

香蕉果实 expansin cDNA 克隆及序列分析

陆旺金

(华南农业大学 广东省果蔬保鲜重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要: 提取成熟香蕉果肉的 RNA 并分离 mRNA, 以 mRNA 反转录合成 cDNA, 以该 cDNA 为模板, 设计 expansin 的简并引物, 进行 RT-PCR(退火温度为 50 °C), 得到的扩增产物纯化后与 pGEM-T-Easy 载体连接, 转化大肠杆菌, 任意挑选 2 个阳性克隆, 进行序列分析, 结果得到 2 个序列相同的 expansin 的 cDNA 基因片段, 命名为 *MA-Exp3*(以示与已登录的香蕉 *MA-Exp1* 和 *MA-Exp2* 的区别), *MA-Exp3* 中存在 expansin 基因的保守区域, 即 8 个半胱氨酸残基和 3 个色氨酸残基, 它编码 177 个氨基酸, 与 *MA-Exp1* 的核苷酸同源性为 74.2%, 氨基酸同源性为 86.4%。

关键词: 香蕉果实; expansin; cDNA 克隆; 序列分析

中图分类号: S667.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2003)03-0040-03

Expansin(膨大素)是 1992 年首次从黄瓜幼苗下胚轴中分离并鉴定的一类能够诱导细胞壁伸展的活性细胞壁蛋白^[1]。Expansin 基因的表达量与胚轴^[1]、胚芽鞘^[2]、节间^[3]、叶片^[4]和根系^[5]等的生长有关。果实 expansin 的研究工作相对较少, 其中研究较多的是番茄及草莓果实。目前已从番茄^[6-7]、草莓^[8-9]、桃^[10]、梨(Hiwasu 等, 个人通信)及荔枝(陆旺金等, 待发表)等果实中克隆出了 expansin 基因, 这些基因有的与果实生长发育有关, 有的与果实后熟软化相关。转基因的研究进一步证明 expansin 基因在果实软化中的作用^[11], 并且转基因的番茄果实品质不受影响^[12]。国内对 expansin 的报道集中于对棉花及大豆幼苗的研究^[13, 14]。目前, 基因库中已登录了香蕉 2 个 expansin 基因, 登录的 *MA-Exp1*(AY083168)的全长为 1 098 bp, 编码 255 个氨基酸, *MA-Exp2*(AF539540)为 291 bp 的基因片段。这里, 笔者报道香蕉果实一个新的 expansin 基因(将其命名为 *MA-Exp3*)片段, 测定该片段的序列, 并采用序列分析软件研究该基因片段与基因库中其他 expansin 基因的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的香蕉购于自由市场, 品种为[*Musa* sp. (AAA group, Cavendish subgroup) cv. Grand Nain]。

1.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

总 RNA 的提取基本按 Wan 等^[15]的方法, 采用 oligod(T)30(Takara, Shiga, Japan)分离 mRNA, 分离方法按说明书进行。

1.3 引物设计与合成

引物是根据基因库中已登录的 expansin 氨基酸保守序列设计的。上游引物的序列是: 5'-G(GC)(N)CA

(TC)GC(N)AC(N)TT(CT)TA(CT)GG(N)G-3', 下游引物的序列是: 5'-(TC)TGCCA(AG)TT(TC)TG(N)CCCCA(AG)TT-3'(N=A, C, G, T), 两个核苷酸引物对应的氨基酸序列分别是: A/GHATFYGG 和 NWGQNWQ; 引物由日本 Amersham pharmacia 公司合成。

1.4 cDNA 克隆及序列分析

以成熟的香蕉果肉 mRNA 为底物, 反转录合成单链 cDNA, 采用该单链 cDNA 为模板, 设计 expansin 的简并引物, 进行 RT-PCR。RT-PCR 条件为: 95 °C 5 min, 1 个循环, 再进行 35 个循环(95 °C 1 min, 50 °C 2 min, 72 °C 2 min), 循环完毕后, 72 °C 再延伸 10 min; RT-PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖电泳后, 切下目的片段, 经回收纯化后与 pGEM-T Easy 载体(Promega, Madison, WI)连接, 转化 JM109 大肠杆菌, 在 LB/AMP/IPTG/X-Gal 平板上筛选阳性克隆, 随机挑选经 *Eco*RI 酶切确认插入的 2 个质粒作序列分析。序列分析采用 DSQ-1000(Shimadzu, Kyoto, Japan)DNA 序列分析仪进行, 以-21M13 或 M13 作为序列分析的引物, 序列分析参照使用手册提供的方法(Amersham Pharmacia, Little Chalfont, UK)进行。

