研究论文

**Research** Article

# 甘蔗 ScGH3.8 基因的克隆、表达及蛋白纯化

黄润<sup>1,2</sup> 张木清<sup>1,2\*</sup>

1 广西大学, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西甘蔗生物学重点实验室, 南宁, 530004; 2 广西大学农学院, 南宁, 530004

\*通信作者, zmuqing@163.com

摘要 Gretchen hagen 3(GH3)基因编码酰基酰胺合成酶,属于植物生长素早期响应基因,通过催化生长素和茉莉酸等激素 与氨基酸的偶联反应,使激素失活或激活来维持植物体内激素的动态平衡,从而调节植物生长发育和抵抗逆境胁迫。本研究 采用 RT-PCR 克隆甘蔗(Saccharum officinarum) GH3 基因,获得长 1 776 bp 具有完整开放阅读框的基因序列,命名为 ScGH3.8。生物信息学分析表明,ScGH3.8基因编码 591 个氨基酸,具有 GH3 高度保守结构域、无跨膜结构和信号肽,亚细胞定位于细胞质,属酸性蛋白。系统进化分析表明,ScGH3.8与南荻(Miscanthus lutarioriparius)、高粱(Sorghum bicolor)和玉米(Zea mays)的 GH3 进化关系最近,属于同一进化分支。逆境胁迫表达分析表明,ScGH3.8 同源基因 Sspon. 03G0024250-1A、Sspon. 03G0024250-3D、Sspon. 03G0037250-1B 受干旱和甘蔗花叶病毒胁迫诱导表达;Sspon. 03G0024250-2C、Sspon. 03G0024250-3D、Sspon. 03G0037250-1B 受干旱和甘蔗花叶病毒胁迫诱导表达;Sspon. 03G0024250-1A 受甘蔗镰孢菌(Fusarium sacchari)胁迫诱导表达。通过构建 pRSF-ScGH3.8 原核表达载体,将其转入大肠杆菌 BL21(DE3)菌株并诱导表达,发现重组蛋白最佳表达条件为 37 ℃,0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 2 h。利用亲和层析法对重组蛋白进行纯化获得 ScGH3.8 蛋白,相对分子质量为 64.59 kDa。这些结果为进一步探究 ScGH3.8 基因在甘蔗发育和抗逆性中的 功能提供理论参考和数据支持。

关键词 甘蔗; 酰基酰胺合成酶基因 (GH3); 逆境胁迫; 原核表达

# Cloning, Expression and Protein Purification of ScGH3. 8 Gene from Sugarcane

HUANG Run<sup>1, 2</sup> ZHANG Muqing<sup>1, 2\*</sup>

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biology, Guangxi University, Nanning, 530004; 2 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, 530004

\* Corresponding author, zmuqing@163.com

**Abstract** The Gretchen hagen 3 (*GH3*) gene encodes acyl acid amido synthetases, which belongs to the early response gene of plant auxin, through catalyzing the coupling reaction of hormones such as indole-3-acetic acid (IAA) and jasmonic acid (JA) with amino acids. The hormone inactivates or activates to maintain the dynamic balance of hormone in plants, thereby regulating plant growth and development and resisting stress. In this study, the sugarcane *ScGH3* gene was cloned by RT-PCR to obtain a 1 776 bp gene sequence with a complete open reading frame named *ScGH3*. 8. Bioinformatics analysis showed that the *ScGH3*. 8 gene encoded 591 amino acids, had a highly conserved domain of GH3 without transmembrane structure and signal peptide, localized in the cytoplasm, and belonged to acidic protein. Phylogenetic analysis showed that *ScGH3*. 8 had the closest evolutionary relationship with GH3 of *Miscanthus lutarioriparius, Sorghum bicolor*, and *Zea mays*, belonging to the same evolutionary branch. The analysis of stress expression showed that the *ScGH3*. 8 homologous genes of *Sspon*. 03G0024250-1A, *Sspon*. 03G0024250-2C, *Sspon*. 03G0024250-3D, and *Sspon*. 03G0037250-1B were induced by drought and sugarcane mosaic virus stress; *Sspon*. 03G0024250-1A expressed in response to *Fusarium sacchari*. The prokaryotic expression vector pRSF-ScGH3. 8 was constructed, introduced into *Escherichia coli* BL21 (DE3), and induced to express. The best expression condition of the recombinant protein was induced in 0. 5 mmol/L IPTG at 37 °C for 2 h. The recombinant protein was purified by affinity chromatography to obtain ScGH3. 8 protein with a relative molecular weight of 64. 59 kDa. These results pro-

引用格式:黄润,张木清,2023. 甘蔗 *ScGH3.* 8 基因的克隆、表达及蛋白纯化. 基因组学与应用生物学,42(12):1311-1322. [HUANG R, ZHANG M Q, 2023, Cloning, expression and protein purification of *ScGH3.* 8 gene from sugarcane. Genomics and Applied Biology, 42(12):1311-1322.]

DOI: 10. 13417/j.gab.042.001311

基金项目:本研究由广西科技重大专项基金项目(桂科 AA22117003)资助。

vide theoretical reference and data support for further exploring the function of the *GH3* gene in sugarcane development and stress resistance.

