

板栗丙酮酸磷酸双激酶基因的克隆与序列分析

梁 雪,王 猛,石卓功*

(西南林业大学 林学院,云南 昆明 650024)

摘 要:为探索板栗 *PPDK* 基因功能以及花粉直感效应分子机理,以板栗果实为材料,根据已登录的拟南芥、桃树、巨桉等多种其他植物物种的 *PPDK* 基因序列的保守区,设计特异性引物。利用 RT-PCR 技术克隆出板栗 *PPDK* 基因的编码区,并进行序列分析。结果表明,该基因长为 3 293 bp,包含一个完整的 ORF,长 2 676 bp,编码 892 个氨基酸,分子量为 97.89 KDa。所编码的氨基酸序列与已知植物来源的若干 *PPDK* 基因相比,同源性大多在 85% 以上,证明所克隆的目的片段为 *PPDK* 基因,并将该序列登录到 GenBank,登录号为 KU234550。在 *PPDK* 基因所编码的氨基酸序列中发现了一个磷酸烯醇式丙酮酸利用酶磷酸化位点标记,一个拉链结构和多个磷酸化位点。同时推测出多肽链中有规则重复的构象,并同源建模 *PPDK* 蛋白整条肽链的三维空间结构。试验认为 *PPDK* 基因可能通过影响板栗光合作用进而使板栗在果实大小、淀粉含量等方面表现出明显的花粉直感效应。

关键词:板栗;*PPDK*;序列分析

中图分类号:S722.39 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2016)06-0104-06

Cloning and Sequence Analysis of *PPDK* Gene in *Castanea mollissima*

LIANG Xue, WANG Meng, SHI Zhuo-gong*

(Academy of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming, Yunnan 650024, China)

Abstract: Through the test, a reference was provided for the studies on the function of pyruvate phosphate dikinase gene and metaxenia effect in *Castanea mollissima*. Taking the fruit as materials, specific primers were designed on the basis of pyruvate phosphate dikinase (*PPDK*) gene from other plants in NCBI, *PPDK* gene was cloned and analyzed by RT-PCR techniques. A *PPDK* cDNA was cloned. The CDS length was 2676 bp, coding 892 amino acids, 97.8 KDa molecular weight. The sequence of *PPDK* had high similarity with other plants. GenBank accession number was KU234550. Besides, The *PPDK* contained some important motifs related with enzyme activities, such as Pyruvate phosphate dikinase, PEP/pyruvate binding domain, PEP-utilizing enzyme, mobile domain, a leucine zipper pattern and many phosphorylation sites. The secondary structure and tertiary structure were predicted. The studies suggested that chestnut showed obviously metaxenia effect on fruit size, starch content which may under the influence of *PPDK* on photosynthesis.

Key words: chestnut; *PPDK*; bioinformatics

板栗 (*Castanea mollissima*) 为壳斗科栗属植物,是一种经济价值极高的树种,也是我国特有的优良坚果类果树^[1]。板栗在我国的栽培历史悠久,栽

