

巴西橡胶树两个蔗糖合成酶基因的克隆和表达分析

朱家红^{1,2}, 徐靖³, 畅文军², 张治礼^{2,3*}

(1. 海南大学农学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口 571101; 3. 海南省农业科学院, 海口 571000)

摘要: 为了解蔗糖合成酶在巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)生长和发育过程中的功能, 利用 RACE 技术从巴西橡胶树中克隆了蔗糖合成酶基因, 并对基因的表达特征进行了分析。结果表明, 从巴西橡胶树中克隆了两个蔗糖合成酶基因(*HbSS1* 和 *HbSS2*), *HbSS1* 全长 2864 bp, 编码 806 个氨基酸; *HbSS2* 全长 2815 bp, 编码 811 个氨基酸。两个基因编码的蛋白具有典型的植物蔗糖合成酶结构特征, 包含 1 个磷酸化位点和两个保守的功能域。半定量 RT-PCR 分析表明, *HbSS1* 和 *HbSS2* 在各组织器官中均有表达, 其中 *HbSS1* 在叶中的表达量最高, *HbSS2* 在树皮中的表达量最高, 这说明 *HbSS1* 和 *HbSS2* 可能参与了各组织的生长和代谢过程, 且功能有所分化。

关键词: 巴西橡胶树; 蔗糖合成酶; 基因; 表达

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.01.013

Cloning and Expression Analysis of Two Sucrose Synthase Genes from *Hevea brasiliensis*

ZHU Jia-hong^{1,2}, XU Jing³, CHANG Wen-jun², ZHANG Zhi-li^{2,3*}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Biosciences and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China; 3. Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100, China)

Abstract: To investigate the function of sucrose synthase in *Hevea brasiliensis* growth and development, two genes encoding sucrose synthase, named as *HbSS1* and *HbSS2*, were cloned from *H. brasiliensis* by RACE-PCR, and their expression patterns were analysed by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the whole length of *HbSS1* cDNA was 2864 bp, encoding 806 amino acids; that of *HbSS2* cDNA was 2815 bp, encoding 811 amino acids. Both *HbSS1* and *HbSS2* had typical characteristic of sucrose synthase in plants, containing a conserved phosphorylation site and two conserved domains. The expressions of *HbSS1* and *HbSS2* were detected in all tissues, their expressions were the highest in leaves and bark, respectively. It was suggested that *HbSS1* and *HbSS2* might be involved in growth and metabolism of various tissues, and they also had functional differentiation.

Key words: *Hevea brasiliensis*; Sucrose synthase; Gene; Expression

蔗糖是植物光合作用的主要产物, 其通过叶片向库器官输送碳源和能量, 广泛参与植物的代谢进

程, 影响植物的生长发育^[1]。在库器官中, 蔗糖本身不能直接被利用, 必须通过蔗糖转化酶(Invertase,

收稿日期: 2013-05-06

接受日期: 2013-06-24

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000313); 中央级公益性科研院所业务费专项资金项目(ITBB110201); 海南省重大科技项目子课题热带生物种质与基因资源研究(ZDZX2013023-1)资助

作者简介: 朱家红(1982~), 男, 硕士, 助理研究员, 从事植物生理与分子生物学研究。E-mail: hjzhu1010@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zzl_catas@hotmail.com

EC 3.2.1.2)或蔗糖合成酶(Sucrose synthase, EC 2.4.1.13)分解后才能参与植物的代谢活动^[1-3]。蔗糖合成酶作为蔗糖代谢调节中的关键酶在调节植物细胞碳水化合物的分配,结构组成和贮藏等代谢途径中具有重要的功能^[3]。蔗糖合成酶的分解活性与各种淀粉贮藏器官的库强度密切相关,包括马铃薯块茎的根、胡萝卜根、玉米粒、豌豆胚等^[4-8]。蔗糖合成酶的活性也与纤维素的合成有关,参与调节细胞壁构建、棉花纤维细胞的发育^[9-11]。此外,蔗糖合成酶的活性还与一些重要的代谢进程有关,如糖的运输、环境胁迫响应、氮的固定等^[12-13]。分离和鉴定编码蔗糖合成酶的基因是了解其生理功能和代谢机制的第一步,目前蔗糖合成酶基因已经从拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[14]、棉花(*Gossypium spp.*)^[3]、玉米(*Zea mays*)^[15]、水稻(*Oryza sativa*)^[16]、小麦(*Triticum aestivum*)^[10]等植物中得到了克隆。

在巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)中,蔗糖是光合产物同化碳转运和分配的主要形式,是橡胶生物合成的初始原料。蔗糖合成酶是蔗糖代谢的关键酶,推测其参与了橡胶生物合成的调节。目前还没有关于巴西橡胶树蔗糖合成酶基因方面的研究报告。在先前的研究中,通过筛选文库在橡胶树胶乳中获得两条编码蔗糖合成酶的基因片段。在此基础上,本研究对2个基因的全长cDNA序列进行了扩增,并对其结构和表达特征进行了分析,为深入研究其在胶乳蔗糖代谢中的调控作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)品种为‘7-33-97’,种植于中国热带农业科学院实验农场。分别采集巴西橡胶树的根、树皮、花、叶和胶乳为样品,置液氮中冷冻,储藏于-70℃冰箱中备用。

1.2 巴西橡胶树RNA的提取

胶乳总RNA的提取参照张治礼等^[17]的方法;叶片、根、皮和花的总RNA提取参照全式金公司RNA提取试剂盒说明书。

1.3 巴西橡胶树蔗糖合成酶基因的克隆

根据先前获得的EST序列^[18],设计4条特异引物,5SS1:5'-TCTATCACCACCAACA ACTACA-3';

5SS2:5'-CTTCACCCTGTCCAGCCTTGC-3';3SS1:5'-TTGGTGGTGATAGAAGAAAGG-3';3SS2:5'-TGGATAACAGCCCAAACAAAT-3',分别和UPM:5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'配对,对两个基因的5'端和3'端进行扩增,具体参照CLOTECH公司的RACE试剂盒说明书进行。将扩增出的片段连接到T载体上进行测序,对所获得的序列和EST序列进行拼接。根据拼接结果,分别在两个基因的5'端和3'端设计2对特异引物SS11:5'-AACATTTTCTGATCAGAGCTATGGC-3'和SS12:5'-CCCTCGAGTTATGTGGTTCCAC-3';SS21:5'-GCGTCAGTTTCGATCATGGG-3'和SS22:5'-AGTTCCATTAGTGATTGTA-3',以cDNA模板对2个基因的编码区进行扩增,将扩增的片段连接到T载体上进行测序,将测序结果与拼接结果进行比较。利用NCBI数据库进行BLAST分析,利用DNAMAN软件对蛋白序列进行比对分析。

1.4 氨基酸序列分析和系统进化树构建

蛋白质特性分析在<http://www.expasy.org>网站在线完成。从NCBI数据库中挑选不同物种蔗糖合成酶基因编码蛋白,利用DNAMAN软件进行氨基酸序列比对分析和分子进化分析。

1.5 基因的表达分析

将不同组织的总RNA反转录成cDNA,以18S rRNA为内标基因进行半定量RT-PCR分析。用于半定量RT-PCR的基因特异引物为RTSS11:5'-CAGATTCATCATCACCAGCAC-3'和RTSS12:5'-CGTAGAACATTTCAAGGTAGCG-3';RTSS21:5'-CTCTGGGTCACCTGGTCTACTA-3'和RTSS22:5'-CTCTGTATCCGATCATTCAACA-3'。PCR反应程序为:94℃预变性5 min,然后94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸30 s,共25次循环。实验重复3次。

2 结果和分析

2.1 橡胶树蔗糖合成酶基因的克隆

根据已有的两条编码蔗糖合成酶的基因片段,设计特异引物对基因的5'端和3'端进行了扩增。扩增条带经回收、克隆和测序,证实得到的5'

