

# 龙眼转醛醇酶基因的克隆与原核表达

游向荣<sup>1</sup>, 许鸿川<sup>1</sup>, 梁文裕<sup>1</sup>, 郑少泉<sup>2</sup>, 陈伟<sup>1</sup>

(1. 福建农林大学 生命科学学院 福建 福州 350002; 2. 福建省农业科学院 果树研究所, 福建 福州 350013)

**摘要:** 转醛醇酶作为磷酸戊糖途径非氧化阶段的关键酶, 在调节植物 PPP 对环境胁迫的应答中起重要作用。该研究应用 RACE 方法克隆了龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.) 花芽中转醛醇酶的基因, 获得一段长度为 1 655 bp 的 cDNA, 其中包括一个 1 320 bp 的开放阅读框, 已登陆 GenBank, 登陆号为 FJ472991 (GI: 217795375)。将转醛醇酶全长 cDNA 在大肠杆菌中表达, 获得一个约 55 kD 带有组氨酸标签的外源蛋白。RT-PCR 结果显示, *TAL* mRNA 在龙眼成花逆转花芽中有较明显的表达量上调, 说明 *TAL* 在一定程度上影响了龙眼正常成花。

**关键词:** 龙眼; 转醛醇酶; 基因; 克隆; 原核表达

**中图分类号:** S 667.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)12-0007-04

磷酸戊糖途径(Pentose phosphate pathway, PPP)是植物体中糖代谢的重要途径, 其主要功能是产生供生物合成所需的还原力 NADPH 以及 ATP 和核酸合成所需的戊糖<sup>[1]</sup>。转醛醇酶(*Transaldolase*, *TAL*)催化景天庚酮糖-7-磷酸的二羟丙酮部分转移到甘油醛-3-磷酸上, 是 PPP 非氧化阶段的关键酶, 连接 PPP 和糖酵解途径, 调节 PPP 氧化、非氧化阶段的平衡<sup>[2]</sup>。植物磷酸戊糖途径已被证明与植物的生长发育和对多种环境胁迫应答有关, 外界环境胁迫在一定程度上能诱导糖代谢由糖酵解转向 PPP<sup>[3]</sup>。

龙眼是我国重要经济型果树, 在内销和外贸上历来有着特殊的地位。龙眼成花质量与产量密切相关, 如果在开花阶段因遭遇暖冬等外界环境胁迫, 则花芽有向营养生长转变的趋势, 影响正常成花, 容易引起产量下降<sup>[4]</sup>。龙眼花穗在发育过程中顶端分生组织由生殖生长转向营养生长的现象, 称为成花逆转<sup>[5]</sup>。前期研究表明龙眼在遭遇暖冬时花芽中转醛醇酶表达上调<sup>[6]</sup>, 花芽分化有逆转趋势。该研究应用分子生物学方法克隆并原核表达了 *TAL* 基因, 为阐明其在龙眼成花过程中的生物学功能, 分析其在成花转变中应对外界胁迫反应中

所起的作用奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)品种为龙优, 种植在福建省莆田市农业科学研究所果树分所龙眼品种园。选择 25 a 生育状态一致的植株 3 株, 采集龙眼正常成花和成花逆转花穗上的花芽。RevertAid<sup>TM</sup> Furst Strand cDNA Synthesis 试剂盒购自 Fermentas 公司, SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification 试剂盒购自 Clontech 公司, 大肠杆菌菌株 BL21, pMD18-T vector, T4 DNA 连接酶, 各种限制性内切酶, Taq DNA 聚合酶, dNTPs, X-gal, IPTG 均购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司(中国大连)公司。其余试剂为国产分析纯。PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, DNA 测序由上海英骏生物有限公司完成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 RACE 方法克隆 *TAL* 龙眼花芽总 RNA 以 SDS 法提取<sup>[7]</sup>, 采用 Fermentas 公司 RevertAid<sup>TM</sup> Furst Strand cDNA Synthesis 试剂盒合成 cDNA 第一链, 以反转录模板直接进行 PCR 反应。运用 BLAST 程序对 GenBank 进行搜索, 选取与龙眼亲缘关系较近植物的 *TAL* 核酸序列进行比对分析并设计保守区特异性引物, 上游引物(P1)为: 5'-AGGCGTAACAAGCAACCCAG-3', 下游引物(P2)为: 5'-GCCATC-CAAGTAGGCATCAA-3'。PCR 扩增条件为: 95℃变性 5 min, 95℃1 min, 52℃30 s, 72℃1 min 进行 35 个循环 72℃延伸 5 min。PCR 产物以 1%琼脂糖凝胶电泳回收, 连接到 pMD18-T 载体上, 热击转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选

