

# 荏梨果实内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因的 克隆及生物信息学分析

张晓菲 张夏南 王 然 张新富 杨绍兰

(青岛农业大学 园林园艺学院, 山东 青岛 266109)

**摘要:** 以成熟的莱阳荏梨果实为试材,应用同源克隆和 RACE 方法从荏梨果肉中克隆到内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因的一个同源基因 cDNA 的全长序列,命名为 *PbEG*,其碱基长度为 1 971 bp,*PbEG* 的开放阅读框编码 493 个氨基酸,相对分子量为 54.596 1 kDa,等电点为 9.14;*PbEG* 编码的蛋白属于糖基水解酶第 9 家族,不含有跨膜区域但在 N-端含有一段信号肽。其编码氨基酸同源性分析表明,荏梨 *PbEG* 基因与蓖麻 *EG* 基因同源性较高,达到 84%,其次是豌豆和葡萄。

**关键词:** 荏梨; 内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因; 生物信息学

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)03-0053-05

## The Gene Cloning and Bioinformatics Analysis of Endo- $\beta$ -1,4-glucanase Gene of Chili Pear

ZHANG Xiao-fei, ZHANG Xia-nan, WANG Ran, ZHANG Xin-fu, YANG Shao-lan

(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** One full-length cDNA sequence of homologous gene endo- $\beta$ -1,4-glucanase from *Pyrus bretschneideri* Rehd. Cv. Chili pear was cloned by polymerase chain reaction (PCR) and RACE method, which was named as *PbEG*. The *PbEG* was 1 971 bp and the open reading frame encoded 493 amino acids, while the estimated molecular weight and isoelectric point of the putative protein were 54.596 1 kDa and 9.14. The protein encoded by *PbEG* belonged to Glycosyl-hydrolases-family-9. There was no membrane-spanning domain in the protein but a signal peptide in the N-terminus. And the deduced amino acids homology analysis indicated that *PbEG* has a high homology with *RcEG* (84%).

**Key words:** Pear; Endo- $\beta$ -1,4-glucanase; Bioinformatics

果实的成熟软化是一个复杂的过程。植物细胞壁的主要成分包括果胶、纤维素、半纤维素、蛋白质等,研究认为,果实的成熟软化过程中细胞壁成分果胶、纤维素、半纤维素等会发生降解<sup>[1-2]</sup>。多种酶类参与了果实的后熟软化,如多聚半乳糖醛酸酶(PG)、 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -Gal)、果胶甲酯酶(PME)、扩张蛋白(Expansin)、内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(EG)、木葡聚糖内糖基转移酶(XET)、阿拉伯糖苷酶(Afase)等<sup>[3-4]</sup>。内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶(Endo- $\beta$ -1,4-glucanase, EGases)是一类由细菌、真菌、昆虫和植

物产生的一种水解酶。具有 1,4- $\beta$ -葡聚糖主链的多聚糖,如纤维素等分子能被 EGases 催化水解,并被随机作用降解成为糊精或寡聚糖<sup>[5]</sup>。研究表明,内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶对植物体的生长发育具有广泛作用,与细胞伸长<sup>[6-8]</sup>、果实成熟软化<sup>[9-11]</sup>、组织器官脱落<sup>[12-13]</sup>等有密切关系。目前,已从拟南芥<sup>[6,8]</sup>、砂梨<sup>[14]</sup>、草莓<sup>[15-16]</sup>、番茄<sup>[9,12-13]</sup>、荔枝<sup>[17]</sup>、柿<sup>[18]</sup>、西洋梨<sup>[19-20]</sup>等多种植物中克隆获得了 EGases 的相关基因。

荏梨(*Pyrus bretschneideri* Rehd. Cv. Chili)是山

收稿日期: 2013-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(31201608); 国家现代农业(梨)产业技术体系建设专项(nycytx-29-06); 山东省高等学校科技计划项目(J09LC13); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目(BS2010NY009); 青岛农业大学高层次人才启动基金项目(630803); 青岛市科技计划项目(621268)。

