

甘薯叶绿体 *rbcL* 基因的克隆与序列分析

王玉华¹, 吴忠义², 贾敬芬¹, 张秀海², 黄丛林^{2,*}

¹西北大学生命科学学院, 西安 710069; ²北京市农林科学院北京农业生物技术研究中心, 北京 100097

摘要: 根据烟草、水稻和菠菜叶绿体的全基因组序列设计引物, 以甘薯的叶绿体基因组DNA为模板, PCR扩增包含甘薯叶绿体 *rbcL* 完整基因(GenBank 登录号为 AY942199)在内的一段序列。序列分析表明: 此片段的全长为 1 627 bp, 包括 1 443 bp 的编码区序列在内, 推测编码 480 个氨基酸, 同时构建了此片段的限制性酶切图谱。相似性比较显示, 此基因编码区序列与烟草、菠菜、小麦、水稻、玉米、矮牵牛、紫花苜蓿、拟南芥、莨苳、葡萄以及甜菜的 *rbcL* 基因核苷酸的同源性为 85%~98%, 氨基酸的同源性为 92%~95%。

关键词: 甘薯; 叶绿体基因; *rbcL* 基因; 序列分析

Cloning and Sequence Analyses of the *rbcL* Gene from Chloroplast of Sweet Potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]

WANG Yu-Hua¹, WU Zhong-Yi², JIA Jing-Fen¹, ZHANG Xiu-Hai², HUANG Cong-Lin^{2,*}

¹College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China; ²Beijing Agro-Biotechnology Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: A pair of primers used in amplifying chloroplast fragment of sweet potato was designed according to the corresponding sequences in tobacco, rice and spinach chloroplast genomes. The fragment containing *rbcL* gene was cloned from sweet potato chloroplast genome. Sequencing analysis indicated that this fragment was 1 627 base pairs (bp) in size. The complete open reading frame of *Ipomoea batatas rbcL* gene is 1 443 bp encoding a polypeptide of 480 amino acids. The restriction map of this cloned fragment was also established. The BLAST results showed that the homologies of this gene with tobacco, spinach, wheat, rice, maize, petunia, alfalfa, *Arabidopsis thaliana*, belladonna, grape and sugar beet were from 85% to 98%, and the homologous amino acid sequences were from 92% to 95%.

Key words: sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.]; chloroplast gene; *rbcL* gene; sequence analyses

叶绿体基因工程作为一项转基因技术, 具有核转化不具备的独特优点: 高效表达目的基因, 环境安全性好, 消除位置效应, 无基因沉默现象, 原核基因表达方式等。但是到目前为止, 几乎所有的叶绿体转化成功的报道都集中于衣藻和烟草等模式植物。最近, 在油菜(Hou 等 2003)、拟南芥(Sikdar 等 1998)、水稻(Khan 和 Maliga 1999)、马铃薯(Sidorov 等 1999)、番茄(Maliga 2003; Wurbs 等 2007)、胡萝卜(Kumar 等 2004a)、矮牵牛(Zubko 等 2004)、大豆(Dufourmantel 等 2004, 2005)、莨苳(Lelivelt 等 2005; Kanamoto 等 2006)、棉花(Kumar 等 2004b)和甘蓝(Liu 等 2007)等植物中获得成功。限制叶绿体转化技术扩展受体范围的主要因素之一是大多数植物的叶绿体基因组序列尚不清楚, 因此无法确定用于载体构建的同源重组片段和外源基因的插入位点。有研究表明, 在高等植物的叶绿体基

因组中编码核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco, E.C. 4.1.1.39)大亚基的 *rbcL* 基因高度保守(Hasebe 等 1992; Andersson 和 Backlund 2008)。本文报道克隆得到甘薯叶绿体 *rbcL* 基因的完整序列, 为在甘薯中开展叶绿体基因工程建立了基础。

材料与方法

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] 品种‘京3’无茵苗由北京市农林科学院小麦中心提供。以不含生长调节物的 MS 固体培养基培养, 每隔 4 周切取茎段继代一次。

