

花叶矢竹叶绿体 *psbD* 基因的克隆与功能分析

许冰清, 安苗苗, 姜可以, 徐丽丽, 杨海芸, 周明兵

(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: 植物叶绿体光系统 II 是植物进行光能转化、水的裂解和释放氧气的重要蛋白复合物, *psbD* 基因编码光系统 II (PS II) 作用中心蛋白 D₂, D₂ 和 D₁ 构成的异源二聚体上结合着与电子传递有关的大部分辅助因子和色素分子。以花叶矢竹 *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* 为材料, 提取总 DNA, 聚合酶链式反应 (PCR) 扩增 *psbD* 基因全长序列 (*Pj-psbD*)。序列分析表明: 其开放阅读框 (ORF) 为 1 059 bp, 编码 352 个氨基酸, 相对分子质量为 39.59 kD, 等电点为 5.34, 有 6 个跨膜结构, 有别于高等植物中 *psbD* 蛋白普遍存在的 5 个跨膜区。*psbD* 还具备有多个与光合作用有关的结构域和功能位点。本实验用荧光定量 PCR 技术检测了花叶矢竹叶片 3 个不同生长阶段和 3 种叶色中 *psbD* 基因的表达量。分析表明: 在花叶矢竹叶片生长发育时期, 为了满足叶片生长发育和叶绿体的形成的需要, *psbD* 基因表达量逐步提高。研究还发现: *psbD* 在白叶中的表达量显著高于绿叶, 这可能与植物的光保护机制有关, 降低强光对白色和部分白叶的光合系统的损伤。图 8 表 1 参 25

关键词: 分子生物学; 花叶矢竹; *psbD* 基因; 克隆; 叶色变异; 荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR)

中图分类号: S795; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2015)04-0557-09

Cloning and functional analysis of the *psbD* gene in *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

XU Bingqing, AN Miaomiao, JIANG Keyi, XU Lili, YANG Haiyun, ZHOU Mingbing

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

Abstract: Photosystem II (PS II) of a plant chloroplast is an important protein complex in light-dependent reactions of oxygenic photosynthesis with the *psbD* gene encoding the center protein D₂. Until now, *psbD* gene in *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* still would not been sequenced and reported. In order to analysis the *psbD* gene structure and the potential relation of *psbD* gene function and leaf color variation, in this study the genomic DNA of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* was extracted and the full-length *psbD* gene sequence (*Pj-psbD*) was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The expression pattern for *Pj-psbD* was detected by the fluorescence quantitative PCR technique in three different growth (S₁, S₂ and S₃) stages using green, stripe and albino leaves of *P. japonica* f. *akebonosuji* leaves with three material replicates and three experiments replicates. Results showed that the Open Reading Frame (ORF) of *Pj-psbD* was 1 059 bp long encoding 352 amino acids with a relative molecular weight of 39.59 kD and an isoelectric point of 5.34. In the *Pj-psbD* polypeptide chain, there were six transmembrane domains, plus multiple photosynthesis domains and other function sites. Among the three colors of leaves the *psbD* expression level in the three growth stages of the albino leaves was highest with more than 2-4 times than those of the according three growth stages of the green leaves. The continuously increasing expression levels of the gene along with leaf growth and development for

收稿日期: 2014-09-22; 修回日期: 2014-11-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31170565, 31270645, 31470615); 浙江省自然科学基金资助项目(LR12C16001, LY12C16002)

作者简介: 许冰清, 从事竹类植物基因组进化研究。E-mail: 349450241@qq.com。通信作者: 周明兵, 副教授, 博士, 从事竹类植物基因组进化研究。E-mail: zmbin@163.com

the three types of leaves could meet the formation needs of the chloroplast, and the high *psbD* expression level in the albino leaf could be the protection mechanism that inhibits light damage in the photosynthetic system. [Ch, 8 fig. 1 tab. 25 ref.]

Key words: molecular biology; *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*; *psbD* genes; cloning; leaf color variation; quantitative real time-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

