

毛白杨蔗糖合酶基因*PtSUS1*的克隆及其表达模式分析

李英 陈仲 李昊 郭斌 王佳 安新民*

(北京林业大学林木育种国家工程实验室; 林木花卉遗传育种教育部重点实验室;
国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室, 北京100083)

摘要 蔗糖合酶(sucrose synthase)与植物库强调节、次生壁的形成和纤维素合成等有着密切的联系, 其中在纤维素合成过程中的作用尤为显著。本研究根据我们已获得的毛白杨*PtSUS1*基因片段设计引物, 采用RACE技术, 获得了毛白杨*PtSUS1*的基因序列, 测序结果显示该基因序列全长为2 669 bp, 包括一个完整的阅读框, 编码805个氨基酸。通过Blast检索分析表明, *PtSUS1*与拟南芥、巨桉、陆地棉、温州蜜柑、毛果杨*SUS1*的核酸和氨基酸序列的同源性分别达到76%~97%和82%~97%。运用生物信息软件对*PtSUS1*编码的蛋白进行了二级结构预测和功能位点分析, 结果显示该蛋白氨基酸序列包括两个功能域, 存在可能的磷酸化位点38个, 无跨膜结构域存在。系统进化分析表明*PtSUS1*与*PtSUS2*关系最为接近。RT-PCR分析结果显示, *PtSUS1*在被检测的毛白杨根、茎、叶及雌雄花芽组织和器官中均有表达, 呈现组成型表达模式。该研究为进一步深入探索毛白杨蔗糖合酶基因*PtSUS1*的功能奠定了基础。

关键词 蔗糖合酶; 毛白杨; 克隆; 表达模式; 纤维素合成

蔗糖合酶(sucrose synthase, SUS)由Cardini于1955年首次在小麦胚芽中发现。其后50多年间, 对蔗糖合酶的研究逐渐深入, 从初步的分子量、存在形式、在植物代谢中的调节功能到SUS基因的克隆、表达调控和遗传转化, 有关蔗糖合酶的研究一直是诸多植物研究中的热点之一。研究表明, 蔗糖是大多数植物体内关键的可移动性碳水化合物, 蔗糖合酶是调控源库组织中光合产物代谢的关键酶之一^[1-2]。在植物蔗糖代谢中, SUS可以催化蔗糖的合成和分解, 是一种可逆酶, 其催化反应: 蔗糖+UDP \leftrightarrow 果糖+UDP-G, 蔗糖合成反应最适pH为8.0~9.5, 蔗糖分解反应最适pH为5.5~6.5, 但许多研究结果显示蔗糖合酶在植物体内主要起分解蔗糖的作用。蔗糖合酶的活性受到反应底物和生成物浓度等的影响, 金属离子也在一定程度上影响着其活性的高低^[3]。蔗糖合酶催化蔗糖分解从而为纤维素的生物合成提供底物, 提高纤维素的合成效率, 而且在库强调控方面起着主导作用^[4-5]。不仅如此, 通过对陆地棉纤维发育的形态学^[6]、生理生化^[7]及转录水平^[8]方面的研究发现, 蔗糖合酶与陆地棉珠被表皮细胞的分化和细胞壁的合成有关; 对玉米、马铃薯^[9]和水稻^[10]植物体内的蔗糖合酶水平和淀粉含量的相关研究表明, 其在淀粉合成的调节方面起到关键作用。此外, 据报道

蔗糖合酶在植物的抗逆性能方面也发挥着重要的作用^[11]。

蔗糖合酶与纤维素合成、植物表皮细胞的分化、细胞壁的合成等有着密切的联系, 在纤维素合成过程中的作用尤为显著^[12-13]。蔗糖合酶不仅可以为纤维素的生物合成直接提供底物UDP-G, 同时可能在维持细胞膨压, 以保证纤维素生物合成反应进行的环境方面发挥重要的作用^[14]。虽然纤维素生物合成反应的机制、起始底物的受体和供体仍在进一步的研究当中, 但是SUS酶在纤维素合成中的重要性已经引起了相关科研工作者的极大兴趣。

目前, 已在多种生物中克隆了SUS基因^[15-16], 并对其功能进行了相关的验证^[17]。但是, 以上有关SUS基因的研究主要集中在模式植物, 在作物方面也有报道, 针对木本植物的研究则很少。本实验以我国重要的乡土优良树种毛白杨(*Populus tomentosa*)为实验材料, 利用RACE方法克隆了*PtSUS1*的cDNA序

收稿日期: 2011-10-16 接受日期: 2011-12-07

国家重点基础研究发展计划(“973”计划)(No.2012CB114505)、国家自然科学基金(No.31170631)和国家高技术研究发展计划(“863”计划)(No.2011AA100201)资助项目

*通讯作者。Tel/Fax: 010-62336248, E-mail: xinminan@163.com

列, 并对其序列特性和功能进行了分析和预测, 进一步对该基因在根、茎、叶、雌雄花芽中的表达模式进行了分析, 初步揭示了该基因的表达规律。*PtSUS1*的克隆为阐明毛白杨蔗糖合酶在木材纤维素形成以及杨树种絮的发育中的作用机制奠定了工作基础, 对于实现毛白杨木材品质改良和种絮发育调控具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

用于RNA提取的组织器官分别为无菌组培苗的根、茎和叶以及成年树的营养芽和不同时期的雌雄花芽。其中毛白杨雌性无性系(TC1521)无菌组培苗取自北京林业大学林木育种国家工程实验室。毛白杨雄株定植于北京林业大学苗圃, 毛白杨雌株定植于海淀区东王庄小区。

1.2 总RNA的提取、质量检测以及反转录成cDNA第一链

用改良CTAB法^[18]分别提取毛白杨不同组织器官的RNA, 采用RQ1 DNase I(Promega)对总RNA样品进行处理以去除痕量DNA。取适量RNA溶液, 分别进行电泳和超微量分光光度计检测RNA的浓度、纯度和完整性。根据PrimeScri^{Ph}™ RT reagents Kit(TaKaRa)说明书, 分别取预处理后不同样品RNA 1 μg, 进行cDNA第一链的合成。将上述反转录反应得到的cDNA用RNase Free ddH₂O稀释10倍, 贮存于-20 °C冰箱备用。

1.3 引物设计

根据我们已获得的毛白杨*PtSUS1*特异基因片段, 按照RACE技术原理, 先后设计第一轮RACE扩增特异性引物R1U与F1U和第二轮RACE扩增特异性引物R2U与F2U。进一步根据*PtSUS1*的测序结果, 在该基因编码区的近3'端和3'-UTR区设计一对特异引物(primer pair 3), 以毛白杨*PtActin*作为内参基因进行RT-PCR检测, 具体数据见表1。

