浙 江 农 林 大 学 学 报，2017，**34**(4)：581-588
Journal of Zhejiang A & F University
doi:10.11833/j.issn.2095-0756.2017.04.003

烟草 *NtPLR*1 基因克隆与表达分析

李冰冰[1]，刘国峰[1]，魏　书[1]，黄龙全[1]，张剑韵[2]

（1. 安徽农业大学 茶与食品科技学院，安徽 合肥 230036；2. 安徽农业大学 外国语学院，安徽 合肥 230036）

摘要：维生素 B_6(VB_6)在植物体内参与多种生化反应，对植物生长至关重要，吡哆醛还原酶(PLR)是 VB_6 代谢转换的作用酶，催化吡哆醛(PL)生成吡哆醇(PN)，对维持细胞内 VB_6 的动态平衡发挥重要作用，而 PLR 在植物中鲜有报道。以拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 吡哆醛还原酶氨基酸序列 AtPLR1 为模板，在公用数据库通过同源比对获得数条烟草 *Nicotiana tabacum NtPLR*1 基因的片段，结合互补脱氧核糖核酸(cDNA)的末端快速扩增-聚合酶链式反应(RACE-PCR)技术获得了烟草吡哆醛还原酶 *NtPLR*1 基因。该基因全长 1 370 bp，编码 369 个氨基酸残基，预测其编码蛋白的分子量为 41 kDa，理论等电点为 9.42。氨基酸多序列比对结果表明：*NtPLR*1 与其他物种的 *PLR*1 相似性较高。实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)分析结果表明：外源吡哆醛 PL 处理时，*NtPLR*1 表达先升高后降低，在 4 d 达到顶峰。相应地，高效液相色谱分析结果表明：烟草叶片中 PL 含量随时间逐渐降低而吡哆醇 PN 含量逐渐升高，表明 *NtPLR*1 可像酵母 PLR 一样，催化 PL 形成 PN。此外，定量分析结果表明：*NtPLR*1 在烟草根、茎和叶片中均有表达，其中在叶片中表达显著高于其他部位($P<0.05$)。在紫外线、氧化和盐害胁迫下，*NtPLR*1 的表达与对照相比均显著上调($P<0.05$)，表明 *NtPLR*1 对这 3 种逆境有响应，可能参与烟草的抗逆过程。将 *NtPLR*1 连入原核表达载体 pET32a，并进行诱导表达，成功表达出目的蛋白。报道的烟草 *NtPLR*1 基因功能为进一步探明植物 PLR 基因的功能和调控机制以及 VB_6 的生物合成提供了重要参考。图 8 表 1 参 25

关键词：植物学；维生素 B_6；烟草；*NtPLR*1；基因克隆；表达分析
中图分类号：S572；S718.3　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**2095-0756(2017)04-0581-08

Cloning and expression analysis of the tobacco *NtPLR*1 gene

LI Bingbing[1], LIU Guofeng[1], WEI Shu[1], HUANG Longquan[1], ZHANG Jianyun[2]

(1. School of Tea and Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China; 2. School of Foreign Languages, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

Abstract: Vitamin B_6(VB_6), essential for plant growth and development and involved in more than 100 biological processes, utilizes pyridoxal reductase (PLR) as the key enzyme in the VB_6 salvage pathway, thereby catalyzing pyridoxal (PL) to generate pyridoxine (PN). Since studies on PLR of plant VB_6 are quite limited, PLR genes were cloned and characterized to improve understanding of VB_6 biosynthesis in plants. Several *NtPLR*1 gene fragments were found in *Nicotiana tabacum* through a homologous blast with *Arabidopsis AtPLR*1. Full length was obtained using rapid amplification of cDNA ends (RACE). Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) and high performance liquid chromatography (HPLC) analysis were conducted; *NtPLR*1 expression by ultraviolet, oxidation, exogenous PL, and NaCl treatments were compared to a control; and prokary otic expression of *NtPLR*1 was accomplished. Results of RACE showed that full length cDNA of *NtPLR*1 was 1 370 bp, which encoded 369 amino acid residues with a protein molecular weight of about 41 kDa and a theoretical isoelectric point of 9.42. Real-time quantitative PCR analysis revealed that an exogenous PL treatment

收稿日期：2016-08-30；修回日期：2016-10-27
基金项目：安徽省教育厅自然科学基金重点资助项目(KJ2010A116)；国家自然科学基金面上项目(31670297)
作者简介：李冰冰，从事维生素 B_6 代谢转换研究。E-mail：lbb126@126.com。通信作者：张剑韵，教授，博士，从事维生素 B_6 代谢和生物多样性研究。E-mail：jianyun218@aliyun.com

induced *NtPLR*1 expression with highest expression at 4 d. The HPLC analysis showed that PL content significantly decreased ($P<0.05$); whereas, PN content significantly increased ($P<0.05$) during an exogenous PL treatment. *NtPLR*1 was expressed in roots, stems, and leaves with leaves having the highest ($P<0.05$) expression level. Also, ultraviolet, oxidation, and NaCl treatments, compared to a control, significantly induced ($P<0.05$) *NtPLR*1 expression. Furthermore, prokaryotic expression of *NtPLR*1 in vector *pET*32*a* successfully revealed the recombinant protein at the expected size. This study reported the *NtPLR*1 gene of *N. tabacum* for the first time, finding that it catalyzed PL to form PN in tobacco as found in yeast, and it may be induced in response to ultraviolet, oxidation, and NaCl stress; thus, the *NtPLR*1 gene can be an important reference for further plant PLR gene functional characterization and regulation as well as VB_6 biosynthesis. [Ch, 8 fig. 1 tab. 25 ref.]

