

水稻几丁质酶基因(*Oschi*) cDNA 的克隆及序列分析*

陈爱葵¹, 俞陆军², 樊剑鸣², 冯冬茹², 王金发²

(1. 广东教育学院生物系, 广东 广州 510303; 2. 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘要: 以成功克隆大蕉几丁质酶基因(*MpChi-1*)时设计的一对引物, 采用 RT-PCR 技术从广亲和水稻品种(*Oryza sativa* L. Cpslo17)中扩增到一水稻几丁质酶的全长 cDNA, 长 1 115 bp, 命名为 *Oschi*; 此序列已在 GenBank 中注册, 登录号为 EU045451; 将 *Oschi* 基因核苷酸测序结果在 NCBI 服务器上用 BLAST 搜索软件进行同源性基因检索; 并将 *Oschi* 的 cDNA 序列及氨基酸序列与大蕉及其它单子叶植物的相应序列进行多重序列排列比较并构建系统树; 结果显示此基因具有编码 I 类几丁质酶的基本结构; 与大蕉核苷酸序列相比同源性为 99%, 氨基酸序列同源性为 99%, 与预测登记的最相近的水稻 [*Oryza sativa* (japonica cultivar-group)] 核苷酸序列相比同源性为 98%, 氨基酸序列同源性为 98%; 广亲和水稻 *Oschi* 基因与大蕉 *MpChi-1* 基因的序列及蛋白结构有较高的一致性。

关键词: 几丁质酶; 基因; 克隆; 序列分析; 水稻 (*Oryza sativa* L.); 遗传工程

中图分类号: Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2008) 02-0099-04

几丁质是绝大多数真菌细胞壁的主要成份, 而在植物中却不存在。但高等植物普遍存在着几丁质酶, 并可通过几丁质酶催化几丁质的水解, 使植物具有抵御真菌侵染的能力^[1]。根据几丁质酶的氨基酸序列特点及在细胞中位置, 通常将几丁质酶分为 6 类。目前研究最多的第 I 类几丁质酶, 是一种碱性蛋白, 多位于液泡, 其氨基酸一级结构组成依次是: ①N-端信号肽区; ②富含半胱氨酸的几丁质结合区 (heveindomain); ③可变间隙区; ④催化结构区^[2]。

在正常情况下, 高等植物的几丁质酶表达水平很低, 而当植物体遭受到病原真菌、细菌和病毒侵染, 机械创伤或乙烯处理时, 其表达活性显著增强。特别是在 $\beta-1, 3$ 葡聚糖酶的协同作用下, 可明显抑制真菌的生长^[3]。因此, 植物中的几丁质酶在抗真菌性病害中起重要作用。现在已对许多植物几丁质酶基因进行了分离克隆和测序, 许多科学家通过转基因方法成功地将外源几丁质酶基因导入植物。提高了转几丁质酶基因的酶活性, 并使转基因植物表现出较强的抗病性^[4]。近年来, 几丁质酶基因在植物抗病基因工程中的应用越来越广泛, 成为植物抗真菌病害基因工程的热点之一。

本研究利用设计的引物, 采用 RT-PCR 技术从水稻 (*Oryza sativa* L. Cpslo17) 叶片中克隆出

水稻几丁质酶基因的 cDNA 片段, 亚克隆测序后对该基因的结构以及分子进化特点进行了分析。为进一步研究该基因的结构及表达打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料及试剂

水稻 (*Oryza sativa* L. Cpslo17) 及菌种 *E. coli* (DH5 α) 为中山大学生命科学学院遗传实验室保存; 质粒 pMD18-T Vector、TaqDNA 聚合酶、限制性核酸内切酶、连接酶等试剂购自宝生物工程(大连)有限公司; PCR 产物纯化试剂盒购自 H. Q and Q 安徽优晶生物公司, 质粒提取试剂盒购自普博欣公司, *Oschi* 特定引物利用本实验室克隆大蕉基因时设计的一对引物。

1.2 方法

1.2.1 水稻总 RNA 的提取 参照英伟创津公司试剂盒说明提取水稻叶片的总 RNA。

1.2.2 cDNA 的合成 cDNA 的合成反应照试剂盒 Improm-IITM Reverse Transcriptase (Promega 公司) 的说明进行。

1.2.3 cDNA 扩增 采用在克隆大蕉几丁质酶基因时设计的一对引物:

P11 : (5' - ACCAGAAGCCGTGTCGAAGG - 3');
P12 : (5' - CGACGCCGACACCAACAAGCG - 3')。

* 收稿日期: 2007-09-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30571069)

作者简介: 陈爱葵 (1962 年生), 女, 副教授; 通讯联系人: 王金发; E-mail: lsswjf@mail.sysu.edu.cn

以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环后, 72 °C 延伸 10 min。

1.2.4 PCR 产物的克隆 PCR 产物通过 $w = 1.0$ % 琼脂糖电泳检测是否有特异性条带生成; 用 PCR 产物纯化试剂盒回收 DNA, 回收的 PCR 产物 DNA 与 TaKaRa 公司的 pMD18-T Vector 连接。

1.2.5 质粒提取 采用普博欣公司质粒提取试剂盒, 按说明书提取质粒。提取的质粒用 TaKaRa 公司的 10 × K Buffer, *Hind* III, Fermentas 公司的 *Bam*H I 进行双酶切鉴定。

1.2.6 快速转化 快速法^[5]将重组质粒转化 *E. coli* (DH5 α) 感受态细胞。

1.2.7 重组子的筛选及鉴定 s Amp 抗性筛选、菌落 PCR 筛选、重组质粒 PCR 鉴定及 *Hind* III, *Bam*H I 双酶切鉴定。

1.2.8 测序及序列分析 取筛选的阳性克隆送交

上海英俊公司测序。测序结果用 Blast 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 进行同源性搜索, DNA 序列及氨基酸序列的比较用 Clustal W 软件进行分析; 用 BIOEDIT 和 MEGA 软件进行系统进化分析。

2 结果与分析

2.1 RNA 提取结果

图 1 是从的叶片中提取的水稻总 RNA 电泳图谱, 图片显示提取的总 RNA 较完整。

2.2 cDNA 的合成

从水稻叶中提取的 RNA 经过反转录合成 cDNA, 见图 2。

2.3 cDNA 扩增

以 cDNA 为模板, P11、P12 为引物进行 PCR 扩增, 扩增产物经 $w = 1.0$ % 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 1 000 bp 处出现一条特异条带, 主带明显, 见图 3。

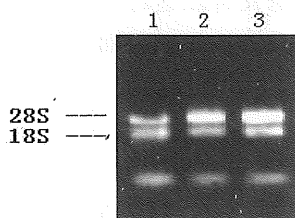


图 1 水稻叶片提取的总 RNA
Fig. 1 The mRNA extracted from leaves of rice

1、2、3: 水稻叶片提取的总 RNA

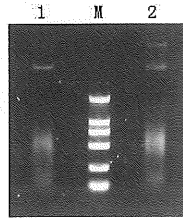


图 2 以水稻 RNA 为模板反转录的第一链
Fig. 2 The first chain reverse transcribed from rice RNA

1、2: 反转录的 cDNA 第一链;
M: DL2000 相对分子质量标准

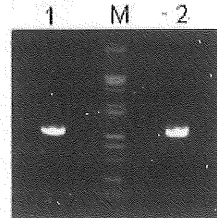


图 3 水稻几丁质酶基因 (*Oschi*) cDNA 扩增结果
Fig. 3 The result of *Oschi* cDNA amplification

1、2: cDNA 扩增产物; M: DL15000 + 2000 分子量标准

2.4 重组子的筛选结果

将片段回收纯化克隆至 pMD18-T Vector 上, 快速转化 *E. coli* (DH5 α) 感受态细胞, 经筛选、鉴定, 克隆 1 有特异带被切出来 (图 4)。

2.5 测序结果与序列分析

2.5.1 测序结果 取筛选的阳性克隆送上海英俊生物技术公司测序。将测序结果拼接, 并进行 BLAST/SEQUENCE 同源性比较分析, 进行生物信息学分析及保守区域分析和开放阅读框 (ORF) 与编码蛋白质分析, 结果见图 5。

2.5.2 序列分析 所克隆的水稻 *Oschi* 基因的 cDNA 共 1 115 bp, 经生物信息学分析有 978 bp 的可译编码框, 其中起始密码子 ATG 位于第 70 ~ 72 bp, 终止密码子 TAA 位于第 1 048 ~ 1 050 bp, 预测编码 326 个氨基酸, 有 69 bp 的 5' 非编码区和