1.4 RACE扩增反应与克隆测序

通过RACE扩增进而获得*PtSUS1*基因, 具体操作分为两轮。第一轮扩增: PCR反应体系为25 μL, 其中, 2.0 μL 10×PCR buffer, 1.6 μL dNTPs(2 mmol/L), 2.0 μL上游引物, 0.4 μL下游引物, 1.0 μL DNA模板, 0.5 μL Taq DNA聚合酶(1.0 U), 加双蒸水至25 μL。PCR循环条件为: 94 °C预变性1 min, 接着进行5个循环扩增, 每个循环过程为: 94 °C变性30 s, 72 °C退火90 s; 然后进行另外5个循环, 每个循环过程为94 °C变性30 s, 70 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 最后进行30个循环, 每个循环过程为94 °C变性30 s, 68 °C退火30 s, 72 °C延伸90 s, 10 °C保存。

将第一轮扩增产物稀释50倍作为第二轮扩增的模板, 第二轮扩增: PCR反应体系为25 μL, 其中, 2.0 μL 10×PCR buffer, 0.4 μL dNTPs(2 mmol/L), 上下游引物各0.5 μL, 1.0 μL DNA模板, 0.5 μL Taq DNA聚合酶(1.0 U), 加双蒸水至25 μL。PCR循环条件为: 94 °C预变性5 min, 接着进行30个循环扩增, 每个循环过程为: 94 °C变性30 s, 65 °C退火30 s, 72 °C

表1 用于毛白杨*PtSUS1*基因克隆和RT-PCR分析的引物
Table1 Primers used in cloning of *PtSUS1* and RT-PCR analysis

项目 Items	编号 Number	引物序列(5'→3')	引物序列(5'→3')	说明 Description
The first RACE	Reverse primer 1 of 5' end	R1U	CCA TTT GCG GAC CAT ACC CTT TC	The size of product is about 1 100 bp
		R1D	UPM (offered by Kit)	
	Forword primer 1 of 3' end	F1U	CCC TCA TGG ATA CTT TGC CCA AGA CA	The size of product is about 1 600 bp
		F1D	UPM (offered by Kit)	
The second RACE	Reverse primer 2 of 5' end	R2U	GGG CAA AGT ATC CAT GAG GGG ACA TA	The size of product is 1 056 bp
		R2D	NUP (offered by Kit)	
	Forword primer 2 of 3' end	F2U	TGG AAA GGG TAT GGT CCG CAA A	The size of product is 1 556 bp
		F2D	NUP (offered by Kit)	
RT-PCR	Primer pair 3	P3U	GTG TGT TCG TTG TGA TTT GTG TTC	Used to analyze expression patterns by RT-PCR
		P3D	GAG AAT TCC TTT TCC CTT ACC TTC	
	<i>PtActin</i>	PtA-U	CTC CAT CAT GAA ATG CGA TG	Used as a reference gene
		PtA-D	TTG GGG CTA GTG CTG AGA TT	

延伸1 min, 最后在10 °C保存。

PCR产物经1%的琼脂糖凝胶电泳分离后, 用洁净刀片切下目的片段, 用DNA凝胶回收试剂盒纯化, 接着将纯化产物与pGEM[®]-T easy载体连接。连接产物转化大肠杆菌DH5 α , 筛选阳性克隆, 委托北京博迈德科技发展有限公司进行测序。

1.5 *PtSUS1*基因及其编码的蛋白特性分析

核酸序列的编辑、翻译使用DNAMAN软件, 蛋白质理化性质分析采用ExPASy网站的ProtParam工具(<http://web.expasy.org/protparam/>), *SUS*的同源核苷酸序列及其对应的氨基酸序列来源于National Center for Biotechnology Information(NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)核酸及蛋白质数据库, 包括毛果杨(*Populus trichocarpa*, GU559729.1)、温州蜜柑(*Citrus unshiu*, AB022092.1)、巨桉(*Eucalyptus grandis*, DQ227993.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NM_122090.3)、陆地棉(*Gossypium hirsutum*, FJ713478.1)。氨基酸翻译后修饰、信号肽、功能结构域的预测分析使用在线工具NetPhos 2.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)、SignalP 3.0 Server^[19](<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/>)和SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)完成。使用SOPMA^[20](<http://pbil.ibcp.fr/>)在线工具预测蛋白质的二级结构。氨基酸同源性比对分析采用Bioedit软件, 系统进化分析运用Clustalx1.83和MEGA4.0^[21]软件。采用Neighbor-Joining(NJ)算法的Poisson模型, Complete deletion模式建树, bootstrap值取1 000。

1.6 *PtSUS1*基因的组织表达谱分析

按上述1.2方法分别提取毛白杨试管苗根、茎、叶以及成年毛白杨的营养芽和不同发育时期的雄花、雌花组织的总RNA, 经RNase-free的DNase处理后, 取1 μ g做为逆转录反应的模板, 按照上述试剂盒说明逆转录成cDNA。逆转录产物稀释10倍后, 取1~2 μ L做模板进行PCR检测, 分析*PtSUS1*基因在毛白杨各个器官中的表达特点。根据*PtSUS1*的测序结果, 在该基因编码区的近3'端和3'-UTR区设计一对特异引物(表1, primer pair 3)。20 μ L RT-PCR反应体系包括: 2 μ L 10 \times PCR buffer, 1.6 μ L dNTPs(2.5 mmol/L), 各0.4 μ L 10 μ mol/L上游引物和下游引物, 1 单位Taq DNA聚合酶。反应条件为: 94 °C预变性3 min, 进入热循环94 °C变性15 s, 60 °C退火15 s, 72 °C延伸15 s,

进行30轮循环, 循环结束后在72 °C延伸7 min, 最后4 °C保存。同时以毛白杨*PtActin*作为内参基因(表1)进行同样条件的反应, 反应在GeneAmp[®] PCR System 9700(ABI)中进行。

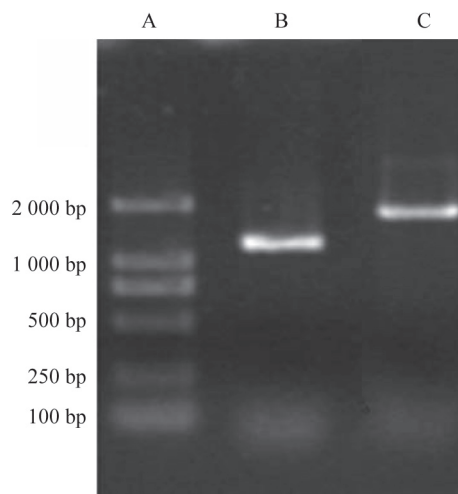
2 结果

2.1 cDNA的合成及*PtSUS1*片段的克隆及测序

提取的RNA电泳图主带清晰完整, 28S和18S的条带亮度比约为2:1, 说明RNA的质量符合实验要求。分别取不同样品总RNA 1 μ g, 进行cDNA第一链合成, 然后将第一链cDNA稀释10倍作为PCR的反应模板。通过已知毛白杨蔗糖合酶的核苷酸序列设计两对特异引物, 进行RACE扩增反应, 经过两轮PCR扩增后, 得到了两条特异性很好的条带, 其中5'端cDNA片段长度在1 100 bp左右, 而3'端cDNA片段长度在1 600 bp左右(图1)。将两个cDNA片段分别回收纯化, 与pGEM[®]-T easy vector连接, 产物转化大肠杆菌感受态细胞, 经PCR筛选和酶切鉴定后测序。测序结果表明, 两个cDNA片段长度分别为1 056 bp和1 556 bp。进一步采用Over-lap PCR将两个片段进行了拼接, 得到了*PtSUS1*基因序列, 结果如图2所示。

