

魏跃, 陈啸寅, 李振陆, 等. 黄瓜 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 cDNA 片段的克隆及表达分析 [J]. 南京农业大学学报, 2010, 33(1): 37–42

黄瓜 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 cDNA 片段的克隆及表达分析

魏跃^{1,2}, 陈啸寅², 李振陆², 王永平², 史建磊¹, 吴志明¹, 张蜀宁¹, 陈劲枫^{1*}

(1. 南京农业大学农业部南方蔬菜遗传改良重点开放实验室, 江苏 南京 210095;
2. 江苏农林职业技术学院, 江苏 镇江 212400)

摘要: 以黄瓜品种露丰为材料, 根据已报道的 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶基因 (*6PGDH*) 的保守氨基酸序列设计简并引物, 利用 RT-PCR 技术获得黄瓜 *6PGDH* 的 cDNA 同源片段, 命名为 *CSPG* (登录号为 EU815934)。该片段长度为 1 207 bp, 包含一个 936 bp 的开放阅读框 (编码 311 个氨基酸) 和 271 bp 的 Poly A 3' 非翻译区末端, 无内含子; 该基因编码的氨基酸序列与拟南芥、大豆、水稻、玉米、菠菜的 *6PGDH* 基因有 75% 以上的同源性。运用半定量 RT-PCR 技术对 *6PGDH* 基因的转录水平进行分析, 结果表明: 该基因在叶、根、茎中均有表达, 高温胁迫下的表达量高于常温对照, 说明 *6PGDH* 基因与热胁迫相关。

关键词: 黄瓜; 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶; cDNA; 克隆

中图分类号: S642.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2030 (2010) 01-0037-06

Cloning of 6-phosphogluconate dehydrogenase gene cDNA fragments from cucumber and expression analysis

WEI Yue^{1,2}, CHEN Xiao-yin², LI Zhen-lu², WANG Yong-ping², SHI Jian-lei¹,
WU Zhi-ming¹, ZHANG Shu-ning¹, CHEN Jin-feng^{1*}

(1. Key Laboratory of Southern Vegetable Crop Genetics Improvement, Ministry of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Jiangsu Polytechnical College of Agriculture and Forestry, Zhenjiang 212400, China)

Abstract: With homology-based PCR strategy, a fragment cDNA named *CSPG* (accession number EU815934) was cloned from *Cucumis sativus* ‘Lufeng’. The length of *CSPG* was 1 207 bp, which encompassed an open reading frame (ORF) with 936 bp encoding 311 amino acid residues and 271 bp non-translation 3'-terminal end region, and no intron existed in *CSPG*. The protein encoded by *CSPG* was more than 75% highly homologous 6-phosphogluconate dehydrogenase gene (*6PGDH*) of *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Oryza sativa*, *Zea mays*, *Spinacia oleracea*. The expression of *6PGDH* was analyzed by semi-quantitative RT-PCR indicating that the gene had expression in leaf, root and stem, and that the amount of expression was higher in heat stress than normal temperature. Which showed that expression of *6PGDH* was related to heat stress.

Key words: *Cucumis sativus* L.; *6PGDH*; cDNA; clone

植物戊糖磷酸途径 (phosphate pentose pathway, PPP) 是细胞中重要的初生代谢途径, 具有重要的生理功能, 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (*6PGDH*) 是戊糖磷酸途径的一个限速酶、关键酶, 它可将 6-磷酸葡萄糖酸脱羧转变为 5-磷酸核酮糖并且产生 NADPH^[1]。当植物受到重金属毒害^[2]、盐胁迫^[3]、病毒侵害^[4]等胁迫时, *6PGDH* 基因的表达与酶活性会显著增强, *6PGDH* 基因已经从玉米 (*Zea mays* (AF061838))^[5]、大豆 (*Glycine max* (AB007907))、苜蓿 (*Medicago sativa* (U18239))^[6]、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* (AY084486))^[7]、菠菜 (*Spinacia oleracea* (AF295670))^[8]、水稻 (*Oryza sativa* AY278362)^[9] 等中分离, 但在黄瓜上还未见报道。

