

黄瓜扩张蛋白 *Cs-EXP10* 基因 5' 序列的 克隆和表达的初步分析

刘春香^{1,2}, 张卫华¹, 曹齐卫¹, 孙小镭¹

(1. 山东省农业科学院 山东设施蔬菜生物学重点实验室 国家蔬菜改良中心山东分中心, 山东 济南 250100;

2. 潍坊学院, 山东 潍坊 261061)

摘要: 扩张蛋白是促进植物细胞壁伸展的一类蛋白质, 黄瓜果实膨大过程中扩张蛋白具有重要作用。本研究以发育中的黄瓜果实 RNA 为试验材料, 通过 RACE 方法克隆了黄瓜 *Cs-EXP10* 基因的 5' 端未知序列, 进而获得了该基因的全长, 序列分析显示该基因编码 287 个氨基酸, 有扩张蛋白的特征序列。Southern 杂交表明 *Cs-EXP10* 在基因组中是以单拷贝形式存在的。其表达具有组织特异性, 在膨大过程中的果实中表达量高, 显示其与果实的膨大有关。在叶和茎组织中也有少量表达, 而在根和花中基本不表达。

关键词: 黄瓜; *Cs-EXP10* 基因; 克隆; 表达

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)01-0063-04

Cucumber Expansin 10(*Cs-EXP10*) Gene 5' End Sequence Cloning and Preliminary Analysis of Gene Expression

LIU Chun-xiang^{1,2}, ZHANG Wei-hua¹, CAO Qi-wei¹, SUN Xiao-lei¹

(1. Institute of Vegetable, Shandong Academy of Agriculture Science, Jinan 250100, China;

2. Weifang University, Weifang 261061, China)

Abstract: Expansin is a kind of protein to promote plant cell wall expanding, it is important for cucumber fruit enlargement during fruit development. Cucumber expansin 10(*Cs-EXP10*) gene 5'-end sequence were clones by RACE method from the RNA of cucumber developing fruits, and then the total cDNA sequence of this gene were get. This gene coded 287 amino acids after sequence analysis. Southern blotting result showed that *Cs-EXP10* was single copy in cucumber genome. Expression analysis showed that it expressed highly in expanding fruit, and express little in stems and leaves, however almost do not express in roots and flowers, which means it correlated with fruit expanding.

Key words: Cucumber; *Cs-EXP10* gene; Clone; Expression

细胞壁的增大是植物形态建成一个很重要的因素, 黄瓜果实的快速膨大离不开扩张蛋白这种促进细胞壁伸展的蛋白质。1992 年, Cosgrove 等^[1,2] 在黄瓜下胚轴伸长的研究中发现了第一个扩张蛋白 (Expansin1, *Cs-EXP1*)。随后, 大量的扩张蛋白基因被不断发现。孙涌栋等^[3] 在对授粉后黄瓜果实发育的 cDNA-AFLP 分析时发现了 *Cs-EXP10*, 并克隆了该基因的下游序列, 但未获得该基因的全长, 认为该基因对果实的发育很重要, 因此, 本研究力求克隆该基因的全长编码序列, 并进一步研究该基因的表

达行为。*Cs-EXP10* 可能是果实特异表达的基因^[4,5]。如果是这样, 该基因的启动子可能对果实特异表达有一定的促进作用。因此本研究还对该基因的组织特异性进行了进一步的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

Smart RACE 试剂盒购自 Clontech 公司, pEASY-T1 购自全氏金公司, pMD18-T 载体、反转录试剂盒及所有的内切酶购自大连宝生物技术公司,

收稿日期: 2010-12-16

基金项目: 山东省博士后择优资助项目 (200603041); 山东省自然科学基金项目 (ZR2009DQ003)

