

毛竹 *LhcaPe03* 基因在不同组织中的表达量

唐文莉

(安徽农业大学经济技术学院园林与艺术系, 合肥 231635)

摘要: 摘取毛竹幼苗嫩新鲜叶片, 提取RNA, 反转录进行RT-PCR, 先克隆捕光叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *Lhca3* 片段, 采用 RACE 扩增全长, 获得一条 1 149 bp cDNA 的基因, 检测后定名为 *LhcaPe03*。从毛竹未出土的笋芽、叶(顶端第一片新叶、老叶)、茎(茎尖、茎秆)中提取RNA备用, 根据已测的毛竹 *LhcaPe03* 基因序列设计引物, 采用实时荧光定量PCR技术, 检测毛竹 *LhcaPe03* 基因在不同部位的相对表达量。结果显示: *LhcaPe03* 基因在毛竹不同部位的表达差异明显, 茎尖和新叶中表达水平较高, 在老叶和茎秆中表达量相当低, 在笋中几乎没有表达。这说明毛竹新叶的光合能力比老叶强; 茎尖和茎秆呈绿色, 具有光合能力, 茎尖光合能力较强; 未出土的笋芽几乎不参加光合。

关键词: 毛竹; *LhcaPe03* 序列; 不同组织; 表达量

中图分类号: G250.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-1891(2019)02-0001-03

Different Tissue-specific Expressions of Gene *LhcaPe03* in *Phyllostachys edulis*

TANG Wenli

(Department of Landscape and Art, Economic and Technical College, Anhui Agricultural University, Hefei 231635, China)

Abstract: RNA was extracted from bamboo shoots tender leaves, and underwent reverse transcription RT-PCR. A segment of chlorophyll a-b binding protein *LhcaPe03* gene was first cloned, and then an 1149bp cDNA was obtained through RACE, which was named *LhcaPe03*. RNA's in earth-covered bamboo shoots, leaves and stalks were extracted for backups. Primers were designed according to determined sequence of *LhcaPe03* gene, and the expressions of *LhcaPe03* gene in different tissues of *Phyllostachys pubescens* was determined by real-time quantitative fluorescence PCR. The results showed that the expression of *LhcaPe03* gene in different tissues was significantly different, with expression of *LhcaPe03* gene in shoot tip and new leaf being higher than that in old leaf, stem and stalk, and with almost no expression in shoot. These indicated that new leaves of *Phyllostachys pubescens* had stronger photosynthetic ability than old leaves did. The green shoot tip and stalk had photosynthetic ability, with shoot tip's photosynthetic ability being stronger; the earth-covered shoots almost did not participate in photosynthesis.

Keywords: *Phyllostachys edulis*; *LhcaPe03* sequence; different tissues; expression level

毛竹(*Phyllostachys edulis*)生长快速, 光合速率高, 是目前我国分布最广、栽培面积最大的笋、材两用竹种^[1], 研究毛竹的光合基因功能具有很高的应用价值。*Lhca3* 基因是植物PS I 中捕光叶绿素结合蛋白基因的一种, 与 *Lhca2* 基因编码蛋白组成LHC I -680 同源二聚体^[2-3]。有研究表明基因在生物的不同阶段、不同部位通过差异表达来决定机体的生长、发育、衰老和病变^[4]。植物Lhc基因表达有组织异质性, 在叶片中表达水平是非常高, 在非绿色组织中是低的, 在一些组织中是不表达的^[5]。普

通的RT-PCR和Northern杂交试验很难检测到低丰度表达的基因^[6]。毛竹不同组织表达丰度未有研究, 而实时荧光定量PCR技术可以检测低丰度基因表达情况。为了了解毛竹Lhca基因家族生长发育不同阶段的表达情况, 本研究首次克隆了毛竹 *LhcaPe03* 基因的全长并对毛竹 *LhcaPe03* 基因在毛竹的叶(嫩叶和老叶)、茎(茎尖和茎秆)以及笋进行了实时定量PCR检测^[7], 以GAPDH基因^[8]作为内参基因采用相对定量的方法, 从而得出 *LhcaPe03* 基因在毛竹选定的几个组织的表达情

况,确定组织的光合能力。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

二年生毛竹(*Phyllostachys edulis* (Carr.) Lehaie) 实生苗; pGEM - T easy 载体(Promega); RNase A (TakaRa); Taq DNA 聚合酶(TakaRa); IPTG、X-gal、氨苄青霉素; Trizol RNA 提取试剂盒(Invitrigion); cDNA 合成试剂盒(Clontech); Light Cycler○R480 型荧光实时定量 PCR 仪; PCR 反应液 SYBR Premix EX Taq™ (TaKaRa)。