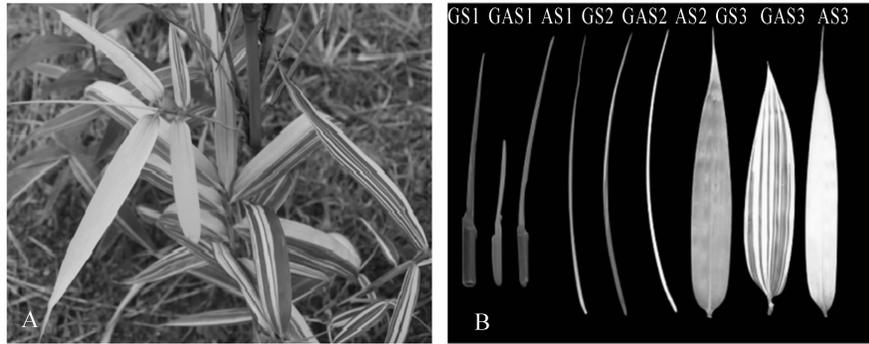
高等植物中进行光合作用的4类复合物均分布于叶绿体类囊体膜中,它们分别是光系统Ⅱ(PSⅡ),细胞色素 b6f 复合物、光系统Ⅰ(PSⅠ)以及三磷酸腺苷酶(ATP 合酶)^[1]。光系统Ⅱ主要分布在垛叠的类囊体膜上,是一种包含 P680 反应中心的光合膜蛋白,由原初电子传递组分和 20 多种蛋白组成。光系统Ⅱ复合体主要由 PSⅡ 核心(主要包括 D₁, D₂ 和细胞色素 b559),核心天线蛋白(CP43 和 CP47),捕光天线复合体(LHCⅡ)和放氧复合体外周蛋白组成^[2]。光系统Ⅱ中能进行光能转化、水的裂解和释放氧气,在光合作用过程中非常重要。*psbA* 和 *psbD* 分别编码光系统Ⅱ反应中心蛋白 D₁ 和 D₂ 蛋白。D₁ 和 D₂ 蛋白组成二聚体再与 PSⅡ 反应中心色素——叶绿素 P680 分子结合,共同构成光系统Ⅱ的光化学反应中心。其中的 D₂ 蛋白按照同步翻译-组装的模型插入类囊体膜^[3-4],并在类囊体膜上跨膜 5 次,最终形成 N 端在基质、C 端在囊腔的跨膜蛋白^[5],D₁ 蛋白以相同方式跨类囊体膜^[5-6]。D₁ 和 D₂ 蛋白在许多物种中都非常的保守,如高等植物、绿藻、眼虫和一些细菌^[7]。由 D₁ 和 D₂ 构成两者组成的异源二聚体上结合着与电子传递有关的大部分辅助因子和色素分子,如原初电子供体 P680,原初电子受体 Pheo_a,β-胡萝卜素,4 个辅助 Chl_a 分子和 1 个非血红素铁。D₁ 蛋白上的 Tyr161(YZ)和 D₂ 蛋白上的 Tyr161(YD)充当了电子传递载体。D₁ 和 D₂ 蛋白的 D-E 连接段分别提供了质体醌 QB 和 QA 的结合位点,QA 可能通过氢键结合着 D₂-His215, Ala261 和 Trp254^[8]。D₂ 蛋白代谢周转较慢,但在光抑制条件下速度加快^[2]。D₂ 不仅可以稳定膜上的光系统Ⅱ复合体,对 D₁ 蛋白的翻译及翻译后水平的调节也起到特殊的作用^[9]。花叶矢竹 *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* 原产于日本,是一种优良的珍稀观赏竹种,株高 2 m 左右,属于矮小型混生竹种,由矢竹 *Pseudosasa japonica* 自然变异而来,叶片颜色为绿白或白绿色条纹,竹丛优美,是重要的园林景观植物^[10]。引种栽培至浙江农林大学翠竹园后,其叶片在生长发育过程中,产生叶色条纹变异,可呈现绿色、白色、绿白相间条纹。条纹的深浅、形状和出现个数和位置都不稳定,还会随着栽培条件的变化而变化^[11]。经长期观察发现,来自同一叶芽的叶片,其叶色变化模式是一致的,即如果第 1 片展开叶为接近纯白叶,第 2 层、第 3 层以及最后 1 层叶片展开后叶色也接近纯白叶。*psbD* 基因在叶绿体的进化过程中变化较小,高度保守^[12]。本实验从花叶矢竹中克隆到 *psbD* 基因,对其序列进行了分析,并提取花叶矢竹总 RNA,用反转录的 cDNA 为模板进行荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR),分析 *psbD* 基因在不同叶色、不同生长时期的表达情况,探讨了花叶矢竹叶色变异与光合系统 *psbD* 基因的关系。

1 材料和方法

1.1 植物材料和主要试剂

psbD 基因克隆的实验材料为花叶矢竹(由日本引种栽培于浙江农林大学翠竹园)生长良好的幼嫩叶片。选取 3 种叶色类型,包括全绿叶(green, G),绿白相间条纹叶(green and albino, GA, 1 片叶子上绿和白各占约 50%)和全白叶(albino, A)。每个类型的叶片各取了来自同一叶芽的 3 层叶片,即未暴露叶(S1),卷曲暴露叶(S2)和全展开叶(S3),总共有 9 个样品(图 1),用于荧光定量 PCR 分析。

AT 克隆 pMD18-T Vector, *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司, SanPrep 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司的。转化用的大肠埃希菌 *Escherichia coli*, DH5 α 由本实验室保存。RNeasy Mini Kit 和 RNase-Free DNase Set 试剂盒购自 QIAGEN 公司。SYBR Premix Ex TapTM II (Tli RNaseH Plus) 和 PrimeScriptTM Master Mix (Perfect Real Time) 试剂盒购至于 TaKaRa 公司。根据毛竹 *Phyllostachys edulis* 的 *Actin* 基因设计引物,作为内参^[13],用于荧光定量 PCR 分析。PCR 引物均由生工生物工程(上海)有限公司合成。



A: 花叶矢竹; B: 花叶矢竹的取样部分

图 1 花叶矢竹

Figure 1 *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* samplings

1.2 方法

1.2.1 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法提取花叶矢竹总 DNA 选取生长良好的花叶矢竹幼嫩叶片, 用 CTAB 法^[14]提取花叶矢竹总 DNA, 用于 *psbD* 基因的克隆。