Key words: botany; vitamin B_6; *Nicotiana tabacum*; *NtPLR*1; gene cloning; expression analysis

维生素 B_6(VB_6)是一类吡啶化合物的总称，包括吡哆醛(PL)，吡哆醇(PN)，吡哆胺(PM)，磷酸吡哆醛(PLP)，磷酸吡哆醇(PNP)，磷酸吡哆胺(PMP)等，其中 PLP 是其主要活性形式，作为辅酶参与生物体内 100 多种生化反应，包括氨基酸代谢、抗生素合成、免疫调节等生理反应及氧化胁迫等抗逆反应[1]。细胞内 VB_6 各组分的平衡是机体进行正常代谢的前提，因而 VB_6 对植物的生长发育至关重要。研究[2]发现，自然界中 VB_6 有从头合成(*de novo* synthetic pathway)和补救合成(salvage pathway)2 种方式，补救合成途径使 VB_6 异养型生物能够利用外源摄入的 PN，PM 和 PL 来合成机体代谢所需要的活化型 PLP 并维持细胞各型 VB_6 浓度相对稳定。从头合成已被广泛研究，而补救合成途径的研究却相对缺乏。其中，吡哆醛还原酶(PLR)是 VB_6 补救合成途径中的作用酶，最初在酵母中被发现，属于醛酮还原酶(aldo-keto reductase)，在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)存在的条件下催化 PL 转换成 PN[3-4]，从而可维持细胞内 VB_6 动态平衡，对于生物体进行正常的生理活动具有重要意义。植物性食物中 VB_6 主要以 PN 或其糖基化形态存在，并推测植物中可能有高效的 PN 生成机制[5]。迄今为止，植物中只有拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 的 *AtPLR*1 基因得到分离鉴定，对酵母突变体进行互补实验表明 *AtPLR*1 像酵母 PLR 一样，可催化 PL 形成 PN[6]。T-DNA 插入的 *Atplr*1 突变体根系生长较野生型明显缓慢，氯化钠、甘露醇胁迫下 *Atplr*1 的生长受到抑制[6]，推测 PLR 可能与植物抵抗盐害和渗透压胁迫有关。烟草 *Nicotiana tabacum* 是一种重要的模式植物及经济作物，对其 PLR 进行克隆和功能分析，有助于进一步明确植物体内 VB_6 的补救合成途径，同时为烟草良种选育提供理论储备。本研究以 *AtPLR*1 为模板，经过对美国生物技术信息中心(NCBI)公共数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)中的序列进行比对和拼接并结合 cDNA 末端快速扩增技术-聚合酶链式反应(RACE-PCR)得到了烟草 *NtPLR*1 基因的全长序列。以此为基础，分析了其生物功能和表达特性，结果 *NtPLR*1 可催化 PL 形成 PN。*NtPLR*1 在叶片中表达最高，与紫外线、氧化及氯化钠胁迫和外源 PL 处理有应答反应。

1 材料与方法

1.1 实验材料

烟草‘云烟 85’*Nicotiana tabacum*‘Yunyan 85’种子和 pET32a 原核表达载体为实验室保存。pEASY-Blunt 载体、菌株 BL21(DE3) Rosetta 和大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5α 购自 TransGen 公司。

1.2 处理方法

紫外线处理：在无菌操作台上用紫外线照射生长至旺长期的烟草，照射时间分别为 2 h，4 h 和 8 h，取茎尖以下的第 3 片叶，液氮冷冻，备用。

盐处理：用 100.0 mmol·L^{-1} 的氯化钠溶液浇灌旺长期烟草，处理 1 d，4 d 和 7 d 后取样，取茎尖以下第 2 片叶。液氮冷冻，备用。

氧化处理：浇灌亚硫酸氢钠-亚硫酸钠($NaHSO_3$-Na_2SO_3)混合物(10.0 mmol·L^{-1}，以亚硫酸钠浓度计)，处理 1 d，4 d 和 7 d 后取样，取茎尖以下第 2 片叶，液氮冷冻，备用。

PL 处理：将旺长期烟草根部洗净，置于添加 100.0 mg·L^{-1} PL 的水培液中，用锡纸将烟草根部及水

培液遮住，茎叶接受正常光照。分别于培养的第 2 天、第 4 天和第 8 天采集茎尖以下第 2 片叶，液氮冷冻，备用。

以上均设置重复 3 个·处理$^{-1}$。

1.3　总核糖核酸(RNA)提取及互补脱氧核糖核酸(cDNA)的合成

根据 RNAiso Plus RNA 提取试剂盒使用说明书(Takara)，进行总 RNA 提取。提取的 RNA 用质量分数为 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行纯度与完整性检测。参照 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录试剂盒(Takara)对质量合格的 RNA 进行反转录，置于–20 ℃备用。

1.4　基因克隆及生物信息学分析

以拟南芥吡哆醛 PLR 的氨基酸序列(NP_200170.2)为模板，在烟草表达序列标签(EST)数据库里同源检索，根据得到的 EST 序列，设计引物 3RACE-1，3RACE-2，3RACE-3(表 1)进行巢式 PCR 扩增目的基因 3′端序列。扩增产物经切胶回收，连接 pEASY-Blunt 载体后，转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞，筛选阳性克隆子进行测序。3′端序列扩增产物测序结果验证后，使用 DNAMAN 软件将它与 EST 起始序列结合得到全长 cDNA 序列。随后设计全长克隆引物 *NtPLR-F*1 和 *NtPLR-R*1(表 1)，扩增 *NtPLR*1 序列。PCR 反应程序为 95 ℃预变性 3.0 min；94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1.5 min，共 28 个循环；72 ℃延伸 10.0 min。获得的 *NtPLR*1 序列在 NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)数据库 BLAST 中进行序列比对。用 ProtParam 软件(http://web.expasy.org/protparam/)在线分析该蛋白的分子量和等电点；采用 DNAMAN 7.0 软件对基因编码的氨基酸序列进行比对分析。

