

玉米NADP⁺-异柠檬酸脱氢酶基因克隆和特征分析

袁进成*, 宋晋辉*, 瓮巧云, 马海莲, 王凌云, 刘颖慧**

河北北方学院农林科技学院, 河北张家口075000

摘要: 异柠檬酸脱氢酶(IDH)是三羧酸循环中最关键和最有意义的限速酶, 在生物体的三羧酸循环代谢反应中起重要的作用。我们从玉米中克隆了一个新的异柠檬酸脱氢酶基因, 命名为*ZmIDH2*并对其特征进行初步研究。*ZmIDH2*基因全长1 643 bp, 开放阅读框1 236 bp, 编码412个氨基酸, 同时克隆了*IDH2*基因组DNA, 全长3 463 bp, 具有11个内含子和12个外显子。进化树分析表明该基因在生物进化中高度保守, 与植物的细胞质*IDH2*基因的亲缘关系较近。半定量RT-PCR结果显示*ZmIDH2*基因在玉米中是组成型表达的, 在根和幼胚中的表达量较高。胁迫处理玉米植株, 表明在干旱和高盐条件下*ZmIDH2*基因表达量明显提高, *ZmIDH2*酶活性也受盐和干旱诱导。

关键词: 异柠檬酸脱氢酶基因; 玉米; 克隆; 特征; 胁迫

Cloning and Character Analysis of NADP⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Gene in Maize

YUAN Jin-Cheng*, SONG Jin-Hui*, WENG Qiao-Yun, MA Hai-Lian, WANG Ling-Yun, LIU Ying-Hui**

College of Agriculture and Forestry, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

Abstract: NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDH) catalyzes the reversible conversion of isocitrate to α -ketoglutarate and plays an essential rate-limiting step in the citric acid cycle. In this report a cytosolic NADP⁺ dependent isocitrate dehydrogenase gene from maize has been cloned. The analysis of the nucleotide sequence revealed an open reading frame of 1 236 bp and encoding 412 amino acids. The *ZmIDH2* had a 12-extron/11-intron genomic structure and a genomic length of 3 463 bp. The amino acid sequence displayed high homology with those from other plants such as rice and *Arabidopsis*. The gene was transcribed in all tissues tested, with the high amount of *ZmIDH2* transcript being found in root and embryo. Semi RT-PCR and enzyme active analyses showed that *ZmIDH2* was induced by drought and salt stress both in transcription and enzyme level.

Key words: *ZmIDH2*; maize; clone; character; stress

异柠檬酸脱氢酶(NADP dependent isocitrate dehydrogenase, IDH) (EC 1.1.1.42)广泛存在于真核生物, 包括叶绿体、线粒体、过氧化物酶体以及胞质的各个细胞器中。真核生物IDH主要参与三羧酸循环, 负责催化异柠檬酸氧化脱羧成 α -酮戊二酸(2-OG), 并将氧化型NAD还原成还原型NADH, 被认为是三羧酸循环最关键与最有意义的限速酶(Yasutake等2003)。IDH催化产生的 α -酮戊二酸(2-OG)不仅仅是糖代谢的重要产物, 也是脂质、蛋白质和核酸代谢最终氧化成二氧化碳和水的重要中间物质, 因此IDH的活性对生物体的整个生命代谢都有重要意义。

NADP-IDH的另一个重要的功能是产生细胞质中的NADPH (Fieuw等1995)。NADPH是谷胱甘肽还原酶和硫氧还蛋白还原酶的重要辅酶(Gallar-

do等1995), 而谷胱甘肽(GSH)和硫氧还蛋白对产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)起重要的作用。研究表明IDH是产生NADPH的主要来源, IDH和生物的ROS产生密切相关, 因此, IDH在植物抗氧化胁迫中起重要的作用, 细胞质的IDH涉及到植物产生谷胱甘肽所需要的NADPH来抵抗氧的胁迫。最近的研究也表明植物在遭受一些非生物胁迫以及离子毒害时IDH活性会增加(Hanschmann等2013; Marino等2007)。这些说明IDH在保护植物

