

# 黄瓜水苏糖合成酶基因的全长 cDNA 克隆及序列分析

缪旻珉, 程皓, 马晨澄 (扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

**摘要** [目的] 克隆黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 水苏糖合成酶 (STS) 基因全长 cDNA, 为深入研究黄瓜同化物运输机理奠定基础。[方法] 以黄瓜品种津研 4 号成熟叶片为材料, 采用 RT-PCR 结合 RACE 技术, 克隆得到 3 个黄瓜水苏糖合成酶全长 cDNA。[结果] 3 序列 (GenBank 登录号分别为: EU096496、EU096497、EU096498) 长度分别为 3 016、3 081、3 153 bp, 编码相同的 846 个氨基酸。序列分析结果表明, 黄瓜 STS 与其他高等植物的 STS 具有较高的同源性。[结论] 3 个 cDNA 序列的差异主要表现在 3' 非翻译区长度不等, 推测可能由同一基因经 3' 非翻译区可变剪接生成。

**关键词** 水苏糖合成酶; 黄瓜; 可变剪接

**中图分类号** S642.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)29-12613-03

## Cloning and Sequence Analysis of Stachyose Synthase Gene in *Cucumis sativus* L.

MIAO Min-min et al (School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009)

**Abstract** [Objective] The research aimed to clone full length cDNA of STS (Stachyose Synthase Gene) for further research on assimilation loading mechanism of cucumber (*Cucumis sativus* L.). [Method] Full length cDNA sequences were of a STS were cloned from cucumber (Jinyan No. 4) mature leaves using RT-PCR and rapid amplification of cDNA ends (RACE). [Result] Three cDNA sequences were consisted of 3016, 3081 and 3153 bp, respectively, with the same ORFs encoding a putative protein of 846 amino acids. Sequence analysis revealed that this putative protein was high homologous to the reported STS proteins of other plants. [Conclusion] Three cDNA sequences were only different in their 3' untranslated regions, indicating that they might be produced by alternative splicing from the same gene.

**Key words** Stachyose synthase; *Cucumis sativus* L.; Alternative splicing

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是一种具有重要经济价值的葫芦科植物。它以水苏糖作为体内光合产物的主要运输形式, 其叶片光合作用合成的蔗糖必须经过一系列反应转化为水苏糖后才能完成韧皮部装载过程。水苏糖合成酶 (Stachyose Synthase, STS) 催化水苏糖合成过程中的第 3 步反应: 棉子糖 + 肌醇半乳糖苷 → 水苏糖 + 肌醇, 是黄瓜同化物装载过程中的关键酶之一<sup>[1]</sup>。目前, 关于同化物如何向黄瓜韧皮部装载的具体机理并不清楚, 研究水苏糖合成酶的时空表达规律可为阐明该机理提供重要线索, 而克隆黄瓜水苏糖合成酶基因则是进行这项工作的第一步。Tanner 等首次从普通菜豆种子中分离得到 STS 并对其动力学特征进行了研究<sup>[2]</sup>。Holthaus 等研究表明, 甜瓜中水苏糖主要在成熟叶片和种子中合成 (除叶绿体外), 并研究了甜瓜水苏糖的各种酶学性质, 发现该酶在 32 °C、pH 值 6.8 的磷酸盐中活性最高<sup>[3]</sup>。Peterbauer 等从赤豆种子中克隆了水苏糖合成酶基因, 并在 *sf 21* 昆虫细胞真核表达系统中进行了异源表达, 结果表明具有水苏糖合成酶催化活性。高水平的水苏糖合成酶可在种子发育过程中被瞬时累积, 同时也在成熟种子和种子萌发中存在<sup>[4]</sup>。Peterbauer 等又纯化了豌豆种子中的水苏糖合成酶并成功克隆了该酶的基因<sup>[5]</sup>。为此, 该试验根据其他高等植物中已克隆的水苏糖合成酶基因的保守序列, 设计引物, 利用 RT-PCR 结合 RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 技术, 克隆黄瓜 STS 基因的全长 cDNA, 以期为深入研究黄瓜同化物的装载机理, 并进而为黄瓜高产优质栽培和育种策略的制定做准备。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 以黄瓜品种津研 4 号为材料, 于 2006 年 4 月种植于扬州大学蔬菜试验田中, 于 5 月底晴朗下午 16:00 左右采集上述黄瓜品种的成熟叶片 (当时气温 20 °C 左右), 立即

