

牡丹丙酮酸脱氢酶基因*PsPDH*的克隆和表达特性分析

杨丽金*, 甘甜*, 盖树鹏, 刘春英, 张玉喜**

青岛农业大学生命科学学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 山东青岛266109

摘要: 根据454测序得到的丙酮酸脱氢酶基因*PDH*的部分cDNA片段设计引物, 运用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术扩增得到牡丹(*Paeonia suffruticosa*) *PDH*基因的全长cDNA, 命名为*PsPDH*。*PsPDH* cDNA序列全长为1 313 bp, 包括132 bp的5'非编码区、173 bp的3'非编码区和1 008 bp的编码区, 共编码335个氨基酸, 其分子量为35.844 kDa。推测的氨基酸序列包括17个可能的磷酸化位点, 其中包括12个Ser位点, 这可能与活性位点的调节有关。亚细胞定位预测该蛋白位于线粒体基质中。同源性比对表明, *PsPDH*与葡萄(*Vitis vinifera*) *VvPDH*同源性最高, 与拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtPDH*的相似性最低。实时定量PCR (quantitative real-time PCR)结果表明*PsPDH*基因在初花期叶片、根和心皮中表达水平较高, 在人工低温处理14 d的牡丹花芽中表达水平最高, *PDH*的酶活力变化趋势与该基因表达趋势一致, 可见, *PsPDH*基因的活化可能是促进花芽休眠解除的原因。本研究为深入解析休眠解除中呼吸代谢的调控提供参考。

关键词: *PsPDH*; 克隆; 生物信息学分析; 表达模式; 酶活力

丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, *PDH*)是*PDH*复合体(*PDH complexes*, *PDHc*)的重要组成部分, 主要在线粒体基质中发挥作用。*PDHc*在线粒体呼吸链能量代谢中起重要作用, 它催化丙酮酸不可逆氧化脱羧生成乙酰辅酶A, 将糖酵解、三羧酸循环和氧化磷酸化反应联系起来, 而*PDH*控制其中第一步反应, 即丙酮酸脱羧反应。*PDHc*缺陷可能引起呼吸代谢障碍, 因此在农业中有重要的应用价值(崔玉娟和刘晓晴2007)。

牡丹(*Paeonia suffruticosa*)为多年生落叶灌木, 观赏价值高, 被誉为“花中之王”。春节催花是牡丹产业的重要组成部分, 单菏泽地区就年创产值1亿元以上(<http://www.hezespring.com/>)。内休眠是牡丹春节催花的主要限制, 足够低温可彻底解除休眠, 保证其正常的开花展叶(Huang等2008)。牡丹花芽的休眠解除过程中必然伴随着能量代谢(Gai等2013), 而*PDHc*在能量代谢中起着极其重要的调控作用, 可能会影响一系列能量代谢和休眠解除相关基因的表达。*PDH*基因在动物上的研究较多(Kiilerich等2010), 在植物如杨树(*Populus trichocarpa*) (Tuskan等2006)、葡萄(*Vitis vinifera*) (Martínez-Esteso等2013)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) (LeClere等2004)中已经被克隆, 在牡丹中的研究未见报道。

课题组前期通过转录组和表达谱分析, 发现*PsPDH*片段在低温解除休眠中差异表达(Gai等2012, 2013)。本研究利用cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNA ends, RACE)技术扩增

*PsPDH*基因的全长cDNA, 同时分析其在初花期不同组织和人工低温解除休眠进程中的表达模式和酶活力, 以期为进一步研究*PsPDH*基因的功能和调节机制提供参考。

材料与方法

1 总RNA提取与cDNA合成

以2013年4月份健壮生长的牡丹(*Paeonia suffruticosa* Andr.)品种‘鲁菏红’为材料, 取初花期的牡丹根、茎、叶、花瓣、萼片、雄蕊和心皮, 立即投入液氮中, 用于组织表达分析。RNA提取采用RNApure Plant Kit (康为世纪), 去DNA采用DNase I (TaKaRa), -80°C 保存。RACE-ready cDNA第一链合成按照SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)步骤进行。

