

DOI:10.11937/bfyy.201513030

枣甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的克隆及表达分析

卜娇迪¹, 陈莹莹², 刘孟军², 赵锦¹

(1. 河北农业大学 生命学院, 河北 保定 071000; 2. 河北农业大学 中国枣研究中心, 河北 保定 071000)

摘要:以‘金丝小枣’为试材,根据 GAPDH 基因保守序列设计引物,采用同源克隆和 RT-PCR 法,克隆枣 GAPDH 基因并进行生物信息学及转录表达分析。结果表明:该基因包含完整的开放阅读框为 1 020 bp,编码 339 个氨基酸残基,预测分子量为 36.904 kDa,理论等电点为 8.53,命名为 ZjGAPDH(KP147910);该蛋白包含 2 个保守结构域,即 Gp_dh_N superfamily 和 Gp_dh_C superfamily;系统进化树分析表明,ZjGAPDH 与其它物种 GAPDH 蛋白的同源性相对较小,但均属于存在细胞质中参与糖酵解过程的蛋白;实时荧光定量分析表明,ZjGAPDH 基因在枣果实不同发育时期中表达有显著差异,在幼果期和全红期果实中的表达丰度较高。

关键词:枣;甘油醛-3-磷酸脱氢酶;克隆;表达分析

中图分类号:Q 786;S 665 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)13-0102-05

甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)是糖代谢和能量代谢过程中的

第一作者简介:卜娇迪(1990-),女,辽宁铁岭人,硕士研究生,研究方向为细胞工程。E-mail:bujiaodi713138@163.com.

责任作者:赵锦(1977-),女,河北安平人,博士,教授,研究方向为植物资源评价。E-mail:zhaojinbd@126.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2013BAD14B03);河北省科技支撑计划资助项目(11230606D-6)。

收稿日期:2015-02-03

关键酶。有研究表明高等植物中存在 2 种不同类型的 GAPDH,一类是依赖于 NAD⁺,存在于细胞质中,另一类以 NADPH 或 NAD⁺ 为辅酶,存在于叶绿体中,分别在糖酵解和植物光合作用中起着重要作用^[1-2]。植物中的 GAPDH 还对逆境胁迫有一定作用,该基因通过翻译调控和多重翻译后修饰以适应胁迫^[3];刘志华等^[4] 研究证明 GAPDH 基因具有抗盐、碱和高温胁迫功能,是一种重要的抗逆境胁迫基因。此外,由于 GAPDH 基因具有高度种属保守序列^[5-6],在一些研究中认为该基因还

Establishment of *Populus deltoides* cv. JuBa Regeneration System and Its Resistance to Hygromycin

WANG Guiying^{1,2}, LIU Xiaojie¹, LI Shanshan², SUN Chao¹, YANG Jinku¹, YANG Minsheng², LIU Meiling¹

(1. Langfang Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Langfang, Hebei 065000; 2. Keylab of Genetic Resources of Forest and Forest Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001)

Abstract: Taking a hybrid poplar variety *Populus deltoides* cv. JuBa (*Populus deltoides* 50 × *P. deltoides* 36) as experiment material, the effect of different phytohormone combination and hygromycin concentration gradient on leaves and shoot tips were studied. The results showed that the optimal medium for bud induction was MS+6-BA 0.25 mg/L+IBA 0.1 mg/L, the optimal regeneration and rooting media was 1/2MS+IBA 0.3 mg/L. Through screening different hygromycin concentrations for leaves and shoot tips, hygromycin could affect the growth of JuBa poplar. The hygromycin inhibitory effects increased with growth time. Leaves were more sensitive comparing to shoot tips. After 2 days of cultivation, leaves were obviously damaged. The damage of shoot tips began to show only after 4 days. After 2 weeks, only a few buds appeared on petiole on 4 mg/L hygromycin; all leaves and shoot tips were dead under above 6 mg/L of hygromycin. The results demonstrated that the range of hygromycin critical concentration was from 4 mg/L to 6 mg/L. This research laid a technological foundation for the genetic transformation of this poplar variety.

