

紫竹多酚氧化酶基因克隆及其表达

王 弋, 郭小勤, 娄永峰, 杨海芸, 林新春, 方 伟

(浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300)

摘要: 为研究紫竹 *Phyllostachys nigra* 多酚氧化酶基因 (*PPO*) 表达与紫竹组培苗褐化之间的关系, 采用同源克隆方法获得紫竹 *PPO* 基因的 cDNA 与 DNA 片段, 将它命名为 *PnPPO*。随后, 研究了该基因在不同褐化程度紫竹组培苗中的表达情况。序列分析显示该基因所编码蛋白为酪氨酸酶 (tyrosinase), 其序列与小麦 *Triticum aestivum* 和水稻 *Oryza sativa* 中 *PPO* 基因同源性很高, 是 *PPO* 的同源序列。RT-PCR 分析显示, 在褐化严重的组培苗中 *PnPPO* 的表达量也较高。这说明 *PnPPO* 基因的表达与紫竹组培苗褐化存在紧密的联系。图 4 参 15

关键词: 森林生物学; 多酚氧化酶; 紫竹; 组织褐化

中图分类号: S718.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5692(2010)05-0781-05

Cloning and expression of polyphenol oxidase (*PPO*) in *Phyllostachys nigra*

WANG Yi, GUO Xiao-qin, LOU Yong-feng, YANG Hai-yun, LIN Xin-chun, FANG Wei

(The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: To study the relationship between polyphenol oxidase (*PPO*) and tissue browning in *Phyllostachys nigra*, homologous cloning was used to obtain a partial sequence of the *PPO* gene in *Phyllostachys nigra* (named *PnPPO*). The gene structure and the expression pattern in tissue cultured seedlings with different degrees of browning were checked using reverse transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The sequence revealed a homolog of the *PPO* gene in *Oryza sativa* and *Triticum aestivum* with the amino acid belonging to tyrosinase. Also, RT-PCR results showed that with high levels of browning, *PnPPO* had strong expression. Thus, the expression of *PnPPO* was related to the degree of browning. [Ch, 4 fig. 15 ref.]

Key words: forest biology; polyphenol oxidase; *Phyllostachys nigra*; tissue browning

多酚氧化酶 (polyphenol oxidase, PPO) 是一种金属蛋白酶, 于 1895 年被发现, 广泛分布于动物、植物、真菌和细菌中^[1-2]。近几十年来, 科研人员对 PPO 及其编码基因进行了广泛深入的研究, 从多种植物中分离了 PPO 蛋白, 并克隆到了其编码基因, 进而对其基因结构、功能、分布情况进行了分析。研究显示 PPO 与植物的生物合成^[3]、光合作用^[4]、抗逆性^[5]和褐化^[6-7]等方面有关。PPO 是导致组织培养过程中褐化现象的重要原因, 它能作用于酚类物质引起材料的褐化。紫竹 *Phyllostachys nigra* 是一种优良的观赏竹种, 具有广阔的市场前景和经济价值。现虽已成功培育出紫竹组培苗, 但由于组培过程中严重的褐化使得组培苗不能够大规模生产和推广。目前, 植物组培褐化问题研究主要集中在水果中, 如桃 *Prunus persica*^[8], 猕猴桃 *Actinidia chinensis*^[9], 苹果 *Malus pumil*^[10], 梨 *Pyrus serotina*^[11] 和山核桃 *Carya cathayensis*^[12] 等, 而对竹类的褐化问题研究较少。事实上, 竹子组织培养过程中也存

收稿日期: 2009-10-27; 修回日期: 2009-12-31

基金项目: 浙江省科学技术计划项目 (2007C22081, 2006C12008); 浙江农林大学科研发展基金资助项目 (2351000721)

作者简介: 王弋, 从事植物分子生物学研究。E-mail: wangyi30626@163.com。通信作者: 郭小勤, 副教授, 博士, 从事植物分子生物学研究。E-mail: xqguo@zjfc.edu.cn

在严重的褐化问题^[13],甚至会导致组织培养失败。国内竹子组培褐化问题研究的很少,顾小平等^[14]研究了小佛肚竹 *Bambusa ventricosa*, 凤尾竹 *Bambusa multiplex* 和孝顺竹 *Bambusa multiplex* 茎尖和带节茎段愈合组织诱导的褐变控制方法,发现利用抗氧化剂-抗坏血酸能明显降低褐变。耿树香等^[14]进行了巨龙竹 *Dendrocalamus sinicus* 外植体愈合组织防褐化处理试验,并筛选出了防褐化的最优培养基组合。但上述实验均是在生理生化水平上对褐化问题进行研究,没有深入了解竹子组培褐化的分子机制。笔者在紫竹组织培养过程中,发现紫竹组培苗在继代过程中会出现严重的褐化现象,最终死亡。本研究以紫竹组培苗为材料,对 *PPO* 基因进行研究,以期初步了解紫竹组培苗褐化与 *PPO* 基因的关系。