作者简介: 张晓菲(1987-),女,山东淄博人,在读硕士,主要从事果实采后生理与分子生物学研究。

通讯作者: 杨绍兰(1978-),女,山东招远人,副教授,博士,主要从事果实采后生理与分子生物学研究。

东栽培的白梨系统中的优良品种,但在梨果实在采后贮藏过程中易发生果皮皱缩、果肉粗糙,且腐烂褐变等现象,严重影响了其外观价值和食用价值,制约了其在市场上的流通和供应期<sup>[21]</sup>。本研究以荏梨成熟果实为试材,克隆内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶基因 *PbEG*,并对所获得的 *PbEG* 基因进行生物信息学分析,对其结构和功能有了初步的了解,为改良荏梨采后贮藏性能奠定一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本试验于 2010 年 10 月份在青岛农业大学果树实验站进行,采收成熟莱阳荏梨果实,当天运抵实验室。果实去掉果皮和果心后,将果肉切成小块混合在一起,用液氮处理,置于  $-70^{\circ}\text{C}$  超低温冰箱保存。

### 1.2 果肉总 RNA 提取及 cDNA 的合成

果肉总 RNA 提取。方法参照 TianGen RNA-plant Reagent (TianGen, 中国) 说明书操作,采用 DNase (Fermentas, 立陶宛) 去除 DNA 污染。第一条 cDNA 的逆转录按 Revert Aid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, 立陶宛) 试剂盒说明书进行操作。

### 1.3 *PbEG* 基因 cDNA 片段的克隆

根据已有的植物序列数据库 (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) 设计简并引物 EGAP、EGSP (表 1) 进行 RT-PCR。PCR

表 1 荏梨 *PbEG* 基因克隆所用引物

Tab.1 The *PbEG* gene cloning primers in this test

引物名称 Name of primers	编号 Serial number	序列 Primer sequences (5'-3')
简并引物 Degenerated primers	EGAP 上游引物	GGCGG( A/C) TACTATGATGC( C/A) GG
	EGSP 下游引物	TGC( A/T) CCCCACAG( T/C) AAT( T/C) CATC
3'RACE 引物 3'RACE primers	上游引物	CCACCGACTACCTCCTCAAA
	下游引物	CTGCCTCTTTGCTCTTCAGG
5'RACE 引物 5'RACE primers	上游引物	CACTCCATGAAAGCATGGTGTTGGT
	下游引物	TTCTGCAGCTCACCCTTCATCAACC

### 1.5 生物信息学分析

利用 DNAMAN 对获得的核苷酸进行氨基酸的翻译;利用 NCBI 网站中的 Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 在线功能预测蛋白的保守结构域;使用 ProtParam tool (<http://web.expasy.org/protparam/>) 分析氨基酸基本成分;运用 PBIL LYON-GERLAND ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_hnn.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hnn.html)) 对 *PbEG* 进行二级结构预测;用 TMHMM Server V. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 进行

扩增的具体程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $55^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳分离回收特异片段,与 T 载体连接,筛选阳性克隆后,送上海英俊公司测序,利用 NCBI BLAST 进行序列比较,确认为 *EG* 基因的 cDNA 序列后,进行全长 cDNA 的 3'和 5'末端扩增(RACE)。

### 1.4 *PbEG* 基因全长 cDNA 序列的获得

根据已获得的 *EG* 基因 cDNA 的保守序列,利用在线 Primer 3 (v. 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/>) 设计 3'RACE 和 5'RACE 的引物,采用的引物见表 1;根据 TakaRa 3'RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒说明书 (TakaRa, 日本) 进行 *EG* 基因 3'cDNA 末端扩增;PCR 程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,  $58^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 30 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$  终延伸 10 min。根据 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, 美国) 试剂盒说明进行 *EG* 基因 5'cDNA 末端扩增。将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳回收,分离和回收特异片段,然后与 pMD18-T 载体连接后筛选阳性克隆,并送上海英俊公司进行测序。将测序结果在 NCBI 网站中进行序列比对,确认这些 5'和 3'末端的扩增片段序列为 *EG* 基因后,利用 DNAMAN 和 DNASTar 等分析软件进行序列分析和拼接,获得 *EG* 基因的 cDNA 全长序列,跨 2 个拼接点设计特异引物进行 cDNA 全长序列验证。

蛋白序列跨膜区分析;利用 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 对蛋白质进行信号肽分析;蛋白质立体结构预测采用 SWISS-MODEL ([http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modeling\\_simple1](http://swissmodel.expasy.org/workspace/index.php?func=modeling_simple1))。