**第一作者简介:** 游向荣(1979-), 女, 福建福州人, 博士, 主要研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail: areyouare@163.com。

**通讯作者:** 陈伟(1955-), 男, 福建福州人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为植物生理学和蛋白质组学。E-mail: weichen909@163.com。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30571293); 福建省自然科学基金资助项目(2007J0045); 教育部博士点基金资助(200803890009)

**收稿日期:** 2009-06-20

PCR 检测阳性克隆子, 送上海英骏生物技术公司测序。根据保守区扩增产物的测序结果设计 3' RACE 特异性引物: 5'-ATGACACTAATGGCACTGTGGAGG-3' 和 5' RACE 特异性引物: 5'-TTACATTGACACTTATGCCCTGAG-3', 采用 Clontech 公司的 SMART<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification 试剂盒进行 3' 端和 5' 端的 RACE 反应。将 3' 端和 5' 端的 RACE 反应产物分别回收, 连接 pMD18-T 载体, 转化测序。

1.2.2 *TAL* 全长 cDNA 克隆及原核表达 根据 5' RACE、3' RACE 及中间序列测序结果拼接而成的 *TAL* cDNA, 重新设计扩增全长基因 cDNA 的引物: AP1 为 5'-GCGGGATCCATGGCTACTGTTTCCAAGCTCTC-3'; AP2 为 5'-GCGCTCGAGACTACAAGCAGGATACACGACGGAA-3', 进行 PCR 扩增。纯化的 PCR 产物和 pET-28a 载体以 *Bam*H I 和 *Xho*I 双酶切, 回收酶切产物, 连接目的基因与载体片段, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, Kan 抗性筛选阳性克隆, 提质粒酶切鉴定, 鉴定正确的质粒转化 BL21 感受态细胞, 以终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导 *TAL* 的表达。SDS-PAGE 电泳分析。

1.2.3 RT-PCR 分析 *TAL* 在花芽中的表达 以分光光度法定量的龙眼正常成花和成花逆转花芽总 RNA 反转录的 cDNA 为模板, 以龙眼  $\beta$ -actin 基因作为内参, 对龙眼 *TAL* 进行 RT-PCR 分析。PCR 扩增条件为: 95℃ 变性 5 min, 95℃ 1 min, 62℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 5 个循环, 95℃ 1 min, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 进行 28 个循环, 72℃ 延伸 5 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 *TAL* 全长 cDNA 克隆

以逆转录合成的 cDNA 为模板, 利用一对特异性引物 P1、P2 进行保守区 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳见一约 400 bp 的 DNA 条带(图 1), 对该片段进行回收测序, 得到一段 402 bp 的 cDNA 序列, 经 DNAMAN 和 BLAST 比对分析, 该序列为 *TAL* cDNA 的同源片段。以带有 UPM 接头的 cDNA 为模板, 利用 3' RACE 特异性引物 AP1 和 UPM 引物进行 3' RACE, 获得 1 个约 1 000 bp 的 DNA 条带, 对该片段进行回收测序, 得到 1 段 961 bp 的 cDNA 序列, 该片段包含一个多聚腺苷(ployA)尾, 并有 309 bp 与保守区测序结果重叠。

以带有 UPM 接头的 cDNA 为模板, 利用 5' RACE 特异性引物 AP2 和 UPM 引物进行 5' RACE, 获得一个约 800 bp 的 DNA 条带, 对该片段进行回收测序, 得到一段 862 bp 的 cDNA 序列, 该片段有 261 bp 与保守区测序结果重叠。

