

# 黄瓜 *CsCCD7* 基因的克隆及表达研究

徐庆华<sup>1</sup>, 胡宝忠<sup>2\*</sup>, 李凤兰<sup>2</sup>, 金峰<sup>2</sup>, 王多佳<sup>2</sup>

(1. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

**摘要:** 使用 RACE 技术克隆黄瓜(*Cucumis sativus* L.)腋芽生长抑制基因并进行生物信息学和半定量 RT-PCR 分析。结果表明:从黄瓜腋芽中成功克隆了拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*AtCCD7/MAX3* 同源基因,命名为 *CsCCD7* (GenBank 登录号:HQ005419);*CsCCD7* 基因序列含有 1665 bp 的开放阅读框(ORF),编码 554 个氨基酸;编码的蛋白质命名为 *CsCCD7*,隶属于 CCD 蛋白家族成员,蛋白质的二级结构和三级结构预测显示其富含  $\beta$  折叠和  $\beta$  转角以及无规卷曲,是不稳定蛋白。*CsCCD7* 在根中的表达量最高,在多分枝、矮化黄瓜 D0462 中的表达量最低,这说明 *CsCCD7* 蛋白可能参与调控植物分枝信号的转导及分枝相关基因的表达调控。

**关键词:** 黄瓜; 腋芽生长抑制基因; 基因克隆; 生物信息学分析; 基因表达

中图分类号:Q943.2

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2011)04-0365-09

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.04.015

## Cloning of *CsCCD7* and Its Expression in *Cucumis sativus* L.

XU Qing-hua<sup>1</sup>, HU Bao-zhong<sup>2\*</sup>, LI Feng-lan<sup>2</sup>, JIN Feng<sup>2</sup>, WANG Duo-jia<sup>2</sup>

(1. Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China; 2. College of Life Science, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The cucumber (*Cucumis sativus* L.) inhibiting axillary bud growth gene, *CsCCD7*, had been cloned (GenBank accession number: HQ005419) using by RACE, and its bioinformatics and semi-quantitative RT-PCR analysis were studied. The results showed that the *CsCCD7* was the homologue gene of *AtMAX3/CCD7* in *Arabidopsis thaliana*, which contain ORF with 1665 bp, and code the protein with 554 amino acids, named *CsCCD7*, belonging to CCD protein family. The secondary and tertiary structure prediction of *CsCCD7* showed having rich  $\beta$  sheets,  $\beta$  turns and irregular curls, which indicated it was unstable protein. *CsCCD7* expression in roots was the highest, while that in dwarf cucumber 'D0462' with lot of branches were the lowest by RT-PCR analysis. It suggested that the *CsCCD7* protein could revolve in control branch signal transduction and related gene expression in cucumber.

**Key words:** Cucumber; Inhibiting axillary growth gene; Gene cloning; Bioinformatics analysis; Gene expression

调节植物分枝发育的植物激素包括生长素和细胞分裂素, Gomez-Roldan 和 Umehara 等<sup>[1-2]</sup> 报道来源于类胡萝卜素裂解物的独角金内酯(strigolactone)是一类新的调节植物分枝发育的植物激素,主要在根中合成、通过抑制腋芽的生长发育而调控植物分枝发育。Beveridge 等<sup>[3]</sup> 指出参与独角金内酯生物合成的有 4 种酶,包括类胡萝卜素裂解双加氧酶 7(CCD7, MAX3/RMS5/D17/HTD1)、类

胡萝卜素裂解双加氧酶 8(CCD8, MAX4/RMS1/DAD1/D10)、D27 和细胞色素 P450 单加氧酶(P450, MAX1);参与独角金内酯信号传导的有 2 种酶:F-box 蛋白(F-box, MAX2/RMS4/D3)和  $\alpha/\beta$  折叠水解酶( $\alpha/\beta$ -fold hydrolase, D14/D88/HTD2)。

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)是十大重要蔬菜作物之一,分枝性状是影响黄瓜结实,进而影响单产的一个重要农艺性状。我国黄瓜的栽培多数采用搭

收稿日期: 2010-11-15

接受日期: 2011-02-16

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z177); 高等学校博士点专项科研基金(200802240008)资助

作者简介: 徐庆华, 博士, 讲师, 主要从事植物分子生物学研究工作, email: xuqinghua1976@yahoo.com

\* 通讯作者 Corresponding author, email: bzhu@neau.edu.cn

架或吊式栽培,因此选用分枝较少的品系;欧美国家栽培模式与我国不同,为了便于机器人采收,会特别选用分枝较多的品系。基于不同栽培模式选用不同分枝特性的黄瓜品系就显得十分重要。目前,有关调控黄瓜分枝发育的相关基因的克隆、生物信息学分析和表达的研究还未见报道。本文克隆了黄瓜腋芽生长抑制基因的同源基因 *CsCCD7*,并对其进行了生物信息学分析和 *CsCCD7* 表达的研究,为黄瓜分枝发育的分子机制的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料黄瓜(*Cucumis sativus* L.)选用东北农业大学黄瓜课题组的高代自交系 602、D0462、D9419 和 D0442,取黄瓜组织用蒸馏水洗净、滤纸吸干后于液氮中速冻、-70℃冻存备用。

### 1.2 RNA 的提取及黄瓜 *CsCCD7* cDNA 的克隆

用 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)提取四叶一心期黄瓜 602 的根组织 RNA。使用 PrimeScript RT-PCR Kit (Takara) 合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中的植物 CCD7(MAX3)蛋白序列同源性较高的氨基酸区域,设计简并引物 FP1 (5'-TCA-TGGNTCCACGGTGCACCCCKCTMGACGG-3') 和 RP1 (5'-TATCNGTRAADGCCCAATCATGDATCA-T-3')。以 cDNA 第一链为模板进行中间片段扩增,反应程序为 94℃ 5 min;94℃ 30 s;60℃ 30 s;72℃ 60 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min,扩增产物