Keywords Sugarcane; Gene encoding acyl acid amido synthetases (GH3); Stress of adversity; Prokaryotic expression

植物激素是在植物体内合成的具有调控功能的 微量小分子有机化合物(Chapman and Estelle, 2009)。植物在受到胁迫时,通过调节各种植物激素 来控制生长发育(Waadt et al., 2022)。生长素是最 早受到关注和研究的一种植物激素,以自由态和束 缚态两种形式存在,自由态具有活性,当植物体内 自由态生长素浓度较高时,可以与其他分子相结合 转变成束缚态形式储存或进一步降解,并以这两种 形式之间的相互转化来调节植物体内激素间的相互 作用(Ljung, 2013; Smolko et al., 2018)。

生长素早期响应基因可分为 Aux/IAAs、GH3s 和 SAURs 三类。在生长素作用下, 三类基因中的大部 分成员迅速表达以调控植物对各种胁迫的抵抗 (Wang et al., 2010; Ding et al., 2020)。酰基酰胺合 成酶(gretchen hagen 3, GH3)将氨基酸与含有羧酸 的植物激素结合在一起,广泛存在于植物中(Guo et al., 2022)。GH3蛋白在信号通路、器官发育和植 物结构中起关键作用(Singh et al., 2015)。对 GH3 家族中的部分蛋白功能分析表明,在逆境条件下, GH3 蛋白一方面通过调控植物体内激素之间的平衡 来调节植物的生长状态以适应环境,另一方面通过 激活水杨酸(salicylic acid, SA)、茉莉酸(jasmonic acid, JA)和乙烯(ethylene, ETH)等信号途径激活植 物对不良环境的抵抗力(Hayashi et al., 2021)。茉莉 酸为一种新型的植物激素,通过具有生物活性的偶 合物茉莉酰异亮氨酸作为关键信号分子来激活茉莉 酸调控花发育和创伤应激反应(Schuman et al., 2018; Delfin et al., 2022)。自 1987 年首个 GH3 基因 在大豆(Glycine max)(Wright et al., 1987)中被鉴定 为生长素应答基因后,已经在拟南芥(Arabidopsis thaliana) (Hagen and Guilfoyle., 2002)、水稻(Oryza sativa) (Jain et al., 2006; Terol et al., 2006)、玉米 (Zea mays) (Feng et al., 2015)、葡萄(Vitis vinifera)(Böttcher et al., 2011)和苜蓿(Medicago truncatula)(Yang et al., 2015)等植物中对 GH3 基因进行 了鉴定。

甘蔗是一种 C<sub>4</sub> 植物,为重要的糖料和能源作物,以甘蔗为原料生产的蔗糖占全球食糖产量的80%以上。生长素是甘蔗生长发育过程中的一类重要激素,生长素信号级联相关的 *GH3* 基因在植

物中不断被发现,在模式植物拟南芥和水稻中得 到较为深入的研究,而甘蔗中 GH3 基因的研究鲜 有报道。本研究克隆了甘蔗 GH3 基因,命名为 ScGH3.8。利用生物信息学方法对 ScGH3.8 基因 进行分析,通过转录组分析甘蔗 GH3 同源基因在 逆境胁迫下的表达;随后将 ScGH3.8 基因构建至 原核表达载体,并进行外源表达,筛选其蛋白诱 导纯化条件,以期在上清中获得稳定表达的蛋 白,为 ScGH3.8 生物学功能的进一步研究提供理 论依据。

#### 1 结果

#### 1.1 ScGH3.8 基因的克隆与进化树分析

#### 1.1.1 ScGH3. 8 基因克隆

本研究基于高粱(Sorghum bicolor)和玉米(Zea mays)同源序列设计引物,以甘蔗栽培种(cv. ROC22)的 cDNA 为模板对 ScGH3.8 基因进行克隆,得到一条大小在1800 bp 左右的条带(图1)。 PCR 产物经琼脂糖凝胶纯化回收后与 pEASY-T1 Simple Cloning Kit 载体连接,将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞,鉴定为阳性克隆后送生工生物工程(上海)有限公司测序,测序后确定基因大小为1776 bp。



M 为 DNA 分子质量 Marker DL10000, 1 为 SeGH3.8 扩增条带。

M was DNA molecular weight Marker DL10000, 1 was amplification of *ScGH3*. 8 gene fragment in sugarcane.

图 1 甘蔗中 ScGH3.8 基因片段扩增 Figure 1 Amplification of ScGH3.8 gene fragment in sugarcane

## 1.1.2 多序列比对分析以及进化树构建

本研究利用 NCBI 在线 Blastp 对 ScGH3.8 蛋白同 源序列比对后发现(图 2), ScGH3.8 基因编码的蛋白 序列与高粱和玉米的 GH3 蛋白序列高度同源, 同源

性分别为 96% 和 92%。利用 MEGA 软件对得到的同 源序列进行同源比对,采用邻近法构建进化树(图 3),发现 ScGH3.8 与南获(*Miscanthus lutarioriparius*)、 高粱和玉米的 GH3 蛋白聚成一支,亲缘关系最近。



ScGH3.8为甘蔗中 GH3 蛋白(GenBank 序列登录号: OQ799001); SbJAR2 为高粱中 GH3 蛋白(GenBank 序列登录号: XP\_002454926.1); ZmGH3.6为玉米中 GH3 蛋白(GenBank 序列登录号: AQK91077.1)。

ScGH3. 8 was GH3 protein in *Saccharum officinarum* (GenBank sequence accession number: OQ799001); SbJAR2 was GH3 protein in *Sorghum bicolor* (GenBank sequence accession number: XP\_002454926.1); ZmGH3. 6 was GH3 protein in *Zea mays* (GenBank sequence accession number: AQK91077.1).







