

# 玉兰酸性转化酶基因的克隆与序列分析

曹春燕, 朱广慧, 黄蕊

(苏州农业职业技术学院 园艺科技学院, 江苏 苏州 215008)

**摘 要:**以玉兰花瓣 RNA 为模板, 根据 GenBank 中其它植物转化酶基因的保守序列设计了 1 对 PCR 扩增引物, 进行玉兰酸性转化酶基因克隆, 并对其序列分析和氨基酸序列同源性比对。结果表明: 该试验克隆获得 1 条约为 500 bp 的条带; 经过序列分析, 其长为 515 bp, 属于开放阅读框的一部分, 不含内含子, 共编码 171 个氨基酸; 该序列及其所编码的氨基酸与其它植物转化酶基因均具有较高的同源性; 进化分析显示该基因属于酸性转化酶一类, 定位于液泡中。

**关键词:**玉兰; 转化酶; 克隆; 序列分析

**中图分类号:**S 685.15 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)21-0120-03

花色素苷是植物叶片、果皮、花瓣及其它器官在自然界的主要色彩表达物质, 其合成除了受温度、光照、激素、pH 等因素的影响外, 在很大程度上还受糖的影响<sup>[1-2]</sup>。研究表明, 糖可以显著影响植物花色素苷的积累, 并且其种类对花色素苷积累影响不一, 尤以蔗糖、果糖和葡萄糖最为有效<sup>[3-5]</sup>。转化酶(EC3.2.1.26)又称蔗糖酶, 可将蔗糖不可逆地转化为葡萄糖和果糖<sup>[6]</sup>。它通常被分为酸性和中性/碱性两大类, 前者存在于细胞壁(不溶性)和液泡中(可溶性), 后者存在于细胞质中<sup>[7]</sup>。除了在蔗糖代谢中起着重要作用外, 转化酶在物质代谢、同化物分配、渗透调节、响应机械伤害及植物信号转导等方面也具有重要的功能<sup>[8]</sup>, 但在花色的相关性研究方面尚鲜见报道。该研究以二乔玉兰‘红运玉兰’为试材, 克隆了转化酶基因的部分片段, 并进行了序列分析, 以期获得该基因全长序列并利用其构建过表达和 RNA 干扰载体与花色关系奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试二乔玉兰品种‘红运玉兰’于 2011 年盛花期采自苏州农业职业技术学院校园内。将花瓣置于液氮速冻后保存于-80℃冰箱中备用。试验中所用的分子生物学药品购自 TaKaRa 公司, 其它生化试剂和常规试剂均购于国药集团化学试剂有限公司。引物和 cDNA 序

列由上海生工生物工程技术有限公司合成及测定。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取与纯化 花瓣总 RNA 的提取参照徐昌杰等<sup>[9]</sup>的 CTAB 法, 并稍加改良。总 RNA 的纯化采用 DNaseI 试剂盒, 具体操作参照其说明书进行。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 根据 GenBank 中其它植物转化酶基因序列设计 1 对引物用于 PCR 扩增。前引: 5'-TACCATCTATTCTACCAGTACAA-3'; 后引: 5'-AAAAAATCAGGACACTCCCACAT-3'。其扩增反应为 94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, 52℃退火 1 min, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环; 最后 72℃延伸 10 min。

1.2.3 PCR 扩增产物的克隆和鉴定 目的片段回收参照 TaKaRa 公司的 DNA 凝胶回收试剂盒说明书进行, 再将其连接到 pMD18-T 的克隆载体上, 转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 提取质粒 DNA 后采用 BamHI 和 HindIII 进行双酶切鉴定, 最后选取阳性克隆用于测序。

1.2.4 序列分析 利用生物学软件 DNAMAN 5.0 对核苷酸及其所编码的氨基酸序列进行分析; 核苷酸及氨基酸序列的同源性比对在互联网上的线工具 NCBI Blast 上完成; 利用 DNAMAN 5.0 构建转化酶基因的系统进化树。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉兰酸性转化酶基因 RT-PCR 扩增结果

采用 CTAB 法提取‘红运玉兰’花瓣的总 RNA, 反转录为 cDNA, 并以此为模板采用 PCR 技术扩增目的片段。由图 1 可知, 扩增获得 1 条特异性条带, 其大小约为 500 bp。将胶回收产物与载体 pMD18-T 连接, 经转化到 DH5α 感受态细胞后摇菌, 再提取质粒进行双酶切鉴定。图 2 表明, 载体插入目的片段大小约为 500 bp, 与扩增结果一致, 说明目的片段克隆成功。

**第一作者简介:**曹春燕(1983-), 女, 江苏苏州人, 硕士, 助教, 研究方向为观赏植物栽培生理及分子生物学。E-mail: chunyancao0410@163.com。

**基金项目:**江苏省“十一五”农业科技攻关资助项目(BE2007309); 江苏省农业三项工程资助项目(SX(2008)043)。

**收稿日期:**2013-06-19

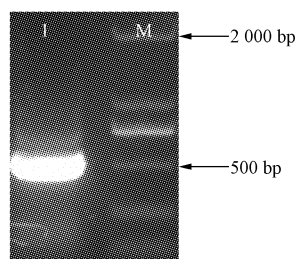


图1 玉兰酸性转化酶基因的 RT-PCR 产物电泳图谱

注:M;DL 2 000;L:RT-PCR 扩增产物。

Fig. 1 Electrophotogram of RT-PCR products of acid invertase gene in *Magnolia*

Note:M;DL 2 000;L:Amplification products by RT-PCR.