## 2 结果与分析

### 2.1 *PbEG* 全长 cDNA 序列的获得

以成熟荏梨果肉为试验试材提取总 RNA,如图 1 提取到的 RNA 28S,18S 条带非常清晰,2 条条带

之间没有弥散现象,说明提取的总 RNA 质量好、无降解现象。根据已发表的 *EG* 基因的保守序列设计简并引物,以荏梨果肉 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增,所扩增片段长度约为 800 bp(图 2)。测序结果经 NCBI Blast 比对,发现该序列编码的氨基酸序列与其他植物上 *EG* 有较高的同源性,证明该序列是 *EG* 基因的一部分。根据已获得的 cDNA 保守序列,设计 3'-和 5'-RACE 特异性引物(表 1),并进行 PCR 扩增。得到 *EG* 基因的 3'和 5'端,将获得的 3 条片段经 DNASTar 软件拼接,得到 *PbEG* 基因 cDNA 序列全长 1 971 bp,命名为 *PbEG*。*PbEG* 的开放阅读框编码 493 个氨基酸,5'端有 146 bp 的非翻译区(5'UTR),3'端含有 343 bp 的非翻译区(3'UTR),片段末端含有 poly A 序列。通过 NCBI Blast 比对发现 *PbEG* 与大豆、蓖麻、豌豆、拟南芥的 *EGase* 基因同源性都在 75% 以上。跨 3 条片段设计特异引物进行全长验证。根据上述特征及全长验证结果判断,本研究获得了 *PbEG* 的完整 cDNA 序列。

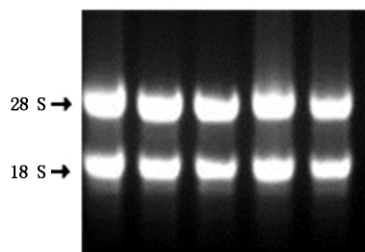


图 1 RNA 检测结果

Fig.1 Electrophoresis of RNA

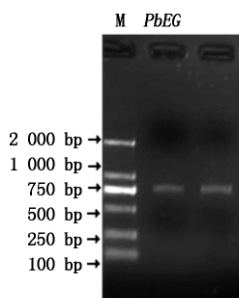


图 2 保守区域 PCR 图片

Fig.2 PCR products of conserved regions

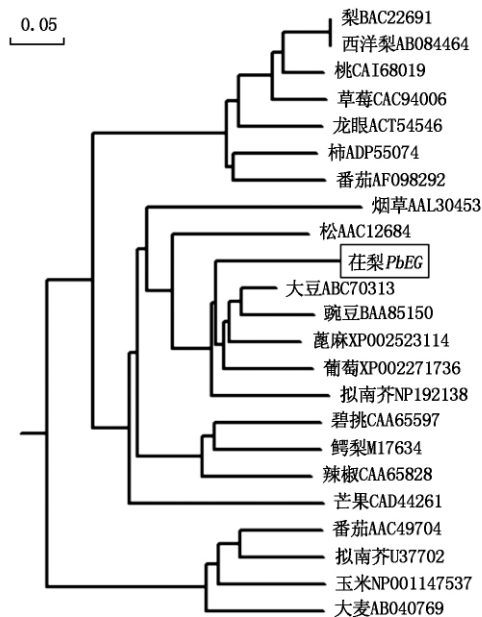
## 2.2 *PbEG* 与其他植物 *EG* 蛋白的序列比对分析

用 DNAMAN 软件构建了包括荏梨 *PbEG* 基因在内的 23 个 *EG* 的系统进化树(图 3)。从图 3 可见,

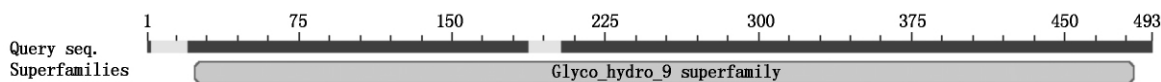
*EG* 可以分为两大类:跨膜型蛋白和分泌型蛋白。跨膜型蛋白包括番茄(AAC49704)、大麦(AB040769)、玉米(NP001147537)、拟南芥(U37702);荏梨 *PbEG* 基因属于分泌型蛋白,与蓖麻(XP002523114)、大豆(ABC70313)、葡萄(XP002271736)等同源性较高,分别达到 84%、80%、79%。

