

团花树形成层扩展蛋白基因 cDNA 的克隆和序列分析

欧阳昆唏¹, 李娜¹, 张东方¹, 骈瑞琪¹, 李伟¹, 辛蓓¹, 陈晓阳^{2*}

(1. 北京林业大学林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 华南农业大学林学院, 广州 510642)

摘要: 以团花树(*Anthocephalus chinensis*)枝条形成层的 cDNA 为模板, 参照 α -Expansin 基因(*EXPA*)序列设计兼并引物, 进行 RT-PCR。以得到的扩增产物为基础, 采用 RACE 技术得到扩展蛋白基因全长 cDNA, 命名为 *AcEXPI*。*AcEXPI* 全长 979 bp(GenBank 注册号为 FJ417847), 开放阅读框为 777 bp, 编码 258 个氨基酸, 并具有 Expansin 特有的保守序列和结构域。经过比对分析, 该基因编码的氨基酸序列与毛白杨、欧洲山杨 \times 美洲山杨、樱桃和矮牵牛的 α -Expansin 基因编码的氨基酸同源性分别为 85%、85%、84% 和 83%。这为研究 *EXP* 基因与团花树木质部生长速度和材质的关系提供了基础。

关键词: 团花树; 扩展蛋白; RACE; *AcEXPI*

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)02-0151-08

Cloning and Sequence Analysis of Expansin Gene from Cambium of *Anthocephalus chinensis*

OUYANG Kun-xi¹, LI Na¹, ZHANG Dong-fang¹, PIAN Rui-qi¹,

LI Wei¹, XIN Bei¹, CHEN Xiao-yang^{2*}

(1. Key Laboratory for Genetics and Breeding of Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using the cDNA from the branch cambium of *Anthocephalus chinensis* as the template, the degenerate primers by reference to the α -Expansin gene (*EXPA*) sequences in other plants were constructed for RT-PCR. Taking the production of the amplification as the starting information, The full-length cDNA of expansin gene was obtained by RACE, named as *AcEXPI*. It was 979 bp in length (GenBank accession No. FJ417847) with 777 bp ORF, encoding 258 amino acid, which had the typical conserved sequence and domain of Expansin. There were 85%, 85%, 84%, 83% homology with *Populus tomentosa*, *Populus tremula* P. *tremuloides*, *Prunus cerasus*, *Petunia hybrida*, respectively. It provided the foundation for studying the relationships between *EXP* gene and growth rate, wood quality of the xylem of *Anthocephalus chinensis*.

Key words: *Anthocephalus chinensis*; Expansin; RACE; *AcEXPI*

植物细胞壁是极其重要的结构, 它决定着细胞的形状, 将细胞互相粘在一起, 为细胞提供基本的机械支撑和硬度, 并作为细胞抗击病原体的一道屏障^[1]。但它也限制了植物细胞的伸长, 一定程度上限制植物细胞原生质量的增加。因此调节细胞壁

的伸展性, 重排细胞壁的动态结构, 尤其是承重网络的活性蛋白质(酶)是调节组织生长的重要突破口^[2]。Expansins(扩展蛋白 EXP)是一类细胞壁蛋白, 它以独特的方式诱导依赖 pH 的细胞壁伸长及缓和壁的压力^[3]。生化分析表明扩展蛋白可能是

通过打断细胞壁微纤丝与基质间的非共价键而使细胞壁扩展的。目前,对扩展蛋白的基因家族、结构、特性、伸展细胞壁的机制有较深入的研究,而且从不同植物也克隆了大量的基因。目前认为扩展蛋白除具有使细胞增大^[4]的功能外,在形态建成^[4-5]、果实成熟^[6-7]、器官脱离^[8]以及细胞解聚和花粉管侵入柱头^[9]等方面也起重要作用。

团花树(*Anthocephalus chinensis*)别名黄梁木,是茜草科(Rubiaceae)团花属植物,常绿大乔木,亚热带树种,要求阳光充足。团花树木材生长十分迅速,其细胞壁遗传分子机理未见报道。研究表明不同植物的木质部形成过程和机理是相同的^[10-11],相关的基因在不同物种中既有同源性又存在特异性^[10,12]。本文以团花树枝条形成层 cDNA 为模板,克隆木质部生长过程中对细胞扩展起重要作用的细胞壁扩展蛋白 *EXP* 基因,并与其他植物的相关数据进行比较,分析其亲缘关系、结构域及保守序

