

小麦籽粒内 AGPase 质体型小亚基的克隆和序列分析

康国章, 沈丙权, 王永华, 刘超, 郭天财*, 朱云集

河南农业大学国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002

提要: 文章从小麦籽粒中克隆了淀粉合成关键酶 AGPase 的质体型小亚基(*SSU II*)的 cDNA 序列。其中间部分与 3' 端序列与大麦 *SSU II* (Z48563) 的同源性高达 97%, 但在 5' 端特异的转移肽切割位点却比 Z48563 缺失一段 113 bp 序列。本文克隆的 *SSU II* 其特异 5' 端序列与已报道的大麦(Z48563)、小麦(536819)、玉米(AF334960)进行多序列比对和同源性比较显示, 它们的亲缘关系较远, 表明这可能是一个新的 *SSU II* 基因。另外, 在检测的 22 个现今推广面积较大的小麦品种中, *SSU II* 5' 端缺失序列的现象都普遍存在。

关键词: 小麦; 淀粉; AGPase; 质体型小亚基; 转移肽切割位点

Cloning and Sequence Analysis of Plastidial Small Subunit of AGPase in Grains of Wheat (*Triticum aestivum* L.)

KANG Guo-Zhang, SHEN Bing-Quan, WANG Yong-Hua, LIU Chao, GUO Tian-Cai*, ZHU Yun-Ji

Engineering Research Center for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstracts: A cDNA sequence of 1 631 bp encoding plastidial small subunit (*SSU II*) gene of AGPase (GenBank No. EU586278), was cloned by RT-PCR in grains of wheat. Sequence analysis showed that wheat *SSU II* was 83.2% identical to barely *SSU II* (Z48563) in the full sequences, and 97% identical in their middle and 3' regions. Compared with *SSU II* (Z48563), there was a lack of a sequence of 113 bp in the unique 5' region. The multiple sequences alignments and homology comparison of the unique 5' region of cloned *SSU II* of wheat AGPase with barely (Z48563), wheat (AF536819) and maize (AF334960) were carried out, respectively. The results showed that the cloned wheat *SSU II* didn't fall these species, suggesting that it could be a novel *SSU II* of AGPase. In addition, the lack of cDNA sequences in unique 5' region of *SSU II* were all found in 22 wheat cultivars, which were broadly cropped.

Key words: wheat; starch; AGPase; plastidial small subunit; transit peptide cleavage site

在作物淀粉合成过程中, ADPG 焦磷酸化酶 (adenosine 5' diphosphate glucose pyrophosphorylase, AGPase) 的作用是将来自光合作用的葡萄糖 -1- 磷酸(G-1-P)和 ATP 转变成 ADP 葡萄糖(ADP-Glc)和 ADP, 其中 ADP-Glc 是合成淀粉的底物, 因此认为 AGPase 是合成淀粉的关键酶(Linebarger 等 2005)。细胞内 AGPase 分为胞质型(cytosolic)和质体型(plastidial)两种, 每种均是由成对的两个大、小亚基构成的异源四聚体(Morell 等 1987; Bhave 等 1990)。因此, 在植物细胞内 AGPase 存在着 4 种亚基: 即胞质型小亚基(cytosolic small subunit, SSU I)、质体型小亚基(plastidial small subunit, SSU II)、胞质型大亚基(cytosolic large subunit, LSU I)和质体型大亚基(plastidial large subunit, LSU II) (Tetlow 等 2004)。大亚基是酶的调节中心, 而小亚基是酶的催化中心, 是酶别构效应的关键部位(Johnson 等