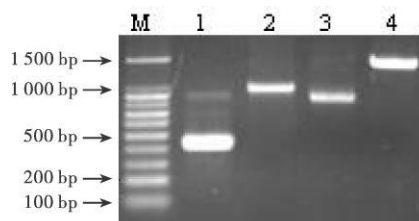


图 1 龙眼成花逆转花芽 *TAL* RT-PCR 扩增结果

注: M; 100 bp DNA 分子量标准; 1: *TAL* 保守区特异扩增结果; 2: *TAL* 3' RACE 扩增结果; 3: *TAL* 5' RACE 扩增结果; 4: *TAL* 全长 cDNA 扩增结果。

Fig 1 RT-PCR amplification product of *TAL* cDNA sequence in longan floral reversion buds

Note: M; 100bp DNA ladder; 1: Amplification of *TAL* conservative region; 2: 3' RACE amplify of *TAL*; 3: 5' RACE amplify of *TAL*; 4: Amplification of *TAL* full length cDNA.

将 3 个片段进行拼接, 获得 1 655 bp 的 *TAL* 基因全长序列(图 2), 该 cDNA 序列包含一个 1 320 bp 的完整开放阅读框, 已登陆 GenBank, 登陆号为 FJ472991 (GI: 217795375)。该开放阅读框编码一个具有 440 个氨基酸残基的蛋白, 推测其分子量为 49 kDa。在 3' ploy(A)<sup>+</sup> 区之前 86 bp 有 1 个 AATAAA 加尾信号, 该开放阅读框包含 159 bp 的 5' 非编码区和 173 bp 的 3' 非编码区。

通过与 GenBank 上其它植物进行 BLAST 比较发现, 龙眼 *TAL* cDNA 与杨树(*Populus trichocarpa*) *TAL* cDNA 基因同源性达 77.8%, 与大豆 *TAL* 基因(*Glycine max*)同源性达 72.6%, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)同源性达 71.7%, 与马铃薯(*Solanum tuberosum*)同源性达 70.3%, 与番茄(*Lycopersicon esculentum*)同源性达 70%, 与水稻(*Oryza sativa*)同源性达 68.6%, 与玉米(*Zea mays*)同源性达 66.6%(图 3)。

### 2.2 RT-PCR 分析 *TAL* 在花芽中的表达

以龙眼正常成花和成花逆转花芽总 RNA 为模板, 以龙眼  $\beta$ -actin 基因作为内参, 对 *TAL* 进行 RT-PCR 分析。结果显示, *TAL* mRNA 在成花逆转的花芽中表达量有较明显的上调(图 4)。

### 2.3 *TAL* 在大肠杆菌中诱导表达

将 pET28a *TAL* 阳性质粒转化到 BL21 感受态细胞中, 并以 IPTG 诱导 *TAL* 的表达, 12.5% SDS-PAGE 电泳结果如图 5, 2~4 道电泳图谱可见大量外源蛋白的表达, 参照蛋白分子量, 外源蛋白分子量约为 55 kD, 符合预测的 *TAL* 蛋白分子量, 表达的融合蛋白带有组氨酸标签, 后期可纯化制备抗体。经凝胶扫描测定, 外源蛋白约占细菌蛋白总量的 14.4%。

