

# 雷竹纤维素合成酶基因 cDNA 克隆与表达分析

杜亮亮, 鲁 专, 金爱武\*

(浙江林学院, 浙江省现代森林培育重点实验室, 浙江 临安 311300)

**摘要:**根据绿竹纤维素合成酶 (cellulose synthase) 基因的保守区序列设计引物, 以雷竹 cDNA 为模板, 采用 PCR 方法, 成功扩增出 1 个含有完整阅读框架的 cDNA 序列, 长度为 3 385 bp, 共编码 1 056 个氨基酸, 将其命名为 *PpCesA1* 基因。氨基酸序列的分析结果表明, *PpCesA1* 与其他纤维 *PeCesA4* 素合成酶有较高的同源性, 同绿竹序列相似性高达 94%, 且其序列具有典型的 Cellulose\_synt - GT - A 结构域, 推测此 *PpCesA1* 为雷竹纤维素合成酶基因。对雷竹不同组织采用半定量方法研究该基因的表达情况, 结果表明该基因在不同组织中的表达有明显差异。

**关键词:**雷竹; 纤维素合成酶; 克隆; 表达分析

**中图分类号:** S795.7; Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000 - 2286 (2010) 03 - 0535 - 06

## cDNA Cloning and Expression of *P. praecox* C. d. Chu et C. S. Chao Cellulose Synthase Gene

DU Liang-liang, LU Zhuan, J N Ai-wu\*

(Key Laboratory for Modern Silvicultural Technology of Zhejiang Province, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, China)

**Abstract:** A cellulose synthase protein gene from *P. praecox* C. d. Chu et C. S. Chao named as *PpCesA1*, was cloned through PCR using primers designed according to the cellulose synthase protein genes conserved region of *Bambusa multiplex*. The coding region of the genomic clone of *PpCesA1* was continuous. The cDNA of *PpCesA1* contained an open reading frame of 3 385 bp and codes for a protein of 1 056 aa. The database search using the amino acid sequence as query showed high homology to several cellulose synthase proteins, especially the *PpCesA1* sequence showed the maximum homology (94% identity) to *Bambusa multiplex* (subspecies cellulose synthase protein gene), and it had a typically conserved domain of Cellulose\_synt - GT - A. Therefore it could be predicted that the *PpCesA1* could be an cellulose synthase gene in bamboo. The result of semiquantitative RT - PCR in different tissues of *P. praecox* C. d. Chu et C. S. Chao showed that the expression of *PpCesA1* gene was different.

**Key words:** *P. praecox* C. d. Chu et C. S. Chao; cellulose synthase; cloning; expression analysis

雷竹 (*P. praecox* C. d. Chu et C. S. Chao) 属禾本科竹亚科刚竹属, 耐瘠薄, 较抗寒, 是我国竹类植物中分布范围广、经济价值最高的一个材用和笋用竹种, 在我国林业生产中占有非常重要的地位。因此

收稿日期: 2009 - 12 - 31 修回日期: 2010 - 05 - 09

基金项目: 浙江省科技厅项目 (2451001049)

作者简介: 杜亮亮 (1985 - ), 男, 硕士生, 主要从事竹林栽培与利用研究, E-mail: 276516769@qq.com; \*通讯作者: 金爱武, 研究员, E-mail: kinaw@zjfc.edu.cn

研究与雷竹纤维合成相关的基因,具有很强的代表性。雷竹笋以其特有的粗纤维、丰富的微量元素以及多种维生素和氨基酸,无污染的生长环境等被公认为是最佳的绿色食品<sup>[1]</sup>、理想的保健食品,经济价值高<sup>[2]</sup>。但是鲜嫩竹笋采后在常温保存条件下,几天内会快速出现“纤维化”,这种竹笋的快速“纤维化”极大地影响竹笋的营养和品质,而采用低温储存则可明显延缓竹笋快速纤维化的进程<sup>[3]</sup>。