列,为研究 *EXP* 与团花树木质部生长速度和材质的关系提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

团花树(*Anthocephalus chinensis*)生长于华南农业大学科研基地,3~5年生,取距地面约3m处枝干的形成层组织,液氮速冻后-80℃保存备用。Reverse Transcriptase XL (AMV)、Ribonuclease Inhibitor、DNase I、*Taq* DNA 聚合酶、LA *Taq* 聚合酶、dNTP、PMD19-T 载体、RACE 试剂盒购自于 TaKaRa 公司;Oligo(dT)₁₅ 和 RNAlant Reagent 植物总 RNA 提取试剂、DNA 凝胶回收试剂盒、感受态大肠杆菌(*E. coli*)DH5α 购于天根生物技术有限公司;用 Primer5 设计的所有引物(表1)由上海生工生物公司合成;测序由上海英骏生物技术有限公司完成;其它药品、试剂购于鼎国生物技术有限公司。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')
A1(forward)	GG(AGCT)GG(AGCT)GC(AGT)TGTGG(AGT)TA(CT)GG
A2(reverse)	TGCCA(AG)TT(CT)TG(AGCT)CCCCA(AG)(AT)T
5'RACE outer primer	CATGGCTACATGCTGACAGCCTA
5'RACE inner primer	CGCGGATCCACAGCCTACTGATGATCAGTCGATG
3'RACE outer primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGATTT
3'RACE inner primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCACTATAGG
A3	CTCCTTGCTTGCAGCACGGC
A4	TTGGGAGGGCAGAAGTTGGTGG
A5	GCTCTATTCAACAATGGGCT
A6	TTCCGTTACTTCAACTTGGT
A7(forward)	GAAGATCTGATGGCTGCAATGTGTCTC
A8(reverse)	AATCGGCCGAATGATCTTCAAACCTCG

黑体为酶切位点碱基。The blackbodies are the bases of enzyme digestion.

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 的合成

取 0.1 g 形成层组织置于预冷的研钵中,加液氮快速研磨成粉末,按照 RNAlant Reagent 试剂盒的方法提取总 RNA,并经 DNase I 处理过夜,以除去 DNA 污染。以总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)₁₅ 为引物,利用 Reverse Transcriptase XL (AMV)反转录酶合成 cDNA 第一条链,置于-20℃保存备用。

1.3 *AcEXPI* 基因中间片段的克隆

利用 BLAST 分析已经在 NCBI 登录的 α-Expansin (EXPA)扩展蛋白的氨基酸序列保守区,设

计一对兼并引物 A1/A2,并用 *Taq* 酶扩增中间片段。扩增程序为 Touchdown:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,62℃ 30 s,每 1 循环降 1℃,72℃ 1 min,13 个循环;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 10 min;10℃ 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收目的片段进行克隆,挑选阳性克隆测序。

1.4 5'RACE 扩增与克隆

按照 TaKaRa 5'RACE 试剂盒的要求把总 RNA 反转录成 cDNA 第一条链。再利用已测序的中间

片段的序列,按照试剂盒巢式 PCR 的要求设计两条下游引物 A3、A4 分别与 5'RACE outer primer、inner primer 成对,并用 LA *Taq* 酶进行巢式 PCR。巢式第二轮 PCR 以第一轮 PCR 的产物为模板,扩增程序为 Touchdown: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 每 1 循环降 1℃, 72℃ 1 min, 11 个循环; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 20 个循环; 72℃ 10 min; 10℃ 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收目的片段进行克隆,挑选阳性克隆测序。

1.5 3'RACE 扩增与克隆

按照 TaKaRa 3'RACE 试剂盒的要求把总 RNA 反转录成 cDNA 第一条链。再利用已测序的中间片段的序列,按照试剂盒巢式 PCR 的要求设计两条上游引物 A5、A6 分别与 3'RACE outer primer、inner primer 成对,并用 LA *Taq* 酶进行巢式 PCR。经巢式第二轮 PCR 后,用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收目的片段进行克隆,挑选阳性克隆测序。