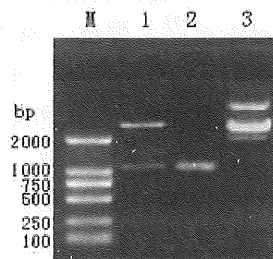


图 4 水稻几丁质酶基因 (*Oschi*) cDNA 的双酶切鉴定

Fig. 4 Characterization of *Oschi* cDNA by a double digest

M: DL2000 分子量标准; 1: 重组质粒的 *Hind* III and *Bam*H I 双酶切产物; 2: 阳性对照 (cDNA 扩增目的带); 3: 阴性对照 (空载质粒)

68 bp 的 3' 非编码区, 预测编码产物相对分子质量约为 33 500, 等电点为 4.78。

1 5' CTT GCA TGC CTG CAG GTC GAC GAT TCC GGG ATC CAG CAA CTC AGC GAT CTT ATA TTT ACC
 61 CAA CAC ACC ATG AGA GGG CTG GCT GTG GTG GGC ATG GTG GGC AGC GGC TTC CTC GCG GCG
 M R A L A V V A M V A T A F L A A
 (1)
 121 GGC GTG CAT GGC GAG CAG TGC GGC AGC CAG GGC GGC GGC GTG TGC CCC AAC TGC GTC
 A V H A E Q C G S Q A G G A V C P N C L
 (2)
 181 TGC TGC AGC CAG TTC GGC TGC GGC TGC ACC TGC GAC TAC TGC GGC GGC GGA TGC CAG
 C C S Q F G W C C G S T S D Y C G A G C C Q
 (3)
 241 AGC CAG TGC TGC GGC GGC TGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 S Q C S A A G C G G G G G P T P P S G G G
 (4)
 301 GGC AGC GGC GTC GGC TGC GGC TGC GGC TGC GGC TGC GGC TGC GGC TGC GGC TGC GGC TGC GGC
 G S G V A S I Y S R S L F D Q M L L H H
 361 AAC GAT GGC GGC TGC GGC GGC AGC AAC TTC TAC ACC TAC GAC GGC TTC GTC GGC GGC GGC
 N D A A C P A S N F Y T Y D A F V A A A
 421 AGC GGC TTC GGC GGC TGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 S A F P C F A A A G G D A D T N K R E V
 (4)
 481 GGC GGC TTC CTT GGC CAG ACC TCC CAG ACC ACC GGC GGC TGC GGC ACC GGC GGC GGC GGC
 A A F L A Q T S H E T T G G W A T A P D
 541 GGC GGC TAC ACC TGC GGC TAC TGC TGC AAG GAG GAG AAC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 G P Y T W G Y C F K E E N G G A A G P D
 601 TAC TGC CAG CAG ACC GGC CAG TGC GGC TGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 Y C Q Q S A Q W P C A A G K K Y Y G R G
 661 CTT ATC CAG TGC TAC AAC TTC AAC TGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 C C I Q L S Y N F N Y G P A G Q A I G A D
 721 CTG CTC GAC CAG GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 L L G D P D L V A S D A T V S F D T A F
 781 TGC TTC TGC ATG GGC GGC CAG TGC GGC ACC GGC TGC GGC CAG GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 W F W M A P Q S P K P S C H A V A T G Q
 841 TGC ACC GGC TGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 W T P S A D D Q A A G R V P C Y G V I T
 901 AAC ATC ATC AAC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 N I I N G G L E C G H G E D D R V A V R
 961 ATC GGC TTC TAC AAC GGC TAC TGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC
 I G F Y K R Y C D I L G V S Y G A N L D
 1021 TGC TAC GGC CAG AGC GGC TTC GGC TGC TAA GCT TGC GCT ACC TAG CTT CCA CAG AGC GGT
 C Y G Q R P F G S *** 3'
 1081 AAA TAT AAG ATC GCT GAG TTG CTG GAT CCG GGA AT

图5 *Oschi* 基因的核苷酸序列及推断的氨基酸序列
 Fig. 5 sequence of gene *Oschi* and deduced amino acid sequence

(1) N端信号肽区; (2) 几丁质结合区; (3) 可变间隙区; (4) 催化结构区

水稻 *Oschi* 基因通过 NCBI 保守结构域数据库注释见图6。

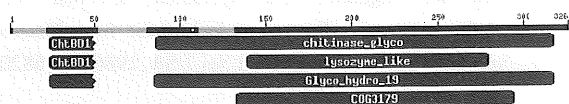


图6 *Oschi* 基因通过 NCBI 保守结构域数据库注释结果
 Fig. 6 annotation of gene *Oschi* by NCBI conservative structure data bank

