西北林学院学报 2018,33(3):82-90
Journal of Northwest Forestry University

doi:10.3969/j.issn.1001-7461.2018.03.13

杉木木糖合成酶基因 *ClUAXS2* 的全长克隆与分析

张　颖[1],苏烁烁[1],陈婉婷[1],陈冉红[1],李　明[1,2*],马祥庆[1,2]

(1.福建农林大学 林学院,福建 福州 350002;2.国家林业局 杉木工程技术研究中心,福建 福州 350002)

摘　要:木糖合成酶 *UAXS* 基因是植物体内调控细胞壁中 UDP-D-葡萄糖醛酸脱羧反应生成 UDP-D-木糖/芹菜糖的关键性核苷糖合成酶,对植物细胞壁多糖物质的稳定合成和转换有重要意义。从杉木转录组中挑选获得木糖合成酶基因 *UAXS* 的中间序列,使用全长克隆技术和 PCR 技术克隆得到 1 个杉木木糖合成酶基因 *ClUAXS2*。结果表明,*ClUAXS2* 基因全长为 1 753 bp,包含的 1 158 bp 的开放阅读框,可编码长度为 386 个氨基酸残基的蛋白质,其蛋白质分子式为 $C_{1936}H_{3026}N_{524}O_{578}S_{19}$,分子质量为 43.90 ku,等电位点为 5.60。*ClUAXS2* 基因为亲水性蛋白,没有信号肽结构域,编码 1 个疑似跨膜区域。蛋白质二级结构分析表明其蛋白主要骨架为 Loop 环和 α-螺旋,预测亚细胞定位于细胞质中。通过对比分析发现 *ClUAXS2* 基因属于 UAXS 家族基因,编码 1 个 UDP-D-Apiose/ UDP-D-Xylose synthase 2(UAXS2)木糖酶蛋白。进化树分析结果显示,杉木 *ClUAXS2* 基因与无油樟(*AtUAXS2*)和可可树(*TcUAXS2*)的氨基酸序列相似度达到 85%、86%,与拟南芥(*AtAXS2*),葡萄(*VvUAXS*)、毛果杨(*PtAXS1*)的氨基酸序列相似度为 84%。实时荧光定量 PCR 结果表明,*ClUAXS2* 基因在杉木的根、茎、叶中均有表达,但在 1 年生杉木幼苗茎中的表达量最高;*ClUAXS2* 基因在不同杉木无性系茎中的表达量差异不显著,在根和叶中的表达量存在差异。

关键词:杉木;*ClUAXS2*;木糖合成酶;基因克隆;表达分析

中图分类号:S791.27　　**文献标志码:**A　　**文章编号:**1001-7461(2018)03-0082-09

Full-length cDNA Cloning and Analysis of UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose Synthase Gene *ClUAXS2* in *Cunninghamia lanceolata*

ZHANG Ying[1], SU Shuo-shuo[1], CHEN Wan-ting[1], CHEN Ran-hong[1], LI Ming[1,2*], MA Xiang-qing[1,2]

(1. *College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian* 350002, *China*;
2. *State Forestry Administration Engineering Research Center of Chinese Fir, Fuzhou, Fujian* 350002, *China*)

Abstract: The xylose synthase *UAXS* gene is a key nucleoside carbohydrate synthase in regulating the decarboxylation of UDP-D-glucuronic acid in the cell wall to produce UDP-D-xylose / apigenin, which is important for the stable synthesis and transformation of polysaccharide from plant cell wall. In this study, the intermediate sequence of xylose synthase gene *UAXS* was selected from the transcriptome of Chinese fir, a xylose synthase gene *ClUAXS2* was cloned from Chinese fir cDNA by RT-PCR and RACE techniques. The results showed that the full-length *ClUAXS2* gene was 1 753 bp, containing an open reading frame of 1 158 bp, encoding a protein with a length of 386 amino acid residues. Its protein molecular formula was $C_{1936}H_{3026}N_{524}O_{578}S_{19}$ with a molecular weight of 43.90 ku, and a isoelectric point of 5.60. The *ClUAXS2* gene is a hydrophilic protein with no signal peptide domain, encoding a suspected transmembrane domains. The analysis of protein two level structure showed that the main skeleton of the protein was loop ring and alpha he-

收稿日期:2017-11-22　**修回日期:**2018-01-14
基金项目:国家自然科学基金海峡联合基金(U1405211);国家自然科学基金青年基金(31500541)。
作者简介:张　颖,女,硕士,研究方向:森林生态和水土保持。E-mail:fjzhying@126.com
* **通信作者:**李　明,男,讲师,研究方向:森林培育。E-mail:limingly@126.com

lix,and subcellular localization was predicted in cytoplasm. Through comparative analysis,we found that the *ClUAXS2* gene belonged to the *UAXS* family gene,encoding a UDP-D-Apiose/ UDP-D-Xylose synthase 2 (*UAXS2*) xylose protein. Phylogenetic tree analysis showed that *ClUAXS2* gene's amino acid sequence similarity between *Amborella trichopoda* and *Theobroma cacao* reached 85% and 86%,and the amino acid sequence similarity of *Arabidopsis thaliana*,*Vitis vinifera* and *Populus trichocarpa* was 84%. Real time quantitative PCR results showed that the *ClUAXS2* gene was expressed in Chinese fir root,stem and leaf,while the expression was the highest in one year old Chinese fir stem. The *ClUAXS2* gene relative expression level was no significant difference in the stems of different Chinese fir clones,but there was a certain difference in the expression level of *ClUAXS2* gene in roots and leaves.

