

西伯利亚蓼甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的 cDNA 克隆与序列分析

李晓泽, 刘关君, 杨传平*

东北林业大学林木遗传育种省级重点实验室, 教育部林木遗传育种与生物技术重点实验室, 哈尔滨 150040

摘要: 根据NaHCO₃胁迫下西伯利亚蓼茎部消减库中甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)表达序列标签序列设计引物, 采用cDNA末端快速扩增技术, 从西伯利亚蓼茎中扩增出*GAPDH*的全长cDNA序列。该cDNA序列全长1331 bp, 完整阅读框1014 bp, 编码337个氨基酸。属于稳定蛋白, 具有*GAPDH*保守功能域。氨基酸组成与其他已知高等植物来自细胞质中的*GAPDH*基因cDNA序列具有很高的同源性, 最高可以达到96%。通过转酿酒酵母INVSC1的NaHCO₃和NaCl胁迫试验表明, 转基因INVSC1 (pYES2-*GAPDH*)有明显的抗盐胁迫特性。在10% NaHCO₃和4 mol·L⁻¹ NaCl胁迫下, 转基因INVSC1 (pYES2-*GAPDH*)菌株存活率明显比INVSC1 (pYES2)高, 可以推测*GAPDH*基因赋予INVSC1 (pYES2-*GAPDH*)抗NaHCO₃和NaCl的能力。该基因的cDNA序列在GenBank中登录号为DQ922680。

关键词: 西伯利亚蓼; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因; 基因克隆; 序列分析

Cloning and Sequence Analysis of cDNA of Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Gene from *Polygonum sibiricum* Laxm.

LI Xiao-Ze, LIU Guan-Jun, YANG Chuan-Ping*

The Provincial Key Laboratory of Forest Genetics and Breeding, The Laboratory of Forest Genetics and Breeding and Biotechnology of Ministry of Education, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: The primers which were used to amplify the full length cDNA of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*) were designed according to the expressed sequence tag (EST) sequence of *GAPDH* gene acquired from suppression subtractive hybridization library of the stem of *Polygonum sibiricum* under the stress of NaHCO₃. The full length cDNA sequence of *GAPDH* gene was obtained by using rapid amplification of cDNA ends (RACE) technology. The results showed that the cDNA of *GAPDH* gene was 1331 bp, encoding 337 amino acid residues, and deduced nucleic acid and amino acid sequence possessed high identity with the ones from the cytoplasm of other higher plants. Among these genes, the most conserved one even share 96% in their nucleic acid sequence. The results from biofunctional analyses with *GAPDH* yeast (*Saccharomyces cerevisiae*, INVSC1) transformants showed that *GAPDH* yeast transformants had significantly higher resistance to different salt stresses. INVSC1 (pYES2-*GAPDH*) had more salt-resistance ability than INVSC1 (pYES2) and the former survival rate was higher than that of the later under the stress of 10% NaHCO₃ and 4 mol·L⁻¹ NaCl. This indicated that the high ability of salt-tolerance of INVSC1 (pYES2-*GAPDH*) might be related to the expression of pYES2 gene. The *GAPDH* was accepted by GenBank which accession number is DQ922680.

Key words: *Polygonum sibiricum*; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*GAPDH*); gene clone; sequence analysis

高等植物有2类不同的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)蛋白: 一类是在叶绿体中有活性的卡尔文循环中的关键酶; 另一类是存在于细胞质中的在糖酵解过程中起作用的酶(Martin等1993)。在糖酵解和糖异生过程中, *GAPDH*是关键酶, 参与糖酵解过程中第一个ATP的形成。在外界环境胁迫如热胁迫、渗透胁迫、缺氧胁迫或营养缺失

胁迫时, 一些糖酵解相关基因的mRNA大量积累表达(印莉萍等2004)。在NaCl胁迫下, 构巢曲霉菌(*Aspergillus nidulans*)的*GAPDH*表达转录水平

收稿 2006-09-11 修定 2007-01-17

资助 国家重大基础研究发展规划“973”项目(G1999016003)和黑龙江省重点攻关项目(GB06B303)。

*通讯作者(E-mail: yangcp@nefu.edu.cn; Tel: 0451-82190006)。

提高(Redkar 等 1998)。转球毛壳菌(*Chaetomium globosum*) *GAPDH*基因的酵母对热激和盐碱胁迫都有高的耐受性(刘志华和杨谦 2005)。耐盐植物冰花(*Mesembryanthemum crystallinum*)受到盐胁迫时, *GAPDH*基因的转录也有明显增强(Jou 等 2004; Yang 和 Yen 2002)。