表 1　*NtPLR*1 基因克隆与表达分析所用引物信息

Table 1　Primers used in *NtPLR*1 gene cloning and expression analysis

用途	引物名称	引物序列(5′→3′)
3′-RACE	3RACE-1	TGCAAATTATGCACCTCTGCAGGAACG
	3RACE-2	TGCAGTTGGGGTGAGCAACTATGGACC
	3RACE-3	TGCGCTCAGCCCAGGTACAATTTTCAT
目的片段扩增 *NtPLR*1	*NtPLR-F*1	ATGGCTCTCTCACTCCCAGCTTCAAAATC
	*NtPLR-R*1	CTTTGTCTGAAATACGTTTTGGATC
原核表达	*NtPLR-F*2	GGATCCATGGCTCTCTCACTCCCAGCTTCAAAATC
	*NtPLR-R*2	GTCGACCTTTGTCTGAAATACGTTTTGGATC
qRT-PCR	*NtPLR-F*3	TGGCAAAAGGTAAAGATGGG
	*NtPLR-R*3	GTTGATGCCATTCTCCACCG

说明：下划线分别表示 *BamH*1 和 *Sal*1。

1.5　*NtPLR*1 表达特性分析

根据 *NtPLR*1 基因的 cDNA 序列，设计特异性定量引物(表 1)，以 18 *S rRNA* 为内参基因，以根、茎、叶及紫外线、氧化、氯化钠处理下不同时间点取样叶片的 cDNA 为模板，进行荧光实时定量 PCR (qRT-PCR)分析。qRT-PCR 反应程序为 95 ℃ 3.0 min，95 ℃ 10 s，55 ℃ 40 s，35 个循环；溶解曲线：从 65 ℃ 按 0.5 ℃/循环增加到 95 ℃ 。以 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法计算相对表达量。

1.6　VB_6 标准试剂的配制及 VB_6 的色谱分析条件

VB_6 检测参照张剑韵等[7-9]的方法，加以改进。VB_6 色谱分析所用色谱柱为 H&E 公司的 XP ODS-A 5 μm 120 A(250.0 mm × 4.6 mm)。高效液相色谱仪为 Waters 600，配备 2475 荧光检测仪。流动相 A(分析用)：体积分数为 1%乙腈(CH_3CN)-25.0 mmol·L^{-1} 磷酸二氢钾(KH_2PO_4)-25.0 mmol·L^{-1} 高氯酸钠($NaClO_4$)，pH 2.5；流速为 0.5 mL·min^{-1}。进样量均为 5.0 μL，荧光检测波长为 395 nm，调整激发波长为 290 nm。

1.7　基因原核表达载体的构建及蛋白诱导表达

原核表达载体构建：根据载体 pET32a 多克隆位点信息，设计带有酶切位点(*Bam*H1 和 *Sal*1)的原核表达引物(表 1)，以云烟 85 cDNA 为模板扩增 *NtPLR*1 基因的 cDNA 片段。经琼脂糖凝胶电泳分离，回收目的条带后，连接 pEASY-Blunt 载体，转化至大肠埃希菌 DH5α 感受态细胞。挑取经PCR 和测序验证的阳性菌落，扩大培养，使用质粒小抽试剂盒(TransGen2)提取质粒，即得到 pEASY-*NtPLR*1 载体。用限制性内切酶 *BamH*1 和 *Sal*1 双酶切 pEASY-*NtPLR*1 和 pET32a 质粒后进行 T4 连接，即得到 pET32a-*NtPLR*1 重组质粒。测序正确后，提取目的质粒并转化至 BL21(DE3)Rosetta 菌株，即得到融合表达菌。

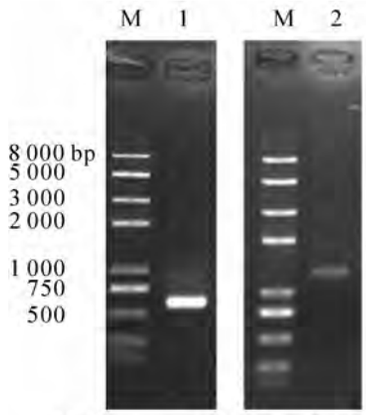
蛋白诱导表达：37 ℃培养融合表达菌至 *D*(600)约为 0.60，加入终浓度为 1.0 mmol·L^{-1} 的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)，并在 18 ℃/37 ℃ 200 r·min^{-1} 诱导 24 h。以含 pET32a 空质粒的 BL21(DE3) Rosetta

为对照。离心收获菌体，8 000 r·min^{-1} 离心 10.0 min，弃上清，用 PBS 重悬。重复 1 次后进行超声波破碎。分别取上清和沉淀，加入上样缓冲液，沸水浴 5.0 min，冷却至室温后，取 20.0 μL 进行 SDS-PAGE (5%浓缩胶，10%分离胶)电泳检测。电泳后，经考马斯亮蓝染色、拍照，分析蛋白表达结果。

