

# Molecular Cloning and Expression Analysis of *HbBAM2* from *Hevea brasiliensis*

Jianghua Yang, Zhi Zou, Xiaohu Xiao, Yunxia Qin\*

Rubber Research Institute, CATAS/Key Open Laboratory for Biology of Rubber Tree, Ministry of Agriculture/State Key Laboratory Breeding Base for Cultivation & Physiology for Tropical Crops Co-Founded by Province and Ministry, Haikou Hainan  
Email: \*qinyunxia2004@163.com

Received: Nov. 5<sup>th</sup>, 2018; accepted: Nov. 16<sup>th</sup>, 2018; published: Nov. 23<sup>rd</sup>, 2018

## Abstract

$\beta$ -amylase which is encoded by a multigene family in plants, plays an important role for starch degradation in different plant tissues. The  $\beta$ -amylase in seeds and leaves already had many reports, however, in other heterotrophic tissues such as flowers has seldom been studied. *HbBAM2* was cloned from *Hevea brasiliensis* in this paper, its coding region is 1752 bp, encodes 583 amino acids. By means of homology analysis and subcellular prediction, *HbBAM2* may locate in the chloroplast. qRT-PCR displayed the expression patterns of *HbBAM2*, which was mainly expressed in male flowers, latex and female flowers. *HbBAM2* was reduced observably in latex of the virgin trees tapped, and down regulated partly by ethephon treatment. The recombinant protein *HbBAM2* was thermal unstable with the optimum temperature 25°C of substrates, soluble starch or amylopectin, and undetectable activity at 45°C. It is presumed that *HbBAM2* may influence the development of flowers by participating the starch degradation in flowers of *Hevea brasiliensis*, and *HbBAM2* may degrade the starch in latex, providing energy and carbon source for rubber synthesis in laticifer.

## Keywords

*Hevea brasiliensis*,  $\beta$ -Amylase, *HbBAM2*, Latex, Flower

## 橡胶树 *HbBAM2* 基因的克隆与表达分析

阳江华, 邹智, 肖小虎, 秦云霞\*

中国热带农业科学院, 橡胶研究所/农业部橡胶树生物学重点开放实验室/省部共建国家重点实验室培育基地, 海南省热带作物栽培生理学重点实验室, 海南 海口  
Email: \*qinyunxia2004@163.com

\*通讯作者。

## 摘要

在植物中,  $\beta$ -淀粉酶由一多基因家族编码, 在不同组织的淀粉降解过程中起重要作用。目前有关种子和叶片的 $\beta$ -淀粉酶研究较多, 而对花等其它异养组织则鲜有报道。本研究从橡胶树胶乳中克隆到了一个 $\beta$ -淀粉酶基因(命名为HbBAM2), 其编码区长1752 bp, 预测编码583个氨基酸。同源比较和亚细胞分析表明HbBAM2定位于叶绿体中。实时荧光定量PCR分析显示, HbBAM2主要在雌花、胶乳和雄花中表达; 割胶条件下, HbBAM2的表达水平在新开割树的胶乳中随刀次的增加而明显下调, 同时, 乙烯利刺激也可部分下调HbBAM2在胶乳中的表达。HbBAM2重组蛋白热稳定性差, 以可溶性淀粉和支链淀粉为底物, 最适酶活性温度均为25 °C, 在45 °C时已没有酶活性。根据HbBAM2的表达特点和酶学特性我们推测HbBAM2可能通过参与橡胶树花器官淀粉的降解, 影响花器官的生长发育, HbBAM2还可能参与了橡胶树胶乳中淀粉的降解, 为乳管细胞中的橡胶合成提供能量和碳源。

## 关键词

橡胶树,  $\beta$ -淀粉酶, HbBAM2, 胶乳, 花

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

淀粉是大多数植物主要的碳源和能量储存方式, 淀粉在植物细胞中以淀粉粒的形式存在, 淀粉粒是一种半晶体颗粒, 由葡萄糖分子聚合而成[1] [2]。贮藏淀粉在种子、根和茎等长期贮藏器官中储存, 结构相对稳定, 其含量没有明显的昼夜变化。而在叶片中, 植物把光合作用产物以临时型淀粉的形式储存在叶片的叶绿体中, 晚上再通过降解这些淀粉, 用于晚上生长需要[3]。在植物的不同器官中, 有着不同的淀粉降解酶和降解途径[4]。在拟南芥的花器官的发育过程中淀粉起到重要的作用[5]。花器官早期积累淀粉, 随着花器官的发育, 淀粉被逐渐降解, 为花的发育提供能量。在雌配子体发育过程中存在一次淀粉积累和降解的波动过程, 而在雄配子体有3次这样的波动过程。