西伯利亚蓼为蓼科植物, 主要分布在潮湿的盐碱地、河滩沙地及田边, 具有很强的耐盐碱性, 能在盐碱地的碱斑上生长, 是盐碱地上的优势种群(刘关君等 2004; 吕艳芳等 2006), 但有关与其耐盐性相关的分子生物学研究很少。本文以构建的 NaHCO_3 胁迫下西伯利亚蓼茎的消减 cDNA 文库中的表达序列标签序列设计引物, 克隆出 *GAPDH* 全长 cDNA 序列, 用生物信息学手段对该基因进行序列比对和分析, 阐明了该全长 cDNA 是存在于细胞质中的基因且具有耐盐相关性; 并获得了转 *GAPDH* 基因的酵母(INVSC1), 对酵母转化子进行了 NaHCO_3 和 NaCl 胁迫试验, 证明该基因具有耐盐性。现报道如下。

材料与方 法

2005年10月, 从黑龙江省肇东县东部盐碱地(东经 $126^{\circ}01'01''$, 北纬 $46^{\circ}00'51''$)挖取西伯利亚蓼(*Polygonum sibiricum* Laxm.)地下茎段于温室内扩繁。次年3月初, 培育西伯利亚蓼地下茎扦插苗时, 用腐殖质和细砂混合物(比例为3:1)作培养基质。温室培养1个月后, 苗高达 $10\sim 15$ cm ($4\sim 5$ 片真叶)时用3% NaHCO_3 溶液进行盐胁迫处理, 12 h浇灌一次, 24 h后取样; 以不浇灌 NaHCO_3 的为对照。用自来水反复冲洗整体植株3遍, 去除泥土及灰尘; 用双蒸水淋洗3遍, 去除表面的离子; 用干净的滤纸吸干表面水分, 去根、叶, 留茎, 以液氮速冻后, 贮于 -70°C 冰箱中备用。

克隆载体 pGEM-Teasy、 T_4 DNA 聚合酶、*Hind*III、*Xba*I 和 PCR 产物胶回收试剂盒均购自 Promega 公司, 大肠杆菌 Top10 菌株、Taq Plus DNA 聚合酶(高保真)和质粒 DNA 小量提取试剂盒购自 Tiangen 公司, YPD 和 SC-U 培养基、BD SmartTM RACE cDNA Amplification Kit 购自 BD Biosciences 公司, 氨苄青霉素(Amp)、X-gal、IPTG、葡萄糖、半乳糖、醋酸锂为 Sigma 公司

产品, DL2000 marker、PCR 所用试剂购于宝生物(大连)生物工程有限公司, 酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) INVSC1、表达载体 pYES2 购于 Invitrogen 公司, 引物由上海生物工程有限公司合成。

参考王玉成等(2003)的方法提取经 NaHCO_3 胁迫处理后的西伯利亚蓼茎部中的总 RNA, 用作快速扩增 cDNA 末端(rapid amplification of cDNA ends, RACE)实验的 cDNA 第一链的合成参考试剂盒说明书(SmartTM RACE cDNA Amplification Kit, BD Biosciences)。根据 NaHCO_3 胁迫下西伯利亚蓼 cDNA 消减文库中已知的表达序列标签(expressed sequence tag, EST)序列, 设计3'方向及5'方向 PCR 的特异性引物 P1 和 P2 及其巢式引物 P1N 和 P2N。3'方向 RACE 引物: P1, 5' TATCAAGC-GTGCCATCAAGGAGG 3'; P1N, 5' TCTACCGA-CTTCGTGGGTGACAACA 3'。5'方向 RACE 引物: P2, 5' TTGTCACCCACGAAGTCGGTAGA-AA 3'; P2N, 5' TCTTGCCCTCAGATGCCTCC-TTG 3'。分别以合成的3' cDNA 和5' cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增, 体系总体积为 20 μL , 其中含 0.5 μL 3' cDNA 或 5' cDNA 模板、2.0 μL $10\times$ PCR 缓冲液、1.0 μL 特异引物 P1 或 P2 ($10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、1.0 μL UPM ($10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、0.5 μL Taq Plus DNA 聚合酶($2.5\ \text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)、0.5 μL dNTPs ($10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、14.5 μL ddH₂O。扩增条件为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 s, 51°C 退火 30 s, 72°C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 5 min。于 4°C 保存。取 0.5 μL 产物作为模板, 特异引物改为 P1N 和 P2N, UPM 改为 NUP, 其他反应条件不变, 进行第 2 次 PCR 扩增。

根据 3' 和 5' RACE 已扩增到的目的片段设计 3' 方向及 5' 方向全长序列 PCR 特异性引物 P3 和 P4: P3, 5' ACAAACCAAATAAAAACA ACTCTGC 3'; P4, 5' TCATCCTACTTTCTCCTCTCACTCG 3'。扩增条件同上, 退火温度为 55°C 。将 PCR 产物进行电泳, 目的条带胶回收、连接载体, 然后转化到感受态大肠杆菌 Top10 中, 在含有 IPTG、X-gal、氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基上过夜培养, 进行蓝白斑筛选。挑取白斑接种于 LB (含 140 mL $52\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Amp) 液体培养基中。取菌液为模