2 结果与分析

2.1 *NtPLR*1 克隆及氨基酸序列分析

以拟南芥吡哆醛 PLR 的氨基酸序列(NP_200170.2)为模板，在烟草 EST 数据库里同源检索到一条同源性(79%)序列(GenBank: HS082453.1)。以此 EST 序列为起点，进行延伸检索后得到 4 条候选 EST 序列，登录号分别为 GenBank:FS425789，GenBank:FS385536.1，GenBank:FS432618，GenBank:FS431044.1。使用 DNAMAN 比对 5 条 EST 序列，发现它们来源于同一基因，拼接后得到 1 条长 800 bp 的起始序列。根据该序列设计 3 轮 3′-RACE 引物(表 1)，进行巢式 PCR 扩增得到大小约为 700 bp 单一明亮条带(图 1 中泳道 1)。将该条带测序后和起始序列拼接得到全长 cDNA 序列。随后设计全长克隆引物(表 1)，PCR 扩增得到大小约 1 500 bp 的序列(图 1 中泳道 2)。测序正确后，将此全长序列命名为*NtPLR*1，其 cDNA 长度为 1 370 bp，开放阅读框 1 110 bp，5′非编码区(UTR)长 55 bp，3′UTR 长205 bp。编码 369 个氨基酸，起始密码子为 ATG，终止密码子为 TGA(图 2)，具有 Aldo-keto 还原酶家族保守底物结合位点[6](图 2 中下划线强调部分)。在线预测其编码蛋白的分子量为 41 070.5 Da，理论等电点为 9.42。氨基酸多序列比对结果显示，NtPLR1 与 AtPLR 相似性为 75%(图 3)，与栗酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe*[10]，酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*[11]PLR 的氨基酸相似性分别为 24%和 26%。



M. DL8000；1. 3-RACE 结果；2. *NtPLR*1 基因全长克隆结果

图 1 琼脂糖凝胶电泳结果

Figure 1 Agorase gel electrophoresis results

2.2 *NtPLR*1 表达特性分析

分别提取烟草根、茎、叶的总 RNA，*D*(260)/*D*(280)为 1.9~2.0，表明 RNA 纯度较好，可进行后续实验。如图 4A 所示：*NtPLR*1 在根、茎和叶均有表达，在叶中表达最高，根、茎表达水平较低。对不同逆境胁迫下 *NtPLR*1 的表达分析发现：紫外线胁迫下，随时间延长，*NtPLR*1 基因在烟草叶片中的表达量表现出先升高后下降的趋势，并在紫外线处理 4 h 时达到最大值(图 4B)。氧化及氯化钠(100.0 mmol·L^{-1})浇灌处理时，随胁迫时间的增加，*NtPLR*1 基因在烟草叶片中的表达持续升高，7 d 时表达最高(图 4C)。在以上逆境胁迫下，*NtPLR*1 表达呈现不同程度的上调，这表明 *NtPLR*1 与紫外线、氧化、氯化钠胁迫有应答反应。

2.3 PL 对 *NtPLR*1 表达的诱导效果及对 PN 生成量的影响

烟草水培液添加外源 PL 后，分别于培养的第 2 天、第 4 天、第 8 天取样，分析 *NtPLR*1 基因的表达水平和 PL，PN 含量。定量 PCR 分析结果表明：*NtPLR*1 表达随处理时间延长呈现先上升后下降的趋势，在第 4 天表达量达到最高，第 2 天、第 4 天、第 8 天的 *NtPLR*1 表达量分别是对照的 2.20，2.85 和 1.50 倍(图 5)。

VB_6 标准品高效液相色谱法(HPLC)检测结果如图 6A，峰型和区分度良好。对未处理的烟草叶片提取液分析发现，在 PMP，PM，PLP，PL 及 PN 的洗脱位置上均出现了相应的洗脱峰(图 6B)，说明检测方法可行。据此，对 PL 处理组烟草叶片进行 HPLC 分析，结果表明：随时间延长，处理组烟草叶片中 PL 含量逐渐降低，PN 含量增幅明显(图 7)，同时，PMP，PM 含量有小幅增长，表明烟草吸收外源 PL 后，主要将 PL 转化为 PN。PL 处理后 *NtPLR*1 的表达受到诱导，而在 8 d 时表达下降，结合 PN，PMP 和 PM 含量的逐渐增多可知，*NtPLR*1 在烟草中催化 PL 形成 PN。VB_6 各组分在烟草中动态转化，且各组分间存在反馈调节。

