

新基因、新种质、新品种
New Gene & Germplasm

绿竹 *cab-BO2* 基因的克隆及其表达载体的构建

高志民¹ 李雪平¹ 岳永德¹ 彭镇华^{2*}

¹ 国际竹藤网络中心, 国家林业局竹藤科学与技术重点开放实验室, 北京, 100102; ² 中国林业科学研究院林业研究所, 北京, 100091

* 通讯作者, gaozhimin@icbr.ac.cn

摘要 捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因是绿色植物光合系统中的重要基因, 其编码的蛋白与色素所形成的蛋白复合体在光化学反应、光保护等方面都起着重要的作用。采用 RT-PCR 技术和与 RACE-PCR 技术, 从绿竹中克隆到捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因的全长 cDNA 编码区, 命名为 *cab-BO2* (GenBank 登记号: EF088668)。该基因编码区长为 792 bp, 编码 263 个氨基酸。通过加酶切位点的方法, 将基因的编码区直接构建到载体 pBI121 多克隆位点。经过酶切检测, 获得了包含 35S 启动子、*cab* 基因、*GUS* 报告基因和 NOS 终止区域的植物表达载体。

关键词 绿竹 (*Dendrocalamopsis oldhamii*), 捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因, *cab-BO2* 基因, 植物表达载体

Cloning and Construction of Expression Vector of *cab-BO2* Gene Encoding the Light Harvesting Chlorophyll a/b-binding Protein in Bamboo

Gao Zhimin¹ Li Xueping¹ Yue Yongde¹ Peng Zhenhua^{2*}

¹ International Center for Bamboo and Rattan, SFA Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology, Beijing, 100102; ² Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing, 100091

* Corresponding author, gaozhimin@icbr.ac.cn

Abstract The *cab* gene coding light harvesting chlorophyll a/b-binding protein is one of key genes in photosynthesis system of green plants, which play an important role in light chemical reaction and light protection by binding with Chlorophyll a/b. A full-length cDNA coding region of *cab* gene was cloned from the first strand of bamboo cDNA by RT-PCR and RACE methods, which named as *cab-BO2* (*cab* gene 2 from *B. oldhamii*) (GenBank accession No.: EF088668). The coding region of *cab-BO2* is 792 bp and encodes 263 amino acids. The *cab-BO2* gene was cloned in the multiple cloning site of pBI121 vector directly by adding restriction enzyme sites. A plant expression vector containing 35S promoter, *cab-BO2* gene, *GUS* and NOS region was confirmed by restriction enzyme analyses.

Keywords Bamboo (*Bambusa oldhamii*), Light harvesting chlorophyll a/b-binding protein gene (*cab*), *cab-BO2* gene, Plant expression vector

绿竹属于禾本科 (Gramineae) 箨竹属 (*Bambusa*) 绿竹亚属 (*B. subg. Dendrocalamopsis*) (Li and Chris, 2006), 是原产我国的优良笋材两用丛生竹种, 具有易栽培、适应范围广、周期短、用途广泛、经济价值高的特点, 是最受竹农欢迎的竹种之一。

光合作用是植物的重要生理活动指标, 在一定程度上对植物的生长速度起着决定性的作用。研究表明, 绿竹的净光合速率日变化呈双峰曲线, 有明

显的“午休”现象, 其净光合速率与不同的绿竹种源密切相关, 而绿竹叶片叶绿素含量与地理分布的关系并不密切 (黄勇, 2003)。通过研究盐分胁迫条件下绿竹的光合作用, 表明随着盐胁迫强度的增加, 绿竹的叶绿素变化则是呈现先上升后下降的趋势, 0.4% 的盐胁迫强度为盐分的一个分界点, 大于 0.4% 则光合作用受到明显的影响, 小于 0.4%, 光合作用受到影响不明显 (郑容妹等, 2002)。在研究一年生、

