

梅菊芬,徐德良,汤茶琴,等. 茶树 *CsLhcb4* 基因的电子克隆与生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(9):51-55.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.010

茶树 *CsLhcb4* 基因的电子克隆与生物信息学分析

梅菊芬,徐德良,汤茶琴,周静峰,邵元海

(无锡市茶叶品种研究所/江苏省茶树种质改良与推广工程技术中心,江苏无锡 214125)

摘要:采用电子克隆方法获得茶树 CP29 蛋白的 cDNA 序列(*CsLhcb4*),并进行相关生物信息学分析。结果表明,该基因包含 1 个 858 bp 的开放阅读框,编码 285 个氨基酸,分子量为 31.1 ku,理论等电位点 5.79。该基因为亲水蛋白,可能位于叶绿体上,属于叶绿素 a/b 连接蛋白超家族成员,其二级结构主要是 α -螺旋和无规则卷曲,三级结构构建模为单体形式。序列进化分析表明,茶树 *CsLhcb4* 基因编码蛋白与大豆、欧洲大叶杨和陆地棉进化距离最近。以上结果为进一步分析 *CsLhcb4* 的功能及花青素代谢中的作用奠定基础。

关键词:茶树;*CsLhcb4*;电子克隆;生物信息学;亲水蛋白;叶绿体;序列进化分析

中图分类号:S571.101;Q785 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)09-0051-04

光合作用产物是人类赖以生存和发展的基础,光捕获是植物光合作用的重要过程。在高等植物中,捕光叶绿素 a/b 结合蛋白(light harvesting chlorophyll a/b binding protein, LHC)是光捕获中的重要功能蛋白,其与叶绿素 a/b 形成复合体,将光能迅速传到光系统 I (PS I)和光系统 II (PS II)的反应中心,使光能转化为化学能,促进光合反应的进行^[1]。PS I 和 PS II 都含有各自的 LHC,即 LHC I 和 LHC II。其中,LHC II 在类囊体膜上的含量最为丰富,它所结合的叶绿素约占类囊体膜上色素量的 50%,目前研究较多,也是结构较清楚的一类膜蛋白^[1-3]。LHC II 被认为是一类结构相似、进化相关、由核基因家族(*Lhcb*)编码的蛋白,与色素所形成的色素蛋白复合体家族,含有保守的叶绿素结合(chlorophyll binding, CB)结构域,它们除进行光能的捕获与传递外,还广泛参与了激发能在 PS I 和 PS II 之间的调节与分配、类囊体膜结构的维持、光保护以及对各种环境的应答等^[4]。LHC II 主要由 6 种色素蛋白复合体组成,分别由 *Lhcb 1*、*Lhcb 2*、*Lhcb 3*、*Lhcb 4*、*Lhcb 5* 和 *Lhcb 6* 编码,其组成了 4 种蛋白亚复合物,LHC II a、LHC II b、LHC II c、LHC II d。其中,LHC II b 为主体 LHC II,包括 LHCB1、LHCB2、LHCB3;其他 3 种合称为微量 LHC II,分别为 LHC II a (LHCB4)、LHC II c (LHCB5)、LHC II d (LHCB6)^[1]。

LHCB4 别称 CP29,是 PS II 内部天线叶绿素 a/b 结合亚复合体,其为次要捕光色素蛋白,较其他蛋白复合体更接近 PS II 核心复合物,其编码基因为 *Lhcb4*^[1]。目前已从拟南芥、水稻、杨树、菠菜、银杏等多种高等植物中克隆了 *Lhcb4* 基因,并研究了其在各种生态环境下的表达情况^[5-10]。

近年,茶树育种目标倾向叶色多样化,白化或紫化等特异

叶色品种的选育成为茶树新品种选育的热点。研究表明,光是诱导茶树花青素形成的主要原因^[11],光合作用与花青素的合成之间是否存在一定关系有待于研究。本研究从紫芽中筛选到下调表达基因片段,Blastx 比对为 *Lhcb4* 的部分基因片段。以该基因片段为探针,在 NCBI 中 Blast 检索茶树中与探针序列相似性较高的 ESTs,然后利用 DNASTar 进行序列拼接,得到茶树叶绿素 a/b 结合蛋白 CP29 基因(*CsLhcb4*),利用生物信息学技术预测该基因编码蛋白的理化性质和结构分析,为后续研究 *CsLhcb4* 与花青素代谢的关系提供参考。

