

## 银杏叶绿体 *petD* 基因的克隆与表达

许锋<sup>1</sup>, 张威威<sup>1</sup>, 唐寅<sup>1</sup>, 王燕<sup>1</sup>, 程水源<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> 长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434025; <sup>2</sup> 黄冈师范学院生命科学与工程学院, 湖北黄冈 438000

**摘要:** 根据黑松、云杉、菠菜与玉米叶绿体 *petD* 基因序列设计引物, 以银杏叶绿体基因组 DNA 为模板, PCR 扩增克隆了银杏叶绿体 *petD* 基因(GenBank 登录号为 DQ923066, 命名为 *Gbp<sub>petD</sub>*)的序列。序列分析显示, *Gbp<sub>petD</sub>* 基因组 DNA 序列编码区长 1 243 bp, 含 1 个内含子和 2 个外显子, 其外显子序列编码 177 个氨基酸。相似性比对显示, 该基因编码区序列与云杉、台东苏铁、黑松、莴苣、木薯、北美落叶松的 *petD* 基因核苷酸同源率为 84%~99%, 氨基酸序列同源率为 85%~93%。系统进化树分析结果表明 *Gbp<sub>petD</sub>* 蛋白质与黑松、北美落叶松、云杉、苏铁等裸子植物的 *petD* 蛋白质聚类关系最近。半定量 RT-PCR 分析表明, *Gbp<sub>petD</sub>* 基因在银杏叶和茎中表达, 在叶中表达量最大。

**关键词:** 银杏; *Gbp<sub>petD</sub>* 基因; 序列分析; 表达

## Cloning and Expression of A Chloroplast *petD* Gene from *Ginkgo biloba* L.

XU Feng<sup>1</sup>, ZHANG Wei-Wei<sup>1</sup>, TANG Yin<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>1</sup>, CHENG Shui-Yuan<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Horticulture and Garden, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China; <sup>2</sup> College of Life Science and Engineering, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000, China

**Abstract:** A chloroplast *petD* gene, named *Gbp<sub>petD</sub>*, was cloned from *Ginkgo biloba* using a pair of primers, which were designed according to the homologous sequences in *Pinus thunbergii*, *Picea abies*, *Spinacia oleracea*, and *Zea mays*. The genomic DNA of *Gbp<sub>petD</sub>* had 1 243 bp coding sequence, including one intron and two exons, which encoding a 177-amino-acid protein. The Blast results showed that the homology of the *Gbp<sub>petD</sub>* nucleotide sequence with *petD* genes from *P. abies*, *Cycas taitungensis*, *P. thunbergii*, *Lactuca sativa*, *Manihot esculenta*, and *Larix occidentalis* was from 84% to 99%, and the homology of amino acid sequences was from 85% to 93%. Phylogenetic tree analysis indicated that the *Gbp<sub>petD</sub>* protein had the closest relationship with *petD* proteins from gymnosperm plants. The expression analysis with semi-quantitative RT-PCR revealed that *Gbp<sub>petD</sub>* gene expressed in leaves and young stems, and the highest level was detected in leaves.

**Key words:** *Ginkgo biloba*; *Gbp<sub>petD</sub>*; sequence analysis; expression

高等植物叶绿体的类囊体膜由 PSI、PSII、ATP 合酶和细胞色素 *b<sub>6</sub>/f* 复合体 4 种复合物构成。其中, 细胞色素 *b<sub>6</sub>/f* 复合体参与光合作用电子传递过程, 它是类囊体膜结合多亚基蛋白, 介导质体醌将电子传递给位于类囊体腔一侧的含铜蛋白质体蓝素(Hurt 和 Hauska 1981), 在光合作用中起作用。在蓝藻类囊体中的研究表明, 细胞色素 *b<sub>6</sub>/f* 不仅参与光合作用的电子传递, 而且参与呼吸作用的电子传递, 它的氧化还原状态更容易受到呼吸作用的影响(Scherer 和 Böger 1982)。叶绿体 *petD* 基因编码细胞色素 *b<sub>6</sub>/f* 复合体亚基 IV, 这种亚基是细胞色素 *b<sub>6</sub>/f* 复合体的组成结构和活性必不可少的(Esposito 等 2001)。在过去的 20 多年中, *petD* 基因的研究已取得了很大进展, 如 Chen 等(1993)发现, 衣藻 *petD* 基因起始密码子突变为 AUU 或者 AUC 后, 翻译起始