可见水稻 *Oschi* 基因符合编码 I 类几丁质酶基因的特征。其中包括: (1) 约 21 个氨基酸的 N-端信号区; (2) 约 40 个氨基酸的富含半胱氨酸的几丁质酶结合区; (3) 富含甘氨酸的可变间隔区 (绞链区); (4) 催化结构区。

2.6 *Oschi* 同源性分析与系统进化分析

从水稻 *Oschi* 基因推导的氨基酸序列与大蕉 *MpChi-1* 基因氨基酸序列相似性很高, 只有 3 个氨基酸的差异, 分别为读码框内的第 727 (G/A), 836 (T/A) 和 907 (G/A) 3 个核苷酸不同, 以致所翻译的氨基酸第 242 (A/T), 296 (V/D),

320 (G/S) 不同。通过与国际核酸和蛋白质数据库的 Blast 比较, 与大蕉几丁质酶基因 *MpChi-1* 有较高的同源性, 达 99%。与其它单子叶植物比较, 相似性不如大蕉, 包括几个较近的水稻品种, 都不如大蕉, 一致性不到 99%。对 GenBank 同源性搜索获得的其它植物几丁质酶基因及已报道的水稻几丁质酶基因氨基酸序列, 系统进化分析结果见图7。

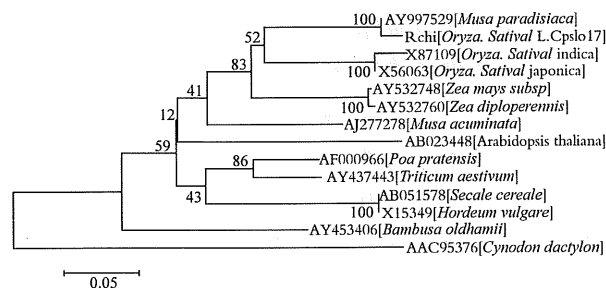


图7 水稻 *Oschi* 和其它植物几丁质酶氨基酸序列的系统进化树构建

Fig. 7 construction a cladogram of amino acid sequence of rice *Oschi* and chitinase from other plant

对 GenBank 同源性搜索获得的其它植物几丁质酶基因氨基酸序列进行系统进化分析, 发现水稻 *Oschi* 最先与大蕉 (AY997529) 聚类, 接着与水稻 (X87109, X56063)、玉米 (AY532748, AY532760)、尖叶蕉 (AJ277278)、拟南芥 (AB023448) 聚类合并, 然后与草地早熟禾 (AF000966)、小麦 (AY437443)、黑麦 (AB051578)、大麦 (X15349)、绿竹 (AY453406)、狗牙根 (AAC95376) 聚类合并。大蕉和水稻几丁质酶能聚为一类, 序列比较和分子系统树提示大蕉和水稻几丁质酶有着相似的进化进程。

3 讨论

水稻几丁质酶基因 (*Oschi*) 编码 I 类几丁质酶, *Oschi* 肽链的 hevein 结构域包括 40 个氨基酸, 其中 Cys 有 9 个, 占 22.5%; Cys 在不同的蛋白质中的 hevein 结构域中是严格保守的, 麦胚凝集素蛋白 wga 具有结合几丁质或其它 N-乙酰氨基寡聚糖残基的能力, 它含有 4 个 hevein 结构域, 每个 hevein 结构域在相同的位置形成二硫键^[6]。*Oschi* 肽链可能与 wga 类似, 通过二硫键形成指状结构, 具有结合几丁质的功能。双子叶植物中 I 类几丁质酶的间隔区富含 Gly, Pro, Thr; 单子叶植物中的则富含 Gly 和 Arg, 水稻几丁质酶基因 (*Oschi*) 的序列分析也见富含 Gly 和 Arg (图5)。

推测的氨基酸包含有将近 40 个氨基酸的 N 端半胱氨酸富集区和高度保守的糖基水解酶 19 家族

几丁质酶结构域, 这两个区域通过多变的脯氨酸-甘氨酸富集的绞链区分开。N 端半胱氨酸富集区被认为是几丁质结合区^[7]。N 端区域由疏水的氨基酸组成并且和已经知道的信号肽序列有很高的相似性并可能从成熟的多肽中被切除^[8]。据报道几丁质酶缺少定位到植物液泡的 C 端靶向序列, 因此该酶可能定位在细胞外^[9]。根据图 5 推测的氨基酸序列可确定该水稻几丁质酶属于第一类几丁质酶, 且是否定位于非原质体还有待于进一步的实验研究。

