

# 木薯可溶性淀粉合成酶基因 *SSII* 克隆及生物学分析

曾文丹<sup>1,2,3</sup>, 罗兴录<sup>2</sup>, 郭雅静<sup>2</sup>, 袁圣勇<sup>2</sup>, 杨鑫<sup>2</sup>

(1. 广西农业科学院 经济作物研究所, 广西 南宁 530007; 2. 广西大学 农学院, 广西 南宁 530005;

3. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西 南宁 530007)

**摘 要:**以木薯品种 SC124 为试材, 采用 RT-PCR 的方法, 克隆了木薯可溶性淀粉合成酶基因 *SSII* 的全长, 并对其进行生物学分析。结果表明: 克隆的基因全长包含完整的开放阅读框 2 256 bp, 编码 751 个氨基酸, 通过核苷酸序列同源性分析, 该 cDNA 与基因库中登录的木薯 *SSII* (登录号为: EF667961.1) 序列同源性达到 99%, 但与其它植物的同源性较低, 为 77%~84%。对木薯 *SSII* 多态性分析可知, 在木薯基因组内存在等位基因及旁系同源基因。

**关键词:**木薯; 可溶性淀粉合成酶基因 *SSII*; 克隆; 生物学分析

**中图分类号:**S 889+.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)02-0099-05

木薯(*Manihot esculenta* Crantz) 属大戟科植物, 其块根营养丰富, 不仅富含大量的碳水化合物而且还含有丰富的维生素、矿物质、微量元素, 其中尤以淀粉含量最多。一般鲜薯淀粉含量可达 30%, 干片淀粉含量可达 70% 以上, 其中直链淀粉约占 17%, 支链淀粉约占 83%, 因而有“淀粉之王”、“能源作物”、“地下粮仓”等美誉<sup>[1]</sup>。而高比例的支链淀粉可转变为变性淀粉, 是生产燃料乙醇的重要原料<sup>[2-3]</sup>。因此, 木薯作为一种新的能源作物越来越受到科研工作者的关注。

已有研究表明, 可溶性淀粉合成酶(SSS)在  $\alpha$ -1,4-糖苷键的作用下, 将 ADPG 中的葡萄糖加到侧链的非还原端, 使支链淀粉的分支链进一步延伸和加长, 因此, 其主要作用是参与支链淀粉的合成<sup>[4]</sup>。SSS 有多种同工酶, 在植物中主要分为 SSSI、SSSII、SSSIII 三大类。SSSI 主要负责 10 个或 10 个以下葡萄糖短链的合成<sup>[5]</sup>; SSSII 负责 10~25 个葡萄糖中等长度支链淀粉的合成; SSSIII 则负责 25~35 个葡萄糖长链淀粉的合成<sup>[6]</sup>。目前, 已成功的将 SS 各同工酶基因从马铃薯<sup>[7]</sup>、小麦<sup>[8]</sup>等植物中克隆出来, 但木薯 *SSII* 基因全长克隆尚鲜见报道。*SSII* 负责中等长度支链淀粉的合成, 该基因在淀粉构成中发挥着重要作用, 是支链淀粉积累过程中的关键因子<sup>[9-10]</sup>,

因此克隆木薯 *SSII* 基因不仅有助于为木薯转基因育种提供重要的操作靶点, 同时也为木薯支链淀粉生物合成和分子调控的机理提供理论依据。为此, 该研究利用 RT-PCR 扩增技术克隆木薯 *SSII* 全长, 并对其序列进行了初步分析, 以期对木薯支链淀粉生物合成和分子调控的机理提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取在广西大学农学院教学科研基地种植 120 d 的木薯品种 SC124 叶片、茎和块根混合样作为试验材料。

主要试剂: 醋酸钠、无水酒精、异硫氰酸胍、柠檬酸钠、十二烷基肌酸钠、焦磷酸二乙酯、氨苄青霉素、琼脂糖、琼脂粉等分析纯试剂, DNA Marker 均购于上海生工工程有限公司; 大肠杆菌 JM109 菌株购于横因生物有限公司; 聚合酶购于北京康为世纪公司; 逆转录酶、PUC-TA 连接试剂盒购于宝生物工程有限公司; 凝胶回收试剂盒购自 Bioer 公司; PCR 引物是由上海生工工程有限公司合成。