于 4℃ 保存。从 1% 琼脂糖凝胶上回收反应产物后,克隆入 pMD-18T 载体(Takara),热激法转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ ,提取质粒、鉴定后由北京华大基因公司测序。根据测序结果设计 3' RACE 特异引物 GSP3 (5'-ACGATGGTGGGTTT-TGGCGTTTTGC-3')和 5' RACE 特异引物 GSP5 (5'-CGCAAACGCCAAAACCCACCATCG-3'),使用 SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit(Clontech)和 Advantage® 2 PCR kit(Clontech),按照说明书进行操作,PCR 扩增后分别获得该基因的 3' 端序列和 5' 端序列。对扩增产物进行序列测定。根据所得的拼接序列在起始密码子和终止密码子附近设计特异引物 FP2 (5'-CACCATGGATCTTC-AATTTGTATC-3') 和 RP2 (5'-CATTGTTGGA-ACTCTTCTGGA-3')进行 PCR 扩增,得到黄瓜 *CsCCD7* 基因编码区序列。测序结果用 BLAST 程序和 DNAMAN 6.0 软件进行序列比对分析。

### 1.3 生物信息学分析

使用在线程序或本地软件(表 1)对 *CsCCD7* 核酸序列和蛋白质序列进行生物信息学分析。

### 1.4 半定量 RT-PCR

分别提取四叶一心期黄瓜 602 的根、下胚轴、上胚轴、叶、腋芽和顶芽组织 RNA 和具有不同分枝特性的四叶一心期的黄瓜 602、D0462、D9419 和 D0442 的根组织 RNA,于 -70℃ 下冻存。依据 *CsCCD7* 的测序结果,设计检测 *CsCCD7* 基因表达的 RT-PCR 引物:FP3:(5'-CGTTCTCGGTGTTGA-

表 1 生物信息学在线程序及软件

Table 1 Series of bioinformatics online programmes and softwares

项目 Items	程序及软件 Programs and softwares
核酸序列 Nucleotide sequence	
同源基因查找 Homologous gene search	GenBank database ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> )
序列比对 Sequences blast	BLAST ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</a> )
开放读码框分析 ORF	ORF finder in NCBI, GENScan
顺式作用元件分析 cis-activing element analyzing	PlantCare ( <a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/</a> )
蛋白质序列 Protein sequence	
理化性质分析 Physico-chemical property analysis	DANMAN 6.0 software
二级结构分析 Secondary structure analysis	Antheprot 4.5 software
保守结构域分析 Conserve structural domain	DANMAN 6.0 software
蛋白质三级结构预测 Tertiary structure prediction	ScanProsite ( <a href="http://expasy.org/tools/">http://expasy.org/tools/</a> )
蛋白质三维结构成像 Tertiary structure image	SWISS-Model ( <a href="http://www.us.expasy.ch">http://www.us.expasy.ch</a> )
同源序列和进化树分析 Homologous sequence and phylogenete	RasMol 2.7 software
	Geneious 5.0.4 software

AGG-3') 和 RP3 (5'-GCATCTTGAATACTCCAT-ATAGC-3')。依据黄瓜  $\beta$ -actin 基因序列<sup>[4]</sup> 设计内参基因扩增引物 AFP (5'-ATGACGCAGATAATGTTTG-3') 和 ARP (5'-ATCACCAGAATCCAGCACG-3')。反应程序为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 60 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min, 扩增产物于 4℃ 保存。CsCCD7 扩增片段长度为 285 bp;  $\beta$ -actin 扩增片段长度为 119 bp。

## 2 结果和分析

### 2.1 黄瓜 *CsCCD7* 的克隆

利用简并引物(FP1 和 RP1)扩增得到 650 bp 的中间片段, 经 Blast 比对, 结果表明该片段与多种植物的 CCD7(MAX3)基因有较高同源性; 使用 RACE

技术分别获得 880 bp 的 5'端序列和 1250 bp 的 3'端序列; 将 3'端序列和 5'端序列拼接, 根据拼接序列的起始密码子和终止密码子附近设计一对特异引物, 经 PR-PCR 扩增后获得约 2200 bp 的全长 cDNA 序列, 再经回收、测序和拼接后得到 2136 bp 的 cDNA 序列(图 1)。将其在 NCBI 中进行 Blast 比对, 结果表明, 其与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、豌豆(*Pisum sativum*)、矮牵牛(*Petunia hybrida*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)、水稻(*Oryza sativa*)等植物中的抑制腋芽生长基因(CCD7)的同源性均为 80% 左右、同源性较高。将此新基因命名为 *CsCCD7*(GenBank 登录号: HQ005419), 拟定为黄瓜腋芽生长抑制基因。

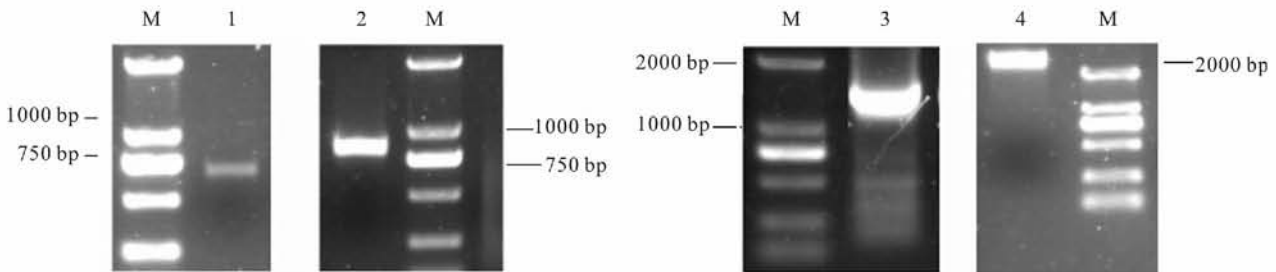


图 1 黄瓜 *CsCCD7* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR of *CsCCD7* from cucumber roots

1: *CsCCD7* 中间片段 Middle fragment of *CsCCD7*; 2: 5'端 cDNA 片段 5' fragment; 3: 3'端 cDNA 片段 3' fragment; 4: 全长 cDNA 片段 Full length cDNA; M: DL 2000 DNA Marker.