Key words:*Cunninghamia lanceolata*; *ClUAXS2*; xylose synthase; gene cloning; expression analysis

UDP-木糖(UDP-Xyl)是植物体内由 D-葡萄糖醛酸脱羧而成的一种尿苷二磷酸五碳糖,主要作为糖基供体合成植物半纤维素木聚糖[1]、木葡聚糖[2]等多糖物质,与植物细胞壁生长和木材的形成密切相关。UDP-木糖也可通过核苷糖之间的合成和转化途径参与形成一些植物天然小分子化合物的次生代谢过程,是合成糖蛋白或糖脂的主要成分[4-6]。UDP-芹菜糖(UDP-Api)是合成高等植物细胞壁中的果胶多糖物质鼠李糖半乳聚糖Ⅱ(RG-Ⅱ)的一种支链五碳糖,通过在植物生长发育中交联细胞壁多糖和硼酸而起作用[7-8],一般在植物体内含量较少,对于富含芹菜苷的浮萍(*Spirodela polyrhiza*)和欧芹(*Petroselinum crispum*),合成 UDP-Api 的研究早已存在[9-11]。UDP-木糖和 UDP-芹菜糖是构成植物细胞壁初生壁和次生壁多糖的主要组分,同时还参与了植物果胶聚糖的组成及相关糖蛋白中糖链的构成。因此,用于合成 UDP-木糖和 UDP-芹菜糖的糖苷合成转化酶的结构和功能备受关注。植物体内可用于同时合成 UDP-木糖和 UDP-芹菜糖的作用酶为 UDP-木糖合成酶(UDP-D-Apiose/ UDP-D-Xylose synthase,UAXS),其能够催化 UDP-葡萄糖醛酸形成 UDP-木糖和 UDP-芹菜糖 2 种糖基供体。

植物体内第 1 个被发现和鉴定的 UDP-木糖合成酶(UDP-D-Xylose synthase,UXS)为拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *AtUXS1*[12],随后于 2003 年在拟南芥中发现既能合成 UDP-木糖,也能合成 UDP-芹菜糖的双功能酶 *AtAXS1*[13]。其中,UXS 在 NAD^+ 作为辅酶参与下通过不可逆的脱羧反应将 UDP-葡萄醛酸(UDP-D-GlcA)转化成为 UDP-Xyl[13]。采用病毒诱导基因沉默的方法对烟草(*Nicotiana benthamiana*)*NbAXS1* 基因研究表明,*NbAXS1* 蛋白酶定位于细胞质中,当 *NbAXS1* 基因沉默之后,植株生长停滞,同时由于细胞壁中 RG-Ⅱ缺乏致使烟草细胞壁结构异常[14]。UAXS 还能够调节植物体内 UDP- Xyl 和 UDP-Api 的合成,通常情况下植物细胞壁中木糖的含量远高于芹菜糖。对虎眼万年青(*Ornithogalum caudatum*)的 UXS 与 UAXS 家族基因的克隆与功能分析发现,UXS 与 UAXS 虽具有相似催化功能,但是两者的活性条件有所不同,金属离子的浓度与种类影响着 UDP-木糖和 UDP-芹菜糖最终的合成比例[15]。

植物木糖合成酶基因家族是催化植物 UDP-糖基供体相互转化的关键酶,对其结构和功能的研究不仅能够为植物天然产物糖基化研究提供指导,而且有助于分析植物细胞壁的形成,各成分功能和人工改造细胞壁构造。目前,对植物的木糖合成酶基因家族的研究除了模式植物拟南芥[12-13,16]和水稻(*Oryza sativa*)[17-18]外,对一些经济作物和药用植物如大麦(*Hordeum vulgare*)[19]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)[20]、虎眼万年青[15,21]等的木糖合成酶基因参与糖类代谢和糖基化产物合成的研究也较为深入。对木本植物木糖合成酶基因的研究仅见毛白杨(*Populus tomentosa*)[22]、桃(*Prunus persica*)[23]等,但对杉科植物的 UXS 与 UAXS 家族成员并没有报道。杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国南方林区主要的人工造林树种,具有速生、丰产、材质优良的特点[24]。同时,杉木的根、节、皮中的一些天然小分子糖基产物还具有重要的药用价值[25-27]。因此,对杉木木糖合成酶基因 *UXS/UAXS* 的克隆和表达研究,不仅有助于认识细胞壁初生壁和次生壁多糖的主要组分 UDP-木糖和 UDP-芹菜糖的合成和转化过程,也有助于了解杉木核苷糖基供体的合成和代谢途径,为杉木木材形成和代谢机制研究提供参考。本试验从杉木转录组中获取了木糖合成酶基因的中间片段,经过 RACE 基因全长克隆与 qPCR 表达分析,获得了杉木 *ClUAXS2* 基因的全长、结构和组织表达情况,研究结果为认识杉木 *ClUAXS2* 基因合成和转化 UDP-木糖和 UDP-芹菜糖的过程和途径提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

杉木 4 号、25 号、32 号无性系 1 年生幼苗均采集于国家林业局杉木工程技术研究中心。采用水培法培养杉木幼苗 1 周后，采集幼苗根、茎和叶进行基因克隆和组织特异表达试验。采用 RNAprep Pure Plant 植物总 RNA 提取试剂盒(北京天根生化科技公司)提取试验材料的总 RNA，并采用 Fermentas 公司 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA 第 1 条链，用于后续的基因克隆和基因表达验证试验。

1.2 杉木 *ClUAXS2* 基因全长的克隆

从前期获得的杉木茎转录组 SRX2586188 中筛选获得高表达丰度的 Unigene 200084_g1 的 cDNA 片段，在 NR 数据库中注释结果为推定的 UDP-木糖/UDP-芹菜糖合成酶 2(UDP-D-Apiose/ UDP-D-Xylose synthase 2)。根据转录组中 cDNA 片段利用 Primer Premier 5.0 软件设计序列验证引物 A415F 和 A415R，对杉木茎 cDNA 进行 PCR 扩增(表 1)。扩增产物经胶回收试剂盒(OMEGA)回收纯化后，与 pMD18T 载体进行连接转化得到阳性克隆并测序，获得目的基因核心片段。

目的基因的 5′端与 3′端序列克隆获取方式参考文献[28-29]。利用目的基因核心片段，采用 Primer Premier 5.0 软件设计 3 条特异性 5′RACE 引物和 2 条特异性 3′RACE 引物(表 2)。使用 SUPERSCRIPT II RT 酶和引物 5′RACE-1 合成目的基因第一链 cDNA，纯化经 RNAase 处理过的 cDNA 后，使用 TdT 酶和 dCTP 对纯化后的 cDNA 进行末端加上 dC 尾。使用引物 5′RACE-2 和桥连铆钉引物 AAP 对已经加 dC 尾的纯化 cDNA 进行第 1 轮 PCR 扩增，然后再使用引物 5′RACE-3 和桥连通用扩增引物 AUAP 进行巢式 PCR 第 2 轮扩增，对扩增后的 PCR 产物进行测序后获得目的基因的 5′端序列。使用试剂盒中的逆转录酶和引物 3′CDS primer A 对杉木总 RNA 进行逆转录合成模板 cDNA，使用特异性引物 3′RACE-1 和 UPM 进行 3′端的第 1 轮 PCR 扩增。对扩增产物进行稀释 50 倍处理，并使用引物 3′RACE-2 和 UPM 对稀释后的扩增产物进行第 2 轮 PCR 扩增，收集第 2 轮扩增产物进行测序，获得目的基因的 3′端序列。