括号内编号为各物种中与 ScGH3.8 蛋白同源的蛋白序列的 GenBank 登录号。 The GenBank accession number of the protein sequence homologous to the ScGH3.8 protein in each species is numbered in parentheses.

图 3 ScGH3.8 和其他植物同源蛋白的系统进化树

Figure 3 Phylogenetic tree of ScGH3. 8 and its homologous proteins from other plants

## 1.2 ScGH3.8 基因的逆境胁迫表达模式分析

本研究对干旱、甘蔗花叶病毒和甘蔗镰孢菌 (Fusarium sacchari)处理下的甘蔗 RNA-seq 数据分 析结果显示,分别有4个、4个和1个 ScGH3.8 同源 基因对上述胁迫有响应(图4)。在干旱处理下, Sspon. 03G0024250-1A 基因表达量逐渐降低,呈下调 趋势; Sspon. 03G0024250-2C、Sspon. 03G0024250-3D、Sspon. 03G0037250-1B 基因的表达模式相似,在 受到胁迫后表达量降低,恢复浇水后表达量增加 (图4A)。在甘蔗花叶病毒侵染处理下,受到病毒胁 迫 后+1 叶中 Sspon. 03G0024250-2C、Sspon. 03G0024250-3 D、Sspon. 03G0037250-1B 基因的表 达模式相似,呈上调趋势;-3 叶中 Sspon. 03G0024250-1A、Sspon. 03G0024250-2C、Sspon. 03G0024250-3D、Sspon. 03G0037250-1B 基因的表 达量增加,也呈上调趋势(图4B)。甘蔗梢腐病是 由甘蔗镰孢菌引起的一种真菌性病,当受到胁迫 后,Sspon. 03G0024250-1A 基因的表达量从健康叶 片到轻微感染的叶片显著降低,而后在发病严重 的叶片中又重新升高(图4C)。综上所述,推测这 些基因可能直接或间接地参与甘蔗对干旱、真菌 和病毒的胁迫应答反应。



图 A 中, W1 为正常供水, W2 为轻度干旱, W3 为严重干旱, W4 为复水; 图 B 中, T01 为 B48 的+1 叶, T02 为 B48 的-3 叶, T03 为 B48 感染后+1 叶, T04 为 B48 感染后-3 叶; 图 C 中, S01 为健康叶片, S02 为轻度感染, S03 为严重 感染。

In figure A, W1 was normal water supply (CK), W2 was slight drought, W3 was severe drought, W4 was rehydration; In figure B, T01 was fully expanded leaves (+1) from B48, T02 was younger leaves (-3) from B48, T03 was fully expanded leaves (+1) leaf after infection of B48, T04 was younger leaves (-3) after infection of B48; In figure C, S01 was healthy leaves, S02 was mild infection, S03 was severe infection.

## 图 4 *ScGH3.* 8 同源基因在逆境胁迫下的差异表达热图 (A)干旱胁迫;(B)甘蔗花叶病毒侵染;(C)甘蔗镰孢菌侵染

Figure 4 Heat map of differential expression of *ScGH3*. 8 homologous genes in response to stress (A) Drought stress; (B) Infected by sugarcane mosaic virus; (C) Infected by *Fusarium sacchari* 

#### 1.3 ScGH3.8 蛋白的理化性质分析与纯化

#### 1.3.1 ScGH3.8 蛋白的理化性质分析

本研究运用 ProtParam tool 在线工具对 ScGH3.8 蛋白序列进行基本理化性质分析,结果显示,该蛋 白由 591 个氨基酸编码组成,相对分子质量为 64.59 kDa,分子式为 C<sub>2876</sub>H<sub>4492</sub>N<sub>788</sub>O<sub>863</sub>S<sub>21</sub>,等电点为 5.96,不稳定系数为 42.47,平均亲水系数为 -0.066,脂肪族氨基酸指数为 85.70。

保守结构域预测结果显示, ScGH3.8 蛋白具有 超家族保守结构域 GH3(图 5A)。亲疏水性预测分 析显示, 疏水性最强的是第 408 位氨基酸残基, 指数为 2.133; 亲水性最强的是第 452 位氨基酸残基, 指数为-2.433(图 5B)。

跨膜结构域分析结果显示, ScGH3.8 蛋白不存 在跨膜结构域(图 5C)。信号肽预测结果显示, ScGH3.8 蛋白不含信号肽,为非分泌蛋白。亚细胞 定位预测结果显示, ScGH3.8 蛋白定位于细胞质。