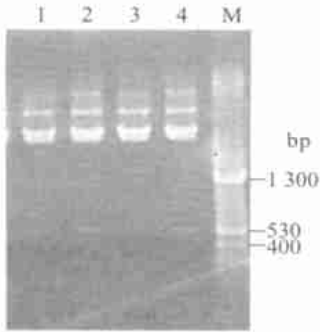
2 结果与分析

2.1 RT-PCR 产物的扩增

以反转录合成的 cDNA 为模板, 并以 expansin 简并引物为引物, 作 RT-PCR, 得到 1 个与目的片段大小相当的 530 bp 左右的条带, 切下该条带, 经 GENECLAN II 药盒回收纯化后, 与 pGEM T-Easy 载体连接, 挑选白色克隆, 经 *Eco*RI 酶切确认片段插入情况(图 1), 再随机挑选插入的 2 个质粒进行序列分析。

2.2 序列分析及同源性比较

序列分析结果见图 2。所挑选的 2 个质粒序列



1~4: 重组质粒酶切 1~4: pLc-Exp+EcoRI, M: Markers
图 1 重组质粒用 EcoRI 酶切结果
Fig. 1 The electrophoresis pattern of pGEM-T Easy vector digest-
ed with EcoRI of MA-Exp fragments

相同, 该片段为 531 个碱基, 编码 177 个氨基酸(将其
定为 *MA-Exp3*), *MA-Exp3* 片段中存在 expansin 基因
的保守序列, 即在氨基酸的 N-terminal 存在 8 个半胱
氨酸残基, 在 C-terminal 存在 3 个色氨酸残基(注: 应
为 4 个, 另有 1 个色氨酸残基可能存于该片段之外
的 3' 端). *MA-Exp3* 与已登录的 *MA-Exp1* 的碱基同源
性为 74.2%, 氨基酸同源性为 86.4%(注: 由于登
录的 *MA-Exp2* 仅为 291 bp 的片段, 难以进行同源性

比较), 通过与基因库中的其他 expansin 基因氨基酸
同源性相比较, 发现 *MA-Exp3* 与草莓 *FaExp2* 的同源
性为 92.1%, 与番茄 *Le-Exp1* 的同源性为 74%, 与桃
Pp-Exp1 的同源性为 91.5%(图 3).

```
GGACACGCTACGTTTACGGTGGGGTGATGCATCTGGCACTATGGGTGGTGCA 54
G H A T F Y G G G D A S G T M G G A
TGTGGGTATGGTAACCTGTACGCCAAGGCTATGGCACAACACTGCAGCTCTT 108
C G Y G N L Y S Q G Y G T N T A A L
AGCACTGCTCTATTCAACAATGGCTTAAGCTGTGGATCCTGCTATGAGATGAAA 162
S T A L F N N G L S C G S C Y E M K
TGTGGCAATGACCCCAATGGTGCCTCCCGGATCGGTCTTGTCACTGCCACC~ 216
C G N D P K W C L P G S V I V T A T
AATTCTGCGCTCTTAACAATGCCTTGGCAAATGACATGGTGGCTGGTGCAAT 270
N F C P L N N A L A N D N G G W C N
CCTCCCTCCCAACATTTTGACATGGCTGAGCTGCTTCTTCAGATTGCTCAA 324
P P L Q H F D M A E P A F L Q I A A
TACCGGCGCGAATCGTCCGATTTCTCCGAAGGGTCCCTGTGTGAAGAAA 378
Y R A G I V P I S F R R V P C V K K
GGAGGAATAAGGTTTACTGTCAATGGTCACTCTACTTCAACTGGTGTCTGATC 432
G G I R F T V N G H S Y F N L V L I
ACAAACGTTGCTGGCGCGGAGATGTGCATTCTGTGTCATCAAGGGTCCAAA 486
T N V A G A G D V H S V S I K G S K
ACAGGTTGGCAACAATGTCGAAGGAATCGGGTCAAAATGGCAA 531
T G W Q T M S R N W G Q N W Q
```

图 2 香蕉果实 expansin cDNA *MA-Exp3* 核苷酸序列和由此推
导的氨基酸序列
Fig. 2 The nucleotide sequence and deduced amino acid sequence
of *MA-Exp3* with primer sequence underlined