基金项目: 本研究由国家林业局948项目(2005-4-38, 2004-4-58, 2004-4-60)资助。

二年生开花绿竹与未开花绿竹的叶质量、叶绿素含量、光合速率、呼吸速率时发现,一年生、二年生开花绿竹与未开花绿竹相比,叶质量、叶绿素总量分别减少 12.75% 和 21.79%,净光合速率、光合系数分别降低 10.36%、27.52%,光呼吸、间呼吸速率分别提高 64.52%、17.90%,说明开花绿竹较未开花绿竹同化能力降低,而异化能力增强(郑郁善等,2003)。仅从生理指标和表观现象不能明确地解释绿竹高效光合作用的机制,因此需要从分子水平来进行研究。在植物光合作用中发挥重要作用的一类基因是光合系统基因(Raghvendra, 1998),其中捕光色素结合蛋白基因通过其编码的蛋白与色素结合形成色素蛋白复合体来捕获光能,并把能量迅速传至反应中心引起光化学反应。该色素蛋白复合体在维持类囊体膜的结构、调节激发能的分配、光保护以及对各种环境的适应等过程中都起着重要的作用(孙钦秒,2000)。本研究以绿竹为材料进行光合捕光蛋白基因的克隆,为从分子水平诠释竹子的高效光合作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 总 RNA 提取与 cDNA 合成

采用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂提取绿竹(源于浙江省温州)幼嫩新鲜叶片的 RNA(Gao et al., 2006),用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA。采用 Clontech 公司的 SMART™ RACE 试剂盒合成 5' cDNA。

1.2 基因的克隆与测序

根据水稻捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因家族中的同源基因序列设计 PCR 引物,由北京三博远志科技有限公司、上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 1: 5'-AGCATCTG GTATGGACCTGAC-3'; 引物 2: 5'-CCTGGACGAAGAATCCGAACA-3'; 引物 3: 5'-GTCGTGCGTGGCTACTACAAG-3'; 引物 4: 5'-ACACCGCCTCGCCGAAGTTGACGCCG-3'; 引物 5: 5'-CCTCGACGAAGCCCATGAGCACACCTG-3'; 引物 6: 5'-TCTAGATCGAGAAGTTTAGGCATGG-3'; 引物 7: 5'-GGATCCTCACT TCCCTGGGACGAAG-3'。

以绿竹 cDNA 为模板,进行梯度 PCR。引物 1 和引物 2 反应条件为: 94 预变性 5 min; 94 1 min, 55~65 1 min, 72 1.5 min, 39 个循环;

72 延伸 10 min。引物 1 和引物 3 反应条件为: 94 预变性 5 min; 94 1 min, 55~65 1 min, 72 2 min, 39 个循环; 72 延伸 10 min。5'-RACE 反应条件 1 为: 94 30 s, 72 3 min, 5 个循环; 94 30 s, 70 30 s, 72 3 min, 5 个循环; 94 30 s, 68 30 s, 72 3 min, 25 个循环。5'-RACE 反应条件 2 为: 94 30 s, 68 30 s, 72 3 min, 39 个循环。引物 6 和引物 7 反应条件为: 94 预变性 5 min; 94 1 min, 55~60 1 min, 72 2 min, 39 个循环; 72 延伸 10 min。

PCR 产物电泳分析后用上海申能博彩生物科技有限公司试剂盒回收。按照 Promega 的 pGEM-T easy 载体快速连接试剂盒操作流程,将回收的 DNA 片段直接(或加 A 后)连接到载体上,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株,经蓝白斑筛选,提取阳性克隆质粒并酶切图谱分析后,再将单克隆送北京三博远志科技有限公司测序。

1.3 序列的生物信息学分析

利用 DNASTAR、SMART 和 Clustl W 等生物软件分析测定的 cDNA 序列及其编码蛋白质的结构特点,并与国际核酸和蛋白质数据库联网进行 Blast 比较分析。

2 结果与分析

2.1 基因保守区片段的克隆与分析

用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA 作模板,引物 1 和引物 2 进行扩增反应,PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳,EB 染色结果如图 1 所示,引物 1 和引物 2 的产物在 550 bp 左右有一条亮带,与预测的基因片段基本相符,初步确定为目的基因片段。回收与 pGEM-T easy 载体连接,转化后将单克隆送公司测序。测序结果表明,插入片段为 554 bp。应用 DNASTAR 软件和 Blast 在线软件,将测序的序列与已经报道的基因进行同源性比较,发现插入片段与 *cab* 基因家族的保守区有着较高的相似性,其中与水稻的相似性达 93%。