二级结构预测结果显示, ScGH3.8 蛋白的二级 结构中含有四种结构, 分别为 40.10% 的 α-螺旋、 41.46% 的无规则卷曲、14.21% 的延伸链、4.23% 的 β-转角(图 5D)。 本研究以拟南芥茉莉酸酰胺合成酶(jasmonic acid-amido synthetase, JAR1; SMTL ID: 5 ecn. 1) 为模板对 SeGH3.8 蛋白的三级结构进行预测(图 5E),结果显示,该蛋白与模板的同源性为

58.20%; 全局模型质量估计值(global model quality estimation, GMQE)为0.80, 定性模型能量分 析(qualitative model energy analysis, QMEAN) 值 为-2.87。



图 5 ScGH3.8 蛋白结构预测分析

(A) ScGH3.8蛋白的保守结构域预测; (B) ScGH3.8蛋白氨基酸序列的亲/疏水性预测; (C) ScGH3.8 跨膜结构 域预测; (D) ScGH3.8蛋白质二级结构预测; (E) ScGH3.8蛋白三级结构预测
 Figure 5 The predicted protein structure of ScGH3.8

(A) The predicted conserved domain of ScGH3.8; (B) Hydrophilicity prediction of the amino acid sequence encoding ScGH3.8; (C) The predicted transmembrane domain of ScGH3.8; (D) The predicted secondary structure of ScGH3.8; (E) The predicted tertiary structure of ScGH3.8

#### 1.3.2 ScGH3.8 原核表达载体构建

本研究利用 In-fusion 方法将 ScGH3. 8 与酶切后的 pRSF-Duet-1(BamH I、Xho I) 胶回收产物连接 后转入大肠杆菌 TOP10 感受态细胞中,挑取成功转

化的单克隆菌落进行 PCR 检测(图 6A)。对重组质 粒 pRSF-ScGH3.8 进行双酶切验证,经 BamH I、 Xho I 双酶酶切后获得了两个片段,分别与 pRSF-Duet-1 载体和 ScGH3.8 序列大小相符(图 6B)。





In figure A, M was DNA molecular weight Marker DL10000, 1 was PCR product from single-clone bacterial solution; In figure B, M was DNA molecular weight Marker DL15000, 1 was cleavage results of recombinant plasmid pRSF-ScGH3. 8.

图 6 pRSF-ScGH3. 8 原核表达载体的鉴定 (A)菌液 PCR 检测;(B)重组质粒 pRSF-ScGH3. 8 酶切 Figure 6 Identification of prokaryotic expression vector pRSF-ScGH3. 8 (A) Bacterial liquid PCR detection;(B) Enzyme digestion of recombinant plasmid pRSF-ScGH3. 8

## 1.3.3 ScGH3.8 重组蛋白的诱导表达及条件优化

本研究将重组质粒 pRSF-ScGH3.8 转化至 BL21 (DE3) 感受态细胞,进行原核表达。结果显示,在 72 kDa 处有一明显条带,与预测的带 6×His-Tag 的目的 蛋白基本一致(图 7)。16 ℃条件下, IPTG 可以明显诱 导 ScGH3.8 蛋白的表达, 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L IPTG 的诱导效果无明显差异, 14 h 后表达量趋于稳定 (图 7A); 37 ℃条件下, IPTG 可以明显诱导 ScGH3.8 蛋白的表达, 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L IPTG 的诱导 效果无明显差异, 2 h 后表达量趋于稳定(图 7B)。





图 A 中, M 为蛋白相对分子量 Marker, M 泳道左侧箭头指向 Marker 条带大小, 0 为没有 IPTG 诱导, 1~4 为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 14、16、18、20 h, 5~8 为 1 mmol/L IPTG 诱导 14、16、18、20 h, 斜箭头表示目的蛋白; 图 B 中, M 为蛋白相对分子量 Marker, 0 为没有 IPTG 诱导, 1~4 为 0.5 mmol/L IPTG 诱导 2、3、4、5 h, 5~8 为 1 mmol/L IPTG 诱导 2、 3、4、5 h, 斜箭头表示目的蛋白。

In figure A, M was protein molecular weight, arrow on the left of lane M points to marker strip size, 0 was no IPTG induced, 1~4 was 0.5 mmol/L IPTG induction for 14, 16, 18, 20 h, 5~8 was 1 mmol/L IPTG induction for 14, 16, 18, 20 h, diagonal arrows indicate target proteins; In figure B, M was Protein molecular weight, 0 was no IPTG induced, 1~4 was 0.5 mmol/L IPTG induced for 2, 3, 4, 5 h; 5~8 was 1 mmol/L IPTG induced for 2, 3, 4, 5 h, diagonal arrows indicate target proteins.