收稿 2008-05-26 修定 2008-07-21

资助 北京市自然科学基金(5062012)、陕西省教育厅自然科学基金专项基金(06JK175)和西北大学校内基金(05NW43)。

* 通讯作者(E-mail: conglinh@126.com; Tel: 010-51503801)。

取30 g左右继代培养3周左右的组培苗叶片,先在4℃下黑暗饥饿过夜,之后用于叶绿体基因组DNA (chloroplast DNA, cpDNA)提取。提取参考高盐低pH法(龚小松和阎隆飞1991),结合2次差速离心技术,先分离纯化叶绿体,后用常规CTAB法提取叶绿体DNA,各取2 μL cpDNA,分别用*Bam*HI和*Pst*I进行酶切,检测cpDNA的质量。纯化的叶绿体DNA稀释到一定浓度后用于PCR扩增。

根据烟草、水稻和菠菜叶绿体全基因组全序列资料,用软件Oligo 6设计引物,引物序列分别为S-rbcL19U: 5'-GGGAGGGATTTATGTCACC-3', S-rbcL21L: 5'-ATCTTTGTTGTATTCGGCTCA-3'。以甘薯叶绿体基因组DNA为模板,用高保真的DNA聚合酶扩增包括*rbcL*基因在内的一段叶绿体片段。PCR反应在PTC-100 Peltier基因扩增仪上进行,反应程序为:94℃预变性3 min;94℃变性1 min,57℃退火1 min,72℃延伸1 min,共30个循环;最后于72℃下延伸10 min。PCR产物以琼脂糖凝胶电泳分离,目的产物用锋利的刀片割下,用胶回收试剂盒回收纯化,之后克隆进pGEM-T载体,转化大肠杆菌DH5α菌株,选取阳性克隆提取质粒DNA,酶切鉴定后测序,并用生物信息学软件分析核苷酸序列、氨基酸序列以及同源性与亲缘的关系。

结果与讨论

1 甘薯叶绿体DNA的提取

由图1可以看出,提取的甘薯cpDNA质量完

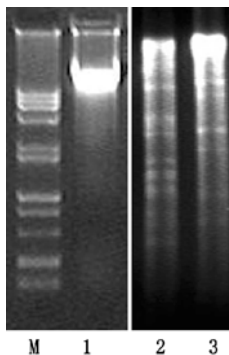


图1 甘薯cpDNA及其限制性酶切电泳图谱

Fig.1 Sweet potato cpDNA and its electropherogram of restriction enzyme digestion

M: DL2000+DL15000 标记; 1: 甘薯cpDNA; 2: 经*Bam*HI消化后的甘薯cpDNA; 3: 经*Pst*I消化后的甘薯cpDNA。

好,基本上无降解,再经限制性酶切后电泳,可以见到一系列大小不同的条带,不像基因组总DNA酶切后呈完全弥散状。由于cpDNA酶切图的背景稍强,所以提取的cpDNA还存在核基因组DNA的污染。但总的来说,提取的cpDNA质量基本上可以满足后续试验中PCR扩增的要求。

2 甘薯*rbcL*基因的克隆与序列分析

以S-rbcL19U和S-rbcL21L为引物,在TaKaRa的PrimeSTAR HS DNA聚合酶作用下,以甘薯cpDNA为模板,PCR扩增获得甘薯叶绿体*rbcL*基因片段。电泳结果显示,PCR产物约为1.6 kb(图2),与预计的大小相符。所得PCR产物回收后,将该片段连接到pGEM-T载体上,得到重组质粒,由上海生物工程公司测序,测序结果已经登陆GenBank,登陆号为AY942199。序列分析表明,重组质粒中插入片段全长1 627 bp,其中包含一个1 443 bp的*rbcL*基因编码区(图3),推测编码480个氨基酸(图4),比烟草叶绿体*rbcL*基因多9个碱基3个氨基酸。

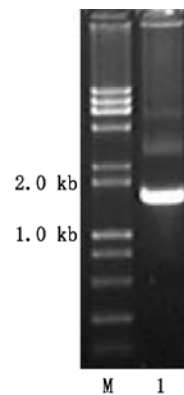


图2 甘薯*rbcL*基因片段的扩增

Fig.2 Amplification of sweet potato *rbcL* gene fragment
M: DL2000+DL15000 标记; 1: 甘薯叶绿体*rbcL*基因扩增片段。

3 甘薯叶绿体*rbcL*基因片段的酶切图谱

利用DNAMAN软件对甘薯叶绿体*rbcL*基因片段进行限制性酶切分析,限制性酶切的图谱(图5)显示,在筛选的24个常见的限制性内切酶中,有9个酶切位点位于该片段中。