1.6 *AcEXPI* 基因全长的获得

对所得的 *AcEXPI* 基因中间序列、5'端序列、3'端序列进行拼接获得基因全长,并根据全长设计一对引物 A7 与 A8,以 cDNA 为模板,用 LA *Taq* 酶进行开放阅读框的扩增。扩增程序为 Touchdown: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 65℃ 40 s, 每 1 循环降 1℃, 72℃ 1 min, 11 个循环; 94℃ 30 s, 55℃ 40 s, 72℃ 1 min, 20 个循环; 72℃ 10 min; 10℃ 保存。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收

目的片段进行克隆,挑选阳性克隆测序。

1.7 *AcEXPI* 基因的全长 cDNA 序列分析

运用 DNAMAN 软件分析 *AcEXPI* 基因可能编码的氨基酸残基序列,并使用 GenBank 上 BLAST-P 程序进行氨基酸同源性分析。利用 DNAMAN 构建 *AcEXPI* 基因编码氨基酸的系统进化树。

2 结果和分析

2.1 总 RNA 的提取

总 RNA 提取后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。从图 1 可以看出总 RNA 的 28S、18S、5S 条带清晰明亮; $OD_{260}/OD_{280} = 1.90$, $OD_{260}/OD_{230} = 2.50$ 。说明总 RNA 的质量好、纯度高,能够满足以后的 cDNA 合成和 RACE 的要求。

2.2 *AcEXPI* 基因中间片段的克隆与测序

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 2),可以看出, DNA 条带清晰特异,大小约为 500 bp,符合预期目的片段。将此片段回收、克隆和测序,片段约 491 bp,碱基序列见图 3。通过 BLAST 分析,该片段与毛白杨(*Populus tomentosa*)的 *PtEXPI* (AY675563)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*) *LeEXPI8* (AJ270960) 及欧洲山杨 × 美洲山杨 (*P. tremula* × *P. tremuloides*) 的 *PttEXPI* (AY435099) 的相似性分别为 83%、81% 和 81%,该片段可能属于团花树 α -Expansin 基因序列。

2.3 5'RACE 扩增产物的克隆与测序

5'RACE 第二次 PCR 扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 4),可以看出, DNA 条带清晰特

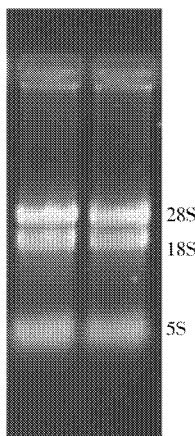


图 1 团花树总 RNA 凝胶电泳图谱

Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of total RNA of *Anthocephalus chinensis*

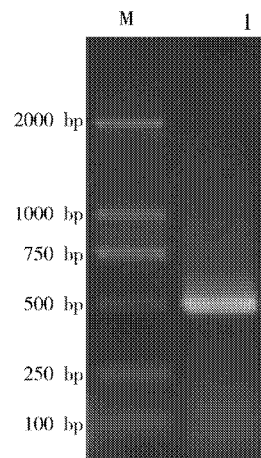


图 2 *AcEXPI* 中间片段的 PCR 扩增图谱

Fig. 2 PCR amplification of *AcEXPI* fragment
M: DL2000 marker

```

1      GGGGGTGCTT GTGGGTACGG GAACTTATAC AGCCAAGGCT ACGGAGTGAA TACTGCAGCA
61     TTAAGCACAG CTCTAATCAA CAATGGGCTC AGTTGOGGCG CATGTTTCGA GCTAAAAATGT
121    GCTGATGATC CACAATGGTG TCACCCCGGC AGCCCTTCAA TTTTCATCAC TGCCACCAAC
181    TTCTGCCCTC CCAATTAATGC TTTGCCAAAT GATAACGGTG GTTGGTGCAA CCCTCCTCGC
241    CCTCATTTCC ATCTTGCCAT GCCTATGTTC CTCAAAGATTG CCGAGTACCG CGCCGGAAATT
301    GTTCCCGTTT CTTACCGCCG GGTGCCGTGC CGCAAGCAAAG GAGGGATCCG GTTCCAAATT
361    AACGGTTTCC GTTACTTCAA CTTGGTTCTG ATCACCACCG TTGCGGGTGC AGGGGATATT
421    GTGCAGGCGT GGGTCAAAGG ATCAAAGAACT GGTGGATAAA GCCTGAGCCG CAACTGGGGC
481    CAGAATTGGC A

```

图 3 *AcEXPI* 中间片段的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of *AcEXPI* fragment