1 材料与方 法

1.1 研究材料及试剂

本研究所用紫竹组培苗采自浙江农林大学森林培育学科组培实验室。选取6株不同褐化程度组培苗作为实验样本。采集后用液氮速冻,放入-70℃冰箱保存。实验所用紫竹叶片采自浙江农林大学翠竹园。

菌株 *Escherichia coli* DH-5 α 和质粒回收试剂盒购自于上海生工技术服务有限公司。载体、反转录酶、PCR 试剂均购自宝生物公司。胶回收试剂盒购自北京鼎国公司。

1.2 总核糖核酸(RNA)及基因组 DNA 提取

采用羟基苯并三氮唑活性酰胺(TRIZOL)法提取总 RNA,采用十六溴基三甲基溴化铵(CTAB)法提取紫竹叶片基因组 DNA。

1.3 cDNA 第 1 链合成

反转录体系及条件,模板 RNA: 1.5 μg , 5 \times 反转录缓冲液: 4 μL , 脱氧核苷三磷酸(2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): 2 μL , RNA 酶抑制剂:(20 \times 16.67 nkat)0.5 μL , 寡聚胸苷酸: 50 pmol, 反转录酶(AMV):(10 \times 16.67 nkat)2.0 μL , 二乙基焦磷酸胺处理水: 10 μL , 反应条件为: 室温 10 min, 42℃保温 60 min, 冰水冷却 2 min, 最后-20℃保存。

1.4 紫竹 *PPO* 基因克隆及系统进化关系分析

根据水稻 *Oryza sativa*, 小麦 *Triticum aestivum* 和玉米 *Zea mays* 等禾本科植物 *PPO* 基因序列的保守区域,设计了 PPO3 引物, PPO3 正: 5'-GTACCTGGCCAAGTACGAGA - 3', PPO3 反: 5'-GGCCTC CTCGTCGTAGAAGA-3'。PCR 反应程序分别为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 38℃循环, 72℃ 5 min, 10℃保存。

用鼎国 XA014-1 胶回收试剂盒对目的片段进行回收纯化,连接到 pMD20 质粒载体上,转化后进行蓝白斑筛选,挑取白斑进行聚合酶链式反应(PCR)和酶切检测,选取阳性克隆进行测序。所得序列应用 Meglign 软件中的 by clustal W method 进行系统进化关系分析。

1.5 不同褐化程度组培苗中 *PPO* 基因的表达情况

选取褐化程度不同的6个紫竹组培苗作为样本。以 Actin 引物为内标引物,在 PPO3 扩增序列内部引物 PPO1 为紫竹基因特异引物。Actin 引物序列为, Actin 正 5'-GATCTTGCTGGGCGTGACCTC- 3', Actin 反 5'-CCATCGGGCATCTCG TAGC- 3', PPO1 引物序列为 PPO1 正 5'-TTCGCGCTGCCGTTCTGGAA- 3', PPO1 反 5'-GATGTGCCACATGCGGTCCA - 3'; Actin 扩增条件是: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 1 min, 27 循环, 72℃ 5 min, 10℃保存。PPO1 扩增条件是 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 53℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 循环, 72℃ 5 min, 10℃保存。扩增产物用 10 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳进行分离检测。

2 实验结果与分析

2.1 *PPO* 基因片段的克隆及序列分析

以 PPO3 为特异引物对紫竹 cDNA 和 DNA 进行扩增,分别得到 750 bp 和 1 000 bp 左右条带。测

序结果显示, 所获得的 cDNA 片段长 759 bp, 均编码氨基酸, DNA 片段长 1 001 bp。2 个序列比对后发现该片段至少包含 3 个外显子和 2 个内含子(图1), 其中第 1 个内含长 131 bp, 第 2 个内含子长 110 bp, 但 2 个内含子的剪切方式存在差别, 第 1 个内含子的剪切方式符合保守的/GT-AG/模式, 而第 2 个内含子的剪切方式为/GC-AG/模式。该 cDNA 编码 252 个氨基酸, 将氨基酸序列进行 blastp 比对(图 2), 发现该基因编码蛋白属于 PPO 家族中的酪氨酸酶。