板, 用上述条件进行扩增, 电泳检测插入片段的大小。序列测定由上海生物工程有限公司完成。

根据西伯利亚蓼 *GAPDH* 基因 cDNA 序列 (DQ922680), 在编码区上游和下游设计合成一对引物: gapdhL, 5' CCCAAGCTTACGATGGCA-AAGATCAAGATCGG 3' (下划线为 *Hind*III 酶切位点); gapdhR, 5' TGCTCTAGAAAACTCA-GGCAACGATGG 3' (下划线为 *Xba*I 酶切位点)。以提取的大肠杆菌 Top10 (*T-GAPDH*) 质粒为模板进行 PCR 扩增。扩增条件同上, 退火温度为 58 °C。纯化产物, 与 pYES2 载体同时进行 *Hind*III 和 *Xba*I 双酶切, 用 T₄ DNA 连接酶连接, 转化到感受态大肠杆菌 Top10 中, 然后进行 PCR、双酶切及测序鉴定重组质粒。参照 Invitrogen 公司提供的说明书, 用醋酸锂沉淀法将重组质粒 (pYES2-*GAPDH*) 及对照质粒 (pYES2) 转化到 INVSC1 中, 转化成功的 INVSC1 可以在缺少尿嘧啶的培养基上 (SC-U, 2% 葡萄糖为碳源) 生长。液氮研磨破胞, 进行 PCR 反应鉴定, 反应体系及反应条件同上。

分别挑取 INVSC1 (pYES2-*GAPDH*) 和 INVSC1 (pYES2) 单菌落, 接种于 SC-U (2% 葡萄糖为碳源) 培养基中, 30 °C 下过夜培养后取 10 mL 以 6 900×g 离心 1 min, 用 50 mL SC-U (2% 半乳糖为碳源及诱导物) 诱导培养基重悬, 诱导表达 48 h, 使两菌株 OD₆₀₀ 值均达到 2.0。用 RT-PCR 检测 *GAPDH* 转化子基因表达情况。提取半乳糖诱导后的酵母 INVSC1 (pYES2-*GAPDH*) 和 INVSC1 (pYES2) 的总 RNA, 按照酵母总 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA。取 1 μg 反转录成 cDNA 后, 分别稀释成 200 μL, 用作 PCR 模板。PCR 体系总体积为 20 μL, 其中含 2.0 μL 10×PCR 缓冲液、2.0 μL 模板 cDNA、特异引物 gapdhL 和 gapdhR (10 μmol·L⁻¹) 各 1.0 μL、0.5 μL Taq Plus DNA 聚合酶 (2.5 U·μL⁻¹)、0.5 μL dNTPs (10 mmol·L⁻¹)、13.0 μL ddH₂O。扩增条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 27 个循环; 72 °C 延伸 7 min。取 8.0 μL PCR 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳。

分别取上述半乳糖诱导的 100 μL 的酵母菌体, 瞬时离心 10 s, 弃去上清液, 菌体分别重悬于 1 mL 10% 的 NaHCO₃ 和 4 mol·L⁻¹ NaCl 中,

将前者置于 30 °C 下胁迫 12 h, 后者置于 4 °C 下胁迫 30 h。胁迫后, 用无菌水重悬菌体, 涂布于 SC-U 培养基中 (2% 葡萄糖为碳源), 以未经胁迫的 INVSC1 (pYES2-*GAPDH*) 和 INVSC1 (pYES2) 菌株作对照, 于 30 °C 下培养 48 h, 照相记录结果。

用 Vectorscreen 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) 检测并去除序列两端的载体相关序列, 通过开放阅读框 (open reading frame) 寻找程序分析基因的阅读框架 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf>), 用 BlastX 程序将编辑后的序列在 NCBI 数据库中进行氨基酸序列同源性比较 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), 用 PtParam 程序 (<http://au.expasy.org/tools/protparam.html>) 预测该氨基酸序列分子量和理论等电点 (pI), 用 Pfam 14.0 (<http://pfam.wustl.edu/hmmsearch.shtml>) 进行蛋白家族预测, 用 ProScale 程序 (<http://www.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>) 预测蛋白疏水性, 用 SignalP 3.0 Server 程序 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 检测信号肽结构, 用 ClustalX 软件进行该基因同源序列的多序列分析, 绘制分子进化树。