$\beta$ -淀粉酶( $\beta$ -amylase, BAM)在植物不同组织中的淀粉降解过程起着关键的作用, 其通过切断 $\alpha$ -1,4-葡聚糖链, 从淀粉的非还原性末端依次切断麦芽糖单体, 产生麦芽糖[6] [7]。在拟南芥中有9个 $\beta$ -淀粉酶基因, 其中6个定位于质体, 调控拟南芥的叶片淀粉代谢[8]。在拟南芥叶片中, BAM1主要在保卫细胞中表达, 控制气孔开合[9], 相对于野生型拟南芥, 突变体**bam1**的保卫细胞中积累了更多的淀粉, 气孔打开的数量减少, 从而提高了**bam1**的耐渗透和耐旱能力[9] [10]。BAM还参与植物对环境胁迫的应答, 寒害处理能够明显上调枳树**PtrBAM1**的表达; 过表达**PtrBAM1**的烟草抗寒性显著提高[11]。BAM可能还具有独立于酶活性的调控功能, 比如拟南芥的BAM4在进化过程中, 由于多个氨基酸位点及一个催化位点的突变, 失去了 $\beta$ -淀粉酶活性, 但是相对于野生型, **bam4**的叶片却有着更高的淀粉含量[12], 因此推测该酶突变后还保留了调控功能。

早期人们深入研究了多种植物中淀粉贮藏器官和叶片的 $\beta$ -淀粉酶[6] [13] [14] [15] [16], 而很少研究其它异养组织比如花器官的淀粉和 $\beta$ -淀粉酶。我们在分析橡胶树叶绿体型 $\beta$ -淀粉酶基因**HbBAM1**的基础

上[17], 获得了在橡胶树雄花和胶乳中高表达的  $\beta$ -淀粉酶基因 *HbBAM2*。本文探索了 *HbBAM2* 的组织表达模式和受诱导情况, 并体外表达并分析 *HbBAM2* 重组蛋白的最适酶活性温度和 pH 范围, 讨论和推断其在橡胶树胶乳合成中可能的生理功能。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料

#### 2.1.1. 植物材料

巴西橡胶树品系热研 7-33-97, 定植于中国热带农业科学院试验场一队。新开割树为 7 年生, 首次割胶, 每三天割胶一次, 连续 8 次, 胶乳直接滴入 RNA 提取液中, 胶乳总 RNA 的提取方法参照 Tang 等的方法[18]。橡胶树经 1% 乙烯利处理后, 于 3 h、12 h 和 24 h 后分别割胶, 收集胶乳用于总 RNA 的提取。

#### 2.1.2. 实验试剂

通用植物总 RNA 提取试剂盒为北京百泰克生物技术有限公司产品。原核表达载体 pGEX-4T-1 和 pET43.1a, 大肠杆菌表达菌株 Rossetta (DE3), 为本实验室保存。引物和 DNA 测序都由英俊生物技术公司完成。可溶性淀粉和支链淀粉为 Sigma 公司产品, 其它生化试剂为进口或国产分析纯。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成

除了胶乳之外的, 巴西橡胶树其它组织的材料, 经液氮研磨后, 称取 0.1~0.2 mg, 总 RNA 提取使用百泰克公司的通用植物总 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 按照操作说明进行方法进行。不同材料都取 1  $\mu$ g 左右的总 RNA, 使用 TaKaRa 公司的 PrimeScript<sup>TM</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒, 合成 cDNA 第一链, 用于荧光定量 PCR 和全长 cDNA 的扩增。

#### 2.2.2. *HbBAM2* 基因的克隆与序列分析

通过比对橡胶树的转录组数据库, 发现在胶乳中还存在一个 *HbBAM1* 的高度同源基因, *HbBAM2*。在 5'UTR 和 3'UTR 设计了一对基因特异性引物 HbBAM2-F 和 HbBAM2-R (表 1), 以胶乳的 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 反应程序为, 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 sec, 55 $^{\circ}$ C, 30 sec, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。琼脂糖凝胶电泳回收目的片段后, 连接到 pMD-18T 载体中, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞。菌落 PCR 鉴定为阳性的克隆, 挑选 5 个送公司测序。使用 DNAMAN 对 HbBAM2、HbBAM1 和 AtBAM1 的氨基酸序列进行同源性分析, 然后用序列处理在线工具包(SMS)编辑比对结果。

