

大叶蛇葡萄类纤维素合成酶基因的克隆及其序列分析

蒲天珍, 张秀桥, 周佩娜, 熊晓妹, 龚玲*
(湖北中医药大学药学院, 武汉 430065)

[摘要] **目的:** 从药用植物大叶蛇葡萄 *Ampelopsis megalophylla* 中克隆得到类纤维素合酶 (Cellulose synthase-like, Csl) 基因 (*AmCsl*) 全长, 并对序列进行生物信息学分析。**方法:** 根据大叶蛇葡萄 *A. megalophylla* 转录组测序数据得到的 *AmCsl* 基因序列设计特异引物, 以嫩叶总 RNA 逆转录的 cDNA 为模板, 采用聚合酶链式反应 (PCR) 技术扩增 *AmCsl* 基因全长, 并进行 TA 克隆测序, 利用多种软件对该序列进行生物信息学分析。**结果:** *AmCsl* 全长 cDNA 为 1 438 bp, 包含 1 个 561 bp 的完整开放阅读框 (open reading frame, ORF), 编码 186 个氨基酸, 蛋白质分子式为 $C_{1011}H_{1547}N_{233}O_{257}S_{10}$, 理论相对分子质量为 22.40 kDa, 理论等电点 (PI) 为 7.59, 脂肪族指数 (AI) 为 116.88, 存在跨膜区, 无信号肽, 可能定位于内质网膜, 平均疏水系数为 0.670, 不稳定性指数为 42.56, 属于疏水性不稳定蛋白, 保守结构域包含了 1 个纤维素合成酶超家族结构域, 二级结构以 α -螺旋为主。氨基酸多序列比对和系统进化树分析发现, *AmCsl* 与同科植物葡萄有较高的同源性。**结论:** 获得了大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因的全长, 对其进行了初步的生物信息学分析, 为进一步研究大叶蛇葡萄多糖的积累和生物合成的调控奠定了必要基础。

[关键词] 大叶蛇葡萄; 类纤维素合酶; 基因克隆; 生物信息学分析

[中图分类号] R289;R284.1;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)20-0147-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192012

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190705.0844.001.html>

[网络出版时间] 2019-07-05 17:20

Cloning and Sequence Analysis of Cellulose Synthase-like Gene from *Ampelopsis megalophylla*

PU Tian-zhen, ZHANG Xiu-qiao, ZHOU Pei-na, XIONG Xiao-mei, GONG Ling*
(Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To clone cellulose synthase-like (Csl) gene from ethnic medicinal plant *Ampelopsis megalophylla*, and analyze its sequence by bioinformatics. **Method:** Specific primers were designed for *AmCsl* gene sequences obtained from *A. megalophylla* transcriptome sequencing data. The full-length cDNA of *AmCsl* gene was amplified by PCR using cDNA of young leaves as template, and TA clone and sequencing was performed. The sequence was analyzed by bioinformatics. **Result:** The full length cDNA was 1 438 bp, containing a 561 bp open reading frame (ORF), and encoding 186 amino acids, the molecular formula of protein was $C_{1011}H_{1547}N_{233}O_{257}S_{10}$, the theoretical relative molecular weight was 22.40 kDa, the theory isoelectric point (PI) was 7.59, and the aliphatic index (AI) was 116.88. There was a transmembrane region and no signal peptide, which may be located in the endoplasmic reticulum, the average hydrophobic coefficient was 0.670, and the instability index was 42.56. It belonged to a hydrophobic unstable protein. The conserved domain contained a cellulose synthase, and the secondary structure mainly was dominated by α -helix. Amino acid sequence alignment and phylogenetic tree analysis showed that *AmCsl* had a high homology with *Vitis vinifera*. **Conclusion:** The full length of *AmCsl* gene was obtained for preliminary bioinformatics analysis, which laid a necessary foundation for

[收稿日期] 20190116(005)

[基金项目] 湖北省教育厅中青年人才项目(Q20182003)

[第一作者] 蒲天珍, 在读硕士, 从事中药品种鉴定及新资源开发研究, E-mail:2660384868@qq.com

[通信作者] * 龚玲, 博士, 讲师, 从事中药品种鉴定及新资源开发研究, Tel:027-68890106, E-mail:g11224@163.com

further study on the accumulation of polysaccharides and the regulation of biosynthesis.