### 1.2 试验方法

根据 GenBank 中木薯 *SSII* 基因(登录号为: EF667961.1)序列, 设计引物。

*SSII* 上游引物(p1): 5'-ATGGCATTATAGGATCACTTCCT-3'; *SSII* 下游引物(p2): 5'-TCACCACTGTACTTGGCTGCA-3'。

1.2.1 RNA 的提取 参照潘华清等<sup>[11]</sup>的异硫氰酸胍-过柱法略有修改。

1.2.2 RT-PCR 扩增 cDNA 第 1 链的合成按照 M-MLV 逆转录酶的操作说明进行, 引物使用随机引物 Olig(dT) 18; PCR 反应体系为 cDNA 模板 1  $\mu$ L, p1 和 p2 各 1  $\mu$ L, 2 $\times$  GoldStar Best MasterMix 10  $\mu$ L, 加 RNase free 的 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu$ L; 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 94 $^{\circ}$ C、

**第一作者简介:**曾文丹(1982-), 女, 湖北随州人, 硕士, 研究实习员, 现主要从事木薯遗传育种等研究工作。E-mail: zengwendan0700208@163.com.

**责任作者:**罗兴录(1957-), 男, 广西上林人, 博士, 教授, 博士生导师, 现主要从事木薯育种和种质资源利用及栽培生理等研究工作。E-mail: luoxinglu@sina.com.

**基金项目:**国家“973”计划资助项目(2010CB126601); 广西自然科学基金重点资助项目(2010GXNSFD013025); 南宁市科技攻关资助项目(201109044B)。

**收稿日期:**2013-09-16

30 s, 58℃、30 s, 72℃、60 s 的 35 个循环, 再在 72℃ 下延伸 10 min。扩增产物加核苷染料后再 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。重复 8 次。用凝胶回收试剂盒进行目的条带的回收。

**1.2.3 PCR 扩增产物的连接及转化** 将回收的目的条带与 PUC-TA 进行连接载体。连接体系: 回收产物 1  $\mu$ L、PUC-T 载体 1  $\mu$ L、Solution Buffer 5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L。将上述组分震荡混匀, 22℃ 连接 2 h。将上述连接产物加入到 50  $\mu$ L 的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 冰浴 30 min, 每隔 10 min 轻弹混匀, 42℃ 热激 50 s 后迅速放入冰中静置 2~3 min。再加入 400  $\mu$ L LB 培养基, 37℃ 以转速 200 r/min 振荡培养 60 min。使获得的菌液与 20  $\mu$ L 100 mg/mL 的氨苄青霉素(Amp)混合均匀涂至 LB 固体平板, 于温度为 37℃ 的培养箱中倒置培养培养过夜。

**1.2.4 阳性重组质粒的筛选及鉴定** 随机挑选白色单菌落于 1.5 mL 离心管中含有 100 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的 800 mL LB 液体培养基中, 37℃ 摇床 200 r/min 振荡培养 3~4 h, 至浑浊。取 1  $\mu$ L 菌液为模板, 使用特异性引物进行菌液 PCR, 电泳检测, 将含有目的片段的阳性菌液送往上海生物工程技术服务有限公司测序。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 的检测

以木薯的叶、茎、根混合样为材料提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳, 检测 RNA 的质量。由图 1 可知, 该试验提取的总 RNA 的 28 S、18 S 条带清楚完整, 无拖尾, 且 28 S 条带亮度大约是 18 S 条带的 2 倍, 点样孔及附近无亮斑, 表明 RNA 完整性好, 无蛋白质和多糖等杂质污染。核酸蛋白检测仪测定 RNA 的纯度和浓度, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 的平均值为 1.95, 浓度为 2 500 ng/ $\mu$ L。数据表明所提取的 RNA 纯度较高, 能够满足后续试验的要求。

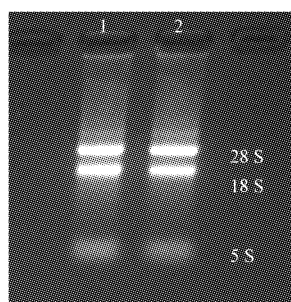


图 1 木薯总 RNA 电泳检测

注: 1~2 为木薯 RNA。

Fig. 1 Total RNA electrophoresis of *Manihot esculenta* Crantz

Note: 1~2 are *Manihot esculenta* Crantz RNA.