图 7 不同 IPTG 浓度、温度和诱导表达时间的 ScGH3.8 蛋白表达
(A) 16 ℃下 IPTG 诱导表达的蛋白; (B) 37 ℃下 IPTG 诱导表达的蛋白
Figure 7 Expression profiles of ScGH3.8 protein induced at different IPTG concentrations, temperatures and induction time
(A) The total protein induced by IPTG at 16 ℃
(B) The total protein induced by IPTG at 37 ℃

#### 1.3.4 ScGH3.8 重组蛋白的纯化

本研究使用不同浓度的咪唑洗脱蛋白,利用 亲和层析法纯化重组蛋白。SDS-PAGE 凝胶蛋白 电泳检测结果表明,用20~300 mmol/L咪唑梯度 洗脱的溶液均可在72 kDa 处观察到目标蛋白条 带,其中 90 mmol/L 咪唑的洗脱效果最好,其洗 脱蛋白条带单一无杂带(图 8A)。取 90 mmol/L 咪唑洗脱的蛋白进一步浓缩, SDS-PAGE 检测得 到特异性条带,表明成功获得纯化的 ScGH3.8 重 组蛋白(图 8B)。



(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



图 A 中, M 为蛋白相对分子量 Marker, 1 为上清, 2 为沉淀, 3 为上清挂柱后基质, 4~12 分别为 20、30、40、50、60、70、80、90、300 mmol/L 咪唑洗脱液; 图 B 中, M 为蛋白相对分子量 Marker, 1 为上清, 2 为沉淀, 3 为 90 mmol/L 咪唑洗脱液, 5 为 纯化后 ScGH3.8 蛋白, 斜箭头所示为目的蛋白。

In figure A, M was protein molecular weight, 1 was supernatant, 2 was precipitation, 3 was supernatant post column matrix, 4~12 was 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 300 mmol/L imidazole eluents; In figure B, M was protein molecular weight standard, 1 was supernatant, 2 was precipitation, 3 was 90 mmol/L imidazole eluent, 5 was purified ScGH3.8 protein, diagonal arrows indicate target proteins.

图 8 ScGH3. 8 重组蛋白的洗脱和纯化 (A)ScGH3. 8 重组蛋白的洗脱;(B)ScGH3. 8 重组蛋白的纯化 Figure 8 Elution and purification of ScGH3. 8 recombinant protein (A) Elution of ScGH3. 8 recombinant protein; (B) Purification of ScGH3. 8 recombinant protein

# 2 讨论与结论

生长素作为重要的植物激素,通过诱导 GH3 等 早期响应基因的瞬时表达,从而调控植物根茎生长 (Cano et al., 2018)、器官发育(Feng et al., 2015)、 激素相互作用(Wojtaczka et al., 2022)、信号传导 (Zou et al., 2019)以及对生物和非生物刺激(Li et al., 2023)的响应。茉莉酸是一种氧基化植物激 素,通过氨基酸偶联控制茉莉酸的生理活性,在植 物生长发育和逆境应答中起重要作用(Wakuta et al., 2011; Ruan et al., 2019)。本研究从甘蔗中克 隆得到了一个1776 bp的 ScGH3.8 基因序列,对所 克隆得到的 ScGH3.8 序列进行生物信息学分析,该基 因编码591 个氨基酸,相对分子质量为64.59 kDa,含 有 GH3 保守结构域,与 GH3 家族基因高度同源。多 序列比对分析发现, ScGH3.8 蛋白与南荻、高粱、 玉米等单子叶植物中的 GH3 蛋白同源性较高。GH3 介导的生长素稳态是调节植物对胁迫适应及激素平 衡中的重要组成部分(Kirungu et al., 2019; Wojtaczka et al., 2022)。在 GH3 蛋白与生长素、茉莉酸结 合活性的研究中, 部分 GH3 蛋白能够催化相应底物 的偶联,从而参与调控激素的稳态,并在植物应激 反应中发挥作用(Yang et al., 2018; Delfin et al., 2022)。在拟南芥中, GH3 基因 WES1 被激活的突变 体 wes1-D 对干旱等胁迫的抗性提高(Park et al., 2007)。在水稻中, OsGH3. 13 的激活降低了水稻的 生长素含量,改变了根系结构,增强了水稻的耐旱 性(Zhang et al., 2009); 而水稻 OsGH3. 8 的过表达 增强了对水稻病原菌 Xanthomonas oryzae 的抗病能 力(Ding et al., 2008)。在玉米中, 大多数 GH3 基因 在盐、重金属或干旱胁迫下表达上调, 表明玉米 GH3 基因应答相关胁迫响应(Feng et al., 2015; Han et al., 2020; Feng et al., 2021 )。转录组分析发现, 部分 ScGH3. 8 同源基因响应干旱胁迫、感染甘蔗镰 孢菌和甘蔗花叶病毒,例如, Sspon. 03G0024250-1A 在甘蔗镰孢菌侵染初期表达量降低,而后在发病严重 的叶片中表达量增加; Sspon. 03G0024250-1A、Sspon. 03G0024250-2C、Sspon. 03G0024250-3D、Sspon. 03G0 037250-1B 在花叶病毒侵染下表达上调;在干旱胁 迫中 Sspon. 03G0024250-1A 基因表达量逐渐降低, 说明这些基因可能响应上述胁迫,而 ScGH3. 8 基因 与这些基因高度同源,推测 ScGH3. 8 基因可能在逆 境胁迫中发挥调控作用。综上所述, ScGH3. 8 基因 在甘蔗环境适应性调节中发挥重要作用,但其作用 机制有待研究。