1.2.2 PCR 扩增 *psbD* 保守区域 根据已报道的 *psbD* 序列保守区域设计了 1 对引物(*psbD*-J-5, *psbD*-J-3, 表 1)。以花叶矢竹 DNA 为模板, PCR 反应体系如下: 10×PCR 缓冲液(无镁离子 Mg^{2+})2.0 μ L, 氯化镁(25 mmol·L⁻¹)1.2 μ L, 引物各 0.8 μ L, TaKaRa *Taq* 0.1 μ L, 三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTP)1.6 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, 灭菌蒸馏水 12.5 μ L, 总反应体积 20.0 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后按下列循环参数进行扩增反应: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 经 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C, 10 min, 以确保新生链延伸完全。PCR 扩增产物经 10 g·kg⁻¹TAE 琼脂糖凝胶电泳检验。采用上海生工生物工程公司胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段, 与 PMD18-T 载体连接, 将 PCR 连接产物转化大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 感受态细胞, 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 1 h 后涂板[含氨苄西林(Amp)的 Luria-Bertani 培养基(LB)平板], 37 $^{\circ}$ C 培养 12~16 h, 直至出现单菌落, 用枪头挑取单克隆至装有 1.0 mL LB 培养液(含 Amp)的 1.5 mL 离心管中, 37 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 2~4 h。取 1.0 μ L 菌液, 用引物 *PsbD*-J-5 和 *PsbD*-J-3 验证, PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后按下列循环参数进行扩增反应: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 110 s, 经 35 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经 10.0 g·kg⁻¹TAE 琼脂糖凝胶电泳, 将检测正确的阳性克隆菌液于-70 $^{\circ}$ C 保存, 并送 Invitrogen 上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.3 PCR 扩增 *psbD* 基因全长序列 将获取的 *psbD* 保守区域片段与已报道的竹子叶绿体基因组比对^[15], 设计了 1 对引物(*PsbD*-F-5, *PsbD*-F-3, 表 1)。以花叶矢竹 DNA 为模板, PCR 反应体系如下: 10×PCR 缓冲液(无镁离子 Mg^{2+})2.0 μ L, 氯化镁(25 mmol·L⁻¹)1.2 μ L, 引物各 0.8 μ L, TaKaRa *Taq* 0.1 μ L, dNTP 1.6 μ L, DNA 模板 1.0 μ L, 灭菌蒸馏水 12.5 μ L, 总反应体积 20.0 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后按下列循环参数进行扩增反应: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 44 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 经 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 10 min, 以确保新生链延伸完全。PCR 扩增产物经质量浓度为 10.0 g·L⁻¹TAE 琼脂糖凝胶电泳检验。采用上海生工生物工程公司胶回收试剂盒回收纯化目的 DNA 片段, 与 PMD18-T 载体连接, 将 PCR 连接产物转化大肠杆菌感受态细胞, 挑取阳性单克隆, 用引物 *PsbD*-F-5 和 *PsbD*-F-3 进行 PCR 菌检, 连接、转化与菌检过程同 1.2.2。将检测正确的阳性克隆菌液于-70 $^{\circ}$ C 保存, 并送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.2.4 实时定量 PCR 分析 根据试剂盒说明书提取花叶矢竹各个样品的总 RNA。所提取的总 RNA 的浓度采用 NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 测定, 并用质量浓度为 10.0 g·L⁻¹的琼脂糖凝胶检测。根据所用反转录试剂盒说明书, 10.0 μ L 的体系, 将提取的 RNA 反转录成 cDNA。包括 2.0 μ L 的 5×Prime-

表 1 *PsbD* 的 PCR 的引物序列Table 1 *PsbD* PCR primers sequences

引物名称	序列(5'→3')
<i>PsbD</i> -J-5	TGACTATAGCCCTTGGTAGA
<i>PsbD</i> -J-3	ACGTGGTAGAACCTCCTCAGG
<i>PsbD</i> -F-5	GCTCGGAAATGGTTGAAGTA
<i>PsbD</i> -F-3	TTCCCAGCCCACCAAGCAAA
<i>PsbD</i> -RT-5	TCCGTATTCTTATTTATCC
<i>PsbD</i> -RT-3	AAGTATTTGCACCATCACC
Actin-RT-5	CTCCTCGTCTCCTCCCGAA
Actin-RT-3	GTCCGTTGCTGTAAATGTGTGG

Script RT Master Mix(Perfect Real Time), 总 RNA 的量最大到 500 ng, 最后用没有 RNA 酶污染的水(RNase Free dH₂O)将总体系加到 10.0 μL。轻柔混匀后进行反转录反应。反应条件如下: 37 °C 15 min, 85 °C 5 s, 4 °C。得到的 cDNA 用于下一步的 RT-PCR 反应的模板。其反应体系为 10.0 μL 体系, 包括 0.8 μL 的反转录的 cDNA, 5.0 μL 的 2×SYBR Green I Mastermix, 各 0.4 μL 的上下游引物(引物序列见表 1, 浓度为 10.0 μmol·L⁻¹), 加双蒸水至反应总体积为 10.0 μL, 所有的样品均重复 3 次; 反应条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 5 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环。RT-PCR 使用的是 CFX96™ Real-Time System 仪器。

1.2.5 *psbD* 基因全长序列分析 通过美国国家生物技术信息中心(NCBI)ORF-finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)来鉴定序列的开放读码框(ORF); 核苷酸和氨基酸序列的同源性在 DNASTar, MAGE 5.0 等软件完成; 用 Protparam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)和 DNASTar 分析氨基酸的相对分子质量和等电点等理化性质; 通过 blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#>)获取蛋白序列的功能结构域信息; 通过 TMHMM(version 2.0)(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)分析蛋白的跨膜区域。

2 结果

2.1 花叶矢竹总 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取花叶矢竹总 DNA, 测得 DNA 样品光密度 $D(\lambda)$ 为 324.5 mg·L⁻¹。将提取到的 DNA 作为模板, 于 -20 °C 冰箱保存, 用于后续 PCR 扩增。

2.2 PCR 扩增 *psbD* 保守区域

以花叶矢竹叶绿体 DNA 为模板, 以 *psbD*-J-5 和 *psbD*-J-3 为引物, PCR 扩增 *psbD* 保守区域, 测序结果表明: 克隆到的片段大小为 1 046 bp。通过 NCBI 上 Blast 比对, 结果表明: 扩增片段为 *psbD* 3' 端部分序列, 因此命名为 *psbD*-P(图 2)。

2.3 *psbD* 基因全长的克隆

以花叶矢竹叶绿体 DNA 为模板, 以 *psbD*-J-5 和 *psbD*-J-3 为引物进行 PCR 扩增, PCR 产物用质量浓度为 10 g·L⁻¹ TAE 的琼脂糖凝胶电泳, 经 EB 染色后, 在 1 125 bp 左右有亮带(图 3), 与预测的基因片段 1 062 bp 大小相符, 初步确定为目的基因片段。测序结果表明, 插入片段大小为 1 062 bp(图 4), 包含完整的 *psbD* 序列, 命名为 *Pj-PsbD*。

