

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201606027

引文格式: 蒋素华, 张燕, 王默霏, 等. 铁皮石斛 *RCA2* 基因克隆与生物信息学分析 [J]. 广西植物, 2017, 37(1):80-86.

JIANG SH, ZHANG Y, WANG MF, et al. Cloning and bioinformatics analysis of *RCA2* gene in *Dendrobium officinale* [J]. Guihaia, 2017, 37(1):80-86.

铁皮石斛 *RCA2* 基因克隆与生物信息学分析

蒋素华¹, 张燕¹, 王默霏¹, 王洁琼², 崔波^{1*}

(1. 郑州师范学院 生物工程研究所, 郑州 450044; 2. 河南农业大学 生命科学学院, 郑州 450002)

摘要: 核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶是光合碳同化作用的关键酶,它对调节铁皮石斛 Rubisco 活性和光合速率具有直接的作用,对其进行基因等方面的研究,会对改变植物光合速率打下良好基础。该研究以一年生铁皮石斛叶片为材料,采用 RT-PCR 和 RACE 技术成功克隆了 Rubisco 活化酶(*RCA*)基因,并对其进行生物信息学分析。结果表明:*RCA* 基因全长 1 730 bp,命名为 *RCA2*(GenBank 登录号 KT205842),其中 5'-UTR 81 bp、3'-UTR 326 bp,开放阅读框 1 323 bp,编码 440 个氨基酸,分子质量为 48.53 kDa,等电点为 6.19,包含 P-loop NTPase 超家族基因结构。氨基酸多重序列比对发现 *RCA2* 核苷酸序列与蝴蝶兰的相似性高达 87%。*RCA2* 编码蛋白为亲水性蛋白;亚细胞定位于叶绿体基质;蛋白质二级结构分析, α 螺旋占 30.68%,延伸链占 25.45%,不规则折叠占 43.86%。*RCA2* 编码蛋白质的功能预测发现,*RCA2* 在中间代谢起到了一个非常重要的角色。该研究发现对铁皮石斛光合作用关键酶 Rubisco 的分析可为其光合作用特性的发掘提供理论基础,并为提高温室大棚栽培效率提供理论依据。

关键词: 铁皮石斛, *RCA2* 基因, 克隆, 生物信息学分析

中图分类号: Q949.71 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2017)01-0080-07

Cloning and bioinformatics analysis of *RCA2* gene in *Dendrobium officinale*

JIANG Su-Hua¹, ZHANG Yan¹, WANG Mo-Fei¹, WANG Jie-Qiong², CUI Bo^{1*}

(1. Institute of Bioengineering, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China; 2. College of Life Sciences, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Ribulose-1,5-bisphosphosphate carboxylase/oxygenase was a key enzyme of photosynthetic carbon assimilation, it had direct adjustive effects Rubisco activity and photosynthetic rate of in *Dendrobium officinale*, and laid a good foundation for changing plant photosynthetic rate by studying the gene. *RCA* gene was cloned from leaf of annual *D. officinale* using RT-PCR and RACE, and was analyzed by bioinformatics. The results showed that the full length cDNA of *RCA* was 1 730 bp length, the cloned *RCA* gene was named *RCA2*(GenBank accession No. KT 205842). It was contained a 5'-untranslated region (5'-UTR) (81 bp), 3'-UTR (326 bp), and an opening reading frame (ORF) (1 323 bp), which could be translated into a 410-amino-acid putative peptides with a molecular weight of 48.53 kDa and a theoretical pI of 6.19, with a domain of P-loop_NTPase super-family. Multiple sequence alignment results showed that the homology of nucleotide sequence between the *RCA2* and the reported *Phalaenopsis* genes was 87%. *RCA2* protein was be-

收稿日期: 2016-07-30 修回日期: 2016-09-22

基金项目: 河南省教育厅重点科研项目(14B180036);郑州市科技发展计划项目(20150448);郑州市重大科技专项(141PZDZX038) [Supported by Henan Provincial Office of Education Key Scientific Research Program(14B180036);Supported by Program of Scientific Development in Zhengzhou (20150448);Supported by Special Key Programs of Science and Technology in Zhengzhou(141PZDZX038)]。

作者简介: 蒋素华(1983-),女,河南漯河人,硕士,讲师,主要从事花卉分子生物学研究,(E-mail) jiangsuhua2006@163.com。

*通信作者: 崔波,博士,教授,主要从事植物分子生物学研究,(E-mail) laocuib@163.com。

long to hydrophilic protein, sub-cellular localization was in the chloroplast. The *RCA2* protein secondary structure components showed that α -helix (h), extended strand (e), and random coil (c) accounted for 30.68%, 25.45% and 43.86%. *RCA2* encoding protein function prediction showed that *RCA2* played a very important role in intermediary metabolism. This study of the key enzyme-photosynthesis Rubisco in *Dendrobium officinale* provides the information for the research of the photosynthetic characteristics, and the basis for improving the efficiency of greenhouse cultivation.

