

# 魔芋 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基 cDNA 片段的克隆

张兴国<sup>1</sup> 杨正安<sup>1</sup> 杜小兵<sup>2</sup> 李正国<sup>2</sup> 刘佩瑛<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 西南农业大学园艺系, 重庆 400716; <sup>2</sup> 西南农业大学食品科学学院, 重庆 400716)

**摘要:** 利用 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶的保守序列设计引物, 采用 RT-PCR 方法, 从白魔芋球茎组织的总 RNA 中扩增出目标 cDNA 片段, 并克隆到 pUC18 载体中。序列分析后确认该片段属于一新的 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因。

**关键词:** 魔芋; RT-PCR; ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因

**中图分类号:** S 632.3; Q 785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 03-0251-04

淀粉约占魔芋球茎干样质量的 15%~20%, 是魔芋精粉加工去除的主要杂质<sup>[1]</sup>。常规育种手段很难培育出低淀粉含量的品种。Murata<sup>[2]</sup> 研究发现魔芋球茎中淀粉合成是以 ADP - 葡萄糖作为葡萄糖供体。而 ADP - 葡萄糖由 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶 (AGP) 催化合成。该酶是淀粉生物合成的关键酶<sup>[3]</sup>。目前已在水稻、小麦和大麦等 20 余种植物中克隆出该酶的大亚基和小亚基基因。Leidreiter 等<sup>[4]</sup> 曾将光合细胞特异启动子控制的 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶小亚基的反义基因导入马铃薯, 发现转基因植株叶片中的淀粉合成被显著抑制。作者从魔芋球茎组织中克隆了 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基的 cDNA 片段, 以期今后利用其反义基因抑制魔芋淀粉合成, 从分子水平进行魔芋品质改良奠定基础。

## 1 材料与方法

以白魔芋 (*Amorphophallus albus* Liu et Chen) 组培苗的幼嫩球茎为材料, 按 Boehringer Mannheim 公司 RNA 提取试剂 (Tripure<sup>TM</sup> Isolation Reagent) 说明书所示方法 (略作改进) 提取总 RNA。参照水稻<sup>[5]</sup>、小麦<sup>[6]</sup> 和大麦<sup>[7]</sup> 等作物的 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶基因的保守序列, 设计 5' 端引物为 5'-CGCGAGCTCGGTACTGCAGATGCTGF-3' (引物 A) 和 3' 端引物为 5'-CGGICTAGAGTACCAATGICTTCCCAAG-3' (引物 B), 并委托上海植物生理研究所贝克曼实验室合成。按 Boehringer Mannheim 公司的 RT-PCR 方法, 将引物 B 和引物 C (5'-TCTAGAT<sub>17</sub>-3') 分别与逆转录酶 M-MuLV 或 AMV 组合后进行单链 cDNA 合成。再利用引物 A 和引物 B 及高保真的 Taq plus I DNA 聚合酶对该 cDNA 产物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为 94℃ 变性 4 min, 随后 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环, 最后 72℃ 再延伸 10 min。

电泳后低熔点琼脂糖回收和酚 - 氯仿纯化的 RT-PCR 产物, 经 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切纯化

收稿日期: 2000 - 10 - 16; 修回日期: 2001 - 02 - 21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870541)

后与经同样处理的 pUC18 载体连接。采用热激法转化大肠杆菌 XL1-Blue 感受态细胞<sup>[8]</sup>。酶切和 PCR 检测为阳性的克隆, 委托北京赛百盛公司和大连宝生物工程有限公司测定 DNA 序列 (序列分析仪为 ABI PRIM Model 377)。采用 Blast 2.0 程序在 GenBank 中搜寻同源序列, 确定所分离的基因片段是否属于 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶基因家族。利用 DNASTar、GenDoc 和 Clustal W 等程序对序列进行同源性和相互关系分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 魔芋 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶基因的 RT-PCR 扩增

利用设计的引物 A 和引物 B, 从 4 种 3' 引物与逆转录酶组合分别合成的 cDNA 中, 均扩增出 1 条约 510bp 条带, 片段大小与预期的一致 (图 1)。泳道 1 的 RT-PCR 产物回收后用于克隆。

