

莲藕可溶性淀粉合成酶基因 *LrSSS* 的克隆与表达特性分析

张莉, 印荔, 杨见秋, 程立宝, 李良俊*

(扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏扬州 225009)

摘要: 以莲藕品种‘美人红’叶片为试材, 利用 RACE 结合 RT-PCR 技术克隆得到全长 4 080 bp 的莲藕可溶性淀粉合成酶基因 (*LrSSS*) cDNA 序列 (GenBank 登录号: KP201636), 其中开放阅读框 3 696 bp, 编码 1 231 个氨基酸; 该序列与甜瓜、葡萄 SSS 基因编码氨基酸序列同源性较高, 分别达 79%、69%。*LrSSS* 所编码的氨基酸序列包含 3 个典型的碳水化合物结合结构域 (CBM_25) 和 1 个淀粉合成酶催化域 (Glyco_transf_5)。*LrSSS* 表达分析表明, 莲藕根状茎膨大具 3 节段时, 在终止叶叶片中的表达量最高, 其次为后把叶叶片, 终止叶叶柄表达量最少; 在根状茎膨大至 4 节段时, *LrSSS* 在第 1、2 节段根状茎中表达量较高, 在第 3、4 节段根状茎中表达量较低, 表明在第 1、2 节段根状茎形态基本建成后 *LrSSS* 在调控产物转化为淀粉过程中可能起到重要作用。

关键词: 莲藕; 淀粉; *LrSSS*; 克隆; 表达

中图分类号: S 645.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 03-0496-09

Cloning and Expression Profiling Analysis of Soluble Starch Synthase Gene in Lotus Rhizome

ZHANG Li, YIN Li, YANG Jian-qiu, CHENG Li-bao, and LI Liang-jun*

(School of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China)

Abstract: The soluble starch synthase gene (*LrSSS*) was cloned from ‘Meirenhong’, a species of lotus rhizome based on reverse transcription polymerase chain RT-PCR and RACE methods with leaf as template in the present study. The full-length of *LrSSS* (GenBank accession number KP201636) was 4 080 bp in nucleotide containing an open reading frame of 3 696 bp which encoding 1 231 amino acid. Phylogenetic analysis showed that *LrSSS* had 79%, 69% homolog with melon, grape respectively. *LrSSS* contained three typical carbohydrate domains (CBM_25) and one catalyzing domains (Glyco_transf_5) relevant to starch synthesis. The expression in different temporal and spatial of *LrSSS* was determined by RT-PCR method. The results was that *LrSSS* showed the highest expression in the last leaf, and then followed by the stalk of the penultimate leaf, the lowest expression was found in the the stalk of the last leaf. In addition, the expression of *LrSSS* was higher in the first and second internodes than in the third and fourth internodes of rhizome, suggesting that *LrSSS* might play an important role in starch synthase processes.

收稿日期: 2014-12-15; 修回日期: 2015-02-01

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2013388); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (CXLX13-918)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: ljli@yzu.edu.cn)

Key words: lotus rhizome; starch; *LrSSS*; clone; expression

莲藕 (*Nelumbo nucifera* Gaertn) 是睡莲科莲属多年生宿根水生草本植物 (赵有为 等, 1999), 原产中国和印度 (中国蔬菜栽培学, 2009), 是中国栽培面积最大的特色水生蔬菜。莲藕含丰富的淀粉、矿质营养和维生素等, 具有很好的营养保健功能 (Takagi et al., 2003)。长期以来, 中国的莲藕加工产品速冻藕、盐渍藕等畅销日、韩、欧美等国家和地区, 已成为中国重要的出口蔬菜之一 (李良俊 等, 2003)。

淀粉是莲藕的主要贮藏物质, 占干物质量的 70% 以上, 由直链淀粉和支链淀粉组成 (李海普 等, 2010), 其含量、组成和性质直接影响莲藕的食用和加工品质。植物直链淀粉和支链淀粉的长链统称表观直链淀粉 (Apparent amylose content, AAC); 其含量的增加将伴随着淀粉糊化温度的增加和峰值粘度的降低 (舒庆尧 等, 1998; Jane et al., 1999)。在表观直链淀粉含量较高的莲藕品种中, 成熟期淀粉的粘度较低, 淀粉不易糊化, 适于用作加工脆嫩爽口的盐渍藕、速冻藕等产品 (李良俊 等, 2006)。植物支链淀粉是由葡萄糖单元以 α -1,4-糖苷键和 α -1,6-糖苷键共同连接形成的有序分支的多聚物, 支链淀粉中没有分支的葡聚糖链称为 A 链, 具有 1 个或多个分支的葡聚糖链称为 B 链, A 链以其还原端通过 α -1,6-糖苷键连接在 B 链上, 支链淀粉分子只有 1 个还原性末端分子, 其侧链上的末端均属非还原端 (高振宇 等, 2004)。可溶性淀粉合成酶 (Soluble starch synthase, SSS) 可通过 α -1,4-糖苷键将腺苷二磷酸葡萄糖 (Adenosine diphosphate glucose, ADPG) 中的葡萄糖加到侧链的非还原性末端, 延伸支链淀粉的分支链, 形成支链淀粉的长链 (谭彩霞 等, 2008)。本试验中以莲藕主栽品种 ‘美人红’ 为材料, 克隆得到可溶性淀粉合成酶基因 (*LrSSS*), 并对该基因在不同组织和根状茎不同节段的表达特性进行分析, 为进一步探明 *LrSSS* 在莲藕淀粉合成过程中的调控作用和机制, 以及为莲藕淀粉品质的分子辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验于 2012—2014 年在扬州大学进行。试材为莲藕主栽品种 ‘美人红’, 种植于扬州大学水生蔬菜试验基地, 常规栽培管理。

