

毛竹 cab - PhE11 基因的克隆与序列分析^①

刘颖丽¹, 高志民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)

摘要: 采用 RT-PCR 技术和 RACE-PCR 技术, 从毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 中分离了捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 cDNA 编码区全长, 命名为 cab - PhE11 (GenBank 登记号: EU327783)。该基因全长 1154b p, 编码区 cDNA 全长 753b p, 编码 250 个氨基酸。生物信息学分析表明, 在 cab - PhE11 编码的蛋白第 62~239 位包括典型的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白功能域, 还包含 1 个 N-糖基化位点、1 个酪氨酸激酶 II 磷酸化位点、5 个 N-肉豆蔻酰化位点以及 1 个丙氨酸富集区。序列相似性分析结果表明, cab - PhE11 编码的氨基酸序列与玉米、绿豆、拟南芥、烟草等的 cab 基因有较高的相似性, 都在 80% 以上, 该基因属于 lhcb6 类基因。

关键词: 毛竹; 捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因; 序列分析

中图分类号: S795.7

文献标识码: A

Cloning and sequence analysis of a full-length cDNA encoding a light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein of *Phyllostachys edulis*

LIUYing-li¹, GAOZhi-min¹, PENGZhen-hua²

(1. International Center for Bamboo and Rattan, Key Laboratory of Bamboo and Rattan Science and Technology of State Forestry Administration, Beijing 100102, China;

2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: A full-length cDNA of light-harvesting chlorophyll a/b (cab) gene was cloned from the first strand of *Phyllostachys edulis* cDNA through RT-PCR and RACE-PCR methods, named as cab - PhE11 (GenBank accession number: EU327783). The length of cab - PhE11 is 1154b p, which contains an open reading frame (753b p) encoding 250 amino acids. The bioinformatics analysis indicated that the protein encoded by cab - PhE11 had one chlorophyll a/b binding domain (62th ~ 239th position), one N-glycosylation site, one Casein kinase II phosphorylation site, five N-myristoylation sites and one alanine-rich region profile. The amino acid sequence of cab - PhE11 showed high similarity with the cab genes of *Zea mays*, *Vigna radiata*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*, more than 80% respectively, which indicated that cab - PhE11 gene belongs to lhcb6 gene family.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; light-harvesting chlorophyll a/b (cab) gene; sequence analysis

① 收稿日期: 2008-03-30

基金项目: 国家林业局 948 项目 (2004-4-60, 2005-4-38); 国家林业局重点项目 (2007-1)

作者简介: 刘颖丽 (1977-), 河北唐山市人, 在读博士, 主要从事林木遗传育种方面的研究。

高志民 (1971-), 河北唐山市人, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事林木遗传育种方面的研究。

通讯作者: 彭镇华 (1931-), 江西吉水人, 教授, 博士生导师, 主要从事森林生态、花卉育种等方面的研究。

刘颖丽和高志民同为第一作者。

竹子具有生长快、用途多、生态和经济价值高等特点,被誉为“绿色的金矿”,是重要的森林资源。其生长快、产量高等特点,意味着竹子具有较强的同化能力,光合作用反应植物对外界物质的同化能力,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。竹子作为高效生物质能源之一,光合作用有着独特的生理规律,如何更好利用和调控竹子的光合效率,提高目标产量,需要在现有基础上开展竹子光合作用的分子机制研究^[1]。

光能是整个光合作用反应的驱动力,光能的捕获和传递过程将会直接影响整个生物体的光合作用表现。在高等植物中,光系统 II 的捕光色素蛋白复合体作为主要的光能捕获、传递和分配者,在光合作用过程中发挥着极其重要的作用。lhcb6 基因是光系统 II 中编码捕光色素蛋白基因之一^[2],本研究以重要的速生型用材竹种毛竹为材料,从中克隆到一个 lhcb6 类基因 cab - PhE11,以期从分子水平揭示毛竹高效光合作用的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用购自广西省柳州地区的毛竹种子进行播种,培养成盆栽实生苗存于本实验室的培养间,取其新鲜叶片用于实验。

1.2 总 RNA 提取与反转录 cDNA 合成

采用 Trizol reagent (Invitrogen) 提取毛竹实生苗幼嫩新鲜叶片的 RNA^[3],用 Promega 公司的反转录试剂盒合成 cDNA。采用 SMARTTM RACE 试剂盒 (Clontech) 合成 5' cDNA 和 3' cDNA。