Keywords: *Populus deltoides* cv. JuBa; regeneration system; hygromycin; critical concentration

能作为潜在的内参基因^[7-9]。

枣树原产我国,是我国第一大干果树种,以其抗逆性强、结果早、经济寿命长、枣果营养丰富等独特优势,已经成为我国果树发展中的热点之一^[10]。现以‘金丝小枣’为试材,采用同源克隆法成功获得了枣 *GAPDH* 基因的完整开放阅读框序列,并进行了生物信息学及表达分析,旨在为深入研究枣 *GAPDH* 基因的相关功能提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料取自山西省国家枣种质资源圃,品种为‘金丝小枣’(*Ziziphus jujuba* Mill. ‘Jinsixiaozao’),在田间采集新鲜叶片和枣果后迅速放入冰盒,带回实验室液氮速冻后存于-70℃冰箱备用。

1.2 试验方法

1.2.1 枣 *GAPDH* 基因 cDNA 的克隆 该试验利用改良 CTAB 法^[11]提取‘金丝小枣’叶片总 RNA,提取中用无 RNA 酶的 DNA 酶 I 去除 DNA 污染,RNA 完整性用 1% 琼脂糖电泳进行检测。而后参考 TransScript First-strand cDNA synthesis superMix AT301 (TransGen Biotech, China)说明合成 cDNA 第 1 链。根据 GenBank 中登录的碧桃 (XM007210461.1)、杏 (JN786 944.1) 和苹果 (KJ152820.1) 等植物 *GAPDH* 保守序列设计一对简并引物,引物为: *GAPDH*-F: 5'-ATGB(TGC)S(CG)TAK(TG)B(TGC)GGAAAGATCAAG-3'; *GAPDH*-R: 5'-TY(TC)ACTN(ATGC)GGCAD(TAG)D(TAG)TGCAACGTG-3',先利用梯度 PCR 技术^[12],筛选出最佳退火温度为 58℃,随后进行 PCR 扩增,将产物回收后连接到 pMD19-T 载体上,热激转化 *E. coli* DH5 α ,得到的重组子,送至上海生工生物工程技术有限公司测序。

1.2.2 枣 *GAPDH* 基因 cDNA 序列的生物信息学分析

通过 BLASTX 搜索 NCBI 的核苷酸数据库序列相似性分析获得具有完整开放阅读框的枣 *GAPDH* 基因,利用 DNAMAN 软件进行核苷酸序列的拼接,氨基酸序列同源性分析。利用 ProtParam tool 预测蛋白质的理论等电点、相对分子量、分子式、脂溶指数和总平均疏水指数;将枣 *GAPDH* 基因的氨基酸序列导入 NCBI 对氨基酸序列的结构域进行预测;利用 Protscale 进行疏水性分析;利用 PSORT 软件对蛋白质的亚细胞定位预测;用 SignalP 4.1 Server 进行蛋白质序列中信号肽的预测分析;利用 ExPASy Proteomics Server 预测待测定序列的二级结构;利用在线软件 Swiss-Model 对待测蛋白的氨基酸序列三级空间结构进行预测;利用 MEGA 5.10 构建同源进化树。

1.2.3 荧光实时定量 PCR 分析 该研究采用实时定量 PCR 的方法对枣 *GAPDH* 基因在果实不同发育时期的

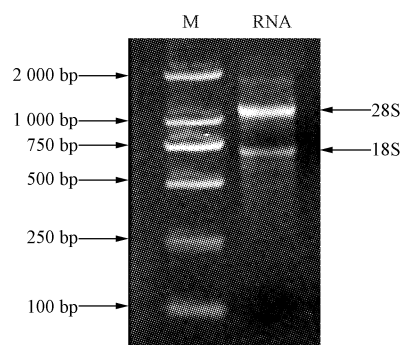
表达量进行分析。用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物为: *ZjHiston-H3* (上游引物: 5'-TCGCTCAGGATTCAAGAC-3', 下游引物: 5'-GAACAGACCGACCAAGTAA-3') 和 *ZjGAPDH* (上游引物: 5'-CAGGAACCCAGAGGAG AT-3', 下游引物: 5'-CCACCC TTTAGATGAGCAG-3')。以 *ZjHiston H3*^[13] 作为内参基因在 Bio-Rad iQTM5 分析系统上进行操作,反应条件如下: 94℃ 预变性 30s; 94℃ 5s, 57℃ 15s, 72℃ 15s, 共 40 个循环。试验重复 3 次。反应结束后收集 Ct 值,基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[14] 进行计算。

1.2.4 枣 *GAPDH* 在果实不同发育时期的表达分析 以‘金丝小枣’幼果期、白熟前期、白熟期、半红期和全红期 5 个不同发育时期的枣果为材料,对 *ZjGAPDH* 在果实不同发育时期的表达量进行了比较分析。

2 结果与分析

2.1 总 RNA 的提取和 cDNA 的合成

该试验利用改良 CTAB 法提取‘金丝小枣’叶片总 RNA, RNA 的电泳检测结果显示,获得的 RNA 条带清晰,无明显降解现象,28S rRNA 和 18S rRNA 亮度比约 2:1 (图 1)。经检测,不同样品的核酸浓度均达到 150 ng/ μ L 以上,且 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 介于 1.9~2.0 之间,说明总 RNA 提取完整性好、纯度高,用于合成 cDNA 第 1 链。



注: M 为 DL 2 000 marker 分子量标准,下同。

Note: M is DL 2 000 marker, the same below.