实验结果

1 3' 和 5' 方向及全长 cDNA 序列的扩增

采用 3' 和 5' RACE 的方法扩增 *GAPDH* 的 3' 和 5' 片段。经 2 轮扩增得到接近 500 bp 和大于 750 bp 的 DNA 片段, 2 条片段与预期目的片段大小吻合。测序后证实为 *GAPDH* 基因的 3' 和 5' 端序列。根据扩增片段的测序结果设计引物 P3 和 P4, 采用 RACE 的方法扩增 *GAPDH* 的全长 cDNA 序列。得到 1 条大于 1 000 bp 的 DNA 片段, 片段与预期目的片段大小吻合。测序后证实为 *GAPDH* 基因全长 cDNA 序列。该 cDNA 序列在 GenBank 中的登录号为 DQ922680。

2 *GAPDH* 基因的全长 cDNA 序列分析

从图 1 中可以看出, 西伯利亚蓼 *GAPDH* 全长 cDNA 序列为 1 331 bp, 自 33 位的起始翻译密码子 ATG 起, 止于 1 046 位的翻译终止密码子 TAG, 5' 非翻译区 33 bp, 3' 非翻译区 285 bp, 有 poly A 尾巴。有完整的开放阅读框, 编码由 337 个氨基酸残基组成的多肽。PtParam 程序预测该氨基酸序列分子量为 36.672 kDa, 理论 pI 值是

1	ATTCATCC TAC TTT CTC CTC TCACTC GAG TCC AFD GCAAAAG ATC AAG	47
		M A K I E
48	ATC GGA ATC AAC GGT TTC GGA AGA ATC GGC GGT TTD CTC GCT AAG	95
		I Q I N O P O R I O R L V A R
93	GTC ATT CTC TCA AGG GGG GAT GTA GAG CTT GTT GCC CTC AAC GAC	142
		V I L S R Q D V E L V A V N D
138	GGG TTC AFD AGG AGG GAG TAC AFD AGA TAC AFD TTC AAG TAT GAG	189
		F F I T T D Y M T Y M F K Y D
183	ACT CTC GAG GGT GAA TGG AAG GAG GAG GAG CTC AAG CTC AAG GAG	237
		T V H O Q W K H H D V K V K D
228	GAG AAG ACT CTT CTC TTT GGC CAG TCACCA GTT ACT GTT TTC GGA	285
		E K T L L F Q Q S P Y T V P G
273	TGG AAG AAG GGA GAG GAG AFD GGA TGG AAT GAG ACT GGT GGT GAT	332
		C H H F E E I F W E Q T D A D
318	TTC CTC GTT GAG TCT ACT GGA GTC TTC ACC GAG AAG GAG AAG GGT	380
		F V V E S T Q V F T D K D E A
363	GCT GCT CAC TTD AAG GGT GGT GCT AAG AAG GTC GTC ATC TCT GCA	427
		A A H L E G G A K E V V I D A
408	CCT AAG AAG GAT GCA CCT AFD TTT GTT GTT GGT GTT AAG GAG GAT	483
		F S E D A P M P Y Y Q Y H E H
453	GAG TAC AAG GGT GAG GTT AAG ATC GTA TCC AAT GCG AAT TCC AGA	517
		E Y E F E L H I V S H A S C T
498	ACT AAG TCC CTT GCT CTT TTD GCT AAG GTT ATC AAT GAC AAC TTC	543
		T H Q L A P L A K V I N D H F
543	GGC ATT GTT GAG GGC CTA AFD ACC AGA GTT CAC GCA AFD ACC GGC	587
		Q I V E Q L M Y T V H A M T A
588	AGACAG AAG AGA GTT GAT GGA GCA TCA AFD AAG GAG TGG AG AAT	633
		T Q E T V D Q F S M K D W E Q
633	GGA AAG GGT GGT TCA TTC AAG AFD AAT GCG ACC AGG ACT GGA GGT	677
		Q R A A S F N I I P S S T O A
678	GCT AAG GCT GTT GGC AAG GTC TTD GCA GTC TTD AAT GGA AAG TTD	733
		A K A V Q K V L F V L N Q K L
718	ACT GGA AFD GCG TTC GGT GTC GGA ACT GTT GAT GTT TCT GTC GTT	787
		T Q M A F R Y F T V D V S V Y
768	GAG CTC ACC GTT AGA CTT GAG AAG GCG GCG AGG TAC GAG GAG AFD	813
		D L T V R L E K A A S Y E D I
813	AAG GGT GGC ATC AAG GAG GCA TCT GAG GGC AAG AFD AAG GGA AIT	857
		K R A I K E A S E Q E M K Q I
858	TTC GGT TAC ACC GAT GAG GAT CTT GTC TCT ACT GAC TTC GTC GGT	903
		L Q T T D E D L V S T D F Y Q
903	GAG AAG AGG TCA AGG AFD TTT GAT GCG AAG GGT GGA AIT GGT TTD	947
		D H N S S I F D A K A Q I A L
948	AAT GAT AAG TTD GTC AAG GTC GTC TCC TGG TAC GAG AAG GAG TGG	993
		N D N F V K L V S W Y D H E W
983	GGC TAC AAT ACC GGT GTC GTC GAC TTD ATC TGT CAC AFD GGC AAG	1037
		Q Y S T R V V D L I Q H M A K
1048	TGG GAG TAA AAT AAT GTT GCG AGA TGA AAT GTC AGA GTT GCG TGG	1083
		S Q *
1083	ATC GTT GCG TGA GTC TTT TGT GCA TGT TTA AIT TTD AAT AGG GAG	1127
		T Q T T E A A A A C T T T G A A A A T A A A G C A G A G T T T T A T T T T
1128	TGT CTC TGA AAA CTT TGG AAG AAT AAA GCA GAG TTD TTT TAT TTT	1173
		G G T T T G C T C T C C T A A T T A C T A C T T C T A C A G G T T A T T T C C C
1173	GGT TTD TCC TCT GCG TAA TGT ACT AAT TCT ATC AAG TTA TTT CCC	1217
		T G G A T T G T C T A A A A T G T T T C C C A A A G A T C T G T G G C A A G G G T A T
1218	TGG AAT TGT CTAAAA TGT TTT GCG AAAGAT CTC TGG CAA GGG TAT	1263
		T T G T A C C T C T G T A G C A A A T A T T A T T C G G G T T E A T A T G A A A A A A A
1263	TTC TAC CTC TGT AGC AAA TAT TAT TCG GGT TGA TAT GAA AAA AAA	1307
		A A G A A A A A A A A A A A A A A A A A
1308	AAG AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA	1311