1.2 试验方法

1.2.1 *LhcaPe03* 基因的克隆

采用 Trizol reagent 提取毛竹幼嫩新鲜叶片 RNA^[7],分光光度计测定后于-20℃冰箱中保存备用。根据反转录试剂盒提供方法合成片段 cDNA、5'和3' cDNA。

参照 *LhcaPe01* 和 *LhcaPe02* 引物设计方法未能克隆到片段,重新运用 DNASTar 软件比对找到植物 *Lhca3* 基因序列的保守区同源性高的位点设计引物 1 和 2。以毛竹 cDNA 为模版,采用引物 1 和 2 进行梯度 PCR,梯度温度为 60~72℃。末端克隆继续采用引物 1 和 2。5'和3'末端的克隆反应条件参照基因 *LhcaPe01* 和 *LhcaPe02*。

引物 1:

5' GGTGGCCATGCTGGGTGTCGCC 3'

引物 2:

5' GAGATCAAGAACGGTTCGACTGG 3'

1.2.2 *LhcaPe03* 基因的检测与测序

片段和末端 PCR 产物均经电泳鉴别后回收,目的 DNA 经连接、1 800 V 电击转化,蓝白斑筛选, LB 培养基加入抗生素氨苄青霉素,37℃摇菌,提取质粒,用 *EcoR* I 进行单酶切鉴定,电泳确定大小符合后进行测序鉴定^[9-12]。

1.3 实时荧光定量 PCR

管家基因选定 GAPDH 基因。摘取毛竹苗的叶片(第一片新叶、老叶)、茎(茎尖、茎秆)和笋芽,3个重复。在非保守区设计引物 3 和 4 扩增 *LhcaPe03* 基因片段。定量 PCR 反应总体积 10 μL=3.6 μL 无菌水+5 μL SYBR 反应混合液+0.2 μL 引物 3+0.2 μL 4+1 μL cDNA。PCR 扩增 30 循环后效果不佳,后增加至 45 循环。

引物 3:

5' GTCGCCAGGGTCGCACTCCAG 3'

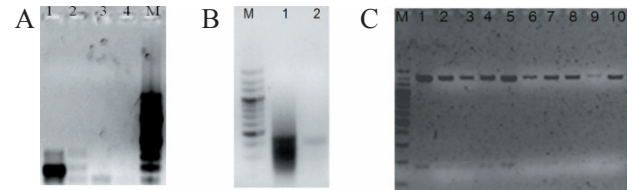
引物 4:

5' AGCAGCGGCTTGTCCTTGTCAG 3'

2 试验结果

2.1 毛竹 *LhcaPe03* cDNA 的克隆与序列分析

从图 1A 电泳检测梯度 PCR 产物,梯度温度设定为 60~72℃,A1 孔产物量最大,电泳检测扩增最优温度为 68℃。依据此温度设定温度扩增回收 DNA。片段和两端 PCR 产物电泳检测,符合预估大小,用 *EcoR* I 单酶切所得产物大小相当,测序后与基因库比对,确定实属毛竹 *LhcaPe03* cDNA 序列。