### 2.2 RT-PCR 扩增产物的鉴定

以逆转录所得的 cDNA 为模板, 加引物 p1、p2 进行 PCR 扩增。将扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。

由图 2 可知, PCR 产物大小约为 2 200 bp, PCR 产物大小与预期目的片段大小符合, 说明可能获得了 SSII 基因 cDNA 克隆。还需做进一步鉴定。

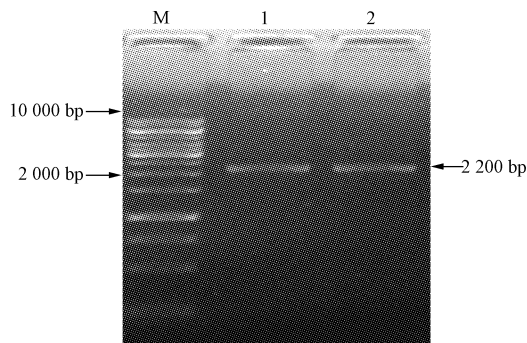


图 2 木薯 SSII 基因的 PCR 扩增

注: M; DNA Marker; 1~2 为 PCR 产物。

Fig. 2 PCR amplification of SSII gene of *Manihot esculenta* Crantz

Note: M; DNA Marker; 1~2 are PCR products.

### 2.3 阳性克隆的鉴定

将扩增获得的 SSII 基因与 T 载体连接, 并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中。从转化后的平板随机挑选单菌落震荡培养 3~4 h 后进行菌液 PCR 检测。由图 3 可知, 菌液扩增片段大小为 2 200 bp, 与 RT-PCR 结果一致, 表明为阳性克隆。将阳性菌液送往上海生物工程技术服务有限公司进行测序比对。

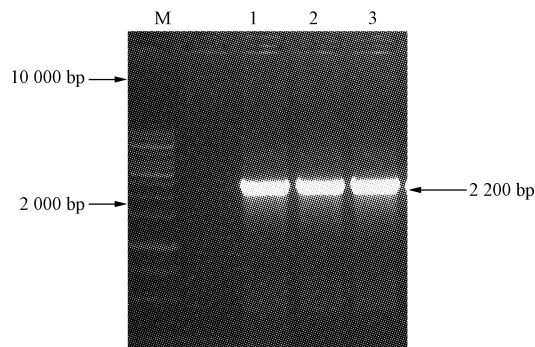


图 3 木薯 SSII 基因阳性克隆

注: M; DNA Marker; 1~3 为 PCR 产物回收带。

Fig. 3 Positive clone of SSII gene of *Manihot esculenta* Crantz

Note: M; DNA Marker; 1~3 are PCR product recovery zone.

### 2.4 SSII 基因的 cDNA 序列及其多态性分析

**2.4.1 SSII 基因的 cDNA 序列** SSII 基因的 cDNA 序列及编码的氨基酸序列如图 4 所示。利用 DNAMAN 软件和 NCBI 网站的 blastn 分析工具对测序结果与其它植物进行同源基因序列进行比对分析。序列分析显示, 该木薯 SSII 基因与基因库中登录的木薯 SSII(登录号为: EF667961.1) 的基因序列同源性达到 99%。但与其它植物的同源性较低, 为 77%~84%, 其中该基因的核苷酸序列与基因库中登录的杨柳科的杨树(登录号为 XM002324025) 的 SSII 基因的同源性最近, 但也仅为