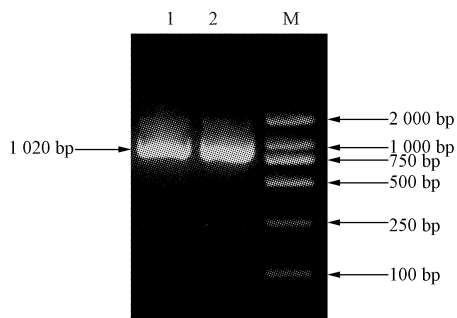
图 1 提取获得的总 RNA 电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoresis result of total extracted RNA

2.2 枣 *GAPDH* 基因 cDNA 的获得

利用该试验设计的 *GAPDH*-F 和 *GAPDH*-R 引物进行 PCR 扩增,筛选出最佳退火温度为 58℃,随后进行 PCR 扩增获得了 1 000 bp 左右的片段 (图 2),对所获得的 cDNA 扩增产物进行回收、转化克隆,然后通过对筛选的阳性克隆进行测序。将该序列在 NCBI 数据库中进行序列同源性检索,通过 BLASTN 分析,确定该基因 ORF 长度为 1 020 bp。保守结构域预测发现,该基因含有 2 个保守区域,即 Gp_dh_N superfamily 和 Gp_dh_C superfamily 保守结构域 (图 3),与其它植物中的 *GAPDH*

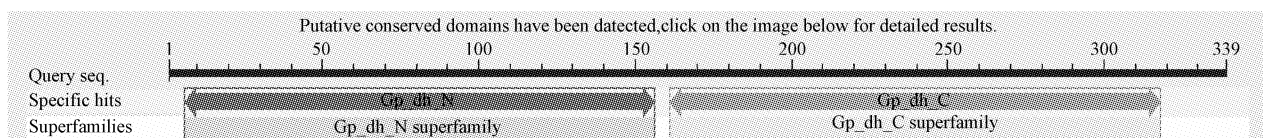
基因保守区相符,证明该基因确为枣的 *GAPDH* 基因,命名为 *ZjGAPDH*(KP147910)。



注:1 和 2 为 RT-PCR 扩增产物,M 为 DL 2 000 marker 分子量标准。
Note:1 and 2 are amplification products by RT-PCR;M is DL 2 000 marker.

图 2 枣 *ZjGAPDH* cDNA 的克隆

Fig. 2 The cloning of *ZjGAPDH*



注:预测的保守结构位点及超家族。

Note:Putative conserved domains and superfamilies.