Key words: *Dendrobium officinale*, *RCA2* gene, gene cloning, bioinformatics analysis

铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 属于兰科 (Orchidaceae) 石斛属 (*Dendrobium*) 多年生的草本植物, 铁皮石斛含石斛多糖、石斛碱、双苜酚类、菲酚类等多种药效成分, 是石斛属药用植物中最为珍稀名贵的种, 具有滋阴清热、润肺止咳、益胃生津、明目强身等作用 (Zhang et al, 2000)。核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco) 是存在于叶绿体内的一个双功能酶, 同时催化卡尔文循环中最初固定 CO_2 的反应以及光呼吸作用中的第一步反应, 该酶处于光合碳还原和碳氧化两个方向相反但又相互关联的循环交叉点上, 对净光合速率起着决定性的影响, 因此提高 Rubisco 活力是提高光合作用的重要途径 (潘瑞焱等, 2004)。因铁皮石斛原生地的生境破坏和常年的滥采乱挖, 野生资源遭到严重的破坏, 濒临灭绝, 已列入中国珍稀濒危保护植物的名录。由于石斛不能够栽培在土壤里, 北方地区必须栽培在树皮、木块、锯末等做的栽培床或者是石头上, 冬天多数需要盖温棚等设施, 投资较大, 加上石斛种植的技术要求高, 目前市场尚未完全打开, 发展速度还不是很快 (张明等, 2010)。

随着生物技术的发展, 许多粮食作物如大麦 (Rundle & Zielinski, 1991)、水稻 (To et al, 1999)、大豆 (Yin et al, 2014) 等植物的 *RCA* 基因被克隆, 但目前报道的 *RCA* 基因很少有涉及药用观赏植物, 最近有朱明库等 (2013) 对羽衣甘蓝 Rubisco 活化酶基因 *BoRCA* 的克隆、生物信息学及表达分析的研究; 袁秀云等 (2016) 对蝴蝶兰 Rubisco 活化酶基因 *PhRCA α* 的序列特征及在低温胁迫下的表达分析的研究; 祝钦陇等 (2011) 对彩叶草 Rubisco 活化酶基因 *SsRCA* 进行了组织表达特异性和光诱导表达特性研究; 曾淑华等 (2012) 已从铁皮石斛中克隆了光合途径关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因。因此, 开展铁皮石斛 *RCA* 基因研究显得尤为必要。本研究为了提高石斛的质量, 提高石斛光合效率, 揭示铁皮石斛光合作用机理自然成了铁皮石斛研究领域

的重要问题, 该研究利用 RACE 技术克隆出铁皮石斛 *RCA2* 全长基因, 并进行生物信息学分析, 为进一步研究铁皮石斛光合作用调节机理奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

铁皮石斛原产地为贵州, 现在种植于河南省郑州市郑州师范学院兰花工程技术研究中心智能日光温室, 植物材料为一年生铁皮石斛。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取 选取一年生铁皮石斛叶片, 液氮速冻, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。叶片总 RNA 提取采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒 (Tiangen 公司); 采用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性; 采用 Quawell Q5000 微量紫外可见分光光度计测定其 A_{260}/A_{280} 值及其浓度。

1.2.2 *RCA2* 基因全长的克隆 以提取的叶片总 RNA 为模板, 用反转录试剂盒合成单链 cDNA。根据 GENBANK 上已知植物的 *RCA* 保守区, 利用 DNAMAN 和 Primer 5.0 生物软件设计兼并引物 (表 1), 扩增 *RCA* 保守片段。PCR 反应体系为 $20.0\text{ }\mu\text{L}$: $10\times\text{PCR buffer } 2.0\text{ }\mu\text{L}$, $\text{dNTP Mix } 2.0\text{ }\mu\text{L}$, 上游引物 *RCA-F1* ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 下游引物 *RCA-R1* ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 模板 cDNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$, *rTaq* 酶 ($5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.2\text{ }\mu\text{L}$, 加灭菌双蒸水至总体积 $20.0\text{ }\mu\text{L}$; 反应程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s , $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s , 35 个循环; 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min 。切胶回收目的片段, 连接 pGEM-T Easy 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α , 挑选阳性克隆送至上海英潍捷基生物技术公司测序, 获得 *RCA* 基因的保守区序列。再根据获得的保守区序列, 分别设计 5' 端和 3' 端特异性巢式引物 (表 1), 以叶 cDNA 为模板, 用巢式 PCR 方式分别扩增 *RCA* 的 5' 端和 3' 端序列, 按 Clontech 公司 SMARTer™ RACE 扩增试剂盒操作说明进行反应, 回收扩增目的产物, 克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 转入

大肠杆菌 DH5 α 菌株,进行测序和拼接。

1.2.3 ORF 的扩增 根据 DNAMAN 软件拼接得到 RCA 基因序列全长,利用 Premier 5.0 设计 1 对特异引物 RCA-F2 和 RCA-R2(表 1),用于完整开放阅读框(ORF)的扩增。PCR 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,58 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 15 min。ORF 片段连接到 pGEM-T Easy 载体上,转化大肠杆菌 DH5 α ,测序进行 ORF 序列验证。

