGGAC
 521 : H S D W Q L V P V D H V F G H * V T P *
 1561 : CATAGCGACTGGCAGCTCGTACAGTTGATCATGTCCTGGACACTGAGTGACCCCATGA
 541 : H I A P N R C V W V V L I E Q M V P A H
 1621 : CATATTGCCCAAACCGGTGCGTATGGGTGATTGATAGAACAAATGGTACCGCCCAT
 561 : V K Q R T I W I V N K I L G R L K M K S
 1681 : GTAAAAACACGGACCATTGGATCGTAATAAAATCTGGCAGGGCTGAAAATGAAAAGC
 581 : G P F P R Q A I G L R I P Y N R F L R I
 1741 : GGTCCGTTCCACGACAAGCGATCGGCCCTGCGAATACCTTATAATAGATTCTCCGAATT
 601 : G D D T N R R I L L G * N N E Y D S E S
 1801 : GGTGACGATACGAAACAGAAGAATTCTGGGTTAGAACAAATGAGATAGCGAAAGT
 621 : N E Q Y S K G D T G H N P G E Q R F C G
 1861 : AATGAACAATAACAGCAAGGTGACACCGGACACAAACCTGGTGAACAAAGGTTTGTGGT
 641 : G L * W W W W V V V V Q * G C V G F
 1921 : GGTTTGTGATGGGGGGTGGTGGTGGTGGTGGTCCAGTAGGGGTGTGTGGGGTT
 661 : M F K V C K G F R G L H G D *
 1981 : ATGTTCAAGGTCTGTAAGGGTTCAAGGGTTGCATGGTGACTGA

图 2 菊芋 1-FFT 基因的核酸及氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide and amino acid sequence of Jerusalem artichoke 1-FFT gene

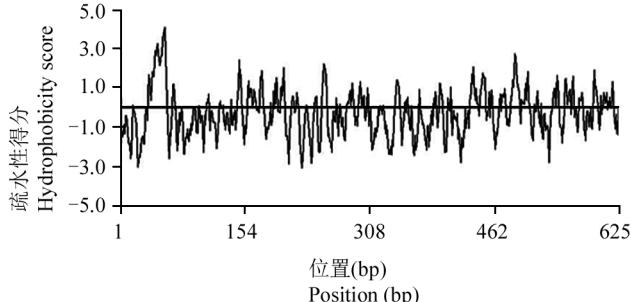


图 3 菊芋 1-FFT 基因编码蛋白的疏水性分析

Figure 3 Hydrophobicity analysis of encoding protein from Jerusalem artichoke 1-FFT gene

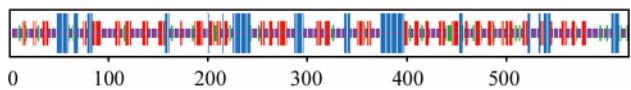


图 4 菊芋 1-FFT 基因编码蛋白二级结构预测

注: 紫色为无规则卷曲, 红色为延伸结构, 蓝色为 β -螺旋, 绿色为 β -转角

Figure 4 Jerusalem artichoke 1-FFT gene encoding protein secondary structure prediction

Note: Purple is Random coil, red is the Extended strand, blue is β -helix, green is β -turn

出 1-FFT 基因在块茎中的表达量最高, 在茎中次之; 在叶、根、花中表达量相对较低。

2 讨论

由于果聚糖代谢与植物碳素分配和抗逆性的密切联系, 及其产品对人类健康的诸多生理功能, 使其代谢分子调控机制研究成为当前的热点。植物果聚糖代谢的关键酶 1-SST、1-FFT 和果聚糖外水解酶(FEH)均被认为源自蔗糖转化酶(INV), 这些蛋白的主要结构与糖苷水解酶家族(GH)32 高度相似(Van den Ende et al., 2009), 并且这些酶通过几个氨基酸的改变即可相互转化(Verhaest et al., 2007; Schroeven et al., 2008; Lasseur et al., 2009)。本研究克隆了菊芋 1-FFT 基因, 通过氨基酸序列分析表明, 菊芋 1-FFT 蛋白和其他植物的 1-FFT 蛋白相比, 在 N 端存在较大差异, 在 C 端都具有保守的特性, 说明 1-FFT 蛋白具有较高的保守区域, 同时不同物种间又有可变的区域, 这种结构保证了 1-FFT 基因功能的专一性, 同时又可以使 1-FFT 基因具有不同的激活因素。进一步利用 MEGA 进化树分析的结果显示, 菊科植物 1-FFT 基因基本表现出近源属内距离较近, 远源属间相对较远的特点。