2.2 *PtSUS1*及其编码蛋白的分子特征

序列拼接结果显示, 毛白杨*PtSUS1*全长序列由2 669个核苷酸组成, 包括一个完整的开放阅读框,



A: DL-2000 marker; B: *PtSUS1*基因5'端RACE产物; C: *PtSUS1*基因3'端RACE产物。

A: DL-2000 marker; B: the 5' end RACE product of *PtSUS1* gene; C: the 3' end RACE product of *PtSUS1* gene.

图1 *PtSUS1*基因的PCR检测

Fig.1 PCR amplification to generate target gene


```

1      CTATGACTGAACGTGCTCTTACTCGTGCCATAGCATTCGTGAACATGTAGATGAGACTCTCAAGGCTCATCGCAATGAAATGTTGCGT
1      M T E R A A L T R V H S I R E H V D E T L K A H R N E I V A
91     TACTCACAAGGATCGAAAAGTAAAGGAAAAGGAATTCTCAACACCACCAGATTGTTGCTGAGTTTGAAGCAATTCCTGAAGACATCAGGA
30     L L T R I E S K G K G I L Q H H Q I V A E F E A I P E D I R
181    AAACATTGGCAGGCGGTGCTTTGCTGAAGTCTCAGATCCACACAGGAAGCAATTGTTGTCCTCCATGGATTGCTTCTGCTCTGCGCC
60     K T L A G G A F A E V L R S T Q E A I V V P P W I A L A L R
271    CGAGGCTGTTGCTGGGAGTACATTAGATGAATGCCAAGCACTGTTGTTGAGGATTGCGTGTGCTGAGTATCTTCATTTCAAGG
90     P R P G V W E Y I R L N V Q A L V V E D L R V A E Y L H F K
361    AGGAGCTTGTGATGGAGGCTCAACGGCAACTTCGTGCTGAAATGGACTTCGAACCAATTCATGATCTTTCCCTCGCCCAACTCTCT
120    E E L V D G G S N G N F V L E L D F E P F N A S F P R P T L
451    CAAAGTATATTGGTAATGGTGTGAGTTCCTCAATCGCCATCTTCGGCTAAGTGTTCATGACAAGGAAAGCCATGATCCCTGCTTG
150    S K Y I G N G V E F L N R H L S A K L F H D K E S L C H P L L
541    CATTCTCAAAGTGCACGTGCACAAGGGGAAGAATATGATGCTGAATGACAGAATTCGTAACCTAGACTCTCTGCAATATGTCTGAGAA
180    A F L K V H C H K G K N M M L N D R I R N L D S L Q Y V L R
631    AGGCTGAGGAGTTTCTGTCTACTCTAAACCTGATCTCCATATCTCAATTTGAACACAAGTTCAGGAGATTGGCTGGAGAAGGGAT
210    K A E E F L S T L K P D T P Y S Q F E H K F Q E I G L E K G
721    GGGTAATACTGCTGAGCGTGTCTTGAGATGATTGCGACTCTTTGGATCTTCTTGAGGCACCAGATCCCTGCACTCTCGAAACATCC
240    W G N T A E R V L E M I R L L L D L L E A P D P C T L E T F
      Forward primer1
811    TAGGCAGAATTCCTATGGTTTCAATGTTGATTTATGCTCCCTCATGGATACTTTGCCCAAGCAATGTTTTGGGGTATCTGATACG
270    L G R I P M V F N V V I M S P H G Y F A Q D N V L G Y P D T
      Reverse primer2
901    GAGGCCAGGTTGTTACATTITGGATCAAGTCCGTCCTGGAGAATGAAATGCTTCAGCGTATCAAGAAGCAAGGACTTGATATACCC
300    G G Q V V Y I L D Q V R A L E N E M L Q R I K K Q G L D I T
991    CCCGAATTCATTATCTGACTACTCCCTGATGACGACGAGCAACCCTGTGGTCAACGTTGGAGAAAGTGTATGGATCTGAGCATT
330    P R I I I T R L L P D A A G T T C G Q R L E K V G S E H
      Forward primer2
1081   GTGATATCTTCGAGTTCCTTCAGAGATGGAAAGGGTATGGTCCGCAATGGATCTTCGCTTTGAAGTGTGGCCATACCTAGAACTT
360    C D I L R V P F R D G K G M V R K W I S R F E V W P Y L E T
      Reverse primer1
1171   TCACCGAGGACGTTGCTGCTGAAATGCTAAGGATGTCAGGGCAAGCCGTATCTTATCATTGGAATACAGTGTGGAACATCGTTG
390   F T E D V A A E I A K E L Q G K P D L I I G N Y S D G N I V
1261   CCTCCTGTTAGCACACAAAATAGGTGTTACAGAGTGCACATTGCGCATGCTCTAGAAAAACAAAGTATCTGACTCAGATATATACT
420   A S L L A H K L G V T E C T I A H A L E K T K Y P D S D I Y
1351   GGAAGAAGTTGATGAAAAGTACCATTCTCATGCCAGTTACAGCTGATCTTTTGCATGAACCATACAGATTCATTATCACACGA
450   W K K F D E K Y H F S C Q F T A D L F A M N H T D F I I T S
1441   CATTCCAAGAGATTGCTGGAAGCAAGGATACTGTTGGACAGTATGAAAGCCACACTGCTTTCACTCTCCCTGGCCTCTATAGAGTGTTC
480   T F Q E I A G S K D T V G Q Y E S H T A F T L P G L Y R V V
1531   ATGGTATGATGCTTGTATCCCAAATCAACATTTGATCCCTGGCGCAGATGAGGCATATACTCCCTACACTGACGAGAAACGTA
510   H G I D V F D P K F N I V S P G A D E S I Y F P Y T D E K R
1621   GGTTGACTTCTTCCATCCGAAATGACGAGCTTCTTACAGCCCTGTTGGAATGAAGAGCACTTATGTGTGCTGAAAGACCGAAACA
540   R L T S F H P E I D E L L Y S P V E N E E H L C V L K D R N
1711   AACCAATTCATTTACCATGGCAAGGCTGGACAGAGTAAAGATTTATCTGGTCTTGTGGAATGGTATGGAAGAATACCAAGCTGCGCG
570   K P I L F T M A R L D R V K N L S G L V E W Y G K N T K L R
1801   AGGTTCTAAATCTGATGTAGTGGTGTGATAGAGAAGGAGTCTAAAGATATAGAAGCAAGCTGAGATGAAGAAGATGACAGTC
600   E V L N L D V V G D R R K E S K D I E E Q A E M K K M Y S
1891   ATATAGAGAAATACAACCTGAAATGCGCAGTTCAGATGGATTTCTCTCAGATGAACCCGCTGAGGAATGGAGAGCTCTACCGTTACATT
630   H I E K Y N L N G Q F R W I S S Q M N R V R N G E L Y R Y I
1981   GTGATACCAAGGGAGCTTTCGTCAGCCCTGCTTGTGATGAGGCTTTTGGATTGACTGTTGTTGAGGCCATGACATGTGGTTGCCAACTT
660   C D T K G A F V Q P A L Y E A F G L T V V E A M T C G L P T
2071   TTGCTACTGCAATGGTGGTCTGCTGAGATCATTGTGCATGGAATAACCGGATTCATATGATCCTTACCATGGAGTACAGGCTGCTG
690   F A T C N G G P A E I I V H G K S G F H I D P Y H G V Q A A
2161   AACTCCTTGTGACTTCTTGAAGTGAAGGCTGATCCCACTTACTGGGACAAAATCTCCAGGGAGGCTGCAGGCAATCCAAGAGA
720   E L L V D F F E K C K A D P T Y W D K I S Q G G L Q R I Q E
2251   AGTATACCTGGAATAATTTACTCTCAAAGGCTCAGCAGTACAGGAGTCTATGGATTCTGGAAGCAGCTTCGAACCTTGATCGTCTTG
750   K Y T W K I Y S Q R L L T L T G V Y G F W K H V S N L D R L
2341   AGAGCCGTGCGTACATGGAATGTTCTATGCACTCAAATACCGTAAATGGCTGAGTCTGTTCCTTTGACCAAGGAGTAAATGTAACGA
780   E S R R Y M E M F Y A L K Y R K L A E S V P L T K E
2431   AGAAATGGAGGAAACACGGGTTGGTTTCGGTTGGAGACAGAACAGAAATAATGTTCAATTCACAATGTAATGTGATAAGAAAGGCTTT
2521   GATTTCAATTTTATTTATGCTTCCATTGATCTTTTCCCTTTCATCTGCGTAATTGCTTGCCTGCTGAGCCCATGAA
2611   TTTCTAGTAAAGAAGTAAAGATTGTTTCTTTGGGTTAAAAA