ctaat acgact cactat aggcaagcagtggt atcaacgcagagtg acgggggggt agcgtgat ctaacacttg aagaaaaaaacccctc  
91 ttttctctcttctgccacctctctt cacttctcaatctcaact accctctcttggctgatctctcc **ATGGCTACTGTTTCCAAGCTC**  
1 M A T V S K L  
181 TCCAATCCAACCACACCTGCTTGTCTCTOCAGTCCAGATCATCATCTCTTCTTTGCTTAGAACCTTCATTGGTTTCAATTCAGAACT  
8 S N P T T P A L S L Q S R S S S S S L P R T F I G F N S R T  
271 GGCTCGCCTTCAAGTTTGCTTCTTCTCACTTGTTTTCTOCGAAAGAACCATGCTTTGAGACACOCATTGTGTCAAGTGTCTGCAOCT  
38 G S A A F K F A S S S H L F L R K N H A L R H P F V V K C S A P  
361 GGTGGAATG TTAATG CAGCAAGAGAACACCOCTTCATGATCTTTACGAAGAGAGAAGGCGAGGCCOCTTGGTATGATAATCTCTGCOGG  
68 G G N G N A A K R T T T L H D L Y E R E G Q S P W Y D N L C R  
451 CCTGTAACGTATCTGCTTCTCTGATGTCAGCGGGTG TGAGAGGTGTAAC TAGCAATOCAGCGATT TTTCCAGAAAGCAATATCATCATCA  
98 P V T T D L L P L I A S G V R G V T S N P A I F Q K A I S S S  
541 AAOGCTTATAATGTCAAATTCAAAGAACTTG TACAATCTGGAAGAAAGACATGAAGCTGCATATTTGGAACTTGTGATCAAGGACATTCAA  
128 N A Y N D Q F K E L V Q S G K D I E A A Y W E L V I K D I Q  
631 AATGCATGCAAACTTTTGAACCGATCTATGATGAAACTGATGGGGTGATGGCTATGTGCTGTTGAGGTATCTOCCAAACTTGCTGAT  
158 N A C K L F E P I Y D T D G G D G Y V S V E V S P K L A D  
721 GACACTAATGGCAGCTG TGGAGGCTGCAAAATGGCTTCACAAAGTAGTCAATCAGOCAAATGTGTACATTAAGATCCOCTGCCACAGCTOCA  
188 D T N G T V E A A K W L H K V V N Q P N V Y I K I P A T A P  
811 TGGTTCTTCTATCAAGGAAGTTATGCTCAGGGCATAAGTGTCATGTAAC TCTCATATTTCCCTGGCTAGATATGAAGCAGTCAAT  
218 C V P S I K E V I A Q G I S V N V T L I F S L A R Y E A V I  
901 GATGCTTACTGGATGACCTTGAGGCTTCTGGGCTTAGTGACCTCTCCAGAGTCACAAGTGTGCGTCTTTTGTGTAGTGGATAGAC  
248 D A Y L D D L E A S G L S D L S R G T C A A S F V S R V D  
991 ACOC TAGTTGATAAGACTGCTGAAAAGATTGGAACCCAGAGCCCTTGATCTAOGGGAAGAGCGTCTGTAGCTCAAGCGGCTGTGCA  
278 T L V D K M L E K I G T P E A L D L R G K A A V A Q A A L A  
1081 TATAAGCTTTAOCAGAAGAAGTTCTCTGGTCCAAAGATGGAGGCTCTTGTAAGAAAGGTGCAAGAAAGCAGAGACTACTGTGGGCATCA  
308 Y K L I Y Q K K F S G P R W E A L V K K G A K K Q R L L W A S  
1171 ACTAGTGTTAAGAACCTGCTACCTGACACTCTATAAGTTGCTCACCTCATGCAOCTGTATACCGTTTCAACCATGCTGACCAAGCT  
338 T S V K N A P D A Y P D T L Y V A P L I G G P D T V S T M P D Q A  
1261 CTCAAGCATTATTOGATCATGGTACTGTTTCAAGGACAATTGACTCAAAATGTGCTTGACGCTGAAGGAATTACAGTGGCTTGAGAAG  
368 L Q A F I D H G T V S R T I D S N V S D A E G I Y S A L E K  
1351 TTGGGAATOGATTGGAGCTATGTGGGAATCAACTOGAAGTAGAAGGTGATGATCTTTTCATGAAGAGCTTTGACAGTCTGCTGATACC  
398 L G I D W S Y V G N Q L E V E G V D S F M K S F D S L D T  
1441 CTGCAAGAGAAGGCAAAATTCCTTAAAGCTGGTTAGCCTGTAAaaaaggcacttgatgtgatttgcttaatttggcatttgtagta  
428 L Q E K A N S L K L V S L \*  
1531 c**AATAAA**aaccagggtgggttcggtcggtatccgtcttgtagtttgt aagacaagatattgttatattatataagtttcagcttctgtg  
1621 ttttaaaaaaataaaaaaataaaaaaataaaaaa