本研究旨在克隆黄瓜 *6PGDH* 基因并研究该基因在逆境胁迫下转录表达的变化, 为将来利用基因工程提高黄瓜对逆境胁迫的适应能力奠定基础。

收稿日期: 2008-10-29

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (30830079); 国家自然科学基金项目 (30671419, 30700541); 国家 863 专项经费项目 (2008AA10Z150, 2006AA100108, 2006AA10Z108); 教育部 111 计划项目 (B08025)

作者简介: 魏跃, 博士研究生。^{*}通讯作者: 陈劲枫, 教授, 博导, 主要从事蔬菜遗传与育种研究, E-mail: jfchen@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为南京农业大学黄瓜课题组提供的黄瓜耐热品种露丰 (*Cucumis sativus* 'Lufeng')。将种子播种于灭菌基质中并放置于人工气候箱中培养，温度为38℃，对照培养温度为28℃，每日光照均为14 h，幼苗长至2~3片真叶时取嫩叶、根、茎。

M-MLV 反转录酶、pMD19-T 载体、Taq 酶均为 TaKaRa 公司产品，大肠杆菌 TOP10 为本实验室保存，Trizol 为美国比太克公司生产。

1.2 方法

1.2.1 DNA、RNA 的提取与反转录 黄瓜叶片 DNA 提取采用 CTAB 法^[10]，RNA 提取采用 Trizol 试剂法^[11]，分别提取嫩叶、根、茎的总 RNA，以 Oligo (dT)₁₄: 5'-GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTT-3'^[12-13] 为反转录引物，M-MLV 反转录酶合成 cDNA。

1.2.2 目的基因片段的克隆及分析 1) *6PGDH* 基因 3'末端片段的扩增。参照拟南芥、水稻、大豆等的 *6PGDH* cDNA 序列比对后的保守氨基酸序列，设计上游简并引物 S1: 5'-GCNTGCMGNMGNGTNGG-3'，以反转录引物 Oligo (dT)₁₄ 为下游引物，以 cDNA 为模板进行 2 次 PCR 扩增。PCR 反应体系为 20 μL，其中含有 10×PCR Buffer 2.0 μL，模板 cDNA 1 μL，200 μmol·L⁻¹ dNTP 1.6 μL，2.0 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 1.6 μL，0.5 μmol·L⁻¹ 上下游引物各 1 μL，1 U Taq 酶 0.2 μL，ddH₂O 11.6 μL。第 1 轮扩增条件为：94℃ 3 min；94℃ 30 s，45℃ 30 s，72℃ 1 min，35 个循环；72℃ 10 min，4℃ 保存；第 2 轮 PCR 扩增以第 1 轮 PCR 产物为模板，退火温度提高至 50℃，其余条件相同。2) *6PGDH* 基因中间片段的扩增。根据 NCBI 数据库中拟南芥、水稻、大豆等的 *6PGDH* cDNA 序列比对后的保守氨基酸序列，设计上游引物 S2: 5'-GGNAAYTTYGTNAARATGGT-3'，根据已得到的 3'末端片段序列设计下游引物 A2: 5'-CTGCTATCTACTC-CCCTAA-3'，分别以 cDNA、DNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系同上，条件为：94℃ 3 min；94℃ 30 s，50℃ 30 s，72℃ 1.5 min，35 个循环；72℃ 10 min，4℃ 保存。3) 目的片段的回收、克隆及分析。回收的目的片段连接到 pMD19-T 载体上，连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10，进行蓝白斑筛选，挑取白斑接种于 1 mL LB (含 100 mg·L⁻¹ 氨苄青霉素) 液体培养基中。温度 37℃，150 r·min⁻¹ 振荡培养过夜。在相同条件下进行 PCR 扩增，琼脂糖凝胶电泳检测插入片段的大小^[14-15]。序列测定由上海博亚生物科技公司完成，在 NCBI 站点进行 BLAST 相似性比对，利用 DNAMan 软件进行多序列比对及同源性分析。

1.2.3 高温胁迫下 *6PGDH* 在不同器官中的表达 根据已得到的 *CSPG* 序列设计上游引物 S3: 5'-CTAGCCTGCCTATTTCG-3'，下游引物为 A2 (同上)，预计扩增长度为 341 bp，以 *actin* 为内标调整叶、根、茎 cDNA 模板浓度，进行 *6PGDH* 基因 mRNA 的半定量表达分析。