培面积广泛,达 22 个省(自治区、直辖市)以上,产量居世界第 1 位^[2]。但根据我国板栗生产现状来看,单位面积产量低仍是板栗生产的主要问题^[3]。

收稿日期:2016-03-09 修回日期:2016-05-12

基金项目:国家自然科学基金(30860231);云南省教育厅科学研究基金(2013y125)。

作者简介:梁 雪,女,在读硕士,研究方向:果树生殖生物学。E-mail:lx1239633936@163.com

* 通信作者:石卓功,男,博士,教授,研究方向:经济林培育。E-mail:zgongshi@sina.com

植物生长依赖阳光,但同样的光照条件下,不同作物的生长状况、产量情况却差异很大。其中,果树 90%~95% 的干物质积累量来源于植物的光合作用,果树对光的吸收和利用能力的大小决定了果树产量的高低,即光能利用率。按照这种能力的大小,植物被划分为 C₃ 植物、C₄ 植物和景天酸代谢植物(CAM)。板栗是光合能力较低的 C₃ 植物,叶片的光合速率(P_n)与其他 C₃ 植物相比较低,且存在着日变化和季节变化^[4-6]。C₄ 植物的高光合效率在于其能利用强光下产生的 ATP 促进磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)与 CO₂ 结合,而丙酮酸磷酸双激酶(pyruvate phosphate dikinase, PP-DK)作为 C₄ 途径中的关键酶,能催化 PEP 的生成,使反应得以循环不间断地持续进行。为使 C₃ 植物获得 C₄ 植物的这种高光效能力,许多研究学者尝试用 C₄ 植物的光合特质来改进并提高 C₃ 植物的光合效率^[7-8],从而增加农作物的产量。而 PPDK 作为 C₄ 植物光合作用关键酶之一,也逐步成为研究重点之一。

目前,人们对 PPDK 基因的研究主要集中在玉米,高粱等农作物上,对经济林树种光合功能基因的克隆的研究仍较少。本研究拟通过 RT-PCR 技术得到板栗 PPDK 基因序列,并进行生物信息学分析,从基因转录水平的角度探讨 PPDK 基因对板栗生长发育的调控机理,旨在为提高板栗产量改善板栗品质提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

板栗取自云南省永仁县。试验前期用北方板栗品种“燕龙”作为父本对进入结果盛期的母株“永丰 1 号”进行授粉并挂牌,采收当年所结板栗果实作为分子试验材料。

1.2 方法

1.2.1 采样 永丰 1 号♀×燕龙♂授粉组合杂交子代板栗球苞开裂后采收。采收到的板栗去球苞后立即放入液氮中冷冻处理,后带回实验室。

1.2.2 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

1.2.2.1 总 RNA 提取

1)RNA 提取方法:取 100 mg 板栗果实液氮中迅速研磨成粉末,后参照试剂盒说明书,利用 TIANGEN 公司的植物总 RNA 提取试剂盒 RNAprep Pure Plant Kit,在常温条件下提取板栗总 RNA。

2)总 RNA 完整性检测:取提取的总 RNA 3.0 μL,与 0.5 μL 6×Loading Buffer 混合后在 0.5% 的琼脂糖凝胶电泳上检测。电泳在 1×TAE 缓冲

液中进行,150 V 的恒压下电泳 15 min,然后在凝胶成像系统中观察所提取 RNA 的完整性并照相。

3)总 RNA 纯度检测:取提取的总 RNA 1.0 μL,用紫外分光光度计测量 260 nm 和 280 nm 处的吸光值并计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值。

4)总 RNA 浓度检测:取提取的总 RNA 1.0 μL,用紫外分光光度计测量 RNA 浓度。

1.2.2.2 cDNA 第一链的合成 采用 Prime-Script™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa 公司)试剂盒进行 cDNA 第一链的合成。整个试验过程在冰上进行,试验方法参照说明书。

1.2.3 基因克隆与序列分析 根据 NCBI 中已登录的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、桃树(*Amygdalus persica*)、巨桉(*Eucalyptus grandis*)等多种其他植物 PPDK 基因的保守序列,用引物设计软件 Primer Premier 5.0 设计 PCR 上游引物 S1、S5 和下游引物 A1、S3(表 1)以及测序引物 S5-A1-WIF 和 S5-A1-WIR;以 cDNA 为模板克隆获得目的基因序列,PCR 扩增体系为 94℃ 预变性 4 min;94℃ 30 s;退火时间 30 s;72℃ 根据目的基因的长度进行设定,本研究为 1~2 min;72℃ 10 min。S5-A1、S1-A3、S1-A1 的最佳退火温度分别为 60℃、60℃、63℃。送上海生物工程股份有限公司进行 PCR 产物测序。

