

龙眼体胚*CDC48*基因的克隆、原核表达及其在体胚发生过程中的表达分析

陈义挺^{1,2}, 赖钟雄^{1*}, 方智振^{1,2}, 蔡英卿¹, 林玉玲¹, 李焕苓¹, 陈登云¹

(1. 福建农林大学亚热带果树研究所, 福州 350002; 2. 福建省农业科学院果树研究所, 福州 350013)

摘要: 为探讨龙眼(*Dimocarpus longan*)体胚 *CDC48* 基因的表达方式, 采用 RT-PCR 和 RACE 方法, 从龙眼胚性愈伤组织中克隆得到 1 条长度为 2620 bp, 含有完整开放阅读框的 *DICDC48* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号: EU606206)和长度为 2418 bp 的 DNA 序列(GenBank 登录号: FJ590953)。 *DICDC48* 编码 1 个含有 805 个氨基酸的蛋白质。 *DICDC48* 基因不含内含子。生物信息学分析表明: *DICDC48* 蛋白为不具跨膜结构域的亲水性胞质蛋白, 不具有信号肽, 定位在细胞核; 与其他植物的 *CDC48* 有较高的同源性。将 *DICDC48* 基因构建成原核表达载体, 经 IPTG 诱导表达了 1 个分子量约为 89 kD 的蛋白。利用实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术, *DICDC48* 在龙眼体胚发育过程中的各个阶段均有表达, 其中球形胚时的表达量最低, 胚性紧实球形结构阶段的表达量最高。这为进一步研究 *CDC48* 基因在植物体胚发生中的作用奠定基础。

关键词: 龙眼; 体细胞胚胎发生; *CDC48* 基因; 生物信息学

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2014.03.004

Cloning and Prokaryotic Expression of *CDC48*, and Its Expression during Somatic Embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour.

CHEN Yi-ting^{1,2}, LAI Zhong-xiong^{1*}, FANG Zhi-zhen¹, CAI Ying-qing¹, LIN Yu-ling¹, LI Huan-ling¹, CHEN Deng-yun¹

(1. Institute of Horticultural Biotechnology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Institute of Fruit, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, China)

Abstract: In order to understand the expression of *CDC48* from embryo of *Dimocarpus longan*, a 2620 bp cDNA sequence (GenBank accession No.: EU606206) with complete ORF and a 2418 bp DNA sequence (GenBank accession No.: FJ590953) was cloned from calli of *Dimocarpus longan*, named *DICDC48* gene. The *DICDC48* gene is intronless, encoding 805 amino acids. Bioinformatic analysis indicated that *DICDC48* was a hydrophilic cytoplasmic protein without transmembrane domain and signal peptide, located in nucleus. The amino acid sequence had high similarity between *DICDC48* and *CDC48* from other plants. Prokaryotic expression vector fused with *DICDC48* was constructed, and a protein about 89 kD was expressed after induced by IPTG. *DICDC48* expressed at all somatic embryogenesis stages of longan by using qPCR method. The expression of *DICDC48* was the lowest at globular embryo stage, while the highest was at compact globular embryo stage. These lay a foundation for future study the *CDC48* gene function during somatic embryogenesis in plants.

Key words: Longan (*Dimocarpus longan*); Somatic embryogenesis; *CDC48* gene; Bioinformatics

收稿日期: 2013-06-18 接受日期: 2013-08-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071787, 31272149); 福建省科技平台建设项目(2008N2001)资助

作者简介: 陈义挺(1972~), 男, 博士, 副研究员。研究方向为果树生物技术与遗传资源。E-mail: 512574073@qq.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: laizx01@163.com

细胞周期调节蛋白(Cell division cycle protein) CDC48 是真核生物 AAA 蛋白家族的一个重要成员,进化上相当保守,能与许多不同的协同因子相互作用,形成各种蛋白复合体,并在多项细胞生理活动中起着关键作用。CDC48 的结构具有明显特征:含有一或两个典型的 ATPase 模块,一个 N 末端底物或受体结合点,属于 AAA-ATPase(与多种细胞生理活动相关的 ATP 酶)家族^[1]。

目前对哺乳动物的 AAA-ATPase 研究较多,并且已明确 CDC48/p97 参与调节细胞内有丝分裂、纺锤体的组装、同类膜的融合、内质网相关蛋白的降解等一系列重要的生理活动^[2]。目前仅从几种植物中克隆了 *CDC48* 基因,且对植物 CDC48 蛋白的特性与功能也了解较少^[3-5]。陈志玲等^[1]和 Chen 等^[6]从烟草(*Nicotiana tabacum*)中克隆得到了 *NiCDC48* 的 cDNA 序列并对其功能进行了初步分析,认为 *NiCDC48* 与细胞分裂密切相关。也有研究报道某些与 CDC48p 高度同源的蛋白质并不具有 CDC48p 相似的功能^[7-10]。目前,已从多种生物中克隆得到 *CDC48* 基因,但其具体功能还不清楚,有待进一步研究。

本研究以龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)胚性培养物为材料,首次从龙眼体胚中克隆得到 *CDC48* 基因的 cDNA 和 DNA 全长序列,并对其推导的氨基酸序列进行生物信息学分析,为进一步研究 *CDC48* 基因在植物体胚发生中的作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究以赖钟雄诱导并长期继代保存的龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)品种‘红核子’的胚性愈伤组织 LC2 细胞系^[11]为试验材料。分别采取胚性愈伤组织、愈伤组织 II、不完全胚性紧实结构、胚性紧实球形结构、球形胚,子叶形胚等 6 个发育阶段的胚性培养物进行龙眼体胚发生过程中 *CDC48* 基因的表达模式分析,龙眼体胚发生的不同发育阶段同步化材料的培养参照前文^[12-15]报道的方法。

1.2 胚性愈伤组织 DNA 和 RNA 的提取以及 cDNA 的合成

采用王风华等^[25]的方法提取龙眼胚性愈伤组织基因组的总 DNA。参照 Trizol Reagent 试剂盒

说明书进行总 RNA 的提取。cDNA 第一链的合成参照 RevertAid™ First-Strand Synthesis System (Fermentas)说明书进行。