图 1 *PnPPO* 结构Figure 1 Structure of *PnPPO*

```

1      GTACCTGGCCAAAGTACGAGAAAGCCGCTGGGACTCATGAAGAAGCTGCCGGCCGATGACCC
1      Y L A K Y E K A V G L M K K L P A D D P
61     GCGCAGCTTCGCGCAGCAGTGGCGACTGCATTGCCCGTACTCCGACGGCCGCTACGATCA
21     R S F A Q Q W R V H C A Y C D G A Y D Q
121    GGTTCGGTTACCGGACTTGGAGATCCAGATACACAACCTGCTCGCTCTTCTTCCCGTGGCA
41     V G L P D L E I Q I H N C W L F F P W H
181    CAGGTCTATCTCTACTTCCACGAGAGGATCCTTGGCAAGCTCATCGGCGACGACACGTT
61     R F Y L Y F H E R I L G K L I G D D T F
241    CGCGCTGCCGTTCTGGAACTGGGATGCCGCCAGGGCCGATGACGCTGCCAGCGATCTACAC
81     A L P F W N W D A P G G M T L P A I Y T
301    CAATAACTCGTCCCGCTGTATCTCCAGAGGGCCAAACCCCGCCACCAGCCACCGTTTCC
101    N N S S P L Y V E R R N P A H Q P P F T
361    ACTCGACCTCGACTACAGTGAGACCCGACCCGAGCATCCCAAAGATCAGCTGATCGATCA
121    L D L D Y S E T D P S I P K D Q L I D Q
421    AAACCTCAAGATCATGTACCGTCCAGATGATTGCCAGTCCCAAGACACAGTTATTCT
141    N L K I M Y R Q M I A S A K K T Q L F L
481    GCGGCAGCCCTACCGCGCCGCGGACGAGCCGAACCCAGGAGCGGCTCCATCGAGAACGT
161    G Q P Y R A G D E P N P G A G S I E N V
541    GCCGCACGGCCCACTCCACTTATGGACCGGTGATCCGAGGCAACCGAAGCGCGAGGACAT
181    P H G P V H L W T G D P R Q P N G E D M
601    GGGCAACTTCTACTCGGCGGGCCGACCCGCTCTTCTTCCGCGCACCACGGCAACGTCGA
201    G N F Y S A G R D P V F F A H H C N V D
661    CCGCATGTGGCACATTTGGCGTGGCCCTCCGCCCCAGCAACTGACTTCACCGACCCCGA
221    R M W H I W R G L R P S N T D F T D P E
721    GGGCTCGATGCAAGCTTCTCTTCTTACGACGAGGAGCC
241    W L D A S F L F Y D E E

```

图 2 *PnPPO* 核苷酸及推测氨基酸序列Figure 2 Nucleotide and predicted amino acid sequence of *PnPPO*