1.2.4 生物信息学分析 利用 ORFfinder 进行开放阅读框的预测;利用 NCBI 上的 BLAST 进行基因相似

性的分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>);利用 DNAMAN 进行氨基酸序列比对分析;利用 ProtScale 程序(<http://expasy.org/tools/protscale.html>)分析蛋白质亲疏水性;利用 TargetP 软件(Using PLANT networks)和 PSORT II(<http://psort.hgc.jp/form.html>)进行亚细胞定位的分析;利用 Protfun(<http://www.cbs.dtu.dk/services/ProtFun/>)分析预测 RCA2 蛋白质结构功能和功能分类;利用 ExPASy 网站上的 GOR 进行蛋白质二级结构预测;利用 ExPASy 网站上的 SWISS-MODEL 进行蛋白质三级结构的预测分析。

表 1 PCR 引物
Table 1 PCR primers

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
RCA-F1	5'-GAYGACCAGCAGGACATAACCA-3'	保守片段扩增
RCA-R1	5'-TTGTTGACGGTGTACTGGGTG-3'	Conserved fragment cloning
GSP1	5'-TGTGCTGCCTCTTCATCAATG-3'	3'端 RACE 引物
GSP2	5'-ACCACCCAGTACACCGTCAA-3'	The 3'end RACE primer
GPS3	5'-ATACTGACGAAGACCTTGGCTGAT-3'	5'端 RACE 引物
GPS4	5'-CACCCCTTTCCTCTGGTTATGTCCT-3'	The 5'end RACE primer
RCA-F2	5'-CCTCACCTTCAGCTATGCCC-3'	RCA 编码区克隆
RCA - R2	5'-CGCTAACCATAGAAAGAACCAGTCT-3'	RCA ORF cloning

2 结果与分析

2.1 RCA2 基因全长克隆

叶片总 RNA 提取后经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性,检测结果显示,28S 和 18S 条带清晰,A₂₆₀/A₂₈₀值 1.96,浓度为 210.56 ng $\cdot\mu$ L⁻¹。

以铁皮石斛叶片总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,以兼并引物 RCA-F1 和 RCA-R2 进行保守区片段 PCR 扩增,得到一个 503 bp 保守片段(图 1:B),根据设计的 3'端和 5'端特异引物,采用 RACE 技术,扩增获得 3'端目的片段(图 1:D)和 5'端目的片段(图 1:C)。利用生物软件 DNAMAN 进行序列拼接得到该基因的全长为 1 730 bp,利用 ORFfinder 分析,共有 9 个 ORF,该基因最长的 ORF 共计 1 323 bp,包含 81 bp 的 5'-UTR、326 bp 的 3'-UTR,编码 440 个氨基酸,将该基因命名为 RCA2,GenBank 登陆号为 KT205842。利用引物 RCA-F2 和 RCA-R2 扩增获得 1 323 bp ORF 片段(图 1:A),连接到 pGEM-T Easy 载体上测序验证,得到的阳性质粒命名为

pGEM-RCA2。

2.2 RCA2 基因全长的生物信息学分析

2.2.1 RCA2 核苷酸及编码蛋白序列的理化性质 利用 blastp 和 DNAMAN 对 RCA2 氨基酸序列进行比对分析,发现该基因包含 P-loop NTPase Superfamily 结构域,分别为“WGKGQQGS”(A 区)和“GKMC-CLFINDLD”(B 区),属于 P-loop NTPase 超家族基因(图 2)。理化性质分析该蛋白的分子质量为 48.53 kDa,等电点为 6.19。将该基因全长核苷酸序列在 NCBI 上进行 blastn 相似性比较,结果表明基因均为 RCA 基因,且与蝴蝶兰(*Phalaenopsis*)的相似性高达 87%。氨基酸序列比对分析,发现其氨基酸序列与蝴蝶兰、葡萄、荷花的相似性分别为 89%、84%、85%(图 3)。

2.2.2 RCA2 编码蛋白质的亲疏水性分析 利用 ProtScale 分析蛋白的亲疏水性发现, RCA2 蛋白质序列具有较高的亲水性,其中第 69 位的 Thr 亲水性最强(-3.078),第 162 位 Leu 的疏水性最强(2.122)(图 4)。