1.3 引物设计

根据 GenBank 上已登录的 *CDC48* 基因序列,设计引物 P1、P2、P3 和 P4(表 1);根据保守区序列设计引物 P5、P6、P8 和 P9 用于 3' RACE 和 5' RACE;采用 DNAMAN 对获得的片段进行拼接;根据获得的 cDNA 全长序列,设计引物 P16 和 P17 用于实时荧光定量 PCR 分析。引物均委托上海博尚生物公司合成。

表 1 使用到的引物序列

Table 1 Primers used in test

引物 Primer	序列 Sequence (5' ~ 3')
P1	GAGATAATTTGTGAGGGTGAACCTGTG
P2	TCACTCTCTCCAAACCACATGGTGAG
P3	ATGACTAACAAAGCTGAATCCTCCG
P4	AGCTCCACCAACTCACGAATC
P5	CTGTTGTTGAAGTTCCTAATGTCAGC
P6	GAGACTGTTCATACCCCTGTGGAGCAT
P8	CTTCAATCGTGTATCCACAGGCAAT
P9	CTCAGGTTGGACCTCACCCAC
P10	CTCGAATTCATGACTAACAAAGCTGAATC
P15	GACCTCGAGTAACTATACAAATCATCTTCG
P16	GAACCGAAGATAAGGATGAACAAGG
P17	GCATCAAAGAGGTTGCCAGTGAC
AUAP	GGCCACGCGTCGACTAGTACT

1.4 目的片段的扩增

PCR 反应体系共 25 μL :包含 cDNA 1.0 μL ,上游引物和下游引物(10 $\mu\text{mol L}^{-1}$)各 1 μL , 10 \times PCR Buffer 2.5 μL , dNTP Mix (2.5 mmol L^{-1}) 2 μL , Ex *Taq* DNA 聚合酶(5U μL^{-1}) 0.2 μL , H₂O 17.3 μL 。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,共 35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增试剂盒购于 TaKaRa 公司。

3' RACE 参照 RevertAid™ First-Strand Synthesis System (Fermentas)说明书进行。5' RACE 参照 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends Version 2.0 (Invitrogen)说明书进行。

采用 PCR Fragment Recovery Kit (TaKaRa)试剂盒进行目的片段的回收。将回收片段克隆到 pMD-18T (TaKaRa)上进行测序,委托上海英骏生物技术公司完成测序。

1.5 序列分析及生物信息学分析

采用 ExPASy ProtParam (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)进行蛋白质理化性质的分析;采用 Tmpred (<http://www.ch.embnet.org/software/tepred-form.html>)进行跨膜结构的预测与分析;采用 PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp/>)进行亚细胞定位的预测与分析;采用 Jpred 程序(<http://www.compbio.dundee.ac.uk/>)进行蛋白质二级结构的预测与分析;采用 Coils (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)进行蛋白质卷曲螺旋结构的预测与分析;采用 NetPhos2.0Serve (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>)进行磷酸化位点的预测与分析;采用 Gene Ontology Annotation (<http://www.uniprot.org/uniprot/>)进行基因功能的预测与分析;采用 DNAMAN 6.0 软件进行分子系统进化的预测与分析。

1.6 原核表达载体的构建与重组蛋白的诱导表达

将 *DICDC48* 的 ORF 克隆到 pMD18-T 载体 (TaKaRa)上,经测序验证后,分别用 *EcoRI* 和 *XhoI* 双酶切 pMD18-T/*DICDC48* ORF 和载体 pET-28a(+),回收目的片段,用 T_4 DNA 连接酶于 16℃ 连接过夜,构建重组质粒,并转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 感受态细胞;挑取含重组质粒的菌落至含 $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ Kan 的 LB 液体培养基上,37℃ 培养过夜。取 100 μL 菌液,加入 3 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基,于 37℃ 下以 $190 \sim 200 \text{ r min}^{-1}$ 振荡培养至 $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$ 。提取质粒进行 PCR 并进行酶切验证。验证结果正确后,取 100 μL 菌液加到 3 mL 含 Kan 的 LB 液体培养基中,在 37℃ 下以 190 r min^{-1} 振荡培养至 $\text{OD}_{600 \text{ nm}} = 0.4 \sim 0.6$ 。加入 IPTG,终浓度为 1 mmol L^{-1} ,然后分别放在 37℃、34℃ 下以 190 r min^{-1} 振荡培养 3~6 h。离心收集菌体,加入 $1 \times$ SDS-PAGE 上样缓冲液 (62.5 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 6.8, 10% 甘油, 100 mmol L^{-1} DTT, 2% SDS)。沸水浴 5 min 后,离心,取上清液进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 *DICDC48* 基因的表达分析

CDC48 基因在龙眼体胚发生过程中的表达分析参照 Lin 和 Lai^[29]的方法,以 *UBQ* 和 *EF-1a* 作为内参基因。具体步骤如下:按照 TRIZOL (Invitrogen)说明书提取不同发育阶段的龙眼胚性培养物的总 RNA,按照 SYBR ExScriptTM (TaKaRa)说明书合成 cDNA。采用两步法进行 qRT-PCR,20 μL 的反应体系包含: $2 \times$ SYBR Premix Ex TaqTM (TaKaRa) 10 μL 、上游引物 P16 和下游引物 P17 各 0.4 μL , cDNA 1.0 μL , dH₂O 8.2 μL 。qRT-PCR 采用 LightCycler 1.5 (Roche)进行,反应程序为:94℃ 预变性 5 min;然后 94℃ 变性 10 s;55℃ 退火 20 s,共 40 个循环。反应结束后读取荧光值生成溶解曲线。以不同阶段胚性培养物 cDNA 的混合样进行 5 倍梯度稀释进行标准曲线的制作。采用 Lin 和 Lai^[16]的方法进行数据分析。

