

基于葡萄EST数据库糖代谢途径有关基因的分析

冷翔鹏¹, 张演义¹, 张春华², 宋长年¹, 刘洪¹, 房经贵^{1*}

¹南京农业大学园艺学院, 南京210095; ²江苏省农业科学院园艺研究所, 南京210014

摘要: 以拟南芥糖代谢相关酶基因序列作为探针, 对葡萄EST数据库进行同源检索筛选, 获得相应的同源EST序列, 并以葡萄果实cDNA为模板, 通过PCR反应, 对葡萄糖代谢途径相关基因进行了分析。进一步预测了葡萄糖代谢途径相关酶编码基因个数, 分别位于1、4、5、6、7、8、11、12、13、16、17、18、19号染色体, 另有3条序列未能定位到染色体, 并对编码基因表达强弱进行了分析, 为深入了解葡萄果实内糖代谢的机理提供一定的工作基础, 也可以为如何调控果实糖代谢以及提高葡萄果实品质提供理论依据。

关键词: 葡萄; EST; 糖代谢

Analysis of Some Genes Involved in the Sugar Metabolic Pathway Based on the Grape EST Database

LENG Xiang-Peng¹, ZHANG Yan-Yi¹, ZHANG Chun-Hua², SONG Chang-Nian¹, LIU Hong¹, FANG Jing-Gui^{1*}

¹College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Horticulture, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China

Abstract: Homologous grapevine EST sequences were searched against the grape EST database using corresponding sugar metabolism gene sequences from *Arabidopsis* as the probes. The related genes involved in the sugar metabolic pathway in grape was then analyzed by PCR reactions using cDNA prepared from developing grapevine fruits as PCR template. From the EST sequences obtained and verified, it is possible to predict the coded genes related to sugar metabolism and analyze gene numbers involved and the location of these genes locations on chromosomes 1, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 16, 17, 18 and 19. Three sequences could not be linked on any chromosome. This study also analyzed the expression patterns of coded genes where it was found that expression varied with the stage of fruit development. The results of this study could provide a theoretical basis for further researches on regulation of fruit sugar metabolism and improvement of grapevine fruit quality.

Key words: grape; EST; sugar metabolism

葡萄(*Vitis vinifera*)是世界上栽培面积最大的果树树种之一, 也是人们最爱嗜食和加工产品最为丰富的水果之一, 有“水果皇后”的美称。葡萄果实品质在很大程度上取决于糖的种类和含量, 其种类和含量直接影响着果实的营养价值、风味口感、色泽等品质性状(Teixeira等2005; 王晨等2009; 王振平等2005)。葡萄果实发育过程中的糖类物质代谢及其变化决定了成熟果实的糖类组成及含量。有关葡萄糖代谢途径的研究一直是国内外果树研究领域的一个热点和重点(Hawker 1969; Davies和Robinson等1996; Hayes等2010)。葡萄作为分子生物学研究的重要对象, 也是继拟南芥、水稻、杨树之后完成全基因组测序的第4种开花植物(Jaillon等2007; 房经贵等2008), 在葡萄上开展糖代谢相关酶的研究, 深入了解果实内糖代谢的机理,

对认识果实糖的来源、代谢相关酶在细胞内的分布、果实发育过程中糖含量及相关酶活性的动态变化等有着重要的理论价值, 还可以为调控果实糖代谢以及进一步开展相关研究提供理论依据。

EST被广泛应用于比较基因组学研究、基因作图、SNP挖掘、cDNA文库构建、基因克隆以及功能分析等领域(Adams等1991, 1992; White等2000; 骆蒙和贾继增2000; Bouchez和Höfte等1998; Ewing等1999)。在后基因组时代, EST技术作为基因组学与功能基因组学以及功能基因组学与后基

收稿 2011-12-12 修定 2012-01-18
资助 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-08-0796)和江苏省普通高校研究生科研创新计划项目。

* 通讯作者(E-mail: fanggg@njau.edu.cn; Tel: 025-84399069)。

基因组学之间的桥梁起到了更加显著的作用。前人(Mehta等2007; Marcelo等2007)就分别利用柑橘的EST序列对柑橘信号途径和成花途径的关键基因进行了预测与验证,这都充分体现了EST数据库在果树各种代谢途径研究中的利用价值。截止到2011年11月15日,NCBI共收录葡萄EST序列362 670条(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html),是释放EST数量最多的果树树种(上官凌飞等2011)。本研究采用生物信息学的方法,以模式植物拟南芥糖代谢相关酶的基因序列为探针,对葡萄EST数据库进行反复同源筛选,获得葡萄糖代谢相关酶基因的EST序列,将得到的葡萄EST序列在其基因组上定位。进一步以‘夏黑’葡萄为试材对获得的EST序列进行扩增、克隆、表达等分析与验证。

材料与amp;方法

1 电子检索

在GenBank的核酸(nr/nt)数据库中检索拟南芥糖代谢相关酶的基因序列,并以拟南芥糖代谢相关酶的基因序列为探针对葡萄EST数据库进行BLAST检索,获得与拟南芥糖代谢基因同源的葡萄EST片段,即目的葡萄EST序列。如果搜索到多条高保守的相关EST序列,则进一步在BioXM软件上进行比对,根据多条同源葡萄EST序列以及拟南芥的序列进行拼接或加以筛选,最终得到一段保守的EST序列片段。