效率下降, 翻译效率降低和亚基 IV 积累减少后, 光合生长速率降低。此外, 由于高等植物叶绿体基因组中的 *petD* 基因序列高度保守(Dixit 等 2002), 因此 *petD* 基因序列也用于检测植物间的系统关系和分子进化(Löhne 和 Borsch 2005)。许多植物的叶绿体 *petD* 基因已被克隆和分析, 如水稻(Côté 等 1988)、衣藻(Turmel 等 1989)和杨树(Dixit 等 2002)等, 然而在银杏中有关 *petD* 基因的研究鲜有报道。银杏为雌雄异株的裸子植物, 是地球上现存种子植

收稿 2009-10-28 修定 2009-11-24

资助 湖北省自然科学基金(2008CDA061)、湖北省教育厅科学研究计划优秀中青年人才项目(Q20091201)和长江大学博士基金(0010113)。

\* 通讯作者(E-mail: s\_y\_cheng@sina.com; Tel: 0713-8833599)。

物中最古老的子遗植物, 由于其系统发育有独特地位, 人们从不同方面对其进行了广泛的研究。基于此, 本文克隆了银杏叶绿体 *petD* 基因的完整序列, 并对其进行了相关生物信息学和组织表达谱的分析, 以期研究银杏叶绿体细胞色素 *b<sub>6</sub>/f* 复合体的结构和功能提供必要的信息, 并为进一步研究银杏光合作用电子传递途径建立基础。

## 材料与方法

银杏(*Ginkgo biloba* L.)各组织的试验材料采自本校银杏科技园中品种为‘家佛手’的15年生嫁接树, 树的长势良好。银杏叶片采自当年长出的新梢, 大小一致, 生长旺盛, 无病虫害; 幼茎均为新梢1 cm的长茎尖; 所采用的果实饱满且大小一致; 根样为2 cm的根尖部分。上述样品均于2007年4月中旬采集, 采集过程中均戴一次性无菌手套操作, 所采样品带回实验室立即清洗干净后置于-80 °C冰箱中。

大肠杆菌DH5 $\alpha$ 为本实验室保存, 限制性内切酶、Taq 酶、pMD18-T 载体、氨苄青霉素均购自于大连 Takara 公司; DNA 纯化回收试剂盒购自美国 Axygen 公司。引物合成及序列测定由上海生工生物技术有限公司完成。

取20 g左右银杏叶片用于叶绿体基因组DNA的提取, 提取参考龙兴等(2008)文中方法。提取的叶绿体DNA分别用琼脂糖凝胶电泳与紫外分光光度计检测浓度及纯度。

根据黑松、云杉、菠菜与玉米叶绿体基因组的 *petD* 基因序列, 用软件 Primer Premier 5.0 设计引物, 引物序列分别为 PetDSP: 5' ATGGGAGTG-TGTGACTTGA ACTACT 3'; PetDAP: 5' CTAATAT-AAACGAAAGATTGAAACT 3'。PCR 反应在 PTC-100 Peltier 基因扩增仪上完成, 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 32 个循环; 最后于 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 目的产物用胶回收试剂盒回收, 胶回收产物克隆进 pMD18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株, 选取阳性克隆提取质粒 DNA 后, 经酶切鉴定后测序。

DNA 序列相似性比较及氨基酸活性位点在 NCBI 网站上用 Blast 和 RPS2Blast 完成, 氨基酸序列比较利用 Vector NTI 10.0 完成, 蛋白质修饰位点及保守结构域分析在 www.expasy.org 网站上利用相关软件分析, 氨基酸序列进化树由 Clustalx1.8.1 和 MEGA 4.0 完成(Saitou 和 Nei 1987)。

银杏的叶、幼茎、果实和根的总 RNA 提取采用 CTAB 法(蔡荣等 2007), cDNA 链的合成用 Ferment 公司的逆转录试剂盒(RevertAdi. first strand cDNA synthesis kit)完成。以银杏看家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(*GAPDH*, GenBank 登录号为 L26924)作为参照, 进行半定量 RT-PCR 分析。*Gbp<sub>petD</sub>* 基因使用特异引物 petDRT1 (5' TTTCCTTGTCATTCATTCC 3')和 petDRT2 (5' ATTTTTC-ATCATCCGGCTC 3')进行30个循环的扩增, *GAPDH* 采用特异引物 GAPDH1 (5' ATGAGTTCCACCGG-AAAGATT 3')和 GAPDH2 (5' TTAGACAGTGG-AGGCCATATG 3')进行 25 个循环的扩增。