2013年11月中旬, 根据Huang等(2008)的取材方法, 待日最低气温达到 10°C , 以此时低温条件下处理0 d作为对照组, 其余‘鲁菏红’材料转移至 4°C 条件的冷库中进行人工低温处理, 之后每隔7 d将植株转入温室并立刻取花芽, 剥去鳞片后, 液氮中速冻, -80°C 条件下保存备用。共5个低温的处理时间(0、7、14、21和28 d), 样品分别进行RNA提取, -80°C 保存。每个处理3个生物学重复, 每重复至少3个花芽或组织。

收稿 2016-06-07 修定 2016-07-25

资助 国家自然科学基金(31471908和31372104)。

* 并列第一作者。

** 通讯作者(E-mail: zhang-yuxi@163.com)。

2 引物设计与RACE扩增

根据转录组中*PDH*的部分表达序列标签(expressed sequence tags, ESTs)序列(Gai等2012)设计基因特异性引物PsPDHGSP5' (5'-GGTATTCACCAACCTCTTCACCCATC-3')和PsPDHGSP3' (5'-GAGGCTGGCTTTACAGGGATTGGTG-3'), 分别用于5'和3'RACE扩增。扩增时, PsPDHGSP5'和PsPDHGSP3'分别与SMART RACE cDNA Amplification Kit自带引物UPM (5'-CTAATACGACTCATATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCA-GAGT-3')配对使用。50 μ L PCR反应体系为: 10 \times BD Advantage PCR buffer 5 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP mix 1 μ L, 50 \times Advantage 2 Polymerase mix 1 μ L, RACE-ready cDNA (5'或3'端) 2.5 μ L, UPM 5 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹ PsPDHGSP5' (或PsPDHGSP3') 1 μ L, 无菌水34.5 μ L。RACE PCR反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 共5个循环; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 共30个循环。

3 实时定量PCR

根据扩增获得的全长cDNA序列中的非保守区, 设计引物PsPDHrealF (5'-AGTATGGTCCTGAGCGGGTTG-3')和PsPDHrealR (5'-GATCAGG-GTCTCTTATAGCAGC-3')用于实时定量PCR。实时定量PCR反应采用SYBR Premix Ex Taq试剂盒(TaKaRa)进行, 在Mx3000P实时荧光定量PCR仪(Agilent)上运行。PCR反应体系为: 2 \times SYBR Premix Dimer Eraser 10 μ L, 10 μ mol \cdot L⁻¹上下游引物各0.75 μ L, cDNA模板2 μ L, ddH₂O补齐至20 μ L, 每个样品3次重复。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共45个循环。采用*actin*为内参(张玉喜等2011), 数据分析采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法(Livak和Schmittgen 2001)。

4 RACE扩增产物测序与生物信息学分析

RACE产物用快速琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(康为世纪)纯化, 插入pGEM-T Easy载体(Promega), 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5 α , 经酶切鉴定的阳性克隆由上海桑尼生物技术有限公司测序。测序结果用DNAMAN 6.0软件拼接和序列分析, 保守结构域利用NCBI在线软件Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)进行预测; 在线软件ExpASy ([\[www.expasy.org/protparam/\]\(http://www.expasy.org/protparam/\)\)、PSORT \(<http://www.genscript.com/psort.html>\)和NetPhos 2.0 \(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos-2.0/>\)分别用于预测理化性质、亚细胞定位和磷酸化位点; 应用ClustalW进行多序列比对, 利用MEGA 5.2软件构建系统进化树, 通过邻接\(neighbor-joining\)法中的自举分析作置信度检验\(bootstrap=1 000\)。](http://</p>
</div>
<div data-bbox=)