投入液氮速冻保存, 取靠近中脉的叶肉组织 (含叶脉) 提取总 RNA。

## 1.2 方法

**1.2.1 黄瓜水苏糖合成酶 cDNA 片段的克隆和分析。** 按照 QIAGEN 公司的 RNeasy Plant Mini Kits 说明书提取总 RNA, -80 °C 保存备用。根据 Genbank 中已发表的豌豆 (AJ311087)、赤豆 (Y19024)、拟南芥 (NM116428) 水苏糖合成酶的 cDNA 序列, 在同源区设计 5' 端引物 5' TTCAGGT-TCAAAACCTGGTGTC3' 和 3' 端引物 5' CCTCCATACTTGTT-GAAGTTC3', 以总 RNA 为模板, RT-PCR 反应参照 Promega 公司的 AMV Reverse Transcriptase 说明书进行。PCR 反应体系为 50 μl, 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 55 °C 复性 1 min, 72 °C 延伸 90 s, 40 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序, 得到序列后用 DNAMAN 软件与其他植物水苏糖合成酶的 cDNA 序列进行同源性比对。

**1.2.2 黄瓜水苏糖合成酶全长 cDNA 全长序列的克隆和分析。** 根据获得的黄瓜水苏糖合成酶 cDNA 片段序列, 设计 5' 端 RACE 后置引物 5' GGTTCGAAGATCCGAATGGT3' 和 3' 端 RACE 前置引物 5' CTTTCTAAAGTTGGATTACAGGAGTG3', 以黄瓜成熟叶片总 RNA 为模板, 以一对引物进行 RT-PCR 反应, RACE 的反应条件按照 Clontech 公司 SMART™ RACE cDNA Amplification Kit 说明书进行。PCR 产物送上海生工生物工程技术有限公司测序, 得到序列后用 DNAMAN 软件拼接并翻译成氨基酸与 GenBank 中已发表的其他植物水苏糖合成酶的氨基酸序列进行同源性比对, 并用 Clustalx 软件对黄瓜水苏糖合成酶和 GenBank 中已发表的其他植物水苏糖合成酶的氨基酸序列进行聚类分析。

## 2 结果与分析

**2.1 黄瓜水苏糖合成酶全长 cDNA 的克隆结果** 试验得到长度约为 1 700 bp 的目的片段。测序后 (1 727 bp) 用 DNAMAN 软件将该序列与 GenBank 上其他植物的水苏糖合成酶

**作者简介** 缪旻珉 (1973-), 男, 江苏如东人, 副教授, 从事园艺植物生物技术研究。

**收稿日期** 2008-07-24

DNA 序列进行同源性比对,发现有较高的同源性。以黄瓜成熟叶片总 RNA 为模板,经 5'端 RACE-PCR 扩增出长度为 1 718 bp 片段,经 3'端 RACE-PCR 扩增出长度分别为 1 090、1 150、1 227 bp 3 个片段,将这些片段与上述 1 727 bp 片段进

行序列拼接,获得了 3 条长度分别为 3 016、3 081、3 153 bp 的全长 cDNA 序列(图 1),GenBank 登录号分别为 EU096496、EU096497、EU096498。



