



## 研究资源

### A Resource

# 大青杨纤维素合酶(*PuCesA7*) cDNA 的克隆及反义表达载体的构建

许雷<sup>1</sup>, 刘一星<sup>1</sup>, 方连玉<sup>2</sup>

1 东北林业大学生物质材料科学与技术教育部重点实验室, 哈尔滨, 150040

2 东北林业大学林学院, 哈尔滨, 150040

✉ 通讯作者: xulei\_fly@126.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 116 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0116

收稿日期: 2011 年 10 月 08 日

接受日期: 2011 年 10 月 20 日

发表日期: 2011 年 11 月 17 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

许雷等, 2011, 大青杨纤维素合酶(*PuCesA7*) cDNA 的克隆及反义表达载体的构建, 分子植物育种(online) Vol.9 No.116 pp.1847-1850 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0116)

引用格式(英文):

Xu et al., 2011, Cloning of a cDNA Fragment Encoding a Cellulose Synthase (*PuCesA7*) and Construction of Antisense Expression Vector, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.116 pp. 1847-1850 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0116)

**摘要** 本研究提取大青杨叶片总 RNA, 经 RT-PCR 扩增得到约 1.3 kb 的 cDNA 片段, 将其克隆到 pMD18-T 载体。经测序, 该片段长 1 304 bp, 与欧洲颤杨 *PtrCesA7* 全长 cDNA 序列比对, 核苷酸相似性为 97%。克隆到载体上的 *PuCesA7* 片段用 *Sac* I 和 *Kpn* I 双酶切, 反向插入到植物表达载体 pROK II 的 P35S 启动子和 Tnos 终止子之间, 成功构建 pROK II -P7 *Sac* I *Kpn* I 反义表达载体。利用该植物表达载体对大青杨的遗传转化正在进行中, 以确定 *PuCesA7* 基因的初步功能。

**关键词** 大青杨; 纤维素合酶; 反义表达载体

## Cloning of a cDNA Fragment Encoding a Cellulose Synthase (*PuCesA7*) and Construction of Antisense Expression Vector

Xu Lei<sup>1</sup>, Liu Yixing<sup>1</sup>, Fang Lianyu<sup>2</sup>

1 Key Laboratory of Bio-Based Material Science and Technology, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, P.R., China

2 College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, 150040, P.R., China

✉ Corresponding author, xulei\_fly@126.com; ✉ Authors

**Abstract** A cDNA fragment encoding a cellulose synthase (*PuCesA7*) was amplified by Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) by using total RNA from young leaves of *Populus ussuriensis* Kom. and cloned into a pMD18-T vector. Sequencing analysis showed that the cDNA fragment shared highly homogeneity (97%) to the cDNA sequence of *PtrCesA7*. The cloned cDNA fragment was further introduced into binary vector pROK II in a reverse orientation with its upstream promoter (P35S), giving an expressing plasmid named pROK II -P7 *Sac* I *Kpn* I that containing the antisense *PuCesA7* gene. In order to identifying the tentative function of *PuCesA7*, transformation of the gene into *Populus ussuriensis* Kom. is still under way.

**Keywords** *Populus ussuriensis* Kom.; Cellulose synthase; Antisense expression vector

### 研究背景

纤维素是自然界中含量最多, 分布最广的一种多糖, 从原始的单细胞生物如海藻、鞭毛和细菌等到高大的乔木到处可见。植物体内纤维素的含量因植物种类而差异显著, 如棉花、木棉种子的绒毛中纤维素含量可达到 95%~99%, 是天然的最纯纤维素; 麻、亚麻的韧皮纤维中含有的纤维素含量约为 80%~90%; 其次是木材和竹材, 纤维素含量约为 40%~50%。拟南芥基因组测序工作的完成推动了植物纤维素合成酶基因功能的深入研究。随着对拟南

芥 *CesA* 基因家族了解的越来越多, 针对有限的几种纤维素合酶基因已应用多种遗传学方法在其功能研究上取得了初步的成果, 并提出了纤维素在生物体内合成的可能途径。第 1 个林木纤维素合酶基因是美国密西根大学的学者在 2000 年从欧洲颤杨中克隆获得的 *PtrCesA1* 基因(Wu et al., 2000), 随后又发现 *PtrCesA2*, *PtrCesA3*, *PtrCesA4*, *PtrCesA5*, *PtrCesA6* 和 *PtrCesA7* 等基因(Samuga et al., 2002; Kalluri et al., 2003; 2004)。通过分析以上基因的表达时期和部位, 认为 *PtrCesA1*, *PtrCesA2* 和 *PtrCesA3*