异,大小约为 450 bp,将此片段回收、克隆和测序,得片段 456 bp,碱基序列见图 5。此序列包含了 5' RACE 的接头引物 inner primer,并与 *AcEXPI* 基因中间片段的序列有 194 bp 重叠,符合特异引物设计的预期目的。去除 5' RACE 的接头引物 inner primer 序列后,经 DNAMAN 软件预测,在 82 bp 处有起始密码子 ATG,确认片段为 *AcEXPI* 基因的 5' 端的完整序列;再通过 BLAST 分析,该片段与毛白杨的 *PtEXPI* (AY675563)、番茄 *LeEXPI8* (AJ270960)及矮牵牛(*Petunia × hybrida*)的 *PhEXPI* (AY487167)的相似性分别为 80%、80% 和 78%。

```

1      CGCGGATCCA CAGCCTACTG ATGATCAGTC GATGGAAATT CCCACTTCAA CTCTGAATTCT
61     CCTTCCCTTAC CAAATATITTT CTTCCTCCCC TTCCCCCTTT CCTCATTCTG CAGCAAATGGC
121    TGCAATGTGT CTCACTAGCA TTGTTGCTCT TTCTTTACTT CTGACACTTG CTGAAGCCAG
181    AATCCAGGT GTTACTCAG GCGGGTCATG GCGGAATGCT CATGCTACAT TCTATGCGCG
241    CAGTGATGCC TCCGGAACTA TGGGGGGTGC TTGTGGGTAC GGGAACTTAT ACAGCCAAGG
301    CTACGGAGTG AATACTGCAG CATTAAAGCAC AGCTCTATTC AACAAATGGC TCAGTTGCGG
361    CGCATGTTTC GAGCTAAAAAT GTGCTGATGA TCCACAATGG TGTCACCCCG GCAGCCCTTC
421    AATTTTCATC ACTGCCACCA ACTTCTGCCC TCCCAA

```

图 5 *AcEXPI* 5'端片段的核苷酸序列

Fig. 5 Nucleotide sequence of 5'terminal of *AcEXPI*

2.4 3'RACE 扩增产物的克隆与测序

3'RACE 第二次 PCR 扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 6),可以看出,有两条特异条带,短的清晰,长的模糊,分别回收、克隆和测序,结果短片段与 *AcEXPI* 基因中间片段完全没有重叠,而长片段大小为 417 bp,包含 mRNA 的 Poly(A),并与 *AcEXPI* 基因中间片段有 125 bp 重叠,符合特异引物设计的预期目的,确定为 *AcEXPI* 基因的 3' 端的完整序列,碱基序列见图 7。去除 3'RACE 的接头引物 inner primer 序列后,再通过 BLAST 分析,该片段与毛白杨的 *PtEXPI* (AY675563)、樱桃(*Prunus cerasus*)的 *PcEXPI4* (AF350939)及欧洲山杨 × 美洲

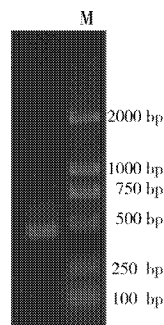


图 4 5'RACE PCR 产物

Fig. 4 PCR production of 5'RACE

山杨的 *PttEXPI* (AY435099)的相似性分别为 79%、80% 和 82%。

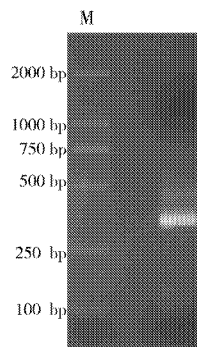


图 6 3'RACE PCR 产物

Fig. 6 PCR production of 3'RACE

```

1      TTCGGTACT TCAACTTGGT TCTGATCACC AACGTTGCGG GTGCAGGGGA TATTGTGCAG
61     GCGTGGGTCA AAGGATCAAG AACTGGTTGG ATAAGCCTGA GCCGCAACTG GGGCCAGAAT
121    TGGCAGACAA ATTCACTGTT GCGGGTCAA TCGCTCTCTT TCAGGGTCAG GGCCAGTGAC
181    CGCCGCTCTT CCACTTCTTG GAACATTGTA CCATCTAATT GGCAATTTGG TCAAACCTTC
241    ACAGGAAAAA ATTTAGAGT TTGAAGATCA TTTTATTTGA TGAACAAGAA CAAGATTAGT
301    TTGCTGCTGA TTTTATGCTT TTTGGGCTAT TTTTTTTATT TATTTTGTTA TCTTAGCTTT
361    TGTGGGAAA GATGAAAAA AAAAACCTAT AGTGAAATCA CTAGTGGAGG ATCCGCG
    
```