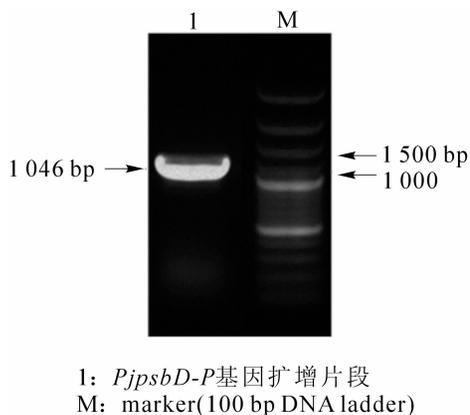


图 2 花叶矢竹 *psbD*-P 基因片段电泳检测图

Figure 2 Electrophoresis of the amplification fragment of *PjpsbD*-P gene of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

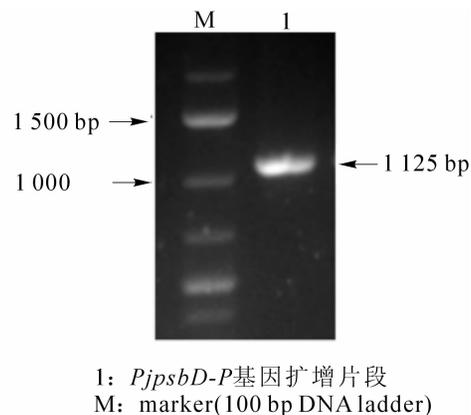


图 3 花叶矢竹 *psbD* 基因电泳检测图

Figure 3 Electrophoresis of the amplification fragment of *PjpsbD* gene of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji*

2.4 *psbD* 基因和编码蛋白序列分析

用 DNASTar 软件和 NCBI 的 Blast 在线软件分析测序结果, 该基因开放阅读框(ORF)的核酸序列及推导出的氨基酸序列如图 4 所示。结果表明: 花叶矢竹 *psbD* 基因序列含有 1 个 1 059 bp 的开放阅读框(ORF), 编码 352 个氨基酸。用 Protparam(<http://us.expasy.org/tools/protparam.html>)进行基因序列编码的蛋白质分析预测。该蛋白氨基酸相对分子质量为 39.59 kD, 理论等电点为 5.34, 不稳定系数约为 41.13。

```

1  [ATG]ACTATAGCCCTGGTAGAGTTACTAAAGAAGAAAATGATCTATTTGATATTATGGACGACTGGTTACGAAGGGACCGTTTCGTTTTT
1  M T I A L G R V T K E E N D L F D I M D D W L R R D R F V F
91  GTAGGATGGTCCGGCCTATTGCTCTTCTTCTTGTGCTTATTTCGCTTTAGGGGGTGGTTACAGGACAACCTTTTGAACCTCTTGGTAT
31  V G W S G L L L F P C A Y F A L G G W F T G T T F V T S W Y
181 ACCCATGGATTGGCTAGTTCCTATTGGAAGGTGTAATTTCTTAACCGCGCAGTTCCACCCCTGCCAATAGTTAGCACACTTTG
61  T H G L A S S Y L E G C N F L T A A V S T P A N S L A H S L
271 TTGCTACTATGGGCCCCGAAGCGCAAGGGGATTTACTCGTTGGTGTCAATTAGGCGGCTGTGGACTTTTTCGCTCTCCATGGGGCT
91  L L L W G P E A Q G D F T R W C Q L G G L W T F V A L H G A
361 TTTGCACTAATAGGTTTACGTTCAGTCAATTTGAACTGCTCGGTCTGTTCAATTGCGGCCTATAATGCAATTCATTCTCTGCTCCA
121 F A L I G F M L R Q F E L A R S V Q L R P Y N A I S F S A P
451 ATCGCTGTTTTTCGTTCCGTTATTCCTATTATCCACTGGGGCAATCTGGTTGGTCTTTGCGCGGAGTTTGGCGTAGCAGCGATATTT
151 I A V F V S V F L I Y P L G Q S G W F F A P S F G V A A I F
541 CGATTCACTCTTTTCCAAGGATTCATAATTGGACATTGAACCCATTTCATATGATGGGAGTTGCCGGAGTATTAGCGCAGCTCTG
181 R F I L F F Q G F H N W T L N P F H M M G V A G V L G A A L
631 CTATGCGCTATTATGGGCGACCGTAGAAAACACTCTATTGAGGACGGTGATGGTCAAATACTTTCCGCGCTTTTAAACCAACTCAA
211 L C A I H G A T V E N T L F E D G D G A N T F R A F N P T Q
721 GCTGAAGAACTTATTCAATGGTCACTGCTAATCGCTTTTGGTCCAAATCTTGGTGGTGGTTTTTCTAATAAACGTTGGTTACATTC
241 A E E T Y S M V T A N R F W S Q I F G V A F S N K R W L H F
811 TTTATGCTATTTGACCCGTCACCGGTTTATGGATGAGTGTCTATTGGCGTAGTCGGCTGGCTCTGAACCTACGTGCCTACTGCTCGTT
271 F M L F V P V T G L W M S A I G V V G L A L N L R A Y D F V
901 TCCCAGGAAATCCGTCGACGGGAAGATCCTGAATTTGAGACTTCTACACTAAAAATATTCTTTTAAACGAGGGTATTGTCGATGGATG
301 S Q E I R A A E D P E F E T F Y T K N I L L N E G I R A W M
991 GCAGCTCAGGATCAGCTCATGAAAATCTTATATCCCTGAGGAGGTTTACCACGTTGAAACGCTCTT[TA]
331 A A Q D Q P H E N L I F P E E V L P R G N A L *
    
```