2 结果和分析

2.1 *CDC48* 基因的 cDNA 序列的克隆

根据 GenBank 上已报道 *CDC48* 的 cDNA 或 mRNA 序列,在最保守的区域设计两对特异性引物 P1/P2 和 P3/P4。以 P1/P2 为引物,从龙眼胚性愈伤组织中扩增得到 1 条长约 1100 bp 的片段(图 1: A),以 P3/P4 为引物,从龙眼胚性愈伤组织中扩增得到 1 条长约 650 bp 的片段(图 1: B)。对两个片段进行克隆测序,结果表明,2 个片段分别长为 1124 bp 和 677 bp。BLAST 分析结果表明,2 个片段均为龙眼胚性愈伤组织 *CDC48* 的 cDNA 序列。采用 DNAMAN 对 2 个片段进行拼接得到 1 条长为 1678 bp 的序列(片段 A)。根据该序列设计引物进行 3' RACE 和 5' RACE。分别以 P5/AUAP 和 P6/AUAP 为引物进行两轮 PCR 扩增,得到 1 个长度为 1167 bp 的 3' 末端片段(图 1: C)。分别以 AUAP/P8 和 AUAP/P9 为引物进行两轮 PCR 扩增,得到 1 个长度为 400 bp 的 5' 末端片段(图 1: D)。经测序后,将 3' 和 5' 末端片段与片段 A 进行拼接,得到 1 条长度为 2620 bp 的序列(图 2)。将该片段命名为 *DICDC48*,并在 GenBank 登录,登录号为 EU606206。*DICDC48* 的 5' 非编码区为 17 bp,3' 非编码区为 187 bp,3' 端 poly(A)尾长 13 bp,开放阅读框(ORF)为 2418 bp,编码 805 个氨基酸(图 2)。