菊芋是提取和加工果聚糖产品的主要来源之一, 其块茎中积累的果聚糖的聚合度很大程度上决定了

加工品质。1-FFT 是菊芋果聚糖合成和决定其聚合度的关键酶, 催化高聚合度的菊糖型果聚糖的形成。研究表明, 在菊芋生长发育前期, 主要在叶片中合成 1-蔗果三糖, 转移到茎中暂时贮存, 在花期和块茎膨大期, 茎中合成部分高聚合度果聚糖的同时, 果聚糖由茎向块茎中迅速转移, 并在块茎中大量合成高聚合度果聚糖并贮存起来(李莉等, 2012)。本研究在菊芋花期不同器官的 1-FFT 表达结果表明: 1-FFT 基因在菊芋各器官均有表达, 但呈现出较大的差异性, 在块茎中表达量最高, 茎次之, 叶、花和根中较低。

3 材料与方法

3.1 材料和试剂

供试菊芋品种“青芋 1 号”来源于青海大学农林科学院菊芋研发中心, 在菊芋开花期取根、茎段、叶片、花和块茎, 并迅速将其投入液氮速冻, 保存于 -80°C 中用于提取 RNA。

本实验所用的 pMD19-T 克隆试剂盒购自 TaKaRa 公司, RNAPrep Pure Plant Kit, DH5 α , DNA Marker, SuperReal PreMix (SYBR Green)、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自天根公司, high-fidelity Phusion DNA polymerase, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo 公司。

3.2 植物基因组总 RNA 及 cDNA 准备

采用 RNA 提取试剂盒提取“青芋 1 号”叶片的总 RNA。微量紫外检测仪 Thermo NANODROP 2000C 测量 RNA 样品浓度。反转录试剂盒将 1 μ g 植物总 RNA 反转录为 cDNA。

3.3 1-FFT 基因的克隆

以已发表植物的 1-FFT 基因的保守区域设计引物, 以 1-FFT-F 和 1-FFT-R 为引物, 1-FFT 编码区的扩增使用高保真酶在 Eppendorf Mastercycler gradient PCR 扩增仪进行。PCR 程序为 98°C 2 min, 98°C 15 s, 55°C 30 s, 72°C 2 min, 35 个循环, 72°C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳分离检测, 将目的带切胶用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒将 PCR 目的片段回收。将回收的 PCR 产物连接至 pMD19-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 阳性克隆送华大基因公司测序。

3.4 1-FFT 生物信息学分析

用 DNAMAN 软件分析推测 1-FFT 基因编码蛋

Cloning and Expression Analysis of Fructan:fructosyl- transferase 1-FFT Gene in Jerusalem Artichoke