5 PDH的酶活力测定

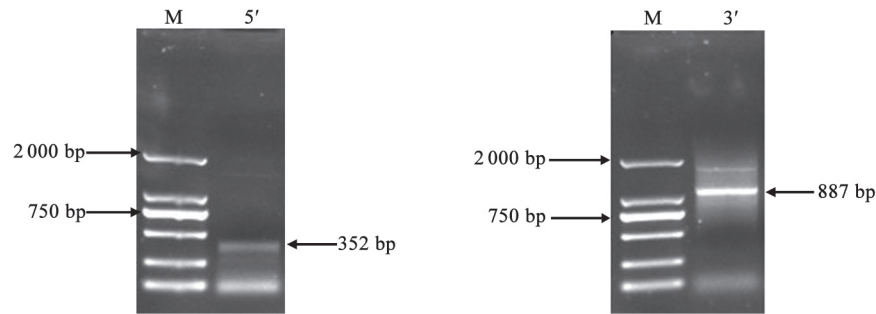
将花芽按1 g \cdot mL⁻¹加入预冷的匀浆缓冲液A {0.4 mol \cdot L⁻¹甘露醇、25 mmol \cdot L⁻¹ 3-吗啉丙磺酸[3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, MOPS]、1 mmol \cdot L⁻¹ 乙二醇双(2-氨基乙基醚)四乙酸[ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, EGTA]、8 mmol \cdot L⁻¹ 半胱氨酸、0.1% (*m/V*)牛血清白蛋白, pH 7.8}进行匀浆, 匀浆液离心力达到4 000 \times g停止, 上清液12 000 \times g离心15 min, 取沉淀。线粒体沉淀以20 mg \cdot mL⁻¹浓度重悬在匀浆缓冲液B [0.4 mol \cdot L⁻¹甘露醇、10 mmol \cdot L⁻¹ *N*-三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)、1 mmol \cdot L⁻¹ EGTA, pH7.2]中, 线粒体超声波(强度40%, 超声10 s, 停20 s)破碎40 min制备酶液(破碎均在冰浴中进行), 之后10 000 \times g离心30 min, 上清液用于酶的活力测定(Balk等1999)。

PDH活力测定采用二氯酚靛酚钠(2,6-dichlorophenolindophenol sodium salt, DCPIP)法(Nemeria等2001), 反应液含有: 1 mL上清液、50 mmol \cdot L⁻¹ KH₂PO₄、1 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂、2.0 mmol \cdot L⁻¹ 丙酮酸钠、0.2 mmol \cdot L⁻¹ 焦磷酸硫胺素(thiamine pyrophosphate chloride, TPP)、0.1 mmol \cdot L⁻¹ DCPIP, pH 7.0; 在600 nm处测定吸光值。在上述条件下, 以每分钟每毫克蛋白在波长600 nm处引起吸光值变化0.001为1个酶活力单位(U)。

实验结果

1 RACE扩增及序列拼接

根据454测序得到的*PDH*的部分EST序列设计基因特异性引物PsPDHGSP5'和PsPDHGSP3'分别进行5'和3'RACE扩增, 结果如图1所示。5'RACE PCR产物为352 bp, 3'RACE产物为887 bp。测序后经DNAMAN 6.0软件进行序列拼接, 得到1 313 bp *PDH*基因全长cDNA (图2), 其中包括132 bp的5'

图1 *PsPDH* 5'和3'RACE扩增的电泳图Fig.1 Electrophoresis results of *PsPDH* RACE PCR

M: DL 2000 Maker; 5': 5'RACE扩增产物; 3': 3'RACE扩增产物。

非编码区(untranslated region, UTR), 173 bp的3'UTR; 完整的开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为1 008 bp, 编码335个氨基酸(GenBank登记号KP168711)。利用Conserved Domains软件对