2 基因组定位

根据葡萄基因组信息,将电子检索得到的保守EST片段在葡萄基因组上进行定位,确定其具体的染色体位置。拟南芥糖代谢途径的酶由多基因家族编码,例如拟南芥中蔗糖合成酶(SS)由6个基因编码,这一基因家族中各个基因在应对不同反应时的表达不同。我们分别以拟南芥糖代谢途径酶的编码基因序列为探针对葡萄EST数据库进行BLAST检索,获得EST序列,对葡萄EST序列进行基因组定位。其中,SPP的CB975800.1和EE089316.1,PGM的EC953157.1和EE095329.1,PFK的EE087164.1和EE089294.1的3种酶的各2条序列分别位于8、1、4号染色体且重叠区域,通过合并进一步确定葡萄糖代谢途径相关酶的基因家族情况(表1)。

3 实验验证

3.1 材料

3年生‘夏黑’葡萄(*Vitis vinifera* L. cv. ‘Xiahei’)的小果(直径约0.5 cm)、中果(直径约1.0 cm)、大果(直径约1.3 cm)于2011年5月下旬~7月上旬采自江苏省农业科学院。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α 由本实验室保存。PowerScript IITM反转录酶购自Clontech公司, DNase酶I、LA-Taq酶、Ex-Taq酶、pMD-19T载体、dNTP、DNA Marker购自TaKaRa公司, Trizol Reagent购自Invitrogen公司, DNA回收试剂盒、DL 2000 Plus DNA Marker为北京全式金生物技术有限公司生产。各种引物由上海英俊生物技术有限公司(Invitrogen)合成,其编号或基因名称及序列见表2。

3.2 RNA提取

葡萄果实中总RNA提取采用CTAB法(房经贵等2003; Chang等1993)。mRNA的纯化采用Promega公司生产的PloyA Ttract mRNA Isolation System IV试剂盒进行。

3.3 cDNA合成

以mRNA为模板,引物P01反转录合成cDNA第一条链,引物P02延伸加帽子,空气加热条件下42 $^{\circ}\text{C}$ 保温1 h, 75 $^{\circ}\text{C}$ 保温10 min,冰上冷却2 min后,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

3.4 EST扩增

根据BLAST检索到的葡萄目的EST序列设计引物,以‘夏黑’葡萄果实cDNA为模板对EST片段进行扩增,初步分析葡萄糖代谢相关的酶基因的存在与表达情况。反应体系为50 μL : cDNA 2 μL , 10 pmol $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的引物各1 μL , 10 \times Ex Buffer 5 μL , 2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的dNTP混合液5 μL , Ex Taq酶0.25 μL ,用灭菌纯水补足到50 μL 。反应参数为94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55~60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。琼脂糖凝胶电泳检测后回收目标片段进行TA克隆,由上海美吉生物技术有限公司完成测序。

3.5 基因表达分析

为了初步分析位于不同染色体上糖代谢基因的大体表达情况,以葡萄大、中、小果实的混合cDNA作为PCR模板,对预测到的葡萄糖代谢途径相关酶的基因进行半定量RT-PCR扩增。为确保半

表1 拟南芥和葡萄EST序列基因组定位

Table 1 Genome location of *Arabidopsis* and grape EST sequences

酶名称	拟南芥序列登录号	拟南芥染色体位置	葡萄EST序列	葡萄染色体位置
蔗糖合成酶(SS)	AT5G20830.1	5	GW837855.1	11
	AT5G49190.1	5	GW837855.1	11
	AT3G43190.1	3	GW837855.1	11
	AT4G02280.1	4	FC065695.1	7
	AT5G37180.1	5	DT016459.1	17
	AT1G73370.1	1	DT016459.1	17
蔗糖磷酸合成酶(SPS)	AT1G04920.1	1	DT011131.1	5
	AT1G11110.1	5	EC919697.1	11
	AT5G20280.1	5	EC919697.1	11
磷酸蔗糖磷酸化酶(SPP)	AT1G51420.1	1	CB975800.1	8
	AT2G35840.1	2	CB975800.1	8
	AT3G54270.1	3	EE089316.1	8
己糖激酶(HK)	AT4G29130.1	4	EC942735.1	11
	AT2G19860.1	2	EC942735.1	11
	AT1G47840.1	1	EE089348.1	18
	AT1G50460.1	1	FC070389.1	6
	AT3G20040.1	3	FC070389.1	6
	AT4G37840.1	4	EC935641.1	未知
果糖激酶(FK)	AT1G69200.1	1	DT016788.1	1
	AT3G54090.1	3	EE064201.1	8
磷酸葡萄糖异构酶(PGI)	AT5G42740.1	5	CB977298.1	18
	AT4G24620.1	4	EE063350.1	16
磷酸葡萄糖变位酶(PGM)	AT5G51820.1	5	EC996127.1	16
	AT1G70730.1	1	EC953157.1	1
	AT1G23190.1	1	EE095329.1	1
	AT1G70820.1	1	CB922942.1	19
磷酸果糖激酶(PFK)	AT5G17530.1	19	CB922942.1	19
	AT4G29220.1	4	CB341314.2	11
	AT5G47810.1	5	EC934912.1	未知
	AT4G26270.1	4	EE089294.1	4
	AT5G61580.1	5	CB917518.1	16
	AT2G22480.1	2	DT008464.1	未知
	AT4G32840.1	4	EE087164.1	4
	AT5G56630.1	5	EE089294.1	4
果糖-6-磷酸1-磷酸转移酶(PFP)	AT1G12000.1	1	EE107719.1	13
	AT1G20950.1	1	EV227859.1	18
果糖-1,6-二磷酸酶(FBP)	AT1G43670.1	1	EC924959.1	18
ADPG焦磷酸化酶(AGP)	AT5G19220.1	5	EC938181.1	5
	AT5G48300.1	5	EE079706.1	12
UDPG焦磷酸化酶(UGP)	AT3G56040.1	3	EC959828.1	13
	AT3G03250.1	3	CB976973.1	4
	AT5G17310.1	5	CB976973.1	4