收稿 2014-12-29 修定 2015-02-15

资助 国家自然科学基金(31101155)、“十二五”农村领域国家科技计划项目(2011BAD06B01)和河北北方学院重大项目(ZD201305)。

* 共同第一作者。

** 通讯作者(E-mail: leely519@126.com; Tel: 0313-4029309)。

免受外界胁迫所引起的氧化胁迫中起重要的作用。

虽然IDH基因在植物中有重要的作用,但是到目前为止对该基因的研究主要集中在基因的表达特征以及基因的细胞定位上,研究的重点在基因参与C的同化和N的吸收关系中。直到最近,人们通过Array/Chip等技术分析逆境胁迫条件下基因的差异表达,发现IDH基因可以应答多种逆境胁迫,所以该基因可能在植物抗逆应答中起重要的作用。基于此,我们从玉米中克隆了一个IDH基因,并对其表达特征进行了初步的研究。

材料与方法

1 植物材料与处理

玉米(*Zea mays* L.)抗旱自交系CN165播种于张家口市农科院大田中,分别取大田生长5~6片叶子时玉米的叶片、茎和根,花期玉米的花丝以及授粉10 d后的胚,供提取不同组织的RNA。同时剪取幼叶以提取基因组DNA。

胁迫处理需要的玉米种子播种于营养土和蛭石(1:3)配置成的基质中,种植在人工培养箱中,将在人工培养箱中生长10 d的玉米幼苗,用蒸馏水冲洗根部,分别进行ABA (100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、PEG (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和NaCl (250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)胁迫处理。取处理0、1、3、6、12、24和48 h的整株幼苗,供提取RNA和酶液用。

2 *ZmIDH2*基因的获得

根据玉米中一个受干旱胁迫诱导表达的EST (448 bp)序列,将该EST在GenBank中进行Blastx比对,获得玉米NADP⁺依赖的异柠檬酸脱氢酶基因(NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase2, *ZmIDH2*),信息学查询表明该基因目前没有研究。利用DNASTar软件分析该序列,设计扩增*ZmIDH2*序列全长的引物,正向:5'-GTCATCTTCTCCTCCTCAGA-3',反向:5'-GGTGACGAAGCAT-TCAAAGTA-3',以玉米幼苗cDNA为模版,获得异柠檬酸脱氢酶基因。扩增条件为94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 90 s, 40个循环;最后72 °C延伸10 min;重复3次。

3 *ZmIDH2*基因的表达分析

取不同材料及不同处理的总RNA进行*ZmIDH2*基因的表达分析。利用M-MLV (Invitrogen)反转录合成第一链cDNA。取1 μg 总RNA按说明书

操作进行反转录,将反转录产物稀释0、5、10、20倍不同的梯度,摸索较好的模板上样浓度,进行半定量PCR分析。基因表达分析所用的引物分别为,扩增*ZmIDH2*正向引物:5'-ACGGAATGACGGTAACCG-3',反向引物:5'-CTCCTTCACTACGACTGCTG-3';平行扩增玉米Actin基因做内参,正向引物:GCATCACACCTTCTACAACGA,反向引物:CAGCCTGGATAGCAACATACAT。PCR反应条件为:94 °C 3 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 28个循环;最后72 °C延伸5 min。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离检测。

4 序列分析及聚类图的构建

序列分析采用DNASTar软件(<http://www1dnastar1.com/>);利用NCBI以及Maizesequence数据库对基因进行比对分析;蛋白的结构分析利用在线软件预测(http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/d3_geno3d2.pl),利用Clustal W软件对来源于不同植物的异柠檬酸脱氢酶基因进行序列比对和聚类分析(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)。GenScan软件分析基因组的内含子和外显子(<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)。

5 *ZmIDH2*酶液的提取和活力的测定

取1 g叶片置于4 °C冰浴的研钵中研磨,材料提取液按1:4添加,提取缓冲液为50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ HEPES-NaOH缓冲液(pH 7.5) [包括5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA-Na₂、10% (V/V)甘油、0.1% (V/V) TritonX-100和2% (W/V) PVP-10]。在4 °C、12 000×g下离心5 min,去沉淀,上清为酶提取液,备用。