基因可能存在于同一个纤维素合酶复合体(CSC)中, 与细胞次生壁的合成有关(Samuga et al., 2004); *PtrCesA4*, *PtrCesA5* 和 *PtrCesA7* 基因可能与细胞初生壁的形成有关(Kalluri et al., 2004); *PtrCesA6* 与茎的伸长生长有关(Liang et al., 2004)。Ranik 和 Myburg (2006)克隆获得6个巨桉纤维素合酶的全长cDNA。定量 PCR 结果显示: *EgCesA1*, *EgCesA2* 和 *EgCesA3* 在木质部等次生长组织中的转录水平较高, 而在叶片等初生生长的组织中较低; *EgCesA4* 和 *EgCesA5* 在初生壁快速分化组织中表达上升; *EgCesA6* 在所有的组织中表达均较弱(Ranik and Myburg, 2006)。但有关纤维素合酶的具体合成机制尚有许多问题有待深入研究。

大青杨是我国东北地区森林环境下重要的杨树乡土树种, 具有适应能力强、生长快、干型好、木材轻软、材质白色、致密、耐朽力强等优点, 是造纸及胶合板材极好的原料。作为黑龙江省东部山区速生丰产林的主栽品种之一, 生长量最高, 人工栽培技术掌握最充分, 在山地森林环境下造林(更新)成效最明显, 特别是在幼林阶段, 是很有希望的短轮伐期工业用材树种。了解纤维素合酶的生物合成机制, 希望利用基因工程等手段来增加纤维素含量以改善大青杨的品质, 培育出更适于造纸的新型树种。

## 1 结果与分析

### 1.1 cDNA 片段的获得

以反转录获得的第一条链 cDNA 为模板进行扩增, 结果可见长度为 1 304 bp 的片段(图 1)。用 NCBI 中的 BLAST 程序将获得的 cDNA 序列在 GenBank 中进行序列同源性比对分析, 结果显示与欧洲颤杨 *PtrCesA7* 基因全长 cDNA 序列相似性为 97%, 将此序列命名为 *PuCesA7* (GenBank 登录号 HQ288419)。

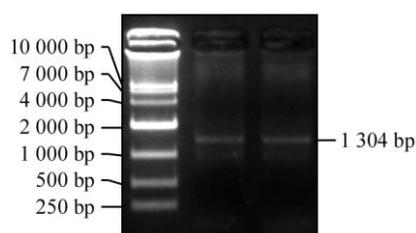


图 1 带酶切位点的 *PuCesA7* 基因 cDNA 扩增结果  
Figure 1 Amplification of *PuCesA7* cDNA fragment with *Sac* I and *Kpn* I site

### 1.2 T-载体克隆及鉴定

重组 T-载体经 PCR 初步鉴定后, 选取阳性克隆进行双酶切鉴定(图 2)及序列测定。结果表明, 酶切片段为目标基因。将经双酶切的 *PuCesA7* cDNA 片段命名为 *P7Sac* I *Kpn* I, 重组 T-载体命名为 pMD18-T-*P7Sac* I *Kpn* I。

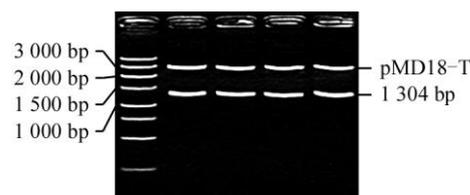


图 2 pMD18-T-*P7Sac* I *Kpn* I 质粒的双酶切  
Figure 2 Endoenzyme digestion of pMD18-T-*P7Sac* I *Kpn* I