2012 年 8 月选择生长健壮植株的嫩叶经液氮处理后置 -80°C 冰箱保存, 备用于 cDNA 克隆。

2013 年 7 月, 莲藕根状茎膨大具 3 个节段时, 取根状茎及其后把叶叶片和叶柄、终止叶叶片和叶柄 (图 1); 于 2013 年 9 月, 在根状茎膨大至具 4 个节段时, 从率先膨大的节段 (后把叶着生节段) 开始向前依次定为第 1、2、3、4 节, 分别取样。各样品立即经液氮处理后置 -80°C 冰箱保存, 备用于基因表达分析。

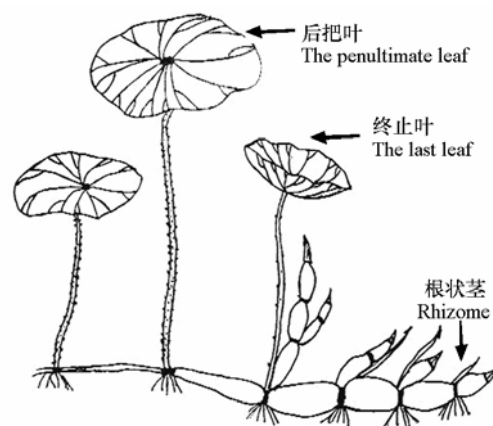


图 1 莲藕植株示意图

Fig. 1 The diagram of lotus rhizome

1.2 方法

1.2.1 *LrSSS* cDNA 3'和 5'端序列的获得

采用改良的 CTAB 法(淦国英 等, 2009)提取 RNA。使用 3'-Full RACE Core Set Ver2.0 试剂盒、5'-Full RACE Kit 试剂盒(TAKARA 公司)进行反转录, 合成 cDNA (具体合成过程及条件完全参照试剂盒说明)。

2012 年 7 月 20 日取莲藕发育过程不同膨大时期的根状茎等量混合, 由深圳华大基因研究院用 Illumina HiSeq™ 2000 测序技术对其进行转录组测序, 拼接和组装过程详见 <http://www.genomics.cn/index.php>。通过 blastx 对基因进行同源性比对, 从中得到 *LrSSS* cDNA 序列片段。

利用 RACE 结合 RT-PCR 技术, 克隆莲藕可溶性淀粉合成酶基因 3'端和 5'端序列。根据上述转录组测序得到的 *LrSSS* cDNA 序列片段, 利用 Primer 5 软件设计 3'端和 5'端 RACE 引物。反应体系参考 TaKaRa 公司的 3'和 5'试剂盒步骤进行操作。将回收的 PCR 产物连接至 pMD18-T 载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞, 蓝白斑筛选阳性克隆, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.2.2 *LrSSS* RT-PCR 分析

利用半定量 PCR 技术对 *LrSSS* 的表达特征进行分析。根据莲藕 *LrSSS* 的 cDNA 序列, 利用软件 Primer 5 设计特异引物, 上游引物: 5'-ACTGTCAGGGTTCCATTG-3', 下游引物: 5'-GTCTTTCCCGTGCTGTTA-3'。利用 β -actin 作为半定量表达内参引物, 上游引物: 5'-GACTCTGGTGATGGTGT-3', 下游引物: 5'-CACTTCATGATGGAGTTGT-3', 扩增片段长度为 370 bp。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。

琼脂糖凝胶电泳检测后, 用 Image J 软件对电泳条带进行定量分析, 测定其灰度值, *LrSSS* 的相对表达量为其电泳条带的灰度值与内参基因 β -actin 的电泳条带灰度值的比值, 然后对数据进行分析。本试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *LrSSS* cDNA 全长序列分析

根据 *LrSSS* cDNA 中间序列片段设计引物, 采用 3' RACE 技术扩增得到一条长度为 465 bp 的基因序列(图 2, A); 5' RACE 技术扩增得到 1 条长度为 453 bp 的基因序列(图 2, B)。将序列与转录组测序得到的 *LrSSS* cDNA 中间序列进行拼接, 得到全长为 4 080 bp 的 *LrSSS* cDNA 序列(GenBank 登录号: KP201636), 包含 3 696 bp 的开放阅读框(ORF), 共编码 1 231 个氨基酸(图 3)。