**Table 1.** The sequences of all primers used in this paper

**表 1.** 本文所用的引物及序列

引物名称	序列	用途	退火温度
HbBAM2-F	5'-GAAATGGCCATGAATATTACC-3'	全长 cDNA 扩增	54 $^{\circ}$ C
HbBAM2-R	5'-ATCCACTCCTAGCTTGTTGAA-3'		
qBAM2-F	5'-CAAGACCATCTTTGAGAGCACTG-3'	实时荧光定量 PCR	60 $^{\circ}$ C
qBAM2-R	5'-CCGTCGCCGAAATCTTGTTGTTA-3'		
RH2b-F	5'-AGGTGGATTGGCTAACTGAG-3'	不同组织荧光表达分析的内参基因引物	60 $^{\circ}$ C
RH2b-R	5'-GAGCCCAAACATCAGTAGTG-3'		
YLS8-F	5'-CCTCGTCGTCATCCGATTC-3'	割胶和乙烯利处理荧光定量的内参基因引物	60 $^{\circ}$ C
YLS8-R	5'-CAGGCACCTCAGTGATGTC-3'		
BAM2-36aa	5'-AAGGATCCGCGGTGTGGAGAACTCCTATG-3'	原核表达	55 $^{\circ}$ C
BAM2-Sal	5'-TACAGTCGACTTAGTGATTAGAGCCACTGCA-3'		

### 2.2.3. *HbBAM2* 基因的表达分析

由于橡胶树 *HbBAM2* 基因和 *HbBAM1* 基因的编码区同源性高, 在 *HbBAM2* 的 3'UTR 设计了三对荧光定量引物, 通过溶解曲线分析和测序鉴定, 选取了特异性好, 扩增效率高 qBAM2-F 和 qBAM2-R 作为荧光定量引物(表 1)。荧光定量 PCR 使用伯乐公司的 CFX96 TOUCH 实时荧光定量 PCR 仪, 荧光定量试剂为 TaKaRa 公司的 TB Green™ Premix Ex Taq™ (Tli RNaseH Plus), 反应程序为两步法, 95°C, 1 min; 95°C, 10 sec, 60°C, 30 sec, 40 个循环。对 *HbBAM2* 基因在不同组织、新开割树前 8 刀, 乙烯利处理进行表达分析, 内参基因的引物参照 Li 等[19]的论文, 数据分析参照 Long 等的方法[20]。

### 2.2.4. *HbBAM2* 原核表达载体的构建与表达

*HbBAM2* 定位于质体上, 其 N 端部分含有疏水结构, 不利于 *HbBAM2* 重组蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达, 参照拟南芥的 *AtBAM1* 和橡胶树 *HbBAM1* 的原核表达方法[8] [17], 除去 *HbBAM2* 的前 36 个氨基酸, 以 BAM2-36aa 和 BAM2-Sal 为引物(表 1), 扩增 *HbBAM2* 的第 37-583 氨基酸的基因序列。PCR 扩增产物经限制性内切酶 Bam HI 和 Sal I 双酶切, 连接到原核表达载体 pGEX-4T-1 和 pET43.1a。构建成功的载体分别命名为 GST-*HbBAM2* 和 NusA-*HbBAM2*。质粒转化大肠杆菌表达菌种 Rossetta (DE3)用于目的蛋白的原核表达, 大肠杆菌在含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 25 μg/ml 氯霉素的 LB 液体培养基中, 37°C 生长至 OD600 = 0.4~0.6 时, 加入终浓度 0.5 mM 的 IPTG, 20°C 诱导培养 16 h。

### 2.2.5. *HbBAM2* 重组蛋白的酶活性分析

诱导表达后的大肠杆菌, 5000 rpm, 10 min, 收集菌体, 沉淀用液体培养基 1/20 体积的无菌水重悬。使用超声破碎仪, 超声 3 sec, 间隔 5 sec, 总有效超声破碎时间 3 min, 破碎菌体。13,000 rpm, 10 min, 4°C 高速离心, 吸取上清至新的离心管, 沉淀用等体积的无菌水重悬。10%的聚丙烯酰胺凝胶, SDS-PAGE 电泳检测 *HbBAM2* 原核表达产物在上清和沉淀中的表达。酶活性测定方法参照阳江华等的方法[17], 取约 5 μg 未经纯化 GST-*HbBAM2* 和 NusA-*HbBAM2* 的粗酶液, 用于最适酶活性温度的测定。反应体系在冰上混合, 总体积 100 μL: 100 mM 柠檬酸 - 柠檬酸钠缓冲液(pH5.6), 底物分别为 1%可溶性淀粉或者支链淀粉, 5 μg 粗酶液。每个温度设三个技术重复, 分别置于不同温度的水浴锅中反应 30 min, 反应结束后迅速置于冰上, 然后加入 900 μL 的 DNS 显色溶液(1%的 3,5 二硝基水杨酸, 30%的酒石酸钾钠, 0.4N 的 NaOH)终止反应, 最后 100°C 水浴反应 5 min 显色, 吸取 200 μL 至酶标管中, 使用酶标仪, 测定 520 nm 吸光值。

## 3. 结果与分析

### 3.1. *HbBAM2* 的序列分析

*HbBAM2* 的编码区和 *HbBAM1* 一样长为 1752 bp, 编码 583 个氨基酸序列, 分子量大小为 65.6 kD。同源性分析表明, *HbBAM2* 与橡胶树的 *HbBAM1* 和拟南芥的 *AtBAM1* 的氨基酸序列高度同源(图 1), 其中与 *HbBAM1* 的同源性为 88.4%, 和 *AtBAM1* 的同源性为 74.1%。应用在线预测软件 TargetP [21]和 ProtComp 分析 *HbBAM2* 编码的氨基酸序列, 预测 *HbBAM2* 定位于叶绿体中。