### 1.3 反义表达载体构建

对重组质粒 pMD18-T-*P7Sac* I *Kpn* I 和植物表达载体 pROK II 进行双酶切(*Sac* I, *Kpn* I), 将目的片段反向连接到表达载体上。对构建的反义表达载体进行 PCR 和双酶切验证, 琼脂糖凝胶电泳结果显示可切出目的片段(图 3), 测序结果亦表明目的片段与植物表达载体连接正确。反义表达载体构建策略见(图 4), 将构建的反义表达载体命名为 pROK II -*P7Sac* I *Kpn* I。

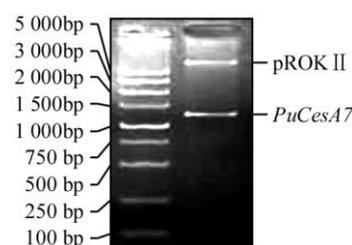
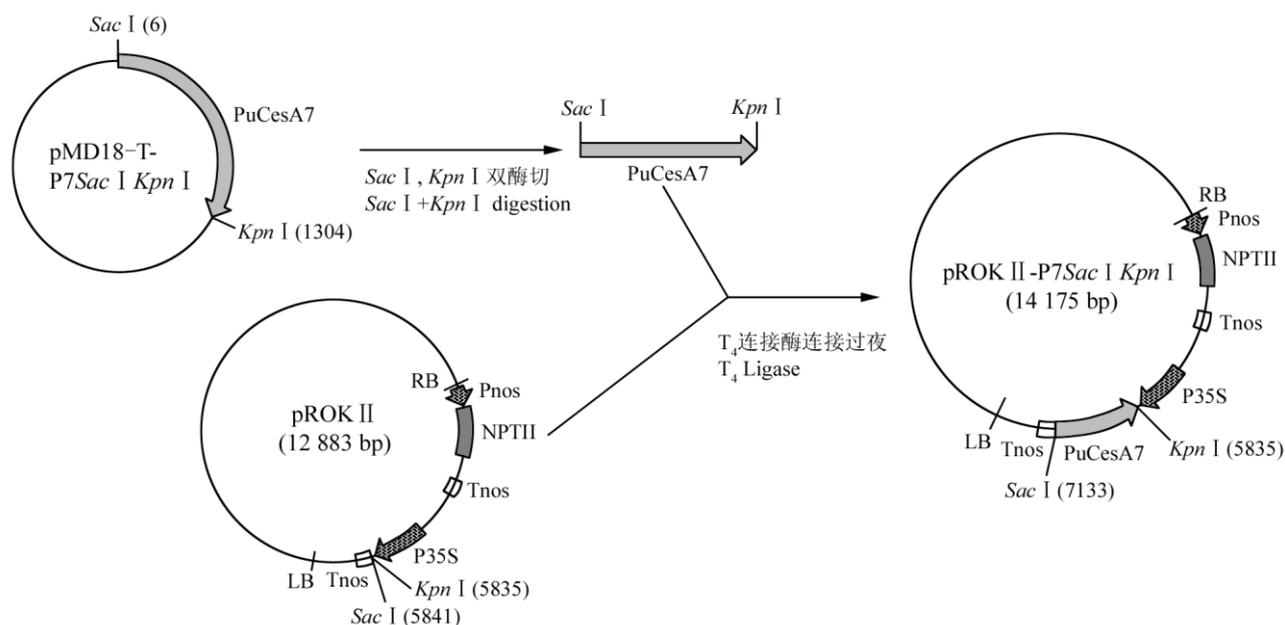


图 3 反义表达载体 pROK II-*P7Sac* I *Kpn* I 的双酶切鉴定  
Figure 3 Identification of constructs of pROK II-*P7Sac* I *Kpn* I by endoenzyme digestion

## 2 讨论

反义 RNA 的设计没有必要使用全长的 cDNA 序列, 也不需要了解目的基因的详细调控知识(孟博和朱大海, 2001, 国外医学遗传学分册, 24(6): 289-292)。对真核生物而言, 针对 5'非编码区设计的反义 RNA 要优于针对编码区的设计, 可能是因为这些非编码序列能够调控编码序列 RNA 和蛋白质的合成以及蛋白质空间结构的形成。由于反义 RNA 可专一抑制特定基因的表达而不影响其它基因, 因此只要将一个无启动子的克隆序列以反向形

图4 pROK II-P7Sac I *Kpn* I 反义表达载体的构建Figure 4 Construction of pROK II-P7Sac I *Kpn* I expression vector