[Key words] *Ampelopsis megalophylla*; cellulose synthase-like; gene clone; bioinformatics analysis

植物多糖,在自然界分布广泛,目前已从怀山药、怀地黄^[1]、铁棍山药^[2]、橘红^[3]等多种植物中分离得到,具有抗肿瘤、免疫调节等作用,植物多糖具有安全性高、毒副作用小等优点,已经被广泛用于药物及保健品的开发。大叶蛇葡萄 *Ampelopsis megalophylla* 为葡萄科蛇葡萄属植物,其叶和嫩茎可以作为茶饮,名为“莓茶”,曾收载于《湖北中草药志》^[4],具有清热凉血等功效,现代药理学表明大叶蛇葡萄具有降血压、抗肿瘤、抗病毒、降血糖、抗菌和抗氧化等作用^[5-6]。水溶性多糖被报道为大叶蛇葡萄的活性成分之一,具有显著的抗肿瘤活性^[7]。课题组前期研究发现大叶蛇葡萄多糖含量较高,具有较强的抗氧化作用。有研究表明,大叶蛇葡萄的水溶性多糖主要由半乳糖、甘露糖、葡萄糖、阿拉伯糖和鼠李糖组成,摩尔比为 2.7:1.6:1.1:0.6:0.3^[7]。对其同科植物藤茶的多糖研究发现,主要组成单糖与大叶蛇葡萄相似^[8]。由此可见,半乳糖、甘露糖是蛇葡萄属多糖的主要成分。尽管这些药用植物多糖的提取、结构、药理作用已有广泛而深入地研究,然而有关大叶蛇葡萄多糖合成的分子机制及多糖生物合成关键酶尚未见报道。

纤维素合成酶超家族由纤维素合成酶(CesA)家族和类纤维素合成酶(Csl)家族组成^[9]。已有研究证实多个 Csl 家族基因直接参与了植物细胞壁多糖如甘露聚糖、葡甘露聚糖、木葡聚糖等合成^[10]。然而,目前对 Csl 基因的研究大多集中在非药用植物中,如在拟南芥中进行 Csl 基因靶向敲除,该植株茎中几乎检测不到葡甘露聚糖,表明 Csl 基因在甘露聚糖生物合成中起着独特的作用;在烟草中过表达 Csl 基因,甘露聚糖合成酶活性显著提高^[11]。在旱金莲中,Csl 基因表达量与木聚糖积累呈现一定的正相关^[12]。因此,挖掘及研究大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因,不仅可为大叶蛇葡萄多糖生物合成机制的阐明提供依据,也可为其他药用植物类似研究提供借鉴。

本研究基于课题组前期所得的大叶蛇葡萄转录组测序数据,以大叶蛇葡萄嫩叶为实验材料,利用聚合酶链式反应(PCR)技术克隆得到 *AmCsl* 基因全长 cDNA 序列,并对该序列进行了生物信息学分析,为进一步研究大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因调控多糖生物合成的作用以及多糖活性成分的开发利用奠定基础。

1 材料

ZF-20D 型暗箱式紫外分析仪(上海广豪分析仪器有限公司),DYY-6C 型电泳仪(北京市八一仪器厂),5424R 型台式离心机(德国 eppendorf 公司),Veriti 96-Well 型降落 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒,克隆载体 pMD18-T vector(天根生化科技有限公司,批号 R6918,K31103);反转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit,感受态细胞(Takara 公司,批号 AK4601,K8001A);DNA 凝胶回收试剂盒(武汉擎科伟业科技有限公司,批号 020170822);DL5000 Marker(批号 Cat#TSJ012,北京擎科新业生物技术有限公司)。

实验材料采自湖北省恩施土家族苗族自治州来凤县革勒车镇土家寨村附近移栽于实验室的植株,经湖北中医药大学药学院张秀桥教授鉴定为葡萄科植物大叶蛇葡萄 *Ampelopsis megalophylla*。采集新鲜嫩叶洗净,速冻于液氮中后,放于 -80 °C 冰箱低温保存。

2 方法

2.1 大叶蛇葡萄总 RNA 提取及 cDNA 合成 取适量大叶蛇葡萄嫩叶样品(约 100 mg),用液氮研磨成细粉,按照多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,并用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量和完整性。以总 RNA 为模板,按照反转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书,逆转录合成 cDNA,放于 -20 °C 保存。