### 3.2. *HbBAM2* 基因在不同组织中的表达分析

实时荧光定量 PCR 分析结果显示, *HbBAM2* 基因主要在巴西橡胶树的异养器官——胶乳、雌花和雄花中表达, 而在叶片和其它异养器官——根, 种子和树皮中表达量比较低(图 2)。*HbBAM2* 基因的表达随着新开割巴西橡胶树前 8 刀的割胶处理, 其在胶乳中的表达量持续降低, 到第 8 刀时, 只有第 1 刀表达量的 28% (图 3)。1%乙烯利刺激割胶也能下调 *HbBAM2* 的表达, 48 h 后, *HbBAM2* 的表达量降低了 25%

左右(图 4)。该试验结果与橡胶树生产实践是一致的,因为橡胶树割胶和乙烯利处理后,其胶乳代谢活动显著增强,蔗糖迅速被利用,底物淀粉含量减少,因而胶乳中的 *HbBAM2* 的基因表达量呈下调表达。

HbBAM2	MAMNITHQIGALAGTPIHRESITTTTSESMATVSVAAVWRTPMPNPRSKIHKPYVVEQKS	60
HbBAM1	MAMNITHQIGALAGTPISTPEITTTTSESTATVSAATAAWKTPMPNMLCRTRKPDVVEQKS	60
AtBAM1	MALNLSHQLGVLGATPIKSGEMTDSSLLSISPPSA----RMMPKAMNRRNYKAHGTD--	54
HbBAM2	QPISPCRSPILLSGIRADLSVACRAFAMEEMTLETATEGAEBRTYREG---SGKEKKKGV	117
HbBAM1	QPTSPCRSPILNGIRADLSVACRAFALAEATTLETATEGAEBRMYREV---SAKEKGRGV	117
AtBAM1	---SPPMSPILGATRADLSVACKAFVAVENG-IGTIEE---QRTYREGGIGGKKEGGGGVP	107
HbBAM2	VYVMMPLDSVTMSNSVNRKAMNASLQALKSAGVEGIMMDVWVGLVERDAPGVYNWGGYT	177
HbBAM1	VYVMMPLDSVTMGNTVNRKAMNASLQALKSAGVEGIMMDVWVGLVERDAPGVYNWGGYT	177
AtBAM1	VFVMMPLDSVTMGNTVNRKAMKASLQALKSAGVEGIMMDVWVGLVEKESPGTYNWGGYN	167
HbBAM2	ELLEMAKRHGLKVQAVMSFHQCGGNVGDSCITPLPKWVVEETDQDPNLAYTDQWGRRNYE	237
HbBAM1	ELLEMAKRHELKVQAVMSFHRCGGNVGDSCITPLPKWVVEETDKDPDLAYTDQWGRRNYE	237
AtBAM1	ELLELAKKLGKVQAVMSFHQCGGNVGDSTIPLPKWVVEEVDKDPDLAYTDQWGRRNHE	227
HbBAM2	YISLGCDTIPVLKGRTPVQCYSDFMRAFRDNFKNLLGDTVVEIQVGMGPAGELRPSYPE	297
HbBAM1	YISLGCDSLPLVLKGRAPVQCYDFMRAFRDNFKNLLGDTIVEIQVGMGPAGELRPSYPE	297
AtBAM1	YISLGAADTLPLVLKGRTPVQCYADFMRAFRDNFKHLLGETLVEIQVGMGPAGELRPSYPE	287
HbBAM2	QNGTWKFPFGIGAFQCYDKYMLSSLKAAEAEKVKGKPEWGSTGPTDAGHYNNWPEDTQFFRKE	357
HbBAM1	QNGTWKFPFGIGAFQCYDKYMLSSLKAAEAAGKPEWGSTGPTDAGRYNNWPEDTQFFRKE	357
AtBAM1	QEGTWKFPFGIGAFQCYDKYSLSSLKAAEAETYGKPEWGSTGPTDAGHYNNWPEDTQFFKKE	347
HbBAM2	NGGWTSPYGEFFLNWYSQMLLDHGERIVSSAKTIFESTGVKISVKVAGIHWYTRSHAP	417
HbBAM1	NGGWTSPYGEFFLNWYSQMLLDHGERILSSADAI FENTSVKISVKVAGIHWYTRSHAP	417
AtBAM1	GGGWNSEYGDFFLSWYSQMLLDHGERILSSAKSIFENMGVKISVKIAGIHWYTRSHAP	407
HbBAM2	ELTAGYYNTRFRDGYLPIAQLGRHGAI FNFTCIEMRDHEQPQDALCAPEKLV RQVALAT	477
HbBAM1	ELTAGYYNTRFRDGYLPIAQLGRHGAI FNFTCIEMRDHEQPQDALCAPEKLV RQVALAT	477
AtBAM1	ELTAGYYNTRFRDGYLPIAQLARHNAI FNFTCIEMRDHEQPQDALCAPEKLV NQVALAT	467
HbBAM2	QKTQVPLAGENALPRYDEYAHEQIISLSASLNID-GNSGD-REMCAFTYLRMNPHLFQDDN	535
HbBAM1	QGAKVPLAGENALPRYDEYAHEQILQAASLNID-GNSGD-GEMCAFTYLRMSPHLFQEDN	535
AtBAM1	LAAEVPLAGENALPRYDDYAHEQILKASALNLDQNNEGEPREMCAFTYLRMNPELFQADN	527
HbBAM2	WRRFVALVKKMNEGQNAERCREQIEREAHFVYISRPSVQBAAVALMH	583
HbBAM1	WRRFVAFVKKMKEGKNABERCREQVEREAHFVHMTQPLVQQAAMALMH	583
AtBAM1	WGKFVAFVKKMGEGRDSHRCREVEREAHFVHVTQPLVQBAAVALTH	575