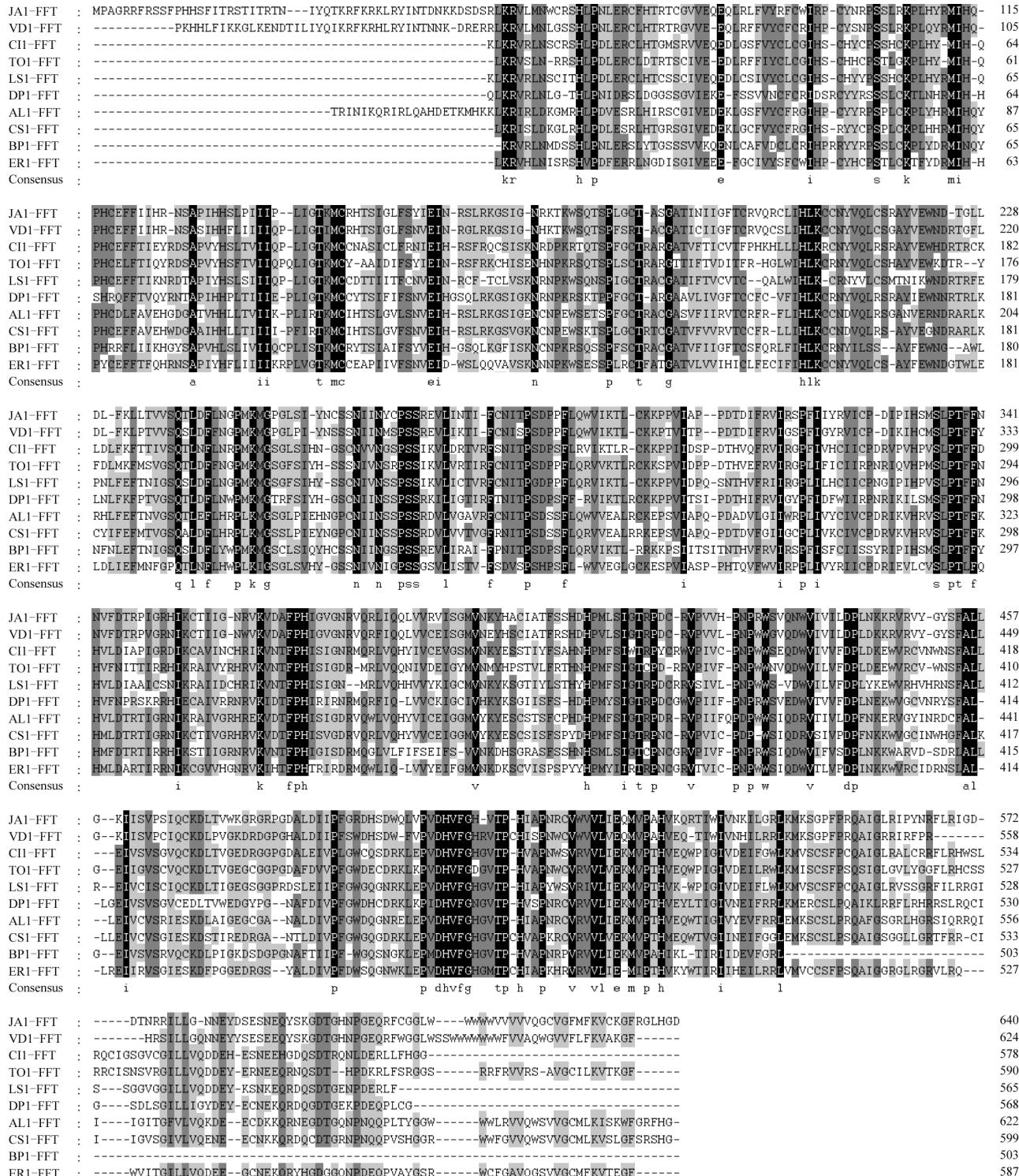


图 5 1-FFT 蛋白氨基酸序列和其他物种 1-FFT 同源蛋白的多重比对

注: Ja1-FFT: 菊芋(*Helianthus tuberosus*); Vd1-FFT: 维氏菊(*Viguiera discolor* AJ811625.1); Ci1-FFT: 菊苣(*Cichorium intybus* JQ346800.1); To1-FFT: 西洋蒲公英(*Taraxacum officinale* AJ829550.1); Ls1-FFT: 莴苣(*Lactuca sativa* EU293871.1); Dp1-FFT: 大豹毒(*Doronicum pardalianches* AJ811696.1); Al1-FFT: 牛蒡(*Arctium lappa* AB47946.1); Cs1-FFT: 朝鲜薊(*C.scolymus* Y09662.1); Bp1-FFT: 雉菊(*Bellis perennis* AJ811697.1); Er1-FFT: 蓝刺头(*Echinops ritro* AJ811624.1)

Figure 5 Multiple sequences alignment of 1-FFT protein amino acid sequence with that of other species

Note: Ja1-FFT: *Helianthus tuberosus* (AJ009756.1); Vd1-FFT: *Viguiera discolor* (AJ811625.1); Ci1-FFT: *Cichorium intybus* (JQ346800.1); To1-FFT: *Taraxacum officinale* (AJ829550.1); Ls1-FFT: *Lactuca sativa* (EU293871.1); Dp1-FFT: *Doronicum pardalianches* (AJ811696.1); Al1-FFT: *Arctium lappa* (AB47946.1); Cs1-FFT: (*C.scolymus* Y09662.1); Bp1-FFT: *Bellis perennis* (AJ811697.1); Er1-FFT: *Echinops ritro* (AJ811624.1)