粗体表示将两条EST片段合并为同一条序列。

定量RT-PCR的特异性, 对部分片段回收测序。目的基因的引物见表2。反应条件为: 94 °C变性3 min; 94 °C变性30 s, 55~60 °C退火30 s, 72 °C延伸30 s, 共30个循环; 72 °C终延伸5 min。

分别以大、中、小果实的cDNA作为PCR模板, 以葡萄看家基因UBI为内参, 对葡萄糖代谢的关键酶蔗糖合成酶(SS)、蔗糖磷酸合成酶(SPS)和磷酸蔗糖磷酸化酶(SPP)的位于不同染色体的基因

表2 引物序列及PCR扩增片段大小

Table 2 Sequence of primers and sizes of PCR amplified products

引物、基因或酶名称	引物序列	片段大小/bp	染色体位置	EST登录号
P01	GCAGGACTGCAGCTGACTGACTACT ₃₀ VN			
P02	GACCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG			
UBI-1	GCTCGCTGTTTGCAGTTCTAC	150		
UBI-2	AACATAGGTGAGGCCGCACTT			
蔗糖合成酶(SS)	1-L ATTGTCCGCAAATGGATCTC	342	11	GW837855.1
	1-R TCCAGCAATCTCTTGAAGG			
	2-L CGTGACCCGGTTAATACCTG	166	7	FC065695.1
	2-R GGTTCCAGATAAAGGCCACA			
	3-L TCCCGCCATTGAAGAACTAC	291	17	DT016459.1
	3-R CTAGCTGGCCCTTGAGTTG			
蔗糖磷酸合成酶(SPS)	1-L CAGGGTCGACCTCTTCACTC	292	5	DT011131.1
	1-R ATATGGCCAAACAGGCTGAC			
	2-L CTTCGGAGAATGTCGTCCAT	301	11	EC919697.1
	2-R GGCAACAATAGGCCAAACCAT			
磷酸蔗糖磷酸化酶(SPP)	1-L CTCAATGGTCCCGATAATG	499	8	CB975800.1
	1-R GATCCCTGATGCACACTTT			EE089316.1
己糖激酶(HK)	1-L TAGGAGGTA AAAAGTCTCAATTCT	334	6	FC070389.1
	1-R GCTACTCGCATATTTAGTCCATTC			
	2-L ACTACATTGTCTGATAGTCTGTTCC	234	未知	EC935641
	2-R AACTCCACTAGCAAGAGAAGTGGTA			
	3-L GCTAAATTTGTTGCTACTGAAGGTG	181	11	EC942735.1
	3-R TTAATTCCTCCACTACATCTTGCC			
	4-L AGTCAGACCTGAGTGTGAGAAAGAT	188	18	EE089348.1
	4-R GGGGTAGTTTTATATTAGGCTCCA			
果糖激酶(FK)	1-L GATCAAGTCCACTGAGAATTTGAC	216	1	DT016788.1
	1-R GACATGTCACAAGTGAAAGGTGTA			
	2-L ACCAAGAACCGAAGAGATTATTACC	171	8	EE064201.1
	2-R GAATGGTGTATAAGCACATCCTCT			
磷酸葡萄糖异构酶(PGI)	1-L GCTTTTAGGTTTGTGAGTGTATGG	231	18	CB977298.1
	1-R ATTAGTTGGTAAAAGCTGTGCTGAC			
	2-L CCAGATCCTAATCTAACCTATGCAA	156	16	EE063350.1
	2-R GCAACATTTGAGACATCTGAGTGTA			
磷酸葡萄糖变位酶(PGM)	1-L GGATGACTTCTCATACACTGATCCT	280	16	CD715467.1
	1-R GCCTTATGTGATCACTGTAGGTTTC			
	2-L GATCTTCTGATGTGGATATCTCTG	670	1	EC953157.1
	2-R TTGCATAGGTTAGATTAGGATCTGG			EE095329.1
	3-L ATAGTGTA ACTTCAGATGGCCTGAC	153	19	CB922942.1
	3-R CACTAGTCTCAATAGCCAGATGTGA			
磷酸果糖激酶(PFK)	1-L CTTTGACACTGCTGTTGAGGAG	174	11	CB341314.2
	1-R GATTCTGGAATCAAGCAACAGTC			
	2-L ACTTGGAAGGGAAAGGAGGGC	353	未知	EC934912.1
	2-R CCCTGTGTACCCTGCCATGAC			
	3-L AGGAGCATCTGTGATTTTGGAGG	581	4	EE089294.1
	3-R TACACATTGTCAGATGCATTGCC			EE087164.1
	4-L GAGATGTGGATTGTTGCTTGATTC	405	16	CB917518.1
	4-R CAGGTCCAATCGTGAAGCCAG			
	5-L ATACATAGAGGCGCATAGTGCTTAT	180	未知	DT008464.1
	5-R AGATACTTCAGGTGACTCAGGACAC			
果糖-6-磷酸1-磷酸转移酶(PFP)	1-L CGCTCAACTGGAAAATACTATCACT	250	13	EE107719.1
	1-R CACCTCAGGTATGAAATCAATAAGG			
	2-L CACAGTTATCTCGGATTGAAAACAG	181	18	EV227859.1
	2-R AGAACGTAGGCATAATCACAGTCA			
果糖-1,6-二磷酸酶(FBP)	1-L GCTTGACCTCTGCTTGTTTC	198	18	EC924959.1
	1-R ATGCAAGTTC CCAAAGATG			
ADPG焦磷酸化酶(AGP)	1-L CCAAACCTCGGGATGTTTAGA	312	5	EC938181.1
	1-R GCCTGTTGAGTGATGCTGAA			
	2-L GGTCTTGATGATGAGAGAGCTAAAG	210	12	EE079706.1
	2-R AATTGTACCAATGTCTTCCAGTAG			
UDPG焦磷酸化酶(UGP)	1-L TCCAGCTGTGGAAGAGGTTT	261	13	EC959828.1
	1-R ATCCAGGTTTGGCAGTTGAC			
	2-L AGTGGATGGIATCAAAGTCTTCAG	155	4	CB976973.1
	2-R AGGTGTAAAGATCAGACTGGACAAG			