*PsPDH*保守结构域进行分析, 从图2可知, 22~331 aa为PDH亚基的保守结构域, 其中47~172 aa为TPP的结合位点, 195~316 aa是酮基转移酶C的结构域。

```

1      TGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGCTTCGGCAAGTCCCTGGCCACCTTCCCGATTCCCGGCCGCTTTTCT
76     ATTCGCAAAATCGATCAGCCTTCAAGCTTACAAAGCTGGTGATTCCAACCTAGAAAATATGTGGGGGATTATAAGG
1      M W G I I R
151    CGAAAAGTCAGCTTAGGATGCTCTCCTGCTTCGATAGTGGAGCAGTCTTACAGAGGATTCCGCCGTGGTAAAT
7      R K V S L G C S P A S I V E Q S L Q R I R P V V N
226    GCTTCTAGGAGTACTCCTCTTCAGCAAAAGAGATGATGGTGCGGGATGCTTTAAATCTGCACCTGATGAAGAA
32     A S R S Y S S S A K E M M V R D A L N S A L D E E
301    ATGCTGCAGATCCTAAAGTGTCTTGATGGGTGAAGAGGTTGGTGAATACCAGGGAGCATAAAGGTTTCCAAA
57     M S A D P K V F L M G E E V G E Y Q G A Y K V S K
376    GGGCTTTTGGATAAGTATGGTCTGAGCGGGTTGTGATACTCCAATCAGGAGGCTGGCTTACAGGGATTGGT
82     G L L D K Y G P E R V V D T P I T E A G F T G I G
451    GTATCTGTACCAATGTTTTTGGGGACCAATGGTGCAGCTGCTGGAGTTGGTGTCAACATCCCAAGTGTAT
107    V S V P I V F R G P N G A A A G V G A Q H S Q C Y
526    GCAGCATGGTATGGTTCATGTCCTGGTTGAAGTACTAGCTCCGTACTCATCAGAAGATGCCCGAGGCCTGCTT
132    A A W Y G S C P G L K V L A P Y S S E D A R G L L
601    AAAGCTGCTATAAGAGACCCGTATCCCGTTATTTTCTTGAATAATGAATGTATATGGCGAGTCTTCCCAAGT
157    K A A I R D P D P V I F L E N E L L Y G E S F P V
676    TCAGCAGCAGTTCGATTCCAGTTTCTCCCTTCCAATAGGAAAAGCAAAGATAGAACGAGAAGGAAAGGATGTG
182    S A A V L D S S F S L P I G K A K I E R E G K D V
751    ACCATTACTGCTTTTCAAGATGGTTGGTTATGCTCTTCGGGCTGCGGAGATTCTTGCAAAGGAGGAATAGC
207    T I T A F S K M V G Y A L R A A E I L A K G G I S
826    GCTGAGGTTGTAATCTGCGCTCGATCCGTCCTTGTATAGAGGAACGATTAATGCCTCTGTTAAGAAAATAAC
232    A E V V N L R S I R P L D R G T I N A S V K K T N
901    AGGCTTGTGACTGTTGAAGAAGGATTCCCTCAACATGGTGTGCGGTGCTGAGATTGTGCATGTGTGTTGAGGAG
257    R L V T V E E G F P Q H G V G A E I C A C V V E E
976    AACTTCGAGTATCTGGATGCACCAAGTTGAGAGGATTGCGGGAGCTGATGTTCCCTATGCCTTATGCTGCTAATCTT
282    N F E Y L D A P V E R I A G A D V P M P Y A A N L
1051   GAGAGGTTGGCTGTCCACAGGTTGAGGATATTGTTCTGCTGCAAAGCGGAGTTGCTATAGATCAGTTCCTAAG
307    E R L A V P Q V E D I V R A A K R S C Y R S V P K
1126   GCTGCAGCTGCTTAGCATGATATGTTTCGATCCATATCAAACCTTTCTTAGTTGAAAATTCGTGTTATGTGGCA
332    A A A A *
1201   TGGTATGTTTTGATCCGATCAAACCTTTCTTAGTTGAAAATTCGTGTTTTTGTGGTGTGATAAATATGAAAAGT
1276   TATGGTATTCCTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAA

```

图2 *PsPDH*的全长cDNA序列与推导的氨基酸序列Fig.2 Full length of cDNA and putative amino acid sequences of *PsPDH*

起始密码子ATG和终止密码子TAG用加粗标识, poly(A)尾用斜体标识, 预测的磷酸化位点用加粗及下划线标识, PDH的保守结构域用阴影标识, TPP的结合位点用波浪线标识, 酮基转移酶C的结构域用虚线标识。

2.2 *PsPDH*蛋白理化性质分析

利用在线软件ExPASy软件进行理化性质分析, 推导的*PsPDH*蛋白分子式为 $C_{1587}H_{2545}N_{437}O_{480}S_{13}$, 其

分子量为35.844 kDa, 理论等电点(pI)为5.93; 不稳定系数为42.13, 推测其为不稳定蛋白(>40)。该蛋白中Ala和Val含量较多, His和Trp含量较少。高等