2003)。大亚基分子量为 51~60 kDa, 小亚基分子量为 50~55 kDa, 二者之间的进化关系非常近(Doan 等 1999)。

不同植物细胞内, 编码 SSU I 和 SSU II 的基因有差异。在玉米胚乳细胞内, 二者由 2 个不同基因所编码(Giroux 和 Hannah 1994)。但在大麦胚乳细胞内, 二者是由同一个基因所编码, 只是第一个外显子起始位点的不同, 造成二者 cDNA 长度有所差异(Thorbjørnsen 等 1996)。因此二者 cDNA 序列相似性超过 90%, 但 *SSU II* 的 5' 端比 *SSU I* 多一个转运肽剪切位点(transit peptide cleavage site, 259

收稿 2008-05-04 修定 2008-07-11

资助 中国博士后科学基金(20060390773)和河南省教育厅自然科学基金(2006210007)。

* 通讯作者(E-mail: gmzx-guo@371.net; Tel: 0371-63558201)。

bp), 这一切割位点认为是此亚基进入质体中的重要识别位点, 所以 *SSU II* 的 cDNA 序列稍长于 *SSU I*。小麦 *SSU I* 的 cDNA 克隆 (GenBank 登录号 AF492644、X66080、AF244997 和 EF405961) 已有所报道 (Ainsworth 等 1993)。但对小麦 *SSU II* 来说, 其 DNA 序列 (AF536819) 仅 Burton 等 (2002) 作过报道, 并克隆出其特异的 5' 端序列, 认为它与大麦的 *SSU II* 序列同源性非常高 (95% 以上)。本文分离出一个小麦 *SSU II* 的 cDNA 全长, 其特异 5' 端与上述报道有较大差异, 认为它可能是一个新的 *SSU II* 基因, 在中国小麦品种中普遍存在。

材料与方法

植物材料为黄淮麦区大面积推广的小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种 '偃展 4110'、'豫农 949'、'豫麦 34'、'郑麦 9023'、'豫农 202'、'新麦 9 号'、'矮抗 58'、'洛麦 21'、'周麦 18'、'周麦 17'、'豫麦 49'、'豫教 2 号'、'兰考矮早 8'、'烟农 15'、'陕优 225'、'小偃 81'、'开麦 18'、'内乡 188'、'漯麦 4 号'、'济麦 20'、'豫麦 18' 和 '鲁麦 22' 以及大麦 (*Hordeum vulgare* L.) 品种 '豫大麦 1 号'、'驻大麦 1 号'、'驻大麦 3 号' 和 '晋引 6 号'。实验于 2006~2007 年在河南农业大学科教示范园区进行。试验地状况和管理均按马冬云等 (2007) 文中的方法。

取上述小麦和大麦品种花后 20 d 左右穗中部的幼嫩籽粒 (2 g 左右), 去掉胚后, 置于液氮中, 研磨至粉末状, 用 Trizol (Sigma 公司) 提取总 RNA。cDNA 合成参照 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit (MBI 公司) 操作步骤进行。

根据 GenBank 中大麦 *SSU II* 的 cDNA 序列 (Z48563), 设计一对克隆小麦 *SSU II* 5' 端特异序列的引物 (P1): 5' GCCTCCCCTTCCAAGAT 3' (正向引物) 和 5' TGGAGTCTGACACGGCAC 3' (反向引物) (扩增位点在 Z48563 序列的 35~221 bp 之间); 另外, 还设计一对扩增 *SSU II* cDNA 全长的引物 (P2): 5' CCACCTCAATGGCGATGGC 3' (正向引物) 和 5' CCAGGGGCACTTCGCGTAA 3' (反向引物) (扩增位点在 Z48563 序列的 9~1 749 bp 之间)。引物均由北京奥科生物技术有限公司合成。

PCR 扩增体系为 3 μ L 10 \times PCR 缓冲液、0.6 μ L 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP、10 μ mol \cdot L⁻¹ 正向和反向引

物各 1 μ L、0.5 μ L 2 U \cdot μ L⁻¹ *Taq* DNA 聚合酶、1 μ L cDNA 模板, 无菌双蒸水补充至 30 μ L。PCR 扩增程序为 95 变性 5 min; 95 50 s, 56 1 min, 72 2.5 min, 35 个循环; 72 延伸 10 min。