端长度分别为 1992 bp 和 1927 bp, 3' 端长度分别为 884 bp 和 738 bp。将 5' 端、3' 端和已有的 EST 序列进行拼接, 获得了两个含有完整阅读框架的 cDNA 序列。利用特异引物 SS11/ SS12 和 SS21/ SS22 对两个基因的编码区进行扩增, 分别获得两条长度为 2500 bp 左右的特异片段, 测序结果表明两个特异片段序列与拼接结果一致, 表明获得了两个基因的全长 cDNA 序列, 将 2 个基因分别命名为 *HbSS1* 和 *HbSS2*。*HbSS1* 全长 2864 bp, 包含 1 个 2421 bp 的开放阅读框, 编码 806 个氨基酸, 5'

端非编码区长 161 bp, 3' 端非编码区长 282 bp; *HbSS2* 全长 2815 bp, 包含 1 个 2436 bp 的开放阅读框, 编码 811 个氨基酸, 5' 端非编码区长 145 bp, 3' 端非编码区长 234 bp。

2.2 HbSS1和HbSS2蛋白序列分析

HbSS1 和 *HbSS2* 蛋白分子量分别为 92.63 kD 和 92.67 kD, 理论等电点分别为 6.14 和 5.74, 两者氨基酸的同源性达 69.42%。*HbSS1* 和 *HbSS2* 与柑橘(*Citrus unshiu*, BAA88904)、拟南芥(*Arabidopsis*