## 2.2 序列分析与同源性比对

由图3可知,经序列分析,该cDNA片段长515 bp,属于开放阅读框的一部分,不含内含子,共编码171个氨基酸。核苷酸序列的同源性搜索表明,该cDNA片段与其它物种转化酶基因具有较高的同源性,如与玉米(HQ263133)、甘薯(AY037938)、梨(AB239590)、脐橙

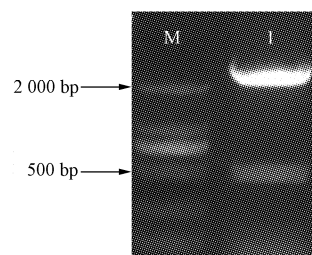


图2 玉兰酸性转化酶基因 cDNA 片段的酶切鉴定

注:M;DL 2 000;L:RT-PCR 扩增片段。

Fig. 2 Identification of *Magnolia* acid invertase gene cDNA fragment by restriction digest

Note:M;DL 2 000;L:Amplification fragment by RT-PCR.

(AF433643)、高粱(AJ006067)和甘蔗(AF062735)等植物的同源性均在70%以上。由图4可知,该序列所编码的氨基酸序列与梨(BAD91193)、葡萄(XP\_002272809)、甜瓜(ABX55832)、脐橙(AF433643)和马铃薯(ADM47340)等的同源性均达70%以上。由此可推测该片段是属于转化酶基因的一部分。

1	TACCATCTATTCTACCACTACAACCCGGACTCCGCCGTGTGGGGCAACATTACATGGGGC
1	Y H L F Y Q Y N P D S A V W G N I T W G
61	CATGCCGTCTCCCGCATCTCATTATTGGCTGCATCTCCCTTTGGCCATGGTCCCGAC
21	H A V S R D L I H W L H L P L A M V P D
121	CACTGGTACGACATGAACGGCGTCTGGACTGGGTCCGCCACATTCTCCACGACGGCTCA
41	H W Y D M N G V W T G S A T F L H D G S
181	ATTGTCATGCTCTACTGGATCTACCAACGAGAAGGCCAGGTCCAGAACCTGGCCTTC
61	I V M L Y T G S T N E K A Q V Q N L A F
241	CCCGCAGATCCCTCCGACCCGCTCCTCATCGATTGGATCAAAATATGATGGAATCCTGTC
81	P A D P S D P L L I D W I K Y D G N P V
301	TTGGTCCCACCCCTGGCATTGGTCTTAAGGATTCCGAGACCCGACTACGCATGGTAT
101	L V P P P G I G L K D F R D P T T A W Y
361	GTTGACGGTGCATGGCGGATCTCAATCGGGTCTAAGGTGAACAAACCGGTATTGCGCTT
121	V D G A W R I S I G S K V N K T G I A L
421	GTGTACGAGACGTCGGATTTCGGTCTACAAGCTGTTGGACGGTGCATGCATGCTGTG
141	V Y E T S D F R S Y K L L D G V M H A V
481	CCAGGCACGGGATGTGGGAGTGTCTGATTTT
161	P G T G M W E C P D F

图3 玉兰转化酶基因核酸序列及推断的氨基酸序列

注:推导氨基酸序列标示于相应核苷酸之下,其余为非编码区;\*表示终止密码子。

Fig. 3 cDNA sequence and the deduced amino acid sequence of acid invertase gene in *Magnolia*

Note:The deduced amino acid sequence is showed underneath the corresponding nucleotide sequence,others is un-coding region;stop code is indicated with \*.

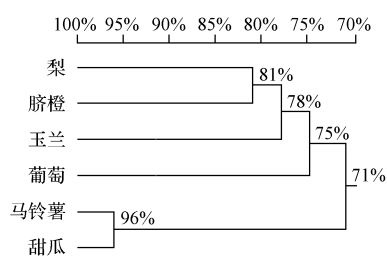


图4 玉兰与其它植物转化酶基因氨基酸序列同源性

Fig. 4 Homology tree of the acid invertase amino acid sequences of magnolia and other species

## 2.3 分子系统进化分析

应用 DNAMAN 5.0 等生物软件对玉兰、拟南芥(BAD44643)、水稻(AAV28816)、烟草(BAC21162)、番茄(CAA78062)、天竺葵(AAK83982)、桃(AAL16969)、玉米(AAF06993)、君子兰(AAN64291)和黑麦草(AAZ29515)等植物转化酶基因的氨基酸序列进行分子系统进化分析。从图5可以看出,这些植物分别聚为三大类,其中玉兰属于酸性转化酶中的液泡转化酶,它与酸性细胞壁转化酶关系较近,与中性/碱性转化酶的亲缘关系较远,可推出其定位于液泡中。