2.2 cDNA 编码区全长的克隆与序列分析

为了获得基因的全长,根据获得克隆插入片段的序列和水稻的序列设计了 3' 端引物 3。同时分别设计了 5'-RACE 引物 4 和 5,与 SMART™ RACE 试剂盒通用引物(UPM): 配对进行扩增。引物 4 和

UPM 的产物在 500 bp 左右有一条亮带, 引物 5 和 UPM 的产物在 600 bp 左右各有一条亮带(图1), 引物 1 和引物 3 的 PCR 产物在 600 bp 有一条亮带(图省略)。将 PCR 产物回收、连接后转化, 在得到的大量克隆中, 选取阳性克隆进行测序, 引物 4 和 UPM 的 PCR 产物、引物 5 和 UPM 的 PCR 产物、引物 1 和引物 3 的 PCR 产物插入片段分别为 457 bp、630 bp、630 bp。通过序列分析拼接后获得含有一个完整编

码区的基因序列, 长为 792 bp, GenBank 登记号为 EF088668。

经过 SMART 软件和 <http://www.expasy.org/prosite/> 里面 MOTIFSCAN 选相对 EF088668 序列的编码区进行分析, 结果显示该编码区编码 263 个氨基酸(图2), 第 62~230 位包括典型的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白功能域(chlorophyll a/b binding domain), 第 1~76 位为泛素结构功能域(ubiquitin domain), 其中包含了蛋白激酶 C 的磷酸化位点(第9~11位)、泛素结构功能域信号(第27~52位)和酪氨酸激酶(CK2)磷酸化位点(第 55~58 位)。该基因命名为 *cab-BO2* (*cab* gene 2 from *B. oldhamii*)。此外, 通过 DANSTAR 软件预测, *cab-BO2* 编码的蛋白质等电点和分子量分别为 5.656 D 和 28 580.5 D。*cab-BO2* 编码的氨基酸序列与来自其他单子叶植物的某些 *cab* 基因高度同源, 与水稻(*Oryza sativa* cultivar-group) AAC15992、两色蜀黎(*Sorghum bicolor*) AAC28490、玉米(*Zea mays*) CAA68451、大麦(*Hordeum vulgare*) P08963 和小麦(*Triticum aestivum*) AAA34260 的一致性分别为 97.7%、96.2%、80.0%、74.3% 和 72.0%。说明与水稻的亲缘关系最近, 接下来是两色蜀黎、玉米、大麦和小麦, 显示了 *cab* 家族基因在进化过程中的保守性(图3)。

