

## 黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达

逯明辉, 李晓明, 陈劲枫, 陈龙正, 钱春桃

(南京农业大学园艺学院/作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095)

**摘要:** 经 15℃ 低温诱导, 采用 cDNA-AFLP 技术从耐冷性强的黄瓜品种长春密刺中分离到一条特异片段, 该片段在耐冷性弱的北京截头中不能被诱导, 命名为 *cctr132*。将 *cctr132* 回收测序并翻译为氨基酸序列, 用 blastx 和 blastp 程序在 NCBI GenBank 数据库中进行同源性检索和相似性比对, 结果发现 *cctr132* 与水稻推测的类赖氨酸脱羧酶蛋白同源性为 88.37%, 相似性为 100%, 并且在 CCTR132 中检测到了赖氨酸脱羧酶家族推测的保守结构域 PGGXGTXXE, 说明黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达有关。

**关键词:** 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.); 耐冷性; cDNA-AFLP; 赖氨酸脱羧酶; 尸胺

## Study on Chilling Tolerance of Cucumber During Germination and Expression of Lysine Decarboxylase Gene

LU Ming-hui, LI Xiao-ming, CHEN Jin-feng, CHEN Long-zheng, QIAN Chun-tao

(National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, College of Horticulture,  
Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

**Abstract:** With cDNA-AFLP technique, a specific fragment was isolated from a chilling tolerant cucumber cultivar 'Changchunmici', under induction at low temperature (15°C). This fragment could not be induced in the chilling sensitive cucumber cultivar 'Beijing jietou' and named as *cctr132*. After recollection, sequencing and translation, the results of blastx and blastp in GenBank of NCBI indicated that *cctr132* had 88.37% identities and 100% positives with *Oryza sativa* putative lysine decarboxylase-like protein, respectively, and PGGXGTXXE, the putative conserved domain of lysine decarboxylase family, was detected from CCTR132, which suggested that the cucumber chilling tolerance during germination is related to the expression of lysine decarboxylase gene.

**Key words:** Cucumber (*Cucumis sativus* L.); Chilling tolerance; cDNA-AFLP; Lysine decarboxylase; Cadaverine

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 是我国设施栽培的主要蔬菜之一, 起源于亚热带, 属于典型的冷敏植物。有关黄瓜耐冷机理和提高黄瓜耐冷性的研究一直受到国内外研究者的重视并取得不少进展<sup>[1]</sup>, 但这些研究大多集中在低温胁迫下黄瓜生理生化指标变化等方面, 有关黄瓜耐冷性的分子基础方面研究很少。康国斌等<sup>[2]</sup>利用差异显示技术 DDRT-PCR 克隆了一个黄瓜叶片在低温锻炼中特异表达的基因 *ccr18*, 但该基因具体的生物学功能尚不清楚。

cDNA-AFLP 是 Bachem 等<sup>[3]</sup>在 AFLP 基础上发展

起来的 RNA 指纹图谱技术。与 DDRT-PCR 相比, cDNA-AFLP 由于采取了较高的退火温度, 试验结果的重复性更好, 假阳性率更低; 引物根据酶切位点的序列来设计, 使低丰度 mRNA 很容易被选择性扩增, 而且所需设备少、费用低、操作简单、结果容易分析。cDNA-AFLP 用于差异表达基因分离的可靠性已经为许多研究所证实<sup>[4, 5]</sup>。

研究表明, 黄瓜种子低温发芽能力与苗期的耐冷性呈显著正相关, 在品种间存在着明显差异<sup>[6]</sup>。笔者采用 15℃ 低温对收集的黄瓜材料进行发芽能力测定,

收稿日期: 2005-06-20

基金项目: 国家“863”计划项目(2004AA241120、2002AA241251)、国家自然科学基金项目(30470120)和农业部蔬菜遗传与生理重点实验室项目资助