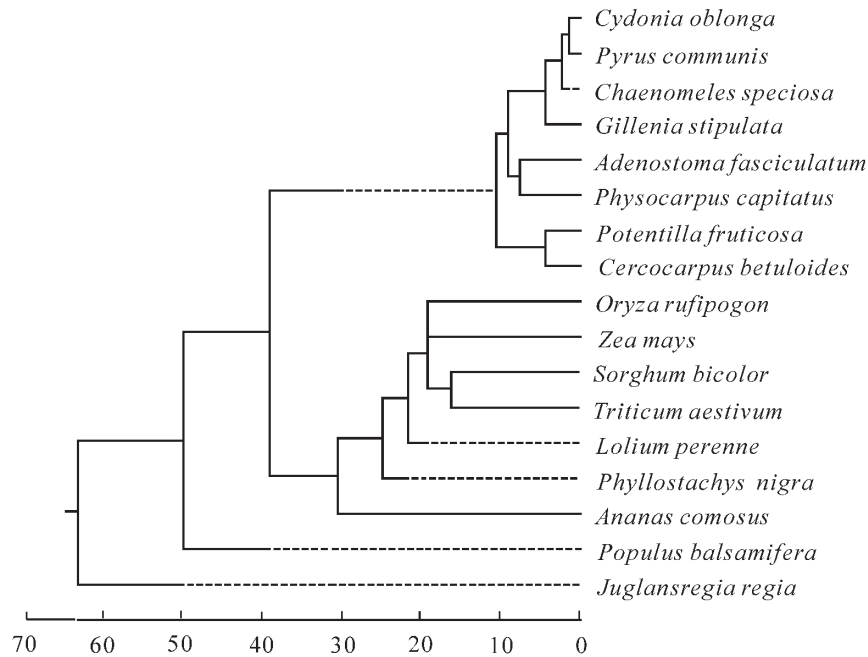
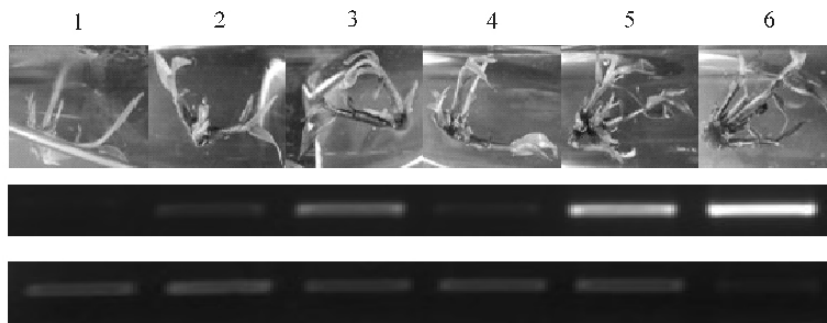
该 cDNA 序列与水稻、小麦、玉米等植物的 *PPO* 基因序列的同源性高达 80% ~ 88%, 将该片段命名为 *PnPPO*。随后, 将该氨基酸序列进行了系统进化关系分析(图 3)。*PnPPO* 与禾本科 Gramineae 植物聚类在一起, 其中与高粱 *Lolium perenne* 的进化关系最近。

2.2 *PnPPO* 在不同褐化程度组培苗中的表达情况

以 *PPO1* 为特异引物研究 *PnPPO* 在不同褐化程度组培苗中的表达情况。结果显示(图 4), 随着组培苗褐化程度不断加深, *PnPPO* 的表达呈明显的上升趋势, 表明 *PnPPO* 的表达量与褐化呈明显的相关性。从图 4 中可以看到, 样品 1 还未出现褐化现象, 此时 *PnPPO* 表达量很低, 样品 2 和样品 4 有轻度褐化, 此时 *PnPPO* 开始表达, 但表达量较低, 样品 3 和样品 5 褐化已很严重, 此时 *PnPPO* 表达量也较高, 样品 6 整株褐化, 已快死亡, 此时 *PnPPO* 的表达水平最高。

3 结论与讨论

紫竹组织培养受到严重的褐化问题影响, 本研究从这一实验现象出发, 研究了在紫竹酶促褐变起到重要作用的 *PnPPO*。基因序列分析显示紫竹 *PnPPO* 所编码 PPO 蛋白属 PPO 家族中的酪氨酸酶。氨

图3 *PnPPO* 系统进化关系分析Figure 3 Phylogenetic analysis of *PnPPO*图4 组培苗中 *PnPPO* 的表达情况

1~6为6个组培苗样本, PPO1电泳结果(中), Actin电泳结果(下)

Figure 4 The expressing of *PnPPO* gene in tissue culture seedling

1-6 represent the six tissue culture seedlings; PPO1(middle); Actin(down)

氨基酸序列与水稻和小麦的同源性高达80%和85%。基因组DNA与cDNA序列比对发现,该基因至少含有3个外显子和2个内含子,这与水稻、小麦等禾本科植物一致。*PPO*在很多植物中存在一个基因家族,少则2~3个,多则6~7个。我们在克隆紫竹*PPO*时还克隆到了另一个*PPO*同源基因,但该基因在褐化组培苗中未表达,但这说明紫竹中至少存在2个*PPO*同源基因。

对该基因在不同褐化程度组培苗中的表达情况进行研究,反转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)分析结果表明*PnPPO*表达与组培苗褐化程度具有明显相关性,组培苗褐化程度越高其*PnPPO*表达量也越高,这暗示*PnPPO*在紫竹组培苗褐化的生理过程中起到一定作用,但是*PnPPO*在褐化过程中具体起到什么作用,以及其作用机制还需进一步研究。

本研究利用分子生物学的方法,对紫竹组培过程中出现的褐化问题进行了研究,克隆了紫竹*PnPPO*基因。结果显示*PnPPO*表达与紫竹褐化有很大的关联,其表达情况与褐化程度具有明显相关性,*PnPPO*表达随着褐化程度加深而不断增高,这一发现为了解紫竹组培苗的褐化机理提供了重要线索。