图 7 *AcEXPI* 3'端片段的核苷酸序列

Fig. 7 Nucleotide sequence of 3'terminal of *AcEXPI*

```

1      GAAATTCACCTTCAACTCTGAATTCCTTCCCTTAGCAAATATTTCTTCTTCCCTTCC
61     CCCTTTCCTCATTCTGCAGCAATGGCTGCAATGTGCTCACTAGCATTTGCTCTTCTCT
1      M A A M C L T S I V A L S
121    TTACTTCTGACACTTGTGAAAGCCAGAAATCCAGGTGTTTACTCAGGCGGGTCATGGCCG
14     L L L T L A E A R I P G V Y S G G S W P
181    AATGCTCATGCTACATCTATGGGGCAGTGATGCCTCOGAACTATGGGGGGTCTTGT
34     N A H A I F Y G G S D A S G T M G G A C
241    GGGTAAGGGAACTTATACAGOCAMGGCTAOGGAGTGAATACTGCAGCATTAAAGCACAGCT
54     G Y G N L Y S Q G Y G V N T A A L S T A
301    CTATTCACAAATGGCTCAGTTGGGGCAGTITTCAGCTAAAAATGTCGTGATGATCCA
74     L F N N G L S C G A C F E L K C A C D D P
361    CAATGGTGTCACCCCGCAGCCCTTCAATTTTCATCACTGCCACCACCTDGCCTCC
94     Q W C H P G S P S I F I T A T N F C P P
421    AATTAATGCTTTGCCAAAATGATAAAGGTGGTTGGTGCAAOCTCCTGCGCTCATTTGGAT
114    N Y A L P N D N G G W C N P P R P H F D
481    CTTGCCATGCCATGTTCCTCAAGATTCGCGAGTAOCCGCGCCGAAATGTTCCCGTTTCT
134    L A M P M F L K I A E Y R A G I V P V S
541    TAOCGCGGGTGGCGTGGCCGCAAGCAAGGAGGGATCCGGTTCCAAATTAACGGTITTCOGT
154    Y R R V P C R K Q G G I R F Q I N G F R
601    TACTTCAACTTGGTTCGATCACCACCGTTGCGGGTGCAGGGGATATTTGTGAGGCGTGG
174    Y F N L V L I T N V A G A G D I V Q A W
661    GTCAAAGGATCAAGAACTGGTTGGATAAGCCTGAGCCGCAACTGGGGCCAGAAATGGCAG
194    V K G S R T G W I S L S R N W G Q N W Q
721    ACAAAATTCAGTGTGGCGGGTCAATCGCTCTCTTTTCAGGTCAGGGCCAGTGACCGCCG
214    T N S V L A G Q S L S F R V R A S D R R
781    TCTTCCACTTCTTGGAAACATGTACCATCTAATTTGCAATTTGGTCAAACCTTCCACAGGA
234    S S T S W N I V P S N W Q F G Q T F T G
841    AAAAAATTCAGAGTTGAAAGATCATTTTATTGATGAACAAGAACAGATTAGCTTTGCTG
254    K N F R V *
901    CTGATTTTATGCTTTTTGGGCTATTTTTTTTATTTTATTTGTTATCTTAGCTTTTGTGG
961    GAAAGATGAAAAAAAAAAAA
    
```

图 8 团花树 *AcEXPI* 基因 cDNA 序列及其氨基酸序列

Fig. 8 Nucleotide and deduced amino acid sequence of *AcEXPI* in *Anthocephalus chinensis*

2.5 *AcEXPI* 基因全长序列

由以上 3 条片段进行拼接,并除去 5' RACE 与 3' RACE 的接头引物 inner primer 序列,得到 *AcEXPI* 基因全长 cDNA 的拼接序列(图 8),全长 979 bp。根据此序列设计引物 A7 与 A8 扩增开放阅读框。PCR 扩增产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 9),可以看出, DNA 条带清晰特异,大小为 750~1000 bp,符合预期目的片段(803 bp)。将此片段回收、克隆和测序,得到序列与 *AcEXPI* 基因全长 cDNA 拼接序列的开放阅读框一致,证实拼接序列的正确性。