根据获得的目的基因核心片段、5′RACE 片段和 3′RACE 片段的序列信息，将 3 段序列通过软件 Vector NTI 10.3.0 拼接后，获得 Unigene 200084_g1 的全长 cDNA 序列。引物合成与阳性结构测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司进行。

表 1 PCR 反应程序

Table 1 PCR reaction program

程序	温度与时间
预变性	94℃ 2 min
变性-退火-延伸(35 个循环)	94℃ 30 s－55℃ 30 s－72℃ 2 min
延伸	72℃ 10 min

表 2 全长克隆引物序列

Table 2 Full length cloned primer sequence

引物名称	序列(5′ to 3′)
A415F	ATGGCGAGCAGAATGGATC
A415R	TCAGCTTGATGCAGTTGATTG
5′RACE-1	ATTACCGTGTGTTGGG
5′RACE-2	GCATCAATCTCTCGCACA
5′RACE-3	AGACCCAATGAAACCCCC
3′RACE-1	GATAGTGACAAGCGAATACCAGACATGA
3′RACE-2	AAACCTCTTTGTCGGATCTGCTTGA
AAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGIIGGGI-IGGGIIG
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTAC
3′CDS primer A	AAGCAGTGGTATCAACGCAGACTAC(T)30 V N
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGC AAG-CAGTGGTATCAACGCAGAGT

1.3 *ClUAXS2* 基因生物信息学分析

采用 NCBI 提供的 ORF finder 程序分析基因的开放阅读框 ORF；采用 DNAMAN 软件进行序列分析和编码氨基酸翻译；使用 ProtParam(http://web.expasy.org/protparam/)分析蛋白的理化性质与氨基酸组成；使用 ProtScale(http://web.expasy.org/protscale/)预测蛋白疏水性；通过 SignalP4.1(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)预测编码蛋白信号肽、采用 NetPhos2.0(http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/)预测分析蛋白磷酸化位点、使用 TMHMM(http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)对蛋白的跨膜结构区域进行预测分析；利用 PredictProtein(https://ppopen.informatik.tu-muenchen.de/)预测蛋白的二级结构，使用 SWISS-MODEL(https://www.swissmodel.expasy.org/)建模预测蛋白的三级结构。通过 NCBI 的 BLAST 工具(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行氨基酸同源性分析；利用 ClustalX2.0 软件进行氨基酸的多序列比对，使用 MEGA5.0 软件中的邻位相连法(Neighbor-joining)构建系统发育树[30-32]。

1.4 *ClUAXS2* 基因表达分析

使用 Promega 公司的 qPCR Master Mix 试剂盒，在 StepOnePlus Real-Time PCR System 仪器上进行荧光定量 PCR，分析目的基因在杉木 4 号、25

号、32 号家系根、茎、叶中的表达情况,并设置 3 次生物学重复。根据目的基因的非保守区设计荧光定量引物为 *ClUAXS2*-F:5′-TCCTCTGGTGGCAATTCTGT-3′和 *ClUAXS2*-R:5′-GGAGCCCTGATGATGATCGA-3′。选择 *β-Actin* 基因为内参基因,其引物为 *β-Actin*-F:5′-TACATTGCCGGTGTATTGAACGTC-3′ 和 *β-Actin*-R:5′-AGTTGCTCCAGAAGAACATCC-3′。PCR 反应程序为:95℃预变性 3 min;95℃变性 20 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 45 个循环;95℃ 30 s,60℃ 30 s,逐渐升温到 95℃,速度为 0.11℃ · s^{-1};采用 $Q=E^{-\triangle\triangle CT}$ 法来计算目的基因的相对表达水平,E 为使用默认值 2[28-29]。

2　结果与分析

2.1　*ClUAXS2* 基因全长的克隆

选取 32 号杉木茎的 cDNA 为模板,根据 Unigenes c200084_g1 基因核心序列设计特异引物进行 PCR 反应来验证目的基因序列,PCR 产物回收测序获得了长度为 1 161 bp 的目的基因保守 cDNA 序列(图 1a)。根据目的基因保守 cDNA 序列,进行目的基因 5′*RACE* 和 3′*RACE* 扩增测序,获得 223 bp 的 5′端片段(图 1b),以及 475 bp 的 3′端片段(图 1c);将目的基因的中间序列、5′端片段和 3′端片段通过软件拼接后,获得 1 条完整长度为 1 634 bp 的 cDNA 序列。通过 NCBI 的 blastx 方法比对相似序列,发现杉木 c200084_g1 基因所编码的蛋白与其他植被 UDP-木糖基因的编码蛋白 UDP-D-Apiose/UDP-D-Xylose synthase 2(UAXS2)的相似性均>80%,因此将目的基因命名为杉木木糖合成酶基因 *ClUAXS2*。

2.2　*ClUAXS2* 基因生物信息学分析

2.2.1　*ClUAXS2* 基因序列分析　利用 ProtParam 在线分析杉木 *ClUAXS2* 基因编码蛋白的理化性质,结果表明 *ClUAXS2* 基因总长度 1 643 bp,包含 1 158 bp 的开放阅读框,编码 1 个含 386 个氨基酸的蛋白质,其中 49 个为酸性氨基酸,39 个为碱性荷氨基酸,其余中性氨基酸,且异亮氨酸(8.8%)和亮氨酸(8.5%)含量最多。*ClUAXS2* 基因编码蛋白理论分子量为 43.50 ku,等电位点为 5.60(表明酸性氨基酸多于碱性氨基酸);分子式组成为 $C_{1936}H_{3026}N_{524}O_{578}S_{19}$,不稳定系数为 47.84,属于不稳定蛋白;脂肪系数为 85.91,评价表明总平均亲水性为 −0.318。使用 ProtScale 软件中的 Hphob./Kyte&Doolittle 方法分析预测 *ClUAXS2* 基因编码蛋白的亲/疏水性。结果显示,*ClUAXS2* 基因的编码蛋白中亲水区域多于疏水区域;同时,第 16 位氨基酸处为疏水区最大值 2.222,亲水区最小值为第 333 位氨基酸的 −2.767,因此判断该编码蛋白为亲水蛋白(图 2)。