2 结果与分析

2.1 黄瓜 *6PGDH* 基因克隆

2.1.1 黄瓜 *6PGDH* 基因 3'端的克隆 以叶片 cDNA 为模板，用简并引物 S1 和 Oligo (dT)₁₄ 对其进行 2 次 PCR 扩增，结果扩增出在 300~600 bp 较亮的弥散条带 (图 1)。PCR 产物纯化后与 pMD19-T 载体

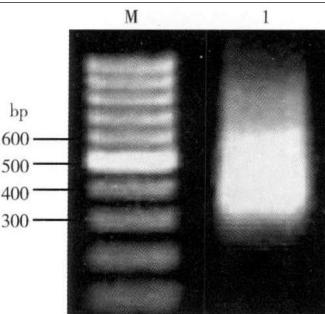


图 1 RT-PCR 的弥散扩增产物

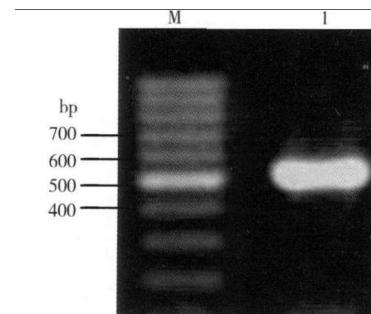


图 2 重组质粒的 PCR 分析

M. DL 1000 DNA 标准分子质量 DL 1000 marker; 1. RT-PCR 的弥散扩增产物 Smear product of RT-PCR

M. DL 1000 DNA 标准分子质量 DL 1000 marker; 1. 重组质粒的 PCR 产物 PCR product of recombinant plasmids

连接, 连接产物转化感受态大肠杆菌 TOP10, 经蓝白斑筛选后, 以纯化的阳性重组质粒为模板, 以引物 S1 和 Oligo (dT)₁₄ 进行 PCR 扩增检测和分别测序, 从中筛选出含有与拟南芥、水稻、大豆等 6PGDH 氨基酸序列同源性高于 75% 的 511 bp 片段的重组质粒 (图 2), 该片段末端含有 15 bp 的 Poly A 结构, 表明所克隆片段是目标片段的 3' 端 (图 3)。

```

GCTTGGAGGAGAGTCGTGGGTTGCCATCGCAGGGATCAGCACCCGGGATGT
GTGCTAGCCTGCCTATTCGACACATAACAGGCGTGTAGGCTGCTGCCAATCTGTG
CAGGCGAAAGAGACTTATGGGCTCATACATATGAGCGGGTGATCGCAAGGCT
CCTACCACACAGAGTGGACAAAGCTGGCTCGCAGTGCTGATGCTGGAGTTGGCATT
CAACTGAGCCTTGAGCTGCCTACCAATTGGCTGGTTCTTCTGCTTCATTGG
GTGCAAATTCCTACTTGATTTGCTTGCCTTCAAAAGTTAGTAGGTTCTTTT
GTATCACAGTTGGACAGTCTTCATGCTTCTTAGGGGAGTAGATAGCAGATAATT
CTGGCCTTGAGTATTGCTATGAATAATAATTAAGGAAAAACAAGAAAGAAGCA
ACAGCTGCAGAATGCCATTGAGTCAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 3 6PGDH 的 3' 末端核苷酸序列

Fig. 3 3' end nucleotide sequences of 6PGDH

阴影部分为终止子密码, 下划线为与中间片段克隆的重叠区域。The shaded region was the terminator code, and the underlined part was superposed filed with middle fragment.

2.1.2 黄瓜 6PGDH 基因中间片段的克隆 分别以叶片 cDNA、DNA 为模板进行扩增都得到长度约 1 100 bp 左右的条带 (图 4), 测序结果显示 2 条片段序列完全相同, 且与图 3 的 6PGDH 基因 3' 末端序列有 402 bp 的重叠区 (图 5), 说明克隆为目标片段且该片段内无内含子存在。

2.2 cDNA 序列生物信息学分析

将 2 个片段进行拼接, 获得 1 个长度为 1 207 bp 的 cDNA 片段, 包含 936 bp 编码 311 个氨基酸的开放阅读框 (ORF) 和含有 271 bp 非翻译区 (UTR) Poly A 3'

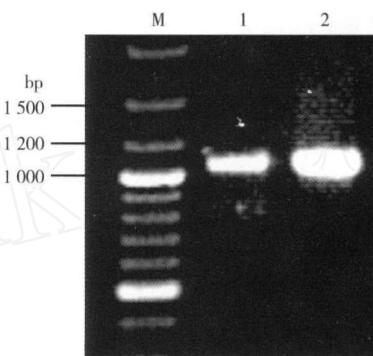


图 4 6PGDH 基因的 PCR 扩增结果

Fig. 4 The electrophoresis results of 6PGDH gene PCR products

M. DL 3000 DNA 标准分子质量 DL 3000 DNA marker; 1. 以 cDNA 为模板的 PCR 片段 PCR product of cDNA; 2. 以 DNA 为模板的 PCR 片段 PCR product of DNA