分别进行半定量RT-PCR扩增, 分析位于不同染色体的基因的空间表达情况。引物及反应条件同上。

实验结果

1 EST的克隆结果

以拟南芥糖代谢关键酶的基因序列为探针, 对葡萄EST数据库进行BLAST检索, 得到与之对应的保守性高的EST序列(GW837855.1、EC919697.1、CB976973.1等)。为确保半定量RT-PCR的特异性, 对扩增到4个SS、SPP、PFP、UDPG基因的EST片段进行测序, 结果显示其序列与已登录的葡萄EST序列仅有个别碱基差异, 同源性分别达到了99.64%、

99.60%、99.20%和100% (表3)。四条测序序列与拟南芥的SS、SPP、PFP和UDPG基因序列对应区域的保守水平分别达到了74.55%、78.36%、83.94%和79.35%。对扩增获得的EST片段进行氨基酸推导, 发现其分别编码114、166、83、52个氨基酸, 说明这些EST序列是葡萄糖代谢有关基因的ORF区的一段。以此EST序列作为种子序列BLAST检索葡萄EST数据库, 将检出的与种子序列同源性较高的或有部分重叠的EST序列拼接组装为重叠群(contig), 再以此重叠群序列重复以上BLAST检索过程, 反复进行EST重叠群序列的拼接、比对以及进行基因组定位分析, 最后可以获得葡萄糖代谢途径关键酶基因的ORF区序列。

表3 测序序列的结构分析

Table 3 Structure analysis of sequenced sequences

酶名称	葡萄EST序列	测序序列(EST目的片段保守水平)/%	EST对应的拟南芥序列号	测序序列(拟南芥序列保守水平)/%	编码氨基酸数量	预计EST存在区域
SS	GW837855.1	99.64	AT5G49190.1	74.55	114	ORF
SPP	拼接序列	99.60	AT2G35840.1	78.36	166	ORF
PFP	EE107719.1	99.20	AT1G12000.1	83.94	83	ORF
UDPG	CB976973.1	100	AT5G17310.1	79.35	52	ORF

2 葡萄糖代谢途径基因家族及表达分析

以GenBank核酸(nr/nt)数据库中拟南芥糖代谢相关酶的编码基因为探针, 经过BLAST检索、PCR扩增、染色体定位, 共获得位于13条不同染色体的葡萄EST序列29条, 其中11、18号染色体各有4个基因, 16号染色体有3个基因, 1、4、5、8、13号染色体各有2个基因, 6、7、12、17、19号染色体各有1个基因, 另有3条EST未能检索到染色体位置。根据扩增的EST序列分析葡萄糖代谢途径的SS、SPS、SPP、HK、FK、PGI、PGM、PFK、PFP、FBP、AGP、UGP分别由3、2、1、4、2、2、3、5、2、1、2和2个基因编码(表4), 其中葡萄SPP、PGM、PFK这3个酶分别由位于8、1、4号染色体的单个基因编码(表2), 其中同一种酶的多候选编码基因极有可能是同工酶基因或共生同源基因的原因, 有待于进一步研究。