4 不同植物的*rbcL*基因之间的相似性比较和进化分析

将克隆到的甘薯叶绿体*rbcL*基因与其他物种的*rbcL*基因进行同源性的比较的结果(表1)显示,该

```

1 GGGAGGGATT TATGTCACCA CAAACAGAGA CTAAAGCAAG TGTTGGATTC AAAGCTGGTG
61 TAAAAGACTA CAAATTGACT TATTATACAC CTGAGTACCA AACCAAAGAT ACTGATATCT
121 TGGCAGCATC CCGAGTAACT CCTCAACCCG GAGTTCACC TGAAGAAGCA GGGGCTGCGG
181 TAGCTGCGGA ATCTTCTACT GGTACATGGA CAACTGTGTG GACCGATGGA CTTACCAGCC
241 TTGATCGGTA CAAGGGGCGA TGCTACCGCA TCGAGCGCGT TATTGGAGAA AAAGATCAAT
301 ATATTGCTTA TGTAGCTTAC CCTTTAGACC TTTTGAAGA AGGTTCTGTT ACCAACATGT
361 TTACTTCCAT TGTGGGTAAT GTATTTGGGT TCAAAGCACT GCGCGCTCTA CGTCTGGAAG
421 ATTTACGAAT CTCTACGGCT TATATTAATA CTTTTCAAGG CCCGCCTCAC GGAATCCAAG
481 TTGAGAGAGA TAAATTGAAC AAGTATGGTC GTCCTCTGTT GGGATGTAAT ATTAACCTA
541 AATTTGGGTT ATCTGCTAAA AACTACGGTA GAGCGGTTTA TGAATGTCTT CGCGGTGGAC
601 TTGATTTTAC CAAAGATGAT GAGAACGTAA ACTCACAACC ATTTATGCGT TGGAGAGACC
661 GPTTCTTATT TTGTGCCGAA GCACCTTATA AAGCACAGGC TGAAACAGGT GAAATCAAAG
721 GACATFACTT GAATGCTACT GCAGGTACAT CGGAAGAAAT GATGAAAAGA GCTATATTTG
781 CTAGAGAATT GGGAGTTCGG ATTGTAATGC ATGACTACTT AACAGGGGGA TTCACTGCAA
841 ATACTTCTTT GGCTCATTAT TGCCGAGATA ATGGTCTACT TCTTCACATC CACCGTGCAA
901 TGCATGCAGT TATTGATAGA CAGAAGAATC ATGGTATGCA CTTCCGTGTA CTAGCTAAAG
961 CGTTACGTCT GTCTGGTGGG GATCACATTC ACGCGGGTAC CGTAGTAGGT AAACCTGAAG
1021 GGGAAAGAGA GATTACTTTG GGCTTTGTTG ACTTACTACG TGATGATTTT GTTGAACAAG
1081 ACCGAAGTCG CGGTATTTAT TTCACTCAAG ATTGGGTCTC TTTACCAGGT GTTCTGCCTG
1141 TTGCTTCAGG GGGTATTCAC GTTTGGCATA TGCTGCTCTT GACCGAGATC TTTGGGGATG
1201 ATTCCGTACT ACAGTTCGGG GGAGGAACTT TAGGGCACCC TTGGGGTAAT GCGCCAGGTG
1261 CCGTAGCTAA TCGAGTCGCT CTAGAAGCAT GTGTACAAGC TCGTAACGAA GGACGTGATC
1321 TTGCTCGGGA AGGTAATGAA ATTATTCGCG AGGCTTGCAA ATGGAGCCCT GAACATCTG
1381 CTGCTTGTGA GGTATGGAAG GAGATCCGAT TTGAATTTAA ACCAGTGGAT ACCTTGGATC
1441 CAGGTACAGC TAAATATAA ATGAAATAAA TACCTTAGCA GATAAATTAT TCGGAGATAA
1501 AGGATAGGGA GAAGGAACTC AAGGAATTAC CCTTCCTTCT CTTCTCTTAA TTGAATTGCA
1561 ATTCAACTCG GCCCAATCTT TTAATAATAC TAAAAGGTAA AAGGATTTGAG CCGAATACAA
1621 CAAAGAT