84%;与模式植物拟南芥(登录号为 XM002882149)的 mRNA 序列的同源性为 78%。通过 ExPASy Proteomics

Server 的 ProtParam 分析,SSII 编码 751 个氨基酸,分子量为 8.37984 kD,等电点为 5.69,属于典型的酸性蛋白。

```

1   ATG GCA TTT ATA GGA TCA CTT CCT TTT ATT ATC CAA ACC AAA GCA GAA AGT TCT GTC CTT
61  CTC CAT GAC AAA AAC CTA CAG CGA TCC AGA TTC TCC GTT TTC CCA TGT AGA TCA CAA AAC
121 TCT TTT AAT TTA GCC GTT TCG TTA TCT TTG AGT TTT AAG CCT GTA AGA GCT ACA GGT AAG
181 GAA GGC GTT AGT GGT GAT GGG TCA GAG GAT ACA CTT CAA GCC ACC ATC GAG AAA AGC AAG
241 AAA GTT CTC GCC TTG CAA AGG GAC CTA CTT CAG AAG ATT GCT GAA AGA AGG AAA TTG GTT
301 TCT TCT ATA CAA AGT AGT GTT GGT GAC CAC GAC ACA AAC AAA ACT TCT CAT GAA CAG AGG
361 GAA AAC TCT TTG CCA AAT TCA GAT AAT ACT TCA ACT AGT GAT GTG AAT ATG CAC CAA CAG
421 CAA AAT GGC CCA GTT CTT CCG AGT AGC TAT GTC CAT TCA ACT GCA GAT GAG TCA TCA GAA
481 ACT GCA TCT TCA GCT ATT AAT AGA GGT CAT GCT AAA GAT GAT AAG GAA CTT GAA CAA CAT
541 GCA TCT CCT AGA ACA GCC TTT GTT AAG AAT TCT ACC AAA CAG TTT AAA GAG ATG GAT TCT
601 GAG AAA CTA CAG ACA GAT GAG ATA CCA TCT TTT CTT TCA AAC ACC ACA GAT ATT TCC ACT
661 ATA AAT GAA GAA AAT AGT GAA CAT TCA AAT GAA TCA ACC TCA CCT ATG GTT GAC ATT TTT
721 GAA AGT GAT TCT ATG ACT GAA GAC ATG AAG CCA CCT TTT GCT GGT GAC AAT GTC ATG
781 AAT GTT ATT TTG GTA GCT GCA GAA TGT GCT CCA TGG TCC AAA ACA GGT GGT CTT GGT GAT
841 GTC GCT GGA TCT TTA CCA AAG GCT TTG GCT CGG CGT GGA CAT CGG GTT ATG GTT GTG GCA
901 CCG CGA TAT GGC AAC TAT GTT GAA CCT CAG GAT ACT GGA GTC CGA AAG AGG TAT AAG GTG
961 GAT GGT CAG GAT TTT GAA GTA TCA TAC TTC CAA GCC TTC ATT GAT GGT GTT GAT TTT GTA
1 021 TTC ATT GAC AGT CCT ATG TTT CGC CAC ATA GGG AAT GAT ATA TAT GGA GGA AAC AGA ATG
1 081 GAT ATA TTA AAG AGG ATG GTA TTA TTT TGC AAA GCT GCT GTT GAG GTT CCT TGG CAT GTC
1 141 CCA TGT GGT GGA GTC TGC TAT GGG GAT GGA AAT TTG GCT TTC ATT GCA AAT GAT TGG CAT
1 201 ACA GCA TTG TTG CCA GTG TAT CTG AAG GCA TAT TAT CGG GAT AAT GGT TTA ATG CAA TAT
1 261 ACA AGA TCT GTT CTT GTA ATT CAT AAC ATA GCT CAC CAG GGT CGG GGT CCA GTG GAT GAT
1 321 TTC TCT TAC GTG GGT CTA CCA GAA CAT TAC ATT GAT CTC TTC AAA CTG CAT GAT CCG ATT
1 381 GGT GGT GAC CAC TTC AAT ATC TTT GCA GCT GGT CTT AAG GTG GCA GAT CGT GTG GTT ACT
1 441 GTT AGT CAT GGA TAC GCC TGG GAG CTT AAA ACA TCT GAA GGT GGT TGG GGT CAC AAT
1 501 ATC ATA AAT GAG AAC GAC TGG AAA TTG CAG GGC ATT GTT AAT GGG ATT GAT GCC AAA GAA
1 561 TGG AAT CCA CAG TTT GAT ATT CAA CTG ACA TCA GAT GGT TAT ACT AAC TAT TCC CTG GAA
1 621 ACA CTT GAT ACT GGC AAG CCT CAG TGC AAG GCA GCC TTA CAG AAG GAG CTC GGT TTG CCC
1 681 ATC CGT CCA GAT GTC CCT GTT ATT GGG TTC ATT GGA AGG TTG GAT TAT CAG AAA GGT GTC
1 741 GAT CTC ATA GCT GAG GCA ATT CCC TGG ATG GTG GGT CAG GAT GTG CAA CTA GTA ATG TTG
1 801 GGT AGT GGC AGA CAA GAC TTG GAA GAG ATG CTT AGA CAA TTT GAA AAC CAA CAT AGA GAT
1 861 AAA GTG AGG GGA TGG GTT GGT TTT TCT GTG AAG ACA GCT CAC AGG ATA ACT GGT GGT GCA
1 921 GAT ATT TTG CTC ATG CCA TCA AGA TTT GAA CCA TGT GGG CTA AAC CAG TTA TAT GCT ATG
1 981 ATG TAC GGG ACG ATT CCT GTA GTA CAC GCT GTG GGT GGA CTA AGG GAC ACG GTG CAA CCT
2 041 TTC GAT CCA TTT AAT GAG TCG GGG CTT GGG TGG ACA TTT GAT AGC GCT GAA TCA CAT AAA
2 101 CTG ATA CAT GCA TTA GGC AAT TTG CTC ACT TAC CGA GAG TAC AAG AAG AGC TGG GAA
2 161 GGA CTG CAG AGA AGA GGG ATG ACT CAA AAC CTC AGC TGG GAC CAT GCT GCT GAG AAA TAT
2 221 GAG GAG ACT CTT GTT GCA GCC AAG TAC CAG TGG TGA
      E   E   T   L   V   A   A   K   Y   Q   W   *