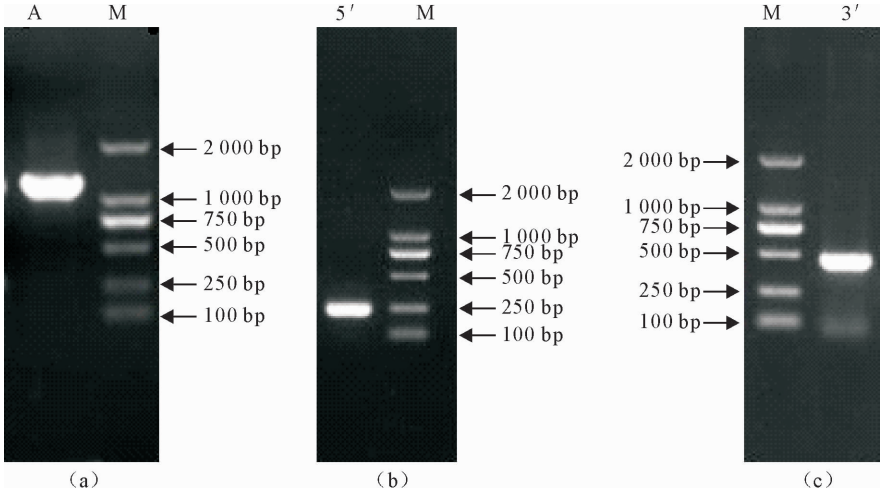


图 1　杉木 *ClUAXS2* 基因琼脂糖凝胶电泳图(a:保守 cDNA;b:5′RACE;c:3′RACE)

Fig. 1　*Cunninghamia lanceolata ClUAXS2* gene's agarose gel electrophoresis (a:conserved sequence cDNA;b:5′RACE;c:3′RACE)

2.2.2　*ClUAXS2* 基因编码蛋白信号肽与跨膜结构分析　在线软件 SignalP4.1 通过分析 *ClUAXS2* 基因编码的氨基酸序列中各个氨基酸的信号肽分值,预测分析该氨基酸序列是否存在信号肽,结果显示,主要有原始剪切点分值(Cscore)、综合剪切点分值(Yscore)以及信号肽值(Sscore),其中当最大 Y 值>阈值 0.45 时,判定该编码蛋白存在信号肽。结果表明第 1~10 位氨基酸的平均 Sscore 为 0.156,第 11 位氨基酸 Y 值最大,为 0.133,均<阈值 0.45;且 1~10 位氨基酸平均信号肽和最大剪接位点分值的平均为 0.145,同样<阈值 0.45,因而推测 *ClUAXS2* 基因编码蛋白不具有信号肽,不是分泌型蛋

白(图 3)。*ClUAXS2* 基因具有明显的 UAXS 基因家族共同的保守结构域和保守的氨基酸位点,如"GxxGxxG"NAD+结合区,"YxxxK"保守区、丝氨酸、苏氨酸位点等。使用在线软件 NetPhos2.0 预测分析 *ClUAXS2* 基因编码蛋白的氨基酸位点(图 4)。结果表明,*ClUAXS2* 基因编码蛋白具有 9 个丝氨酸(Ser)磷酸修饰位点,4 个苏氨酸(Thr)磷酸修饰位点以及 3 个酪氨酸(Tyr)磷酸修饰位点。TMHMM Server 在线软件预测 *ClUAXS2* 基因编码蛋白跨膜结构表明,该编码蛋白仅具有 1 个疑似跨膜区域,位于第 11～31 位氨基酸残基范围内(图 5)。

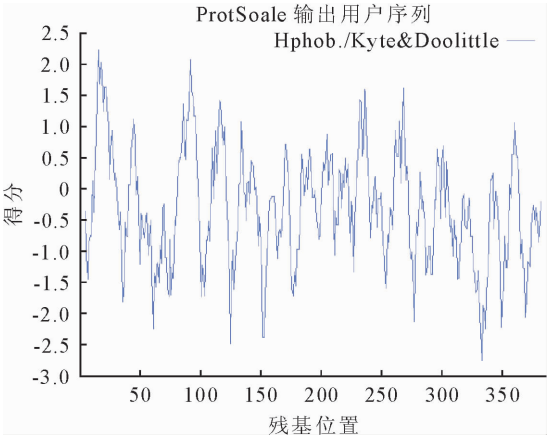


图 2 *ClUAXS2* 基因亲/疏水性曲线

Fig. 2 Hydrophilic / hydrophobic curves of *ClUAXS2* gene

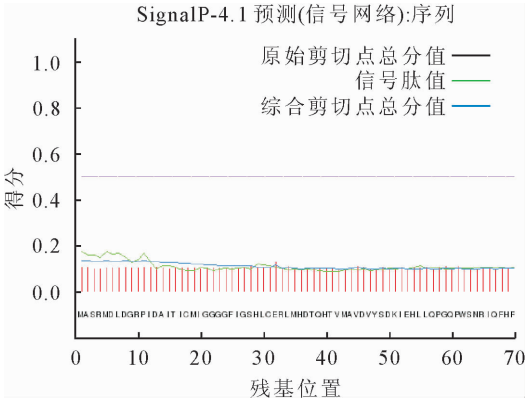


图 3 *ClUAXS2* 基因信号肽分析与预测

Fig. 3 Analysis and prediction of signal peptide of *ClUAXS2* gene

2.2.3 *ClUAXS2* 基因蛋白结构预测分析 使用 PredictProtein 工具预测 *ClUAXS2* 基因编码蛋白的二级结构,结果显示该编码主要结构为无规则卷曲 Loop 环,占该蛋白二级结构总体的 50.26%,其次为 34.97%的 α-螺旋,以及 14.77%的 β-折叠。通过在线软件 SWISS-MODEL 预测 *ClUAXS2* 基因编码蛋白的三级结构(图 6),发现构成该蛋白质的主要三级骨架是 α-螺旋和 Loop 环。且 *ClUAXS2* 基因编码蛋白总共有 8 个可能的二硫键形成位点,亚细胞定位预测显示位于细胞质中。二级结构预测中,还显示 *ClUAXS2* 基因编码蛋白具有 4 个功能蛋白位点,分别为 7 个磷酸化位点,5 个酪蛋白激酶Ⅱ磷酸化位点,2 个酪氨酸激酶磷酸化位点和 5 个 N 酰基化位点。