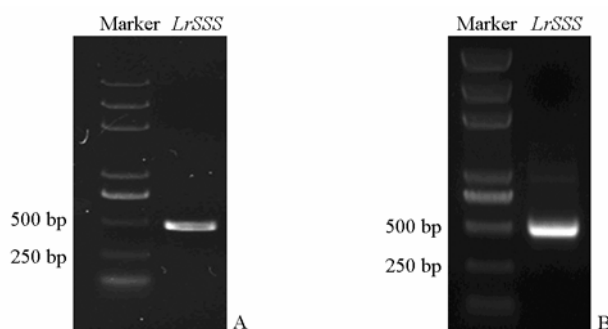


图 2 *LrSSS* 3'端 (A) 和 5'端 (B) PCR 产物

Fig. 2 PCR product of 3' cDNA (A) and 5' cDNA (B) of *LrSSS*

```

1      AGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGATTTTGTATTATTTATTATTATATTTCTGCA
61     TTGAGACAGACATCGATCGATCATCGATCGAAGATTTTTCATCGTCTGTGGTGAAGACG
121    TAATCAGCGAACAGACATTCTATGGCAACAATGGAGATCGCTCTACAAGTGCAGAGACCC
      M A T M E I A L Q V Q R P
181    GTCTGTACAGAACAACCTTCCCTGAAAAAACTCATTTGAAGGTCCAGCCGACTGTTAGA
      V C Y R T T F P E K T H L K V Q P T V R
241    TTCTTCTCTCATGGCAGAACCAATCTGTTCTCGCATACATCTCCTTGGCGCAAAGAATGT
      F F S H G R T N L F S H T S P W R K E C
301    CCAACAATTGGATTGTCGTGTCACATCTTCGCCGGTGCAGAATTTTCAAGGAGGAGATCA
      P T I G L S C H I F A G A E F S R R R S
361    AGGAAGGCCAGGTCTCAAGGCCAAAAGGCTCTGCTGCTAAGGGATTTCATGCCAAAAA
      R K G Q V S R P K G S A A K G F M P K T
      5'RACE Inner primer
421    CGGGTTGGAACAAGCACCCAGAGGAGAGAGAAAAGTGATAATGATGATAACGGCAGTTCA
      R V G T S T Q R R E K S D N D D N G S S
      5'RACE Outer primer
481    AGCCCTTCCCTTCCCGGTGAACATCCAGGTTCCAGCAAGAATCCAGCTGAAATGAAGGTA
      S P S L P G E H P G S S K N P A E M K V
541    GATACTGGTAAAAAGCAGGAAACTAAATATCTTCAAGAGAAGGAAGTGGAGGAAACAAAG
      D T G K K Q E T K Y L Q E K E V E T K
601    GTTGAAATTGAAAAAAGGTTGGCACAACAATATCACCAACAACAGTTTGGCGTGGTT
      V E I E N K V G T T T I S P N K Q F G V V
661    AAAATGTTGATATTGAGGGAATGGAAGATTTTCAGAATGATGATGGTCCAACCAAG
      K N V D I E G N G R F S R I D D G P T K
721    TCACAGAAATCAGAAATAATCACTTCAAAGGAATTTGAGGATGATGATAGTAAACGCCA
      S Q K S E I I T S K E F E D D V D E T P
781    TTTGCAAGAAAGAAATCTGGAATGGAAGATTTTCGTAATGATGATAGTACAAAGTAAG
      F A R K N S G N G R F S V I D D S T S K
841    TCACAGAAATCAGAAATAATCACTTCAAAAAAAGTGAAGGATGATGTAATGAACATCA
      S Q K S E I I T S K K T E D D V N E T S
901    TTTGCAAGAGAGAATTTGGATACATTTAATGGCAGAATTTATGGTCAAAGTAGAACCTTT
      F A R E N L D T F N G R I I G Q S T R G
961    ACTGTGGTTGATGAAGATTTGGTTGAAACTGAGTTGGACAGCCAAAATTAAGTACAAG
      T V V D E D L V E T E L D K P K L D K
1021   ACAGAGAAGTTAATGTTGAAGAGCCAGAGATGAAGGAGCATTTGTTAAAACCAAGATG
      T E K L M F E E P E M K E H L L K P K M
1081   GAGATGGATGCCGAGGCACGCAGAAAGGTGATTGAGAGTCTGCAGAGGAGAACTTTTCA
      E M D A E A R R K V I E S L A E E N F S
1141   AGAGGGTGCAAAATGTTGTTTATCCTGAGGTAGTTAAACCTGATCAAGACATAGAAGTG
      R G C K M F V Y P E V V K P D Q D I E V
1201   TTCCTTAGCAGGAATCTTCCACTTAAAAAATGAACCCGATGTTTGTATGGTGCC
      F L S R N L S T L K N E P D V L I M G A
1261   TTTAATGATTGGAGATGGAATCTTTTACTATAAAGTTGAATAAGACCCATCTTAGAGGG
      F N D W R W K S F T I K L N K T H R G
1321   GATTGGTGGTCTTGCCTAGTTTATATTCCTAAGGAGGCATACAAGATGGATTTTGTTC
      D W W S C L V Y I P K E A Y K M D F V F
1381   TTCAATGGGGCAAATGTCTATGAAACAATGAACAAAGGATTTCTCTTAACTGTTGAA
      F N G A N V Y E N N E T K D F S L T V E
1441   GGTGTAATGGATGCATCAACCTTTGAGGATTTCTGCTTGAAGAGAAACGAAGAGAACTT
      G V M D A S T F E D F L L E E K R R E L
1501   GAAAAGCTTGCTGCAGAGCAAGCTGAAAAGGAAAGACAAGAGGAAGAGCGCGCGGATT
      E K L A A E O A E K E R O E E E R R R I
1561   GAACGAGAAAAGGTTGCAAGTGAAGCTGATAGGGCAAAAGCAAGAGCAGAGGCTGCAAG
      E A E K V A S E A D R A K A R A E A A K
1621   GGAAGAGAAAGTTTACAGCAATTCATTAAGAGGCTGTAAGATCTGTTGTAATGTTTGG
      G R E S L H E F I K K A V R S V D N V W
1681   TATATAGAGCCTAAGGAATTCAAAGGTGGGGATCTGGTCAGGTTATATTACAATAGGAAC
      Y I E P K E F K G G D L V R L Y Y N R N
1741   TCACGTCCTCTTGCTCATGCTAATGAACCTTGATTACGGGGGGCACATAAATGGAAG
      S R P L A H A N E L W I H G G H N K W K
1801   GATGGGTGTCTATCATTTGGAGACTTGTCCACTCTGAGATTAAAGATGGTGACTGGTGG
      D G L S I I G R L V H S E I K D G D W W
1861   TATGTTGATGTTGTTGTACCCGATCGAGCTCTCATCATGGATTGGGTTTGTCTGATGGA
      Y V D V V V P D R A L I M D W V F A D G
1921   CCTCCCGGAGTGCTACAGTTTATGATAATAAATCTTCAAGATTTCCATGCTATTGTC
      P P G S A T V Y D N N N F Q D F H A I V