目前对于竹笋采后竹纤维素生物合成及快速纤维化的内在分子机制还未见到相关报道<sup>[4-6]</sup>,而纤维素合成酶基因 (cellulose synthase) 在纤维素合成途径中具有重要作用<sup>[7]</sup>。实验表明 CesA 糖基转移酶可能是以 SG 为引物起始葡聚糖的聚合反应。首先以 SG 和 UDP - G 为底物生成 SCD,纤维素合成酶基因催化其进行聚合反应,然后由 KOR 酶切除聚合在多聚链上的 SG,进入纤维素的结晶过程<sup>[8-11]</sup>,并最终合成纤维素。以雷竹为材料,获得一条与绿竹纤维素合成酶基因同源的全长克隆,命名为 *PpCesA1*,并对其进行序列和不同组织基因表达谱的分析,为进一步揭示植物纤维化分子机理奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

以雷竹 1 年生实生苗为材料,取叶片 5 g,采用改良的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法,选用北京 TANGEN 的 RNA 快速提取试剂盒提取雷竹 RNA。Marker, Taq plus DNA 聚合酶、dNTPs 均购自上海生工,感受态细胞 DH5 为实验室自备,载体 pMD18 - T、逆转录试剂盒 (TaKaRa AMV Ver 3. 0) 购自大连宝生物公司,其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 PCR 扩增 在比较绿竹纤维素合成酶基因序列保守区的基础上,设计 2 对长度为 20 bp 左右的特异引物,并递交上海生物工程技术有限公司合成,引物设计见表 1。提取的雷竹 RNA 经过逆转录合成雷竹 cDNA 序列,经过 PCR 克隆目的片段。反应体系 (25  $\mu$ L) 为 10  $\times$ PCR buffer 2.5  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25  $\mu$ mol/L) 2.0  $\mu$ L, dNTP (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, 引物 (10  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, Taq Plus DNA 聚合酶 (8.34  $\times 10^{-5}$  kat/L) 0.3  $\mu$ L, 模板 DNA 2.0  $\mu$ L (100 ng), ddH<sub>2</sub>O 16.7  $\mu$ L。反应程序为: 94 预变 5 min, 94 变性 30 s, 50 ~ 55 退火 30 s, 72 延伸 60 ~ 120 s, 30 个循环, 72 延伸 7 min, 4 保温。

表 1 引物设计

Tab 1 Primer design

引物名称 Primer name	SP: (5' - 3')	ASP: (5' - 3')
P <sub>1</sub> / P <sub>2</sub>	TCCA TGTCATWAGTTGTGGC	TGTCAGCCACTCAA YTAT
P <sub>3</sub> / P <sub>4</sub>	CAGGTGTGCCAGATCTGCGG	CACCCAA TCTCAGTTCGCCA
P <sub>5</sub> / P <sub>6</sub>	ATGGA GGGCAGCGCGA GGC	TACTTGGTCTTGCACTGTGG