对葡萄糖代谢途径12个酶的编码基因进行半定量扩增, 初步分析位于不同染色体上基因的大体表达情况。对编码SS的3条EST片段进行半定量

扩增, 从结果(图1泳道1~3)可以清楚的看出3条EST片段的表达强弱情况, 泳道1、2、3分别为位于11号染色体的GW837855.1、7号染色体的FC065695.1和17号染色体的DT016459.1, 表达由强到弱, 进而推断出葡萄中编码SS的3个基因的表达强弱, 位于11号染色体上基因表达最强烈, 位于17号染色体上的基因表达较弱。对编码PGM的3条EST片段进行扩增, 结果显示(图1泳道15~17)表达最强的是位于1号染色体的两条EST序列(EC953157.1和EE095329.1)的拼接序列(图1泳道16), 其次是位于19号染色体的CB922942.1 (图1泳道17), 表达最弱的是位于16号染色体的CD715467.1 (图1泳道15)。从图1中也可以清楚的发现其他酶基因位于不同染色体上基因的表达强弱情况。

3 SS、SPS和SPP基因的空间表达情况

葡萄浆果主要积累果糖和葡萄糖, 而果糖和葡萄糖由蔗糖分解而来, 因而葡萄糖代谢途径中与蔗糖合成与分解有关的SS、SPS、SPP就显得尤

表4 葡萄糖代谢途径关键酶的基因家族及表达分析

Table 4 Gene family and expression analysis of critical enzymes involved in grape sugar metabolism

酶名称	预计存在编码基因数	染色体位置	表达情况(最强/最弱)
蔗糖合成酶(SS)	3	7、11、17	11/17
蔗糖磷酸合成酶(SPS)	2	5、11	11/5
磷酸蔗糖磷酸化酶(SPP)	1	8	
己糖激酶(HK)	4	6、11、18、未知	11/未知
果糖激酶(FK)	2	1、8	1/8
磷酸葡萄糖异构酶(PGI)	2	16、18	18/16
磷酸葡萄糖变位酶(PGM)	3	1、16、19	1/16
磷酸果糖激酶(PFK)	5	4、11、16、2个未知	4/未知
果糖-6-磷酸1-磷酸转移酶(PFP)	2	13、18	18/13
果糖-1,6-二磷酸酶(FBP)	1	18	
ADPG焦磷酸化酶(AGP)	2	5、12	12/5
UDPG焦磷酸化酶(UGP)	2	4、13	4/13

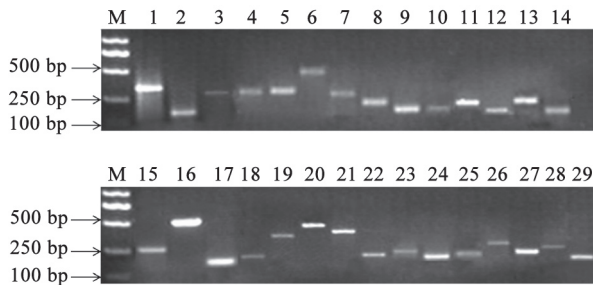


图1 葡萄糖代谢途径相关酶的半定量表达分析

Fig.1 Semi-quantitative analysis enzymes related related to the sugar metabolic pathway

1~3: 蔗糖合成酶(SS); 4、5: 蔗糖磷酸合成酶(SPS); 6: 磷酸蔗糖磷酸化酶(SPP); 7~10: 己糖激酶(HK); 11、12: 果糖激酶(FK); 13、14: 磷酸葡萄糖异构酶(PGI); 15~17: 磷酸葡萄糖变位酶(PGM); 18~22: 磷酸果糖激酶(PFK); 23、24: 果糖-6-磷酸1-磷酸转移酶(PFP); 25: 果糖-1,6-二磷酸酶(FBP); 26、27: ADPG焦磷酸化酶(AGP); 28、29: UDPG焦磷酸化酶(UGP)。

为重要。我们分别以小、中、大果的cDNA为模板,通过半定量RT-PCR对SS、SPS、SPP位于不同染色体上的基因进行时空表达分析(图2, UBI为内参)。由图2可清楚的发现蔗糖合成酶(SS)的位于11、7、17号染色体的基因在不同时期表达差异明显,位于11号染色体的SS1在小果、中果中表达强烈,在大果中表达较弱;位于7号染色体的SS2在小果、中果中表达较弱,在大果中表达强烈;位于17号染色体的SS3在各个时期表达均较弱。蔗糖磷酸合成酶(SPS)位于5、11号染色体的基因在不同时期的表达也不相同,位于5号染色体的SPS1只在小果中表达,位于11号染色体的SPS2在各个时期

表达都较弱,但在小果的时候相对较强。磷酸蔗糖磷酸化酶(SPP)只有位于8号染色体的一个基因, SPP在中果中表达较强烈,在小果和大果中表达较弱(图2)。

讨 论

葡萄是继拟南芥、水稻、杨树之后完成全基因组测序的第4种开花植物(Jaillon等2007; 房经贵等2008),也是分子生物学研究的重要对象。由于葡萄高效遗传转化体系建立的难度大,葡萄功能基因组学研究明显滞后于拟南芥、水稻等模式植物。而EST序列在分子标记开发、遗传图谱构建、鉴定与植物代谢相关的基因、研究基因表达差异和基因表达谱等方面发挥重要作用,利用EST序列结合生物信息学对基因及代谢途径的预测有着重要的作用。如何利用葡萄EST序列和基因组信息进行基因功能分析是认识葡萄生长发育过程的重要研究内容,利用这些EST序列和基因组序列信息对于开展葡萄重要代谢途径研究、认识葡萄重要性状关键调控基因、了解葡萄性状乃至建立基因网络,进行功能基因组学研究具有重要帮助。前人已经利用EST序列在柑橘上开展了信号途径和成花途径等方面的研究,本研究利用葡萄EST序列对葡萄糖代谢途径相关基因及表达情况进行了分析,对于准确认识葡萄糖代谢途径,以及葡萄糖代谢途径重要基因的功能基因组学研究具有一定的帮助。