作者简介: 刘春香 (1974-), 女, 黑龙江望奎人, 副教授, 博士, 主要从事蔬菜育种与分子生物学研究。

通讯作者: 孙小镭 (1956-), 女, 山东济南人, 研究员, 主要从事黄瓜遗传育种研究。

Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司,生物素标记试剂盒及杂交检测试剂盒购自华美生物工程公司,DNA 分子量标准及凝胶回收试剂盒购自天根生物技术公司。CTAB 及其他试剂为国产分析纯。菌种 DH5 α 由本室保存。引物 E5' RA2 GAT TGT GAA CCT GAT TCC TCC TT、E5' RA3 TAG AGA TTA CCA TA CCC ACA AGC 用于克隆 5'未知序列;exp10-s AAC CTT CAA CCC TCA AAC TC、exp10-a TTC CCC ACT ACT CCA AAA CT 用于克隆基因的全长编码序列;actin1 GCT GCT TCC ATT CCT ATC、actin2 TTC TTT GTG CCT TGC TTT 用于做内参 actin 的 PCR 扩增,以上引物均由上海生工生物技术公司合成。

1.2 *Cs-EXP10* 基因 5'RACE

取新鲜密刺黄瓜生长到 10 ~ 15 cm 的正常果实,用 Trizol 试剂盒提取 RNA,按照 Smart RACE 试剂盒的说明,取 1 μ L RNA 做反转录反应,反应后的 cDNA 作为 PCR 扩增的模板。PCR 扩增采用 E5' RA2 和 UPM 引物(来自试剂盒),以 5'cDNA 为模板,利用热启动 DNA 聚合酶 20 μ L 反应体系,按照以下程序进行 PCR 反应:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;67 $^{\circ}$ C 退火 40 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;循环 20 次;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;66 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;循环 20 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶中电泳,切下目的凝胶块,冰冻 20 min,融化后 12 000 r/min 离心 5 min,取 1 μ L 的胶液做模板,以 E5' RA3、NPM(来自试剂盒)为引物,做巢式 PCR,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;67 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;循环 5 次;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s;65 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min;循环 25 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。通过两次 PCR,获得可靠的 5'RACE 扩增产物,将目的片段回收,回收产物与 pMD18-T 载体连接,转化后,阳性重组菌落送上海生工生物技术公司测序。

1.3 扩张蛋白基因全长编码序列的克隆

根据测序结果及报道的下游序列设计引物 exp10-s、exp10-a 采用 5'cDNA 为模板,进行全长序列 PCR 扩增,扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s;53 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min;循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,电泳后用试剂盒回收长度为 1.1 kb 左右的带,室温连接 15 min,使其连接到 pEASY-T1 载体上,转化到大肠杆菌 DH5 α 内,将提取的转化质粒进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切鉴定,阳性菌落送上海生工公司测序。

1.4 扩张蛋白基因的 Southern 杂交

采用 CTAB 法提取黄瓜叶片的基因组 DNA,分别

用 *EcoR* I、*Kpn* I、*Cla* I、*Pst* I、*Xho* I、*Xba* I 进行单酶切;*EcoR* I/*Hind* III、*Pst* I/*Xho* I、*Xho* I/*EcoR* I、*Cla* I/*Hind* III 进行双酶切,酶切完全后电泳,根据刘进元^[7]的方法进行杂交,利用克隆 5'RACE 序列的质粒,采用 exp10-s 和 E5' RA2 进行 PCR 扩增,回收扩增片段,按照试剂盒说明进行生物素标记,进一步进行杂交和检测,采用 BCIP-NBT 显色。

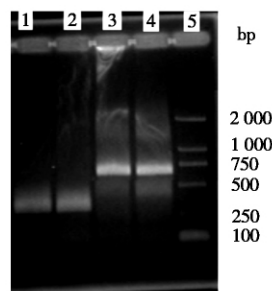
1.5 RT-PCR 半定量分析基因表达

用 Trizol 试剂盒提取黄瓜根、茎、叶、花、果实、种子和卷须总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 作为反转录的模板,反转录体积 10 μ L,分别取 2 μ L 做模板,扩增内参 *actin* 和 *Cs-EXP10* 基因,以 exp10-s、exp10-a 为引物,按照 1.3 所示的扩增条件,循环 27 次,根据电泳后的条带亮度判断基因的表达量。