方框内为转录起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA。

图 4 *psbD* 编码区核酸序列及其推导出的氨基酸序列

Figure 4 Nucleotide and predicted amino acid sequence of *psbD*

用 TMHMM (version 2.0) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) 预测蛋白的跨膜区域，跨膜结构预测结果显示含有 6 个跨膜区 (图 5)，这与高等植物中已经证实的 5 个跨膜区有差别^[5-6]。

psbD 氨基酸序列包含有 6 个蛋白接口，13 个功能域，其中相关的功能域见图 6。6 个蛋白接口分别为：蛋白 J 接口，蛋白 H 接口，蛋白 X 接口，蛋白 L 接口，蛋白 T 接口，蛋白 M 接口。13 个功能域分别是：D₁ 界面，叶绿素结合位点，脱镁叶绿素结合位点，β-胡萝卜素的结合位点，细胞色素 b559 β 界面，醌结合位点，细胞色素 b559 α 界面，核心的捕光蛋白界面，CP43 界面，铁离子结合的结合位点的，锰稳定多肽的界面，溴的结合位点和细胞色素 c-550 界面。

资料表明：由 D₁ 和 D₂ 构成两者组成的异源二聚体上结合着与电子传递有关的大部分辅助因子和色素分子，如原初电子供体 P680，原初电子受体 Pheo_a，β-胡萝卜素，4 个辅助 Chl_a 分子和 1 个非血红素铁。D₁ 蛋白上的 Tyr161 (YZ) 和 D₂ 蛋白上的 Tyr161 (YD) 充当了电子传递载体。D₁ 和 D₂ 蛋白的 D-E 连接段分别提供了质体醌 QB 和 QA 的结合位点，QA 可能通过氢键结合着 D₂-His215，Ala261 和 Trp254^[8]。

用美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 基因数据库，对获得的 *PjpsbD* 基因序列进行了同源性分析，结果表明：*Pj-psbD* 基因编码的蛋白与其他物种的 *psbD* 基因有着较高的相似性 (图 6)，与玉米 *Zea mays*

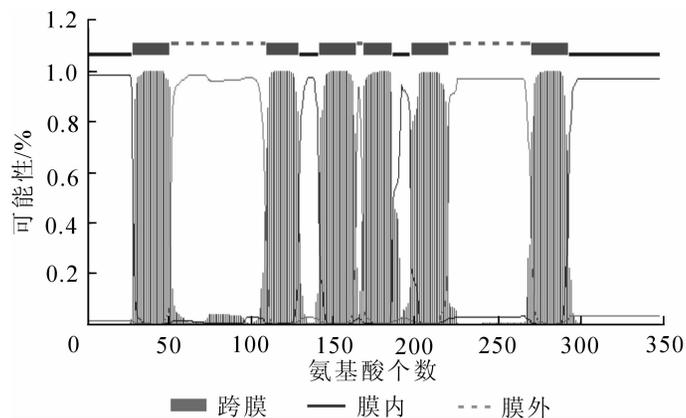


图 5 *psbD* 基因编码蛋白的跨膜区域

Figure 5 *psbD* genes encoding amino acid sequence across the membrane area

中的 *Zm-psbD* 一致性达 95%，与日本晴 *Oryza sativa* subsp. *japonica* 的 *OsJ-psbD* 一致性达 98%，与籼稻 *O. sativa* subsp. *indica* 中的 *OsI-psbD* 一致性达 98%，与大豆 *Glycine max* 中的 *Gm-psbD* 一致性达 97%。

2.5 进化树分析

通过 MAGE 5.0 运用 Neighbor-Joining 方法构建不同物种间的系统进化树。对 *Pj-psbD* 基因编码的蛋白质进行系统进化树分析(图 7)，对比毛竹(YP004733564.1)，水稻 *Oryza sativa* (AAS46108.1)，高粱 *Sorghum bicolor* (YP899392.1)，粟 *Foxtail millet* (AHV90309.1)，二穗短柄草 *Brachypodium distachyon* (B3TNB8.1)，玉米(NP 043009.1)，花叶矢竹与毛竹中的 *psbD* 基因亲缘关系较近，其次和水稻的 *psbD* 基因。

2.6 *psbD* 荧光定量 PCR 分析

用质量分数为 10.0 g·kg⁻¹ 的琼脂糖凝胶检测提取的 RNA 结构完整，可以用于定量 PCR 分析。由熔解曲线来检验引物特异性，产物没有引物二聚体或其他非特异性扩增，该引物可用来检测基因表达量。用反转录的 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR，以 Actin 做为内参，*psbD* 在花叶矢竹 9 个样品中的表达量如图 8。结果显示：在全绿叶(G)中，*psbD* 的表达量在全展开叶期(S₃)最低，其次是卷曲暴露叶期