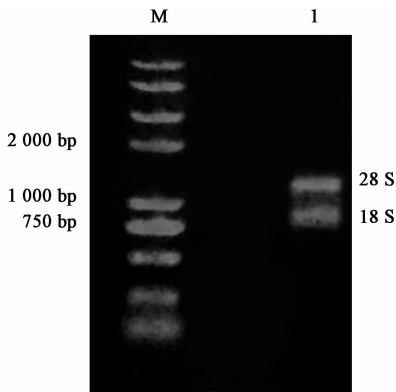
2.2 大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因克隆 根据大叶蛇葡萄转录组数据,利用 Primer5.0 设计 *AmCsl* 特异性引物,分别为 *AmCsl*-Z: 5'-TGCCATCCATTATTGATAGTTGA-3'; *AmCsl*-F: 5'-GAGGTTCTTCTGTCCCTCTGTCT-3'。以大叶蛇葡萄的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,PCR 体系如下: MgCl₂ 2.5 μL, 10 × LA Buffer 2.5 μL, dNTP 4 μL, LA Taq 0.25 μL, cDNA 3 μL, 上、下游引物各 1 μL, ddH₂O 10.75 μL, 共 25 μL。PCR 扩增程序如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 48 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后,对目的条带进行切胶回收,并连接至 pMD18-T 载体,转化感受态细胞 DH5α, 37 °C, 培养过夜,挑取单菌落进行菌落 PCR 验证。

将阳性单克隆送上海生物工程公司测序。

2.3 大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因生物信息学分析 利用“ORF Finder”在线软件查找 *AmCsl* 序列开放阅读框。利用 DNAMAN 软件进行氨基酸的翻译和氨基酸多序列比对。利用 ExPASy-ProtParam 和 ProtScale 在线软件预测蛋白的理化性质及亲/疏水性。利用 NCBI 在线工具 Conserved Domains 搜索蛋白保守结构域。利用 Signal P 4.1 Server 在线软件分析蛋白信号肽。利用 NetPhos 3.1 Server 在线软件分析磷酸化位点。利用 PSORT 在线软件分析亚细胞定位。利用 SOPMA 在线软件预测蛋白质二级结构。利用 TMHMM Server v. 2.0 分析蛋白的跨膜结构域。利用 MEGA 6.05 软件构建 N-J 系统进化树。

3 结果与分析

3.1 大叶蛇葡萄总 RNA 的提取及检测 总 RNA 置于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, RNA 的 18S 和 28S 条带清晰明亮且无杂质带(图 1), 微量紫外分光光度计测定结果为总 RNA 浓度为 $55.37 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $A_{260 \text{ nm}/280 \text{ nm}}$ 为 2.04, 表明 RNA 完整性和质量都较好, 能满足后续实验要求。



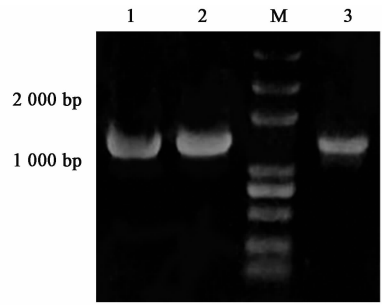
M. DL5000 Marker; 1. RNA

图 1 大叶蛇葡萄总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis of total RNA of *Ampelopsis megalophylla*

3.2 大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因的克隆 以大叶蛇葡萄总 RNA 为模板, 利用 *AmCsl*-Z 和 *AmCsl*-F 进行 PCR 全长扩增, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳显示, 在 1 400 bp 处有一特异性条带(图 2)。将切胶纯化后的目的条带连接到 pMD18-T 载体上, 转化到感受态细胞 DH5 α 中, 随机挑选 12 个单菌落进行菌落 PCR 扩增, 选取了 6, 11, 12 号阳性克隆进行菌液培养并测序(图 3)。测序结果显示 *AmCsl* 基因的 cDNA 序列长度为 1 438 bp, 与预期长度一致, 初步判定扩增片段为预期的目的基因。通过 NCBI 在线工具“ORF Finder”分析该序列, 发现该序列含有一个

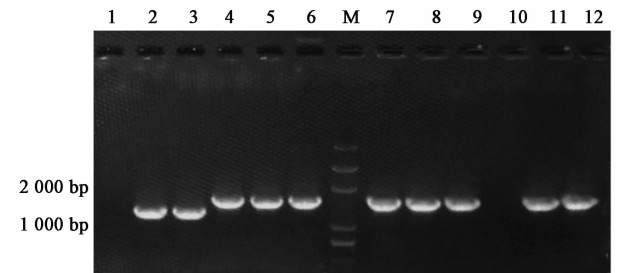
561 bp 的完整开放阅读框(ORF), 并编码 186 个氨基酸(图 4)。