```

灰色背景部分的序列是已知的毛白杨*PtSUS1*基因片段。Forward primer 1、Forward primer 2分别为3'端第一轮和第二轮引物; Reverse primer 1、Reverse primer 2分别为5'端第一轮和第二轮引物。

The sequence displayed with a gray background is a known sequence of *PtSUS1*. Forward primer 1 and Forward primer 2 are primers of 3' end in the first and second RACE; Reverse primer 1 and Reverse primer 2 are primers of 5' end in the first and second RACE, respectively.

图2 *PtSUS1*基因的核酸和氨基酸序列

Fig.2 Nucleic acid sequence and amino acid of *PtSUS1*

该阅读框大小为2 415 nt, 编码805个氨基酸。通过 ExPASy网站的ProtParam工具分析蛋白的理化性质, 相关结果显示: 该PtSUS1蛋白分子量为92.410 kDa, 理论等电点为6.23, 分子式为 $C_{4183}H_{6504}N_{1118}O_{1193}S_{27}$,

总平均亲水性-0.294, 整个多肽链表现为亲水性, 推测此蛋白是亲水性蛋白。

2.3 *PtSUS1*的结构特点和功能特性分析

SMART在线软件对PtSUS1氨基酸序列功能域

(图3A)的预测结果显示PtSUS1具有2个功能域: N端7-554肽段的蔗糖合成(sucrose_synth)功能区段和C端556-742肽段的糖基转移(glycos_transf_1)功能区段, 这两个结构域分别行使催化尿苷二磷酸葡萄糖和果糖合成蔗糖的功能和转移糖基化合物(UDP、ADP、GDP或CDP)的功能。

PtSUS1氨基酸序列的二级结构预测结果如图3B所示: α -螺旋和不规则卷曲是PtSUS1较大量的结构元件, 而 β -转角和延伸链则散布于整个蛋白质中。统计表明, PtSUS1的二级结构由53.29%的 α -螺旋、27.95%的不规则卷曲、12.17%的延伸链和6.58%的 β -转角组成。

由图3C所示可知PtSUS1的C值、S值和Y值都小于0.5, 预测结果显示没有信号肽, 进而推测该蛋白不是分泌蛋白, 即属于非分泌蛋白类。用TMHMM 2.0 Server预测^[22]毛白杨PtSUS1氨基酸序列的跨膜结构域的结果表明, 毛白杨PtSUS1不存在跨膜结构域, 属于非跨膜蛋白类。

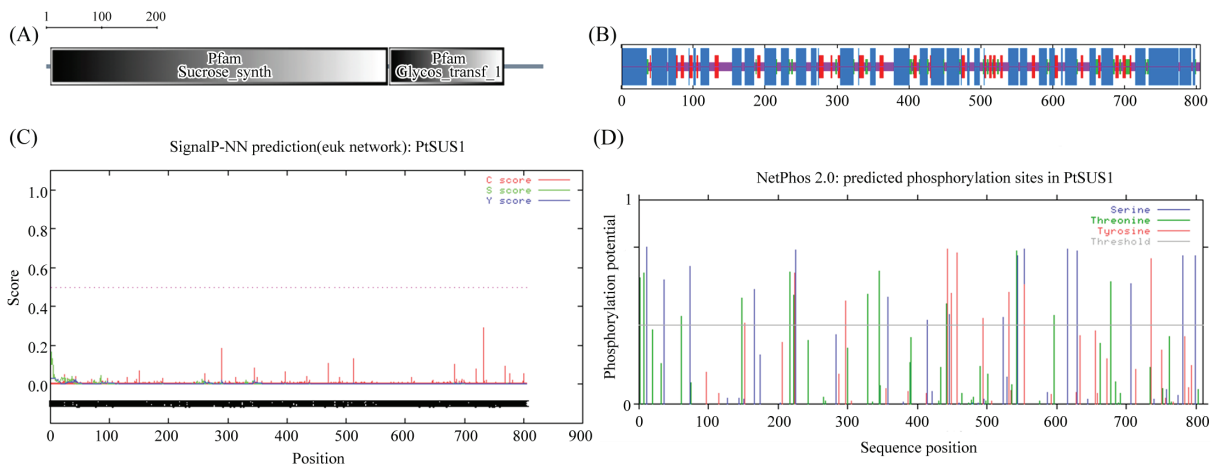
对PtSUS1翻译后修饰预测^[23]的结果表明, 整个多肽链中分值在0.5以上的氨基酸位点共有38个, 即PtSUS1的磷酸化位点有38个, 而且较均匀分布于整个多肽链中(图3D)。Winter等^[24]认为, 磷酸化作用有利于SUS可溶性构象的形成。据此我们推测, 毛白杨PtSUS1是水溶性的。