生物PDHc活性的调控主要取决于PDH活性与非活性状态的相互转变, 而状态之间的转变主要取决于磷酸化位点的状态。利用在线软件NetPhos 2.0预测*PsPDH*蛋白的磷酸化位点, 结果如图2所示, 共预测到17个可能的磷酸化位点, 其中包含12个Ser位点、2个Thr位点和3个Tyr位点。利用在线软件PSORT预测了*PsPDH*的亚细胞定位, 结果显示, 该蛋白定位在线粒体基质的预测值为0.481, 定位在线粒体内膜或膜间隙的预测值为0.189, 因此推测该蛋白主要存在于线粒体基质中, 这可能与丙酮酸脱氢酶系主要在线粒体中发挥功能相一致。

2.3 *PsPDH*同源性比较和系统进化树的构建

利用ClustalW方法将*PsPDH*的氨基酸序列与其他已知植物的PDH氨基酸序列进行多序列比对, 结果表明, *PsPDH*与比对植物的PDH相似性在16.5%~87.7%之间, 其中与葡萄的相似性最高, 为87.7%; 与杨树和柑橘(*Citrus × sinensis*)的相似性次之, 分别为87.2%和86.2%; 与拟南芥的相似性最低, 为16.5%。利用MEGA 5.2软件构建系统进化树(图3), 结果表明*PsPDH*先与葡萄VvPDH和杨树PtPDH形成分支, 再与柑橘等聚在一起, 最后与拟南芥形成分支, 结果与同源性比对结果一致, 也基

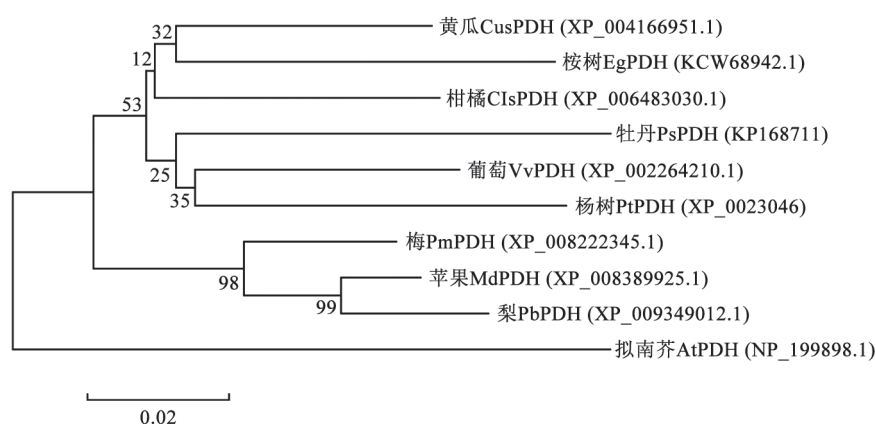


图3 牡丹*PsPDH*蛋白与其他植物PDH蛋白的系统进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of PDH protein homolog sequences from tree peony and other plants

标尺0.02代表每100个核苷酸/氨基酸中有2个不同。

本与植物学上的传统分类关系相一致。

2.4 *PsPDH*的表达分析

2.4.1 *PsPDH*在初花期牡丹不同组织中的表达模式

实时定量PCR分析了*PsPDH*在初花期牡丹的营养器官根、茎、叶及花器官萼片、花瓣、雄蕊和心皮中的表达模式(图4), 结果表明*PsPDH*基因在牡丹的7种不同组织中均有表达, 但表达量不同, 其中在叶片中转录水平最高, 其次为心皮、根和茎, 在花瓣和雄蕊中表达量相对较低, 在萼片中转录水平最低, 叶片中*PsPDH*的表达量约是萼片中的42.3倍。