### 2.2 RT-PCR 产物的克隆

回收的 RT-PCR 产物经酶切和纯化后插入 pUC18 载体, 转化大肠杆菌, 通过蓝白筛选得到 7 个白斑菌落。随机挑取 2 个克隆提取质粒, PCR 检测结果均为阳性 (图 2, A), *Xba*I/*Sac*I 双酶切后均有 510 bp 大小的条带 (图 2, B)。这表明 RT-PCR 产物已克隆到载体上。

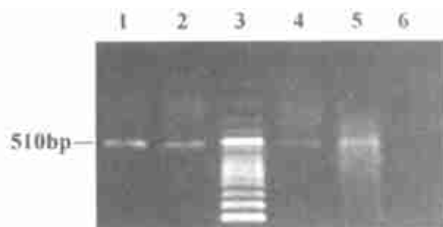


图 1 魔芋 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶基因 RT-PCR 扩增产物

1. 引物 B 和 M-MuLV; 2. 引物 C 和 M-MuLV;
3. 100 bp DNA 梯度分子量参照; 4. 引物 B 和 AMV;
5. 引物 C 和 AMV; 6. 无 RNA 模板对照; 1、2、4 和 5 的 cDNA 合成在引物和逆转录酶上不同。

Fig. 1 RT-PCR products of ADP-glucose pyrophosphorylase gene in *Amorphophallus albus*

1. Primer B and M-MuLV; 2. Primer C and M-MuLV;
3. 100 bp DNA ladder plus marker; 4. Primer B and AMV;
5. Primer C and AMV; 6. Control without RNA template.

The primer and reverse transcriptase used in cDNA synthesis were different among lane 1, 2, 4 and 5.

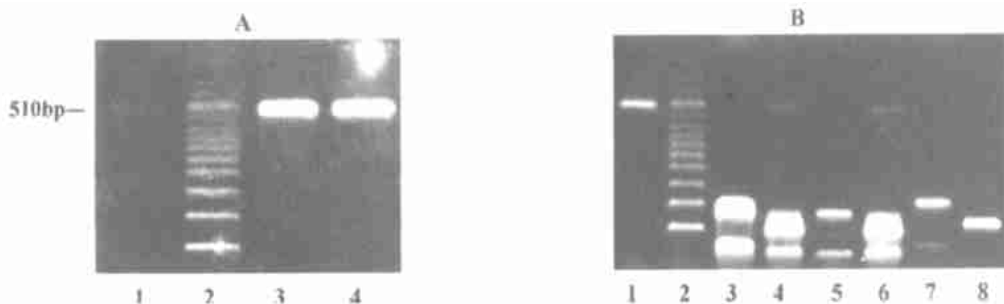


图 2 重组子的 PCR 和酶切鉴定

1. 白魔芋球茎总 RNA 的 RT-PCR 产物对照; 2. 100 bp DNA 梯度分子量参照; A-3. 1# 重组质粒的 PCR 产物;
- A-4. 2# 重组质粒的 PCR 产物; B-3. 1# 重组质粒 DNA; B-4. 1# 重组质粒 *Xba*I/*Sac*I 酶切产物; B-5. 2# 重组质粒 DNA; B-6. 2# 重组质粒 *Xba*I/*Sac*I 酶切产物; B-7. pUC18 DNA; B-8. pUC18 *Xba*I/*Sac*I 双酶切产物。

Fig. 2 Screening of positive construct via PCR and enzyme digestion

1. Control, the RT-PCR product from total RNA of *A. albus*; 2. 100 bp DNA ladder plus; A-3. PCR product from construct 1#; A-4. PCR product from construct 2#; B-3. DNA of construct 1#; B-4. *Xba*I/*Sac*I digest products of construct 1#; B-5. DNA of construct 2#; B-6. *Xba*I/*Sac*I digest products of construct 2#;
- B-7. pUC18 DNA; B-8. *Xba*I/*Sac*I digest products of pUC18.