2.4 *NtPLR*1 原核载体构建及重组蛋白诱导表达

将重组质粒 pET32a-NtPLR1 转入 BL21(DE3)Rosetta，分别在 28 ℃和 37 ℃条件下经异丙基硫代半乳

```
          10        20        30        40        50        60        70        80        90
   1 ATGGCTCTCTCACTCCCAGCTTCAAAATCCATTTTTTACATAAGATGTAGCAATTCGACAAATGATCCTGTTCCATCTTCCTCTGTGTTT
   1  M  A  L  S  L  P  A  S  K  S  I  F  Y  I  R  C  S  N  S  T  N  D  P  V  P  S  S  S  V  F
         100       110       120       130       140       150       160       170       180
  91 AAATCCCTCAAACTTCCCCGTTTCTGGCCATGGCAAAAGGTAAAGATGGGACCTTTAACAGTATCTCCAATGGGTTTTGGTACTTGGGCA
  31  K  S  L  K  L  P  R  F  W  P  W  Q  K  V  K  M  G  P  L  T  V  S  P  M  G  F  G  T  W  A
         190       200       210       220       230       240       250       260       270
 181 TGGGGAAATCAACTTCTCTGGGGTTATCAAGATTCTATGGACTCTGAACTTCAGCGCACTTTCAATCTTGCGGTGGAGAATGGCATCAAC
  61  W  G  N  Q  L  L  W  G  Y  Q  D  S  M  D  S  E  L  Q  R  T  F  N  L  A  V  E  N  G  I  N
         280       290       300       310       320       330       340       350       360
 271 CTATTTGATACGGCTGATTCTTATGGGACTGGAAGGTTAAATGGACAAAGTGAGAAACTTCTCGGAAAATTCATTCGCGAATTTCCAGGA
  91  L  F  D  T  A  D  S  Y  G  T  G  R  L  N  G  Q  S  E  K  L  L  G  K  F  I  R  E  F  P  G
         370       380       390       400       410       420       430       440       450
 361 GACAAGCAAGTAAAGAATGACATTGTGATTGCAACAAAGTTTGCAGCATACCCATGGCGCCTAACACCTGGACAATTTGTGAATGCTTGC
 121  D  K  Q  V  K  N  D  I  V  I  A  T  K  F  A  A  Y  P  W  R  L  T  P  G  Q  F  V  N  A  C
         460       470       480       490       500       510       520       530       540
 451 AAGTCTTCTCTGGATAGGATGCAAATTGAGCAAATTGGAATAGGACAATTGCACTGGTCAACTGCAAATTATGCACCTCTGCAGGAACAA
 151  K  S  S  L  D  R  M  Q  I  E  Q  I  G  I  G  Q  L  H  W  S  T  A  N  Y  A  P  L  Q  E  Q
         550       560       570       580       590       600       610       620       630
 541 GCTCTTTGGGATGGTTTAGTGGCCATGTACGAGAAGGGTTTAGTTCGTGCAGTTGGGGTGAGTAACTATGGACCAAAGCAGCTGCTGAAA
 181  A  L  W  D  G  L  V  A  M  Y  E  K  G  L  V  R  A  V  G  V  S  N  Y  G  P  K  Q  L  L  K
         640       650       660       670       680       690       700       710       720
 631 ATACACAAATATCTTGATGACCGAGGAGTTCCTTTGCGCTCAGCCCAGGTACAATTTTCATTGCTGAGTATGGGAAGTGATCAAATGGAG
 211  I  H  K  Y  L  D  D  R  G  V  P  L  R  S  A  Q  V  Q  F  S  L  L  S  M  G  S  D  Q  M  E
         730       740       750       760       770       780       790       800       810
 721 ATGAAAAATGTATGTGATTCTCTAGGCATACGGGTCATAGCATACAGTCCTCTTGGTCTTGGTATGCTCACTGGGAAATATACGCCCTCA
 241  M  K  N  V  C  D  S  L  G  I  R  V  I  A  Y  S  P  L  G  L  G  M  L  T  G  K  Y  T  P  S
         820       830       840       850       860       870       880       890       900
 811 AATCTTCCACCTGGGCCAAGGGGACTACTCTTTAGACAAATACTACCTGGATTGGAGCCATTACTTACCTCACTGAGAGAAATAGCTCAA
 271  N  L  P  P  G  P  R  G  L  L  F  R  Q  I  L  P  G  L  E  P  L  L  T  S  L  R  E  I  A  Q
         910       920       930       940       950       960       970       980       990
 901 CGACGTGGGAAAATAATACCACAGATAGCTATCAACTGGTGTATATCCAAGGGTACAATTCCTATCCCTGGAGTCAAATCTGTAAAACAA
 301  R  R  G  K  I  I  P  Q  I  A  I  N  W  C  I  S  K  G  T  I  P  I  P  G  V  K  S  V  K  Q
        1000      1010      1020      1030      1040      1050      1060      1070      1080
 991 GCTGAAGAGAATCTAGGAGCCCTTGGCTGGCAACTCACTTCTGATGAATTGCTCCAATTAGAATACGCAGCTCTTGATTCTCCACGCAAG
 331  A  E  E  N  L  G  A  L  G  W  Q  L  T  S  D  E  L  L  Q  L  E  Y  A  A  L  D  S  P  R  K
        1090      1100      1110
1 081 ATGATCCAAAACGTATTTCAGACAAAGTGA
 361  M  I  Q  N  V  F  Q  T  K  *
```