1 材料与与方法

1.1 材料

笔者所在研究组从紫芽中筛选的差异表达基因片段(*D-ZY-5*),经 Blastx 比对为 *Lhcb4* 的部分基因片段。

1.2 方法

1.2.1 茶树 *CsLhcb4* 基因的电子克隆 以差异筛选的 EST 基因片段为查询探针,利用 NCBI 中的 Blastn 工具,搜索茶树 EST 数据库(taxid:4442),得到具有高度同源性(选择相似性大于等于 90%,覆盖率大于 100 bp)的 EST 序列,再利用 DNASTar 进行重叠区域拼接和组装,构建重叠序列群。以重叠序列群为信息标签,进一步检索比对,搜索高度同源序列,并拼接组装,直至没有发现高度同源序列。在非冗余数据库中进行搜索,确认新基因序列,获得茶树 *CsLhcb4* 的 cDNA 序列。

1.2.2 茶树 *CsLhcb4* 基因及蛋白质序列的生物信息学鉴定

以 NCBI 的 ORFfinder 和 Conserved Domain Database 功能对扩增的基因序列进行蛋白质翻译及其保守结构域预测。以 ExPasy 的在线分析软件对蛋白序列进行理化性质(ProtParam tool)、疏水性(ProtScale)、二级结构(SOPMA)和三维结构分析预测(SWISS-MODEL),同时利用在线分析工具分析无序区域(foldindex)、亚细胞定位(TargetP 1.1 Server)及磷酸化位点预测(NetPhos 3.1 Server)。利用 NCBI 的 PSI-BLAST 进行蛋白序列同源比对,利用 DNAMAN 软件进行同源蛋白的氨基酸多序列比对并用 Mega 构建系统进化树。

收稿日期:2016-12-02

基金项目:国家茶产业技术体系建设专项(编号:CARS23);江苏省自然科学基金(编号:BK2011174);江苏省无锡市科技发展项目(编号:CLE02N1512)。

作者简介:梅菊芬(1982—),女,江苏宜兴人,硕士,高级农艺师,主要从事茶树育种与分子生物学研究。E-mail:meijufen@sina.com。

2 结果与分析

2.1 茶树 *CsLhcb4* 基因克隆及序列分析

以筛选的 *EST* 基因片段为查询探针,利用 Blastn 对茶树 *EST* 数据库进行搜索,得到 2 个高度同源的 *EST* 序列 (FS954792.1 和 JK993206.1),利用 DNASTar 对序列进行重叠区域拼接和组装,在以拼接的重叠序列群进行检索,得到高度同源的 *EST* 序列 (FS960161.1),重复拼接得到茶树 *CsLhcb4* 基因 cDNA 序列,长度为 1 085 bp。经 ORFfinder 分

析,该基因包含 1 个 858 bp 的 ORF,编码 1 个含 285 个氨基酸的蛋白质。

2.2 茶树 CP29 蛋白保守结构域预测

利用 NCBI 在线分析软件 Conserved Domain Database (CDD)对蛋白进行结构域分析,结果(图 1)显示,在茶树叶绿素 a/b 连接蛋白 CP29 的氨基酸序列第 13 个和第 285 个之间存在光系统 II 光捕获复合体结构域(PLN00187),编码蛋白属于叶绿素 a/b 连接蛋白超家族成员。



图1 茶树 CP29 蛋白保守结构域预测

2.3 茶树 CP29 蛋白同源比对及序列进化分析

在 NCBI 中的 Blastp 中采用 PSI - Blast 方法在 refseq 数据库中进行氨基酸序列同源比对,结果显示,有 478 个蛋白与茶树 CP29 蛋白同源,一致性最大为 89%,最小为 32%,这些蛋白包括假定未知的蛋白、预测的蛋白、功能已鉴定的蛋白,它们都有叶绿素 a/b 结合蛋白超家族结构域(PLN00187),相对保守。在功能已鉴定的蛋白中,茶树 CP29 蛋白与陆地棉 CP29.1(NP001314598.1)、欧洲大叶杨 CP29(XP002323575.1)、大豆 CP29(NP001304343.1)、拟南芥(NP187506.1)、深山南