M. DL5000 Marker; 1 ~ 3. PCR 产物

图 2 大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因 PCR 产物电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis analysis of *AmCsl* gene of *Ampelopsis megalophylla*



M. DL5000 Marker; 1 ~ 12. 菌落 PCR 产物

图 3 大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因菌落 PCR

Fig. 3 Colony PCR of *AmCsl* gene of *Ampelopsis megalophylla*

```
1 GAGGTTCTGTGTCCTGTCTCATGAATCTCATGCTTGAAGTTTTTCTGTTGCTTTTCCTTTCTCTCAGGTAAAAAAGTT
91 CATCTTATGTGAATTGGAGATGGT7TGAAGTATGATTGTGCGATGGAGACATTATACAGACCTCTCAATAGCATGTAGAGTTGG
181 AAATCCATCTATTGAATCCAGAAAGGAAGGGCTCTCTGGGTGTGGCCGCACACACTGTGCAGTCACTAATACAACATAAGAGTGG
271 TCAGAGGCCACCTTCAGATCTTCTCTCGAGGTACTGCTCATATATGGACATAAAAGGTTCTCTGAACTTCAACTCTCATAC
361 TCTAGCTATAATCTGTGGCTGCAACTGCTGGCTAGCTATACTATGTTGCTGCCATCCCTTGTCTCTGGAGGCATCTCTTAC
451 TTTCCAAAGGTATGAACATACATCATTTGAAACGGATACTTTCAAATATACACTTTTGGTAGTACAGAACGCAATCACTATTGTG
541 CAAGGACAGGCCAACATGTCCATATATATGATGCTAGCTAGCAAAATTTCTTATATTCTCAAAAATTTAGTTTCTGACATGA
631 OGGATTTTCTAAACTTCAAAAAGAACAGTGGCTTCTTCTTCCATCTTAGAAAAGAGAAGTCTGGCATGACACTTGTCTTACC
721 CAAACAATTCAAATCTATATTGTGCCAGCAATGACTCATGTTACTTGTTCAGATATGGAGCTGTGGATCCTGCCCTTGGCTATGTC
241 M L L V Q I W S L W I L P F A Y V
811 ATTATCACCGAGTATGCATACAGCTTGGGGAGTTCTTGGTTGATGGCACATCAAAGTGGTGGAAATGTTCAGAGAATATGATG
271 I I T E Y A Y S L G E F L W F D G T I K G W W N V Q R I W M
901 TTCAGAGGCCAACCTTCTTACTTCTTGGCTTCTTGAATGATGATCTTGAAGTACTAGGTTTGGTGAAGACCACTTTGTGCTGACTGCA
301 F R R T T S Y F F G F L D T I L R I L G F A E T T F A V T A
991 AAGTGTGTGATGAAGATGTGTCTCAAGATACGAGGCAAGAAATGATGGATTTGGTCTTCCACCAATGTTAGCATTTAGCCACA
331 K V C D E D V S Q R Y E R E I M E F G S P S P M F T I L A T
1081 CTTGCAATGCTCAACTGTTCAAGTTTGGCTATTGTGTAAGAGGGTGGTGTGGATATCAAATTAAGGCTTTAGAGCATTAACTGTG
361 L A M L N L F S F A Y C V K R V V D I Q I K A L E S L T
1171 CAGATCTCTTATGGGGTGTGTCTGCTCACTCACTGCTTATACCAAGTCTCTTTTCCGCAAGAAGCAAGGAGGCATGCCAAC
391 Q I L L C G V L V L I N L P V Y Q G L F F R K D K G A M P N
1261 TGTGTACATCAAAATCGTGGCTTGTAGCAGCTGTGGCCGTCTCAATAGCTTGTATTAGTTTACTGTATGATAGCAAAAGTCTCTTTG
421 S V T Y K S V A L A L L A C S I A L Y *
1351 CCACACTTATATGATATATAGGCTGTGAATAGATGTTATATGAATTAATGATGACAGTTTCAACTATCAATAATGGATGGCA
```

图 4 大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因序列及预测氨基酸序列

Fig. 4 Sequence of *AmCsl* gene and its predicted amino acid of *Ampelopsis megalophylla*