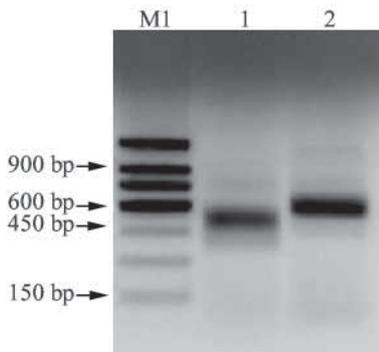


图1 5'-RACE PCR产物电泳检测

注: 1: 引物4和UPM的产物; 2: 引物5和UPM的产物; M1: 150 bp 分子量标记

Figure 1 5'-RACE products checked by electrophoresis

Note: Lane 1: Product of primer 4 & UPM; Lane 2: Product of primer5 & UPM; M1: 150 bp ladder

```

1  ATGGCCGCGTCTCGGCGCTGCACCAGACCACCAGCTTCCTCGGCACCGCCCCCGCCGGGATGAGCTC
M  A  A  S  A  L  H  Q  T  T  S  F  L  G  T  A  P  R  R  D  E  L
67  GTCCGCCACGTCTGGCGACTTCGGCGGCCGCATCACCATGCGCCGACCGTCAAGAGCGCCCCCAG
V  R  H  V  G  D  F  G  G  R  I  T  M  R  R  T  V  K  S  A  P  Q
133 AGCATCTGGTACGGCCCTGACCGTCCCAAGTACCTGGGCCCCGTTCTCGGAGCAGACGCCGTCGTAC
S  I  W  Y  G  P  D  R  P  K  Y  L  G  P  F  S  E  Q  T  P  S  Y
199  CTGACCGGCGAGTTCCCCGGAGACTACGGGTGGGACACGGCGGGGCTCTCCGCTGACCCTGAGACG
L  T  G  E  F  P  G  D  Y  G  W  D  T  A  G  L  S  A  D  P  E  T
265  TTCGCGCGGAACCGGGAGCTGGAGGTGATCCACTCGAGGTGGGCGATGCTCGGCGCGCTGGGCTGC
F  A  R  N  R  E  L  E  V  I  H  S  R  W  A  M  L  G  A  L  G  C
331  GTGTTCCCGGAGATTCTGTCCAAGAACGGCGTCAAGTTCGGCGAGGCGGTTGTGGTTCAAAGCCGGC
V  F  P  E  I  L  S  K  N  G  V  K  F  G  E  A  V  W  F  K  A  G
397  GCGCAGATCTTCTCCGAGGGCGGGCTGGACTACCTGGGCAACCCCAACCTGGTGCACGCGCAGAGC
A  Q  I  F  S  E  F  G  G  L  D  Y  L  G  N  P  N  L  V  H  A  Q  S
463  ATCCTGGCCACTCTGGGCGAGCCAGGTGGTGCATGGGCTTCGTCGAGGGCTACCGCATCGGAGGC
I  L  A  I  W  A  S  Q  V  V  L  M  G  F  V  E  G  Y  R  I  G  G
529  GGCCCCGCTCGGGGAGGGGCTCGACAAGTTTACCCCGGCGCGCCTTCGACCCGCTCGGCCTCGCC
G  P  L  G  E  G  L  D  K  V  Y  P  G  G  A  F  D  P  L  G  L  A
595  GACGACCCGGACACCTTCGCCGAGCTCAAGGTCAAGGAGCTCAAGAACGGCCGCTCGCCATGTTC
D  D  P  D  T  F  A  E  L  K  V  K  E  L  K  N  G  R  L  A  M  F
661  TCTATGTTCTGGCTTCTTCGTGCAGGCCATCGTCACCGCAAGGGGCCATCGAGAACCCTCTTCGAC
S  M  F  G  F  F  V  Q  A  I  V  T  G  K  G  P  I  E  N  L  F  D
727  CACGTCGCCGACCCCGTCAACAACAACGCATGGGCCTACGCCACCAACTTCGTCCCAGGGAAGTGA
H  V  A  D  P  V  N  N  N  A  W  A  Y  A  T  N  F  V  P  G  K
    
```

图2 *cab-BO2*编码区核酸序列及其推导出的氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence and deduced amino acids sequence of *cab-BO2*

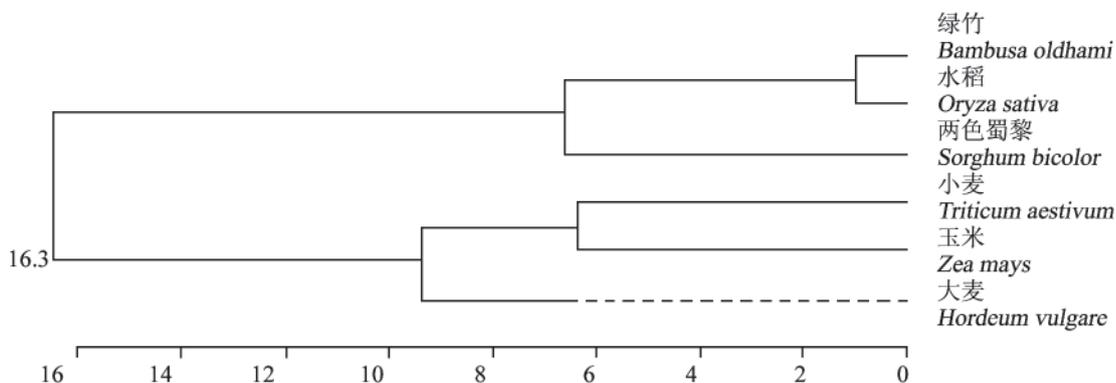


图3 *cab-BO2*编码的氨基酸序列与已报道的单子叶植物中*cab*家族基因的聚类分析
Figure 3 Phylogenetic tree of the inferred amino acid sequences of *cab-BO2* in monocotyledon plants

