

雏菊 *rbcL* 基因的克隆及其生物信息学分析

熊 勇¹, 赵 春 艳², 杨 青 松¹, 张 维 汉¹

(1. 云南民族大学 民族药资源化学国家民委-教育部重点实验室, 云南 昆明 650500;

2. 中华全国供销合作总社昆明食用菌研究所, 云南 昆明 650221)

摘 要:以雏菊为试验材料,采用 PCR 方法扩增雏菊 *rbcL* 基因并测序,并用 DNASTar、PAML 等生物软件对该基因进行生物信息学及其适应性进化研究。结果表明:雏菊 *rbcL* 基因序列全长 1 508 bp,编码区全长 1 458 bp,共编码 485 个氨基酸,与基因库中菊科其它属植物比较,核苷酸和氨基酸序列的同源性均超过了 96%。*rbcL* 蛋白二级结构主要有 20 个 α 螺旋、17 个 β 折叠、33 个转角以及一些无规则卷曲,适应性进化检测发现共有 3 个正选择氨基酸位点(94 E,149 Q,309 M)。获得完整雏菊 *rbcL* 基因有助于更深入地研究雏菊对其生境的适应,*rbcL* 蛋白大亚基正选择位点的空间结构对于维持核酮糖结构具有重要的作用。

关键词:雏菊;*rbcL* 基因;蛋白质结构预测;适应性进化

中图分类号:S 681.903.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0089-07

雏菊(*Bellis perennis* L.)属菊科紫菀族雏菊属多年生或一年生草本植物,约有 7 个种,分布于北半球,高约 5~15 cm,叶为倒卵形,通常基生,呈绿色。头状花序,单生于茎枝顶或花葶上,花多为白色或白带红色或粉红色,花果期 4~7 个月^[1]。

核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)是光合作用还原和光合氧化 2 个连锁循环的交叉点,为调节光合作用和光呼吸、决定净光合速率的第一关键酶^[2-3]。Rubisco 全酶是一个复合体,由 8 个大亚基(*rbcL* 基因)和 8 个小亚基(*rbcS* 基因)组成。Rubisco 活性受到渗透压、干旱、高温等很多环境压力的限制,环境因素是致使大亚基的 *rbcL* 基因产生适应性进化的原因^[4]。在该酶的作用下,核酮糖-1,5-二磷酸和 CO₂ 作用形成 2 个 3-磷酸甘油分子,完成 CO₂ 羧化阶段。Rubisco 是卡尔文循环的关键酶,既参与光合作用又参与光呼吸作用,调节二者之间的关系,是所有光合生物进行光合碳同化的关键性酶。因此,该酶对 CO₂ 的利用效率越高,光合作用效率就越高,植物适应环境的能力也就越强。雏菊原产欧洲,目前在我国许多地区作为观赏植物进行栽培,因此对雏菊 *rbcL* 基因的研究,对于探究雏菊的适应性具有

重要的作用,关于雏菊 *rbcL* 基因序列已有报道^[5-6],但是尚鲜见该植物 *rbcL* 基因完整的序列以及该蛋白生物信息学的研究报道,该研究以菊科的叶绿体 *rbcL* 基因为探针^[7-8],设计引物获得雏菊 *rbcL* 基因的完整序列,并进行相关的生物信息学及适应性进化分析,以期研究雏菊适应其生境提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料雏菊购买于昆明市斗南花卉市场,实验室培养,取其茎叶提取 DNA。常规试剂 Tris、EDTA、NaCl、SDS、KCl、MgCl₂、MgSO₄、氯仿、异戊醇、异丙醇等均均为分析纯,琼脂糖(西班牙), β -巯基乙醇,2 \times Power Taq PCR MasterMix(北京百泰克)。GENE GENIUS 凝胶成像系统(美国),Eppendorf 5331 PCR 仪(德国),DYCP-31DN 电泳槽(北京六一),DYY-GB 电泳仪(北京六一)。

利用植物叶绿体基因在进化中高度保守的特点,根据 Panero 等^[9]发表 *Erigeron tenuis* 的 *rbcL* 基因序列(GenBank accession: EU384973),设计 2 对引物,引物由北京梓熙生物科技有限公司合成(表 1)。

表 1 引物信息

Table 1	Primer information	
引物名称	碱基序列(5'~3')	退火温度
Primer name	Base sequence (5'-3')	Temperature/°C
RbcL1-F	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	60.4
RbcL1-R	TTTCTTCGCATGTACCCGC	57.6
RbcL2-F	CAGGTGAATCAAAGGGC	55.0
RbcL2-R	CTTTTAGTAAAAGATTGGGCCGAG	58.6

第一作者简介:熊勇(1977-),男,布依族,硕士,副教授,现主要从事生物化学等研究工作。E-mail:17639121@qq.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21262048);云南民族大学大学生创新训练计划资助项目(0205-02010008)。

收稿日期:2014-11-10

1.2 试验方法

1.2.1 雏菊总 DNA 提取及检测 用加以改良 SDS 法提取雏菊总 DNA^[10], 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量及纯度。