图 3 枣 *ZjGAPDH* 的蛋白结构域预测

Fig. 3 The predicted conserved domains of *ZjGAPDH*

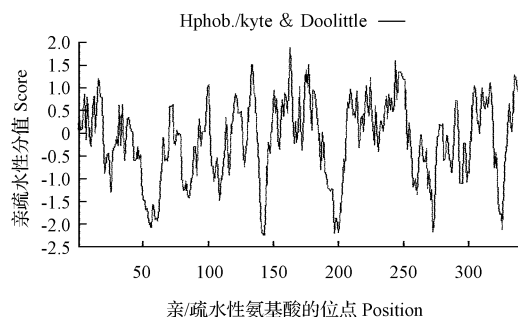


图 4 *ZjGAPDH* 蛋白的亲/疏水性分析

Fig. 4 The hydropathy/hydrophobic analysis of *ZjGAPDH*

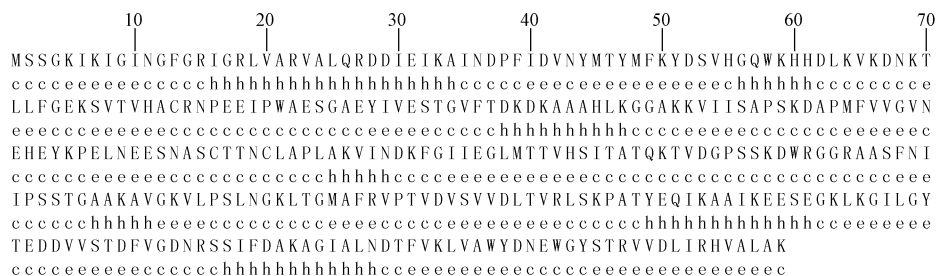
2.3 枣 *GAPDH* 基因编码蛋白分析

2.3.1 蛋白质的一级结构分析 用 ProtParam tool 预测 *ZjGAPDH* 编码的蛋白含有 339 个氨基酸残基,相对分子量为 36.904 kDa,理论等电点为 8.53,分子式为 $C_{1651}H_{2630}N_{446}O_{493}S_9$,脂肪系数为 90.59,总平均亲水指数为 -0.14。用 Protscale 进行亲水性分析表明,*ZjGAPDH* 存在 2 个高分值峰(Score>1.5)(图 4),分别分布在 170、240 氨基酸位点附近,这些区域属于疏水性;而 5 个低分值峰(Score<0)则位于 60、140、200、270、330 氨基酸位点附近,这些区域属于高亲水性,综合分析该蛋白属于亲水性蛋白。

2.3.2 蛋白质的二级、三级结构分析 利用 ExPASy Proteomics Server 预测 *ZjGAPDH* 的二级结构,分析表明,该基因编码的氨基酸由 70 个 α -螺旋结构(20.65%),

119 个扩展链(35.1%),150 个无规则卷曲(44.25%)组成(图 5)。有研究发现在 *GAPDH* 分子中心与 2 个亚基的接触面存在 S-loop 区,该区域是一段二级结构含量较低的自由卷曲,与整个分子结构的稳定性有着密切的关系^[15-18],枣 *GAPDH* 二级结构中存在较多的无规则卷曲,推测也起着维持稳定性的作用。用 PSORT 软件对蛋白质的亚细胞定位预测分析,表明该蛋白是一种细胞质蛋白。利用 SignalP4.1Server 进行蛋白质序列中信号肽的预测分析,结果表明该基因不存在信号肽序列。

2.3.3 蛋白质的三级结构分析 用 Swiss Model 程序进行同源建模,预测 *ZjGAPDH* 的三级结构(图 6)。该



注:h,e,c 分别表示 α -螺旋、扩展链和无规则卷曲氨基酸残基。

Note:h,e,c represents alpha helix,extended strand and random coil amino acid residues respectively.

图 5 *ZjGAPDH* 蛋白氨基酸的二级结构预测

Fig. 5 Predicted second structure of amino acid of *ZjGAPDH*

基因的三级结构预测结果表明其空间结构由 α 螺旋、 β 折叠和 β 转角所组成,包括 4 个亚基。

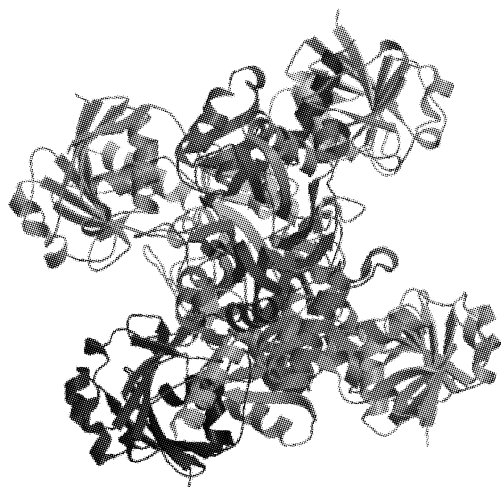


图 6 *ZjGAPDH* 基因氨基酸的三级结构预测
Fig. 6 Predicted tertiary of amino acid of *ZjGAPDH*

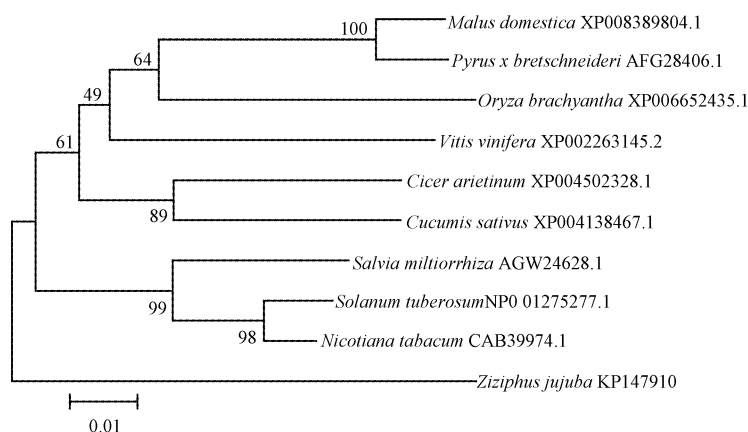


图 7 *ZjGAPDH* 蛋白与其它 9 个物种同源蛋白的分子进化树
Fig. 7 Phylogentic tree of *ZjGAPDH* and GAPDH from other 9 species