2 结果与分析

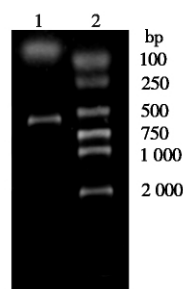
2.1 *Cs-EXP10* 基因 5'未知序列的克隆

利用 RACE 试剂盒,通过 E5' RA2、E5' RA3 分别和 UPM 扩增,获得的产物如电泳图 1 所示,两种引物扩增得到不同大小的片段,一条约 0.6 kb,另一条约 0.3 kb,将 2 条带都切割下来,进行二次 PCR,电泳纯化后,分别连接到 pBS-T 载体上。转化后,对质



1 ~ 4. 不同引物的 PCR 扩增产物; 5. Marker.
1 ~ 4. PCR results by different primer; 5. Marker.

图 1 *EXP* 基因 5'RACE-PCR 电泳图
Fig. 1 Gel electrophoresis map of *EXP* gene 5'end RACE-PCR



1. Marker 2. 巢式 PCR 结果。
1. Marker; 2. The nest PCR result.

图 2 *EXP* 基因 5'端巢式 PCR 电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis map of *EXP* gene 5'end sequence electrophoresis nest PCR

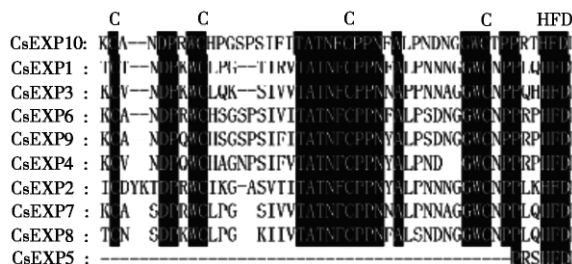
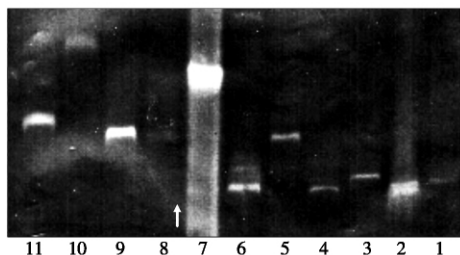


图6 Cs-EXP 氨基酸序列保守性分析比较

Fig.6 Cs-EXP amino acid sequence conserved analysis in comparison

2.3 *Cs-EXP10* 的 Southern 杂交

为了进一步确定 *Cs-EXP10* 在基因组中的拷贝数,便于了解该基因在基因组中邻近常见限制性内切酶位点的远近,对克隆的 *Cs-EXP10* 基因进行了多种限制性内切酶消化后的 Southern 杂交,结果见图7,从图7可以看出,该基因是单拷贝基因,大部分酶切割后该基因表现为一条带。第10泳道 *Xho* I / *Eco* R I 酶切后片段小,小于4.5 kb Marker,第5泳道 *Xho* I 单酶切后片段及第11泳道 *Cla* I / *Hind* III 的相对较小,可以作为通过酶切加接头克隆未知序列时备选的限制性内切酶。



1. *Eco* R I; 2. *Kpn* I; 3. *Cla* I; 4. *Pst* I; 5. *Xho* I; 6. *Xba* I; 7. 4.5 kb Marker; 8. *Eco* R I / *Hind* III; 9. *Pst* I / *Xho* I; 10. *Xho* I / *Eco* R I; 11. *Cla* I / *Hind* III. 箭头表示电泳方向 (Arrow means electrophoresis direction)。

图7 *Cs-EXP10* 的 Southern 杂交图谱

Fig.7 Southern blotting of *Cs-EXP10* gene

2.4 *Cs-EXP10* 基因表达的组织特异性分析

利用 RT-PCR 半定量法,相对定量目的基因在各器官的表达,从电泳图谱(图8)可以看出,在内参 *actin* 扩增产物比较一致的前提下,黄瓜 *Cs-EXP10* 基因在果实、未熟种子及根中电泳条带亮度较高,证明在这些组织中有表达,但表达量在果实和幼嫩种子中较高。