1.2.2 雏菊 *rbcL* 基因 PCR 扩增 PCR 反应体系如下: PCR Master Mix 25 μ L, 正反引物各 2 μ L, ddH₂O 16 μ L, DNA 模板 5 μ L (1 ng/ μ L); PCR 反应条件设置如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环, 72℃ 再延伸 10 min, 最后 4℃ 保存。反应结束后, 各取产物 6 μ L 于 1.5% 胶进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物回收、克隆及测序 用北京北泰克生物技术有限公司多功能 DNA 纯化回收试剂盒(离心柱型)对 PCR 扩增产物进行胶回收纯化, 用上海生工 T-载体 PCR 产物克隆试剂盒(SK2213)进行克隆, 提取质粒, 再用 M13 通用引物对质粒进行 PCR 扩增鉴定, 送到北京梓熙生物科技有限公司进行测序。

1.3 数据分析

1.3.1 测序结果处理 用生物软件 DNAMAN^[11] 对正、反向测序的结果进行拼接, 把获得的 *rbcL* 基因完整序列上传到 NCBI 进行 blast, 进行同源性比较, 获得 PCR 扩增雏菊 *rbcL* 基因的准确性。

1.3.2 生物信息学研究 根据雏菊的 *rbcL* 核苷酸序列, 用 MEGA6.0 中的 Kimura-2-parameter (K-2-P) 模型计算遗传距离, 构建距离矩阵。以百合属华丽百合 (*Lilium superbum*) 为外群, 用邻接 (neighbor-joining Method, N-J)^[12] 法构建系统发育树。通过软件 Antherpot program 和 DNASTar 来分析 *rbcL* 蛋白质的二级结构, 并通过对在线软件 SWISS-MODEL^[13-14] 对其蛋白质的三级结构进行预测, 然后在线 (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>) 对预测出的三级结构进行评估。

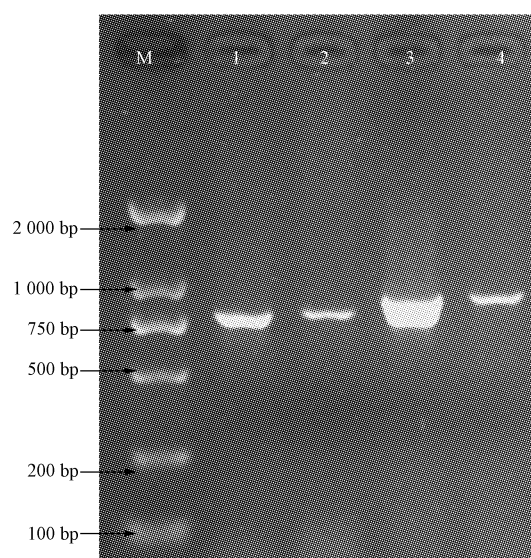
1.3.3 适应性进化分析 其它菊科 *rbcL* 基因序列均从 GenBank 下载, 运用 Mega 对所获得的序列进行处理, 排除不可靠及无完整 Rubisco 催化活性区的序列, 最后得到 22 种以及百合为外群 *rbcL* 基因的 Rubisco 催化活性区序列, 构建系统进化树, 基于 ML 进化树, 以 PAML 4.2 中的 codeml 程序^[15] 检测 *rbcL* 氨基酸的正选择位点, 进行适应性进化分析。

2 结果与分析

2.1 雏菊 *rbcL* 基因 PCR 扩增及质粒 M13 引物 PCR 检测电泳图

由图 1 可知, 扩增出的条带清晰没有杂带, 大小为 750~1 000 bp。

从图 2 可以看出, 空载质粒(对照组)PCR 产物大小为 200 bp, 而重组子 PCR 产物大小为 1 000~1 500 bp, 说明连接和转化成功, 可以进行测序。

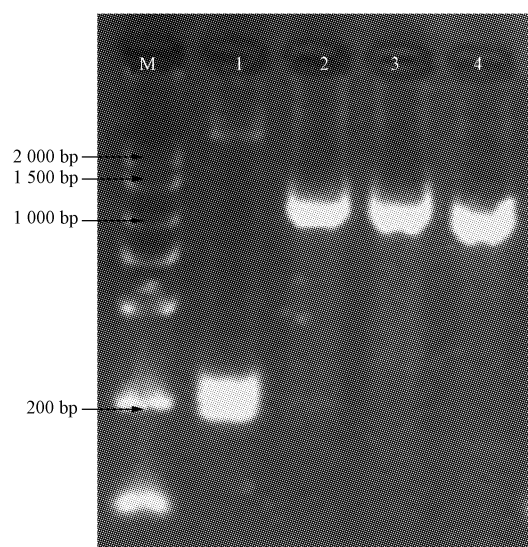


注: M 为 marker, 1、2 为引物 1 (rbcL1-F, rbcL911-R) 扩增出的产物; 3、4 为引物 2 (rbcL876-F, rbcL2-R) 扩增出的产物。

Note: M-DNA mark DL 2 000, 1-4 PCR amplification *rbcL* gene.

图 1 雏菊 *rbcL* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 1 The gel electrophoresis of PCR amplification *rbcL* gene from *Bellis perennis*



注: M 为 marker, 1 对照质粒 PCR 扩增出的结果; 2~4 为重组子 M13 引物 PCR 扩增结果。

Note: M-DNA mark DL 2 000+1 500, 1 CK plasmid PCR amplification, 2-4 recombinant plasmid PCR amplification.