下画线为Aldo-keto还原酶保守功能结构域；*代表终止密码子

图 2　*NtPLR*1 基因开放阅读框及预测氨基酸序列

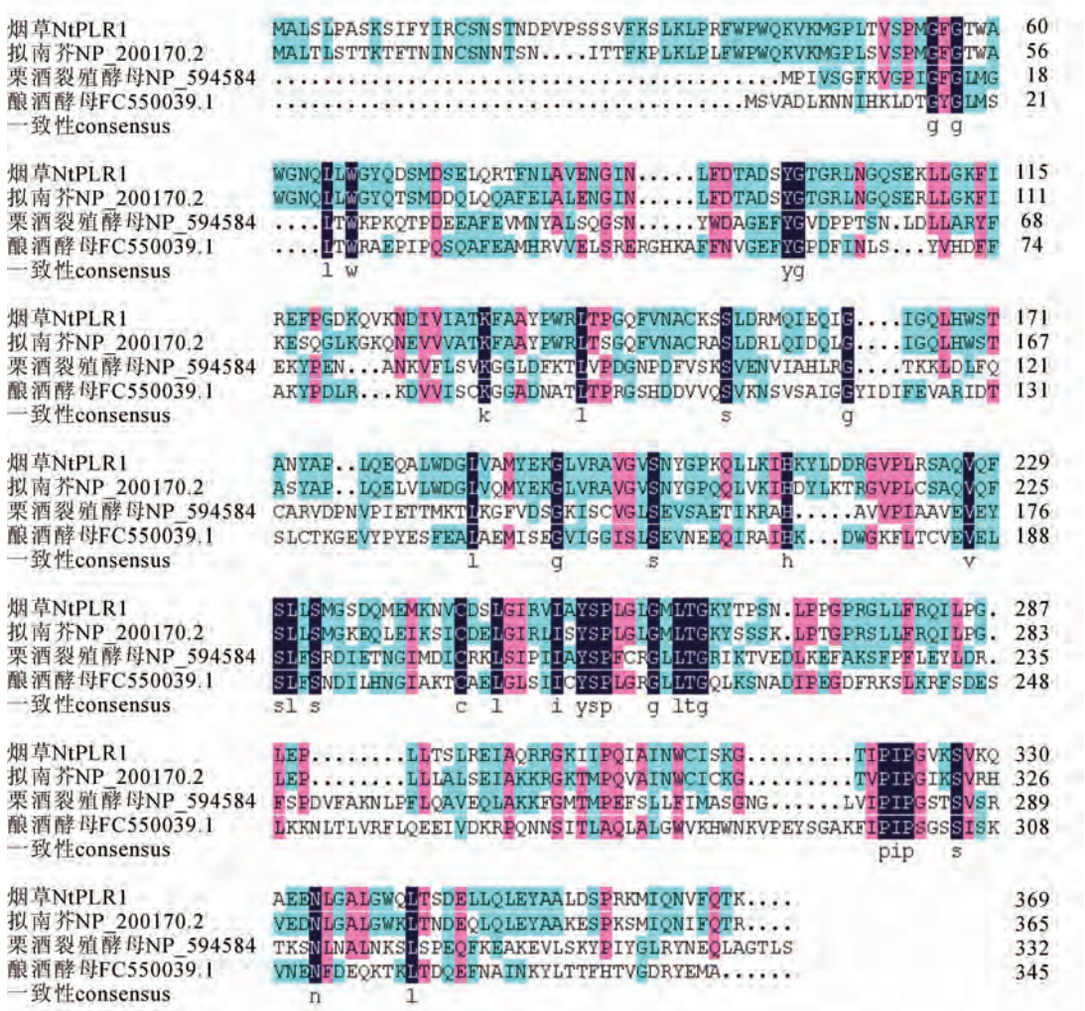
Figure 2　ORF of *NtPLR*1 gene and the corresponding amino acid sequence

糖苷(IPTG)诱导后，超声波破碎菌体，离心分离上清和沉淀。将上清和沉淀分别进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)检测，结果显示：上清中无目的条带，而沉淀中在约 53 kDa 处出现明显蛋白条带，因 pET32a 的组氨酸标签(his-tag)约为 12 kDa，故蛋白条带的大小与预期相符。仅沉淀中出现目的条带，表明 *NtPLR*1 在大肠埃希菌中以包涵体形式存在(图 8)。

3　讨论

VB_6 在自然界中广泛地存在，主要以辅酶的形式参与生物体内多种物质代谢反应，是生物机体内很多重要酶系的辅酶[12]。植物体内，VB_6 参与淀粉、亚油酸等物质的合成[13]，对于生长素、叶绿素以及乙烯的合成是不可或缺的[14-15]。近年来的研究还发现，VB_6 具有抗氧化作用，可猝灭超氧阴离子自由基及单线态氧[16]；除此之外，在低温、渗透压、盐害、紫外及病菌等逆境中，VB_6 可以提高植株的抵抗力，发挥一定的抗逆作用[13,17-20]。

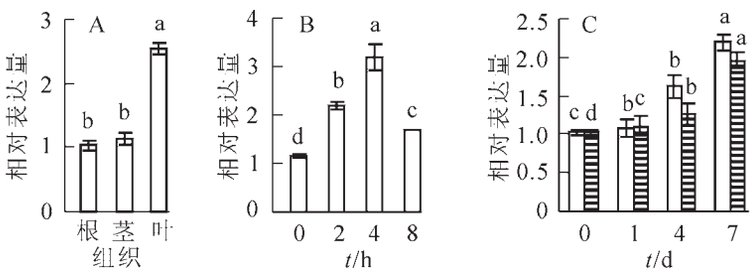
VB_6 从头合成途径和补救合成途径普遍存在于植物和微生物中[21-24]。植物和微生物是 VB_6 自养生物，动物自身无法从头合成 VB_6，只能从食物中获得 VB_6 前体物质，通过补救合成途径满足机体对 VB_6 的需求。VB_6 补救途径由多种酶参与，PLR 是其中一种 VB_6 补救合成酶，对于细胞进行正常生理活动具有重要意义。在研究拟南芥 *Atplr*1 时发现，*Atplr*1 的 VB_6 总水平下降，其中 PL，PLP，PM 和 PMP 水平显著下降，而 PN 和 PNP 无显著变化，推测在拟南芥内可能存在 PLR 的同工酶[6]。而 HUANG 等[25]的研究认为：烟草叶际 PL—PN 的转换可能受叶际微生物的影响较大。VB_6 对植物的生长发育、逆境适应及人和动物的营养具有重要意义，其从头合成途径已有较多的研究，而补救途径还有许多不明之处，有待深入研究。本研究从烟草中克隆得到烟草 *NtPLR*1，并设置了不同的逆境胁迫条件对 *NtPLR*1 进行探究，结果表明：*NtPLR*1 在叶中表达最高且受紫外线，氧化和氯化钠胁迫的诱导，推测 *NtPLR*1 参与烟草植株



由上而下依次为烟草(*NtPLR*1)，拟南芥 *Arabidopsis thaliana*(NP_200170.2)，栗酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe*(NP_594584)，酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*(FC550039.1)