芥(XP002873005.1)、玉米(NP001105502.1)、衣藻(XP001697193.1)、绿藻(XP005646225.1)一致性分别是 87%、87%、87%、83%、83%、82%、51%、47%,这表明植物叶绿素 a/b 连接蛋白 CP29 序列在不同植物之间具有一定程度的序列分化。利用 DNAMAN 软件将茶树与这 8 个植物的 CP29 蛋白进行多重比较分析,序列一致性为 74.19%(图 2)。Mega 构建系统发育树表明,高等植物的 CP29 区别于藻类,在进化距离上较近;茶树与大豆、欧洲大叶杨和陆地棉进化距离最近,聚为一类(图 3)。

茶树	MAATTS.AAATTSFIFGTFP.EVHSGSGVGRFEGGAKKA...PAKRF...AKPGS.D...RFLWHPGAKAEWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	85
陆地棉	MAAVTN.AAATTSFMTTRFP.DVYTSSEGFVAREFGGKKA...APKKA...SKQTS.D...RFLWHPGAVPEWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	85
欧洲大叶杨	MAATTA.AAATTSFIFGTRVP.DVYSNAGRIQAREGFG...KK...APKRS...IKTIP.D...RELWHPGAKAPEYLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	83
大豆	.MATAT.AAATTSFMTTRLL.EAHSGAGVHAREFGGKKA...PAQKK...ASRGS...GRDVTRELWHPGAKAPEYLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	88
玉米	..MASSVAAAATFLETRLA.DPAPQNGIVAREGFG.LGGKAKPAPKRV...AKTSTSSD...RELWHPGAVAPDYLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	89
深山南芥	MAATSAAAAASIMCTVAVGFIHPGSSRFTLHSEGGKKA...APKRSASKKTVIT.D...RELWHPGAISEWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	90
拟南芥	MAATST.AAAAASIMCTRVVSDISSNSSFTARFEGGTTKKA...SPKKA...KTVIS.D...RFLWHPGAKSEYLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	86
衣藻MVFKFPTPPCTQKAGGTTATKPAKATTKKVATST...GTRSGGVGYRKYQ..G...DALMLPNTTRPEWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	84
绿藻MVHLSSGFLGSTITALAPQNGAKTVMATKIVRKAQK...AANSATRTYKKF.D.G...DALMLPNTTRPEWLDGSLVGDYGFDPFGLGKPEAY	85
茶树	LQFELDSDLDONLANNLACDIIIGTR.....FESADVKSTPEFCPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALTEWLTGVTWQIAGKVELLEGSSYIGQ	178
陆地棉	LQYDLSLDLDONLANNMAGEIIGTR.....TEVADVKNATPEFCPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALTEWLTGVTWQIAGKVELLEGSSYIGQ	178
欧洲大叶杨	LQFELDSDLDONLANNLACDIIIGTR.....TEVSDVKSPEFCPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALTEWLTGVTWQIAGKVELLEGSSYIGQ	176
大豆	LQFELDSDLDONLANNVAGDIIIGTR.....TELADVKSPEFCPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALTEWLTGVTWQIAGKVELLEGSSYIGQ	181
玉米	LQFELDSDLDONLANNRFGIIGTR.....FESSEVKSPEFCPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALTEWLTGVTWQIAGKVELLEGSSYIGQ	182
深山南芥	LQFELDSDLDONLANNLACDVIIGTR.....TEAADAKSTPEFCPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALTEWLTGVTWQIAGKVELLEGSSYIGQ	183
拟南芥	LQFELDSDLDONLANNLYGVIIGTR.....TEAVDFKSTPEFCPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALTEWLTGVTWQIAGKVELLEGSSYIGQ	179
衣藻	LVIGVDENDONAAANNKGSVEI...VQAPDEVSSENRLAPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALVAPATTGQSWVWAGKVELLEGSSYIAGL	178
绿藻	LQVDLDSLDLNNKSNKGGIVGKYSSSKVCAAGAA.....LSPYSEVFLGRFREDELHGRWAMLATLGALVAPATTGQSWVWAGKVELLEGSSYIAGL	178
茶树	SLPFSITLILIEVLVIGYTEFQRNAELDPEKRIYPGGKYFDPLGLASDPERKKT.LQIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	277
陆地棉	SLPFSITLILIEVLVIGYTEFQRNAELDPEKRIYPGGKYFDPLGLAADPERKKT.LQIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	277
欧洲大叶杨	SLPFSITLILIEVLVIGYTEFQRNAELDPEKRIYPGGNFDPDGLAADPERKKT.LQIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	275
大豆	SLPFSITLILIEVLVIGYTEFQRNAELDPEKRIYPGGSYFDPLGLASDPERKKT.LQIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	280
玉米	SLPFSITLILIEVLVIGYTEFQRNAELDPEKRIYPGGSYFDPLGLAADPERKKT.LQIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	281
深山南芥	SLPFSITLILIEVLVIGYTEFQRNAELDPEKRIYPGGKYFDPLGLAADPERKKT.LQIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	282
拟南芥	SLPFSITLILIEVLVIGYTEFQRNAELDPEKRIYPGGKFDPLGLASDPERKKT.LQIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	278
衣藻	SLPFSITLILIEVLVIGGAPVYRNSITPEKRIYPGGV.FDPLKGLASDPERKKTFRKIAEIKHARLAMAFGLGFVQAAATGKGPLNNWATHLSDPLHT	277
绿藻	SLPFSITLILIEVLVIGGAPVYRNRSTLPEKRIYPGGV.FDPLKGLASDSCRTFRKIAEIKHARLAMAFGLCAQVQSRQSLYLRSQWP.....	267
茶树	TIIDTFSS.	285
陆地棉	TIIDTFSS.	285
欧洲大叶杨	TIIDTLSS.	283
大豆	TIIDTFSS.	289
玉米	TIIDTFSS.	290
深山南芥	TIIDTFSS.	291
拟南芥	TIIDTFSS.	287
衣藻	KGL.....	280
绿藻	267