图 2 质粒 M13 通用引物鉴定凝胶电泳图

Fig. 2 The gel electrophoresis of recombinant plasmid M13 PCR amplification

2.2 雏菊 *rbcL* 基因全长序列获得

用生物软件 DNAMAN 对正、反向测序的结果进行拼接, 得到雏菊 *rbcL* 完整基因序列, 共有 1 458 个碱基组成 (图 3) (包含启动子和终止子), 编码 485 氨基酸 (图 4)。

```

1~50  ATGTC  ACCCC  AAACA  GAGAC  TAAAG  CAAGT  GTTGG  ATTCA  AAGCT  GGGGT
51~100 TAAAG  ATTAT  AAATT  GACTT  ATTAT  ACTCC  TGAGT  ATGAA  ACCAA  GGATA
101~150 CTGAT  ATCTT  GGCAG  CATTT  CGAGT  AACTC  CTCAA  CCTGG  AGTTC  CGCCT
151~200 GAAGA  AGCAG  GGGCC  GCAGT  AGCTG  CCGAA  TCTTC  TACTG  GTACA  TGGAC
201~250 AACTG  TGTGG  ACCGA  TGGAC  TTACG  AGCCT  TGATC  GTTAC  AAAGG  GCGAT
251~300 GCTAT  GGAAT  TGAGC  CTGTT  CTTGG  AGAAG  AGAAT  CAATA  TATTT  GCTAT
301~350 GTAGC  TTACC  CATT  GACCT  TTTTG  AAGAA  GGTTT  TGTTA  CTAAC  ATGTT
351~400 TACTT  CCATT  GTAGG  TAACG  TATTT  GGTTT  CAAAG  CCCTG  CGTGC  TCTAC
401~450 GTCTG  GAAGA  TTTGC  GAATT  CCTAC  TGGCT  ATGTT  AAAAC  TTTCC  AAGGT
451~500 CCGCC  TCACG  GTATC  CAAGT  TGAAA  GAGAT  AAATT  GAACA  AGTAT  GGTCG
501~550 TCCTC  TGTTC  GGATG  TACTA  TTTAA  CCTAA  ATTGG  GGTTA  TCCGC  TAAAA
551~600 ACTAC  GGTAG  AGCTG  TTTAT  GAATG  TCTTC  GTGGT  GGCCT  TGATT  TTACT
601~650 AAAGA  TGATG  AGAAC  GTGAA  CTCCC  AATCA  TTTAT  GCGTT  GGAGA  GACCG
651~700 TTTCT  TATTT  TGTGC  CGAAG  CTATT  TTTAA  ATCAC  AAGCT  GAAAC  AGGTG
701~750 AAATC  AAAGG  GGCAT  ACTTG  AATGC  TACTG  CCGGT  ACATG  CGAAG  ACATG
751~800 ATGAA  AAGGG  CTGTA  TTTGC  CAGAG  AATTG  GGAGT  TCCTA  TCGTA  ATGCA
801~850 TGACT  ACCTA  ACAGG  GGGAT  TCACT  GCAAA  TACTA  CCTTG  GCTCA  TTATT
851~900 GCCGA  GATAA  TGGCT  TACTT  CTTCA  CATCC  ACCGC  GCAAT  CATG  CAGTT
901~950 ATTGA  TAGAC  AGAAG  AATCA  TGGTA  TGCAC  TTCCG  TGTAC  TAGCT  AAAGC
951~1 000 GTTAC  GTATG  TCTGG  TGGAG  ATCAT  ATCCA  TGCCG  GTACC  GTAGT  AGGTA
1 001~1 050 AACTT  GAAGG  GGAAG  GAGAG  ATCAC  TTTGG  GCTTT  GTTGA  TTTAT  TACGT
1 051~1 100 GATGA  TTTTA  TTGAA  AAAGA  TAGAA  GTCGC  GGTAT  TTATT  TCACC  CAAGA
1 101~1 150 TTGGG  TGTCT  CTACC  GGGTG  TTCTG  CCGGT  AGCTT  CGGGC  GGTAT  TCACG
1 151~1 200 TTTGG  CATAT  GCCTG  CTCTG  ACCGA  GATCT  TTGGA  GATGA  TTCCG  TACTA
1 201~1 250 CAGTT  CGGTG  GCGGA  ACTTT  AGGCC  ACCCT  TGGGG  AAATG  CACCT  GGTGC
1 251~1 300 CGTAG  CTAAC  CGAGT  AGCTC  TAGAA  GCATG  TGTAC  AAGCT  CGTAA  TGAGG
1 301~1 350 GACGC  GATCT  TGCTA  CCGAG  GGTAA  TGAAA  TTATC  CGCGA  AGCTA  CCAAA
1 351~1 400 TGGAG  TCCTG  AACTA  GCTGC  TGCTT  GTGAA  GTATG  GAAGG  AGATC  AAATT
1 401~1 450 TGAAT  TCCAG  GCAAT  GGATA  CTTTG  GATGA  CGATA  AAGAT  AAGGA  TAAAA
1 451~1 458 AGAGA  TAA