本研究通过葡萄EST数据库利用相关12个酶

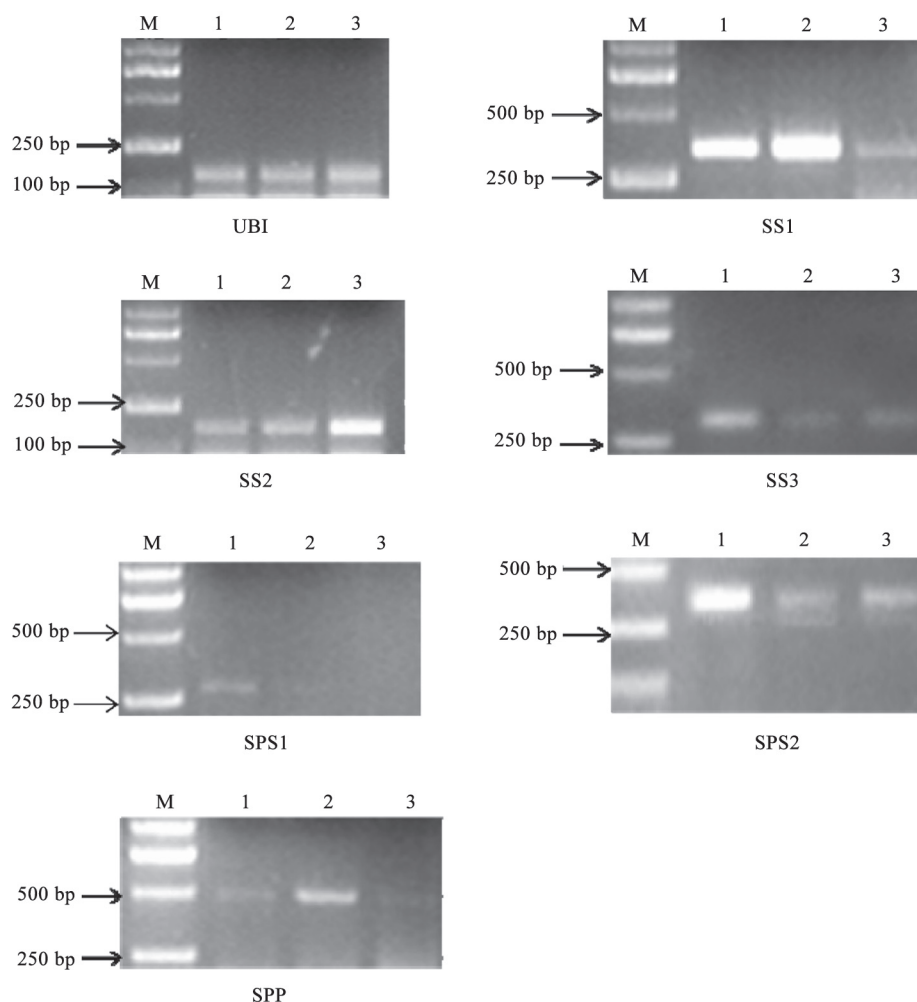


图2 不同时期SS、SPS和SPP基因半定量表达分析

Fig.2 Semi-quantitative analysis of SS, SPS and SPP gene in different period

M: Marker; 1、2、3: 小果、中果、大果。SS1、SS2和SS3分别是位于11、7和17号染色体上的基因; SPS1和SPS2分别是位于5和11号染色体上的基因; SPP为位于8号染色体上的基因。

的29个基因对葡萄糖代谢途径进行了分析验证。从分析结果(图3)可以看出,除了淀粉体内的部分反应没有得到验证(未验证的路径用虚线表示),其他的糖代谢反应都得到了验证,验证结果表明葡萄中的糖代谢途径与前人(张上隆和陈昆松2007;陈俊伟等2004)等所介绍的基本一致。未验证到的淀粉代谢是否存在、何时存在、代谢强弱将成为我们进一步研究的重要内容。

从本研究分析可知葡萄中SS由3个基因家族编码,这与玉米(Hardin和Huber 2004)、水稻(Wang等1999)、柑橘(Komatsu等2002)的研究结果相一致。SS催化如下反应:蔗糖+UDP→果糖+UDPG。此反应是可逆的,但普遍认为SS的主要功能是分解

蔗糖。SS的生理功能主要是调控果实输入蔗糖多少和代谢蔗糖的能力、参与细胞建成。研究表明,葡萄在转熟之前,己糖主要用于代谢,转熟之后,己糖主要用于积累(孙凌俊等2008)。本研究中发现SS1小果、中果中表达强烈,可能由于SS1在生长前期分解蔗糖参与代谢过程,如在细胞发育过程中通过蔗糖降解提供UDPG构建细胞壁或者合成胍胍质。而SS2在大果中表达强烈,可能是在葡萄生长后期需要积累己糖。葡萄中SS3由拟南芥*atSuS5*和*atSuS6*预测而来,在整个生长过程中表达均较弱,而拟南芥*atSuS5*和*atSuS6*在所有组织中的表达是组成型的,不受胁迫条件的影响(雷美华等2007),两者研究结果相一致。SPS是植物中调控