1981   CCGAGAGGCATACCTGAAGAATGTATTGGGTGAAGAAGAACAGCAAGTATATGGGAGG
      P R G I P E E L Y W V E E E Q Q V Y G R
2041   CTT CAGGAAGAGAGGAGGATAAGAGAAGAGGCTATACGTGTGAAGGCTGAAAGAACAGCA
      L Q E E R R I R E E A I R V K A E R T A
2101   CACATGAAAGCTGAGACAAAGGAACGACCATGAAAATGTTTCTATTGCTCAAAAGCAT
      H M K A E T K E R T M K M F L L S K K H
2161   ATAGTCTACACTGAGCCACTTGATGRTCAAAGCAGGAACACTGTTACGGTQTTTATAAT
      I V Y T E P L D V K A G T T V T V F Y N
2221   CCTTCTAACACAGTTCTCAATGGGAAACCTGAAGTTTGGTTTAGATGCTCATTTAACCGC
      P S N T V L N G K P E V W F R C S F N R
2281   TGGACCCATCGTAATGGGCCATTACACCTCAGAAAATGTTGCTGTAGATAACAGCTCT
      W T H R N G P L P P Q K M L P V D N S P
2341   CGTGTCAAAACCACTGTCCAGGGTTCCATTGGATGCATATGTGATGGACTTTGTTTTCTCT
      R V K T T V R V P L D A Y V M D F V F S
2401   GAGAAGGAAGATGGTGGAAATTATGACAACAGAAATGGCATGGACTACCACATACCTGTA
      E K E D G G I Y D N R N G M D Y H I P V
2461   TTGGGAGGAATTACAAGGAGCCACCAATGCATATTGTGCATGTGGCTGTTGAAATGGCT
      L G G I T K E P P M H I V H V A V E M A
2521   CCCATTGCAAGGTGGGAGGCCTTGGAGATGTTGTCAAGTCTTTCCCGTGCTGTTAA
      P I A K V G G L G D V V T S L S R A V K
2581   GATTTAGGTGATAATGTTGACATAATCTTCCAAAATATGACTGTTTGAACCTCAGCAAT
      D L G H N V D I I L P K Y D C L N L S N
2641   GTAAAGTACTTCCAATTCATCGAAGTTATTCCTGGGGTGGAACTGAAATAAGGTTTGG
      V K Y F Q F H R S Y S W G G T E I K V W
    
```

```

2701   TTTGGGAAGGTAGAAGGCCTGCCTGTCTACTTTTTGGAGCCTCAAAATGGATTATTTTCG
      F G K V E G L P V Y F L E P Q N G L F S
2761   GCAGGGTGCATATATGGATGTAGGAATGATGGGCAGAGATTGGCTTCTTTGCCATGCT
      A G C I Y G C R N D G Q R F G F F C H A
2821   GCGCTTGAGTTCCTTCTCCAAAGTGGATTTCATCCTGATATTTACATTGCCATGACTGG
      A L E F L L Q S G F H P D I L H C H D W
2881   TCTAGTGCACCTGTTGCATGGTTGTTAAGGAGCATTATATGCATTATGGCCTCAGTAAA
      S S A P V A W L F K E H Y M H Y G L S K
2941   GCTCGGGTTGCTTCAAAATCATAATCTTGAGTTTGGAGCACAGTTGATTGGGAAGGCA
      A R V V F T I H N L E F G A Q L I G K A
3001   ATGTTGTACTCAGACAAGGCTACAACGTGTCTCTACTTATCAAGGGAGGTTTCAGGA
      M L Y S D K A T T V S P T Y S R E V S G
3061   AATCCAGCAATTGCTCCTCATCTTCAGAAGTTCTATGGTATTCTGAATGGAATTGATCCA
      N P A I A P H L Q K F Y G I L N G I D P
3121   GATATCTGGGATCCATACAATGACAAATTTATCCCGTATCTTACACTTCAGACAATGTT
      D I W D P Y N D K F I P V S Y T S D N V
3181   GTGGAAGGAAAAGGGCTGCAAGGAGAGCCTTACACAAAAAAGTTGGTTTGAAGAGGGCT
      V E G K R A A K E A L Q Q K L G L K R A
3241   GATCTCCCTATGGTTGGAATCATTACTCGCTTAACATCAGAAAGGAATTCACCTTATC
      D L P M V G I I T R L T H Q K G I H L I
3301   AAGCATGCCATTGGCGCACTTGAACGAAATGGGCAGGTTGTTGCTAGGTTTCAGCT
      K H A I W R T L E R N G Q V V L L G S A
3361   CCAGACCCTCGTATACAAATGATTTTGTAACTTGGCAAATCAATTGCATCATCACAT
      P D P R I Q N D F V N L A N Q L H S S H
3421   GGTGATCGTGACGACTTTGTCTGACCTATGATGAACCTCTATCACATTTGATATGCA
      G D R A R L C L T Y D E P L S H L I Y A
3481   GGTTCAGATTTATTCTAGTTCATCAATTTTGGAGCATGTGGCCTAACCCAGCTTACA
      G S D F I L V P S I F E P C G L T Q L T
      3'RACE Outer primer
3541   GCAATGAGATATGGTTCAATACCTGTTGTTTCGCAAACTGGAGGACTTCATGATACTGTA
      A M R Y G S I P V V R K T G G L H D T V
      3'RACE Inner primer
3601   TTTGATGTCGACCATGATAAAGAGAGAGCCGAGCATTGGTCTTGAGCCAAATGGATTC
      F D V D H D K E R A R A F G L E P N G F
3661   AATTTTGATGGAGCTGATCTGCTGGTGTGATTATGCTCTCAATAGAGCTATCTCTGCC
      N F D G A D T A G V D Y A L N R A I S A
3721   TGGTATGATGGACGTGATTGGTTCAACTCCTTATGTAAGGGGGTAATGGAGCAAGATTGG
      W Y D G R D W F N S L C K G V M E Q D W
3781   TCTTGAACCGCCAGCATTGGACTATATGGAACCTACCGTGCAGCCCGGAAGTAAGGC
      S W N R P A L D Y M E L Y R A A R K *
3841   AGGAGAAAATTGGCCAGATGAATGAGAAAGAAAGAGATCCCATACAAGGATTGTTAGAGA
      TCCCATACCACAATTATTTGTACAGGCTTACGAATAAATTTTCATTTCTTTATTTATC
3901   TTAGCCAAACAATGGCAGGTAATTTTATAGTTTGTGTTATTTATGACATCTTTGGTGTTA
3961   AAGATTTGAAATAGCTCATCCATTTTATGTGAAAGCAATTTTGAACCCCAAAAAAAAAA
4021