### 2.2 *CsCCD7* 核酸序列分析

#### 2.2.1 ORF 预测

将 PCR 扩增得到的 *CsCCD7* 的 cDNA 全长序列 2136 bp, 提交到 NCBI 上的 ORF finder 在线程序, 结果表明(图 2), 该序列包含了 1 个长度为 1665 bp 的开放阅读框, 从 151 ~ 1815 bp, 在 5'端有一段 150 bp 的非编码区, 第 151 ~ 153 bp 为编码蛋氨酸的起始密码子 ATG, 1813 ~ 1815 bp 处为该基因的终止密码子 TAA, 在 3'端有一段 200 bp 的非编码区。完整的开放阅读框编码 554 个氨基酸。通过 GENSCAN 在线程序分析得到长度为 1665 bp 的 CDS 序列。

#### 2.2.2 *CsCCD7* 基因的染色体定位分析

用 *CsCCD7* 的 cDNA 序列在黄瓜基因组数据库(CuGenDB, <http://www.icugi.org>)中检索, 结果表明, *CsCCD7* 基因与位于第 6 号染色体上的 *Csa008472* 基因同源性最高, 预测基因组序列全长

8114 bp, 基因含有 7 个外显子和 6 个内含子, 对应的 unigenes 为 CU38689。

### 2.3 *CsCCD7* 蛋白结构分析

#### 2.3.1 一级结构

1665 bp 的 *CsCCD7* 基因中的 ORF 核酸序列可编码 554 个氨基酸, 命名为 *CsCCD7* 蛋白, 蛋白质登录号(Protein ID)为 ADM18968。用 DNAMAN 6.0 软件进行分析可知, *CsCCD7* 的分子量为 62.7 kD, pI 为 8.06, 亲水性蛋白。用 Motif Scan 对氨基酸序列进行 Motif 序列分析, 结果表明, *CsCCD7* 蛋白序列中含有酰胺化位点(AMIDATION, 171 ~ 174)、N-糖基化位点(ASNGLYCOSYLATION, 186 ~ 189、362 ~ 365、449 ~ 452)、蛋白激酶 CK2 磷酸化位点(CK2 PHOSPHO SITE, 75 ~ 78、295 ~ 298、378 ~ 381、386 ~ 389、405 ~ 408)、豆蔻酰化位点(MYRISTYL, 88 ~ 93、235 ~ 240、342 ~ 347、498 ~ 503、511 ~ 516)、蛋白激酶 C 磷酸化位点(PKC, 34 ~ 36、45 ~ 47、72 ~ 74、

```

1   GTTTTCCCAGTACGACGTTGTAAAACGACGACGAGTGAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACGATTCTAATACG
76  ACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGAACAAATAAAAGATCAAAACTTTCCAAAGTG
151  ATGAAGGCCAATTCACCTCACTTCATCTCTCCCTCCAATTTCCATCGCCCATCAAACCT
1   M K A N S L T S S L P L Q F P S P I K L
211  CCTCCTCCGTCCACCGGTATACGATTCCCATCTTCTCTAACTCCCAAAGCCATATCGATT
21  P P P S T G I R F P S S L T P K A I S I
271  TCCACCCCAACACCCACCGGATATCCATCAACAAAAACGACGACGACGATTCCATC
41  S T P N T H R I S I N K N D D D D D S I
331  GCAGCCTTTGGGACTACCAATTCCTCTTCATTTCACAGAGGACCGAGACCGAAAACCT
61  A A F W D Y Q F L F I S Q R T E T E N P
391  GCGTCCCTCCGCTAGTCGATGGCGCATACCATCAGATTGCCCTCCGGCACCTACTAC
81  A V L R L V D G A I P S D F P S G T Y Y
451  CTTACCGGACCGGCATGTTCTCCGAGCATGTTCCAGGTTCCACGGTGCACCCCTCTCGACGGT
101  L T G P G M F S D D H G S T V H P L D G
511  CATGGGTATTAAAGCGTFTGTTTTCGAGAAGGATCACAGGTTGACTTTTCATGGCGAAG
121  H G Y L R A F V F E K D H E V T F M A K
571  TACGTGAAAACGGAGCGAAAAATGGAAGAGCATGATCCGGAGCCGATAGGTGGCGGTTT
141  Y V K T E A K M E E H D P E T D R W R F
631  ACACATAGAGGACCGTCTCGGTGTTGAAGGGAGGGAAGAAATAGGGAATACTAAGGTG
161  T H R G P P S V L K G G K K L G N T K V
691  ATGAAAAATGTGGCAATACGAGTGTGCTCCGGTGGGTGGCCCTTCTCTGCCTTTGG
181  M K N V A N T S V L R W G G R L L C L W
751  GAGGGCGGCGATCCCTACGAAATTCGGGCGGAGGATTGGATACGGTGGGAAATTTTGT
201  E G G D P Y E I R A E D L D T V G K F C
811  GCTTCCACGGTGGTATGATCATGATTCCGCCGCGCGGAGGTTACGATGGTGGG
221  A F H G G D D H D S P S R G G G Y D G G
871  TTTTGGCGTTTGGCGGAGCTTTGAAGCCTGTGCTATATGGAGTATTCAAGATGCCA
241  F W R F A A E L L K P V L Y G V F K M P
931  CCGAAGAGGTTATTGTCTCATTACAAAGTTGATGCACAAAGGAATAGACTTCTCGTAATG
261  P K R L L S H Y K V D A Q R N R L L V M
991  TCATGCAATGCTGAGGATATGCTTCTACCAACTAGCCATTCACTTTTATGAATTTGAT
281  S C N A E D M L L P T S H F T F Y E F D
1051  AGCAATTTCAAGTTATTACAAAAGAAGGATATGGTTATTGATGATCACTTGATGATTCAT
301  S N F K L L Q K K D M V I D D H L M I H
1111  GATTGGGCWTTCAAGGATAACCATATATCTCTTTGCTAATCGAATTAAGCTTGATGC
321  D W A F T D N H Y I L F A N R I K L D V
1171  ATCGGTGCAATGAGTGCAATTAGTGAATATCTCAATGATATCGCACTTAGTGTAAC
341  I G A M S A I S G I S P M I S A L S V N
1231  ACAAACAAAAGCACTTCTCCAATTTATTTGATCCCAAGATTGGTGAAGACTCAAAAAA
361  T N K S T S P I Y L I P R F G E D S K K
1291  GACGATTGGAAGAACTATTGTTGAAGTTCCTTCAAGCTTTGGCTTCTCATGTTGGC
381  D D W K E T I V E V P S R L W L L H V G
1351  AATGCCTTTGAGACTATTCATGAAGATGGTACCTTAGACTTCGAAATCCATGCCTCTTCT
401  N A F E T I H E D G T L D F E I H A S S
1411  TGCTCATATCAATGGTCAATTTCAAAAAATTTTGGTTATAATTGGCAGACTGGAAAA
421  C S Y Q W F N F K K L F G Y N W Q T G K
1471  CTGATCTTCTGTTATGAACCAATGAAACCAAAAGTAAGCAATTTCTCCTCAGTGT
441  L D P S V M N P N E T K S K Q F P H L V
1531  AAGGTAAGCATTAGTTAAGTAAGAATGGGAAGTGTGAAAAGTGCAGTGTGGAACCTTTG
461  K V S I S L S K N G K C E K C S V E P L
1591  AACCAATGGCCAAAATCCTCAGATTTCCAGTGATAAACCTAAGTTCTCAGGTCTAAAA
481  N Q W P K S S D F P V I N P K F S G L K
1651  CACAATTACTTATATGCTGCAACTTCTCCGGTAACCGGCGGTCCGTACCGTCGTTTCCA
501  H N Y L Y A A T S S G N R R S L P S F P
1711  TTTGATATGATCGTAAAGCTCGACACAGTCACAAACACTGCCGACGTTGGTTTGTGGT
521  F D M I V K L D T V T N T V R T W F A G
1771  AATCGGAGATTCGTTGGAGAACCCTGTTTGTCCCAAGGAGATGAGATGATGGATATC
541  N R R F V G E P V L F P R R *
1831  TCTCGTATGAGTATGAGTATCATAAAGATGCTATCTTATTATTTTGAGCTCAAGATT
1891  TGAGAGCAGATGAGTGTGAGATTTGAGTCTAGCACTGGAGTCTATGCTCATGCTTT
1951  GGCTGCTATACTAATTAATTAGACATGTCAAGCAGAAGTGGACTGATTACAGATGTGGG
2011  TTCTAAAAA