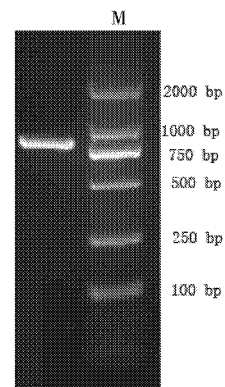


图 9 *AcEXPI* 全长 PCR 产物

Fig. 9 PCR production of full-length of *AcEXPI*

2.6 序列比对、同源性分析及聚类分析结果

根据核苷酸序列,利用 DNAMAN 软件推测其氨基酸序列(图 8)。可知,克隆的 AcEXP1 基因全长 cDNA 序列为 979 bp,含有开放阅读框(777 bp),编码 258 个氨基酸(aa)残基。

利用 NCBI 数据库中的 Blast-P 程序,将推测的团花树 AcEXP1 氨基酸序列与其它植物的序列进行同源性比较(图 10)。可知,该基因编码的氨基酸与毛白杨 PtEXP1、欧洲山杨 × 美洲山杨的 PttEXP1、樱桃 PcEXP4 及矮牵牛 PhEXP2 基因所编码的氨基酸序列的同源性分别为 85%、85%、84%

和 83%。氨基酸序列中含有 8 个保守的半胱氨酸和 1 个组氨酸(His_Phe_Asp,HFD)域,羧基末端存在 5 个保守的色氨酸,可与细胞壁中的纤维素相结合^[13]。

扩展蛋白一般分为 4 类^[14],分别命名为 α-Expansin (EXPA)、β-Expansin (EXPB)、expansin-like family A (EXPLA)、expansin-like family B (EXPLB)。部分 expansin 蛋白的系统进化树见图 11,AcEXP1 蛋白属于 α-Expansin (EXPA)蛋白,这与试验预期相符合。