```

图3 雏菊的 *rbcL* 基因序列(ATG 启动子,TAA 终止子)Fig. 3 The sequence of *Bellis perennis rbcL* gene(Underlined words are ATG promoter and TAA terminator)

```

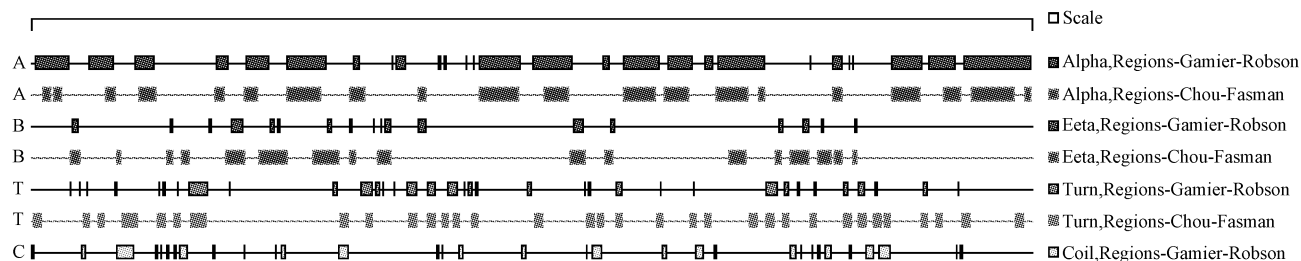
1~50  MSPQTETKAS  VGFKAGVKDY  KLYYTPEYE  TKDITLAAF  RVTQPQGVPP
51~100 EEAGAAVAE  SSTGTWTVW  TDGLTSLDRY  KGRCYGIEPV  LGEENQYICY
101~150 VAYPLDLFEE  GSVTNMFTSI  VGNVFGFKAL  RALRLDLRI  PTAYVKTFQG
151~200 PPHGIQVERD  KLNKYGRPLL  GCTIKPKLGL  SAKNYGRAVY  ECLRGGLDFT
201~250 KDDENVNSQP  FMRWRDRFLF  CAEAIKFSQA  ETGEIKGHYL  NATAGTCEDM
251~300 MKRAVFAREL  GVPVIMHIDYL  TGGFTANTTL  AHYCRDNGLL  LHIHRAMHAV
301~350 IDRQKNHGMH  FRVLAKALRM  SGGDHIHAGT  VVGKLEGERE  ITLGFVDLLR
351~400 DDFIEKDRSR  GIYFTQDWVS  LPGVLPVASG  GIHVHWPAL  TEIFGDSDSVL
401~450 QFGGTLGHP  WGNAPGAVAN  RVALEACVQA  RNEGRDLATE  GNEIIREATK
451~485 WSPELAAACE  VWKEIKFEFQ  AMDLDDDDK  KDKKR*

```

图4 雏菊的 *rbcL* 基因氨基酸序列Fig. 4 Amino acid sequence of *Bellis perennis rbcL* gene2.3 雏菊 *rbcL* 蛋白质结构分析

2.3.1 *rbcL* 蛋白质的二级结构预测 用 DNASTar Lasergene 7.1 软件包中的 protean 对雏菊 *rbcL* 蛋白进行二级结构预测,从图 5 可以看出,不同方法预测二级结构有一定差异,各成分出现位置也有所不同。Chou-Fas-

man 法所分析的 *rbcL* 蛋白片段有 20 个 α 螺旋、17 个 β 折叠、33 个转角以及一些无规则卷曲。20 个 α 螺旋分别位于 3~20、29~41、51~61 等 20 个区域,17 个 β 折叠出现在 20~24、42~45、66~70 等区域,33 个转角在 2~5、26~30、33~36 等区域。

图5 雏菊 *rbcL* 蛋白质二级结构预测Fig. 5 The secondary structure prediction of *Bellis perennis rbcL* protein

2.3.2 雏菊 rbcL 蛋白质三级结构构建 通过在线软件 SWISS-Model (<http://swissmodel.expasy.org/repository/>) 对雏菊的 rbcL 蛋白三级结构进行建模,获得 3 个合适模板,其中以豌豆 Rubisco 三维结构(PDB ID:4mkv. 1. A)得分最高,二者序列一致性为 91.8%,序列相似性(Seq Identity)95.85%,符合同源建模的可靠性要求,如图 6 所示。对获得的三级结构用 RasTop 软件显示,如图 7 所示,红色为 α 螺旋,黄色为 β 折叠片,Rubisco 大亚基的 C 基末端有一个 α/β 桶状结构域,其活性中心由一个大亚基的 α/β 桶状结构域同另一个大亚基的氨基末端结构域组成。

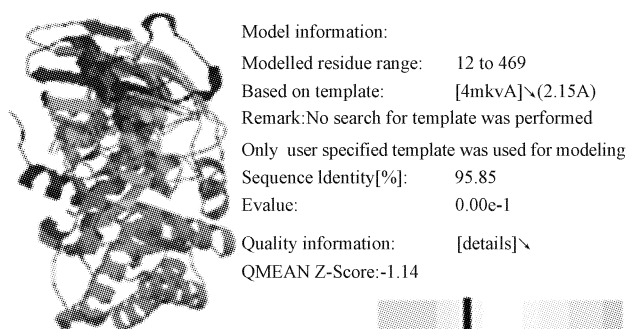


图 6 SWISS MODEL 构建 rbcL 蛋白三级结构

Fig. 6 3D structure of *Bellis perennis* rbcL protein predicted using SWISS MODEL