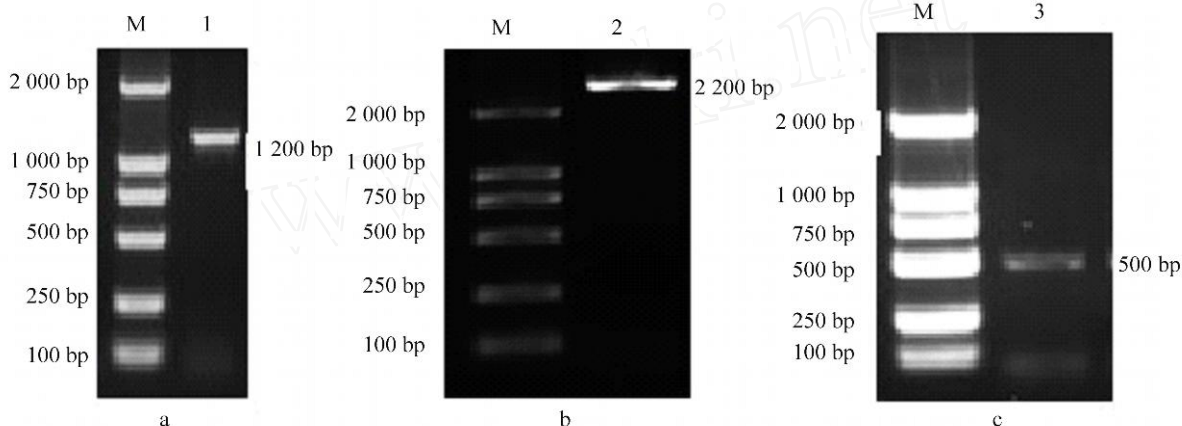
1.2.2 目的片段的回收和重组 把 PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖电泳检测后,利用 QIAGEN 公司的离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒从琼脂糖凝胶上回收目的片段;纯化产物与 pMD18 - T 载体 16 连接过夜,并转化感受态细胞 DH5,挑取白色单菌落,37 摇菌过夜;以微量菌液为模板进行 PCR 验证是否为阳性克隆。

1.2.3 目的片段的测序及生物信息学分析 将含有目的片段的重组质粒寄上海生物工程技术有限公司进行测序。测定的序列用 BLAST 进行同源序列比对;蛋白的亲疏水性使用 (<http://www.expasy.org/tools/protscale.html>) 程序分析;分子进化树的构建使用 MEGA4.1 软件中 NJ 法完成。用 ProtParam 分析 *PpCesA1* 编码蛋白的氨基酸序列组成、相对分子质量和等电点等理化性质 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>);利用 PBL LYON - GERLAND 信息库对蛋白质序列进行二级结构预测 ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn));利用 TMHMM 软件进行蛋白质跨膜区预测 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>);利用 Signal P 程序分析 N 末端信号肽序列 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>);利用 ProtFun 分析预测 *PpCesA1* 蛋白的功能 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>);运用 Scratch protein 对蛋白质的二硫键做出分析 (<http://www.ics.uci.edu/baldig/scratch/index.html>)。

## 2 结果与分析

### 2.1 PpCesA1 基因克隆

以雷竹 cDNA 为模板,通过设定的兼并引物进行 PCR 扩增,得到长度为 1 200 bp (图 1a), 2 200 bp (图 1b), 500 bp (图 1c)左右的条带,目的片段进行测序后经拼接获得了长度为 3 385 bp 的序列,经验证无误。



1: P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> cDNA 扩增产物, 2: P<sub>3</sub>/P<sub>4</sub> cDNA 扩增产物, 3: P<sub>5</sub>/P<sub>6</sub> cDNA 扩增产物。

1: The PCR products by P<sub>1</sub>/P<sub>2</sub> from cDNA, 2: The PCR products by P<sub>3</sub>/P<sub>4</sub> from cDNA, 3: The PCR products by P<sub>5</sub>/P<sub>6</sub> from cDNA

图 1 PCR 克隆结果 (1~3: PCR 扩增产物; M: Mark)

Fig 1 Isolation of *PpCesA1* gene amplified from *P. pruecox* C. d. Chu et C. S. Chao (1~3 PCR products; M: Mark)

### 2.2 生物信息学分析

2.2.1 雷竹 PpCesA1 蛋白结构分析、同源比对和进化树的构建 雷竹 *PpCesA1* 基因长 3 385 bp, 具有完整的开放式阅读框 (ORF, 1 - 3 168 bp), 编码 1 056 个氨基酸。在 Pfam 上对其机构域进行分析发现, 在其 48~52 位氨基酸位点具有典型锌指结构 CXXC (半胱氨酸 - X - X<sub>2</sub> 半胱氨酸, 图 2), 在其 355~1 052 位氨基酸位点具有典型的 Cellulose\_synt - GT - A - GT - A 糖基转移酶家族功能域 (图 2)。在 Cellulose