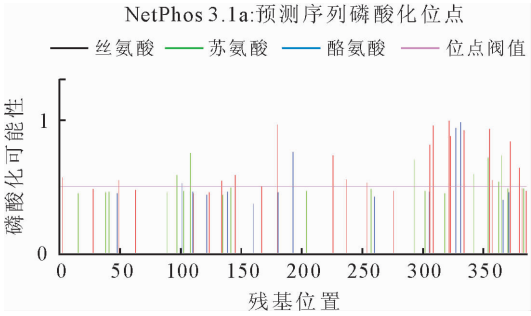


图 4 *ClUAXS2* 基因磷酸化位点分析与预测

Fig. 4 Analysis and prediction of phosphorylation sites of *ClUAXS2* gene

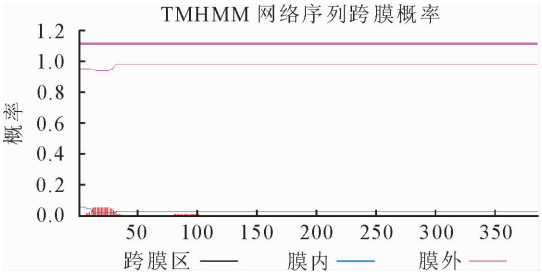


图 5 *ClUAXS2* 基因跨膜区域预测

Fig. 5 Transmembrane domain prediction of *ClUAXS2* gene

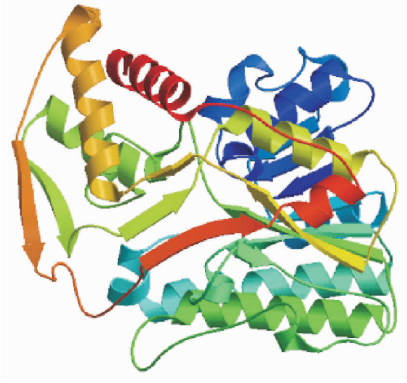
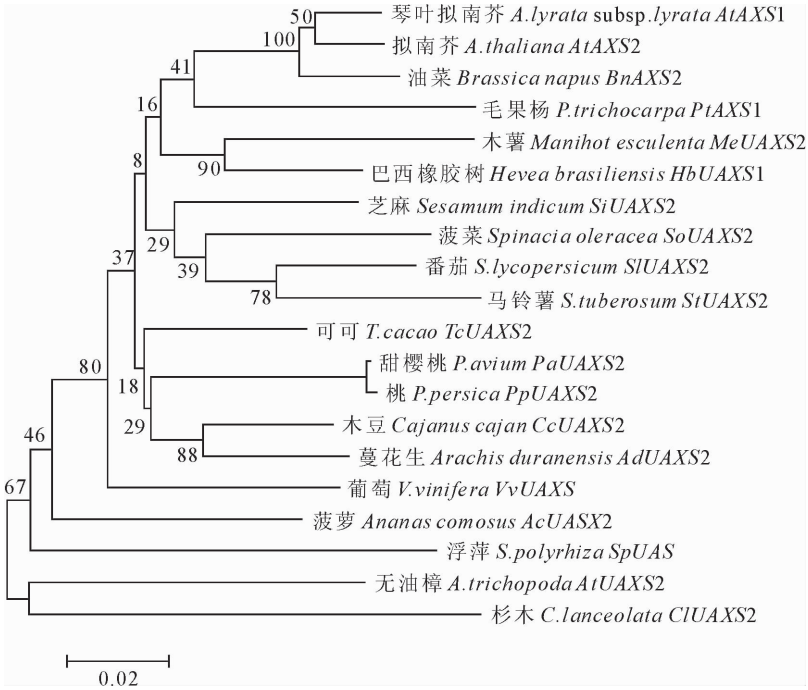


图 6 *ClUAXS2* 基因编码蛋白三级结构图

Fig. 6 Three level structure map of coding protein of *ClUAXS2* gene

2.2.4 *ClUAXS2* 基因蛋白序列同源性分析 通过 NCBI 中的 BLASTP 工具对 *ClUAXS2* 基因蛋白序列进行检索与比对,结果显示其属于 UAXS 基因家族。使用软件 ClustalX2.0 和 MEGA5.0 对 *ClUAXS2* 基因以及与其同源性较高的其他物种 UAXS 进行氨基酸多序列比对,并构建系统进化树(图 7)。结果表明,*ClUAXS2* 基因编码氨基酸与其

他物种相似性均在 80%以上,其中与无油樟(*Amborella trichopoda*)和可可树(*Theobroma cacao*)的相似度达到 85%、86%,与拟南芥、葡萄(*Vitis vinifera*)、毛果杨(*P. trichocarpa*)的相似度均为 84%。对比杉木与其他物种的木糖合成酶基因发现,其中有 16 个长度超过 5 个氨基酸序列且序列完全一致的(深色阴影部分),最长为 177～194 共 18 个氨基酸(图 8)。



注:GenBank 登录号:琴叶拟南芥 XP_020883807.1;拟南芥 NP_563807.1;油菜 XP_013657587.1;毛果杨 XP_006384681.1;木薯 XP_021611295.1;橡胶树 XP_021640429.1;芝麻 XP_011088822.1;菠菜 XP_021843735.1;番茄 NP_001296729.1;马铃薯 NP_001275341.1;可可树 EOY33604.1;甜樱桃 XP_021812132.1;桃 XP_007205322.1;木豆 XP_020230997.1;蔓花生 XP_015935869.1;葡萄 AEP17006.1;菠萝 XP_020110718.1;浮萍 AOG75416.1;无油樟 XP_006851788.1。

图 7　*ClUAXS2* 基因系统发育进化树

Fig. 7　Phylogenetic tree of *ClUAXS2* gene

2.3　*ClUAXS2* 基因组织特异表达分析

采用实时荧光定量 PCR 检测 *ClUAXS2* 基因在杉木 4 号、25 号、32 号无性系各个组织的表达情况,检测显示杉木 *ClUAXS2* 基因在其根、茎与叶中均有表达,其中 *ClUAXS2* 基因在茎中的相对表达量最高(图 9)。*ClUAXS2* 基因在 4 号和 32 号杉木叶中的相对表达量要高于在根中的相对表达量;在 25 号杉木根中的相对表达量要高于在叶中的相对表达量。*ClUAXS2* 基因在杉木 4 号、25 号、32 号无性系茎中的相对表达量不存在显著差异($P>0.05$)。*ClUAXS2* 基因在杉木 25 号无性系根中的相对表达量与在杉木 32 号、4 号无性系根中的相对表达量存在显著差异($P<0.05$);*ClUAXS2* 基因在杉木 32 号无性系叶中的相对表达量与在杉木 25 号、4 号无性系叶中的相对表达量存在显著差异($P<0.05$),这可能与杉木无性系间木糖、芹菜塘合成相关的代谢活性不同有关。