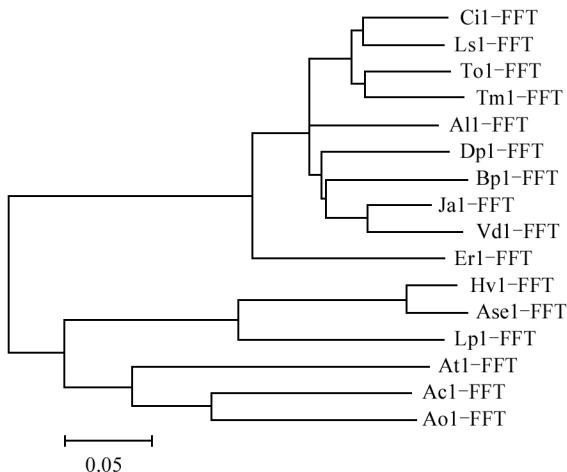


图 6 不同物种的 1-FFT 基因进化树

注: Ja1-FFT: 菊芋(*Helianthus tuberosus*); Vd1-FFT: 维氏菊(*Viguiera discolor* AJ811625.1); Bp1-FFT: 雏菊(*Bellis perennis* AJ-811697.1); Dp1-FFT: 大豹毒(*Doronicum pardalianches* AJ811696.1); Al1-FFT: 牛蒡(*Arctium lappa* AB47946.1); Ci1-FFT: 菊苣(*Cichorium intybus* JQ346800.1); Ls1-FFT: 莴苣(*Lactuca sativa* EU293871.1); To1-FFT: 西洋蒲公英(*Taraxacum officinale* AJ8-29550.1); Tm1-FFT: 蒲公英(*Taraxacum mongolicum* AJ250634.1); Er1-FFT: 蓝刺头 (*Echinops ritro* AJ811624.1); Ta1-FFT: 小麦(*Triticum aestivum* EU981916.1); Ase1-FFT: 山羊草(*Aegilops searsii* ACH73189.1); Lp1-FFT: 黑麦草(*Lolium perenne* AY24-5431.1); At1-FFT: 龙舌兰(*Agave tequilana* EU026119.1); Ao1-FFT: 芦笋(*Asparagus officinalis* AB115555.1); Ac1-FFT: 洋葱(*Allium cepa* AJ006066.1); As1-FFT: 大蒜(*Allium sativum* AY-098442.1)

Figure 6 Phylogenetic trees of 1-FFT nucleotides sequence from various species

Note: Ja1-FFT: *Helianthus tuberosus* (AJ009756.1); Vd1-FFT: *Viguiera discolor* (AJ811625.1); Bp1-FFT: *Bellis perennis* (AJ-811697.1); Dp1-FFT: *Doronicum pardalianches* (AJ811696.1); Al1-FFT: *Arctium lappa* (AB47946.1); Ci1-FFT: *Cichorium intybus* (JQ346800.1); Ls1-FFT: *Lactuca sativa* (EU293871.1); To1-FFT: *Taraxacum officinale* (AJ829550.1); Tm1-FFT: *Taraxacum mongolicum* (AJ250634.1); Er1-FFT: *Echinops ritro* (AJ811624.1); Ta1-FFT: *Triticum aestivum* (EU981916.1); Ase1-FFT: *Aegilops searsii* (ACH73189.1); Lp1-FFT: *Lolium perenne* (AY245431.1); At1-FFT: *Agave tequilana* (EU026119.1); Ao1-FFT: *Asparagus officinalis* (AB115555.1); Ac1-FFT: *Allium cepa* (AJ006066.1); As1-FFT: *Allium sativum* (AY098442.1)

蛋白的氨基酸组成。用 Primer 5.0 (Premier Biosoft)软件进行引物设计 ,Prot Scale (<http://ca.expasy.org/tools/Protscale.html>)工具推测其疏水性 ,Prot Param (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)推测其分子量和等点电 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma).

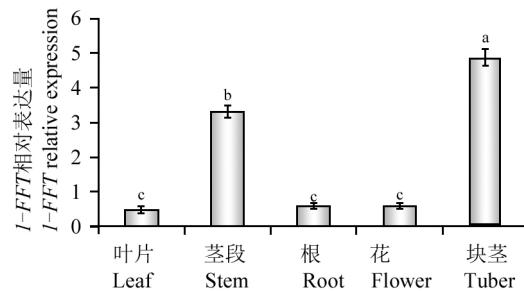


图 7 菊芋 1-FFT 基因在不同组织中的表达量分析

Figure 7 Expression of 1-FFT at different stages of tissue

html) 推测其二级结构 ,MEGA6.0 构建 1-FFT 蛋白系统进化树。

3.5 1-FFT 基因表达分析

根据基因特征设计实时荧光定量引物 1-FFT-QF 和 1-FFT-QR (表 1) ,以 Actin 为内参基因 ,分别选取菊芋的根、茎、叶、花和块茎部位 ,提取 RNA 并检测其浓度 ,每个样品用 300 ng 反转录 ,使用 Bio-Rad iQ5 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增 ,分析该基因在菊芋不同部位中的表达情况 ,反应程序如下 :95°C 5 min ,95°C 10 s ,60°C 30 s ,72°C 20 s 扩增 40 个循环。反应结束后进行扩增曲线和溶解曲线评价 ,基因表达采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