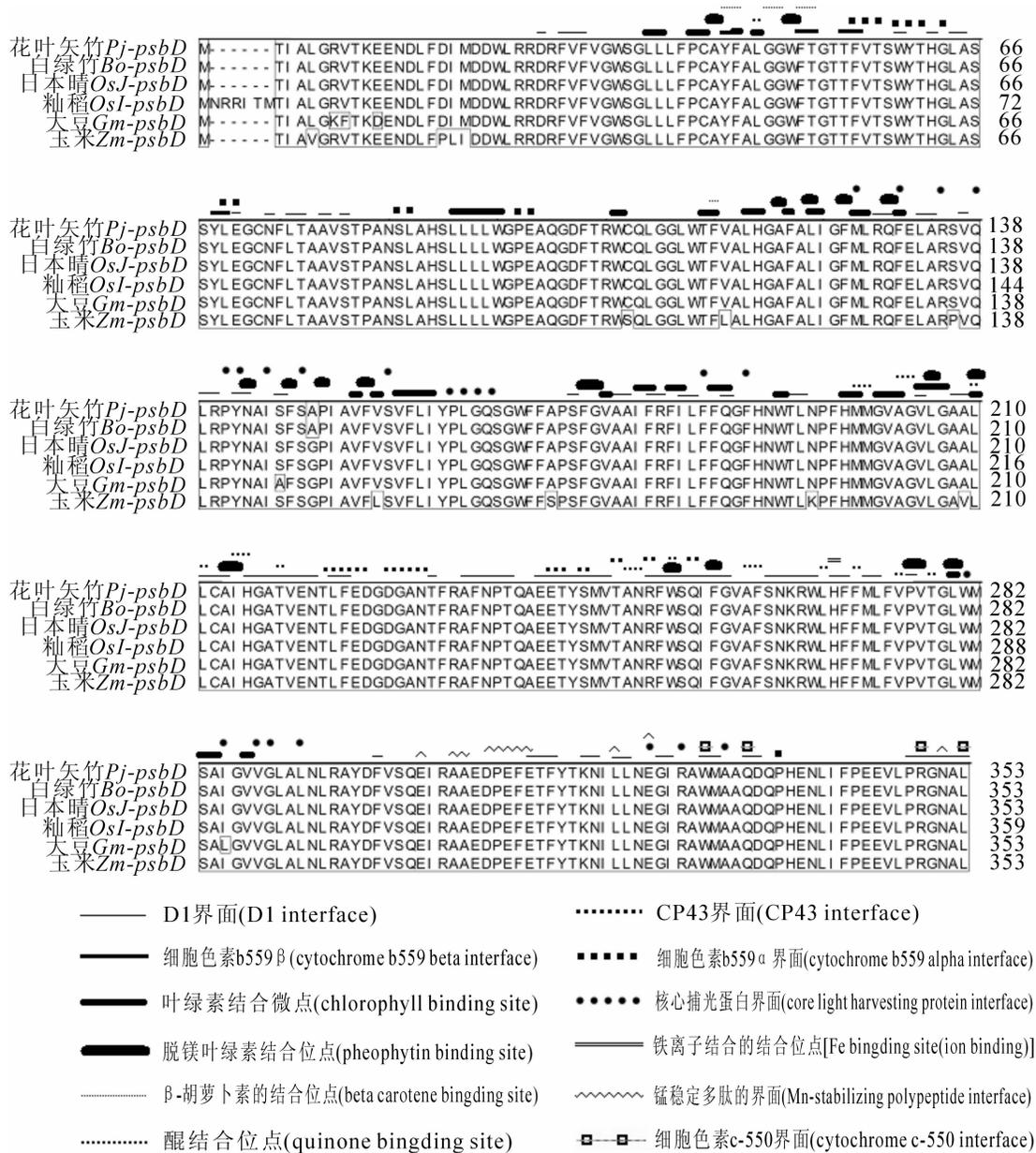
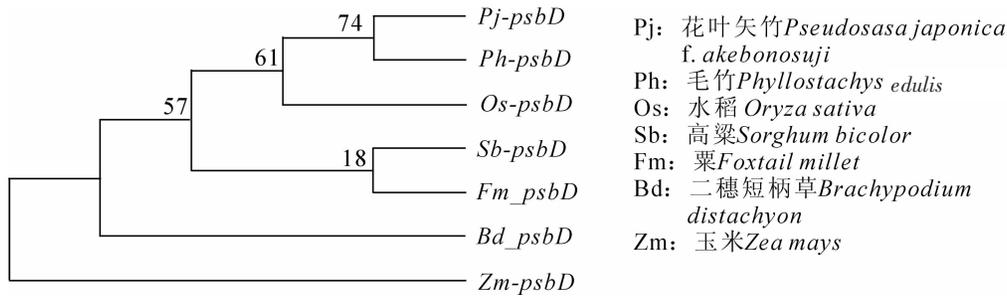


图 6 *psbD* 基因编码蛋白的多序列比对

Figure 6 Alignment analysis of amino acid sequences encoded by *psbD*

图 7 *psbD* 基因编码蛋白系统进化树分析Figure 7 Phylogenetic tree analysis of amino acid sequences encoded by *psbD*

(S₂), 表达量最高的是未暴露叶期(S₁); 绿白相间条纹叶(GA)和全白叶(A)中 *psbD* 基因在 S₃ 期的表达量也是最低, S₁ 和 S₂ 期的表达最高。对应的同一个发育阶段中, A 叶片的表达量最高, G 叶片表达量最低, 即随着叶片绿色部分体积的减小, 基因 *psbD* 的表达量逐渐上升。

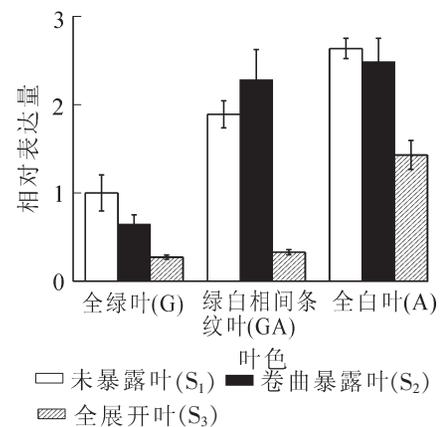
3 讨论

用 CTAB 法提取植物叶片 DNA, 会得到叶片中所有的 DNA, 总 DNA 里包括叶绿体 DNA, 使用这种模板可以进行叶绿体和线粒体基因组上的扩增。所以, 可以用 CTAB 法提取的植物叶片的 DNA 中扩增出 *psbD* 基因。叶绿体 DNA (chloroplast DNA, cpDNA) 属母性遗传, 相对于核基因组, 具有分子量小, 结构简单, 序列保守, 突变率较低, 遗传稳定等特点^[16]。大多数高等植物的叶绿体基因组结构是稳定的, 基因数量、排列顺序及组成上具有保守性^[17]。*psbD* 基因在叶绿体的进化过程中变化较小, 高度保守。由 *psbD* 基因构建的进化树表明花叶矢竹与毛竹中的 *psbD* 基因亲缘关系较近, 其次和水稻的 *psbD* 基因, 但与玉米的亲缘关系较远。部分分子证据也表明, 竹亚科 Bambusoideae 和稻亚科 Ehrhartoideae 有最近的亲缘性和最相似的基因序列结构^[18-19], 在早期的禾本科 Gramineae 分类中, 水稻曾被分在竹亚科之下, 与竹类植物分数不同的族^[20]。