Figure 1. The homology analysis of *HbBAM2*  
图 1. *HbBAM2* 的同源性分析

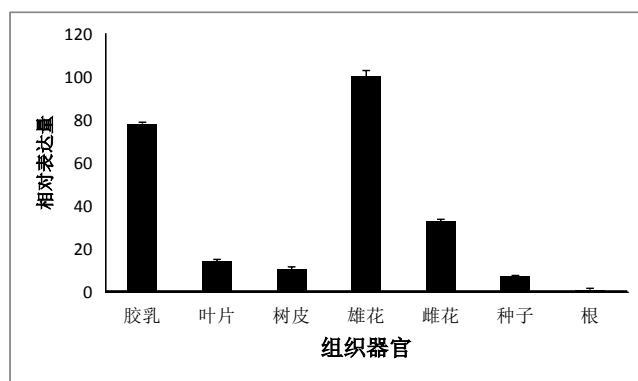
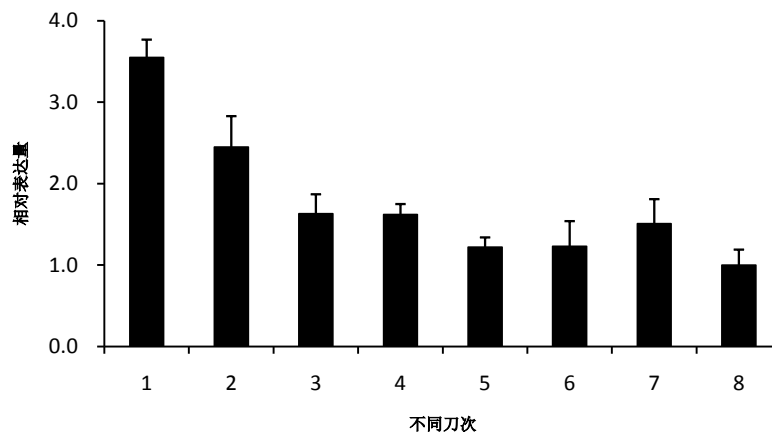