```

GGGAATTGTGAAGATGGTGCATAATGGTATTGAATATGGTATATGCGAGCTCATT
CGGAGGCCTACGACGTTTGAAACGTGTGGAGGGGTGCTCAATTCCGAAATTGGCTG
ACATTTCTCTGAGTGGAACAGGGGGAGTTGGAGAGCTTCTAATTGAGATATCAGC
TGATATCTTAAAGTTAAAGATGAACATGGTATGGGAATTGGCGATAAGATTG
GACAAGACTGGGATGAAAGGAACAGGGGGAGTTGGACTGTGCAGCAAGCTGCTGAGCT
TTCCATTGTAGCGCCAACGATTGCGCCTCGTTGGATTGAGATACTTGAGTGGATTG
AAGGACGAGAGGGAAAGTGCAGGGAGGTGTAAGGAAGCAGGTATGACGGATAG
TGTAGGATCGTGTAGAAGTGGGATTGACAAGAAGAAGTTGATTGAAGATGTAAGGCA
AGCTTGTATGCCCTCAAGATTTGAGCTATGCTCAGGGGATGAACTTGCTAAGGCC
AAGAGCTGGAGAAGGGATGAACTTGAATTGGGAAATTGGCGAGGATTGGAAA
GGTGGGTGCATCATAAGAGCTGTGTTCTGGACAGGATCAAGAAGGATATCAGGC
AATCCCAACCTGCTAGCTGCTGGGATCTGAGTTGCTAGAGAGATGGCAGA
GGCAGGCTGCTGGAGAGCTGCTGGGGGGCCATCGGCAGGGATCAGCACCC
CGGGGATGTGTGCTAGCCTTGCTATTTCGACACATAACAGGCGTGTAGGCTGCTGC
CAATCTTGTGCAGGCGAAAGAGACTTATGGGCTCATACATATGAGCGGGTGG
TCGCCAAGGCTCCTACACACAGAGTGGACAAAGCTGGCTCGCAGTGCTGATGCTGG
AGTTGGCATTTCAACTGAGCCTTGAGCTGCCATTCAAAAGTTAGTA
TGCTTCAAATTGGGTGCAAATTCTACTTGATTGCTTGCTGCCATTCAAAAGTTAGTA
GGTTTCTTTGTATCACAGTTGGACAGTCTTCCATGCTTCTAGGGGAGTAGATA
GCAG

```

图 5 6PGDH 基因中间片段的核苷酸序列

Fig. 5 Middle nucleotide sequences of 6PGDH

阴影部分为引物, 下划线为与 3' 末端克隆的重叠区域。The shaded region was the primer code, and the underlined part was superposed filed with 3' end fragment.

末端, 用 NCBI 的 BLAST 和 DNAlign 软件进行序列对比及同源性比较, 结果表明: 编码的氨基酸序列与拟南芥、菠菜、水稻、玉米、大豆、苜蓿等的 6PGDH 基因氨基酸序列同源性较高, 分别为 86.8%、83.3%、78.8%、77.4%、75.7%、74.9% (图 6), 推测该片段为黄瓜 6PGDH 基因序列, 命名为 CSPG (GenBank 登录号为 EU815934)。

拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILKNGGLSNDELAEIFITIEWNRGBIESFIVEITSIDI	243
水稻 <i>Oryza sativa</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILRRVGGGLNSNEIADVFAEWNRGBIESFIVEITADI	227
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILKTVGMSASEIAAVFEENNESNLQSFLIEITAAI	100
玉米 <i>Zea mays</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILKFVGKLTNSELHQVFSEWNKGELLSFLIEITADI	241
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILKNGGLSNEELGQIFDEWNKSEIESFIVEITADI	285
大豆 <i>Glycine max</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILKSVGKLSNEELQSVFSEWNKGELLSFLIEITADI	243
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILKSVGKLTNEELQSAFTEWNKGELLSFLIEITADI	243
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	GNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVILKRVGGLNSELADIFSEWNRGBIESFILIEISADI	60