```

图3 甘薯叶绿体 *rbcL* 基因序列

Fig.3 Nucleotide sequence of sweet potato chloroplast gene *rbcL*
方框内为 *rbcL* 基因的起始密码子和终止密码子。

```

1 MSPQTETKAS VGFKAGVKDY KLTYYTPEYQ TKDTDILAAS RVTPQPGVPP EEAGAAVAAB
61 SSTGTWTTVW TDGLTSLDRY KGRCYRIERV IGEKDQYIAY VAYPLDLFEE GSVTNMFTSI
121 VGNVFGFKAL RALRLEDLRI STAYIKTFQG PPHGIQVERD KLNKYGRPLL GCTIKPKLGL
181 SAKNYGRAVY ECLRGGLDFT KDDENVNSQP FMRWRDRFLF CAEALYKAQA ETGEIKGHYL
241 NATAGTCEEM MKRAIFAREL GVPIVMHDYL TGGFANTSL AHYCRDNGLL LHIHRAMHAV
301 IDRQKNHGMH FRVLAKALRL SGGDHIHAGT VVGKLEGERE ITLGFVDLLR DDFVEQDRSR
361 GIYFTQDWVS LPGVLPVAVS GIHVHMPAL TEIFGDDSVL QFGGGTLGHP WGNAPGAVAN
421 RVALEACVQA RNEGRDLARE GNEIIREACK WPELSAACE VWKEIRFEFK PVDTLDPGTA

```

图4 甘薯叶绿体基因 *rbcL* 的氨基酸序列

Fig.4 Amino acid sequence of *rbcL* gene from sweet potato chloroplast genome

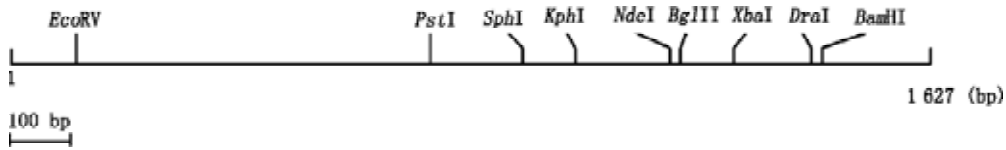


图5 甘薯叶绿体 *rbcL* 基因的限制性酶切图谱
Fig.5 The restriction map of sweet potato chloroplast gene *rbcL*

表1 不同物种 *rbcL* 基因间的相似性比较
Table 1 Comparison of *rbcL* gene from sweet potato with those from other plants

种名	<i>rbcL</i> 基因核苷酸相似性 /%	<i>rbcL</i> 基因氨基酸相似性 /%
甘薯(<i>Ipomoea batatas</i>)	100	100
烟草(<i>Nicotiana tabacum</i>)	98	95
莨菪(<i>Atropa belladonna</i>)	98	95
菠菜(<i>Spinacia oleracea</i>)	90	93
玉米(<i>Zea mays</i>)	86	92
水稻(<i>Oryza sativa</i>)	85	92
紫花苜蓿(<i>Medicago sativa</i>)	89	92
矮牵牛(<i>petunia hybrida</i>)	93	94
小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	85	92
拟南芥(<i>Arabidopsis thaliana</i>)	89	93
葡萄(<i>Vitis vinifera</i>)	91	94
甜菜(<i>Beta vulgaris</i>)	90	92

基因编码区序列与烟草、菠菜、小麦、水稻、玉米、矮牵牛、紫花苜蓿、拟南芥、莨菪、葡萄和甜菜的 *rbcL* 基因核苷酸的同源性为 85%~98%，而氨基酸的同源性为 92%~95%，据此可以确定所克隆的基因为甘薯叶绿体 *rbcL* 基因。氨基酸序列的同源程度大于核苷酸序列的同源程度，说明在某些物种中，Rubisco酶大亚基要实现其功能，在氨基酸水平上必须具有相当的保守性。

此外，用 DNASTAR 软件，以 *rbcL* 基因序列为指标，分析了甘薯、烟草、菠菜、小麦、水稻、玉米、矮牵牛、紫花苜蓿、拟南芥、莨菪、葡萄及甜菜之间的亲缘关系，建立的进化树(图6)显示：参与分析的 12 个物种在进化树上呈现两大分支，A 支包括茄科的烟草、莨菪、矮牵牛，旋花科的甘薯，藜科的甜菜和菠菜，葡萄科的葡萄和十字花科的拟南芥，B 支包括豆科的苜蓿和禾本科的水