```

图 4 SSII 基因全长序列及其编码的氨基酸(\*为终止密码子)

Fig. 4 SSII gene sequence and the amino acid(\* means termination codon)

2.4.2 SSII 序列多态性分析 分析木薯基因组和测序结果,发现 SSII 存在等位基因和旁系同源基因,分别为: cassava4.1-002278; cassava4.1-028098; cassava4.1-004619; cassava4.1-003916; cassava4.1-000528; cassava4.1-003898; cassava4.1-000719; cassava4.1-001042; cassava4.1-003886,在核酸水平上, cassava4.1-002278 与 cassava4.1-028098 相

似性为 86.2%,其它旁系同源基因之间的相似性很低。9 个旁系同源基因分布在 9 条不同的染色体上,而且 cassava4.1-003898 和 cassava4.1-003886 存在 1 和 2 个选择性剪切。分析 9 个旁系同源基因上游、下游序列,发现 9 个旁系同源基因的上、下游序列没有同源性,说明基因个数不是由于染色体加倍而引起的加倍。

为了确定 *SSII* 的进化过程,在 [www.phytozome.org](http://www.phytozome.org) 中,搜索相似性>50%的同源蛋白,进行系统进化树

分析。由图 5、6 可知,在木薯中,第 1 次基因复制产生了 *cassava4.1-002278*, *cassava4.1-028098*, *cassava4.1-004*,