图1 西伯利亚蓼茎中GAPDH 基因序列及由此推导的氨基酸序列

Fig. 1 Nucleotide and deduced amino acid sequences of GAPDH gene from the stem of *P. sibiricum*

7.66, 整个氨基酸组成中 Val 占最大比例, 高达 11.3%, 蛋白不稳定系数是 24.31, 属于稳定蛋白。用 SignalP 3.0 Server 检测不含信号肽序列, 无分泌蛋白。

用 Pfam 14.0 蛋白家族预测表明, 该蛋白为

糖酵解和糖异生的关键酶, 具有 2 个保守区域, 其中 Gp_dh_C 的 C 端是混合的 α / 反平行 β 折叠, 行使糖运输和代谢的催化功能域; 另一个是 Gp_dh_N, 为 Rossmann NAD(P) 结合功能域。与用 BlastP 程序查找蛋白保守区的结果一致(图2)。

氨基酸同源比对显示, 草本植物西伯利亚蓼的 *GAPDH* 与其他草本植物的 *GAPDH* 基因同源序列相似性较高, 最高达到 96%; 与银杏纲银杏和木兰纲落叶灌木辛夷也具有较高的同源性, 最高达到 93% (表 1)。从图 3 中可以看到, 氨基酸序列的前 4 个和后 11 个氨基酸保守性差。由表 1 可以看出, 在核苷酸序列上的保守性没有蛋白的整体保守性好, 表明序列的多态性强。保守区主要集中在部分区域, 例如催化位点 (159~316 bp)、NAD 结合区 (4~154 bp) 等 (图 2)。所以可以认为, 西伯利亚蓼的 *GAPDH* 基因保守区域的相似性强, 相同性较弱 (表 1)。

进化树中显示, 西伯利亚蓼 *GAPDH* 基因与冰花、百合、玉米、大麦、水稻亲缘进化关系较近, 来自于同一个进化分枝, 而与其他植物阳芋、拟南芥、大豆、金鱼草、胡萝卜、普通烟草、番茄、辛夷、银杏等属不同分枝, 进化关系较远, 尤其是落叶灌木辛夷和银杏纲植物银

杏进化距离最远 (图 4)。

3 重组质粒 pYES2-*GAPDH* 的构建

利用 *gapdhL* 和 *gapdhR* 引物扩增出 *GAPDH* 基因, 与 pYES2 同时进行双酶切, 连接后获得重组质粒并转化到大肠杆菌 Top10 中。用 *gapdhL* 和 *gapdhR* 作为引物进行菌液 PCR, 获得大于 1 000 bp 的片段, 双酶切鉴定获得 1 011 和 519 kb 2 种产物, 均与预期片段相符。测序表明 *GAPDH* 基因已准确地克隆到酵母表达载体 pYES2 中, 命名为 pYES2-*GAPDH* 质粒。