2.4.2 *PsPDH*在低温处理牡丹花芽休眠解除进程中的表达模式

实时定量PCR分析*PsPDH*在低温处理0、7、14、21和28 d的牡丹花芽中的表达模式(图5), 结果

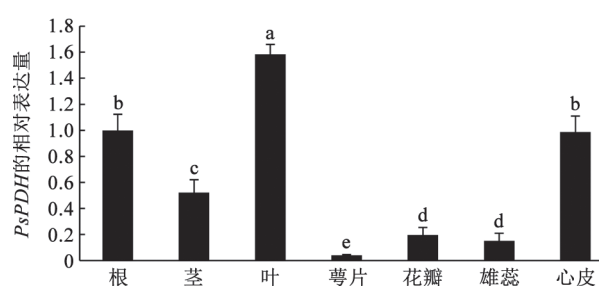


图4 *PsPDH*在初花期牡丹不同组织中的表达模式

Fig.4 The relative expression levels of *PsPDH*s in different tissues at the early stage of flowering

表明*PsPDH*基因在低温解除牡丹休眠进程中呈先上升后下降的表达趋势, 在牡丹14 d低温处理的花芽中转录水平最高, 之后逐渐下调, 到低温处理28 d时表达最低。

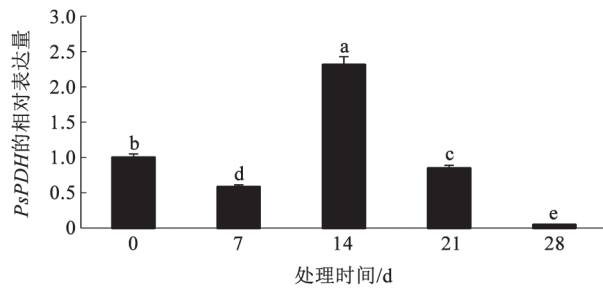


图5 *PsPDH*在不同时间低温处理的牡丹花芽中的表达模式
Fig.5 The relative expression levels of *PsPDHs* in flower buds after different chilling treatments

2.5 低温处理牡丹花芽休眠解除进程中PDH的活力测定

利用二氯酚靛酚钠法测定了休眠进程中PDH酶活力变化(图6)。结果表明PDH的酶活力在低温处理的牡丹休眠进程中呈先上升后下降的趋势,其中在低温处理14 d时酶活力最高,之后逐渐下降,到低温28 d时酶活力最低。PDH酶活力变化趋势与*PsPDH*基因表达规律一致。

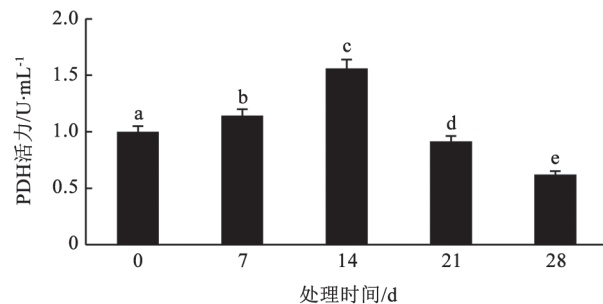


图6 不同时间低温处理的牡丹花芽中PDH的酶活力
Fig.6 *PsPDH* activities in flower buds after different chilling treatments

3 讨论

丙酮酸脱氢酶系是一种多酶复合体,由PDH、硫辛酸乙酰转移酶和硫辛酰胺脱氢酶组成(Wiskich和Dry 1985),其中PDH作为PDHc的重要组分对整个PDHc的反应活性起关键作用,它参与丙酮酸的氧化脱羧过程的第一步,是线粒体代谢与生长的调控枢纽,而PDH的功能发挥依赖于其序列基础、高级结构的形成和活性位点的调控(Patel等2014)。本研究获得了*PsPDH*基因的全长cDNA,编码的*PsPDH*蛋白22~331 aa为PDH的保守

结构域,属于典型的PDHc复合物中的E1亚基的典型结构(王更先等2010)。丙酮酸脱羧酶系上的PDH是磷酸化和去磷酸化的调节位点。哺乳动物中PDH上的3个Ser残基通过磷酸化和去磷酸化可以调节PDH的活性状态(Patel和Korotchkina 2001)。*PsPDH*蛋白具有12个Ser的磷酸化修饰位点,另外还有2个Thr和3个Tyr的磷酸化修饰位点,这些磷酸化修饰位点可能与其活性状态和非活性状态的调控相适应。亚细胞定位预测*PsPDH*蛋白主要定位于线粒体基质中,这是与其发挥功能相适应的。