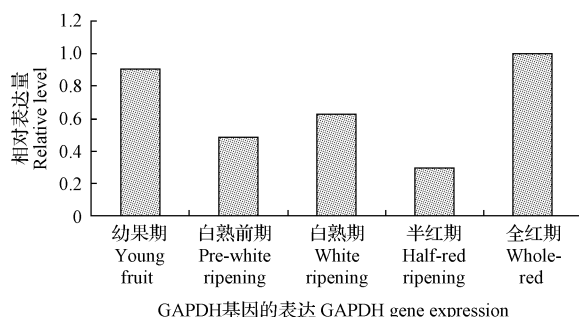


图 8 ‘金丝小枣’果实不同发育时期 *ZjGAPDH* 的表达

Fig. 8 *ZjGAPDH* expression of ‘Jinsixiaozao’ fruit at different ripening stages

2.4 枣 *GAPDH* 的系统进化树分析

将枣 *GAPDH* 蛋白序列与苹果、梨及水稻等 9 个物种的蛋白序列进行了系统进化树分析(图 7)。结果表明,枣 *GAPDH* 蛋白与其它 9 个物种的同源性为 87%~90%,但枣 *GAPDH* 蛋白最后与其它物种聚到一起,分析发现其 C 端与其它物种序列差异较大。进一步氨基酸比对分析还发现,该试验中 10 个物种的 *GAPDH* 蛋白均为 337~340 个氨基酸,根据罗聪等^[19]的研究,编码 337~340 氨基酸残基的 *GAPDH* 基因参与糖酵解过程,并存在于细胞质中,该研究获得的枣 *GAPDH* 基因经亚细胞定位预测结果与该结论相一致,也进一步说明 *ZjGAPDH* 参与糖酵解过程。

2.5 枣 *GAPDH* 在果实不同发育时期的表达分析

ZjGAPDH 在‘金丝小枣’果实不同发育时期的表达量进行了比较分析,结果表明 *ZjGAPDH* 在幼果期和全红期表达较高,在白熟前期、白熟期和半红期的表达相对低一些(图 8)。

3 讨论

甘油醛-3-磷酸脱氢酶是存在于许多生物体内非常重要的一个酶,其与糖酵解、呼吸链等生命活动息息相关。该研究克隆了枣 *GAPDH* 基因,获得了 1 020 bp 完整开放阅读框的 cDNA 序列,编码 339 个氨基酸残基。该研究对 *ZjGAPDH* 进行亚细胞定位预测分析表明, *ZjGAPDH* 是一种细胞质蛋白,由此推断该基因可能是参与糖酵解过程,而且进一步的进化树分析也表明,该基因与其它物种存在细胞质中的 *GAPDH* 类基因同源性较高,为该基因的功能确定提供了参考。

余汇等^[20]、孙蓉等^[21]等研究表明 *GAPDH* 在不同组织中表达较稳定,可以作为内参基因,该研究结果与其相反,原因可能是试验材料不同导致的。且该基因在

幼果期和全红期表达丰度较高,在其它时期表达量相对较低一些。由于存在胞质中的 *ZjGAPDH* 基因参与糖酵解作用,所以推测幼果期的 *GAPDH* 表达量高的原因可能是果实在发育初期主要通过糖酵解释放能量有助果实成长导致的;而全红期 *GAPDH* 表达丰度高的原因可能是果实在发育后期已经积累了大量的糖分,因此糖酵解成为了释放能量的主要途径。