作者简介: 逯明辉(1977-), 男, 山西临汾人, 博士研究生, 主要从事蔬菜生物技术与分子生物学方面的研究。E-mail: lmhdick@163.com。陈劲枫为通讯作者, Tel/Fax: 025-84396279; E-mail: jfchen@njau.edu.cn



鉴定出了耐冷性存在明显差异的两个品种, 长春密刺(耐冷性强)和北京截头(耐冷性弱)。笔者以这两个材料为试材, 采用 cDNA-AFLP 技术研究耐冷性不同的黄瓜品种在低温诱导下基因的表达, 从而获得与黄瓜发芽期耐冷性相关的特异基因片段, 通过分析其生物学功能, 探讨黄瓜耐冷性的分子机制, 为进一步深入研究和选育耐低温设施栽培专用黄瓜品种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及低温处理

试验材料为本实验室筛选出的耐冷性强的黄瓜品种长春密刺(T, tolerant)和耐冷性弱的黄瓜品种北京截头(S, sensitive)。

取饱满种子各 100~120 粒, 55℃ 温水消毒 10 min 后, 28℃ 浸种 3 h, 用镊子轻轻剥去种皮, 28℃ 恒温暗催芽, 待幼芽长至 5 mm 时, 取半数种子(整个种子, 包括子叶和幼芽)迅速冻于液氮, 作为对照, 其中长春密刺记为 TCK, 北京截头记为 SCK。剩下的种子经 15℃ 低温处理 24 h 后, 同样迅速冻于液氮作为低温处理, 长春密刺记为 TLT, 北京截头记为 SLT。

### 1.2 黄瓜耐冷相关基因片段的获得

**1.2.1 总 RNA 提取及双链 cDNA 合成** 采用改良尿素法<sup>[7]</sup>提取黄瓜发芽种子的总 RNA, 并按照 Clark 的方法<sup>[8]</sup>进行 DNase 处理, 以除去残留的 DNA。双链 cDNA 的合成参照文献<sup>[9]</sup>, 逆转录引物使用 oligo dT<sub>25</sub>V (委托上海英骏生物技术有限公司合成), 逆转录酶使用 M-MLV RT RNase H<sup>-</sup> (Promega)。

**1.2.2 cDNA-AFLP 显示差异片段** 双链 cDNA 用 EcoRI (识别位点为 5'-G\*AATTC-3') 和 Tru 9 (识别位点为 5'-T\*TAA-3') 进行双酶切, 采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳结束后进行银染显色, 具体操作步骤按照娄群峰<sup>[10]</sup>等的方法进行。

EcoR I 接头序列: 5'-CTC GTAGACTGCGTAC C-3', 3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5'; Tru 9 接头序列: 5'-GACGATGAGTCCTGAG-3', 3'-TACTCAGG ACTCAT-5'; EcoR I 预扩增引物: 5'-GACTGCGTACC AATTC-3' (E<sub>00</sub>); Tru 9 预扩增引物: 5'-GATGAGTCC TGAGTAA-3' (T<sub>00</sub>)。

EcoR I 选择性扩增引物: E<sub>00</sub>-MN (其中 M 为 A/T, N 为 A/G/C/T); Tru 9 选择性扩增引物: T<sub>00</sub>-CMN (其中 M 为 A/T, N 为 A/G/C/T)。

### 1.3 差异片段的回收、测序及同源性比较

用灭菌的手术刀片准确切下差异显示的条带, 转入装有 100~200 μl 超纯水(视条带的深度而定)的 1.5 ml 离心管中, 室温放置过夜, 然后沸水浴 15 min, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min。取 5 μl 上清液作为模板再次以相同的引物组合和扩增体系进行 PCR 反应。

PCR 产物委托上海英骏生物技术有限公司进行双向测序, 测序结果去除引物序列后用 DNAMAN 软件翻译为氨基酸序列, 采用 NCBI 的 Blastx 和 Blastp 程序在 GenBank 中进行同源性检索和相似性比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 低温诱导下黄瓜耐冷相关基因片段的获得