```

图 2 *CsCCD7* 基因的 cDNA 序列全长及推导的氨基酸序列

Fig. 2 Full length of nucleotide and deduced amino acid sequence of *CsCCD7*

155 ~ 157、161 ~ 163、361 ~ 363、378 ~ 380、438 ~ 440、533 ~ 535)。Protparam 在线程序分析显示, *CsCCD7* 的不稳定系数(Instability index)为 40.77, 属于不稳定蛋白。

### 2.3.2 二级结构预测

蛋白质二级结构分为 H、E、T 和 C 4 种类型,分

别代表螺旋、折叠、卷曲和松散结构。当  $H > 45\%$ 、 $E < 5\%$  时为 all-alpha 型;当  $H < 5\%$ 、 $E > 45\%$  时为 all-beta 型;当  $H > 30\%$ 、 $E > 20\%$  时为 alpha-beta 型;其它情况为 mixed 型。用 Antheptrot 4.5 软件对 *CsCCD7* 蛋白的二级结构进行预测,采用 Garnier 算法分析,结果表明, *CsCCD7* 蛋白的  $\alpha$  螺旋为 30%、 $\beta$



折叠为 25%、β 转角为 26%、其它松散结构为 19%，所以 CsCCD7 蛋白的二级结构为 alpha-beta 型。

### 2.3.3 三级结构预测

将 CsCCD7 的氨基酸序列在线提交 SWISS-MODEL 分析系统<sup>[5-7]</sup> 预测蛋白质三级结构。结果(图3)表明, CsCCD7 蛋白中的 492 个氨基酸(63 ~

554 AA)与已知蛋白质 RPE65 的三级结构有较高的同源性,据此模拟 CsCCD7 可能的三级结构模型并生成原子坐标(PDB 格式),用 RasMol 2.7 软件进行 CsCCD7 三维结构成像,由预测的三维结构可知形成的部分高级结构与二级结构预测结果相符,蛋白质富含 β 折叠、转角和无规则卷曲结构。

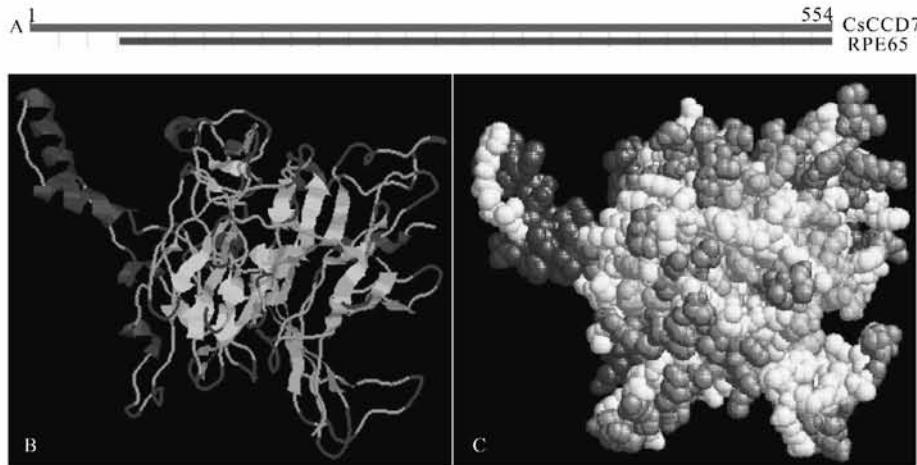


图3 CsCCD7 蛋白三级结构预测

Fig. 3 CsCCD7 tertiary structure prediction

A: 三级结构同源蛋白比对 Alliment homologous protein in tertiary structure; B: 卡通模式 Cartoons model; C: 球状模式 Spacefill model; 红色:α螺旋; 黄色:β折叠; 蓝色:转角; 白色:无规则卷曲。Red, yellow, blue and white present α-helix, β-sheet, β-tum, and coil, respectively.