一致序列 Consensus	gnfvkmvhngieygdmliseaydvk vgglnsela vf ewnkgelesflietadi	
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	FRVKDE...GDGEVDKILLDKTGKGTGWTVCQAAELSVAAPTIASLDCRYLSGIKD	300
水稻 <i>Oryza sativa</i>	FTVADPLDGSGGGGLVVKILLDKTGKGTGWTVCQAAELAIAAPTIASLDGRYLSGLKD	287
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	LRTSDCLLVG.DGSALVVKVLLDTGAKGTGWTVCQAAARLVPPIPTIAALEARYLSALKE	159
玉米 <i>Zea mays</i>	FGIKDEH...GDGYLVVKVLLDKTGKGTGWTVCQAAELSVAAPTIASLDLSRFLSGIKD	298
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	FKVKDCL...ADGGLVVKVLLDKTGKGTGWTVCQAAELSVAAPTIASLDCRYLSGIKD	342
大豆 <i>Glycine max</i>	FGIKDDK...GDGYEVVKVLLDKTGKGTGWTVCQAAELSIAAPTIASLDARFLSGIKD	300
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	FGIKDDK...GDGYLVVKVLLDKTGKGTGWTVCQAAELSPVAPTIASLDARFLSGIMD	300
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	FKVKDEH...GDGEVDKILLDKTGKGTGWTVCQAAELSIVAPTIASLDCRYLSGIKD	117
一致序列 Consensus	f vkdd gdg lvdkildktgkgtgkwtvqqaelsvaaptiaasld rylsglkd	
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	ERENAAKYLEEAGLKEDIGSASRGVDKKRIIDDVRCALYASKICSYAQGMNLLRAKSIEK	360
水稻 <i>Oryza sativa</i>	ERVAAGVVLKAEGMPGSL.LETINVDRKKMIVDRVRCALYASKICSYAQGMNLLRAKSVEK	346
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	DRTAASAVLAGPSTDAAP..SVTAEEKAAIAVAVRSALYASKICSYAQGMNLLRAKSIEK	217
玉米 <i>Zea mays</i>	ERVEASKIFQGDYYS....TGSPVDKAQIIVEDVRCALYASKICSYAQGMNLLRAKSIEK	353
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	ERENAAKILEAACMKEEVNAIRGGVDKKKRIIDDVRCALYASKICSYAQGMNLLRAKSIEK	402
大豆 <i>Glycine max</i>	ERVEAAKVFKSGGIGDIV..TDQHVDKQKIIDDVRCALYAAKICSYAQGMNLLRAKSIEK	358
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	ERVEAAKVFKSGGFIDIL..TDQQVDKKKQIIDDVRCALYAAKICSYAQGMNLLRAKSIEK	358
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	ERESAAEVVLKEAGMTDSVGSVRSGIDKKKLIIEVRCALYASKICSYAQGMNLLRAKSIEK	177
一致序列 Consensus	erv aakvlk g vdkk liddvrvqalyaskicsyaqgmnllraks ek	
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	GWDLNLGEMARIWKGGCIIRAVFLDRIKKAYQRNTNLASIIVDPDFAKEMVQROAAWRV	420
水稻 <i>Oryza sativa</i>	GNINNLAELARIWKGGCIIRAKFLDRIKKAYDRNPELANLIVDRBFAREMVQROAAWRV	406
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	GWGLDLGSISRIWKGGCIIRAVFLDRIKAAYCVDAELIASLIVDPGFASELASAOSAWRSV	277