注:A:4孔均为片段PCR产物,B:1、2孔分别为5'端和3'端PCR产物,C:10孔均为为*EcoR* I 酶切产物

图1 凝胶电泳图

```
1  ACGCGGGGACACATCATCACGACACAAACACTAGATGAGAACAAGCATCACAGGAAGCTAGGATCCGATCGACATGCAAGCGCCGACG
M A A A A T
91  ATGCGCCTCTCTCCCGGGCGCTGGCGGCAAGATGCGAGGAAAGTGTTCGGCGAGGGCCGATCAAGATGCGCAAGACCGCGCGCCG
M A L S S P A L A G K I G R D V F G E G R I T M R K T G G R
181  GCCAGGCCACGACGCTGTCGACAGCGCTGCTGACGCGCGCGGACCGCGTGTCTGTCGCGCCGCTGTCCGCGAGCCCGCCGAGCTAC
A R P T A A S G S P W Y G P D R V L Y L G P L S G E P P S Y
271  CTCGACCGCGAGTCCCGAGGACTACCGGTGGACACCGCGCGGCTGTCCCGCAGCCCGAGAGAGTTCGCCAAGAACCGCGAGCTTGAG
L T G E F P G D Y G W D T A G L S A D P E T F A K N R E L E
361  GTGATCCACTCGCGGTGGCCATGCTGGGTGTGCGCGCTTCATCATCCCGGAGCGGTGCAACAAGTTCGGCGCCACTCGCGCGCCGAG
V I H C R W A M L G V A G F I I P E A C N K F G A N C G P E
451  GCGCTGTGTTCAAGACCGCGCCCTCTCTCTGGAAGCCACACCCCTCAACTACTTTCGCGCAAGCATCCCATCAACTCATCTCGCC
A V W F K T G A L L L D G N T L N Y F G N S I P I N L I L A
541  GTCATCGCGAGCTGCTCTGTCGAGCGCGCGAGTACTACAGAAATCATATGAGCTTGAGGACAACTCCACCCAGCGCGG
V I A E V V L V G G A E Y Y R I I N G L D L E D K L H P P G
631  CCGTTCGACCGCGCTCGCGCTGCGCGACCGCGACCGCGCGCGCGCGCTGCTCAAGGTGAAGGAGATCAAGAACCGGTGAGCTGCGCATCTTC
P F D P L G L A S D P D Q A A L L K V K E I K N G R L A M F
721  TCCATCTGGGGTCTTCATCCAAAGCTACGACCGCGAGCGCGCGCGCGCGCTGCGAGAACTGGCCAAAGCCTCAGCGAACCTCTCGCCAC
S M L G F F I Q A Y V T G E G P V E N L A K H L S D P F G N
811  AACCTGCTCACCGCTTTCGCTGCTGTCGCGAGGACCGCGCGCGCTGTCGAGCTGCTGTTTGTAGTCAAGCGCGCGCTGCGCGCTGCGCGTGG
N L L T V I S A G A E R T P S L
901  CGTGTGATGATCAGCTGCATCGCTGCGAGTGGCGCAAGATGCTGCTTAAATTTTACCGGGAAGATGAGAGTTGATGCTGCGCGTA
991  CGTGTAAATTTGAAAGGGGGAAGGCTGATCATTTTAAATTTCTGAAAGGACACTGCTTAAATTTTGTGCGAGAGAACTACTGCTAC
1081  TACATAATTAATCTGAAATGGTTTCCATCTCTGCTTGAAGTGCACAAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

图2 毛竹 *LhcaPe03* 基因序列和阅读框

毛竹 *LhcaPe03* 测序后通过软件分析得出(图 2):该基因序列 cDNA 长为 1 149 bp,含有 1 个 OPM (76 bp~861 bp) 和一个中止密码子,编码 262 个氨基酸,3'端含有非编码区 288 bp 和 Poly(A),5'端含有非编码区 75 bp。此基因定名为 *LhcaPe03* (GenBank: EU366147)。在 NCBI 核酸数据库中进行,得出与玉米同源性最高。