图 3 几个已知物种的 PLR 多序列比对

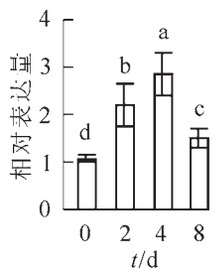
Figure 3 Multiple protein sequence alignment of several known PLR enzymes



A. *NtPLR*1在不同组织中的表达特异性；B. *NtPLR*1对紫外胁迫的响应分析；C. *NtPLR*1对盐胁迫□和氧化胁迫▤的响应分析。不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

图 4 *NtPLR*1 表达的组织特异性及对不同胁迫处理的响应

Figure 4 QPCR analysis of spatial expression of *NtPLR*1 and its response to different stress treatments



不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著

图 5 *NtPLR*1 对外源 PL 处理的响应分析

Figure 5 QPCR analysis of the response of *NtPLR*1 to exogenous PL

对紫外线、氧化和氯化钠胁迫的抗逆反应。外源添加 PL 后，*NtPLR*1 表达量与对照相比显著上调，表明 PL 对 *NtPLR*1 有显著的诱导作用。此外，外源 PL 处理的前 4 d *NtPLR*1 的表达呈上升趋势，而在培养的第 8 天时 *NtPLR*1 的表达降低，相应的 PL 持续降低，而 PN，PM 和 PMP 等都有不同程度的升高，表明 VB_6 各组分在烟草叶片中可相互转化并存在反馈调节。目前，本实验室正在进行 *NtPLR*1 重组蛋白的优

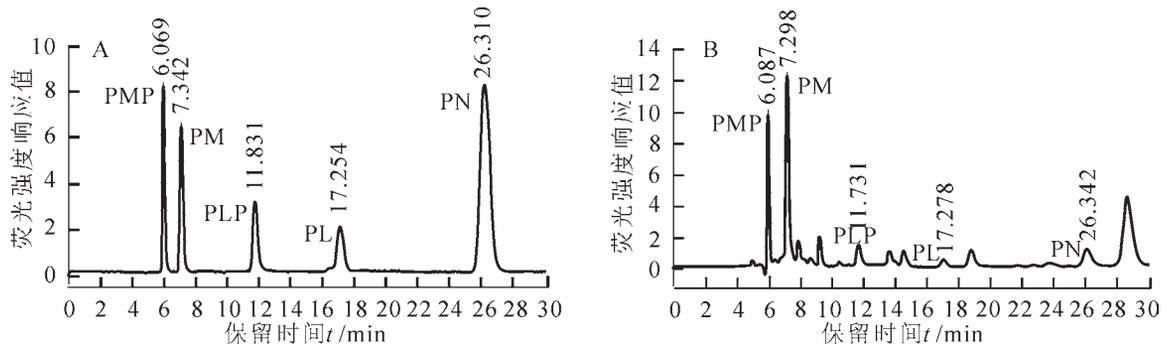
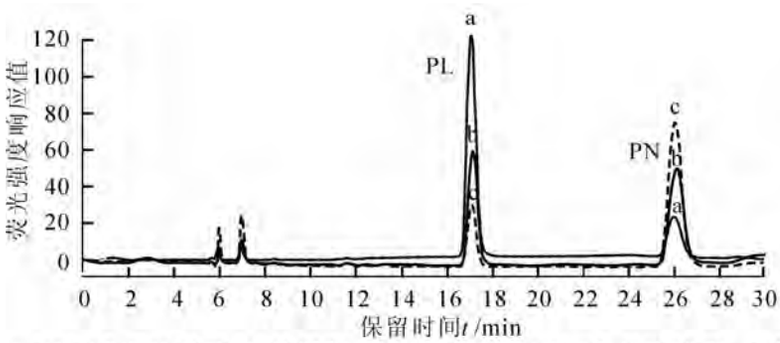


图 6　HPLC 分析 VB_6 标准品(A)及对照烟草叶片提取液(B)

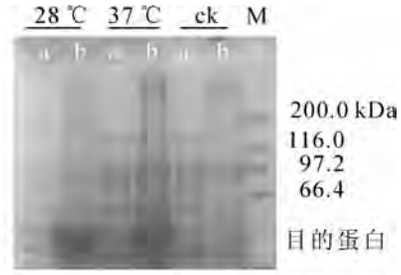
Figure 6　HPLC analysis for VB_6 authentic standards (A) and extracts from control tobacco leaves (B)



a. HPLC分析PL处理 2 d 的烟草叶片提取液；b. HPLC分析PL处理 4 d 的烟草叶片提取液；c. HPLC分析PL处理 8 d 的烟草叶片提取液

图 7　HPLC 分析外源 PL 处理组烟草叶片提取液

Figure 7　HPLC analysis of extracts from exogenous PL treated tobacco leaves



a. 上清；b. 沉淀；ck. 空质粒对照；M. 蛋白标记

图 8　*NtPLR*1 在表达菌株 BL21(DE3)Rosetta 中的表达

Figure 8　Prokaryotic expression of *NtPLR*1 in BL21(DE3)Rosetta

化表达及体外酶活测定，以期为进一步探明烟草 PLR 基因功能及 VB_6 补救合成过程奠定基础。

4　参考文献

[1] RAIL L C, NIKBIN M S. Vitamin B_6 and immune competence [J]. *Nutr Rev*, 1993, **51**(8): 217 – 225.

[2] HUANG Shuohao, ZENG Haibin, ZHANG Jianyun, *et al.* Interconversions of different forms of vitamin B_6 in tobacco plants [J]. *Phytochemistry*, 2011, **72**(17): 2124 – 2129.