玉米 <i>Zea mays</i>	GWGLNLGELARIWKGGCIIRAIFLDRIKKAYDRNPGLASLIVDPBFAQEIMDROAAWRV	413
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	GWDLNLGELARIWKGGCIIRAVFLDSIKAYQRNPNLASIIVDPPEFAKEMVQROAAWRV	462
大豆 <i>Glycine max</i>	GWDLKLGELARIWKGGCIIRAIFLDRIKQAYERNPNLANLIVDPPEFAKEIIDYOSAWRSV	418
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	GWDLALGELARIWKGGCIIRAIFLDRIKQAYDRNPNLANLIVDPPEFAKEIIEROTAWRSV	418
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	GWNLNEGELARIWKGGCIIRAVFLDRIKKAYQRNPNLASIIVDPPEFAREMVQROAAWRV	237
一致序列 Consensus	gwdlnlgelariwgcciravfldrikaydrnpnlasllvdpefaekemvgrqaawrrv	
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	VGLAISAGISTPGMCASLAYFDITYRRARLP.AN.LQACRDIFGAHTYERIDRPGAYHTEW	478
水稻 <i>Oryza sativa</i>	VARAVEAGISTPGMCASLSFYDTYRCSFLP.ANLIQACRDIFGAHTYERIDREGSFHTEW	465
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	VTTAINAGVSPEAMSGSLAYFDITYRTVLPQAQMVSQSRDFFGSHTYKRLDKGVHTRW	337
玉米 <i>Zea mays</i>	VCLAINNGVSTPGMCASLAYFDTSYRDRFLP.ANLVOACRDIFGAHTYERVDMPGSFHTEW	472
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	VGLAVSAGISTPGMCASLAYFDITYRRARLP.ANLVOACRDIFGAHTYERVDLPGSVHTEW	521
大豆 <i>Glycine max</i>	VCLAINSGISTPGMCASLAYFDITYRREFLP.ANLVOACRDIFGAHTYERVDIEGSVHTEW	477
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	VSLSVNSGISLPGMCASLAYFDTSYRREFLP.ANLVOACRDIFGAHTYERVDIEGSVHTEW	477
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	VGLAISAGISTPGMCASLAYFDITYRRARLP.ANLVOACRDIFGAHTYERVDROGSVHTEW	296
一致序列 Consensus	v lainagistpgmcaslafdttyrr rlp anlvqaqrdfygahtyervd pgsvhtew	
拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	TKLARKSQ.....	486
水稻 <i>Oryza sativa</i>	TKLARKSNGAAI...	477
条斑紫菜 <i>Porphyra yezoensis</i>	SSDGVTETQ.....	346
玉米 <i>Zea mays</i>	FKIARNISNN.....	482
菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	SKLARKSDPNVAAL	536
大豆 <i>Glycine max</i>	FKLAKQSKKLYCIS	492
苜蓿 <i>Medicago sativa</i>	FKLAKQSRI.....	486
黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	TKLARSADAGVGIFN	311
一致序列 Consensus	klar s	

图 6 不同物种 6PGDH 氨基酸序列同源性比较

Fig. 6 Alignment of predicted amino acid sequences of 6PGDH from different species

应用 DNAMan 软件将推断的黄瓜 6PGDH 氨基酸序列和从 GenBank 中获取的其他植物氨基酸序列进行系统树分析, 发现黄瓜与拟南芥最先聚类, 说明与拟南芥在进化上靠得最近, 接着与菠菜、水稻、玉米、大豆、苜蓿聚类, 与条斑紫菜在进化上的亲缘关系最远 (图 7)。

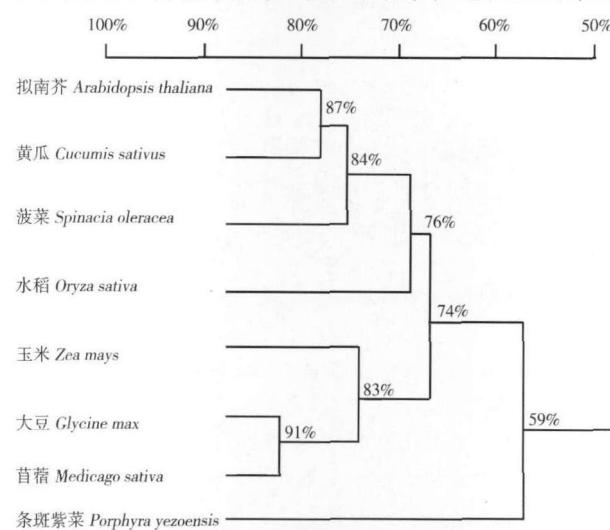