图2 茶树与不同植物 CP29 蛋白同源序列多重序列比对

2.4 茶树 CP29 蛋白理化性质分析

CsLhcb4 编码的蛋白质分子式为 $C_{41}H_{427}N_{218}O_{366}S_4$, 分子量为 31.1 ku, 理论等电点 5.79。亮氨酸(Leu)和丙氨酸

(Ala)占比最大,分别为 11.2% 和 10.9%,芳香族氨基酸[苯丙氨酸(Phe)、酪氨酸(Tyr)、色氨酸(Trp)]33 个,占比 11.6%。负电荷残基[天冬氨酸(Asp) + 谷氨酸(Glu)]数为

31 个,正电荷残基[精氨酸(Arg) + 赖氨酸(Lys)]数为 27 个,脂溶系数为 84,总平均疏水性为 -0.099 。不稳定系数 31.69,该蛋白为稳定蛋白。无序区域预测结果表明,其存在 1 个无序区域 1~50 位氨基酸处,不可折叠性 0.194,对蛋白折叠、表达水平干扰较小。

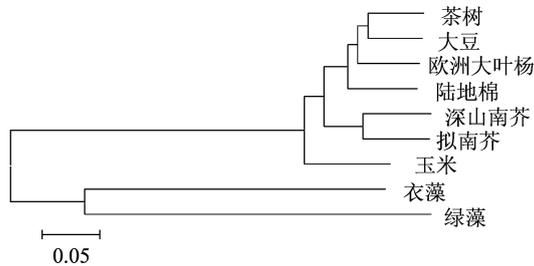


图3 茶树 CP29 蛋白与不同植物的同源蛋白构建的进化树

2.5 茶树 CP29 蛋白疏水性分析

用 ProtScale 软件对蛋白质进行疏水性/亲水性分析(图 4),正值越大表示越疏水,负值越大表示越亲水,介于 $+0.5 \sim -0.5$ 之间的主要为两性氨基酸。结果表明,Glu191 疏水性最强,疏水性参数为 2.789;Leu206 和 Asp207 亲水性最强,疏水性参数为 -2.333 。蛋白中约在 183~197 区域疏

水性最强,其次是 245~256、144~157 区域具有较强的疏水性;在 199~219 区域亲水性最强,其次在 38~54、227~232 区域具有较强的亲水性。该蛋白的亲水区域大于疏水区域,预测该蛋白为亲水蛋白,与 ProtParam 分析结果一致。