```

图3 莲藕 *LrSSS* cDNA 序列及其推测氨基酸序列

单下划线为 5'RACE 获得的 cDNA 片段, 双下划线为 3'RACE 获得的 cDNA 片段。

Fig. 3 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *LrSSS* in lotus lotus rhizome

The fragment of cDNA produced by 5' RACE are indicated with single underlines, the fragment of cDNA produced by 3' RACE are indicated with double underlines.

2.2 *LrSSS* 基因序列分析

将莲藕 *LrSSS* 与其他植物的 SSS 基因的氨基酸序列在 MEGA5 软件中进行比对和基于 Neighbor-Joining 算法的系统进化树进行分析, 结果显示莲藕 *LrSSS* 与甜瓜 *SSSIII*、葡萄 *SSSIII* 等同源性较高 (图 4)。

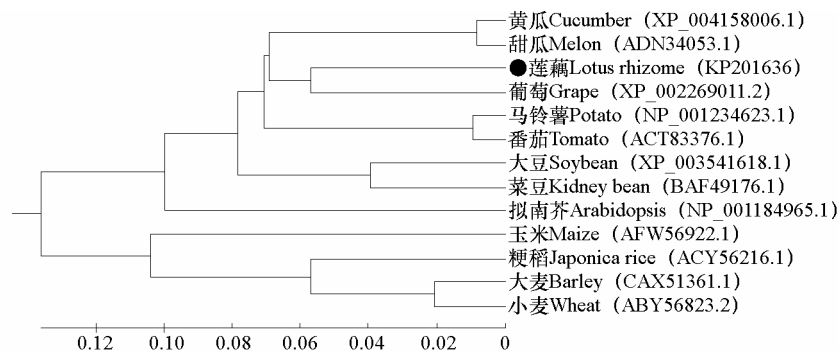


图4 植物 SSS 基因编码的氨基酸的聚类分析

Fig. 4 Phylogenetic analysis of SSS from different plant species

将莲藕 *LrSSS* cDNA 序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 后发现, 该序列与葡萄 *SSSIII* 基因 cDNA 序列 (XM_002268975.2) 相似度达 83%, 与大豆 *SSSIII* 基因 cDNA 序列 (XM_003541570.1) 相似度达 79%。同时, *LrSSS* 与甜瓜、葡萄 *SSSIII* 编码的氨基酸序列同源性分别达 79%和 69% (图 5)。