利用生物信息学软件 Vector NTI10.3 对 PPDK 基因编码的氨基酸数目、组成以及蛋白质保守域进行了预测与分析;登录网址 http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan,用在线分析软件 Motif Scan 预测 PPDK 的活性位点。登录网址 https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html,用软件 SOPMA 在线预测出 PPDK 多肽链中有规则重复的构象;通过 SWISS-MODE (<http://www.expasy.ch/swiss-mod/SWISS-MODEL.html>)同源模建蛋白的三级结构,使用 PyMOL 软件渲染输出;用 MEGA5.0 构建系统发育进化树。

表 1 引物名称及其序列

Table 1 The names and sequences of primers in the test	
名称	序列(5'-3')
S1	CAGGGGTGTCAGCATTTGCCATA
S5	CAATAGGAACCCTGAATGGAGAACA
A1	AAAGTTGAAGCGTGAAAAAGGAGTC
A3	AGAGAACGGTTTCGTGATG
S5-A1-WIF	CCTCTTCATTTATGCCAGTCT
S5-A1-WIR	GGGCTTGCCAGCATCTCC

注:S1、S5、A1、A3 是 PCR 引物,S5-A1-WIF S5-A1-WIR 是测序引物。

2 结果与分析

2.1 板栗总 RNA 的提取及 PPDK 基因 cDNA 的克隆

用试剂盒从板栗坚果中提取总 RNA,测得总 RNA 的纯度 260/280 比值均在 1.8~2.1 之间,而浓度多在 3 000 ng·μL⁻¹ 以上。其完整性用 0.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图 1)所示,RNA 提取质量较好。用引物 S5-A1、S1-A3、S1-A1 对板栗的 cDNA 进行 PCR 扩增(图 2),得到长度为 2 500、2 100 bp 和 1 560 bp 3 条特异性条带,条带清晰。后经测序,拼接,得到 1 条板栗 cDNA 基因序列。在 NCBI 中对该基因序列所编码的氨基酸序列进行 Protein-blast,与其他已知植物来源的若干 PPDK 基因所编码的氨基酸相比,同源性大多在 85% 以上,证明所克隆的目的片段为 PPDK 基因。

2.2 板栗 PPDK 蛋白质序列分析

2.2.1 板栗 PPDK 蛋白质序列的基本性质分析
用软件 Vector NTI10.3 对板栗 PPDK 基因所编码的氨基酸序列进行预测,结果显示,板栗 PPDK 基因全长 3 293 bp,编码一个完整的开放阅读框 ORF,包

含 892 个氨基酸。用在线软件 ExPASy 预测出该氨基酸序列的分子量为 97.89 KDa,理论等电点 pI 为 5.81,包括 13 797 个原子,分子式为 C₄₃₃₄ H₆₉₃₄ N₁₁₈₂ O₁₃₀₁ S₁₆;不稳定指数为 33.01,该蛋白稳定。

2.2.2 板栗 PPDK 基因编码的氨基酸序列分析
用在线软件 Motif Scan 分析 PPDK 的活性位点,发现除了 1 个 PEP 利用酶磷酸化位点标记,还有一个拉链结构和多个磷酸化位点,包括 12 个蛋白激酶 C 磷酸化位点、17 个酪蛋白激酶 II 磷酸化位点、1 个酪氨酸激酶磷酸化位点、2 个酰胺化位点、3 个糖基化位点等。其中,拉链结构为 PPDK 蛋白之间及与其它蛋白相互作用提供了基础,而磷酸化位点是蛋白质参与信号传导所必需的。

2.2.3 板栗 PPDK 蛋白二级结构及三级结构预测

根据 SOPMA 软件预测,板栗 PPDK 二级结构主要是由 α-螺旋(Hh)、β-折叠(Ee)、β-转角(Tt)以及随机卷曲(Cc)组成,所占比例分别为 43.83%、19.28%、11.10%和 25.78%。通过在线分析软件 SWISS-MODEL 进行同源建模,得到 PPDK 蛋白的三级结构模型(图 4)。评测推导的 PPDK 蛋白模型的 QMEN 得分为 0.94,蛋白序列相似性为 54%。