图2 龙眼成花逆转花芽 *TAL* cDNA 的核苷酸序列(上行)及推导氨基酸序列(下行)

Fig.2 Schematic representation of the nucleotide sequence(upper lines) and its deduced amino acid sequence(lower lines) of *TAL* cDNA

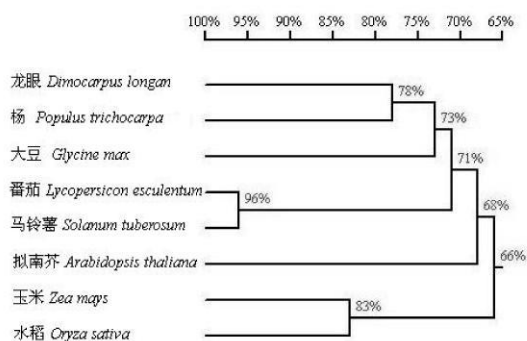


图3 *TAL* 核苷酸序列同源树

Fig. 3 Homology tree of nucleotide sequences of *TAL*

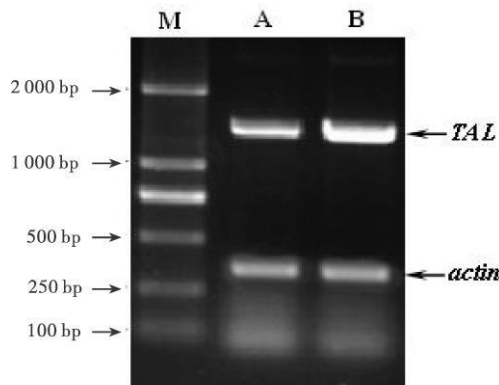


图4 TAL在龙眼正常成花和成花逆转花芽表达的RT-PCR分析

注: M: DL 2 000 DNA 分子量标准; A: 正常成花; B: 成花逆转。

Fig.4 RT-PCR analysis of *TAL* expressed in normal flowering and floral reversion longan buds

Note: M: DL 2000 DNA ladder; A: Normal flowering; B: Floral reversion.

### 3 讨论

目前,对植物磷酸戊糖途径的研究多集中于氧化阶段酶 G6PHD 和 6PGDH 上,对 PPP 非氧化阶段酶的研究

究还较少。作为 PPP 非氧化阶段的关键酶 转醛醇酶对外界胁迫的应答表现为植物的呼吸作用中 PPP 比例上升<sup>[3]</sup>。

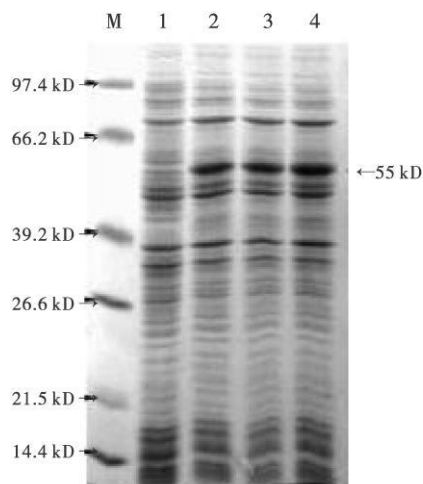


图5 *TAL* 蛋白在大肠杆菌中表达的 SDS-PAGE 电泳图谱

注: 蛋白分子量标准; 1: IPTG 诱导的空质粒转化子; 2-4: IPTG 诱导的阳性质粒转化子。

Fig 5 SDS-PAGE map of *TAL* protein expressed in *E. coli*

Note: M: Protein marker; 1: IPTG induced negative transformant; 2-4: IPTG induced positive transformant with pET28a-*TAL*.