IDH2活性测定按Murakami等(2006)的方法,反应体系含有20 mmol MOPS (pH 7.4)、2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -NAD⁺、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO₄、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl₂、0.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ AMP及25%体积的酶粗提液。在终体积为3 mL的反应介质(Tris-HCl 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0)中加入0.3 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ DTT、5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂、1.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NADP、7.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异柠檬酸三钠和酶。

实验结果

1 *ZmIDH2*基因全长的克隆和DNA序列分析

前期我们构建了干旱条件下玉米花期的差减文库,其中的一个EST (545 bp)是受干旱胁迫诱导

表达的, 将该EST在GenBank中进行Blastx比对, 发现其与水稻的细胞质异柠檬酸脱氢酶基因(登录号AF155334)有较高的相似性, 同时该EST和玉米的一段EST序列有99%的相似性(登录号ACF82986.1), 软件分析表明登录号为ACF82986.1的序列是代表一个基因全长的cDNA, 其编码产物为玉米细胞质异柠檬酸脱氢酶基因, 目前还没有对该序列深入研究的报导。基于此序列, 我们设计引物扩增, 获得玉米异柠檬酸脱氢酶基因, 命名为*ZmIDH2*。*ZmIDH2*基因全长1 643 bp, 编码412个氨基酸。

根据所得的*ZmIDH2*基因序列设计引物, 扩增了玉米*ZmIDH2*基因组DNA, 结果表明玉米的*IDH2*基因组DNA全长3 463 bp, 有11个内含子和12个外显子。12个外显子的氨基酸大小分别为18、37、12、29、21、34、31、34、44、43、88和21个氨基酸。可以看到, 该基因的内含子和外显子数量很多, 而且外显子的长度都较短, 其中倒数第2个外显子最长, 为88个氨基酸(图1)。目前对植物中*IDH2*基因组结构的研究报导不多, 仅拟南芥中有3个*IDH2* (At1g65930、At1g54340及At5g14590)的基因组结构有报导, 3条编码*IDH2*的基因均为保守的15个外显子/14个内含子的结构。

2 *ZmIDH2*的同源比对和进化树

将获得的*ZmIDH2*在NCBI数据库中进行同源比对, 表明其属于异柠檬酸脱氢酶家族(图2)。*ZmIDH2*蛋白和水稻的异柠檬酸脱氢酶(EAY99113.1)相似性非常高, 达到96%, 和谷子的异柠檬酸脱氢酶(XP_004961158)相似性达到97% (图3), 同时和其他植物如拟南芥的NADP-IDH2 (NP176768)相似性达到86%, 和杨树的NADP-IDH2 (ABA18651)



图1 *ZmIDH2*的基因组DNA结构

Fig.1 The genomic structure of *ZmIDH2*

细线代表内含子, 黑框代表外显子。



图2 *ZmIDH2*在NCBI数据库中查询显示其属于异柠檬酸脱氢酶家族

Fig.2 Search on NCBI showed *ZmIDH2* belong to cytosolic NADP⁺ dependent isocitrate dehydrogenase family

的相似性达到87%。比对结果表明不同物种*IDH2*的相似性很高, 这也表明该基因在进化中是非常保守的, 应该在维持生物的功能中发挥重要作用。

获得的*ZmIDH2*在GenBank上进行查询, 获取近100个不同植物的*IDH2*序列, 选取其中的38个有代表性的序列, 利用Clustal W软件进行进化树分析(图4)。结果表明植物中的*IDH2*的分类主要根据物种和同工酶的种类来分类, 其中多数胞质*IDH2*聚在一起, 而线粒体*IDH2*聚在一起, 相同类型的*IDH2*主要按物种的亲源关系来聚类。玉米中的*ZmIDH2*和水稻的*OsIDH2*关系最近, 聚为一类, 和小麦、谷子等胞质的*IDH2*距离很近。*IDH2*在进化上是高度保守的, 王鹏等(2009)曾对不同物种的*IDH*进行聚类分析, 结果表明, 利用来自不同物种的*IDH*可以将植物、动物和微生物分别聚为一类。