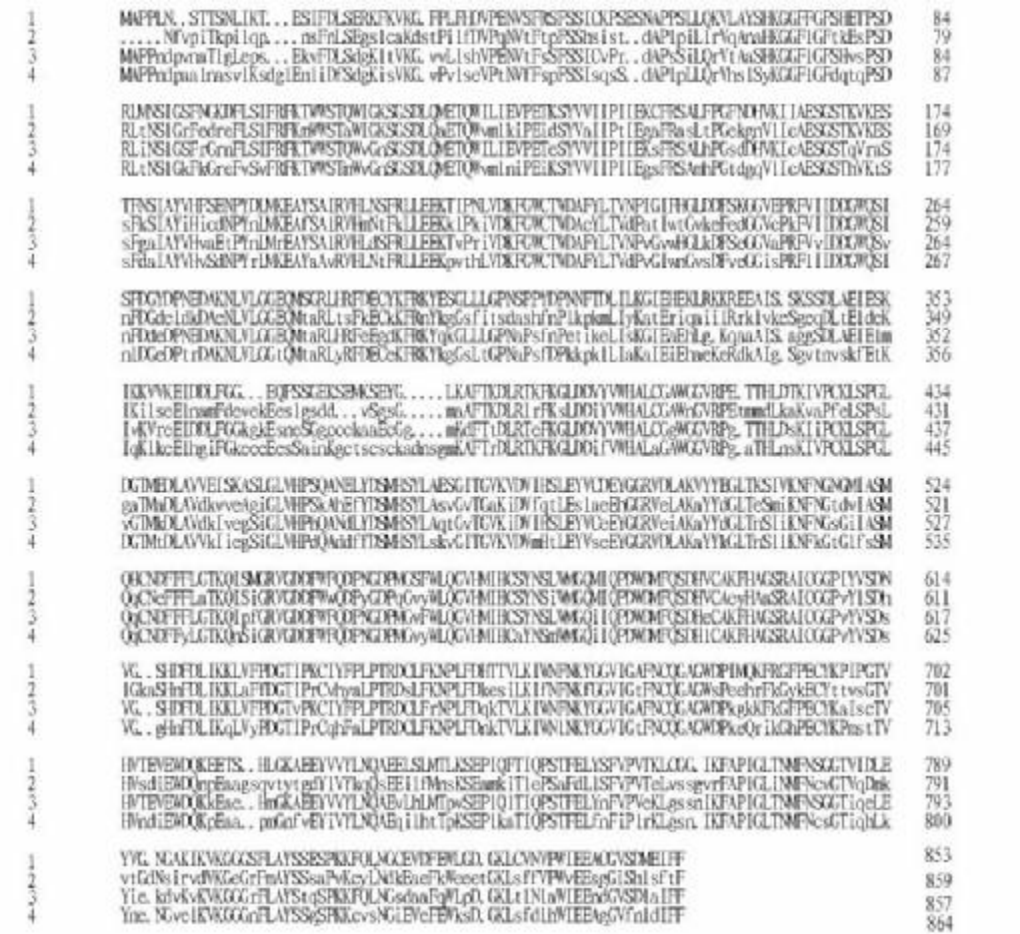
注:1 为黄瓜水苏糖合成酶形式 I (EU096496) 3'非翻译区;2 为黄瓜水苏糖合成酶形式 II (EU096497) 3'非翻译区;3 为黄瓜水苏糖合成酶形式 III (EU096498) 3'非翻译区。单下划线表示终止子。  
 Note:1. 3'untranslated region of cucumber stachyose synthetase I (EU096496); 2. 3'untranslated region of cucumber stachyose synthetase II (EU096497); 3. 3'untranslated region of cucumber stachyose synthetase III (EU096498). Stop codon is underlined with a mongline.

图 1 黄瓜水苏糖合成酶 3 种形式 3'非翻译区 cDNA 序列

Fig. 1 3' untranslated region cDNA sequence of three cucumber stachyose synthetases

2.2 黄瓜水苏糖合成酶基因序列分析 推导上述 cDNA 的氨基酸序列,其开放阅读框(ORF)为 252~2 846 bp,编码 864 个氨基酸。与 GenBank 上其他植物的水苏糖合成酶的序列进行比对,发现有较高的同源性,与豌豆 (*Pisum sativum*)、赤