## 2.3 *PbEG* 的生物信息学分析

利用 ProtParam 对 *PbEG* 蛋白进行理化性质预测,推测该蛋白的分子式为  $C_{2440}H_{3758}N_{676}O_{708}S_{22}$ ,相对分子量为 54.596 1 kDa,等电点为 9.14;该蛋白中有 20 种氨基酸,其中相对含量最多的氨基酸是 Ser(49 个,9.9%)其次是 Leu(47 个,9.5%)、Ala(43 个,8.7%)、Gly(38 个,7.7%),含量较少的氨基酸为 Trp(7 个,1.4%)、Cys(9 个,1.8%)、Glu(11 个,2.2%)、Met(13 个,2.6%);亲水性平均指数为 -0.253,推测该蛋白为亲水蛋白。

图 3 植物 *EG* 基因推导的氨基酸序列系统进化树Fig.3 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of plant *EG*

通过 NCBI CDD 预测表明 *PbEG* 含有糖基水解酶家族-9 的活性位点,属于糖基水解酶第 9 家族(图 4)。

图 4 *PbEG* 基因编码蛋白的 Blast 结果Fig.4 Blast result of *PbEG* coding protein

利用 TMHMM Server v. 2.0 程序对 *PbEG* 进行蛋白跨膜区分析,发现 *PbEG* 蛋白不存在跨膜区域(图 5)。根据 SignalP 4.0 对 *PbEG* 进行信号肽预

测,结果表明 *PbEG* 的第 1~23 个氨基酸残基为信号肽,信号肽裂解点位于第 23 和第 24 位氨基酸之间(图 6)。利用 NetPhos 2.0 Server 预测该蛋白有

33 个磷酸化作用位点,利用 NetOGlyc 3.1 和 NetNG-lyc 1.0 预测该蛋白,表明有 4 个 O-糖基化位点为 (488、489、490、493) 和 2 个 N-糖基化位点 (247、350)。