将获得的*ZmIDH2*进行蛋白结构预测, 预测结果和细菌的*IDH2*相近, *ZmIDH2*由2个亚基组成, 它们通过一个铰链区相连, 每个亚基间都有多个结构域。和大多数异柠檬酸脱氢酶一样, 玉米的*ZmIDH2*有2个结构域, 其中一个结构域靠近C端, 有14个 α 螺旋和5个 β 折叠组成, 形成富含螺旋的区域, 另一个结构域靠近N端, 含有16个 β 折叠和13个 α 螺旋, 在2个结构域中间是空隙, 该空隙有助于2个*IDH*形成异聚体, 同时有利于Mn等二价离子的结合来发挥作用(图5)。

3 *ZmIDH2*基因的表达特征

提取玉米根、茎、叶、花丝、胚等不同组织的RNA, 进行半定量RT-PCR。从检测的结果可以看到*ZmIDH2*在玉米的不同组织部位和不同发育时期都有表达。但是基因在根和胚中的表达量最高, 在茎、叶组织中表达量较低(图6)。因为N的吸收主要在根中, C的同化主要发生在胚等生殖器官, 所以*IDH2*的表达量变化也许受代谢调节, 与基因的功能作用相一致。

因为最初我们是从玉米干旱胁迫文库中获得

MA STKIKVANP IVEMD DQSDPSPIFPSLHGSATS DEMTRV	40
MA FNKIKVANP VVEMD.....GDEMTRI	23
MA FNKIKVANP VVEMD.....GDEMTRI	23
ma kikvanp vemd demtr	
FWKSIKDKLIFPFL LDIKYFDLGLPYR DQ TDDKVTVEAA	80
FWKSIKDKLIFPFLLDIKYFDLGLPHRDATDDKVTVEAA	63
FWKSIKDKLIFPFLLDIKYFDLGLPHRDATDDKVTVEAA	63
fwksikdklifpfl ldikyfdlglp rd tddkvtveaa	
EATLKYNVAIKCATITPDEARVKEFSLKSMWKS PNGTIRN	120
EATLKYNVAIKCATITPDEARVKEFSLKAMWKS PNGTIRN	103
EATLKYNVAIKCATITPDEARVKEFSLKAMWKS PNGTIRN	103
eatlkyuvaikcatitpdearvkefslk mwks pngtirn	
ILNGTVFREPIICKNIPRLVPGWTKPICIGRHAF GDQYRA	160
ILNGTVFREPIICKNIPRLVPGWTKPICIGRHAF GDQYRA	143
ILNGTVFREPIICKNIPRLVPGWTKPICIGRHAF GDQYRA	143
ilngtvfrepiickniprlvpgwtkpicigrhaf gdqyra	
TDAVIKGGPKLKL VYEGKDEE IELEVNF TGAGGVA QSMY	200
TDAVIKGGPKLKL VYEGKEE QVELEVNF TGSGGVAL AMY	183
TDAVIKGGPKLKL VYEGKEE QVELEVNF TGSGGVAL AMY	183
tdavikgpgkklklyvegk e elev nftg ggva my	
NTDESI RSFAEAS MATAYEK KWPLYL STKNTILK KYDGRF	240
NTDESI HAF AEAS MATAYEK KWPLYLSTKNTILK KYDGRF	223
NTDESI HAF AEAS MATAYEK KWPLYLSTKNTILK KYDGRF	223
ntdesi faeasmatayekkwplylstkntilkk ydgrf	
KDIFQEVYEA GWKSK FEAAGI WYEHRL IDDMVAYAL KSEG	280
KDIFQEVYEA GWKSK FEAAGI WYEHRL IDDMVAYAL KSEG	263
KDIFQEVYEA GWKSK FEAAGI WYEHRL IDDMVAYAL KSEG	263
kdifqevyea wkskfeaagiwyehrliddmvayal kseg	
GYVWACKNYDGDVQSD FLAQQ F GS LG LMTSV LVC PDGKTI	320
GYVWACKNYDGDVQSD FLAQQ F GS LG LMTSV LVC PDGKTI	303
GYVWACKNYDGDVQSD FLAQQ F GS LG LMTSV LVC PDGKTI	303
gyvwacknydgdvqsdf laqq f gs lg lmtsv lvc pdgkti	
EAEAAHGTVTRHYR VH QK GETSTNS IASIFAWTR GLAHR	360
EAEAAHGTVTRHYR VH QK GETSTNS IASIFAWTR GLAHR	343
EAEAAHGTVTRHYR VH QK GETSTNS IASIFAWTR GLAHR	343
eaeaahtvtvtrhyrv qk getstns iasifawtr glahr	
AKLDDNARLLD FTQK LEAACIGAVES GKMTKDL LALLV HGS	400
AKLDDNARLLD FTQK LEAACIGAVES GKMTKDL LALLV HGS	383
AKLDDNARLLD FTQK LEAACIGAVES GKMTKDL LALLV HGS	383
aklldnarll dftqk leaacigaves gkmtkdl all vhgs	
SNVTRSHYLN TEEF IDA VADEL RSRLAAN..	429
SNVTRSHYLN TEEF IDA VADEL RSRLAAN SN	414
SNVTRSHYLN TEEF IDA VADEL RSRLAAN SN	414
snvtrshyln teef idavadelrsrlaan	