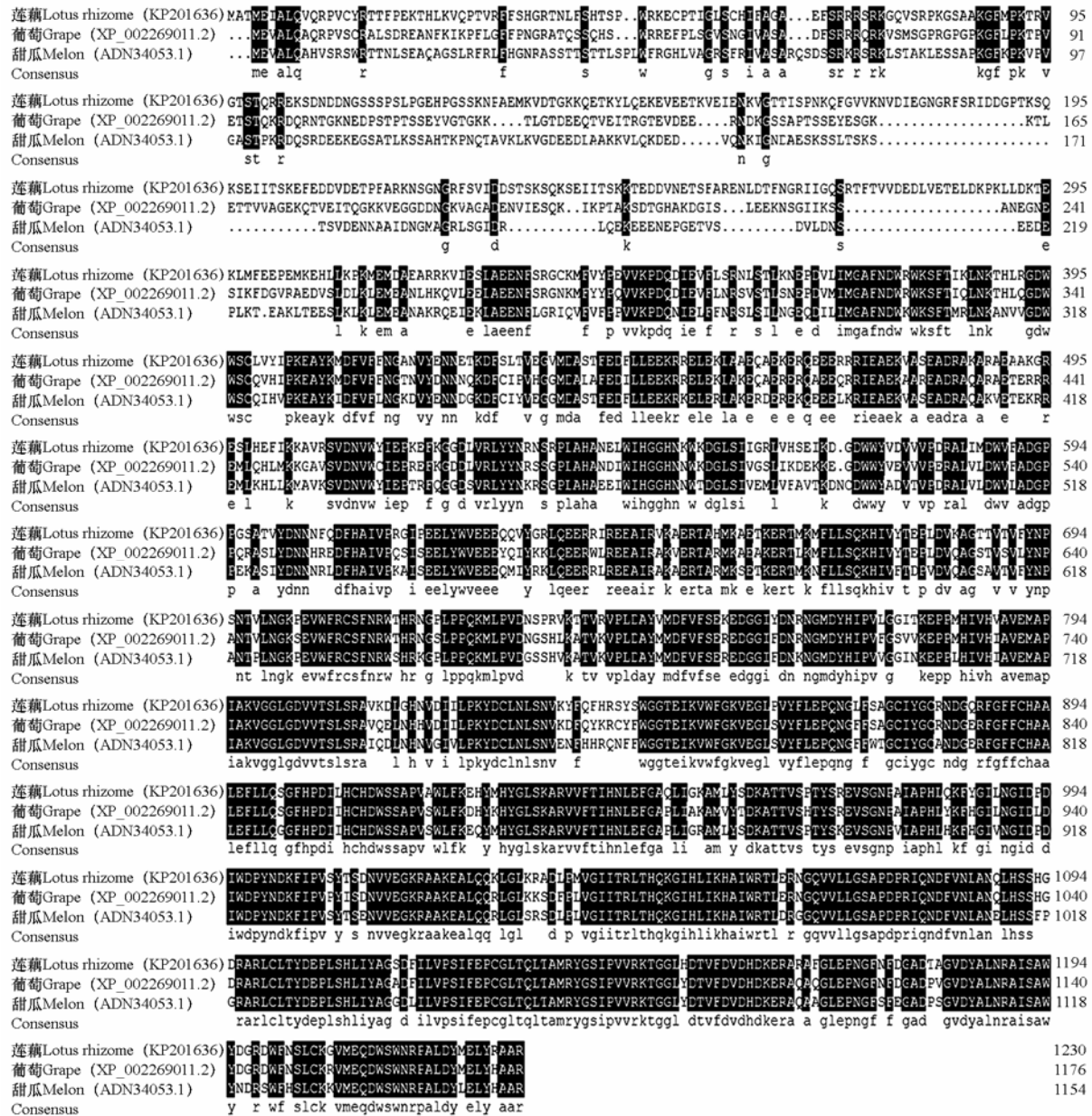


图 5 莲藕 SSS 与其他植物 SSS 的同源性比较

Fig. 5 The comparison of SSS in lotus rhizome with that of other species

利用 ProtParam 软件 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html/>) 对莲藕可溶性淀粉合成酶氨基酸序列进行分析, *LrSSS* 编码的蛋白分子量 140 100.7 kD, 蛋白质的性质分析表明, 该蛋白不存在跨膜域, 理论等电点为 6.52, 带负电荷的氨基酸残基数 (Asp + Glu) 为 176 个, 带正电荷的氨基酸残

基数 (Arg + Lys) 为 167 个, 总平均疏水性为 -0.555, 为亲水性蛋白。结构功能域是蛋白质亚基结构中介于蛋白质二级与三级结构之间的一种独立结构和功能单位, 对了解蛋白的功能具有重要作用 (廉德君和许根俊, 1997)。对莲藕 *LrSSS* 编码的 SSS 蛋白结构域分析表明 (图 6), 其具有 3 个能够结合 α -寡葡萄糖的碳水化合物结合域 (CBM_25) 和 1 个淀粉合成酶催化域 (Glyco_transf_5)。

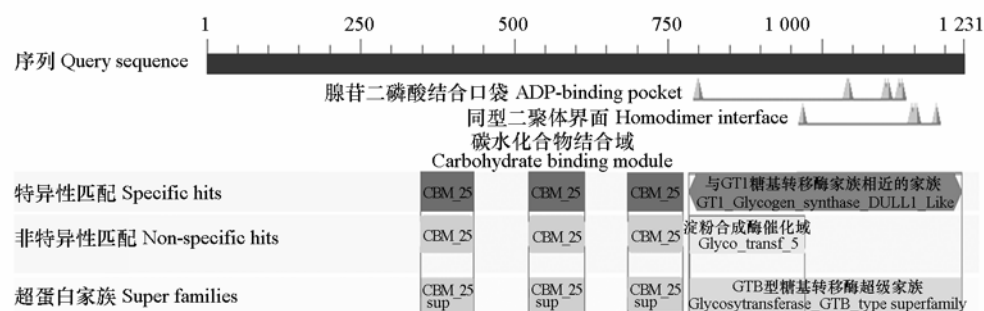


图 6 莲藕 SSS 蛋白功能域分析

Fig. 6 Functional domains analysis of SSS in lotus rhizome

2.3 *LrSSS* 表达分析

如图 7、图 8 所示, *LrSSS* 在不同组织和根状茎不同节段均有表达, 在终止叶叶片中表达量最高, 其次为后把叶叶片, 终止叶叶柄表达量最低; 在根状茎第 1、2 节段中表达量较高, 第 3、4 节段表达量较低。

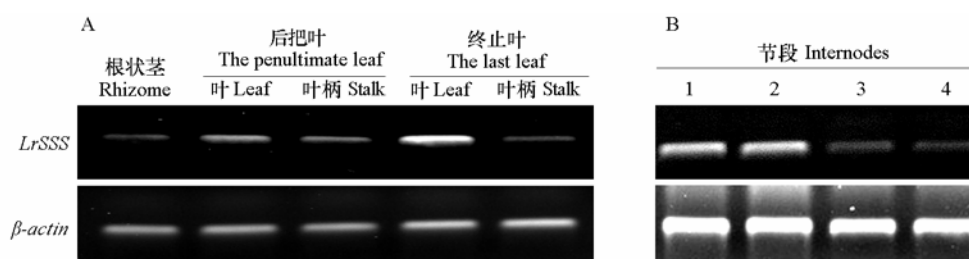


图 7 莲藕 *LrSSS* 在不同组织 (A) 和不同节段 (B) 的表达

Fig. 7 The genes expression of *LrSSS* in different organs (A) and different internodes (B) of lotus rhizome