将获得的 *SSU II* 全长经 T4 连接酶 (MBI 公司) 与 pMD20-T (大连宝生物公司) 连接后, 转化大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR 和质粒酶切鉴定为阳性的单克隆进行测序。

上述阳性克隆由上海英骏生物技术有限公司测序。测序结果在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 上进行同源性比较分析。

实验结果

1 小麦 *SSU II* cDNA 全长的克隆以及与大麦 *SSU II* 比较

以小麦品种 '豫教 2 号' 和大麦品种 '晋引 6 号' 籽粒 RNA 为模板, 用材料与方法中提供的扩增 *SSU II* cDNA 全长的特异引物, 进行 RT-PCR 扩增并电泳的结果显示, 从大麦中克隆出 *SSU II* 基因的 cDNA 序列长度稍大于小麦中的 *SSU II* (图 1)。

测序结果表明, 从大麦中克隆出的 *SSU II* cDNA 序列长度为 1 741 bp, 与预期大小相同; 但从小麦中克隆出的 *SSU II* cDNA 序列长度为 1 631 bp。序列分析显示, 大麦 *SSU II* 的编码域长度为 1 542 bp, 小麦 *SSU II* 编码域长度为 1 428 bp (图 2), 并将小麦的 *SSU II* 到 GenBank 上登录, 序列号为 EU586278。

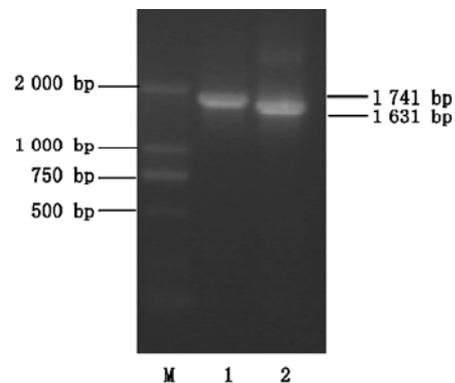


图 1 小麦和大麦籽粒中 *SSU II* cDNA 全长的扩增
Fig. 1 Amplification of cDNA sequences of *SSU II* genes from grain of wheat and barley

M: DNA 分子量标准; 1: 大麦 '晋引 6 号' 籽粒 *SSU II* 的 cDNA 序列; 2: 小麦 '豫教 2 号' 籽粒 *SSU II* 的 cDNA 序列。