在细胞代谢中,PDH是PDC的前件酶,参与生成柠檬酸循环的起始物乙酰辅酶A,决定着生物体内营养成分的分配。蒋蕊(2013)利用实时定量PCR技术显示*PDH*基因在花粉萌发期高度表达。本研究通过实时定量检测了*PsPDH*基因在牡丹初花期不同组织中的表达谱,结果表明该基因在所检测的组织中均有转录,但在根、叶和心皮中的转录水平较高,这与初花期生长状态和耗能状态相一致,心皮中的高表达可能与雌蕊后熟特性有关。

牡丹花芽休眠属于典型内休眠,低温累积是解除其休眠的有效措施。前期通过转录组和基因芯片分析发现一个类*PsPDH*片段在低温休眠解除前激活表达(Gai等2013)。本研究进一步克隆了其全长基因,证明了其编码PDH。实时定量PCR分析表明,14 d低温可明显促进*PsPDH*的表达,进而提高PDH的酶活力,与前文研究结果一致。14 d时‘鲁菏红’正处于休眠解除的临界状态,需要大量能量解除花芽休眠(Huang等2008),而PDH是连接能量代谢的闸门,此时表达水平和酶活升高,表明该基因能促进牡丹花芽休眠解除。当内休眠解除及随后生态休眠状态时,该基因表达水平和酶活迅速降低,进一步说明该基因表达反映了休眠解除中花芽的能量需求状况。因此,牡丹*PsPDH*基因的激活可能是休眠解除的重要原因,而其表达水平的下降标志着休眠彻底解除。本研究结果对深入理解牡丹休眠解除中的能量代谢以及牡丹反季节催花生产提供参考。

参考文献

- Balk J, Leaver CJ, McCabe PF (1999). Translocation of cytochrome c from the mitochondria to the cytosol occurs during heat-induced

- programmed cell death in cucumber plants. *FEBS Lett*, 463: 151–154
- Cui YJ, Liu XQ (2007). Development and application of pyruvate dehydrogenase complex. *J Northwest Norm Univ-Nat Sci*, 43 (6): 79–83 (in Chinese with English abstract) [崔玉娟, 刘晓晴 (2007). 丙酮酸脱氢酶复合体的研究进展及应用. 西北师范大学学报(自然科学版), 43 (6): 79–83]
- Gai S, Zhang Y, Liu C, Zhang Y, Zheng G (2013). Transcript profiling of *Paeonia ostii* during artificial chilling induced dormancy release identifies activation of GA pathway and carbohydrate metabolism. *PLoS ONE*, 8 (2): e55297
- Gai S, Zhang Y, Mu P, Liu C, Liu S, Dong L, Zheng G (2012). Transcriptome analysis of tree peony during chilling requirement fulfillment: assembling, annotation and markers discovering. *Gene*, 497: 256–262
- Huang X, Zhu W, Dai S, Gai S, Zheng G, Zheng C (2008). The involvement of mitochondrial phosphate transporter in accelerating bud dormancy release during chilling treatment of tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Planta*, 228: 545–552
- Jiang X (2013). Isolation and expression of genes in tea (*Camellia sinensis* (L.) O.Kuntze) pollen tube under cold stress (Master's thesis). Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese with English abstract) [蒋芯(2013). 低温胁迫下茶树花粉管相关基因的分离与表达分析(硕士论文). 南京: 南京农业大学]
- Kiilerich K, Gudmundsson M, Birk JB, Lundby C, Taudorf S, Plomgaard P, Saltin B, Pedersen PA, Wojtaszewski JFP, Pilegaard H (2010). Low muscle glycogen and elevated plasma free fatty acid modify but do not prevent exercise-induced PDH activation in human skeletal muscle. *Diabetes*, 59 (1): 26–32
- LeClere S, Rampey RA, Bartel B (2004). *IR4*, a gene required for auxin conjugate sensitivity in *Arabidopsis*, encodes a pyruvate dehydrogenase E1 α homolog. *Plant Physiology*, 135 (2): 989–999
- Livak J, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods*, 25 (4): 402–408
- Martínez-Esteso MJ, Vilella-Antón MT, Pedreño MÁ, Valero ML, Bru-Martínez R (2013). iTRAQ-based protein profiling provides insights into the central metabolism changes driving grape berry development and ripening. *BMC Plant Biol*, 13: 167
- Nemeria N, Yan Y, Zhang Z, Brown AM, Arjunan P, Furey W, Guest JR, Jordan F (2001). Inhibition of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex E1 subunit and its tyrosine 177 variants by thiamin 2-thiazolone and thiamin 2-thiothiazolone diphosphates. *J Biol Chem*, 276 (49): 45969–45978
- Patel M, Nemeria NS, Furey W, Jordan F (2014). The pyruvate dehydrogenase complexes: structure-based function and regulation. *J Biol Chem*, 289 (24): 16615–16623
- Patel MS, Korotchkina LG (2001). Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. *Exp Mol Med*, 33 (4): 191–197
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, et al (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313 (5793): 1596–1604
- Wang GX, Sima YH, Zhou YN, Ji MM, Xu SQ (2010). Molecular cloning, sequence structure and expression analysis of *Bm-l(1)* gene with pyruvate dehydrogenase function in the silkworm, *Bombyx mori*. *Sci Sericult*, 36 (5): 759–765 (in Chinese with English abstract) [王更先, 司马杨虎, 周嫣娜, 季明明, 徐世清 (2010). 具有丙酮酸脱氢酶功能的家蚕*Bm-l(1)*基因的克隆及序列结构与表达研究. 蚕业科学, 36 (5): 759–765]
- Wiskich JT, Dry IB (1985). The tricarboxylic acid cycle in plant mitochondria: its operation and regulation. In: Douce R, Day DA (eds). *Higher Plant Cell Respiration*. Berlin: Springer-Verlag, 281–313
- Zhang Y, Gai S, Liu C, Mu P, Zheng G (2011). Selection of control genes in real-time qPCR analysis during bud dormancy release in Tree Peony (*Paeonia suffruticosa*). *Mol Plant Breed*, 9 (7): 1052–1056 (in Chinese with English abstract) [张玉喜, 盖树鹏, 刘春英, 穆平, 郑国生(2011). 牡丹花芽休眠解除过程中实时定量PCR内参基因的选择. 分子植物育种, 9 (7): 1052–1056]