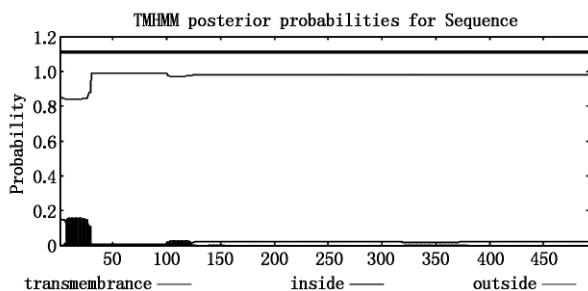


图 5 PbEG 跨膜区域预测结果

Fig.5 The predicted result of PbEG transmembrane region

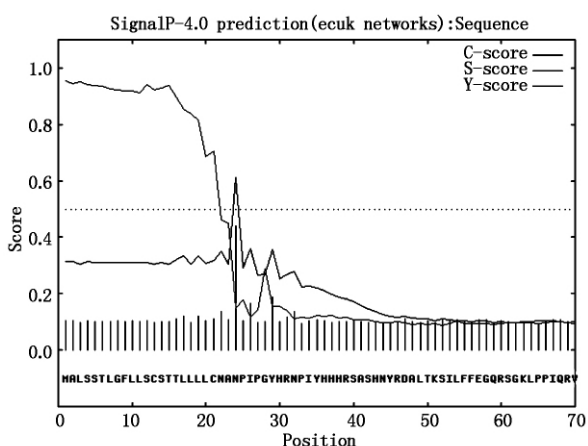


图 6 PbEG 的信号肽预测结果

Fig.6 The predicted result of PbEG signal peptide

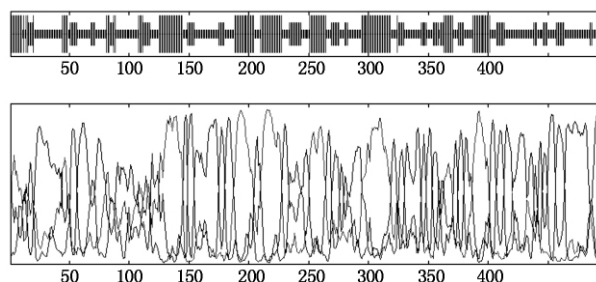


图 7 PbEG 编码氨基酸的二级结构预测

Fig.7 The secondary structure prediction of PbEG encoding amino acids

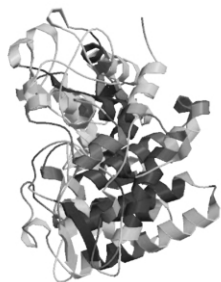


图 8 SWISS-MODEL 预测 PbEG3D 结构图

Fig.8 The tertiary structure of PbEG

was predicted with SWISS-MODEL

用 Hopfield 神经网络(HNN)预测 PbEG 的氨基酸

序列。结果表明 PbEG 的二级结构是由大量的  $\alpha$ -螺旋、延伸链和无规则卷曲结构组成,PbEG 的  $\alpha$ -螺旋有 145 个,占 29.41%,延伸链有 100 个,占 20.28%,无规则卷曲有 248 个,占 50.30% (图 7)。利用 SWISS-MODEL 对 PbEG 的立体结构进行在线预测,对 EG 进行同源建模,结果如图 8。

### 3 讨论

高等植物的 EGases 是由多蛋白组成的家族<sup>[22]</sup>。根据所编码的氨基酸残基特征 EGases 基因家族分为两类<sup>[23]</sup>:其中一类的 N 端含有疏水跨膜区,属于跨膜型蛋白;另一类的 N 端则含有信号肽,属于分泌型蛋白;而后一类又可以根据 C 端是否含有纤维素结合区域(Cellulose binding domain,CBD)又分为两组。研究认为,跨膜型 EG 蛋白,可能与植物纤维生物合成有关<sup>[22,24]</sup>;而分泌型 EG 蛋白,与果实成熟、器官脱落、细胞伸长等有关<sup>[22]</sup>。蛋白跨膜区分析,发现本试验得到的 PbEG 蛋白没有跨膜区域,而在 N-端有一段信号肽,推测 PbEG 蛋白属于分泌型蛋白,可能与果实成熟、器官脱落、细胞伸长等发育过程有关。

EGases 在植物体的细胞伸长、果实成熟软化、组织器官脱落等生长发育过程中有广泛作用。在果实成熟软化过程中,多种不同的 EGases 通过水解具有 1-4- $\beta$ -葡聚糖酶主链的多聚糖,改变细胞壁的多孔性和黏性,促使细胞壁修饰酶更加容易接近其作用的底物,从而更快地引起果实的软化<sup>[5]</sup>。本研究从荏梨果肉中克隆得到了 PbEG 基因的全长 cDNA,利用生物信息学对 PbEG 基因的功能域和结构进行了分析和预测,PbEG 长度为 1971 bp,PbEG 的开放阅读框编码 493 个氨基酸,相对分子量为 54.596 kDa,等电点为 9.14。NCBI CDD 预测 PbEG 属于糖基水解酶第 9 家族;蛋白跨膜区分析,发现 PbEG 蛋白没有跨膜区域,PbEG 的第 1~23 个氨基酸残基为信号肽。该项研究对于探明一些果实成熟和软化中内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶的作用有重要意义,同时,为开展该基因的表达研究,进一步确定其功能奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Brummell D A. Cell wall disassembly in ripening fruit [J]. Functional Plant Biology 2006 33(2): 103-119.
- [2] 吴彩娥,王文生,寇晓虹.果实成熟软化机理研究进展 [J]. 果树学报 2001,18(6): 365-369.
- [3] Bennett A B,Labavitch J M. Ethylene and ripening-regulated expression and function of fruit cell wall modifying