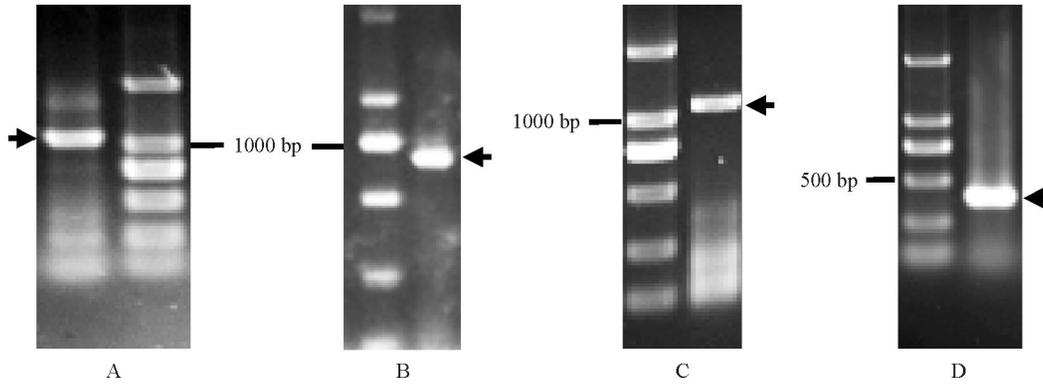


图 1 龙眼胚性愈伤组织 *CDC48* 基因的克隆。A,B: cDNA 片段扩增; C: 3' RACE; D: 5' RACE。

Fig. 1 Clone of *CDC48* gene from calli of longan. A, B: Amplification of cDNA fragments; C: 3' RACE; D: 5' RACE.

```

1  ATCGACTCTCTACCACCATGACTAACAAAGCTGAATCCTCCGATTCTAAGGGCACGAAGAGAGACTTCAGTACGGCGATTCTGGAGCGGA
    M T N K A E S S D S K G T K R D F S T A I L E R
91  AGAAGGCGCGAATCGGCTCATTGTCGATGAAGCTATTAACGACGACAACCTGTCTGCTCCGCTCCATCCCGACACCATTGGAGAAGCTGC
    K K A A N R L I V D E A I N D D N S V V S L H P D T M E K L
181  AGCTCTCCGCGCGACACCATCCTCATCAAGGAAAGAAGAGGAGGATACGATTGCATCGCACTTGGCGAGGATACATGTGACGAAC
    Q L F R G D T I L I K G K K R R D T I C I A L A E D T C D E
271  CGAAGATAAGGATGAACAAGGTGGTGAAGTCCAACCTGAGGGTTAGGCTTGGAGATGTTGTTCCGTGCATCAGTGTCTGATGTCAAAT
    P K I R M N K V V R S N L R V R L G D V V S V H Q C P D V K
361  ATGGAAAGCGTTCACATATTGCCTGTGGATGACACGATTGAAGGGTCTGACGCAACCTCTTGTATGCATCTTGAACCATATTCTT
    Y G K R V H I L P V D D T I E G V T G N L F D A F L K P Y F
451  TGGAGGCATACCGACTGTGAGGAAGGTGATCTATTCTTGTGAGAGGGGGATGAGAAGCGTGGAGTCAAAGTTATTGAGACTGATC
    L E A Y R P V R K G D L F L V R G G M R S V E F K V I E T D
541  CTGCTGAGTACTGTGTGGTGGCCCCAGATACTGAGATATTTGTGAGGGTGAACCTGTGAGGAGAGAGGACGAGGATAGGTTGGACGAAG
    P A E Y C V V A P D T E I F C E G E P V R R E D E D R L D E
631  TTGGTTATGATGATGTTGGTGGTTAGGAAGCAGATGGCTCAGATTCTGAGTTGGTGGAGCTGCCTTTAAGGCATCCTCAACTTTTAA
    V G Y D D V G G V R K Q M A Q I R E L V E L P L R H P Q L F
721  AGTCGATGGTGTGAAACCCAAAGGAATCCTGCTTTATGGACCTCCCGTTCAGGAAAGACATTGATAGCCAGAGCTGTGTCTAATG
    K S I G V K P P K G I L L Y G P P G S G K T L I A R A V A N
811  AAACGGTGGCTTTCTTCTTTGATCAATGGACCGGAGATTATGTCCAAATGGCTGGTGGAGAGTGAAGCAATCTCCGGAAGCGCTTGG
    E T G A F F F C I N G P E I M S K L A G E S E S N L R K A F
901  AAGAAGCTGAGAAGATGCTCCATCAATCATCTTTATTGATGAGATTGATTGCTCCAAAGCGTGAAGACTCACGGTGAAGTTG
    E E A E K N A P S I I F I D E I D S I A P K R E K T H G E V
991  AAAGGCGCATTGTTCTCAGCTCTAACTCTAATGGATGGGCTGAAATCCCGAGCTCATGTTATTGTCATTGGGGCTACTAATCGTCCAA
    E R R I V S Q L L T L M D G L K S R A H V I V I G A T N R P
1081  ATACTATTGACCTGCTTGGAGAAGGTTGGTAGATTTGATAGGGAGATAGATATTGGTGTCTGATGAAGTTGGGCGCTTGAAGTTC
    N T I D P A L R R F G R F D R E I D I G V P D E V G R L E V
1171  TCCGCATCCATACCAAGAACATGAAGTTGCTGATGATGTTGATCTAGAAAAGGATTGCAAAAAGATACTCATGGGTACGTTGGTGTGATC
    L R I H T K N M K L S D D V D L E R I A K D T H G Y V F A D
1261  TTGCTGCTGTGCACTGAAGTGCCTGCAATGCATCAGAGAGAAAATGGATGTTATCGACTTGGAAAGTGAACCATTGATGCTGAGA
    L A A L C T E A A L Q C I R E K M D V I D L E D E T I D A E
1351  TACTAAATCCATGGCTGTTTCAAATGAGCACTTCCAACTGGCCCTTGGAAACGAGCAATCCCTCTGCTTTGCGTGAACCTGTTGTTGAAG
    I L N S M A V S N E H F Q T A L G T S N P S A L R E T V V E
1441  TTCTAATGTCAGCTGGGAAGATATTGGAGGCCTTGAANAATGCAAGCGGAGCTACAAGAGACTGTTCAATACCTGTGGAGCATCCAG
    V P N V S W E D I G G L E N V K R E L Q E T V Q Y P V E H P
1531  AGAGGTCGAGAAATTTGGTATGGCACCTTCAAAGGTTGCTTTTCTATGGTCCCGCAGGATGGTAAAACCTGCTGGCTAAGGCAA
    E R F E K F G M A P S K G V L F Y G P P G C G K T L L A K A
1621  TTGCAAAATGAATGCCAAGCAAATTCATCAGCGTCAAAGGCTGAACTGCTCACCATGTTGGTTGGAGAGAGTGAAGCTAATGTTCCGG
    I A N E C Q A N F I S V K G P E L L T M W F G E S E A N V R
1711  AAATATTTGACAAGGCCGACAATCAGCCCATGTCCTTTTCTTGTGAGCTCGACTCTATTGCTACACAGAGGGGAAGCAGTGTCC
    E I F D K A R Q S A P C V L F F D E L D S I A T Q R G S S V
1801  GGGATGCTGGTGGTGTGAGACCGTGTAAATCAACTCCTAAGTGAATGGATGGCATGTCAGCTAAAAAGACTGTTTCATAATTG
    G D A G G A A D R V L N Q L L T E M D G M S A K K T V F I I
1891  GGGTACAAACAGACTGACATCATTGACCCAGCACTTCTGCGGCTGGTCTGCTAGACCCAGTAACTATATTCTCTCCAGATGAGG
    G A T N R P D I I D P A L L R P G R L D Q L I Y I P L P D E
1981  ATTACGTCATCAGATCTTCAAAGCCTGTTGAGAAAGTACCAGTCTTAAAGATGTTGACCTTAGAGCACTGGCGAAGTATACTCAAG
    D S R H Q I F K A C L R K S P V S K D V D L R A L A K Y T Q
2071  GCTTACGCGGTGAGATATCAGGAGATATGCCAGCGAGTGTCAAGTATGCTATTAGAGAGAATATAGAGAAGGACATGAGAGGGAGA
    G F S G A D I T E I C Q R A V K Y A I R E N I E K D I E R E
2161  FAAGGAGAAGGACAATCCTGAGGCTATGGATGAGGATGTTGAAGATGATGGCAGAGATTAAGGCTGCTCACTTGAAGGAGTCTATGA
    R R R R D N P E A M D E D V E D D V A E I K A A H F E E S M
2251  AGTTTCCGTAAGGAGTGTGAGTGTGATATCGCAAATCAAGCTTTTGTCTCAGACCTTGCAGCAGTGCAGGGGTTTGGGACTG
    K F A R R S V S D A D I R K Y Q A F A Q T L Q S R G F G T
2341  AATTTAGGTTTCTGAGAGCTCAGCTGGGCTACTGGATCCGATCCATTTGCAACTCAGCTGGTGGGCTGACGAGAGATGATTGTATA
    E F R F S E T S A G A T G S D P F A T S A G G A D E D L Y
2431  GTTAGTCTGATGCTTTAAGTTAAGTACATCTGTTTATAGGCATTACCACAATTTATGGAAGTGGTAGTTTATGTAAGTGGGTTCAA
    S *
2521  GGTTCACAGTACTGTTATGTTGGTTGCTGCATTTACATTTCCAGTTCATCAAAGACGTTATTTATGGATGAAATGAATACCTTTAAA
    AAAAAAAAAA

```

图 2 龙眼 *CDC48* 基因 cDNA 序列及其推导的氨基酸序列

Fig. 2 cDNA sequence of *CDC48* and deduced amino acid sequence from calli of longan

2.2 DICDC48的DNA序列的克隆及基因结构

为了对 *DICDC48* 基因的结构进行分析, 根据 *DICDC48* 基因的 cDNA 序列设计引物(P10/P15)进行 *DICDC48* 的 DNA 序列扩增, 得到 1 条长为 2418 bp 的序列, 目的片段经回收和测序后, 在 GenBank 上登录, 登录号为 FJ590953, 该序列含有 ATG 起始密码子和 TAG 终止密码子。将 *DICDC48* 基因 DNA 序列和 cDNA 序列的 ORF 部分进行比对分析, 发现两条序列相同。这表明扩增得到的 *DICDC48* 基因编码区不含内含子序列。