Figure 2. The expression profiles of *HbBAM2* in different tissues of Hevea

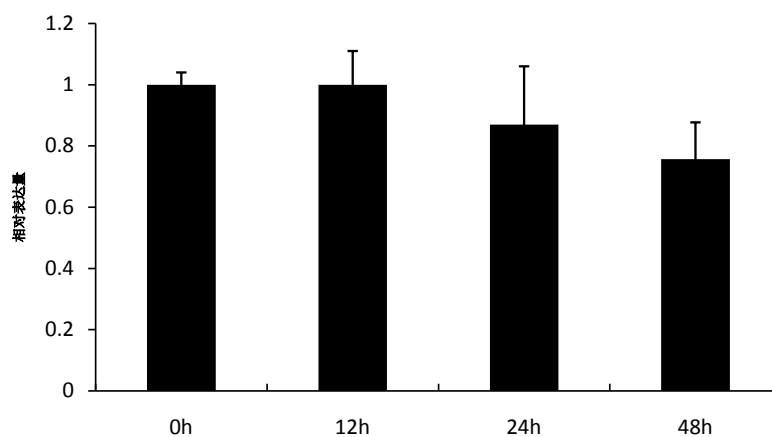
图 2. *HbBAM2* 基因在橡胶树不同组织中的表达分析





**Figure 3.** The expression analysis of *HbBAM2* with eight consecutive tapping times in virgin trees

**图 3.** *HbBAM2* 基因随新开割橡胶树前 8 刀割胶处理的表达分析



**Figure 4.** The expression profiles of *HbBAM2* in Hevea latex after 1% ethephon treatment

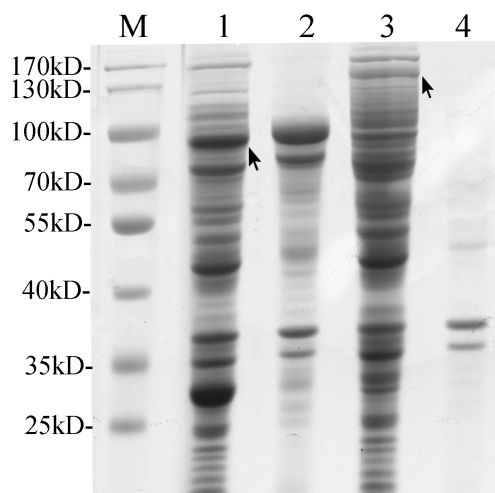
**图 4.** 1%乙烯利影响 *HbBAM2* 在胶乳中的表达水平

### 3.3. HbBAM2 在大肠杆菌中的重组表达

重组蛋白 GST-HbBAM2 和 NusA-HbBAM2 在上清液中都有表达(图 5), 酶活性分析表明, 两种重组蛋白都有较强的  $\beta$ -淀粉酶活性。虽然 GST-HbBAM2 重组蛋白在沉淀中的表达量相对较大, 但是其在上清中的表达量明显大于 NusA-HbBAM2 的表达, 所以最适酶活性温度实验使用 GST-HbBAM2 重组蛋白。使用可溶性淀粉为底物时, HbBAM2 的最适酶活性温度是 25°C, 在 40°C 只有 9.6% 的酶活性, 在 45°C 时则完全检测不到酶活性(图 6)。当支链淀粉为底物时, HbBAM2 的最适酶活性温度也是 25°C, 同样在 45°C 时其酶活性也为 0 (图 6)。

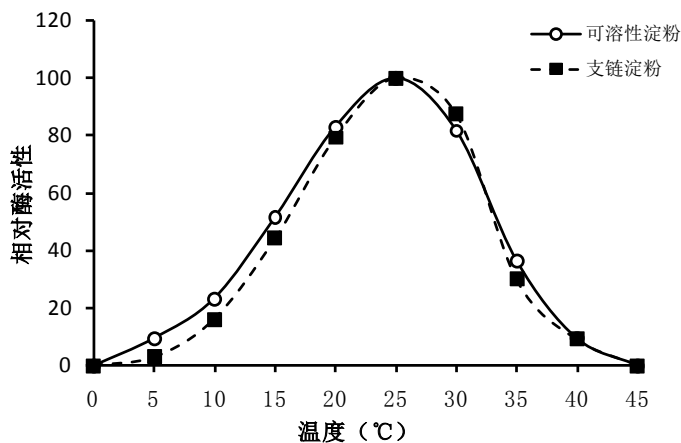
## 4. 讨论与结论

植物除了在种子、块根、块茎和鳞茎等贮藏组织中含有大量长期保存的贮藏淀粉外, 在叶肉细胞的叶绿体、花和树皮等异养器官储存有大量的临时储存形式的淀粉。本研究从橡胶树胶乳中克隆到一个质体型  $\beta$ -淀粉酶基因 *HbBAM2*, 与 HbBAM1 类似, 且 HbBAM2 和 HbBAM1 高度同源(图 1), 它们都在花器官中高效表达[17], 尤其是在雄花中有着最大的表达量, 但是 *HbBAM2* 还主要在橡胶树非专一性淀粉



**Figure 5.** SDS-PAGE analysis of HbBAM2 recombinant protein. M: Prestained Protein Marker, 1: the supernatant of GST-HbBAM2, 2: Precipitate of GST-HbBAM2; 3: the supernatant of NusA-HbBAM2, 4: Precipitate of NusA-HbBAM2, Arrows point to the recombinant proteins

**图 5.** SDS-PAGE 电泳分离 HbBAM2 重组蛋白。M: 预染蛋白分子量 marker, 1: GST-HbBAM2 超声破碎后上清, 2: GST-HbBAM2 超声破碎后沉淀, 3: NusA-HbBAM2 超声破碎后上清, 4: NusA-HbBAM2 超声破碎后沉淀, 箭头指向重组蛋白



**Figure 6.** The enzyme activity of HbBAM2 recombinant protein in different temperatures with soluble starch and amylopectin as substrates

**图 6.** 以可溶性淀粉和支链淀粉为底物, HbBAM2 重组蛋白在不同温度的酶活性分析

贮藏器官——胶乳中高表达, 因此 HbBAM2 除了和 HbBAM1 一样在橡胶树花发育尤其是雄花器官发育过程中起着重要作用外, 很可能与天然橡胶合成有关。

通常负责降解贮藏淀粉的  $\beta$ -淀粉酶的最适酶活性温度一般在 50°C 以上, 这样有利于在室温条件下减缓淀粉的降解速度, 利于种子、块根和块茎等的长期保存, 为适宜条件下的休眠种子萌发、植株再生存储能量。而降解临时储存形式淀粉的  $\beta$ -淀粉酶的最适温度一般较低, 在 35°C 左右, 有利于淀粉的快速利用[8] [17]。