2.2.3 RCA2 编码蛋白质的亚细胞定位 蛋白的亚细胞定位与该蛋白所执行的功能是密切相关的,用

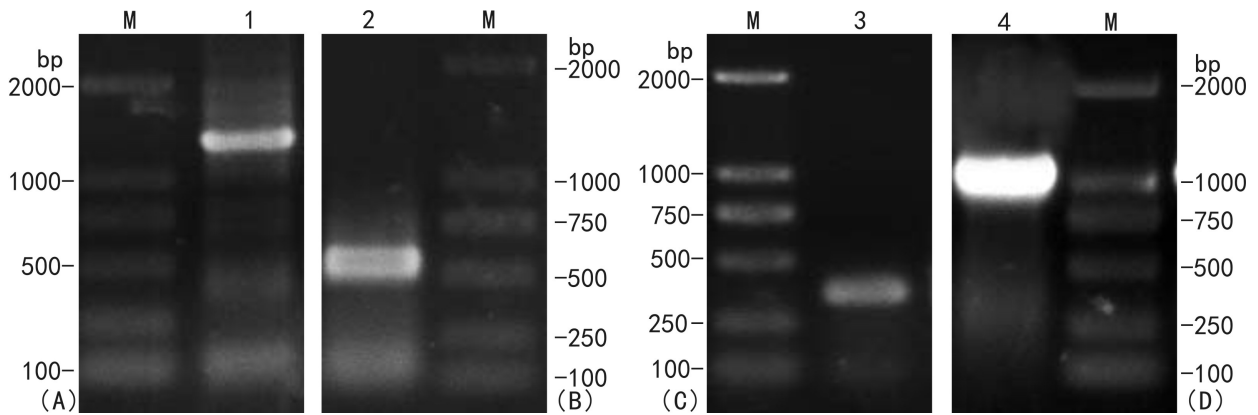


图 1 *RCA2* 基因扩增结果 A. 开放阅读框扩增; B. 保守片段扩增; C. 5' RACE 扩增; D. 3' RACE 扩增; M. Marker 2000; 1. ORF 扩增产物; 2. 保守片段; 3. 3' RACE 产物; 4. 5' RACE 产物。

Fig. 1 Amplification results of gene *RCA2* A. Amplification products of ORF; B. Conserved region amplification; C. Amplification products of 3' RACE; D. Amplification products of 5' RACE; M. Marker 2000; 1. Amplification products of primers ORF; 2. Conserved region; 3. Amplification products of 3' RACE; 4. Amplification products of 5' RACE.

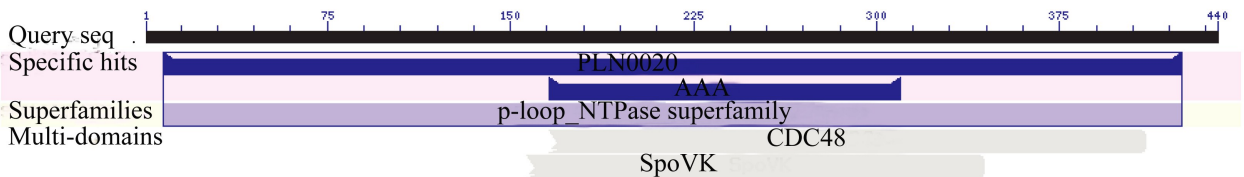


图 2 *RCA2* 蛋白的功能域分析

Fig. 2 Function domain analysis of *RCA2* protein

TargetP 和 PSORT II 软件进行亚细胞定位分析, TargetP 预测结果显示 *RCA2* 蛋白定位于叶绿体基质, 可信度为 3 (图 5:A), 用 PSORT II 预测蛋白显示, *RCA2* 蛋白定位于叶绿体基质、线粒体基质间隙、叶绿体类囊体膜、叶绿体类囊体腔, *RCA2* 蛋白主要存在于叶绿体基质 (图 5:B)。

2.2.4 *RCA2* 编码蛋白质的功能预测与分析 利用 Protfun software of CBS 分析预测 *RCA2* 蛋白质结构和功能分类, 可能有意义的功能包括中间代谢、脂肪酸代谢、翻译、辅酶因子的生物合成和能量代谢等, 他们的几率分别是 5.484、4.387、4.048、3.639、3.098。这表明 *RCA2* 在中间代谢起到了一个非常重要的角色, 在脂肪酸代谢、翻译中起到了重要作用, 在辅酶因子的生物合成和能量代谢中也起到了关键作用。

2.2.5 *RCA2* 编码蛋白质的二级、三级结构预测 采用 ExPASy 网站上的 GOR 进行蛋白质二级结构预

测, 结果表明, α 螺旋占 30.68%, 延伸链占 25.45%, 不规则折叠占 43.86% (图 6)。用 ExPASy 网站上的 SWISS-MODEL Workspace 预测蛋白质的三维结构以 4w5w.1.A (SMTL id) 为模板进行建模, 该模板以 X-RAY 2.90 Å 方法产生, 与 *RCA2* 蛋白一致性为 86.02% (图 7)。

3 讨论与结论

该研究通过 RT-PCR 和 RACE 技术方法, 成功克隆了铁皮石斛 *RCA2* 基因 (GenBank 登录号 KT205842) 全长 1 730 bp, 开放阅读框 1 323 bp, 编码 440 个氨基酸; 核苷酸序列分析结果表明, *RCA2* 核苷酸序列与蝴蝶兰 (*Phalaenopsis*) 的相似性高达 87%, 其编码蛋白属于 P-loop NTPase Superfamily 家族基因。蛋白理化性质分析该蛋白的分子质量为 48.53 kDa, 等电点为 6.19, 为亲水性蛋白, *RCA2* 编

铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	MATAVSTIGAVNRVPLQLTIHGSGSATSAPSSSTIFGNNLKKVNSQSIHGRLTAGTFKVLAAADLDETKQIQ	70
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis hybrid cultivar</i>	MATAVSTIGSVNRVP.LLSLHGSGSSASAPGSAIFGNSLKKVSPSPVNHGRLSAGSFKVMAADLDESKQIK	68
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MAATTSTLCAVNRAP.LLNHGSGTGAIVPSSAFLGNSLKKVSSKTAHPRTSSGNFKVVA.EVDEEKQTS	67
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	MATAITSTIGSVNRAP.LLNHGSGAGTGVNSAIFGNSLKKVSSGFTQPKVSSGSEKVA.EIDDETKQIN	67
Consensus	ma st g vnr p l l sg s p s f g lkkv g fkv a de kqt	
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	KDRWGLAYDQSDDDQDITRKGAVDSLFAQPMGDGTHVAVMNSYEVYISQGLRRTYVNDNTVDGFIYAPAF	140
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis hybrid cultivar</i>	KDRWAGLAYDQSDDDQDITRKGAVDSLFAQPMGDGTHVAVMNSYEVYISQGLRRTYVNDNTVDGFIYAPAF	138
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	KDKRWGLAFDESDDDQDITRKGAVDSLFAQPMDSGTHVAVMNSYDYITSTGLRQVNDNTVDGFIYAPAF	137
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	KDKRWGLAYDITSDDDQDITRKGAVDSLFAQPMQDAGTHVAVLSSYEVYISQGLRQVNDNTVDGFIYAPAF	137
Consensus	kd w gla d sddqdditrkg vds l f q a p g t h v a v m n s y e v y i s q g l r r t y v n d n t v d g f i y a p a f	
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	MDKLVVHITKFNFMITLPNIKVPLILGVIWGGKGGKSFQCELVFAKMGINPIIMMSAGELBSGNAGEPAKLIR	210
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis hybrid cultivar</i>	MEKLVVHITKFNFLITLPNIKVPLILGVIWGGKGGKSFQCELVFAKMGINPVMMSAGELBSGNAGEPAKLIR	208
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	MDKLVVHITKFNFMITLPNIKVPLILGVIWGGKGGKSFQCELVFAKMGINPIIMMSAGELBSGNAGEPAKLIR	207
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	MDKLVVHITKFNFMITLPNIKVPLITLGIWGGKGGKSFQCELVFAKMGINPIIMMSAGELBSGNAGEPAKLIR	207
Consensus	m klvvhitkn tlpnikvplilg vggk g g k s f q c e l v f a k m g i n p i m m s a g e l b s g n a g e p a k l i r	
	A区	
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	QRYREAABI LKKGKMCCLFINDLDAGAGRLGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPVNLVQLPGLYNKQENAR	280
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis hybrid cultivar</i>	QRYREAADLI LKKGKMCCLFINDLDAGAGRLGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPVNLVQLPGMYNKQENPR	278
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	QRYREAADLI LKKGKMCCLFINDLDAGAGRLGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPVNLVQLPGMYNKQENPR	277
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	QRYREAADLI LKKGKMCCLFINDLDAGAGRLGGTTQYTVNNQMVNATLMNIADNPVNLVQLPGMYNKQENAR	277
Consensus	qryreaa ii l k g k m c c l f i n d l d a g a g r l g g t t q y t v n n q m v n a t l m n i a d n p t n v q l p g y n k e n r	
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	VPITVITGDNDFSTLYAPLIRDGRMEKFWAPTRERDRIGVCTGIFRSDNIQAEDIVKLVDTFPQGSIDFFGA	350
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis hybrid cultivar</i>	VPITVITGDNDFSTLYAPLIRDGRMEKFWAPTRERDRIGVCTGIFRSDNIPKEDIMVKLVDTFPQGSIDFFGA	348
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	VPITVITGDNDFSTLYAPLIRDGRMEKFWAPTRERDRIGVCTGIFRSDNIPKEDIMVKLVDTFPQGSIDFFGA	347
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	VPITVITGDNDFSTLYAPLIRDGRMEKFWAPTRERDRIGVCTGIFRSDNPVNDIIVKLVDTFPQGSIDFFGA	347
Consensus	v p i i t v i t g n d n d f s t l y a p l i r d g r m e k f w a p t r e d r i g v c t g i f r s d n i q a e d i v k l v d t f p q g s i d f f g a	
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	LRARVYDDEVKRWIIEVGVDRVGRRLVNSREGPPTFEQPKMSEKLLLEYGNMLVQEQENVKRVQLADKYL	420
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis hybrid cultivar</i>	LRARVYDDEVKRWIEEVGVDRVGRRLVNSREGPPTFEQPKMSEKLLLEYGNMLVQEQENVKRVQLADKYL	418
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	LRARVYDDEVKRWVAVSVEGEGKLLVNSREGPPTFEQPKMSEKLLLEYGNMLVQEQENVKRVQLADKYL	417
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	LRARVYDDEVKRWITSGVGVESVGGKLLVNSREGPPTFEQPKMSEKLLLEYGNMLVQEQENVKRVQLADKYL	417
Consensus	l r a r v y d d e v r k w i e v g v d r v g r r l v n s r e g p p t f e q p k m s e k l l e y g n m l v q e q e n v k r v q l a d k y l	
铁皮石斛 <i>Dendrobium officinale</i>	SEAALGDANEDAMKTSFYG.....	440
蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis hybrid cultivar</i>	REAAALGDANEDALKTSFYGKGAQQVQVPEGCTDPGAQNFDPPTARSDNGSCTY.	473
葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	SEAALGDANEDAITSFYGKAAQQVNLVPEGCTDPSANFDPPTARSDDGSCLYQ	473
荷花 <i>Nelumbo nucifera</i>	SEAALGDANEDSITKRTIEYGKAAQQVNVVPEGCTDPAAKNFDPPTARSDNGTCLYE	473
Consensus	eaalgdaned k g f y g	