4 含重组质粒 pYES2-*GAPDH* 的酵母的 RT-PCR 检测和耐盐性分析

用醋酸锂沉淀法将重组质粒 (pYES2-*GAPDH*) 及非重组质粒 (pYES2) 转化到 INVSC1 中, 对酵母转化子菌落进行 PCR。结果表明, 已经成功地获得了转 *GAPDH* 基因的酵母 (*GAPDH*⁺) 和转非重组质粒 pYES2 (不含 *GAPDH* 基因) 的酵母 (*GAPDH*⁻)。在半乳糖诱导 48 h 后, 进行 RT-PCR 检测, 表明



图2 BlastP推导的氨基酸序列的保守区预测

Fig. 2 BlastP search for conserved domains in deduced sequence of amino acid

表1 西伯利亚蓼与其他植物的 *GAPDH* 基因序列同源性分析

Table 1 Analysis of sequence homology of the *P. sibiricum* *GAPDH* gene with those of other plants

物种	序列号	同源性/%	
		核苷酸	氨基酸
冰花 (<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>)	P17878	84	94
阳芋 (<i>Solanum tuberosum</i>)	AAM92008	80	95
拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP-172801	83	96
大豆 (<i>Glycine max</i>)	ABC75834	81	93
金鱼草 (<i>Antirrhinum majus</i>)	CAA42103	80	93
胡萝卜 (<i>Daucus carota</i>)	AAR84410	79	94
烟草 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	CAB39974	81	94
番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	AAB51592	79	92
百合 (<i>Lilium longiflorum</i>)	ABC47829	80	93
玉米 (<i>Zea mays</i>)	AAA87580	81	92
大麦 (<i>Hordeum vulgare</i>)	CAA42901	79	93
水稻 (<i>Oryza sativa</i>)	AAA82047	79	82
辛夷 (<i>Magnolia quinquepetala</i>)	CAA42905	80	93
银杏 (<i>Ginkgo biloba</i>)	AAA33352	78	92

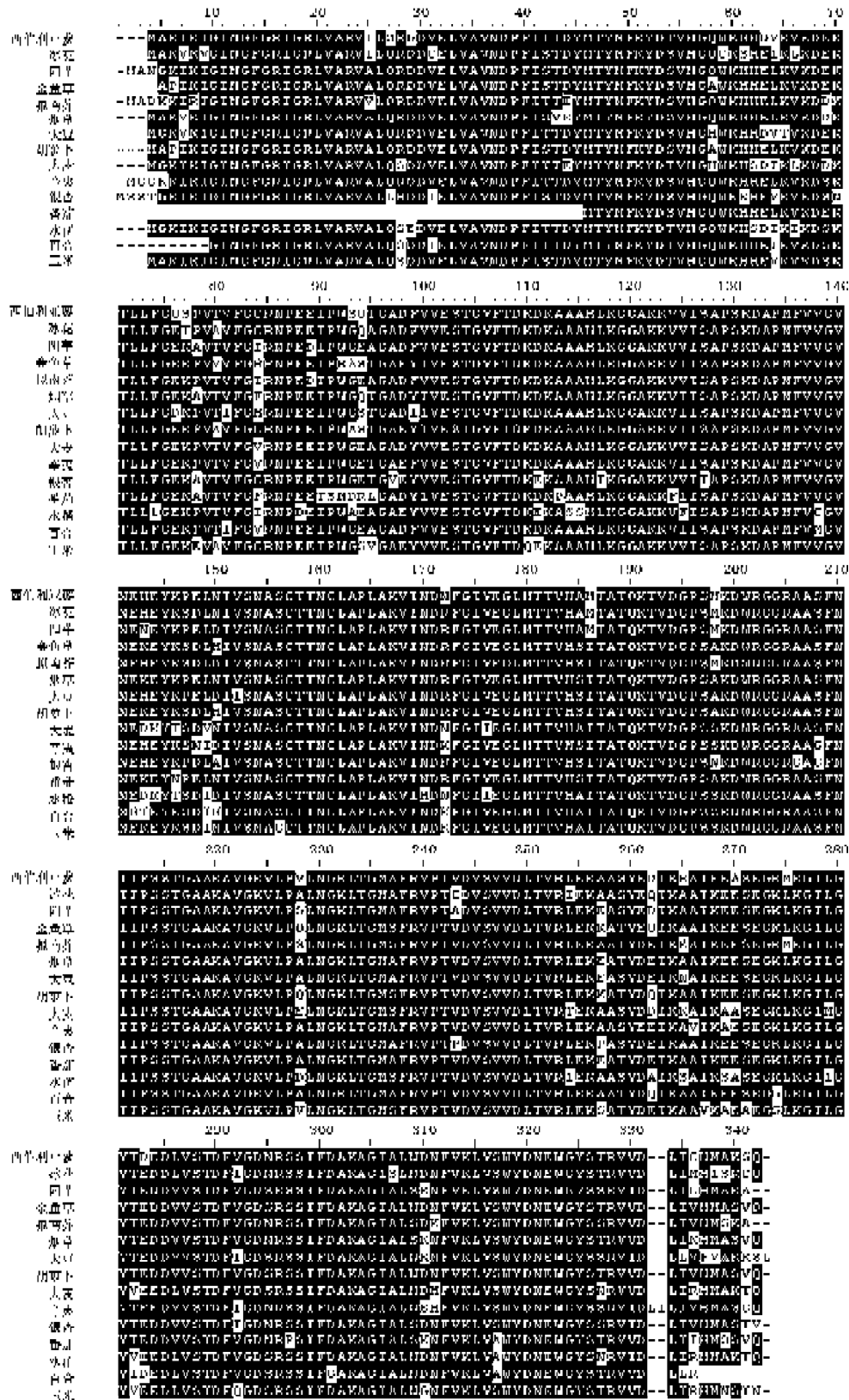
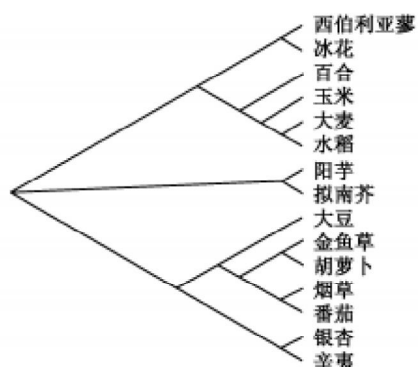