1	MEGDAAEAVKS GRHGSQGVQC ICGDVGVTTA EGDVFAACDV CGFFVCRPCY	— 锌指结构
51	EYERKDGTOA CPQCKTKYKR HKGSPILRGE EGEDTDADDA SDFNYPASGN	Zinc-finger Structure
101	DDQKQKIADR MRSWRMNAGG GGDVGRPKYD SGEIGLTKYD SGEMPRGYIP	
151	SVTNSQISGE IPGASPDHMH MSPITGNISKR VFFPYVNHSP NPSRKFSGSI	
201	GNVAWKEVRG GWRMKQDKGA IPMTNGTISA PSEGRGVGDI DASTDYNMDD	
251	ALLNDETRQP LSRKVPLFSS RINPYRMVIV LRLIVLSIFL HYRITNPVRN	
301	AYPLWLLSVI CETWFALSWI LDQFPKWFPI NREAYLDRLA LRYDREGEPS	
351	QLAAVDIFVS TVDPMKEPPL VTANTVLSIL AAFDALAETS EFARKWVFFV	
401	KKYNIAPRAP EWFYFCQKIDY LKDKVHPSLV KDRRAMKREY EEFKIRVNAL	
451	VAKAQKVPEE GWIMQDGTPTW PGNNTRDHPG MIQVFLGHSG GLDTEGNELP	— 保守区 A
501	RLVYVSREKR PGFOHHKAG AMNALVRVSA VLTNGQYMLN LCDCHYINNS	The conserved domain(A)
551	KALRKAMCFL MDPNLGRSAC YVQSPQRFDG IDKNDRYANR NTVFFDINLR	
601	GLDGIQGPVY VGTGCVFNRT ALYGYEPPVK QKKKGGFLSS LCGGRKKTSK	
651	SKKTSDDKKK SNKHVDSSVP VFNLEDIEEG VEGAGFDDEK SLLMSQMSLE	
701	KRFGQSAAFV ASTLMEYGGV PQSATPESLL KEAIRHVISCG YEDKTDWGN	
751	IGWIYGSVTE DILTGFMHA RGNRSIYCMF KLPFAFKGSAP INLSDRLNQV	— 保守区 B
801	LRWALGSVEI LFSRHCPWIY GYGGRLKFLF RFAYINTTIY PLTSLPLLIY	The conserved domain(B)
851	CVLPAICLLT GKFIIPKISN FASIFISLF ISIFATGILE MRWSVLALTS	
901	VRSQFWVIEY LCHLFASSSL LRCLLVSIPT SLSPQSFSEE GDFTELYVFK	
951	WTTLLIPPTT ILIVNLVGVV AGISYAINSG YQSWGPLFGK LFFAFVIVH	
1001	LYPFLKGLMG RQNRTPTIIV VWAILLASIF SLLWVRVDPF TTRVTGPDTQ	
1051	TCGINC*	