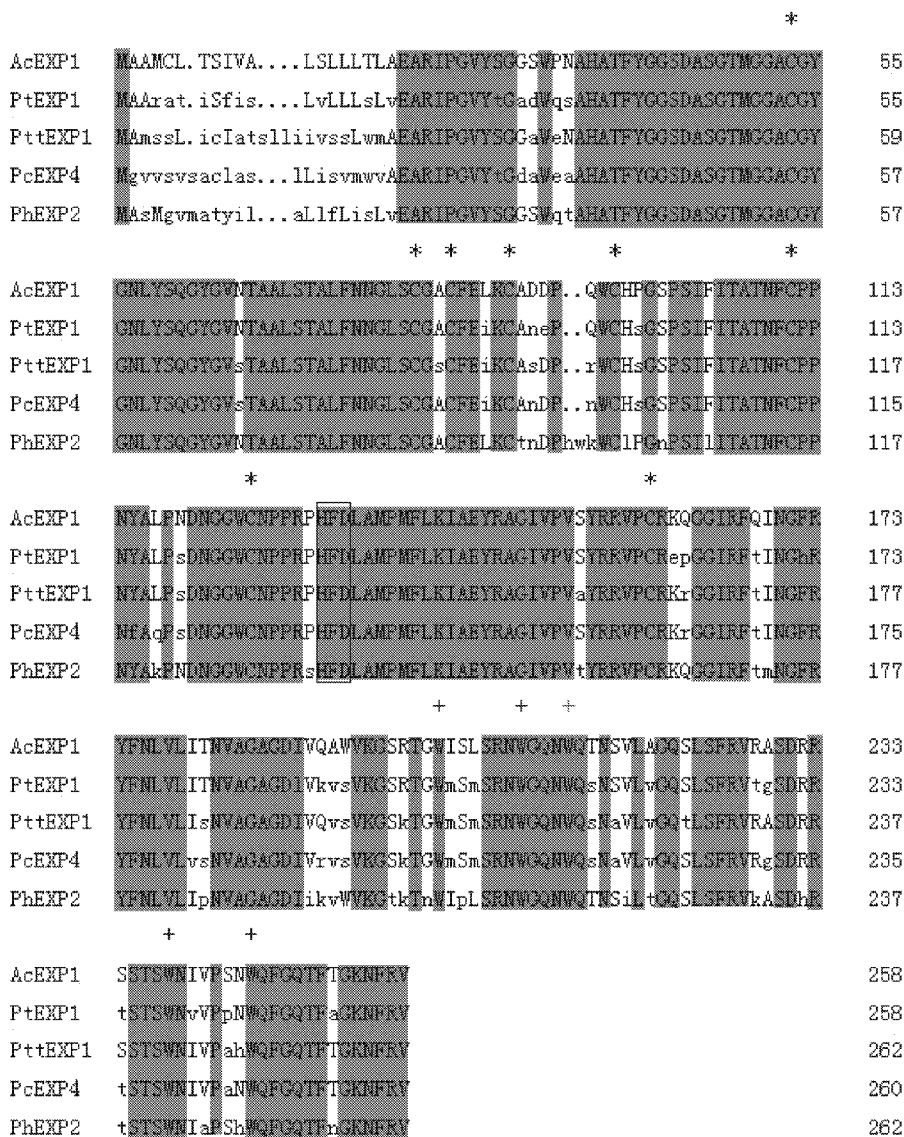


图 10 几种植物的 EXP 蛋白氨基酸序列的比较

Fig. 10 Comparison of the deduced amino acid sequence of some species

AcEXP1: 团花树 *Anthocephalus chinensis*; PtEXP1: 毛白杨 *Populus tomentosa*; PttEXP1: 欧洲山杨 × 美洲山杨 *Populus tremula* × *P. tremuloides*; PcEXP4: 樱桃 *Prunus cerasus*; PhEXP2: 矮牵牛 *Petunia × hybrida*. *: N 端的 8 个半胱氨酸残基 Eight cysteine residues at N terminal; +: C 端的 5 个色氨酸残基 Five tryptophan residues at C terminal; 方框: HFD 域 HFD region in the frame.