豆 (*Vigna angularis*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 水苏糖合成酶 cDNA 序列的同源性分别达 59.99%、63.36% 和 56.79%,氨基酸序列的同源性分别为 65.13%、68.59% 和 59.45% (图 2)。



注:1 为豌豆 *Pisum sativum* (AJ311087); 2 为拟南芥 *Arabidopsis thaliana* (NM116428); 3 为赤豆 *Vigna angularis* (Y19024); 4 为黄瓜 *Cucumis sativus* L. (EU096496)。  
 Note:1. *Pisum sativum* (AJ311087); 2. *Arabidopsis thaliana* (NM116428); 3. *Vigna angularis* (Y19024); 4. *Cucumis sativus* L. (EU096496).

图 2 不同植物 STS 基因氨基酸序列同源性比较

Fig. 2 Sequence similarity comparison of deduced amino acid sequences of STS gene in different plants

用 Clustalx 软件对克隆所得的黄瓜 STS cDNA 和 GenBank 中已报道的其他植物的 6 个 STS 序列进行聚类分析,结果表明,STS 基因与 *Alonsoa meridionalis* STS 及草石蚕 STS 的序列相似度高,而与豌豆、赤豆、拟南芥 STS 序列相差较大(图 3)。



图 3 黄瓜 STS 基因氨基酸序列与其他植物氨基酸序列聚类分析结果

Fig.3 Phylogenetic analysis of amino acid sequence of cucumber STS gene with other reported genes

### 3 结论与讨论

(1) 试验所克隆的 3 条全长 cDNA 序列编码的氨基酸序列与 GenBank 已报道的其他高等植物的 STS 氨基酸序列具高度同源性,因此,这 3 条 cDNA 所对应的基因可能为黄瓜 STS 基因。目前,笔者正将这些序列的编码区置于昆虫表达系统中进行离体表达,以进一步验证表达产物是否具有 STS 活性。黄瓜 STS 催化水苏糖生物合成的关键步骤,克隆该基因可为进一步研究该酶的时空表达规律,并进而揭示黄瓜同化物的装载机理打下良好基础。

(2) 该试验所克隆的 3 条全长 cDNA 编码区序列完全一致,但是 3'非翻译区长度不同,这一现象可能由同一基因转录后的可变剪接所致。若想进一步证实这一现象确实为可变剪切现象,应在编码区设计探针,以黄瓜基因组 DNA 为材料进行 Southern 杂交分析,如始终产生单一条带,则表明该试验克隆的 3 条 cDNA 确实由可变剪切生成,目前这项工作正在进行中。

(3) 生物体内,转录后生成的核不均一 RNA(hnRNA)必须经过剪接方可形成成熟的 mRNA。hnRNA 的剪切可分为组成性剪接和可变剪接。组成性剪接是指 hnRNA 成熟时总是在固定的剪切点进行剪切,合成相同的 mRNA,大多数基因表达时的剪切过程属于这一类。可变剪接是指同一基因的转录产物在不同的发育阶段、分化细胞或生理状态下,通过不同的剪接方式,可以得到不同的 mRNA,又可进一步分为编码区可变剪接和非编码区可变剪接。编码区可变剪接可翻译出不同的蛋白质,而非编码区剪接虽然翻译的蛋白质相同,但因为非翻译区的序列常对 mRNA 的表达模式、表达强度和细胞中存在的半衰期产生影响,事实上已成为生物体调节基因表达的一种重要手段<sup>[6]</sup>。Jia 等发现,枳(*Poncirus trifoliata*)的 *CLT* 基因表达时存在 3'非翻译区可变剪切现象,CLTa 转录本只在低温胁迫时表达,而 CLTb 转录本则为组成性表达,显然,该基因的可变剪切对枳的低温适应具有调节作用<sup>[7]</sup>。试验中的 3 条 cDNA 如确系 3'非翻译区可变剪切生成,其在黄瓜同化物装载过程中的调节作用值得进一步研究。