3.3 大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因编码蛋白质的理化性质分析 利用 ExPASy-ProParam 预测 *AmCsl* 蛋白质的理化性质, 发现该蛋白质共有 186 个氨基酸, 理论蛋白质分子式为 $C_{1011}H_{1547}N_{233}O_{257}S_{10}$, 相对分子质量

为 22.40 kDa,等电点(PI)为 7.59,脂肪族指数(AI)为 116.88,带负电的氨基酸(Asp + Glu)有 14 个,带正电的氨基酸(Arg + Lys)有 15 个,不稳定指数为 42.56 > 40,表明该蛋白不稳定,平均疏水系数为 0.670,表明 AmCsl 蛋白为疏水性蛋白。在 186 个氨基酸中,含量最高的是亮氨酸为 14.0%,其次是异亮氨酸和苯丙氨酸均为 8.1%,最低的是半胱氨酸和天冬酰胺均为 2.2%。

利用 ExPASy-ProtScale 分析 AmCsl 蛋白的亲/疏水性(图 5),发现整条肽链的氨基酸预测值大部分位于正值。其中疏水性最强位于第 143 个氨基酸,最高为 3.356;亲水性最强位于第 86 和第 87 个氨基酸,最低均为 -2.322,进一步说明 AmCsl 蛋白为疏水性蛋白。

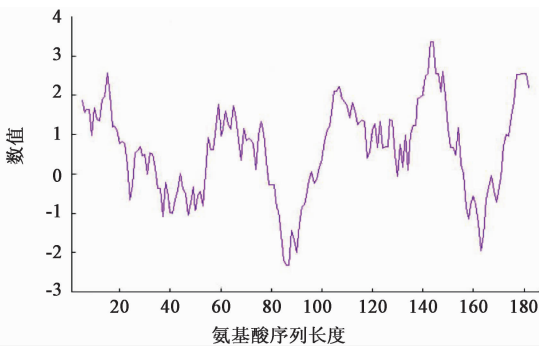


图 5 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白亲水性/疏水性预测
Fig. 5 Predicted hydrophobicity of AmCsl protein of *Ampelopsis megalophylla*

3.4 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白结构域预测 利用 NCBI 在线工具 Conserved Domains 预测蛋白保守结构域(图 6),发现 AmCsl 蛋白是纤维素合成酶(Cellulose_synt superfamily)超家族成员。植物纤维素合成酶蛋白是一种完整的膜蛋白,有许多高度保守的残基,被证明具有隐性的糖基转移酶活性,能够催化合成细胞壁多糖的骨架^[13-14]。

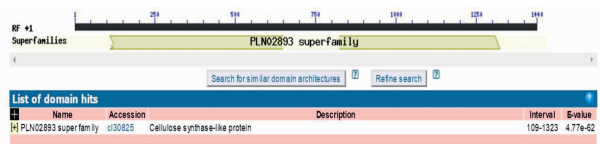


图 6 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白结构域保守域
Fig. 6 Conserved domain of AmCsl of *Ampelopsis megalophylla*

3.5 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白跨膜结构域预测 利用 TMHMM Server v. 2.0 预测跨膜结构域(图 7),发现 AmCsl 蛋白有 5 个跨膜区,分别位于 10 ~ 32, 53 ~ 75, 102 ~ 124, 131 ~ 153, 163 ~ 185, 平均跨膜区域为 22 个氨基酸残基。结果表明 AmCsl 蛋白可能

是一个与细胞信号传导有关的膜受体蛋白。

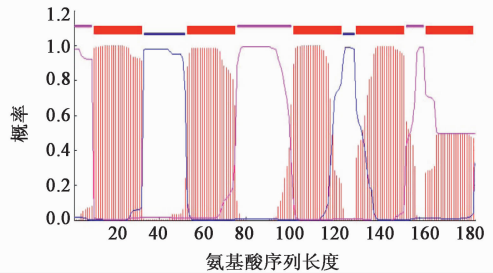
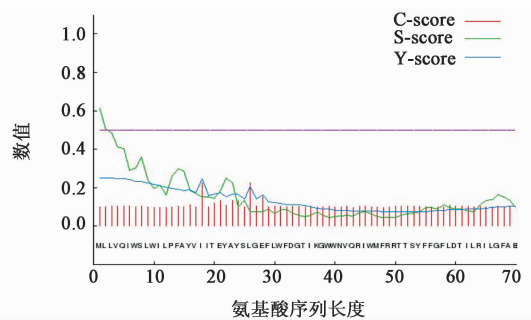