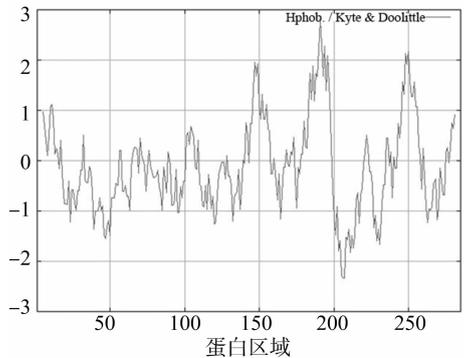


图4 茶树 CP29 蛋白疏水性/亲水性预测

水。蛋白中约在 183~197 区域疏

表 1 茶树 CP29 蛋白亚细胞定位

名称	长度	叶绿体转运肽	线粒体靶向肽	分泌途径的信号肽	其他	位置	可靠性等级
CP29	285	0.798	0.057	0.103	0.206	细胞质	3

2.7 茶树 CP29 蛋白磷酸化修饰位点及分析

磷酸化是蛋白翻译前修饰的最常见的形式之一,在调节从基因表达到信号和代谢调控等所有细胞功能中都起作用^[4]。CP29 的磷酸化可能与植物的抗逆有关^[12-13],其磷酸化可能是调节光能的捕获及激发能向反应中心传递的一种方式,也是一种新的光保护机制。利用 NetPhos 3.1 预测茶树 CP29 蛋白磷酸化位点,结果(表 2)显示,CP29 蛋白磷酸化位点有 23 个,其中 Thr 9 个,丝氨酸(Ser)10 个,Tyr 4 个。

2.8 茶树 CP29 蛋白二级结构预测和分析

利用 SOPMA 在线预测蛋白的二级结构(图 5), α -螺旋和无规则卷曲是其主要二级结构,其中 115 个氨基酸可能形成无规则卷曲,占 40.35%,97 个氨基酸可能形成 α -螺旋,占 34.04%,49 个氨基酸可能形成延伸链,占 17.19%,24 个氨基酸可能形成 β -转角,占 8.42%,不含其他二级结构。

2.9 茶树 CP29 蛋白三级结构建模及分析

利用 swiss-model 在线对其进行建模,从 PDB(蛋白质结构数据库)中获得 63 个同源蛋白序列,选择其中的 3jeu.1 菠菜 PS II-LHC II 超分子复合物,与靶标序列比对结果作模板,其序列一致性为 88.51%,获得其三级结构(图 6)。三级结构从 N 端开始形成 8 端螺旋结构,至 C 端形成较长的延伸链。建模结果估值(OMQE)为 0.75,介于 0~1 之间,接近 1,建模结果处于接受水平。但是 QMEAN4 值为 -3.95 ,其理想值为 1,因此建模结果并不十分理想。

2.6 茶树 CP29 蛋白亚细胞定位预测

结合 TargetP 亚细胞定位预测(表 1),蛋白定位于叶绿体。CP29 为植物 PS II 3 种次要捕光色素蛋白之一,蛋白亚细胞定位结果符合其功能预测。

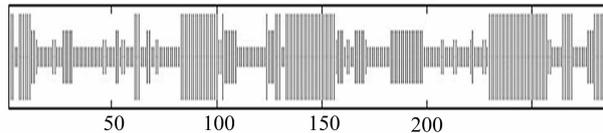
表 2 茶树 CP29 蛋白磷酸化修饰位点预测

编号	位点	氨基酸	激酶	分值
1	4	苏氨酸	Cdc2	0.527
2	5	苏氨酸	PKC	0.731
3	10	苏氨酸	PKC	0.697
4	12	丝氨酸	PKC	0.522
5	16	苏氨酸	unsp	0.636
6	23	丝氨酸	unsp	0.704
7	25	丝氨酸	unsp	0.834
8	72	酪氨酸	INSR	0.501
9	92	丝氨酸	PKA	0.512
10	108	苏氨酸	unsp	0.794
11	117	丝氨酸	unsp	0.641
12	118	苏氨酸	unsp	0.719
13	147	苏氨酸	PKA	0.601
14	175	酪氨酸	EGFR	0.520
15	183	丝氨酸	PKA	0.544
16	197	酪氨酸	EGFR	0.642
17	204	丝氨酸	unsp	0.994
18	218	酪氨酸	unsp	0.819
19	226	丝氨酸	CKII	0.601
20	249	丝氨酸	DNAPK	0.518
21	259	苏氨酸	PKC	0.845
22	272	丝氨酸	PKA	0.626
23	278	苏氨酸	unsp	0.806