### 2.3.4 CsCCD7 蛋白同源性比较与序列分析

将全长 CsCCD7 基因编码的氨基酸序列,在 GenBank 中进行 Blast 比对,结果表明,其与牵牛花的 DAD3/PhCCD7、番茄的 SICCD7、豌豆的 RMS5/PsCCD7 和拟南芥的 MAX3/AtCCD7 有较高同源性,与 SICCD7 的同源性为 76%,因此将新的蛋白命名为 CsCCD7。

将 CsCCD7 氨基酸序列提交 NCBI 的 Protein conserved domain 程序进行保守结构域分析,由图4可知, CsCCD7 蛋白与 RPE65 (retinal pigment epithelial memberane receptor) 和 NCED (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) 有相同的蛋白保守结构域。RPE65 是哺乳动物中 CCD 蛋白家族成

员;NCED 是植物中 CCD 蛋白家族成员<sup>[8]</sup>。所以 CsCCD7 属于类胡萝卜素裂解双加氧酶家族(carotenoid cleavage dioxygenases, CCDs)。图5显示出了 CsCCD7 与番茄、矮牵牛、豌豆、拟南芥和水稻的 CCD7 蛋白同源性较高的序列。

### 2.4 系统进化分析

在 NCBI 上查找到 CCD 家族有 22 种蛋白质,用 Geneious 5.0.4 软件分析并根据计算的相似性绘制系统进化树(图6)。从图6可见, CCD 家族蛋白间存在明显的物种进化关系, CsCCD7 蛋白与 CCD 家族蛋白的同源性高,与拟南芥 AtCCD7/MAX3、豌豆 PsCCD7/RMS5、番茄 LeCCD7、矮牵牛 PhCCD7 等蛋白进化距离近、同在一个进化枝。

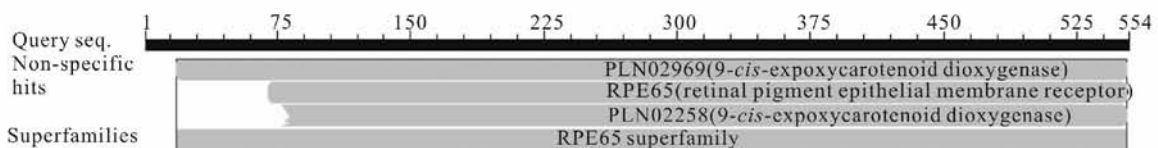


图4 NCBI Protein conserved domain 分析 CsCCD7 保守结构域

Fig. 4 Analysis of the protein conserved domains of CsCCD7 in NCBI

## 2.5 CsCCD7 的表达

用琼脂糖凝胶电泳检测四叶一心期时的黄瓜

602 各组织的 RNA, 结果表明提取的 RNA 完整性好、无降解、无 DNA 污染, RNA 的 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 值

1.	SIPSDFPSGTYYLTPGGLFADDHGSTVHPLDGHGYLRTFE	147
2.	SIPvnFPSGTYYLtGPGGLFtDDHGSTVHPLDGHGYLRaFh	123
3.	aIPSDFPSGTYYLTPGmFsDDHGSTVHPLDGHGYLRaFv	128
4.	aIPpDFPaGTYYLaGPGiFsDDHGSTVHPLDGHGYLRsFr	118
5.	aIPSDFPSGTYYLTPGGLFtDDHGSTVHPLDGHGYLRTFE	125
6.	eIPtDFPSGaYYLTGPGiFkDDHGSTVHPLDGHGYLRaFa	138
Consensus	ip fp g yyl gpg f ddhgstvhpldghgylr f	
1.	IDGSTGQVKFMARYIETEAQTEERDPVSGKWRFTHRGPFS	187
2.	IDGnkrkatFtAkYvkTEAkKEEhDPVtdtWRFTHRGPFs	163
3.	fekd.heVtFMakYvkTEAkMEhDPetdrWRFTHRGPFs	167
4.	frpgdrtiHysARfvETaAkrEE.srdgasWRFTHRGPFs	157
5.	IDGgsGQVKFMARYIETEAQaEERDPVtGqWRFTHRGPFs	165
6.	fDnaTkeVKyMAkYIkTEAQvEEfDrktnsWRFTHRGPFs	178
Consensus	a t a ee wrfthrgpfs	
1.	VLKGGKMGVNTKVMKNVANTSVLQWGGRLFCLWEGGDPYE	227
2.	VLKGGKrfGNTKVMKNVANTSVLkWaGRLlCLWEGGePYE	203
3.	VLKGGKklGNTKVMKNVANTSVLrWGGRLlCLWEGGDPYE	207
4.	VLqGGKkVGnVkvMKNVANTSVLrWGGRLlCLWEGGqPYE	197
5.	VLKGGKMGVNTKVMKNVANTSVLrWGGRLlCLWEGGePYE	205
6.	VLKGGKkiGNTKVMKNVANTSVLmWGkkLlCmWEGGnPYE	218
Consensus	vl ggk gn kvmknvantsvl w l c wegg pye	
1.	IDSKTLNLTGKFELIKNSDQ.....VLEDKKISHSDF	259
2.	IeSgsLdTvGrFnvenNgces...cddddssDrdlSghDi	240
3.	IraedLdTvGKFcafhhggDd....hdspstrgggydg.gF	241
4.	vDprTLeTvGpFdLlglaaadnkatnasaarrpwlqeag	237
5.	IDSKTLNtvGKFELIKtces.....laEeeKf.HgDF	236
6.	IeSdTLdTiGkFnmtd.gcd.....sadhgeshgg.Dv	249
Consensus	l t g f	
1.	LDVAAQLLKPILYGVFKMSPKRLLSHYKIDTRRNRLIMS	299
2.	wDtAAAdLLKPIlqGVFKMpPKRfLSHYKvDgRRkRLltvt	280
3.	wrfAAeLLKpVLYGVFKMpPKRLLSHYKvDaqRNRLlvMS	281
4.	LDaAArLLrPvLsGVFdMpgKRLLaHYKIDpRRgRLlmva	277
5.	LDVAAQiLKPILYGVFKMtPKRLLSHYKIDaRRNRLlIMt	276
6.	weVAAnLLKPILYGiFKMpPKRLLSHYKlDssmNRLltva	289
Consensus	aa l p l g f m kr l hyk d rll	
1.	CNAEDMLLPRSNFTFYEFDSNFQLLQSQEFEIPDHLMIHD	339
2.	CNAEDMLLPRSNFTFcEyDSeFkLiQtKEfKIdDHmMIHD	320
3.	CNAEDMLLPtShFTFYEFDSNFkLLQkdmvIdDHLMIHD	321
4.	CNAEDMLLPRShFTFYEFdAhFdLvQkrEFvvPDHLMIHD	317
5.	CNAEDMLLPRSNFTFYEFDSNFkLLQSQEFnIPDHLMIHD	316
6.	CNAEDMLLPRSNFTFtEyDSNFkmvekQEFkIPDHmMIHD	329
Consensus	cnaedmlp s ftf e d f dhmihd	
1.	WAFtdTHYILFGNRIKLDIPGSMtAVCGLSPMISALSVNP	379
2.	WAFtdTHYILFaNRvKLnpiGSiaAmCGmSPMvsALSlnP	360
3.	WAFtdNHYILFaNRIKLDviGaMsAisGiSPMISALSVnt	361
4.	WAFtdTHYILlGNRIKLDIPGSllAltGthPMIaALaVdP	357
5.	WAFtdTHYILFGNRIKLDIPGSMtAVCGLSPMISALSVNP	356
6.	WAFtdTyYIvFaNRIKLDIlGSMfAVCGaSPMISALtVNP	369
Consensus	waftd yi nr kl g a g pm al	