3　结论与讨论

UAXS 是植物体内可同时催化 UDP-葡萄醛酸合成 UDP-木糖和 UDP-芹菜糖的双功能酶,其结构和功能的完整性对植物体内木糖、芹菜糖的合成、分配和平衡都是非常重要的。以 UDP-葡萄醛酸(UDP-D-GlcA)为底物,加之辅酶 NAD^+,UAXS 可以将 UDP-葡萄醛酸转化成为 UDP-木糖;同时,在 UAXS 作用下,通过脱羧反应与碳骨架重新排列,底物 UDP-葡萄醛酸转化为 UDP-木糖的反应中同时有 UDP-芹菜糖产生。植物体内木糖的含量往往远超过芹菜糖,如桦木(*Betula*)中木糖的含量占全部核苷糖总量的 30% 以上,而在一些松类植物上的含量却<9% ;UDP-芹菜糖则是仅在高等植物细胞壁中存在的罕见支链五碳糖。本试验利用全长克隆方法和 PCR 技术,从杉木中克隆获得了 1 个编码杉木木糖合成酶蛋白的基因 *ClUAXS2*,包含 1 643 bp 全长 cDNA 序列,其中包括 1 158 bp 的开放阅读框。杉木 *ClUAXS2* 基因编码的木糖合成酶蛋白分子量为 43.5 ku,与已报道的虎眼万年青的 *OcUAXS1/2* 的 44.1、43.9 ku 相似,不同于早前拟南芥中的 *AtAXS1/2*。*ClUAXS2* 基因编码的蛋白没


AtAXS1
AtAXS2
BnAXS2
PtAXS1
MeUAXS2
HbUAXS1
SiUAXS2
SoUAXS2
SlUAXS2
StUAXS
TcUAXS2
PaUAXS2
PpUAXS2
CcUAXS2
AdUAXS2
VvUAXS
AcUAXS2
SpUAS
AtUAXS2
ClUAXS2
Consensus

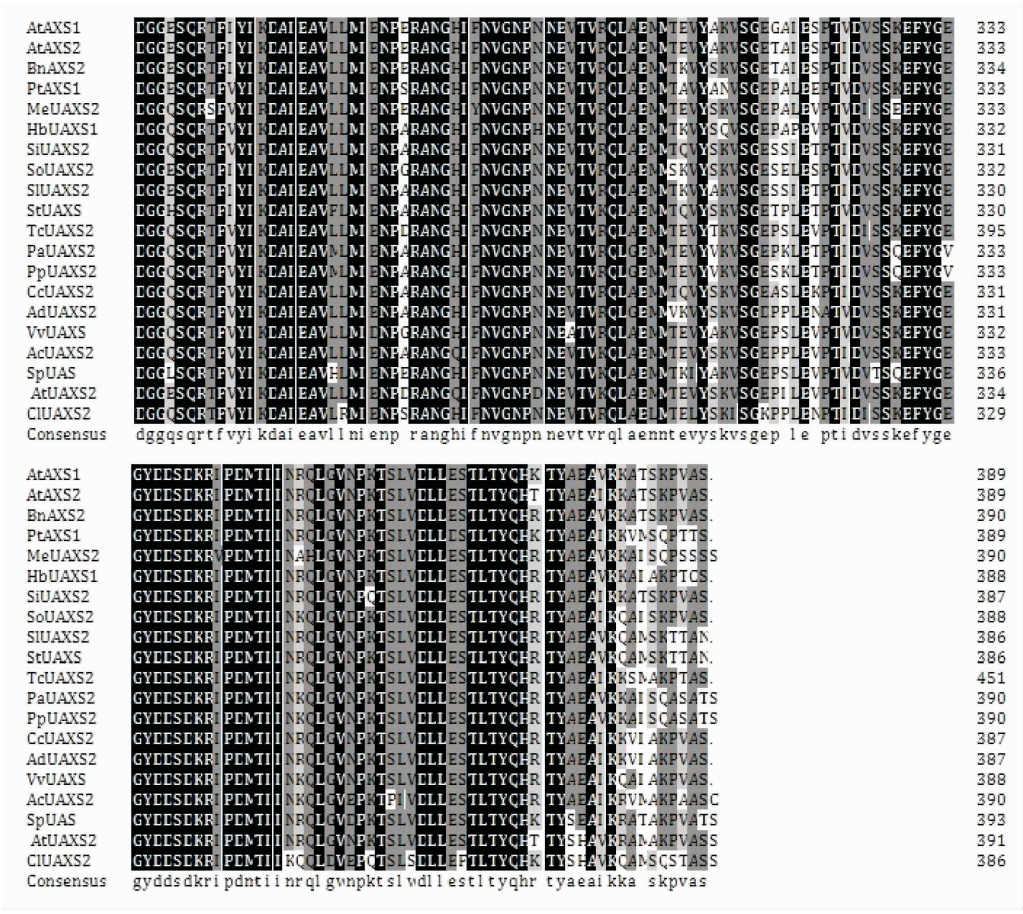
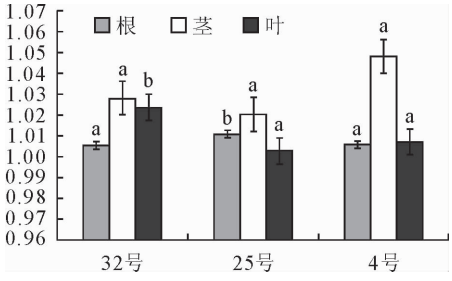


图 8　*ClUAXS2* 基因编码氨基酸序列

Fig. 8　Coded amino acid sequence of *ClUAXS2* gene



注:相同组织部位比较中,不同字母表示存在显著差异($P<0.05$),相同字母表示不存在显著差异($P>0.05$)。

图 9　*ClUAXS2* 基因在不同杉木组织中的相对表达量

Fig. 9　Expression analysis of *ClUAXS2* genes in different tissues of *C. lanceolata*

有跨膜区,无信号肽且存在于细胞质中,均与 *AtAXS1/2*、*OcUAXS1/2* 相同,且同样具有"GxxGxxG"NAD+结合区,"YxxxK"保守区,是植物细胞壁合成途径中的重要糖苷蛋白。qPCR 结果表明,*ClUAXS2* 基因在杉木根、茎与叶中均有表达,在杉木茎中的相对表达量在各个组织中最高。*ClUAXS2* 基因在不同无性系茎中的相对表达量不存在显著差异,而在根与叶中的相对表达量存在一定的差异,这可能与杉木无性系间木糖、芹菜塘合成相关的代谢活性不同有关。