2.4 核酸及氨基酸序列的同源性比对分析

用Blast程序比对毛白杨与其它植物SUS的核酸及氨基酸序列同源性, 结果表明: 毛白杨PtSUS1基因的开放阅读框与毛果杨、温州蜜柑、陆地棉、巨桉、拟南芥等有较高的一致性, 分别为97%、81%、79%、77%、76%; 对蛋白质-蛋白质的Blastp (protein-protein blast)比对的结果显示毛白杨PtSUS1的氨基酸序列与以上植物相应的氨基酸序列的相似性程度更高, 一致性分别为97%、87%、87%、84%、82%。为了进一步探究PtSUS1氨基酸序列的特点, 本试验选取了拟南芥、毛果杨、陆地棉、玉米的PtSUS1氨基酸序列与毛白杨PtSUS1进行同源性比对。结果如图4所示, 在蔗糖合酶SUS1成员共有的两个典型区域即N端的蔗糖合成(sucrose_synth)功能域和C端的糖基转移(glycos_transf_1)功能域内分别存在21个和7个不同程度的保守氨基酸残基序列, 在其他区段还存在3个保守的氨基酸残基序列。

2.5 进化树的构建及分析

为了分析毛白杨PtSUS1与其他物种SUS蛋白在植物中的系统发育进化关系, 选择在NCBI注册的裸子植物和被子植物共18个物种33个SUS成员的蛋白氨基酸序列。由图5进化树可见, 图中所示的被子植物和裸子植物(火炬松, *Pinus taeda*) SUS蛋白成员共同形成了一个家族, 推测它们约在20~30亿年

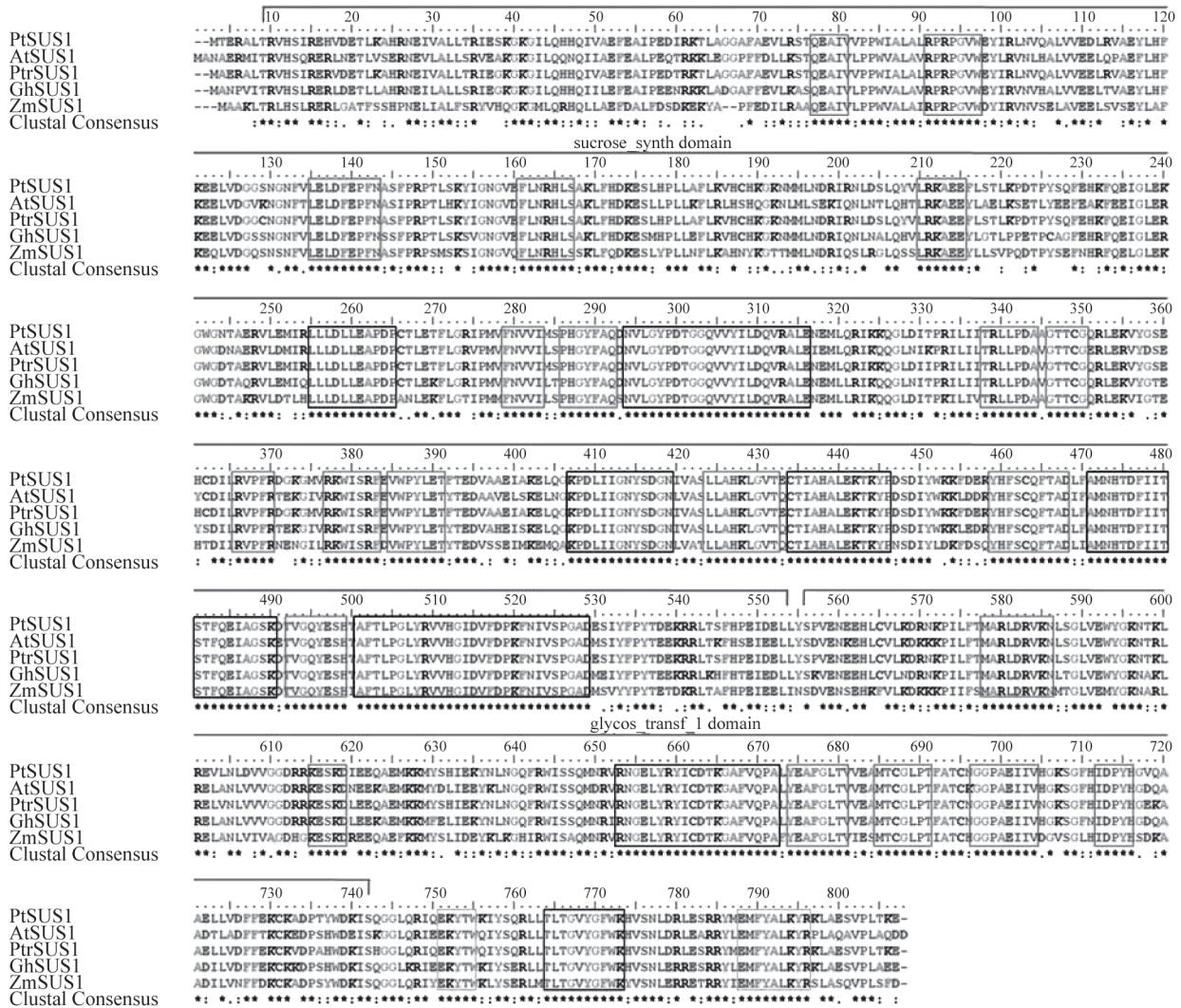


A: PtSUS1氨基酸序列功能域预测; B: PtSUS1蛋白二级结构预测(蓝色区域代表 α -螺旋; 红色区域代表延伸链; 绿色区域代表 β -转角; 紫色区域代表不规则卷曲); C: PtSUS1氨基酸序列的信号肽预测; D: PtSUS1蛋白磷酸化位点预测。

A: prediction of functional domains in amino acid sequence of *PtSUS1*; B: prediction of protein secondary structure (the blue regions represent α -helix; the red regions represent extended strand; the green regions represent β -turn; the purple regions represent random coil); C: prediction of the presence and location of signal peptide cleavage sites in amino acid sequence; D: prediction of protein phosphorylation sites in amino acid sequence of *PtSUS1*.