电泳显示, 用改良尿素法提取的黄瓜发芽种子总 RNA 降解很少, 质量较高, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 均在 2.0 左右, 能满足 cDNA-AFLP 技术的要求。合成的双链 cDNA 大小为 500~5 000 bp, 预扩增产物大小为 400 bp 左右, 表明逆转录和酶切效果较好。

共利用 32 个 EcoR I / Tru 9 选择性引物对进行了扩增, 其中 E-AT/T-CTC 扩增到了在 TLT 中表达而在 TCK、SCK 和 SLT 均无表达的差异片段(图 1), 说明该片段为耐冷性强的黄瓜品种受低温特异性诱导的片段。对此差异片段进行了回收测序, 去除引物序列后得到了长度为 132 bp 的核苷酸序列(图 2A), 命名为 *cctr132* (cucumber chilling tolerance related), 并向 NCBI GenBank 数据库提交, 登录号为 DQ073398。

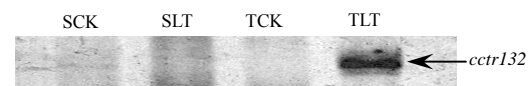


图 1 15℃ 低温处理 24 h 后, 引物组合 E-AT/T-CTC 得到在 TLT 中特异诱导的片段

Fig. 1 The fragment amplified by the primer pair E-AT/T-CTC is specifically induced in TLT after treatment with low temperature of 15℃ for 24 h

### 2.2 *cctr132* 的同源序列搜索及相似性比对

应用 blastx 程序将 *cctr132* 的核苷酸序列在 GenBank 中的蛋白质数据库中进行同源序列搜索。结果发现, *cctr132* 与水稻的推测赖氨酸脱羧酶蛋白 (putative lysine decarboxylase-like protein, Plclp) 的同源性 (identities) 为 88.37% (38/43), 相似性 (positives) 为 100% (43/43) (图 3)。

A 1 GACAAGCCAG TGGGACTGTT GAATGTTGAT GGATATTACA ATTCACTACT GTCATTTATT  
 61 GATAAAGCTG TCGAGGAAGG AATTGTCAGT CCAAGTGCAC GCCAAATTAT CGTATCAGCG  
 121 CCAACGGCGA AG

B 1 DKPVGLLNVDGYYNLSLFSIDKAVEEGFVSPSARQIIVSAPTAK 44

图2 *cctr132*的核苷酸序列(A)及翻译后的氨基酸序列(B)

Fig. 2 The nucleoside sequence of *cctr132* (A) and the amino acid sequence translated from *cctr132* (B)

CCTR132	DKPVGLLNVDGYYNLSLFSIDKAVEEGFVSPSARQIIVSAPTAK	43
Pldclp	DKPVGLLNVDGYYNLSLTFIDQAVEEGHSPSARRIIVSAPTAQ	43

图3 *cctr132*与水稻的类推测赖氨酸脱羧酶蛋白的比对结果

Fig. 3 The alignment result of *cctr132* with *Oryza sativa* putative lysine decarboxylase-like protein (Pldclp)

### 2.3 CCTR132中蛋白质结构域的检测

利用 DNAMAN 软件将 *cctr132* 核苷酸序列翻译为氨基酸序列 CCTR132 (图 2B), 与 GenBank 数据库进行 Blastp 同源性比较, 在 CCTR132 中检测到赖氨酸脱羧酶家族的推测保守结构域 PGGXGTXXE (图 4)。

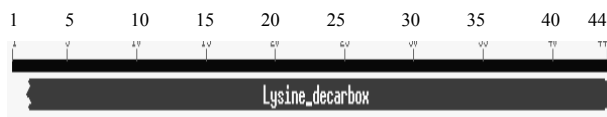


图4 在 CCTR132 中检测到了赖氨酸脱羧酶家族的推测保守结构域

Fig. 4 The conserved domain of lysine decarboxylase family was detected in CCTR132