2.2 实时定量 PCR 分析

2.2.1 熔解曲线分析

在荧光实时定量 PCR 过程中,熔解温度(Tm)是区分 PCR 扩增特异产物与引物二聚体、非特异的 PCR 产物的关键^[13],熔解曲线显示试验效果很好,所有测定样本荧光量随着温度而下降,呈现明显的峰谷曲线(图 3)。

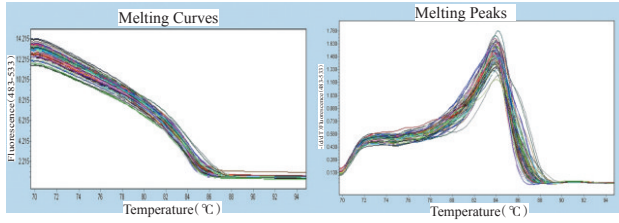
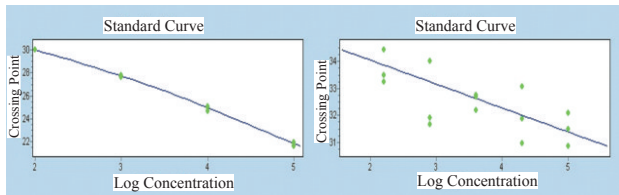


图3 毛竹LhcaPe03基因的熔解曲线

2.3.2 标准曲线分析

毛竹 GAPDH 和 *LhcaPe03* 基因标准曲线由 Light Cycler 自动测出,见图 4。结果表明:毛竹 GAPDH 和 *LhcaPe03* 基因标准曲线具有好的相关性,GAPDH 基因重复性非常好,而 *LhcaPe03* 基因标准曲线重复性差,但是趋势是明确的,试验采用 45 个循环。从图 4 中可以看出 Ct 值与 DNA 模板扩增拷贝数的对数呈反比,即 Ct 值越低,拷贝数就越大,扩增拐点循环数与浓度 Log 函数成负线性相关。



注:左图为 GAPDH 的标准曲线,右图为 *LhcaPe03* 基因的标准曲线。

图4 毛竹 GAPDH 和 *LhcaPe03* 基因的标准曲线

2.3.3 *LhcaPe03* 基因的相对定量

实时荧光定量 PCR 采用相对定量法,本试验选用内参基因 GAPDH 来矫正归化反应起始模板量,每次检测均设立标准曲线,每份样本同时扩增 *LhcaPe03* 和 GAPDH 内参照基因。试验结果采用最大二级导数法计算转录水平(mRNA)表达量,以公式表示:校正比值 $NQ = LhcaPe03$ mRNA 的拷贝数/

GAPDH mRNA 的拷贝数。得出 NQ 值如表 1。*LhcaPe03* 基因的 Ct 值偏大,基本都为 30 循环以上。PCR 循环数少于 30 时检测不到 *LhcaPe03* 的扩增产物。QPCR 检测基因表达结果显示:毛竹苗 *LhcaPe03* 基因表达水平低,在所选的 5 个组织均有表达,但表达量具有显著差异。茎尖和新叶中表达水平较高,在老叶、和茎秆中表达量相当低。在未出土的笋芽中几乎没有表达。这说明毛竹新叶的光合能力比老叶强;茎尖和茎秆呈绿色,具有光合能力,刚出土的笋芽几乎不参加光合。

表1 *LhcaPe03*基因在毛竹不同组织的表达

重复组织	1	2	3	平均
嫩叶	1.032 559	1.034 796	1.039 304	1.035 553
老叶	0.049 755	0.048 986	0.052 621	0.050 454
茎尖	2.658 979	2.654 337	2.695 241	2.669 519
茎秆	0.565 868	0.565 679	0.568 103	0.566 550
笋芽	0.000 796	0.000 788	0.000 993	0.000 859

毛竹二年生实生苗 PSI 捕光叶绿素结合蛋白基因 *LhcaPe03* 对不同的组织具有表达差异,总体上在毛竹的新老叶和茎中都有表达。*LhcaPe03* 基因的 Ct 值偏大,基本都为 30 循环以上,这说明模板浓度低,表达量较小,证明毛竹 *LhcaPe03* 基因含量少。而毛竹不同组织表达存在差异,在新叶(第一片叶)、老叶(下部)、茎尖和茎秆中表达,未出土的笋芽中含量极其少。因此 *LhcaPe03* 基因直接参与毛竹叶和茎的光合作用,尤其对新叶和茎尖的光合作用起着关键的作用。茎尖和未展开的新叶中表达水平远远高于其它组织,而这两个组织的选取的位置在植物体最顶端,说明毛竹顶端优势明显。当年生毛竹苗茎尖新绿色,具有很强的光合作用。

参考文献:

- [1] 訾兴中,李树春.安徽树木志 [M].北京:中国林业出版社,2015.
- [2] 郁飞,唐崇钦,辛越勇,等.光系统 I(PSI)的结构与功能研究进展[J].植物学通报,2001,18(3):266-275.
- [3] The properties of the chlorophyll a/b-binding proteins Lhca2 and Lhca3 using antisense inhibition[J]. Plant Physiology,2001, 127(1):150-158.
- [4] FRANK K,ANDREAS S, CHRISTOS N, et al. Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants[J].Plant Physiology,2006,140(3):793-804.