图3 PtSUS1的氨基酸结构特点和功能特性分析

Fig. 3 Analysis of structural characteristics and functional properties of amino acids encoded by *PtSUS1*



At: 拟南芥; Pt: 毛白杨; Ptr: 毛果杨; Gh: 陆地棉; Zm: 玉米。

At: *Arabidopsis thaliana*; Pt: *Populus tomentosa*; Ptr: *Populus trichocarpa*; Gh: *Gossypium hirsutum*; Zm: *Zea mays*.

图4 *PtSUS1*与其他植物SUS1氨基酸序列对比

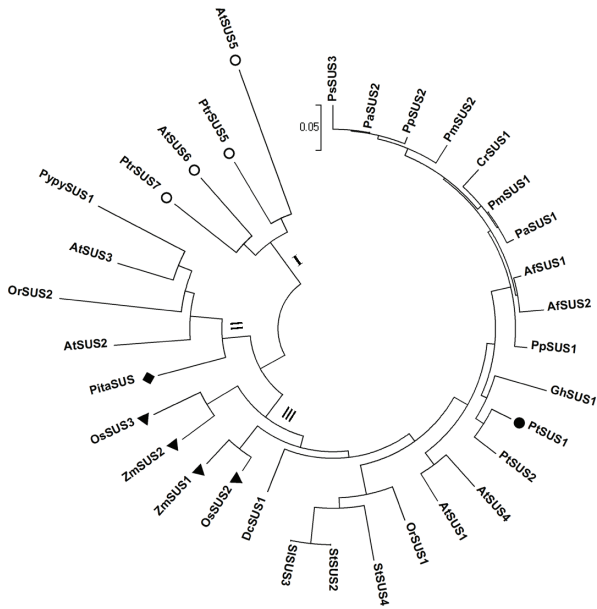
Fig.4 Alignment of amino acids encoded by *PtSUS1* with homologous proteins of other plants

前起源于原核生物^[25]且均属于古代起源类型; 其中, *PtSUS1*与*PtSUS2*、*GhSUS1*等聚为一类。如图所示, 植物SUS蛋白家族分为3个亚家族, 即III类型I、II和III。其中, I仅由双子叶植物SUS蛋白组成, II和III则分别向双子叶植物和单子叶植物方向发生分歧。由图5显示的SUS系统进化关系可推测, 最初进化而来的被子植物SUS蛋白成员伴随着基因组内的复制经历了多次SUS蛋白的复制, 其中约发生在2亿年前^[26]的被子植物第1次染色体复制事件产生了I、II和III亚家族成员, 发生在双子叶植物与单子叶植物分歧之前; 随后, I、II及III亚家族内发生染色体复制事件,

有些成员出现在双子叶或单子叶内物种分化之前, 而有些则出现在物种分化之后。值得一提的是, 裸子植物火炬松的SUS成员与部分双子叶植物聚为一类, 这从侧面说明了植物尤其是被子植物SUS成员的进化是不同步的。

2.6 *PtSUS1*的表达模式分析

为研究*PtSUS1*基因的组织表达特性, 我们分别采集了毛白杨组培苗的根、茎和叶, 并于3月1日采集发育成熟的雌雄花芽和7月1日采集处于发育早期的雌雄花芽和营养芽, 分别提取RNA进行RT-PCR分析, 检测*PtSUS1*基因在各个组织器官中的表达模式。



Af: 顶果木; At: 拟南芥; Cr: 总状垂花楸; Dc: 香石竹; Gh: 陆地棉; Or: 多枝列当; Os: 水稻; Pa: 扁轴木; Pita: 火炬松; Pm: 大叶五山柳苏木; Pp: 盾柱木; Ps: 豌豆; Pt: 毛白杨; Ptr: 毛果杨; Pypy: 沙梨; Sl: 番茄; St: 马铃薯; Zm: 玉米。○: 双子叶植物SUS成员(第I亚家族); ■: 火炬松SUS; ●: 毛白杨PtSUS1; ▲: 单子叶植物SUS成员。

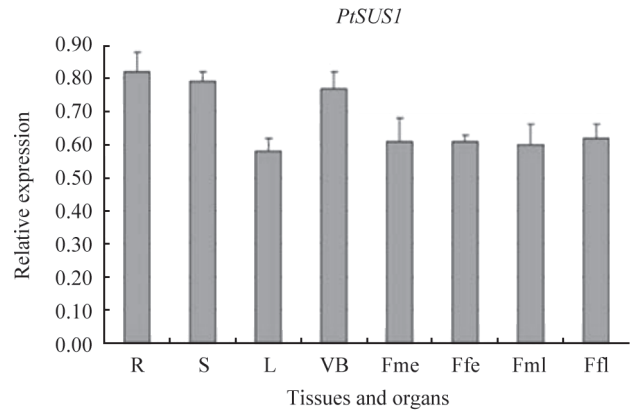
Af: *Acrocarpus fraxinifolius*; At: *Arabidopsis thaliana*; Cr: *Colvillea racemosa*; Dc: *Dianthus caryophyllus*; Gh: *Gossypium hirsutum*; Or: *Orobancha ramose*; Os: *Oryza sativa*; Pa: *Parkinsonia aculeate*; Pita: *Pinus taeda*; Pm: *Pentaclethra macrophylla*; Pp: *Peltophorum pterocarpum*; Ps: *Pisum sativum*; Pt: *Populus tomentosa*; Ptr: *Populus trichocarpa*; Pypy: *Pyrus pyrifolia*; Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*; Zm: *Zea mays*. ○: SUSs of dicotyledonous plants (family I); ■: SUS of *Pinus taeda*; ●: PtSUS1 of *Populus tomentosa*; ▲: SUSs of monocot plants.

图5 *PtSUS1*与其他植物SUS基因家族成员的系统进化树
Fig.5 Phylogenetic tree of *PtSUS1* and members of *SUS* gene family in other plants

结果显示, *PtSUS1*基因在各个组织部位均有表达, 在组培苗的根、茎中表达量较高, 而在组培苗叶片中表达量相对较低; 成年树营养芽中的*PtSUS1*的转录本水平则高于同期花芽和晚期花芽; 不同时期雄雌花芽中*PtSUS1*的表达丰度基本稳定, 差别不大(图6)。总体而言, 该基因呈现组成型表达模式, 即在根、茎、叶、营养芽和花芽中均有表达, 表达丰度以根、茎及营养芽中较高, 在叶和花芽中表达量差别不明显。

3 讨论

高等植物的蔗糖代谢是一个复杂的过程。目前



R: 组培苗根; S: 组培苗茎; L: 组培苗叶; VB: 成年树营养芽; Fme: 早期雄花芽; Ffe: 早期雌花芽; Fml: 成熟期雄花芽; Ffl: 成熟期雌花芽。
R: root of tissue-cultured plantlet; S: stem tissue-cultured plantlet; L: leaf tissue-cultured plantlet; VB: vegetative bud; Fme: floral bud-male-early stage; Ffe: floral bud-female-early stage; Fml: floral bud-male-late stage; Ffl: floral bud-female-late stage.