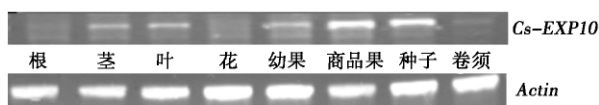


图8 *Cs-EXP10* 在各器官中的表达分析

Fig.8 Expression analysis of *Cs-EXP10* in various organs

3 讨论

采用 RACE 方法克隆未知序列是较为有效的克隆方法,由于一端是通用引物,在扩增时经常存在非特异性,本研究在进行初次扩增以后,测序结果不正确,然后对初次扩增的 PCR 产物进行一轮巢式 PCR 之后,再次测序获得了目的序列。说明进行巢式 PCR 是增加准确性较为有效的手段^[7]。该基因与黄瓜其他扩张蛋白基因有较高的氨基酸序列同源性。显示其潜在的功能是促进细胞壁伸展。是否在疏导组织膨大过程中有作用,尚需要免疫组化的验证。

本研究认为 *Cs-EXP10* 基因在黄瓜中以单拷贝形式存在,这与孙涌栋等^[4]的报道相同。而且,单独以 *Xho* I 或以 *Xho* I / *Eco* R I 以及 *Cla* I / *Hind* III 双酶切可以获得相对较小的目的片段,通过加接头进行 PCR 扩增有可能获得侧翼未知序列的产物。

孙涌栋等^[4]通过黄瓜根、茎、叶和幼果的 RT-PCR 分析结果得出: *Cs-EXP10* 基因只在授粉后 3 d 的幼果中表达,而不在根、茎和叶组织中表达。进一步对黄瓜不同果实发育阶段的 Northern 杂交结果发现: *Cs-EXP10* 基因在 2~3 cm 的幼小子房和开花当天子房中均未被检测出表达信号,在授粉后 3 d 开始生长的幼果中出现表达,在授粉后 10 d 的迅速生长的幼果中表达量进一步增强,在授粉后 26 d 生长停止的果实中处于关闭状态。初步认为 *Cs-EXP10* 是一个果实特异表达的基因,它主要在授粉后迅速膨大生长的幼果组织中表达。希望获得果实特异表达的启动子,鉴于孙涌栋的研究结果,本研究对 *Cs-EXP10* 基因的表达进行了特异性检测,发现不仅是发育中的果实,连叶片和茎等组织也有微量表达,但在根和花组织基本不表达。本研究认为,以此基因的表达看,这个基因的启动子不应该是果实特异表达的,只是在果实快速膨大过程中表达量高。

参考文献:

- [1] Cosgrove D J. Characterization of long-term extension of isolated cell walls from growing cucumber hypocotyls [J]. *Planta*, 1989, 177: 121-30.
- [2] McQueen-Mason S, Urachko D M, Cosgrove D J. Two endogenous proteins that induce cell wall expansion in plants [J]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1425-1433.
- [3] 孙涌栋, 张兴国, 侯瑞贤, 等. 授粉后黄瓜果实膨大相关基因的鉴别 [J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31(4): 403-408.
- [4] 孙涌栋, 张兴国, 杜小兵, 等. 黄瓜扩展蛋白基因 *CsEXP10* 的克隆与表达 [J]. *植物生理与分子生物学报*, 2006, 32(3): 375-380.
- [5] 孙涌栋, 张兴国, 李新峰, 等. 黄瓜 *CsEXP5* 基因片段的克隆与序列分析 [J]. *华北农学报*, 2008, 23(1): 12-14.
- [6] 刘进元, 常智杰, 赵广荣. 分子生物学实验指导 [M]. 北京: 清华大学出版社, 2002.
- [7] 刘春香. ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 cDNA 的克隆及表达 [J]. *园艺学报*, 2008, 35(9): 1357-1362.