		*			*	*	*		*	
MA-Exp3	GHATFYGGGDASGTMGGACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNNGLSCGSCYEMKCGNDP. .	KWCLPGS. .	66							
MA-Exp1	AHATFYGGGDASGTMGGACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNNGLSCGACYEVRCAADDP. .	RWCLPGS. .	66							
Fa-Exp2	GHATFYGGGDASGTMGGACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNDGLSCGSCYEMRCNDNP. .	RWCLPGS. .	66							
Le-Exp1	AHATFYGGSDASGTMGGACGYGNLYSQGYGVNTAALSTALFNNGLSCGACFELKCTNTPNWKWCLPGNPS		70							
Le-Exp2	AHATFYGGGDASGTMGGACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNNGLTCGACYELTCNNA. .	QWCLQGT. .	66							
Pp-Exp1	GHATFYGGGDASGTMGGACGYGNLYSQGYGTNTAALSTALFNDGLSCGSCYEMRCSDP. .	KWCLPGS. .	66							
		*		*		*				
MA-Exp3	VIVTATNFCPLNNALANDNGGWCNPPLQHFDMAEPAFLQIAQYRAGIVPISFRRVPCVKKGIRFTVNGH		136							
MA-Exp1	IVVTATNFCPPNYALPSDNGGWCNPQRHFDLAEPAFLQIAQYRAGIVPVSFRRVACVKKGVRFTINGH		136							
Fa-Exp2	IIVTATNFCPPNFAQANDNGGWCNPPLQHFDLAEPAFLQIAQYRAGIVPVSFRRVACVKKGIRFTINGH		136							
Le-Exp1	ILITATNFCPPNYALPNDNGGWCNP RP HFDLAMPFLKLAQYRAGIVPVTYRRIPCRKQGGIRFTINGF		140							
Le-Exp2	ITVTATNFCPPNPSLPNNNGGWCNPPLQHFDLAQPAFLQIAKYKAGIVPVSFRRVPCMRKKGIRFTVNGH		136							
Pp-Exp1	IIVTATNFCPPNLAQSDNNGGWCNPPLQHFDLAEPAFLQIAQYRAGIVPVSFRRVSCVKKGIRFTINGH		136							
		#	#	#						
MA-Exp3	SYFNLVLITNVAGAGDVHSVSIKSGKTGWQTSRNWGCNQWQ		177							
MA-Exp1	SYFILVLITNVGAAGDVHAVSIKSGKTGWQRMSRNWGCNQWQ		177							
Fa-Exp2	SYFNLVLITNVAGAGDVHSVSIKSGKGWQSMSRNWGCNQWQ		177							
Le-Exp1	RYFNLVLITNVAGAGDIKVVVKGTKTNWIPLSRNWGCNQWQ		181							
Le-Exp2	SFFNLVLVTNVGGAGDIQSVSIKGSNTGWQMSRNWGCNQWQ		177							
Pp-Exp1	SYFNLVLITNVGGAGDVHSVSIKSGKTGWQMSRNWGCNQWQ		177							

图中的基因序列接受号分别是: *MA-Exp1*: AF539650; *Fa-Exp2*: 159563; *Le-Exp1*: U82183; *Le-Exp2*: AF096776; *Pp-Exp1*: AB029083. * 表示 N 端的 8
个半胱氨酸残基, # 表示 C 端的 3 个色氨酸残基

Gene bank accession numbers: *MA-Exp1*: AY083168; *Fa-Exp2*: 159563; *Le-Exp1*: U82183; *Le-Exp2*: AF096776; *Pp-Exp1*: AB029083. * stands for the eight
conserved cysteine residues in N-terminal and # stands for 3 conserved tryptophan residues in C-terminal

图 3 香蕉果实 expansin 基因氨基酸序列与番茄、草莓和桃等果实 expansin 基因氨基酸同源性比较
Fig. 3 Alignment of the banana expansin partial amino acid sequences deduced from cDNA sequence between *MA-Exp3* and *MA-Exp1*, *Fa-Exp2* from strawberry fruit, *Le-Exp* from tomato fruit and *Pp-Exp* from peach fruit using the Clustal method of DNASTAR Megalign (DNASTAR inc., Madison, WI)

3 讨论

过去对香蕉果实软化的研究多集中于对果实果胶代谢相关酶基因如 PG(多聚半乳糖醛酸酶)^[16] 和 Pectate lyase(果胶裂解酶)^[17] 等,但这些研究不能解释香蕉果实软化过程中果肉软化在极短时间内完成,而果皮软化却一直在进行这种生理现象,且番茄转基因的研究表明,果胶代谢并非果实软化的关键酶类^[18]。因此,与果实软化有关的半纤维素多糖代谢的酶基因,如 expansin 和 XET(木葡聚糖内糖基转移酶)等基因克隆、表达及与果实软化关系的研究引起了人们的关注。目前,基因库中已登录了香蕉果实 2 个 expansin 基因片段,我们又克隆出 1 个新的 expansin 基因片段,这说明,香蕉 expansin 基因也是一个由多基因编码的基因家族。基因家族各成员的表达受植物的发育时期、环境条件等的影响,并且在不同的条件下具有不同的表达特征;同时,双子叶植物细胞壁半纤维素多糖的主要成分是木葡聚糖(Xyloglucan),而香蕉是单子叶植物,其果皮果肉细胞壁半纤维素多糖的主要成分以及在软化过程中的降解、与半纤维素多糖代谢相关的酶基因 expansin 和 XET 在香蕉果实软化中的作用等我们将会进一步报道。