2.3 DICDC48的理化性质与结构特征

应用生物信息学软件对 *DICDC48* 的核苷酸序列和推导的氨基酸序列进行了分析。结果表明: *DICDC48* 蛋白的分子量为 89.5648 kD, 理论等电点 pI 为 4.92, 是不具跨膜结构域的亲水性胞质蛋白, 不具有信号肽, 细胞主要定位在细胞核上, 有 3 个区域最有可能形成卷曲螺旋, 由 40.87% 的 α 螺旋、15.28% 的延伸链和 43.85% 的不规则卷曲组成, 磷酸化位点有 39 个。对保守结构域与功能域的分析表明: 龙眼 CDC48 具有两个典型的 ATPase 模块, 以及含有 CDC48 特有的 N 端。通过功能的预测与分析, 推测与细胞的分裂有关系。此外, 还对 CDC48 酶分子三维立体结构等进行了预测和分析: 龙眼 CDC48 蛋白 C-末端有 Tyr 磷酸化位点, 可以用来调节 CDC48 蛋白的构象。龙眼 CDC48 推测能利用水解 ATP 的能量, 打破蛋白 V-SNARE 与靶膜上的 T-SNARE 相结合复合体结构上的天冬氨酸、精氨酸位点而促使内质网的融合。

2.4 DICDC48的系统进化分析

将 *DICDC48* 蛋白与 NCBI 数据库中的烟草 (ABF59516)、大豆 (*Glycine max*, XP_003554388)、葡萄 (*Vitis vinifera*, XP_002282146)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*, XP_004241286)、毛果杨 (*Populus trichocarpa*, XP_002323472) 和野茶树 (*Camellia sinensis*, AFF59215) 的 CDC48 氨基酸序列进行比对分析, 结果表明龙眼 *DICDC48* 蛋白与拟南芥 CDC48 蛋白和其他植物的 CDC48 蛋白高度同源, 与烟草、大豆和葡萄的氨基酸序列的一致性高达 94%、95% 和 97% (图 3)。此外, *DICDC48* 具有典型的 ATP 结

合结构域以及 Walker A 和 Walker B 基序(图 3)。

采用 Mega 5.0 近邻相接法(Neighbor-Joining, NJ)对 *DICDC48* 与来源于 NCBI 数据库的烟草、大豆、番茄、黄瓜 (*Cucumis sativus*)、野草莓 (*Fragaria vesca* subsp. *vesca*)、洋葱 (*Allium cepa*)、乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*)、葡萄、山羊草 (*Aegilops tauschii*)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、细小微胞藻 (*Micromonas pusilla*)、斑马鱼 (*Danio rerio*) 和盘基网柄菌 (*Dictyostelium lacteum*) 等 15 种生物的 CDC48 蛋白进行系统进化分析, 结果表明 *DICDC48* 与烟草、大豆和番茄的 CDC48 蛋白亲缘关系较近(图 4)。以上结果表明, *DICDC48* 为 CDC48 家族成员。

2.5 DICDC48基因的原核表达

利用 *DICDC48* ORF 序列构建原核表达载体 pET-DICDC48, 并用 PCR 和 *EcoR* I + *Xho* I 双酶切验证重组质粒。将鉴定的重组质粒转入到大肠杆菌 BL21 感受态细胞。经 1 mmol L^{-1} 的 IPTG 诱导表达, 提取总蛋白进行 SDS-PAGE 分析。结果表明, 34°C 培养的 pET28a-CDC48 经诱导后有 1 个大约为 89 kD 的蛋白大量表达, 而对照组未见相应的蛋白表达(图 5)。

2.6 DICDC48在体胚发生过程中的表达分析

以龙眼胚性培养物中 *UBQ* 和 *EF-1a* 基因共同作为内参基因, 利用荧光定量 PCR 技术对龙眼体胚发生过程中的 *DICDC48* 基因的表达情况进行分析。结果表明(图 6): *DICDC48* 在体胚发生的各阶段均有表达。在体胚发生过程中随胚性愈伤组织的分化, *DICDC48* 基因的表达量先下降后上升, 在胚性紧实球形结构阶段的表达量最大, 之后又逐渐下降, 到子叶胚阶段 *DICDC48* 的表达量又稍微上升。整个体胚发生过程中, 以胚性紧实球形结构阶段的表达量最大, 其次是胚性愈伤组织阶段, 最低的是球形胚阶段, 说明在胚性紧实球形结构和愈伤组织阶段 *DICDC48* 基因大量表达, 调控细胞迅速分裂; 而在球形胚阶段 *DICDC48* 表达量最低, 说明这个阶段的细胞分裂最少。这与 Feiler 等^[3]报道拟南芥 *AtCDC48* 在细胞的分裂和生长过程中发挥重要作用, *AtCDC48* 在芽、根、花的伸长细胞以及生长点细胞中均高度表达的结论相一致。