参考文献

- [1] Martin W, Brinkmann H, Savonna C, et al. Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: Eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes[J]. PNAS, 1993, 90: 8692-8696.
- [2] 王幼宁, 刘孟雨, 李霞. 植物 3-磷酸甘油醛脱氢酶的多维本质[J]. 西北植物学报, 2005, 25(3): 607-614.
- [3] Hajirezaei M R, Biemelt S, Peisker M, et al. The influence of cytosolic phosphorylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPC) on potato tuber metabolism[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(10): 2363-2377.
- [4] 刘志华, 杨谦. 球毛壳菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因克隆及特性分析[J]. 微生物学报, 2005, 45(6): 885-889.
- [5] Zhang X H, Rao X L, Shi H T, et al. Over expression of a cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene OsGAPC3 confers salt tolerance in rice[J]. Plant Cell Tissue Organ Culture, 2011, 107(1): 1-11.
- [6] Kubo H. Cloning and expression analysis of putative glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes in *Pilobolus crystallinus* [J]. Mycoscience, 2011, 52(2): 99-106.
- [7] 岳彩凤, 康国章, 刘超, 等. 小麦 *GAPDH* 基因克隆及序列分析[J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 94-98.
- [8] 杨洋, 张智俊, 罗淑萍. 毛竹甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的克隆与序列分析[J]. 经济林研究, 2010, 28(3): 7-13.
- [9] 朱华, 李坤, 赵瑞强, 等. 三七植物 *GAPDH* 基因克隆及序列分析[J]. 西北植物学报, 2006, 26(7): 1316-1319.
- [10] 赵锦, 代丽, 薛陈心, 等. 离体条件下进行治疗枣疯病药物筛选的可行性研究[J]. 河北农业大学学报, 2006, 29(1): 70-73.
- [11] 刘中成. 枣的总 RNA 提取及 mRNA 差异显示技术体系的建立[D]. 保定: 河北农业大学, 2005.
- [12] 张传义, 孟玉平, 孙海峰, 等. 苹果 *AFL1* 基因原核表达载体的构建及其在大肠杆菌中的表达[J]. 山西农业科学, 2008, 36(7): 14-16.
- [13] Sun H F, Meng Y P, Cui G M, et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies on the development of fruit bearing shoots in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36, 2183-2190.
- [14] Live K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2011, 25: 402-408.
- [15] Mukherjee S, Dutta D, Saha B, et al. Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 1 from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* MRSA252 provides novel insights into substrate binding and catalytic mechanism [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 401(5): 949-968.
- [16] Robien M A, Bosch J, Buckner F S, et al. Crystal structure of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Plasmodium falciparum* at 2.25 Å resolution reveals intriguing extra electron density in the active site[J]. Proteins: Structure, Function, Bioinformatics, 2006, 62(3): 570-577.
- [17] Frayne J, Taylor A, Cameron G, et al. Structure of insoluble rat sperm glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) via heterotetramer formation with *Escherichia coli* *GAPDH* reveals target for contraceptive design [J]. Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(34): 22703-22712.
- [18] Kundu S, Roy D. Computational study of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Entamoeba histolytica*: Implications for structure-based drug design[J]. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2007, 25(1): 25-33.
- [19] 罗聪, 何新华, 胡颖, 等. 杧果 *MGAPDH* 同源基因的克隆及其表达分析[J]. 果树学报, 2011, 28(6): 1019-1024.
- [20] 余汇, 蒋向军, 覃宇燕, 等. 罗汉果 *GAPDH* 基因的克隆及其在基因表达分析中的应用[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(2): 495-498.
- [21] 孙蓉, 高静雷, 刘珊, 等. 金龙胆草 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因的克隆及序列分析[J]. 中草药, 2013, 44(19): 2732-2735.

Cloning and Expression Analysis of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase From *Ziziphus jujuba*

BU Jiaodi¹, CHEN Yingying², LIU Mengjun², ZHAO Jin¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Research Center of Chinese Jujube, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

Abstract: Taking *Ziziphus jujuba* Mill. 'Jinsixiaozao' as material, a full-length cDNA sequence of *GAPDH* gene was cloned from Chinese jujube by homologous gene cloning method and RT-PCR method. The results showed that, the gene was 1 020 bp, the estimated molecular weight and isoelectric point of the putative protein were 36.904 kDa and 8.53, named as *ZjGAPDH* (accession number KP147910). The protein had two conserved domains named as Gp_dh_N superfamily and Gp_dh_C superfamily. Phylogenetic analysis showed that *ZjGAPDH* had a low homology with that of other species but all belong to cytoplasmic proteins and involve in glycolysis. qRT-PCR analysis showed that the *ZjGAPDH* expressions at different ripening stages of jujube fruit were significantly different, and the expression level of *ZjGAPDH* at young fruit stage and whole-red ripening stage were higher than that of other stages.

Keywords: *Ziziphus jujuba*; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; cloning; expression analysis