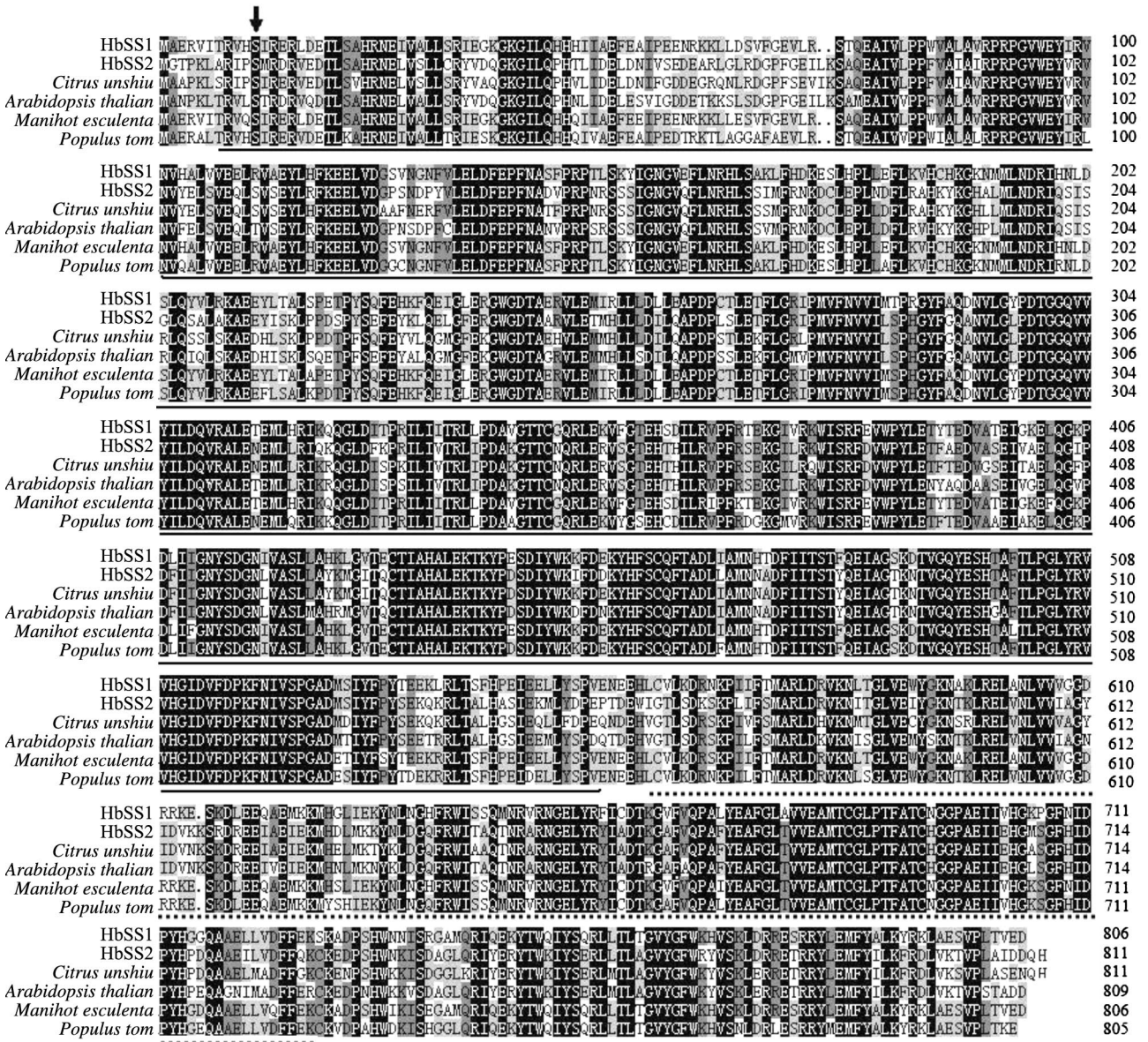


图 1 HbSS1/2 与其它植物中的蔗糖合成酶氨基酸序列的多重比对。箭头示丝/苏蛋白激酶磷酸化位点; 实线示蔗糖合成结构域; 虚线示糖基转移结构域。

Fig.1 Multialignment of amino acid sequences of HbSS1/2 and other plant sucrose synthase. Arrow show Ser/Thr kinase phosphorylation site. Sucrose synthetase domain and glycosyltransferase domain were marked by solid line and dotted line, respectively.

thaliana, AED92895)、木薯(*Manihot esculenta*, ABD-96570)及毛白杨(*Populus tomentosa*, ADW80550)中的蔗糖合成酶具有较高的序列同源性和类似的结构特征(图 1),均包含 1 个磷酸化位点和两个保守的功能域:HbSS1 和 HbSS2 蛋白的第 11 个氨基酸(箭头处)为丝/苏蛋白激酶磷酸化位点;HbSS1 蛋白的第 7~554 氨基酸, HbSS2 蛋白的第 7~556 氨基酸区段为蔗糖合成结构域(实线处),具有合成蔗糖的功能;HbSS1 和 HbSS2 蛋白的第 569~746 氨基酸区段为糖基转移结构域(虚线处),行使糖基化合物转移的功能。

2.3 蛋白序列的系统进化分析

利用 DNAMAN 软件,将 HbSS1/2 和其它植物的蔗糖合成酶蛋白序列进行聚类分析。结果表明,这些植物的蔗糖合成酶可以分为 3 大类:SS I 类、SS II 类和 SS III 类(图 2),各类中均有单子叶植物和双子叶植物,说明蔗糖合成酶的分化可能发生在单子叶和双子叶植物分化之前。此外,SS I 类中的蔗糖合成酶又可以分为两个亚类,一类是单子叶植物的蔗糖合成酶,一类是双子叶植物的蔗糖合成酶。本研究所获得的 HbSS1 和 HbSS2 的亲缘关系较远,分别属于 SS I 类和 SS II 类,说明它们行使