图 7 大叶蛇葡萄 AmCsl 跨膜结构域预测
Fig. 7 Predicted transmembrane domain of AmCsl of *Ampelopsis megalophylla*

3.6 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白信号肽及磷酸化位点预测 利用 Signal P 4.1 Server 分析蛋白的信号肽,结果表明 AmCsl 蛋白没有信号肽,说明其不是分泌蛋白(图 8)。利用 NetPhos 3.1 Server 分析蛋白的磷酸化位点,结果表明蛋白有 11 个 Ser 位点,12 个 Thr 位点,8 个 Tyr 位点。



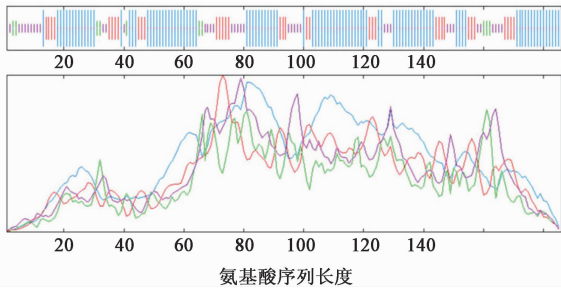
C-score. 原始剪切位点分值;S-score. 信号肽分值;Y-score. 综合剪切位点分值

图 8 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白信号肽预测
Fig. 8 Signal P-NN prediction of AmCsl protein of *Ampelopsis megalophylla*

3.7 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白的亚细胞定位分析 利用 PSORT 分析 AmCsl 蛋白的亚细胞定位,发现定位于内质网膜的概率为 68.5%,定位于细胞膜的概率为 64.0%,定位于高尔基体的概率为 46.0%,定位于内质网腔为的概率为 10%。结果表明 AmCsl 蛋白可能定位于内质网膜,进一步说明其不是分泌蛋白,这与信号肽预测结果一致。

3.8 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白二级结构预测分析 利用 SOPMA 分析 AmCsl 蛋白质的二级结构,结果显示在二级结构中, α -螺旋占 54.30%,无规则卷曲占 20.48%,延伸链占 19.89%, β -转角占 5.38%(图 9),说明大叶蛇葡萄 AmCsl 二级结构以 α -螺旋为主。

3.9 大叶蛇葡萄 AmCsl 基因编码氨基酸序列分析
3.9.1 大叶蛇葡萄 AmCsl 基因编码氨基酸多序列

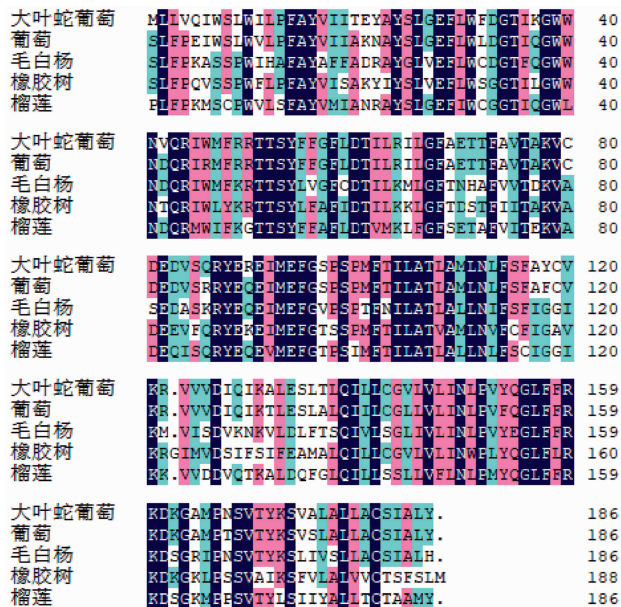


蓝色. α -螺旋; 红色. 延伸链; 绿色. β -转角; 橙色. 无规则卷曲; 紫色. 无二级结构氨基酸

图 9 大叶蛇葡萄 AmCsl 蛋白的二级结构

Fig. 9 Secondary structure of AmCsl protein of *Ampelopsis megalophylla*

分析 选取 NCBI 数据库葡萄 *Vitis vinifera* (XP_0106470721), 毛白杨 *Populus tomentosa* (APR6363679.1), 橡胶树 *Hevea brasiliensis* (XP_021641767.1), 榴莲 *Durio zibethinus* (XP_022719962.1) 和 AmCsl 氨基酸序列利用 DNAMAN 进行多序列分析, 发现 AmCsl 氨基酸和其他物种的类纤维素合酶具有较高相似性。其中与葡萄序列相似性最高, 高达 89%, 与毛白杨、橡胶树、榴莲的序列相似性分别为 64%, 64%, 63% (图 10)。