图 2 *PpCesA1* 保守功能域和蛋白序列

Fig 2 The conserved domain(A, B) and protein sequence of *PpCesA1*

\_synt - GT - A - GT - A 功能域的保守区域 A 中含有保守的天冬氨酸残基,排列为 Dx.....xDCD;在保守区域 B 中含有保守的天冬氨酸残基,排列为 Dx.....QVLRW (图 2)。利用 BLAST 比对,显示其与以下几 *PpCesA1* 蛋白序列类似,包括绿竹纤维素合成酶蛋白 *CesA4* (AAY 43220, 94%),水稻纤维素合成酶蛋白 *CesA4* (NP 001059162, 91%),玉米纤维素合成酶蛋白 *CesA4* (NP 001105621, 90%),高粱纤维素合成酶蛋白 (XP 002461675, 89%),玉米纤维素合成酶蛋白 *CesA9* (NP 001104959, 89%),水稻纤维素合成酶蛋白 (EAZ 03158, 88%),绿竹纤维素合成酶蛋白 *CesA5* (AAY 43222, 86%),小麦纤维素合成酶蛋白 (BAD 06322, 85%),大麦纤维素合成酶蛋白 *CesA1* (AAR 29962, 87%),玉米纤维素合成酶蛋白 *CesA5* (NP 001104955, 84%),水稻纤维素合成酶蛋白 *CesA2* (NP 001051648, 85%),拟南芥纤维素合成酶蛋白 *CesA3* (NP 196136, 73%) 等。在此基础上构建的系统进化树 (图 3) 结果表明,雷竹 *PpCesA1* 蛋白与绿竹、水稻、玉米等禾本科植物的纤维素合成酶蛋白在进化关系上都具有很近的亲缘关系。由此可以推断 *PpCesA1* 蛋白是雷竹中的纤维素合成酶蛋白。

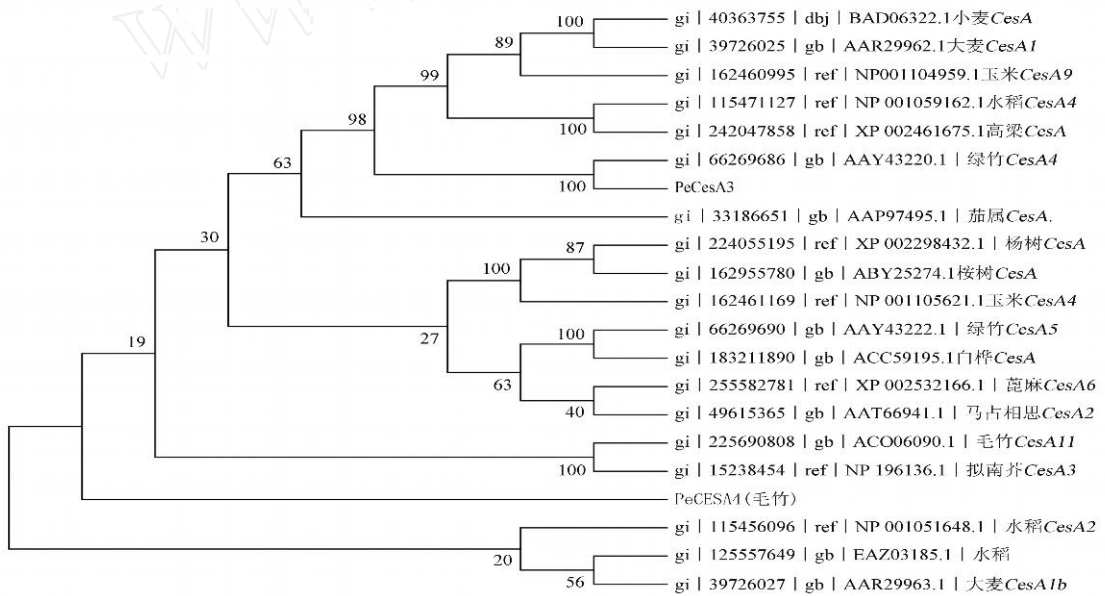


图 3 雷竹 *PpCesA1* 与其他纤维素合成酶蛋白的系统发生分析

Fig 3 *P. praecox* C d Chu et C S Chao of *PpCesA1* and others cellulose synthase proteins

2.2.2 *PpCesA1* 蛋白的结构特点和理化性质 用 ProtParam 预 *PpCesA1* 蛋白的理化性质,推测该蛋白相对分子质量为 118 052.5 ku,等电点为 8.62;理论推导半衰期大于 20 h,不稳定参数为 41.5,属于不稳定蛋白。*PpCesA1* 蛋白的二级结构中