为了进一步了解 ScGH3.8 蛋白的功能,将 ScGH3.8 基因构建到表达载体上进行原核表达,探 究 ScGH3.8 基因在不同温度、诱导剂浓度和诱导表 达时间下的蛋白表达量。结果发现,添加 IPTG 直接 影响总蛋白的表达,而添加 0.5 mmol/L 和 1.0 mmol/L IPTG 的诱导效果无明显差异;16 ℃和 37 ℃下,总蛋白表达量分别在14 h和2 h 后趋于稳 定,说明 ScGH3.8 蛋白的最佳表达条件为37 ℃下 0.5 mmol/L 的 IPTG 诱导 2 h。

综上,本研究揭示了 ScGH3.8 基因响应甘蔗逆 境胁迫表达,为 ScGH3 基因在甘蔗中的功能研究提 供了重要的参考。本研究通过原核表达分析,探究 得到了 ScGH3.8 蛋白的最佳诱导条件,为后续开展 ScGH3.8 蛋白相关生化功能研究奠定了基础。

## 3 材料与方法

## 3.1 试验材料

本研究所用 pRSF-Duet-1 载体为本实验室自行

保存; TOP10 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司; BL21(DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术股份有限公司; His 纯化基质购自天地人和生物科技有限公司; PCR 扩增试剂、核酸内切酶和InFusion HD Cloning Plus 购自宝日医生物技术(北京)有限公司; 蛋白 Marker 购自天地扬生物科技有限公司; DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。

使用 TBtools 从甘蔗属基因组数据库(Saccharum Genome Database, SGD)(Zhang et al., 2018)(ht-tps://www.life.illinois.edu/ming/downloads/Sponta-neum\_genome/)下载甘蔗割手密的基因组数据,然后提取割手密基因组中 *ScGH3*.8 基因的同源基因。

本研究用于逆境胁迫表达模式分析的转录组数 据来自于本课题组前期研究,获取方式如下:分别 从 NCBI-SRA 网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ sra)下载甘蔗花叶病毒感染(Akbar et al., 2021) (Accession: SRX6792038、SRX6792039、SRX6792040、 SRX6792041)、干旱胁迫(Yuan et al., 2021)(Accession: SRX3524547、SRX3524548、SRX3524558、SRX 3524559)及甘蔗镰孢菌感染(Xu et al., 2018)(Accession: SRP127762)的 RNA-seq 数据。

#### 3.2 ScGH3.8 基因的克隆及原核表达载体的构建

利用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物,以 甘蔗 cDNA 为模板,使用设计合成的特异引物(表 1) 扩增目标基因片段。采用 DNA 凝胶纯化回收试剂盒 回收纯化 PCR 产物,将纯化回收后的 PCR 产物与空 载体 pRSF-Duet-1 连接,转化至 TOP10 感受态细胞,筛 选单克隆并进行菌液 PCR 验证正确后,送生工生物工 程(上海)股份有限公司测序。将测序正确的重组质粒 pRSF-ScGH3.8转化至 TOP10 感受态细胞 BL21(DE3)。

	表	1	本研	究所月	用弓	物	
Table	1	Pri	mers	used	in	this	study

	引物序列(5'-3')	
Primer name	Primer sequence (5'-3')	
ScGH3. 8- F	CCAGTAAAGATGCCGATCTGTAGCTG	
ScGH3. 8- R	TTATCAGAGCCCATAGGCGGTACTG	
pRSF-ScGH3. 8- F	CCACAGCCAGGGATCCATGCCGGAGAAGAAGAACCCCGC	
pRSF-ScGH3. 8- R	CTTTACCAGACTCGAGTCAGTCGTAGGCGGCGCTG	

#### 3.3 生物信息学分析

利用 NCBI 在线 Blastp 进行 ScGH3.8 蛋白的同 源性检索;利用 ProtParam tool 在线工具分析 ScGH3.8 蛋白的理化性质;利用在线软件 ProtsScale

分析 ScGH3.8 蛋白的亲疏水性;利用在线工具 TMHMM 分析 ScGH3.8 蛋白的跨膜结构域;利用在 线工具 SignalP 5.0 Server 预测 ScGH3.8 蛋白的分泌 信号;利用在线工具 Softberry 预测 ScGH3.8 蛋白的 亚细胞定位;利用在线工具 SOMPA 预测 ScGH3.8 蛋白的二级结构;利用 SWISS-MODEL 在线工具预测 ScGH3.8 蛋白的三级结构;通过 SMART 数据库

预测 ScGH3.8 蛋白的保守结构域;利用 MEGA 6.0 软件进行进化树构建。上述生物信息学分析软件的 网址见表 2。

Table 2         Bioinformatics analysis tools used in this study						
生物信息学分析 Bioinformatics analysis	软件名称 Software brand	网址 Website				
蛋白同源性检索 Protein homology retrieval	NCBI	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/				
蛋白理化性质分析 Analysis of physical and chemical properties of protein	ExPASy-ProtParam	(https://web. expasy. org/protparam/)				
跨膜结构分析 Transmembrane structure analysis	ТМНММ	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/				
信号肽分析 Signal peptide analysis	SignalP 5.0	https://services. healthtech. dtu. dk/service. php/SignalP-5.0				
结构域的预测 Prediction of domains	SMART	http://smart.embl.de/				
亚细胞定位 Subcellular localization	Softberry	http://linux1. softberry. com/berry. phtml				
二级结构 Protein secondary structure	SOPMA	https://npsa-prabi.ibcp. fr/cgi-bin/npsa_automat. pl? page = npsa% 20_ sopma. html				
三级结构 Protein Tertiary structure	SWISS-MODEL	https://swissmodel.expasy.org/				
进化树构建 Evolutionary tree construction	MEGA 6.0	https://web. expasy. org/protscale/				
亲水性 Hydrophilicity	ProtsScale	https://web. expasy. org/protscale/				