图 7 蛋白质的三级空间结构

Fig. 7 The tertiary structure of rbcL protein

2.3.3 雏菊 rbcL 蛋白质三级结构模型质量评估 对得到的三维结构模型用 Profiles-3D 进行氨基酸残基兼容

性考察。从图 8 可以看出,雏菊的 rbcL 三维构象中绝大部分氨基酸残基得分为正值,位于合理范围。为了确保 rbcL 蛋白质三级结构的质量,选择 Ramachandran Plot 进行评价,从图 9 可知,大多数氨基酸残基都在一个合理的范围内,458 个氨基酸残基中有 336 个位于 A、B、L 区域,占 89.4%,a、b、l、p 允许区域分布了 36 个,占 9.2%,可以接受为 2 个,非应许区域为 2 (VAL 331、GLU 94),因而有超过 90%的残基均在允许范围内。

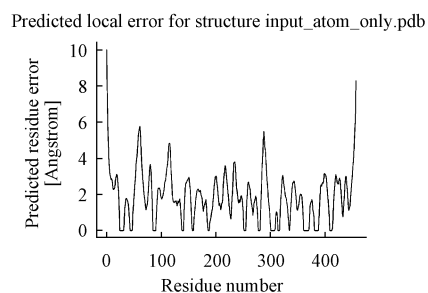


图 8 氨基酸残基 Profiles-3D 评估

Fig. 8 Profiles-3D assessment of amino acid residue

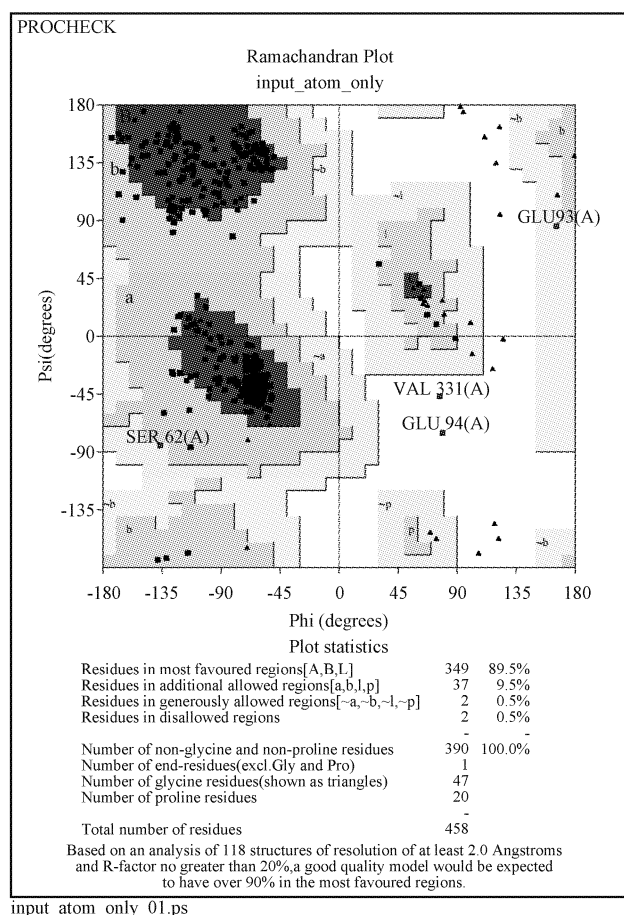


图 9 雏菊 rbcL 蛋白三级模型的拉式构象图

Fig. 9 The 3D structure Ramachandran plot assessment of rbcL protein

2.4 雏菊 *rbcL* 蛋白的氨基酸同源性分析及进化树的构建

将雏菊 *rbcL* 蛋白的氨基酸进行一致性分析,由表 2 可知,一致性均在 98%以上,其中与菊科菊花(*Chrysanthemum*×*mori folium*)最高达到 100%。据此可以确定所扩增的产物为雏菊 *rbcL* 基因,同时说明在某些物种中,Rubisco 酶大亚基要实现其功能,在核苷酸和氨基酸水平上具有相当的保守性。

表 2 *rbcL* 蛋白的氨基酸一致性情况

Table 2 Identities of the amino acid sequences of *rbcL* protein

种名 Species	一致性 Identities/ %	GeneBank 登陆号 Accession
<i>Chrysanthemum</i> × <i>mori folium</i>	100	YP_007353774. 1
<i>Chrysanthemum indicum</i>	99	YP_007474737. 1
<i>Leucanthemum maximum</i>	99	AAA84129. 1
<i>Artemisia frigida</i>	99	YP_007624803. 1
<i>Erigeron tenuis</i>	99	ACB29062. 1
<i>Oncosiphon grandiflorum</i>	98	ACB29091. 1