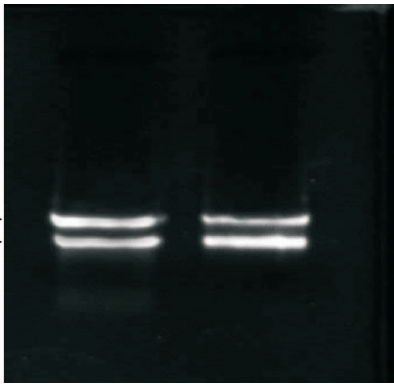


图 1 板栗 RNA 电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA in *C. mollissima*

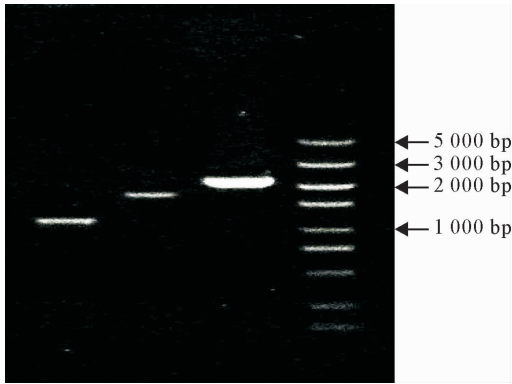


图 2 板栗 PPDK cDNA 克隆的凝胶电泳

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of PPDK cDNA in *C. mollissima*

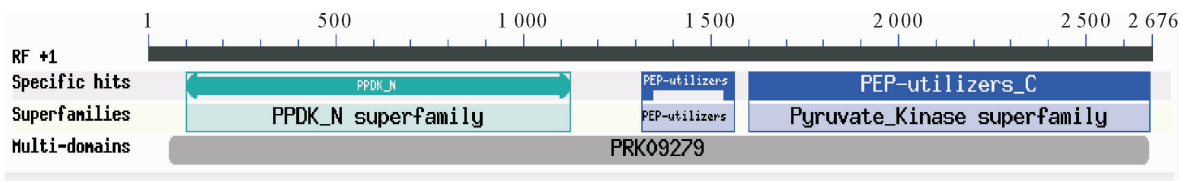


图 3 PPDK 蛋白的氨基酸保守结构域

Fig. 3 Conserved domain of PPDK protein

2.3 板栗 PPDK 蛋白序列的同源性分析和系统发育树的构建

将所推导的氨基酸序列与 NCBI 中其他物种 PPDK 氨基酸序列通过 Vector NTI10.30 进行同源性比对(图 5),序列从 N 端到 C 端进行排列比对,黄色区域表示该区域相对较为保守,蓝色区域说明在

这 14 种植物存在一定的保守性,白色区域表示该区域保守性差。表明此类蛋白较为保守,N 端保守性较差,且物种之间差异较大,而 C 端及中间区域保守性比较高。与其它植物该基因所编码的氨基酸序列同源性大多在 85% 以上,相似度高。用软件 MEGA5.0 构建系统发育树(图 6)。从系统发育进