图 5 CsCCD7 蛋白序列比对

Fig. 5 Alignment of CsCCD7 protein sequences

1. 番茄 *Lycopersicon esculentum*; 2. 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; 3. 黄瓜 *Cucumis sativus*; 4. 水稻 *Oryza sativa*; 5. 矮牵牛 *Petunia hybrida*; 6. 豌豆 *Pisum sativum*.

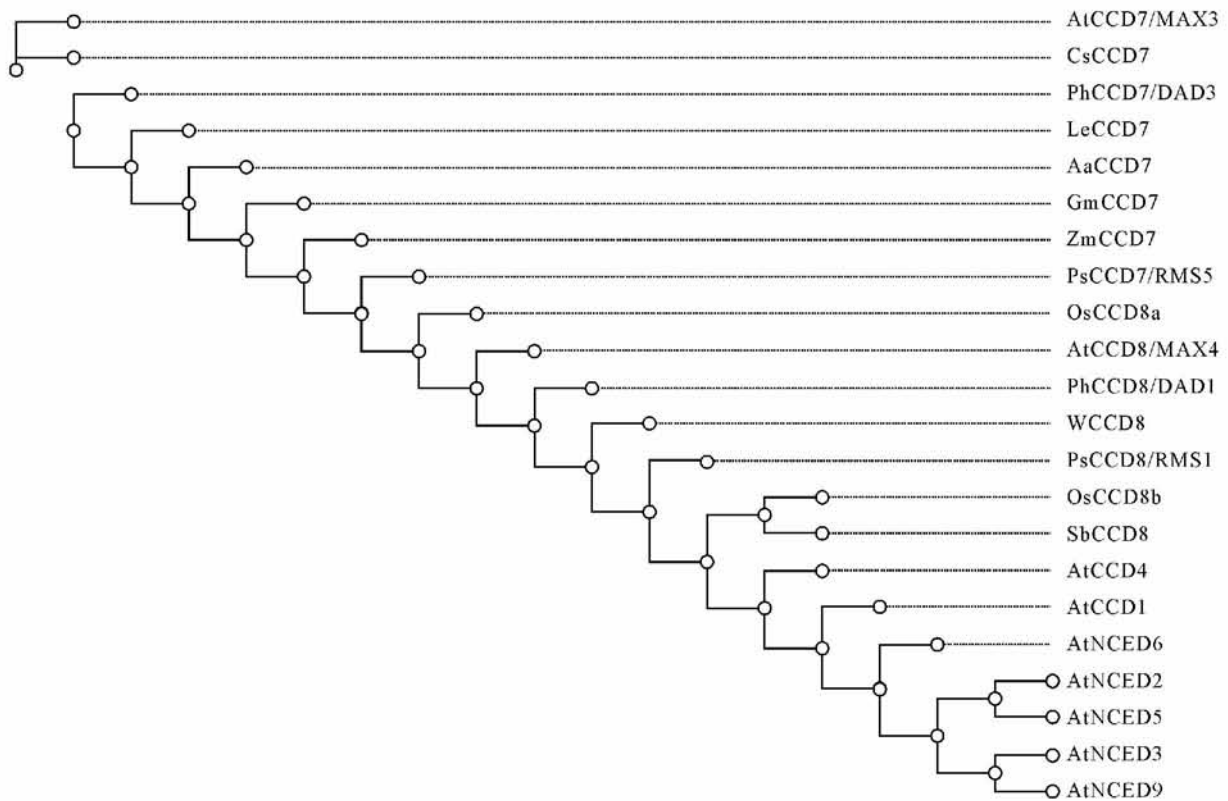


图 6 黄瓜 *CsCCD7* 系统进化分析  
Fig. 6 *CsCCD7* phylogenetic analysis

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*): AtCCD1 (At3g63520), AtNCED2 (At4g18350), AtNCED3 (At3g14440), AtCCD4 (At4g19170), AtNCED5 (At1g30100), AtNCED6 (At3g24220), AtCCD7/MAX3 (At2g44990), AtCCD8/MAX4 (At4g32810), AtNCED9 (At1g78390);水稻(*Oryza sativa*): OsCCD8b (NM001050764), OsCCD8 (NM001049898);矮牵牛(*Petunia hybrida*): PhCCD7/DAD3 (ACY01408), PhCCD8/DAD1 (AY743219);玉米(*Zea mays*): ZmCCD7 (ACR33784);大豆(*Glycine max*): GmCCD7 (ADK26570.1);豌豆(*Pisum sativum*): PsCCD7/RMS5 (ABD67496), PsCCD8/RMS1 (AY557341);青蒿(*Artemisia annua*): AaCCD7 (ADB64459);番茄(*Lycopersicon esculentum*): LeCCD7(ACY39882);欧洲葡萄(*Vitis vinifera*): VvCCD8 (XM002281203);高粱(*Sorghum bicolor*): SbCCD8 (XM002458432);野蕉(*Musa balbisiana*): MbCCD8 (AC186755).

均在 2.0 左右。以  $\beta$ -actin 为内参基因,对 *CsCCD7* 表达水平进行半定量 RT-PCR 分析,结果(图 7)表明, *CsCCD7* 在黄瓜 602 的根、上胚轴、下胚轴、叶、腋芽、顶芽中均有表达,但表达量有明显差异,以根中的表达量最高,顶芽中的最少,营养器官中呈现由下向上表达量递减的趋势。

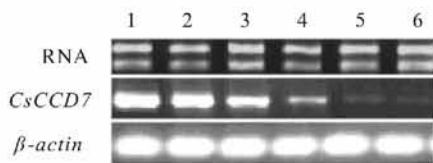


图 7 黄瓜 *CsCCD7* 组织特异性表达的分析  
Fig. 7 Tissue specific expression analysis of *CsCCD7*  
1: 根 Root; 2: 下胚轴 Epicotyl; 3: 上胚轴 Hypocotyl;  
4: 叶 Leaf; 5: 腋芽 Axillary bud; 6: 顶芽 Apical bud.