图3 西伯利亚蓼和其他植物的GAPDH氨基酸序列比较

Fig.3 Alignment of the amino acid sequences of GAPDH between *P. sibiricum* and other plants

图4 *GAPDH*基因系统发生分析Fig. 4 Analysis of phylogenetic tree of *GAPDH* gene

*GAPDH*基因在 *GAPDH*⁺ 酵母中有明显的表达, 而 *GAPDH*⁻ 酵母中则检测不到该基因的表达。说明 *GAPDH*⁻ 酵母在半乳糖诱导下成功地实现了基因的表达, 而 *GAPDH*⁺ 酵母则没有该基因的表达(图5)。从图6可以看出, 在正常条件下, 酵母(*GAPDH*⁺)和对照酵母(*GAPDH*⁻)存活率都很高, 而在NaCl和NaHCO₃胁迫下, 酵母 *GAPDH*⁺ 的存活率仍然很高, 且明显高于酵母 *GAPDH*⁻ 的存活率。说明在半乳糖诱导后, *GAPDH*基因赋予了INVSC1 (pYES2-*GAPDH*)抗NaHCO₃和NaCl的能力。

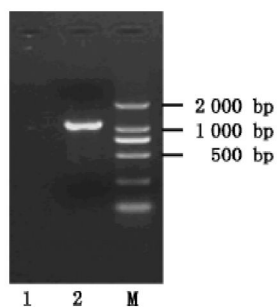


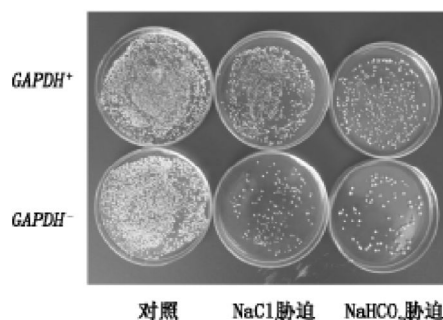
图5 RT-PCR检测

Fig. 5 RT-PCR test

M: DNA分子量标记 DL2000; 1: INVSC1 (pYES2); 2: INVSC1 (pYES2-*GAPDH*)。

讨 论

叶绿体中的GAPDH是由GAPA和GAPB 2个亚基组成; 而细胞质中的在糖酵解过程中发挥作用的GAPDH是由4个同种亚基GAPC组成的多聚

图6 转 *GAPDH*基因的酵母在NaCl和NaHCO₃胁迫下的生长情况Fig. 6 Phenomenon of yeast cell transformed with *GAPDH* gene under NaCl and NaHCO₃ stresses

NaCl胁迫: 4 mol·L⁻¹ NaCl 胁迫30 h; NaHCO₃胁迫: 10% NaHCO₃胁迫12 h。 *GAPDH*⁺: 转pYES2-*GAPDH*质粒的酵母; *GAPDH*⁻: 只转化了pYES2载体的酵母。

体(Martin等1993)。叶绿体的GAPDH和细胞质中的GAPDH氨基酸序列比较显示, 亚基A和B有高度相似性, 高达80%, 而叶绿体和胞质的亚基间相似性只有45%, 从而说明叶绿体和胞质中的GAPDH源自2个不同的谱系, 他们的趋异早于原核生物与真核生物的趋异(Shih和Goodman 1988; Shih等1988)。本文对西伯利亚蓼 *GAPDH*基因保守区的测定和同源性序列分析的结果显示, 它与一些存在于细胞质中的GAPDH基因的氨基酸序列同源性高达96%。推测此基因也是属于胞质中的GAPDH基因。