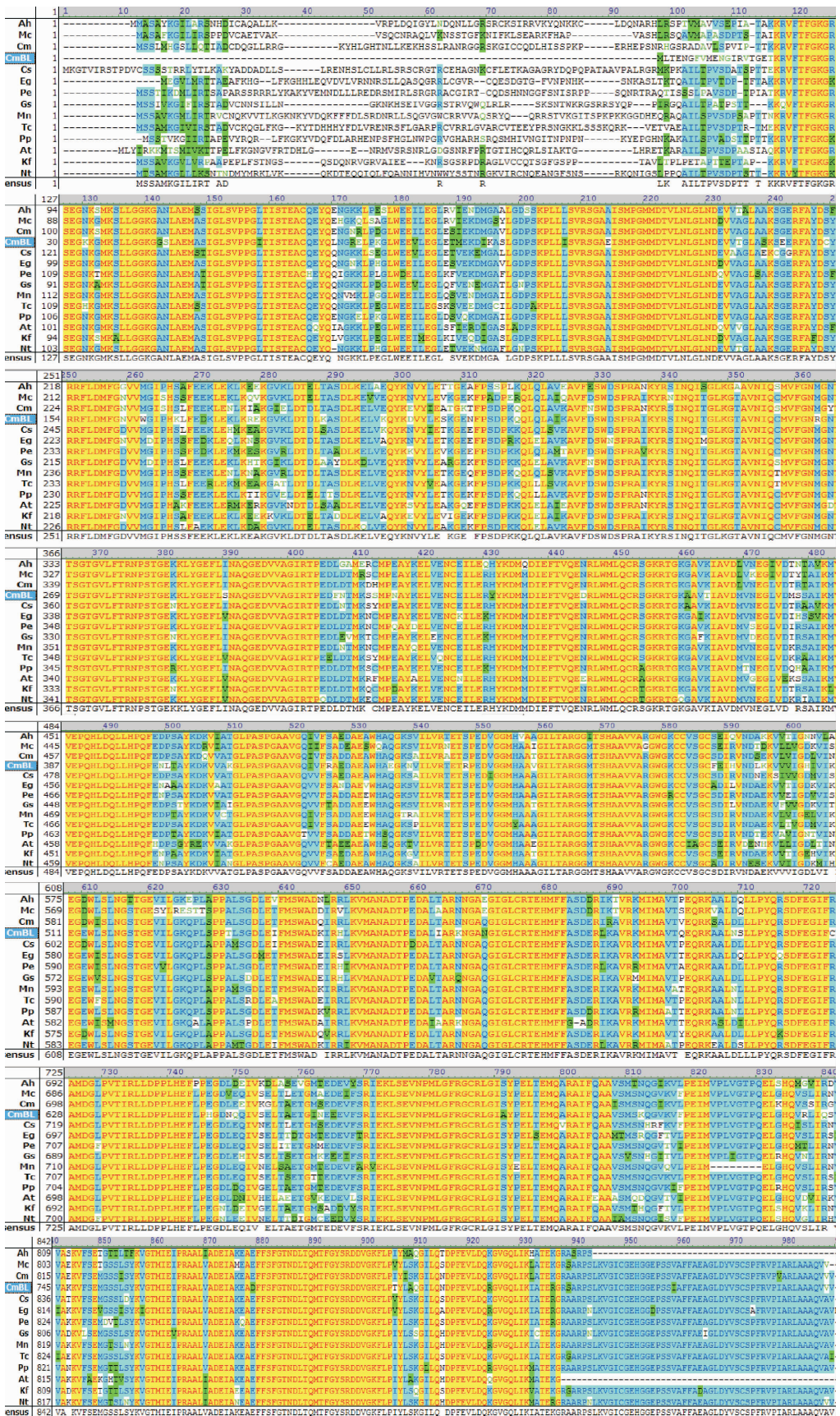


图 5 不同物种 PPDK 蛋白序列比对结果

Fig. 5 Protein sequences alignment in PPDK from different species

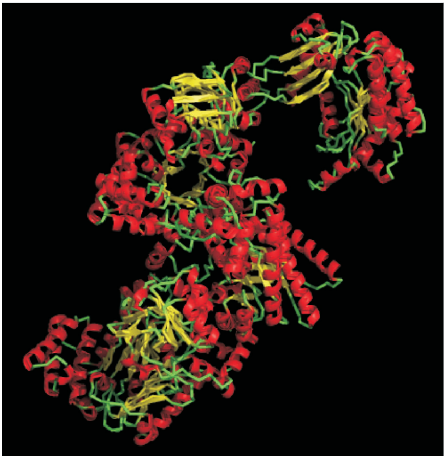


图 4 PPDK 三级结构立体模型

Fig. 4 Spatial pattern of PPDK tertiary structure

化树看,板栗 *PPDK* 基因与烟草的亲缘关系更为接近。

3 结论与讨论

许多学者在 20 世纪末就已开始了大量的杂交育种试验,希望成功将 C_4 植物的高效特性转移到 C_3 植物中,试验证明,通过遗传育种,有可能选育出较高 C_4 途径活性的 C_3 植物^[9-10]。随着研究的逐步深入,大量试验表明, C_3 植物中也存在有 C_4 途径^[11-12],本试验利用 C_3 植物板栗的果实成功克隆出板栗 *PPDK* 基因,也在一定程度上证实了 C_3 植物中确实存在有 C_4 途径。