图3 RCA2的氨基酸序列比对

Fig. 3 Alignment of the predicted amino acid sequence of RCA2

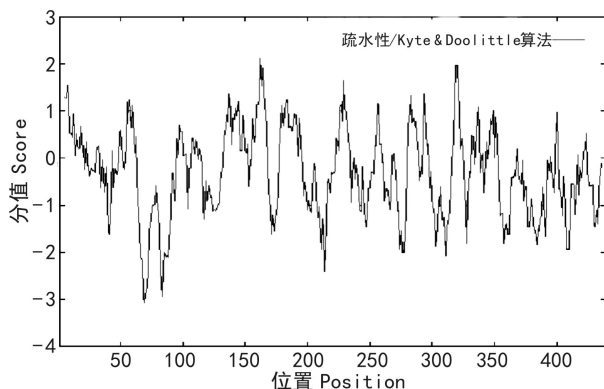


图4 RCA2蛋白的亲疏水性预测

Fig. 4 Hydrophilic-hydrophobic property prediction of RCA2 protein

码蛋白质的亚细胞定位于叶绿体基质;编码蛋白质的功能包括中间代谢、脂肪酸代谢、翻译、辅酶因子

的生物合成和能量代谢等,蛋白质三级结构预测模型与 RCA2 蛋白一致性为 86.02%,这些生物学参数为进一步研究 RCA2 蛋白的酶学性质及其在铁皮石斛中的光合作用机理奠定了理论基础。

Rubisco 作为光合速率的限制性因子,近些年已成为提高植物光合效率的研究目标之一,而 RCA 对维持 Rubisco 的净光合速率及初始羧化活力均有重要调节作用(张国等,2005) RCA 自被 Salvucci et al (2005)在拟南芥中报道以来,一直是农业生物工程研究关注的焦点。当 RCA 基因表达量降低时,植物的光合速率随之下降,生长也变慢,因此通过调控 RCA 的表达提高光合作用,最终实现植株产量的增加,将会有广泛及良好的前景(李海霞等,2010)。Rubisco 活化酶能维持并调节植物 Rubisco 的活性,使 Rubisco 的活性位点因为与磷酸糖类物质的结合

<p>A</p> <pre>### targetp v1.1 prediction results ##### Number of query sequences: 1 Cleavage site prediction not included. Using PLANT networks. Name Len cTP mTP SP other Loc RC seq1 440 0.683 0.173 0.047 0.051 C 3</pre>	<p>B</p> <pre>chloroplast stroma --- Certainty= 0.644(Affirmative) < succ> mitochondrial matrix space --- Certainty= 0.570(Affirmative) < succ> chloroplast thylakoid membrane --- Certainty= 0.407(Affirmative) < succ> chloroplast thylakoid space ---</pre>
---	---

图 5 *RCA2* 蛋白亚细胞定位 **A.** TargetP 软件预测结果 **B.** PSORT II 软件预测结果。
Fig. 5 *RCA2* protein sub-cellular localization. **A.** TargetP prediction **B.** PSORT II prediction.