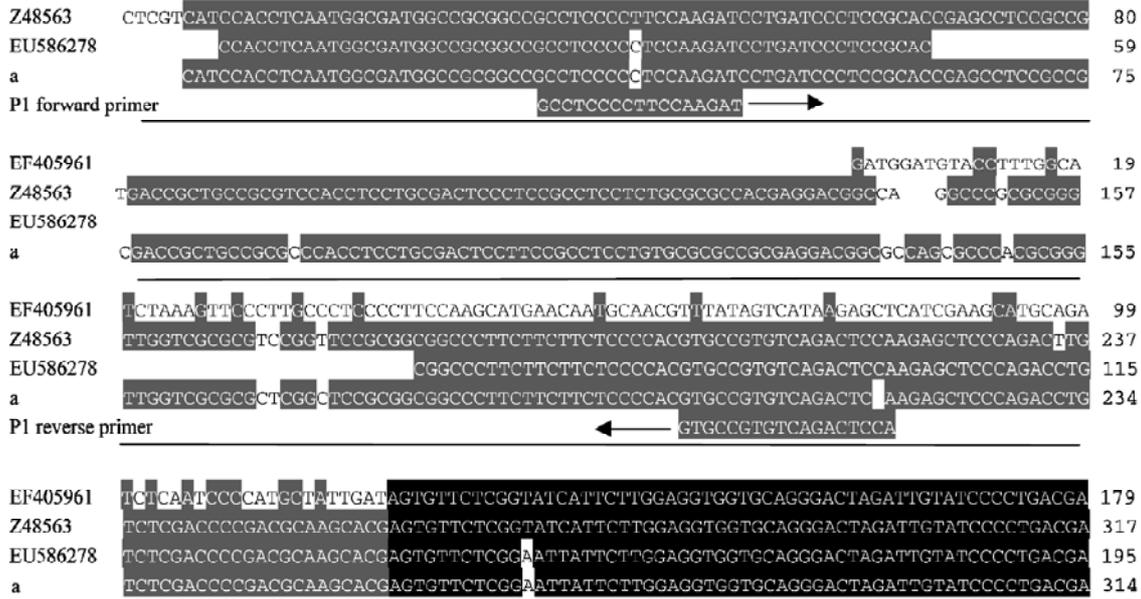


图2 小麦 *SSU II* 与大麦 *SSU II*、小麦 *SSU I* 之间 5' 端特异 cDNA 序列的比较

Fig.2 Comparisons on the unique 5' cDNA sequences of *SSU II* from wheat, barely and *SSU I* from wheat

Z48563: 大麦 *SSU II* 的 cDNA 序列; EF405961: 小麦‘豫教 2 号’*SSU I* 的 cDNA 序列; a: 小麦品种‘Bobwhite’*SSU II* 5' 端特异的 cDNA 序列(Burton 等 2002); EU586278: 小麦‘豫教 2 号’*SSU II* 的 cDNA 序列。下划线部分为 *SSU II* 5' 端特异的 cDNA 序列; P1 primers 为扩增 *SSU II* 5' 端特异的 cDNA 序列, 在大麦中, 扩出 *SSU II* 5' 187 bp 的一段 cDNA 序列, 在小麦中, 扩出 *SSU II* 5' 端 74 bp 的一段 cDNA 序列。同源碱基以阴影显示。EU586278、EF405961 和 Z48563 的中间序列与 3' 端序列相同, 图略。

本文所克隆的小麦 *SSU II* 与 Z48563 的同源性为 83.2%; 在中间及 3' 端序列, 二者的同源性高达 97%。但特异的 5' 端差异较大, 序列比对后发现, 本文所克隆的小麦 *SSU II* 的 cDNA 序列在 5' 端比 Z48563 序列少 113 bp, 缺失长度高达 40% 左右(图 2)。为了更清晰地显示这一差异, 我们设计一对专门用于扩增 *SSU II* 5' 端的引物(引物序列见材料与 方法)。电泳结果显示, 从大麦品种‘晋引 6 号’籽粒 cDNA 中扩增出预期的条带(187 bp); 而从小麦品种‘豫教 2 号’籽粒 cDNA 中扩增出的条带(74 bp), 明显小于大麦的(图 3)。

采用软件 DNAMAN 3.0 预测小麦和大麦 *SSU II* cDNA 序列所编码的蛋白质的结果显示, 大麦 *SSU II* 编码 513 个氨基酸, 而小麦 *SSU II* 编码了 475 个氨基酸。在线分析预测的蛋白质(<http://www.expasy.org/cgi-bin/protparam>), 发现大麦 *SSU II* 的分子量为 56.05 kDa, 推测的等电点(pI)为 6.11; 而小麦 *SSU II* 的分子量为 52.01 kDa, 推测的等电点为 5.48。虽然二者所编码蛋白质的分子量有一定差异, 但对二者保守区域分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>)的结果表明二者均属于