## 结果与讨论

### 1 *Gbp<sub>petD</sub>* 基因的克隆及序列特征

通过特异引物 PetDSP 与 PetDAP 进行 PCR 扩增获得一个约 1 300 bp 的片段, 与预期的基因片段大小一致, 回收后与 T 载体连接进行测序分析可知该 DNA 序列长 1 243 bp。经 NCBI 网站 Blast 比较的结果显示, 该序列与其它植物的 *petD* 核苷酸序列高度同源, 如云杉(*Picea abies*, 同源性为 99%, GenBank 登录号为 AJ001024, 下同)、柳杉(*Cryptomeria japonica*, 90%, NC\_010548)、台东苏铁(*Cycas taitungensis*, 86%, NC\_009618)、黑松(*Pinus thunbergii*, 86%, NC\_001631)、北美落叶松(*Larix occidentalis*, 84%, FJ899578)、木薯(*Manihot esculenta*, 87%, NC\_010433)、金粟兰(*Chloranthus spicatus*, 87%, NC\_009598)、小叶黄杨(*Buxus microphylla*, 86%, NC\_009599), 表明该序列为银杏叶绿体 *petD* 基因, 因此将该序列片段命名为 *Gbp<sub>petD</sub>* (GenBank 登录号为 DQ923066)。

进一步分析 *Gbp<sub>petD</sub>* 序列的结果显示, 所克隆的片段包含 *Gbp<sub>petD</sub>* 基因的编码区, 含 1 个内含子和

2个外显子,与所报道的陆地植物*petD*基因的序列结构非常相似(Löhne和Borsch 2005),而且与所有分析的*petD*基因相同,*Gbp**petD*的外显子/内含子的剪接位点位于一个保守的缬氨酸位点(Turmel等1989;Dixit等2002)。图1为部分代表植物*petD*基因的内含子和外显子的结构,其中不管是裸子植物如银杏、红松(*Pinus koraiensis*, GenBank 登录号为AY228468,下同)、云杉、北美落叶松、台东苏铁,还是被子植物如玉米(*Zea mays*, NC\_001666)、烟草(*Nicotiana tabacum*, Z00044)、胡萝卜(*Daucus carota*, NC\_008325),它们的*petD*基因外显子1均为8 bp长,外显子2的长度均在500 bp左右,如裸子植物中银杏、红松、云杉的外显子2分别为526 bp、562 bp和529 bp,被子植物中玉米、烟草和胡萝卜的外显子2均为475 bp。一般而言在*petD*基因的内含子水平上,亲缘关系较近的植物是较为保守的,因此*petD*基因内含子的序列已作为研究植物分子进化与亲缘关系的一个分子标记(Löhne和Borsch 2005)。

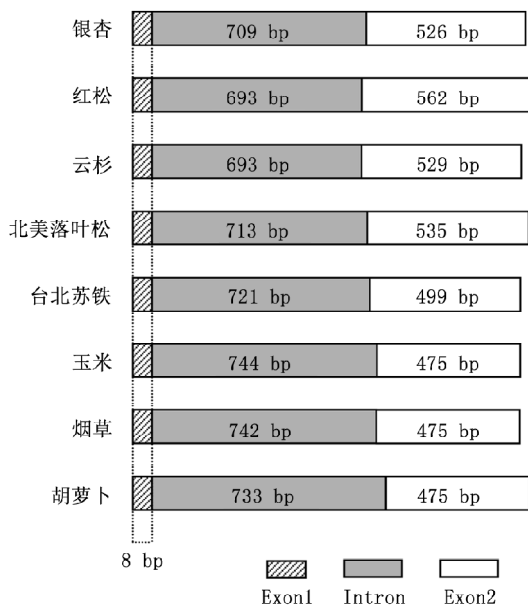


图1 *Gbp**petD* 基因与其它部分代表植物*petD*基因外显子/内含子比较

Fig.1 Comparison of the exon/intron organization among *petD* genes from *G. biloba* and several other representative plant species