Memoto 发现, 盐胁迫下小麦根系和叶片中 PPP 增强与植物盐诱导应答反应有关<sup>[8]</sup>。林善枝等<sup>[9]</sup>认为毛白杨在低温胁迫下 PPP 途径的效率提高增强了植株对低温的适应性。玉米<sup>[10]</sup>和水稻<sup>[11]</sup>在涝渍逆境下幼苗根系中磷酸戊糖途径占总呼吸的百分率都有不同程度增加。Moehs 等<sup>[12]</sup>研究发现 *TAL* mRNA 在受机械损伤的土豆块茎里大量累积, 他们认为 *TAL* 在成熟土豆的块茎中累积量远高于根、茎组织说明 *TAL* 可能参与木质素合成。Paul 等<sup>[3]</sup>认为, *TAL* 对环境因素的响应表明其可能在植物体其它代谢途径中起作用, 并推测 *TAL* 可能与初生和次生代谢中的碳通量调节有关。

龙眼在开花期常遭遇暖冬高温等外界环境胁迫, 导致正常成花受到影响。现以龙眼正常成花和成花逆转的花芽为研究对象, RT-PCR 结果表明, *TAL* mRNA 在

成花逆转的花芽中表达量有较大幅度的上调, 磷酸戊糖途径在呼吸作用中的比例增加, 可能与龙眼成花过程中的胁迫应答有关。说明 *TAL* 可能在调节非氧化阶段 PPP, 应对外界环境胁迫中起作用。

该试验克隆了 *TAL* 全长 cDNA 并在 *E. coli* 中表达, 为今后研究环境胁迫下 *TAL* 的表达调控对 PPP 及龙眼成花转变的影响奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Kruger N J, von Schaewen A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organization[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(3): 236-246.
- [2] Perl A. The pathogenesis of transaldolase deficiency[J]. *IUBMB Life*, 2007, 59(6): 365-373.
- [3] Maxime C, Paul Q W. New insights into plant transaldolase[J]. *Plant journal*, 2005, 43: 1-16.
- [4] 林顺权, 胡又厘. 龙眼的成花逆转与冲梢调控[J]. *植物生理学通讯*, 2001, 37(6): 581-583.
- [5] Tooke F, Ordridge M, Chiurugwi T. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(420): 2587-2599.
- [6] 陈思思. 龙眼花芽成花逆转的差异蛋白分析[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2008.
- [7] 章希娟, 许鸿川, 游向荣, 等. 龙眼胚胎 F3H 基因的 cDNA 克隆及序列分析[J]. *园艺学报*, 2008, 35(11): 1581-1586.
- [8] Nemoto, Sasakuma T. Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Plant sciences*, 2000, 158: 53-60.
- [9] 林善枝, 李雪平, 张志毅. 在低温诱导毛白杨抗冻性中 CaM 含量和 G6PDHase 及 ATPase 活性的变化[J]. *北京林业大学学报*, 2001, 23(5): 4-9.
- [10] 刘晓忠, 汪宗立, 高煜珠. 涝渍逆境对玉米根系磷酸戊糖途径的影响[J]. *江苏农业学报*, 1992, 6(4): 43-46.
- [11] 彭克勤, 夏石头, 李阳生. 涝害对早中稻生理特性及产量的影响[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2001, 21: 173-176.
- [12] Moehs C B, Allen P V, Friedman M. Cloning and expression of transaldolase from potato[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32: 447-452.

## Cloning and Prokaryotic Expression of Transaldolase from Longan

YOU Xiang-rong<sup>1</sup>, XU Hong-chuan<sup>1</sup>, LIANG Wen-yu<sup>1</sup>, ZHENG Shao-quan<sup>2</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 2. Fruit Research Institute, Fujian Academy of Agriculture Science, Fuzhou, Fujian 350013, China)

**Abstract:** The pentose-phosphate pathway (PPP) plays a pivotal role in carbohydrate metabolism, as a key enzyme of the nonoxidative PPP branch, transaldolase showed advertent response to environmental stress regulation. We have isolated a cDNA encoding transaldolase, an enzyme of the pentose-phosphate pathway, from longan (*Dimocarpus longan* Lour.). RACE method was used and a full length of 1 655 bp cDNA, with a 1 320 bp open reading frame, was obtained (GenBank access number: FJ479618). Transaldolase cDNA was expressed in *E. coli*, and a 55 kD heterologous protein with histidine tag was obtained. The RT-PCR result showed *TAL* mRNA had a remarkable up-regulation, indicate the expression of transaldolase influence longan flowering transition in a certain extent.

**Key words:** Longan; Transaldolase; Gene; Clone; Prokaryotic expression