[3] MORINO Y, SAKAMOTO Y. Enzymatic studies on pyridoxine metabolism (Ⅳ) a pyridoxine dehydrogenase from baker's yeast [J]. *J Biochem*, 1960, **48**: 733 – 744.

[4] HOLZER H, SCHNEIDER S. Purification and characterization of a TPN-dependent pyridoxol dehydrogenase from brewers yeast [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1961, **48**(2): 71 – 76.

[5] OLLILAINEN V. HPLC analysis of vitamin B_6 in foods [J]. *Agric Food Sci Finland*, 1999, **8**(6): 515 – 619.

[6] HERRERO S, GONZALEZ E, GILLIKIN J W, *et al.* Identification and characterization of a pyridoxal reductase involved in the vitamin B_6 salvage pathway in *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 2011, **76**(1/2): 157 – 169.

[7] 蒋守花，张剑韵，黄龙全. 采用高效液相色谱技术分析茶树体内维生素 B_6[J]. 茶叶科学，2010，**30**(2)：79 – 82.

JIANG Shouhua, ZHANG Jianyun, HUANG Longquan. Analysis of VB_6 derivatives in tea plant with high performance liquid chromatography [J]. *J Tea Sci*, 2010, **30**(2): 79 – 82.

[8] 张剑韵，黄龙全，早川享志，等. 采用高效液相色谱技术分析生物体内维生素 B_6[J]. 高等学校化学学报，2004，**25**(4)：638 – 640.

ZHANG Jianyun, HUANG Longquan, HAYAKAWA T, *et al.* Analysis of VB_6 derivatives in biological samples with high performance liquid chromatography [J]. *Chem J Chin Univ*, 2004, **25**(4): 638 – 640.

[9] 曾海彬，张剑韵，黄龙全. 采用高效液相色谱技术分析烟草体内的维生素 B_6 化合物[J]. 广西植物，2011，**31**(5)：695 – 698.

ZENG Haibin, ZHANG Jianyun, HUANG Longquan. Analysis of vitamin B_6 vitamers in tobacco plants by high performance liquid chromatography [J]. *Guihaia*, 2011, **31**(5): 695 – 698.

[10] GUIRARD B M, SNELL E E. Physical and kinetic properties of a pyridoxal reductase purified from baker's yeast [J]. *Biofactors*, 1988, **1**(2): 187 – 192.

[11] NAKANO M, MORITA T, YAMAMOTO T, *et al.* Purification, molecular cloning, and catalytic activity of *Schizosaccharomyces pombe* pyridoxal reductase a possible additional family in the aldo-keto reductase superfamily [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(33): 23185 – 23190.

[12] LYON J B, BAIN J A, WILLIAMS H L. The distribution of vitamin B_6 in the tissues of two inbred strains of mice fed complete and vitamin B_6-deficient rations [J]. *J Biol Chem*, 1962, **237**(6): 1989 – 1991.

[13] MOONEY S, HELLMANN H. Vitamin B_6: killing two birds with one stone? [J]. *Phytochemistry*, 2010, **71**(5/6): 495 – 501.

[14] TAO Yi, FERRER J L, LJUNG K, *et al.* Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants [J]. *Cell*, 2008, **133**(1): 164 – 176.

[15] VAVILIN D V, VERMAAS W F J. Regulation of the tetrapyrrole biosynthetic pathway leading to heme and chlorophyll in plants and cyanobacteria [J]. *Physiol Plantarum*, 2002, **115**(1): 9 – 24.

[16] BILSKI P, LI M Y, EHRENSHAFT M, *et al.* Vitamin B_6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants [J]. *Photochem Photobiol*, 2000, **71**(2): 129 – 134.

[17] SHI Huazhong, XIONG Liming, STEVENSON B, *et al.* The *Arobidopsis* salt overly sensitive 4 mutants uncover a critical role for vitamin B_6 in plant salt tolerance [J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(3): 575 – 588.

[18] CHEN Hao, XIONG Liming. Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidative stresses [J]. *Plant J*, 2005, **44**(3): 396 – 408.

[19] ZHANG Yafen, JIN Xiaoyi, OUYANG Zhigang, *et al.* Vitamin B_6 contributes to disease resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Plant Physiol*, 2015, **175**(1): 21 – 25.

[20] 黄龙全，张剑韵. 植物维生素 B_6 从头合成与代谢转换研究进展[J]. 西北植物学报，2015，**35**(10)：2124 – 2131.

HUANG Longquan, ZHANG Jianyun. Review on the de novo synthesis and metabolic conversions of vitamin B_6 in plants [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2015, **35**(10): 2124 – 2131.

[21] YU Shunwu, LUO Lijun. Expression analysis of a novel pyridoxal kinase messenger RNA splice variant, PKL, in oil rape suffering abiotic stress and phytohormones [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, **40**(12): 1005 – 1014.

[22] SANG Yuying, BARBOSA J M, WU Hongzhuan, *et al.* Identification of a pyridoxine (pyridoxamine) 5′-phosphate oxidase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *FEBS Letters*, 2007, **581**(3): 344 – 348.

[23] EHRENSHAFT M, BILSKI P, LI M Y, *et al.* A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B_6 biosynthesis [J]. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1999, **96**(16): 9374 – 9378.

[24] MITTENHUBER G. Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B_6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, **3**(1): 1 – 20.

[25] HUANG Shuohao, ZHANG Jianyun, TAO Zhen, *et al.* Enzymatic conversion from pyridoxal to pyridoxine caused by microorganisms within tobacco phyllosphere [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2014, **85**: 9 – 13.