1.3 基因的克隆与测序

根据玉米捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因家族中的同源基因序列设计保守区 PCR 引物 1、2; 根据保守区序列及 RACE 试剂盒通用引物 UPM 设计 5' RACE 引物 - 引物 3、4 和 3' RACE 引物 - 引物 5、6。由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 1: 5' -TTCCTCAAGTGGTACCGGGAG-3'; 引物 2: 5' -TCTTGCCCTGCCCAGCCT-3'; 引物 3: 5' -ACGCCGTCTCTGGGTTATGCCGCCGAG-3' (5' RACE 引物); 引物 4: ACTCCACCCAC - CCCATGAGCAGCAGC (5' RACE 引物); 引物 5: 5' -CTGGGCATCTTCGTCGGGCAGGCGTG-3' (3' RACE 引物); 引物 6: 5' -AAGCGGTGGGTG - GACTTCTTCAGCC-3' (3' RACE 引物)。

以毛竹 cDNA 为模板,进行梯度 PCR,扩增保守区序列。20 μ L 反应体系: 10 μ L 2 $\times$ LAMP Buffer (Mg²⁺ Plus), 0.2 μ L TaKaRa LA Taq 酶,

3.2 μ L dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP 2.5 mM each), 2 μ L 引物 1 (5 mM), 2 μ L 引物 2 (5 mM)、1 μ L 模板, 1.6 μ L 超纯水。引物 1 和引物 2 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 39 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

以毛竹 5' cDNA 为模板,用引物 3、引物 4 扩增 5' 端 DNA, 5' -RACE 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 以 3' cDNA 为模板,用引物 5、引物 6 扩增 3' 端 DNA, 3' -RACE 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环。

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 公司的 pGEM-Teasy 载体快速连接试剂盒操作流程,将回收的 DNA 片段直接连到载体上,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,将单克隆送三博远志科技有限公司测序。

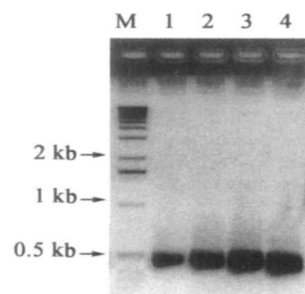
1.4 序列分析方法

应用 DANSTAR、SMART、ClustalW、Blast 和 MOTIFSCAN 等在线软件对序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 基因保守区片段的克隆与分析

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 500 bp 左右有一条亮带,与预测的基因片段基本相符。回收与 pGEM-Teasy 载体连接,转化后将单克隆送公司测序。测序结果表明,插入片段位 472 bp。应用 DANSTAR 软件和 Blast 在线软件,将测序的序列与已报道的基因进行同源比较,发现插入片段与 cab 基因家族的保守区有着较高的相似性,其编码的蛋白与绿豆的捕光色素蛋白 CP24 的相似性达 89%,与烟草 CP24 的相似性达 88%,初步确认为毛竹的捕光色素蛋白基因的部分序列。



1: 55.9 $^{\circ}$ C; 2: 56.7 $^{\circ}$ C; 3: 57.8 $^{\circ}$ C; 4: 59.3 $^{\circ}$ C; M: 1 kb

图1 梯度 PCR 产物电泳结果

Fig.1 DNA fragments amplified by gradient PCR

2.2 cDNA 全长的克隆与分析

为了获得基因的全长,根据已获得保守区片断的序列设计了 5'-RACE 引物 3 和 3'-RACE 引物 5,与 SMARTTM RACE 试剂盒通用引物(UPM)配对进行扩增。取引物 3 扩增产物 5 μ L 与 245 μ L 水混合做模板,引物 4 与通用引物 NUP 扩增产物产物在 800b p 左右有一条亮带(图 2);取引物 5 扩增产物 5 μ L 与 245 μ L 水混合做模板,引物 6 与通用

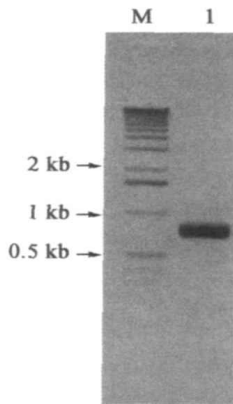


图 2 5' racePCR 产物电泳检测

Fig.2 DNA fragmentation amplified by 5' race

2.3 序列的生物信息学分析

利用 DNASTAR、SMART、MOTIFSCAN 和 ClustlW 等在线生物软件分析了 *cab - PhE11* 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。*cab - PhE11* 基因序列从第 1 bp 开始至 753b p 含有 1 个开放阅读框(Openreading frame, ORF)和 1 个终止密码子,编码 250 个氨基酸(图 4),在 *cab - PhE11* 编码的蛋