图3 玉米ZmIDH2和其他作物IDH2蛋白的比对分析

Fig.3 Alignment of ZmIDH2 and other protein in amino sequences

比对分析选用的蛋白(自上而下)分别为水稻的蛋白(EAY99113.1)、谷子的蛋白(XP_004961158)和玉米的ZmIDH2, 蛋白的一致性列在比对结果的最下面。

的一段序列, 因此我们研究了该基因在不同逆境条件下的诱导表达情况。提取不同处理(NaCl、PEG和ABA)玉米幼苗RNA, 对ZmIDH2基因的转录本进行分析。经过半定量PCR, 初步检测基因的表达变化。图7可见基因表达的基本趋势, 即ZmIDH2为干旱和盐胁迫诱导表达(图7), 其中受盐

诱导表达明显, 在诱导初期基因的表达量就提高至对照的近5倍, 当处理12 h时表达量达到了最高; 对于干旱处理基因也是快速应答的, 处理1 h基因的表达量就迅速提高, 大约3 h达到了最高; 从半定量PCR的结果可见, 基因的表达并不受ABA诱导。

我们从转录水平检测基因的表达特性, 那么

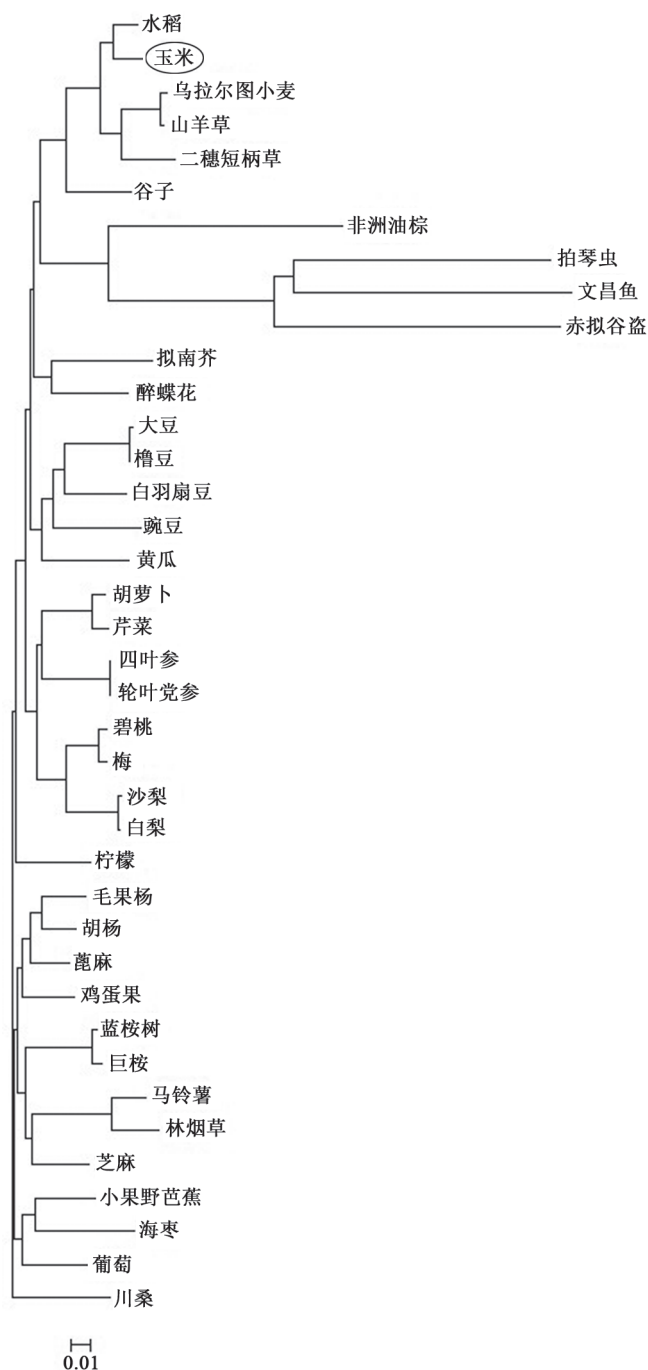


图4 ZmIDH2基因的进化树分析

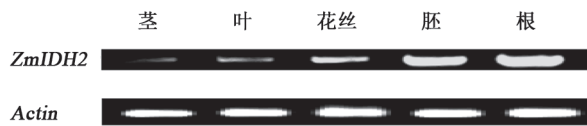
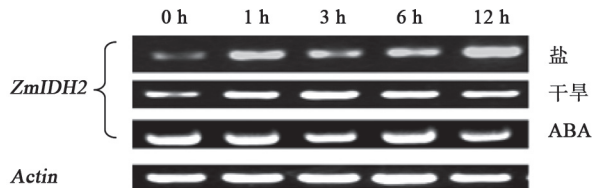
Fig.4 Phylogenetic tree for ZmIDH2

各物种中文和拉丁学名: 水稻 *Oryza sativa*; 玉米 *Zea mays*; 乌拉尔图小麦 *Triticum urartu*; 山羊草 *Aegilops tauschii*; 二穗短柄草 *Brachypodium distachyon*; 谷子 *Setaria italica*; 