Molecular cloning and expression pattern analysis of pyruvate dehydrogenase *PsPDH* gene from tree peony (*Paeonia suffruticosa*)

YANG Li-Jin*, GAN Tian*, GAI Shu-Peng, LIU Chun-Ying, ZHANG Yu-Xi**

College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University / Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao, Shandong 266109, China

Abstract: According to the partial fragment of pyruvate dehydrogenase gene *PDH* obtained from 454 sequencing, the full-length cDNA was amplified by rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR, and named as *PsPDH*. The full-length cDNA of *PsPDH* was 1 313 bp including 132 bp 5' untranslated region (UTR), 173 bp 3'UTR and 1 008 bp encoding frame, which encodes 335 amino acids with the molecular weight of 35.844 kDa. The result of phosphorylation site predication shows that the *PsPDH* protein had 17 possible phosphorylation sites including 12 Ser sites, which might be associated with the regulation of active sites. The result of subcellular prediction indicates that *PsPDH* was mainly located in mitochondrial matrix. Alignment analysis was consistent with phylogenetic analysis, which indicates that *PsPDH* was highly conserved with *VvPDH*, lowest with *AtPDH*, and basically accorded with botanical classification system. The results of quantitative real-time PCR indicate that the *PsPDH* transcripts were abundant in the leaf, root and carpel at the early stage of flowering, and were highest in flower buds after 14 d chilling duration. The relative activity of *PDH* was consistent with the expression pattern of *PsPDH* gene during dormancy release. Taken together, the activation of *PsPDH* transcripts might be a critical cue to promote dormancy release of tree peony, and the results provide theoretical basis to validate the regulation mechanism of respiratory metabolism during dormancy release.

Key words: *PsPDH*; cloning; bioinformatics analysis; expression patterns; enzyme activity

Received 2016-06-07 Accepted 2016-07-25

This work was supported by the Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31471908 and 31372104).

*Co-first authors.

**Corresponding author (E-mail: zhang-yuxi@163.com).