引物 NUP 扩增产物产物在 700b p 左右有一条亮带(图 3)。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。通过已经获得的保守区序列与 3' RACE、5' RACE 序列的拼接得到了基因的全长 cDNA 序列,全长为 1154b p,含有一个完整编码区(753b p)、3' 非翻译区(346b p)和 5' 非翻译区(55b p),命名为 *cab - PhE11*, GenBank 登记号为 EU327783。

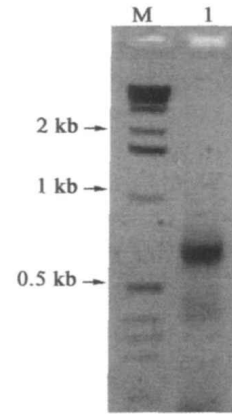


图 3 3' racePCR 产物电泳检测

Fig.3 DNA fragmentation amplified by 3' race

白第 62~239 位包括典型的捕光叶绿素 a/b 结合蛋白功能域,第 179~182 位为 N-糖基化位点,第 55~58 位为酪氨酸激酶 II 磷酸化位点,第 12~17、67~72、107~112、123~128、135~140 位为 N-肉豆蔻酸化位点,第 16~45 位为丙氨酸富集区。*cab - PhE11* 基因编码的蛋白的等电点和分子量分别为 7.30 和 26563.57 Da。

```

1  ACGCGGGGCCCCAGTCACAGCATCCACACAACATTACCAGGAAATATTTATGGCCATG
M
59  GCCACCGCCGTCCTGAAGTCGCCGTTCTCGGCACGAGCCGTGCGCTCGCCAATGCCGCC
   A T A V L K S P F L G T S R A L A N A A
119  GCCGCCGGCAAGCCGGCGGCCACGATCGCTGCCCTCCCGCGGAATGGTCGTGGTGGCCGCG
   A A G K P A A T I A A S R G M V V V A A
179  GCTGCCACCGCCAAGAAGTCGTGGGTCCCCGCCGTCAAGAGCGACGCCGAGTTCATCAAC
   A A T A K K S W V P A V K S D A E F I N
239  CCGCCGTGGCTCGATGGCTCGTCCCCGGCGACTACGGATTGACCCGCTGGGCCTGGGC
   P P W L D G S L P G D Y G F D P L G L G
299  AAGGACCCGGCGTTTCTCAAGTGGTACCGCGAGGCGGAGCTGATCCACGGGAGGTGGGCG
   K D P A F L K W Y R E A E L I H G R W A
359  ATGTCGGCGGTGCTGGGCATCTTCGTGGGGCGGCGTGGAGCGGCGTGGCTGGTTCGAG
   M S A V L G I F V G R A W S G V P W F E
419  GCCGGCGCGCAGCCGGGCGGTTGGCGCCCTTCTCGTTCGGCACGCTGCTGGGCACGCAG
   A G A Q P G A V A P F S F G T L L G T Q
479  CTGCTGCTCATGGGGTGGGTGGAGTCGAAGCGGTGGGTGGACTTCTTACGCCCGGACTCG
   L L L M G W V E S K R W V D F F S P D S

```

```

539 CAGTCCGTGGAGTGGGCCACGCCGTGGTCGCGCACCGCCGACAACTTCGCCAACGCCACC
    Q S V E W A T P W S R T A D N F A N A T
599 GGCGAGCAGGGGTACCGGGGGGCAAGTTCTTCGACCCGCTCGGCCTCGGCGGCATAACC
    G E Q G Y P G G K F F D P L G L G G I T
659 CAGGACGGCGTCTACATCCCCGACGCCGACAAGCTGGAGCGGCTCAAGCTGGCCGAGATC
    Q D G V Y I P D A D K L E R L K L A E I
719 AAGCACGCGCGCTCGCCATGCTCGCCATGCTCATCTTCTACTTTCGAGGCTGGGCAGGGC
    K H A R V A M L A M L I F Y F E A G Q G
779 AAGACGCCGCTCGGCGCCCTCGGCCTGTGAGCGAGGCCAAATCGACATCACCATGCCTGC
    K T P L G A L G L
839 ATTGCACGGCTTAATTCGCAGGGTATTGAGATATTGAGTAATATTGATCAGAGAGGAAAT
899 CAAGAAAGTGGGCGTCACTGTATGGCTGCTAGCTAGCTGTTCTGCGCAAAGGTTCAAGTTT
959 GCTGCTTCTTTTCCCCGCCTTTTGTATATACTTTGTATGTATGTAGTACTAGAATGTAGT
1019 AATACTTTAGTCATATGTATATTCTGGATTTAATCTGTCGAAAAATATGTGGAATTGAGG
1079 TATGATGAGTGAGCCGTAAGGAGACGGTCTCAATCGAATGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
1139 AAAAAAAAAAAAAAAAAA
    
```