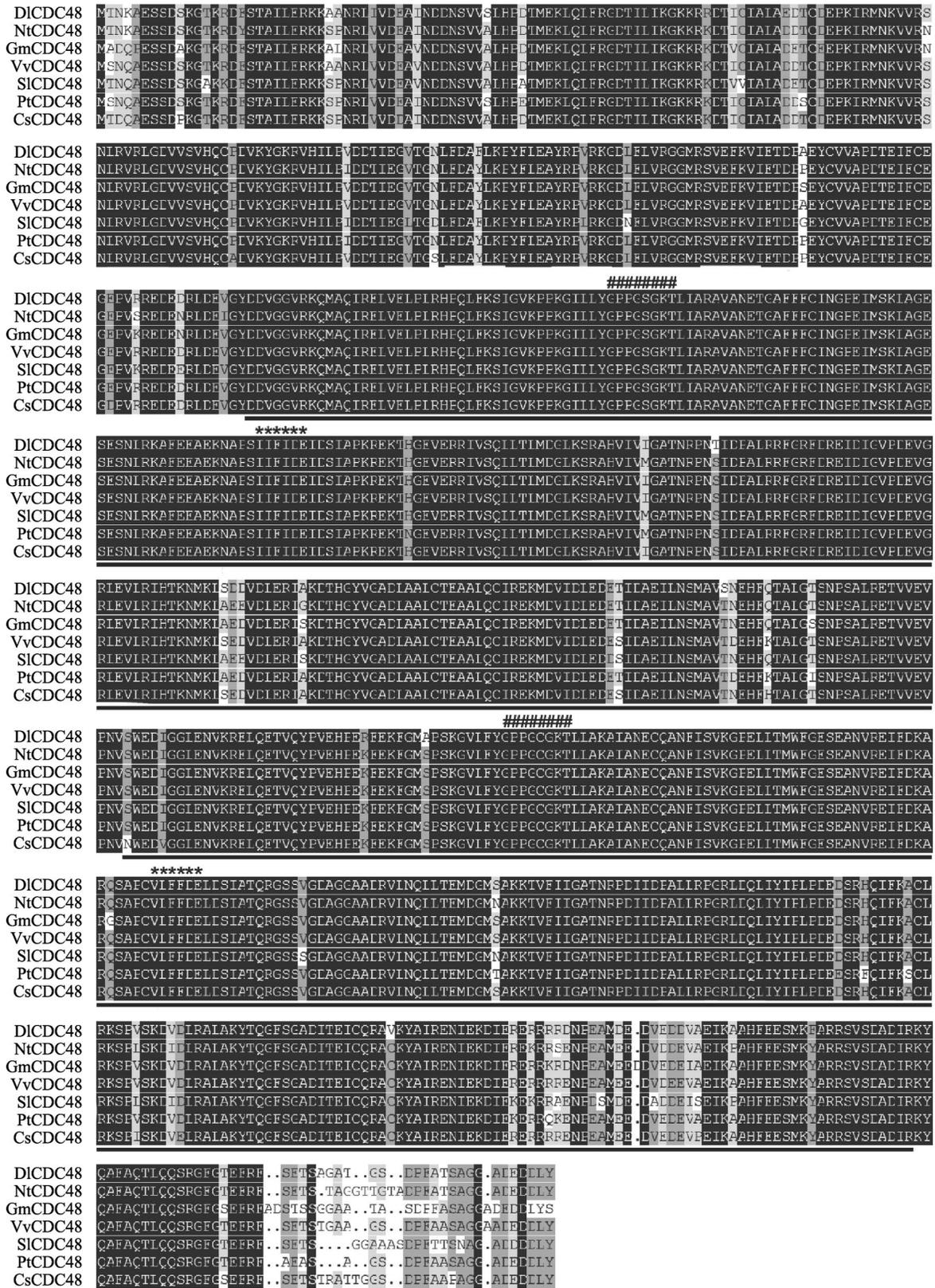


图 3 龙眼与其他植物的 CDC48 蛋白氨基酸序列比对。_：ATP 结合结构域；#：Walker A 基序；*：Walker B 基序。DICDC48：龙眼；NtCDC48：烟草；GmCDC48：大豆；VvCDC48：葡萄；SICDC48：番茄；PtCDC48：毛果枧；CsCDC48：黄瓜。

Fig. 3 Multiple alignments of CDC48 sequences from longan and other plants. _：ATP-binding domains；#：Walker A motif；*：Walker B motif；DICDC48：Dimocarpus longan；NtCDC48：Nicotiana tabacum；GmCDC48：Glycine max；VvCDC48：Vitis vinifera；SICDC48：Lycopersicon esculentum；PtCDC48：Populus trichocarpa；CsCDC48：Cucumis sativus.

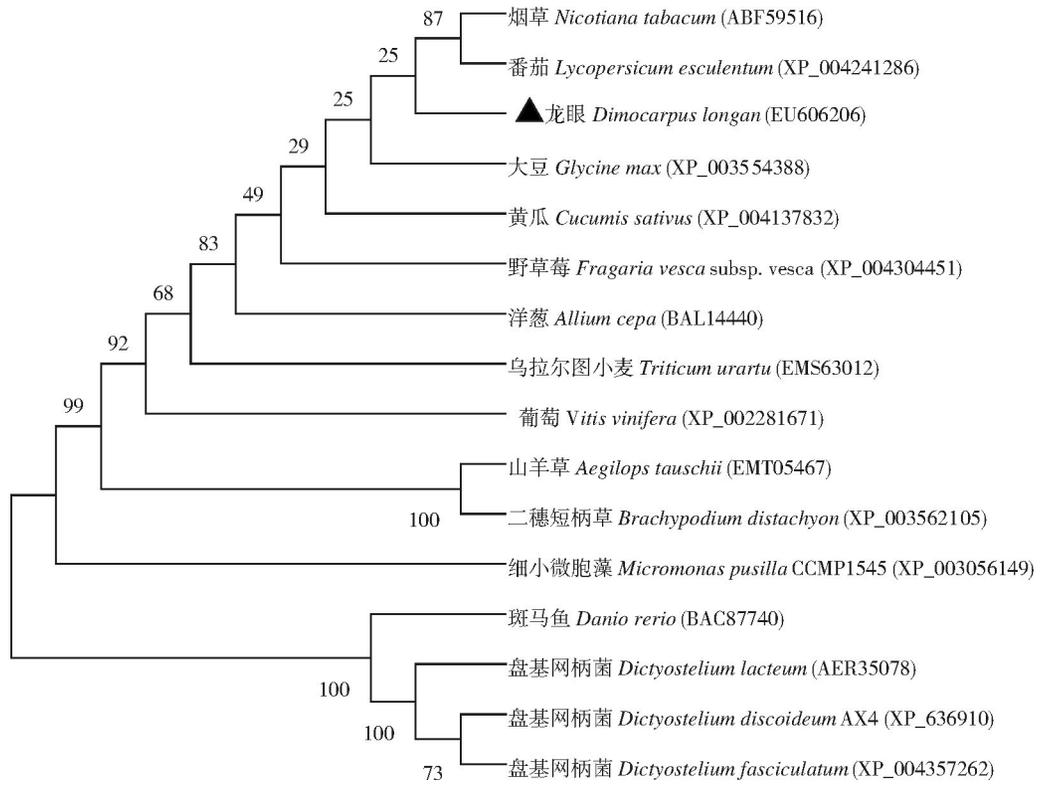


图 4 龙眼 CDC48 与其他物种的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic relationship of CDC48 among *Dimocarpus longan* and other species.