## 2 *Gbp**petD* 蛋白质的特征

*Gbp**petD* 基因编码一个177 aa的蛋白,采用Computer pI/Mw Tool软件预测该蛋白的等电点和分子量大小分别为6.57和19.4 kDa,与所报道的其它植物的*petD*蛋白性质相似。用Vector NTI 10.0多重比较*Gbp**petD*蛋白与其它植物*petD*蛋白序列,结果表明,*Gbp**petD*蛋白与其它裸子植物和被子植物的*petD*蛋白高度同源,其同源性都达到85%以上,如与柳杉、木薯、拟南芥、云杉、台东苏铁、黑松和北美落叶松蛋白质序列相似性分别为92%、91%、90%、88%、93%、85%和85%(图2)。

*Gbp**petD* 蛋白的修饰位点预测分析表明,其含有1个cAMP和cGMP依赖性蛋白激酶磷酸化位点(169RKIS)、2个蛋白激酶C磷酸化位点(4TKK、165TVK)、2个酪蛋白激酶II磷酸化位点(26SYGE、71TPSE)和4个N-豆蔻酰化位点(21GMGHNS、46GTIACT、136GTAVAl和144GIGAAL),这与黑松和云杉*petD*蛋白的修饰位点类型和数量是一致的(Wakasugi等1994),同时也反映*petD*蛋白在植物进化上的保守性,而这些活性位点的存在说明蛋白翻译后修饰在实现*petD*蛋白的功能中起作用。ProtScale和CDS保守结构域搜索结果表明,*Gbp**petD*蛋白C端存在1个高度保守的细胞色素 $b_6$ -末端结构域,而且该结构域还存在1个*petD*蛋白中恒定不变的三联氨基酸位点(77PEW),它对于细胞色素 $b_6$ 复合体蛋白在辅酶/泛醌氧化还原场所的电子传递作用具有重要意义(Esposti等1993)。*Gbp**petD*蛋白上述的活性位点与保守结构域与已被研究的*petD*蛋白高度一致,暗示*Gbp**petD*与它们可能有相似的功能。

## 3 *Gbp**petD* 蛋白的系统进化树分析

为了研究*Gbp**petD*蛋白和其它植物*petD*蛋白之间的进化关系,用软件Clustalx 1.81和MEGA 4.0通过邻接法(neighbor-joining, NJ)构建了*petD*的系统进化树(图3)。系统进化树显示:首先,所有*petD*蛋白被分成裸子植物与被子植物2大类,如银杏与云杉、黑松、北美落叶松、台东苏铁组成裸子植物类,而南天竺、小叶黄杨、玉米和胡萝卜等