## 3 讨论

赖氨酸脱羧酶的主要生物学功能是催化赖氨酸脱羧生成尸胺 (cadaverine, Cad) [11]。CCTR132 中存在赖氨酸脱羧酶家族的保守结构域, 说明 Cad 与黄瓜发芽期耐冷性有关。这项结果首次将黄瓜的耐冷性与特定基因联系起来, 对进一步研究黄瓜耐冷性形成的生理及分子机制具有重要意义。但需要进一步验证 *cctr132* 在不同耐冷性黄瓜品种中的时序表达特点、低温处理后赖氨酸脱羧酶活性及尸胺水平的变化等。

有关多胺, 如腐胺 (putrescine, Put)、亚精胺 (spermidine, Spd) 和精胺 (spermine, Spm) 等, 在提高植物耐冷性中的作用已有很多研究, 主要是通过阻止活性氧产生、防止膜脂过氧化、降低细胞膜相变

温度等方面来实现 [12, 13]。相比之下, Cad 在植物中的存在并不广泛, 对于植物耐冷性的作用和机理也不清楚。根据本文取得的结果和已有的研究, 笔者推测 Cad 可能通过以下 3 种机制影响黄瓜的耐冷性:

(1) 稳定细胞的超微结构。研究表明, 用赖氨酸脱羧酶的抑制剂 DFMO (二氟甲基鸟氨酸, difluoromethylornithine) 处理发芽的大豆种子, Cad 含量减少, 胚根发育畸形。但用 DFMO 和 Cad 同时处理, 则不会观察到胚根畸形的现象 [14]。低温胁迫能够引起黄瓜胚根根尖细胞的微管组织解聚, 使胚根不能正常发育 [15]。由此推测, Cad 可能通过稳定细胞的超微结构, 使各种细胞器在遇到低温胁迫时仍能发挥正常功能来提高黄瓜的耐冷性。

(2) 阻止活性氧进入细胞。赖氨酸脱羧酶主要定位于质膜上, Cad 也主要通过与质膜上的磷脂基团结合来发挥调节作用, 它可以抑制质膜孔蛋白通道的开放来阻止 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等有毒物质进入细胞 [16]。因此, 与 Spd、Spm 和 Put 一样, Cad 也可能通过阻止活性氧对细胞的伤害来提高黄瓜对低温冷害的耐受性。

(3) 参与低温信号转导。Cad 可以作为热激后的信号物质在植株体内传递 [17], 而热激也能够提高黄瓜的耐冷性 [1]。所以, Cad 也可能作为低温信号转导途径中的一个组分来诱导黄瓜耐冷相关基因的表达。

如果尸胺在黄瓜耐冷性中的作用得到全面验证, 在将来的研究中, 赖氨酸脱羧酶就可以作为一个靶目标, 可以通过分析该基因的调控序列和研究其它物质处理对其表达的影响来探讨黄瓜耐冷性形成的信号转导机制及其中间组分。

## 4 结论

低温能够在耐冷性强的黄瓜品种中诱导发芽期赖氨酸脱羧酶基因的表达, 而该基因在耐冷性弱的品种中不能被诱导, 说明黄瓜发芽期的耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达有关。赖氨酸脱羧酶催化尸胺的生物合成, 说明尸胺参与了黄瓜发芽期耐冷性的形成。