作者贡献

孙雪梅是本研究的构思者和负责人 ,指导数据分析和论文写作 杨世鹏、赵孟良和王丽慧是实验设计和研究执行人 杨世鹏完成数据分析和论文初稿的写作 赵孟良、钟启文、李莉参与了实验设计 ;刘宝龙指导实验设计。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)和青海省科技厅应用基础研究项目(2013-Z-718)共同资助。

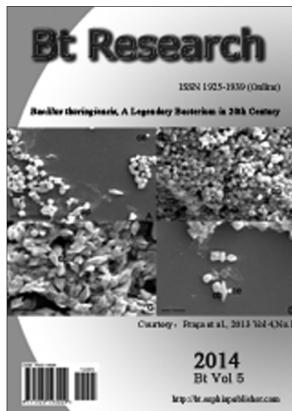
参考文献

- Joudi M., Ahmadi A., Mohamadi V., Abbasi A., Vergauwen R., Mohammadi H., and Van den Ende W., 2012, Comparison of fructan dynamics in two wheat cultivars with different capacities of accumulation and remobilization under drought stress, *Physiol. Plant*, 144(1):1-12
 Kawakami A., Yoshida M., and Van den Ende W., 2005, Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading

- small graminans like bifurcose, *Gene*, 358:93-101
- Lasseur B., Schroeven L., Lammens W., Le Roy K., Spangenberg G., Manduzio H., Vergauwen R., and Van den Ende W., 2009, Transforming a fructan:fructan 6G-fructosyltransferase from perennial ryegrass into a sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase, *Plant Physiol.*, 149(1): 327-339
- Li L., Zhong Q.W., and Sun X.M., 2012, *Helianthus tuberosus* L., Qinghai People's Publishing House, Xingning, China, pp. 48-58 (李莉, 钟启文, 孙雪梅, 2012, 菊芋, 青海人民出版社, 中国, 西宁, pp.48-58)
- Marx S.P., Nosberger J., and Frehner M., 1997, Seasonal variation of fructan- β -fructosidase (FEH) activity and characterization of a β - (2-1)-linkage specific FEH from tubers of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), *New Phytol.*, 135(2): 267-277
- Ritsema T., and Smeekens S., 2003, Fructans: beneficial for plants and human, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 6(3): 223-230
- Roberfroid M.B., 2007, Inulin-type fructans: functional food ingredients, *The Journal of Nutrition*, 137(11): 2493-2502
- Schroeven L., Lammens W., Van Laere A., and Van den Ende W., 2008, Transforming wheat vacuolar invertase into a high affinity sucrose: sucrose 1-fructosyltransferase, *New Phytologist*, 180(4): 822-831
- Vijn I., and Smeekens S., 1999, Fructan: more than a reserve carbohydrate, *Plant Physiol.*, 120(2): 351-360
- Van den Ende W., Lammens W., Van Laere A., Schroeven L., and Le Roy K., 2009, Donor and acceptor substrate selectivity among plant glycoside hydrolase family 32 enzymes, *the FEBS Journal*, 276(20): 5788-5798
- Verhaest M., Lammens W., Le Roy K., De Ranter C.J., Van Laere A., Rabijns A., and Van den Ende W., 2007, Insights into the fine architecture of the active site of chicory fructan 1-exohydrolase: 1-kestose as substrate vs sucrose as inhibitor, *New Phytologist*, 174(1): 90-100
- Zhao G.M., Zhao P.L., Chen M.D., and Kou W.F., 2006, Effect of saline aquaculture effluent on salt-tolerant Jerusalem Artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in a semi-arid coastal area of China, *Pedosphere*, 16(6): 762-769



Bt Research (BT)



Bt Research (ISSN 1925-1939) is an open access, peer reviewed journal published online by BioPublisher. The Journal is publishing high quality original research on all aspects of *Bacillus thuringiensis* and their toxins affecting the living organisms, as well as environmental risk and public policy relevant to *Bt* modified organisms. Topics include (but are not limited to) *Bt* strain identification, novel *Bt* toxin discovery and bioassay, transgenic *Bt* plants, insecticidal mechanism of *Bt* toxin as well as resistant mechanisms of target-insect to *Bt* toxin. *Bt* Research is particularly keen to publish the original research and review article from authors in countries where the *Bt* modified crops are widely used in commerce in order to provide a forum for advocator, protestor and middle-of-the-roader. *Bt* Research is archived in Library and Archive Canada and deposited in CrossRef. The Journal has been indexed by

ProQuest as well.

Email: edit@bt.biopublisher.ca

Web: <http://bt.biopublisher.ca>