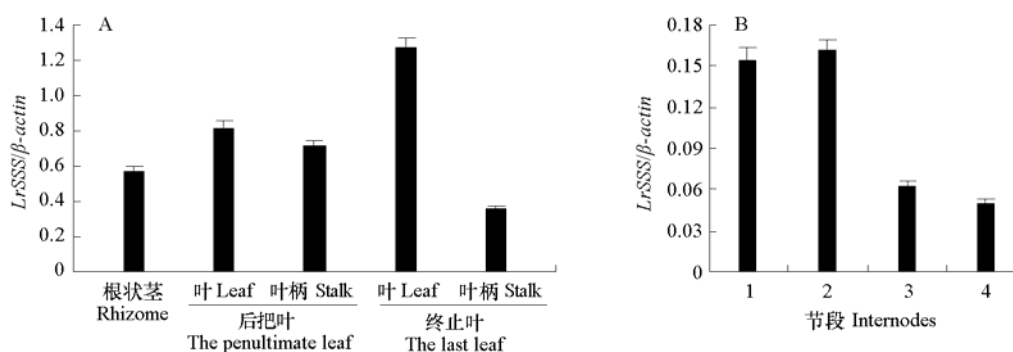


图 8 莲藕 *LrSSS* 在不同组织 (A) 和不同节段 (B) 的相对表达量

Fig. 8 The genes relative expression of in different organs (A) and different internodes (B) of lotus rhizome

3 讨论

植物 SSS 主要分布于基质与淀粉粒之间的质体中, 也可与淀粉粒结合。SSS 有多种同工酶, 主要分为 3 大类: SSS I、SSS II 和 SSS III (谭彩霞 等, 2008)。各类同工酶在支链淀粉合成中发挥着不同作用, 并具有特定的功能 (Martha et al., 2003)。SSS I 主要负责 10 个或 10 个以下葡萄糖聚合度 (DP) 的短链的合成; SSS II 与中等长度的支链淀粉合成有关; SSS III 则参与 DP 为 25 ~ 35 长链淀粉的合成 (Commuri & Keeling, 2001)。玉米的 SSS I 与 DP6 ~ 15 的短链合成有关, 而 SSS II 主要参与 DP > 24 的长链合成 (Martha et al., 2003); 马铃薯的 SSS III 催化了 DP25 ~ 35 的长链合成, 而 SSS II 在中等长度的支链淀粉合成中起着其他 SSS 所不能替代的作用 (Edwards et al., 1999)。本试验中克隆得到长度为 4 080 bp 的 *LrSSS* cDNA, 其中开放阅读框 3 696 bp, 编码 1 231 个氨基酸, 与甜瓜、葡萄等的 *SSSIII* 同源性较高, 分别达 79%、69%, 推测该基因可能是莲藕 *SSSIII* (*LrSSSIII*)。而该基因在莲藕支链淀粉合成中发挥着什么样的作用以及是否还存在 *LrSSS I* 和 *LrSSS II*, 尚需进一步研究。木薯 *SSIII-1* 和 *SSIII-2* 控制着碳水化合物的结合活性, 它们所编码氨基酸的 N-端都含有 3 个 CBM_25 碳水化合物结合结构域 (Yang et al., 2013), *LrSSSIII* 编码的氨基酸中具有同样的特点, 该基因是否也控制着碳水化合物的结合活性, 也待进一步研究。

LrSSS 在莲藕的叶片和叶柄中均有表达, 且表达量差异较小, 与马铃薯 *SSSIII* 在叶片的不同发育阶段表达量 (Abel et al., 1996) 基本一致。莲藕根状茎膨大初期以细胞分裂为主, 当根状茎的形态基本建成时, 莲藕根状茎以物质积累为主 (陈维培和张四美, 1989)。本试验中, 莲藕根状茎膨大至具 4 个节段时, 在第 1、2 节段根状茎 *LrSSS* 表达量较高, 第 3、4 节段根状茎 *LrSSS* 表达量较少。可能是莲藕根状茎膨大至具 4 个节段时, 第 3、4 节段根状茎处于细胞分裂和体积快速膨大时期, 光合产物主要用于根状茎细胞分裂和体积膨大而淀粉积累较少, 因此 *LrSSS* 表达量较低; 但在第 1、2 节段根状茎形态基本建成, 在 *LrSSS* 作用下, 同化产物绝大部分开始被转化成为淀粉并贮藏在根状茎中, 从而促使莲藕根状茎中淀粉含量迅速增加 (李良俊 等, 2006)。

本试验中克隆得到 *LrSSS* cDNA 序列, 对其结构作初步分析, 进而对该基因在根状茎膨大过程中的表达进行了分析, 对阐明该基因的功能及其在莲藕支链淀粉的长链合成及淀粉品质形成机制具有重要理论意义; 同时, 对今后开展莲藕淀粉品质育种材料的分子辅助筛选及相关新品种的选育, 提升莲藕产业发展水平, 提高我国莲藕产品在国内外市场的竞争力具有重要意义。