近年来,人们在利用基因工程技术改造培植高产农作物等方面取得了一定的进展。其中,对玉米,

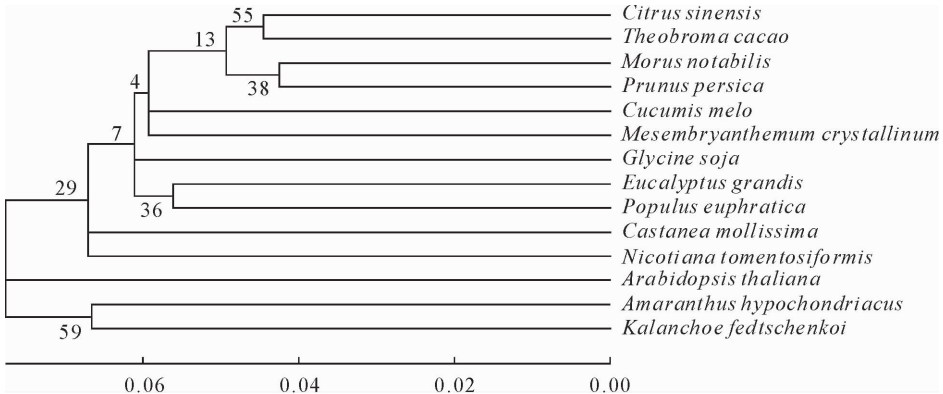


图 6 不同物种 *PPDK* 种系关系构建

Fig. 6 Phylogenetic construction of *PPDK* gene from different species

高粱等农作物^[13-16]的研究证明了把 C_4 植物 *PPDK* 基因全长导入 C_3 植物中,能够数十倍的提高 C_3 植物中 *PPDK* 的活性^[17-19],酶活性的提高,能够促使 C_4 途径速率的提高,从而提高光合效率,增加农作物的产量。为赋予 C_3 植物 C_4 植物的光合途径提供了重要思路。然而,对于 *PPDK* 基因在 C_3 植物中表达调控的方法途径的相关研究还较少,根据前期所进行的大量南北方板栗品种的正反交授粉试验,且利用了 cDNA-AFLP 技术对板栗花粉直感效应进行的差异性研究,分析不同时期子叶的转录信息,成功筛选出 40 条差异性条带,经条带回收以及克隆分析后发现了 *PPDK* 基因片段,说明该基因在花粉直感效应过程中也可能起到一定的作用。

目前,有关板栗花粉直感效应分子机理的研究鲜有报道,对板栗花粉直感效应的研究仍停留在宏观层次上,大多研究集中在花粉直感效应对板栗内外在品质的影响等方面。如在大量授粉试验后,得出板栗的大小^[20-21],内含物的含量^[22-24]等均表现出明显花粉直感现象的结论。郝乃斌^[9]等曾用结荚习