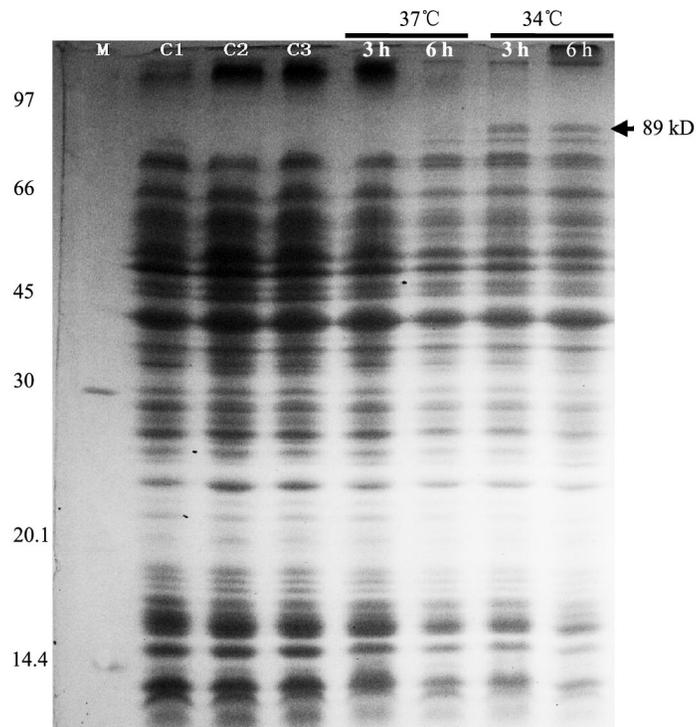


图 5 重组质粒 pET28a-CDC48 在大肠杆菌中的表达。C1: 未经 IPTC 诱导 pET-28a 载体; C2: 经 IPTC 诱导 pET-28a 载体; C3: 未经 IPTC 诱导的重组载体 pET28a-CDC48。

Fig. 5 pET28a-CDC48 expression in *E. coli* using SDS-PAGE. C1: pET-28a vector uninduced by IPTC; C2: pET-28a vector induced by IPTC; C3: Recombinant pET28a-CDC48 uninduced by IPTC.

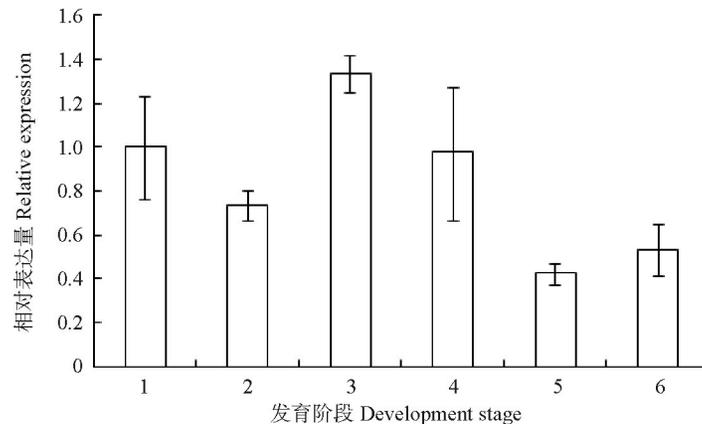


图6 *CDC48* 在龙眼体胚不同发育阶段的相对表达量。1: 胚性愈伤; 2: 胚性愈伤 II; 3: 胚性紧实球形结构; 4: 不完全胚性紧实结构; 5: 球形胚; 6: 子叶胚。

Fig. 6 Relative expression of *CDC48* during somatic embryogenesis of longan. 1: Callus; 2: Callus II; 3: Compact globular embryo; 4: Incomplete compact globular embryo; 5: Globular embryo; 6: Cotyledon embryo.

3 讨论

3.1 DICDC48可能是AAA蛋白家族成员之一

AAA 是与一系列细胞内活动相关的 ATPase 的简称。其本质功能就是结合 ATP,同时利用水解 ATP 的能量使底物发生去折叠的作用。AAA 家族的特征结构就是几个 ATP 酶结构域的串联,同时在其 N 端有一个与受体蛋白结合的位点^[17]。主要的功能是调控细胞内的一系列活动,其中报道较多的有蛋白水解、细胞周期调控、转录激活、器官发生和膜泡运输等^[18-22]。本研究将龙眼 DICDC48 基因的核苷酸序列和推导的氨基酸序列在 NCBI 上进行 BLAST,结果表明它与其他物种的 CDC48(AAA 家族)同源性都很高;将龙眼 DICDC48 与烟草、拟南芥、酵母和老鼠 CDC48(或 AAA)的氨基酸进行多重序列比对,结果表明龙眼 DICDC48 与 4 物种的 CDC48(或 AAA)氨基酸序列同源性非常高,有着几乎一致的氨基酸组成,2 个 ATPase 模块(包括 Walker A 基序和 Walker B 基序)氨基酸序列也基本相同。因此,推测 DICDC48 是 AAA-ATP 蛋白家族的成员之一。氨基酸序列同源性很高,但是功能不一定相同。猪的 CDC48p 同源物 VCP (Valosin-containing protein)与酵母 CDC48 的氨基酸序列同源性很高,但是猪的 VCP 却不能互补酵母 CDC48 突变株的功能缺陷^[3]。因此,要确认 DICDC48 是 AAA-ATP 蛋白家族成员之一,还需利用生物信息学进一步预测龙眼 DICDC48 的结构和功能并进行功能鉴定。

3.2 CDC48基因在龙眼体胚发生过程中的作用

细胞分裂是所有生物生命活动过程中最为重要的事件之一,是一个高度有序的生命过程。在高等生物的生长发育过程中,细胞分裂受到严格的控制,个体的生长发育、组织的分化再生以及细胞的衰老等生理现象都与细胞周期密切相关。*CDC48* 广泛存在于真核生物中,并在细胞的多项生理活动中起着关键作用。Feiler 等^[3]的研究表明拟南芥 *AtCDC48* 在细胞的分裂和生长过程中发挥重要作用, *AtCDC48* 能够拯救酵母 *CDC48* 突变体并实现同源基因在纺锤体分离中的功能。超表达烟草 *NtCDC48* 基因可促进烟草 BY-2 细胞的有丝分裂,并影响纺锤体的动态组织^[1]。这些表明, *CDC48* 在植物细胞分裂过程中扮演着重要的角色。同样,本研究结果表明, *DICDC48* 在细胞快速分裂的龙眼体胚发生早期表达量较高,球形胚阶段表达量下降到最低水平可能与球形胚形成后细胞分裂速度降低有关。有研究表明在体胚发生早期细胞进行快速的增殖,而在球形胚形成之后细胞分裂速度减慢^[23]。Rienties 等^[24]的研究表明 SERK1 与 CDC48 和 GF14λ 存在相互作用, SERK1 能够磷酸化 CDC48。SERK 是一类在植物体胚发生过程中发挥着重要作用的蛋白质^[25]。CDC48 可能是通过与 SERK 的相互作用参与信号转导最终促进植物胚的形成。龙眼体胚发生过程实际上是细胞不断分裂与分化的过程,它必然跟 CDC48 有着密切的关系。龙眼胚性愈伤组织 *CDC48* 的成功克隆,为研究龙眼体胚发生过程中细胞分裂机制奠定基础,为