图6 毛白杨*PtSUS1*基因的组织表达特性

Fig.6 Expression pattern of *PtSUS1* in different tissues of *Populus tomentosa*

的研究已能够清楚地认识植物中糖的代谢途径及相关酶的酶学特征, 但这是否真实地反应体内几种酶之间的相互作用, 仍有待研究。另外, 对这些酶基因表达的调控以及糖信号有关酶在信号感受与转导中的作用方式方面还有许多待研究探明的问题, 糖作为一种信号分子, 可能对源库关系起调控作用, 同时也与糖代谢基因表达有关。借助已有的糖信号调控基因表达的知识, 运用转基因研究等现代手段加强植物中相关酶基因表达及生物学特性研究是认识与解决这一问题的有效途径。

目前, 研究者已经从马铃薯^[27]、玉米^[28]、甘蔗^[29]等不同种属的植物中成功地克隆出SUS基因。有关其蔗糖合酶的转化研究也获得了很大的进展, 例如, 研究表明小麦蔗糖合酶基因的表达水平与蔗糖合酶活性和细胞壁多糖的含量呈正相关关系^[30]。据报道, 杨树SUS基因的表达模式研究表明, SUS基因的表达量与与纤维素合成趋势一致^[31]。Coleman等^[32]通过控制两种类型的启动子研究陆地棉蔗糖合酶基因在白杨杂种(银白杨×大齿杨, *Populus alba*×*grandidentata*)中的过量表达效应, RNA转录水平的研究数据显示, 在不影响植物生长的前提下, 与对照组相比, 转基因株系无论是酶活性、细胞壁成

分还是可溶性糖含量都有显著的变化。最新研究结果表明, 拟南芥蔗糖合酶基因*SUS2*和*SUS3*在种子中强烈而有差异地表达, 并指出*SUS*可能与种子的代谢平衡和种子发育的启动时间有关^[33], 以上这些结果都表明了*SUS*同源基因在植物发育过程的多个方面发挥着重要的调控作用。

大多数植物中至少有两种*SUS*的同工酶, 通常它们在氨基酸序列和生化性质方面都有较高的一致性, 但是在基因调控方面却有明显的不同^[34]。RT-PCR分析结果表明, *PtSUS1*的表达具有组成型的特点, 它在根、茎、叶、营养芽、雌雄花芽中均检测到转录本, 而在组培苗的根、茎及成年树的营养芽中表达水平较高, 可能是由于根部和茎部是植株纤维素含量较高的部位且代谢旺盛所致; 成年树营养芽在发育过程中形态分化先于花芽, 而且营养芽着生于枝条顶端, 其各种生理生化代谢活动更为活跃, 这可能是*PtSUS1*在该器官中表达水平较高的原因。据此, 我们推测作为蔗糖代谢关键酶基因*PtSUS1*参与了毛白杨根、茎、叶、营养芽、花芽的发育过程, 并在这些组织器官的生命活动中发挥着重要的调控作用。

此外, 通过软件将*PtSUS1*与拟南芥、毛果杨、陆地棉和玉米*SUS1*的氨基酸序列进行同源性比对, 结果显示在蔗糖合成(*sucrose_synth*)功能域和糖基转移(*glycos_transf_1*)功能域内均存在多个不同程度的保守氨基酸残基序列, 由于氨基酸序列中的保守性残基对于维持整个蛋白质分子特定的三维结构和功能有着重要的意义^[35], 加之有关拟南芥和陆地棉等植物*PtSUS1*基因调控功能方面的研究报道^[36-37], 我们推测, *PtSUS1*基因可能与在源库组织中韧皮部装载过程中和卸载后蔗糖代谢的能量提供关系密切, 并且在光合作用的碳分配过程中同样发挥着重要的作用。综上所述, *PtSUS1*基因与纤维素合成过程有着密切的联系。

已有研究报道证实蔗糖合酶在植物表皮细胞的分化、细胞壁的合成和木材纤维素合成等多方面发挥着重要的调控作用。因此不难推测, 通过控制毛白杨相关组织器官中蔗糖合酶基因的表达来调控细胞的分化、细胞壁形成和纤维素合成可能是一条可行的途径。本实验依据已知毛白杨*PtSUS1*基因片段通过RACE扩增成功克隆了*PtSUS1*的cDNA序列, 对其表达模式进行了初步分析研究, 还需要进一步

研究该基因的启动子的驱动特性、利用基因过表达或RNA干扰技术对其生物学功能进行验证。这不仅有利于进一步阐释植物糖代谢途径的内在机理, 而且对于通过基因工程手段进行毛白杨木质纤维品质改良、提高木材产量具有潜在的应用价值。

参考文献 (References)

- 1 Sun J, Loboda T, Sung SJ, Black CC. Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* 1992; 98(3): 1163-9.
- 2 Asano T, Kunieda N, Omura Y, Ibe H, Kawasaki T, Takano M, et al. Rice SPK, a calmodulin-like domain protein kinase, is required for storage product accumulation during seed development: Phosphorylation of sucrose synthase is a possible factor. *Plant Cell* 2002; 14(3): 619-28.
- 3 Elling L. Effect of metal ions on sucrose synthase from rice grains—a study on enzyme inhibition and enzyme topography. *Glycobiology* 1995; 5(2): 201-6.
- 4 Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J* 1995; 7(1): 97-107.
- 5 Zhou LL, Paull RE. Sucrose metabolism during papaya (*Carica papaya*) fruit growth and ripening. *J Am Soc Hortic Sci* 2001; 126(3): 351-7.
- 6 Ruan YL, Chourey PS. A fiberless seed mutation in cotton is associated with lack of fiber cell initiation in ovule epidermis and alterations in sucrose synthase expression and carbon partitioning in developing seeds. *Plant Physiol* 1998; 118(2): 399-406.
- 7 Cosgrove D. Biophysical control of plant cell growth. *Annu Rev Plant Physiol* 1986; 37: 377-405.
- 8 Salnikov VV, Grimson MJ, Delmer DP, Haigler CH. Sucrose synthase localizes to cellulose synthesis sites in tracheary elements. *Phytochemistry* 2001; 57(6): 823-33.
- 9 Wang F, Sanz A, Brenner ML, Smith A. Sucrose synthase, starch accumulation, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* 1993; 101(1): 321-7.
- 10 Heim U, Weber H, Baumlein H, Wobus U. A sucrose-synthase gene of *Vicia faba* L.: Expression pattern in developing seeds in relation to starch synthesis and metabolic regulation. *Planta* 1993; 191(3): 394-401.
- 11 Leonid VS, Tracy H, Norman PA. Sucrose metabolism in spring and winter wheat in response to high irradiance, cold stress and cold acclimation. *Physiol Plantarum* 2000; 108: 270-8.
- 12 Coleman HD, Yan J, Mansfield SD. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(31): 13118-23.
- 13 Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP. A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential

- role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(20): 9353-7.
- 14 Ruan YL, Chourey PS. A fiberless seed mutation in cotton is associated with lack of fiber cell initiation in ovule epidermis and alterations in sucrose synthase expression and carbon partitioning in developing seeds. *Plant Physiol* 1998; 118(2): 399-406.
- 15 Brill E, van Thournout M, White RG, Llewellyn D, Campbell PM, Engelen S, *et al.* A novel isoform of sucrose synthase is targeted to the cell wall during secondary cell wall synthesis in cotton fiber. *Plant Physiol* 2011; 157(1): 40-54.
- 16 Barratt DH, Barber L, Kruger NJ, Smith AM, Wang TL, Martin C. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea. *Plant Physiol* 2001; 127(2): 655-64.
- 17 Bieniawska Z, Paul Barratt DH, Garlick AP, Thole V, Kruger NJ, Martin C, *et al.* Analysis of the sucrose synthase gene family in *Arabidopsis*. *Plant J* 2007; 49(5): 810-28.
- 18 Chang S, Puryear J, Cairney J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep* 1993; 11(2): 113-6.
- 19 Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 1997; 10(1): 1-6.
- 20 Geourjon C, Deleage G. SOPMA: Significant improvements in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* 1995; 11(6): 681-4.
- 21 Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007; 24(8): 1596-9.
- 22 Ikeda M, Arai M, Lao DM, Shimizu T. Transmembrane topology prediction methods: A re-assessment and improvement by a consensus method using a dataset of experimentally-characterized transmembrane topologies. *In Silico Biol* 2002; 2(1): 19-33.
- 23 Blom N, Sicheritz-Pontén T, Gupta R, Gammeltoft S, Brunak S. Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* 2004; 4(6): 1633-49.
- 24 Winter H, Huber SC. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: Localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2000; 35(4): 253-89.
- 25 Lunn JE. Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiol* 2002; 128(4): 1490-500.
- 26 Mitchell-Olds T, Clauss MJ. Plant evolutionary genomics. *Curr Opin Plant Biol* 2002; 5(1): 74-9.
- 27 Salanoubat M, Belliard G. Molecular cloning and sequencing of sucrose synthase cDNA from potato (*Solanum tuberosum* L.): Preliminary characterization of sucrose synthase mRNA distribution. *Gene* 1987; 60(1): 47-56.
- 28 McCarty DR, Shaw JR, Hannah LC. The cloning, genetic mapping, and expression of the constitutive sucrose synthase locus of maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(23): 9099-103.
- 29 Sugiharto B, Sakakibara H, Saumadi, Sugiyama T. Differential expression of two genes for sucrose-phosphate synthase in sugarcane: Molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol* 1997; 38(8): 961-5.
- 30 Xue GP, McIntyre CL, Jenkins CL, Glassop D, van Herwaarden AF, Shorter R. Molecular dissection of variation in carbohydrate metabolism related to water-soluble carbohydrate accumulation in stems of wheat. *Plant Physiol* 2008; 146(2): 441-54.
- 31 Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, *et al.* A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(25): 14732-7.
- 32 Coleman HD, Yan J, Mansfield SD. Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(31): 13118-23.
- 33 Angeles-Núñez JG, Tiessen A. *Arabidopsis* sucrose synthase 2 and 3 modulate metabolic homeostasis and direct carbon towards starch synthesis in developing seeds. *Planta* 2010; 232(3): 701-18.
- 34 卢合全, 沈法富, 刘凌霄, 孙维方. 植物蔗糖合成酶功能与分子生物学研究进展. *中国农学通报* 2005; 21(07): 34-7, 57.
- 35 Bajaj M, Blundell T. Evolution and the tertiary structure of proteins. *Annu Rev Biophys Bioeng* 1984; 13: 453-92.
- 36 Hardin SC, Duncan KA, Huber SC. Determination of structural requirements and probable regulatory effectors for membrane association of maize sucrose synthase 1. *Plant Physiol* 2006; 141(3): 1106-19.
- 37 Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L. Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J* 1993; 4(2): 367-77.

Cloning and Expression Patterns of *PtSUS1* in *Populus tomentosa*

Li Ying, Chen Zhong, Li Hao, Guo Bin, Wang Jia, An Xinmin*

(National Engineering Laboratory for Tree Breeding, NDRC; Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, MOE; Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of State Forestry Administration, SFA, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Sucrose synthase (SUS) was closely associated with sink strength, secondary wall formation and cellulose synthesis in plant. Among these items, cellulose synthesis is considered to be the most important. According to the known gene fragment of *PtSUS1* and the principle of RACE amplification, we got the gene sequence of *PtSUS1* from *Populus tomentosa*. The full sequence of *PtSUS1* which contains an open reading frame (ORF) is 2 669 bp encoding a deduced amino acid sequence of 805 residues. Blast analysis results indicated that the homology was as high as 76% to 97% and 81% to 97%, respectively, when compared *PtSUS1* sequence of amino acid and nucleotide with the ones of *Arabidopsis thaliana*, *Eucalyptus grandis*, *Gossypium hirsutum*, *Citrus unshiu*, and *Populus trichocarpa*. Furthermore, secondary structure and functional sites in amino acid sequences have been predicted by the bioinformatics technology, the results suggested that the encoded protein contains 2 functional domains, 38 PKA phosphorylation sites and no transmembrane regions. Phylogenetic analysis demonstrated that *PtSUS1* is most similar to *PtSUS2*. And the expression of *PtSUS1* mRNA was detected in all the tissues and organs tested such as root, stem, leaves and flowers of *Populus tomentosa* by RT-PCR, presenting the constitutive expression pattern. The data of this paper will provide the basis for further gene function research of *PtSUS1* in *Populus tomentosa*.

Key words sucrose synthase; *Populus tomentosa*; cloning; expression pattern; cellulose synthesis

Received: October 16, 2011 Accepted: December 7, 2011

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2012CB114505), the National Natural Science Foundation of China (No.31170631) and the National High-tech R&D Program of China (863 Program) (No.2011AA100201)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62336248, E-mail: xinminan@163.com