图 7 不同物种 6PGDH 氨基酸序列的系统树分析

Fig. 7 Phylogenetic tree of the deduced amino acid sequence of 6PGDH in different species

2.3 6PGDH 基因的半定量表达分析

以组成型表达基因 *actin* 为内标, 运用半定量 RT-PCR 技术对 6PGDH 基因在高温胁迫和常温对照下叶、根、茎中的表达水平进行分析, 发现高温胁迫和常温下 3 种器官中该基因均有表达, 高温胁迫下 6PGDH 表达量高于常温对照 (图 8)。

3 讨论

根据高度保守的氨基酸序列设计简并引物, 利用 RT-PCR 方法进行克隆是一种简便快速获得目的基因的方法, 但对引物的特异性要求较高。本试验设计了 2 对引物, 其中 1 对的下游引物是根据 mRNA 3' 末端的 Poly A 特点设计的, 结果获得的序列 3' 末端有 15 个连续 A, 表明可通过设计适当的引物利用 RT-PCR 直接获得 3' 末端序列, 而不需要购买昂贵的试剂盒。2 对引物具有 402 bp 的重叠区域, 测序结果表明 PCR 扩增所得到的 2 条序列确实具有 402 bp 的重叠区域, 说明了分段克隆目的基因的可行性。

林善枝等^[16]研究了低温胁迫下 PPP 途径中多种酶活性的变化, 经相关性分析表明低温锻炼中酶活性的增加可使 PPP 的效率提高从而增强植株对低温的适应性。朱雪竹等^[17]发现小麦在铝盐胁迫下通过消耗较多的葡萄糖形成还原力 NADPH, 增加能量消耗以抵消铝胁迫。侯夫云^[18]研究发现水稻 6PGDH 的转录水平不同程度地受到高盐、低温、干旱和 ABA 胁迫的诱导且 6PGDH 酶活性显著增强, 认为水稻的戊糖磷酸途径可能参与植物对胁迫的应答反应, 其中 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (6PGDH) 对提高戊糖磷酸途径的效率起决定作用。本试验结果表明: 经 38 ℃ 高温胁迫处理 6PGDH 基因在黄瓜叶、根、茎中的表达量均高于对照, 说明该基因与耐热胁迫应答相关, 与上述前人的研究结论一致。本研究克隆黄瓜 6PGDH 基因含 3' 末端序列片段经 BLAST 比对, 发现其编码的氨基酸序列与亲缘关系较远的物种拟南芥、大豆、水稻、玉米、菠菜 6PGDH 的同源性都达 75% 以上, 说明该基因氨基酸序列具有极高的保守性。目前笔者正准备构建黄瓜 6PGDH 基因反义表达载体, 通过反义抑制表达进一步证实该基因的功能。该片段的成功获得为克隆该基因全长和研究黄瓜戊糖磷酸代谢中相关基因表达转录调控与逆境胁迫相关性奠定了基础。

参考文献:

- [1] 沈同, 王镜岩. 生物化学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 104
- [2] van Assche F, Cardinaels C, Clijsters H. Induction of enzyme capacity in plants as a result of heavy metal toxicity: dose-response relation in *Phaseolus vulgaris* L. treated with zinc and cadmium [J]. Environ Pollut, 1988, 52(2): 103–115

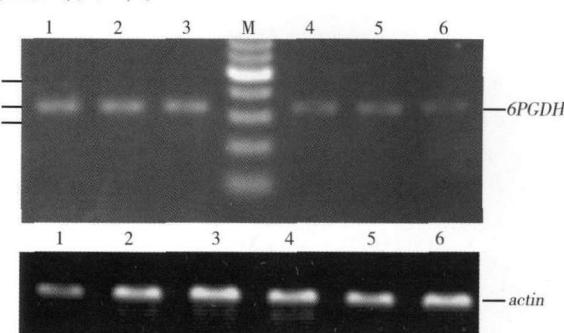


图 8 不同器官中 6PGDH 基因的半定量 RT-PCR 表达分析图谱

Fig. 8 The expression map of 6PGDH gene in different organs by semi-QRT-PCR

M. DL 1000 DNA 标准分子质量 DL 1000 marker; 1、2、3. 分别为高温胁迫的叶、根、茎 Leaf, root and stem under heat stress; 4、5、6. 分别为常温对照的叶、根、茎 Leaf, root and stem under normal temperature

- [3] Sláki J J, Zhang G, Basu U, et al. Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) is associated with rapid, Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphoglucanate dehydrogenase in root apices [J]. *Physiologia Plantarum*, 1996, 98: 477–484
- [4] Šindelář L, Šindelářová M, Burketová L. Changes in activity of glucose-6-phosphate and 6-phosphoglucanate dehydrogenase isozymes upon potato virus Y infection in tobacco leaf tissues and protoplast [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37(3): 195–201