## 2.3 魔芋 ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶 cDNA 片段的序列分析

2.3.1 序列测定 对 1 # 和 2 # 重组子进行测序。结果显示 2 个重组子插入片段的 DNA 序列一致。双向测序结果表明克隆的 cDNA 片段长 501 bp (不包括两端的 *Sac*I 和 *Xba*I 酶切位点)。推导的氨基酸序列长 167 个氨基酸 (图 3)。

```

GGTACTGCAGATGCTGTGAGACAATTCATCTGGGTCTTTGAGGATCCAAGGAACAAGAACATAGAGCACGTACTG 75
G T A D A V R Q F I W V F E D P R N K N I E E V L 25
ATCTTGTCTGGTGATCAGCTTTACAGAATGGATTATATGGACTTGGTGCAGAGGCACATGGACACTCGGGCAGAT 150
I L S G D Q L Y R M D Y M D L V Q R H M D T R A D 50
ATTACGGTTTCATGTGTACCGTGGACGACAGCCGTCATCTGACTTCGGATTGATGAAGATCGATAAGGTTGGC 225
I T V S C V P V D D S R A S D F G L M K I D K V G 75
CGGATTGTCCATTCTCTGAGAAACCTAAGGGTCTCTGTTCTGGATGCCATGAAGGTTGACACCAATTCCTCGGG 300
R I V H F S E K P K G S V L D A M K V D T C T I P G 100
TTATCTCCTTATGAAGCCAAAAATTTTCCCTACATTGCATCGATGGGAGTATATGCCTTCAGAACAGAAATCCTT 375
L S P Y E A K N F P Y I A S M G V Y A F R T E I L 125
CTAACCTCTTGGAGTGGAGGTACCCAACATCCAATGATTTTGGATCTGAAATCATTCTTCTGCTGTGAATGAG 450
L N L L R W R Y P T S N D F G S E I I P S A V N E 150
TACAATGTACAGGCTTATCTCTTCAAGGACTACTGGGAAGACATTGGTACT 501
Y N V Q A Y L F K D Y W E D I G T 167

```

图 3 魔芋 ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基 cDNA 片段序列及其推导的氨基酸序列

上行为 cDNA 序列; 下行黑体为推导的氨基酸序列。cDNA 序列在 GenBank 中的登记号为 AF316326

Fig. 3 Sequences of cDNA fragment and its deduced amino acid of ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit in konjak

The above line showed cDNA sequence, under which the bold letters were the sequence of deduced amino acid.

The cDNA sequence accession number in GenBank is AF316326

2.3.2 同源性分析 与 GenBank 中的同源序列比较, 本研究中所分离的 cDNA 片段的氨基酸序列与其它物种 ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基的氨基酸序列同源性多介于 60 % ~ 76 %, 而与小亚基氨基酸序列同源性在 58 % 以下。其中同西瓜的 ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基同源性最高, 达 76 %。据此认为, 该 cDNA 片段属于 ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因家族, 而且属于一个新的基因。命名为 Aa-AGP-L1。

2.3.3 魔芋与其它物种 ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基的相互关系 图 4 关系结构图显示, 魔芋 ADP- 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基 cDNA 片段所推导的氨基酸序列与西瓜、甜瓜和番茄等的较为接近, 与同是单子叶植物的水稻和小麦等的关系较远。

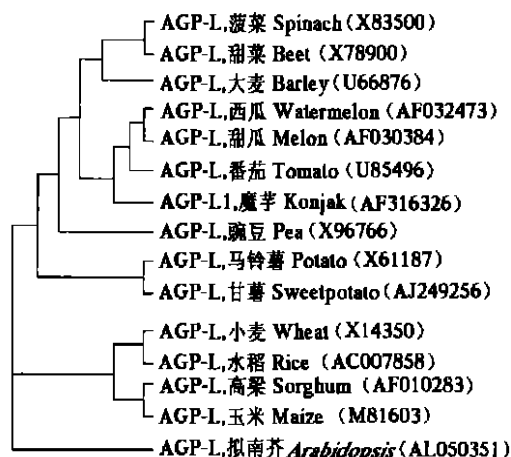


图 4 魔芋 AGP-L1 与其它物种 AGP 大亚基的相互关系

括号内为 GenBank 中的序列登记号

Fig. 4 Relationship of ADP-glucose pyrophosphorylase large subunits among konjak and other species