- [5] 张立国,张璐.实时定量 PCR 技术的介绍[J].生物技术,2003,13(2):39-40.
- [6] 彭书明,唐琳,叶杨,等.苦瓜 BAG 基因组织特异性表达研究[J].园艺学报 2006,33(5):1007-1010.
- [7] 程占超,马艳军,侯丹,等.毛竹 PheMADS15 基因的克隆及功能分析[J].浙江农林大学学报,2017,34(3):421-426.
- [8] 王萍,丛敏,李忆梅,等. Taqman 荧光定量 PCR 是核酸水平对管家基因 GAPDH 进行定量的好方法[J].首都医科大学学报, 2006,27(2):210-213.
- [9] 唐文莉,高健彭,彭镇华.刚竹属 3 种重要散生竹光系统 I 基因(Lhca1)的克隆、序列分析和蛋白结构预测[J].北京林业大学学报,2008,30(4):109-115.

2.4 谱系图的分析

本文利用系统聚类模型,在对大气污染物取样数据分析的基础上,对8个地区的污染特征进行了分类,现将8个地区分成四类,佛山单独为一类,这一类的地区中臭氧含量浓度较低,一氧化碳含量、二氧化硫含量和PM10含量较高;上海、海口、西安、拉萨、重庆是一类,这一类中与第一类相反,一氧化碳含量和二氧化硫含量相对较低,而臭氧含量相对较高,其余几项污染物指标居中;北京单独为一类,这一类中除二氧化硫含量居中外,剩余污染物含量都排名靠前,环境状态较为严峻;最后,酒泉单独为一类,这一类中PM2.5含量较低,但PM10含量、二

氧化硫含量和臭氧含量较高。

3 结论

根据以上的计算分析过程,能够发现地区间的污染物含量存在较大差异,根据系统聚类分析结果,能够针对性的对这些地区提供环境保护的方针政策。若继续利用聚类分析模型对大气污染物进行分类研究,进一步可以考虑不同的聚类方法对分析结果的影响。本文通过系统聚类方法对8个地区的归类可以看出,科学的统计方法在社会发展中的应用广泛,合理的数学模型辅以分析方法能够更加客观和科学的对问题进行深度的研究。

参考文献:

- [1] 樊琳琳.大气治理中的个体责任探究[J].西昌学院学报(自然科学版),2018,32(2):36-38.
- [2] 吕连宏,罗宏,张型芳.近期中国大气污染状况、防治政策及对能源消费的影响[J].能源与环境,2015,37(8):9-15.
- [3] 陈健鹏,李佐军.中国大气污染治理形式与存在问题及若干政策建议[J].发展研究,2013,10:4-14.
- [4] 童金茂,李利利,文燕梅.2008-2016年我国篮球研究热点问题的聚类分析——以12种体育核心期刊为例[J].西昌学院学报(自然科学版),2016,30(3):29-33.
- [5] 李慕容.基于聚类分析的安徽企业R&D资源分布研究[J].合肥工业大学学报(自然科学版),2004,27(11):1464-1468.
- [6] 钱堃,包为民,李偲松,等.K均值聚类分析方法在洪水预报中的应用[J].水电能源科学,2012,30(5):41-44.
- [7] 王全亮,张月芬.系统聚类法在网络学习行为分析中法应用研究[J].中国教育信息化,2016,8:90-92.
- [8] 高激.广东省自然地理环境聚类分析模型及其应用——以21个地级市为例[J].现代经济信息,2013,9:444.
- [9] 潘本锋,宫正宇.环境空气质量指数在应用中存在的问题及建议[J].中国环境监测,2015,1(11):64.
- [10] 尚子激,程一帆,康延臻,等.全国10个代表性城市空气污染指数与气象条件的关系[J].兰州大学学报(自然科学版),2018,54(1):98-103.
- [11] 李小飞,张明军,王圣杰,等.中国空气污染指数变化特征及影响因素分析[J].环境科学,2012,33(6):1936-1943.
- [12] 高会旺,陈金玲,陈静.中国城市空气污染指数的区域分布特征[J].中国海洋大学学报,2014,44(10):25-34.
- [13] 于闯,周翔.系统聚类分析法在统筹区域土地利用分区研究中的应用[J].国土资源刊,2008,1:44-46.

(责任编辑:曲继鹏)

(上接第3页)

- [10] 唐文莉,高健彭,彭镇华.毛竹(*Phyllostachys edulis*)光系统I基因LhcaPe02全长的克隆与序列分析[J].安徽农业大学学报,2008,35(2):153-155.
- [11] 黄培堂.分子克隆实验指南[M].科学出版社.2002:27-28.
- [12] 高志民,李雪平,彭镇华,等.竹子捕光叶绿素a/b结合蛋白基因全长的克隆和序列分析[J].林业科学.2007,43(3):34-38.
- [13] 马荣群,陈红运,黄文胜,等.实时定量PCR方法检测转基因产品[J].植物检疫,2002,16(1):61-64.

(责任编辑:曲继鹏)