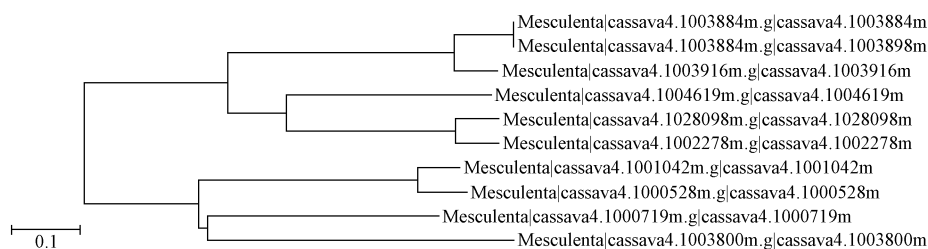


图 5 *SSII* 种内进化树

Fig. 5 The phylogenetic tree of *SSII*

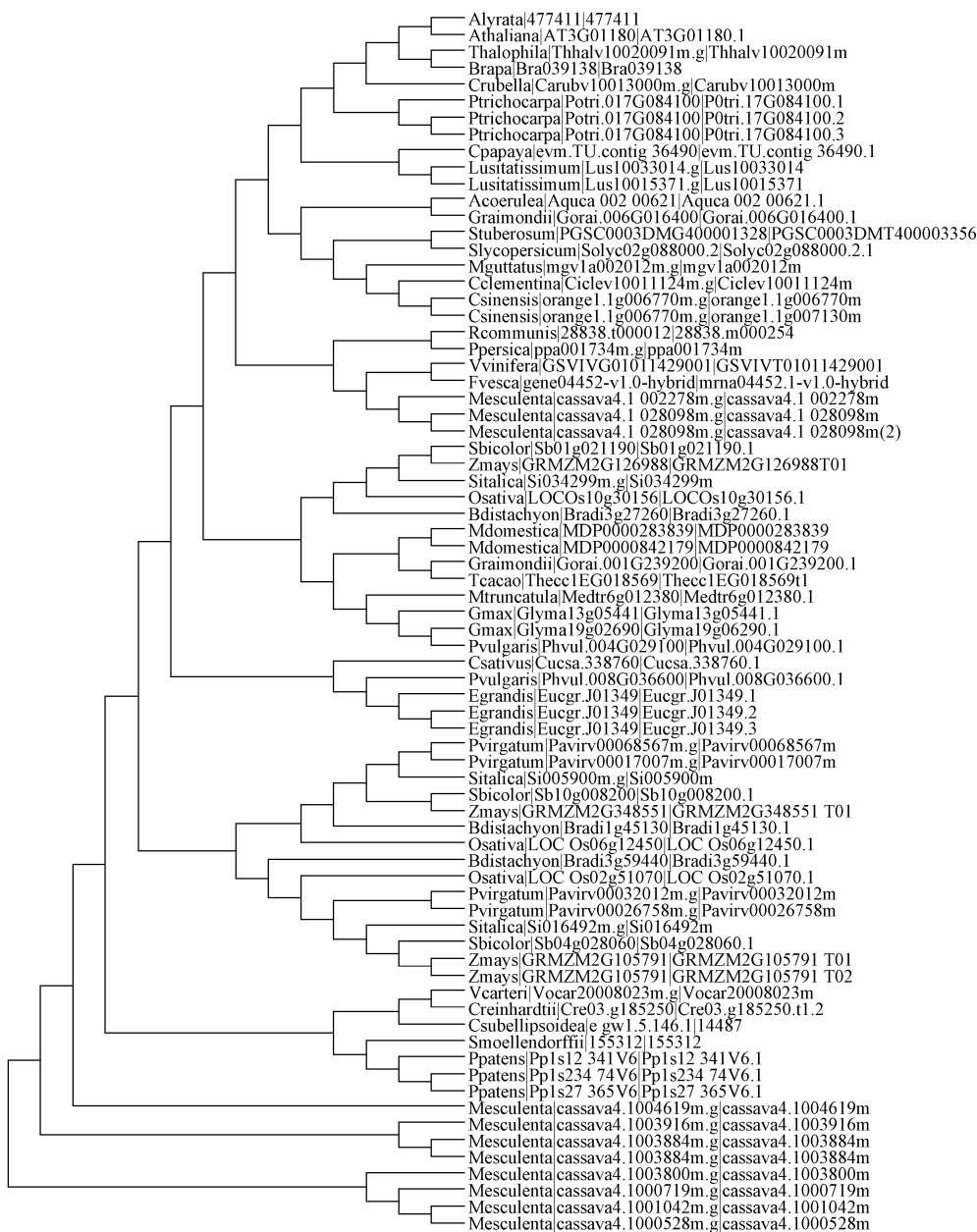


图 6 *SSII* 总基因进化树

Fig. 6 Total genetic evolutionary tree of *SSII*

cassava4.1-003916, cassava4.1-003898 的共同祖先和 cassava4.1-000528; cassava4.1-000719; cassava4.1-001042; cassava4.1-003886 的共同祖先, 该次基因复制发生在很远古的时期, 因为在所有的双子叶和单子叶植物中能都发现 2 簇基因的直系同源基因。第 2 次基因复制是发生在物种形成以后, 因为在其它的植物体中未发现同源基因。