## 表 2 本研究所用的生物信息学分析工具

## 3.4 诱导表达条件的优化

为优化重组蛋白 pRSF-ScGH3.8 的诱导表达条件,从诱导温度、诱导剂浓度和诱导表达时间方面做了优化。将重组菌 pRSF-ScGH3.8 接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 10 mL LB 培养基,37 ℃ 210 r/min 振 荡培养 12 h。按 1:100 比例吸取菌液至对应抗性的 LB 培养基中培养至 *OD*<sub>600</sub> 值为 0.6~0.8 时,取 1 mL 菌液作为阴性对照,向剩余培养液中分别加入终浓 度为 0、0.5、1 mmol/L IPTG 置于 16 ℃培养 14、16、 18、20 h,37 ℃培养 2、3、4、5 h 后取样,在样品中 加入 5×SDS PAGE 上样缓冲液,煮沸 10 min,进行 SDS-PAGE 电泳分析。

#### 3.5 重组蛋白的纯化

根据 ScGH3.8 蛋白的优化条件扩大培养细菌, 取诱导后的菌液离心,弃上清,沉淀用 10 mL PBS 缓冲液重悬,进行超声细胞破碎,设置破碎时工作 3 s,间歇 7 s,破碎 20 min,经离心收集上清。取上 清与 His 基质结合,对超声裂解后的上清进行纯化, 分别用含 20、30、40、50、60、70、80、90、 300 mmol/L 咪唑的 PBS 缓冲液洗脱 10 min 后, 使用 SDS-PAGE 电泳检测蛋白的表达。样品浓缩后 -80 ℃保存。

#### 3.6 甘蔗 ScGH3 基因表达模式分析

从割手密基因组中提取 ScGH3.8 基因的同源基因,在甘蔗花叶病毒胁迫、干旱胁迫、甘蔗镰孢菌胁迫的 RNA-seq 数据中分析 ScGH3.8 同源基因的表达模式。剔除表达量为0的基因,将变化倍数不小于2的基因定义为差异表达基因。RNA-seq 数据的表达矩阵均为 FPKM 值,使用 TBtools 绘制表达热图。

#### 3.7 数据获取

本研究克隆的 ScGH3.8 基因序列已上传至 NCBI 的 GenBank 数据库(https://www.ncbi.nlm. nih.gov/genbank/), 索引号为 OQ799001。

## 作者贡献

## 黄润是本研究的执行人,完成数据分析、论文

初稿的写作;张木清是本研究的构思者及负责人, 指导实验设计、数据分析、论文写作与修改。全体 作者都阅读并同意最终的文本。

# 参考文献

- AKBAR S, YAO W, YU K, et al., 2021. Photosynthetic characterization and expression profiles of sugarcane infected by Sugarcane mosaic virus (SCMV). Photosynth. Res., 150 (1): 279-294.
- BÖTTCHER C, BOSS P K, DAVIES C, 2011. Acyl substrate preferences of an IAA-amido synthetase account for variations in grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening caused by different auxinic compounds indicating the importance of auxin conjugation in plant development. J. Exp. Bot., 62 (12): 4267-4280.
- CANO A, SÁNCHEZ-GARCÍA A B, ALBACETE A, et al., 2018. Enhanced conjugation of auxin by GH3 enzymes leads to poor adventitious rooting in carnation stem cuttings. Front. Plant Sci., 9: 566.
- CHAPMAN E J, ESTELLE M, 2009. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annu. Rev. Genet., 43: 265-285.
- DELFIN J C, KANNO Y, SEO M, et al., 2022. AtGH3. 10 is another jasmonic acid-amido synthetase in Arabidopsis thaliana. Plant J., 110(4): 1082-1096.
- DING X H, CAO Y L, HUANG L L, et al., 2008. Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonateindependent basal immunity in rice. Plant Cell, 20(1): 228-240.
- DING X H, ZHENG Y Y, QIU T, et al., 2020. The SAUR41 subfamily of cell expansion-promoting genes modulates abscisic acid sensitivity and root touch response: a possible connection to ion homeostasis regulation. Plant Signal. Behav., 15(1): 1702239.
- FENG S G, YUE R Q, TAO S, et al., 2015. Genome-wide identification, expression analysis of auxin-responsive GH3 family genes in maize (*Zea mays L.*) under abiotic stresses. J. Integr. Plant Biol., 57(9): 783-795.
- FENG X, LIU L L, LI Z G, et al., 2021. Potential interaction between autophagy and auxin during maize leaf senescence. J. Exp. Bot., 72(10): 3554-3568.
- GUO R P, HU Y, AOI Y, et al., 2022. Local conjugation of auxin by the GH3 amido synthetases is required for normal development of roots and flowers in *Arabidopsis*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 589: 16-22.
- HAGEN G, GUILFOYLE T, 2002. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant

Mol. Biol., 49(3): 373-385.