图 4 cab - PhE 11 编码区核酸序列及其推导出的氨基酸序列

Fig.4 Nucleotideand predictedaminoacidse quenceof cab - PhE 11(EU327783)

在线比对结果表明, cab - PhE 11 基因编码的蛋白与其它物种的 cab 基因有着较高的相似性,与玉米中 AAA64416.1 的一致性达 86%、与烟草 ABG73416.1 的一致性达 86%、与绿豆 AAD27882.2 的一致性达 85%、与拟南芥中 AAD28777.1 的一致性达 84%、与菠菜中 P36494 的一致性达 86%。对 cab - PhE 3 基因编码的蛋白进行系统进化树分析(图 5),结果表明 cab - PhE 11 基因与玉米等单子叶植物中该类基因亲缘关系最近。由其推测蛋白的结构特点和相似性比较的结果可知, cab - PhE 11 基因属于 lhcb6 类基因。

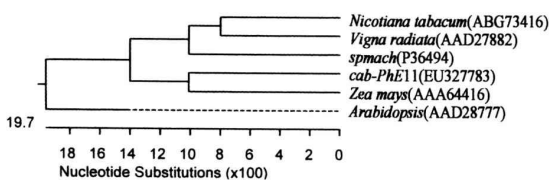


图 5 cab - PhE 11 基因编码蛋白系统进化树分析

Fig.5 Phylogenetictreeanal ysisof proteins encodedby cab - PhE 11 gene

3 讨论与结论

在高等植物体内,捕光色素蛋白复合体(LHC)又称为天线色素蛋白复合体,是一类捕获光能,并将其迅速传至光合反应中心引起光化学反应的色素蛋白系统。光系统 II和光系统 I都有各自的 LHC,但由于 LHC II占有类囊体膜中近 50% 的色素和约 1/3 的蛋白质,其生理功能复杂,且易被大量分离和纯化而备受研究者的关注。目前已知,LHC II是由一系列结构相似、进化相关、由核基因(lhcb)编码的蛋白与色素形成的色素蛋白复合体家族(LHCB)构成

的。LHC II有四个主要功能:捕获和传递光能;光保护和过剩能量耗散;调节光能在两个光系统中分配;维持类囊体膜的结构。

Jansson^[4]等根据 LHC II蛋白质组分的基因类型,将该类编码基因分别命名为 lhcb1、lhcb2、lhcb3、lhcb4、lhcb5、lhcb6。它们编码的蛋白质分别与色素结合形成 LHCB1、LHCB2、LHCB3、LHCB4、LHCB5 和 LHCB6 六种色素蛋白复合体。根据其含量的不同可分为大量天线和微量天线,LHCB1、LHCB2 和 LHCB3 为大量天线,在体内以同质、异质三聚体或寡聚体形式存在,LHCB4、LHCB5 和 LHCB6 为小量或微量捕光天线,在体内主要以单体形式存在。LHCB6 是 LHCB 蛋白分子量中较小的,结合 6 个 Chla 和 4 个 Chlb 分子,与其他 LHCB 蛋白相比,其与 LHCB1 同源性最低,约为 29.2%。CP24 蛋白缺乏暴露于囊腔侧的 C 末端和螺旋 D 区^[5],在提取过程中 CP24 结合的色素易丢失,这可能与不含螺旋 D 有关^[6],而 Chlb 则有稳定其结构的作用^[2]。lhcb6 类基因在拟南芥、菠菜、水稻、玉米等植物中已被分离,但在竹类植物中未见报道,而竹子是重要的森林资源,在保护环境、发展地方经济以及人与自然和谐发展等方面都发挥着重要作用,具有良好的生态价值和经济价值。本研究从毛竹中分离了 lhcb6 类基因 cab - PhE 11,为研究该基因的功能实现该基因的体外表达奠定了基础,对于通过 cab - PhE 11 基因体外表达与色素的重组来研究蛋白结果与功能有着积极的帮助。结合本实验室已经克隆到的竹子捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 cab - BO 1^[7]、cab - BO 2^[8]、cab - PhE 4^[9] 的研究,将有助