以相似性 50% 为阈值, 蓝色标注的是 $\geq 50\%$, 粉红色标注的是 $\geq 75\%$, 深蓝色标注的是 $\geq 100\%$

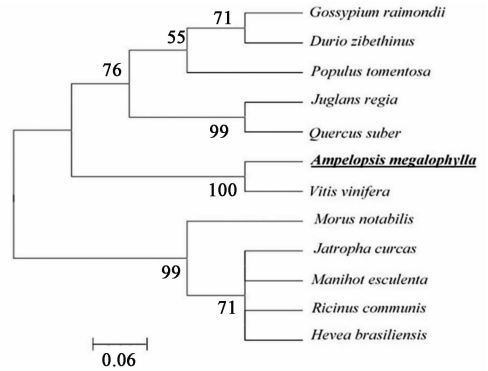
图 10 大叶蛇葡萄 AmCsl 氨基酸多序列对比

Fig. 10 Multiple sequence alignment of AmCsl amino acids of *Ampelopsis megalophylla*

3.9.2 大叶蛇葡萄 AmCsl 编码氨基酸的系统进化树分析

为了分析 AmCsl 与其他植物 Csl 的亲缘关

系, 在 NCBI 选取 11 个物种 Csl 蛋白的氨基酸序列, 利用 N-J 法构建系统进化树, bootstrap 为 1 000, 分析物种间的亲缘关系。结果发现大叶蛇葡萄 AmCsl 与葡萄 Csl 聚为一支, 说明大叶蛇葡萄和葡萄的亲缘关系较近, 这与传统物种分类一致 (图 11)。



Gossypium rainondii. 雷蒙德氏棉; *Durio zibethinus*. 榴莲; *Populus tomentosa*. 毛白杨; *Juglans regia*. 核桃; *Quercus suber*. 欧洲栓皮栎; *Vitis vinifera*. 葡萄; *Morus notabilis*. 川桑; *Jatropha curcas*. 麻风树; *Manihot esculenta*. 木薯; *Ricinus communis*. 蓖麻; *Hevea brasiliensis*. 橡胶树

图 11 大叶蛇葡萄 AmCsl 系统进化树分析

Fig. 11 Phylogenetic analysis of AmCsl of *Ampelopsis megalophylla*

4 讨论

近几年, Csl 家族基因已从拟南芥、小麦、水稻、石斛、毛果杨等多种植物中发现, 且其生物功能在不同植物中大多保守。在拟南芥中过表达铁皮石斛 *DoCslA6* 基因, 拟南芥中甘露糖含量明显增加^[15]。ZHANG 等^[16]采用转录组测序方法, 分析铁皮石斛成年及幼苗阶段纤维素合酶家族表达模式, 发现 *CslE* 和 *CslG* 基因家族基因显著上调, 推测可能这两个基因负责编码了甘露聚糖合成酶蛋白。Vega-Sa'nchez 等^[17]发现水稻中 *CslF6* 突变会导致含混合连接葡聚糖 (MLG) 量急剧下降, 将 *CslF6* 基因在不积累 MLG 烟草叶片中瞬时过表达, 结果在叶片中积累了大量的 MLG。这些研究均表明 Csl 基因在多糖尤其是甘露聚糖的合成中发挥了重要作用。

此外, 有研究还发现拟南芥中 *CslD* 基因在花粉的萌发和花粉管的伸长、正常根毛的顶端生长、植物对渗透压的耐受性、叶片细胞分裂等方面发挥了重要作用^[18]。果杨中 *PtrCslD* 参与根尖的形成, 并提供 *CslD* 家族成员参与了木质部的形成的初步证据^[19]。玉米中的 *ZmCslD1* 能控制玉米器官的大小^[20]。因此, Csl 基因不仅参与活性物质多糖合成过程, 而且在植物的生长发育中具有重要作用。

甘露糖为大叶蛇葡萄多糖的主要成分, 本研究从大叶蛇葡萄嫩叶中成功克隆得到了 AmCsl 基因,

获得了该基因的生物学信息,为进一步利用生物工程手段调控大叶蛇葡萄 *AmCsl* 基因表达,增加多糖合成和积累以及调控植物生长发育,从而改善大叶蛇葡萄品质提供重要依据。

[参考文献]

[1] 徐辉,朱金花,刘绣华,等. 怀山药、怀地黄及其“对药”中多糖的单糖组成及含量比较[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(13):61-65.