式与某启动子连接, 并通过载体将之导入受体细胞中, 就可使细胞合成特异性的反义 RNA, 进而调控相关基因的生物功能(许本波等, 2003), 常用来研究基因失活与表型变化间的相互关系。

生物体内纤维素的合成都与  $\beta$ -1,4 糖苷键有关, 这是一个相当复杂的过程, 并受到多种因素的调控。不同植物的纤维素在合成过程中, 需要多种纤维素合酶基因的共同调控, 并且这些纤维素合酶基因的作用也是不同的。Burton 等(2000)利用病毒诱导植物纤维素合成酶基因沉默的方法将 3 个与 *CesA* 基因相关的 cDNA 片段分别插入马铃薯 X 病毒载体中, 接种到烟草(*Nicotiana benthamiana*)来研究 *CesA* 基因的功能, 试验结果出现受感染的植株节间缩短、小叶和侏儒的症状, 并且叶表面由于缺少纤维素而表现出细胞膨胀, 叶片中的多聚糖含量降低了 25%。这些现象说明 cDNA 片段沉默了一个或多个纤维素合成酶基因的表达, 导致 *CesA* 基因转录水平的降低(Burton et al., 2000)。Burn 等(2002)通过构建反义表达载体并转化拟南芥进行纤维素合成酶基因的功能分析, 结果表明拟南芥 *CesA1*, *CesA2*, *CesA3* 3 个基因存在连锁表达的情况, 由此推断这 3 个基因可能组合在一个纤维素合酶复合体(CSC)中并参与纤维素的生物合成, 主要功能与细胞初生壁的合成相关(Burn et al., 2002)。本研究成功构建了大青杨纤维素合酶 *PuCesA7* 基因的反义表

达载体, 下一步工作将通过转基因大青杨的表型差异来确定纤维素合酶 *PuCesA7* 基因的初步功能以及与其它纤维素合酶基因的相互关系。

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料

取大青杨幼嫩叶片, 采用改良  $2 \times$  CTAB 法提取叶片总 RNA(许雷等, 2010)。根据欧洲颤杨 *PtrCesA7* 基因全长 cDNA 序列设计一对带特异酶切位点的引物 P7F (5'-GAGCTCGGATGAGGGCAGG CAGCCACTTTC-3')和 P7R (5'-GGTACCATGCTT CCCTGTTCTTTGACTTCT-3')。cDNA 第一链的合成, 采用 20  $\mu$ L 反转录体系: 5 $\times$  Buffer (4  $\mu$ L), RNase Inhibitor (1  $\mu$ L), Dntp (2.5 mmol/Leach) (4  $\mu$ L), Oligo dT18 (1  $\mu$ L), Random Primer (1  $\mu$ L), AMV 反转录酶 XL (2  $\mu$ L), 总 RNA (2  $\mu$ L), RNase-free H<sub>2</sub>O (5  $\mu$ L)。54 $^{\circ}$ C 延伸至少 2 h, 冰上放置终止反应。T<sub>4</sub> DNA 连接酶, 限制性内切酶(*Sac* I, *Kpn* I), AMV 反转录酶 XL, pMD18-T 载体, LA *Taq* 聚合酶购自 TAKARA 公司; 胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒为 PROMEG 公司。

#### 3.2 cDNA 片段的扩增

建立 20  $\mu$ L PCR 反应体系: 10 $\times$  Buffer (2  $\mu$ L), dNTP (2.5 mmol/L each) (1  $\mu$ L), 5'特异引物(10  $\mu$ mol/L) (0.5  $\mu$ L), 3'特异引物(10  $\mu$ mol/L) (0.5  $\mu$ L), cDNA 第一

条链(1  $\mu$ L), LA Taq 聚合酶(0.3  $\mu$ L), ddH<sub>2</sub>O (14.7  $\mu$ L)。扩增程序为 94℃下预变性 5 min; 94℃下变性 30 s, 57℃退火 45 s, 72℃延伸 4 min, 35 个循环; 72℃延伸 15 min。对 PCR 产物进行 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段。