几丁质酶是植物体中与防御有关的一种次生水解酶, 是植物广谱防御机制的一个成分^[10], 它能催化真菌细胞壁的重要成分—几丁质的水解, 从而抑制真菌的生长增殖, 提高植物的抗真菌能力。而植物体中尚未发现几丁质酶作用的底物, 所以, 几丁质酶在植物体中诱导与积累, 对于增强植物的抗病能力有重要作用。自从 1986 年, Broglie 首次从菜豆中克隆分离了几丁质酶基因^[11], 迄今已从多种植物中克隆分离了几丁质酶基因并被用于转基因植物中, 转化植株同野生株相比, 抗病性有了明显的提高。

本研究克隆的水稻几丁质酶基因 (*Oschi*) 与大蕉几丁质酶基因 (*MpChi-1*) 的氨基酸序列比较, 一致性高达 99%, 说明两种植物的几丁质酶基因有着相似的进化进程, 两基因在功能上, 在各自植物中的作用及抗病机理是否也是如此一致, 如何应用于植物抗真菌病害中, 还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] SHIBUYA N, MINAMI E. Oligosaccharide signalling for defense responses in plant[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 159: 223-233.
- [2] LI H, ZHU Q, BAI Y Y. DNA Structure analysis of Chitinase gene clone RCH8 from rice[J]. *Acta Phytophysiol Sinica*, 1997, 23(4): 391-398.
- [3] SELA-BURRLAGE M B, Ponstein A S. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and $\beta-1,3$ -glucanases exhibit anti-fungal activity[J]. *Plant Physiology*, 1993, 101: 857-863.
- [4] YAMAMOTO T, IKETANI H, IEKI H, et al. Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens[J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19: 639-646.
- [5] 王立良, 王淼, 陈连凤, 等. 冷冻复苏法高效转化大肠杆菌[J]. *生物技术通讯*, 2002, 13(3): 194.
WANG Liling, WANG Miao, CHEN Lianfeng, et al. Efficient transformation of *E. coli* by freezing-thawing method[J]. *Letters in Biotechnology*, 2002, 13(3): 194.
- [6] WRIGHT C S, GAVILLINES F, PETERSON D L. Primary structure of wheat germ agglutinin isolectin 2. Peptide order deduced from X-ray structure[J]. *Biochem*, 1984, 23: 280.
- [7] ASENSIO J L, CANADA F J, SIEBERT H C, et al. Structural basis for chitin recognition by defense proteins: GlcNAc residues are bound in a multivalent fashion by extended binding sites in hevein domains[J]. *Chem Biol*, 2000, 7: 529-543.
- [8] HILLER K, GROTE A, SCHEER M, et al. PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 375-379.
- [9] COLLINGE D B, KRAH K M, MIKKELSEN J D, et al. Plant chitinases[J]. *Plant J*, 2000, 3: 31-40.
- [10] VAN LOON L C, VAN STRIEN E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins[J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1999, 55: 85-97.
- [11] BROGLIE K E, GAYNOR J J, BROGLIE R M, et al. Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83: 6820.

The Analysis of the Cloning and Sequence of the cDNA Gene Encoding Chitinase from Rice (*Oschi*)

CHEN Ai-kui¹, YU Lu-jun², FAN Jian-ming², FENG Dong-ru², WANG Jin-fa²

(1. Biology Department, Guangdong Education Institute, Guangzhou 510303, China;

2. School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Using a degenerate primer designed for cloning chitinase cDNA from plantain banana (*MpChi-1*), we obtained a full-length cDNA clone named *Oschi* from rice by RT-PCR. The rice chitinase cDNA was 1 115 bp long and registered in GenBank with the accession number, EU045451. Using Clustal W online, we compared the cDNA sequence and amino acid sequence of *Oschi* with that from the plantain banana and the other monocotyledon, and constructed a phylogeny tree. The result shows that *Oschi* has some basic structures which are common among chitinase I gene. It shares a 99% homology with the gene sequence as well as amino sequence with those from plantain banana, and a 98% homology with that from *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) which has been reported. These evidences supported that *Oschi* and *Mpchi-1* were highly identical to the gene sequences and protein structures.

Key words: chitinase; genes; cloning; sequence analysis; rice; genetic engineering