非洲油棕 *Elaeis guineensis*; 拍琴虫 *Perkinsus marinus*; 文昌鱼 *Branchiostoma lanceolatum*; 赤拟谷盗 *Tribolium castaneum*; 拟南芥 *Arabidopsis thaliana*; 醉蝶花 *Tarenaya hassleriana*; 大豆 *Glycine max*; 槽豆 *Glycine max*; 白羽扇豆 *Lupinus albus*; 豌豆 *Pisum sativum*; 黄瓜 *Cucumis sativus*; 胡萝卜 *Daucus carota*; 芹菜 *Apium graveolens*; 四叶参 *Codonopsis lanceolata*; 轮叶党参 *Codonopsis lanceolata*; 碧桃 *Prunus persica*; 梅 *Prunus mume*; 沙梨 *Pyrus pyrifolia*; 白梨 *Pyrus bretschneideri*; 柠檬 *Citrus limon*; 毛果杨 *Populus trichocarpa*; 胡杨 *Populus euphratica*; 蓖麻 *Ricinus communis*; 鸡蛋果 *Passiflora edulis* f. *flavicarpa*; 蓝桉树 *Eucalyptus globulus*; 巨桉 *Eucalyptus grandis*; 马铃薯 *Solanum tuberosum*; 林烟草 *Nicotiana glauca*; 芝麻 *Sesamum indicum*; 小果野芭蕉 *Musa acuminata*; 海枣 *Phoenix dactylifera*; 葡萄 *Vitis vinifera*; 川桑 *Morus notabilis*。