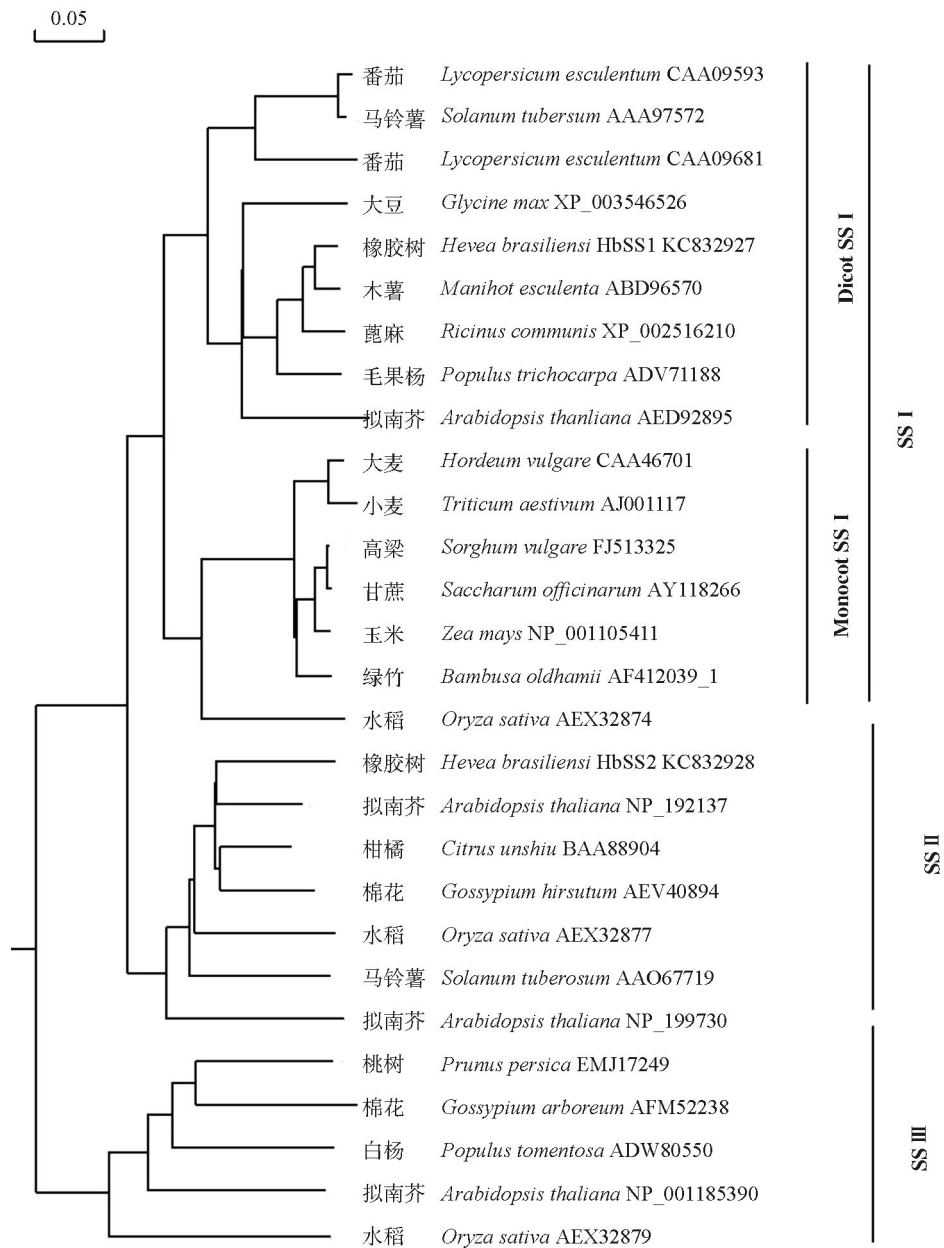


图 2 HbSS1/2 与其它植物蔗糖合成酶的聚类分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis between HbSS1/2 and sucrose synthases in other plants

的功能可能不同。

2.4 *HbSS1*和*HbSS2*的表达分析

分别提取巴西橡胶树根、树皮、花、叶以及胶乳的总 RNA,经反转录后进行半定量 RT-PCR 分析。结果表明, *HbSS1* 和 *HbSS2* 在所有检测组织器官中均有表达,其中 *HbSS1* 在叶中的表达量最高,胶乳中次之, *HbSS2* 在树皮中的表达量最高,叶中次之。

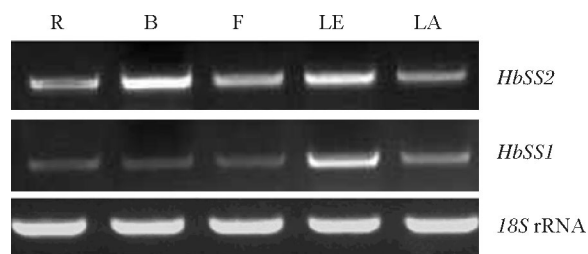


图3 *HbSS1*和*HbSS2*的表达。R: 根; B: 树皮; F: 花; LE: 叶; LA: 胶乳。
Fig. 3 Expression of *HbSS1* and *HbSS2*. R: Root; B: Bark; F: Flower; LE: Leaves; LA: Latex.