性不同的大豆品种对大豆光合产物的有效地分配进行了综合性的研究发现,高光效主要表现在植物生长发育中后期,此时光合速率高,光化学活性强,光合产物明显增加,产物大量地运往结实器官中,仅从幼荚到鼓粒期间输送至籽粒中光合产物的量就增加了 32.4%。早在 1967 年, W. A. Brun^[25] 等就对 2 个大豆品种进行了光合作用与产量相关关系的比较,发现光合强度较高的品种,产量也高。董钻^[26]等在研究大豆光合作用的过程中也证实了大豆生育后期净光合速率高时,籽粒产量也高。结合 *PPDK* 基因在光合作用中的关键作用,认为可能是通过 *PPDK* 基因的作用提高板栗光合效率,从而使板栗在数量性状上表现出花粉直感效应。在 C_3 植物中,同一种植物不同品系之间 C_4 途径的强弱也有很大的差别。父本的高光效性能的高低可能是造成子代板栗大小,淀粉含量等出现花粉直感现象的原因之一。本试验对板栗 *PPDK* 基因所编码的蛋白质序列进行了分析,以期以后板栗 *PPDK* 基因功能及花粉直感效应的分子机理研究提供基础。

参考文献:

- [1] 段续伟,邓舒,沈元月,等. 板栗 *CmAPs* 基因的克隆及在芽变短雄花序中的表达分析[J]. 林业科学,2010,46(12):49-55.
DUAN X W,DENG S,SHEN Y Y,*et al.* Cloning and expression analysis of *CmAPs* in mutant short catkin of *Castanea mollissima* [J]. Scientia Silvae Sinicae,2010,46(12):49-55. (in Chinese)
- [2] 张宇和. 中国果树志:板栗,榛子卷[M]. 北京:中国林业出版社,2005.
- [3] 寇艳茹,苏淑钗. 授粉方式对板栗胚胎发育的影响[J]. 西北林学院学报,2015,30(3):94-99.
KOU Y R,SU S C. Effects of pollination methods on chestnut embryonic development[J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(3):94-99. (in Chinese)
- [4] 文晓鹏,罗充. 影响板栗田间净光合的主要因子[J]. 西南农业学报,1999,12(3):107-111.
WEN X P,LUO C. Main factors affecting net photosynthetic rate of Chinese chestnut, *castanea mollissima* BL. [J]. South-west China Journal of Agricultural Sciences,1999,12(3):107-111. (in Chinese)
- [5] 彭方仁,黄宝龙. 密植板栗树光合特性的研究[J]. 浙江林学院学报,1997,14(2):151-154.
PENG F R,HUANG B L. Photosynthetic characteristics of chestnuts in high density planting orchards[J]Journal of Zhejiang Forestry College,1997,14(2):151-154. (in Chinese)
- [6] 张媛,邵建柱,刘兴菊,等. 我国板栗光合作用研究进展[J]. 西北林学院学报,2007,22 (5):53-56.
ZHANG Y,SHAO J Z,LIU X J,*et al.* Advances in photosynthesis researches on Chinese chestnut[J]. Journal of Northwest Forestry University,2007,22 (5) :53-56. (in Chinese)
- [7] ISHIMARU K, ICHIKAWA H, MATSUOKA M, OHSUGI R. Analysis of a C_4 maize pyruvate, orthophosphate dikinase expressed in C_3 transgenic *Arabidopsis* plants[J]. Plant Science,1997,129(1):57-64.
- [8] SHERIFF A, MEYER H, RIEDEL E, *et al.* The influence of plant pyruvate, orthophosphate dikinase on a C_3 plant with respect to the intracellular location of the enzyme[J]. Plant Science,1998,136(1):43-57.
- [9] 郝乃斌,戈巧英,杜维广. 大豆高光效育种光合生理研究进展[J]. 植物学通报,1991,8(2):13-19.
- [10] 戈巧英,郝乃斌,白克智,等. C_3 作物亲本与子代的光合碳同化酶活性表达研究[C]. 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编 (1933—2003),2003.
- [11] DUFFUS C M, ROSIE R. Some enzyme activities associated with the chlorophyll containing layers of the immature barley pericarp[J]. Planta,1973,114(3):219-226.
- [12] NUTBEAM A R, DUFFUS M. Evidence for C_4 photosynthesis in barley pericarp tissue[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications,1976,70(4):1198-1203.