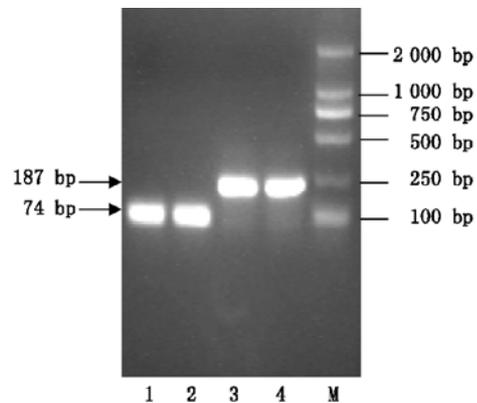


图3 小麦‘豫教 2 号’和大麦‘晋引 6 号’籽粒内 *SSU II* 特异 5' 端 cDNA 序列的扩增

Fig.3 Amplification of the unique 5' cDNA sequences of *SSU II* in grain of wheat ‘Yujiao 2’ and barely ‘Jinyin 6’

M: DNA 分子量标准; 1 和 2: 小麦‘豫教 2 号’籽粒内 *SSU II* 特异 5' 端 cDNA 序列; 3 和 4: 大麦‘晋引 6 号’籽粒内 *SSU II* 特异 5' 端 cDNA 序列。

AGPase 小亚基家族。

将克隆的小麦 EU586278 的 5' 端与大麦 (Z48563)、小麦(536819)、玉米(AF334960)进行多序列比对, 并用 DNAMAN 得出它们之间同源进

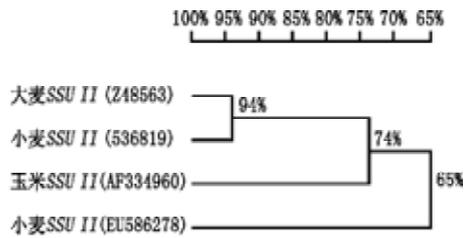


图4 4个 *SSU II* 基因 5'端 cDNA 特异序列的系统树状图
Fig.4 Dendrogram of the unique 5' cDNA sequences from four *SSU II* genes

化树状图的结果(图4)显示,本文所克隆的小麦*SSU II* (EU586278)与它们之间的亲缘关系较远,表明我们所克隆*SSU II*序列与上述基因序列差异较大,可能是一个新的*SSU II*基因。

此外,本文所克隆的EU586278序列与我们已克隆出的小麦*SSU I* cDNA序列(EF405961)及GenBank上报道的其它小麦*SSU I* cDNA序列(AF492644、X66080、AF244997和EF405961)相比,其中间序列与3'端之间的同源性在95%以上(图2显示的仅是EU586278和EF405961序列比对的结果,EU586278与其它序列比对的结果与此相同,图略);但EU586278的5'端与上述几个序列显著不同,它们之间的同源性非常低。这表明,与大麦相似,小麦中的*SSU I*和*SSU II*也是由一个基因编码的,可能是第一个外显子的不同,以致二者之间的cDNA序列有一定的差异。

2 中国其它小麦品种中AGPase *SSU II*的5'端cDNA特异序列的扩增

为研究上述克隆的特异*SSU II*基因序列是否在中国其它小麦品种上也有此特征,除‘豫教2号’外,我们还选用现今黄淮麦区大面积推广的‘偃展4110’、‘豫农949’、‘豫麦34’、‘郑麦9023’、‘豫农202’、‘新麦9号’、‘矮抗58’、‘洛麦21’、‘周麦18’、‘周麦17’、‘豫麦49’、‘鲁麦22’、‘兰考矮早8’、‘烟农15’、‘陕优225’、‘小偃81’、‘开麦18’、‘内乡188’、‘漯麦4号’、‘济麦20’和‘豫麦18’等21个小麦品种,扩增它们籽粒内*SSU II*5'端特异的cDNA序列,并用‘豫大麦1号’、‘驻大麦1号’和‘驻大麦3号’3个大麦品种作对照的结果(图5)显示,与‘豫教2号’相同,从‘偃展4110’、‘豫农949’、‘豫麦34’等21个小麦品种均扩增出74 bp的*SSU II*5'端特异cDNA条带,与‘晋引6号’相似,从‘豫大麦1号’、‘驻大麦1号’和‘驻大麦3号’中均扩增出187 bp的*SSU II*5'端特异cDNA条带。这表明,中国现今小麦品种中广泛存在着本文所克隆的*SSU II*基因。