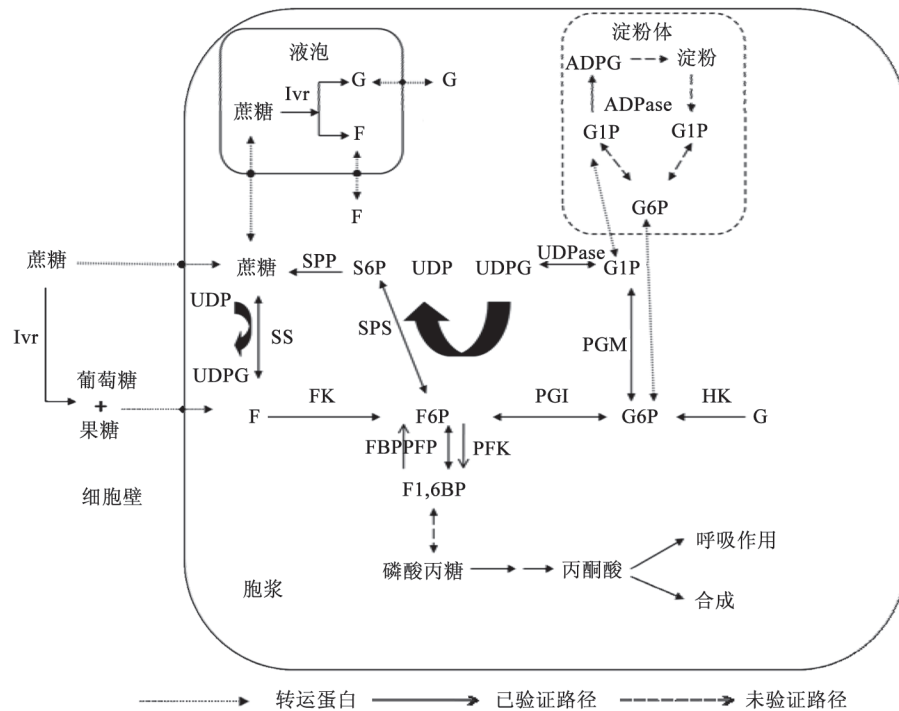


图3 果实糖代谢路径

Fig.3 Fruits sugar metabolism pathway

参考张上隆和陈昆松(2007)以及陈俊伟等(2004)文献并作修改。Ivr: 转化酶; G: 葡萄糖; F: 果糖; G1P: 1-磷酸葡萄糖; G6P: 6-磷酸葡萄糖; F6P: 6-磷酸果糖; F1,6BP: 1,6-二磷酸果糖; S6P: 6-磷酸蔗糖; UDP: 二磷酸尿苷; UDPG: 尿苷二磷酸葡萄糖; ADPG: 腺苷二磷酸葡萄糖; SS: 蔗糖合成酶; SPS: 蔗糖磷酸合成酶; SPP: 磷酸蔗糖磷酸化酶; HK: 己糖激酶; FK: 果糖激酶; PGI: 磷酸葡萄糖异构酶; PGM: 磷酸葡萄糖变位酶; PFK: 磷酸果糖激酶; FFP: 果糖-6-磷酸1-磷酸转移酶; FBP: 果糖-1,6-二磷酸酶; UDPase: UDPG焦磷酸化酶; ADPase: ADPG焦磷酸化酶。

蔗糖合成的关键酶之一,是光合产物向蔗糖和淀粉分配的关键调控点。大量的研究表明SPS基因只有在一定的发育阶段、在一定的组织中才会起始表达(Komatsu等1996; Castleden等2004),本研究中SPS1只在小果中有表达,这也与前人研究结果相一致,SPS2在小、中、大果中都有表达,但在小果中表达相对较强,这可能由于SPS对光合作用产物分配的影响效果因作物的碳水化合物的积累类型的不同而有所不同。SPS和SPP又是以复合体的形式存在于植物体内(Echeverria等1997),且SPP在葡萄中仅预测到一个基因,因此,在不同时期果实中均应检测到SPP的表达。

本研究通过SS、SPS、SPP编码基因的时空表达可以看出,SS在整个葡萄浆果发育过程中均有表达强烈的基因,SPS和SPP在整个浆果生长期表达相对较弱,而SS的主要功能是把蔗糖分解成单糖,SPS和SPP主要功能是合成蔗糖,高表达的SS

与低表达的SPS和SPP造成结果是葡萄浆果积累单糖,分解蔗糖,这与前人关于葡萄浆果主要积累葡萄糖和果糖,蔗糖含量极微(冷翔鹏等2011; 孙凌俊等2008)的研究结果相一致。此外,本研究中葡萄糖代谢途径预测结果与陈俊伟等(2004)所报道的果实糖代谢途径基本一致。值得注意的是淀粉途径并没有得到验证,这可能是由于葡萄ADPG淀粉合成酶及焦磷酸化酶活性很低、葡萄果实中淀粉存在与相应代谢发生时间很短而难以发现等原因造成的。