选取分枝性状和株高有显著差异的四叶一心期黄瓜品系 D0442、D0462、602 和 D9419,它们的分枝性状见表 2。对根组织中的 *CsCCD7* 表达水平进行半定量 RT-PCR 分析,结果(图 8)表明, *CsCCD7* 在 D9419 的表达量较高,在 D0462 中最少。可见,黄瓜 4 个品系 *CsCCD7* 的表达量为 D9419 > 602 > D0442 > D0462。

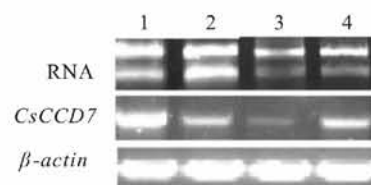


图 8 不同品系黄瓜 *CsCCD7* 的表达  
Fig. 8 *CsCCD7* expression in different cucumber lines  
1: D9419; 2: D0442; 3: D0462; 4: 602.

表 2 供试黄瓜分枝性状差异显著性分析

Table 2 Analysis of significance of difference in cucumbers

	株高 Height (cm)	分枝数 Number of branch	节间数 Number of internode	分枝长度 Branch length (cm)	节间长 Length of internode (cm)
D0442	145Bb	15Aa	25.50Aa	90Bb	15.80Aa
D0462	37Cc	15Aa	15.00Bb	30Cc	3.44Dd
602	140Bb	6Bb	26.30Aa	87Bb	6.60Cc
D9419	230Aa	2Cc	28.60Aa	100Aa	9.16Bb

数据后不同大写和小写字母分别表示差异显著( $P < 0.05$ )和极显著( $P < 0.01$ )。Data followed capital and small letters indicate significant differences at 0.05 and 0.01 levels, respectively.

### 3 讨论和结论

本研究首次从黄瓜中克隆了 *CsCCD7* 基因的全长 cDNA, 长度为 2136 bp, 含有 1 个长度为 1665 bp 的 ORF (151 ~ 1815 bp), 编码长度为 554 AA 的 *CsCCD7* 蛋白(Genbank 登录号: HQ005419)。本研究还采用多种生物信息学方法对黄瓜 *CsCCD7* 的 cDNA 序列和编码的蛋白进行分析, Blast 分析表明 *CsCCD7* 与多个物种的 *CCD7* 基因的同源性很高, 含有 CCD 蛋白家族保守结构域, 它是黄瓜内独角金内酯合成途径中的第一个基因。

Ferguson 等<sup>[9]</sup>报道将独角金内酯注入植株茎节的维管束中, 可抑制此节向上几厘米内的腋芽发生。此外独角金内酯可能作为第二信使, 在 IAA 的下游参与顶端优势的维持。在豌豆、水稻和拟南芥的多分枝突变体中, 独角金内酯类化合物的含量与分枝增加有一定关系, 即独角金内酯的含量降低, 其分枝增加, 而且通过体外施加独角金内酯则可挽救植物的突变表型<sup>[1-2]</sup>。在拟南芥<sup>[10]</sup>、水稻<sup>[11]</sup>和豌豆<sup>[12]</sup>中还有一类表型与 *max*、*rms* 和 *htd1/d10* 相似的多分枝突变体(*max2/rms4/d3*), 它们的突变涉及分枝抑制信号受体的功能缺失。但这些突变体施加独角金内酯后不能使突变体恢复成野生型。这些研究表明独角金内酯很可能就是推测的具有抑制植物分枝功能的新激素, 或者至少是这类激素的前体。鉴于此, 我们选用具有不同分枝特性和不同株高的黄瓜品系, 从中克隆了黄瓜独角金内酯合成途径的第一个基因(*CsCCD7*), 进而探讨独角金内酯对黄瓜腋芽生长发育的调控。