### 参考文献

- [1] 蒋亚华,缪旻琰,陈学好,等. 黄瓜叶片和韧皮部汁液中碳水化合物及相关酶的日变化[J]. 园艺学报,2006,33(3):529-533.
- [2] TANNER W, KANDLER O. Biosynthesis of stachyose in *Phaseolus vulgaris* [J]. Plant Physiol, 1966, 41: 1540-1542.
- [3] HOLTHAUS U, SCHMITZ K. Stachyose synthesis in mature leaves of *Cucumis melo*. Purification and characterization of stachyose synthase (EC 2.4.1.67) [J]. Planta, 1991, 184(4): 525-531.
- [4] PETERBAUER T, MUCHA J, MAYER U, et al. Stachyose synthesis in seeds of adzuki bean (*Vigna angularis*): Molecular cloning and functional expression of stachyose synthase [J]. Plant J, 1999, 20(5): 509-518.
- [5] PETERBAUER T, MUCHA J, MACH L, et al. Chain elongation of raffinose in pea seeds. Isolation, characterization, and molecular cloning of a multifunctional enzyme catalyzing the synthesis of stachyose and verbascose [J]. J Biol Chem, 2002, 277(1): 194-200.
- [6] REDDY A. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era [J]. Annu Rev Plant Biol, 2007, 58: 267-294.
- [7] JIA Y, RIO H S Del, ROBBINS A L, et al. Cloning and sequence analysis of a low temperature induced gene from trifoliolate orange with unusual pre-mRNA processing [J]. Plant Cell Rep, 2004, 23(3): 159-166.

(上接第 12612 页)

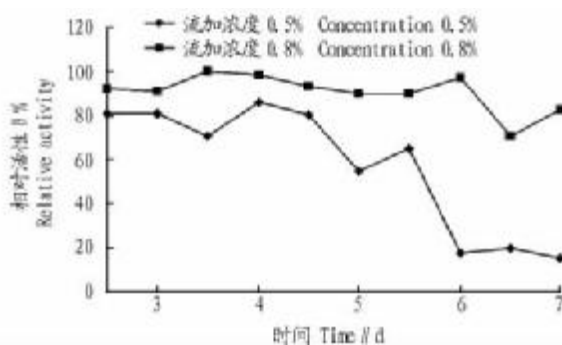


图 4 甲醇流加浓度为 0.5% 和 0.8% 时的产酶水平比较

Fig.4 Comparison of enzyme production with 0.5% and 0.8% methanol concentrations

生产木聚糖酶的优势。

(2) 甲醇诱导试验表明,该菌每 12 h 流加 1 次甲醇的产酶优于每 24 h 流加 1 次,0.8% 甲醇终浓度的诱导优于 0.5%

终浓度,这与刘明启等<sup>[7]</sup> 0.5% 终浓度的最优诱导条件不同,说明该重组毕赤酵母木聚糖酶的产生依赖较高浓度的甲醇,这是毕赤酵母工程菌生产木聚糖酶时要注意的。

### 参考文献

- [1] 张红莲,姚斌,王亚茹,等. 链霉菌 *Streptomyces olivaceoviridis* A1 木聚糖酶基因 *xynA* 在大肠杆菌及毕赤酵母中的高效表达 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(1): 41-45.
- [2] 江正兵,宋慧婷,马立新. 短小芽孢杆菌木聚糖酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(1): 50-55.
- [3] 陆健,曹钰,陈坚. 运用定点突变提高重组木聚糖酶在毕赤氏酵母中的表达 [J]. 微生物学报, 2002, 42(4): 425-430.
- [4] 李春华,李翔,马立新,等. 酸性木聚糖酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的分泌表达 [J]. 微生物学通报, 2005, 32(6): 89-95.
- [5] 杨梦华,李颖,关国华,等. 极端耐热木聚糖酶基因在大肠杆菌和毕赤酵母中的高效表达 [J]. 微生物学报, 2005, 45(2): 236-240.
- [6] BRADFORD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [7] 刘明启,孙建义,翁晓燕,等. 重组毕赤酵母产木聚糖酶条件的优化 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(2): 222-226.