讨 论

大麦的*SSU I*和*SSU II*是由同一基因所编码,只是由于第一个外显子的不同,造成两个基因转录序列的差异。与*SSU I* cDNA序列相比,大麦的*SSU II* (Z48563)在5'端多了一个由259 bp编码的

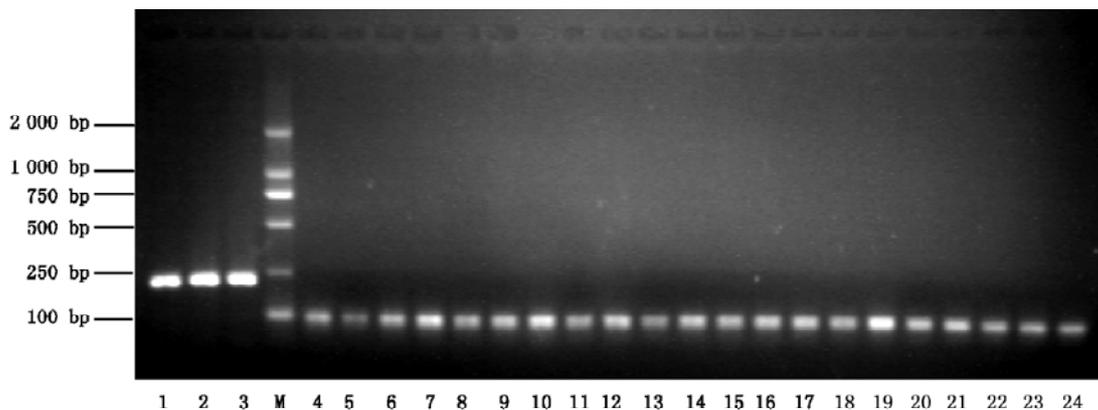


图5 21个小麦品种和3个大麦品种籽粒内*SSU II*基因5'端cDNA特异序列的扩增

Fig.5 Amplification of the unique 5' cDNA sequences of *SSU II* from grains of 21 wheat cultivars and 3 barely cultivars

M: DNA分子量标准; 1、2和3分别为‘豫大麦1号’、‘驻大麦1号’和‘驻大麦3号’籽粒内*SSU II*基因5'端cDNA特异序列; 4~24分别为‘偃展4110’、‘豫农949’、‘豫麦34’、‘郑麦9023’、‘豫农202’、‘新麦9号’、‘矮抗58’、‘洛麦1号’、‘周麦18’、‘周麦17’、‘豫麦49’、‘鲁麦22’、‘兰考矮早8’、‘烟农15’、‘陕优225’、‘小偃81’、‘开麦18’、‘内乡188’、‘漯麦4号’、‘济麦20’和‘豫麦18’等21个小麦品种籽粒内*SSU II*基因5'端cDNA特异序列。