3 讨论与结论

LHC 蛋白是高等植物光合作用过程中的重要功能蛋白,本研究以在紫芽中下调表达的基因片段(*D-ZY-5*)为查询探针,通过电子克隆的方式得到编码茶树 CP29 蛋白基因的

cDNA 序列,命名为 *CsLhcb4*,长度为 1 085 bp,ORF 为 858 bp,编码 285 个氨基酸,分子量为 31.1 ku。蛋白保守结构域分析表明其编码氨基酸序列第 13 个和第 285 个之间存在光系统 II 光捕获复合物结构域(编号 PLN00187),属于叶绿素 a/b 连



竖线从长到短依次为 α -螺旋、延伸链结构、 β -转角、无规则卷曲

图5 茶树 CP29 蛋白二级结构预测



图6 茶树 CP29 蛋白三级结构

接蛋白超家族成员。亚细胞定位于叶绿体上,与蛋白预测的功能相吻合。

氨基酸同源序列分析表明,克隆的茶树 *CsLhcb4* 编码氨基酸与这些序列相似性为 32% ~ 89%,总体上相对保守,属于叶绿素 a/b 结合蛋白 CP29。构建进化树表明,茶树与高等植物陆地棉、绿豆和烟草进化距离最近,聚为一类。

二级结构分析表明, α -螺旋和无规则卷曲是茶树 CP29 的主要二级结构, α -螺旋是一种稳定结构,能维持蛋白的结构稳定性。三维结构分析表明,基于茶树 CP29 与菠菜 PS II-LHC II 超分子复合物(3jcu.1)序列同源性的 88.51%,利用 Swiss-Model 中的同源建模法构建茶树 CP29 的三维结构,构建模型为单体形式。

氨基酸序列亲水性/疏水性分析结果显示,该蛋白的亲水区域大于疏水区域,预测该蛋白为亲水蛋白。不稳定系数为 31.69,该蛋白为稳定蛋白,能稳定保持其与叶绿素 a/b 形成的复合物,传输光能,促进光合作用。

在高等植物中,CP29 在 LHC II 中分子量最大,结构最简单,光谱值相对简单,结合 6 个叶绿素 a、2 个叶绿素 b 和 2 个类胡萝卜素分子,其结构及功能研究相对明确^[14-15]。研究表明,CP29 是植物光系统 II 天线蛋白不可或缺的结构组成,在非光化学淬灭(NPQ)作用中至关重要,其缺失会造成光系统 II 结构变化,并影响光保护作用^[16-18]。CP29 的磷酸化可能与植物的抗逆性有一定关系,低温、强光等逆境能诱导 CP29 的磷酸化,其磷酸化可在多个位点发生,并通过可逆磷酸化调节和决定 LHC II 在 2 个光系统之间的亲和性和 LHC II 的状态迁移^[19]。

本研究通过电子克隆方式得到在高花青素茶树中下调表达的叶绿素 a/b 结合蛋白 CP29 基因,通过生物信息学分析预测其理化性质、二级结构和三维结构,为进一步研究 CP29 在高花青素茶树代谢中的作用奠定了基础。CP29 是否通过光保护作用或磷酸化等来影响花青素的代谢有待于进一步研究。

捕光色素蛋白有 14 类,最初序列上的相似性却表明这些

色素蛋白都起始于 1 个相同的原始基因,原始基因能够编码 1 个含跨膜螺旋的蛋白^[4]。高等植物的 PS II 外周光捕获蛋白都在非光化学淬灭(NPQ)下发挥其作用,起到光保护作用^[17]。因此,在 CP29 的研究基础上继续对高花青素茶树捕光色素蛋白的表达及功能进行研究具有一定的意义。

参考文献:

- [1]孙钦秒,冷静,李良璧,等. 高等植物光系统 II 捕光色素蛋白复合体结构与功能研究的新进展[J]. 植物学通报,2000,17(4):289.
- [2]Labate M T, Ko K, Ko Z W, et al. Constitutive expression of pea *Lhcb* 1 - 2 in tobacco affects plant development, morphology and photosynthetic capacity[J]. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(5): 701 - 714.
- [3]李晓鹏,杜林方和梁厚果. 菠菜光系统 II 天线组分 CP29 的分离及其性质[J]. 生物化学与生物物理学报,1999,31(6):631 - 636.
- [4]罗玲. 捕光色素蛋白复合物的研究进展[J]. 现代农业科技, 2008(22):270 - 273,276.
- [5]Xu Y H, Liu R, Yan L, et al. Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(3): 1095 - 1106.
- [6]袁定阳,余东,谭炎宁,等. RT-PCR 克隆籼稻叶绿素 a/b 结合蛋白基因全长 cDNA 及序列的 in silico 分析[J]. 基因组学与应用生物学,2012,31(2):173 - 177.
- [7]王欢利,刘新亮,郁万文,等. 银杏叶绿素 a/b 结合蛋白基因 (*GbLhcb4*) 及其启动子克隆[J]. 中南林业科技大学学报,2015, 35(5):114 - 121.
- [8]Klimmek F, Sjödin A, Noutsos C, et al. Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants[J]. *Plant Physiology*, 2006, 140(3):793 - 804.
- [9]Pan X, Li M, Wan T, et al. Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach [J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2011, 18(3):309 - 315.
- [10]邹智,安锋,礼礼富,等. 大戟科 *Lhcb* 基因家族的全基因组鉴定、分类与进化分析[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(12):46 - 52.
- [11]张泽岑,王能彬. 光质对茶树花青素含量的影响[J]. 四川农业大学学报,2002,20(4):337 - 339.
- [12]刘文娟,袁澎,林宏辉. 高等植物的光系统 II 蛋白磷酸化机制及其对环境胁迫的响应[J]. 植物生理学通讯,2007,43(6): 995 - 1001.
- [13]Liu W J, Chen Y E, Tian W J, et al. Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress [J]. *Biochimica et Biophysica acta*, 2009, 1787(10):1238 - 1245.
- [14]Pascal A, Peterman E, Gradinaru C, et al. Structure and interactions of the chlorophyll a molecules in the higher plant *Lhcb4* antenna protein [J]. *Journal of Physical Chemistry B*, 2000, 104(39): 9317 - 9321.
- [15]Gastaldelli M, Canino G, Croce R, et al. Xanthophyll binding sites of the CP29 (*Lhcb4*) subunit of higher plant photosystem II investigated by domain swapping and mutation analysis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(21):19190 - 19198.

葛慧雯, 李佳佳, 王高华, 等. 利用 HiTAIL-PCR 技术鉴定 T-DNA 在 RNAi-OsRhoGAP2 水稻中的插入位点[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(9): 55-59. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.09.011

利用 HiTAIL-PCR 技术鉴定 T-DNA 在 RNAi-OsRhoGAP2 水稻中的插入位点

葛慧雯, 李佳佳, 王高华, 闫鑫甜, 安文静, 杜京尧, 石佳, 彭静静, 王美娜, 梁卫红
(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要: 水稻 *OsRhoGAP2* 基因是前期从幼穗 cDNA 文库中筛选获得的功能未知基因, 采用 DNA 重组技术构建 *OsRhoGAP2* 基因 RNA 干扰载体, 并转化水稻。对转基因水稻的表型分析显示, *OsRhoGAP2* 基因 RNA 干扰水稻株高显著高于对照水稻。采用高效热不对称交错 PCR 法 (HiTAIL-PCR) 对 RNAi-OsRhoGAP2 转基因水稻 T-DNA 插入位点的侧翼序列进行分析, 利用特异性嵌套引物扩增, 结合序列对比分析, 发现在 4 个不同的转基因水稻株系中, T-DNA 均插入到水稻 *OsRhoGAP2* 基因的第 5 个外显子内, 本研究将为后续对该基因的功能鉴定提供重要依据。