光照能促进叶绿体的形成。在个体发育中叶绿体由原质体发育而来, 原质体存在于根和芽的分生组织中, 由双层被膜包围, 含有 DNA、一些小泡和淀粉颗粒的结构, 但不含片层结构, 小泡是由质体双层膜的内膜内折形成的。在有光条件下原质体的小泡数目增加并相互融合形成片层, 多个片层平行排列成行, 在某些区域增殖, 形成基粒, 变成绿色原质体发育成叶绿体。在黑暗性长时, 原质体小泡融合速度减慢, 并转变为排列成网格的小管的三维晶格结构, 称为原片层, 这种质体称为黄色体。黄色体在有光的情况下原片层弥散形成类囊体, 进一步发育出基粒, 变为叶绿体。

PS II 复合体是叶绿体重要组成部分, 其核心是由 2 个结构相似的 D₁ 和 D₂ 蛋白组成的光反应中心, D₂ 蛋白在维持 PS II 反应中心构像的稳定和电子传递方面起重要作用, 同时还参与调节 D₁ 蛋白表达^[21]。另一方面, 有研究表明: 从高等植物叶绿体中分离得到的 PS II 反应中心 D₁ 对强光不稳定, 其中色素分子以及组氨酸残基会发生光照破坏^[22-24], 最终导致 D₁ 蛋白的降解。研究表明: D₂ 蛋白上非原初电子受体 pheo(反应中心复合物中去镁叶绿素 a)对 P680 具有保护作用^[25]。因此, 叶绿体中的 D₂ 蛋白对 PS II 的正常工作意义重大。

本实验用荧光定量 PCR 技术检测了花叶矢竹 3 种叶色 3 种不同生长阶段中 *psbD* 基因的表达量, 得出成熟叶片(S₃)中的表达量明显低于生长发育时期(S₁, S₂), 而在不同叶色间比较, 在全白叶中基因 *psbD* 表达量最高, 在全绿叶(G)中的表达量最低, 并且随着叶片白色部分的增多, *psbD* 基因表达量逐渐

图 8 *psbD* 反转录 RT-PCR 在花叶矢竹不同组织不同时期的表达量Figure 8 Expression level of *psbD* in various organs of *Pseudosasa japonica* f. *akebonosuji* at different developmental stages

上升。

花叶矢竹叶片处于 S_1 和 S_2 生长发育阶段时, 叶面积变化最显著, 叶片生长最快, 为了满足叶片生长发育和叶绿体的形成的需要, *psbD* 基因在 3 种类型的叶片 S_1 和 S_2 表达量最高, 随着在叶片展开为成熟叶片以后, 叶片生长变慢, 表达量明显降低。在不同叶色间比较, 在全白叶(A)中基因 *psbD* 表达量最高, 这可能是不同叶色的叶片应对强光对光合系统的破坏的一种保护机制, 因为在同等光照条件下, 白叶透光率明显高于绿叶, 白叶的光合系统更容易因光破坏而影响正常功能, D_2 蛋白上非原初电子受体 pheo(反应中心复合物中去镁叶绿素 a)对 P680 具有保护作用, 因此, 白叶中需要 *psbD* 高表达来降低光对白色和部分白叶的光合系统的损伤^[24], 从而表现为在白叶中, *psbD* 基因表达量最高。