[2] 刘苏伟,文艺,张骆琪,等. 铁棍山药 SUS 基因 CDS 区克隆与生物信息学分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(9):136-143.

[3] 王可,尤良震,胡静波,等. 橘红多糖增强小鼠免疫功能及抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(21):180-182.

[4] 周佩娜,万倩芸,张秀桥,等. 大叶蛇葡萄无色花色素还原酶基因的克隆及其序列分析[J]. 基因组学与应用生物学,2018:1-9.

[5] 黄静,桂春,答国政,等. 大叶蛇葡萄提取物对 SMMC-7721 细胞增殖抑制作用的研究[J]. 中国现代中药,2017,19(4):525-528.

[6] XIE X F, WANG J W, ZHANG H P. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Ampelopsis megalophylla* [J]. Nat Prod Res,2014,28(12):853-860.

[7] XIE X F, WANG J W, ZHANG H P. Characterization and antitumor activities of a water-soluble polysaccharide from *Ampelopsis megalophylla* [J]. Carbohydr Polym,2015,129:55-61.

[8] 罗祖友,陈根洪,郑小江,等. 藤茶多糖 AGP-3 的分离纯化与结构的初步鉴定[J]. 时珍国医国药,2009,20(7):1707-1709.

[9] Little A, Lahnstein J, Jeffer D W, et al. A novel (1,4)- β -linked glucoxytan is synthesized by members of the Cellulose Synthase-Like F Gene Family in land plants [J]. ACS Cent Sci, 2019, doi: 10.1021/acscentsci.8b00568.

[10] SONG X M, XU L, YU J W, et al. Genome-wide characterization of the cellulose synthase gene superfamily in *Solanum lycopersicum* [J]. Gene,2018,688:71-83.

[11] Cocuron J C, Lerouxel O, Drakakaki G, et al. A gene

from the cellulose synthase-like C family encodes a β -1,4 glucan synthase [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2007,104(20):8550-8555.

[12] Liepman A H, Cavalier D M. The cellulose synthase-like A and cellulose synthase-like C families: recent advances and future perspectives [J]. Front Plant Sci,2012,3:109.

[13] Burton R A, Jobling S A, Harvey A J, et al. The genetics and transcriptional profiles of the cellulose synthase-Like *HvCslF* gene family in barley [J]. Plant Physiol,2008,146(4):1821-1833.

[14] Pear J R, Kawagoe Y, Schreckengost W E, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial *celA* genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase [J]. Proc Natl Acad Sci,1996,93(22):12637-12642.

[15] HU C M, WU K L, ZHANG J X, et al. Cytochemical localization of polysaccharides in *Dendrobium officinale* and the involvement of *DoCSLA6* in the synthesis of mannan polysaccharides [J]. Front Plant Sci,2017,8:173.

[16] ZHANG J X, HE C M, WU K L, et al. Transcriptome analysis of *Dendrobium officinale* and its application to the identification of genes associated with polysaccharide synthesis [J]. Front Plant Sci,2016,7(5):1-14.

[17] Vega-Sa' nchez M E, Verhertbruggen Y, Christensen U, et al. Loss of cellulose synthase-like F6 function affects mixed-linkage glucan deposition, cell wall mechanical properties, and defense responses in vegetative tissues of rice [J]. Plant Physiol,2012,159(1):56-69.

[18] 胡慧贞. 拟南芥纤维素合酶及纤维素合酶类似 D 基因家族生物学功能分析 [D]. 武汉: 华中科技大学,2017.

[19] PENG X P, PANG H Y, Abbas M, et al. Characterization of Cellulose synthase-like D (CSLD) family revealed the involvement of *PtrCslD5* in root hair formation in *Populus trichocarpa* [J]. Sci Rep,2019,9(1):1452.

[20] LI W Y, YANG Z X, YAO J Y, et al. Cellulose synthase-like D1 controls organ size in maize [J]. BMC Plant Biol,2018,18(1):239.

[责任编辑 顾雪竹]