以雏菊的 *rbcL* 基因序列为探针,在 NCBI 上进行 blast,获得同源性较高的 22 条序列,然后用 Mega 6 进行处理,对 22 条序列的两端对齐切平长度为 1 455 bp(去除终止子),共有 485 个密码子。以百合科 *Lilium superbun* 作为外群,用 Mega 6 构建系统进化树。从图 10 系统进化树可以看出,该系统进化树以菊科黄菊属 *Felicia* 8 个种为基础,雏菊 *Bellis pernmis* 与菊属 *Chrysanthemum* × *mori folium*、*Chrysanthemum indicum* 等聚为一支,而与百合科 *Lilium superbun* 聚类较远。

2.5 适应性进化分析

雏菊植物主要分布北半球,很多地区作为观赏植物进行栽培,生境适应性强。以密码子为单位,用 Mega 进行序列对位排列,用 clustalx 和 DNMBE 程序对数据进行处理。采用位点间可变比值(ω)模型检验是否存在经

受正选择($\omega>1$) 的位点,位点模型假定不同位点有不同的选择压力,而在系统树的不同分支上并无差异,基于进化 ML 树,以 PAML 4.2 中的 codeml 程序检测 *rbcL* 基因的适应性进化,并进行显著性检验。

该研究比较了 3 对模型,即 M1(近中性)和 M2(选择)、M0(单比率)和 M3(离散)以及 M7(beta)和 M8(beta 和 ω),检测是否存在正选择。在 95%水平上,模型 M2;Selection 和 M8;beta & w 共鉴定出 3 个氨基酸位点(94 E,149 Q,309 M)受到正选择。由表 3 可知,结果支持检验各模型参数估计值和对数似然值,正选择位点的检测是正确的。

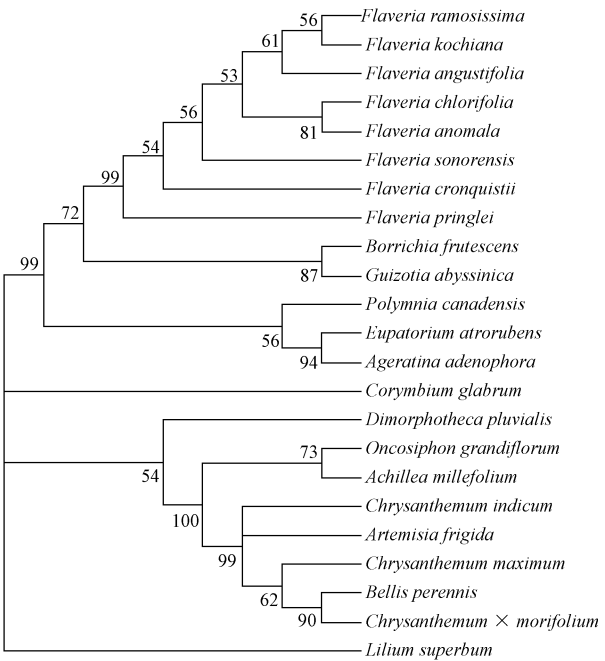


图 10 基于 *rbcL* 基因系统进化树

Fig. 10 Phylogenetic tree of *rbcL* genes

表 3 雏菊 *rbcL* 基因正选择位点参数计算

Table 3 Parameter for positively selective postions of the *rbcL* gene calculated in *Bellis perennis*

模型 Model	参数数目 n_p	似然值 $\ln LRT$	评估参数 Estimated parameters	正选择位点 Positively selective selected site(BEB)
M0;one-ratio	47	-3 091. 53205	$\omega=0. 15639$	None
M1;Neutral	48	-3 036. 67631	$p_0=0. 88054; p_1=0. 10975$	Not allowed
M2;Selection	50	-3 027. 87804	$p_0=0. 88014; p_1=0. 10785; p_2=0. 01201; \omega=6. 40079$	94 E* ,149 Q* *, 309 M*
M3;discrete	51	-3 030. 37932	$p_0=0. 92627; p_1=0. 00004; p_2=0. 07369; \omega=. 38905$	Not allowed
M7;beta	48	-3 037. 18019	$p=0. 00506; q=0. 04846;$	Not allowed
	50	-3 027. 96391	$p_0=0. 98681; p_1=0. 01319; p=0. 00500; q=0. 04828; \omega=5. 99268$	94E* *, 149Q* *, 309 M* *

注: * 表示 95%后验概率下推测出的正选择位点, ** 表示 99%后验概率下推测出的正选择位点。

Note: The positively selected sites were in * and ** under 95% and 99% posterior probability values, respectively.

表 4 似然比值检验统计量

Table 4 Likelihood ratio statistics

模型比较 Comparison of models	$2\Delta\ell$	自由度 df Degree of freedom	$\chi^2_{1\%}$
M0 vs. M3	121. 30**	4	13. 28
M1a vs. M2a	17. 60**	2	9. 21
M7 vs. M8	19. 84**	2	9. 21

2.6 氨基酸正选择空间位点的空间位置

正选择氨基酸位点空间位置用 RasTOP 软件显示,如图 11 所示,由菊科 *rbcL* 基因通过软件推出的氨基酸序列一共鉴定出 3 个正选择位点,3 个位点核酮糖大亚基 α/β 桶装结构活性区域上^[16],94 E 和 149 Q 位于 C 端活性区域的转角上,309 M 位于 β 折叠上。