-螺旋 (helix) 占 38.54%, -折叠 (sheet) 占 11.27%,无规则卷曲 (coil) 占 50.19%。预计可形成二硫键 11 个,分别在第 1 052 ~ 1 056、615 ~ 642、558 ~ 570、739 ~ 778、912 ~ 923、19 ~ 22、61 ~ 64、38 ~ 46、41 ~ 49、851 ~ 857、311 ~ 415,参与维持蛋白质构象的稳定。疏水性/亲水性分析结果表明,疏水性最大值为 3.344,最小值为 -3.044,总体看属于亲水性蛋白 (图 4)。跨膜结构预测表明 *PpCesA1* 蛋白拥有 5 个跨膜区,分别是 837 ~

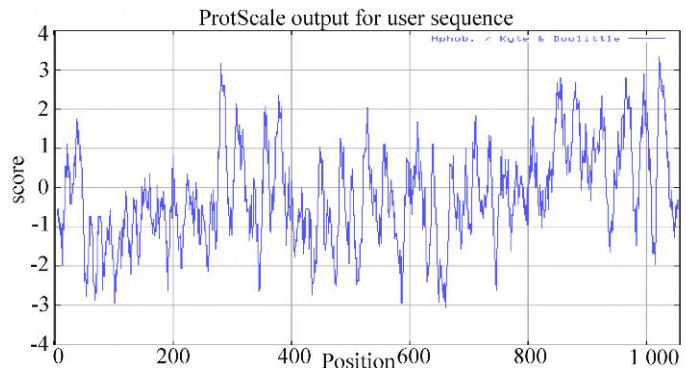


图 4 *PpCesA1* 蛋白氨基酸序列的疏水性分析

Fig 4 Hydrophobicity and analyses of deduced amino acid sequence of *PpCesA1* protein

859、871 ~ 893、955 ~ 977、984 ~ 1 003、1 018 ~ 10 351 (图 5),无信号肽。通过蛋白质亚细胞定位软件 PSORT 预测发 *PpCesA1* 蛋白无核定位信号,是一种主要存在于质膜 (0.6)、叶绿体类囊体膜 (0.494) 和

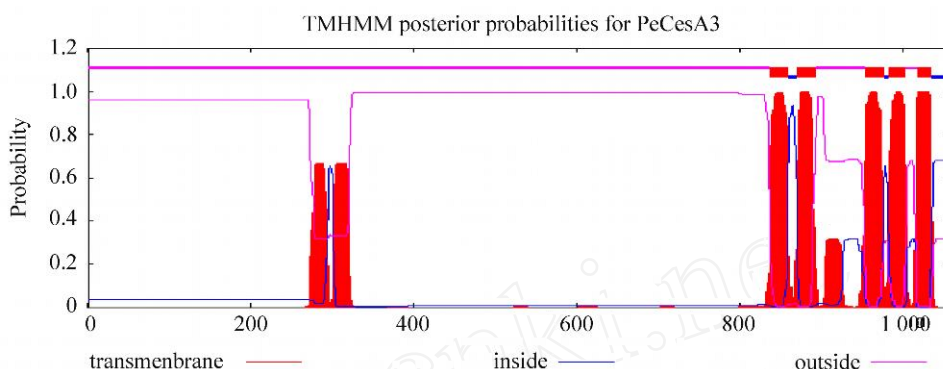


图 5 PpCesA1 蛋白氨基酸序列的跨膜区分析

Fig 5 Transmembrane domain and analyses of deduced amino acid sequence of PpCesA1 protein