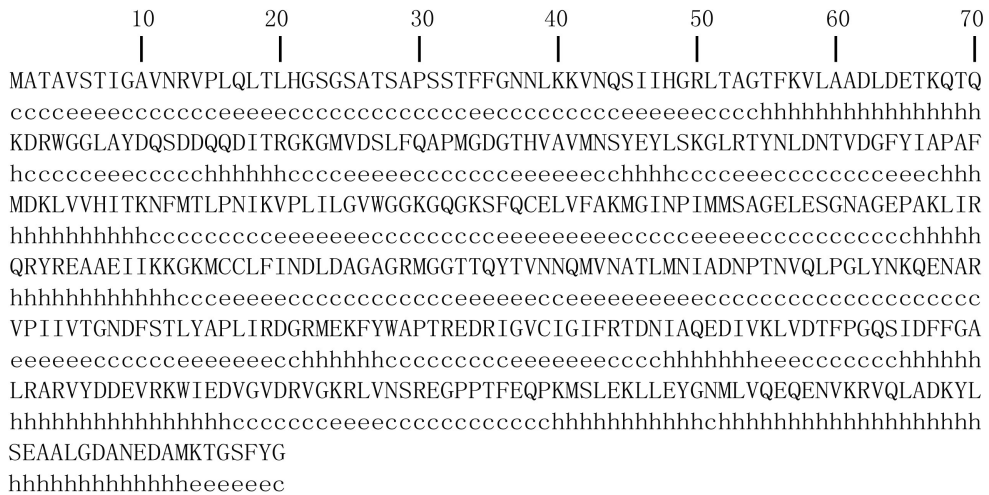


图 6 铁皮石斛 *RCA2* 蛋白的二级结构预测 **h.** α 螺旋; **e.** 延伸链; **c.** 不规则折叠。

Fig. 6 Prediction of second structure for protein of *RCA2* from *Dendrobium officinale* **h.** Alpha helix; **e.** Extended strand; **c.** Random coil.

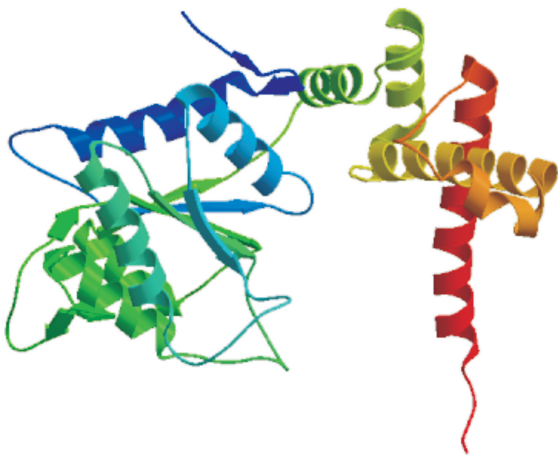


图 7 铁皮石斛 *RCA2* 蛋白的三级结构预测
Fig. 7 Prediction of 3D structure for protein of *RCA2* from *Dendrobium officinale*

而导致活性降低的不利影响得到最大程度的抑制,且能够降低 Rubisco 去氨基甲酰化时所需 CO₂ 的浓度,显著提高 Rubisco 的活性,因此对调节植物光合速率有着直接作用 (Portis, 2003; Salvucci & Crafts-Brandner, 2004; Zhang et al, 2002)。铁皮石斛是药用观赏植物,其 *RCA* 基因的分子克隆、生物信息学的研究,为研究其他药用观赏植物 *RCA* 基因的结构及功能提供了参考和借鉴价值,并为进一步研究 Rubisco 活化酶在铁皮石斛光合作用中的功能和分子调控机理奠定了基础,其进一步的相关研究工作正在进行中。

参考文献:

LI HX, WANG ZM, ZENG HL, 2010. The research progresses in

- Rubisco activase in plant [J]. *J Plant Physiol*, (11): 1092–1100. [李海霞, 王真梅, 曾汉来, 2010. 植物 Rubisco 活化酶的研究进展 [J]. *植物生理学报*, (11): 1092–1100.]
- PAN RZ, WANG XJ, LI NH, 2014. *Plant physiology* [M]. 5th Ed. Beijing: High Education Press: 89–91. [潘瑞焜, 王小菁, 李娘娘, 2004. *植物生理学* [M]. 5 版. 北京: 高等教育出版社: 89–91.]
- PORTIS JR AR, 2003. Rubisco activase-Rubisco's catalytic chaperone [J]. *Photosynthesis Res*, 75(1):11–27.
- RUNDLE SJ, ZIELINSKI RE, 1991. Organization and expression of two tandemly oriented genes encoding ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase activase in barley [J]. *J Biol Chem*, 266(8): 4677–4685.
- SALVUCCI ME, CRAFTS-BRANDNER SJ, 2004. Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of Rubisco activase in plants from contrasting thermal environments [J]. *J Pant Physiol*, 134(4):1460–1470.
- SALVUCCI ME, LOO FJ, STECHER D, 2005. Two isoforms of Rubisco activase in cotton, the products of separate genes not alternative splicing [J]. *Planta*, 216(5):736–744.
- TO KY, SUEN DF, CHEN SC, 1999. Molecular characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice leaves [J]. *Planta*, 209(1):66–76.
- YIN ZT, MENG FF, SONG HN, et al, 2010. Expression quantitative trait loci analysis of two genes encoding rubisco activase in soybean [J]. *J Pant Physiol Plant Physiol*, 152(3):1625–1637.
- YUAN XY, XU SP, WANG JQ, et al, 2016. Characterization of Rubisco activase gene PhRCA α from *Phalaenopsis* and its expression under low temperature [J]. *Mol Plant Breed*, 14(4), 835–843. [袁秀云, 许申平, 王洁琼, 等, 2016. 蝴蝶兰 Rubisco 活化酶基因 PhRCA α 的序列特征及在低温胁迫下的表达分析 [J], *分子植物育种*, 14(4), 835–843.]
- ZHANG N, KALLIS RP, EWY RG, et al, 2002. Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of the larger Rubisco activase isoform [J]. *Proc Nat Acad Sci*, 99(5): 3330–3334.
- ZHANG M, LIU HY, 2010. The development of medicinal dendrobium stem industry present situation and prospects [J]. *Mod Chin Med*, 12(10):1673–4890. [张明, 刘宏源, 2010. 药用石斛产业的发展现状及前景, *中国现代中药*, 12(10):1673–4890.]
- ZENG SH, WEN GS, XU SZ, et al, 2012. Cloning and expression analysis on phosphoenolpyruvate carboxylase gene in *Dendrobium officinale* [J]. *Chin Trad Herb Drugs*, 43(4): 766–771. [曾淑华, 文国松, 徐绍忠, 等, 2012. 铁皮石斛磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因的克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 43(4): 766–771.]
- ZHANG G, LI B, ZOU Q, 2005. Cloning and expression of Rubisco activase gene in wheat [J]. *Chin Bull Bot*, 22(3): 313–319. [张国, 李滨, 邹琦, 2005. 小麦 Rubisco 活化酶基因的克隆和表达特性 [J], *植物学通报*, 22(3): 313–319.]
- ZHU MK, CHEN GP, ZHOU S, et al, 2013. Cloning, bioinformatics and expression analysis of Rubisco activase gene BoRCA from *Brassica oleracea* [J]. *J Yunnan Univ*, 35(6):857–865. [朱明库, 陈国平, 周爽等, 2013. 羽衣甘蓝 Rubisco 活化酶基因 BoRCA 的克隆、生物信息学及表达分析 [J], *云南大学学报*, 35(6):857–865.]
- ZHU QL, XIE XR, SUI SZ, et al, 2011. Molecular characteristics and expression patterns of a novel Rubisco activase gene, SsRCA, from *Solenostemon scutellarioides* (L.) Codd [J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 31(6):1097–1104. [祝钦泷, 谢先荣, 眭顺, 等, 2011. 彩叶草 Rubisco 活化酶基因 SsRCA 的分子特征及其表达模式 [J], *西北植物学报*, 31(6):1097–1104.]
- ZHANG M, ZHU F, WEI XY, et al, 2000. Germination of *Dendrobium candidum* embryos and quality control of protocorm-like bodies [J]. *J Zhejiang Univ (Sci Ed)*, 27(1): 92–94.
- ~~~~~
- (上接第 55 页 Continue from page 55)
- naming and classification [J]. *Plant Divers Resour*, 37(1):39–45 [许再富, 2015. 傣族的植物认知: 命名-含义与分类 [J]. *植物分类与资源学报*, 37(1):35–45.]
- XU ZF, HUANG YL, 1991. Research on plant folk nomenclature and taxonomic system of Dai Nationalty [J]. *Acta Bot Yunnan*, 13(4): 383–390 [许再富, 黄玉林, 1991. 西双版纳傣族民间植物命名与分类系统研究 [J]. *云南植物研究*, 13(4):383–390.]
- XU ZF, DUAN QW, YANG Y, et al, 2011. Ecological culture of tropical rainforest in Xishuangbanna [M]. Kunming: Yunnan Scientific Press: 113–120. [许再富, 段其武, 杨云, 等, 2011. 西双版纳傣族热带雨林生态文化 [M]. 昆明: 云南科技出版社: 113–120.]
- XU ZF, YAN HD, DUAN QW, et al, 2015. Dai plant vernacular names & explanations [M]. Beijing: Science Press: 358. [许再富, 岩罕单, 段其武, 等, 2015. 植物傣名及其释义(西双版纳) [M], 北京: 科学出版社: 358.]
- YU PH, XU ZF, HUANG YL, 1985. The study on traditional cultivated plants in TAI villages of Xishuangbanna [J]. *Acta Bot Yunnan*, 7(2): 169–186. [禹平华, 许再富, 黄玉林. 1985. 西双版纳傣寨传统栽培植物的调查研究 [J]. *云南植物研究*, 7(2): 169–186.]
- ZENG J, 2008. The comparative study of medicinal plants in the aspect of clinical utilization among Dai people in Xishuangbanna TPR of China and Lana people in the Upper-Northern Thailand. Chiang Rai: a thesis submitted to Chingrai Rajabhat University for the degree of Master of art in social research and development (focusing on culture and health): 295.
- ZHENG P, 2005. A collection of legend stories in Xishuangbanna [C]. Beijing: Chinese Press of Ethnical Photography Art: 475. [征鹏, 2005. 西双版纳传说故事集 [M]. 北京: 中国民族摄影艺术出版社: 475.]