2.3 *cab-BO2* 基因植物表达载体的构建与检测

为了保证克隆基因的正确性，设计了引物6和引物7，采用 pyrobest polymerase 进行扩赠。引物1和引物2的产物在800 bp左右有一条亮带(图省略)，与预测的基因片段相符，测序结果表明插入片段为

819 bp，包含酶切位点 *Xba*、*BamH* 和完整的编码区。以 pBI121 为载体，用 *Xba* 和 *BamH* 双酶切，将 *cab* 基因直接插入到 pBI121 载体 35S 后面的多克隆位点，即构建了包含 35S 启动子(0.8 kb)、*cab* 基因 0.8 kb、GUS 报告基因(1.87 kb)和 NOS 终止区域(0.3 kb)的植物表达载体(图4)。

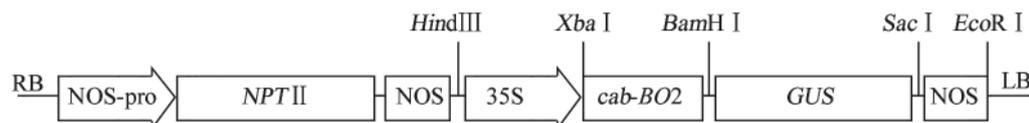


图4 *cab-BO2*基因植物表达载体
Figure 4 Plant expression vector of *cab-BO2*

根据 *cab-BO2* 基因植物表达载体上的酶切位点预测，*Xba* /*BamH* 酶切带型为 0.8 kb、12.1 kb；*Hind* /*EcoR* 酶切带型为 3.7 kb 和 9.2 kb；*Xba* /*EcoR* 酶切带型为 2.9 kb、和 10.0 kb；*Hind* /*BamH* 酶切带型为 1.6 kb 和 11.3 kb。*Sac* 单酶切带型为 15 bp、550 bp、2.1 kb 和 9.3 kb。对载体质粒酶切后电泳检测(图5)，酶切指纹图谱与预测的完全一致，表明 *cab-BO2* 基因植物表达载体是正确的。

3 讨论

在 *cab-BO2* 基因内部有 3 个 *Sac* 酶切位点，分别位于 65 bp、620 bp 和 635 bp，载体上 pBI121 有 1 个 *Sac* 酶切位点，用 *Sac* 单酶切带型为 15 bp、550 bp、2.1 kb 和 9.3 kb。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，15 bp 的带无法看到，而 550 bp 的带虽然可在紫外下看到，但成像后因量较低也不可辨认，因此，图4中 *Sac* 单酶切指纹图中显示了 2.1 kb 和 9.3 kb 两条带。

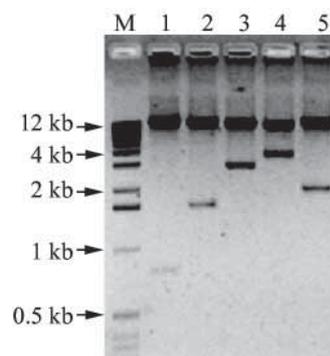


图5 *cab-BO2*基因植物表达载体质粒酶切检测
注: 1: *Xba* /*BamH* ; 2: *Hind* /*EcoR* ; 3: *Xba* /*EcoR* ; 4: *Hind* /*BamH* ; 5: *Sac* ; M: 1 kb 分子量标记

Figure 5 The plant expression vector of *cab-BO2* checked by restriction enzymes

Note: Lane 1: *Xba* /*BamH* ; Lane 2: *Hind* /*EcoR* ; Lane 3: *Xba* /*EcoR* ; Lane 4: *Hind* /*BamH* ; Lane 5: *Sac* ; M: 1 kb ladder

在核酸及其编码蛋白的 Blast 分析中发现，*cab-BO2* 为光系统 的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因，

其结构特点与水稻(向太和等, 2005)的非常相似, 其中的蛋白激酶C的磷酸化位点、泛素结构功能域信号和酪氨酸激酶(CK2)磷酸化位点, 可能与该基因转录后的调节有关(Allen and Nilsson, 1997)。这为依据单子叶模式植物——水稻开展竹子的光合机制研究奠定了基础。