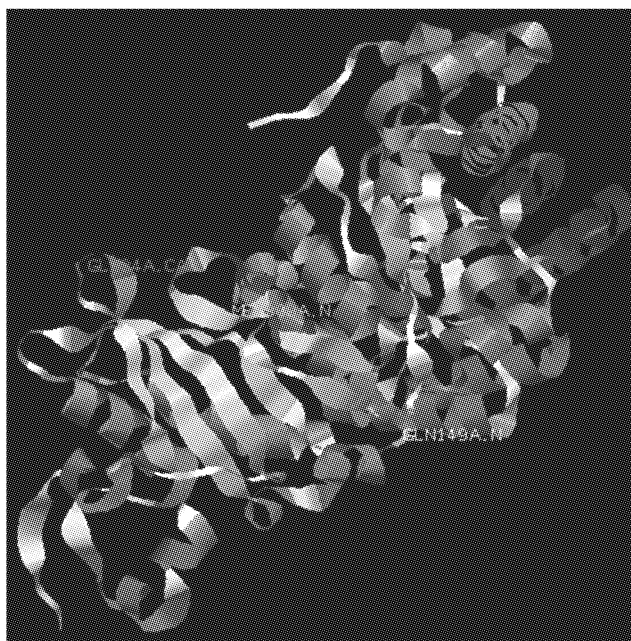


图 11 雏菊 Rubisco 大亚基正选择位点的空间位置

Fig. 11 Spatial locations of the positively selected sites in the *rbcL* subunit of *Bellis perennis*

3 讨论

通过对雏菊 *rbcL* 基因进行 PCR 扩增,首次获得的雏菊 *rbcL* 基因的完整序列,编码区全长 1 458 bp,共编码 485 个氨基酸,与 NCBI GenBank 中的菊科 *Chrysanthemum × morifolium*、*Erigeron tenuis* 等植物相比较,核苷酸和氨基酸序列的同源性均超过了 96%,该试验获得的雏菊序列为 *rbcL* 基因,为研究雏菊该基因的功能提供一定基因材料。

对 *rbcL* 蛋白高级结构进行分析和构建,该基因编码的蛋白质的二级结构主要以 α -螺旋结构、 β 折叠和转角为主,其数量和特征与三级构架的 3D 结构相似。该雏菊 *rbcL* 三维构象中绝大部分氨基酸残基得分为正值,位于合理范围。用 Ramachandran Plot 进行评估,共有 458 个氨基酸残基,所有残基的能力均大于 0,表现积极活跃。从坐落位置所处范围来看,只有 2 个残基在膜外(图 9),总体有超过了 90% 的残基都处在最佳范围或允许范围。

基于 *rbcL* 序列用 PAML 中的 codeml 程序检测氨基酸正选择位点,探究菊科适应性进化,通过氨基酸非同义替换率(dN)和同义替换率(dS)的比值,用 site model 计算氨基酸正选择位点,非同义替换率比同义替换率统计上显著偏高,能被当作蛋白质发生适应性进化的证据。通过计算选择模型 M2 和模型 M8 都有 3 个正选择位点(94 E,149 Q,309 M),虽然 309 M 位点分别与 94 E 和 149 Q 三个选择位点在序列上距离较远,但在空

间结构上却相距较近,309M 含有一硫原子,能够与附近位点形成二硫键,通过范德华力维持 Rubisco 酶催化核心的结构稳定,可能对维持 Rubisco 的稳定性和动力学特性具有重要意义^[17-18]。

参考文献

- [1] 吴征镒,陈书坤. 云南植物志[M]. 北京:科学出版社,2004.
- [2] Spreitzer R J, Saluvcci M E. Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme [J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53: 449-475.
- [3] Loewen P C, Didychuk A L, Switala L, et al. Structure of *Pisum sativum* Rubisco with bound ribulose 1,5-bisphosphate[J]. Acta Cryst, 2013, 69: 10-14.
- [4] Sen L, Mario A F, Liang B, et al. Molecular evolution of *rbcL* in three gymnosperm families: identifying adaptive and coevolutionary patterns [J]. Biology Direct, 2011, 6: 1-29.
- [5] Silvertown J, McConway K, Gowing D, et al. Absence of phylogenetic signal in the niche structure of meadow plant communities[J]. Proceedings: Biological Sciences, 2005, 273(1582): 39-44.
- [6] Schaefer H, Hardy O J, Silva L, et al. Testing Darwin's naturalization hypothesis in the Azores[J]. Ecol Lett, 2011, 14(4): 389-396.
- [7] 熊勇,赵春艳,高兴艳,等. 药用植物灯盏花 *rbcL* 基因的克隆、生物信息学及适应性进化分析(英文)[J]. 生物技术, 2014, 24(3): 25-31.
- [8] Saslis-Lagoudakis C H, Savolainen V, Williamson E M. Phylogenies reveal predictive power of traditional medicine in bioprospecting[J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A, 2012, 109: 15835-15840.
- [9] Panero J L, Funk V A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed [J]. Mol Phylogenet Evol, 2008, 47: 757-782.
- [10] 魏群,向本琼,崔丽华,等. 分子生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,2007.
- [11] 李军,张莉娜,温珍昌. 生物软件选择与使用指南[M]. 北京:化学工业出版社,2008.
- [12] Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. Molecular Biology Evolution, 1987, 4: 406-425.
- [13] Schwede T, Kopp J, Guex N, et al. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31: 3381-3385.
- [14] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling[J]. Bioinformatics, 2006, 22: 195-201.
- [15] Yang Z. PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood [J]. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1586-1591.
- [16] Knight S, Andersson I, Brndén C I. Crystallographic analysis of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution Subunit interactions and active site[J]. J Mol Biol, 1990, 215: 113-160.
- [17] Sage R F. Variation in the *kcat* of rubisco in C3 and C4 plants and some implications for photosynthetic performance at high and low temperature[J]. J Exp Bot, 2002, 53: 609-620.
- [18] Galmés J, Flexas J, Keys A J, et al. Rubisco specificity factor tends to be larger in plant species from drier habitats and in species with persistent leaves [J]. Plant Cell Environ, 2005, 28: 571-579.