3 讨论

有研究表明,蔗糖合成酶是由一个小的多基因家族编码,大多数植物蔗糖合成酶至少有3个基因编码,不同形式的蔗糖合成酶行使不同的代谢功能^[3]。拟南芥中的蔗糖合成酶有6个基因编码, *atSuS1* 和 *atSuS4* 在厌氧条件下表达增加; *atSuS2* 在开花后12 d 特异性高度表达; *atSuS3* 在叶片失水、渗透胁迫等条件下各个器官及后熟的种子中均有表达;而 *atSuS5* 和 *atSuS6* 表达是组成性的,几乎不受胁迫条件的影响^[14]。此外水稻中的蔗糖合成酶基因有6个^[16]、棉花有7个^[3]、玉米和柑橘各有3个^[19-20],各个基因家族的基因在不同器官、不同发育阶段以及应对各种胁迫响应时的表达不同。本研究中,从巴西橡胶树中分离到两个编码蔗糖合成酶的基因 *HbSS1* 和 *HbSS2*,两个基因在不同器官中均有表达,说明它们广泛参与了各组织的生长发育和代谢过程。但两个基因的表达又有所差异,其中 *HbSS1* 在叶中的表达量最高, *HbSS2* 在树皮中的表达量最高。此外 *HbSS1* 和 *HbSS2* 亲缘关系较远,分别属于不同的类型,说明它们行使的功能可能不同。

在巴西橡胶树中,乳管自身不能进行光合作

用,橡胶生物合成所需的原料(蔗糖)来自乳管外的细胞,经乳管原生质体膜进入乳管^[21]。乳管细胞以蔗糖为起始物,大约经过20个酶促反应生成异戊二烯单体^[22]。研究表明,胶乳产量的第一限制因素是乳管系统中可利用糖的含量及糖代谢的强度,蔗糖转化为葡萄糖和果糖的反应是橡胶生物合成的一个限制因子^[23-25]。蔗糖合成酶作为蔗糖代谢调节中的关键酶能够可逆地合成和分解蔗糖,但通常认为主要起分解蔗糖的作用^[3,26]。对胶乳中蔗糖合成酶相关基因的研究,将有助于进一步深入了解蔗糖合成酶调节蔗糖代谢及橡胶生物合成的机理。在本研究中克隆获得的两个蔗糖合成酶基因在树皮和胶乳中均有表达,树皮中含有大量的乳管细胞,而乳管细胞和胶乳中均不能合成蔗糖,这进一步说明 *HbSS1* 和 *HbSS2* 可能具有分解蔗糖的功能。本研究分离获得了两个巴西橡胶树的蔗糖合成酶基因,并对它们的表达特征进行了分析,这为进一步研究蔗糖合成酶在橡胶树生长、发育及胶乳代谢中的功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Lutfiyya L L, Xu N F, D'Ordine R L, et al. Phylogenetic and expression analysis of sucrose phosphate synthase isozymes in plants [J]. *J Plant Physiol*, 2007, 164(7): 923-933.
- [2] Li J, Baroja-Fernández E, Bahaji A, et al. Enhancing sucrose synthase activity results in increased levels of starch and ADP-glucose in maize (*Zea mays* L.) seed endosperms [J]. *Plant Cell Physiol*, 2013, 54(2): 282-294.
- [3] Chen A Q, He S E, Li F F, et al. Analyses of the sucrose synthase gene family in cotton: Structure, phylogeny and expression patterns [J]. *BMC Plant Biol*, 2012, 12(1): 85.
- [4] Fu H, Park W D. Sink- and vascular-associated sucrose synthase functions are encoded by different gene classes in potato [J]. *Plant Cell*, 1995, 7(9): 1369-1385.
- [5] Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, et al. Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Plant J*, 1995, 7(1): 97-107.
- [6] Chourey P S, Taliencio E W, Carlson S J, et al. Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 259(1): 88-96.
- [7] Tang G Q, Sturm A. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affect growth rather than sucrose partitioning [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41(4): 465-479.