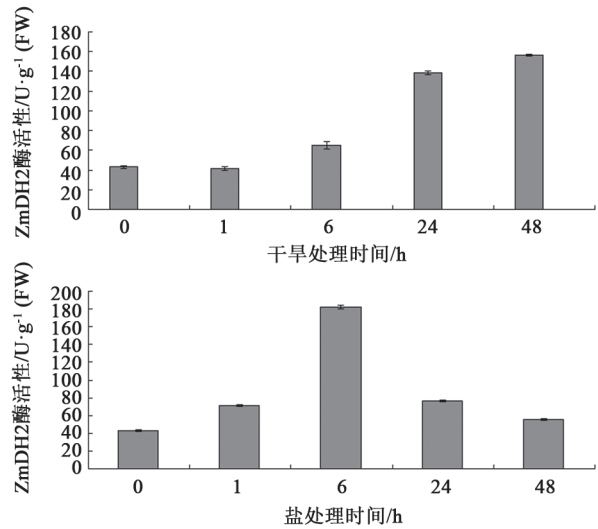


图5 ZmIDH2的空间立体结构图

Fig.5 Stereo drawing of the conformational structure of ZmIDH

图6 ZmIDH2基因在玉米不同部位的表达情况
Fig.6 Relative expression of maize *IDH2* in different maize organs图7 ZmIDH2基因受盐、干旱和ABA胁迫诱导表达
Fig.7 Salt, drought and ABA stress response expression of *ZmIDH2* transcripts

是否胁迫处理会影响IDH2酶的活性变化? 因此提取了不同处理玉米幼苗的酶液, 观察异柠檬酸脱氢酶活性的变化(图8)。研究结果表明, IDH2酶活性也受胁迫诱导表达, 在干旱处理约6 h时检测到酶活性的提高, 在处理48 h时酶的表达量达到最高值。盐胁迫下酶的表达量在6 h就达到最高, 为对照的近4倍。虽然不同胁迫处理IDH2酶的活性变化不同, 但是总的变化趋势一致, 即IDH2酶是受胁迫诱导, 而且在胁迫诱导的条件下酶活性大幅度提高。

图8 ZmIDH2在干旱和盐胁迫条件下酶活性的变化
Fig.8 The IDH2 enzyme activities levels were determined under drought and salt stresses

讨 论

依据细胞内的定位, 植物IDH存在4种形式的同工酶, 包括细胞质IDH (cytIDH)、线粒体IDH (mitIDH)、叶绿体IDH (chlIDH)和过氧化物酶体IDH (perIDH) (Park和Kahn 1999; Udvardi等1993; Hanschmann等2013)。我们获得是细胞质IDH。通过GenBank的同源查询, 结果表明*ZmIDH2*和水稻、拟南芥等细胞质的IDH2基因相似性最高。进化树分析也表明, *ZmIDH2*的聚类首先和植物的细胞质IDH2聚在一起, 然后再和亲缘关系近的物种聚为一类。

在烟草、苜蓿、马铃薯、蚕豆等植物的各个组织部位可以检测到IDH2的活性。我们的实验结果也表明, 玉米中的IDH2是组成型表达, *ZmIDH2*的转录本可以在玉米的根、茎、叶、花丝以及胚中检测到, 但是在根和胚中的表达量要比其他部位高。这种表达特性和在烟草、蚕豆、苜蓿、豌豆以及其他植物中的结果一致(Chen等1988)。因为NADP-IDH存在于细胞质, 在TCA循环中可以产生2-OG, 而2-OG是联系C和N循环的主要物质, 可以为植物的N代谢提供C骨架, 所以基因的表达特性可能是受代谢调节的, 这也许是该基因在根和胚中高效表达的原因。