### 3 讨论

目前, 木薯燃料乙醇已成为我国第一种实现封闭运行的非粮原料。同时木薯在加工提取乙醇的过程中, 其废渣、废水还能伴生沼气、二氧化碳和蛋白饲料等。因此在石油等燃料需求逐渐攀升的情况下, 发展木薯新能源和培育高产优质的木薯新品种成为研究的热点。而支链淀粉转变为变性淀粉, 是生产燃料乙醇的重要原料。余春梅等<sup>[13]</sup>研究表明, SS 基因在支链淀粉合成中起着重要的作用, 如果 SS 基因发生突变或通过转入反义 SS 基因, 致使该基因的结构发生彻底的改变, 引起可溶性淀粉合成酶活性降低, 最终导致支链淀粉含量也随之发生改变。该研究利用 RT-PCR 技术克隆出木薯 SSII 基因的全长, 并对其进行了初步的生物学分析, 为开展木薯淀粉基因工程的研究奠定了基础, 也为实现高产优质的木薯新品种的提供了一定的研究基础。与此同时, 也为进一步深入研究支链淀粉的生物机制原理起到一定的帮助。因此, 该研究结果具有十分重要的应用前景和学术价值。但对该基因的功能鉴定以及在木薯中的时空表达尚有待进一步研究。

### 参考文献

[1] 李永锋, 赵光龙, 张志强, 等. 国内木薯淀粉化学改性的研究进展[J].

热带农业科学, 2007, 27(5): 64-72.

[2] Rolland-Sabaté A, Sánchez T, Buléon A, et al. Structural characterization of novel cassava starches with low and high-amylose contents in comparison with other commercial sources[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 27(1): 161-174.

[3] Zeeman S C, Kossmann J, Smith A M. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2010, 61: 209-234.

[4] 谭彩霞, 封超年, 陈静, 等. 作物淀粉合成关键酶及其基因表达的研究进展[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(5): 912-919.

[5] Commuri P D, Keeling P L. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme; studies of glucan affinity and catalytic properties[J]. Plant J, 2001, 25(5): 475-486.

[6] Edwards A, Fullon D C, Hylton C M, et al. A combined reduction in activity of starch synthase II and III of potato has novel effects on the starch of tubers[J]. Plant J, 1999, 17(3): 251-261.

[7] 张付芸, 陈伟霞, 刘子渲, 等. 小麦 SSII-A 基因片段的克隆及其 RNAi 表达载体的构建[J]. 中国农学通报, 2011, 27(7): 50-54.

[8] 杨涛, 张宁, 栗亮, 等. 马铃薯可溶性淀粉合成酶 SSIII 基因克隆及生物信息学分析[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 545-549.

[9] Dian W, Jiang H, Ping W. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice[J]. J Exp Bot, 2005, 56(412): 623-632.

[10] Ling K H, Loos S, Roslir, et al. In silico identification and characterization of a putative phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase (PIP5K) gene in *Eimeria tenella*[J]. In Silico Biology, 2007, 7(1): 115-121.

[11] 潘华清, 何龙飞, 何海旺. 3 种飞机草总 RNA 提取方法比较研究[J]. 广西农业科学, 2009, 40(8): 957-960.

[12] 陈丽珍, 叶剑秋. 我国木薯加工业的发展现状与展望[J]. 园艺与种苗, 2011(3): 87-90.

[13] 余春梅, 陈佩度, 季本华. 小麦胚乳淀粉合成酶基因研究进展[J]. 麦类作物学报, 2004, 24(4): 123-128.

## Cloning and Sequence Analysis of SSII Gene in *Manihot esculenta* Crantz

ZENG Wen-dan<sup>1,2,3</sup>, LUO Xing-lu<sup>2</sup>, GUO Ya-jing<sup>2</sup>, YUAN Sheng-yong<sup>2</sup>, YANG Xin<sup>2</sup>

(1. Cash Crops Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, Guangxi 530007; 2. College of Agricultural, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005; 3. Lab of Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology, Nanning, Guangxi 530007)

**Abstract:** Taking *Manihot esculenta* Crantz cultivar SC124 as material, by RT-PCR technology, the whole sequence of SSII gene was firstly obtained. The results showed that the gene contained an 2 256 bp open reading frame (ORF) of SSII and encoding 751 amino acids. Comparing to the published sequence (EF667961.1), the homology of nucleotide sequence could share 99%. However, the homology was low comparing with other plants, about 77%~84%. The analysis of SSII polymorphism showed that there were alleles and paralogous gene in *Manihot esculenta* Crantz gene groups.

**Key words:** *Manihot esculenta* Crantz; soluble starch synthase isoform II gene; gene cloning; bioinformatic analysis