我们的研究表明 HbBAM2 可以利用可溶性淀粉和支链淀粉为底物, HbBAM2 重组蛋白的最适酶活性温度是 25℃, 而在 45℃时就完全没有酶活性(图 6), 相对于橡胶树 HbBAM1 [17], 拟南芥的 BAM1 [8]和豌豆上胚轴中  $\beta$ -淀粉酶[22], 其最适酶活性低了 10℃左右, 是目前为止, 最适酶活性温度最低和热稳定性最差的  $\beta$ -淀粉酶。我们推想, 其最适酶活性的差异很可能是由于巴西橡胶树原产地位于亚马逊流域的热带雨林中, 年平均温度在 25℃~27℃, 为了获取阳光和养分, 植物之间的竞争比温带地区的更为激烈。HbBAM2 的最适酶活性温度为 25℃, 与环境温度基本相同, 有利于橡胶树在需要时, 迅速降解花器官和树皮中临时储存形式的淀粉, 促进快速生长发育, 以获得更大的生长优势。另外, 在新开割树中, 随着割胶的进行, 乳管中代谢加剧, 蔗糖迅速被利用, 底物淀粉合成减少, HbBAM2 自然也不需要太多, 因而胶乳中的 HbBAM2 的基因表达量明显下调表达[23] [24]。 $\beta$ -淀粉酶基因的表达水平与组织细胞中蔗糖含量负相关的情况与其它  $\beta$ -淀粉酶基因的表达模式相类似。比如在拟南芥全光照条件下, 叶片中  $\beta$ -淀粉酶的活性明显高于室内照明条件[8], 橡胶树 HbBAM1 在晚上的表达量也低于光合作用最强的 10 点和 16 点[17]。总之, 尽管本文初步揭示了 HbBAM2 的表达特征和酶学特点, 为进一步研究  $\beta$ -淀粉酶在植物异养组织的生理功能奠定了基础, 然而 HbBAM2 是如何影响胶乳中糖的供给还需要更多的研究。

## 基金项目

中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630022018019 和 1630022017001)支持。

## 参考文献

- [1] Larsson, K. (1991) Structure of the Starch Granule—A Curved Crystal. *Acta Chemica Scandinavica*, **45**, 840-843. <https://doi.org/10.3891/acta.chem.scand.45-0840>
- [2] Crochet, P., Beauxis-Lagrange, T., Noel, T.R., Parker, R. and Ring, S.G. (2005) Starch Crystal Solubility and Starch Granule Gelatinisation. *Carbohydrate Research*, **340**, 107-113. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.11.006>
- [3] Streb, S., Eicke, S. and Zeeman, S.C. (2012) The Simultaneous Abolition of Three Starch Hydrolases Blocks Transient Starch Breakdown in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, **287**, 41745-41756. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395244>
- [4] Smith, A.M., Zeeman, S.C. and Smith, S.M. (2005) Starch Degradation. *Annual Review of Plant Biology*, **56**, 73-98. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.56.032604.144257>
- [5] Hedhly, A., Vogler, H., Schmid, M.W., Pazmino, D., Gagliardini, V., Santelia, D. and Grossniklaus, U. (2016) Starch Turnover and Metabolism during Flower and Early Embryo Development. *Plant Physiology*, **172**, 2388-2402. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00916>
- [6] Lao, N.T., Schoneveld, O., Mould, R.M., Hibberd, J.M., Gray, J.C. and Kavanagh, T.A. (1999) An Arabidopsis Gene Encoding a Chloroplast-Targeted Beta-Amylase. *Plant Journal*, **20**, 519-527. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00625.x>
- [7] Lu, Y. and Sharkey, T.D. (2004) The Role of Amylomaltase in Maltose Metabolism in the Cytosol of Photosynthetic Cells. *Planta*, **218**, 466-473. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1127-z>
- [8] Monroe, J.D., Storm, A.R., Badley, E.M., Lehman, M.D., Platt, S.M., Saunders, L.K., Schmitz, J.M. and Torres, C.E. (2014) Beta-Amylase1 and Beta-Amylase3 Are Plastidic Starch Hydrolases in Arabidopsis That Seem to Be Adapted for Different Thermal, pH, and Stress Conditions. *Plant Physiology*, **166**, 1748-1763. <https://doi.org/10.1104/pp.114.246421>
- [9] Valerio, C., Costa, A., Marri, L., Issakidis-Bourguet, E., Pupillo, P., Trost, P. and Sparla, F. (2011) Thioredoxin-Regulated  $\beta$ -Amylase (BAM1) Triggers Diurnal Starch Degradation in Guard Cells, and in Mesophyll Cells under Osmotic Stress. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 545-555. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq288>
- [10] Prasad, C.M., Ott, K.V., Bauer, H., Ache, P., Hedrich, R. and Sonnewald, U. (2015) Ss-Amylase1 Mutant Arabidopsis Plants Show Improved Drought Tolerance Due to Reduced Starch Breakdown in Guard Cells. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 6059-6067. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv323>
- [11] Peng, T., Zhu, X., Duan, N. and Liu, J.H. (2014) PtrBAM1, a Beta-Amylase-Coding Gene of *Poncirus trifoliata*, Is a CBF Regulon Member with Function in Cold Tolerance by Modulating Soluble Sugar Levels. *Plant Cell and Environment*, **37**, 2754-2767. <https://doi.org/10.1111/pce.12384>