早花忍冬离体快繁技术

王 欢^{1,2}, 姜 哲¹, 许士钊¹, 刘 洋¹, 苑 禹¹

(1. 北华大学 林学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林省林业与生态环境重点实验室, 吉林 吉林 132013)

摘 要:以东北地区早春植物早花忍冬的幼嫩茎段为外植体, MS培养基为基本培养基, 添加不同的植物生长调节物质, 进行了离体快速繁殖技术研究。结果表明: 采用 2.0% NaClO 处理 20 min 的灭菌效果好; 诱导早花忍冬侧芽分化的适宜培养基为 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3.0% 蔗糖+0.7% 琼脂; 增殖培养基为 MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+3.0% 蔗糖+0.7% 琼脂, 30 d 的增殖系数为 8; 最佳的生根培养基为 1/2MS+0.3 mg/L IBA+0.3 mg/L NAA+1.5% 蔗糖+0.7% 琼脂, 生根率达 100%。

关键词:早花忍冬; 组织培养; 早春植物

中图分类号:S 793.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)04-0095-04

早花忍冬 (*Lonicera praeflorens* Batalin) 属忍冬科 (Caprifoliaceae) 忍冬属落叶灌木, 主要分布于我国东北三省的东南部, 俄罗斯 (远东地区)、朝鲜、日本也有分布^[1]。该树种枝叶茂盛, 开花早, 果实成熟早, 绿叶衬托着红果, 甚是美观。能弥补东北地区早春时节的萧条景象, 延长城市的绿化时间, 丰富早春时节绿化景观, 是一

种具有开发价值的优良绿化树种。

目前, 关于早花忍冬的研究尚少见报道。翟富^[2]采用正交设计实验研究了 ABT 浓度、处理时间及扦插基质对早花忍冬嫩枝扦插的影响。贺勇等^[3]的研究表明早花忍冬具有很强的滞尘和杀菌能力, 在所研究的 20 种乡土树种中早花忍冬的杀菌能力最强, 除菌率 83.07%。现已研究多数忍冬属植物具有清热解毒、保肝利胆、抗氧化、提高免疫力等功效。其花蕾和果实中还含有人体必需的微量元素、氨基酸和其它一些营养成分, 具有营养保健价值^[4]。早花忍冬的化学成分及药理药效作用有待进一步分析, 可以考虑作为金银花的代用

第一作者简介:王欢(1978-), 女, 硕士, 副教授, 现主要从事珍稀植物保育生物学等研究工作。E-mail: magnolia2009@126.com.

基金项目:吉林省教育厅“十二五”科技资助项目(20140172)。

收稿日期:2014-11-06

Molecular Cloning, Bioinformatics Analysis of *rbcl* Gene in *Bellis perennis*

XIONG Yong¹, ZHAO Chun-yan², YANG Qing-song¹, ZHANG Wei-han¹

(1. Key Laboratory of Ethnic Medicine Resource Chemistry, State Ethnic Affairs Commission and Ministry of Education, Yunnan University of Nationalities, Kunming, Yunnan 650500; 2. Kunming Edible Fungi Institute of All China Federation of Supply and Marketing Cooperatives, Kunming, Yunnan 650221)

Abstract: Taking *Bellis perennis* as experimental materials. *Bellis perennis rbcl* gene was amplified using PCR method and sequenced. Biological softwares DNASTAR, PAML was used to bioinformatic and adaptive evolutionary analysis for this gene. The results showed that the full length of cDNA of *Bellis perennis rbcl* gene was 1 458 bp, it encoded 485 amino acids. Compared to the sequences of this gene in other compositae plants, homology of their nucleotide and amino acid sequences were over 96%. The secondary structure of *Rbcl* protein had 20 α -helices, 17 β -sheets, 33 turns and some coils structures. The adaptive evolutionary analysis using variable ω ratio sites method indicated that 3 amino acid residues (94 E, 149 Q and 309 M) were positively selected. The isolation of *rbcl* gene will facilitate the further research in *Bellis perennis* adapting to particular environment. The spatial locations of the positively selected sites in *rbcl* subunit played an important role to maintain function of Rubisco.

Keywords: *Bellis perennis*; *rbcl* gene; protein structure prediction; adaptive evolution