The GenBank accession number of responsive gene was in the parentheses

## 3 讨论

魔芋 RNA 提取较为困难。一是由于多酚类物质含量高, 分离获得的 RNA 产率低, 以叶片为材料时很难成功。二是由于含有大量的醇不溶性葡甘露聚糖, 直接按 Boehringer

Mannheim 公司的说明书提取的 RNA 中含有大量的胶状粘稠物质, 给 RT-PCR 扩增带来不便。本试验对此进行了改进, 即在沉淀 RNA 时, 先用 30 % 的低浓度乙醇沉淀和去除葡甘露聚糖, 然后补加乙醇含量至要求的浓度 (60 %)。这样回收的 RNA 质量明显提高。

本研究的 PCR 引物是参考 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶 (AGP) 的两个保守区域 GIA-DAVR 和 YWEDIGT 设计的。引物合成时该基因克隆尚少。目前基因库中登记的序列已多达 150 余个, 而且在这两个区域均表现出高度保守性。从魔芋材料中扩增出 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因的同源序列, 说明本研究设计的两个 PCR 引物具有代表性。

魔芋属于单子叶植物, 亲疏关系分析却表明, 它的 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基片段的序列与西瓜、甜瓜和番茄等双子叶物种的更为接近, 但这只是在氨基酸序列可比区域内的情况。确定魔芋 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基的亲疏地位, 尚有待该基因的完整分离。此外, 魔芋 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基片段与其它物种的同源性较低, 亦反映了 ADP - 葡萄糖焦磷酸化酶大亚基基因不太保守的特性<sup>[9]</sup>。

#### 参考文献:

- 1 刘佩瑛, 张盛林, 张兴国. 中国魔芋科学技术的研究和应用. 西南农业大学学报, 1995, 11 (增刊): 1~13
- 2 Murata T. Composition of soluble nucleotides in growing corms of *A. konjac* C. Koch. Agri. Biol. Chem., 1975, 39 (7): 1401~1406
- 3 Okita T W, Nakata P A, Anderson J M. The subunit structure of potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase. Plant Physiol., 1990, 93: 785~790
- 4 Leidreiter K, Heineke D, Heldt H W, et al. Leaf-specific antisense inhibition of starch biosynthesis in transgenic potato plants leads to an increase in photoassimilate export from source leaves during the light period. Plant Cell Physiol., 1995, 36 (4): 615~624
- 5 Anderson J M, Hnilo J, Larson R, et al. The encoded primary sequence of a rice seed ADP-glucose pyrophosphorylase subunit and its homology to the bacterial enzyme. J. Biol. Chem., 1989, 264: 12238~12242
- 6 Olive M R, Ellis R J, Schuch W W. Isolation and nucleotide sequences of cDNA clones encoding ADP-glucose pyrophosphorylase polypeptides from wheat leaf and endosperm. Plant Mol. Biol., 1989, 12: 525~538
- 7 Villand P, Aalen R, Olsen O A, et al. PCR amplification and sequences of cDNA clones for the small and large subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase from barley tissues. Plant Mol. Biol., 1992, 19 (3): 381~389
- 8 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 251~272
- 9 Smith-White B J, Preiss J. Comparison of protein of ADP-glucose pyrophosphorylase from diverse sources. Plant Mol. Biol., 1992, 34 (5): 449~464

## Isolation of a cDNA Fragment Homologous to the Large Subunit Gene of ADP-Glucose Pyrophosphorylase from *Amorphophallus*

Zhang Xingguo<sup>1</sup>, Yang Zheng'an<sup>1</sup>, Du Xiaobing<sup>2</sup>, Li Zhengguo<sup>2</sup>, and Liu Peiying<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Horticulture, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716; <sup>2</sup>College of Food Sciences, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716)

**Abstract:** PCR primers were designed based on the consensus domain of ADP-glucose pyrophosphorylase. A cDNA fragment was amplified from the total RNA isolated from the yang corm of *Amorphophallus albus* via RT-PCT and cloned into plasmid pUC18. The determined sequence showed this cDNA fragment was homologous to the large subunit gene of ADP-glucose pyrophosphorylase.

**Key words:** *Amorphophallus*; RT-PCR; ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit gene