参考文献:

- [1] McQUEEN-MASON S J, DURACHKO D M, COSGROVE D J. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants [J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1 425—1 433.
- [2] LI Z C, DURACHKO D M, COSGROVE D J. An oat coleoptile wall protein that induces wall extension *in vitro* and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls [J]. *Planta*, 1993, 191: 349—366.
- [3] CHO H T, KENDE H. Expression of expansin gene is correlated with growth in deepwater rice [J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 1 661—1 671.
- [4] KELLER E, COSGROVE D J. Expansins in growing tomato leaves [J]. *Plant J*, 1995, 8: 795—802.
- [5] WU Y, THORNE E T, SHARP R E, et al. Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials [J]. *Plant Physiol*, 2001, 126(4): 1 471—1 479.
- [6] CATAIA G, ROSE J K C, BENNETT A B. Auxin-regulated

genes encoding cell wall-modifying proteins are expressed during early tomato fruit growth [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 527—534.

- [7] HARRISON E P, McQUEEN-MASON S J, MANNING K. Expression of six expansin genes in relation to extension activity in developing strawberry fruit [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52 (360): 1 437—1 446.
- [8] ROSE J K C, LEE H H, BENNETT A B. Expression of a divergent expansin gene is fruit specific and ripening-regulated [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5 955—5 960.
- [9] CIVELLO P M, POWELL A L, SABEHAT A, et al. An expansin gene expressed in ripening strawberry fruit [J]. *Plant Physiol*, 1999, 121(4): 1 273—1 280.
- [10] HAYAMA H, SHIMADA T, HAJI T, et al. Molecular cloning of a ripening-related expansin cDNA in peach: evidence for no relationship between expansin accumulation and change in fruit firmness during storage [J]. *J Plant Physiol*, 2000, 157: 567—573.
- [11] BRUMELL D A, HARPSTER M H, CIVELLO P M, et al. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening [J]. *Plant Cell*, 1999, 11(11): 2 203—2 216.
- [12] BRUMELL D A, HOWIE W J, MA C, et al. Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin [J]. *Postharvest Biol and Technol*, 2002, 23: 209—220.
- [13] 于晓红, 朱勇清, 卢山等. 陆地棉徐-142 种子无毛突变体的比较研究 [J]. *中国科学(C 辑)*, 2000(10): 517—522.
- [14] 李连朝, 王学臣, 荆家海. 大豆幼苗下胚轴扩张蛋白的存在及其特性 [J]. *植物学报*, 1998, 40(7): 627—634.
- [15] WAN C Y, WILKINS T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Anal Biochem*, 1994, 223: 7—12.
- [16] DOMINGUEZ-PUIGIANER E, VENDRELL M, LUDEVID M D. Differential protein accumulation in banana fruit during ripening [J]. *Plant Physiol*, 1992, 98: 157—162.
- [17] PUA E C, ONG C K, LIU P, et al. Isolation and expression of two pectate lyase genes during fruit ripening of banana (*Musa acuminata*) [J]. *Physiol Plant*, 2001, 113: 92—99.
- [18] GIOVANNONI J J, DELLA P D, BENNETT A B, et al. Expression of a chimeric polygalacturonase gene in transgenic *rin* (ripening inhibitor) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening [J]. *Plant Cell*, 1989, 1: 53—63.

Cloning and Sequencing of an Expansin cDNA Fragment in Banana Fruit

LU Wang-jin

(Guangdong Provincial Key Lab. of Postharvest Physiology and Technology of Fruits and Vegetables
South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Using PCR degenerate primers designed with reference to the conserved amino acid sequences of known expansins to amplify cDNA fragments in banana fruit by RT-PCR, a new cDNA fragment named *MA-Exp3* was cloned, whose fragment was 531 bp encoding 177 amino acids; 8 cysteine residues and 3 tryptophan residues which are supposed to be the characteristics of expansins are conserved in *MA-Exp3*; *MA-Exp3* shared 74.2% and 86.4% homologue with *MA-Exp1* at nucleotide and amino acid levels, respectively.

Key words: banana fruit; expansin; cDNA cloning; sequence

【责任编辑 柴焰】