

青花菜纤维素合成酶基因 (*BoiCesA*) 的克隆及功能验证

王 颖, 赵 冰, 郭仰东*

(中国农业大学蔬菜学系, 北京 100193)

蔬菜中含有丰富的纤维素, 是人们日常饮食中膳食纤维的主要来源。调控蔬菜作物中纤维素含量是兼顾营养与口感品质的关键。本研究旨在克隆青花菜中纤维素合成酶基因并进行基因功能验证, 为深入研究青花菜中纤维素的生物合成, 及纤维素缺失—多糖代谢等反馈与补偿的生理适应机制的研究提供理论基础。

借鉴亲缘关系相近的模式植物拟南芥作为契机设计引物通过 RT-PCR 方法克隆青花菜纤维素合成酶基因的大部分编码序列, 同时分析基因及推测蛋白的结构, 并且在该序列上选择特异性较高的区域构建 RNAi 载体, 以期验证该片段所在基因的功能。

利用分离的植物纤维素合成酶基因的 Cellulose_synt 结构域为检索序列, 从 NCBI 和其它数据库中调取已完成测序的物种的纤维素合成酶的氨基酸序列, 共涉及 10 个物种的 171 个基因, 基于以上氨基酸序列, 应用 MEGA4.0 生成系统进化树。结果表明 *CesA* 基因和 *Csl* 基因的分化可能在单子叶和真双子叶植物分化之前, 单子叶和真双子叶植物的最近共同祖先中至少存在 7 个 *CesA* 基因, 综合已知的模式植物 *CesA* 基因的功能 (初生壁或次生壁形成特异性), 可为推测其它物种该基因的功能提供帮助。

根据已知的拟南芥纤维素合成酶基因保守序列设计特异引物, 通过 RT-PCR 从青花菜叶片中克隆出纤维素合成酶 *CesA* 基因片段。该 cDNA 片段长度为 2 575 bp, 推断的氨基酸序列编码产物为 858 个氨基酸残基, 其中包含高度保守的纤维素合成酶催化活性结构域的 3 个天冬氨酸残基和 QxxRW 区。

选择该序列中 268 bp 的特异片段经 *Bam*H I /*Spe* I, *Asc* I /*Swa* I 酶切连接至载体 pFGC1008, 构建重组的 RNAi 载体 pFGCCesA, 并经农杆菌介导法转化青花菜。获得的转化株的形态表征为植株明显变矮, 叶片远轴面紧邻维管组织出现肿胀, 表皮细胞变形气孔开度异常, 透射电镜观察到叶绿体结构变化为梭形且淀粉粒降解, 出现较多的嗜银体。测定了 10 个转基因植株及非转化对照叶片的纤维素和果胶含量, 转化株的纤维素合成下调了 40.4%, 果胶含量也减少了 19.6%。半定量 RT-PCR 分析证实了 RNAi 诱导元件的表达抑制了内源 *CesA* 基因的表达。说明了导入 *CesA* 基因的特异片段形成的发卡结构影响了内源靶基因的表达, 证实了该基因片段与纤维素合成相关。

关键词: 青花菜; 纤维素合成酶; RNAi; 转化

中图分类号: S 635

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) S-2550-01

收稿日期: 2011-08-18

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2009CB119000)

* 通信作者 (E-mail: yaguo@cau.edu.cn; Tel: 010-62734845)