4 参考文献

- [1] ROCHAIX J D. Genetics of the biogenesis and dynamics of the photosynthetic machinery in eukaryotes [J]. *Plant Cell Online*, 2004, **16**(7): 1650 – 1660.
- [2] 陈晓亚, 韩红卫. 植物生理与分子生物学[M]. 4版. 北京: 高等教育出版社, 2012: 236.
- [3] ZHANG Lixin, PAAKKARINEN V, SUORSA M, *et al.* A SecY homologue is involved in chloroplast-encoded D1 protein biogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(41): 37809 – 37814.
- [4] ZHANG Lixin, PAAKKARINEN V, van WIJK K J, *et al.* Biogenesis of the chloroplast-encoded D1 protein: regulation of translation elongation, insertion, and assembly into photosystem II [J]. *Plant Cell Online*, 2000, **12**(9): 1796 – 1782.
- [5] TREBST A. The topology of the plastoquinone and herbicide binding peptides of photosystem II in the thylakoid membrane [J]. *Z Naturforsch*, 1986, **41c**: 240 – 245.
- [6] 朱树勇, 迟伟, 张立新. 分裂泛素化酵母双杂交系统研究光合膜蛋白相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, **33**(4): 350 – 356.
ZHU Shuyong, CHI Wei, ZHANG Lixin. Studying of the thylakoid membrane protein interactions through the split-ubiquitin yeast two hybrid system [J]. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(4): 350 – 356.
- [7] ERICKSON J M, DELEPELAIRE P, ROCHAIX J, *et al.* *Molecular Biology of the Photosynthetic Apparatus* [M]. New York: Cold Spring Harbor, 1985: 53 – 66.
- [8] DEBUS R J. The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1992, **1102**(3): 269 – 352.
- [9] ERICKSON J M, RAHIRE M, MALNOË, *et al.* Lack of the D2 protein in a *Chlamydomonas reinhardtii psbD* mutant affects photosystem II stability and D1 expression [J]. *EMBO J*, 1986, **5**(8): 1745 – 1754.
- [10] 杨海芸, 王晓芹, 张宁, 等. 日本花叶矢竹组织培养与叶色变异研究[J]. 竹子研究汇刊, 2010, **29**(4): 15 – 20.
YANG Haiyun, WANG Xiaoqin, ZHANG Ning, *et al.* Tissue culture and leaf color variation of *Pseudosasa japonica* ‘Akebonosuji’ [J]. *J Bamboo Res*, 2010, **29**(4): 15 – 20.
- [11] 姜可以. 花叶矢竹叶绿素生物合成关键基因 *PjPORB* 和 *PjCAO* 的克隆与功能分析[D]. 临安: 浙江农林大学, 2013.
JIANG Keyi. *Cloning and Functional Analysis of Key Genes Involved in Chlorophyll Biosynthetic Pathway in Pseudosasa japonica* ‘akebonosuji’ [D]. Lin’an: Zhejiang A & F University, 2013.
- [12] 施定基, 张超, 李世明, 等. 蓝藻与植物叶绿体光合系统基因的生物信息学研究[J]. 遗传学报, 2004, **31**(6): 627 – 633.
SHI Dingji, ZHANG Chao, LI Shiming, *et al.* Bioinformatics studies on photosynthetic system genes in *Cyanobacteria* and chloroplasts [J]. *Acta Genet Sin*, 2004, **31**(6): 627 – 633.
- [13] 齐飞艳, 胡陶, 彭镇华, 等. 毛竹实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选及成花基因 *PheTFL1* 表达分析[J]. 西北植物学报, 2013, **33**(1): 48 – 52.
QI Feiyan, HU Tao, PENG Zhenhua, *et al.* Screening of reference genes used in qRT-PCR and expression analysis of *PheTFL1* gene in Moso bamboo [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2013, **33**(1): 48 – 52.
- [14] 陈德富, 陈喜文. 现代分子生物学实验原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 100 – 101.
- [15] ZHANG Yunjie, MA Pengfei, LI Dezhu. High-throughput sequencing of six bamboo chloroplast genomes: phylogenetic

- implications for temperate woody bamboos (Poaceae: Bambusoideae) [J]. *PLoS One*, 2011, **6**(5): e20596. doi: 10.1371/journal.pone.0020596
- [16] 李璐滨, 唐征, 庄彩云, 等. 利用早园竹叶叶绿体基因序列分析其在禾本科植物中的分类地位[J], 园艺学报, 2009, **36**(10): 1498 – 1503.
- LI Lubin, TANG Zheng, ZHUANG Caiyun, *et al.* Taxonomic status of *Phyllostachys propinqua* McClure in Poaceae basing on sequence analysis of chloroplast genes [J]. *Acta Horti Sin*, 2009, **36**(10): 1498 – 1503.
- [17] PALMER J D. Comparative organization of chloroplast genomes [J]. *Ann Rev Genet*, 1985, **19**(1): 325 – 354.
- [18] 樊龙江, 郭兴益, 马乃训. 竹类植物与水稻等其他禾本科作物的系统进化关系及基因序列组成的比较[J]. 林业科学研究, 2006, **19**(2): 165 – 169.
- FAN Longjiang, GUO Xingyi, MA Naixun. Comparative study on phylogenetics and sequences composition of bamboos and cereals [J]. *For Res*, 2006, **19**(2): 165 – 169.
- [19] 王海莲, 管延安, 张华文, 等. 高粱基因组学研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2009, **28**(3): 549 – 556.
- WANG Hailian, GUAN Yanan, ZHANG Huawen, *et al.* Advances in the study on sorghum genomics [J]. *Genom Appl Biol*, 2009, **28**(3): 549 – 556.
- [20] 查普曼 G P, 皮特 W E. 禾本科植物导论(包括竹子及禾谷类作物)[M]. 王彦容, 译. 北京: 科学出版社, 1996: 30 – 49.
- [21] DINER B A, RAPPAPORT F. Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, **53**(1): 551 – 580.
- [22] 于振宝, 匡廷云, 唐崇钦, 等. 光系统 II 反应中心 D₁-D₂-Cyt b-559 的光破坏作用的研究 [J]. 生物物理学报, 1992, **8**(4): 634 – 639.
- YU Zhenbao, KUANG Tingyun, TANG Chongqin, *et al.* Photodamage of photosystem I reaction center D₁- D₂- cytochrome b559 complex [J]. *Acta Biophys Sin*, 1992, **8**(4): 634 – 639.
- [23] TELFER A, HE W Z, BARBER J. Spectral resolution of more than one chlorophyll electron donor in the isolated Photosystem II reaction centre complex [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990, **1017**(2): 143 – 151.
- [24] 匡廷云, 于振宝, 唐崇钦, 等. 光系统 II 反应中心 D₁/D₂/Cyt b-559 复合物的组氨酸残基的光照破坏[J]. 植物学报, 1993, **35**(3): 246 – 248.
- KUANG Tingyun, YU Zhenbao, TANG Chongqin, *et al.* Light-induced damage of histidine residues in photosystem II reaction center D₁/D₂/Cyt b559 complex [J]. *Acta Biophys Sin*, 1993, **35**(3): 246 – 248.
- [25] 匡廷云, 侯建敏, 彭德川, 等. 光系统 II 反应中心 D₁/D₂/Cyt b-559 复合物中去镁叶绿素 a 的光照破坏[J]. 植物学报, 1995, **37**(5): 401 – 404.
- KUANG Tingyun, HOU Jianmin, PENG Dechuan, *et al.* Light-induced damage of pheophytin a molecule in the isolated Photosystem II reaction center D₁/D₂/Cyt b559 complex [J]. *Acta Biophys Sin*, 1995, **37**(5): 401 – 404.