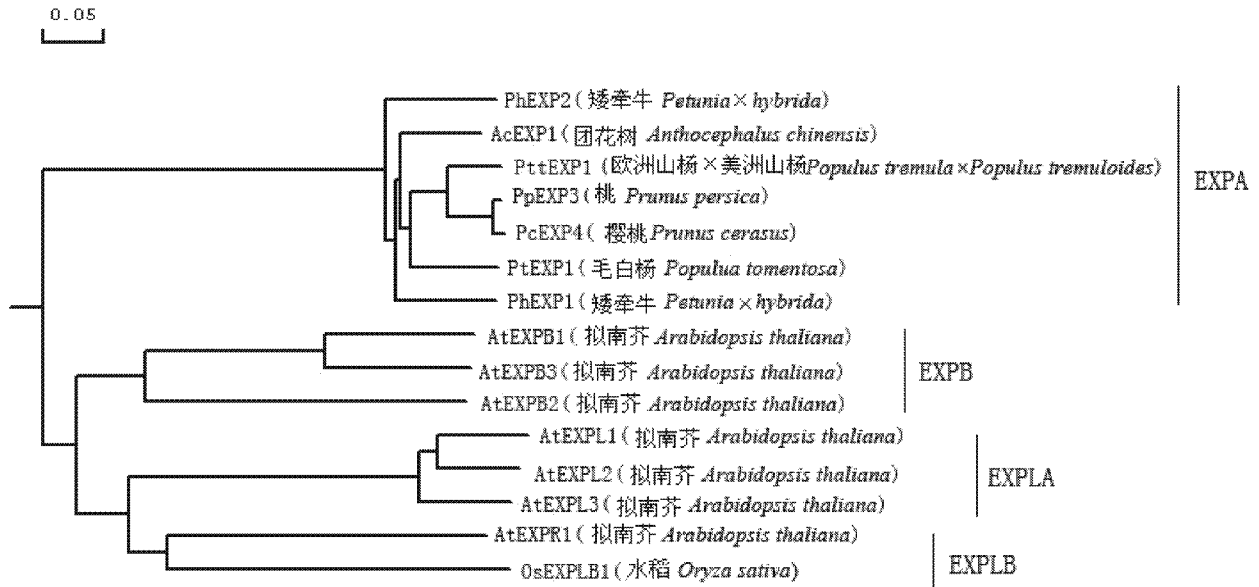


图 11 EXP 蛋白的系统进化树

Fig. 11 The phylogenetic tree of EXP proteins

3 讨论

本试验成功克隆出团花树形成层的 *AcEXPI* 基因,并进行了全长 cDNA 序列测定及分析。同源性分析表明,该基因与毛白杨、欧洲山杨 × 美洲山杨、樱桃及矮牵牛的扩张蛋白基因具有高度同源性,并且具有 Expansin 特有的保守序列和相关特征。该基因编码的氨基酸序列的 C 端有一系列的保守色氨酸,这些色氨酸在空间上类似于某些细菌的 CBDs^[13]。色氨酸和相关的芳香族氨基酸对蛋白质-碳水化合物的相互作用至关重要,这些色氨酸有可能协助 ACEXP1 蛋白结合到细胞壁^[15]。而 N 端的半胱氨酸主要集中在类似于 family-45 糖基水解酶的催化区域,很可能在二硫键的形成中起作用^[15]。

本试验在克隆基因时,多处使用 Touchdown 程序进行 PCR,使得 PCR 的特异性大大提高;并且在 3'RACE 和 5'RACE 中利用巢式 PCR,使得扩增的目的条带特异性增强;这保证了拼接的全长基因的准确性,从而成功克隆出含有完整 ORF 的全长 cDNA。3'RACE 中第二次 PCR 出现的两条带分别进行回收、克隆及测序,其中短的片段与 *AcEXPI* 基因中间片段完全没有重叠,而长的与 *AcEXPI* 基因中间片段的序列有 125 bp 重叠,因此,长片段符合要求。出现多条带可能是因为在同一个家族中 EXP 基因同源性太高,设计的引物使其它的 EXP 基因也得到了扩增。

植物细胞壁扩展蛋白(expansins)以其特殊的生物学功能在陆生植物细胞生长,细胞壁多糖的运动和对酶的敏感性等方面有重要作用。由于在细胞生长中的重要生物学功能,因而被认为是改变细胞形状、大小和性质策略中颇受关注的焦点,对团花树形成层扩展蛋白基因的克隆,不仅可以研究其在形成层的特异表达、调控模式及作用机理,还可以借助转基因手段提高木材的生产率,改良木材的材性,在生物工程上的应用具有广阔的前景。

参考文献

- [1] Cosgrove D J. Loosening of plant cell walls by expansins [J]. Nature, 2000, 407: 321-326.
- [2] Strauss E. 李大卫, 何方淑. 译. 细胞壁: 决定植物细胞命运的信使 [J]. 世界科学, 1999(5): 21-22.
- [3] Daniel J C, Li L, Cho H T, et al. The growing world of expansins [J]. Plant Cell Physiol, 2002, 43: 1436-1444.
- [4] Fleming A J, McQueen-Mason S, Mandel T, et al. Induction of leaf primordia by the cell wall protein expansin [J]. Science, 1997, 276 (5317): 1415-1418.
- [5] Pien S, Wyrzykowska J, McQueen-Mason S, et al. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 11812-11817.
- [6] Rose J K C, Lee H H, Bennett A B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 5955-5960.
- [7] Brummell D A, Harpster M H. Differential expression of expansin gene family members of tomato fruit [J]. Plant Mol Biol, 1999, 39: 161-169.

- [8] Cho H T, Cosgrove D J. Altered expression of expansin modulates leaf growth and pedicel abscission in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9783–9788.
- [9] Yuan L P(袁隆平). The system of rice intensification [J]. Hybrid Rice(杂交水稻), 2001, 16(4): 4–6.(in Chinese)
- [10] Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, et al. A transcriptional roadmap to wood formation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 14732–14737.
- [11] Paux E, Tamasloukht M, Ladouce N, et al. Identification of genes preferentially expressed during wood formation in *Eucalyptus* [J]. Plant Mol Biol, 2004, 55: 263–280.
- [12] Kirst M, Johnson A, Baucom C, et al. Apparent homology of expressed genes from wood-forming tissues of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) with *Arabidopsis thaliana* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(12): 7383–7388.
- [13] Din N, Forsythe I J, Burtnick L D, et al. The cellulose-binding domain of edoglucanase A (Cen A) from *Cellulomonas fimi*: Evidence from the involvement of tryptophan residues in binding [J]. Mol Microbiol, 1994, 11: 747–755.
- [14] Yi L, Catherine P D, Veronica O, et al. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin [J]. Plant Physiol, 2002, 128: 854–864.
- [15] Cosgrove D J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1999, 50: 391–417.