高尔基体 (0.4) 中的一种膜蛋白。根据 ProtFun 功能预测表明, PpCesA1 蛋白具有生物合成相关的电压门控离子通道连接酶的作用。

### 2.3 雷竹 PpCesA1 基因的半定量 RT-PCR 和表达分析

将雷竹 1 年生实生苗的根部泥土用自来水冲洗干净, 取生长正常的根、茎及展开叶, 采用 TANGEN 公司的 RNA 快速提取试剂盒提取雷竹笋的总 RNA, 并对其完整性和浓度进行检测 (图 7), 结果表明 RNA 的完整性和浓度符合半定量 RT-PCR 的要求。另取雷竹根、茎、叶、笋上部及笋基部材料若干, 于 60℃ 烘箱中烘干至恒重, 采用莫尔式盐法测定其纤维素含量, 具体测定结果见图 6。提取的 RNA 取 1 μg 用 TaKaRa AMV Ver 3.0 逆转录试剂盒合成 cDNA, 运用已有的雷竹 Action 引物调整半定量反应模板的起始量。根据已测序 PpCesA1 基因的序列, 运用 Primer premier 5 软件设计半定量引物, 交由上海生工合成, 分别是上游引物 P<sub>1</sub>: 5' - AAGATA TAGG - GAGGGTGTGGAAG, 下游引物 P<sub>2</sub>: 5' - CTGGAGTTGCGGATT - GAGG。

PpCesA1 基因半定量结果表明, 在雷竹植株的不同组织中 PpCesA1 基因均有表达, 表达量有显著差异 (图 8)。

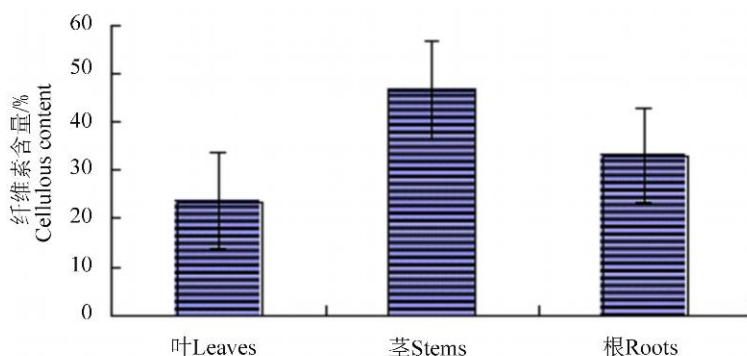


图 6 雷竹一年生实生苗不同组织纤维素含量

Fig 6 The content of cellulose in different tissues in annual seedling of *P. praecox* C. d. Chu et C. S. Chao

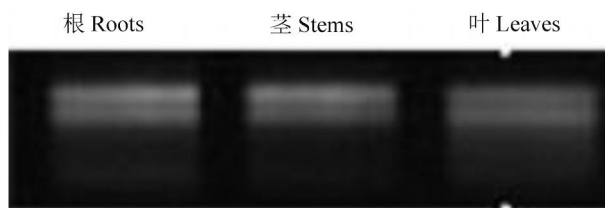


图 7 雷竹不同组织总 RNA 的提取

Fig 7 Total RNA preparation from different tissue of sample preparation bamboo

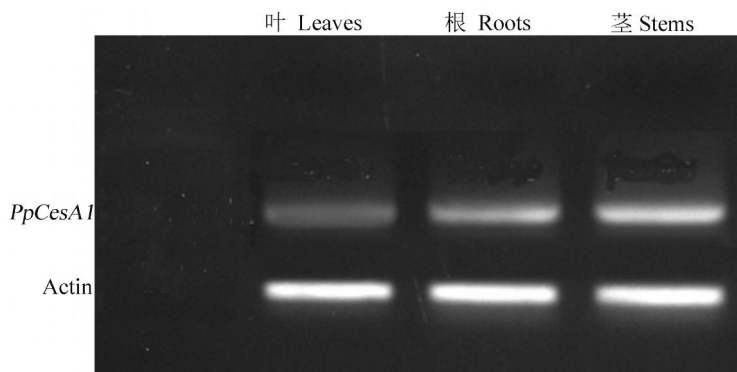


图 8 雷竹 PpCesA1 基因的半定量 RT-PCR

Fig 8 Semiquantitative RT-PCR of PpCesA1

### 3 讨 论

雷竹不同组织纤维化的程度是不同的,而在木纤化过程中纤维素合成酶基因家族 (cellulose synthase family)起着重要的作用。研究表明,不同的 *CesA* 基因所参与的纤维素进程也不同,如拟南芥 *CesA1*、*CesA2*、*CesA3*对初生细胞壁的合成起作用,而水稻 *CesA4*、*CesA7*、*CesA8*则是次生细胞壁的合成所必须的<sup>[12]</sup>。