目前, 全球森林资源日益锐减的情况下, 竹子以异常的生长速度与高效生物量积累而成为非常重要的将太阳能转变为生物能量的潜在能源植物(Embaye, 2001)。竹子作为木材资源的有益补充, 其产业的蓬勃发展对于推动林业可持续发展, 保障资源生态安全, 促进社会主义新农村建设等方面发挥着举足轻重的作用(张德明等, 2006), 竹子已成为各国际竹藤组织成员国倍受关注的重要物种。然而, 与水稻、拟南芥、杨树等模式植物相比, 对竹子的分子生物学研究起步较晚, 因此竹子光合分子机制的研究将是一项突破性的工作。

参考文献

- Allen J.F., and Nilsson A., 1997, Redox signalling and the structural basis of regulation of photosynthesis by protein phosphorylation: Topics in photosynthesis, *Physiol. Plant*, 100(4): 863-868
- Li D.Z., and Chris S., 2006, *Bambuseae (Poaceae)*, In: Wu Z.Y., and Raven P.H. (eds.) *Flora of China*, Vol. 22, Science Press, Beijing, and Missouri Botanical Garden Press, St. Louis
- Embaye K., 2001, The potential of bamboo as an interceptor and converter of solar energy into essential goods and services: focus on Ethiopia, *Int. J. Sustain. Dev. World Ecol.*, 8(4): 346-355
- Gao Z.M., Li X.P., Li L.B., and Peng Z.H., 2006, An effective method for total RNA isolation from bamboo, *Zhongguo Linye Keji (Chinese Forestry Science and Technology)*, 5(3): 52-54 (Chinese Journal in English)
- Huang Y., 2003, Study on the photosynthetic characteristics of *Dendrocalamopsis oldhami* Provenances, *Fujian Linye Keji (Journal of Fujing Forestry Science and Technology)*, 30(3): 50-53,72 (黄勇, 2003, 绿竹种源的光合特性研究, *福建林业科技*, 30(3): 50-53,72)
- Raghvendra A.S., ed., 1998, *Photosynthesis: a comprehensive treatise*, Cambridge University Press, UK, pp.72-86
- Sun Q.M., Leng J., Li L.B., and Kuang T.Y., 2000, Recent advances of studies on the structure and function of the light-harvesting chlorophyll a/b protein complex, *Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany)*, 17(4): 289-301 (孙钦秒, 冷静, 李良璧, 匡廷云, 2000, 高等植物光系统 捕光色素蛋白复合体结构与功能研究的新进展, *植物学通报*, 17(4): 289-301)
- Xiang T.H., Wang L.L., and Pang J.L., 2005, Cloning and characterization of a full-length *cab* gene encoding the light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins in rice (*Oryza sativa* L.), *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 31(9): 1227-1232 (向太和, 王利琳, 庞基良, 2005, 水稻(*Oryza sativa* L.)捕光叶绿素a/b结合蛋白基因全长cDNA的克隆和特性分析, *作物学报*, 31(9): 1227-1232)
- Zhang D.M., Chen S.L., and Hu J.J., 2006, The roles of bamboo industry in constructing socialism new countryside and related problems—a case study on Longyou county, *Zhuzi Yanjiu Huikan (Journal of Bamboo Research)*, 25(3): 5-8 (张德明, 陈双林, 胡建军, 2006, 竹业在社会主义新农村建设中的作用及应注意的问题——以龙游县为例, *竹子研究汇刊*, 25(3): 5-8)
- Zheng R.M., Zheng Y.S., Zhang M., Li Q.R., Chen X.D., and Chen L.G., 2002, Study on impact of photosynthesis and chlorophyll of *Dendrocalamopsis oldhami* grown in the coastal areas under salt stress, *Zhuzi Yanjiu Huikan (Journal of Bamboo Research)*, 21(4): 76-80 (郑容妹, 郑郁善, 张梅, 李庆荣, 陈羨德, 陈礼光, 2002, 盐分胁迫对沿海绿竹光合作用及叶绿素的影响, *竹子研究汇刊*, 21(4): 76-80)
- Zheng Y.S., Gao P.J., Chen L.G., and Wu Z.X., 2003, A study on the physiological and biochemical character of flowering for *Dendrocalamopsis oldhami*, *Linye Kexue (Scientia Silvae Sinicae)*, 39(3): 143-147 (郑郁善, 高培军, 陈礼光, 吴擢溪, 2003, 绿竹开花生理生化特性研究, *林业科学*, 39(3): 143-147)