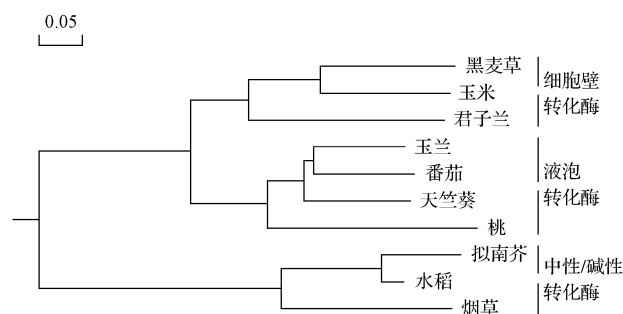


图5 玉兰转化酶基因氨基酸序列与其它植物的进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree of the acid invertase amino acid sequences of *Magnolia* and other species

### 3 讨论

在植物的蔗糖代谢过程中,转化酶起着至关重要的作用。Taliencio 等<sup>[10]</sup>研究表明,3 种类型的转化酶均包含多个家族成员,且具有表达特异性。如玉米存在 4 种细胞壁转化酶基因 *Incw1*、*Incw2*、*Incw3* 和 *Incw4* (GenBank Accession No. AF050129, AF050128, AF043346 和 AF043347),其中 *Incw1* 在悬浮培养的细胞、白化茎、根中高水平表达,而在发育的籽粒中低水平表达。相反 *Incw2* 在发育的籽粒中处于主导地位,不过也表达在白化茎中。因此,只有通过基因表达才能阐明每个成员的具体功能,而通过酶活性测定则无法判别其作用的内在本质<sup>[11]</sup>。

该研究从玉兰中获得一个转化酶基因的片段,序列分析表明其长 515 bp,属于开放阅读框的一部分,不含内

含子,共编码 171 个氨基酸。同源性与进化分析显示该序列及其编码的氨基酸与其它植物具有较高的同源性,且属于酸性液泡转化酶。该基因的获得,无论是对于进一步克隆全长序列,还是利用 RNA 干扰及过表达技术研究其与玉兰花色调控的相关性都具有极其重要的意义。

### 参考文献

- [1] 姜卫兵,徐莉莉,翁忙玲,等. 环境因子及外源化学物质对植物花色素苷的影响[J]. 生态环境学报,2009,18(4):1546-1552.
- [2] 程海燕,李德红. 光、糖与激素影响植物花色素苷合成与积累的研究进展(综述)[J]. 亚热带植物科学,2010,39(3):82-86.
- [3] 孟祥春,彭建宗,王小菁. 光和糖对非洲菊花色素苷积累及 CHS、DFR 基因表达的影响[J]. 园艺学报,2007,34(1):227-230.
- [4] 孟祥春,张玉进,王小菁. 非洲菊花序的离体培养及其舌状花花色素苷积累的调控[J]. 华南农业大学学报,2005,26(3):56-59.
- [5] 李倩,张立军,张旭,等. 糖对植物花色素苷合成和积累的调节[J]. 生命的化学,2009,29(2):218-222.
- [6] 郭文平,王帅军,祝建波,等. 棉花转化酶基因保守片段的克隆及其序列分析[J]. 石河子大学学报(自然科学版),2007,25(5):537-540.
- [7] Roitsch T, González M C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations[J]. Trends Plant Sci,2004(9):606-613.
- [8] 潘秋红,张大鹏. 植物酸性转化酶基因及其表达调控[J]. 植物学通报,2005,22(2):129-137.
- [9] 徐昌杰,陈昆松,张波,等. 柑橘组织 RNA 提取方法研究[J]. 果树学报,2004,21(2):136-140.
- [10] Taliencio E W, Kim J Y, Mahe A, et al. Isolation, characterization and expression analyses of two cell wall invertase genes in maize[J]. Journal of Plant Physiology,1999,155:197-204.
- [11] 安新民,张志毅,陶俊,等. 苹果液泡酸性转化酶基因片段的克隆及序列分析[J]. 细胞生物学杂志,2003,25(6):398-401.

## Gene Cloning and Sequence Analysis of Acid Invertase Gene in *Magnolia*

CAO Chun-yan, ZHU Guang-hui, HUANG Rui

(College of Horticulture and Technology, Soochow Polytechnic Institute of Agriculture, Soochow, Jiangsu 215008)

**Abstract:** Taking RNA extracted from the petals of *Magnolia* as template, a pair of PCR primers were designed according to conservative sequence of acid invertase genes in other plants reported in GenBank, and acid invertase gene in *Magnolia* was cloned and its sequence was analyzed. The results showed that a 500 bp fragment was amplified. Sequence analysis showed that the fragment was 515 bp and encoded 171 amino acids. Homology analysis showed that nucleotide and amino acids sequence all shared high similarities with invertase genes cloned from other plants. Phylogenetic analysis revealed that this gene belonged to a class of acid invertase and located in the vacuole.

**Key words:** *Magnolia*; invertase; cloning; sequence analysis