IDH是产生NADPH的主要来源, IDH和生物

的活性氧产生密切相关, 在真核生物中IDH起重要的抗氧化胁迫作用(Gálvez等2005; Hernández等2001)。Jo等(2001)研究表明IDH在线粒体维持氧化还原平衡以及抗氧化中起主要的作用。Lee等(2010)的研究证明IDH在保护细胞抵御离子胁迫中也有重要的作用。在盐胁迫的条件下, IDH的活性在橄榄树的叶子中可以提高30%~50%。IDH受诱导表达不仅变现在转录本提高上, 而且酶活性也会提高(Murakami等2006)。我们的研究表明*ZmIDH2*可以被高盐和PEG诱导表达, IDH2受诱导表达不仅在转录本上提高, 而且酶活性也提高, 因此保护细胞免受逆境因子的胁迫是IDH2的另一个重要的生物学功能。但是该基因如何应答逆境胁迫以及在抗逆中的作用还需要深入的研究, 我们已经将该基因转化到拟南芥中, 以进一步深入研究该基因的功能。

参考文献

- 王鹏, 赵军, 翟羽佳, 朱国萍(2009). 植物NADP⁺依赖型异柠檬酸脱氢酶的分子进化及功能研究进展. 生物学杂志, 26 (3): 45~48
- Chen R, Le Marechal P, Vidal J, Jacquot JP, Gadal P (1988). Purification and comparative properties of the cytosolic isocitrate dehydrogenases (NADP) from pea (*Pisum sativum*) roots and green leaves. Eur J Biol, 175: 565~572
- Fieuw S, Muller-Rober B, Gálvez S, Willmitzer L (1995). Cloning and expression analysis of the cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase from potato. Plant Physiol, 107: 905~913
- Gallardo F, Gálvez S, Gadal P, Cánovas FM (1995). Changes in NADP-linked isocitrate dehydrogenase during tomato fruit ripening. Planta, 196: 148~154
- Gálvez L, González EM, Arrese-Igor C (2005). Evidence for carbon flux shortage and strong carbon/nitrogen interactions in pea nodules at early stages of water stress. J Exp Bot, 56: 2551~2561
- Hanschmann EM, Godoy JR, Berndt C, Hudemann C, Lillig CH (2013). Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins—molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. Antioxid Redox Sign, 19: 1539~1604
- Hernández JA, Ferrer MA, Jimenez A, Barcelo AR, Sevilla F (2001). Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. Plant Physiol, 127: 817~831
- Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Song IH, Kim YO, Lee YS, Jeong KS, Kim WB, Park JW et al (2001). Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. J Biol Chem, 276: 16168~16176
- Lee SH, Ha SO, Koh HJ, Kim K, Jeon SM, Choi MS, Kwon OS, Huh TL (2010). Upregulation of cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase by hyperglycemia protects renal cells against oxidative stress. Mol Cells, 29: 203~208
- Marino D, González EM, Frendo P, Puppo A, Arrese-Igor C (2007). NADPH recycling systems in oxidative stressed pea nodules: a key role for the NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase. Planta, 225: 413~421
- Murakami K, Tsubouchi R, Fukayama M, Ogawa T, Yoshino M (2006). Oxidative inactivation of reduced NADP-generating enzymes in *E. coli*: iron-dependent inactivation with affinity cleavage of NADP-isocitrate dehydrogenase. Arch Microbiol, 186: 385~392
- Park KS, Kahn ML (1999). Distribution of two isoforms of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase in soybean (*Glycine max*). Plant Mol Biol, 40: 13~21
- Udvardi MK, McDermott TR, Kahn ML (1993). Isolation and characterization of a cDNA encoding NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase from soybean (*Glycine max*). Plant Mol Biol, 21: 739~752
- Yasutake Y, Watanabe S, Yao M, Takada Y, Fukunaga N, Tanaka I (2003). Crystal structure of the monomeric isocitrate dehydrogenase in the presence of NADP⁺. J Biol Chem, 38: 36897~36904