UAXS 基因家族对于植物细胞壁结构的正常合成和代谢具有重要意义,缺乏 UAXS 可以导致植物细胞与细胞壁结构异常或死亡。J. W. Ahn[14] 等曾利用病毒诱导使烟草中的木糖合酶基因 *NbAXS1* 沉默,发现该基因亚细胞定位于细胞质中,同时由于 *NbAXS1* 基因的沉默烟草的生长有明显的缺陷,大量细胞死亡[14]。因此,植物细胞 UAXS 基因功能的缺失会引起植物木糖代谢功能受阻,从而导致植物细胞壁结构发育异常。同时,UDP-芹菜糖作为 RG-Ⅱ与硼酸结合部位的附着点,缺失 UAXS 会导致植物缺少 UDP-芹菜糖而减少与硼酸盐交联,则会引起细胞壁增厚,生长受到抑制[14]。在虎眼万年青中发现 *OcUAXS1/2* 基因是虎眼万年青多糖代谢途径中重要的一环,对于植物体内木糖和芹菜糖的代谢平衡至关重要,进而影响细胞壁合成和结构的完整[15,21]。同时,UAXS 编码合成的 UDP-木糖还可以作为重要的糖基供体,参与许多植物中生物活性物质和药用糖苷类物质的合成。木薯(*Manihot esculenta*)的 *MeUAXS2* 可用于将合成淀粉的葡萄糖转入合成其他代谢糖类[33],虎眼万年青

中的 *OcUAXS2* 参与虎眼万年青抗癌多糖的合成[21]。本研究从杉木中克隆获得了一个在杉木各组织中稳定表达的 UAXS 基因家族成员 *ClUAXS2*，研究结果对于认识和理解杉木 UDP-木糖/芹菜糖的合成和代谢过程奠定了基础。目前，对于杉木 UXS 和 UAXS 基因的家族成员、合成过程和代谢机制研究还尚未深入，其研究结果不仅有助于认识杉木细胞壁多糖的合成过程，也有助于发掘杉木功能性糖苷类物质的代谢过程。

参考文献：

[1] RODGERS M W, BOLWELL G P. Partial purification of golgi-bound arabinosyltransferase and two isoforms of xylosyltransferase from french bean (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Biochemical Journal, 1992, 288(3): 817.

[2] WHITE A R, XIN Y, PEZESHK V. Xyloglucan glucosyltransferase in Golgi membranes from *Pisum sativum* (pea)[J]. Biochemical Journal, 1993, 294(1): 231-238.

[3] ZENG Y, BANNON G, THOMAS V H, *et al*. Purification and specificity of beta1, 2-xylosyltransferase, an enzyme that contributes to the allergenicity of some plant proteins[J]. Journal of Biological Chemistry, 1997, 272(50): 31340-7.

[4] STRASSER R, MUCHA J, MACH L, *et al*. Molecular cloning and functional expression of beta1, 2-xylosyltransferase cDNA from *Arabidopsis thaliana*[J]. Febs Letters, 2000, 472(1): 105-8.

[5] REITER W D. Biosynthesis and properties of the plant cell wall[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(6): 536-542.

[6] SEIFERT G J. Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7(3): 277-284.

[7] ISHII T, MATSUNAGA T, PELLERIN P, *et al*. The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. [J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(19): 13098-13104.

[8] O'NEILL M A, ISHII T, ALBERSHEIM P, *et al*. Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 55(1): 109.

[9] STEVENSON T T, ALAN G. DARVILL, PETER ALBERSHEIM. Structural features of the plant cell-wall polysaccharide rhamnogalacturonan-II[J]. Carbohydrate Research, 1988, 182(2): 207-226.

[10] GOLOVCHENKO V V, OVODOVA R G, SHASHKOV A S, *et al*. Structural studies of the pectic polysaccharide from duckweed *Lemna minor* L. [J]. Phytochemistry, 2002, 60(1): 89-97.

[11] HAHLBROCK K, KNOBLOCH K H, KREUZALER F, *et al*. Coordinated induction and subsequent activity changes of two groups of metabolically interrelated enzymes[J]. Eur. J. Biochem., 1976, 61(1): 199 - 206.

[12] HARPER A D, BARPELED M. Biosynthesis of UDP-Xylose. cloning and characterization of a novel *Arabidopsis* Gene family, UXS, encoding soluble and putative membrane-bound UDP-Glucuronic acid decarboxylase isoforms[J]. Plant Physiology, 2002, 130(4): 2188-98.

[13] MØLHØJ M, VERMA R, REITER W D. The biosynthesis of the branched-chain sugar d-apiose in plants: functional cloning and characterization of a UDP-d-apiose/UDP-d-xylose synthase from *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2003, 35(6): 693.

[14] AHN J W, VERMA R, KIM M, *et al*. Depletion of UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthases results in rhamnogalacturonan-II deficiency, cell wall thickening, and cell death in higher plants. [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(19): 13708.

[15] 尹森. 虎眼万年青天然产物糖苷生物合成关键酶基因的克隆和功能研究[D]. 北京：北京协和医学院，2016.

[16] PATTATHIL S, HARPER A D, BAR-PELED M. Biosynthesis of UDP-xylose: characterization of membrane-bound *AtUxs2*[J]. Planta, 2005, 221(4): 538.

[17] SUZUKI K, SUZUKI Y, KITAMURA S. Cloning and expression of a UDP - glucuronic acid decarboxylase gene in rice [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(389): 1997.

[18] SUZUKI K, WATANABE K, MASUMURA T, *et al*. Characterization of soluble and putative membrane-bound UDP-glucuronic acid decarboxylase (*OsUXS*) isoforms in rice[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2004, 431(2): 169-77.

[19] ZHANG Q, FINCHER G B. Characterization and expression patterns of UDP-D-glucuronate decarboxylase genes in barley [J]. Plant Physiology, 2005, 138(1): 131-41.

[20] GUYETT P, GLUSHKA J, GU X, *et al*. Real-time NMR monitoring of intermediates and labile products of the bifunctional enzyme UDP-apiose/UDP-xylose synthase [J]. Carbohydrate Research, 2009, 344(9): 1072-8.

[21] YIN S, KONG J Q. Transcriptome-guided gene isolation and functional characterization of UDP-xylose synthase and UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase families from *Ornithogalum caudatum* Ait[J]. Plant Cell Reports, 2016, 35(11): 1-19.

[22] DU Q, PAN W, TIAN J, *et al*. The UDP-glucuronate decarboxylase gene family in *Populus*: structure, expression, and association genetics. [J]. Plos One, 2013, 8(4): 60880.