- [12] Fulton, D.C., Stettler, M., Mettler, T., Vaughan, C.K., Li, J., Francisco, P., Gil, M., Reinhold, H., Eicke, S., Messerli, G., Dorken, G., Halliday, K., Smith, A.M., Smith, S.M. and Zeeman, S.C. (2008) Beta-AMYLASE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active Beta-Amylases in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell*, **20**, 1040-1058. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056507>
- [13] Visuri, K. and Nummi, M. (1972) Purification and Characterisation of Crystalline  $\beta$ -Amylase from Barley. *European Journal of Biochemistry*, **28**, 555-565. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb01944.x>
- [14] Kreis, M., Williamson, M., Buxton, B., Pywell, J., Hejgaard, J. and Svendsen, I. (1987) Primary Structure and Differential Expression of  $\beta$ -Amylase in Normal and Mutant Barleys. *European Journal of Biochemistry*, **169**, 517-525. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13640.x>
- [15] Mikami, B., Hehre, E.J., Sato, M., Katsube, Y., Hirose, M., Morita, Y. and Sacchettini, J.C. (1993) The 2.0-Å Resolution Structure of Soybean Beta-Amylase Complexed with Alpha-Cyclodextrin. *Biochemistry*, **32**, 6836-6845. <https://doi.org/10.1021/bi00078a006>
- [16] Zeeman, S.C., Umemoto, T., Lue, W.L., Au-Yeung, P., Martin, C., Smith, A.M. and Chen, J. (1998) A Mutant of Arabidopsis Lacking a Chloroplastic Isoamylase Accumulates both Starch and Phytoglycogen. *Plant Cell*, **10**, 1699-1712. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.10.1699>
- [17] 阳江华, 龙翔宇, 秦云霞, 唐朝荣. 橡胶树  $\beta$ -淀粉酶基因 HbBAM1 的克隆与表达分析[J]. 热带作物学报, 2018(39): 709-715.
- [18] Tang, C., Qi, J., Li, H., Zhang, C. and Wang, Y. (2007) A Convenient and Efficient Protocol for Isolating High-Quality RNA from Latex of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **70**, 749-754. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2007.04.002>
- [19] Li, H., Qin, Y., Xiao, X. and Tang, C. (2011) Screening of Valid Reference Genes for Real-Time RT-PCR Data Normalization in *Hevea brasiliensis* and Expression Validation of a Sucrose Transporter Gene HbSUT3. *Plant Science*, **181**, 132-139. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.04.014>
- [20] Long, X., He, B., Gao, X., Qin, Y., Yang, J., Fang, Y., Qi, J. and Tang, C. (2015) Validation of Reference Genes for Quantitative Real-Time PCR during Latex Regeneration in Rubber Tree. *Gene*, **563**, 190-195. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.026>
- [21] Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H. (2007) Locating Proteins in the Cell Using TargetP, SignalP and Related Tools. *Nature Protocols*, **2**, 953-971. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.131>
- [22] Lizotte, P.A., Henson, C.A. and Duke, S.H. (1990) Purification and Characterization of Pea Epicotyl  $\beta$ -Amylase. *Plant Physiology*, **92**, 615-621. <https://doi.org/10.1104/pp.92.3.615>
- [23] Tupy, J. (1973) The Level and Distribution Pattern of Latex Sucrose along the Trunk of *Hevea brasiliensis* Mull. arg. as Affected by the Sink Region Induced by Latex Tapping. *Physiologie Végétale*, **11**, 1-11.
- [24] Tang, C., Huang, D., Yang, J., Liu, S., Sakr, S., Li, H., Zhou, Y. and Qin, Y. (2010) The Sucrose Transporter HbSUT3 Plays an Active Role in Sucrose Loading to Laticifer and Rubber Productivity in Exploited Trees of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree). *Plant Cell and Environment*, **33**, 1708-1720. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02175.x>

### 知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5665, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: [br@hanspub.org](mailto:br@hanspub.org)