关键词: *OsRhoGAP2* 基因; HiTAIL-PCR; 侧翼序列; T-DNA; 转基因水稻; 插入位点

中图分类号: Q754; S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)09-0055-05

近年来, 随着农杆菌介导的遗传转化技术的发展, T-DNA 插入技术已经广泛应用于水稻等模式植物转基因研究^[1]。但是, 在转基因植物的研究过程中发现外源基因在转基因植物中并不都能实现预期表达, 其表达的稳定性问题有待解决^[2]。已有研究报道, 转基因植物中外源基因能否在植物基因组中稳定表达受到多种因素的影响, 如外源基因自身的结构、启动子等^[3-4]。此外, 也与其插入位点的侧翼序列和染色体定位有关, 外源基因插入到染色体的不同位置, 其表达稳定性和表达效率可能也不同^[5]。因此, 鉴定外源基因的插入位点, 了解其侧翼序列及染色体定位对于后续的基因功能研究有重要意义。目前 T-DNA 插入位点侧翼序列的鉴定多采用 PCR 扩增的方法, 主要包括热不对称交错 PCR 法 (thermal asymmetric interlaced-PCR, TAIL-PCR)^[6]、反向 PCR (inverse PCR, I-PCR)^[7] 和 PCR-walking 法^[8] 3 种。

前期研究发现水稻 ROP (Rho of plant) 基因 *OsRacD* 与水稻

稻育性相关^[9], 为研究其功能和作用机制, 利用酵母双杂交技术, 以 *OsRacD* 为诱饵筛选水稻幼穗 cDNA 文库, 获得了若干功能未知基因^[10-11], 其中包括 *OsRhoGAP2*。为了鉴定 *OsRhoGAP2* 基因的功能, 本研究利用 Gateway 克隆技术, 构建了 *OsRhoGAP2* 的 RNA 干扰植物表达载体 pANDA-OsRhoGAP2, 对水稻进行遗传转化, 筛选获得阳性转基因植株, 并发现转基因水稻株高显著高于对照水稻。为确定鉴定外源载体的整合位点, 本研究采用改良的高效热不对称交错 PCR 法 (high-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR, HiTAIL-PCR) 对 RNAi-OsRhoGAP2 转基因水稻 T-DNA 的侧翼序列进行分析, 旨在为研究 RNAi-OsRhoGAP2 转基因水稻表型变化的分子基础提供依据。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

本研究所用植物材料包括水稻粳稻栽培品种日本晴 (*Oryza sativa* L.) 野生型 (简称 WT) 和笔者所在的实验室前期筛选获得的 T₁ 代 *OsRhoGAP2* 干扰转基因水稻植株 (简称 RNAi-OsRhoGAP2), 遗传背景为日本晴。

1.2 质粒和菌株

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 由笔者所在的实验室保存; pAD-OsRhoGAP2 来自酵母双杂交筛选, 由笔者所在的实验室保存; pENTR/D gateway 入门载体购自 Invitrogen 公司;

收稿日期: 2017-09-10

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31171182); 河南省高校科技创新团队支持计划 (编号: 15IRTSTHN020); 河南省基础与前沿技术研究项目 (编号: 132300410137)。

作者简介: 葛慧雯 (1993—), 女, 山东郓城人, 硕士研究生, 主要从事植物发育分子生物学研究。E-mail: 458986129@qq.com。

通信作者: 梁卫红, 博士, 教授, 主要从事植物发育分子生物学研究。E-mail: liangwh@htu.cn。

[16] de Bianchi S, Betterle N, Kouril R, et al. *Arabidopsis* mutants deleted in the light-harvesting protein *Lhcb4* have a disrupted photosystem II macrostructure and are defective in photoprotection [J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(7): 2659-2679.

[17] Mozzo M, Passarini F, Bassi R, et al. Photoprotection in higher plants: the putative quenching site is conserved in all outer light-harvesting complexes of photosystem II [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1777(10): 1263-1267.

[18] Miloslavina Y, de Bianchi S, Dall'osto L, et al. Quenching in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking monomeric antenna proteins of photosystem II [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(42): 36830-36840.

[19] Kargul J, Turkina M V, Nield J, et al. Light-harvesting complex II protein CP29 binds to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* under state 2 conditions [J]. *FEBS Journal*, 2005, 272(18): 4797-4806.