转移肽切割位点, 因此造成这两个不同基因 cDNA 序列长度的不同(Thorbjørnsen 等 1996)。本文从小麦‘豫教 2 号’籽粒中所克隆的 APGase *SSU II* 的 cDNA 序列(EU586278) (图 1), 其中间序列及 3' 端与已报道从同一品种中克隆出的 *SSU I* (EF405961) 同源性非常高(图 2), 这表明小麦与大麦相似, *SSU I* 和 *SSU II* 均由同一基因编码, 只是由于第 1 个外显子的不同, 才出现 2 个不同的转录子。Burton 等(2002)根据大麦的 *SSU II* 序列, 从小麦品种‘Bobwhite’克隆出 *SSU II* 特异的 5' 端转移肽切割位点的 cDNA 序列, 并用嵌套式 PCR 法克隆出 DNA 序列(AF536819), 观察到它与大麦此基因(Z48563)的同源性非常高, 且 5' 端转移肽切割位点的 cDNA 序列与大麦此段序列的长度基本相同(图 2)。但在本文所克隆的 *SSU II* cDNA 序列的 5' 端转移肽切割位点处, 则比大麦的 *SSU II* (Z48563) 和 Burton 等(2002)克隆小麦的 *SSU II* 5' 端特异 cDNA 序列均缺失一段 113 bp 序列(图 3), 仅有 146 bp, 缺失长度高达 40% 左右, 因而它们之间的亲缘关系较远(图 4)。并且这一缺失在本文所检测的 22 个小麦品种中普遍存在(图 5)。由于缺失这段序列位于编码域内, 所以本文所克隆小麦的 *SSU II* 亚基分子量(52.01 kDa) 小于大麦的 *SSU II* (56.05 kDa)。今后的研究是克隆本文所用小麦品种籽粒内 *SSU II* 和 *SSU I* 基因共有的 DNA 序列, 并将其与 AF536819 进行比较, 进一步寻找某一碱基位点的突变, 是否会导致 5' 端转移肽切割位点 cDNA 的一段序列缺失。另外, 将本文所克隆的 *SSU II* 基因(EU586278) 和大麦的 *SSU II* 基因(Z48563) 共同转到大肠杆菌中, 高效表达后, 提取其表达的蛋白质, 并在相同底物的条件下研究此段序列的缺失是否会导致 AGPase 的活性差异。

参考文献

马冬云, 郭天财, 查菲娜, 王晨阳, 朱云集, 王永华(2007). 种植密度对两种穗型冬小麦旗叶氮代谢酶活性及籽粒蛋白质含量的影响. 作物学报, 33: 514~517

- Ainsworth C, Tarvis M, Clark J (1993). Isolation and analysis of a cDNA clone encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase from wheat. *Plant Mol Biol*, 23 (1): 23~33
- Bhave MR, Lawrence S, Barton C, Hannah LC (1990). Identification and molecular characterization of *Shrunken-2* cDNA clones of maize. *Plant Cell*, 2: 581~588
- Burton RA, Johnson PE, Beckles KM, Fincher GB, Jenner HL, Naldrett MJ, Denyer K (2002). Characterization of the genes encoding the cytosolic and plastidial forms of ADP-Glucose pyrophosphorylase in wheat endosperm. *Plant Physiol*, 130: 1464~1475
- Doan DNP, Rudi H, Olsen OA (1999). The allosterically unregulated isoform of ADP-glucose pyrophosphorylase from barley endosperm is the most likely source of ADP-glucose incorporated into endosperm starch. *Plant Physiol*, 121: 965~975
- Giroux MJ, Hannah LC (1994). ADP-glucose pyrophosphorylase in *shrunken-2* and *brittle-2* mutants of maize. *Mol Gen Genet*, 243: 400~408
- Johnson PE, Patron NJ, Bottrill AR, Dinges GR, Fahy BF, Parker ML, Waite DN, Denyer K (2003). A low-starch barley mutant, *Risaφ16*, lacking the cytosolic small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase, reveals the importance of the cytosolic isoform and the identity of the plastidial small subunit. *Plant Physiol*, 131: 684~696
- Linebarger CRL, Boehlein SK, Sewell AK, Shaw J, Hannah C (2005). Heat stability of maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase is enhanced by integration of a cysteine in the N terminus of the small subunit. *Plant Physiol*, 139: 1625~1634
- Morell MK, Bloom M, Knowles V, Preiss J (1987). Subunit structure of spinach leaf ADP glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol*, 85: 182~187
- Tetlow IJ, Morell MK, Emes MJ (2004). Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants. *J Exp Bot*, 406: 2131~2145
- Thorbjørnsen T, Villand P, Kleczkowski LA, Olsen OA (1996). A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem J*, 313: 149~154