References

- Abel G W, Springer F, Willmitzer L, Kossmann J. 1996. Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal*, 10 (6): 981 – 991.
- Commuri P D, Keeling P L. 2001. Chain-length specificities of maize starch synthase I enzyme: Studies of glucan affinity and catalytic properties. *The Plant Journal*, 25 (5): 475 – 486.
- Chen Wei-pei, Zhang Si-mei. 1989. The structure, elongation and thickening of rhizome in *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Acta Botanica Sinica*, 31 (3): 191 – 197. (in Chinese)
- 陈维培, 张四美. 1989. 莲的根茎构造、伸长与增粗. *植物学报*, 31 (3): 191 – 197.
- Edwards A, Fulton D C, Hylton C M, Jobling S A, Gidley M. 1999. A combined reduction in activity of starch synthases II and III of potato has novel effects on the starch of tubers. *The Plant Journal*, 17 (3): 251 – 261.
- Gao Zhen-yu, Huang Da-nian, Qian Qian. 2004. Advances in research on biosynthesis of plant amylopectin. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 30 (5): 489 – 495. (in Chinese)

- 高振宇, 黄大年, 钱 前. 2004. 植物支链淀粉生物合成研究进展. *植物生理与分子生物学学报*, 30 (5): 489 – 495.
- Gan Guo-ying, Qi Yan-xiang, Pu Jin-ji, Zhang Xin, Xie Yi-xian. 2009. Improved CTAB method for extracting high quality total RNA from banana leaves. *Guangdong Agricultural Science*, 7: 192 – 193. (in Chinese)
- 淦国英, 漆艳香, 蒲金基, 张 欣, 谢艺贤. 2009. 改良 CTAB 法提取高质量香蕉叶片总 RNA. *广东农业科学*, 7: 192 – 193.
- Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences. 2009. *Olericulture in China*. Beijing: China Agricultural Press: 799. (in Chinese)
- 中国农业科学院蔬菜花卉研究所. 2009. *中国蔬菜栽培学*. 北京: 中国农业出版社: 799.
- Jane J, Chen Y Y, Lee L F, Mcpherson A E, Wong K S, Radosavljevic M, Kasemsuwan T. 1999. Effects of amylopectin branch chain length and amylose content on the gelatinization and pasting properties of starch. *Cereal Chemistry*, 76 (5): 629 – 637.
- Li Hai-pu, Li Bin, Ou-yang Ming, Zhang Sha-sha. 2010. Advances in characterization of amylose and amylopectin starch. *Food Science*, 31 (11): 273. (in Chinese)
- 李海普, 李 彬, 欧阳明, 张莎莎. 2010. 直链淀粉和支链淀粉的表征. *食品科学*, 31 (11): 273.
- Li Liang-jun, Lin Hui-ming, Cao Bei-sheng. 2003. Several problems existing in the pollution-free production of *Nelumbo nucifera* Gaertn in Jiangsu Province. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 19 (4): 156 – 158. (in Chinese)
- 李良俊, 林惠鸣, 曹碯生. 2003. 江苏省莲藕无公害生产中存在的几个问题. *中国农学通报*, 19 (4): 156 – 158.
- Li Liang-jun, Zhang Xiao-dong, Shen Xin-ping, Sun Lei, Xie Ke, Gu Li, Cao Bei-sheng. 2006. Studies on starch RVA profile and starch granule shape in rhizome of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (3): 534 – 538. (in Chinese)
- 李良俊, 张晓冬, 沈新平, 孙 磊, 谢 科, 顾 丽, 曹碯生. 2006. 莲藕淀粉 RVA 谱特征和淀粉粒形态的研究. *园艺学报*, 33 (3): 534 – 538.
- Lian De-jun, Xu Gen-jun. 1997. The structure of protein and the domain in function. *Progress In Biochemistry and Biophysics*, 24 (6): 482. (in Chinese)
- 廉德君, 许根俊. 1997. 蛋白质结构与功能中的结构域. *生物化学与生物物理进展*, 24 (6): 482.
- Martha G, James Y, Kay D, Alan M M. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. *Current Opinion Plant Biology*, 6 (3): 215 – 222.
- Shu Qing-yao, Xu Guang-hua, Xia Ying-wu, Gao Ming-wei. 1998. Advances in research on apparent amylose content in rice. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 10 (1): 47 – 54. (in Chinese)
- 舒庆尧, 徐光华, 夏英武, 高明尉. 1998. 稻米表观直链淀粉含量研究进展. *浙江农业学报*, 10 (1): 47 – 54.
- Takagi K, Miyata A, Harazono Y. 2003. An alternative approach to determining zero-plane displacement, and its application to a lotus paddy field. *Agricultural and Forest Meteorology*, 115 (3 – 4): 173 – 181.
- Tan Cai-xia, Feng Chao-nian, Chen Jing, Guo Jing, Guo Wen-shan, Zhu Xin-kai, Li Chun-yan, Peng Yong-xin. 2008. Progress on key enzymes involved in crop starch synthesis and their gene expression. *Journal of Triticeae Crops*, 28 (5): 912 – 919. (in Chinese)
- 谭彩霞, 封超年, 陈 静, 郭 静, 郭文善, 朱新开, 李春燕, 彭永欣. 2008. 作物淀粉合成关键酶及其基因表达的研究进展. *麦类作物学报*, 28 (5): 912 – 919.
- Yang Ze-feng, Wang Yi-fan, Xu Shu-hui, Xu Chen-wu, Yan Chang-jie. 2013. Molecular evolution and functional divergence of soluble starch synthase genes in cassava (*Manihot Esculenta* Crantz). *Evolutionary Bioinformatics*, 9: 239 – 240.
- Zhao You-wei. 1999. *Chinese aquatic vegetables*. Beijing: China Agricultural Press: 17 – 38. (in Chinese)
- 赵有为. 1999. *中国水生蔬菜*. 中国农业出版社: 17 – 38.