参考文献

- 陈俊伟,张上隆,张良诚(2004).果实中糖的运输、代谢与积累及其调控.植物生理与分子生物学学报,30(1):1~10
 房经贵,高志红,陶建敏(2003).一种提取葡萄芽中总RNA的方法.生物技术,13(2):24~25
 房经贵,刘洪,杨光(2008).基因组学研究时代的葡萄酿造明星——黑比诺.中外葡萄与葡萄酒,(4):57~59
 雷美华,叶冰莹,张华,王冰梅,黄祖新,许莉萍,陈由强,陈如凯

- (2007). 植物蔗糖合成酶的研究现状. 亚热带农业研究, 3 (4): 309~312
- 冷翔鹏, 慕茜, 房经贵, 韩键(2011). 葡萄浆果中的糖成分以及相关代谢研究的进展. 江苏林业科技, 38 (2): 40~43
- 骆蒙, 贾继增(2000). 国际麦类基因组EST计划研究进展. 中国农业科学, 33 (6): 110~112
- 上官凌飞, 王晨, 房经贵, 李晓颖, 王西成, 宋长年(2011). 利用GenBank中大量葡萄EST序列分离有效基因的电子表达分析平台. 中国农业科学, 44 (13): 2748~2759
- 孙凌俊, 马丽, 王振家(2008). 葡萄果实糖代谢的研究进展. 中外葡萄与葡萄酒, (6): 70~72
- 王晨, 房经贵, 王涛, 谭洪花(2009). 果树果实中的糖代谢. 浙江农业学报, 21 (5): 529~534
- 王振平, 奚强, 李玉霞(2005). 葡萄果实中糖分研究进展. 中外葡萄与葡萄酒, (6): 26~30
- 张上隆, 陈昆松(2007). 果实品质形成与调控的分子生理. 北京: 中国农业出版社
- Adams MD, Dubnick M, Kerlavage AR, Moreno R, Kelley JM, Utterback TR, Nagle JW, Fields C, Venter C (1992). Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature*, 355: 632~634
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF et al (1991). Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252: 1651~1656
- Bouchez D, Höfte H (1998). Functional genomics in plants. *Plant Physiol*, 118: 725~732
- Castleden CK, Aoki N, Gillespie VJ, MacRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn JE (2004). Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol*, 135: 1753~1764
- Chang S, Puryear J, Cairney J (1993). A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol Rep*, 11: 113~116
- Davies C, Robinson SP (1996). Sugar accumulation in grape berries: cloning of two putative vacuolar invertase cDNAs and their expression in grapevine tissues. *Plant Physiol*, 111: 275~283
- Echeverria E, Salvucci ME, Gonzalez P, Paris G, Salerno G (1997). Physical and kinetic evidence for an association between sucrose-phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase. *Plant Physiol*, 115: 223~227
- Ewing RM, Kahla AB, Poirot O, Lopez F, Audic S, Claverie JM (1999). Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res*, 9: 950~959
- Hardin SC, Huber SC (2004). Proteasome activity and the post-translational control of sucrose synthase stability in maize leaves. *Plant Physiol Biochem*, 42: 197~208
- Hawker JS (1969). Changes in the activities of enzymes concerned with sugar metabolism during the development of grape berries. *Phytochemistry*, 8: 9~17
- Hayes MA, Feechan A, Dry IB (2010). Involvement of abscisic acid in the coordinated regulation of a stress-inducible hexose transporter (VvHT5) and a cell wall invertase in grapevine in response to biotrophic fungal infection. *Plant Physiol*, 153: 211~221
- Jailon O, Aury JM, Noel B (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature*, 449: 463~467
- Komatsu A, Moriguchi T, Koyama K, Omura M, Akihama T (2002). Analysis of sucrose synthase genes in citrus suggests different roles and phylogenetic relationships. *J Exp Bot*, 53: 61~71
- Komatsu A, Takanokura Y, Omura M, Akihama T (1996). Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc.). *Mol Gen Genet*, 252: 346~351
- Marcelo CD, Raquel LBC, Luciana HMF, Marco AT (2007). A genetic framework for flowering-time pathways in *Citrus* spp. *Genet Mol Biol*, 30 (3): 769~779
- Mehta A, Sliva MS, Guidetti-Gonzalez S, Carrer H, Takita MA, Martins NF (2007). Signaling pathways in a Citrus EST database. *Genet Mol Biol*, 30 (3): 734~751
- Teixeira RT, Knorpp C, Glimelius K (2005). Modified sucrose, starch and ATP levels in two alloplasmic male-sterile lines of *B. napus*. *J Exp Bot*, 56 (414): 1245~1253
- Wang AY, Kao MH, Yang WH, Sayion Y, Liu LF, Lee PD, Su JC (1999). Differentially and developmentally regulated expression of the rice sucrose synthase genes. *Plant Cell Physiol*, 40 (8): 800~807
- White JA, Todd J, Newman T, Focks N, Girke T, Ilárduy a OM, Jaworski JG, Ohlrogge JB, Benning C (2000). A new set of *Ara-bidopsis* expressed sequence tags from developing seeds: the metabolic pathway from carbohydrates to seed oil. *Plant Physiol*, 124: 1582~1594