塔赫他间系统认为木兰纲原始, 百合纲起源于木兰纲。从进化树中可以看出, 木兰纲植物西伯利亚蓼的 *GAPDH*基因与一些百合纲植物的 *GAPDH*基因亲缘关系比一些木兰纲植物 *GAPDH*基因的亲缘关系近, 推测西伯利亚蓼中 *GAPDH*基因的进化有接近于百合纲植物 *GAPDH*基因的进化趋势。半乳糖诱导后, *GAPDH*基因在酵母(*GAPDH*⁺)中有明显的表达。NaCl和NaHCO₃胁迫的结果表明, *GAPDH*基因赋予了酵母INVSC1 (pYES2-*GAPDH*)一定的抗盐碱胁迫能力, 说明该基因本身具有抗盐碱胁迫的能力。与该基因进化距离最近的是来自于盐地生长的植物冰花(Jou等2004; Yang和Yen 2002)的 *GAPDH*基因, 它与该基因亲缘关系最近的百合纲植物玉米、大麦、水稻的 *GAPDH*基因也都有一定的抗胁迫功能(仪

慧兰等 2002; 印莉萍等 2004; Khan 等 2005)。迄今为止, *GAPDH* 在细胞中的功能还没有完全搞清楚, 是否是由于逆境胁迫的作用使这些植物的 *GAPDH* 基因的进化方向和功能趋于相同, 还待获得更多盐生植物的 *GAPDH* 基因后加以验证。

耐盐植物可分为吸盐型植物和拒盐植物(也有人将盐生植物分为3类, 即真盐生植物、泌盐盐生植物和假盐生植物), 根据西伯利亚蓼中无机离子的变化(李金耀等 2003; 吕艳芳等 2006), 推测西伯利亚蓼的耐盐机制接近拒盐植物。而 *GAPDH* 基因在这一机制中的功能, 尚有待进一步研究。

参考文献

- 李金耀, 张富春, 马纪, 王宾(2003). 植物分子水平的耐盐机制. 植物生理学通讯, 39 (6): 715~719
- 刘关君, 王大海, 郭晓瑞, 杨传平, 冯昕, 张波(2004). 用SDS-PAGE 研究 NaHCO_3 处理后西伯利亚蓼不同部位蛋白表达的变化. 植物研究, 24 (3): 361~365
- 刘志华, 杨谦(2005). 球毛壳菌甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因克隆及特性分析. 微生物学报, 45 (6): 885~889
- 吕艳芳, 王大海, 刘关君, 杨传平, 周颖(2006). 盐碱胁迫下西伯利亚蓼体内无机离子的变化. 广西植物, 26 (3): 304~307
- 王玉成, 薄海侠, 杨传平(2003). 胡杨、怪柳总 RNA 提取方法的建立. 东北林业大学学报, 31 (5): 99~100
- 仪慧兰, 梁爱华, 陈芳(2002). 盐胁迫诱导的大麦基因差异性表达. 植物生理学通讯, 38 (5): 440~442
- 印莉萍, 孙彤, 李伟, 黄勤妮, 刘祥林(2004). 缺铁诱导的水稻根转录本组和蛋白质组分析与膜泡运输. 自然科学进展, 14 (5): 522~527
- Jou Y, Chou PH, He M, Hung Y, Yen HE (2004). Tissue-specific expression and functional complementation of a yeast potassium-uptake mutant by a salt-induced ice plant gene *mcSKDI*. Plant Mol Biol, 54: 881~893
- Khan MM, Jan A, Karibe H, Komatsu S (2005). Identification of phosphoproteins regulated by gibberellin in rice leaf sheath. Plant Mol Biol, 58 (1): 27~40
- Martin W, Brinkmann H, Savonna C, Cerff R (1993). Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 8692~8696
- Redkar RJ, Herzog RW, Singh NK (1998). Transcriptional activation of the *Aspergillus nidulans gpdA* promoter by osmotic signals. Appl Environ Microbiol, 64: 2229~2231
- Shih MC, Goodman HM (1988). Differential light regulated expression of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. EMBO J, 7: 893~898
- Shih MC, Heinrich P, Goodman HM (1988). Intron existence predated the divergence of eukaryotes and prokaryotes. Science, 242: 1164~1166
- Yang J, Yen HE (2002). Early salt stress effects on the changes in chemical composition in leaves of ice plant and *Arabidopsis*. A Fourier transform infrared spectroscopy study. Plant Physiol, 130: 1032~1042