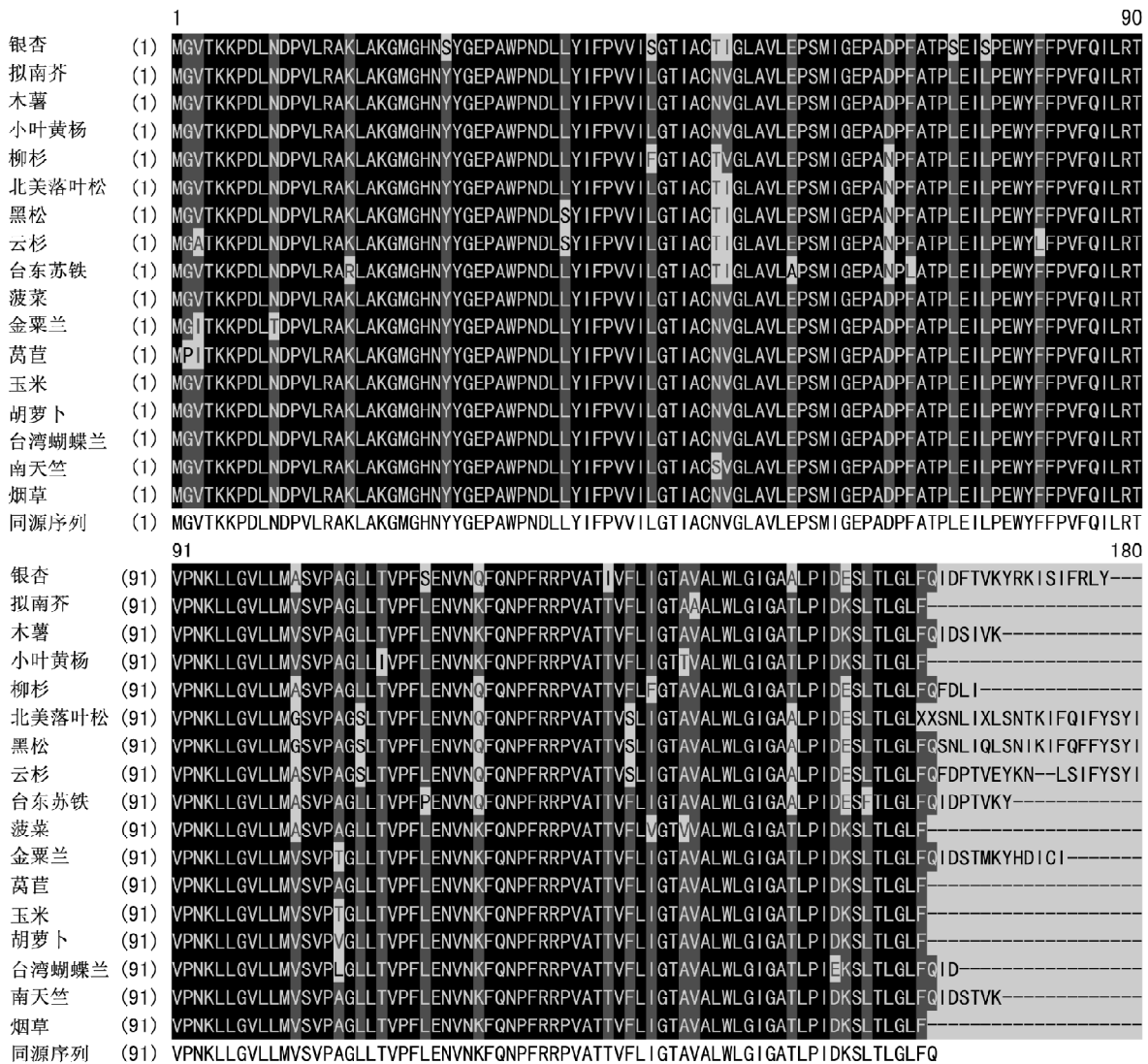


图2 GbpD 蛋白与其它植物 petD 蛋白氨基酸序列的多重比较

Fig.2 Sequence multialignment of the deduced GbpD protein with other plant petD proteins

黑底白字表示氨基酸完全一致的序列, 灰底白字表示高度保守的氨基酸序列, 白底黑字表示完全不相似氨基酸序列。各种植物 petD 蛋白的 GenBank 登录号如下: 银杏, AB195800; 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), NP\_051089; 木薯, YP\_001718468; 小叶黄杨, YP\_001294215; 柳杉, YP\_001806639; 北美落叶松, ACP52220; 黑松, NP\_042435; 云杉, O47044; 台东苏铁, YP\_001312237; 菠菜 (*Spinacia oleracea*), NP\_054965; 金粟兰, YP\_001294129; 莴苣(*Lactuca sativa*), YP\_398359; 玉米, NP\_043054; 胡萝卜, YP\_740148; 台湾蝴蝶兰(*Phalaenopsis aphrodite* subsp. *formosana*), YP\_358612; 南天竺(*Nandina domestica*), ABI49895; 烟草, NP\_054531。

聚成被子植物类, 因此从这个角度而言, 银杏与其它裸子植物在进化上的亲缘关系比与被子植物的亲缘关系近。系统进化树的分析结果暗示 GbpD 和其它植物的 petD 源于共同的祖先。

#### 4 GbpD 基因的组织特异性表达

提取银杏的叶、幼茎、果实和根的总 RNA, 采用半定量 RT-PCR 的方法分析 GbpD 在银杏各

器官中的表达情况。半定量 RT-PCR 检测的结果显示, GbpD 基因只在叶和幼茎中表达, 在根和果实中不表达, 而且叶中的表达量显著高于茎(图4), 这与玉米和菠菜 petD 基因的表达模式相似(Rock 等 1987)。植物光合代谢主要发生在含有叶绿体的组织中, 如叶和茎, 而细胞色素 *b<sub>6</sub>/f* 复合体的主要功能就是参与光合作用电子传递过程, GbpD 基因组