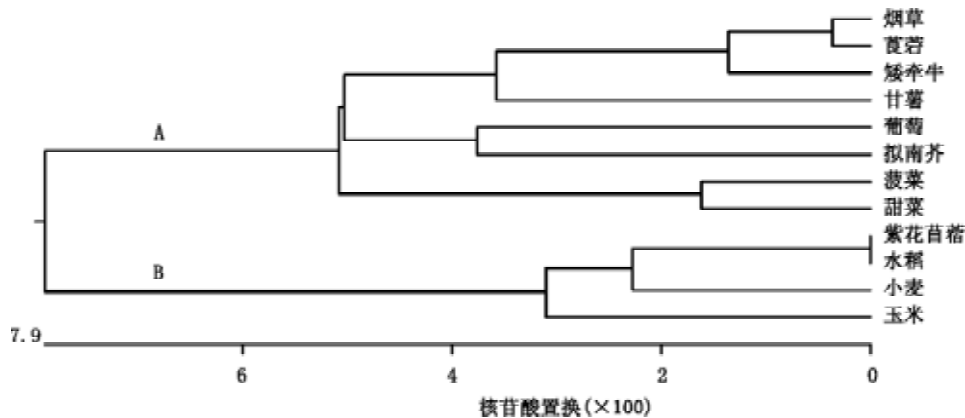


图6 基于 *rbcL* 编码区构建的进化树
Fig.6 The dendrogram of sweet potato based on *rbcL* ORF

稻、小麦和玉米; A支全部由双子叶植物构成, B支中除苜蓿外, 其余均为单子叶植物。除葡萄科的葡萄和十字花科的拟南芥划分为一个子分支与植物学分类结果不符外, 其余均与植物学分类的结果一致, 这可能与该基因中遗传密码子的变异有关, 暗示仅以 *rbcl* 基因核苷酸序列为指标研究植物系统关系的结果并不确切, 应该结合氨基酸序列分析的结果, 并与植物学分类的结果相对应。

参考文献

- 龚小松, 阎隆飞(1991). 高等植物叶绿体 DNA 提纯方法改进. 科学通报, 36 (6): 467~469
- Andersson I, Backlund A (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiol Biochem*, 46: 275~291
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garçon F, Peltier G, Ferullo JM, Tissot G (2004). Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Mol Biol*, 55: 479~489
- Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, Garçon F, Muhr C, Jansens S, Pelissier B, Peltier G, Dubald M (2005). Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* cry1Ab protoxin. *Plant Mol Biol*, 58: 659~668
- Hasebe M, Ito M, Kofuji R, Iwatsuki K, Ueda K (1992). Phylogenetic relationships in gnetophyta deduced from *rbcl* gene sequences. *J Plant Res*, 105: 385~391
- Hou BK, Zhou YH, Wan LH, Zhang ZL, Shen GF, Chen ZH, Hu ZM (2003). Chloroplast transformation in oilseed rape. *Transgenic Res*, 12: 111~114
- Kanamoto H, Yamashita A, Asao H, Okumura S, Takase H, Hattori M, Yokota A, Tomizawa K(2006). Efficient and stable transformation of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids. *Transgenic Res*, 15 (2): 205~217
- Khan MS, Maliga P (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nat Biotechnol*, 17: 910~915
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004a). Plastid-expressed *betaine aldehyde dehydrogenase* gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol*, 136: 2843~2854
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004b). Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Mol Biol*, 56: 203~216
- Lelivelt CL, McCabe MS, Newell CA, Desnoo CB, van Dun KM, Birch-Machin I, Gray JC, Mills KH, Nugent JM. Lelivelt CL et al (2005). Stable plastid transformation in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Plant Mol Biol*, 53: 763~774
- Liu CW, Lin CC, Chen JJW, Tseng MJ (2007). Stable chloroplast transformation in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) by particle bombardment. *Plant Cell Rep*, 26 (10): 1733~1744
- Maliga P (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol*, 21 (1): 20~28
- Sidorov VA, Kasten D, Pang SZ, Hajdukiewicz PT, Staub JM, Nehra NS (1999). Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plastid marker. *Plant J*, 19: 209~216
- Sikdar SR, Serino G, Chaudhuri S, Maliga P (1998). Plastid transformation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 18: 20~24
- Wurbs D, Ruf S, Bock R (2007). Contained metabolic engineering in tomatoes by expression of carotenoid biosynthesis genes from the plastid genome. *Plant J*, 49: 276~288
- Zubko MK, Zubko EI, van Zuilen K, Meyer P, Day A (2004). Stable transformation of petunia plastids. *Transgenic Res*, 13: 523~530