根据 CCD 家族蛋白的同源性分析和系统进化分析, 结果表明, *CsCCD7* 与 CCD 家族蛋白具有高度同源, 且与拟南芥 *AtCCD7/MAX3*、豌豆 *PsCCD7/RMS5*、番茄 *LeCCD7*、矮牵牛 *PhCCD7* 等

蛋白进化距离近、聚在同一个进化分枝上, 证明 *CCD7* 的同源基因无论在双子叶还是单子叶植物中都是十分保守的, 他们的分枝调控机制也是保守的, 与 Simons 等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。

蛋白质一级结构分析的结果表明, *CsCCD7* 蛋白富含磷酸化位点, *CsCCD7* 可能通过自身磷酸化和去磷酸化在细胞内信号转导途径中接受信号调控而行使其生物学功能。蛋白质的四种二级结构中  $\alpha$  螺旋是最为稳定的蛋白质空间结构, 普遍存在于各类蛋白质中, 并常常位于蛋白质表面, 但是 *CsCCD7* 富含  $\beta$  折叠和  $\beta$  转角以及无规卷曲,  $\alpha$  螺旋结构较少。由此推测 *CsCCD7* 蛋白的空间结构和理化性质不稳定。这与使用 Protprarm 在线程序分析的结果一致, 即 *CsCCD7* 是不稳定蛋白。

黄瓜 *CsCCD7* 组织的特异性表达结果表明, 该基因在根、下胚轴中的表达量最大, 与拟南芥<sup>[14]</sup>、矮牵牛<sup>[15]</sup>、豌豆<sup>[12]</sup>等的研究结果一致, 预示着根、茎是 *CCD7* 行使功能的场所。但是, 番茄的 *LeCCD7* 基因在绿色、未成熟的果实中的表达量比在根、茎中的高很多, 其在未成熟果实中的功能还不是十分清楚<sup>[16]</sup>; 水稻 *OsCCD7/HTD1* 基因在所有组织中都有表达, 但是气生组织(如叶、茎和花序)中的表达量比根组织中的高<sup>[17]</sup>。

研究具有不同分枝性状的植物突变体表明, 分枝多的同时还表现出植株变矮的农艺性状, 如水稻多蘖矮化突变体 *htd1*、拟南芥多分枝突变体 *max* 和豌豆多分枝突变体 *rms* 均表现出分枝数量和高度呈现负相关的性状<sup>[10-11, 15, 18]</sup>, 水稻多分蘖矮化突变体 *htd1* 去除腋芽后高度明显增加<sup>[19]</sup>。本研究选取 4 种不同株高、不同分枝特性的黄瓜品系, 初步探讨了 *CsCCD7* 黄瓜分枝数量和植株高度的关系, 结果表明, 分枝多、极矮的 D0462 品系的根中 *CsCCD7*



表达量最少,而分枝多但株高极高的 D0442 品系中 CsCCD7 表达量比 D0462 中的稍高,预示着植物的矮化可能与植物分枝过多有着一定的联系。

### 参考文献

- [1] Gomez-Roldan V, Fermas S, Brewer P B, et al. Strigolactone inhibition of shoot branching [J]. *Nature*, 2008, 455(7210): 189-194.
- [2] Umehara M, Hanada A, Yoshida S, et al. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones [J]. *Nature*, 2008, 455(7210): 195-200.
- [3] Beveridge C A, Kyojuka J. New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2009, 13: 1-6.
- [4] Mathooko F M, Mwaniki M W, Nakatsuka A, et al. Expression characteristics of CS-ACSI, CS-ACS2 and CS-ACS3, three members of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family in cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit under carbon dioxide stress [J]. *J Plant Cell Physiol*, 1999, 40(2): 164-172.
- [5] Guex N, Peitsch M C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 2714-2723.
- [6] Schwede T, Kopp J, Guex N. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server [J]. *Nucl Acids Res*, 2003, 31: 3381-3385.
- [7] Arnold K, Bordoli L, Kopp J. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22: 195-201.
- [8] Snowden K C, Simkin A J, Janssen B J, et al. The decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* carotenoid cleavage dioxygenase 8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(3): 746-759.
- [9] Ferguson B J, Beveridge C A. Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching [J]. *Plant Physiol*, 2009, 149: 1929-1944.
- [10] Stimberg P, van De Sande K, Leyser H M. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2002, 129(5): 1131-1141.
- [11] Ishikawa S, Maekawa M, Arite T, et al. Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(1): 79-86.
- [12] Johnson X, Brcich T, Dun E A, et al. Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals [J]. *Plant Physiol*, 2006, 142(3): 1014-1026.
- [13] Simons J L, Napoli C A, Janssen B J, et al. Analysis of the decreased apical dominance genes of *Petunia* in the control of axillary branching [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143: 697-706.
- [14] Booker J, Auldridge M, Wills S, et al. MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule [J]. *Curr Biol*, 2004, 14: 1232-1238.
- [15] Drummond R S M, MartÍñez-Sañchez N M, Janssen B J, et al. *Petunia hybrida* carotenoid cleavage dioxygenase 7 is involved in the production of negative and positive branching signals in *Petunia* [J]. *Plant Physiol*, 2009, 151: 1867-1877.
- [16] Vogell J T, Walter M H, Giavalisco P, et al. SICCD7 controls strigolactone biosynthesis, shoot branching and mycorrhiza-induced apocarotenoid formation in tomato [J]. *Plant J*, 2010, 61: 300-311.
- [17] Zou J H, Zhang S Y, Zhang W P. The rice high-tillering dwarf 1 encoding an ortholog of *Arabidopsis* MAX3 is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds [J]. *Plant J*, 2006, 48: 687-696.
- [18] Li X, Qian Q, Fu Z. Control of tillering in rice [J]. *Nature*, 2003, 422: 618-621.
- [19] Sorefan K, Booker J, Haurogne K. MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea [J]. *Genes Devel*, 2003, 17: 1469-1474.