- [13] 王国英,谢华安. 玉米高光效基因 *PPDK* 在籼稻 IR64 中的整合及其与光合作用相关的特性分析[J]. 分子植物育种,2007,4(6):797-804.
- [14] 王金明,丁在松,张桂芳,等. 家稗丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 基因的克隆及序列分析[J]. 作物学报,2007,33(6):927-930.
- WANG J M,DING Z S,ZHANG G F, *et al.* Cloning and sequence analysis of *ppdk* gene in *Echinochloa crusgalli* var. *frumentacea*(Roxb.)W. F. wight[J]. Acta Agronomica Sinica,2007,33(6):927-930. (in Chinese)
- [15] 王真梅,李海霞,何莹,等. 植物丙酮酸磷酸双激酶 (PPDK) 研究进展[J]. 植物生理学报,2012,48(10):949-957.
WANG Z M,LI H X,HE Y, *et al.* Advances in plant pyruvate, orthophosphate dikinase[J]. Plant Physiology Journal,2012,48(10):949-957. (in Chinese)
- [16] 张建福,谢华安,王国英,等. 玉米 *PEPC* 基因和 *PPDK* 基因在籼稻明恢 63 中的整合及与光合作用相关的特性分析[J]. 分子植物育种,2006,4(5):655-662.
ZHANG J F,XIE H A,WANG G Y, *et al.* Integration of intact *PEPC* and *PPDK* genes of maize to Indica rice MH63 and characteristic analysis related to photosynthesis[J]. Molecular Plant Breeding,2006,4(5):655-662. (in Chinese)
- [17] FUKAYAMA H, TSUCHIDA H, AGARIE S, *et al.* Significant accumulation of C_4 -specific pyruvate, orthophosphate dikinase in a C_3 plant, rice[J]. Plant Physiology,2001,127(3):1136-1146.
- [18] HUDSPETH R L, GRUL J W, DAI Z, *et al.* Expression of maize phosphoenolpyruvate carboxylase in transgenic tobacco effects on biochemistry and physiology[J]. Plant Physiology,1992,98(2):458-464.
- [19] 张桂芳. 稗草 C_4 关键酶 (PEPC, PEDK) 基因的克隆及 PEPC 基因对水稻和烟草的遗传转化[D]. 北京:中国农业大学,2005.
- [20] 陈在新,王宜雄,李金秋,等. 3 个板栗新品系授粉结实特性研究[J]. 长江大学学报 B: 自然科学版,2006,3(2):119-122,129.
CHEN Z X,WANG Y X,LI J Q, *et al.* Studies on pollinated fruit-setting characteristics of three new Chinese chestnut strains[J]Journal of Yangtze University: Natural Science Edition,2006,3(2):119-122,129. (in Chinese)
- [21] 陆斌,邵则夏,杨卫民,等. 板栗新品系授粉试验[J]. 西北林学院学报,2002,17(2):41-44.
LU B,SHAO Z X,YANG W M, *et al.* Pollination test on new strains of Chinese chestnut[J]. Journal of Northwest Forestry University,2002,17(2):41-44. (in Chinese)
- [22] 赵志珩,杨柳,石卓功,等. 板栗花粉直感效应在坚果内在品质上的表现[J]. 经济林研究,2012,30(4):9-12.
- [23] 杨柳,赵志珩,石卓功. 板栗花粉直感效应对果实含糖量的影响[J]. 西北林学院学报,2012,27(6):75-77.
YANG L,ZHAO Z H,SHI Z G. Metaxenia effects on sugar content in Chinese chestnut (*Castanea mollissima*) [J]. Journal of Northwest Forestry University,2012,27(6):75-77. (in Chinese)
- [24] 陈佳佳. 板栗花粉直感现象对果实品质的影响[D]. 昆明:西南林业大学,2010.
- [25] BRUN W A, COOPER R L. Effects of light intensity and carbon dioxide concentration on photosynthetic rate of soybean [J]. Crop Sci. ,1967(7):451-454.
- [26] 董钻. 大豆的器官平衡与产量[J]. 辽宁农业科学,1981(3):14-21.