于全面揭示竹子 LHC II 蛋白的结构和功能,对于今后通过基因工程手段实现对竹子的光合性能的改良,实现以提高竹子光合效率为育种目标的育种时间有着重要的价值和意义。

参考文献:

- [1] 高志民,李雪平,彭镇华,等. 竹子捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因全长的克隆和序列分析[J]. 林业科学, 2007,43 (3):34-38.
- [2] 孙钦秒,冷静,李良璧,等. 高等植物光系统 II 捕光色素蛋白复合体结构与功能研究的新进展[J]. 植物学通报,2000,17 (4):289-301.
- [3] Gao Zhimin, Li Xue ping, Li Lubin, et al. A neffective method for total RNA isolation from bamboo[J]. Chinese forestry science and technology, 2006,5 (3):52-54.
- [4] Jansson Stefan. A guide to the lhc genes and their relatives in Arabidopsis[J]. Trends in plant science, 1999,4 (6):236-240.
- [5] Allen KD, Staehelin LA. Biochemical characterization of

photosystem II antenna polypeptides in grana and stroma membranes of spinach[J]. Plant Physiology, 1992,100:1517-1526.

- [6] Bassi R, Pineau B, Dainese P, et al. Carotenoid-binding proteins of photosystem II[J]. Eur J Biochem, 1993,212:297-303.
- [7] Gao Zhimin, Li Xue ping, Li Lubin, et al. An effective Method of Total RNA Isolation from bamboo[J]. Chinese Forestry Science and Technology, 2006,5 (3):52-54.
- [8] 高志民,李雪平,岳永德,等. 绿竹 cab - BO2 基因的克隆及其表达载体的构建[J]. 分子植物育种, 2007,5 (3):431-435.
- [9] Gao Zhimin, Li Lubin, Peng Zhen Hua, et al. Cloning and Characterization of Gene cab - PhE 4 in Phyllostachys edulis[J]. Chinese forestry science and technology, 2007,6 (2):49-53.

(编辑:梁虹)

(上接第 18 页)

- [6] 王军辉,陆熙娴,张守攻. 落叶松制浆造纸适应性及开发利用的前景[J]. 中国造纸,2004,23 (6):47-52.
- [7] Wegner TH, Myers GC, Leatham GF. Biological treatments as an alternative to chemical pretreatments in high-yield wood pulping[J]. Tappi, 1991,74 (3):189.
- [8] Viikari L, Rana M, Kantelinen A, et al. Bleaching with enzymes[C] // Proc 3rd int conf on biotechnology in the pulp and paper industry. Stockholm, Sweden, 1983:67.
- [9] 于红,秦梦华,卢雪梅,等. 微生物预处理对麦草微观结构和化学成分的影响[J]. 中国造纸学报,2004,19 (1):19-23.
- [10] Akhtar M, Gary M, Scott R, et al. Biomechanical pulping: a mill scale evaluation[J]. Resources, Conservation and Recycling, 2000,28:241.
- [11] 中国轻工业标准汇编(造纸卷)[S]. 北京:中国标准出版社,2000.
- [12] 王军辉,张守攻,石淑兰,等. 日本落叶松原料纤维形态特性的研究[J]. 河北农业大学学报,2005,27 (1):35-38.
- [13] 王军辉,张守攻,石淑兰,等. 日本落叶松木材的化学组成研究[J]. 林业科学研究,2004,17 (5):570-575.
- [14] 王军辉,张守攻,石淑兰,等. 日本落叶松纸浆材造纸性能的研究[J]. 北京林业大学学报,2004,26 (5):77-81.
- [15] 王军辉,张守攻,石淑兰,等. 日本落叶松不同树龄的制浆性能研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2005,33 (2):117-122.
- [16] 徐青林. 生物制浆[J]. 浙江造纸,2000,4:10-14.
- [17] Akhtar M, Attridge MC, Myers GC, et al. Biomechanical pulping of loblolly pine chips with selected white-rot fungi[J]. Holzforschung, 1993,47:36.

(编辑:梁虹)