致谢: 感谢浙江农林大学特聘教授郑康乐在实验和论文写作中提出的宝贵建议和意见。

参考文献:

- [1] 王曼玲, 胡中立, 周明全, 等. 植物多酚氧化酶的研究进展[J]. 植物学通报, 2005, **22** (2): 215 - 222.
WANG Manling, HU Zhongli, ZHOU Mingquan, *et al.* Advances in research of polyphenol oxidase in plants [J]. *Chin Bull Bot*, 2005, **22** (2): 215 - 222.
- [2] ALFRED M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review [J]. *Phytochemistry*, 2006, **67**: 2318 - 2331.
- [3] NAKAYAMA T, SATO T, FUKUI Y, *et al.* Specificity analysis and mechanism of aureone synthesis catalyzed by aureusidin synthase, a polyphenol oxidase homolog responsible for flower coloration [J]. *FEBS Lett*, 2002, **499** (1 - 2): 107 - 111.
- [4] VAUGHN K C, LAX A R, DUKE S. Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function [J]. *Plant Physiol*, 1988, **72**: 6496 - 6531.
- [5] PARTINGTON J C, BOLWELL G P, SMITH C. Changes in the location of polyphenol oxidase in potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber during cell death in response to impact injury: comparison with wound tissue [J]. *Planta*, 1999, **207**: 449 - 460.
- [6] ZHOU Y, DAHLER J M, WILLS R B, *et al.* The enzymes associated with blackheart development in pineapple [J]. *Food Chem*, 2003, **80**: 565 - 572.
- [7] ELTMAN R H, LARRIGAUDIÈRE C, WICHERS H, *et al.* PPO activity and polyphenol content are not limiting factors during brown core development in pears (*Pyrus communis* 'Conference') [J]. *Plant Physiol*, 1999, **154**: 697 - 702.
- [8] 庞勇. 果树组织培养中褐化现象的研究进展[J]. 甘肃林业科技, 2004, **29** (1): 16 - 18.
PANG Yong. Research progress of browning phenomenon in tissue culture of fruit trees [J]. *J Gansu For Sci Technol*, 2004, **29** (1): 16 - 18.
- [9] GUO Xiaoxing, HIRSCH A M. Microcallus formation from leaf mesophyll protoplasts in the genus *Actinidia* Lindl [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, **15** (12): 896 - 899.
- [10] BLOCK R, LANKES C. Reasons for tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during in vitro establishment [J]. *Gartenbauwissenschaft*, 1995, **60** (6): 276 - 279.
- [11] 晏本菊, 李焕秀. 梨外植体褐变与多酚氧化酶及酚类物质的关系[J]. 四川农业大学学报, 1998, **16** (3): 310 - 313.
YAN Benju, LI Huanxiu. The relationship between browning ratio in vitro PPO and phenols of pear explants [J]. *J Sichuan Agric Univ*, 1998, **16** (3): 310 - 313.
- [12] 万俊丽, 黄坚钦, 夏国华, 等. 山核桃幼胚不定芽的诱导[J]. 浙江林学院学报, 2009, **26** (5): 762 - 766.
WAN Junli, HUANG Jianqin, XIA Guohua, *et al.* Adventitious bud induction with immature embryo of *Carya cathayensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2009, **26** (5): 762 - 766.
- [13] 姚洪军, 罗小芳, 田砚亭. 植物组织培养外植体褐变的研究进展[J]. 北京林业大学学报, 1999, **21** (3): 78 - 84.
YAO Hongjun, LUO Xiaofang, TIAN Yanting. Development of explant browning researches [J]. *J Beijing For Univ*, 1999, **21** (3): 78 - 84.
- [14] 顾小平, 苏梦云, 岳晋军, 等. 几种丛生竹愈伤组织诱导与防褐变技术研究[J]. 林业科学研究, 2006, **19** (1): 75 - 78.
GU Xiaoping, SU Mengyun, YUE Jinjun, *et al.* Study on callus induction and brown stain prevention techniques of some sympodial bamboo species [J]. *For Res*, 2006, **19** (1): 75 - 78.
- [15] 耿树香, 普晓兰, 王曙光. 巨龙竹种子、小穗外植体愈伤组织的诱导培养[J]. 西部林业科学, 2006, **35** (4): 78 - 83.
GENG Shuxiang, PU Xiaolan, WANG Shuguang. Study on callus induction culture of *Dendrocalamus sinicus* [J]. *J West China For Sci*, 2006, **35** (4): 78 - 83.