构建龙眼体胚基因网络提供新的基因。

参考文献

- [1] Chen Z L, Yu Y, Liu L N, et al. Cloning and function analysis of *NtCDC48* gene in tobacco [J]. *Prog Nat Sci*, 2006, 16(12): 1561–1567.
陈志玲, 虞沂, 刘丽娜, 等. 烟草*NtCDC48*基因的克隆及功能分析 [J]. *自然科学进展*, 2006, 16(12): 1561–1567.
- [2] Stolz A, Hilt W, Buchberger A, et al. Cdc48: A power machine in protein degradation [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36(10): 515–523.
- [3] Feiler H S, Desprez T, Santoni V, et al. The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells [J]. *EMBO J*, 1995, 14(22): 5626–5637.
- [4] Marshall R S, Jolliffe N A, Ceriotti A, et al. The role of CDC48 in the retro-translocation of non-ubiquitinated toxin substrates in plant cells [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(23): 15869–15877.
- [5] Astier J, Wawer I, Besson-Bard A, et al. GAPDH, NtOSAK and CDC48, a conserved chaperone-like AAA-ATPase, as nitric oxide targets in response to abiotic stresses [J]. *Nitric Oxide*, 2012, 27(S1): S9. doi: 10.1016/j.niox.2012.04.035.
- [6] Chen Z L, Yu Y, Liu L N, et al. Isolation, characterization and functional analysis of a *cdc48* homologue from tobacco BY-2 cells [J]. *Prog Nat Sci*, 2007, 17(2): 156–162.
- [7] Beuron F, Flynn T C, Ma J P, et al. Motions and negative cooperativity between p97 domains revealed by cryo-electron microscopy and quantised elastic deformational model [J]. *J Mol Biol*, 2003, 327(3): 619–629.
- [8] Dalal S, Hanson P I. Membrane traffic: What drives the AAA motor? [J] *Cell*, 2001, 104(1): 5–8.
- [9] Rockel B, Jakana J, Chiu W, et al. Electron cryo-microscopy of VAT, the archaeal p97/CDC48 homologue from *Thermoplasma acidophilum* [J]. *J Mol Biol*, 2002, 317(5): 673–681.
- [10] Rouiller I, De LaBarre B, May A P, et al. Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2002, 9(12): 950–957.
- [11] Lai C C, Lai Z X, Fang Z Z, et al. Proteomic analysis of early somatic embryogenesis in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. *Sci Agri Sin*, 2012, 45(9): 1775–1790.
赖呈纯, 赖钟雄, 方智振, 等. 龙眼体细胞胚发生早期的蛋白质组学 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(9): 1775–1790.
- [12] Lai Z X, Pan L Z, Chen Z G. Establishment and maintenance of longan embryogenic cell lines [J]. *J Fujian Agri Univ*, 1997, 26(2): 160–167.
赖钟雄, 潘良镇, 陈振光. 龙眼胚性细胞系的建立与保持 [J]. *福建农业大学学报*, 1997, 26(2): 160–167.
- [13] Chen C L, Lai Z X. Synchronization regulation of embryogenesis of embryogenic calli and their histological observations in longan (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. *J Fujian Agri Univ (Nat Sci)*, 2002, 31(2): 192–194.
陈春玲, 赖钟雄. 龙眼胚性愈伤组织体胚发生同步化调控及组织细胞学观察 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2002, 31(2): 192–194.
- [14] Fang Z Z, Lai Z X. Preliminary synchronization regulation at the middle developmental stage during longan somatic embryogenesis [J]. *Chin Agri Sci Bull*, 2009, 25(1): 152–155.
方智振, 赖钟雄. 龙眼体胚发生中期发育同步化的初步调控 [J]. *中国农学通报*, 2009, 25(1): 152–155.
- [15] Fang Z Z, Lai Z X, Lai C C, et al. Proteomics on somatic embryogenesis during the middle stage in longan [J]. *Sci Agri Sin*, 2011, 44(14): 2966–2979.
方智振, 赖钟雄, 赖呈纯, 等. 龙眼体细胞胚发生中期的蛋白质组学研究 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(14): 2966–2979.
- [16] Lin Y L, Lai Z X. Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree [J]. *Plant Sci*, 2010, 178(4): 359–365.
- [17] Nishikori S, Esaki M, Yamanaka K, et al. Positive cooperativity of the p97 AAA ATPase is critical for essential functions [J]. *J Biol Cell*, 2011, 286(18): 15815–15820.
- [18] Ye Y, Meyer H H, Rapoport T A. Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: Dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains [J]. *J Cell Biol*, 2003, 162(1): 71–84.
- [19] Song C C, Wang Q, Li C C H. ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP) D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(6): 3648–3655.
- [20] de LaBarre B, Christianson J C, Kopito R R, et al. Central pore residues mediate the p97/VCP activity required for ERAD [J]. *Mol Cell*, 2006, 22(4): 451–462.
- [21] Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, et al. Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(49): 47358–47365.
- [22] Briggs L C, Baldwin G S, Miyata N, et al. Analysis of nucleotide binding to P97 reveals the properties of a tandem AAA hexameric ATPase [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(20): 13745–13752.
- [23] Fujimura T, Komamine A. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture [J]. *New Phytol*, 1980, 86(2): 213–218.
- [24] Rienties I M, Vink J, Borst J W, et al. The *Arabidopsis* SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14 λ and the PP2C phosphatase KAPP [J]. *Planta*, 2005, 221(3): 394–405.
- [25] Ma J, He Y H, Wu C H, et al. Cloning and molecular characterization of a *SERK* gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2012, 30(1): 195–203.