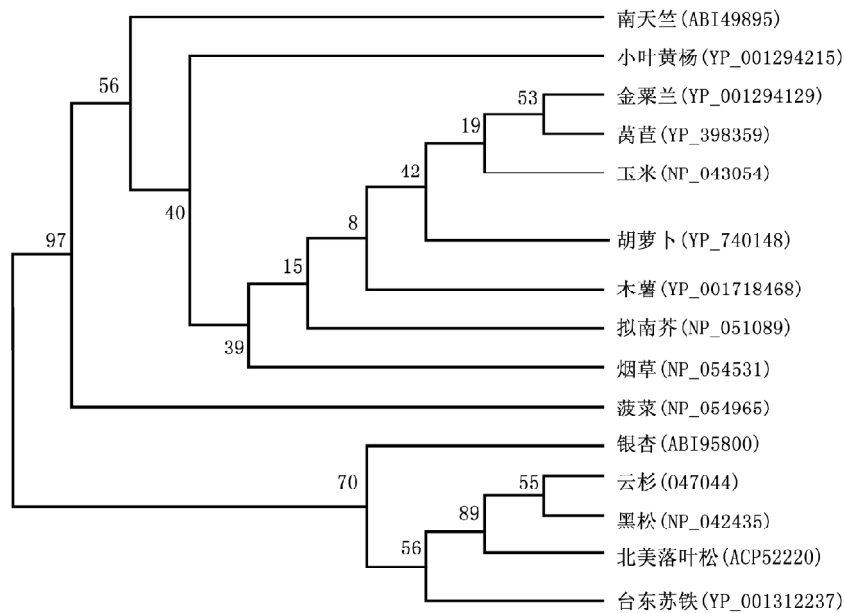


图3 用邻接法构建的GbpD蛋白与其它植物petD蛋白的系统进化树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of the sequences of GbpD and other plant petD proteins

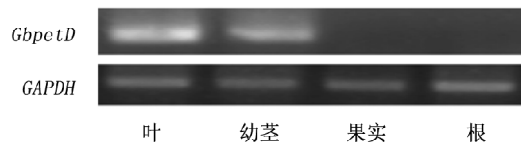


图4 RT-PCR 分析 GbpD 基因在银杏各组织中的表达

Fig.4 Expression pattern of GbpD gene in different tissues by RT-PCR

织特异性表达模式也表明银杏叶与幼茎是发生光合作用的主要场所。

### 参考文献

- 蔡荣, 许锋, 陈柳吉, 程水源(2007). 银杏不同组织的总 RNA 提取方法的改进. 生物技术, 17 (4): 38~41
- 龙兴, 曾继吾, 黄秉智, 黄永红, 易干军, 陈金印, 夏瑞(2008). 香蕉叶绿体分离及叶绿体 DNA 提取方法. 江西农业大学学报, 30 (3): 534~537
- Chen X, Kindle K, Stern D (1993). Initiation codon mutations in the *Chlamydomonas* chloroplast *petD* gene result in temperature-sensitive photosynthetic growth. EMBO J, 12 (9): 3627~3635
- Côté J-C, Wu N-H, Wu R (1988). Nucleotide sequence of the rice chloroplast apocytochrome b6 gene (*petB*). Plant Mol Biol, 11: 873~874
- Dixit R, Trivedi P, Nath P, Sane PV (2002). Characterization of *petB* and *petD* genes of the *Populus deltoides* chloroplast *psbB* operon. Plant Mol Biol Rep, 20: 357~368
- Esposito MD, de Vries S, Crimi M, Ghelli A, Patarnello T, Meyer

A (1993). Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. Biochim Biophys Acta, 1143 (3): 243~271

- Esposito D, Higgs DC, Drager RG, Stern DB, Girard-Bascou J (2001). A nucleus-encoded suppressor defines a new factor which can promote *petD* mRNA stability in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. Curr Genet, 39: 40~48
- Hurt E, Hauska G (1981). A cytochrome *fb<sub>6</sub>* complex of five polypeptides with plastoquinol-plastocyanin-oxidoreductase activity from spinach chloroplasts. Eur J Biochem, 117: 591~599
- Löhne C, Borsch T (2005). Molecular evolution and phylogenetic utility of the *petD* group II intron: a case study in basal angiosperms. Mol Biol Evol, 22 (2): 317~332
- Rock CD, Barkan A, Taylor WC (1987). The maize plastid *psbB-psbF-petB-petD* gene cluster: spliced and unspliced *petB* and *petD* RNAs encode alternative products. Curr Genet, 12: 69~77
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol, 4 (4): 406~425
- Scherer S, Böger P (1982). Respiration of blue-green algae in the light. Arch Microbiol, 132: 329~332
- Turmel M, Boulanger J, Bergeron A (1989). Nucleotide sequence of the chloroplast *petD* gene of *Chlamydomonas eugametos*. Nucleic Acids Res, 17 (9): 3593
- Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T, Sugiura M (1994). Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 9794~9798