### 3.3 T-载体克隆鉴定

目的片段与 T-载体连接按试剂盒指导操作, 重组质粒转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞。经过蓝白斑筛选、特异引物 PCR 鉴定筛选出阳性克隆; 初步鉴定为阳性克隆的质粒进行双酶切(*Sac* I, *Kpn* I), 能切出相应大小片段的克隆即为阳性克隆; 对阳性克隆作 DNA 序列测定, 测序工作由北京六合华大基因科技股份有限公司测序。

### 3.4 反义表达载体的构建和鉴定

选择植物表达载体 pROK II 质粒, 该载体的选择标记为 NPT II, 即新霉素磷酸转移酶(Neomycin Phosphotransferase II)。分别对重组质粒和植物表达载体 pROK II 进行双酶切(*Sac* I, *Kpn* I), 回收目的片段。用 T<sub>4</sub> DNA ligase 连接目标片段与载体, 将连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 提取质粒。经 PCR 初步鉴定后, 再用 *Sac* I, *Kpn* I 双酶切鉴定阳性克隆。阳性克隆送测序鉴定。

### 作者贡献

许雷为本研究的构思者及负责人, 试验设计和试验研究的执行人; 方连玉参与试验设计, 试验结果分析, 数据分析及论文初稿的写作; 刘一星指导试验设计, 数据分析, 论文写作与修改工作。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由中央高校基本科研业务费专项资金(41401005)及林业工程学科创新引智基地项目(B080160)资助。

### 参考文献

- Burn J.E., Hocart C.H., Birch R.J., Cork A.C., and Williamson R.E., 2002, Functional analysis of the cellulose synthase genes *CesA1*, *CesA2*, and *CesA3* in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.*, 129(2): 797-807
- Burton R.A., Gibeaut D.M., Bacic A., Findlay K., Roberts K., Hamilton A., Baulcombe D.C., and Fincher G.B., 2000, Virus-induced silencing of a plant cellulose synthase gene, *Plant Cell*, 12(5): 691-706
- Kalluri U.C., and Joshi C.P., 2003, Isolation and characterization of a new, full-length cellulose synthase cDNA, *PtrCesA5*

from developing xylem of aspen trees, *J. Exp. Bot.*, 54(390): 2187-2188

Kalluri U.C., and Joshi C.P., 2004, Differential expression patterns of two cellulose synthase genes are associated with primary and secondary cell wall development in aspen trees, *Planta*, 220(1): 47-55

Liang X., and Joshi C.P., 2004, Molecular cloning of ten distinct hypervariable regions from the cellulose synthase gene superfamily in aspen trees, *Tree Physiol.*, 24(5): 543-550

Ranik M., and Myburg A.A., 2006, Six new cellulose synthase genes from *Eucalyptus* are associated with primary and secondary cell wall biosynthesis, *Tree Physiol.*, 26(5): 545-556

Samuga A., and Joshi C.P., 2002, A new cellulose synthase gene (*PtrCesA2*) from aspen xylem is orthologous to *Arabidopsis AtCesA7(irc3)* gene associated with secondary cell wall synthesis, *Gene*, 296(1-2):37-44

Samuga A., and Joshi C.P., 2004, Cloning and characterization of cellulose synthase-like gene *PtrCSLD2* from developing xylem of aspen trees, *Physiol. Plant.*, 120(4): 631-641

Wu L., Joshi C.P., and Chiang V.L., 2000, Axylem-specific cellulose synthase gene from aspen (*Populus tremuloides*) is responsive to mechanical stress, *Plant J.*, 22(6): 495-502

Xu B.B., Zhang X.K., and Li J.N., 2003, Application of antisense RNA technique in crop genetic improvement, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 19(3): 84-88 (许本波, 张学昆, 李加纳, 2003, 反义RNA 技术在现代作物遗传改良中的应用, *中国农学通报*, 19(3): 84-88)

Xu L., Liu Y.X., and Fang L.Y., 2010, Method of Extracting RNA Quickly from Leaves of *Populus ussuriensis* kom., *Shengwu Jishu Tongxun (Letters in Biotechnology)*, 21(6): 857-860 (许雷, 刘一星, 方连玉, 2010, 大青杨叶片总 RNA 的快速提取方法, *生物技术通讯*, 21(6): 857-860)



**5<sup>th</sup>Publisher**是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>