- [5] Redinbaugh M G, Campbell W H. Nitrate regulation of the oxidative pentose phosphate pathway in maize (*Zea mays* L.) root plastids induction of 6-phosphoglucanate activity, protein and transcript levels [J]. *Plant Science*, 1998, 134(2): 129–140
- [6] Fahrendorf T, Ni W, Shorroosh B S, et al. Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XI X. Transcriptional activation of oxidative pentose phosphate pathway genes at the onset of the isoflavanoid phytoalexin response [J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 885–900
- [7] Alexandrov N N, Troukhan M E, Brover V V, et al. Features of *Arabidopsis* genes and genome discovered using full-length cDNAs [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 69–85
- [8] Krepinsky K, Plaumann M, Martin W, et al. Purification and cloning of chloroplast 6-phosphoglucanate dehydrogenase from spinach [J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 2678–2686
- [9] Huang Ji, Zhang Hongsheng, Wang Jianfei, et al. Molecular cloning of rice 6-phosphoglucanate dehydrogenase genes that is up regulated by salt-stress [J]. *Mol Biol Reports*, 2003, 30: 223–227
- [10] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 1980, 8(19): 4321–4326
- [11] 杨寅桂, 庄勇, 娄群峰, 等. 适于cDNA-AFLP的黄瓜幼叶总RNA快速高效提取方法 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(1): 129–133
- [12] Hayashi H, Huang P, Takada S, et al. Differential expression of three oxidosqualene cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27: 1086–1092
- [13] Iturbe-Ormaetxe I, Haralamidis K, Papadopoulou K, et al. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* L. and *Lotus japonicus* [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51: 731–743
- [14] 孙菲菲, 侯喜林, 李英, 等. 不结球白菜硝酸还原酶基因 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. 南京农业大学学报, 2006, 29(2): 15–19
- [15] 蒋芳玲, 侯喜林, 史公军, 等. 不结球白菜 *BrLOS2* 基因 cDNA 全序列克隆及结构特征分析 [J]. 南京农业大学学报, 2007, 30(3): 27–32
- [16] 林善枝, 陈晓敏, 蔡世英, 等. 低温锻炼对香蕉幼苗能量代谢和抗冷性效应的研究 [J]. 热带作物学报, 2001, 22(2): 17–21
- [17] 朱雪竹, 宗良纲, 孔繁翔. 活性铝对小麦葡萄糖含量及相关酶活性影响的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(3): 452–454
- [18] 侯夫云. 水稻戊糖磷酸途径两个关键酶基因的克隆与功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005: 40–42

责任编辑: 范雪梅