- [8] Barratt D H P, Barber L, Kruger N J, et al. Multiple, distinct isoforms of sucrose synthase in pea [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127(2): 655–664.
- [9] Xu S M, Brill E, Llewellyn D J, et al. Overexpression of a potato sucrose synthase gene in cotton accelerates leaf expansion, reduces seed abortion, and enhances fiber production [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(2): 430–441.
- [10] Albrecht G, Mustroph A. Localization of sucrose synthase in wheat roots: Increased in situ activity of sucrose synthase correlates with cell wall thickening by cellulose deposition under hypoxia [J]. *Planta*, 2003, 217(2): 252–260.
- [11] Fujii S, Hayashi T, Mizuno K. Sucrose synthase is an integral component of the cellulose synthesis machinery [J]. *Plant Cell Physiol*, 2010, 51(2): 294–301.
- [12] Hohnjec N, Perlick A M, Pühler A, et al. The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi [J]. *Mol Plant Microb Interact*, 2003, 16(10): 903–915.
- [13] Baier M C, Keck M, Gödde V, et al. Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 152(2): 1000–1014.
- [14] Baud S, Vaultier M N, Rochat C. Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55(396): 397–409.
- [15] Carlson S J, Chourey P S, Helentjaris T, et al. Gene expression studies on developing kernels of maize sucrose synthase (SuSy) mutants show evidence for a third SuSy gene [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49(1): 15–29.
- [16] Hirose T, Scofield G N, Terao T. An expression analysis profile for the entire sucrose synthase gene family in rice [J]. *Plant Sci*, 2008, 174(5): 534–543.
- [17] Zhang Z L, Yang Y, Liu K C, et al. A rapid and efficient protocol for total RNA isolation from latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin Bull Bot*, 2007, 24(4): 516–520.
- 张治礼, 杨云, 刘宽灿, 等. 一种快速、高效的橡胶树胶乳总RNA提取方法 [J]. *植物学通报*, 2007, 24(4): 516–520.
- [18] Liu K C, Yang Y, Zhao L H, et al. Primary analysis and construction of ethephon-induced latex SSH cDNA library from *Hevea brasiliensis* [J]. *Chin J Trop Crops*, 2007, 28(3): 1–4.
- 刘宽灿, 杨云, 赵丽红, 等. 乙烯利诱导橡胶树胶乳cDNA消减文库的构建 [J]. *热带作物学报*, 2007, 28(3): 1–4.
- [19] Hardin S C, Huber S C. Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(3): 197–208.
- [20] Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K. Analysis of sucrose synthase genes in *Citrus* suggests different roles and phylogenetic relationships [J]. *J Exp Bot*, 2002, 53(366): 61–71.
- [21] Bouteau F, Dellis O, Bousquet U, et al. Evidence of multiple sugar uptake across the plasma membrane of laticifer protoplasts from *Hevea* [J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1999, 48(1): 135–139.
- [22] Bamba T, Murayoshi M, Gyoksen K, et al. Contribution of mevalonate and methylerythritol phosphate pathways to polyisoprenoid biosynthesis in the rubber-producing plant *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. *Z Naturforsch C*, 2010, 65(5/6): 363–372.
- [23] Tupy J. Some aspects of sucrose transport and utilization in latex producing bark of *Hevea brasiliensis* Muel. Arg. [J]. *Biol Plant*, 1985, 34(4): 51–64.
- [24] Tupy J. The activity of latex invertase and latex production in *Hevea brasiliensis* Mull. Arg. [J]. *Physiol Veg*, 1973, 11(4): 633–641.
- [25] Tupy J. Stimulatory effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and of 1-naphthylacetic acid on sucrose level, Invertase activity and sucrose utilization in the latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Planta*, 1969, 88(2): 144–153.
- [26] Kleczkowski L A, Kunz S, Wilczynska M. Mechanisms of UDP: Glucose synthesis in plants [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 2010, 29(4): 191–203.