- HAN Q H, CHEN K L, YAN D, et al., 2020. ZmDREB2A regulates ZmGH3. 2 and ZmRAFS, shifting metabolism towards seed aging tolerance over seedling growth. Plant J., 104(1): 268-282.
- HAYASHI K I, ARAI K, AOI Y, et al., 2021. The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. Nat. Commun., 12: 6752.
- JAIN M, KAUR N, TYAGI A K, et al., 2006. The auxinresponsive GH3 gene family in rice (Oryza sativa). Funct. Integr. Genom., 6(1): 36-46.
- KIRUNGU J N, MAGWANGA R O, LU P, et al., 2019. Functional characterization of Gh\_A08G1120 (GH3. 5) gene reveal their significant role in enhancing drought and salt stress tolerance in cotton. BMC Genet., 20(1): 1-17.
- LI J Y, MIN X Y, LUO K, et al., 2023. Molecular characterization of the GH3 family in alfalfa under abiotic stress. Gene, 851: 146982.
- LJUNG K, 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. Development, 140(5): 943-950.
- MOCKAITIS K, ESTELLE M, 2008. Auxin receptors and plant development: a new signaling paradigm. Annu. Rev. Cell Dev. Biol., 24: 55-80.
- PARK J E, PARK J Y, KIM Y S, et al., 2007. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. J. Biol. Chem., 282 (13): 10036-10046.
- RUAN J J, ZHOU Y X, ZHOU M L, et al., 2019. Jasmonic acid signaling pathway in plants. Int. J. Mol. Sci., 20(10): 2479.
- SCHUMAN M C, MELDAU S, GAQUEREL E, et al., 2018. The active jasmonate JA-Ile regulates a specific subset of plant jasmonate-mediated resistance to herbivores in nature. Front. Plant Sci., 9: 787.
- SINGH V K, JAIN M, GARG R, 2015. Genome-wide analysis and expression profiling suggest diverse roles of *GH3* genes during development and abiotic stress responses in legumes. Front. Plant Sci., 5: 789.
- SMOLKO A, LUDWIG-MÜLLER J, SALOPEK-SONDI B, 2018. Auxin amidohydrolases-from structure to function: revisited. Croat. Chem. Acta, 91(2): 233-239.
- TEROL J, DOMINGO C, TALÓN M, 2006. The GH3 family in plants: genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis. Gene, 371(2): 279-290.
- WAADT R, SELLER C A, HSU P, et al., 2022. Plant hormone regulation of abiotic stress responses. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 23(10): 680-694.
- WAKUTA S, SUZUKI E, SABURI W, et al., 2011. OsJAR1 and OsJAR2 are jasmonyl-l-isoleucine synthases involved in

wound and pathogen induced jasmonic acid signalling. Biochem. Biophys. Res. Commun., 409(4): 634-639.

- WANG S K, BAI Y H, SHEN C J, et al., 2010. Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor*. Funct. Integr. Genom., 10(4): 533-546.
- WOJTACZKA P, CIARKOWSKA A, STARZYNSKA E, et al., 2022. The GH3 amidosynthetases family and their role in metabolic crosstalk modulation of plant signaling compounds. Phytochemistry, 194: 113039.
- WRIGHT R M, HAGEN G, GUILFOYLE T, 1987. An auxininduced polypeptide in dicotyledonous plants. Plant Mol. Biol., 9(6): 625-634.
- XU S Q, WANG J H, SHANG H Y, et al., 2018. Transcriptomic characterization and potential marker development of contrasting sugarcane cultivars. Sci. Rep., 8: 1683.
- YANG L F, JIN Y H, HUANG W, et al., 2018. Full-length transcriptome sequences of ephemeral plant *Arabidopsis pumila* provides insight into gene expression dynamics during continuous salt stress. BMC Genom., 19(1): 1-14.
- YANG Y J, YUE R Q, SUN T, et al., 2015. Genome-wide iden-

tification, expression analysis of GH3 family genes in *Medicago truncatula* under stress-related hormones and *Sinorhizobium meliloti* infection. Appl. Microbiol. Biotechnol., 99 (2): 841-854.

- YUAN Y, YANG X P, FENG M F, et al., 2021. Genome-wide analysis of R2R3-MYB transcription factors family in the autopolyploid *Saccharum spontaneum*: An exploration of dominance expression and stress response. BMC Genomics, 22 (1): 622.
- ZHANG J S, ZHANG X T, TANG H B, et al., 2018. Alleledefined genome of the autopolyploid sugarcane Saccharum spontaneum L. Nat. Genet., 50(11): 1565-1573.
- ZHANG S W, LI C H, CAO J, et al., 2009. Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by TLD1/OsGH3. 13 activation. Plant Physiol., 151(4): 1889-1901.
- ZOU X P, LONG J H, ZHAO K, et al., 2019. Overexpressing GH3.1 and GH3.1L reduces susceptibility to Xanthomonas citri subsp. citri by repressing auxin signaling in Citrus (Citrus sinensis Osbeck). PLoS ONE, 14(12): e0220017.

(责任副主编 王海峰) (责任执行主编 陈玲玲)