[23] LI Z, GAO L, WANG Y T, *et al*. Carbohydrate metabolism changes in *Prunus persica* gummosis infected with *Lasiodiplodia theobromae*[J]. Phytopathology, 2014, 104(5): 445.

[24] 俞新妥. 中国杉木研究进展（2000－2005）I. 杉木生理生态研究综述[J]. 福建林学院学报，2006，26(2)：177-185.
YU X T. Progress in research on Chinese fir (2000－2005) I. Chinese fir physiological and ecological research review[J]. Journal of Fujian Forestry College, 2006, 26(2): 177-185. (in Chinese)

[25] 郭婷，董莉，魏秀丽，等. 杉木的萜类化学成分研究[J]. 中国药学杂志，2016，51(15)：1278-1281.
GUO T, DONG L, WEI X L, *et al*. Terpene constituents from *Cunninghamia lanceolate*[J]. Chin. Pharm. J., 2016, 51(15): 1278-1281. (in Chinese)

（下转第 143 页）

[22] 刘少军,周广胜,房世波. 中国橡胶树种植气候适宜性区划[J]. 中国农业科学,2015,48(12):2335-2345.
LIU S J,ZHOU G S,FANG S B. Climatic suitability regionalization of rubber plantation in China[J]. Scientia Agricultura Sinica,2015,48(12):2335-2345. (in Chinese)

[23] 刘少军,周广胜,房世波. 中国橡胶种植北界研究[J]. 生态学报,2016,36(5):1272-1280.
LIU S J,ZHOU G S,FANG S B. A preliminary study of the northern planting boundary of rubber tree cultivation in China [J]. Acta Ecologica Sinica,2016,36(5):1272-1280. (in Chinese)

[24] 李国尧,王权宝,李玉英,等. 橡胶树产胶量影响因素[J]. 生态学杂志,2014,33(2):510-517.
LI G Y,WANG Q B,LI Y Y,*et al*. A review of influencing factors on latex yield of *Hevea brasiliensis*[J]. Chinese Journal of Ecology,2014,33(2):510-517. (in Chinese)

[25] 杨铨. 几种气象因子与产胶量的关系[J]. 中国农业气象,1989(1):42-44.
YANG Q. The relationship between several meteorological factors and the yield of rubber[J]. Chinese Journal of Agrometeorology ,1989(1):42-44. (in Chinese)

[26] 金华斌,田维敏,史敏晶. 我国天然橡胶产业发展概况及现状分析[J]. 热带农业科学,2017,37(5):98-104.
JIN H B,TIAN W M,SHI M J. Current situation and industrial development of natural rubber in China[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture,2017,37(5):98-104. (in Chinese)

[27] 孙海东,刘备,吴炳孙,等. 橡胶树人工林地土壤酸度特征及酸化原因分析[J]. 西北林学院学报,2016,31(2):49-54.
SHUN H D,LIU B,WU B S,*et al*. Characteristics and causes of soil acidification in the rubber plantation[J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(2):49-54. (in Chinese)

[28] 袁坤,杨礼富,陈帮乾,等. 海南植胶区橡胶树死皮发生现状分析[J]. 西北林学院学报,2016,31(1):176-179.
YUAN K,YANG L F,CHEN B Q,*et al*. Current situation of *Hevea brasilinesis* tapping panel dryness occurring in Hainan [J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(1):176-179. (in Chinese)

[29] 吴春太,李维国,黄华孙. 近年来国内外橡胶树种质资源与育种方法研究新进展[J]. 西北林学院学报,2013,28(2):118-124.
WU C T,LI W G ,HUANG H S. Research progresses on *Heaven* germ plasm resources and breeding methods[J]. Journal of Northwest Forestry University,2013,28(2):118-124. (in Chinese)

(上接第 90 页)

[26] 刘娟,张曼,刘品,等. 杉木化学成分及药理作用研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2010(9):8-9.
LIU J,ZHANG M,LIU P,*et al*. Research on chemical constituents and pharmacological activity of *Cunninghamia lanceolata*.[J]. Journal of Liaoning University of TCM,2010(9):8-9. (in Chinese)

[27] 张磊,叶志玮,赵晨曦,等. 沙柳 *SpsLAZY1a* 和 *SpsLAZY1b* 基因克隆及生物信息学分析[J]. 西北林学院学报,2017,32(1):98-105.
ZHANG L,YE Z W,ZHAO C X,*et al*. Cloning and bioinformatics analysis of *SpsLAZY1a* and *SpsLAZY1b* Genes in *Salix psammophila*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2017,32(1):98-105. (in Chinese)

[28] 苏烁烁,李明,吴鹏飞,等. 杉木磷转运蛋白基因 ClPht1;1 的克隆及表达分析[J]. 林业科学,2017,53(5):33-42.
SU S S,LI M,WU P F,*et al*. Cloning and expression analysis of phosphate transporter gene ClPht1;1 in *Cunninghamia lanceolata*[J]. Science Silvae Sincae,2017,53(5):33-42. (in Chinese)

[29] 苏烁烁. 基于转录组测序的杉木磷转运相关基因的鉴定及表达分析[D]. 福州:福建农林大学,2017.

[30] 郑程莉,蔡永华,朱吉彬,等. 林麝生长激素基因的克隆与生物信息学分析[J]. 西北林学院学报,2016,31(6):214-219.
ZHENG C L,CAI Y H,ZHU J B,*et al*. Bioinformatics analysis of *Moschus berezovskii* GH gene[J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(6):214-219. (in Chinese)

[31] 虎娟,张虹,蒋清安,等. 黑果枸杞花青素生物合成关键基因的生物信息学分析与克隆[J]. 西北林学院学报,2017,32(6):1-11.
HU J,ZHANG H,JIANG Q A,*et al*. Bioinformatics analysis and cloning of the key genes associated with anthocyanin biosynthesis from *Lycium ruthenicum*[J]. Journal of Northwest Forestry University,2017,32(6):1-11. (in Chinese)

[32] 游韩莉,袁义杭,李长江,等. 青杆 MYB 转录因子基因 PwMYB20 的克隆及表达分析[J]. 林业科学,2017,53(5):23-32.
YOU H L,YUAN Y H,LI C J,*et al*. Cloning and expression analysis of MYB homologous gene *PwMYB20* from *Picea wilsonii*[J]. Science Silvae Sincae,2017,53(5):23-32. (in Chinese)

[33] 尹奇. 木薯块根淀粉代谢相关基因克隆和表达分析[D]. 海口:海南大学,2013.