本研究首次从雷竹中获得 *PpCesA1*基因,序列分析表明其与水稻等的纤维素合成酶基因同源性很高,其蛋白序列具有 Cellulose\_synt - GT - A 功能域、5个跨膜结构、典型的保守区和可变区等纤维素合成酶家族共有的特征,从而确定 *PpCesA1*是雷竹纤维素合成酶家族的一员。通过半定量 RT - PCR 分析雷竹 1年生实生苗的根、茎、叶中 *PpCesA1*基因的表达发现,*PpCesA1*表达量的高低有明显差异,茎部的 *PpCesA1*的表达量最高,根部次之,叶中最低。通过对其相对应部分纤维素含量的测定,我们发现雷竹苗植株不同组织纤维素的含量的高低与 *PpCesA1*的表达量的高低趋势相符,*PpCesA1*表达量越高,其组织纤维素含量越高。因此推测 *PpCesA1*基因在雷竹不同组织纤维素的形成过程中作用显著。

植物纤维素的合成是一个复杂的过程,而纤维素合成酶基因更是一个大的家族,*PpCesA1*基因只是其中的一个,想要系统的研究其分子调控过程,需要更多的雷竹纤维素基因的克隆。*PpCesA1*基因的发现,为进一步在分子水平上研究竹类的木纤化分子机理打下一定的基础。

#### 参考文献:

- [1]肖丽霞.绿竹笋采前品质相关影响因素和采后生理特性研究[D].北京:中国农业大学,2005.
- [2]徐学军.绿竹笋采后生理及鲜笋保鲜技术研究[D].南京:南京林业大学,2004.
- [3]林海萍,吴家森,付顺华,等.雷竹笋采后贮藏生理的研究[J].江苏林业科技,2002,29(12):16-17.
- [4]徐学军,陈庆虎,吴家森,等.保鲜处理对高节竹笋采后生理的影响[J].竹子研究汇刊,2004,23(1):45-48.
- [5]徐俐,陆加贵,刘万军.不同保鲜剂对竹笋纤维化及保鲜效果的影响[J].贵州大学学报,2002,21(2):110-114.
- [6]王敬文.采后竹笋老化生理研究[J].林业科学研究,2002,15(6):687-692.
- [7]周晓馥,王景余,王兴智.植物纤维素合酶基因研究进展[J].遗传,2002,24(3):376-378.
- [8]Peng L, Xiang F, Roberts E, et al The experimental herbicide CGA 325615 inhibits synthesis of crystalline cellulose and causes accumulation of non - crystalline - 1,4 - glucan associated with *CesA* protein[J]. Plant Physiol, 2001, 12(6): 981 - 922.
- [9]Peng L, Kawagoe Y, Hogan P, et al Sitosterol - glucoside as primer for cellulose synthesis in plants[J]. Science, 2002, 29(5): 147 - 150.
- [10]Delmer D P, Pear J R. Andrawis genes encoding small GTP - binding proteins analogous to mammalian *Rac* are preferentially expressed in developing cotton fibers[J]. Mol Gen Genet, 1995, 24(8): 43 - 51.
- [11]Seagull R. The effects of microtubule and microfilament disrupting agents on cytoskeletal arrays and wall deposition in developing cotton fibers[J]. Protoplasma, 1990, 15(9): 44 - 59.
- [12]邵付菊,李学宝.植物纤维素合成酶基因的研究进展[J].细胞生物学杂志,2004,21(6):490-494.
- [13]李春秀,齐力旺,王建华,等.植物纤维素合成酶基因和纤维素的生物合成[J].生物技术通报,2005,4(7):5-10.