- proteins [J]. Plant Science 2008 ,175: 130 – 136.
- [4] Brummell D A ,Harpster M H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants [J]. Plant Mol Biol 2001 ,47: 311 – 340.
- [5] 欧阳杰,蒋建雄,张天真,等. 内切- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶在植物细胞生长发育中的作用 [J]. 西北植物学报, 2007 27(4): 844 – 851.
- [6] Sato S ,Kato T ,Kakegawa K *et al.* Rapid paper-role of the putative membrane-bound endo-1, 4-glucanase KORRIG-AN in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant and Cell Physiology 2001 ,42(3): 251 – 263.
- [7] Wu S C ,Blumer J M ,Darvill A G *et al.* Characterization of an endo- $\beta$ -1, 4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls [J]. Plant Physiol 1996 ,110(1): 163 – 170.
- [8] Shani Z ,Dekel M ,Roiz L *et al.* Expression of endo-1, 4- $\beta$ -glucanase (*cell*) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth xylem development and cell wall thickening [J]. Plant Cell Rep 2006 ,25: 1067 – 1074.
- [9] Real M D ,Company P ,García-Agustín P *et al.* Characterization of tomato endo-beta-1, 4-glucanase cell protein in fruit during ripening and after fungal infection [J]. Planta 2004 ,220(1): 80 – 86.
- [10] Chourasia A ,Sane V A ,Singh R K *et al.* Isolation and characterization of the *MiCell* gene from mango: ripening related expression and enhanced endoglucanase activity during softening [J]. Plant Growth Regul 2008 ,56: 117 – 127.
- [11] Lee Y K ,Kim I J. Modulation of fruit softening by antisense suppression of endo- $\beta$ -1, 4-glucanase in strawberry [J]. Mol Breeding 2011 ,27: 375 – 383.
- [12] Kalaitzis P ,Hong S B ,Solomos T *et al.* Molecular characterization of a tomato endo-beta-1, 4-glucanase gene expressed in mature pistils abscission zones and fruit [J]. Plant Cell Physiol 1999 ,40(8): 905 – 908.
- [13] Gonzalez-Bosch C ,Del Campillo E ,Bennett A B. Immunodetection and characterization of tomato endo-[beta]-1, 4-glucanase cell protein in flower abscission zones [J]. Plant Physiol 1997 ,114(4): 1541 – 1546.
- [14] 丛郁,李慧,颜志梅,等. 砂梨 2 个内切- $\beta$ -1, 4-葡聚糖酶基因 cDNA 的克隆及其在果实贮藏过程中的表达分析 [J]. 江苏农业学报, 2010 ,26(2): 383 – 389.
- [15] Arpster M H ,Brummell D A ,Dunsmuir P. Expression analysis of aripening-specific ,auxin-repressed endo-1, 4-beta-glucanase gene in strawberry [J]. Plant Physiol , 1998 ,118(4): 1307 – 1316.
- [16] Trainotti L ,Spolaore S ,Pavanello A *et al.* A novel E-type endo- $\beta$  (1, 4)-glucanase with a putative cellulose-binding domain is highly expressed in ripening strawberry fruits [J]. Plant Mol Biol 1999 ,40(2): 323 – 332.
- [17] 吴富旺,邝健飞,陆旺金,等. 荔枝果实内切-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶基因(EG)的克隆和表达分析 [J]. 园艺学报, 2009 ,36(12): 1733 – 1740.
- [18] 宋康华,饶景萍,常晓晓,等. 柿果实内切-1, 4- $\beta$ -葡聚糖酶基因克隆与定量表达分析 [J]. 园艺学报, 2011 ,38(10): 1893 – 1900 .
- [19] Sekine D ,Munemura I ,Gao M *et al.* Cloning of cDNAs encoding cell-wall hydrolases from pear (*Pyrus communis*) fruit and their involvement in fruit softening and development of melting texture [J]. Physiologia Plantarum , 2006 ,126(2): 163 – 174.
- [20] Hisawa K ,Kunigasa Y ,Amano S *et al.* Ethylene is required for both the initiation and progression of softening in pear (*Pyrus communis* L.) fruit [J]. Journal of Experimental Botany 2003 ,54(383): 771 – 779.
- [21] 鞠志国,朱广廉,曹宗饌. 莱阳荏梨果实褐变与多酚氧化酶及酚类物质区域化分布的关系 [J]. 植物生理学报, 1988 ,14(4): 356 – 361.
- [22] Libertini E ,Li Y ,McQueen-Mason S J. Phylogenetic analysis of the plant endo- $\beta$ -1, 4-glucanase gene family [J]. Journal of Molecular Evolution 2004 ,58(5): 506 – 515.
- [23] Urbanowicz B R ,Catala C ,Irwin D *et al.* Tomato endo-beta-1, 4-glucanase SlCel9C1 represents a distinct subclass with a new family of carbohydrate binding modules (CBM49) [J]. Journal of Biological Chemistry ,2007 ,282(16): 12066 – 12074.
- [24] Brummell D A ,Catala C ,Lashbrook C C *et al.* A membrane-anchored E-type endo-1, 4-beta-glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants [J]. Plant Biology 1997 ,94(9): 4794 – 4799.