## References

- [1] 逯明辉, 娄群峰, 陈劲枫. 黄瓜的冷害及耐冷性. 植物学通报, 2004, 21: 578-586.
- Lu M H, Lou Q F, Chen J F. A review on chilling injury and tolerance in cucumber. *Chinese Bulletin of Botany*, 2004, 21: 578-586. (in Chinese)
- [2] 康国斌, 许勇, 雍伟东, 葛磊, 王丽萍, 张海英, 王永健, 种康. 低温诱导的黄瓜 *ccr18* 基因的 cDNA 克隆及其表达特性分析. 植物学报, 2001, 43: 955-959.
- Kang G B, Xu Y, Yong W D, Ge L, Wang L P, Zhang H Y, Wang Y J, Zhong K. Molecular cloning of a specific expression gene for cold acclimation in cucumber. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 955-959. (in Chinese)
- [3] Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G F. Visualisation of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant Journal*, 1996, 9: 745-753.
- [4] 王永勤, 曹家树, 符庆功, 余小林, 叶纨芝, 向珣. 利用 cDNA-AFLP 技术分析白菜核雄性不育两用系的表达差异. 中国农业科学, 2003, 36: 557-560.
- Wang Y Q, Cao J S, Fu Q G, Yu X L, Ye W Z, Xiang X. Differential expression analysis of genic male sterility A/B lines by cDNA-AFLP in Chinese cabbage-pak-choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* Makino). *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36: 557-560. (in Chinese)
- [5] 郭丽琼, 林俊芳, 杨丽卿, 刘瑞瑞. 应用 cDNA-AFLP 技术分离草菇冷诱导表达基因. 园艺学报, 2005, 32: 54-59.
- Guo L Q, Lin J F, Yang L Q, Liu R R. Isolation of cold stress genes through cDNA-AFLP from *Volvariella volvacea*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32: 54-59. (in Chinese)
- [6] 朱其杰, 高守云, 蔡洙湖, 纪颖彪, 李长纓. 黄瓜耐冷性鉴定指标及遗传规律的研究. 见: 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 1995: 457-462.
- Zhu Q J, Gao S Y, Cai Z H, Ji Y B, Li C Y. Studies on the estimating indexes and genetics of cucumber chilling injury. In: Li S D. *Progress in the Plant Breeding of Resistance to Diseases*. Beijing: Science Press, 1995: 457-462. (in Chinese)
- [7] 姚红艳, 赵双宜, 夏光敏. 改良尿素-氯化锂方法提取成熟小麦种子总 RNA. 中国生物工程杂志, 2003, 23 (4): 86-88.
- Yao H Y, Zhao S Y, Xia G M. Improved urea LiCl method for extracting total RNA from wheat mature seeds. *China Biotechnology*, 2003, 23(4): 86-88. (in Chinese)
- [8] Clark M S. *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual*. Heidelberg: Springer, 1997: 163.
- [9] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 11.38-11.48.
- [10] 娄群峰, 陈劲枫, Molly J, 陈龙正, 耿红, 罗向东. 黄瓜全雌性基因连锁的 AFLP 和 SCAR 分子标记. 园艺学报, 2005, 32: 256-261.
- Lou Q F, Chen J F, Molly J, Chen L Z, Geng H, Luo X D. Identification of AFLP and SCAR molecular markers linked to gynocious loci in *Cucumis sativus* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32: 256-261. (in Chinese)
- [11] Smith T A. Polyamines. *Annual Review of Plant Physiology*, 1985, 36: 117-143.
- [12] Guye M G, Vigh L, Wilson J M. Polyamine titre in relation to chill-sensitivity in *Phaseolus* sp. *Journal of Experimental Botany*, 1986, 37: 1 036-1 043.
- [13] Shen W, Nada K, Tachibana S. Involvement of polyamines in the chilling tolerance of cucumber cultivars. *Plant Physiology*, 2000, 124: 431-439.
- [14] Gamarnik A, Frydman R B. Cadaverine, an essential diamine for the normal root development of germinating soybean (*Glycine max*) seeds. *Plant Physiology*, 1991, 97: 778-785.
- [15] Lee S H, Singh A P, Chung G C, Kim Y Soo, Kong I B. Chilling root temperature causes rapid ultrastructural changes in cortical cells of cucumber (*Cucumis sativus* L.) root tips. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53: 2225-2237.
- [16] Tkachenko A G, Nesterova L Yu. Polyamines as modulators of gene expression under oxidative stress in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68: 850-856.
- [17] Shevyakova N I, Rakitin V Yu, Dam D B, Kuznetsov V V. Cadaverine as a signal of heat shock in plants. *Dokasdy Biological Sciences*, 2000, 375: 715-717.